



**Vanessa Alexandra Pinho de Sousa Guedes**

*Phytolacca americana* L.: potencial das bagas  
de uma planta invasora

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

Trabalho desenvolvido sobre a orientação de:

**Prof. Doutora Ana Cristina M. Ferreira da Vinha**  
**Prof. Doutora Maria Beatriz Prior Pinto de Oliveira**

**Setembro, 2015**

É autorizada a reprodução integral desta dissertação apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrita do interessado que a tal se compromete.

# Agradecimentos

Antes de mais gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram para a elaboração deste trabalho, e que de certa forma fizeram parte desta etapa da minha vida.

À Professora Doutora Ana Vinha, Orientadora deste trabalho, por estar sempre disponível, disposta a cooperar no meu bom desempenho e valiosa revisão crítica desta tese.

À Professora Doutora Beatriz Oliveira pela sua orientação e por me ter disponibilizado todas as condições necessárias à realização deste projeto.

Ao Serviço de Bioquímica do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, em particular ao Professor Doutor Elísio Costa pelo acolhimento e pela colaboração.

À minha mãe pelo exemplo de mulher, mãe e amiga. Onde quer que estejas sei que estás sempre presente.

Ao meu pai pela confiança e apoio que me deu nesta e em outras fases da minha vida.

Ao meu irmão, cunhada, sobrinhos, Zeza, To-zé e amigos, pelo amor, amizade e apoio.

Ao Carlos por todo o amor, carinho, incentivo e principalmente paciência nos momentos mais difíceis deste trabalho.

A todos, muito obrigada.

# Resumo

A *Phytolacca americana* L., conhecida como uva-de-rato ou tintureira, é uma planta herbácea, da família Phytolaccaceae, ordem Caryophyllales. Esta espécie, de propagação acidental, encontra-se amplamente distribuída em regiões temperadas, particularmente nas regiões de clima mediterrânico. Portugal não é exceção e, atualmente, a proliferação desta espécie ocorre não só no território continental mas também nos arquipélagos da Madeira e dos Açores.

Morfologicamente esta espécie é uma planta de porte médio, de aparência agradável, com caules quadrangulares avermelhados e frutos redondos pretos-azulados, agrupados em cacho.

Tem sido utilizada em medicina tradicional no tratamento de distúrbios gastrointestinais, processos inflamatórios e erupções cutâneas. Recentemente têm sido atribuídas propriedades anticancerígenas e antivíricas. A maceração das bagas origina um corante vermelho intenso, em tempos valorizado pelas indústrias tintureiras ou utilizada como adulterante de vinhos tintos desprovidos de cor.

O estudo desenvolvido nesta dissertação visou a valorização das bagas de *Phytolacca americana* L.. Trata-se de uma planta abundante no ecossistema e há pouca informação quanto às suas propriedades biológicas. A partir de extratos hidroalcoólicos determinaram-se os teores de saponinas, fenólicos totais, flavonoides e carotenoides. Foram usados vários métodos para avaliar a atividade antioxidante (DPPH, FRAP e Redução da Hemólise).

Os resultados obtidos mostraram que as bagas de *Phytolacca americana* são ricas em saponinas e compostos fenólicos e, relativamente rica em flavonoides. A predominância das clorofilas *a* e *b* em detrimento do  $\beta$ -caroteno e licopeno indicam que os pigmentos naturais deste fruto são betalaínas, compostos descritos apenas em espécies vegetais da ordem Caryophyllales.

A atividade antioxidante foi confirmada em ambos os métodos estudados (DPPH e FRAP) e a percentagem de redução de hemólise em eritrócitos humanos demonstrou a possível valorização deste fruto em aplicações na área alimentar.

Este estudo preliminar mostrou a necessidade de uma caracterização química mais exaustiva para a possível valorização desta planta invasora. De acordo com o nosso conhecimento esse estudo não foi ainda realizado.

**Palavras-Chave:** *Phytolacca americana* L.; Bagas; Compostos bioativos; Atividade antioxidante; Atividade hemolítica.

# Abstract

*Phytolacca americana* L., known as grape rat or dyer plant, is a herbaceous plant from Phytolaccaceae family, order Caryophyllales. This specie has an accidental propagation, and it is widely distributed in temperate regions, particularly in Mediterranean climates. Portugal is no exception and currently the proliferation of this specie occurs not only on the mainland territory but also in the archipelagos of Madeira and Azores. Morphologically this specie is a handsome medium-sized plant, with quadrangular red stems and black-blue round fruits, grouped in a cluster.

It has been used in traditional medicine in the treatment of gastrointestinal disorders, inflammation, and skin eruptions. Recently, they have been associated with anticancer and antiviral properties. The maceration of berries gives a strong red dye commonly used in food industries or used as a natural adulterant to pale red wines.

The study developed in this work aimed at enhancement *Phytolacca americana* L. berries. It is an abundant plant in the ecosystem and there is little information about their biological properties. From hydroalcoholic extracts we determined the total saponins, total phenolics, carotenoids and flavonoids contents. Several methods were used to evaluate the antioxidant activity (DPPH, FRAP and reduction of hemolysis).

The results showed that *Phytolacca americana* berries are rich in saponins and phenolic compounds, and relatively rich in flavonoids content. The predominance of chlorophylls a and b at the expense of  $\beta$ -carotene and lycopene indicate that the natural pigments of this fruit are betalains, compounds only described in plant species from order Caryophyllales.

The antioxidant activity was confirmed in both studied methods (DPPH and FRAP) and the percentage of hemolysis inhibition in human erythrocytes showed a possible valuation of this fruit in applications in the food industry.

This preliminary study showed the need for a more comprehensive chemical characterization of this plant and also for its valorization. According to our knowledge this study has not yet been done.

**Keyword:** *Phytolacca americana* L., berries, bioactive compounds, antioxidant activity, hemolysis activity.

# Índice

<b>Agradecimentos</b> .....	<b>iii</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>iv</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>v</b>
<b>Índice</b> .....	<b>vi</b>
<b>Índice de Figuras</b> .....	<b>ix</b>
<b>Índice de Tabelas</b> .....	<b>x</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>xi</b>
<b>1. Revisão Bibliográfica</b> .....	<b>1</b>
1.1. Espécies invasoras .....	2
1.2. <i>Phytolacca americana</i> L. ....	3
1.2.1. Raiz .....	6
1.2.2. Folha .....	7
1.2.3. Bagas .....	8
1.3. Composição fitoquímica .....	9
1.3.1. Saponinas .....	10
1.3.2. Ácidos fenólicos e flavonoides .....	12
1.3.3. Pigmentos naturais .....	15
1.3.3.1. Betalaínas .....	15
1.3.3.2. Clorofilas .....	18
1.3.3.3. Carotenoides .....	19
1.4. Interesse farmacológico .....	21
1.5. Toxicidade .....	22
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>23</b>
2.1. Objetivo geral .....	24
2.2. Objetivos específicos .....	24
<b>3. Material e Métodos</b> .....	<b>25</b>
3.1. Reagentes .....	26
3.2. Equipamentos .....	26

3.3.	Amostras.....	27
3.4.	Preparação dos extratos .....	28
3.5.	Determinação dos compostos bioativos .....	28
3.5.1.	Determinação de teor de saponinas.....	28
3.5.2.	Fenólicos totais .....	29
3.5.3.	Flavonoides.....	30
3.5.4.	Determinação de carotenoides.....	30
3.6.	Atividade antioxidante <i>in vitro</i> .....	31
3.6.1.	Método DPPH .....	31
3.6.2.	Método FRAP .....	32
3.6.3.	Atividade hemolítica .....	33
3.6.3.1.	Preparação da suspensão de eritrócitos .....	33
3.6.3.2.	Incubação com AAPH .....	34
3.6.3.3.	Avaliação da percentagem de inibição de hemólise .....	35
3.6.3.4.	Análise morfológica dos eritrócitos.....	35
3.7.	Tratamento estatístico.....	35
<b>4.</b>	<b>Resultados e Discussão .....</b>	<b>36</b>
4.1.	Solvente extrator .....	37
4.2.	Análise dos compostos bioativos .....	37
4.3.	Análise da atividade antioxidante .....	42
4.3.1.	Atividade captora dos radicais DPPH*.....	43
4.3.2.	Poder antioxidante por redução do ião férrico (FRAP) .....	44
4.3.3.	Avaliação da atividade hemolítica induzida pelo AAPH .....	46
4.3.4.	Análise morfológica dos eritrócitos.....	48
4.4.	Correlação entre as atividades antioxidantes .....	50
4.4.1.	Correlação entre a atividade antioxidante (DPPH) e a redução da hemólise .....	50
4.4.2.	Correlação entre atividade antioxidante (FRAP) e a redução da hemólise ..	51
4.4.3.	Correlação entre as atividades antioxidantes DPPH e FRAP .....	51

<b>5. Conclusão.....</b>	<b>53</b>
<b>6. Bibliografia .....</b>	<b>55</b>



# Índice de Figuras

Figura 1: Morfologia da <i>Phytolacca americana</i> L.....	3
Figura 2: Morfologia específica da flor de <i>Phytolacca americana</i> L. ....	4
Figura 3: Distribuição geográfica da <i>Phytolacca americana</i> L., em Portugal. ....	5
Figura 4: Saponinas triterpénicas bioativas de <i>Phytolacca americana</i> L.....	11
Figura 5: Fórmulas estruturais dos derivados dos ácidos fenólicos. ....	12
Figura 6: Estrutura geral dos flavonoides mais comuns. ....	14
Figura 7: Estrutura química do ácido betalâmico.....	16
Figura 8: Estruturas químicas das betalaínas. A) betacianinas e B) betaxantinas .....	16
Figura 9: Estruturas químicas do $\beta$ -caroteno e da xantofila. ....	20
Figura 10: Morfologia da baga de <i>P. americana</i> L. no momento da colheita. ....	27
Figura 11: Curva de calibração do padrão de saponina. ....	29
Figura 12: Curva de calibração do ácido gálico. ....	29
Figura 13: Curva de calibração da catequina. ....	30
Figura 14: Microplaca usada no método DPPH.....	32
Figura 15: Curva de calibração na determinação do poder antioxidante pelo método FRAP. ....	33
Figura 16: Representação gráfica dos teores de compostos bioativos da baga .....	38
Figura 17: Percentagem de inibição do radical DPPH* em função das diferentes concentrações dos extratos hidroalcoólicos das bagas .....	43
Figura 18: Determinação da atividade antioxidante pelo método FRAP .....	45
Figura 19: Redução de hemólise induzida por AAPH (%).....	47
Figura 20: Visualização microscópica da Inibição hemolítica das bagas de <i>P. americana</i> L.....	49
Figura 21: Correlação entre a redução da hemólise e a atividade antioxidante (método DPPH).....	50
Figura 22: Correlação entre a redução da hemólise e a atividade antioxidante (método FRAP).....	51
Figura 23: Correlação entre as atividades antioxidantes medidas pelos métodos DPPH e FRAP. ....	52

# Índice de Tabelas

Tabela 1. Procedimento experimental para avaliação da percentagem de inibição da hemólise.....	34
Tabela 2. Teores totais dos compostos bioativos da baga de <i>P. americana</i> L.....	38
Tabela 3. Teores de clorofilas e carotenos da baga de <i>P. americana</i> L.....	41
Tabela 4. Inibição da hemólise (%) induzida por AAPH.....	46

# Lista de Abreviaturas

ADN – ácido desoxirribonucleico

CFT – conteúdo fenólicos totais

DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo

EAG – equivalentes de ácido gálico

ERE – espécies reativas de enxofre

ERO – espécies reativas de oxigénio

ES – equivalentes de saponina

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogénio

HSV – vírus herpes simplex

LDL – lipoproteínas de baixa densidade

O<sub>2</sub><sup>-</sup> - anião superóxido

<sup>1</sup>O<sub>2</sub> – oxigénio singleto

OH<sup>\*</sup> - radical hidroxilo

PBS – solução salina com tampão fosfatos

RFC – reagente Folin-Ciocalteu

RIP – proteínas inativadoras dos ribossomas

RO<sup>\*</sup> - radical alcoxilo

ROO<sup>\*</sup> - radical peroxilo

UICN – União Internacional para Conservação da Natureza

# **1. Revisão Bibliográfica**

---

## 1.1. Espécies invasoras

A invasão dos ecossistemas por espécies invasoras é uma forte ameaça à biodiversidade, podendo pôr em risco as espécies nativas. De uma maneira geral, este tipo de invasão não é homogêneo quer geográfica quer de acordo com o clima, sendo raros em condições extremas e predominando em climas temperados (Marchante, 2001).

Em Portugal continental, ao longo dos dois últimos séculos, e especialmente nas últimas décadas, o número de espécies exóticas têm aumentado significativamente, ascendendo a cerca de 670 espécies, o que corresponde a cerca de 18% da flora nativa (Almeida e Freitas, 2012). Estão incluídas neste número espécies casuais, naturalizadas e invasoras. Em Portugal, o Decreto de Lei nº 565/99 de 21 de dezembro, regula a introdução na natureza de espécies não indígenas da flora e fauna, também como a utilização e detenção de organismos geneticamente modificados, ou de produtos que os contenham; proíbe o cultivo, transporte, criação, comercialização, exploração económica e a utilização de planta ornamental ou animal de companhia das espécies identificadas, como espécies invasoras.

Entre as mais vulgares espécies invasoras presentes em território nacional, encontram-se as famílias das Fabaceae, Asteraceae, Poaceae, Solanaceae e Phytolaccaceae (Decreto de Lei, 565/99).

O local de propagação da espécie invasora também depende de muitos fatores. Por exemplo, a propagação torna-se propícia quando numa determinada área geográfica, a espécie nativa é abundante. O facto das espécies invasoras serem taxonomicamente distintas das espécies nativas também é uma das condições favoráveis à sua propagação, uma vez que nesses territórios não existem predadores (agentes patogénicos e/ou herbívoros) que possam prejudicar o seu desenvolvimento, pois estes apenas têm capacidade de atuar sobre as espécies nativas (os seus hospedeiros) (Marchante, 2001). As variáveis ambientais tais como a topografia, o clima e a geologia são também relevantes na propagação das espécies invasoras (Hellmann *et al.*, 2008).

Pelos motivos supracitados, as plantas invasoras têm sido pouco valorizadas, uma vez que só lhes é atribuída importância devido à competição que exercem por recursos e espaços territoriais com outras culturas de interesse. No entanto, torna-se importante estudar detalhadamente a composição química destas plantas, uma vez que podem tornar-se interessantes para diferentes áreas, tais como alimentar, farmacêutica ou dermocosmética e, assim, passar a constituir um recurso natural relativamente económico.

## 1.2. *Phytolacca americana* L.

A *Phytolacca americana* L. é uma planta herbácea, perene, da família Phytolaccaceae e da ordem Caryophyllales. Esta espécie originária da América do Norte foi introduzida no resto do mundo como planta cultivada ou acidental, dispersando-se majoritariamente em regiões de clima temperado. Esta planta invadiu preferencialmente regiões de clima mediterrânico, em terrenos baldios ou zonas densamente povoadas de plantas (Patra *et al.*, 2014; Zheleva-Dimitrova, 2013). Nas últimas décadas a sua propagação a nível europeu mereceu a classificação de “planta invasora” ou “praga vegetal” por parte da União Internacional para Conservação da Natureza (UICN).

A *P. americana* L. conhecida como uva-de-rato ou erva-tintureira é uma planta de porte pequeno com aproximadamente 1 metro, podendo atingir até 3 metros de altura quando as condições edafo-climáticas são favoráveis, tais como, solos ricos em nitratos e pouco mobilizados e temperaturas amenas com elevada precipitação. O crescimento, desenvolvimento e proliferação da planta ocorre preferencialmente em florestas húmidas, matas ripícolas, margens dos campos cultivados, bermas de estradas e clareiras (Maness *et al.*, 2014; Takahasi *et al.*, 2003).

Morfologicamente, esta espécie de porte médio caracteriza-se por apresentar caules avermelhados, folhas grandes e inteiras e flores brancas com inflorescência racemosas lineares inicialmente eretas que, com a maturação do fruto, tendem a cair (Figura 1).



**Figura 1:** Morfologia da *Phytolacca americana* L.

As flores hermafroditas apresentam normalmente 10 estames e 10 carpelos e a sua morfologia é de extrema importância para a diferenciação entre espécies (Figura 2). Os frutos são bagas carnudas, pretas azuladas, com cerca de 1 cm de diâmetro, constituídos por 10 sulcos longitudinais profundos, apresentando um epicarpo enrugado quando maduros, resultantes da coalescência dos carpelos na maturação.



*Phytolacca americana*

Flores com todas as tépalas iguais e com 10 estames.



*Phytolacca heterotelapa*

Flores com tépalas diferentes e com mais de 10 estames.

**Figura 2:** Morfologia específica da flor de *Phytolacca americana* L.

A utilização de espécies exóticas (cultivadas ou invasoras) em plantios de recuperação de áreas degradadas tem sido condenada com o argumento de que essas espécies podem contaminar os ecossistemas naturais em redor das áreas onde foram plantadas. No entanto, alguns dados relatam que a introdução e o cultivo desta planta deveu-se, essencialmente, às suas aplicações em medicina tradicional e pelas propriedades tintureiras das bagas.

De facto, esta planta esteve fortemente ligada a uma vertente cultural. Ravikiran *et al.* descreveram o seu uso pelos nativos de tribos americanas como “planta depurativa”, capaz de expulsar espíritos maus do corpo humano, através de diarreias e vómitos. A baga também era usada em pinturas de adorno ou rituais tribais (Ravikiran *et al.*, 2011).

A sua utilização na medicina tradicional era comum entre os indígenas norte-americanos, sendo rapidamente adotada pelos colonos europeus naquele continente e, posteriormente, importada para a Europa onde a planta foi incluída na Farmacopeia comum, passando a ser cultivada para esse fim.

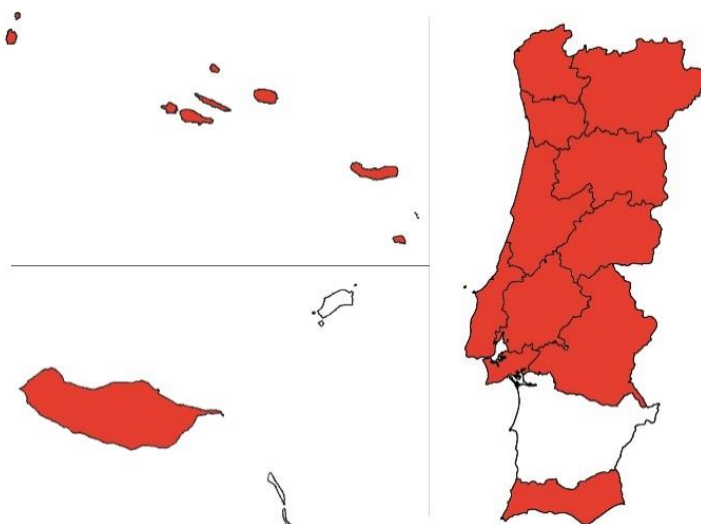
A maceração das bagas origina um corante vermelho intenso, em tempos valorizado pelas indústrias tintureiras ou como adulterante dos vinhos tintos desprovidos de cor (Delgado-Vargas *et al.*, 2000).

Segundo diversos autores, a *P. americana* tem sido tradicionalmente usada na Ásia e na América, no tratamento de distúrbios gastrointestinais, processos inflamatórios e

erupções cutâneas (Maness *et al.*, 2014; Patra *et al.*, 2014; Iwakiri *et al.*, 2013). Atualmente investigam-se propriedades anticancerígenas e antivirais associadas a esta planta (Maness *et al.*, 2014).

Para além das propriedades supracitadas, alguns estudos têm demonstrado que as suas raízes e folhas apresentam elevado potencial na recuperação de solos contaminados com metais pesados, prejudiciais para o organismo (Fu *et al.*, 2011). A presença de Cádmio (Cd) e Manganês (Mn) nos solos, provenientes de fertilizantes fosfatados e da mineralização industrial diminuem quando a *P. americana* é plantada (Gao *et al.*, 2013; Fu *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2011).

Em Portugal é possível encontrar esta planta em quase todo o território continental, Açores e ilha da Madeira (Figura 3).



**Figura 3:** Distribuição geográfica da *Phytolacca americana* L., em Portugal (retirado de [www.invasoras.pt/gallery/phytolacca-americana](http://www.invasoras.pt/gallery/phytolacca-americana)).

O estudo das plantas tem acompanhado a evolução do homem através dos tempos e o seu uso como agentes terapêuticos data de milhares de anos (Fowler, 2006). A maior parte dos fármacos usados atualmente, derivaram direta ou indiretamente de princípios ativos, que foram isolados de uma planta ou de um órgão específico da mesma. No caso concreto da *P. americana*, vários estudos sobre as suas propriedades biológicas têm sido publicados, sempre recorrendo aos diferentes órgãos mais representativos da planta, nomeadamente, raiz, folha e fruto.



### 1.2.1. Raiz

A raiz da *P. americana* L. tem grandes dimensões, uma forma cónica e carnuda e é coberta por uma casca fina de cor castanha (Ravikiran *et al.*, 2011).

As raízes secas são utilizadas na fitoterapia e na medicina popular Chinesa no tratamento de tumores, bronquites e processos inflamatórios (Wang *et al.*, 2008). Também estão descritas propriedades expetorantes e aplicações no tratamento de infeções do trato respiratório. No entanto, em doses elevadas ou tratamentos prolongados podem conferir toxicidade ao organismo. Da sua composição química salienta-se a presença de saponinas triterpénicas (Wang *et al.*, 2008) e glicoproteínas (Yamaguchi *et al.*, 2004; Aron e Irvin, 1980) com propriedades biológicas reconhecidas. As raízes podem ser utilizadas no tratamento da dor, inquietação, prostração e no tratamento de inchaços glandulares. Maness *et al.* (2014) demonstrou que os extratos etanólicos e aquosos da raiz promovem alterações na expressão genética em células do cancro do colon, sugerindo um possível tratamento e cura do mesmo. Segundo Aron e Irvin (1980) a raiz desta planta contém uma proteína com propriedades antivíricas capaz de inibir diferentes vírus. Ryan e Ray (2004) observaram capacidade inibitória na multiplicação do vírus Herpes Simplex (HSV), espécie da família Herpesviridae, responsável por causar infeções em humanos. Num outro estudo foi verificado que a mesma proteína tinha capacidade de inibir 90% da síntese do ADN do HSV (Teltow *et al.*, 1983).

As glicoproteínas presentes na raiz, concretamente as lectinas, também são descritas pelas suas propriedades mutagénicas em linfócitos T e B (Ahmad *et al.*, 2009; Yamaguchi *et al.*, 2004; Kino *et al.*, 1995). De facto, foi na década de sessenta que se iniciaram os estudos sobre a capacidade das lectinas aglutinarem células neoplásicas (Aub *et al.*, 1963).

A raiz da *P. americana* L. tem sido amplamente estudada para avaliar o seu efeito em diversos sistemas biológicos. O conhecimento aprofundado da função biológica das saponinas, das lectinas e de outros compostos minoritários no reconhecimento e nas interações celulares, poderão servir de suporte no diagnóstico e no tratamento de muitas doenças.

## 1.2.2. Folha

As folhas da *P. americana* L. são alternas, elíptico-ovais, pontiagudas, inteiras, de cor verde clara, com 10 a 40 cm de comprimento e com pecíolos curtos (Ravikiran *et al.*, 2011).

Tal como na raiz, as folhas têm sido alvo de vários estudos. Um dos motivos pelo interesse acrescido do conhecimento dos compostos químicos detetados e consequentes efeitos biológicos a eles associados prende-se com o facto de os compostos bioativos distribuem-se heterogeneamente durante o desenvolvimento e crescimento da planta, podendo encontrar-se em maiores quantidades num órgão específico da mesma.

As proteínas inativadoras dos ribossomas (RIP) são proteínas vegetais taxonomicamente não relacionadas, capazes de inativar irreversivelmente a síntese de proteínas em ribossomas de animais, apresentando propriedades antivíricas. A primeira RIP tipo 1 a ser caracterizada foi isolada das folhas da *P. americana* L., o que suscitou maior interesse pelo estudo desta planta (Günhan *et al.*, 2008; Zhang e Halaweish, 2007; Barbieri *et al.*, 1993). No entanto, as RIP também apresentam atividade abortiva (Barbieri *et al.*, 1993).

Embora esta planta seja reconhecida pela sua elevada toxicidade, muitos estudos potenciam o seu uso tanto na área farmacêutica como na medicina. A título de exemplo cita-se o estudo realizado por Patra *et al.* (2014) que observou uma elevada atividade antibacteriana exercida pelos extratos da folha contra agentes patogénicos associados às doenças periodontais inflamatórias e cáries dentárias. Segundo os mesmos autores, estas folhas podem contribuir para o desenvolvimento de novos produtos terapêuticos naturais, com elevada atividade antimicrobiana e isentos de efeitos secundários na flora natural da cavidade oral.

Ding *et al.* (2013) também descreveu atividade acaricida nas folhas, através do isolamento do esculentósido E (triterpeno glicosilado).

Embora esta espécie vegetal possa ser utilizada como planta ornamental, alguns estudos referem o consumo das suas folhas enquanto jovens, após processos de cocção e/ou branqueamento (Karami *et al.*, 2010; Nabavi *et al.*, 2009), mostrando que existe alguma controvérsia sobre a sua toxicidade (Heinrich *et al.*, 2004; Harkness *et al.*, 2003).

A atividade antioxidante e anti-inflamatória está intimamente relacionada com a presença de compostos fenólicos, metabolitos secundários sintetizados pelas plantas. Bylka e Matlawska (2001) identificaram diferentes ácidos fenólicos e flavonoides nos extratos metanólicos das folhas de *P. americana* L.. De entre os ácidos fenólicos foram

identificados os ácidos sinápico, *p*-cumárico, vanílico, cafeico, ferúlico e *p*-hidroxibenzoico, enquanto os flavonoides descritos foram o campferol 3-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosídeo, campferol 3-*O*- $\beta$ -D-xilopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) - $\beta$ -D-glucopiranosídeo, campferol 3-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) - $\beta$ -D-glucopiranosídeo, campferol 3-*O*-diglucósido e quercetina 3-*O*-glucósido.

### 1.2.3. Bagas

Os frutos da *P. americana* L. florescem entre julho e setembro em aglomerados de 5 pétalas esbranquiçadas com centros verdes (Ravikiran *et al.*, 2011). Os longos cachos de flores brancas germinam, originando frutos negros azulados, esféricos e achatados, ligados a um pequeno pedúnculo rosa escuro (Figura 1) (Ravikiran *et al.*, 2011). Alguns estudos consideram os frutos edíveis e o seu uso em medicina tradicional (Burrows e Tyrl, 2001; Huang, 1999).

Como já referido anteriormente, esta planta é conhecida popularmente por vários nomes comuns, tais como baga-moira, baga-noiva, erva-dos-cachos-da-índia, erva-dos-cântaros, erva-dos-tintureiros, erva-tintureira, gaia-moça, uva-da-américa, vermelhão, vinagreira, tintureira, uva-dos-tintureiros, erva-dos-cancros, tintureira, uva-de-cão, uva-de-rato, todos eles diretamente relacionados com as bagas características desta planta.

As atividades biológicas das bagas são muito semelhantes às já descritas na raiz e nas folhas, caracterizadas por um elevado teor em saponinas e lectinas. A atividade moluscicida foi descrita neste fruto, no controlo de pragas de caracóis (Karunamoorthi *et al.*, 2008). Num estudo realizado em mais de 100 plantas, Kloos e McCullough (1984) reportaram que as bagas imaturas (verdes) da *P. americana* L. eram as que possuíam maior atividade moluscicida.

A toxicidade da baga foi já descrita (Karunamoorthi *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008) no entanto, alguns estudos referem o seu consumo sem problemas, bem como o das raízes e das folhas jovens (Burrows e Tyrl, 2001; Huang, 1999).

A atividade anticarcinogénica foi também descrita, principalmente devido aos efeitos antitumorais e anti-inflamatórios, bem como o estímulo do sistema imunitário. Este efeito parece associado com a presença de uma toxina produzida pela planta, a toxina phytolacca (Ravikiran *et al.*, 2011). As propriedades antioxidantes de determinados compostos também permitem associar esta planta à prevenção do cancro. Compostos como o ácido ascórbico,  $\beta$ -caroteno, ácido oleanólico, quercetina e taninos estão descritos como anticarcinogénicos, antitumorais ou antileucémicos (Rangarajan *et al.*,

2014; Shanmugam *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2013; Pertino *et al.*, 2013; Cui *et al.*, 2012; Harleva *et al.*, 2012; Kuno *et al.*, 2012; Gomes de Melo *et al.*, 2010; Lee, 2009; Albanes *et al.*, 1995).

A morfologia e coloração das bagas também é um fator importante a considerar, não só a nível ornamental como nas possíveis aplicações. Alguns estudos referem que a intensidade da cor negra azulada desta baba está diretamente ligada a um grupo de pigmentos naturais, as betalaínas que podem ser amarelas ou violetas e que substituem as antocianinas em espécies vegetais pertencentes à ordem Caryophyllales (Pavokovi e Krsnik-Rasol, 2011; Tanaka *et al.*, 2008). Segundo Clement e Mabry (1996), a mútua exclusividade de antocianinas e/ou de betalaínas em Caryophyllales levou a vários estudos taxonómicos das referidas plantas (Brockington *et al.*, 2011).

Pela presença dos corantes referidos, as bagas apresentam propriedades pigmentantes interessantes para a indústria têxtil (tinturarias) (Liu *et al.*, 2014; Ravikiran *et al.*, 2011) e na indústria vinícola e alimentar, como adulterante em vinhos tintos ou corante doutros alimentos (Ogzewalia *et al.*, 1962).

A presença de betalaínas nas bagas também confere propriedades antioxidantes (Zheleva-Dimitrova, 2013; Ravikiran *et al.*, 2011; Nabavi *et al.*, 2010).

### **1.3. Composição fitoquímica**

O potencial medicinal da *P. americana* L. tem sido associado aos diferentes fitoquímicos presentes na mesma (Patra *et al.*, 2014).

Muitos estudos demonstram que a maioria das ações terapêuticas exibidas pelas plantas está associada à diversidade de compostos bioativos presentes nas mesmas. Várias classes de compostos de origem vegetal conferem proteção contra doenças degenerativas cerebrais, como Alzheimer, doenças cardiovasculares, vários tipos de cancro, infeções e alterações no sistema imunitário, doenças ósseas, envelhecimento precoce, entre outras, uma vez que estes compostos atuam como antioxidantes, prevenindo ou retardando os danos provocados pelos radicais livres (Liu, 2013; Liu, 2004; Willett, 2002). Acresce o facto de muitas destas biomoléculas serem induzidas pelas plantas como elementos de defesa contra predadores e pragas, razão que justifica o seu amargor. Estes compostos são também capazes de inibir alguns sistemas enzimáticos e de quelatar metais, conferindo-lhes propriedades antibacterianas, antivirais, antifúngicas, moluscicida e inseticida.

Estes fitoquímicos precisam de ser isolados e identificados, de forma a possibilitar um melhor entendimento sobre os seus metabolismos de síntese e, conseqüentemente, os seus potenciais benefícios para a saúde (Liu, 2003).

Pelos motivos supracitados, serão referidos alguns grupos de compostos bioativos descritos na *P. americana* L. para melhor se avaliar a possibilidade de valorização desta planta.

### **1.3.1. Saponinas**

A investigação desenvolvida na *P. americana* L. é bastante limitada no que se refere aos diferentes fitoquímicos existentes, encontrando-se maioritariamente direcionada para o estudo dos saponósidos.

De facto, as diferentes partes desta espécie botânica são, atualmente, consideradas excelentes fontes de saponinas triterpénicas, abundantes nos tecidos mais vulneráveis à contaminação por fungos, bactérias, insetos e predadores, intervindo assim no mecanismo de defesa da planta (Cheok *et al.*, 2014; Manase, 2013). Para além de conferirem proteção à planta, estes compostos possuem outras propriedades biológicas que permitem a sua utilização na medicina tradicional (Manase, 2013).

A composição qualitativa e quantitativa das saponinas varia com as condições edafo-climáticas, fase de maturação e parte da planta de onde são extraídas (Dini *et al.*, 2009).

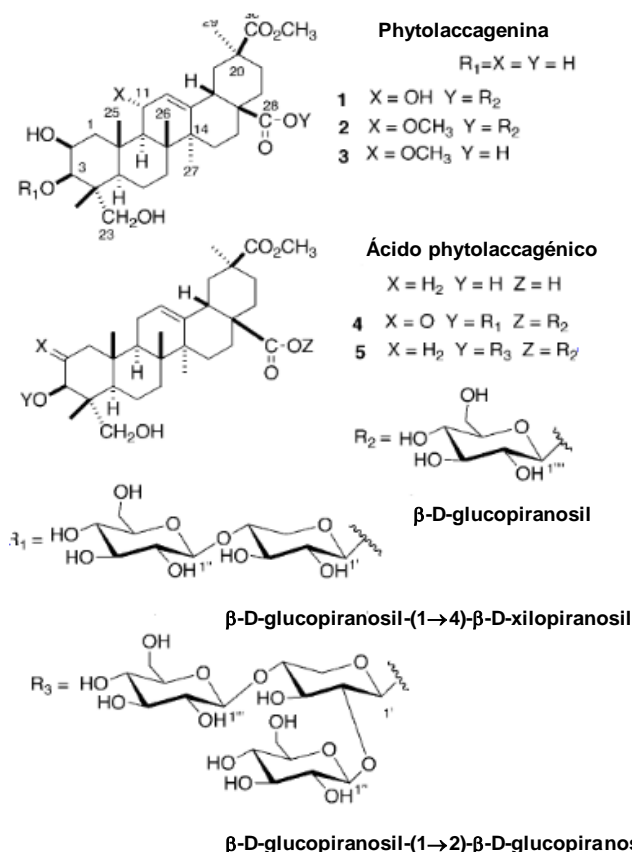
As saponinas encontram-se no reino vegetal e são compostos não voláteis e surfatantes (Manase, 2013). Possuem uma estrutura anfipática formada por resíduos hidrofílicos de açúcares ligados a uma aglicona hidrofóbica. A aglicona é composta por átomos de carbono organizados em forma de anéis, denominada sapogenina.

Na indústria farmacêutica, cosmética, química e alimentar as saponinas são muito utilizadas, dado a sua facilidade de dissolução em água, originando soluções afrógenas (espumantes), por diminuição da tensão superficial do líquido. Apresentam ainda propriedades emulsionante e de hemólise. Esta última deve-se à capacidade do glicósido se combinar com moléculas de colesterol presentes na membrana dos eritrócitos, perturbando o equilíbrio interno-externo, promovendo a rutura da célula e conseqüente libertação da hemoglobina (Manase, 2013).

Devido ao elevado número de saponinas já identificadas, a *P. americana* L., traz benefícios na área agrícola, sendo um excelente aliado na descontaminação de solos cultivados e pela sua ação pesticida natural (Manase, 2013).

Já foram identificadas 12 saponinas nesta espécie vegetal, mas 7 foram descritas por um único autor (Yi, 1992; 1991; 1990). Mais recentemente, Wang *et al.* (2008) identificaram mais 5 saponinas (Figura 4), atribuindo-lhes propriedades expetorantes e diuréticas. Estes autores sugerem que possam ser utilizadas como adjuvantes para aumentar a absorção de medicamentos, pelo aumento da solubilidade ou interferência nos mecanismos de absorção e, como adjuvantes para aumentar a resposta imunológica.

Também devido às suas propriedades detergentes, estas podem ser usadas na indústria química na preparação de emulsões para filmes fotográficos e na indústria de cosméticos na formulação de batons e champôs (Cheeke, 2000). As saponinas triterpênicas encontram-se em muitas leguminosas, como a soja, feijão, ervilha e podem ser utilizadas pela indústria alimentar como aditivos, nomeadamente, aromatizantes e agentes espumantes e conservantes (Cheek *et al.*, 2014). A sua atuação nas diferentes fases do desenvolvimento tumoral, principalmente no caso da próstata, mama e colon, intensificaram a busca de saponinas no reino vegetal (Cheek *et al.*, 2014; Dini *et al.*, 2009). Dini *et al.* (2009), mencionaram ainda propriedades antioxidantes, antirreumáticas, cardioprotetoras, anti-trombóticas, anti-inflamatórias, hepatoprotetoras e antidiabéticas.



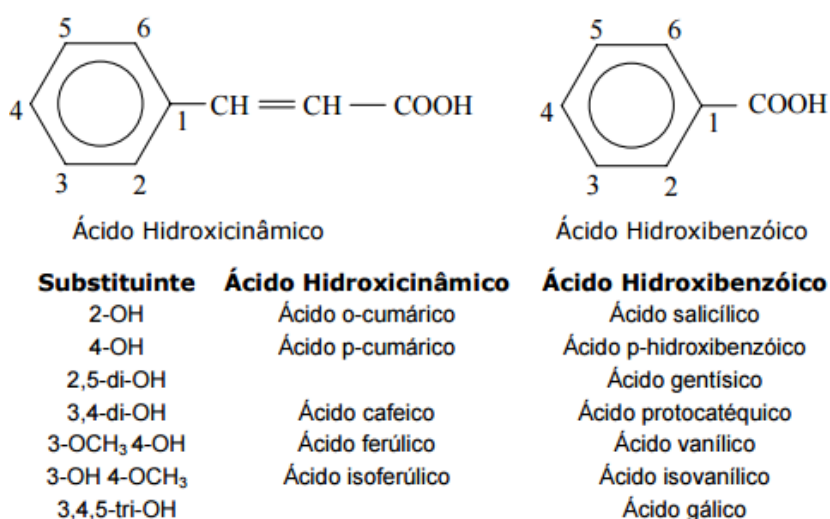
**Figura 4:** Saponinas triterpênicas bioativas extraídas da *P. americana* L. (adaptado de Wang *et al.*, 2008).

### 1.3.2. Ácidos fenólicos e flavonoides

A presença dos compostos fenólicos nas plantas tem sido muito estudada devido às suas atividades farmacológica e antinutricional, capazes de inibir a oxidação lipídica e a proliferação de fungos (Baskaran *et al.*, 2014; Kumar e Pandey, 2013; Yao *et al.*, 2004; Heim *et al.*, 2002), além de participarem nos processos metabólicos responsáveis pela cor, adstringência e aroma das plantas (Harborne e Williams, 2000).

Diversos trabalhos científicos têm sido realizados no sentido de efetuar a separação, identificação, quantificação e utilização dos compostos fenólicos em espécies vegetais, uma vez que este grupo engloba uma gama enorme de substâncias (fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, taninos e ligninas). Alguns compostos fenólicos não se apresentam na forma livre, mas sim sob a forma de polímeros, nomeadamente taninos e ligninas.

Os ácidos fenólicos (Figura 5) dividem-se em três grupos distintos. O primeiro é composto pelos ácidos benzóicos, que possuem sete átomos de carbono (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>) sendo os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza; o segundo é formado pelos ácidos cinâmicos com nove átomos de carbono (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>), sendo estes os comumente encontrados no reino vegetal e, por último, as cumarinas que derivam do ácido cinâmico por ciclização da cadeia lateral do ácido *o*-cumárico.



**Figura 5:** Fórmulas estruturais dos derivados dos ácidos fenólicos.

Os ácidos fenólicos caracterizam-se pela presença de um anel benzénico, um grupo carboxílico e um ou mais grupos de hidroxilos e/ou metoxilos na molécula, conferindo-lhe

propriedades antioxidantes, tanto para as plantas como para o organismo humano, sendo, por isso, indicados para o tratamento e prevenção do cancro e doenças cardiovasculares, entre outras.

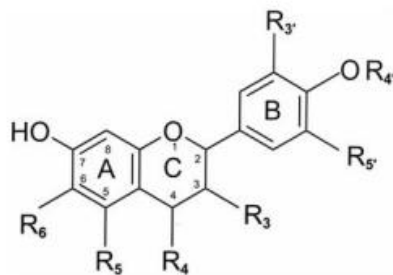
Até à data existem poucos estudos sobre a caracterização do perfil de ácidos fenólicos na *P. americana* L.. Bylka e Matlawska (2001) identificaram os ácidos sinápico, *p*-hidroxibenzóico, vanílico, *p*-cumárico, ferúlico e cafeico nas folhas da planta. Posteriormente, foram identificados os ácidos cinâmico, clorogénico, gálico e protocatéuico (Kim *et al.*, 2005). Embora estes estudos reportem a presença destes compostos nas folhas, é do conhecimento geral que a sua distribuição ao longo dos diferentes órgãos é muito heterogénea, encontrando-se maioritariamente nos órgãos superiores da mesma, uma vez que conferem proteção.

Muitos estudos destacam as propriedades dos fitoquímicos como substâncias antioxidantes sequestradoras de radicais livres. Parece que os efeitos biológicos desses antioxidantes são diversos e envolvem respostas mediadas pelas células e a modulação de várias vias de sinalização celular. As hipóteses sobre os mecanismos de ação dos fitoquímicos resultam, frequentemente, do conhecimento das suas estruturas químicas e das suas propriedades físico-químicas. Presentemente, o desafio está em interpretar as complexas relações entre os fitoquímicos presentes nas plantas e a saúde, tendo em conta, quer a diversidade das suas estruturas químicas, quer a complexidade dos seus efeitos metabólicos, bem como a sua biodisponibilidade e absorção no metabolismo humano (Manach *et al.*, 2009).

Devido às suas propriedades biológicas, especificamente antioxidantes, alguns estudos já mencionaram o teor de fenólicos totais nas raízes, folhas e bagas da *P. americana* L. (Zheleva-Dimitrova, 2013; Nabavi *et al.*, 2009; Hosseinimehr *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2005).

Os flavonoides integram o grupo dos compostos fenólicos, sendo constituídos por estruturas polifenólicas. Estão presentes habitualmente nas folhas, flores, raízes e frutos das plantas. As suas principais classes são os flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanas, isoflavonoides e antocianinas. Estes compostos são quimicamente constituídos por um núcleo de três anéis fenólicos (Tapas *et al.*, 2008). O primeiro anel benzeno (Anel A) é condensado com o sexto carbono do terceiro anel (Anel C), que na posição 2 carrega um grupo fenil como substituinte (Anel B) (Sandhar *et al.*, 2011). Devido ao facto deste terceiro anel se apresentar na forma de um anel pirona, torna-se responsável pela formação da maioria das diferentes classes destes compostos, recebendo a denominação do núcleo 4-oxo (Figura 6) (Sandhar *et al.*, 2011).





**Figura 6:** Estrutura geral dos flavonoides mais comuns com anéis e posições numeradas (retirado de Sandhar *et al.*, 2011).

No que respeita à estrutura química, os flavonoides podem ocorrer como agliconas, glicósidos ou como parte de outras estruturas que contenham flavonoides, como por exemplo as flavoligninas. No entanto, as formas maioritárias no reino vegetal são as glicosiladas.

Os flavonoides são antioxidantes eficazes devido às suas propriedades quelantes de radicais livres e iões metálicos, conferindo proteção aos tecidos celulares e atuando contra a peroxidação lipídica (Kandaswami e Middleton, 1994). De uma forma geral, a propriedade antioxidante está direcionada para o radical hidroxilo (OH<sup>\*</sup>) e anião superóxido (O<sub>2</sub><sup>\*</sup>), ambas espécies altamente reativas envolvidas na iniciação da peroxidação lipídica. Para além desta ação, os flavonoides apresentam propriedades estabilizadoras de membrana, podendo afetar alguns processos do metabolismo intermediário (Formica e Regelson, 1995). Embora os flavonoides apresentem propriedades antioxidantes importantes na prevenção de doenças crónicas, alguns estudos têm vindo a demonstrar atividade pró-oxidante *in vitro* (Procházková *et al.*, 2011; Simić *et al.*, 2007; Sakihama *et al.*, 2002; Dičkancaitė *et al.*, 1998).

Na *P. americana* L. foram identificados os campferol 3-O-β-D-glucopiranosídeo, campferol 3-O-β-D-xilopiranosil (1→2)-β-D-glucopiranosídeo, campferol 3-O-α-L-ramnopiranosil (1→2) -β-D-glucopiranosídeo, campferol 3-O-diglicósido e quercetina 3-O-glucósido (Bylka e Matlawska, 2001). Poucos estudos procuraram a identificação destes compostos nos diferentes órgãos da planta. Sugere-se o desenvolvimento de mais estudos, para a na identificação do perfil completo dos diferentes órgãos vegetais, visando relacioná-los com as propriedades biológicas anteriormente referidas.

### 1.3.3. Pigmentos naturais

A cor é um dos atributos mais importantes das plantas, sendo um indicador de qualidade e do grau de maturação das mesmas.

Devido aos problemas associados com a toxicidade e a carcinogenicidade dos corantes sintéticos surgiu um crescente interesse em novos corantes naturais (Chandrasekhar *et al.*, 2015; Boo *et al.*, 2012), aliando as suas propriedades biológicas com os parâmetros organoléticos dos géneros alimentícios que os integram (Sakuta, 2013). Os corantes são utilizados como aditivos ou suplementos nas indústrias alimentar, farmacêutica, cosmética e agropecuária (Boo *et al.*, 2012).

Os pigmentos naturais são atualmente um alvo importante de estudo para a indústria alimentar, uma vez que, para o consumidor final, uma das principais características avaliadas na seleção de um produto é a cor (Boo *et al.*, 2012). São exemplos de corantes alimentares naturais as antocianinas, as betalainas, os carotenoides e as clorofilas, que para além de corantes, conferem proteção contra o stresse oxidativo (Sakuta, 2013). Estes pigmentos naturais também exercem um papel fundamental na propagação de espécies, dado que as suas cores atraem insetos, pássaros e animais, para a polinização e dispersão das sementes.

De uma forma geral, os pigmentos naturais são compostos orgânicos ou inorgânicos que absorvem na gama entre 350 e 750 nm (Boo *et al.*, 2012).

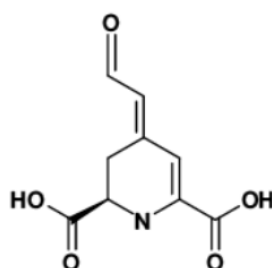
A luz é um dos fatores decisivos na biossíntese dos pigmentos pelas plantas, uma vez que esta interfere nos processos físicos e químicos (Chandrasekhar *et al.*, 2015).

#### 1.3.3.1. Betalainas

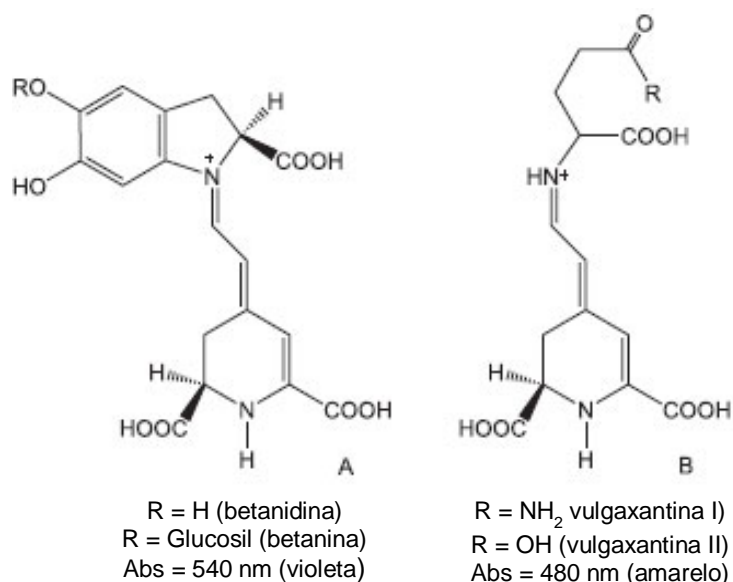
As betalainas sempre receberam menor atenção do que as outras classes de pigmentos naturais acima referidos devido à sua restrita ocorrência no reino vegetal. Encontram-se na maioria das famílias da ordem Caryophyllales, exceto nas famílias Caryophyllaceae e Molluginaceae, e em alguns géneros de fungos *Basidiomicetos* (Gonçalves *et al.*, 2015; Sakuta, 2013; Gandía-Herrero *et al.*, 2005). Entretanto, devido à descoberta recente da sua atividade antioxidante, fluorescência e consequentes propriedades biológicas, as betalainas têm sido alvo de maior interesse por parte da comunidade científica (Gonçalves *et al.*, 2015; Sakuta, 2013; Gonçalves *et al.*, 2012; Delgado-Vargas *et al.*, 2000).

Do ponto de vista químico, as betalainas são alcaloides nitrogenados, solúveis em água, localizados no vacúolo das plantas e sem toxicidade aparente (Gonçalves *et al.*,

2015). Estes compostos resultam do acoplamento de um cromóforo, o ácido betalâmico (Figura 7), com aminoácidos/aminas (betaxantinas amarelas) ou derivados de ciclo-Dopa (betacianinas vermelho-violeta) (Figura 8). A indicaxantina e a betanina são as mais conhecidas nestes dois grupos (Azeredo *et al.*, 2009). Devido a possíveis glicosilações e acilações, as betalaínas exibem uma grande diversidade estrutural. A betanina (betanidina-5-O-β-glucósido) é a betacianina mais comum do reino vegetal. De acordo com a legislação dos aditivos alimentares, o uso de betanina é permitido como corante alimentar vermelho natural (E162) (Esatbeyoglu *et al.*, 2015). Além disso, a betanina é usada como corante em cosméticos e produtos farmacêuticos.



**Figura 7:** Estrutura química do ácido betalâmico.



**Figura 8:** Estruturas químicas das betalaínas. A) betacianinas e B) betaxantinas (adaptado de Gonçalves *et al.*, 2015).

Foram descritos recentemente os potenciais benefícios das betalaínas, procedendo-se à sua pesquisa no reino vegetal. Esatbeyoglu *et al.* (2015) avaliaram a atividade

antioxidante da betanina, tendo concluído ser um excelente quelante das espécies reativas de oxigénio. Outros autores verificaram que as betalaínas possuem estabilidade química e, por conseguinte, apresentam elevada atividade antioxidante, que tem vindo a ser associada à proteção contra doenças degenerativas (Clifford *et al.*, 2015; Gokhale e Lele, 2014; Azeredo, 2009; Stintzing *et al.*, 2005; Tesoriere *et al.*, 2004; Strack *et al.*, 2003).

Outros relatos sugerem que a betanina impede a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e danos no ADN (Esatbeyoglu *et al.*, 2015). Gonçalves *et al.* (2015) acrescentaram ainda que as betalaínas modulam a resposta inflamatória e apresentam efeitos antiproliferativos em linhagens celulares tumorais.

O facto destes pigmentos naturais serem tão restritos a determinadas espécies vegetais condiciona o desenvolvimento de outros pigmentos naturais nas mesmas. De facto, a existência de betalaínas numa determinada planta, elimina a possibilidade da presença de antocianinas na mesma (Sakuta, 2013). Não se sabe concretamente em que contexto é que as betalaínas evoluíram, nem a razão das betalaínas e antocianinas não estarem presentes em simultâneo, uma vez que, a reconstrução da história evolutiva destes pigmentos ainda não foi até à data totalmente elucidada. Existe a hipótese de a via regulatória ser comum e que as antocianinas atuam como inibidoras da biossíntese de betalaínas e vice-versa (Brockington *et al.*, 2011).

Alguns estudos relatam a presença de betalaínas nas bagas de *P. americana* L.. Apenas Jerz *et al.* (2008) identificaram 17 betalaínas, entre as quais diferentes isómeros de betaninas e betaxantinas, em maiores quantidades, destacando-se a isovulgaxantina IV, vulgaxantina IV como os compostos maioritários.

As betalaínas presentes na baga de *P. americana* L. podem ter vantagens tecnológicas devido à sua capacidade tintureira, acrescendo o facto da sua cor matriz remanescente não ser alterável ao longo de uma ampla faixa de pH entre 3 e 7. Esta estabilidade torna-as particularmente adequadas para uso como corantes naturais em alimentos de acidez baixa ou neutra, onde a capacidade pigmentante das antocianinas habitualmente falha (Stintzing e Carle, 2004).

Face ao exposto, mais estudos deverão ser realizados para a identificação e quantificação destes compostos, numa perspetiva sustentável e de valorização de uma planta invasora.

### 1.3.3.2. Clorofilas

As clorofilas são pigmentos naturais das plantas, ocorrem nos cloroplastos das folhas e outros tecidos vegetais e participam no processo de fotossíntese (Wissgott e Bortlik, 1996).

A clorofila não é uma molécula isolada, mas uma família de substâncias semelhantes entre si, designadas por clorofilas *a*, *b*, *c* e *d*.

A clorofila *a*, a mais abundante e mais importante desta família, corresponde aproximadamente a 75% dos pigmentos verdes encontrados nas plantas. A clorofila *b* difere da clorofila *a* por uma pequena variação na substituição no anel pirrólico II, enquanto as clorofilas *c* e *d*, mais raras, estão presentes preferencialmente nas algas (Lanfer-Marquez, 2003).

A clorofila pode ser usada como corante natural, designada por clorofilina cúprica, apresentando variadas aplicações, tanto em alimentos, produtos farmacêuticos como em suplementos alimentares (Goldberg, 1994). As diferenças de cor das plantas são resultado da presença e distribuição variável de outros pigmentos associados, os carotenoides. Os pigmentos clorofílicos são os mesmos numa grande variedade de plantas (Mortensen, 2004). Assim sendo, existem muitas combinações possíveis entre a clorofila e os carotenoides, mas sendo sempre favorecida a tonalidade verde característica (Wissgott e Bortlik, 1996). Por outro lado, na indústria farmacêutica a clorofila é importante para produzir clorofilina (derivado sintético da clorofila), amplamente estudada pela sua propriedade antimutagénica.

As clorofilas embora não tenham muito destaque como pigmentos naturais apresentam efeitos benéficos para a saúde, pelas suas propriedades antimutagénicas e antigenotóxicas (Lila, 2004; Ferruzzi *et al.*, 2002). Um estudo demonstrou que as clorofilas, clorofilinas e compostos tetrapirrólicos relacionados (porfirinas) são indutores de genes citoprotectores, os quais protegem as células contra os danos oxidativos provocados pelos radicais livres (Fahey *et al.*, 2005). Outro estudo, que utilizou extratos aquosos de derivados de clorofilas, demonstrou que estas são capazes de melhorar a habilidade de linfócitos humanos aumentando a sua resistência contra o dano oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Hsu *et al.*, 2005). Também foi demonstrado que a clorofilina reduz a biodisponibilidade de químicos cancerígenos e inibe a aflatoxina B (Goldberg, 1994).

De entre as suas características, as clorofilas são solúveis em solventes apolares, enquanto as clorofilinas são hidrossolúveis. O seu uso é limitado devido ao facto de serem instáveis e conferirem opacidade. Devido à sua cor e propriedades físico-químicas,

são também usadas como aditivos para géneros alimentícios. Porém estes pigmentos são quimicamente instáveis, fotossensíveis, termolábeis e oxidáveis, sofrendo alteração fácil. No entanto, estes pigmentos podem ser quimicamente modificados antes de serem incorporados em alimentos, como, por exemplo, substituindo o magnésio ( $Mg^{2+}$ ) por cobre ( $Cu^{2+}$ ) resultando na clorofila cúprica que é estável e pode ser usada em formulações hidro e lipossolúveis, permitindo-lhe aumentar o campo de ação em diferentes áreas industriais.

### 1.3.3.3. Carotenoides

Os carotenoides são corantes naturais responsáveis pelas tonalidades amarela, laranja e vermelho, habitualmente utilizados nas indústrias alimentar, farmacêutica, cosmética e agropecuária (Boo *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2012). Além do seu amplo uso como corantes e no enriquecimento de alimentos, também são utilizados por apresentarem atividade pró-vitáminica A, resultando na promoção de funções biológicas benéficas, tais como o fortalecimento do sistema imunológico (Souza *et al.*, 2012) e a diminuição do risco de doenças degenerativas, como cancro, doenças cardiovasculares, degeneração macular e cataratas (Silva *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2012; Dutta *et al.*, 2005).

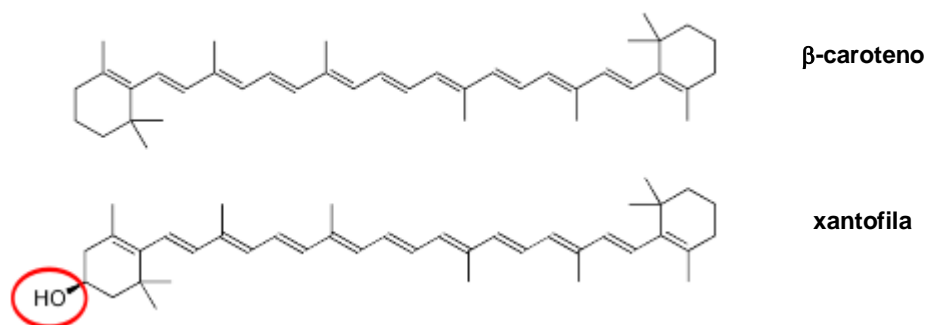
Os carotenoides têm sido alvo do interesse da comunidade científica, incluindo química, bioquímica, ciência e tecnologia de alimentos, medicina, farmácia e nutrição. Embora estes pigmentos estejam sempre associados a uma gama de cores entre o amarelo e o vermelho, não se pode colocar de parte a hipótese da sua existência em plantas de tonalidades diferentes. De facto, a sua presença em plantas verdes é um dado adquirido, sendo a cor dos carotenoides mascarada pelo pigmento dominante, a clorofila. Durante a degradação da clorofila potenciam-se as cores características dos carotenoides. Este fenómeno pode ser observado durante a maturação dos frutos e na alteração das tonalidades das folhas das árvores no outono. Nos alimentos, para além da sua função como pigmentos naturais e precursores da vitamina A podem ser extraídos de matrizes vegetais e reutilizados como aditivos alimentares (Parlamento Europeu e Diretiva do Conselho, 1994).

De entre os carotenoides, já foram identificados cerca de 700, dos quais 40 se incluem nos alimentos habitualmente consumidos pelo homem (Kotake-Nara e Nagao, 2011; Auldrige *et al.*, 2006) e apenas 6 carotenoides foram encontrados nos tecidos humanos, sugerindo que existe uma seletividade na sua absorção intestinal (Kotake-Nara e Nagao, 2011).

Os carotenoides são compostos tetraterpenoides com 40 carbonos, unidos por unidades opostas no centro da molécula (Fraser e Bramley, 2004). As reações químicas de ciclização, hidrogenação, desidrogenação, migração de duplas ligações, encurtamento ou alongamento da cadeia, rearranjo, isomerização, introdução de funções com oxigénio ou a combinação destes processos resultam na diversidade estrutural dos diferentes carotenoides (Tanaka *et al.*, 2008). No entanto, todas as estruturas são baseadas em 7 diferentes grupos terminais, dos quais somente 4 ( $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\kappa$  e  $\psi$ ) são encontrados em carotenoides de plantas superiores (Fraser e Bramley, 2004).

Os carotenoides diferenciam-se das antocianinas e das betalaínas, não só pela sua estrutura química mas também pelo papel que desempenham na vida da planta. São exemplo a função fotoprotetora durante a fotossíntese (Niyogi, 2000) e o fornecimento de substratos para a biossíntese do ácido abscísico, hormona reguladora de vários aspetos ligados com a fisiologia da planta, como o seu crescimento e desenvolvimento (Auldrige *et al.*, 2006).

De entre os diversos carotenoides, alguns contêm apenas carbono e hidrogénio e são designados carotenos; os que apresentam grupos substituintes com oxigénio, como hidroxilos, grupos ceto e epóxi (carotenoides oxidados), são as xantofilas (Kotake-Nara e Nagao, 2011), como se pode observar na Figura 9.



**Figura 9:** Estruturas químicas do  $\beta$ -caroteno e da xantofila.

Há evidências epidemiológicas que sugerem que a ingestão de carotenoides pode inibir certos tipos de cancro e doenças degenerativas resultantes do stresse oxidativo (Fiedor e Burda, 2014; Galano *et al.*, 2010; Dutta *et al.*, 2005; Edge *et al.*, 1997). A capacidade quelante dos carotenoides e, conseqüentemente, a sua atividade antioxidante é já conhecida, no entanto, os carotenoides também exercem benefícios no sistema imune e na comunicação intracelular. Além disso, há indícios de que os carotenoides em associação com outros compostos presentes nas plantas apresentam

efeito protetor contra algumas doenças crônicas. Por exemplo, foi observado um efeito sinérgico entre o  $\beta$ -caroteno e as vitaminas C e E (antioxidantes naturais) na proteção celular, provavelmente decorrente da capacidade do  $\beta$ -caroteno destruir radicais livres e reparar os radicais de tocoferol produzidos pela ação do  $\alpha$ - tocoferol (Delgado-Vargas *et al.*, 2000).

Não estão descritos carotenoides na *P. americana* L., no entanto, carotenoides como a zeaxantina, violaxantina e luteína são, invariavelmente, encontrados em folhas e hastes das plantas em geral. Em contraste, os carotenoides em tecidos não-verdes mostram composições distintas que dependem das espécies vegetais (Tanaka *et al.*, 2008).

Por exemplo, a *Bixa orellana* é a única planta que acumula bixina (também conhecida como anato, e usada em alimentos e cosméticos como um aditivo de cor vermelha) nas suas sementes (Bouvier *et al.*, 2003). Assim torna-se importante estudar os carotenoides das bagas de *P. americana* L. para caracterizar exaustivamente este fruto e promover a sua utilização.

#### **1.4. Interesse farmacológico**

Durante o decurso desta revisão bibliográfica foram referidas diferentes atividades biológicas associadas à *P. americana* L. Independentemente dos diferentes órgãos estudados, e de uma maneira geral, as propriedades biológicas atribuídas advêm de diferentes grupos de compostos bioativos presentes em todas as partes da planta.

Muitos estudos realizados até à data mencionam benefícios no tratamento de tumores (Das *et al.*, 2014; Maness *et al.*, 2014; Patra *et al.*, 2014; Ding *et al.*, 2012), atividade anti-inflamatória (Patra *et al.*, 2014; Ding *et al.*, 2012; Ravikiran *et al.*, 2011; Nabavi *et al.*, 2009), utilidade em tratamentos dermatológicos, nomeadamente em doenças cutâneas, incluindo acne e erupções escamosas (Ravikiran *et al.*, 2011), regeneração dos tecidos ósseos e dos tecidos moles e tratamento de dores de garganta e amigdalites (Ravikiran *et al.*, 2011). A atividade antimicrobiana também foi descrita na raiz, folhas e bagas da *Phytolacca americana* L. (Patra *et al.*, 2014; Boo *et al.*, 2012; Ding *et al.*, 2012; Nabavi *et al.*, 2009).

A atividade antioxidante é uma das propriedades biológicas mais estudadas no reino vegetal. Devido à sua importância no metabolismo humano, já foram realizados estudos em plantas inteiras ou em órgãos específicos. Os benefícios do uso de plantas com ação antioxidante já são do conhecimento geral e sabe-se que auxiliam na eliminação de espécies reativas de oxigénio (ERO), e espécies não radicalares do oxigénio, sendo as



mais relevantes os radicais superóxido ( $O_2^{\bullet}$ ), hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ), peróxido ( $ROO^{\bullet}$ ), alcóxido ( $RO^{\bullet}$ ), peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) e o oxigénio singleto ( $^1O_2$ ) (Kunwar e Priyadarsini, 2011; Lobo *et al.*, 2010; Valko *et al.*, 2007).

A descoberta de compostos antioxidantes eficazes na eliminação de radicais livres, naturais, isentos de toxicidade e com boa biodisponibilidade para atravessar os tecidos e a barreira hemato-encefálica é uma mais valia.

Zheleva-Dimitrova (2013) estudou a atividade antioxidante das folhas e bagas de *P. americana* L. através de diversos métodos Já Nabavi *et al.* (2009), também avaliaram o poder antioxidante destas bagas, verificando um elevado potencial.

Mais estudos deverão ser levados a cabo, recorrendo a diferentes metodologias analíticas para avaliar a atividade antioxidante desta planta.

## 1.5. Toxicidade

Vários estudos mencionam a *P. americana* L. como um espécie tóxica (Park *et al.*, 2014; Nabavi *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2008; Ogzewalla *et al.*, 1963), devido a perturbações gastrointestinais, como náuseas, vômitos e diarreia após o seu consumo. Segundo Ogzewalla *et al.* (1963), a administração de doses elevadas podem inclusive promover estados de sonolência, vertigens, perda de visão, prostração e, por vezes, convulsões, seguidas de morte por paralisia respiratória. Park *et al.* (2014) salientaram que a ingestão das bagas de *P. americana* L. promove distúrbios gastrointestinais, acompanhados por pulso e respiração enfraquecida, observados em bovinos e aves. Já Barnett, em 1975, mencionou que muitas aves consomem bagas de *P. americana* L. e não manifestaram os efeitos tóxicos supracitados. As bagas, concretamente o sumo das bagas é usado como aditivo alimentar, por exemplo como corante alimentar vermelho natural (E162) (Esatbeyoglu *et al.*, 2015) e como adulterante do vinho tinto na indústria vinícola, o que permite subentender que não existe toxicidade nas bagas. Segundo Ogzewalla *et al.* (1963) a toxicidade da baga é devida às sementes e não à polpa.

## **2. Objetivos**

---

## **2.1. Objetivo geral**

Esta dissertação teve o intuito de valorizar as bagas da espécie *Phytolacca americana* L., planta herbácea invasora, cuja aplicação nas indústrias alimentar e farmacêutica ainda é escassa. O objetivo primordial foi determinar o teor em compostos bioativos e a atividade antioxidante das bagas, como estudo piloto. Pretende-se a sua futura utilização nas indústrias alimentar (aplicação em suplementos alimentares/alimentos funcionais) e farmacêutica (por ex. suplementos, cosmética, entre outros), respondendo às questões emergentes de sustentabilidade ambiental, social e económica.

## **2.2. Objetivos específicos**

Foi desenvolvido um conjunto de tarefas laboratoriais, articuladas entre si, procurando respostas sequenciais e cumulativas para os seguintes objetivos específicos:

- Obtenção de extratos hidroalcoólicos, a partir de um processo de extração sólido/líquido.
- Quantificação do teor de fenólicos totais, flavonoides, saponinas e carotenoides.
- Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* dos extratos obtidos, recorrendo a duas metodologias diferentes e complementares (DPPH<sup>•</sup> e FRAP).
- Avaliação da percentagem de inibição de hemólise em eritrócitos humanos recorrendo ao método de adição do oxidante AAPH.

### **3. Material e Métodos**

---

A realização do trabalho laboratorial decorreu no Departamento de Ciências Químicas e no Departamento de Ciências Biológicas (Serviço de Bioquímica), da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

### **3.1. Reagentes**

AAPH (2,2'- azo-bis(2-amidinopropano)) (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.)

Acetato de sódio (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.)

Acetona (Merck, Hohenbrum, Germany)

Ácido gálico - padrão (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.)

Ácido Sulfúrico (Merck, Darmstadt, Germany)

Carbonato de sódio (Merck, Darmstadt, Germany)

Catequina - padrão (SIGMA Aldrich, Inc., St. Louis, U.S.A.)

Cloreto de alumínio (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.)

Cloreto férrico (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.)

DPPH<sup>•</sup> (radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.)

Etanol absoluto (Fisher Chemical, Loughborough, U.K.)

Hidróxido de sódio (Merck, Darmstadt, Germany)

Nitrito de sódio (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.)

*n*-Hexano (Merck, Darmstadt, Germany)

Reagente de Folin-Ciocalteu (Merck, Darmstadt, Germany)

Saponina - padrão (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.)

Sulfato ferroso (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.)

TPTZ (2,4,6-tri-(2-piridil)-1,3,5-triazina) (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.)

Vanilina (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.)

### **3.2. Equipamentos**

Câmara de Azoto (Stuart – SBHCONC/1, Biocote, U.K.)

Centrífuga (Heraeus Sepatech - Megafuge 1.0, Germany)

Espectrofotómetro (SHIMADZU, UV-1800, Japan)

Incubadora (Binder, Germany)

Leitor microplacas (BioTek Instruments, Synergy HT GENS5, U.S.A.)

Liofilizador (Telstar – Cryodos, Spain)

Microscópio (Nikon DS – Eclipse CI, Japan)

Moinho (GM 200, RETSCH, Haan, Germany)

Placa de agitação (VARIOMAG, TELEMODUL 40 CT, H+P Labortechnik, Germany)

Vortex (VWR INTERNATIONAL, Darmstadt, Germany)

### 3.3. Amostras

A amostra estudada neste trabalho corresponde às bagas maduras da espécie *Phytolacca americana* L. (Figura 10). Os frutos foram colhidos no litoral norte de Portugal, concelho de Amarante, freguesia de S. Simão de Gouveia, Lugar de Friande (41° 13' 1" N, 8° 4' 11" O) em agosto de 2014. Durante a seleção e preparação da amostra mantiveram-se controlados diversos fatores, tais como região de colheita, estado de maturação do fruto e exposição à radiação solar.



**Figura 10:** Morfologia da baka da *P. americana* L. no momento da colheita.

Após receção das bagas, as mesmas foram congeladas a - 80 °C, liofilizadas e, posteriormente, trituradas para garantir maior homogeneização da amostra. A amostra pulverizada foi conservada em frascos hermeticamente selados e mantida ao abrigo da luz, antes de ser utilizada para as determinações analíticas.

### **3.4. Preparação dos extratos**

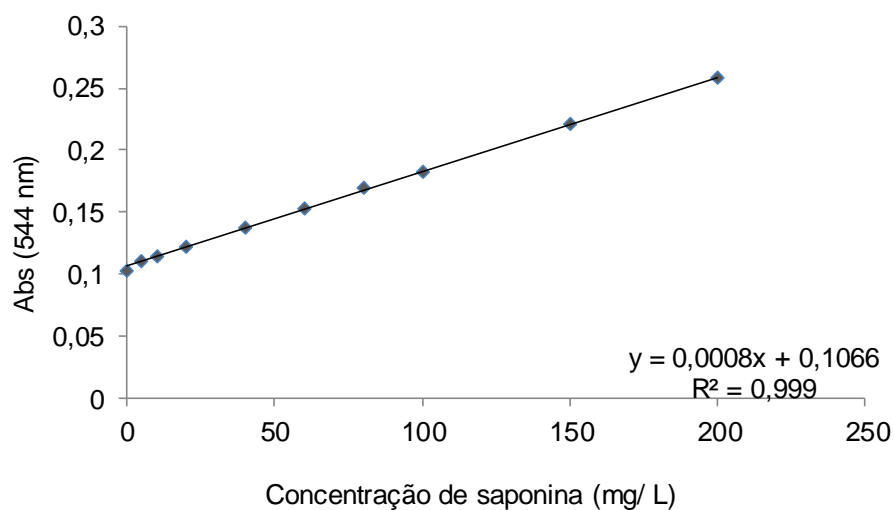
Num estudo preliminar, procedeu-se à avaliação da melhor relação entre a massa do fruto (g) e a quantidade de solvente (mL) para garantir a maior recuperação dos compostos. Foram estudadas as relações 1:50 e 1:100 (m/v), tendo-se verificado que a melhor proporção para garantir maior extração dos compostos bioativos era de 1:100 (m/v). Posteriormente foram cumpridas as condições de extração descritas por Costa *et al.* (2014).

Aproximadamente 0,5 g de amostra foi dissolvida em 50 mL de uma mistura hidroalcoólica (50/50, v/v), sendo a extração efetuada em placa de aquecimento (40 °C) com agitação constante (600 rpm) durante 1 hora. Os extratos foram filtrados por gravimetria e congelados a -25 °C para posterior análise.

### **3.5. Determinação dos compostos bioativos**

#### **3.5.1. Determinação de teor de saponinas**

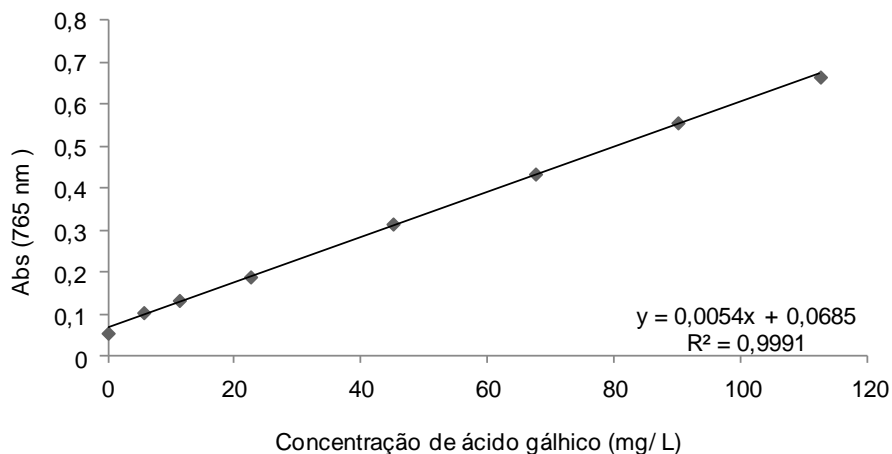
O teor de saponinas seguiu o procedimento experimental descrito por Helaly *et al.* (2001), com ligeiras modificações. Ao extrato hidroalcoólico (descrito no ponto 3.4.) foram adicionados uma mistura de 0,5 mL de vanilina (8%) em etanol e 5,0 mL de ácido sulfúrico (72%), mantidas em banho de gelo. Após homogeneização da mistura, a mesma foi colocada num banho termostatizado, a 60 °C durante 20 minutos. Posteriormente, a solução foi arrefecida no mesmo banho de gelo e, seguidamente, efetuaram-se as leituras espectralométricas a 544 nm. Para proceder ao cálculo do teor de saponinas, construiu-se uma curva de calibração (Figura 11), recorrendo a um padrão de saponina com concentração inicial de 200 mg/L e os resultados expressos em mg equivalentes saponina (ES)/ g de amostra.



**Figura 11:** Curva de calibração do padrão de saponina.

### 3.5.2. Fenólicos totais

A determinação do teor de fenólicos totais dos extratos hidroalcoólicos foi efetuada por um método espectrofotométrico, utilizando o reagente Folin-Ciocalteu (RFC), segundo metodologia previamente descrita por Alves *et al.* (2010). A 500  $\mu$ L de extrato adicionaram-se 2,5 mL de RFC diluído em água desionizada (1:10) e 2,0 mL de carbonato de sódio para alcalinizar a solução. A solução final foi colocada em banho-maria a 45 °C durante 15 minutos ao abrigo da luz e, posteriormente, mantida à temperatura ambiente durante 30 minutos. As leituras foram efetuadas a 765 nm e os resultados finais foram calculados a partir de uma curva de calibração usando o ácido gálico como padrão (Figura 12). Os ensaios foram efetuados em triplicado e os resultados expressos em mg equivalentes ácido gálico (EAG)/ g de amostra.



**Figura 12:** Curva de calibração do ácido gálico.



### 3.5.3. Flavonoides

O método usado para a determinação dos flavonoides seguiu a metodologia previamente descrita por Lin e Tang (2007) com ligeiras modificações. A absorvência foi determinada a 510 nm, correspondendo ao máximo de absorção do complexo  $\text{AlCl}_3$ -flavonoide formado. A catequina foi o padrão utilizado para construir a curva de calibração e quantificação nos extratos estudados (Figura 13). Num tubo de ensaio colocou-se 1,0 mL de extrato, 4,0 mL de água desionizada e 300  $\mu\text{L}$  de nitrito de sódio (5%). Após 5 minutos, adicionaram-se 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{AlCl}_3$  a 10% e, após 1 minuto, adicionaram-se 2,0 mL de solução de hidróxido de sódio (1 mol/ L) e 2,4 mL de água desionizada. Os ensaios foram efetuados em triplicado e os resultados expressos em mg equivalentes catequina (EC)/ g de amostra.

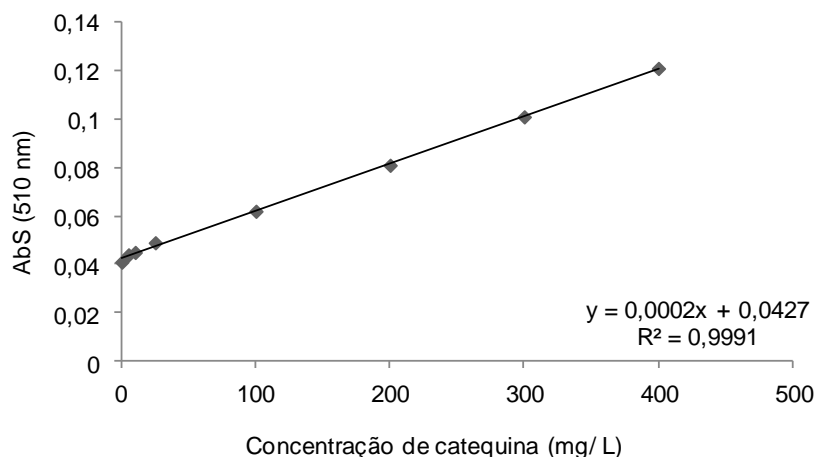


Figura 13: Curva de calibração da catequina.

### 3.5.4. Determinação de carotenoides

Os carotenoides foram quantificados por colorimetria, utilizando-se um espectrofotômetro de UV da marca Shimadzu, segundo procedimento publicado por Vinha *et al.* (2014). Aproximadamente 0,5 g de amostra foram submetidas a um processo de extração com uma mistura apolar de acetona-n-hexano (4:6, v/v). Após centrifugação (30 minutos a 3500 rpm) recolheu-se o sobrenadante para efetuar as leituras das absorvências a diferentes comprimentos de onda, de forma a quantificar os teores de clorofila a, clorofila b, licopeno e  $\beta$ -caroteno, segundo as equações:

- Clorofila a (mg/ g) =  $0,999A_{663} - 0,0989A_{645}$
- Clorofila b (mg/ g) =  $- 0,328A_{663} + 1,77A_{645}$
- Licopeno (mg/ g) =  $- 0,0458A_{663} + 0,204A_{645} + 0,372A_{505} - 0,0806A_{453}$
- $\beta$ -caroteno (mg/ g) =  $0,216A_{663} - 1,22A_{645} - 0,304A_{505} + 0,452A_{453}$

### 3.6. Atividade antioxidante *in vitro*

O estudo da atividade antioxidante reflete a ação cumulativa de todas os compostos antioxidantes presentes num extrato ou amostra biológica proporcionando, desta forma, uma análise de parâmetros integrados.

O número de métodos para avaliar a atividade antioxidante de um composto ou de uma matriz é muito variável, estando descritos diferentes métodos analíticos baseados em diferentes mecanismos de ação e associados às diferentes estruturas químicas dos compostos com potencial ação antioxidante. Assim, torna-se imperativo que num estudo deste tipo sejam realizados diferentes métodos analíticos para a avaliação da atividade antioxidante.

Para a avaliação da atividade antioxidante *in vitro* consideraram-se 2 métodos, segundo as metodologias descritas por Brand-Williams *et al.* (1995) e Benzie e Strain (1996), respetivamente:

- Determinação da capacidade de neutralização do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH\*);
- Avaliação do poder antioxidante por redução do ião férrico (método FRAP).

#### 3.6.1. Método DPPH

A determinação da atividade antioxidante pode ser realizada pelo método de redução do radical estável DPPH\* (2,2-difenil-1-picril-hidrazila). Este é um método colorimétrico, onde o radical livre DPPH\* é estabilizado por substâncias com propriedades antioxidantes (Pyrzynska e Pękal, 2013). O ensaio consiste essencialmente numa reação de oxidação-redução, onde o DPPH\* (coloração violeta) é reduzido por uma espécie antioxidante, ocorrendo uma mudança da cor violeta para amarelo pálido (Figura 14). Desta forma, determina-se a capacidade de uma substância/ extrato captar o radical, sendo o que conduz a um decréscimo da absorvência a 515 nm. É esta mudança de coloração que permite acompanhar visualmente a reação química.

O procedimento experimental consistiu em pipetar 20  $\mu$ L de amostra e 180  $\mu$ L de solução de DPPH\* (0,06 mM) e, posteriormente homogeneizar a solução. As leituras

efetuaram-se igualmente em intervalos de 2 em 2 minutos durante 40 minutos, numa microplaca de 96 poços (Figura 14). A atividade antioxidante foi expressa em percentagem de inibição do radical DPPH\*, segundo a seguinte equação:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{\text{Abs branco} - \text{Abs final}}{\text{Abs branco}} \times 100$$

em que Abs branco é a absorvência da solução de DPPH no primeiro tempo de leitura e Abs final do extrato após obtenção de absorvências constantes.



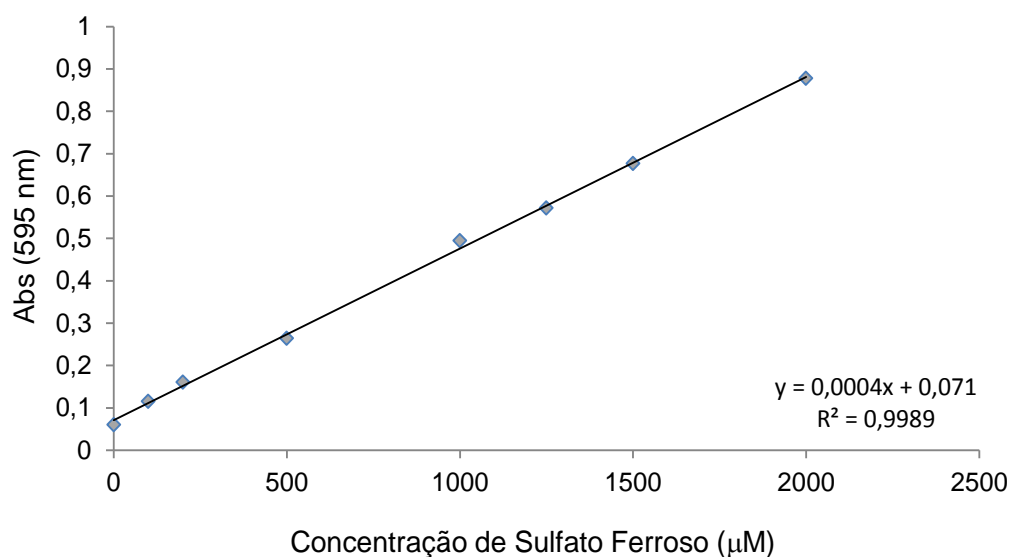
**Figura 14:** Microplaca usada no método DPPH.

### 3.6.2. Método FRAP

Este método consiste na redução de complexo Fe(III)/ferricianeto  $[\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$  a Fe(II), forma ferrosa, pela presença do composto antioxidante na solução.

Este método mede a capacidade dos antioxidantes reduzirem o complexo TPTZ (2,4,6-tri-(2-piridil)-1,3,5-triazina) com  $\text{Fe}^{3+}$ , dando origem a um complexo azul-escuro  $[\text{Fe}(\text{II})(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ . A sua determinação é feita por espectrofotometria a um comprimento de onda de 595 nm.

Assim, determinou-se o poder antioxidante por redução do íon férrico, segundo metodologia previamente descrita (Benzie e Strain, 1996), utilizando-se uma curva de calibração de sulfato ferroso ( $\mu\text{M}$ ) (Figura 15).



**Figura 15:** Curva de calibração na determinação do poder antioxidante pelo método FRAP.

Num tubo de ensaio, colocaram-se 90 µL de extrato, 270 µL de água destilada e 2,7 mL de reagente FRAP (750 mL de tampão acetato 0,3 M, 75 mL solução TPTZ 10 mM e 75mL FeCl<sub>3</sub> 20 mM). Homogeneizou-se e colocou-se em banho-maria a 37°C. Após 30 minutos, as leituras foram efetuadas espectrofotometricamente ( $\lambda = 595 \text{ nm}$ ) em leitor de microplacas (BioTek Instruments, Synergy HT GEN5, USA).

### 3.6.3. Atividade hemolítica

#### 3.6.3.1. Preparação da suspensão de eritrócitos

O sangue venoso foi colhido em EDTA (anticoagulante) de três doadores voluntários e saudáveis. Para obter os eritrócitos, procedeu-se a uma centrifugação do sangue total (10 mL) a 1500 rpm durante 10 minutos a 4 °C. O plasma e a camada leucocitária foram removidos e os eritrócitos foram lavados três vezes com solução tampão de fosfato (PBS: 13,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O; 61,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 77 Mm NaCl; pH 7,4) nas condições acima referidas. Após a última lavagem fez-se o volume com PBS de forma a obter uma suspensão eritrocitária com hematócrito de 2,6 %.

### 3.6.3.2. Incubação com AAPH

Já foram referidas anteriormente, várias substâncias antioxidantes capazes de desencadear o stresse oxidativo em eritrócitos, tais como, o peróxido de hidrogénio (Shabbir *et al.*, 2013; Gulcin *et al.*, 2003; Oktay *et al.*, 2003) e o terc-butilhidroperóxido (Kim *et al.*, 2015; Geetha *et al.*, 2009). No entanto, a substância mais amplamente utilizada é o 2,2'-azo-bis(2-amidinopropano) (AAPH) (Guedes *et al.*, 2013; Pieroni *et al.*, 2011; Fernandes *et al.*, 2010; Peyrat-Maillard *et al.*, 2003).

Para avaliar o efeito protetor da baga da espécie *P. americana* L. foram estudadas várias concentrações do extrato hidroalcoólico (2,6; 1,3; 0,65; 0,32; 0,163; 0,081 e 0,041 mg/ mL), onde a suspensão de eritrócitos foi incubada com o oxidante AAPH na concentração final de 600 mM.

Aos tubos de hemólise adicionaram-se 500 µL da suspensão de eritrócitos a 2,6 % e 85 µL do extrato de baga de *P. americana* L. Incubou-se a 37 °C durante 15 minutos com ligeira agitação. Após este período de incubação, adicionaram-se 65 µL da solução de AAPH, indutora de stresse oxidativo, de acordo com a Tabela 1.

Os tubos de hemólise foram incubados durante 4 horas, a 37 °C, com agitação suave e ao abrigo da luz.

**Tabela 1.** Procedimento experimental para avaliação da percentagem de inibição da hemólise.

<b>Tubos</b>	<b>Suspensão de Eritrócitos</b>	<b>AAPH (600mM)</b>	<b>Amostra</b>	<b>PBS</b>
<b>Controlo (+)</b>	500	65	-	85
<b>Controlo (-)</b>	500	-	-	150
<b>2,6 mg/ mL</b>	500	65	65	20
<b>1,3 mg/ mL</b>	500	65	65	20
<b>0,65 mg/ mL</b>	500	65	65	20
<b>0,325 mg/ mL</b>	500	65	65	20
<b>0,163 mg/ mL</b>	500	65	65	20
<b>0,081 mg/ mL</b>	500	65	65	20
<b>0,041 mg/ mL</b>	500	65	65	20

### 3.6.3.3. Avaliação da percentagem de inibição de hemólise

No final da incubação retirou-se de cada tubo uma alíquota de 50 µL para um eppendorf contendo 950 µL de água destilada e outra alíquota de 50 µL para um eppendorf contendo 950 µL de PBS. Os eppendorfs foram centrifugados durante 8 minutos a 4000 rpm. De seguida, retiraram-se 200 µL do sobrenadante de cada eppendorf para uma microplaca de 96 poços, de modo a proceder-se à leitura das absorvências a 540 nm.

A percentagem de inibição de hemólise foi calculada a partir da razão entre as duas leituras, segundo equação a abaixo:

$$\% \text{ Hemólise} = \frac{\text{Abs}(\text{teste})}{\text{Abs}(\text{hemólise total})} \times 100$$

### 3.6.3.4. Análise morfológica dos eritrócitos

O efeito das diferentes concentrações de extrato de bagas de *P. americana* L., na morfologia dos eritrócitos foi avaliado por microscopia ótica. Retiraram-se alíquotas de 20 µL de suspensão de eritrócitos de tubos usados no teste da avaliação de inibição de hemólise após 4h de incubação a 37°C. Este volume foi colocado diretamente numa lâmina, coberto com uma lamela e observou-se ao microscópio ótico com objetiva de 40x (Nikon Eclipse CI, Nikon Corporation, Japão).

## 3.7. Tratamento estatístico

O tratamento estatístico foi efetuado com recurso ao software estatístico SPSS versão 22. A comparação de médias foi efetuado pelo teste de Mann-Whitney U. O teste de correlação de Spearman foi usado para avaliar a correlação entre variáveis. Foi considerado estatisticamente significativo um valor de  $p < 0,05$ .

## **4. Resultados e Discussão**

---

O interesse em estudar a *P. americana* L. prende-se com o facto de se tratar de uma espécie adaptada a ambientes humanos e perturbados, como bermas de caminhos e terrenos baldios, comportando-se como invasora. Essa característica aumenta o interesse no seu estudo, uma vez que os encargos agrícolas são inexistentes e a sua distribuição pelo território nacional é elevada. Para além das propriedades biológicas associadas à baga desta planta, já referidas anteriormente, a caracterização química e a avaliação do seu potencial antioxidante ainda não foram estudados na *P. americana* L. crescida em Portugal. Admitindo-se que as condições edafo-climáticas interferem significativamente no metabolismo secundário das plantas, esta planta pode ser vantajosa como recurso natural e sustentável para futuras aplicações na área alimentar, farmacêutica e cosmética.

Assim, neste capítulo serão apresentados e discutidos os teores de compostos bioativos e a avaliação da atividade antioxidante das bagas de *P. americana* L. colhida numa determinada região de Portugal.

#### **4.1. Solvente extrator**

Durante a pesquisa bibliográfica verificou-se a existência de inúmeros estudos associados às condições de extração dos compostos bioativos. Contudo, também se verificou que a maior parte desses estudos valoriza apenas a quantidade de compostos extraídos, baseados na natureza dos solventes. Entre alguns solventes descritos, o metanol é o mais utilizado, simples ou em diferentes concentrações aquosas, no entanto, a sua toxicidade e valor económico nunca foi considerado pelos autores. Por esse motivo, neste estudo optou-se por usar uma mistura hidroalcoólica (50%:50%) nas mesmas condições de extração previamente validadas por Costa *et al.* (2014). Os extratos foram preparados a partir de 0,5 g de amostra em 50 mL de uma solução hidroalcoólica, durante 1 hora, a 40 °C, com agitação constante.

#### **4.2. Análise dos compostos bioativos**

Os compostos analisados nos extratos hidroalcoólicos das bagas foram os fenólicos totais, flavonoides e saponinas, recorrendo a técnicas espectrofotométricas. Para a determinação dos teores de carotenoides recorreu-se a uma técnica de extração diferente, usando-se uma mistura de solventes apolares (acetona: *n*-hexano), sendo posteriormente também quantificados por espectrofotometria.

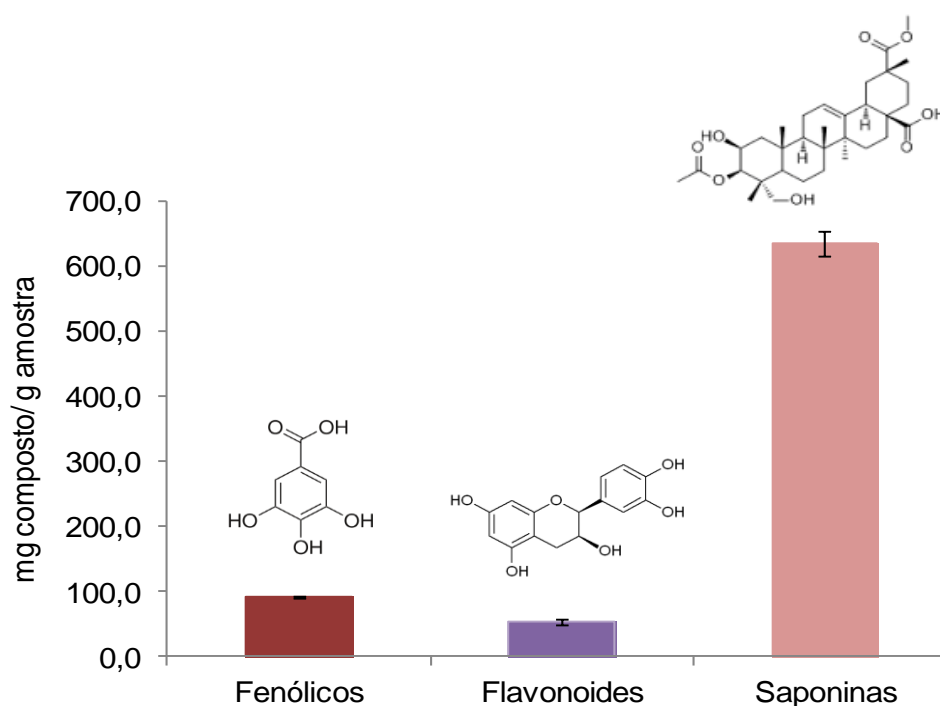


Os resultados obtidos referentes à quantificação dos fenólicos totais, flavonoides e saponinas encontram-se descritos na Tabela 2 e para melhor visualização e interpretação dos resultados, os mesmos estão graficamente representados na Figura 16.

**Tabela 2.** Teores totais dos compostos bioativos da baga de *P. americana* L...

	Fenólicos totais* (mg EAG/ g)	Flavonoides* (mg EC/ g)	Saponinas* (mg S/ g)
Extrato da baga	91,0 ± 0,44	52,1 ± 7,04	634,5 ± 39,71

\*Valores expressos em média ± desvio padrão, para n=3.



**Figura 16:** Representação gráfica dos teores de compostos bioativos estudados na baga de *P. americana* L.

Pelos resultados (Tabela 2 e Figura 16) verifica-se que os teores de saponinas são significativamente superiores aos teores de flavonoides e de fenólicos totais encontrados no extrato do fruto, respetivamente. Esta ordem de concentrações está em concordância com outros estudos realizados na mesma planta. De facto muitos estudos realçam o teor de saponinas nesta espécie vegetal, não atribuindo tanto ênfase aos fenólicos totais e flavonoides (Ding *et al.*, 2013; Getiya *et al.*, 2011; He *et al.*, 2011; Galarraga *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2008). O teor de fenólicos totais na amostra apresentou um valor

ligeiramente inferior aos descritos por outros autores. Zheleva-Dimitrova (2013) e Nabavi *et al.* (2009) obtiveram concentrações de 174,76 mg (EAG)/ g e de 102,11 mg (EAG)/ g, respetivamente em extratos metanólicos da baga. Esta diferença, principalmente com o valor descrito por Zheleva-Dimitrova (2013), poderá estar associada às condições de extração e condições edafo-climáticas.

O metanol é o solvente mais utilizado para extrair compostos fenólicos em matrizes vegetais, considerado por muitos autores como o solvente com maior capacidade extratora (Moran-Palacio *et al.*, 2014; Barros *et al.*, 2011; Ebrahimzadeh *et al.*, 2010). No entanto, face à sua toxicidade e custo elevado, não se adequa o seu uso em matérias que possam ser edíveis. O tempo de extração também pode interferir no rendimento dos teores de compostos obtidos. Por exemplo, Ebrahimzadeh *et al.* (2010) utilizou 3 dias (25 °C) para a recuperação dos compostos fenólicos, enquanto no trabalho que se apresenta o tempo de contacto entre o solvente e a matriz foi de 1 h (40 °C).

As condições edafo-climáticas também exercem uma grande influência no teor de compostos bioativos. Temperaturas elevadas, baixa pluviosidade e condições do solo podem potenciar o stresse hídrico na planta, favorecendo a síntese de metabolitos secundários. As bagas estudadas por Ebrahimzadeh *et al.* (2010) e por Nabavi *et al.* (2009) foram colhidas no Irão, mais concretamente na floresta de Mazandaran onde as temperaturas são idênticas às do norte de Portugal. No entanto, as bagas estudadas por Zheleva-Dimitrova (2013) foram colhidas na Bulgária que embora tenham temperaturas médias idênticas a Portugal, as variações climáticas são mais drásticas, podendo interferir na síntese metabólica secundária da planta.

Os flavonoides tal como a maioria dos compostos fenólicos exibem diferentes funções biológicas, incluindo ações antialérgicas, antivirais, anti-inflamatórias e vasodilatadoras (Tanaka e Takahashi, 2013; Magrone e Jirillo, 2012; Visioli *et al.*, 2011; Manach *et al.*, 2004; Middleton *et al.*, 2000). O número de grupos hidroxilo, a natureza dos grupos substituintes e as suas posições específicas na estrutura dos anéis influenciam a função dos flavonoides como moduladores da atividade enzimática ou como antioxidantes *in vitro* e *in vivo*. Devido à elevada diversidade de estruturas que este grupo de compostos tem e às muitas propriedades biológicas a eles associadas, a determinação dos flavonoides numa matriz natural revela-se importante.

Os teores de flavonoides encontrados nos extratos hidroalcoólicos estudados foram superiores aos descritos por Zheleva-Dimitrova (2013) (24,7 mg EC/ g) e por Nabavi *et al.* (2009) (15,9 mg EC /g). Todos obtiveram teores de flavonoides inferiores aos teores de fenólicos totais, resultados que estão concordantes com os obtidos neste trabalho.

Existem poucos estudos realizados nas bagas de *P. americana* L., sendo preferencialmente estudadas as folhas e raízes da mesma, o que restringe possíveis comparações entre os teores de fitoquímicos estudados.

Outra possível justificação para a diferença dos teores de flavonoides prende-se com a polaridade do solvente extrator. Zheleva-Dimitrova (2013) e Nabavi *et al.* (2009) quantificaram o teor de flavonoides a partir de extratos metanólicos, enquanto neste trabalho, usou-se uma mistura hidroalcoólica (50:50). O metanol, embora mais polar do que o etanol, apresenta menos polaridade do que a água. Por outro lado, quanto maior a cadeia carbonada de um composto menor a solubilidade em solventes polares. Como neste estudo se utilizou uma mistura hidroalcoólica, o solvente além de ter adquirido maior polaridade, favoreceu assim as ligações intramoleculares e de hidrogénio e, conseqüentemente promoveu o aumento da extração destes compostos na amostra.

Numa perspetiva futura, sugere-se que sejam realizados mais ensaios para identificar e quantificar o teor de flavonoides, recorrendo a técnicas mais rigorosas, como por exemplo, HPLC.

As saponinas são o grupo de compostos bioativos mais descritos na bibliografia, presentes nas bagas e raízes da *P. americana* L.. Contudo não foram encontradas publicações com quantificação de saponinas por espectrofotometria. Os resultados obtidos evidenciam que a sua concentração é significativamente superior aos teores dos outros compostos estudados (Tabela 2 e Figura 16).

A importância desta classe de metabolitos secundários é responsável do seu uso a nível industrial, apresentando uma ampla utilização nas áreas alimentares, têxtil e cosmética, além das suas propriedades biológicas já previamente referidas, incluindo ação antiplaquetária, hipocolesterolémica antitumoral, antivírica, imunoadjuvante, anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica e leishmanicida (Yendo *et al.*, 2010).

Mediante os teores encontrados nas bagas de *P. americana* L. nacional e pelas propriedades biológicas supracitadas, considera-se que as saponinas e, conseqüentemente, estas bagas possam ser promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos e/ou nutracêuticos naturais.

O teor de carotenoides também foi estudado. Embora não sejam os pigmentos naturais predominantes nas bagas de *P. americana* L., mas sim as betalaínas, podem estar relacionados com o processo de desenvolvimento e maturação das mesmas, uma vez que são os únicos pigmentos que participam diretamente no processo de fotossíntese da planta (Auldrige *et al.*, 2006).

Foram quantificados os teores de clorofila *a*, clorofila *b* e os dois carotenos predominantes no reino vegetal ( $\beta$ -caroteno e licopeno) e os resultados estão apresentados na tabela 3.

**Tabela 3.** Teores de clorofilas e carotenos da baga de *P. americana* L..



Carotenoides (mg/ g)			
Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	$\beta$ - Caroteno	Licopeno
12,9 $\pm$ 0,13	6,4 $\pm$ 0,01	2,4 $\pm$ 0,08	2,2 $\pm$ 0,02

\*Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão, para n=3.

Relativamente ao teor de carotenoides totais, verificou-se existir uma predominância de clorofila *a*, aproximadamente o dobro do teor de clorofila *b*. Segundo Streit *et al.* (2005) as clorofilas *a* e *b* encontram-se na natureza numa proporção de 3:1, respetivamente, e diferem nos substituintes de carbono C-3. Os teores de carotenos,  $\beta$ -caroteno e licopeno, foram muito similares e bastante inferiores aos obtidos nas clorofilas (*a* e *b*). Crê-se que este estudo tenha sido pioneiro, face à inexistência de artigos científicos que descrevam os teores de carotenoides nas bagas de *P. americana* L..

As clorofilas são os pigmentos naturais mais abundantes presentes nas plantas e ocorrem nos cloroplastos das folhas e noutros tecidos vegetais, incluindo os frutos. A sua ausência é total nas raízes da planta. Alguns estudos realizados em diferentes espécies de plantas caracterizam os pigmentos clorofílicos como predominantes, mas face à sua instabilidade, sofrem hidrólise durante o amadurecimento e maturação dos frutos. As diferenças aparentes na cor de um vegetal são devidas à presença e distribuição variável de outros pigmentos associados (carotenos, xantofilas, antocianinas e betalaínas).

Embora já se tenha referido que a coloração das bagas de *P. americana* L. é devida às betalaínas, é importante estudar os pigmentos fotossintéticos presentes na mesma, uma vez que a sua abundância varia de acordo com a espécie vegetal e também devido ao facto da clorofila *a* estar presente em todos os organismos que realizem fotossíntese.

Por outro lado, as clorofilas exercem efeitos benéficos para a saúde, pelas suas propriedades antimutagénicas e antígenotóxicas (Lila, 2004; Ferruzzi *et al.*, 2002).

Os teores de carotenos encontrados nas bagas foram pouco representativos, demonstrando, uma vez mais, que não são os pigmentos naturais predominantes nesta espécie vegetal.

Pela análise global do perfil quantitativo dos diferentes bioativos estudados, reforça-se a ideia da importância de um estudo mais exaustivo e mais abrangente, isto é, identificar e quantificar mais grupos de compostos bioativos, recorrer a outros solventes para uniformizar a base de dados dos resultados obtidos e dos já publicados noutros estudos e estudar possíveis aplicações da baga não só numa perspetiva alimentar como farmacêutica.

### **4.3. Análise da atividade antioxidante**

É do conhecimento geral que os compostos bioativos não possuem a mesma atividade antioxidante, pelo que um aumento da concentração de um determinado composto não significa um aumento proporcional da atividade antioxidante (Sanjust *et al.*, 2008). Quando se procede a uma avaliação de um extrato complexo, independentemente da natureza do solvente extrator, é necessário considerarem-se os efeitos sinérgicos ou antagónicos entre os diversos compostos presentes, o que torna não só, a atividade antioxidante dependente da concentração de cada composto, mas também da interação entre os diferentes compostos. Não se deve excluir a possibilidade de existência de outras moléculas presentes nas bagas de *P. americana* L. ainda não identificadas que possam afetar a atividade antioxidante, como por exemplo alcaloides, cumarinas, quinonas, taninos, entre outros.

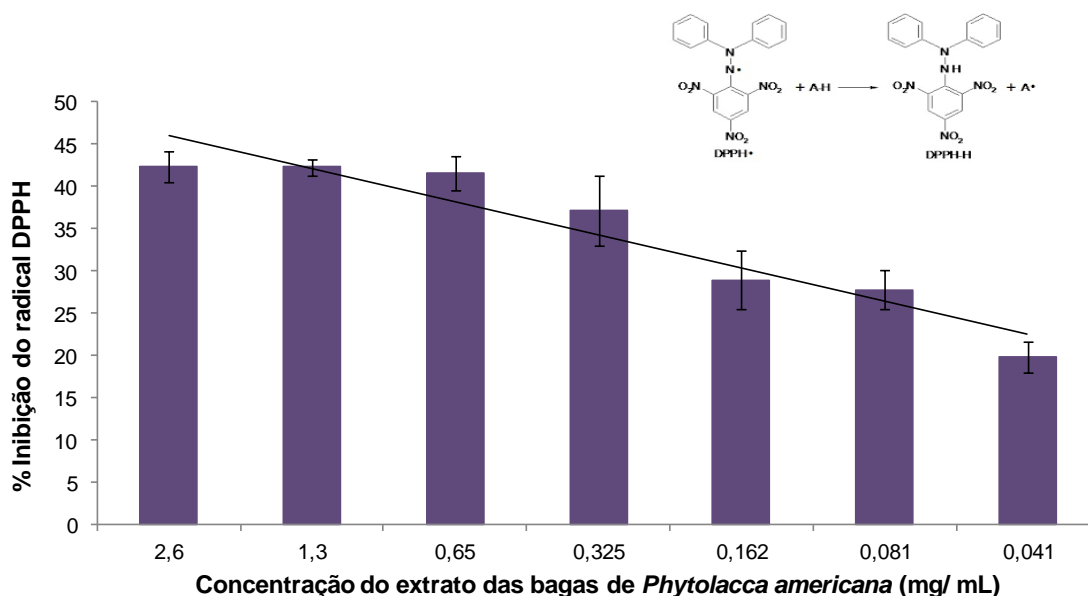
Assim, a atividade antioxidante de uma e qualquer matriz vegetal poderá sugerir a contribuição relativa da soma dos seus constituintes com ação antioxidante. Mediante os dados publicados até à data, os polifenóis, os carotenoides e a vitamina C (Egea *et al.*, 2010) parecem ser os melhores indicadores dessas ações. O desenvolvimento de novos métodos analíticos para a determinação da atividade antioxidante ou quantificação de antioxidantes específicos em matrizes complexas, como os extratos vegetais, pode ser justificado pela relevância comercial e farmacológica destes compostos, bem como pela necessidade de metodologias mais simples e económicas (Palanisamy *et al.*, 2011).

### 4.3.1. Atividade captora dos radicais DPPH\*

A avaliação da atividade antioxidante nos diferentes métodos usados foi efetuada a partir de diferentes concentrações de extrato (2,6; 1,3; 0,650; 0,325; 0,162; 0,081 e 0,041 mg/ mL) correspondendo aos fatores de diluição de 1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:74, respetivamente.

A solução de DPPH (radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) está disponível comercialmente e apresenta uma cor violeta forte (Karadag *et al.*, 2009). O radical DPPH\* na presença de antioxidantes dadores de átomos de H, como é o caso dos fenóis, ou eletrões, é reduzido formando um produto amarelo, com conseqüente diminuição da absorvência. Quando existem compostos antioxidantes na solução, esta coloração perde a sua intensidade ou desaparece. O DPPH\* é convertido em hidrazina, de cor amarela pálida, resultando numa diminuição da absorvência entre 515 e 528 nm, até valores constantes.

Como é possível constatar, através da Figura 17, a atividade antioxidante é diretamente proporcional à concentração de extrato de bagas de *P. americana* L., sendo que o extratos com maior atividade antioxidante (42,4 e 42,3%) foram os mais concentrados, correspondentes a 2,6 mg/ mL e 1,3 mg/ mL, respetivamente.



**Figura 17:** Percentagem de inibição do radical DPPH\* em função das diferentes concentrações dos extratos hidroalcoólicos das bagas de *P. americana* L.

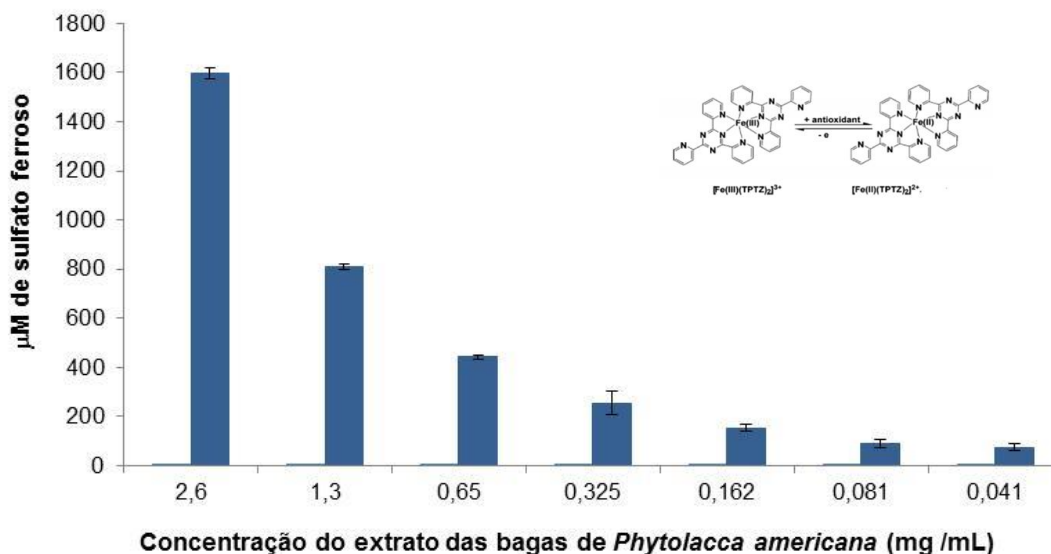
Devido aos valores obtidos serem inferiores a 50% da percentagem de inibição, não foi possível apresentar os resultados na forma de IC<sub>50</sub>, que corresponde à concentração do antioxidante necessária para reduzir em 50% o radical DPPH•, sendo que quanto menor o IC<sub>50</sub>, maior a atividade antioxidante da matriz estudada (Negri *et al.*, 2009). Por este motivo, torna-se impossível fazer uma comparação direta com os valores já descritos noutros estudos. Existem poucos estudos sobre a atividade antioxidante da baga de *P. americana* L. No entanto, para o mesmo método antioxidante, recorrendo a extratos metanólicos, Zheleva-Dimitrova (2013) obteve um IC<sub>50</sub> de 412,06 µg/ mL no extrato das bagas de *P. americana* L., substancialmente superior ao ensaio controlo usando o antioxidante sintético BHT (64,76 µg/ mL). Já Nabavi *et al.* (2009) referiram um IC<sub>50</sub> de 62,0 µg/ mL para a amostra contra um IC<sub>50</sub> de 53,96 µg/ mL obtido no antioxidante sintético BHA. Embora os resultados descritos e os obtidos neste trabalho não demonstrem uma elevada atividade antioxidante, não significa que as bagas não a possuam. Não se deve omitir que o método DPPH• apresenta bastantes interferências e, muitas das vezes os resultados não são reproduzíveis quando avaliados apenas por esta metodologia, sendo sempre necessário recorrer a outras metodologias para avaliar a atividade antioxidante.

#### **4.3.2. Poder antioxidante por redução do ião férrico (FRAP)**

Os métodos de inibição do DPPH• e FRAP, apresentam mecanismos diferentes de ação responsáveis pela determinação da capacidade antioxidante (Huang *et al.*, 2005) e as interações entre os compostos presentes na matriz estudada podem condicionar os resultados finais (Yuksel *et al.*, 2010).

O método de FRAP baseia-se na redução, em meio ácido, de um complexo férrico de TPTZ (2,4,6- tripiridil-s-triazina) a um complexo ferroso de TPTZ com uma forte coloração azul escura. Quanto maior for a capacidade antioxidante da amostra, maior será a produção do complexo ferroso de TPTZ, podendo ser monitorizado através da leitura da absorvência a um comprimento de onda de 595 nm (Huang *et al.*, 2005).

O poder antioxidante por redução do ião férrico (FRAP) foi avaliado e os resultados apresentam-se na Figura 18.



**Figura 18:** Determinação da atividade antioxidante pelo método FRAP (expresso em  $\mu\text{M}$  de equivalentes sulfato ferroso).

Pela observação da Figura 18 pode-se verificar que existe uma relação proporcional entre a atividade antioxidante e as diferentes concentrações de extrato, ou seja, a atividade antioxidante decresce proporcionalmente com a diminuição de concentração de extrato. Pode ser observado um declive muito pequeno na reta de calibração de sulfato ferroso (Figura 15, Capítulo 3), levando a variações de sinal muito baixas para pequenas diferenças de concentração. Por esse facto, para concentrações muito baixas, cujas absorvências são inferiores a 0,2, não existe uma grande diferença de sinal relativamente a outras concentrações próximas. No entanto, é aplicado um fator de diluição considerável, induzindo a valores de equivalentes de sulfato ferroso muito superiores aos espectáveis e fora da linearidade. Uma vez mais, devido à limitação de publicações sobre esta matriz, mais estudos devem ser efectuados, uma vez que até à data nenhum autor realizou este procedimento analítico.

Pelo referido, não parece ser possível comparar a capacidade antioxidante da baga por este método. No entanto, sugere-se que, futuramente, sejam realizados mais estudos sobre a atividade antioxidante, recorrendo a vários métodos, uma vez que, para cada método usado, existem vantagens e desvantagens em recorrer a um só, nomeadamente, à simplicidade da metodologia, instrumentação necessária, mecanismos, método de quantificação, interferências e relevância biológica (Niki, 2010).



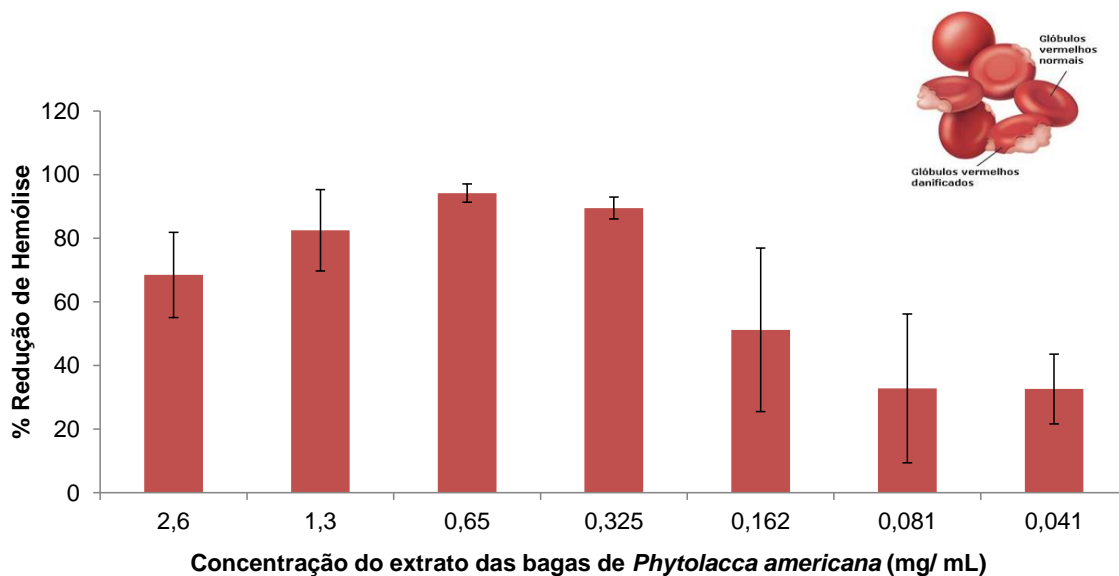
### 4.3.3. Avaliação da atividade hemolítica induzida pelo AAPH

Os eritrócitos constituem um sistema celular adequado para o estudo *in vitro* quer dos efeitos de radicais livres e espécies oxidantes nas membranas biológicas, quer para estudar o efeito protetor exercido pelos diferentes compostos bioativos nos mesmos, em virtude da sua simplicidade estrutural, acessibilidade e vulnerabilidade dos constituintes ao processo de oxidação. As principais estruturas eritrocitárias afetadas pelas espécies oxidantes são os constituintes membranares e a hemoglobina. Pretendeu-se assim estudar o papel protetor dos extratos aquosos obtidos das bagas de *P. americana* L. relativamente aos danos oxidativos induzidos por radicais livres em eritrócitos humanos. O AAPH foi utilizado neste estudo como sistema gerador de radicais livres. Os danos oxidativos foram avaliados pela percentagem de hemólise. A taxa de hemólise de eritrócitos incubados depende do tempo de incubação, da presença de agentes promotores de stresse oxidativo e da presença de agente antioxidantes. Estudou-se o efeito de inibição da hemólise promovida pelo oxidante AAPH em diferentes concentrações de extratos de bagas de *P. americana* L., após 4h de incubação a 37°C. As concentrações utilizadas foram 2,6; 1,3; 0,65; 0,325; 0,162; 0,081 e 0,041 mg/ mL, as mesmas usadas nos outros métodos antioxidantes estudados. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4 e Figura 19, respetivamente.

**Tabela 4.** Inibição da hemólise (%) induzida por AAPH.

Concentração do Extrato (mg/ mL)	Redução de Hemólise (%)
2,6	68,5 ± 13,4
1,3	82,6 ± 12,8
0,650	94,2 ± 2,84
0,325	89,5 ± 3,47
0,162	51,2 ± 25,7
0,081	32,8 ± 23,3
0,041	32,6 ± 11,0

\*Os valores são apresentados como média ± desvio padrão (n=5).



**Figura 19:** Redução de hemólise induzida por AAPH (%).

De forma a elucidar a importância biológica da atividade antioxidante da espécie *P. americana* L., concretamente as bagas, foi usado neste estudo um modelo celular baseado no eritrócito humano. O dano oxidativo induzido pelo oxidante AAPH nos eritrócitos humanos tem sido largamente estudado como modelo para o dano peroxidativo nas membranas biológicas.

Ao fim do período de incubação verificou-se um efeito protetor do extrato em todas as concentrações estudadas, atingindo um valor máximo de inibição de hemólise na concentração de extrato de 0,65 mg/ mL. Tanto para concentrações mais baixas como mais altas a referida percentagem de redução de hemólise vai diminuindo, no entanto, de uma maneira geral, poder-se-á dizer que todas as concentrações estudadas conferiram proteção nas membranas eritrocitárias.

As bagas, juntamente com a raiz e folhas da *P. americana* L. contêm saponinas, cuja atividade hemolítica está bem descrita. Este trabalho mostrou que a ingestão de saponinas em concentrações relativamente baixas não apresenta efeitos nocivos ao metabolismo. Isso justifica e vai ao encontro do que é referido por muitos autores sobre o efeito antioxidante e pró-oxidante dos compostos antioxidantes. Alguns estudos provam que estes compostos quando presentes em concentrações elevadas podem comportar-se como pró-oxidantes, tanto *in vitro* como *in vivo*, conduzindo à formação de peróxido de hidrogénio, do radical hidroxilo e do anião superóxido (Forester e Lambert, 2011; Ling *et al.*, 2010; Shiva *et al.*, 2007; Schwartz, 1996).

Tanto quanto sabemos, este é o primeiro estudo a avaliar o potencial antioxidante na espécie *P. americana* L. neste modelo celular. No entanto, mais estudos devem ser

conduzidos para comprovar a atividade antioxidante da baga desta planta, bem como avaliar o efeito sinérgico dos diferentes compostos bioativos na capacidade de sequestro dos radicais livres.

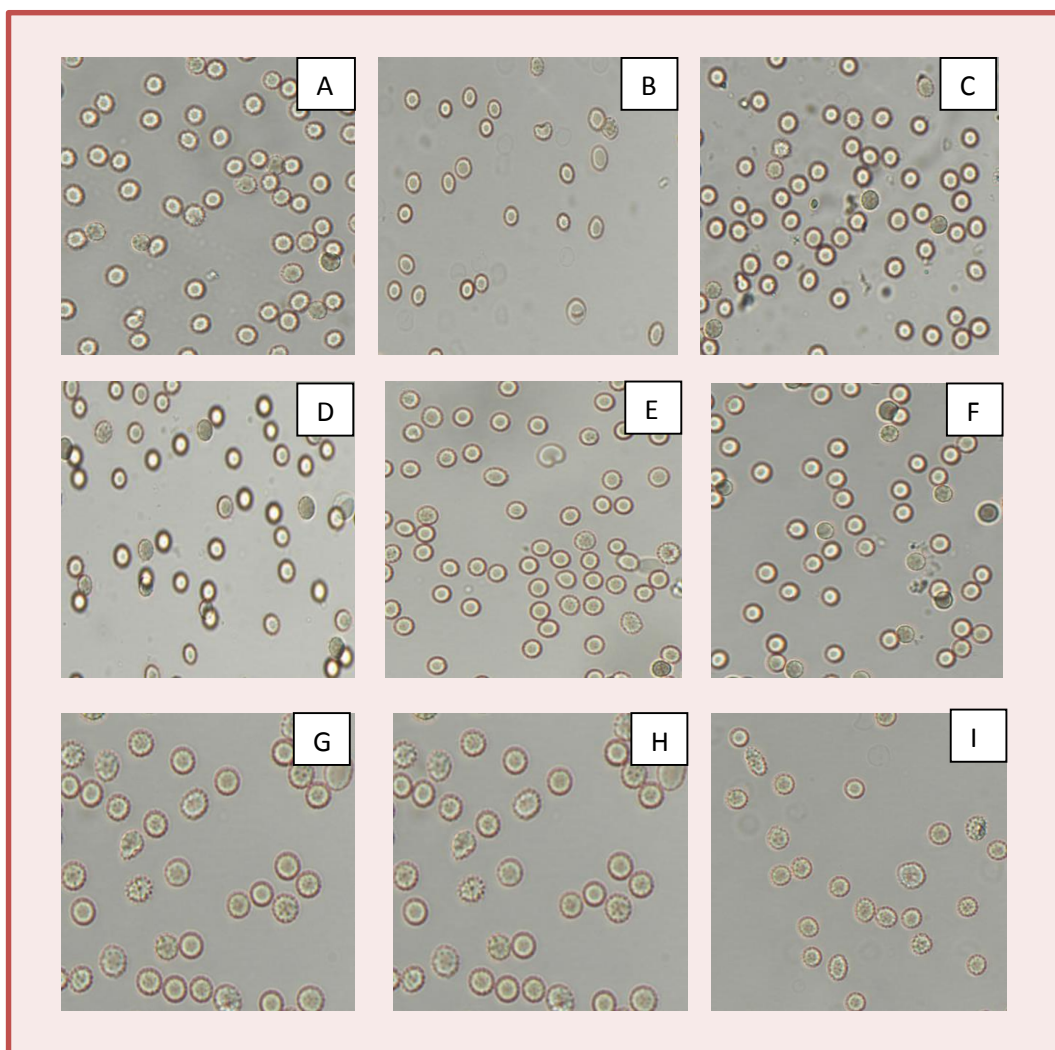
#### **4.3.4. Análise morfológica dos eritrócitos**

Quando sujeitos a stresse oxidativo, os eritrócitos sofrem alterações morfológicas, que se podem manifestar pela lise das células.

Analisou-se ao microscópio ótico o efeito do stresse oxidativo iniciado por AAPH na morfologia dos eritrócitos, bem como a influência dos extratos das bagas de *P. americana* L.

A análise morfológica dos eritrócitos revelou o efeito oxidante do AAPH, dada a presença de células fantasma (ghost cells) e uma menor quantidade de células no controlo positivo, quando comparado com o controlo negativo.

O extrato de baga de *P. americana* L. teve um efeito protetor contra a lise dos eritrócitos, nas concentrações mais elevadas diminuindo com a diminuição da concentração de extrato (Figura 20).



**Figura 20:** Visualização microscópica da Inibição hemolítica das bagas de *P. americana* L., nas várias concentrações estudadas. Controlo negativo (A); Controlo positivo (B); Concentrações de baga de *P. americana* L. estudadas: 2,6 mg/ mL (C); 1,3 mg/ mL (D); 0,65 mg/ mL (E); 0,325mg/ mL (F); 0,163 mg/ mL (G); 0,081 mg/ mL (H); 0,041 mg/ mL (I).

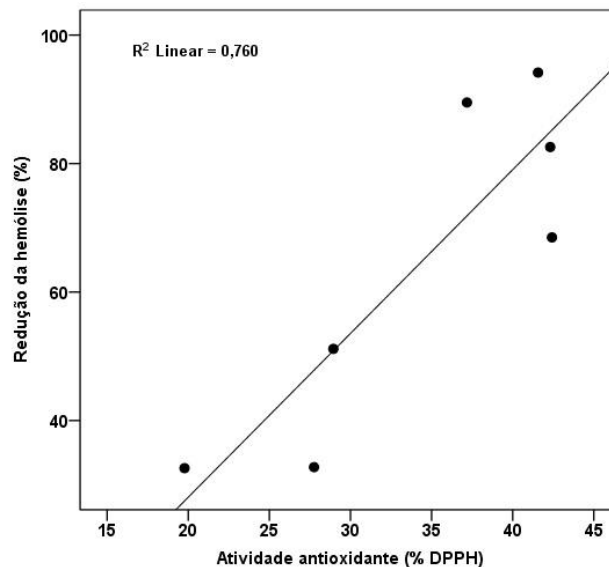
Outro facto a ser avaliado neste estudo foi a interferência das saponinas, o seu comportamento anfifílico e a ação sobre membranas celulares, o que pode alterar a permeabilidade ou até mesmo levar à sua destruição (Schenkel *et al.*, 2001). Relacionadas com essa ação sobre membranas, estão as atividades hemolíticas, ictiotóxica e moluscicida. No entanto, neste estudo verificou-se que as concentrações de saponinas nos extratos não provocaram hemólise.

#### 4.4. Correlação entre as atividades antioxidantes

De modo a interligar os resultados obtidos efetuou-se uma correlação de atividades antioxidantes estudadas.

##### 4.4.1. Correlação entre a atividade antioxidante (DPPH) e a redução da hemólise

A Figura 21 apresenta os valores da correlação de Spearman ( $R^2$ ) para os dois ensaios da atividade antioxidante, DPPH e redução da hemólise, analisando a correlação verificada.

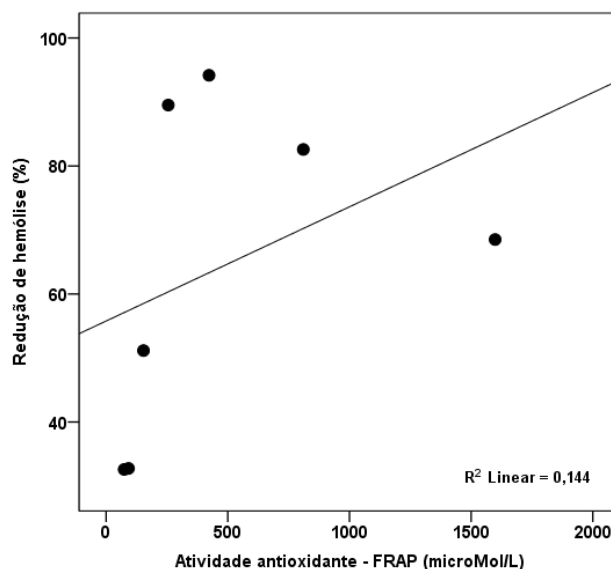


**Figura 21:** Correlação entre a redução da hemólise e a atividade antioxidante (método DPPH).

Verificou-se existir uma correlação significativa ( $R^2 = 0,760$ ;  $p < 0,05$ ). Assim pode referir-se uma correlação entre os teores de fitoquímicos das bagas de *P. americana* L. e, conseqüentemente, uma relação positiva entre a atividade antioxidante e a proteção das membranas eritrocitárias.

#### 4.4.2. Correlação entre atividade antioxidante (FRAP) e a redução da hemólise

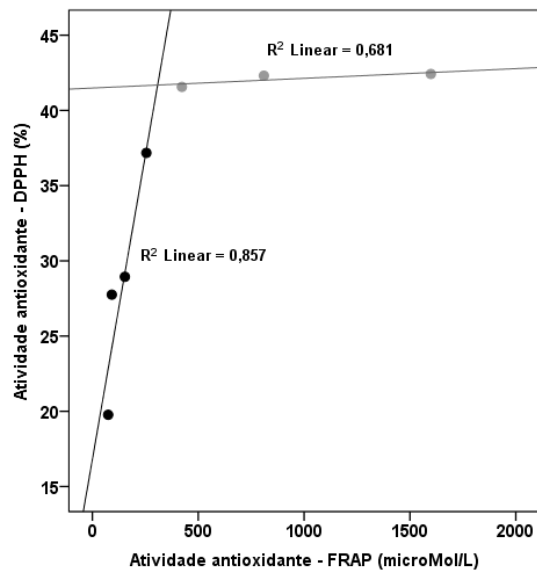
A Figura 22 apresenta os valores da correlação de Spearman ( $R^2$ ) para os dois ensaios da atividade antioxidante, FRAP e redução de hemólise. Não se encontrou uma correlação significativa entre estas duas variáveis ( $R^2 = 0,144$ ;  $p > 0,05$ ).



**Figura 22:** Correlação entre a redução da hemólise e a atividade antioxidante (método FRAP).

#### 4.4.3. Correlação entre as atividades antioxidantes DPPH e FRAP

A Figura 23 apresenta os valores da correlação de Spearman ( $R^2$ ) entre os dois métodos estudados, DPPH e FRAP. Através da análise estatística verificaram-se correlações significativas entre ambos os métodos, sendo mais significativa entre valores de atividade antioxidante mais baixas ( $R^2 = 0,857$ ;  $p < 0,05$ ), face aos valores mais elevados ( $R^2 = 0,681$ ;  $p < 0,05$ ).



**Figura 23:** Correlação entre as atividades antioxidantes medidas pelos métodos DPPH e FRAP.

Estes trabalhos indicam que são necessários mais estudos, quer *in vitro* quer *in vivo*, para melhor compreender os efeitos antioxidantes das bagas de *P. americana* L..

## **5. Conclusão**

---



O stresse oxidativo parece estar envolvido na maioria das doenças crónicas tais como, cancro, doenças degenerativas e doenças cardiovasculares, cuja taxa de mortalidade tem vindo a aumentar. Os antioxidantes, ou compostos bioativos, provenientes de fontes naturais são particularmente importantes na luta contra essas doenças uma vez que conferem proteção contra os danos induzidos pelos radicais livres nas proteínas, lípidos e ADN celular.

O planeamento e implementação de planos de gestão de áreas territoriais por plantas invasoras são, frequentemente, processos morosos, muito dispendiosos e por vezes sem sucesso. Por esses motivos, surge o interesse acrescido de estudar e, hipoteticamente valorizar as “indesejadas” plantas invasoras.

A *Phytolacca americana* L. é uma espécie invasora, adaptável ao clima mediterrânico e cuja distribuição em território nacional está bem implementada. Pelos dados bibliográficos obtidos e pela sua riqueza em compostos bioativos, surgiu interesse em efetuar um estudo preliminar de caracterização de alguns compostos bioativos nas bagas desta planta e os seus efeitos como agentes antioxidantes.

Os resultados obtidos mostraram que as bagas de *P. americana* L. são ricas em saponinas, compostos fenólicos e flavonoides. Os carotenoides também foram quantificados, numa perspetiva inovadora, não só pelas suas reconhecidas funções biológicas, mas também numa perspetiva de avaliar o grau de maturação do fruto, como base para estudos futuros.

O estudo da atividade antioxidante recorreu a diferentes metodologias. Provou-se que as bagas apresentam uma atividade antioxidante considerável. A percentagem de hemólise foi aqui reportada pela primeira vez, tendo-se concluído que as concentrações de compostos antioxidantes podem influenciar o efeito protetor nos eritrócitos, ou seja, o efeito pró-oxidante dos compostos bioativos pode existir, se ingeridos em elevadas quantidades.

São sugeridos mais estudos, nomeadamente na caracterização e avaliação do potencial antioxidante da *P. americana* L.. No entanto, este trabalho vem dinamizar o interesse de plantas pouco valorizadas, mas que podem ser fontes naturais de compostos fitoquímicos com interesse para a indústria alimentar, farmacêutica e cosmética.

## **6. Bibliografia**

---

- Ahmad E, Kamranur Rahman S, Masood Khan J, Varshney A, Hasan Khan R. *Phytolacca americana* lectin (Pa-2; pokeweed mitogen): an intrinsically unordered protein and its conversion into partial order at low pH. *Biosci Rep.* 2009, 30(2): 125-134.
- Albanes D, Heinonen OP, Huttunen JK, Taylor PR, Virtamo J, Edwards BK, Haapakoski J, Rautalahti M, Hartman A, Palmgren J, Greenwald P. Effects of alpha-tocopherol and beta-carotene supplements on cancer incidence in the alpha-tocopherol beta-carotene cancer prevention study. *Am J Clin Nutr.* 1995, 62(6): 1427S-1430S.
- Almeida J, Freitas H. Exotic flora of continental Portugal – a new assessment. *Bocconea.* 2012, 2: 231-237.
- Alves R, Costa A, Jerez M, Casal S, Sineiro J, Nunez M, Oliveira B. Antiradical activity, phenolics profile, and hydroxymethylfurfural in espresso coffee: influence of technological factors. *J Agric Food Chem.* 2010, 58(23): 12221-12229.
- Aron GM, Irvin JD. Inhibition of herpes simplex virus multiplication by the pokeweed antiviral protein. *Antimicrob Agents and Chemother.* 1980, 17(6): 1032-1033.
- Aub JC, Tieslau C, Lankester A. Reactions of normal and tumor cells surfaces to enzymes. I- Wheat-germ lipase is associated mucopolysaccharides. *Proc Natl Acad Sci.* 1963, 50: 613-619.
- Auldridge M, McCarty D, Klee H. Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Curr Opin Plant Biol.* 2006, 9(3): 315-321.
- Azeredo M. Original article Betalains: properties, sources, applications, and stability – a review. *Int J Food Sci Tech.* 2009, 44: 2365–2376.
- Barbieri L, Zamboni M, Lorenzoni E, Montanaro L, Sperti S, Stirpe F. Inhibition of protein synthesis in vitro by proteins from the seeds of *Momordica charantia* (bitter pear melon). *Biochem J.* 1980, 186(2): 443-452.
- Barnett B. Toxicity of pokeberries (fruit of *Phytolacca americana* large) for turkey poults. *Poult Sci.* 1975, 54(4): 1215-1217.
- Barros L, Carvalho A, Ferreira I. Comparing the composition and bioactivity of *Crataegus monogyna* flowers and fruits used in folk medicine. *Phytochem Anal.* 2011, 22: 181-188.
- Baskaran P, Moyo M, Van Staden J. In vitro plant regeneration, phenolic compound production and pharmacological activities of *Coleonema pulchellum*. *S African J Bot.* 2014, 90: 74-79.
- Benzie I, Strain J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP Assay. *Anal Biochem.* 1996, 239: 70- 76.

- Boo H-O, Hwang S-J, Bae C-S, Park S-H, Heo B-G, Gorinstein S. Extraction and characterization of some natural plant pigments. *Ind Crop Prod.* 2012, 40: 129-135.
- Bouvier F, Dogbo O, Camara B. Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). *Science (New York, NY)*. 2003, 300(5628): 2089-2091.
- Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol.* 1995, 28: 25-30.
- Brockington S, Walker R, Glover B, Soltis P, Soltis D. Complex pigment evolution in the *Caryophyllales*. *New Phytol.* 2011, 190(4): 854-864.
- Burrows G, Tyrl R. Toxic plants of North America. IA State University Press: Ames, IA. 2001, 857-861.
- Bylka W, Matlawska I. Flavonoids and free phenolic acids from *Phytolacca americana* L. leaves. *Acta Pol Pharm.* 2001, 58(1): 69-672.
- Chandrasekhar J, Sonika G, Madhusudhan M, Raghavarao K. Differential partitioning of betacyanins and betaxanthins employing aqueous two phase extraction. *J Food Process Eng.* 2015,144: 156-163.
- Cheeke P. Actual and Potential Applications of *Yucca Schidigera* and *Quillaja Saponaria* Saponins in Human and Animal Nutrition. In: Oleszek W, Marston A, editors. Saponins in Food, Feedstuffs and Medicinal Plants. Proceedings of the Phytochemical Society of Europe. 45: Springer Netherlands. 2000, 241-254.
- Chen S, Nien S, Wu C, Liu C, Chang Y, Lin Y. Reappraisal of the anticancer efficacy of quercetin in oral cancer cells. *J Chin Med Assoc.* 2013, 76(3): 146-152.
- Cheok C, Salman H, Sulaiman R. Review: Extraction and quantification of saponins: A review. *Food Rev Int.* 2014, 59: 16-40.
- Clement J, Mabry T. Pigment evolution in the *Caryophyllales*: a systematic overview. *Bot Acta.* 1996, 109(5): 360-367.
- Clifford T, Howatson G, West D, Stevenson E. The potential benefits of red beetroot supplementation in health and disease. *Nutrients.* 2015, 7: 2801-2822.
- Costa A, Alves R, Vinha A, Barreira S, Nunes M, Cunha L, Oliveira B. Optimization of antioxidants extraction from coffee silverskin, a roasting by-product, having in view a sustainable process. *Ind Crop Prod.* 2014, 53: 350-357.
- Cui B, Liu S, Wang Q, Lin X. Effect of beta-carotene on immunity function and tumour growth in hepatocellular carcinoma rats. *Molecules.* 2012, 17(7): 8595-603.

- Das J, Das S, Paul A, Samadder A, Khuda-Bukhsh AR. Strong anticancer potential of nano-triterpenoid from *Phytolacca decandra* against A549 adenocarcinoma via a Ca<sup>(2+)</sup>-dependent mitochondrial apoptotic pathway. *J Acupunct Meridian Stud.* 2014, 7(3): 140-150.
- Delgado-Vargas F, Jimenez A, Paredes-Lopez O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains--characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2000, 40(3): 173-289.
- Dickancaite E, Nemeikaite A, Kalvelyte A, Cenas N. Prooxidant character of flavonoid cytotoxicity: structure-activity relationships. *Biochem Mol Biol Int.* 1998, 45(5): 923-930.
- Ding L-J, Ding W, Zhang Y-Q, Luo J-X. Bioguided fractionation and isolation of esculentoside P from *Phytolacca americana* L. *Ind Crop Prod.* 2013, 44: 534-541.
- Dini I, Tenore G, Dini A. Saponins in *Ipomoea batatas* tubers: Isolation, characterization, quantification and antioxidant properties. *Food Chem.* 2009, 113(2): 411-419.
- Dutta D, Chaudhuri U, Chakraborty R. Structure, health benefits, antioxidant property and processing and storage of carotenoids. *Afr J Biotechnol.* 2005, 4(13): 1510-1520.
- Ebrahimzadeh M, Nabavi SM, Nabavi S, Bahramian F, Bekhradnia A. Antioxidant and free radical scavenging activity of *H. officinalis* L. var. *angustifolius*, *V. odorata*, *B. hyrcana* and *C. speciosum*. *Pak J Pharm Sci.* 2010, 23(1): 29-34.
- Edge R, McGarvey D, Truscott T. The carotenoids as anti-oxidants-a review. *J Photochem Photobiol B.* 1997, 41(3): 189-200.
- Egea I, Sanchez-Bel P, Romojaro F, Pretel M. Six edible wild fruits as potential antioxidant additives or nutritional supplements. *Plant Foods Hum Nutr.* 2010, 65(2): 121-129.
- Esatbeyoglu T, Wagner AE, Schini-Kerth V, Rimbach G. Betanin - a food colorant with biological activity. *Mol Nutr Food Res.* 2015, 59(1): 36-47.
- Fahey J, Stephenson K, Dinkova-Kostova A, Egnér P, Kensler T, Talalay P. Chlorophyll, chlorophyllin and related tetrapyrroles are significant inducers of mammalian phase 2 cytoprotective genes. *Carcinogenesis.* 2005, 26(7): 1247-1255.
- Fernandes J, Eaton P, Nascimento H, Gião M, Ramos O, Belo L, Santos-Silva A, Pintado M, Malcata F. *Carbohydr Polym.* 2010, 79(4): 1101-1106.
- Ferruzzi M, Böhm V, Courtney P, Schwartz S. Antioxidant and antimutagenic activity of dietary chlorophyll derivatives determined by radical scavenging and bacterial reverse mutagenesis assays. *J Food Sci.* 2002, 67(7): 2589-2595.

- Fiedor J, Burda K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients*. 2014, 6(2): 466-488.
- Forester S, Lambert J. The role of antioxidant versus pro-oxidant effects of green tea polyphenols in cancer prevention. *Mol Nutr Food Res*. 2011, 55(6): 844-854.
- Formica J, Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 1995, 33(12): 1061-1080.
- Fowler MW. Plants, medicines and man. *J Sci Food Agr*. 2006, 86(12): 1797-1804.
- Fraser P, Bramley P. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res*. 2004, 43(3): 228-265.
- Fu X, Dou C, Chen Y, Chen X, Shi J, Yu M, Xu J. Subcellular distribution and chemical forms of cadmium in *Phytolacca americana* L. *J Hazard Mater*. 2011, 186: 103-107.
- Galano A, Vargas R, Martinez A. Carotenoids can act as antioxidants by oxidizing the superoxide radical anion. *Phys Chem Chem Phys*. 2010, 12(1): 193-200.
- Galarraga M E, Mitaine-Offer A, Lacaille-Dubois M, Amaro-Luis J, Rojas L, Miyamoto T, Pouységu L, Quideau S, Rojas L, Lacaille-Dubois M. Triterpene saponins from the fruits of *Phytolacca rugosa* (Phytolaccaceae). *Nat Prod Commun*. 2010, 5(5): 775-776.
- Gandia-Herrero F, Escribano J, Garcia-Carmona F. Betaxanthins as pigments responsible for visible fluorescence in flowers. *Planta*. 2005, 222(4): 586-593.
- Gao L, Peng K, Xia Y, Wang G, Niu L, Lian C, et al. Cadmium and manganese accumulation in *Phytolacca americana* L. and the roles of non-protein thiols and organic acids. *Int J Phytoremediat*. 2013, 15(4): 307-319.
- Geetha S, Ram M, Sharma S, Ilavazhagan G, Banerjee P, Sawhney R. Cytoprotective and antioxidant activity of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) flavones against tert-butyl hydroperoxide-induced cytotoxicity in lymphocytes. *J Med Food*. 2009, 12(1): 151-158.
- Getiya M, Gabelaya M, Mshvildadze V, Pichette A, Lavoie S, Dekanosidze G. A new triterpene glycoside from fruit of *Phytolacca americana*. *Chem Nat Compd*. 2011, 47(5): 764-766.
- Gokhale S, Lele S. Betalain Content and Antioxidant Activity of *Beta vulgaris*: Effect of Hot Air Convective Drying and Storage. *J Food Process Preserv*. 2014, 38(1): 585-590.

- Goldberg, I. Functional foods: designer foods, pharmafoods, nutraceuticals. New York: Chapman & Hall. 1994, 406.
- Gonçalves L, Marcato A, Rodrigues A, Pagano A, Freitas B, Machado C, Nakashima K, Esteves L, Lopes N, Bastos E. Betalains: From the colors of beetroots to the fluorescence of flowers. *Rev Virtual Quim.* 2015, 7(1): 292-309.
- Gonçalves L, Trassi M, Lopes N, Dörr F, Santos M, Baader W, Oliveira V, Bastos E. A comparative study of the purification of betanin. *Food Chem.* 2012, 131(1): 231-238.
- Guedes A, Gião M, Seabra R, Silva-Ferreira A, Tamagnini P, Moradas-Ferreira P, Malcata F. Evaluation of the antioxidant activity of cell extracts from microalgae. *Mar Drugs.* 2013, 11(4): 1256-1270.
- Gulcin I, Buyukokuroglu M, Kufrevioglu O. Metal chelating and hydrogen peroxide scavenging effects of melatonin. *J Pineal Res.* 2003, 34: 278–281.
- Gunhan E, Swe M, Palazoglu M, Voss J, Chalupa L. Expression and purification of cysteine introduced recombinant saporin. *Protein Expr Purif.* 2008, 58: 203–209.
- Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochem.* 2000, 55(6): 481-504.
- Harkness R, Bratman S, Louis M. *Mosby's Handbook of Drug-Herb and Drug-Supplement Interactions.* Mosby: London. 2003, 256-258.
- Harlev E, Nevo E, Lansky EP, Lansky S, Bishayee A. Anticancer attributes of desert plants: a review. *Anti-cancer Drugs.* 2012, 23(3): 255-271.
- He J, Ma J, Lai D-W, Zhang Y-m, Sun W-J. A new triterpenoid saponin from the roots of *Phytolacca acinosa*. *Nat Prod Rep.* 2011, 25(18): 1771-1775.
- Heim K, Tagliaferro A, Bobilya D. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem.* 2002, 13(10): 572-584.
- Heinrich M, Branes J, Gibbons S, Williamson JM. *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy.* Churchill Livingstone: Edinburgh. 2004, 859-865.
- Helaly F, Soliman H, Soheir A, Ahmed A. Controlled release of migration of molluscicidal saponin from different types of polymers containing *Calendula officinalis*. *Adv Polym Tech.* 2001, 20(4): 305-311.
- Hellmann J, Byers J, Bierwagen B, Dukes J. Five Potential Consequences of Climate Change for Invasive Species. *Conserv Biol.* 2008, 22(3): 534-543.

- Hosseinimehr S, Pourmorad F, Shahabimajd N, Shahrbandy K, Hosseinzadeh R. In vitro antioxidant activity of *Polygonum hyrcanicum*, *Centaurea depressa*, *Sambucus ebulus*, *Mentha spicata* and *Phytolacca americana*. Pak J Biol Sci. 2007, 10(4): 637-640.
- Hsu C, Yang C, Chen C, Chao P, Hu S. Effects of chlorophyll-related compounds on hydrogen peroxide induced DNA damage within human lymphocytes. J Agric Food Chem. 2005, 53(7): 2746-2750.
- Huang D, Ou B, Prior RL. Chemistry behind antioxidant capacity assays. J Agric Food Chem. 2005, 53(6):1841–1856.
- Huang K. The pharmacology of Chinese herbs; CRC Press: Boca Raton, FL. 1999, 233-238.
- Iwakiri T, Mase S, Murakami T, Matsumoto M, Hamada H, Nakayama T, Ozaki S-I. Glucosylation of hydroxyflavones by glucosyltransferases from *Phytolacca americana*. J Mol Catal B Enzym Enzymatic. 2013, 90: 61-65.
- Jerz G, Skotzki T, Fiege K, Winterhalter P, Wybraniec S. Separation of betalains from berries of *Phytolacca americana* by ion-pair high-speed counter-current chromatography. J Chromatogr A. 2008, 1190(1–2): 63-73.
- Kandaswami C, Middleton E. Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. Adv Exp Med Biol. 1994, 366: 351-376.
- Karadag A, Ozcelik B, Saner S. Review of methods to determine antioxidant capacities. Food Anal Method. 2009, 2: 41-60.
- Karami M, Majd N, Saeidnia S, Omrani N. The hepatotoxicity of aqueous methanol extract and fractionated-methanol extract of *Phytolacca americana* in male rat using perfusion method. J Shahrekord Univ Med Sci. 2007, 9(1): 1-9.
- Karunamoorthi K, Bishaw D, Mulat T. Laboratory evaluation of Ethiopian local plant *Phytolacca dodecandra* extract for its toxicity effectiveness against aquatic macroinvertebrates. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2008, 12(6): 381-386.
- Kim Y, Hwang JW, Sung SH, Jeon YJ, Jeong JH, Jeon BT, Moon SH, Park PJ. Antioxidant activity and protective effect of extract of *Celosia cristata* L. flower on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative hepatotoxicity. Food Chem. 2015, 168: 572-579.
- Kim Y, Johnson J, Lee E. Phytotoxic effects and chemical analysis of leaf extracts from three *Phytolaccaceae* species in South Korea. J Chem Ecol. 2005, 31(5): 1175-1186.



- Kino M, Yamaguchi K, Umekawa H, Funatsu G. Purification and characterization of three mitogenic lectins from the roots of pokeweed (*Phytolacca americana*). *Biosci Biotechnol Biochem.* 1995, 59: 683–688.
- Kotake-Nara E, Nagao A. Absorption and metabolism of xanthophylls. *Mar Drugs.* 2011, 9: 1024–1037.
- Kloos H, Mccullough F. Plant Molluscicides. In: A. Lemma, D. Heyneman, S.M. Silangwa, Eds. *Phytolacca dodecandra* (Endod) Dublin, Ireland: Tycooly International Publishing Ltd; 1984.
- Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Scientific World Journal.* 2013, 1-16.
- Kuno T, Tsukamoto T, Hara A, Tanaka T. Cancer chemoprevention through the induction of apoptosis by natural compounds. *J Biophys Chem.* 2012, 3(2): 156-173.
- Kunwar A, Priyadarsini K. Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. *J Hist Med Allied Sci.* 2011, 1(2): 53-60.
- Lanfer-Marquez U. O papel da clorofila na alimentação humana: uma revisão. *Rev Bras Cienc Farm.* 2003, 39: 227-242.
- Lee WJ. The prospects of vitamin C in cancer therapy. *Immune Netw.* 2009, 9(5): 147-152.
- Lei nº 565/99 “D.R. Série A” 295 (21-12-1999)
- Lila, M. Plant pigments and human health. In: Davis, S. Plant pigments and their manipulation. Oxford: CRC Press/Blackwell Publ. 2004, 248-274.
- Lin J, Tang CH. 2007. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chem.* 2007, 101(1): 140-147.
- Ling L, Palanisamy U, Cheng H. Prooxidant/antioxidant ratio (ProAntidex) as a better index of net free radical scavenging potential. *Molecules.* 2010, 15(11): 7884-7892.
- Liu J, Zhu P, Zhao C, Sui S, Dong Z, Zhang L. Study on the dyeing of wool fabrics with *Phytolacca* berry natural dyes. *Fiber Polym.* 2014, 15(8): 1601-1608.
- Liu R. Health-promoting components of fruits and vegetables in the diet. *Adv Nutr.* 2013, 4(3): 384S-392S.
- Liu R. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J Nutr.* 2004, 134(12): 3479S-3485S.

- Liu R. Health benefits of fruits and vegetables are from additive and synergistic combination of phytochemicals. *Am J Clin Nutr.* 2003, 78: 517S–520S.
- Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 2010, 4(8): 118-126.
- Magrone T, Jirillo E. Influence of polyphenols on allergic immune reactions: mechanisms of action. *Proc Nutr Soc.* 2012, 71(2): 316-321.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004, 79: 727–747.
- Manach C, Hubert J, Llorach R, Scalbert A. The complex links between dietary phytochemicals and human health deciphered by metabolomics. *Mol Nutr Food Res.* 2009, 53(10): 1303-1315.
- Manase M. Etude chimique et biologique de saponines isolées de trois espèces malgaches appartenant aux familles des *Caryophyllaceae*, *Pittosporaceae* et *Solanaceae*. Université de Bourgogne. 2013, 12-18.
- Maness L, Goktepe I, Chen H, Ahmedna M, Sang S. Impact of *Phytolacca americana* extracts on gene expression of colon cancer cells. *Phytother Res.* 2014, 28(2): 219-223.
- Marchante, H., Marchante, E., Freitas, H., 2005. "Plantas Invasoras em Portugal – fichas para identificação e controlo." URL:  
[http://www.abae.pt/programa/EE/documentacao/plantas\\_invasoras\\_em\\_Portugal\\_fichas\\_para\\_identificacao\\_e\\_controlo\[1\].pdf](http://www.abae.pt/programa/EE/documentacao/plantas_invasoras_em_Portugal_fichas_para_identificacao_e_controlo[1].pdf)
- Melo J, Araujo TA, Castro V, Cabral D, Rodrigues M, Nascimento S, et al. Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. *Molecules.* 2010, 15(12): 8534-8542.
- Middleton E, Kandaswami C, Theoharides T. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev.* 2000, 52(4): 673-751.
- Moran-Palacio E, Zamora-Álvarez L, Stephens-Camacho N, YáñezFarías G, Virgen-Ortiz A, Martínez-Cruz O, Rosas-Rodríguez J. Antioxidant capacity, radical scavenging kinetics and phenolic profile of methanol extracts of wild plants of southern Sonora, Mexico. *Trop J Pharm Res.* 2014, 13(9): 1487-1493.
- Mortensen, A. Carotenoids: an overview. *AgroInd. Hi-Technol.* 2004, 32-33.
- Nabavi SM, Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Bahramian F. In vitro antioxidant activity of *Phytolacca americana* berries. *Pharmacologyonline* 2009, 1: 81-88.

- Negri M, Possamai J, Nakashima T. Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., secas em diferentes temperaturas. Rev Bras Farmacogn. 2009, 19: 553-556.
- Niki E. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. Free Radic Biol Med. 2010, 49: 503-515.
- Niyogi K. Safety valves for photosynthesis. Curr Opin Plant Biol. 2000, 3(6):455-460.
- Ogzewalla C, Mossberg H, Beck J, Farrington O. Studies on the toxicity of poke berries. Proc Okla Acad Sci. 1963, 43: 54-57.
- Oktay M, Gulcin I, Kufrevioglu O. Determination of *in vitro* antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. LWT-Food Sci Technol. 2003, 36(2): 263–271.
- Palanisamy U, Ling L, Manaharan T, Appleton D. Rapid isolation of geraniin from *Nephelium lappaceum* rind waste and its anti-hyperglycemic activity. Food Chem. 2011, 127(1): 21-27.
- Parlamento Europeu e Directiva do Conselho (1994). 94/36/EC. 30.6.1994. On colors for use in food stuffs. Official J. European Communities. 237: 13-29.
- Patra J, Kim E, Oh K, Kim H, Kim Y, Baek K. Antibacterial effect of crude extract and metabolites of *Phytolacca americana* on pathogens responsible for periodontal inflammatory diseases and dental caries. BMC Complement Altern Med. 2014, 14: 343.
- Pavokovit D, Krsnik-Rasol M. Complex biochemistry and biotechnological production of betalains. Food Technol. Biotechnol. 2011, 49(2): 145–155.
- Pertino M, Lopez C, Theoduloz C, Schmeda-Hirschmann G. 1,2,3-triazole-substituted oleanolic Acid derivatives: synthesis and antiproliferative activity. Molecules. 2013, 18(7): 7661-7674.
- Peyrat-Maillard M, Cuvelier M, Berset C. Antioxidant activity of phenolic compounds in 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidation: Synergistic and antagonistic effects. J Am Oil Chem Soc. 2003, 80(10): 1007-1012.
- Pieroni L, Rezende F, Ximenes V, Dokkedal A. Antioxidant activity and total phenols from the methanolic extract of *Miconia albicans* (Sw.) triana leaves. Molecules. 2011, 16: 9439-9450.
- Plantas invasoras em Portugal. Distribuição geográfica da *Phytolacca americana* L., em Portugal. 2013. Disponível em <http://invasoras.pt/gallery/acacia-dealbata/>. Consultado em 10/04/2015.

- Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*. 2011, 82(4): 513-523.
- Pyrzynska K, Pękal A. Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Food Anal Method*. 2013, 17: 4288-4295.
- Rangarajan S, Sunil B, Curtis LM. Ascorbic Acid in Cancer: A Renewed Hope? *J Cancer Sci Ther*. 2014, 6: 333-336.
- Ravikiran G, Venugopal Y. *Phytolacca americana*: A Review. *Int J Res Pharma Biomed Sci*. 2011, 2: 942–946.
- Rodrigues M, Souza A, Lima J, Moura C, Geraldine R. Cinética da degradação de carotenoides e da alteração de cor do azeite de pequi submetido ao aquecimento em temperatura de fritura. *Cienc Rural*. 2013, 43(8): 1509-1515.
- Ryan KJ, Ray CG (editors). *Sherris Medical Microbiology* (4<sup>th</sup> ed.). McGraw Hill. 2004, pp. 555–562.
- Sakihama Y, Cohen M, Grace S, Yamasaki H. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*. 2002, 177(1): 67-80.
- Sakuta M. Diversity in plant red pigments: anthocyanins and betacyanins. *Plant Biotechnol Rep*. 2013, 8(1): 37-48.
- Sandhar H, Kumar B, Prasher S, Tiwari P, Salhan M, Sharma P. A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. *Sci Pharm*. 2011, 1(1): 25-41.
- Sanjust E, Mocci G, Zucca P, Rescigno A. Mediterranean shrubs as potential antioxidant sources. *Nat Prod Res*. 2008, 22(8): 689-708.
- Schenkel E, Gosmann G, Athayde M. Saponinas. In: Simões CM, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia: da planta ao medicamento* .3 ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS/Ed. UFSC. 2001, 27: 597-619.
- Schwartz JL. The dual roles of nutrients as antioxidants and prooxidants: their effects on tumor cell growth. *J Nutr*. 1996, 126(4): 1221S-1227S.
- Shabbir M, Khan M, Saeed N. Assessment of phytochemicals, antioxidant, anti-lipid peroxidation and anti-hemolytic activity of extract and various fractions of *Maytenus royleanus* leaves. *BMC Complement Altern Med*. 2013, 13: 143-156.

- Shanmugam MK, Dai X, Kumar AP, Tan BK, Sethi G, Bishayee A. Oleanolic acid and its synthetic derivatives for the prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical evidence. *Cancer Lett.* 2014, 346(2): 206-216.
- Shiva S, Subramanyam M, Vani R, Asha Devi S. In vitro models of oxidative stress in rat erythrocytes: Effect of antioxidant supplements. *Toxicol in Vitro.* 2007, 21(8): 1355-1364.
- Silva K, Vieira E, Fialho J, Carvalho L, Silva M. Potencial agronómico e teor de carotenoides em raízes de reserva de mandioca. *Cienc Rural.* 2014, 44(8): 1348-1354.
- Simić A, Manojlović D, Šegan D, Todorović M. Electrochemical Behavior and Antioxidant and Prooxidant Activity of Natural Phenolics. *Molecules.* 2007, 12(10): 2327.
- Souza C, Menezes J, Neto D, Assis J, Silva S, Druzian J. Carotenoides totais e vitamina A de cucurbitáceas do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido. *Cienc Rural.* 2012, 42(5): 926-933.
- Stintzing F, Herbach K, Mosshammer M, Carle R, Yi W, Sellappan S, et al. Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia spp.*) clones. *J Agric Food Chem.* 2005, 53(2): 442-451.
- Stintzing F, Carle R. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends Food Sci Tech.* 2004, 15(1): 19-38.
- Strack D, Vogt T, Schliemann W. Recent advances in betalain research. *Phytochemistry.* 2003, 62(3): 247-269.
- Streit NM, Canterle LP, Canto MWd, Hecktheuer LHH. As clorofilas. *Cienc Rural.* 2005, 35: 748-755.
- Takahasi H, Yanagi K, Ueda M, Nakade K, Fukuyama Y. Structures of 1,4-benzodioxane derivatives from the seeds of *Phytolacca americana* and their neuritogenic activity in primary cultured rat cortical neurons. *Chem Pharm Bull.* 2003, 51(12): 1377-1381.
- Tanaka T, Takahashi R. Flavonoids and Asthma. *Nutrients.* 2013, 5: 2128-2143.
- Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant J.* 2008, 54(4): 733-749.
- Tapas A, Sakarkar D, Kakde B. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Trop J Pharm Res.* 2008, 7(3): 1089-1099.
- Teltow G, Irvin J, Aron G. Inhibition of herpes simplex virus DNA synthesis by pokeweed antiviral protein. *Antimicrob Agents Chemother.* 1983, 23(3): 390-396.

- Tesoriere L, Allegra M, Butera D, Livrea MA. Absorption, excretion, and distribution of dietary antioxidant betalains in LDLs: potential health effects of betalains in humans. *Am J Clin Nutr.* 2004, 80(4): 941-945.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem.* 2007, 39(1): 44-84.
- Vinha A, Alves R, Barreira S, Castro A, Costa A, Oliveira B. Effect of peel and seed removal on the nutritional value and antioxidant activity of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) fruits. *LWT-Food Sci Technol.* 2014, 55(1): 197-202.
- Visioli F, Lastra C, Andres-Lacueva C, Aviram M, Calhau C, Cassano A, et al. Polyphenols and human health: a prospectus. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2011, 51(6):524-546.
- Wang L, Bai L, Nagasawa T, Hasegawa T, Yang X, Sakai J, et al. Bioactive triterpene saponins from the roots of *Phytolacca americana*. *J Nat Prod.* 2008, 71(1): 35-40.
- Willett W. Balancing life-style and genomics research for disease prevention. *Science.* 2002, 296(5568): 695-698.
- Wissgott U, Bortlik K. Prospects for new natural food colorants. *Trends Food Sci Tech.* 1996, 7(9): 298-302.
- Yamaguchi K, Uechi M, Katakura Y, Oda T, Ishiguro M. Mitogenic properties of pokeweed lectin-D isoforms on human peripheral blood lymphocytes: Non-mitogen PL-D1 and Mitogen PL-D2. *Biosci Biotech Biochem.* 2004, 68(7): 1591-1593.
- Yao L, Jiang Y, Shi J, Tomas-Barberan F, Datta N, Singanusong R, et al. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Food Hum Nutr.* 2004, 59(3): 113-122.
- Yendo A, Costa F, Gosmann G, Fett-Neto A. Production of plant bioactive triterpenoid saponins: elicitation strategies and target genes to improve yields. *Mol Biotechnol.* 2010, 46(1): 94-104.
- Yi Y. A triterpenoid saponin from *Phytolacca esculenta*. *Phytochemistry.* 1992, 31(7): 2552-2554.
- Yi Y. A triterpenoid and its saponin from *Phytolacca esculenta*. *Phytochemistry.* 1991, 30(12): 4179-4181.
- Yi Y. Esculentoside L and K: two new saponins from *Phytolacca esculenta*. *Planta Med.* 1990, 56(3): 301-303.

Yuksel Z, Avci E, Erdem Y K. Characterization of binding interactions between green tea flavanoids and milk proteins. *Food Chem.* 2010, 121: 450-456.

Zhang D, Halaweish FT. Isolation and characterization of ribosome-inactivating proteins from *Cucurbitaceae*. *Chem Biodivers.* 2007,4(3): 431-442.

Zhao L, Sun YL, Cui SX, Chen M, Yang HM, Liu HM, et al. Cd-induced changes in leaf proteome of the hyperaccumulator plant *Phytolacca americana*. *Chemosphere.* 2011, 85(1): 56-66.

Zheleva-Dimitrova DZ. Antioxidant and acetylcholinesterase inhibition properties of *Amorpha fruticosa* L. and *Phytolacca americana* L. *Pharmacogn Mag.* 2013, 9(34): 109-113.