



**Efeito do processo de secagem no potencial
antioxidante e na composição fitoquímica de plantas
medicinais da família Fabaceae**

José Virgílio Santulhão Pinela

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança
para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia*

Orientado por
Isabel Cristina Fernandes Rodrigues Ferreira
Ana Maria Pinto Carvalho

Bragança
2012

AGRADECIMENTOS

No percurso desta etapa de estudo e trabalho que agora termina participaram, direta ou indiretamente, várias pessoas que merecem o meu sincero agradecimento, sem as quais esta dissertação não estaria completa. De modo particular gostaria de agradecer:

À **Professora Doutora Isabel C.F.R. Ferreira** e à **Professora Doutora Ana Maria Carvalho** pela excelente orientação, pelo apoio, disponibilidade e simpatia, bem como por toda a experiência e conhecimentos que me transmitiram ao longo do meu percurso académico.

À **Doutora Lillian Barros** por todo o apoio, disponibilidade e simpatia que sempre disponibilizou desde o início deste trabalho.

Ao Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada, em particular ao BioChemCore, e a todos aqueles que lá trabalham pela constante boa disposição.

À minha família por todo o afeto, pela força e incentivo que sempre me deu, em especial ao longo deste percurso pois, com o seu apoio, tudo ficou mais fácil.

E, por fim, a todos aqueles que, de uma forma mais ou menos direta, me apoiaram ao longo desta caminhada.

Muito obrigado!

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABELAS	VI
ABREVIATURAS	VII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT	X
I. INTRODUÇÃO	2
1.1. AS PLANTAS MEDICINAIS	2
1.1.1. Caracterização botânica	6
1.1.1.1. <i>Cytisus multiflorus</i> (L'Hér.) Sweet.....	6
1.1.1.2. <i>Cytisus scoparius</i> (L.) Link.....	7
1.1.1.3. <i>Cytisus striatus</i> (Hill) Rothm.	8
1.1.1.4. <i>Pterospartum tridentatum</i> (L.) Willk.....	9
1.1.2. Processos de secagem	10
1.2. CONSTITUINTES ATIVOS DAS PLANTAS.....	13
1.2.1. Compostos fenólicos.....	13
1.2.3. Tocoferóis	17
1.2.4. Ácido ascórbico	21
1.2.5. Carotenoides	22
1.2.6. Clorofilas	24
1.2.7. Açúcares	26
1.2.8. Ácidos gordos	27
1.3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	31
1.3.1. Radicais livres e stresse oxidativo	31
1.3.2. Antioxidantes e fitoquímicos	36
1.3.3. Métodos de avaliação da atividade antioxidante	39
1.3.3.1. Ensaio da atividade captadora de radicais DPPH	40
1.3.3.2. Ensaio do poder redutor	42
1.3.3.3. Ensaio da inibição da descoloração do β -caroteno	43
1.3.3.4. Ensaio da inibição de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)	44
1.4. OBJETIVOS E HIPÓTESES DE ESTUDO	46

II. MATERIAL E MÉTODOS.....	48
2.1. SELEÇÃO, COLHEITA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	48
2.2. PADRÕES E REAGENTES	49
2.3. AVALIAÇÃO IN VITRO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES	49
2.3.1. Preparação dos extratos	49
2.3.2. Atividade captadora de radicais DPPH.....	50
2.3.3. Poder redutor	50
2.3.4. Inibição da descoloração do β -caroteno	51
2.3.5. Inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)	51
2.3.6. Grupos de compostos fenólicos	52
2.4. DETERMINAÇÃO DE ANTIOXIDANTES HIDROFÍLICOS	52
2.4.1. Vitamina C	52
2.4.2. Açúcares	53
2.5. DETERMINAÇÃO DE ANTIOXIDANTES LIPOFÍLICOS	53
2.5.1. Tocoferóis	53
2.5.2. Pigmentos	54
2.5.3. Ácidos gordos	55
2.6. AVALIAÇÃO DO VALOR ENERGÉTICO	56
2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
3.1. PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES	59
3.2. COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA	63
3.3. VALOR ENERGÉTICO	71
IV. CONCLUSÕES	75
V. BIBLIOGRAFIA.....	78
VI. ANEXOS	102

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química de compostos farmacologicamente ativos usados pelas companhias farmacêuticas para produzir medicamentos.	3
Figura 2. <i>Cytisus multiflorus</i> em floração e detalhe da flor e do fruto.	6
Figura 3. <i>Cytisus scoparius</i> em floração e detalhe da flor e do fruto.	7
Figura 4. <i>Cytisus striatus</i> em floração e detalhe da flor e do fruto.	8
Figura 5. <i>Pterospartum tridentatum</i> em floração.	9
Figura 6. Estrutura química de ácidos fenólicos derivados do ácido benzoico e derivados do ácido cinâmico.	14
Figura 7. Estrutura química das principais classes de flavonoides	15
Figura 8. Estrutura química da quercetina e grupos estruturais envolvidos na atividade antioxidante dos flavonoides.	16
Figura 9. Estrutura química dos tocoferóis e dos tocotrienóis.	17
Figura 10. Esquema representativo da redução do radical peróxido (LOO [•]) pelo tocoferol e redução do radical tocoferoxilo (TO [•]) de volta a tocoferol pelo ascorbato (AsH ⁻).	19
Figura 11. Estrutura química do ácido ascórbico.	21
Figura 12. Estrutura química do β-caroteno e do licopeno.	23
Figura 13. Estrutura química da clorofila a e da clorofila b.	25
Figura 14. Estrutura química da sacarose.	27
Figura 15. Estrutura química de alguns ácidos gordos.	28
Figura 16. Esquema representativo de algumas das principais reações que envolvem espécies reativas de oxigénio (ROS) e espécies reativas de azoto (RNS).	32
Figura 17. Principais causas e consequências da ação dos radicais livres.	35
Figura 18. Representação esquemática da redução do DPPH [•]	41
Figura 19. Reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) com o malonaldeído (MDA), com formação do produto corado rosa (TBA-MDA).	45
Figura 20. Estrutura química de compostos fenólicos anteriormente identificados em <i>Pterospartum tridentatum</i>	61
Figura 21. Estrutura química de flavonas e flavonóis recentemente identificadas em <i>Cytisus multiflorus</i>	62
Figura 22. Perfil em açúcares de <i>Cytisus multiflorus</i> liofilizada e <i>Cytisus multiflorus</i> seca à sombra.	65
Figura 23. Perfil em tocoferóis de <i>Cytisus striatus</i> liofilizada e <i>Cytisus striatus</i> seca à sombra.	67

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Usos medicinais das flores das espécies arbustivas estudadas relatados em inquéritos etnobotânicos realizados recentemente na Península Ibérica.....	5
Tabela 2. Propriedades antioxidantes (valores de EC ₅₀) e composição em grupos de compostos fenólicos (antioxidantes hidrofílicos) das flores das plantas arbustivas submetidas a diferentes processos de secagem	60
Tabela 3. Composição em antioxidantes hidrofílicos (vitamina C e açúcares) das flores das plantas arbustivas submetidas a diferentes processos de secagem. Os resultados são expressos em mg/100 g de massa seca.....	64
Tabela 4. Composição em antioxidantes lipofílicos (tocoferóis, carotenoides e clorofilas) das flores das plantas arbustivas submetidas a diferentes processos de secagem. Os resultados são expressos em mg/100 g de massa seca	66
Tabela 5. Composição em ácidos gordos (percentagem relativa) das flores das plantas arbustivas submetidas a diferentes processos de secagem	69
Tabela 6. Valor energético (Kcal/100 g de massa seca) das flores das plantas arbustivas submetidas a diferentes processos de secagem. Os resultados são expressos em g/100 g de massa fresca para a humidade e em g/100 g de massa seca para os restantes nutrientes.....	72

ABREVIATURAS

Absorvância	A
Radical livre	A[•]
Atividade captadora de radicais	ACR
Ácido desoxirribonucleico	ADN
Molécula antioxidante	AH
Associação de Químicos Analistas Oficiais (<i>Association of Official Analytical Chemists</i>)	AOAC
Radical semidesidroascorbato	As[•]
Ião ascorbato	AsH[•]
Butil-hidroxitolueno (2,6-di- <i>terc</i> -butil-4-metilfenol)	BHT
Carotenoides	CAR
Catalase	CAT
Cadeia transportadora de elétrons	CTE
Doenças cardiovasculares	DCV
Desvio padrão	DP
2,2-difenil-1-picril-hidrazilo	DPPH
Por exemplo (<i>Exempli gratia</i>)	e.g.
Equivalentes de ácido cafeico	EAC
Equivalentes de ácido clorogénico	EACL
Concentração de extrato correspondente a 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância no ensaio do poder redutor	EC₅₀
Equivalentes de quercetina	EQ
Transferência de elétrons (<i>Electron Transfer</i>)	ET
Estados Unidos da América	EUA
Ésteres metílicos de ácidos gordos (<i>Fatty Acid Methyl Esters</i>)	FAME
Detetor de ionização de chama (<i>Flame Ionization Detector</i>)	FID
Cromatografia gasosa (<i>Gas Chromatography</i>)	GC
Glutationa	GSH
Glutationa peroxidase	GSH-Px
Glutationa redutase	GSH-R
Glutationa dissulfito	GS-SG
Transferência de átomos de hidrogénio (<i>Hydrogen Atom Transfer</i>)	HAT
Lipoproteína de alta densidade (<i>High Density Lipoprotein</i>)	HDL
Radical hidroxilo	HO[•]

Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>)	HPLC
Radical alquilo	L[•]
Lipoproteína de baixa densidade (<i>Low Density Lipoprotein</i>)	LDL
Lípidos membranares	LH
Radical alcoxilo	LO[•]
Radical peroxilo	LOO[•]
Hidroperóxido lipídico	LOOH
Malondialdeído	MDA
Espetrometria de massa (<i>Mass Spectrometry</i>)	MS
Ácidos gordos monoinsaturados (<i>Monounsaturated Fatty Acids</i>)	MUFA
Ómega	<i>n</i>
Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)	NADP⁺
Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reduzida)	NADPH
Não detetado	nd
Óxido nítrico	NO[•]
Sintase do óxido nítrico (<i>Nitric Oxide Synthase</i>)	NOS
Radical anião superóxido	O₂^{•-}
Organização Mundial de Saúde	OMS
Peroxinitrilo	ONOO[•]
Padrão Interno	PI
Ácidos gordos polinsaturados (<i>Polyunsaturated Fatty Acids</i>)	PUFA
Detetor de índice de refração (<i>Refractive Index Detector</i>)	RID
Espécies reativas de azoto (<i>Reactive Nitrogen Species</i>)	RNS
Hidroperóxido orgânico	ROOH
Espécies reativas de oxigénio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)	ROS
Ácidos gordos saturados (<i>Saturated Fatty Acids</i>)	SFA
Superóxido dismutase	SOD
Ácido tiobarbitúrico (<i>Thiobarbituric acid</i>)	TBA
Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (<i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i>)	TBARS
Radical tocoferoxilo	TO[•]
Tocoferol	TOH
Radiação ultravioleta (<i>Ultraviolet</i>)	UV
World Health Organization (<i>Organização Mundial de Saúde</i>)	WHO

RESUMO

As flores de várias espécies dos géneros *Cytisus* e *Genista* (da Tribo Genisteeae, família Fabaceae) são muito utilizadas em todo o Mediterrâneo, e em particular na região do Nordeste de Portugal, para fins medicinais e condimentares. Tradicionalmente procede-se à secagem destas flores logo após a colheita, mantendo-as à sombra e à temperatura ambiente durante um período de cerca de 30 dias. No entanto, o processo de liofilização tem vindo a ser indicado como uma melhor alternativa para a preservação da qualidade das amostras de material vegetal. Neste trabalho, avaliaram-se os efeitos do processo de secagem (tradicional *versus* liofilização) no potencial antioxidante e na composição fitoquímica de flores de *Cytisus multiflorus* (L'Hér.) Sweet (giesta branca), *Cytisus scoparius* (L.) Link (giesta negra), *Cytisus striatus* (Hill) Rothm. (giesta amarela) e *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk (carqueja).

As propriedades antioxidantes foram avaliadas por métodos bioquímicos (inibição da descoloração do β -caroteno na presença de radicais livres derivados do ácido linoleico e inibição da formação de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) em homogeneizados cerebrais) e métodos químicos (determinação do poder redutor e da capacidade captadora de radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH)). Determinaram-se antioxidantes hidrofílicos (ácido ascórbico, fenóis incluindo flavonóis e ésteres tartáricos e açúcares) e lipofílicos (carotenoides incluindo β -caroteno e licopeno, clorofilas, tocoferóis e ácidos gordos). O valor energético das amostras também foi calculado com base nos níveis totais de lípidos, proteínas e glúcidos.

A amostra liofilizada de *Pterospartum tridentatum* apresentou a maior atividade antioxidante (valores de $EC_{50} \leq 0,15$ mg/mL), o que está de acordo com os seus níveis mais elevados de fenóis (~520 mg EACI/g extrato). As amostras liofilizadas demonstraram sempre maior bioatividade e maiores concentrações de antioxidantes hidrofílicos (fenóis, ácido ascórbico e açúcares) e lipofílicos (tocoferóis, clorofilas e licopeno). No entanto, o processo de secagem não teve influência significativa na contribuição energética (que variou entre 386 e 404 kcal/100 g de massa seca).

Os resultados obtidos dão suporte técnico e científico aos usos tradicionais destas plantas na medicina popular como anti-inflamatórios, destacando-as como fonte de compostos bioativos. Mais ainda, a liofilização mostrou preservar de uma forma mais eficaz as qualidades das plantas medicinais em estudo, podendo ser aplicada a plantas medicinais para utilizações na indústria cosmética ou farmacêutica.

ABSTRACT

Flowers from several common Mediterranean shrubs, such as those from the *Cytisus* genus and *Genista* genus (tribe Genisteae/Fabaceae) have long been used for medicinal purposes and seasoning in the northeastern Portuguese region. Despite, the shade-drying traditionally used to process these plants, freeze-drying is claimed to better preserve the quality of medicinal plants. Herein, the effects of drying process in the antioxidants composition and properties of *Cytisus multiflorus* (L'Hér.) Sweet (white Spanish broom), *Cytisus scoparius* (L.) Link (common broom), *Cytisus striatus* (Hill) Rothm. (Portuguese broom) and *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk were evaluated.

The antioxidant activity was evaluated by biochemical (β -carotene bleaching inhibition in the presence of free radicals derived from linoleic acid and inhibition of lipid peroxidation through thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay) and chemical methods (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) radical scavenging capacity and reducing power). Hydrophilic (ascorbic acid, sugars and phenolics including flavonols and tartaric esters) and lipophilic (carotenoids including β -carotene and lycopene, chlorophylls, tocopherols, and fatty acids) compounds were quantified. The energetic value of the samples was also calculated based on the total levels of fats, proteins and carbohydrates.

Pterospartum tridentatum submitted to freeze- or shade-drying proved to be the species with highest antioxidant capacity in all the assayed methods (lowest EC_{50} values), which is in agreement to its highest levels of phenolics (~500 mg CIAE/g extract). Freeze-drying benefits were confirmed showing, the samples submitted to this process, higher antioxidant activity and higher concentrations of hydrophilic (phenolics, ascorbic acid and sugars) and lipophilic (tocopherols, chlorophylls and lycopene) compounds. Nevertheless, the drying process did not have significantly influence in energetic contribution (values ranging from 386 and 404 kcal/100 g dry weight).

The results give technical and scientific support to the traditional uses of these plants in folk medicine as anti-inflammatory, highlighting them as a source of bioactive compounds. Moreover, the drying process to be used in industrial applications is very important, since freeze-drying proved to preserve more the quality of the studied medicinal plants. This process could be applied in scale-up treatments of the studied plants for cosmetic or pharmaceutical applications.



Capítulo I

I. INTRODUÇÃO

1.1. As plantas medicinais

Desde cedo que as civilizações primitivas se aperceberam da existência, ao lado das plantas comestíveis, de outras dotadas de maiores ou menores efeitos sobre o organismo, desde efeitos tóxicos (venenos) até à intervenção sobre a doença, revelando muitas vezes, embora empiricamente, o seu potencial curativo. Todo este conhecimento sobre o valor terapêutico das plantas que tem acompanhado a evolução do homem através dos tempos foi, de início, transmitido oralmente de geração em geração. Posteriormente, com o surgimento da escrita passou a ser compendiado, guardado e difundido como um tesouro precioso (Cunha *et al.*, 2010).

Num tempo em que a presença dos médicos era quase inexistente nos meios rurais, o recurso a plantas medicinais para o tratamento de várias doenças e males era prática comum entre as populações. Tal como ainda se verifica em diversos locais (e.g. em Trás-os-Montes, nordeste de Portugal), era sobretudo às plantas silvestres que essas populações recorriam, por serem aquelas que a natureza mais facilmente punha à sua disposição (Salgueiro, 2005; Cunha *et al.*, 2010).

Atualmente, a colheita de plantas silvestres foi praticamente abandonada. Para a obtenção de medicamentos à base de plantas e para as indústrias farmacêuticas interessadas no isolamento de biomoléculas ou de compostos a serem utilizados na semi-síntese de medicamentos são utilizadas plantas de cultura. Estas plantas, quimiovariedades provenientes de populações silvestres geneticamente homogêneas, são selecionadas a fim de obter uma maior quantidade do constituinte de interesse ou um maior rendimento global de um dado grupo de constituintes (Cunha *et al.*, 2010; Lubbe & Verpoorte, 2011). A cultura de plantas medicinais também é importante para assegurar grandes quantidades de material vegetal à indústria e para conservar o património genético existente nas plantas silvestres (Lubbe & Verpoorte, 2011).

Assim, quando a indústria farmacêutica necessita de isolar compostos de uma dada espécie vegetal, recorre a uma prospeção química exaustiva nas espécies silvestres a fim de obter raças químicas com um teor elevado do constituinte que pretende obter, fazendo posteriormente a cultura da variedade selecionada (Cunha *et al.*, 2010).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 80% da população mundial utilize plantas medicinais em cuidados básicos de saúde (WHO, 2009). Através da

publicação de várias diretivas, a OMS procura alargar a todos melhores cuidados de saúde. Nesse sentido, a fitoquímica e a farmacologia têm dado um contributo valioso ao estudar a composição e aspetos farmacológicos de muitos produtos vegetais, usados tradicionalmente por diferentes povos (Cunha *et al.*, 2010).

Um renovado interesse pelo uso de plantas medicinais e dos respetivos extratos na terapêutica tem surgido no mundo ocidental (WHO, 2003; Cunha *et al.*, 2010). Este incremento de medicamentos à base de plantas teve início na Alemanha, França e Reino Unido e expandiu-se a outros países europeus e à América do Norte graças aos vários benefícios encontrados (Cunha, 2005).

No entanto, além do interesse dos produtos naturais em cuidados básicos de saúde, as plantas também são usadas para extrair vários compostos farmacologicamente ativos (e.g. glúcidos, cardiopónicos, antibióticos, alcaloides e ácidos orgânicos). Tais compostos extraídos das plantas podem ser usados pelas companhias farmacêuticas para produzir medicamentos ou então ser usados como matéria-prima para produzir drogas semissintéticas (Houghton, 2001). Exemplos do primeiro caso (**Figura 1**) incluem: o alcaloide taxol, registado com o nome de paclitaxel, com atividade anticancerígena e isolado do teixo do Pacífico (*Taxus brevifolia*); os alcaloides vincristina e vimblastina, isolados de *Cataranthus roseus*; e a digoxina isolada da dedaleira (*Digitalis lanata*). Um bom exemplo para o segundo caso é a utilização de esteroides vegetais, tais como os extraídos do inhame mexicano (*Dioscorea ssp.*), para produzir semi-sinteticamente esteroides para uso em contraceptivos orais. Atualmente, mais de 25% das drogas farmacêuticas usadas a nível mundial são derivadas de produtos naturais de plantas (Farnsworth, 1979; Schmidt *et al.*, 2008; Lubbe & Verpoorte, 2011).

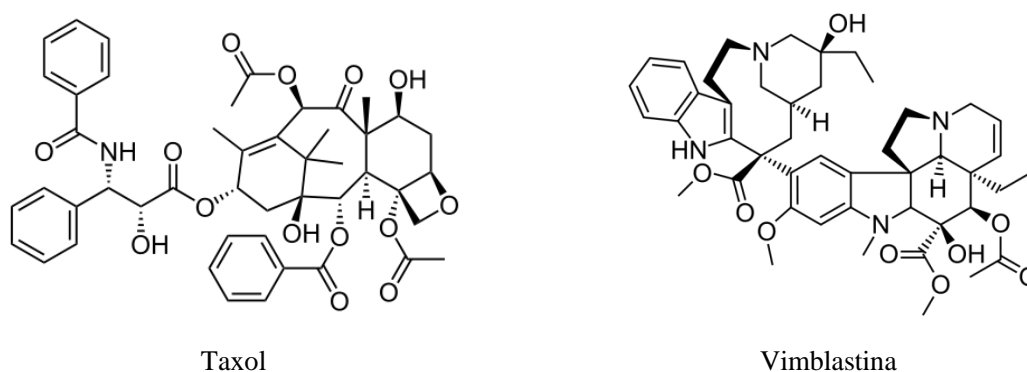


Figura 1. Estrutura química de compostos farmacologicamente ativos usados pelas companhias farmacêuticas para produzir medicamentos.

Cytisus multiflorus (L'Hér.) Sweet (giesta branca), *Cytisus scoparius* (L.) Link (giesta negral), *Cytisus striatus* (Hill) Rothm (giesta amarela) e *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk (carqueja) são plantas medicinais da Tribo Genisteae (Fam. Fabaceae, subFam. Faboideae) da flora silvestre portuguesa. Estas espécies são frequentes na Península Ibérica, crescem de forma espontânea em clima mediterrâneo e são amplamente utilizadas na medicina popular e, por vezes, na culinária como condimento (Blanco & Diez, 2005; Cunha *et al.*, 2007; Gallego & Gallego, 2008; Pardo de Santayana, 2008; Carvalho, 2010). A **Tabela 1** apresenta um resumo dos usos medicinais das flores destas espécies arbustivas relatados em inquéritos etnobotânicos realizados recentemente na Península Ibérica.

Em Portugal, estas Fabaceae são utilizadas há séculos e considera-se que têm propriedades anti-inflamatórias (Camejo *et al.*, 2003; Salgueiro, 2004; Novais *et al.*, 2004; Cunha *et al.*, 2007; Neves *et al.*, 2009; Carvalho, 2010). Devido às suas propriedades terapêuticas, a partir das flores frescas ou secas à sombra, são preparadas infusões, decocções e tónicos, amplamente utilizados no tratamento de várias doenças do trato respiratório, gastrointestinal e do foro dermatológico, bem como para controlar a diabetes e doenças do sistema metabólico, nomeadamente o aumento dos níveis de colesterol e gota. As flores de *Pterospartum tridentatum*, organizadas em ráceros curtos, são tradicionalmente usadas na culinária para tempero (Pardo de Santayana *et al.*, 2007; Carvalho, 2010). Recentemente, Barros *et al.* (2011) descreveram propriedades antioxidantes de *Cytisus multiflorus*, sendo o conhecimento sobre o potencial antioxidante das outras três plantas muito escasso.

Muitas espécies da família Fabaceae são conhecidas como sendo plantas com algum nível de toxicidade, podendo, em alguns casos, ser prejudiciais para o homem e os animais. Em particular, a casca, as vagens e as sementes de vários géneros são nocivas e revelam potenciais toxinas (Cooper & Johnson, 1984; Rivera & Obón de Castro, 1991; Nelson *et al.*, 2007). O conhecimento empírico tradicional e os curandeiros locais assumem que o consumo de bebidas preparadas com estas plantas poderá causar alguns riscos, particularmente devido ao emprego de doses excessivas de matéria vegetal e a tratamentos prolongados. No entanto, a medicina popular evita este tipo de riscos, recomendando dosagens específicas e controlando os períodos de toma com práticas de cura ritualistas (**Tabela 1**).

Tabela 1. Usos medicinais das flores das espécies arbustivas estudadas relatados em inquéritos etnobotânicos realizados recentemente na Península Ibérica.

Nome científico	Nome vernáculo	Usos tradicionais e indicações	Preparação	Toxicidade e cuidados particulares de acordo com referências
<i>Cytisus multiflorus</i>	Giesta branca	Diabetes. Pressão arterial. Colesterol. Dor de cabeça e enxaqueca. Insuficiência cardíaca. Artrite reumatoide. Feridas e erupções cutâneas e inflamações. Acne.	Administração oral: infusões das flores ou decocções.	As quantidades recomendadas de planta, as dosagens e a duração do uso devem ser controladas. Uso prolongado não aceitável (Carvalho, 2010).
		Anti-inflamatório, depurativo do sangue, hipocolesterolemia, vasodilatador.	Fumigação tópica: exposição ao fumo da queima das sumidades florais.	Não mencionado (Dias, 2005; Gallego & Gallego, 2008; Neves <i>et al.</i> , 2009).
<i>Cytisus scoparius</i>	Giesta negral	Colesterol. Diabetes. Gota e doenças reumáticas. Hipotensão. Insuficiência cardíaca e taquicardia. Dor de articulações e músculos. Mau funcionamento hepático. Insuficiência renal. Inflamações e doenças da pele.	Administração oral: infusão das flores e maceração das flores em vinho.	Considerada tóxica (Salgueiro, 2004).
		Anti-hemorrágico, anti-inflamatório, cardiotónico, colagogo, diurético, hipocolesterolemia, vasopressor.	Aplicações tópicas: cataplasmas das flores fervidas em leite, aplicadas ainda quentes.	Recomendada precaução com a frequência de utilização e com as dosagens (Dias, 2005). Não mencionado (Cunha <i>et al.</i> , 2008; Neves <i>et al.</i> , 2009; González <i>et al.</i> , 2010).
<i>Cytisus striatus</i>	Giesta amarela	Gota e desordens reumáticas. Hipotensão. Insuficiência cardíaca. Dor de articulações e músculos. Mau funcionamento hepático.	Administração oral: infusões das flores.	Precaução recomendada (Carvalho, 2010)
		Anti-inflamatório, cardiotónico, colagogo, diurético, depurativo, vasopressor.	Aplicações tópicas: decocções das flores.	
<i>Pterospartum tridentatum</i>	Carqueja	Dor reumática aguda. Colesterol. Diabetes. Sistema digestivo e respiratório. Dor de cabeça e enxaqueca. Fígado e sistema biliar. Sistema nervoso. Sistema urinário. Gripe. Infeções e inflamações da pele.	Administração oral: infusões das flores	As quantidades recomendadas de planta, as dosagens e a aplicação devem ser estritamente controladas. Uso prolongado não aceitável (Carvalho, 2010).
		Anti-astenia, anti-inflamatório, ansiolítico, carminativo; depurativo, diaforético, diurético, laxativo, estomáquico, vasodilatador, vulnerário.	Aplicação tópica, banhos, cataplasmas: decocções das flores.	Precaução recomendada (Blanco & Diez, 2005). Não mencionado (Dias, 2005; Neves <i>et al.</i> , 2009; González <i>et al.</i> , 2010).

1.1.1. Caracterização botânica

1.1.1.1. *Cytisus multiflorus* (L'Hér.) Sweet

Cytisus multiflorus (**Figura 2**), vulgarmente conhecida por giesta branca, é uma planta autóctone e muito abundante na Península Ibérica, amplamente distribuída pelo sudoeste mediterrânico (Cristofolini & Troia, 2006). Também é encontrada na Índia, Austrália, França, Itália, EUA e Argentina, onde foi introduzida. É muito comum em matos, matagais, terrenos abandonados, taludes e bordas de caminhos, crescendo em solos pobres, arenosos e com características ácidas. É utilizada como planta medicinal e ornamental, na produção de mel, na fertilização de solos e no manejo agrosilvopastoril (e.g. pastoreio e corte de matos) (Ciudad *et al.*, 2004, Rodriguez-Riano *et al.*, 2004; Castroviejo *et al.*, 1999; Carvalho, 2010).



Figura 2. *Cytisus multiflorus* em floração (A) e detalhe da flor (B) e do fruto (C) (Anthos, 2012).

Cytisus multiflorus é um arbusto de 0,8 a 1,5 m de altura, ereto, com ramos angulosos e flexíveis, com (6)8 estrias em forma de T, por vezes com 1-2 estrias secundárias adicionais. As folhas são estipuladas, com folíolos seríceos ou aveludados por ambas as faces; as inferiores são trifolioladas e pecioladas, as superiores são unifolioladas; pecíolo 1,5-10 mm; folíolos elípticos. Flores (Abril - Junho) axilares, solitárias ou em grupos de 2-3(4) nos braquiblastos; pedicelo tomentoso, com 3 bractéolas triangulares situadas na metade superior, por vezes cercando o cálice. Cálice pubescente; lábios um pouco divergentes. Corola branca e caduca; estandarte quase do tamanho das asas e quilha, amplamente elíptico, com ápice e base arredondados, glabro; asas hemielípticas, glabras; quilha hemielíptica, com aurícula ciliada e a margem inferior

puberulenta, no resto glabra. Androceu com 5 estames compridos com anteras dorsifixas e 5 mais curtos com anteras basifixas; tubo estaminal reto, quase duas vezes maior que o cálice; anteras dorsifixas menores que as basifixas. Ovário sentado, com 7-14 rudimentos seminiais, seríceo. O fruto é uma vagem oblonga, aplanada, vilosa quando jovem, glabrescente na deiscência com 1-7 sementes (Franco, 1971; Castroviejo *et al.*, 1999).

1.1.1.2. *Cytisus scoparius* (L.) Link

Cytisus scoparius (**Figura 3**), vulgarmente conhecida por giesta negral, pode ser encontrada em quase toda a Europa e Macaronésia. Foi introduzida no Norte da América, Austrália e Sul de África. É comum em matos, matagais e ripícola (Castroviejo *et al.*, 1999) e orlas de bosques e caminhos. É utilizada como medicinal, no manejo agrosilvopastoril, como combustível e no fabrico de vassouros para exteriores (Carvalho, 2010).



Figura 3. *Cytisus scoparius* em floração (A) e detalhe da flor (B) e do fruto (C) (Anthos, 2012).

Cytisus scoparius é um arbusto de (0,50)1 a 2 m de altura. O caule é verde, ereto, anguloso, estriado longitudinalmente, rijo, com ramos consistentes e flexíveis, geralmente com 5 estrias bem definidas em forma de V invertido, glabras (proporcionando aos caules uma coloração escura); o espaço entre as estrias é maior que a largura das mesmas. As folhas são caducas, alternas, estipuladas, pequenas, pecioladas, trifoliadas, sendo as superiores sésseis e simples; as dos ramos jovens são

unifolioladas, estipuladas, oblanceoladas, lanceoladas ou elípticas, com pecíolo curto e limbo de até 17×5 mm; as dos ramos mais velhos são quase todas trifolioladas ou unifolioladas, as trifolioladas com pecíolo de até 13 mm e folíolos de até 11×4 mm. Flores (Abril - Junho) grandes, cálice glabro com dois lábios curtos, corola papilionácea amarelo-dourada, estandarte comprido, quilha pendente. Androceu formado por dez estames diadelfos; 4 estames compridos, 1 mediano e 5 curtos, os compridos e 1 dos curtos com anteras dorsifixas, o mediano e 4 dos curtos com anteras basifixas; as anteras basifixas são um pouco maiores que as dorsifixas. Ovário com 14-18 rudimentos seminiais. O fruto é uma vagem achatada, preta, hirsuta na margem, com uma dúzia de sementes castanhas. Cheiro suave (Franco, 1971; Delaveau *et al.*, 1983; Castroviejo *et al.*, 1999).

1.1.1.3. *Cytisus striatus* (Hill) Rothm.

Cytisus striatus (**Figura 4**), vulgarmente conhecida por giesta amarela, é uma planta muito abundante no Oeste da Península Ibérica e Noroeste de Marrocos. Também é encontrada no Oeste da Europa e no Norte da América, onde foi introduzida. Em Portugal encontra-se por todo o território continental, o que se deve, em parte, à ação do homem. Cresce em matos e matagais, coloniza plantações florestais, terrenos incultos e abandonados pela agricultura, encostas pedregosas, taludes e bermas de caminhos; é frequente em ambiente rupícola (Castroviejo *et al.*, 1999; Carvalho, 2010). É utilizada como planta medicinal, como combustível, no fabrico de vassouros para exteriores e no manejo agrosilvopastoril (Carvalho, 2010).

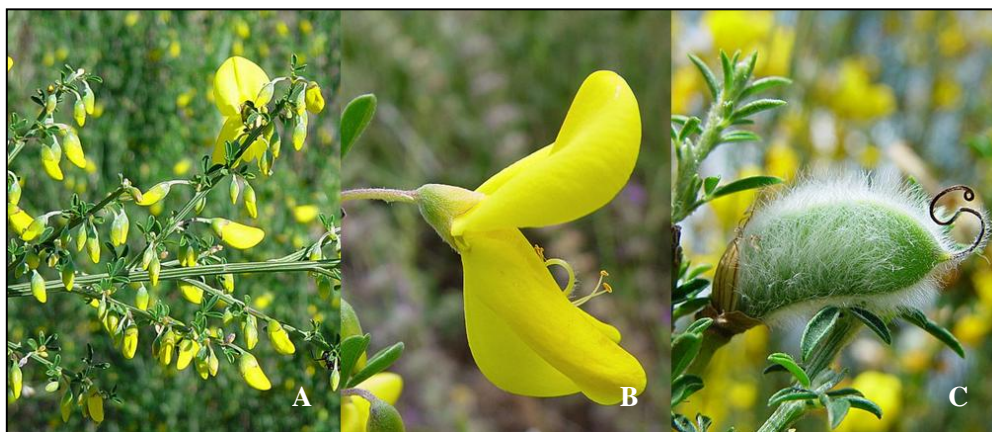


Figura 4. *Cytisus striatus* em floração (A) e detalhe da flor (B) e do fruto (C) (Flora-on, 2012).

Cytisus striatus é um arbusto ou árvore pequena de 1 a 3 metros de altura, ramificado, caducifólio, com ramos abundantes, estriados e flexíveis, geralmente com (7)8(9) estrias em forma de T, densamente pubescentes (proporcionando uma coloração verde-acinzentada ou glauca); o espaço entre as estrias é muito mais reduzido que a sua largura; pode formar um pequeno tronco quando podado para o efeito. As folhas são estipuladas, pecioladas, pubescentes, constituídas por 1 a 3 folíolos de até 13×6 mm, que surgem nas bases dos ramos. As flores (Abril - Junho) são solitárias e a corola é amarela, caduca; o cálice tem a forma de campânula, bilabiado, com bordo superior da quilha curvo na extremidade formando um bico e bordo inferior anguloso; androceu com 9 estames (5 curtos, 2 medianos e 2 compridos); o estilete é comprido na extremidade. O fruto é uma vagem arredondada coberta por denso indumento acinzentado que as recobre, com (1)2-8 sementes (Franco, 1971; Castroviejo *et al.*, 1999).

1.1.1.4. *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk

Pterospartum tridentatum (**Figura 5**), vulgarmente conhecida por carqueja, é uma planta endémica da Europa relativamente abundante no Oeste da Península Ibérica (Talavera, 1999; Ribeiro *et al.*, 2000). Em Portugal é comum nas montanhas do interior Norte e Centro (Vítor *et al.*, 2004). É utilizada como planta medicinal, na produção de mel, como combustível, no manejo agrosilvopastoril e na alimentação humana e animal (Carvalho, 2010).



Figura 5. *Pterospartum tridentatum* em floração (A e B) (Fotos de Ana Maria Carvalho).

Pterospartum tridentatum é um subarbusto ou arbusto com 15-100 cm de altura, ereto ou prostrado. Os caules dos ramos férteis são lenhosos e apresentam 2-14 mm de largura, com 5 ou 6 pequenas estrias longitudinais em forma de V invertido. Estas são achatadas ondulado-tuberculadas, duas das quais semelhantes a asas, opostas e mais ou menos desenvolvidas. As folhas são mais ou menos desenvolvidas, unifolioladas; limbo foliar $3-7 \times 1,5-6$ mm; o que corresponde às verdadeiras folhas são três pequenas brácteas pontiagudas em forma de dentes em cada nó, daí o adjetivo específico *tridentatum*. As flores (Março - Julho) dispõem-se em inflorescências corimbiformes na parte terminal dos caules; possuem pelos nas sépalas que as revestem. A corola é amarela; estandarte ovado. Androceu variável, frequentemente com 4 estames curtos com anteras basifixas, 5 de tamanho médio com anteras dorsifixas e 1 comprido com antera basifixa. Fruto $8,5-14 \times 3,2-4$ mm (Franco, 1971; Castroviejo *et al.*, 1999; Teixeira & Pereira, 2004). O seu aroma é adocicado (Ribeiro *et al.*, 2000).

1.1.2. Processos de secagem

As plantas medicinais são frequentemente secas e armazenadas durante largos períodos antes de serem transformadas em vários tipos de produtos. Estas são geralmente comercializadas sob a forma desidratada, sendo o processo de secagem fundamental para a qualidade do produto a ser comercializado. Esta técnica tem por finalidade retirar parte da água contida nos produtos, com o objetivo de preservar as características organolépticas e aumentar o tempo de utilização e/ou vida de prateleira.

A secagem é uma técnica comum e fundamental de preservação pós-colheita de plantas medicinais, pois permite conservar as propriedades medicinais das plantas de uma forma rápida e simples. Há cerca de 4000 anos atrás, no antigo Egito, já eram realizados ensaios a fim de estudar a qualidade entre plantas medicinais secas à sombra e ao sol. Atualmente, fatores como a escala de produção, a disponibilidade de novas tecnologias e padrões de qualidade farmacêutica devem ser considerados na secagem das plantas medicinais (Muller & Heindl, 2006).

A secagem pode ser definida como um método eficaz que aumenta a data de validade do produto final, pois desacelera o crescimento de microrganismos e previne o aparecimento de certas reações bioquímicas que poderão alterar as propriedades

organolélicas. Mais ainda, reduz o peso e volume das plantas para transportes e armazenamentos mais fáceis e baratos (Lin, 2011; Sellami *et al.*, 2011).

Atualmente são vários os métodos disponíveis para desidratar as plantas medicinais (Kim *et al.*, 2000; WHO, 2003; Stuart & Wills, 2003; Cunha, 2005; Liu *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2011), nomeadamente: ao ar livre e sob influência do calor solar; num lugar bem ventilado à sombra; em estufa por ar quente; em túneis ventilados com ar quente, onde a planta colocada em tabuleiros de rede sai na extremidade do túnel já seca; por aquecimento indireto; por liofilização; por micro-ondas; por raios infravermelhos; e em estufa sob vazio.

A secagem natural (secagem à sombra sem energia auxiliar) e a secagem com ar quente são ainda os métodos mais utilizados pelo seu baixo custo. No entanto, a secagem natural tem muitas desvantagens devido à incapacidade de manusear grandes quantidades de material vegetal e conseguir parâmetros de qualidade consistentes (Soysal & Öztekin, 2001). A liofilização é geralmente referida como sendo melhor para preservar a qualidade das plantas medicinais durante o processamento (Abascal *et al.*, 2005), no entanto o custo é consideravelmente mais elevado do que o da secagem com ar quente (Lin *et al.*, 2011).

No caso da secagem natural ao ar livre, as plantas medicinais devem ser espalhadas em finas camadas em tabuleiros de secagem e agitadas ou viradas frequentemente. A fim de garantir uma circulação de ar adequada, os tabuleiros de secagem devem localizar-se a uma altura suficiente acima do solo. Deve assegurar-se uma secagem uniforme para evitar a formação de mofo. A secagem das plantas medicinais diretamente sobre o solo descoberto deve ser evitada; se a superfície for de concreto ou cimento, as plantas devem ser colocados numa lona ou pano apropriado. Este processo de secagem é lento e deve ser realizado em locais protegidos de poeiras e do ataque de insetos e outros animais. No entanto, esta técnica de secagem só deve ser considerada para pequenas quantidades. Em casos de produção em massa torna-se indispensável recorrer a outras técnicas de secagem (WHO, 2003).

A liofilização é uma técnica de secagem altamente especializada que se baseia na sublimação da água (passagem direta da água do estado sólido ao gasoso sem passar pelo estado líquido) de uma matriz congelada. Esta técnica é pouco agressiva para materiais sensíveis, permitindo conservar as suas propriedades biológicas e químicas. É bastante usada no fabrico de medicamentos e na conservação de células e tecidos corporais, alimentos e microrganismos (Gerald, 2006; Ward, 2006). Este processo de

secagem tem como principais vantagens: a remoção da água sem aquecimento significativo da matriz; a diminuição da perda dos componentes voláteis; a redução da ocorrência de reações de oxidação e hidrólise; a rápida reconstituição do produto devido à elevada área de superfície; e à manutenção da atividade, pois não há alteração da constituição química original. Como desvantagens refere-se: o aumento do custo e da complexidade do processo de secagem; e os elevados gastos energéticos (Lachman, 2001; Prista *et al.*, 2003). No final do processo de liofilização obtém-se um produto de aparência porosa, com cor e textura uniformes. Este é geralmente bastante higroscópico, razão pela qual deverá ser acondicionado em recipiente bem selado e, no caso de se tratar de substâncias termolábeis, deverão ser conservadas ao abrigo da luz e a baixas temperaturas (Pinto, 2010).

A utilização de radiações, como a infravermelha ou micro-ondas, tem sido considerada na secagem de materiais como complemento às técnicas de secagem por ar quente e seco (em que o material deve ter uma granulometria adequada à sua fluidização no ar que o atravessa), ou exclusivamente por incidência direta sobre os materiais em secagem (Pinto, 2010).

O método e a temperatura usados na secagem devem ter um impacto considerável na qualidade do material vegetal resultante; por exemplo, a secagem à sombra é preferível para manter ou minimizar a perda de cor das flores e folhas; e temperaturas mais baixas devem ser empregues no caso de plantas medicinais que contenham substâncias voláteis (WHO, 2003).

De acordo com a procura crescente de espécies medicinais, a secagem artificial tem sido uma das necessidades mais importantes da indústria farmacêutica, a qual não tem estrutura para utilizar plantas frescas nas quantidades necessárias à produção industrial. Mais ainda, a utilização crescente de procedimentos de secagem, dentro de várias linhas tecnológicas no setor alimentar e biotecnológico, resultou em estudos sobre processos de secagem que assumem um interesse prático importante (Sellami *et al.*, 2011). Além disso, o controlo do processamento das plantas representa uma prioridade, de forma a evitar contaminações, adulterações e garantir uma boa qualidade dos produtos à base de plantas.

1.2. Constituintes ativos das plantas

A OMS define "planta medicinal" como todo o vegetal que contém, em pelo menos um dos seus órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou preventivos ou que são precursores de semi-síntese quimiofarmacêutica (Garcia, 1998). Devido à ampla diversidade de substâncias bioativas, as plantas medicinais representam um recurso terapêutico alternativo de grande aceitação pela população e vem crescendo junto da comunidade médica, desde que a sua eficácia e segurança esteja comprovada cientificamente (Cechinel & Yunes, 1998; Kinghorn, 2001; Rigotti, 2008).

1.2.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos formam um dos maiores e mais diversos grupos de metabolitos secundários de plantas, sendo a sua distribuição quase ubíqua (Pereira *et al.*, 2009). Nas plantas desempenham essencialmente funções de defesa (contra herbívoros, microrganismos, vírus ou plantas competidoras), de sinalização (atração de agentes polinizadores ou dispersores de sementes), e de proteção da radiação UV ou de oxidantes (Daayf & Lattanzio, 2008). Além de possuírem propriedades antioxidantes e farmacológicas (Fernandez *et al.*, 1998; Hollman & Katan, 1998), conferem características sensoriais aos alimentos (e.g. cor, sabor e aroma) (Peleg *et al.*, 1998). Este conjunto de compostos pode ser dividido em vários grupos, de acordo com o número de anéis benzénicos e os elementos estruturais que se ligam aos anéis. Incluem os flavonoides, os ácidos fenólicos, os taninos, as cumarinas e os estilbenos (Balasundram *et al.*, 2006). No entanto, os ácidos fenólicos e os flavonoides são os dois grupos principais.

Os ácidos fenólicos dividem-se em derivados do ácido benzoico e derivados do ácido cinâmico (**Figura 6**) (Brett & Ghica, 2003; Blasco *et al.*, 2005). Os derivados do ácido benzoico possuem a estrutura base C_6-C_1 . Os derivados do ácido cinâmico, geralmente sob a forma de heterósidos fenilpropanoicos, de estrutura base C_6-C_3 , são os mais difundidos na natureza. Tradicionalmente, as plantas contendo estes compostos (e.g. alecrim) são empregues como coleréticas e hipocolesterolémicas. O potencial antioxidante destes compostos tem sido estudado nos últimos anos (Cunha, 2005), o qual depende da posição e do número de grupos hidroxilo presentes na molécula (Rice-

Evans *et al.*, 1996). A ligação dupla existente na cadeia lateral dos derivados do ácido cinâmico (**Figura 6 B**) contribui, provavelmente, para que o radical fenoxilo que se forma após a reação com radicais livres seja estabilizado por ressonância; por essa razão, estes compostos apresentam maior atividade antioxidante do que os derivados do ácido benzoico (Valentão, 2002; Silva *et al.*, 2004; Silva, 2005; Seabra *et al.*, 2006).

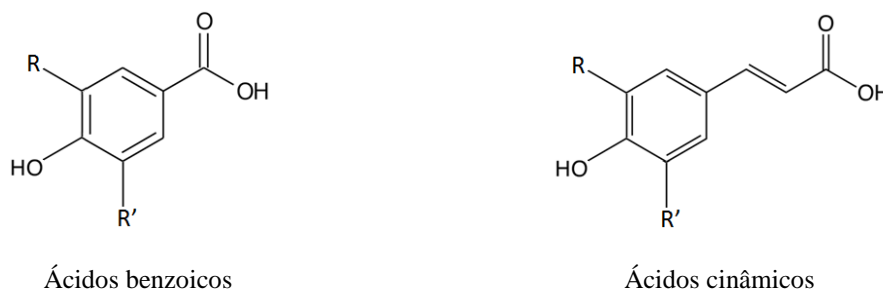


Figura 6. Estrutura química de ácidos fenólicos derivados do ácido benzoico (ácido *p*-hidroxibenzoico: R = R' = H; ácido gálico: R = R' = OH; ácido protocatéquico: R = OH, R' = H; ácido vanílico: R = OCH₃, R' = H e ácido siríngico: R = R' = OCH₃) e derivados do ácido cinâmico (ácido *p*-cumárico: R = R' = H; ácido cafeico: R = OH, R' = H; ácido ferúlico: R = OCH₃, R' = H e ácido sinápico: R = R' = OCH₃).

Os flavonoides representam a maior classe de polifenóis, com cerca de 8000 compostos descritos, amplamente distribuídos no reino vegetal. São sintetizados nas plantas e participam na fase luminosa da fotossíntese durante a qual catalisam o transporte de elétrons (Cunha, 2005). Estes compostos de baixa massa molecular são formados por 15 átomos de carbono, organizados na configuração C₆-C₃-C₆. A flavona (**Figura 7**) é a estrutura base destes compostos, ou seja, são formados por dois anéis aromáticos (anéis A e B) unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico do tipo pirano, designado por anel C (Brett & Ghica, 2003; Seabra *et al.*, 2006).

Os flavonoides são compostos de origem biossintética mista, em que a sua formação ocorre pela união de uma subunidade fenólica (anel A), proveniente da via do acetato, a uma subunidade da via do xiquimato, constituída por um anel aromático (anel B) ligado a uma cadeia com três átomos de carbono. As diferenças estruturais encontradas no anel C permitem classificar os diferentes flavonoides em classes (**Figura 7**), tais como flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanóis (ou flavan-3-óis), antocianidinas e isoflavonoides (Valentão, 2002; Ferreira & Abreu, 2007). Substituições nos anéis A e B originam diferentes compostos dentro de cada classe dos flavonoides.

As flavonas, os flavonóis e os isoflavonoides constituem 80% dos flavonoides, encontrando-se normalmente na forma glucosilada (Cunha *et al.*, 2007). Geralmente o glucósido encontra-se na posição 3, podendo também surgir na posição 7. A glucose é o glucósido mais comum, mas também ocorre galactose, arabinose, ramnose, apiose, ácidos glucurónico e galacturónico, sendo também possível a presença sob formas mais complexas (di-, tri- ou tetrassacarídeos) (Harborne, 1989; Cunha, 2005; Ghica & Brett, 2005). As formas glucosiladas promovem uma melhor absorção intestinal e uma maior biodisponibilidade destes compostos. No entanto, apresentam menor atividade antioxidante que a aglicona correspondente (Rice-Evans *et al.*, 1996; Hopia & Heinonen, 1999; Fukumoto & Mazza, 2000), o que pode ser explicado pela sua maior hidrofília, o que dificulta o acesso do antioxidante à fase lipídica (Heim *et al.*, 2002).

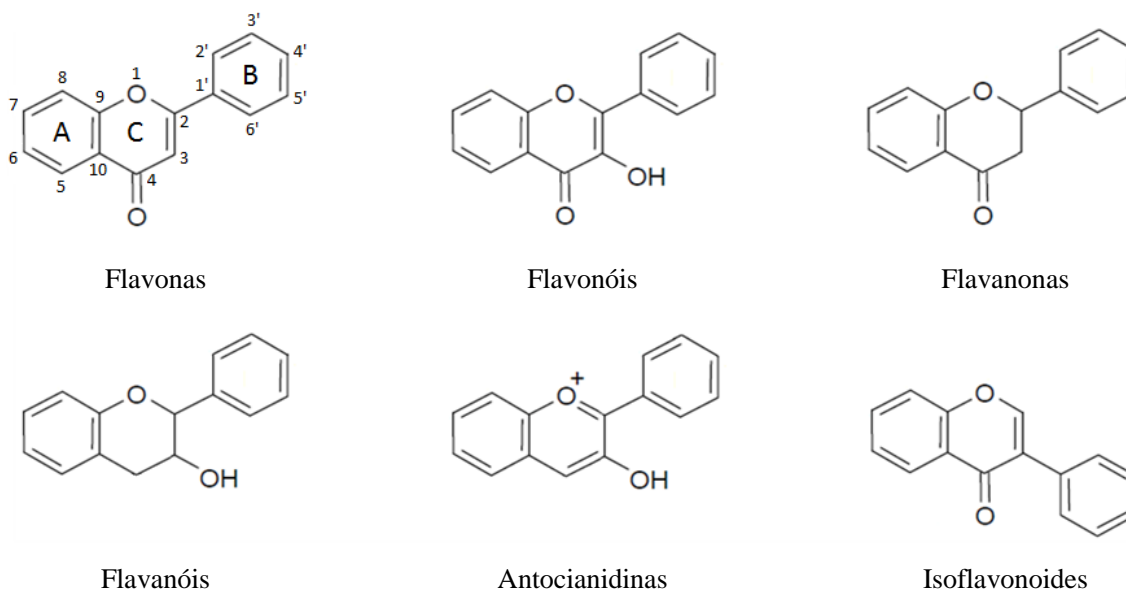


Figura 7. Estrutura química das principais classes de flavonoides. Flavonas: grupo carbonilo na posição 4 e ligação dupla entre as posições 2 e 3; Flavonóis: grupo carbonilo na posição 4, ligação dupla entre as posições 2 e 3 e grupo hidroxilo na posição 3; Flavanonas: grupo carbonilo na posição 4; Flavanóis: grupo hidroxilo na posição 3; Antocianinas: grupo hidroxilo na posição 3 e duas ligações duplas, uma entre o átomo de oxigénio e o carbono 2 e outra entre os carbonos 3 e 4; Isoflavonoides: grupo carbonilo na posição 4 e anel B ligado à restante molécula através do carbono 3, podendo ainda possuir uma ligação dupla entre os carbonos 2 e 3.

O potencial antioxidante dos compostos fenólicos assenta essencialmente no seu elevado potencial para captar radicais livres, tais como radicais superóxido, hidroxilo e peróxido (Halliwell *et al.*, 2000; Yanishlieva-Maslareva, 2001), através de mecanismos

de transferência de átomos de hidrogénio e de eletrões (Wright *et al.*, 2001). Apesar de não reagirem rapidamente com o peróxido de hidrogénio, estes antioxidantes são capazes de captar o oxigénio singlete e o ácido hipocloroso (Payá *et al.*, 1992). A partir de vários estudos sobre atividade antioxidante de flavonoides foi possível estabelecer algumas relações entre a sua estrutura química e a referida atividade. As características estruturais associadas à ação antioxidante são (Valentão, 2002; Silva *et al.*, 2004; Silva, 2005; Seabra *et al.*, 2006): a configuração dos grupos hidroxilo do anel B (substituição *orto*-3',4'-di-hidroxi); a existência da ligação dupla entre os carbonos 2 e 3 em combinação com o grupo carbonilo na posição 4 no anel C; e a presença de grupos hidroxilo na posição 3 do anel C e na posição 5 do anel A. A quercetina (**Figura 8**) é um composto que preenche todos os requisitos estruturais referidos anteriormente.

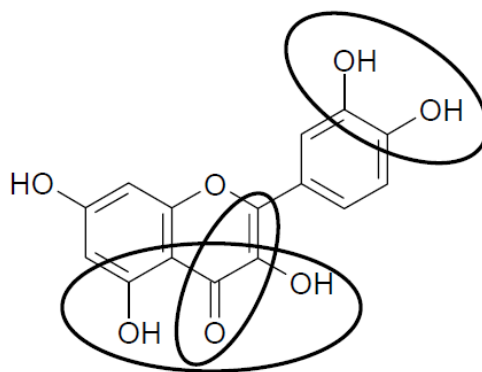


Figura 8. Estrutura química da quercetina e grupos estruturais envolvidos na atividade antioxidante dos flavonoides.

Os compostos fenólicos podem quelatar iões metálicos. Porém, esta capacidade poderá conferir-lhes algum poder pro-oxidante na medida em que podem reduzir os iões metálicos, aumentando desta forma a formação de radicais livres via reação de Fenton (Rice-Evans *et al.*, 1995; Decker, 1997; Brown *et al.*, 1998; Croft, 1998). Contudo, os compostos fenólicos podem interagir sinergicamente com outros antioxidantes, tais como o ácido ascórbico e os tocoferóis, proporcionando efeitos benéficos peculiares (Croft, 1998; Liao & Yin, 2000; Shi *et al.*, 2001).

1.2.3. Tocoferóis

O termo “vitamina E” engloba vários compostos lipossolúveis quimicamente semelhantes que partilham uma estrutura química base. Essa estrutura é comum ao conjunto de todos os tocoferóis e tocotrienóis (**Figura 9**), os quais apresentam quatro isoformas de origem natural, designadas por α -, β -, γ - e δ -, que diferem no número e posição dos grupos metilo no anel aromático (Machlin, 1991).

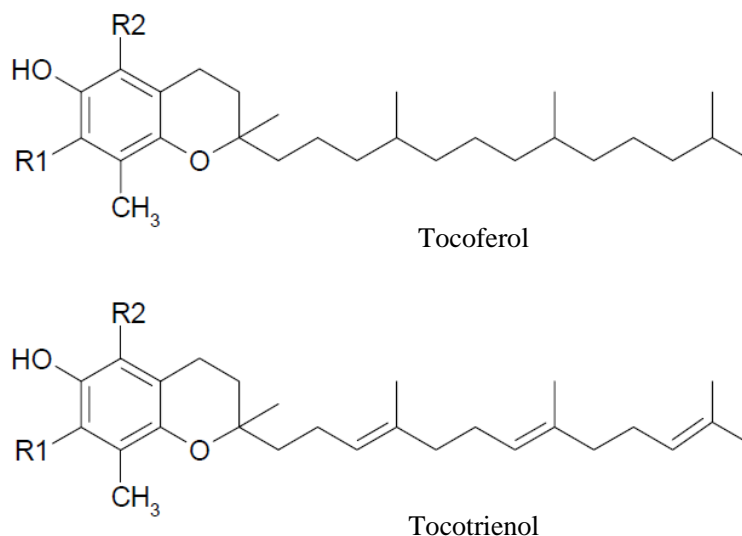


Figura 9. Estrutura química dos tocoferóis e dos tocotrienóis (α -tocoferol/tocotrienol: R₁ = R₂ = CH₃; β -tocoferol/tocotrienol: R₁ = H, R₂ = CH₃; γ -tocoferol/tocotrienol: R₁ = CH₃, R₂ = H; δ -tocoferol/tocotrienol: R₁ = R₂ = H).

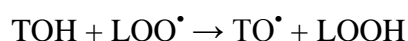
Os tocoferóis e os tocotrienóis são moléculas estruturalmente semelhantes, ambas constituídas por um anel cromanol e uma cadeia alifática lateral formada por dezasseis carbonos na posição carbono 2. É esta cadeia lateral que os distingue, sendo os tocoferóis constituídos por uma cadeia fitilo, enquanto os tocotrienóis possuem uma cadeia similar mas com três ligações duplas nas posições 3', 7' e 11' (**Figura 9**), denominada por cadeia isoprenoide insaturada (Yoshida *et al.*, 2002).

Estes antioxidantes lipofílicos são sintetizados por organismos fotossintéticos, ocorrendo maioritariamente em folhas e sementes (Munne-Bosch & Alegre, 2002; Ouchikh *et al.*, 2011). Relativamente à composição em isoformas, o γ -tocoferol é vulgarmente predominante em óleos de sementes, enquanto o α -tocoferol é a forma mais abundante em folhas, havendo algumas exceções (Szymanska & Kruk, 2008). Em animais, o α -tocoferol é a forma predominante de vitamina E no plasma, nos eritrócitos

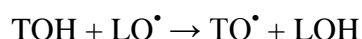
e no fígado. Esta vitamina é transportada na corrente sanguínea pelas lipoproteínas (Pinto, 2010). O α -tocoferol tem sido a forma mais estudada em investigação clínica, animal e bioquímica. Apesar do γ -tocoferol ser a forma predominante de vitamina E na dieta norte-americana (McLaughlin & Weihrauch, 1979) tem recebido pouca atenção devido à baixa biodisponibilidade e bioatividade em modelos animais (Brigelius-Flohé & Traber, 1999). Em alimentos, os tocoferóis podem estabilizar os ácidos gordos prevenindo a rancificação durante o armazenamento (Li *et al.*, 2007).

A vitamina E encontra-se entre os antioxidantes mais importantes no combate ao stresse oxidativo (Fang *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2012); no entanto, apesar de serem compostos intimamente relacionados quimicamente, possuem graus variados de atividade biológica (Suarna *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 1993; Kamat & Devasagayam, 1995; Black *et al.*, 2000; O'Byrne *et al.*, 2000; Sen *et al.*, 2000; Packer & Weber, 2001; Qureshi *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2001). Estas moléculas inibem a produção de radicais peroxilo (LOO^\bullet) induzida por espécies reativas de oxigénio (ROS), protegendo assim as células da peroxidação dos ácidos gordos polinsaturados (PUFA) na membrana fosfolipídica, de danos oxidativos das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), proteínas celulares, ADN, e da degeneração membranar (Fang *et al.*, 2002).

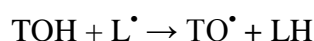
No processo de peroxidação lipídica, os tocoferóis (TOH) atuam como antioxidantes através da cedência de um átomo de hidrogénio aos radicais peroxilo (LOO^\bullet) produzidos a partir dos PUFA dos fosfolípidos membranares ou lipoproteínas, originando um hidroperóxido lipídico estável (LOOH) e um radical tocoferoxilo (TO^\bullet):



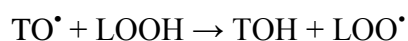
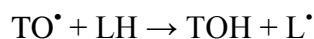
Por sua vez, o TO^\bullet pode reagir com outros radicais peroxilo ou tocoferoxilo formando produtos mais estáveis e menos reativos que o LOO^\bullet (Buettner, 1993; Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996; Ferreira *et al.*, 2009). Os tocoferóis também podem reagir com radicais alcóxido (LO^\bullet) formados no processo de propagação:



Em casos muito especiais, quando o oxigénio está presente em quantidades limitantes e os hidroperóxidos em quantidades desprezáveis, os tocoferóis podem reagir diretamente com radicais alquilo (L^\bullet) (Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996):



A natureza aromática do sistema do anel do tocoferol, combinada com influências estereoquímicas e eletrónicas dos substituintes metilo, estabilizam o radical tocoferoxilo. No entanto, este radical pode reagir com lípidos insaturados (LH) ou hidroperóxidos lipídicos (LOOH), iniciando a oxidação lipídica (efeito pro-oxidante):



De forma a evitar este efeito, o TO^{\bullet} poder ser reduzido de volta a TOH pelo ascorbato (AsH^-) (Buettner, 1993; Chew, 1995; Nagaoka *et al.*, 2007) ou pela glutathiona (GSH) (Wefers & Sies, 1988; Winkler, 1992; Liebler & Reed, 1997). Nesta etapa, o tocoferol (TOH) cede um átomo de hidrogénio ao radical originando um hidroperóxido (LOOH) e um radical tocoferoxilo (TO^{\bullet}). O ascorbato (AsH^-), na interface da membrana celular, regenera o tocoferol (TOH) através da cedência de um átomo de hidrogénio, transformando-se em semidesidroascorbato (As^{\bullet}).

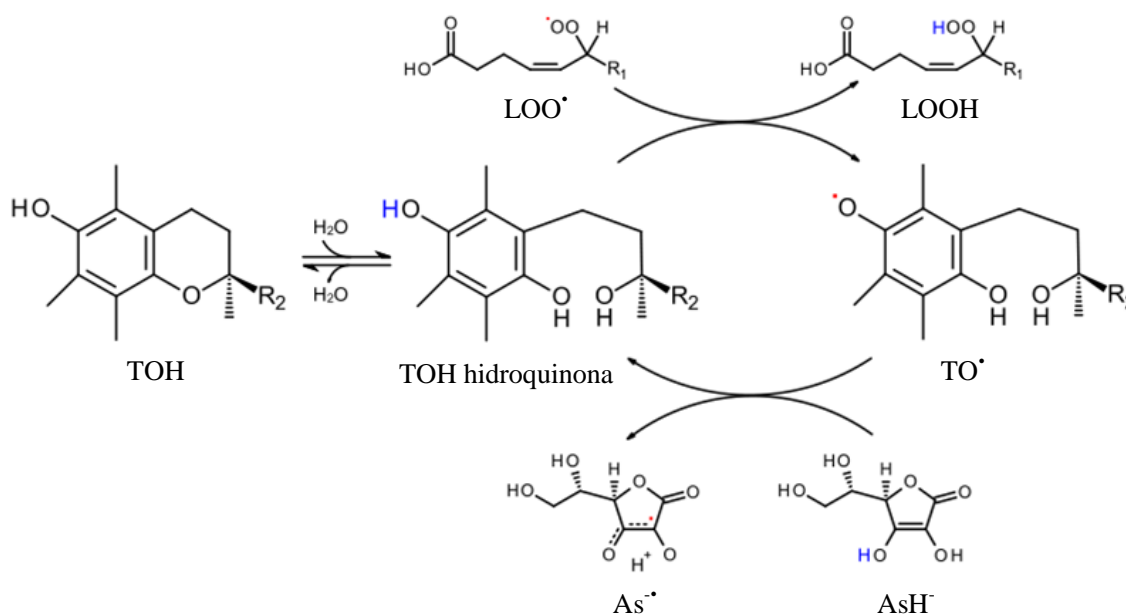


Figura 10. Esquema representativo da redução do radical peroxilo (LOO^{\bullet}) pelo tocoferol (TOH) e redução do radical tocoferoxilo (TO^{\bullet}) de volta a tocoferol (TOH) pelo ascorbato (AsH^-) (Wikimedia, 2011).

Nos anos 80 do século XX, verificou-se que doentes com síndrome de malabsorção, relacionado com a diminuição da absorção ou de transporte de vitamina E,

desenvolviam vários sintomas neurológicos cuja progressão podia ser prevenida pela administração de vitamina E (Sokol, 1988). Estudos epidemiológicos demonstraram uma diminuição do risco de doença de Alzheimer e Parkinson, bem como um atraso na progressão da doença e um baixo risco no desenvolvimento de demências em indivíduos submetidos a dietas muito ricas em vitamina E (Golbe *et al.*, 1998; Engelhart *et al.*, 2002).

O α -tocoferol é geralmente indicado como o tocoferol biologicamente mais ativo (Bieri & Evarts, 1974; Halliwell & Gutteridge, 1999). No entanto, esta afirmação advém de uma generalização decorrente da má interpretação dos resultados da literatura mais antiga. Trabalhos recentes demonstraram que tocoferóis sem grupos metilo, tais como o γ -tocoferol, podem suprimir RNS de forma mais eficaz relativamente ao α -tocoferol e assim proporcionar efeitos benéficos peculiares. O γ -tocoferol possui propriedades anti-inflamatórias, antineoplásicas e antidiuréticas. Mais ainda, dados epidemiológicos recentes sugerem que este tocoferol constitui um fator de risco mais negativo para determinados tipos de cancro e enfartes do miocárdio em relação ao α -tocoferol (Hensley *et al.*, 2004).

Todas as isoformas de tocoferóis e tocotrienóis podem ser analisadas com precisão recorrendo a técnicas cromatográficas (Abidi, 2000; Piironen, 2000; Rupérez *et al.*, 2001). A cromatografia líquida de alta eficiência de fase normal com deteção de fluorescência (NP-HPLC-FLD) é a técnica vulgarmente mais utilizada (Alasalvar *et al.*, 2003; Panfili *et al.*, 2003; Hewavitharana *et al.*, 2004). Outros meios de separação incluem a cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC), a cromatografia gasosa (GC) e a eletrocromatografia capilar (Abidi *et al.*, 2002). A espectrometria de massa (MS) combinada com HPLC auxilia na identificação de compostos (Strohschein *et al.*, 1999; Stoggl *et al.*, 2001). Os vitâmeros são relativamente instáveis em condições alcalinas, devendo ser tomadas precauções para evitar a sua destruição. Estes devem ser protegidos usando antioxidantes sintéticos, tais como o BHT (butil-hidroxitolueno), e trabalhando sob luz difusa (Eitenmiller & Landen, 1999).

1.2.4. Ácido ascórbico

O ácido ascórbico (**Figura 11**), vulgarmente designado por vitamina C, é um nutriente hidrossolúvel envolvido em múltiplas funções biológicas. É essencial ao homem e deve ser adquirido através da dieta, pois o nosso organismo não o consegue sintetizar (Salem & Baskin, 1997). Em sistemas biológicos, esta vitamina encontra-se sob a forma de ascorbato (AsH^-), que é a forma que atua como antioxidante ao ceder um átomo de hidrogénio, ou um átomo de hidrogénio e um eletrão, a um radical.

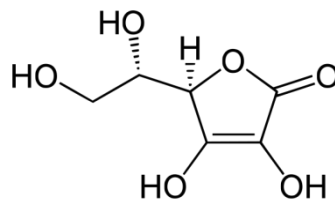


Figura 11. Estrutura química do ácido ascórbico.

O ácido ascórbico é a vitamina mais termolábil, funcionando assim como indicador de qualidade de alimentos processados, pois, se esta estiver presente indica que, provavelmente, os restantes compostos também estão presentes (Lin *et al.*, 1998). Além da importante função antiescorbútica (Magiorkinis *et al.*, 2011), esta vitamina é um potente agente redutor, capaz de reduzir a maioria das espécies reativas fisiologicamente relevantes (Halliwell & Gutteridge, 1999). Este composto tem a capacidade de eliminar diretamente espécies reativas de oxigénio e de azoto (ROS e RNS), regenerar o tocoferol, como referido anteriormente, e, portanto, participar no mecanismo protetor contra a peroxidação lipídica.

O ascorbato (AsH^-) atua como antioxidante em ambiente biológico aquoso, resultando na formação do radical semidesidroascorbato (As^\bullet) (**Figura 10**). Atua eficientemente sobre o radical superóxido (O_2^\bullet), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o hipoclorito (ClO^-) e os radicais hidroxilo (HO^\bullet) e peróxido (LOO^\bullet). O ascorbato pode atuar diretamente nas membranas celulares, ao impedir a iniciação da peroxidação lipídica ou indiretamente ao regenerar a vitamina E, que atua como antioxidante na interface lipofílica da membrana (Chew, 1995; Nagaoka *et al.*, 2007), como já referido.

O radical semidesidroascorbato, que é pouco reativo, pode ser regenerado a ascorbato ou, a partir de duas moléculas, haver formação de ácido desidroascórbico,

pouco estável a pH fisiológico, que poderá ser posteriormente reduzido a ácido ascórbico através da glutathione (Liebler & Reed, 1997; Ternay & Sorokin, 1997; Barreiros *et al.*, 2006) ou ser hidrolisado irreversivelmente (Duarte & Lunec, 2005). Em situação de stresse oxidativo, os níveis do radical semidesidroascorbato são elevados; assim, este radical pode ser usado como indicador de stresse oxidativo em fluidos corpóreos (Pedro *et al.*, 1993).

Apesar da grande eficiência antioxidante, estudos *in vitro* demonstraram que a vitamina C também pode atuar paradoxalmente como pró-oxidante, favorecendo a reação de Fenton, levando à formação de radicais hidroxilo (HO[•]) (Liebler & Reed, 1997). *In vivo* os metais encontram-se indisponíveis, complexados nas proteínas (Halliwell, 1999). No entanto, em situações patológicas em que a quantidade de ferro e/ou cobre livre se encontra elevada, a atividade pró-oxidante pode ser relevante (Herbert *et al.*, 1996).

Atualmente, a vitamina C também é muito estudada no tratamento do cancro. Acredita-se que estimule o sistema imune, iniba a formação de nitrosaminas e bloqueie a ativação metabólica de carcinogénicos. Contudo, as células tumorais parecem necessitar de ácido ascórbico e competem com células saudáveis por este nutriente, provavelmente para se defenderem da ameaça oxidativa, uma vez que tumores tratados com vitamina C tornam-se mais resistentes ao dano oxidativo (Halliwell, 2001; Gold, 2003).

1.2.5. Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos naturais amplamente distribuídos na natureza, sintetizados por plantas e muitos microrganismos. São responsáveis pela coloração de flores, frutos e vegetais, bem como de muitos pássaros, insetos e animais marinhos (CaroteNature, 2000; Quirós & Costa, 2006; Pinto, 2010). Estes pigmentos conferem aos alimentos uma coloração característica que, através do seu processamento, pode ser alterada. Deste modo, os carotenoides funcionam como indicadores de qualidade de alimentos (Chen *et al.*, 1995). No entanto, o teor destes pigmentos em frutos e vegetais depende de vários fatores, tais como a variabilidade genética, o amadurecimento, o armazenamento pós-colheita, o processamento e a preparação (Quirós & Costa, 2006).

Do ponto de vista químico, os carotenoides dividem-se em carotenos, compostos constituídos apenas por carbono e hidrogénio, e seus derivados oxigenados, as xantófilas (De Las Rivas, 2003; Cunha, 2005; Quirós & Costa, 2006; Pinto, 2010). Estes compostos são geralmente constituídos por oito unidades de isopreno, formando uma longa cadeia de polieno que pode conter de duas a quinze ligações duplas conjugadas, o que permite muitas configurações *cis* e *trans* (Fraser & Bramley, 2004; Cunha, 2005).

Dos cerca de 600 carotenoides isolados a partir de fontes naturais somente vinte, provenientes da dieta, são encontrados em tecidos humanos (Pfander, 1987). Entre estes, os principais incluem os hidrocarbonetos β -caroteno e licopeno (**Figura 12**), e as xantófilas astaxantina, cantaxantina, luteína e zeaxantina (El-Agamey *et al.*, 2004). O grande interesse no estudo destes nutrientes deve-se às suas funções biológicas e fisiológicas (van den Berg *et al.*, 2000). Alguns carotenoides, além de serem precursores de vitamina A (retinol), possuem propriedades antioxidantes e melhoram a resposta imunológica (Pinto, 2010; Cunha, 2005). Mais ainda, as xantófilas demonstraram ser eficazes na supressão de radicais livres (Krinsky, 1994).

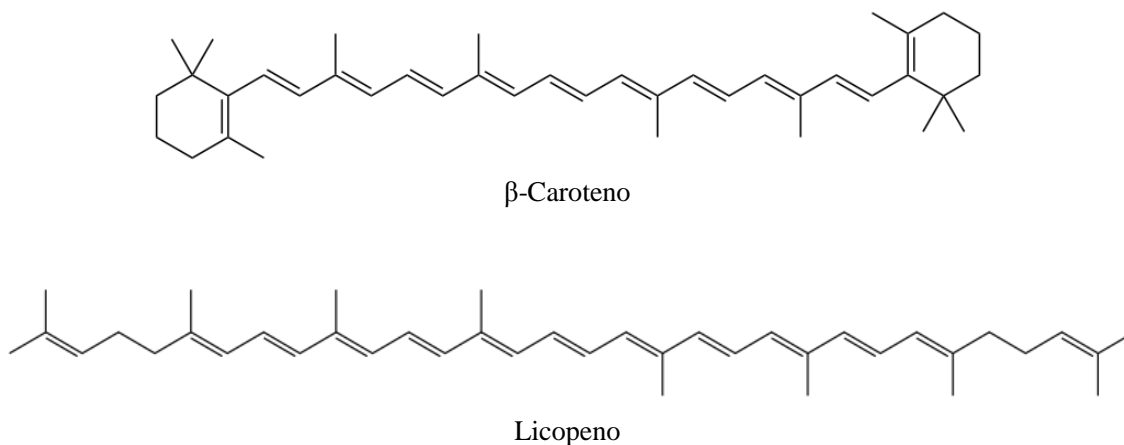
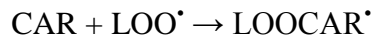
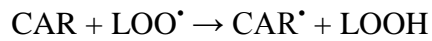
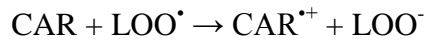


Figura 12. Estrutura química do β -caroteno e do licopeno.

Evidências epidemiológicas associam altos níveis plasmáticos de carotenoides com o risco diminuído de cancro e doenças cardiovasculares (Pinto, 2010). As propriedades antioxidantes dos carotenoides fundamentam-se na sua estrutura, principalmente no sistema de ligações duplas conjugadas (Cunha, 2005), tornando possível a captação de radicais livres, principalmente o radical peróxido (LOO^{\bullet}) (Young & Lowe, 2001; Tapiero *et al.*, 2004). *In vitro*, os antioxidantes carotenoides (CAR)

podem reagir com radicais peróxido (LOO^\bullet) através de vários mecanismos, nomeadamente transferência de eletrões, captação de hidrogénio alílico e adição (El-Agamey *et al.*, 2004), tal como representado, respetivamente, nas seguintes equações:



Em ambientes apolares *in vivo*, a transferência de eletrões é improvável para o β -caroteno e licopeno. Contudo, carotenoides como a zeaxantina podem intercetar radicais em meio aquoso e na superfície das membranas (Mortensen *et al.*, 2001; El-Agamey *et al.*, 2004). Geralmente, os radicais carotenoides, tal como os radicais tocoferoxilo e semidesidroascorbato, são pouco reativos. No entanto, uma vez que os carotenoides podem captar radicais através de diferentes mecanismos, são originados vários radicais carotenoides que, por sua vez, levam a diferentes produtos finais (El-Agamey *et al.*, 2004).

Alguns estudos evidenciaram que determinados carotenoides apresentam efeitos pró-oxidantes. Quando em elevadas concentrações podem alterar propriedades de membranas biológicas, proporcionando permeabilidade a toxinas, ao oxigénio ou a metabolitos (El-Agamey *et al.*, 2004). Quando em concentrações elevadas de O_2 os carotenoides sofrem auto-oxidação e a atividade antioxidante diminui. Contrariamente, o α -tocoferol é muito mais eficiente na presença de elevadas concentrações de O_2 . Tal facto evidencia os possíveis efeitos cooperativos entre os diferentes antioxidantes (Woodall *et al.*, 1997; Young & Lowe, 2001).

1.2.6. Clorofilas

A clorofila é o mais ubíquo de todos os pigmentos naturais (Khachik *et al.*, 1986), sendo responsável pela cor verde de todas as plantas (Sheer, 1991). Desempenha um papel primordial na fotossíntese e encontra-se associada com carotenoides, bem conhecidos pela sua bioatividade. No entanto, estes pigmentos azuis-esverdeados são muitas vezes negligenciados no que diz respeito ao seu potencial impacto fisiológico na prevenção de doenças crónicas (Ferruzzi & Blakeslee, 2007).

A estrutura molecular da clorofila consiste num complexo anel porfirínico tetrapirrólico, com um catião metálico de magnésio ligado ao centro do anel através de duas ligações covalentes e duas ligações conjugadas (Walker & Willows, 1997). Possui uma longa cadeia hidrofóbica de fitol, através da qual se encontra presa à membrana do tilacoide (De Las Rivas, 2003; Fiedor *et al.*, 2003; Proll *et al.*, 2006). As clorofilas a e b (**Figura 13**) diferem estruturalmente entre si pelos substituintes do carbono 3. A clorofila a possui um grupo metilo (CH₃) e a clorofila b possui um grupo aldeído (CHO) (De Las Rivas, 2003).

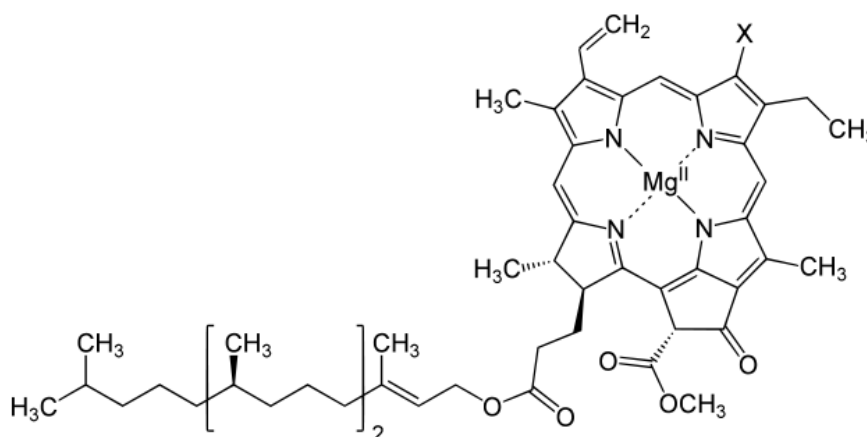


Figura 13. Estrutura química da clorofila a (X = CH₃) e da clorofila b (X = CHO).

As clorofilas e os seus derivados possuem uma longa história de utilização em medicina tradicional e para fins terapêuticos (Kephart, 1955). O seu potencial cicatrizante (Edwards, 1954), anti-inflamatório (Bowers, 1947; Larato & Pfau, 1970) e desodorizante interno (Young & Beregi, 1980) tem sido amplamente estudados. Mais ainda, a sua capacidade de atuar como fotossensibilizadores tem permitido a sua utilização em terapia fotodinâmica do cancro (Henderson *et al.*, 1997; Sternberg *et al.*, 1998).

Em aplicações medicinais, as clorofilas e os seus derivados têm demonstrado uma elevada atividade biológica *in vitro* e *in vivo* relacionada com a prevenção do cancro, incluindo a atividade antioxidante, antimutagénica, a modulação de enzimas metabolizadoras de xenobióticos e a indução de apoptose em linhas celulares cancerígenas. Tais resultados têm levado à investigação de efeitos quimiopreventivos em humanos (Egner *et al.*, 2001, 003). Embora se assuma que sejam pigmentos inabsorvíveis por humanos, começam a surgir evidências que sustentam que os

derivados das clorofilas podem, de facto, encontrar-se biodisponíveis (Ferruzzi & Blakeslee, 2007). A atividade antioxidante das clorofilas baseia-se na sua capacidade de ceder átomos de hidrogénio a radicais livres (Usuki *et al.*, 1984; Endo *et al.*, 1985a,b).

No entanto, as clorofilas podem apresentar atividade pró-oxidante em óleos e gorduras comestíveis quando expostos à luz, devido às características fotossensíveis do anel porfirina dessas moléculas, o que facilita a formação de oxigénio singlete, iniciando assim o processo de auto-oxidação. A estrutura química intacta do anel porfirínico parece ser fundamental à inibição da auto-oxidação lipídica (Hoshina *et al.*, 1998). O conteúdo de clorofila e derivados é um parâmetro de qualidade; por essa razão, tais substâncias devem ser removidas durante o processamento dos óleos para aumentar a estabilidade oxidativa dos mesmos (Levadoux *et al.*, 1987; Minguez-Mosquera *et al.*, 1990; Cenkowski *et al.*, 1993; Tautorus & Low, 1993; Gomes *et al.*, 2003).

1.2.7. Açúcares

Os glúcidos são compostos orgânicos de grande importância na natureza, resultantes do metabolismo primário das plantas. São compostos de carbono, oxigénio e hidrogénio, muitos dos quais obedecem à fórmula empírica $C_m(H_2O)_n$, razão pela qual já foram designados por hidratos de carbono (Wade, 1999). No entanto, existem muitas exceções, quer na proporção dos principais constituintes, quer pela presença doutros elementos associados, como o azoto, o enxofre ou o fósforo. Este vasto grupo de compostos orgânicos também tem recebido a designação de açúcares, visto os de menor peso molecular serem doces e solúveis em água (Cunha, 2005).

Fazem parte dos glúcidos os monossacarídeos, os dissacarídeos, os oligossacarídeos (moléculas com 3 a 10 monossacarídeos), polissacarídeos homogéneos (com mais de 10 monossacarídeos, originando por hidrólise o mesmo monossacarídeo) e os polissacarídeos heterogéneos (por hidrólise originam dois ou mais monossacarídeos, podendo estar associados a ácidos urónicos) (Cunha *et al.*, 2010).

Os monossacarídeos, devido às propriedades redutoras, fixam com facilidade o oxigénio, o que origina a passagem, na maioria dos casos, do grupo carbonilo a carboxilo. Os dissacarídeos também podem ser redutores quando a ligação glucosídica implicar a função redutora de um monossacarídeo e um hidroxilo alcoólico de outro monossacarídeo (Cunha, 2005). Os principais açúcares redutores são a frutose, a

glucose, a maltose e a lactose. A sacarose, sendo formada por glucose e frutose (**Figura 14**), pode converter-se em açúcar redutor se sofrer ação enzimática ou hidrólise ácida.

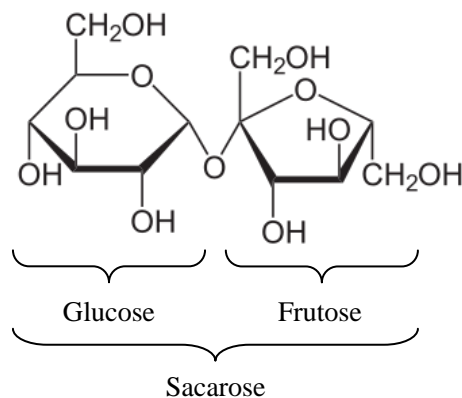


Figura 14. Estrutura química da sacarose.

Os açúcares livres podem ser determinados por técnicas cromatográficas, tais como a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC-RID) (Cotte *et al.*, 2003; Devillers *et al.*, 2004; Batista *et al.*, 2011) e a cromatografia gasosa (GC) conectada a espectrometria de massa (MS) (Sanz *et al.*, 2002, 004; Lazaridou *et al.*, 2004). A técnica de HPLC-RID é bastante utilizada por razões económicas, quando a análise não requer uma elevada sensibilidade, particularmente se as análises forem restritas a glúcidos como a glucose, a frutose e a sacarose (Glyad & Russian, 2002; Cabálková *et al.*, 2007).

1.2.8. Ácidos gordos

Na base dos lípidos está a existência dos ácidos gordos (ácidos carboxílicos de cadeia linear ou ramificada com quatro ou mais átomos de carbono, geralmente em número par) que podem encontrar-se livres ou esterificando um álcool ou um poliálcool, tal como o glicerol. Consideram-se provenientes do metabolismo primário, embora na sua formação haja condensação de moléculas de acetil-coenzima A, através do complexo AGS (Ácido Gordo Sintase) (Christie, 2003; Cunha *et al.*, 2010). Repartem-se por séries, a dos ácidos gordos saturados (SFA), a dos seus homólogos monoinsaturados (MUFA) (série oleica), di-insaturados (série diénica) ou polinsaturados (PUFA) (séries

triénica e poliénica) (Cunha, 2005). Por sua vez, os PUFA podem ser divididos em duas famílias principais, a dos ómega-3 ($n-3$) e a dos ómega-6 ($n-6$) (Gurib-Fakim, 2006).

Os ácidos gordos são usualmente designados por nomes vulgares, geralmente relacionados com a fonte natural de onde foram isolados inicialmente. Também são usadas formas de designação abreviada que resumem o número de átomos de carbono, o número de insaturações e o seu posicionamento na cadeia carbonada, como se exemplifica na **Figura 15** para os ácidos linoleico, α -linolénico e araquidónico (Cunha, 2005).

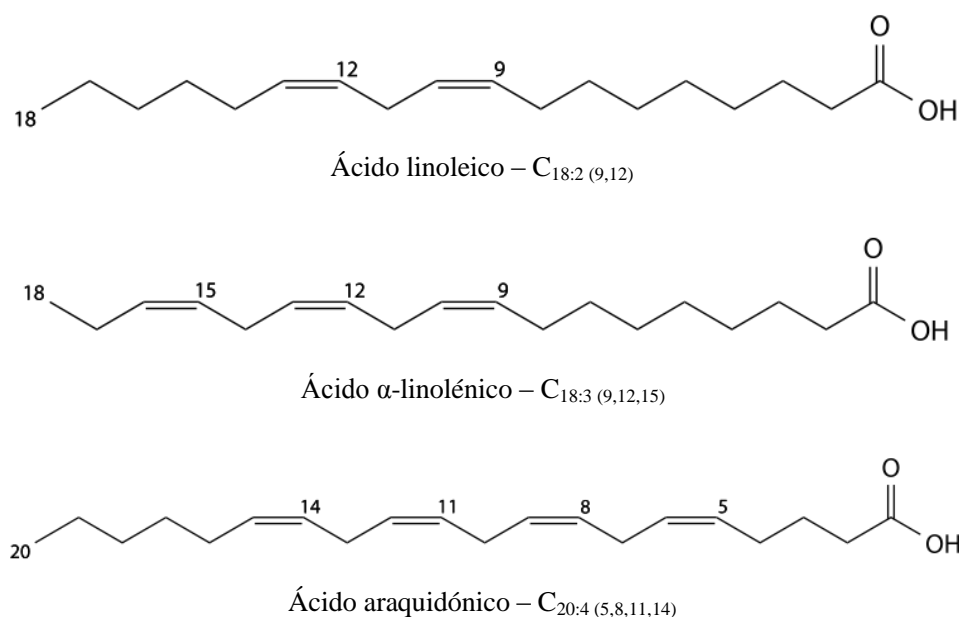


Figura 15. Estrutura química de alguns ácidos gordos.

Os SFA mais comuns e abundantes em tecidos de animais e plantas são compostos de cadeia linear com 14, 16 e 18 átomos de carbono, tais como o ácido mirístico (14:0), o ácido palmítico (16:0) e o ácido esteárico (18:0). No entanto, todos os possíveis homólogos, de numeração par ou ímpar com 2 a 36 átomos de carbono, têm sido encontrados na natureza sob a forma esterificada (Pinto 2010; Xiao, 2010). Estudos epidemiológicos (Kromhout *et al.*, 1995; Kromhout, 2001) e clínicos (Hu *et al.*, 2000) têm demonstrado que a ingestão de gorduras saturadas está associada com o aumento do risco de doenças cardiovasculares. No entanto, são os SFA com 12 a 16 átomos de carbono que parecem ser os maiores responsáveis pelo aumento da concentração das formas prejudiciais de colesterol no sangue (colesterol total e c-LDL) (Chizzolini *et al.*, 1999).

O MUFA mais abundante na natureza é o ácido oleico (C_{18:1 (9)}) (Pinto 2010; Xiao, 2010). O consumo elevado deste MUFA diminui os níveis de c-LDL, ao passo que os níveis de c-HDL não são afetados significativamente (Molkentin, 2000).

A nomenclatura dos PUFA *n*-3 e *n*-6 refere-se à localização da primeira ligação insaturada a partir do extremo metilo (“*n*”) da cadeia carbonada. A primeira ligação dupla está localizada no carbono 3, para os ácidos gordos *n*-3, e no carbono 6, para os *n*-6. O ácido α -linolénico (18:3) e o ácido linoleico (18:2) são os precursores dos ácidos gordos das séries *n*-3 e *n*-6, respetivamente. Uma vez que o organismo humano não tem a capacidade de inserir uma ligação dupla antes do carbono 9 na cadeia carbonada do ácido gordo, nem de biossintetizar ácido α -linolénico ou ácido linoleico, estes são, portanto, considerados ácidos gordos essenciais. A melhor fonte de PUFA *n*-3 é o óleo de peixe; contudo, o ácido α -linolénico também está presente nos cloroplastos das células vegetais. Os PUFA *n*-3 encontram-se em vários óleos vegetais edíveis e são, de longe, os PUFA mais abundantes na dieta típica ocidental (Breda, 2003; Mazza *et al.*, 2007; Pinto 2010; Xiao, 2010).

O aumento da razão PUFA *n*-6/PUFA *n*-3 na dieta pode originar um estado fisiológico promotor de doenças cardiovasculares (DCV) e de cancro. A proteção das DCV pelos PUFA *n*-3 e o seu favorecimento pelos PUFA *n*-6 parece estar relacionado com a sua capacidade de biossíntese diferencial de eicosanoides (Simopoulos, 2000). Os eicosanoides formados a partir dos PUFA *n*-6 (e.g. prostaglandina E₂, tromboxano A₂ e leucotrieno B₄) são biologicamente mais ativos do que os biossintetizados a partir dos PUFA *n*-3 (e.g. prostaglandina I₃, tromboxano A₃ e leucotrieno B₅). Quando formados em grande quantidade, os eicosanoides derivados dos PUFA *n*-6 podem contribuir para a formação de trombos e ateromas, para o desenvolvimento de problemas alérgicos e inflamatórios, e ainda proliferação celular; razões pelas quais, uma dieta rica em ácidos gordos *n*-6 pode originar um estado pró-trombótico, pró-inflamatório e vasoconstritor (Assunção, 2007). A razão *n*-6/*n*-3 é muito alta na dieta dos países ocidentais; por sua vez tem sido reconhecido, por diversas organizações de saúde a nível mundial, que os PUFA deverão formar pelo menos 3% e preferivelmente 8-23% do total de lípidos ingeridos. De acordo com o Department of Health (1994), os valores da razão *n*-6/*n*-3 deverão ser inferiores a quatro.

Os ácidos gordos podem ser determinados por cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama (GC-FID), após um processo de derivatização (Batista *et al.*, 2011). A análise requer que os componentes dos ácidos gordos sejam convertidos em

ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME), a fim de aumentar a sua volatilidade e assim assegurar a obtenção de picos cromatográficos com um melhor formato. Os FAME são obtidos na presença de um catalisador (e.g. ácido sulfúrico) misturado ou dissolvido em metanol (Xiao, 2010). O rendimento do processo de derivatização poderá ser melhorado através da remoção da água que se forma, promovendo o aquecimento do meio reacional (Augustin & Berry, 1983).

1.3. Atividade antioxidante

1.3.1. Radicais livres e stresse oxidativo

Um radical livre é definido como qualquer espécie que possui um ou mais eletrões desemparelhados na orbital exterior. Uma vez que os eletrões são mais estáveis quando emparelhados, os radicais apresentam maior reatividade que as espécies não radicalares (Halliwell, 1991). Os radicais livres derivados do oxigénio incluem as chamadas ROS e representam a classe mais importante de radicais livres geradas pelo organismo (Ferreira & Abreu, 2007). Chega-se, portanto, a um aparente paradoxo: se, por um lado, o oxigénio molecular (O_2) é essencial à vida aeróbia, por outro, com as lesões celulares que progressivamente induz por ação das ROS, e que se vão acumulando a nível celular, poderá ser responsabilizado pela perda de funcionalidade celular, tecidual ou orgânica que ocorre de forma progressiva com a idade, ou seja, pelo envelhecimento (Bejma *et al.*, 2000; Mota *et al.*, 2004). Este fenómeno é designado por “paradoxo do oxigénio” (Gilbert, 2000).

Em organismos aeróbios, os radicais livres são produzidos durante o funcionamento normal da célula, a maior parte sob a forma de ROS e de RNS. Depois de produzidos, a maior parte destes radicais livres é removida pelas defesas antioxidantes. Para um funcionamento normal do organismo é necessário que haja um equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes. Quando este equilíbrio não é verificado, devido a uma produção excessiva de radicais livres ou a uma deficiência nas defesas antioxidantes da célula, diz-se que o organismo está em stresse oxidativo (Ferreira & Abreu, 2007).

No entanto, em concentrações baixas ou controladas, as ROS e as RNS são essenciais para a existência e o desenvolvimento das células, estando envolvidas em vários processos fisiológicos (Fridovich, 1990; Bast *et al.*, 1991; Ferreira & Abreu, 2007). Estas espécies desempenham um papel fundamental na sinalização celular e na ativação de genes (e.g. H_2O_2). São os principais agentes de defesa libertados pelos neutrófilos contra vírus e bactérias durante a fagocitose, sendo os agentes responsáveis pela dilatação dos vasos sanguíneos; e participam na manutenção da pressão arterial e no metabolismo de xenobióticos (e.g. NO^*) (Kohen & Nyska, 2002; Caballero *et al.*, 2005; Seabra *et al.*, 2006).

Na **Figura 16** são apresentadas algumas das principais vias de produção de ROS. A adição de um eletrão ao oxigénio molecular (O_2) gera o anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), considerado o ROS “primário”. Este radical pode originar outros radicais “secundários” através da interação com outras moléculas, tais como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o radical hidroxilo (HO^{\cdot}) (Ferreira *et al.*, 2009). O HO^{\cdot} , formado através da reação de Fenton, tem um tempo de vida muito curto mas é extremamente reativo, sendo mesmo o radical que causa mais danos (Halliwell *et al.*, 1995; Kohen & Nyska, 2002; Ferreira *et al.*, 2009). Ataca principalmente moléculas de ADN, danificando o esqueleto de desoxirribose, bem como purinas e pirimidinas (Ferreira *et al.*, 2009).

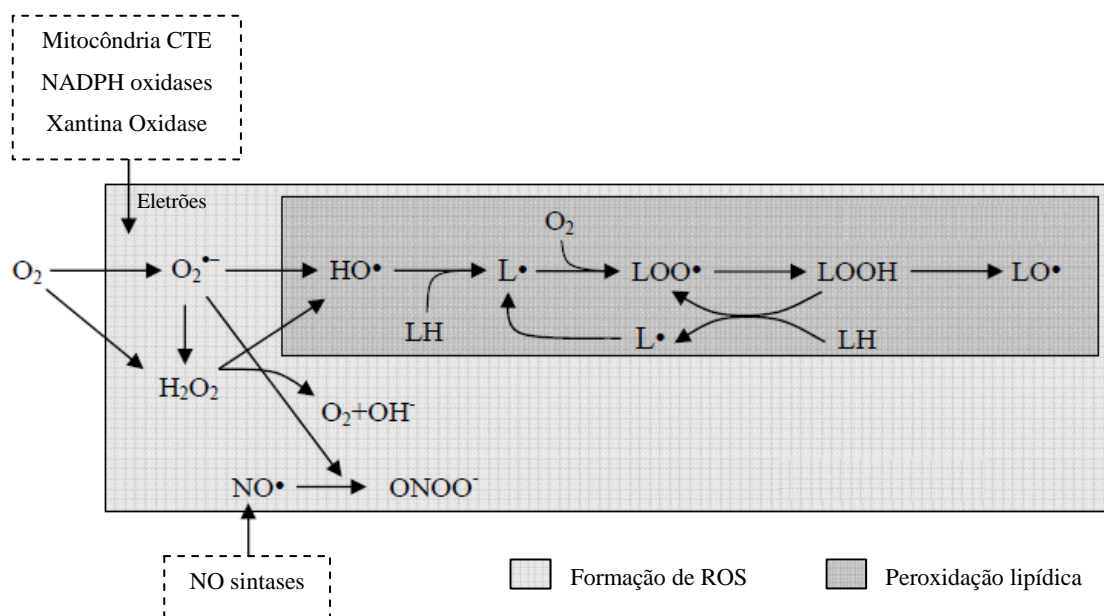


Figura 16. Esquema representativo de algumas das principais reações que envolvem espécies reativas de oxigénio (ROS) e espécies reativas de azoto (RNS). Apresentam-se as fontes endógenas de ROS/RNS mais representativas (retângulos tracejados): Cadeia transportadora de eletrões mitocondrial (CTE), NADPH oxidases e Xantina oxidase para as ROS e NO sintases para as RNS. Os aniões superóxido ($O_2^{\cdot-}$) produzidos podem ser transformados em peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e radicais hidroxilo (HO^{\cdot}). Estes radicais podem reagir com lípidos membranares (LH), promovendo o processo de peroxidação lipídica originando radicais lipídicos (L^{\cdot}), radicais peróxido (LOO^{\cdot}) e hidroperóxidos lipídicos (LOOH). A sintase do óxido nítrico mitocondrial (NOS) produz óxido nítrico (NO^{\cdot}), que combina com o anião superóxido para produzir peroxinitrilo ($ONOO^{\cdot}$). Quando em excesso, todos estes ROS podem causar danos mitocondriais e celulares (Ferreira & Abreu, 2007).

As ROS são geradas através de vários processos biológicos, nomeadamente na cadeia respiratória mitocondrial durante a redução do oxigénio a água para produção de

energia, via xantina oxidase, via NADPH oxidase em células fagocíticas, via síntese de prostaglandinas no retículo endoplasmático liso e no sistema enzimático citocromo P450 que envolve reações de destoxificação de fármacos e outros xenobióticos (Myers, 1997; Acworth *et al.*, 1997; Kohen & Nyska, 2002). As mitocôndrias, sendo as principais fontes de ROS, são também um dos primeiros alvos de ataque destes radicais. Uma vez que a cadeia respiratória é composta por proteínas transmembranares que existem na membrana mitocondrial interna, a formação de ROS ocorre perto da membrana. Assim, as ROS têm fácil acesso aos lípidos membranares, especialmente sensíveis ao ataque de radicais livres. A este ataque chamamos peroxidação lipídica e promove a formação de várias ROS (Ferreira & Abreu, 2007; Ferreira *et al.*, 2009).

A peroxidação lipídica acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares, havendo uma consequente perda de seletividade na troca iónica e na libertação do conteúdo de organelos, como enzimas hidrolíticas de lisossomas, e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído), culminando com a morte celular (Halliwell, 1991; Comporti, 1998). Contudo, os processos de peroxidação lipídica nem sempre são prejudiciais, pois os seus produtos são importantes na reação em cascata a partir do ácido araquidónico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória (Halliwell & Gutteridge, 1990). Porém, o excesso de tais produtos pode ser lesivo (Ross & Moldeus, 1991).

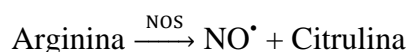
A peroxidação lipídica é uma reação de propagação em cadeia que pode ser dividida nas etapas de iniciação, propagação e terminação (Comporti, 1998). Começa normalmente com a extração de um átomo de hidrogénio de uma cadeia polinsaturada de um lípido (LH) (**Figura 16**), por intermédio da ação de uma espécie reativa como o HO[•] ou o H₂O₂, formando-se um radical lipídico (L[•]) e H₂O (Reação de iniciação). Na primeira etapa de propagação, o L[•] reage rapidamente com o O₂, resultando um radical peróxilo (LOO[•]) que, por sua vez, sequestra um novo átomo de hidrogénio de um LH formando novamente um L[•] e hidroperóxidos lipídicos (LOOH), sendo a segunda etapa da propagação. Os LOOH podem facilmente ser decompostos para formar novamente radicais L[•]. A terminação ocorre quando os radicais (L[•] e LOO[•]) produzidos nas etapas anteriores se aniquilam originando produtos não radicalares ou quando intervêm as defesas antioxidantes, nomeadamente a glutathione e o α-tocoferol (Ferreira & Matsubara, 1997; Ferreira *et al.*, 2009; Magalhães, 2009).

A peroxidação lipídica pode ser catalisada por iões de metais de transição, por conversão de LOOH em radicais altamente reativos (LO[•], HO[•] e LOO[•]) que, por sua

vez, podem iniciar uma nova cadeia de reações, denominada ramificação. Esta série de reações de propagação em cadeia, se não forem travadas atempadamente, podem causar danos muito superiores aos causados pelas ROS que iniciam a reação (Halliwell & Chirico, 1993; Ferreira *et al.*, 2009).

A peroxidação dos lípidos constitui a principal causa de deterioração das gorduras, com implicação direta no seu valor comercial mas também de todos os produtos que a partir delas são formulados (e.g. alimentos, cosméticos e fármacos). Durante as etapas de transformação e armazenamento, as gorduras podem sofrer alterações do tipo oxidativo, com consequente alteração do *flavor* original e o aparecimento de odores e gostos característicos do ranço, o qual representa para o consumidor uma importante causa de depreciação ou rejeição (Halliwell & Chirico, 1993; Castera-Rossignol & Bosque, 1994). Este tipo de reações não só diminui o tempo de vida e o valor nutritivo dos produtos alimentares, como podem gerar compostos nocivos (Frankel, 1993). Os antioxidantes podem retardar a rancificação, diminuindo a velocidade da reação ou prolongando o seu período de indução (Castera-Rossignol & Bosque, 1994; Halliwell *et al.*, 1995; Berset & Cuvelier, 1996).

Além das ROS, é importante salientar a existência de RNS, tais como o óxido nítrico (NO[•]). Este radical é sintetizado nos organismos vivos pelas sintases do óxido nítrico (NOS) (**Figura 16**) ao converter o aminoácido arginina em NO[•] e citrulina (von Bohlen & Halbach, 2003; Ghafourifar & Cadenas, 2005):



O NO[•] é muito abundante e desempenha um papel de mensageiro molecular, estando envolvido na regulação de diversos processos fisiológicos tais como: transdução de sinais, neurotransmissão, relaxamento do músculo liso, inibição da agregação plaquetária, regulação da pressão sanguínea, controlo do sistema imunitário, aprendizagem e memória (Moncada *et al.*, 1991; Nagano, 1999). Alguns dos efeitos tóxicos observados em células expostas a um excesso de NO[•] não se devem diretamente à ação deste radical, mas sim à ação dos seus produtos de oxidação, nomeadamente o peroxinitrilo (ONOO[•]), que é um potente agente oxidante e pode causar fragmentação de ADN e oxidação lipídica (Eiserich *et al.*, 1996; Koppenol, 1998).

As várias espécies reativas que afetam os sistemas vivos podem ter uma origem endógena ou exógena. Além das fontes endógenas referidas anteriormente, as fontes

exógenas englobam a própria molécula de O₂ e o O₃, a exposição a radiações ionizantes e não-ionizantes, a poluição ambiental, o alcoolismo e tabagismo, os fármacos, uma grande variedade de xenobióticos com atividade pró-oxidante (e.g. toxinas, pesticidas, herbicidas e outros químicos) e as infeções microbianas (Kohen & Nyska, 2002; Seabra *et al.*, 2006). Assim, o stresse oxidativo pode ter causas naturais, como as que ocorrem em situações de exercício físico extremo ou em processos de inflamação; mas pode também ter causas não naturais como a presença de xenobióticos no organismo ou em situações relacionadas com várias doenças (**Figura 17**) (Ferreira *et al.*, 2009).

Os radicais livres, quando em excesso, podem danificar todo o tipo de biomoléculas, incluindo ácidos nucleicos, lípidos membranares, proteínas e glúcidos, inibindo a sua função normal (Halliwell, 1996; Valko *et al.*, 2007). Desta forma, o stresse oxidativo pode estar relacionado com um conjunto variado de fenómenos biológicos e numerosas patologias, incluindo vários tipos de cancro, processos inflamatórios, artrite reumatoide, asma, diabetes, cirrose, doenças cardiovasculares, doenças oculares, aterosclerose, doenças de Parkinson e Alzheimer, desordens do foro neurológico e o processo de envelhecimento (**Figura 17**) (Halliwell, 1996; Kohen & Nyska, 2002; Valko *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2009; Shekhawat *et al.*, 2010). Em condições extremas de stresse oxidativo, os danos podem causar o esgotamento dos níveis de ATP, o que evita uma apoptose celular controlada e provoca a falha total do funcionamento celular, causando necrose (Lelli *et al.*, 1998; Lee & Shacter, 1999).

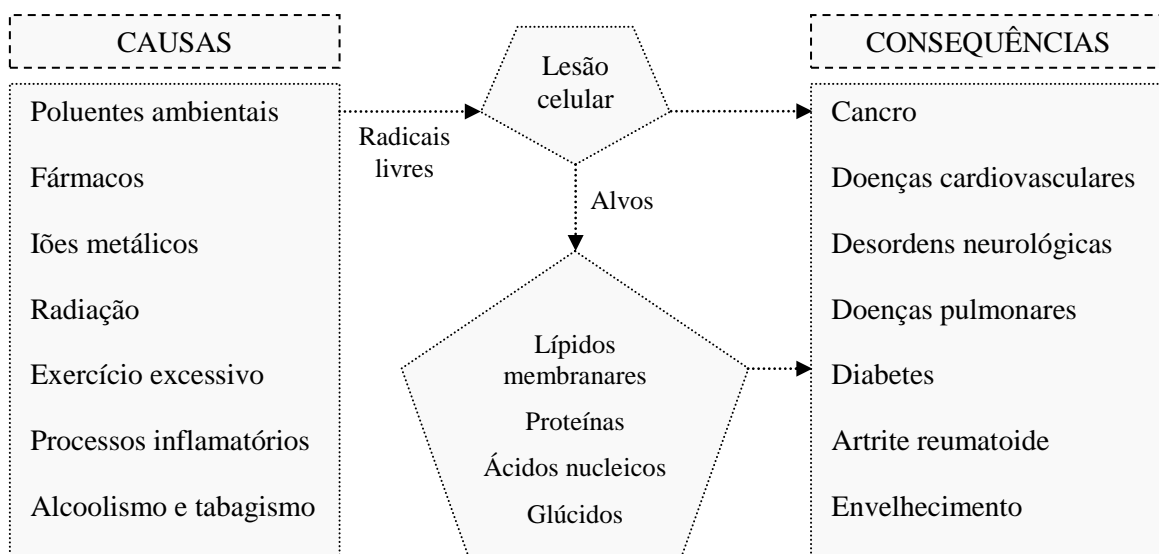


Figura 17. Principais causas e consequências da ação dos radicais livres (Ferreira *et al.*, 2009).

Para combater ou evitar o stresse oxidativo, os antioxidantes naturais ou de síntese desempenham um papel crucial no auxílio ao sistema protetor endógeno (Liu, 2003; Ferreira & Abreu, 2007), podendo funcionar como um tipo de medicina preventiva (Krishnaiah *et al.*, 2011).

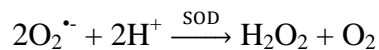
1.3.2. Antioxidantes e fitoquímicos

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias naturais ou sintéticas adicionadas aos produtos a fim de prevenir ou retardar a sua deterioração pela ação do oxigénio. Em bioquímica e medicina, os antioxidantes são definidos como enzimas ou outras substâncias orgânicas, tais como a vitamina E ou o β -caroteno, capazes de neutralizar os efeitos prejudiciais da oxidação em tecidos animais (Huang *et al.*, 2005).

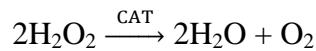
Existem vários tipos de antioxidantes, podendo ser classificados mediante os mecanismos associados. Estes podem ser preventivos, captadores, reparadores ou de adaptação (Niki, 2010). Os antioxidantes preventivos constituem a primeira linha de defesa do organismo (e.g. SOD e CAT), suprimindo a formação de ROS. Os antioxidantes captadores funcionam como segunda linha de defesa, removendo rapidamente espécies reativas, impedindo o ataque a várias biomoléculas (e.g. α -tocoferol, ácido ascórbico e GSH). Por sua vez, os antioxidantes reparadores atuam numa terceira linha de defesa do organismo. Estes atuam reparando lesões, eliminando resíduos ou reconstituindo funções perdidas (e.g. proteases, fosfolipases e transferases). Por último, os antioxidantes de adaptação, que constituem uma quarta linha de defesa, exercem uma função de adaptação, em que cada antioxidante é produzido na altura certa e transferido na quantidade necessária para as posições adequadas.

As defesas antioxidantes podem ser enzimáticas ou não enzimáticas (Ferreira *et al.*, 2009). As defesas antioxidantes enzimáticas são em grande número e encontram-se espalhadas por todo o organismo, tanto no meio intracelular como no meio extracelular. Estas defesas incluem a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GSH-Px), a glutathione reductase (GSH-R), entre outras (Sies, 1993; Ferreira & Abreu, 2007).

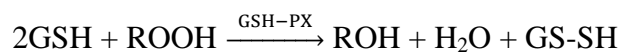
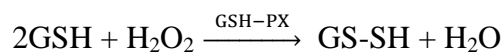
A SOD protege as células aeróbias da ação do anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), catalisando a conversão deste radical em peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e oxigénio molecular (O_2) (Somani *et al.*, 1997; Ferreira *et al.*, 2009):



O peróxido de hidrogénio formado é posteriormente transformado em água e oxigénio molecular pela CAT nos lisossomas:

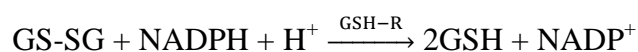


A GSH-Px é uma enzima dependente de selénio que catalisa a redução do peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e de hidroperóxidos orgânicos (ROOH) a água, à custa da oxidação da glutathiona (GSH), que serve de cofator à enzima (Somani *et al.*, 1997; Ferreira & Abreu, 2007):



Esta enzima encontra-se em grandes quantidades quer no citoplasma quer nas mitocôndrias. A sua distribuição é complementar à da CAT, que não existe na mitocôndria. Assim, esta enzima exerce um papel fundamental na metabolização do peróxido de hidrogénio (Halliwell & Gutteridge, 1999).

A GSH-R é uma enzima citosólica essencial na manutenção do quociente GSH/GS-SG, regenerando a GSH na forma reduzida a partir da GS-SG, usando o NADPH como cofator (Halliwell & Gutteridge, 1999):



A relação GSH-R/GSH-Px evidencia se o sistema de reciclagem da GSH funciona corretamente. Se esta razão diminuir significa que a célula não produz GSH suficiente para destoxificar o H_2O_2 e os hidroperóxidos, aumentando a probabilidade de ocorrer dano oxidativo (Liebler & Reed, 1997; Kohen & Nyska, 2002).

É importante salientar que as defesas antioxidantes enzimáticas apresentam interações sinérgicas, a fim de manter os níveis de radicais livres dentro dos limites fisiológicos. Enquanto a SOD e a CAT atuam principalmente em regiões hidrofílicas, a GSH-Px protege regiões hidrofóbicas, com especificidade para peróxidos lipídicos (Michiels *et al.*, 1994).

Além das enzimas, as células contêm outros compostos antioxidantes que lhes conferem uma maior proteção contra os radicais livres, visto os antioxidantes enzimáticos não serem suficientes para neutralizar todos os radicais produzidos. Tais compostos antioxidantes não enzimáticos advêm da dieta, sendo a maioria de origem vegetal e designam-se por fitoquímicos. Muitos são essenciais, pois o nosso organismo não os consegue sintetizar, tais como o ácido ascórbico, o α -tocoferol e os flavonoides (Patel, 2008). Os fitoquímicos englobam carotenoides (e.g. α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina, luteína, zeaxantina, astaxantina e licopeno); compostos fenólicos: ácidos fenólicos (e.g. ácidos hidroxibenzoicos e ácidos hidroxicinâmicos), flavonoides (e.g. flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas, antocianidinas e isoflavonoides), estibenos, cumarinas e taninos; alcaloides; compostos azotados (e.g. derivados da clorofila, aminoácidos e aminas) e compostos organossulfurados (e.g. isotiocianatos, indoles, compostos de enxofre alílicos) (Ferreira & Abreu, 2007).

Tais antioxidantes exógenos, componentes da dieta, constituem o principal mecanismo antioxidante não enzimático do organismo (Kohen & Nyska, 2002). Por essa razão, uma dieta rica em fruta e vegetais é altamente benéfica devido à complexa mistura de compostos antioxidantes presente. Esta combinação de fitoquímicos, alguns hidrofílicos outros lipofílicos, pode atuar de uma forma aditiva ou sinérgica no organismo humano de uma forma superior à capacidade de um único antioxidante, por mais eficaz que seja. Assim, os compostos antioxidantes/bioativos são mais convenientemente adquiridos a partir de uma dieta alimentar completa do que a partir de quaisquer suplementos dietéticos (Ferreira & Abreu, 2007).

Além da importância dos fitoquímicos na dieta, quando presentes ou adicionados a alimentos, exercem igualmente um efeito protetor; preservam as propriedades organolépticas e nutricionais, prolongam o prazo de validade e previnem a formação de produtos de decomposição oxidativa pela ação da luz, temperatura e humidade. Assim, os compostos bioativos são de grande importância no setor alimentar e biotecnológico podendo ser usados em diversas aplicações, principalmente no desenvolvimento de aditivos alimentares, nutracêuticos, alimentos funcionais e fármacos com ação anti-inflamatória, digestiva, antinecrótica, neuroprotetora e hepatoprotetora, podendo envolver um mecanismo antioxidante e/ou captador de radicais livres (Perry *et al.*, 1999; Lin & Huang, 2002; Repetto & Llesuy, 2002; Loziene *et al.* 2007). Paralelamente, existe um crescente interesse na descoberta de novos antioxidantes de origem natural, a fim de substituir os antioxidantes sintéticos, tais como o BHA (butil-

hidroxianisol) e o BHT (butil-hidroxitolueno), utilizados na preservação de alimentos, cosméticos e medicamentos. Esta procura deve-se ao facto dos antioxidantes sintéticos serem muito voláteis e instáveis a temperaturas elevadas, apresentarem alguns efeitos tóxicos e carcinogénicos e serem menos potentes que os agentes antioxidantes naturais (Shi *et al.*, 2001; Seabra *et al.*, 2006; Ravikumar & Gnanadesigan, 2011).

1.3.3. Métodos de avaliação da atividade antioxidante

Devido à diversidade química de compostos antioxidantes presentes em alimentos e extratos vegetais torna-se muito difícil separar cada um deles e estudá-lo individualmente. Adicionalmente, compostos antioxidantes individuais não refletem necessariamente a capacidade antioxidante total, visto poderem existir interações sinérgicas ou antagónicas entre os diferentes compostos presentes (Huang *et al.*, 2005; Magalhães *et al.*, 2008). Tratando-se de extratos vegetais, a capacidade antioxidante não depende apenas da composição do extrato, mas também das condições do ensaio.

Na seleção de métodos para avaliar a capacidade antioxidante deve ter-se em atenção se são métodos já usados durante um certo período de tempo e por diferentes laboratórios, de tal forma que os pontos fortes e fracos do método tenham já sido detetados e corrigidos. No entanto, isto não quer dizer que métodos mais recentes não sejam potencialmente melhores (Prior *et al.*, 2005). Os métodos padronizados devem obedecer a vários requisitos, nomeadamente: utilizarem uma fonte biologicamente relevante de radicais, serem simples, utilizarem um método com um mecanismo químico e um ponto final definidos, usarem instrumentação adequada, terem boa reprodutibilidade, serem adaptáveis a ensaios com antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos e à utilização de diferentes fontes de radicais, e serem adaptáveis a análises de controlo de qualidade (Prior *et al.*, 2005).

Com base nas reações químicas envolvidas, os métodos mais usuais para determinar a capacidade antioxidante *in vitro* podem ser genericamente divididos em duas categorias: ensaios baseados na reação de transferência de átomos de hidrogénio (HAT) e ensaios baseados na reação de transferência de eletrões (ET).

Os ensaios baseados em HAT avaliam a capacidade de um antioxidante eliminar os radicais livres através da cedência de átomos de hidrogénio, representando o mecanismo de reação da oxidação lipídica (Prior *et al.*, 2005). Nestas reações, os

antioxidantes e o substrato competem pelos radicais peróxido (Zulueta *et al.*, 2009). São ensaios que não dependem da natureza do solvente nem do pH (Wright *et al.*, 2001) e de rápida ação (Phipps *et al.*, 2007). No entanto, espécies redutoras (e.g. metais) podem causar interferências no método podendo levar erradamente a atividades aparentemente elevadas (Prior *et al.*, 2005).

Os ensaios baseados em ET detetam a capacidade de um potencial antioxidante em transferir um eletrão para reduzir um oxidante, incluindo metais, carbonilos e radicais que mudam de cor quando reduzidos (Wright *et al.*, 2001). A extensão da mudança de cor está correlacionada com a concentração de antioxidantes na amostra. A reatividade destes ensaios é baseada, principalmente, na desprotonação e potencial de ionização do grupo funcional reativo. Ao contrário das reações baseadas em HAT, estas são dependentes do pH do meio e a avaliação da capacidade antioxidante é feita com base na percentagem de diminuição da formação do produto, sendo geralmente reações lentas (Wright *et al.*, 2001).

Porém, os mecanismos HAT e ET têm muitas semelhanças e ocorrem quase sempre em conjunto em todas as amostras, tornando-se difícil a sua diferenciação (Karadag *et al.*, 2009). Quando se pretende avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* de determinada amostra, o ideal será combinar pelo menos dois métodos de forma a incluir os vários modos de ação, originando resultados mais fidedignos (Huang *et al.*, 2005). Neste trabalho foram empregues quatro ensaios para avaliar a capacidade antioxidante das flores das plantas arbustivas, dois baseados em ET (ensaio da atividade captadora de radicais DPPH e ensaio do poder redutor) e dois baseados em HAT (ensaio da inibição da descoloração do β -caroteno e ensaio da inibição de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)).

1.3.3.1. Ensaio da atividade captadora de radicais DPPH

O método do DPPH baseia-se na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorvância a 515 nm (Brand-Williams *et al.*, 1995). O DPPH é um radical livre azotado, amplamente estudado e utilizado em ensaios de atividade anti-radicalar *in vitro*, que pode ser obtido diretamente por dissolução do reagente em meio orgânico (Cunha, 2005). Este composto é um radical livre estável devido à deslocalização do eletrão livre sobre a

molécula como um todo, deste modo, a molécula não forma dímeros, o que seria de esperar na maioria dos outros radicais livres. A deslocalização do radical livre também é responsável pela cor azul-violeta intensa, caracterizada por uma absorvância, em solução alcoólica concentrada, a cerca de 515 nm. Quando a solução de DPPH é misturada com substâncias capazes de doar átomos de hidrogénio (e.g. extratos de plantas), a sua coloração intensa vai desaparecendo como consequência da redução do radical, originando uma coloração amarelo pálido devido à permanência do grupo picrilo (**Figura 18**) (Molyneux, 2004; Cunha, 2005).

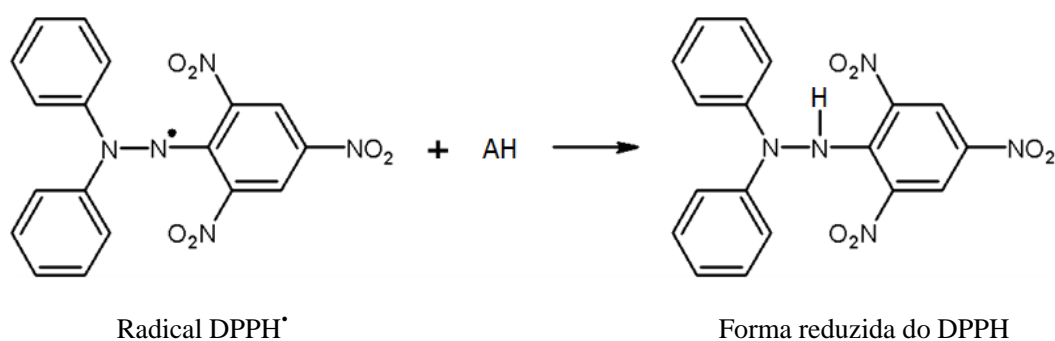
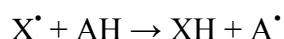


Figura 18. Representação esquemática da redução do DPPH[•] (Molyneux, 2004).

Se representarmos o radical DPPH por X[•] e a molécula antioxidante por AH obtemos a seguinte reação:



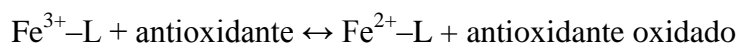
onde XH corresponde à forma reduzida e A[•] ao radical livre produzido nesta primeira etapa. Este último radical vai depois sofrer reações que controlam a estequiometria geral, isto é, o número de moléculas reduzidas (descoradas) de DPPH por cada molécula redutora. Esta reação destina-se a fornecer a ligação com outras reações que ocorrem num sistema de oxidação, como a auto-oxidação de um lípido ou outra substância insaturada; a molécula X[•] pretende assim representar os radicais livres presentes no sistema cuja atividade é suprimida pela substância AH (Molyneux, 2004).

Este método tem a vantagem de não ser afetado por reações laterais, como a quelatação de iões metálicos e a inibição enzimática, ao contrário de outros radicais produzidos em laboratório (Amarowicz *et al.*, 2004). No entanto, o DPPH só pode ser dissolvido em meio orgânico (e.g. solventes alcoólicos) e os resultados podem ser afetados pelas alterações do DPPH por ação da luz, do oxigénio e do tipo de solvente

(Karadag *et al.*, 2009). Além disso, parte do DPPH coagula acima de uma certa percentagem de água, impossibilitando a reação com antioxidantes. Outros compostos que absorvem ao comprimento de onda de 515 nm (e.g. carotenoides) podem interferir nos resultados (Karadag *et al.*, 2009).

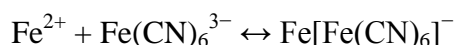
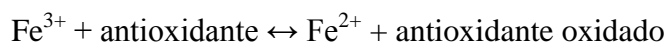
1.3.3.2. Ensaio do poder redutor

O método do poder redutor baseia-se na capacidade que os antioxidante possuem em reduzir o Fe^{3+} / ferricianeto ($\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) à forma ferrosa (Fe^{2+}) (Chung *et al.*, 2002). Dependendo do poder redutor dos compostos avaliados, a cor amarela da solução altera para várias tonalidades de verde ou azul, podendo ser medida espectrofotometricamente a 690 nm (Yen & Chen, 1995; Amarowicz *et al.*, 2004). A reação ocorre em meio ácido (pH = 3,6) para manter a solubilidade do ferro (Karadag *et al.*, 2005). Este pH diminui o potencial de ionização que impulsiona a transferência de elétrons e aumenta o potencial redox, causando uma mudança no mecanismo de reação (Pior *et al.*, 2005). A química do ensaio baseado na redução do ferro pode ser traduzida na seguinte equação:

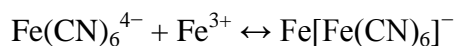
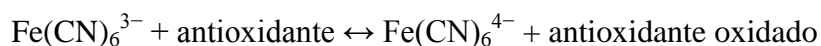


onde L corresponde ao ligando cromogénico seletivo do ião ferroso que produz o complexo corado $\text{Fe}^{2+}\text{-L}$ como resultado da reação redox.

Quando a espécie oxidante é o Fe^{3+} ou o $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ (na composição do reagente ferricianeto), forma-se respetivamente Fe^{2+} ou $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ como produto da redução com o antioxidante, combinando-se com o outro componente do reagente para originar $\text{KFe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (azul da Prússia) como produto colorido. Ou seja, quando o Fe^{3+} é usado juntamente com o $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ como agente oxidante (no ensaio ferricianeto modificado), independentemente do par de reações que ocorra, ambas originam o mesmo produto colorido (azul da Prússia) (Berker *et al.*, 2007):



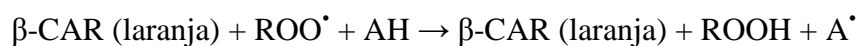
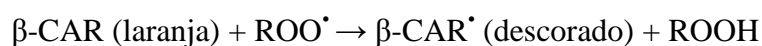
ou



O ensaio do poder redutor é considerado simples, rápido, económico e bastante fiável, podendo ser aplicado de forma manual, automatizada ou semi-automatizada (Prior *et al.*, 2005). No entanto, qualquer substância capaz de doar eletrões com potencial redox inferior ao par $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ pode influenciar o ensaio. Por outro lado, um antioxidante capaz de reduzir pro-oxidantes pode não ser capaz de reduzir o Fe^{3+} , não sendo detetados os compostos que captam radicais (Karadag *et al.*, 2009). Outros compostos que absorvem no mesmo comprimento de onda podem interferir na determinação, causando sobrestimação de resultados (Magalhães *et al.*, 2008).

1.3.3.3. Ensaio da inibição da descoloração do β -caroteno

A inibição da peroxidação lipídica pode ser avaliada através da inibição da descoloração do β -caroteno, neutralizando o radical livre linoleato bem como outros radicais livres formados no sistema, os quais atacam as moléculas insaturadas de β -caroteno. O método baseia-se na descoloração competitiva do β -caroteno durante a auto-oxidação (induzida pelo calor) do ácido linoleico em emulsão aquosa monitorizada pelo decréscimo da absorvância na região do visível (Miller, 1971; Kaur & Geetha, 2006; Gutierrez *et al.*, 2006). O ácido linoleico possui um grupo metileno bis-álílico ativo ao qual é removido um átomo de hidrogénio durante a oxidação, formando-se assim um radical pentadieno que ataca o β -caroteno insaturado para readquirir átomos de hidrogénio. Quando isto acontece, os carotenoides perdem a sua cor laranja, o que pode ser verificado espectralmente a 470 nm (Burda & Oleszek, 2001; Amarowicz *et al.*, 2004). Para retardar a descoloração do β -caroteno basta adicionar antioxidantes individuais (von Gadov *et al.*, 1997) ou extratos vegetais (AH) (Laguerre *et al.*, 2007), pois estes podem ceder átomos de hidrogénio aos radicais, prevenindo assim a descoloração do β -caroteno (β -CAR) (Kaur & Geetha, 2006):



em que ROO^{\bullet} representa o radical livre linoleato, $\beta-CAR^{\bullet}$ a forma oxidada do β -caroteno, $ROOH$ a forma reduzida do radical livre e A^{\bullet} representa a forma oxidada do antioxidante. Assim, a presença de antioxidantes retarda a extensão da descoloração do β -caroteno, neutralizando o radical livre linoleato e outros radicais livres formados no sistema (Jayaprakasha *et al.*, 2001).

Este é um método simples e não requer instrumentação especializada (Amarowicz *et al.*, 2004; Karadag *et al.*, 2009). Pode ser aplicado em ambientes lipofílicos e hidrofílicos e pode detetar tanto a ação antioxidante como pro-oxidante de compostos (Ndhlala *et al.*, 2010). No entanto, como o β -caroteno poder sofrer descoloração a 470 nm por múltiplas vias, a interpretação dos resultados pode ser difícil (Ndhlala *et al.*, 2010).

1.3.3.4. Ensaio da inibição de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Há mais de três décadas que o ácido tiobarbitúrico (TBA) e o malonaldeído (MDA) são utilizados como biomarcadores de peroxidação lipídica (Niki, 2009). Esta pode ser determinada através da quantificação de substâncias que reagem com o TBA.

A peroxidação lipídica, consequência do stresse oxidativo, está associada à perda progressiva do potencial da membrana, aumentando assim a sua permeabilidade e conduzindo, por fim, à morte celular. A formação de TBARS em homogeneizados cerebrais é uma consequência da peroxidação lipídica. As células cerebrais são altamente sensíveis aos danos oxidativos, visto consumirem muito oxigénio, serem relativamente deficientes em defesas antioxidantes e serem ricas em substratos oxidáveis como PUFA e catecolaminas (Chong *et al.*, 2005), são também ricas em iões de metais de transição como o ferro, geralmente envolvidos em reações catalisadas por metais que levam à formação de espécies reativas de oxigénio.

A base química deste método encontra-se na constatação de que durante a oxidação da maioria dos sistemas biológicos são formadas pequenas quantidades de MDA “livre” (**Figura 19**). A adição do TBA, a acidificação e o aquecimento promovem a formação de um produto de cor rosa, que absorve a um comprimento de onda de 532 nm (Kaur & Geetha, 2006; Gill & Tuteja, 2010) e apresenta emissão de fluorescência a 553 nm (quando o feixe de excitação é de 515 nm) (Peixoto *et al.*, 2003).

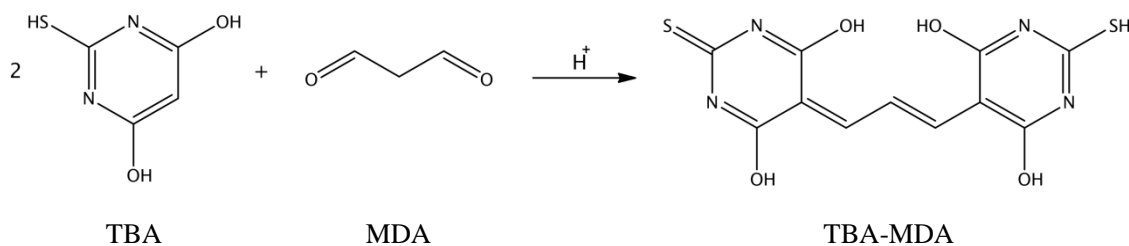


Figura 19. Reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) com o malonaldeído (MDA), com formação do produto corado rosa (TBA-MDA) (Halliwell & Gutteridge, 1999).

O ácido tricloroacético é utilizado para criar um meio com características ácidas que precipite as proteínas das amostras, pois a reação exige um pH igual ou superior a 3 para decorrer rapidamente e na sua totalidade (Peixoto *et al.*, 2003). A extensão da oxidação é verificada após a adição de TBA, a qual é medida espectralmente. Devido à presença de antioxidantes (e.g. extratos combinados de plantas) é de esperar uma diminuição da absorvância (Antolovich *et al.*, 2002).

No entanto, este ensaio é criticado por ser inespecífico, pois mede a formação não só de MDA como também de outros oxocompostos (Ndhlala *et al.*, 2010). Por essa razão, se no meio da reação existirem outros compostos contaminantes que absorvam a um comprimento de onda de 532 nm, o aduto (TBA)₂-MDA deve ser separado por HPLC e seguidamente quantificado por espectrofotometria (Peixoto *et al.*, 2003).

Os ácidos gordos polinsaturados (e.g. eicosapentanoico, C_{20:5}, ou docosahexanoico, C_{22:6}) são os principais contribuintes na formação de malonaldeído durante o processo de peroxidação de frações de tecidos, sendo a contribuição de ácidos gordos di-insaturados (e.g. ácido linoleico) reduzida (Peixoto *et al.*, 2003).

1.4. Objetivos e hipóteses de estudo

O conhecimento empírico registado em inventários etnobotânicos realizados na Península Ibérica atribui às flores de várias espécies dos géneros *Cytisus* e *Genista* (da Tribo Genisteeae, família Fabaceae) propriedades medicinais e condimentares. Tradicionalmente procede-se à secagem destas flores logo após a colheita, mantendo-as à sombra e à temperatura ambiente durante um período de cerca de 30 dias. As aplicações para fins medicinais são acompanhadas de recomendações relativas ao consumo, dosagem e período de toma, porque a sabedoria popular reconhece nestas espécies algum potencial tóxico, muitas vezes relacionado com a forma de processar o material vegetal (Carvalho, 2010).

Visto que o processo de liofilização tem vindo a ser indicado como uma melhor alternativa para a preservação da qualidade das amostras, neste trabalho, pretendeu-se avaliar os efeitos do processo de secagem (tradicional *versus* liofilização) no potencial antioxidante e na composição fitoquímica de flores de *Cytisus multiflorus* (L'Hér.) Sweet (giesta branca), *Cytisus scoparius* (L.) Link (giesta negra), *Cytisus striatus* (Hill) Rothm. (giesta amarela) e *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk (carqueja).

As propriedades antioxidantes foram avaliadas por métodos bioquímicos (inibição da descoloração do β -caroteno na presença de radicais livres derivados do ácido linoleico e inibição da formação de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) em homogeneizados cerebrais) e métodos químicos (determinação do poder redutor e da capacidade captadora de radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH)).

Foram determinados antioxidantes hidrofílicos (ácido ascórbico, fenóis incluindo flavonóis e ésteres tartáricos e açúcares) e lipofílicos (carotenoides incluindo β -caroteno e licopeno, clorofilas, tocoferóis e ácidos gordos).

O valor energético das amostras também foi calculado com base nos níveis totais de lípidos, proteínas e glúcidos.



Capítulo II

II. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Seleção, colheita e preparação das amostras

Para a realização deste trabalho foram selecionadas quatro plantas medicinais da tribo Genisteae (Família Fabaceae), sendo elas *Cytisus multiflorus* (L'Hér.) Sweet, *Cytisus scoparius* (L.) Link, *Cytisus striatus* (Hill) Rothm. e *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk, vulgarmente conhecidas pelos seus respetivos nomes vernáculos de giesta branca, giesta negral, giesta amarela e carqueja. A seleção foi baseada em inventários etnobotânicos realizados em Trás-os-Montes, onde estas plantas são comumente utilizadas (Carvalho, 2010).

Durante a fase de plena floração, as flores das quatro espécies vegetais foram recolhidas na primavera de 2010 (Abril e Maio, dependendo de cada espécie), no território Bragança e Miranda do Douro, de Trás-os-Montes, nordeste de Portugal, considerando a fase mais favorável de acordo com o conhecimento empírico e os usos medicinais locais (**Tabela 1**) citados por curandeiros e consumidores selecionados. Assim, os locais, a época de apanha e a escolha das partes da planta a analisar tiveram em consideração critérios e preferências de consumidores locais relativos ao uso das espécies selecionadas (Carvalho, 2010; Carvalho & Morales, 2010). A identificação botânica das espécies foi confirmada com os caracteres morfológicos definidos pela Nova Flora de Portugal (Franco, 1971) e pela Flora Ibérica (Castroviejo *et al.*, 1999). Exemplares prensados e montados encontram-se depositados no Herbário da Escola Superior Agrária de Bragança (BRESA).

As amostras em estudo foram submetidas a dois processos diferentes de secagem: um grupo de plantas foi liofilizado (Liofilizador Ly-8-FM-ULE) imediatamente após terem sido coletadas; e outro grupo de plantas foi seco à sombra, tendo sido armazenadas num local escuro e seco, à temperatura ambiente durante 30 dias, simulando as condições gerais de utilização referidas por informantes (Carvalho, 2010). As amostras foram posteriormente pulverizadas e mantidas nas melhores condições, a -20 °C, para utilização subsequente.

2.2. Padrões e reagentes

Os solventes acetonitrilo 99,9%, *n*-hexano 95% e acetato de etilo 99,98%, de grau HPLC, foram fornecidos pela Lab-Scan (Lisboa, Portugal). A mistura padrão com 37 ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) (norma 47885-U) foi adquirida na Sigma (St. Louis, MO, EUA), assim como outros isómeros individuais de ácidos gordos, ácido *L*-ascórbico, padrões de tocoferóis (isoformas α -, β -, γ - e δ -), padrões de açúcares (D(-)-frutose, D(+)-glucose anidra, D(+)-melezitose hidratada, D(+)-sacarose e D(+)-trealose) e padrões utilizados nos ensaios de atividade antioxidante (trolox: ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, ácido cafeico, ácido clorogénico e quercetina desidratada). O tocol racémico, 50 mg/mL, foi adquirido na Matreya (PA, EUA). O 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) foi obtido na Alfa Aesar (Ward Hill, MA, EUA). Todos os outros produtos químicos e solventes usados eram de grau analítico e foram adquiridos a partir de fontes comuns. A água foi tratada com um sistema de purificação Milli-Q (TGI Pure Water Systems, EUA).

2.3. Avaliação *in vitro* das propriedades antioxidantes

2.3.1. Preparação dos extratos

As amostras secas pulverizadas (20 mesh; ~1 g) foram submetidas a uma extração sólido-líquido por agitação com 50 mL de metanol (25 °C a 150 rpm, em placa de agitação) durante 1 h e posteriormente filtradas através de papel Whatman n.º 4. O resíduo obtido foi re-extraído com uma porção adicional de 50 mL de metanol nas mesmas condições referidas anteriormente. Os extratos metanólicos combinados foram depois evaporados a 35 °C sob pressão reduzida (evaporador rotativo Büchi R-210) e redissolvidos em metanol a fim de obter uma concentração final de 5 mg/mL (solução *stock*). Posteriormente, a partir da solução *stock* prepararam-se extratos metanólicos com diferentes concentrações, através de diluições sucessivas, a fim de os submeter a testes *in vitro* (Barros *et al.*, 2011) para avaliar as suas propriedades antioxidantes e quantificar alguns compostos. As concentrações de extrato que forneceram 50% da atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância (EC₅₀) foram calculadas a partir dos gráficos das percentagens de atividade antioxidante (ensaios DPPH, inibição da

descoloração do β -caroteno e TBARS) ou da absorvância a 690 nm (ensaio do poder redutor) em função da concentração de extrato. Utilizou-se trolox como padrão.

2.3.2. Atividade captadora de radicais DPPH

Esta metodologia foi realizada utilizando um Leitor de Microplacas ELX800 (Bio-Tek equipamento, Inc.) seguindo o método descrito por Hatano *et al.* (1988). A mistura da reação, em cada um dos 96 poços, consistiu nas diferentes soluções dos extratos (30 μ L) às quais se adicionou uma solução metanólica (270 μ L) contendo radicais DPPH (6×10^{-5} mol/L). A mistura foi deixada em repouso durante 60 min no escuro. A redução do radical DPPH foi determinada pela medição da absorvância a 515 nm. A atividade captadora de radicais (ACR) foi calculada pela percentagem de descoloração da solução de DPPH, usando a equação:

$$\% \text{ ACR} = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{S}})/A_{\text{DPPH}}] \times 100$$

onde A_{S} corresponde à absorvância da solução de DPPH na presença de diferentes concentrações de extrato e A_{DPPH} é a absorvância do branco (solução de DPPH mais o solvente de extração (metanol) em vez da solução de extrato).

2.3.3. Poder redutor

Esta metodologia foi realizada utilizando o Leitor de Microplacas descrito anteriormente seguindo o método de Oyaizu (1986). As diferentes soluções de extrato (0,5 mL) foram misturadas com tampão fosfato de sódio (200 mmol/L, pH 6,6, 0,5 mL) e ferricianeto de potássio (1% w/v, 0,5 mL). A mistura foi incubada a 50 °C durante 20 min. Após esse período adicionou-se ácido tricloroacético (10% w/v, 0,5 mL). A mistura (0,8 mL) foi colocada nos 48 poços juntamente com água desionizada (0,8 mL) e cloreto de ferro (0,1% w/v, 0,16 mL), e a absorvância foi medida a 690 nm. Foi preparado um branco com o solvente de extração (metanol) em vez da solução de extrato.

2.3.4. Inibição da descoloração do β -caroteno

Este ensaio foi realizado seguindo o método descrito por Mi-Yae *et al.* (2003). Preparou-se uma solução de β -caroteno dissolvendo este composto (2 mg) em clorofórmio (10 mL). Transferiram-se 2 mL desta solução para um balão periforme de 100 mL e removeu-se o clorofórmio a 40 °C, sob vácuo. Posteriormente juntou-se ácido linoleico (40 mg), emulsionante Tween 80 (400 mg) e água destilada (100 mL), e agitou-se vigorosamente. Transferiram-se alíquotas (4,8 mL) desta emulsão para tubos de ensaio contendo diferentes concentrações dos extratos (0,2 mL). Logo após a adição da emulsão a cada tubo, agitou-se e determinou-se o tempo zero de absorvância a 470 nm (espectrofotómetro AnalytikJena). Seguidamente foram incubados num banho a 50 °C durante 2 h. Passado esse tempo determinou-se novamente a absorvância a 470 nm. Foi preparado um branco com o solvente de extração (metanol) em vez da solução de extrato. A inibição da descoloração do β -caroteno foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ Descoloração} = [(A_{470} \text{ após } 2\text{h}/A_{470} \text{ inicial}) \times 100]$$

2.3.5. Inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para realização deste ensaio, baseado nos trabalhos descritos por Ohkawa *et al.* (1979) e Bird & Draper (1984), utilizou-se tecido cerebral, obtido a partir de porco (*Sus scrofa*), que foi dissecado e homogeneizado em gelo com tampão Tris-HCl (20 mM, pH 7,4) a fim de produzir um homogeneizado de tecido cerebral numa proporção 1:2 (w/v) após centrifugação (centrífuga refrigerada Centorion K24OR) a 3000g durante 10 min. Incubou-se uma alíquota (0,1 mL) do sobrenadante com as diferentes concentrações dos extratos (0,2 mL), na presença de FeSO₄ (10 μ M; 0,1 mL) e ácido ascórbico (0,1 mM; 0,1mL) a 37 °C durante 1 hora. A reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético (28% w/v; 0,5 mL), seguindo-se a adição do ácido tiobarbitúrico (TBA; 2%, w/v; 0,38 mL). A mistura foi aquecida a 80 °C durante 20 min. Após centrifugação, a 3000g durante 10 min, para remoção do precipitado de proteínas, a intensidade da cor do complexo malonaldeído (MDA)-TBA do sobrenadante foi medida através da sua absorvância a 532 nm. Foi preparado um branco com o tampão tris-HCl em vez da

solução de extrato. A percentagem de inibição da peroxidação lipídica (%) foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = [(A - B)/A] \times 100\%$$

onde A e B correspondem à absorvância do branco e da solução com o extrato, respetivamente.

2.3.6. Grupos de compostos fenólicos

Para quantificar grupos de compostos fenólicos, os extratos metanólicos das amostras concentrados a 0,625 mg/mL (250 µL) foram misturados com HCl 0,1% em etanol 95% (250 mL) e HCl 2% (4550 µL). Após 15 min mediu-se a absorvância a 280, 320 e 360 nm. A absorvância (A) a 280 nm foi utilizada para quantificar o conteúdo em fenóis totais, $A_{320 \text{ nm}}$ foi utilizada para quantificar os ésteres tartáricos e $A_{360 \text{ nm}}$ foi utilizada para quantificar flavonóis (Mazza *et al.*, 1999). Para construir as retas de calibração utilizou-se: ácido clorogénico (0,2-3,2 mM) sendo os resultados dos fenóis totais expressos em mg de equivalentes de ácido clorogénico (EACI) por g de extrato; ácido cafeico (0,2-3,6 mM) sendo os resultados dos ésteres tartáricos expressos em mg de equivalentes de ácido cafeico (EAC) por g de extrato; e quercetina (0,2-3,2 mM) sendo os resultados dos flavonóis expressos em mg de equivalentes de quercetina (EQ) por g de extrato.

2.4. Determinação de antioxidantes hidrofílicos

2.4.1. Vitamina C

A vitamina C foi determinada de acordo com o método de Klein & Perry (1982). As amostras secas (500 mg) pulverizadas (20 mesh) foram extraídas com ácido metafosfórico (1%, 10 mL) durante 45 min à temperatura ambiente e filtradas através de papel de filtro Whatman n.º 4. O filtrado (1 mL) foi misturado com 2,6-dicloro-indofenol (9 mL) e, após 30 min, mediu-se a absorvância a 515 nm. Foi preparado um branco com o solvente de extração (ácido metafosfórico) em vez da solução de extrato. A concentração de ácido ascórbico foi calculada com base na curva de calibração do

ácido L-ascórbico (6×10^{-3} -0,1 mg/mL), e os resultados foram expressos em g de ácido ascórbico por 100 g de massa seca.

2.4.2. Açúcares

Os açúcares livres foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC-RID), conforme descrito por Batista *et al.* (2011). As amostras secas pulverizadas (1,0 g) foram enriquecidas com melezitose enquanto padrão interno (PI, 5 mg/mL) e extraídas com 40 mL de etanol 80% a 80 °C durante 30 min. A suspensão resultante foi centrifugada a 15.000g durante 10 min. O sobrenadante foi concentrado a 60 °C sob pressão reduzida e deslipificado, através de três lavagens sucessivas com 10 mL de éter etílico numa ampola de decantação. Após concentração a 40 °C, os resíduos sólidos foram dissolvidos em água para um volume final de 5 mL, filtrados através de filtros de *nylon* de 0,22 µm da Whatman para *vials* âmbar e analisados por HPLC-RID.

O equipamento de HPLC utilizado consistia num sistema integrado com uma bomba (Knauer, Smartline system 1000), um sistema desgaseificador (Smartline manager 5000), um amostrador automático (AS-2057 Jasco) e um detetor de RI (Knauer Smartline 2300). Os dados foram analisados usando o *software* Clarity 2.4 (DataApex). A separação cromatográfica foi conseguida com uma coluna Eurospher 100-5 NH₂ (4,6 × 250 mm, 5 mm, Knauer) operando a 30 °C (forno 7971 R Grace). A fase móvel usada foi acetonitrilo/água desionizada, 70:30 (v/v) com um fluxo de 1 mL/min. O volume de injeção foi de 20 µL. Os compostos foram identificados por comparação cromatográfica com padrões comerciais. A quantificação foi realizada usando o método do padrão interno e o conteúdo em açúcares foi expresso em g por 100 g de massa seca.

2.5. Determinação de antioxidantes lipofílicos

2.5.1. Tocoferóis

Os tocoferóis presentes nas amostras foram determinados segundo um procedimento previamente otimizado e descrito por Barros *et al.* (2011). Antes do processo de extração adicionou-se às amostras (~500 mg) uma solução de BHT (2,6-di-

tert-butil-4-metilfenol) em hexano (10 mg/mL; 100 μ L) e o padrão interno (PI) em hexano (tocol; 50 μ g/mL; 400 μ L). As amostras foram homogeneizadas com metanol (4 mL) num vórtex durante 1 min. Depois adicionou-se hexano (4 mL) e homogeneizou-se novamente num vórtex durante 1 min. Posteriormente adicionou-se uma solução aquosa saturada de NaCl (2 mL), homogeneizou-se (1 min), centrifugou-se (5 min, 4000g) e transferiu-se, cuidadosamente, o sobrenadante para um *vial* rodeado por gelo e protegido da luz. As amostras foram re-extraídas mais duas vezes com hexano. Os extratos combinados foram secos em corrente de azoto, redissolvidos em 2 mL de *n*-hexano, desidratados com sulfato de sódio anidro e filtrados através de um filtro LC descartável de 0,22 μ m. Os filtrados foram transferidos para *vials* de injeção âmbar e analisados por HPLC.

A análise foi realizada no sistema de HPLC descrito anteriormente, ligado a um detetor de fluorescência (FP-2020; Jasco) programado para comprimentos de onda de excitação a 290 nm e de emissão a 330 nm. Os resultados foram analisados utilizando o *software* Clarity 2.4 (DataApex). A separação cromatográfica foi conseguida com uma coluna de Poliamida II de fase normal (250 \times 4,6 mm; YMC Waters) operando a 30 °C. A fase móvel utilizada consistiu numa mistura de *n*-hexano e acetato de etilo (70:30, v/v) com um fluxo de 1 mL/min. O volume de injeção foi de 20 μ L. Os compostos foram identificados por comparação cromatográfica com padrões comerciais. A quantificação foi baseada na resposta do sinal fluorescente, utilizando o método do padrão interno, e o conteúdo em tocoferóis foi expresso em mg por 100 g de massa seca.

2.5.2. Pigmentos

Os pigmentos β -caroteno, licopeno e clorofilas a e b foram determinados segundo o procedimento previamente descrito por Nagata & Yamashita (1992). As amostras secas pulverizadas (150 mg) foram agitadas vigorosamente em 10 mL de uma mistura de acetona-hexano (4:6, v/v) durante 1 min e filtradas através de papel de filtro Whatman n.º 4. A absorvância do filtrado foi medida a 453, 505, 645 e 663 nm. O conteúdo em β -caroteno, licopeno e clorofilas a e b foi calculado de acordo com as seguintes equações:

$$\beta\text{-caroteno (mg/100 mL)} = 0,216 \times A_{663} - 1,220 \times A_{645} - 0,304 \times A_{505} + 0,452 \times A_{453}$$

$$\text{Licopeno (mg/100 mL)} = -0,0458 \times A_{663} + 0,204 \times A_{645} + 0,304 \times A_{505} - 0,0452 \times A_{453}$$

$$\text{Clorofila a (mg/100 mL)} = 0,999 \times A_{663} - 0,0989 \times A_{645}$$

$$\text{Clorofila b (mg/100 mL)} = -0,328 \times A_{663} + 1,77 \times A_{645}$$

Os resultados foram expressos em mg por 100 g de massa seca.

2.5.3. Ácidos gordos

Os ácidos gordos foram determinados por cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama (GC-FID), equipado com uma coluna capilar, como descrito anteriormente por Batista *et al.* (2011). As amostras secas pulverizadas (3 g) foram transferidas para cartuchos de Soxhlet e extraídas, com éter de petróleo, durante 7 h. Depois de evaporar o solvente, os resíduos obtidos foram submetidos a um processo de derivatização com 5 mL de metanol:ácido sulfúrico:tolueno 2:1:1 (v/v/v) durante, pelo menos, 12 h num banho a 50 °C e a 160 rpm. De seguida, adicionaram-se 3 mL de água desionizada para obter a separação das fases. A mistura FAME foi recuperada com 3 mL de éter dietílico por agitação no vórtex e a água foi eliminada com sulfato de sódio anidro. A amostra foi recuperada para um *vial* com teflon e, antes da injeção, filtrou-se com um filtro de *nylon* de 0,2 µm da Milipore.

A análise foi realizada com um modelo GC DANI 1000 equipado com um injetor *split/splitless*, um detetor de ionização de chama (FID a 260 °C) e uma coluna Macherey-Nagel (30 m × 0,32 mm ID × 0,25 µm *df*). A rampa de temperaturas do forno foi a seguinte: a temperatura inicial da coluna foi de 50 °C, durante 2 min; depois, a 30 °C/min aumentou para 125 °C, a 5 °C/min aumentou para 160 °C, a 20 °C/min aumentou para 180 °C, a 3 °C/min aumentou para 200 °C e a 20 °C/min aumentou para 220 °C, temperatura que foi mantida durante 15 min. O fluxo do gás de transporte (hidrogénio) foi de 4,0 mL/min (0,61 bar), medido a 50 °C. A injeção *split* (1:40) foi realizada a 250 °C. O volume de amostra injetado foi de 1 µL. A identificação dos ácidos gordos foi feita comparando os tempos relativos de retenção dos picos dos FAME das amostras com padrões. Os resultados foram processados usando o *software* CSW 1.7 (DataApex 1,7) e expressos em percentagem relativa de cada ácido gordo.

2.6. Avaliação do valor energético

Para avaliar o valor energético das amostras quantificou-se a humidade, as proteínas, os lípidos, os glúcidos e as cinzas, seguindo os procedimentos oficiais de análise da AOAC (AOAC, 1995).

A humidade foi determinada através da diferença entre a massa da planta fresca e a massa da planta após secagem. Os resultados foram expressos em g por 100 g de massa fresca.

As proteínas totais ($N \times 6,25$) foram estimadas pelo método de macro-Kjeldahl. Este método permite avaliar o teor em azoto total de origem orgânica. As amostras secas pulverizadas (100 mg) foram digeridas durante 5 h após adicionar uma solução de digestão (2,2 mL), preparada com ácido sulfúrico e uma mistura catalisadora para acelerar a reação. Assim, todo o azoto (proteico e não proteico) foi convertido em iões amónio que tendem a associar-se com iões sulfato formando sulfato de amónio. Posteriormente, os resíduos da digestão foram dissolvidos em água (100 mL). Misturaram-se 100 μ L dessa solução com 5 mL de solução corada e homogeneizou-se num vórtex. Passados 15 min adicionaram-se 5 mL de solução alcalina de hipoclorito e homogeneizou-se no vórtex. Esperou-se 1 h e leu-se a absorvância a 660 nm. Foi preparado um branco contendo 100 μ L de água em vez da solução preparada com os resíduos da digestão. O teor em azoto foi calculado com base na curva de calibração de sulfato de amónio (0,05-0,5 mg/mL; $Y=3,3783X-0,1065$; $R^2=0,9986$) e convertido em proteínas multiplicando o teor em azoto da amostra (N) pelo fator de conversão 6,25. Os resultados foram expressos em g por 100 g de massa seca.

Os lípidos totais foram determinados após extração de uma massa conhecida de amostra seca pulverizada (3 g) com éter de petróleo, durante 7 h, usando um aparelho de Soxhlet. O solvente orgânico (éter de petróleo) extraiu os lípidos que foram quantificados através da pesagem do resíduo após a eliminação do solvente. Os resultados foram expressos em g por 100 g de massa seca.

O teor em cinzas foi determinado após incineração em mufla a 600 ± 15 °C. As amostras secas pulverizadas (250 mg) foram colocadas em cadinhos de porcelana, previamente calcinados e pesados, os quais permaneceram na mufla até queima total da matéria orgânica. A diferença entre a massa inicial e a massa após incineração forneceu a massa de cinzas. Os resultados foram expressos em g por 100 g de massa seca.

Os glúcidos foram calculados pela diferença:

$$100 - (\text{g proteínas} + \text{g lípidos} + \text{g cinzas})$$

Os resultados foram expressos em g por 100 g de massa seca.

A energia total foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Energia (kcal)} = 4 \times (\text{g proteínas} + \text{g glúcidos}) + 9 \times (\text{g lípidos})$$

Os resultados foram expressos em kcal por 100 g de massa seca.

2.7. Análise estatística

Os ensaios relativos a cada uma das amostras foram feitos em triplicado. Os resultados foram expressos em valores médios \pm desvio padrão (DP). Os resultados de cada processo de secagem foram analisados através da análise de variância (ANOVA) seguida de um teste de Tukey HSD com $\alpha = 0,05$. Este tratamento foi efetuado utilizando o programa SPSS v. 16.0. As diferenças estatísticas obtidas pela ANOVA foram representadas por letras (letras diferentes indicam diferenças significativas entre resultados). As letras foram ordenadas alfabeticamente de acordo com a diminuição dos valores dos resultados (e.g. a letra “a” representa o melhor resultado para a composição fitoquímica em antioxidantes e o pior resultado para os ensaios das propriedades antioxidantes).



Capítulo III

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Propriedades antioxidantes

As plantas, tal como outras amostras de origem natural, são constituídas por uma ampla diversidade química de compostos antioxidantes. Por essa razão, é irrealista separar cada componente antioxidante e estudá-lo individualmente. Além disso, os níveis de um único antioxidante não refletem necessariamente a capacidade antioxidante total, devido às possíveis interações sinérgicas existentes entre os diferentes compostos (Magalhães *et al.*, 2008). Portanto, neste trabalho as propriedades antioxidantes foram avaliadas usando extratos metanólicos obtidos a partir das flores das quatro plantas medicinais arbustivas liofilizadas e secas à sombra.

Atualmente são vários os testes existentes para avaliar a capacidade antioxidante. Contudo, não existe um método universal capaz de avaliar com precisão a capacidade antioxidante de todas as amostras quantitativamente (Wright *et al.*, 2001; Zulueta *et al.*, 2009; Niki, 2010). Neste trabalho, as propriedades antioxidantes foram avaliadas através de ensaios químicos: atividade captadora de radicais DPPH e poder redutor; e bioquímicos: inibição da peroxidação lipídica no sistema β -caroteno linoleato e na presença de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS). Também foram quantificados grupos de compostos fenólicos como fenóis totais, ésteres tartáricos e flavonóis, visto estarem associados às propriedades antioxidantes, principalmente os flavonóis dada a sua estrutura química (Cunha, 2005).

Os resultados da composição em grupos de compostos fenólicos (antioxidantes hidrofílicos) e da atividade antioxidante das espécies Fabaceae estudadas são apresentados na **Tabela 2**. *Pterospartum tridentatum*, submetida a liofilização ou secagem à sombra, demonstrou ser a espécie com maior capacidade antioxidante em todos os métodos realizados (valores de EC_{50} mais baixos), o que está de acordo com os seus níveis mais elevados de fenóis (~500 mg EACl/g extrato).

Tabela 2. Propriedades antioxidantes (valores de EC₅₀) e composição em grupos de compostos fenólicos (antioxidantes hidrofílicos) das flores das plantas arbustivas submetidas a diferentes processos de secagem. Em cada linha, e para cada processo de secagem, letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$); n = 9.

	Liofilização				Secagem à sombra			
	<i>Cytisus multiflorus</i>	<i>Cytisus scoparius</i>	<i>Cytisus striatus</i>	<i>Pterospartum tridentatum</i>	<i>Cytisus multiflorus</i>	<i>Cytisus scoparius</i>	<i>Cytisus striatus</i>	<i>Pterospartum tridentatum</i>
Atividade captadora de radicais DPPH (mg/mL)	0,50 ± 0,02 ^a	0,39 ± 0,00 ^b	0,51 ± 0,04 ^a	0,15 ± 0,01 ^c	1,78 ± 0,01 ^a	1,06 ± 0,05 ^b	1,03 ± 0,02 ^b	0,76 ± 0,03 ^c
Poder redutor (mg/mL)	0,41 ± 0,01 ^a	0,36 ± 0,00 ^c	0,38 ± 0,00 ^b	0,13 ± 0,00 ^d	0,44 ± 0,01 ^b	0,39 ± 0,00 ^c	0,63 ± 0,00 ^a	0,13 ± 0,00 ^d
Inibição da descoloração do β-caroteno (mg/mL)	0,70 ± 0,05 ^a	0,28 ± 0,02 ^c	0,38 ± 0,08 ^b	0,14 ± 0,02 ^d	1,68 ± 0,02 ^a	0,47 ± 0,09 ^c	1,05 ± 0,12 ^b	0,13 ± 0,01 ^d
Inibição de TBARS (mg/mL)	0,18 ± 0,04 ^a	0,13 ± 0,05 ^a	0,16 ± 0,01 ^a	0,12 ± 0,02 ^a	0,41 ± 0,01 ^a	0,34 ± 0,01 ^{ba}	0,42 ± 0,09 ^a	0,13 ± 0,04 ^b
Fenóis (mg EACL/g extrato)	313,87 ± 36,27 ^c	427,10 ± 60,55 ^b	389,04 ± 9,29 ^b	523,42 ± 36,09 ^a	198,88 ± 26,31 ^c	282,73 ± 25,14 ^c	232,92 ± 9,16 ^b	519,81 ± 40,24 ^a
Esteres tartáricos (mg EAC/g extrato)	60,08 ± 7,26 ^{ba}	50,03 ± 7,76 ^c	70,45 ± 4,61 ^a	65,18 ± 7,07 ^b	48,76 ± 6,48 ^b	55,11 ± 5,48 ^b	41,54 ± 3,79 ^b	89,41 ± 8,97 ^a
Flavonóis (mg EQ/g extrato)	72,64 ± 7,08 ^b	45,55 ± 7,36 ^d	86,98 ± 4,24 ^a	58,12 ± 5,78 ^c	67,84 ± 5,48 ^{ba}	47,35 ± 3,56 ^c	57,62 ± 2,27 ^{bc}	85,58 ± 5,60 ^a

EACL – Equivalentes de ácido clorogénico; EAC – Equivalentes de ácido caféico; EQ – Equivalentes de quercetina.

Para além dos grupos de compostos fenólicos (flavonóis e ésteres tartáricos) quantificados neste trabalho, *Pterospartum tridentatum* foi já identificada como sendo uma fonte de isoflavonas, como a 5,5'-di-hidroxi-3'-metoxi-isoflavona-7-O-glucósido, prunetina (5,4'-di-hidroxi-7-metoxi-isoflavona), genistina (5,4'-di-hidroxi-isoflavona-7-O-β-glucósido) e sissotrina (5-hidroxi-4'-metoxi-isoflavona-7-O-β-glucósido) (**Figura 20**); e de isoquercitrina (5,7,3',4'-tetra-hidroxi-flavonol-3-O-β-glucósido) um flavonol glucósido com propriedades antioxidantes, com capacidade de prevenir ou reduzir o desenvolvimento de complicações vasculares diabéticas (Vítor *et al.*, 2004).

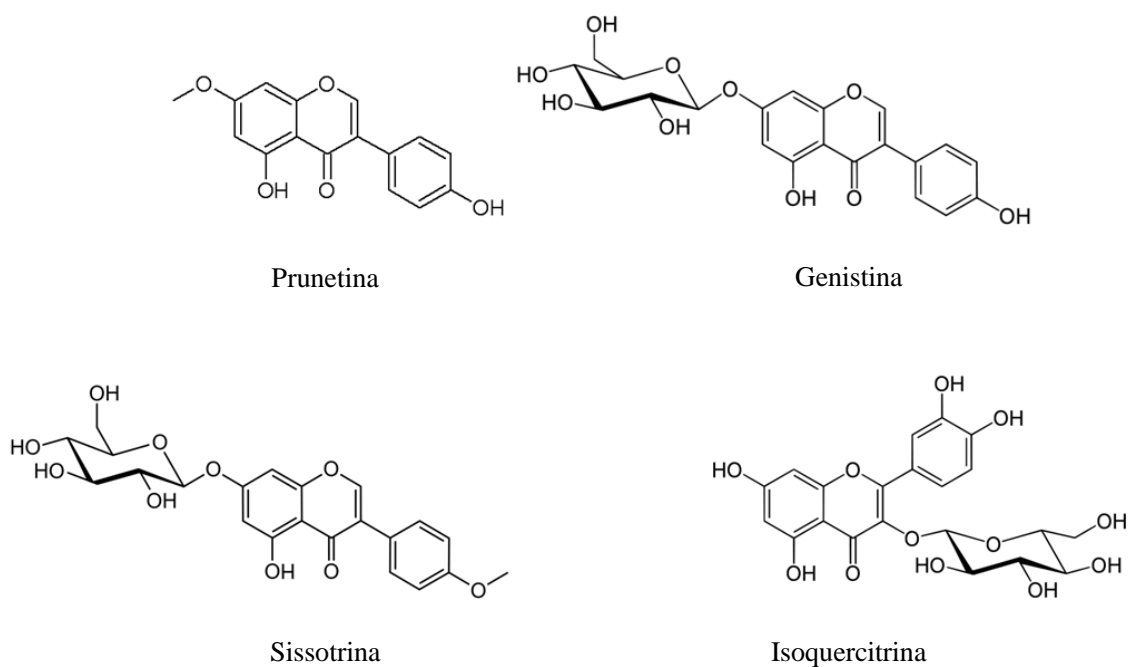


Figura 20. Estrutura química de compostos fenólicos anteriormente identificados em *Pterospartum tridentatum*.

Curiosamente, *Pterospartum tridentatum* foi a única espécie a apresentar resultados similares para a atividade antioxidante (exceto para o ensaio do DPPH) após liofilização ou secagem à sombra. *Cytisus striatus* liofilizada e *Pterospartum tridentatum* seca à sombra revelaram os níveis mais elevados de flavonóis e ésteres tartáricos, respetivamente. De uma forma geral, a secagem à sombra pareceu diminuir significativamente a capacidade antioxidante, aumentando os valores correspondentes de EC₅₀, e também diminuir o teor em compostos fenólicos.

Cytisus scoparius demonstrou também uma elevada capacidade antioxidante, mais acentuada nas amostras liofilizadas, no entanto significativamente inferior à

apresentada por *Pterospartum tridentatum*. *Cytisus scoparius* foi já descrita como contendo flavonas (6''-*O*-acetil-scoparina), flavonóis (kaempferol, rutina, quercetina, quercitrina e isoramnetina) e isoflavonas (genisteína e sarotannosídeo) (Brum-Bousquet *et al.*, 1981; Viscardi *et al.*, 1984; Raja *et al.*, 2007; Hanganu *et al.*, 2010a,b).

De um modo geral, *Cytisus multiflorus* destacou-se com uma capacidade antioxidante inferior (valores elevados de EC₅₀) e com os níveis mais baixos de fenóis (~314 mg EACl/g extrato para as flores liofilizadas e ~199 mg EACl/g extrato para as flores secas à sombra). Recentemente, nas flores desta planta medicinal foram identificadas flavonas, incluindo derivados de crisina, orientina, derivados de luteolina e apigenina, e flavonóis como o kaempferol e a quercetina (**Figura 21**) (Barros *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2012). Foram também detetadas flavonas que comumente não são encontradas na família Fabaceae (Pereira *et al.*, 2012).

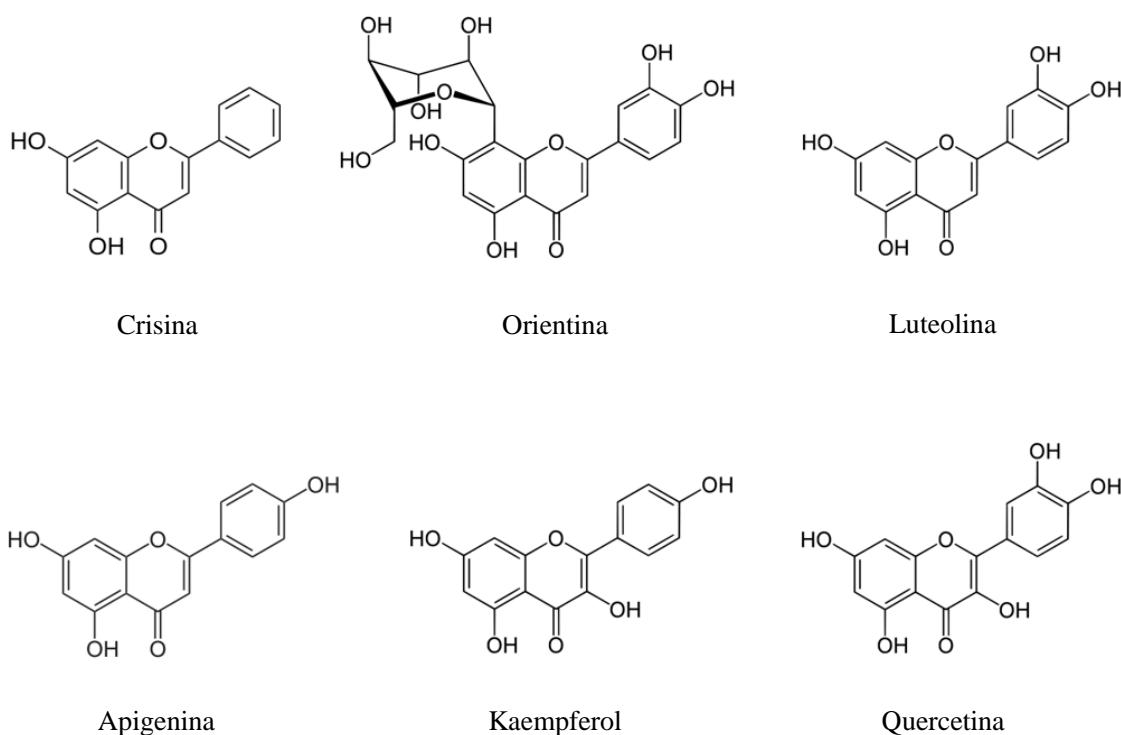


Figura 21. Estrutura química de flavonas e flavonóis recentemente identificados em *Cytisus multiflorus*.

O ensaio da inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) apresentou, de uma forma geral, os menores valores de EC₅₀, principalmente no grupo das plantas submetidas a liofilização. Contudo, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os valores das plantas

liofilizadas; apenas *Pterospartum tridentatum* se destacou com maior capacidade antioxidante no grupo das plantas secas à sombra.

Entre as quatro espécies estudadas, apenas *Cytisus scoparius* foi referida com capacidade de proteger o fígado dos efeitos adversos do stresse oxidativo induzido por CCl₄ (tetracloreto de carbono) em ratos (Raja *et al.*, 2007), não havendo mais evidências disponíveis sobre o potencial antioxidante das quatro espécies. Assim, para além da novidade dos resultados, os efeitos antioxidantes aqui descritos para as quatro espécies Fabaceae apoiam as recomendações locais destas plantas. Mais ainda, considerando o envolvimento do stresse oxidativo nos processos inflamatórios, os presentes resultados poderão explicar o uso empírico destas espécies como anti-inflamatórios (**Tabela 1**).

3.2. Composição fitoquímica

Atualmente existe um grande interesse no estudo de compostos antioxidantes devido, principalmente, às descobertas dos efeitos dos radicais livres e outras espécies reativas no organismo. Neste estudo, para além dos grupos de compostos fenólicos, foram quantificados outros antioxidantes hidrofílicos, tal como o ácido ascórbico e os açúcares (mono e dissacarídeos) e os resultados são apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Composição em antioxidantes hidrofílicos (vitamina C e açúcares) das flores das plantas arbustivas submetidas a diferentes processos de secagem. Os resultados são expressos em mg/100 g de massa seca. Em cada linha, e para cada processo de secagem, letras diferentes representam diferenças significativas entre os resultados ($p < 0,05$); $n = 9$.

	Liofilização				Secagem à sombra			
	<i>Cytisus multiflorus</i>	<i>Cytisus scoparius</i>	<i>Cytisus striatus</i>	<i>Pterospartum tridentatum</i>	<i>Cytisus multiflorus</i>	<i>Cytisus scoparius</i>	<i>Cytisus striatus</i>	<i>Pterospartum tridentatum</i>
Vitamina C	0,05 ± 0,00 ^d	0,25 ± 0,01 ^a	0,13 ± 0,01 ^b	0,08 ± 0,01 ^c	0,04 ± 0,00 ^b	0,23 ± 0,00 ^a	0,05 ± 0,00 ^b	0,03 ± 0,00 ^b
Frutose	4,03 ± 0,27 ^c	10,04 ± 1,02 ^a	8,07 ± 0,35 ^b	3,49 ± 0,11 ^c	3,81 ± 0,51 ^{ba}	3,86 ± 0,90 ^{ba}	4,94 ± 0,51 ^a	2,58 ± 0,63 ^b
Glucose	4,86 ± 0,28 ^b	6,06 ± 1,06 ^b	9,36 ± 0,20 ^a	1,19 ± 0,05 ^c	1,45 ± 0,29 ^{ba}	1,89 ± 0,30 ^a	1,64 ± 0,15 ^a	0,84 ± 0,16 ^b
Sacarose	1,27 ± 0,23 ^a	1,27 ± 0,06 ^a	1,24 ± 0,25 ^a	0,58 ± 0,03 ^b	1,10 ± 0,34 ^b	3,45 ± 0,71 ^a	2,96 ± 0,29 ^a	1,54 ± 0,25 ^b
Trealose	0,27 ± 0,09 ^a	0,35 ± 0,01 ^a	nd	nd	0,17 ± 0,04 ^b	0,27 ± 0,04 ^a	nd	nd
Açúcares totais	10,43 ± 0,15 ^b	17,72 ± 2,15 ^a	18,67 ± 0,79 ^a	5,27 ± 0,09 ^c	6,53 ± 0,53 ^{ba}	9,47 ± 1,95 ^a	9,54 ± 0,95 ^a	4,96 ± 1,04 ^b

nd – não detetado

As flores de *Cytisus scoparius* e *Cytisus striatus* liofilizadas e secas à sombra revelaram a maior concentração de ácido ascórbico (~0,2 g/100 g de massa seca) e de açúcares totais (~19 e 10 g/100 g de massa seca), respetivamente. Detetou-se frutose, glucose e sacarose em todas as espécies estudadas, no entanto não se detetou trealose em *Cytisus striatus* e *Pterospartum tridentatum*. As amostras secas à sombra revelaram um teor em ácido ascórbico um pouco mais baixo e uma concentração significativamente inferior em açúcares relativamente às amostras liofilizadas. Este efeito pode ser observado na **Figura 22** para o exemplo de *Cytisus multiflorus*.

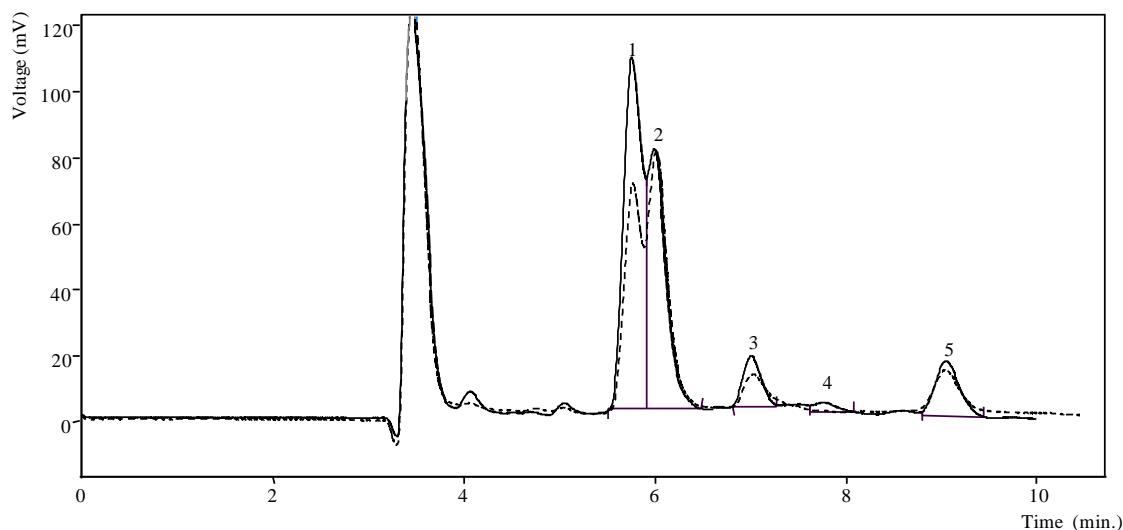


Figura 22. Perfil em açúcares de *Cytisus multiflorus* liofilizada (—) e *Cytisus multiflorus* seca à sombra (- - -). 1- Frutose; 2-glucose; 3-sacarose; 4-trealose e 5-melezitose (PI).

Nas flores das quatro plantas arbustivas em estudo também foram quantificados antioxidantes lipofílicos, incluindo tocoferóis, carotenoides e clorofilas e os resultados são apresentados na **Tabela 4**. Foram detetadas as quatro isoformas dos tocoferóis, sendo o α -tocoferol o composto maioritário em todas as espécies. *Cytisus striatus* (~23 mg/100 g de massa seca) e *Cytisus scoparius* (~12 mg/100 g de massa seca) apresentaram o maior teor de tocoferóis nas amostras liofilizadas e secas à sombra, respetivamente. As amostras de *Cytisus scoparius* exibiram também os níveis mais elevados de licopeno e a amostra seca à sombra revelou o maior teor em clorofilas. Entre as amostras liofilizadas, os níveis mais elevados de clorofila a e b foram encontrados em *Pterospartum tridentatum* e *Cytisus striatus*, respetivamente.

Tabela 4. Composição em antioxidantes lipofílicos (tocoferóis, carotenoides e clorofilas) das flores das plantas arbustivas submetidas a diferentes processos de secagem. Os resultados são expressos em mg/100 g de massa seca. Em cada linha, e para cada processo de secagem, letras diferentes representam diferenças significativas entre os resultados ($p < 0.05$); $n = 9$.

	Liofilização				Secagem à sombra			
	<i>Cytisus multiflorus</i>	<i>Cytisus scoparius</i>	<i>Cytisus striatus</i>	<i>Pterospartum tridentatum</i>	<i>Cytisus multiflorus</i>	<i>Cytisus scoparius</i>	<i>Cytisus striatus</i>	<i>Pterospartum tridentatum</i>
α-tocoferol	0,75 ± 0,04 ^c	10,71 ± 0,87 ^b	19,97 ± 1,20 ^a	9,13 ± 0,49 ^b	1,08 ± 0,01 ^c	11,65 ± 0,34 ^a	9,88 ± 0,64 ^b	0,70 ± 0,02 ^c
β-tocoferol	0,02 ± 0,01 ^d	0,21 ± 0,02 ^c	0,48 ± 0,04 ^a	0,14 ± 0,01 ^d	0,04 ± 0,01 ^d	0,37 ± 0,02 ^a	0,20 ± 0,02 ^b	0,13 ± 0,01 ^c
γ-tocoferol	0,26 ± 0,02 ^c	0,42 ± 0,04 ^b	2,12 ± 0,08 ^a	0,27 ± 0,02 ^c	0,35 ± 0,00 ^b	0,32 ± 0,03 ^b	0,76 ± 0,05 ^a	0,05 ± 0,01 ^c
δ-tocoferol	0,05 ± 0,01 ^d	0,32 ± 0,01 ^b	0,57 ± 0,02 ^a	0,10 ± 0,01 ^c	nd	0,12 ± 0,01 ^a	nd	nd
Tocoferóis totais	1,08 ± 0,07 ^c	11,66 ± 0,94 ^b	23,14 ± 1,29 ^a	9,64 ± 0,51 ^b	1,47 ± 0,01 ^c	12,46 ± 0,37 ^a	10,84 ± 0,70 ^b	0,88 ± 0,03 ^c
β-caroteno	0,16 ± 0,03 ^c	1,56 ± 0,04 ^b	1,55 ± 0,09 ^b	2,05 ± 0,07 ^a	0,21 ± 0,00 ^d	1,82 ± 0,05 ^b	2,15 ± 0,04 ^a	0,92 ± 0,02 ^c
Licopeno	0,04 ± 0,00 ^c	0,38 ± 0,03 ^a	0,24 ± 0,03 ^b	nd	0,03 ± 0,00 ^b	0,16 ± 0,05 ^a	nd	nd
Clorofila a	0,65 ± 0,05 ^d	1,00 ± 0,04 ^c	1,09 ± 0,01 ^b	1,20 ± 0,12 ^a	0,37 ± 0,00 ^c	0,82 ± 0,04 ^a	0,65 ± 0,09 ^b	0,19 ± 0,02 ^d
Clorofila b	0,27 ± 0,01 ^d	0,48 ± 0,04 ^b	0,70 ± 0,10 ^a	0,38 ± 0,07 ^c	0,15 ± 0,01 ^c	0,35 ± 0,04 ^a	0,18 ± 0,02 ^b	0,03 ± 0,00 ^d

nd – não detetado

O processo de secagem à sombra diminuiu significativamente o teor em tocoferóis em *Cytisus striatus* e *Pterospartum tridentatum* tal como pode ser observado na **Figura 23** para a primeira espécie. Particularmente, não foi detetado δ -tocoferol em três das quatro amostras analisadas secas à sombra. Este processo também reduziu os níveis de clorofilas e licopeno. Pelo contrário, a secagem à sombra pareceu preservar melhor o β -caroteno do que o processo de liofilização, exceto para *Pterospartum tridentatum*.

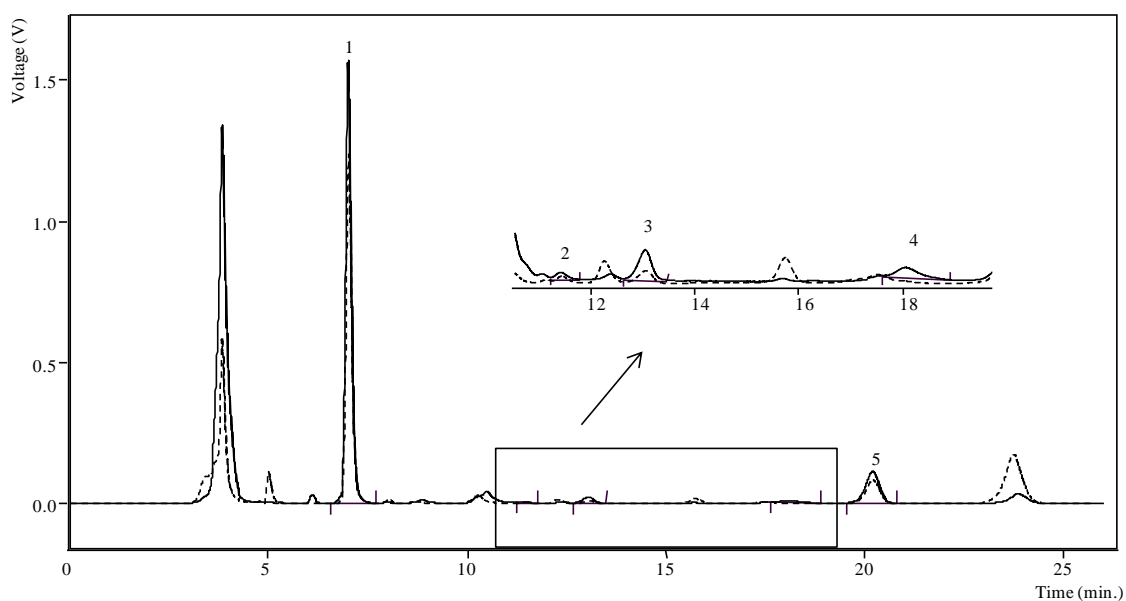


Figura 23. Perfil em tocoferóis de *Cytisus striatus* liofilizada (—) e *Cytisus striatus* seca à sombra (- - -). 1- α -tocoferol; 2- β -tocoferol; 3- γ - tocoferol; 4- δ -tocoferol e 5-tocol (PI).

Entre os pigmentos estudados, os carotenoides encontram-se entre os mais difundidos na natureza e têm recebido uma atenção considerável devido aos seus papéis enquanto provitamina A e antioxidantes. O sistema de extensas ligações duplas dos carotenoides torna-os suscetíveis ao ataque de radicais peróxido (LOO^{\bullet}), os quais são formados a partir dos lípidos e muito nocivos para as células, resultando na formação de produtos inativos (Rao & Rao, 2007). As clorofilas e os seus derivados são conhecidos por possuírem atividade antioxidante, estando associadas ao risco reduzido de desenvolvimento de doenças induzidas por radicais livres, tal como certos tipos de cancro. Nos animais, as clorofilas inibem a peroxidação lipídica e protegem a mitocôndria de danos induzidos por vários radicais livres (Lanfer-Marquez *et al.*, 2005). Portanto, estes pigmentos desempenham um importante papel enquanto antioxidantes.

Porém, as moléculas mais importantes no combate ao stresse oxidativo são os tocoferóis (vitamina E) e o ácido ascórbico (vitamina C) (Babior *et al.*, 1997). Estas duas vitaminas são nutrientes antioxidantes de elevada importância para a saúde, capazes de inativar radicais livres nocivos produzidos através da atividade normal da célula ou através de agentes indutores de stresse (Chew, 1995). Através de uma interação sinérgica na interface membrana-citosol, a vitamina C tem a capacidade de regenerar a vitamina E oxidada através da cedência de um átomo de hidrogénio (Babior *et al.*, 1997; Halliwell, 1999). Tais interações entre estes antioxidantes são muito importantes para a proteção celular, uma vez que a concentração de cada antioxidante isoladamente pode não ser adequada para proteger efetivamente as células da peroxidação lipídica (Chew, 1995; Nagaoka *et al.*, 2007). A presença de ambas as vitaminas poderá explicar as utilizações empíricas destas espécies em doenças relacionadas com o stresse oxidativo (**Tabela 1**).

Os resultados da composição em ácidos gordos, ácidos gordos saturados (SFA), ácidos gordos monoinsaturados (MUFA), ácidos gordos polinsaturados (PUFA) e as razões PUFA/SFA e *n-6/n-3* das flores das espécies Fabaceae estudadas são apresentados na **Tabela 5**. O processo de secagem não teve influência no perfil dos ácidos gordos. O ácido α -linolénico (C18:3n3) foi o ácido gordo maioritário em todas as amostras estudadas, seguido pelo ácido palmítico (C16:0) e linoleico (C18:2n6). Além destes três ácidos gordos, foram identificados e quantificados mais vinte e dois, sendo os SFA predominantes em *Cytisus multiflorus* e os PUFA predominantes nas outras três espécies. Quer as amostras liofilizadas quer as amostras secas à sombra resultaram em razões PUFA/SFA superiores a 0,45 e razões ácidos gordos *n-6/n-3* inferiores a 4,0 conforme recomendado para uma "boa qualidade nutricional", incluindo efeitos benéficos à saúde (Guil *et al.*, 1996).

Os ácidos gordos *n-3* (e.g. ácido α -linolénico) e *n-6* (e.g. ácido linoleico) estão relacionados com a redução do risco de várias doenças inflamatórias e cardíacas, hipertensão, e certos tipos de cancro (Connor, 2000; Terry *et al.*, 2004; Djousse *et al.*, 2005). Mais ainda, estes ácidos gordos são precursores na biossíntese de eicosanoides envolvidos em diversas funções metabólicas (Zubay, 2006). Uma alimentação deficiente em ácidos gordos essenciais pode conduzir a vários problemas de saúde (Burtis & Ashwood, 1996). Nessa perspetiva, as plantas estudadas poderão ser utilizadas como fonte de ácido α -linolénico e linoleico, precursores de *n-3* e *n-6*, muitas vezes relacionados com o aumento do c-HDL e diminuição do c-LDL (Connor, 2000).

Tabela 5. Composição em ácidos gordos (percentagem relativa) das flores das plantas arbustivas submetidas a diferentes processos de secagem. Em cada linha, e para cada processo de secagem, letras diferentes representam diferenças significativas entre os resultados ($p < 0,05$); $n = 9$.

	Liofilização				Secagem à sombra			
	<i>Cytisus multiflorus</i>	<i>Cytisus scoparius</i>	<i>Cytisus striatus</i>	<i>Pterospartum tridentatum</i>	<i>Cytisus multiflorus</i>	<i>Cytisus scoparius</i>	<i>Cytisus striatus</i>	<i>Pterospartum tridentatum</i>
C6:0	0,66 ± 0,08	0,04 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,35 ± 0,06	0,20 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,25 ± 0,08
C8:0	0,08 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,65 ± 0,13	0,06 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,13 ± 0,01
C10:0	0,04 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,28 ± 0,07	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,22 ± 0,00
C12:0	0,37 ± 0,01	0,72 ± 0,01	0,86 ± 0,03	3,08 ± 0,20	0,37 ± 0,02	0,97 ± 0,07	0,97 ± 0,01	2,83 ± 0,01
C13:0	0,05 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,05 ± 0,00
C14:0	0,54 ± 0,04	2,24 ± 0,02	2,44 ± 0,09	2,30 ± 0,01	0,54 ± 0,03	2,55 ± 0,13	2,86 ± 0,00	2,56 ± 0,04
C14:1	0,15 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,03	0,08 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,10 ± 0,00	0,25 ± 0,01	0,06 ± 0,00
C15:0	0,24 ± 0,01	0,09 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,19 ± 0,00	0,20 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,22 ± 0,01
C16:0	17,09 ± 0,07	18,51 ± 0,10	22,53 ± 0,78	14,84 ± 0,83	13,01 ± 0,06	18,33 ± 0,22	20,15 ± 0,09	15,23 ± 0,22
C16:1	0,59 ± 0,13	0,12 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,34 ± 0,07	0,30 ± 0,02	0,04 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,51 ± 0,02
C17:0	0,56 ± 0,02	0,26 ± 0,00	0,29 ± 0,01	0,42 ± 0,02	0,54 ± 0,02	0,29 ± 0,01	0,35 ± 0,00	0,47 ± 0,03
C18:0	7,96 ± 0,82	4,19 ± 0,01	4,59 ± 0,05	3,97 ± 0,16	7,21 ± 0,12	4,89 ± 0,07	4,82 ± 0,03	5,71 ± 0,03
C18:1n9	7,96 ± 0,01	8,01 ± 0,05	4,40 ± 0,22	9,22 ± 1,09	7,26 ± 0,12	7,11 ± 0,01	4,46 ± 0,06	9,44 ± 0,17
C18:2n6	18,00 ± 0,03	12,82 ± 0,10	11,06 ± 0,08	19,59 ± 0,67	16,93 ± 0,32	10,49 ± 0,13	10,19 ± 0,25	18,00 ± 0,06
C18:3n6	nd	0,09 ± 0,00	0,04 ± 0,01	nd	nd	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,00	nd

C18:3n3	18,97 ± 0,43	41,40 ± 0,62	40,68 ± 0,08	29,50 ± 1,98	22,76 ± 0,33	39,79 ± 0,51	39,89 ± 0,64	27,98 ± 0,81
C20:0	5,56 ± 0,03	0,77 ± 0,03	1,69 ± 0,06	4,87 ± 0,03	5,74 ± 0,16	1,00 ± 0,01	1,91 ± 0,18	4,63 ± 0,23
C20:1	0,49 ± 0,04	0,27 ± 0,01	0,17 ± 0,00	0,34 ± 0,02	0,39 ± 0,02	0,29 ± 0,03	0,26 ± 0,01	0,46 ± 0,02
C20:2	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,00	0,11 ± 0,01	0,21 ± 0,07	0,33 ± 0,06	0,05 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,12 ± 0,03
C20:3n3+C21:0	0,45 ± 0,05	0,19 ± 0,00	0,22 ± 0,01	0,23 ± 0,03	0,54 ± 0,07	0,27 ± 0,04	0,35 ± 0,02	0,22 ± 0,02
C20:5n3	0,21 ± 0,04	0,05 ± 0,00	0,10 ± 0,01	nd	0,14 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,01	nd
C22:0	2,92 ± 0,07	1,26 ± 0,00	1,45 ± 0,04	2,26 ± 0,01	3,16 ± 0,02	1,45 ± 0,01	1,66 ± 0,05	2,82 ± 0,02
C23:0	14,35 ± 0,25	7,21 ± 0,51	7,35 ± 0,59	5,06 ± 0,50	16,56 ± 0,85	10,21 ± 0,18	9,83 ± 0,13	4,75 ± 0,17
C22:6n3	0,12 ± 0,02	0,04 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,11 ± 0,03	0,14 ± 0,05	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,86 ± 0,08
C24:0	2,53 ± 0,07	1,46 ± 0,07	1,49 ± 0,14	2,06 ± 0,09	3,42 ± 0,08	1,85 ± 0,04	1,58 ± 0,06	2,47 ± 0,24
SFA totais	52,95 ± 0,44 ^a	36,83 ± 0,80 ^d	42,96 ± 0,16 ^b	40,38 ± 1,54 ^c	51,08 ± 0,85 ^a	41,75 ± 0,64 ^c	44,39 ± 0,34 ^b	42,35 ± 0,89 ^c
MUFA totais	9,18 ± 0,12 ^b ^a	8,49 ± 0,09 ^b	4,78 ± 0,19 ^c	9,98 ± 1,18 ^a	8,08 ± 0,15 ^b	7,53 ± 0,04 ^c	5,03 ± 0,07 ^d	10,47 ± 0,17 ^a
PUFA totais	37,86 ± 0,56 ^c	54,69 ± 0,71 ^a	52,27 ± 0,03 ^{ba}	49,64 ± 2,72 ^b	40,84 ± 0,70 ^c	50,72 ± 0,69 ^a	50,58 ± 0,41 ^a	47,18 ± 0,72 ^b
PUFA/SFA	0,72 ± 0,02 ^c	1,49 ± 0,05 ^a	1,22 ± 0,00 ^b	1,23 ± 0,11 ^b	0,80 ± 0,03 ^c	1,22 ± 0,04 ^a	1,14 ± 0,02 ^b	1,11 ± 0,04 ^b
n-6/n-3	0,92 ± 0,02 ^a	0,31 ± 0,00 ^c	0,27 ± 0,00 ^d	0,66 ± 0,02 ^b	0,72 ± 0,00 ^a	0,26 ± 0,00 ^c	0,25 ± 0,01 ^c	0,62 ± 0,02 ^b

Ácido caproico (C6:0); Ácido caprílico (C8:0); Ácido cáprico (C10:0); Ácido láurico (C12:0); Ácido mirístico (C14:0); Ácido miristoleico (C14:1); Ácido pentadecanoico (C15:0); Ácido palmítico (C16:0); Ácido palmitoleico (C16:1); Ácido heptadecanoico (C17:0); Ácido esteárico (C18:0); Ácido oleico (C18:1n9c); Ácido linoleico (C18:2n6c); Ácido γ -linolénico (C18:3n6); Ácido α -linolénico (C18:3n3); Ácido araquídico (C20:0); Ácido eicosenoico (C20:1c); Ácido *cis*-11,14-eicosadienoico (C20:2c); Ácido *cis*-11,14,17-eicosatrienoico e ácido heneicosanoico (C20:3n3 + C21:0); Ácido *cis*-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (C20:5n3); Ácido beénico (C22:0); Ácido tricosanoico (C23:0); ácido docosahexaenoico (C22:6n3); Ácido lignocérico (C24:0). SFA – Ácidos gordos saturados; MUFA – Ácidos gordos monoinsaturados; PUFA – Ácidos gordos polinsaturados; nd – não detetado.

O efeito hipocolesterolémico e a atividade antioxidante do ácido linolénico têm sido extensivamente estudados (Dhar *et al.*, 1999; Mukherjee *et al.*, 2002; Saha *et al.*, 2012). Alguns autores demonstraram que o ácido linoleico, o ácido linoleico conjugado e o éster metílico do ácido linoleico têm atividade antioxidante, podendo explicar os seus efeitos anticarcinogénico e antiaterogénico. Este ácido gordo e os seus isómeros combatem o stresse oxidativo reduzindo a peroxidação lipídica e aumentando os níveis de antioxidantes enzimáticos (Saha & Ghosh, 2009, 2010, 2011). No entanto, são necessários mais estudos para demonstrar a sua atividade captadora de radicais livres em diferentes sistemas de radicais e em condições fisiológicas, e para determinar se existe qualquer ligação entre as suas propriedades captadoras de radicais e os seus efeitos biológicos (Fagali & Catalá, 2008).

Relativamente a *Cytisus multiflorus*, uma investigação anterior realizada por Barros *et al.* (2011) já havia avaliado a sua composição fitoquímica e a atividade antioxidante utilizando material vegetal recolhido em Maio de 2009, nos mesmos locais. Foram realizados ensaios *in vitro*, baseados em métodos químicos, bioquímicos e eletroquímicos e os resultados obtidos para os fitoquímicos antioxidantes, tais como compostos fenólicos, flavonoides, ácido ascórbico e tocoferóis apresentaram melhor performance nas amostras frescas liofilizadas de 2009 do que nas de 2010, também amostras frescas liofilizadas. Esta discrepância poderá ser explicada por uma pequena diferença no desenvolvimento da flor (e.g. flores não fertilizadas *versus* flores fertilizadas já incluindo vagens e primórdios de sementes) e pela variação anual das condições climáticas que afetam as fases fenológicas de cada espécie.

3.3. Valor energético

Uma vez que as espécies estudadas são, por vezes, utilizadas como condimento e na preparação de infusões e decocções medicinais (**Tabela 1**), o seu valor energético também foi avaliado, determinando os teores de proteínas, lípidos e glúcidos, e os resultados são apresentados na **Tabela 6**.

Tabela 6. Valor energético (Kcal/100 g de massa seca) das flores das plantas arbustivas submetidas a diferentes processos de secagem. Os resultados são expressos em g/100 g de massa fresca para a humidade e em g/100 g de massa seca para os restantes nutrientes. Em cada coluna, e para cada processo de secagem, letras diferentes representam diferenças significativas entre os resultados ($p < 0,05$); $n = 9$.

	Humidade	Cinzas	Proteínas	Lípidos	Glúcidos	Energia	
Liofilização	<i>Cytisus multiflorus</i>	73,33 ± 0,34	4,57 ± 0,14 ^b	17,36 ± 0,39 ^c	1,03 ± 0,14 ^c	77,04 ± 0,11 ^b	386,85 ± 2,68 ^c
	<i>Cytisus scoparius</i>	78,18 ± 0,65	4,58 ± 0,20 ^b	22,12 ± 0,11 ^a	4,17 ± 0,33 ^a	69,13 ± 0,09 ^d	402,53 ± 1,71 ^{ba}
	<i>Cytisus striatus</i>	79,85 ± 1,08	5,12 ± 0,06 ^a	21,04 ± 0,79 ^b	3,29 ± 0,57 ^{ba}	70,55 ± 0,34 ^c	395,95 ± 2,19 ^b
	<i>Pterospartum tridentatum</i>	60,80 ± 0,16	2,36 ± 0,00 ^c	15,92 ± 0,60 ^d	2,69 ± 0,51 ^b	79,03 ± 0,74 ^a	404,01 ± 4,05 ^a
Secagem à sombra	<i>Cytisus multiflorus</i>	74,69 ± 2,19	4,42 ± 0,03 ^a	21,31 ± 0,58 ^b	1,29 ± 0,16 ^b	72,98 ± 0,49 ^c	388,77 ± 0,63 ^b
	<i>Cytisus scoparius</i>	79,05 ± 0,50	4,08 ± 0,00 ^b	22,80 ± 0,10 ^a	2,56 ± 0,21 ^a	70,56 ± 0,10 ^d	396,46 ± 0,73 ^a
	<i>Cytisus striatus</i>	80,15 ± 0,21	4,36 ± 0,28 ^{ba}	13,96 ± 0,09 ^d	2,79 ± 0,72 ^a	78,89 ± 0,31 ^a	396,51 ± 3,35 ^a
	<i>Pterospartum tridentatum</i>	60,90 ± 0,17	2,72 ± 0,11 ^c	18,99 ± 0,38 ^c	1,40 ± 0,28 ^b	76,89 ± 0,53 ^b	396,10 ± 0,66 ^a

A humidade foi similar nas amostras submetidas aos dois processos de secagem, o que demonstra que ambos são eficientes na remoção da água. Os glúcidos foram macronutrientes abundantes e os níveis mais elevados foram encontrados em *Pterospartum tridentatum* liofilizada e em *Cytisus striatus* seca à sombra (~79 g/100 g de massa seca). Esta última espécie revelou o maior teor em cinzas, enquanto *Cytisus scoparius* apresentou o maior teor em proteínas (~22 ou 23 g/100 g de massa seca para as amostras liofilizadas e secas à sombra, respetivamente), valores semelhantes aos descritos por outros autores: 18,9 g/100 g de massa seca numa amostra do Reino Unido (Tolera *et al.*, 1997) e 21,6 g/100 g de massa seca numa amostra de Espanha (Ammar *et al.*, 2004). Os níveis mais elevados de lípidos foram encontrados em *Cytisus scoparius* e *Cytisus striatus* sem diferença estatisticamente significativa (~3 ou 4 g/100 g de massa seca). Em geral, os níveis de lípidos diminuíram nas amostras secas à sombra. No entanto, o processo de secagem não teve influência significativa na contribuição energética (valores que variaram entre 386 e 404 kcal/100 g de massa seca).



Capítulo IV

IV. CONCLUSÕES

Com a realização deste trabalho pretendeu-se avaliar os efeitos do processo de secagem (tradicional *versus* liofilização) no potencial antioxidante e na composição fitoquímica de flores de *Cytisus multiflorus* (L'Hér.) Sweet (giesta branca), *Cytisus scoparius* (L.) Link (giesta negral), *Cytisus striatus* (Hill) Rothm. (giesta amarela) e *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk (carqueja). Estas quatro espécies foram selecionadas com base no conhecimento empírico das populações locais, muitas vezes consagrado pelo uso contínuo, a ser testado e validado com bases científicas. Os estudos de carácter farmacológico e fitoquímico, baseados neste tipo de conhecimentos fornecem, muitas vezes, informações de grande importância, além de proporcionarem uma economia de tempo e dinheiro (Amorozo, 1996).

As propriedades antioxidantes foram avaliadas por métodos bioquímicos (inibição da descoloração do β -caroteno na presença de radicais livres derivados do ácido linoleico e inibição da formação de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) em homogeneizados cerebrais) e métodos químicos (determinação do poder redutor e da capacidade captadora de radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH)). A análise da composição fitoquímica incluiu a determinação de antioxidantes hidrofílicos (ácido ascórbico, fenóis incluindo flavonóis e ésteres tartáricos e açúcares) e lipofílicos (carotenoides incluindo β -caroteno e licopeno, clorofilas, tocoferóis e ácidos gordos). O valor energético das amostras foi calculado com base nos níveis totais de lípidos, proteínas e glúcidos, segundo métodos oficiais de análise.

Verificou-se que a secagem à sombra diminuiu significativamente a capacidade antioxidante e o teor em compostos fenólicos. A amostra liofilizada de *Pterospartum tridentatum* apresentou a maior atividade antioxidante (valores de $EC_{50} \leq 0,15$ mg/mL), o que está de acordo com os seus níveis mais elevados de fenóis (~520 mg EACI/g extrato). As amostras liofilizadas demonstraram sempre maior bioatividade e maiores concentrações de antioxidantes hidrofílicos (fenóis, ácido ascórbico e açúcares) e lipofílicos (tocoferóis, clorofilas e licopeno). No entanto, o processo de secagem não teve influência significativa na contribuição energética (valores que variaram entre 386 e 404 kcal/100 g de massa seca).

Tendo em conta a informação disponível na literatura, esta é a primeira caracterização detalhada dos antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos das flores destas

espécies de Genisteae, após liofilização e secagem à sombra. Os resultados obtidos dão suporte técnico e científico aos usos tradicionais destas plantas na medicina popular como anti-inflamatórios, destacando-as como fonte de compostos bioativos que podem ser incorporados em bebidas, alimentos funcionais ou outras formulações com potencial anti-inflamatório e propriedades relacionadas com o stresse oxidativo, com consequentes benefícios para a saúde dos consumidores. Além disso, o processo de secagem a ser utilizado em aplicações industriais é de extrema importância, pois o controlo do processamento das plantas representa uma prioridade, de forma a evitar contaminações, adulterações e garantir uma boa qualidade dos produtos à base de plantas. Uma vez que a liofilização mostrou preservar de uma forma mais eficaz as qualidades das plantas medicinais em estudo, este processo de secagem poderá ser aplicado a plantas medicinais para utilizações na indústria cosmética ou farmacêutica.

Este trabalho entrelaça o saber empírico com o conhecimento científico, contribuindo assim para a divulgação destas espécies localmente utilizadas para fins medicinais e estimulando a reflexão em torno de uma estratégia que vise a gestão, conservação e utilização destes recursos naturais locais numa perspetiva de desenvolvimento sustentável. Mais ainda, é de salientar a importância do estudo do conhecimento e uso tradicional das plantas medicinais, pois os usos populares podem ser otimizados através do desenvolvimento de preparados farmacêuticos de baixo custo e ser empregues em processos de desenvolvimento tecnológico (Pereira, 2011).



Capítulo V

V. BIBLIOGRAFIA

- Abascal, K., Ganora, L., Yarnell, E. (2005). The effect of freeze drying and its implications for botanical medicines: a review. *Phytother. Res.*, 19, 655-660.
- Abidi, S.L. (2000). Chromatographic analysis of tocol-derived lipid antioxidants. Review. *Journal of Chromatography A*, 881, 197-216.
- Abidi, S.L., Thiam, S., Warner, I.M. (2002). Elution behavior of unsaponifiable lipids with various capillary electrochromatographic stationary phases. *Journal of Chromatography A*, 949, 195-207.
- Acworth, I.N., McCabe, D.R., Maher, T.J. (1997). The analysis of free radicals, their reaction products, and antioxidants. In: Baskin, S.I., Salem, H. (Ed.). *Oxidants, Antioxidants, and free radicals*. Taylor & Francis, 23-77.
- Alasalvar, C., Shahidi, F., Cadwallader, K.R. (2003). Comparison of natural and roasted Turkish Tömbül hazelnut (*Corylus avellana* L.) volatiles and flavor by DHA/GC/MS and descriptive sensory analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 5067-72.
- Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., Weil, J.A. (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 84, 551-562.
- Ammar, H., López, S., González, J.S., Ranilla, M.J. (2004). Seasonal variations in the chemical composition and in vitro digestibility of some Spanish leguminous shrub species. *Animal Feed Science and Technology*, 115, 327-340.
- Amorozo, M.C.M. (1996). A abordagem etnobotânica na pesquisa de plantas medicinais. In: Di Stasi, L.C. *Plantas medicinais: arte e ciência*. São Paulo: UNESP, 47-68.
- Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127, 183-198.
- Anthos (2012). <http://www.anthos.es/>, último acesso em Maio de 2012.
- AOAC (1995). *Official methods of analysis* (16th Ed.). Arlington VA, USA: Association of Official Analytical Chemists.
- Assunção, J. (2007). Contribuição para o estudo da composição lipídica e do valor nutricional de leites e produtos lácteos dos Açores. Dissertação de mestrado. Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

- Augustin, M.A, Berry, S.K. (1983). Effectiveness of Antioxidants in Refined, Bleached and Deodorized Palm Olein. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 60, 29-32.
- Babior, B.M. (1997). Superoxide: a two-edged sword. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 30, 141-155.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191-203.
- Barreiros, L.B.S., David, J.M., David, J.P. (2006). Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesas do organismo. *Química Nova*, 29, 113-123.
- Barros, L., Cabrita, L., Vilas Boas, M., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R. (2011). Chemical, biochemical and electrochemical assays to evaluate phytochemicals and antioxidant activity of wild plants. *Food Chemistry*, 127, 1600-1608.
- Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R., Santos-Buelga (2012). Characterization of phenolic compounds in flowers of wild medicinal plants from Northeastern Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 1576-1582.
- Bast, A., Haenen, G.R.M.M., Doelman, C.J.A. (1991). Oxidants and antioxidants: state of the art. *The American Journal of Medicine*, 91, 2-13.
- Batista, C., Barros, L., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R. (2011). Nutritional and nutraceutical potential of rape (*Brassica napus* L. var. *napus*) and “tronchuda” cabbage (*Brassica oleraceae* L. var. *costata*) inflorescences. *Food Chem. Toxicol.* 49, 1208-1214.
- Bejma, J., Ramires, P., Ji, L.L. (2000). Free radical generation and oxidative stress with ageing and exercise: differential effects in the myocardium and liver. *Acta Physiol. Scand.*, 169, 343-51.
- Berker, K.I., Güçlü, K., Tor, I., Apak, R. (2007). Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*, 72, 1157-1165.
- Berset, C., Cuvelier, M.E. (1996). Méthodes d'évaluation du degré d'oxydation des lipides et de mesure du pouvoir antioxydant. *Sci. Aliments*, 16, 219-245.
- Bieri, J.G., Evarts, R.P. (1974). Gamma tocopherol: metabolism, biological activity and significance in human vitamin E nutrition. *Am J Clin Nutr*, 27, 980-6.
- Bird, R.P., Draper, H.H. (1984). Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. *Methods Enzymol*, 105, 299-305.

- Black, T.M., Wang, R., Maeda, N., Coleman, R.A. (2000). Palm tocotrienols protect ApoE +/- mice from diet-induced atheroma formation. *J. Nutr.*, 130, 2420-2426.
- Blanco, E., Díez, J. (2005). *Guia de la Flora de Sanabria, Carballada y Los Valles: Catálogo de etnoflora selecta*. Zamora: Adisac-La Voz.
- Blasco, A.J., Rogerio, M.C., Gonzalez, M.C., Escarpa, A. (2005). “Electrochemical Index” as a screening method to determine “total polyphenolics” in foods: A proposal. *Anal. Chim. Acta*, 539, 237-244.
- Bowers, W.F. (1947). Chlorophyll in wound healing and suppurative disease. *Am. J. Surg.*, 73, 37-50.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Fat. Sci. Technol.*, 28, 25-30.
- Breda, J. (2003). *Fundamentos de Alimentação, Nutrição e Dietética*. Coimbra: Mar da Palavra – Edições, Lda. 21-25.
- Brett, A.M.O., Ghica, M.E. (2003). Electrochemical oxidation of quercetin. *Electroanalysis*, 15, 1745-1750.
- Brigelius-Flohé, R., Traber, M.G. (1999). Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J*, 13, 1145-55.
- Brown, J.E., Khodr, H., Hider, R.C., Rice-Evans, C.A. (1998). Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem. J.*, 330, 1173-1178.
- Brum-Bousquet, M., Lallemand, J.Y., Tillequin, F., Fougeras, P., Delaveau, P. (1981). Isolation and properties of sarothamnoside, a novel isoflavone glycoside from various *Sarothamnus* species. *Planta Medica*, 43, 367-374.
- Buettner, G.R. (1993). The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha tocopherol and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* 300, 535-543.
- Burda, S., Oleszek, W. (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J. Agric. Food Chem*, 49, 2774-2779.
- Burtis, C.A., Ashwood, E.R. (1996). *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, 4th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company.
- Cabálková, J., Wahlund, K.G., Chmelik, J. (2007). Complex analytical approach to characterization of the influence of carbon dioxide concentration on carbohydrate composition in Norway spruce needles. *J. Chromatogr. A*, 1148, 189-199.

- Caballero, B., Allen, L., Prentice, A. (2005). *Encyclopedia of human nutrition*, 2nd ed. Elsevier: Academic Press, 257-262.
- Camejo-Rodrigues, J.S., Ascensão, L., Bonet, M.À., Vallès, J. (2003). An ethnobotanical study of medicinal and aromatic plants in the Natural Park of Serra de S. Mamede (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*, 89, 199–209.
- CaroteNature (The carotenoids page) (2000). <http://www.carotenature.com/>, último acesso em Janeiro 2012.
- Carvalho, A.M., & Morales, R. (2010). Persistence of wild food and wild medicinal plant knowledge in a North-Eastern region of Portugal. In M. Pardo de Santayana, A. Pieroni, & R. Puri (Eds.), *Ethnobotany in the new Europe: People, health and wild plant resources*. Oxford, UK: Berghahn Books.
- Carvalho, A.M. (2010). Plantas y sabiduría popular del Parque Natural de Montesinho. Un estudio etnobotánico en Portugal. *Biblioteca de Ciencias*, 35. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Castera-Rossignol, A., Bosque, F. (1994). Nouvelle approche des anti-oxydants. *OCL*, 1, 131-143.
- Castroviejo, S. *et al.* (Eds.) (1999). *Flora Ibérica. Plantas vasculares de la Península Ibérica, e Islas Baleares*. Vol. VII (I), Leguminosae (partim). Madrid: Real Jardín Botánico, C.S.I.C.
- Cechinel, V.F., Yunes, R.A. (1998). Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente activos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para optimização da actividade. *Química Nova*, 21, 99-105.
- Cenkowski, S., Jayas, D.S., Daun, J.K. (1993). Potential of in-field and low-temperature drying for reducing chlorophyll contents in canola (*Brassica napus* L). *J. Sci. Food Agric.*, 63, 377-383.
- Chen, B.H., Peng, H.Y., Chen, H.E. (1995). Changes of carotenoids, color, and vitamin A contents during processing of carrot juice. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 1912-18.
- Chew, B.P. (1995). Antioxidant vitamins affect food animal immunity and health. *Journal of Nutrition*, 125, 1804-1808.
- Chizzolini, R., Zanardi, E., Dorigoni, V., Ghidin, S. (1999) Calorific value and cholesterol content of normal and low-fat meat and meat products. *Trends in Food Science & Technology*, 10, 119-128.

- Chong, Z.Z., Li, F., Maiese, K. (2005). Oxidative stress in the brain: Novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. *Progress in Neurobiology*, 75, 207-246.
- Christie, W.W. (2003). *Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids*, 3rd ed. Bridgwater, UK: Oily Press.
- Chung, Y., Chang, C., Chao, W., Lin, C., Chou, S. (2002). Antioxidative activity and safety of the 50 ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *J.Agric.Food Chem*, 50, 2454-2458.
- Ciudad, A.G., Santos, B.F., de Aldana, B.R.V., Zabalgogazcoa, I., Gutierrez, M.Y., Criado, B.G. (2004). Use of near infrared reflectance spectroscopy to assess forage quality of a Mediterranean shrub. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 35, 665-78.
- Comporti, M. (1998). Lipid peroxidation as a mediator of chemical-induced hepatocyte death. In: Plaa, G.L, Hewitt, W.R. (ed.). *Toxicology of the liver*. Washington DC: Taylor & Francis.
- Connor, W.E. (2000). Importance of *n*-3 fatty acids in health and disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 171-175.
- Cooper, M., Johnson, A. (1984). *Poisonous Plants in Britain and their Effects on Animals and Man*. London: H.M.S.O.
- Cotte, J.F., Casabianca, H., Chardon, S., Lheritier, J., Grenier-Loustalot, M.F. (2003). Application of carbohydrate analysis to verify honey authenticity. *Journal of Chromatography A*, 1021, 145-155.
- Cristofolini, G., Troia, A. (2006). A reassessment of the sections of the genus *Cytisus* Desf. (Cytiseae, Leguminosae). *Taxon*, 55, 733-746.
- Croft, K.D. (1998). The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Ann N Y Acad Sci*, 854,435-442.
- Cunha, A.P. (2005). *Farmacognosia e Fitoquímica*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Cunha, A.P., Ribeiro, J.A., Roque, O.R. (2007). *Plantas aromáticas em Portugal. Caracterização e utilizações*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Cunha, A.P., Teixeira, F., Silva, A.P., Roque, O.R. (2010). *Plantas na Terapêutica, Farmacologia e Ensaio Clínicos*, 2.º Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian.
- Daayf, F., Lattanzio, V. (2008). *Recent Advances in Polyphenol Research, Vol I*: Blackwell Publishing Ltd.

- De Las Rivas, J. (2003). La Luz y el Aparato Fotosintético In: Azcón-Bieto, J., Talón, M. (eds.). *Fundamentos de Fisiologia Vegetal*. Barcelona: McGraw-Hill Interamericana de España, 131-153.
- Decker, E.A. (1997). Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutrition Reviews*, 55, 396-398.
- Delaveau, P. *et al.* (1983). *Segredos e Virtudes das Plantas Medicinaiis*. Lisboa: Selecções do Reader's Digest.
- Department of Health (1994). *Nutritional Aspects of Cardiovascular disease: Report on Health and Social Subjects*, n.º 46. London: HMSO.
- Devillers, J., Morlot, M., Pham-Delegue, M.H., Dore, J.C. (2004). Classification of monofloral honeys based on their quality control data. *Food Chem.*, 86, 305-312.
- Dhar, P., Ghosh, S., Bhattacharyya, D.K. (1999). Dietary effects of conjugated octadecatrienoic fatty acid (9 *cis*, 11 *trans*, 13 *trans*) levels on blood lipids and nonenzymatic in vitro lipid peroxidation in rats. *Lipids*, 34, 109-114.
- Dias, C. (2005). *Guia das Plantas Aromáticas e Medicinaiis do Parque Natural do Internacional*. ICN-PNDI.
- Djousse, L., Arnett, D.K., Pankow, J.S., Hopkins, P.N., Province, M.A., Ellison, R.C. (2005). Dietary linolenic acid is associated with a lower prevalence of hypertension in the NHLBI family heart study. *Hypertension*, 45, 368-373.
- Duarte, T.L., Lunec, J. (2005). When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. *Free Rad Res*, 39, 671-686.
- Edwards, B.J. (1954). Treatment of chronic leg ulcers with ointment containing soluble chlorophyll. *Physiotherapy*, 40, 177-9.
- Egner, P.A., Munoz, A., Kensler, T.W. (2003). Chemoprevention with chlorophyllin in individuals exposed to dietary aflatoxin. *Mutat Res*, 523-524, 209-16.
- Egner, P.A., Wang, J.B., Zhu, Y.R., Zhang, B.C., Wu, Y., Zhang, Q.N., *et al.* (2001). Chlorophyllin intervention reduces aflatoxin-DNA adducts in individuals at high risk for liver cancer. *Proc Natl Acad Sci*, 98, 14601-6.
- Eiserich, J.P., Cross, C.E., Jones, A.D., Halliwell, B., van der Vliet, A. (1996). Formation of nitrating and chlorinating species by reaction of nitrite with hypochlorous acid. *J. Biol. Chem.*, 272, 19199-19208.
- Eitenmiller, R.R., Landen Jr, W.O. (1999). Vitamin E: tocopherols and tocotrienols. In: Eitenmiller, R.R., Landen, W.O. (eds.). *Vitamin Analysis for the Health and Food Science*. Boca Raton, FA: CRC Press, 109-148.

- El-Agamey, A., Lowe, G.M., McGarvey, D.J., Mortensen, A., Phillip, D.M., Truscott, T.G., Young, A.J. (2004). Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Arch Biochem Biophys*, 430, 37-48.
- Endo, Y., Usuki, R., Kaneda, T. (1985a). Antioxidant effects of chlorophyll and pheophytin on the autoxidation of oils in the dark. I. Comparison of the inhibitory effects. *JAACS*, 62, 1375-1378.
- Endo, Y., Usuki, R., Kaneda, T. (1985b). Antioxidant effects of chlorophyll and pheophytin on the autoxidation of oils in the dark. II. The mechanism of antioxidative action of chlorophyll. *JAACS*, 62, 1387-1390.
- Engelhart, M.J., Geerlings, M.I., Ruitenber, A., van Swieten, J.C., Hofman, A., Witteman, J.C., Breteler, M.M. (2002). Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer's disease. *JAMA*, 287, 3223-3229.
- Fagali, N., Catalá, A. (2008). Antioxidant activity of conjugated linoleic acid isomers, linoleic acid and its methyl ester determined by photoemission and DPPH techniques. *Biophysical Chemistry*, 137, 56-62.
- Fang, Y.Z., Yang, S., Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18, 872-879.
- Farnsworth, N.R. (1979). Present and future of pharmacognosy. *Am. J. Pharm. Educ.* 43, 239-243.
- Fernandez-Panchon, M.S., Villano, D., Troncoso, A.M., Garcia-Parrilla, M.C. (2008). Antioxidant activity of phenolic compounds: From *in vitro* results to *in vivo* evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 649-671.
- Ferreira, A.L., Matsubara, L.S. (1997). Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e stresse oxidativo. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, 43, 61-68.
- Ferreira, I.C.F.R., Abreu, R.M.V. (2007). Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. *Bioanálise - Sociedade Portuguesa de BioAnalistas da Saúde*, Ano IV, n.º 2, Julho/Dezembro.
- Ferreira, I.C.F.R., Barros, L. Abreu, R.M.V. (2009). Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, 16, 1543-1560.
- Ferruzzi, M.G., Blakeslee, J. (2007). Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. *Nutrition Research*, 27, 1-12.
- Fiedor, L., Stasiek, M., Mysiliwa-Kurdziel, B., Strzalka, K. (2003). Phytol as one of the Determinants of Chlorophyll Interactions in Solution. *Photosynthesis Research*, 78, 47-57.

- Flora-on (2012). <http://www.flora-on.pt/index.php?q=Cytisus+striatus>, último acesso em Maio de 2012.
- Franco, J.A. (1971). *Nova Flora de Portugal (Continente e Açores)*, Vol. I (Licopodiaceae - Umbelliferae). Lisboa: Soc. Astória, Lda.
- Frankel, E.N. (1993). In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. *Trends Food Sci. & Technol*, 4, 220-225.
- Fraser, P.D., Bramley, P.M. (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog. Lipid Res.*, 43, 228-265.
- Fridovich, I. (1999). Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 893, 13-18.
- Fukumoto, L.R., Mazza, G. (2000). Assessing antioxidant activities of phenolic compound. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3597-3604.
- Gallego, E.C., Gallego, A.C. (2008). *Usos, tradiciones y conocimientos de las plantas por las gentes de Sayago*. Zamora: ADERISA.
- Garcia, A.A. (1998). *Fitoterapia: vademécum de prescrição*, 3ª edição. Barcelona: Masson, S.A.
- Gerald, A. (2006). Lyophilization: the current state of the art. *Innovations in Pharmaceutical Technology*, 21, 8-10.
- Ghafourifar, P., Cadenas, E. (2005). Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci*, 26, 190-5.
- Ghica, M.E., Brett, A.M.O. (2005). Electrochemical oxidation of rutin. *Electroanalysis*, 17, 313-318.
- Gilbert, D.L. (2000). Fifty years of radical ideas. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899, 1-14.
- Gill, S.S., Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 909-930.
- Glyad, V.M., Russian, J. (2002). Determination of monosaccharides, disaccharides, and oligosaccharides in the same plant sample by High-Performance Liquid Chromatography. *Russian Journal of Plant Physiology*, 49, 277-282.
- Golbe, L.I., Farrel, T.M., Davis, P.H. (1998). Case-control study of early life dietary factors in Parkinson's disease. *Arch Neurol*, 45, 1350-1353.
- Gold, M.D. (2003). Vitamin C in cancer. *Integr Cancer Ther*, 2, 158-159.

- Gomes, M.S.O., Sinnecker, P., Tanaka, R.T., Lanfer-Marquez, U.M. (2003). Effect of harvesting and drying conditions on chlorophyll levels of soybean (*Glycine max* L. Merr). *J. Agric. Food Chem.*, 51, 1634-1639.
- González, J.A., García-Barriuso, M., Amich, F. (2010). Ethnobotanical study of medicinal plants traditionally used in the Arribes del Duero, western Spain. *Journal of Ethnopharmacology*, 131, 343-355.
- Guil, J.L., Torija, M.E., Giménez, J.J., Rodriguez, I. (1996). Identification of fatty acids in edible wild plants by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 719, 229-235.
- Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 1-93.
- Gutierrez, R.M.P., Luna, H.H., Garrido, S.H. (2006). Antioxidant activity of *Tagetes erecta* essential oil. *J. Chil. Chem. Soc.*, 51, 883-886.
- Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *Am. J. Med.*, 91, 14-22.
- Halliwell, B. (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annu. Rev. Nutr.*, 16, 33-50.
- Halliwell, B. (1999). Vitamin C: poison, prophylactic or panacea? *Trends Biochem. Sci.*, 24, 255-259.
- Halliwell, B. (2001). Vitamin C and genomic stability. *Mutat. Res.*, 475, 29-35.
- Halliwell, B., Aeschbach, R., Löliger, J., Aruoma, O.I. (1995). The characterization of antioxidants. *Food Chem Toxicol*, 33, 601-617.
- Halliwell, B., Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.*, 57, 715-725.
- Halliwell, B., Clement, M.V., Long, H. (2000). Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Letters*, 486, 10-13.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. In: Packer, L., Glazer, A.N. (Eds). *Methods in Enzymology*, 186, 1-85.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*, 5th ed. Oxford: Clarendon Press.
- Hanganu, D., Vlase, L., Olah, N. (2010a). LC/MS analysis of isoflavones from Fabaceae species extracts. *Farmacia*, 58, 177-183.

- Hanganu, D., Vlase, L., Olah, N. (2010b). Phytochemical analysis of isoflavons from some Fabaceae species extracts. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj.*, 38, 57-60.
- Harborne, J.B. (1989). General procedures and measurement of total phenolics. In: *Methods in plant biochemistry, vol. 1: plant phenolics*. Dey, P.M., Harborne, J.B. (eds.). London: Academic Press.
- Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T., Okuda, T. (1988). Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 36, 2090-2097.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutrition Biochemistry*, 13, 572-584.
- Henderson, B.W., Bellnier, D.A., Greco, W.R., Sharma, A., Pandry, R.K., Vaughan, L.A., et al. (1997). An in vivo quantitative structure-activity relationship for a congeneric series of pyropheophorbide derivatives as photosensitizers for photodynamic therapy. *Cancer Res*, 57, 4000-7.
- Hensley, K., Benaksas, E.J., Bolli, R., Comp, P., Grammas, P., Hamdheydari, L., Mou, S., Pye, Q.N., Stoddard, M.F., Wallis, G., Williamson, K.S., West, M., Wechter, W.J., Floyd, R.A. (2004). New perspectives on vitamin E: γ -tocopherol and carboxyethylhydroxychroman metabolites in biology and medicine. *Free Radical Biology and Medicine*, 36, 1-15.
- Herbert, V., Shaw, S., Jayatilleke, E. (1996). Vitamin C-driven free radical generation from iron. *J. Nutr.*; 126, 1213-1220.
- Hewavitharana, A.K., Lanari, M.C., Becu, C. (2004). Simultaneous determination of vitamin E homologs in chicken meat by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1025, 313-317.
- Hollman, P.C.H., Katan, M.B. (1998). Quercetin in the diet and in health. Pathophysiology. *International Congress of Pathophysiology*, 5, 267-274.
- Hopia, A., Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of flavonol aglycones and their glycosides in methyl linoleate. *JAACS*, 76, 139-144.
- Hoshina, C., Tomita, K., Shioi, Y. (1998). Antioxidant activity of chlorophylls: its structure-activity relationship. *Photosynthesis: Mechanisms Effects*, 4, 3281-3284.
- Houghton, P.J. (2001). Old yet new—pharmaceuticals from plants. *J. Chem. Educ.*, 78, 175-184.

- Hu, X., Jandacek, R.J., White, W.S. (2000). Intestinal absorption of beta-carotene ingested with a meal rich in sunflower oil beef tallow: Postprandial appearance in triacylglycerol-rich lipoproteins in women. *Am J Clin Nutr*, 71, 1170-1180.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem*, 53, 1841-1856.
- Jayaprakasha, G.K., Singh, R.P., Sakariah, K.K. (2001). Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. *Food Chemistry*, 73, 285-290.
- Kamal-Eldin, A., Appelqvist, L. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31, 671-701.
- Kamat, J.P., Devasagayam, T.P. (1995). Tocotrienols from palm oil as potent inhibitors of lipid-peroxidation and protein oxidation in rat-brain mitochondria. *Neurosci. Lett.*, 195, 179-182.
- Karadag, A., Ozcelik, B. Saner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*, 2, 41-60.
- Kaur, I.P., Geetha, T. (2006). Screening methods for antioxidants – a review. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 6, 305-312.
- Kephart, J.C. (1955). Chlorophyll derivatives – their chemistry, commercial preparations and uses. *Econ Bot*, 9, 3-38.
- Khachik, F., Beecher, G.R., Whittaker, N.F. (1986). Separation, identification and quantification of the major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography. *J Agric Food Chem*, 34, 603-16.
- Kim, H.O., Durance, T.D., Scaman, C.H., Kitts, D.D. (2000). Retention of caffeic acid derivatives in dried *Echinacea purpurea*. *J Agric Food Chem*, 48, 4182-86.
- Kim, T.S., Decker, E.A., Lee, J. (1012). Antioxidant capacities of α -tocopherol, trolox, ascorbic acid, and ascorbyl palmitate in riboflavin photosensitized oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 133, 68-75.
- Kinghorn, A.D. (2001). Pharmacognosy in the 21st century. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53, 135-148.
- Klein, B.P., Perry, A.K. (1982). Ascorbic acid and vitamin A activity in selected vegetables from different geographic areas of the United States. *Journal of Food Science*, 47, 941-945.

- Kohen, R., Nyska, A. (2002). Invited Review: Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 30, 620-650.
- Koppenol, W.H. (1998). The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite. *Free Radic. Biol. Med.*, 25, 385-391.
- Krinsky, N.I. (1994). The biological properties of carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*, 66, 1003-1010.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*, 89, 217-233.
- Kromhout, D. (2001). Epidemiology of cardiovascular diseases in Europe. *Public Health Nutrition*, 4, 441-457.
- Kromhout, D., Menotti, A., Bloemberg, B. (1995). Dietary saturated and *trans* fatty acids and cholesterol and 25-year mortality from coronary heart disease: The Seven Countries Study. *Preventive Medicine*. 24, 308-31.
- Lachman, L., Lieberman, H.A., Kaning, J.L. (2001). *Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica*, vols. I e II. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Laguerre, M., Lecomte, P. Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counter lipid oxidation: Existing methods: New trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46, 244-282.
- Lampi, A.M., Kamal-Eldin, A., Piironen, V. (2002). Tocopherols and tocotrienols from oil and cereal grains. In: Shi, J., Mazza, G., Le Maguer, M. *Functional Foods, Biochemical and Processing Aspects*. CRC Press, Boca Raton, FA, pp. 1-38.
- Lanfer-Marquez, U.M., Barros, R.M.C., Sinnecker, P. (2005). Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives. *Food Research International*, 38, 885-891.
- Larato, D.C., Pfau, F.R. (1970). Effects of water soluble chlorophyllin ointment on gingival inflammation. *NY Dent J*, 36, 291-3.
- Lazaridou, A., Biliaderis, C.G., Bacandritsos, N., Sabatini, A.G. (2004). Composition, thermal and rheological behaviour of selected Greek honeys. *Journal of Food Engineering*, 64, 9-21.
- Lee, Y., Shacter, E. (1999). Oxidative stress inhibits apoptosis in human lymphoma cells. *J Biol Chem*, 274, 19792-8.
- Lelli, J., Becks, L., Dabrowska, M., Hinshaw, D. (1998). ATP converts necrosis to apoptosis in oxidant-injured endothelial cells. *Free Radic Biol Med*, 25, 694-702.

- Levadoux, W.L., Kalmokoff, M.L., Pickard, M.D., Groofwassink, J.W.D. (1987). Pigment removal from canola oil using chlorophyllase. *J. Am. Oil Chem. Soc., Champaign*, 64, 139-144.
- Li, L., Tsao, R., Yang, R., Kramer, J.K.G., Hernandez, M. (2007). Fatty acid profiles, tocopherol contents, and antioxidant activities of heartnut (*Juglans ailanthifolia* Var. *cordiformis*) and persian walnut (*Juglans regia* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 1164-1169.
- Liao, K.L., Yin, M.C. (2000). Individual and combined antioxidant effects of seven phenolic agents in human erythrocyte membrane ghosts and phosphatidylcholine liposome systems: importance of the partition coefficient. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2266-2270.
- Liebler, D.C. Reed, D.J. (1997). Free-radical defense and repair mechanisms. In: Wallace, K.B. (Ed.). *Free radical Toxicology*. Taylor & Francis, 141-173.
- Lin, C.C., Huang, P.C. (2002). Antioxidant and hepatoprotective effects of *Acatopanax senticosus*. *Phytotherapy Research*, 14, 489-494.
- Lin, S.D., Sung, J.M., Chen, C.L. (2011). Effect of drying and storage conditions on caffeic acid derivatives and total phenolics of *Echinacea purpurea* grown in Taiwan. *Food Chemistry*, 125, 226-231.
- Lin, T.M., Durance, T.D., Scaman, C.H. (1998). Characterization of vacuum microwave, air and freeze dried carrot slices. *Food Research International*, 31, 111-117.
- Liu, R.H. (2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am. J. Clin. Nutr.*, 78, 517-520.
- Liu, Y.C., Zeng, J.G., Chen, B., Yao, S.Z. (2007). Investigate of phenolic constituents in *Echinacea purpurea* grown in china. *Planta Medica*, 73, 1600-1605.
- Loziene, K., Venskutonis, P.R., Sipailiene, A. Labokas, J. (2007). Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. *Food Chemistry*, 103, 546-559.
- Lubbe, A., Verpoorte, R. (2011). Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. *Industrial Crops and Products*, 34, 785-801.
- Machlin, L.J. (1991). *Handbook of Vitamins*, 2^{ed}. New York: Marcel Dekker, 99-144.
- Magalhães, A. (2009). Estudo do efeito protector da espécie *Cydonia oblonga* Miller na danificação oxidativa em eritrócitos humanos. Tese. Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade Fernando Pessoa.

- Magalhães, L.M., Segundo, M.A., Reis, S., Lima, J.L.F.C. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613, 1-19.
- Magiorikinis, E., Beloukas, A., Diamantis, A. (2011). Scurvy: Past, present and future. *European Journal of Internal Medicine*, 22, 147-152.
- Mazza, M., Pomponi, M., Janiri, L., Bria, P., Mazza, S. (2007). Omega-3 fatty acids and antioxidants in neurological and psychiatric diseases: an overview. *Progress in neuropsychopharmacology biological psychiatry*, 31, 12-26.
- Mazza, G., Fukumoto, L., Delaquis, P., Girard, B., Ewert, B. (1999). Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot noir wines from British Columbia. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 4009-4017.
- McLaughlin, P.J., Weihrauch, J.L. (1979). Vitamin E content of foods. *J Am Diet Assoc*, 75, 647-665.
- Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O., Remacle, J. (1994). Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 17, 235-248.
- Miller, H.E. (1971). A simplified method for the evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 48, 91-97.
- Mínguez-Mosquera, M.I., Gandul-Rojas, B., Garrido-Fernandez, J., Gallardoguerrero, L. (1990). Pigments present in virgin oil. *J. Am. Oil Chem. Soc., Champaign*, 67, 192-196.
- Mi-Yae, S., Tae-Hun, K., Nak-ju, S. (2003). Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (Phellinus of Hymenochaetaceae) extracts. *Food Chemistry*, 82, 593-597.
- Molkentin, J. (2000). Occurrence and biochemical characteristics of natural bioactive substance in bovine milk lipids. *British Journal of Nutrition*, 84, 47-53.
- Molyneux, P. (2004). The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarín J. Sci. Technol.*, 26, 211-219.
- Moncada, S., Palmer, R.M., Higgs, E.A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 43, 109-142.
- Mortensen, A., Skibsted, L.H., Truscott, T.G. (2001). The interaction of dietary carotenoids with radical species. *Arch. Biochem. Biophys.*, 385, 13-19.
- Mota, M.P., Figueiredo, P., Duarte, J.A. (2004). Teorias biológicas do envelhecimento. *Rev. Port. Cienc. Desp.*, 4, 81-110.

- Mukherjee, C., Bhattacharyya, S., Ghosh, S., Bhattacharyya, D.K. (2002). Dietary effects of punicic acid on the composition and peroxidation of rat plasma lipid. *Journal of Oleo Science*, 51, 513-522.
- Muller, J., Heindl, A. (2006). Drying of medicinal plants. In: Bogers, R.J., Cracker, L.E., Lange, D. (Eds.). *Medicinal and Aromatic Plants*. Netherland: Springer, 237-252.
- Munne-Bosch, S., Alegre, L. (2002). The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21, 31-57.
- Myers, C.R. (1997). Subcellular sites of xenobiotic-induced free-radical generation. In: Wallace, K.B. (Ed.). *Free Radical Toxicology*. Taylor & Francis, 25-41.
- Nagano, T. (1999). Practical methods for detection of nitric oxide. *Luminescence*, 14, 283-290.
- Nagaoka, S., Kakiuchi, T., Ohara, K., Mukai, K. (2007). Kinetics of the reaction by vitamin E is regenerated which natural by vitamin C. *Chemistry and Physics of Lipids*, 146, 26-32.
- Nagata, M., Yamashita, I. (1992). Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.*, 39, 925-928.
- Ndhlala, A., Moyo, M., Van Staden, J. (2010). Natural antioxidants: fascinating or mythical biomolecules? *Molecules*, 15, 6905-6930.
- Nelson, L.S., Shih R.D., Balick M.J. (2007). *Hand book of poisonous and injurious plants*. The New York Botanical Garden and Springer.
- Neves, J.M., Matosa, C., Moutinho, C., Queiroz, G., Gomes, L.R. (2009). Ethnopharmacological notes about ancient uses of medicinal plants in Trás-os-Montes (northern of Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*, 124, 270-283.
- Niki, E. (2009). Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. *Free Radical Biology & Medicine*, 47, 469-484.
- Niki, E. (2010). Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radical Biology and Medicine*, 49, 503-515.
- Novais, M.H., Santos, I., Mendes, S., Pinto-Gomes, C. (2004). Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrábida Natural Park (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*, 93, 183-195.
- O'Byrne, D., Grundy, S., Packer, L., Devaraj, S., Baldenius, K., Hoppe, P.P., Kraemer, K., Jialal, I., Traber, M.G. (2000). Studies of LDL oxidation following α -, γ -, or δ -

- tocotrienyl acetate supplementation of hypercholesterolemic humans. *Free Rad. Biol. Med.*, 29, 834-845.
- Ohkawa, H., Oshishi, N., Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95, 351-358.
- Ouchikh, O., Chahed, T., Ksouri, R., Taarit, M.B, Faleh, H., Abdelly, C., Kchouk, M.E., Marzouk, B. (2011). The effects of extraction method on the measured tocopherol level and antioxidant activity of *L. nobilis* vegetative organs. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 103-110.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr*, 44, 307-315.
- Packer, L., Weber, S.U. (2001). Molecular aspects of alpha-tocotrienol antioxidant action and cell signaling. *J. Nutr.*, 131, 369-373.
- Panfili, G., Fratianni, A., Irano, M. (2003). Normal phase highperformance liquid chromatography method for the determination of tocopherols and tocotrienols in cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3940-3944.
- Pardo de Santayana, M. (2008). *Estudios etnobotánicos en Campoo (Cantábria)*. Biblioteca de Ciencias n.º 32. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Pardo de Santayana, M., Tardío, J., Blanco, E., Carvalho, A.M., Lastra, J.J., San Miguel, E. Morales, R. (2007). Traditional knowledge of wild edible plants used in the northwest of the Iberian Peninsula (Spain and Portugal): a comparative study. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 3, 27.
- Patel, J.M. (2008). A Review of Potential Health Benefits of Flavonoids. *Lethbridge Undergraduate Research Journal*, 3, 2.
- Payá, M., Halliwell, B., Hoult, J.R.S. (1992). Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species. Scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. *Biochem. Pharmacol*, 44, 205-214.
- Pedro, M.A., Gatti, R.M., Augusto, O. (1993). *In Vivo* Free Radical Formation Monitored By The Ascorbyl Radical. *Química Nova*, 16, 370-372.
- Peixoto, F., Santos, D.L., Fernandes, A.F. (2003). *Métodos para análise de espécies reactivas de oxigénio e antioxidantes em sistemas biológicos*. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

- Peleg, H., Bodine, K.K., Noble, A.C. (1998). The influence of acid on astringency of alum and phenolic compounds. *Chemical Senses*, 23, 371-378.
- Pereira, C. (2011). Caracterização nutricional e propriedades bioativas de espécies silvestres da etnoflora transmontana tradicionalmente consumidas em verde. Tese mestrado. Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança.
- Pereira, D., Valentão, P., Pereira, J., Andrade, P. (2009). Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules*, 14, 2202-2211.
- Pereira, O.R., Silva, A.M.S., Domingues, M.R.M., Cardoso, S.M. (2012). Identification of phenolic constituents of *Cytisus multiflorus*. *Food Chemistry*, 131, 652-659.
- Perry, E.K., Pickering, A.T., Wang, W.W., Houghton, P.J., Perru, N.S., (1999). Medicinal plants and Alzheimer's disease: from ethnobotany to phytotherapy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51, 527-534.
- Pfander, H. (1987). Key to Carotenoids, 2nd ed. Basel: Birkhauser.
- Phipps, S.M., Sharaf, M.H.M., Butterweck, V. (2007). Assessing Antioxidant activity in botanicals and other dietary supplements. *Pharmacopeial Forum*, 33, 810-814.
- Piironen, V. (2000). Determination of tocopherols and tocotrienols in foods and tissues. In: Song, W.O., Beecher, G.R., Eitenmiller, R.R. (Eds.). *Modern Analytical Methodologies in Fat- and Water-Soluble Vitamins*. New York, US: Wiley-Interscience, 81-128.
- Pinto, J.F. (2010). *Nutracêuticos e alimentos funcionais*. Lidel – edições técnicas, lda. Lisboa – Porto.
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4290-4302.
- Prista, L.N., Alves, A.C., Morgado, R., Lobo, J.S. (2003). *Tecnologia Farmacêutica, vols. 1 a 3*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Proll, S., Wilhelm, B., Robert, B., Scheer, H. (2006). Myoglobin with modified tetrapyrrole chromophores: binding specificity and photochemistry. *Biochim Biophys Acta*, 1757, 750-63.
- Quirós, A.R.B., Costa, H.S. (2006). Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: a review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 97-111.
- Qureshi, A.A., Salser, W.A., Parmar, R., Emeson, E.E. (2001). Novel tocotrienols of rice brain inhibit atherosclerotic lesions in C57BL/6 apoE-deficient mice. *J. Nutr.*, 131, 2606-2618.

- Raja, S., Ahamed, K., Kumar, V., Mukherjee, K., Bandyopadhyay, A., Mukherjee, P. K. (2007). Antioxidant effect of *Cytisus scoparius* against carbon tetrachloride treated liver injury in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 109, 41-47.
- Rao, A.V., Rao, L.G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, 55, 207-216.
- Ravikumar, S., Gnanadesigan, M. (2011). Hepatoprotective and antioxidant activity of a mangrove plant *Lumnitzera racemosa*. *Asian Pac J Trop Biomed*, 348-352.
- Repetto, M.G., Llesuy, S.F. (2002). Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Braz J Med Biol Res*, 35, 523-534.
- Ribeiro, J., Monteiro A., Silva, M. (2000). *Etnobotânica: Plantas Bravias, Comestíveis, Condimentares e Mediciniais*. Mirandela: João Azevedo Editor.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-956.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., Pridham, J.B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenols flavonoids. *Free Rad. Res.*, 22, 375-383.
- Rigotti, M. (2008). *Plantas Mediciniais: Botânica, cultivo e aplicações*. Versão online: <http://www.scribd.com/doc/7293225/Plantas-is-Cultivo-e-Applicacoes>.
- Rivera, D., Obón de Castro, C. (1991). *La guía Incafo de las planta utiles de la Península Ibérica y Baleares*. Madrid: Incafo.
- Rodriguez-Riano, T., Ortega-Olivencia, A., Devesa, J.A. (2004). Reproductive biology in *Cytisus multiflorus* (Fabaceae). *Ann. Bot. Fenn.* 41, 179-188.
- Ross, D., Moldeus, P. (1991). Antioxidant defense systems and oxidative stress. In: Vigo-Pelfrey, C. (Ed.). *Membrane lipid oxidation*. 1th ed. Boca Raton: CRC Press, 151-170.
- Rupérez, F.J., Martín, D., Herrera, D., Barbas, C. (2001). Chromatography analysis of a α -tocoferol and related compounds in various matrices. *J. Chromatogr. A*, 935, 45-69.
- Saha, S.S., Ghosh, M. (2009). Comparative study of antioxidant activity of alphaeleostearic acid and punicic acid against oxidative stress generated by sodium arsenite. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2551-2556.

- Saha, S.S., Ghosh, M. (2010). Ameliorative role of conjugated linolenic acid isomers against oxidative DNA damage induced by sodium arsenite in rat model. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 3398-3405.
- Saha, S.S., Ghosh, M. (2011). Antioxidant effect of vegetable oils containing conjugated linolenic acid isomers against induced tissue lipid peroxidation and inflammation in rat model. *Chemico-Biological Interactions*, 190, 109-120.
- Saha, S.S., Patra, M., Ghosh, M. (2012). In vitro antioxidant study of vegetable oils containing conjugated linolenic acid isomers. *LWT - Food Science and Technology*, 46, 10-15.
- Salem, H., Baskin, S.I. (1997). The toxicology of antioxidants. In: Baskin, S.I. Salem, H. (Ed.). *Oxidants, Antioxidants, and free radicals*. Taylor & Francis, 207-225.
- Salgueiro, J. (2004). *Ervas, usos e saberes*. Lisboa: MARCA, Associação de Desenvolvimento Local.
- Sanz, M.L., Sanz, J., Martinez-Castro, I. (2002). Characterization of *O*-trimethylsilyl oximes of disaccharides by gas chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia*, 56, 617-622.
- Sanz, M.L., Sanz, J., Martinez-Castro, I. (2004). Gas chromatographic-mass spectrometric method for the qualitative and quantitative determination of disaccharides and trisaccharides in honey. *J. Chromatogr. A*, 1059, 143-1483.
- Schmidt, B., Ribnicky, D.M., Poulev, A., Logendra, S., Cefalu, W.T., Raskin, I. (2008). A natural history of botanical therapeutics. *Metab. Clin. Exp.*, 57, 3-9.
- Seabra, R.M., Andrade, P.B., Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Bastos, M.L. (2006). Antioxidant compounds extracted from several plant materials. In: Fingerman M, Nagabhushanam R. *Biomaterials from aquatic and terrestrial organisms*. Enfield (NH) USA: Science, 115-174.
- Sellami, I.H., Wannes, W.A., Bettaieb, I., Berrima, S., Chahed, T., Marzouk, B., Limam, F. (2011). Qualitative and quantitative changes in the essential oil of *Laurus nobilis* L. leaves as affected by different drying methods. *Food Chemistry*, 126, 691-697.
- Sen, C.K., Khanna, S., Roy, S., Packer, L.J. (2000). Tocotrienol potently inhibits glutamate-induced pp60c-Src kinase activation and death of HT4 neuronal cells. *Biol. Chem.*, 275, 13049-13055.
- Sheer, H. (1991). *The chlorophylls*. Boca Raton (Fla): CRC Press.

- Shekhawat, N., Payal, S.S., Singht, T., Vijayvergia, R. (2010). Assessment of free radicals scavenging activity of crude extracts of some medicinal plants. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 5, 298-301.
- Shi, H., Noguchi, N., Niki, E. (2001). Introducing natural antioxidants. In: Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. (eds.). *Antioxidants in food: Practical applications*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.*, 215, 213-219.
- Silva, B.M. (2005). Marmelo (*Cydonia oblonga* Miller) e marmelada: perfil em compostos fenólicos, ácidos orgânicos e aminoácidos livres e avaliação do potencial antioxidante. Tese de Doutoramento. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.
- Silva, B.M., Andrade, P.B., Valentão, P., Ferreres, F.M., Ferreira M.A. (2004). Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp, peel, and seed) and jam: antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4705-4712.
- Simopoulos, A.P. (2000). Symposium: role of poultry products in enriching the human diet with *n*-3 PUFA. Human requirement for *n*-3 polyunsaturated fatty acids. *Poultry Science*. 79, 961-970.
- Sokol, R.J. (1988). Vitamin E deficiency and neurologic disease. *Annu Red Nutr*, 8, 351-373.
- Somani, S.M., Husain, K., Schlorff, E.C. (1997). Response of antioxidant system to physical and chemical stress. In: Baskin, S.I., Salem, H. (Eds.). *Oxidants, Antioxidants, and free radicals*. Taylor & Francis, 125-141.
- Soysal, Y., Öztekin, S. (2001). Technical and economic performance of a tray dryer for medicinal and aromatic plants. *J Agr Eng Res*, 79, 73-79.
- Sternberg, E.D., Dolphin, D., Brqckner, C. (1998). Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron*, 54, 4151-202.
- Stoggl, W.M., Huck, C.W., Scherz, H., Popp, M., Bonn, G.K. (2001). Analysis of vitamin E in food and phytopharmaceutical preparations by HPLC and HPLC-APCI-MS-MS. *Chromatographia*, 54, 179-185.
- Strohschein, S., Rentel, C., Lacker, T., Bayer, E., Albert, K. (1999). Separation and identification of tocotrienol isomers by HPLC-MS and HPLC-NMR coupling. *Analytical Chemistry*, 71, 1780-1785.

- Stuart, D.L., Wills, R.B.H. (2003). Effect of drying temperature on alkylamide and cichoric acid concentrations of *Echinacea purpurea*. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 1608-1610.
- Suarna, C., Hood, R.L., Dean, R.T., Stocker, R. (1993). Comparative antioxidant activity of tocotrienols and other natural lipid-soluble antioxidants in a homogeneous system, and in rat and human lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1166, 163-170.
- Suzuki, Y.J., Tsuchiya, M., Wassall, S.R., Choo, Y.M., Govil, G., Kagan, V.E., Packer, L. (1993). Structural and dynamic membrane properties of α -tocopherol and α -tocotrienol: implication to the molecular mechanism of their antioxidant potency. *Biochemistry*, 32, 10692-10699.
- Szymanska, R., Kruk, J. (2008). Tocopherol content and isomers composition in selected plant species. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46, 29-33.
- Talavera, S. (1999). *Flora Iberica Vol. VII(I)* (pp. 44-137) Madrid: CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas).
- Tapiero, H., Townsend, D.M., Tew, K.D. (2004). Organosulfur compounds from alliaceae in the prevention of human pathologies. *Biomed Pharmacother.*, 58, 183-193.
- Tautorus, C.L., Low, N.H. (1993). Chemical aspects of chlorophyll breakdown products and their relevance to canola oil stability. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 70, 843-847.
- Teixeira, G., Pereira, A.L. (2004). Winged stems in *Pterospartum tridentatum*: morphoanatomical study. *Acta Botanica Gallica*, 151, 103-109.
- Ternay, A.L., Sorokin, V. (1997). Redox, radicals and antioxidants. In: Baskin, S. I., Salem, H. (Ed.). *Oxidants, Antioxidants, and free radicals*. Taylor & Francis, 1-21.
- Terry, P.D., Terry, J.B., Rohan, T.E. (2004). Long-chain (*n*-3) fatty acid intake and risk of cancers of the breast and prostate: recent epidemiological studies, biological mechanisms, and directions for future research. *Journal of Nutrition*, 134, 3412-20.
- Tolera, A., Khazaal, K., Orskov, E.R. (1997). Nutritive evaluation of some browse species. *Animal Feed Science Technology*, 67, 181-195.
- Usuki, R., Suzuki, T., Endo, Y., Kaneda, T.K. (1984). Residual amounts of chlorophylls and pheophytins in refined edible oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 61, 785-788.
- Valentão, P. (2002). Limonete, Hipericão-do-gerês, Cardo-de-coalho, Fel-da-terra: metodologias de controlo de qualidade com base na fracção fenólica e estudos de

- acção antioxidante e hepatoprotectora. Tese de Doutoramento. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 39, 44-84.
- van den Berg, H., Faulks, R., Granado, H.F., Hirschberg, J., Olmedilla, B., Sandmann, G., Southon, S., Stahl, W. (2000). The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. *J. Sci. Food Agric.*, 80, 880-912.
- Viscardi, P., Reynaud, J., Reynaud, J. (1984). A New isoflavone glycoside from the flowers of *Cytisus scoparius* Link. (Leguminosae). *Pharmazie*, 39, 11-781.
- Vítor, R.F., Mota-Filipe, H., Teixeira, G., Borges, C., Rodrigues, A.I., Teixeira, A., Paulo. (2004). Flavonoids of an extract of *Pterospartum tridentatum* showing endothelial protection against oxidative injury. *J. Ethnopharmacol.*, 93, 363-370.
- von Bohlen & Halbach, O. (2003) Nitric oxide imaging in living neuronal tissues using fluorescent probes. *Nitric oxide*, 9, 217-228.
- von Gadov, A., Joubert, E., Hansmann, C.F. (1997). Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of Rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -tocopherol, BHT, and BHA. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 632-638.
- Wade, L.G. (1999). *Organic chemistry*. Prentice-Hall.
- Walker, C.J., Willows, R.D. (1997). Mechanism and regulation of Mg-chelatase. *Biochem. J.*, 327, 321-333.
- Ward, K. (2006). Lyophilisation: Art or Science? *Pharmaceutical Manufacturing and Packing Sources*, 21, 23-24.
- Wefers, H, Sies, H. (1988). The protection by ascorbate and glutathione against microsomal lipid peroxidation is dependent on vitamin E. *European Journal of Biochemistry*, 174, 353-357.
- Wikimedia (2011). https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Reduction_of_lipid_radical_by_%CE%B1-Tocopherol.svg, último acesso em Janeiro de 2012.
- Winkler, B.S. (1992). Unequivocal evidence in support of the nonenzymatic redox coupling between glutathione/glutathione disulfide and ascorbic acid/dehydroascorbic acid. *Biochim Biophys Acta*, 1117, 287-290.
- Woodall, A.A., Britton, G., Jackson, M.J. (1997). Carotenoids and protection of phospholipids in solution or liposomes against oxidation by peroxy radicals:

- relationship between carotenoid structure and protective ability. *Biochim Biophys Acta*, 1336, 575-586.
- World Health Organization (2003). *WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants*. Geneva.
- World Health Organization. Regional Office for South-East Asia. (2009). *The use of herbal medicines in primary health care*. Report of the Regional Meeting 10-12 March, Yangon, Myanmar.
- Wright, J.S., Johnson, E.R., DiLabio, G.A. (2001). Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 1173-1183.
- Xiao, L. (2010). Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from marine products. Master thesis of EMQAL project. Bjørn Grung, University of Bergen.
- Xu, Z.M., Hua, N., Gadber, J.S. (2001). Antioxidant activity of tocopherols, tocotrienols, and γ -oryzanol components from rice bran against cholesterol oxidation accelerated by 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride. *J. Agr. Food Chem.*, 49, 2077-2081.
- Yamauchi, R., Noro, H., Shimoyamada, M., Kato, K. (2002). Analysis of vitamin E and its oxidation products by HPLC with electrochemical detection. *Lipids*, 37, 515-522.
- Yanishlieva-Maslarova, N.V. (2001). Inhibiting oxidation. In: Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gorgon, M. *Antioxidants in Food*. New York: CRC Press, 22-70.
- Yen, G.H., Chen, H.Y. (1995). Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food. Chem*, 43, 27-32.
- Yoshida, Y., Niki, E., Noguchi, N. (2002). Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects. *Chemistry and Physics of Lipids*, 123, 63-75.
- Young, A.J., Lowe, G.M. (2001). Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch. Biochem. Biophys.*, 385, 20-27.
- Young, R.W., Beregi, J.S. (1980). Use of chlorophyllin in the treatment of geriatric patients. *J Am Geriatr Soc*, 28, 46-7.
- Zubay, G. (2006). *Biochemistry*, 5th ed, Wm. C. Brown Publishers.
- Zulueta, A., Esteve, M.J., Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 144, 310-316.



Capítulo VI

VI. ANEXOS

Os resultados descritos nesta dissertação deram origem a uma publicação em revista indexada ao ISI e a duas comunicações nacionais:

Pinela J., Barros L., Carvalho A.M. & Ferreira I.C.F.R. (2011). Influence of the drying method in the antioxidant potential and chemical composition of four shrubby flowering plants from the tribe Genisteae (Fabaceae). *Food and Chemical Toxicology*, 49, 2983-2989. (**Anexo 1**)

Pinela J., Carvalho A.M. & Ferreira I.C.F.R. (2011). Composição fitoquímica e propriedades antioxidantes de plantas medicinais da família Fabaceae submetidas a diferentes processos de secagem. In I Jornadas de Jovens Investigadores da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança. Bragança. (**Anexo 2a**)

Pinela J., Barros L., Carvalho A.M. & Ferreira I.C.F.R. (2011). Efeito do processo de secagem no potencial antioxidante de plantas medicinais da família Fabaceae. In XII Encontro Nacional da Sociedade Portuguesa de Química – 100 anos de Química em Portugal. Braga. (**Anexo 2b**)

A1. Publicação em revista internacional



Influence of the drying method in the antioxidant potential and chemical composition of four shrubby flowering plants from the tribe Genisteae (Fabaceae)

José Pinela, Lillian Barros, Ana Maria Carvalho, Isabel C.F.R. Ferreira*

CIMO/Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 June 2011

Accepted 18 July 2011

Available online 24 July 2011

Keywords:

Genisteae

MAP

Antioxidants

Energetic value

Drying process

ABSTRACT

Flowers from several common Mediterranean shrubs, such as those from the *Cytisus* genus and *Genista* genus (tribe Genisteae/Fabaceae) have long been used for medicinal purposes and seasoning in the north-eastern Portuguese region. Despite, the shade-drying traditionally used to process these plants, freeze-drying is claimed to better preserve the quality of medicinal plants. Herein, the effects of drying process in the antioxidants composition and properties of *Cytisus multiflorus*, *Cytisus scoparius*, *Cytisus striatus* and *Pterospartum tridentatum* were evaluated. Freeze-dried *P. tridentatum* revealed the highest antioxidant properties (EC_{50} values ≤ 0.15 mg/ml). Freeze-drying benefits were confirmed showing, the samples submitted to this process, higher antioxidant activity and higher concentrations of hydrophilic (phenolics, ascorbic acid and sugars) and lipophilic (tocopherols, chlorophylls and lycopene) compounds. This process could be applied in scale-up treatments of the studied plants for cosmetic or pharmaceutical applications.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The World Health Organization estimates that 80% of the world's population uses medicinal plants in primary health needs (WHO, 2009). Medicinal plants are often dried and stored for a long time before use in manufacturing various types of products. Drying is an effective method that increases the shelf life of the final product by slowing the growth of microorganisms and preventing certain biochemical reactions that may alter the organoleptic characteristics. Furthermore, it reduces the weight and bulk of plants for cheaper transport and storage (Lin et al., 2011; Sellami et al., 2011).

Dehydration of plants can be performed using different methods. Natural drying (drying in the shade) and hot air drying are still most widely used methods because of their lower cost. Nevertheless, natural drying has many disadvantages due to the inability to handle the large quantities and to achieve consistent quality standards (Soysal and Öztekin, 2001). Freeze-drying is generally better in preserving the quality of medicinal plants during processing (Abascal et al., 2005), but the drying cost is considerably higher than hot air-drying (Lin et al., 2011).

Cytisus multiflorus, *Cytisus scoparius*, *Cytisus striatus* and *Pterospartum tridentatum* are four species from the Tribe Genisteae (Fam. Fabaceae, subFam. Faboideae) commonly encountered in the Portuguese wild flora. These species are frequent in the Iberian

Peninsula, growing spontaneously in thermo-Mediterranean conditions and widely used in local folk medicine and sometimes as condiment (Blanco and Díez, 2005; Carvalho, 2010; Cunha et al., 2007; Gallego and Gallego, 2008; Pardo de Santayana, 2008).

In Portugal, these Fabaceae have been used for centuries and are considered to have anti-inflammatory properties (Camejo-Rodrigues et al., 2003; Carvalho, 2010; Cunha et al., 2007; Novais et al., 2004; Neves et al., 2009; Salgueiro, 2004). Medicinal infusions, decoctions and tonics are prepared with fresh or shade-dried flowers, and largely used for several respiratory, gastrointestinal and skin affections and to control diabetes and metabolic system disorders, such as cholesterol and gout. *P. tridentatum* flowers in short racemes are traditionally used for seasoning (Carvalho, 2010; Pardo de Santayana et al., 2007). Furthermore, our research group recently reported antioxidant properties of one of those species—*C. multiflorus* (Barros et al., 2011), remaining the knowledge about antioxidant potential of the other three species very scanty.

Many species of the Fabaceae family are known as poisonous and injurious plants. Especially, bark, pods and seeds of several genus are noxious and reveal potential toxins (Cooper and Johnson, 1984; Rivera and Obón de Castro, 1991; Nelson et al., 2007). Empirical traditional knowledge and local healers assume that consuming oral dosage forms from these plants can lead to some risks especially due to excessive doses and long-term treatments. However, folk medicine avoids these kinds of risks recommending specific dosages and controlling the periods of intake with ritual healing practices.

* Corresponding author. Tel.: +351 273 303219; fax: +351 273 325405.

E-mail address: iferreira@ipb.pt (I.C.F.R. Ferreira).

A2. Comunicações nacionais

- a. In I Jornadas de Jovens Investigadores da Escola Superior Agrária de Bragança***

- b. In XII Encontro Nacional da Sociedade Portuguesa de Química – 100 anos de Química em Portugal***

Composição fitoquímica e propriedades antioxidante de plantas medicinais da família Fabaceae submetidas a diferentes processos de secagem

José Pinela, Lillian Barros, Ana Maria Carvalho, Isabel C.F.R. Ferreira

*CIMO-Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia,
Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal.*

As flores dos géneros *Cytisus* e *Genista* (da Tribo Genisteae, família Fabaceae) são muito utilizadas em todo o Mediterrâneo, e em particular na região do Nordeste de Portugal, para fins medicinais e condimentares [1]. Tradicionalmente, procede-se à secagem destas flores logo após a colheita mantendo-as à sombra e à temperatura ambiente durante um período de cerca de 30 dias. No entanto, o processo de liofilização tem vindo a ser indicado como uma melhor alternativa para a preservação da qualidade das amostras [2]. Neste trabalho, avaliaram-se os efeitos do processo de secagem (tradicional *versus* liofilização) no potencial antioxidante e na composição fitoquímica de flores de *Cytisus multiflorus* (L'Hér.) Sweet (giesta branca), *Cytisus scoparius* (L.) Link (giesta negral), *Cytisus striatus* (Hill) Rothm. (giesta amarela) e *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk (carqueja).

As propriedades antioxidantes foram avaliadas por métodos bioquímicos (inibição da descoloração do β -caroteno na presença de radicais livres derivados do ácido linoleico e inibição da formação de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) em homogeneizados cerebrais) e métodos químicos (determinação do poder redutor e da capacidade captadora de radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH)). Determinaram-se antioxidantes hidrofílicos (ácido ascórbico, fenóis incluindo flavonóis e ésteres tartáricos, açúcares) e lipofílicos (carotenoides incluindo β -caroteno e licopeno, clorofilas, tocoferóis e ácidos gordos). O valor energético das amostras foi também calculado com base nos níveis totais de lípidos, proteínas e glúcidos.

A amostra liofilizada de carqueja foi a que apresentou maior atividade antioxidante (valores de $EC_{50} \leq 0,15$ mg/mL). As amostras liofilizadas demonstraram sempre maior bioatividade e maiores concentrações de antioxidantes hidrofílicos (fenóis, ácido ascórbico e açúcares) e lipofílicos (tocoferóis, clorofilas e licopeno) [3]. Este processo pode ser aplicado a plantas medicinais para utilizações na indústria cosmética ou farmacêutica.

Agradecimentos: FCT, POPH-QREN e FSE pela bolsa SFRH/BPD/4609/2008 atribuída a L. Barros.

Referências

- [1] Pardo de Santayana, M., Tardio, J., Blanco, E., Carvalho, A.M., Lastra, J.J., San Miguel, E., Morales, R. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 3 (2007) 27.
- [2] Abascal, K., Ganora, L., Yarnell, E. *Phytotherapy Research*, 19 (2005) 655-660.
- [3] Pinela, J., Barros, L., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R. *Food and Chemical Toxicology*, 49 (2011) 2983-2989.

Efeito do processo de secagem no potencial antioxidante de plantas medicinais da família Fabaceae

José Pinela, Lillian Barros, Ana Maria Carvalho, Isabel C.F.R. Ferreira

*Centro de Investigação de Montanha, Escola Superior Agrária, Campus de Santa Apolónia,
Apartado 1172, 5301-854 Bragança*

As flores dos géneros *Cytisus* e *Genista* (da Tribo Genisteae, família Fabaceae) são muito utilizadas em todo o Mediterrâneo, e em particular na região do Nordeste de Portugal, para fins medicinais e condimentares [1]. Tradicionalmente, procede-se à secagem destas flores logo após a colheita mantendo-as à sombra e à temperatura ambiente durante um período de cerca de 30 dias. No entanto, o processo de liofilização tem vindo a ser indicado como uma melhor alternativa para a preservação da qualidade das amostras [2]. Neste trabalho, avaliaram-se os efeitos do processo de secagem (tradicional *versus* liofilização) no potencial antioxidante, incluindo a composição fitoquímica de flores de *Cytisus multiflorus* (L'Hér.) Sweet (giesta branca), *Cytisus scoparius* (L.) Link (giesta negral), *Cytisus striatus* (Hill) Rothm. (giesta amarela) e *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk (carqueja).

Determinaram-se antioxidantes hidrofílicos (ácido ascórbico, fenóis incluindo flavonóis e ésteres tartáricos, açúcares) e lipofílicos (carotenoides incluindo β -caroteno e licopeno, clorofilas, tocoferóis e ácidos gordos). O valor energético das amostras foi também calculado com base nos níveis totais de lípidos, proteínas e glúcidos. As propriedades antioxidantes foram avaliadas por métodos bioquímicos (inibição da descoloração do β -caroteno na presença de radicais livres derivados do ácido linoleico e inibição da formação de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) em homogeneizados cerebrais) e métodos químicos (determinação do poder redutor e da capacidade captadora de radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH)).

A amostra liofilizada de carqueja foi a que apresentou maior atividade antioxidante (valores de $EC_{50} \leq 0,15$ mg/mL). As amostras submetidas a liofilização demonstraram sempre maior bioatividade e maiores concentrações de antioxidantes hidrofílicos (fenóis, ácido ascórbico e açúcares) e lipofílicos (tocoferóis, clorofilas e licopeno). Este processo pode ser aplicado a plantas medicinais para utilizações na indústria cosmética ou farmacêutica.

Agradecimentos: L. Barros agradece à FCT, POPH-QREN e FSE pela bolsa SFRH/BPD/4609/2008.

Referências

- [1] Pardo de Santayana, M., Tardio, J., Blanco, E., Carvalho, A.M., Lastra, J.J., San Miguel, E., Morales, R. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 3 (2007) 27.
- [2] Abascal, K., Ganora, L., Yarnell, E. *Phytotherapy Research*, 19 (2005) 655-660.