

**Propriedades nutricionais, nutracêuticas e antioxidantes de
espécies silvestres condimentares utilizadas na gastronomia
tradicional do nordeste transmontano**

Ângela Sofia Feitor Fernandes

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança
para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança
Alimentar*

Orientado por

Isabel Cristina F. R. Ferreira

Ana Maria Carvalho

Bragança

2010

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a algumas pessoas a sua valiosa colaboração, disponibilidade e apoio irrefutável no desenvolvimento deste trabalho.

Estou particularmente grata à Doutora Isabel Ferreira e à Doutora Ana Carvalho pela excelente orientação, apoio e simpatia, bem como a experiência e conhecimentos que me proporcionaram.

À Doutora Lillian Barros pela afeição, empenho, atenção e ajuda que me disponibilizou.

À minha mãe, sem ela esta caminhada não seria possível, nada teria valor e nada poderia ter sido concretizado.

Por fim agradeço a todas as pessoas que directa ou indirectamente contribuíram para que este trabalho tivesse sido elaborado.

A todos, um sincero, **muito obrigado!**

RESUMO

As plantas aromáticas e medicinais são muito apreciadas e utilizadas em todo o Mundo. Muitas costumavam ser importantes como suplementos na dieta alimentar, fornecendo compostos bioactivos, eram e são ainda usadas como tempero na cozinha tradicional Portuguesa e em diversas aplicações farmacológicas.

Neste trabalho, determinou-se a composição nutricional e nutracêutica de três espécies de Lamiaceae (*Mentha pulegium*, *Thymus pulegioides* e *Thymus mastichina*). A determinação da composição nutricional incluiu avaliação da humidade, proteínas, lípidos, glícidos e cinzas, bem como determinação do perfil em ácidos gordos por cromatografia gasosa acoplada a um detector de ionização de chama (GC-FID) e em açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de índice de refração (HPLC-RI). A determinação da composição nutracêutica incluiu análise dos tocoferóis por HPLC acoplada a um detector de fluorescência, ácido ascórbico, carotenóides e fenóis totais por métodos espectrofotométricos. Para a determinação da actividade antioxidante foram aplicados quatro ensaios: actividade bloqueadora de radicais livres de 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH), poder redutor, inibição da descoloração do β -caroteno e inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reactivas do ácido tiobarbitúrico (TBARS).

A *Mentha pulegium* (vulgarmente conhecida por poejo) revelou os maiores valores de humidade, cinzas, proteínas e açúcares, bem como as melhores propriedades antioxidantes ($EC_{50} < 0,56$ mg/ml), o que está de acordo com a sua maior concentração em fenóis (331,69 mg/g) e outros antioxidantes tais como, açúcares redutores (7,99 g/100 g) e tocoferóis, principalmente α -tocoferol (69,54 mg/100 g). A presença desses compostos antioxidantes pode explicar a sua utilização como anti-séptico, anti-inflamatório e como conservante de alimentos e em molhos especiais. O *Thymus pulegioides* (tomilho-dos-prados ou pojinha) revelou o maior valor de glícidos (89,35 g/100 g), carotenóides (2,04 mg/100 g) e flavonóides (128,24 mg/g) o que poderá explicar a sua utilização para melhorar o valor nutricional de sopas tradicionais. O *Thymus mastichina* (tomilho-branco) revelou maiores valores de lípidos (8,39 g/100 g), energia (418,35 Kcal/100g), ácido ascórbico (12,87 mg/100 g), e ainda maior quantidade de ácidos gordos polinsaturados (PUFA). Estas propriedades são razões

mais que suficientes para justificar a sua utilização como especiaria, para dar sabor e aroma a várias receitas tradicionais e de conservação de alimentos.

Este estudo contribui para o conhecimento do valor nutricional/nutracêutico de espécies silvestres do Nordeste de Portugal. As plantas estudadas poderão ter um grande potencial na indústria alimentar devido às suas propriedades condimentares e composição nutricional (incluindo açúcares e ácidos gordos ómega-3 e ómega-6), mas também na indústria farmacêutica, devido aos seus benefícios biológicos e medicinais. Os efeitos sinérgicos dos diferentes compostos encontrados (nomeadamente fenóis, vitaminas e carotenóides) contribuem para a explicação dos seus usos tradicionais como anti-sépticos e anti-inflamatórios (actividades relacionadas com o *stress* oxidativo), mas também como conservantes alimentares.

ABSTRACT

Aromatic and medicinal plants are much appreciated and used all over the world. Many used to be important as supplements in the nutrition, providing bioactive compounds and being used as spice in the traditional Portuguese recipes and in diverse pharmacology applications.

In this work the nutritional and nutraceutical composition of three species of Lamiaceae (*Mentha pulegium*, *Thymus pulegioides* and *Thymus mastichina*) were evaluated. The evaluation of the nutritional composition included determination of moisture, proteins, fat, carbohydrates and ash, as well as the determination of the fatty acids composition by gas chromatography coupled to flame ionization detection (GC-FID), and sugars using high performance liquid chromatography coupled to refraction detection (HPLC-RI). The determination of the nutraceutical composition included analysis of tocopherols by HPLC coupled to fluorescence detection, and ascorbic acid, carotenoids and phenolics by spectrophotometric methods. To evaluate the antioxidant activity four assays were applied: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical-scavenging activity (DPPH), reducing power, inhibition of β -carotene bleaching and inhibition of lipid peroxidation in the presence of reactive substances of thiobarbituric acid (TBARS).

Mentha pulegium (commonly known as pennyroyal) revealed the highest contents of moisture, ash, proteins and sugars, as well as the best antioxidant properties ($EC_{50} < 0.56$ mg/ml), according to its higher contents in phenolics (331.69 mg/g) and other antioxidants such as reducing sugars (7.99 g/100 g) and tocopherols, mainly α -tocopherol (69.54 mg/100 g). The presence of these compounds could explain its use as antiseptic, anti-inflammatory and as preservative for food and special sauces. *Thymus pulegioides* (thyme-meadow or pojinha) presented the highest value in carbohydrates (89.35 g/100 g), carotenoids (2.04 mg/100 g) and flavonoids (128.24 mg/g) which could explain its use to increase the nutritional value of traditional soups. *Thymus mastichina* (mastic thyme) showed the highest fat content (8.39 g/100 g), energy (418.35 Kcal/100g) and ascorbic acid (12.87 mg/100 g) as well as the highest values of polyunsaturated fatty acids (PUFA). These properties are reasons to justify its use as spice, to flavor and give aroma to different traditional recipes, and in the conservation of food.

This study contributes to knowledge of the nutritional/nutraceutical value of wild species of northern Portugal. The studied plants may have potential in the food industry, due to its flavoring properties and nutritional composition (including fatty acids omega-3 and omega-6), but also in the pharmaceutical industry, due to its biological and medical benefits. The synergistic effects of the different compounds found (particularly phenolics, vitamins and carotenoids) could contribute to the explanation of their traditional functions as antiseptics and anti-inflammatory (activities related to the oxidative stress), but also in food conservation.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	v
ÍNDICE.....	vii
ÍNDICE DE TABELAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ABREVIATURAS	xi
I. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Nutrientes e nutracêuticos em plantas.....	1
1.2. Stress oxidativo e antioxidantes fitoquímicos.....	4
1.3. Caracterização botânica das plantas estudadas	6
1.4. Usos alimentares e medicinais das plantas estudadas	6
1.5. Objectivos e hipóteses de estudo	11
II. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
2.1. Selecção, colheita e preparação de amostras.....	12
2.2. Produtos químicos.....	12
2.3. Avaliação da composição nutricional	13
2.3.1. <i>Macronutrientes</i>	13
2.3.2. <i>Ácidos Gordos</i>	13
2.3.3. <i>Açúcares</i>	14
2.4. Avaliação da composição nutracêutica	15
2.4.1. <i>Tocoferóis</i>	15
2.4.2. <i>Determinação do ácido ascórbico</i>	15
2.4.3. <i>Carotenóides</i>	16
2.4.4. <i>Fenóis</i>	16
2.5. Avaliação in vitro das propriedades antioxidantes.....	17
2.5.1. <i>Geral</i>	17
2.5.1.1. <i>Actividade bloqueadora de radicais de DPPH</i>	17
2.5.2. <i>Poder redutor</i>	17
2.5.3. <i>Inibição da descoloração do β-caroteno</i>	18

2.5.4. <i>Inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reactivas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)</i>	18
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
3.1. Propriedades nutricionais	20
3.2. Propriedades nutracêuticas	26
IV. CONCLUSÃO	39
V. BIBLIOGRAFIA	41

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.

Informação etnobotânica das três Lamiaceae estudadas. 9

Tabela 2.

Humidade, macronutrientes e valor energético de três Lamiaceae. 22

Tabela 3.

Composição em ácidos gordos de três Lamiaceae. 24

Tabela 4.

Composição em vitaminas e carotenóides de três Lamiaceae..... 29

Tabela 5.

Rendimento de extracção, composição em fenóis e flavonóides, e valores de EC₅₀ relativos à actividade antioxidante de três Lamiaceae..... 35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	
<i>Mentha pulegium</i> L.....	6
Figura 2.	
<i>Thymus pulegioides</i> L.....	7
Figura 3.	
<i>Thymus mastichina</i> L.....	8
Figura 4.	
Perfil de açúcares em <i>Mentha pulegium</i> L.	23
Figura 5.	
Fórmula de estrutura dos açúcares não-redutores sacarose e trealose.	23
Figura 6.	
Perfil de ácidos gordos individuais de <i>Thymus mastichina</i> L.....	25
Figura 7.	
Fórmula de estrutura das vitaminas e carotenóides quantificados nas três Lamiaceae estudadas.	28
Figura 8.	
Perfil de tocoferóis em <i>Mentha pulegium</i> L.	30
Figura 9.	
Estrutura genérica de flavonóides.....	34
Figura 10.	
Estrutura química do trolox: ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2- carboxílico.	38

ABREVIATURAS

A Absorvância

AOAC Métodos oficiais de análise

BHA 2- e 3-*terc*-butil-4-metoxifenol

BHT 2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol

DNA Ácido desoxirribonucleico

DNS 3,5-dinitrosalicílico

DP Desvio padrão

DPPH 1,1-Difenil-2-picril-hidrazilo

EC Concentração de extracto

EUA Estados Unidos da América

FAME Mistura de ésteres metílicos de ácidos gordos

FID Detector de ionização de chama

GAEs Equivalentes de ácido gálico

GC Cromatografia gasosa

HDL Lipoproteína de alta densidade

HPLC Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

LDL Lipoproteína de baixa densidade

MDA-TBA Complexo malonaldeído-ácido tiobarbitúrico

MUFA Ácidos gordos monoinsaturados

NADH Forma reduzida de nicotinamida adenina dinucleotídeo

NAD Nicotinamida adenina dinucleotídeo

OMS Organização Mundial de Saúde

PI Padrão interno

PUFA Ácidos gordos polinsaturados

RI Detector de índice de refração

ROS Espécies Reactivas de Oxigénio

rpm Rotações por minuto

RSA Actividade bloqueadora de radicais

SFA Ácidos gordos saturados

TBARS Substâncias reactivas do ácido tiobarbitúrico

TBA Ácido tiobarbitúrico

I. INTRODUÇÃO

1.1. Nutrientes e nutracêuticos em plantas

Desde os primórdios da humanidade, o homem dependeu do uso das plantas, ao utilizá-las como alimento, medicamento, na construção de abrigos, no aquecimento. As crenças e ritos mágicos imperavam a par da utilização das plantas. Logo assim, as plantas aromáticas foram associadas aos rituais sagrados, devido à intensificação do seu odor ao serem queimadas. Os primeiros habitantes do planeta queimavam plantas de odor agradável para pedir protecção aos bons deuses, sendo que as de aroma desagradável eram usadas para afugentar os animais, os inimigos e os deuses maléficos. Com o passar dos anos, as plantas aromáticas passaram a fazer parte das técnicas de prevenção e tratamento das doenças, de feridas e contusões (Cunha et al. 2007).

Num tempo em que a figura e função do médico era quase ausente dos meios rurais, o uso das plantas era prática corrente entre as mulheres, pastores, ferreiros e virtuosos. Além das plantas comestíveis, cultivadas nas hortas e nos quintais, existiam as espontâneas, tal como hoje. Era a estas que muita gente pobre recorria. A principal aplicação era em sopas com feijão, grão, arroz ou massa, para comer cruas ou em saladas (Salgueiro 2005).

Pela narração de Salgueiro (2005), numa cozinha tradicional e menos variada, mas criativa, percebe-se a importância dos cheiros de poejo, da hortelã, dos coentros na elaboração e condimentação dos cozinhados tradicionais. Ainda é de referir a utilização das plantas no quotidiano das pessoas, como p.e. o uso do poejo queimado para afastar os mosquitos, as moscas e parasitas. Havia um profundo sentido da Natureza e uma atenção especial voltada para as plantas, porque eram essenciais na alimentação, na cura de maleitas e em outros fins.

Nas civilizações orientais, a China e a Índia usavam as plantas na prevenção das doenças por intermédio da fumigação, eram utilizadas como medicamento e ainda hoje a medicina chinesa as emprega com bons resultados. Nas civilizações Grega e Romana, grandes médicos como Hipócrates, considerado o “Pai da Medicina”, indicavam o interesse dos banhos aromáticos com anis, cominhos, incenso, mirra, tomilho no tratamento de doenças da mulher. A civilização Árabe interessou-se mais pela química, tendo desenvolvido a destilação das plantas aromáticas. A Idade Média e o

Renascimento foram caracterizados pelas preparações secretas e cheias de mistério de *unguentos maravilhosos* aplicados com fórmulas mágicas usadas em prol da saúde (Cunha et al. 2007).

Com o Renascimento, o charlatanismo e o empirismo da medicina e da farmácia da Idade Média, cedem lugar à experimentação, ao mesmo tempo que vão sendo introduzidos novos fármacos (Cunha et al. 2007).

De facto, a partir de plantas descritas e usadas com base no conhecimento popular, foram descobertos diversos medicamentos usados até hoje na medicina convencional. O uso terapêutico de plantas medicinais é um dos traços mais característicos da espécie humana. É tão antigo quanto o *Homo sapiens* e encontrado em praticamente todas as civilizações ou grupos culturais conhecidos (Rosa 2009). A natureza proporciona assim ao Homem uma infinidade de plantas com valor medicinal. E a flora portuguesa é uma fonte de plantas que podem auxiliar no tratamento e prevenção de vários males. Se os nossos ancestrais contavam apenas com o conhecimento empírico, nós, hoje, dispomos de pesquisas científicas que comprovam as propriedades medicinais de várias plantas, atestando a sua eficiência (Gobeth 2007).

Pode-se considerar como planta medicinal aquela planta consumida ou administrada sob qualquer forma, que exerce algum tipo de acção farmacológica no Homem ou nos animais. A caracterização botânica das espécies vegetais com actividade farmacológica e o estudo da sua composição química é uma das características da fitoquímica moderna. As plantas aromáticas nas últimas décadas têm sido submetidas a intensos estudos químicos e farmacológicos, que deram a conhecer ou a confirmar a sua actividade e os seus constituintes (Cunha et al. 2007).

Os métodos e as técnicas actuais de isolamento são fundamentais para identificar cada vez mais constituintes das plantas. Quando estes estudos são acompanhados de testes capazes de pôr em evidência as respectivas acções farmacológicas, pode relacionar-se a sua respectiva actividade biológica. Este tem sido o caminho usado pela indústria farmacêutica quando pretende obter um constituinte activo de uma planta já usada na terapêutica tradicional, com vista a poder transformar esse constituinte em medicamento. Foi o que se passou p.e. com a digoxina, extraída da dedaleira, e com muitos outros constituintes activos de plantas dos quais se têm obtido medicamentos (Cunha 2006).

A planta medicinal, para além do ou dos constituintes activos, possui um número elevado de outros compostos que podem influenciar a sua acção. Estes compostos,

protegem os constituintes activos de alterações, tais como oxidações, hidrólises, entre outras, permitindo assim uma melhor absorção pelo organismo (Cunha 2006). Justifica-se assim, que a acção conjunta dos constituintes da planta, tenha muitas vezes, maior efeito e actividade que a mesma quantidade de constituinte activo isolado e, daí, o ter havido um renovado interesse pelos medicamentos à base de plantas (Cunha 2006).

Os diferentes grupos de compostos existentes nas plantas com potencial acção farmacológica incluem vários tipos de moléculas. Para além dos ácidos gordos livres e sob a forma de ésteres glicéricos, que são os principais constituintes dos lípidos, existem nas plantas, outros ácidos orgânicos, normalmente sob a forma de sais. No entanto, estes sais de ácidos orgânicos, no meio estomacal, são hidrolisados e libertam os respectivos ácidos. Destes ácidos destaca-se o cítrico, o málico e o tartárico, que têm sobre o organismo uma acção laxante e diurética. Os ácidos aromáticos e os seus ésteres são também compostos responsáveis por numerosos efeitos farmacológicos. Deste grupo destaca-se o ácido cafeico, rosmarínico, clorogénico, cumárico e fumárico, que têm acção hepatoprotectora e antioxidante, anti-séptica, antifúngica, diurética, analgésica e espasmolítica. Outros compostos são os alcalóides (quimicamente considerados os mais importantes), a piridina (nicotina), indol (estricnina), quinolina (quinina), isoquinolina (morfina), purina (cafeína), entre outros. Existem também constituintes amargos tais como genciana (amarogentina e genciopirina), absinto (absintina), quina (quinina), lúpulo (lupulona e humulona), uma vez administrados aumentam o apetite e melhoram a digestão. Outros compostos são os taninos (compostos polifenólicos com afinidade para as proteínas) que possuem acção anti-séptica (antibacteriana e antifúngica) favorecendo a regeneração dos tecidos no caso de feridas ou queimaduras. Os glícidos, p.e. gomas, mucilagens, pectinas têm acção na supressão do apetite, uma vez que originam a sensação de saciedade, efeito hipocolesterolémico e hipoglicémico e acção imunoestimulante. Os heterósidos mais interessantes para a terapêutica são os antocianósidos, antraquinónicos, cardiotónicos, cianogenéticos, cumarínicos, flavonóides, iridóides, naftoquinónicos, saponósidos e sulfo-heterósidos. Estes heterósidos são potenciais inibidores do aparecimento do cancro. Os óleos essenciais são formados por compostos voláteis que lhes conferem acção anti-séptica, acção espasmolítica, expectorante, sendo também usados em aromaterapia em processos infecciosos cutâneos. Os óleos gordos são constituídos por ésteres de ácidos gordos e de glicerina. Nos ácidos gordos destaca-se o ácido oleico, linoleico, linolénico e araquidónico que, biologicamente, são os mais importantes. A deficiência destes ácidos

na alimentação pode originar eczemas a nível da pele e pode alterar a composição dos fosfolípidos das membranas celulares. As resinas são exsudados vegetais de consistência variável e têm interesse pela sua acção anti-séptica e fluidificante das secreções brônquicas (Cunha 2006).

Por toda esta diversidade de moléculas bioactivas, a utilização de plantas medicinais tornou-se um recurso terapêutico alternativo de grande aceitação pela população e vem crescendo junto da comunidade médica, desde que sejam utilizadas plantas cujas actividades biológicas tenham sido investigadas cientificamente, comprovando a sua eficácia e segurança (Cechinel et al. 1998; Kinghorn 2001; Rigotti 2008).

1.2. Stress oxidativo e antioxidantes fitoquímicos

Nos organismos aeróbios, os radicais livres são produzidos durante o funcionamento normal da célula, na maior parte sob a forma de espécies reactivas de oxigénio (ROS). Uma vez produzidos, a maior parte dos radicais livres são removidos pelas defesas antioxidantes da célula que incluem enzimas e moléculas não enzimáticas. A manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes são uma condição essencial para o funcionamento normal do organismo (Valko et al. 2007; Ferreira et al. 2007). No entanto, há situações em que o equilíbrio entre a produção de ROS e as defesas antioxidantes pode ser destruído devido a uma produção excessiva de ROS, ou porque existe uma deficiência nas defesas antioxidantes da célula (Machlin et al. 1987; Ferreira et al. 2007). Assim, a este desequilíbrio chamamos *stress* oxidativo e nestas situações os ROS em excesso podem oxidar e danificar lípidos celulares, proteínas e DNA, levando à sua modificação e frequentemente à inutilização, inibindo a sua função normal (Fu et al. 1998; Ridnour et al. 2005; Valko et al. 2007; Ferreira et al. 2007).

O stress oxidativo pode ter causas naturais, como o que ocorre 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. A produção não controlada de radicais livres foi associada com múltiplas doenças tais como: cancro, diabetes, cirrose, doenças cardiovasculares, desordens do foro neurológico e também com o processo de envelhecimento (Halliwell et al. 1984; Halliwell 1996; Valko et al. 2007; Ferreira et al. 2007).

O controlo da produção excessiva de ROS pode ser obtido assegurando níveis adequados de antioxidantes e quelantes de radicais livres; quer melhorando a qualidade da dieta (maior consumo de vegetais, leguminosas e frutos), quer evitando comportamentos de risco que levem a uma maior produção de radicais livres e ROS como o tabaco, o álcool, a exposição excessiva a poluentes ambientais e xenobióticos (Lachance et al. 2001; Ferreira et al. 2007).

As mitocôndrias são uma das principais fontes de ROS, mas 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, os ROS têm fácil acesso aos lípidos da membrana, especialmente sensíveis a fenómenos de ataques de radicais livres. A este ataque chamamos peroxidação lipídica e promove a formação de vários tipos de ROS (Mehrotra et al. 1991; Ferreira et al. 2007).

A exposição do organismo a radicais livres, provenientes de diversas fontes, levou o organismo a desenvolver mecanismos de defesa (defesas endógenas) para eliminar estes radicais livres (Cadenas 1997; Ferreira et al. 2007). Estas defesas endógenas podem ser enzimáticas ou não enzimáticas. As defesas antioxidantes enzimáticas são em grande número e encontram-se espalhadas por todo o organismo, tanto no meio intracelular como no meio extracelular. Exemplo destas defesas são a superóxido dismutase, a catalase, a glutathione peroxidase, a glutathione reductase, entre outras. Entre as defesas antioxidantes não enzimáticas destacam-se compostos como a glutathione, o α -tocoferol (vitamina E), o ácido ascórbico (vitamina C), o ácido lipóico, os carotenóides, os flavonóides, entre outros (Valko et al. 2007; Ferreira et al. 2007).

Para além destas defesas endógenas, existe uma panóplia de moléculas naturais ou sintéticas com propriedades antioxidantes e que podem constituir um sistema exógeno de defesa, as quais designamos de fitoquímicos (Kanter 1998; Ferreira et al. 2007).

Os antioxidantes presentes na nossa dieta assumem uma grande importância como possíveis agentes protectores, uma vez que ajudam o corpo humano na redução dos danos oxidativos. Assim, os fitoquímicos são classificados como compostos bioactivos provenientes de diferentes partes das plantas, tais como, sementes, cereais, vegetais, frutos, folhas, raízes, especiarias e ervas (Ramarathnam et al. 1995; Skerget et al. 2005; Ferreira et al. 2007), e estão relacionados com a redução do risco de ocorrência de várias doenças crónicas, nomeadamente vários tipos de cancro. Sendo o *stress*

oxidativo induzido por radicais livres, responsável por várias dessas doenças crónicas, os fitoquímicos presentes em frutos e vegetais assumem cada vez mais uma enorme importância (Liu 2003; Ferreira et al. 2007).

Efectivamente, as plantas são uma fonte natural que contém compostos bioativos eficazes, incluindo antioxidantes, como polifenóis, vitaminas, carotenóides, ácidos gordos insaturados e açúcares redutores, que podem ser utilizadas para diversas aplicações, principalmente como aditivos alimentares e na promoção da saúde como ingredientes na formulação de alimentos funcionais e nutracêuticos (Loziene et al. 2007).

1.3. Caracterização botânica das plantas estudadas

Estudaram-se três espécies silvestres de Lamiaceae amplamente utilizadas em duas regiões de Portugal, Alentejo e Trás-os-Montes: *Mentha pulegium* L., *Thymus pulegioides* L. e *Thymus mastichina* L., respectivamente designadas neste trabalho, por poejo, tomilho-dos-prados e tomilho-branco de acordo com a nomenclatura popular de Trás-os-Montes.



Figura 1. *Mentha pulegium* L.

A *Mentha pulegium* L. (**Figura 1**) caracteriza-se por ser uma espécie herbácea vivaz, de 20 a 40 cm de tamanho, subprostrada, subglabra a tomentosa, fortemente aromática, de folhas pequenas (8 a 30 mm), elíptico-oblongas, atenuadas na base, curtamente pecioladas, inteiras ou esparsamente dentadas, pilosas na página virada para

o caule; inflorescências em verticilastros esféricos com entrenós visíveis, cálice de dentes ciliados; corola de cerca de 5 mm de tamanho, lilacínea, estames exsertos; mericarpos com 0,7 mm, acastanhados (Cunha et al. 2007).

É uma espécie de lameiros e da beira-rio, ocorrendo fundamentalmente ao longo das agueiras. Contudo, é possível encontrá-la ainda nas beiras de caminhos que permanecem húmidos durante parte do ano.

Em fitoterapia, as partes aéreas floridas usam-se para a falta de apetite, em digestões difíceis, na flatulência, em cólicas gastrointestinais. Externamente usa-se em inflamações cutâneas (Cunha et al. 2007).



Figura 2. *Thymus pulegioides* L.

O *Thymus pulegioides* L. (**Figura 2**) é uma espécie subarborescente, herbácea, suberecta a prostrada, de caules floríferos com 25 a 40 cm, por vezes ramificados, tetragonais e só pilosos nos ângulos; folhas pequenas, ovadas, obtusas, geralmente acunheadas e ciliadas na base, sem nervura marginal; inflorescências em verticilastros interrompidos na base e próximos na parte apical, por vezes capituliformes; cálice com 3 a 4 mm com dentes superiores geralmente mais compridos que largos e ciliados; corola com 4 a 5 mm de cor púrpura-rosada (Cunha et al. 2007).

É claramente uma espécie de lameiros húmidos, desenvolvendo-se melhor nas zonas mais sombrias.

Em fitoterapia, é ligeiramente menos activo que o tomilho-branco, mas sendo usado de modo semelhante em afecções das vias respiratórias (tosse, bronquite) e do

aparelho digestivo, como dispepsias hipossecretoras, flatulência, cólicas gastrointestinais. Também é empregue em perturbações urinárias como cistites e litíase. Externamente é usado em infecções cutâneas e estomatites. Utiliza-se em banhos para diminuir dores e espasmos musculares (Cunha et al. 2007).



Figura 3. *Thymus mastichina* L.

O *Thymus mastichina* L. (**Figura 3**) é uma espécie subarborescente de 10 a 30 cm de porte, com caules puberulentos, erectos, ou ascendentes; folhas de 7 x 1 mm, geralmente excedendo os fascículos de folhinhas axilares, lineares, subagudas, sésseis, tomentosas, de margens revolutas e esparsamente ciliadas na base; inflorescências verticilastros até 10 cm, espiciformes ou capituliformes, de brácteas semelhantes às folhas e excedendo os verticilastros; cálice com 3 a 4 mm tomentoso, verde-acinzentado, de dentes tão compridos como largos, geralmente não ciliados; corola de 4 a 5 mm, esbranquiçada (Cunha et al. 2007).

É uma planta heliófita e ruderal (que vive nos caminhos e beiras das estradas), também frequente nos terrenos incultos, matos e matagais.

Em fitoterapia, as partes aéreas são usadas nas afecções das vias respiratórias (gripe, catarros, tosse irritativa) e também nas digestões lentas, gastrites crônicas e dores espasmódicas do tubo digestivo (Cunha et al. 2007).

1.4. Usos alimentares e medicinais das plantas estudadas

A **Tabela 1** apresenta um resumo dos usos alimentares e medicinais, bem como o nome científico e vulgar de cada uma das plantas estudadas.

Tabela 1. Informação etnobotânica das três Lamiaceae estudadas.

Nome científico	Nome vulgar	Indicação medicinal	Uso na alimentação
<i>Mentha pulegium</i> L.	Poejo, mangerico do rio, poejo dos lameiros	Sistema digestivo, indigestão, colesterol, panaceia	Tempero de sopas de peixe e caldeiradas, chá/tisana, licor
<i>Thymus pulegioides</i> L.	Pojinha, tomilho-dos-prados	Sistema respiratório, constipações, tosse	Chá/tisana e temperos
<i>Thymus mastichina</i> L.	Bela-luz, sal-puro, tomilho-branco	Sistema digestivo, indigestão, panaceia	Adoba de coelho e carne, tempero de pratos cozinhados, cura de azeitonas

O poejo é um condimento emblemático da gastronomia do Alentejo (Póvoa 2008), sendo também particularmente apreciado em Trás-os-Montes (Pardo de Santayana et al. 2007; Carvalho 2010). É muito popular em todo o país devido ao famoso licor preparado com as inflorescências, o licor de poejo. O uso tradicional desta espécie centra-se em usos alimentares e em aplicações farmacêuticas, sem uma fronteira clara entre estas duas finalidades. A parte aérea e as inflorescências são recolhidas durante o verão, secas à sombra e mantidas em casa para temperar e preparar remédios caseiros (infusões, xaropes, elixir) recomendados para a indigestão, dor de estômago, dores de cabeça, sistema respiratório e colesterol (Póvoa et al. 2004; Pardo de Santayana et al. 2007). O licor e a infusão de flores são bebidos tanto por prazer como pelas suas propriedades digestivas e carminativas (Pardo de Santayana et al. 2007; Carvalho 2010). No Alentejo, usa-se uma pasta, localmente conhecida como "piso", que é preparada com partes da planta fresca, sal, alho e azeite; esta mistura é preservada para uso posterior ao longo do ano, quando a planta não está disponível (Póvoa et al. 2004; Póvoa 2008; Póvoa et al. 2009). Várias receitas com "piso" são utilizadas em

cozinhados à base de peixe, pão e diferentes tipos de queijo de cabra ou ovelha. Além disso, no Alentejo, o poejo é geralmente cultivado nas proximidades das janelas para, no verão, repelir moscas e mosquitos (Póvoa et al. 2004).

O tomilho-dos-prados, também conhecido como pojinha, é uma espécie dos prados do norte de Portugal, ocorrendo raramente na região sul. Em Trás-os-Montes, esta espécie de tomilho é muito valorizada na terapia popular (Carvalho 2010) e devido às suas propriedades, tem sido tradicionalmente utilizado como anti-séptico e anti-inflamatório no tratamento das constipações, tosse, sinusite, bronquite, pneumonia e tuberculose. Efeitos carminativos e emenagogos também foram relatados (Carvalho 2010). As infusões medicinais e as tisanas são preparadas com a parte aérea da planta, devendo ser colhidas em Junho e penduradas em ramos a secar. As inflorescências, uma vez secas, eram frequentemente usadas para tempero de caldos insípidos e refeições pouco variadas durante os períodos de fome. Várias pessoas entrevistadas acerca do seu uso, afirmaram que, além de dar gosto agradável, o tomilho contribui para melhorar o valor nutritivo dos alimentos, tal como outras ervas aromáticas, que tradicionalmente se colhiam no meio envolvente das aldeias (Pardo de Santayana et al. 2007; Carvalho 2010).

O tomilho-branco é uma das plantas mais populares, usada como aditivo alimentar, na região de Trás-os-Montes. É uma planta perene do Mediterrâneo, também considerada como planta medicinal (Ivanova et al. 2005; Kumarasamy et al. 2007; Pardo de Santayana et al. 2007; Carvalho 2010). As folhas e as inflorescências são secas, armazenadas e usadas durante todo o ano, para dar sabor a várias receitas tradicionais e ajudar na conservação de alimentos. A sua utilização na cozinha tradicional não tem apenas como objectivo melhorar a qualidade das receitas gastronómicas, mas também como uso terapêutico, porque permite aumentar a digestibilidade dos alimentos cozinhados como afirmam Bonet e Valles (2002). Na medicina popular, o tomilho-branco é recomendado para o sistema respiratório e gastrointestinal. Infusões preparadas com material seco desta planta são boas para aliviar constipações, tosse, irritação na garganta e dores abdominais. As tisanas da planta fresca são aconselhadas para a indigestão e dor de barriga. As folhas têm propriedades anti-inflamatórias e anti-sépticas e, portanto, são usadas para inflamações externas e doenças de pele (Carvalho et al. 2007; Frazão-Moreira et al. 2007; Pardo de Santayana et al. 2007; Carvalho 2010).

1.5. Objectivos e hipóteses de estudo

A maioria dos usos descritos para as plantas estudadas resulta de situações empíricas recolhidas numa perspectiva etnobotânica e etnofarmacológica. Partindo do pressuposto de que o uso empírico destas espécies e os saberes e práticas a elas associados foram ratificados e confirmados ao longo de gerações de consumidores, é de considerar que as espécies em estudo têm um potencial fitoquímico, fitofarmacológico e nutritivo que interessa avaliar. Assim sendo, o presente trabalho tem como objectivo geral analisar e descrever a composição nutricional e nutracêutica, e as propriedades antioxidantes da parte aérea de três espécies de Lamiaceae (*Mentha pulegium*, *Thymus pulegioides* e *Thymus mastichina*). Na análise nutricional, determinaram-se proteínas, lípidos, cinzas e glúcidos, e identificaram-se os perfis individuais de açúcares e de ácidos gordos por técnicas cromatográficas. Na análise nutracêutica, determinaram-se compostos fitoquímicos, tais como fenóis, flavonóides, carotenóides e vitaminas (tocoferóis e ácido ascórbico). Para avaliar a actividade antioxidante utilizaram-se quatro ensaios, nomeadamente, actividade bloqueadora de radicais de DPPH, poder redutor, inibição da descoloração do β -caroteno e inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reactivas do ácido tiobarbitúrico (TBARS).

II. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Selecção, colheita e preparação de amostras

A escolha dos exemplares silvestres, assim como das partes das plantas que constituem as amostras para análise, teve em conta critérios relacionados com o conhecimento empírico e as práticas locais relativas ao uso das espécies seleccionadas (Póvoa et al. 2004; Pardo de Santayana et al. 2007; Carvalho 2010). Além disso, foi também considerado o padrão de desenvolvimento anual das plantas e a data de ocorrência do estágio vegetativo adequado ao uso condimentar e medicinal.

O material vegetal para análise e o material necessário para a elaboração de pranchas de herbário foram ambos colhidos nos meses de Maio e Junho de 2008 e 2009, nos habitats característicos de cada espécie, em terrenos pertencentes a informantes das aldeias de Donai, Espinhosela e Cova de Lua, incluídas no território do Parque Natural de Montesinho, Trás-os-Montes, Nordeste de Portugal. A respectiva identificação botânica foi confirmada com os caracteres morfológicos definidos pela Nova Flora de Portugal (Franco 1984) e pela Flora Ibérica (Castroviejo coord. 2010). Os exemplares prensados e montados encontram-se depositados no Herbário da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança.

Das três espécies foi colhida a parte aérea florida (flores na ántese) constituída por caules com inflorescências e folhas, troços de aproximadamente 20 cm medidos a partir da base da inflorescência e em direcção à zona do colo da planta.

As amostras foram liofilizadas com o equipamento Ly-8-FM-ULE, Snijders, Holanda, e mantidas nas melhores condições para uso posterior.

2.2. Produtos químicos

Os solventes acetonitrilo 99,9%, n-hexano 95% e acetato de etilo 99,8% eram de gradiente HPLC e marca Lab-Scan (Lisboa, Portugal). Todos os outros solventes usados eram de grau analítico: metanol e éter etílico, da marca Lab-Scan, tolueno e ácido sulfúrico, da marca Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). A mistura padrão com 37 ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) (C4-C24; norma 47885-U) foi adquirida na Sigma, assim como outros isómeros individuais de ácidos gordos, padrões de açúcares ($L(+)$ -arabinose, $D(-)$ -frutose, L -fucose, $D(+)$ -galactose, $D(+)$ -glucose anidra,

lactose mono-hidratada, maltose mono-hidratada, maltulose mono-hidratada, $D(+)$ -manitol, $D(+)$ -manose, $D(+)$ -melezitose, $D(+)$ -melibiose mono-hidratada, $D(+)$ -rafinose penta-hidratada, $L(+)$ -ramnose mono-hidratada, $D(+)$ -sacarose, $D(+)$ -trealose, $D(+)$ -turanose e $D(+)$ -xilose), padrões de tocoferóis (α , β , γ e δ) e os padrões utilizados nos ensaios da actividade antioxidante: trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), ácido gálico e (+)-catequina. O tocol racémico, 50 mg/ml, foi adquirido na Matreya (PA, EUA). O 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) foi obtido na Alfa Aesar (Ward Hill, MA, EUA). Todos os outros produtos químicos foram obtidos na Sigma. A água foi tratada num sistema de purificação Milli-Q (TGI Puré Water Systems, EUA).

2.3. Avaliação da composição nutricional

2.3.1. Macronutrientes

Para determinação da composição química das amostras, analisou-se humidade, proteínas, lípidos, glícidos e cinzas, utilizando os procedimentos AOAC (1995). As proteínas totais ($N \times 6,25$) foram estimadas pela técnica macro-Kjeldahl. Os lípidos totais foram determinados após extracção de uma massa conhecida da amostra com éter de petróleo, utilizando o aparelho de Soxhlet. As cinzas foram determinadas por incineração a 660 ± 15 °C. Os glícidos foram calculados por diferença: $100 - (g \text{ proteínas} + g \text{ lípidos} + g \text{ cinzas})$, os açúcares redutores foram determinados pelo método colorimétrico do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). A energia total foi calculada de acordo com a seguinte equação: Energia (Kcal) = $4 \times (g \text{ proteínas} + g \text{ glícidos}) + 9 \times (g \text{ lípidos})$.

2.3.2. Ácidos Gordos

Os ácidos gordos foram determinados por cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (GC-FID), como descrito anteriormente por Barros et al. (2008), e após o seguinte processo de trans-esterificação. A massa obtida por extracção em Soxhlet foi misturada com 5 ml de metanol:ácido sulfúrico:tolueno 2:1:1 (v/v/v), durante pelo menos 12 h, num banho a 50 °C a 160 rpm; de seguida, adicionaram-se 3 ml de água desionizada, para obter a separação das fases. A FAME foi recuperada com 3 ml de éter etílico em agitação no vortex; fez-se passar o sobrenadante através de uma microcoluna de sulfato de sódio anidro, a fim de eliminar a água; recuperou-se a amostra para um *vial* com teflon e filtrou-se com um filtro de nylon 0,2 μ m Milipore. O

perfil de ácidos gordos foi obtido num GC modelo DANI 1000 equipado com um injector *split/splitless*, detector de ionização de chama (FID) e uma coluna Macherey Nagel (30 m × 0,32 mm × 0,25 µm). O programa de temperatura do forno foi o seguinte: a temperatura inicial da coluna foi 50 °C, durante 2 min; em seguida, aumentou-se a temperatura a 10 °C/min até 240 °C, que foi mantida por 11 min. O gás de transporte (hidrogénio) tinha um caudal de 4,0 ml/min (0,61 bar), medido a 50 °C. A injeção *split* (1:40) foi realizada a 250 °C. Para cada análise, injectou-se 1 µl da amostra. A identificação de ácidos gordos foi feita com base nos tempos de retenção relativos dos picos da FAME e das amostras. Os resultados foram processados usando o software CSW 1,7 (DataApex 1,7) e expressos em percentagem relativa de cada ácido gordo.

2.3.3. Açúcares

Os açúcares livres foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de índice de refração (HPLC-RI), conforme descrito por Barros et al. (2008) com algumas modificações. A amostra liofilizada (1,0 g) foi enriquecida com melezitose como padrão interno (PI, 5 mg/ml) e foi extraída com 40 ml de etanol aquoso 80%, a 80 °C, durante 30 min. A suspensão resultante foi centrifugada (centrífuga refrigerada Centorion K240R-2003) a 15,000g durante 10 min. O sobrenadante foi concentrado a 60 °C sob pressão reduzida; os vestígios de lípidos foram removidos em três lavagens sucessivas com 10 ml de éter etílico. Após a concentração a 40 °C, os resíduos sólidos foram dissolvidos em água para um volume final de 5 ml. Os açúcares foram determinados usando o HPLC (Knauer, sistema Smartline) a 35 °C. O sistema de HPLC estava equipado com um detector de RI (Knauer Smartline 2300) e com uma coluna 100-5 NH₂ Eurospher (4,6 × 250 mm, 5 mm, Knauer). A fase móvel foi acetonitrilo/água desionizada, 7:3 (v/v) com um caudal de 1 ml/min. Os resultados foram expressos em g por 100 g de massa seca, calculados pela normalização interna da área do pico cromatográfico. A identificação dos açúcares foi feita comparando os tempos de retenção relativos dos picos das amostras com padrões.

2.4. Avaliação da composição nutracêutica

2.4.1. Tocoferóis

Os tocoferóis foram determinados segundo um procedimento previamente otimizado e descrito por Barros et al. (2009). Antes do processo de extração, adicionou-se à amostra (~500 mg) uma solução BHT em hexano (10 mg/ml; 100 µl) e uma solução de PI em hexano (tocol:50 µg/ml; 400 µl). As amostras foram homogeneizadas com metanol (4 ml) no vortex (1 min). Posteriormente, adicionou-se hexano (4 ml) e homogeneizou-se novamente no vortex durante 1 min. Seguidamente, adicionou-se uma solução aquosa concentrada de NaCl (2 ml), homogeneizou-se (1 min) e centrifugou-se (5 min, 4000g). O sobrenadante foi, cuidadosamente, transferido para um *vial*. A amostra foi re-extraída mais duas vezes com hexano. Os extratos combinados foram levados à secura sob corrente de azoto, re-dissolvidos em 2 ml de hexano, desidratados com sulfato de sódio anidro, filtrados através de um filtro descartável LC de 0,22 µm, transferidos para um *vial* de injeção *ambar* e analisados no HPLC. O equipamento de HPLC consistia num sistema integrado com uma bomba Smartline 1000 (Knauer, Alemanha), um desgaseificador Smartline 5000, um amostrador automático AS-2057 2500 e um detector de fluorescência FP-2020 (Jasco, Japão) programado para excitação a 290 nm e emissão a 330 nm. Os dados foram analisados usando o software Clarity 2,4 (DataApex). A separação cromatográfica foi conseguida com uma coluna em fase normal Poliamida II (250 × 4,6 nm) YMC Waters (Japão) operando a 30 °C (forno 7971 R Grace). A fase móvel utilizada foi uma mistura de hexano e acetato de etilo (7:3, v/v) com um caudal de 1 ml/min. A quantificação foi baseada na resposta do sinal de fluorescência, usando o método do padrão interno e por comparação cromatográfica com padrões. Os resultados foram expressos em µg por g de massa seca.

2.4.2. Determinação do ácido ascórbico

O ácido ascórbico foi determinado de acordo com o método de Klein e Perry (1982). A amostra liofilizada (150 mg) foi extraída com ácido metafosfórico (1%, 10 ml) durante 45 min à temperatura ambiente e filtrada através de um 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 (Espectrofotómetro Analytikijena 200-2004). A concentração de ácido ascórbico foi calculada com base na curva de calibração de L-

ácido ascórbico (0,006-0,1 mg/ml; $y = 3,0062x + 0,007$; $R^2=0,9999$), e os resultados foram expressos em mg de ácido ascórbico por g de massa seca.

2.4.3. Carotenóides

O β -caroteno e o licopeno foram determinados de acordo com o método de Nagata e Yamashita (1992). A amostra liofilizada (150 mg) foi agitada vigorosamente com 10 ml de acetona-hexano (4:6) durante 1 min e filtrada através de papel de filtro Whatman n.º 4. A absorvância do filtrado foi medida a 453, 505, 645 e 663 nm. As concentrações de β -caroteno e licopeno foram calculadas de acordo com a seguinte equação: licopeno (mg/100ml) = $-0,0458 \times A_{663} + 0,204 \times A_{645} + 0,372 \times A_{505} - 0,0806 \times A_{453}$; β -caroteno (mg/100 ml) = $0,216 \times A_{663} - 1,220 \times A_{645} - 0,304 \times A_{505} + 0,452 \times A_{453}$. Os resultados foram expressos em mg de carotenóides por g de massa seca.

2.4.4. Fenóis

A amostra liofilizada (~1g) foi extraída com 50 ml de metanol a 25 °C e com agitação a 150 rpm durante 12 h e filtrada através de papel de filtro Whatman n.º 4. O resíduo extraído com mais 50 ml de metanol. Os extractos foram obtidos por evaporação do metanol a 35 °C sob pressão reduzida (evaporador rotativo Büchi R-210), re-dissolvidos em metanol na concentração de 10 mg/ml, e armazenados a 4 °C para posterior utilização.

Os fenóis totais foram estimados com base no procedimento descrito por Wolfe et al. (2003) com algumas modificações. A uma alíquota da solução de extracto (1 ml), adicionou-se *Folin-Ciocalteu* (5 ml, previamente diluído em água 1:10 v/v) e carbonato de sódio (75 g/1,4 ml). Centrifugou-se a mistura durante 15 s e deixou-se repousar durante 30 min a 40 °C para desenvolvimento da cor. A absorvância foi medida a 765 nm. O ácido gálico foi utilizado para o cálculo da curva padrão (0,05-0,8 mM: $y = 1,9799x + 0,0299$; $R^2 = 0,9997$), e os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico (GAEs) por g de extracto.

Os flavonóides totais foram determinados pelo método de Jia et al. (1999), com algumas modificações. Uma alíquota (0,5 ml) da solução de extracto foi misturada com água destilada (2 ml) e, posteriormente, com solução de NaNO₂ (5%, 0,15 ml). Após 6 min, adicionou-se a solução de AlCl₃ (10%, 0,15 ml) e deixou-se repousar durante 6 min. Adicionou-se uma solução de NaOH (4%, 2 ml) e água destilada até perfazer o volume final de 5 ml. Em seguida, a solução foi completamente misturada e deixada

repousar durante 15 min. A intensidade da cor rosa foi medida a 510 nm. (+) Catequina foi utilizada para calcular a curva padrão (0,0156-1,0 mM; $y = 0,9186x - 0,0003$; $R^2 = 0,9999$) e os resultados foram expressos em mg de (+)-catequina equivalente (CEs) por g de extracto.

2.5. Avaliação *in vitro* das propriedades antioxidantes

2.5.1. Geral

Foram aplicados quatro ensaios (Barros et al. 2009) para avaliar a actividade antioxidante de todas as amostras. Utilizaram-se concentrações de extracto entre 10 e 0,05 mg/ml para determinar os valores de EC₅₀.

2.5.1.1. Actividade bloqueadora de radicais de DPPH

Esta metodologia foi realizada utilizando um Leitor de Microplacas ELX800 (Bio-Tek equipamento, Inc.). A mistura da reacção em cada um dos 96 poços consistiu em: extracto de cada uma das concentrações testadas (30 µl) e solução metanol:água (8:2, v/v, 270 µl) contendo radicais de DPPH (6×10^{-5} mol/l). A mistura foi deixada em repouso durante 60 min no escuro. A redução do radical de DPPH foi determinada pela medição da absorvância a 515 nm. A actividade bloqueadora de radicais (RSA) foi calculada como percentagem da descoloração da solução de DPPH, usando a equação: $\% \text{ RSA} = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{S}})/A_{\text{DPPH}}] \times 100$, onde A_{S} é a absorvância da solução na presença de extracto numa determinada concentração e A_{DPPH} é a absorvância da solução de DPPH. A concentração de extracto que leva a 50% da actividade bloqueadora de radicais (EC₅₀) foi calculada a partir do gráfico de percentagem RSA em função da concentração de extracto. Utilizou-se trolox como padrão.

2.5.2. Poder redutor

Esta metodologia foi realizada utilizando o Leitor de Microplacas descrito anteriormente. As diferentes concentrações de extracto (0,5 ml) foram misturadas com tampão fosfato de sódio (200 mmol/l, pH 6,6, 0,5 ml) e adicionou-se ferricianeto de potássio (1% w/v, 0,5 ml). A mistura foi incubada a 50 °C durante 20 min e 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 férrico (0,1% w/v, 0,16 ml), a absorvância foi medida a 690 nm. A concentração de extracto que fornece 0,5 de

absorvância (EC₅₀) foi calculada a partir do gráfico de absorvância a 690 nm em função da concentração do extracto. Utilizou-se trolox como padrão.

2.5.3. Inibição da descoloração do β-caroteno

Preparou-se uma solução por dissolução de β-caroteno (2 mg) em clorofórmio (10 ml). Transferiram-se 2 ml desta solução para um balão de fundo redondo. Após remoção do clorofórmio a 40 °C, sob vácuo, juntou-se ácido linoleico (40 mg), emulsificante Tween 80 (400 mg) e água destilada (100 ml) e agitou-se vigorosamente. Transferiu-se uma alíquota (4,8 ml) desta emulsão para tubos de ensaio contendo diferentes concentrações dos extractos (0,2 ml). Os tubos foram agitados e incubados a 50 °C em banho-maria. Imediatamente após a adição da emulsão a cada tubo, mediu-se a absorvância a 470 nm no tempo zero. A inibição da descoloração do β-caroteno foi calculada utilizando a seguinte equação: (conteúdo de β-caroteno após 2 h de ensaio/conteúdo inicial de β-caroteno) × 100. A concentração de extracto que leva a 50% de actividade antioxidante (EC₅₀) foi calculada por interpolação a partir do gráfico de percentagem da inibição da descoloração do β-caroteno em função da concentração de extracto. Utilizou-se trolox como padrão.

2.5.4. Inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reactivas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Utilizou-se tecido cerebral de porco (*Sus scrofa*) com cerca de 150 Kg de peso, dissecado e homogeneizado em gelo com tampão Tris-HCl (20 mM, pH 7,4) numa proporção 1:2 (w/v) e após centrifugação a 3000g durante 10 min. Incubou-se uma alíquota (0,1 ml) do sobrenadante com as diferentes concentrações dos extractos (0,2 ml), FeSO₄ (10 μM; 0,1 ml) e ácido ascórbico (0,1 mM; 0,1ml) a 37 °C durante 1 h. A reacção 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 de proteínas, a intensidade da cor do complexo malonaldeído (MDA)-TBA do sobrenadante foi medida através da sua absorvância a 532 nm. A percentagem de inibição da peroxidação lipídica (%) foi calculada utilizando a seguinte fórmula: [(A - B)/A] × 100%, onde A e B era a absorvância do controlo e da solução com o extracto, respectivamente. A concentração de extracto que leva a 50% de inibição da peroxidação

lipídica (EC_{50}) foi calculada a partir do gráfico da percentagem de inibição da formação de TBARS em função da concentração de extracto. Utilizou-se trolox como padrão.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Propriedades nutricionais

A deficiência de micronutrientes tornou-se um problema global, especialmente em locais onde a dieta é pouco variada (Welch et al. 1999; Kennedy et al. 2003; Flyman et al. 2006). Há aproximadamente 40 vitaminas e minerais, que são considerados essenciais para o desenvolvimento físico e mental, para o sistema imunológico e para os processos metabólicos. Em 2000, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que mais de 3,7 milhões de mortes poderiam ser atribuídas ao baixo peso das crianças. Para além destas, as deficiências em ferro, zinco e vitamina A, causaram um adicional de 750000-850000 de mortes (Food and Agriculture Organization 2004; Flyman et al. 2006).

Têm sido aplicadas três estratégias para resolver a desnutrição em micronutrientes: suplementação, fortificação e modificação da dieta (Kennedy et al. 2003; Flyman et al. 2006). A suplementação é uma abordagem técnica onde os nutrientes são fornecidos directamente em xaropes ou comprimidos, enquanto a fortificação implica a utilização de alimentos amplamente acessíveis e vulgarmente consumidos. A modificação dietética visa aumentar a quantidade de micronutrientes consumidos na dieta e os nutrientes mais disponíveis para absorção pelo corpo humano (Ruel 2001; Flyman et al. 2006). O presente trabalho pretende promover o consumo de três plantas silvestres a partir da modificação da dieta.

Vários autores referem que as dietas dos países desenvolvidos não são as mais adequadas (Johns 2003; Flyman et al. 2006) e que a globalização e a modernização na agricultura resultaram na simplificação das dietas e na dependência de poucas espécies alimentares (Welch et al. 1999; Flyman et al. 2006). A promoção da integração de vegetais silvestres na dieta é uma forma prática e sustentável de melhorar a carência de nutrientes (Chadha et al. 2003; Flyman et al. 2006). Há um consenso crescente de que os alimentos silvestres poderiam contribuir significativamente para aliviar a fome e a desnutrição (Burlingame 2000; Flyman et al. 2006). Além disso, há evidências que sugerem que o sucesso da nutrição está ligado à diversificação de alimentos (Altieri et al. 1987; Flyman et al. 2006), que

poderá ser conseguido através da modificação das práticas agrícolas e do aumento da produção de plantas silvestres (Grivetti 1979; Flyman et al. 2006).

O facto de muitas comunidades rurais serem nutricionalmente bem sucedidas, mesmo durante os períodos de seca, confirma a importância do reconhecimento dos recursos tradicionais e da utilização dos alimentos silvestres (Altieri et al. 1987; Flyman et al. 2006). Assim, a utilização de plantas silvestres para combater a deficiência de micronutrientes (minerais e vitaminas) na dieta humana assume uma enorme relevância (Booth et al. 1992; Freyre et al. 2000; Ogle et al. 2001; Sundriyal et al. 2004; Gupta et al. 2005; Flyman et al. 2006).

Os múltiplos papéis das plantas silvestres tradicionais como alimento e como fonte medicinal têm sido amplamente documentados. Os vegetais silvestres contêm quantidades relativamente elevadas de vitaminas. Estes e outros micronutrientes antioxidantes presentes nos frutos e legumes frescos (Szeto et al. 2002; Flyman et al. 2006), promovem a saúde, ajudando na prevenção do cancro, na regulação da tensão arterial, estimulam o sistema imunológico, melhoram o metabolismo de fármacos e a regeneração dos tecidos (Rayner 1998; Krebs-Smith et al. 2001; Walingo 2005; Flyman et al. 2006). Para além da riqueza em micronutrientes as plantas silvestres têm também na sua composição química, diferentes macronutrientes.

Na **Tabela 2**, apresenta-se o perfil das três plantas estudadas em macronutrientes e o seu valor energético.

Tabela 2. Humidade (g/100 g de massa fresca), macronutrientes (g/100 g de massa seca) e valor energético (kcal/100 g de massa seca) de três Lamiaceae (média \pm DP, n = 3). Em cada linha, letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0,05$).

	<i>Mentha pulegium</i>	<i>Thymus pulegioides</i>	<i>Thymus mastichina</i>
Humidade	59,47 \pm 9,22 a	47,66 \pm 12,60 c	54,67 \pm 7,03 b
Cinzas	5,92 \pm 0,09 a	4,94 \pm 0,62 c	5,89 \pm 0,18 b
Glúcidos	84,74 \pm 0,59 b	89,35 \pm 1,54 a	80,83 \pm 0,18 c
Proteínas	7,12 \pm 0,49 a	5,53 \pm 1,40 b	4,89 \pm 0,10 c
Lípidos	2,22 \pm 0,22 b	0,18 \pm 0,02 c	8,39 \pm 0,23 a
Energia	387,44 \pm 0,53 b	381,14 \pm 1,76 c	418,35 \pm 0,96 a
Frutose	2,39 \pm 0,11 a	0,22 \pm 0,00 c	0,99 \pm 0,02 b
Glucose	3,37 \pm 0,22 a	0,33 \pm 0,03 c	2,14 \pm 0,24 b
Sacarose	4,62 \pm 0,28 a	1,06 \pm 0,02 b	0,04 \pm 0,00 c
Trealose	0,61 \pm 0,05 a	0,24 \pm 0,04 b	nd
Rafinose	0,29 \pm 0,05 b	0,55 \pm 0,04 a	nd
Açúcares totais	11,29 \pm 0,61 a	2,39 \pm 0,13 c	3,17 \pm 0,24 b
Açúcares redutores	7,99 \pm 1,72 a	2,11 \pm 0,15 c	2,65 \pm 0,07 b

nd: não detectado

O poejo revelou maior valor de humidade, cinzas, proteínas e açúcares, o tomilho-dos-prados revelou maior valor de glúcidos e rafinose e o tomilho-branco revelou maior quantidade de lípidos e energia. Os glúcidos foram os macronutrientes mais abundantes; os açúcares foram apenas uma pequena parte dos glúcidos totais, devido à presença abundante de polissacarídeos como o amido e a celulose. A celulose é um polissacarídeo estrutural que constitui o maior componente da parede celular das plantas; é o composto orgânico mais abundante constituindo, aproximadamente, 50% de todo o carbono encontrado em plantas (Zubay 2006). O amido é o polissacarídeo mais utilizado como reserva energética nas células vegetais, quer na forma não ramificada de amilose quer na forma ramificada de amilopectina (Zubay 2006).

Os açúcares frutose, glucose, trealose, rafinose e sacarose foram detectados nas amostras de poejo e tomilho-dos-prados, sendo este último o açúcar mais abundante. Na

amostra de tomilho-branco não foram detectados os açúcares rafinose e trealose. Os açúcares encontrados desempenham funções centrais no metabolismo energético e fornecem carbonos para a síntese de outros compostos. A **Figura 4** mostra um cromatograma exemplificativo do perfil de açúcares obtido para uma das plantas estudadas.

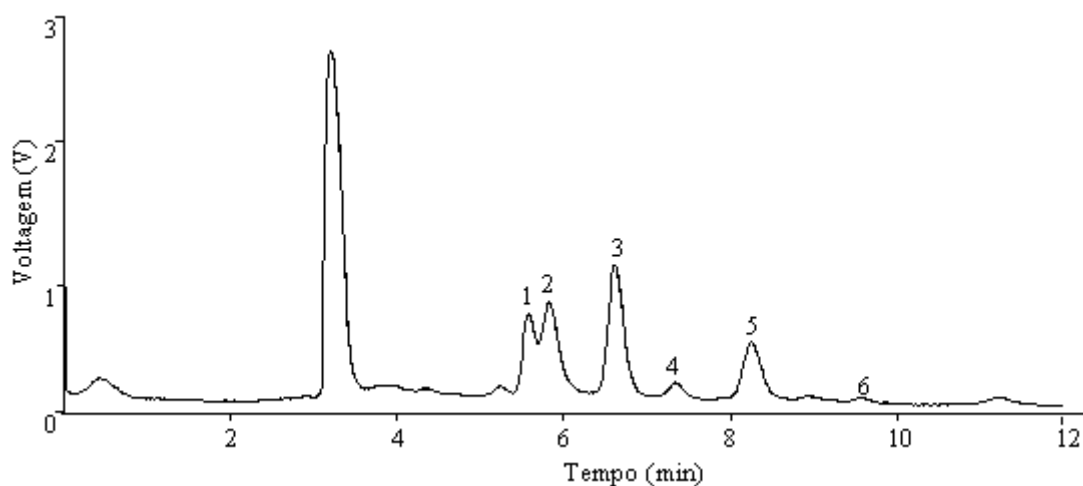


Figura 4. Perfil de açúcares em *Mentha pulegium* L. 1- Frutose; 2- Glucose; 3- Sacarose; 4- Trealose; 5- Melezitose (PI); 6- Rafinose.

Os açúcares totais foram mais elevados do que os açúcares redutores, devido à presença de sacarose e trealose que são açúcares não-redutores (**Figura 5**).

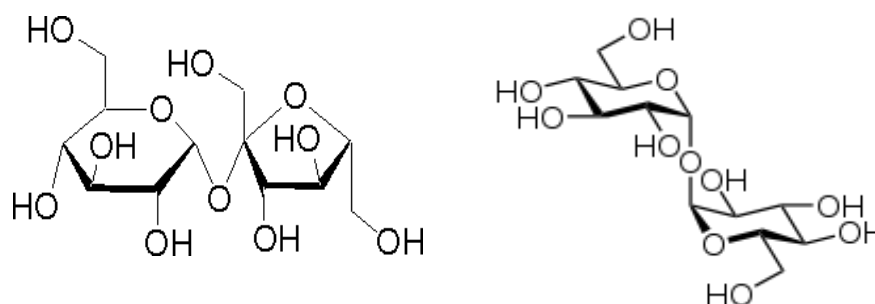


Figura 5. Fórmula de estrutura dos açúcares não-redutores sacarose e trealose.

Na **Tabela 3**, apresentam-se os resultados da composição em ácidos gordos, SFA (ácidos gordos saturados), MUFA (ácidos gordos monoinsaturados) e PUFA (ácidos gordos polinsaturados).

Tabela 3. Composição em ácidos gordos (percentagem relativa) de três Lamiaceae (média \pm DP, n = 3). Em cada linha, letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0,05$).

	<i>Mentha pulegium</i>	<i>Thymus pulegioides</i>	<i>Thymus mastichina</i>
C6:0	0,79 \pm 0,04	0,28 \pm 0,05	0,05 \pm 0,00
C8:0	1,03 \pm 0,06	nd	0,21 \pm 0,00
C12:0	1,75 \pm 0,20	0,24 \pm 0,01	0,12 \pm 0,01
C14:0	3,42 \pm 0,07	5,70 \pm 0,74	1,32 \pm 0,02
C14:1	0,32 \pm 0,02	1,42 \pm 0,16	0,16 \pm 0,00
C15:0	0,14 \pm 0,04	0,30 \pm 0,00	0,09 \pm 0,00
C16:0	14,82 \pm 0,09	16,70 \pm 0,22	10,22 \pm 0,20
C16:1	0,11 \pm 0,01	nd	0,38 \pm 0,08
C17:0	0,52 \pm 0,07	nd	0,38 \pm 0,09
C18:0	4,96 \pm 0,03	3,39 \pm 0,05	2,35 \pm 0,22
C18:1n9c	5,77 \pm 0,20	11,40 \pm 0,10	9,82 \pm 0,18
C18:2n6c	16,27 \pm 0,33	12,98 \pm 0,52	11,83 \pm 0,06
C18:3n3	37,00 \pm 0,35	36,69 \pm 0,25	45,65 \pm 0,55
C20:0	2,36 \pm 0,07	1,37 \pm 0,08	1,77 \pm 0,18
C20:1	0,63 \pm 0,02	nd	0,34 \pm 0,07
C20:2	0,15 \pm 0,01	nd	1,16 \pm 0,08
C20:3n3+C21:0	0,20 \pm 0,04	nd	0,15 \pm 0,02
C22:0	0,90 \pm 0,07	nd	0,87 \pm 0,00
C22:2	1,93 \pm 0,09	nd	1,20 \pm 0,15
C23:0	5,46 \pm 0,05	8,04 \pm 0,41	9,33 \pm 0,34
C24:0	1,47 \pm 0,27	1,50 \pm 0,18	2,63 \pm 0,05
SFA totais	37,62 \pm 0,83 a	37,52 \pm 0,82 b	29,32 \pm 0,08 c
MUFA totais	6,82 \pm 0,19 c	12,81 \pm 0,05 a	10,69 \pm 0,32 b
PUFA totais	55,48 \pm 0,53 b	49,67 \pm 0,77 c	59,99 \pm 0,40 a

nd: não detectado

Os ácidos gordos mais abundantes foram: ácido α -linolénico (C18:3), linoleico (C18:2) e palmítico (C16:0), como se pode ver na **Figura 6**.

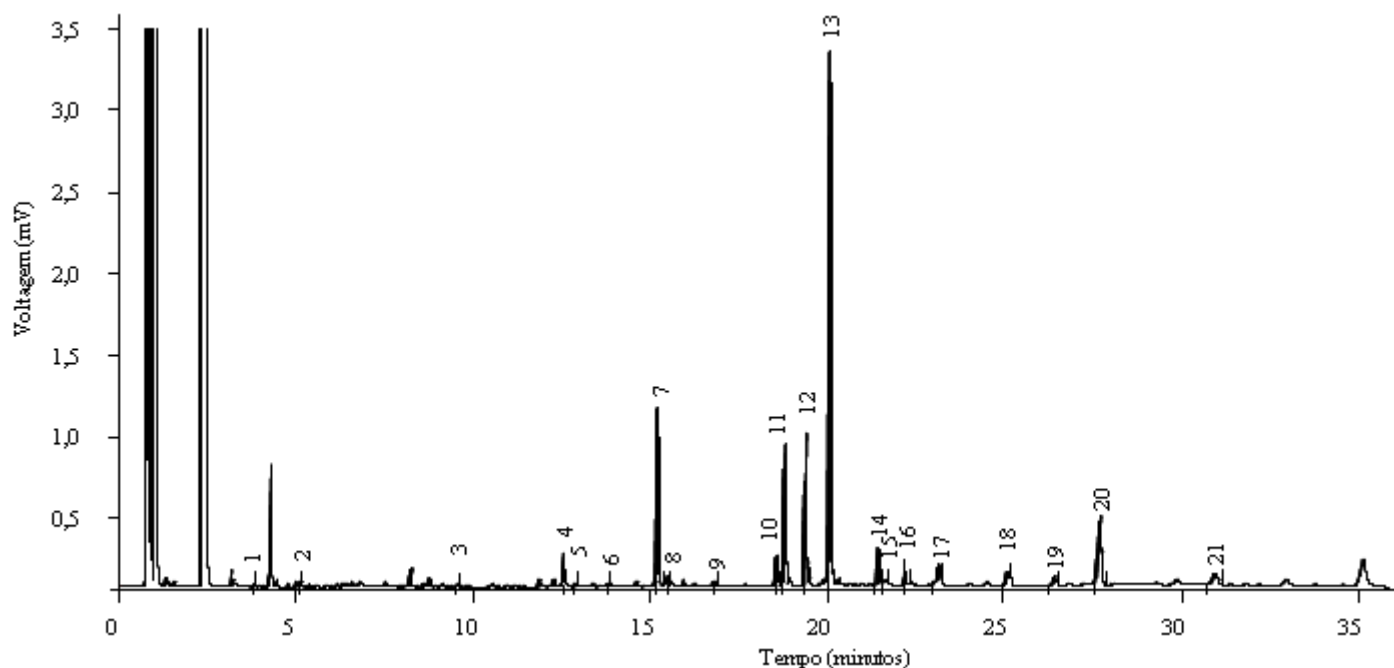


Figura 6. Perfil de ácidos gordos individuais de *Thymus mastichina* L. 1- Ácido caprónico (C6:0); 2- ácido caprílico (C8:0); 3- ácido láurico (C12:0); 4- ácido mirístico (C14:0); 5- ácido miristoleico (C14:1); 6- ácido pentadecanóico (C15:0); 7- ácido palmítico (C16:0); 8- ácido palmitoleico (C16:1); 9- ácido heptadecanóico (C17:0); 10- ácido esteárico (C18:0); 11- ácido oleico (C18:1n9c); 12- ácido linoleico (C18:2n6c); 13- α -linolénico (C18:3n3); 14- ácido araquídico (C20:0); 15- ácido eicosenóico (C20:1c); 16- *cis*-11,14-ácido eicosadienóico (C20: 2c); 17- *cis*-11,14,17-ácido eicosatrienóico; 18- ácido heneicosanóico (C20:3n3 + C21:0); 19- ácido beénico (C22:0); 20- ácido docosadienóico (C22:2); 21- ácido tricosanóico (C23:0); 22- ácido lignocérico (C24:0).

Além dos três principais ácidos gordos mencionados, foram identificados e quantificados mais dezoito, sendo os PUFA, o grupo principal de ácidos gordos. Os ácidos gordos ω -3 (incluindo o ácido α -linolénico) e ω -6 (incluindo o ácido linoleico) estão associados a vários efeitos benéficos para saúde, nomeadamente na minimização de risco de doenças inflamatórias, hipertensão, doenças cardíacas, cancro da próstata e mama (Connor 2000; Terry et al. 2004; Djousse et al. 2005). Por outro

lado, os ácidos gordos ómega-3 e -6 são precursores da biossíntese de eicosanóides envolvidos em diversas funções metabólicas (Zubay 2006).

Uma ingestão deficiente de ácidos gordos essenciais pode conduzir a vários problemas nomeadamente, dermatites, imunossupressão e disfunções cardíacas (Burtis et al. 1996), e nessa perspectiva, as plantas estudadas podem ser utilizadas como uma fonte alimentar de ácido α -linolénico e linoleico, precursores de ómega-3 e ómega-6, muitas vezes relacionados com o aumento do colesterol-HDL e diminuição do colesterol-LDL, triglicerídeos, oxidação lipídica, e susceptibilidade de LDL à oxidação (Connor 2000).

3.2. Propriedades nutracêuticas

Antioxidantes não enzimáticos como o β -caroteno, ácido ascórbico e α -tocoferol, podem ter um papel importante na resposta celular ao *stress* oxidativo, reduzindo as espécies reactivas de oxigénio (ROS), retardando assim a evolução de muitas doenças crónicas, bem como impedindo a oxidação lipídica de alimentos; podem, portanto, ter múltiplas aplicações como aditivos alimentares, na cosmética, em produtos anti-envelhecimento e em produtos farmacêuticos utilizados no tratamento de doenças crónicas relacionadas com o *stress* oxidativo (Lagouri et al. 2009).

A natureza equipou os organismos contra os danos provocados pelos radicais livres com vários mecanismos de defesa que actuam de diferentes formas. Como referido, os antioxidantes são moléculas naturais que previnem a formação descontrolada de radicais livres e ROS ou que inibem a sua reacção com as estruturas biológicas, interrompendo a reacção em cadeia e formando radicais com baixa reactividade que são facilmente removidos do organismo (Chevion et al. 1997; Falcão 2008).

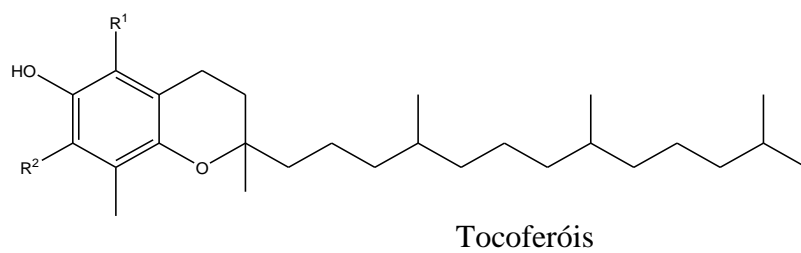
Os radicais livres são produzidos no metabolismo normal das células aeróbias, principalmente na forma de ROS. Uma vez produzidos, a maioria dos radicais livres são neutralizados pelas defesas antioxidantes da célula (enzimas e moléculas não-enzimáticas). A manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes da célula são uma condição essencial para o funcionamento normal do organismo (Ferreira et al. 2009).

Os efeitos benéficos de ROS ocorrem em concentrações baixas ou moderadas e envolvem funções fisiológicas de sinalização e regulação da célula. No entanto, o

equilíbrio entre a produção de ROS e as defesas antioxidantes pode ser destabilizado, quer pela superprodução de ROS quer pela perda das defesas antioxidantes da célula. Este desequilíbrio é conhecido como *stress* oxidativo e, neste caso, os ROS em excesso podem oxidar e danificar os lípidos, proteínas e DNA da célula, levando à alteração e inibindo a sua função normal (Ferreira et al. 2009).

O ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno e outros carotenóides, como o licopeno e compostos fenólicos, são exemplos de antioxidantes obtidos da alimentação. As plantas constituem a maior fonte destas moléculas para o homem (Ramarathanam et al. 1995; Rice-Evans et al. 1996; Romani et al. 2000; Falcão 2008).

As plantas estudadas revelaram a presença de várias moléculas antioxidantes (**Figura 7; Tabela 4**).



$R^1=R^2=Me$ – α -tocopherol
 $R^1=Me, R^2=H$ – β -tocopherol
 $R^1=H, R^2=Me$ – γ -tocopherol
 $R^1=R^2=H$ – δ -tocopherol

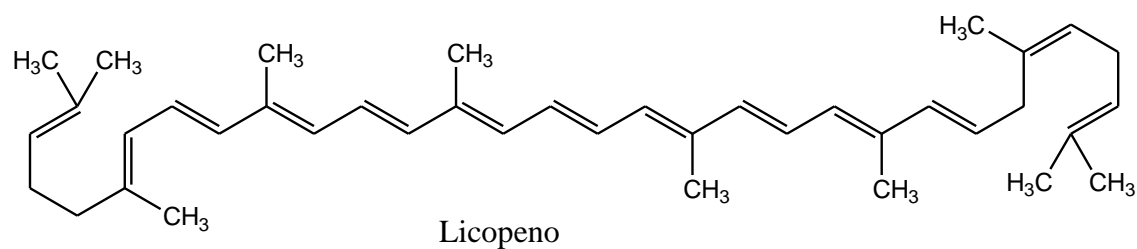
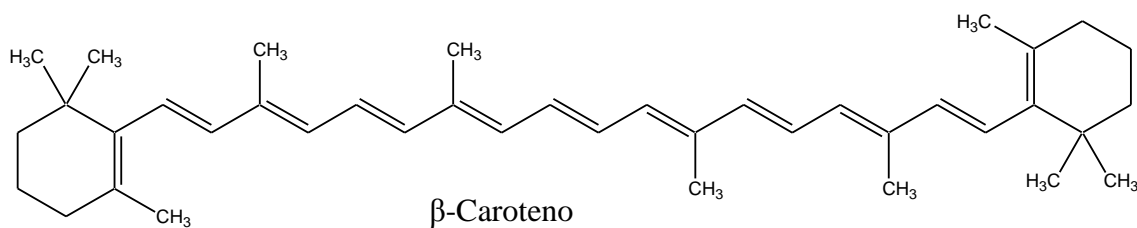
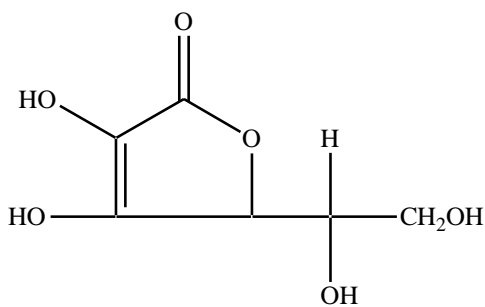


Figura 7. Fórmula de estrutura das vitaminas e carotenóides quantificados nas três Lamiaceae estudadas.

Tabela 4. Composição em vitaminas e carotenóides (mg/100 g de massa seca) de três Lamiaceae (média \pm DP, n = 3). Em cada linha, letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0,05$)

	<i>Mentha pulegium</i>	<i>Thymus pulegioides</i>	<i>Thymus mastichina</i>
α -tocoferol	69,54 \pm 11,44 a	12,63 \pm 0,82 b	0,35 \pm 0,06 c
β -tocoferol	1,84 \pm 0,26 a	0,08 \pm 0,00 b	0,03 \pm 0,00 c
γ -tocoferol	9,84 \pm 1,54 a	0,77 \pm 0,08 c	3,75 \pm 0,14 b
δ -tocoferol	8,48 \pm 1,55 a	nd	0,01 \pm 0,00 b
Tocoferóis totais	89,70 \pm 14,79 a	13,48 \pm 0,91 b	4,14 \pm 0,20 c
Ácido ascórbico	7,90 \pm 0,17 b	5,95 \pm 0,11 c	12,87 \pm 0,22 a
Carotenóides	0,42 \pm 0,00 b	2,04 \pm 0,04 a	nd

nd: não detectado

O poejo apresentou níveis elevados de tocoferóis, particularmente α -tocoferol (69,54 mg/100 g de massa seca) enquanto que o tomilho-dos-prados apresentou níveis elevados de carotenóides (2,04 mg/100 g). Estes pigmentos não foram detectados na amostra de tomilho-branco, embora tenha revelado maior concentração de ácido ascórbico (12,87 mg/100 g).

A **Figura 8** apresenta um cromatograma exemplificativo do perfil de tocoferóis para uma das plantas estudadas.

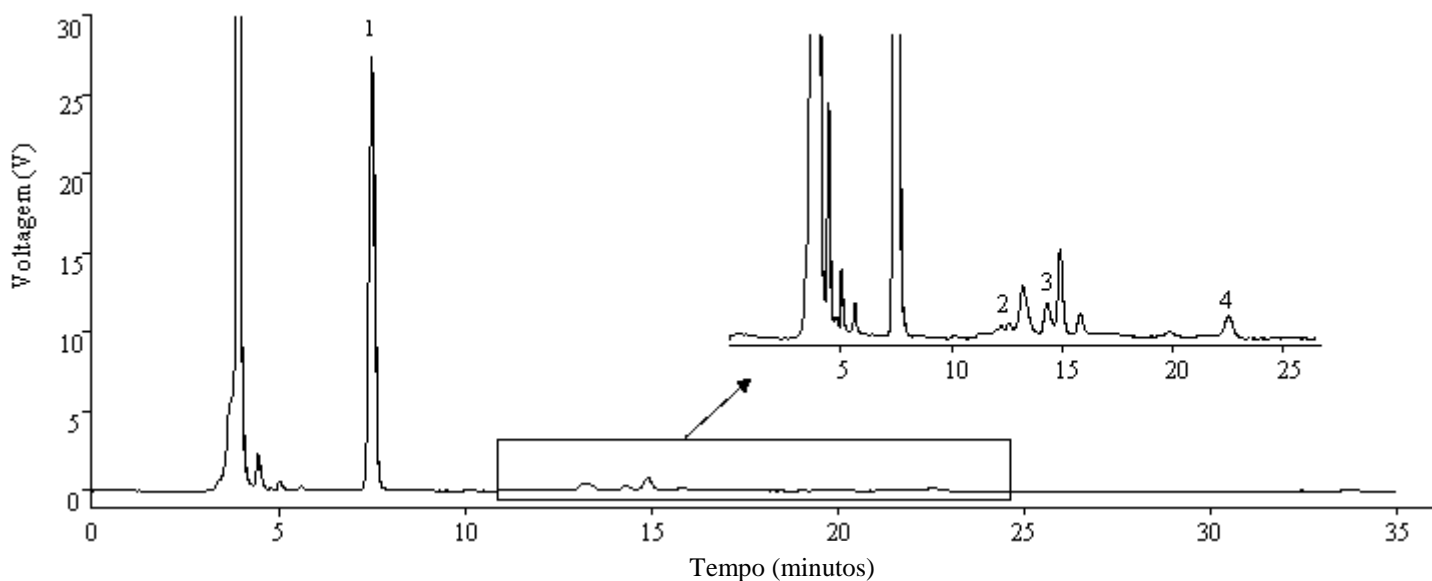
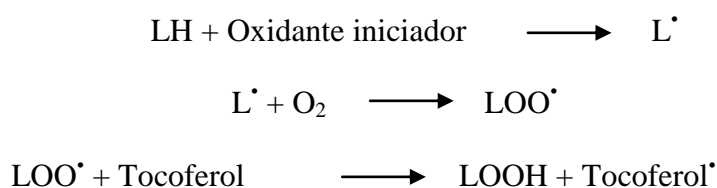


Figura 8. Perfil de tocoferóis em *Mentha pulegium* L. 1- α -tocoferol; 2- β -tocoferol; 3- γ -tocoferol; 4- tocol (PI).

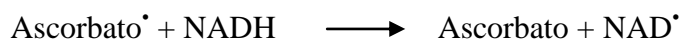
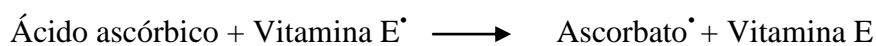
Vitamina E é um termo muito usado para designar uma família de compostos quimicamente relacionados, ou seja, tocoferóis e tocotrienóis, que compartilham uma estrutura comum. A vitamina E é composta por oito compostos químicos: α -, β -, γ - e δ -tocoferóis e quatro tocotrienóis correspondentes. É um antioxidante natural importante nos alimentos, especialmente nos ricos em ácidos gordos polinsaturados. Devido ao seu papel como agente bloqueador de radicais livres, a vitamina E protege o corpo humano contra anomalias degenerativas, e principalmente o cancro, bem como em doenças cardiovasculares (Ferreira et al. 2009).

A vitamina E reage com os radicais peróxido produzidos a partir de ácidos gordos polinsaturados dos fosfolípidos da membrana ou lipoproteínas para produzir um hidroperóxido lipídico estável. Agem como antioxidantes, dando um átomo de hidrogénio aos radicais peróxido das moléculas de lípidos insaturados, formando um radical hidroperóxido e tocoferoxilo, que reage com outros radicais formando ligações estáveis (Ferreira et al. 2009).



O ácido ascórbico, também conhecido como vitamina C é um nutriente necessário para alguns animais, incluindo o ser humano, que é incapaz de sintetizar. Além disso, o ácido ascórbico parece exercer um papel protector contra várias doenças associadas ao *stress* oxidativo, tais como doença cardíaca, acidente vascular cerebral, cancro, doenças neurodegenerativas e cataratogénese. A vitamina C pode proteger contra os danos da peroxidação lipídica biomembranar, eliminando os radicais peróxilo na fase aquosa antes que este possa iniciar a peroxidação lipídica (Ferreira et al. 2009).

A vitamina C é eficaz contra o superóxido, peróxido de hidrogénio, radical hidroxilo, oxigénio singlete e radical peróxilo. Existe uma interacção entre a vitamina C e vitamina E, que interagem sinergicamente na interface membrana-citosol. A vitamina E oxidada pode ser reduzida de volta à sua forma antioxidante na fase aquosa, por acção do ácido ascórbico. O ácido ascórbico reage rapidamente com o radical tocoferol através da redução do ácido ascórbico ao radical ascorbato.



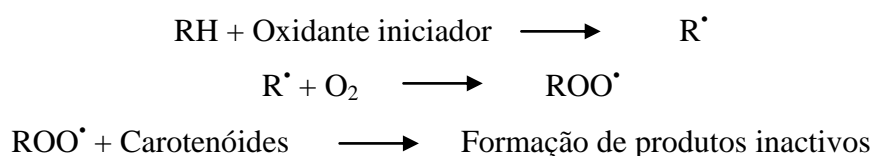
As interacções entre esses nutrientes antioxidantes são provavelmente muito importantes na protecção das células, pois a concentração de cada antioxidante sozinho pode não ser adequada para efectivamente proteger as células contra a peroxidação lipídica (Ferreira et al. 2009).

Os carotenóides são pigmentos mais generalizados na natureza e também têm recebido atenção considerável devido ao seu papel antioxidante. Os carotenóides são sintetizados por plantas e microrganismos, mas não por animais. Frutas e vegetais constituem as principais fontes de carotenóides na dieta humana. Cerca de 90% dos carotenóides na dieta e no corpo humano são representados pelo β -caroteno, α -caroteno, licopeno, luteína e β -criptoxantina (Ferreira et al. 2009).

Todos os carotenóides possuem 40-carbonos numa estrutura de poli-isoprenóides, uma longa cadeia de duplas ligações conjugadas que formam a parte central da molécula e uma simetria bilateral em torno da ligação dupla central, como características químicas comuns. Estas características são responsáveis pela sua reactividade química e propriedades de absorção da luz. O licopeno e o β -caroteno são exemplos de carotenóides não-cíclicos e cíclicos, respectivamente. Devido à presença das ligações conjugadas, os carotenóides podem sofrer isomerização *cis-trans*. Embora

os isómeros *trans* sejam mais comuns nos alimentos e mais estáveis, muito pouco é conhecido sobre o significado biológico da isomerização de carotenóides para a saúde (Ferreira et al. 2009).

Os carotenóides são conhecidos pelas suas propriedades benéficas na prevenção de doenças, incluindo as doenças cardiovasculares, cancro e outras doenças crónicas. São importantes fontes alimentares de vitamina A, sendo o β -caroteno, o α -caroteno, o β -criptoxantina capazes de funcionar como provitamina A. Os carotenóides podem reagir com os radicais livres interrompendo reacções em cadeia num ambiente lipídico. Os radicais peroxilo (ROO^\bullet) formados a partir dos lípidos (fosfolípidos polinsaturados) são muito prejudiciais para as células. Os sistemas extensivos de duplas ligações fazem os carotenóides susceptíveis ao ataque de radicais peroxilo, resultando na formação de produtos inactivos (Ferreira et al. 2009).



As três plantas silvestres estudadas contêm vários antioxidantes, tais como tocoferóis, ácido ascórbico e carotenóides, que podem ser utilizados como ingredientes funcionais ou seja, contra as doenças crónicas relacionadas com o *stress* oxidativo. Por outro lado, as plantas podem ser usadas directamente na dieta e na promoção da saúde, aproveitando os efeitos cumulativos e sinérgicos de todos os compostos bioativos presentes. As autoridades de saúde pública consideram a prevenção com nutracêuticos um poderoso instrumento para a manutenção e promoção da saúde, da longevidade e qualidade de vida. Para além dos compostos mencionados, possuem também grandes quantidades de compostos fenólicos, poderosos antioxidantes (Ferreira et al. 2009).

O efeito farmacológico dos polifenóis, uma classe diversificada de produtos naturais fundamentais nas propriedades bioactivas de plantas comestíveis, parece estar relacionado com as suas propriedades antioxidantes (isto é, actividade bloqueadora de radicais livres e ROS), actividade antioxidante indirecta (p.e. inibição enzimática), actividade anti-inflamatória e com efeitos modificadores da expressão de determinados genes (The Local Food-Nutraceutical Consortium 2005). Os compostos fenólicos são um grupo extenso e complexo de fitoquímicos e são encontrados em grandes quantidades nos vegetais, frutas e plantas. A presença dos compostos fenólicos em

plantas tem sido muito estudada por apresentarem actividade farmacológica e também por inibirem a oxidação lipídica e a proliferação de fungos. Além das propriedades antioxidantes, a sua presença contribui para a parte sensorial dos alimentos, como a cor, o sabor e o aroma (Snapos et al. 1992; Falcão 2008).

Devido às recentes restrições colocadas ao uso de antioxidantes sintéticos como o BHA (2- e 3-*terc*-butil-4-metoxifenol) e o BHT (2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol), o interesse por antioxidantes de origem natural aumentou significativamente. Muitas indústrias cosméticas, farmacêuticas e alimentares usam-nos na formulação dos seus produtos, porque além de possuírem valor medicinal, previnem o envelhecimento e degradação dos produtos (Ames 1983; Briante et al. 2003; Falcão 2008).

Os compostos fenólicos têm na sua constituição básica um ou mais anéis benzénicos hidroxilados e as suas propriedades redox estão relacionadas com as suas características estruturais: o número e posição dos grupos hidroxilo e metoxilo no anel, a extensão da conjugação e a presença de grupos dadores ou aceitadores de electrões no anel aromático. Nas reacções em que estão envolvidos como antioxidantes actuam como dadores de electrões, em meios aquosos, e dadores de protões, em meios não polares, como no caso da peroxidação lipídica, na qual se vão ligar aos radicais alquilperoxilo (ROO^\bullet), formando um radical estabilizado pela ressonância do anel aromático (Belitz et al. 1987; Jovanovic et al. 1996; Falcão 2008).

Dois grupos importantes de compostos fenólicos são os ácidos fenólicos e os flavonóides. Os ácidos fenólicos dividem-se em derivados do ácido benzóico (p.e. ácido gálico) e derivados do ácido cinâmico (p.e. ácido cafeico, ácido clorogénico). A actividade antioxidante dos ácidos fenólicos e dos seus ésteres depende do número de grupos hidroxilo existentes na molécula. A presença do grupo carboxilato, um aceitador de electrões por efeito mesomérico, confere aos derivados hidroxilados do ácido benzóico uma menor tendência para se comportarem como dadores de protões, comparativamente aos derivados hidroxilados do ácido cinâmico (Rice-Evans et al. 1996; Falcão 2008).

Os flavonóides englobam compostos encontrados com grande frequência na natureza, unicamente em vegetais, que além de possuírem propriedades antioxidantes são considerados pigmentos. Todos os flavonóides possuem uma estrutura base $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$, em que dois dos anéis da molécula são anéis aromáticos (Bobbio et al. 1989; Brett et al. 2003; Falcão 2008).

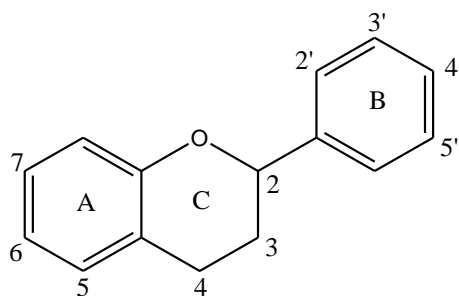


Figura 9. Estrutura genérica de flavonóides.

Estes compostos possuem como estrutura base a flavona, ou uma forma hidrogenada dessa estrutura. Podem ser agrupados em vários grupos como: flavonas (p.e. luteolina), flavonóis (p.e. quercetina), flavanonas (p.e. naringina) e isoflavonas. Os flavonóis são um grupo abundante e ocorrem geralmente esterificados com glicosídeos e/ou glicurónidos. Normalmente, o glicosídeo encontra-se na posição 3, podendo também surgir na posição 7. A glicose é o glicosídeo mais comum, mas também ocorrem a rutinose, galactose, arabinose ou a xilose. A rutina (quercetina-3-*o*-rutinose) é um dos flavonóides mais bioativos, também conhecida por vitamina P, e já descrito como um factor activador para a vitamina C (Ghica et al. 2005; Falcão 2008).

Neste trabalho, a quantificação de fenóis foi feita por um método fundamentado na reacção de oxidação-redução entre os polifenóis e o reagente de *Folin-Ciocalteu*, da qual resulta um complexo de cor azul que absorve radiação a 765 nm. A desvantagem deste procedimento é que pode sobrestimar-se o conteúdo em fenóis totais, já que várias substâncias como, o dióxido de enxofre, ácido ascórbico ou açúcares redutores, podem interferir na medição (Blasco et al. 2005; Falcão 2008). Para a quantificação dos flavonóides foi usado o método do tricloreto de alumínio (AlCl_3), onde foi medido espectrofotometricamente o produto rosa avermelhado a 510 nm.

A quantidade de fenóis encontrada no extracto metanólico de poejo silvestre (331,69 mg GAE/g) foi superior à quantidade encontrada numa amostra, também portuguesa, comprada num mercado tradicional (extracto etanólico 71,7 mg/g; extracto aquoso 57,9 mg/g) (Mata et al. 2007). Pelo contrário, a quantidade de fenóis encontrada no extracto metanólico de tomilho-dos-prados (210,49 mg/g) foi inferior à quantidade encontrada num extracto etanólico numa amostra de Itália (435,1 mg/g) (The Local Food-Nutraceutical Consortium 2005) (**Tabela 5**). Estas moléculas foram também encontradas em quimiotipos de *Thymus pulegioides* da Lituânia (Loziene et al. 2007) e

em amostras da Argélia (Stocker et al. 2004). A amostra de tomilho-branco (*Thymus mastichina*) revelou a menor concentração de fenóis (165,29 mg/g).

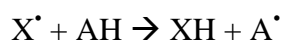
Tabela 5. Rendimento de extracção, composição em fenóis e flavonóides, e valores de EC₅₀ (mg/ml) relativos à actividade antioxidante de três Lamiaceae (média ± DP, n = 3). Em cada linha, letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0,05$).

	<i>Mentha pulegium</i>	<i>Thymus pulegioides</i>	<i>Thymus mastichina</i>
η (%)	54,62 ± 4,26 a	24,61 ± 0,60 b	21,61 ± 0,52 c
Fenóis (mg GAE/g extracto)	331,69 ± 19,63 a	210,49 ± 21,16 b	165,29 ± 1,11 c
Flavonóides (mg CE/g extracto)	39,85 ± 1,27 c	128,24 ± 6,00 a	83,85 ± 1,42 b
Actividade bloqueadora de DPPH	0,56 ± 0,05 c	0,68 ± 0,03 b	0,69 ± 0,04 a
Poder redutor	0,12 ± 0,01 c	0,49 ± 0,03 a	0,23 ± 0,00 b
Inibição da descoloração do β-caroteno	0,01 ± 0,00 c	0,03 ± 0,00 b	0,90 ± 0,09 a
Inibição de TBARS	0,08 ± 0,00 c	0,22 ± 0,01 b	0,43 ± 0,02 a

Os extratos metanólicos das plantas silvestres estudadas mostraram possuir actividade antioxidante, que foi avaliada, por quatro ensaios *in vitro* diferentes. Não existe um método universal que possa avaliar a capacidade antioxidante de todas as amostras quantitativamente e com precisão. A origem dos radicais e o mecanismo de reacção dos antioxidantes é fundamental na escolha adequada dos métodos para avaliação da capacidade antioxidante (Prior et al. 2005; Guimarães et al. 2010). Assim, foram realizados quatro ensaios *in vitro* diferentes: actividade bloqueadora de radicais de DPPH, poder redutor, inibição da descoloração do β-caroteno e inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reactivas do ácido tiobarbitúrico (TBARS).

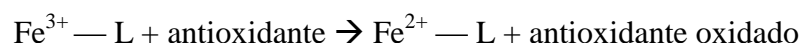
A actividade bloqueadora de radicais de DPPH foi maior na amostra de poejo (EC₅₀ = 0,56 mg/ml; **Tabela 5**). O 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) é um radical de azoto estável, está disponível comercialmente e tem uma cor roxa. Neste método, os radicais de DPPH, que absorvem a 515 nm são, em parte, neutralizados pelos compostos antioxidantes, resultando uma diminuição da absorvância do sistema reaccional ao referido comprimento de onda (Antolovich et al. 2002; Amarowicz et al. 2004; Guimarães et al. 2010). Quando uma solução de DPPH (X) é misturada com uma

substância que pode ceder um átomo de hidrogénio (AH), ocorre a seguinte reacção que explica a perda da cor (Ali et al. 2008; Guimarães et al. 2010).



A amostra de poejo também apresentou os melhores resultados de poder redutor ($EC_{50} = 0,12$ mg/ml; **Tabela 5**).

Neste ensaio, foi medida a transformação do Fe^{3+} a Fe^{2+} . Os antioxidantes presentes causam a redução do Fe^{3+} /complexo ferricianeto ($FeCl_3/K_3Fe(CN)_6$) à forma ferrosa (Fe^{2+}). Assim, em função do poder redutor das amostras, a coloração amarela da solução sofre alteração entre os tons de verde ou azul (Amarowicz et al. 2004; Guimarães et al. 2010), o que pode ser medido espectrofotometricamente a 700 nm. Para determinar o poder redutor (ciclo redox) das substâncias testadas, estas são postas em contacto com um determinado metal responsável pela produção de radicais livres e, em alguns casos, pela regeneração dos antioxidantes:

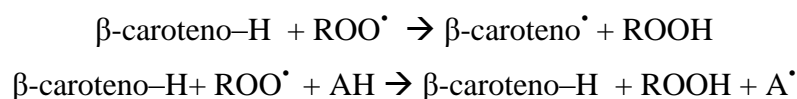


Onde L é o ligante selectivo não ferroso cromogénico que produz a coloração (azul da prússia) da espécie $Fe^{2+} - L$ como resultado da reacção redox em questão; a espécie oxidante é $Fe^{3+} - L$ ou $Fe(CN)_6^{3-}$ (quando se utiliza ferricianeto como reagente) (Berker et al. 2007; Guimarães et al., 2010).

A mesma amostra de poejo revelou a maior capacidade para inibir a descoloração do β -caroteno ($EC_{50} = 0,01$ mg/ml; **Tabela 5**). Uma outra amostra de poejo, também proveniente de Portugal mas adquirida num mercado tradicional, e estudada por outros autores, originou piores resultados no ensaio do DPPH (valor EC_{50} de extracto etanólico: 24,9 mg/ml) e no ensaio de inibição da descoloração do β -caroteno (165 mg/ml) (Mata et al. 2007).

A descoloração do β -caroteno pode ser medida por espectrofotometria a 470 nm. O β -caroteno sofre uma descoloração rápida na ausência de um antioxidante, uma vez que o radical livre ácido linoleico ataca a molécula do β -caroteno, que perde as ligações duplas e, conseqüentemente, perde a sua cor alaranjada característica. O β -caroteno é extremamente sensível à oxidação mediada por radicais livres de ácido linoleico (Gutierrez et al. 2006; Guimarães et al. 2010). Os antioxidantes podem dar

átomos de hidrogénio para eliminar os radicais e impedir a descoloração de carotenóides:



Os antioxidantes podem neutralizar qualquer radical livre que se formem no âmbito do sistema (p.e. o radical livre linoleato), inibindo a descoloração do β -caroteno (Jayaprakasha et al. 2001; Amarowicz et al. 2004; Guimarães et al. 2010). Assim, a absorção diminuiu rapidamente nas amostras desprovidas de antioxidantes, enquanto na presença de um antioxidante, mantêm a cor aumentando, assim, a absorção por um período maior de tempo.

Também no ensaio TBARS foi o poejo que originou melhores valores de EC_{50} (0,08 mg/ml; **Tabela 5**). Este ensaio mede o malonaldeído (MDA) formado a partir da oxidação de ácidos gordos insaturados. Postula-se que a formação de MDA a partir de ácidos gordos com menos de três duplas ligações (p.e. o ácido linoleico) ocorre através da oxidação secundária de compostos carbonílicos (p.e. non-2-enal) (Fernández et al. 1997; Guimarães et al. 2010). O MDA reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar um pigmento rosa (TBARS), que é medido espectrofotometricamente a 532 nm (Ng et al. 2000; Guimarães et al. 2010).

Apesar da sua menor actividade antioxidante (**Tabela 5**), o valor de EC_{50} obtido no ensaio de TBARS para o tomilho-branco ($0,43 \pm 0,02$ mg/ml) foi muito melhor do apresentado por Miguel et al. (2004) em óleos essenciais da mesma espécie ($38,9 \pm 1,3\%$ a 500 mg/ml). A peroxidação lipídica, uma consequência do *stress* oxidativo, está associada à perda progressiva do potencial da membrana aumentando, assim, a permeabilidade da membrana e, conduzindo, finalmente, à morte celular. A formação de TBARS em homogeneizados de cérebro é uma consequência da peroxidação lipídica. Portanto, os valores EC_{50} extraordinariamente baixos (**Tabela 5**) obtidos para o ensaio de TBARS na presença das plantas estudadas são muito promissores. De facto, o cérebro é considerado altamente sensível ao danos oxidativos, uma vez que: consome uma quantidade significativa de oxigénio, é relativamente deficiente em defesas antioxidantes, é rico em substratos oxidáveis como ácidos gordos polinsaturados e catecolaminas (Chong et al. 2005) e é rico em iões de metais de transição como o ferro, geralmente envolvidos em reacções catalisadas por metais que levam à formação de

espécies reactivas de oxigénio (Ali et al. 2004).

Em suma, o poejo demonstrou maior capacidade antioxidante (valores de $EC_{50} < 0,56$ mg/ml), o que está de acordo com a sua maior concentração de fenóis (**Tabela 5**) e de outros antioxidantes tais como açúcares redutores (**Tabela 2**) e tocoferóis (**Tabela 4**). Outros autores correlacionam também a actividade antioxidante encontrada em *Thymus pulegioides* da Lituânia (Loziene et al. 2007) e em *Mentha pulegium* de Espanha (López et al. 2009) com a concentração de compostos polifenólicos, nomeadamente ácidos fenólicos e flavonóides.

Apesar dos bons resultados obtidos em comparação com outras fontes naturais, os valores de EC_{50} obtidos para as plantas estudadas foram superiores aos valores obtidos para o padrão Trolox (0,04 no ensaio de DPPH; 0,03 no ensaio de poder redutor; 0,003 no ensaio da descoloração do β -caroteno; 0,004 no ensaio TBARS). Compostos puros revelam, geralmente, mais actividade do que extractos, sobretudo este padrão específico que é um derivado hidrossolúvel da vitamina E com extraordinária actividade antioxidante (**Figura 10**). É, pois, importante realçar que estes valores de EC_{50} das Lamiaceae representam concentrações de extracto, onde cada um dos compostos antioxidantes está presente em menor concentração final.

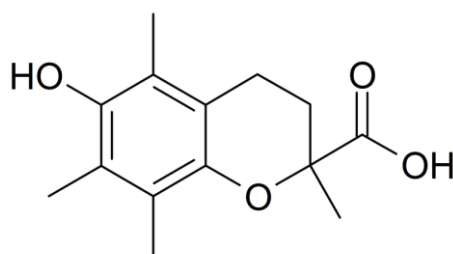


Figura 10. Estrutura química do trolox: ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico.

Para além do presente estudo, apenas foi descrita na literatura a actividade antioxidante de extractos etanólicos de tomilho proveniente de Itália (The Local Food-Nutraceutical Consortium 2005), de extractos metanólicos de poejo proveniente de Espanha (López et al. 2009) e de óleos essenciais de tomilho-branco também proveniente de Portugal (Miguel et al. 2004).

IV. CONCLUSÃO

Através deste trabalho pretendeu-se explorar o potencial nutricional e nutracêutico de três espécies de Lamiaceae silvestres comestíveis provenientes da região de Trás-os-Montes: *Mentha pulegium* (poejo), *Thymus pulegioides* (tomilho-dos-prados) e *Thymus mastichina* (tomilho-branco).

A análise referente à composição nutricional incluiu a determinação de humidade, proteínas, lípidos, cinzas e glúcidos e os perfis individuais de açúcares e de ácidos gordos. A determinação da composição nutracêutica incluiu a análise de tocoferóis, ácido ascórbico, carotenóides e fenóis totais. A avaliação da actividade antioxidante foi feita através de quatro ensaios diferentes: actividade bloqueadora de radicais livres de DPPH, poder redutor, inibição da descoloração do β -caroteno e inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reactivas do ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Pelos estudos de avaliação da composição nutricional, demonstrou-se que a amostra de *Mentha pulegium* revelou maior valor de humidade, cinzas, proteínas, açúcares totais, açúcares redutores e ácidos gordos saturados. A amostra de *Thymus pulegioides* revelou maior concentração de glúcidos e ácidos gordos monoinsaturados, enquanto que a amostra de *Thymus mastichina* revelou maior quantidade de lípidos, energia e ácidos gordos polinsaturados. Nos estudos da determinação da composição nutracêutica, a amostra de *Mentha pulegium* revelou maior valor de tocoferóis e fenóis. A amostra de *Thymus pulegioides* apresentou maior concentração de carotenóides e flavonóides, enquanto que a amostra de *Thymus mastichina* revelou maior quantidade de ácido ascórbico. Das três amostras estudadas, a de *Mentha pulegium* foi a que apresentou maior actividade antioxidante.

As plantas estudadas poderão ter potencial na indústria alimentar devido às suas propriedades condimentares e composição nutricional (incluindo açúcares e ácidos gordos ómega-3 e ómega-6), mas também na indústria farmacêutica, devido aos seus benefícios biológicos e medicinais. Os efeitos sinérgicos dos diferentes compostos encontrados nas plantas (nomeadamente fenóis, vitaminas e carotenóides) contribuem para a explicação dos seus usos tradicionais como anti-sépticos e anti-inflamatórios (actividades relacionadas com o *stress* oxidativo). Além disso, a presença de antioxidantes pode explicar o uso do poejo como conservante alimentar. O valor nutritivo do tomilho-dos-prados caracterizado por elevados níveis de glúcidos, poderá

explicar a sua utilização para melhorar o valor nutricional de sopas confeccionadas à base de batata e de caldos engrossados com farinha de centeio, consumidas há muito tempo atrás em Trás-os-Montes durante os períodos de fome (Pardo de Santayana et al. 2007; Carvalho 2010).

A importância de se estudar o conhecimento e o uso tradicional das plantas medicinais pode ter implicações distintas, tais como recuperar o património cultural tradicional e assegurar a sua sobrevivência e continuidade; otimizar os usos populares desenvolvendo preparados terapêuticos (remédios caseiros) de baixo custo e organizar os conhecimentos tradicionais de maneira a utilizá-los em processos de desenvolvimento tecnológico (Amorozo 1996; Elisabetsky et al. 2001; Fonte et al. 2005). Segundo estimativa da OMS (2002), um terço da população mundial não tem acesso periódico a medicamentos essenciais, sendo necessário que se invista na medicina tradicional como alternativa. Estas directrizes apontam para a necessidade de se identificar práticas seguras e eficazes, a fim de proporcionar uma base sólida que fomente a medicina tradicional.

Uma alternativa que podia ser incentivada, era que cada país procedesse a um levantamento regional das plantas utilizadas na medicina popular tradicional, estimulando e recomendando o uso das que tiverem eficácia comprovada, desaconselhando as que podem ser prejudiciais e, acima de tudo, desenvolver projectos de cultivo e uso das plantas seleccionadas (OMS 1978; Tomazzoni 2004).

Numa época em que saberes e usos da flora, na medicina e na alimentação, estão a desaparecer do dia-a-dia das comunidades rurais, a sua preservação e reabilitação, adaptada às necessidades actuais, só será possível a partir do reconhecimento da importância das culturas locais, da realização de um inventário à escala local e do seu uso sustentado. Com este trabalho, que entrelaça o saber empírico e o conhecimento científico, pretendemos contribuir para a divulgação de espécies localmente utilizadas para fins medicinais e alimentares e estimular a reflexão em torno de uma importante estratégia que vise a gestão, conservação e utilização dos recursos naturais locais, numa perspectiva de desenvolvimento sustentável.

Os resultados desta dissertação foram reunidos numa publicação científica submetida a uma revista internacional da especialidade e ainda apresentados numa comunicação internacional.

V. BIBLIOGRAFIA

- Ali, F.E., Barnham, K.J., Barrow, C.J., Separovic, F. (2004). Metal catalyzed oxidation of tyrosine residues by different oxidation systems of copper/hydrogen peroxide. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98, 173-184.
- Ali, S.S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A., Bora, U. (2008). Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International*, 41, 1-15.
- Altieri, M.A., Merrick, L.C., Anderson, M.K., (1987). Peasant agriculture and the conservation of crop and wild plant resources. *Conservation Biology*, 1, 49-58.
- 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.
- Ames, B.M. (1983). Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*, 221, 1256-1263.
- 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.
- AOAC (1995). Official methods of analysis. 16th ed. Arlington VA, EUA: Association of Official Analytical Chemistry.
- Barros, L., Venturini, B., Baptista, P., Estevinho, L., Ferreira, I.C.F.R. (2008). Chemical composition and biological properties of portuguese wild mushrooms: a comprehensive study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3856-3862.

- Barros, L., Heleno, S.A., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R. (2009). Systematic evaluation of the antioxidant potential of different parts of *Foeniculum Vulgare* Mill from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2458-2464.
- Belitz, H.D., Grosch, W. (1987). Edible fats and Oils. Berlin: Springer-Verlag. *Food Chemistry*, 14, 472-493.
- 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.
- Blasco, A.J., Rogerio, M.C., González, M.C., Escarpa, A. (2005). “Electrochemical Index” as a screening method to determine “total polyphenolics” in foods: A proposal. *Analytical Chimica Acta*, 539, 237-244.
- Bobbio, F.O., Bobbio, P.A. (1989). Introdução à Química de Alimentos. Livraria Varela, 2.^a ed, São Paulo.
- Bonet, M.A., Valles, J. (2002). Use of non-crop food vascular plants in Montseny biosphere reserve (Catalonia, Iberian Peninsula). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 53, 225-248.
- Booth, S., Bressani, R., Johns, T. (1992). Nutrient content of selected indigenous leafy vegetables consumed by the Kekchi people of Alta Verapaz, Guatemala. *Journal of Food Composition and Analysis*, 5, 25-34.
- Brett, A.M.O., Ghica, M.E. (2003). Electrochemical oxidation of quercetin. *Electroanalysis*, 15, 1745-1750.
- Briante, R., Febbraio, F., Nucci, R. (2003). Antioxidant properties of low molecular weight phenols present in the mediterranean diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6975-6981.

- Burlingame, B. (2000). Wild nutrition. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13, 99-100.
- Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Tietz. (1996). *Fundamentals of Clinical Chemistry*. 4th ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia.
- Cadenas, E. (1997). Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors*, 6, 391-7.
- Carvalho, A.M. (2010). *Plantas y sabiduría popular del Parque Natural de Montesinho. Un estudio etnobotánico en Portugal*. Biblioteca de Ciencias, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, 450.
- Carvalho, A.M., Martins, M.E., Frazão-Moreira, A. (2007). Flora aromática e medicinal do nordeste português: espécies, usos e saberes da Terra-Fria Transmontana. *Actas do II Colóquio Nacional de Plantas Aromáticas e Mediciniais*. Caldas do Gerês, 28 e 29 de Setembro.
- Castroviejo (coord.). (2010). *Flora Iberica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares*. Vol. XII. Madrid: Real Jardín Botánico, CSIC.
- 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, 99a.
- Chadha, M.L., Oluoch, M.O. (2003). Home-based vegetable gardens and other strategies to overcome micronutrient malnutrition in developing countries. *Food, Nutrition and Agriculture Series*, vol. 32. FAO, Rome, Italy.
- Chevion, S., Berry, E.M., Kitrossky, N., Kohen, R. (1997). Evaluation of plasma low molecular weight antioxidant capacity by cyclic voltammetry. *Free Radical Biology & Medicine*, 22, 411-421.

- 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.
- Connor, W.E. (2000). Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 171S–175S.
- Cunha, A.P. (2006). Plantas e produtos vegetais em fitoterapia. 2.^a ed. 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.
- 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.
- Elizabetsky, E. (2001). Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3.^a ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS/ Ed. UFSC, 87-99.
- Falcão, S.I.D.M. (2008). Avaliação da actividade electroquímica em cogumelos silvestres comestíveis. Tese. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- Fernández, J., Perez-Alvarez, J.A., Fernández-Lopez, J.A. (1997). Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chemistry*, 59, 345-353.
- 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.

- Flyman, M.V., Afolayan, A.J. (2006). The suitability of wild vegetables for alleviating human dietary deficiencies. *South African Journal of Botany*, 72, 492-497.
- Fonte, N.N., Santos, F.O.S., Dugonski J., Lucas R., Sessak M.H.M.A., Nerone M.L., Verdeckim M.G., Bolognesi T., Fiusa T.S., Teixeira T.T. (2005). Incentivo ao uso racional de plantas medicinais. Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal. Sector de Ciências Agrárias. Universidade Federal do Paraná. Versão online: <http://www.proec.ufpr.br/enec2005/download/pdf/SA%DADE/PDF%20SAUDE/25%20-%20INCENTIVO%20AO%20USO%20RACIONAL%20DE%20PLANTAS%20MEDICINAIS%20-%20rev.pdf>
- Food and Agriculture Organisation. (2004). The state of food insecurity in the world. *Economic and Social Department*, Rome, Italy.
- Franco, J.A. (1984). Nova Flora de Portugal (Continente e Açores). Volume II. Lisboa: Edição do Autor.
- Frazão-Moreira, A.M., Carvalho, A.M., Martins, M.E. (2007). Conocimientos acerca de plantas en la nueva ruralidad. Cambio social y agro ecología en el Parque Natural de Montesinho (Portugal). *Revista Periféria*, nº 7. Institut de Ciències i Tecnologies Ambientals (ICTA), Universitat Autònoma de Barcelona.
- Freyre, M.R., Baigorria, C.M., Rozycki, V.R., Bernardi, C.M., Charpentier, M. (2000). Suitability of wild underexploited vegetables from the Argentine Chaco as a food resource. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 50, 394-399.
- Fu, S., Davies, M.J., Stocker, R., Dean, R.T. (1998). Evidence for roles of radicals in protein oxidation in advanced human atherosclerotic plaque. *Biochemistry Journal*, 333, 519-25.
- Ghica, M.E., Brett, A.M.O. (2005). Electrochemical oxidation of rutin. *Electroanalysis*, 17, 313-318.

- Gobeth, L. (2007). Cultivo de Plantas Medicinais: conhecimento popular aliado à ciência. Versão online: <http://hotsites.sct.embrapa.br/prosarural/programacao/2007/a-importancia-e-o-cultivo-de-plantas-medicinais>.
- Grivetti, L.E. (1979). Kalahari agro-pastoral-hunter-gatherers. The Tswana example. *Ecology of Food and Nutrition*, 7, 235-256.
- Guimarães, R., Barros, L., Barreira, C.M., Sousa, M.J., Carvalho, A.C., Ferreira, I.C.F.R. (2010). Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: Grapefruit, lemon, lime and orange. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 99-106.
- Gupta, S., Lakshmi, A.J., Manjunath, M.N., Prakash, J. (2005). Analysis of nutrient and antinutrient content of underutilized green leafy vegetables. *LWT-Food Science and Technology*, 38, 339-345.
- Gutierrez, R.M.P., Luna, H.H., Garrido, S.H. (2006). Antioxidant activity of *Tagetes erecta* essential oil. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 51, 883-886.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (1984). Free radicals, lipid peroxidation, and cell damage. *Lancet*, 2, 1095.
- Halliwell, B. (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*, 16, 33-50.
- Ivanova, D., Gerova, D., Chervenkov, T., Yankova, T. (2005). Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 96, 145-150.
- 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.

- Jia, Z., Tang, M., Wu, J. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64, 555-559.
- Johns, T. (2003). Plant biodiversity and malnutrition: simple solutions to complex problems. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition, and Development* 3. Online version. <http://www.ajfand.net/IssueIV%20files/IssueIV->.
- Jovanovic, S.V., Steenken, S., Hara, Y., Simic, M. (1996). Reduction potentials of flavonoid and model phenoxyl radicals. Which ring in flavonoids is responsible for antioxidant activity? *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions*, 2, 2497-2504.
- Kanter, M. (1998). Free radicals, exercise and antioxidant supplementation. *Proceedings of the Nutrition Society*, 57, 9-13.
- Kennedy, G., Nantel, G., Shetty, P. (2003). The scourge of “hidden hunger”: global dimensions of micronutrient deficiencies. Food, Nutrition and Agriculture Series, vol. 32. *Food and Agriculture Organisation*, Rome, Italy.
- 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 geografar areas of the United States. *Journal of Food Science*, 47, 941-945.
- Krebs-Smith, S.M., Kantor, L.S. (2001). Choose a variety of fruits and vegetables daily: understanding the complexities. *Journal of Nutrition*, 131, S487-501.
- Kumarasamy, Y., Byres, M., Cox, P.J., Jaspars, M., Nahar, L., Sarker, S.D. (2007). Screening seeds of some Scottish plants for free radical scavenging activity. *Phytotherapy Research*, 21, 615-621.

- Lachance, P.A., Nakat, Z., Jeong, W.S. (2001). Antioxidants: an integrative approach. *Nutrition*, 17, 8358.
- Lagouri, V., Nisteropoulou, E. (2009). Free radical scavenging and ferric reducing antioxidant properties of *O. onites*, *T. vulgaris* and *O. basilicum* from Greece and their rosmarinic acid content. *Free Radical Research*, 43, S27-97.
- Liu, R.H. (2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *American Journal of Clinique Nutrition*, 78, S517-520.
- López, V., Martín, S., Gómez-Serranillos, M.P. Carretero, M.E., Jager, A.K. Calvo, M.I. (2009). Neuroprotective and neurochemical properties of mint extracts. *Phytotherapy Research*: 10.1002/ptr.3037.
- 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.
- Machlin, L.J., Bendich, A. (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 1, 441-5.
- Mata, A.T., Proença, C., Ferreira, A.R., Serralheiro, M.L.M., Nogueira, J.M.F. Araújo, M.E.M. (2007). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chemistry*, 103, 778-786.
- Mehrotra, S., Kakkar, P., Viswanathan, P.N. (1991). Mitochondrial damage by active oxygen species in vitro. *Free Radical Biology Medical*, 10, 277-285.
- Miguel, G., Simões, M., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Carvalho, L. (2004). Composition and antioxidant activities of the essential oils of *Thymus caespititius*, *Thymus camphoratus* and *Thymus mastichina*. *Food Chemistry*, 86, 183-188.

- Nagata, M., Yamashita, I. (1992). Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenóides in tomato fruit. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi: Journal of Japanese Society of Food Science and Technology*, 39, 925-928.
- Ng, T.B., Liu, F., Wang, Z. (2000). Antioxidative activity of natural products from plants. *Life Science*, 66, 709-723.
- Ogle, B.M., Johansson, M., Tuyet, H.T., Johannesson, L., (2001). Evaluation of the significance of dietary folate from wild vegetables in Vietnam. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 10, 216-221.
- OMS (1978). Cuidados primários de saúde. Relatório da Conferência Internacional Sobre Cuidados Primários de Saúde, Alma-Ata – URSS. Brasília, 6-12, Setembro.
- OMS/WHO - World Health Organization (2002). Medicina tradicional: necessidades crescentes y potencial. *Policy perspectives on medicines*. Geneva, 2, 1-6.
- 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, 27-37.
- Póvoa, O., Marinho, S., Farinha, N. (2004). Preliminary study of hart's pennyroyal and pennyroyal ethnobotany in Alentejo. Proceedings of the 9th International Congress of Ethnobiology. Canterbury: University of Kent.
- Póvoa, O. (2008). Produção e utilização dos taxa *Mentha pulegium* L. e *Mentha cervina* L.. Tese. Universidade Técnica de Lisboa.
- Póvoa, O., Ribeiro, G., Rodrigues, L., Lobato, P., Monteiro, P., Monteiro, A., Moldão-Martins, M. (2009). Chemical characterization and organoleptical evaluation of a *M. pulegium* L. and *M. cervina* L. «piso», a traditional food sauce. *Acta Horti*, 826, 193-200.

- Prior, R.L., Wu, X.L., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290-4302.
- Ramarathnam, N., Osawa, T., Ochi, H., Kawakishi, S. (1995). The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends in Food Science & Technology*, 6, 75-82.
- Rayner, M. (1998). Vegetables and fruits are good for us so why don't we eat more? *British Journal of Nutrition*, 80, 119-120.
- Rice-Evans, C., Miller, N.J., Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20 (7), 933-956.
- Ridnour, L.A., Isenberg, J.S., Espey, M.G., Thomas, D.D., Roberts, D.D., Wink, D.A. (2005). Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 102, 13147-13152.
- Rigotti, M. (2008). Plantas Mediciniais: Botânica, cultivo e aplicações. Versão online: <http://www.scribd.com/doc/7293225/Plantas-is-Cultivo-e-Applicacoes>.
- Romani, A., Minunni, M., Mulinacci, N., Pinelli, P., Vincieri, F., F. (2000). Comparison among differential pulse voltammetry, amperometric biosensor, and HPLC/DAD analysis for polyphenol determination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1197-1203.
- Rosa, J.C., Gomes, A.M.S. (2009). Os Aspectos Etnobotânicos da Copaíba. Revista Geografar. Versão online: <http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/geografar/article/viewFile/14428/9696>.
- Ruel, M.T. (2001). Can food-based strategies help reduce vitamin A and iron deficiencies? A review of recent evidence. *International Food Policy Research Institute*, Washington D.C., EUA.

- Salgueiro, J. (2005). Ervas, Usos e Saberes. Plantas Medicinais no Alentejo e outros Produtos Naturais. 3.^a ed. Lisboa: Edições Colibri.
- Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hras, A.R., Simonic, M., Knez, Z. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 89, 191-8.
- Snapos, G., Wrolstad, R. (1992). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1478.
- Stocker, P., Yousfi, M., Djerridane, O., Perrier, J., Amziani, R., Boustani, S.E.I. Moulin, A. (2004). Effect of flavonóides from various Mediterranean plants on enzymatic activity of intestinal carboxylesterase. *Biochimie*, 86, 919-925.
- Sundriyal, M., Sundriyal, R.C. (2004). Wild edible plants of the Sikkim Himalaya: nutritive values of selected species. *Economic Botany*, 58, 286-299.
- Szeto, Y.T., Tomlinson, B., Benzie, I.F.F. (2002). Total antioxidant and ascorbic acid content of fresh fruits and vegetables: implications for dietary planning and food preservation. *British Journal of Nutrition*, 87, 55-59.
- 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, S3412-3420.
- The Local Food-Nutraceuticals Consortium. (2005). Understanding local Mediterranean diets: a multidisciplinary pharmacological and ethnobotanical approach. *Pharmacological Research*, 52, 353-366.
- Tomazzoni, M.I. (2004). Subsídios para a introdução do uso de fitoterápicos na rede básica de saúde do Município de Cascavel. Universidade Federal do Paraná. Sector de Ciências da Saúde. Programa de Pós Graduação em Enfermagem. Versão online: <http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/1884/843/1/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20Marisa%20Tomazzoni.pdf>

- Walingo, K.M. (2005). Role of Vitamin C (Ascorbic acid) on human health-a review. *African Journal of Agriculture, Food, Nutrition and Development*, 5, 1-13.
- 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. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39, 44-84.
- Welch, R.M., Graham, R.D. (1999). A new paradigm for world agriculture: human needs productive, sustainable, nutritious. *Field Crops Research*, 60, 1-10.
- Wolfe, K., Wu, X., Liu, R.H. (2003). Antioxidant activity of apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 609-614.
- Zubay, G. (2006). *Biochemistry*, 5th ed, Wm. C. Brown Publishers.