



***Rumex induratus*: Caracterização Química e Potencial Antioxidante**

Dissertação de Mestrado em Controlo de Qualidade
Especialização em Água e Alimentos

Orlanda Clara Ferreira Pereira

Trabalho realizado sob a orientação da
Professora Doutora Patrícia Carla Ribeiro Valentão

Porto
Setembro 2009

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA DISSERTAÇÃO, APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Aos meus Pais

Indicam-se de seguida as publicações e comunicações que contêm resultados incluídos neste trabalho:

Publicações

Guerra L, Pereira C, Andrade PB, Rodrigues MA, Ferreres F, de Pinho PG, Seabra RM, Valentão P. Targeted metabolite analysis and antioxidant potential of *Rumex induratus*. J Agric Food Chem 2008 Sep; 56 (17): 8184-94.

Guerra L, Pereira C, Rodrigues MA, Andrade PB, Gonçalves RF, Seabra RM, Valentão P. *Rumex induratus* leaves: phytochemical profiling and antioxidant activity. Planta Med 2008 Jul; 74: 1093. Resumo.

Comunicações

Guerra L, Pereira C, Gonçalves R, Andrade PB, Seabra RM, Valentão P. Phenolic compounds, organic acids and antioxidant properties of *Rumex induratus*. IJUP – Investigação Jovem na Universidade do Porto. I Encontro de Jovens Investigadores da Universidade do Porto. Porto, 20 - 22 Fevereiro de 2008. Comunicação oral.

Guerra L, Pereira C, Rodrigues MA, Andrade PB, Gonçalves RF, Seabra RM, Valentão P. *Rumex induratus* leaves: phytochemical profiling and antioxidant activity. 7th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF. “Natural Products With Pharmaceutical, Nutraceutical, Cosmetic and Agrochemical interest.” Athens Greece, 3-8 August 2008. Comunicação em painel.

Agradecimentos

No percurso de estudo e trabalho que agora termina participaram, directa ou indirectamente, várias pessoas e instituições que merecem o meu sincero agradecimento, sem as quais esta dissertação não estaria completa.

De modo particular gostaria de agradecer:

À minha orientadora Professora Doutora Patrícia Valentão pela sua dedicada orientação e atenção, pelo constante apoio, exemplo e conselho, pela disponibilidade e compreensão, pelas sábias correcções e pelos conhecimentos transmitidos ao longo da minha formação académica.

À Professora Doutora Paula Andrade pelo seu acolhimento, simpatia, competência e colaboração.

À Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto pela possibilidade da realização deste Mestrado.

Ao Laboratório de Farmacognosia, que me acolheu, pela estrutura e assistência necessárias à realização deste trabalho.

À Professora Doutora Maria Beatriz Oliveira, coordenadora do Mestrado em Controlo de Qualidade, pela colaboração e disponibilidade.

Ao Professor Doutor Manuel Ângelo Rodrigues, da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, pelo valioso contributo na obtenção e identificação das amostras.

À Doutora Paula Guedes de Pinho pelas contribuições relativas à análise estatística dos resultados.

Ao Luís Guerra, aluno de investigação, pela contribuição na realização da parte experimental.

Aos restantes elementos do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto pelo bom acolhimento e pela cooperação ao longo destes meses de trabalho.

À colega Dr.^a Alexandra Noites Lopes pela amizade partilhada ao longo da nossa vida académica e profissional, pelo apoio nos momentos de maior desânimo, pelo seu companheirismo e pelas nossas longas conversas.

O maior agradecimento é dirigido à minha família. Aos meus Pais, Cândida e Geraldo, e à minha irmã Eunice, pelo amor e apoio que sempre me deram, pela paciência e pela presença, carinho e sorriso nos bons e maus momentos.

A todos os que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, aqui fica o meu agradecimento.

Resumo

Neste trabalho foi realizada a caracterização de metabolitos primários e secundários (ácidos orgânicos e compostos fenólicos, respectivamente) e a avaliação da actividade antioxidante do extracto aquoso obtido das folhas de *Rumex induratus*. Foram analisadas amostras provenientes de plantas de cultivo em estufa e de crescimento espontâneo, que foram colhidas em diferentes locais, épocas e estados de desenvolvimento.

Os compostos fenólicos identificados por HPLC-DAD foram: cafeoil-hexósido, *p*-cumaroil-hexósido, feruloil-hexósido, sinapoil-hexósido, quercetina-6-C-hexósido, luteolina-8-C-hexósido, luteolina-2''-O-pentósido-8-C-hexósido, luteolina-6-C-hexósido, apigenina-2''-O-pentósido-8-C-hexósido, apigenina-6-C-hexósido, quercetina-3-O-hexósido, quercetina-3-O-rutinósido, diosmetina-7-O-hexósido e isoramnetina-3-O-rutinósido.

De modo geral, as amostras de crescimento espontâneo exibiram maior teor de compostos fenólicos do que as desenvolvidas em estufa. A análise do perfil fenólico do conjunto das amostras de campo permitiu verificar que na fase inicial do desenvolvimento o composto mais abundante é a apigenina-6-C-hexósido. No final do ciclo vegetativo a luteolina-6-C-hexósido torna-se o composto presente em maior percentagem. O composto maioritário nas amostras de cultivo em estufa, para todos os estados de desenvolvimento, é a apigenina-6-C-hexósido.

No extracto aquoso das folhas de *R. induratus* foram identificados e quantificados por HPLC-UV os ácidos oxálico, cítrico, málico, ascórbico e chiquímico. O ácido oxálico é o composto mais abundante, facto que é característico do género.

Na segunda parte deste trabalho foi avaliada a actividade sequestrante do extracto das folhas de *R. induratus* face ao radical DPPH, uma espécie reactiva de oxigénio, o ácido hipocloroso (HOCl), e uma espécie reactiva de azoto, o óxido nítrico (NO). O extracto demonstrou possuir actividade antioxidante contra as espécies reactivas testadas, sendo essa capacidade dependente da concentração.

Os resultados obtidos sugerem que as folhas de *R. induratus* poderão constituir uma interessante fonte de compostos antioxidantes sobretudo fenóis, com utilidade a nível da indústria alimentar ou farmacêutica.

Palavras-chave: *Rumex induratus*; compostos fenólicos; ácidos orgânicos; actividade antioxidante.

Abstract

In this work targeted metabolite analysis of the aqueous extract of *Rumex induratus* leaves, in terms of phenolic compounds and organic acids, and the study of its antioxidant activity were performed. The analysed samples were collected in various locations, spontaneously occurring or from greenhouse culture, in different seasons and at several stages of development.

The phenolic compounds identified by HPLC-DAD were: caffeoyl-hexoside, *p*-coumaroyl-hexoside, feruloyl-hexoside, sinapoyl-hexoside, 6-*C*-hexosyl-quercetin, 8-*C*-hexosyl-luteolin, 2''-*O*-pentosyl-8-*C*-hexosyl-luteolin, 6-*C*-hexosyl-luteolin, 2''-*O*-pentosyl-8-*C*-hexosyl-apigenin, 6-*C*-hexosyl-apigenin, 3-*O*-hexosyl-quercetin, 3-*O*-rutinosyl-quercetin, 7-*O*-hexosyl-diosmetin and 3-*O*-rutinosyl-isorhamnetin.

In general, spontaneously occurring samples showed higher amounts of phenolic compounds than greenhouse ones. Phenolic profile analysis of field samples showed that 6-*C*-hexosyl-apigenin is the most abundant compound in the first stage of plant development. 6-*C*-hexosyl-luteolin becomes the prevalent compound at the end of the vegetative cycle. The major compound in greenhouse samples during the whole cycle of plant growth is 6-*C*-hexosyl-apigenin.

In the aqueous extract of *R. induratus* leaves were identified and quantified, by HPLC-UV, five organic acids: oxalic, citric, malic, ascorbic and shikimic. Oxalic acid is the most abundant compound and high amounts of this acid characterize *Rumex* genus.

In the second part of this work it was evaluated the scavenging capacity of aqueous extract of *R. induratus* leaves against DPPH radical, a reactive oxygen species, hypochlorous acid (HOCl), and a reactive nitrogen species, nitric oxide (NO). The extract showed antioxidant capacity against all reactive species tested, in a concentration-dependent way.

The results obtained in the present work provide evidence that *R. induratus* leaves are an interesting source of antioxidant compounds, namely phenolics, which may be useful in food or pharmaceutical industries.

Keywords: *Rumex induratus*; phenolic compounds; organic acids; antioxidant activity.

Índice geral

Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
Índice geral	ix
Índice de figuras.....	xi
Índice de tabelas.....	xiv
Lista de abreviaturas e símbolos	xv
1. Introdução.....	1
2. Objectivos.....	5
2.1. Gerais.....	6
2.2. Específicos	6
3. Fundamentos teóricos.....	7
3.1. Compostos fenólicos	8
3.1.1. Ácidos fenólicos	10
3.1.2. Flavonóides.....	12
3.1.3. Extracção e análise.....	14
3.2. Ácidos orgânicos	18
3.2.1. Extracção e análise.....	21
3.3. Oxidantes e antioxidantes	22
3.3.1. Espécies Reactivas de Oxigénio e Azoto	25
3.3.2. Defesas antioxidantes.....	34
3.3.2.1. Sistema antioxidante enzimático	36
3.3.2.2. Sistema antioxidante não enzimático	39
3.3.2.3. Compostos fenólicos	44
4. <i>Rumex induratus</i>.....	48
5. Materiais e Métodos	52
5.1. Substâncias de referência e reagentes.....	53
5.2. Amostras	53
5.3. Aparelhagem	56
5.4. Extracção dos compostos fenólicos e ácidos orgânicos	58

5.5.	Análise dos compostos fenólicos por HPLC-DAD.....	59
5.6.	Análise dos ácidos orgânicos por HPLC-UV.....	60
5.7.	Avaliação da actividade antioxidante.....	61
5.7.1.	Avaliação da actividade anti-radicalar.....	61
5.7.2.	Avaliação da actividade sequestrante para o ácido hipocloroso.....	62
5.7.3.	Avaliação da actividade sequestrante para o óxido nítrico.....	63
5.8.	Análise estatística.....	65
6.	Resultados e Discussão.....	66
6.1.	Compostos fenólicos em <i>R. induratus</i>	67
6.2.	Ácidos orgânicos em <i>R. induratus</i>	80
6.3.	Actividade antioxidante de <i>R. induratus</i>	91
7.	Conclusões.....	99
8.	Referências bibliográficas.....	103

Índice de figuras

Figura 1. Estruturas dos ácidos fenólicos mais frequentes.....	10
Figura 2. Estrutura do ácido clorogénico.	11
Figura 3. Estrutura básica dos flavonóides.....	12
Figura 4. Estruturas das principais classes de flavonóides (adaptado de Manach <i>et al.</i> , 2004).....	13
Figura 5. Estruturas dos principais ácidos orgânicos presentes nas plantas.	19
Figura 6. Redução univalente do oxigénio a água (adaptado de Ferreira <i>et al.</i> , 2007).	26
Figura 7. Representação da metabolização de nucleóticos a ácido úrico com produção do radical superóxido.	27
Figura 8. Formação de espécies reactivas de azoto (adaptado de Burney <i>et al.</i> , 1999)....	32
Figura 9. Dano oxidativo induzido por espécies reactivas de oxigénio e azoto (adaptado de Kohen <i>et al.</i> , 2002).	33
Figura 10. Actividade da glutathiona peroxidase (GPx) e da glutathiona redutase (GR).	38
Figura 11. Estrutura da glutathiona na forma reduzida (GSH).....	40
Figura 12. Síntese da glutathiona.	40
Figura 13. Estrutura do ácido úrico.	41
Figura 14. Oxidação do ascorbato a radical ascorbilo e ácido desidroascórbico (adaptado de Seabra <i>et al.</i> , 2006).....	42
Figura 15. Estrutura do α -tocoferol.	42
Figura 16. Interação entre o α -tocoferol, o ácido ascórbico e a glutathiona (adaptado de Valentão, 2003).....	43
Figura 17. Estrutura do β -caroteno.	43
Figura 18. Representação esquemática da acção das defesas antioxidantes (adaptado de Ferreira <i>et al.</i> , 2007).....	44
Figura 19. Sequestro de radicais livres por compostos fenólicos (adaptado de Seabra <i>et al.</i> , 2006)	45
Figura 20. Relação estrutura/actividade antioxidante dos flavonóides (adaptado de Valentão, 2003).....	47
Figura 21. Locais de quelatação de iões metálicos pelos flavonóides (adaptado de Seabra <i>et al.</i> , 2006).	47
Figura 22. <i>Rumex induratus</i> (adaptado de Jardim Botânico da UTAD, 2007 e Universidad de Extremadura, 2000-2008).	49
Figura 23. Amostras de <i>R. induratus</i> de crescimento espontâneo.	55

Figura 24. Sistema de HPLC-DAD usado na separação e identificação de compostos fenólicos.	57
Figura 25. Sistema de HPLC-UV usado na separação e identificação de ácidos orgânicos.....	57
Figura 26. Gradiente de eluição utilizado na análise dos compostos fenólicos por HPLC-DAD.....	59
Figura 27. Estrutura do radical 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazilo (DPPH).....	61
Figura 28. Reacção de Griess modificada (adaptado de Tsikas, 2007).	64
Figura 29. Perfil cromatográfico do extracto aquoso das folhas de <i>R. induratus</i> (amostra 22) obtido por HPLC-DAD.....	68
Figura 30. Espectros de UV-Vis dos ácidos fenólicos identificados e dos flavonóides mais representativos.....	69
Figura 31. Diagrama de componentes principais do conteúdo fenólico das amostras analisadas.....	71
Figura 32. Variação da quantidade de compostos fenólicos totais em função do estado de desenvolvimento nas amostras de <i>R. induratus</i> de crescimento em estufa.	72
Figura 33. Perfil em compostos fenólicos das amostras de <i>R. induratus</i> de crescimento em estufa (colheita de Outono/Inverno).....	73
Figura 34. Perfil em compostos fenólicos das amostras de <i>R. induratus</i> de crescimento em estufa (colheita de Primavera).	73
Figura 35. Concentração de compostos fenólicos nas amostras de campo de <i>R. induratus</i> de acordo com o estado de desenvolvimento.....	75
Figura 36. Perfil fenólico do conjunto das amostras de campo de <i>R. induratus</i> (média±erro padrão) em função do estado de desenvolvimento.	76
Figura 37. Perfis fenólicos das amostras de campo de <i>R. induratus</i>	78
Figura 38. Perfil em ácidos orgânicos do extracto aquoso das folhas de <i>R. induratus</i> (amostra 9) obtido por HPLC-UV.	80
Figura 39. Diagrama de componentes principais do conteúdo em ácidos orgânicos das amostras analisadas.	83
Figura 40. Concentração de ácidos orgânicos totais nas amostras de campo de <i>R. induratus</i> por estado de desenvolvimento.	84
Figura 41. Perfil em ácidos orgânicos do conjunto das amostras de campo de <i>R. induratus</i> (média±erro padrão) em função do estado de desenvolvimento.	85
Figura 42. Perfis em ácidos orgânicos das amostras de campo de <i>R. induratus</i>	86

Figura 43. Concentração de ácidos orgânicos totais nas amostras de estufa de <i>R. induratus</i> por estado de desenvolvimento.	88
Figura 44. Perfil em ácidos orgânicos das amostras de <i>R. induratus</i> de crescimento em estufa (colheita de Outono/Inverno).	89
Figura 45. Perfil em ácidos orgânicos das amostras de <i>R. induratus</i> de crescimento em estufa (colheita de Primavera).	89
Figura 46. Efeito do extracto aquoso das folhas de <i>R. induratus</i> na redução do DPPH. ..	91
Figura 47. Efeito da luteolina-7-O-glucósido na redução do DPPH.	92
Figura 48. Efeito do extracto aquoso das folhas de <i>R. induratus</i> na intercepção do $\cdot\text{NO}$. ..	93
Figura 49. Efeito da luteolina-7-O-glucósido na intercepção do $\cdot\text{NO}$	94
Figura 50. Actividade do extracto aquoso das folhas de <i>R. induratus</i> face ao ácido hipocloroso.	95

Índice de tabelas

Tabela 1. Doenças associadas ao stress oxidativo.	24
Tabela 2. Espécies reactivas de oxigénio.	25
Tabela 3. Espécies reactivas de azoto.	30
Tabela 4. Origem, localização e mecanismos de acção dos principais antioxidantes orgânicos (adaptado de Ferreira <i>et al.</i> , 2007).	35
Tabela 5. Caracterização das amostras de <i>R. induratus</i> em estudo.	54
Tabela 6. Composição fenólica das amostras de <i>R. induratus</i> (mg de compostos fenólicos/kg de extracto liofilizado).	70
Tabela 7. Composição em ácidos orgânicos das amostras de <i>R. induratus</i> (g de ácido orgânico/kg de extracto liofilizado).	82

Lista de abreviaturas e símbolos

Abs	Absorvância
ABTS	Ácido 2,2'-Azinobis-3-etilbenzotiozolino-6-sulfônico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DL₅₀	Dose que provoca a morte (dose letal) de 50% da população testada
DPPH	2,2'-Difenil-1-picrilhidrazilo
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
MS	Espectrometria de massa
<i>et al.</i>	e colaboradores
IC₅₀	Concentração necessária para atingir 50% do efeito máximo
ERA	Espécies reactivas de azoto
ERO	Espécies reactivas de oxigénio
g	Gramma
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta pressão com detector de díodos
HPLC-UV	Cromatografia líquida de alta pressão com detector de ultravioleta
kg	Kilograma
l	Litro
mg	Miligrama
min	Minutos
µg	Micrograma
ml	Mililitro
mM	Milimolar
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reduzida
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato hydrogenado
NBT	Azul de nitrotetrazólio
nm	Nanómetro
·NO	Radical óxido nítrico
nq	Não quantificável
RMN	Ressonância magnética nuclear
UV	Ultravioleta
Vis	Visível

1. Introdução

A alimentação constitui um factor relevante para a promoção e manutenção da saúde. Os dados epidemiológicos evidenciam o importante papel da dieta na prevenção e controlo da morbilidade e mortalidade prematuras, resultantes de doenças crónicas não transmissíveis.

Neste contexto, a tradicional dieta mediterrânea é reconhecida como uma das mais saudáveis (Lairon, 2007; Barbaste *et al.*, 2002). Trata-se de uma dieta composta por alimentos frescos (nomeadamente fruta e vegetais), cereais, leguminosas, peixe, ervas aromáticas, leite e derivados, azeite e vinho em quantidades moderadas.

O crescimento exponencial da industrialização, o desenvolvimento económico e a globalização dos mercados têm um impacto significativo no estado nutricional e de saúde das populações. De facto, as alterações nos padrões alimentares, reflectidas num aumento da ingestão de alimentos altamente calóricos, ricos em gorduras, sobretudo saturadas, em sal e açúcares refinados, e na diminuição do consumo fruta e vegetais, associadas a um estilo de vida sedentário, aumentam o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e de cancro.

As estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que o baixo consumo de fruta, legumes e vegetais apresenta-se entre os cinco factores de risco para o desenvolvimento de doença. Na verdade, os alimentos de origem vegetal constituem-se como componentes importantes de uma dieta saudável, pois contêm alto teor de micronutrientes e fibras, uma grande variedade de metabolitos secundários biologicamente activos e apresentam baixo teor energético (WHO, 2004).

Diversas evidências científicas e epidemiológicas (Tapsell *et al.*, 2006; Arts e Hollman, 2005) têm revelado a associação inversa entre o consumo de fruta e legumes e o risco de doenças cardiovasculares e determinados tipos de cancro, principalmente no sistema digestivo. Este efeito benéfico e protector é mediado por diversos mecanismos, envolvendo antioxidantes e micronutrientes, tais como flavonóides, carotenóides, tocoferóis, vitamina C, minerais, entre outros. Estas substâncias diminuem o nível de stress oxidativo no organismo, prevenindo a peroxidação lipídica e o dano oxidativo de macromoléculas como o DNA e proteínas (Liu, 2004; Barbaste *et al.*, 2002; WHO, 2002; Urquiaga e Leighton, 2000).

Desta forma, a OMS, num relatório publicado em conjunto com a Organização para a Agricultura e a Alimentação (FAO) sobre dieta, nutrição e a prevenção de doenças crónicas não transmissíveis, recomenda o consumo mínimo de 400 g/dia de fruta e hortaliças para a prevenção de doenças como obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares e cancro (WHO, 2003).

Vários estudos utilizando diferentes componentes presentes nos alimentos vegetais, tais como flavonóides e outros compostos fenólicos e ácidos orgânicos, demonstram que estes são antioxidantes efectivos (Silva *et al.*, 2004; Pulido *et al.*, 2000; Tseng *et al.*, 1997). Por esta razão, estes constituintes desempenham um papel importante tanto na própria planta, como na dieta da qual esta faz parte, funcionando também como compostos bioactivos para o consumidor (Heinrich *et al.*, 2006; Barbaste *et al.*, 2002; Urquiaga e Leighton, 2000). Além disto, é sabido que substâncias como os compostos fenólicos e os ácidos orgânicos influenciam as propriedades organolépticas de frutos e vegetais (Vaughan e Geissler, 1997) e têm sido utilizados no seu controlo de qualidade e autenticidade (Sousa *et al.*, 2005; Valentão *et al.*, 2005a e 2005b).

O género *Rumex* L. pertence à família Polygonaceae e compreende cerca de 200 espécies e subespécies de crescimento anual, bienal ou perene. Encontra-se largamente distribuído, principalmente no hemisfério norte, sobretudo em solos acídicos (Plantamed, 2005). Em Portugal, o género *Rumex* é frequente em quase todo o país, sendo de crescimento espontâneo ou cultivo.

Vulgarmente conhecidas por azedas, as folhas e raízes de algumas espécies de *Rumex*, nomeadamente a *Rumex acetosa*, a *Rumex crispus*, a *Rumex patientia* e a *Rumex aquaticus*, são usadas na medicina tradicional no tratamento de inflamação do tracto respiratório, obstipação, doenças de pele (eczema e psoríase) e desintoxicação hepática. Estas indicações resultam das suas propriedades diurética, purgativa, depurativa, mucolítica, antianémica e antibacteriana (Cunha *et al.*, 2003; DerMarderosian e Bentler, 2002; *PDR for Herbal Medicines*, 1998; Newall *et al.*, 1996; Hellemont, 1986).

As espécies do género *Rumex* contêm na sua composição antraquinonas, compostos fenólicos, vitamina C, sais de ferro e ácido oxálico, livre ou sob a forma de oxalato de cálcio ou de potássio (Cunha *et al.*, 2003; DerMarderosian e Bentler, 2002; *Fitoterapia*, 1998; *PDR for Herbal Medicines*, 1998; Newall *et al.*, 1996; Hellemont, 1986).

Para além da sua utilização em fitoterapia, algumas espécies, como a *R. acetosa*, a *Rumex acetosella*, a *Rumex alpinus*, a *R. crispus*, a *R. patientia* e a *Rumex induratus* são comestíveis, sendo consumidas cruas em saladas ou cozinhadas sob a forma de puré, ou ainda como ervas aromáticas em sopas e temperos (*Plants For A Future*, 1996-2003).

A espécie *R. induratus* é endémica da Península Ibérica e de crescimento espontâneo no Nordeste de Portugal. Apesar de não possuir indicação medicinal, esta

planta é muito utilizada na alimentação. As suas folhas possuem um sabor refrescante e são muito apreciadas em saladas.

A utilização da *R. induratus* na alimentação e o interesse contínuo na pesquisa e identificação dos diferentes compostos químicos presentes nas variadíssimas espécies vegetais usadas na alimentação, das actividades biológicas que lhe estão associadas e do conhecimento dos benefícios que daí possam advir, justificam o estudo da composição química e do potencial antioxidante desta espécie.

2. Objectivos

2.1. Gerais

O trabalho desenvolvido nesta Dissertação de Mestrado em Controlo de Qualidade, Especialização em Água e Alimentos, visa a determinação do perfil metabólico, a avaliação da actividade antioxidante e a valorização nutricional da espécie *R. induratus*.

2.2. Específicos

- Determinar o perfil de compostos fenólicos de folhas de *R. induratus* por cromatografia líquida de alta pressão com detector de díodos (HPLC-DAD);
- Determinar o perfil de ácidos orgânicos de folhas de *R. induratus* por cromatografia líquida de alta pressão com detector de ultravioleta (HPLC-UV);
- Estabelecer associações entre os perfis fenólico e de ácidos orgânicos, o estado de desenvolvimento e a origem geográfica de *R. induratus*;
- Avaliar a actividade anti-radicalar do extracto aquoso das folhas de *R. induratus* face ao radical DPPH;
- Avaliar o potencial antioxidante do extracto aquoso das folhas de *R. induratus* face a espécies reactivas de oxigénio (ácido hipocloroso) e de azoto (óxido nítrico);
- Estabelecer correlações entre a actividade antioxidante e a composição química.

3. Fundamentos teóricos

3.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos estão presentes em todos os frutos e vegetais. Devido à sua ampla distribuição na natureza, constituem um dos grupos mais numerosos de metabolitos. Pela sua ubiquidade e simultaneamente pela sua presença característica dentro de grupos botânicos, alguns deles podem ser considerados marcadores químicos em sistemas taxonómicos, sendo muitas vezes utilizados no controlo de qualidade e na avaliação da autenticidade de produtos naturais (Valentão *et al.*, 2005a; Sousa *et al.*, 2005; Merken e Beecher, 2000; Ribéreau-Gayon, 1968).

Resultantes do metabolismo secundário das plantas, os compostos fenólicos compreendem um grupo heterogéneo de substâncias, umas com estruturas relativamente simples e outras mais complexas. Estes compostos caracterizam-se pela existência de um anel aromático, ao qual está ligado um ou mais grupos hidroxilo, livres ou envolvidos numa ligação éter, éster ou heterosídica. São também definidos como compostos não azotados com um ciclo aromático, que derivam do metabolismo do ácido chiquímico e/ou de um poliacetato. Esta definição resulta da sua origem biossintética em que se distinguem duas vias anabólicas (Bruneton, 1999):

- a via do ácido chiquímico (mais comum), que resulta da condensação do fosfoenolpiruvato com a eritrose-4-fosfato e dá origem aos aminonácidos aromáticos fenilalanina e tirosina. Estes aminoácidos, por desaminação, originam ácidos cinâmicos que entram na via fenilpropanóide.

- a via do acetato, em que os compostos fenólicos se formam por ciclização de um poli- β -cetoéster.

Habitualmente, os compostos fenólicos encontram-se na natureza na forma conjugada, principalmente com moléculas de açúcar ligadas ao hidroxilo fenólico (*O*-heterósidos) ou, mais raramente, ao anel benzénico (*C*-heterósidos). Os monossacarídeos mais frequentemente envolvidos são a glucose, a galactose, a ramnose e a apiose e os ácidos glucurónico e galacturónico; porém, também é possível encontrar di-, tri-, ou tetrassacarídeos. (Cunha, 2005; Bruneton, 1999).

Nas plantas, os compostos fenólicos desempenham funções essenciais na reprodução e no crescimento (são fundamentais no processo de polinização), funcionam como mecanismos de protecção e defesa contra radiações ultravioleta (UV), agentes

patogénicos, parasitas e predadores, e contribuem para a coloração e o sabor (Naczk e Shahidi, 2006; Liu, 2004).

Os níveis de compostos fenólicos nos alimentos de origem vegetal dependem de diversos factores, entre eles a exposição à radiação UV, a temperatura, a poluição, a infecção por agentes patogénicos, as técnicas de cultivo, as condições de crescimento, o processo de amadurecimento e as condições de processamento e armazenamento (Naczk e Shahidi, 2006).

Em adição às funções exercidas nas plantas, os compostos fenólicos fazem parte da dieta e parecem estar associados a benefícios para a saúde humana, nomeadamente no tratamento e prevenção do cancro, doenças cardiovasculares e outras patologias, devido sobretudo à sua capacidade antioxidante (Barbaste *et al.*, 2002; Urquiaga e Leighton, 2000; Bravo, 1998).

Além das propriedades antioxidantes, os polifenóis demonstram outros efeitos, quer em modelos animais, quer em sistemas *in vitro*: regulação do óxido nítrico, indução da expressão genética na proliferação celular e na apoptose, inibição da proliferação celular e angiogénese, modulação da actividade enzimática, estimulação do sistema imunitário, regulação do metabolismo hormonal, actividade anti-inflamatória e acção antibacteriana e antiviral. Estes efeitos parecem também contribuir para o papel protector dos polifenóis no cancro e em doenças cardiovasculares (Arts e Hollman, 2005; Liu, 2004; Ross e Kasum, 2002).

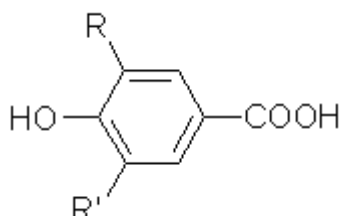
Os potenciais efeitos benéficos para a saúde dos compostos fenólicos dependem da quantidade consumida, da matriz alimentar, do tipo de glicósido e respectiva biodisponibilidade. A biodisponibilidade sofre influência de diversas variáveis, nomeadamente a absorção intestinal, o metabolismo pela microflora intestinal e hepático, a cinética dos compostos no plasma, a actividade relativa, a acumulação nos tecidos e a eliminação dos metabolitos. Por outro lado, a natureza e distribuição dos polifenóis na dieta podem ser também muito diversas. Daí que seja muito importante determinar como os antioxidantes da alimentação são metabolizados *in vivo* e de que forma os seus metabolitos actuam nos sistemas vivos. Neste contexto, os estudos clínicos e epidemiológicos são extremamente importantes para avaliar a relação entre o consumo destes compostos na alimentação ou em suplementos nutricionais e os potenciais efeitos benéficos para a saúde (Arts e Hollman, 2005; Manach *et al.*, 2004; Ross e Kasum, 2002).

O grupo dos compostos fenólicos compreende diversas classes de compostos, nomeadamente fenóis simples, benzoquinonas, ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos, cumarinas, taninos, lenhanas e lenhinas. As estimativas apontam para que os flavonóides correspondam a aproximadamente 2/3 dos compostos fenólicos que fazem parte da dieta humana e os ácidos fenólicos ao restante 1/3 (Liu, 2004).

3.1.1. Ácidos fenólicos

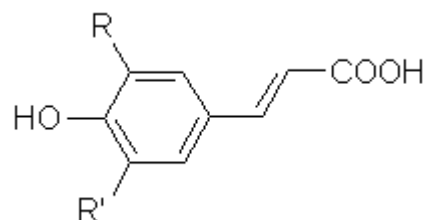
Os ácidos fenólicos estão divididos em dois grupos: os derivados hidroxilados do ácido benzóico e os derivados hidroxilados do ácido cinâmico, cujas principais estruturas estão representadas na figura 1.

Derivados do ácido benzóico



- R = R' = H; **ácido *p*-hidroxibenzóico**
- R = OH, R' = H; **ácido protocatéquico**
- R = OCH₃, R' = H; **ácido vanílico**
- R = R' = OH; **ácido gálhico**
- R = R' = OCH₃; **ácido siríngico**

Derivados do ácido cinâmico



- R = R' = H; **ácido *p*-cumárico**
- R = OH, R' = H; **ácido cafeico**
- R = OCH₃, R' = H; **ácido ferúlico**
- R = R' = OCH₃; **ácido sinápico**

Figura 1. Estruturas dos ácidos fenólicos mais frequentes.

Os ácidos hidroxibenzoicos são compostos abundantes na natureza, que possuem a função carboxílica ligada ao anel aromático hidroxilado (C₆-C₁). Os ácidos *p*-hidroxibenzoico, salicílico (ácido *o*-hidroxibenzoico), vanílico, siríngico, elágico e gálico são exemplos deste grupo (Bruneton, 1999).

Os derivados do ácido cinâmico são compostos fenólicos que possuem um anel aromático ao qual está ligada uma cadeia propanóide (C₆-C₃). Os ácidos *p*-cumárico, ferúlico, cafeico e sinápico são os ácidos hidroxicinâmicos mais comuns na natureza.

Devido à existência de uma dupla ligação na cadeia lateral dos ácidos cinâmicos, estes podem existir nas formas *cis* ou *trans*. Na natureza ocorrem os isômeros *trans*; porém, quando em solução e por influência da luz, os dois isômeros interconvertem-se facilmente até atingirem o equilíbrio (Ribéreau-Gayon, 1968).

Estes ácidos existem nas plantas, usualmente sob a forma de ésteres, como por exemplo o ácido clorogénico, ou ácido 5-O-cafeoilquínico (figura 2). Também são encontrados na forma de glicósidos, ligados a proteínas e a outros polímeros da parede celular e na forma livre (Bruneton, 1999).

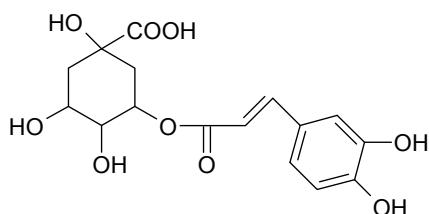


Figura 2. Estrutura do ácido clorogénico.

Os ácidos fenólicos são solúveis nos solventes orgânicos em meio ácido e solúveis na água e nos solventes orgânicos polares (metanol e etanol), quando se encontram na forma de ésteres ou de heterósidos (Cunha, 2005).

Estes dois grupos de ácidos fenólicos apresentam propriedades antioxidantes e os seus derivados são também conhecidos pelas propriedades colerética e hipocolesterolémica e pela actividade anti-inflamatória dos derivados do ácido salicílico (Bruneton, 1999).

3.1.2. Flavonóides

Os flavonóides constituem a maior classe de compostos fenólicos (mais de 4000) e ocorrem naturalmente em frutos e vegetais, sendo responsáveis pela coloração de folhas, flores e frutos. Estando presentes em todas as plantas, fazem parte da dieta humana: encontram-se no chá, na cebola, na maçã, no vinho tinto, etc. Podem também ser encontrados em extractos de muitas plantas medicinais, nomeadamente ginkgo (*Ginkgo biloba*) e passiflora (*Passiflora incarnata*), podendo o seu consumo variar entre 50 a 800 mg/dia (Seabra *et al.*, 2006; Bruneton, 1999).

A estrutura básica dos flavonóides ($C_6-C_3-C_6$) é o núcleo benzopirano ligado a um anel aromático (figura 3). Assim, dois anéis aromáticos (A e B) estão ligados por uma cadeia alifática com três carbonos, que normalmente condensa sob a forma de anel pirano (anel C) (Seabra *et al.*, 2006; Ross e Kasum, 2002).

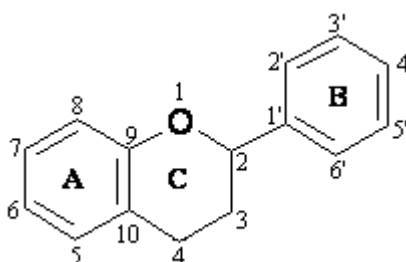


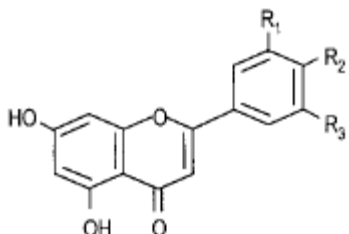
Figura 3. Estrutura básica dos flavonóides.

Os flavonóides são compostos com origem biossintética mista, isto é, o anel A resulta da via do acetato e, por isso, tem um esquema de substituição alternado característico, com hidroxilos nas posições 5 e 7; os anéis B e C são provenientes da via do chiquimato, sendo habitualmente hidroxilados nas posições 3', 4' e 5' (Ross e Kasum, 2002; Bruneton, 1999).

Os flavonóides são classificados com base no grau de oxidação e no padrão de substituição do anel central C (Seabra *et al.*, 2006; Manach *et al.*, 2004; Markham, 1989). Deste modo, os flavonóides podem ser divididos em classes: flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanóis (ou flavan-3-óis), antocianidinas e isoflavonas, cujas estruturas estão representadas na figura 4.

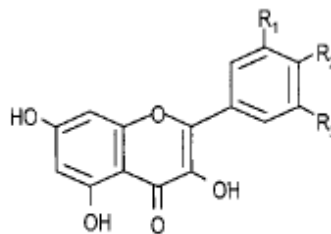
Flavonóides

Flavonas



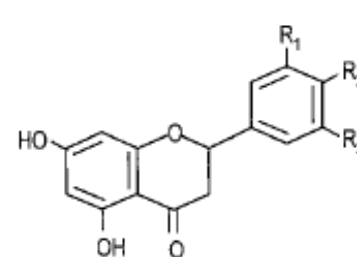
$R_1=H$; $R_2=OH$; **apigenina**
 $R_1=R_2=OH$; **luteolina**

Flavonóis



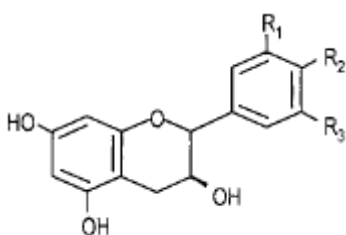
$R_2=OH$; $R_1=R_3=H$; **campferol**
 $R_1=R_2=OH$; $R_3=H$; **quercetina**
 $R_1=R_2=R_3=OH$; **miricetina**

Flavanona



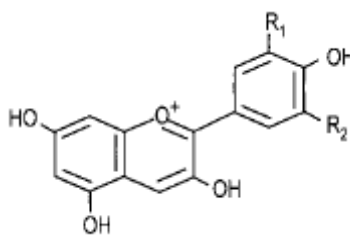
$R_1=H$; $R_2=OH$; **narigenina**
 $R_1=R_2=OH$; **eriodictiol**
 $R_1=OH$; $R_2=OCH_3$; **hesperetina**

Flavanóis



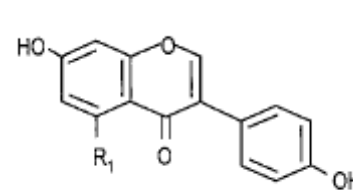
$R_1=R_2=OH$; $R_3=H$; **catequina**
 $R_1=R_2=R_3=OH$; **gallocatequina**

Antocianidinas



$R_1=OH$; $R_2=H$; **cianidina**
 $R_1=R_2=OCH_3$; **malvidina**

Isoflavonas



$R_1=H$; **daidzeína**
 $R_1=OH$; **genisteína**

Figura 4. Estruturas das principais classes de flavonóides (adaptado de Manach *et al.*, 2004).

Estes compostos podem ocorrer na forma livre ou em formas hidrossolúveis (C- e/ou O-heterósidos), armazenadas nos vacúolos celulares. Embora não tão frequentes, podem também ocorrer outras modificações, como metilação, metoxilação, acilação dos hidroxilos, dimerização, entre outras. Geralmente, a ligação entre a genina e o açúcar é feita através dos hidroxilos nas posições 3 e 7 dos flavonóis e na posição 7 das flavonas. No caso dos C-heterósidos, a ligação faz-se habitualmente aos carbonos situados na posição 6 ou 8 das flavonas (Cunha 2005; Bruneton, 1999).

O interesse do estudo dos flavonóides resulta das suas potenciais actividades biológicas. Estes polifenóis apresentam propriedades vasoactivas (aumento da resistência e diminuição da permeabilidade capilar), actividades antioxidante, antialérgica, antidiarreica, antibacteriana e antiviral, estrogénica, “tipo benzodiazepina”, inibem a proliferação celular anormal, possuem efeito cardioprotector e inibidor da carcinogénese pulmonar e actividade antitumoral (Cunha, 2005; Liu, 2004; Ross e Kasum, 2002; Bruneton, 1999).

Alguns trabalhos parecem demonstrar actividade antiproliferativa e ausência de citotoxicidade dos flavonóides, sobretudo da classe das flavonas (Ross e Kasum, 2002).

Em conjunto, as actividades antioxidante, estrogénica e antiproliferativa poderão explicar os potenciais benefícios dos flavonóides na redução da ocorrência das doenças cardiovasculares (efeito cardioprotector) e cancro (Ross e Kasum, 2002).

3.1.3. Extracção e análise

A análise de compostos fenólicos em materiais vegetais é influenciada pelas características químicas do composto, o método de extracção utilizado, a natureza e o tamanho da amostra, o tempo e as condições de armazenamento, a metodologia do ensaio, o padrão utilizado e a presença de substâncias interferentes, tais como ceras, gorduras, terpenos e clorofilas (Naczki e Shahidi, 2006).

O procedimento mais apropriado para a extracção dos compostos fenólicos depende da natureza da amostra, do seu estado físico e do tipo de fenóis que se pretende extrair. A solubilidade dos polifenóis varia de acordo com a polaridade do solvente utilizado, o grau de polimerização destes compostos e suas interacções com outros componentes da planta, como hidratos de carbono e proteínas. Os solventes mais utilizados para a extracção dos compostos fenólicos são água, metanol, etanol, acetona, acetato de etilo, propanol, dimetilformaldeído e misturas hidroalcoólicas. Para além da solubilidade, este processo é também influenciado pelo tempo de extracção, temperatura, tamanho das partículas da amostra e rácio entre a quantidade de solvente e a quantidade de amostra (Naczki e Shahidi, 2006; Andrade e Seabra, 2005).

Outro aspecto importante no desenvolvimento de métodos de análise de compostos fenólicos é a dificuldade em encontrar um padrão específico e conveniente, devido à complexidade das substâncias fenólicas presentes nos alimentos e às diferenças de reactividade entre estas substâncias e os reagentes. Por isto, a identidade de um composto deve ser estabelecida com base em variados critérios, incluindo dados das análises cromatográficas e determinações espectrofotométricas e espectrométricas. Tendo em consideração os estudos já desenvolvidos nestas áreas e a disponibilidade comercial de substâncias de referência, a identificação dos compostos pode ser estabelecida por comparação entre os resultados obtidos com estas substâncias e os compostos a determinar, por diferentes métodos.

Da variedade de métodos existentes para a determinação de compostos fenólicos em matrizes vegetais será dado especial destaque ao HPLC.

A HPLC é a técnica de eleição utilizada na separação e quantificação de compostos fenólicos, devido ao elevado nível de resolução, reprodutibilidade, sensibilidade e rapidez da mesma (Harborne, 1989).

De uma forma geral, a cromatografia é feita em fase reversa (RP – *reversed phase*), pois obtém-se uma melhor resolução na separação de compostos polares. Em RP-HPLC são utilizadas fases estacionárias constituídas por micropartículas de sílica (3 a 10 µm de diâmetro), covalentemente ligadas a cadeias hidrocarbonadas com 8 ou 18 átomos de carbono, normalmente designadas por RP8 ou C8, RP18 ou C18 ou ODS (octadecilsilano). A dimensão das partículas e da coluna (100 a 250 mm de comprimento e 4 a 6 mm de diâmetro interno) condicionam a pressão desenvolvida. Os fluxos mais usados variam entre 1 e 2 ml/minuto e o volume de amostra injectada entre 1 e 100 µl (Stalikas, 2007; Andrade e Seabra, 2005; Merken e Beecher, 2000).

A sequência da eluição dos compostos é determinada pelo grau de adsorção na fase estacionária hidrofóbica e subsequente eluição com a fase móvel polar, em função da extensão da formação de pontes de hidrogénio. A eluição pode ser desenvolvida em modo isocrático ou em gradiente. A fase móvel é constituída por misturas de água e solventes orgânicos, sendo os mais frequentes o metanol e o acetonitrilo. O pH do eluente deve ser sempre ácido, de modo a evitar a ionização de grupos acídicos dos compostos presentes na amostra e melhorar a simetria dos picos, minimizando o risco de *tailing*. Para este efeito, os ácidos mais utilizados são os acético, fórmico, fosfórico ou trifluoracético (Stalikas, 2007; Andrade e Seabra, 2005).

Utilizando a RP-HPLC os compostos polares são os primeiros a eluírem, evitando-se que estes fiquem irreversivelmente retidos na coluna. Desta forma, os tempos de retenção são inversamente relacionados com o aumento da glicosilação, eluindo primeiro os diglucósidos, depois os monoglicósidos e finalmente os compostos não glicosilados (Markham, 1989; van Sumere, 1989).

Os compostos fenólicos são habitualmente detectados recorrendo ao detector de UV, uma vez que, devido à existência de anéis aromáticos e ligações duplas conjugadas, todos os compostos fenólicos absorvem radiação nesta zona do espectro. A utilização de detectores de díodos (DAD) facilita a correcta identificação dos compostos, uma vez que permite o registo do espectro de absorção em função do comprimento de onda. O espectro UV do composto eluído, o tempo de retenção e a comparação com substâncias de referência são parâmetros importantes para o processo de identificação dos compostos (Andrade e Seabra, 2005; van Sumere, 1989).

Os ácidos benzóicos apresentam o máximo de absorção na região dos 200 a 290 nm e os seus espectros são influenciados pelo padrão de hidroxilação do anel benzénico. Os derivados do ácido cinâmico absorvem em duas zonas do espectro de UV: possuem um máximo de absorção a 225-235 nm e dois a 290-330 nm. Esta dupla absorção a 290-330 nm resulta da existência de isómeros *cis* e *trans*, sendo que a absorvância relativa de cada pico depende da proporção dos isómeros. A presença de moléculas de açúcar modifica os espectros de absorção em função da natureza da ligação. Os ésteres de um mesmo ácido cinâmico apresentam espectros de absorção semelhantes, independentemente da sua estrutura (van Sumere, 1989; Ribéreau-Gayon 1968).

Um espectro com duas bandas de absorção é característico dos flavonóides. A banda II, com o máximo de absorção no intervalo de 240-285 nm, está relacionada com o anel A (figura 3), enquanto a banda I, com o máximo situado entre 300-550 nm está associada aos anéis B e C e aos seus padrões de substituição e conjugação (Stalikas, 2007; Merken e Beecher, 2000; Markham, 1989).

A localização e intensidade relativa destas bandas fornecem informações sobre a classe do flavonóide e o seu padrão de oxigenação. Assim (Markham, 1989; Markham, 1982; Mabry *et al.*, 1970):

- o aumento da oxigenação causa geralmente um desvio batocrómico da banda respectiva, isto é, um desvio das bandas de absorção para maiores comprimentos de onda;

- a metilação e a glicosilação (especialmente nos hidroxilos em 3, 5, 7 e 4') originam desvios hipsocrómicos;
- a natureza do açúcar nos glicósidos não provoca qualquer alteração;
- a existência de ácidos cinâmicos a acilar flavonóides origina um máximo de absorção a 320 nm;
- a existência de um segundo pico ou inflexão na banda II é, de uma forma geral, o resultado da presença do sistema 3',4'-di-hidroxilo nas flavonas e nos flavonóis.

Para além da HPLC-DAD, a adição de reagentes de deslocamento fornece informações adicionais sobre a classe da aglicona e o seu padrão de substituição. Estes reagentes específicos, ionizantes e quelantes, induzem desvios nos máximos de absorção, através dos quais é possível identificar a posição dos hidroxilos livres e as suas substituições. Hidróxido de sódio, acetato de sódio, cloreto de alumínio, acetato de sódio com adição de ácido bórico e cloreto de alumínio com adição de ácido clorídrico são exemplos de reagentes de deslocamento (Stalikas, 2007; Markham, 1982).

O acoplamento da HPLC a outros métodos de detecção e identificação, como a detecção electroquímica, a voltametria, a espectrometria de massa (MS) ou a ressonância magnética nuclear de protão (RMN ¹H) e de carbono (RMN ¹³C) permite obter informação estrutural mais detalhada sobre as moléculas analisadas. A análise pode ainda estar associada a uma hidrólise prévia dos heterósidos (Naczki e Shahidi, 2006; Andrade *et al.*, 2003; Merken e Beecher, 2000; Markham, 1989).

3.2. Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos são ácidos fracos, solúveis em água e etanol, que se encontram nos vacúolos celulares de várias plantas (Dashek e Micales, 1997).

O tipo de ácidos orgânicos e a sua concentração são factores importantes, pois influenciam as características organolépticas de frutos e vegetais, nomeadamente o seu sabor (Vaughan e Geissler, 1997).

Os ácidos orgânicos apresentam-se como líquidos incolores com elevado ponto de ebulição, devido à facilidade que têm em estabelecer pontes de hidrogénio. A nível químico, estes compostos são classificados em função do número de grupos carboxilo que possuem e de acordo com outros grupos funcionais que possam existir (Lopez-Bucio *et al.*, 2000; Dashek e Micales, 1997).

O metabolismo dos ácidos orgânicos parece estar directamente associado com a capacidade da planta para se adaptar ao stress provocado por diferentes condições ambientais. Os ácidos orgânicos actuam não só como intermediários no metabolismo do carbono, mas também nos mecanismos que algumas plantas utilizam para se adaptarem às deficiências nutricionais, a diversas ecologias dos solos ou às interações com diferentes microrganismos. Possuem ainda um papel importante nos mecanismos de detoxificação interna de metais pesados existentes nos solos, através da formação de complexos (por exemplo citrato ou oxalato de alumínio) que se acumulam nos vacúolos das plantas (Lopez-Bucio *et al.*, 2000).

O perfil de ácidos orgânicos de vegetais, frutos e seus derivados poderá ser igualmente utilizado em estudos taxonómicos, pois é característico da espécie (Valentão *et al.*, 2005b), e no controlo de qualidade, porque são compostos relativamente estáveis durante o armazenamento e o processamento deste tipo de alimentos (Cámara *et al.*, 1994 citado por Valentão *et al.*, 2005b; Silva *et al.*, 2002).

Além destas propriedades, os ácidos orgânicos poderão exercer um efeito protector contra diversas doenças, nomeadamente aterosclerose e cancro, devido à sua actividade antioxidante, que está relacionada com a sua capacidade para interceptarem radicais livres e quelatarem iões metálicos (Seabra *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2004).

Na figura 5 estão representados os principais ácidos orgânicos que ocorrem na natureza: oxálico, ascórbico, tartárico, málico, cítrico, succínico, α -cetoglutarico, quínico, chiquímico, fumárico, pirúvico, malónico e láctico.

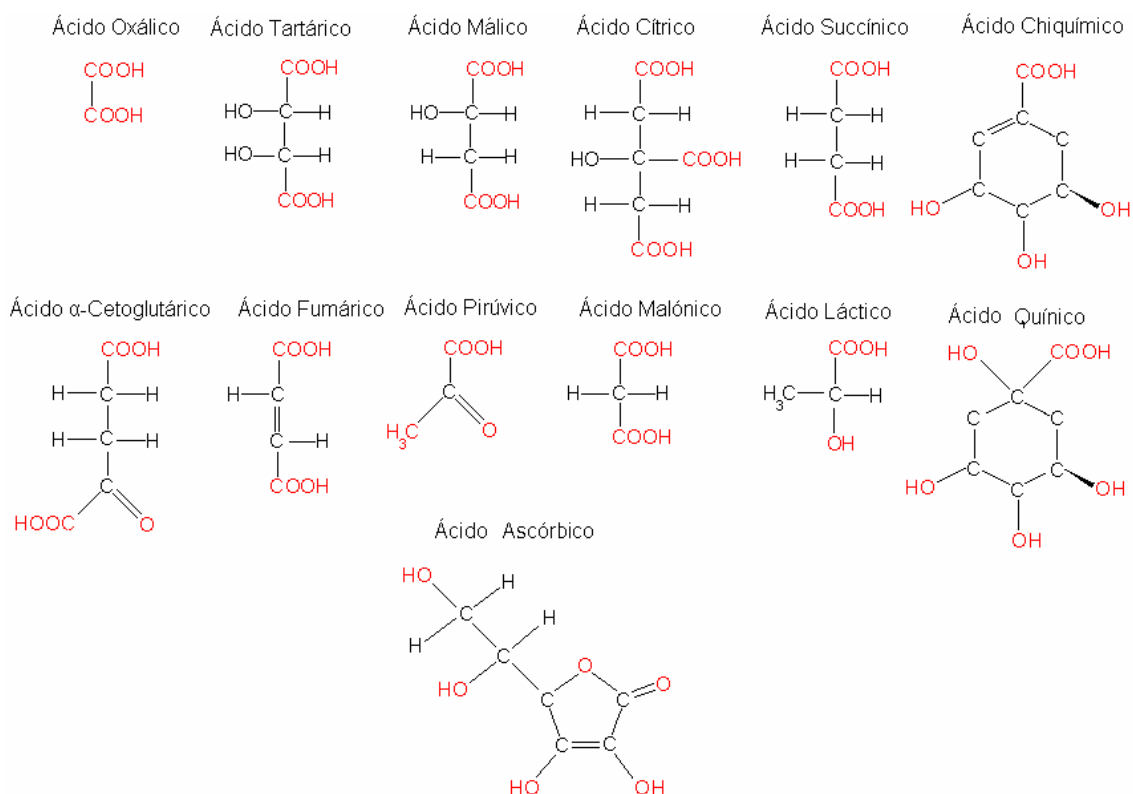


Figura 5. Estruturas dos principais ácidos orgânicos presentes nas plantas.

O **ácido oxálico** é um ácido dicarboxílico que exerce diversas funções importantes nas plantas. Este ácido pode estar presente na forma livre ou sob a forma de oxalato de cálcio insolúvel, cristalizado no interior das células vegetais. Níveis elevados de ácido oxálico poderão constituir um factor de protecção das plantas contra herbívoros, insectos e outros microrganismos patogénicos, porque influenciam o gosto, a textura, a acidez e a disponibilidade e o metabolismo do cálcio. Este ácido pode ainda actuar na planta como regulador do pH e da osmolaridade (Libert e Franceschi, 1987).

O ácido oxálico tem sido considerado como um antinutriente devido à sua capacidade para quelatar catiões multivalentes, interferindo com a absorção e o metabolismo do cálcio, ferro, magnésio e cobre. Esta situação ocorre quando este ácido é consumido em quantidades consideráveis por longos períodos (Libert e Franceschi, 1987).

Além disso, quando ingerido em grandes quantidades, este composto exerce efeitos tóxicos agudos, pois é irritante para o estômago e intestino, causando distúrbios gastrointestinais, como vômitos, cólicas e diarreia. O ácido absorvido reage com o cálcio sérico, provocando hipocalcemia e, conseqüentemente, efeitos nocivos graves nos sistemas nervoso, cardiovascular, hepático e renal, levando mesmo à insuficiência renal devido à deposição de cristais de oxalato de cálcio nos nefrônios. A DL_{50} estimada para o ácido oxálico é de 375 mg/kg de peso corporal (Libert e Franceschi, 1987).

Mas, para além dos efeitos tóxicos, o ácido oxálico, nas concentrações habitualmente encontradas nas plantas comestíveis, parece possuir efeitos antioxidantes e poderá exercer efeitos benéficos, devido à sua capacidade para quelatar metais como alumínio, ferro ou cobre (Seabra *et al.*, 2006; Kayashima e Katayama, 2002).

Outro composto importante na natureza é o **ácido ascórbico**, também conhecido como vitamina C, em conjunto com a sua forma oxidada, o ácido desidroascórbico.

O ácido ascórbico é um antioxidante hidrossolúvel muito importante na alimentação, uma vez que o organismo humano não tem capacidade para o sintetizar. Actua através da intercepção e neutralização de espécies reactivas de oxigénio e azoto, estando também envolvido na regeneração de outros antioxidantes, como o α -tocoferol e o ácido úrico. Esta actividade antioxidante poderá estar na base dos efeitos benéficos que este ácido parece exercer na prevenção da aterosclerose, do cancro e outras doenças degenerativas, embora alguns estudos reclamem uma acção pró-oxidante, quando presente em baixas concentrações. Adicionalmente, a vitamina C está envolvida na síntese de neurotransmissores, hormonas esteróides e colagénio, na conversão do colesterol a ácidos biliares e na absorção do ferro e do cálcio (Seabra *et al.*, 2006).

O **ácido cítrico** é um ácido tricarboxílico presente na maioria dos frutos, particularmente abundante nos diferentes frutos do género *Citrus*, sendo responsável pelo seu sabor ácido e refrescante. É usado como conservante natural e na preservação dos alimentos, sob a forma de citrato de cálcio. Tal como o ácido cítrico, outros ácidos

como o málico, o tartárico, o succínico e o chiquímico comportam-se como antioxidantes preventivos ou sinérgicos, devido à sua capacidade para quelatar metais (Seabra *et al.*, 2006).

3.2.1. Extracção e análise

Os ácidos orgânicos são analisados por HPLC em fase reversa, com fases estacionárias semelhantes às citadas para os compostos fenólicos, ou com colunas de troca iónica. Neste último caso, o principal mecanismo de separação dos ácidos consiste na exclusão iónica. Para tal, a fase estacionária é constituída por sílica ou polímeros de celulose sintéticos, revestidos por substituintes com carga, com os quais ocorre a troca iónica. É comum executar-se esta análise em colunas termostatadas com temperaturas iguais ou superiores a 30°C. A detecção é realizada com base no índice de refração dos compostos ou por espectrofotometria, uma vez que o grupo carboxílico é um cromóforo fraco (Masson, 2000).

3.3. Oxidantes e antioxidantes

O oxigénio é um dos principais elementos da crosta terrestre e constitui cerca de 21% da composição do ar atmosférico. Esta molécula é indispensável para a produção de energia, pois a oxidação constitui a parte fundamental do metabolismo aeróbio. Porém, embora seja indispensável, este processo conduz à formação de espécies reactivas de oxigénio (ERO) e de espécies reactivas de azoto (ERA). A acumulação destas espécies reactivas pode resultar em danos reversíveis ou mesmo irreversíveis e daí a necessidade da sua inactivação permanente para manutenção da homeostasia. A inactivação das espécies reactivas e o combate aos seus efeitos deletérios são o resultado do envolvimento de mecanismos antioxidantes, enzimáticos ou não enzimáticos. Um desequilíbrio entre a produção de espécies reactivas e a defesa antioxidante, com um aumento da capacidade pró-oxidante, conduz a uma situação de stress oxidativo e, por consequência, ao dano oxidativo. (Kohen e Nyska, 2002).

Os sistemas vivos estão expostos a uma variedade destas espécies reactivas, de origem endógena e exógena. As fontes exógenas incluem a própria molécula de oxigénio (O_2) e o ozono (O_3), a exposição a radiações ionizantes e não-ionizantes (radiação UV), a poluição atmosférica, o fumo do cigarro, os fármacos, uma grande variedade de xenobióticos com actividade pró-oxidante (toxinas, pesticidas, herbicidas e outros químicos), as infecções microbianas e os alimentos (Seabra *et al.*, 2006; Kohen e Nyska, 2002).

Contudo, a exposição a espécies reactivas de origem endógena, provenientes do próprio metabolismo, é muito mais importante. A mitocôndria é a principal fonte de ERO, na redução do oxigénio a água para produção de energia ao nível da cadeia respiratória, seguida das reacções de destoxificação de fármacos e outros xenobióticos, que envolvem o sistema enzimático citocromo P450. Enzimas como a xantina oxidase ou a óxido nítrico sintetase estão também envolvidas na formação endógena de ERO (Kohen e Nyska, 2002).

A produção endógena de espécies reactivas é, todavia, essencial para a existência e desenvolvimento da célula, pois cria condições para numerosos processos bioquímicos. As ERO e ERA têm um papel fundamental na activação de genes, no crescimento celular e na modulação de reacções químicas. São os principais agentes de

defesa libertados pelos neutrófilos (fagócitos) contra vírus e bactérias durante a fagocitose e são agentes responsáveis pela dilatação dos vasos sanguíneos. Participam na regulação do tónus do músculo liso, no controlo da pressão arterial e no metabolismo dos xenobióticos. São mediadores na biossíntese de outras moléculas, como por exemplo prostaglandinas, e funcionam como moléculas sinalizadoras de processos celulares (Seabra *et al.*, 2006; Kohen e Nyska, 2002).

Embora possam exercer efeitos benéficos para o organismo, o excesso de espécies oxidantes reactivas apresenta efeitos prejudiciais. Os alvos biológicos mais sensíveis ao dano oxidativo são as proteínas (incluindo enzimas), os lípidos, os hidratos de carbono e o DNA.

Nas proteínas, as interacções com as ERO podem provocar peroxidação, alteração na estrutura terciária, degradação, alteração da funcionalidade e perda da actividade enzimática.

A peroxidação lipídica danifica sobretudo os lípidos membranares devido ao seu elevado teor em ácidos gordos insaturados, propagando-se habitualmente através de um conjunto de reacções em cadeia.

Ao nível da molécula de DNA podem ocorrer vários danos: modificação de bases, perda de purinas, alteração da molécula do açúcar, quebra da dupla cadeia ou dano no sistema reparador do DNA (Kohen e Nyska, 2002).

Desta forma, o stress oxidativo pode estar relacionado com um conjunto de fenómenos biológicos variados e numerosas patologias (tabela 1), nomeadamente processos inflamatórios, mutação, envelhecimento, carcinogénese, doenças cardiovasculares, disfunção endotelial, aterosclerose, doenças do tracto intestinal, artrite reumatóide, diabetes, doenças oculares e doenças neurodegenerativas, como por exemplo a doença de Alzheimer ou de Parkinson (Kohen e Nyska, 2002; Pulido *et al.*, 2000; Sies 1993).

Tabela 1. Doenças associadas ao stress oxidativo.

Alvo	Patologias
Tracto gastrointestinal	Diabetes; Pancreatite; Dano hepático
Cérebro e Sistema Nervoso	Doença de Parkinson; Doença de Alzheimer; Hipertensão; Esclerose múltipla
Coração e vasos sanguíneos	Aterosclerose; Trombose coronária
Pulmão	Asma; Enfisema pulmonar
Olho	Cataratas; Retinopatia
Articulações	Artrite reumatóide
Rim	Glomerulonefrite
Pele	Manchas de envelhecimento; Rugas
Diversos	Envelhecimento; Cancro; Doenças auto-imunes; Estados inflamatórios; SIDA; Lupus.

Para evitar estes efeitos nocivos, a produção constante de espécies reactivas oxidantes é contrabalançada pela presença de antioxidantes endógenos (produzidos pelo organismo) ou exógenos (fornecidos pela dieta).

Neste contexto, os antioxidantes presentes em frutos e espécies vegetais desempenham um papel fundamental no sistema de protecção do organismo contra espécies oxidantes, resultantes de processos patológicos e fisiológicos. Além disso, os antioxidantes exercem igualmente um efeito protector, quando presentes ou adicionados a alimentos, porque preservam as suas qualidades organolépticas e nutricionais, prolongando o seu prazo de validade e prevenindo a formação de produtos de decomposição oxidativa pela acção da luz, temperatura e humidade.

Paralelamente, existe um interesse crescente na descoberta de novos antioxidantes de origem natural, que substituam antioxidantes sintéticos como o butil-hidroxi-anisol (BHA) e o butil-hidroxi-tolueno (BHT), utilizados na preservação da qualidade e segurança de alimentos, cosméticos e medicamentos. Esta procura deve-se ao facto destes antioxidantes sintéticos possuírem uma grande volatilidade e instabilidade a

temperaturas elevadas, apresentarem alguma toxicidade e serem menos potentes que os agentes antioxidantes naturais (Seabra *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2001).

Entre as diversas classes de compostos com actividade antioxidante, a dos compostos fenólicos representa uma das de maior interesse, porque para além de se encontrarem amplamente distribuídos na natureza, estes compostos apresentam actividade anti-radicalar, capacidade para quelatar metais e inibir a produção de radicais livres (Shi *et al.*, 2001; Rice-Evans *et al.*, 1997; Halliwell *et al.*, 1995; Sies, 1993).

3.3.1. Espécies Reactivas de Oxigénio e Azoto

Alguns exemplos de ERO potencialmente tóxicas estão representados na tabela 2.

Tabela 2. Espécies reactivas de oxigénio.

Nome	Símbolo
Radical superóxido	$O_2^{\bullet-}$
Radical hidroxilo	HO^{\bullet}
Radical peroxilo	ROO^{\bullet}
Radical alcoxilo	RO^{\bullet}
Oxigénio	$O_2^{\bullet\bullet}$
Peróxido de hidrogénio	H_2O_2
Radical hidroperoxilo	HO_2^{\bullet}
Oxigénio singleto	1O_2
Ácido hipocloroso	$HOCl$

As espécies reactivas podem ser classificadas em dois grupos: radicalares e não radicalares. Um radical livre é definido como qualquer espécie química com existência independente que contém um ou mais electrões desemparelhados. A ocorrência de um electrão desemparelhado resulta numa grande reactividade e num tempo de semi-vida curto, isto porque estas espécies têm afinidade para doar ou obter um electrão de modo a

se tornarem estáveis. Dentro das espécies radicalares incluem-se os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxilo (ROO^{\cdot}), alcóxilo (RO^{\cdot}), hidróxilo (HO^{\cdot}) e a própria molécula de oxigénio ($O_2^{\cdot\cdot}$), que tem uma natureza bi-radicalar. O oxigénio singlete (1O_2), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e os hidroperóxidos lipídicos não são radicalares, embora sejam também espécies muito reactivas (Seabra *et al.*, 2006; Kohen e Nyska, 2002).

Devido à sua configuração electrónica, o oxigénio tende a receber electrões na sua redução a água ao nível da mitocôndria, formando compostos intermediários altamente reactivos, como ilustra o esquema da figura 6.

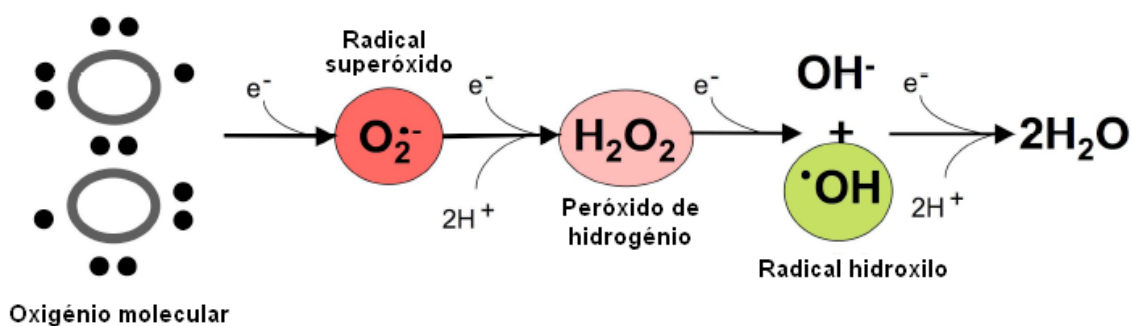
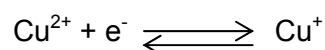
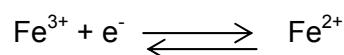


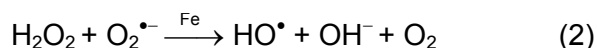
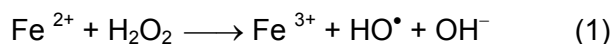
Figura 6. Redução univalente do oxigénio a água (adaptado de Ferreira *et al.*, 2007).

A adição de um electrão à molécula de oxigénio no estado fundamental leva à produção do radical superóxido. Da adição de um segundo electrão a este radical resulta o peróxido de hidrogénio. Da adição de mais um electrão forma-se o radical hidróxilo. Assim, a redução do oxigénio molecular por adição de quatro electrões dá origem a moléculas de água.

O fornecimento de electrões pode ser feito por metais de transição, nomeadamente o ferro e o cobre:



Os metais de transição estão envolvidos na conversão de espécies relativamente estáveis noutras mais reactivas e, por isso, actuam como promotores das reacções que envolvem os radicais livres, como ilustram as reacções de Fenton (1) e Haber-Weiss (2):



O **radical superóxido** ($\text{O}_2^{\bullet-}$) resulta da redução da molécula de oxigénio por um único electrão e pode ser formado *in vivo* por três vias metabólicas principais:

- via cadeia respiratória na mitocôndria (a redução completa da ubiquinona ou coenzima Q requer dois electrões e dois prótons e ocorre em duas etapas por meio de um intermediário radicalar semiquinona, que pode ser oxidado pelo oxigénio molecular, dando origem ao radical $\text{O}_2^{\bullet-}$);
- via xantina oxidase, na conversão de hipoxantina em xantina e da xantina em ácido úrico, no catabolismo das purinas (figura 7);
- via da NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato hidrogenado) oxidase em fagócitos activados.

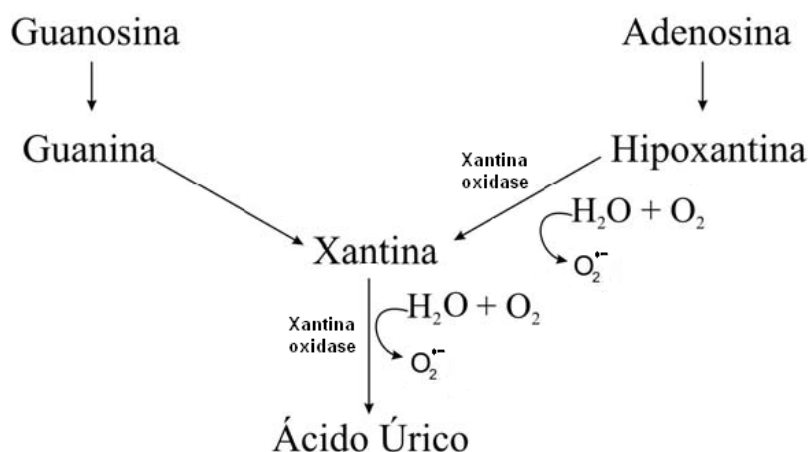


Figura 7. Representação da metabolização de nucleóticos a ácido úrico com produção do radical superóxido.

Embora tenha importância vital para as células de defesa, o radical superóxido não é muito reactivo. Em meio aquoso sofre dismutação, dando origem a peróxido de hidrogénio e oxigénio. O seu ácido conjugado, o radical hidroperóxido (HO_2^\bullet), é mais reactivo.

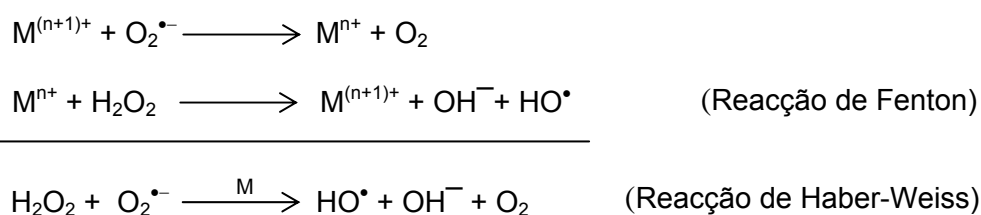
A toxicidade do radical superóxido deve-se à sua participação em processos químicos importantes no contexto biológico, nomeadamente ao seu envolvimento na formação de outras ERO extremamente reactivas. Esta espécie intervém na formação do radical hidroxilo (HO^\bullet), através da reacção de Haber-Weiss (2), e do peroxinitrito (ONOO^-) por reacção com o radical óxido nítrico ($^\bullet\text{NO}$) (3).



O superóxido possui a capacidade de libertar ferro das proteínas de armazenamento e transporte, tais como a ferritina e a transferrina, e de o reduzir de ião férrico (Fe^{3+}) a ião ferroso (Fe^{2+}) (Kohen e Nyska, 2002; Halliwell *et al.*, 1995).

O **radical hidroxilo** (HO^\bullet) é o mais reactivo e o mais deletério para o organismo: possui um tempo de semi-vida curto (10^{-9} segundos) e não se difunde para longe do local onde é produzido. Esta ERO pode atacar o DNA, hidroxilar as suas bases, provocar modificações nos açúcares, quebrar cadeias, dar origem a ligações cruzadas, conduzindo à morte celular ou a fenómenos de mutagenese. Pode também causar danos nas proteínas e está envolvido na peroxidação lipídica, provocando a ruptura e perda de funcionalidade das membranas celulares (Kohen e Nyska, 2002; Halliwell *et al.*, 1995).

A formação do HO^\bullet *in vivo* deve-se maioritariamente à redução do peróxido de hidrogénio por um metal de transição, através da reacção de Fenton, em que o H_2O_2 reage com a forma reduzida do metal dando origem ao radical hidroxilo, a um ião hidroxilo e à forma oxidada do metal:



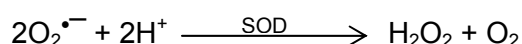
Nesta reacção catalítica estão habitualmente envolvidos os metais (M) ferro ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$) e cobre ($\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$); porém o ferro é mais importante devido à sua maior biodisponibilidade.

O radical hidroxilo pode também resultar da homólise da água, por exposição à radiação ionizante (Halliwell *et al.*, 1995):

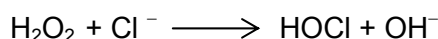


O **peróxido de hidrogénio** (H_2O_2) é pouco reactivo na ausência de metais de transição; no entanto, exerce um papel importante no stress oxidativo por ser capaz de atravessar facilmente as membranas celulares e gerar o radical hidroxilo.

O H_2O_2 é gerado *in vivo* pela dismutação do radical superóxido. Esta conversão pode ser espontânea ou catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD):



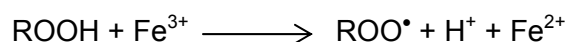
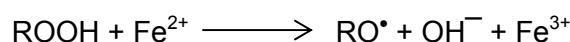
Nos neutrófilos o H_2O_2 é utilizado pelas mieloperoxidasas para oxidar iões cloreto a **ácido hipocloroso** (HOCl):



O ácido hipocloroso possui actividade antibacteriana e é um oxidante forte, que pode danificar os tecidos se produzido fora dos fagossomas. Mesmo em baixas concentrações, é capaz de danificar as células: concentrações de 10-20 μM de HOCl oxidam grupos SH das proteínas da membrana plasmática, provocando alterações nas suas funções.

O HOCl pode ser formado em alimentos irradiados (Halliwell *et al.*, 1995).

A formação de **radicais peroxilo** (ROO^\bullet) constitui o passo mais importante na propagação da cadeia de radicais, que ocorre no processo de peroxidação lipídica. Contudo, esta espécie forma-se também em sistemas não lipídicos, como as proteínas. A decomposição de peróxidos, por aquecimento ou catalisada por iões metálicos, pode gerar radicais peroxilo e alcoxilo (Halliwell *et al.*, 1995):



O **oxigénio singleto** ($^1\text{O}_2$) corresponde ao primeiro estado excitado do oxigénio molecular e é a causa da toxicidade fotoinduzida do O_2 , podendo reagir com lípidos membranares, proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos e hidratos de carbono.

Esta espécie pode ser produzida em alimentos ou na pele, como resultado de reacções de fotossensibilização, podendo também ser gerada na peroxidação lipídica, durante a fagocitose e nas lentes do olho, contribuindo para o desenvolvimento de cataratas (Halliwell *et al.*, 1995).

Relativamente a espécies reactivas de azoto biologicamente importantes são apresentados alguns exemplos na tabela 3.

Tabela 3. Espécies reactivas de azoto.

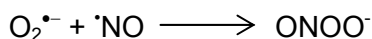
Nome	Símbolo
Óxido nítrico	$^{\bullet}\text{NO}$
Peroxinitrito	ONOO^-
Nitrito	NO_2^-
Nitrato	NO_3^-
Ácido nitroso	HNO_2
Óxido nitroso	N_2O_3

O radical **óxido nítrico** ($^{\bullet}\text{NO}$) pode ser produzido no organismo pela acção de óxido nítrico sintetases (em células endoteliais e neuronais) a partir de arginina, oxigénio e NADPH (figura 8), e por redução de nitratos inorgânicos. Este radical pode também ser gerado em maiores quantidades em macrófagos e neutrófilos humanos estimulados.

Apesar de possuir um papel essencial, controlando a vasodilatação, a neurotransmissão e participando na actividade citostática e citotóxica de macrófagos activados, a produção de óxido nítrico, em excesso, pode contribuir para a evolução de doenças neurodegenerativas, inflamação crónica, arterioesclerose, choque séptico, hipertensão arterial, falência renal, broncoespasmo, enfarte do miocárdio e impotência masculina (Pacher *et al.*, 2007; Kohen e Nyska, 2002; Burney *et al.*, 1999).

O óxido nítrico é muito instável em atmosfera aeróbia, pois reage com oxigénio formando dióxido de azoto (NO₂) e óxido nitroso (N₂O₃).

O **peroxinitrito** (ONOO⁻) (figura 8) é formado *in vivo* pela reacção entre os radicais superóxido e óxido nítrico (Kohen e Nyska, 2002):

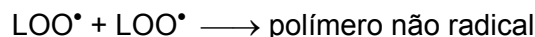


A forma protonada de peroxinitrito (ONOOH) é um agente oxidante potente que pode causar depleção de grupos sulfidriilo (-SH) e oxidar diversas moléculas, provocando um dano semelhante ao originado pelo HO[•]. Está presente nas células endoteliais, células de Kupffer, neutrófilos e macrófagos.

O peroxinitrito e seus derivados induzem a peroxidação lipídica e são capazes de nitrar aminoácidos aromáticos e as bases do DNA, estando implicados no desenvolvimento das doenças de Alzheimer e Parkinson (Pacher *et al.*, 2007; Kohen e Nyska, 2002).

O nitrato pode transformar-se em nitrito, que em pH ácido dá origem ao **ácido nitroso** (HNO₂). O óxido nitroso (N₂O₃) também é precursor do HNO₂ através da sua reacção com a água. O HNO₂ promove a desaminação das bases do DNA que contêm grupo -NH₂ livre (citosina, adenina e guanina), formando-se uracilo, hipoxantina e xantina (Pacher *et al.*, 2007; Burney *et al.*, 1999).

O **óxido nitroso** (N₂O₃), formado pela reacção entre [•]NO e oxigénio (figura 8), é capaz de desaminar bases azotadas, transformando a guanina em xantina, a adenina em hipoxantina, a citosina em uracilo e a 5-metil-citosina em timina. Reage ainda com aminas secundárias, formando *N*-nitrosaminas que podem danificar o DNA por alquilação (Pacher *et al.*, 2007).



A fase de terminação depende de factores como a composição em ácidos gordos do sistema, a concentração de oxigénio e a presença de metais e substâncias antioxidantes.

A peroxidação lipídica afecta a integridade estrutural e funcional da membrana, alterando a sua fluidez e permeabilidade. Este processo tem como consequência a activação de fosfolipases, intumescimento de mitocôndrias, inactivação de receptores, formação de outras espécies reactivas e, em casos extremos, pode provocar ruptura membranar, com libertação de produtos tóxicos (Halliwell e Chirico, 1993).

O esquema da figura 9 resume as interacções entre as espécies reactivas de oxigénio e azoto e o seu envolvimento no dano oxidativo.

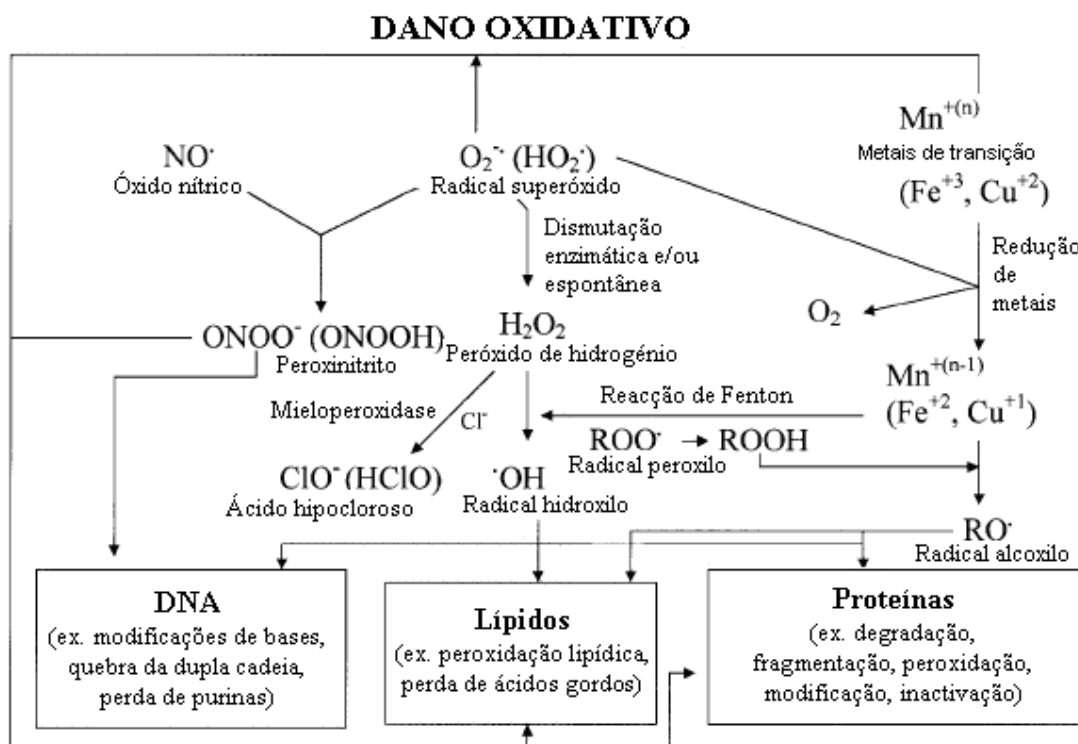


Figura 9. Dano oxidativo induzido por espécies reactivas de oxigénio e azoto (adaptado de Kohen *et al.*, 2002).

3.3.2. Defesas antioxidantes

A exposição contínua a diferentes tipos de espécies oxidantes conduziu ao desenvolvimento, por parte dos organismos aeróbios, de uma gama de mecanismos de defesa antioxidante, enzimática e não enzimática, de modo a neutralizar as espécies reactivas e evitar os seus danos.

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, presentes em baixas concentrações, são capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis, tais como proteínas (incluindo enzimas), lípidos, hidratos de carbono ou DNA. Esta acção pode ser exercida *in vivo* ou nos alimentos, inibindo a produção de espécies reactivas ou interceptando-as. *In vivo* os antioxidantes podem também exercer a sua acção indirectamente, estimulando a expressão de antioxidantes endógenos (Seabra *et al.*, 2006; Halliwell *et al.*, 1995).

Integram o sistema de defesa antioxidante enzimático a superóxido dismutase, a glutathione peroxidase, a glutathione reductase e a catalase. Os antioxidantes de baixo peso molecular, como a glutathione reduzida (GSH) e o ácido úrico, actuam directamente, interceptando os radicais de oxigénio e evitando que estes exerçam os seus efeitos nefastos, sendo habitualmente designados por *scavengers*. Como os *scavengers* são pequenas moléculas, têm a capacidade de atravessar as membranas celulares, podendo exercer a sua acção protectora junto do alvo biológico. Além disso, possuem uma ampla acção contra uma grande variedade de espécies reactivas e podem ser regenerados pela própria célula, que possui também a capacidade para regular a sua concentração (Seabra *et al.*, 2006; Kohen e Nyska, 2002).

No entanto, a maior parte dos antioxidantes são provenientes da dieta, nomeadamente o ácido ascórbico, o α -tocoferol (vitamina E), o β -caroteno e alguns minerais, como o selénio, o cobre e o zinco, que são determinantes na acção catalítica de enzimas antioxidantes (Seabra *et al.*, 2006).

Para além destes antioxidantes “tradicionais”, os compostos fenólicos presentes em frutos e vegetais têm demonstrado possuir clara actividade antioxidante e têm sido associados a uma menor incidência de doenças relacionadas com o stress oxidativo (Silva *et al.*, 2004; Pulido *et al.*, 2000; Urquiaga e Leighton, 2000).

Os antioxidantes podem exercer a sua acção de três formas: preventivamente, directamente (interceptando espécies reactivas oxidantes) e indirectamente (estimulando as defesas antioxidantes e os mecanismos de reparação do dano oxidativo).

Os antioxidantes preventivos constituem a primeira linha de defesa e actuam inibindo a formação de espécies oxidantes (glutathiona peroxidase, catalase e superóxido dismutase) ou complexando metais envolvidos na sua formação (apoferritina, transferrina, ceruloplasmina).

Os antioxidantes com actividade anti-radicalar possuem capacidade para sequestrar os radicais livres impedindo o início do processo de peroxidação lipídica e a sua propagação, sendo exemplos o α -tocoferol, o ácido ascórbico e a glutathiona.

Indirectamente, um antioxidante pode actuar por reparação do dano oxidativo, reconstituindo a membrana, degradando proteínas danificadas, metabolizando hidroperóxidos lipídicos e reparando o DNA, de que são exemplo proteases, fosfolipases, transferases. Pode ainda induzir outras enzimas como a glutathiona-S-transferase ou a heme oxigenase (Seabra *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2005; Kohen e Nyska, 2002; Sies, 1993).

A tabela 4 resume os principais antioxidantes presentes no organismo.

Tabela 4. Origem, localização e mecanismos de acção dos principais antioxidantes orgânicos (adaptado de Ferreira *et al.*, 2007).

Antioxidantes		Antioxidantes Endógenos	
Exógenos		Extracelulares	Intracelulares
Prevenção		Prevenção	Prevenção
Zinco		Albumina	Glutathiona peroxidase
Selénio		Bilirrubina	Superóxido dismutase
		Ceruloplasmina	Catalase
Intercepção		Ferritina	Glutathiona redutase
Ácido Ascórbico		Mioglobina	Intercepção
α -tocoferol		Metalotioneína	Glutathiona
Carotenóides		Haptoglobina	Ácido úrico
Compostos fenólicos			Coenzima Q
			Reparação
			Proteases
			Fofolipases

Devido à diversidade de componentes antioxidantes presentes em vegetais e outros alimentos, torna-se difícil medir a acção de cada composto separadamente. Além disso, os diferentes compostos antioxidantes presentes no material a estudar podem interagir, ocorrendo efeitos quer sinérgicos, quer antagónicos (Seabra *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2005).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a actividade antioxidante total de alimentos, não existindo um método universal através do qual a actividade antioxidante possa ser mensurada qualitativa e quantitativamente. As metodologias para determinar a actividade antioxidante podem envolver sistemas *in vitro* não-celulares e celulares, ou fazendo uso de ensaios *in vivo* (Seabra *et al.*, 2006; Pellegrini *et al.*, 2003).

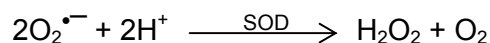
Por estas razões, a avaliação da actividade antioxidante total, utilizando diferentes métodos, torna-se cada vez mais importante do que determinar a concentração de cada antioxidante individualmente e poderá ser um dos parâmetros na investigação dos efeitos protectores relacionados com a ingestão de fruta e vegetais.

Paralelamente à determinação da actividade antioxidante total, é importante avaliar como os antioxidantes presentes nos alimentos são metabolizados *in vivo*, o grau de absorção, distribuição e eliminação e como actuam os seus metabolitos. De igual forma, são também necessárias informações sobre a sua ingestão para que seja possível definir correctamente quais os benefícios para a saúde relacionados com o consumo de fruta e vegetais (Seabra *et al.*, 2006).

3.3.2.1. Sistema antioxidante enzimático

A superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase são as enzimas que desempenham o papel principal como reguladoras da “homeostasia redox” das células. Existem também outras enzimas envolvidas na redução de formas oxidadas de pequenos antioxidantes moleculares, também consideradas antioxidantes de prevenção, tais como a glutathione reductase (GR), a desidroascorbato reductase (DR) ou aquelas que são responsáveis pela manutenção dos grupos tiol das proteínas, como a tioredoxina reductase e a xantina desidrogenase (catalisadora da produção de ácido úrico); existem ainda enzimas responsáveis por mecanismos celulares que mantêm um meio reduzido, nomeadamente a glucose-6-fosfato desidrogenase, que catalisa a produção de NADPH (Kohen e Nyska, 2002; Sies, 1993).

A enzima **superóxido dismutase** (SOD) tem como função principal catalisar a reacção de dismutação do radical superóxido, gerando oxigénio molecular e peróxido de hidrogénio:



Existem três tipos de SOD que variam no ião metálico que possuem. A forma predominante encontra-se no citosol e o seu núcleo é composto por cobre e zinco (Cu/Zn-SOD). Existe também Cu/Zn-SOD no compartimento extracelular. Na mitocôndria encontra-se um tipo de SOD que contém o ião metálico manganês (Mn-SOD). O terceiro tipo tem como ião metálico o ferro (Fe-SOD) e é encontrado apenas em algumas bactérias. A actividade da SOD é mais elevada no fígado, rim e eritrócitos e a sua actividade é aumentada por indução enzimática ou em situações que aumentem a concentração de superóxido (Kohen e Nyska, 2002; Liebler e Reed, 1997).

A **catalase** (CAT) cataliza a decomposição do peróxido de hidrogénio em água e oxigénio molecular:

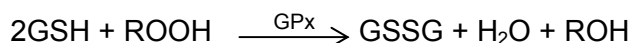
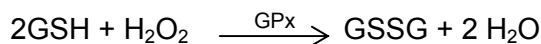


Esta enzima tem também uma acção peroxidica, sendo responsável pela oxidação de dadores de hidrogénio com consumo de peróxido.

A catalase é uma enzima homotetramérica amplamente distribuída nos tecidos, embora exista em maior quantidade nos peroxissomas do fígado e do rim (Kohen e Nyska, 2002).

O peróxido de hidrogénio pode também ser destoxificado por acção de outra enzima presente no citoplasma e na matriz mitocondrial, a **glutathiona peroxidase** (GPx). A GPx dos mamíferos tem uma maior afinidade para o H_2O_2 do que a CAT, o que significa que em concentrações baixas de H_2O_2 , a GPx apresenta um papel muito mais activo na sua remoção celular.

A GPx cataliza a redução de peróxido de hidrogénio e de hidroperóxidos orgânicos a água, através da oxidação da glutathiona reduzida (GSH), que actua como co-substrato da enzima:



Esta enzima ocorre geralmente associada ao selénio, daí a importância deste metal como antioxidante, mas também pode ser independente deste.

A glutatona peroxidase opera em conjunto com a **glutaciona redutase** (GR) (figura 10), que catalisa a redução da glutaciona oxidada (GSSG) pelo NADPH transformando-a novamente em GSH:

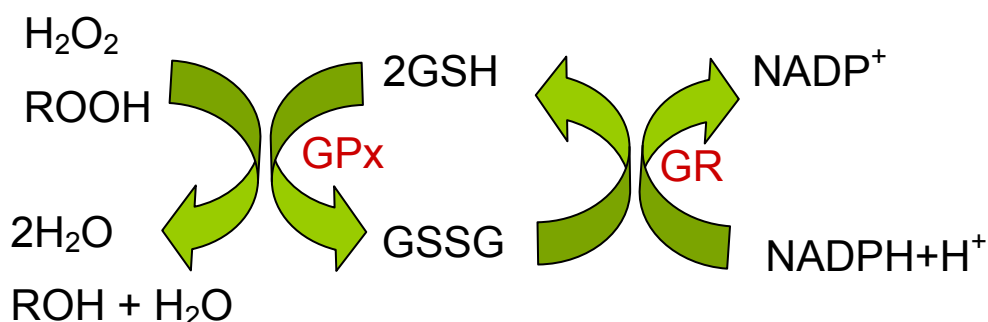
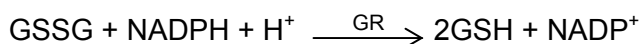


Figura 10. Actividade da glutaciona peroxidase (GPx) e da glutaciona redutase (GR).

A relação GR/GPx é importante pois evidencia se o sistema de reciclagem da GSH funciona correctamente. Se esta razão diminui, significa que a célula não produz GSH suficiente para detoxificar o H₂O₂ e os hidroperóxidos, aumentando a probabilidade de ocorrer dano oxidativo (Kohen e Nyska, 2002; Liebler e Reed, 1997).

Para além da GPx, a redução dos hidroperóxidos orgânicos com recurso à GSH pode também ser catalisada por uma enzima independente do selénio, a **glutaciona-S-transferase** (GST), a qual pode actuar quer como uma peroxidase, quer como uma transferase. A actividade da GPx parece ser particularmente importante na redução de hidroperóxidos orgânicos, enquanto a actividade da GST parece amplamente envolvida

na eliminação de xenobióticos, particularmente a nível hepático, através da conjugação com a glutatona (Kohen e Nyska, 2002; Liebler e Reed, 1997):



3.3.2.2. Sistema antioxidante não enzimático

Conforme já foi referido, para além das enzimas antioxidantes, os organismos aeróbios possuem outros antioxidantes não enzimáticos, de baixo peso molecular, uns com características lipofílicas (α -tocoferol e β -caroteno) e outros hidrofílicos (ácido ascórbico e GSH). Estas substâncias actuam por intercepção das ERO (tabela 4), convertendo-as em espécies menos reactivas, por supressão da formação de radicais e participam na reparação das alterações estruturais da célula iniciadas pelas ERO, contribuindo, em conjunto com os outros agentes antioxidantes, para a manutenção do equilíbrio do estado redox da célula.

Face às enzimas, estes antioxidantes têm capacidade para penetrar as membranas atingindo mais facilmente o alvo, podem ser regenerados, a sua concentração é regulada pela própria célula e possuem actividade contra várias espécies reactivas.

Os antioxidantes exógenos, componentes da dieta, constituem o principal mecanismo antioxidante não enzimático do organismo (Kohen e Nyska, 2002).

A **glutatona** (γ -glutamilcisteinilglicina) (figura 11) é um antioxidante hidrossolúvel, reconhecido como o tiol não proteico mais importante nos sistemas vivos. Trata-se de um tripéptido linear, sintetizado no organismo e constituído por três aminoácidos, glicina, ácido glutâmico e cisteína, sendo o grupo tiol deste último o local activo responsável pelas propriedades bioquímicas da molécula. Nas células do organismo a sua concentração pode atingir os 12 mM, sendo o fígado o órgão onde está presente em maior quantidade. A nível extracelular a concentração de GSH é da ordem de 5-50 μM (Kohen e Nyska, 2002; Dringen, 2000).

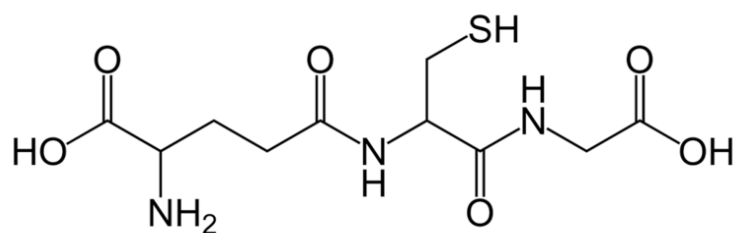


Figura 11. Estrutura da glutathiona na forma reduzida (GSH).

A glutathiona pode encontrar-se na forma reduzida (GSH) ou dimerizada (GSSG, forma oxidada da glutathiona).

A GSH é sintetizada em dois passos (figura 12), catalisados pela γ -glutamilcisteína sintetase e pela glutathiona sintetase. Este processo ocorre essencialmente no fígado, sendo a GSH exportada, através da circulação sanguínea, para todos os tecidos (Dringen, 2000).

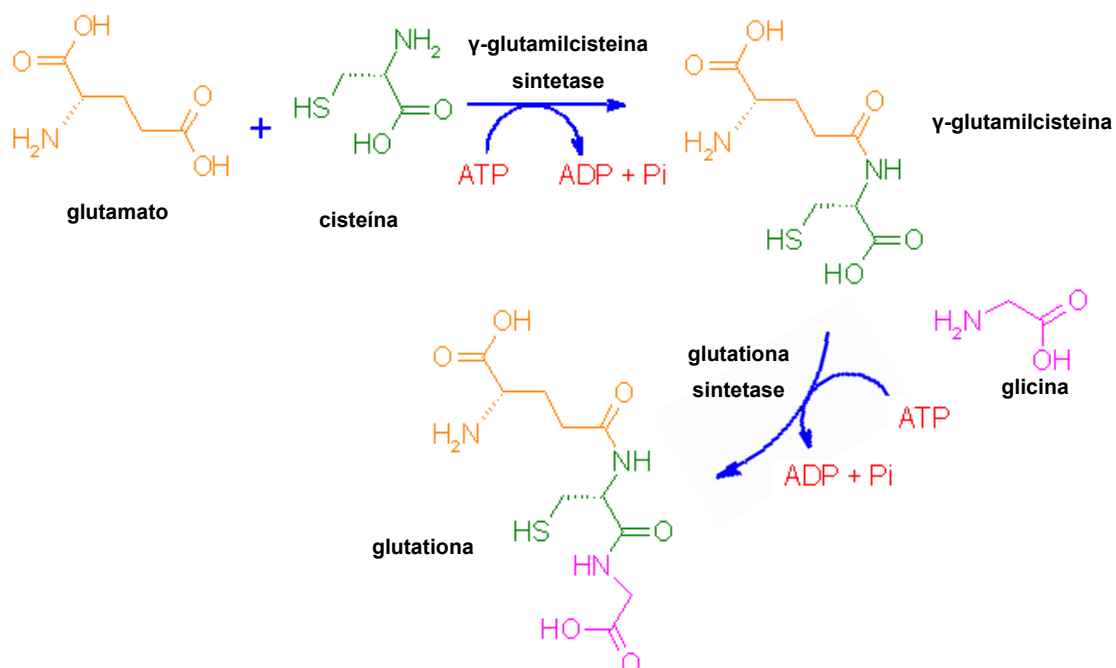


Figura 12. Síntese da glutathiona.

A degradação da glutatona nos seus aminoácidos ocorre a nível extracelular, especialmente a nível renal, numa reacção catalisada pela γ -glutamyltranspeptidase e pela cisteinil-glicinadipeptidase (Dringen, 2000).

Em situações normais a GSSG representa apenas uma pequena fracção da glutatona total (menos de 10%). A GSH pode também formar dissulfuretos, do tipo GSSR, com o grupo tiol da cisteína presente em proteínas.

A glutatona possui um papel crucial (Kohen e Nyska, 2002; Dringen, 2000):

- como cofactor da GPx na metabolização do H_2O_2 e outros hidroperóxidos;
- na intercepção de radicais (HO^\bullet , ROO^\bullet , RO^\bullet e $HOCl$), formando o radical glutationilo (GS^\bullet), que posteriormente poderá dimerizar e formar GSSG;
- como agente quelante de iões ferro e cobre, prevenindo as reacções de Haber-Weiss e de Fenton;
- na manutenção do α -tocoferol e do ácido ascórbico no estado reduzido;
- na metabolização de xenobióticos como cofactor da GST;
- e no co-transporte de xenobióticos para o exterior da célula.

O **ácido úrico** (figura 13) é um produto resultante do metabolismo celular (resulta da oxidação da hipoxantina e da xantina) que possui actividade antioxidante. O urato (estado fisiológico do ácido úrico) reage com radicais hidroxilo dando origem ao radical urato, que é regenerado pelo ascorbato ao estado original. Este composto pode também interceptar radicais peroxilo e óxido nítrico, quelatar iões metálicos, como o cobre e o ferro, impedindo-os de participar em ciclos redox (Kohen e Nyska, 2002).

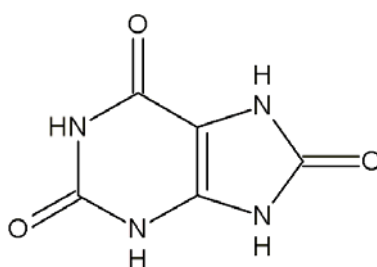


Figura 13. Estrutura do ácido úrico.

O **ácido ascórbico** é um antioxidante hidrossolúvel fornecido exclusivamente pela dieta, uma vez que o organismo humano não tem capacidade para o sintetizar.

A pH fisiológico, o ascorbato pode actuar como sequestrador de radicais livres ou agente redutor, capaz de doar os seus electrões às ERO e ERA, como os radicais superóxido, hidroxilo e peróxido, ácido hipocloroso, peroxinitrito, entre outros. A oxidação do ascorbato dá origem ao radical ascorbilo e ao ácido desidroascórbico (figura 14), que pode posteriormente ser regenerado por agentes redutores como a GSH ou o NADH.

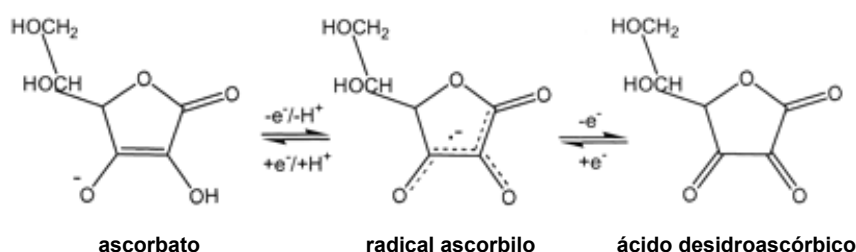


Figura 14. Oxidação do ascorbato a radical ascorbilo e ácido desidroascórbico (adaptado de Seabra *et al.*, 2006).

O ascorbato actua em parceria com outros antioxidantes, estando envolvido na manutenção do α -tocoferol, do urato e do β -caroteno nas suas formas reduzidas.

Porém, em determinadas condições (em baixas concentrações e na presença de metais de transição), o ácido ascórbico pode actuar como pró-oxidante, pois reduz o Fe^{3+} e o Cu^{2+} , que reagem com o peróxido de hidrogénio, dando origem a radicais hidroxilo (reacção de Fenton) (Seabra *et al.*, 2006; Kohen e Nyska, 2002).

O α -tocoferol (figura 15) é uma molécula lipofílica presente nas membranas celulares e lipoproteínas plasmáticas.

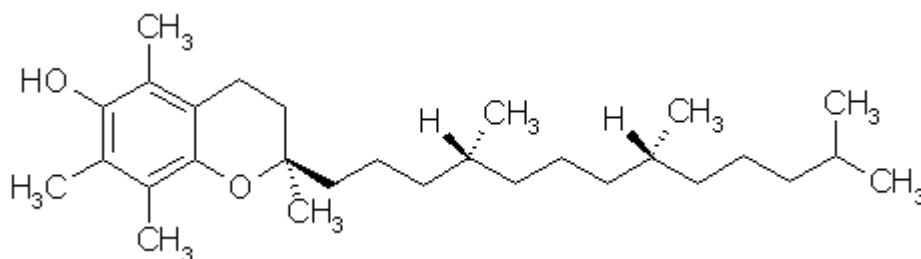
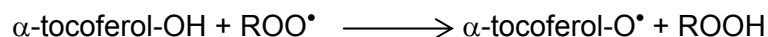


Figura 15. Estrutura do α -tocoferol.

Juntamente com outros tocoferóis constitui a chamada vitamina E, que é inibidora da peroxidação lipídica *in vivo*. Estas substâncias agem como doadores de H para o radical peróxido, interrompendo a reacção radicalar em cadeia:



O radical α -tocoferilo formado é pouco reactivo, sendo regenerado a α -tocoferol pelo ascorbato, junto às membranas celulares (figura 16); o ácido ascórbico, por sua vez, é mantido no seu estado reduzido por acção da glutatona, como foi atrás referido (Seabra *et al.*, 2006; Kohen e Nyska, 2002).

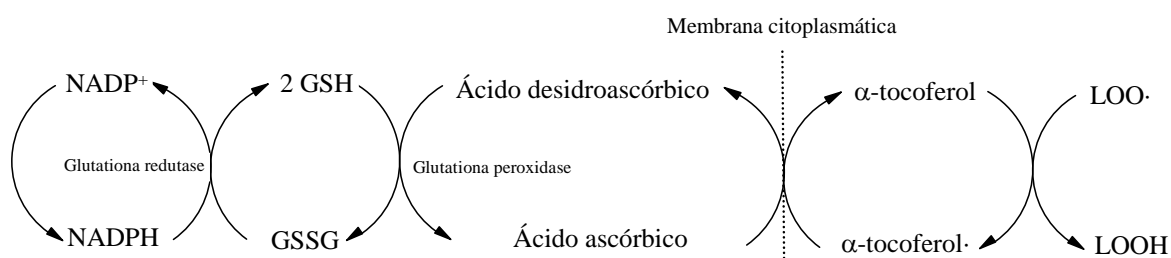


Figura 16. Interação entre o α -tocoferol, o ácido ascórbico e a glutatona (adaptado de Valentão, 2003).

O **β -caroteno** (figura 17) é uma substância lipossolúvel, precursora da vitamina A, com capacidade antioxidante.

A actividade antioxidante é exercida *in vivo* através de dois mecanismos: desactivação de oxigénio singlete e sequestro de radicais peróxido e alcóxido formados durante a peroxidação lipídica (Seabra *et al.*, 2006).

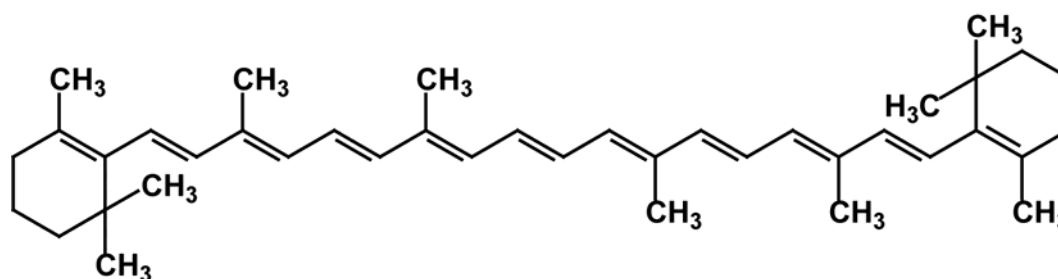


Figura 17. Estrutura do β -caroteno.

A figura 18 resume a acção integrada de vários mecanismos (enzimáticos e não enzimáticos) envolvidos na protecção contra o stress oxidativo.

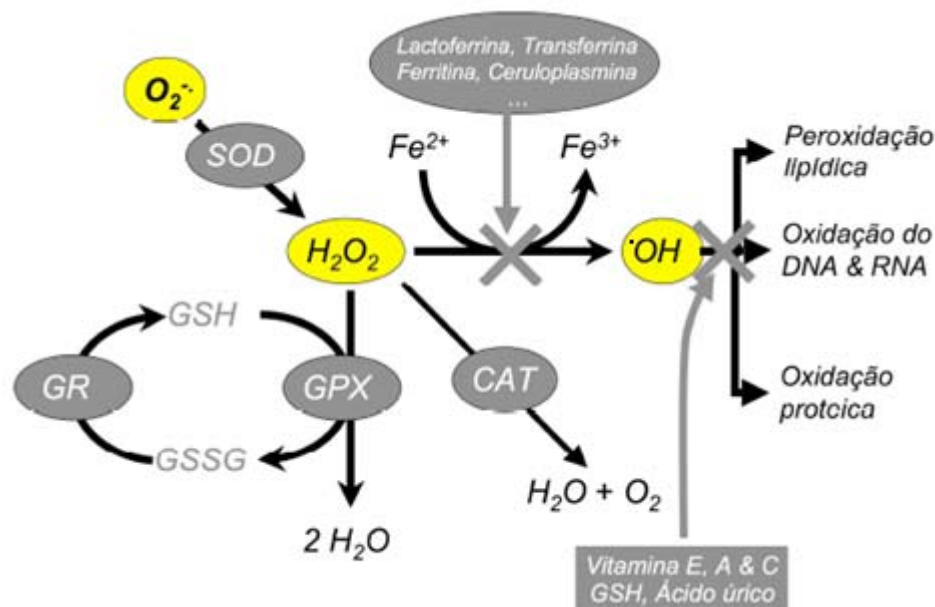


Figura 18. Representação esquemática da acção das defesas antioxidantes (adaptado de Ferreira *et al.*, 2007).

3.3.2.3. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos, em particular os flavonóides, possuem uma estrutura ideal para o sequestro de radicais livres e têm demonstrado serem antioxidantes efectivos. A actividade antioxidante destes compostos depende da sua estrutura e pode ser determinada por diversos factores: reactividade como agentes doadores de hidrogénio e electrões, estabilidade do radical fenoxilo formado, reactividade com outros antioxidantes, capacidade para quelatar metais de transição, interacção com enzimas envolvidas na produção de espécies reactivas e solubilidade e interacção com as membranas (Seabra *et al.*, 2006; Rice-Evans *et al.*, 1997).

O potencial de sequestro de radicais livres está directamente ligado ao potencial de oxidação dos polifenóis. Estes compostos apresentam elevada facilidade em doar

hidrogénio do grupo hidroxilo fenólico, dando origem a um radical fenoxilo (figura 19), cuja estabilidade depende da deslocalização do electrão desemparelhado.

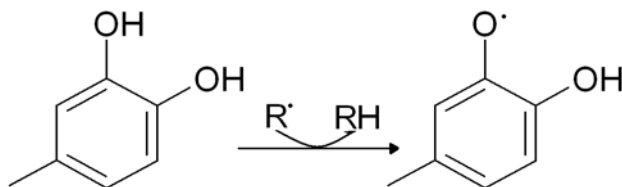


Figura 19. Sequestro de radicais livres por compostos fenólicos (adaptado de Seabra *et al.*, 2006).

Deste modo, os compostos fenólicos podem exercer a sua acção antioxidante sequestrando radicais superóxido, hidroxilo, peroxilo e óxido nítrico, peroxinitrito e ácido hipocloroso, gerados *in vivo* ou nos alimentos (Seabra *et al.*, 2006; Heim *et al.*, 2002; Rice-Evans *et al.*, 1997; van Acker *et al.*, 1995).

Adicionalmente, a capacidade para quelatar iões metálicos envolvidos na produção de radicais livres, particularmente ferro e cobre, justifica a acção dos polifenóis como antioxidantes preventivos. No entanto, compostos com menor potencial de oxidação do que o Fe^{3+} e o Cu^{2+} podem reduzir esses metais funcionando como pro-oxidantes (Seabra *et al.*, 2006; Heim *et al.*, 2002; Rice-Evans *et al.*, 1997; van Acker *et al.*, 1995).

Devido à capacidade que possuem para interagir com proteínas, através da formação de pontes de hidrogénio, a actividade antioxidante destes compostos pode também resultar da inibição de enzimas, nomeadamente xantina oxidase, lipoxigenases, cicloxigenase e enzimas do complexo citocromo P450. Contudo, esta capacidade para formar complexos com proteínas poderá afectar a biodisponibilidade e eficácia antioxidante dos compostos (Seabra *et al.*, 2006).

Os compostos fenólicos podem ainda exercer acções sinérgicas com outros antioxidantes, tais como ácido ascórbico, β -caroteno e α -tocoferol, e induzir antioxidantes endógenos, como por exemplo a glutatona (Seabra *et al.*, 2006).

Finalmente, as características de solubilidade e a interacção com as membranas constituem factores importantes que influenciam a actividade antioxidante dos compostos. Compostos com coeficientes de partilha óleo/água elevados conseguem

maior interacção com as membranas, membranas essas que são alvos preferenciais da maioria das ERO e ERA. Porém, possuem um menor efeito antioxidante face a radicais livres hidrossolúveis (Seabra *et al.*, 2006; Rice-Evans *et al.*, 1996).

A actividade antioxidante dos **ácidos fenólicos** e seus ésteres é geralmente determinada pelo número e posição dos grupos hidroxilo presentes na molécula. Por exemplo, o grupo hidroxilo do ácido ferúlico (figura 1) existente na posição *orto* relativamente ao grupo metoxilo, doador de electrões, é um factor que aumenta a estabilidade do radical fenoxilo e a eficiência antioxidante do composto. A presença de um segundo hidroxilo na posição *orto* ou *para* aumenta a actividade antioxidante do composto, como no caso do ácido cafeico. Grupos doadores de electrões, como é o caso dos grupos metilo ou alquilo em posição *orto* aumentam a estabilidade do radical formado, aumentando a capacidade antioxidante.

Os ácidos hidroxicinâmicos têm maior capacidade antioxidante que os derivados do ácido benzóico correspondente. Isto deve-se ao facto de a dupla ligação presente na cadeia lateral das moléculas dos derivados do ácido cinâmico (-HC=CHCOOH) participar, por ressonância, na estabilização do radical fenoxilo, aumentando a actividade antioxidante do anel aromático (Seabra *et al.*, 2006; Rice-Evans *et al.*, 1996).

A actividade antioxidante dos **flavonóides** é determinada pela sua estrutura, em particular pelo número e arranjo dos grupos funcionais em torno do esqueleto base destas moléculas. Assim, (Seabra *et al.*, 2006 ; Heim *et al.*, 2002; Rice-Evans *et al.*, 1997 e 1996):

- a configuração dos grupos hidroxilo do anel B (substituição *orto* 3',4'-di-hidroxi) é a principal responsável pelo sequestro de espécies reactivas de oxigénio e azoto (figura 20A);
- a existência da dupla ligação entre C2 e C3 em combinação com grupo carbonilo na posição 4 do anel C contribui também para o potencial antioxidante destes compostos (figura 20B);
- a presença de grupos hidroxilo na posição 3 do anel C e na posição 5 do anel A facilita a deslocação de electrões entre os anéis A e B e a estabilização por ressonância (figura 20C).

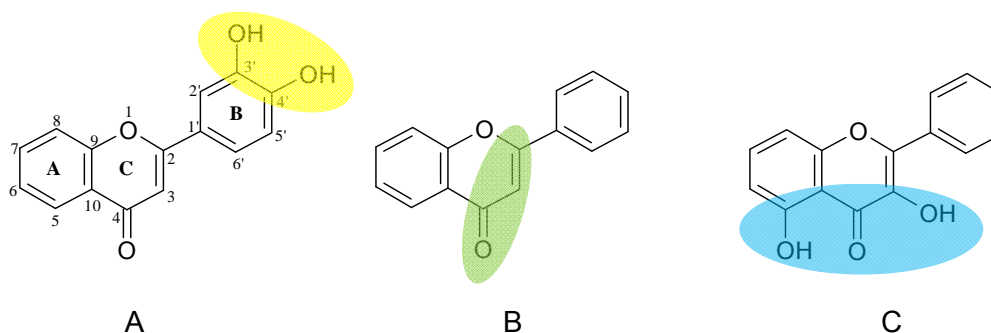


Figura 20. Relação estrutura/atividade antioxidante dos flavonóides (adaptado de Valentão, 2003).

A glicosilação e a metilação dos flavonóides reduzem a sua capacidade antioxidante, quando comparada com as respectivas agliconas, devido à obstrução estérica, à diminuição da coplanaridade entre o anel B e a restante estrutura e ao aumento da hidrofília que influencia o acesso do antioxidante à fase lipídica (Seabra *et al.*, 2006; Heim *et al.*, 2002; Ross e Kasum, 2002).

Os flavonóides exercem a sua acção antioxidante também de forma indirecta, quelatando metais de transição, envolvidos na geração de radicais livres através da reacção de Fenton. Para esta acção é fundamental a presença de grupos *orto* difenólicos, nomeadamente os sistemas 3',4'-dihidroxi, 4-ceto-3-hidroxi e 4-ceto-5-hidroxi (figura 21) (Seabra *et al.*, 2006; Heim *et al.*, 2002; Rice-Evans *et al.*, 1997).

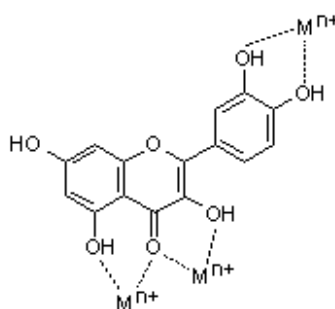


Figura 21. Locais de quelatação de iões metálicos pelos flavonóides (adaptado de Seabra *et al.*, 2006).

4. *Rumex induratus*

A espécie *R. induratus* Boiss. & Reuter (figura 22) é uma planta herbácea, perene, com caules aéreos muito ramificados que podem medir entre 35 a 65 cm. As suas folhas são alternadas e ovadas ou lanceoladas, as flores hermafroditas ou unisexuais e os frutos têm a forma de uma pequena noz. A época de floração ocorre de Maio a Agosto.

Esta espécie, endêmica na Península Ibérica e Noroeste de África, tem como *habitats* preferenciais fissuras das rochas e muros e terrenos pedregosos em meio seco (*Universidad de Extremadura, 2000-2008; Jardim Botânico da UTAD, 2007; Valdés et al., 1987; Franco, 1971*).



Figura 22. *Rumex induratus* (adaptado de *Jardim Botânico da UTAD, 2007 e Universidad de Extremadura, 2000-2008*).

Apesar de não estar descrita a sua utilização em fitoterapia, a *R. induratus* é frequentemente utilizada na alimentação, sobretudo na região do Nordeste de Portugal. As suas folhas são preferencialmente consumidas em saladas, temperadas com azeite para atenuar a sua acidez (Ferrerres *et al.*, 2006a). Devido ao seu sabor ácido característico, esta espécie é vulgarmente conhecida como “azedas-das-paredes”, “azedaromana” ou “azedão” (*Jardim Botânico da UTAD*, 2007).

Embora seja vulgarmente usada na alimentação, são poucos os estudos envolvendo esta espécie, nomeadamente a sua caracterização química e potencial biológico.

Tem sido demonstrado o interesse ecológico da *R. induratus*, resultante da sua capacidade para bioacumular mercúrio, podendo assim ser utilizada na fitorremediação de solos contaminados (Moreno-Jiménez *et al.*, 2005). O seu pólen é referido como alergénico (García González, 2002).

Ferrerres *et al.* (2006a) identificaram no extracto hidrometanólico das folhas vários compostos com espectro de UV característico de derivados do ácido hidroxicinâmico. Por HPLC-DAD-MS foram identificados e quantificados derivados glicosilados dos ácidos cafeico, *p*-cumárico, ferúlico e sinápico.

Foi também verificada a ocorrência de diversos compostos com espectro de UV característico de polihidroxiflavonas, nomeadamente derivados C-glicosilados de quercetina, luteolina, apigenina e genkwanina, e O-heterósidos de quercetina, diosmetina e isorramnetina.

Além destes, foram detectados quatro compostos considerados C-glicosil-flavonas O-glicosiladas, dois dos quais foram identificados como derivados de luteolina e apigenina (Ferrerres *et al.*, 2007).

Neste estudo verificou-se que os ácidos fenólicos correspondiam a cerca de 21% dos compostos fenólicos totais existentes no extracto aquoso liofilizado das folhas de *R. induratus* e que a luteolina 6-C-hexósido era o composto presente em maior quantidade, representando cerca de 40,8% dos compostos fenólicos totais (Ferrerres *et al.*, 2006a).

Relativamente aos ácidos orgânicos, foi descrita a presença de grande quantidade de ácido oxálico no extracto aquoso liofilizado das folhas de *R. induratus* (Ferrerres *et al.*, 2006a).

Ferreres *et al.* (2006a) avaliaram também o potencial antioxidante das folhas de *R. induratus*. O extracto aquoso das folhas exibiu actividade anti-radicalar face ao radical 2,2'-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) de modo dependente da concentração, com um valor de IC₅₀ igual a 149,9 µg/ml.

Foi também demonstrado que tinha capacidade para interceptar o radical superóxido e para impedir a sua produção por inibição da xantina oxidase, sendo estas actividades dependentes da concentração do extracto.

Os valores da IC₅₀ encontrados relativamente ao sequestro do radical superóxido gerado em sistema químico e enzimático e para a inibição da xantina oxidase foram 336,9 µg/ml, 67,5 µg/ml e 708,8 µg/ml, respectivamente.

Foi sugerido que os derivados de ácidos hidoxicinâmicos, as polihidroxi flavonas e o ácido oxálico presentes no extracto das folhas de *R. induratus* são contribuintes importantes para a capacidade antioxidante observada (Ferreres *et al.*, 2006a).

5. Materiais e Métodos

5.1. Substâncias de referência e reagentes

Os ácidos cafeico, *p*-cumárico, ferúlico e sinápico, a luteolina-7-*O*-glucósido, a apigenina-7-*O*-glucósido, a diosmetina-7-*O*-rutinósido, a isoramnetina-3-*O*-glucósido, a quercetina-3-*O*-galactósido e a quercetina-3-*O*-rutinósido foram adquiridos à Extrasynthèse (Genay, França). Os ácidos oxálico, cítrico, málico, ascórbico, cetoglutárico, quínico, chiquímico, fumárico e a sulfanilamida foram fornecidos pela Sigma (St. Louis, MO, EUA).

A naftiletenodiamina foi adquirida à Merck (Darmstadt, Alemanha) e o nitroprussiato de sódio (SNP) à Riedel-de Haën (Seelze, Alemanha). O DPPH, o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), a solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) contendo 4% de cloro, o borohidreto de sódio e a sulfanilamida foram obtidos da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, EUA).

O metanol e o ácido fórmico usados na análise por HPLC tinham grau de pureza “Lichrosolv” e foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Os ácidos sulfúrico e *orto*-fosfórico, assim como os restantes reagentes tinham qualidade “Pro analysis” e foram adquiridos à Merck (Darmstadt, Alemanha).

A água usada nas fases móveis foi tratada num sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA). Para as diversas determinações foi utilizada água destilada.

5.2. Amostras

As amostras de *R. induratus* (tabela 5) pertenciam a dois grupos: amostras de crescimento espontâneo, colhidas em diferentes locais da província de Trás-os-Montes (Nordeste de Portugal), e amostras cultivadas em estufa na Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança (ESA/IPB). A identidade das amostras foi assegurada pelo Professor Doutor Manuel Ângelo Rodrigues (ESA/IPB).

Tabela 5. Caracterização das amostras de *R. induratus* em estudo.

Amostra	Proveniência	Data da colheita	Estado de desenvolvimento
1	Estufa (cultivo de Outono)	23-11-2005	Plântulas
2	Estufa (cultivo de Inverno)	22-12-2005	Planta ¹
3	Estufa (cultivo de Inverno)	02-02-2006	Escarpo ²
4	Estufa (cultivo de Inverno)	03-03-2006	Limite de utilização na alimentação
5	Estufa (cultivo de Primavera)	11-04-2006	Plântulas
6	Estufa (cultivo de Primavera)	23-04-2006	Planta ¹
7	Estufa (cultivo de Primavera)	09-05-2006	Escarpo ²
8	Estufa (cultivo de Primavera)	25-05-2006	Limite de utilização na alimentação
9	Fervença	01-02-2006	Planta ¹
10	Fervença	02-04-2006	Escarpo ²
11	Fervença	23-04-2006	Limite de utilização na alimentação
12	Pombares	20-01-2006	Planta ¹
13	Pombares	02-04-2006	Escarpo ²
14	Pombares	24-04-2006	Limite de utilização na alimentação
15	Macedo	04-02-2006	Planta ¹
16	Macedo	02-04-2006	Escarpo ²
17	Macedo	25-04-2006	Limite de utilização na alimentação
18	Romeu	04-02-2006	Planta ¹
19	Romeu	02-04-2006	Escarpo ²
20	Romeu	26-04-2006	Limite de utilização na alimentação
21	Sra. das Neves	04-02-2006	Planta ¹
22	Sra. das Neves	02-04-2006	Escarpo ²
23	Sra. das Neves	27-04-2006	Limite de utilização na alimentação
24	Cerejais	04-02-2006	Planta ¹
25	Cerejais	02-04-2006	Escarpo ²
26	Cerejais	28-04-2006	Limite de utilização na alimentação
27	Chãs	04-02-2006	Planta ¹
28	Chãs	02-04-2006	Escarpo ²
29	Chãs	29-04-2006	Limite de utilização na alimentação

¹ O estado de planta corresponde ao desenvolvimento vegetativo intermédio.² O escarpo corresponde ao ponto óptimo para alimentação.

As amostras de campo, das quais são exemplos as apresentadas na figura 23, foram colhidas entre Janeiro e Abril, em diferentes locais tendo como principais factores de variação o solo e as condições climáticas.



Figura 23. Amostras de *R. induratus* de crescimento espontâneo (fotografias gentilmente cedida pelo Professor Doutor Manuel Ângelo Rodrigues (ESA/IPB)).

As amostras de estufa foram cultivadas numa estufa de parede de policarbonato dupla. O solo era constituído por uma mistura de substrato orgânico, areia e vermiculite (3:1:1), à qual foi adicionado um fertilizante rico em N:P:K (15:10:20) e outros micronutrientes.

Tendo por referência o estado fenológico ou de desenvolvimento da planta foi possível classificar as amostras de *R. induratus* em quatro grupos distintos. Assim, as plântulas representam o primeiro estado de desenvolvimento e dizem respeito a plantas muito jovens, colhidas 15 dias após a emergência. As plantas correspondem à fase de desenvolvimento vegetativo e no caso das amostras de campo representam colheitas de Inverno. O escarpo refere-se ao início da saída da inflorescência, sendo nesta fase do crescimento que as azedas são mais apreciadas e o seu consumo na alimentação aumenta. O último grupo inclui as amostras em estado de desenvolvimento avançado, plantas mais fibrosas e espigadas, que representam o limite de utilização na alimentação.

Após a colheita, as partes aéreas das plantas foram transferidas para o laboratório, congeladas a -20°C e depois liofilizadas ao abrigo da luz. Posteriormente, as folhas secas foram separadas dos caules, pulverizadas (1600 µm) e conservadas em frascos hermeticamente fechados, ao abrigo da luz e da humidade.

5.3. Aparelhagem

HPLC-DAD

O sistema cromatográfico utilizado na análise dos compostos fenólicos (figura 24) apresentava as seguintes características:

- Cromatógrafo marca Gilson, equipado com duas bombas, modelo 321
- Módulo manométrico Gilson (modelo 802C)
- Câmara misturadora Gilson (modelo 811)
- Injector Rheodyne (modelo 7125), com um loop de 20 µl
- Coluna de fase reversa Spherisorb ODS2 (5 µm de tamanho de partícula, 25,0 x 0,46 cm)
- Detector de matriz de díodos Gilson (modelo 170)

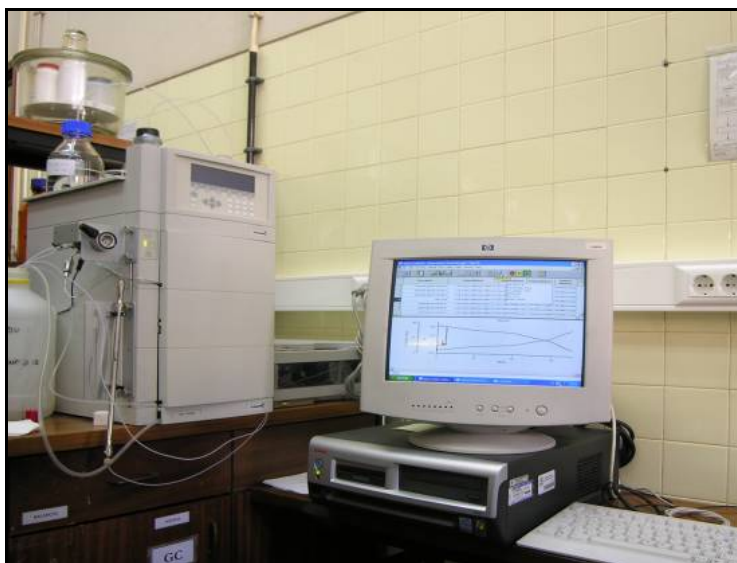


Figura 24. Sistema de HPLC-DAD usado na separação e identificação de compostos fenólicos.



Figura 25. Sistema de HPLC-UV usado na separação e identificação de ácidos orgânicos.

HPLC-UV

O sistema cromatográfico utilizado na análise dos ácidos orgânicos (figura 25) apresentava as seguintes características:

- Cromatógrafo marca Gilson, equipado com duas bombas 302 e 305
- Coluna de exclusão iónica Nucleogel Ion 300 AO (300 x 7,7 mm) inserida num dispositivo de aquecimento da coluna (Jones Chromatography) ajustado a 30°C
- Injector Rheodyne (modelo 7125) provido de loop de 20 µl
- Detector UV Gilson (Holochrome)

Outros equipamentos

- Liofilizador Labconco Freezone 4.5 (Kansas City, MO, EUA)
- Banho de ultra sons Bandelin Sonorex RK100H
- Leitor de placas Multiskan Ascent (Thermo Lab Systems)
- Espectrofotómetro de feixe duplo Helios α (Unicam)

5.4. Extracção dos compostos fenólicos e ácidos orgânicos

Para a caracterização química e avaliação do potencial oxidante das folhas de *R. induratus* foi preparado um extracto aquoso. Para tal, 3 g de amostra pulverizada foram extraídos com 500 ml de água, durante 30 minutos, à ebulição. O extracto aquoso obtido foi filtrado por Büchner nº 3, com o auxílio de um sistema de vácuo, congelado a -20 °C e liofilizado. Os extractos liofilizados foram conservados em frascos hermeticamente fechados, ao abrigo da luz e da humidade.

5.5. Análise dos compostos fenólicos por HPLC-DAD

Para identificação e quantificação dos compostos fenólicos, cerca de 20 mg de extracto liofilizado foram redissolvidos em 1 ml de água para HPLC.

Após filtração por membranas filtrantes (0,2 μm), 20 μl de extracto foram analisados por HPLC-DAD¹. As condições cromatográficas utilizadas foram (Ferrerres *et al.*, 2006a):

- Sistema eluente constituído por uma mistura de água:ácido fórmico (19:1) (A) e metanol (B);
- Eluição em gradiente: 0' – 5% B, 3' – 15% B, 13' – 25% B, 25' – 30% B, 35' – 35% B, 39' – 45% B, 42' – 45% B, 44' – 50% B, 47' – 55% B, 50' – 70% B, 56' – 75% B, 60' – 80% B (figura 26);
- Fluxo de eluição de 0,9 ml/min;
- Registo dos cromatogramas a 280, 320 e 350 nm.

Os dados foram processados pelo *software* Unipoint (Gilson Medical Electronics, Villiers le Bel, France).

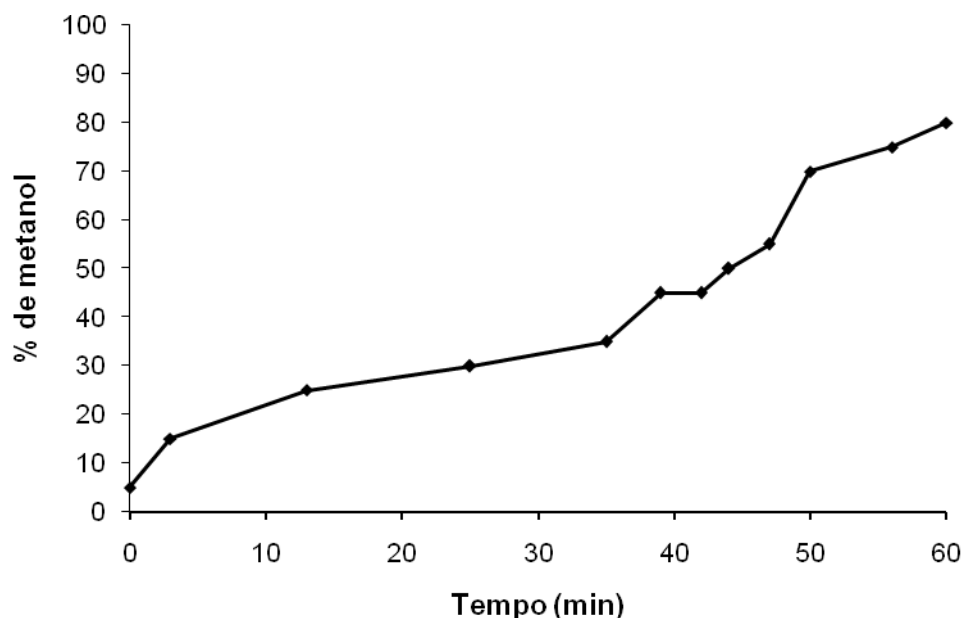


Figura 26. Gradiente de eluição utilizado na análise dos compostos fenólicos por HPLC-DAD.

¹ Ver 5.3. Aparelhagem

Os diferentes compostos fenólicos foram identificados por comparação dos seus tempos de retenção e espectros de UV-Vis, na gama de comprimento de onda de 200 - 400 nm, com os obtidos por Ferreres *et al.* (2006a e 2007). Os cromatogramas foram analisados a 320 nm para derivados de ácidos fenólicos e a 350 nm para flavonóides.

A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada pelo método do padrão externo, com base na absorvância registada nos cromatogramas, utilizando a área do pico correspondente.

Devido à inexistência no mercado de padrões dos compostos identificados nas folhas de *R. induratus*, os derivados dos ácidos cafeico, *p*-cumárico, ferúlico e sinápico foram quantificados como ácidos cafeico, *p*-cumárico, ferúlico e sinápico, respectivamente; os derivados da luteolina como luteolina-7-*O*-glucósido, os derivados da apigenina como apigenina-7-*O*-glucósido, a quercetina-6-*C*-hexósido como quercetina-3-*O*-galactósido, o derivado da diosmetina como diosmetina-7-*O*-rutinósido e o derivado da isorramnetina como isorramnetina-3-*O*-glucósido. A quercetina-3-*O*-hexósido e a quercetina-3-*O*-rutinósido foram quantificadas conjuntamente como quercetina-3-*O*-rutinósido.

5.6. Análise dos ácidos orgânicos por HPLC-UV

Para identificação e quantificação dos ácidos orgânicos, cerca de 5 mg de extracto liofilizado foram redissolvidos em 1 ml de ácido sulfúrico 0,01 N.

Após filtração por membranas filtrantes (0,2 µm), 20 µl de extracto foram analisados por HPLC-UV². As condições cromatográficas utilizadas foram (Ferreres *et al.*, 2006a):

- a) Eluição isocrática, utilizando como eluente ácido sulfúrico 0,01 N;
- b) Fluxo de eluição de 0,2 ml/min;
- c) Registo dos cromatogramas a 214 nm.

A identificação destes compostos foi realizada comparando os tempos de retenção com os obtidos com padrões externos. A quantificação foi obtida pela

² Ver 5.3. Aparelhagem

absorvância registada nos cromatogramas relativamente aos padrões, utilizando a área do pico correspondente.

5.7. Avaliação da actividade antioxidante

A intercepção de radicais livres é um dos mecanismos reconhecidos como estando envolvido na actividade antioxidante³. Assim, foi avaliada a actividade anti-radicalar e a capacidade de intercepção de uma espécie reactiva de oxigénio (ácido hipocloroso) e de uma espécie reactiva de azoto (óxido nítrico).

5.7.1. Avaliação da actividade anti-radicalar

A actividade anti-radicalar do extracto aquoso das folhas de *R. induratus* foi determinada por espectrofotometria de UV-Vis, monitorizando o desaparecimento do radical DPPH a 515 nm, de acordo com Silva *et al.* (2004).

Esta metodologia baseia-se na acção de compostos antioxidantes sobre o DPPH (figura 27), uma espécie radicalar estável de cor violeta que apresenta uma forte absorvância a 515 nm. A actividade anti-radicalar corresponde à redução do DPPH e consequente diminuição da absorvância.

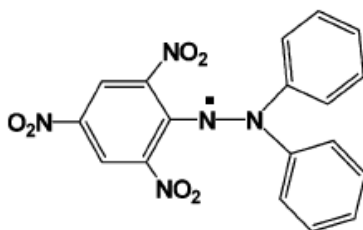


Figura 27. Estrutura do radical 2,2'-difeníl-1-picrílhidrazilo (DPPH).

³ Ver 3.3.2. Defesas antioxidantes

Os resultados são expressos na forma de percentagem de intercepção (redução) do DPPH relativamente ao controlo, calculada da seguinte forma:

$$\text{Intercepção do DPPH (\%)} = [(Abs_{\text{controlo}} - Abs_{\text{amostra}}) / Abs_{\text{controlo}}] \times 100$$

Para este estudo recorreu-se a um microensaio: numa placa de 96 poços foi avaliada uma série de concentrações de extracto liofilizado redissolvido em água, tendo sido realizados três ensaios, em triplicado. A mistura reaccional em cada poço continha 25 µl de amostra e 200 µl de solução metanólica de DPPH (150 µM). As placas foram incubadas à temperatura ambiente (22-25°C) durante 20 minutos e as absorvâncias lidas a 515 nm num leitor de placas Multiskan Ascent.

Para cada ensaio efectuou-se um controlo, no qual foi usada água destilada em vez de amostra, e um ensaio em branco para cada concentração de amostra, substituindo o DPPH por metanol.

Foi calculada a concentração de extracto capaz de interceptar 50% do DPPH (IC₅₀).

5.7.2. Avaliação da actividade sequestrante para o ácido hipocloroso

O poder oxidante do ácido hipocloroso induz a conversão do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB), que apresenta um máximo de absorção a 412 nm, em ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), cujo máximo de absorção ocorre a 325 nm (Künzel *et al.*, 1996). Assim, a actividade sequestradora para o ácido hipocloroso foi determinada espectrofotometricamente através do aumento da absorvância a 412 nm, que traduz a inibição da conversão do TNB em DTNB (Valentão *et al.*, 2002).

Síntese do ácido hipocloroso (HOCl)

Neste trabalho foi preparada uma solução extemporânea de HOCl (75 µM), ajustando uma solução de NaOCl a 1% com ácido sulfúrico diluído, até pH 6,2. A concentração da solução de HOCl foi determinada espectrofotometricamente a 235 nm,

usando o coeficiente de extinção de $100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A solução foi depois diluída com água, de modo a que a oxidação posterior do TNB não fosse superior a 50%.

Síntese do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB)

Para obter o TNB preparou-se uma mistura de DTNB 1 mM em tampão de fosfatos (KH_2PO_4 -KOH 50 mM com EDTA 5 mM, pH 6,6) com borohidreto de sódio 20 mM. A solução resultante foi incubada a 37°C durante 30 minutos. A concentração de TNB foi determinada medindo a absorvância da solução a 412 nm, usando um coeficiente de extinção de $13\,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Ensaio da reactividade com o HOCl

Foram realizados três ensaios, em triplicado, para uma série de diluições da amostra, medindo a absorvância a 412 nm, num espectrofotómetro de feixe duplo Helios α . A mistura reaccional continha 250 μl de TNB, 225 μl de amostra e 250 μl de solução de HOCl (75 μM).

Para cada ensaio efectuou-se um controlo, no qual foi utilizado tampão de fosfatos em vez de amostra e um ensaio em branco para cada concentração de amostra, substituindo a solução de TNB por tampão.

Os ensaios foram conduzidos à temperatura ambiente, sendo a absorvância a 412 nm lida 5 min após a adição de HOCl.

Os resultados foram expressos em percentagem de inibição da oxidação do TNB a DTNB, que representam a percentagem de interceptação do HOCl.

Foi calculada a concentração de extracto capaz de interceptar 20% de HOCl (IC_{20}).

5.7.3. Avaliação da actividade sequestrante para o óxido nítrico

O nitroprussiato de sódio (SNP) gera espontaneamente o radical óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) em solução aquosa, a pH fisiológico. Na presença de oxigénio, este radical dá origem a nitrito, que pode ser determinado através da reacção de Griess (Griess, 1879) modificada (Tsikas, 2007): o cromóforo formado pela diazotação do nitrito com a sulfanilamida e subsequente ligação à naftiletilenodiamina pode ser determinado a 562 nm (figura 28). Na presença de substâncias sequestradoras do $\cdot\text{NO}$ a produção de nitrito é reduzida e a absorvância diminui.

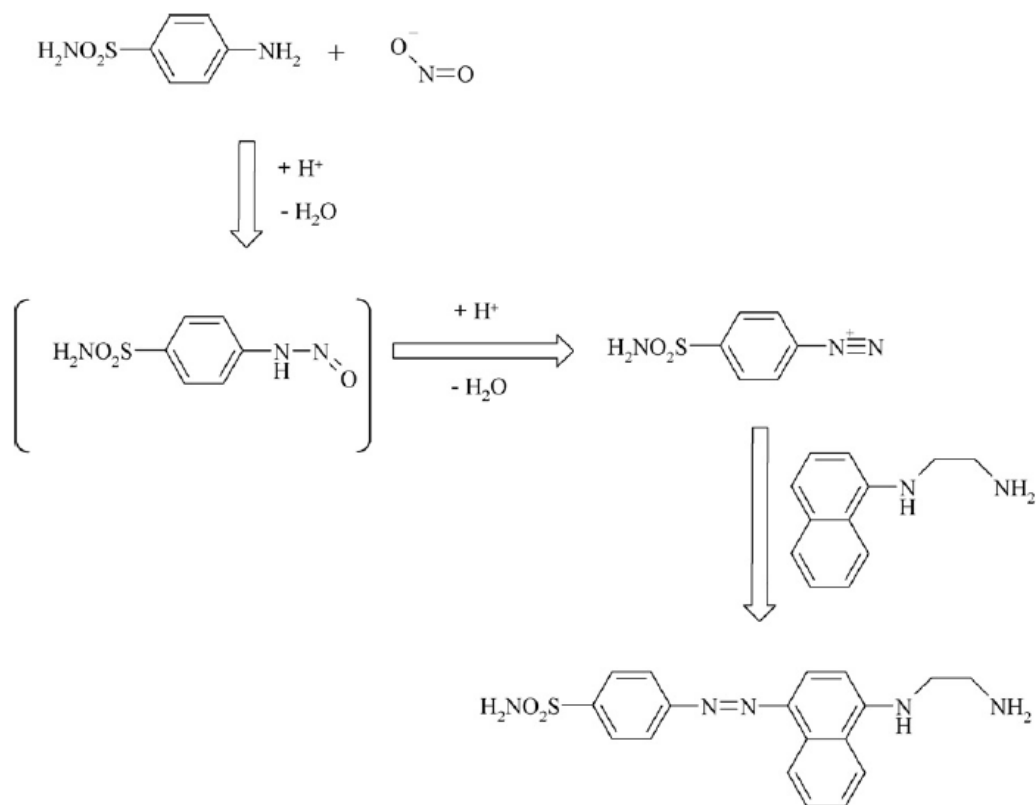


Figura 28. Reacção de Griess modificada (adaptado de Tsikas, 2007).

Para esta determinação foi preparada, numa placa de 96 poços, uma série de diluições, tendo-se efectuado três ensaios, em triplicado (Vrchovská *et al.*, 2007). A mistura reaccional em cada poço consistiu em 100 µL de SNP (20 mM) e 100 µL de extracto dissolvido em tampão de fosfatos (100 mM, pH=7,4).

As placas foram colocadas à temperatura ambiente sob a luz, durante 60 minutos. De seguida, adicionou-se 100 µL de Reagente de Griess (1% sulfanilamida e 0.1% naftiletilenodiamina em ácido fosfórico a 2%). Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, foram lidas as absorvâncias a 562 nm, num leitor de placas Multiskan Ascent.

Para cada ensaio efectuou-se um controlo, no qual foi utilizado tampão de fosfatos em vez de amostra, e um ensaio em branco para cada concentração de amostra, substituindo o reagente de Griess por ácido fosfórico a 2%.

Os resultados foram expressos em percentagem de intercepção de radical [•]NO relativamente ao controlo.

5.8. Análise estatística

Os resultados apresentam-se sob a forma de média \pm erro padrão, para três ensaios efectuados em cada determinação.

A análise de componentes principais (ACP) foi realizada utilizando o *software* XLSTAT 2008.5. Esta análise permitiu identificar semelhanças entre as amostras, quais as variáveis ou componentes que as explicam e se existe um pequeno número de componentes principais que seja responsável por uma proporção elevada da variação total associada ao conjunto original.

6. Resultados e Discussão

6.1. Compostos fenólicos em *R. induratus*

A análise por HPLC-DAD do extracto aquoso das folhas de *R. induratus*, realizada de acordo com as condições descritas em 5.5., revelou um perfil típico, composto por derivados de ácidos hidroxicinâmicos e de flavonóides (figura 29).

Os compostos identificados foram: cafeoil-hexósido, *p*-cumaroil-hexósido, feruloil-hexósido, sinapoil-hexósido, quercetina-6-*C*-hexósido, luteolina-8-*C*-hexósido, luteolina-2''-*O*-pentósido-8-*C*-hexósido, luteolina-6-*C*-hexósido, apigenina-2''-*O*-pentósido-8-*C*-hexósido, apigenina-6-*C*-hexósido, quercetina-3-*O*-hexósido, quercetina-3-*O*-rutinósido, diosmetina-7-*O*-hexósido e isorramnetina-3-*O*-rutinósido.

A identidade dos compostos foi estabelecida por comparação do seu comportamento cromatográfico e espectros de UV-Vis com os já descritos para esta espécie (Ferrerres *et al.*, 2006a e 2007), alguns dos quais estão representados na figura 30.

A quantificação dos compostos fenólicos identificados revelou diferenças entre as amostras analisadas, quer a nível da quantidade de composto, quer na evolução do perfil fenólico ao longo do ciclo fenológico da planta (tabela 6).

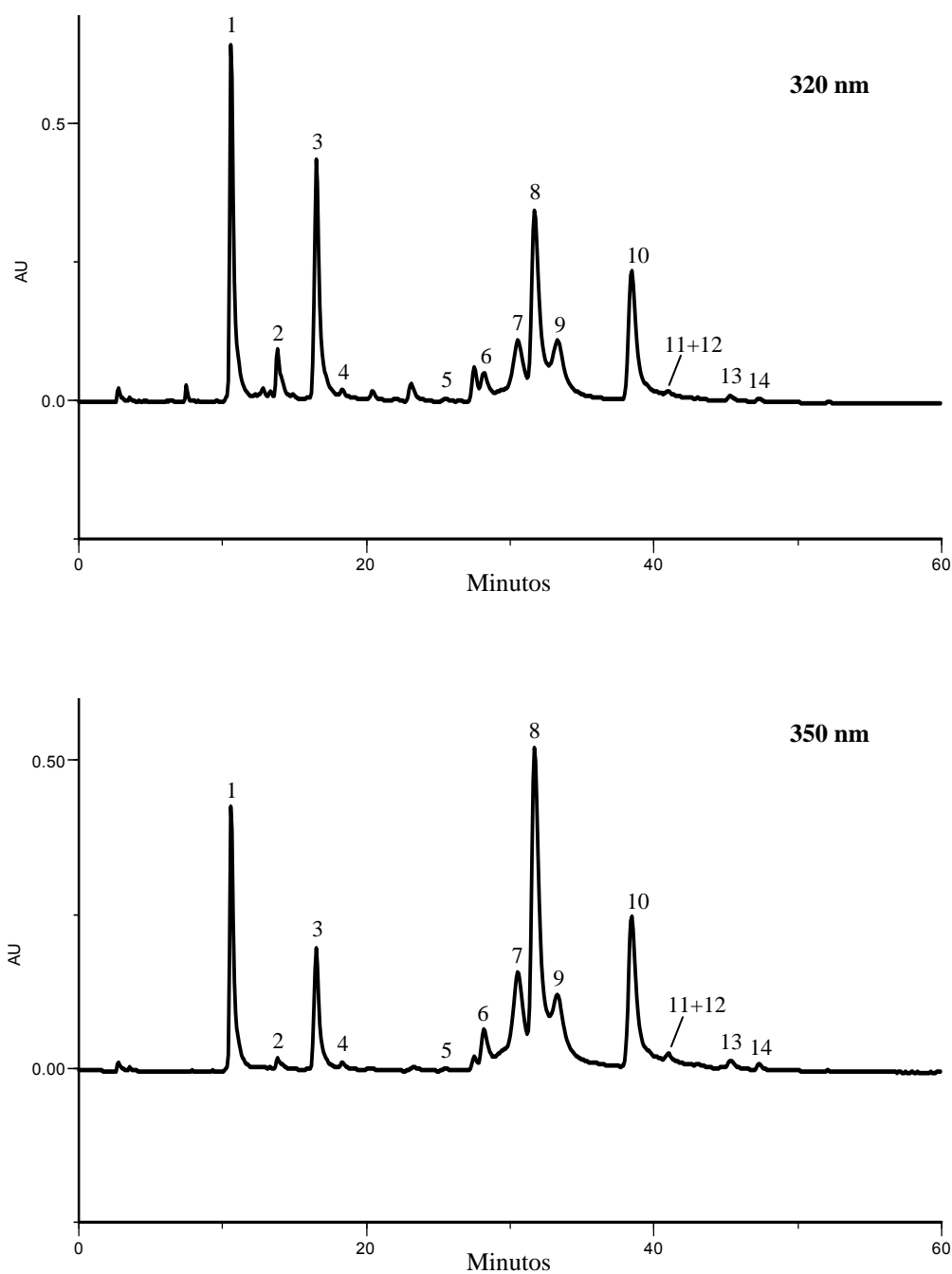


Figura 29. Perfil cromatográfico do extracto aquoso das folhas de *R. induratus* (amostra 22) obtido por HPLC-DAD.

(1) cafeoil-hexósido; (2) *p*-cumaroil-hexósido; (3) feruloil-hexósido; (4) sinapoil-hexósido; (5) quercetina 6-C-hexósido; (6) luteolina-8-C-hexósido; (7) luteolina-2''-O-pentósido-8-C-hexósido; (8) luteolina-6-C-hexósido; (9) apigenina-2''-O-pentósido-8-C-hexósido; (10) apigenina-6-C-hexósido; (11) quercetina-3-O-hexósido; (12) quercetina-3-O-rutinósido; (13) diosmetina-7-O-hexósido; (14) isorramnetina-3-O-rutinósido.

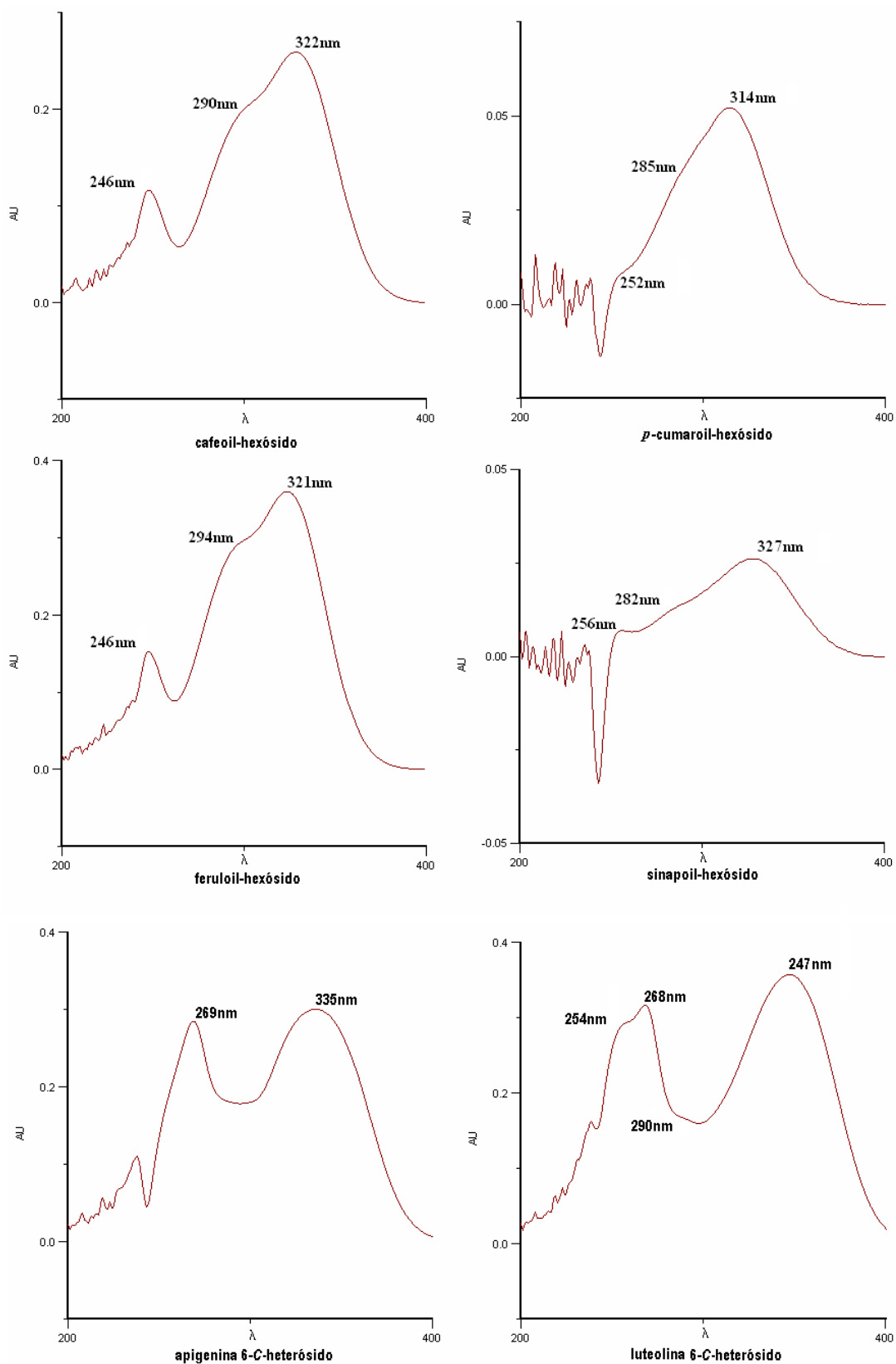


Figura 30. Espectros de UV-Vis dos ácidos fenólicos identificados e dos flavonóides mais representativos.

Tabela 6. Composição fenólica das amostras de *R. induratus* (mg de compostos fenólicos/kg de extracto liofilizado)^a.

Amostra	Compostos ^b														Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11+12	13	14		
1	2309,5±0,9	159,2±0,3	1747,6±18,4	623,4±1,3	-	198,5±3,7	419,6±4,7	787,9±2,1	2784,4±65,9	4885,2±11,4	-	-	-	13914,1	
2	2554,7±65,9	156,9±10,0	1677,1±50,7	207,4±7,3	-	290,0±1,1	408,7±10,0	1257,4±35,0	2609,1±82,5	5235,5±52,8	119,3±16,6	-	-	14516,3	
3	1683,9±5,8	359,2±3,3	2538,7±9,7	70,4±0,3	nq	976,5±20,4	1475,9±3,2	4820,3±7,9	5608,0±27,6	8821,3±338,5	466,4±10,3	89,4±1,3	nq	26910,1	
4	1503,6±43,8	427,3±10,2	2654,1±106,3	102,7±4,1	-	1381,3±15,4	3772,2±9,9	9448,7±54,5	7576,5±54,2	10340,5±366,6	618,6±113,4	291,9±76,9	57,2±6,6	38174,6	
5	2161,1±1,2	188,0±0,7	1485,0±7,6	218,6±2,1	-	374,9±2,1	1000,2±2,8	1275,9±5,7	3116,8±97,4	6715,2±19,8	-	-	-	16535,6	
6	3037,1±129,4	196,3±4,4	2034,5±88,2	270,5±2,3	-	457,1±2,0	809,8±12,8	1794,5±5,0	4163,2±45,4	8957,8±171,4	-	-	-	21720,7	
7	4256,0±39,7	355,1±1,7	2677,7±3,4	390,1±7,6	-	484,6±0,9	665,2±6,0	2491,2±23,1	4583,0±21,5	9159,9±63,5	-	-	-	25062,9	
8	3922,9±10,1	242,9±0,7	2999,6±2,9	310,4±0,7	-	286,3±3,6	343,4±1,8	1203,6±3,3	3735,8±5,7	6598,5±32,0	-	-	-	19643,3	
9	3017,6±128,5	219,8±0,6	2318,8±41,9	270,9±0,7	32,9±3,2	1712,2±27,2	1365,2±9,8	6224,6±51,0	5537,1±21,4	9113,9±250,2	394,9±8,4	58,9±1,0	46,2±0,4	30313,0	
10	2703,5±26,1	559,3±2,1	2645,5±2,8	36,7±1,7	52,8±0,9	3018,1±2,7	1913,4±14,2	8769,2±122,4	5926,8±117,7	8974,9±138,7	252,7±11,9	117,5±67,2	434,5±3,9	35404,9	
11	2905,6±12,4	742,1±7,3	3268,2±4,7	51,2±1,1	151,9±5,1	3824,9±98,6	5346,1±36,9	16204,4±187,2	8693,5±72,5	10700,9±65,3	712,7±55,7	33,5±4,7	456,0±11,7	53091,1	
12	1147,1±20,8	278,7±5,0	2003,5±52,1	500,8±6,1	34,5±0,2	1741,7±47,4	667,4±17,1	5776,3±137,4	4317,5±171,2	8112,9±30,9	403,0±14,7	-	19,5±0,6	25002,9	
13	3702,8±5,6	292,2±1,4	3765,8±22,6	230,1±3,4	111,6±0,8	1819,2±44,3	4506,1±9,5	14087,6±240,3	8633,7±135,3	12648,9±40,2	745,2±36,6	348,5±1,7	994,4±35,6	47962,9	
14	2932,0±5,3	356,2±12,7	3742,5±95,2	132,0±2,2	166,2±11,0	2712,7±3,5	4215,2±160,7	17208,1±130,0	8225,7±26,5	17152,8±234,7	1819,8±161,1	-	1127,2±77,8	59790,5	
15	2971,9±22,1	401,1±0,1	3526,1±5,4	331,0±3,4	48,8±0,9	1676,8±16,5	1607,4±62,9	6258,4±48,3	6148,1±61,2	10688,7±225,2	446,0±50,3	124,2±4,1	287,0±7,5	34515,7	
16	3959,9±10,6	322,0±7,3	4287,1±3,4	189,9±0,8	86,1±9,0	1026,4±18,8	3731,5±59,6	9249,4±27,4	7438,8±35,3	10723,2±26,7	981,6±2,0	671,2±26,4	761,6±10,7	43428,7	
17	3278,8±14,0	438,7±3,6	2904,4±14,0	35,3±1,1	121,8±35,2	1315,1±72,2	5653,2±234,1	15472,3±297,4	8814,7±130,8	11734,0±226,0	1711,2±7,1	562,1±5,8	861,1±70,1	52902,8	
18	3970,7±3,1	283,4±2,0	3171,0±92,3	207,2±1,5	-	1107,8±72,1	449,2±1,3	3229,0±43,4	2170,3±30,0	4549,2±105,6	574,3±22,1	179,7±0,1	143,2±0,8	20035,0	
19	4489,8±43,6	439,8±1,3	4177,4±5,2	105,9±20,8	133,0±34,5	2862,7±22,9	3002,0±41,4	13388,9±51,0	5910,5±92,8	14202,3±9,7	1016,2±41,3	118,0±20,0	741,0±47,1	50587,6	
20	2969,5±52,4	293,4±6,9	3064,7±58,8	86,2±4,9	41,0±3,6	2475,0±89,8	4325,7±8,9	15080,6±158,9	6402,2±38,4	9972,2±225,3	841,4±20,5	375,4±29,4	437,7±48,2	46364,9	
21	3257,0±1,3	275,5±0,8	2595,8±41,5	344,4±7,7	51,0±0,4	1414,2±25,3	1073,7±11,4	7152,2±30,3	5284,9±43,0	9935,1±65,5	670,3±22,0	129,4±6,2	49,2±0,5	32232,8	
22	6418±69,6	862,3±7,8	5163,9±33,1	104,7±3,0	107,6±4,0	2029,1±2,5	4590,9±45,3	17687,7±14,6	7689,1±231,3	14703,7±52,9	2494,7±85,5	747,1±59,8	389,7±0,1	62988,6	
23	5991,3±44,9	607,7±11,8	5012,1±90,6	217,8±0,4	136,5±15,2	1479,5±25,0	4170,7±99,1	18600,4±21,5	5587,3±239,1	13067,7±461,9	2466,0±150,3	689,6±31,5	371,7±15,7	58398,4	
24	3627,8±0,7	540,2±1,4	4013,8±25,7	726,7±1,4	-	1391,6±2,1	884,3±34,3	5259,6±20,8	3552,6±63,1	7996,4±45,1	352,8±22,3	91,5±10,7	nq	28437,4	
25	3885,0±0,9	991,3±7,8	4339,3±13,0	226,4±0,3	19,9±0,7	1926,2±16,9	5109,5±10,7	14664,3±102,0	7079,2±7,3	16374,2±51,0	677,8±0,3	398,8±2,3	309,0±4,3	56000,8	
26	2999,8±13,4	927,8±1,7	3035,2±15,2	157,6±0,6	86,0±1,6	1779,2±5,5	5191,5±111,4	14924,4±40,4	6582,3±7,3	14824,3±128,5	858,7±8,3	342,0±0,2	295,9±10,9	52004,7	
27	1608,5±19,3	447,0±19,9	2888,0±20,4	639,5±6,1	43,5±2,7	2152,5±51,5	1226,8±9,2	6526,4±7,3	3486,4±2,9	8119,3±33,3	513,5±32,3	102,8±0,6	nq	27754,1	
28	5233,2±63,4	913,4±10,4	5793,9±59,8	172,4±1,4	-	1324,0±14,0	3984,7±231,2	12652,3±460,7	5438,9±11,9	12784,4±243,7	634,6±4,4	455,6±2,7	300,1±6,8	49687,4	
29	2779,0±2,8	934,4±9,3	3346,1±18,7	85,9±2,0	45,7±3,7	2512,3±38,3	5572,8±9,9	16013,4±122,0	7286,1±108,9	16105,4±58,1	1211,7±35,6	748,8±3,0	331,0±0,3	56972,6	

^aValores expressos em média±desvio padrão de três determinações para cada amostra; ^bCompostos: (1) cafeoil-hexósido; (2) p-cumaroil-hexósido; (3) feruloil-hexósido; (4) sinapoil-hexósido; (5) quercetina-6-C-hexósido; (6) luteolina-8-C-hexósido; (7) luteolina-2''-O-pentósido-8-C-hexósido; (8) luteolina-6-C-hexósido; (9) apigenina-2''-O-pentósido-8-C-hexósido; (10) apigenina-6-C-hexósido; (11) quercetina-3-O-hexósido; (12) quercetina-3-O-rutinósido; (13) diosmetina-7-O-hexósido; (14) isorramnetina-3-O-rutinósido; nq - não quantificável.

As amostras de campo demonstraram possuir maior conteúdo fenólico do que as amostras de estufa (amostras 1-8), com exceção das amostras no estado de desenvolvimento vegetativo (amostras 9, 12, 15, 18, 21, 24 e 27) (figura 31).

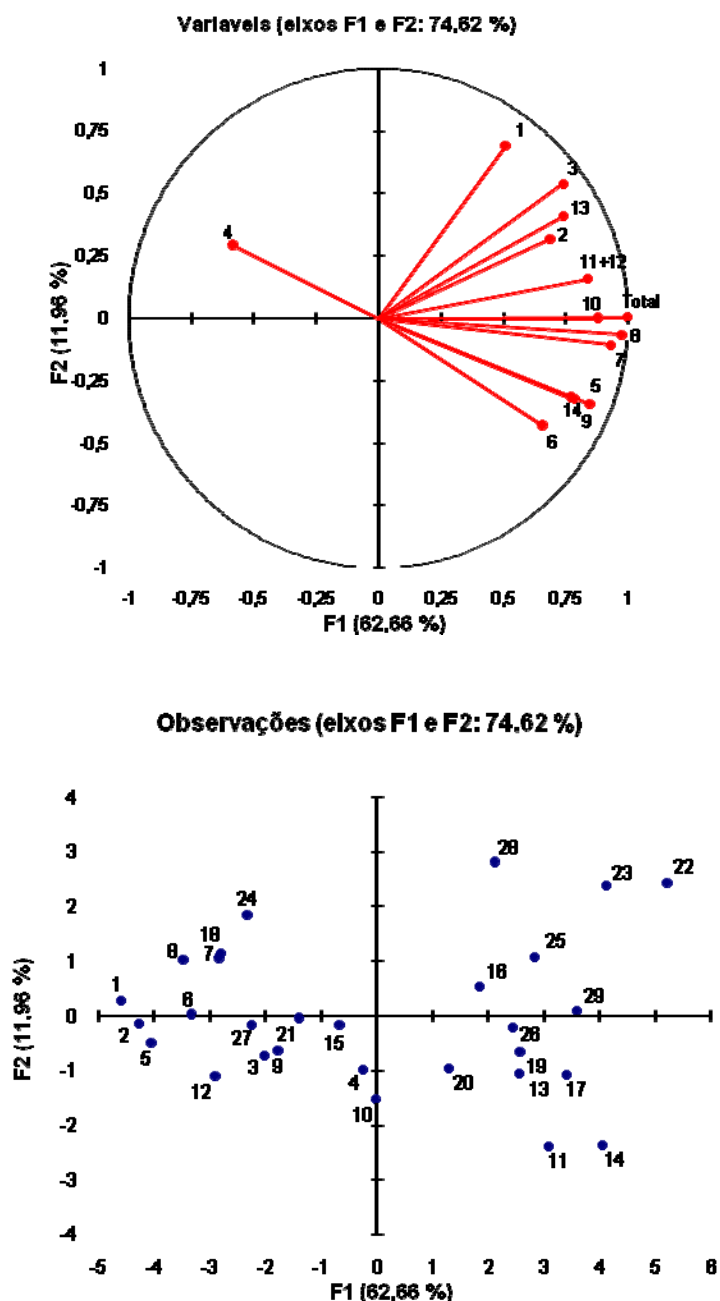


Figura 31. Diagrama de componentes principais do conteúdo fenólico das amostras analisadas. As componentes 1 e 2 representam 74,62% da variância total. A identidade dos compostos (1-14) está de acordo com a figura 29 e a das amostras (1-29) de acordo com a tabela 5.

A quantidade total de derivados de ácidos fenólicos e flavonóides identificados nas amostras de estufa variou entre 13914,1 e 38174,6 mg/kg de extracto liofilizado. Já nas amostras de campo a variação foi entre 20035,0 e 62988,6 mg/kg.

O facto de as amostras de estufa produzirem menor quantidade de compostos fenólicos poderá ser justificado pela reduzida exposição a agressões ambientais, pois é sabido que os compostos fenólicos estão relacionados com a capacidade de as plantas resistirem a essas agressões, predação dos insectos ou com interações no que toca a estimulantes do apetite e oviposição (Harbone e Williams, 2000), situações estas que são reduzidas em ambiente de estufa.

Nos primeiros estados do ciclo fenológico (plântula e desenvolvimento vegetativo) a amostra cultivada na Primavera apresentava maior teor em compostos fenólicos do que a amostra cultivada no Outono/Inverno (figura 32). Em ambas as colheitas ocorreu um aumento na quantidade de fenóis totais ao longo do ciclo até à fase de escarpo, na qual os teores destes compostos eram semelhantes.

Porém, na fase final do ciclo vegetativo as duas colheitas têm comportamentos distintos. Enquanto na amostra de Outono/Inverno o teor de fenóis continua a aumentar, na amostra da colheita de Primavera verificou-se um ligeiro decréscimo.

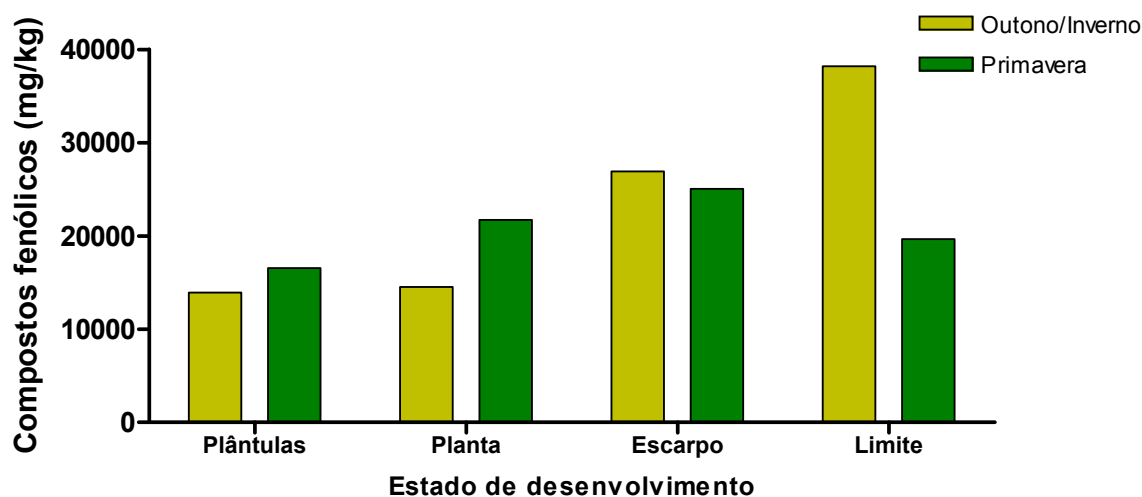


Figura 32. Variação da quantidade de compostos fenólicos totais em função do estado de desenvolvimento nas amostras de *R. induratus* de crescimento em estufa.

O limite corresponde à fase do limite de utilização na alimentação.

Os gráficos das figuras 33 e 34 representam a evolução relativa, ao longo do desenvolvimento da planta, de cada um dos compostos encontrados nas amostras de estufa.

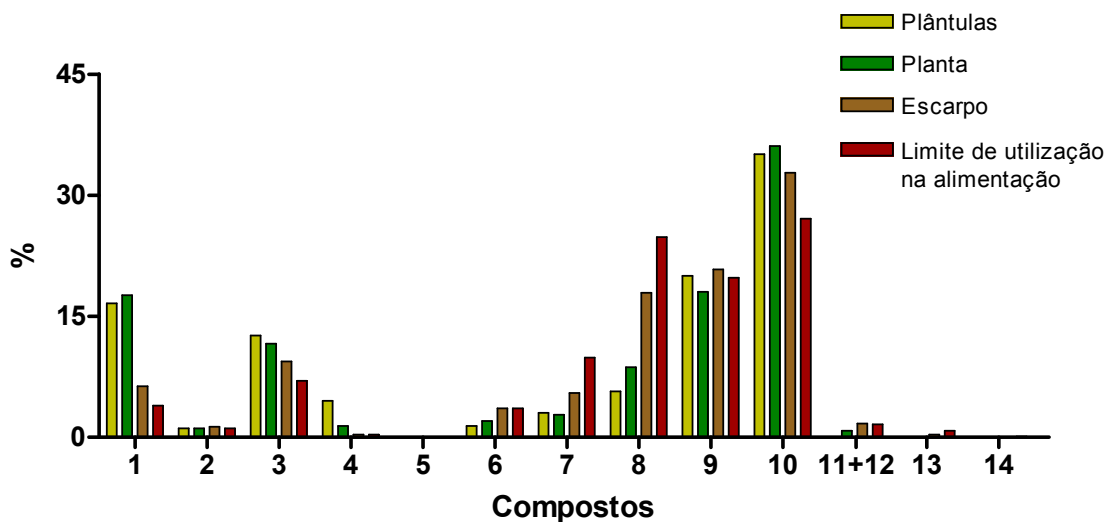


Figura 33. Perfil em compostos fenólicos das amostras de *R. induratus* de crescimento em estufa (colheita de Outono/Inverno). A identidade dos compostos está de acordo com a figura 29.

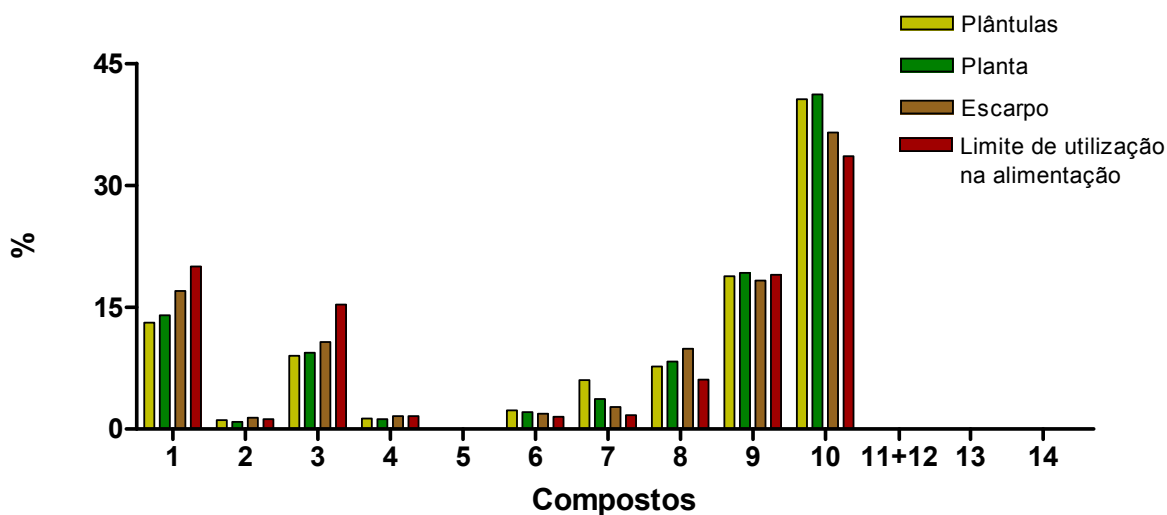


Figura 34. Perfil em compostos fenólicos das amostras de *R. induratus* de crescimento em estufa (colheita de Primavera). A identidade dos compostos está de acordo com a figura 29.

O composto maioritário nas duas colheitas de amostras de estufa, em todos os estados de desenvolvimento, foi a apigenina-6-C-hexósido (10), representando entre 27,1 e 41,2% do total de compostos quantificados. A percentagem deste composto foi, de uma forma geral, diminuindo ao longo do ciclo.

Nas amostras colhidas no Outono/Inverno os compostos encontrados em maior quantidade foram, por ordem decrescente, a apigenina-2''-O-pentósido-8-C-hexósido (9), o cafeoil-hexósido (1) e o feruloil-hexósido (3). Porém, na última fase do ciclo vegetativo a luteolina-6-C-hexósido (8) torna-se o segundo composto mais abundante (figura 33).

Durante a evolução da planta o cafeoil-hexósido (1) e o feruloil-hexósido (3) vão diminuindo e tornam-se muito menos importantes do que a apigenina-2''-O-pentósido-8-C-hexósido (9). Tanto a luteolina-8-C-hexósido (6), como a luteolina-2''-O-pentósido-8-C-hexósido (7) aumentam ao longo do ciclo da planta.

No caso das amostras de Primavera (figura 34), a apigenina-2''-O-pentósido-8-C-hexósido (9) representa o segundo composto mais importante e os seus níveis mantêm-se estáveis ao longo crescimento da planta. O cafeoil-hexósido (1) e o feruloil-hexósido (3) são os terceiro e quarto compostos mais abundantes, respectivamente, e vão aumentando ligeiramente e de forma semelhante. No limite de utilização na alimentação, o cafeoil-hexósido (1) torna-se o segundo composto mais abundante.

Ao contrário das amostras de Outono/Inverno, nas amostras colhidas na Primavera a luteolina-6-C-hexósido (8) não evolui como um dos compostos maioritários, enquanto a luteolina-2''-O-pentósido-8-C-hexósido (7) diminui com o desenvolvimento.

Os compostos minoritários (quercetina-3-O-hexósido (11), quercetina-3-O-rutinósido (12), diosmetina-7-O-hexósido (13) e isoramnetina-3-O-rutinósido (14)) só foram detectados nas amostras colhidas no Outono/Inverno a partir a fase de planta, não tendo sido detectados no cultivo de Primavera.

De uma forma geral, a quantidade de fenóis totais nas amostras de campo aumenta ao longo do ciclo da planta (tabela 6, figura 35).

De facto, as amostras colhidas em Fervença (9-11), Pombares (12-14), Macedo (15-17) e Chãs (27-29) apresentam uma evolução crescente da concentração de compostos fenólicos totais ao longo das diversas fases de desenvolvimento, um comportamento semelhante ao das amostras de estufa colhidas no Outono/Inverno (1-4).

As amostras de Romeu (18-20), Sra. das Neves (21-23) e Cerejais (24-26) apresentam um ligeiro decréscimo na fase final do desenvolvimento, tal como as amostras de estufa da colheita de Primavera (5-8) (figura 35).

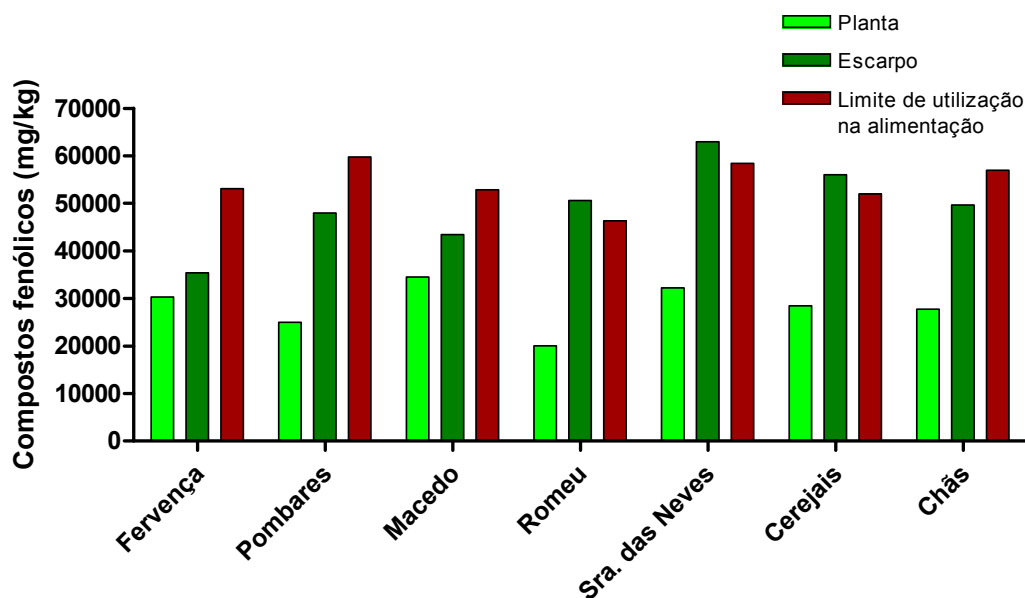


Figura 35. Concentração de compostos fenólicos nas amostras de campo de *R. induratus* de acordo com o estado de desenvolvimento.

A análise do perfil fenólico do conjunto das amostras de campo (figura 36) permite verificar que na fase inicial (planta) o composto mais abundante é a apigenina-6-C-hexósido (10), correspondendo a $29,2 \pm 1,2\%$ do total de compostos fenólicos quantificados. O segundo composto mais abundante é a luteolina-6-C-hexósido (8) ($20,3 \pm 1,1\%$), seguida da apigenina-2''-O-pentósido-8-C-hexósido (9) ($15,1 \pm 1,2\%$), do feruloil-hexósido (3) ($10,6 \pm 1,2\%$), do cafeoil-hexósido (1) ($10,2 \pm 1,9\%$) e da luteolina-8-C-hexósido (6) ($5,7 \pm 0,5\%$).

Na fase de escarpo, a apigenina-6-C-hexósido e a luteolina-6-C-hexósido estão presentes em quantidades semelhantes: $25,8 \pm 0,8\%$ e $25,6 \pm 0,8\%$, respectivamente.

No final do ciclo vegetativo a relação entre as duas flavonas glicosiladas em 6 inverte-se, tornando-se a luteolina-6-C-hexósido (8) o composto presente em maior percentagem ($29,9 \pm 0,6\%$), seguido da apigenina-6-C-hexósido (10) ($24,5 \pm 1,4\%$).

Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Ferreres *et al.* (2006a), cuja amostra, colhida na mesma época do ano (Primavera) e possivelmente no mesmo estado de desenvolvimento, apresentou a luteolina-6-C-hexósido como composto maioritário.

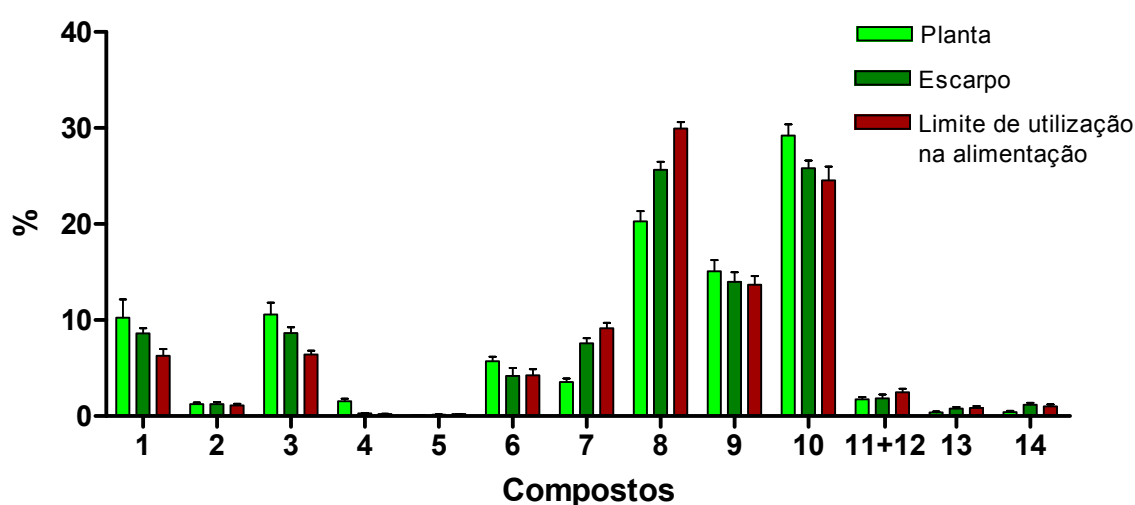


Figura 36. Perfil fenólico do conjunto das amostras de campo de *R. induratus* (média \pm erro padrão) em função do estado de desenvolvimento. A identidade dos compostos está de acordo com a figura 29.

Ao longo do ciclo vegetativo, a apigenina-2''-O-pentósido-8-C-hexósido (9), o feruloil-hexósido (3), o cafeoil-hexósido (1) e a luteolina-8-C-hexósido (6) sofrem um decréscimo, enquanto a luteolina-2''-O-pentósido-8-C-hexósido (7) aumenta.

Os restantes compostos (quercetina-3-O-hexósido, quercetina-3-O-rutinósido, *p*-cumaroil-hexósido, diosmetina-7-O-hexósido e isoramnetina-3-O-rutinósido) estão presentes em pequenas quantidades e permanecem relativamente estáveis ao longo do ciclo da planta.

O sinapoil-hexósido (4) poderá representar um marcador do estado de maturação, uma vez que diminui durante o desenvolvimento da planta (figuras 31 e 36, tabela 6).

Genericamente, pode dizer-se que o perfil das amostras de estufa colhidas no Outono/Inverno apresenta maiores semelhanças com o das amostras de campo, embora estas exibam um aumento da luteolina-6-C-hexósido (8) e um decréscimo da apigenina-6-C-hexósido (10) mais pronunciado.

A figura 37 apresenta os perfis fenólicos das amostras de *R. induratus* provenientes das diferentes localizações.

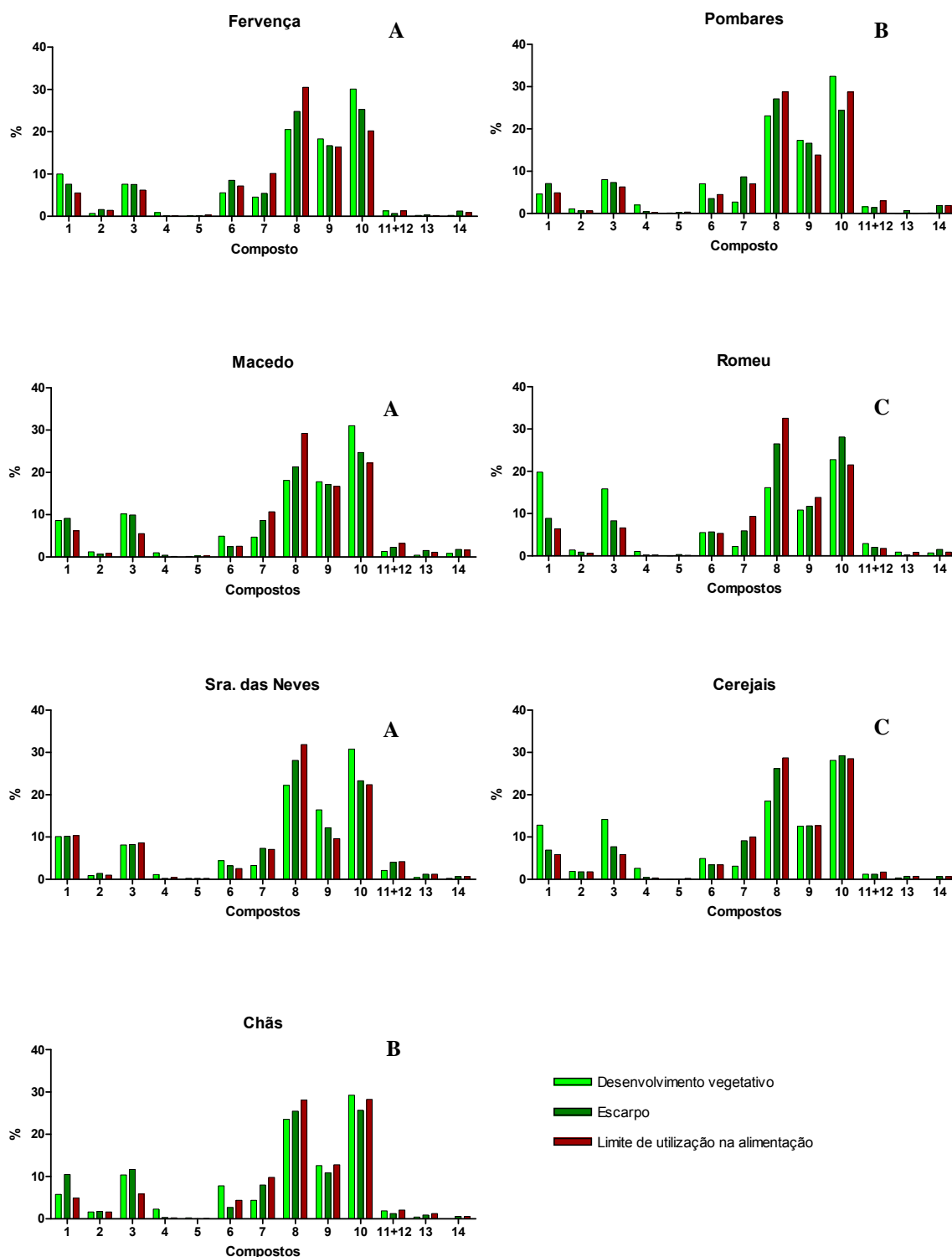


Figura 37. Perfis fenólicos das amostras de campo de *R. induratus*. A identidade dos compostos está de acordo com a figura 29. Perfis A, B e C representam conjuntos de amostras com evolução semelhante da apigenina-6-C-hexósido (10).

Analisando a evolução relativa do composto maioritário, apigenina-6-*C*-hexósido (10), ao longo do desenvolvimento da planta, é possível identificar a existência de três perfis distintos (A, B e C) nas amostras de campo estudadas.

Nas amostras de Fervença, Macedo e Sra. das Neves (perfil A) a apigenina-6-*C*-hexósido (10) vai diminuindo com a idade da planta. No caso das amostras de Pombares e Chãs (perfil B), a apigenina-6-*C*-hexósido sofre um decréscimo na fase de escarpo para depois aumentar na fase final. Já as amostras provenientes de Romeu e Cerejais (perfil C) apresentam um aumento deste composto na fase de escarpo e uma diminuição na fase seguinte. Nestas duas amostras ocorre um decréscimo semelhante do cafeoil-hexósido (1) e do feruloil-hexósido (3).

A luteolina-6-*C*-hexósido (8) apresenta uma evolução semelhante em todas as amostras, ocorrendo um aumento que poderá ser característico do crescimento e maturação da *R. induratus*.

6.2. Ácidos orgânicos em *R. induratus*

A análise cromatográfica por HPLC-UV do extracto aquoso das folhas de *R. induratus*, realizada de acordo com as condições descritas em 5.6., revelou um perfil de ácidos orgânicos composto pelos ácidos oxálico, cítrico, málico, ascórbico e chiquímico (figura 38).

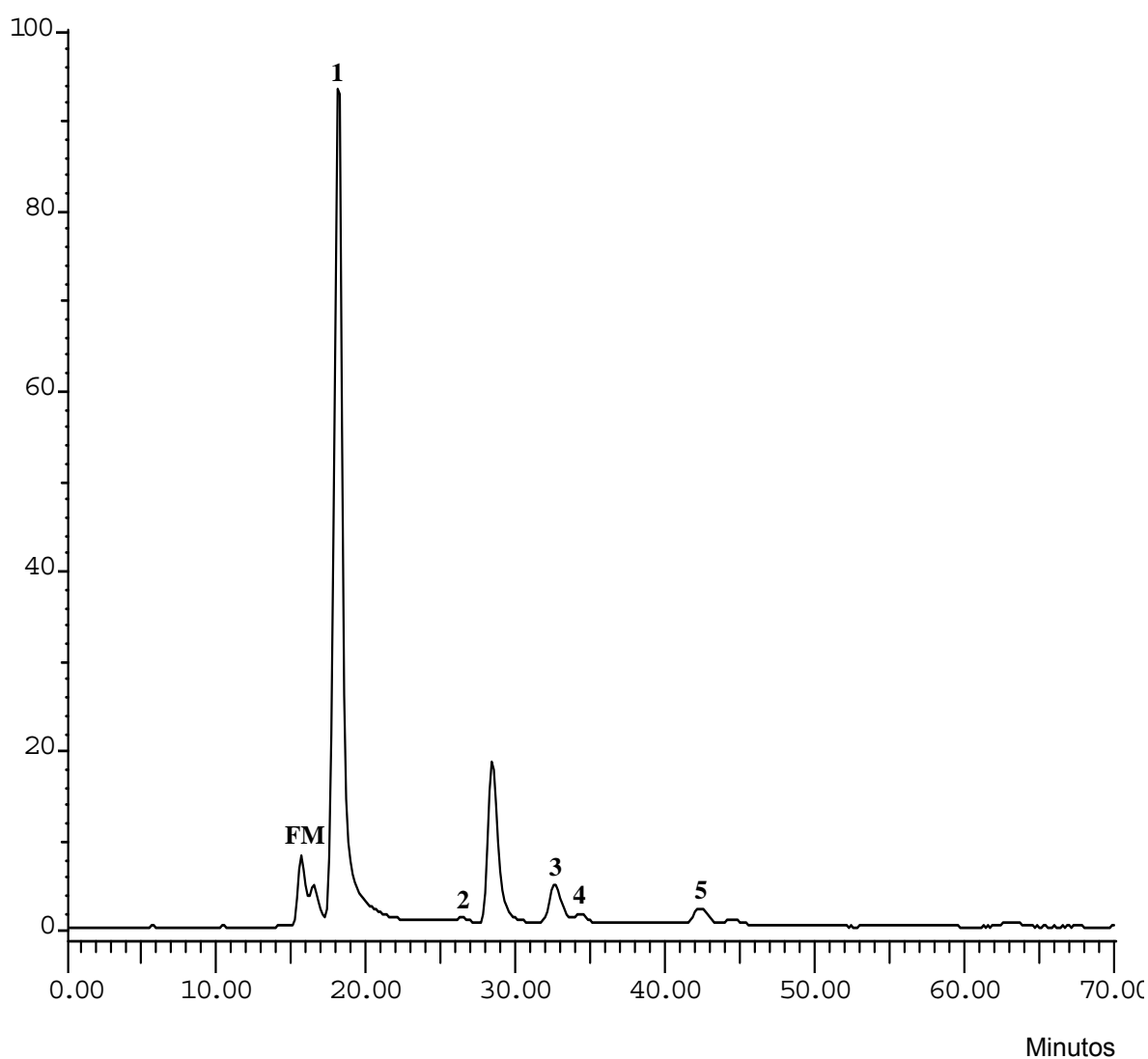


Figura 38. Perfil em ácidos orgânicos do extracto aquoso das folhas de *R. induratus* (amostra 9) obtido por HPLC-UV. Detecção a 214 nm. (FM) fase móvel; (1) ácido oxálico; (2) ácido cítrico; (3) ácido málico; (4) ácido ascórbico e (5) ácido chiquímico.

Estes compostos foram identificados pela primeira vez nesta espécie, com excepção do ácido oxálico descrito anteriormente por Ferreres *et al.* (2006a). Os ácidos cítrico e o málico tinham já sido encontrados noutras espécies de *Rumex*, nomeadamente *R. acetosa* e *R. vesicarius* (Alfawaz, 2006; Tolrà *et al.*, 2004).

A determinação do teor em ácidos orgânicos torna-se importante nos estudos relacionados com a utilização das azedas em sopas e saladas, ou como aditivo para modificar o sabor e aroma de alguns alimentos.

A quantificação dos ácidos orgânicos identificados revelou diferenças entre as amostras analisadas, quer a nível do perfil de compostos, quer na sua evolução ao longo do ciclo fenológico da planta (tabela 7 e figura 39).

As amostras de estufa (1 a 8) possuem um maior teor em ácidos orgânicos do que as amostras de campo, com excepção das amostras 3 e 4, que são as amostras da colheita de Inverno nos estados mais avançados do desenvolvimento. O menor conteúdo em ácidos orgânicos das amostras de campo poderá dever-se ao facto de estas amostras estarem mais envolvidas na produção de metabolitos secundários, como os compostos fenólicos, para sua defesa.

Tabela 7. Composição em ácidos orgânicos das amostras de *R. induratus* (g de ácido orgânico/kg de extracto liofilizado).

Amostra	Ácido ^a (g/kg)					Total
	oxálico	cítrico	málico	ascórbico	chiquímico	
1	362,8±6,5	6,7±3,1	79,6±0,2	2,6±0,4	0,16±0,00	451,8
2	201,4±0,1	9,6±1,8	105,7±1,3	2,4±0,4	0,11±0,01	319,3
3	112,8±0,6	-	48,5±1,8	1,8±0,1	1,08±0,00	164,3
4	114,8±0,5	nq	12,9±0,4	1,5±0,1	1,09±0,03	130,3
5	354,1±1,4	nq	25,5±0,3	0,9±0,0	0,23±0,00	380,7
6	388,0±3,9	15,4±1,4	33,2±0,1	1,0±0,0	0,14±0,00	437,7
7	308,0±1,3	5,9±0,3	33,8±0,7	0,6±0,0	0,17±0,00	348,4
8	293,7±0,9	5,8±1,9	46,1±3,6	2,2±0,3	0,18±0,02	347,9
9	127,1±0,3	5,3±0,0	76,4±0,9	2,1±0,0	0,37±0,00	211,3
10	196,8±1,0	2,7±0,2	24,0±0,9	nq	0,68±0,00	224,2
11	159,5±0,3	2,6±0,1	28,3±0,9	1,0±0,6	0,95±0,01	192,4
12	72,0±0,3	7,2±1,8	125,1±0,4	nq	0,16±0,00	204,4
13	209,3±4,4	nq	39,7±3,4	2,4±0,3	0,47±0,00	251,9
14	156,2±0,5	nq	30,0±4,0	nq	3,19±0,01	189,3
15	73,4±0,5	12,9±4,7	102,7±1,3	nq	0,29±0,03	189,3
16	205,0±1,6	-	77,6±2,1	nq	0,67±0,02	283,2
17	161,2±0,4	nq	39,2±1,9	1,9±0,5	1,30±0,02	203,6
18	96,8±0,7	17,6±4,0	189,8±5,8	0,9±0,2	0,51±0,13	305,6
19	177,0±0,7	nq	47,9±2,4	nq	0,93±0,01	225,8
20	153,7±0,8	nq	49,4±1,0	nq	1,19±0,02	208,0
21	90,0±0,8	3,5±0,3	83,9±2,0	1,9±0,2	0,24±0,00	179,5
22	163,0±2,4	-	18,3±0,2	-	0,87±0,01	182,2
23	218,8±0,9	-	28,3±0,5	nq	0,91±0,00	248,5
24	160,9±3,9	9,5±0,1	109,7±2,3	nq	0,31±0,02	280,4
25	224,1±2,0	-	29,3±0,7	nq	1,02±0,11	254,4
26	182,5±0,9	-	37,1±2,7	nq	0,68±0,07	220,3
27	80,7±2,0	8,2±0,9	94,9±0,2	nq	0,14±0,00	184,0
28	205,0±0,9	-	23,2±3,1	nq	0,35±0,01	228,5
29	108,9±0,3	-	59,8±7,7	nq	0,42±0,00	169,2

^aValores expressos como a média±desvio padrão de três determinações para cada amostra; nq - não quantificável

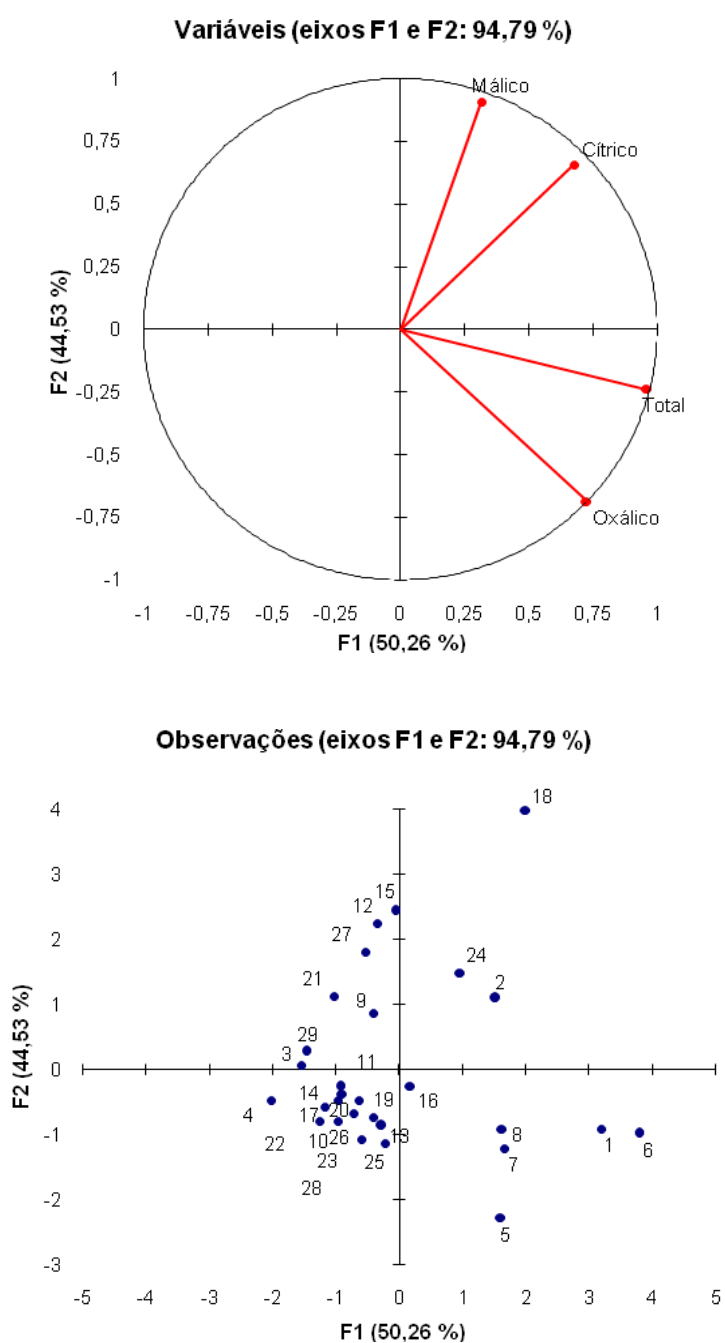


Figura 39. Diagrama de componentes principais do conteúdo em ácidos orgânicos das amostras analisadas. As componentes 1 e 2 representam 94,79% da variância total. Identidade das amostras de acordo com a tabela 5.

Da quantificação dos ácidos orgânicos presentes nas amostras de campo verificou-se que a sua concentração total varia de acordo com o estado de desenvolvimento da planta (figura 40). Na fase inicial (planta) a quantidade total de ácidos orgânicos corresponde, em média, a $222,1 \pm 19,0$ g/kg de extracto liofilizado. Na fase de escarpo a quantidade média é de $235,7 \pm 12,0$ g/kg, ocorrendo um decréscimo para $203,9 \pm 9,5$ g/kg no limite para utilização na alimentação.

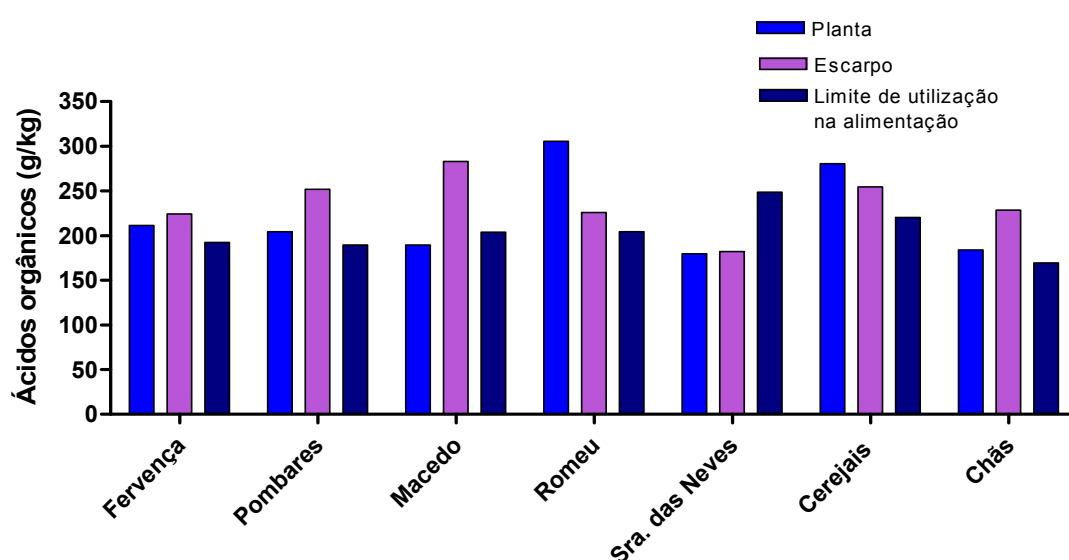


Figura 40. Concentração de ácidos orgânicos totais nas amostras de campo de *R. induratus* por estado de desenvolvimento.

As amostras de Sra. das Neves, Romeu e Cerejais apresentam uma tendência contrária às restantes amostras: ao longo do crescimento da planta a quantidade total de ácidos orgânicos aumenta no primeiro caso e diminui nos dois últimos. As amostras 18 e 24 (amostras no início do desenvolvimento colhidas em Romeu e Cerejais, respectivamente) destacam-se pelo elevado conteúdo em ácidos orgânicos face às restantes amostras no mesmo estado de desenvolvimento (figura 39 e 40).

A determinação quantitativa dos ácidos orgânicos no conjunto total das amostras de campo permitiu encontrar o perfil representado na figura 41.

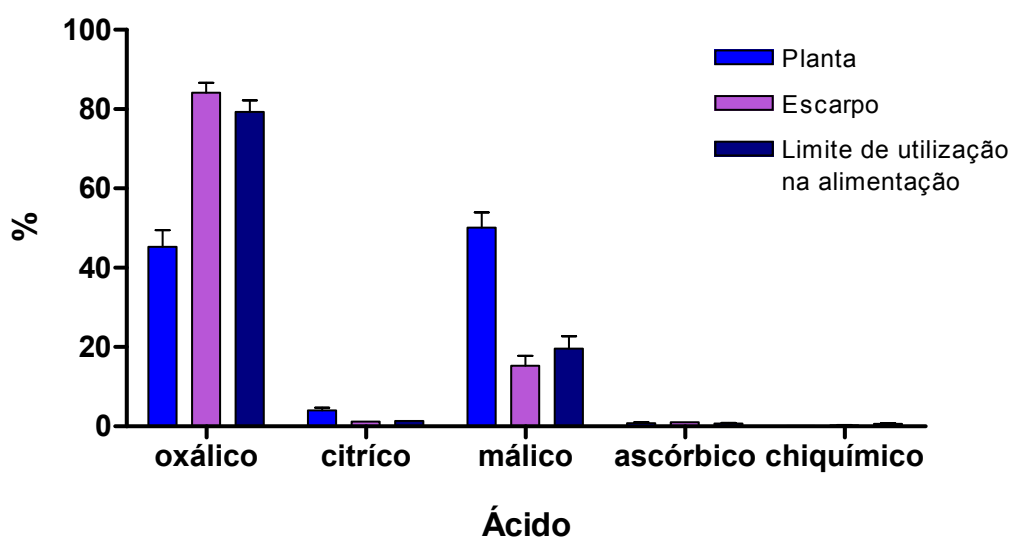


Figura 41. Perfil em ácidos orgânicos do conjunto das amostras de campo de *R. induratus* (média±erro padrão) em função do estado de desenvolvimento.

Nestas amostras, os ácidos málico e oxálico são os compostos maioritários, correspondendo no estado inicial a $50,2 \pm 3,8\%$ e $45,3 \pm 4,1\%$ do total de ácidos orgânicos, respectivamente.

Na fase de escarpo ocorre um decréscimo acentuado da concentração de ácido málico ($15,3 \pm 2,5\%$), tornando-se o ácido oxálico o maioritário ($84,1 \pm 2,3\%$).

Na fase final ocorre um ligeiro decréscimo na percentagem de ácido oxálico ($79,3 \pm 2,9\%$) e aumento da quantidade de ácido málico ($19,7 \pm 3,0\%$).

O ácido cítrico vai diminuindo ao longo do desenvolvimento. Os ácidos ascórbico e chiquímico estão presentes em quantidades muito reduzidas (tabela 7 e figura 41).

A evolução da proporção de cada ácido orgânico nas amostras de campo colhidas nas diversas localizações é apresentada na figura 42.

Em todas as amostras a fase inicial do desenvolvimento é a que apresenta menores teores de ácido oxálico. Este ácido aumenta consideravelmente da planta até ao escarpo, ocorrendo o contrário com o ácido málico, que sofre uma diminuição acentuada.

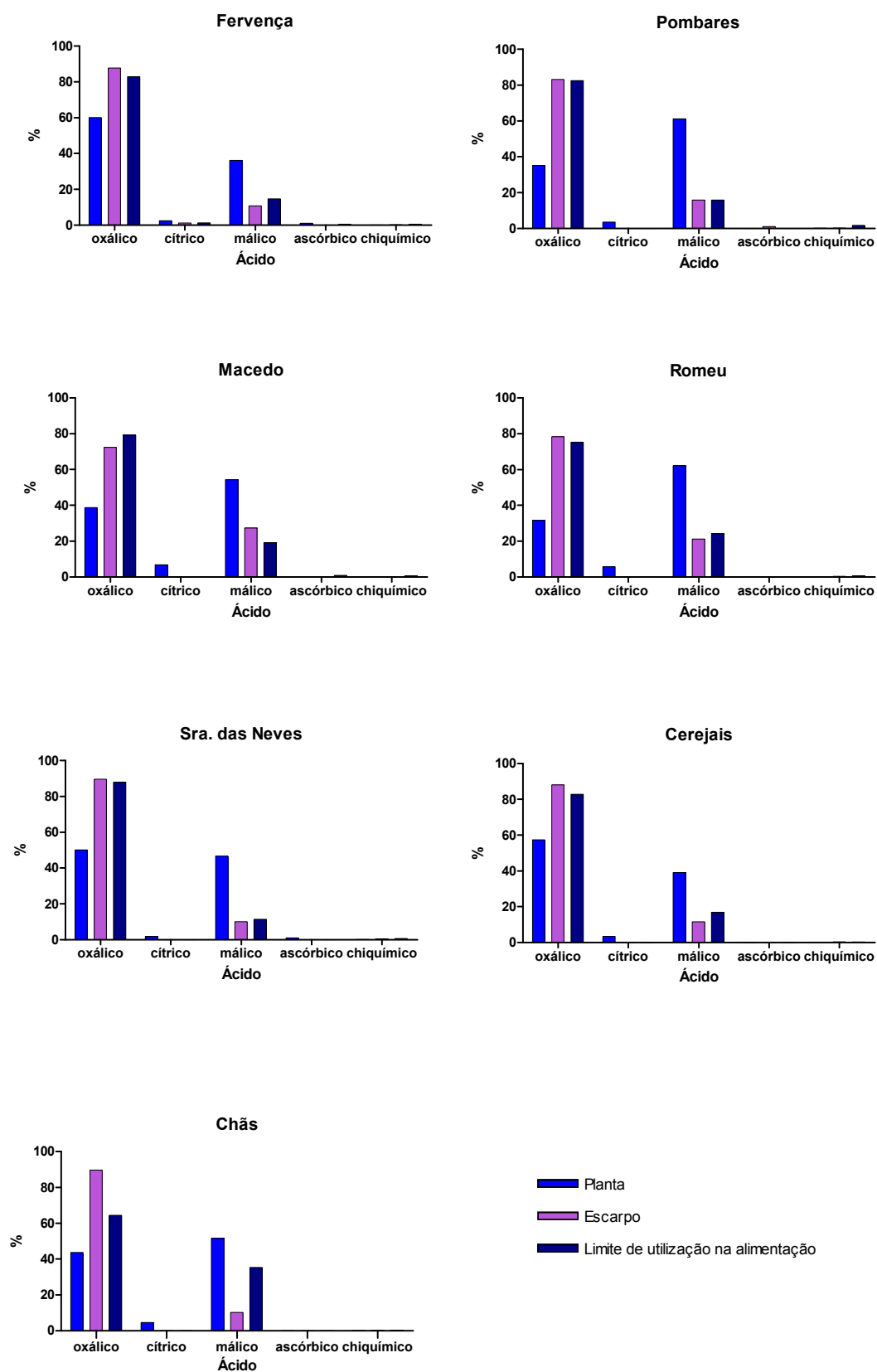


Figura 42. Perfis em ácidos orgânicos das amostras de campo de *R. induratus*.

No estágio de desenvolvimento mais tardio (limite de utilização na alimentação) ocorre o inverso: o ácido oxálico sofre um ligeiro decréscimo e o ácido málico um ligeiro aumento, com exceção da amostra colhida em Chãs, na qual essa variação é mais acentuada, e da colhida em Macedo, na qual o ácido oxálico aumenta e o ácido málico diminui.

Estes resultados estão de acordo com o descrito na literatura que refere o ácido oxálico como o mais frequente e característico do género *Rumex* (DerMarderosian e Bentler, 2002; *PDR for Herbal Medicine*, 1998; Newall *et al.*, 1996).

Os níveis elevados de ácido oxálico encontrados nestas amostras, principalmente na fase de escarpo (fase em que a espécie é mais consumida na alimentação), poderão estar na origem do sabor ácido característico das folhas de *R. induratus*.

O ácido oxálico parece exercer funções importantes para as plantas. De facto, níveis elevados deste ácido poderão constituir um factor de protecção da planta contra herbívoros, insectos e outros microorganismos patogénicos, influenciando o sabor, a textura e a biodisponibilidade do cálcio, actuando também como regulador do pH e da osmolaridade (Libert e Franceschi, 1987).

A ingestão de elevadas quantidades de ácido oxálico poderá causar perturbações gastrointestinais, pois este composto é irritante para o estômago e intestino. Além disso, o ácido oxálico interfere com a absorção e metabolismo do cálcio, afectando o mecanismo de coagulação sanguínea e podendo exercer ainda efeitos nocivos graves nos sistemas renal e hepático (Newall *et al.*, 1996; Libert e Franceschi, 1987).

O ácido málico parece estar relacionado com o grau de maturação das plantas de crescimento espontâneo. Na verdade, trabalhos anteriores evidenciam a relação entre a concentração de ácido málico e o estado de maturação de frutos (Org *et al.*, 2006; Glew *et al.*, 2003).

Neste estudo verificou-se que no estado mais jovem as amostras possuíam uma maior concentração de ácido málico do que nos estados mais avançados (tabela 7 e figura 41). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Org *et al.* (2006), uma vez que ocorre uma diminuição do ácido málico com a maturação da planta.

A quantificação dos ácidos orgânicos totais nas amostras provenientes do cultivo em estufa, colhidas no Outono/Inverno e na Primavera, revelou dois comportamentos distintos (tabela 7 e figura 43).

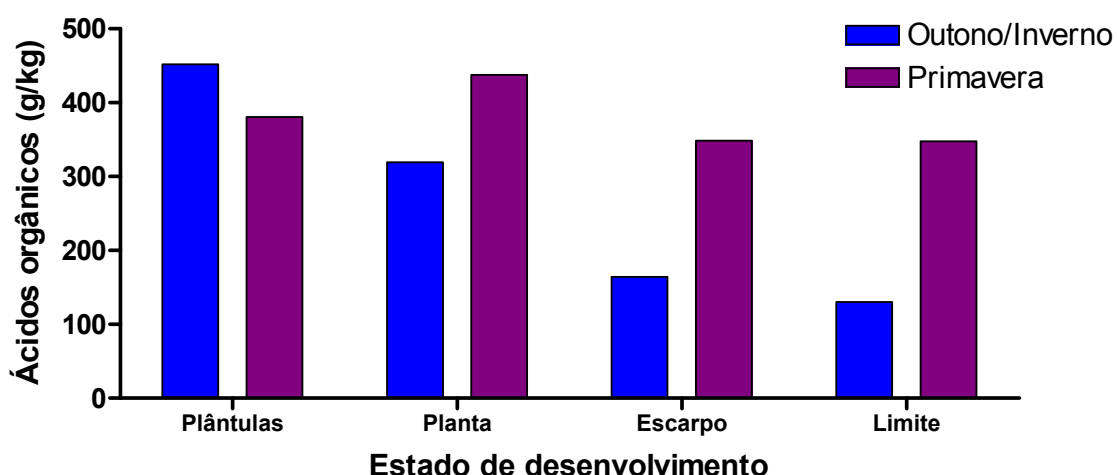


Figura 43. Concentração de ácidos orgânicos totais nas amostras de estufa de *R. induratus* por estado de desenvolvimento.

Nas amostras da colheita de Outono/Inverno (1 a 4) a quantidade de ácidos orgânicos totais produzidos sofre uma diminuição acentuada ao longo do ciclo da planta, variando de 451,8 g/kg na fase de plântula para 130,3 g/kg na fase final do ciclo.

Nas amostras da colheita de Primavera (5 a 8) a quantidade de ácidos orgânicos produzida não sofre grande variação, observando-se um pequeno aumento na fase do desenvolvimento vegetativo.

A diminuição na concentração de ácidos orgânicos totais é comum e acompanha o amadurecimento de muitos frutos. Este decréscimo advém do facto de a planta utilizar estes compostos como substratos no processo de respiração e como fontes de carbono para a síntese de novos compostos (Kays, 1991).

A análise dos perfis em ácidos orgânicos das amostras de estufa permite verificar que estas não apresentam o mesmo padrão de evolução das amostras de campo, embora o ácido oxálico seja sempre o composto maioritário nas duas colheitas e em todas as fases de desenvolvimento (figuras 44 e 45).

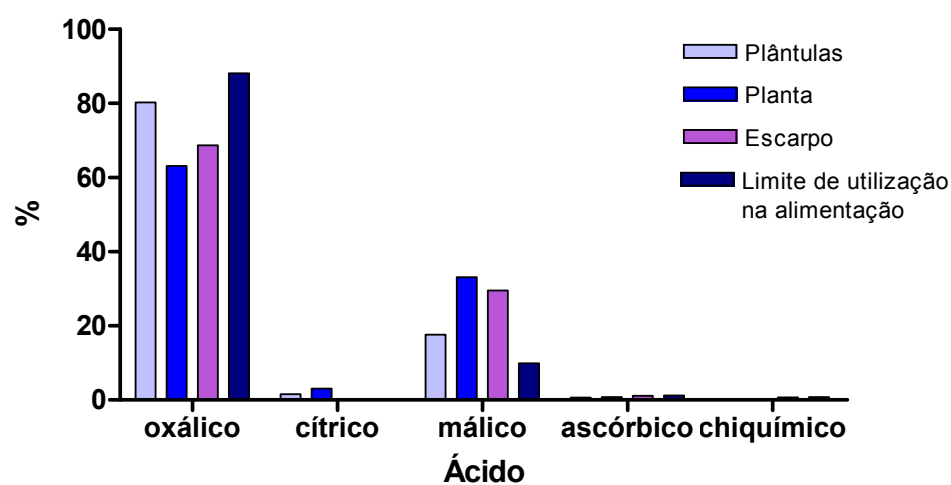


Figura 44. Perfil em ácidos orgânicos das amostras de *R. induratus* de crescimento em estufa (colheita de Outono/Inverno).

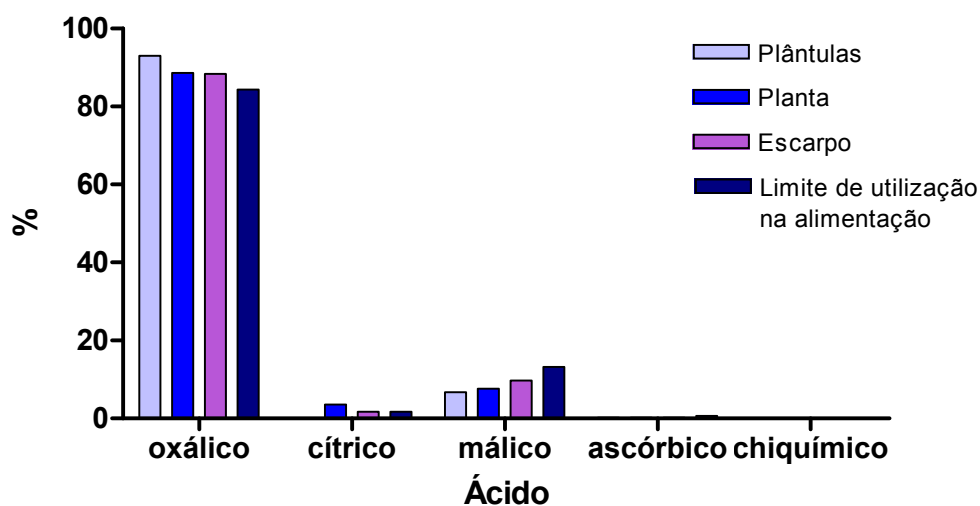


Figura 45. Perfil em ácidos orgânicos das amostras de *R. induratus* de crescimento em estufa (colheita de Primavera).

Nas amostras da colheita de Outono/Inverno o ácido oxálico sofre inicialmente uma diminuição na fase de planta para depois aumentar até à fase limite para utilização na alimentação. Nestas amostras o ácido málico sofre uma evolução contrária, atingindo a maior concentração no estado de desenvolvimento vegetativo.

Nas amostras colhidas na Primavera o perfil de ácidos orgânicos é mais estável ao longo do ciclo de desenvolvimento, ocorrendo uma pequena diminuição do ácido oxálico e um ligeiro aumento do ácido málico.

Os ácidos cítrico, ascórbico e chiquímico estão presentes em quantidades diminutas e sofrem pequenas variações com a maturação da planta.

De entre as amostras de estufa analisadas a amostra colhida no Outono/Inverno é a que apresenta o perfil em ácidos orgânicos mais próximo do observado para as amostras de campo durante a fase de escarpo. As amostras da colheita de Primavera apresentam concentrações de ácido oxálico substancialmente superiores às encontradas nas amostras de campo (tabela 7 e figura 45), o que poderá representar um risco acrescido de intoxicação oxálica. As amostras da colheita de Outono/Inverno apresentam menores teores em ácido oxálico, representando menor risco para a saúde humana quando ingeridas.

6.3. Actividade antioxidante de *R. induratus*

A segunda parte desta tese consistiu, como já foi referido, na avaliação da actividade antioxidante das folhas de *R. induratus*, visto ser esta a parte da planta mais utilizada na alimentação, sobretudo em sopas e saladas.

Para tal, foi determinada a actividade sequestrante do extracto aquoso das folhas (amostra 22) para algumas espécies reactivas de oxigénio e azoto, nomeadamente o ácido hipocloroso (HOCl) e o óxido nítrico ($^{\cdot}\text{NO}$), e ainda a actividade face ao radical DPPH.

O ensaio do DPPH fornece informação básica sobre a actividade anti-radicalar dos extractos.

O efeito do extracto aquoso das folhas de *R. induratus* na redução do DPPH está representado na figura 46.

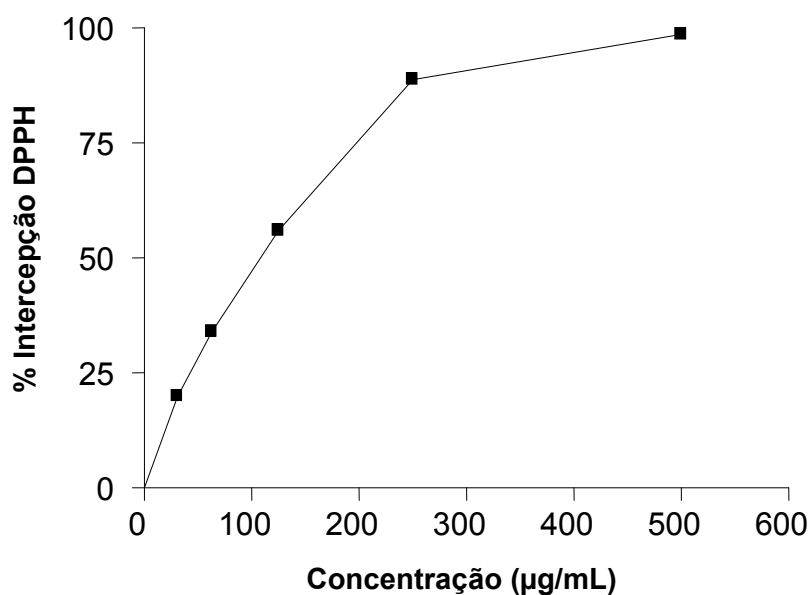


Figura 46. Efeito do extracto aquoso das folhas de *R. induratus* na redução do DPPH. Os resultados são apresentados sob a forma de média \pm erro padrão de três ensaios realizados em triplicado.

Os resultados indicam ocorrer intercepção do DPPH de modo dependente da concentração. O IC_{50}^4 determinado foi de 106,5 $\mu\text{g/ml}$.

Neste estudo, foi também avaliada a capacidade antioxidante de compostos de referência representativos dos compostos existentes no extracto de *R. induratus*, neste caso a luteolina-7-O-glucósido, para os compostos fenólicos, e o ácido oxálico, uma vez que é o ácido orgânico mais abundante.

O ácido oxálico não demonstrou actividade face ao radical DPPH enquanto a luteolina-7-O-glucósido exibiu forte actividade anti-radicalar, de modo dependente da concentração ($IC_{50} = 78,6 \mu\text{g/ml}$) (figura 47).

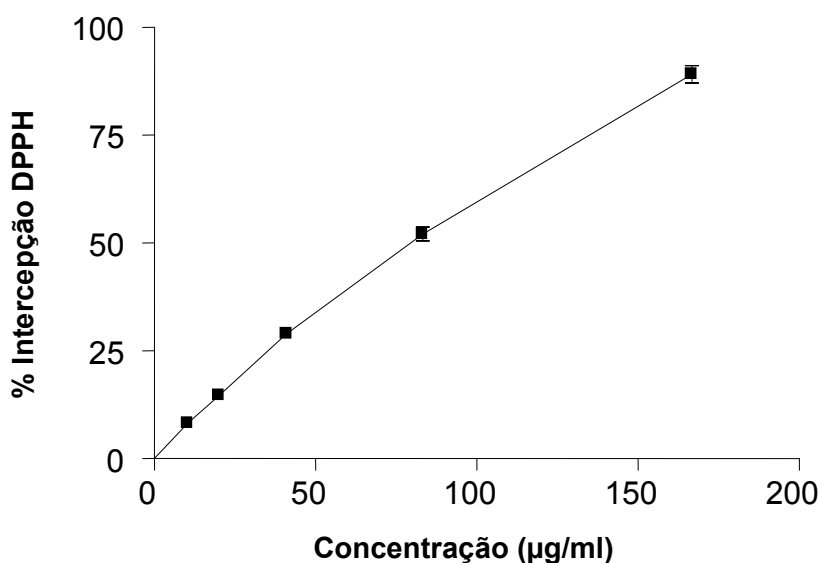


Figura 47. Efeito da luteolina-7-O-glucósido na redução do DPPH. Os resultados são apresentados sob a forma de média \pm erro padrão de três ensaios realizados em triplicado.

⁴ Concentração necessária para atingir 50% de redução do DPPH. Representa o grau de eficácia do extracto na intercepção do radical.

A determinação da actividade sequestrante para o óxido nítrico revelou que o extracto aquoso das folhas de *R. induratus* possui capacidade para interceptar esta espécie reactiva ($IC_{25} = 92,7 \mu\text{g/ml}$). A actividade observada foi dependente da concentração, como é possível verificar na figura 48.

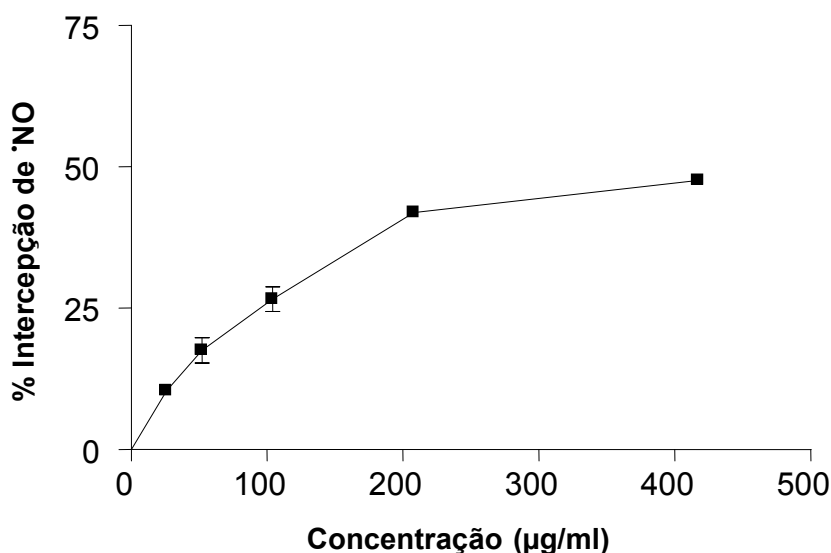


Figura 48. Efeito do extracto aquoso das folhas de *R. induratus* na interceptação do $\cdot\text{NO}$. Os resultados são apresentados sob a forma de média \pm erro padrão de três ensaios realizados em triplicado.

Foi igualmente testada a actividade do ácido oxálico e da luteolina-7-O-glucósido contra o $\cdot\text{NO}$, tendo-se verificado que o ácido oxálico não possui actividade contra este radical, enquanto a luteolina-7-O-glucósido tem um efeito protector dependente da concentração, sendo o IC_{50} de $22,5 \mu\text{g/ml}$ (figura 49).

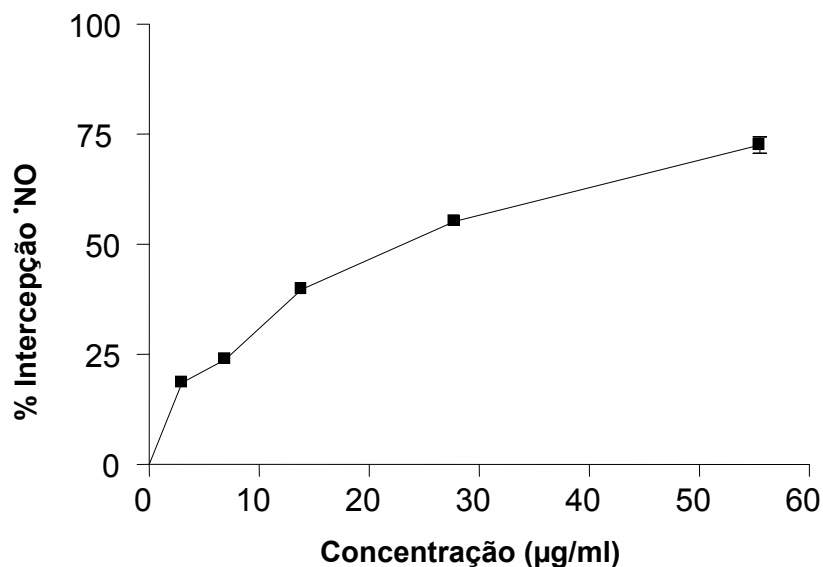


Figura 49. Efeito da luteolina-7-O-glucósido na intercepção do $\cdot\text{NO}$. Os resultados são apresentados sob a forma de média \pm erro padrão de três ensaios realizados em triplicado.

Relativamente ao ácido hipocloroso, os resultados deste trabalho demonstraram que o extracto das folhas de *R. induratus* possui uma menor actividade contra esta espécie reactiva (figura 50). De qualquer modo, o extracto tem capacidade para interceptar o HOCl e inibir a oxidação do TNB a DTNB, sendo o efeito observado dependente da concentração ($\text{IC}_{20}=171,3 \mu\text{g/ml}$).

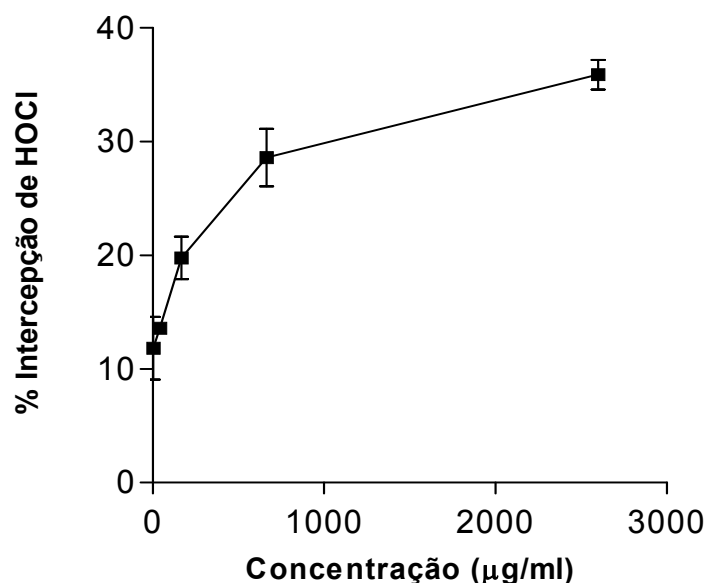


Figura 50. Actividade do extracto aquoso das folhas de *R. induratus* face ao ácido hipocloroso. Os resultados são apresentados sob a forma de média \pm erro padrão de três ensaios realizados em triplicado.

Como foi já referido (3.3.1.) o óxido nítrico e o ácido hipocloroso podem ser responsáveis pela formação de espécies mais reactivas, como, por exemplo, o radical hidroxilo.

Assim, a capacidade do extracto para sequestrar radicais superóxido e inibir a xantina oxidase, verificada anteriormente (Ferrerres *et al.*, 2006a), em conjunto com os resultados obtidos neste estudo, nomeadamente a capacidade para interceptar o \cdot NO e o HOCl, são de elevada importância, indicando o extracto das folhas de *R. induratus* como potente antioxidante, com actividade a nível da prevenção da formação de espécies reactivas e sequestro das mesmas.

A actividade anti-radicalar desta amostra face ao DPPH revelou-se superior à observada anteriormente para a mesma espécie por Ferrerres *et al.* (2006a) (IC_{50} =149,9 µg/ml), sob as mesmas condições experimentais. Este efeito poderá ser devido à maior

concentração em compostos fenólicos da amostra usada neste trabalho (62988,6 mg/kg), apesar de menor conteúdo em ácidos orgânicos (182,2 g/kg).

Atendendo aos resultados obtidos os compostos fenólicos darão um contributo importante para a actividade antioxidante do extracto das folhas de *R. induratus*, nomeadamente os derivados glicosilados da luteolina, da apigenina e dos ácidos ferúlico e caféico, identificados como constituintes maioritários do extracto.

A capacidade da luteolina e seus derivados para sequestrar radicais foi já anteriormente avaliada em diversos ensaios, nomeadamente na protecção da peroxidação de lipoproteínas de baixo peso molecular (LDL) induzida por Cu^{2+} (Wu *et al.*, 2005; Brown e Rice-Evans, 1998), actividade face ao DPPH (Du *et al.*, 2006; Es-Safi *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2005), intercepção de radicais hidroxilo gerados pelo sistema de Fenton (Shimoi *et al.*, 1994), inibição da oxidação num sistema composto por β -caroteno e ácido linoleico (Materska e Perucka, 2005; Burda e Oleszek, 2001), captação de radicais superóxido gerados pelo sistema enzimático xantina/xantina oxidase e supressão da formação de radicais superóxido induzida pela N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (Wu *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2002).

O potencial antioxidante da apigenina e seus derivados foi igualmente demonstrado em vários estudos, através da inibição da oxidação num sistema composto por β -caroteno e ácido linoleico (Materska e Perucka, 2005; Burda e Oleszek, 2001), quelatação de ferro no sistema de Fenton, sequestro de radicais hidroxilo gerados na fotólise do peróxido de hidrogénio e inibição da peroxidação lipídica (Moran *et al.*, 1997; Husain *et al.*, 1987).

Também o poder antioxidante dos ácidos hidroxicinâmicos foi evidenciado em diversos modelos experimentais. Os estudos incluem a capacidade para inibir a oxidação num sistema composto por β -caroteno e ácido linoleico (Materska e Perucka, 2005; Fukumoto e Mazza, 2000), quelatação de ferro no sistema de Fenton e inibição da oxidação do ácido linoleico (Moran *et al.*, 1997), sequestro do radical catião ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolono-6-sulfónico (ABTS^{•+}) (Nilsson *et al.*, 2005).

Além do importante contributo dos compostos fenólicos para a actividade antioxidante de alimentos vegetais, também os ácidos orgânicos (oxálico, málico,

ascórbico e cítrico) são conhecidos pelo seu efeito protector (Kayashima e Katayama, 2002). Neste estudo verificou-se que o ácido oxálico não possui capacidade para sequestrar espécies reactivas, nomeadamente o DPPH, o \cdot NO e o HOCl. Assim, os ácidos orgânicos poderão contribuir para a actividade antioxidante total do extracto das folhas de *R. induratus* através, por exemplo, da quelatação de metais envolvidos na geração de radicais oxidantes e não por interceptação directa dos mesmos.

Moreno-Jiménez *et al.* (2005) estudaram a capacidade da *R. induratus* para acumular mercúrio, funcionando como agente de biomonitorização da contaminação de solos e biomarcador de poluentes ambientais, além de poder ser utilizada na fitorremediação de solos contaminados.

Os resultados obtidos com o trabalho aqui desenvolvido poderão explicar a capacidade que a planta possui para resistir ao stress oxidativo provocado pela acumulação de mercúrio nos seus tecidos, sem apresentar sintomas de toxicidade.

Quando comparada com outros vegetais mais frequentemente utilizados na alimentação, e atendendo aos resultados aqui obtidos, é possível afirmar que a *R. induratus* representa uma excelente alternativa, uma vez que constitui uma interessante fonte de compostos bioactivos, nomeadamente compostos fenólicos e ácidos orgânicos.

De uma forma geral, as amostras de campo nos três estados fenológicos (desenvolvimento vegetativo, escarpo e limite de utilização na alimentação) possuem maiores teores de fenóis do que as folhas internas (1389,6 mg/kg) e externas (13337,4 mg/kg) de *Brassica oleracea* var. *costata*, a couve-tronchuda, um dos vegetais mais utilizados e consumidos em Portugal (Ferrerres *et al.*, 2006b). Os teores de compostos fenólicos determinados na *R. induratus* são igualmente superiores aos encontrados nas inflorescências de *B. oleracea* var. *costata* (195677,7 mg/kg), de *Brassica oleracea* var. *acephala*, a couve-galega (9455,4 mg/kg) e de *Brassica rapa* var. *rapa*, a nabiça (18383,8 mg/kg) (Sousa *et al.*, 2008a).

Da mesma forma, os extractos das folhas de *R. induratus* são substancialmente mais ricos em ácidos orgânicos do que os das folhas internas (23,3 g/kg) e externas (25,5 g/kg) de *B. oleracea* var. *costata* (Ferrerres *et al.*, 2006b), e das inflorescências de *B. oleracea* var. *costata* (49,0 g/kg), de *B. oleracea* var. *acephala* (163,1 g/kg) e de *B. rapa* var. *rapa* (38,0 g/kg) (Sousa *et al.*, 2008a).

Neste caso, a diferença deve-se sobretudo à presença de elevadas quantidades de ácido oxálico nas folhas de *R. induratus* que não foi detectado nos outros vegetais.

Em relação à actividade anti-radicalar face ao DPPH o extracto das folhas de *R. induratus* (escarpo) é mais potente ($IC_{50}=106,5 \mu\text{g/ml}$) do que os extractos das inflorescências de *B. oleracea* var. *costata* ($IC_{50}=754 \mu\text{g/ml}$), de *B. oleracea* var. *acephala* ($IC_{50}=565 \mu\text{g/ml}$) e de *B. rapa* var. *rapa* ($IC_{50}=774 \mu\text{g/ml}$) (Sousa *et al.*, 2008a) e das folhas internas ($IC_{25}=1192 \mu\text{g/ml}$) e externas ($IC_{25}=440 \mu\text{g/ml}$) de *B. oleracea* var. *costata*. (Ferrerres *et al.*, 2006b).

Tanto o extracto das folhas internas, como o das externas de *B. oleracea* var. *costata* exibiram uma fraca actividade contra o ácido hipocloroso ($IC_{20}>1000 \mu\text{g/ml}$). O mesmo aconteceu com o extracto das inflorescências de *B. oleracea* var. *costata*, *B. oleracea* var. *acephala* e *B. rapa* var. *rapa* ($IC_{10}=639 \mu\text{g/ml}$, $1186 \mu\text{g/ml}$ e $770 \mu\text{g/ml}$, respectivamente) (Sousa *et al.*, 2008a, Ferrerres *et al.*, 2006b). Quando comparados com os resultados obtidos neste trabalho, verifica-se que o extracto das folhas de *R. induratus* exibiu maior protecção face a esta espécie reactiva ($IC_{20}=171,3 \mu\text{g/ml}$).

Os resultados obtidos nos ensaios de avaliação da actividade sequestrante para o óxido nítrico sugerem que o extracto das folhas de *R. induratus* possui maior capacidade para interceptar o $\cdot\text{NO}$ ($IC_{50}=92,7 \mu\text{g/ml}$) do que os extractos das folhas internas ($IC_{50}=2228 \mu\text{g/ml}$) e externas ($IC_{50}=884 \mu\text{g/ml}$) de *B. oleracea* var. *costata*. (Sousa *et al.*, 2008b), podendo fornecer maior protecção face a este radical.

7. Conclusões

Os efeitos benéficos para a saúde relacionados com o consumo de fruta e vegetais têm sido amplamente estudados nos últimos anos. Estes efeitos são atribuídos principalmente ao seu conteúdo em antioxidantes e outros micronutrientes, entre eles flavonóides, carotenóides, tocoferóis, vitamina C e minerais.

No trabalho desenvolvido nesta Dissertação de Mestrado em Controlo de Qualidade, Especialização em Água e Alimentos, procedeu-se à caracterização química dos extractos aquosos das folhas de *R. induratus*, no que se refere a compostos fenólicos e ácidos orgânicos. Foi também avaliada a actividade antioxidante dos mesmos extractos. Com base nos resultados obtidos foram retiradas as conclusões enunciadas em seguida.

- Os resultados da análise por HPLC-DAD do extracto aquoso das folhas de *R. induratus* de diferentes origens geográficas mostram um perfil de compostos fenólicos idêntico, constituído por 14 compostos: cafeoil-hexósido, *p*-cumaroil-hexósido, feruloil-hexósido, sinapoil-hexósido, quercetina-6-*C*-hexósido, luteolina-8-*C*-hexósido, luteolina-2''-*O*-pentósido-8-*C*-hexósido, luteolina-6-*C*-hexósido, apigenina-2''-*O*-pentósido-8-*C*-hexósido, apigenina-6-*C*-hexósido, quercetina-3-*O*-hexósido, quercetina-3-*O*-rutinósido, diosmetina-7-*O*-hexósido e isoramnetina-3-*O*-rutinósido.
- As amostras de campo são mais ricas em compostos fenólicos do que as amostras de estufa.
- De uma forma geral, a quantidade de fenóis totais aumenta ao longo do ciclo fenológico para as amostras de campo e para as de colheita de Outono/Inverno em estufa; para as amostras de estufa colhidas na Primavera ocorre um decréscimo no fim do ciclo.
- O composto maioritário nas amostras de estufa, em todos os estados de desenvolvimento, é a apigenina-6-*C*-hexósido.
- Nas amostras de campo o composto maioritário altera-se ao longo do ciclo: no início o composto mais abundante é a apigenina-6-*C*-hexósido, seguido da luteolina-6-*C*-hexósido, invertendo-se a relação ao longo do ciclo de desenvolvimento da planta.

- O perfil em compostos fenólicos das amostras de estufa colhidas no Outono/Inverno é o que mais se aproxima do perfil das amostras de campo.
- A análise por HPLC-UV do extracto aquoso das folhas de *R. induratus* de diferentes origens geográficas revelou um perfil constituído por cinco ácidos orgânicos: oxálico, cítrico, málico, ascórbico e chiquímico.
- De modo geral, o teor total de ácidos orgânicos diminui ao longo do ciclo vegetativo.
- Nas amostras de campo, o ácido málico é o composto maioritário na fase do desenvolvimento vegetativo, seguido do ácido oxálico. Contudo, no estágio limite para utilização na alimentação o ácido oxálico torna-se o composto mais abundante.
- Nas amostras de estufa, o composto maioritário é sempre o ácido oxálico. O ácido málico comporta-se de maneira distinta nos dois conjuntos de amostras: nas amostras de Outono/Inverno, apresenta o seu maior teor no estado de desenvolvimento vegetativo decrescendo na fase final, enquanto que nas amostras de Primavera aumenta ligeiramente ao longo de todo o ciclo.
- O perfil em ácidos orgânicos das amostras de estufa colhidas no Outono/Inverno é o que mais se aproxima do observado para as amostras de campo.
- O extracto aquoso das folhas de *R. induratus* revelou capacidade para interceptar os radicais DPPH e $\cdot\text{NO}$ e o HOCl, de modo dependente da concentração.
- A actividade antioxidante do extracto das folhas de *R. induratus* poderá ser justificada pela presença de diversos compostos fenólicos, entre eles os derivados glicosilados da luteolina, da apigenina e dos ácidos ferúlico e caféico.
- O efeito protector face ao $\cdot\text{NO}$ e HOCl é particularmente importante, porque, em conjunto com a capacidade para interceptar o radical superóxido verificada em estudos anteriores, permite prevenir a formação de outras espécies reactivas de oxigénio e azoto.

O presente trabalho confirmou que as folhas de *R. induratus* representam uma valiosa fonte de compostos fenólicos e ácidos orgânicos com potencial biológico, uma vez que os seus extractos possuem capacidade para eficientemente sequestrar espécies reactivas oxidantes. Estas características poderão potenciar a utilização da *R. induratus* na alimentação, como fonte de suplementos antioxidantes, ou ainda no desenvolvimento de alimentos funcionais (alimentos com benefícios para a saúde).

Devido ao elevado teor em ácido oxálico recomenda-se alguma precaução no seu consumo, devido à possibilidade de intoxicação oxálica, sobretudo em crianças.

Outras pesquisas devem ser realizadas visando complementar os resultados aqui obtidos, nomeadamente a avaliação do efeito protector dos extractos *in vivo*.

8. Referências bibliográficas

Alfawaz MA. Chemical composition of hummayd (*Rumex vesicarius*) grown in Saudi Arabia. J Food Compost Anal 2006 Sep; 19: 552-5.

Andrade PB, Seabra RM. Phenolic compounds, analysis by HPLC. In: Cazes J, editor. Encyclopedia of Chromatography. 2nd ed. New York: Taylor & Francis; 2005. p. 215-23.

Arts I, Hollman P. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. Am J Clin Nutr 2005 Jan; 81 (suppl): 317S-25S.

Barbaste M, Berke B, Dumas M, Soulet S, Delaunay JC, Castagnino C, et al. Dietary antioxidants, peroxidation and cardiovascular risks. J Nutr Health Aging 2002 May; 6 (3): 209-23.

Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutr Rev 1998 Nov; 56 (11): 317-33.

Brown JE, Rice-Evans CA. Luteolin-rich artichoke extract protects low density lipoprotein from oxidation in vitro. Free Radic Res 1998 Sep; 29 (3): 247-55.

Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3^e éd. Paris: Tec & Doc; 1999.

Burda S, Oleszek W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. J Agric Food Chem 2001 May; 49 (6): 2774-9.

Burney S, Caulfield JL, Niles JC, Wishnok JS, Tannenbaum SR. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. Mutat Res 1999 Mar; 424 (1-2): 37-49.

Croft KD. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. Ann N Y Acad Sci 1998 Nov; 854: 435-42.

Cunha AP. Farmacognosia e Fitoquímica. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 2005.

Cunha AP, Silva AP, Roque OR. Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 2003. p. 152-53.

Dashek WV, Micales JA. Isolation, Separation, and Characterization of Organic Acids. In: Dashek WV, editors. Methods in plant biochemistry and molecular biology. Boca Raton, FL: CRC Press; 1997. p. 107-109.

Dermarderosian A, Bentler JA. The Review of Natural Products. 3rd ed. St. Louis, MO: Facts and Comparisons; 2002. p. 772.

Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. Prog Neurobiol 2000 Dec; 62 (6): 649-71.

Du Q, Xu Y, Li L, Zhao Y, Jerz G, Winterhalter, P. Antioxidant constituents in the fruits of *Luffa cylindrica* (L.) Roem. J Agric Food Chem 2006 Mai; 54 (12): 4186-90.

Es-safi NE, Khelifi S, Kerhoas L, Kollmann A, Abbouyi A, Ducrot PH. Antioxidant constituents of the aerial parts of *Globularia alypum* growing in Morocco. J Nat Prod 2005 Aug; 68 (8): 1293-96.

Ferreira F, Ferreira R, Duarte JA. Stress oxidativo e dano oxidativo muscular esquelético: influência do exercício agudo inabitual e do treino físico. Rev Port Cien Desp 2007; 7 (2): 257-75.

Ferreres F, Gil-izquierdo A, Andrade PB, Valentão P, Tomás-Barberán FA. Characterization of C-glycosyl flavones O-glycosylated by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. J Chromatogr A 2007 Aug; 1161 (1-2): 214-23.

Ferreres F, Ribeiro V, Izquierdo AG, Rodrigues MA, Seabra RM, Andrade PB, Valentão P. *Rumex induratus* Leaves: an Interesting Dietary Source of Potential Bioactive Compounds. J Agric Food Chem 2006a Jul; 54 (16): 5782-89.

Ferreres F, Sousa C, Vrchovska V, Valentão P, Pereira JA, Seabra RM, Andrade PB. Chemical composition and antioxidant activity of tronchuda cabbage internal leaves. Eur Food Res Technol 2006b Jan; 222 (1-2): 88-98.

Fitoterapia – Vademecum de Prescripción. 3^a ed. Barcelona: Masson; 1998. p. 51.

Franco JA. Nova Flora de Portugal (Continente e Açores). Lisboa: Edição do Autor; 1971. p. 82-87.

Glew RH, Ayaz FA, Sanz C, Vanderjagt DJ, Huang HS, Chuang LT, Strnad M. Changes in sugars, organic acids and amino acids in medlar (*Mespilus germanica* L.) during fruit development and maturation. Food Chemistry 2003 Nov; 83 (3): 363-69.

Halliwel B, Aeschbach R, Loliger J, Aruoma OI. The characterization of antioxidants. Food Chem Toxicol 1995 Jul; 33 (7): 601-617.

Halliwel B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. Am J Clin Nutr 1993 May; 57(5): 715S -25S.

Harborne JB, Williams C.A. Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry 2000 Nov; 55 (6): 481-504.

Harborne JB. General Procedures and Measurement of Total Phenolics. In: Dey PM, Harborne JB, editors. Methods in plant biochemistry, vol. I: Plant Phenolics. London: Academic Press; 1989. p. 1-27.

Hellefont JV. Compendium de Phytotherapie. Bruxelles: Association Pharmaceutique Belge; 1986. p. 351-353.

Heim KYE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. J Nutr Biochem 2002 Oct; 13 (10): 572-584.

Heinrich M, Nebel S, Leonti M, Rivera D, Obon C. 'Local Food-Nutraceuticals': bridging the gap between local knowledge and global needs. Forum Nutr 2006; 59: 1-17.

Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. J Agric Food Chem 2005 Mar; 53 (6): 1841-56.

Husain SR, Cillard J, Cillard P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. Phytochemistry 1987; 26 (9): 2489-91.

Kayashima T, Katayama T. Oxalic acid is available as a natural antioxidant in some systems. *Biochim Biophys Acta* 2002 Oct; 1573 (1): 1-3.

Kays SJ. Development of plants and plant parts. In: *Postharvest Physiology of Perishable Plant Products*. New York: AVI Publishing, Van Nostrand Reinhold; 1991. p. 257–333.

Lairon D. Intervention studies on Mediterranean diet and cardiovascular risk. *Mol Nutr Food Res* 2007 Oct; 51 (10): 1209-14.

Libert B, Franceschi VR. Oxalate in crop plants. *J Agric Food Chem* 1987 Nov; 35 (6): 926-38.

Liebler DC, Reed DJ. Free-radical defense and repair mechanisms. In: Wallace KB, editor. *Free radical toxicology*. Washington: Taylor & Francis; 1997. p. 141-73.

Liu RH. Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action. *J Nutr* 2004 Dec; 134 (12): 3479S-85S.

Lopez-Bucio J, Nieto-Jacobo MF, Ramirez-Rodriguez VV, Herrera-Estrella L. Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. *Plant Sci* 2000 Dec; 160 (1): 1-13.

Lu J, Feng X, Sun Q, Lu H, Manabe M, Sugahara K *et al*. Effect of six flavonoid compounds from *Ixeris sonchifolia* on stimulus-induced superoxide generation and tyrosyl phosphorylation in human neutrophils. *Clin Chim Acta* 2002 Feb; 316 (1-2): 95-9.

Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB. *The systematic identification of flavonoids*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 1970. p. 41-60.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004 May; 79 (5): 727-47.

Markham KR. Flavones, flavonols and their glycosides. In: Dey PM, Harborne JB, editors. *Methods in plant biochemistry*, vol. 1: *Plant Phenolics*. London: Academic Press; 1989. p. 197-232.

Markham KR. Ultraviolet-visible absorption spectroscopy. In: Treherne JE, Rubery PH, editors. Techniques of flavonoid identification. London: Academic Press; 1982.

Masson, P. Influence of organic solvents in the mobile phase on the determination of carboxylic acids and inorganic anions in grape juice by ion chromatography. J Chromatogr A 2000 Jun; 881 (1-2): 387-94.

Materska M, Perucka I. Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L). J Agric Food Chem 2005 Mar; 53 (5): 1750-6.

Merken HM, Beecher GR. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. J Agric Food Chem 2000 Feb; 48 (3): 577-99.

Moran JF, Klucas RV, Grayer RJ, Abian J, Becana M. Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: prooxidant and antioxidant properties. Free Radic Biol Med 1997; 22 (5): 861-70.

Moreno-Jimenez E, Gamarra R, Carpena-Ruiz RO, Millan R, Penalosa JM, Esteban E. Mercury bioaccumulation and phytotoxicity in two wild plant species of Almaden area. *Chemosphere* 2006 Jun; 63 (11): 1969-73.

Naczki M, Shahidi F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. J Pharm Biomed Anal 2006 Aug; 41 (5): 1523-42.

Newall CA, Anderson LA, Phillipson JD. Herbal Medicines – A guide for health-care professionals. London: The Pharmaceutical Press; 1996. p. 274.

Nilsson J, Pillai D, Önning G, Persson C, Nilsson Å, Åkesson B. Comparison of the 2,2'-azinobis-3-ethylbenzotiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) methods to assess the total antioxidant capacity in extracts of fruit and vegetables. Mol Nutr Food Res 2005 Mar; 49 (3): 239-46.

Ong BT, Nazimah SAH, Osman A, Quek SY, Voon YY, Hashim DM, Chew PM, Kong YW. Chemical and flavour changes in jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) cultivar J3 during ripening. Postharvest Biology and Technology 2006 Jun; 40 (3): 279-86.

Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite: in Health and disease. *Physiol Rev* 2007 Jan; 87 (1): 315-424.

PDR for Herbal Medicines. Montvale, NJ: Medical Economics Company; 1998. p. 1105-07.

Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, Brighenti F. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different *in vitro* assays. *J Nutr* 2003 Sep; 133 (9): 2812-19.

Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agric Food Chem* 2000 Aug; 48 (8): 3396-402.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci* 1997 Apr; 2 (4): 152-9.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 1996; 20 (7): 933-56.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolics flavonoids. *Free Radic Res* 1995 Apr; 22(4): 375-83.

Ribéreau-Gayon P. *Les Composés Phénoliques des Végétaux*. Paris: Dunod; 1968.

Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. *Annu Rev Nutr* 2002 Jul; 22 (19-34): 19-34.

Seabra RM, Andrade PB, Valentão P, Fernandes E, Carvalho F, Bastos ML. Antioxidant compounds extracted from several plant materials. In: Fingerman M, Nagabhushanam R, editors. *Biomaterials from aquatic and terrestrial organisms*. Enfield (NH) USA: Science; 2006. p. 115-74.

Shi H, Noguchi N, Niki E. Introducing natural antioxidants. In: Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M, editors. Antioxidants in Food – Practical Applications. Boca Raton, USA: CRC; 2001. p. 147-55.

Shimoi K, Masuda S, Furugori M, Esaki S, Kinae N. Radioprotective effect of antioxidative flavonoids in gamma-ray irradiated mice. *Carcinogenesis* 1994 Nov; 15(11): 2669-72.

Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 1993 Jul; 215 (2): 213-9.

Silva BM, Andrade PB, Valentão P, Ferreres F, Seabra RM, Ferreira MA. Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp, peel, and seed) and jam: antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 2004 Jul; 52 (15): 4705-12.

Silva BM, Andrade PB, Mendes GC, Seabra RM, Ferreira MA. Study of the organic acids composition of quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit and jam. *J Agri Food Chem* 2002 Apr; 50 (8), 2313-7.

Sousa C, Taveira M, Valentão P, Fernandes F, Pereira JA, Estevinho L, *et al.* Inflorescences of Brassicacea species as source of bioactive compounds: a comparative study. *Food Chem* 2008a Oct; 110 (4): 953-61.

Sousa C, Valentão P, Ferreres F, Seabra RM, Andrade PB. Tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC): scavenger of reactive nitrogen species. *J Agri Food Chem* 2008b Jun; 56 (11): 4205-11.

Sousa C, Valentão P, Rangel J, Lopes G, Pereira JA, Ferreres F, *et al.* Influence of two fertilization regimens on the amounts of organic acids and phenolic compounds of tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. Var. *costata* DC). *J Agri Food Chem* 2005 Nov; 53 (23): 9128-32.

Stalikas CD. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J Sep Sci* 2007 Dec; 30 (18): 3268-95.

Tapsell LC, Hemphill I, Cobiac L, Patch CS, Sullivan DR, Fenech M, *et al.* Health benefits of herbs and spices: the past, the present, the future. *Med J Aust* 2006 Aug; 185 (4): S4-24.

Tolrà RP, Poschenrieder C, Luppi B, Barceló J. Aluminium-induced changes in the profiles of both organic acids and phenolic substances underlie Al tolerance in *Rumex acetosa* L. Environ Exp Botany 2004 Nov; 54 (3): 231-8.

Tseng TH, Kao ES, Chu CY, Chou FP, Lin HW, Wang CJ. Protective effects of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. against oxidative stress in rat primary hepatocytes. Food Chem Toxicol 1997 Dec; 35 (12): 1159-64.

Tsikis D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2007 May; 851 (1-2): 51-70.

Urquiaga I, Leighton F. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. Biol Res 2000; 33 (2): 55-64.

Valdés B, Talavera S, Fernández-Galiano E. Flora Vascular de Andalucía Occidental. Barcelona: Ketres Editora; 1987. p. 287.

Valentão P, Andrade PB, Rangel J, Ribeiro B, Silva BM, Baptista P, Seabra RM. Effect of the conservation procedure on the contents of phenolic compounds and organic acids in chanterelle (*Cantharellus cibarius*) mushroom. J Agric Food Chem 2005a Jun; 53 (12): 4925-31.

Valentão P, Lopes G, Valente M, Barbosa P, Andrade PB, Silva BM *et al.* Quantitation of nine organic acids in wild mushrooms. J Agric Food Chem 2005b May; 53 (9): 3626-30.

Valentão P. Limonete, Hipericão-D-Gerês, Cardo-Do-Coalho, Fel-Da-Terra-Metodologias de Controlo de Qualidade com base na fracção fenólica. Estudos de acção antioxidante e hepatoprotectora. [Tese de Doutoramento]. Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; 2003.

Valentão P, Fernandes E, Carvalho F, Andrade PB, Seabra RM, Bastos ML. Antioxidative properties of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) infusion against superoxide radical, hydroxyl radical, and hypochlorous acid. J Agric Food Chem 2002 Aug; 50 (17): 4989-93.

van Acker SA, Tromp MN, Haenen GR, van Der Vijgh WJ, Bast A. Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. *Biochem Biophys Res Commun* 1995 Sep; 214 (3): 755-9.

van Sumere CF. Phenols and Phenolic Acids. In: Dey PM, Harborne JB editors. *Methods in plant biochemistry*, vol. 1: Plant Phenolics. London: Academic Press; 1989. p. 29-68.

Vaughan JG, Geissler CA. *The New Oxford Book of Food Plants*. New York: Oxford University Press; 1997. p. 196.

Vrchovská V, Spilková J, Valentão P, Sousa C, Andrade PB, Seabra RM. Antioxidative properties and phytochemical composition of *Ballota nigra* infusion. *Food Chem* 2007; 105 (4): 1396-403.

WHO. *Global strategy on diet, physical activity and health*. Geneva: World Health Organization; 2004.

WHO. *Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases*. Disease Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. WHO Technical Report Series, No. 916. Geneva: World Health Organization; 2003.

WHO. *Quantifying Selected Major Risks to Health*. In: *The World Health Report 2002: reducing risks, promoting healthy life*. Geneva: World Health Organization; 2002. p. 49-97.

Wu MJ, Huang CL, Lian TW, Kou MC, Wang L. Antioxidant activity of *Glossogyne tenuifolia*. *J Agric Food Chem* 2005 Aug; 53 (16): 6305-12.

Jardim Botânico da UTAD [*on line*]. Disponível em:

aguiar.hvr.utad.pt/pt/herbario/cons_req.asp [acedido em 04/02/2008]

Plantamed – Plantas e ervas medicinais e fitoterápicos [*on line*]. Disponível em:

www.plantamed.com.br/GEN/Rumex.htm [acedido em 04/02/2008]

Plants for a Future [*on line*]. Disponível em:

www.pfaf.org/database/search_name.php?ALLNAMES=Rumex [acedido em 04/02/2008]

Universidad de Extremadura [*on line*]. Disponível em:

www.unex.es/botanica/herbarium/html/rumind.htm [acedido em 04/02/2008].