

*Faculdade de Farmácia*

**Universidade do Porto**

**LIMONETE, HIPERICÃO-DO-GERÊS, CARDO-DO-COALHO, FEL-DA-TERRA**

**Metodologias de controlo de qualidade com base na fracção fenólica**

**Estudos de acção antioxidante e hepatoprotectora**

**Patrícia Carla Ribeiro Valentão**

**Porto, 2002**



*Faculdade de Farmácia*  
**Universidade do Porto**

**LIMONETE, HIPERICÃO-DO-GERÊS, CARDO-DO-COALHO, FEL-DA-TERRA**

**Metodologias de controlo de qualidade com base na fracção fenólica**  
**Estudos de acção antioxidante e hepatoprotectora**

**Patrícia Carla Ribeiro Valentão**

*Porto, 2002*

---

*Dissertação de candidatura ao grau de Doutor  
apresentada à Faculdade de Farmácia da  
Universidade do Porto*

---

*À memória de minha Mãe*

*Ao meu Pai*

---

## Publicações e Comunicações

Alguns dos resultados incluídos nesta dissertação são já do conhecimento da comunidade científica, quer através de publicações bem como de comunicações apresentadas em congressos:

### *Publicações*

- P.B. Andrade, R.M. Seabra, P. Valentão, F. Areias - Simultaneous determination of flavonoids, phenolic acids and coumarins in seven medicinal species by HPLC/DAD. **J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.** (1998) 21(18), 2813-2820.
- P. Valentão, P.B. Andrade, F. Areias, F. Ferreres, R.M. Seabra - Analysis of vervain flavonoids by HPLC/Diode-Array detector method. Its application to quality control. **J. Agric. Food Chem.** (1999) 47, 4579-4582.
- P. Valentão, F. Areias, J. Amaral, P. Andrade, R. Seabra - Tetraoxygenated xanthenes from *Centaurium erythraea*. **Nat. Prod. Lett.** (2000) 14 (5), 319-323.
- P. Valentão, E. Fernandes, F. Carvalho, P. B. Andrade, R. M. Seabra, M. L. Bastos - Antioxidant activity of *Centaurium erythraea* infusion evidenced by its superoxide radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activity. **J. Agric. Food Chem.** (2001) 49, 3476-3479.
- P. Valentão, P. B. Andrade, E. Silva, A. Vicente, H. Santos, M. L. Bastos, R. M. Seabra - Methoxylated xanthenes in the quality control of small centaury (*Centaurium erythraea*) aerial parts. **J. Agric. Food Chem.** (2002) 50, 460-463.
- P. Valentão, E. Fernandes, F. Carvalho, P. B. Andrade, R. M. Seabra, M. L. Bastos - Antioxidant activity of *Hypericum androsaemum* infusion: scavenging activity against superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. **Biol. Pharm. Bull.** (2002) 25, 1320-1323.

- 
- P. Valentão, E. Fernandes, F. Carvalho, P. B. Andrade, R. M. Seabra, M. L. Bastos - Studies on the antioxidant activity of *Lippia citriodora* infusion: scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. **Biol. Pharm. Bull.** (2002) 25, 1324-1327.
  - P. Valentão, E. Fernandes, F. Carvalho, P. B. Andrade, R. M. Seabra, M. L. Bastos - Antioxidative properties of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) infusion against superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. **J. Agric. Food Chem.** (2002) 50, 4989-4993.
  - R. M. Seabra, P. Valentão, F. Ferreres, P. B. Andrade - Phenolic profiles in the definition of natural products authenticity: cardoon *versus* artichoke profile. **In Natural products in the new millenium: prospects and industrial applications.** (Aceite para publicação).
  - P. Valentão, P. B. Andrade, A. M. S. Silva, M. M. Moreira, R. M. Seabra - Isolation and structural elucidation of 5-formyl-2,3-dihydroisocoumarin from *Centaureum erythraea* aerial parts. **Nat. Prod. Lett.** (Aceite para publicação).
  - P. Valentão, A. Dias, M. Ferreira, B. Silva, P. B. Andrade, M. L. Bastos, R. M. Seabra - Variability in phenolic composition of *Hypericum androsaemum*. **Nat. Prod. Lett.** (Aceite para publicação).
  - P. Valentão, E. Fernandes, F. Carvalho, P. B. Andrade, R. M. Seabra, M. L. Bastos - Evaluation of the antioxidant activity of small centaury (*Centaureum erythraea*) infusion: scavenging of hydroxyl radical and hypochlorous acid. **Food Chem.** (Submetido para publicação).

---

## Comunicações

- R.M. Seabra, F. Areias, P. Valentão, P.B. Andrade - Phenolic profiles of sage, lavender, peppermint and vervain. **Euro Food Chem IX**. 24-26 Setembro, 1997. Interlaken. Suíça.
- P. Valentão, F. Areias, J. Amaral, P. Andrade - Characterization of seven medicinal species by the phenolic constituents of their hydrolyzed extracts. **1<sup>st</sup> International Meeting of Aromatic and Medicinal Mediterranean Plants**. 24-26 Abril, 1998. Conimbriga-Ansião. Portugal.
- P. Valentão, F. Areias, P. Andrade, F. Ferreres, R. Seabra - Analysis of vervain flavonoids by HPLC/Diode-Array detector method. Its application to quality control. **XXVII Reunión Científica del Grupo de Cromatografía y Técnicas Afines**. 8-10 Julho, 1998. Lugo. Espanha. (Comunicação oral).
- R. M. Seabra, P. Valentão, F. Areias, P.B. Andrade, F. Ferreres - Characterisation of Lavender, Vervain and Peppermint by their phenolic composition. **XIX<sup>TH</sup> International Conference on Polyphenols**. 1-4 Setembro, 1998. Lille. França.
- P. Valentão, F. Areias, J. Amaral, P. Andrade, R. Seabra - Xantonas tetraoxigenadas de *Centaurium erythraea*. **I Congresso das Plantas Aromáticas e Medicinais dos Países de Língua Oficial Portuguesa**. 7-9 Junho, 1999. Conimbriga-Ansião. Portugal.
- P. Valentão, E. Fernandes, F. Carvalho, P. Andrade, R. Seabra, M. L. Bastos - Antioxidant activity of *Centaurium erythraea*. **4º Congresso de Radicais Livres em Química, Biologia e Medicina**. 22-24 Setembro, 1999. Tróia. Portugal.
- P. Valentão, B. Silva, P. Andrade, F. Ferreres, R. Seabra - Determination of phenolic compounds in *Cynara cardunculus* by solid-phase extraction and HPLC. **PSE Meeting – Natural Products from the Plants and Marine Organisms of the**

---

**Mediterranean and Atlantic Seaboard: Isolation, Synthesis and Industrial Applications.** 2-5 Abril, 2000. Lisboa. Portugal.

- P. Valentão, P. Andrade, R. Seabra - Determinação de compostos fenólicos do Cardo-do-Coalho por HPLC/DAD. **Curso de HPLC – Fundamentos teóricos e potencialidades.** 13-14 Junho, 2000. Bragança. Portugal. (Comunicação oral).
- P. Valentão, E. Fernandes, F. Carvalho, P. Andrade, R. Seabra, M. L. Bastos - Antioxidant activity of *Lippia citriodora*. **XX<sup>th</sup> International Conference on Polyphenols.** 11-15 Setembro, 2000. Freising-Weihenstephan. Alemanha.
- P. Valentão, E. Silva, P. Andrade, R. Seabra - Ácidos fenólicos e flavonóides do Hiperião-do-Gerês. **XIV Encontro Luso-Galego de Química.** 22-24 Novembro, 2000. Braga. Portugal.
- P. Valentão, E. Fernandes, F. Carvalho, P. Andrade, R. Seabra, M. L. Bastos - Antioxidant activity of *Hypericum androsaemum* infusion. **Euro Food Chem XI.** 26-28 Setembro, 2001. Norwich. Inglaterra.
- P. Valentão, E. Fernandes, F. Carvalho, P. Andrade, R. M. Seabra, M. L. Bastos - Scavenging effect of *Lippia citriodora* infusion on hydroxyl radical and hypochlorous acid. **International Symposium on "Dietary Phytochemicals and human health".** 18-20 Abril, 2002. Salamanca. Espanha.
- P. Valentão, E. Fernandes, F. Carvalho, P. Andrade, R. M. Seabra, M. L. Bastos - Antioxidant effect of cardoon infusion. **XXI<sup>st</sup> International Conference on Polyphenols.** 9-12 Setembro, 2002. Marraquexe. Marrocos.



**Agradecimentos**

## *Agradecimentos*

Ao tornar pública esta dissertação, sinto o dever de expressar o meu profundo agradecimento a quantos, por qualquer forma, contribuíram para a concretização deste trabalho. Mesmo correndo o risco de não nomear, por esquecimento que não por falta de reconhecimento, algumas pessoas, não posso deixar de agradecer, sensibilizada e reconhecidamente:

À Prof. Doutora Rosa Maria Seabra, pela sabedoria com que orientou esta dissertação, pela confiança que em mim depositou, pela forma como me responsabilizou, pelo empenho que sempre mostrou no desenvolvimento do meu trabalho e pelas suas qualidades humanas, que a levaram a continuamente me animar. Manifesto, ainda, a minha admiração pelo seu esforço em proporcionar condições materiais e humanas para o desenvolvimento do trabalho experimental de fitoquímica, no Serviço de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, do qual é Directora.

À Prof. Doutora Maria de Lourdes Bastos, co-orientadora desta dissertação, pelo apoio científico e espírito crítico que muito enriqueceram este trabalho, pelo acolhimento, pelas palavras de estímulo, pela disponibilidade sempre manifestada, e pelo modo como sempre colocou à minha disposição recursos humanos e materiais necessários à realização dos ensaios de actividade antioxidante e hepatoprotectora, no Serviço de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, do qual é Directora.

À Prof. Doutora Paula Branquinho de Andrade, co-orientadora desta dissertação, pelos valiosos conhecimentos que me transmitiu, pela pronta colaboração face a todas as minhas solicitações, pela confiança que em mim depositou e pelo apoio e entusiasmo que me incutiu desde a minha iniciação e crescimento científico no Serviço de Farmacognosia.

Ao Prof. Doutor Félix Carvalho, pelos seus ensinamentos, pelo constante encitamento e pela crítica, empenho e saber científico com que sempre acompanhou o meu trabalho.

À Doutora Eduarda Fernandes, pelos conhecimentos transmitidos, pela disponibilidade, pelo auxílio prestado em alguns ensaios, e pela sua amizade.

Ao Prof. Doutor Federico Ferreres, do Consejo Superior de Investigaciones Cientificas (CSIC), de Murcia, pela disponibilidade e pelo valioso contributo na identificação de alguns compostos presentes nos extractos de Limonete e de Cardo-do-Coalho.

Ao Prof. Doutor Alberto Dias, do Departamento de Biologia da Universidade do Minho, pelos conhecimentos transmitidos sobre o Hiperição-do-Gerês e o Fel-da-Terra, pela ajuda prestada na elucidação estrutural de xantonas e, ainda, pelas palavras de incitamento.

À Mestre Branca Silva, minha colega no Serviço de Farmacognosia mas, principalmente, uma amiga, pela sua colaboração no trabalho experimental, pelas palavras de entusiasmo e de conforto e pela sua amizade.

À Mestre Márcia Carvalho, a cujos conhecimentos recorri frequentemente, pela disponibilidade, pelo auxílio prestado no isolamento de hepatócitos de rato e, também, pelas palavras de encorajamento e amizade.

Ao Prof. Doutor Artur Silva, do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, pelo seu contributo no esclarecimento da estrutura da 5-formil-2,3-di-hidro-isocumarina.

À Prof. Doutora Maria de Lourdes Pereira, pela colaboração prestada nos estudos de histologia realizados no Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro. Agradeço, também, ao Dr. Ricardo Neves, pela sempre pronta disponibilidade na ajuda e na obtenção das fotografias de microscopia óptica de cortes de fígado.

À Dra. Laura Pereira, pela disponibilidade e pelo auxílio dispensado na quantificação das transaminases plasmáticas, realizada no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

À Dra. Joana Amaral e ao Eurico Silva, pela contribuição nos estudos fitoquímicos, enquanto alunos de investigação.

À Eng.<sup>a</sup> Ana Vicente, da Direcção Regional de Agricultura de Entre Douro e Minho, pelo fornecimento de algumas das amostras analisadas e pelo interesse sempre demonstrado pela investigação em curso.

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia, pela atribuição de uma bolsa de doutoramento (PRAXIS XXI/BD/15740/98) e pelos subsídios concedidos para participação em congressos no estrangeiro.

Ao Mestre Filipe Areias, com quem convivi no Serviço de Farmacognosia da F.F.U.P., pelo apoio prestado no início deste trabalho.

À Eng.<sup>a</sup> Ana Vinha, pela constante boa disposição e pela amizade partilhada todos os dias no Serviço de Farmacognosia da F.F.U.P..

Ao Dr. Fernando Remião, à Dra. Helena Carmo e à Eng.<sup>a</sup> Maria Elisa Soares, pelo apoio científico, pelas palavras de incitamento e pelas provas de amizade dadas no Serviço de Toxicologia da F.F.U.P..

Aos membros dos Serviços de Farmacognosia e de Toxicologia da F.F.U.P., que ao longo dos anos me acolheram, me apoiaram e me estimularam.

À minha Irmã Sandra, o meu profundo agradecimento por estarmos sempre juntas.

Ao Pitrez, o meu agradecimento pela disponibilidade, paciência e amizade.

À Márcia, por me ter feito sorrir nos momentos difíceis, um beijinho muito especial.

À memória da minha Avó Custódia, um “Muito Obrigada” por sempre ter conseguido “carregar” o mundo às costas. Estou certa que, junto com a minha Mãe, estejam onde estiverem, continuam a olhar por nós.

Ao Zé Manel, um agradecimento muito especial, pela partilha dos bons e maus momentos, por todo o seu carinho, encorajamento e apoio.

Ao meu Pai, pelo esforço nunca regateado para me proporcionar todas as condições necessárias à obtenção da licenciatura em Ciências Farmacêuticas, porque sempre acreditou em mim e pelo apoio incondicional que tornou possível este trabalho, o meu eterno agradecimento.

**Abreviaturas e símbolos**

---

$\lambda$	Comprimento de onda
$\delta$	Desvio químico em ppm
$\mu\text{g}$	Microgramas
$\mu\text{l}$	Microlitros
$\mu\text{M}$	Micromolar
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Trifosfato de adenosina
<i>t</i> -BHP	<i>tert</i> -Butil-hidroperóxido
CC	Cromatografia em coluna
CCF	Cromatografia em camada fina
$\text{CDCl}_3$	Clorofórmio deuterado
$\text{CD}_3\text{COCD}_3$	Acetona hexadeuterada
CLAP	Cromatografia líquida de alta pressão
DEPT	“Distortionless enhancement by polarization transfer”
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> 6	Dimetilsulfóxido hexadeuterado
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
EDTA	Ácido etilenodiaminatetracético
EGTA	Ácido etilenoglicol-bis( $\beta$ -aminoetiléter)N,N,N',N'-tetracético
EM	Espectrometria de massa
<i>et al.</i>	e colaboradores
F. F. U. P.	Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto
g	Gramas
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
$\text{H}_2\text{O}_2$	Peróxido de hidrogénio
HETCOR	“Heteronuclear chemical shift correlation”

---

---

HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanossulfónico
HMBC	“Heteronuclear multiple bond correlation”
HO•	Radical hidroxilo
HOCl	Ácido hipocloroso
Hz	Hertz
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória de 50% da reacção
IE	Impacto electrónico
inf.	Inflexão
<i>J</i>	Constante de acoplamento
Kg	Quilogramas
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis-Menten
L•	Radical lipídico
LDH	Desidrogenase láctica
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LO•	Radical alcóxido lipídico
LOO•	Radical peróxido lipídico
LOOH	Hidroperóxido lipídico
m / e	Relação massa / carga
M <sup>+</sup>	Ião molecular
MeOH	Metanol
mg	Miligramas
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido na forma reduzida
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato na forma oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato na forma reduzida
NBT	Azul de nitrotetrazólio
nm	Nanómetros
O <sub>2</sub> • <sup>-</sup>	Radical superóxido
OCH <sub>3</sub>	Metóxido
OH	Hidroxilo
PMS	Metossulfato de fenazina



ppm	Partes por milhão
R <sub>f</sub>	Factor de retenção
RMN de <sup>13</sup> C	Ressonância magnética nuclear de carbono treze
RMN de <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de protão
ROO <sup>•</sup>	Radical peroxilo
ROS	Espécies reactivas de oxigénio
r.p.m.	Rotações por minuto
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reactivas com o ácido tiobarbitúrico
TNB	Ácido 5-tio-2-nitrobenzóico
t <sub>r</sub>	Tempo de retenção
UV	Ultra-Violeta
Vis	Visível
V <sub>máx</sub>	Velocidade máxima da reacção
X	Xantina
XO	Xantina oxidase

**Índice geral**

## Índice Geral

<b>Considerações gerais.....</b>	<b>9</b>
I. Introdução geral e objectivos.....	11
II. Caracterização das espécies em estudo.....	13
Limonete.....	13
Hipericão-do-Gerês.....	15
Cardo-do-Coalho.....	16
Fel-da-Terra.....	18
<b><i>Parte A: Limonete, Hipericão-do-Gerês, Cardo-do-Coalho, Fel-da-Terra – Metodologias de controlo de qualidade com base na fracção fenólica.....</i></b>	<b><i>21</i></b>
<b>1. Fundamentos teóricos.....</b>	<b>23</b>
1. 1. Compostos fenólicos - generalidades.....	25
1. 2. Utilização do perfil fenólico como marcador de autenticidade.....	31
1. 3. Metodologia usada no isolamento e caracterização de compostos fenólicos.....	33
1. 3. 1. Métodos cromatográficos.....	34
1. 3. 1. 1. Cromatografia em camada fina (CCF).....	34
1. 3. 1. 2. Cromatografia em coluna (CC).....	35
1. 3. 1. 3. Cromatografia líquida de alta pressão (CLAP).....	35
1. 3. 2. Métodos espectrofotométricos (UV-Visível).....	37
1. 3. 3. Métodos espectrométricos.....	41
1. 3. 3. 1. Ressonância magnética nuclear (RMN).....	41
1. 3. 3. 2. Espectrometria de massa (EM).....	43
1. 3. 4. Métodos degradativos.....	44
1. 4. Análise quantitativa de compostos fenólicos.....	45
<b>2. Metodologia geral.....</b>	<b>47</b>
2. 1. Substâncias de referência e reagentes.....	49
2. 2. Análise dos compostos fenólicos por CLAP.....	50
2. 3. Determinação estrutural dos compostos fenólicos isolados.....	51

---

2. 3. 1. Espectrofotometria de UV.....	51
2. 3. 2. Ressonância magnética nuclear.....	52
2. 3. 3. Espectrometria de massa.....	52
2. 4. Quantificação dos fenóis totais.....	52
<b>3. Composição fenólica do Limonete.....</b>	<b>55</b>
3. 1. Caracterização do material em estudo.....	57
3. 2. Extração dos compostos fenólicos.....	58
3. 3. Condições analíticas.....	58
3. 4. Resultados e discussão.....	59
<b>4. Composição fenólica do Hiperião-do-Gerês.....</b>	<b>69</b>
4. 1. Caracterização do material em estudo.....	71
4. 2. Extração dos compostos fenólicos.....	72
4. 3. Condições analíticas.....	72
4. 4. Resultados e discussão.....	74
<b>5. Composição fenólica do Cardo-do-Coalho.....</b>	<b>85</b>
5. 1. Caracterização do material em estudo.....	87
5. 2. Extração dos compostos fenólicos.....	88
5. 3. Condições analíticas.....	88
5. 4. Resultados e discussão.....	89
<b>6. Composição fenólica do Fel-da-Terra.....</b>	<b>95</b>
6. 1. Caracterização do material em estudo.....	97
6. 2. Extração dos compostos fenólicos.....	97
6. 3. Condições analíticas.....	98
6. 4. Isolamento e determinação estrutural dos compostos fenólicos.....	99
6. 5. Resultados e discussão.....	102
6. 5. 1. Elucidação estrutural dos compostos fenólicos.....	102
6. 5. 2. Análise dos compostos fenólicos.....	148
<b>7. Conclusões.....</b>	<b>153</b>

---

---

<b>Parte B: Estudos de acção antioxidante e hepatoprotectora.....</b>	<b>157</b>
<b>BI. Acção antioxidante.....</b>	<b>159</b>
<b>1. Fundamentos teóricos.....</b>	<b>161</b>
1. 1. Introdução.....	163
1. 2. Espécies reactivas de oxigénio (ROS).....	165
1. 3. Oxidação lipídica.....	172
1. 4. Defesas antioxidantes.....	177
1. 4. 1. Antioxidantes enzimáticos endógenos.....	178
1. 4. 2. Antioxidantes não enzimáticos endógenos.....	180
1. 4. 3. Compostos fenólicos.....	185
<b>2. Parte experimental.....</b>	<b>191</b>
2. 1. Substâncias de referência e reagentes.....	193
2. 2. Preparação das infusões.....	193
2. 3. Avaliação da actividade sequestrante das infusões para o radical superóxido.....	194
2. 3. 1. Método não enzimático (NADH/PMS).....	194
2. 3. 2. Método enzimático (xantina/xantina oxidase).....	195
2. 3. 3. Estudo do efeito das infusões sobre a xantina oxidase.....	197
2. 4. Avaliação da actividade sequestrante das infusões para o radical hidroxilo.....	198
2. 5. Avaliação da actividade sequestrante das infusões para o ácido hipocloroso.....	200
<b>3. Resultados e discussão.....</b>	<b>203</b>
3. 1. Limonete.....	205
3. 2. Hipericão-do-Gerês.....	210
3. 3. Cardo-do-Coalho.....	215
3. 4. Fel-da-Terra.....	220
<b>4. Conclusões.....</b>	<b>227</b>

---

<b>B2. Ação hepatoprotectora.....</b>	<b>231</b>
<b>1. Fundamentos teóricos.....</b>	<b>233</b>
1. 1. Introdução.....	235
1. 2. Toxicidade do <i>terc</i> -butil-hidroperóxido.....	236
<b>2. Parte experimental.....</b>	<b>239</b>
2. 1. Ensaios <i>in vitro</i> em hepatócitos isolados de rato.....	241
2. 1. 1. Substâncias de referência e reagentes.....	241
2. 1. 2. Animais.....	241
2. 1. 3. Isolamento dos hepatócitos de rato.....	242
2. 1. 4. Incubação dos hepatócitos.....	245
2. 1. 5. Determinação da viabilidade dos hepatócitos isolados.....	246
2. 1. 5. 1. Exclusão do azul de tripano.....	246
2. 1. 5. 2. Liberação da desidrogenase láctica (LDH).....	247
2. 1. 6. Determinação dos níveis de glutathiona total.....	249
2. 1. 7. Determinação dos níveis de glutathiona oxidada.....	250
2. 1. 8. Determinação da extensão da peroxidação lipídica.....	252
2. 2. Ensaios <i>in vivo</i> em ratinhos.....	253
2. 2. 1. Substâncias de referência e reagentes.....	253
2. 2. 2. Animais.....	254
2. 2. 3. Tratamento dos animais.....	254
2. 2. 4. Relação peso do fígado/peso corporal.....	255
2. 2. 5. Determinação dos níveis de glutathiona total.....	255
2. 2. 6. Determinação dos níveis de glutathiona oxidada.....	256
2. 2. 7. Determinação da extensão da peroxidação lipídica.....	258
2. 2. 8. Determinação dos níveis plasmáticos de transaminases.....	258
2. 2. 9. Análise histológica de cortes de fígado.....	259
2. 3. Análise estatística.....	259
<b>3. Resultados e discussão.....</b>	<b>261</b>
3. 1. Ensaios <i>in vitro</i> em hepatócitos isolados de rato.....	263
3. 2. Ensaios <i>in vivo</i> em ratinhos.....	272

<b>4. Conclusões.....</b>	<b>283</b>
<b>Bibliografia .....</b>	<b>287</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>307</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>313</b>
<b>Résumé.....</b>	<b>319</b>

**Considerações gerais**



## **Índice**

I. Introdução geral e objectivos.....	11
II. Caracterização das espécies em estudo.....	13
Limonete.....	13
Hiperião-do-Gerês.....	15
Cardo-do-Coalho.....	16
Fel-da-Terra.....	18

## I. Introdução geral e objectivos

A Organização Mundial de Saúde define “planta medicinal” como “todo o vegetal que contém em um ou mais dos seus órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou preventivos ou que são precursores de semi-síntese quimiofarmacêutica” (Fitoterapia, 1998).

As plantas constituem a principal forma de resposta às necessidades de cuidados de saúde nos países menos desenvolvidos, constituindo cerca de 65% da população mundial. Por outro lado, na Europa, América do Norte e Austrália, as estatísticas mostram um aumento no recurso à fitoterapia.

O processo de controlo de qualidade das espécies medicinais está definido nas Farmacopeias e compreende ensaios de identidade, pesquisa de falsificações e doseamento de constituintes. Estes ensaios obedecem a parâmetros botânicos (macroscópicos e microscópicos) e químicos. A comercialização de misturas de plantas e de formas farmacêuticas contendo os seus extractos, levou à necessidade de valorizar a caracterização química, numa tentativa de encontrar marcadores químicos que, de modo qualitativo e quantitativo, definam a espécie.

Para o presente trabalho foram escolhidas quatro espécies de grande consumo em Portugal: *Lippia citriodora* (Limonete), *Hypericum androsaemum* (Hipericão-do-Gerês), *Cynara cardunculus* (Cardo-do-Coalho) e *Centaurium erythraea* (Fel-da-Terra). São espécies medicinais, de composição química parcialmente conhecida, para as quais estão descritos diversos compostos fenólicos. Estes compostos têm uma ampla distribuição na natureza, e são utilizados como marcadores taxonómicos de diversas espécies.

Contudo, o conhecimento dos seus constituintes não foi, ainda, suficientemente explorado para a elaboração de processos de controlo de autenticidade destas espécies. Foi nosso objectivo estabelecer metodologias para controlo de qualidade, que possam ser empregues na análise de rotina de cada uma das espécies. Para esse efeito foram definidas as condições de análise dos compostos fenólicos presentes em extractos obtidos de cada espécie, por cromatografia líquida de alta pressão (CLAP), que é actualmente o método mais utilizado para determinação destes compostos. Essas condições foram aplicadas a plantas de crescimento espontâneo ou cultivadas em várias regiões do país, e colhidas em diversos anos, na tentativa de encontrar uma relação entre

o padrão de composição fenólica e a origem botânica, que permita definir o perfil (qualitativo e quantitativo) característico da espécie. A identificação dos compostos foi feita, sempre que possível, recorrendo a substâncias de referência disponíveis comercialmente, de modo a poder estar acessível a uma análise de rotina.

Frequentemente a utilização de plantas medicinais baseia-se no conhecimento tradicional das suas acções. A inexistência de um suporte científico para a actividade que lhes é atribuída levou a que começassem a ser desenvolvidos ensaios biológicos dessas espécies.

Muitas das acções terapêuticas exibidas pelas plantas medicinais decorrem da sua actividade antioxidante. De entre os diferentes tipos de compostos naturais, o grupo dos compostos fenólicos é, talvez, o mais estudado, com actividade antioxidante comprovada em diversos sistemas. Convém lembrar que os antioxidantes sintéticos mais utilizados, butil-hidroxianisol (BHA) e butil-hidroxitolueno (BHT), são compostos fenólicos; contudo, a sua utilização tem vindo a ser restringida devido à toxicidade que apresentam.

Atendendo a que as espécies envolvidas neste trabalho apresentam um importante conteúdo fenólico, e dada a inexistência de estudos sobre a acção antioxidante das mesmas, propusemo-nos avaliar o potencial antioxidante das infusões obtidas de cada uma das espécies, uma vez que esta constitui a forma sob a qual são mais frequentemente utilizadas. Com este objectivo foi estudado o comportamento das infusões face a diversas espécies reactivas de oxigénio, nomeadamente o radical superóxido, o radical hidroxilo e o ácido hipocloroso.

Das espécies incluídas neste trabalho, o Hipericão-do-Gerês e o Cardo-do-Coalho são tradicionalmente reconhecidas como possuindo actividade sobre o fígado. A descoberta da acção hepatoprotectora da silibina, isolada do Cardo-de-Santa-Maria e actualmente comercializada em algumas especialidades farmacêuticas, despertou o interesse para a pesquisa de actividade hepatoprotectora em espécies vegetais.

Para validar cientificamente a actividade hepatoprotectora que lhe é atribuída, escolhemos o Hipericão-do-Gerês, por parecer ser, das duas espécies referidas, aquela mais utilizada em Portugal com esta finalidade. Este estudo foi efectuado recorrendo a ensaios *in vitro* e *in vivo*.

A avaliação *in vitro* foi desenvolvida em hepatócitos isolados de rato, usando *tert*-butil-hidroperóxido (*t*-BHP) como indutor de toxicidade. O estudo da actividade anti-hepatotóxica foi feito através das determinações de glutathiona reduzida e oxidada,

peroxidação lipídica, libertação de lactato desidrogenase para o meio extracelular e viabilidade celular.

Os ensaios de hepatoprotecção *in vivo* foram efectuados recorrendo ao ensaio de toxicidade aguda provocada pelo *t*-BHP, em ratinhos. A avaliação da actividade hepatoprotectora foi feita através das determinações de glutathione reduzida e oxidada, peroxidação lipídica e transaminases hepáticas (ALT e AST), controlo de peso diário e análise histológica do parênquima hepático.

## II. Caracterização das espécies em estudo

### *Limonete*

O Limonete, igualmente conhecido como Bela-Luísia, Lúcia-lima, ou Doce-lima (*Lippia citriodora* (Ort.) H.B.K., *Aloysia citriodora* (Cav.) Ort., *A. triphylla* Brit., *L. triphylla* sic, *Verbena citriodora* Cav., *V. triphylla* L'Her) (**Figura 1**), é um arbusto da família *Verbenaceae*, originário da América do Sul e cultivado na Europa Meridional desde o final do século XVIII (Coutinho, 1939). O fármaco é constituído pelas folhas secas (Farmacopeia Francesa, 1989), que são habitualmente colhidas em Julho e Setembro (Paris e Moyses, 1971).

A presença de um óleo essencial, cujo principal constituinte é o citral, determina o forte aroma a limão encontrado nas folhas e a sua utilização como aromatizante. Nos EUA esta espécie está classificada como segura para consumo humano, em bebidas alcoólicas e infusões (Van Hellefont, 1986; Newall *et al.*, 1996), sendo também usada em sobremesas, saladas e geléias de frutas. Além do óleo essencial, estão também descritos diversos compostos fenólicos (**Tabela 1**).

Ao Limonete são atribuídas diversas propriedades: analgésica, anti-inflamatória, antipirética, sedativa, diurética, anti-espasmódica e estomáquica. É tradicionalmente utilizado, sob a forma de infusão, no tratamento de problemas digestivos, asma, constipações, cólicas, diarreia, flatulência e indigestão (Paris e Moyses, 1971; Van Hellefont, 1986; Newall *et al.*, 1996; Bruneton, 1999; Pascual *et al.*, 2001).

Na monografia incluída na Farmacopeia Francesa (1989), o controlo de qualidade do Limonete passa pela pesquisa de citral, por cromatografia em camada fina.

Atendendo à ampla distribuição deste monoterpreno na natureza, a sua presença pode não garantir a identidade da espécie, sobretudo se a análise macroscópica e/ou microscópica estiverem dificultadas pela forma galénica na qual está incluído.



**Figura 1** - Limonete (*Lippia citriodora*).

**Tabela 1** - Compostos fenólicos descritos no Limonete.

Classe	Composto	Referência
Ácidos cinâmicos e derivados	Verbascósido	Lamaison <i>et al.</i> , 1993; Carnat <i>et al.</i> , 1999; Pascual <i>et al.</i> , 2001.
Flavonas	Apigenina	Tomás-Barnerán <i>et al.</i> , 1987;
	Crysoeriol	Skaltsa e Shamma, 1988;
	Cirsimaritina	Lamaison <i>et al.</i> , 1993; Carnat <i>et al.</i> , 1995; De Vincenzi e
	Diosmetina	Maialetti, 1995; Newall <i>et al.</i> ,
	Eupafolina	1996; Andrade <i>et al.</i> , 1998c;
	Eupatorina	Carnat <i>et al.</i> , 1999; Bruneton,
	6-Hidroxiluteolina	1999; Pascual <i>et al.</i> , 2001.
	Hispidulina	
	Luteolina	
	Luteolina 7- <i>O</i> -diglucuronato	
	Luteolina 7- <i>O</i> -glucuronilglucósido	
	Luteolina 7- <i>O</i> -glucósido (cinarósido)	
	Pectolinarigenina	
	Salvigenina	

### *Hipericão-do-Gerês*

O Hipericão-do-Gerês, ou Androsemo (*Hypericum androsaemum* L.), é um arbusto pertencente à família *Hypericaceae*. Em Portugal encontra-se essencialmente no Minho, Beiras e Estremadura (Sintra), em lugares húmidos e sombrios, bosques e margens dos rios. A floração ocorre entre Junho e Setembro (Coutinho, 1939). O fármaco é constituído pelos ramos floridos secos, colhidos imediatamente antes ou durante o período de floração (**Figura 2**) (Costa, 1994; Farinha *et al.*, 1998).



**Figura 2** - Hipericão-do-Gerês (*Hypericum androsaemum*).

Entre os muitos constituintes desta espécie (cera, resina, óleo essencial), os compostos fenólicos revelam-se particularmente importantes para a sua caracterização (**Tabela 2**). Um dado importante a ter em atenção é a ausência de quercetina 3-*O*-rutinósido (rutina) e de hipericina (uma naftodiantrona), presentes noutras espécies deste género (*H. perforatum*, *H. undulatum*). No género *Hypericum* está também descrita a existência de compostos derivados do floroglucinol, nomeadamente hiperforina (Costa, 1994; Dias *et al.*, 1999).

A infusão de Hipericão-do-Gerês é tradicionalmente usada como colagogo, hepatoprotector, diurético e em situações de falência renal (Costa, 1994; Farinha *et al.*, 1998).

Contudo, não existe nenhuma monografia indicando como deverá ser feito o controlo de qualidade desta planta.

**Tabela 2** - Compostos fenólicos descritos no Hipericão-do-Gerês.

Classe	Composto	Referência
Ácidos cinâmicos	Ácido cafeico	Seabra e Correia Alves, 1989a; Dias <i>et al.</i> , 1999.
	Ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico	
	Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico (ácido clorogénico)	
Flavonas	Luteolina	Andrade <i>et al.</i> , 1998c.
Flavonóis	Kaempferol	Seabra e Correia Alves, 1989b; Seabra e Correia Alves, 1990; Andrade <i>et al.</i> , 1998c; Dias <i>et al.</i> , 1999.
	Quercetina	
	Quercetina 3- <i>O</i> -glucósido (isoquercitrina)	
	Quercetina 3- <i>O</i> -galactósido (hiperósido)	
	Quercetina 3- <i>O</i> -ramnósido (quercitrina)	
	Quercetina 3- <i>O</i> -glucuronato	
Xantonas	1,7-di-hidroxixantona	Seabra e Correia Alves, 1989a; Schmidt <i>et al.</i> , 2000.
	1,3,5,6-tetra-hidroxi-2-prenilxantona	
	1,3,6,7-tetra-hidroxi-8-prenilxantona	
	1,3,6,7-tetra-hidroxi-2,8-diprenilxantona	
	1,3,6,7-tetra-hidroxi-2-glicosil-xantona (mangiferina)	

### *Cardo-do-Coalho*

O Cardo-do-Coalho (*Cynara cardunculus* L.) (*Compositae*) é uma planta herbácea (**Figura 3**), originária da região mediterrânea, que se desenvolve em terrenos incultos e áridos, na Estremadura, Alentejo e Algarve (Coutinho, 1939).



**Figura 3** - Cardo-do-Coalho (*Cynara cardunculus*).

Actualmente é cultivada como legume, sobretudo na zona sudoeste da Europa, sendo consumidos os pecíolos e as nervuras esbranquiçadas e carnudas das folhas. As folhas são usadas no fabrico de bebidas amargas e licores (Paris e Moyse, 1971; Plantas medicinais, 1990). A existência de proteinases confere às flores capacidade para coagular o leite e, por isso, são utilizadas na produção de queijo. A este respeito, lembramos que queijos com “Denominação de Origem Protegida”, como o “Serra da Estrela”, só podem ser produzidos usando as flores de Cardo-do-Coalho como coagulante (Vioque *et al.*, 2000).

Para fins terapêuticos utilizam-se as folhas, colhidas na época de floração, que ocorre entre Junho e Agosto. As folhas contêm um suco amargo (cianopictina), mucilagens, taninos, ácidos orgânicos e vitamina A e são o órgão mais rico em compostos fenólicos, sobretudo ésteres do ácido cafeico (**Tabela 3**) (Coutinho, 1939; Paris e Moyse, 1971; Volák e Stodola, 1990).

**Tabela 3** - Compostos fenólicos descritos no Cardo-do-Coalho.

Classe	Composto	Referência
Ácidos cinâmicos	Ácido cafeico	Paris e Moyse, 1971; Ševčíková <i>et al.</i> , 2002.
	Ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico	
	Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico (ácido clorogénico)	
	Ácido 1,3- <i>O</i> -dicafeoilquínico (cinarina)	
	Ácido 1,5- <i>O</i> -dicafeoilquínico	
Flavonas	Apigenina	Paris e Moyse, 1971; Andrade <i>et al.</i> , 1998c; Ševčíková <i>et al.</i> , 2002.
	Luteolina	
	Luteolina 7- <i>O</i> -glucósido (cinarósido)	

A infusão de Cardo-do-Coalho é tradicionalmente usada como colerético, colagogo, hepatoprotector e diurético. Apresenta um efeito de prevenção da arteriosclerose, por diminuição da colesterolemia, e capacidade para reduzir a glicemia, sendo utilizado como adjuvante no tratamento da diabetes (Paris e Moyse, 1971; Volák e Stodola, 1990; Amico e Sorce, 1997).

No que diz respeito ao controlo de qualidade, não é conhecida qualquer monografia relativa ao Cardo-do-Coalho.



### ***Fel-da-Terra***

O Fel-da-Terra, ou Centáurea menor (*Centaureum erythraea* Rafn., *C. minus* Moench; *C. umbellatum* Gilib, *Erythraea centaurium* Pers.), é uma planta herbácea da família *Gentianaceae*, que se distribui por quase todo o país, em matos, bosques pastagens e outeiros secos (Coutinho, 1939). Na Flora Europeia (1968) é possível encontrar a descrição de seis subespécies diferentes (*erythraea*, *turcicum*, *rumelicum*, *grandiflorum*, *rhodense* e *majus*). O fármaco é constituído pelas sumidades floridas (**Figura 4**) (Farmacopeia Portuguesa, 1997), que são colhidas no período de floração, entre Junho e Agosto (Coutinho, 1939; Volák e Stodola, 1990).



**Figura 4** - Fel-da-Terra (*Centaureum erythraea*).

Na sua composição química encontramos diversos componentes amargos, principalmente swertiamarina, swerósido, amarogentina, eritrocentaurina, gentiopicrina e gentianina, que lhe conferem um sabor muito amargo. Existem, também, um óleo essencial e compostos fenólicos, de entre os quais se destacam diversas xantonas, características da família *Gentianaceae* (**Tabela 4**) (Paris e Moyses, 1971; Van Hellemont, 1986; Hostettmann e Hostettmann, 1989; Volák e Stodola, 1990; Newall *et al.*, 1996; Bruneton, 1999).

O Fel-da-Terra está classificado pelo Conselho da Europa na categoria N2, indicando que esta espécie pode ser utilizada em pequenas quantidades (ainda não

especificadas), como aromatizante de géneros alimentares (Newall *et al.*, 1996). Devido à excitação das papilas gustativas, e consequente aumento da saliva e do suco gástrico, provocada pelos componentes amargos, esta espécie entra na composição de aperitivos. Nos EUA os teores permitidos em bebidas alcoólicas e não-alcoólicas varia entre 0,0002 e 0,0008% (Paris e Moyse, 1971; Van Hellemont, 1986; Volák e Stodola, 1990; Newall *et al.*, 1996; Bruneton, 1999).

Do ponto de vista terapêutico, o Fel-da-Terra tem descritas diversas propriedades: analgésico, anti-inflamatório, antipirético, aperitivo, depurativo, digestivo, febrífugo, sedativo e tónico. Além da infusão, a forma mais comum de utilização, são também preparados extractos aquosos e alcoólicos desta espécie (Paris e Moyse, 1971; Van Hellemont, 1986; Berkan *et al.*, 1991; Volák e Stodola, 1990; Newall *et al.*, 1996; Bruneton, 1999).

O controlo de identidade química preconizado pela Farmacopeia Portuguesa (1997) baseia-se num ensaio de pesquisa de swertiamarina, por cromatografia em camada fina.

Atendendo à inexistência de informação sobre o controlo de autenticidade do Hiperício-do-Gerês e do Cardo-do-Coalho, e considerando que, dada a sua ampla distribuição na natureza, o citral e a swertiamarina não garantem a identidade de amostras de Limonete e de Fel-da-Terra, respectivamente, o nosso trabalho poderá representar uma contribuição importante no âmbito do controlo de qualidade e autenticidade das espécies envolvidas.

Tabela 4 - Compostos fenólicos descritos no Fel-da-Terra.

Classe	Composto	Referência
Ácidos benzóicos*	Ácido <i>m</i> -hidroxibenzóico	Hatjimanoli e Debelmas, 1977; Dombrowicz <i>et al.</i> , 1988; Andrade <i>et al.</i> , 1998c; Newall <i>et al.</i> , 1996
	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	
	Ácido gentísico	
	Ácido protocatéuico	
	Ácido siríngico	
	Ácido vanílico	
Ácidos cinâmicos*	Ácido cafeico	Hatjimanoli e Debelmas, 1977; Meravý, 1987; Dombrowicz <i>et al.</i> , 1988; Andrade <i>et al.</i> , 1998c; Newall <i>et al.</i> , 1996.
	Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquinico (ácido clorogénico)	
	Ácido <i>p</i> -cumárico	
	Ácido ferúlico	
	Ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico	
	Ácido sinápico	
Flavonóis	Kaempferol	Andrade <i>et al.</i> , 1998c.
	Quercetina	
Xantonas	1-hidroxi-3,5,6-trimetoxi-xantona	Takagi e Yamaki, 1982; Neshta <i>et al.</i> , 1982; Neshta <i>et al.</i> , 1983a; Neshta <i>et al.</i> , 1983b; Neshta <i>et al.</i> , 1984; Kaouadji <i>et al.</i> , 1986; Kaouadji e Mariotte, 1986; Meravý, 1987; Beerhues e Berger, 1994; Beerhues e Berger, 1995; Shimmer e Mauthner, 1996.
	1-hidroxi-3,5,6,7-tetrametoxi-xantona	
	1-hidroxi-3,5,6,7,8-pentametoxi-xantona (eustomina)	
	1-hidroxi-3,7,8-trimetoxi-xantona (decussatina)	
	1,2,3-tri-hidroxi-5-metoxi-xantona	
	1,4-di-hidroxi-3,5-dimetoxi-xantona	
	1,5-di-hidroxi-3-metoxi-xantona	
	1,6,8-tri-hidroxi-3,5,7-trimetoxi-xantona	
	1,8-di-hidroxi-2,3,4,6-tetrametoxi-xantona	
	1,8-di-hidroxi-3,4,6-trimetoxi-xantona	
	1,8-di-hidroxi-3,5-dimetoxi-xantona (metilbelidifolina)	
	1,8-di-hidroxi-3,5,6,7-tetrametoxi-xantona (desmetileustomina)	
3,5,6,7,8-pentametoxi-1- <i>O</i> -primeverosil-xantona		

\* Livres ou em combinação.

## **PARTE A**

**Limonete, Hiperição-do-Gerês, Cardo-do-Coalho, Fel-da-Terra.  
Metodologias de controlo de qualidade com base na fracção fenólica.**

## **1. Fundamentos teóricos**

## Índice

1. 1. Compostos fenólicos - generalidades.....	25
1. 2. Utilização do perfil fenólico como marcador de autenticidade.....	31
1. 3. Metodologia usada no isolamento e caracterização de compostos fenólicos.....	33
1. 3. 1. Métodos cromatográficos.....	34
1. 3. 1. 1. Cromatografia em camada fina (CCF).....	34
1. 3. 1. 2. Cromatografia em coluna (CC).....	35
1. 3. 1. 3. Cromatografia líquida de alta pressão (CLAP).....	35
1. 3. 2. Métodos espectrofotométricos (UV-Visível).....	37
1. 3. 3. Métodos espectrométricos.....	41
1. 3. 3. 1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	41
1. 3. 3. 2. Espectrometria de massa (EM).....	43
1. 3. 4. Métodos degradativos.....	44
1. 4. Análise quantitativa de compostos fenólicos.....	45

## 1. Fundamentos teóricos

### 1. 1. Compostos fenólicos - generalidades

Os compostos fenólicos são caracterizados pela presença de, pelo menos, um anel benzênico, que está ligado directamente a, pelo menos, um grupo hidroxilo livre ou envolvido numa outra função: éter, éster, heterósido (Harborne, 1989; Bruneton, 1999). Os monossacáridos associados a estes compostos incluem a glucose, galactose, arabinose, rarnnose, apiose, ácidos glucurónico e galacturónico, sendo também possível a sua presença sob formas mais complexas (dí-, tri- ou tetrassacáridos) (Harborne, 1989). Para além destas formas hidrossolúveis, situadas principalmente nos vacúolos celulares, os compostos fenólicos existem também sob formas poliméricas menos polares como as lenhinas, situadas na parede celular, encontrando-se as formas mais metoxiladas nas cutículas.

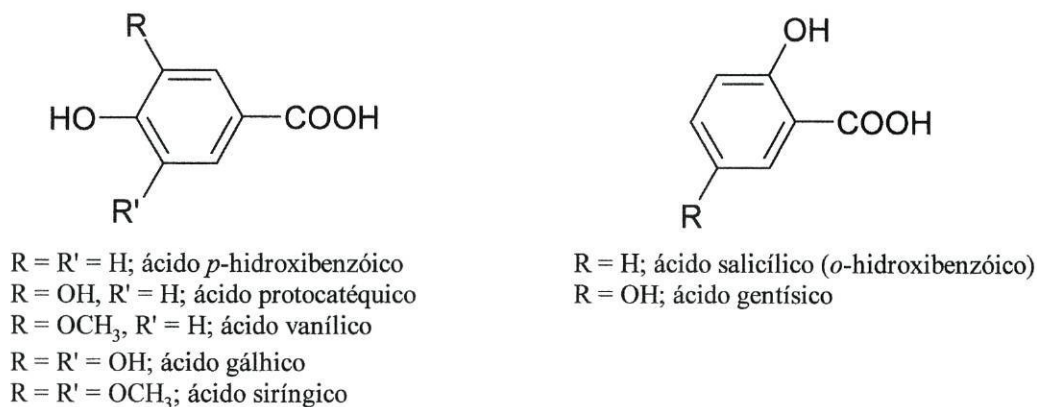
Os compostos fenólicos são produtos do metabolismo secundário, estando presentes em todos os tecidos vegetais. As substâncias de natureza fenólica, mais abundantes nas plantas, pertencem às classes dos ácidos fenólicos, flavonóides e taninos. Outras classes têm uma distribuição mais discreta, tais como os isoflavonóides, antraquinonas e xantonas (Ribéreau-Gayon, 1968a; Harborne, 1989; Waterman e Mole, 1994a).

#### *Ácidos fenólicos*

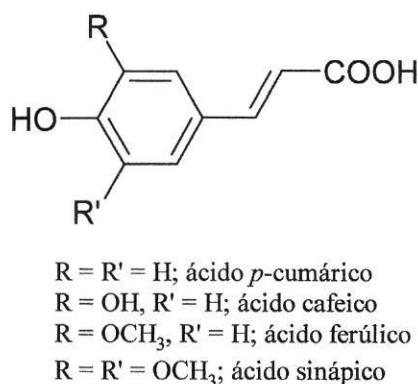
A denominação geral de “ácidos fenólicos” pode ser aplicada a todos os compostos orgânicos que possuem, pelo menos, uma função carboxílica e um hidroxilo fenólico (Bruneton, 1999). Esta denominação compreende os ácidos benzóicos, com sete átomos de carbono (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>) e os ácidos cinâmicos, com nove átomos de carbono (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>), cujas principais estruturas estão representadas nas **Figuras 5 e 6**.

A presença de uma ligação dupla na cadeia lateral dos ácidos cinâmicos implica que possam existir formas isoméricas *cis* e *trans*. Os ácidos cinâmicos naturais correspondem aos isómeros *trans*. Contudo, quando em solução, os dois isómeros

convertem-se facilmente um no outro, por influência da luz, até à obtenção de um equilíbrio (Ribéreau-Gayon, 1968).



**Figura 5** - Estruturas dos principais ácidos benzóicos (adaptado de Ribéreau-Gayon, 1968b).



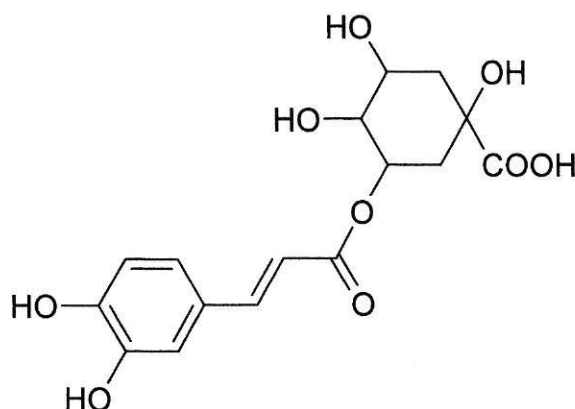
**Figura 6** - Estruturas dos principais ácidos cinâmicos (adaptado de Ribéreau-Gayon, 1968b).

Os ácidos cinâmicos encontram-se habitualmente na natureza na forma combinada. A grande variedade de ácidos cinâmicos existentes nos vegetais resulta da natureza das ligações e das moléculas envolvidas nessas combinações. Um dos principais tipos de ligação identificados corresponde à ligação éster entre a função carboxílica do ácido fenólico e um grupo alcoólico de um composto orgânico (Macheix *et al.*, 1990a).

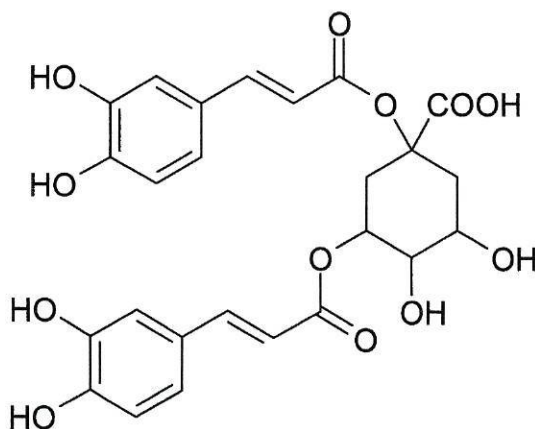
O ácido 5-*O*-cafeoilquínico, também conhecido por ácido clorogénico, é um éster do ácido cafeico e do ácido quínico e constitui a combinação mais frequente na natureza (**Figura 7**) (Ribéreau-Gayon, 1968a). No caso do ácido 1,3-*O*-



dicafeoilquínico, ou cinarina, o ácido quínico está esterificado com duas moléculas de ácido cafeico (**Figura 8**).

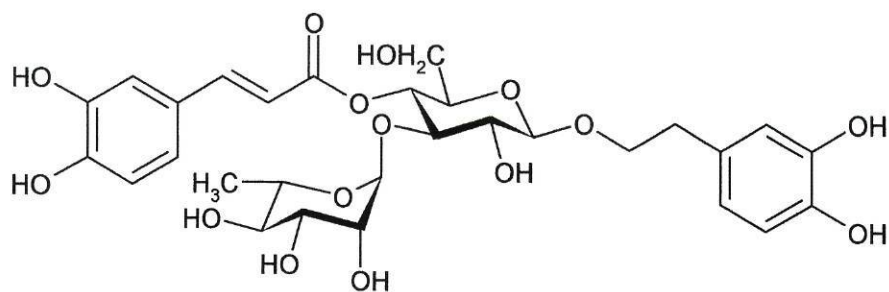


**Figura 7** - Estrutura do ácido 5-*O*-cafeoilquínico.



**Figura 8** - Estrutura do ácido 1,3-*O*-dicafeoilquínico.

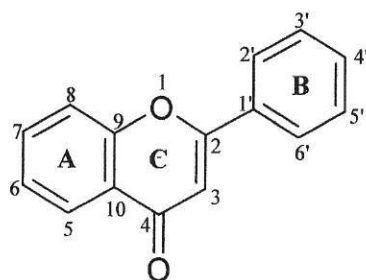
Um outro grupo de derivados razoavelmente frequente é constituído por compostos do tipo do verbascósido (**Figura 9**), que envolve três tipos de moléculas: um ácido cinâmico, geralmente o ácido cafeico, açúcares e um feniletanol (Bruneton, 1999).



**Figura 9** - Estrutura do verbascósido.

### *Flavonóides*

Os flavonóides são caracterizados por uma estrutura geral com quinze átomos de carbono,  $C_6-C_3-C_6$ , na qual dois anéis benzênicos se encontram ligados por uma cadeia de três átomos de carbono, podendo ou não formar-se um terceiro anel. Os anéis são designados por A, B e C, e o sistema de numeração tem início no átomo de oxigênio do heterociclo, prosseguindo até aos carbonos envolvidos na junção dos anéis (**Figura 10**). De acordo com o grau de oxidação do heterociclo oxigenado, os flavonóides são agrupados em classes distintas (**Figura 11**) (Ribéreau-Gayon, 1968a, 1968c; Markham, 1989; Bruneton, 1999).

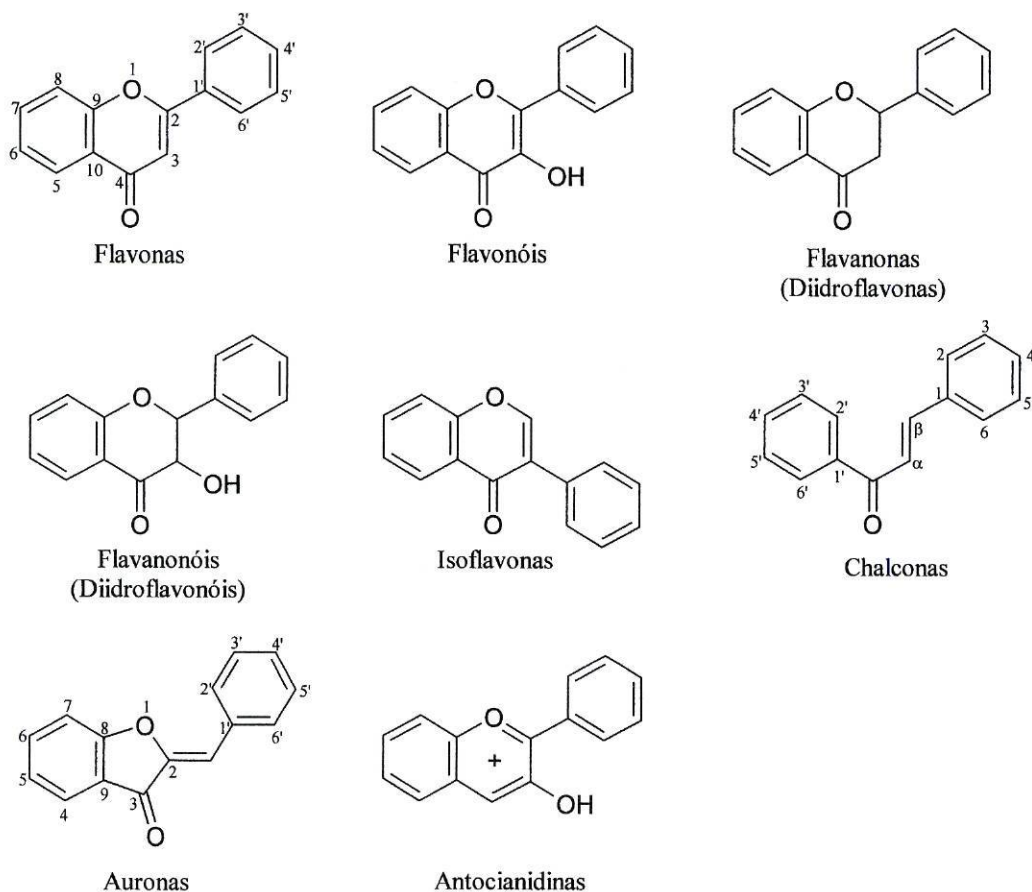


**Figura 10** - Estrutura geral dos flavonóides.

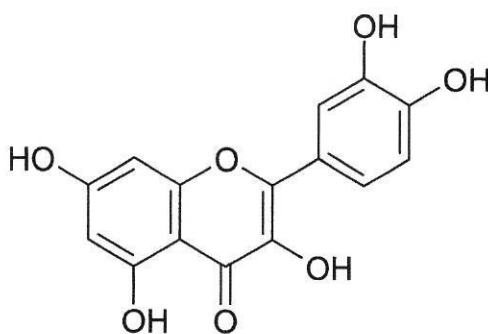
De entre estes compostos, os flavonóis são aqueles que possuem uma distribuição mais ampla, sendo a quercetina (3,5,7,3',4'-pentahidroxiavona) (**Figura 12**) o composto fenólico que ocorre com maior frequência na natureza (Ribéreau-Gayon, 1968c; Harborne, 1989).

Os flavonóides são compostos com origem biossintética mista, sendo o anel A formado “via acetato” e os anéis B e C sintetizados “via chiquimato”. Como

consequência, o esquema de substituição mais frequente é a hidroxilação alternada no anel A, nas posições 5 e 7, e a hidroxilação *para* no anel B, que poder ser do tipo 4'-OH, 3',4'-diOH ou 3',4',5'-triOH. A variedade de estruturas encontrada nas diferentes classes resulta de modificações posteriores, sendo a glicosilação e a metilação dos hidroxilos as mais comuns. Outras modificações, como metilação, metoxilação, hidroxilação adicional, formação de C-glicosilflavonóides, prenilação, acilação dos hidroxilos do núcleo flavonóide ou dos açúcares que lhe estão ligados, metilenação de grupos *orto*-di-hidroxilos e dimerização surgem na natureza com menor frequência.



**Figura 11** - Estruturas das diferentes classes de flavonóides.



**Figura 12** - Estrutura da quercetina.

### *Heterósidos flavónicos*

Os flavonóides existem na natureza, preferencialmente, na forma de heterósidos, de modo a tornar a molécula menos reactiva e mais solúvel no suco vacuolar.

Nos *O*-heterósidos a ligação entre a genina e o açúcar é feita através de qualquer um dos hidroxilos da genina, mas geralmente são os hidroxilos na posição 7 das flavonas e os hidroxilos nas posições 3 e 7 dos flavonóis e diidroflavonóis que estão envolvidos.

Menos frequente é a ocorrência de *C*-heterósidos, nos quais a molécula de açúcar se liga, pelo seu carbono anomérico, ao carbono na posição 6 ou 8 da genina, estabelecendo uma ligação carbono-carbono. Geralmente as geninas implicadas neste tipo de compostos são flavonas.

A parte glicosídica da molécula pode ser constituída por mono-, di- ou trissacáridos, de forma linear ou ramificada. A D-glucose é o principal açúcar envolvido na glicosilação, mas também se encontram combinações com D-galactose, D-alose, D-apiose, L-arabinose, L-ramnose, D-xilose, ácidos glucurónico e galacturónico.

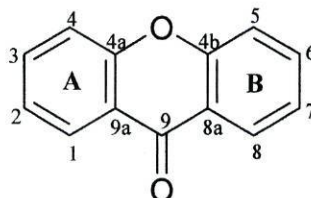
Mais raramente a fracção glicosídica pode sofrer acilação com várias moléculas (ácidos cinâmicos, ácido acético, ácido malónico, hidrogenossulfatos), estabelecendo-se uma ligação do tipo éster com um hidroxilo glucídico do heterósido (Ribéreau-Gayon, 1968a, 1968c; Bruneton, 1999).

Existem, ainda, estruturas sulfatadas, nas quais um ou mais grupos sulfato estão ligados a hidroxilos fenólicos ou de açúcares, aumentando a sua solubilidade em água.

## Xantonas

As xantonas são compostos de natureza fenólica com uma distribuição restrita na natureza, estando descritos unicamente em *Gentianaceae*, *Guttiferae*, *Polygalaceae*, *Leguminosae*, *Lythraceae*, *Moraceae*, *Loganiaceae* e *Rhamnaceae*. Contudo, *Gentianaceae* e *Guttiferae* são as famílias nas quais a sua presença é mais significativa, sendo importantes a nível taxonómico (Harborne, 1989; Hostettmann e Hostettmann, 1989; Waterman e Mole, 1994a).

Estes compostos apresentam uma estrutura geral relacionada com a dos flavonóides, com treze átomos de carbono, C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, na qual dois anéis benzénicos se encontram ligados por um átomo de carbono, formando-se um terceiro anel (**Figura 13**). O seu comportamento cromatográfico é semelhante ao dos flavonóides.



**Figura 13** - Estrutura geral das xantonas.

As xantonas, tal como os flavonóides, são compostos de biossíntese mista, apresentando uma parte da molécula (anel A) sintetizada “via acetato” e outra parte (anel B e carbono 9) sintetizada “via chiquimato”. Consequentemente, a presença de grupos oxigenados nas posições 1 e 3 do anel A, e nas posições 5, 6 e/ou 7 do anel B, constituem o padrão de substituição encontrado para a maioria dos casos. Todavia, são conhecidos cerca de 40 padrões de substituição diferentes (Bennett e Lee, 1989; Hostettmann e Hostettmann, 1989).

### 1. 2. Utilização do perfil fenólico como marcador de autenticidade

Os produtos fitoterápicos, uma vez que são derivados de seres vivos, apresentam uma composição química complexa. Porém, a variabilidade de que são dotados é geneticamente limitada. Para assegurar a sua qualidade é necessário definir os limites para os quais essa variabilidade é aceitável, e em que circunstâncias se fala de alteração

ou adulteração desses produtos. Torna-se, por conseguinte, importante definir o seu perfil químico.

De acordo com Ribéreau-Gayon (1968d) para que um composto possa ser utilizado como marcador taxonómico deverá obedecer a várias condições: não deve pertencer aos constituintes principais universalmente distribuídos, tais como glúcidos e ácidos orgânicos, não poderá ter uma estrutura demasiado complexa, elaborada por um número restrito de espécies, deverá ser acumulado e intervir no metabolismo, e de fácil detecção. Certos compostos fenólicos reúnem estes requisitos e por isso são utilizados como marcadores de autenticidade.

De facto, geralmente é possível associar aos produtos de origem vegetal um perfil fenólico qualitativo e quantitativo característico, que permite garantir a sua autenticidade. Todavia, convém chamar a atenção para o facto de a produção de compostos fenólicos ser controlada geneticamente e ser dependente de vários factores ambientais, tais como a exposição à luz, temperatura e humidade (Macheix *et al.*, 1990b). Adicionalmente, é de considerar a variação existente dentro da própria planta, que se pode revelar não só em termos qualitativos, ou seja, os compostos presentes nas folhas podem ser diferentes daqueles existentes nas raízes, flores ou frutos, mas também em termos quantitativos, isto é, apesar de os compostos serem os mesmos, a sua concentração nas diferentes partes da planta pode variar significativamente (Harborne, 1989).

Vários estudos têm sido desenvolvidos no sentido de traçar o perfil fenólico de produtos naturais. Num trabalho realizado com alfazema, foram identificados diversos compostos fenólicos, nomeadamente os ácidos 2-*O*-glucosilcumárico, *o*-cumárico e rosmarínico, cumarina, apigenina 7-*O*-glucósido, herniarina, luteolina e apigenina (Areias *et al.*, 2000). Na hortelã-pimenta identificaram-se o ácido rosmarínico, eriodictiol 7-*O*-rutinósido, eriodictiol 7-*O*-glucósido, luteolina 7-*O*-glucósido, hesperetina 7-*O*-rutinósido, apigenina 7-*O*-rutinósido, 5,6-di-hidroxi-7,8,3',4'-metoxiflavona, pebrelina e gardenina B (Areias *et al.*, 2001). Em ambos os estudos foi possível determinar a proporção relativa de cada composto identificado na planta, estabelecendo desse modo o seu perfil fenólico, que se verificou ser independente da factores extrínsecos. Estes trabalhos confirmaram, ainda, o ácido rosmarínico, éster do ácido cafeico e do ácido 3,4-di-hidroxifeniláctico, como marcador taxonómico das *Lamiaceae*.

O perfil fenólico é também utilizado como indicador de origem botânica. A título de exemplo refere-se o estudo realizado por Andrade e colaboradores (1998b) com grãos de café, que permitiu concluir que as espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora* var. *robusta* se distinguem pelo teor mais elevado em ácido 3,4-dimetoxicinâmico da segunda. Um outro exemplo diz respeito à utilização do ácido elágico e da miricetina 3'-metiléter no esclarecimento da origem botânica do mel de urze (Ferrerres *et al.*, 1996).

A composição fenólica reveste-se, também, de particular importância na avaliação da autenticidade de produtos naturais. Por exemplo, Andrade e colaboradores (1998a) demonstraram que é possível detectar a adulteração de polpas de marmelo com maçã pela presença de floretina 2'-*O*-xilossilglucósido e floretina 2'-*O*-glucósido, enquanto que a existência de arbutina indica uma adulteração por adição de pêra. Estes resultados foram posteriormente aplicados a derivados de marmelo, nomeadamente marmelada e geleia (Silva *et al.*, 2000a, 2000b).

### **1. 3. Metodologia usada no isolamento e caracterização de compostos fenólicos**

A identidade de um composto deve ser esclarecida pelo maior número de critérios possível, que incluem dados obtidos em processos cromatográficos, preferencialmente em sistemas distintos, e determinações espectrofotométricas e espectrométricas. Atendendo ao trabalho já realizado nestes domínios e à disponibilidade, no mercado, de muitas substâncias de referência, a identificação de compostos pode ser estabelecida por comparação de resultados obtidos com substâncias de referência com os resultados obtidos com as substâncias em análise, nos diferentes métodos.

Dos diversos métodos existentes para determinação de compostos fenólicos, limitar-nos-emos a descrever alguns aspectos referentes àqueles por nós utilizados.

### 1. 3. 1. Métodos cromatográficos

As técnicas cromatográficas podem ser usadas com fins analíticos ou de isolamento, e fornecem informações importantes para a identificação de compostos fenólicos.

#### 1. 3. 1. 1. Cromatografia em camada fina (CCF)

A cromatografia em camada fina (CCF) pode ser utilizada, a nível preparativo, na separação de qualquer tipo de composto fenólico.

Várias fases estacionárias podem ser usadas, embora as mais frequentemente utilizadas sejam a sílica (especialmente para compostos menos polares) e a celulose. Os desenvolventes habitualmente usados são o butanol acético e ácido acético diluído (Harborne, 1989; Waterman e Mole, 1994b). No caso particular das xantonas utiliza-se geralmente gel de sílica e misturas de benzeno-acetato de etilo, benzeno-clorofórmio, benzeno-metanol ou clorofórmio metanol, como desenvolventes (Hostettmann e Hostettmann, 1989).

A mobilidade de um composto num determinado desenvolvente é traduzida pelo seu  $R_f$ . O interesse da CCF na identificação de compostos fenólicos reside na possibilidade de relacionar o valor de  $R_f$  de uma substância, encontrado para um determinado desenvolvente, com a estrutura em causa. Teoricamente esse valor deverá ser uma característica reprodutível da substância. No caso dos flavonóides algumas relações estão já estabelecidas (Ribéreau-Gayon, 1968e):

- O aumento do número de grupos hidroxilo diminui o  $R_f$ , quer em solvente alcoólico (butanol acético) quer em solvente aquoso.
- A metilação de grupos hidroxilo aumenta o  $R_f$ .
- A glicosilação diminui o  $R_f$  em solvente alcoólico e aumenta-o em solvente aquoso; a posição do açúcar influencia o  $R_f$ : geralmente os heterósidos de flavonóis com um grupo hidroxilo livre na posição 3 têm um  $R_f$  nulo em água.
- A acilação com um ácido cinâmico aumenta o  $R_f$ .



É também possível inferir alguns dados estruturais a partir da observação à luz natural e UV (366 nm), antes e depois de submeter os cromatogramas a certos reagentes químicos. Assim, a cor natural dos compostos fenólicos revela que estamos em presença de um ácido cinâmico, no caso de se observar uma cor azul, ou que se trata de um flavonóide, por desenvolvimento de uma fluorescência amarelada. Do mesmo modo, o aparecimento de fluorescência azul ou amarela intensa, quando o cromatograma é exposto à luz UV, sugere a presença de um ácido cinâmico ou de um flavonóide, respectivamente.

No nosso trabalho escolhemos como revelador a luz UV antes e após a aplicação de solução metanólica do complexo etanolamina-ácido difenilbórico a 1% (Naturstoffreagenz A), que permite visualizar flavonóides e ácidos cinâmicos.

### ***1. 3. 1. 2. Cromatografia em coluna (CC)***

A cromatografia em coluna (CC) é uma técnica amplamente utilizada na separação de compostos fenólicos. Geralmente o enchimento da coluna é celulose (microcristalina) ou sílica (diâmetro de partícula entre 0,06 e 0,30 mm). Nalguns casos utilizam-se colunas de Sephadex LH-20, colunas de resinas poliméricas (Amberlite XAD) ou colunas de fase reversa (C<sub>8</sub> ou C<sub>18</sub>), por exemplo, colunas Lobar (diâmetro de partícula entre 40 e 60 µm). A eluição é desenvolvida a baixa pressão, recorrendo a uma grande variedade de sistemas solventes (Markham, 1989; Waterman e Mole, 1994b). Tal como na CCF, a detecção pode ser feita por observação à luz natural ou UV.

### ***1. 3. 1. 3. Cromatografia líquida de alta pressão (CLAP)***

A cromatografia líquida de alta pressão (CLAP) é, na sua essência, uma forma de cromatografia líquida em coluna com grande poder de resolução, que se desenvolve a pressão elevada. Atendendo ao elevado nível de resolução e sensibilidade e à possibilidade de se efectuarem determinações quantitativas, esta técnica tem sido utilizada em investigação taxonómica e definição de perfis químicos de cultivares (Markham, 1989). Adicionalmente, pode ser usada com fins preparativos.

Normalmente recorre-se a fases estacionárias constituídas por partículas de pequeno diâmetro (5  $\mu\text{m}$ ), revestidas de cadeias hidrocarbonadas com 8 ou 18 átomos de carbono (fase reversa), pois são aquelas com as quais se obtém melhor resolução. O tamanho da partícula e o comprimento da coluna vão condicionar a pressão desenvolvida. A sequência de eluição é determinada pela adsorção na fase estacionária hidrofóbica e subsequente eluição com a fase móvel, de acordo com a extensão da formação de ligações de hidrogénio (Ferrerres *et al.*, 1989). As eluições podem ser desenvolvidas em gradiente ou em modo isocrático, sendo a fase móvel constituída por misturas de água e solventes orgânicos. O solvente mais usado é o metanol. Geralmente são incluídas nas fases móveis pequenas concentrações de ácidos, que impedem a ionização de grupos acídicos presentes na amostra e melhoram a simetria dos picos. Os ácidos mais utilizados são o acético e o fórmico. O fluxo usado para a eluição depende do tamanho da partícula e do comprimento da coluna. Os fluxos mais usados variam entre 1 e 2 ml/min (Ferrerres *et al.*, 1989).

Nestas condições, os compostos mais polares são os primeiros a eluírem. Assim, os tempos de retenção estão inversamente relacionados com o aumento da glicosilação, e, desta forma, eluem inicialmente os diglicósidos, seguindo-se os monoglicósidos que, por sua vez, precedem os compostos não glicosilados (Markham, 1989; Van Sumere, 1989). O tipo (*O*- ou *C*-heterósidos) e a posição da glicosilação nos flavonóides interferem com a sua mobilidade, sabendo-se que glucósidos e galactósidos constituem pares críticos, de difícil separação (Ferrerres *et al.*, 1989).

Uma vez que todos os compostos fenólicos absorvem na zona do UV, o detector universal para este tipo de compostos é o detector de UV. Este tipo de detecção não é destrutivo, o que representa uma vantagem quando se pretende utilizar subsequentemente um outro sistema de detecção para aquisição de mais informação, ou quando se pretende proceder ao isolamento de compostos.

A disponibilidade de detectores de matriz de díodos aumenta a possibilidade de identificação dos compostos e permite o registo dos cromatogramas a diferentes comprimentos de onda; este detector faculto o espectro de UV de cada composto eluído que, juntamente com o tempo de retenção, constituem dois parâmetros importantes para o processo de identificação dos compostos (Van Sumere, 1989; Waterman e Mole, 1994b).

Actualmente é frequente encontrar detectores de UV e de espectrometria de massa ou de ressonância magnética nuclear acoplados ao mesmo sistema de CLAP, permitindo a detecção, quantificação e identificação dos compostos numa única análise.

Por ser um método analítico sensível, exacto e rápido, a CLAP constitui o processo de eleição para a análise qualitativa e quantitativa de compostos fenólicos.

### 1. 3. 2. Métodos espectrofotométricos (UV-Visível)

Devido à presença de núcleos aromáticos, muitas vezes conjugados, os compostos fenólicos apresentam um espectro de UV característico, que pode fornecer elementos muito importantes para a sua caracterização estrutural. Todos os compostos exibem um ou mais máximos de absorção entre 230 e 290 nm e a ionização provocada por uma base induz um desvio batocrómico (15-50 nm) acompanhado por um aumento da absorvência (Harborne, 1989). Os espectros são habitualmente obtidos a partir de soluções metanólicas do composto puro (Markham, 1982; Waterman e Mole, 1994c).

#### *Ácidos fenólicos*

Os ácidos cinâmicos absorvem em duas zonas do espectro de UV, observando-se um primeiro máximo entre 225 e 235 nm e dois outros entre 290 e 330 nm. A dupla absorção nesta segunda zona é devida à presença dos isómeros *cis* e *trans* e a sua absorvência relativa depende da proporção de cada um dos isómeros. Os diferentes ésteres de um mesmo ácido cinâmico apresentam espectros de absorção semelhantes, independentemente da molécula com função álcool (ácido quínico, açúcar, ácido tartárico) interveniente na sua estrutura. No caso dos heterósidos, os espectros de absorção são modificados em função da natureza da ligação, exibindo espectros diferentes do ácido cinâmico correspondente (Ribéreau-Gayon, 1968b; Harborne, 1989).

No que diz respeito aos ácidos benzóicos, o seu espectro no UV varia em função da hidroxilação dos anéis benzénicos, mais do que o dos ácidos cinâmicos, apresentando uma única região de absorção máxima entre 235 e 325 nm; apenas os ácidos benzóicos di-hidroxilados possuem dois máximos de absorção. A metilação dos

hidroxilos não interfere, significativamente, com o espectro (Ribéreau-Gayon, 1968b; Harborne, 1989; Waterman e Mole, 1994c).

### *Flavonóides*

O espectro de UV dos flavonóides apresenta geralmente duas zonas de absorção máxima:

- entre 240 e 285 nm (banda I), relacionada com os anéis B e C;
- entre 240 e 280 nm (banda II), associada ao anel A.

A posição e a intensidade relativa de cada um destes máximos fornecem dados importantes para esclarecer o tipo de flavonóide e o seu esquema de oxigenação. De facto, o espectro de UV é influenciado principalmente pela oxigenação, sabendo-se que, na generalidade, um aumento da oxigenação provoca um desvio das bandas de absorção para maiores comprimentos de onda (Mabry *et al.*, 1970; Markham, 1982; Markham, 1989). As modificações relacionadas com a oxigenação podem ser resumidas do seguinte modo (Markham, 1982):

- Alterações no anel A reflectem-se na banda II, enquanto que modificações nos anéis B e C reflectem-se na banda I;
- O aumento da oxigenação, especialmente a hidroxilação, provoca geralmente um desvio batocrómico da banda correspondente;
- A metilação e a glicosilação (particularmente dos hidroxilos em 3, 5, 7 e 4') causam desvios das bandas de absorção para menores comprimentos de onda; nos glucósidos, a natureza do açúcar não tem qualquer influência;
- A presença de ácidos cinâmicos como funções acilo num flavonóide pode ser detectada pela existência de um máximo de absorção a 320 nm, característico dos ácidos;
- A presença do sistema 3',4'-di-hidroxilo nas flavonas e flavonóis é geralmente evidenciado por um segundo pico (por vezes uma inflexão) na banda II.

Informação adicional pode ser obtida após a adição de reagentes específicos, ionizantes e quelantes (hidróxido de sódio ou metóxido de sódio, acetato de sódio, acetato de sódio com adição de ácido bórico, cloreto de alumínio, cloreto de alumínio

com adição de ácido clorídrico), que induzem desvios no espectro de UV. Através das alterações produzidas é possível localizar os hidroxilos livres e as suas substituições (Markham, 1982; Markham, 1989):

- Adição de *hidróxido de sódio* ou *metóxido de sódio*: por serem bases fortes, o hidróxido de sódio ou o metóxido de sódio ionizam todos os grupos hidroxilo, sendo particularmente importantes na detecção de hidroxilo livres nas posições 3, 7 e 4';
- Adição de *acetato de sódio* e posterior junção de *ácido bórico*: sendo uma base fraca, o acetato de sódio ioniza apenas os grupos hidroxilo mais acídicos do esqueleto flavónico, especialmente o hidroxilo na posição 7, provocando desvios batocrómicos. A adição posterior de ácido bórico quelata os dois hidroxilos de grupos *orto*-di-hidroxi, sendo usado para detectar a sua presença;
- Adição de *cloreto de alumínio* e posterior junção de *ácido clorídrico*: o cloreto de alumínio forma complexos estáveis entre hidroxilos e funções cetónicas na sua vizinhança, e complexos lábeis com sistemas *orto*-di-hidroxilados, originando desvios batocrómicos. A adição posterior de ácido clorídrico decompõe os complexos instáveis, provocando um desvio hipsocrómico relativamente ao espectro obtido com cloreto de alumínio. Assim, o espectro obtido em presença de cloreto de alumínio representa o efeito resultante de todos os complexos, e o espectro com cloreto de alumínio e ácido bórico mostra unicamente o efeito dos complexos entre grupos hidroxilo e a função cetónica.

Os valores referidos por Markham (1982) e Mabry e colaboradores (1970) para os desvios obtidos na análise dos espectros de flavonas e flavonóis, em presença dos reagentes de deslocamento, encontram-se na **Tabela 5**.

### *Xantonas*

Na generalidade, as xantonas são caracterizadas por um espectro de UV com quatro máximos de absorção, muitas vezes com intensidades decrescentes. Nalguns casos é possível distinguir xantonas com diferentes esquemas de substituição. Na **Tabela**

6 estão indicados os máximos de absorção de xantonas típicas do género *Gentiana*, de acordo com Hostettmann e Hostettmann (1989).

**Tabela 5** -Desvios observados no espectro de UV de flavonas e flavonóis, em relação ao obtido em metanol, após adição de reagentes ionizantes e quelantes (adaptado de Mabry *et al.*, 1970 e Markham, 1982).

Reagente	Desvio observado	Interpretação
MeOH + NaOMe	(Banda I) + 45 a 65 nm; Estável sem diminuição de intensidade + 45 a 65 nm; Estável com diminuição de intensidade Decomposição Nova banda entre 320 e 335 nm	4'-OH 3-OH; 4'-OH substituído 3,4'-OH 7-OH
MeOH + NaOAc	(Banda II) + 5 a 20 nm Decomposição	7-OH 5,6,7-triOH 5,7,8-triOH 3,3',4'-triOH 3,4'-diOH 3'OMe
MeOH + NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	(Banda I) + 12 a 30 nm	<i>o</i> -diOH no anel B <i>o</i> -diOH no anel A
MeOH + AlCl <sub>3</sub>	(Banda I) + 60 nm + 35 a 55 nm + 50 a 60 nm + 17 a 20 nm	3-OH 5-OH 3,5-diOH 5,6-diOH
MeOH + AlCl <sub>3</sub> + HCl	(Banda I) - 30 a 40 nm * - 20 nm *	<i>o</i> -diOH no anel B Três hidroxilos no anel B

\* Desvio hipsocrómico relativamente ao espectro registado em MeOH + AlCl<sub>3</sub>

**Tabela 6** - Máximos de absorção (nm) encontrados nos espectros de UV de xantonas (adaptado de Hostettmann e Hostettmann, 1989).

Banda	Esquema de oxigenação		
	Geral	1,3,7,8	1,3,5,8
I	225-245	234-242	222-227
II	245-270	250-270	252-254
II'	-	-	274-278
III	300-345	303-330	325-336
IV	335-410	350-380	382-390

A espectrofotometria no UV-Visível é útil para localizar grupos hidroxilo livres no núcleo da xantona. Em particular, um grupo hidroxilo livre nas posições 3 ou 6 é facilmente detectado pela adição de uma base fraca (acetato de sódio), resultando num desvio batocrómico da banda situada entre 300 e 345 nm, com aumento de intensidade.

Quando o hidroxilo na posição 3 (ou 6) está substituído (por grupo metoxilo ou glucosilo) o espectro não sofre alteração.

As bases fortes, como o metóxido de sódio, têm capacidade para ionizar todos os grupos hidroxilo fenólicos, com a exceção daqueles ligados nas posições 1 e 8. Estes hidroxilos, situados em posição *peri* relativamente ao grupo carbonilo, são evidenciados pelo complexo formado com a adição de cloreto de alumínio, estável em meio ácido. Os grupos *orto*-di-hidroxilo também complexam com este reagente, mas são distinguidos dos primeiros pela instabilidade do complexo em presença de ácido clorídrico, tal como acontece com os flavonóides.

### 1. 3. 3. Métodos espectrométricos

#### 1. 3. 3. 1. Ressonância magnética nuclear (RMN)

A ressonância magnética nuclear de protão (RMN  $^1\text{H}$ ) e de carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ) são dois métodos importantes na análise estrutural de compostos fenólicos.

#### *RMN de $^1\text{H}$*

Através dos valores de desvio químico ( $\delta$ ), da integração dos sinais obtidos e do valor das constantes de acoplamento ( $J$ ), a RMN de  $^1\text{H}$  fornece várias informações que permitem elucidar a estrutura dos flavonóides (Markham, 1982; Markham, 1989):

- Definição de relações entre os protões do núcleo flavónico e, portanto, do esquema de oxigenação;
- Determinação do número de grupos metoxilo;
- Determinação do número de açúcares presentes, da posição da sua ligação à genina e da forma anomérica em que se encontram;
- Detecção de cadeias hidrocarbonadas, cujos valores de desvio químico são distintos dos encontrados para os restantes protões da molécula flavónica.

Os dados são normalmente registados entre 0 e 14 ppm, mas a parte mais informativa do espectro corresponde à região dos protões aromáticos, 6-8 ppm, cujos

valores de  $\delta$  e  $J$  irão geralmente definir o esquema de substituição do flavonóide. A **Tabela 7** resume alguns intervalos de  $\delta$  em que se encontram os sinais originados por flavonas e flavonóis existentes na natureza.

**Tabela 7** - Desvios químicos aproximados de flavonas e flavonóis existentes na natureza, observados em RMN  $^1\text{H}$  (adaptado de Markham, 1982 e Markham, 1989).

<b>Tipo de próton</b>	<b>Desvio químico (ppm)</b>
Metilos aromáticos	1,8-2,3
Maioria dos prótons dos açúcares	3,5-4,0
Metoxilos aromáticos	3,7-4,0
Próton 1 do açúcar	4,2-6,0
Prótons dos anéis A e B	6,0-8,0

A RMN de  $^1\text{H}$ , juntamente com RMN de  $^{13}\text{C}$ , constituem os métodos mais importantes na determinação estrutural de xantonas. O aparecimento de um sinal a 12-13 ppm, no espectro de uma xantona, confirma a presença de um grupo hidroxilo na posição 1 ou 8. A ausência de substituintes nestas posições traduz-se no aparecimento dos sinais dos prótons aromáticos entre 7,7 e 8,1 ppm (Hostettmann e Hostettmann, 1989).

### *RMN de $^{13}\text{C}$*

As principais aplicações da RMN de  $^{13}\text{C}$  são as seguintes:

- Determinação do número e natureza dos carbonos da molécula;
- Identificação dos açúcares e determinação da natureza da sua ligação à genina;
- Determinação dos locais de ligação interglicosídica;
- Identificação e localização de substituintes acilo.

Os desvios químicos dos carbonos flavónicos são influenciados principalmente pela sua densidade electrónica. Assim, carbonos com uma densidade electrónica relativamente baixa, tais como carbonos carbonílicos e carbonos aromáticos



oxigenados, apresentam sinais a 130-185 ppm, enquanto carbonos alifáticos mostram sinais entre 0 e 110 ppm (**Tabela 8**).

**Tabela 8** - Desvios químicos aproximados de flavonas e flavonóis existentes na natureza, observados em RMN  $^{13}\text{C}$  (adaptado de Markham, 1982 e Markham, 1989).

Tipo de carbono	Desvio químico (ppm)
Carbonílico	170-210
Aromáticos e olefínicos	
- Oxigenados	130-165
- Não oxigenados	90-135
Glucosídicos	69-83
C-1 de <i>O</i> -glicósido	cerca de 100
C-1 de <i>C</i> -glicósido	cerca de 74
Metoxilo	55-63
Metilo alifático	17-20
Metilo aromático	7-12

O desvio químico provocado pelo carbono carbonílico é particularmente importante para a identificação do esquema de oxigenação das xantonas (**Tabela 9**).

**Tabela 9** - Desvios químicos aproximados dos carbonos carbonílicos de xantonas, observados em RMN  $^{13}\text{C}$  (adaptado de Hostettmann e Hostettmann, 1989).

Esquema de oxigenação	Desvio químico (ppm)
1,8-diOH	184
1- ou 8-OH	178-181
- 3-OCH <sub>3</sub> ou 3- <i>O</i> -glicósido	180-181
- 3-OH	179
- 3,6-diOH	178
Sem OH em 1 e 8	174-175

### 1. 3. 3. 2. Espectrometria de massa (EM)

A principal aplicação da espectrometria de massa é a determinação da massa molecular de um composto. A massa exacta do ião molecular permite calcular a composição elementar da substância em análise. Da análise dos sinais resultantes da fragmentação do composto obtêm-se importantes informações para o esclarecimento da

sua estrutura. Apesar de haver destruição da amostra, a grande vantagem deste método reside na reduzida quantidade de composto necessária para análise.

Frequentemente o ião molecular apresenta o pico de maior intensidade. Além deste, é frequente a observação dos sinais  $M^+ - 1$  correspondente à perda de hidrogénio,  $M^+ - 17$  devido à perda de hidroxilo,  $M^+ - 18$  originado pela perda de água e  $M^+ - 28$  e  $M^+ - 29$ , indicando a perda de CO e CHO a partir da função carbonílica. A existência de outros radicais na molécula (metilo, metoxilo ou isopentenilo) também pode ser detectada pela presença dos sinais correspondentes à massa molecular subtraída da massa desses radicais (Hostettmann e Hostettmann, 1989; Markham, 1989).

#### 1. 3. 4. Métodos degradativos

Os métodos degradativos constituem meios auxiliares na determinação estrutural de compostos. Entre estes citam-se diferentes processos de hidrólise (ácida, alcalina e enzimática).

A **hidrólise ácida** destina-se à ruptura de ligações hemiacetálicas. É um processo degradativo que permite distinguir *O*- de *C*-heterósidos pela resistência destes últimos à hidrólise ácida.

O tempo necessário para a separação da parte glicosídica de um *O*-glicosilflavonóide é determinado pela concentração do ácido, pela natureza do açúcar (por exemplo, ácido glucurónico > glucose = galactose > ramnose) e pela posição deste no flavonóide (por exemplo, 7-*O*-glicósidos > 4'-*O*-glicósidos > 3-*O*-glicósidos).

Através da **hidrólise alcalina** provoca-se a ruptura de ligações éster, estabelecidas entre um ácido alifático ou aromático e um hidroxilo fenólico de uma genina ou um hidroxilo de um açúcar.

A **hidrólise enzimática** é um método útil para estabelecer a natureza da ligação do açúcar à genina ( $\alpha$  ou  $\beta$ ). Contudo, açúcares acilados e *C*-glicósidos são resistentes à hidrólise enzimática (Ribéreau-Gayon, 1968c e 1968e; Markham, 1982).

## 1. 4. Análise quantitativa de compostos fenólicos

A metodologia usada na quantificação de compostos fenólicos baseia-se nas propriedades gerais destes compostos, nomeadamente na sua capacidade para sofrer oxidação e quelatar metais ou na absorção na zona do UV-Vis (Macheix *et al.*, 1990a).

A determinação dos **fenóis totais** assenta na quantificação dos grupos hidroxilo fenólicos presentes num extracto, e pode ser realizada recorrendo ao **reagente de Folin-Ciocalteu**. Este método envolve uma reacção de oxidação-redução, em meio alcalino, na qual o ião fenolato é oxidado e o complexo fosfotúngstico-fosfomolibdico presente no reagente é reduzido a uma mistura de óxidos de tungsténio e de molibdénio, de cor azul. A coloração desenvolvida (absorção máxima entre 725 e 750 nm) é proporcional ao teor de compostos fenólicos (Ribéreau-Gayon, 1968f; Waterman e Mole, 1994d).

Contudo, este método apresenta algumas limitações. Um dos principais problemas reside na sua inespecificidade, uma vez que qualquer composto fenólico presente no extracto é susceptível de sofrer oxidação mas com uma reactividade distinta, de acordo com a molécula em causa. Por outro lado, qualquer substância com capacidade para ser oxidada pelo reagente (por exemplo, o ácido ascórbico) contribuirá para a formação da cor azul, embora este problema possa ser obviado pela purificação prévia do extracto (Harborne, 1989; Macheix *et al.*, 1990a; Waterman e Mole, 1994d).

A **CLAP** é o método mais indicado, pois permite quantificar individualmente cada composto fenólico, atendendo ao seu factor de resposta e à área que apresenta o seu pico cromatográfico. Um factor limitante é, por vezes, a inexistência de substâncias de referência, que permitiriam definir as características de absorção do composto (Harborne, 1989; Macheix *et al.*, 1990a).

## **2. Metodologia geral**

## Índice

2. 1. Substâncias de referência e reagentes.....	49
2. 2. Análise dos compostos fenólicos por CLAP.....	50
2. 3. Determinação estrutural dos compostos fenólicos isolados.....	51
2. 3. 1. Espectrofotometria de UV.....	51
2. 3. 2. Ressonância magnética nuclear.....	52
2. 3. 3. Espectrometria de massa.....	52
2. 4. Quantificação dos fenóis totais.....	52

## 2. Metodologia geral

### 2.1. Substâncias de referência e reagentes

A eupatorina, o ácido 5-*O*-cafeoilquínico (ácido clorogénico), a quercetina 3-*O*-glucósido, a quercetina 3-*O*-galactósido, a quercetina 3-*O*-arabinósido, a quercetina 3-*O*-ramnósido, a luteolina 7-*O*-glucósido, a apigenina 7-*O*-glucósido, o kaempferol, a quercetina e a luteolina foram adquiridos à Extrasynthèse (Genay, França). A xantona foi fornecida pela Sigma (St. Louis, Mo., USA).

Nepetina, hispidulina, jaceosidina, cirsimaritina e cirsilineol foram isolados de *Salvia lavandulaefolia* e de *Lippia nodiflora* (Tomás-Barberán *et al.*, 1997; Tomás-Lorente *et al.*, 1988). A quercetina 3-sulfato e a quercetina 3-*O*-glucuronato foram isoladas previamente de *Hypericum androsaemum*, no Serviço de Farmacognosia (Seabra e Correia Alves, 1989b; Seabra e Correia Alves, 1990). O ácido 3,5-*O*-dicafeoilquínico foi isolado anteriormente de *Lactuca sativa* (Ferrerres *et al.*, 1997).

Por não se encontrarem disponíveis no mercado, os ácidos 3- e 4-*O*-cafeoilquínico foram preparados a partir do ácido 5-*O*-cafeoilquínico por transesterificação, usando hidróxido de tetrametilamónio (Clifford *et al.*, 1989a, b).

O ácido 1,3 -*O*-dicafeoilquínico (cinarina) foi cedido pela Natiris (Lisboa, Portugal). A hiperforina e a adhiperforina foram fornecidas pela Addipharma (Hamburg, Germany).

Os solventes utilizados na extração e no isolamento dos compostos fenólicos, o ácido clorídrico e os solventes usados na análise por CCF tinham grau de pureza "Pro analysi" e foram adquiridos à Merck (Darmstadt, Alemanha) e à Riedel-de-Haën (Seelze, Alemanha). O reagente de Folin-Ciocalteu foi fornecido pela Sigma (St. Louis, Mo., USA).

O metanol, o acetonitrilo, o ácido fórmico e o ácido acético usados em CLAP tinham grau de pureza "Lichrosolv" e foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). A água usada na fase móvel foi tratada num sistema de purificação de água Milli-Q (Milipore, Bedford, MA).

A acetona deuterada ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ) e o dimetilsulfóxido hexadeuterado ( $\text{DMSO-}d_6$ ) foram fornecidos pela Sigma (St. Louis, Mo., USA), e o clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) foi adquirido à Merck (Darmstadt, Alemanha).

## 2. 2. Análise dos compostos fenólicos por CLAP

O sistema cromatográfico utilizado para a análise dos compostos fenólicos apresentava as seguintes características:

- Cromatógrafo Gilson equipado com duas bombas (modelos 302 e 305);
- Módulo manométrico Gilson (modelo 802C);
- Câmara misturadora Gilson (modelo 811);
- Injector Rheodyne (modelo 7125), com “loop” de 20  $\mu\text{l}$ ;
- Coluna de fase reversa Spherisorb ODS2 (Waters, 25,0 x 0,46 cm; 5  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula); para a análise dos extractos clorofórmicos obtidos de Fel-da-Terra utilizou-se uma coluna de fase reversa Hypersil ODS (Teknokroma, 20 x 0,4 cm; 5  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula);
- Detector de matriz de díodos Gilson, modelo 160.

Os cromatogramas foram registados a 280, 320 e 350 nm, e os diferentes compostos fenólicos foram identificados por comparação dos seus tempos de retenção e espectros de UV-Vis, no intervalo de comprimentos de onda 200-400 nm, com aqueles das substâncias de referência ou isoladas de fontes vegetais e, sempre que possível, por co-cromatografia com estas substâncias. A pureza dos picos observados nos cromatogramas foi verificada utilizando o “Gilson 160 Spectra Viewer Software Contrast Facilities”.

Para a quantificação dos diversos compostos fenólicos recorreu-se ao método do padrão externo, utilizando a área do pico correspondente no cromatograma.

## 2. 3. Determinação estrutural dos compostos fenólicos isolados

### 2. 3. 1. Espectrofotometria de UV

Registou-se o espectro no UV dos diferentes compostos isolados, em metanol, antes e depois da adição dos reagentes de deslocamento clássicos (Mabry *et al.*, 1970):

- Metóxido de sódio (NaOMe) - solução a 2,5% de sódio metálico, recentemente cortado, em metanol espectroscópico;
- Hidróxido de sódio (NaOH) - solução a 20% de hidróxido de sódio, em água destilada;
- Cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) - solução a 5% de cloreto de alumínio anidro, em metanol espectroscópico;
- Ácido clorídrico (HCl) - solução de 50 ml de ácido clorídrico concentrado, em 100 ml de água destilada;
- Acetato de sódio (NaOAc) - acetato de sódio anidro suprapur (artº 6264, Merck);
- Ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) - ácido bórico suprapur (artº 765, Merck).

Os espectros foram obtidos da seguinte forma:

- Espectro em MeOH + NaOMe: registou-se o espectro da amostra em MeOH, e de seguida adicionou-se três gotas de solução de NaOMe à solução contida na tina, procedeu-se à mistura e registou-se o espectro; decorridos 5 minutos o espectro do composto foi de novo registado.
- Espectro em MeOH + NaOH + HCl: após o registo do espectro da amostra em MeOH, adicionou-se duas gotas de solução de NaOH à solução contida na tina, procedeu-se à mistura e registou-se o espectro; adicionou-se à solução anterior duas gotas de HCl, misturou-se e registou-se em seguida o espectro.
- Espectro em MeOH +  $\text{AlCl}_3$  + HCl: adicionou-se seis gotas de  $\text{AlCl}_3$  à solução metanólica contida na tina e registou-se o espectro; três gotas de HCl



foram adicionadas à solução anterior, misturou-se e registou-se em seguida o espectro.

- Espectro em MeOH + NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>: adicionou-se NaOAc à solução metanólica do composto, de forma a depositar-se uma camada de 2 mm no fundo da tina, e em seguida registar o espectro; á solução anterior juntou-se H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, até este começar a depositar e em seguida registou-se o espectro.

### **2. 3. 2. Ressonância magnética nuclear**

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C foram obtidos num espectrómetro Bruker AMX-300, trabalhando a 300 e 75, MHz respectivamente.

Utilizou-se o tetrametilsilano como padrão interno; os desvios químicos ( $\delta$ ) foram registados em ppm. e as constantes de acoplamento ( $J$ ) em Hz.

As correlações entre carbonos e protões foram determinadas por DEPT, HETCOR e HMBC.

### **2. 3. 3. Espectrometria de massa**

Os espectros de massa IE foram registados num espectrómetro de massas VG AutoSpec Q, com uma voltagem de 70 eV.

## **2. 4. Quantificação dos fenóis totais**

Os grupos fenólicos presentes nas infusões liofilizadas das espécies em estudo foram determinados por um método baseado na sua reacção com o reagente de Folin-Ciocalteu (Wang *et al.*, 1997).

300  $\mu$ l de cada solução aquosa de liofilizado (1 mg/ml) foram diluídos com 2 ml de água, em balão volumétrico de 10 ml. Após a junção de 1 ml de reagente de Folin-Ciocalteu as misturas foram agitadas vigorosamente. Imediatamente a seguir,

adicionaram-se 5 ml de solução de carbonato de sódio a 20%, completou-se o volume com água e agitaram-se novamente as misturas. A reacção foi conduzida à temperatura ambiente, e a absorvência a 735 nm foi lida após 20 min, num espectrofotómetro (Unicam Helios  $\alpha$ ) programado na função fotométrica.

As determinações foram realizadas em duplicado, e os resultados foram calculados a partir da equação da recta correspondente à curva de calibração para o ácido 5-*O*-cafeoilquínico ( $y = 60,2587x - 0,0064$ ), obtida do mesmo modo. Os resultados obtidos foram apresentados em mg de fenóis / mg de liofilizado, expressos em ácido 5-*O*-cafeoilquínico.

### **3. Composição fenólica do Limonete**

## **Índice**

3. 1. Caracterização do material em estudo.....	57
3. 2. Extracção dos compostos fenólicos.....	58
3. 3. Condições analíticas.....	58
3. 4. Resultados e discussão.....	59

### 3. Composição fenólica do Limonete

#### 3. 1. Caracterização do material em estudo

Foram analisadas as folhas de vinte e seis ramos de limonete, colhidos em diferentes locais de Portugal, durante os anos de 1997 e 1998; excepcionalmente analisaram-se, também, as folhas de dois ramos colhidos em 1996, em Braga e Santa Maria da Feira, e que se encontravam disponíveis no Serviço de Farmacognosia (Tabela 10). Cada origem geográfica representa um arbusto diferente.

Tabela 10 - Amostras de Limonete.

Amostra	Proveniência	Colheita	Flavonóides totais (mg/kg, peso seco)
1	Santa Maria da Feira	Novembro, 1996	396,1
2	Braga	Dezembro, 1996	301,6
3	Matosinhos	Julho, 1997	1361,3
4	Matosinhos	Setembro, 1997	1405,6
5	Penacova A <sup>a</sup>	Julho, 1997	606,7
6	Penacova A <sup>a</sup>	Setembro, 1997	692,1
7	Santa Maria da Feira	Julho, 1997	696,4
8	Santa Maria da Feira	Setembro, 1997	1194,2
9	Viana do Castelo	Setembro, 1997	734,8
10	Braga	Julho, 1997	654,0
11	Matosinhos	Julho, 1998	907,5
12	Matosinhos	Setembro, 1998	1180,2
13	Penacova A <sup>a</sup>	Julho, 1998	669,0
14	Penacova A <sup>a</sup>	Setembro, 1998	715,9
15	Penacova B <sup>a</sup>	Julho, 1998	1867,4
16	Penacova B <sup>1a</sup>	Setembro, 1998	1619,3
17	Penacova B <sup>2a</sup>	Setembro, 1998	1693,6
18	Braga	Julho, 1998	1281,6
19	Braga	Outubro, 1998	975,0
20	Vila Nova de Gaia	Julho, 1998	758,0
21	Vila Nova de Gaia	Setembro, 1998	757,6
22	Arouca	Julho, 1998	1279,2
23	Arouca	Outubro, 1998	1116,4
24	Santa Maria da Feira	Julho, 1998	1137,9
25	Santa Maria da Feira	Setembro, 1998	2151,2
26	Santa Maria da Feira	Outubro, 1998	1541,8
27	Santa Maria da Feira	Novembro, 1998	947,1
28	Santa Maria da Feira	Dezembro, 1998	974,1

<sup>a</sup> Arbustos com a mesma origem geográfica; <sup>1</sup> e <sup>2</sup> correspondem, respectivamente, a folhas grandes e pequenas.

Os ramos foram secos em estufa a 30° C e as folhas foram posteriormente destacadas e reduzidas a pó (910). Para a obtenção da infusão utilizaram-se folhas inteiras.

### 3. 2. Extracção dos compostos fenólicos

Para fins qualitativos, cerca de 2 g de uma amostra (folhas) foram agitados por duas vezes com 50 ml de diferentes solventes (etanol 40%, etanol 60%, etanol, éter etílico). Cada uma das soluções extractivas foi filtrada e levada à secura, a pressão reduzida, à temperatura de 30 °C. O resíduo foi dissolvido em 1 ml de metanol e analisado por CLAP.

Para a quantificação dos diferentes compostos fenólicos, 1,00 g de cada amostra pulverizada (910) foi submetido a três extracções sucessivas, primeiro com 100 ml de éter etílico durante 20 minutos, seguida de duas extracções com 50 ml de éter etílico, durante 10 minutos de cada vez, com agitação e à temperatura ambiente. Os extractos etéreos foram combinados e a solução extractiva, assim obtida, foi filtrada e levada à secura, a pressão reduzida, à temperatura de 30 °C. O resíduo foi dissolvido em 1,0 ml de metanol e analisado por CLAP (Valentão *et al.*, 1999).

Foi, também, preparada uma infusão, obtida por extracção de 5,00 g de uma amostra de folhas inteiras de limonete (amostra 8) com 200 ml de água fervente, durante 15 min. O extracto aquoso foi filtrado e submetido a liofilização (Modulyo 4K Freeze Dryer Edwards). Cerca de 10,00 mg de liofilizado foram posteriormente dissolvidos em 1 ml de água e analisados por CLAP. O liofilizado restante foi utilizado nos ensaios de avaliação da actividade antioxidante da infusão de limonete (Valentão *et al.*, 2002d).

### 3. 3. Condições analíticas

A análise por CLAP dos compostos fenólicos existentes nas soluções extractivas obtidas de cada uma das amostras obedeceu às seguintes condições:

- Sistema eluente: água:ácido fórmico (19:1) (solvente A) e metanol (solvente B);
- Gradiente 1: 0 min - 30% B, 15 min - 30% B, 20 min - 40% B, 30 min - 45% B, 50 min - 60% B, 60 min - 80% B, 65 min - 80% B; Fluxo: 1 ml/min.

- Gradiente 2: 0 min - 50% B, 5 min - 60% B, 30 min - 80% B; Fluxo: 1 ml/min.
- Registo dos cromatogramas a 350 nm.
- Quantificação a 350 nm; a luteolina e a eupatorina foram quantificadas por comparação com as substâncias de referência; os restantes compostos foram expressos em eupatorina (Valentão *et al.*, 1999).

Na separação e identificação dos compostos fenólicos presentes na infusão de Limonete, as condições analíticas foram as que a seguir se indicam:

- Sistema eluente: água:ácido fórmico (19:1) (solvente A) e metanol (solvente B);
- Gradiente 1: 0 min - 30% B, 15 min - 30% B, 20 min - 40% B, 30 min - 45% B, 50 min - 60% B; Fluxo: 1 ml/min (Andrade *et al.*, 1998c).
- Registo dos cromatogramas a 320 nm.

### 3. 4. Resultados e discussão

Com o objectivo de determinar o conjunto de condições de extracção e análise que originava o melhor perfil em termos analíticos, isto é, aquelas condições em que é possível identificar o maior número de compostos, procedeu-se à obtenção de diferentes extractos, a partir de uma única amostra.

Todas as soluções extractivas obtidas foram analisadas utilizando o gradiente 1. Os cromatogramas apresentavam uma boa resolução, sendo que os extractos mais polares (etanol 40%, etanol 60% e etanol) eram essencialmente caracterizados pela presença de um composto com um espectro de UV característico de um ácido cinâmico ( $t_R$  11,16 min) (**Figura 14**). Atendendo a estas características e por comparação com os dados disponíveis na bibliografia, concluiu-se que o composto em questão era o verbascósido, já anteriormente identificado como um dos compostos maioritários desta espécie, por Lamaison e colaboradores (1993) (ver estrutura na Parte A, 1. 1.).

Contudo, para além do verbascósido, nos extractos etanólicos encontrava-se, também, uma quantidade apreciável de flavonóides (**Figura 15**).

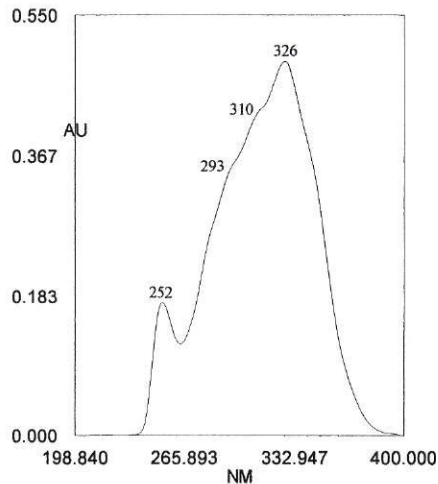


Figura 14 - Espectro no UV do composto com  $t_r$  11,16 min.

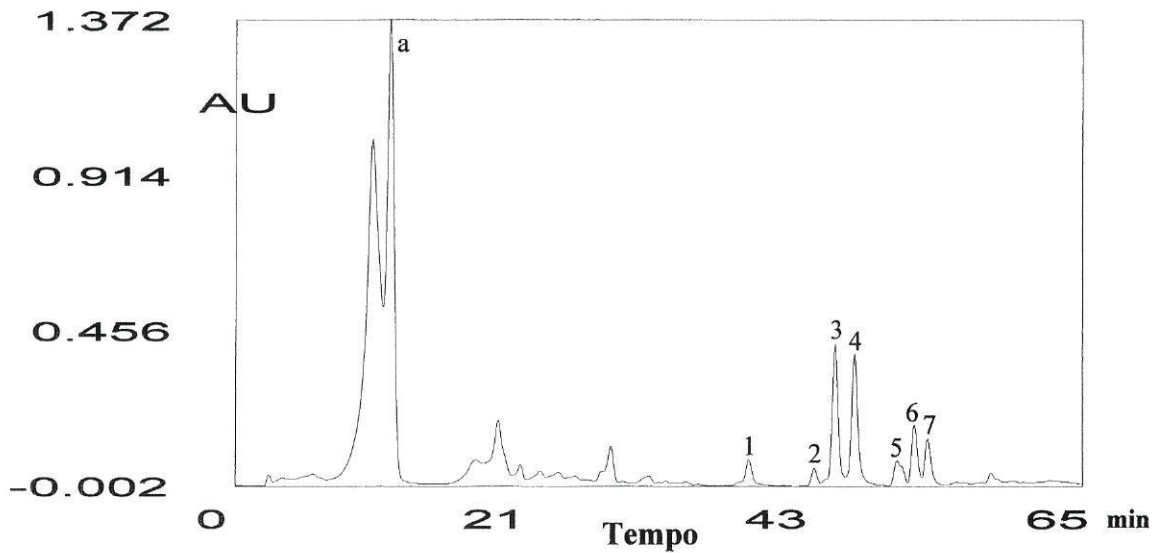
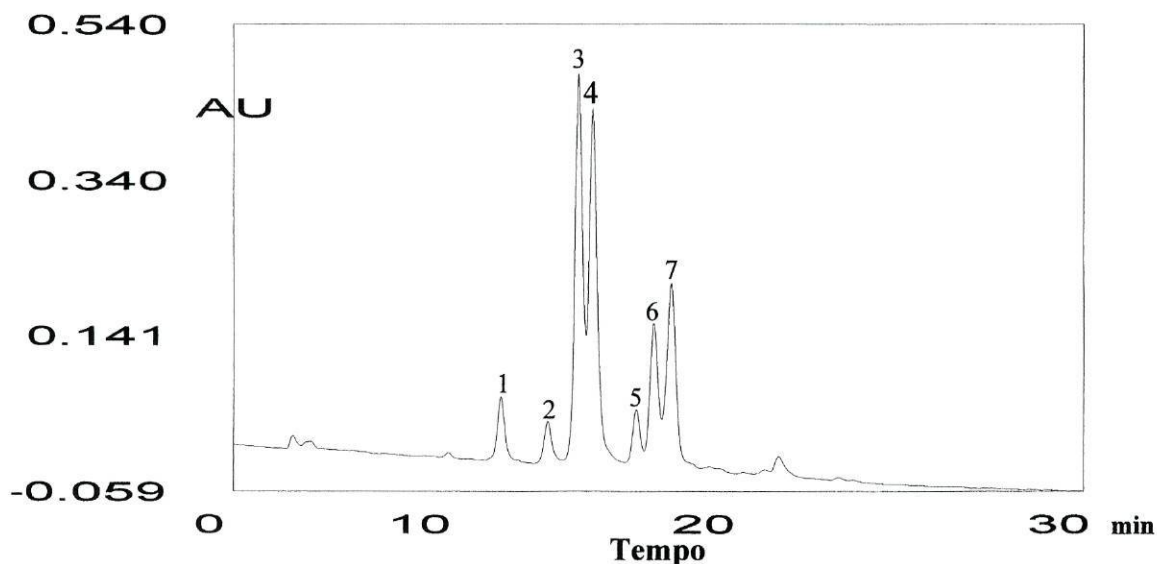


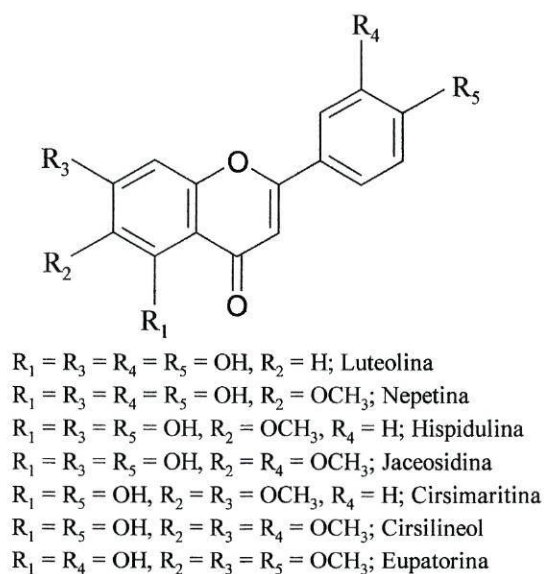
Figura 15 - Cromatograma obtido com uma amostra de Limonete extraída com etanol (gradiente 1). Detecção a 350 nm. (a) verbascósido; (1) luteolina; (2) nepetina; (3) hispidulina; (4) jaceosidina; (5) cirsimaritina; (6) cirsilineol; (7) eupatorina.



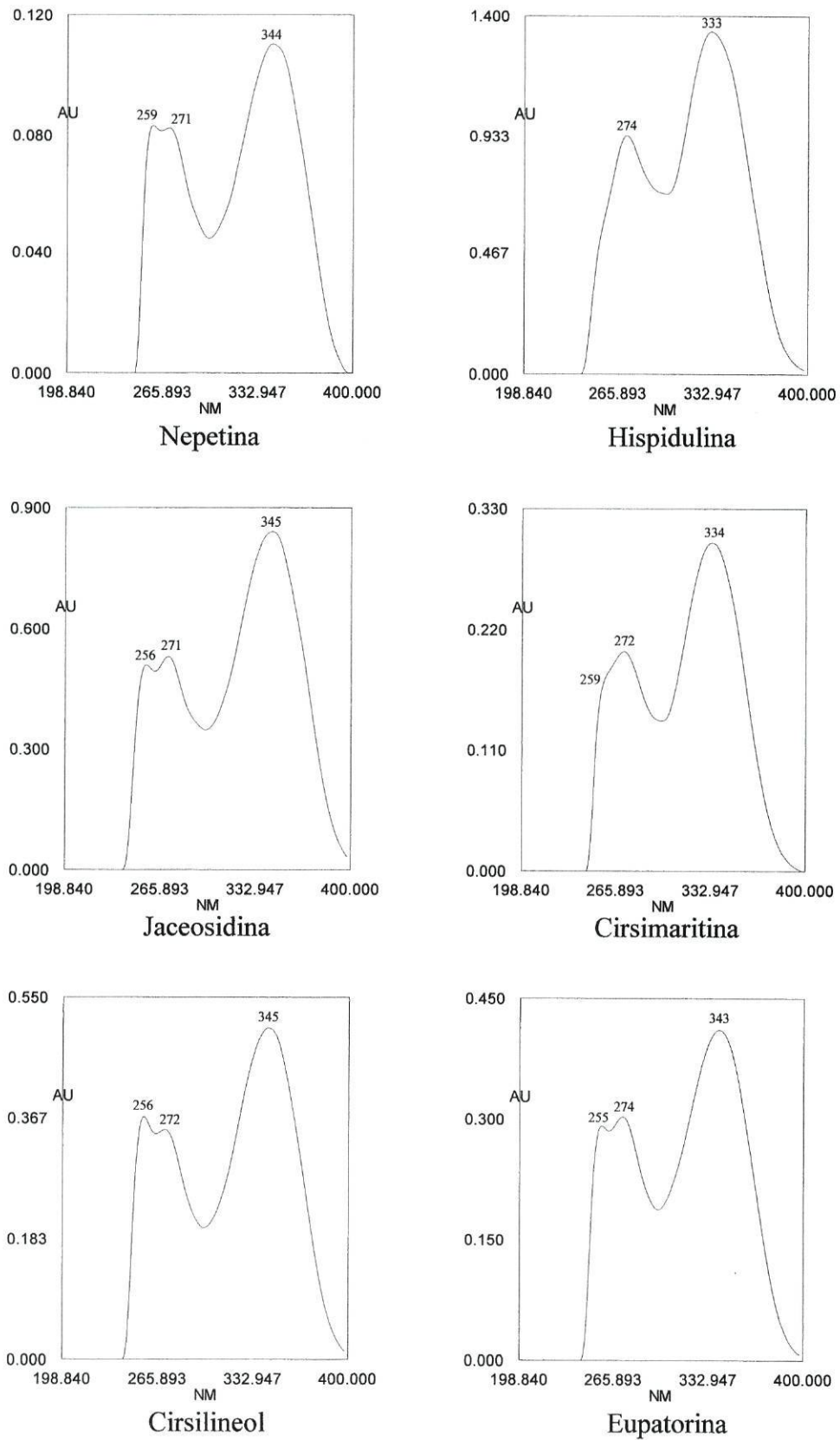
O extracto obtido com éter etílico não apresentava derivados do ácido cinâmico, detectando-se apenas uma quantidade considerável de flavonóides. Estabeleceu-se, então, um gradiente mais curto para eluição destes compostos (gradiente 2) e, sob as condições descritas em 3. 3., foi possível separar e identificar sete flavonas (**Figura 16**): luteolina, nepetina, hispidulina, jaceosidina, cirsimaritina, cirsilineol e eupatorina (**Figuras 17 e 18**).



**Figura 16** - Cromatograma obtido com uma amostra de Limonete extraída com éter etílico (gradiente 2). Detecção a 350 nm. Identidade dos compostos de acordo com a **Figura 15**.



**Figura 17** - Estruturas dos flavonóides identificados nos extractos etéreos de Limonete.

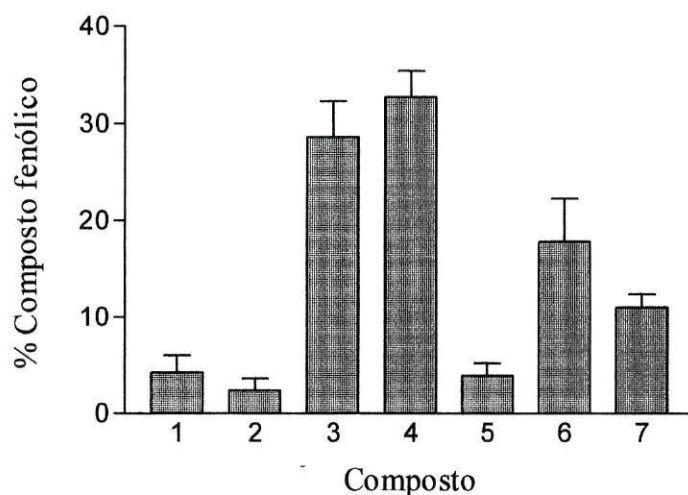


**Figura 18** - Espectros no UV de alguns flavonóides do Limonete, registados no detector de díodos.

A existência destes compostos no Limonete tinha já sido descrita anteriormente por outros autores (Skaltsa e Shamma, 1988), com excepção da jaceosidina e do cirsilineol, que foram identificados pela primeira vez nesta espécie (Valentão *et al.*, 1999).

Na **Tabela 11** apresentam-se as quantidades dos flavonóides detectados no extracto etéreo das amostras de Limonete. A quantidade total dos compostos identificados varia entre 302 e 2151 mg/kg (peso seco) de amostra (**Tabela 10**).

Todas as amostras analisadas revelaram um perfil fenólico característico, no qual a hispidulina e a jaceosidina são os compostos maioritários e a nepetina o composto existente em menor quantidade (**Figura 19**), com a excepção da amostra 27, para a qual o cirsilineol é o composto presente em maior quantidade, e das amostras 1, 8 e 21, nas quais a cirsimaritina é composto minoritário (**Tabela 11**).



**Figura 19** - Perfil fenólico das amostras de Limonete (média  $\pm$  erro padrão). (1) luteolina; (2) nepetina; (3) hispidulina; (4) jaceosidina; (5) cirsimaritina; (6) cirsilineol; (7) eupatorina.

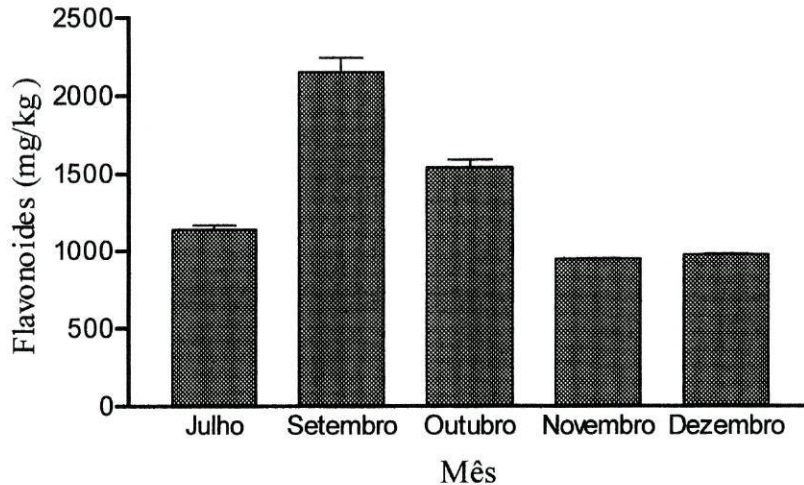
As folhas de Limonete são colhidas habitualmente em Julho e em Setembro (Paris e Moysé, 1971) e, por isso, as amostras foram, sempre que possível, colhidas nestes dois meses. Ao comparar amostras com a mesma origem, colhidas em Julho e em Setembro, verifica-se que não há grande variação no teor de flavonóides entre estes meses, com excepção do arbusto de Santa Maria da Feira (amostras 7, 8, 24 e 25) (**Tabela 10**).

Tabela 11 - Composição fenólica das amostras de Limonete (mg/kg, peso seco).

Amostra	Composto*							
	Luteolina	Nepetina	Hispidulina	Jaceosidina	Cirsimaritina	Cirsilineol	Eupatorina	
1	17,3 (0,38)	26,5 (0,06)	117,1 (3,09)	125,7 (1,34)	12,5 (0,07)	56,1 (0,15)	40,9 (0,02)	
2	6,5 (0,32)	nq	111,3 (6,45)	98,3 (0,50)	11,5 (0,07)	39,0 (0,78)	35,0 (0,52)	
3	39,6 (0,67)	25,5 (0,24)	343,5 (7,01)	464,0 (17,62)	90,4 (5,46)	210,9 (12,54)	187,7 (27,97)	
4	49,2 (1,23)	31,2 (0,60)	381,7 (4,91)	437,8 (4,71)	94,6 (2,90)	219,2 (7,81)	192,0 (13,78)	
5	12,7 (0,55)	8,2 (0,19)	179,1 (2,36)	201,1 (0,86)	23,4 (0,05)	103,0 (0,19)	79,3 (0,32)	
6	19,2 (0,70)	10,2 (0,33)	192,4 (2,38)	246,4 (1,12)	22,2 (0,06)	113,4 (0,77)	88,4 (0,50)	
7	32,0 (0,79)	17,0 (0,08)	210,0 (7,13)	232,7 (0,98)	23,4 (0,48)	103,3 (1,55)	78,0 (1,73)	
8	69,2 (1,10)	41,1 (0,06)	332,0 (2,13)	392,1 (0,20)	36,1 (0,86)	197,8 (2,71)	125,9 (5,72)	
9	30,5 (0,79)	17,2 (0,08)	217,2 (0,24)	253,6 (2,00)	22,5 (0,44)	112,9 (1,19)	80,8 (0,26)	
10	15,1 (0,38)	7,5 (0,09)	230,9 (2,19)	220,6 (3,28)	26,2 (0,60)	82,9 (0,83)	70,9 (0,90)	
11	91,6 (0,18)	31,6 (0,19)	305,8 (0,16)	235,1 (0,35)	42,4 (1,37)	98,2 (2,58)	102,8 (4,18)	
12	57,5 (0,61)	33,4 (0,12)	332,1 (3,17)	415,5 (5,08)	40,8 (1,26)	179,1 (0,58)	121,7 (0,44)	
13	13,8 (0,08)	6,4 (0,58)	216,4 (2,38)	218,5 (0,91)	19,1 (0,55)	123,5 (0,51)	71,3 (0,45)	
14	18,6 (0,21)	11,2 (0,37)	218,3 (5,17)	241,0 (4,69)	26,0 (4,35)	121,1 (0,95)	79,5 (0,19)	
15	52,1 (0,53)	21,5 (0,17)	493,7 (23,44)	617,6 (9,55)	97,5 (1,83)	390,0 (11,56)	195,0 (2,19)	
16	61,3 (0,76)	34,9 (0,14)	394,1 (3,97)	562,0 (4,72)	88,1 (1,87)	305,7 (2,62)	173,2 (1,50)	
17	76,3 (0,65)	43,1 (1,77)	402,8 (8,07)	591,0 (4,21)	90,2 (3,09)	304,4 (1,77)	185,8 (1,86)	
18	51,1 (0,75)	24,9 (0,02)	385,6 (3,07)	404,4 (4,74)	41,1 (0,93)	246,2 (6,43)	128,3 (11,69)	
19	43,6 (0,12)	22,5 (0,17)	262,4 (1,69)	299,7 (0,31)	30,6 (0,90)	219,2 (1,12)	97,0 (0,48)	
20	nq	nq	274,3 (2,21)	276,5 (1,81)	18,4 (0,12)	112,4 (0,04)	76,4 (0,40)	
21	50,4 (0,61)	27,9 (0,31)	209,1 (0,39)	282,6 (2,72)	15,9 (0,48)	102,9 (0,40)	68,9 (0,62)	
22	43,0 (0,12)	23,5 (0,50)	325,2 (2,87)	419,8 (2,45)	76,5 (0,75)	221,2 (0,02)	170,0 (0,04)	
23	43,3 (0,45)	20,7 (0,22)	288,4 (2,49)	339,6 (2,85)	34,8 (0,22)	278,5 (0,52)	111,0 (0,89)	
24	53,0 (1,61)	31,1 (0,72)	340,6 (18,24)	352,5 (7,97)	42,0 (1,68)	214,3 (6,97)	104,3 (2,92)	
25	124,1 (5,59)	60,9 (2,46)	523,2 (32,38)	702,4 (29,62)	107,4 (9,10)	383,4 (24,84)	249,9 (26,41)	
26	90,0 (2,23)	45,6 (0,91)	379,1 (7,76)	499,2 (20,88)	64,2 (21,57)	297,6 (12,39)	166,0 (15,21)	
27	49,4 (0,63)	29,0 (0,31)	228,8 (1,16)	256,1 (1,28)	28,3 (0,78)	271,8 (0,92)	83,7 (0,29)	
28	40,0 (0,63)	23,4 (0,09)	263,4 (2,48)	269,0 (0,86)	39,7 (0,08)	240,2 (3,76)	98,4 (0,26)	

\* Valores expressos como média (desvio padrão) de duas determinações para cada amostra; nq - não quantificável.

Da amostra de Santa Maria da Feira, em 1998, fizeram-se também colheitas em Outubro, Novembro e Dezembro, para avaliar a evolução na produção de compostos fenólicos até praticamente ao final do período de existência de folhas. Os resultados revelam um decréscimo evidente no total de flavonóides ao longo do tempo (**Figura 20**), facto que está de acordo com os baixos teores encontrados nas amostras 1 e 2.



**Figura 20** - Evolução do conteúdo total de flavonóides entre Julho e Dezembro, nas amostras de Santa Maria da Feira, em 1998 (média  $\pm$  erro padrão).

As folhas colhidas em Setembro de 1998, em Penacova B, foi dividida em amostra de folhas grandes (amostra 16) e de folhas pequenas (amostra 17), que foram analisadas individualmente; contudo, não se verificou uma diferença clara entre o teor total de flavonóides destas duas amostras, sugerindo que o tamanho da folha não será um factor responsável pela variação daquele valor.

A origem geográfica das amostras não parece ser um factor determinante nas variações observadas, uma vez que, para amostras provenientes do mesmo local e colhidas na mesma data (amostras 13 e 15), foi encontrada uma grande diferença na quantidade de compostos fenólicos.

As amostras de Penacova A (amostras 5, 6, 13 e 14) foram aquelas que apresentaram os teores mais baixos em flavonóides, nos dois anos, o que poderá ser atribuído ao facto de este ser o único arbusto que não se encontra exposto ao Sol; adicionalmente, este arbusto foi também aquele para o qual se observou menor variação

no conteúdo fenólico entre os dois anos e as duas épocas de colheita. Estes resultados confirmam a teoria de que as plantas que crescem expostas ao Sol contêm maior quantidade de flavonóides do que aquelas que se desenvolvem à sombra, actuando os flavonóides como filtros solares (Larson, 1988; Harborne e Williams, 2000).

As amostras de Vila Nova de Gaia (amostras 20 e 21) também apresentaram um teor de flavonóides inferior a 1000 mg/kg; apesar de o arbusto de origem se encontrar exposto à luz solar, este arbusto, o de Penacova A (amostras 5, 6, 13 e 14) e o de Matosinhos (amostras 3, 4, 11 e 12) são os únicos que não são podados, e este poderá ser um factor determinante nos baixos valores obtidos para os flavonóides.

Outras variações poder-se-ão dever, por exemplo, ao acesso à água: o arbusto de Santa Maria da Feira é submetido a rega e poda todos os anos, o que poderá justificar o facto de serem as amostras provenientes desta planta aquelas para as quais se verificou o maior aumento na quantidade de compostos fenólicos entre 1997 e 1998 (cerca de 74%) e, no mesmo ano, de Julho para Setembro (de 70 a 90%).

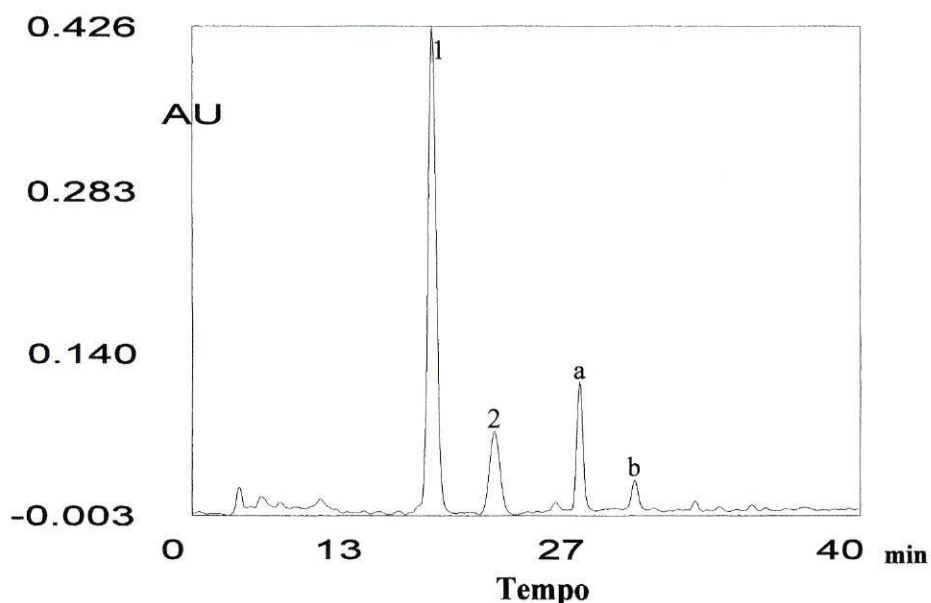
Da análise de todas as amostras de Limonete parece poder concluir-se que os factores mais importantes na produção de flavonóides são a exposição solar, a poda e a rega, pois foram os arbustos sujeitos a estas condições que forneceram os maiores rendimentos.

Os resultados obtidos neste estudo colocam em evidência um perfil fenólico que se revelou característico desta espécie, uma vez que é independente da origem geográfica, ano e época de colheita, condições edáficas e exposição solar, podendo ser utilizado no seu controlo de identidade e qualidade.

Do processo de liofilização da infusão de Limonete obteve-se 1,18 g de liofilizado. O valor encontrado na determinação de grupos fenólicos pelo reagente de Folin-Ciocalteu (ver 2. 4.) foi de  $0,373 \pm 0,0059$  mg de fenóis / mg de liofilizado.

A determinação da composição fenólica deste extracto baseou-se no facto de, em princípio, os compostos presentes serem bastante polares e em resultados referidos na literatura para a infusão de Limonete (Carnat *et al.*, 1999). Sob as condições descritas

em 3. 3., a análise por CLAP da infusão liofilizada revelou a presença de compostos com espectros no UV que apontavam para derivados do ácido cinâmico (compostos 1 e a) e flavonóides, particularmente derivados da luteolina (compostos 2 e b). Uma vez que, nos extractos de maior polaridade estudados, o verbascósido era o composto dominante, foi sugerida a sua presença na infusão como composto característico. Da comparação dos tempos de retenção e espectros de UV dos compostos, com os resultados obtidos por Carnat e colaboradores (1999), podemos deduzir que o composto 1 era o verbascósido e o composto 2 a luteolina 7-*O*-diglucuronato (**Figura 21**).



**Figura 21** - Cromatograma obtido com a infusão de Limonete. Detecção a 320 nm. (1) Verbascósido; (2) Luteolina 7-*O*-diglucuronato; a, b - compostos não identificados.

#### **4. Composição fenólica do Hipericão-do-Gerês**



## **Índice**

4. 1. Caracterização do material em estudo.....	71
4. 2. Extração dos compostos fenólicos.....	72
4. 3. Condições analíticas.....	72
4. 4. Resultados e discussão.....	74

## 4. Composição fenólica do Hipericão-do-Gerês

### 4.1. Caracterização do material em estudo

Foram analisadas as folhas de quinze ramos floridos de Hipericão-do-Gerês, colhidos em diferentes locais do norte e centro de Portugal, durante o período de floração (Tabela 12). As amostras de Arouca, Arcos e Matosinhos 3 tinham a mesma origem: colheram-se estacas em Ponte de Lima que se submeteram a macropropagação e que foram posteriormente transplantadas para dois campos experimentais, em Março de 1998, em Arcos e Arouca, sendo o seu cultivo da responsabilidade da Direcção Regional de Agricultura de Entre Douro e Minho; uma planta foi também transplantada para Matosinhos (amostras de Matosinhos 3). As restantes amostras são provenientes de exemplares espontâneos ou existentes em jardins botânicos ou privados. Em Matosinhos foram colhidas amostras de três plantas diferentes. Algumas amostras encontravam-se infestadas por *Uromyces* sp..

Tabela 12 - Amostras de Hipericão-do-Gerês.

Amostra	Proveniência	Colheita	Exposição ao Sol	Infestada	Ácidos fenólicos + flavonóides (g/kg)	Floroglucínóis totais (g/kg)
1	Gerês	Junho 1998	-	-	15,06	0,42
2	Matosinhos 1	Julho 1998	-	-	25,70	9,18
3	Matosinhos 1	Julho 1998	-	+	14,13	6,22
4	Matosinhos 3	Julho 1998	-	-	18,17	4,92
5	Arouca	Outubro 1998	+	-	21,92	2,64
6	Arcos	Outubro 1998	+	-	17,30	2,09
7	Santa Maria da Feira	Julho 1999	+	+	39,28	12,69
8	Matosinhos 1	Junho 1999	-	-	28,55	25,55
9	Matosinhos 1	Junho 1999	-	+	11,31	11,90
10	Matosinhos 2	Junho 1999	-	+	17,42	13,50
11	Matosinhos 3	Junho 1999	-	+	22,23	3,50
12	Serralves	Junho 1999	+	+	35,34	1,96
13	Arouca	Junho 1999	+	+	35,40	3,58
14	Arcos	Junho 1999	+	+	31,38	5,37
15	Arada	Junho 1999	+	+	33,11	16,37

Os diversos ramos foram secos à temperatura ambiente e destacaram-se as folhas que foram reduzidas a pó (1600). Na preparação da infusão usaram-se folhas inteiras de uma amostra adquirida no comércio.

## 4. 2. Extracção dos compostos fenólicos

Para fins qualitativos, cerca de 1 g de uma amostra (folhas) foi agitado por duas vezes com 50 ml de diferentes solventes (éter etílico, etanol 30%, etanol 50%, etanol 80%, metanol). Cada uma das soluções extractivas foi filtrada e levada à secura, a pressão reduzida, à temperatura de 30 °C. O resíduo foi dissolvido em 1 ml de metanol e analisado por CLAP.

Para a quantificação, cada uma das amostras de Hiperício-do-Gerês foi pesada (0,10 g) e agitada com metanol até extracção completa dos compostos fenólicos, isto é, até reacção negativa com NaOH 20%. O extracto metanólico foi filtrado e concentrado até à secura, sob pressão reduzida, à temperatura de 30 °C. O resíduo foi redissolvido em 1,0 ml de metanol e analisado por CLAP e por CCF (Valentão *et al.*, 2002c).

A infusão de Hiperício-do-Gerês foi preparada extraindo 15,00 g da amostra com 500 ml de água fervente, durante 15 min. A solução assim obtida foi filtrada e posteriormente liofilizada. Cerca de 5 mg de liofilizado foram dissolvidos em 1,0 ml de água e analisados por CLAP. O liofilizado restante foi utilizado nos ensaios de determinação das actividades antioxidante e hepatoprotectora da infusão (Valentão *et al.*, 2002e).

## 4. 3. Condições analíticas

### *Análise dos compostos fenólicos por CLAP*

Experimentaram-se diversas condições analíticas, que compreenderam a utilização de diferentes colunas (Spherisorb ODS2 e Hypersil ODS) e gradientes de composição distinta.

As condições utilizadas para o estabelecimento do perfil fenólico, por serem consideradas as mais adequadas, foram as que a seguir se indicam:

- Sistema eluente: água:ácido fórmico (19:1) (solvente A) e metanol (solvente B);

- Gradiente: 0 min - 10% B, 2 min - 30% B, 8 min - 30% B, 13 min - 35% B, 20 min - 50% B, 22 min - 50% B, 30 min - 70% B, 35 min - 70% B, 45 min - 80% B, 50 min - 80% B, 55 min - 95% B, 62 min - 95% B, 65 min - 10% B; Fluxo: 1 ml/min (Dias *et al.*, 1999).
- Registo dos cromatogramas a 280 e 350 nm.
- Os floroglucínóis foram quantificados a 280 nm e expressos em hiperforina; a quantificação dos restantes compostos foi feita a 350 nm, por comparação com as substâncias de referência; o ácido 3-*O*-cafeoilquínico foi expresso em ácido 5-*O*-cafeoilquínico e quercetina 3-sulfato em quercetina (Valentão *et al.*, 2002c).

A análise da infusão obedeceu às mesmas condições.

#### ***Análise dos compostos fenólicos por CCF***

Dado que a quercetina 3-*O*-glucuronato apresentava, na análise por CLAP e em qualquer das condições analíticas experimentadas, o mesmo tempo de retenção que a quercetina 3-*O*-glucósido, foi necessário proceder a um estudo por CCF para determinar a presença ou ausência da quercetina 3-*O*-glucuronato nas amostras de Hiperício-do-Gerês.

A análise do extracto metanólico foi efectuada por CCF bidimensional, em placas de celulose com 0,5 mm de espessura, com os seguintes desenvolventes (Ribéreau-Gayon, 1968c):

1º desenvolvente - butanol / ácido acético / água (6 / 1 / 2)

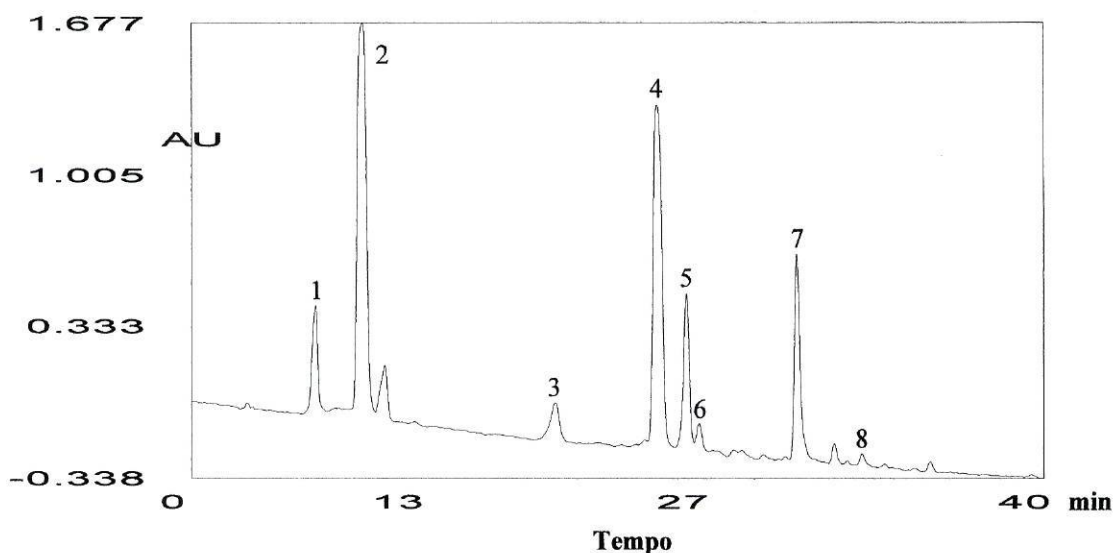
2º desenvolvente - água

Para a visualização das manchas dos diversos compostos fenólicos as placas foram observadas à luz UV de 366 nm, antes e depois da pulverização com solução metanólica do complexo etanolamina-ácido difenilbórico a 1%.

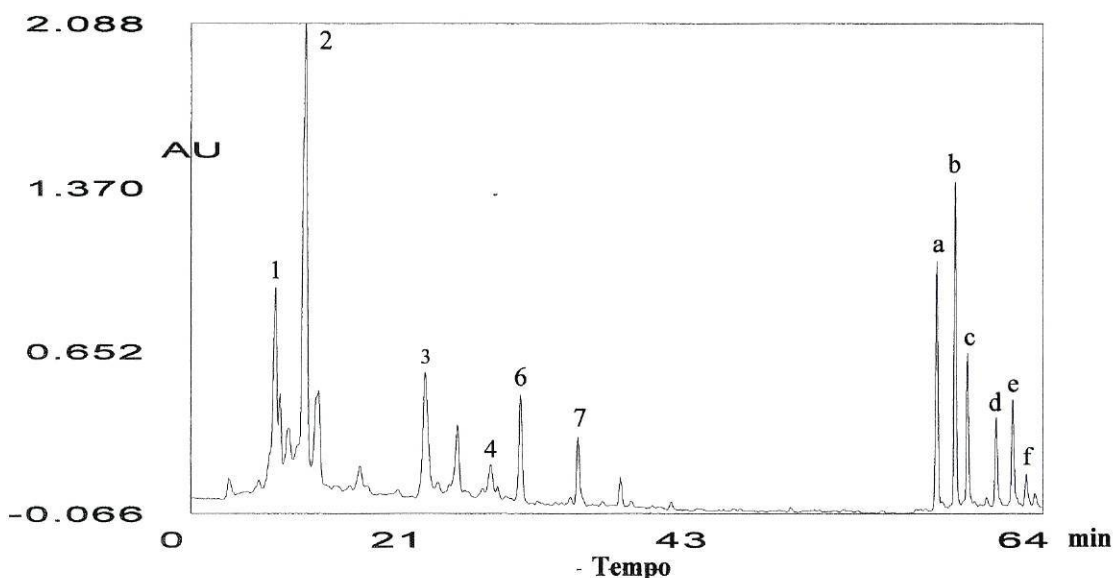
#### 4. 4. Resultados e discussão

Na análise feita por CLAP, de acordo com as condições descritas em 4. 3., foi possível observar que o extracto metanólico das amostras de Hiperício-do-Gerês era aquele que apresentava maior quantidade de compostos, cujo espectro no UV indicava tratar-se de ácidos cinâmicos e flavonóides. A co-cromatografia e a comparação com substâncias de referência permitiu a identificação de nove compostos: ácidos 3- e 5-*O*-cafeoilquínicos, quercetina 3-*O*-sulfato, quercetina 3-*O*-galactósido, quercetina 3-*O*-glucósido, quercetina 3-*O*-arabinósido, quercetin 3-*O*-ramnósido, quercetina e kaempferol (**Figura 22**). A quercetina 3-*O*-galactósido e a quercetina 3-*O*-glucósido apresentavam um tempo de retenção muito próximo e, por essa razão, foram quantificadas juntamente como quercetina 3-*O*-galactósido. Todos estes compostos estavam já descritos nesta espécie (Seabra, 1987; Dias *et al.*, 1999).

Para além destes compostos, um outro derivado da quercetina, a quercetina 3-*O*-glucuronato, tinha sido também encontrado em Hiperício-do-Gerês (Seabra e Correia Alves, 1990). A análise por CLAP da substância anteriormente isolada revelou que este composto apresentava o mesmo tempo de retenção da quercetina 3-*O*-glucósido. Face a estes resultados, a sua presença nas amostras de Hiperício-do-Gerês teve que ser pesquisada por CCF, atendendo a que a conjugação com ácido glucurónico confere à molécula grande poder de migração em água, contrariamente ao verificado com os outros glicósidos (Ribéreau-Gayon, 1968c). No cromatograma resultante da análise dos extractos metanólicos das amostras 2, 3, 7, 8, 9 e 10 foi possível detectar uma mancha castanha, quando observada no UV (366 nm), que corou de laranja após revelação com a solução do complexo etanolamina-ácido difenilbórico; os valores de  $R_f$  em butanol acético e em água foram 0,49 e 0,67, respectivamente. A co-cromatografia com a substância isolada confirmou que o composto em causa era a quercetina 3-*O*-glucuronato.



**Figura 22** - Cromatograma obtido com uma amostra de Hiperício-do-Gerês. Detecção a 350 nm. (1) ácido 3-*O*-cafeoilquínico; (2) ácido 5-*O*-cafeoilquínico; (3) quercetina 3-*O*-sulfato; (4) quercetina 3-*O*-galactósido + quercetina 3-*O*-glucósido + quercetina 3-*O*-glucuronato; (5) quercetina 3-*O*-arabinósido; (6) quercetina 3-*O*-ramnósido; (7) quercetina; (8) kaempferol.



**Figura 23** - Cromatograma obtido com uma amostra de Hiperício-do-Gerês. Detecção a 280 nm. Identidade dos compostos de acordo com a **Figura** ; a, b, c, d, e, f - derivados do floroglucinol não identificados.

Para além dos compostos fenólicos referidos, o cromatograma obtido por CLAP apresentava, também, compostos com espectros no UV com um máximo de absorção a 270 nm e elevado tempo de retenção (**Figura 23**). Atendendo a que no género *Hypericum* estão descritos compostos derivados do floroglucinol, nomeadamente a hiperforina (Decosterd *et al.*, 1991; Rocha *et al.*, 1995; Dias *et al.*, 1999), possuindo espectros idênticos aos observados nas amostras analisadas, experimentaram-se diversas condições analíticas de CLAP tendo em vista determinar a presença de hiperforina e de adhiperforina. Contudo, nenhum dos compostos por nós detectados no Hiperício-do-Gerês correspondia às substâncias de referência derivadas do floroglucinol, embora apresentassem tempos de retenção muito próximos.

A quantidade total de ácidos fenólicos e flavonóides identificados nas amostras analisadas variou entre 11 e 39 g/kg (peso seco) (**Tabela 12**).

As diferenças observadas entre as amostras colhidas nos dois campos experimentais (amostras 5, 6, 13 e 14) poderão ser justificadas pela sua melhor adaptação em 1999, atendendo ao facto de que estas plantas foram para lá transplantadas em Março de 1998, e que o rendimento é geralmente menor no primeiro ano de cultivo (Büter *et al.*, 1998).

A produção de compostos fenólicos parece estar condicionada pela exposição ao Sol, tal como aconteceu com as amostras de Limonete. As amostras colhidas em locais expostos ao Sol apresentaram um conteúdo fenólico situado entre 31 e 39 g/kg, exceptuando as amostras 5 e 6 pelas razões apontadas anteriormente, enquanto que nas amostras de plantas que cresciam em locais sombrios a quantidade de compostos fenólicos foi inferior a 28 g/kg. Estes resultados confirmam, uma vez mais, a hipótese de o conteúdo em compostos fenólicos estar relacionado com a exposição solar (Larson, 1988).

A influência da contaminação com *Uromyces* sp. pode ser avaliada ao compararmos os pares de amostras 2 / 3 e 8 / 9, correspondentes à mesma planta, com a mesma data de colheita, mas para as quais se analisaram separadamente folhas saudáveis e folhas infestadas com o fitopatogénico. Os resultados obtidos sugerem que a infestação provocaria uma diminuição na quantidade de compostos fenólicos; contudo, devido à escassez de dados, não é possível concluir seguramente qual o efeito da contaminação.

As quantidades dos diferentes compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonóides) identificados nas amostras de Hiperício-do-Gerês foram determinadas (**Tabela 13**). Apesar de estar presente em todas as amostras analisadas, o kaempferol foi sempre o composto minoritário, e em alguns casos não foi possível efectuar a sua quantificação. A análise dos resultados revela a existência, nas amostras analisadas, de quatro perfis fenólicos distintos, com diferenças a nível qualitativo e quantitativo.

Assim, nas amostras de Matosinhos 1 (amostras 2, 3, 8 e 9), Matosinhos 2 (amostra 10) e Santa Maria da Feira (amostra 7) os compostos fenólicos existentes em maior quantidade foram o ácido 5-*O*-cafeoilquínico (entre 45% e 63%) e a quercetina 3-*O*-ramnósido (de 16% a 28%) (**Figura 24 - A**); este é o único grupo de amostras a apresentar quercetina 3-*O*-glucuronato na sua composição.

As amostras de Matosinhos 3, Arouca, Arcos (amostras 4, 5, 6, 11, 13 e 14), todas possuindo a mesma origem genética, e a amostra de Serralves (amostra 12), apesar de exibirem uma quantidade total de fenóis muito diversa (entre 17 e 36 g/kg), apresentaram um perfil fenólico comum, no qual o ácido 5-*O*-cafeoilquínico e o par quercetina 3-*O*-galactósido + quercetina 3-*O*-glucósido são os compostos maioritários, variando entre 54% e 78% e entre 16% e 34%, respectivamente (**Figura 24 - B**).

No que diz respeito aos dois compostos mais abundantes na amostra do Gerês (amostra 1) eles são os mesmos do grupo anterior, mas com uma inversão da ordem dos respectivos teores, isto é, a quantidade de quercetina 3-*O*-galactósido + quercetina 3-*O*-glucósido (45%) é, neste caso, superior à de ácido 5-*O*-cafeoilquínico (31%) (**Figura 24 - C**). Atendendo a que esta foi a única amostra que apresentou este tipo de perfil fenólico, não é possível saber se estaremos, ou não, na presença de um outro grupo, pelo que seria necessário efectuar mais estudos que confirmassem estes dados.

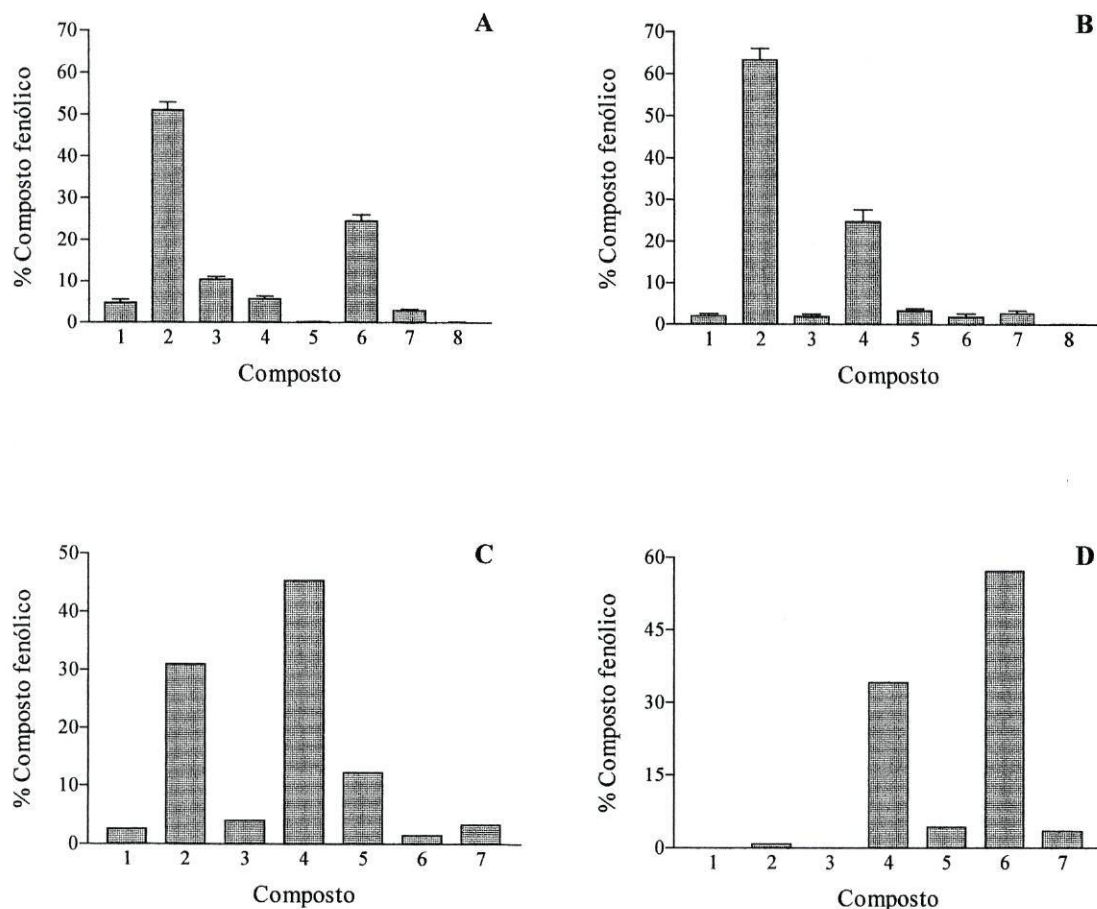
Para a amostra de Arada (amostra 15) a análise por CLAP revelou um perfil fenólico consideravelmente diferente: esta amostra não apresentou quercetina 3-*O*-sulfato e é caracterizada pela presença de uma elevada quantidade de quercetina 3-*O*-ramnósido (57% nesta amostra, enquanto todas as outras amostras apresentam teores inferiores a 28%) e por um reduzido teor em ácido 5-*O*-cafeoilquínico (0,8 %) (**Figura 24 - D**).



**Tabela 13** - Composição em ácidos fenólicos e flavonóides das amostras de *Hiperício-do-Gerês* (g/kg, peso seco).

Amostra	Composto*									
	Ácido 3-O- cafeoilquínico	Ácido 5-O- cafeoilquínico	Quercetina 3-O- sulfato	Quercetin 3-O-galactósido + Quercetin 3-O-glucósido	Quercetin 3-O- arabinósido	Quercetin 3-O- ramnósido	Quercetina	Kaempferol		
1	0,39 (0,009)	4,67 (0,028)	0,60 (0,002)	6,83 (0,020)	1,85 (0,051)	0,23 (0,004)	0,49 (0,003)	nq		
2	0,92 (0,004)	13,65 (0,430)	2,66 (0,012)	2,19 (0,005)	0,06 (0,004)	5,81 (0,013)	0,39 (0,009)	0,02 (0,000)		
3	0,48 (0,006)	6,68 (0,049)	1,43 (0,017)	1,23 (0,011)	0,07 (0,006)	3,92 (0,013)	0,31 (0,002)	0,01 (0,000)		
4	0,35 (0,001)	12,76 (0,011)	0,25 (0,001)	3,57 (0,030)	0,36 (0,024)	0,15 (0,012)	0,72 (0,012)	0,01 (0,001)		
5	0,36 (0,003)	17,08 (0,006)	0,22 (0,058)	3,71 (0,006)	0,35 (0,000)	0,09 (0,006)	0,11 (0,000)	nq		
6	0,18 (0,002)	10,04 (0,048)	0,20 (0,010)	5,87 (0,037)	0,69 (0,005)	0,17 (0,009)	0,15 (0,000)	nq		
7	1,33 (0,009)	19,37 (0,656)	3,33 (0,011)	2,39 (0,002)	0,05 (0,001)	11,20 (0,008)	1,56 (0,005)	0,05 (0,000)		
8	1,34 (0,002)	14,40 (0,011)	3,08 (0,018)	1,46 (0,013)	0,03 (0,003)	7,23 (0,059)	0,97 (0,018)	0,04 (0,001)		
9	0,37 (0,006)	5,09 (0,052)	1,48 (0,005)	0,67 (0,011)	0,03 (0,001)	3,17 (0,006)	0,47 (0,002)	0,03 (0,000)		
10	0,90 (0,040)	8,73 (0,050)	2,03 (0,006)	0,83 (0,012)	nq	4,22 (0,005)	0,68 (0,018)	0,03 (0,005)		
11	0,37 (0,001)	15,86 (0,194)	0,26 (0,005)	3,60 (0,044)	0,44 (0,061)	0,06 (0,000)	1,62 (0,006)	0,02 (0,001)		
12	0,68 (0,004)	20,13 (0,105)	1,36 (0,025)	9,88 (0,162)	1,89 (0,064)	0,71 (0,055)	0,67 (0,000)	0,02 (0,000)		
13	0,38 (0,001)	20,58 (0,802)	0,29 (0,005)	11,59 (0,143)	1,54 (0,008)	0,50 (0,034)	0,52 (0,014)	nq		
14	0,42 (0,002)	18,74 (0,129)	0,31 (0,001)	9,90 (0,070)	1,25 (0,012)	0,26 (0,032)	0,50 (0,004)	nq		
15	nq	0,25 (0,001)	-	11,33 (0,030)	1,43 (0,004)	18,94 (0,001)	1,16 (0,002)	nq		

\* Valores expressos como média (desvio padrão) de duas determinações para cada amostra; nq - não quantificável.



**Figura 24** - Perfil fenólico das amostras de Hipericão-do-Gerês (média  $\pm$  erro padrão). (A) Amostras de Matosinhos 1, Matosinhos 2 e Santa Maria da Feira; (B) Amostras de Matosinhos 3, Arouca, Arcos e Serralves; (C) Amostra do Gerês; (D) Amostra de Arada. (1) ácido 3-*O*-cafeoilquínico; (2) ácido 5-*O*-cafeoilquínico; (3) quercetina 3-*O*-sulfato; (4) quercetina 3-*O*-galactósido + quercetina 3-*O*-glucósido + quercetina 3-*O*-glucuronato; (5) quercetina 3-*O*-arabinósido; (6) quercetina 3-*O*-ramnósido; (7) quercetina; (8) kaempferol.

Do exposto anteriormente, e atendendo às características de cada amostra, podemos dizer que os perfis fenólicos encontrados não estão relacionados com factores ambientais, em termos de exposição solar e origem geográfica, nem com a presença ou ausência do fitopatogénico. Estes factos sugerem, por isso, a existência de variabilidade química dentro da espécie *Hypericum androsaemum*.

Na **Tabela 12** indicam-se os teores de floroglucínóis totais nas diferentes amostras. Da análise desta tabela podemos inferir que a quantidade total de compostos derivados do floroglucínol não tem relação com a exposição ao Sol, origem ou infestação das amostras. Apesar de não estarem identificados, a quantidade dos diferentes floroglucínóis foi também determinada (**Tabela 14**). Procedeu-se ao mesmo estudo que foi efectuado em relação aos ácidos fenólicos e flavonóides, e a análise da proporção de cada composto revelou novamente a presença de quatro perfis distintos, agrupando, exactamente, as mesmas amostras (**Figura 25**). A nível de floroglucínóis as diferenças entre os quimiotipos é ainda mais pronunciada, o que reforça a hipótese de esta espécie estar sujeita a variabilidade química, devida, provavelmente, a diferentes padrões genéticos.

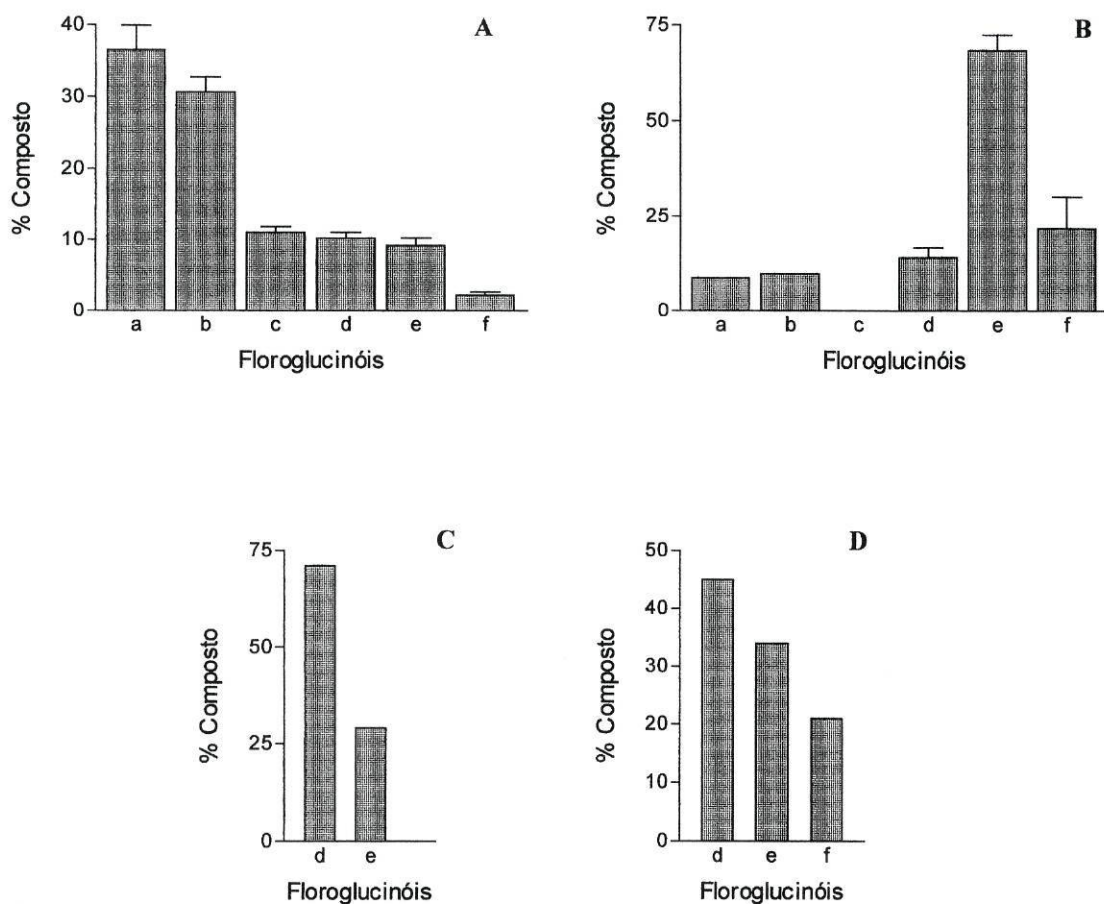
O facto de existir uma variabilidade química no género *Hypericum* não constitui novidade, dado que estudos anteriormente realizados com diversas espécies permitiram chegar a essa conclusão (Kartnig *et al.*, 1996; Büter *et al.*, 1998). A sua importância relaciona-se, sobretudo, com a possibilidade de seleccionar os quimiotipos capazes de produzirem maior quantidade de compostos com interesse terapêutico.

Dos resultados encontrados para o Hipericão-do-Gerês podemos inferir que, para esta espécie, o controlo de identidade e qualidade não deverá ser efectuado com base no seu perfil fenólico.

**Tabela 14 - Composição em floroglucínóis das amostras de Hiperício-do-Gerês (g/kg, peso seco).**

Amostra	Composto*					
	a	b	c	d	e	f
1	nq	nq	nq	0,30 (0,053)	0,12 (0,053)	nq
2	3,97 (0,081)	2,33 (0,001)	0,79 (0,007)	1,17 (0,022)	0,75 (0,019)	0,17 (0,006)
3	2,60 (0,064)	1,72 (0,026)	0,66 (0,016)	0,73 (0,016)	0,39 (0,007)	0,12 (0,001)
4	nq	nq	nq	0,72 (0,052)	3,62 (0,008)	0,58 (0,011)
5	0,24 (0,163)	0,26 (0,189)	nq	0,41 (0,027)	1,31 (0,053)	0,42 (0,088)
6	nq	nq	nq	0,30 (0,019)	1,49 (0,133)	0,30 (0,000)
7	5,97 (0,030)	3,31 (0,165)	1,02 (0,028)	1,30 (0,019)	0,90 (0,010)	0,19 (0,008)
8	7,71 (0,075)	9,14 (0,022)	3,27 (0,004)	1,95 (0,038)	2,53 (0,002)	0,95 (0,032)
9	3,37 (0,054)	4,41 (0,285)	1,42 (0,083)	1,00 (0,029)	1,43 (0,087)	0,27 (0,009)
10	3,94 (0,179)	4,38 (0,217)	1,75 (0,080)	1,37 (0,081)	1,62 (0,009)	0,44 (0,015)
11	nq	nq	nq	0,46 (0,009)	2,62 (0,060)	0,42 (0,044)
12	nq	nq	nq	0,50 (0,056)	1,14 (0,063)	0,32 (0,009)
13	nq	nq	nq	0,44 (0,002)	2,66 (0,023)	0,48 (0,004)
14	nq	nq	nq	0,65 (0,069)	4,20 (0,530)	0,52 (0,100)
15	nq	nq	nq	7,41 (0,181)	5,60 (0,458)	3,36 (0,160)

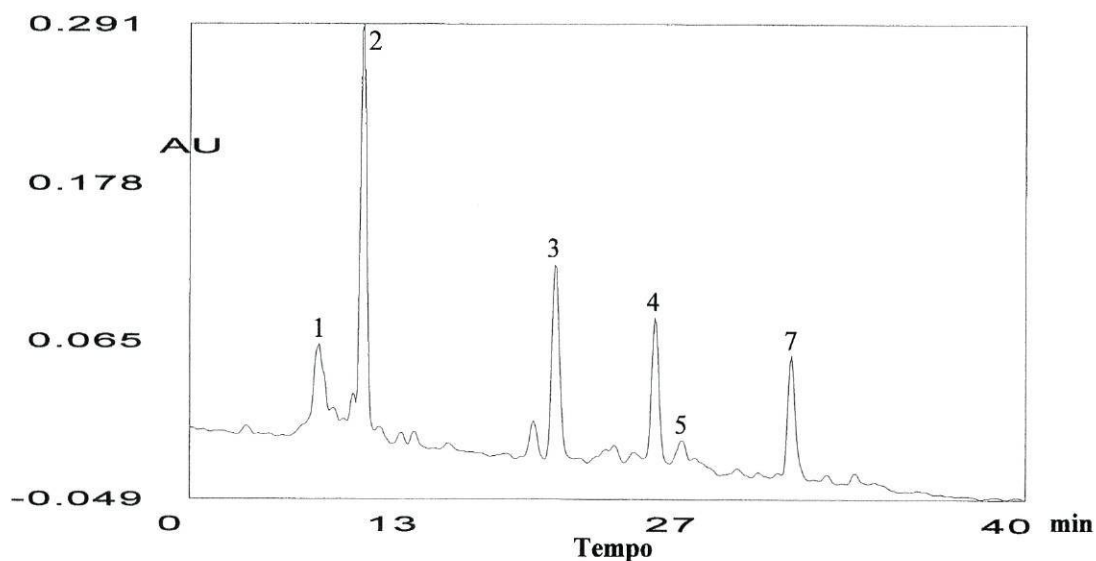
\* Valores expressos como média (desvio padrão) de duas determinações para cada amostra; nq - não quantificável.



**Figura 25** - Derivados do floroglucínol das amostras de Hiperício-do-Gerês (média  $\pm$  erro padrão). (A) Amostras de Matosinhos 1, Matosinhos 2 e Santa Maria da Feira; (B) Amostras de Matosinhos 3, Arouca, Arcos e Serralves; (C) Amostra do Gerês; (D) Amostra de Arada. a, b, c, d, e, f - derivados do floroglucínol não identificados.

A liofilização da infusão de Hiperício-do-Gerês resultou na obtenção de 0,51 g de liofilizado, contendo  $0,386 \pm 0,0102$  mg de fenóis / mg de liofilizado.

No que diz respeito à análise por CLAP, verificou-se que, qualitativamente, a composição da infusão é idêntica à do extracto metanólico (**Figura 26**). Dada a sua polaridade não é de estranhar a presença dos mesmos compostos, embora predominem aqui o ácido 5-*O*-cafeoilquínico e a quercetina 3-*O*-sulfato.



**Figura 26** - Cromatograma obtido com a infusão de Hiperício-do-Gerês. Detecção a 350 nm. Identidade dos compostos de acordo com a **Figura 22**.

## **5. Composição fenólica do Cardo-do-Coalho**

## Índice

5. 1. Caracterização do material em estudo.....	87
5. 2. Extração dos compostos fenólicos.....	88
5. 3. Condições analíticas.....	88
5. 4. Resultados e discussão.....	89



## 5. Composição fenólica do Cardo-do-Coalho

### 5.1. Caracterização do material em estudo

As folhas de Cardo-do-Coalho (**Tabela 15**) foram obtidas em dois campos experimentais situados no norte de Portugal, em Arcos e Arouca. O cultivo destas amostras foi da responsabilidade da Direcção Regional de Agricultura de Entre Douro e Minho. O Cardo-do-Coalho foi semeado em Março de 1997 e colhido em 1998 e 1999, durante o período de floração, como é tradicionalmente recomendado, e também em Dezembro. Em 1999, após a floração, as plantas foram cortadas pela base mas desenvolveram-se novamente, tendo-se analisado, também, amostras correspondentes a um segundo período de floração.

A maioria das amostras apresentava folhas muito desenvolvidas, com nervuras muito protuberantes e cujo peso, nalguns casos, excedia largamente o dos limbos; destas amostras apenas os limbos foram estudados, com excepção da amostra 7, da qual se analisaram separadamente as nervuras e os limbos.

As amostras 3 e 9 encontravam-se contaminadas por um agente patogénico não identificado, exibindo manchas acastanhadas.

**Tabela 15** - Amostras de Cardo-do-Coalho.

Proveniência	Amostra	Colheita	Material vegetal	Produção de folhas (kg/1000 m <sup>2</sup> )	Fenóis totais (g/kg)
Arcos	1	Junho, 1998	Limbos	158	26,04
	2	Dezembro, 1998*	Limbos	154	25,46
	3	Junho, 1999	Folhas	171	12,84
	4	Setembro, 1999	Folhas	126	19,50
	5	Dezembro, 1999*	Limbos	256	35,82
Arouca	6	Maio, 1998	Limbos	875	29,74
	7	Dezembro, 1998*	Limbos	287	33,14
			Nervuras		6,61
	8	Abril, 1999	Folhas	642	21,89
	9	Julho, 1999	Limbos	338	7,29
	10	Dezembro, 1999*	Limbos	441	28,51

\* Fora do período de floração.

As amostras foram secas à temperatura ambiente e cortadas de modo a ficarem aproximadamente com o mesmo grau de divisão, uma vez que a existência de uma elevada quantidade de pêlos na página inferior das folhas impediu a sua pulverização e

tamização. Antes da extracção dos compostos fenólicos as amostras foram liofilizadas. Na preparação da infusão usaram-se folhas grosseiramente divididas.

## 5. 2. Extracção dos compostos fenólicos

Uma amostra de Cardo-do-Coalho (0,20 g) foi extraída com água fervente, até que a reacção com NaOH 20% fosse negativa. O extracto aquoso foi filtrado, acidificado com HCl e aplicado numa coluna de extracção em fase sólida Isolute C18 (Paci, Portugal; 10 g/70 ml), previamente acondicionada com metanol e água ácida (pH 2 com HCl). Os compostos fenólicos ficaram retidos no adsorvente da coluna, enquanto que açúcares e outros compostos polares foram eluídos com o solvente aquoso. A fracção fenólica foi, depois, eluída com metanol. Obteve-se assim um extracto rico em compostos fenólicos, que foi evaporado até à secura, a pressão reduzida, à temperatura de 30° C. Redissolveu-se o extracto em 1,5 ml de metanol para análise qualitativa por CLAP.

Para a determinação do perfil fenólico 0,20 g de cada amostra liofilizada foi agitado com metanol, a 30°C, até extracção completa dos compostos fenólicos (reacção negativa com NaOH 20%). O extracto foi levado à secura, a pressão reduzida (30° C). O resíduo obtido foi dissolvido em 3 ml de metanol e analisado por CLAP (Seabra *et al.*, 2002).

Na preparação da infusão de Cardo-do-Coalho 4,00 g de folhas (amostra 6) foram infundidos com 200 ml de água fervente, durante 15 min. A solução extractiva foi depois filtrada e liofilizada. Cerca de 16 mg de liofilizado foram redissolvidos em 1 ml de água e analisados por CLAP, enquanto que o restante foi utilizado para testar a actividade antioxidante deste extracto (Valentão *et al.*, 2002f).

## 5. 3. Condições analíticas

A análise por CLAP das soluções extractivas obtidas de cada amostra foi realizada de acordo com as condições que se indicam de seguida:

- Sistema eluente: água:ácido fórmico (19:1) (solvente A) e metanol (solvente B);
- Gradiente 1: 0 min - 5% B, 3 min - 15% B, 13 min - 25% B, 25 min - 30% B, 35 min - 35% B, 39 min - 45% B, 59 min - 60% B, 60 min - 100% B; Fluxo: 0,9 ml/min (Seabra *et al.*, 2002).
- Registo dos cromatogramas a 320 e 350 nm.
- A quantificação dos ácidos fenólicos e dos flavonóides foi feita a 320 e 350 nm, respectivamente; os ácidos 3- e 4-*O*-cafeoilquínicos foram expressos em ácido 5-*O*-cafeoilquínico, sendo os ácidos 3,4-, 3,5-, 1,5- e 4,5-*O*-dicafeoilquínicos expressos em cinarina; os restantes compostos foram quantificados por comparação com as substâncias de referência.

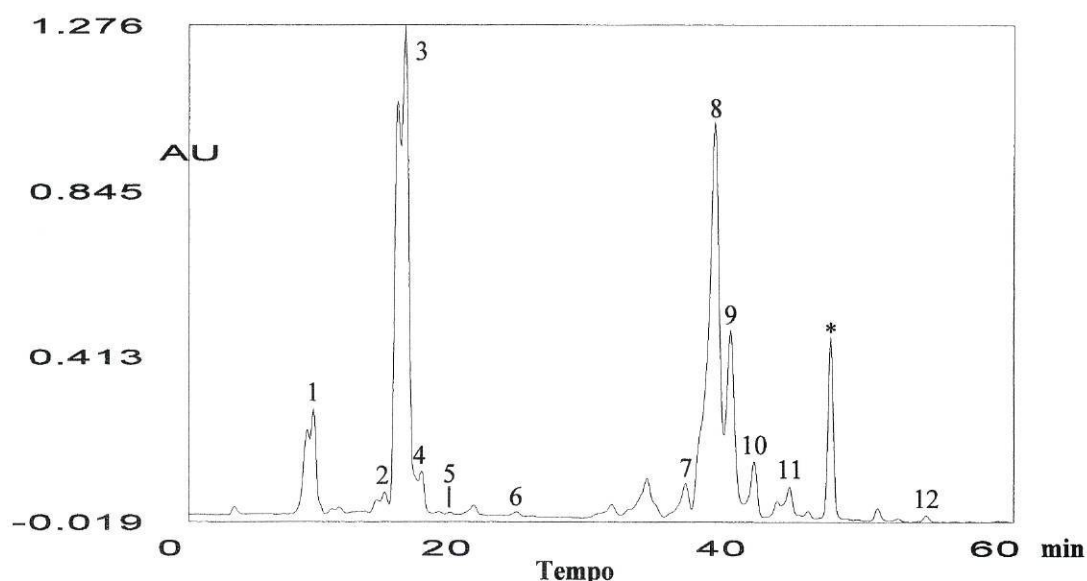
A análise da infusão foi efectuada nas mesmas condições.

#### 5. 4. Resultados e discussão

Uma vez que a informação relativa à composição fenólica do Cardo-do-Coalho é escassa e tendo em consideração a existência de diversos ácidos dicafeoilquínicos, compostos muito polares, na Alcachofra (Adzet e Puigmacia, 1985), uma espécie do mesmo género (*Cynara scolymus*) já mais estudada, optamos por usar a água para a extracção dos compostos fenólicos. A extracção com água fervente, seguida de purificação em coluna de extracção em fase sólida, levou à obtenção de um extracto rico em compostos fenólicos. Esta metodologia apresenta a vantagem de permitir a eliminação fácil de grandes volumes de água, não sendo necessário recorrer a elevadas temperaturas para concentração do extracto. Contudo, devido à grande instabilidade dos ácidos cafeoilquínicos, que facilmente sofriam isomerização, este método extractivo teve que ser abandonado.

Nos cromatogramas obtidos na análise dos extractos metanólicos por CLAP, segundo as condições descritas anteriormente, observavam-se picos correspondentes a compostos com espectros no UV característicos de ácidos cinâmicos e de flavonóides.

Atendendo ao tipo de espectros no UV registados para os diversos compostos e às informações bibliográficas disponíveis sobre a Alcachofra, fomos levados a concluir que a composição fenólica do Cardo-do-Coalho é muito semelhante à daquela espécie. A identificação dos ácidos 3-, 4, e 5-*O*-cafeoilquínicos, ácido cafeico, ácidos 1,3- e 3,5-*O*-dicafeoilquínicos, luteolina 7-*O*-glucósido, apigenina 7-*O*-glucósido e luteolina foi confirmada por co-cromatografia com substâncias de referência. A identidade dos ácidos 3,4-, 1,5- e 4,5-*O*-dicafeoilquínicos é aqui apenas sugerida, por análise dos espectros de UV e por comparação com a ordem de eluição encontrada na literatura para esses compostos (Adzet e Puigmacia, 1985; Clifford, 1985), já descritos na Alcachofra (Adzet e Puigmacia, 1985), quando analisados em condições semelhantes (**Figura 27**). De acordo com Clifford (1986), é o ácido 1,3-*O*-dicafeoilquínico que corresponde actualmente à cinarina, e não o ácido 1,5-*O*-dicafeoilquínico.



**Figura 27-** Cromatograma obtido com uma amostra de Cardo-do-Coalho. Detecção a 320 nm. (1) ácido 3-*O*-cafeoilquínico; (2) ácido 4-*O*-cafeoilquínico; (3) ácido 5-*O*-cafeoilquínico; (4) ácido cafeico; (5) ácido 1,3-*O*-dicafeoilquínico; (6) ácido 3,4-*O*-dicafeoilquínico; (7) ácido 3,5-*O*-dicafeoilquínico; (8) ácido 1,5-*O*-dicafeoilquínico; (9) luteolina 7-*O*-glucósido; (10) ácido 4,5-*O*-dicafeoilquínico; (11) apigenina 7-*O*-glucósido; (12) luteolina; (\*) derivado da luteolina.

Relativamente ao teor em compostos fenólicos podemos observar que, apesar de existir uma maior produção de folhas nas amostras provenientes de Arouca, tal facto

não se traduz numa quantidade superior de fenóis (**Tabela 15**). A análise dos resultados obtidos com as amostras colhidas em Dezembro (limbos saudáveis) não mostra uma diferença expressiva no conteúdo fenólico, sugerindo que a origem geográfica e o ano da colheita não interferem com aquele valor. Do mesmo modo, não se nota grande diferença ao comparar amostras do mesmo material vegetal, saudáveis, colhidas no mesmo ano e no mesmo local, mas em estados de desenvolvimento distintos (pares de amostras 1/2 e 6/7).

Da análise individualizada de nervuras e limbos (amostra 7) podemos verificar que nas primeiras o teor de compostos fenólicos é muito reduzido. Tal facto poderá ser devido a uma menor produção destes metabolitos a nível das nervuras, o que justificaria o baixo valor obtido com as amostras 3, 4 e 8, das quais se analisou a folha inteira.

As amostras contaminadas com o fitopatogénico apresentaram uma redução nítida do conteúdo fenólico (amostras 3 e 9).

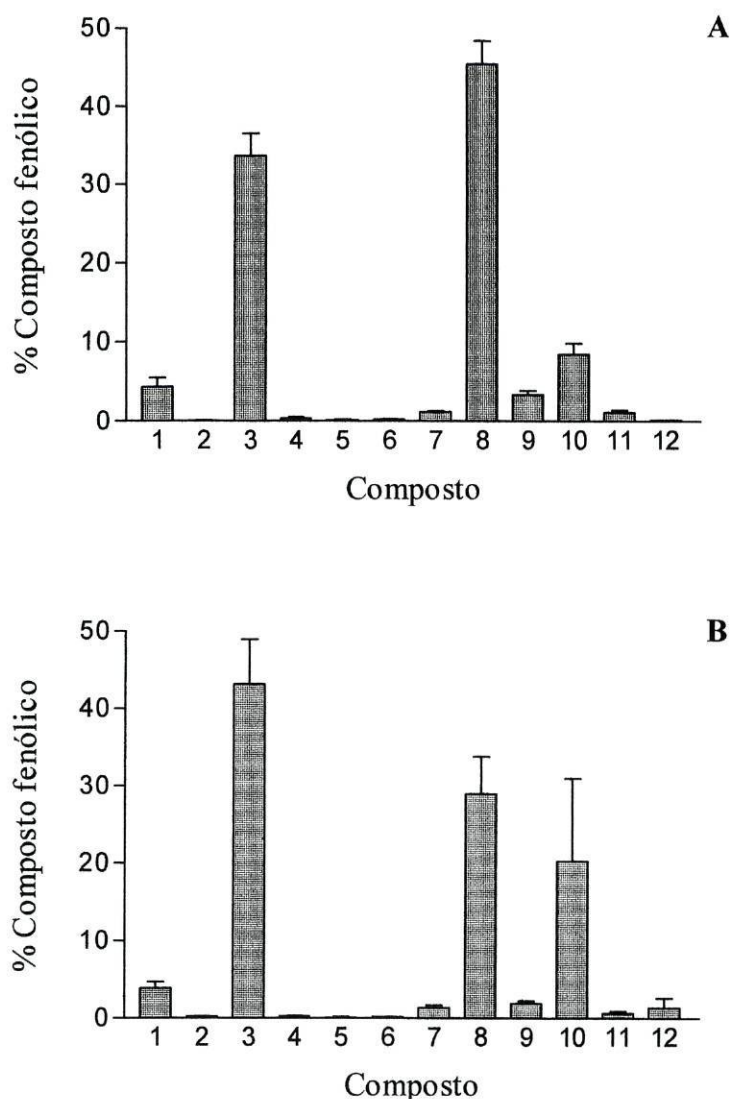
A quantificação de cada composto identificado (**Tabela 16**) origina um perfil químico que não sofre influência do ano, local de cultivo, material analisado, fase de desenvolvimento ou estado de saúde das amostras (**Figura 28**). Em todas as amostras os ácidos 5-*O*-cafeoilquínico e 1,5-*O*-dicafeoilquínico foram os compostos mais abundantes, situando-se os seus teores entre 28% e 53%. Relativamente a estes dois compostos pode-se observar que as suas proporções variam em função da época de colheita: nas amostras colhidas durante o Verão (Junho, Julho e Setembro) o ácido 1,5-*O*-dicafeoilquínico é o composto maioritário, enquanto que nas amostras colhidas na Primavera (Abril e Maio) e no Inverno (Dezembro) o composto presente em maior quantidade é o ácido 5-*O*-cafeoilquínico.

Apesar do número reduzido de amostras que foi usado neste estudo, o perfil fenólico que apresentaram parece ser bastante constante; contudo, outras amostras, colhidas noutros anos e noutros locais, deveriam ser analisadas de modo a confirmar a utilidade deste perfil químico no controlo de qualidade desta espécie.

Tabela 16 - Composição fenólica das amostras de Cardo-do-Coalho (g/kg, peso seco).

Amostra	Composto*											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	1,11 (0,039)	0,04 (0,002)	10,51 (0,399)	0,04 (0,006)	0,02 (0,003)	0,07 (0,039)	0,29 (0,010)	11,06 (0,513)	2,13 (0,050)	0,57 (0,077)	0,16 (0,080)	0,03 (0,000)
2	0,63 (0,007)	0,08 (0,020)	13,11 (0,609)	0,10 (0,044)	0,05 (0,000)	nq	0,15 (0,003)	7,49 (0,454)	3,04 (0,036)	0,48 (0,012)	0,28 (0,002)	0,05 (0,000)
3	0,55 (0,001)	nq	4,66 (0,127)	0,07 (0,018)	0,03 (0,001)	0,04 (0,001)	0,17 (0,008)	5,07 (0,069)	1,55 (0,022)	0,44 (0,039)	0,22 (0,003)	0,03 (0,001)
4	0,32 (0,003)	nq	5,89 (0,058)	0,09 (0,016)	0,04 (0,000)	0,03 (0,000)	1,97 (0,123)	9,14 (0,078)	1,06 (0,118)	0,95 (0,032)	nq	0,02 (0,001)
5	0,95 (0,005)	0,07 (0,002)	18,78 (0,197)	0,20 (0,002)	nq	0,05 (0,001)	0,53 (0,002)	11,97 (0,147)	2,37 (0,047)	0,73 (0,008)	0,17 (0,009)	nq
6	1,13 (0,034)	0,03 (0,003)	11,52 (0,388)	0,05 (0,005)	0,01 (0,002)	0,06 (0,035)	0,25 (0,020)	13,05 (0,428)	3,00 (0,054)	0,45 (0,036)	0,17 (0,076)	0,02 (0,003)
7	1,93 (0,011)	0,08 (0,001)	13,60 (0,075)	0,02 (0,001)	nq	0,04 (0,007)	0,40 (0,034)	12,22 (0,176)	4,12 (0,046)	0,24 (0,109)	0,44 (0,004)	0,05 (0,001)
8	0,49 (0,005)	0,05 (0,017)	9,72 (0,203)	0,06 (0,039)	nq	0,06 (0,005)	0,56 (0,004)	8,74 (0,176)	1,56 (0,007)	0,60 (0,001)	0,05 (0,003)	nq
9	0,54 (0,006)	0,00 (0,000)	2,02 (0,022)	nq	nq	nq	nq	3,86 (0,016)	0,59 (0,012)	0,22 (0,006)	0,07 (0,001)	nq
10	1,67 (0,013)	nq	15,19 (0,071)	0,04 (0,003)	0,00 (0,000)	0,04 (0,003)	0,29 (0,005)	7,85 (0,039)	2,81 (0,052)	0,59 (0,076)	0,03 (0,001)	nq

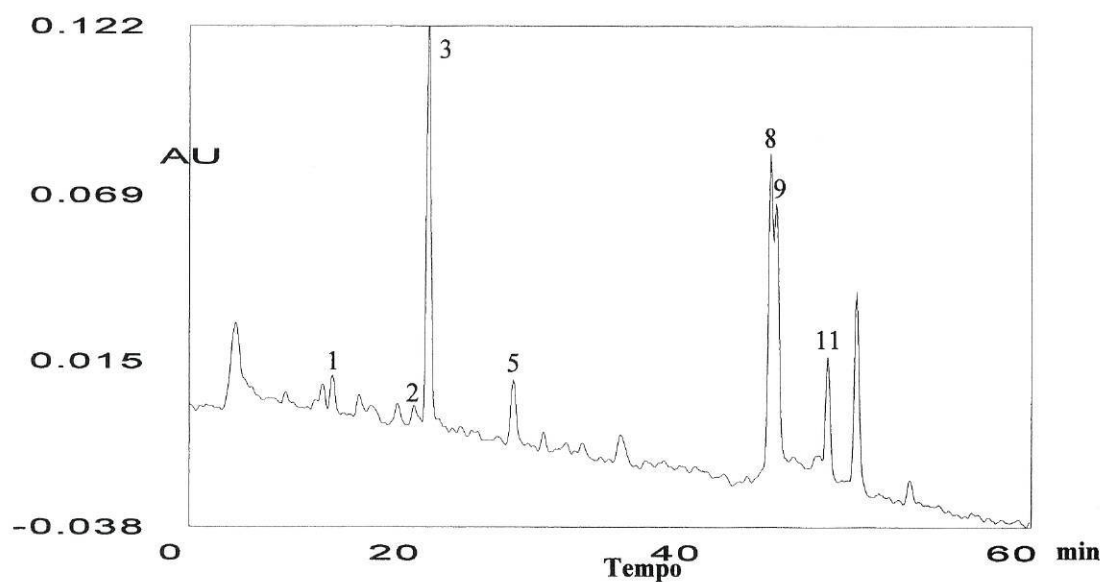
\* Valores expressos como média (desvio padrão) de duas determinações para cada amostra; nq - não quantificável.



**Figura 28** - Perfil fenólico das amostras de Cardo-do-Coalho, colhidas no Verão (A) e na Primavera e Inverno (B) (média  $\pm$  erro padrão). (1) ácido 3-*O*-cafeoilquínico; (2) ácido 4-*O*-cafeoilquínico; (3) ácido 5-*O*-cafeoilquínico; (4) ácido cafeico; (5) ácido 1,3-*O*-dicafeoilquínico; (6) ácido 3,4-*O*-dicafeoilquínico; (7) ácido 3,5-*O*-dicafeoilquínico; (8) ácido 1,5-*O*-dicafeoilquínico; (9) luteolina 7-*O*-glucósido; (10) ácido 4,5-*O*-dicafeoilquínico; (11) apigenina 7-*O*-glucósido; (12) luteolina.

Relativamente à infusão de Cardo-do-Coalho, a liofilização conduziu à produção de 1,17 g de liofilizado. O valor obtido na determinação de grupos fenólicos foi de  $0,054 \pm 0,0060$  mg de fenóis / mg de liofilizado.

A análise, por CLAP, de uma alíquota de liofilizado revelou uma composição fenólica semelhante à do extracto metanólico, tendo-se identificado os compostos de maior polaridade: alguns ácidos cafeoilquínicos e os heterósidos da luteolina e da apigenina (**Figura 29**).



**Figura 29** - Cromatograma obtido com a infusão de Cardo-do-Coalho. Detecção a 320 nm. Identidade dos compostos de acordo com a **Figura 27**.



## **6. Composição fenólica do Fel-da-Terra**

## Índice

6. 1. Caracterização do material em estudo.....	97
6. 2. Extração dos compostos fenólicos.....	97
6. 3. Condições analíticas.....	98
6. 4. Isolamento e determinação estrutural dos compostos fenólicos.....	99
6. 5. Resultados e discussão.....	102
6. 5. 1. Elucidação estrutural dos compostos fenólicos.....	102
6. 5. 2. Análise dos compostos fenólicos.....	148

## 6. Composição fenólica do Fel-da-Terra

### 6.1. Caracterização do material em estudo

As parte aéreas de Fel-da-Terra foram colhidas entre 1997 e 2000 no norte de Portugal (Tabela 17). As sementes das amostras 9 a 11 foram fornecidas pelo Jardim Botânico da Universidade de Lisboa; após germinação *in vitro* e propagação, na Universidade do Minho, foram cultivadas num campo experimental em Arouca, com e sem fertilização, sob a responsabilidade da Direcção Regional de Agricultura de Entre Douro e Minho. As restantes amostras foram obtidas de exemplares espontâneos, e a sua identificação foi determinada no Instituto de Botânica Dr. Gonçalo Sampaio (Porto).

**Tabela 17 - Amostras de Fel-da-Terra.**

Amostra	Proveniência	Colheita
1	Penacova	Agosto 1997
2	Monção	Agosto 1997
3	Monção	Junho 1998
4	Gerês	Julho 1998
5	Ancede	Julho 1998
6	Penacova	Junho 1999
7	Penacova	Junho 1999
8	Arada	Junho 1999
9	Arouca	Julho 1999
10	Arouca <sup>1</sup>	Julho 1999
11	Arouca <sup>2</sup>	Julho 1999
12	Penacova	Junho 2000

<sup>1,2</sup> Fertilização com 120 e 60 kg/ha/ano de azoto, respectivamente.

As sumidades floridas foram separadas, secas à temperatura ambiente e reduzidas a pó (1600). Para preparação da infusão usou-se amostra não pulverizada.

### 6.2. Extracção dos compostos fenólicos

Para uma análise preliminar, cerca de 2 g de uma amostra (sumidades floridas) foram agitados, por duas vezes, com 50 ml de diferentes solventes (clorofórmio, éter etílico, etanol 30%, etanol 80%, acetato de etilo, metanol). Cada solução extractiva foi filtrada e levada à secura, a pressão reduzida, à temperatura de 30 °C. O resíduo foi dissolvido em 2 ml de metanol e analisado por CLAP.

Os melhores resultados foram obtidos com o extracto clorofórmico, que revelava, na análise por CLAP, ser constituído essencialmente por compostos de natureza xantónica, que, conforme referido anteriormente, são característicos da família *Gentianaceae*. Por isso, cada amostra pulverizada (1,00 g) foi agitada com 100 ml de clorofórmio, durante 10 min, seguida de duas extracções com 100 ml de clorofórmio, durante 15 minutos de cada vez. Os extractos clorofórmicos foram combinados, filtrados e o clorofórmio foi removido sob pressão reduzida, a 30° C. O resíduo foi dissolvido em 2,0 ml de metanol e analisado por CLAP (Valentão *et al.*, 2002a).

A infusão de Fel-da-Terra foi preparada extraíndo 5,00 g de amostra de sumidades floridas (amostra 1) com 500 ml de água fervente, durante 15 min. A solução aquosa foi filtrada e liofilizada.

Atendendo à complexidade de composição da infusão, revelada na análise por CLAP, procedeu-se à hidrólise alcalina deste extracto: 10 ml de NaOH foram adicionados a 0,1 g de liofilizado e a solução foi conservada ao abrigo da luz, à temperatura ambiente, durante 4 horas; seguidamente a amostra foi acidificada com HCl e aplicada numa coluna para extracção em fase sólida Isolute C18 (Paci, Portugal), previamente acondicionada com metanol e HCl 2N; os compostos fenólicos foram depois eluídos com metanol. A solução metanólica obtida foi levada à secura, a pressão reduzida (30° C), e o resíduo obtido foi dissolvido em 1,0 ml de metanol para posterior análise por CLAP (Valentão *et al.*, 2001).

O restante liofilizado foi utilizado em ensaios de actividade antioxidante da infusão de Fel-da-Terra.

### 6. 3. Condições analíticas

Para determinar o perfil fenólico, a análise por CLAP da solução extractiva clorofórmica obtida de cada amostra foi desenvolvida nas seguintes condições:

- Sistema eluente: acetonitrilo:água:ácido acético (15:84:0,85) (solvente A) e metanol (solvente B);
- Gradiente: 0 min - 0% B, 70 min - 100% B; Fluxo: 0,8 ml/min.
- Registo dos cromatogramas a 320 nm.

- Quantificação a 320 nm; compostos expressos em xantona (Valentão *et al.*, 2002a).

Os compostos fenólicos presentes na infusão hidrolisada de Fel-da-Terra foram separados e identificados nas condições que a seguir se indicam:

- Sistema eluente: água:ácido fórmico (19:1) (solvente A) e metanol (solvente B);
- Gradiente 1: 0 min - 30% B, 15 min - 30% B, 20 min - 40% B, 30 min - 45% B, 50 min - 60% B; Fluxo: 1 ml/min (Andrade *et al.*, 1998c).
- Registo dos cromatogramas a 320 nm (Valentão *et al.*, 2001).

#### 6. 4. Isolamento e determinação estrutural dos compostos fenólicos

Atendendo a que não se encontram comercialmente disponíveis substâncias de referência derivadas da xantona, e a que este tipo de compostos é característico do Fel-da-Terra (Hostettmann e Hostettmann, 1989), tornou-se necessário proceder ao seu isolamento e identificação, para poder definir o perfil fenólico obtido na análise por CLAP.

Para este fim, 600 g de sumidades floridas de Fel-da-terra, colhida em Agosto de 1997 (amostra 1), foram macerados com clorofórmio, já que este solvente revelou ser o mais indicado para a extracção daquele tipo de compostos. O isolamento dos compostos foi realizado segundo o esquema apresentado na **Figura 30**. O extracto clorofórmico obtido foi fraccionado por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 (Sigma, St. Louis, Mo., USA). A eluição foi efectuada com metanol e monitorizada através da observação à luz UV de 366 nm, até ausência de fluorescência. Recolheram-se quatro fracções, que continham a totalidade dos compostos fenólicos. As duas primeiras fracções, de cor escura, foram rejeitadas após análise por CLAP, por não conterem compostos de interesse. As fracções 3 e 4 apresentavam uma fluorescência amarelo-azulada.

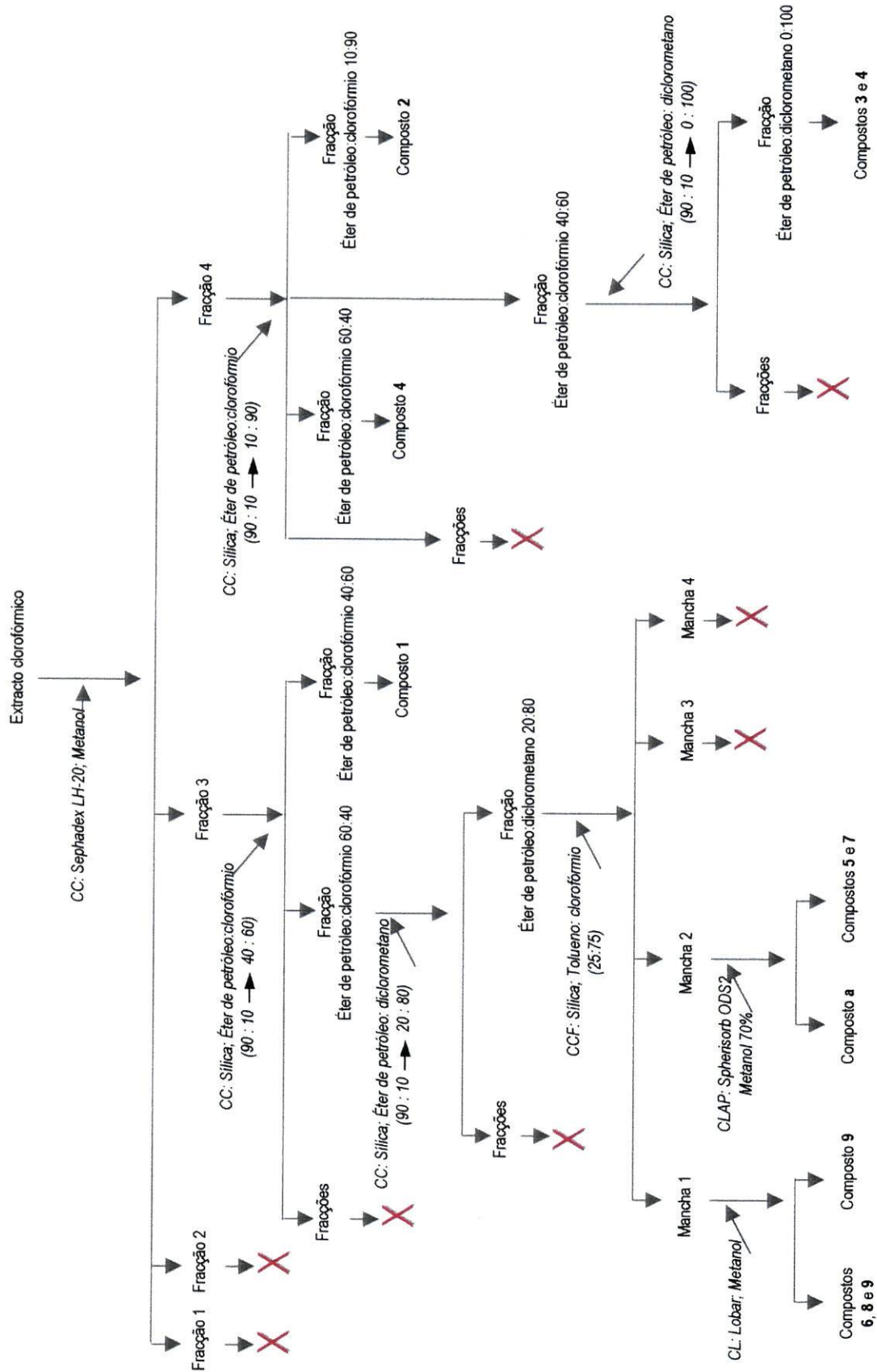


Figura 30 - Isolamento dos compostos fenólicos do Fel-da-Terra.

A terceira fracção resultante da cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 foi submetida a uma cromatografia em coluna de gel de sílica (230-400 mesh; Merck, Darmstadt, Alemanha), usando como eluente um gradiente de éter de petróleo:clorofórmio, de 90:10 até 40:60.

A fracção eluída com 40% de clorofórmio foi posteriormente cromatografada em coluna de gel de sílica, e a eluição foi realizada com éter de petróleo:diclorometano (de 90:10 até 20:80). A fracção obtida com 80% de diclorometano foi dissolvida em clorofórmio e submetida a cromatografia preparativa em placas de gel de sílica (60 G; Merck, Darmstadt, Alemanha) e usando como eluente tolueno:clorofórmio (25:75); deste modo obtiveram-se quatro zonas com fluorescência no UV (366 nm).

A fracção correspondente à mancha com  $R_f$  mais alto (mancha 1) foi depois purificada por cromatografia líquida em coluna Lobar (Lichroprep RP-18, 40-63  $\mu\text{m}$ ; Merck, Darmstadt, Alemanha), tendo a eluição sido efectuada com metanol. Com este procedimento foi possível isolar os compostos **6**, **8** e **9** (Valentão *et al.*, 2002a).

A fracção respeitante à segunda zona de fluorescência, por ordem decrescente de  $R_f$  (mancha 2), foi submetida a um fraccionamento por CLAP semi-preparativa, com uma coluna Spherisorb ODS2 (Waters, 25,0 x 1,0 cm; 10  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula) e eluição com metanol a 70%, a um fluxo de 2 ml/min. Deste modo foram isolados os compostos **5**, **7** e **a** (Valentão *et al.*, 2002a, 2002b).

A fracção eluída da primeira coluna de gel de sílica com 60% de clorofórmio, após análise por CLAP, revelou ser constituída apenas pelo composto **1** (Valentão *et al.*, 2000).

A quarta fracção resultante da cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 foi também submetida a uma cromatografia em coluna de gel de sílica, usando como eluente um gradiente de éter de petróleo:clorofórmio, de 90:10 até 10:90.

A fracção eluída com 60% de clorofórmio foi refraccionada em coluna de gel de sílica e a eluição foi realizada usando misturas de polaridade crescente de éter de petróleo e diclorometano; da fracção eluída com 100% de diclorometano foi possível obter os compostos **3** e **4** (Valentão *et al.*, 2002a, 2000).

Na fracção eluída com 90% de clorofórmio e após análise por CLAP encontramos o composto **2** (Valentão *et al.*, 2000).

Os compostos assim isolados foram submetidos à análise por espectrofotometria de UV-Visível, RMN e EM, tendo em vista o esclarecimento das respectivas estruturas. Os espectros de RMN foram registados dissolvendo os compostos **1**, **2** e **3** em DMSO-*d*<sub>6</sub>, o composto **4** em CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub> e os restantes em CDCl<sub>3</sub>.

## 6. 5. Resultados e discussão

### 6. 5. 1. Elucidação estrutural dos compostos fenólicos

As xantonas são uma classe de compostos fenólicos característica das espécies pertencentes à família *Gentianaceae*, na qual está incluído o Fel-da-Terra (Hostettmann e Hostettmann, 1989). Uma vez que estes compostos não estão disponíveis comercialmente e que as suas características cromatográficas nem sempre estão referidas na literatura, procedeu-se ao seu isolamento e identificação, tendo em vista a determinação do perfil fenólico desta espécie.

Várias xantonas foram descritas anteriormente como constituintes das partes aéreas (Neshta *et al.*, 1982; Neshta *et al.*, 1984; Schimmer e Mauthner, 1996), raízes (Kaouadji *et al.*, 1986; Kaouadji e Mariotte, 1986), planta inteira (Takagi e Yamaki, 1982) e mesmo em culturas de células de Fel-da-Terra (Meravý, 1987). Atendendo a que apenas as sumidades floridas desta espécie são utilizadas com fins terapêuticos, tornou-se necessário saber, de entre aqueles que estão descritos, quais os compostos presentes nesta parte da planta.

Nove compostos presentes no extracto clorofórmico das sumidades floridas de Fel-da-Terra foram extraídos e isolados do modo descrito em 6.4.. Os compostos existentes no extracto obtido apresentavam espectros de UV característicos de xantonas (**Figura 31**).



*Caracterização do composto 1*

O espectro de UV do composto **1** sugeria a presença de uma xantona tetraoxigenada nas posições 1, 3, 5 e 6 (Chaudhuri e Ghosal, 1971) (**Figura 31 - 1**). O seu espectro de massa apresentava o ião molecular  $M^+$  a m/e 302 (**Figura 32**), apontando para uma xantona com um hidroxilo e três metoxilos.

De modo a localizar os diferentes grupos na molécula procedeu-se ao estudo dos espectros de UV em metanol, antes e após a adição de reagentes de deslocamento (**Tabela 18**). O espectro obtido depois da adição de  $AlCl_3$  era sobreponível ao espectro em metanol, indicando que não existiam grupos hidroxilo nas vizinhanças do grupo carbonilo, nem *orto* hidroxilos. A adição de NaOH e de NaOAc deu origem a espectros com desvios batocrômicos, confirmando a presença de um grupo hidroxilo; atendendo a que estes dois espectros eram idênticos, podemos deduzir que o grupo hidroxilo se encontrava na posição 3 (Lins Mesquita *et al.*, 1968).

O espectro de RMN de  $^1H$  encontra-se reproduzido nas **Figuras 33 e 34** e apresentou as seguintes características:

- $\delta$  3,85 (3H), 3,89 (3H) e 3,92 (3H), três singuletos, atribuídos aos prótons de três grupos  $OCH_3$ ;
- $\delta$  6,49 (1H), duplete,  $J=2,4$  Hz, atribuído ao próton em 2;
- $\delta$  6,71 (1H), duplete,  $J=2,4$  Hz, atribuído ao próton em 4;
- $\delta$  6,90 (1H), duplete,  $J=9,0$  Hz, atribuído ao próton em 7;
- $\delta$  7,65 (1H), duplete,  $J=9,0$  Hz, atribuído ao próton em 8.

Os dados analíticos fornecidos por este espectro confirmam a existência de quatro substituintes na molécula (um grupo hidroxilo e três grupos metoxilo), dois prótons aromáticos do anel B em acoplamento *orto* ( $\delta$  7,65 e 6,90) e dois prótons aromáticos pertencentes ao anel A em acoplamento *meta* ( $\delta$  6,71 e 6,49).

A estrutura do composto **1** foi deste modo confirmada, tratando-se, então, da **3-hidroxi-1,5,6-trimetoxixantona (Figura 53)**. Os dados obtidos estavam de acordo com os anteriormente descritos para este composto, isolado de *Kielmeyera rupestris* (De Barros Corrêa *et al.*, 1970); o Fel-da-Terra foi a segunda espécie na qual foi encontrado (Valentão *et al.*, 2000).

## Caracterização do composto 2

No espectro de massa do composto **2** o íon molecular  $M^+$  (m/e 274) revelava a existência de um grupo metoxilo e três grupos hidroxilo ligados ao núcleo da xantona (**Figura 35**).

O seu espectro de RMN de  $^1H$  (**Figura 36 e 37**) mostrou os seguintes sinais:

- $\delta$  3,76 (3H), singuleto, atribuído aos prótons de  $OCH_3$ ;
- $\delta$  12,95 (1H), singuleto, atribuído ao próton de OH;
- $\delta$  6,53 (1H), singuleto, atribuído ao próton em 4;
- $\delta$  7,30 (1H), duplete de dupletos,  $J=7,8$  e  $1,8$  Hz, atribuído ao próton em 6;
- $\delta$  7,25 (1H), duplete,  $J=7,5$  Hz, atribuído ao próton em 7;
- $\delta$  7,54 (1H), duplete de dupletos,  $J=7,5$  e  $1,8$  Hz, atribuído ao próton em 8.

Estes resultados apontavam para a presença de um metoxilo ( $\delta$  3,76), um hidroxilo na vizinhança do grupo carbonilo ( $\delta$  12,95), um próton aromático no anel A ( $\delta$  6,53), e três prótons aromáticos com constantes de acoplamento que indicavam tratar-se de prótons vicinais do anel B ( $\delta$  7,54, 7,30 e 7,25); os altos valores de desvio químico encontrados para os prótons do anel B sugeriam a existência de um grupo oxigenado na posição 5. Estes resultados estariam de acordo com um padrão de substituição do tipo 1,2,3,5- ou 1,3,4,5-. A comparação com dados disponíveis na literatura para os dois padrões de substituição possíveis (Westerman *et al.*, 1977; Lin *et al.*, 1987), permitiu concluir que o composto **2** era uma xantona substituída nas posições 1, 2 e 3.

O espectro de RMN de  $^{13}C$  (**Figura 38**) veio comprovar esta hipótese, uma vez que apresentava sinais para três carbonos vicinais com substituintes oxigenados no anel A ( $\delta$  159,1, 154,1 e 130,7). Os restantes sinais foram distribuídos da forma que se segue:  $\delta$  60,0 ( $OCH_3$ ), 154,1 (carbono 1), 130,7 (carbono 2), 159,1 (carbono 3), 94,2 (carbono 4), 152,4 (carbono 4a), 144,9 (carbono 4b), 146,2 (carbono 5), 120,5 (carbono 6)\*, 124,0 (carbono 7), 114,4 (carbono 8), 120,4 (carbono 8a)\*, 180,6 (carbono 9), 102,4 (carbono 9a). \*Valores permutáveis.

O estudo dos espectros de UV do composto **2** obtidos antes e após a adição de  $AlCl_3$  (**Tabela 18**) indicou a presença de um hidroxilo livre em posição *peri* relativamente ao grupo carbonilo, traduzida pelo desvio batocrômico verificado depois da adição daquele reagente de deslocamento; uma vez que a adição posterior de HCl não provocou alteração do espectro, pode-se concluir que não havia grupos hidroxilo

em posição *orto* na molécula. Os espectros de UV resultantes da adição de NaOH e de NaOAc indicam a presença de outro grupo hidroxilo na posição 3, pelos mesmos motivos que foram apresentados na discussão da estrutura do composto 1.

Face aos resultados obtidos, o composto 2 foi identificado como **1,3,5-tri-hidroxi-2-metoxixantona (Figura 53)**, encontrando-se em concordância com os dados referidos para este composto (Westerman *et al.*, 1977).

### *Caracterização do composto 3*

A análise por CLAP mostrou que o composto 3 não foi isolado no estado puro, encontrando-se em mistura com o composto 4. Esta mistura foi sujeita a análise por RMN de protão e de carbono.

Tendo em atenção os dados que adiante serão referidos para o composto 4, isolado e caracterizado em primeiro lugar, a integração registada e que o espectro de RMN de protão da mistura sugeria a existência de dois anéis A com o mesmo padrão de substituição, podemos atribuir ao composto 3 os seguintes sinais (**Figuras 39 a 41**):

- $\delta$  3,90 (3H), singuleto, atribuído aos protões de OCH<sub>3</sub>;
- $\delta$  12,87 (1H), singuleto, atribuído ao protão de OH em 1;
- $\delta$  6,40 (1H), duplete,  $J=2,2$  Hz, atribuído ao protão em 2;
- $\delta$  6,64 (1H), duplete,  $J=2,2$  Hz, atribuído ao protão em 4;
- $\delta$  7,33 (1H), duplete de dupletos,  $J=7,8$  e 1,8 Hz, atribuído ao protão em 6;
- $\delta$  7,27 (1H), triplete,  $J=1,8$  Hz, atribuído ao protão em 7;
- $\delta$  7,56 (1H), duplete de dupletos,  $J=7,8$  e 1,8 Hz, atribuído ao protão em 8.

A informação recolhida deste espectro indica a presença de um metoxilo ( $\delta$  3,90), um hidroxilo na vizinhança de um grupo carbonilo ( $\delta$  12,87), dois protões aromáticos pertencentes ao anel A em acoplamento *meta* ( $\delta$  6,40 e 6,64) e três protões aromáticos com constantes de acoplamento que indicavam tratar-se de protões vicinais do anel B ( $\delta$  7,33, 7,27 e 7,56); os altos valores de desvio químico encontrados para os protões do anel B sugeriam a existência de um grupo oxigenado na posição 5.

Tendo em consideração que no espectro de RMN de carbono não foi possível detectar os sinais correspondentes a todos os carbonos existentes nas moléculas, atribuímos ao composto 3 os sinais que a seguir se descrevem (**Figura 42**):  $\delta$  56,2

(OCH<sub>3</sub>), 162,6 (carbono 1), 97,1 (carbono 2), 166,1 (carbono 3), 92,8 (carbono 4), 156,8 (carbono 4a), 146,3 (carbono 5), 120,9 (carbono 6), 124,3 (carbono 7), 114,5 (carbono 8), 103,0 (carbono 9a).

A identificação do composto **3** teve como base o facto de este composto possuir propriedades espectrais idênticas às descritas para **1,5-di-hidroxi-3-metoxixantona** (**Figura 53**) (Delle Monache *et al.*, 1983), isolado anteriormente apenas em culturas celulares de Fel-da-Terra (Beerhues e Berger, 1995). Este composto foi descrito pela primeira vez *in vivo* nesta espécie (Valentão *et al.*, 2002a).

#### Caracterização do composto 4

O composto **4** apresentava, tal como o composto **1**, um espectro de UV característico de uma xantona tetraoxigenada nas posições 1, 3, 5 e 6 (Chaudhuri e Ghosal, 1971) (**Figura 31 - 4**). A adição de AlCl<sub>3</sub> induziu um forte desvio batocrómico, causado pela formação de um complexo estável com o alumínio, indicando a existência de um hidroxilo em posição *peri* relativamente ao grupo carbonilo; atendendo a que o espectro que se obteve depois da adição de HCl era idêntico a este, concluímos que não havia na molécula grupos hidroxilo em posição *orto*. Além disso, o facto de a adição de NaOH e de NaOAc ter resultado em espectros sobreponíveis revelava a presença de uma 1,6-di-hidroxi-xantona (**Tabela 18**) (Lins Mesquita *et al.*, 1968).

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H, reproduzido na **Figura 43**, apresentou os seguintes sinais:

- $\delta$  3,71 (3H) e 3,80 (3H), dois singuletos, atribuído aos protões de dois OCH<sub>3</sub>;
- $\delta$  12,83 (1H), singuleto, atribuído ao protão de OH;
- $\delta$  6,08 (1H), duplete,  $J=1,9$  Hz, atribuído ao protão em 2;
- $\delta$  6,35 (1H), duplete,  $J=1,9$  Hz, atribuído ao protão em 4;
- $\delta$  6,80 (1H), duplete,  $J=8,7$  Hz, atribuído ao protão em 7;
- $\delta$  7,60 (1H), duplete,  $J=8,7$  Hz, atribuído ao protão em 8.

Foram assim encontrados sinais para dois protões aromáticos em acoplamento *orto* ( $\delta$  7,60 e 6,80); estes valores elevados de desvio químico sugerem a existência de substituintes oxigenados nas posições 5 e 6 (anel B). Também foi possível observar

sinais para prótons aromáticos do anel A, em acoplamento *meta*, ( $\delta$  6,35 e 6,08), sinais para dois metoxilos ( $\delta$  3,80 e 3,71) e um hidroxilo na vizinhança do grupo carbonilo ( $\delta$  12,83).

Relativamente ao espectro de RMN de carbono, os escassos dados de que dispomos foram obtidos na análise da mistura com o composto **3**. Atendendo à menor quantidade de composto **4**, apenas foi possível encontrar os seguintes sinais (**Figura 42**):  $\delta$  166,5 (carbono 3), 92,7 (carbono 4), 131,7 (carbono 5), 157,2 (carbono 6), 114,2 (carbono 7), 120,7 (carbono 8).

No espectro de massa, o ião molecular  $M^+$  correspondia ao sinal a m/e 288 (**Figura 44**), confirmando a existência de dois grupos hidroxilo e dois grupos metoxilo na molécula.

A estrutura do composto **4** foi assim elucidada, tratando-se da **1,6-di-hidroxi-3,5-dimetoxixantona** (**Figura 53**). Os resultados obtidos estão de acordo com o referido para este composto, isolado anteriormente de *Canscora decussata* (Ghosal *et al.*, 1973) e identificado agora no Fel-da-Terra (Valentão *et al.*, 2000).

#### *Caracterização do composto 5*

A análise por CLAP mostrou que composto **5** foi isolado em mistura com o composto **7**, existindo o composto **5** em bastante maior quantidade (aproximadamente 1:0,2). A atribuição dos sinais obtidos no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figuras 45 a 47**) foi feita de acordo com a integração registada para cada sinal e tem as características que se indicam de seguida:

- $\delta$  3,87 (3H), 3,93 (3H) e 3,99 (3H), singuletos, atribuído aos prótons de três grupos  $\text{OCH}_3$ ;
- $\delta$  13,26 (1H), singuleto, atribuído ao próton de OH (em sobreposição com o sinal do composto **7**);
- $\delta$  6,33 (1H), duplete,  $J=2,1$  Hz, atribuído ao próton em 2;
- $\delta$  6,30 (1H), duplete,  $J=2,1$  Hz, atribuído ao próton em 4;
- $\delta$  7,33 (1H), duplete,  $J=9,2$  Hz, atribuído ao próton em 5;
- $\delta$  7,16 (1H), duplete,  $J=9,2$  Hz, atribuído ao próton em 6.

Estes dados apontam para a existência de um hidroxilo na vizinhança do grupo carbonilo ( $\delta$  13,26), dois prótons aromáticos acoplados em *meta* no anel A ( $\delta$  6,33 e 6,30) e outros dois no anel B, com acoplamento *orto* ( $\delta$  7,33 e 7,16). Face a estes resultados, o composto em questão poderia apresentar o padrão de substituição 1,3,5,6-, 1,3,5,8- ou 1,3,7,8-. Contudo, atendendo a que já estava descrita no Fel-da-Terra a 1-hidroxi-3,7,8-trimetoxixantona, procedemos à comparação dos valores de ressonância por nós obtidos, tendo-se verificado uma grande semelhança; tal facto levou-nos a pensar que se trataria do mesmo composto.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 48**) confirmou a existência de um carbono carbonílico ( $\delta$  181,2), doze carbonos com carácter aromático e três com características de carbonos alifáticos oxigenados; os valores dos deslocamentos químicos obtidos foram distribuídos pelos diferentes carbonos da molécula, partindo dos valores de RMN de carbono publicados para a xantona (Castelão *et al.*, 1977) e sabendo que a introdução de hidroxilo e de metoxilo provocam os seguintes deslocamentos (Levy e Nelson, 1972):

	Carbono 1	Carbonos em <i>orto</i>	Carbonos em <i>meta</i>	Carbonos em <i>para</i>
OH	+ 26,9	- 12,7	+ 1,4	- 7,3
OCH <sub>3</sub>	+ 31,4	- 14,4	+ 1,0	- 7,7

Deste modo foi possível chegar a valores teóricos, segundo os quais se fez a atribuição dos valores encontrados no espectro:  $\delta$  55,8 (OCH<sub>3</sub> no carbono 3)\*, 57,1 (OCH<sub>3</sub> no carbono 7)\*, 61,8 (OCH<sub>3</sub> no carbono 8)\*, 163,8 (carbono 1), 96,8 (carbono 2), 166,4 (carbono 3), 92,0 (carbono 4), 157,1 (carbono 4a), 150,9 (carbono 4b), 112,8 (carbono 5), 120,3 (carbono 6), 149,2 (carbono 7), 148,7 (carbono 8)\*\*, 115,7 (carbono 8a)\*\*, 104,0 (carbono 9a), 181,2 (carbono 9); \*Valores permutáveis; \*\*Sinais detectados, cujos valores de desvio químico foram lidos por estimativa por não terem sido registados pelo aparelho. Embora não se encontrem ainda publicados os valores de RMN de  $^{13}\text{C}$  para o composto sugerido, os dados por nós obtidos não excluem a hipótese de se tratar de facto da **1-hidroxi-3,7,8-trimetoxixantona** ou **decussatina** (**Figura 53**). As características espectrais encontradas estão em concordância com as referidas em trabalhos anteriores para este composto (Kaouadji e Mariotte, 1986; Wolfender *et al.*, 1991), que já tinha sido descrito em raízes de Fel-da-Terra (Kaouadji

*et al.*, 1986; Kaouadji e Mariotte, 1986) e foi agora isolado das sumidades floridas (Valentão *et al.*, 2002a).

### Caracterização do composto 6

Através da análise por CLAP, verificámos que o composto 6 se encontrava em mistura com os compostos 8 e 9, sensivelmente na proporção de 0,4:1:0,2, respectivamente. Atendendo aos dados obtidos para o composto 9, isolado e caracterizado em primeiro lugar, e à integração registada, foi possível proceder à atribuição dos sinais encontrados no espectro de RMN de protão para o composto 6 (**Figuras 49 a 51**):

- $\delta$  3,90 (3H), singuleto, atribuído aos protões de OCH<sub>3</sub> em 3 (em sobreposição com os sinais dos compostos 8 e 9);
- $\delta$  4,02 (3H) e 4,02 (3H), dois singuletos, atribuídos aos protões de dois OCH<sub>3</sub> em 5 e 6;
- $\delta$  12,93 (1H), singuleto, atribuído ao protão de OH;
- $\delta$  6,36 (1H), duplete,  $J=2,6$  Hz, atribuído ao protão em 2;
- $\delta$  6,53 (1H), duplete,  $J=2,6$  Hz, atribuído ao protão em 4;
- $\delta$  7,00 (1H), duplete,  $J=8,9$  Hz, atribuído ao protão em 7;
- $\delta$  8,00 (1H), duplete,  $J=8,9$  Hz, atribuído ao protão em 8.

A informação recolhida neste espectro sugere a existência de um hidroxilo em posição *peri* relativamente ao grupo carbonilo ( $\delta$  12,93), dois protões aromáticos *meta* acoplados no anel A ( $\delta$  6,36 e 6,53) e outros dois em acoplamento *orto* no anel B ( $\delta$  7,00 e 8,00); os valores de desvio químico apresentados pelos protões do anel B apontam para substituição em 1,3,5,6-.

Por comparação com dados obtidos em trabalhos anteriores o composto 6 foi identificado como **1-hidroxi-3,5,6-trimetoxixantona** (**Figura 53**) (Kaouadji e Mariotte, 1986); tal como o composto 5, também este composto estava já descrito em raízes de Fel-da-Terra (Kaouadji *et al.*, 1986; Kaouadji e Mariotte, 1986), tendo sido agora encontrado nas sumidades floridas (Valentão *et al.*, 2002a).

*Caracterização do composto 7*

Conforme foi referido anteriormente, o composto 7 foi isolado juntamente com o composto 5. Relativamente à elucidação estrutural do composto 7, a distribuição dos sinais exibidos no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras 45 a 47) foi feita de acordo com a integração registada para cada sinal:

- $\delta$  3,93 (3H), singuleto, atribuído ao protão de  $\text{OCH}_3$  em 3;
- $\delta$  3,87 (3H), 3,98 (3H), 3,99 (3H) e 4,13 (3H), quatro singuletos, atribuídos a protões de quatro  $\text{OCH}_3$ ;
- $\delta$  13,26 (1H), singuleto, atribuído ao protão de OH (em sobreposição com o sinal do composto 5);
- $\delta$  6,32 (1H), duplete,  $J=2,1$  Hz, atribuído ao protão em 2;
- $\delta$  6,44 (1H), duplete,  $J=2,1$  Hz, atribuído ao protão em 4.

Os dados obtidos indicam a presença de um hidroxilo na vizinhança do grupo carbonilo ( $\delta$  13,26), dois protões aromáticos em acoplamento *meta* no anel A e cinco metoxilos; face a estes resultados, a xantona em questão apresenta o anel B totalmente substituído com metoxilos.

Atendendo à menor quantidade de composto 7 na mistura, no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 48) apenas foi registado o sinal atribuído ao carbono 4 ( $\delta$  92,2); contudo outros sinais foram detectados, nomeadamente aqueles correspondentes ao anel <sup>a</sup>

De acordo com estes resultados consideramos que o composto 7 é a **1-hidroxi-3,5,6,7,8-pentametoxixantona** ou **eustomina** (Figura 53), identificada anteriormente em raízes, parte aérea e cultura de células de Fel-da-Terra (Kaouadji *et al.*, 1986; Kaouadji e Mariotte, 1986; Shimmer e Mauthner, 1996).

*Caracterização do composto 8*

Tal como o indicado anteriormente, o composto 8 estava misturado com os compostos 6 e 9. A atribuição dos sinais encontrados no espectro de RMN de protão para este composto (Figuras 49 a 51) foi feita tendo em atenção os dados obtidos para o composto 9, isolado anteriormente, e à integração registada:

- $\delta$  3,90 (3H), singuleto, atribuído aos protões de  $\text{OCH}_3$  em 3;



- $\delta$  3,97 (3H), 4,06 (3H) e 4,07 (3H), três singuletos, atribuídos a prótons de três OCH<sub>3</sub>;
- $\delta$  12,88 (1H), singuleto, atribuído ao próton de OH;
- $\delta$  6,37 (1H), duplete,  $J=2,3$  Hz, atribuído ao próton em 2;
- $\delta$  6,52 (1H), duplete,  $J=2,3$  Hz, atribuído ao próton em 4;
- $\delta$  7,42 (1H), singuleto, atribuído ao próton em 8.

Os resultados obtidos indicavam a existência de dois prótons em acoplamento *meta* no anel A ( $\delta$  6,37 e 6,52) e de um hidroxilo em posição *peri* relativamente ao carbonilo ( $\delta$  12,88); uma vez que não há sinais para prótons em acoplamento *orto* no anel A, e face ao valor de desvio químico que resta, este hidroxilo só poderá estar ligado ao carbono 1.

Consequentemente, consideramos que o composto **8** seria a **1-hidroxi-3,5,6,7-tetrametoxixantona (Figura 53)** e os resultados encontrados estão de acordo com o anteriormente publicado (Kaouadji e Mariotte, 1986). Este composto fora encontrado apenas nas raízes de Fel-da-Terra (Kaouadji et al., 1986; Kaouadji e Mariotte, 1986), tendo sido agora descrito nas suas sumidades floridas (Valentão *et al.*, 2002a).

#### *Caracterização do composto 9*

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H do composto **9** está reproduzido na **Figura 52** e apresenta as características seguintes:

- $\delta$  3,90 (3H), singuleto, atribuído a prótons de OCH<sub>3</sub> em 3;
- $\delta$  3,93 (3H), 3,94 (3H) e 4,14 (3H), três singuletos, atribuídos a prótons de três OCH<sub>3</sub>;
- $\delta$  11,98 (1H) e 11,90 (1H), dois singuletos, atribuídos aos prótons de OH;
- $\delta$  6,35 (1H), duplete,  $J=2,3$  Hz, atribuído ao próton em 2;
- $\delta$  6,50 (1H), duplete,  $J=2,3$  Hz, atribuído ao próton em 4.

A análise deste espectro revela a existência de dois prótons aromáticos em acoplamento *meta* no anel A ( $\delta$  6,35 e 6,50); não se detecta qualquer sinal para prótons aromáticos do anel B. Os valores obtidos para os hidroxilos sugerem que estes encontrar-se-ão na vizinhança do grupo carbonilo e, portanto, os metoxilos estarão ligados aos carbonos 3, 5, 6 e 7.

Em função destes resultados, e por comparação com dados publicados, concluímos que o composto **9** seria a **1,8-di-hidroxi-3,5,6,7-tetrametoxixantona** ou **desmetileustomina** (**Figura 53**) (Kaouadji e Mariotte, 1986). Este composto foi identificado anteriormente em raízes e na parte aérea do Fel-da-Terra (Kaouadji *et al.*, 1986; Kaouadji e Mariotte, 1986; Shimmer e Mauthner, 1996).

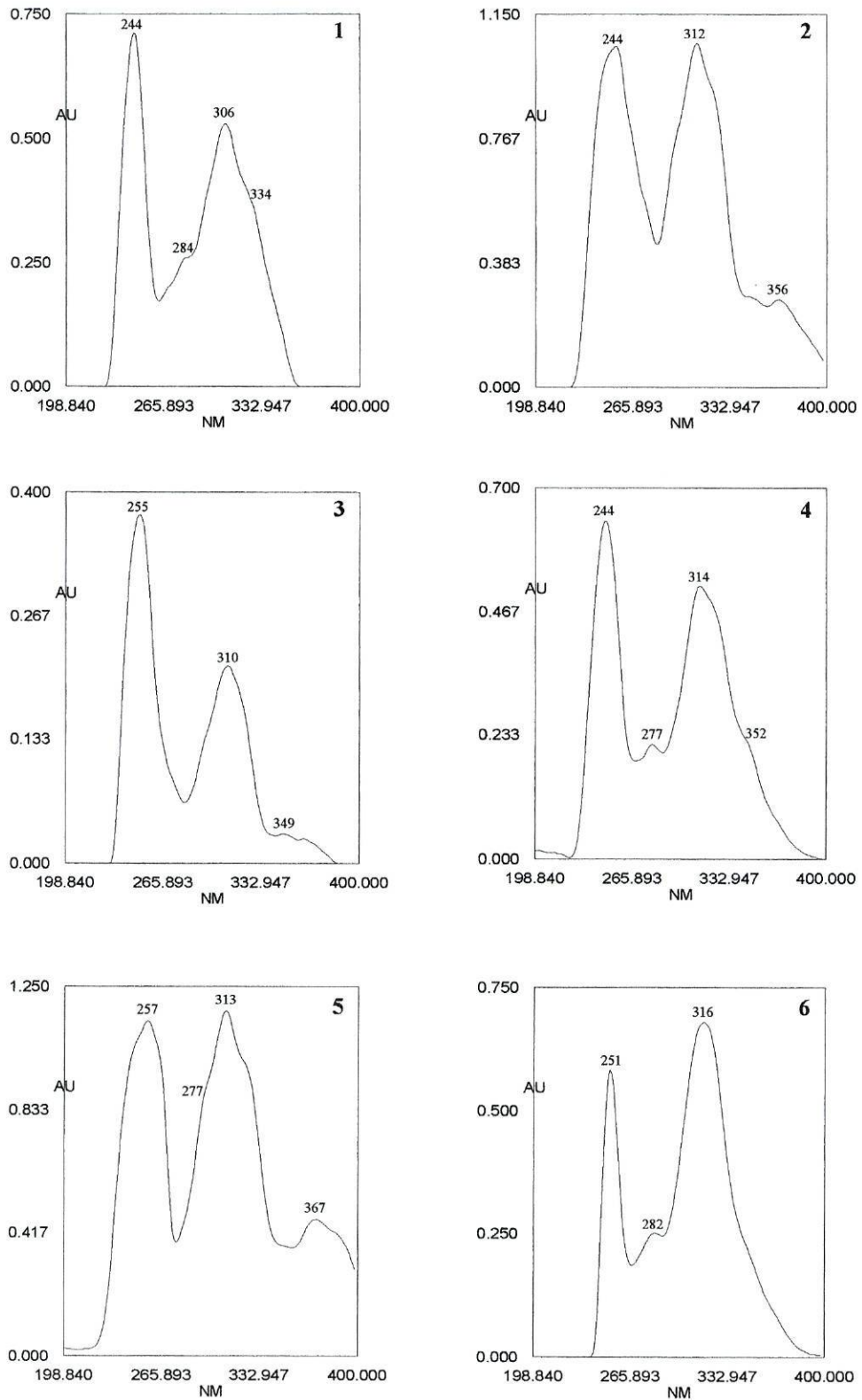
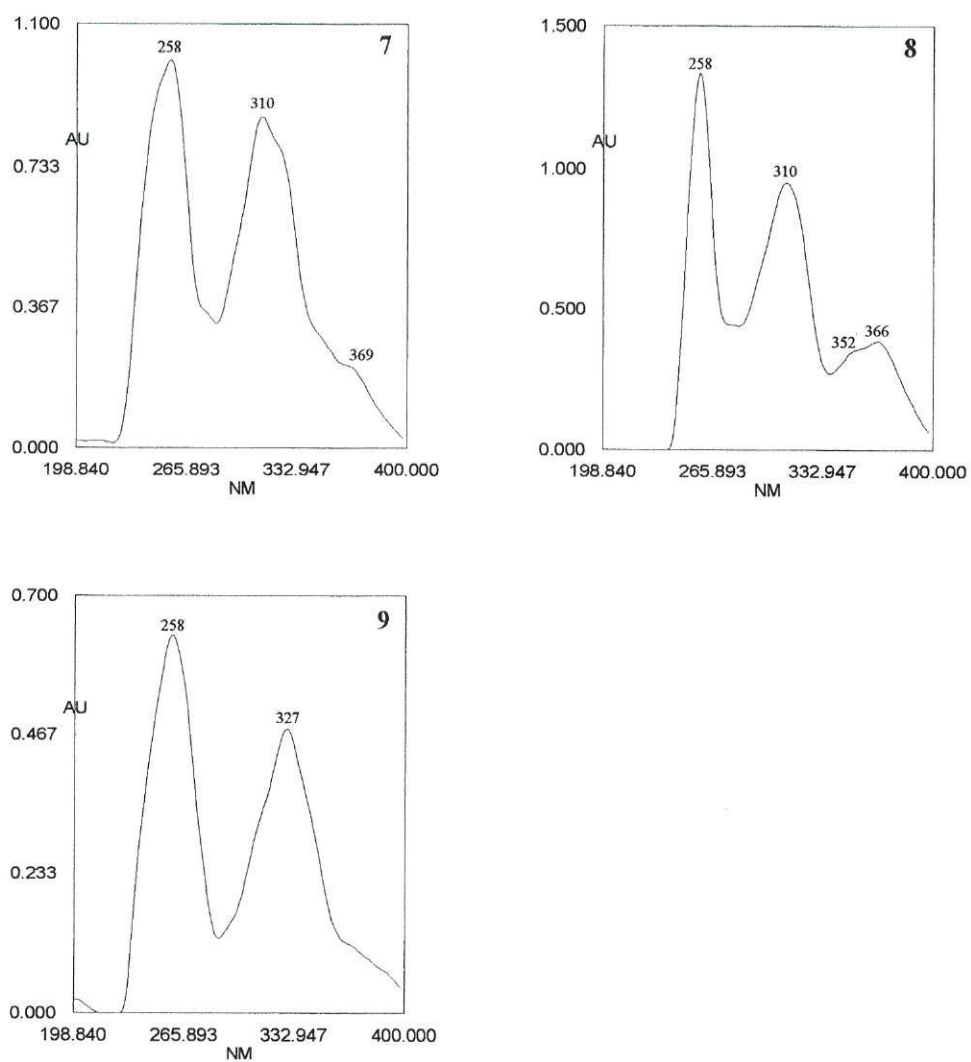


Figura 31 - Espectros no UV das xantonas caracterizadas no Fel-da-Terra, registados no detector de díodos.



**Figura 31** - Espectros no UV das xantonas caracterizadas no Fel-da-Terra, registados no detector de díodos (continuação).

Tabela 18 - Propriedades espectrais (UV) de algumas xantonas de Fel-da-Terra.

	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)			
	1	2	3	4
MeOH	244, 284, 306, 334 inf	244, 273 inf, 312, 356		244, 277, 314, 352 inf
MeOH+NaOH	238, 261, 282, 352	233, 254, 291, 354		240, 260, 282, 364
MeOH+NaOH+HCl	244, 284, 306, 334 inf	244, 273 inf, 313, 355		244, 278, 314, 352 inf
MeOH+NaOAc	230, 261, 282, 351	232, 261 inf, 290, 354		232, 262, 284, 364
MeOH+NaOAc+H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	233, 282, 308, 334 inf	234, 318, 360		234, 320, 348, 415 inf
MeOH+AlCl <sub>3</sub>	244, 284, 304, 334 inf	245, 264, 281, 340, 412		254, 267 inf, 285 inf, 342, 389
MeOH+AlCl <sub>3</sub> +HCl	244, 283, 305, 334 inf	245, 265, 218, 338, 412		253, 267 inf, 285 inf, 340, 387

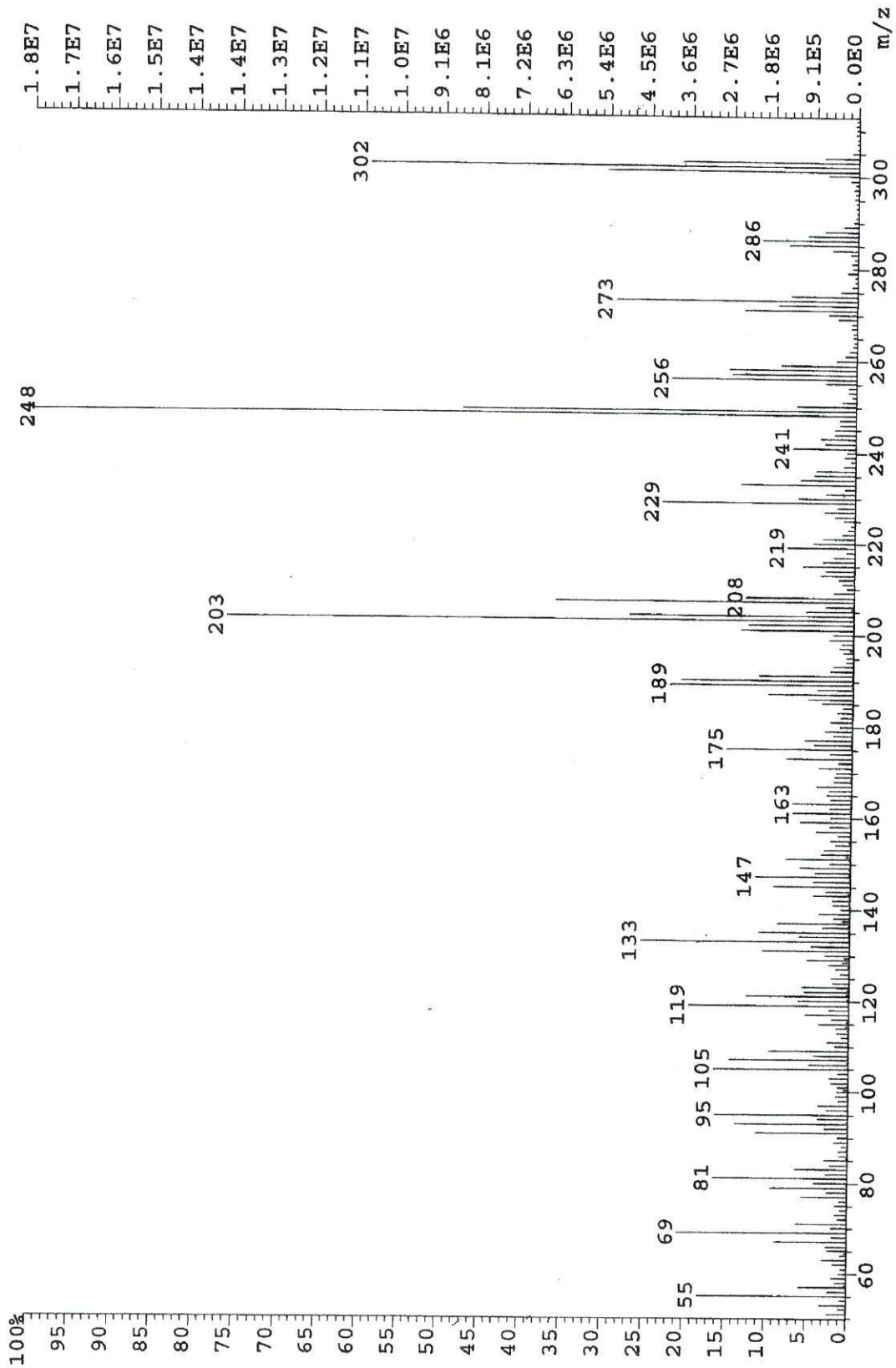


Figura 32 - Espectro de massa do composto 1.

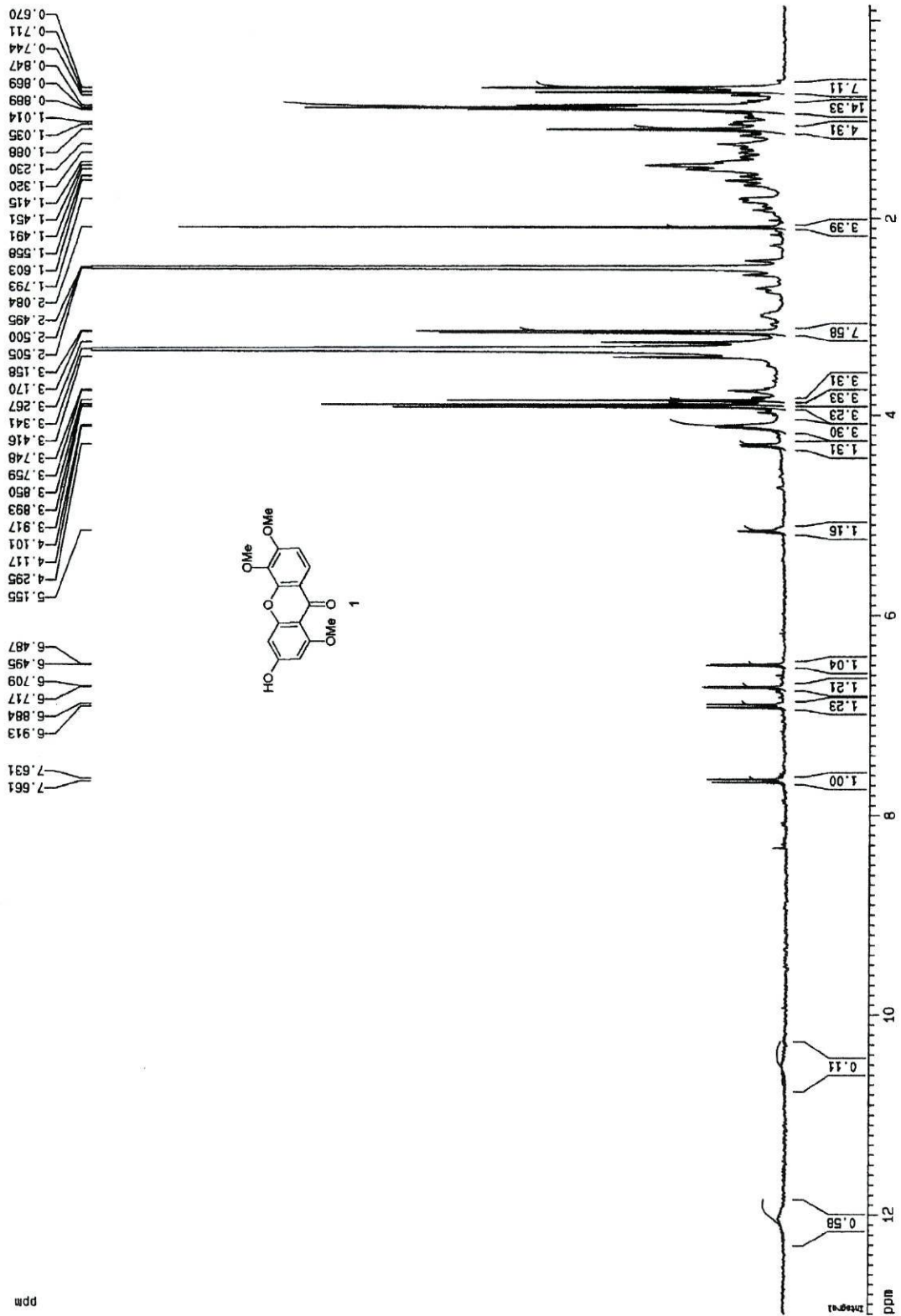


Figura 33 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto 1.

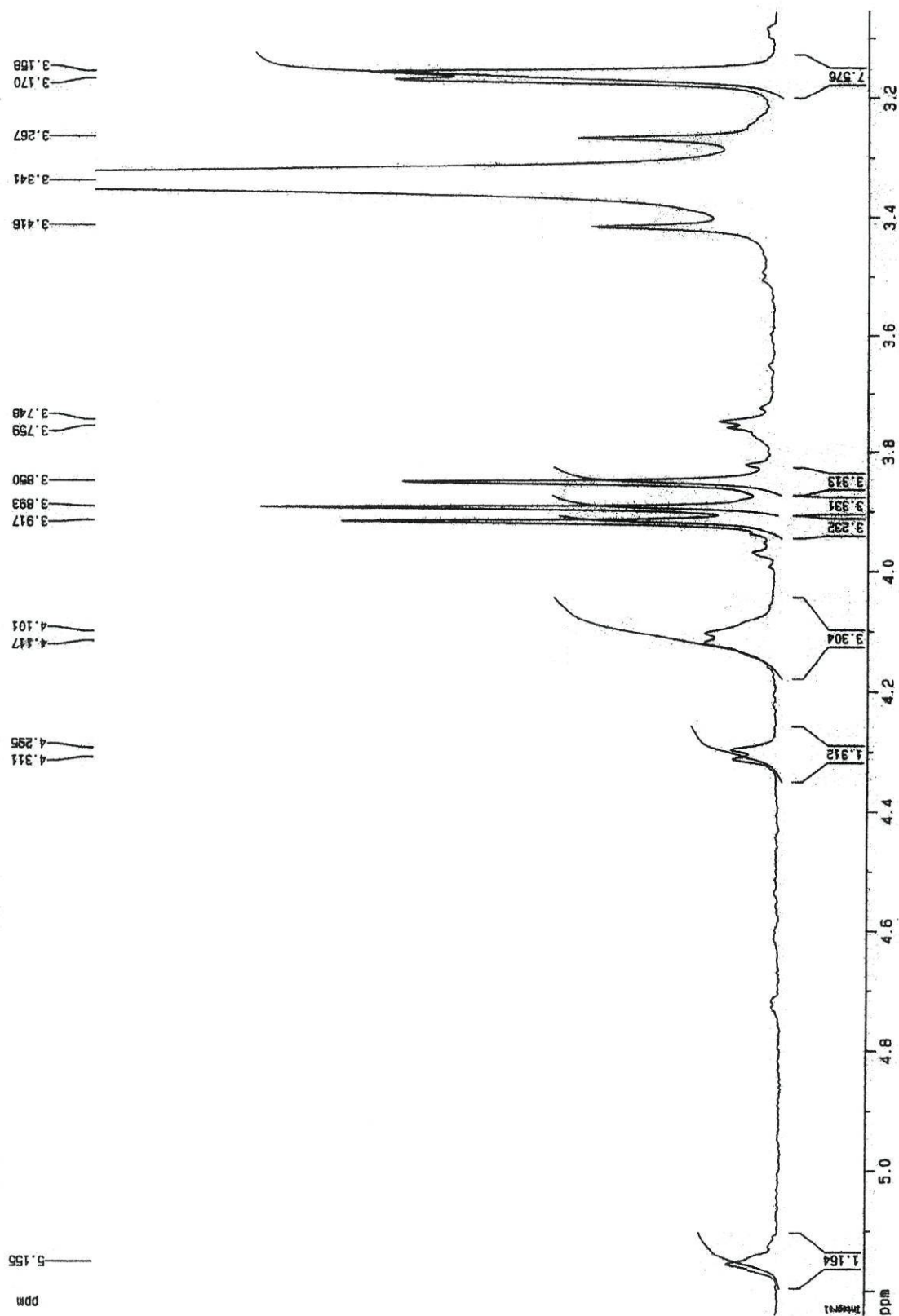


Figura 34 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 1 (expansão).



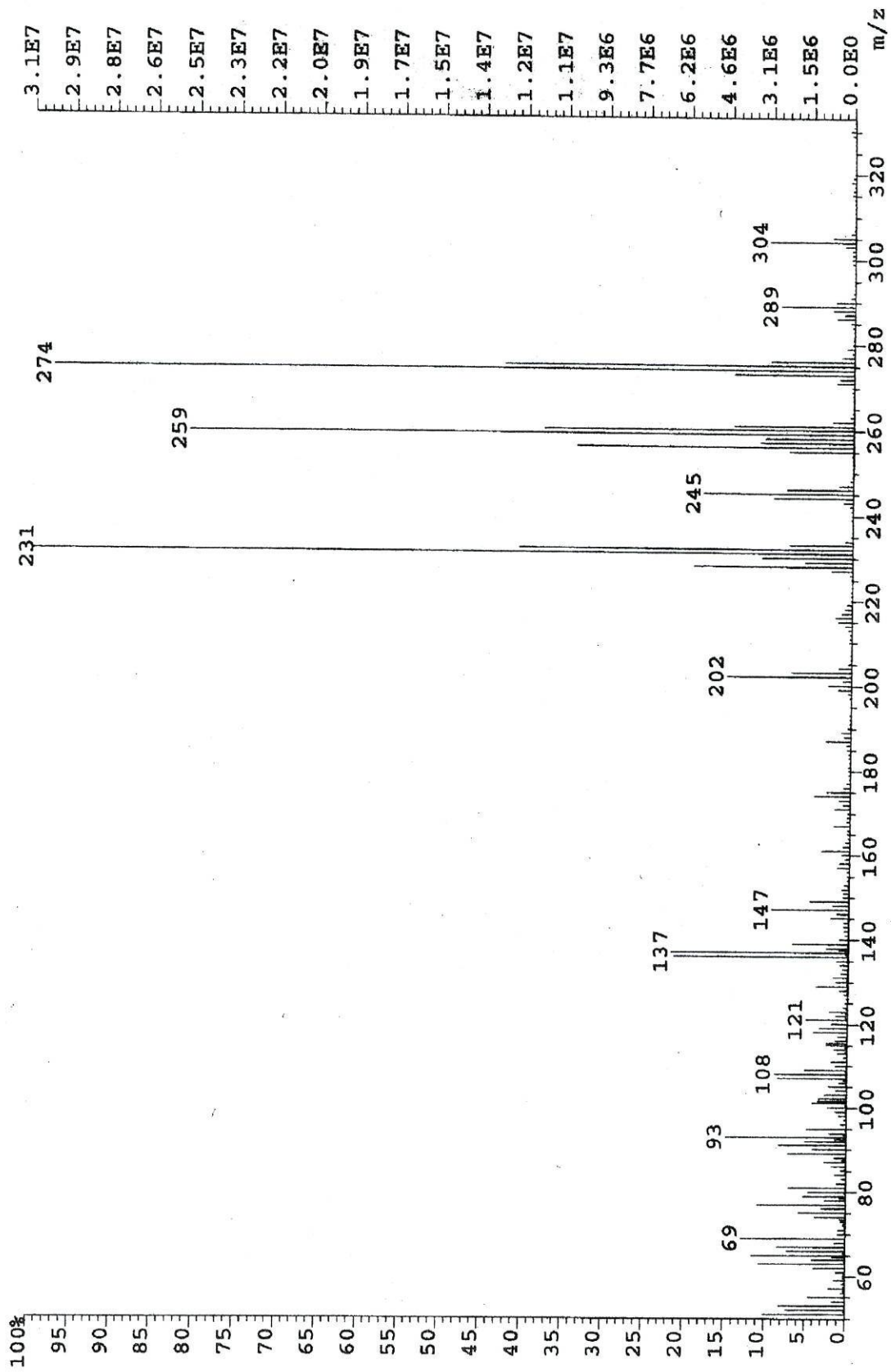


Figura 35 - Espectro de massa do composto 2.

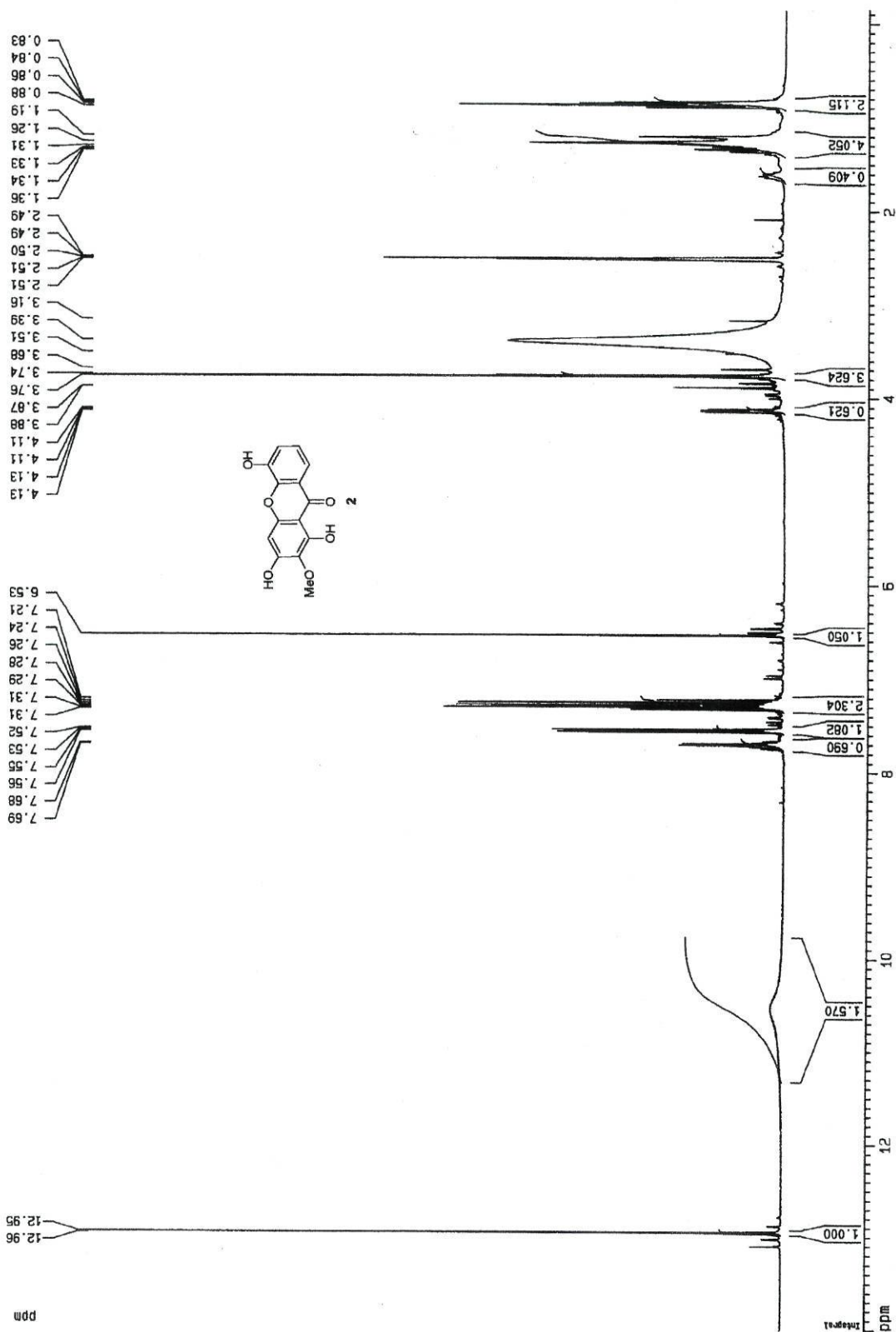


Figura 36 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto 2.

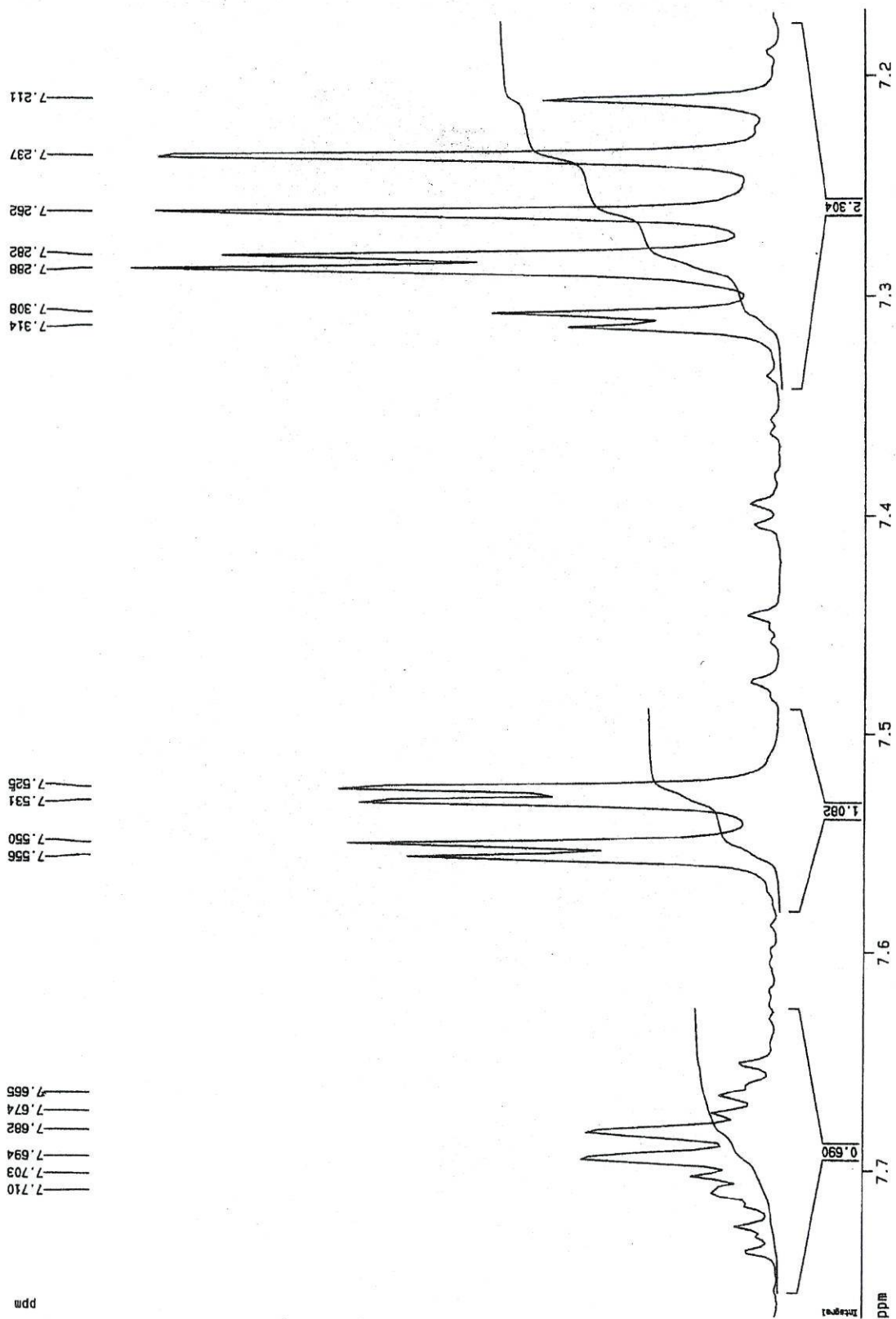


Figura 37 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 2 (expansão).

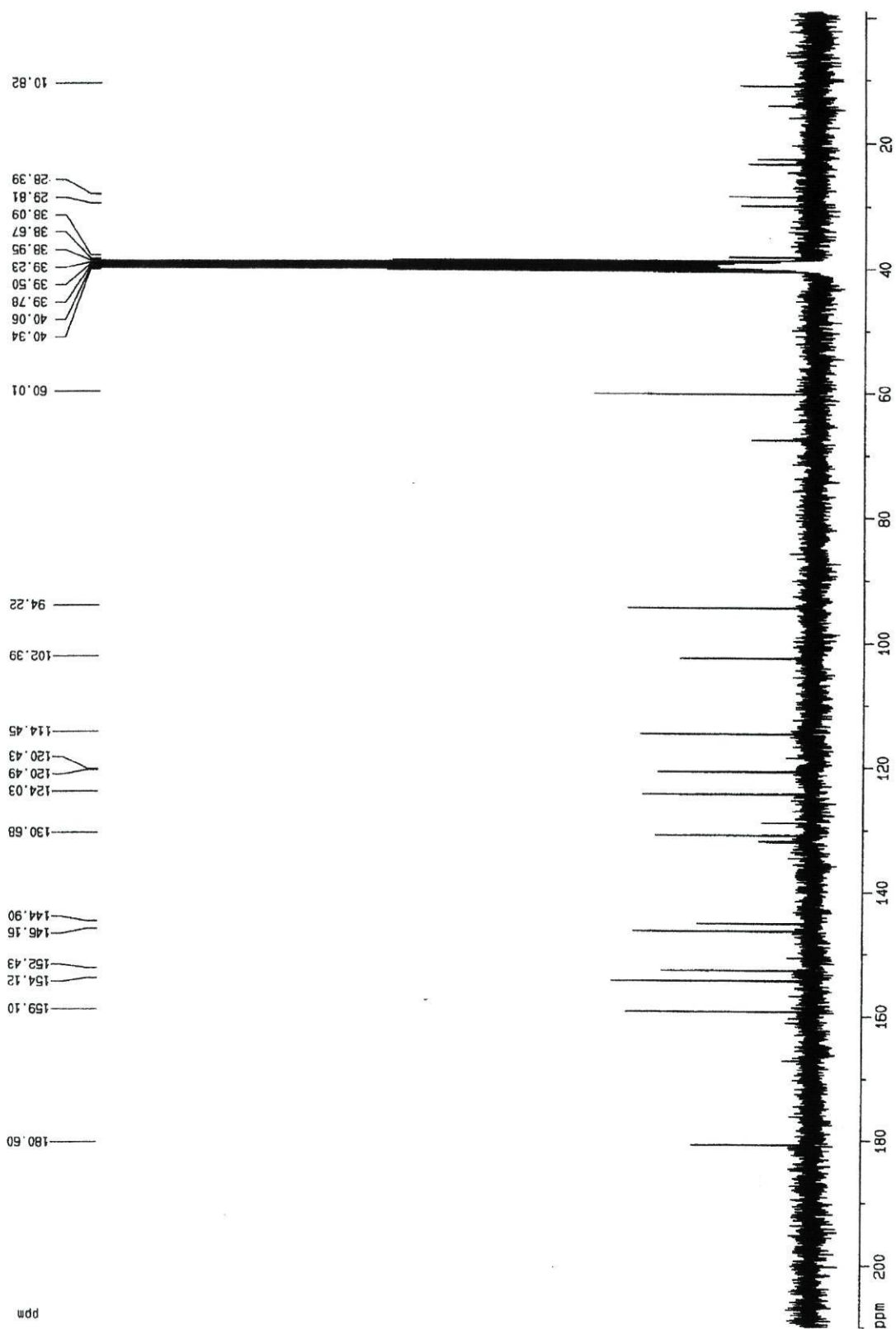


Figura 38 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto 2.

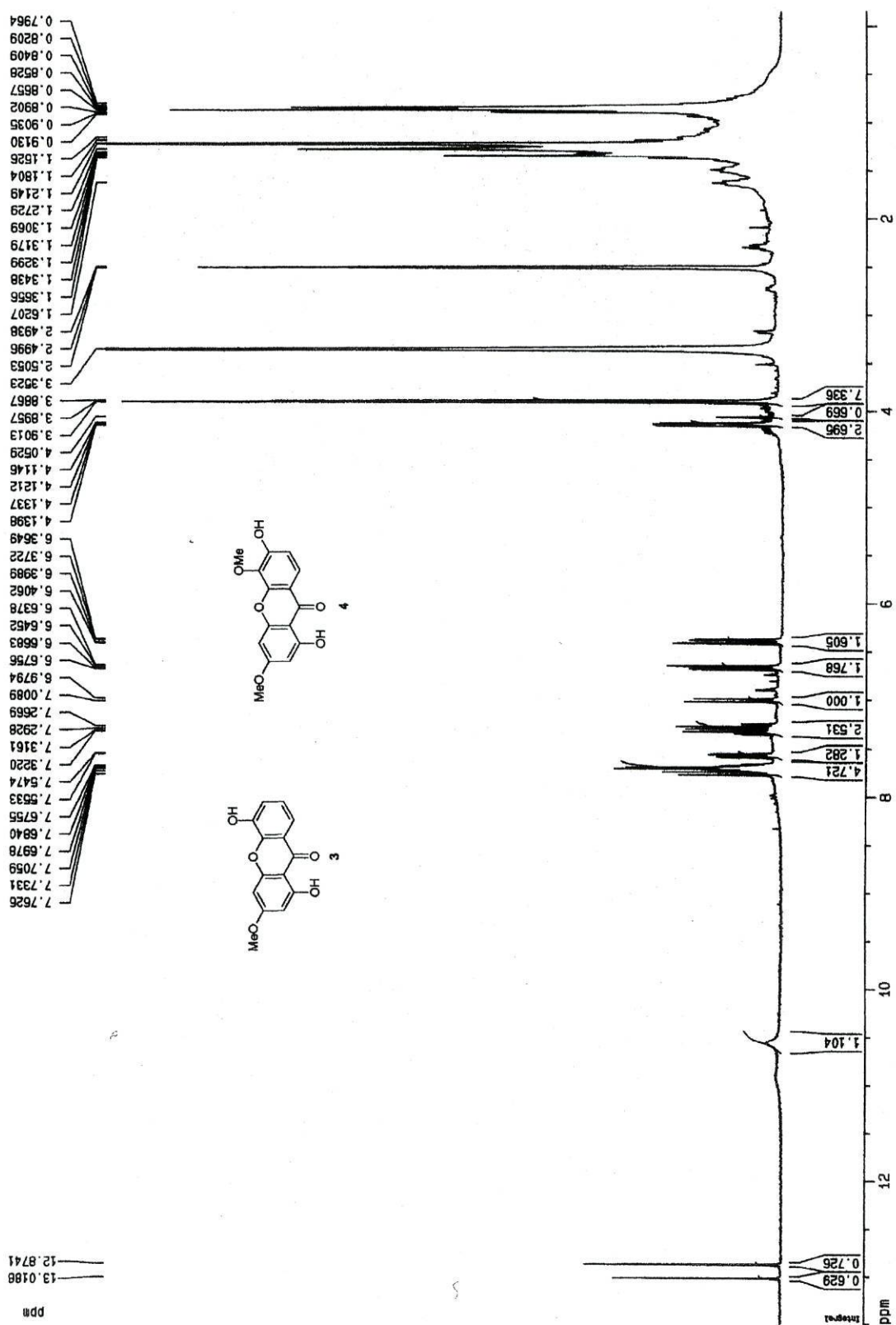


Figura 39 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H dos compostos 3 + 4.

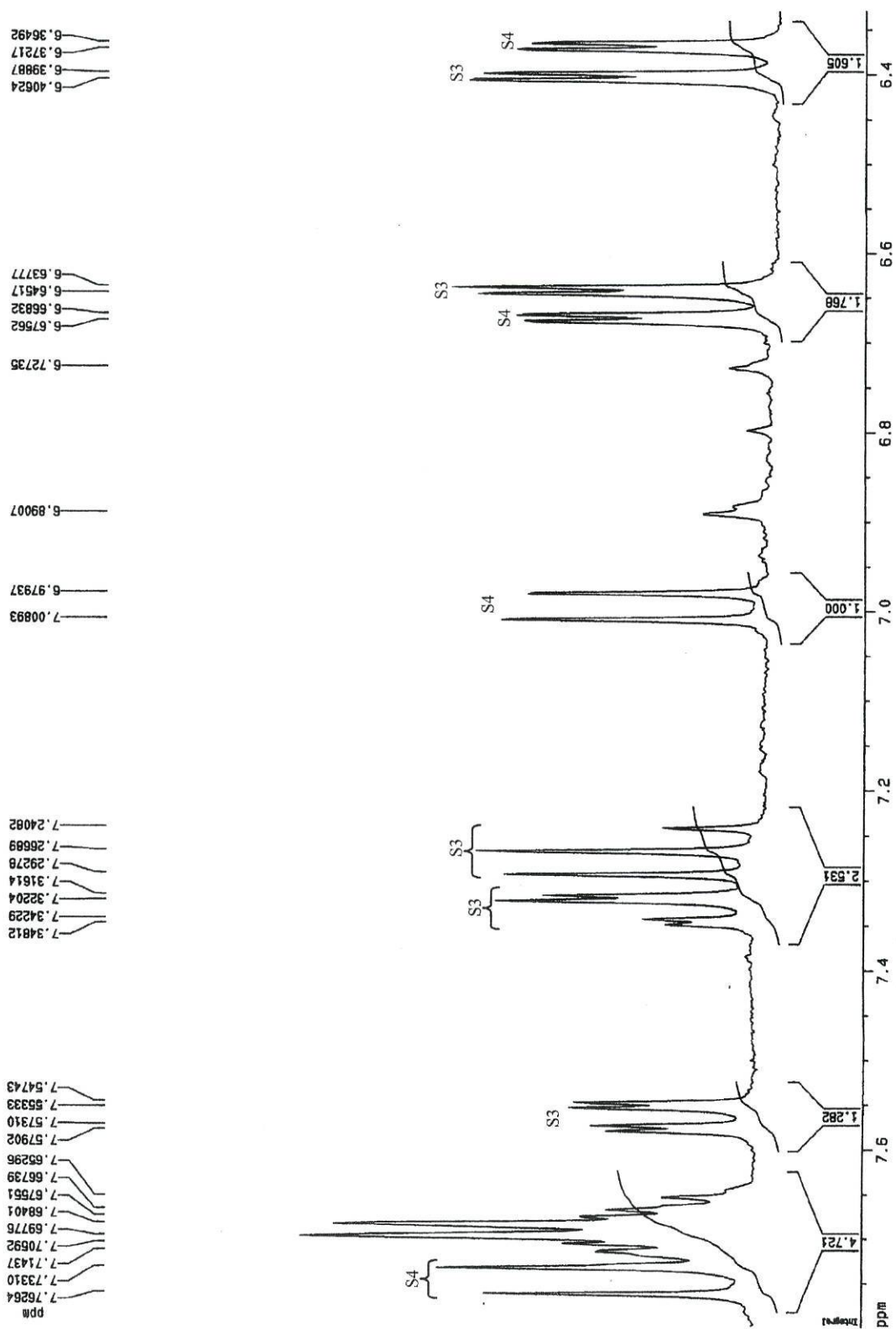


Figura 40 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H dos compostos 3 (S3) + 4 (S4) (expansão).

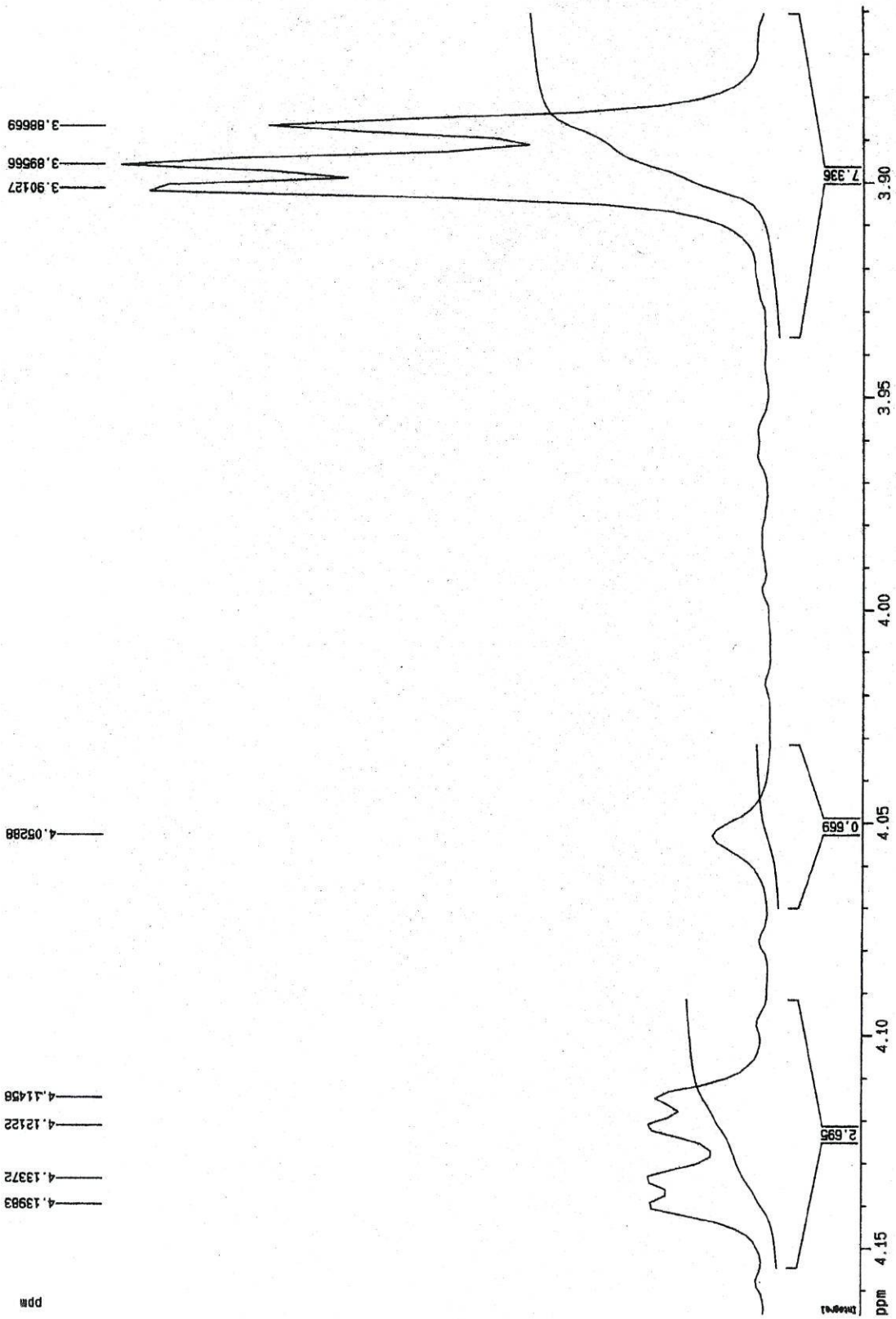


Figura 41 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  dos compostos 3 + 4 (expansão).

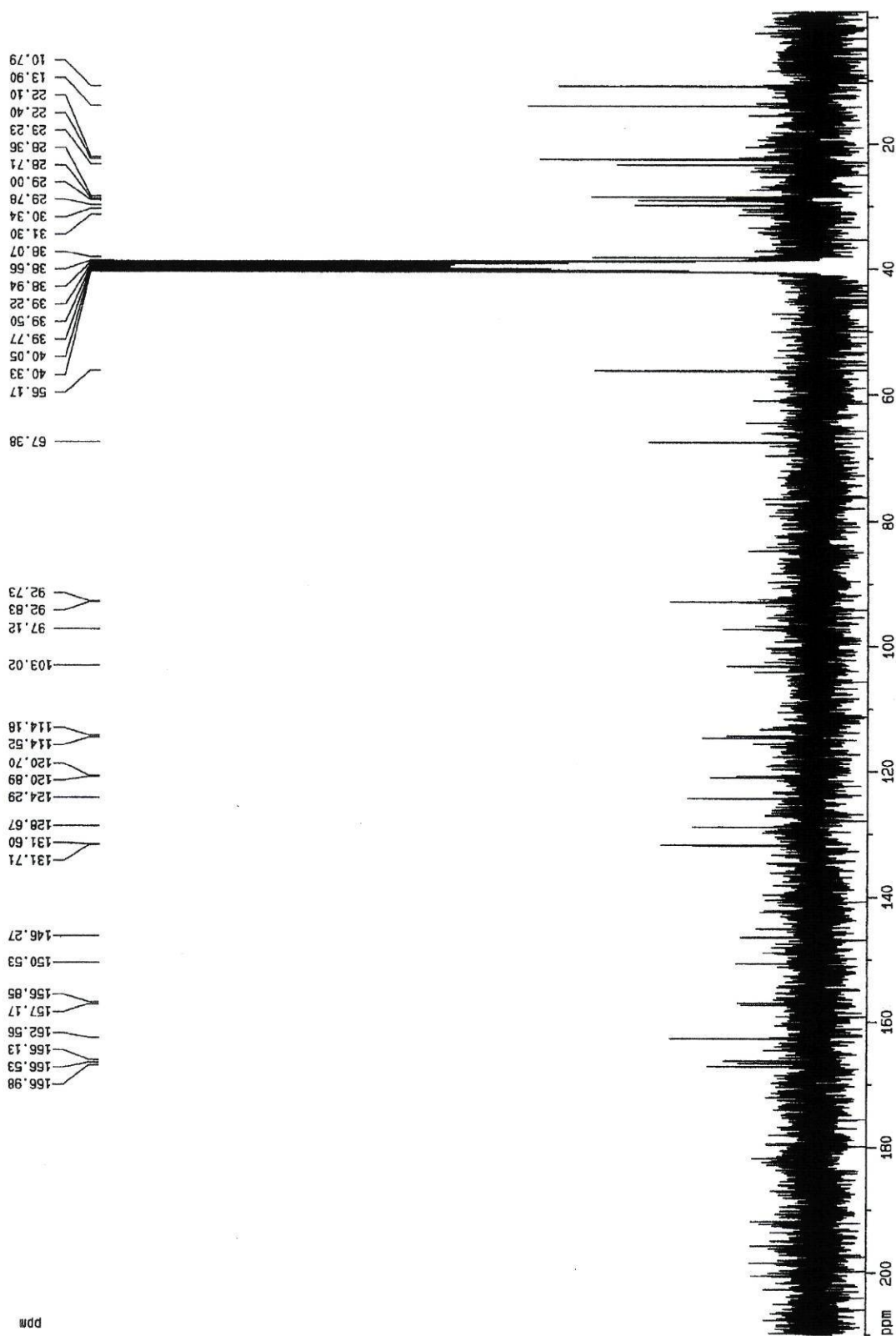


Figura 42 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  dos compostos 3 + 4.



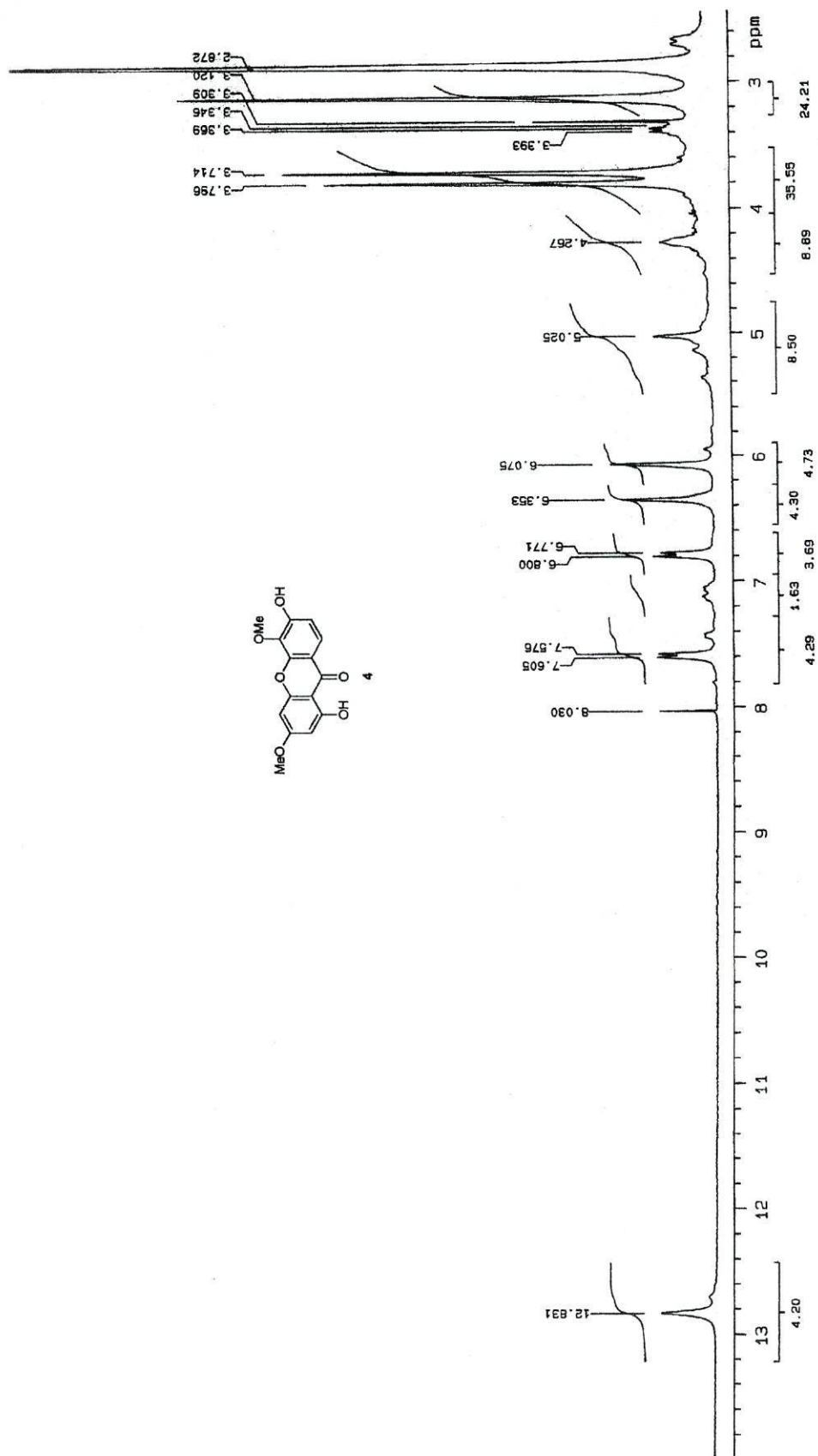


Figura 43 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 4.

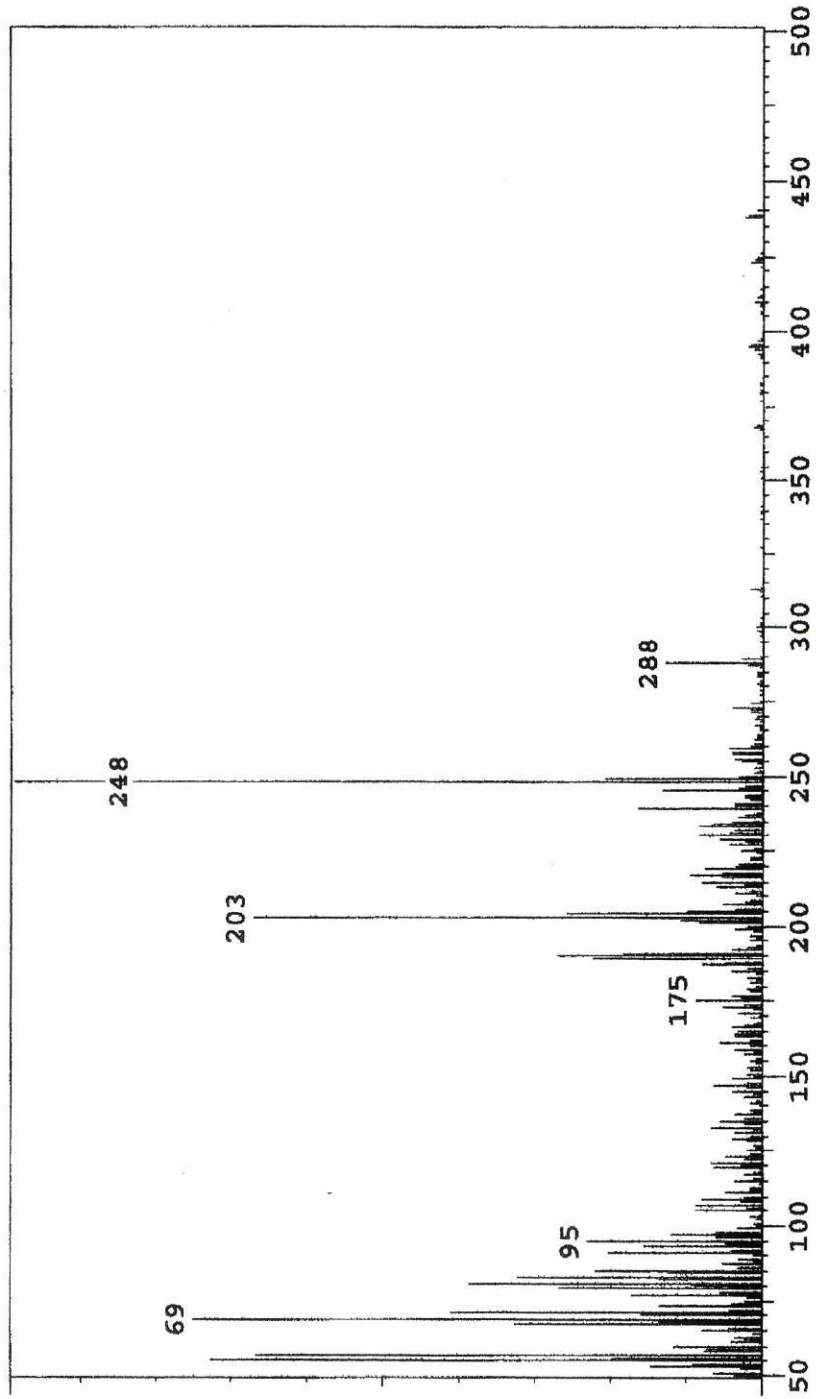


Figura 44 - Espectro de massa do composto 4.

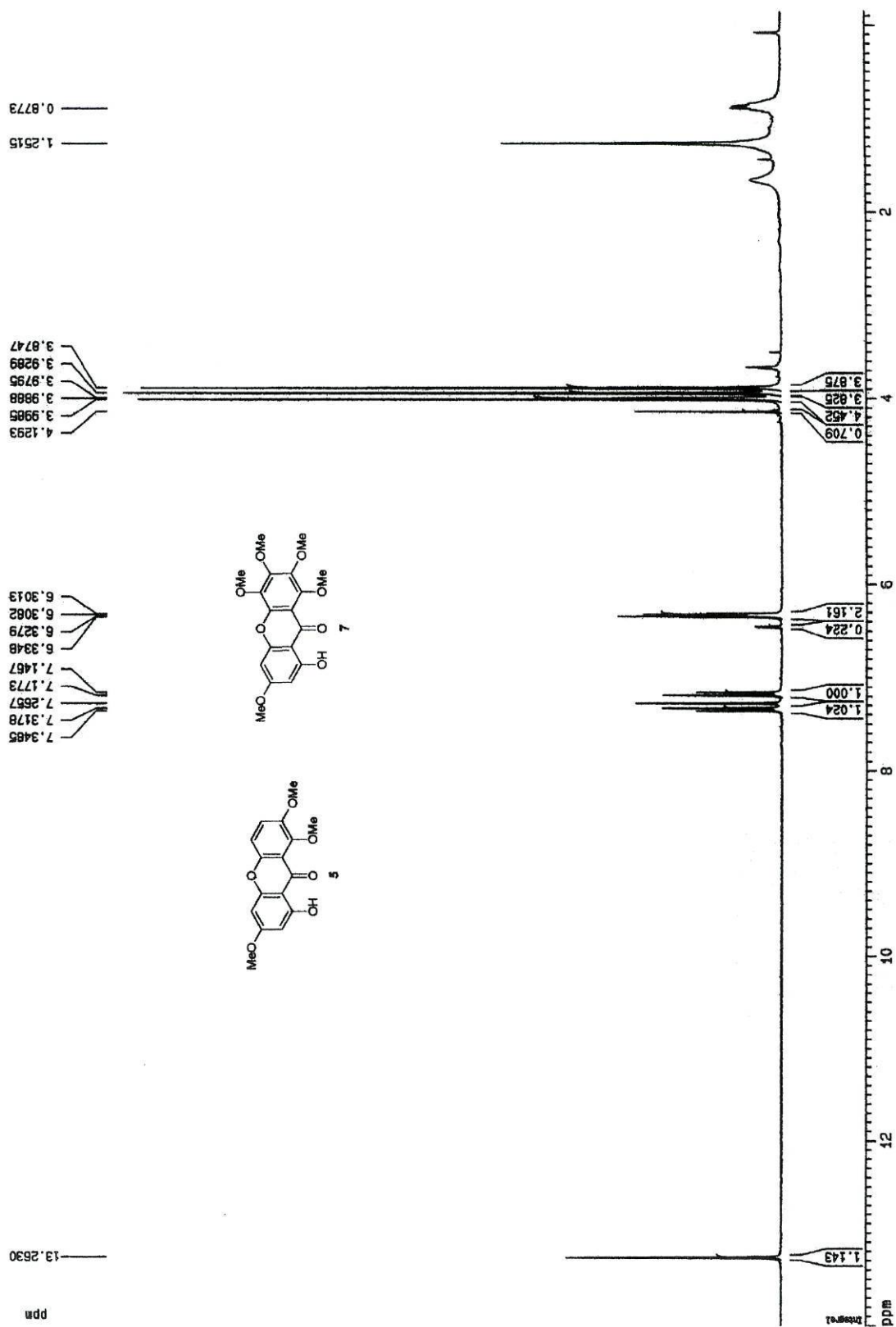


Figura 45 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  dos compostos 5 + 7.

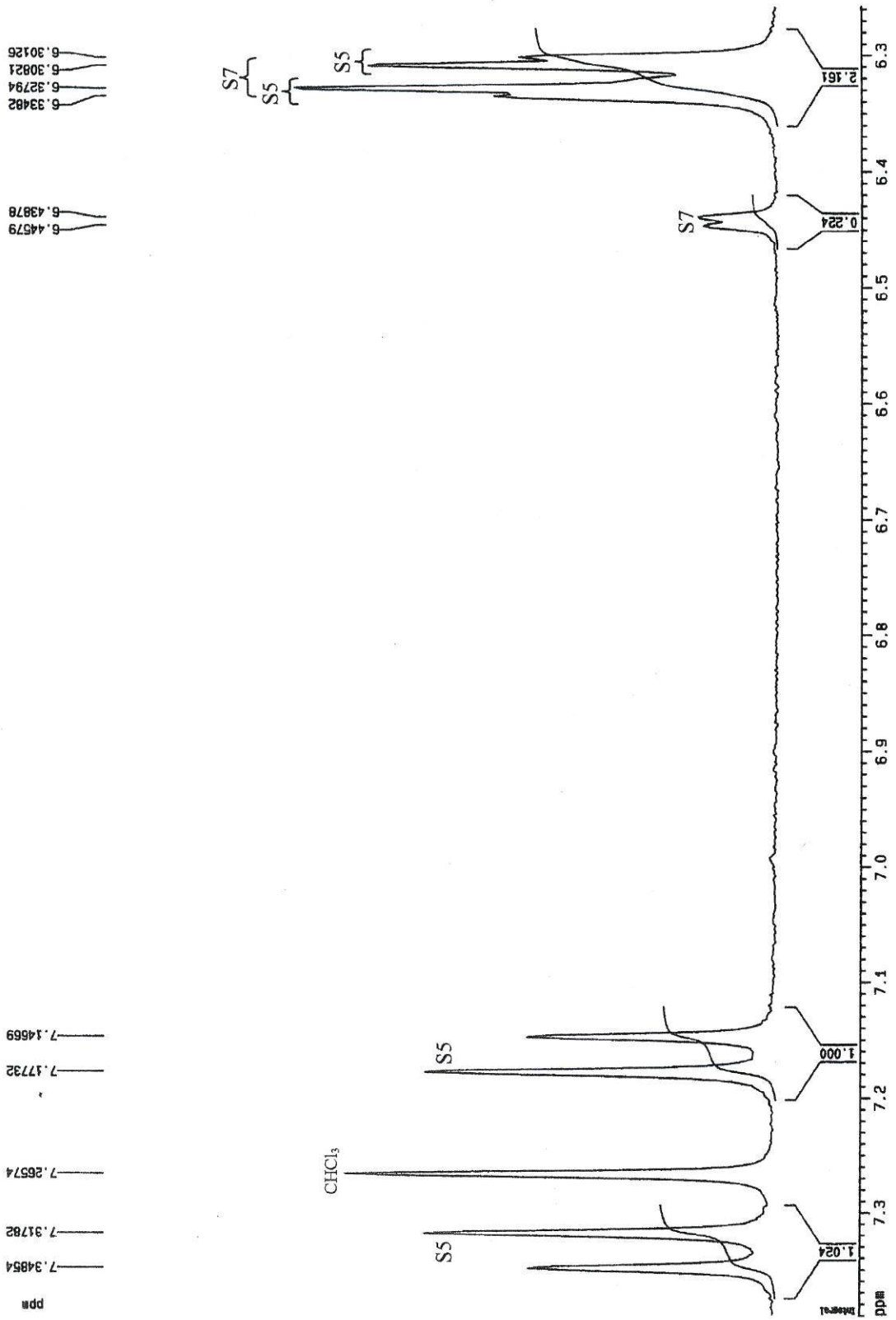


Figura 46 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H dos compostos 5 (S5)+ 7 (S7) (expansão).

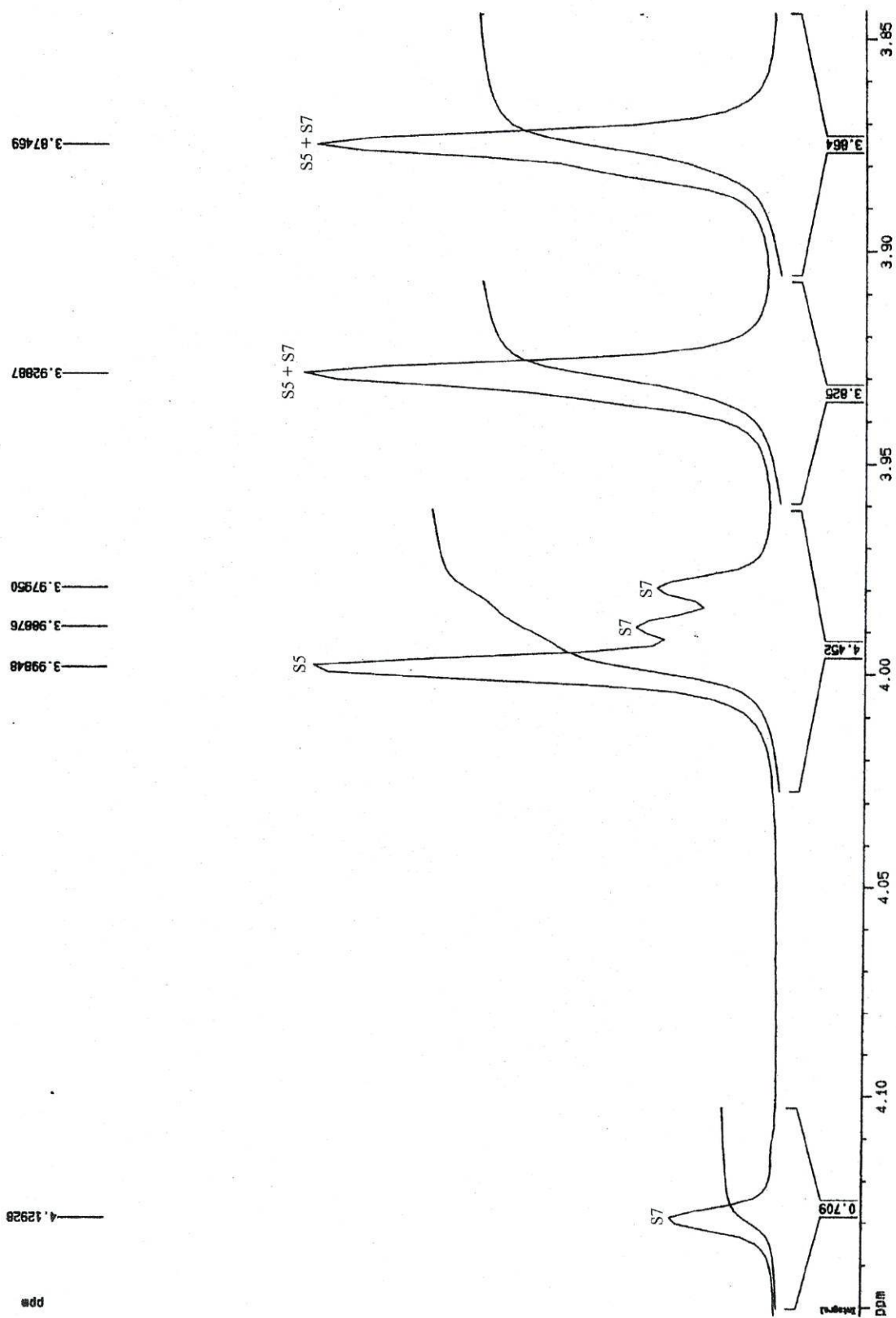


Figura 47 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  dos compostos 5 (S5) + 7 (S7) (expansão).

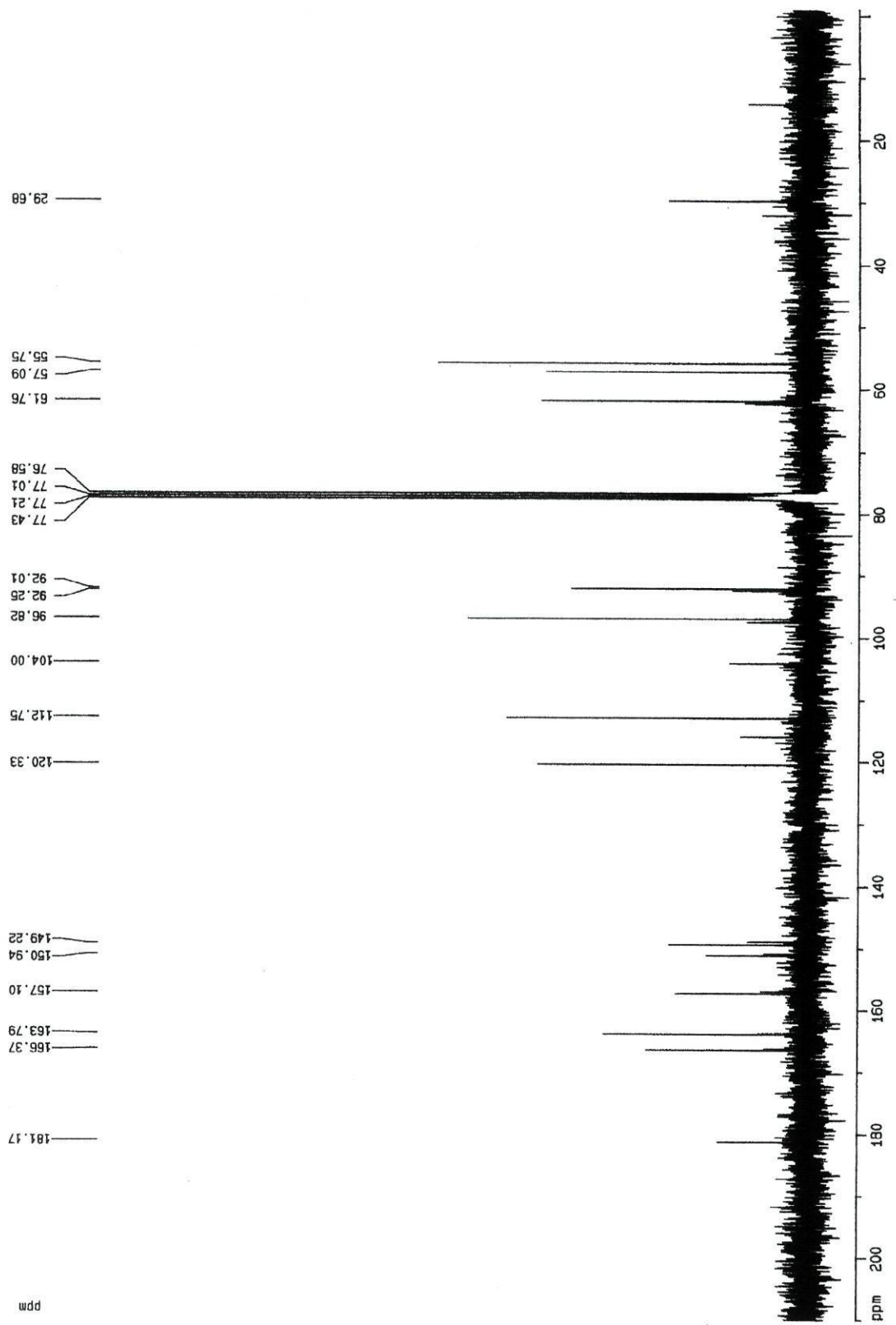


Figura 48 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  dos compostos 5 + 7.

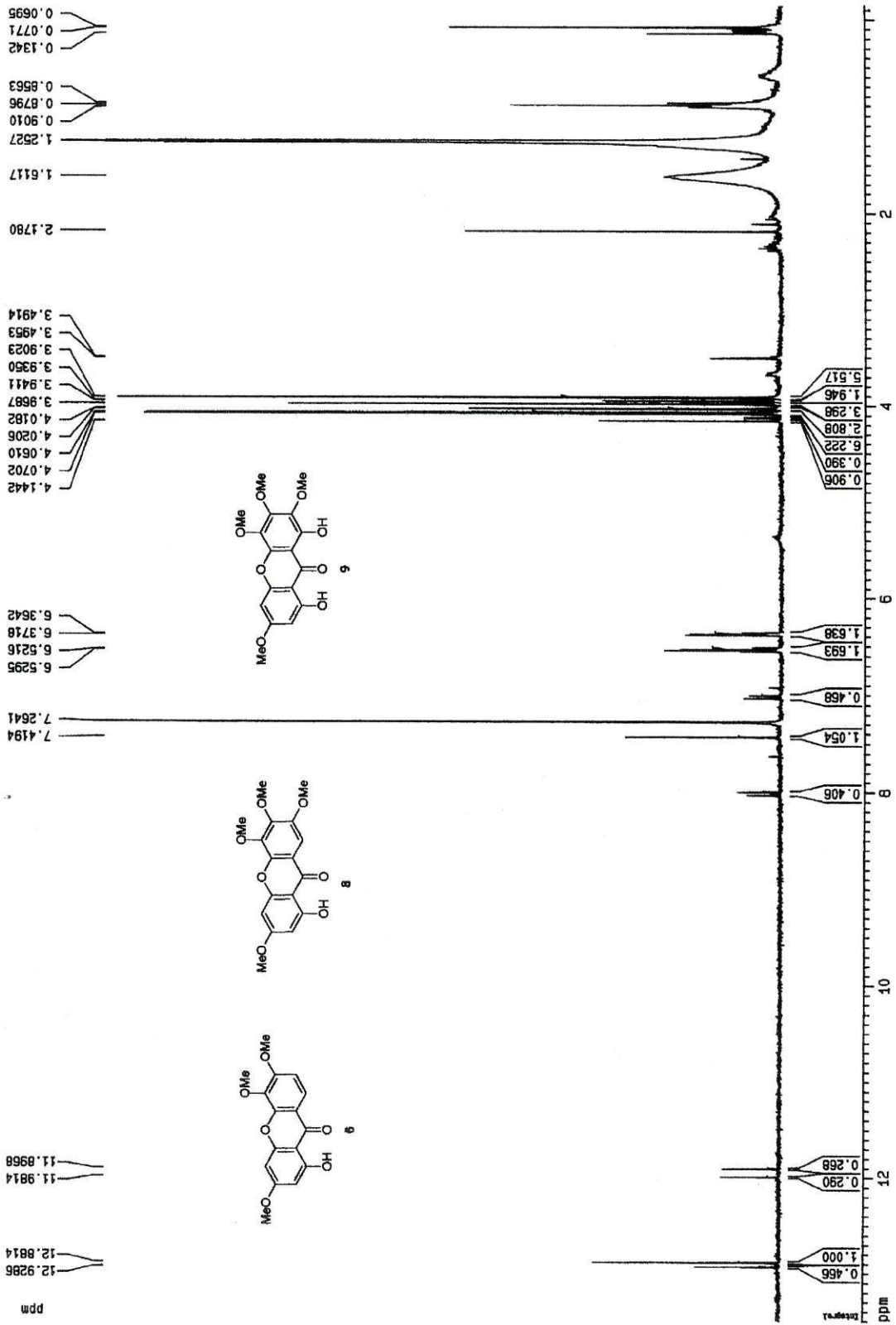


Figura 49 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  dos compostos 6 + 8 + 9.

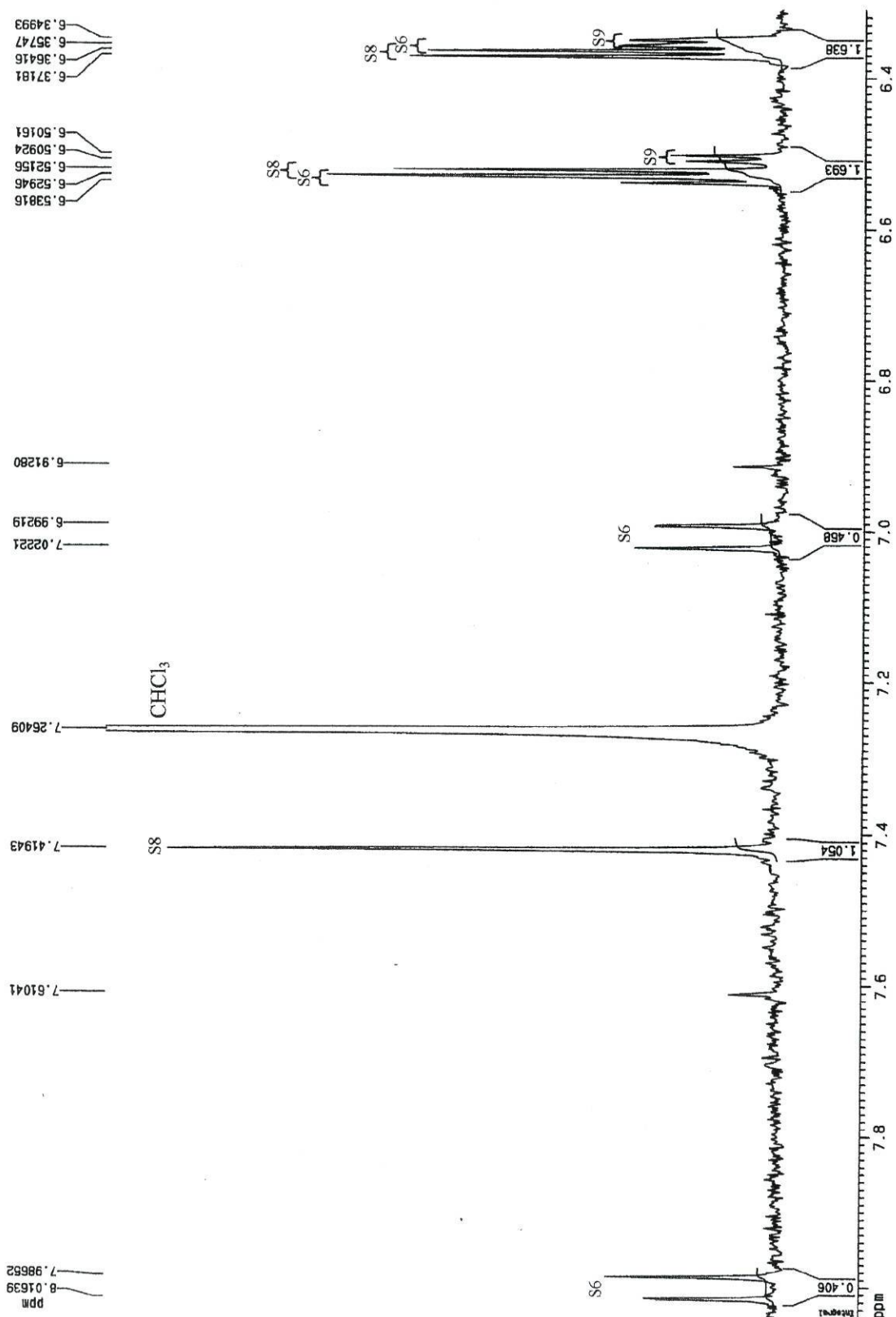


Figura 50 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H dos compostos 6 (S6) + 8 (S8) + 9 (S9) (expansão).



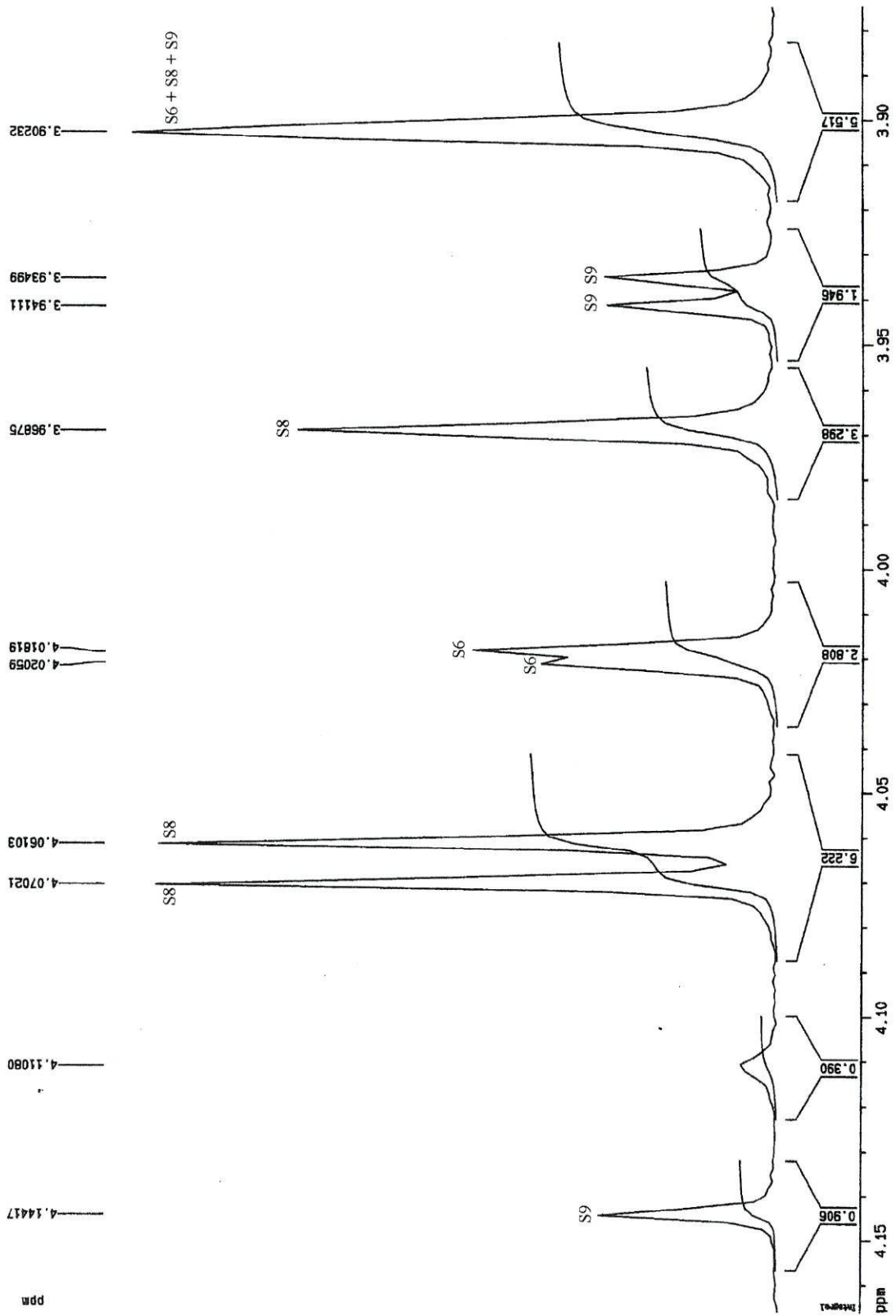


Figura 51 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  dos compostos 6 (S6) + 8 (S8) + 9 (S9) (expansão).

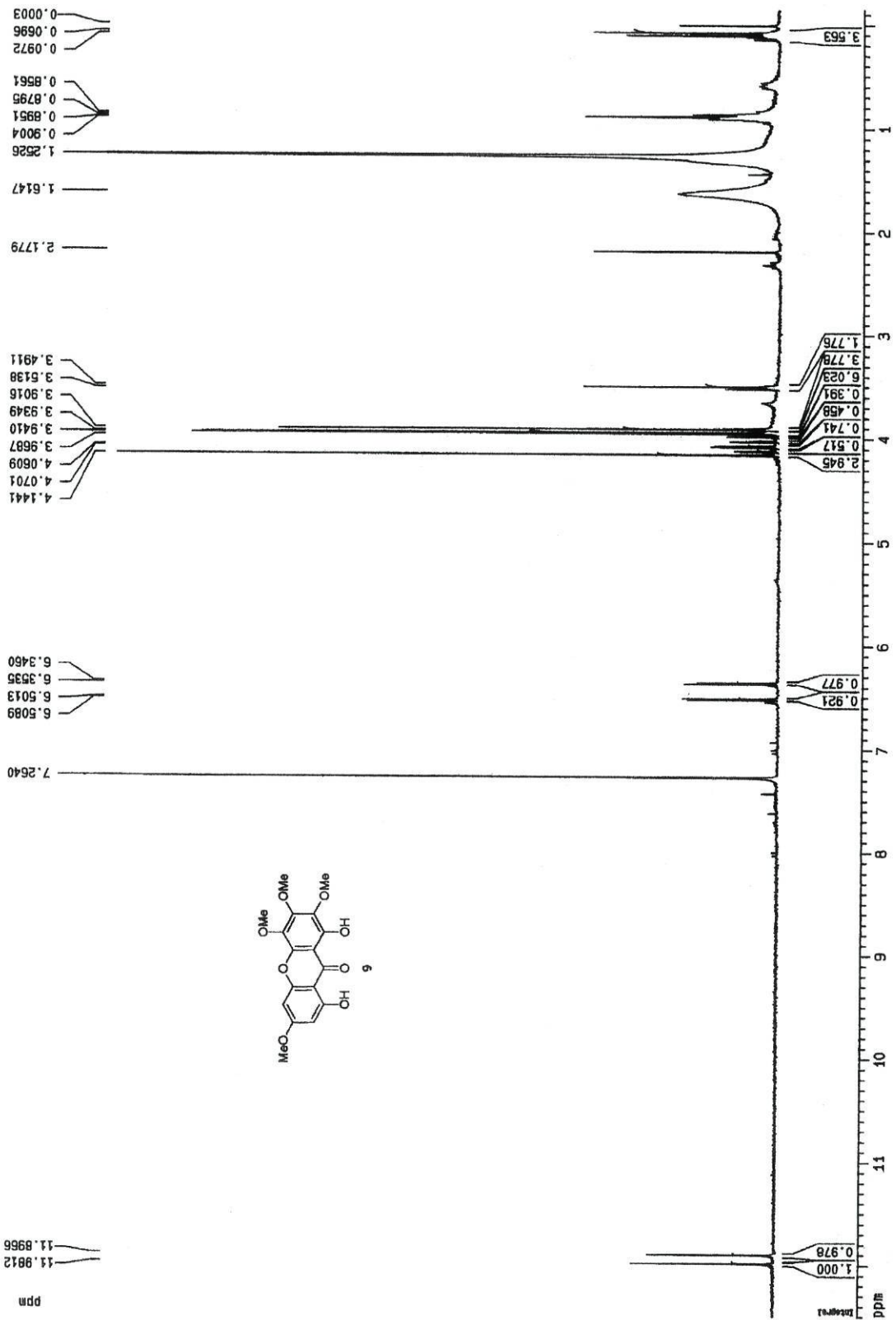
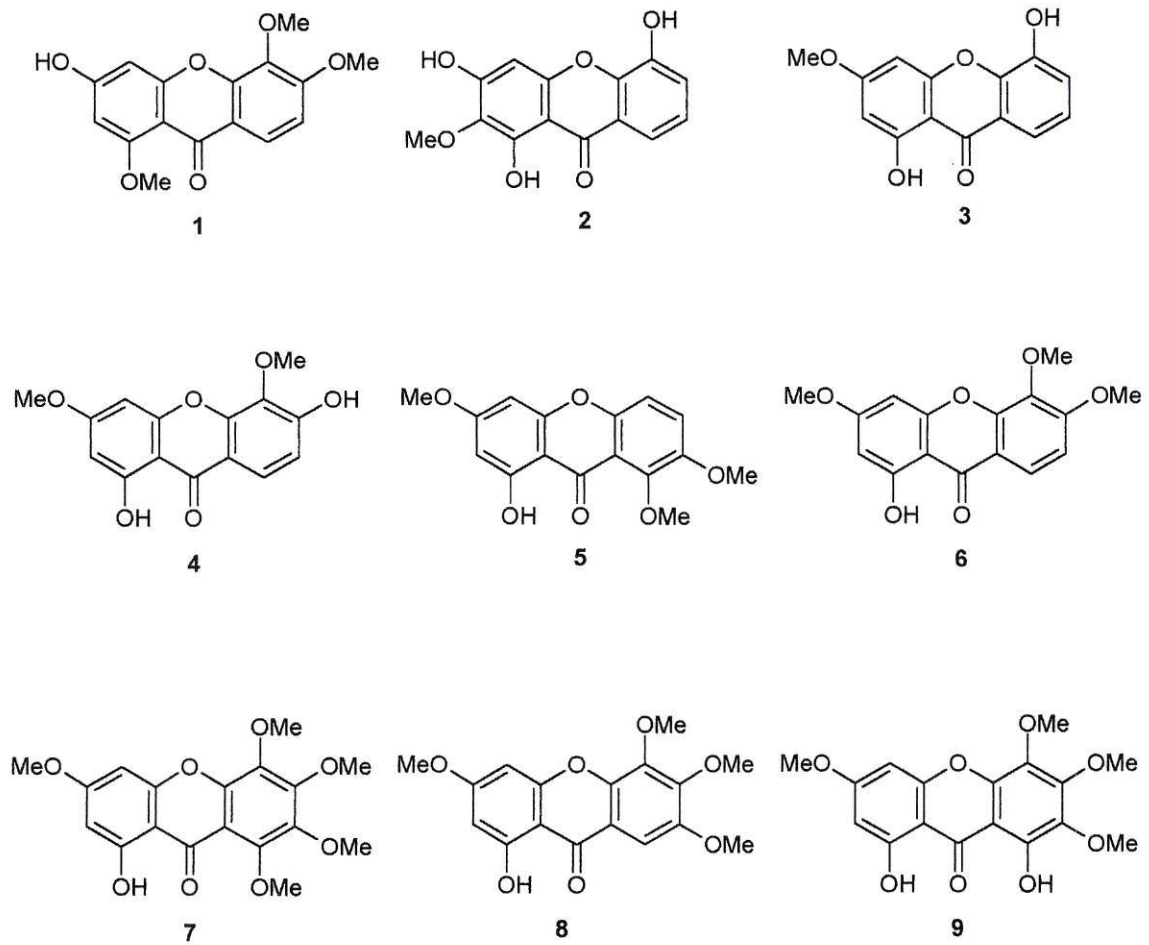


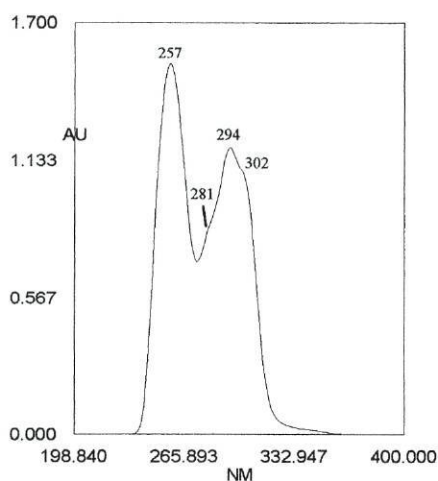
Figura 52 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto 9.



**Figura 53** - Estrutura química das xantonas isoladas de Fel-da-Terra. (1) 3-hidroxi-1,5,6-trimetoxixantona; (2) 1,3,5-tri-hidroxi-2-metoxixantona; (3) 1,5-di-hidroxi-3-metoxixantona; (4) 1,6-di-hidroxi-3,5-dimetoxixantona; (5) 1-hidroxi-3,7,8-trimetoxixantona; (6) 1-hidroxi-3,5,6-trimetoxixantona; (7) 1-hidroxi-3,5,6,7,8-pentametoxixantona; (8) 1-hidroxi-3,5,6,7-tetrametoxixantona; (9) 1,8-di-hidroxi-3,5,6,7-tetrametoxixantona.

*Caracterização do composto a*

O espectro de UV do composto **a** exibiu dois máximos de absorção a 257 e 294 nm (**Figura 54**), indicando a existência de um composto aromático. A adição de NaOMe não induziu qualquer alteração no espectro, o que significa a inexistência de grupos fenólicos.



**Figura 54** - Espectro no UV do composto **a** isolado do Fel-da-Terra, registrado no detector de díodos.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 56**) era possível observar dois sinais correspondendo, cada um, a dois prótons vicinais na região alifática ( $\delta$  3,59 e 4,57), um sistema de três prótons aromáticos acoplados entre si ( $\delta$  7,64, 8,06 e 8,40) e um próton de um grupo aldeído ( $\delta$  10,22). O sinal registrado a  $\delta$  3,59 sugeria que este grupo metilénico estaria ligado a um anel aromático, enquanto o sinal a  $\delta$  4,57, sugeria que o outro grupo metilénico estava ligado a um oxigénio.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , reproduzido na **Figura 57**, apresentava sinais para dois carbonilos, correspondentes a um grupo éster ( $\delta$  164,2) e a um grupo aldeído ( $\delta$  191,9). No espectro  $^{13}\text{C}$  DEPT-135 (**Figura 58**) foi possível detectar sinais para três carbonos quaternários ( $\delta$  127,0, 132,6 e 141,1), dois grupos metilénicos ( $\delta$  24,6 e 66,7) e três grupos metínicos ( $\delta$  127,9, 135,7 e 138,5). Estes resultados estariam de acordo com a estrutura de uma cumarina; contudo, os valores de desvio químico encontrados para os carbonilos indicavam que ambos estariam ligados a um anel aromático. O composto em questão seria, então, uma isocumarina, concretamente uma di-hidro-

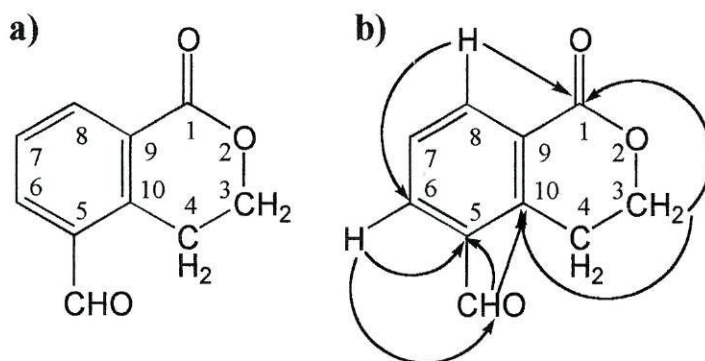
isocumarina, uma vez que no anel lactônico temos dois grupos metilénicos e não dois grupos metínicos.

Faltaria definir a posição do grupo aldeído na molécula, que só poderia ocupar a posição 5 ou 8, uma vez que havia no anel aromático três prótons vicinais.

A distribuição dos valores de desvio químico obtidos, pelos prótons e carbonos, e a elucidação estrutural da molécula foi esclarecida pelas correlações encontradas nos espectros HETCOR e HMBC (Figuras 59 a 61). A Tabela 19 resume as correlações observadas no espectro de HMBC e as mais importantes estão representadas na Figura 55.

**Tabela 19** - Correlações encontradas no espectro HMBC do composto a.

Prótons	Carbonos correlacionados
5-CHO	C-10 e C-5
H-8	C-10, C-6 e C-1
H-7	C-9 e C-5
H-6	5-CHO, C-10 e C-8
4-CH <sub>2</sub>	C-10, C-9, C-5 e C-3
3-CH <sub>2</sub>	C-10, C-4 e C-1



**Figura 55** - Estrutura química da 5-formil-2,3-di-hidro-isocumarina (a) e principais correlações observadas no espectro HMBC (b).

Os sinais encontrados no espectro de RMN de <sup>1</sup>H foram distribuídos do seguinte modo:

- $\delta$  4,57 (2H), tripleto,  $J=6,1$  Hz, atribuído a dois prótons em 3;
- $\delta$  3,59 (2H), tripleto,  $J=6,1$  Hz, atribuído a dois prótons em 4;
- $\delta$  8,06 (1H), dupletto de dupletos,  $J=7,7$  e  $1,4$  Hz, atribuído ao próton em 6;
- $\delta$  7,64 (1H), dupletto de dupletos,  $J=7,9$  e  $7,7$  Hz, atribuído ao próton em 7;

- $\delta$  8,40 (1H), duplete de dupletos,  $J=7,9$  e  $1,4$  Hz, atribuído ao próton em 8;
- $\delta$  10,22 (1H), singuleto, atribuído ao próton do CHO em 5.

Os sinais encontrados no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram distribuídos da forma que se segue:  $\delta$  164,2 (carbono 1), 66,7 (carbono 3), 24,6 (carbono 4), 132,6 (carbono 5), 138,5 (carbono 6), 127,9 (carbono 7), 135,7 (carbono 8), 127,0 (carbono 9), 141,1 (carbono 10), 191,9 (CHO no carbono 5).

O espectro de massa do composto **a** apresentava o ião molecular  $M^+$  a  $m/e$  176 (**Figura 62**); quebras de massa correspondentes à perda de CO e de  $\text{HCO}^\bullet$  confirmam a presença do grupo formilo e o esqueleto de uma 2,3-di-hidro-isocumarina.

Da informação recolhida podemos concluir que o composto **a** é a **5-formil-2,3-di-hidro-isocumarina** ou **erythrocentaurina** (**Figura 55**). Este composto já tinha sido descrito no Fel-da-Terra (Ghosal *et al.*, 1974) e os resultados estão de acordo com os publicados anteriormente (Ghosal *et al.*, 1974; El-Sedawy *et al.*, 1989).

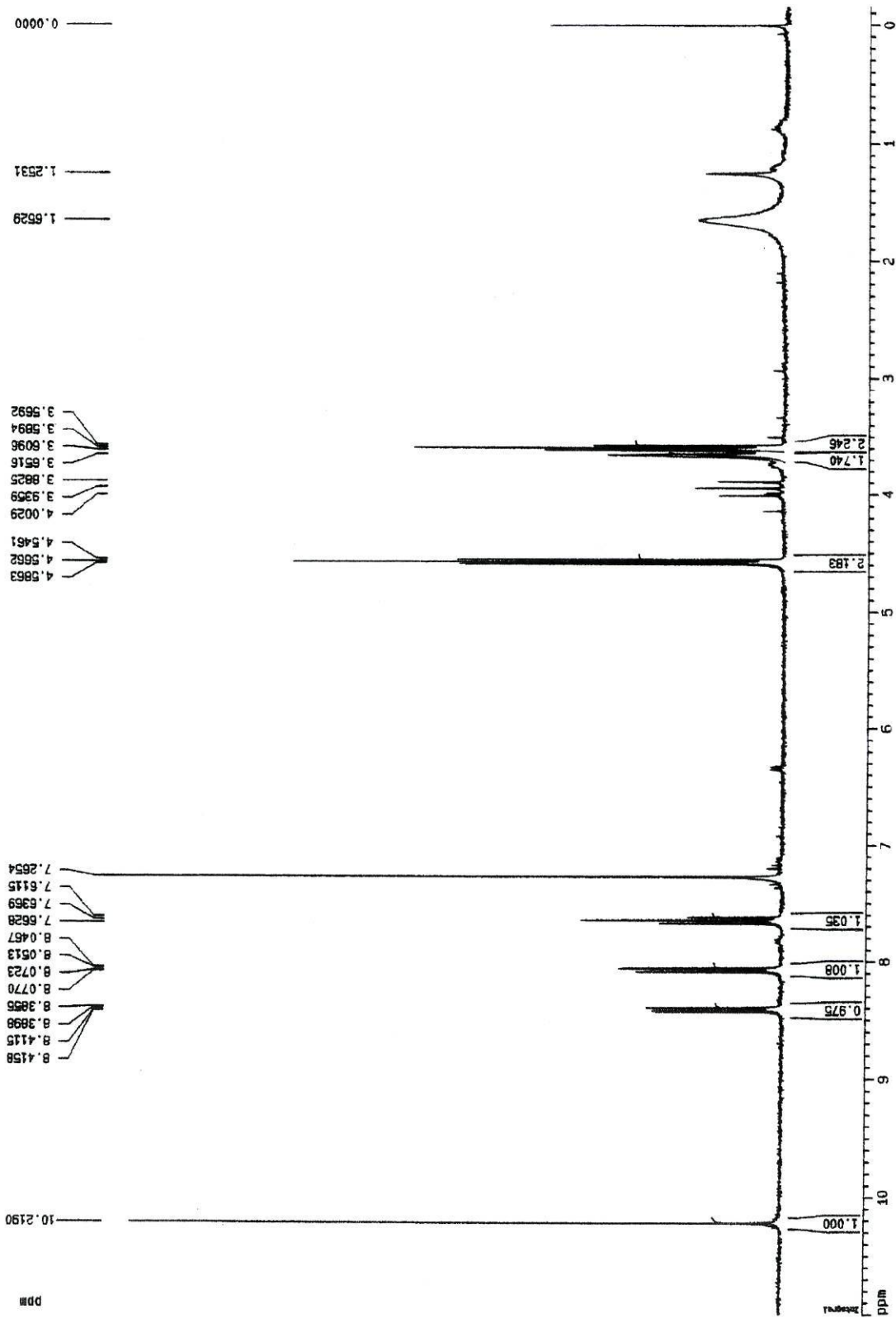


Figura 56 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto a.

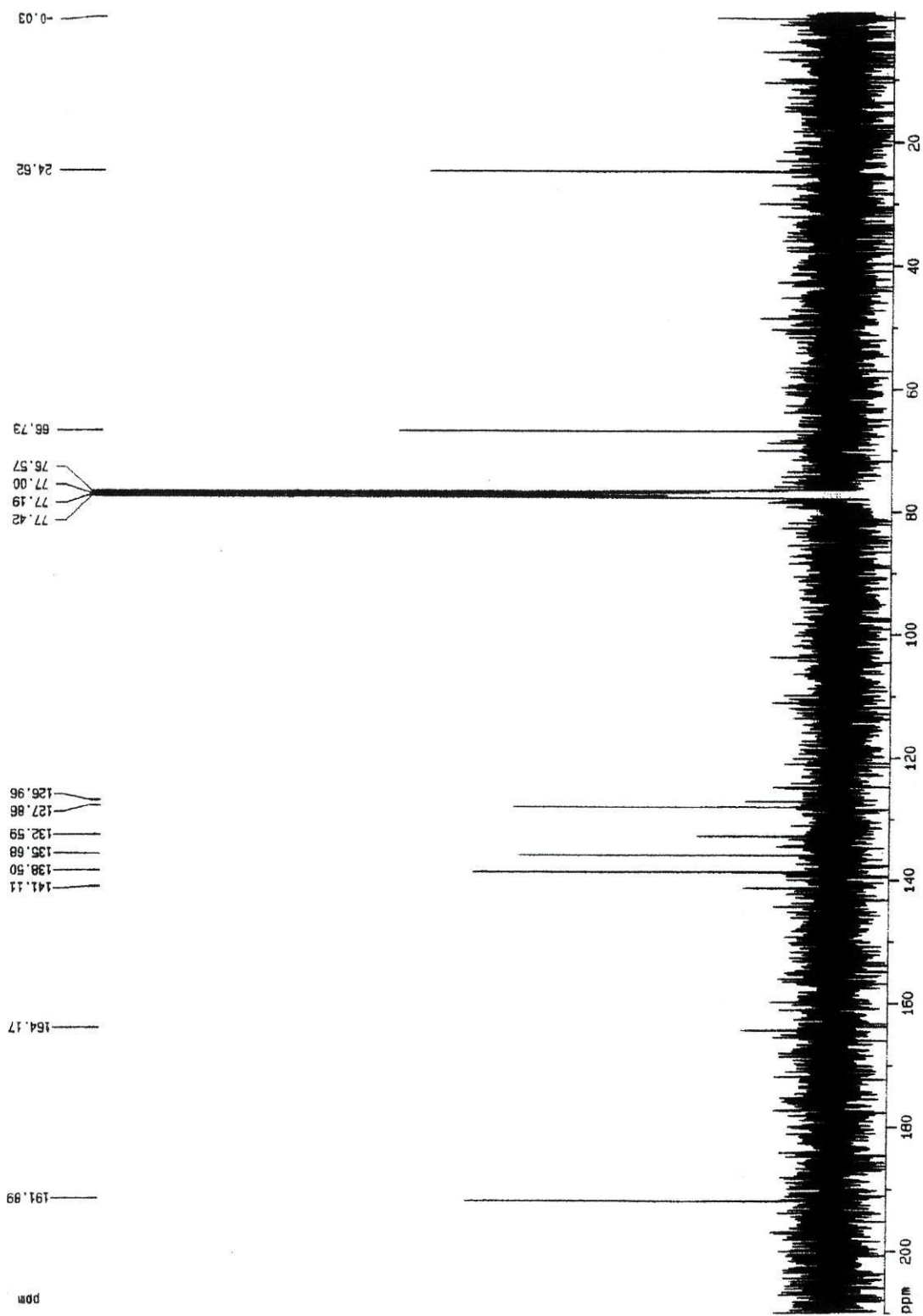


Figura 57 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **a**.



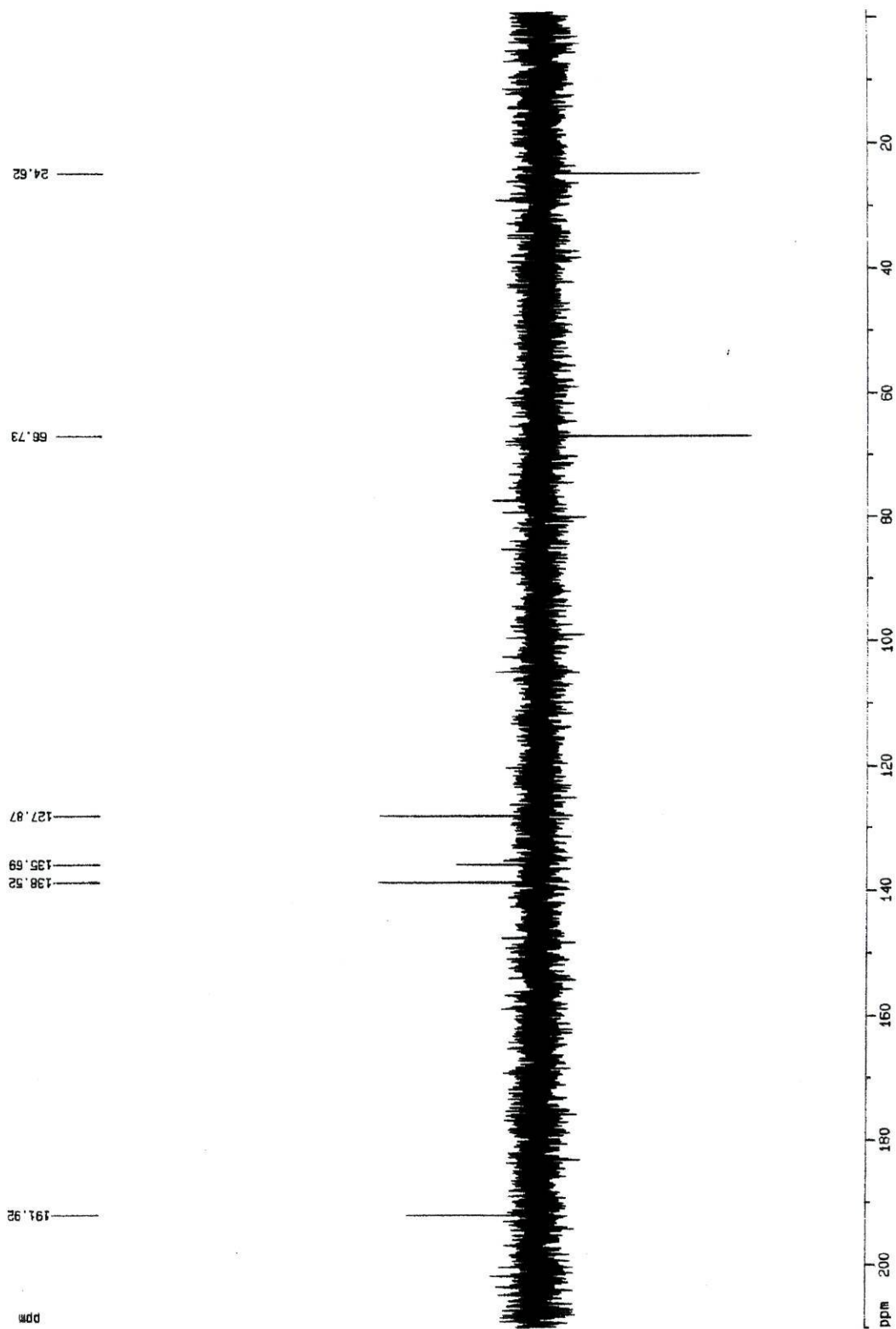


Figura 58 - Espectro  $^{13}\text{C}$  DEPT-135 do composto a.

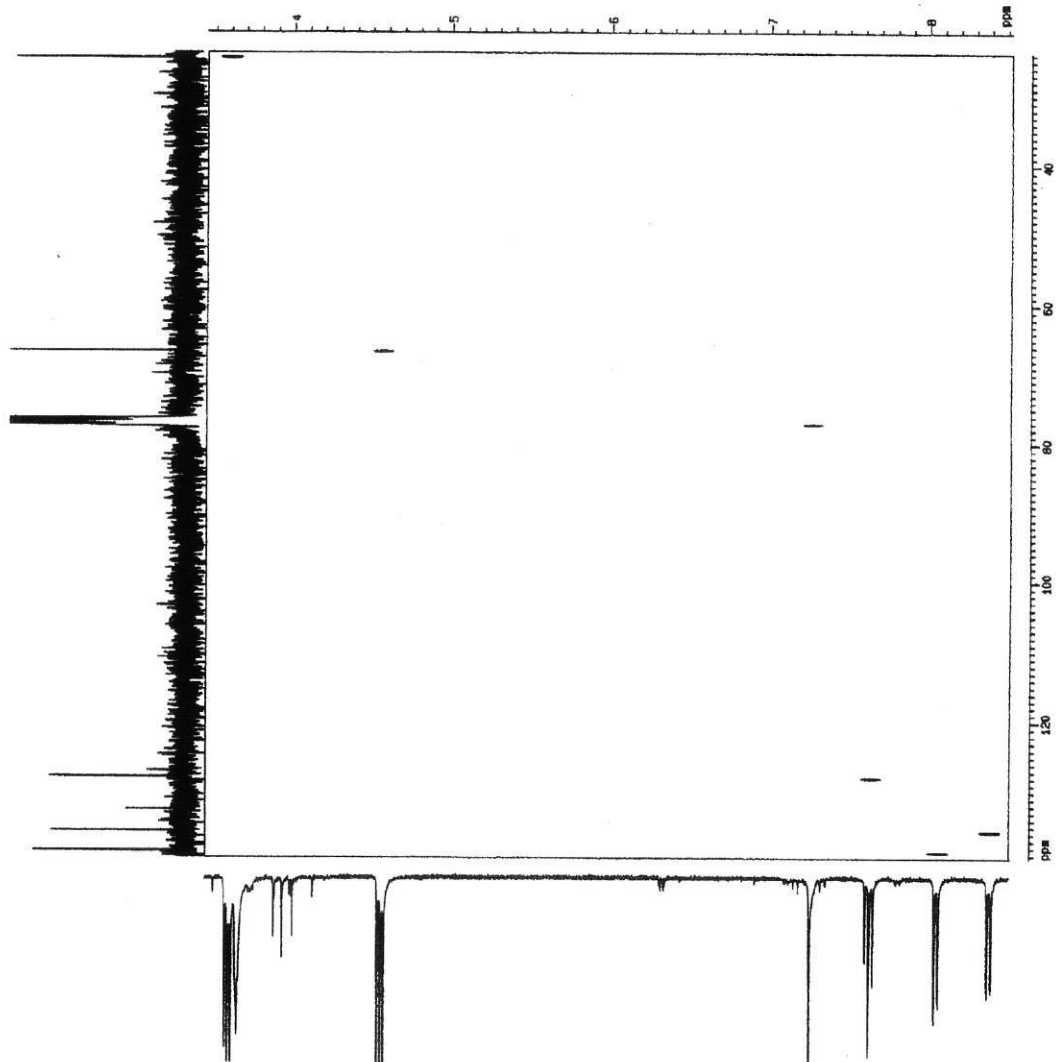


Figura 59 - Espectro HETCOR do composto a.

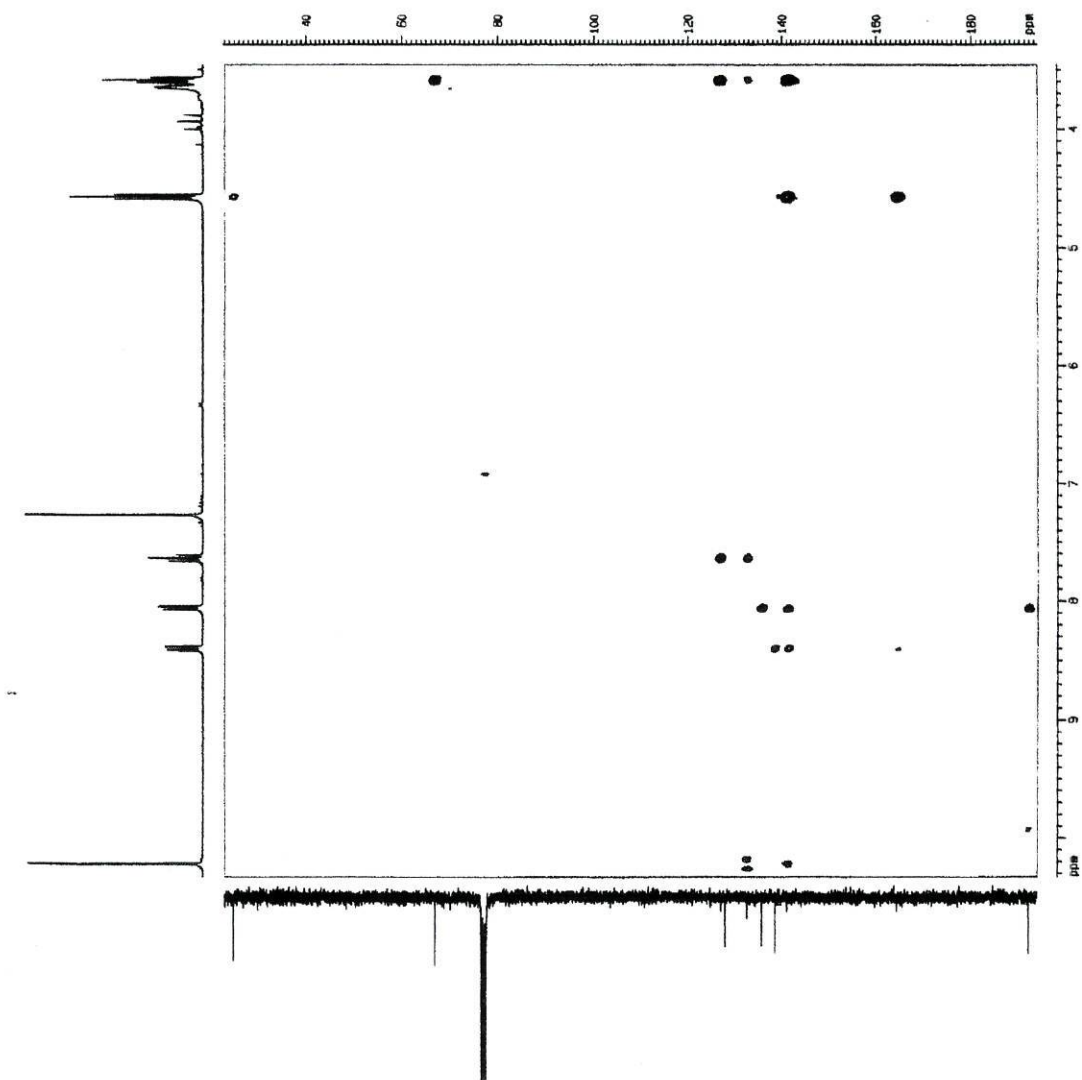


Figura 60 - Espectro HMBC do composto a.

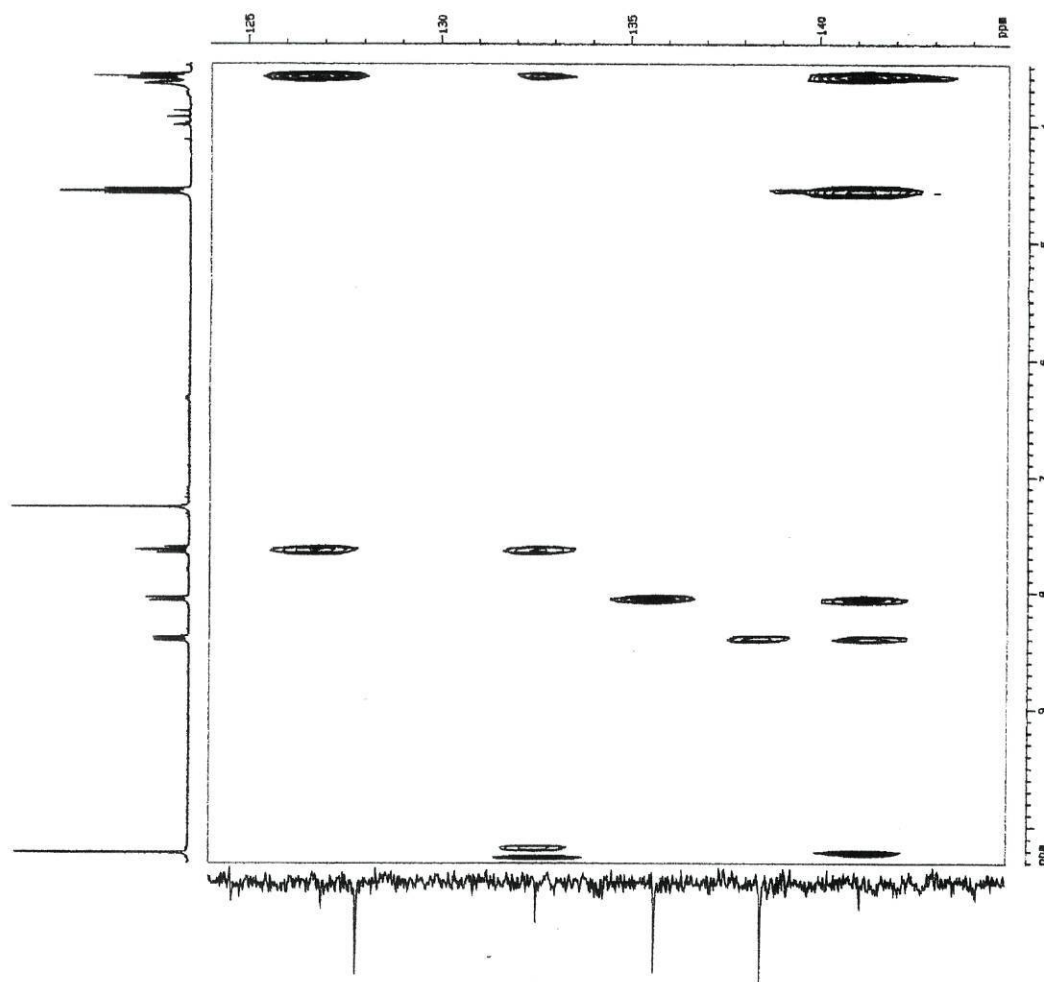


Figura 61 - Espectro HMBC do composto a (expansão).

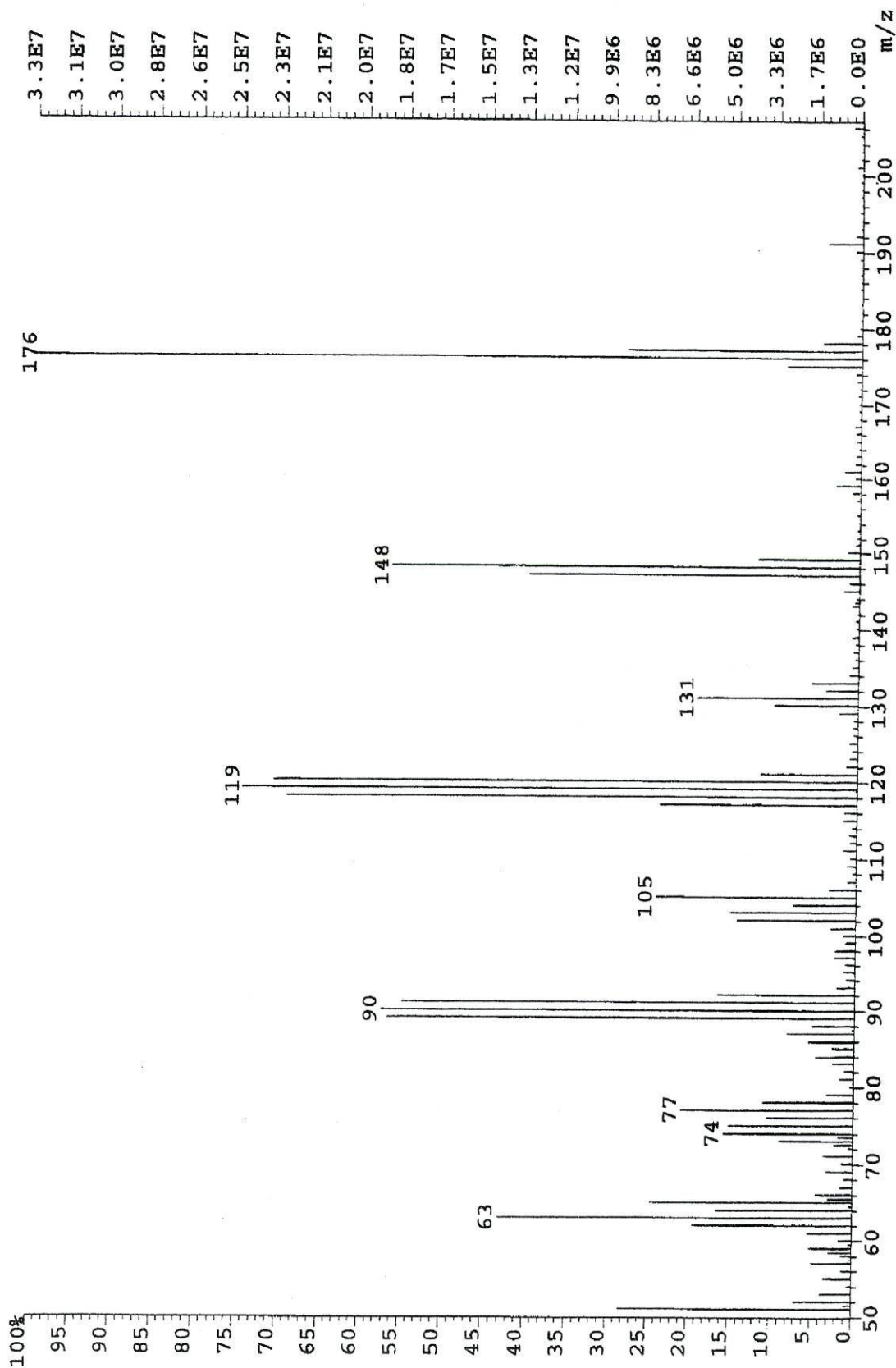
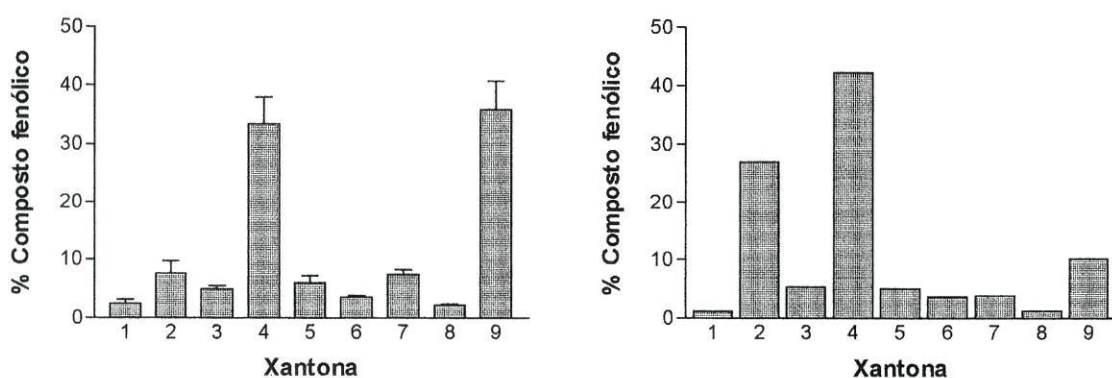


Figura 62 - Espectro de massa do composto a.

### 6. 5. 2. Análise dos compostos fenólicos

A análise por CLAP do extracto clorofórmico revelou a existência, entre outros compostos, das nove xantonas isoladas (**Figura 64**). Atendendo a que não foi encontrada na literatura qualquer referência ao comportamento cromatográfico destes compostos, os tempos de retenção obtidos sob as condições descritas em 6. 3. estão indicados na **Tabela 20**. Não foi possível detectar nos cromatogramas o pico correspondente à 5-formil-2,3-dihidroisocumarina, devido a este composto se encontrar misturado com outros compostos, ou estar presente em muito pequena quantidade.

Em todas as amostras foram detectadas as nove xantonas, em quantidades distintas (**Tabela 21**). Apesar das diferenças, é possível encontrar um perfil fenólico razoavelmente característico. Assim, em todas as amostras, com a excepção da amostra 5, a 1,6-di-hidroxi-3,5-dimetoxixantona e a 1,8-di-hidroxi-3,5,6,7-tetrametoxixantona (compostos **4** e **9**) são os compostos maioritários (**Figura 63**). Nas amostras 1, 2, 3, 9, 10 e 11 o composto **4** é aquele que existe em maior quantidade, situando-se entre 36 e 56% do total dos compostos quantificados, seguido do composto **9**; em oposição, nas amostras 4, 6, 7, 8 e 12 verifica-se uma inversão na proporção relativa destes compostos, na qual o composto **9** varia entre 36 e 65% do total dos compostos quantificados.

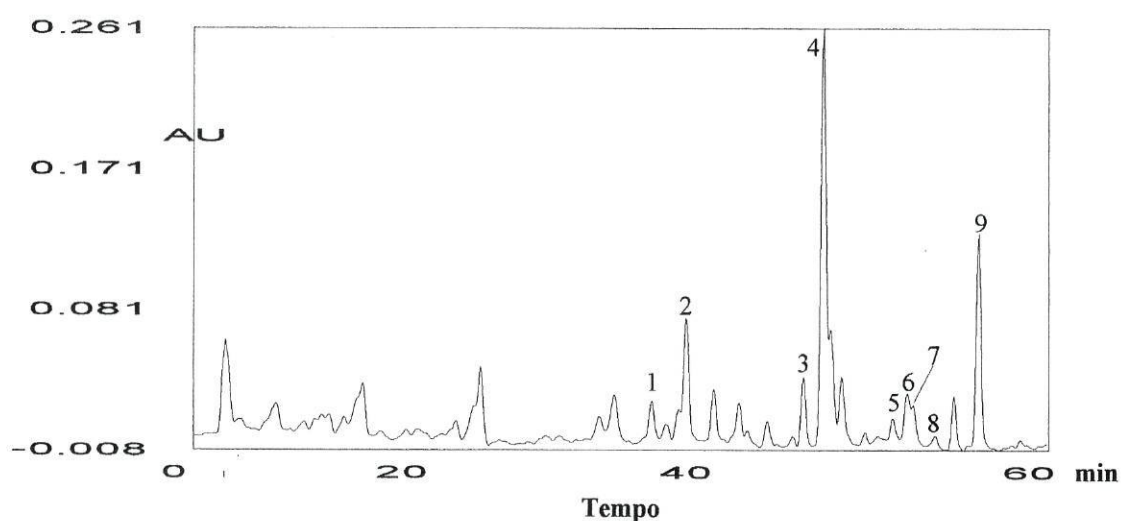


**Figura 63** - Perfil fenólico das amostras de Fel-da-Terra (média  $\pm$  erro padrão). (A) Amostras 1 a 4 e 5 a 12; (B) amostra 5. (1) 3-hidroxi-1,5,6-trimetoxixantona; (2) 1,3,5-tri-hidroxi-2-metoxixantona; (3) 1,5-di-hidroxi-3-metoxixantona; (4) 1,6-di-hidroxi-3,5-dimetoxixantona; (5) 1-hidroxi-3,7,8-trimetoxixantona; (6) 1-hidroxi-3,5,6-trimetoxixantona; (7) 1-hidroxi-3,5,6,7,8-pentametoxixantona; (8) 1-hidroxi-3,5,6,7-tetrametoxixantona; (9) 1,8-di-hidroxi-3,5,6,7-tetrametoxixantona.

A amostra 5 é a única que apresenta a 1,3,5-tri-hidroxi-2-metoxixantona e a 1,6-di-hidroxi-3,5-dimetoxixantona (compostos 2 e 4) como compostos mais abundantes (**Figura 63- B**). Nesta amostra a quantidade de composto 2 é muito elevada (27%) comparativamente com a existente nas restantes amostras (entre 2 e 10%). Do ponto de vista fitoquímico esta variabilidade poderá estar relacionada com a existência de diferentes quimiotipos, que alguns autores consideram ser subespécies ou variedades (*Flora Europaea*, 1968); neste estudo a classificação botânica das amostras ficou somente a nível da espécie e, por essa razão, não podemos justificar a variabilidade observada com a presença de subespécies distintas. Adicionalmente, a ocorrência de formas de transição, referida por Franco (1984), impossibilita, por vezes, a correcta classificação da espécie.

As amostras de Arouca (amostras 9, 10 e 11) possuíam a mesma origem genética, tendo sido cultivadas no mesmo campo mas sob diferentes condições. A amostra 9 não foi fertilizada, enquanto as amostras 10 e 11 receberam 120 e 60 kg/ha/ano de azoto, respectivamente. Os resultados obtidos mostram que a fertilização com azoto leva a um aumento da produção de xantonas, particularmente de 1,3,5-tri-hidroxi-2-metoxixantona, 1,5-di-hidroxi-3-metoxixantona e de 1,6-di-hidroxi-3,5-dimetoxixantona (compostos 2, 3 e 4).

Em função dos resultados obtidos neste estudo podemos dizer que a quantificação de cada composto, para além de ser útil no controlo de qualidade da planta, poderá ser importante para a classificação de amostras de Fel-da-Terra até ao nível de variedade ou subespécie.



**Figura 64** - Cromatograma obtido para uma amostra de Fel-da-Terra. Detecção a 320 nm. (1) 3-hidroxi-1,5,6-trimetoxixantona; (2) 1,3,5-tri-hidroxi-2-metoxixantona; (3) 1,5-di-hidroxi-3-metoxixantona; (4) 1,6-di-hidroxi-3,5-dimetoxixantona; (5) 1-hidroxi-3,7,8-trimetoxixantona; (6) 1-hidroxi-3,5,6-trimetoxixantona; (7) 1-hidroxi-3,5,6,7,8-pentametoxixantona; (8) 1-hidroxi-3,5,6,7-tetrametoxixantona; (9) 1,8-di-hidroxi-3,5,6,7-tetrametoxixantona.

**Tabela 20** - Xantonas isoladas do Fel-da-Terra.

Nº	Xantona	Tempo de retenção
	xantona	43.26 min
1	3-hidroxi-1,5,6-trimetoxixantona	32.34 min
2	1,3,5-tri-hidroxi-2-metoxixantona	34.53 min
3	1,5-di-hidroxi-3-metoxixantona	42.48 min
4	1,6-di-hidroxi-3,5-dimetoxixantona	44.14 min
5	1-hidroxi-3,7,8-trimetoxixantona	48.38 min
6	1-hidroxi-3,5,6-trimetoxixantona	50.01 min
7	1-hidroxi-3,5,6,7,8-pentametoxixantona	50.24 min
8	1-hidroxi-3,5,6,7-tetrametoxixantona	52.53 min
9	1,8-di-hidroxi-3,5,6,7-tetrametoxixantona	56.08 min



**Tabela 21** - Composição fenólica das amostras de Fel-da-Terra (mg/kg, peso seco).

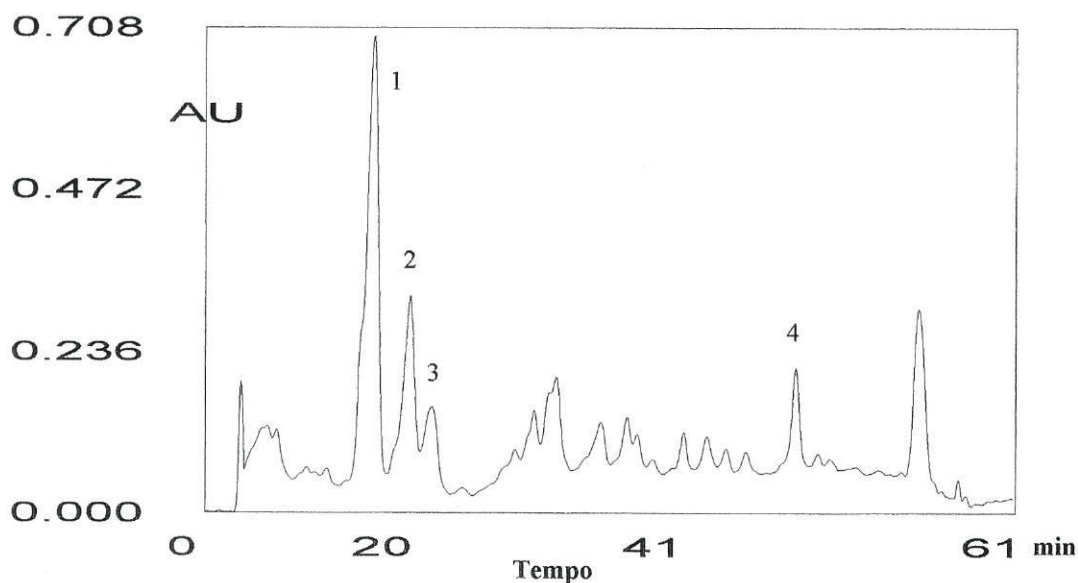
Amostra	Composto*											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9			
1	nq	17,04 (0,498)	18,60 (0,148)	212,78 (3,426)	11,75 (0,218)	11,28 (0,531)	27,28 (0,807)	8,96 (0,366)	157,68 (9,361)			
2	12,57 (4,899)	91,12 (2,513)	70,43 (2,608)	502,71 (45,321)	40,15 (11,716)	37,83 (7,259)	68,43 (11,809)	13,76 (2,691)	187,94 (17,079)			
3	21,79 (4,754)	47,61 (0,617)	29,49 (0,522)	661,13 (15,891)	114,96 (0,509)	79,84 (0,056)	168,33 (7,389)	36,56 (11,63)	321,25 (11,451)			
4	6,32 (0,961)	29,75 (1,395)	40,95 (0,279)	161,50 (19,458)	132,46 (2,594)	37,91 (2,837)	100,33 (0,830)	19,55 (0,181)	317,57 (0,210)			
5	12,21 (0,282)	287,38 (6,156)	56,94 (4,596)	448,01 (13,091)	54,28 (5,146)	38,44 (5,783)	41,39 (3,995)	13,01 (3,112)	107,85 (27,880)			
6	20,82 (0,159)	37,68 (0,338)	29,24 (0,593)	103,29 (0,882)	16,38 (0,221)	17,23 (0,503)	22,16 (1,200)	10,29 (0,178)	182,38 (4,751)			
7	9,13 (0,518)	nq	30,04 (1,275)	74,05 (1,288)	19,17 (0,796)	12,58 (0,507)	34,57 (0,265)	11,97 (0,985)	210,91 (17,642)			
8	nq	12,70 (0,073)	27,09 (4,758)	86,30 (11,545)	46,39 (6,841)	27,57 (5,701)	49,08 (9,057)	22,98 (3,883)	399,64 (58,626)			
9	nq	20,69 (0,088)	12,06 (0,131)	171,00 (8,690)	nq	14,67 (0,364)	31,72 (0,227)	5,99 (0,464)	125,02 (8,375)			
10	nq	41,14 (7,088)	25,22 (1,302)	232,23 (10,878)	nq	11,00 (1,206)	21,46 (5,817)	nq	87,00 (4,600)			
11	nq	13,70 (1,132)	19,19 (0,841)	93,83 (2,019)	nq	11,02 (1,767)	31,06 (3,196)	nq	96,82 (4,174)			
12	31,12 (6,029)	35,79 (6,386)	11,00 (0,597)	54,60 (1,319)	15,64 (2,708)	7,50 (1,365)	20,28 (1,520)	11,90 (1,063)	349,11 (15,537)			

\* Valores expressos como média (desvio padrão) de duas determinações para cada amostra; nq - não quantificável; identidade dos compostos igual à da tabela 4.<sup>1,2</sup> Amostras fertilizadas com 120 e 60 kg/ha/ano de azoto, respectivamente.

Da liofilização da infusão de Fel-da-Terra obteve-se 0,67 g de liofilizado, contendo  $0,112 \pm 0,0044$  mg de fenóis / mg de liofilizado.

Relativamente à análise por CLAP da infusão, o cromatograma obtido revelou uma composição bastante complexa, podendo-se observar essencialmente a presença de compostos com espectro de UV típicos de ácidos cinâmicos. Estes resultados estão de acordo com dados publicados, os quais referem a existência de ácidos hidroxicinâmicos combinados nesta espécie (Dombrowicz *et al.*, 1988). Dada a impossibilidade de identificar esses compostos recorrendo às substâncias de referência disponíveis, e numa tentativa de aproximação à identidade química desses compostos, a infusão foi submetida a uma hidrólise alcalina.

No cromatograma obtido com o extracto hidrolisado foi possível identificar os ácidos *p*-cumárico, ferúlico e sinápico, e o kaempferol (**Figura 65**). Existiam, ainda, outros compostos que não foram identificados.



**Figura 65** - Cromatograma obtido para a infusão de Fel-da-Terra, após hidrólise alcalina. Detecção a 320 nm. (1) ácido *p*-cumárico; (2) ácido ferúlico; (3) ácido sinápico; (4) kaempferol.

## **7. Conclusões**

- O estudo efectuado com estas quatro espécies confirmou, mais uma vez, a utilidade do perfil fenólico como parâmetro de autenticidade de produtos de origem vegetal.
- No extracto etéreo de Limonete identificamos sete flavonas: luteolina, nepetina, hispidulina, jaceosidina, cirsimaritina, cirsilineol e eupatorina. A quantificação destes compostos nas diferentes amostras levou à obtenção de um perfil fenólico característico, no qual a hispidulina e a jaceosidina são os compostos maioritários e a nepetina o composto existente em menor quantidade. Os factores que exercem maior influência na produção de flavonóides parecem ser a exposição solar, a poda e a rega, pois foi nos arbustos sujeitos as estas condições que se verificou uma produção mais elevada de compostos fenólicos.
- A infusão de Limonete é constituída essencialmente por verbascósido, tendo-se detectado, também, luteolina 7-*O*-diglucuronato.
- A análise do extracto metanólico de Hiperição-do-Gerês permitiu a identificação dos ácidos 3- e 5-*O*-cafeoilquínicos, quercetina 3-*O*-sulfato, quercetina 3-*O*-galactósido, quercetina 3-*O*-glucósido, quercetina 3-*O*-arabinósido, quercetin 3-*O*-ramnósido, quercetina e kaempferol. Além destes compostos foi possível detectar a presença de derivados do floroglucinol, que não foram identificados. Neste caso não é possível utilizar o perfil fenólico para o controlo de identidade e qualidade da espécie, uma vez que se obtiveram quatro perfis distintos; esta variabilidade química pode estar relacionada com a existência de diferentes quimiotipos intraespecíficos.
- A composição fenólica da infusão de Hiperição-do-Gerês é semelhante à do extracto metanólico.
- No extracto metanólico de Cardo-do-Coalho encontramos os ácidos 3-, 4, e 5-*O*-cafeoilquínicos, ácido cafeico, ácidos 1,3-, 3,4-, 3,5-, 1,5-, e 4,5-*O*-dicafeoilquínicos, luteolina 7-*O*-glucósido, apigenina 7-*O*-glucósido e luteolina. O perfil fenólico encontrado apresenta os ácidos 5-*O*-cafeoilquínico e 1,5-*O*-dicafeoilquínico como compostos mais abundantes; contudo este perfil parece ser afectado pela época do ano em que é feita a colheita, uma vez que nas amostras

colhidas durante o Verão o ácido 1,5-*O*-dicafeoilquínico era tendencialmente o composto maioritário, enquanto que as amostras colhidas na Primavera e no Inverno revelaram tendência para apresentar o ácido 5-*O*-cafeoilquínico como composto mais abundante.

- A infusão de Cardo-do-Coalho apresenta uma composição idêntica à do extracto metanólico.
- No estudo do Fel-da-Terra foram isolados dez compostos do extracto clorofórmico das sua sumidades floridas: 3-hidroxi-1,5,6-trimetoxixantona, 1,3,5-tri-hidroxi-2-metoxixantona, 1,5-di-hidroxi-3-metoxixantona, 1,6-di-hidroxi-3,5-dimetoxixantona, 1-hidroxi-3,7,8-trimetoxixantona, 1-hidroxi-3,5,6-trimetoxixantona, 1-hidroxi-3,5,6,7,8-pentametoxixantona, 1-hidroxi-3,5,6,7-tetrametoxixantona, 1,8-di-hidroxi-3,5,6,7-tetrametoxixantona e 5-formil-2,3-di-hidro-isocumarina. A 3-hidroxi-1,5,6-trimetoxixantona, a 1,3,5-trihidroxi-2-metoxixantona e a 1,6-di-hidroxi-3,5-dimetoxixantona foram isoladas pela primeira vez nesta espécie.
- O perfil fenólico característico do extracto clorofórmico do Fel-da-Terra apresenta a 1,6-di-hidroxi-3,5-dimetoxixantona e a 1,8-di-hidroxi-3,5,6,7-tetrametoxixantona como compostos maioritários. Este perfil pode ser útil na distinção das diferentes variedades, uma vez que parece estar condicionado por este factor.
- A infusão de Fel-da-Terra é composta essencialmente por derivados do ácido cinâmico. A análise da infusão depois de sujeita a hidrólise alcalina revela a presença dos ácidos *p*-cumárico, ferúlico e sinápico e de kaempferol.

## **PARTE B**

### **Estudos de acção antioxidante e hepatoprotectora**

## **PARTE B1**

### **Acção antioxidante**

## **1. Fundamentos teóricos**



## Índice

1. 1. Introdução.....	163
1. 2. Espécies reactivas de oxigénio (ROS).....	165
1. 3. Oxidação lipídica.....	172
1. 4. Defesas antioxidantes.....	177
1. 4. 1. Antioxidantes enzimáticos endógenos.....	178
1. 4. 2. Antioxidantes não enzimáticos endógenos.....	180
1. 4. 3. Compostos fenólicos.....	185

## **1. Fundamentos teóricos**

### **1. 1. Introdução**

Um radical livre é definido como qualquer espécie com existência independente, que contém um ou mais electrões desemparelhados (Halliwell, 1991).

Uma vez que os electrões são mais estáveis quando emparelhados, os radicais apresentam maior reactividade do que as espécies não radicalares. O encontro de dois radicais resulta na combinação dos seus electrões desemparelhados e na formação de uma ligação covalente (Halliwell, 1991).

No que diz respeito ao Homem, de modo particular ao desenvolvimento de doenças, a presença de agentes oxidantes no organismo resulta de três situações: (i) uns, são produzidos ao nível intracelular, na sequência de processos biológicos normais; (ii) outros, são libertados pelas células envolvidas em processos inflamatórios; e (iii) alguns, são secundários à presença de xenobióticos, tanto pelo facto de o próprio xenobiótico ter actividade pró-oxidante, mas também porque o xenobiótico induz a formação de agentes oxidantes nas células (Crystal, 1991).

Os mecanismos relacionados com a actividade prejudicial dos agentes oxidantes são complexos. Dada a facilidade destes em aceitar electrões das moléculas alvo, podem modificar a sua estrutura e/ou função. Deste ponto de vista, os agentes oxidantes podem interagir com componentes estruturais, como a membrana plasmática, material genético e processos enzimáticos; adicionalmente, podem também alterar moléculas do meio extracelular, modificando assim a arquitectura dos tecidos, moléculas envolvidas na defesa dos tecidos e mediadores celulares (Crystal, 1991).

O metabolismo aeróbio conduz à formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS); daí resulta uma necessidade permanente de inactivação dessas espécies reactivas, para manutenção da homeostasia. Em algumas circunstâncias, poderá existir um desequilíbrio entre pro-oxidantes e antioxidantes, com favorecimento dos primeiros, surgindo um quadro de stresse oxidativo. A perda de controlo dos processos oxidativos endógenos associados à utilização de oxigénio pelas células é o factor determinante nos danos relacionados com esta situação. Tais danos podem afectar todos os tipos de moléculas, incluindo ácidos nucleicos, lípidos, proteínas e hidratos de carbono. Deste

modo, o stresse oxidativo pode estar envolvido em processos de mutagénese, carcinogénese, processos inflamatórios, envelhecimento, arteriosclerose, peroxidação lipídica, oxidação e fragmentação de proteínas, bem como em alterações dos hidratos de carbono (Sies, 1991; Sies, 1993; Pulido *et al.*, 2000).

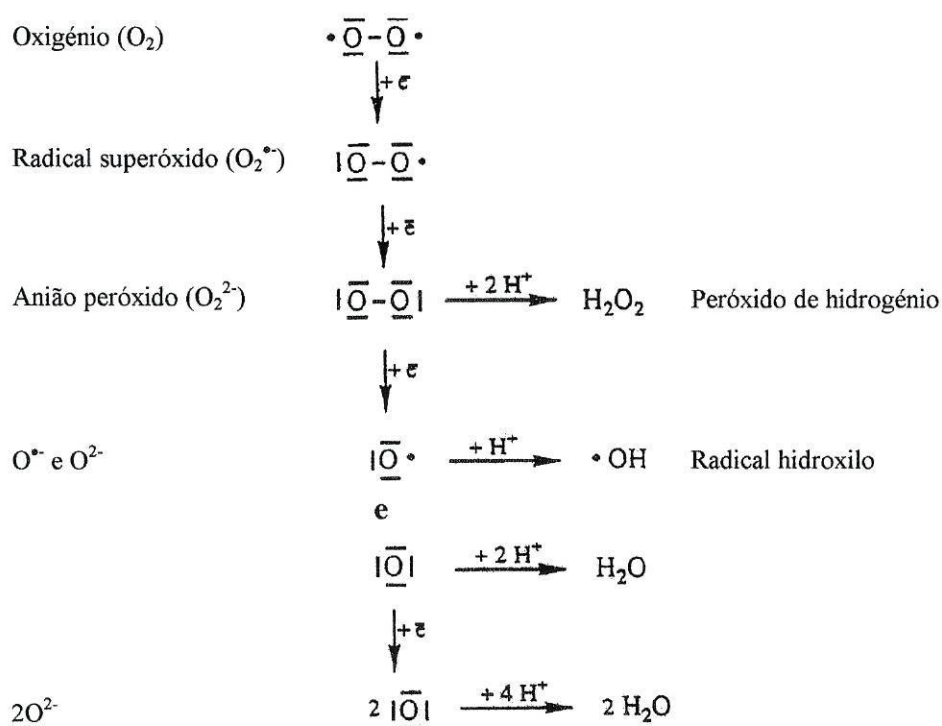
As ROS são geradas em processos oxidativos que ocorrem na mitocôndria. Calcula-se que 90% do oxigénio total consumido pelos mamíferos é utilizado pelas mitocôndrias, onde é reduzido a água, ao nível da cadeia respiratória. Perto de 4% do oxigénio mitocondrial é incompletamente reduzido, devido à libertação de electrões ao longo da cadeia respiratória, formando-se diversas ROS (Liebler e Reed, 1997; Reed, 1998). O metabolismo de fármacos e outros xenobióticos, ao nível dos microssomas, também pode levar à produção de ROS (Somani *et al.*, 1997).

Apesar de serem produzidos em processos biológicos, a capacidade que os agentes oxidantes apresentam para alterar as moléculas de forma deletéria é controlada pela presença de antioxidantes endógenos e exógenos, tais como a superóxido dismutase, a catalase, a glutathione peroxidase, a glutathione, a transferrina, as vitaminas C e E, os flavonóides, entre outros (Crystal, 1991; Sies, 1993; Halliwell *et al.*, 1995).

Os agentes antioxidantes não são unicamente relevantes na medicina preventiva e em terapêutica. A sua presença ao nível alimentar é importante, não só para preservação dos alimentos, mas também porque constituem um suplemento de defesa para o organismo (Shi *et al.*, 2001). São vários os estudos que demonstram os efeitos benéficos exercidos pelos agentes antioxidantes presentes na dieta, em diferentes patologias (Gordon *et al.*, 2001; Virgili *et al.*, 2001; Aviram, 2002; Rietveld *et al.*, 2002; Matito *et al.*, 2002; Núñez Sellés, 2002). Numerosos agentes antioxidantes sintéticos têm sido desenvolvidos, entre os quais o butil-hidroxianisol (BHA) e o butil-hidroxitolueno (BHT); contudo, a sua utilização tem vindo a ser restringida devido à toxicidade que apresentam, e também porque são menos potentes do que os agentes antioxidantes naturais (Velioglu *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 2001). Entre as diferentes classes de compostos com propriedades antioxidantes, a dos compostos fenólicos representa uma das de maior interesse, dado que, para além de se encontrarem amplamente distribuídos na natureza, apresentam actividade anti-radicalar, bem como capacidade para quelatar metais e inibir sistemas produtores de radicais livres (Sies, 1993; Halliwell *et al.*, 1995; Rice-Evans *et al.*, 1995; Aucamp *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2000c; Shi *et al.*, 2001; Yanishlieva-Maslarova, 2001).

## 1. 2. Espécies reactivas de oxigénio (ROS)

A molécula de oxigénio tem uma natureza birradicalar, com um electrão desemparelhado em cada uma das suas orbitais mais externas  $\pi^*$  (Ternay Jr. e Sorokin, 1997). Apesar de ser essencial à vida, o oxigénio também pode ser tóxico. A estrutura electrónica da molécula conduz à formação de água, através da redução univalente envolvendo quatro electrões. Da redução do oxigénio resultam várias formas intermediárias (**Figura 1**):



**Figura 1** - Redução univalente do oxigénio (adaptado de Bast *et al.*, 1991).

A adição de um electrão à molécula de oxigénio no estado fundamental leva à produção do radical superóxido  $\text{O}_2^{\bullet}$ . Da adição de mais um electrão a este radical resulta o anião peróxido  $\text{O}_2^{2-}$ . Nos sistemas biológicos, o produto da redução do oxigénio por dois electrões é o peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ); da adição de um electrão ao anião peróxido forma-se o radical hidroxilo ( $\text{HO}^{\bullet}$ ). A redução do oxigénio molecular por adição de quatro electrões resulta na formação de água.

As ROS potencialmente tóxicas estão representadas na **Tabela 1**. Algumas destas espécies, tais como o oxigénio singleto ( $^1\text{O}_2$ ) e o peróxido de hidrogénio, não são

radicalares, embora sejam muito reactivas. Os tempos de semi-vida das diversas espécies são diferentes, sendo o radical hidroxilo o mais reactivo, com um tempo de semi-vida curto ( $10^{-9}$  segundos). O radical peróxilo ( $\text{ROO}^\bullet$ ) possui um tempo de semi-vida mais longo (7 segundos), resultando numa difusão mais prolongada através dos sistemas biológicos, o que lhe dá a possibilidade de se deslocar do local onde é produzido e atingir outros locais nas células (Sies, 1991).

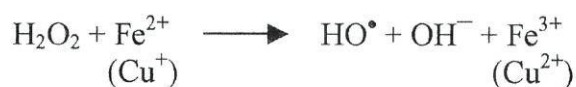
**Tabela 1** - Espécies reactivas de oxigénio potencialmente tóxicas.

$\text{O}_2^{\bullet-}$	Radical superóxido
$\text{HO}_2^\bullet$	Radical hidroperóxido
$\text{H}_2\text{O}_2$	Peróxido de hidrogénio
$\text{HO}^\bullet$	Radical hidroxilo
$\text{RO}^\bullet$	Radical alcoxilo
$\text{ROO}^\bullet$	Radical peróxido
$^1\text{O}_2$	Oxigénio singleto
$\text{HOCl}$	Ácido hipocloroso

O fornecimento de electrões às diferentes espécies de oxigénio pode ser feito por metais de transição. De facto, muitos metais de transição, como o ferro e o cobre, têm vários números de oxidação. A mudança do estado de oxidação envolve a aceitação ou a doação de um electrão:



Deste modo, os metais de transição têm a capacidade de facilitar a transferência de electrões, actuando como promotores de reacções que envolvem radicais livres (Halliwell, 1991; Halliwell *et al.*, 1995):



Contudo, as ROS desempenham também um papel importante em processos fisiológicos, tais como nas reacções de oxidação mediadas pelo citocromo P450, regulação do tónus do músculo liso e acção bactericida dos leucócitos (Bast *et al.*, 1991).

### ***Oxigénio no estado singleto***

No estado fundamental, os electrões das orbitais  $\pi^*$  da molécula de oxigénio possuem “spins” paralelos; quando excitados, estes electrões permanecem desemparelhados em orbitais diferentes, mas com “spins” opostos, recebendo a denominação de oxigénio singleto ( $^1\Delta_g$ ). Existe ainda um outro tipo de oxigénio singleto,  $^1\Sigma_g$ , mais reactivo, que possui dois electrões com “spins” opostos na mesma orbital  $\pi^*$  (Ternay Jr. e Sorokin, 1997).

O oxigénio singleto, gerado por diversos processos incluindo a irradiação do oxigénio, pode levar à peroxidação lipídica. Esta espécie pode ser produzida em alimentos ou na pele, como resultado de reacções de fotossensibilização, podendo também ser gerada no olho, estando associada ao desenvolvimento de cataratas (Halliwell *et al.*, 1995). A forma mais estável ( $^1\Delta_g$ ) também é produzida durante a fagocitose, por reacção entre o ião hipoclorito e peróxido de hidrogénio (Ternay Jr. e Sorokin, 1997).

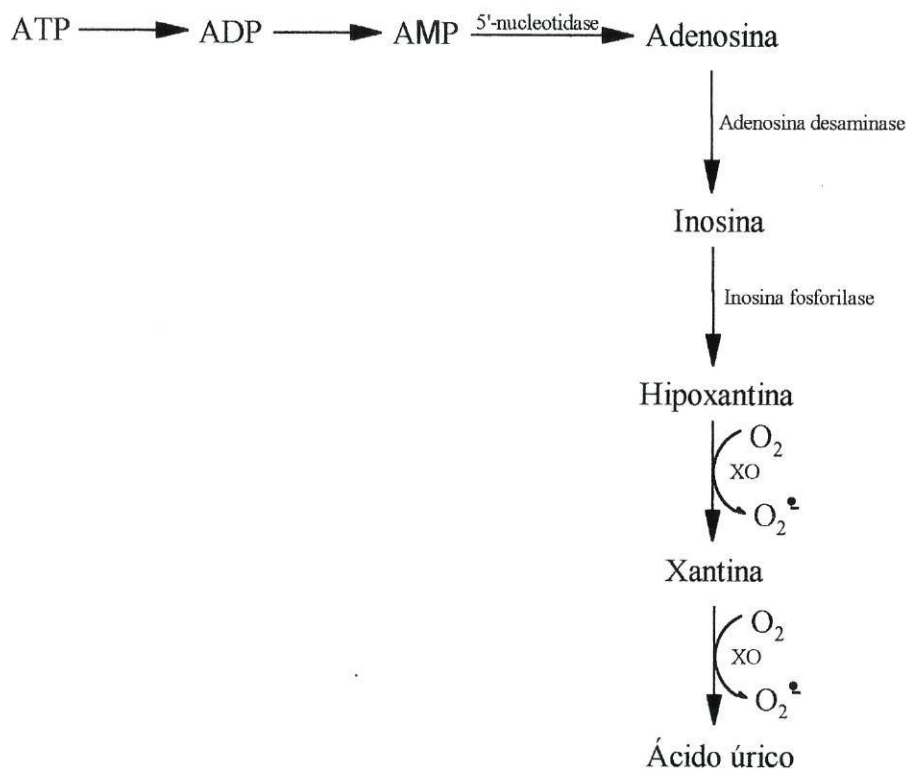
### ***Radical superóxido***

O radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) é formado por adição de um electrão à molécula de oxigénio:



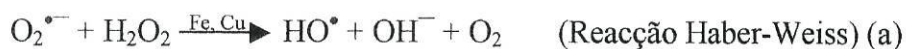
Este radical é formado *in vivo* por fagócitos activados, sendo importante para a protecção do organismo contra algumas estirpes bacterianas (Halliwell, 1991; Liebler e Reed, 1997). Algum superóxido gerado *in vivo* resulta da fuga de electrões da cadeia respiratória, que vão reduzir o oxigénio (Halliwell, 1991). A enzima xantina oxidase

(XO) está também envolvida na produção de superóxido *in vivo*, resultante da conversão da hipoxantina em xantina e da xantina em ácido úrico (**Figura 2**):



**Figura 2** - Representação esquemática da metabolização de nucleótidos de adenina, com formação de ácido úrico (adaptado de Borges *et al.*, 2002).

O radical superóxido não é um radical muito reactivo mas é considerado tóxico. Para além da acção directa sobre as biomoléculas, a toxicidade deste radical deve-se ao seu envolvimento na formação de outras ROS extremamente reactivas, nomeadamente o radical hidroxilo, na reacção de Haber-Weiss (a), e o peroxinitrito,  $\text{ONOO}^-$ , por reacção com o radical óxido nítrico ( $^{\bullet}\text{NO}$ ) (b) (Halliwell *et al.*, 1995; Ternay Jr. e Sorokin, 1997):



O meio redutor criado pela presença do radical superóxido que leva à libertação do ferro ligado à ferritina e outras metaloproteínas e a sua facilidade em converter

Fe(III) em Fe(II), contribuem para a toxicidade desta ROS (Liebler e Reed, 1997; Ternay Jr. e Sorokin, 1997).

### ***Peróxido de hidrogénio***

O  $O_2^{\bullet-}$  formado *in vivo* é convertido em peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) através de uma reacção de dismutação, catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD):

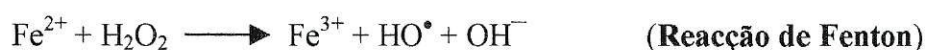


Nesta reacção ocorre a oxidação de um  $O_2^{\bullet-}$  a oxigénio e a redução de outro  $O_2^{\bullet-}$  a  $H_2O_2$ . Na ausência de SOD, a velocidade de dismutação é cerca de quatro vezes inferior, a pH 7,4 (Halliwell, 1991).

Dada a sua fraca reactividade, as reacções de oxidação envolvendo  $H_2O_2$  geralmente decorrem a velocidades baixas, o que pode explicar a sua reduzida toxicidade. Contudo, tem capacidade para difundir até à bicamada lipídica das membranas e depósitos de gordura (Ternay Jr. e Sorokin, 1997).

### ***Radical hidroxilo***

A formação do radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ) requer a presença de metais de transição, sendo o ferro e o cobre os mais importantes *in vivo* (Bast *et al.*, 1991; Halliwell *et al.*, 1995; Comporti, 1998):





Um outro mecanismo de formação de HO• envolve a reacção entre o radical superóxido e o óxido nítrico (•NO) :



A pH fisiológico, o ONOO<sup>-</sup> é protonado, decompondo-se em ROS muito reactivas, nomeadamente os radicais hidroxilo e dióxido de azoto (NO<sub>2</sub>•) (**Figura 2**).

O peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), por si só, pode danificar biomoléculas, por oxidação dos grupo tiol (SH), e tem capacidade para destruir a metionina (Halliwell *et al.*, 1995; Liebler e Reed, 1997).

A reacção do ácido hipocloroso (HOCl) com O<sub>2</sub><sup>•-</sup> conduz, também, à formação de algum HO• (Halliwell *et al.*, 1995):

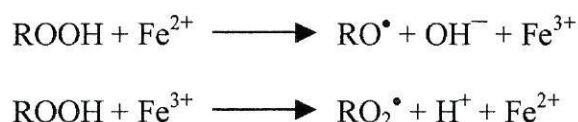


Um outro processo de gerar radicais hidroxilo é através da exposição da água à radiação ionizante (Halliwell *et al.*, 1995).

O radical hidroxilo é considerado a espécie mais reactiva em química e biologia. Tem capacidade para atacar e danificar praticamente qualquer molécula presente nas células. Dada a sua elevada reactividade, não difunde para longe do local onde é produzido, reagindo rapidamente com moléculas da sua vizinhança. Provavelmente, uma das acções mais importantes deste radical está relacionada com o seu envolvimento na peroxidação lipídica. Este processo ocorre quando o HO• é gerado perto das membranas celulares e ataca as cadeias laterais de ácidos gordos dos fosfolípidos membranares, resultando na ruptura e perda da sua funcionalidade. A molécula de ADN constitui um outro alvo da acção nociva do radical, que é capaz de hidroxilar as suas bases púricas e pirimídicas e quebrar as cadeias, conduzindo à morte celular ou à proliferação maligna das células sobreviventes (Halliwell, 1991; Halliwell *et al.*, 1995).

### *Radicais peroxilo*

A formação de radicais peroxilo ( $\text{ROO}^\bullet$ ) constitui o passo mais importante na propagação da cadeia de radicais, que ocorre no processo de peroxidação lipídica. No entanto, esta espécie forma-se também em sistemas não lipídicos, como as proteínas. A decomposição de peróxidos, por aquecimento ou por iões metálicos, gera radicais peroxilo e alcoxilo, como se mostra de seguida, de um modo bastante simplificado (Halliwell *et al.*, 1995):



### *Ácido hipocloroso*

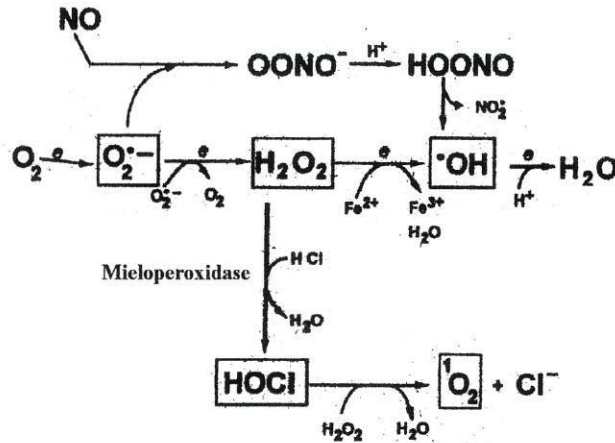
Os neutrófilos contêm mieloperoxidase, uma enzima que utiliza  $\text{H}_2\text{O}_2$  para oxidar iões cloreto a ácido hipocloroso (Halliwell, 1991):



Trata-se de um agente antibacteriano, dotado de actividade oxidante forte. O HOCl produzido fora dos fagócitos pode danificar os tecidos. Oxida, nos fluidos humanos, o resíduo de metionina da  $\alpha_1$ -antiproteínase, responsável pela inibição da elastase. Mesmo em baixas concentrações, é capaz de danificar e induzir a destruição celular: concentrações de 10-20  $\mu\text{M}$  de HOCl oxidam grupos SH das proteínas da membrana plasmática, causando distúrbio nas suas funções (Cochrane, 1991).

Esta espécie não tem grande expressão nos alimentos, mas pode ser formada durante o processo de irradiação de alimentos que contenham iões cloro, na ausência de oxigénio.

Assim, as diversas espécies reactivas de oxigénio com interesse biológico podem ser geradas por reacções de oxidação-redução envolvendo um electrão, a partir do oxigénio molecular, e por reacções espontâneas com óxido nítrico (**Figura 3**).



**Figura 3** - Formação de ROS por redução do oxigênio molecular (adaptado de Reed, 1998).

### 1. 3. Oxidação lipídica

A oxidação lipídica é um processo catalítico mediado por radicais livres. Este processo está relacionado com situações de stresse oxidativo, surgindo, normalmente, na sequência da produção de ROS nas células e tecidos e da falência das defesas antioxidantes.

Entre as moléculas mais facilmente oxidáveis encontram-se os ácidos gordos poliinsaturados, essenciais para vários sistemas de suporte das células, tais como membrana celular, retículo endoplasmático e mitocôndria. Assim, a perturbação das suas propriedades estruturais tem consequências perigosas para a função celular (Muriel, 1997).

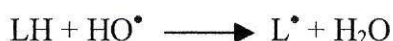
O mecanismo de degradação dos lípidos comporta três etapas: iniciação, propagação e finalização (**Figura 4**) (Comporti, 1998).

#### *Iniciação*

A fase inicial, consiste na interacção de radicais livres com os ácidos gordos poliinsaturados (LH) dos fosfolípidos membranares. O ataque é feito a um hidrogénio alílico de um átomo de carbono situado entre duas ligações duplas, devido à baixa

energia de dissociação da ligação. A remoção de um átomo de hidrogénio resulta na formação de um radical lipídico ( $L^{\bullet}$ ).

Radicais de carbono, como o radical triclorometilo ( $^{\bullet}CCl_3$ ) resultante do metabolismo do tetracloreto de carbono ( $CCl_4$ ), podem iniciar este processo. Os radicais de oxigénio podem, também, iniciar a oxidação dos lípidos, mas geralmente requerem a presença de metais de transição. O radical superóxido não tem reactividade suficiente para retirar o hidrogénio; contudo, pode sofrer dismutação, via superóxido dismutase, para formar peróxido de hidrogénio, o qual origina radical hidroxilo pela reacção de Fenton. Este radical, dada a sua reactividade, tem capacidade para abstrair hidrogénio do ácido gordo poliinsaturado, libertando-se uma molécula de água.



Uma vez formado, o radical lipídico sofre um rearranjo molecular, dando origem a um dieno conjugado, que pode ter vários destinos possíveis. A colisão de dois radicais lipídicos na membrana leva à formação de uma ligação covalente entre as cadeias laterais de ácidos gordos, à custa dos electrões desemparelhados; a reacção com proteínas membranares também é possível. Contudo, sob condições fisiológicas, o destino mais provável é a reacção e inactivação com o  $\alpha$ -tocoferol, ou, na falta deste, combinação com o oxigénio, formando um outro radical (Halliwell, 1991).

### *Propagação*

Os radicais lipídicos reagem facilmente com o oxigénio, originando radicais peróxido lipídicos ( $LOO^{\bullet}$ ). Estes radicais têm capacidade para remover hidrogénio de ácidos gordos poliinsaturados situados na sua vizinhança, formando-se hidroperóxidos lipídicos ( $LOOH$ ) e um outro radical lipídico:



Este processo decorre continuamente, uma vez que se conserva o número de radicais na sequência de reacções; ou seja, novos radicais lipídicos vão sendo constantemente formados.

A acumulação de hidroperóxidos lipídicos na membrana interfere negativamente na sua função, causando perturbação nos componentes celulares.

A decomposição dos hidroperóxidos, catalisada pelo ferro ou por outro metal de transição, resulta no aparecimento de radicais alcoxilo ( $\text{LO}^\bullet$ ) e peroxilo, amplificando o processo de propagação:



Agentes redutores, como o ácido ascórbico e  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , aceleram estas reacções, pois os iões  $\text{Cu}^+$  e  $\text{Fe}^{2+}$  reagem mais rapidamente com peróxidos, do que  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ , respectivamente (Halliwell, 1991).

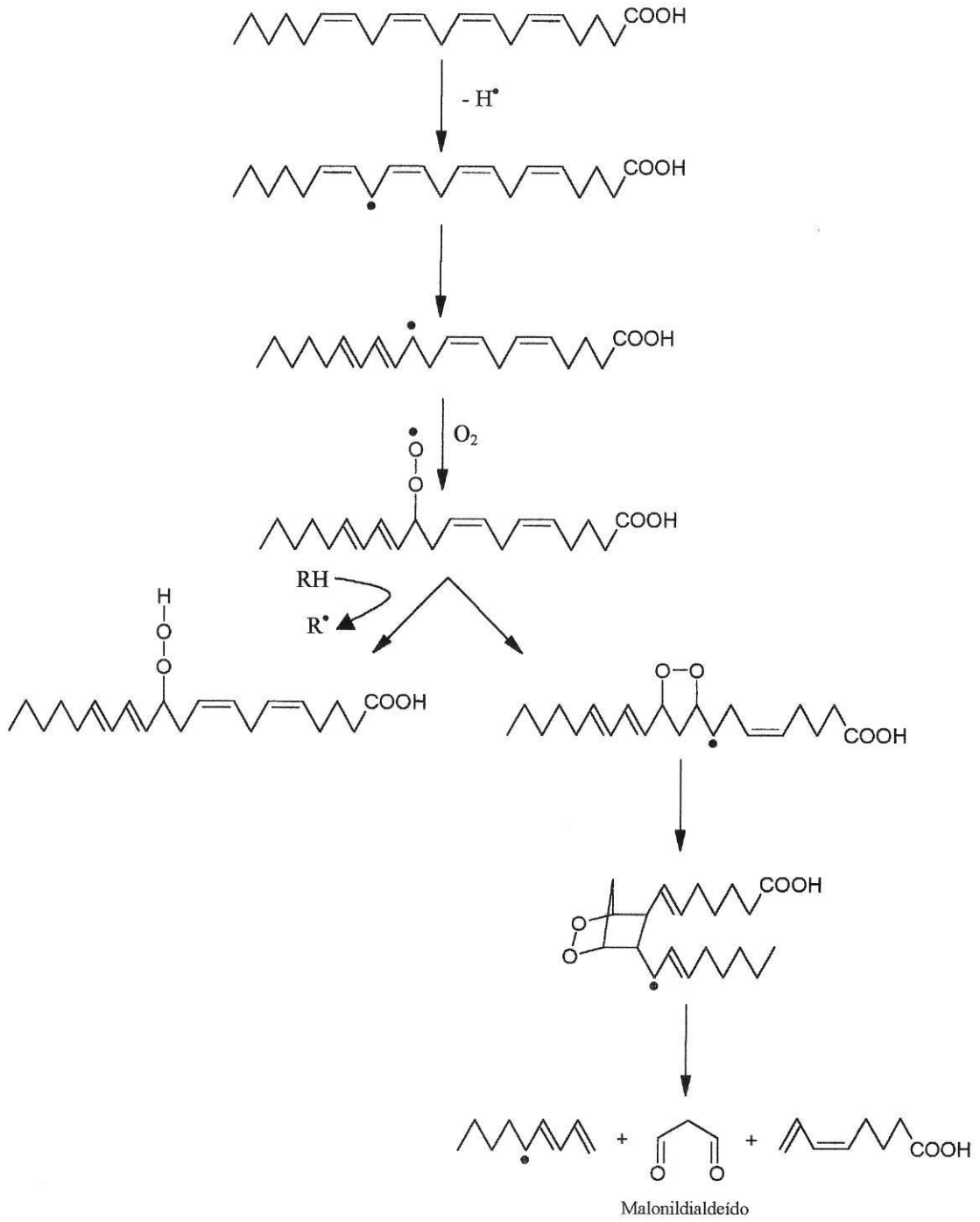
Os peróxidos lipídicos podem ainda ser decompostos por quebra de ligações carbono-carbono das moléculas. A fragmentação de endoperóxidos lipídicos, formados a partir de ácidos gordos poliinsaturados contendo, pelo menos, três ligações duplas metilénicas interruptas, resulta na produção de malonildialdeído. O malonildialdeído é o produto de degradação mais frequentemente utilizado para quantificação da peroxidação lipídica. Entre os produtos finais deste processo encontram-se, também, outros aldeídos, como o 4-hidroxinonal (muito tóxico, dada a sua capacidade para reagir com grupos SH de tióis de baixo peso molecular, proteínas, enzimas, aminoácidos, fosfolípidos e ácidos nucleicos) e hidrocarbonetos de cadeia curta, nomeadamente etano e pentano (Comporti, 1998).

### ***Finalização***

A cascata de reacções em cadeia termina quando dois radicais se combinam para formar uma espécie não radicalar ou intervêm as defesas antioxidantes, nomeadamente a glutathiona e o  $\alpha$ -tocoferol (ver Defesas antioxidantes, 1. 4.). Nas membranas biológicas podem ocorrer interacções anormais entre lípidos, ou entre lípidos e proteínas; esta última deve-se ao facto de os radicais lipídicos serem capazes de retirar

hidrogénio das proteínas, formando-se uma ponte entre as duas moléculas (Comporti, 1998).

São vários os efeitos da peroxidação lipídica nas membranas celulares: diminuição da fluidez membranar, aumento da permeabilidade da membrana, que provoca intumescimento das mitocôndrias, vacuolização do retículo endoplasmático e libertação de enzimas, danificação das proteínas membranares, inactivação de receptores e de enzimas da membrana. Para além da perda da estrutura membranar, a oxidação lipídica resulta, também, na libertação de produtos tóxicos, particularmente aldeídos (Halliwell, 1991; Comporti, 1998).



**Figura 4** - Representação esquemática da peroxidação lipídica (adaptado de Comporti, 1998).

## 1. 4. Defesas antioxidantes

Os organismos aeróbios desenvolveram sistemas de protecção para minimizar os efeitos deletérios causados por agentes oxidantes, resultantes da bioactivação de diversos compostos e do metabolismo celular do oxigénio (Reed, 1998). Todas as células contêm sistemas de defesa para prevenir ou limitar o dano celular causado pelos intermediários biológicos reactivos (Liebler e Reed, 1997).

Um antioxidante é definido como uma substância que, quando presente em pequena concentração comparativamente à do substrato oxidável, retarda ou previne significativamente a sua oxidação (Halliwell, 1995). Este “substrato oxidável” pode ser qualquer componente celular, incluindo proteínas, lípidos, hidratos de carbono e ADN.

Entre as diversas defesas antioxidantes, encontram-se algumas de carácter enzimático, como a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase; e outras não enzimáticas, como a glutathione, o ácido ascórbico e o  $\alpha$ -tocoferol. De acordo com o seu modo de actuação, os antioxidantes podem ser divididos em três categorias: preventivos, sequestradores de radicais e de reparação (Comporti, 1998). Os antioxidantes preventivos actuam reduzindo a velocidade de formação de radicais livres (glutathione peroxidase, catalase, glutathione-S-transferase), sequestrando iões metálicos (apoferritina, transferrina, ceruloplasmina), aprisionando ROS (carotenóides) ou promovendo a sua dismutação (superóxido dismutase). Os antioxidantes capazes de interceptar radicais impedem o início do processo de peroxidação lipídica e interrompem a propagação da cadeia de radicais ( $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico). Os compostos que actuam por mecanismos de reparação são aqueles que corrigem o dano causado pelas ROS e reconstituem a membrana (fosfolipase A<sub>2</sub>, protease); vários sistemas enzimático reparam o ADN, degradam proteínas danificadas e metabolizam os hidroperóxidos lipídicos (Halliwell, 1991; Sies, 1993; Comporti, 1998). Em adição a estes sistemas de defesa, também os mecanismos de adaptação deverão ser considerados, nomeadamente aqueles que induzem proteínas, tais como a heme oxygenase, tirosina fosfatase e glutathione transferase (Sies, 1993).



### 1. 4. 1. Antioxidantes enzimáticos endógenos

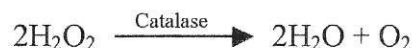
Todas as células eucariotas contêm enzimas com forte poder antioxidante, sendo a superóxido dismutase, a catalase e a glutathiona peroxidase as três mais importantes (Sies, 1993). Estas enzimas são caracterizadas por uma localização específica e pelo envolvimento de metais nas reacções que catalisam, nomeadamente cobre, ferro, manganês, selénio e zinco. Estes sistemas antioxidantes estão amplamente distribuídos na natureza, o que vem reforçar o seu valor na prevenção dos danos causados pelos metabolitos reactivos de oxigénio nos sistemas biológicos (Halliwell, 1991). Geralmente têm uma acção dirigida contra o radical superóxido, peróxido de hidrogénio e hidroperóxidos orgânicos (Liebler e Reed, 1997).

A principal função da **superóxido dismutase** (SOD) consiste em catalisar a dismutação do radical superóxido que ocorre em meios protonados:



As superóxido dismutases são classificadas em três classes distintas, dependendo do ião metálico que contêm: Cu/Zn-SOD, Mn-SOD e Fe-SOD. As células dos mamíferos apresentam duas isoenzimas, localizadas em diferentes compartimentos subcelulares: no citoplasma encontra-se a Cu/Zn-SOD, enquanto a mitocôndria tem Mn-SOD; existe também Cu/Zn-SOD no compartimento extracelular. A actividade da SOD varia conforme o tecido, sendo mais elevada no fígado, rim e eritrócitos. A sua actividade é regulada através da biossíntese, que é sensível à oxigenação dos tecidos (Liebler e Reed, 1997; Somani *et al.*, 1997).

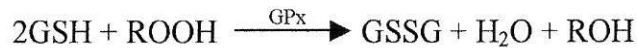
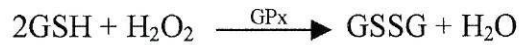
A **catalase** é a enzima que cataliza a decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ . Para além desta função, tem também uma acção peroxidica, sendo responsável pela oxidação de dadores de hidrogénio com consumo de peróxido:



Apesar da sua ampla distribuição nos tecidos, a sua actividade varia não só entre os diferentes tecidos, mas também dentro da própria célula. Esta enzima predomina nos

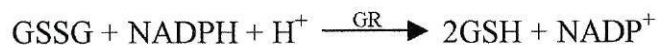
peroxissomas no fígado e rim, e nos microperoxissomas de outros tecidos. O fígado e o rim possuem níveis relativamente elevados de catalase (Somani *et al.*, 1997).

A **glutathiona peroxidase** (GPx) cataliza a redução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de hidroperóxidos orgânicos a água, à custa da oxidação da glutathiona reduzida (GSH), que serve de co-substrato à enzima:



Os dois tipos de GPx celulares, dependente e independente de selénio, catalisam estas reacções, protegendo deste modo contra os danos provocados por peróxidos. Dentro das células, a GPx encontra-se no citosol e mitocôndria, sendo a sua distribuição complementar à da catalase; a ausência de catalase na mitocôndria implica que, a este nível, o metabolismo do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seja efectuado apenas pela GPx. A actividade da GPx é elevada no fígado e no rim (Liebler e Reed, 1997; Somani *et al.*, 1997).

A GSH é regenerada a partir da glutathiona oxidada (GSSG), numa reacção catalisada pela **glutathiona redutase** (GR):



A GR é uma enzima auxiliar no controlo da quantidade de ROS, via redução da GSSG em presença de NADPH; consequentemente, a razão GSH/GSSG é mantida num nível elevado, de modo que a célula seja capaz de combater situações de stresse oxidativo (Somani *et al.*, 1997).

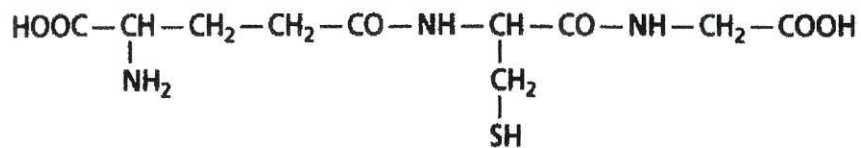
As relações que envolvem as enzimas antioxidantes são consideradas indicadores de stresse oxidativo. A título de exemplo, quando a razão catalase/SOD ou a GPx/SOD aumentam, tal facto aponta para maior actividade das enzimas antioxidantes devido a espécies reactivas de oxigénio; a diminuição da razão indica um aumento de ROS, ao qual as enzimas não conseguem responder de modo eficaz, podendo resultar no aparecimento de danos oxidativos. Portanto, estas duas razões dão-nos uma perspectiva do grau de adaptação e do nível das enzimas antioxidantes. A relação GR/GPx é também importante, uma vez que mostra se o sistema de reciclagem da GSH funciona convenientemente; o aumento da razão sugere que esse sistema consegue manter um

nível de GSH capaz de proteger a célula; se a razão GR/GPx diminui, então a célula não produz GSH suficiente para eliminar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e hidroperóxidos orgânicos, indicando assim a presença de dano oxidativo (Somani *et al.*, 1997).

#### 1. 4. 2. Antioxidantes não enzimáticos endógenos

Além das enzimas, a célula contém também substâncias antioxidantes que lhe conferem uma maior protecção contra as ROS.

A **glutathiona** ( $\gamma$ -glutamilcisteinilglicina) (**Figura 5**) é um tripéptido não proteico presente nas células de todos os seres vivos, que contribui para a sua capacidade de protecção contra o dano oxidativo. Dependendo do tipo de célula, a sua concentração intracelular varia entre 0,5 e 10 mM, sendo o fígado o órgão onde está presente em maior quantidade (4 a 8 mM) (Reed, 1998).

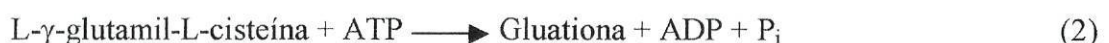
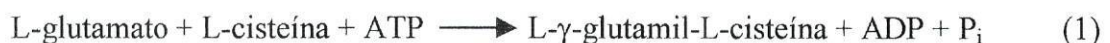


**Figura 5** - Estrutura da glutathiona.

A glutathiona existe sob duas formas: reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). A soma das formas reduzida e oxidada é referida como GSH total:

$$[\text{GSH}]_{\text{total}} = [\text{GSH}] + 2[\text{GSSG}]$$

A síntese de GSH ocorre principalmente no fígado, onde a sua concentração é mais elevada, a partir dos três aminoácidos que constituem a molécula:



Em homeostase, quase toda a glutathiona se encontra na forma reduzida (GSH); apenas cerca de 5% da glutathiona total corresponde à forma oxidada (GSSG). Este

estado redox é mantido à custa da GR e de NADPH. O ciclo redox da glutathione (Figura 6) constitui o meio de defesa antioxidante mais importante usado pelas células. Em condições de stresse oxidativo provocado por peróxido de hidrogénio ou peróxidos orgânicos, a GSH é oxidada, numa reacção catalisada pela glutathione peroxidase, originando GSSG e água ou alcoóis. Para manter um nível eficaz de GSH, a GSSG formada deve ser reduzida de novo a GSH, através de um processo catalisado pela glutathione redutase, com consumo de NADPH.

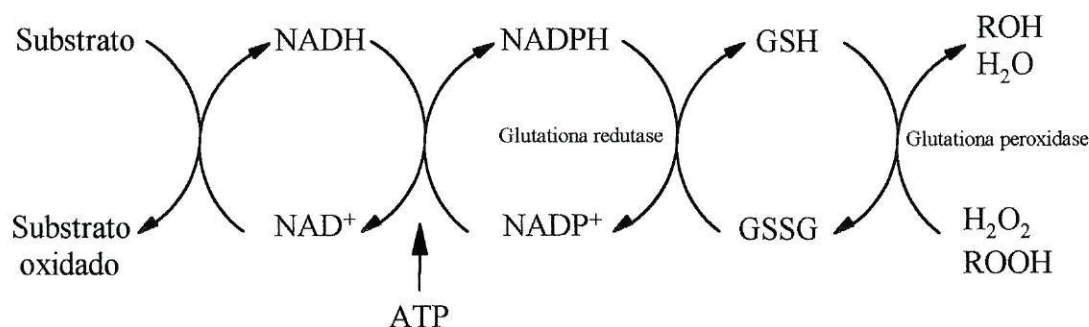


Figura 6 - Ciclo redox da glutathione e stresse oxidativo.

A GSH actua como agente conjugante nucleofílico de numerosos compostos electrofílicos e seus metabolitos, facilitando a sua excreção. O grupo nucleofílico sulfidrílo (SH), presente no resíduo de cisteína da molécula de GSH, combina-se com compostos tóxicos contendo átomos de carbono electrofílicos. Esta reacção com o anião tiolato ( $GS^-$ ) dá origem a uma ligação tioéter, entre os átomos de carbono e o grupo SH da GSH. O ataque nucleofílico também pode ser feito a outros átomos electrofílicos, tais como o azoto e o enxofre. A formação destes conjugados é possível devido à acção das glutathione-S-transferases, muito abundantes no fígado, embora também possa acontecer de forma espontânea. Por fim, por acção de *N*-acetiltransferases, os conjugados dão origem a derivados do ácido mercaptúrico e são excretados.

A GSH actua também como cofactor na destruição de hidroperóxidos mediada pela GPx (Figura 6) (Reed, 1998). Assim, a GSH funciona como redutor nas reacções catalisadas pela GPx, mas também pode interceptar radicais livres, levando à formação do radical tiilo ( $GS^\bullet$ ); este pode dimerizar e formar GSSG:



A exposição contínua a ROS, incluindo peróxido de hidrogénio e hidroperóxidos lipídicos, tem como consequência a produção constante de GSSG. O estado redox da célula pode ser determinado quantitativamente, através do cálculo da razão GSH/GSSG. Em condições metabólicas óptimas, a razão GSH/GSSG pode ser superior a 100. Contudo o aumento dos danos oxidativos pode comprometer a capacidade do fígado para produzir GSH suficiente, reduzindo desse modo a possibilidade de a utilizar em resposta a espécies electrofílicas. Sabe-se que uma depleção em GSH até 15-20% do nível de glutatona total pode levar não só ao aparecimento de dano mas também à morte celular.

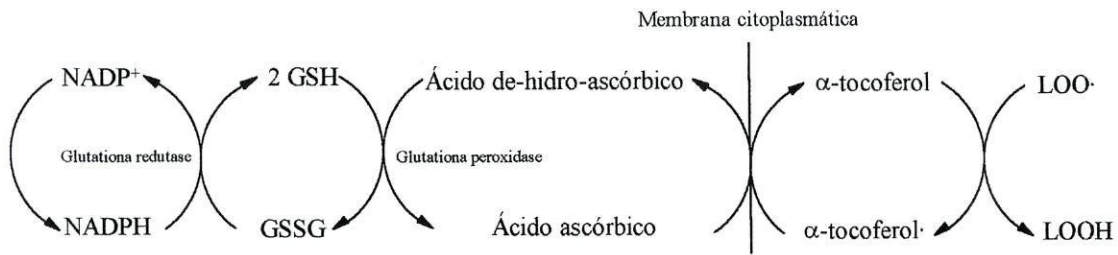
Adicionalmente, devido à sua estrutura, a GSH é também capaz de quelatar metais potencialmente tóxicos (ferro, cobre, prata, cádmio, arsénio), impedindo-os de intervir em reacções de Fenton: o grupo sulfidrilo, o grupo amina, as duas ligações peptídicas e os dois grupos carboxílicos constituem locais potenciais de ligação a metais. Por outro lado, existem metais de extrema importância para os processos de destoxificação mediados pela GSH: o selénio, juntamente com a GSH, é necessário como co-substrato para a glutatona peroxidase, sendo a acção desta enzima atribuída aos grupos seleno-cisteína presentes nos seus quatro locais activos.

A GSH é importante para a redução de dissulfuretos proteicos e sulfuretos mistos de GSH e proteína, mantendo os grupos sulfidrilo no estado reduzido, contribuindo assim para a manutenção do equilíbrio sulfidrilo-dissulfureto proteico e do potencial redox celular:



Este potencial é essencial para manter a funcionalidade de certas proteínas, particularmente enzimas como as ATPases dependentes de cálcio.

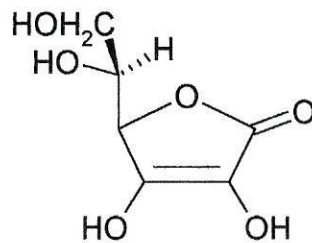
As funções de protecção da GSH não podem ser atribuídas unicamente à presença do resíduo de cisteína. A GSH colabora com outros antioxidantes, nomeadamente  $\alpha$ -tocoferol e ácido ascórbico (vitamina C), na formação do mecanismo de defesa celular: a GSH assume um papel vital na manutenção do  $\alpha$ -tocoferol e do ácido ascórbico no estado reduzido (**Figura 7**), impedindo a peroxidação lipídica.



**Figura 7** - Ciclo redox da glutatona e interacção com o ácido ascórbico e o  $\alpha$ -tocoferol (adaptado de Sciuto, 1997).

A GSH serve, também, como forma de armazenamento e transporte de cisteína e pode intervir em processos importantes, tais como síntese de proteínas, síntese de ADN, formação de leucotrieno e prostaglandina  $E_2$  e transporte de aminoácidos (Sciuto, 1997; Somani *et al.*, 1997; Reed, 1998).

O **ácido ascórbico** (vitamina C) (**Figura 8**) é um composto com características hidrofílicas, que o organismo humano não consegue sintetizar, obtendo-o através da dieta. A sua tendência para se acumular nos tecidos poderá explicar o seu papel de antioxidante.



**Figura 8** - Estrutura do ácido ascórbico.

A sua capacidade de actuar como agente redutor permite-lhe reagir directamente com os radicais superóxido e hidroxilo (Somani *et al.*, 1997). Da oxidação do ácido ascórbico resulta o ácido de-hidro-ascórbico, que pode ser posteriormente reduzido a ácido ascórbico por agentes redutores como a glutatona (**Figura 7**). Deste modo, a glutatona está envolvida no processo de reciclagem do ácido ascórbico, para manutenção de um potencial redox favorável à protecção face ao dano causado por radicais livres.

Contudo, quando presente em baixa concentração (0,2 mM), o ácido ascórbico pode actuar como pró-oxidante, dada a sua capacidade para reduzir metais de transição; por outro lado, a oxidação do ácido ascórbico leva também à formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, estando deste modo criadas as condições para a produção de radicais hidroxilo pela reacção de Fenton (Bast *et al.*, 1991).

O  $\alpha$ -tocoferol (Figura 9), uma molécula lipossolúvel presente nas membranas celulares e lipoproteínas plasmáticas, com capacidade para quebrar a cadeia de radicais livres do processo de peroxidação lipídica.

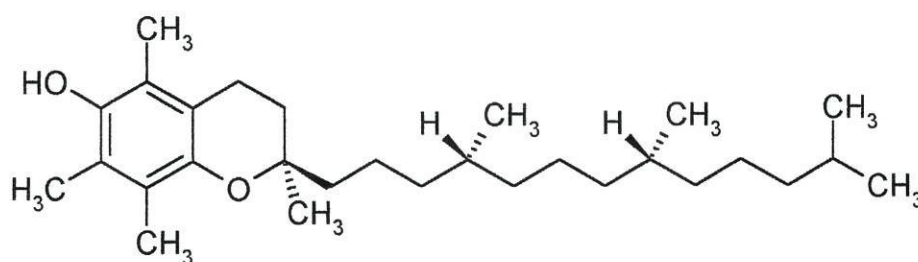


Figura 9 - Estrutura do  $\alpha$ -tocoferol.

Esta molécula apresenta um grupo hidroxilo na sua estrutura, cujo átomo de hidrogénio pode ser facilmente removido. Daí que os radicais peróxido e alcóxido gerados durante a peroxidação dos lípidos se combinem preferencialmente com o antioxidante e não com os ácidos gordos poliinsaturados adjacentes:



Forma-se, assim, um novo radical, o  $\alpha$ -tocoferilo ( $\alpha$ -tocoferol-O<sup>•</sup>), pouco reactivo e sem capacidade para atacar as cadeias laterais de ácidos gordos poliinsaturados. Este radical pode migrar até à superfície membranar, sendo reconvertido em  $\alpha$ -tocoferol por reacção com o ácido ascórbico. A GSH também está envolvida na redução do  $\alpha$ -tocoferilo a  $\alpha$ -tocoferol (Figura 7) (Bast *et al.*, 1991; Halliwell, 1991).

O  $\beta$ -caroteno (Figura 10) é uma substância lipossolúvel, capaz de reagir directamente com radicais de oxigénio formados durante a peroxidação lipídica. O  $\beta$ -

caroteno exerce a sua acção antioxidante através do sequestro de radicais peróxido e alcóxido (Somani *et al.*, 1997).

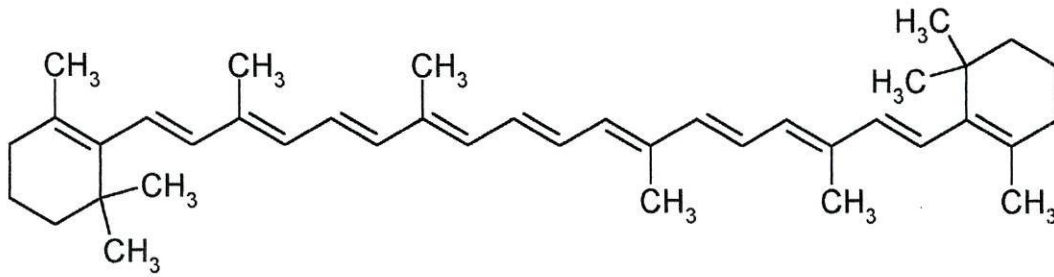


Figura 10 - Estrutura do β-caroteno.

As defesas celulares envolvidas no metabolismo e inactivação de ROS estão representadas na Figura 11.

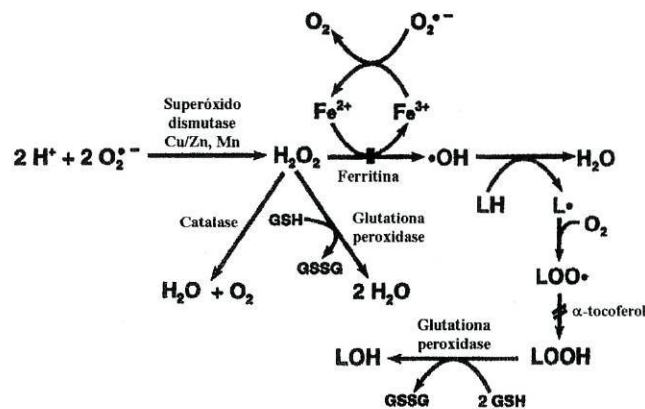


Figura 11 - Representação esquemática das defesas antioxidantes (adaptado de Reed, 1998).

### 1. 4. 3. Compostos fenólicos

Os antioxidantes sintéticos são, na sua maioria, compostos de natureza fenólica, substituídos com grupos alquila de modo a aumentar a sua lipossolubilidade. Os antioxidantes naturais podem ser compostos fenólicos (tocoferóis, flavonóides e ácidos fenólicos), compostos azotados (alcalóides, derivados da clorofila, aminoácidos, aminas), carotenóides e ácido ascórbico (Velioglu *et al.*, 1998). Os compostos fenólicos podem assumir um papel importante como antioxidantes *in vivo*, em condições de



aumento do seu consumo na dieta, ou ingestão sob a forma de suplementos (Liebler e Reed, 1997).

O mecanismo de acção mais importante, no que diz respeito à acção antioxidante dos compostos fenólicos, assenta no elevado potencial que apresentam para sequestrar radicais livres. Esta característica pode ser explicada pela sua facilidade em doar o átomo de hidrogénio do grupo hidroxilo fenólico, originando um radical fenoxilo que é posteriormente estabilizado pelo deslocamento do electrão desemparelhado (Sawa *et al.*, 1999; Halliwell, 2000). Podem exercer a sua acção antioxidante sequestrando diversos radicais gerados *in vivo* ou nos alimentos, tais como, os radicais superóxido, hidroxilo e peróxido (Halliwell, 2000; Yanishlieva-Maslarova, 2001). Os compostos fenólicos não reagem rapidamente com o peróxido de hidrogénio, mas são capazes de sequestrar oxigénio singlete e ácido hipocloroso (Payá *et al.*, 1992; Visioli *et al.*, 1998; Halliwell, 2000).

Uma outra propriedade que apresentam é a possibilidade de quelatar iões metálicos (Rice-Evans *et al.*, 1995; Decker, 1997; Brown *et al.*, 1998; Croft, 1998). Contudo, esta capacidade poderá conferir-lhes algum poder pro-oxidante, uma vez que podem quelatar metais de um modo que a actividade catalítica destes se mantém ou aumenta, ou então reduzir os iões metálicos aumentando, assim, a formação de radicais livres (Laughton *et al.*, 1989; Decker, 1997; Croft, 1998).

A actividade antioxidante pode, também, ser resultante da inibição de enzimas, tais como xantina oxidase, mieloperoxidase, lipoxigenase e ciclooxigenase, estas duas últimas envolvidas na oxidação do ácido araquidónico na membrana plasmática (Laughton *et al.*, 1991; Decker, 1997; Cos *et al.*, 1998; Halliwell, 2000; Shi *et al.*, 2001).

Adicionalmente, os compostos fenólicos podem interagir sinergicamente com outros antioxidantes, como o ácido ascórbico e o  $\alpha$ -tocoferol (Croft, 1998; Liao e Yin, 2000; Shi *et al.*, 2001).

O pH dos sistemas biológicos é um factor determinante na acção dos compostos fenólicos. Geralmente, uma diminuição do pH provoca um aumento na redução do ferro; conseqüentemente, a capacidade para quelatar ou inibir a actividade catalítica do ferro é reduzida (Decker, 1997).

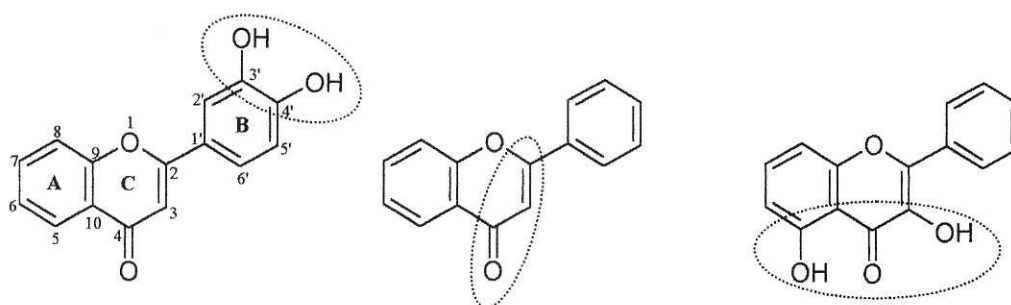
O efeito antioxidante de um composto fenólico está dependente das suas características de solubilidade. O seu coeficiente de partilha óleo/água (O/A) afecta a sua interacção com a membrana celular e a sua acção antioxidante, particularmente quando estão envolvidos oxidantes hidrossolúveis. Coeficientes de partilha O/A mais elevados traduzem-se numa interacção mais profunda com as membranas, mas que pode resultar num menor efeito antioxidante quando se trata de impedir a acção de oxidantes solúveis em água, como  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Cu}^+$ , ou de radicais livres presentes na fase aquosa (Brown *et al.*, 1998; Liao e Yin, 2000).

Os antioxidantes fenólicos são, de uma forma geral, susceptíveis de formar complexos com proteínas. Num estudo realizado por Arts e colaboradores (2002), a influência da ligação entre os compostos fenólicos do chá e as proteínas do leite na actividade antioxidante daqueles compostos foi avaliada, tendo-se verificado que a capacidade antioxidante dos flavonóides se revelava inferior em presença das proteínas. Tal facto indica que os compostos fenólicos poderão não desenvolver a sua capacidade antioxidante máxima na matriz onde estão incluídos; esta diminuição da actividade antioxidante poderá resultar numa oxidação mais rápida dessa matriz.

Uma vez que os compostos fenólicos se ligam às proteínas salivares e à albumina, outra consequência da interacção com as proteínas é a diminuição da concentração e biodisponibilidade do antioxidante (Haslam, *et al.*, 2000; Arts *et al.*, 2002).

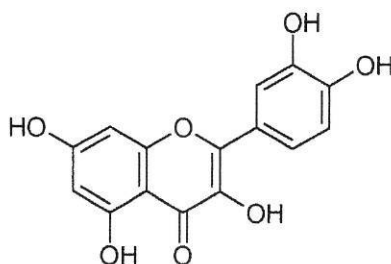
Os **flavonóides** são compostos presentes nas plantas e frequentemente fazem parte da dieta. São consumidos diariamente em grande quantidade, sendo os frutos e os vegetais a sua principal fonte (Shi *et al.*, 2001).

Dos numerosos estudos realizados sobre a actividade antioxidante dos flavonóides foi possível estabelecer algumas relações entre a sua estrutura química e a referida actividade. As características estruturais associadas à acção antioxidante são (i) padrão de substituição *orto*-di-hidroxi no anel B (grupo catecol), (ii) ligação dupla entre os carbonos 2 e 3 e grupo carbonilo em 4, no anel C, e (iii) grupos hidroxilo em 3, no anel C, e em 5, no anel A (**Figura 12**) (Arora *et al.*, 1998; Hopia e Heinonen, 1999; Burda e Oleszek, 2001; Cos *et al.*, 2001; Yanishlieva-Maslarova, 2001).



**Figura 12** - Relação estrutura-atividade antioxidante dos flavonóides.

A quercetina (**Figura 13**), o composto fenólico mais frequente na natureza, preenche todos estes requisitos.



**Figura 13** - Estrutura da quercetina.

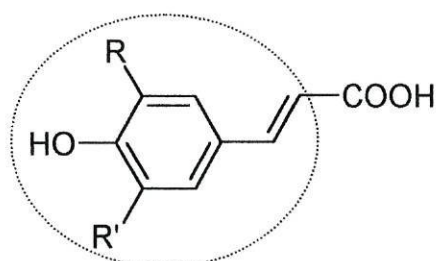
As agliconas apresentam maior actividade do que os heterósidos (Hopia e Heinonen, 1999; Burda e Oleszek, 2001; Cos *et al.*, 2001; Yanishlieva-Maslarova, 2001). No entanto, o organismo é capaz de absorver quer os compostos livres, quer os ligados a açúcares (Hollman, 2000). O primeiro passo do metabolismo dos heterósidos consiste na quebra da ligação glicosídica por  $\beta$ -glucosidases intestinais, libertando-se a aglicona. O flavonóide pode ser posteriormente degradado, originando diversos ácidos fenilcarboxílicos que, dependendo do seu padrão de substituição, poderão, também, apresentar actividade antioxidante (Day e Williamson, 1999; Schneider *et al.*, 1999; Spencer *et al.*, 1999; Hollman, 2000).

Os **ácidos fenólicos**, nomeadamente os derivados dos ácidos benzóico e cinâmico, estão também presentes nos frutos e vegetais, sendo por isso consumidos diariamente.

Vários estudos indicam que a posição e o número de grupos hidroxilo na molécula são determinantes na actividade antioxidante destes compostos. Os compostos

com um grupo hidroxilo são menos eficientes do que os polifenóis; a introdução de um segundo grupo hidroxilo na molécula aumenta a actividade antioxidante, sendo as moléculas com hidroxilos em *orto* aquelas que apresentam maior actividade (Laranjinha *et al.*, 1994; Foti *et al.*, 1996; Natella *et al.*, 1999; Fukumoto e Mazza, 2000; Yanishlieva-Maslarova, 2001). A metoxilação de grupos hidroxilo de moléculas com grupo catecol aumenta a capacidade antioxidante dessas moléculas (Natella *et al.*, 1999; Yanishlieva-Maslarova, 2001).

A ligação dupla, existente na cadeia lateral dos derivados do ácido cinâmico, contribuirá, provavelmente, para que o radical fenoxilo que se forma após a reacção com radicais livres seja estabilizado por ressonância; por essa razão estes compostos apresentam maior actividade antioxidante do que os derivados do ácido benzóico (Laranjinha *et al.*, 1994; Natella *et al.*, 1999). Na **Figura 14** estão representadas as estruturas dos ácidos cinâmicos mais comuns na natureza.



R = R' = H; ácido *p*-cumárico  
 R = OH, R' = H; ácido cafeico  
 R = OCH<sub>3</sub>, R' = H; ácido ferúlico  
 R = R' = OCH<sub>3</sub>; ácido sinápico

**Figura 14** - Estruturas dos principais ácidos cinâmicos (adaptado de Ribéreau-Gayon, 1968b) e relação estrutura-actividade antioxidante.

O consumo de frutos e vegetais está associado a uma diminuição na incidência de doenças como cancro e arteriosclerose, provavelmente devido à presença de compostos com actividade antioxidante, nomeadamente compostos fenólicos (Harborne e Williams, 2000). Contudo, o seu potencial antioxidante depende não só da quantidade, mas também da qualidade dos compostos presentes (Vinson *et al.*, 1995; Vinson *et al.*, 1998; Kähkönen *et al.*, 1999).

## **2. Parte experimental**

## Índice

2. 1. Substâncias de referência e reagentes.....	193
2. 2. Preparação das infusões.....	193
2. 3. Avaliação da actividade sequestrante das infusões para o radical superóxido.....	194
2. 3. 1. Método não enzimático (NADH/PMS).....	194
2. 3. 2. Método enzimático (xantina/xantina oxidase).....	195
2. 3. 3. Estudo do efeito das infusões sobre a xantina oxidase.....	197
2. 4. Avaliação da actividade sequestrante das infusões para o radical hidroxilo.....	198
2. 5. Avaliação da actividade sequestrante das infusões para o ácido hipocloroso.....	200

## 2. Parte experimental

### 2. 1. Substâncias de referência e reagentes

A xantina, xantina oxidase (XO) (EC 1.1.3.22), nicotinamida adenina dinucleótido na forma reduzida (NADH), metossulfato de fenazina (PMS), azul de nitrotetrazólio (NBT), cloreto férrico anidro ( $\text{FeCl}_3$ ), sal dissódico do ácido etilenodiaminatetracético (EDTA), ácido ascórbico, ácido tricloroacético, ácido tiobarbitúrico, desoxirribose, solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) contendo 4% de cloro, ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), ácido lipóico e o boro-hidreto de sódio foram adquiridos à Sigma (St. Louis, Mo., USA).

Todos os outros reagentes tinham grau de pureza "Pro analysi" e foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). A água foi tratada num sistema de purificação de água Milli-Q (Milipore, Bedford, MA).

### 2. 2. Preparação das infusões

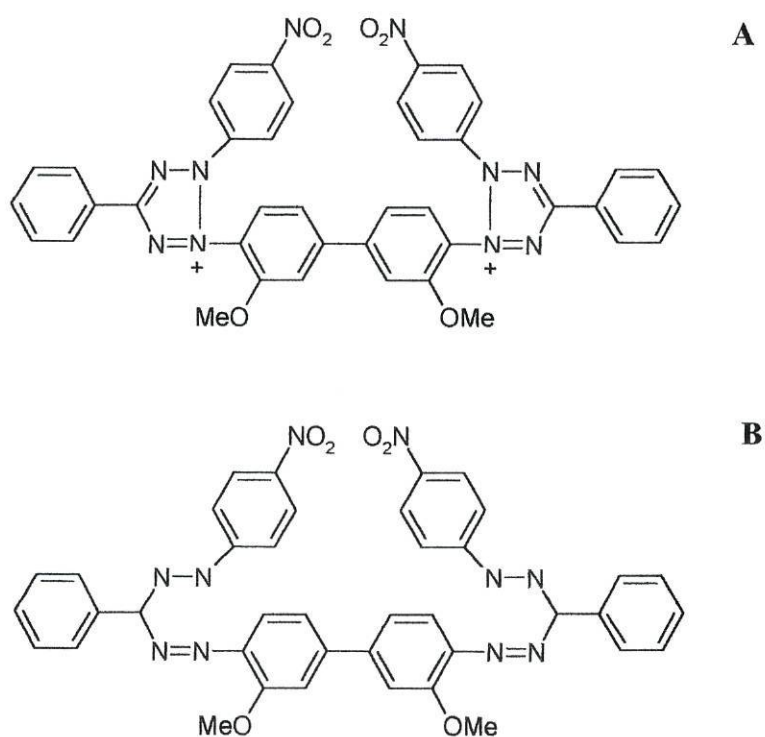
Para cada espécie em estudo foi preparada uma infusão, de acordo com as condições descritas na Parte A; resumidamente:

- Para o Limonete, 5 g de folhas inteiras foram infundidos com 200 ml de água fervente, durante 15 min;
- Para o Hipericão-do-Gerês, 15 g de folhas inteiras foram infundidos com 500 ml de água fervente, durante 15 min;
- Para o Cardo-do-Coalho, 4 g de folhas grosseiramente divididas foram infundidos com 200 ml de água fervente, durante 15 min;
- Para o Fel-da-Terra, 5 g de sumidades floridas foram infundidos com 500 ml de água fervente, durante 15 min.

A extracção com água à ebulição aumenta o teor de compostos fenólicos no extracto, provavelmente por destruição das paredes celulares da planta (Sawa *et al.*, 1999). Atendendo à instabilidade dos compostos fenólicos quando em solução aquosa, e tendo em vista a concentração das soluções obtidas, após filtração todas as infusões foram liofilizadas.

## 2. 3. Avaliação da actividade sequestrante das infusões para o radical superóxido

O radical superóxido reage com o NBT, reduzindo-o a formazano (**Figura 14**), um composto azul que apresenta um máximo de absorção a 560 nm. Qualquer molécula capaz de sequestrar  $O_2^{\bullet-}$  conduzirá a uma diminuição na velocidade de redução do NBT (Halliwell *et al.*, 1995).



**Figura 14** - Estrutura do (A) NBT e do (B) formazano.

A actividade anti-radicalar foi determinada espectrofotometricamente num leitor de placas (Ceres 900) programado na função cinética, monitorizando o efeito de cada infusão na redução do NBT provocada por  $O_2^{\bullet-}$ , a 560 nm.

### 2. 3. 1. Método não enzimático (NADH/PMS)

O radical superóxido é gerado pelo sistema NADH/PMS: após redução pelo NADH, a PMS reduzida reage com o oxigénio produzindo  $O_2^{\bullet-}$ :





Neste trabalho a capacidade das infusões para sequestrar  $\text{O}_2^{\bullet-}$  foi avaliada de acordo com o método descrito por Fernandes e colaboradores (1999).

As amostras e o controlo foram colocados, em triplicado, em placas de 96 poços para leitura no leitor de placas. Em cada poço adicionou-se, num volume final de 300  $\mu\text{l}$ :

- 50  $\mu\text{l}$  de solução de infusão liofilizada, dissolvida em tampão de fosfatos, ou apenas tampão de fosfatos no caso do controlo.

Para as infusões de Limonete e de Hiperião-do-Gerês as concentrações testadas foram 5,2; 10,4; 20,8; 41,7; 83,3 e 166,7  $\mu\text{g/ml}$ ; para a infusão de Cardo-do-Coalho as concentrações utilizadas foram 52,1; 104,2; 208,3; 416,7; 833,3 e 1666,7  $\mu\text{g/ml}$ ; no caso do Fel-da-Terra usou-se 26,0; 52,1; 104,2; 208,3; 416,7 e 833,3  $\mu\text{g/ml}$ .

- solução de NADH 166  $\mu\text{M}$
- solução de NBT 43  $\mu\text{M}$
- solução de PMS 2,7  $\mu\text{M}$

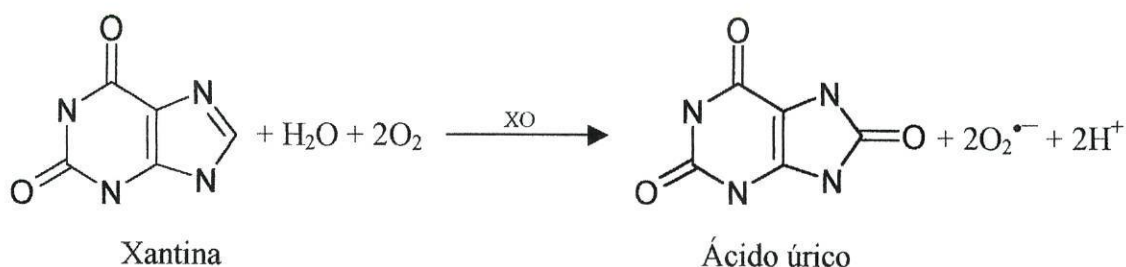
Todos os componentes da mistura foram dissolvidos em tampão de fosfatos ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  19 mM, pH 7,4).

Os ensaios foram conduzidos à temperatura ambiente, durante 2 min, sendo iniciados com a adição da solução de PMS.

Os resultados foram expressos em percentagem de inibição da redução do NBT relativamente ao controlo.

### 2. 3. 2. Método enzimático (xantina/xantina oxidase)

A xantina oxidase (XO) catalisa a oxidação da xantina a ácido úrico, formando-se  $\text{O}_2^{\bullet-}$ :



A actividade das infusões face ao O<sub>2</sub><sup>•-</sup> gerado neste sistema foi avaliada de acordo com o método descrito por Fernandes e colaboradores (1999).

As amostras e o controlo foram colocados, em triplicado, em placas para leitura no leitor de placas. Em cada poço adicionou-se, num volume final de 300 µl:

- 50 µl de solução de infusão liofilizada, dissolvida em tampão de fosfatos, ou apenas tampão de fosfatos no caso do controlo.

No caso das infusões de Limonete e de Hiperião-do-Gerês as concentrações testadas foram 0,5; 1,0; 2,1; 4,2; 8,3 e 16,7 µg/ml; para as infusões de Cardo-do-Coalho e de Fel-da-Terra as concentrações utilizadas foram 5,2; 10,4; 20,8; 41,7; 83,3 e 166,7 µg/ml.

- solução de xantina 44 µM
- solução de xantina oxidase 0,29 U/ml
- solução de NBT 50 µM

A xantina foi dissolvida em hidróxido de sódio 1 µM, a xantina oxidase em EDTA 0,1 mM e os restantes componentes da mistura em tampão de fosfatos (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 50 mM com EDTA 0,1 mM, pH 7,8).

Os ensaios foram conduzidos à temperatura ambiente, durante 2 min, sendo iniciados com a adição da solução de xantina oxidase.

Os resultados foram expressos em percentagem de inibição da redução do NBT relativamente ao controlo.

### 2.3.3. Estudo do efeito das infusões sobre a xantina oxidase

Atendendo a que uma diminuição na velocidade de redução do NBT, observada quando se aplica o método enzimático, pode ser atribuída não só à capacidade de sequestrar o radical superóxido, mas também à inibição da xantina oxidase (Halliwell *et al.*, 1995), o efeito provocado pelas diferentes infusões na actividade da enzima foi avaliado. Para isso procedeu-se à monitorização espectrofotométrica da conversão da xantina em ácido úrico, que apresenta um máximo de absorção a 295 nm.

As determinações foram realizadas em triplicado, num espectrofotómetro de feixe duplo (Shimadzu 160) programado na função cinética, para absorção a 295 nm. A mistura reactiva continha, num volume final de 600 µl:

- 100 µl de solução de infusão liofilizada, dissolvida em tampão de fosfatos, ou apenas tampão de fosfatos no caso do controlo.

No caso das infusões de Limonete e de Hiperião-do-Gerês as concentrações testadas foram 0,5; 1,0; 2,1; 4,2; 8,3 e 16,7 µg/ml; para as infusões de Cardo-do-Coalho e de Fel-da-Terra as concentrações utilizadas foram 5,2; 10,4; 20,8; 41,7; 83,3 e 166,7 µg/ml.

- solução de xantina 44 µM
- solução de xantina oxidase 0,29 U/ml

A xantina foi dissolvida em hidróxido de sódio 1 µM, a xantina oxidase em EDTA 0,1 mM e os restantes componentes da mistura em tampão de fosfatos (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 50 mM com EDTA 0,1 mM, pH 7,8).

Os ensaios foram conduzidos à temperatura ambiente, durante 2 min, sendo iniciados com a adição da solução de xantina oxidase.

Os resultados foram expressos em percentagem de inibição da actividade da xantina oxidase relativamente ao controlo.

### *Estudo do tipo de inibição sobre a xantina oxidase*

Para determinar qual o tipo de inibição exercido pelas infusões sobre a enzima, o procedimento acima descrito foi executado variando a concentração de xantina (11, 22, 44, 88  $\mu\text{M}$ ), e testando as seguintes concentrações de infusão: 10,7  $\mu\text{g/ml}$  para o Hipericão-do-Gerês, 89,4  $\mu\text{g/ml}$  para o Cardo-do-Coalho e 73,2  $\mu\text{g/ml}$  para o Fel-da-Terra (ver 2. 3. 3.); estas concentrações correspondem às  $\text{IC}_{50}$  encontradas, para cada caso, no método enzimático. A infusão de limonete não foi testada porque não inibiu a xantina oxidase

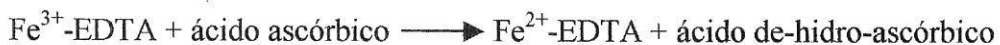
Com os resultados obtidos construíram-se os gráficos correspondentes à representação de Lineweaver-Burk (1/velocidade vs 1/xantina). Para cada caso foram calculadas a velocidade máxima da reacção ( $V_{\text{máx}}$ ) e a constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ), sabendo que o valor de  $1/V_{\text{máx}}$  é dado pela intercepção da recta com o eixo dos yy e que o valor  $1/K_m$  corresponde à intercepção com o eixo dos xx (Moran *et al.*, 1994).

## **2. 4. Avaliação da actividade sequestrante das infusões para o radical hidroxilo**

Os radicais hidroxilo são gerados em misturas constituídas por peróxido de hidrogénio,  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA e ácido ascórbico (sistema de Fenton) (Halliwell, 1995), segundo a reacção:

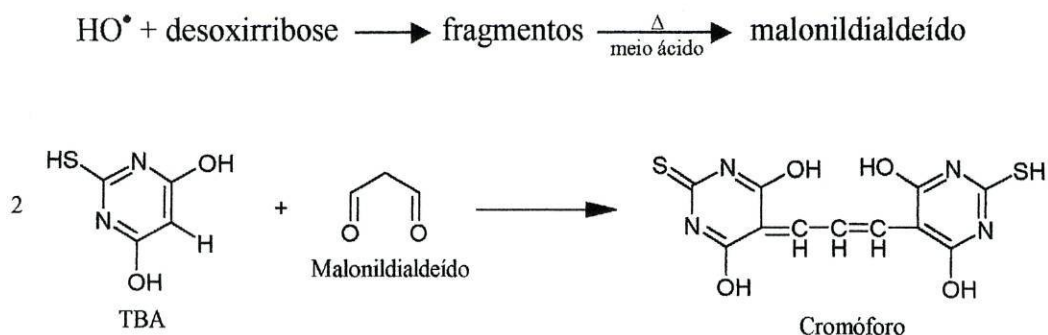


Esta reacção é acelerada pela presença de agentes redutores como o ácido ascórbico, que reduzem o  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  e, também, o  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$ . (Puppo, 1992):



No método da desoxirribose, o  $\text{HO}^{\bullet}$  produzido pelo sistema de Fenton degrada o açúcar, formando-se uma mistura de produtos. O aquecimento desta mistura, em meio ácido, origina malonildiadeído, que é detectado pela reacção com o ácido tiobarbitúrico

(TBA), formando-se um cromóforo de cor rosa, com um máximo de absorção a 532 nm (Halliwell *et al.*, 1987):



A actividade das infusões face a  $\text{HO}^{\bullet}$  foi avaliada de acordo com o método descrito por Payá *et al.* (1992).

As determinações foram realizadas em duplicado, num espectrofotómetro de feixe duplo (Shimadzu 160) programado na função fotométrica, para absorção a 532 nm. A mistura reactiva continha, num volume final de 1 ml:

- 10  $\mu\text{l}$  de solução de infusão liofilizada, dissolvida em tampão de fosfatos, ou apenas tampão de fosfatos no caso do controlo.

No caso das infusões de Limonete e de Hipericão-do-Gerês as concentrações testadas foram 0,03; 0,16; 0,80; 4,00; 20,0; 100 e 500  $\mu\text{g/ml}$ ; para as infusões de Cardo-do-Coalho e de Fel-da-Terra as concentrações utilizadas foram 3,1; 12,5; 50,0; 200 e 800  $\mu\text{g/ml}$ .

- solução de ácido ascórbico 50  $\mu\text{M}$
- solução de  $\text{FeCl}_3$  20  $\mu\text{M}$
- solução de EDTA 2 mM
- $\text{H}_2\text{O}_2$  1,42 mM
- solução de desoxirribose 2,8 mM

Todos os componentes da mistura foram dissolvidos em tampão de fosfatos ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -KOH 10mM, pH 7,4).

A mistura foi incubada a 37 °C durante 1 hora. Após esse período, adicionou-se 1 ml de ácido tricloroacético a 2,8% e 1 ml de solução de ácido tiobarbitúrico a 1% (m/v) (solução extemporânea).

A solução resultante foi aquecida durante 15 min em banho de água a 100 °C. Depois de arrefecida leu-se a sua absorvência a 532 nm.

Os compostos que apresentam capacidade para reduzir o íão metálico, necessário à produção de HO<sup>•</sup>, podem actuar como pró-oxidantes, aumentando a formação do radical (Li e Xie, 2000). Para avaliar o potencial pró-oxidante das infusões, o ensaio foi também efectuado na ausência de ácido ascórbico.

A degradação da desoxirribose ocorre igualmente se no sistema de Fenton omitirmos o EDTA. Compostos com capacidade para complexar ferro retiram o metal e tornam-no inactivo ou com pouca actividade na reacção de Fenton, impedindo, assim, a degradação da desoxirribose (Payá *et al.*, 1992; Ko *et al.*, 1995; Moran *et al.*, 1997). Para avaliar a capacidade das infusões para quelatar metais, ensaios na ausência de EDTA foram também realizados.

## **2. 5. Avaliação da actividade sequestrante das infusões para o ácido hipocloroso**

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

### ***Síntese do ácido hipocloroso***

Neste trabalho foi preparada uma solução extemporânea de HOCl, ajustando com ácido sulfúrico diluído uma solução de NaOCl (contendo 4% de cloro), disponível no comércio, até pH 6,2. A concentração da solução de HOCl foi determinada espectrofotometricamente a 235 nm, usando um coeficiente de extinção de 100 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Payá *et al.*, 1992). A solução foi posteriormente diluída com água, de modo que a oxidação posterior do TNB não fosse superior a 50%.

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

O TNB foi obtido de acordo com Ching e colaboradores (1994). Preparou-se uma mistura de DTNB 1 mM em tampão de fosfatos (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-KOH 50mM com EDTA

5 mM, pH 6,6) com borohidreto de sódio 20 mM. A solução resultante foi incubada a 37 °C durante 30 min. A concentração de TNB foi determinada medindo a absorvência da solução a 412 nm, usando um coeficiente de extinção de  $13\,600\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ .

### ***Ensaio da reactividade com o HOCl***

As determinações foram realizadas em duplicado, num espectrofotómetro Shimadzu 160, programado na função fotométrica, para absorção a 412 nm. A cuvette continha, num volume final de 600 µl:

- 160 µl de solução de infusão liofilizada, dissolvida em tampão de fosfatos, ou apenas tampão de fosfatos no caso do controlo.

No caso das infusões de Limonete e de Hiperião-do-Gerês as concentrações testadas foram 62,5; 125; 250; 500 e 1000 µg/ml; para as infusões de Cardo-do-Coalho e de Fel-da-Terra as concentrações utilizadas foram 125; 250; 500 e 1000 µg/ml.

- solução de TNB 40 µM
- HOCl 40 µM

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

Neste ensaio o ácido lipóico foi usado como composto de referência. Os resultados foram expressos em percentagem de TNB que não foi oxidado a DTNB.

### **3. Resultados e Discussão**



## **Índice**

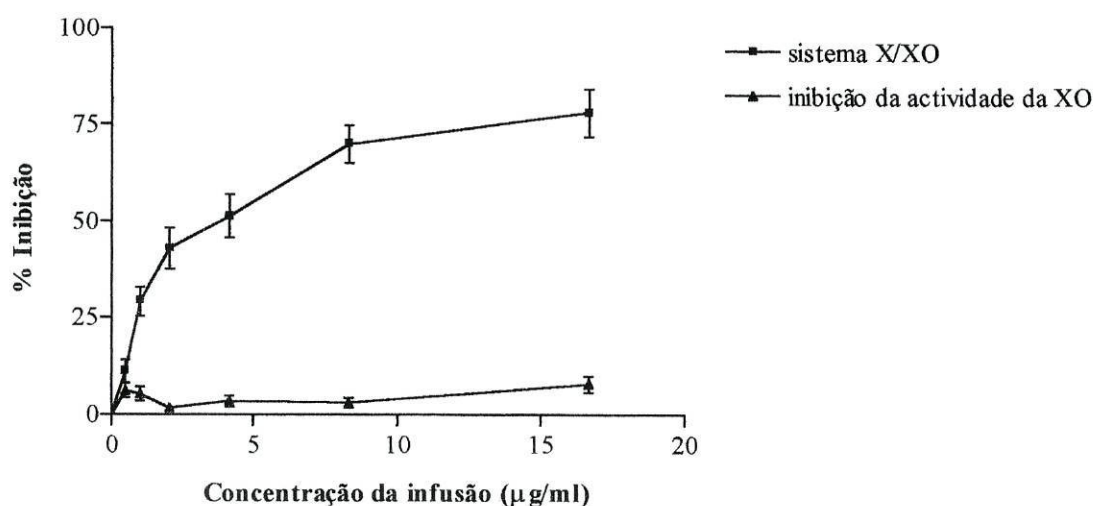
3. 1. Limonete.....	205
3. 2. Hipericão-do-Gerês.....	210
3. 3. Cardo-do-Coalho.....	215
3. 4. Fel-da-Terra.....	220

### 3. Resultados e Discussão

#### 3. 1. Limonete

O objectivo deste trabalho consistia na avaliação da capacidade antioxidante da infusão de Limonete. Esta constitui a forma tradicional de uso desta planta, sendo utilizada no tratamento de problemas digestivos, asma, constipações, cólicas e diarreia (Paris e Moyses, 1971; Van Hellemont, 1986; Newall *et al.*, 1996; Bruneton, 1999; Pascual *et al.*, 2001). Para isso estudou-se a actividade sequestrante da infusão liofilizada obtida das suas folhas para algumas espécies reactivas de oxigénio, nomeadamente os radicais superóxido e hidroxilo e o ácido hipocloroso.

A infusão de Limonete apresentou grande reactividade face ao radical superóxido gerado pelo sistema xantina/xantina oxidase (X/XO), com uma concentração inibitória de 50% da reacção (IC<sub>50</sub>) de 3,3 µg/ml (Figura 16). Para concentrações de infusão liofilizada entre 0,5 e 8,3 µg/ml o efeito observado foi dependente da concentração.

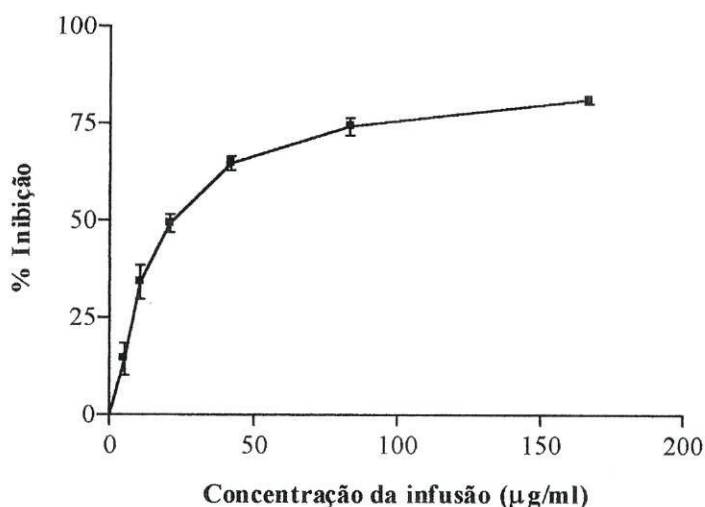


**Figura 16** - Efeito da infusão de Limonete sobre a redução do NBT induzida pelo  $O_2^{\bullet-}$  gerado no sistema X/XO e sobre a actividade da xantina oxidase. Os valores são apresentados sob a forma de média  $\pm$  erro padrão (n=4).

Atendendo a que a diminuição na velocidade de redução do NBT obtida no sistema X/XO pode ser atribuída quer à capacidade da infusão para sequestrar o radical

superóxido, quer à diminuição na produção de  $O_2^{\bullet-}$  por inibição da enzima (Halliwell *et al.*, 1995), procedeu-se ao estudo da conversão da xantina em ácido úrico, em presença da infusão. Contudo, nas condições do ensaio, não se observou qualquer efeito da infusão na actividade da xantina oxidase (**Figura 16**).

A actividade sequestrante de  $O_2^{\bullet-}$  pela infusão de limonete foi confirmada quando este radical foi gerado no sistema químico constituído por PMS, NADH e oxigénio, obtendo-se um valor de  $IC_{50}$  de 22,8  $\mu\text{g/ml}$  (**Figura 17**).



**Figura 17** - Efeito da infusão de Limonete sobre a redução do NBT induzida pelo  $O_2^{\bullet-}$  gerado no sistema NADH/PMS. Os valores são apresentados sob a forma de média  $\pm$  erro padrão ( $n=4$ ).

A infusão de Limonete apresentou também actividade sequestradora do radical hidroxilo gerado no sistema de Fenton, de forma dependente da concentração, apresentando um valor de  $IC_{25}$  de 0,81  $\mu\text{g/ml}$  (**Tabela 2**). As concentrações mais elevadas da infusão (100 e 500  $\mu\text{g/ml}$ ) não foram testadas nas condições do ensaio, uma vez que a partir da concentração de 4,00  $\mu\text{g/ml}$  observou-se um efeito pró-oxidante da infusão, traduzido num aumento da absorvência registada a 532 nm.

Para estudar o potencial pró-oxidante da infusão, o ensaio foi repetido nas mesmas condições, mas sem ácido ascórbico; deste modo avalia-se a capacidade da infusão para reduzir o ião férrico a ferroso, que conduziria a um aumento da produção de  $HO^{\bullet}$ . Os resultados obtidos revelaram que, para concentrações superiores a 4,00  $\mu\text{g/ml}$ , a infusão de Limonete é um substituto eficaz do ácido ascórbico no sistema de

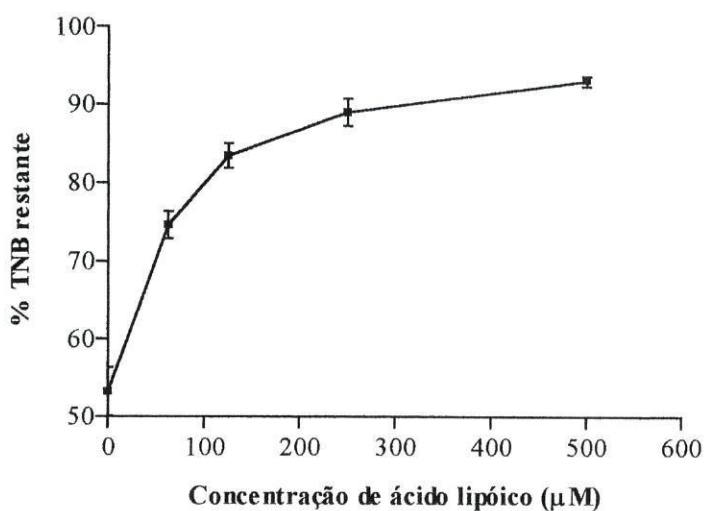
Fenton, como se comprova pelo aumento da absorvência (**Tabela 2**). Estes resultados estão de acordo com os obtidos no ensaio anterior, indicando que a infusão de Limonete poderá actuar como pró-oxidante para concentrações acima de 4,00 µg/ml.

**Tabela 2** - Efeito da infusão de Limonete face a HO<sup>•</sup> no ensaio com desoxirribose, em presença e na ausência de ácido ascórbico (-AA) ou de EDTA (-EDTA).

Concentração da infusão (µg/ml)	Absorvência (532 nm)	Actividade sequestradora (%)	Absorvência (-AA) (532 nm)	Absorvência (-EDTA) (532 nm)
0,00	0,374	-	0,158	0,250
0,03	0,364	2,9	0,140	0,225
0,16	0,334	11,0	0,125	0,221
0,80	0,281	24,9	0,120	0,248
4,00	0,231	38,3	0,146	0,244
20,0	0,249	33,6	0,252	0,226
100	-	-	0,470	0,152
500	-	-	0,446	0,113

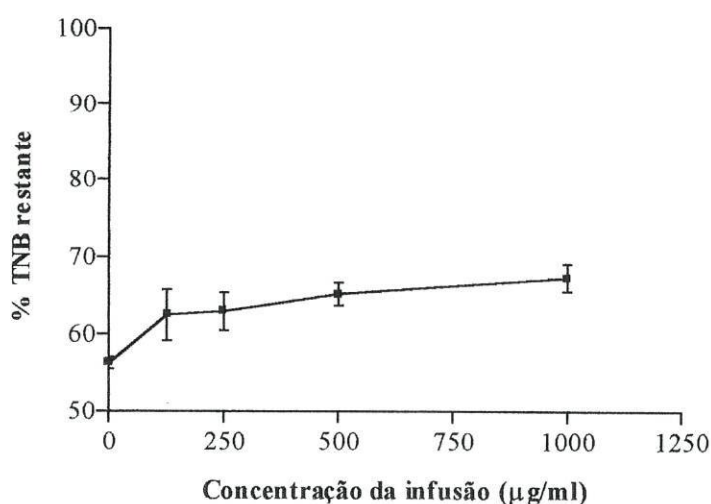
O ensaio para avaliação da actividade sequestrante do radical hidroxilo foi, ainda, executado na ausência de EDTA, para verificar se a infusão tinha capacidade para complexar iões ferro, diminuindo, assim, a quantidade de malonildialdeído formado a partir da degradação da desoxirribose. Da **Tabela 2** podemos inferir que a infusão de Limonete é capaz de quelatar ferro, uma vez que se verificou uma diminuição da absorvência, dependente da concentração, quando o ensaio foi realizado sem EDTA.

Sob as condições experimentais descritas no capítulo Metodologia, o ácido lipóico usado como composto de referência sequestrou eficazmente o HOCl, de um modo dependente da concentração. O efeito sequestrante de HOCl, traduzido pela inibição da oxidação do TNB, foi de 95% para uma concentração de 500 µM de ácido lipóico (**Figura 18**).



**Figura 18** - Efeito do ácido lipóico na oxidação do TNB induzida por HOCl. A quantidade de TNB que não sofreu alteração está expressa em percentagem da quantidade inicial. Os valores são apresentados sob a forma de média  $\pm$  erro padrão (n=4).

A infusão de Limonete, apesar de não ser tão eficaz, inibiu a oxidação do TNB, apresentando, por isso, alguma capacidade para sequestrar ácido hipocloroso (**Figura 19**).



**Figura 19** - Efeito da infusão de Limonete na oxidação do TNB induzida por HOCl. A quantidade de TNB que não sofreu alteração está expressa em percentagem da quantidade inicial. Os valores são apresentados sob a forma de média  $\pm$  erro padrão (n=4).

O valor obtido na determinação de grupos fenólicos na infusão liofilizada de Limonete foi de  $0,373 \pm 0,0059$  mg de fenóis / mg de liofilizado (ver Parte A, 3. 4.).

Para tentar relacionar a actividade antioxidante demonstrada com alguns dos seus constituintes, uma alíquota de infusão liofilizada foi submetida a análise por CLAP, de acordo com o descrito na Parte A. Os resultados obtidos revelaram a presença de verbascósido, um composto com uma ampla distribuição nas plantas, e outros compostos derivados da luteolina (ver Parte A, 3. 4.).

Os ácidos hidroxicinâmicos estão presentes nas plantas sob as formas livre, esterificada ou glicosilada. A acção fisiológica da molécula ligada ao ácido hidroxicinâmico é geralmente secundária (Bengoechea *et al.*, 1995). Os flavonóides, por seu lado, podem ser absorvidos na forma de aglicona ou de heterósido (Croft, 1998).

A actividade antioxidante do verbascósido, um derivado hidroxicinâmico (ver parte A, 1. 1.), foi já intensamente estudada, apresentando este composto um forte efeito protector em diversos modelos experimentais, tais como supressão da peroxidação lipídica induzida por NADPH/ $\text{CCl}_4$  em microssomas de rato (Xiong *et al.*, 1998), inibição da peroxidação lipídica induzida por ácido ascórbico/ $\text{Fe}^{2+}$  e por ADP/NADPH/ $\text{Fe}^{3+}$  em fígado de rato (Xiong *et al.*, 1996), inibição da oxidação de lipoproteínas de baixo peso molecular (LDL) induzida por  $\text{Cu}^{2+}$  (Seidel *et al.*, 2000), captação de radicais superóxido e hidroxilo recorrendo a métodos de “spin trap” (Wang *et al.*, 1996), captação de radicais superóxido gerados pelo sistema NADH/PMS (Zhou e Zheng, 1991), captação de radicais 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) e de radicais superóxido gerados pelo sistema xantina/xantina oxidase (Xiong *et al.*, 1996). Esta actividade poderá ser atribuída quer ao grupo cafeóilo existente na molécula de verbascósido, quer ao resíduo feniletilo desta molécula (Xiong *et al.*, 1998).

A capacidade da luteolina e seus derivados para sequestrar radicais foi, também, avaliada anteriormente em diversos trabalhos, nomeadamente através da determinação do seu efeito protector da peroxidação de LDL mediada por  $\text{Cu}^{2+}$  (Brown e Rice-Evans, 1998; Brown *et al.*, 1998), inibição da peroxidação lipídica induzida pelo ferro em lipossomas (Arora *et al.*, 1998), inibição da oxidação num sistema composto por  $\beta$ -caroteno e ácido linoleico e actividade anti-radicalar face ao DPPH (Burda e Oleszek, 2001; Igile *et al.*, 1994), supressão da formação de radicais superóxido induzida pela N-formil-metionil-leucil-fenilalanina ou pelo ácido araquidónico em neutrófilos (Lu *et al.*, 2002), actividade sequestradora de radicais hidroxilo gerados pelo sistema de Fenton (Shimoi *et al.*, 1994) e captação de radicais hidroxilo gerados por fotólise do peróxido

de hidrogénio (Husain *et al.*, 1987). A posição do grupo glucuronilo é importante para a actividade antioxidante da molécula, pois o potencial de redução do anel B destes compostos é inferior ao do anel A (Spencer *et al.*, 1999). Contudo, neste caso a conjugação com o ácido glucurónico é feita no hidroxilo existente no anel A, exercendo menor influência no potencial antioxidante da luteolina (Spencer *et al.*, 1999).

Considerando os resultados obtidos podemos dizer que a infusão de limonete é dotada de uma forte actividade antioxidante, que está relacionada com a sua capacidade para sequestrar radicais superóxido e hidroxilo e ácido hipocloroso. Atendendo à sua composição fenólica, os efeitos observados neste estudo poderão ser devidos, em parte, à presença de verbascósido e de derivados da luteolina (Valentão *et al.*, 2002d).

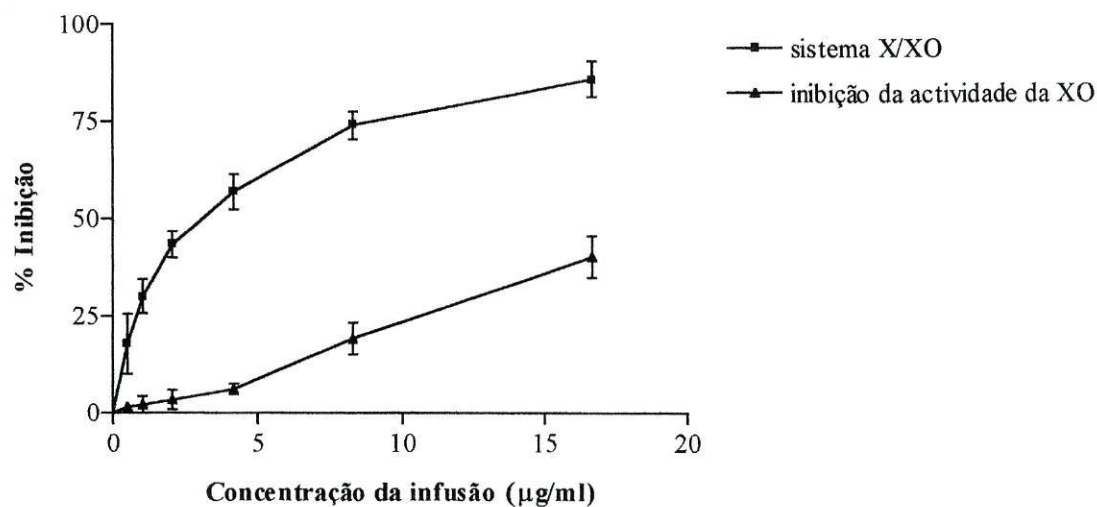
### 3. 2. Hipericão-do-Gerês

As folhas do Hipericão-do-Gerês são usadas na medicina popular para preparar infusões com actividade diurética e hepatoprotectora (Costa, 1994). Pretendeu-se com este estudo avaliar a capacidade antioxidante da infusão, através do seu comportamento relativamente aos radicais superóxido e hidroxilo e ao ácido hipocloroso.

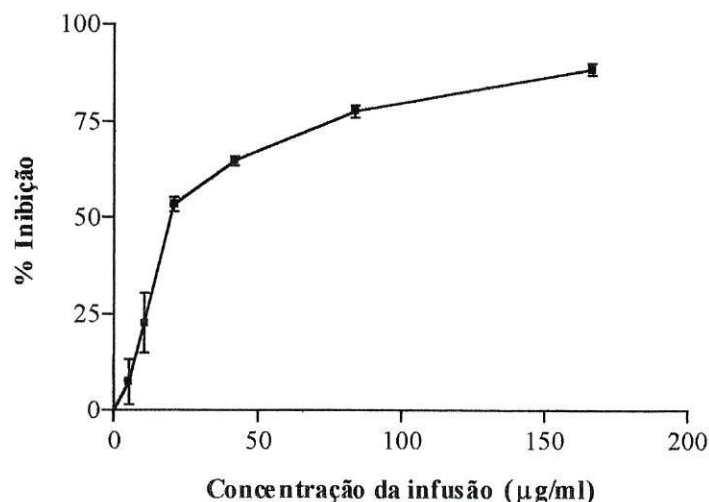
Os resultados obtidos quando o radical superóxido foi gerado no sistema X/XO revelaram uma forte capacidade da infusão de Hipericão-do-Gerês para sequestrar este radical, de um modo dependente da concentração ( $IC_{50} = 2,9 \mu\text{g/ml}$ ) (**Figura 20**).

Tendo em atenção o facto da inibição da xantina oxidase poder também levar à diminuição da redução do NBT (Halliwell *et al.*, 1995), o efeito da infusão de Hipericão-do-Gerês na conversão da xantina em ácido úrico, catalisada por aquela enzima, foi determinado. Os resultados demonstraram que esta infusão exerce uma ligeira inibição sobre a XO, tendo-se encontrado um  $IC_{25}$  de  $10,7 \mu\text{g/ml}$  (**Figura 20**).

Face a estes dados não é possível demonstrar claramente uma acção sequestradora de  $O_2^{\bullet-}$  nítida. Assim, a acção da infusão foi também avaliada usando o sistema NADH/PMS para gerar este radical. Os resultados encontrados indicaram um  $IC_{50}$  de  $25,6 \mu\text{g/ml}$  (**Figura 21**).



**Figura 20** - Efeito da infusão de Hipericão-do-Gerês sobre a redução do NBT induzida pelo  $O_2^{\bullet-}$  gerado no sistema X/XO e sobre a actividade da xantina oxidase. Os valores são apresentados sob a forma de média  $\pm$  erro padrão (n=4).



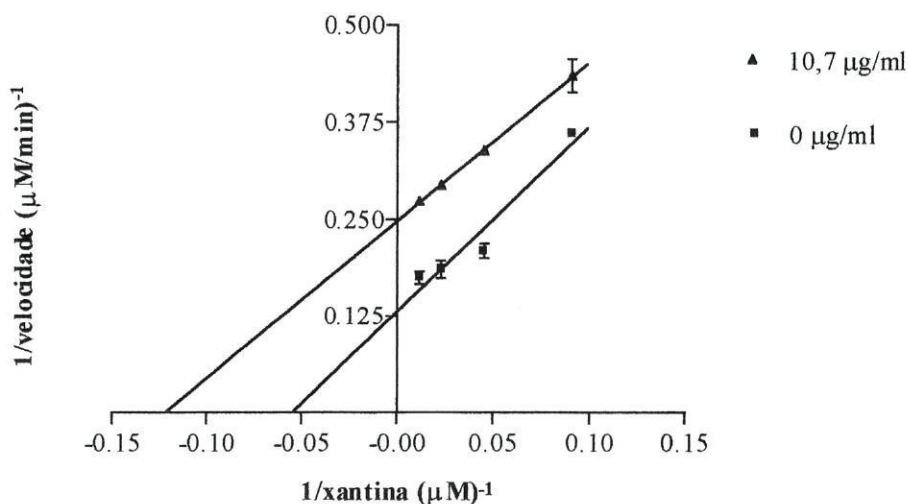
**Figura 21** - Efeito da infusão de Hipericão-do-Gerês sobre a redução do NBT induzida pelo  $O_2^{\bullet-}$  gerado no sistema NADH/PMS. Os valores são apresentados sob a forma de média  $\pm$  erro padrão (n=4).

Para determinar o tipo de inibição exercido pela infusão sobre a XO, a actividade da enzima foi testada usando diferentes concentrações de substrato (X) (**Figura 22**). Na presença da infusão, quer a velocidade máxima da reacção ( $V_{m\acute{a}x}$ ) quer a constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) diminuíram, de 7,6 para 4,0  $\mu M/min$  e de 18,2



para 8,2, respectivamente. Estes resultados sugerem um tipo de inibição não competitiva misto, isto é, os constituintes da infusão ligam-se à enzima e ao complexo enzima/substrato, mas com maior afinidade para este último (Moran *et al.*, 1994).

Deste modo concluímos que a infusão de Hipericão-do-Gerês tem capacidade para sequestrar radicais superóxido, e também para impedir a sua formação na reacção catalisada pela xantina oxidase, por inibição da enzima.



**Figura 22** - Representação de Lineweaver-Burk para a inibição exercida pela infusão de Hipericão-do-Gerês sobre a xantina oxidase, com xantina como substrato. Os valores são apresentados sob a forma de média  $\pm$  erro padrão ( $n=3$ ).

A infusão de Hipericão-do-Gerês é capaz de sequestrar radicais hidroxilo gerados pelo sistema de Fenton, como ficou demonstrado pela inibição da degradação da desoxirribose, traduzida na diminuição da absorvência a 532 nm ( $IC_{25} = 1,89 \mu\text{g/ml}$ ) (Tabela 3). O aumento da absorvência registado para a concentração de  $20 \mu\text{g/ml}$  indicava alguma actividade pró-oxidante da infusão; por esta razão não foi avaliado o efeito das concentrações mais elevadas (100 e  $500 \mu\text{g/ml}$ ).

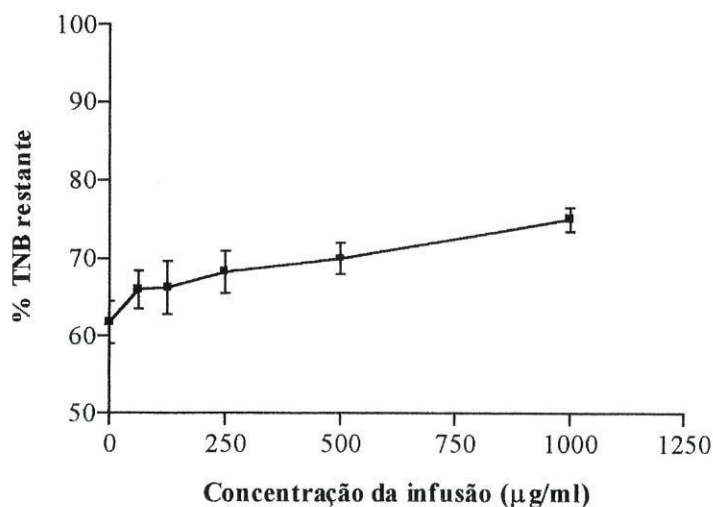
Estes resultados foram posteriormente confirmados quando o ensaio foi repetido sem ácido ascórbico (Tabela 3). De facto, para concentrações superiores a  $4 \mu\text{g/ml}$  registou-se um aumento da absorvência a 532 nm, provocado pela maior produção de substâncias reactivas com o ácido tiobarbitúrico; estes resultados indicam uma maior formação de radicais hidroxilo no sistema de Fenton, sugerindo que a infusão de Hipericão-do-Gerês é dotada de forte poder redutor dos iões férricos.

**Tabela 3** - Efeito da infusão de Hiperião-do-Gerês face a HO<sup>\*</sup> no ensaio com desoxirribose, em presença e na ausência de ácido ascórbico (-AA) ou de EDTA (-EDTA).

Concentração da infusão (µg/ml)	Absorvência (532 nm)	Actividade sequestradora (%)	Absorvência (-AA) (532 nm)	Absorvência (-EDTA) (532 nm)
0,00	0,374	-	0,158	0,250
0,03	0,358	4,1	0,136	0,240
0,16	0,345	7,8	0,137	0,224
0,80	0,303	19,0	0,125	0,223
4,00	0,267	28,6	0,149	0,229
20,0	0,288	23,2	0,237	0,226
100	-	-	0,364	0,172
500	-	-	0,396	0,115

Contudo, a infusão é capaz de quelatar iões metálicos, de um modo dependente da concentração, como se observou no ensaio executado na ausência de EDTA (**Tabela 3**). Para concentrações mais elevadas a infusão reduz claramente a quantidade de substâncias reactivas com o ácido tiobarbitúrico, levando a uma diminuição da absorvência lida a 532 nm.

A determinação da actividade sequestrante do ácido hipocloroso demonstrou que a infusão tem capacidade para captar esta espécie reactiva de oxigénio, uma vez que inibiu a oxidação do TNB a DTNB (**Figura 23**). O efeito observado foi dependente da concentração.



**Figura 23** - Efeito da infusão de Hiperício-do-Gerês na oxidação do TNB induzida por HOCl. A quantidade de TNB que não sofreu alteração está expressa em percentagem da quantidade inicial. Os valores são apresentados sob a forma de média  $\pm$  erro padrão (n=4).

A determinação de grupos fenólicos na infusão liofilizada de Hiperício-do-Gerês indicou a existência de  $0,386 \pm 0,0102$  mg de fenóis / mg de liofilizado (ver Parte A, 4. 4.).

Para tentar estabelecer uma relação entre a composição fenólica da infusão e a actividade antioxidante observada, a infusão foi submetida a uma análise por CLAP, de acordo com o descrito na Parte A deste trabalho. Desse modo foram identificados os ácidos 3- e 5-*O*-cafeoilquínicos, quercetina 3-*O*-sulfato, quercetina 3-*O*-galactósido, quercetina 3-*O*-glucósido, quercetina 3-*O*-arabinósido e quercetina (ver Parte A, 4. 4.).

A actividade antioxidante do ácido 5-*O*-cafeoilquínico foi descrita em trabalhos anteriores, em diversos modelos experimentais e para diferentes ROS, apresentando este composto capacidade para inibir a oxidação de LDL (Vinson *et al.*, 1995; Laranjinha *et al.*, 1994), capacidade para sequestrar o radical alquilperoxilo em ensaios baseados no efeito bactericida deste radical (Sawa *et al.*, 1999), capacidade para sequestrar radicais superóxido gerados num sistema enzimático contendo xantina oxidase e inibição da oxidação do linoleato de metilo (Nakatani *et al.*, 2000), capacidade para sequestrar DPPH e reduzir a produção de malonildialdeído numa emulsão de ácido linoleico (Fukumoto e Mazza, 2000), capacidade para quelatar ferro no sistema de Fenton e inibir a oxidação do ácido linoleico (Moran *et al.*, 1997).

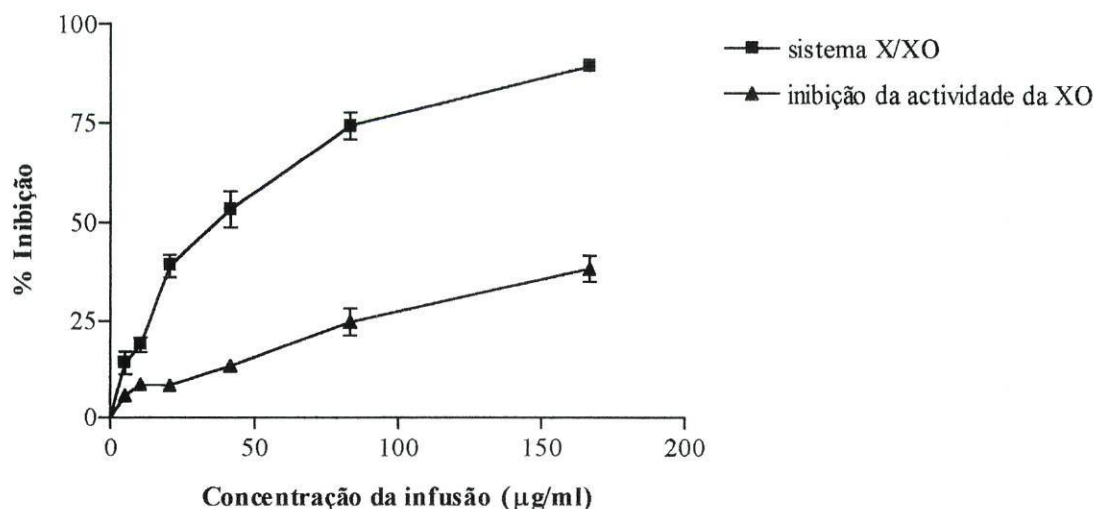
A quercetina, dada a sua ampla distribuição nas plantas é, talvez, o composto fenólico mais estudado. A sua actividade antioxidante, bem como a dos seus derivados, está exaustivamente comprovada em vários ensaios, tais como na prevenção da formação do hidroperóxido do linoleato de metilo (Hopia e Heinonen, 1999), sequestro de radicais superóxido gerados nos sistemas X/XO e NADH/PMS (Robak e Gryglewski, 1988), sequestro do radical alquilperoxilo em ensaios baseados no efeito bactericida deste radical (Sawa *et al.*, 1999), inibição da lipoxigenase e da cicloxigenase em leucócitos de rato, inibição da peroxidação lipídica em microssomas de fígado de rato e inibição da degradação do ADN em presença de iões ferro (Laughton *et al.*, 1991), inibição da oxidação de LDL (Vinson *et al.*, 1995), sequestro de DPPH e redução da produção de malonildialdeído numa emulsão de ácido linoleico (Fukumoto e Mazza, 2000), prevenção da peroxidação do ácido linoleico em micelas de dodecilsulfato de sódio (Foti *et al.*, 1996), inibição da oxidação num sistema composto por  $\beta$ -caroteno e ácido linoleico (Burda e Oleszek, 2001) e captação de radicais hidroxilo gerados por fotólise do peróxido de hidrogénio (Husain *et al.*, 1987).

Face à composição da infusão de Hipericão-do-Gerês, e atendendo particularmente à predominância de derivados da quercetina, os efeitos sequestradores verificados em relação aos radicais superóxido e hidroxilo e ao ácido hipocloroso poderão ser atribuídos, em parte, à presença destes compostos (Valentão *et al.*, 2002e).

### 3. 3. Cardo-do-Coalho

As folhas de Cardo-do-Coalho têm sido tradicionalmente usadas como diurético, colerético e hepatoprotector (Paris, 1971). Sendo a infusão a forma mais comum de utilização desta espécie, com este trabalho pretendeu-se estudar a capacidade antioxidante deste extracto. Para esse efeito avaliou-se a sua actividade sequestrante dos radicais superóxido e hidroxilo e do ácido hipocloroso.

A infusão de Cardo-do-Coalho inibiu a redução do NBT a formazan provocada pelos radicais superóxido gerados no sistema X/XO, tendo-se encontrado um IC<sub>50</sub> de 35,0  $\mu$ g/ml (**Figura 24**).

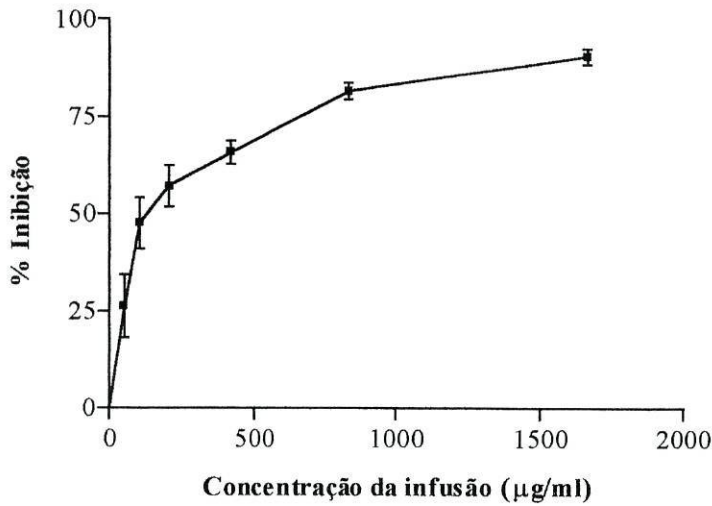


**Figura 24** - Efeito da infusão de Cardo-do-Coalho sobre a redução do NBT induzida pelo  $O_2^{\bullet-}$  gerado no sistema X/XO e sobre a actividade da xantina oxidase. Os valores são apresentados sob a forma de média  $\pm$  erro padrão (n=4).

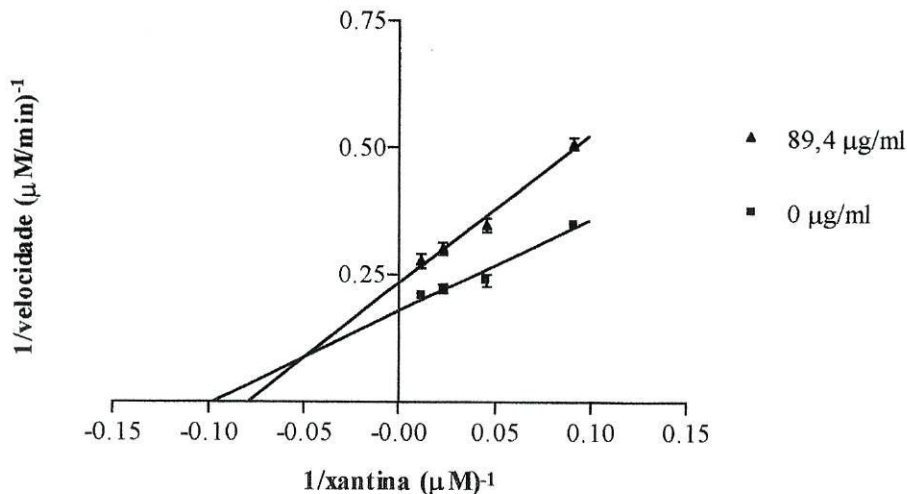
O efeito da infusão na conversão da xantina em ácido úrico, por acção da xantina oxidase, foi avaliado com o objectivo de verificar se o resultado obtido no ensaio anterior poderia ser devido à inibição da enzima. Os resultados revelaram que a infusão apresenta capacidade para inibir a XO ( $IC_{50}$  de 89,4  $\mu\text{g/ml}$ ) (**Figura 24**) e, por isso, não foi possível demonstrar de forma clara a actividade sequestrante do radical superóxido.

Para esclarecer a informação recolhida destes ensaios, o efeito da infusão face ao radical superóxido gerado no sistema químico NADH/PMS foi também avaliado, tendo-se encontrado o valor de  $IC_{50}$  a 145,2  $\mu\text{g/ml}$  (**Figura 25**).

O estudo efectuado para elucidar o tipo de inibição exercido pela infusão sobre a XO revelou uma diminuição da velocidade máxima da reacção de conversão da xantina em ácido úrico, de 5,6 para 4,3  $\mu\text{M/min}$ , e um aumento de  $K_m$ , de 10,2 para 12,5 (**Figura 26**). Estes resultados apontam para uma inibição não competitiva mista, ou seja, os constituintes da infusão ligam-se quer à enzima quer ao complexo enzima/substrato, mas com maior afinidade para a primeira (Moran *et al.*, 1994).



**Figura 25** - Efeito da infusão de Cardo-do-Coalho sobre a redução do NBT induzida pelo  $O_2^{\bullet-}$  gerado no sistema NADH/PMS. Os valores são apresentados sob a forma de média  $\pm$  erro padrão (n=4).



**Figura 26** - Representação de Lineweaver-Burk para a inibição exercida pela infusão de Cardo-do-Coalho sobre a xantina oxidase, com xantina como substrato. Os valores são apresentados sob a forma de média  $\pm$  erro padrão (n=3).

O comportamento da infusão de Cardo-do-Coalho face ao radical superóxido assenta, portanto, quer na sua capacidade para sequestrar este radical quer na inibição da sua produção a partir da xantina oxidase.

A infusão de Cardo-do-Coalho apresentou também uma forte capacidade para sequestrar o radical hidroxilo, de um modo dependente da concentração, como se pode observar pela diminuição da absorvência a 532 nm ( $IC_{50} = 27,3 \mu\text{g/ml}$ ) (**Tabela 4**).

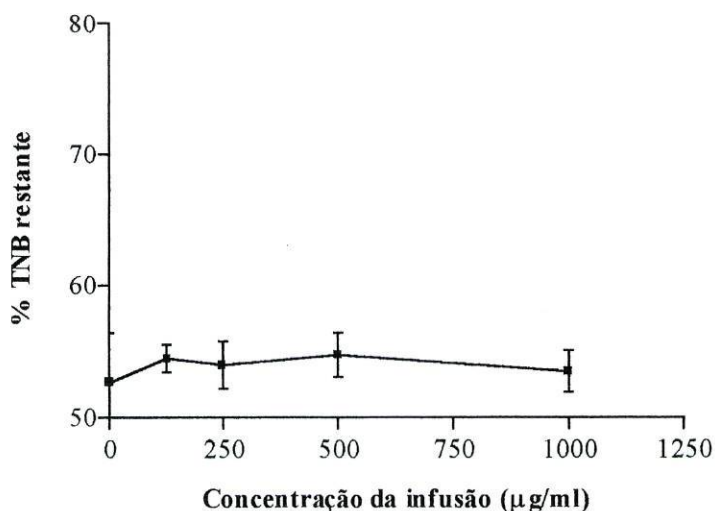
**Tabela 4** - Efeito da infusão de Cardo-do-Coalho face a  $HO^{\bullet}$  no ensaio com desoxirribose, em presença e na ausência de ácido ascórbico (-AA) ou de EDTA (-EDTA).

Concentração da infusão ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorvência (532 nm)	Actividade sequestradora (%)	Absorvência (-AA) (532 nm)	Absorvência (-EDTA) (532 nm)
0,00	0,401	-	0,151	0,212
3,10	0,325	19,0	0,124	0,205
12,5	0,235	41,5	0,093	0,247
50	0,182	54,8	0,092	0,261
200	0,134	66,7	0,104	0,201
800	0,115	71,5	0,106	0,092

A ausência de ácido ascórbico no sistema de Fenton provocou uma ligeira redução na produção de  $HO^{\bullet}$ , diminuindo assim a degradação da desoxirribose (**Tabela 4**). Atendendo a estes resultados, podemos dizer que, nas concentrações testadas, a infusão não foi capaz de reduzir o ião férrico necessário para gerar aquele radical, não tendo, por isso, actividade pró-oxidante.

A capacidade para quelatar metais foi testada no ensaio realizado sem EDTA. Nessas condições a infusão preveniu a degradação do açúcar apenas para concentrações superiores a  $200 \mu\text{g/ml}$  (**Tabela 4**).

O estudo da actividade sequestrante da infusão de Cardo-do-Coalho face ao ácido hipocloroso revelou que esta infusão não inibe a oxidação do TNB, induzida por esta ROS (**Figura 27**).



**Figura 27** - Efeito da infusão de Cardo-do-Coalho na oxidação do TNB induzida por HOCl. A quantidade de TNB que não sofreu alteração está expressa em percentagem da quantidade inicial. Os valores são apresentados sob a forma de média  $\pm$  erro padrão (n=4).

O valor obtido na determinação de grupos fenólicos na infusão liofilizada de Cardo-do-Coalho foi de  $0,054 \pm 0,006$  mg de fenóis / mg de liofilizado (ver Parte A, 5. 4.).

Para tentar relacionar a composição fenólica da infusão com o efeito protector revelado neste estudo, uma alíquota de infusão liofilizada foi analisada por CLAP. Foram identificados sete compostos, nomeadamente ácidos 3-, 4, e 5-*O*-cafeoilquínicos, ácidos 1,3 e 1,5-*O*-dicafeoilquínicos, luteolina 7-*O*-glucósido, e apigenina 7-*O*-glucósido (ver Parte A, 5. 4.).

A actividade antioxidante do ácido 5-*O*-cafeoilquínico e dos seus isómeros, bem como a da luteolina e seus derivados, foi observada anteriormente em diversos trabalhos, conforme o referido para o Hiperião-do-Gerês (ver 3. 2.) e Limonete (ver 3. 1.), respectivamente.

É de salientar que, num estudo efectuado com extractos padronizados provenientes das folhas de uma outra espécie do mesmo Género, concretamente a *Cynara scolymus*, foi possível verificar não só a sua capacidade para inibir a peroxidação lipídica induzida pelo *tert*-butil-hidroperóxido, mas também a do ácido 5-*O*-cafeoilquínico e da cinarina (Gebhardt, 1997). Nesse trabalho observou-se, também, o efeito sinérgico resultante da mistura destes dois compostos, que parecem contribuir



para a actividade antioxidante exibida pelos extractos; contudo, atendendo à presença de outros compostos não identificados, o ácido 5-*O*-cafeoilquínico e a cinarina poderão não ser os únicos compostos a contribuir para a actividade antioxidante total dos extractos.

Outros autores estudaram a acção dos compostos identificados nesta infusão, em diferentes sistemas. O ácido 1,5-*O*-dicafeoilquínico demonstrou actividade anti-radicalar em neutrófilos (Heilmann *et al.*, 1995) e capacidade para inibir a oxidação do linoleato de metilo (Maruta *et al.*, 1995).

A capacidade antioxidante da apigenina e seus derivados ficou, também, demonstrada em diferentes estudos, nomeadamente na inibição da oxidação de LDL (Vinson *et al.*, 1995), inibição da oxidação num sistema composto por  $\beta$ -caroteno e ácido linoleico e actividade anti-radicalar face ao DPPH (Burda e Oleszek, 2001), capacidade para quelatar ferro no sistema de Fenton e inibição da oxidação do ácido linoleico (Moran *et al.*, 1997) e sequestro de radicais hidroxilo gerados por fotólise do peróxido de hidrogénio (Husain *et al.*, 1987).

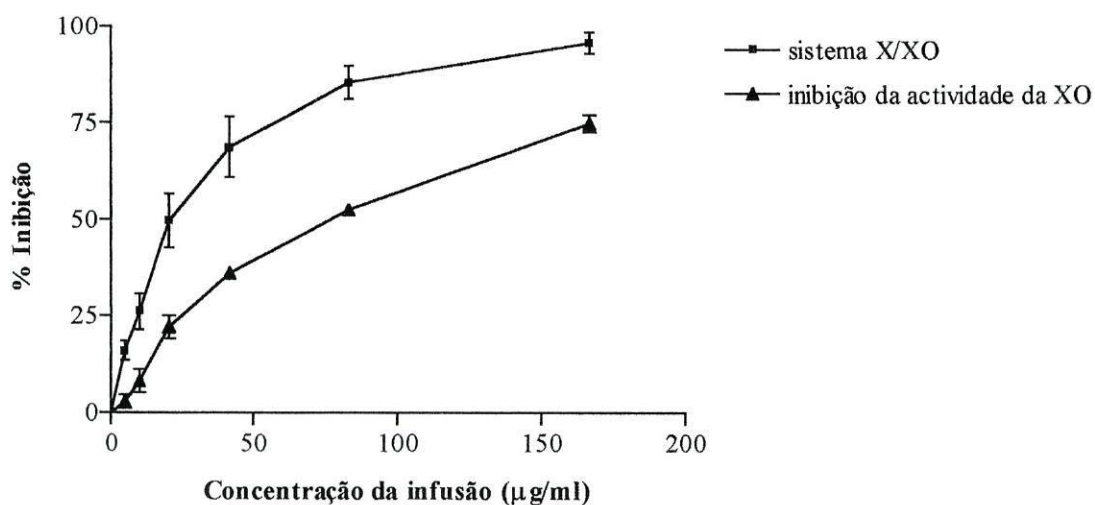
Atendendo aos resultados obtidos, e à existência de diversos compostos fenólicos na infusão de Cardo-do-Coalho, a actividade sequestrante observada em relação aos radicais superóxido e hidroxilo pode ser devida, em parte, à presença destes compostos no extracto (Valentão *et al.*, 2002f).

### **3. 4. Fel-da-Terra**

A infusão das sumidades floridas constitui a principal forma de utilização do Fel-da-Terra, usada devido às suas propriedades analgésica, anti-inflamatória, antipirética, aperitiva, depurativa, digestiva, febrífuga, sedativa e tónica (Paris e Moyse, 1971; Van Hellefont, 1986; Berkan *et al.*, 1991; Newall *et al.*, 1996; Bruneton, 1999). O objectivo deste trabalho consistiu na avaliação da capacidade antioxidante deste extracto, através do estudo da sua actividade sequestrante face aos radicais superóxido e hidroxilo e ao ácido hipocloroso.

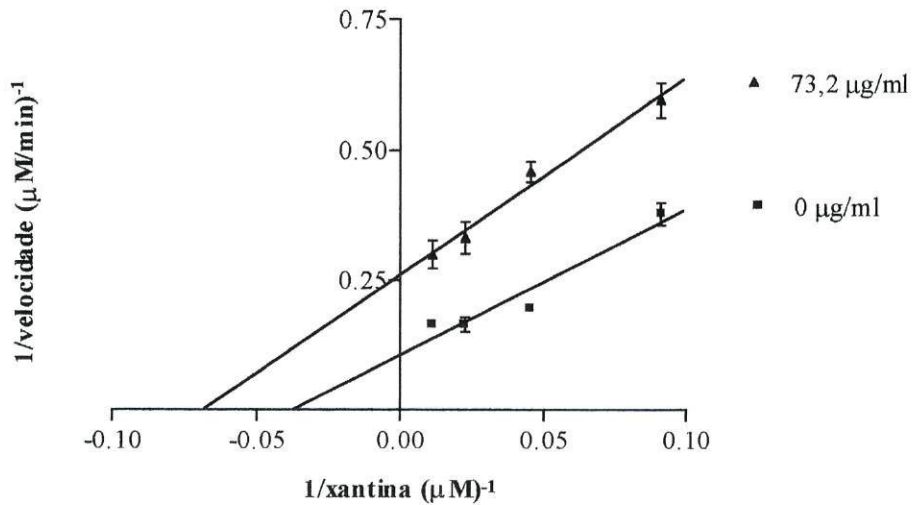
A infusão de Fel-da-Terra demonstrou uma grande capacidade para inibir a redução do NBT, provocada pelo radical superóxido gerado no sistema enzimático, situando-se o valor de  $IC_{50}$  em 22,8  $\mu\text{g/ml}$  (**Figura 28**).

Dada a possibilidade de, neste ensaio, o efeito observado ser consequência, não só do sequestro de  $O_2^{\bullet-}$ , mas também da inibição da xantina oxidase, a acção exercida pela infusão sobre a enzima foi avaliada. Os resultados obtidos revelaram que a infusão inibe fortemente a conversão da xantina em ácido úrico, de um modo dependente da concentração ( $IC_{50} = 73,2 \mu\text{g/ml}$ ) (**Figura 28**).



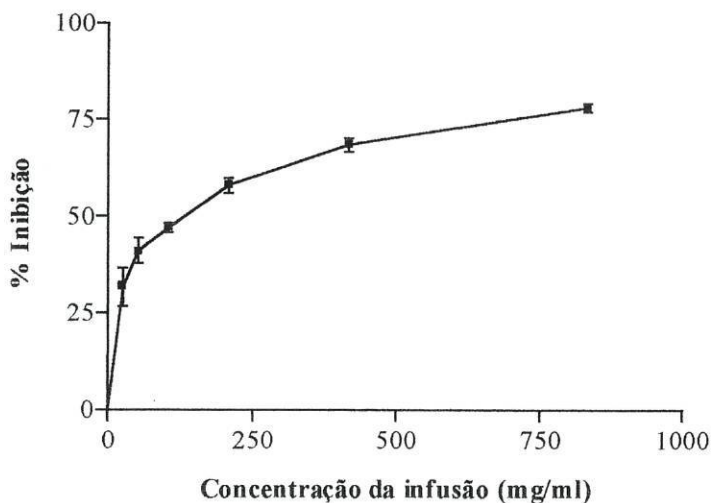
**Figura 28** - Efeito da infusão de Fel-da-Terra sobre a redução do NBT induzida pelo  $O_2^{\bullet-}$  gerado no sistema X/XO e sobre a actividade da xantina oxidase. Os valores são apresentados sob a forma de média  $\pm$  erro padrão ( $n=4$ ).

Para determinar o tipo de inibição envolvido, este ensaio foi repetido com várias concentrações de xantina (**Figura 29**). Na presença da infusão, os valores encontrados para  $V_{m\acute{a}x}$  e  $K_m$  diminuíram de 9,4 para 3,8  $\mu\text{M}$  e de 26,6 para 14,6, respectivamente. Face a estes resultados concluímos que se trata de um tipo de inibição não competitiva misto, segundo o qual os constituintes da infusão têm maior afinidade para se ligar ao complexo X/XO do que à xantina oxidase (Moran *et al.*, 1994).



**Figura 29** - Representação de Lineweaver-Burk para a inibição exercida pela infusão de Fel-da-Terra sobre a xantina oxidase, com xantina como substrato. Os valores são apresentados sob a forma de média  $\pm$  erro padrão (n=3).

Para esclarecer o comportamento da infusão face ao radical superóxido, o ensaio de redução do NBT foi também efectuado recorrendo ao sistema NADH/PMS para gerar este radical. Os resultados confirmaram a capacidade da infusão para sequestrar  $O_2^{\bullet-}$ , de um modo dependente da concentração, com  $IC_{50}$  a 120,2  $\mu\text{g/ml}$  (**Figura 30**).



**Figura 30** - Efeito da infusão de Fel-da-Terra sobre a redução do NBT induzida pelo  $O_2^{\bullet-}$  gerado no sistema NADH/PMS. Os valores são apresentados sob a forma de média  $\pm$  erro padrão (n=4).

Assim, podemos dizer que a infusão de Fel-da-Terra é dotada de actividade antioxidante, sendo capaz de sequestrar radicais superóxido e de inibir a xantina oxidase.

O estudo efectuado em relação ao radical hidroxilo demonstrou que a infusão de Fel-da-Terra apresenta um elevado potencial para sequestrar este radical, impedindo a degradação da desoxirribose de um modo dependente da concentração ( $IC_{50} = 39,5 \mu\text{g/ml}$ ) (**Tabela 5**).

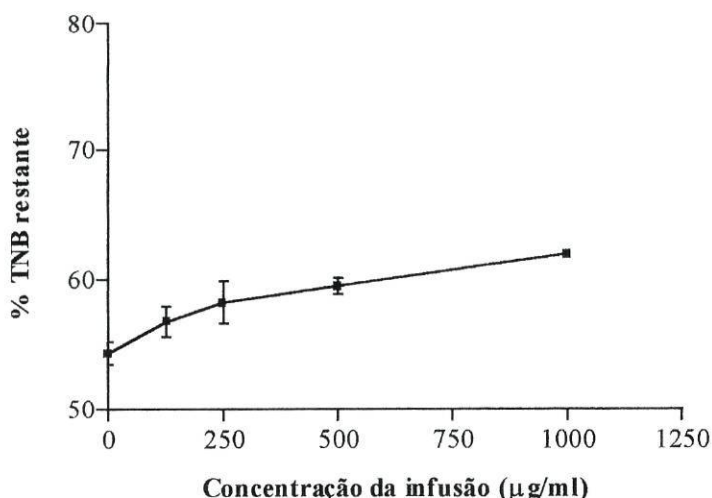
A presença de compostos com acção pró-oxidante na infusão conduziria a uma maior produção de radicais hidroxilo por redução dos iões férricos no sistema de Fenton, e, conseqüentemente, a um aumento da absorvência lida a 532 nm. Nas concentrações testadas a infusão não revelou actividade pró-oxidante, conforme ficou demonstrado no ensaio realizado sem ácido ascórbico (**Tabela 5**).

A capacidade para complexar iões metálicos foi avaliada no ensaio executado na ausência de EDTA. Para concentrações superiores a  $50 \mu\text{g/ml}$  registou-se uma diminuição da absorvência, traduzindo o efeito protector da infusão contra a decomposição do açúcar (**Tabela 5**).

**Tabela 5** - Efeito da infusão de Fel-da-Terra face a  $HO^{\bullet}$  no ensaio com desoxirribose, em presença e na ausência de ácido ascórbico (-AA) ou de EDTA (-EDTA).

Concentração da infusão ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorvência (532 nm)	Actividade sequestradora (%)	Absorvência (-AA) (532 nm)	Absorvência (-EDTA) (532 nm)
0.0	0.401	-	0.151	0.212
3.1	0.289	27.8	0.114	0.221
12.5	0.235	41.5	0.115	0.219
50	0.195	51.6	0.130	0.247
200	0.162	59.7	0.147	0.153
800	0.147	63.5	0.150	0.090

Relativamente ao ácido hipocloroso, os resultados encontrados revelaram que a infusão de Fel-da-Terra apresenta algum efeito protector contra esta ROS, uma vez que conseguiu inibir a oxidação do TNB a DTNB, de modo dependente da concentração (**Figura 31**).



**Figura 31** - Efeito da infusão de Fel-da-Terra na oxidação do TNB induzida por HOCl. A quantidade de TNB que não sofreu alteração está expressa em percentagem da quantidade inicial. Os valores são apresentados sob a forma de média  $\pm$  erro padrão (n=4).

A determinação de grupos fenólicos na infusão liofilizada de Hipericão-do-Gerês indicou a existência de  $0,112 \pm 0,0044$  mg de fenóis / mg de liofilizado (ver Parte A, 6. 5. 2.).

A actividade antioxidante da infusão de Fel-da-terra poderá ser atribuída à presença de compostos fenólicos, nomeadamente ésteres dos ácidos *p*-cumárico, ferúlico e sinápico, e kaempferol, revelados pela análise por CLAP, após hidrólise alcalina, de uma alíquota da infusão (ver Parte A, 6. 5. 2.).

A actividade antioxidante dos ácidos *p*-cumárico, ferúlico e sinápico e seus ésteres está descrita em diversos modelos experimentais. Os exemplos incluem a prevenção da oxidação de LDL e capacidade para sequestrar radicais peróxido (Vinson *et al.*, 1995; Natella *et al.*, 1999), capacidade para sequestrar DPPH e reduzir a produção de malonildialdeído numa emulsão de ácido linoleico (Fukumoto e Mazza, 2000), protecção da peroxidação do ácido linoleico em micelas de dodecilsulfato de sódio (Foti *et al.*, 1996), capacidade para quelatar ferro no sistema de Fenton e inibir a oxidação do ácido linoleico (Moran *et al.*, 1997), capacidade para sequestrar radicais superóxido gerados no sistema X/XO e inibição da peroxidação lipídica induzida por estes radicais (Toda *et al.*, 1991), capacidade para sequestrar DPPH, inibição da auto-oxidação do linoleato de metilo e da oxidação de lipossomas (Kikuzaki *et al.*, 2002).

O kaempferol apresenta, também, actividade antioxidante, comprovada em diferentes estudos, que incluem a inibição da lipoxigenase e da cicloxigenase em leucócitos de rato, inibição da peroxidação lipídica em microsomas de fígado de rato e inibição da degradação do ADN em presença de iões ferro (Laughton *et al.*, 1991), inibição da oxidação de LDL (Vinson *et al.*, 1995), capacidade para sequestrar o radical alquilperoxilo em ensaios baseados no efeito bactericida deste radical (Sawa *et al.*, 1999), capacidade para sequestrar DPPH e reduzir a produção de malonildialdeído numa emulsão de ácido linoleico (Fukumoto e Mazza, 2000), inibição da oxidação num sistema composto por  $\beta$ -caroteno e ácido linoleico (Burda e Oleszek, 2001) e sequestro de radicais hidroxilo gerados por fotólise do peróxido de hidrogénio (Husain *et al.*, 1987).

Considerando os resultados obtidos, o efeito protector demonstrado pela infusão de Fel-da-Terra deve-se à sua capacidade para sequestrar radicais superóxido e hidroxilo, inibir a xantina oxidase e sequestrar ácido hipocloroso. Entre os diversos compostos presentes neste extracto, os compostos fenólicos concorrem, certamente, para este efeito (Valentão *et al.*, 2001, 2002g).

## **4. Conclusões**

- O trabalho desenvolvido constitui o primeiro estudo sobre a actividade antioxidante de qualquer uma das espécies. O estudo efectuado com as infusões da folhas de Limonete, Hiperição-do-Gerês, e Cardo-do-Coalho e das sumidades floridas de Fel-da-Terra confirma a actividade antioxidante atribuída a certos produtos naturais.
- As infusões de cada uma das quatro espécies, a forma mais comum para a sua utilização, foram avaliadas relativamente à sua capacidade para captar os radicais superóxido e hidroxilo e o ácido hipocloroso.
- As quatro infusões revelaram grande capacidade para sequestrar o radical superóxido, quer no sistema X/XO quer no sistema NADH/PMS. As infusões de Limonete e de Hiperição-do-Gerês foram aquelas que exibiram maior actividade.
- À excepção da infusão de Limonete, todas as infusões demonstraram capacidade para inibir a xantina oxidase, de modo não competitivo, impedindo, assim, a formação de radicais superóxido. A infusão de Fel-da-Terra é aquela que exerce maior efeito inibidor sobre esta enzima.
- Todas as infusões em estudo revelaram aptidão para sequestrar radicais hidroxilo gerados no sistema de Fenton, bem como para quelatar iões ferro. As infusões de Cardo-do-Coalho e de Fel-da-Terra foram aquelas que apresentaram maior actividade sequestrante para este radical. Com o Limonete e o Hiperição-do-Gerês observou-se algum efeito pró-oxidante, para as concentrações mais elevadas (100 e 500 µg/ml).
- As infusões exibiram capacidade para sequestrar ácido hipocloroso, com a excepção da infusão de Cardo-do-Coalho que não tem actividade sobre esta espécie reactiva de oxigénio.
- O efeito protector encontrado poderá ser justificado pela presença de diversos compostos fenólicos nas infusões. A actividade observada deve ser atribuída a interacções entre estes compostos e os restantes constituintes de cada infusão, já que



a extracção com água, a alta temperatura, arrasta compostos de diferentes classes químicas.

- De um modo geral, as infusões de Limonete e de Hiperição-do-Gerês exibiram maior actividade sequestrante para as ROS estudadas. Este facto poderá estar relacionado com a presença de maior quantidade de fenóis nas infusões destas duas espécies: 0,373 mg de fenóis / mg liofilizado para o Limonete, e 0,386 mg de fenóis / mg liofilizado na infusão de Hiperição-do-Gerês; nas infusões de Cardo-do-Coalho e de Fel-da-Terra o teor em fenóis era consideravelmente menor (0,054 e 0,112 mg de fenóis / mg liofilizado, respectivamente).
- A ingestão destas infusões contribuirá para o aumento das defesas antioxidantes do organismo, protegendo-o dos efeitos deletérios causados pelas espécies reactivas de oxigénio.
- As infusões de Hiperição-do-Gerês, Cardo-do-Coalho e Fel-da-Terra poderão ter algum interesse na terapêutica da gota, devido à sua capacidade para inibir a xantina oxidase, impedindo, assim, a formação de ácido úrico. Pela mesma razão poderão ser associadas à prevenção da doença isquémica do coração e da hipertensão.
- Atendendo a actividade sequestrante de todas as infusões, face aos radicais superóxido e hidroxilo e ao ácido hipocloroso, estes extractos poderão desempenhar um papel importante em processos inflamatórios, nos quais são produzidas espécies reactivas de oxigénio e de azoto ( $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $HO^{\bullet}$ ,  $^1O_2$ ,  $HOCl$ ,  $^{\bullet}NO$ ,  $ONOO^-$ ).

**PARTE B2**

**Acção hepatoprotectora**

## **1. Fundamentos teóricos**

## Índice

1. 1. Introdução.....	235
1. 2. Toxicidade de <i>terc</i> -butil-hidroperóxido.....	236

## 1. Fundamentos teóricos

### 1. 1. Introdução

O fígado é, por excelência, um órgão alvo dos xenobióticos. A acção deletéria exercida por substâncias químicas sobre o fígado tem sido objecto de numerosos estudos. A acentuada vulnerabilidade deste órgão face aos danos induzidos por agentes químicos está relacionada com a sua proximidade anatómica ao sangue proveniente do aparelho digestivo, a capacidade para concentrar e biotransformar xenobióticos e com o seu papel na excreção destes compostos ou seus metabolitos para a bile. A hepatotoxicidade depende não só da substância química envolvida, mas também do período de exposição. Geralmente após uma intoxicação aguda verifica-se acumulação lipídica nos hepatócitos, necrose celular ou disfunção hepatobiliar, enquanto que alterações cirróticas ou neoplásicas são resultado de exposição crónica (Plaa e Charbonneau, 2001).

Os danos celulares induzidos por substâncias químicas poderão resultar, em parte, do stresse oxidativo resultante do efeito dessas substâncias sobre o metabolismo do oxigénio molecular, que conduz à oxidação de constituintes celulares, tais como compostos de baixo peso molecular contendo grupos tiólicos, incluindo a glutathione, grupos tiólicos proteicos e outros grupos funcionais de macromoléculas, e à peroxidação de lípidos e outros constituintes celulares. Muitas destas substâncias, como o acetaminofeno, sofrem processos de bioactivação, originando intermediários reactivos, que se ligam a macromoléculas e aumentam a formação de radicais de oxigénio. Contudo, conforme referido anteriormente, todas as células possuem sistemas de destoxificação e antioxidantes que previnem ou limitam o dano celular (Reed, 1998).

Das espécies envolvidas neste trabalho, o Hipericão-do-Gerês e o Cardo-do-Coalho são utilizados tradicionalmente em medicina popular como hepatoprotectores, sob a forma de infusão (Costa, 1994; Amico e Sorce, 1997; Farinha *et al.*, 1998). Contudo, não temos conhecimento da existência de qualquer estudo que comprove esta actividade. No âmbito da valorização farmacológica da espécie, e numa tentativa de demonstrar a acção que lhe é atribuída, pareceu-nos interessante avaliar a actividade hepatoprotectora do Hipericão-do-Gerês, por ser a espécie mais utilizada com esta finalidade. Nesse sentido, foram efectuados ensaios com a infusão liofilizada de

Hiperião-do-Gerês, para avaliar a acção protectora contra a toxicidade induzida pelo *tert*-butil-hidroperóxido (*t*-BHP) *in vitro*, em hepatócitos isolados de rato, e *in vivo*, em ratinhos. A razão pela qual o ensaio *in vivo* não foi realizado em ratos prende-se com a quantidade limitada de liofilizado disponível para o ensaio.

Para a avaliação da capacidade citoprotectora da infusão de Hiperião-do-Gerês, no ensaio *in vitro* procedeu-se à determinação da viabilidade celular, do conteúdo intracelular de glutathiona reduzida e oxidada (GSH e GSSG) e da extensão da peroxidação lipídica. No ensaio em ratinhos, o estudo foi realizado através da quantificação de transaminases plasmáticas, determinação de GSH e GSSG, determinação da extensão da peroxidação lipídica e exame histológico de cortes de fígado.

## 1. 2. Toxicidade de *tert*-butil-hidroperóxido

O *t*-BHP é um composto frequentemente utilizado para induzir stresse oxidativo em sistemas biológicos. Trata-se de um hidroperóxido orgânico análogo dos hidroperóxidos lipídicos de cadeia curta (Joyeux *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 2002).

A toxicidade induzida por este composto é função da sua metabolização no fígado, que ocorre por duas vias distintas (Figura 1).

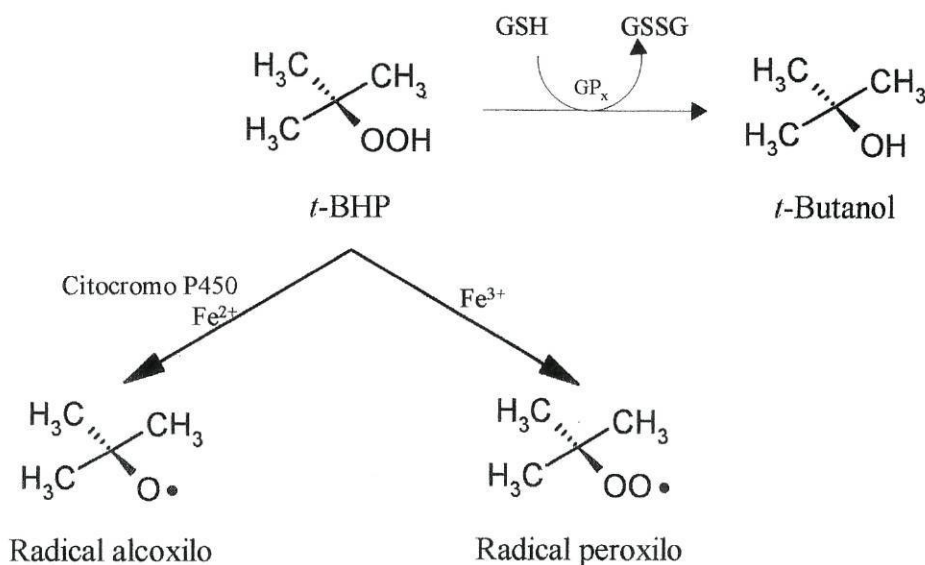
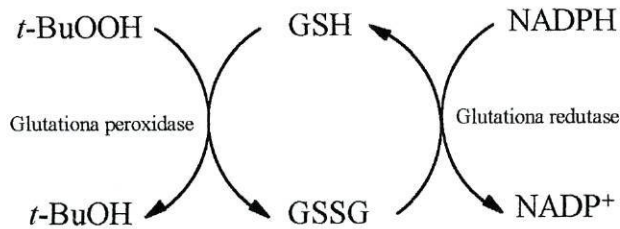


Figura 1 - Representação dos processos de metabolização do *t*-BHP.

O principal processo de metabolização do *t*-BHP envolve a sua redução pela glutathiona peroxidase, originando *t*-butanol, com consumo de glutathiona reduzida (GSH) que é convertida em glutathiona oxidada (GSSG). A GSSG formada é subsequentemente reduzida a GSH pela glutathiona reductase, com oxidação de NADPH (Jewell *et al.*, 1986; Tseng *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2002) (**Figura 2**).



**Figura 2** - Redução do *t*-BHP e ciclo redox da glutathiona.

O *t*-BHP é também metabolizado pelo sistema enzimático citocromo P450 ou pelos íons ferroso e férrico, que catalisam a sua transformação nos radicais alcóxido e peróxido correspondentes (**Figura 1**). Os radicais livres assim formados podem subsequentemente iniciar o processo de peroxidação lipídica referido anteriormente (ver parte B1, 1. 3.), afectar a integridade celular e formar ligações covalentes com moléculas celulares, tais como o ADN e proteínas, danificando a célula (Jewell *et al.*, 1986; Tseng *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2002).

Uma parte significativa dos grupos sulfidrilo proteicos das células é perdida durante a metabolização do *t*-BHP. Esta redução envolve dois mecanismos diferentes: oxidação dos grupos tiólicos livres e/ou formação de dissulfuretos proteicos mistos, por ligação a grupos sulfidrilo de outras moléculas, particularmente aos da GSH. A diminuição dos grupos SH proteicos está íntima e inversamente relacionada com o teor de GSH intracelular, e é acentuada nos hepatócitos que inicialmente possuem baixa concentração de tióis (Jewell *et al.*, 1986; Reed, 1998).

A toxicidade do *t*-BHP traduz-se na libertação celular de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e desidrogenase láctica

(LDH), produção de malonildialdeído e depleção de GSH (Joyeux *et al.*, 1990; Tseng *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2002).

Atendendo à actividade antioxidante referida anteriormente (ver parte B1, 1. 4. 2.), a GSH é a biomolécula mais importante para protecção contra a citotoxicidade induzida por substâncias químicas (Reed, 1998) e, por essa razão, foi considerada um biomarcador importante para avaliação da actividade protectora da infusão de Hiperião-do-Gerês.



## **2. Parte experimental**

## Índice

2. 1. Ensaios <i>in vitro</i> em hepatócitos isolados de rato.....	241
2. 1. 1. Substâncias de referência e reagentes.....	241
2. 1. 2. Animais.....	241
2. 1. 3. Isolamento dos hepatócitos de rato.....	242
2. 1. 4. Incubação dos hepatócitos.....	245
2. 1. 5. Determinação da viabilidade dos hepatócitos isolados.....	246
2. 1. 5. 1. Exclusão do azul de tripano.....	246
2. 1. 5. 2. Libertação da desidrogenase láctica (LDH).....	247
2. 1. 6. Determinação dos níveis de glutathiona total.....	249
2. 1. 7. Determinação dos níveis de glutathiona oxidada.....	250
2. 1. 8. Determinação da extensão da peroxidação lipídica.....	252
2. 2. Ensaios <i>in vivo</i> em ratinhos.....	253
2. 2. 1. Substâncias de referência e reagentes.....	253
2. 2. 2. Animais.....	254
2. 2. 3. Tratamento dos animais.....	254
2. 2. 4. Relação peso do fígado/peso corporal.....	255
2. 2. 5. Determinação dos níveis de glutathiona total.....	255
2. 2. 6. Determinação dos níveis de glutathiona oxidada.....	256
2. 2. 7. Determinação da extensão da peroxidação lipídica.....	258
2. 2. 8. Determinação dos níveis plasmáticos de transaminases.....	258
2. 2. 9. Análise histológica de cortes de fígado.....	259
2. 3. Análise estatística.....	259

## 2. Parte experimental

### 2. 1. Ensaios *in vitro* em hepatócitos isolados

Neste trabalho utilizou-se hepatócitos isolados de rato como modelo *in vitro* para avaliação da acção hepatoprotectora da infusão de Hipericão-do-Gerês. Este modelo tem sido intensamente usado no estudo do metabolismo hepático de xenobióticos e da sua hepatotoxicidade. Como indutor de toxicidade recorreu-se ao *t*-BHP (Jewell *et al.*, 1986; Joyeux *et al.*, 1990).

#### 2. 1. 1. Substâncias de referência e reagentes

O *terc*-butil-hidroperóxido (*t*-BHP), a collagenase (tipo I), a albumina sérica bovina (fracção V), o ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanossulfónico (HEPES), o ácido etilenoglicol-bis(β-aminoetiléter)N,N,N',N'-tetracético (EGTA), o ácido etilenodiaminatetracético (EDTA), o ácido 2-tiobarbitúrico, a forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), a forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), o ácido pirúvico, a 2-vinilpiridina, a forma reduzida da glutathione (GSH), a forma oxidada da glutathione (GSSG), a glutathione redutase (EC 1.6.4.2), o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), a desidrogenase láctica (EC 1.1.1.28) e o azul de tripano foram adquiridos à Sigma (St. Louis, Mo., USA).

O ácido perclórico, o ácido tricloroacético e os restantes reagentes foram fornecidos pela Merck (Darmstadt, Alemanha).

Todos os produtos usados nas experiências tinham grau de pureza "Pro analysi".

#### 2. 1. 2. Animais

Utilizaram-se ratos Wistar (machos), com peso entre 200 e 220 g. Os ratos foram mantidos em gaiolas de polietileno de rede metálica no topo, com aparas de madeira, numa temperatura ambiente de 20±2 °C, humidade entre 40 e 60 % e ciclos de dia/noite de 12/12 horas. Os animais tiveram livre acesso à água e alimento.

Os procedimentos cirúrgicos para remoção do fígado desenvolveram-se sempre entre as 9 e as 10 horas.

### 2. 1. 3. Isolamento dos hepatócitos de rato

A técnica para o isolamento dos hepatócitos foi executada segundo o método de Moldéus e colaboradores (1978), designado por “two-step perfusion”. O fígado é primeiramente perfundido com uma solução isenta de cálcio, contendo um agente quelante específico para este íão (EGTA), para diminuir a funcionalidade dos complexos juncionais cálcio-dependentes. Seguidamente a perfusão é feita com uma solução de colagenase, contendo cálcio para permitir a acção da enzima, que completa a separação dos hepatócitos. Os passos seguintes consistem na dissociação mecânica das células e purificação da suspensão obtida, que permite remover os hepatócitos mortos, células não parenquimatosas (células de Kupfer, adipócitos e células endoteliais) e outras contaminações.

Utilizaram-se sucessivamente quatro soluções tamponadas:

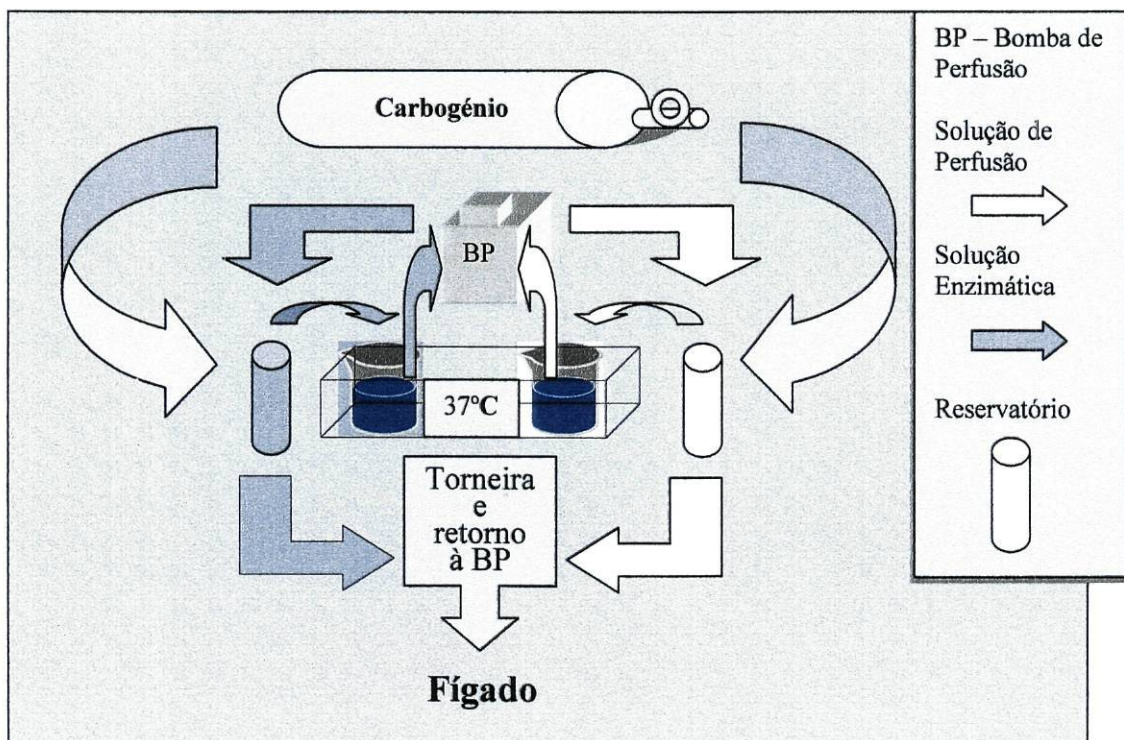
- Solução 1 (solução de perfusão): solução de Hank modificado, pH 7,4 (NaCl, 8,00 g; KCl, 0,40 g; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,20 g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,06 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,06 g; NaHCO<sub>3</sub>, 2,10 g e HEPES 3,00 g, por litro), ao qual se adicionou 0,6 mM EGTA e 0,67% de albumina;
- Solução 2 (solução enzimática): solução de Hank modificado, com 0,05% de colagenase e 0,06% de CaCl<sub>2</sub>;
- Solução 3: solução de Krebs-Henseleit com HEPES, pH 7,4 (NaCl, 6,96 g; KCl, 0,36 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,16 g; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,30 g; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,38 g, NaHCO<sub>3</sub>, 2,10 g e HEPES, 3,00 g, por litro), adicionada de 1% de albumina;
- Solução 4: solução de Krebs-Henseleit com HEPES.

Todas as soluções foram gaseificadas com carbogénio (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>) e a temperatura estabilizada a 37 °C antes da sua utilização. Esta mistura gasosa foi usada durante a perfusão do fígado e a incubação dos hepatócitos.

### Sistema de perfusão

O sistema utilizado para perfundir o fígado com as soluções 1 e 2 (**Figura 3**), referidas anteriormente, era constituído por:

- Uma bomba peristáltica que permitia a circulação das soluções de perfusão;
- Um suporte metálico para dois goblés, um contendo a solução 1 e o outro com a solução 2. Este suporte encontrava-se mergulhado num banho termostático a 37-38 °C. Cada goblé estava ligado à bomba peristáltica por um tubo de silicone mergulhado nas soluções;
- Dois reservatórios com cerca de 10 cm de comprimento e 1,5 cm de largura, com quatro aberturas:
  - a) uma abertura para a entrada de carbogénio, cuja pressão é regulada por um manómetro de pressão;
  - b) uma abertura na parte superior para a entrada da solução de perfusão;
  - c) uma abertura na parte inferior para a saída da solução de perfusão, ligada a um tubo de silicone em cuja extremidade se encontra a cânula;
  - d) uma abertura na parte superior lateral para a saída de carbogénio e da solução de perfusão em excesso, que retorna ao goblé inicial.



**Figura 3** - Esquema do sistema de perfusão (adaptado de Remião, 1998).

### ***Procedimento cirúrgico***

a) Os animais foram anestesiados com éter etílico num recipiente fechado, sendo depois colocados em decúbito dorsal numa placa de dissecação, onde os membros foram convenientemente imobilizados. A manutenção da anestesia durante todo o procedimento cirúrgico foi assegurada com éter etílico.

b) Abriu-se a cavidade abdominal com uma incisão em forma de V, começando na base do abdómen e estendendo-se até um pouco acima do diafragma.

c) Expôs-se a veia porta hepática, deslocando-se as vísceras para a direita. Passaram-se dois fios de algodão por trás da veia porta, fez-se uma pequena incisão neste vaso a cerca de 1 cm do fígado e introduziu-se rapidamente uma cânula. Com o auxílio dos fios de algodão fixou-se a veia à cânula. Iniciou-se, deste modo, a perfusão *in situ*, com solução 1 e fluxo regulado (cerca de 1 a 2 gotas por segundo).

### ***Perfusão do fígado e isolamento dos hepatócitos***

a) Após o início da perfusão *in situ*, o fígado foi transferido para o goblé que continha a solução 1, mantendo-se a perfusão durante 5 minutos.

b) Terminada a perfusão com a solução 1, o fígado foi perfundido com a solução 2, durante 8 a 10 minutos, até perder a sua plasticidade quando levemente pressionado.

c) Retirou-se, então, a cânula do fígado, que foi colocado num recipiente de polietileno contendo solução 3, à temperatura ambiente. Rompeu-se a membrana que reveste o fígado e dispersaram-se as células hepáticas com agitação suave.

d) A suspensão celular obtida foi filtrada por uma rede de poliamida (350 mesh) para dois tubos de centrífuga de 50 ml. Centrifugou-se durante 1 minuto a 300 r.p.m e aspirou-se o sobrenadante.

e) Os tubos foram cheios com solução 4 e agitados muito suavemente para lavar as células. A lavagem, centrifugação e aspiração do sobrenadante foram repetidas mais duas vezes.

f) Por fim, determinaram-se a densidade e a viabilidade dos hepatócitos na suspensão obtida.

#### **2. 1. 4. Incubação dos hepatócitos**

a) A suspensão celular foi distribuída por 6 frascos de 10 ml rolhados e diluída com solução 4, de forma a ter, em cada frasco, 1 ml de suspensão com  $1,0 \times 10^6$  células/ml. Os frascos foram colocados num banho termostatado a 37 °C, com agitação (90 oscilações/minuto), e arejados com carbogénio sempre que eram abertos. As células foram pré-incubadas durante 60 minutos.

b) Após o período de pré-incubação, adicionou-se em cada frasco 10 µl de uma solução de infusão liofilizada de Hiperião-do-Gerês, preparada com a solução 4, de modo a obter 16, 62 e 250 µg de liofilizado por ml de suspensão celular. A concentração mais elevada de infusão liofilizada (250 µg de liofilizado/ml) foi testada em dois frascos. Dois dos frascos foram usados como controlo, tendo sido adicionado, nesta fase, igual volume de solução 4.

Paralelamente, um ensaio com quercetina foi executado como controlo positivo. Para esse efeito adicionou-se em cada frasco 10 µl de uma solução de quercetina, preparada com DMSO, de modo a obter concentrações de 1,6, 12,5 e 50,0 µM na suspensão celular. A concentração mais elevada de quercetina (50,0 µM) foi testada em duplicado. Dois frascos foram sempre utilizados como controlo, tendo sido adicionado, nesta fase, apenas 10 µl de DMSO.

c) Decorridos 5 minutos após a adição da infusão liofilizada, da quercetina, da solução 4 ou de DMSO adicionou-se em todos os frascos 10 µl de *t*-BHP dissolvido na solução 4, numa concentração final de 1,0 mM. Num dos frascos controlo da série correspondente ao ensaio da infusão apenas se juntou 10 µl de solução 4. Num dos

frascos controlo da série correspondente ao ensaio da quercetina apenas se juntou 10 µl de DMSO. Num dos frascos contendo as concentrações mais elevadas de infusão liofilizada ou de quercetina adicionou-se 10 µl de solução 4.

d) Ao fim de 30 minutos de incubação com *t*-BHP, foram retiradas alíquotas de suspensão celular de cada frasco, para a determinação da viabilidade celular, do conteúdo intracelular de GSH e GSSG e da peroxidação lipídica.

### **2. 1. 5. Determinação da viabilidade dos hepatócitos isolados**

Os hepatócitos viáveis são aqueles que possuem morfologia normal, membrana plasmática íntegra e funções bioquímicas normais. Na prática, quando se pretende determinar a viabilidade das células, o que geralmente se avalia é a integridade da membrana plasmática. Para esse efeito recorreu-se a dois métodos: exclusão do corante azul de tripano e libertação da desidrogenase láctica (LDH) para o meio extracelular.

#### **2. 1. 5. 1. Exclusão do azul de tripano**

O azul de tripano é um corante orgânico de carga negativa, que é excluído pelos hepatócitos que possuem as respectivas membranas intactas, como resultado da manutenção do potencial de membrana. A perda desse potencial torna as células com membranas danificadas permeáveis a este corante. Deste modo, os hepatócitos viáveis exibem uma forma esférica, aspecto refringente e cor amarela, enquanto que as células danificadas apresentam-se coradas de azul.

Para determinar o número de células e a viabilidade dos hepatócitos na suspensão celular inicial, retirou-se 40 µl de suspensão celular para um eppendorf e adicionou-se 360 µl de solução azul de tripano a 0,4% em NaCl 0,9%. Procedeu-se à contagem das células ao microscópio óptico (ampliação 40 x), na área central nos dois lados de uma câmara de Neubauer.



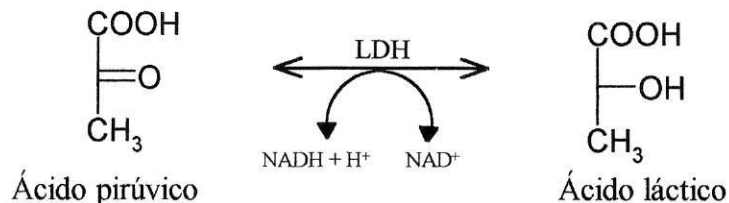
Atendendo ao número de células viáveis obtido, a suspensão celular foi diluída com solução 4, até à concentração pretendida ( $1,0 \times 10^6$  células/ml).

Para a determinação da viabilidade, após a diluição da suspensão, a solução de azul de tripano e a suspensão celular foram misturadas em proporções iguais (0,1 ml/0,1 ml). Para calcular a viabilidade celular, em percentagem, dividiu-se o número de células viáveis pelo número total de células e multiplicou-se por 100.

O rendimento conseguido no isolamento dos hepatócitos variou entre 200 e 400 milhões de células vivas, apresentando uma viabilidade entre 75 e 90%.

### 2. 1. 5. 2. Libertação da desidrogenase láctica (LDH)

A LDH é uma enzima citoplasmática que intervém no último passo da glicólise anaeróbica, catalisando a redução reversível do ácido pirúvico a ácido láctico:



A LDH é um marcador bioquímico de citotoxicidade, *in vitro*, uma vez que o aumento do seu teor a nível extracelular traduz lise das células.

A determinação dos níveis de LDH pode ser útil para a avaliação da viabilidade celular, apresentando algumas vantagens relativamente à técnica de exclusão do azul de tripano. Em oposição à técnica de avaliação pela exclusão do azul de tripano, não tem importância a possível ocorrência de lise celular, uma vez que se pode fazer uma estimativa de danos celulares ainda que as células danificadas se tenham desintegrado. Assim, apesar das células desintegradas terem desaparecido, a LDH correspondente a estas células encontra-se no sobrenadante e, sendo mensurável, traduz exactamente a extensão da perda de viabilidade celular (Plaa e Charbonneau, 2001).

Adicionalmente, são evitados os possíveis erros inerentes ao pequeno número de células que é examinado na técnica de exclusão do azul de tripano.

Será de salientar o facto de a determinação de LDH não ser aconselhada para avaliação da viabilidade celular na suspensão celular inicial, uma vez que, durante o processo de obtenção dos hepatócitos isolados, as células são submetidas a várias lavagens, que levam à remoção da LDH libertada pelas células danificadas.

A quantidade de LDH nas suspensões celulares foi determinada medindo a diminuição da absorvência a 340 nm, quando o NADH é oxidado a NAD<sup>+</sup>.

a) Determinação da LDH extracelular

Retirou-se 200 µl de cada suspensão celular para um eppendorf e centrifugou-se a 13000 r.p.m. durante 20 segundos, numa centrífuga refrigerada (4 °C). Transferiu-se o sobrenadante para outro eppendorf, que foi mantido entre 0 e 4 °C até ao doseamento da LDH, efectuado no próprio dia.

b) Determinação da LDH total

- Retirou-se 200 µl de cada suspensão celular para um eppendorf e manteve-se entre 0 e 4 °C até ao doseamento da LDH.
- Após agitação em vortex, cada amostra foi desintegrada num sonicador (Vibracell 375 W sonicador, Sonics & Materials Danbury, USA) e posteriormente centrifugada a 13000 r.p.m. durante 20 segundos, em centrífuga refrigerada (4 °C). Transferiu-se o sobrenadante para outro eppendorf.

c) Análise cinética da LDH

Programou-se o leitor de placas (Ceres 9000) na função cinética, para absorção a 340 nm. As amostras foram colocadas, em triplicado, em placas para leitura no leitor de placas. Em cada poço adicionou-se:

- 20 µl de amostra, preparada do modo referido anteriormente em a) ou b), e diluída (1:2 ou 1:5, respectivamente, em tampão de fosfatos, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,05 M pH 7,4)
- 140 µl de solução de piruvato de sódio (0,450 mg de piruvato de sódio em 6 ml de tampão de fosfatos, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,05 M pH 7,4)

- 140 µl de solução de NADH (2,556 mg de NADH em 6 ml de tampão de fosfatos)

A reacção foi conduzida a 25 °C, durante 2 minutos, com leituras de 10 em 10 segundos. Registou-se a variação da absorvência a 340 nm, determinando-se assim a velocidade de consumo do NADH.

Os resultados foram expressos em % de LDH libertada.

### 2. 1. 6. Determinação dos níveis de glutathiona total

Os níveis de glutathiona foram determinados recorrendo a um processo enzimático. A GSH é oxidada pelo ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), formando-se GSSG e ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) (1) . A GSSG é reduzida a GSH por acção da glutathiona redutase, com consumo de NADPH. A cinética de formação do TNB é monitorizada a 415 nm e é proporcional à soma da GSH e da GSSG (2).



a) Retirou-se 200 µl de cada suspensão celular para um eppendorf e adicionou-se 200 µl de ácido perclórico a 10%.

b) Após agitação no vortex, cada amostra foi centrifugada a 13000 r.p.m. durante 10 minutos, numa centrífuga refrigerada (4 °C). Retirou-se o sobrenadante que foi congelado a -80 °C até determinação da glutathiona total e da GSSG, no máximo dentro de 15 dias.

c) Em eppendorf adicionou-se 170 µl de cada sobrenadante diluído (1:4, em ácido perclórico a 5%) e 170 µl de KHCO<sub>3</sub> 0,76 M, de modo a neutralizar a acidez.

Cada amostra foi agitada no vortex e centrifugada a 13000 r.p.m. durante 20 segundos, numa centrífuga refrigerada (4 °C).

d) Programou-se o leitor de placas (Ceres 9000) na função cinética, para absorção a 415 nm. As amostras foram colocadas, em triplicado, em placas para leitura no leitor de placas. Em cada poço adicionou-se:

- 100 µl de cada sobrenadante obtido em c)
- 65 µl de solução reagente (4,070 ml de NADPH 1,7 mM; 1,969 ml de DTNB 20,2 mM; 4,007 ml de água; o DTNB e o NADPH foram dissolvidos em tampão de fosfatos: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 57,3 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 81,2 mM com EDTA 0,62 mM, pH 7,5)

e) Após incubação das placas a 30 °C, durante 15 minutos, adicionou-se, em cada poço, 40 µl de solução de glutatona redutase 10 U/ml, em tampão de fosfatos.

A reacção teve início com a adição da glutatona redutase. Registou-se a variação da absorvência a 415 nm, determinando-se a velocidade de formação do TNB com leituras de 10 em 10 segundos, durante 3 minutos.

A quantificação da glutatona total foi efectuada a partir da equação da recta obtida na curva de calibração construída com soluções de GSH (0,62; 1,25; 2,50; 5,00; 10,0; 15,0 nmol/ml, em ácido perclórico a 5%), tratadas do mesmo modo.

Os valores foram convertidos em nmoles de GSH por milhão de células.

### **2. 1. 7. Determinação dos níveis de glutatona oxidada**

A GSSG foi determinada recorrendo ao método que foi utilizado para a glutatona total, mas após derivatização da GSH com 2-vinilpiridina.

Esta determinação foi realizada com mesmo sobrenadante utilizado para a glutatona total, obtido após centrifugação da suspensão celular precipitada com ácido perclórico (ver 2. 1. 6.).

a) Em eppendorf adicionou-se 200 µl de cada sobrenadante diluído (1:4, em ácido perclórico a 5%) e 10 µl de 2-vinilpiridina e agitou-se durante 1 hora num agitador para eppendorfs.

b) Decorrido esse período juntou-se 210 µl de  $\text{KHCO}_3$  0,76 M. Cada amostra foi agitada no vortex e centrifugada a 13000 r.p.m. durante 20 segundos, numa centrífuga refrigerada (4 °C).

c) Programou-se o leitor de placas (Ceres 9000) na função cinética, para absorção a 415 nm. As amostras foram colocadas, em triplicado, em placas para leitura no leitor de placas. Em cada poço adicionou-se:

- 100 µl de cada sobrenadante obtido em b)
- 65 µl de solução reagente (4,070 ml de NADPH 1,7 mM; 1,969 ml de DTNB 20,2 mM; 4,007 ml de água; o DTNB e o NADPH foram dissolvidos em tampão de fosfatos:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  57,3 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  81,2 mM com EDTA 0,62 mM, pH 7,5)

d) Após incubação das placas a 30 °C, durante 15 minutos, adicionou-se, em cada poço, 40 µl de solução de glutatona redutase 10 U/ml, em tampão de fosfatos.

A reacção teve início com a adição da glutatona redutase. Registou-se a variação da absorvência a 415 nm, determinando-se a velocidade de formação do TNB com leituras de 10 em 10 segundos, durante 3 minutos.

A quantificação da GSSG foi efectuada a partir da equação da recta obtida na curva de calibração construída com soluções de GSSG (0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 4,00; 8,00 nmol/ml, em ácido perclórico a 5%), tratadas do mesmo modo.

Os valores foram convertidos em nmoles de GSSG por milhão de células.

A GSH foi determinada por cálculo, subtraindo a GSSG à glutatona total, de acordo com:

$$[\text{Glutaciona}]_{\text{total}} = [\text{GSH}] + 2[\text{GSSG}]$$

Atendendo a que a inibição da enzima, pela infusão ou pela quercetina, colocaria alguns problemas à utilização deste método para determinação da GSH e da GSSG e considerando que, de acordo com o descrito por Elliot e colaboradores (1992), a quercetina inibe a glutathione redutase, avaliou-se o efeito da infusão liofilizada e da quercetina sobre esta enzima. Para esse efeito adicionaram-se quantidades conhecidas de GSSG (0,00; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 4,00 nmol/ml) aos sobrenadantes obtidos das concentrações mais elevadas que foram testadas sem *t*-BHP (250 µg/ml de liofilizado e 50 µM de quercetina) e procedeu-se à determinação sem a derivatização com 2-vinilpiridina. A partir da quantidade de GSSG encontrada e do seu teor inicial nos sobrenadantes testados determinaram-se as respectivas percentagens de recuperação.

Este estudo revelou que, para as concentrações testadas (250 µg/ml de liofilizado e 50 µM de quercetina), não havia inibição da enzima. Os valores de recuperação de GSSG variaram entre 88 e 114%.

### **2. 1. 8. Determinação da extensão da peroxidação lipídica**

Conforme referido anteriormente, a oxidação de lípidos é um processo mediado por radicais livres, que induz a destruição das membranas lipídicas, por alteração da permeabilidade membranar, e a formação de ROS e outros compostos electrofilicos, como o 4-hidroxinonal (ver Parte B1, 1. 3.).

A extensão da peroxidação lipídica foi determinada pela formação de substâncias reactivas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Este método baseia-se na reacção da molécula de malonildialdeído com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico, com formação de um complexo de cor vermelha estável.

a) Retirou-se 250 µl de cada suspensão celular para um eppendorf e adicionou-se 500 µl de ácido tricloroacético a 10%.

b) Após agitação em vortex, as amostras foram centrifugadas a 6000 r.p.m. durante 20 segundos, em centrífuga refrigerada (4 °C).

c) Retirou-se 500  $\mu\text{l}$  de sobrenadante para um tubo de ensaio, ao qual se adicionou igual volume de ácido tiobarbitúrico a 1% (solução extemporânea).

d) A mistura foi aquecida durante 15 minutos em banho de água à ebulição e, após arrefecimento, procedeu-se à leitura da absorvência a 535 nm, num espectrofotómetro Shimadzu 160.

Os resultados foram expressos em nmol de equivalentes de malonildialdeído por milhão de células, usando um coeficiente de extinção de  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

## 2. 2. Ensaio *in vivo* em ratinhos

Neste trabalho usou-se o ratinho como modelo animal para o estudo *in vivo* da acção hepatoprotectora da infusão de Hipericão-do-Gerês. A situação ideal seria a utilização da mesma espécie animal usada nos ensaios *in vitro*; contudo, a quantidade limitada de liofilizado disponível obrigou-nos a recorrer ao ratinho para a realização deste estudo. Tal como no ensaio com hepatócitos isolados, também se utilizou *t*-BHP em ratinhos como indutor de hepatotoxicidade.

### 2. 2. 1. Substâncias de referência e reagentes

O *terc*-butil-hidroperóxido (*t*-BHP), o ácido etilenodiaminatetracético (EDTA), o ácido 2-tiobarbitúrico, a forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), a 2-vinilpiridina, a forma reduzida da glutathione (GSH), a forma oxidada da glutathione (GSSG), a glutathione redutase (EC 1.6.4.2) e o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) foram adquiridos à Sigma (St. Louis, Mo., USA).

O ácido perclórico, o ácido tricloroacético e os restantes reagentes foram fornecidos pela Merck (Darmstadt, Alemanha).

Todos os produtos usados nas experiências tinham grau de pureza "Pro analysi".

### 2. 2. 2. Animais

Utilizaram-se ratinhos Charles River (machos), com peso aproximado de 35 g.

No estudo preliminar para determinar a dose de *t*-BHP a administrar, os animais foram divididos em 4 grupos, de 5 animais cada. O ensaio definitivo foi realizado com 6 grupos de 5 animais.

Em ambos os casos os ratinhos foram mantidos em gaiolas de polietileno de rede metálica no topo, com aparas de madeira, numa temperatura ambiente de  $20\pm 2$  °C, humidade entre 40 e 60 % e ciclos de dia/noite de 12/12 horas. Os animais tiveram livre acesso ao alimento e à bebida.

### 2. 2. 3. Tratamento dos animais

Para determinar a dose de *t*-BHP a administrar no ensaio, testaram-se 3 doses de *t*-BHP (0,6; 1,8; 5,4 nmol/kg). Após administração (i.p.) do *t*-BHP os animais foram privados de alimento. Decorridas 24 horas, os animais foram sacrificados e retirou-se o fígado para a determinação dos níveis de glutathiona reduzida e oxidada e a extensão da peroxidação lipídica.

Face aos resultados obtidos, e em virtude da concentração mais elevada de *t*-BHP testada (5,4 nmol/kg) ter provocado a morte em 4 animais desse grupo ao fim de 30 minutos, optamos por induzir a toxicidade com 1,8 nmol/kg de *t*-BHP.

No ensaio para avaliação do efeito protector da infusão de Hipericão-do-Gerês contra a toxicidade induzida pelo *t*-BHP, o liofilizado foi dissolvido na água de bebida (4,00; 20,0; 100 mg/kg) e administrado durante 5 dias consecutivos. No quarto dia injectou-se, por via intraperitoneal, o *t*-BHP (1,8 nmol/kg), e 24 horas depois os ratinhos foram sacrificados por decapitação, tendo-se recolhido sangue para quantificação dos níveis plasmáticos de transaminases. O fígado foi removido, pesado e dividido em 3 porções para determinação dos níveis de GSH e de GSSG, da extensão da peroxidação lipídica e para estudo histológico.

O efeito da concentração mais elevada da infusão foi também estudado, de modo a avaliar a possibilidade de esta exercer, ou não, uma acção tóxica sobre o fígado. Estes animais foram injectados com solução de NaCl 0,9% (p/v) em vez de *t*-BHP.



Para avaliar a toxicidade induzida pelo *t*-BHP, um grupo de animais foi tratado apenas com *t*-BHP. Um outro grupo (animais controlo) foi injectado unicamente com NaCl 0,9% (p/v). Os animais destes dois grupos beberam apenas água.

Todos os grupos de animais foram privados de alimento nas últimas 24 horas do ensaio.

#### **2. 2. 4. Relação peso do fígado/peso corporal**

Os animais foram pesados diariamente ao longo de todo o ensaio. No final do ensaio, o fígado foi removido e lavado com NaCl 0,9% (p/v). O excesso de solução salina foi retirado com papel de filtro e pesou-se o fígado.

Os resultados foram expressos na forma de relação entre o peso do fígado e o peso corporal dos animais, no dia anterior ao sacrifício e no dia do sacrifício.

#### **2. 2. 5. Determinação dos níveis de glutathiona total**

Os níveis de glutathiona total foram determinados recorrendo à oxidação da GSH pelo ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), formando-se GSSG e ácido 5-to-2-nitrobenzóico (TNB). A formação do TNB foi monitorizada a 415 nm.

a) Pesou-se uma porção de fígado (cerca de 500 mg), que foi colocada num tubo de ensaio contendo 2 ml de ácido perclórico a 5% e mantida a -80 °C até determinação da glutathiona total e da GSSG, no máximo dentro de 15 dias.

b) Cada amostra foi homogeneizada (Ultra-Turrax) até se obter uma suspensão homogénea e, seguidamente, centrifugada a 6000 r.p.m. durante 10 minutos, numa centrífuga refrigerada (4 °C). Retirou-se o sobrenadante para um eppendorf.

c) Em eppendorf adicionou-se 170 µl de cada sobrenadante diluído (1:200, em ácido perclórico a 5%) e 170 µl de KHCO<sub>3</sub> 0,76 M. Cada amostra foi agitada no vortex e centrifugada a 13000 r.p.m. durante 20 segundos, numa centrífuga refrigerada (4 °C).

d) Programou-se o leitor de placas (Ceres 9000) na função cinética, para absorção a 415 nm. As amostras foram colocadas, em triplicado, em placas para leitura no leitor de placas. Em cada poço adicionou-se:

- 100 µl de cada sobrenadante obtido em c)
- 65 µl de solução reagente (4,070 ml de NADPH 1,7 mM; 1,969 ml de DTNB 20,2 mM; 4,007 ml de água; o DTNB e o NADPH foram dissolvidos em tampão de fosfatos: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 71,8 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 93,3 mM com EDTA 0,62 mM, pH 7,5)

e) Após incubação das placas a 30 °C, durante 15 minutos, adicionou-se, em cada poço, 40 µl de solução de glutatona redutase 10 U/ml, em tampão de fosfatos.

A reacção teve início com a adição da glutatona redutase. Registou-se a variação da absorvência a 415 nm, determinando-se a velocidade de formação do TNB com leituras de 10 em 10 segundos, durante 3 minutos.

A quantificação da glutatona total foi efectuada a partir da equação da recta obtida na curva de calibração construída com soluções de GSH (0,62; 1,25; 2,50; 5,00; 10,0; 15,0 nmol/ml, em ácido perclórico a 5%), tratadas do mesmo modo.

Os valores foram convertidos em nmoles de GSH por milhão de células.

### **2. 2. 6. Determinação dos níveis de glutatona oxidada**

A GSSG foi determinada recorrendo ao método que foi usado para a glutatona total, mas após derivatização da GSH com 2-vinilpiridina.

Esta determinação foi realizada com mesmo sobrenadante utilizado para a glutatona total, obtido após centrifugação do homogeneizado de fígado (ver 2. 2. 5.).

a) Em eppendorf adicionou-se 200 µl de cada sobrenadante diluído (1:100, em ácido perclórico a 5%) e 10 µl de 2-vinilpiridina, e agitou-se durante 1 hora num agitador para eppendorfs.

b) Decorrido esse período juntou-se 210  $\mu\text{l}$  de  $\text{KHCO}_3$  0,76 M. Cada amostra foi agitada no vortex e centrifugada a 13000 r.p.m. durante 20 segundos, numa centrífuga refrigerada (4 °C).

c) Programou-se o leitor de placas (Ceres 9000) na função cinética, para absorção a 415 nm. As amostras foram colocadas, em triplicado, em placas para leitura no leitor de placas. Em cada poço adicionou-se:

- 100  $\mu\text{l}$  de cada sobrenadante obtido em b)
- 65  $\mu\text{l}$  de solução reagente (4,070 ml de NADPH 1,7 mM; 1,969 ml de DTNB 20,2 mM; 4,007 ml de água; o DTNB e o NADPH foram dissolvidos em tampão de fosfatos:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  71,8 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  93,3 mM com EDTA 0,62 mM, pH 7,5)

d) Após incubação das placas a 30 °C, durante 15 minutos, adicionou-se, em cada poço, 40  $\mu\text{l}$  de solução de glutatona redutase 10 U/ml, em tampão de fosfatos.

A reacção teve início com a adição da glutatona redutase. Registou-se a variação da absorvência a 415 nm, determinando-se a velocidade de formação do TNB com leituras de 10 em 10 segundos, durante 3 minutos.

A quantificação da GSSG foi efectuada a partir da equação da recta obtida na curva de calibração construída com soluções de GSSG (0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 4,00; 8,00 nmol/ml, em ácido perclórico a 5%), tratadas do mesmo modo.

Os valores foram convertidos em nmoles de GSSG por milhão de células.

A GSH foi determinada por cálculo, subtraindo a GSSG à GSH total, de acordo com:

$$[\text{Glutaciona}]_{\text{total}} = [\text{GSH}] + 2[\text{GSSG}]$$

### 2. 2. 7. Determinação da extensão da peroxidação lipídica

A extensão da peroxidação lipídica foi determinada pela formação de substâncias reactivas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

a) Pesou-se uma porção de fígado (cerca de 400 mg), que foi colocada num tubo de ensaio contendo 2 ml de ácido tricloroacético a 10%.

b) Cada amostra foi homogeneizada (Ultra-Turrax) até se obter uma suspensão homogénea e, seguidamente, centrifugada a 6000 r.p.m. durante 1 minuto, numa centrífuga refrigerada (4 °C).

c) Retirou-se 600 µl de sobrenadante para um tubo de ensaio, ao qual se adicionou igual volume de ácido tiobarbitúrico a 1% (solução extemporânea).

d) A mistura foi aquecida durante 15 minutos em banho de água à ebulição e, após arrefecimento, procedeu-se à leitura da absorvência a 535 nm.

Os resultados foram expressos em nmol de equivalentes de malonildialdeído por g de fígado, usando um coeficiente de extinção de  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### 2. 2. 8. Determinação dos níveis plasmáticos de transaminases

A determinação da actividade das enzimas hepáticas, libertadas para a corrente sanguínea pelo fígado danificado, constitui um dos parâmetros de maior utilidade no estudo da hepatotoxicidade, conseguido por um processo não invasivo.

Um aumento dos teores de fosfatase alcalina (ALP) e de  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase ( $\gamma$ -GT) reflecte, sobretudo, uma lesão colestática. Em oposição, a alanina aminotransferase (ALT), presente no citoplasma, e a aspartato aminotransferase (AST), existente no citoplasma e mitocôndria, são enzimas mais sensíveis ao dano citotóxico. Uma elevação dos níveis plasmáticos destas enzimas traduz lesão hepática, e, por isso, o seu estudo reveste-se de particular importância (Plaa e Charbonneau, 2001).

Após decapitação dos animais, procedeu-se à colheita de sangue para tubos de vidro, que foram colocados em banho de água a 37 °C, durante 30 minutos. As amostras foram, de seguida, centrifugadas a 3000 r.p.m., durante 10 minutos, para separação do plasma.

Os níveis plasmáticos de ALT e AST foram determinados usando kits apropriados (Boehringer Mannheim GmbH Diagnostica), em analisador automático (Cobas Mira S).

Os resultados foram expressos em unidades de enzima por litro (U/l).

### **2. 2. 9. Análise histológica de cortes de fígado**

O fígado foi dissecado, com o auxílio de bisturi, em pequenas porções, que foram imediatamente imersas em “Bouin” (ácido pícrico:formaldeído (37%):ácido acético, 15:5:1) e mantidas no fixador durante 24 horas. Os procedimentos seguintes consistiram, resumidamente, na desidratação com álcool, impregnação com parafina e inclusão em blocos, corte dos blocos no micrótomo (3-8 µm), colagem dos cortes na lâmina, desparafinação com xilol, re-hidratação, coloração com hematoxilina e eosinaploxina, desidratação com álcool, clareamento com xilol, montagem com bálsamo, limpeza de excessos de bálsamo e etiquetagem.

Os cortes de fígado foram observados ao microscópio óptico, utilizando uma ampliação de 10 ou 40x.

### **2. 3. Análise estatística**

Os resultados apresentam-se sob a forma de médias±erros padrão, para o número de animais referido em cada determinação.

As comparações estatísticas foram realizadas através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls. As diferenças foram consideradas significativas para  $p < 0,05$ .

### **3. Resultados e Discussão**

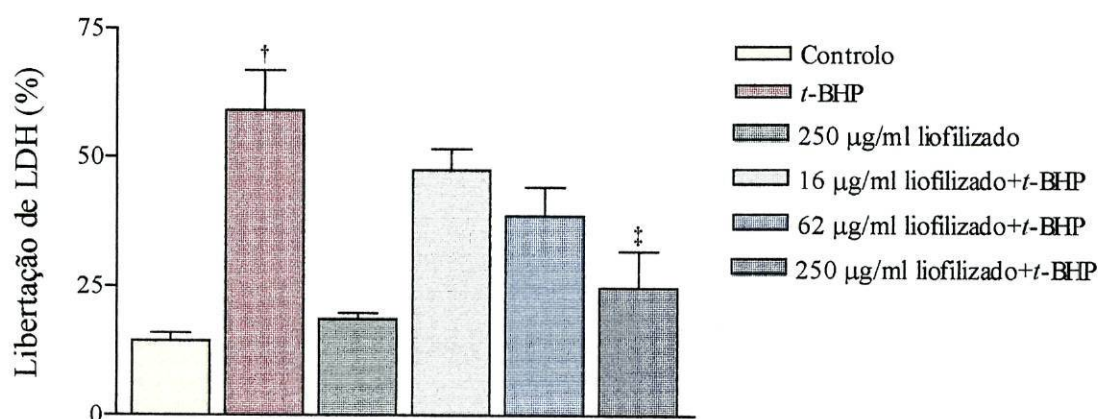
## Índice

3. 1. Ensaio <i>in vitro</i> em hepatócitos isolados de rato.....	263
3. 2. Ensaio <i>in vivo</i> em ratinhos.....	272

### 3. Resultados e Discussão

#### 3. 1. Ensaio *in vitro* em hepatócitos isolados de rato

A LDH extracelular é considerada um marcador de lise celular. Neste trabalho a acção do *t*-BHP resultou numa redução significativa da viabilidade celular dos hepatócitos isolados, expressa pelo aumento de LDH extracelular (**Figura 4**). O contacto das células com infusão liofilizada, na concentração de 250 µg/ml, não provocou qualquer alteração na viabilidade celular.

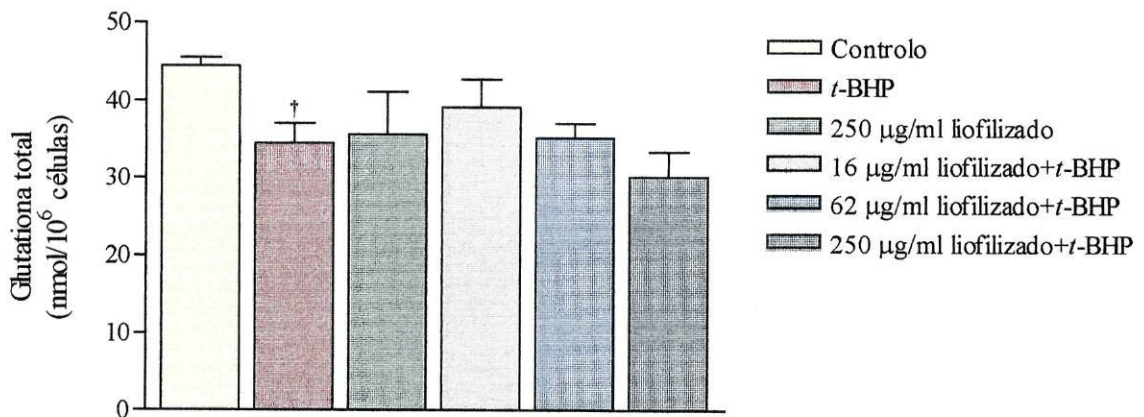


**Figura 4** - Efeito da infusão de Hipericão-do-Gerês na viabilidade celular, expresso pela libertação de LDH para o meio extracelular pelos hepatócitos isolados de rato. Os valores são apresentados sob a forma de média  $\pm$  erro padrão ( $n=5$ ); <sup>†</sup> $p<0,05$ : *t*-BHP vs controlo; <sup>‡</sup> $p<0,05$ : 250 µg/ml de liofilizado+*t*-BHP vs *t*-BHP.

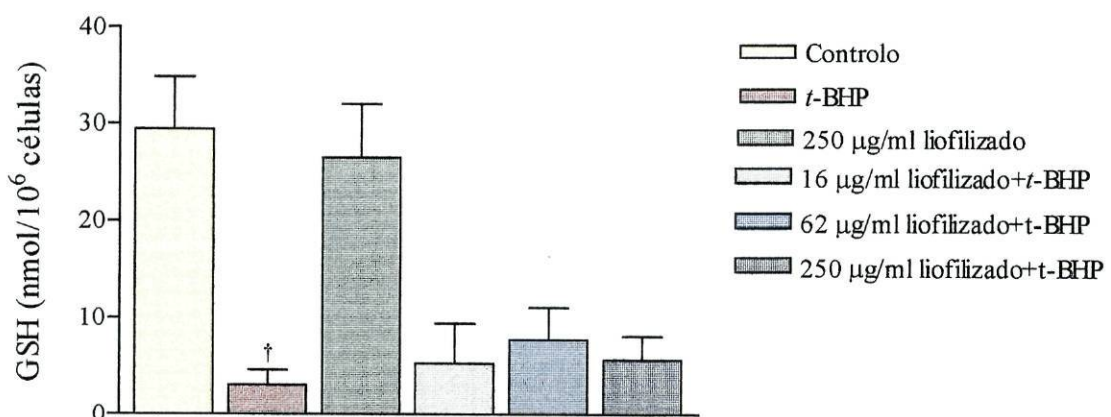
A incubação dos hepatócitos isolados de rato com infusão de Hipericão-do-Gerês, nas concentrações de 16, 62 e 250 µg/ml de liofilizado, e com *t*-BHP, protegeu as células da toxicidade induzida pelo peróxido orgânico, de uma forma dependente da concentração, como se pode verificar pela diminuição da libertação de LDH para o meio extracelular (**Figura 4**). A protecção das células, demonstrada na viabilidade celular, foi significativamente maior para a concentração mais elevada de infusão liofilizada.



O efeito sobre a homeostase da glutathiona foi, também, avaliado. Como se verifica na **Figura 5**, a incubação dos hepatócitos com *t*-BHP levou a uma diminuição significativa dos níveis de glutathiona total. A infusão de Hipericão-do-Gerês, por si só, não provocou alteração dos níveis de glutathiona total celular. A incubação das células com infusão e *t*-BHP originou uma tendência para a depleção do conteúdo em glutathiona total, de forma dependente da concentração, sugerindo que a infusão poderá potenciar o efeito depletor de glutathiona total induzido pelo peróxido orgânico; estes resultados poderão estar relacionados com a existência, na infusão, de compostos com capacidade para induzir o citocromo P450, nomeadamente a quercetina (Rahden-Staron *et al.*, 2001).

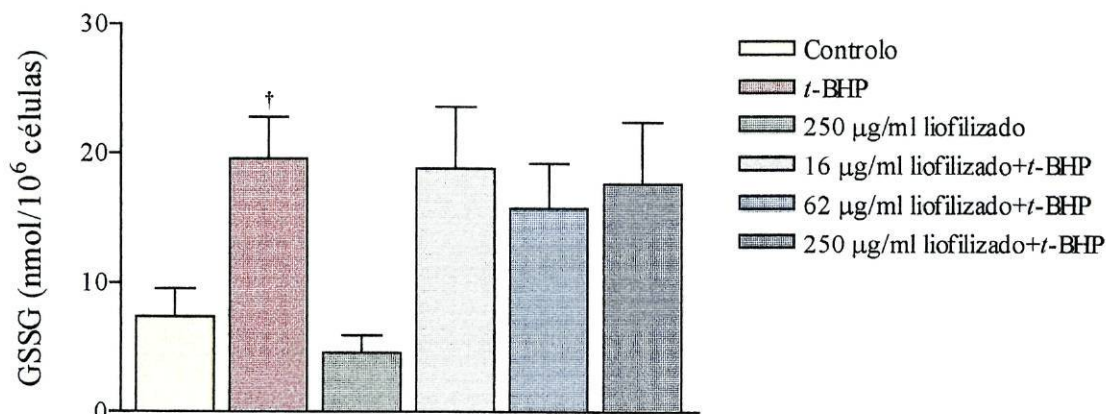


**Figura 5** - Efeito da infusão de Hipericão-do-Gerês no conteúdo de glutathiona total, em hepatócitos isolados de rato. Os valores são apresentados sob a forma de média  $\pm$  erro padrão (n=5); <sup>†</sup>p<0,05: *t*-BHP vs controlo.

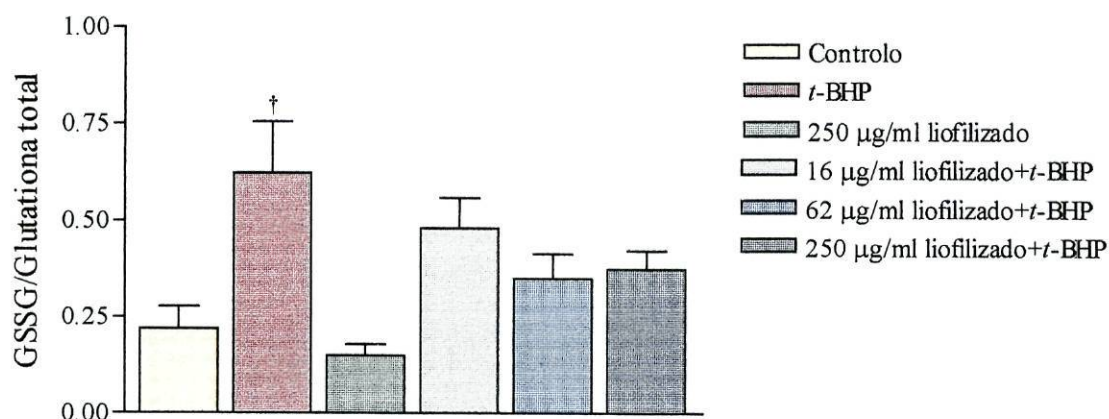


**Figura 6** - Efeito da infusão de Hipericão-do-Gerês no conteúdo de GSH, em hepatócitos isolados de rato. Os valores são apresentados sob a forma de média  $\pm$  erro padrão (n=5); <sup>†</sup>p<0,05: *t*-BHP vs controlo.

Uma das vias de metabolização do *t*-BHP consiste na sua redução pela glutathiona peroxidase, originando *t*-butanol, com consumo de GSH que é convertida em GSSG (Jewell *et al.*, 1986). Neste estudo, a incubação das células com *t*-BHP provocou uma depleção significativa dos níveis de GSH (**Figura 6**), contrariamente ao verificado com a infusão liofilizada. Nas concentrações testadas, a infusão liofilizada não protegeu as células relativamente à depleção de GSH induzida pelo *t*-BHP.



**Figura 7** - Efeito da infusão de Hipericão-do-Gerês na formação de GSSG, em hepatócitos isolados de rato. Os valores são apresentados sob a forma de média ± erro padrão (n=5); †p<0,05: *t*-BHP vs controlo.



**Figura 8** - Efeito da infusão de Hipericão-do-Gerês na razão GSSG/glutationa total, em hepatócitos isolados de rato. Os valores são apresentados sob a forma de média ± erro padrão (n=5); †p<0,05: *t*-BHP vs controlo.

O *t*-BHP induziu nas células o aumento significativo da formação de GSSG (**Figura 7**) e, conseqüentemente, aumento da razão GSSG/glutathiona total (**Figura 8**), confirmando, assim, a existência de uma situação de stresse oxidativo. Estas tendências foram também observadas nas células incubadas com infusão de Hipericão-do-Gerês e *t*-BHP e, portanto, a incubação prévia com infusão não conferiu protecção às células. Nos hepatócitos incubados apenas com liofilizado não se verificou aumento de GSSG nem da razão GSSG/glutathiona total.

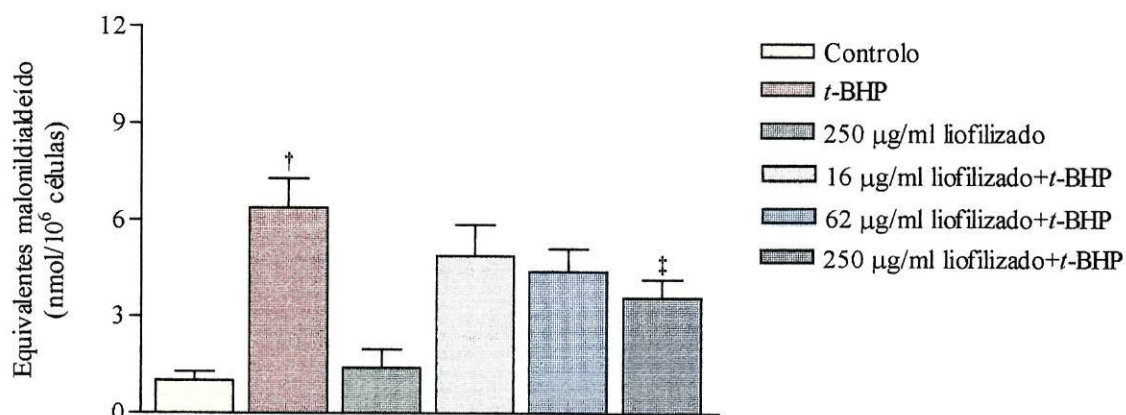
A depleção de GSH, induzida pelo *t*-BHP, não foi acompanhada de um aumento proporcional da formação de GSSG. Estes resultados poderão ser devidos à formação de ligações covalentes entre a GSH e espécies electrofílicas geradas durante o metabolismo do *t*-BHP, ou à reacção da GSH com grupos sulfidrílo proteicos, protegendo-os da oxidação (Jewell *et al.*, 1986). Uma outra hipótese poderá estar relacionada com a ligação da GSH a metabolitos dos constituintes da infusão, uma vez que está descrita, por exemplo, a formação *in vitro* de conjugados com GSH dos produtos resultantes do metabolismo do ácido 5-*O*-cafeoilquínico (ácido clorogénico) (Moridani *et al.*, 2001); esta hipótese poderá justificar a reduzida formação de GSSG verificada nas células incubadas apenas com liofilizado (**Figura 7**).

O facto de a protecção da viabilidade celular, exercida pela infusão contra a toxicidade induzida pelo *t*-BHP, não se ter reflectido claramente na manutenção da homeostase da glutathiona poderá significar que a acção sobre a referida homeostase não será, provavelmente, o factor que mais contribui para o efeito observado sobre a viabilidade celular.

Atendendo a que os danos membranares resultantes da peroxidação lipídica podem levar à perda de viabilidade celular, este parâmetro foi também estudado. A incubação dos hepatócitos com *t*-BHP causou peroxidação lipídica, expressa pelo aumento significativo de substâncias reactivas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) (**Figura 9**).

A infusão de Hipericão-do-Gerês apresentou capacidade para redução da produção de TBARS induzida pelo *t*-BHP, de forma dependente da concentração. A protecção das células contra os efeitos tóxicos do *t*-BHP revelou-se significativa para a concentração mais elevada (250 µg/ml), conforme se pode verificar na **Figura 9**. Assim, a diminuição da peroxidação lipídica será, provavelmente, um dos mecanismos envolvidos na protecção dos hepatócitos contra a toxicidade induzida pelo *t*-BHP, uma

vez que, conforme verificado no estudo da acção antioxidante, esta infusão é dotada de capacidade para quelatar radicais livres, nomeadamente os radicais superóxido e hidroxilo (ver parte B1, 3. 2.). Adicionalmente, a capacidade de protecção contra a peroxidação lipídica induzida pelo *t*-BHP em hepatócitos, foi anteriormente descrita para o ácido 5-*O*-cafeoilquínico (Gebhardt, 1997). Num estudo realizado com microsomas de fígado de rato, a quercetina revelou, também, o mesmo efeito (Rodriguez *et al.*, 2001),.



**Figura 9** - Efeito da infusão de Hipericão-do-Gerês na formação de substâncias reactivas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), nos hepatócitos isolados de rato (n=5); <sup>†</sup>p<0,05: *t*-BHP vs controlo; <sup>‡</sup>p<0,05: 250 µg/ml de liofilizado+*t*-BHP vs *t*-BHP.

Por outro lado, atendendo à capacidade para quelatar metais, demonstrada anteriormente por esta infusão (ver parte B1, 3. 2.), e ao envolvimento dos catiões ferroso e férrico no metabolismo do *t*-BHP, a protecção contra a toxicidade induzida por este peróxido orgânico poderá estar associada à complexação desses catiões pelos constituintes da infusão.

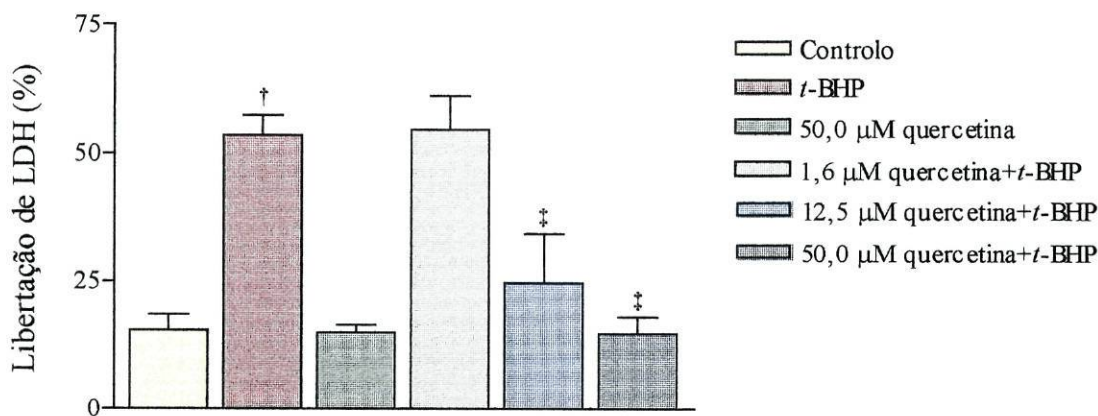
A acção protectora poderia, ainda, estar relacionada com a inibição do citocromo P450, que resultaria na diminuição do metabolismo do *t*-BHP. Contudo, está descrito que alguns dos compostos presentes na infusão de Hipericão-do-Gerês, nomeadamente heterósidos da quercetina, quercetina e ácido 5-*O*-cafeoilquínico, apresentam um reduzido potencial de inibição do citocromo P450 (Scott Obach, 2000).

Ao tentarmos interpretar os resultados obtidos, deve-se ter sempre presente que se trata do estudo de um extracto, contendo, certamente, compostos de diferentes classes

químicas que, no seu conjunto, contribuem para os efeitos observados. Tanto quanto sabemos este foi o primeiro estudo desenvolvido com o objectivo de avaliar a actividade hepatoprotectora atribuída ao Hipericão-do-Gerês. O estudo *in vivo* poderá contribuir para o esclarecimento desta actividade.

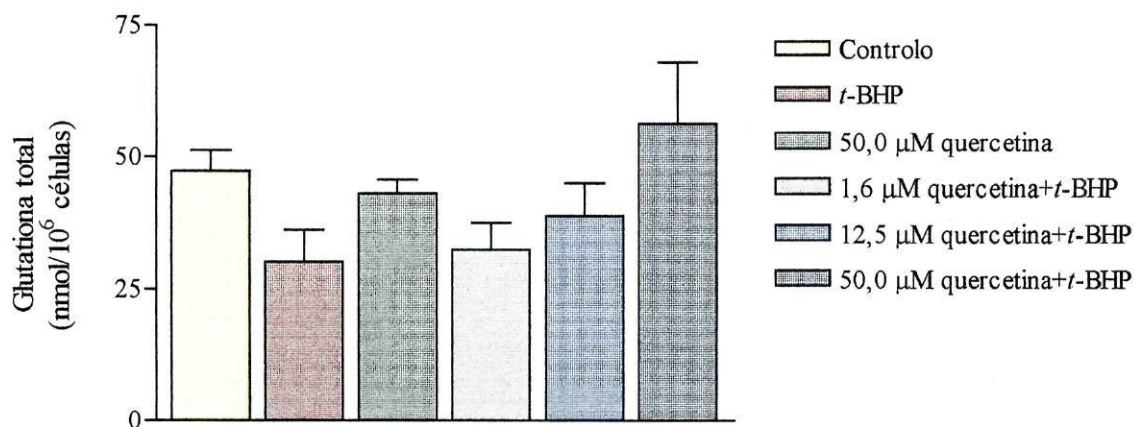
Face aos resultados obtidos *in vitro*, algumas reservas deverão ser colocadas à utilização desta espécie como hepatoprotector, uma vez que, apesar do efeito protector da peroxidação lipídica, a sua acção protectora não se verificou ao nível da depleção de GSH originada pelo *t*-BHP.

Relativamente à quercetina, este composto revelou capacidade para proteger contra a toxicidade induzida pelo *t*-BHP, como se pode verificar pelos resultados da libertação de LDH (**Figura 10**). O efeito observado foi dependente da concentração, apresentando a concentração mais elevada (50,0  $\mu$ M) resultados significativamente diferentes dos obtidos com *t*-BHP. A quercetina, por si só, não tem qualquer efeito sobre a viabilidade celular.

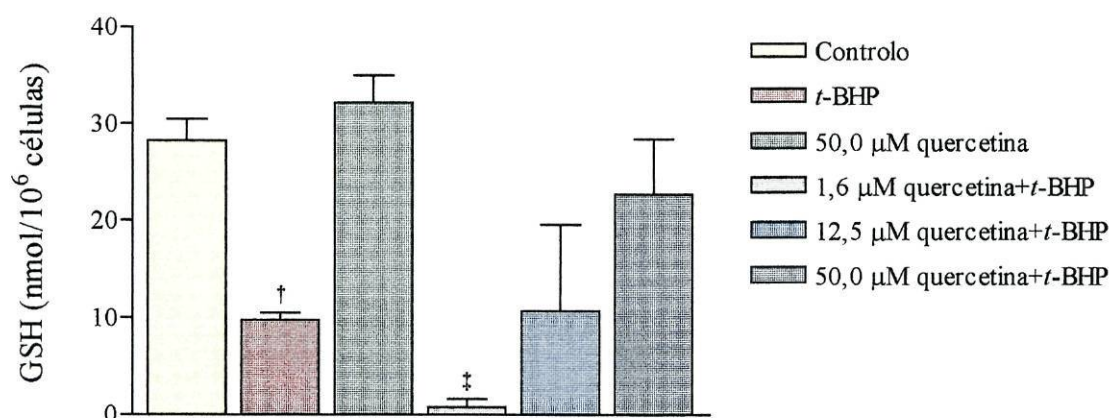


**Figura 10** - Efeito da quercetina na viabilidade celular, expresso pela libertação de LDH para o meio extracelular pelos hepatócitos isolados de rato. Os valores são apresentados sob a forma de média  $\pm$  erro padrão (n=5); <sup>†</sup>p<0,05: *t*-BHP vs controlo; <sup>‡</sup>p<0,05: quercetina 12,5 ou 50,0  $\mu$ M+*t*-BHP vs *t*-BHP.

A incubação das células com *t*-BHP mostrou uma tendência para a diminuição da glutatona total, conforme se verifica na **Figura 11**. O contacto dos hepatócitos com quercetina não teve qualquer efeito nos níveis de glutatona total, embora se verifique uma tendência para protecção das células, quando incubadas juntamente com *t*-BHP.



**Figura 11** - Efeito da quercetina no conteúdo de glutatona total, em hepatócitos isolados de rato. Os valores são apresentados sob a forma de média  $\pm$  erro padrão (n=3).

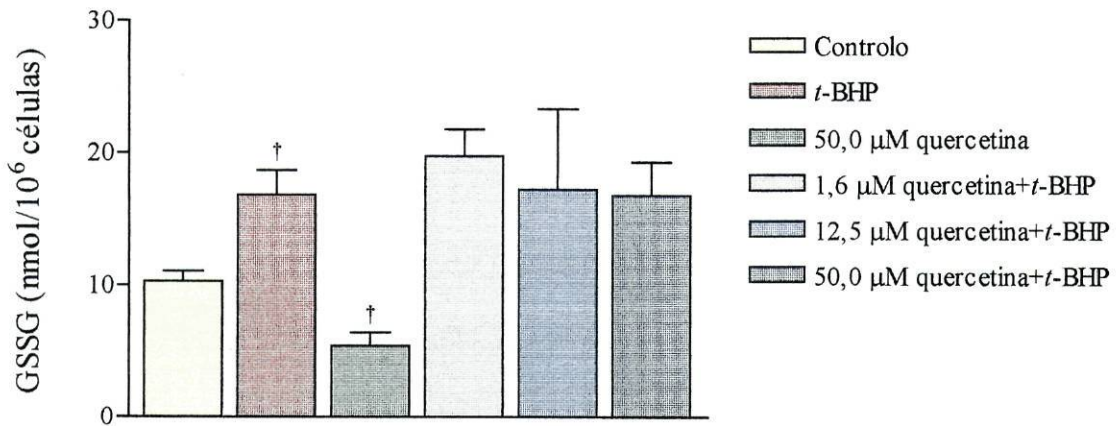


**Figura 12** - Efeito da quercetina no conteúdo de GSH, em hepatócitos isolados de rato. Os valores são apresentados sob a forma de média  $\pm$  erro padrão (n=3); <sup>†</sup>p<0,05: *t*-BHP vs controlo; <sup>‡</sup>p<0,05: quercetina 1,6 μM+*t*-BHP vs *t*-BHP.

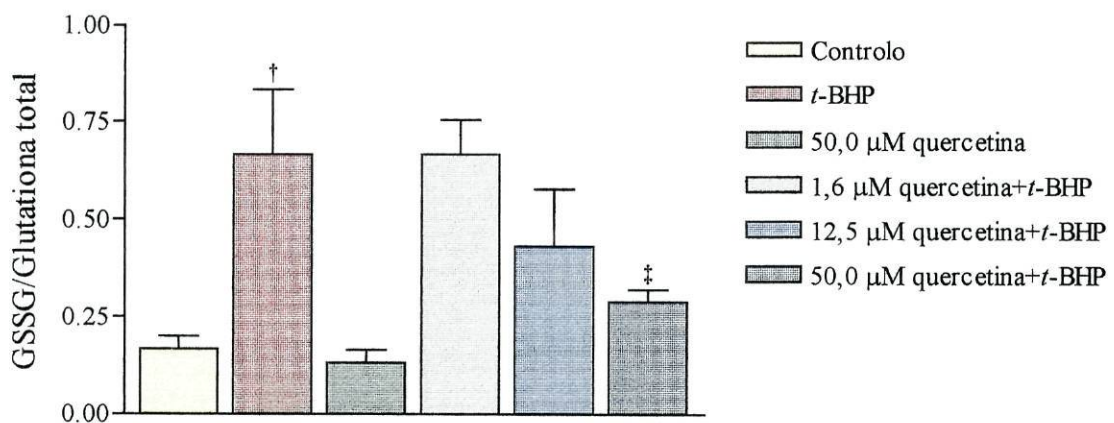
Embora se observe uma tendência para a protecção celular, dependente da concentração, a quercetina não foi capaz de impedir a depleção de GSH induzida pelo *t*-BHP (**Figura 12**). Neste ensaio a acção exercida pelo *t*-BHP levou à redução significativa da GSH. De acordo com Nagata e colaboradores (1999), a actividade antioxidante exercida pela quercetina a nível intracelular é potenciada pela sua capacidade para activar a glutatona peroxidase; porém, não se observou depleção de

GSH (**Figura 12**) nem aumento de GSSG (**Figura 13**) nas células incubadas apenas com quercetina.

A toxicidade induzida pelo *t*-BHP foi evidenciada pelo aumento significativo de GSSG (**Figura 13**). Os resultados encontrados nas células incubadas com *t*-BHP e nas células incubadas com diferentes concentrações de quercetina e *t*-BHP foram semelhantes, não se observando qualquer diferença significativa.



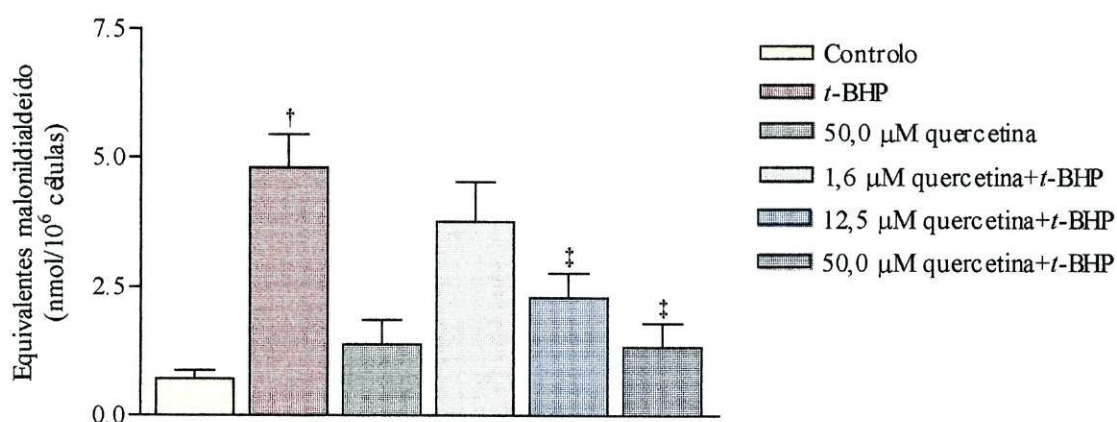
**Figura 13** - Efeito da quercetina no conteúdo de GSSG, em hepatócitos isolados de rato. Os valores são apresentados sob a forma de média  $\pm$  erro padrão ( $n=3$ ); † $p<0,05$ : *t*-BHP ou quercetina 50,0  $\mu$ M vs controlo.



**Figura 14** - Efeito da quercetina na razão GSSG/glutationa total, em hepatócitos isolados de rato. Os valores são apresentados sob a forma de média  $\pm$  erro padrão ( $n=3$ ); † $p<0,05$ : *t*-BHP vs controlo; ‡ $p<0,05$ : quercetina 50,0  $\mu$ M+*t*-BHP vs *t*-BHP.

Contudo, a acção da quercetina na razão GSSG/glutathiona total mostra uma tendência para a protecção das células, de forma dependente da concentração (**Figura 14**), apresentando a concentração mais elevada (50,0  $\mu\text{M}$ ) um efeito significativamente diferente.

A quercetina adicionada à suspensão de hepatócitos protegeu as células contra a peroxidação lipídica induzida pelo *t*-BHP, de forma dependente da concentração, sendo este efeito significativo apenas para as concentrações mais elevadas (12,5 e 50,0  $\mu\text{M}$ ) (**Figura 15**).



**Figura 15** - Efeito da quercetina na formação de substâncias reactivas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), nos hepatócitos isolados de rato. Os valores são apresentados sob a forma de média  $\pm$  erro padrão ( $n=5$ ); † $p<0,05$ : *t*-BHP vs controlo; ‡ $p<0,05$ : quercetina 12,5 ou 50,0  $\mu\text{M}$ +*t*-BHP vs *t*-BHP.

A diminuição da peroxidação lipídica nas concentrações mais elevadas, será, provavelmente, muito importante na protecção da viabilidade celular. Estes resultados estão de acordo com o descrito por Rodriguez e colaboradores (2001), num estudo com microsomas de fígado de rato. Nesse estudo, a quercetina (5 e 25  $\mu\text{M}$ ) inibiu a peroxidação lipídica induzida pelos sistemas  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato,  $\text{Fe}^{3+}$ -ADP/NADPH e pelo *t*-BHP e protegeu a viabilidade celular.

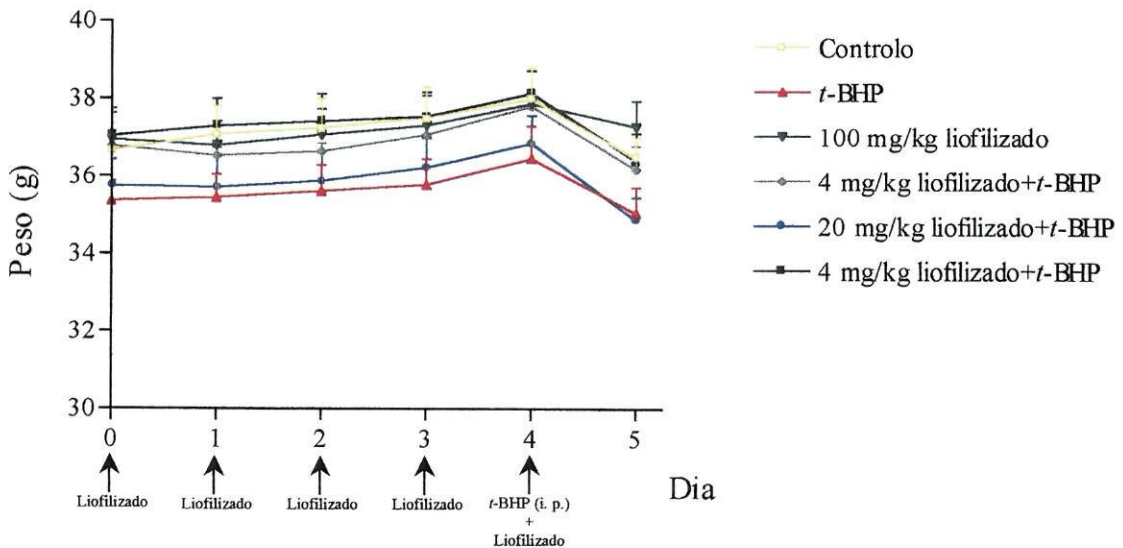
Face a estes resultados, a quercetina, presente na infusão de Hiperício-do-Gerês sob a forma de sulfato, em combinação com açúcares, conjugada com ácido glucurónico, ou na forma livre, poderá contribuir para o efeito observado com a infusão.



### 3. 2. Ensaio *in vivo* em ratinhos

Tal como nos ensaios com hepatócitos isolados, também no ensaio *in vivo* o *t*-BHP foi utilizado como indutor de hepatotoxicidade, para avaliar o efeito protector da infusão de Hipericão-do-Gerês.

A variação do peso dos ratinhos foi registada diariamente ao longo de todo o ensaio (**Figura 16**). Apesar de não existirem diferenças significativas entre os pesos registados para os diferentes grupos, o que poderá indicar uma boa tolerância ao liofilizado, podemos observar uma diminuição do peso corporal em todos os grupos no dia seguinte à administração do *t*-BHP, devida, provavelmente, à privação de alimento.



**Figura 15** - Variação de peso diária dos ratinhos. Os valores são apresentados sob a forma de média  $\pm$  erro padrão (n=5).

A relação peso do fígado/peso corporal (índice hepatossomático) foi, também, determinada (**Tabela 1**). Em todos os grupos esta razão é maior quando o peso do fígado é comparado com o peso corporal no dia do sacrifício, o que pode ser justificado pela diminuição do peso corporal dos animais no dia seguinte à administração do *t*-BHP. Pela observação dos resultados obtidos, podemos também verificar que, apesar de não terem sido encontradas diferenças significativas para os diferentes grupos analisados, existe uma tendência para o aumento desta razão nos grupos tratados com infusão de Hipericão-do-Gerês. Estes resultados poderão indicar um efeito hipertrófico

da infusão, devido, por exemplo, à proliferação de peroxissomas ou por indução do citocromo P450.

**Tabela 1** - Efeito da infusão de Hiperião-do-Gerês na razão entre o peso do fígado e o peso corporal no dia anterior e o peso corporal no dia do sacrifício.

Peso fígado/peso corporal (mg/g)*		
Grupo	Relativamente ao peso corporal no dia anterior	Relativamente ao peso corporal no dia do sacrifício
Controlo	39,03±1,69	40,60±1,57
<i>t</i> -BHP	40,27±0,75	41,80±0,58
100 mg/kg liofilizado	44,97±2,15	45,60±2,20
4 mg/kg liofilizado + <i>t</i> -BHP	43,46±1,79	45,60±1,60
20 mg/kg liofilizado + <i>t</i> -BHP	40,04±0,91	42,20±0,74
100 mg/kg liofilizado + <i>t</i> -BHP	41,86±1,19	44,00±1,22

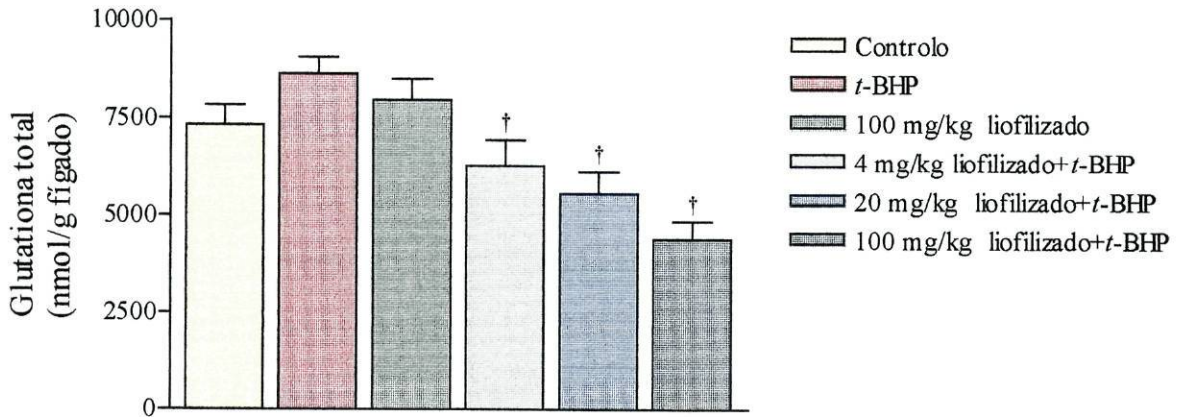
\* Os valores são apresentados sob a forma de média ± erro padrão (n=5).

O *t*-BHP não induziu depleção dos níveis hepáticos em glutathiona total (**Figura 17**). Em oposição, o tratamento prévio dos animais com a infusão de Hiperião-do-Gerês levou a uma diminuição da glutathiona total induzida pelo *t*-BHP, encontrando-se, inclusive, diferenças significativas quando os grupos tratados com as concentrações mais elevadas de infusão (20 e 100 mg/kg) e *t*-BHP são comparados com os animais aos quais foi administrado apenas *t*-BHP.

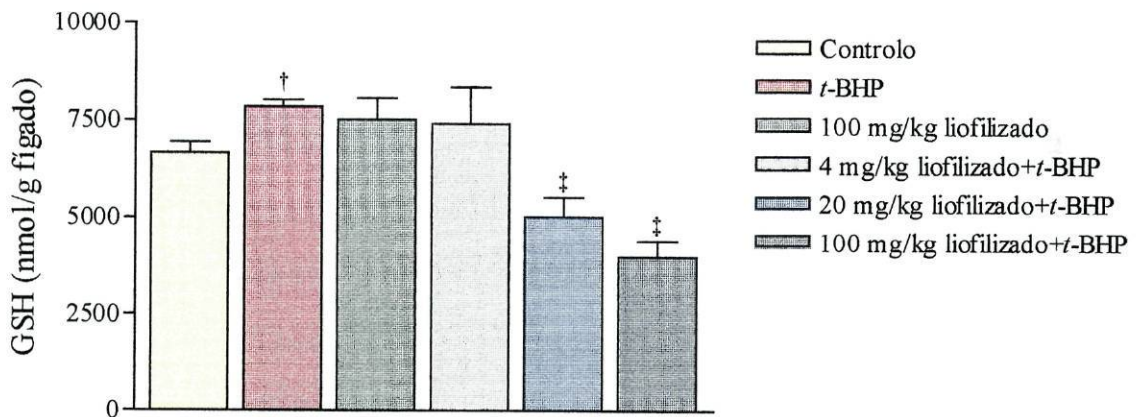
Estes resultados reflectiram-se naqueles obtidos para a GSH, tendo-se verificado um aumento dos níveis hepáticos de GSH no grupo de animais tratado com *t*-BHP (**Figura 18**). As concentrações mais elevadas de infusão potenciaram a depleção dos teores hepáticos em GSH induzida pelo *t*-BHP.

A tendência para o aumento dos níveis hepáticos em glutathiona total, verificada no grupo tratado com *t*-BHP e no grupo tratado apenas com a concentração mais elevada de infusão (100 mg/kg), bem como dos níveis de GSH (significativo para os animais tratados com *t*-BHP), poderá ser atribuído à capacidade de resposta dos animais contra a agressão provocada quer pelo peróxido orgânico, quer pela infusão, aumentando a produção de GSH. De facto, sabe-se que a depleção de GSH, pela rápida

conjugação com espécies electrofílicas, pode induzir o aumento da sua síntese até 2-3  $\mu$ moles/hora por grama de fígado (Reed, 1998). Por outro lado, é de considerar, também, a capacidade de regeneração tecidual, como resposta biológica de compensação que acompanha a toxicidade induzida por xenobióticos (Mehendale, 1998).

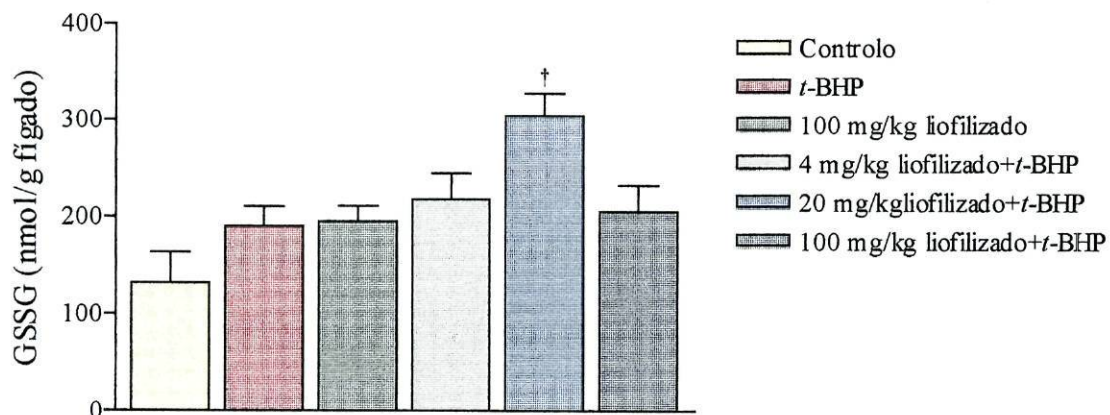


**Figura 17** - Efeito da infusão de Hipericão-do-Gerês nos níveis hepáticos de glutathiona total. Os valores são apresentados sob a forma de média  $\pm$  erro padrão (n=5); <sup>†</sup>p<0,05: 4, 20 ou 100 mg/kg de liofilizado+*t*-BHP vs *t*-BHP.



**Figura 18** - Efeito da infusão de Hipericão-do-Gerês nos níveis hepáticos de GSH. Os valores são apresentados sob a forma de média  $\pm$  erro padrão (n=5); <sup>†</sup>p<0,05: *t*-BHP vs controlo; <sup>‡</sup>p<0,05: 20 ou 100 mg/kg de liofilizado+*t*-BHP vs *t*-BHP.

A diminuição acentuada dos níveis hepáticos de Glutathiona total e de GSH, verificada nos animais tratados com as doses mais elevadas de infusão (20 e 100 mg/kg) e aos quais foi administrado o *t*-BHP, poderá ser justificada pela potenciação da toxicidade induzida pelo peróxido orgânico e pelo liofilizado, sendo o organismo incapaz de produzir GSH suficiente para combater essa acção. Um aspecto importante da hepatotoxicidade induzida pelo *t*-BHP reside na sua redução a *t*-butanol pela glutathiona peroxidase, com consumo de GSH; por outro lado, a metabolização do *t*-BHP mediada pelo citocromo P450 leva à formação do radical alcoxilo correspondente, que pode ser sequestrado pela GSH. Estes dois factores contribuiriam para a depleção de GSH e acumulação de GSSG. Atendendo a que na infusão existem compostos com capacidade para induzir o citocromo P450, nomeadamente a quercetina (Rahden-Staron, 2001), o tratamento dos animais com *t*-BHP e liofilizado resulta numa maior depleção de GSH. A inibição das enzimas envolvidas na síntese de GSH, por parte do liofilizado, não pode ser considerada, uma vez que o tratamento dos animais apenas com infusão (100 mg/kg) conduziu a resultados semelhantes aos obtidos com o grupo controlo.

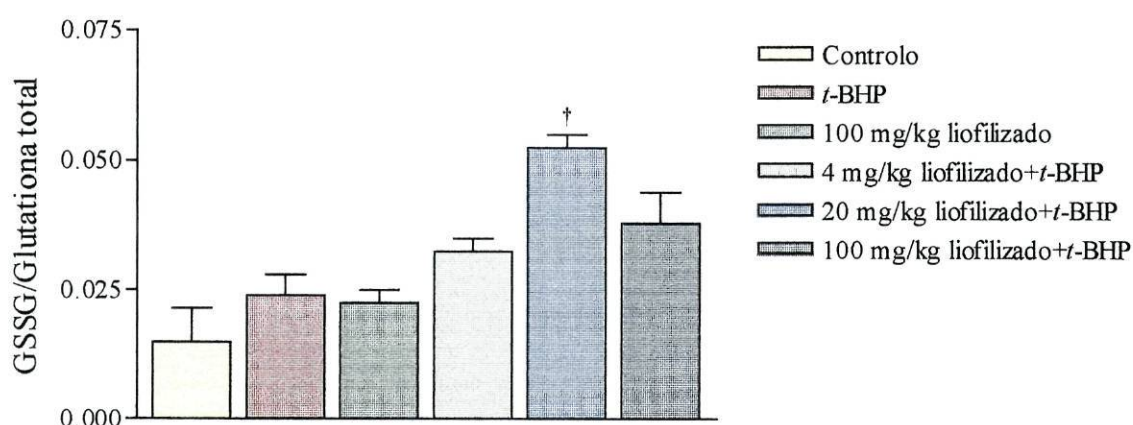


**Figura 19** - Efeito da infusão de Hipericão-do-Gerês nos níveis hepáticos de GSSG. Os valores são apresentados sob a forma de média  $\pm$  erro padrão (n=5); <sup>†</sup>p<0,05: 20 mg/kg de liofilizado+t-BHP vs *t*-BHP.

Os resultados obtidos nos grupos tratados com *t*-BHP ou com infusão de Hipericão-do-Gerês mostram uma tendência para o aumento dos níveis hepáticos de GSSG (**Figura 19**). Esta tendência foi também verificada nos animais tratados com infusão e com *t*-BHP, sendo significativa apenas no grupo tratado com 20 mg/kg de liofilizado e *t*-BHP, facto que coloca em evidência uma possível potenciação da actividade hepatotóxica do peróxido orgânico. A perda da dependência da concentração

observada nos animais tratados com 100 mg/kg de liofilizado e *t*-BHP, poderá estar relacionada com a saturação dos mecanismos de toxicidade, ou com a diminuição da quantidade de GSH disponível para ser oxidada em GSSG.

Tal como nos hepatócitos isolados, também no ensaio *in vivo* a depleção de GSH no fígado não foi acompanhada de um aumento proporcional da formação de GSSG, facto que poderá ser devido não só à formação de ligações covalentes entre a GSH e espécies electrofílicas ou grupos sulfidrílo proteicos, mas também à ligação da GSH a metabolitos dos constituintes da infusão.



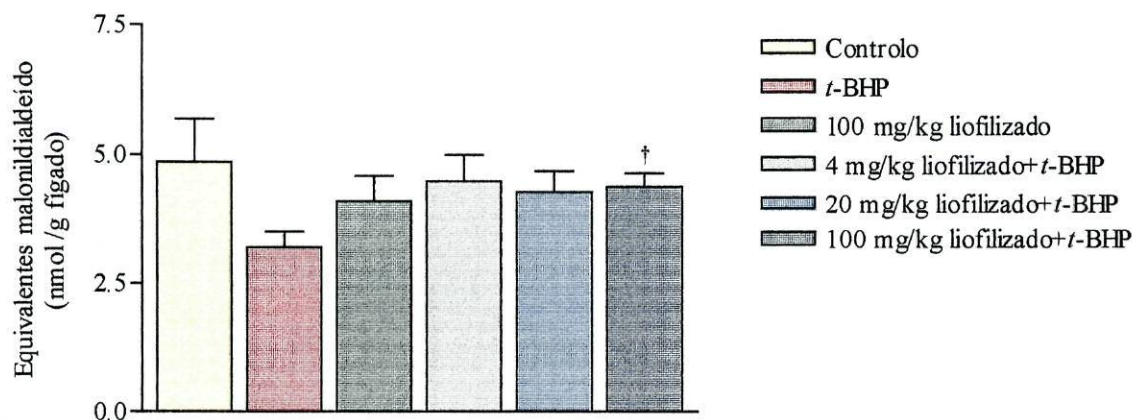
**Figura 20** - Efeito da infusão de Hipericão-do-Gerês na razão GSSG/glutationa total. Os valores são apresentados sob a forma de média  $\pm$  erro padrão ( $n=5$ ); † $p<0,05$ : 20 mg/kg de liofilizado+t-BHP vs *t*-BHP.

A capacidade da infusão de Hipericão-do-Gerês para aumentar a susceptibilidade das células à acção hepatotóxica do *t*-BHP, foi evidenciada pelo aumento da razão GSSG/glutationa total nos animais tratados com infusão seguida da administração de *t*-BHP (**Figura 20**), com possível saturação dos mecanismos de toxicidade para a concentração mais elevada (100 mg/kg de liofilizado).

A formação de TBARS foi usada para determinação da extensão da peroxidação lipídica. Contrariamente ao previsto, no grupo tratado com *t*-BHP verificou-se uma diminuição no conteúdo hepático de TBARS (**Figura 21**). Os níveis de glutaciona total e de GSH encontrados neste grupo já indicavam uma resposta das defesas antioxidantes. Contudo, esta diminuição pode também estar relacionada com a rápida

metabolização do malonildialdeído, composto detectado no ensaio, no organismo e não com a ausência de peroxidação lipídica (Plaa e Charbonneau, 2001).

Relativamente à infusão de Hipericão-do-Gerês, os resultados obtidos foram semelhantes aos do grupo controlo. Nos animais tratados com infusão e *t*-BHP verificou-se um aumento significativo de malonildialdeído apenas no grupo tratado com a concentração mais elevada de liofilizado (100 mg/kg).

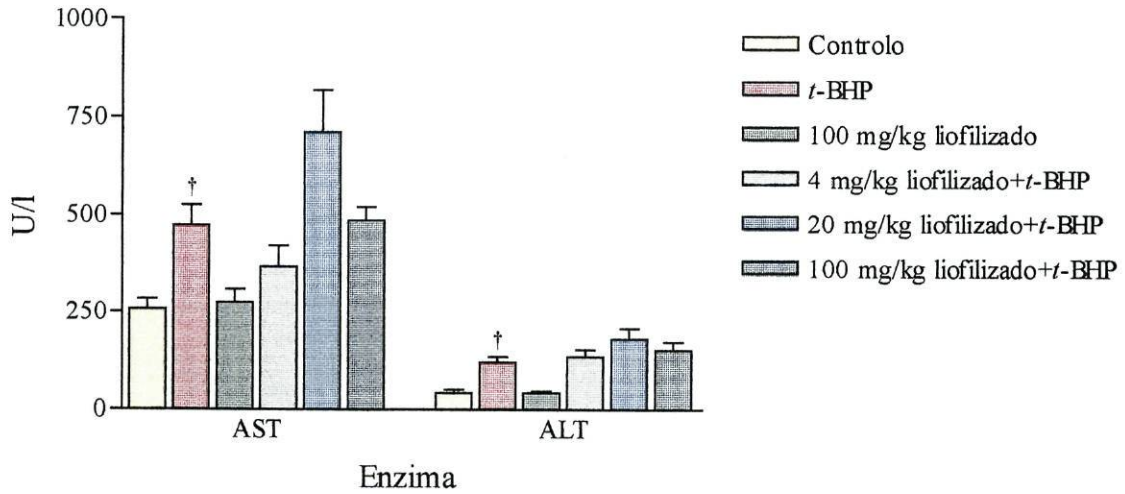


**Figura 21** - Efeito da infusão de Hipericão-do-Gerês na extensão da peroxidação lipídica. Os valores são apresentados sob a forma de média  $\pm$  erro padrão ( $n=5$ ); <sup>†</sup> $p<0,05$ : 100 mg/kg de liofilizado+*t*-BHP vs *t*-BHP.

O dano hepático provoca uma elevação das actividades séricas das transaminases (AST e ALT). Neste trabalho, a administração de *t*-BHP levou a um aumento significativo da libertação destas enzimas para a corrente sanguínea, reflectindo a morte celular (**Figura 22**).

Os níveis plasmáticos da AST e da ALT não foram afectados pela administração isolada da infusão de Hipericão-do-Gerês, na concentração mais elevada (100 mg/kg). A administração da infusão não teve qualquer efeito protector contra a toxicidade induzida pelo *t*-BHP (**Figura 22**).

Atendendo ao facto da ALT se encontrar essencialmente localizada no fígado, enquanto a AST tem uma distribuição mais ampla no organismo (fígado, coração, cérebro, rim e músculo esquelético), e à acção tóxica do *t*-BHP sobre diversos órgãos, seria de esperar encontrar níveis superiores de AST, que não se verificou.



**Figura 22** - Efeito da infusão de Hipericão-do-Gerês nos níveis plasmáticos de transaminases. Os valores são apresentados sob a forma de média  $\pm$  erro padrão (n=5); <sup>†</sup>p<0,05: t-BHP vs controlo.

O exame histológico de cortes de fígado revelou que o tratamento com t-BHP provocou alterações no parênquima hepático (**Figura 23, B**). A administração apenas da infusão de Hipericão-do-Gerês (100 g/kg) (**Figura 23, F**) levou, também, ao aparecimento de vacuolização nos hepatócitos, confirmando, assim, um possível efeito adverso da infusão. O tratamento prévio com infusão seguido da injeção de t-BHP induziu alterações para todas as concentrações de infusão testadas (**Figura 23, C-E**).

**Tabela 2** - Efeito da infusão de Hipericão-do-Gerês nas alterações histológicas observadas no fígado de ratinhos.

Alterações histológicas*		
Grupo	Vacuolização	Perda dos cordões de hepatócitos
Controlo	-	-
t-BHP	++	++
100 mg/kg liofilizado	+	-
4 mg/kg liofilizado + t-BHP	++	+
20 mg/kg liofilizado + t-BHP	++	+
100 mg/kg liofilizado + t-BHP	+++	+++

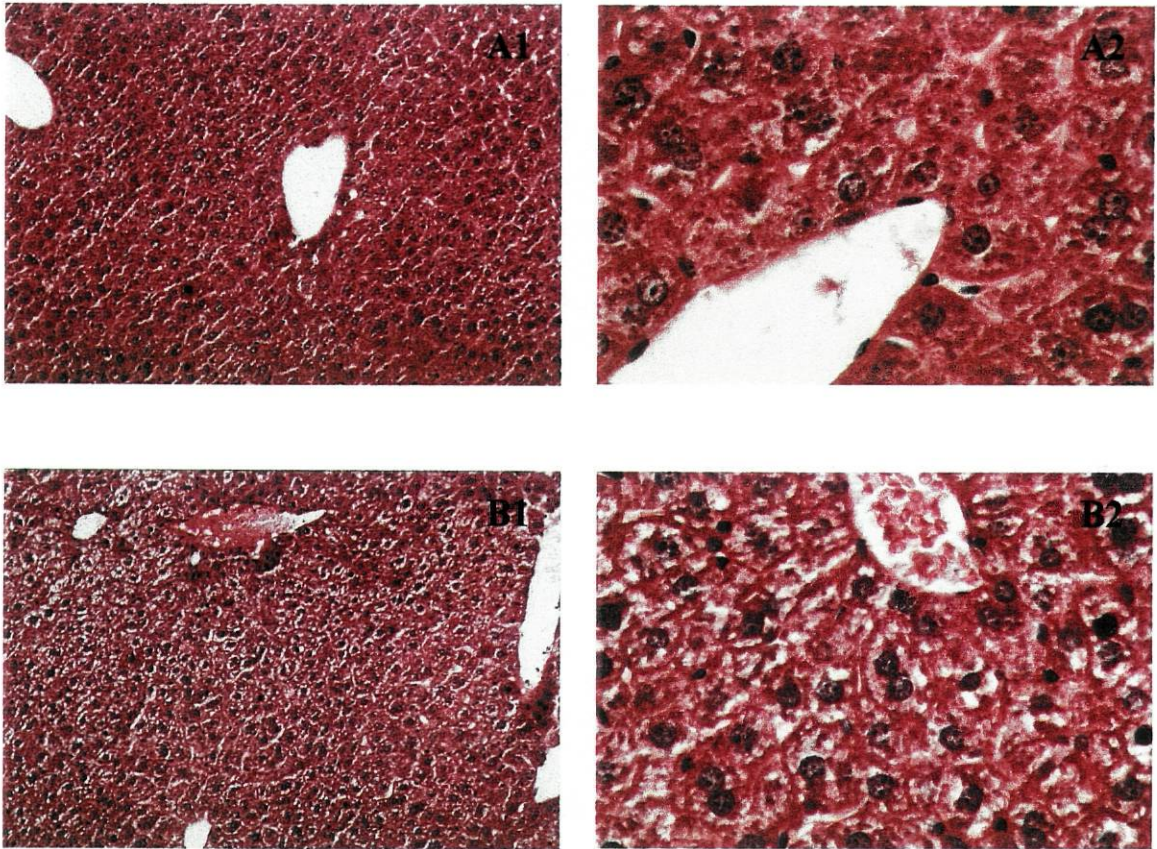
\* -: ausente; +: presente em menos de 25% das lâminas; ++: presente em 25% a 75% das lâminas; +++: presente em mais de 75% das lâminas.

As alterações histológicas foram analisadas e incluídas em diferentes categorias (**Tabela 2**). Para esse efeito a vacuolização dos hepatócitos foi avaliada em cada lâmina, através da contagem do número de hepatócitos vacuolizados em 100 observados; do mesmo modo, a perda da organização típica dos cordões de hepatócitos foi também estudada. Da análise da **Tabela 2** será de realçar o aumento de alterações histológicas observado nos animais tratados com a concentração mais elevada de infusão (100 mg/kg) e com *t*-BHP.

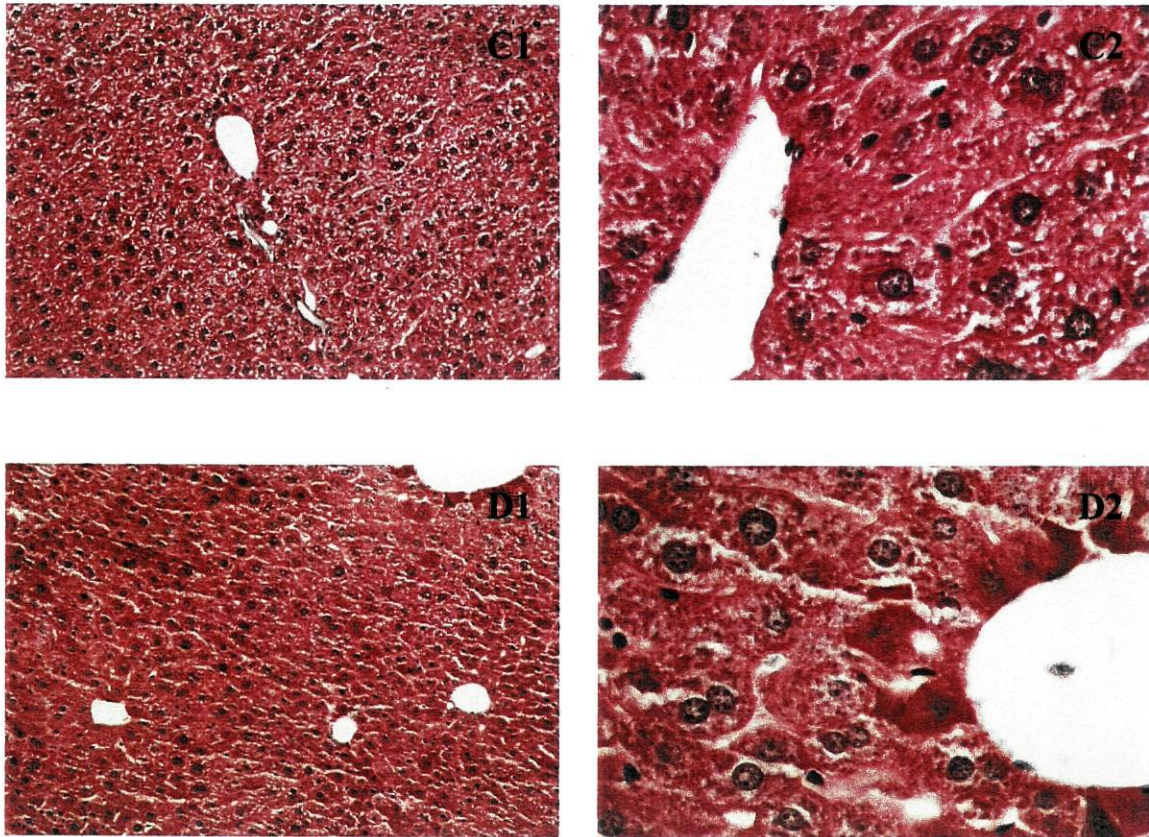
Face ao exposto, podemos dizer que, de um modo geral, a infusão de Hipericão-do-Gerês contribui para a potenciação do dano oxidativo induzido pelo *t*-BHP. Adicionalmente, a infusão, por si só, é dotada de algum potencial para provocar efeitos adversos hepáticos, conforme foi verificado pela elevação dos níveis de GSSG e da razão GSSG/glutathiona total e na análise histológica do parênquima hepático.

Tanto quanto sabemos, este foi o primeiro estudo relativo à avaliação da actividade hepatoprotectora do Hipericão-do-Gerês, devendo ser complementado com trabalhos adicionais, nomeadamente a avaliação do seu efeito sobre o citocromo P450 e sobre as enzimas antioxidantes. Os resultados obtidos neste trabalho deixam algumas dúvidas quanto à sua utilização como protector do fígado, em especial em situações de depleção dos sistemas de defesa antioxidante, nomeadamente da glutathiona, que poderão agravar o dano hepático.

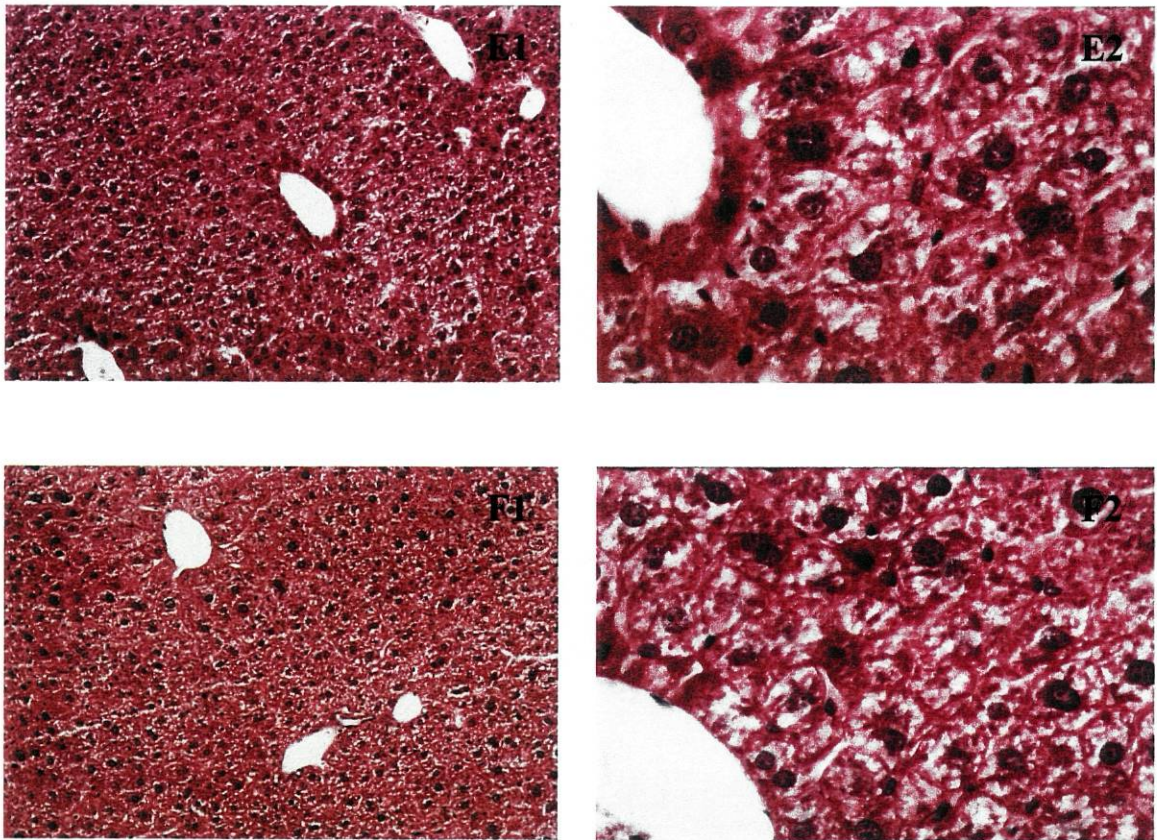




**Figura 23** - Fotografias de microscopia óptica obtidas de cortes de fígado de ratinho. (A1) (ampliação de 250x) e (A2) (ampliação de 1000x), fígado de ratinho controlo. (B1) (ampliação de 250x) e (B2) (ampliação de 1000x), fígado de ratinho injectado com *t*-BHP; observa-se uma zona vacuolizada extensa, com alteração na organização dos cordões de hepatócitos.



**Figura 23** - Fotografias de microscopia óptica obtidas de cortes de fígado de ratinho (cont.). (C1) (ampliação de 250x) e (C2) (ampliação de 1000x), fígado de ratinho tratado com infusão de Hipericão-do-Gerês (4 mg/kg) e injectado com *t*-BHP; observa-se uma desorganização do parênquima hepático e vacuolização dos hepatócitos. (D1) (ampliação de 250x) e (D2) (ampliação de 1000x), fígado de ratinho tratado com infusão de Hipericão-do-Gerês (20 mg/kg) e injectado com *t*-BHP; observa-se uma desorganização do parênquima hepático e aumento do calibre dos sinusóides.



**Figura 23** - Fotografias de microscopia óptica obtidas de cortes de fígado de ratinho (cont.). (E1) (ampliação de 250x) e (E2) (ampliação de 1000x), fígado de ratinho tratado com infusão de Hipericão-do-Gerês (100 mg/kg) e injectado com *t*-BHP, mostrando vacuolização extensa e destruição dos cordões de hepatócitos. (F1) (ampliação de 250x) e (F2) (ampliação de 1000x), fígado de ratinho tratado com infusão de Hipericão-do-Gerês (100 mg/kg), revelando vacuolização difusa na região periportal e centrolobular.

## **4. Conclusões**

- A infusão de Hipericão-do-Gerês foi avaliada relativamente à sua actividade hepatoprotectora, através de ensaios *in vitro*, com hepatócitos isolados de rato, e *in vivo*, em ratinhos.
- No ensaio *in vitro* a incubação das células com *t*-BHP provocou perda de viabilidade celular, depleção de glutatona total e de GSH, aumento de GSSG e induziu peroxidação lipídica. A incubação dos hepatócitos com infusão e *t*-BHP teve um efeito protector da viabilidade celular e da peroxidação lipídica, de modo dependente da concentração. Contudo, apesar da ligeira elevação dos níveis de GSH, não evitou o aumento da GSSG e a depleção da glutatona total. A actividade protectora da infusão estará relacionada com o sua capacidade para sequestrar radicais e/ou quelatar metais e não com uma acção a nível da regulação da homeostase da glutatona.
- A incubação com quercetina protegeu as células contra a toxicidade induzida pelo *t*-BHP, aumentando a viabilidade celular, inibindo a peroxidação lipídica, aumentando os níveis de glutatona total e de GSH e diminuindo a GSSG. A presença deste composto na infusão contribuirá para a sua actividade.
- No ensaio *in vivo* a ingestão de infusão seguida da administração de *t*-BHP (i.p.) resultou na potenciação da acção tóxica induzida pelo *t*-BHP, traduzida pela diminuição dos níveis de glutatona total e de GSH e pelo aumento da GSSG. Algum efeito protector foi observado a nível de peroxidação lipídica.
- A ingestão da infusão (100 mg/kg) provocou uma elevação dos níveis de GSSG e da razão GSSG/glutatona total, indicando a existência de um efeito adverso para as células.
- O efeito protector encontrado nos ensaios *in vitro* poderá ser justificado, em parte, pela presença de compostos fenólicos, nomeadamente da quercetina e dos seus derivados.

- A acção hepatoprotectora da infusão de Hipericão-do-Gerês estará relacionada essencialmente com a sua capacidade para captar radicais livres. Contudo, a sua acção não está isenta de toxicidade, aspecto que não deverá ser esquecido quando a sua utilização visar fins terapêuticos.

**Bibliografia**

- Adzet, T.; Puigmacia, M. (1985). High-performance liquid chromatography of caffeoylquinic acid derivatives of *Cynara scolymus* L. leaves. *J. Chromatogr.*, **348**, 447-453.
- Amico, F.P.; Sorce, E.G. (1997). Medicinal plants and phytotherapy in Mussomeli area (Caltanissetta, Sicily, Italy). *Fitoterapia*, **68**, 143-159.
- Andrade, P.B.; Carvalho, A.R.F.; Seabra, R.M.; Ferreira, M.A. (1998a). A previous study of phenolic profiles of quince, pear and apple purees by HPLC-diode array detection, for the evaluation of quince purees authenticity. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 968-972.
- Andrade, P.B.; Leitão, R.; Seabra, R.M.; Oliveira, M.B.; Ferreira, M.A. (1998b). 3,4-Dimethoxycinnamic acid level as a tool for differentiation of *Coffea canephora* var. *robusta* and *Coffea arabica*. *Food Chem.*, **61**, 511-514.
- Andrade, P.B.; Seabra, R.M.; Valentão, P.; Areias, F. (1998c). Simultaneous determination of flavonoids, phenolic acids and coumarins in seven medicinal species by HPLC/diode-array detector. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **21**, 2813-2820.
- Areias, F.M.; Valentão, P.; Andrade, P.B.; Ferreres, F.; Seabra, R.M. (2001). Phenolic fingerprint of peppermint leaves. *Food Chem.*, **73**, 307-311.
- Areias, F.M.; Valentão, P.; Andrade, P.B.; Moreira, M.M.; Amaral, J.; Seabra, R.M. (2000). HPLC/DAD analysis of phenolic compounds from lavender and its application to quality control. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **23**, 2563-2572.
- Arora, A.; Nair, M.G.; Strasburg, G.M. (1998). Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radic. Biol. Med.*, **24**, 1355-1363.
- Arts, M.J.T.J.; Haenen, G.R.M.M.; Wilms, L.C.; Beetstra, S.A.J.N.; Heijnen, C.G.M.; Voss, H.-P.; Bast, A. (2002). Interactions between flavonoids and proteins: effect on the total antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 1184-1187.
- Aucamp, J.; Gaspar, A.; Hara, Y.; Apostolides, Z. (1997). Inhibition of xanthine oxidase by catechins from tea (*Camellia sinensis*). *Anticancer Res.*, **17**, 4381-4386.
- Aviram, M. (2002). Dietary tomato's lycopene reduces heart diseases. *Abstracts of International Symposium on «Dietary Phytochemicals and Human Health»*. Salamanca, Espanha: 18-20 de Abril.
- Bast, A.; Haenen, G.R.M.M.; Doelman, C.J.A. (1991). Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am. J. Med.*, **91** (suppl 3C), 2S-13S.



- Beerhues, L.; Berger, U. (1994). Xanthones in cell suspension cultures of two *Centaureum* species. *Phytochemistry*, **35**, 1227-1231.
- Beerhues, L.; Berger, U. (1995). Differential accumulation of xanthones in methyl-jasmonate- and yeast-extract-treated cell cultures of *Centaureum erythraea* and *Centaureum littorale*. *Planta*, **197**, 608-612.
- Bennett, G.J.; Lee, H.-H. (1989). Xanthones from *Guttiferae*. *Phytochemistry*, **28**, 967-998.
- Bengoechea, L.; Hernández, T.; Quesada, C.; Bartolomé, B.; Estrella, I.; Gómez-Cordovés, C. (1995). Structure of hydroxycinnamic acid derivatives established by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *Chromatographia*, **41**, 94-98.
- Berkan, T.; Üstünes, I.; Lermiöglu, F.; Özer, A. (1991). Antiinflammatory, analgesic and antipyretic effects of an aqueous extract of *Erythraea centaureum*. *Planta Med.*, **57**, 34-37.
- Borges, F.; Fernandes, E.; Roleira, F. (2002). Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors. *Curr. Med. Chem.*, **9**, 195-217.
- Brown, J.E.; Khodr, H.; Hider, R.C.; Rice-Evans, C.A. (1998). Structural dependence of flavonoid interactions with Cu<sup>2+</sup> ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem. J.*, **330**, 173-1178.
- Brown, J.E.; Rice-Evans, C.A. (1998). Luteolin-rich arichoke extract protects low density lipoprotein from oxidation *in vitro*. *Free Rad. Res.*, **29**, 247-255.
- Bruneton, J. (1999). Composés phénoliques, shikimates, acétates. In *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Paris: Editions TEC & DOC.
- Burda, S.; Oleszek, W. (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 2774-2779.
- Büter, B.; Orlacchio, C.; Soldati, A.; Berger, K. (1998). Significance of genetic and environmental aspects in the field cultivation of *Hypericum perforatum*. *Planta Med.*, **64**, 431-437.
- Carnat, A.; Carnat, A.P.; Chavignon, O.; Heitz, A.; Wylde, R.; Lamaison, J.L. (1995). Luteolin 7-diglucuronide, the major flavonoid compound from *Aloysia triphylla* and *Verbena officinalis*. *Planta Med.*, **61**, 490.
- Carnat, A.; Carnat, A.P.; Fraisse, D.; Lamaison, J.L. (1999). The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea. *Fitoterapia*, **70**, 44-49.

- Castelão, J.F. Jr.; Gottlieb, O.R.; De Lima, R.A.; Mesquita, A.A.L. (1977). Xanthonolignoids from *Kielmeyera* and *Caraipa* species -  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy of xanthenes. *Phytochemistry*, **16**, 735-740.
- Chaudhuri, R.K.; Ghosal, S. (1971). Xanthenes of *Canscora decussata* Schult. *Phytochemistry*, **10**, 2425-2432.
- Ching, T.-L.; de Jong, j.; Bast, A. (1994). A method for screening hypochlorous acid scavengers by inhibition of the oxidation of 5-thio-2-nitrobenzoic acid: application to anti-asthmatic drugs. *Anal. Biochem.*, **218**, 377-381.
- Clifford, M.N. (1985). Chlorogenic acids. In *Coffee: Chemistry*, vol. **I**. Clarke, R.J.; Macrae, R. (ed.). London: Elsevier Applied Science Publishers, Ltd.
- Clifford, M.N. (1986). Coffee bean dicaffeoylquinic acids. *Phytochemistry*, **25**, 1767-1769.
- Clifford, M.N.; Kellard, B.; Birch, G.G. (1989a). Characterization of chlorogenic acids by simultaneous isomerisation and transesterification with tetramethylammonium hydroxide. *Food Chem.*, **33**, 115-123.
- Clifford, M.N.; Kellard, B.; Birch, G.G. (1989a). Characterization of caffeoylferuoylquinic acids by simultaneous isomerisation and transesterification with tetramethylammonium hydroxide. *Food Chem.*, **34**, 81-88.
- Cochrane, C.G. (1911). Cellular injury by oxidants. *Am. J. Med.*, **91** (suppl 3C), 23S-30S.
- Comporti, M. (1998). Lipid peroxidation as a mediator of chemical-induced hepatocyte death. In *Toxicology of the liver*. Plaa, G.L.; Hewitt, W.R. (ed.). Washington DC: Taylor & Francis.
- Cos, P.; Ying, L.; Calomme, M.; Hu, j.P.; Cimanga, K.; Van Poel, B.; Pieters, L.; Vlietinck, A.J.; Vanden Berghe, D. (1998). Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod.*, **61**, 71-76.
- Cos, P.; Calomme, M.; Sindambiwe, J.-B.; De Bruyne, T.; Cimanga, K.; Pieters, L.; Vlietinck, A.J.; Vanden Berghe, D. (2001). Cytotoxicity and lipid peroxidation-inhibiting activity of flavonoids. *Planta Med.*, **67**, 515-519.
- Costa, A.F. (1994). *Farmacognosia*, vol. II. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. pp 1022-1023.
- Coutinho, A.X.P. (1939). *Flora de Portugal* (2ª edição). Lisboa: Bertrand (Irmãos), Ltd..

- Croft, K.D. (1998). The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Am. NY Acad. Sci.*, **854**, 435-442.
- Crystal R. G. (1991). Biology of free radicals - Introduction. *Am. J. Med.*, **91** (suppl 3C), 1S.
- Day, A.J.; Williamson, G. (1999). Human metabolism of dietary quercetin glycosides. In *Plant polyphenols 2: chemistry, biology, pharmacology, ecology*. Gross *et al.*(ed.). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- De Barros Côrrea, D.; Fonseca e Silva, L. G.; Gottlieb O. R.; Janot Gonçalves, S. (1970). Quinone and xanthone constituents of *Kielmeyera rupestris*. *Phytochemistry*, **9**, 447-451.
- De Vincenzi, M.; Maialetti, F. (1995). Monographs on botanical substances used in foods. Part IV. *Fitoterapia*, **66**, 203-210.
- Decker, E.A. (1997). Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutrition Reviews*, **55**, 396-398.
- Decosterd, L.A.; Hoffmann, E.; Kyburz, R.; Bray, D.; Hostettmann, K. (1991). A new phloroglucinol derivative from *Hypericum calycinum* with antifungal and in vitro antimalarial activity. *Planta Med.*, **57**, 548-551.
- Delle Monache, F.; Marquina Mac-Quhae, M.; Delle Monache, G.; Marini Bettolo, G.B.; Alves de Lima, R. (1983). Xanthones, xanthonolignoids and other constituents of the roots of *Vismia guaramirangae*. *Phytochemistry*, **22**, 227-232.
- Dias, A.; Seabra, R.M.; Andrade, P.B.; Fernandes-Ferreira, M. (1999). The development of an HPLC-DAD method for the analysis of the phenolic fractions from *in vivo* and *in vitro* biomass of *Hypericum* species. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **22**, 215-227.
- Dombrowicz, E.; Swiatek, L.; Zadernowski, R. (1988). Phenolic acid in bitter drugs. Part III. Examination of *Herba centaurei*. *Farm. Pol.*, **44**, 657-660. (CA: 110: 209359).
- El-Sedawy, A.I.; Shu, Y.-Z.; Hattori, M.; Kobashi, K.; Namba, T. (1989). Metabolism of *Swertia japonica* by human intestinal bacteria. *Planta Med.*, **55**, 147-150.
- Elliot, A.J.; Scheiber, S.A.; Thomas, C.; Pardini, R.S. (1992). Inhibition of glutathione reductase by flavonoids. A structure-activity study. *Biochem. Pharmacol.*, **44**, 1603-1608.
- Farinha, A.; Martins, J.M.; Soares, M. (1998). Hipericão. *Boletim do LEF*, nº 16, 1-8.
- Farmacopeia Francesa (1989). 10ª edição.

- Farmacopeia Portuguesa (1997). VI edição, suplemento 1999.
- Fernandes, E.; Borges, F.; Milhazes, N.; Carvalho, F. D.; Bastos, M. L. (1999). Evaluation of superoxide radical scavenging activity of gallic acid and its alkyl esters using an enzymatic and a non-enzymatic system. *Toxicol. Lett.*, **109**, 42.
- Ferreres, F.; Andrade, P.; Gil, M.I.; Tomás-Barberán, F.A. (1996). Floral nectar phenolics as biochemical markers for the botanical origin of heather honey. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **202**, 40-44.
- Ferreres, F.; Gil, M.I.; Castañer, M.; Tomás-Barberán, F.A. (1997). Phenolic metabolites in red pigmented lettuce (*Lactuca sativa*). Changes with minimal processing and cold storage. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 4249-4254.
- Ferreres, F.; Tomás-Lorente, F.; Tomás-Barberán, F.A. (1989). Current trends in plant flavonoid analysis. In *Studies in natural products chemistry*. Atta-ur-Rahman (ed.). Amsterdam: Elsevier.
- Fitoterapia (1998). 3ª Edição. Barcelona: Masson, S. A..
- Flora Europaea* (1968). Vol. **III**. London: Cambridge University Press.
- Foti, M.; Piattelli, M.; Baratta, M.T.; Ruberto, G. (1996). Flavonoids, coumarins and cinnamic acids as antioxidants in a micellar system. Structure-activity relationship. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 497-501.
- Franco, J.A. (1984). *Nova Flora de Portugal (Continente e Açores)*, vol. **II**. Lisboa.
- Fukumoto, L.R.; Mazza, G. (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 3597-3604.
- Gebhardt, R. (1997). Antioxidative and protective properties of extracts from leaves of the artichoke (*Cynara scolymus* L.) against hydroperoxide-induced oxidative stress in cultured rat hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **144**, 279-286.
- Ghosal, S.; Chaudhuri, R. K.; Nath, A. (1973). Chemical constituents of *Gentianaceae* IV: new xanthenes of *Canscora decussata*. *J. Pharm. Sci.*, **62**, 137-139.
- Ghosal, S.; Singh, A.K.; Sharma, P.V.; Chaudhuri, R.K. (1974). Chemical constituents of *Gentianaceae* IX: natural occurrence of erythrauridin in *Enicostemma hyssopifolium* and *Swertia lawii*. *J. Pharm. Sci.*, **63**, 944-945.
- Gordon, M.H.; Walker, A.F.; Roberts, W.G. (2001). A human study investigating the effects of increased fruit and vegetable consumption in smokers. In *Biologically-active phytochemicals in food*. Pfannhauser, W.; Fenwick, G.R.; Khokhar, S. (ed.). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.

- Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *Am. J. Med.*, **91** (suppl 3C), 14S-22S.
- Halliwell, B. (2000). Antioxidant activity and other biological effects of flavonoids. In *Wake up to flavonoids*. Rice-Evans, C. (ed.). London: Royal Society of Medicine Press Limited.
- Halliwell, B.; Aeschbach, R., Löliger, J.; Aruoma, O.I. (1995). The characterization of antioxidants. *Food. Chem. Toxicol.*, **33**, 601-617.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C.; Aruoma, O.I. (1987). The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal. Biochem.*, **165**, 215-219.
- Harborne, J.B. (1989). General procedures and measurement of total phenolics. In *Methods in plant biochemistry*, vol. 1: plant phenolics. Dey, P.M. e Harborne, J.B. (ed.). London: Academic Press.
- Harborne, J.B.; Williams, C.A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, **55**, 481-504.
- Haslam, E.; Williamson, M.; Charlton, A. (2000). Protein-polyphenol interactions. In *Wake up to flavonoids*. Rice-Evans, C. (ed.). London: Royal Society of Medicine Press Limited.
- Hatjimanoli, M.; debelmas, A.M. (1977). Study of *Centaurium umbelatum* Gil. Identification of phenolic acids. *Ann. Pharm. Fr.*, **35**, 107-111. (CA: 87: 35919).
- Heilmann, J.; Merfort, I.; Weiss, M. (1995). Radical scavenger activity of different 3',4'-dihydroxyflavonols and 1,5-dicaffeoylquinic acid studied by inhibition of chemiluminescence. *Planta Med.*, **61**, 435-438.
- Hollman, P. (2000). Bioavailability of flavonoids. In *Wake up to flavonoids*. Rice-Evans, C. (ed.). London: Royal Society of Medicine Press Limited.
- Hopia, A.; Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of flavonol aglycones and their glycosides in methyl linoleate. *JAOCS*, **76**, 139-144.
- Hostettmann, K.; Hostettmann, M. (1989). Xanthones. In *Methods in plant biochemistry - Plant phenolics*, vol. 1. Harborne, J.B. (ed.). London: Academic Press.
- Husain, S.R.; Cillard, J.; Cillard, P. (1987). Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry*, **26**, 2489-2491.
- Igile, G.O.; Oleszek, W.; Jurzysta, M.; Burda, S.; Fafunso, M.; Fasanmade, A.A. (1994). Flavonoids from *Vernonia amygdalina* and their antioxidant activities. *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 2445-2448.

- Jewell, S.A.; Di Monte, D.; Richelmi, P.; Bellomo, G.; Orrenius, S. (1986). *tert*-Butylhydroperoxide-induced toxicity in isolated hepatocytes: contribution of thiol oxidation and lipid peroxidation. *J. Biochem. Toxicol.*, **1**, 13-22.
- Joyeux, M.; Rolland, A.; Fleurentin, J.; Mortier, F.; Dorfman, P. (1990). *Tert*-butyl hydroperoxide-induced injury in isolated rat hepatocytes: a model for studying anti-hepatotoxic crude drugs. *Planta Med.*, **56**, 171-174.
- Kähkönen, M.P.; Hopia, A.I.; Vuorela, H.J.; Rauha, J.-P.; Pihlaja, K.; Kujala, T.S.; Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 3954-3962.
- Kaouadji, M.; Vaillant, I.; Mariotte, A.-M. (1986). Polyoxygenated xanthenes from *Centaurium erythraea* roots. *J. Nat. Prod.*, **49**, 359.
- Kaouadji, M., Mariotte, A.-M. (1986). *Centaurium erythraea*: analyse du contenu xanthonique des racines et considerations chimiotaxinomiques. *Bull. Liaison-Groupe Polyphenols*, **13**, 546-552.
- Kartnig, T.; Göbel, I.; Heydel, B. (1996). Production of hypericin, pseudohypericin and flavonoids in cell cultures of various *Hypericum* species and their chemotypes. *Planta Med.*, **62**, 51-53.
- Kikuzaki, H.; Hisamoto, M.; Hirose, K.; Akiyama, K.; Taniguchi, H. (2002). Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 2161-2168.
- Ko, F.-N.; Liao, C.-H.; Kuo, Y.-H.; Lin, Y.-L. (1995). Antioxidant properties of demethyldiisoeugenol. *Biochim. Biophys. Acta*, **1258**, 145-152.
- Künzel, J.K.v.F.D.; Zee, J.v.d.; Ijzerman, A.P. (1996). Radical scavenging properties of adenosine and derivatives *in vitro*. *Drug Develop. Res.*, **37**, 48-54.
- Lamaison, J.L.; Petitjean-Freytet, C.; Carnat, A. (1993). Le verbascoside, composé phénolique majeur des feuilles de frêne (*Fraxinus excelsior*) et de verveine (*Aloysia trtphylla*). *Plant. Méd. Phytothér.*, **26**, 225-233.
- Laranjinha, J.A.N.; Almeida, L.M.; Madeira, V.M.C. (1994). Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals: antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation. *Biochem. Pharmacol.*, **48**, 487-494.
- Larson, R.A. (1988). The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, **27**, 969-978.
- Laughton, M.J.; Evans, P.J.; Moroney, M.A.; Houlst, J.R.S.; Halliwell, B. (1991). Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. *Biochem. Pharmacol.*, **42**, 1673-1681.

- Laughton, M.J.; Halliwell, B.; Evans, P.J.; Hoult, J.R.S. (1989). Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. Effects on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA. *Biochem. Pharmacol.*, **38**, 2859-2865.
- Levy, G.C.; Nelson, G.L. (1972). *Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance for Organic Chemists*. New York: Wiley Interscience.
- Li, C.; Xie, B. (2000). Evaluation of the antioxidant and pro-oxidant effects of tea catechin oxypolymers. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 6362-6366.
- Liao, K.-L.; Yin, M.-C. (2000). Individual and combined antioxidant effects of seven phenolic agents in human erythrocyte membrane ghosts and phosphatidylcholine liposome systems: importance of the partition coefficient. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 2266-2270.
- Liebler, D.C.; Reed, D.J. (1997). Free-radical defense and repair mechanisms. In *Free radical toxicology*. Wallace, K.B. (ed.). Washington: Taylor & Francis.
- Lin, C.-N.; Chung, M.-I.; Gan K.-H.; Chiang J.-R. (1987). Xanthenes from formosan Gentianaceous plants. *Phytochemistry*, **26**, 2381.
- Lin, W.-L.; Wang, C.-J.; Tsai, Y.-Y.; Liu, C.-L.; Hwang, J.-M.; Tseng, T.-H. (2000). Inhibitory effect of esculetin on oxidative damage induced by *t*-butyl hydroperoxide in rat liver. *Arch. Toxicol.*, **74**, 467-472.
- Lins Mesquita, A. A.; De Barros Corrêa, D.; Gottlieb O. R.; Taveira Magalhães, M. (1968). Methods for the structural investigation of xanthenes - Part II: Location of hydroxyl groups by ultraviolet and visible spectroscopy. *Anal. Chim. Acta*, **42**, 311-323.
- Liu, C.-L.; Wang, J.-M.; Chu, C.-Y.; Cheng, M.-T.; Tseng, T.-H. (2002). In vivo protective effect of protocatechuic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatotoxicity. *Food Chem. Toxicol.*, **40**, 635-641.
- Lu, J.; Feng, X.; Sun, Q.; Lu, H.; Manabe, M.; Sugahara, K.; Ma, D.; Sagara, Y.; Kodama H. (2002). Effect of six flavonoid compounds from *Ixeris sonchifolia* on stimulus-induced superoxide generation and tyrosyl phosphorylation in human neutrophils. *Clin. Chim. Acta*, **316**, 95-99. (PMID: 11750278).
- Mabry, T.J.; Markham, K.R.; Thomas, M.B. (1970). *The systematic identification of flavonoids*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Macheix, J.-J.; Fleuriet, A.; Billot, J. (1990a). The main phenolics of fruits. In *Fruit phenolics*. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc.

- Macheix, J.-J.; Fleuriet, A.; Billot, J. (1990b). Changes and metabolism of phenolic compounds in fruits. In *Fruit phenolics*. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc.
- Markham, K.R. (1982). Ultraviolet-visible absorption spectroscopy. In *Techniques of flavonoid identification*. Treherne, J.E. e Rubery, P.H. (ed.). London: Academic Press
- Markham, K.R. (1989). Flavones, flavonols and their glycosides. In *Methods in plant biochemistry*, vol. 1: plant phenolics. Dey, P.M. e Harborne, J.B. (ed.). London: Academic Press.
- Maruta, Y.; Kawabata, J.; Niki, R. (1995). Antioxidative caffeoylquinic acid derivatives in the roots of burdock (*Arctium lappa* L.). *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 2592-2595.
- Matito, C.; Comín-Anduix, B.; Torres, J.L.; Centelles, J.J.; Cascante, M. (2002). Antiproliferative effect of antioxidant polyphenols from wine by-products. *Abstracts of International Symposium on «Dietary Phytochemicals and Human Health»*. Salamanca, Espanha: 18-20 de Abril.
- Mehendale, H.M. (1998). Role of tissue repair in toxicologic interactions among hepatotoxic organics. *Environ. Health Perspect.*, **106** (Suppl 6), 1307-1317.
- Meravý, L. (1987). Phenolic substances in tissue cultures of *Centaureum erythraea*. *Biologia Plantarum*, **29**, 81-87.
- Moldéus, P.; Hogberg, J.; Orrenius, S. (1978). Isolation and use of liver cells. *Methods Enzymol.*, **52**, 60-71.
- Moran, J.F.; Klucas, R.V.; Grayer, R.J.; Abian, J.; Becana, M. (1997). Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: prooxidant and antioxidant properties. *Free Radic. Biol. Med.*, **22**, 861-870.
- Moran, L.A.; Scrimgeour, K.G.; Horton, H.R., Ochs, R.S.; Rawn, J.D. (1994). *Biochemistry*. New Jersey: Neil Patterson Publishers/Prentice-Hall Inc.
- Moridani, M.Y.; Scobie, H.; Jamshidzadeh, A.; Salehi, P.; O'Brien, P.J. (2001). Caffeic acid, chlorogenic acid, and dihydrocaffeic acid metabolism: glutathione conjugate formation. *Drug Metab. Dispos.*, **29**, 1432-1439. (PMID: 11602518).
- Muriel, P. (1997). Peroxidation of lipids and liver damage. In *Oxidants, antioxidants and free radicals*. Baskin, S.I.; Salem, H. (ed.). Washington DC: Taylor & Francis.
- Nagata, H.; Takekoshi, S.; Takagi, T.; Honma, T.; Watanabe, K. (1999). Antioxidative action of flavonoids, quercetin and catechin, mediated by the activation of glutathione peroxidase. *Tokai J. Exp. Clin. Med.*, **24**, 1-11.



- Nakatani, N.; Kayano, S.; Kikuzaki, H.; Sumino, K.; Katagiri, K.; Mitani, T. (2000). Identification, quantitative determination and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (*Prunus domestica* L.). *J. Agric. Food. Chem.*, **48**, 5512-5516.
- Natella, F.; Nardini, M.; Di Felice, M.; Scaccini, C. (1999). Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure-activity relation. *J. Agric. Food. Chem.*, **47**, 1453-1459.
- Neshta, N.M.; Glyzin, V.I.; Nikolaeva, G.G.; Sheichenko, V.I. (1983a). New xanthone compound from *Centaurium erythraea*. *Khim. Prir. Soedin.*, **1**, 106-107. (CA: 98: 194985).
- Neshta, N.M.; Glyzin, V.I.; Patudin, A.V. (1984). A new xanthone compound from *Centaurium erythraea*. IV. *Khim. Prir. Soedin.*, **1**, 110. (CA: 101: 3893).
- Neshta, N.M.; Glyzin, V.I.; Savina, A.A.; Patudin, A.V. (1983b). New xanthone compound from *Centaurium erythraea*. III. *Khim. Prir. Soedin.*, **6**, 787. (CA: 100: 171554).
- Neshta, N.M.; Nikolaeva, G.G.; Sheichenko, V.I.; Patudin, A.V. (1982). New xanthone compound from *Centaurium erythraea*. *Khim. Prir. Soedin.*, **2**, 258. (CA: 97: 123930).
- Newall, C.A.; Anderson, L.A., Phillipson, J.D. (1996). *Herbal Medicines - A guide for health-care professionals*. London: The Pharmaceutical Press.
- Núñez Sellés, A.J. (2002). Antioxidants for human health: myth or reality? *Abstracts of International Symposium on «Dietary Phytochemicals and Human Health»*. Salamanca, Espanha: 18-20 de Abril.
- Paris, R.; Moyses, H. (1971). *Matière Médicale*, vol. **3**. Paris: Masson & C<sup>ie</sup>.
- Pascual, M.E.; Slowing, K.; Carretero, E.; Sánchez Mata, D.; Villar, A. (2001). Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *J. Ethnopharmacol.*, **76**, 201-214.
- Payá, M.; Halliwell, B.; Hoult, J.R.S. (1992). Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species. Scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. *Biochem. Pharmacol.*, **44**, 205-214.
- Plaa, G.L.; Charbonneau, M. (2001). Detection and evaluation of chemically induced liver injury. In *Principles and methods of toxicology* (4th edition). Hayes, A.W. (ed.). Philadelphia: Taylor & Francis.

- Pulido, R.; Bravo, L.; Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 3396-3402.
- Puppo, A. (1992). Effect of flavonoids on hydroxyl radical formation by Fenton-type reactions: influence of the iron chelator. *Phytochemistry*, **31**, 85-88.
- Rahden-Staron, I.; Czczot, H.; Szumilo, M. (2001). Induction of rat liver cytochrome P450 isoenzymes CYP 1A and CYP 2B by different fungicides, nitrofurans and quercetin. *Mutat. Res.*, **498**, 57-66.
- Reed, D.J. (1998). Evaluation of chemical-induced oxidative stress as a mechanism of hepatocyte death. In *Toxicology of the liver*. Laa, G.L.; Hewitt, W.R. (ed.). Washington: Taylor & Francis.
- Remião, F. (1998). *O coração como órgão alvo de toxicidade. Utilização de suspensões de cardiomiócitos isolados de rato adulto para estudos de cardiotoxicidade*. Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. pp 98.
- Ribéreau-Gayon, P. (1968a). Notions générales sur les composés phénoliques. In *Les composés phénoliques des végétaux*. Paris: Dunod.
- Ribéreau-Gayon, P. (1968b). Les acides-phénols et leurs dérivés. In *Les composés phénoliques des végétaux*. Paris: Dunod.
- Ribéreau-Gayon, P. (1968c). Les flavones, les flavonols et les composés voisins. In *Les composés phénoliques des végétaux*. Paris: Dunod.
- Ribéreau-Gayon, P. (1968d). Métabolisme et propriétés des composés phénoliques. In *Les composés phénoliques des végétaux*. Paris: Dunod.
- Ribéreau-Gayon, P. (1968e). Méthodes générales d'étude des composés phénoliques. In *Les composés phénoliques des végétaux*. Paris: Dunod.
- Ribéreau-Gayon, P. (1968f). Propriétés chimiques des phénols. Applications aux produits naturels. In *Les composés phénoliques des végétaux*. Paris: Dunod.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J.; Bolwell, P.G.; Bramley, P.M.; Pridham, J.B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Rad. Res.*, **22**, 375-383.
- Rietveld, A.; Wiseman, S.; Van der Ham, M.; Gross, M.; Leenen, R.; Roodenburg, A.; Vita, J.; Balentine, D. (2002). The effects of tea consumption on markers of oxidative damage and cardiovascular health in humans. *Abstracts of International Symposium on «Dietary Phytochemicals and Human Health»*. Salamanca, Espanha: 18-20 de Abril.

- Robak, J.; Gryglewski, R.J. (1988). Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 837-841.
- Rocha, L.; Marston, A.; Potterat, O.; Kaplan, M.A.; Stoeckli-Evans, H.; Hostettmann, K. (1995). Antibacterial phloroglucinols and flavonoids from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry*, **40**, 1447-1452.
- Rodriguez, R.J.; Miranda, C.L.; Stevens, J.F.; Deinzer, M.L.; Buhler, D.R. (2001). Influence of prenylated and non-prenylated flavonoids on liver microsomal lipid peroxidation and oxidative injury in rat hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.*, **39**, 437-445.
- Sawa, T.; Nakao, M.; Akaike, T.; Ono, K.; Maeda, H. (1999). Alkylperoxyl radical-scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: implication for the anti-tumor-promoter effect of vegetables. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 397-402.
- Schimmer, O.; Mauthner, H. (1996). Polymethoxylated xanthenes from the herb of *Centaurium erythraea* with strong antimutagenic properties in *Salmonella typhimurium*. *Planta Med.*, **62**, 561-564.
- Schmidt W.; El-Mawla, A.; Wolfender, J.-L.; Hostettmann, K.; Beerhues, L. (2000). Xanthenes in cell cultures of *Hypericum androsaemum*. *Planta Med.*, **66**, 380-381.
- Schneider, H.; Schwiertz, A.; Collins, M.D.; Blaut, M. (1999). Anaerobic transformation of quercetin-3-glucoside by bacteria from the human intestinal tract. *Arch. Microbiol.*, **171**, 81-91.
- Sciuto, A. M. (1997). Antioxidant properties of glutathione and its role in tissue protection. In *Oxidants, antioxidants and free radicals*. Baskin, S.I.; Salem, H. (ed.). Washington DC: Taylor & Francis.
- Scott Obach, R. (2000). Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by constituents of St. John's Wort, an herbal preparation used in the treatment of depression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **294**, 88-95.
- Seabra, R.M. (1987). *Contribuição para o estudo de compostos flavónicos em espécies de Hypericum da flora portuguesa*. Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Tese de doutoramento.
- Seabra, R.M.; Correia Alves, A. (1989a). Mangiferin and chlorogenic acid from *Hypericum* species. *Planta Med.*, **55**, 404.

- Seabra, R.M.; Correia Alves, A. (1989b). Identificação de 3-sulfato de quercetina em *Hypericum androsaemum*. *Rev. Port. Farm.*, **39**, 16-18.
- Seabra, R.M.; Correia Alves, A. (1990). Flavonoids from *Hypericum* species. *Fitoterapia*, **61**, 146-147.
- Seabra, R.; Valentão, P.; Ferreres, F.; Andrade, P. (2002). Phenolic profiles in the definition of natural products authenticity. Cardoon *versus* artichoke profile. In *Natural products in the new millenium: prospects and industrial applications*. Rauter, A.P.; Araújo, M.E.; Palma, F.B.; Justino, J.; Santos, S.P. (ed.). Netherlands: Kluwer Academic Publishers (Em publicação).
- Seidel, V.; Verholle, M.; Malard, Y.; Tillequin, F.; Fruchart, J.-C.; Duriez, P.; Bailleul, F.; Teissier, E. (2000). Phenylpropanoids from *Ballota nigra* L. inhibit *in vitro* LDL peroxidation. *Phytother. Res.*, **14**, 93-98.
- Ševčíková, P.; Glatz, Z.; Slanina, J. (2002). Analysis of artichoke (*Cynara cardunculus* L.) extract by means of micellar electrokinetic capillary chromatography. *Electrophoresis*, **23**, 249-252.
- Shi, H.; Noguchi, N.; Niki, E. (2001). Introducing natural antioxidants. In *Antioxidants in food - Pratical applications*. Pokorny, J.; Yanishlieva, N.; Gordon, M. (ed.). Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- Shimoi, K.; Masuda, S.; Furugori, M.; Esaki, S.; Kinae, N. (1994). Radioprotective effect of antioxidative flavonoids in gamma-ray irradiated mice. *Carcinogenesis*, **15**, 2669-2672. (PMID: 7955124).
- Sies, H. (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am. J. Med.*, **91** (suppl 3C), 31S-38S.
- Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.*, **215**, 213-219.
- Silva, B.M.; Andrade, P.B.; Mendes, G.C.; Valentão, P.; Seabra, R.M.; Ferreira, M.A. (2000a). Analysis of phenolic compounds in the evaluation of commercial quince jam authenticity. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 2853-2857.
- Silva, B.M.; Andrade, P.B.; Valentão, P.; Mendes, G.C.; Seabra, R.M.; Ferreira, M.A. (2000b). Phenolic profile in the evaluation of commercial quince jellies authenticity. *Food Chem.*, **71**, 281-285.
- Silva, F.A.M.; Borges, F.; Guimaraes, C.; Lima, J.L.C.; Matos, C.; Reis, S. (2000c). Phenolic acids and derivatives: studies on the relationship among structure, radical scavenging activity and physicochemical parameters. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 2122-2126.

- Skaltsa, H.; Shamma, G. (1988). Flavonoids from *Lippia citriodora*. *Planta Med.*, **54**, 465.
- Somani, S.M.; Husain, K.; Schlorff, E.C. (1997). Response of antioxidant system to physical and chemical stress. In *Oxidants, antioxidants and free radicals*. Baskin, S.I.; Salem, H. (ed.). Washington DC: Taylor & Francis.
- Spencer, J.P.E.; Chowrimootoo, G.; Choudhury, R.; debnam, E.S.; Srini, S.K.; Rice-Evans, C. (1999). The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett.*, **458**, 224-230.
- Takagi, S.; Yamaki, M. (1982). Studies on the constituents of *Erythraea centaurium* (Linne) Persoon. III. Isolation and structure of xanthenes. *Yakugaku Zasshi*, **102**, 546-548. (CA: 97: 212621).
- Ternay Jr., A.L.; Sorokin, V. (1997). Redox, radicals and antioxidants. In *Oxidants, antioxidants and free radicals*. Baskin, S.I.; Salem, H. (ed.). Washington DC: Taylor & Francis.
- Toda, S.; Kumura, M.; Ohnishi, M. (1991). Effects of phenolcarboxylic acids on superoxide anion and lipid peroxidation induced by superoxide anion. *Planta Med.*, **57**, 8-10.
- Tomás-Barbéran, F.A.; Harborne, J.B.; Self, R. (1987). Twelve 6-oxygenated flavone sulphates from *Lippia nodiflora* and *Lippia canescens*. *Phytochemistry*, **26**, 2281-2284.
- Tomás-Lorente, F.; Garcia-Grau, M.; Tomás-Barbéran, F. (1988). The wastes of the industrial treatment of *Salvia lavandulaefolia* as a source of biologically active flavonoids. *Fitoterapia*, **59**, 62-64.
- Tseng, T.-H.; Kao, E.-S.; Chu, C.-Y.; Chou, F.-P.; Lin Wu, H.-W.; Wang, C.-J. (1997). Protective effects of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. against oxidative stress in rat primary hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.*, **35**, 1159-1164.
- Valentão, P.; Andrade, P.B.; Areias, F.; Ferreres, F.; Seabra, R. M. (1999). Analysis of vervain flavonoids by HPLC/diode array detector method. Its application to quality control. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 4579-4582.
- Valentão, P.; Areias, F.; Amaral, J.; Andrade, P.; Seabra, R. (2000). Tetraoxygenated xanthenes from *Centaurium erythraea*. *Nat. Prod. Lett.*, **14**, 319-323.
- Valentão, P.; Andrade, P.B.; Silva, E.; Vicente, A.; Santos, H.; Bastos, M.L.; Seabra, R. M. (2002a). Methoxylated xanthenes in the quality control of small centaury (*Centaurium erythraea*) flowering tops). *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 460-463.

- Valentão, P.; Andrade, P.B.; Silva, A.M.S.; Moreira, M.M.; Seabra, R. M. (2002b). Isolation and structural elucidation of 5-formyl-2,3-dihydroisocoumarin from *Centaurium erythraea* aerial parts. *Nat. Prod. Lett.* (aceite para publicação).
- Valentão, P.; Dias, A.; Ferreira, M.; Silva, B.; Andrade, P.B.; Bastos, M.L.; Seabra, R. M. (2002c). Variability in phenolic composition of *Hypericum androsaemum*. *Nat. Prod. Lett.* (aceite para publicação).
- Valentão, P.; Fernandes, E.; Carvalho, F.; Andrade, P.B.; Seabra, R. M.; Bastos, M.L. (2001). Antioxidant activity of *Centaurium erythraea* infusion evidenced by its superoxide radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activity. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 3476-3479.
- Valentão, P.; Fernandes, E.; Carvalho, F.; Andrade, P.B.; Seabra, R. M.; Bastos, M.L. (2002d). Studies on the antioxidant activity of *Lippia citriodora* infusion: Scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 1324-1327.
- Valentão, P.; Fernandes, E.; Carvalho, F.; Andrade, P.B.; Seabra, R. M.; Bastos, M.L. (2002e). Antioxidant activity of *Hypericum androsaemum* infusion: scavenging activity against superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 1320-1323.
- Valentão, P.; Fernandes, E.; Carvalho, F.; Andrade, P.B.; Seabra, R. M.; Bastos, M.L. (2002f). Antioxidative properties of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) infusion against superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 4989-4993.
- Valentão, P.; Fernandes, E.; Carvalho, F.; Andrade, P.B.; Seabra, R. M.; Bastos, M.L. (2002g). Hydroxyl radical and hypochlorous acid scavenging activity of small centaury (*Centaurium erythraea*) infusion. *Food Chem.* (submetido para publicação).
- Van Hellemont, J. (1986). Compendium de Phytotherapie. Bruxelles: Service Scientifique de l'APB.
- Van Sumere, C.F. (1989). Phenols and phenolic acids. In *Methods in plant biochemistry*, vol. 1: plant phenolics. Dey, P.M. e Harborne, J.B. (ed.). London: Academic Press.
- Velioglu, Y.S.; Mazza, G.; Gao, L.; Oomah, B.D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 4113-4117.

- Vinson, J.A.; Dabbagh, Y.A.; Serry, M.M.; Jang, J. (1995). Plant flavonoids, especially tea flavonols are powerful antioxidants using *in vitro* oxidation model for heart disease. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 2800-2802.
- Vinson, J.A.; Hao, Y.; Su, X.; Zubik, L. (1998). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 3630-3634.
- Vioque, M.; Gómez, R.; Sánchez, E.; Mata, C.; Tejada, L.; Fernández-Salguero, J. (2000). Chemical and microbiological characteristics of ewes' milk cheese manufactured with extracts from flowers of *Cynara cardunculus* and *Cynara humilis* as coagulants. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 451-456.
- Virgili, F.; Scaccini, C.; Packer, L.; Rimbach, G. (2001). Cardiovascular disease and nutritional phenolics. In *Antioxidants in food - Practical applications*. Pokorny, J.; Yanishlieva, N.; Gordon, M. (ed.). Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- Visioli, F.; Bellomo, G.; Galli, C. (1998). Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **247**, 60-64.
- Volák, J.; Stodola, J. (1990). *Plantas medicinais*. Lisboa: Editorial Inquérito.
- Wang, C.-J.; Wang, J.-M.; Lin, W.-L.; Chu, C.-Y.; Chou, F.-P.; Tseng, T.-H. (2000). Protective effect of *Hibiscus* anthocyanins against *tert*-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. *Food Chem. Toxicol.*, **38**, 411-416.
- Wang, C.-K.; Lee, W.-H.; Peng, C.-H. (1997). Contents of phenolics and alkaloids in *Areca catechu* Linn. during maturation. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 1185-1188.
- Wang, M.; Li, J.; Rangarajan, M.; Shao, Y.; La Voie, E.J.; Huang, T.-C.; Ho, C.-T. (1998). Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 4869-4873.
- Wang, P.; Kang, J.; Zheng, R.; Yang, Z.; Lu, J.; Gao, J.; Jia, Z. (1996). Scavenging effects of phenylpropanoid glycosides from *Pedicularis* on superoxide anion and hydroxyl radical by the spin trapping method (95)02255-4. *Biochem. Pharmacol.*, **51**, 687-691. (PMID: 8615906).
- Waterman, P.G.; Mole, S. (1994a). Patterns in the distribution of phenolic secondary metabolites. In *Analysis of phenolic plant metabolites*. Lawton, J.H.; Likens, G.E. (ed.). Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Waterman, P.G.; Mole, S. (1994b). Qualitative and quantitative separation methods. In *Analysis of phenolic plant metabolites*. Lawton, J.H.; Likens, G.E. (ed.). Oxford: Blackwell Scientific Publications.

- Waterman, P.G.; Mole, S. (1994c). Structure elucidation of phenolics. In *Analysis of phenolic plant metabolites*. Lawton, J.H.; Likens, G.E. (ed.). Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Waterman, P.G.; Mole, S. (1994d). Extraction and chemical quantification. In *Analysis of phenolic plant metabolites*. Lawton, J.H.; Likens, G.E. (ed.). Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Westerman, P.W.; Uvais, M.; Sultanbawa S.; Kazlauskas R. (1977). Carbon-13 NMR study of naturally occurring xanthenes. *Org. Magn. Reson.*, **9**, 631-636.
- Wolfender, J.-L.; Hamburger, M.; Msonthi, J.D.; Hostettmann, K. (1991). Xanthenes from *Chironia krébsii*. *Phytochemistry*, **30**, 3625-3629.
- Xiong, Q.; Hase, K.; Tezuka, Y.; Tani, T.; Namba, T.; Kadota, S. (1998). Hepatoprotective activity of phenylethanoids from *Cistanche deserticola*. *Planta Med.*, **64**, 120-125.
- Xiong, Q.; Kadota, S.; Tani, T.; Namba, T. (1996). Antioxidative effects of phenylethanoids from *Cistanche deserticola*. *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 1580-1585. (PMID: 8996643).
- Yanishlieva-Maslarova, N.V. (2001). Inhibiting oxidation. In *Antioxidants in food - Pratical applications*. Pokorny, J.; Yanishlieva, N.; Gordon, M. (ed.). Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- Zhou, Y.C.; Zheng, R.L. (1991). Phenolic compounds and an analog as superoxide anion scavengers and antioxidants. *Biochem. Pharmacol.*, **42**, 1177-1179. (PMID: 1653565).



**Resumo**

## Resumo

Neste trabalho foram estudadas quatro espécies medicinais de grande consumo em Portugal: *Lippia citriodora* (Limonete), *Hypericum androsaemum* (Hipericão-do-Gerês), *Cynara cardunculus* (Cardo-do-Coalho) e *Centaurium erythraea* (Fel-da-Terra).

Embora a caracterização química do Limonete e do Fel-da-Terra, definida em Farmacopeias, seja feita através da detecção de compostos terpénicos, foi objectivo deste trabalho propor metodologias para controlo de qualidade de cada uma das quatro espécies, baseadas nos seus perfis fenólicos. Cada espécie foi extraída por diversos solventes e os extractos obtidos foram analisados por CLAP acoplado a um detector de díodos. Para estabelecer o perfil fenólico é proposto o extracto que fornece o maior número de compostos identificados.

O extracto etéreo de Limonete é caracterizado pela presença de luteolina, nepetina, hispidulina, jaceosidina, cirsimaritina, cirsilineol e eupatorina. Todas as amostras revelaram um perfil fenólico comum, no qual a hispidulina e a jaceosidina são os compostos maioritários e a nepetina o composto existente em menor quantidade. O extracto metanólico de Hipericão-do-Gerês é caracterizado pela presença dos ácidos 3- e 5-*O*-cafeoilquínicos, quercetina 3-*O*-sulfato, quercetina 3-*O*-galactósido, quercetina 3-*O*-glucósido, quercetina 3-*O*-arabinósido, quercetina 3-*O*-ramnósido, quercetina, kaempferol e de derivados do floroglucinol, que não foram identificados. Contudo, a quantificação dos diversos compostos revelou quatro perfis distintos, facto que pode indicar a existência de diferentes quimiotipos intraespecíficos. O extracto metanólico de Cardo-do-Coalho é caracterizado pela presença dos ácidos 3-, 4, e 5-*O*-cafeoilquínicos, ácido cafeico, ácidos 1,3-, 3,4-, 3,5-, 1,5- e 4,5-*O*-dicafeoilquínicos, luteolina 7-*O*-glucósido, apigenina 7-*O*-glucósido e luteolina, sendo os ácidos 5-*O*-cafeoilquínico e 1,5-*O*-dicafeoilquínico os compostos mais abundantes. No caso do Fel-da-Terra foi necessário proceder ao isolamento e determinação estrutural dos compostos presentes no extracto clorofórmico. Para esse efeito recorreu-se a métodos cromatográficos (CC, CCF, CLAP), espectrofotométricos (UV) e espectrométricos (RMN, EM). Identificaram-se assim 3-hidroxi-1,5,6-trimetoxixantona, 1,3,5-tri-hidroxi-2-metoxixantona, 1,5-di-hidroxi-3-metoxixantona, 1,6-di-hidroxi-3,5-dimetoxixantona, 1-hidroxi-3,7,8-trimetoxixantona, 1-hidroxi-3,5,6-trimetoxixantona, 1-hidroxi-3,5,6,7,8-pentametoxixantona, 1-hidroxi-3,5,6,7-tetrametoxixantona, 1,8-di-hidroxi-3,5,6,7-

tetrametoxixantona e 5-formil-2,3-di-hidro-isocumarina. A 3-hidroxi-1,5,6-trimetoxixantona, a 1,3,5-tri-hidroxi-2-metoxixantona e a 1,6-di-hidroxi-3,5-dimetoxixantona foram isoladas pela primeira vez nesta espécie. A 1,6-di-hidroxi-3,5-dimetoxixantona e a 1,8-di-hidroxi-3,5,6,7-tetrametoxixantona são os compostos maioritários.

Paralelamente foi determinada a composição fenólica das infusões liofilizadas obtidas de cada uma das espécies, uma vez que é sob a forma de infusão que são habitualmente utilizadas. A infusão de Limonete é constituída essencialmente por verbascósido, tendo-se detectado, também, luteolina 7-*O*-diglucuronato e outros compostos não identificados. As infusões de Hipericão-do-Gerês e de Cardo-do-Coalho apresentam uma composição idêntica à do extracto metanólico respectivo. A infusão de Fel-da-Terra é composta essencialmente por derivados do ácido cinâmico; procedeu-se à hidrólise alcalina desta infusão e a análise do extracto hidrolisado revelou a presença dos ácidos *p*-cumárico, ferúlico e sinápico e de kaempferol.

Na segunda parte deste trabalho apresentam-se os resultados de estudos realizados no âmbito da valorização farmacológica das espécies estudadas. Atendendo ao conteúdo fenólico que estas espécies apresentam e dada a inexistência de estudos sobre a sua acção antioxidante, a actividade sequestrante das infusões obtidas de cada uma das espécies para os radicais superóxido e hidroxilo e para o ácido hipocloroso foi estudada. Para esse efeito o radical superóxido foi gerado num sistema enzimático (xantina/xantina oxidase) e num sistema químico (NADH/PMS) e a actividade sequestrante foi avaliada pela inibição da redução do azul de nitrotetrazólio. O radical hidroxilo foi gerado pelo sistema de Fenton ( $\text{Fe}^{3+}$ /EDTA/ascorbato) e a actividade sequestrante foi determinada pela inibição da degradação da desoxirribose em substâncias reactivas com o ácido tiobarbitúrico; esta determinação foi também efectuada na ausência de EDTA ou de ascorbato, para avaliar, respectivamente, o potencial pró-oxidante e a capacidade para quelatar metais das infusões. A actividade sequestrante para o ácido hipocloroso foi avaliada pela inibição da oxidação do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico.

Os resultados obtidos demonstraram que as quatro infusões são dotadas de actividade antioxidante, atribuída à sua capacidade para sequestrar radicais superóxido e hidroxilo e ácido hipocloroso e também para quelatar metais. Contudo, as infusões de Limonete e de Hipericão-do-Gerês apresentam algum potencial pró-oxidante.

---

Ainda na vertente da actividade farmacológica foram realizados ensaios *in vitro*, em hepatócitos isolados de rato, e *in vivo*, em ratinhos, com o objectivo de tentar contribuir para o entendimento da acção hepatoprotectora atribuída ao Hiperião-do-Gerês. Nos ensaios efectuados estudou-se a actividade hepática da infusão de Hiperião-do-Gerês isoladamente e o seu papel contra a toxicidade induzida pelo *tert*-butil-hidroperóxido (*t*-BHP).

Os parâmetros avaliados nos ensaios *in vitro* foram a viabilidade celular, o conteúdo intracelular de glutathiona reduzida (GSH) e de glutathiona oxidada (GSSG) e a extensão da peroxidação lipídica.

Os parâmetros avaliados no ensaio *in vivo* foram os níveis plasmáticos de transaminases, o conteúdo hepático em GSH e GSSG, a extensão da peroxidação lipídica e o exame histológico de cortes de fígado.

Nos ensaios *in vitro* verificou-se que a incubação dos hepatócitos com infusão e *t*-BHP teve um efeito protector da viabilidade celular e da peroxidação lipídica. Contudo, não evitou o aumento da GSSG e a depleção da glutathiona total.

No ensaio *in vivo* a infusão potenciou a toxicidade induzida pelo *t*-BHP, como foi verificado pela diminuição dos níveis de glutathiona total e de GSH e pelo aumento da GSSG. Algum efeito protector foi observado a nível de peroxidação lipídica. A ingestão da infusão (100 mg/kg) provocou uma elevação dos níveis de GSSG e da razão GSSG/glutathiona total.

**Abstract**

## Abstract

In this work four medicinal species of great consumption in Portugal were studied: *Lippia citriodora*, *Hypericum androsaemum*, *Cynara cardunculus* and *Centaureum erythraea*.

Although the chemical characterization of *L. citriodora* and *C. erythraea* is made, in some Pharmacopoeias, by the detection of terpenoid compounds, the aim of this work was to propose methodologies for the quality control of the four species, based on their phenolic profiles. Several extracts of each species were prepared and analysed by HPLC coupled to a diode array detector. For the establishment of the phenolic profile we propose the solvent that gave the higher number of identified compounds.

The ether extract of *L. citriodora* is characterized by the presence of luteolin, nepetin, hispidulin, jaceosidin, cirsimaritin, cirsilineol and eupatorin. All of the samples showed a common phenolic profile, in which hispidulin and jaceosidin are the major compounds and nepetin is the compound present in lower amount. The methanolic extract of *H. androsaemum* is characterized by the presence of 3- and 5-*O*-caffeoylquinic acids, quercetin 3-*O*-sulphate, quercetin 3-*O*-galactoside, quercetin 3-*O*-glucoside, quercetin 3-*O*-arabinoside, quercetin 3-*O*-rhamnoside, quercetin, kaempferol and phloroglucinol derivatives, which were not identified. On analysing the proportion among the quantified phenolics we found four distinct profiles, indicating the existence of intraspecific chemotypes. The methanolic extract of *C. cardunculus* is characterized by the presence of 3-, 4- and 5-*O*-caffeoylquinic acids, caffeic acid, 1,3-, 3,4-, 3,5-, 1,5- and 4,5-*O*-dicaffeoylquinic acids, luteolin 7-*O*-glucoside, apigenin 7-*O*-glucoside and luteolin, being 5-*O*-caffeoylquinic acid and 1,5-*O*-dicaffeoylquinic acid the major compounds. For *C. erythraea* it was necessary to proceed to the isolation and structural elucidation of the compounds present in the chloroformic extract. On this regard chromatographic (CC, TLC, HPLC), spectrophotometric (UV) and spectrometric (NMR, MS) methods were employed, which allowed the identification of 3-hydroxy-1,5,6-trimethoxyxanthone, 1,3,5-tri-hydroxy-2-methoxyxanthone, 1,5-di-hydroxy-3-methoxyxanthone, 1,6-di-hydroxy-3,5-dimethoxyxanthone, 1-hydroxy-3,7,8-trimethoxyxanthone, 1-hydroxy-3,5,6-trimethoxyxanthone, 1-hydroxy-3,5,6,7,8-pentamethoxyxanthone, 1-hydroxy-3,5,6,7-tetramethoxyxanthone, 1,8-di-hydroxy-

3,5,6,7-tetramethoxyxanthone and 5-formyl-2,3-di-hydro-isocoumarin. 3-Hydroxy-1,5,6-trimethoxyxanthone, 1,3,5-tri-hydroxy-2-methoxyxanthone and 1,6-di-hydroxy-3,5-dimethoxyxanthone were isolated for the first time in this species. 1,6-di-hydroxy-3,5-dimethoxyxanthone and 1,8-di-hydroxy-3,5,6,7-tetramethoxyxanthone are the major compounds.

Since these species are commonly used in infusions, the phenolic composition of their lyophilized infusions was also determined. *L. citriodora* infusion is mainly characterized by the presence of verbascoside, despite the existence of luteolin 7-*O*-diglucuronide and other unidentified compounds. *H. androsaemum* and *C. cardunculus* infusions' composition was identical to the correspondent methanolic extract. *C. erythraea* infusion is mainly characterized by the presence of cinnamic acid derivatives; the infusion was subjected to an alkaline hydrolysis and the analysis of the hydrolyzed extract revealed the presence of *p*-coumaric, ferulic and sinapic acids and kaempferol.

The second part of this work presents the performed studies for the pharmacological valorization of the four species. Taking into account the phenolic content of these species and considering that nothing had been reported about their antioxidant activity, the superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid scavenging activities of each infusion were examined. On this regard superoxide radical was generated either in an enzymatic (xanthine/xanthine oxidase) or in a chemical (NADH/PMS) systems, and scavenging ability was assessed by the inhibition of nitroblue tetrazolium reduction. Hydroxyl radical was generated by the Fe<sup>3+</sup>-EDTA/ascorbate Fenton system, and assayed by evaluating deoxyribose degradation into thiobarbituric acid-reactive substances; this assay was also performed without EDTA or ascorbic acid, in order to evaluate, respectively, the pro-oxidant potential and the ability to chelate iron ions of the infusions. Hypochlorous acid scavenging activity was tested by measuring the inhibition of 5-thio-2-nitrobenzoic acid oxidation.

The results provided evidence that the four infusions exhibit antioxidant activity, expressed by their capacity to scavenge superoxide and hydroxyl radicals and hypochlorous acid. However, *L. citriodora* and *H. androsaemum* infusions may act as a pro-oxidants.

In addition to the pharmacological activity evaluation, *in vitro* studies, in isolated rat hepatocytes, and *in vivo* studies, in mice, were performed, in an attempt to contribute for the understanding of the hepatoprotective capacity attributed to *H.*

*androsaemum*. The assays examined the protective activity of *H. androsaemum* infusion against the toxicity induced by *tert*-butylhydroperoxide (*t*-BHP).

The parameters under evaluation for the *in vitro* assays were the cell viability, quantification of reduced glutathione (GSH) and oxidised glutathione (GSSG) and lipid peroxidation.

The parameters under evaluation for the *in vivo* assays were the plasmatic levels of transaminases, hepatic GSH and GSSG contents, hepatic lipid peroxidation and histological examination of the liver.

*In vitro* assays showed that the simultaneous incubation of the hepatocytes with infusion and *t*-BHP prevented the loss in cell viability and lipid peroxidation. However, it caused an increase in GSSG and a depletion in total glutathione levels.

*In vivo* assays showed that the infusion potentiated the *t*-BHP-induced toxicity, as it was observed by the depletion in total glutathione and GSH contents and increase in GSSG levels. A protective effect was noticed against lipid peroxidation. The infusion itself (100 mg/kg) caused an increase in GSSG levels and in the GSSG/total glutathione ratio.



**Résumé**

## Résumé

Dans ce travail quatre espèces médicinales de grande consommation au Portugal ont été étudiées: *Lippia citriodora*, *Hypericum androsaemum*, *Cynara cardunculus* et *Centaurium erythraea*.

Bien que la caractérisation chimique de *L. citriodora* et de *C. erythraea*, définie dans les Pharmacopées, soit faite à travers la détection de composés terpéniques, il a été objectif de ce travail de proposer des méthodologies pour le contrôle de qualité de chacune des quatre espèces, fondées sur leurs profils phénoliques. Chaque espèce a été extraite par plusieurs solvants et les extraits obtenus ont été analysés par CLHP accouplé à un détecteur à barrettes de diodes. Pour établir le profil phénolique on propose l'extrait qui fournit le plus grand nombre de composés identifiés.

L'extrait étheré de *L. citriodora* est caractérisé par la présence de lutéoline, nepétine, hispiduline, jaceosidine, cirsimaritrine, cirsilinéol et eupatorine. Tous les échantillons ont révélé un profil phénolique commun, dans lequel l'hispiduline et la jaceosidine sont les composés majoritaires et la nepétine le composé qui existe dans une plus petite quantité. L'extrait méthanolique de *H. androsaemum* est caractérisé par la présence des acides 3- et 5-*O*-caféylquiniques, quercétine 3-*O*-sulfate, quercétine 3-*O*-galactoside, quercétine 3-*O*-glucoside, quercétine 3-*O*-arabinoside, quercétine 3-*O*-rhamnoside, quercétine, kaempférol et de dérivés du phloroglucinol, qui n'ont pas été identifiés. Cependant, la quantification des plusieurs composés a révélé quatre profils distincts, ce que peut indiquer l'existence de différents chimiotypes intra-spécifiques. L'extrait méthanolique de *C. cardunculus* est caractérisé par la présence des acides 3-, 4- et 5-*O*-caféylquiniques, acide caféique, acides 1,3-, 3,4-, 3,5-, 1,5- et 4,5-*O*-dicaféylquiniques, lutéoline 7-*O*-glucoside, apigénine 7-*O*-glucoside et lutéoline, étant les acides 5-*O*-caféylquiniques et 1,5-*O*-dicaféylquinique les composés les plus abondants. En ce qui concerne la *C. erythraea* on a eu besoin de faire l'isolement et la détermination structurale des composés présents dans l'extrait chloroformique. Pour ça, on s'est servi des méthodes chromatographiques (CCM, CC, CLHP), spectrophotométriques (UV) et spectrométriques (RMN, SM). Ainsi, on a identifié 3-hydroxy-1,5,6-triméthoxyxanthone, 1,3,5-tri-hydroxy-2-méthoxyxanthone, 1,5-dihydroxy-3-méthoxyxanthone, 1,6-di-hydroxy-3,5-diméthoxyxanthone, 1-hydroxy-3,7,8-triméthoxyxanthone, 1-hydroxy-3,5,6-triméthoxyxanthone, 1-hydroxy-3,5,6,7,8-

pentaméthoxyxanthone, 1-hydroxy-3,5,6,7-tetraméthoxyxanthone, 1,8-di-hydroxy-3,5,6,7-tetraméthoxyxanthone et 5-formyl-2,3-di-hydro-isocoumarine. 3-Hydroxy-1,5,6-triméthoxyxanthone, 1,3,5-tri-hydroxy-2-méthoxyxanthone et 1,6-di-hydroxy-3,5-diméthoxyxanthone ont été isolés pour la première fois dans cette espèce. La 1,6-di-hydroxy-3,5-diméthoxyxanthone et la 1,8-di-hydroxy-3,5,6,7-tetraméthoxyxanthone sont les composés majoritaires.

On a aussi déterminé la composition phénolique des infusions lyophilisées obtenues de chacune des espèces, une fois que, d'habitude, elles sont utilisées sur cette forme là. L'infusion de *L. citriodora* est surtout constituée par verbascoside, malgré la détection de lutéoline 7-*O*-diglucuronide et d'autres composés qui ne sont pas identifiés. Les infusions de *H. androsaemum* et de *C. cardunculus* présentent une composition identique à celle de l'extrait méthanolique correspondant. L'infusion de *C. erythraea* est essentiellement composée de dérivés de l'acide cinnamique; on a fait l'hydrolyse alcaline de cette infusion et l'analyse de l'extrait hydrolysé a montré la présence des acides *p*-coumarique, férulique et sinapique et de kaempférol.

Dans la deuxième partie de ce travail, on présente les résultats de quelques études réalisées sur la valorisation pharmacologique des espèces étudiées. En prenant en considération le contenu phénolique présenté par ces espèces, et l'inexistence d'études sur leur action antioxydante, l'activité séquestrante des infusions obtenues de chacune des espèces pour les radicaux superoxyde et hydroxyle et pour l'acide hypochloreux a été étudiée. Pour ça, le radical superoxyde a été engendré dans un système enzymatique (xanthine/xanthine oxydase) et dans un système chimique (NADH/PMS) et l'activité séquestrante a été évaluée par l'inhibition de la réduction du bleu de nitrotétrazole. Le radical hydroxyle a été engendré par le système de Fenton ( $\text{Fe}^{3+}$ /EDTA/ascorbat) et l'activité séquestrante a été déterminée par l'inhibition de la dégradation de la désoxyribose sur des substances réactives avec l'acide thiobarbiturique; cette détermination a aussi été effectuée à l'absence d'EDTA ou d'ascorbat, afin d'évaluer, respectivement, le potentiel pro-oxydant et la capacité pour quelater métaux des infusions. L'activité séquestrante pour l'acide hypochloreux a été évaluée par l'inhibition de l'oxydation de l'acide 5-thio-2-nitrobenzoïque.

Les résultats obtenus montrent que les quatre infusions sont dotées d'activité antioxydante, attribuée à leur capacité pour séquestrer des radicaux superoxyde et hydroxyle et d'acide hypochloreux et aussi pour quelater des métaux. Cependant, les

---

infusions de *L. citriodora* et de *H. androsaemum* présentent quelque potentiel pro-oxydant.

Encore dans l'activité pharmacologique, on a réalisé des essais *in vitro*, sur des hépatocytes isolés du rat, et *in vivo*, sur des souris, afin d'essayer de contribuer pour la compréhension de l'action hépatoprotectrice attribuée au *H. androsaemum*. Dans les essais effectués, on a étudié l'activité hépatique de l'infusion de *H. androsaemum* toute seule et son rôle contre la toxicité induite par le *tert*-butylhydroperoxyde (*t*-BHP).

Les paramètres évalués dans les essais *in vitro* ont été la viabilité cellulaire, le contenu intracellulaire de glutathione réduite (GSH) et de glutathione oxydée (GSSG) et l'extension de la peroxydation lipidique.

Les paramètres évalués dans l'essai *in vivo* ont été les niveaux plasmatiques de transaminases, le contenu hépatique en GSH et GSSG, l'extension de la peroxydation lipidique et l'examen histologique de coupages de foie.

Dans les essais *in vitro* on a vérifié que l'incubation des hépatocytes avec infusion et *t*-BHP a eu un effet protecteur de la viabilité cellulaire et de la peroxydation lipidique. Cependant, ça n'a pas évité l'augmentation de la GSSG et la déplétion de la glutathione totale.

Dans l'essai *in vivo* l'infusion a potencé la toxicité induite par le *t*-BHP, tel qu'on a vérifié par la diminution des niveaux de glutathione totale et de GSH et par l'augmentation de la GSSG. On a observé quelque effet protecteur au niveau de la peroxydation lipidique. L'ingestion de l'infusion (100 mg/kg) a provoqué une élévation des niveaux de GSSG et de la raison GSSG/ glutathione totale.