

# Agradecimentos

Aos meus orientadores, Professor Doutor António José Geraldês de Mendonça e Professora Doutora Dina Isabel Malheiros Dinis de Mendonça, do Departamento de Química da Universidade da Beira Interior, pelo apoio, disponibilidade e saber científico que me transmitiram ao longo deste trabalho e nas unidades curriculares que leccionam no curso de bioquímica onde fui discente. Em particular agradeço-lhes a amizade e o optimismo nos momentos de maior desânimo, bem como a oportunidade de realizar este trabalho.

Em especial aos meus pais, irmã e avó, pelo incentivo e amor que me transmitiram na realização deste trabalho e durante toda a minha vida, e pela possibilidade de poder alcançar mais uma etapa.

À Raquel Fontes, pelo apoio, paciência e incentivo ao longo dos últimos meses.

A Deus pelo dom da vida e pela protecção nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos e colegas de laboratório e mestrado que sempre me proporcionaram um bom ambiente de trabalho e que de algum modo me apoiaram durante a realização do mesmo. Em particular à Liliana pela amizade, companheirismo, e ajuda indispensável em determinadas etapas.

Aos meus amigos e colegas de quarto da residência universitária, pelo apoio no dia-a-dia, amizade e momentos de laser.

Aos meus amigos e colegas do coro da Universidade da Beira Interior, pelos bons momentos que passámos juntos durante as actuações e pelo incentivo.

A todos os professores e funcionários que contribuíram não só para o meu desenvolvimento profissional, mas também pessoal e social.

À Universidade da Beira Interior, por todas as oportunidades profissionais e não profissionais que me disponibilizou ao longo da licenciatura e mestrado.

Ao Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS) e à Unidade de Materiais Têxteis e Papeleiros (Departamento de Química), pelo apoio à realização do projecto.

Por ultimo à Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), pelo apoio prestado ao projecto FCOMP-01-0124-FEDER-007430-“Plantas medicinais Angolanas: actividade biológica”, com participação FEDER.

A todos o meu Muito Obrigado.

# Resumo

Nos últimos anos tem crescido o interesse pela descoberta de novos compostos antioxidantes, a partir de fontes naturais, aplicáveis quer na indústria alimentar como na medicina preventiva.

Neste trabalho foi estudada a capacidade antioxidante de extractos de dez plantas medicinais Angolanas em diferentes solventes orgânicos (*Hymenodictyon floribundum*, *Parinari pumila*, *Tinnea antiscorbutica*, *Eragrostis viscosa*, *Xylopia odoratissima*, *Peucedanum angolense*, *Boscia microphylla*, *Adenodolichos huillensis*, *Cassia occidentalis* e *Rhus kirkii*). A capacidade antioxidante foi avaliada por quatro métodos *in vitro* (ABTS, DPPH, TBA e Valor peróxido). A concentração de compostos fenólicos totais nos extractos foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteu.

Os compostos fenólicos totais variam entre 40,63mg/g extracto  $\pm$  0,00 para a *Eragrostis viscosa* em diclorometano e 549,27mg/g extracto  $\pm$  0,01 para a *Parinari pumila* aquoso. A percentagem mais elevada de inibição de radicais livres de DPPH, quando em comparação com uma solução de Trolox na mesma concentração dos extractos (69,79 %  $\pm$  0,43), foi observada no extracto de *Parinari pumila* em metanol com um valor de 36,19 %  $\pm$  0,21. Para o método de ABTS, o valor mais alto de TEAC e de percentagem de inibição, foi observado para o extracto de *Hymenodictyon floribundum* em acetato de etilo, respectivamente com o valor de 3,24 mM Trolox/g extracto  $\pm$  0,52 e 5,71 %  $\pm$  0,52. No teste de TBA, os extractos de *Parinari pumila* e *Hymenodictyon floribundum* são alguns dos que se mostraram menos eficazes na prevenção da oxidação do ácido linoleico, embora onze dos extractos tenham apresentado uma capacidade antioxidante equivalente à do BHA. Relativamente ao valor peróxido, o extracto com melhor capacidade em diminuir a oxidação ao longo dos oitos dias, foi o de *Adenodolichos huillensis* folhas aquoso, com um valor de 37,47meq / g extracto  $\pm$  0,20.

Uma vez que a composição química dos diferentes extractos não é conhecida, será necessário isolar e purificar os diferentes compostos químicos presentes nos extractos.

Palavras-chave: ABTS, DPPH, TBA, Valor peróxido, Folin-Ciocalteu, Trolox, Antioxidantes, compostos fenólicos.

# Abstract

In recent years there has been growing interest in the discovery of new antioxidant compounds from natural sources, apply whether the food industry and in preventive medicine.

In this work the antioxidant capacity of extracts of ten medicinal plants from Angola in different organic solvents (*Hymenodictyon floribundum*, *Parinari pumila*, *Tinnea antiscorbutica*, *Eragrostis viscosa*, *Xylopi odoratissima*, *Peucedanum angolense*, *Boscia microphylla*, *Adenodolichos huillensis*, *Cassia occidentalis* e *Rhus kirkii*), was studied. The antioxidant capacity was evaluated by four *in vitro* methods (ABTS, DPPH, TBA and Peroxide value). The concentration of total phenolic compounds in the extracts was determined by Folin-Ciocalteu method.

The total phenolic compounds ranging from 40,63 mg / g extract  $\pm$  0,00 for *Eragrostis viscosa* in dichloromethane and 549,27 mg / g extract  $\pm$  0,01 for *Parinari pumila* aqueous. The highest percentage of inhibition of DPPH free radicals, when compared with a solution of Trolox in the same concentration of extracts (69,79 %  $\pm$  0,43), was observed in the extract of *Parinari pumila* in methanol with a value of 36,19 %  $\pm$  0,21. For the method of ABTS, the highest value of TEAC and percentage of inhibition was observed for the extract *Hymenodictyon floribundum* in ethyl acetate, respectively with a value of 3,24 mM Trolox / g extract  $\pm$  0,52 and 5,71%  $\pm$  0,52. In the test of TBA, the extracts of *Parinari pumila* and *Hymenodictyon floribundum* are among those who were less effective in preventing the oxidation of linoleic acid, although eleven of extracts have an antioxidant capacity equivalent to that of BHA. For the peroxide value, the extract with better ability in reduce oxidation during the eight days, was *Adenodolichos huillensis* leaves aqueous, with a value of 37,47meq / g extract  $\pm$  019.

Since the chemical composition of different extracts is not known, it is necessary to isolate and purify the different chemical compounds present in the extracts.

Keywords: ABTS, DPPH, TBA, Peroxide value, Folin-Ciocalteu, Trolox, Antioxidants, phenolic compounds.

# Abreviaturas

- ABTS** – 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato  
**ABTS<sup>•+</sup>** – Catião radicalar 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato  
**AOCS** – *American Oil Chemists' Society*  
**ATP** – Trifosfato de adenosina  
**APX** – Peroxidase do ascorbato  
**BHT** – Butil-hidroxitolueno  
**BHA** – Butil-hidroxianisole  
**CAT** – Catalase  
**CO<sub>3</sub><sup>•-</sup>** – Radical anião carbonato  
**CO<sub>2</sub><sup>•-</sup>** – Radical anião dióxido de carbono  
**DPPH** – 1,1-difenil-1-2-picrilhidrazil  
**DPPH<sup>•</sup>** – Radical 1,1-difenil-1-2-picrilhidrazil  
**EC<sub>50</sub>** – Concentração eficiente  
**ESR** – Ressonância electrónica de spin  
**EPR** – Ressonância paramagnética electrónica  
**ET** – Transferência de um electrão  
**FC** – Folin-Ciocalteu  
**FRAP** – *Ferric reducing antioxidant power assay*  
**FADH<sub>2</sub>** – Flavina adenina dinucleotídeo  
**GPX ou GSH-P<sub>x</sub>** – Glutaciona peroxidase  
**GSH** – Glutaciona reduzida  
**GSSH** – Glutaciona oxidada  
**HAT** – Transferência de um átomo de Hidrogénio  
**HPLC** – Cromatografia líquida de alta eficiência  
**HPLC-MS** – Cromatografia líquida de alta eficiência - espectrometria de massa  
**H<sup>•</sup>** – Radical de hidrogénio  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Peróxido de di-hidrogénio  
**HOCl** – Ácido hipocloroso  
**HOBr** – Ácido hipobromoso  
**HO<sub>2</sub><sup>•</sup>** – Radical hidroperóxido  
**HO<sup>•</sup>** – Radical hidroxilo  
**KI** – Iodeto de potássio

**MDA** – Malonaldeído

**MeOH** – Metanol

**MPO** – mieloperoxidase

**NADPH** – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma reduzida)

**NOs** – Sintetases do óxido nítrico

**2NO<sub>2</sub><sup>•</sup>** – Radical dióxido de azoto

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**ORAC** – Ensaio da capacidade de absorção do radical oxigénio

**O<sub>3</sub>** – Ozono

**ONNO<sup>•</sup>** – Radical anião hiponitrito

**ONOOH** – Ácido peroxinitroso

**ONOOCO<sub>2</sub><sup>-</sup>** – Anião nitrosoperoxicarbonato

**ONOO<sup>-</sup>** – Anião peroxinitrito

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>** – Radical anião superóxido

**PA** – Ácido fosfórico

**PG** – Propil galato

**PUFA<sub>s</sub>** – Ácidos gordos polinsaturados

**PV** – Valor peróxido

**RE** – Retículo endoplasmático

**RNS** – Espécies reactivas de azoto

**ROS** – Espécies reactivas de oxigénio

**RO<sub>2</sub><sup>•</sup>** – Radical peroxilo

**RO<sup>•</sup>** – Radical Alcoxilo

**SOD** – Superóxido dismutase

**SE** – Erro padrão

**TBA** – Ácido 2-tiobarbitúrico

**TBARS** – Substâncias reactivas ao ácido tiobarbitúrico

**TBHQ** – Butilhidroquinona terciária

**TCA** – Ácido tricloroacético

**TEAC** – Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox

**TEC<sub>50</sub>** – Tempo necessário para atingir a concentração eficiente

**TEP** – 1,1,3,3-tetrametoxipropano

**TOSC** – Capacidade total de remoção de oxiradicaís

**TRAP** – *Total radical-trapping antioxidant parameter assay*

**UV** – Radiação ultravioleta

# Índice

1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Uso de plantas na medicina tradicional.....	1
1.2 Preparação dos extractos .....	1
1.2.1 Métodos de extracção de compostos de plantas .....	1
1.2.2 Escolha do solvente .....	3
1.3 Caracterização das plantas utilizadas no estudo.....	5
1.3.1 <i>Hymenodictyon floribundum</i> .....	5
1.3.2 <i>Parinari pumila</i> .....	6
1.3.3 <i>Tinnea antiscorbutica</i> .....	8
1.3.4 <i>Eragrostis viscosa</i> .....	9
1.3.5 <i>Xylopiya odoratissima</i> .....	10
1.3.6 <i>Peucedanum angolense</i> .....	11
1.3.7 <i>Boscia microphylla</i> .....	12
1.3.8 <i>Adenodolichos huillensis</i> .....	13
1.3.9 <i>Cassia occidentalis</i> .....	14
1.3.10 <i>Rhus kirkii</i> .....	16
1.4 Radicais livres .....	17
1.4.1 Actividade dos radicais .....	17
1.4.2 Oxigénio e os seus radicais.....	18
1.4.3 Produção de ROS e RNS .....	19
1.4.4 Efeitos biológicos das ROS e RNS.....	21
1.4.5 Mecanismos de destoxificação das ROS e RNS.....	22
1.4.6 Oxidação lípidica .....	23
1.5 Antioxidantes .....	24
1.5.1 Classificação e modo de acção dos antioxidantes .....	25
1.5.2 Antioxidantes sintéticos e naturais .....	26
1.6 Métodos para avaliar a capacidade antioxidante.....	26
1.6.1 Método ABTS .....	27
1.6.2 Método DPPH .....	30

1.6.3 Método do TBA .....	33
1.6.4 Valor peróxido.....	35
1.7 Métodos para a determinação de compostos fenólicos totais .....	36
1.7.1 Método de Folin-Ciocalteu.....	36
1.8 Objectivo do trabalho .....	38
<b>2 – MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
2.1 Material e equipamento.....	38
2.1.1 Material.....	38
2.1.2 Reagentes .....	39
2.2 Técnicas experimentais .....	40
2.2.1 Método Folin-Ciocalteu.....	40
2.2.2 Capacidade antioxidante .....	41
2.2.2.1 Método do ABTS .....	41
2.2.2.2 Método do DPPH .....	42
2.2.2.3 Método do TBA .....	42
2.2.2.4 Valor Peróxido .....	43
<b>3 – RESULTADOS EXPERIMENTAIS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
3.1 Resultados do método de Folin-Ciocalteu .....	44
3.2 Resultados da capacidade antioxidante.....	46
3.2.1 Método do ABTS.....	46
3.2.2 Método do DPPH.....	49
3.2.3 Método do TBA .....	50
3.2.4 Valor Peróxido.....	51
<b>4 – CONCLUSÕES .....</b>	<b>58</b>
<b>5 – BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>61</b>
<b>6 – CIBERGRAFIA.....</b>	<b>77</b>

# Índice de tabelas

<b>Tabela 1:</b> Índice de polaridade e solubilidade em água de alguns solventes utilizados em processos de extracção .....	4
<b>Tabela 2:</b> Algumas das diferentes espécies reactivas de oxigénio .....	19
<b>Tabela 3:</b> Registo dos reagentes utilizados .....	39
<b>Tabela 4:</b> Volumes usados das diferentes soluções para proceder ao processo de oxidação do ácido linoleico .....	43

# Índice de figuras

<b>Figura 1:</b> Esquema geral sobre o procedimento na preparação de extractos, representando o uso de diferentes solventes. (MeOH) – metanol .....	5
<b>Figura 2:</b> <i>Hymenodictyon floribundum</i> .....	6
<b>Figura 3:</b> <i>Parinari pumila</i> .....	7
<b>Figura 4:</b> <i>Tinnea antiscorbutica</i> .....	8
<b>Figura 5:</b> <i>Eragrostis viscosa</i> .....	9
<b>Figura 6:</b> <i>Xylopiya odoratissima</i> .....	11
<b>Figura 7:</b> Exemplo de uma planta ( <i>Peucedanum palustre</i> ), pertencente ao género <i>Peucedanum</i> .....	12
<b>Figura 8:</b> <i>Boscia microphylla</i> .....	13
<b>Figura 9:</b> <i>Adenodolichos huillensis</i> .....	14
<b>Figura 10:</b> <i>Cassia occidentalis</i> .....	15
<b>Figura 11:</b> <i>Rhus kirkii</i> .....	16
<b>Figura 12:</b> Representação dos principais mecanismos de defesa enzimática das espécies reactivas de oxigénio, bem como algumas das fontes de origem. RE- retículo endoplasmático; MPO-mieloperoxidase; GSH- glutationa reduzida; GR- glutationa reductase; GSSH- glutationa oxidada; SOD- superóxido dismutase .....	20
<b>Figura 13:</b> Representação das estruturas do ABTS e ABTS <sup>•+</sup> .....	28
<b>Figura 14:</b> Representação das estruturas do Trolox e crisina .....	29



<b>Figura 15:</b> Representação do radical livre DPPH e respectivas estruturas de ressonância. Ilustração esquemática da reacção dada pela equação 15 .....	31
<b>Figura 16:</b> Representação esquemática da reacção entre o TBA e o MDA, com formação do aducto .....	33

## Índice de gráficos

<b>Gráfico 1:</b> Curva de calibração para o método de Folin-Ciocalteu (N=9 ± SE) .....	45
<b>Gráfico 2:</b> Resultados da concentração de compostos fenólicos totais das diferentes amostras de plantas para o método de Folin-Ciocalteu (N=9 ± SE).....	45
<b>Gráfico 3:</b> Resultados da percentagem de inibição das diferentes amostras de plantas para o método de ABTS (N=9 ± SE) .....	46
<b>Gráfico 4:</b> Curva de calibração para o cálculo do valor TEAC, para os diferentes extractos (N=9 ± SE) .....	47
<b>Gráfico 5:</b> Valor TEAC para os diferentes extractos .....	48
<b>Gráfico 6:</b> Correlação entre a percentagem de inibição do radical de ABTS e o valor TEAC .....	48
<b>Gráfico 7:</b> Resultados da percentagem de inibição das diferentes amostras de plantas para o método de DPPH (N=9 ± SE) .....	49
<b>Gráfico 8:</b> Correlação entre a percentagem de inibição do radical de DPPH e a concentração de composto fenólicos .....	50
<b>Gráfico 9:</b> Curva de calibração para o método TBA (N=9 ± SE) .....	50
<b>Gráfico 10:</b> Resultado das diferentes amostras de plantas para o método TBA (N=9 ± SE) . $\uparrow$ < 5,44 $\mu$ mol MDA/L .....	51
<b>Gráfico 11:</b> Número de dias necessários para obter uma oxidação de cerca de 100 meq /g de amostra .....	52
<b>Gráfico 12:</b> Valor peróxido para os extractos de <i>Rhus kirkii</i> em metanol, <i>Cassia occidentalis</i> em metanol e <i>Xylopiya aromatissima</i> em tolueno para os 8 dias de oxidação (N=3 ± SE) .....	52
<b>Gráfico 13:</b> Valor peróxido para os extractos de <i>Adenodolichos huillensis</i> , para os diferentes solventes, nos 8 dias de oxidação (N=3 ± SE) .....	53

<b>Gráfico 14:</b> Valor peróxido para os extractos de <i>Boscia microphylla</i> , para os diferentes solventes, nos 8 dias de oxidação (N=3 ± SE).....	54
<b>Gráfico 15:</b> Valor peróxido para os extractos de <i>Eragrostis viscosa</i> , para os diferentes solventes, nos 8 dias de oxidação (N=3 ± SE).....	55
<b>Gráfico 16:</b> Valor peróxido para os extractos de <i>Hymenodictyon floribundum</i> , para os diferentes solventes, nos 8 dias de oxidação (N=3 ± SE).....	55
<b>Gráfico 17:</b> Valor peróxido para os extractos de <i>Parinari pumila</i> , para os diferentes solventes, nos 8 dias de oxidação (N=3 ± SE).....	56
<b>Gráfico 18:</b> Valor peróxido para os extractos de <i>Peucedanum angolense</i> , para os diferentes solventes, nos 8 dias de oxidação (N=3 ± SE).....	57
<b>Gráfico 19:</b> Valor peróxido para os extractos de <i>Tinnea antiscorbutica</i> , para os diferentes solventes, nos 8 dias de oxidação (N=3 ± SE).....	58

“A maior recompensa do nosso trabalho não é o que pagam por ele, mas aquilo em que ele nos transforma,”

John Ruskin

# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 Uso de plantas na medicina tradicional**

Desde há séculos que as plantas têm sido amplamente usadas no tratamento de doenças. Na medicina tradicional o uso de plantas é uma prática comum e o ser humano manifesta cada vez mais interesse no mundo vegetal, devido não só às propriedades terapêuticas que certas plantas manifestam, mas também pelo facto de apresentarem baixa toxicidade (Li *et al.*, 2008).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), designa-se por planta medicinal, qualquer planta que possui em um ou mais dos seus órgãos, substâncias que podem ser utilizadas quer para fins terapêuticos quer como precursoras na síntese de fármacos. (Doughari *et al.*, 2008; Okigbo *et al.*, 2009). Nos últimos anos têm-se verificado avanços científicos envolvendo estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais, com a finalidade de se obter novos compostos com propriedades terapêuticas. As plantas além do seu uso na medicina popular com finalidades terapêuticas, constituem um recurso natural de compostos biologicamente activos (Portillo *et al.*, 2001), derivados do seu metabolismo secundário e cuja função na planta muitas das vezes não é conhecida (Yesil-Celiktas *et al.*, 2007; Okigbo *et al.*, 2009), e que permitem o desenvolvimento de novos fármacos (De las Heras *et al.*, 1998; Wojdyło *et al.*, 2007).

## **1.2 Preparação dos extractos**

### **1.2.1 Métodos de extracção de compostos de plantas**

As plantas produzem uma série de metabolitos secundários com diferentes grupos funcionais. As categorias de produtos naturais geralmente encontrados incluem as ceras e ácidos gordos, poliacetilenos, terpenóides, óleos essenciais, compostos fenólicos, alcalóides e derivados glicosídicos (Sarker *et al.*, 2006).

Várias abordagens podem ser usadas para extrair produtos naturais das plantas. Embora a água seja utilizada como um extractor em vários protocolos, solventes orgânicos de diferentes polaridades são geralmente usados na extracção de diferentes compostos orgânicos das plantas com base nas diferentes solubilidades.

Os procedimentos de extracção com solventes incluem a maceração, extracção por solvente assistida por ultra-sons, percolação, extracção em Soxhlet, extracção por solvente pressurizado,

extracção sob refluxo e destilação a vapor. A extracção com solventes baseia-se no princípio de qualquer extracção “líquido - líquido” ou “sólido - líquido”. Nesta última, as partes da planta são colocadas em contacto com o solvente.

O processo de extracção pode ser executado em três etapas. Inicialmente, o solvente difunde-se para o interior das células, no passo seguinte solubiliza os metabolitos e por fim difunde-se para fora das células, enriquecido em metabolitos extraídos. Em geral, a extracção pode ser facilitada pela trituração e por aumento da temperatura (favorecendo a solubilização). A evaporação dos solventes orgânicos ou liofilização (de soluções aquosas), origina extractos brutos (Pombeiro, 1991).

O processo de extracção mais simples e amplamente usado é a maceração. Esta consiste em deixar a planta mergulhada num solvente apropriado, num recipiente fechado, à temperatura ambiente. A principal desvantagem da maceração é que o processo pode ser bastante demorado, levando até várias semanas. Além disso quando é efectuado de forma exaustiva leva ao consumo de grandes volumes de solvente e à perda potencial de metabolitos. Por outro lado, como a extracção é realizada à temperatura ambiente, é menos susceptível de conduzir à degradação de metabolitos termolábeis.

A extracção por solvente assistida por ultra-sons é um método de maceração modificado, em que a extracção é facilitada pelo uso de ultra-sons. É raramente aplicada à extracção em grande escala, sendo principalmente aplicada na extracção de uma pequena quantidade de material.

Na percolação, o material vegetal em pó é inicialmente embebido num solvente depois adicionado solvente no topo do material vegetal, permitindo a infiltração lenta para fora de um coador. A percolação é adequada para a extracção inicial e em grande escala. Há várias questões a considerar quando da realização de uma percolação. O tamanho em que o material é triturado pode influenciar o rendimento, dado que pós finos e materiais como resinas e plantas que incham excessivamente, podem obstruir o coador. Além disso, se o material não é distribuído de forma homogénea no recipiente, o solvente pode não atingir todos os pontos do material e a extracção será incompleta. Temperaturas altas melhoram a extracção, mas podem levar à decomposição de metabolitos lábeis. Outra desvantagem da percolação é a necessidade de grandes volumes de solvente, podendo o processo ser demorado (Sarker *et al.*, 2006).

A extracção em Soxhlet é outra das técnicas usadas amplamente na extracção de metabolitos de plantas. A planta em pó é colocada num cilindro de celulose, no interior de uma câmara de extracção (extractor de Soxhlet). Um solvente apropriado é adicionado e aquecido sob refluxo. A principal vantagem da extracção em Soxhlet é que é um processo contínuo, dado que ocorre reposição de solvente condensado, além disso requer menos tempo e menos quantidade de solvente do que os processos de maceração e percolação. A principal desvantagem de extracção em Soxhlet é que o extracto é constantemente aquecido no ponto de ebulição do solvente usado, e isso pode levar a perda de compostos termolábeis e ou iniciar a formação de artefactos.

A extracção com líquidos pressurizados, emprega temperaturas elevadas, e requer altas pressões para manter o solvente no estado líquido a temperaturas elevadas. Temperaturas e pressões altas, aumentam a penetração do solvente no material e melhoram a solubilização dos metabolitos, aumentando assim a velocidade e rendimento de extracção. Além disso, requer baixas quantidades de solvente, oferecendo uma alternativa mais económica e ecológica do que as abordagens convencionais. Como o material é completamente seco após a extracção, é possível realizar extracções repetidas com o mesmo solvente ou extracções sucessivas com solventes de polaridade crescente. Uma vantagem adicional é que a técnica pode ser programável, o que oferece maior reprodutibilidade. No entanto, factores variáveis como por exemplo, a temperatura de extracção, tempo de extracção e solvente mais adequado, têm de ser determinado para cada amostra (Pombeiro, 1991).

Na extracção sob refluxo, o material vegetal é imerso num solvente, colocado num balão de fundo redondo, que é ligado a um condensador. O solvente é aquecido até que atinge o seu ponto de ebulição. O vapor é condensado, e o solvente retorna ao balão. A destilação por arrastamento de vapor é um processo semelhante e é geralmente aplicado à extracção de óleos essenciais de plantas. A principal desvantagem da extracção sob refluxo e destilação por arrastamento de vapor é que os componentes termolábeis correm o risco de serem degradados.

O processo de extracção ideal deve ser exaustivo, rápido, simples e reprodutível se executado repetidamente. A selecção de um método de extracção adequado depende principalmente do tipo de trabalho a ser realizado e dos metabolitos alvo (Sarker, 2006).

### ***1.2.2 Escolha do solvente***

Nos processos de extracção podem-se usar solventes miscíveis ou imiscíveis em água, o solvente escolhido deve ter um baixo potencial para a formação de artefactos, uma baixa toxicidade e inflamabilidade bem como um baixo risco de explosão. Além disso, devem ser económicos e facilmente recicláveis.

Os principais solventes utilizados nos processos de extracção (tabela1), incluem desde hidrocarbonetos alifáticos e clorados, ésteres e álcoois, até à água entre outros (Sarker, 2006).

**Tabela 1:** Índice de polaridade e solubilidade em água de alguns solventes utilizados em processos de extração. (adaptado de Sarker, 2006).

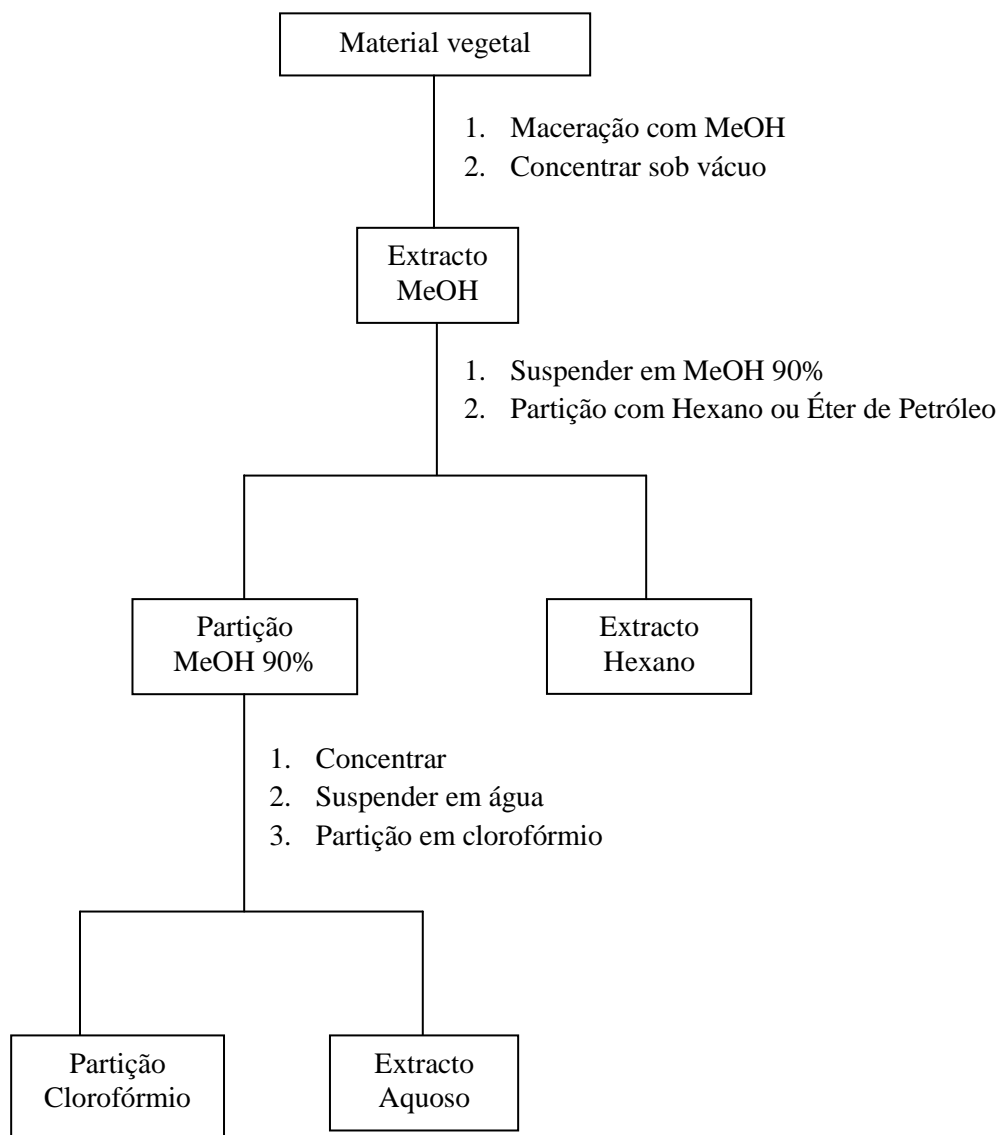
<i>Solvente</i>	<i>Índice de polaridade</i>	<i>Solubilidade em água (%m/m)</i>
n-Hexano	0,0	0,001
Diclorometano	3,1	1,6
n-Butanol	3,9	7,81
Iso-Propanol	3,9	100
n-Propanol	4,0	100
Clorofórmio	4,1	0,815
Acetato de Etilo	4,4	8,7
Acetona	5,1	100
Metanol	5,1	100
Etanol	5,2	100
Água	9,0	100

As extracções podem ser “selectivas” ou “totais”. Assim numa extracção selectiva, os compostos vegetais são extraídos com um solvente de uma polaridade adequada, seguindo o princípio de que “igual dissolve igual”.

Solventes apolares são utilizados principalmente para solubilizar compostos lipofílicos; solventes de polaridade média são utilizados na extracção de compostos de polaridade intermediária e os solventes mais polares são usados para mais compostos polares.

Na extracção referida como “total”, é usado um solvente orgânico polar, como por exemplo metanol ou uma mistura aquosa de álcool, numa tentativa de extrair deste modo o maior número de compostos possível. Esta baseia-se na capacidade de solventes alcoólicos aumentarem a permeabilidade da parede celular, facilitando assim a extracção eficiente de grandes quantidades de compostos polares.

Solventes simples ou misturas de solventes podem ser utilizados nos protocolos de extracção, como apresentado na figura 1. Contudo na extracção em Soxhlet, é preferível usar um único solvente, isto porque um dos solventes na mistura pode destilar mais rapidamente do que outro, levando a uma mudança nas proporções de solvente na câmara de extracção (Sarker, 2006).



**Figura 1:** Esquema geral sobre o procedimento na preparação de extractos, representando o uso de diferentes solventes. (MeOH) – metanol (adaptado de Sarker, 2006).

### 1.3 Caracterização das plantas utilizadas no estudo

#### 1.3.1 *Hymenodictyon floribundum*

O *Hymenodictyon floribundum* (figura 2), é uma árvore de pequeno porte que cresce nas montanhas rochosas da província da Huila (Angola), pertence ao género *Hymenodictyon*, que possui 22 espécies e à família *Rubiaceae* que reúne mais de seis mil espécies distribuídas por todo o planeta, centrando-se a sua expressão máxima a nível dos trópicos, onde é representada sobre tudo por plantas lenhosas cujas cascas são usadas no tratamento de estados febris. À família *Rubiaceae* pertencem também outras plantas de grande importância como é o caso da planta do café (*Coffea arabica*).



Estudos fotoquímicos realizados a plantas pertencentes à família *Rubiaceae*, revelaram que as plantas apresentam uma composição química maioritariamente caracterizada por iridoides e alcalóides do tipo índole (Hegnauer *et al.*, 1973). Poucos estudos têm sido efectuados ao género *Hymenodictyon*, contudo no que diz respeito ao *Hymenodictyon floribundum*, foram obtidos a partir das cascas glicosídeos derivados da escopolatina, himeselsina, escopolina e do  $\beta$ -sitosterol em particular o 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosil- $\beta$ -sitosterol e a lupenona (Borges *et al.*, 2010). Ainda em relação ao *Hymenodictyon floribundum* foi encontrado nas folhas dois novos iridoides, o floribundano A e B, que também podem ser encontrados nas cascas e os compostos conhecidos de lupenona, escopoletina e 4,5-di-hidroblumenol A.

Algumas das espécies pertencentes a este género, são usadas na medicina tradicional como por exemplo o *Hymenodictyon excelsum* que é usado como adstringente e febrifugo, tendo-se isolado das cascas desta espécie um apioglucósido da escopolatina, o xerobosídeo (Borges, 2008; Borges *et al.*, 2010).



**Figura 2:** *Hymenodictyon floribundum*

([http://www.zimbabweflora.co.zw/speciesdata/genus.php?genus\\_id=1369](http://www.zimbabweflora.co.zw/speciesdata/genus.php?genus_id=1369); 20 de Junho de 2010).

### 1.3.2 *Parinari pumila*

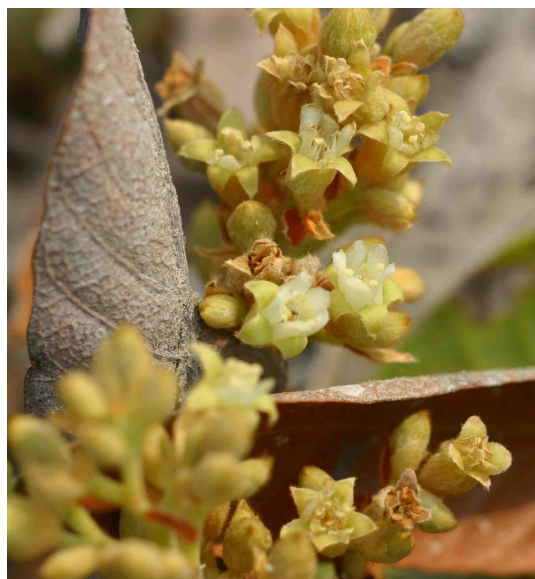
A *Parinari pumila* (figura 3), é uma planta pertencente à família *Chrysobalanaceae*, género *Parinari*. Trata-se de uma árvore de pequeno porte que cresce nos planaltos da província da Huila (Angola), e é usada com fins medicinais. Por exemplo usam-se as folhas, frutos, raiz e as casca no tratamento da tuberculose. O género *Parinari*, constituído por cerca de 35 espécies, encontra-se disperso por três continentes (África, América e Ásia). Algumas das espécies pertencentes a este género são usadas na medicina tradicional, apresentando actividades antibacterianas, antimaláricas, antiepi-

lépticas entre outras, por exemplo o extracto metanólico da *Parinari polyandra* alivia as dores de dentes e actua também como estimulante cardíaco.

A família *Chrysobalanaceae* é constituída por 17 géneros e mais de 450 espécies representadas por árvores e arbustos. A maior parte das espécies são cultivadas devido aos seus frutos, por exemplo as folhas das plantas pertencentes à espécie *Coupeia icaco*, são usadas como agente diurético e hipoglicémico, as sementes da planta *Coupeia edulis* por exemplo são esmagadas e usadas nos bolos de tapioca (Borges, 2008).

Dos poucos estudos efectuados ao género *Parinari*, foram identificados como compostos maioritários os flavonóides e os kauranos muitos dos quais apresentam actividade antitumoral. As características químicas das espécies pertencentes à família *Chrysobalanaceae* incluem flavonóides, triterpenos e diterpenos, esteroides e taninos

Em relação à *Parinari pumila* colhida em Angola, foram isolados e identificados em extractos de hexano e tolueno quatro compostos, o fitol, o  $\beta$ -sitosterol, a 3-*epi*- $\alpha$ -amirina e o 18-acetoxi- -16- $\beta$ -hidroxi-*ent*-kaurano. Os três primeiros já tinham sido isolados e identificados, mas o kaurano é a primeira vez que é identificado como produto natural (Saraiva, 2004).



**Figura 3:** *Parinari pumila* ([http://www.zimbabweflora.co.zw/speciesdata/genus.php?genus\\_id=661](http://www.zimbabweflora.co.zw/speciesdata/genus.php?genus_id=661); 20 de Junho de 2010).

### 1.3.3 *Tinnea antiscorbutica*

A *Tinnea antiscorbutica* (figura 4), é uma planta pertencente à família *Lamiaceae* e ao género *Lamiaceae*. Esta é um semiarbusto que cresce no planalto da província da Huíla e cujas folhas ou novos rebentos são usadas no tratamento e prevenção do escorbuto (Bossard, 1996). O género *Tinnea* engloba 19 espécies, todas de origem africana. No que diz respeito à família *Lamiaceae*, esta abrange cerca de 200 géneros e 3200 espécies, na sua maioria ervas e arbustos, raramente árvores. Muitas dessas espécies são aromáticas e caracterizam-se por possuírem óleos essenciais, além disso podem ser usadas como plantas medicinais, como por exemplo a cedronela (*Cedronella triphylla*), usada na indústria cosmética e cujos rebentos podem ser usados como anti-sépticos, ou na culinária como por exemplo a salva (*Salvia officinalis*) e o rosmaninho (*Rosmarinus officinalis*) (Borges, 2008).



**Figura 4:** *Tinnea antiscorbutica*

(<http://www.aluka.org/action/showContentImage?doi=10.5555/AL.AP.SPECIMEN.G00018008&pgs=>; 20 de Junho de 2010).

A maior parte dos géneros da família *Lamiaceae*, são uma boa fonte de terpenóides, mas também apresentam na sua composição química flavonóides, óleos essenciais e esteres de ácido cafeico. Algumas plantas desta família apresentam diterpenos com actividade antitumoral (Ali *et al.*, 2000). Nas plantas pertencentes à família *Lamiaceae*, podem ser encontrados raramente alcalóides, flavonóides, lignanos e terpenos (Borges, 2008).

Recentemente foram isolados três novos clerodanos (antiscorbuticano A, B e C), a partir do extracto metanólico de *Tinnea antiscorbutica*, e os compostos conhecidos glutinol, friedelina, 5,7-diidroxiflavanona (pinocembrina), 5-hidroxi-3,6,7,4'-tetramethoxiflavona, 5-hidroxi-3,6,7,3',4'-

pentamethoxiflavona (artemetin), 5,4'-dihidroxi-3,6,7,3'-tetramethoxiflavona (penduletina) e 5,3',4'-trihidroxi-3,6,7-trimethoxiflavona (crisosfenol D) (Borges, 2008).

### 1.3.4 *Eragrostis viscosa*

A *Eragrostis viscosa* (figura 5), é uma espécie vegetal pertencente à família *Poaceae* (= *Gramineae*) e género *Eragrostis*. A família *Poaceae*, formada por plantas monocotiledóneas, consiste em mais de 600 géneros e aproximadamente 9000 espécies. A família pode ser dividida em seis subfamílias (*Pooideae*, *Panicoideae*, *Bambusoideae*, *Arundinoideae*, *Oryzoideae* e *Chloridoideae*), com base nas diferenças anatómicas das folhas. Essas diferenças estruturais específicas reflectem diferenças funcionais distintas e têm sido relacionadas com várias vias fotossintéticas que existem na família *Poaceae*. A *Eragrostis viscosa* é mais específica da África do Sul, no entanto esta espécie foi também assinalada no norte dos Camarões onde ocorre junto com outras oito espécies *Eragrostis* anuais espontâneas, que surgem nos campos de cultivo de algodão, milho, sorgo e amendoim. Fora da África, variantes da *Eragrostis viscosa* foram também assinaladas na Malásia.



**Figura 5:** *Eragrostis viscosa*

(<http://www.aluka.org/action/showCompilationPage?doi=10.5555/AL.AP.COMPILATION.PLANT-NAME-SPECIES.ERAGROSTIS.VISCOSA>; 20 de Junho de 2010).

Em Angola esta espécie encontra-se nas zonas de clima semi-árido, região sudoeste do país. O povo autóctone da região faz um uso etnofarmacológico desta espécie devido ao efeito nocivo que causa às cobras, além disso o gado não a come, talvez devido ao facto de que por ser viscosa (aderente), esta não lhe saiba bem ou por outra razão ainda por descobrir (Sebastião *et al.*, 2010).

O género *Eragrostis* está pouco estudado quimicamente, a maior parte da informação científica refere-se aos aspectos botânicos e ambientais. Os poucos estudos químicos efectuados estão virados para a avaliação do valor nutritivo, ou seja determinação dos componentes do metabolismo primários tais como aminoácidos, proteínas, minerais, fibras entre outros. Quanto aos metabolitos secundários, apenas algumas espécies foram estudadas como no caso da *Eragrostis ferrugínea*, cujas raízes são usadas em certas regiões da Coreia no tratamento da diabetes.

O estudo de extractos de *Eragrostis viscosa* em tolueno, hexano e diclorometano, permitiu isolar dez compostos com predominância para compostos diterpénicos com esqueleto labdano. Sete destes compostos são 8,15-epoxilabdano, um novo tipo de éter ciclico, que foram caracterizados como novos compostos naturais (8,15-epoxi-16-norlabdano, 16-acetoxi-8,15-epoxilabdano, 8,15-epoxi-16-norlabdan-13-ona, ácido 8,15-epoxilabdano-16-óico, 8,15-epoxilabdano-16-ol, 8,15-epoxi-16-norlabdan-16-ol, e 8,15-epoxilabdano-16-oato de metilo). Os três restantes compostos foram identificados como sendo compostos já conhecidos (o (+)-14,15,16-trinorlabdan-13,8-olida (ambreinólida), 3 $\beta$ -(3'',4''-dihidroxi)-(E)-cinamoiloxilup-20(29)-eno e o 3-(2',3',4',6'-tetra-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosiloxi)- $\beta$ -sitosterol) (Sebastião, 2007; Sebastião et al., 2010).

### 1.3.5 *Xylopi*a *odoratissima*

*Xylopi*a *odoratissima* (figura 6), é uma planta pertencente à família *Annonaceae*, uma família de plantas floridas, e ao género *Xylopi*a (Robson, 1960; Fernandes, 2003). Este género é constituído por cerca de 160 espécies, como a *Xylopi*a *aethiopica*, *Xylopi*a *frutenscens*, *Xylopi*a *brasiliensis*, *Xylopi*a *grandiflora*, entre outras, que ocorrem nos trópicos, especialmente na África, Ásia e América central e do sul (Moreira *et al.*, 2003).

Vários extractos de *Xylopi*a, tem demonstrado propriedades anti-sépticas, analgésicas e insecticidas. Por exemplo a *Xylopi*a *aethiopica*, pode ser usada no tratamento de infecções da pele e no tratamento da tosse e febre, a *Xylopi*a *brasiliensis*, uma árvore de grande porte localizada no sudeste do Brasil é utilizada na medicina popular como sedativo e analgésico e a *Xylopi*a *aromatica*, uma árvore de pequeno porte encontrada na América central e do sul, cujo fruto é usado em produtos alimentícios, perfumes e cosméticos, devido ao seu aroma (Stashenko *et al.*, 2004; Karioti *et al.*, 2004).

Várias partes da *Xylopi*a *aromatica*, tem sido objecto de estudos químicos, por apresentarem várias classes de produtos naturais, incluindo alcalóides, acetogeninas e diterpenos. As acetogeninas annonácias, possuem actividades biológicas interessantes tais como: antimicrobianas, antiparasitas, anti-tumorais, citotóxicas e pesticidas. Actuam pelo menos em parte como poderosos inibidores do glutamato-dependente mitocondrial da respiração nos mamíferos e insectos, especificamente inibem o NADH: actividade da ubiquinona oxidoreductase da qual todas as acetogeninas parecem inibir. Na

raiz da *Xylopia* foram isolados flavonóides com actividade anti-bactericida contra as estirpes de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Mycobacterium smegmatis*. O extracto de éter de petróleo da raiz apresenta propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e oxitocicas (apresentam a mesma acção que a oxitocina) (Fernandes, 2003).



**Figura6:** *Xylopia odoratissima*

(<http://www.aluka.org/action/showMetadata?doi=10.5555/AL.AP.SPECIMEN.COI00004885>; 20 de Junho de 2010).

### 1.3.6 *Peucedanum angolense*

O *Peucedanum angolense* é uma planta pertencente à família *Apiaceae*, também conhecida como *Umbelliferae* e ao género *Peucedanum*. O género *Peucedanum* encontra-se distribuído pela Europa, Ásia e África, e é caracterizado por possuir frutos achatados com asas laterais mais ou menos desenvolvidas (Spalik *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2000). A família *Apiaceae*, apresenta características botânicas peculiares tais como inflorescências em forma de umbela (inflorescências em forma de guarda chuva), e frutos secos especializados divididos em dois mericarpos, possui cerca de 450 géneros e 3700 espécies (Zhou *et al.*, 2009; Miyazawa *et al.*, 1996).

As plantas pertencentes a esta família, encontram-se amplamente distribuídas em regiões de clima temperado onde muitas vezes são utilizadas como especiarias e drogas, devido à presença de metabolitos secundários como cumarinas, óleos essenciais e sesquiterpenos. Por exemplo o *Peucedanum japonicum*, apresenta propriedades diuréticas, laxativas e sedativas e o *Peucedanum praeruptorum*, é usado na medicina tradicional chinesa em distúrbios alimentares e dores no peito. Relativamente ao *Peucedanum angolense*, não existem estudos sobre a sua composição química. Na figura 7

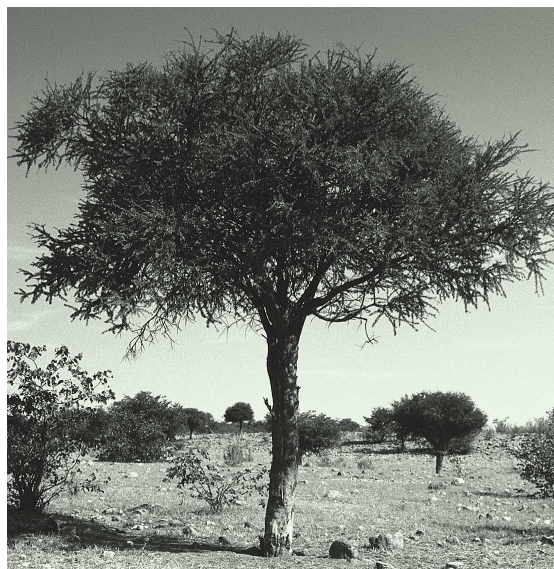
encontra-se representado um exemplo de uma planta (*Peucedanum palustre*), pertencente ao género *Peucedano*.



**Figura 7:** Exemplo de uma planta (*Peucedanum palustre*), pertencente ao género *Peucedanum* ([http://www.floracyberia.net/spermatophyta/angiospermae/dicotyledoneae/apiaceae/peucedanum\\_palustre.html](http://www.floracyberia.net/spermatophyta/angiospermae/dicotyledoneae/apiaceae/peucedanum_palustre.html); 20 de Junho de 2010).

### ***1.3.7 Boscia microphylla***

A *Boscia microphylla* (figura 8), é uma planta pertencente à família *Capparaceae*, e género *Boscia*. A família *Capparaceae* possui cerca de 40-45 géneros e 700-900 espécies, cujos membros apresentam uma diversidade considerável no que diz respeito ao local onde habitam, sendo mais visível em habitats tropicais sazonalmente secos, características florais e frutícolas. Por exemplo as plantas do género *Cleome*, pertencente à família *Capparaceae*, apresentam diversas propriedades medicinais importantes, sendo úteis no tratamento de processos inflamatórios e do reumatismo, além disso manifestam propriedades analgésicas, antioxidantes e anti-bacteriana (HALL *et al.*, 2002; Albarello *et al.*, 2006). Relativamente a esta planta, não existem estudos sobre a sua composição química.



**Figura 8:** *Boscia microphylla* ([http://www.biodiversity.org.na\\_treatlas\\_SpPDFs\\_Sp084](http://www.biodiversity.org.na_treatlas_SpPDFs_Sp084) ; 20 de Junho de 2010).

### ***1.3.8 Adenodolichos huillensis***

O *Adenodolichos huillensis* (figura 9), pertence à família *Fabaceae* também conhecida por *Leguminosae*, e ao género *Adenodolichos*. A *Fabaceae* é a terceira maior família de plantas no mundo, compreendendo cerca de 730 géneros e 19 300 espécies. Grande parte da diversidade de espécies de *Fabaceae* está concentrada nas regiões tropicais e subtropicais (Ata *et al.*, 2009; Estrella *et al.*, 2010). A maioria das plantas pertencentes a esta família, possui flores que são caracterizadas por terem um único eixo de simetria.

A *Caesalpinia bonduc*, é uma planta, abundante nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia, usada na medicinal tradicional. Os extractos aquosos e etanólico das suas sementes possuem efeitos hiperglicémicos na diabetes tipo 2, além disso as fracções aquosas, metanólicas e de acetato de etilo apresentam actividade contra o crescimento *in vitro* de uma variedade de bactérias patogénicas e fungos.

O género *Canavalia*, um outro exemplo pouco conhecido da família *Fabaceae*, possui cerca de 50 espécies e apresenta importantes aplicações. Diversas partes das plantas, das diferentes espécies são úteis na alimentação humana, forragem, adubação, controle de erosão, e produção de produtos farmacêuticos e fitoquímicos (Wagstaff *et al.*, 1999; Citerne *et al.*, 2006; Sahai, 2008). No que diz respeito ao género *Adenodolichos*, não existem estudos químicos.





Figura 9: *Adenodolichos huillensis* (<http://actd.iict.pt/view/actd:LISC001902>; 20 de Junho de 2010).

### 1.3.9 *Cassia occidentalis*

*Cassia occidentalis* (figura 10), também conhecida como *Senna occidentalis*, é uma planta perene à família *Leguminosae*, também conhecida como *Fabaceae* e ao género *Cassia*. Este género possui entre 500-600 espécies, a maioria provenientes da América. Na África o género *Cassia* é encontrado principalmente nas florestas húmidas densas. Esta espécie vegetal apresenta-se como uma planta semi-lenhosa anual em áreas tropicais ou como um arbusto, por vezes um arbusto perene de curta duração em áreas geladas (Nuhu *et al.*, 2008; Sob *et al.*, 2010).

Na medicina tradicional, as raízes, folhas e caules têm sido amplamente utilizadas como laxante, analgésico, diurético, hepatoprotector, e vermífugo, são também usadas como antídoto para vários tipos de venenos e como um poderoso abortivo. Na Nigéria a infusão das folhas de *Cassia occidentalis* é usada por curandeiros locais no tratamento da hepatite, o potencial do extracto das folhas pode estar relacionado com a sua capacidade antioxidante. No Peru, as raízes são utilizadas como um diurético e é feita a decocção para tratar estados febris (Aragão *et al.*, 2009; Barbosa-Ferreira *et al.*, 2010; Yadav *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2003). No Brasil, as raízes são consideradas como um tónico, diurético e são usadas no tratamento de estados febris, tuberculose, anemia e problemas de fígado. Na região oeste da África a planta é usada principalmente no tratamento do estado febril.



**Figura 10:** *Cassia occidentalis* ([http://plantes-rizieresguyane.cirad.fr/dicotyledones/caesalpinaceae/senna\\_occidentalis](http://plantes-rizieresguyane.cirad.fr/dicotyledones/caesalpinaceae/senna_occidentalis); 20 de Junho de 2010).

Esta planta apresenta alguns compostos tóxicos como a albumina tóxica e crisarobina, isolados das sementes. Pode ser encontrada em campos de soja e trigo, e as sementes são semelhantes em tamanho e densidade aos grãos das culturas, sendo assim quase impossível evitar a mistura de grãos durante a colheita (Chukwujekwu *et al.*, 2006; Medoua *et al.*, 2007). A planta é também tóxica para animais de várias espécies tais como bovinos, suínos e aves, sendo as lesões mais importantes a degeneração e necrose dos músculos estriados e cardíaco. Todas as partes da planta são tóxicas, mas a maior toxicidade é encontrada nas sementes. Assim a contaminação de rações para aves e gado é um grande problema veterinário. Quando torradas e moídas, as sementes são utilizadas na preparação de uma bebida semelhante ao café, contudo as bebidas preparadas a partir de sementes não apresentam qualquer risco de toxicidade para os consumidores devido ao facto de que o procedimento tradicionalmente utilizado eliminar o factor tóxico das sementes e a água utilizada como solvente, não extrair a toxina para a bebida. As sementes de *Cassia occidentalis* são uma fonte de galactomanana, este composto é utilizado em diversas indústrias, tais como a do papel, alimentar, em produtos cosméticos e farmacêuticos, em tintas, na perfuração de poços e minas e em explosivos (Sheeba *et al.*, 2009; Tasak *et al.*, 2000; Gupta *et al.*, 2004; Damron *et al.*, 2001).

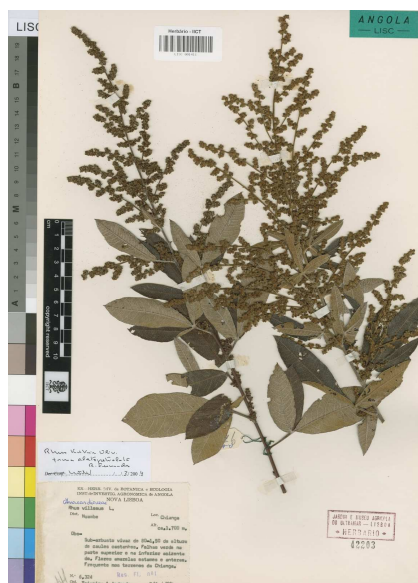
A maioria dos compostos da *Cassia occidentalis* inclui: acrosina, aloe-emodina, emodina, antraquinonas, antranas, apigenina, aurantiobtusina, campesterol, cassiolina, criso-obtusina, ácido crisofanico, crisarobina, crisofanol, crisoeriol, óleos essenciais, funiculosina, galactopiranosil, helmintosporina, islandicina, kaempferol, ácido lignocérico, ácido linoleico, ácido linolênico, manitol, manopiranosil, mateucinol, obtusifolina, obtusina, ácido oleico, fisciona, quercetina, ramnosidos, reina, rubrofusarina, sitosteróis, taninos e xantorina. A natureza e a quantidade da maioria dos compostos varia de acordo com o clima. Por exemplo, caules, folhas e casca e raiz de *Cassia occidentalis*

da Costa do Marfim (África), contêm pequena quantidade de saponinas, esteróis, triterpenos, quininas, taninos, flavonóides e não apresenta alcalóides.

As sementes e raízes são ricas em antraquinonas livres e limitadas, mas as quantidades em geral diferem acentuadamente, o conteúdo de antraquinona é maior nas sementes do que nas folhas. A partir do extracto etanólico da planta inteira, é possível obter o 3,2'-dihidroxi-7,8,4'-trimetoxi-flavona-5-O-{beta-D-glucopiranosil-(1-->2)}beta-D-galactopiranosida. Das partes aéreas de *Cassia occidentalis*, é possível isolar três novos flavonóides C-glicosídicos (cassiaooccidentalis A, B e C) (Yadav *et al.*, 2010).

### 1.3.10 *Rhus kirkii*

*Rhus kirkii* (figura11), é uma espécie vegetal pertencente à família *Anacardiaceae* e ao género *Rhus*, que pode ser encontrada na Angola, nomeadamente na província de Huambo. *Sumac* é o nome comum atribuído às espécies do género *Rhus*, este contém mais de 250 espécies de plantas que podem ser encontradas em regiões de clima temperado e tropical.



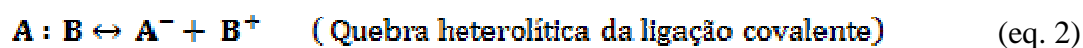
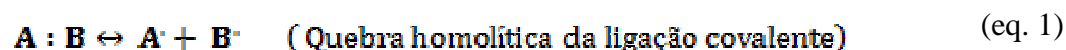
**Figura 11:** *Rhus kirkii* (<http://actd.iict.pt/view/actd:LISCA001411>; 20 de Junho de 2010).

Várias espécies têm sido utilizadas para fins medicinais, por exemplo a *Rhus glabra* é tradicionalmente usada por povos nativos da América do norte no tratamento de doenças bacterianas como a sífilis, gonorreia, disenteria e gangrena. Os extractos de plantas pertencentes ao género *Rhus*, apresentam uma variedade de propriedades biológicas, nomeadamente propriedades anti-fúngicas, anti-inflamatórias, anti-bacterianas, antivirais, antioxidantes, antimaláricas e anti-tumorais. Por exemplo extractos etanólicos obtidos a partir da madeira de *Rhus verniciflua*, exibiram forte capacidade antio-

xidante em culturas de células neuronais (Rayn *et al.*, 2007). No que diz respeito a esta planta, não existem estudos sobre a sua composição química.

## 1.4 Radicais livres

De acordo com Halliwell, radical livre é qualquer espécie (átomo ou molécula), capaz de existência independente e que contém um ou mais electrões desemparelhados, numa orbital atómica ou molecular (Halliwell *et al.*, 2008). Existem nos sistemas vivos, muitos radicais livres embora a maioria das moléculas *in vivo* não sejam radicais. Os radicais podem ser formados por perda de um electrão de um composto químico, ou por quebra de uma ligação covalente, em que um electrão do par de ligação permanece em cada átomo. Este processo é conhecido como quebra homolítica da ligação covalente, e a energia necessária para dissociar ligações covalentes pode ser disponibilizada pelo calor, radiação ultravioleta ou radiação ionizante. Assim se **A** e **B** forem dois átomos ligados covalentemente (: representa o par de electrões), a quebra homolítica e heterolítica da ligação pode ser representada pelas equações 1 e 2 respectivamente (Halliwell *et al.*, 2008):



### 1.4.1 Actividade dos radicais

Quando dois radicais livres se encontram, estes podem juntar os seus electrões desemparelhados para formar uma ligação covalente, como no caso da reacção entre dois radicais de hidrogénio ( $\text{H}^{\bullet}$ ) em que se forma a molécula de  $\text{H}_2$ . No entanto, quando um radical livre reage com um composto não radicalar, forma-se um novo radical e nesta situação podem ocorrer reacções em cadeia. Considerando  $\text{X}^{\bullet}$  um composto radicalar, este ao reagir com um composto não radicalar (Y), pode actuar de quatro maneiras diferentes (Halliwell *et al.*, 2008):

1. Pode adicionar-se ao composto não radicalar (Y), formando um aducto com um electrão desemparelhado (equação 3):



2. O composto radicalar pode actuar como agente redutor, doando um electrão ao composto não radicalar (equação 4):



3. O radical pode actuar como agente oxidante, removendo um electrão do composto não radicalar (equação 5):



4. O radical pode remover um átomo de hidrogénio de uma ligação C-H de um composto não radicalar (equação 6):



### 1.4.2 Oxigénio e os seus radicais

A evolução dos processos metabólicos aeróbios, tais como a respiração e a fotossíntese, inevitavelmente conduziram à produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS). Por exemplo, a adição de um electrão à molécula de oxigénio ( $\text{O}_2$ ), forma o radical anião superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) (Apel *et al.*, 2004; Matés *et al.*, 2000; Valko *et al.*, 2007).

Em 1954 Rebeca Gerschman verificou que os efeitos resultantes do  $\text{O}_2$  nas células eram devidos às espécies reactivas de oxigénio (citado por Gomes *et al.*, 2005). O termo espécies reactivas de oxigénio (ROS), inclui não só os radicais de oxigénio mas também alguns derivados de oxigénio não radicalares que podem originar radicais, tais como o peróxido de di-hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ) e o ozono ( $\text{O}_3$ ). A tabela 2 apresenta algumas das espécies reactivas de oxigénio. Posteriormente foram identificadas espécies reactivas de azoto, cloro, bromo e enxofre (Halliwell *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2005).

As espécies reactivas de oxigénio e azoto (RNS), desempenham um papel fundamental nos sistemas biológicos uma vez que podem ser benéficas para os sistemas vivos mas também prejudiciais. Apresentam um comportamento paradoxal na sua função biológica dado que por um lado auxiliam o sistema imunológico, mediando a sinalização celular e desempenhando um papel essencial na apop-

tose, e por outro lado podem danificar biomoléculas importantes nas células (Seifried *et al.*, 2007; Valko *et al.*, 2006).

**Tabela 2:** Algumas das diferentes espécies reactivas de oxigénio (adaptado de Halliwell *et al.*, 2008).

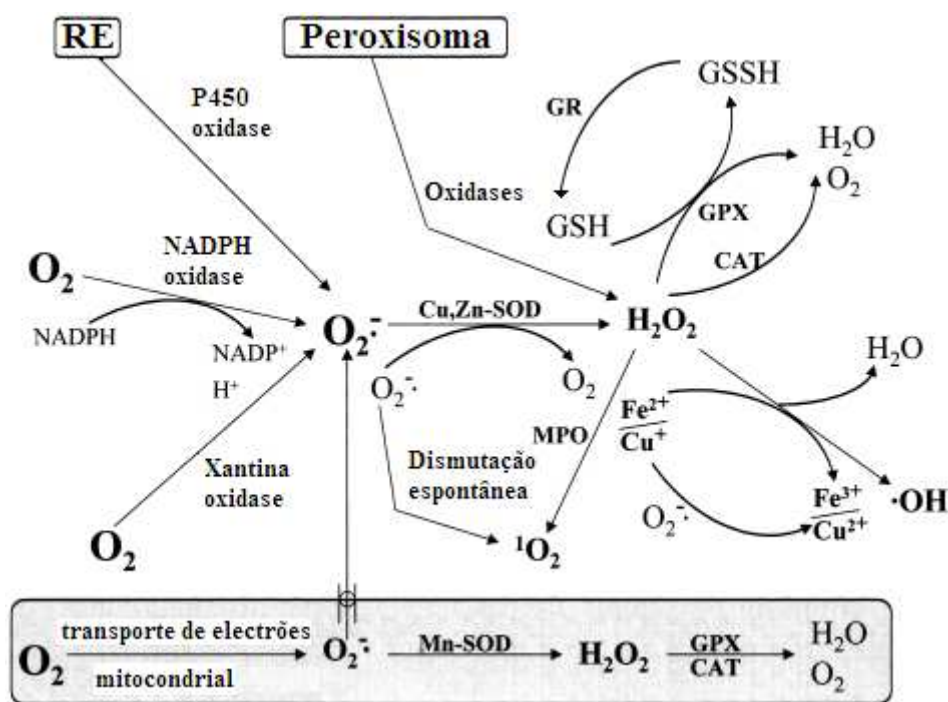
<b>Radicais</b>	<b>Não radicais</b>
Anião superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ )	Peróxido de di-hidrogénio ( $H_2O_2$ )
Hidroperoxilo ( $HO_2^{\bullet}$ )	Anião peroxinitrito ( $ONOO^-$ )
Hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ )	Ácido peroxinitroso ( $ONOOH$ )
Peroxilo ( $RO_2^{\bullet}$ )	Anião nitrosoperoxicarbonato ( $ONOOCO_2^-$ )
Alcoxilo ( $RO^{\bullet}$ )	Ácido hipocloroso ( $HOCl$ )
Anião carbonato ( $CO_3^{\bullet-}$ )	Ácido hipobromoso ( $HOBr$ )
Anião dióxido de Carbono ( $CO_2^{\bullet-}$ )	Ozono ( $O_3$ )

### 1.4.3 Produção de ROS e RNS

A produção de ROS é importante para a manutenção da homeostase do oxigénio nos tecidos. A homeostase do oxigénio (equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes), é mantida através de uma série de reacções de oxidação-redução, envolvendo a transferência de electrões entre duas espécies químicas: as que perdem electrões (são oxidadas) e as que ganham electrões (são reduzidas). Quando a homeostase não é mantida, o ambiente celular fica em stress oxidativo. Em termos celulares, o stress oxidativo é definido como um excesso de ROS disponível na célula (Gomes *et al.*, 2005; Kregel *et al.*, 2006).

A nível celular, as espécies reactivas de oxigénio podem ser obtidas tanto a nível endógeno como exógeno. A nível endógeno uma das principais fontes de radicais livres é a mitocôndria (figura 12). Durante o processo de síntese de ATP, verifica-se a redução de  $O_2$  a água por um mecanismo que envolve quatro electrões. Contudo pode ocorrer a redução de  $O_2$  apenas com um ou dois electrões originando-se  $O_2^{\bullet-}$  ou  $H_2O_2$  que pode depois ser convertido em ROS. Na mitocôndria, a semi-ubiquinona também é responsável pela formação de radicais livres em particular de  $O_2^{\bullet-}$  (Valko *et al.*, 2006; Ji, 1999; Cadenas *et al.*, 2000). A produção pode também ocorrer a nível do reticulo endoplasmático (figura 12), onde a NADPH-citocromo P450 reductase pode ceder electrões ao  $O_2$  dando origem ao anião superóxido. Os sistemas contendo  $FADH_2$  e citocromo  $b_5$ , também podem ceder electrões ao oxigénio molecular, originando o anião superóxido. A produção intracelular de ROS inclui também as reacções que envolvem oxidases dos peroxisomas (figura 12), em particular a xan-

tina oxidase, que catalisa a oxidação da xantina, hipoxantina ou acetaldeído a ácido úrico, composto este que por sua vez leva à produção de radical superóxido. Enzimas do citocromo P450 (figura 12), também estão envolvidas na produção de radicais livres de oxigénio. No que diz respeito à produção exógena de ROS, existe uma variedade de estímulos envolvidos nomeadamente a radiação (ultravioleta (UV), raios X e radiações gama), reacções catalisadas por metais (reacção de Fenton que origina o radical hidroxilo), as infecções por organismos patogénicos o que leva à activação de células envolvidas no processo inflamatório (neutrófilos, macrófagos e eosinófilos). Estas células usam o oxigénio para produzir radicais livres como o anião superóxido e também HOCl e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Matés *et al.*, 2000). A exposição a xenobióticos em particular compostos clorados, agentes carcinogénicos e barbitúricos também promove a produção de ROS. Alterações de temperatura e a presença de tóxicos ambientais (herbicidas/insecticidas) são exemplos de condições exógenas que levam a produção de ROS (Del Río *et al.*, 2002; Blokhina *et al.*, 2003; Kouakou-Siransy *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2005; Dröge *et al.*, 2002; Ara *et al.*, 2009).



**Figura 12:** Representação dos principais mecanismos de defesa enzimática das espécies reativas de oxigénio, bem como algumas das fontes de origem. RE- retículo endoplasmático; MPO- mieloperoxidase; GSH- glutatona reduzida; GR- glutatona reductase; GSSH- glutatona oxidada; SOD- superóxido dismutase; CAT- catalase; GPX- glutatona peroxidase (Matés *et al.*, 2000).

Relativamente às espécies reativas de azoto, nos sistemas biológicos estas têm origem principalmente a partir do óxido nítrico gerado por acção das sintetases do óxido nítrico (NOSs). Estas

enzimas provocam a redução da arginina a citrulina, com formação de  $\text{NO}^\bullet$  (óxido nítrico). Este radical ao reagir com o  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , origina o anião peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), da reacção com  $\text{O}_2$  forma-se o radical dióxido de azoto  $2\text{NO}_2^\bullet$ , e da reacção com outra molécula de  $\text{NO}^\bullet$ , forma-se o radical anião hiponitrito ( $\text{ONNO}^{\bullet-}$ ) (Valko *et al.*, 2007; Halliwell *et al.*, 2008).

A nível das plantas, estas produzem continuamente ROS como subprodutos de várias vias metabólicas localizadas em diferentes compartimentos celulares, e também através da activação de várias oxidases e peroxidases. Sob condições fisiológicas estáveis, as ROS são eliminadas por diferentes componentes de defesa antioxidante que se encontram por vezes confinados em compartimentos específicos. O equilíbrio entre a produção e a eliminação das ROS pode ser perturbado por uma série de factores ambientais de origem biótica, impostos por outros organismos, por exemplo infecção por vírus, fungos ou bactérias, levando à produção de ROS que vão actuar directamente sobre os microrganismos; ou abiótica, decorrentes de um excesso ou défice no ambiente físico-químico, como por exemplo baixas ou altas temperatura, e a luminosidade (Apele *et al.*, 2004; Gara *et al.*, 2003).

#### **1.4.4 Efeitos biológicos das ROS e RNS**

A nível dos efeitos biológicos, as espécies reactivas de oxigénio e de azoto estão envolvidas em diferentes funções biológicas tais como a transdução de sinal, neurotransmissão, relaxação do músculo liso, indução da apoptose, agregação plaquetária, modelação da pressão sanguínea, controlo do sistema imunológico, processos de aprendizagem e memória, regulação do crescimento celular e metabolismo de xenobióticos (Gomes *et al.*, 2005; Apele *et al.*, 2004). Podem também ser usadas como marcadores de infertilidade masculina (Agarwal *et al.*, 2006). No entanto quando são produzidas em quantidades elevadas ou as defesas antioxidantes estão em défice, estas espécies reactivas tornam-se prejudiciais, provocando a oxidação de biomoléculas tais como lípidos, proteínas, glúcidos e ácidos nucleicos (Ogunlana *et al.*, 2008). Além disso as espécies reactivas estão também envolvidas no envelhecimento e estabelecimento de algumas doenças como cancro (Matés *et al.*, 2000; Nishikawa, 2008), diabetes *mellitus* (Maritim *et al.*, 2002), asma, arteriosclerose, doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (Kumaran *et al.*, 2006), artrite reumatóide (Elmastas *et al.*, 2007), e doenças cardiovasculares (Lee *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2007; Jeong *et al.*, 2010; Naphade *et al.*, 2009; Ara *et al.*, 2009; Benzie *et al.*, 2003; Valko *et al.*, 2007).

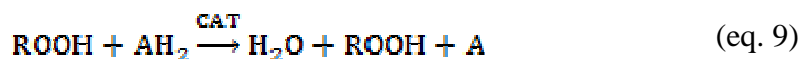


### 1.4.5 Mecanismos de destoxificação das ROS e RNS

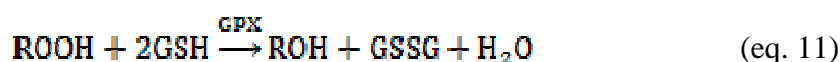
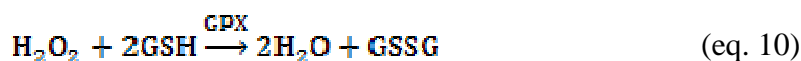
As propriedades citotóxicas das ROS e RNS, levaram ao desenvolvimento de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos de destoxificação destas espécies reactivas. O mecanismo de defesa enzimático (figura 12), actua por remoção directa das espécies reactivas. Este mecanismo de defesa primário inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPX ou GSH-P<sub>X</sub>), catalase (CAT), tioredoxina reductase e peroxidase do ascorbato (APX). A SOD, uma metaloenzima que existe sob duas isoformas intracelulares: SOD cobre-zinco (CuZnSOD) e SOD manganês (MnSOD), catalisa a dismutação do anião superóxido a peróxido de hidrogénio e oxigénio, de acordo com a equação 7 (Matés *et al.*, 2000):



A CAT apresenta como substrato o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, provocando a redução deste composto a água e oxigénio molecular (O<sub>2</sub>), de acordo com a equação 8. Reage também com dadores de átomos de H como por exemplo fenóis, ácido fórmico metanol e etanol, de acordo com a equação 9 (Matés *et al.*, 2000):



A GSH-P<sub>X</sub>, catalisa a redução de três espécies reactivas: peróxido de hidrogénio, hidroperóxidos lipídicos (equação 11), e peroxinitritos. Trata-se de uma enzima dependente de selénio (quatro átomos de selénio), que acelera a oxidação da glutathiona (GSH) pelo peróxido de hidrogénio (equação 10), que é convertido em água (Matés *et al.*, 2000):



A tioredoxina reductase é uma enzima capaz de reduzir O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e NO<sup>•</sup>, usando tioredoxina como substrato. A APX, permite a remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, para tal requer ascorbato e o sistema de regeneração da GSH (ciclo ascorbato-glutathiona). Alguns dos compostos que fazem parte do mecanismo não enzimático são nomeadamente o ácido ascórbico (vitamina C), α-tocoferol (vitamina E), glutathiona

(GSH),  $\beta$ -caroteno, bilirrubina, vitamina A, compostos fenólicos e ácido úrico. (Apele *et al.*, 2004; Blokhina *et al.*, 2002; Halliwell *et al.*, 2008; Ogunlana *et al.*, 2008; Laguerre *et al.*, 2007).

### 1.4.6 Oxidação lipídica

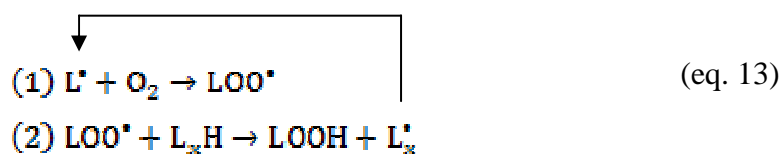
Os lípidos podem ser oxidados, halogenados ou sofrerem nitração por uma variedade de espécies reactivas. A peroxidação lipídica é um processo complexo que ocorre na presença de iniciadores como os radicais livres, calor, luz e iões metálicos. Pode ocorrer por três via reaccionais, (i) auto-oxidação não enzimática mediada por radicais livres, (ii) foto-oxidação não enzimática e não radicalar e (iii) oxidação enzimática, provocando assim a deterioração oxidativa de ácidos gordos polinsaturados (PUFAs). Estes são ácidos gordos que contêm duas ou mais ligações duplas. Os ácidos gordos monoinsaturados e mesmo os saturados também podem ser oxidados, contudo é mais difícil (Halliwell *et al.*, 2008; Laguerre *et al.*, 2007).

Na auto-oxidação formam-se hidroperóxidos e compostos voláteis através de três fases:

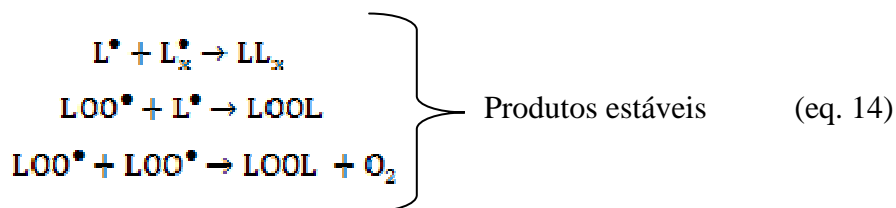
- 1) **Iniciação:** Esta envolve a quebra homolítica do hidrogénio na posição  $\alpha$  relativamente à ligação dupla no ácido gordo polinsaturado (LH), de acordo com a equação 12. Esta fase pode ser iniciada por factores externos como calor, radiação ionizante e agentes químicos como iões metálicos, radicais livres e metaloproteínas.



- 2) **Propagação:** Nesta fase, e em condições aeróbias, o carbono do radical  $\text{L}^\bullet$  reage com o oxigénio molecular, originando espécies radicalares peroxilo ( $\text{LOO}^\bullet$ ), que depois remove um outro hidrogénio de um outro ácido gordo polinsaturado ( $\text{L}_x\text{H}$ ), formando hidroperóxidos ( $\text{LOOH}$ ) e um novo radical peroxilo ( $\text{L}_x^\bullet$ ), que reage de igual modo com o oxigénio molecular (equação 13). Ocorre assim a chamada reacção em cadeia, e a produção máxima de peróxidos marca o início da fase de terminação.



- 3) **Terminação:** Nesta etapa dois radicais livres combinam-se formando produtos estáveis (equação 14), tais como hidrocarbonetos, aldeídos, álcoois e acetonas voláteis (Laguerre *et al.*, 2007; Blokhina *et al.*, 2002).



As membranas que rodeiam células e organelos possuem grandes quantidades de PUFAs e por isso encontram-se sob constante risco de sofrerem peroxidação lipídica. Esta contribui para o decréscimo da fluidez das membranas, aumento da permeabilidade a substâncias que normalmente não atravessam as membranas, e lesões nas proteínas membranares, enzimas e canais iónicos. Os ácidos gordos que circulam na corrente sanguínea podem também sofrer oxidação. Como a peroxidação é responsável pela degradação de PUFAs, uma maneira de avaliar a oxidação consiste em seguir o desaparecimento dos PUFAs, uma vez que se formam dienos conjugados que absorvem radiação ultravioleta na zona dos 230 a 235 nm (Halliwell *et al.*, 2008).

A oxidação de lípidos provoca a rancidez dos alimentos durante a sua manipulação e armazenamento. A rancidez conduz à formação de compostos que nos alimentos são responsáveis por alterações do sabor, textura, proteínas e destruição de aminoácidos essenciais, diminuindo o valor nutritivo dos alimentos. O controlo e monitorização da peroxidação lipídica durante o processamento e armazenamento dos alimentos são fundamentais devido ao aumento de alimentos pré-preparados (Halliwell *et al.*, 2008; Ulu *et al.*, 2004; Guillén-Sans *et al.*, 1998).

## 1.5 Antioxidantes

Os antioxidantes são compostos que apresentam imensas aplicações tais como a preservação e controlo da qualidade dos alimentos, preservação de obras de arte, aplicações no fabrico de borrachas, tintas, plásticos, performances de combustíveis e óleos lubrificantes. (Halliwell *et al.*, 2008).

O termo antioxidante, refere-se a qualquer composto (exógeno ou endógeno, natural ou sintético), que em pequenas concentrações, quando em comparação com o composto alvo a ser oxidado, atrasa, remove ou previne a oxidação deste (Halliwell *et al.*, 2008; Gilgun-Sherki *et al.*, 2002; Poljša-ke *et al.*, 2008; Maisuthisakul *et al.*, 2007; Laguerre *et al.*, 2007).

A nível da medicina e bioquímica, antioxidantes são enzimas ou substâncias orgânicas capazes de neutralizar os efeitos nocivos da oxidação nos tecidos animais (Huang *et al.*, 2005). Na escolha de

um antioxidante que previna a oxidação em emulsões lipídicas, há que ter em conta as propriedades do antioxidante. Antioxidantes hidrofílicos em geral são pouco eficazes em termos de protecção de lípidos em emulsões (Schwarz *et al.*, 2000).

### ***1.5.1 Classificação e modo de acção dos antioxidantes***

Uma vez que os antioxidantes podem ser classificados de acordo com as suas propriedades durante as diferentes etapas no processo de oxidação, e uma vez que actuam por diferentes mecanismos, estes podem ser divididos em dois grandes tipos de antioxidantes: antioxidantes primários e secundários. Os antioxidantes primários inibem ou retardam a oxidação, por cedência de átomos de hidrogénio ou electrões aos radicais livres, convertendo-os em compostos mais estáveis. Estes antioxidantes são considerados agentes redutores, uma vez que cedem electrões ou átomos de hidrogénio aos radicais. Os antioxidantes secundários actuam por ligação a iões metálicos necessários à formação de ROS, remoção de oxigénio das espécies reactivas e/ou dos seus precursores, conversão de hidroperóxidos em espécies não radicalares e absorção de radiação ultravioleta (Maisuthisakul *et al.*, 2007; Gilgun-Sherki *et al.*, 2002; Das *et al.*, 2006; Scheibmeir *et al.*, 2005).

A nível celular, os sistemas de defesa antioxidante, que se encontram distribuídos pelo citoplasma e organelos, podem ser classificados em enzimáticos ou não enzimáticos, e de acordo com a origem em endógenos, produzidos pelas células, ou exógenos quando são provenientes da dieta. As defesas enzimáticas incluem principalmente as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX ou GSH-P<sub>X</sub>), catalase (CAT), tioredoxina reductase e peroxidase do ascorbato (APX). Estas vão converter as ROS em moléculas mais estáveis como a água e o O<sub>2</sub> (Blokhina *et al.*, 2002). No caso da defesa antioxidante não enzimática, este grupo é representado por moléculas como o ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), glutathione (GSH), carotenóides, flavonóides, polifenóis, e alguns metais como o selénio, magnésio, zinco e cobre. Os sistemas enzimáticos e não enzimáticos, actuam em conjunto para garantir o equilíbrio redox das células. Além disso, uma vez que não é possível aumentar a actividade dos antioxidantes endógenos, torna-se assim fundamental o uso de antioxidantes exógenos, derivados da dieta, a fim de aumentar as defesas das células contra os radicais livres (Valko *et al.*, 2006; Valko *et al.*, 2007; Poljšake *et al.*, 2008; Maisuthisakul *et al.*, 2007; Das *et al.*, 2006; Gilgun-Sherki *et al.*, 2002).

### **1.5.2 Antioxidantes sintéticos e naturais**

Os antioxidantes butil-hidroxitolueno (BHT), butilhidroquinona terciária (TBHQ), butil-hidroxi-*anisole* (BHA) e propil, octil e dodecil galato (PG), são os compostos antioxidantes sintéticos, mais utilizados na preservação dos alimentos (Naphade *et al.*, 2009). No entanto têm surgido preocupações sobre os eventuais efeitos adversos que os antioxidantes sintéticos apresentam, tais como toxicidade e carcinogenicidade. Devido à segurança e à limitação do uso de antioxidantes sintéticos, os antioxidantes naturais obtidos principalmente a partir de matérias vegetais, tornaram-se interessantes (Mariod *et al.*, 2010; Maisuthisakul *et al.*, 2007; Özen *et al.*, 2008; Kosar *et al.*, 2007; Bahramikia *et al.*, 2009).

Apesar dos antioxidantes naturais produzidos pelas células (enzimas antioxidantes), as plantas possuem também uma variedade de antioxidantes naturais, tais como por exemplo: compostos fenólicos derivados do metabolismo secundário, em particular flavonóides, como por exemplo flavonóis, flavonas, isoflavonas, antocianinas e flavononas (Estevinho *et al.*, 2008; Huda-Faujan *et al.*, 2007; Francisco *et al.*, 2009; Simić *et al.*, 2007). Estes compostos possuem grupos hidroxilo livres ligados ao anel aromático e que vão actuar por quelatação de metais e remoção de radicais livres. O tocoferol (vitamina E), um antioxidante lipossolúvel presente na membrana das células e que as protege da peroxidação lipídica, também é considerado um composto antioxidante natural, assim como o ácido ascórbico (vitamina C) (Bouayed *et al.*, 2007; Padayatty *et al.*, 2003), um antioxidante solúvel em água que reage com radicais hidroxilo e superóxido, cedendo electrões. Após ceder electrões forma-se o radical ascorbil, que é relativamente estável. O Trolox, é um derivado do tocoferol, este é um antioxidante de síntese que doa, tal como o tocoferol, átomos de hidrogénio aos radicais (Chirinos *et al.*, 2008; Hall *et al.*, 2010). Os carotenóides ( $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno), actuam também como antioxidantes naturais (Das *et al.*, 2006; Poljšake *et al.*, 2008; Özen *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009).

### **1.6 Métodos para avaliar a capacidade antioxidante**

É importante seleccionar e usar um método estável e rápido para o ensaio de capacidade antioxidante, uma vez que a análise de centenas de amostras é bastante demorado. Vários métodos têm sido desenvolvidos para determinar a capacidade antioxidante total de extractos vegetais. Métodos como o ABTS, com resultados apresentados como equivalentes de Trolox, pelo facto de que usa como padrão o Trolox, DPPH, FRAP (*ferric reducing antioxidant power assay*), ORAC (*oxygen radical absorbance capacity assay*), TBARS (*thiobarbituric acid reactive substances*), TRAP (*total radical-trapping antioxidant parameter assay*),  $\beta$ -caroteno, valor peróxido, e as técnicas de voltame-

tria cíclica, fluorescência, quimioluminescência, ESR (*electron spin resonance*), bem como os ensaios de Crocin, TOSC (*oxyradical scavenging capacity*) e electroquímicos, podem ser usados para avaliar a capacidade antioxidante de extractos vegetais. O método de Folin-Ciocalteu (FC), também pode ser usado como ferramenta para avaliar a capacidade antioxidante de extractos (Roginsky *et al.*, 2005; Antolovich *et al.*, 2001; Prior *et al.*, 1999; Thaipong *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2008; Böhm *et al.*, 2004; Yoo *et al.*, 2007; Cai *et al.*, 2004; Huda-Faujan *et al.*, 2007).

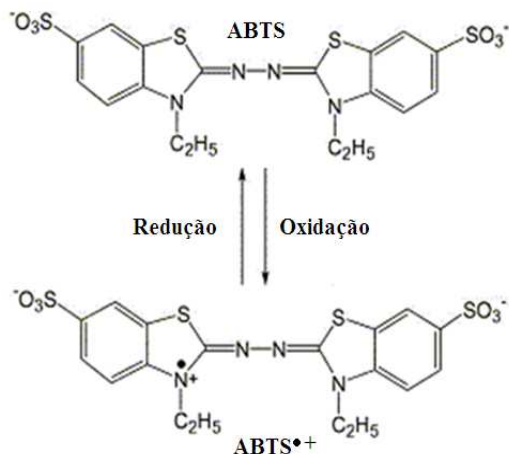
Com base nas reacções químicas envolvidas, os ensaios de capacidade antioxidante podem ser divididos em duas categorias: (1) transferência de átomo de hidrogénio (HAT) e (2) transferência de um electrão (ET). Os ensaios baseados em ET, envolvem uma reacção redox, em que o oxidante funciona como indicador do final da reacção. Os ensaios que têm por base HAT, são compostos por um radical livre sintético, um composto oxidável e um antioxidante. Ambos os métodos são usados para medir a capacidade de remoção de um radical (ou oxidante), e não a capacidade antioxidante da amostra (Huang *et al.*, 2005).

### **1.6.1 Método ABTS**

O método descrito por Miller *et al.* em 1993 (citado por Roginsky *et al.*, 2005), tem aplicação na análise de amostras biológicas, no entanto este pode ser usado também na determinação da capacidade antioxidante tanto em produtos alimentares como extractos de plantas e substâncias puras (Yoo *et al.*, 2007; Prior *et al.*, 1999; Roginsky *et al.*, 2005; Antolovich *et al.*, 2001).

O 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolína-6-sulfonato (ABTS), é um composto quimicamente estável, solúvel em água e que se apresenta incolor na forma reduzida. Pode ser convertido no catião radicalar estável (figura 13), de cor azul-esverdeada  $ABTS^{\bullet+}$  (forma oxidada), por reacções de oxidação com radicais inorgânicos, como por exemplo o radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ), radicais orgânicos como por exemplo o radical alcóxido ( $RS^{\bullet}$ ), e espécies não radicalares como por exemplo espécies de cloro e bromo (Erel *et al.*, 2004). A oxidação do ABTS pode também ser conseguida por via enzimática na presença de peróxido de hidrogénio, usando oxido-reductases como por exemplo peroxidases, ou através da utilização de proteínas não enzimáticas contendo grupos heme (metamioglobina e meta-hemoglobina). Oxidantes como o dióxido de manganês ( $MnO_2$ ) e persulfato de potássio ( $K_2S_2O_8$ ), podem também ser usados para produzir o radical  $ABTS^{\bullet+}$  (Osman *et al.*, 2006<sup>a</sup>). Após a mistura de uma dada amostra com a solução de  $ABTS^{\bullet+}$ , a reacção completa-se geralmente após um período de 5 a 6min, embora em algumas situações se complete em 1min. O radical  $ABTS^{\bullet+}$  pode ainda ser gerado por meios electroquímicos. Um outro método consiste na produção fotoquímica a partir de soluções aquosas de ABTS, por incidência de radiação ultravioleta (UV) a 254 nm (Lee *et al.*, 2008), no

entanto este método é influenciado pelo pH da solução utilizada, bem como pela presença de oxigênio dissolvido (Osman *et al.*, 2006<sup>b</sup>; Böhm *et al.*, 2004; Prior *et al.*, 1999; Arts *et al.*, 2004; Re *et al.*, 1999).



**Figura 13:** Representação das estruturas do ABTS e ABTS<sup>•+</sup> (adaptado de Lee *et al.*, 2008).

A produção do ABTS<sup>•+</sup> constitui a base do método espectrofotométrico aplicado na determinação da capacidade antioxidante em compostos hidrofílicos e lipofílicos. Quando o ABTS<sup>•+</sup> é misturado com uma substância capaz de doar átomos de hidrogênio, é reduzido à sua forma original (ABTS incolor), ao passo que a substância é oxidada. Esta característica é o princípio básico dos métodos que usam o ABTS (Osman *et al.*, 2006<sup>b</sup>; Erel *et al.*, 2004; Roginsky *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2008).

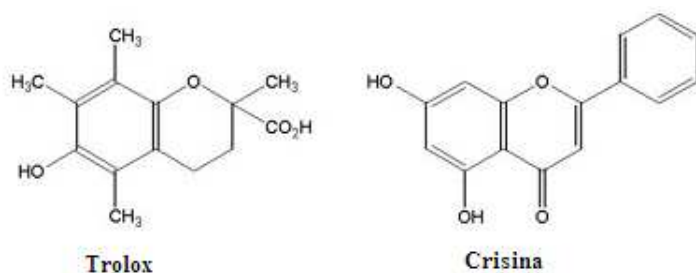
O ABTS<sup>•+</sup> apresenta absorção aos comprimentos de onda máximos nas zonas dos 414, 645, 650, 734, 805, e 820 nm, ao passo que o ABTS apresenta absorção máxima a 342 nm. A capacidade relativa dos antioxidantes doadores de átomos de hidrogênio, em impedir a acumulação de radicais ABTS<sup>•+</sup>, pode ser medida espectrofotometricamente a 414 ou 734nm. A monitorização do ABTS<sup>•+</sup> a 414nm resulta em limites de detecção baixos, no entanto as interferências de compostos das amostras são minimizadas efectuando leituras de absorvência a 734nm (Labrinea *et al.*, 2004; Antolovich *et al.*, 2001; Re *et al.*, 1999).

Alguns antioxidantes são capazes de retardar a formação de ABTS<sup>•+</sup>, e outros de remove-lo dando origem a outros radicais, no entanto, podem existir compostos antioxidantes capazes de exercer as duas funções (Böhm *et al.*, 2004)

No método ABTS é usual usar-se como padrão o Trolox (figura 14), um composto solúvel em água, análogo à vitamina E com propriedades antioxidante. No entanto pode também ser usado como padrão ácido ascórbico. Os resultados do método de ABTS são geralmente expressos por comparação com concentrações conhecidas destes dois compostos, em que no caso do Trolox são expressos como valor TEAC. O TEAC é igual à concentração milimolar de uma solução de Trolox que contem capa-

cidade antioxidante equivalente a uma solução 1,0 mM da substância a ser investigada. Ou seja reflecte a capacidade relativa de um antioxidante (dador de hidrogénios ou de electrões), em remover o  $ABTS^{*+}$ , comparada com a do Trolox. No entanto o valor de TEAC depende do tempo de incubação e da diferença entre a concentração de  $ABTS^{*+}$  e quantidade de amostra (Antolovich *et al.*, 2001; Yoo *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2008).

O valor TEAC pode não se correlacionar exactamente com a capacidade antioxidante, por exemplo o composto crisina (figura 14), possui um valor de TEAC alto ao passo que a capacidade antioxidante é relativamente baixa. A razão deve-se ao facto de que da reacção com crisina forma-se um radical que reage rapidamente com uma segunda molécula de  $ABTS^{*+}$ , contribuindo assim para o valor de TEAC. Ou seja os produtos resultantes da reacção do  $ABTS^{*+}$  com um dado composto, também podem reagir com o  $ABTS^{*+}$ , contribuindo para o aumento do valor de TEAC. Deste modo pode acontecer que os produtos da reacção tenham melhor capacidade antioxidante do que o composto de partida. Apesar desta limitação, no que diz respeito aos ensaios de avaliação capacidade antioxidante, o método TEAC é uma ferramenta útil na detecção de antioxidantes desconhecidos em misturas complexas (Arts *et al.*, 2004).



**Figura 14:** Representação das estruturas do Trolox e crisina (Arts *et al.*, 2004).

A vantagem do método ABTS consiste na sua relativa simplicidade, o que permite a aplicação em ensaios de rotina em qualquer laboratório. Contudo a pequena selectividade do  $ABTS^{*+}$ , quando em comparação com o método de DPPH que é mais selectivo na reacção com dadores de átomos de hidrogénio, é mais uma limitação do método. O radical  $ABTS^{*+}$  reage com qualquer composto aromático hidroxilado, independentemente da sua real capacidade antioxidante (Roginsky *et al.*, 2005). De Beer *et al.* apresentaram duas razões pelas quais diferentes trabalhos podem apresentar diferentes valores para TEAC, a primeira tem a ver com a estratégia de produção do  $ABTS^{*+}$ , e a segunda com diferença no tempo de incubação (Beer *et al.*, 2003).

O método ABTS pode ser aplicado com HPLC, permitindo assim efectuar a detecção de compostos antioxidantes em matrizes complexas (Koleva *et al.*, 2001).



### 1.6.2 Método DPPH

Em 1922, Goldschmidt e Renn descobriram um composto de cor violeta e estável, de fórmula molecular  $C_{18}H_{12}N_5O_6$  ( $M_r = 394.33$  g/mol), designado por 1,1-difenil-1-2-picrilhidrazil (DPPH) (figura 15). Este permite obter um radical livre estável em virtude da deslocalização do electrão livre sobre a molécula como um todo. Esta deslocalização é responsável pela cor violeta intensa, idêntica à do  $KMnO_4$ . O DPPH é caracterizado por possuir um espectro de UV-visível, com máximo de absorção, entre os 515 - 520 nm. O anião (DPPH<sup>-</sup>), pode também ser oxidado a radical DPPH. Na sua forma reduzida (1,1-difenil-1-2-picrilhidrazina (DPPH-H)), apresenta uma cor entre o amarelo e laranja (Molyneux, 2004; Ionita, 2003; Villaño *et al.*, 2007).

Dado que o DPPH pode ser armazenado, com pequena degradação, pois não dimeriza nem reage com o oxigénio, este torna-se útil na investigação, em particular na determinação de propriedades antioxidantes de aminas, fenóis, compostos naturais (extractos de plantas), vitaminas, fármacos, e de produtos alimentares, bem como inibição de reacções homolíticas e de polimerização (Ionita, 2003; Scalzo, 2008).

O radical livre de DPPH possui a capacidade de abstrair hidrogénios, originado como produto DPPH-H, com a perda da cor violeta, ou seja a reacção de transferência do protão causa um decréscimo na intensidade de absorção e a solução perde a cor inicial. Deste modo, a adição de um antioxidante resulta numa diminuição de absorvência proporcional à concentração e actividade do composto antioxidante (Molyneux, 2004; Ionita, 2003; Locatelli *et al.*, 2009; Villaño *et al.*, 2007; Scalzo, 2008). Representando o radical DPPH por DPPH<sup>•</sup> e a molécula dadora de protões por AH, a reacção é dada pela equação 15:

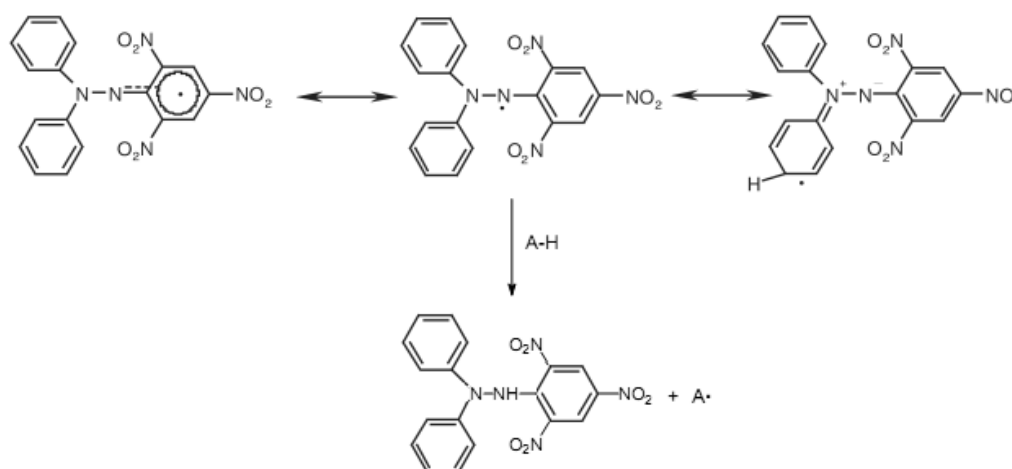


onde DPPH-H é a forma reduzida do DPPH e  $A^{\bullet}$  um radical livre. O radical livre  $A^{\bullet}$  reage em seguida com outra molécula do mesmo tipo, produzida numa reacção paralela, originando um composto não radicalar, a figura 15 ilustra um exemplo da reacção dada pela equação 15 (Molyneux, 2004). A reacção do DPPH pode também ser acompanhada através de ressonância paramagnética electrónica (EPR), também conhecida por ressonância electrónica de spin (ESR), esta técnica baseia-se na medição das transições de electrões desemparelhados num campo magnético, permitindo assim detectar e indentificar moléculas com electrões desemparelhados como os radicais livres. A capacidade antioxidante também pode ser determinada através desta técnica (Scalzo, 2008; Liu *et al.*, 2009).

Analisando a estrutura do DPPH (figura 15), é de esperar que este reaja com outro radical livre de várias maneiras diferentes:

- i) Pelo acoplamento aos átomos de azoto do radical;
- ii) Por acoplamento na posição *para* do anel fenil;
- iii) Acoplamento no substituínte picril;

No método de DPPH, a capacidade antioxidante é medida à temperatura ambiente, eliminando o risco de degradação térmica das moléculas testadas. No entanto, o mecanismo reaccional entre os antioxidantes e o radical DPPH depende da conformação estrutural do antioxidante (Bondet *et al.*, 1997; Molyneux, 2004).



**Figura 15:** Representação do radical livre DPPH e respectivas estruturas de ressonância. Ilustração esquemática da reacção dada pela equação 15 (adaptado de Ionita, 2003; Scalzo, 2008).

Um parâmetro introduzido na interpretação dos resultados do método DPPH, é a concentração "eficiente" ou valor EC50. Este é definido como a concentração de substrato que faz com que haja 50% de redução da actividade de DPPH, medida pela cor. Nesta situação, quanto maior a actividade antioxidante, menor é o valor de EC50. O tempo necessário para atingir o estado estacionário na concentração EC50, é chamado TEC50, que considera a taxa de reacção para o radical livre. No caso de misturas complexas, tais como extractos de plantas, os resultados devem ser expressos como equivalentes de DPPH por grama de matéria. Contudo a abordagem mais simples na apresentação dos resultados, consiste na elaboração de um gráfico de absorvência em função da concentração de substrato, mas também se pode apresentar os resultados em termos de percentagem de redução do DPPH (Q), por vezes designado como a inibição, que é definido pela equação 16:

$$Q = \frac{(A_0 - A_c)}{A_0} \times 100 \quad (\text{eq. 16})$$

onde  $A_0$  é a absorvência inicial e  $A_c$  é o valor de concentração de amostra adicionado (Villaño *et al.*, 2007; Molyneux, 2004; Locatelli *et al.*, 2009).

Os padrões mais comuns do método são o ácido ascórbico (vitamina C) e  $\alpha$ -tocoferol (Vitamina E), no entanto pode também ser usado o Trolox, usado inicialmente apenas para o método ABTS (Villaño *et al.*, 2007; Molyneux, 2004).

No que diz respeito ao tempo de realização do método, originalmente foi recomendado um tempo de reacção de 30 minutos, no entanto como a taxa de reacção varia entre substratos, a melhor prática é a de acompanhar a reacção até que esta termine (Katalinic *et al.*, 2006; Molyneux, 2004).

Relativamente ao solvente a ser utilizado, o método funciona igualmente bem com metanol ou etanol, nenhum dos quais apresenta interferências com a reacção (Molyneux, 2004). Este método apresenta a vantagem de usar um radical livre estável e comercialmente disponível, o que faz com que seja amplamente aplicado no estudo da capacidade antioxidante de alimentos, como o azeite, frutas, sumos e vinhos. Além disso, é fácil de executar, altamente reprodutível e comparável com outros métodos como o ABTS, redução do anião superóxido e inibição da peroxidação lipídica. Outras vantagens a ter em conta é que o método é independente da polaridade das amostras e além disso é pouco dispendioso. A principal desvantagem é que o radical DPPH é um radical artificial e não reproduz as condições *in vivo* (Villaño *et al.*, 2007; Locatelli *et al.*, 2009; Marxen *et al.*, 2007).

Vários factores podem influenciar o método e a interpretação dos dados experimentais, tais como o solvente usado, o pH, concentração de DPPH e das amostras, e tempo de reacção. Embora as opiniões sobre a influência da natureza hidrofílica ou lipofílica do antioxidante na reacção com DPPH são contraditórias, esse facto pode ser uma limitação importante na interpretação das propriedades de antioxidantes hidrofílicos (Locatelli *et al.*, 2009).

Segundo Jae Min Lee *et al.* (Lee *et al.*, 2007), o método de DPPH pode ser usado na previsão da estabilidade oxidativa de óleos, considerando os valores iniciais de absorvência do DPPH, a taxa de formação de radicais livres, a concentração inicial de compostos antioxidantes e o tempo de oxidação necessário para o consumo dos antioxidantes. Para além disso, Qian-kun Zhuang *et al.*, 1999, estudaram o comportamento electroquímico de partículas sólidas de DPPH immobilizadas na superfície de um eléctrodo de carbono. Verificou-se que o par redox  $\text{DPPH}^\bullet / \text{DPPH}$  pode ser usado em métodos electroquímicos, nomeadamente os amperométricos, para a determinação da capacidade antioxidante, em amostras biológicas ou outras amostras transparentes ou coloridas sem tratamentos prévios (Zhuang *et al.*, 1999; Milardovic *et al.*, 2005; Milardović *et al.*, 2006).

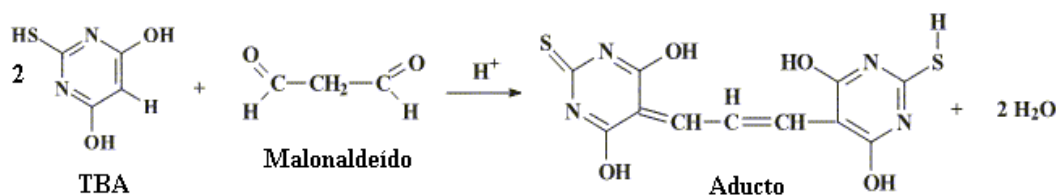
O método de DPPH pode também ser utilizado em HPLC-MS, permitindo efectuar uma caracterização rápida da capacidade antioxidante de compostos em amostras biológicas e extractos vegetais (Nuengchamnong *et al.*, 2010; Molyneux, 2004).

### 1.6.3 Método do TBA

O método TBA descrito inicialmente por Kohn e Liversedge em 1944, é um dos métodos frequentemente utilizado para avaliar a peroxidação lipídica em produtos alimentares que contenham ácidos gordos polinsaturados, como por exemplo carnes e óleos alimentares e em sistemas biológicos como por exemplo tecido cerebral e lípidos das membranas celulares (Garcia *et al.*, 2005; Frankel *et al.*, 1983; Hodges *et al.*, 1999; Gomes *et al.*, 2003; Halliwell *et al.*, 2008; Tsaknis *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 2001; Guillén-Sans *et al.*, 1998).

O ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), figura 16, é um composto amplamente utilizado devido à sua reactividade com substâncias que apresentam um grupo carbonilo (aldeídos, cetonas), apesar de ácidos, ésteres, amido, açúcares e compostos de pirimidina também podem exibir reactividade ao TBA. O mecanismo da reacção com o grupo carbonilo, surge como uma consequência da instabilidade do grupo metileno na posição C-5 da molécula. É utilizado principalmente no reconhecimento do nível de oxidação de gorduras e o valor TBA representa o nível de aldeídos na fracção lipídica dos alimentos que sofreram oxidação (Guillén-Sans *et al.*, 1998).

Este método é uma técnica colorimétrica que se baseia na medição da absorvência de um composto de cor rosa-avermelhado, designado por aducto, com absorção máxima aos 532-535 nm e fluorescência a 533nm, e que é resultado da reacção entre duas moléculas de TBA e uma molécula de malonaldeído (MDA). O MDA, figura 6, é um produto resultante da degradação oxidativa e/ou enzimática de ácidos gordos polinsaturados (PUFAs), permitindo avaliar a oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos. Trata-se de um dialdeído de três carbonos que a pH ácido é encontrado maioritariamente na forma  $\beta$ -hidroxiacroleína, a pH neutro e alcalino na forma de anião enolato (Seljeskog *et al.*, 2006; Garcia *et al.*, 2005; Ulu, 2004; Tokur *et al.*, 2006; Tsaknis *et al.*, 1998).



**Figura 16:** Representação esquemática da reacção entre o TBA e o MDA, com formação do aducto (adaptado de Osawa e tal., 2005).

Há que ter em conta também o facto de que no caso dos alimentos, a maioria do MDA se encontra ligado aos constituintes que fazem parte dos alimentos e pouco existe na forma livre, pelo

que se torna necessário a adição de soluções ácidas para libertar o MDA. Diferentes soluções de extracção do MDA têm sido sugeridas, nomeadamente o uso de ácido tricloroacético (TCA) em solução aquosa, TCA com solução de ácido fosfórico (PA) e ácido perclórico em solução aquosa. Estas soluções além de libertarem o MDA, são também fundamentais para o desenvolvimento da cor quando este reage com o TBA. A cor é também afectada pela presença de iões metálicos, responsáveis por acelerar o processo de oxidação, e antioxidantes responsáveis pelo processo oposto (Ulu *et al.*, 2004; Guillén-Sans *et al.*, 1998; Halliwell *et al.*, 2008).

O valor de TBA pode ser expresso em mg malonaldeído por kg de amostra ou miligramas de malonaldeído por unidade de lípidos, no entanto o valor altera-se de acordo com as condições usadas no método. O MDA pode ser determinado por HPLC ou cromatografia gasosa (Ulu *et al.*, 2004; Halliwell *et al.*, 2008; Böhm *et al.*, 2004).

A construção de uma curva de calibração para este método torna-se complicado pelo facto de o MDA ser instável e por isso este deve ser preparado por hidrólise do 1,1,3,3-tetrametoxipropano ou 1,1,3,3-tetraetoxipropano, que é usado como padrão no teste de TBA (Gomes *et al.*, 2003; Halliwell *et al.*, 2008).

O método apresenta como principal desvantagem o facto de que não ser específico para o MDA, porque muitos produtos resultantes da oxidação lipídica, tais como hidroperóxidos, aldeídos conjugados, proteínas e ureia, dão resultados positivos, porque reagem como o TBA. Estes produtos formados podem apresentar absorvência na zona dos 455 nm (cor amarela), 495 nm (cor laranja) e 532 nm (cor vermelha) (Sun *et al.*, 2001; Frankel *et al.*, 1983; Tsaknis *et al.*, 1998; Böhm *et al.*, 2004). No caso particular de extractos vegetais, os glúcidos e pigmentos também contribuem para a absorvência a 532 nm, aumentando do valor de MDA. Como os níveis destes compostos variam entre plantas, é necessário efectuar uma remoção prévia dos mesmos, eliminando deste modo potenciais contribuições para a absorvência a 532 nm (Hodges *et al.*, 1999).

Um outro aspecto importante a ter em conta quando se usa o método TBA, é o facto de que o MDA apresenta capacidades mutagénicas, isto é a capacidade de interagir com ácidos nucleicos e proteínas, além disso interfere também com a estabilidade cardiovascular (Rio *et al.*, 2005; Frankel *et al.*, 1983; Halliwell *et al.*, 2008).

Apesar de o método ser criticado pela falta de especificidade e problemas associados a sua execução, este é no entanto sensível a pequenas alterações das substâncias reactivas ao TBA em tecidos animais e vegetais, e além disso é reconhecido como um método fiável para estimar a peroxidação lipídica. No entanto, este não pode ser usado para comparar níveis de peroxidação entre tecidos com diferente composição em PUFAs (Halliwell *et al.*, 2008; Hodges *et al.*, 1999).

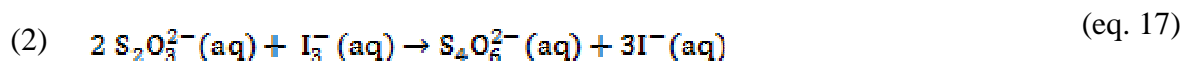
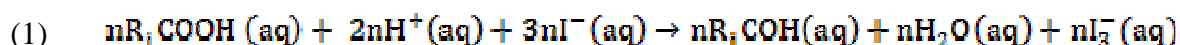
### 1.6.4 Valor peróxido

Os óleos e lípidos dos alimentos sofrem auto-oxidação quando em contacto com o ar, durante as etapas de processamento, transporte e armazenamento. A oxidação causa a deterioração do sabor, odor, cor, textura e aparência e também uma diminuição do valor nutricional dos alimentos, além disso contribui para as intoxicações alimentares (Setiowaty *et al.*, 2000; Shiozawa *et al.*, 2006).

Da reacção de oxidação resulta geralmente hidroperóxidos, produtos primários da reacção entre o oxigénio e ácidos gordos insaturados, e que desempenham um papel central na auto-oxidação dos lípidos. Produtos secundários como aldeídos, polímeros e cetonas podem também ser formados. Os valores de aldeídos e cetonas aumentam inicialmente, mas tendem depois a diminuir como resultado da degradação dos mesmos. Alterações de sabor e toxicidade dos alimentos, são devido aos produtos secundários (Shiozawa *et al.*, 2006; Antolovich *et al.*, 2001).

A concentração de peróxido, tradicionalmente designada como valor ou índice peróxido (PV), consiste na concentração de substâncias, em termos de miliequivalentes de peróxidos por 1000g de amostra, que oxida o iodeto de potássio (KI). O PV surge assim como uma característica da qualidade dos óleos e gorduras alimentares, e além disso permite quantificar a quantidade de hidroperóxido e peróxidos de oxigénio em gorduras e óleos. O PV aumenta durante a fase de propagação e depois decresce na fase de terminação da oxidação lipídica (Setiowaty *et al.*, 2000; Strochkova *et al.*, 2001; Antolovich *et al.*, 2001; Laguerre *et al.*, 2007).

O método de referência para a determinação do PV, consiste no método da *American Oil Chemists' Society* (AOCS, 1989). Este trata-se de um método iodométrico que usa como solvente uma mistura de ácido acético com isoctano ou clorofórmio. A primeira fase do método consiste na reacção de oxidação do KI (KI em excesso), com os hidroperóxidos e peróxidos de oxigénio presentes na amostra. A segunda etapa consiste na titulação volumétrica dos aniões triiodeto libertados ( $I_3^-$ ), com o tiosulfato de sódio ( $Na_2S_2O_3$ ), usando como indicador uma solução de amido. Considerando RCOOH como sendo a fórmula química dos hidroperóxidos, as reacções e envolvidas no método são dadas pela equação 17 (Setiowaty *et al.*, 2000; Strochkova *et al.*, 2001; Antolovich *et al.*, 2001):



O anião triiodeto libertado, pode também ser quantificado usando um método potenciométrico de oxidação-redução, isto de acordo com a reacção dada pela equação 18 (Strochkova *et al.*, 2001):



O método deve ser aplicado na avaliação da capacidade antioxidante durante o início da oxidação lipídica, em condições suaves, a capacidade antioxidante é visualizada através de uma redução na oxidação em relação à amostra controlo (amostra sem tratamento) (Antolovich *et al.*, 2001). As limitações do método são nomeadamente a falta de sensibilidade e selectividade, a possível incorporação de iodo nas ligações insaturadas o que conduz a resultados mais baixos, a oxidação do iodeto pelo oxigénio dissolvido e as variações na reactividade com os diferentes peróxidos e hidroperóxidos. Outra limitação a ter em conta é que a determinação de níveis baixos de PV requer experiência do analista em fixar o ponto final da titulação iodométrica, uma vez que este se torna difícil em detectar. A exposição à luz e a temperatura a que se realiza o ensaio, uma vez que esta pode levar à decomposição de hidroperóxidos, também pode afectar os resultados, além disso este método não é relevante para amostras em que se encontram muito oxidadas (Antolovich *et al.*, 2001; Stochkova *et al.*, 2001; Laguerre *et al.*, 2007).

## **1.7 Método para a determinação de compostos fenólicos totais**

Os métodos usados na determinação de compostos fenólicos, são baseados nas propriedades de oxidação-redução. Os compostos fenólicos podem actuar como agentes redutores e ceder átomos de hidrogénios ou electrões. O método mais usual na determinação de compostos fenólicos é o método de Folin-Ciocalteu (FC) (Stratil *et al.*, 2007).

### **1.7.1 Método de Folin-Ciocalteu**

Os compostos fenólicos são um grupo complexo, mas importante, de compostos que ocorrem naturalmente nas plantas, originários do metabolismo secundário destas. Não estão envolvidos no crescimento nem no metabolismo energético das plantas, e normalmente são produzidos em resposta ao stress ambiental como por exemplo o ataque por microrganismos, predadores e os níveis radiação UV. Possuem propriedades biológicas, tais como: antioxidantes, anti-apoptóticas, anti-envelhecimento, anti-cancerígenas, anti-inflamatórias, anti-arterioscleróticas, protecção cardiovascular, melhoria da função endotelial e inibição da actividade de proliferação celular. A maioria destas acções biológicas tem sido atribuída às suas capacidades intrínsecas de redução (Harnly *et al.*, 2007; Teixeira *et al.*, 2009; Antolovich *et al.*, 2000; Hodzic *et al.*, 2009).

A quantificação de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu (FC), envolve a oxidação de fenóis em meio básico, pelo reagente de cor amarela Folin-Ciocalteu. Este reagente consiste na mistura dos ácidos fosfomolibdico ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) e fosfotúngstico ( $H_3W_{12}O_{40}$ ), em que o molibdénio e tungsténio estão no estado +6. Da reacção de oxidação resulta um composto de cor azul (molibdotungstofosfato), cuja absorção máxima é dada em função da composição quantitativa de compostos fenólicos, e do pH da solução obtido geralmente pela adição de carbonato de sódio (Cicco *et al.*, 2009; Ikawa *et al.*, 2003).

Este método baseia-se na transferência de electrões do composto antioxidante para o agente oxidante, que neste caso é o reagente de Folin-Ciocalteu, e o aumento de absorvência é medido a 750nm (Magalhães *et al.*, 2007).

Compostos fenólicos totais, podem ser quantificados por este método, com base nas propriedades de redução de fenóis em meio alcalino. No entanto, esta técnica colorimétrica não apresenta especificidade, ou seja não faz a distinção entre os diferentes tipos de compostos fenólicos (polifenóis ou monofenóis), para tal será necessário recorrer às técnicas cromatográficas. Além disso existem outras substâncias que reagem com o reagente FC, provocando interferências no método, nomeadamente as aminas alifáticas terciárias, aminas terciárias presentes em tampões biológicos, aminoácidos como a tirosina e o triptofano, hidroxilaminas, hidrazinas, certas purinas, dióxido de enxofre, ácido ascórbico, açúcar,  $Fe^{(II)}$  e diversos agentes redutores orgânicos e inorgânicos (Carbot *et al.*, 2005; Magalhães *et al.*, 2006; Ikawa *et al.*, 2003; Remóne *et al.*, 2009; Roginsky *et al.*, 2005).

As variações do método são devidas à concentração de carbonato de sódio, à sequência de adição de reagentes, bem como o tempo de adição dos mesmos, o tempo e temperatura de incubação da mistura. Solventes na amostra além da água, também podem interferir com o método FC, nomeadamente na formação do composto de cor azul. Assim a preparação de padrões e brancos com o mesmo solvente da amostra, minimiza esta interferência do método (Cicco *et al.*, 2009).

Como solução padrão no método de FC, geralmente usa-se uma solução de ácido gálico dissolvido em água, e os resultados são apresentados em equivalentes de ácido gálico (Magalhães *et al.*, 2007; Turkmen *et al.*, 2006; Roginsky *et al.*, 2005).

A principal vantagem do método consiste no facto de ser um método sensível uma vez que se baseia na formação de um produto corado, além disso não requer uma padronização restrita das condições do ensaio (Roginsky *et al.*, 2005)



## 1.8 Objectivo do trabalho

Com este trabalho pretende-se estudar a capacidade antioxidante de alguns extractos de plantas de origem angolana, tais como o *Adenodolichos huillensis*, o *Hymenodictyon floribundo*, a *Parinari pumila*, o *Peucedano angolense*, a *Tinnea antiscorbútica*, a *Eragrostis viscosa*, a *Xilopia aromatis-sima*, a *Boscia microphylla*, a *Cassia occidentals* e o *Rhus kirkii*, pelos métodos de DPPH e ABTS. Avaliar a inibição da peroxidação lipídica pelos métodos do ácido tiobarbitúrico (TBA) e da determinação do valor peróxido. Determinar o teor de compostos fenólicos totais nos referidos extractos usando o método de Folin-Ciocalteu.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material e equipamento

#### 2.1.1 Material:

Na execução do trabalho experimental, para além do material corrente de laboratório, foram utilizados os seguintes equipamentos:

- **Balanças:** efectuaram-se as pesagens dos reagentes necessários nas balanças analíticas Sartorius e Kern.
- **Block heater da Stuart:** foi usado para o método do ácido tiobarbitúrico (TBA), e do valor peróxido.
- **Espectofotómetro:** as determinações espectrofotométricas para o método ABTS e DPPH, foram realizadas num espectofotómetro Ultrospec, modelo U/V 3000 da Pharmacia Biotech. Para o método TBA foi usado o espectofotómetro Shimadzu, modelo UV-1700 da Pharmaspec.
- **Potenciómetro:** o pH das soluções foi medido num potenciómetro pH-Meter da Metrohm.
- **Vortex:** as soluções foram agitadas num vortex Mixer da Labnet Internacional, Inc.
- **Pipetador:** as soluções e reagentes foram pipetados com o auxílio de um pipetador automático Rota-Filler 3000.
- **Evaporador rotativo:** foi utilizado um evaporador rotativo da Heidolph VV 2000 na obtenção dos diferentes extractos.

- **Placa de aquecimento com agitação da Bunsen:** foi usada na preparação das diferentes soluções.
- **Banho de ultra-sons (Transonic T460/H):** foi usado na preparação de uma solução para o método do ácido tiobarbitúrico (TBA).

### 2.1.2 Reagentes:

Na execução do trabalho experimental foram usados diversos produtos químicos, que se apresentam na tabela 3, com o respectivo fabricante e grau de pureza.

**Tabela 3:** Registo dos reagentes utilizados.

<i>Reagente</i>	<i>Fabricante</i>	<i>Pureza %</i>
Metanol	Panreac	99,8
Clorofórmio	Lab-Scan Analytical Siences	99,5
1,1,3,3-Tetraepoxipropano (TEP)	Fluka	97
Ácido gálico monohidratado	Aldrich	98
3-etil-benzotiazolino-6-sulfónico (ABTS)	Sigma	98
Carbonato de sódio anidro	Fluka	99
Persulfato de potássio	Aldrich	99
Butil-hidroxianisolo (BHA)	Sigma	98
Folin	Sigma	---
Tween 20	Panreac	---
2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)	Sigma	---
Ácido tiobarbitúrico (TBA)	Sigma	98
Ácido linoleico	Aldrich	---

## 2.2 Técnicas experimentais

- **Preparação dos extractos:**

As plantas em estudo, *Hymenodictyon floribundum*, *Parinari pumila*, *Tennea antiscorbutica*, *Eragrostis viscosa*, *Xylopiya aromatissima*, *Peucedano angolense*, *Boscia microphylla*, *Adenodolichos huillensis*, *Cassia occidentalis* e a *Rhus kirkii*, foram recolhidas em Angola na província de Huila. Foram depois colocadas em balões onde permaneceram durante alguns dias em maceração com metanol, e seguidamente obteve-se os diferentes extractos metanólicos por evaporação do solvente. Por fim, os extractos foram submetidos a extracções líquido-líquido com diferentes solventes.

Ao longo do texto irá ser usada a designação de hexano1 e 2, referindo-se estas apenas ao facto de que as plantas em causa terem sido recolhidas em anos diferentes, assim para a planta com a designação hexano1 o ano de recolha foi em 2001, e para a designação hexano2 em 2003. A designação extracto C., refere-se a extractos em que o solvente de extracção usado foi o acetato de etilo.

Preparam-se depois soluções dos extractos, extraídos com diferentes solventes, com uma concentração de 0,01 mg/mL (0,250 mg em 25mL de metanol), e em seguida efectuou-se uma diluição com metanol (25  $\mu$ L da concentração 0,01 mg/mL para um volume de 5 mL), obtendo-se uma concentração de 0,05  $\mu$ g/mL.

### 2.2.1 Método Folin-Ciocalteu

- **Construção da curva de calibração:**

Pipetou-se 0; 10; 20; 40; 80; 120; 160 e 200  $\mu$ L da solução de ácido gálico (5g/L), para diferentes balões e perpez-se com água destilada para o volume final de 10 mL. De cada solução pipetou-se 400  $\mu$ L para tubos de ensaio, aos quais se adicionou 2000  $\mu$ L de reagente de Folin-Ciocalteu (1/10), passados 8 min adicionou-se 1600  $\mu$ L de carbonato de sódio 7,5%. Agitou-se os tubos de ensaio no vórtex e deixou-se incubar 90 min à temperatura ambiente até a solução adquirir uma cor azul. Em seguida, após o registo da absorvência das cuvets quando vazias, leu-se a absorvência das cuvets contendo as amostras a 765 nm, considerando o branco a solução que contem 0  $\mu$ L de ácido gálico.

Depois de traçada a curva de calibração (absorvência em função da concentração), cujo gráfico se encontra nos resultados, prosseguiu-se à análise das amostras.

- **Medição da absorvência das amostras:**

Para cada tubo de ensaio, introduziu-se: 2000 µL de reagente de Folin-Ciocalteau (1/10) e 400 µL de extracto de planta. Esperou-se 8 min e em seguida adicionou-se 1600 µL de carbonato de sódio 7,5%. Agitou-se os tubos de ensaio no vórtex, e incubou-se 90 min até a solução adquirir cor azul. Seguidamente leu-se a absorvência das amostras a 765 nm, tendo-se registado previamente o valor das cuvets vazias. Usou-se como branco um tubo que continha 400 µL de água destilada em vez de 400 µL de extracto. Foram realizados nove ensaios em três séries de três ensaios para cada amostra.

## 2.2.2 Capacidade antioxidante:

### 2.2.2.1 Método do ABTS

- **Medição da absorvência das amostras:**

Aos 5 mL da solução do ABTS (7mM), adicionou-se 88 µL de persulfato de potássio (140 mM). Esta solução foi depois mantida no escuro durante 12-16 h, para assegurar a formação do radical ABTS<sup>•+</sup>. No dia seguinte procedeu-se a diluição com etanol 50% até se obter uma absorvência de cerca de 0,7 a 734 nm. A solução de ABTS<sup>•+</sup> deve ser preparada para cada ensaio.

As pipetagens foram efectuadas directamente para as cuvets, após o registo da absorvência destas quando vazias. Para as amostras, foram pipetados para cada cuvete 3000 µL da solução de ABTS<sup>•+</sup> e 30 µL da solução dos extractos. Realizou-se também ao mesmo tempo, um ensaio para a solução de ABTS<sup>•+</sup>. Este tem como objectivo observar o comportamento da solução de ABTS<sup>•+</sup> ao longo dos 15 min, assim para a respectiva cuvete pipetou-se 3000 µL da solução de ABTS<sup>•+</sup> e 30 µL de metanol. O branco para acertar o espectrofotómetro a zero de absorvência consistia em 30030 µL de metanol.

Mediram-se as absorvências das cuvets a 734 nm, durante 15 min (aos tempos de 1 seg., 5 seg., 1 min, 3 min, 5 min, 10 min e 15 min), tendo-se realizado nove ensaios em três séries de três ensaios para cada amostra. A percentagem de inibição foi calculada usando a expressão dada pela equação 19:

$$\% \text{ Inibição} = 100 \times \left[ \frac{\text{Absorvência}_{\text{branco}} - \text{Absorvência}_{\text{amostra}}}{\text{Absorvência}_{\text{branco}}} \right] \quad (\text{eq. 19})$$

Como padrão foi usado uma solução de Trolox de concentração igual à dos extractos.

### **2.2.2.2 Método do DPPH**

- **Medição da absorvência das amostras:**

As pipetagens foram efectuadas directamente para as cuvetes, após o registo da absorvência destas quando vazias. Assim para as amostras, pipetou-se para cada cuvete 2700  $\mu\text{L}$  da solução de DPPH (40 $\mu\text{M}$ ) e 200  $\mu\text{L}$  da solução dos extractos. Realizou-se também em simultâneo com os ensaios das amostras, um ensaio para a solução de DPPH. Este teve como finalidade observar o comportamento do DPPH ao longo dos 15 min, assim para a respectiva cuvete pipetou-se 2700  $\mu\text{L}$  da solução de DPPH e 200  $\mu\text{L}$  de metanol. O branco para acertar o espectrofotómetro a zero de absorvência consistia em 2900  $\mu\text{L}$  de metanol.

Mediram-se as absorvências das cuvetes com as amostras, branco e a solução de DPPH a 515 nm, durante 15 min (aos tempos de 1 seg., 5 seg., 1 min, 3 min, 5 min, 10 min e 15 min), tendo-se realizado nove ensaios em três séries de três ensaios para cada amostra. A percentagem de inibição foi calculada usando a expressão dada pela equação 19. Como padrão usou-se uma solução de Trolox de concentração igual à dos extractos.

### **2.2.2.3 Método do TBA**

- **Construção da curva de calibração:**

Na construção da curva de calibração (absorvência em função da concentração), prepararam--se diferentes soluções de (TEP), em PBS (0,05M a pH=7). Assim para cada tubo de ensaio efectuaram-se as pipetagens de 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3 mL de TEP (25 $\mu\text{M}$ ), para um volume final de 3 mL. Em seguida incubou-se a 80°C durante 30 min. Após a incubação adicionou-se 1 mL de TCA 20% e 2 mL de TBA 1%, e procedeu-se a uma segunda incubação durante 15 min. Por fim arrefeceu-se os tubos em água corrente e procedeu-se às leituras das absorvências a 530 nm. Depois de encontrada a curva de calibração, cuja representação gráfica se encontra nos resultados, prosseguiu-se à quantificação da matéria peroxidada. Usou-se como branco a solução de PBS, que sofreu igual procedimento.

- **Medição da absorvência das amostras:**

Na análise da matéria peroxidada, procedeu-se à oxidação do ácido linoleico na presença dos diferentes extractos e de um composto antioxidante, nomeadamente o BHA 0,1% (p/v), que serviu como referência para o método em questão. Assim efectuou-se as pipetagens das diferentes soluções, para os tubos de ensaio, de acordo com a tabela 4.

**Tabela 4:** Volumes usados das diferentes soluções para proceder ao processo de oxidação do ácido linoleico.

<i>Soluções</i>	<i>Amostra</i> ( $\mu\text{L}$ )	<i>Branco</i> ( $\mu\text{L}$ )
Ácido linoleico	2000	2000
Extracto / BHA 1%	140	--
Metanol	--	140
Etanol 95%	860	860
<b>Volume final (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	3000	3000

Após as pipetagens, incubou-se os tubos a 80°C durante 30 min. De seguida pipetou-se de cada tubo, contendo matéria oxidada, 20  $\mu\text{L}$  para um volume final de 1 mL com etanol 95%. Desta solução pipetou-se de cada tubo para um outro tubo de ensaio 100  $\mu\text{L}$  e adicionou-se 2 mL de tampão fosfato pH=6, 1 mL de TCA 20% e 2 mL de TBA 1%. Procedeu-se depois à incubação durante 15 min a 80°C. Depois desta última incubação arrefeceu-se os tubos em água corrente e efectuou-se a leitura das respectivas absorvências a 530 nm. Foram realizados nove ensaios para cada extracto.

#### **2.2.2.4 Valor peróxido**

- **Determinação do valor peróxido:**

Inicialmente procedeu-se a determinação do número de dias necessários para obter uma oxidação considerável, isto é um valor peróxido de cerca de 100 meq/g de amostra, para amostras de óleo alimentar de girassol e de soja adquiridos numa superfície comercial. Esta etapa teve como objectivo a determinação de qual seria o melhor modelo para se proceder à oxidação. Uma vez determinado o número de dias (8 dias), procedeu-se à realização dos ensaios. Assim, num tubo com rolha adicionou-se 20 mL de óleo, colocou-se de seguida a oxidar durante os 8 dias a 80°C. Durante este tempo de oxidação procedeu-se a uma determinação diária do valor peróxido, aos dias 0; 1; 2; 3; 5; 6; 7 e 8.

Para a determinação do valor peróxido pesou-se 2,5 g das amostras oxidadas para um balão de Erlenmeyer de 250 mL, e em seguida adicionou-se 15 mL da solução de ácido acético/clorofórmio (3:2). Agitou-se para dissolver e adicionou-se 250 µL de solução de KI saturada. Voltou-se a agitar durante 1min, tempo após o qual se adicionou 15 mL de água destilada e 250 µL de solução de amido 1%. Procedeu-se depois à titulação com Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0,01N até a cor desaparecer. Determinou-se de igual modo um branco, que consistia apenas em metanol (sem amostra de óleo). Calculou-se o valor peróxido de acordo com o método da *American Oil Chemists' Society* (AOCS, 1997), usando a fórmula dada pela equação 20:

$$V.P. = \frac{(V_{Na_2S_2O_3} \text{ Branco} - V_{Na_2S_2O_3} \text{ Amostra}) \times N \times 1000}{(g) \text{ Amostra}} \quad (\text{eq. 20})$$

onde N é a normalidade da solução de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> usada. Para depois se poder observar e comparar a evolução da oxidação do óleo ao longo dos oito dias na presença dos extractos, procedeu-se também, ao mesmo tempo que para os extractos, à realização de um “controlo” para cada extracto. Este continha 20 mL de óleo e 2 mL de metanol.

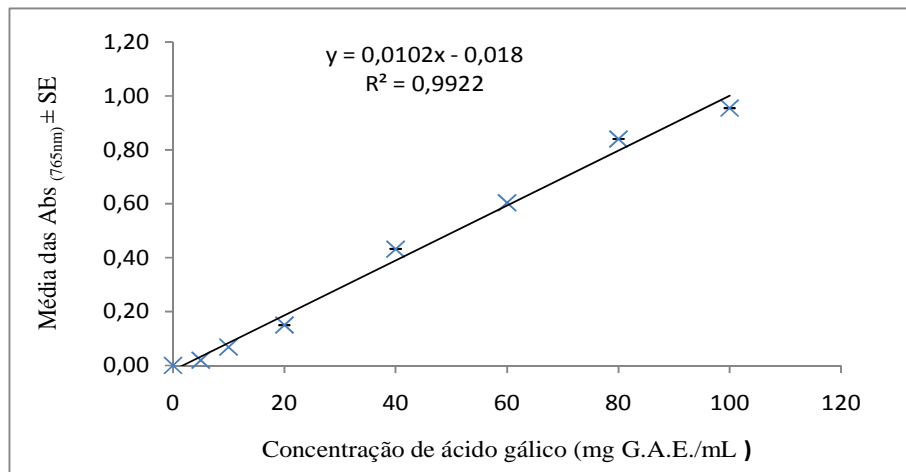
### 3 RESULTADOS EXPERIMENTAIS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Resultados do método de Folin-Ciocalteu

Utilizaram-se os extractos preparados de acordo com 2.2. Determinou-se a curva de calibração (gráfico 1), de acordo com 2.2.1. A concentração total de compostos fenólicos (gráfico 2), dos diferentes extractos obteve-se por substituição dos valores experimentais das absorvências na equação  $y=0,0102x-0,018$ . As concentrações foram expressas em mg G.A.E /g de extracto (equivalentes de ácido gálico), usando a expressão dada pela equação 21:

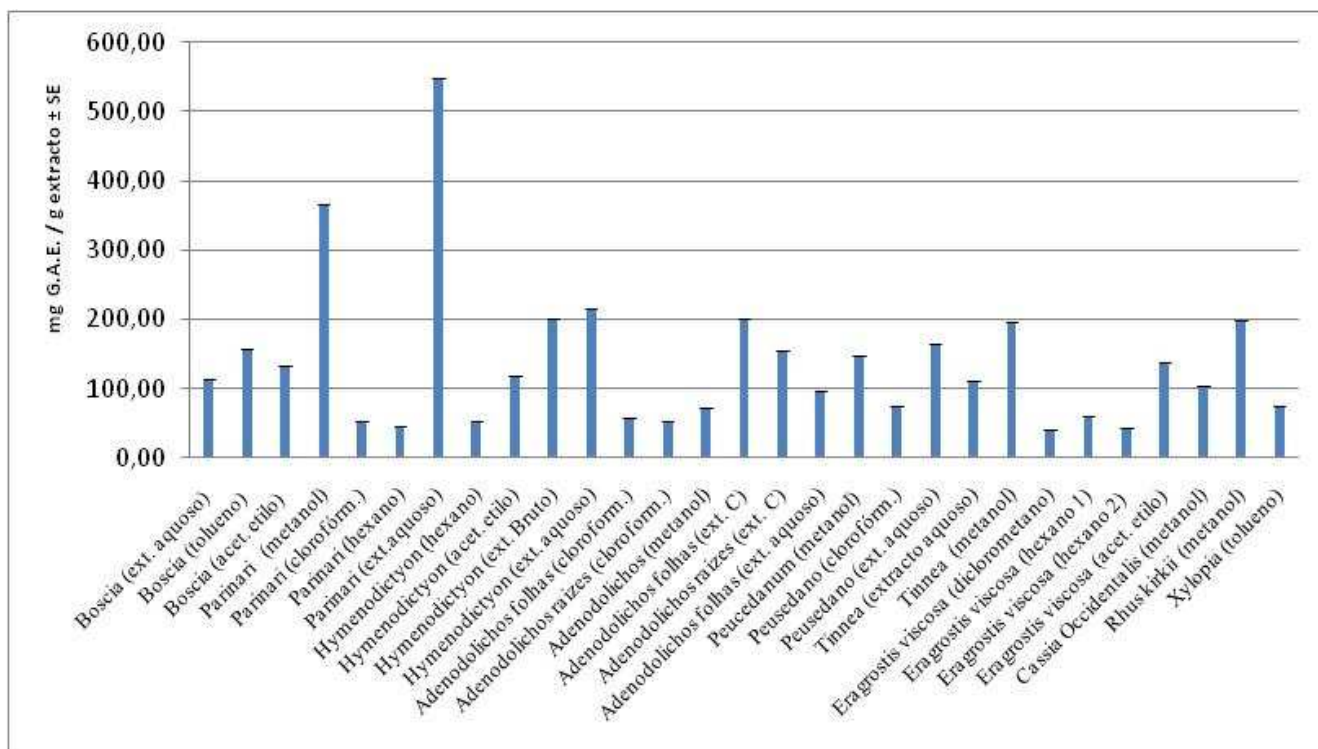
$$\text{mg G.A.E. / g de ext.} = \frac{\text{mg G.A.E. / mL de ext.} \times V_{\text{ext.}} (\text{mL}) \times Fd}{M_{\text{ext.}} (\text{g})} \quad (\text{eq. 21})$$

onde  $V_{\text{ext.}}$  corresponde ao volume da solução de extracto,  $M_{\text{ext.}}$  a massa de resíduo de extracto e  $Fd$  ao factor de diluição.



**Gráfico 1:** Curva de calibração para o método de Folin-Ciocalteu (N=9 ± SE).

A partir do gráfico 2, é possível observar que os extractos que apresentaram uma concentração maior de compostos fenólicos são os extractos de *Parinari pumila* aquoso e metanólico (549,27 mg G.A.E / g extracto ± 0,01 e 365,12 mg G.A.E / g extracto ± 0,00, respectivamente), *Hymenodictyon floribundum* aquoso e bruto (216,93 mg G.A.E / g extracto ± 0,00 e 202,43 mg G.A.E / g extracto ± 0,01, respectivamente), o extracto de *Adenodolichos huillensis* folhas extracto C. (202,33 mg G.A.E / g extracto ± 0,01), *Rhus kirkii* em metanol (199,86 mg G.A.E / g extracto ± 0,00) e o extracto de *Tinnea antiscorbutica* em metanol (197,08 mg G.A.E / g extracto ± 0,01).



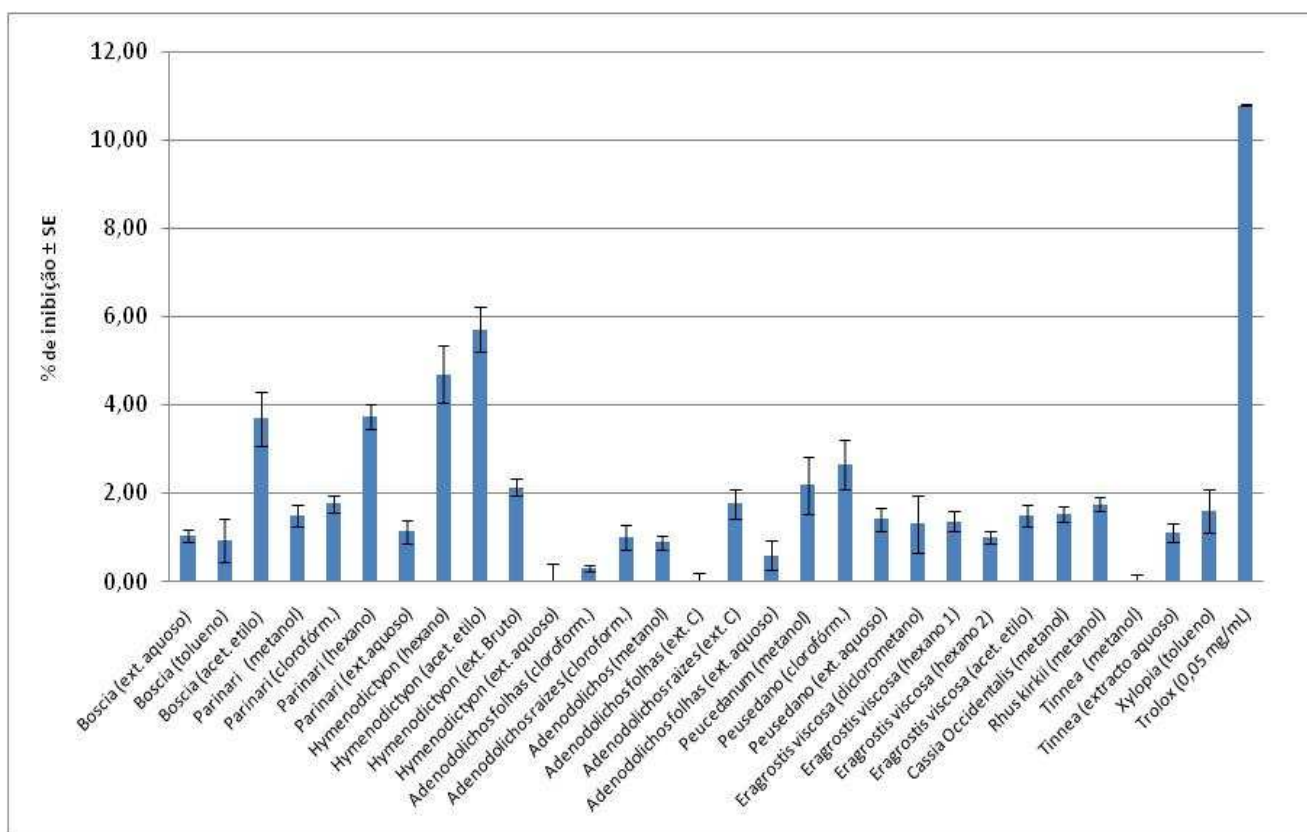
**Gráfico 2:** Resultados da concentração de compostos fenólicos totais das diferentes amostras de plantas para o método de Folin-Ciocalteu (N=9 ± SE).



## 3.2 Resultados da capacidade antioxidante

### 3.2.1 Método do ABTS

A percentagem de inibição do ABTS<sup>•+</sup> pelos diferentes extractos (gráfico 3), foi determinada de acordo com 2.2.2.1, usando-se como padrão uma solução de Trolox de concentração igual à dos extractos. Os resultados foram depois apresentados em termos de percentagem de inibição do ABTS<sup>•+</sup>, tendo-se observado para o Trolox (gráfico 3), um valor de 10,78 % ± 0,00.



**Gráfico 3:** Resultados da percentagem de inibição das diferentes amostras de plantas para o método de ABTS (N=9 ± SE).

Tendo em conta os resultados apresentados no gráfico 3, os extractos que apresentaram maior percentagem de inibição do ABTS<sup>•+</sup>, em comparação com o padrão de Trolox, são nomeadamente os de *Hymenodictyon floribundum* em acetato de etilo e hexano (5,71 % ± 0,52 e 4,68 % ± 0,64, respectivamente), *Parinari pumila* em hexano (3,74 % ± 0,28) e *Boscia microphylla* em acetato de etilo (3,68 % ± 0,61).

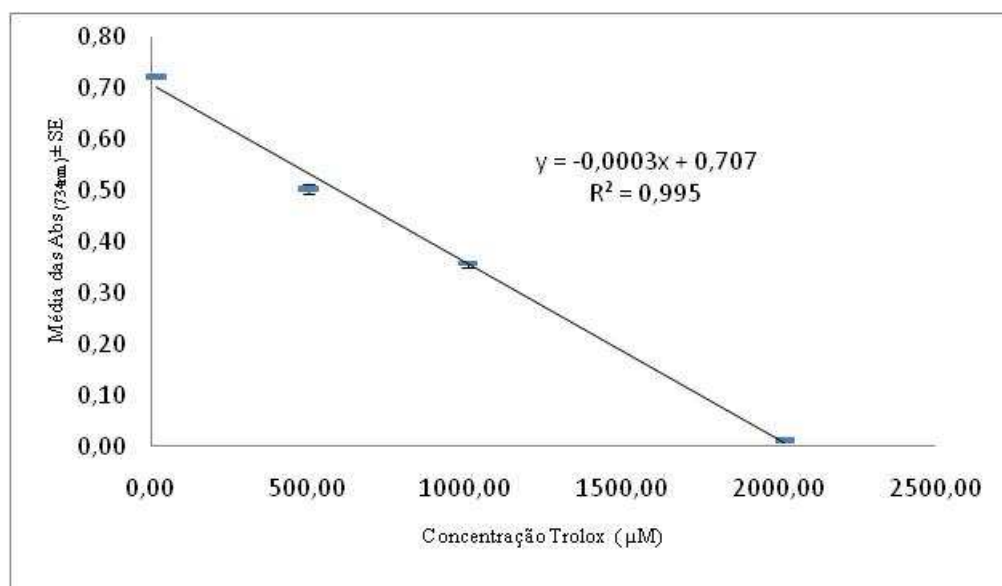
O valor TEAC foi calculado para os diferentes extractos de acordo com Nenadis *et al.* (Nenadis *et al.*, 2004). Este valor reflecte a capacidade antioxidante dos extractos em comparação com uma solução padrão de Trolox. Para tal procedeu-se à construção de uma curva de calibração (gráfico 4),

usando Trolox com diferentes concentrações. Uma vez obtida a equação da curva ( $Y = -0,0003x + 0,707$ ), procedeu-se ao cálculo da absorvência correspondente a  $1000 \mu\text{M}$  de trolox. Este valor foi depois usado para calcular a concentração de cada extracto ( $\text{mg/L}$ ) equivalente a  $1000 \mu\text{M}$  de trolox, usando a equação da curva obtida para cada extracto com as concentrações de 0 e  $50 \text{ mg/L}$ .

O valor TEAC para cada extracto foi depois calculado usando a equação 22, e os resultados foram expressos em  $\text{mM}$  de trolox/g de extracto:

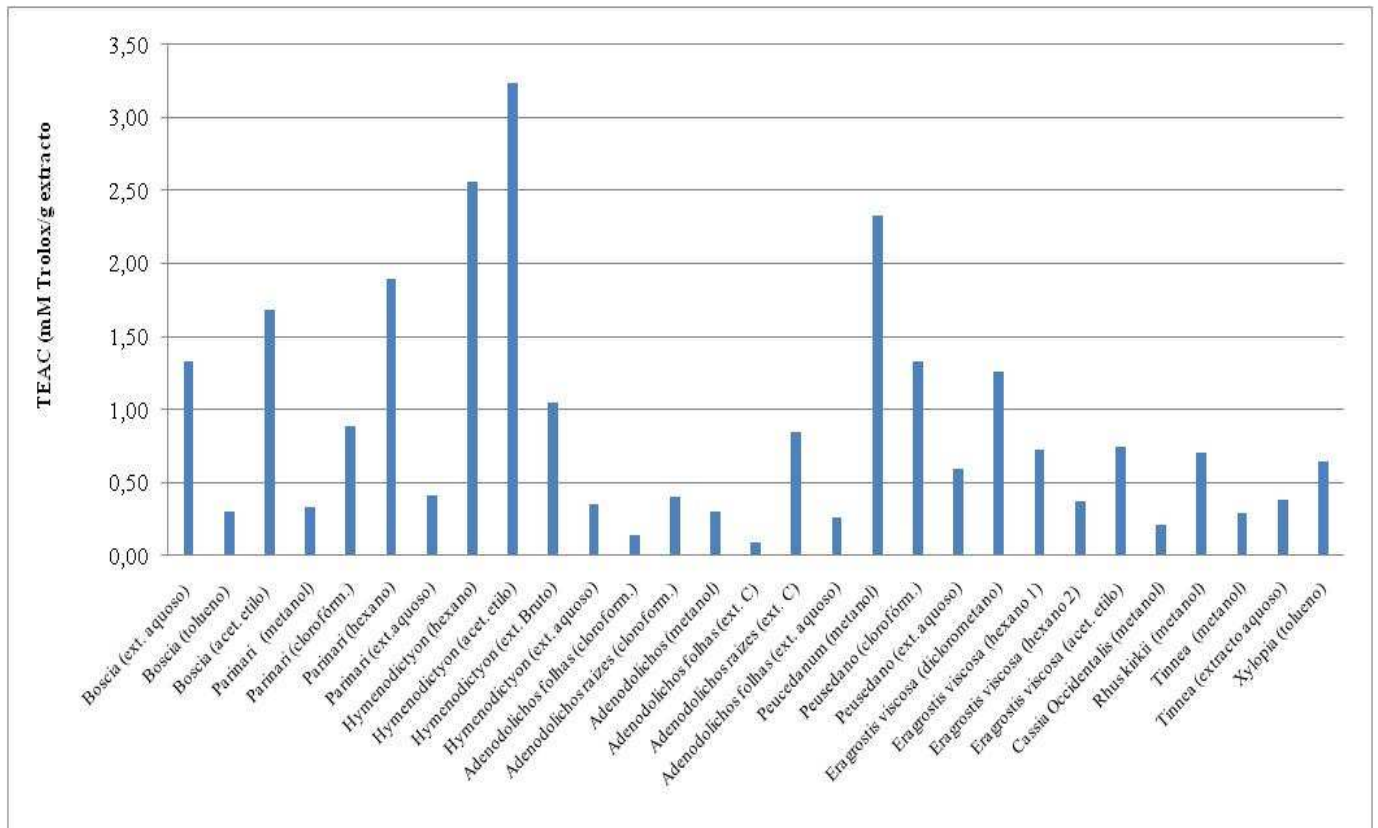
$$\text{TEAC} = \frac{1000 (\mu\text{M})}{\text{Concentração (g/L)}} \quad (\text{eq. 22})$$

Os resultados obtidos para os diferentes extractos, encontram-se representados no gráfico 5.



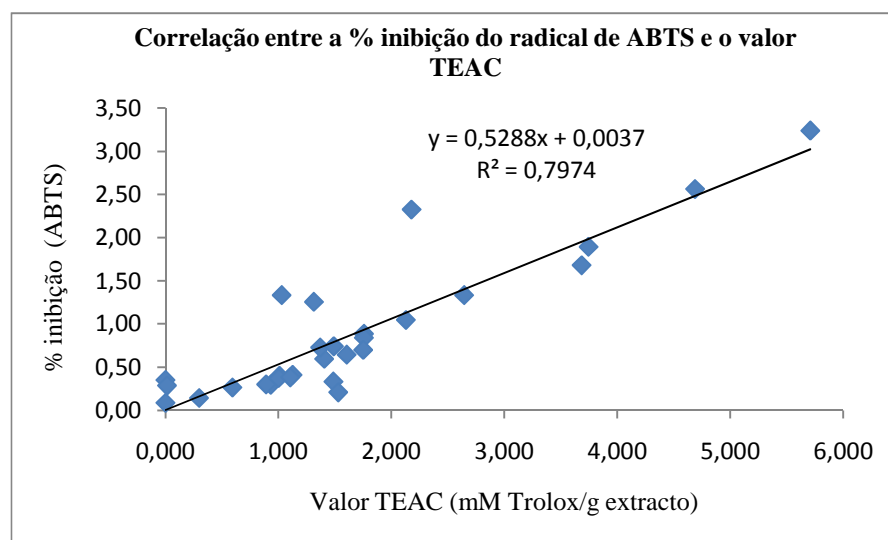
**Gráfico 4:** Curva de calibração para o cálculo do valor TEAC, para os diferentes extractos ( $N=9 \pm \text{SE}$ ).

Através do gráfico 5, é possível observar que o extracto de *Hymenodictyon floribundum* em acetato de etilo é o que apresenta um valor de TEAC mais elevado ( $3,24 \text{ mM Trolox/g extracto}$ ). Seguidamente com valores de TEAC altos destacam-se o *Hymenodictyon* em hexano com um valor de  $2,56 \text{ mM Trolox/g extracto}$  e o *Peucedano angolense* em metanol com um valor de  $2,32 \text{ mM Trolox/g extracto}$ . Os restantes extractos apresentam valores de TEAC mais baixos que os extractos referidos.



**Gráfico 5:** Valor TEAC para os diferentes extractos.

Analisou-se a relação entre a percentagem de inibição do radical de ABTS e o valor TEAC (gráfico 6). Obteve-se uma relação linear estatisticamente significativa (95%) (Gonçalves, 2001).

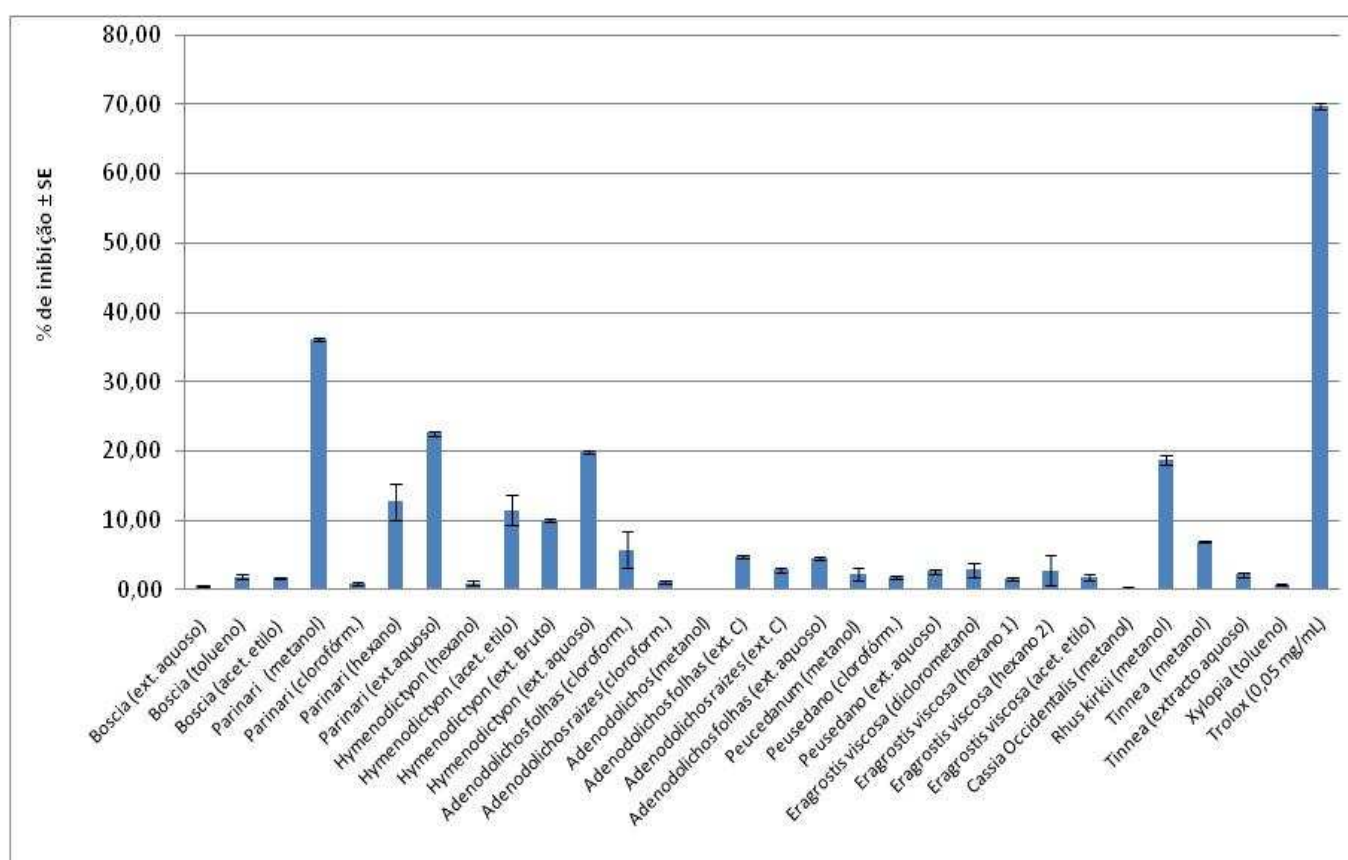


**Gráfico 6:** Correlação entre a percentagem de inibição do radical de ABTS e o valor TEAC.

### 3.2.2 Método do DPPH

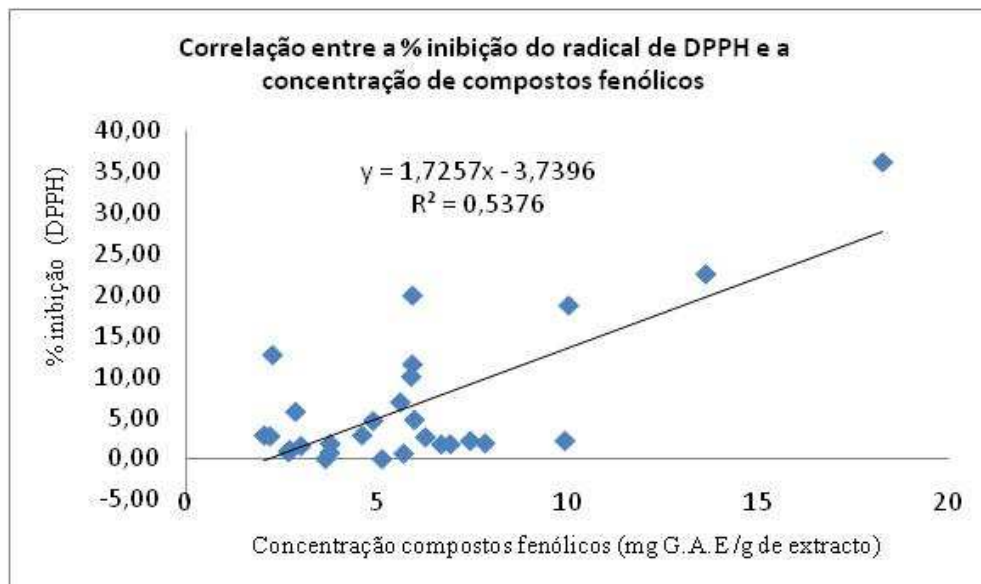
A percentagem de inibição da absorvência da solução de DPPH para cada extracto (gráfico 7), foi determinada tal como no ponto 2.2.2.2. Uma solução de Trolox (0,05 mg/mL), foi usada como padrão, tendo-se observado para esta solução uma percentagem de inibição de DPPH<sup>•</sup> de 69,78 % ± 0,43.

Através do gráfico 7, e em comparação com o padrão Trolox, os extractos que apresentaram uma maior capacidade em sequestrar o DPPH<sup>•</sup> são nomeadamente os extractos de *Parinari pumila* metanólico, aquoso e em hexano (36,18% ± 0,211, 22,53% ± 0,27 e 12,68% ± 2,54, respectivamente), *Hymenodictyon floribundum* aquoso (19,92% ± 0,16) e *Rhus kirkii* em metanol (18,72% ± 0,61).



**Gráfico 7:** Resultados da percentagem de inibição das diferentes amostras de plantas para o método de DPPH (N=9 ± SE).

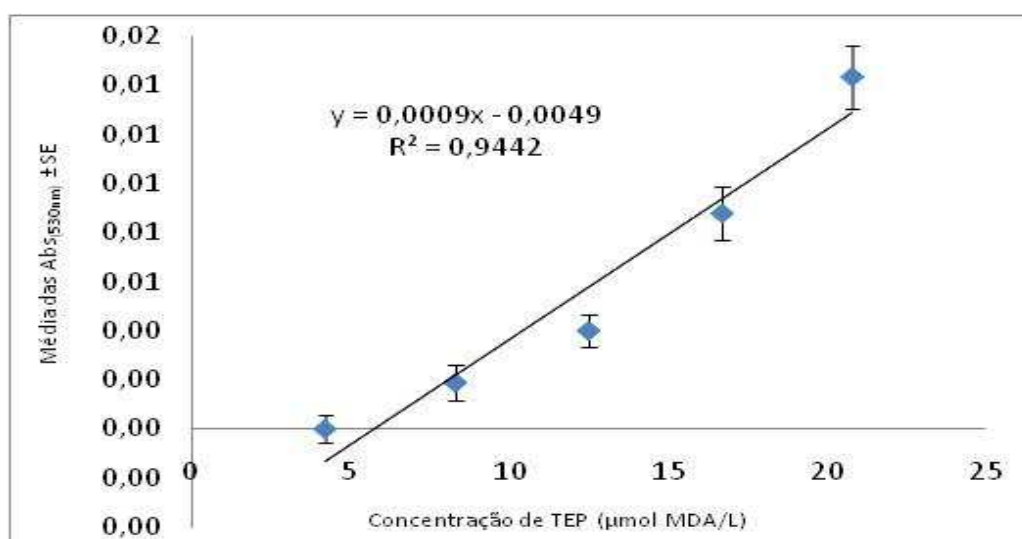
Analisou-se a relação entre a percentagem de inibição do radical de DPPH e a concentração total de composto fenólicos (gráfico 8). Obteve-se uma relação linear estatisticamente significativa (95%) (Gonçalves, 2001).



**Gráfico 8:** Correlação entre a percentagem de inibição do radical de DPPH e a concentração de composto fenólicos.

### 3.2.3 Método do TBA

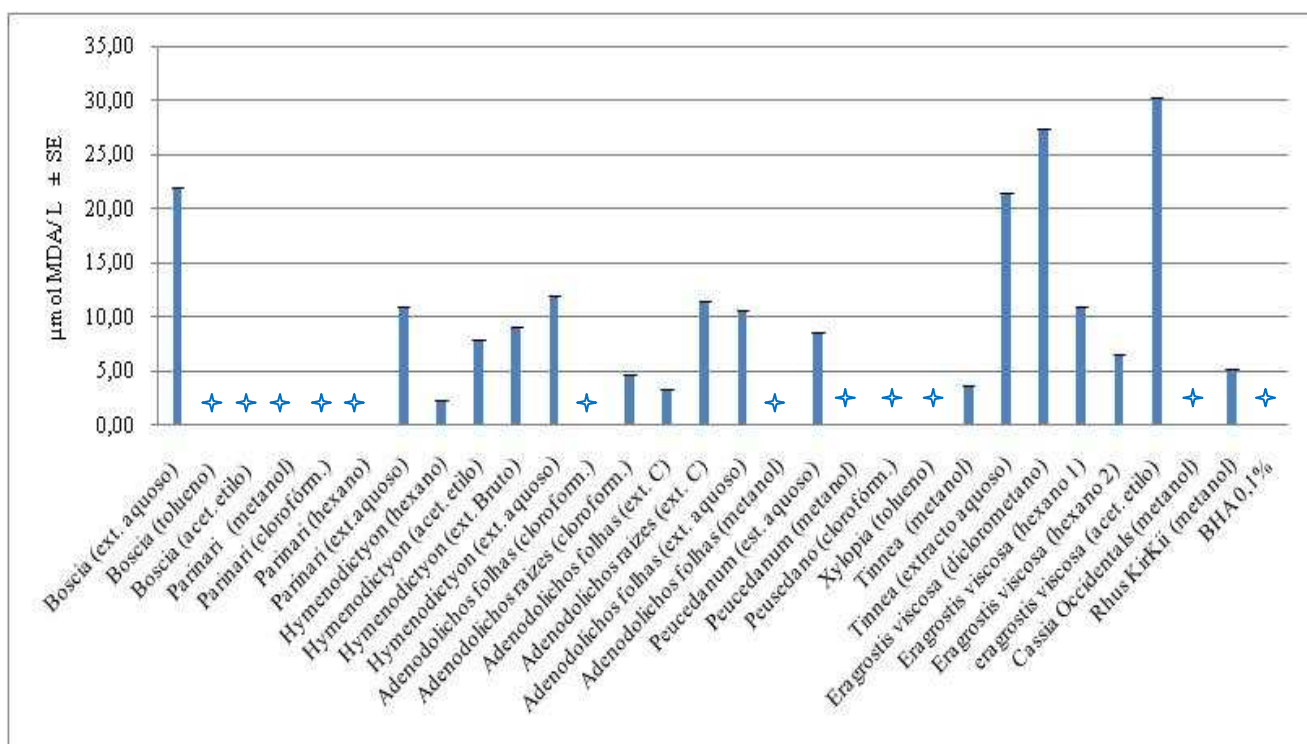
Usando-se diferentes concentrações de uma solução padrão de TEP, determinou-se a curva de calibração (gráfico 9), tal como descrito em 2.2.2.3. A concentração de compostos provenientes da oxidação do ácido linoleico, para as diferentes amostras de plantas e para o BHA a 0,1% (p/v) (gráfico 9), foi obtida por substituição dos valores experimentais das absorvências na equação  $y=0,0009x-0,0049$ , tendo-se obtido para o BHA um valor inferior a  $5,44 \mu\text{mol MDA/L} \pm 0,01$ .



**Gráfico 9:** Curva de calibração para o método TBA (N=9 ± SE).

Analisando o gráfico 9, verifica-se que para concentrações menores de  $5,44 \mu\text{mol MDA/L} \pm 0,01$ , a curva de calibração não permite quantificar a matéria peroxidada.

No gráfico 10 encontram-se representados os valores de concentração de MDA obtidos com a utilização de todos os extractos. Os que possuem maior actividade antioxidante, tal como o antioxidante sintético BHA a 0,1% (p/v), apresentam valores de concentração de MDA inferiores a  $5,44 \mu\text{mol MDA/L} \pm 0,01$ . Neste caso os extractos são nomeadamente a *Xylopiya odoratissima* em tolueno, a *Boscia microphylla* em tolueno e acetato de etilo, o *Peucedano angolense* em metanol e clorofórmio, a *Parinari pumila* em metanol, clorofórmio e hexano, a *Cassia occidentalis* em metanol e o *Adenodolichos huillensis* folhas em metanol e clorofórmio.

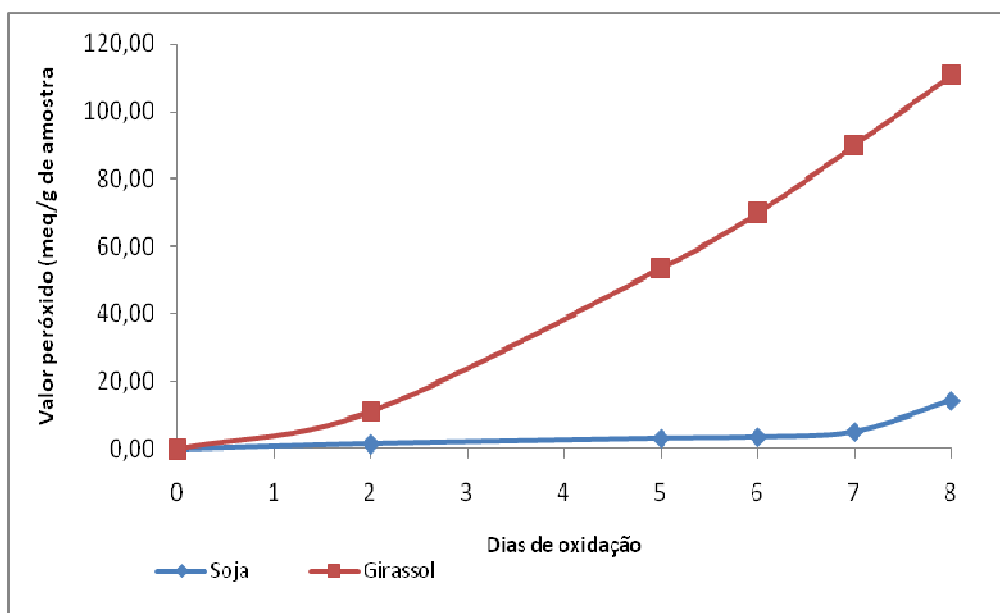


**Gráfico 10:** Resultado das diferentes amostras de plantas para o método TBA ( $N=9 \pm SE$ ).  $\star < 5,44 \mu\text{mol MDA/L} \pm 0,01$ .

### 3.2.4 Valor peróxido

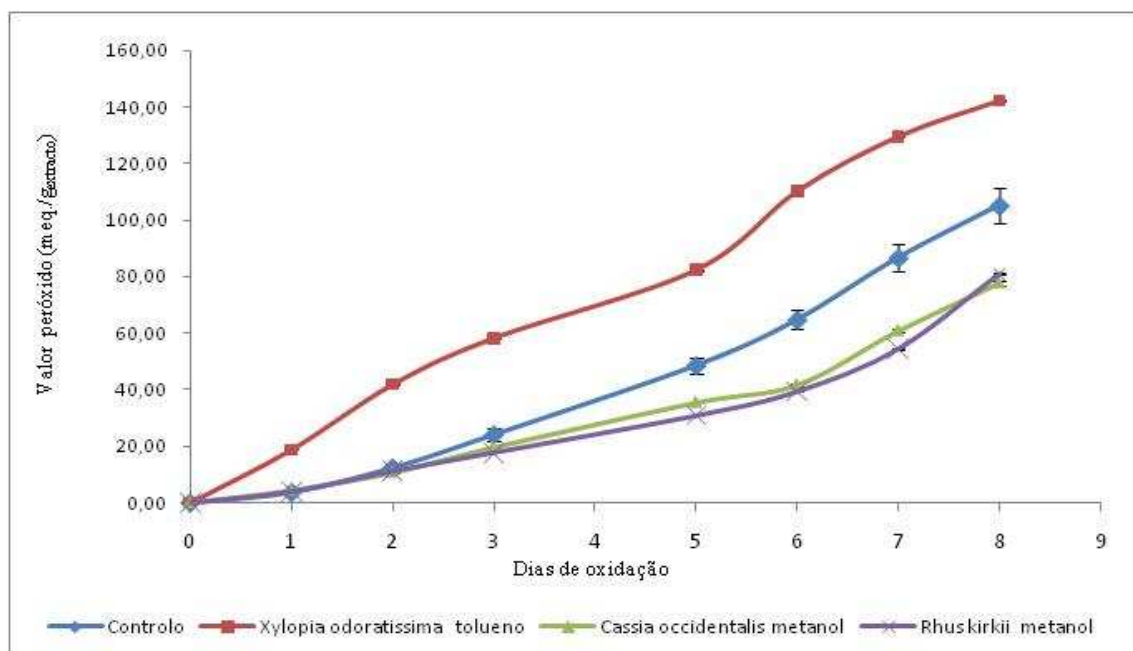
O valor peróxido para os diversos extractos foi determinado de acordo com 2.2.2.4. Inicialmente procedeu-se à determinação do número de dias necessários para obter uma oxidação de cerca de 100 meq/g de amostra, em amostras comerciais de óleo de girassol e soja. Foi obtido ao fim de oito dias de oxidação um valor de 110,80 meq/g de amostra, como mostra o gráfico 11, para a amostra de óleo de girassol, e um valor de 14,40 meq/g de amostra para o óleo de soja. Tendo em conta o facto de a amostra de óleo de soja demorar mais tempo a atingir um valor peróxido de 100 meq/g de amostra,

foi assim escolhido o óleo de girassol como substracto para estudar o efeito dos diferentes extractos sobre a sua oxidação.



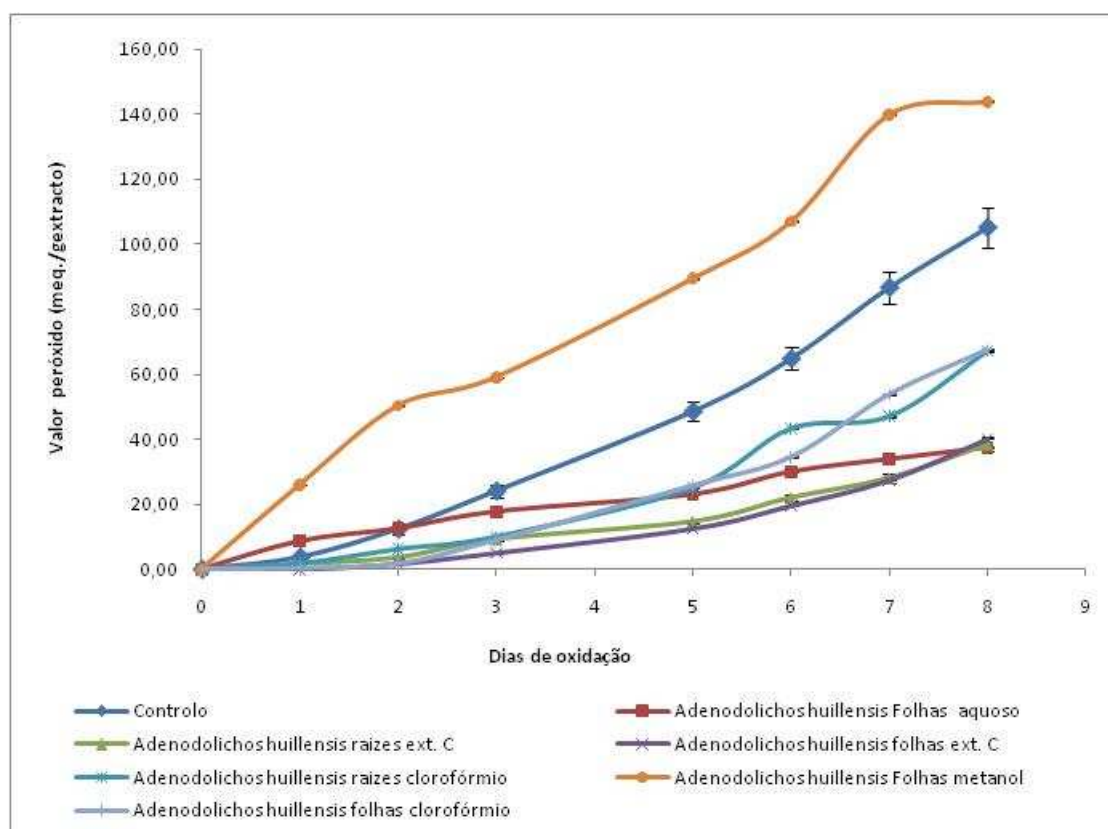
**Gráfico 11:** Número de dias necessários para obter uma oxidação de cerca de 100 meq/g de amostra.

Os resultados obtidos para os diferentes extractos, ao longo dos 8 dias de oxidação, encontram-se representados pelos gráficos 12 a 19.



**Gráfico 12:** Valor peróxido para os extractos de *Rhus kirkii* em metanol, *Cassia occidentalis* em metanol e *Xylopi odoratissima* em tolueno para os 8 dias de oxidação (N=3 ± SE).

Quando em comparação com o controlo, no que diz respeito ao gráfico 12 os extractos metanólicos de *Rhus kirkii* e *Cassia occidentalis* apresentam uma capacidade em reduzir a oxidação do óleo. Possuem respectivamente um valor peróxido ao fim dos 8 dias de oxidação de 80,93 meq/g de amostra  $\pm$  0,32 e 77,87 meq/g de amostra  $\pm$  0,89. Relativamente à *Xylopiya odoratissima* esta revela um comportamento pró-oxidante, apresentando um valor peróxido de 142,27 meq/g de amostra  $\pm$  0,35. O resultado obtido para este extracto pode ser devido a problemas de solubilidade no óleo, não actuando assim correctamente na prevenção da oxidação lipídica ou então devido à presença de componentes na amostra que contribuem para a oxidação.

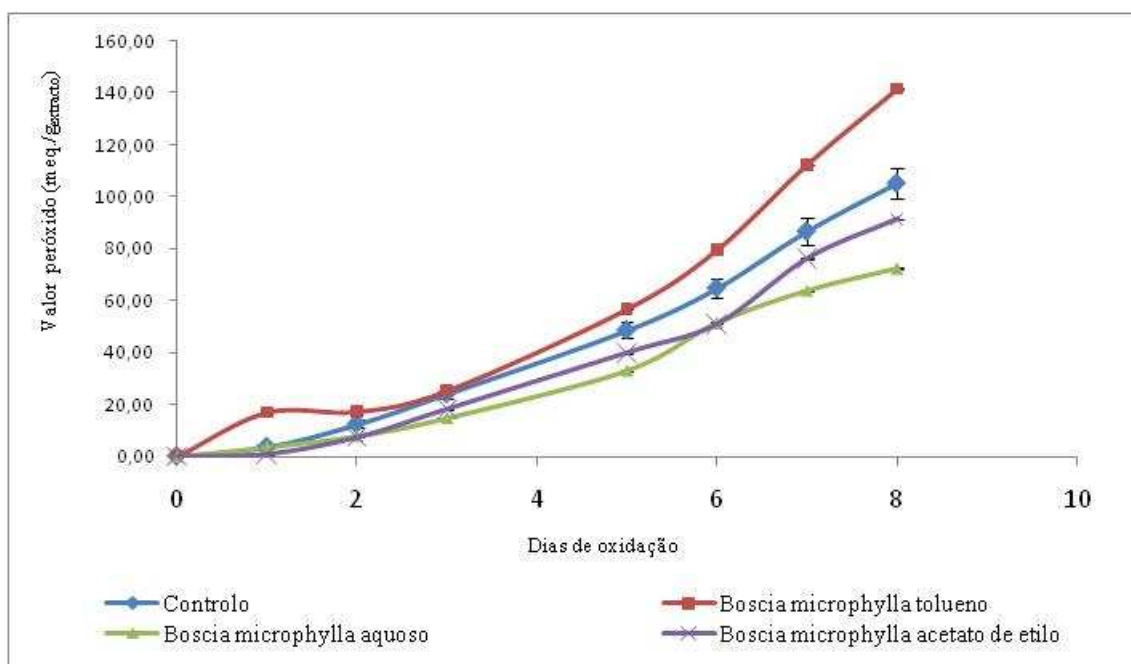


**Gráfico 13:** Valor peróxido para os extractos de *Adenodolichos huillensis*, para os diferentes solventes, nos 8 dias de oxidação (N=3  $\pm$  SE).

Para os extractos de *Adenodolichos huillensis* (gráfico 13), e tendo em conta o controlo, apenas o extracto metanólico de *Adenodolichos huillensis* folhas apresentou um comportamento pró-oxidante desde o início com um valor peróxido de 144,00 meq/g de amostra  $\pm$  0,15 ao fim de oito dias. Tal facto pode ser devido a problemas de solubilidade do referido extracto em óleo ou à presença de componentes no extracto com propriedades oxidantes. Os restantes extractos apresentaram uma boa capacidade em reduzir a oxidação do óleo. Destes destacam-se em particular os extractos de *Adenodolichos huillensis* folhas e raízes extracto C., respectivamente com valores peróxido de 40,13 meq/g de amostra  $\pm$  0,87 e 38,40 meq/g de amostra  $\pm$  0,10, e o extracto aquoso de *Adenodolichos huillensis*

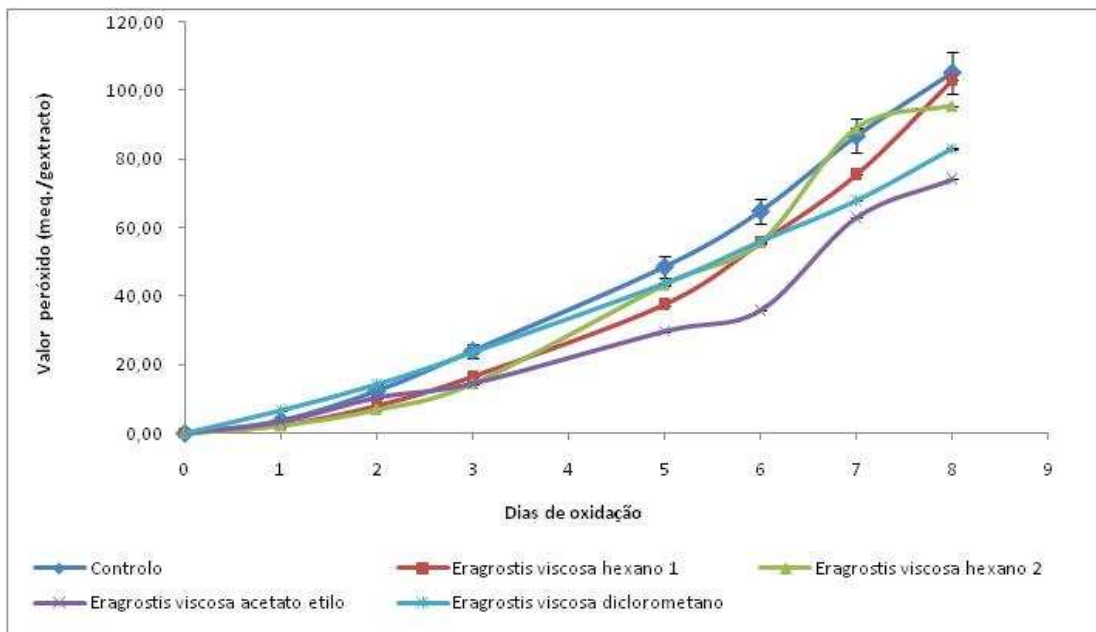


folhas com um valor peróxido ao final dos oito dias de oxidação de 37,47 meq/g de amostra  $\pm$  0,19. Estes três extractos, no que diz respeito ao grupo de extractos da planta *Adenodolichos huillensis*, são os que em termos de redução da oxidação lipídica se revelaram ser os mais eficazes.



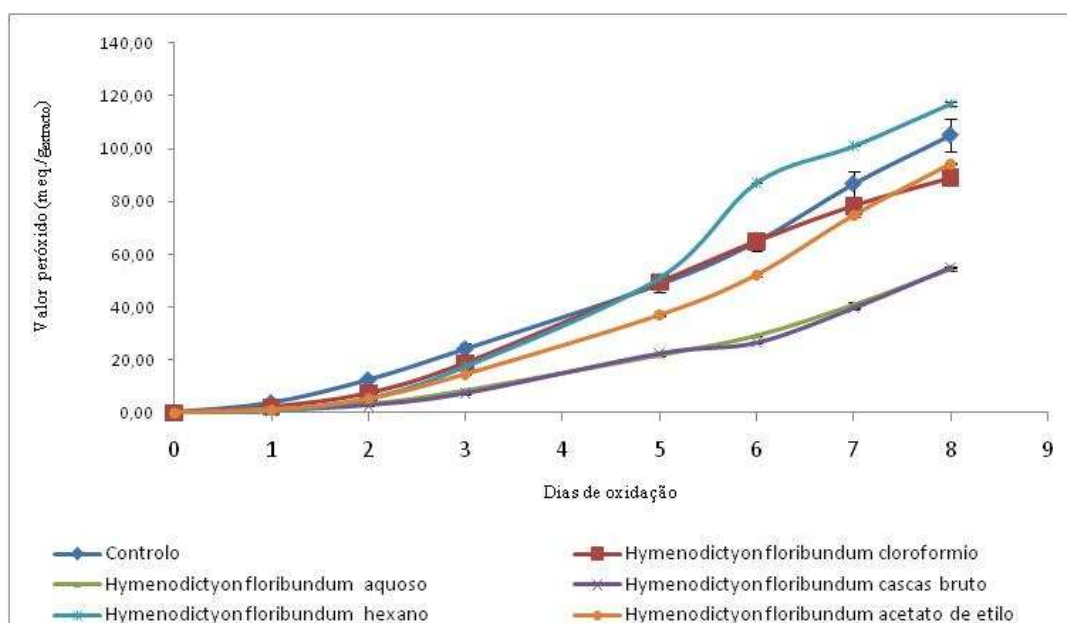
**Gráfico 14:** Valor peróxido para os extractos de *Boscia microphylla*, para os diferentes solventes, nos 8 dias de oxidação (N=3  $\pm$  SE).

Para a *Boscia microphylla* (gráfico 14), e em comparação com o controlo, apenas a *Boscia microphylla* em tolueno apresenta-se como pró-oxidante com um valor peróxido de 141,47 meq/g de amostra  $\pm$  0,35. Uma vez mais tal situação poderá ser devido a eventuais problemas de solubilidade do referido extracto em óleo ou à presença de componentes da amostra que contribuem para a oxidação. Dos restantes extractos, destaca-se em particular o de *Boscia microphylla* aquoso com um valor de 72,53 meq/g de amostra  $\pm$  0,52, pelo que neste grupo de plantas este é o que apresenta uma melhor eficácia em termos de redução da oxidação do óleo.



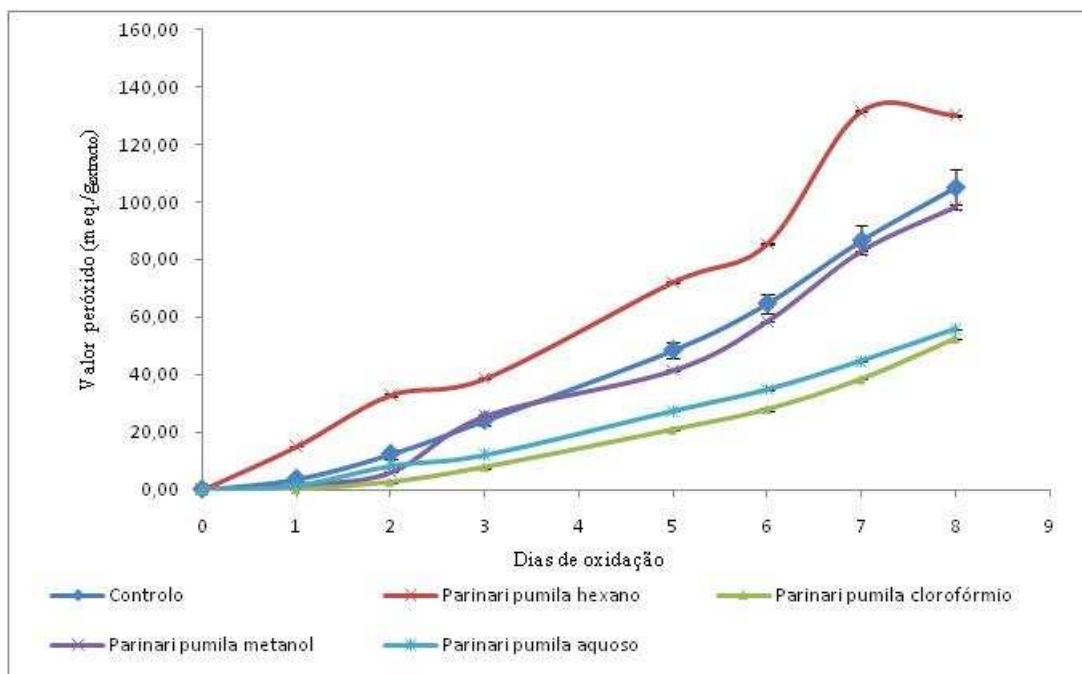
**Gráfico 15:** Valor peróxido para os extractos de *Eragrostis viscosa*, para os diferentes solventes, nos 8 dias de oxidação (N=3 ± SE).

Os extractos de *Eragrostis viscosa* (gráfico 15), apresentam capacidade em reduzir a oxidação do óleo ao longo dos oito dias de oxidação. Contudo os que apresentam melhores resultados, são os extractos de *Eragrostis viscosa* em diclorometano e acetato de etilo, respectivamente com valor peróxido de 83,07 meq/g de amostra ± 0,12 e 74,13 meq/g de amostra ± 0,09. Destes dois extractos o que em termos de diminuição da oxidação pode ser considerado mais eficaz é o de *Eragrostis viscosa* em acetato de etilo.



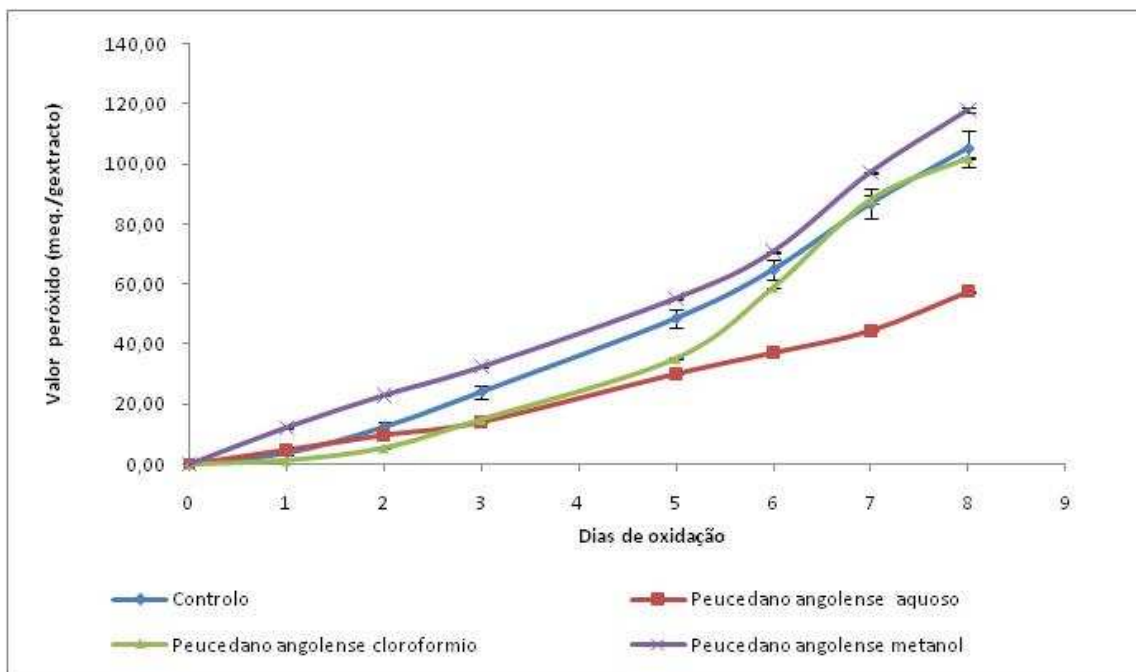
**Gráfico 16:** Valor peróxido para os extractos de *Hymenodictyon floribundum*, para os diferentes solventes, nos 8 dias de oxidação (N=3 ± SE).

Com os extractos de *Hymenodictyon floribundum* (gráfico 16), é possível observar que deste grupo de extractos, apenas o de *Hymenodictyon floribundum* em hexano se revela pró-oxidante ao final dos oito dias com um valor peróxido de 117,07 meq/g de amostra  $\pm 0,83$ , isto quando em comparação com o controlo. No entanto este extracto inicialmente apresenta capacidade em reduzir a oxidação, tornando-se pró-oxidante ao quinto dia. Isto sugere que este extracto em particular, possui compostos que numa fase mais avançada de oxidação contribuem para o aumento desta. Assim em termos de redução da oxidação, os extractos que apresentam melhores resultados são o extracto bruto de *Hymenodictyon floribundum* cascas com um valor de 55,20 meq/g de amostra  $\pm 0,30$ , e o extracto aquoso de *Hymenodictyon floribundum*, com um valor de 54,8 meq/g de amostra  $\pm 0,85$ . Observando o gráfico 16 é possível observar que estes dois extractos apresentam um comportamento semelhante em termos de redução da oxidação, apesar dos diferentes valores peróxido para cada extracto.



**Gráfico 17:** Valor peróxido para os extractos de *Parinari pumila*, para os diferentes solventes, nos 8 dias de oxidação (N=3  $\pm$  SE).

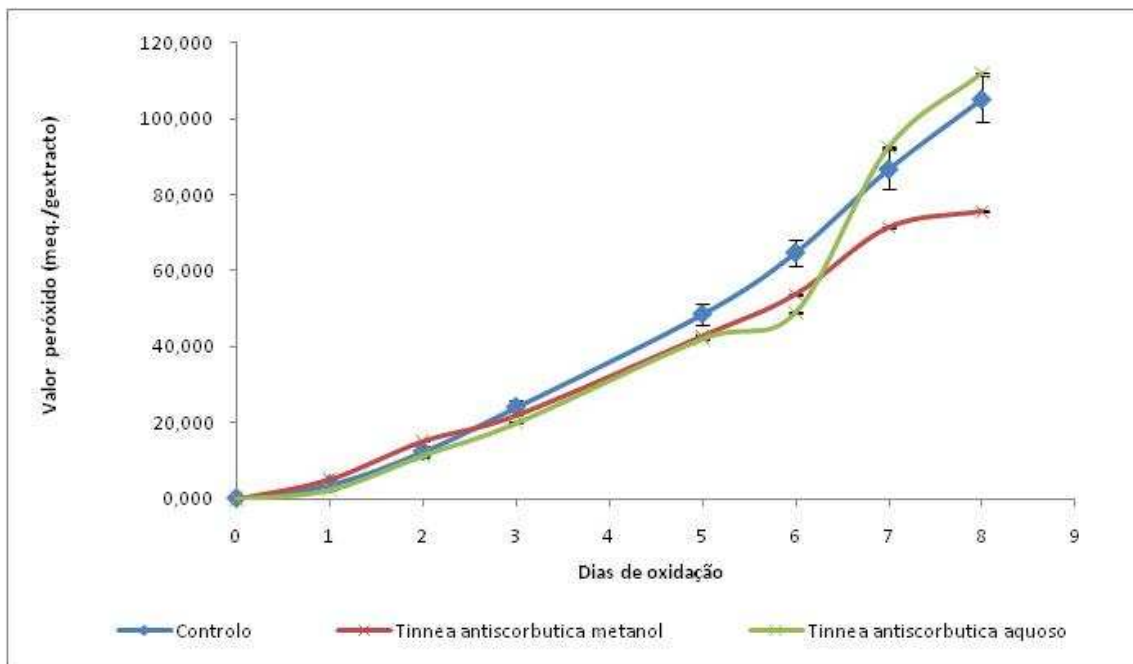
Para a *Parinari pumila* (gráfico 17), é possível verificar que apenas o extracto de *Parinari pumila* em hexano é que se apresenta como pró-oxidante (130,13  $\pm 0,32$ ), eventualmente devido a problemas de solubilidade ou à presença de compostos que promovem a oxidação. Deste grupo de extractos é possível observar que os de *Parinari pumila* aquoso e em clorofórmio, são os que apresentam valores peróxido mais baixos, respectivamente de 55,73 meq/g de amostra  $\pm 0,09$  e 52,53 meq/g de amostra  $\pm 0,09$ , o que sugere que em termos de diminuição da oxidação da amostra de óleo, estes são os mais eficazes.



**Gráfico 18:** Valor peróxido para os extractos de *Peucedano angolense*, para os diferentes solventes, nos 8 dias de oxidação (N=3 ± SE).

Do grupo de extractos apresentados no gráfico 18, quando em comparação com o controlo, o extracto de *Peucedano angolense* em metanol é o que se apresenta como pró-oxidante, com um valor de 117,87 meq/g de amostra ± 0,73. As causas para este resultado podem ser as mesmas que já foram referidas anteriormente para os extractos que se apresentaram como pró-oxidantes. Apenas o extracto aquoso de *Peucedano angolense* apresenta uma boa capacidade em reduzir a oxidação da amostra de óleo comercial, apresentando um valor peróxido de 57,47 meq/g de amostra ± 0,17.

O extracto de *Peucedano angolense* em clorofórmio apresenta até ao quinto dia um efeito retardador na formação de peróxidos, embora a partir daí apresente um comportamento quase coincidente com o do controlo o que significa que o seu efeito passa a ser nulo.



**Gráfico 19:** Valor peróxido para os extractos de *Tinnea antiscorbutica*, para os diferentes solventes, nos 8 dias de oxidação ( $N=3 \pm SE$ ).

Para os extractos de *Tinnea antiscorbutica* (gráfico 19), e em comparação com o controlo, é possível observar que o extracto que apresenta uma melhor capacidade em reduzir a oxidação da amostra ao final dos oito dias de oxidação é o de *Tinnea antiscorbutica* em metanol ( $75,60 \text{ meq/g de amostra} \pm 0,31$ ). Embora o extracto aquoso de *Tinnea antiscorbutica* apresente uma capacidade em diminuir a oxidação até ao sexto dia, a partir do qual se torna pró-oxidante. Isto sugere a presença de componentes no extracto que inicialmente têm uma capacidade em atenuar a oxidação, mas que com o decorrer do tempo a formação de peróxidos é acelerada em relação ao controlo.

Em termos gerais para o valor peróxido, o extrato com os melhores resultados ao final dos oito dias de oxidação foi o extrato aquoso de *Adenodolichos huillensis* folhas com um valor peróxido de  $37,47 \text{ meq/g extracto} \pm 0,19$ .

## 4 CONCLUSÕES

Dos extractos que apresentaram uma maior percentagem de inibição do  $ABTS^{+}$ , apenas o extracto aquoso de *Parinari pumila* é que apresentou uma concentração mais elevada em compostos fenólicos. Assim para o extracto aquoso de *Parinari pumila*, reactividade com o  $ABTS^{+}$  pode ser devido em maioria aos compostos de natureza fenólica que possui. O facto de a *Boscia microphylla* em acetato de etilo apresentar uma concentração de compostos fenólicos que não é das mais altas e apresentar uma boa percentagem de inibição do radical  $ABTS$ , pode ser devido a uma grande capaci-

dade antioxidante dos compostos fenólicos presentes e também a existência de outros compostos antioxidantes não fenólicos, pois há que ter em conta o facto de os efeitos antioxidantes dos extractos poderem não ser resultado de um único composto, mas sim da sinergia entre compostos.

Ao contrário a *Parinari pumila* em metanol tem uma concentração elevada em compostos fenólicos mas uma percentagem de inibição baixa, o que pode ser devido a uma baixa reactividade com o ABTS<sup>•+</sup>. O extracto que mas se destacou em termos de reactividade com o radical de ABTS, foi o de *Hymenodictyon floribundum* em acetato de etilo, este apresentou maior percentagem de inibição e maior valor TEAC, apesar da sua baixa concentração em compostos fenólicos, este facto pode ser devido à grande capacidade antioxidante dos poucos compostos fenólicos presentes e à existência de compostos antioxidantes de natureza não fenólica (sinergia entre compostos). Em relação aos valores TEAC estes apresentam uma relação linear (gráfico 6), com a percentagem de inibição do radical de ABTS. A gama de valores obtidos para o TEAC encontra-se de acordo com a gama de valores obtidos para extractos de outras plantas como por exemplo da região do rio Amazonas (Silva *et al.*, 2006).

Dos extractos que apresentaram uma boa capacidade em sequestrar o DPPH<sup>•</sup>, os de *Parinari pumila* aquoso e em metanol, o *Rhus kirkii* em metanol e o *Hymenodictyon floribundum* aquoso, foram os que apresentaram uma concentração maior em compostos fenólicos. Tendo em conta que existe uma relação linear (gráfico 7), entre a quantidade de fenóis totais e a capacidade antioxidante, pode-se afirmar em relação ao método de DPPH, que estes extractos apresentam uma boa capacidade antioxidante devido à quantidade de compostos fenólicos que possuem. Os restantes extractos apresentaram uma percentagem de inibição de DPPH<sup>•</sup> baixa. No entanto por exemplo o extracto bruto de *Hymenodictyon floribundum*, apresenta uma concentração de compostos fenólicos das mais elevadas entre todos os extractos, mas em relação aos radicais de DPPH não apresenta uma boa capacidade de *scavenging*.

Comparando o resultados obtidos para o ABTS e DPPH, ambos os testes de capacidade antiradicalar, pode-se concluir que os extractos de *Parinari pumila* e *Hymenodictyon floribundum* são os que se apresentam como fontes promissoras em termos de compostos antioxidantes naturais.

No método de TBA, as amostras tratadas com onze dos extractos levaram à quantificação de níveis de MDA idênticos aos obtidos com uma solução de BHA 0,1% (p/v). Os extractos de *Parinari pumila* e *Hymenodictyon floribundum* são alguns dos que se mostraram menos eficazes na prevenção da oxidação do ácido linoleico. Este método permite também ter uma ideia em relação à natureza hidrofílica e ou lipofílica dos compostos presentes nos diferentes extractos, que apresentaram capacidade em prevenir a formação de produtos da oxidação do ácido linoleico. A solução do referido ácido forma uma emulsão do tipo óleo em água (O/A), devido à maior quantidade de água. Neste tipo de emulsões originam-se gotículas de óleo dispersas na fase aquosa (Aulton, 2001), e assim os compos-

tos poderão actuar de duas maneiras diferentes. Se apresentarem uma natureza hidrofílica vão actuar na região externa da gotícula, protegendo deste modo a parte lipídica da oxidação, se for de natureza lipofílica actuam dentro protegendo a parte lipídica de uma forma mais directa.

No que diz respeito ao método do valor peróxido, este permite avliar o comportamento dos extractos, no que diz respeito à diminuição da oxidação de uma amostra lipídica. Apesar da maioria dos extractos diminuir a oxidação ao longo dos oito dias, apenas os extractos de *Adenodolichos huilensis* raízes extracto C., e aquoso de folhas é que revelaram ser os mais efectivos na diminuição da oxidação lipídica.

Em termos de perspectivas para trabalhos futuros, deve efectuar-se o isolamento, purificação e caracterização de cada um dos compostos presentes nos diferentes extractos, sobretudo nos de *Pari-nari pumila* e *Hymenodictyon floribundum*, com o objectivo de elucidar qual ou quais dos compostos, fenólicos ou não fenólicos, apresenta propriedades antioxidantes. Por outro lado, o estudo fitoquímico das plantas Angolanas deve continuar devido aos resultados prometedores como fontes de antioxidantes naturais.

## 5 BIBLIOGRAFIA

Agarwal, A.; Sharma, R.K.; Nallella, K.P.; Thomas, A.J.; Alvarez, J.G.; Sikka, S.C.; “*Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility*”; Fertility and Sterility; 4; 2006; 1-8.

Albarello, N.; Simões, C.; Rosas, P. F. G.; Castro, T. C.; Gianfaldoni, M. G.; Callado, C. H.; Mansur, E.; “*In vitro propagation of Cleome Spinosa (Capparaceae) using explants from nursery-grown seedlings and axenic plants*”; In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant; 42; 2006; 601-606.

Ali, M.S.; Saleem, M.; Ali, Z.; Ahmad, V.U.; “*Chemistry of Zataria multiflora (Lamiaceae)*”; Phytochemistry; 55; 2000; 933-936.

Antolovich, M.; Prenzler, P.; Robards, K.; Ryan, D.;" *Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits*"; Analyst; 125; 2000; 989-1009.

Antolovich, M.; Prenzler, P.D.; Patsalides, E.; McDonald,S.; Robards, K.; “*Methods for testing antioxidant activity*”; Analyst; 127, 2002; 183-198.

Apel, K.; Hirt, H.; “*Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction*”; Annual Review of Plant Physiology; 55; 2004; 373-99.

Ara, N.; Nur, H.; “*In Vitro Antioxidant Activity of Methanolic Leaves and Flowers Extracts of Lippia Alba*”; Research Journal of Medicine and Medical Sciences; 4; 2009; 107-110.

Aragão, T.P.; Lyra, M.M.A.; Silva, M.G.B.; Andrade, B.A.; Ferreira, P.A.; Ortega, L.F.; Silva, S.D.; Silva, J.C.P.; Fraga, M.C.C.A.; Wanderley, A.G.; Lafayette, S.S.L.; “*Toxicological reproductive study of Cassia occidentalis L. in female Wistar rats*”; Journal of Ethnopharmacology; 123; 2009; 163-166.

Arts, M.J.T.J.; Haenen, G.R.M.M.; Voss, H.P.; Bast, A.; “*Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay*”; Food and Chemical Toxicology; 42; 2004; 45-49.

Ata, A.; Gale, E. M.; Samarasekera, R.;" *Bioactive chemical constituents of Caesalpinia bonduc (Fabaceae)*"; Phytochemistry Letters; 2; 2009;106-109.



- Aulton, M.E.; “*Delineamento de formas farmacêuticas*”; 2 ed.; 2001; Artmed; São Paulo.
- Bahramikia, S.; Ardestani, A.; Yazdanparast, R.; “*Protective effects of four Iranian medicinal plants against free radical-mediated protein oxidation*”; *Food Chemistry*; 115; 2009; 37-42.
- Barbosa-Ferreira, M.; Pfister, J.A.; Gotardo, A.T.; Maiorka, P.C.; Górnjak, S. L.; “*Intoxication by Senna occidentalis seeds in pregnant goats: Pre natal and post natal evaluation*”; *Experimental and Toxicologic Pathology*; 2010; 1-6.
- Barminas, J.T.; James, M.K.; Abubakar, U.M.; “*Chemical composition of seeds and oil of Xylopiya aethiopica grown in Nigeria*”; *Plant Foods for Human Nutrition*; 53; 1999; 193-198.
- Beer, D.; Joubert, E.; Geld erblom, W.C.A.; Manley, M.; “*Antioxidant Activity of South African Red and White Cultivar Wines: Free Radical Scavenging*”; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 51; 2003; 902-909.
- Benzie, I.F.F.; “*Evolution of dietary antioxidants*”; *Comparative Biochemistry and Physiology*; 136; 2003; 113-126.
- Blokhina, O.; Viroinen, E.; Gerstedt, K.V.; “*Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review*”; *Annals of Botany*; 91; 2003; 179-194.
- Böhm, V.; Schlesier, K.; “*Methods to evaluate the antioxidant activity*”; *Quality Handling and Evaluation*; 3; 2004; 55-71.
- Bondet, V.; Brand-Williams, W.; Berset, C.; “*Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH• Free Radical Method*”; *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*; 30; 1997; 609-615.
- Borges, C.M.P.; “*Estudo da composição química de plantas medicinais da província da Huila (Angola)*”; 2008; Tese de doutoramento- Universidade da Beira Interior; Covilhã.
- Borges, C.M.P.; Diakanawm, C.; de Mendonça, D.I.M.D.; “*Iridoids from Hymenodictyon floribundum*”; *Journal of Brazilian Chemical Society*; 6; 2010; 1121-1125.

Bossard, E.;" *La médecine traditionnelle au centre et à l'ouest de l'Angole*"; Ministério da ciência e tecnologia – Instituto de investigação Científica Tropical; 1996; Lisboa.

Bouayed, J.; Piri, K.; Rammal, H.; Dicko, A.; Desor, F.; Younos, C.; Soulimani, R.; "Comparative evaluation of the antioxidant potential of some Iranian medicinal plants"; Food Chemistry; 104; 2007; 364-368.

Cadenas, E.; Davies, K.J.A.; "Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging"; Free Radical Biology & Medicine; 29; 2000; 222-230.

Cai, Y.; Luo, Q.; Sun, M.; Corke, H.; "Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer"; Life Sciences; 74; 2004; 2157-2184.

Chirinos, R.; Campos, D.; Warnier, M.; Pedreschi, R.; Rees, J.F.; Larondelle, Y.; "Antioxidant properties of mashua (*Tropaeolum tuberosum*) phenolic extracts against oxidative damage using biological in vitro assays"; Food Chemistry; 111; 2008; 98-105.

Chukwujekwu, J.C.; Coombes, P.H.; Mulholland, D.A.; Staden, J.V.; "Emodin, an antibacterial anthraquinone from the roots of *Cassia occidentalis*"; South African Journal of Botany; 72; 2006; 295-297.

Cicco, N.; Lanorte, M.T.; Paraggi, M.; Viggiano, M.; Lattanzio, V.; "A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts"; Microchemical Journal; 91; 2009; 107-110.

Citerne, H.L.; Pennington R. T.; Cronk, Q.C.B.; "An apparent reversal in floral symmetry in the legume *Cordia* is a homeotic transformation"; Proceedings of the National Academy of Sciences; 32; 2006; 12017-12020.

Damron, B.L.; Jacob, J.P.; "Toxicity to Poultry of Common Weed Seeds"; Institute of Food and Agricultural Sciences; 55; 2001; 1-5.

Das, S.; Das, D.K.;" *Antioxidant Paradox*"; Society for Free Radical Research - India Bulletin; 5; 2006; 8-11.

De las Heras, B.; Slowing, K.; Benedí, J.; Carretero, E.; Ortega, T.; Toledo, C.; Bermejo, P.; Iglesias, I.; Abad, M.J.; Gómez-Serranillos, P.; Liso, P.A.; Villar, A.; Chiriboga, X.; “*Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador*”; *Journal of Ethnopharmacology*; 61; 1998; 161-166.

Del Río, L.A.; Corps, J.; Sandalio, L.M.; Palma, J.M.; Gómez, M.; Barroso, J.B.; “*Reactive oxygen species, antioxidants systems and oxide in peroxisomes*”; *Journal of experimental botany*; 53; 2002; 1255-1272.

Doughari, J. H.; Manzara, S.; “*In vitro antibacterial activity of crude leaf extracts of Mangifera indica Linn*”; *African Journal of Microbiology Research*; 2; 2008; 067-072.

Dröge, W.; “*Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function*”; *Physiological Reviews*.; 82; 2002; 47-95.

Elmastas, M.; Isildak, O.; Turkecul, I.; Temur, N.; “*Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms*”; *Journal of Food Composition and Analysis*; 20; 2007; 337-34.

Erel, O.; “*A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation*”; *Clinical Biochemistry*; 37; 2004; 277- 285.

Estevinho, L.; Pereira, A.P.; Moreira, L.; Dias, L.G.; Pereira, E.; “*Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey*”; *Food and Chemical Toxicology*; 46; 2008; 3774-3779.

Estrella, M.; Cabezas, F.J.; Aedo, C.; Velayos, M.; “*The Papilionoideae (Leguminosae) of Equatorial Guinea (Annobón, Bioko and Río Muni)*”; *FoliaGeobot*; 45; 2010; 1-57.

Fernandes, N.M.G.; “*Estudo da composição química das folhas da Xylopia adoratissima*”; 2003; Tese de licenciatura- Universidade da Beira Interior; Covilhã.

Francisco, M.L.L.D.; Resurreccion, A.V.A.; “*Total phenolics and antioxidant capacity of heat-treated peanut skins*”; *Journal of Food Composition and Analysis*; 22; 2009; 16-24.

Frankel, E.N.; Neff, E.W.; “*Formation of malonaldehyde from lipid oxidation products*”; *Biochimica et Biophysica Acta*; 754; 1983, 264-270.

Gara, L.D.; Pinto, M.C.; Tommasi, F.; “*The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction*”; *Plant Physiology and Biochemistry*; 41; 2003; 863-870.

Garcia, Y.J.; Rodríguez-Malaver, A.J.; Peñaloza, N.; “*Lipid peroxidation measurement by thiobarbituric acid assay in rat cerebellar slices*”; *Journal of Neuroscience Methods*; 144; 2005; 127-135.

Gilgun-Sherki, Y.; Rosenbaum, Z.; Melamed, E; Offen, D.; “*Antioxidant Therapy in Acute Central Nervous System Injury: Current State*”; *Pharmacological Reviews*; 54; 2002; 271–284.

Gomes, A.; Fernandes, E.; Lima, J.L.F.C.; “*Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species*”; *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*; 65; 2005; 45-80.

Gomes, H.A.; Silva, E.N.; Nascimento, M.R.L.; Fukuma, H.T.; “*Evaluation of the 2-thiobarbituric acid method for the measurement of lipid oxidation in mechanically deboned gamma irradiated chicken meat*”; *Food Chemistry*; 80; 2003; 433-437.

Gonçalves, M.L.S.S. Métodos Instrumentais para análise de soluções: Análise Quantitativa, 4ª edição, Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.

Guillén-Sans, R.; Guzmán-Chozas, M.; “*The Thiobarbituric Acid (TBA) Reaction in Foods: A Review*”; *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*; 38; 1998; 315-330.

Gupta, S.; Sharma, P.; Soni, P.L.; “*Carboxymethylation of Cassia occidentalis Seed Gum*” *Journal of Applied Polymer Science*; 94; 2004; 1606-1611.

Hall, J. C.; Sytsma, K. J.; Iltis, H. H.; “*Phylogeny of Capparaceae and Brassicaceae based on chloroplast sequence data*”; *American Journal of Botany*; 89; 2002; 1826-1842.

Hall, N.K.; Chapman, T.M.; Kim, H.J.; Min, D.B.; “*Antioxidant mechanisms of Trolox and ascorbic acid on the oxidation of riboflavin in milk under light*”; *Food Chemistry*; 118; 2010; 534-539.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.; “*Free Radicals in Biology and Medicine*”; 4<sup>a</sup> ed.; 2008; Biosciences Oxford; New York.

Harmly, J.M.; Bhagwat, S.; Lin, L.Z.; “*Profiling methods for the determination of phenolic compounds in foods and dietary supplements*”; Analytical and Bioanalytical Chemistry; 389; 2007; 47-61.

Hegnauer, R.; Hegnauer, M.; “*Chemotaxonomie der Pflanzen: Leguminosae Bd.11a*”; Birkhäuser Verlag; 130; 1973.

Hodges, D.M.; Long, J.M.D.; Forney, C.F.; Prange, R.K.; “*Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds*”; Planta; 207; 1999; 604-611.

Hodzic, Z.; Pasalic, H.; Memisevic, A.; Srabovic, M.; Saletovic, M.; Poljakovic, M.; “*The Influence of Total Phenols Content on Antioxidant Capacity in the Whole Grain Extracts*”; European Journal of Scientific Research; 3; 2009; 471-477.

Huang, D.; Ou, B.; Prior, R.L.; “*The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays*”; Journal of agricultural and food chemistry; 53; 2005; 1841-1856.

Huda-Faujan, N.; Noriham, A.; Norrakiah, A.S.; Babji, A.S.; “*Antioxidant activity of plants methanolic extracts containing phenolic compounds*”; African Journal of Biotechnology; 3; 2009; 484-489.

Ikawa, M.; Schaper, T.D.; Dollard, C.A.; Sasner, J.J.; “*Utilization of Folin-Ciocalteu Phenol Reagent for the Detection of Certain Nitrogen Compounds*”; Journal of Agricultural and Food Chemistry; 51; 2003; 1811-1815.

Ionita, P.; “*Is DPPH Stable Free Radical a Good Scavenger for Oxygen Active Species?*”; Chemical Papers.; 59; 2005; 11-16.

Jeong, C.H.; Choi, G.N.; Kim, J.H.; Kwak, J.H.; Kim, D.O.; Kim, Y.J.; Heo, H.J.; “*Antioxidant activities from the aerial parts of Platycodon grandiflorum*”; Food Chemistry; 118; 2010; 278-282.

Ji, L.L.; “*Antioxidants and oxidative stress in exercise*”; Society for Experimental Biology and Medicine; 1999.

Karioti, A.; Hadjipavlou-Litina, D.; Mensah, M. L. K.; Fleischer, T.C.; Skaltsa, H.; *Composition and Antioxidant Activity of the Essential Oils of Xylopia aethiopica (Dun) A. Rich. (Annonaceae) Leaves, Stem Bark, Root Bark, and Fresh and Dried Fruits, Growing in Ghana*; Journal of Agricultural and Food Chemistry; 52; 2004; 8094-8098.

Katalinic, V.; Milos, M.; Kulisic, T.; Jukic, M.; “*Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols*”; Food Chemistry; 94; 2006; 550-557.

Koleva, I.I.; Niederlander, H.A.G.; Beek, T.A.V.; “*Application of ABTS Radical Cation for Selective On-Line Detection of Radical Scavengers in HPLC Eluates*”; Analytical Chemistry; 73; 2001; 3373-3381.

Kosar, M.; Bozan, B.; Temelli, F.; Baser, K.H.C.; “*Antioxidant activity and phenolic composition of sumac (Rhus coriaria L.) extracts*”; Food Chemistry; 103; 2007; 952-959.

Kouakou-Siransy, G.; Sahpaz, S.; Irié-Nguessan, G.; Datte, Y.J.; Kablan, J.; Gressier, B.; Bailleul, F.; “*Oxygen species scavenger activities and phenolic contents of four West African plants*”; Food Chemistry; 118; 2010; 430-435.

Kregel, K.C.; Zhang, H.J.; “*An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations*”; American Journal of Physiology- Regulatory, Integrative and Comparative Physiology; 292; 2007; 18-36.

Kumar, A.; Chattopadhyay, S.; “*DNA damage protecting activity and antioxidant potential of pudina extract*”; Food Chemistry; 100; 2007; 1377-1384.

Kumaran, A.; Karunakaran, R.J.; “*Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of Coleus aromaticus*”; Food Chemistry; 97; 2006; 109-114.

Labrinea, E.P.; Georgiou, C.A.; “*Stopped-flow method for assessment of pH and timing effect on the ABTS total antioxidant capacity assay*”; Analytica Chimica Acta; 526; 2004; 63-68.

Laguette, M.; Lecomte, J.; Villeneuve, P.; “*Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges*”; *Progress in Lipid Research*; 46; 2007; 244-282.

Lee, C.; Yoon, J.; “*UV direct photolysis of 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) in aqueous solution: Kinetics and mechanism*”; *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*; 197; 2008; 232-238.

Lee, J.M.; Chung, H.; Chang, P.S.; Lee, J.H.; “*Development of a method predicting the oxidative stability of edible oils using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)*”; *Food Chemistry*; 103; 2007; 662-669.

Lee, S.-B.; Rasmussen, S. K.; “*Molecular markers in some medicinal plants of the Apiaceae family*”; *Euphytica*; 114; 2000; 87-91.

Lee, S.E.; Hwang, H.J.; Ha, J.S.; Jeong, H.S.; Kim, J.H.; “*Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity*”; *Life Sciences*; 73; 2003; 167-179.

Lemke, T.L.; Williams, D.A.; Roche, V.F.; Zito, S.W.; “*Foye’s principles of medicinal chemistry*”; 6<sup>th</sup> ed.; 2008; Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia USA.

Li, H.; Wong, C.; Cheng, K.; Chen, F.; “*Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants*”; *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*; 41; 2008; 385-390.

Liu, Q.; Kong, B.; Jiang, L.; Cui, X.; Liu, J.; “*Free radical scavenging activity of porcine plasma protein hydrolysates determined by electron spin resonance spectrometer*”; *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie - Food Science and Technology*; 42; 2009; 956-962.

Locatelli, M.; Gindro, R.; Travaglia, F.; Coisson, J.D.; Rinaldi, M.; Arlorio, M.; “*Study of the DPPH<sub>2</sub>-scavenging activity: Development of a free software for the correct interpretation of data*”; *Food Chemistry*; 114; 2009; 889-897.

Magalhães, L.M.; Segundo, M.A.; Reis, S.; Lima, J.L.F.C.; Rangel, A.O.S.S.; "Automatic Method for the Determination of Folin-Ciocalteu Reducing Capacity in Food Products"; Journal of Agricultural and Food Chemistry; 54; 2006; 5241-5246.

Magalhães, L.M.; Segundo, M.A.; Reis, S.; Lima, J.L.F.C.; Tóth, I.V.; Rangel, A.O.S.S.; "Automatic flow system for sequential determination of ABTS•+ scavenging capacity and Folin-Ciocalteu index: A comparative study in food products"; Analytica Chimica Acta; 592; 2007; 193-201.

Maisuthisakul, P.; Suttajit, M.; Pongsawatmanit, R.; "Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants"; Food Chemistry; 100; 2007; 1409-1418.

Mariod, A.A.; Ibrahim, R.M.; Ismail, M.; Ismail, N.; "Antioxidant activities of phenolic rich fractions (PRFs) obtained from black mahlab (*Monechma ciliatum*) and white mahlab (*Prunus mahaleb*) seedcakes"; Food Chemistry; 118; 2010; 120-127.

Maritim, A.C.; Sanders, R.A.; Watkins, J.B.; "Diabetes, Oxidative Stress, and Antioxidants: A Review"; J Biochem molecular toxicology; 17; 2003; 1-15.

Marxen, K.; Vanselow, K.H.; Lippemeier, S.; Hintze, R.; Ruser, A.; Hansen, U.P.; "Determination of DPPH Radical Oxidation Caused by Methanolic Extracts of Some Microalgal Species by Linear Regression Analysis of Spectrophotometric Measurements"; Sensors; 7; 2007; 2080-2095.

Matés, J.M.; Sánchez-Jiménez, F.M.; "Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy"; The International Journal of Biochemistry & Cell Biology; 32; 2000; 157-170.

Medoua, G.N.; Mbofung, C.M.F.; "Kinetics studies of some physico-chemical substances during roasting and preparation of beverage made by *Cassia occidentalis* seeds"; Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie; 40; 2007; 730-736.

Milardović, S.; Iveković, D.; Rumenjak, V.; Grabaric, B.S.; "A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical"; Bioelectrochemistry; 68; 2006; 175-180.

Milardović, S.; Iveković, D.; Rumenjak, V.; Grabaric, B.S.; "Use of DPPH/DPPH Redox Couple for Biamperometric Determination of Antioxidant Activity"; Electroanalysis; 20; 2005; 1847-1853.



Miyazawa, M.; Shimamura, H.; Bhuvu, R. C.; Nakamura, S.; Kameoka, H.; “ *Antimutagenic Activity of Falcarindiol from Peucedanum praeruptorum*”; Journal of Agricultural and Food Chemistry; 44; 1996; 3444-3448.

Molyneux, P.,” *The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating anti-oxidant Activity*”; Songklanakarin Journal of Science and Technology; 26; 2004; 211-219.

Moreira, I.C.; Lago, J. H. G.; Young, M. C. M.; Roque, N. F.; “*Antifungal Aromadendrane Sesquiterpenoids from the Leaves of Xylopiia brasiliensis*”; Journal of Brazilian Chemical Society; 5; 2003; 828-831.

Naphade, S.S.; Khadabadi, S.S.; Deore, S.L.; Jagtap, N.S.; Hadke, S.P.; “*Antioxidant activity of different extracts of plant Tricholepis Glaberrima DC (Asteraceae)*”; International Journal of Pharm-Tech Research; 3; 2009; 502-505.

Nenadis, N.; Wang, L.F.; Tsimidou, M.; Zhang, H.Y.; “ *Estimation of scavenging activity of phenolic*

Nishikawa, M.; “*Reactive oxygen species in tumor metastasis* “; Cancer Letters; 266; 2008; 53-59.

Nuengchamnong, N.; Ingkaninan, K.; “*On-line HPLC–MS–DPPH assay for the analysis of phenolic antioxidant compounds in fruit wine: Antidesma thwaitesianum Muell.*”; Food Chemistry; 118; 2010, 147-152.

Nuhu, A.A.; Aliyu, R.; “*Effects of Cassia occidentalis aqueous leaf extract on biochemical markers of tissue damage in rats*”; Tropical Journal of Pharmaceutical Research; 7; 2008; 1137-1142.

Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists’ Society; “*Peroxide Value method*”; American Oil Chemists’ Society; Champaign; 4 ed.; 1997; Method Cd 8-53.

Ogunlana, O.E.; Ogunlana, O.; Farombi, O.E.; “*Assessment of the Scavenging Activity of Crude Methanolic Stem Bark Extract of Newbouldia Laevis on Selected Free Radicals*”; Advances in Natural and Applied Sciences; 2; 2008; 249-254.

Okigbo, R. N.; Anuagasi, C. L.; Amadi, J. E.; “*Advances in selected medicinal and aromatic plants indigenous to Africa*”; Journal of Medicinal Plants Research; 3; 2009; 086-095.

Osawa, C.C.; Felício, P.E.; Gonçalves, L.A.G.; “*teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos*” Quimica Nova; 4; 2005; 655-663.

Osman<sup>a</sup>, A.M.; Wong, K.K.Y.; Hill, S.J.; Fernyhough, A.; “*Isolation and the characterization of the degradation products of the mediator ABTS-derived radicals formed upon reaction with polyphenols*”; Biochemical and Biophysical Research Communications; 340; 2006; 597-603.

Osman<sup>b</sup>, A.M.; Wong, K.K.Y.; Hill, S.J.; Fernyhough, A.; “*ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: Isolation and structural elucidation of covalent adduct*”; Biochemical and Biophysical Research Communications; 346; 2006; 321-329.

Özen, T.; Kinalioğlu, K.; “*Determination of antioxidant activity of various extracts of Parmelia saxatilis*”; Biologia; 63; 2008 ; 211-216.

Padayatty, S. J.; Katz, A.; Wang, Y.; Eck, P.; Kwon, O.; Lee, J.H.; Chen, S.; Corpe, C.; Dutta, A.; Dutta, S.K.; Levine, M.; “*Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention*”; Journal of the American College of Nutrition; 1; 2003; 18-35.

Poljšake, B.; Raspor, P.; “*The antioxidant and pro-oxidant activity of vitamin C and trolox in vitro: a comparative study*”; Journal of Applied Toxicology; 28; 2008; 183-188.

Pombeiro, A.J.L.O.; “*Técnicas e operações unitárias em química laboratorial*”; 2<sup>a</sup> ed.; 1991; Fundação Calouste Gulbenkian; Lisboa.

Portillo, A.; Vila, R.; Freixa, B.; Adzet, T.; Cañigueral, S.; “*Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine*”; Journal of Ethnopharmacology; 76; 2001; 93-98.

Prior, R.L.; Cao, G.; “*In vivo total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods*”; Free Radical Biology & Medicine; 27; 1999; 1173-1181.

Rayne, S.; Mazza, G.; “*Biological Activities of Extracts from Sumac (Rhus spp.): A Review*”; Plant Foods for Human Nutrition; 62; 2007; 165-175.

Re, R.; Pellegrini, N.; Proggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C.; “*Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*”; Free Radical Biology & Medicine; 9/10; 1999; 1231-1237.

Remóna, M.A.; González, B.A.; Rosa, Z.R.; Lacueva, A.C.; Estruch, R.; González, M.A.M.; Espino, J.D.; Raventosa, R.M.L.; “*Rapid Folin–Ciocalteu method using microtiter 96-well plate cartridges for solid phase extraction to assess urinary total phenolic compounds, as a biomarker of total polyphenols intake*”; Analytica Chimica Acta; 634; 2009; 54-60.

Rio, D.D.; Stewart, A.J.; Pellegrini, N.; “*A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress*”; Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases; 15; 2005; 316-328.

Robson, N.K.B.; “*Annonaceae*”; Flora Zambesiaca; volume: 1 part: 1; 1960; 104.

Roginsky, V.; Lissi, E.A.; “*Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food*”; Food Chemistry; 92; 2005; 235-254.

Sahai, K.; “*Reproductive biology of two species of Canavalia DC. (Fabaceae)-A non-conventional wild legume*”; Flora; 204; 2009; 762-768.

Saraiva, A.C.M.S.; “*Estudo da composição química das folhas da Parinari pumila*”; 2004; Tese de licenciatura- Universidade da Beira Interior; Covilhã.

Sarker, S. D.; Latif, Z.; Gray, A. I.; “*Natural Products Isolation*”; 2<sup>a</sup> ed.; 2006; Humana Press Inc.; New Jersey;.

Scalzo, R.L.; “*Organic acids influence on DPPH scavenging by ascorbic acid*”; Food Chemistry; 107; 2008; 40-43.

Scheibmeir, H.D.; Christensen, K.; Whitaker, S.H.; Jegaethesan, J.; Clancy, R.; Pierce, J.D.; “*A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses*”; Intensive and Critical Care Nursing; 21; 2005; 24-28.

Schwarz, K.; Huang, S.W.; German, J.B.; Tiersch, B.; Hartmann, J.; Frankel, E.N.; “*Activities of Antioxidants Are Affected by Colloidal Properties of Oil-in-Water and Water-in-Oil Emulsions and Bulk Oils*”; Journal of agricultural and food chemistry; 48; 2000; 4874-4882.

Sebastião, N.N.; “*Avaliação química da Eragrostis viscosa (Lubango/ Angola)*”; 2007; Tese de doutoramento- Universidade da Beira Interior; Covilhã.

Sebastião, N.S. N.; Cordeiro, I.J.S.; dos Santos, A.F.; Gaspar, J.F.; Martins, C.; Rueff, J.; Diakanamwa, C.; Sant’Ana, A.E.G.; de Mendonça, D.I.M.D.; “*8,15-epoxylabdane and norlabdane diterpenoids from Eragrostis viscosa.*”; Phytochemistry; 2010; 71: 798-803.

Seifrieda, H.E.; Anderson, D.E.; Fishera, E.I.; Milner, J.A.; “*A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species*”; Journal of Nutritional Biochemistry; 18; 2007; 567-579.

Seljeskog, E.; Hervig, T.; Mansoor, M.A.; “*A novel HPLC method for the measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). A comparison with a commercially available kit*”; Clinical Biochemistry; 39; 2006; 947-954.

Setiowaty, G.; Che, M.Y.B.; Jinap, S.; Moh, M.H.; “*Quantitative Determination of Peroxide Value in Thermally Oxidized Palm Olein by Fourier Transform Infrared Spectroscopy*”; Phytochemical Analysis; 11; 2000; 74-78.

Setiowaty, S.; Tanaka, M.; Ohno, K.; Nagao, Y.; Yamada, T.; “*Re-evaluation of peroxide value as an indicator of the quality of edible oils*”; Journal of the food hygienic society of Japan; 3; 2007; 51-57.

Sheeba, M.; Emmanuel, S.; Revathi, K.; Ignacimuthu, S.; “*Wound healing activity of Cassia occidentalis L. in albino Wistar rats*”; International Journal of Integrative Biology; 8; 2009; 1-6.

Silva, E.M.; Souza, J.N.S.; Rogez, H.; Rees, J.F.; Larondelle, Y.; “*Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region*”; Food Chemistry; 101; 2006; 1012-1018.

Silva, T.C.; Gorniak, S.L.; Oloris, S.C.S.; Raspantini, P.C.; Haraguchi, M.; Dagle, M.L.Z.; “*Effects of Senna occidentalis on chick bursa of Fabricius*”; Avian Pathology; 32; 2003; 633-637.

Simić, A.; Manojlović, D.; Šegan, D.; Todorović, M.; “*Electrochemical Behavior and Antioxidant and Prooxidant Activity of Natural Phenolics*”; *Molecules*; 12; 2007; 2327-2340;

Singh, S.; Singh, R.P.; “*In Vitro Methods of Assay of Antioxidants: An Overview*”; *Food Reviews International*; 24; 2008; 392-415.

Sob, S.V.T.; Wabo, H.K.; Tchinda, A.T.; Tane, P.; Ngadjui, B.T.; Ye, Y.; “*Anthraquinones, sterols, triterpenoids and xanthenes from Cassia obtusifolia*”; *Biochemical Systematics and Ecology* ; 2010; 1-4.

Spalik, K.; Reduron, J.-P.; Downie, S. R.; “*The phylogenetic position of Peucedanum sensu lato and allied genera and their placement in tribe Selineae (Apiaceae, subfamily Apioideae)*”; *Plant Systematics and Evolution*; 243; 2004; 189-210.

Stashenko, E. E.; Jaramillo, B. E.; Martínez, J. R.; “*Analysis of volatile secondary metabolites from Colombian Xylopia aromatica (Lamarck) by different extraction and headspace methods and gas chromatography*”; *Journal of Chromatography A*; 1025; 2004; 105-113.

Strochkova, E.K.; Kuselman, Y.I.T.I.; “*Redox-potentiometric determination of peroxide value in edible oils without titration*”; *Talanta*; 54; 2001; 411-416.

Su, X.Y.; Yu, Zh.; Liu, W.R.; “*In vitro and in vivo antioxidant activity of Pinus koraiensis seed extract containing phenolic compounds*”; *Food Chemistry*; 117; 2009; 681-686.

Sun, Q.; Faustman, C.; Senecal, A.; Wilkinson, A.L.; Furr, H.; “*Aldehyde reactivity with 2-thiobarbituric acid and TBARS in freeze-dried beef during accelerated storage*”; *Meat Science*; 57; 2001; 55-60.

Tasak, A.C.; Weg, R.; Calore, E.E.; Sinhorini, I.L.; Dagli, M.L.Z.; Haraguchi, M.; Górniak, S.L.; “*Toxicity Testing of Senna occidentalis Seed in Rabbits*”; *Veterinary Research Communications*; 24; 2000; 573-582.

Teixeira, D.M.; Canelas, V.C.; Canto, A.M.; Teixeira, J.M.G.; Dias, C.B.; “*HPLC-DAD Quantification of Phenolic Compounds Contributing to the Antioxidant Activity of Maclura pomifera, Ficus carica and Ficus elastica Extracts*”; Analytical Letters; 42; 2009; 2986-3003.

Thaipong, K.; Boonprakob, U.; Crosby, K.; Cisneros-Zevallos, L.; Byrne, D.H.; “*Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts*”; Journal of Food Composition and Analysis; 19; 2006; 669-675.

Tokur, B.; Korkmaz, K.; Ayas, D.; “*Comparison of Two Thiobarbituric Acid (TBA) Method for Monitoring Lipid Oxidation in Fish*”; Journal of Fisheries & Aquatic Sciences; 23; 2006; 331-334.

Torre-carbot, K.; Jauregui, O.; Gimeno, E.; Castellote, A.I.; Raventós, R.M.L.; Sabater, M.C.P.; “*Characterization and Quantification of Phenolic Compounds in Olive Oils by Solid-Phase Extraction, HPLC-DAD, and HPLC-MS/MS*”; Journal of Agricultural and Food Chemistry; 53; 2005; 4331-4340.

Tsaknis, J.; Lalas, S.; Hole, M.; Smith, G.; Tychopoulos, V.; “*Rapid high-performance liquid chromatographic method of determining malondialdehyde for evaluation of rancidity in edible oils*”; Analyst; 123; 1998; 325-327.

Turkmen, N.; Sari, F.; Velioglu, Y.S.; “*Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods*” Food Chemistry; 99; 2006; 835-841.

Ulu, H.; “*Evaluation of three 2-thiobarbituric acid methods for the measurement of lipid oxidation in various meats and meat products*”; Meat Science; 67; 2004; 683-687.

Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.D.; Mazur, M.; Telser, T.; “*Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*”; The International Journal of Biochemistry & Cell Biology; 39; 2007; 44-84.

Valko, M.; Rhodes, C.J.; Moncola, J.; Izakovic, M.; Mazura, M.; “*Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*”; Chemico-Biological Interactions; 160; 2006; 1-40.

Villaño, D.; Fernández-Pachón, M.S.; Moyá, M.L.; Troncoso, A.M.; García-Parrilla, M.C.; “*Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical*”; *Talanta*; 71; 2007; 230-235.

Wagstaff, S.J.; Heenan, P.B.; Sanderson, M.J.; “*Classification, origins, and patterns of diversification in New Zealand Carmichaelinae (Fabaceae)*”; *American Journal of Botany*; 86; 1999; 1346-1356.

Wang, T.; Jónsdóttir, R.; Ólafsdóttir, G.; “*Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweed*”; *Food Chemistry*; 116; 2009; 240-24.

Wojdyło, A.; Oszmianski, J.; Czemerys, R.; “*Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs*”; *Food Chemistry*; 105; 2007; 940-949.

Yadav, J.P.; Arya, V.; Yadav, S.; Panghal, M.; Kumar, S.; Dhankhar, S.; “*Cassia occidentalis L.: A review on its ethnobotany, phytochemical and pharmacological profile*”; *Fitoterapia*; 2009; 1-8.

Yesil-Celiktas, O.; Nartop, P.; Gurel, A.; Bedir, E.; Vardar-Sukan, F.; “*Determination of phenolic content and antioxidant activity of extracts obtained from Rosmarinus officinalis' calli*”; *Journal of Plant Physiology*; 164; 2007; 1536-1542.

Yoo, K.M.; Kim, D.O.; Lee, C.Y.; “*Evaluation of different methods of antioxidant measurement*”; *Food Science and Biotechnology*; 2; 2007; 177-182.

Zhou, J.; Gong, X.; Downie, S.R.; Peng, H.; “*Towards a more robust molecular phylogeny of Chinese Apiaceae subfamily Apioideae: Additional evidence from nrDNA ITS and cpDNA intron (rpl16 and rps16) sequences*”; *Molecular Phylogenetics and Evolution*; 53; 2009; 56-68.

Zhuang, Q.K.; Scholz, F.; Pragst, F.; “*The voltammetric behavior of solid 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) microparticles*”; *Electrochemistry Communications*; 1; 1999; 406-410.

## **6 CIBERGRAFIA**

<http://actd.iict.pt/view/actd:LISC001411>; **20 de Junho de 2010.**

<http://actd.iict.pt/view/actd:LISC001902>; **20 de Junho de 2010.**

[http://plantes-rizieresguyane.cirad.fr/dicotyledones/caesalpiaceae/senna\\_occidentalis](http://plantes-rizieresguyane.cirad.fr/dicotyledones/caesalpiaceae/senna_occidentalis); **20 de Junho de 2010.**

<http://www.aluka.org/action/showCompilationPage?doi=10.5555/AL.AP.COMPILATION.PLANT-NAME-SPECIES.ERAGROSTIS.VISCOSA>; **20 de Junho de 2010.**

<http://www.aluka.org/action/showContentImage?doi=10.5555/AL.AP.SPECIMEN.G00018008&pgs=>; **20 de Junho de 2010.**

<http://www.aluka.org/action/showMetadata?doi=10.5555/AL.AP.SPECIMEN.COI00004885>; **20 de Junho de 2010.**

[http://www.biodiversity.org.na\\_treetlas\\_SpPDFs\\_Sp084](http://www.biodiversity.org.na_treetlas_SpPDFs_Sp084); **20 de Junho de 2010.**

[http://www.floracyberia.net/spermatophyta/angiospermae/dicotyledoneae/apiaceae/peucedanum\\_palustre.html](http://www.floracyberia.net/spermatophyta/angiospermae/dicotyledoneae/apiaceae/peucedanum_palustre.html); **20 de Junho de 2010.**

[http://www.zimbabweflora.co.zw/speciesdata/genus.php?genus\\_id=1369](http://www.zimbabweflora.co.zw/speciesdata/genus.php?genus_id=1369); **20 de Junho de 2010.**

[http://www.zimbabweflora.co.zw/speciesdata/genus.php?genus\\_id=661](http://www.zimbabweflora.co.zw/speciesdata/genus.php?genus_id=661); **20 de Junho de 2010.**



