

Faculdade de Farmácia  
Universidade de Coimbra

***Agrimonia eupatoria* L. e *Equisetum telmateia* Ehrh.**

**Perfil Polifenólico e Capacidade de Captação de  
Espécies Reactivas de Oxigénio**

Helena Sofia Nogueira Correia

COIMBRA

2005



*Dissertação de candidatura ao grau de Mestre  
apresentada à Faculdade de Farmácia da  
Universidade de Coimbra*



*Aos meus pais*

*À minha irmã*



*“Não sei o que possa parecer aos olhos do mundo, mas aos meus pareço apenas ter sido como um menino brincando à beira-mar, divertindo-me com o facto de encontrar de vez em quando um seixo mais liso ou uma concha mais bonita do que o normal, enquanto o grande oceano da verdade permanece completamente por descobrir à minha frente.”*

Isaac Newton





## AGRADECIMENTOS

O meu principal agradecimento vai, como não podia deixar de ser, para a orientadora deste trabalho, Professora Doutora Teresa Batista. Quaisquer palavras são insuficientes para expressar a minha admiração e o meu reconhecimento. Sublinho, de um modo especial, os ensinamentos na área da Farmacognosia que tanto me cativaram, a confiança que sempre depositou em mim, a sua dedicação e o apoio incondicional em todas as fases deste projecto.

À Professora Doutora Teresa Dinis, co-orientadora deste projecto, agradeço todo o apoio prestado na parte experimental deste trabalho, realizada no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia. Grata, recordo e evidencio a sua constante disponibilidade para esclarecer e discutir todas as questões que me foram surgindo e a partilha do seu espírito científico que muito contribuiu para a elaboração deste trabalho e para o meu desenvolvimento pessoal.

Para o Professor Doutor Celestino Santos-Buelga vai também a minha elevada gratidão pela forma como me recebeu no Departamento de Química Analítica, Nutrição e Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Salamanca. Agradeço, especialmente, a confiança que depositou em mim desde a primeira hora e o modo como me fez sentir um elemento do departamento.

Ao Professor Doutor Proença da Cunha, à Professora Doutora Lúcia Couto, à Professora Doutora Leonor Almeida e ao Professor Doutor Julián Rivas Gonzalo agradeço por me terem recebido nos seus laboratórios e deste modo, viabilizarem a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Jorge Paiva expresse o meu agradecimento pela disponibilidade e ajuda na identificação das plantas utilizadas neste trabalho.



À Dra. Teresa Amaral agradeço o apoio, a sua disponibilidade e amizade. Realço particularmente o auxílio nos estudos fitoquímicos realizados no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia de Coimbra.

Para a Professora Doutora Ana González-Parámas vão os meus agradecimentos por todo o apoio técnico-científico, particularmente na caracterização fitoquímica e nos estudos preliminares de actividade antioxidante realizada no Departamento de Química Analítica, Nutrição e Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Salamanca. Registo com agrado a sua amizade e recorro todos os bons momentos, verdadeiramente enriquecedores, que passámos no laboratório.

Agradeço também à Dra. Susana Gonzalez, à Dra. Pilar Martín López e ao Dr. Joaquín Pérez Alonso todo o apoio técnico, na aplicação de diferentes metodologias de análise.

Ao Sr. Arménio do Instituto Botânico da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra agradeço a sua colaboração e paciência na procura de diferentes espécies de *Equisetum*.

Ao Dr. Tiago Brandão agradeço todo apoio “fotográfico”.

Para a Mestre Cristina Gonçalves vai também toda a minha gratidão, pela sua amizade e pelo modo como me incentivou, aquando da realização da sua tese de mestrado, para a concretização deste trabalho.

Aos companheiros e amigos que conheci nos diferentes laboratórios, agradeço os momentos de boa disposição que me proporcionaram e a força que me transmitiram nas alturas mais difíceis. A todos, muito obrigada.





Se o valor de um trabalho depender do que se abdica para o realizar então, os inúmeros momentos em que não pude estar com a minha família, já o valorizam suficientemente. Aos meus pais, irmã, padrinhos, madrinhas e primo, agradeço toda a compreensão.

Aos meus pais e à minha irmã, agradeço de um modo especial porque sem eles este trabalho nunca teria sido possível. Obrigada pelas asas e por me ensinarem a voar.

Ao Tiago, meu companheiro, agradeço a calma que sempre me conseguiu transmitir e o novelo de afecto e carinho com que me envolveu. A sua presença e constante disponibilidade foram muito importantes para a conclusão deste projecto.

À Real República do Bota-Abaixo agradeço todo o calor e amizade.

A todos os amigos, obrigada.



De acordo com o n.º 2 do Artº 8º do Decreto-Lei n.º 338/70, utilizaram-se na elaboração desta dissertação, resultados publicados nos seguintes trabalhos:

***Publicações em revistas internacionais***

- Artigos publicados

Correia H, González-Parámas A, Amaral T, Santos-Buelga C, and Batista T. "Polyphenolic profile characterization of *Agrimonia eupatoria* L. by HPLC with different detection devices". Biomedical Chromatography 2005, Jun. (em impressão). Publicado "on-line" em Wiley Interscience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/bmc.553.

Correia H, González-Parámas A, Amaral T, Santos-Buelga C, and Batista T. "Characterization of polyphenols by HPLC-DAD-ESI-MS and antioxidant activity in *Equisetum telmateia*". Phytochemical Analysis 2005; 16: 380-387.

- Artigos a publicar

Correia H, Batista T and Dinis T. "Antioxidant activity of *Agrimonia eupatoria* L.; a possible mechanism of protection against inflammation" (submetido para publicação).

Correia H, Batista T and Dinis T. "Reactive oxygen species scavenging by polyphenols from *Equisetum telmateia* Ehrh.: an important role on inflammatory diseases" (em fase de elaboração).

***Publicações sobre a forma de proceedings***

Correia H, González-Parámas A, Amaral T, Santos-Buelga C and Batista T. "*Agrimonia eupatoria* L. and *Equisetum telmateia* Ehrh.: antioxidant activity and phytochemical characterization". Polyphenols Communications 2002, XXI Conference on Polyphenols, Marrakech (Marrocos), 9 a 12 de Setembro de 2003. Livro de resumos, tópico 3: "Phenolics: pharmacology, nutrition and health": 301-302.

### *Comunicações em painel*

Correia H, González-Parámas A, Amaral T, Santos-Buelga C, and Batista T. "Equisetum telmateia Ehrh. polyphenols and their healthy antioxidant activity". Pacificchem - Chemistry and Biochemistry of Antioxidant Phytochemicals, Honolulu, Hawaii (USA) 2005, 15 a 20 de Dezembro de 2005 (comunicação em poster n.º 17).

Correia H, Batista T, Santos-Buelga C and Dinis T. "Polyphenols from *Agrimonia eupatoria* and *Equisetum telmateia* as scavengers of ROS involved in inflammatory processes". 6<sup>th</sup> Portuguese Congress on Free Radicals in Chemistry, Biology and Medicine. 1<sup>st</sup> Luso-Spanish Congress on Free Radicals. Coimbra (Portugal), 4 a 6 Dezembro de 2003. Livro de resumos: 82 (comunicação em poster, n.º 024).

Correia H, Santos-Buelga C, Amaral MT, Proença da Cunha A, Batista MT. "Pre-absorption process simulation of *Agrimonia eupatoria* L. and *Equisetum arvense* L. extracts: alterations occurred in acid environment". International Symposium on Dietary Phytochemicals and Human Health, Salamanca (Espanha), 18 a 20 de Abril, 2002. Livro de resumos: 83 (comunicação em poster, n.º 7).



## RESUMO

A *Agrimonia eupatoria* L. (Rosaceae) e o *Equisetum telmateia* Ehrh. (Equisetaceae) são duas plantas usadas na medicina tradicional, pelas suas propriedades anti-inflamatórias, sob a forma de extractos hidro-alcoólico e aquoso, respectivamente.

Em situações inflamatórias, as células fagocíticas activadas, formam e libertam quantidades elevadas de espécies reactivas de oxigénio (ROS), que protegem o organismo contra agentes nocivos. No entanto, o excesso de ROS é responsável pela destruição celular e tecidual, que pode ocorrer por acção directa, por degradação oxidativa de componentes celulares essenciais; ou por acção indirecta, por alteração do equilíbrio normal proteases/antiproteases. É sabido que, compostos com actividade antioxidante, nomeadamente, os polifenóis, captam as espécies reactivas de oxigénio e reduzem, deste modo, o stresse oxidativo responsável pela destruição celular, podendo contribuir para a prevenção ou retardamento das situações inflamatórias. Os polifenóis estão presentes em muitas plantas superiores, mas a sua estrutura molecular influencia marcadamente as diversas actividades farmacológicas que lhe têm sido atribuídas.

O objectivo do presente estudo, foi verificar se a actividade anti-inflamatória atribuída à agrimónia e ao equisetum estaria relacionada com a sua capacidade de captar espécies reactivas de oxigénio, envolvidas em processos inflamatórios, e tentar estabelecer uma relação entre a composição polifenólica e a actividade antioxidante. Assim, prepararam-se fracções de acetato de etilo, a partir dos respectivos extractos, que foram quimicamente caracterizadas, por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) acoplada a detecção por díodos (DAD), a espectrometria de massa (MS) e com detecção, "on-line", após reacção química com o *p*-dimetilaminocinamaldeído (DMACA).

A análise por HPLC/DAD/ESI-MS permitiu concluir que a *Agrimonia eupatoria* L. é constituída, essencialmente, por catequina, procianidinas diméricas (B1, B2, B3, B6, B7), triméricas (EEC, C1, C2) e algumas tetraméricas; por glicosilflavonóis derivados da quercetina (quercetina 3-O-glucósido, quercetina 3-O-galactósido) e do canferol (canferol 3-O-glucósido), assim como por um derivado acetilado do canferol [canferol 3-O-(6''-*p*-cumaroíl)glucósido]; por C-glicosilflavonas, nomeadamente a isovitexina (6-C-glucosilapigenina); e por ácidos fenólicos (ácido protocatéquico e ácido

*p*-cumárico). A identificação das procianidinas foi confirmada por reacção química pós-coluna, com o DMACA.

No *Equisetum telmateia* Ehrh., a análise por HPLC/DAD/ESI-MS permitiu associar os principais polifenóis presentes a proantocianidinas do tipo A, derivados da (epi)afzelequina, procianidinas B2 e C1; e a derivados do canferol (canferol acetil-di-hexose, canferol ramnósido-glucósido, canferol 3-O-glucósido, canferol 3-O-acetilglucósido e canferol acetilglucósido-ramnósido).

Paralelamente, os extractos e as fracções foram testados relativamente à sua capacidade de captar espécies reactivas de oxigénio. Ambos, extractos e fracções, apresentaram um elevado potencial antioxidante, como demonstrado pela capacidade de reduzir o radical livre DPPH. Posteriormente, verificou-se que possuíam capacidade para reagir com o O<sub>2</sub><sup>•</sup>, <sup>•</sup>OH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HOCl, ONOO<sup>•</sup> e ROO<sup>•</sup>, tal como foi avaliado pela inibição da redução do azul de nitrotetrazolio, diminuição da degradação da desoxi-ribose, diminuição da formação do tetraguaiacol, pela protecção da actividade da elastase e pela diminuição da oxidação da di-hidro-rodamina e da R-ficoeritrina, respectivamente. Adicionalmente, inibiram a peroxidação lipídica, como demonstrado pela inibição da formação dos dienos conjugados. De um modo geral, as fracções exibiram actividades significativamente superiores à dos respectivos extractos, apontando para um potencial antioxidante superior. As diferenças de actividades entre extractos e fracções sugerem um envolvimento, dos polifenóis presentes nas fracções, na captação das espécies reactivas, o que nos leva a sugerir que a actividade anti-inflamatória proposta para a *Agrimonia eupatoria* L. e para o *Equisetum telmateia* Ehrh. se deve, pelo menos em parte, à presença de compostos, com significativa actividade antioxidante, como aqueles identificados neste trabalho. No entanto, trabalhos futuros, realizados *in vitro* e *in vivo*, são necessários para confirmar a actividade antioxidante como mecanismo de protecção dos processos inflamatórios.

## ABSTRACT

*Agrimonia eupatoria* L. (Rosaceae) and *Equisetum telmateia* Ehrh. (Equisetaceae) are used in traditional medicine for their anti-inflammatory activity, as hydro-alcoholic and aqueous extracts, respectively.

Under inflammatory conditions, phagocytic cells are activated generating and releasing high amounts of reactive oxygen species (ROS) that protect cells against deleterious agents. However, the excess of ROS is responsible for cell and tissue injury, either directly by oxidative degradation of essential cellular components or indirectly, by altering the normal protease/antiprotease balance. It is known that compounds with antioxidant activity, such as polyphenols, scavenge ROS, reducing the oxidative stress responsible for cell damage and contributing to the prevention or delaying of inflammatory situations. Polyphenols are widely present in superior plants; however, their molecular structures significantly influence the pharmacological activities that have been reported to them.

The aim of this study was to determine whether the proposed anti-inflammatory activity of these plants is related with their capacity to scavenge ROS involved in inflammatory processes and to establish a relationship between polyphenol composition and antioxidant activity. In this sense, an ethyl acetate fraction from each extract was obtained and chemically characterized by high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with diode-array and mass spectrometry detectors (DAD and MS, respectively) and HPLC with *p*-dimethylaminocinamaldehyde (DMACA) post-column chemical reaction on-line detection.

HPLC/DAD/ESI-MS analysis showed that *Agrimonia eupatoria* L. is essentially constituted by catechin, dimeric procyanidins (B1, B2, B3, B6, B7), trimeric procyanidins (EEC, C1, C2) and some unidentified tetramers; by glycosylflavonols, namely, quercetin derivatives (quercetin 3-O-glucoside, quercetin 3-O-galactoside) and kaempferol derivatives (kaempferol 3-O-glucoside) and by one acylated glycoside kaempferol derivative [kaempferol 3-O-(6''-O-*p*-coumaroyl)glucoside]; by C-glycosylflavones, namely, isovitexin (6-C-glucosylapigenin) and by phenolic acids (protocatechuic acid and *p*-coumaric acid). Procyanidins identification was confirmed by DMACA post-column chemical reaction detection.

In *Equisetum telmateia* L. the mass spectral data showed that the major phenolic compounds present were A-type proanthocyanidins and (epi)afzelechin derivatives, procyanidins B2 and C1; and kaempferol derivatives (kaempferol acetyl-dihexose, kaempferol rhamnoside-glucoside, kaempferol 3-O-glucoside, kaempferol acetylglucoside-rhamnoside, kaempferol 3-O-acetylglucoside).

On the other hand, extracts and fractions were tested for a possible scavenging activity of ROS. Both extracts and fractions were able to reduce the free radical DPPH, suggesting a high antioxidant potential. Moreover, they showed capacity to react with  $O_2^{\cdot -}$ ,  $HO^{\cdot}$ ,  $H_2O_2$ ,  $HOCl$ ,  $ONOO^{\cdot}$  and  $ROO^{\cdot}$ , as assessed by the inhibition of nitroblue tetrazolium reduction, by the decrease in the deoxyribose degradation, by the decrease of tetraguaiacol formation, by the elastase activity protection, by the decrease of dihydrorhodamine and R-phycoerythrin oxidation, respectively. Moreover, their effects on lipid peroxidation were evaluated by the decrease of the diene-conjugated formation. The fractions present a significant higher antioxidant potential than the extracts, pointing to a significant contribution of the polyphenols present. The results suggest that the proposed *Agrimonia eupatoria* L. and *Equisetum telmateia* Ehrh. anti-inflammatory activity could be due, at least in part, to the presence of the compounds identified in this study. However, further research is required to support the antioxidant activity as a mechanism of protection against inflammation.

## ABREVIATURAS

<b>A</b>	absorvância	<b>DNA</b>	ácido desoxi-ribonucleico
<b>AAPH</b>	2,2'-azobis(2-amidinopropano)	<b>DPPH</b>	1,1-difenil-2-picril-hidrazilo
<b>ADP</b>	adenosina difosfato	<b>DTPA</b>	ácido dietilenotriaminopentacético
<b>AF</b>	fracção enriquecida em polifenóis da <i>Agrimonia eupatoria</i> L.	<b>E</b>	elastase
<b>AT</b>	extracto hidro-alcoólico da <i>Agrimonia eupatoria</i> L.	<b>EC</b>	epicatequina
<b>APCI</b>	ionização química a pressão atmosférica	<b>EC<sub>50</sub></b>	concentração eficaz a 50%
<b>API</b>	ionização a pressão atmosférica	<b>EDTA</b>	ácido etilenodiaminotetracético
<b>aq</b>	aquoso	<b>EEC</b>	epicatequina-(4 $\beta$ 8)-epicatequina-(4 $\beta$ 8)-catequina
<b>AR</b>	artrite reumatóide	<b>EF</b>	fracção enriquecida em polifenóis do <i>Equisetum telmateia</i> Ehrh.
<b>ATP</b>	adenosina trifosfato	<b>EI</b>	extracto aquoso do <i>Equisetum telmateia</i> Ehrh.
<b>u.a.</b>	unidades arbitrárias	<b>ESI</b>	ionização por "electrospray"
<b>B1</b>	epicatequina-(4 $\beta$ 8)-catequina	<b>EtOH</b>	etanol
<b>B2</b>	epicatequina-(4 $\beta$ 8)-epicatequina	<b>FAD</b>	flavina adenina dinucleótido
<b>B3</b>	catequina-(4 $\beta$ 8)-catequina	<b>HPLC</b>	cromatografia líquida de alta resolução
<b>B4</b>	catequina-(4 $\beta$ 8)-epicatequina	<b>HRF</b>	fissão do anel heterocíclico
<b>B7</b>	epicatequina-(4 $\beta$ 6)-catequina	<b>IC<sub>50</sub></b>	concentração inibitória a 50%
<b>C</b>	catequina	<b>IL</b>	interleucina
<b>C1</b>	epicatequina-(4 $\beta$ 8)-epicatequina-(4 $\beta$ 8)-epicatequina	<b>IV</b>	infravermelho
<b>C2</b>	catequina-(4 $\beta$ 8)-catequina-(4 $\beta$ 8)-catequina	<b>LDL</b>	lipoproteínas de baixa densidade
<b>Cat</b>	catalase	<b>LC</b>	cromatografia líquida
<b>CC</b>	cromatografia em coluna	<b>M<sup>+</sup></b>	ião molecular
<b>Cist</b>	cisteína	<b>MDA</b>	malonildialdeído
<b>CoA</b>	coenzima A	<b>[M+H]<sup>+</sup></b>	ião molecular obtido em modo ião positivo
<b>CRD</b>	detecção por reacção química	<b>[M-H]<sup>-</sup></b>	ião molecular obtido em modo ião negativo
<b>DAD</b>	detector de matriz de díodos	<b>MS</b>	espectrometria de massa
<b>DHR</b>	di-hidro-rodamina 123	<b>m/z</b>	razão entre a massa e a carga do ião
<b>DMACA</b>	<i>p</i> -dimetilaminocinamaldeído		

<b>NADPH</b>	nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato	<b>SFE</b>	extracção com fluidos supercríticos
<b>NBT</b>	azul de nitrotetrazolio	<b>SOD</b>	superóxido dismutase
<b>NOS</b>	óxido nítrico sintetase	<b>TCA</b>	ácido tricloroacético
<b>iNOS</b>	óxido nítrico sintetase indutiva	<b>TBA</b>	ácido 2-tiobarbitúrico
<b>cNOS</b>	óxido nítrico sintetase constitutiva	<b>TBARS</b>	substâncias reactivas com o ácido tiobarbitúrico
<b>OA</b>	osteoartrite	<b>TLC</b>	cromatografia em camada fina
<b>PAF</b>	factor de activação plaquetária	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	factor de necrose tumoral $\alpha$
<b>PC</b>	cromatografia em papel	<b>t<sub>R</sub></b>	tempo de retenção
<b>ppm</b>	partes por milhão	<b>UDP</b>	uridina difosfato
<b>RDA</b>	fissão <i>retro</i> Diels-Alder	<b>u.m.</b>	unidades de massa
<b>R<sub>f</sub></b>	factor de retenção	<b>UV</b>	ultravioleta
<b>RMN</b>	ressonância magnética nuclear	<b>Vis</b>	visível
<b>ROS</b>	espécies reactivas de oxigénio		
<b>SFC</b>	cromatografia com fluidos supercríticos		

# ÍNDICE

<b>I. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>I-1</b>
1. INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS.....	I-3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	I-5
2.1. PLANTAS ESTUDADAS .....	I-5
2.1.1. <i>AGRIMONIA EUPATORIA</i> L.....	I-5
2.1.2. <i>EQUISETUM TELMATEIA</i> EHRH.....	I-6
2.2. COMPOSTOS POLIFENÓLICOS.....	I-9
2.2.1. ESTRUTURA, CLASSIFICAÇÃO E NOMENCLATURA.....	I-10
Flavanóis e proantocianidinas.....	I-13
2.2.2. BIOSÍNTESE .....	I-16
2.2.3. DISTRIBUIÇÃO E OCORRÊNCIA .....	I-17
2.2.4. FUNÇÕES NAS PLANTAS.....	I-20
2.2.5. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	I-21
Interacção com proteínas.....	I-22
Captação de radicais livres.....	I-23
Complexação com iões metálicos.....	I-26
2.2.6. BIODISPONIBILIDADE.....	I-28
Efeitos biológicos dos metabolitos dos flavonóides .....	I-33
2.2.7. ANÁLISE .....	I-35
Extracção.....	I-35
Análise qualitativa .....	I-36
<i>Separação</i> .....	I-36
<i>Identificação</i> .....	I-38
Análise quantitativa.....	I-44
2.3. INFLAMAÇÃO .....	I-47
2.3.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DA INFLAMAÇÃO.....	I-47
2.3.2. PRODUÇÃO E PAPEL DAS ESPÉCIES REACTIVAS DE OXIGÉNIO NA INFLAMAÇÃO .....	I-48
2.3.3. PAPEL DAS ROS NAS DOENÇAS REUMÁTICAS .....	I-52
Anião Superóxido .....	I-52
Peróxido de Hidrogénio .....	I-53
Radical Hidroxilo .....	I-54
Ácido Hipocloroso .....	I-55
Óxido Nítrico .....	I-56
Peroxinitrito .....	I-57
<b>II. PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>II-59</b>
3. MATERIAIS .....	II-61
3.1. AMOSTRAS.....	II-61
3.2. REAGENTES.....	II-61

3.3. PADRÕES.....	II-62
4. MÉTODOS.....	II-63
4.1. PREPARAÇÃO DOS EXTRACTOS E DAS FRACÇÕES ENRIQUECIDAS EM POLIFENÓIS .....	II-63
4.2. ESTUDO PRELIMINAR DOS EXTRACTOS E DAS FRACÇÕES ENRIQUECIDAS EM POLIFENÓIS.....	II-66
4.2.1. ANÁLISE QUALITATIVA .....	II-66
4.2.2. ANÁLISE QUANTITATIVA.....	II-67
DOSEAMENTO DOS FLAVONÓIS TOTAIS.....	II-68
DOSEAMENTO DOS FLAVANÓIS .....	II-68
<i>Método da vanilina</i> .....	II-69
4.3. IDENTIFICAÇÃO DOS POLIFENÓIS .....	II-70
4.3.1. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO (HPLC) .....	II-70
Condições utilizadas na detecção por espectrofotometria de díodos (HPLC/DAD)....	II-71
Condições utilizadas na detecção por espectrometria de massa com ionização por “electrospray” (HPLC/DAD/ESI-MS) .....	II-72
Condições utilizadas na detecção após reacção química (HPLC/CRD) .....	II-73
4.4. DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	II-75
4.4.1. AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIRADICALAR.....	II-76
4.4.2. FORMAÇÃO E CAPTAÇÃO DO ANIÃO SUPERÓXIDO .....	II-77
4.4.3. CAPTAÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÉNIO.....	II-79
4.4.4. FORMAÇÃO E CAPTAÇÃO DO RADICAL HIDROXILO .....	II-81
4.4.5. FORMAÇÃO E CAPTAÇÃO DO ÁCIDO HIPOCLOROSO.....	II-83
4.4.6. FORMAÇÃO E CAPTAÇÃO DE PEROXINITRITO.....	II-85
4.4.7. FORMAÇÃO E CAPTAÇÃO DO RADICAL PEROXILO.....	II-86
4.4.8. INIBIÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	II-87
4.5. TRATAMENTO ESTATÍSTICO DE RESULTADOS .....	II-89
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	II-91
5.1. ESTUDO PRELIMINAR DOS EXTRACTOS E DAS FRACÇÕES ENRIQUECIDAS EM POLIFENÓIS.....	II-91
5.2. IDENTIFICAÇÃO DOS POLIFENÓIS .....	II-96
5.2.1. ÁCIDOS FENÓLICOS.....	II-101
5.2.2. FLAVANÓIS.....	II-102
<i>Agrimonia eupatoria</i> L. ....	II-104
<i>Equisetum telmateia</i> Ehrh.....	II-111
5.2.3. FLAVONÓIS.....	II-117
<i>Agrimonia eupatoria</i> L. ....	II-117
<i>Equisetum telmateia</i> Ehrh.....	II-119
5.2.4. FLAVONAS.....	II-123
<i>Agrimonia eupatoria</i> L. ....	II-123
5.3. ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	II-125
5.3.1. ACTIVIDADE ANTIRADICALAR.....	II-125
5.3.2. CAPACIDADE DE CAPTAÇÃO DO ANIÃO SUPERÓXIDO.....	II-129
5.3.3. CAPACIDADE DE CAPTAÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÉNIO .....	II-134
5.3.4. CAPACIDADE DE CAPTAÇÃO DO RADICAL HIDROXILO .....	II-136



5.3.5. CAPACIDADE DE CAPTAÇÃO DO ÁCIDO HIPOCLOROSO .....	II-138
5.3.6. CAPACIDADE DE CAPTAÇÃO DO PEROXINITRITO .....	II-141
5.3.7. CAPACIDADE DE CAPTAÇÃO DO RADICAL PEROXILO .....	II-143
5.3.8. CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA .....	II-146
6. DISCUSSÃO GERAL.....	II-149
7. CONCLUSÕES .....	II-155
<b>III. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>III-157</b>
8. BIBLIOGRAFIA.....	III-159



## I. INTRODUÇÃO GERAL



## 1. INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

Apesar da inflamação ser estudada há vários séculos, muitos estados patológicos desencadeados por processos inflamatórios, particularmente, por processos de inflamação crónica, continuam a afectar a qualidade de vida de grande parte da população mundial. Com efeito, nestas situações, como é o caso de certas doenças reumáticas, os fármacos de primeira escolha são os anti-inflamatórios não-esteróides que nem sempre são eficazes, contribuindo apenas para uma melhoria dos sintomas. Por outro lado, o consequente uso regular destes fármacos conduz a um elevado número de efeitos secundários, que passam não só por uma elevada intolerância gástrica e desenvolvimento de ulcerações mas também por alterações ao nível da função renal e por reacções de hipersensibilidade. Daí, ter aumentado a popularidade do uso de terapêuticas complementares e alternativas em pessoas com este tipo de doenças crónicas. No caso da osteoartrite, da artrite reumatóide e da dor reumática, a fitoterapia tem sido identificada como um dos tratamentos que possui efeitos benéficos. Apesar do interesse e uso crescente dos produtos à base de plantas, os mecanismos de acção que suportam a sua actividade anti-inflamatória, assim como a segurança e duração dos tratamentos, são alguns dos factores que continuam por esclarecer (Little e Parsons, 2005).

As situações inflamatórias estão associadas a uma elevada produção de espécies oxidantes que conduzem ao stresse oxidativo. O desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e as espécies oxidantes tem sido responsabilizado pela patogénese de muitas doenças, entre as quais as doenças inflamatórias. Uma vez que as situações inflamatórias estão associadas a um desequilíbrio entre antioxidantes e oxidantes então, deverá ser possível limitar o dano oxidativo e diminuir a progressão da resposta inflamatória ao suplementar as defesas antioxidantes. Deste modo, compostos com reconhecida actividade antioxidante, como é o caso dos polifenóis, um grupo de compostos naturais, ubíquos no reino vegetal, podem contribuir significativamente para a resolução destas situações.

Neste trabalho foram seleccionadas duas plantas - a *Agrimonia eupatoria* L. e o *Equisetum telmateia* Ehrh. - por possuírem, de acordo com os usos tradicionais, propriedades anti-inflamatórias. Apesar da sua utilização na medicina popular, não existe qualquer informação científica que confirme a sua eficácia ou que indique o mecanismo de acção envolvido nesta actividade.

Estudos recentes, realizados noutros vegetais, têm sugerido que a actividade anti-inflamatória pode depender de um mecanismo de acção antioxidante, o qual, frequentemente, está relacionado com a presença de polifenóis (Fylaktakidou *et al.*, 2004; Tapiero *et al.*, 2002).

A pouca informação existente sobre a fitoquímica da *Agrimonia eupatoria* L. e do *Equisetum telmateia* Ehrh., nomeadamente, acerca dos polifenóis, e a importância das espécies oxidantes no processo inflamatório levou-nos a um desenho experimental que consistiu em caracterizar o perfil polifenólico e avaliar a capacidade antioxidante de extractos obtidos conforme o uso tradicional destas plantas, com o objectivo principal de **verificar se a actividade anti-inflamatória proposta para a *Agrimonia eupatoria* L. e para o *Equisetum telmateia* Ehrh. na medicina popular estaria relacionada com a sua capacidade de captar espécies oxidantes, envolvidas nos processos inflamatórios, e posteriormente estabelecer uma correlação entre composição polifenólica e actividade antioxidante.**

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. PLANTAS ESTUDADAS

#### 2.1.1. *AGRIMONIA EUPATORIA* L.

A *Agrimonia eupatoria* L., conhecida por agrimónia, erva hepática ou hepatória dos gregos, encontra-se distribuída por toda a Europa (Forey e Lindsay, 1997). É muito comum nas regiões soalheiras, na berma de estradas, nas clareiras, nos prados secos e terrenos baldios (Lieutaghi, 2002).



**Figura 1.** *Agrimonia eupatoria* L.

Disponível em {<http://ispb.univ-lyon1.fr/cours/botanique/Photographies/liste%20dicot.htm>}.

É uma planta vivaz que pertence à família das *Rosaceae*. Apresenta caules verdes ou, na maioria das vezes avermelhados, cilíndricos, erectos, entre 30 e 60 cm de altura, pouco ramificados (Lieutaghi, 2002; FPVII). São cobertos por pêlos longos direitos ou emaranhados. As folhas são peniculadas, “alternas e recortadas em segmentos de grande dimensão, dentados, dispostos em duas fiadas, separadas por segmentos bastante mais pequenos” (Lieutaghi, 2002). É facilmente reconhecível pela sua fina espiga floral terminal, com flores amarelas de cinco pétalas (figura 1). Na base da inflorescência há, geralmente, receptáculos frutíferos cónicos, coroados de pêlos em forma de gancho (Forey e Lindsay, 1997; FPVII).

A agrimónia é constituída por ácido palmítico, esteárico e silícico; por flavonóides: apigenina, luteolina, luteolina 7-glucósido, quercetina, quercitrina, canferol, canferol 3-ramnósido, canferol 3-rutinósido, canferol 3-glucósido; por taninos (3-21%), condensados e hidrolisados (elagitaninos, coriariina A); por vitaminas, ácido ascórbico (vitamina C), complexo nicotonamida, tiamina e vitamina K e por outros constituintes, como triterpenos, cumarinas, fitoesteróis e óleos voláteis (0,2%) (Copland *et al.*, 2003; Feldman e Lawlor, 2000; Feldman *et al.*, 2000; Newall *et al.*, 1996; Bilia *et al.*, 1993).

Na Idade Média, a agrimónia, era muito utilizada como remédio para o fígado. Prevenia as crises de cólicas hepáticas e contribuía, quando utilizada prolongadamente, para melhorar situações de hepatite crónica e icterícia (Lieutaghi, 2002).

As partes aéreas são utilizadas na medicina tradicional, como infusos, decoctos ou tinturas, pelas suas propriedades anti-espasmódica, anti-inflamatória, diurética e anti-hemorrágica e, pela sua capacidade de favorecer a secreção biliar (Forey e Lindsay, 1997).

### 2.1.2. *EQUISETUM TELMATEIA* EHRH.

O *Equisetum telmateia* Ehrh., cavalinha-maior ou erva-pinheira, pertence à família das *Equisetaceae*. Tradicionalmente, são-lhe imputadas as mesmas actividades farmacológicas do *Equisetum arvense* L., ou cavalinha-dos-campos. Morfologicamente semelhantes, ambas



as plantas, são vulgarmente denominadas por cauda-de-cavalo, cauda-de-raposa ou cauda-de-cabra (Lieutaghi, 2002). No entanto, o seu perfil de flavonóides mostra-se diferente (Veit *et al.*, 1995).

Ao longo deste trabalho, o *Equisetum telmateia* Ehrh., será designado apenas por equisetum.

Esta planta cresce em quase toda a Europa, em terrenos húmidos, não ácidos, em valas, fontes e em terrenos alagadiços (Lieutaghi, 2002; Forey e Lindsay, 1997).

No início da Primavera, o rizoma do *Equisetum telmateia* Ehrh. emite caules férteis, simples, brancos ou branco esverdeados, espessos (até 1,0-1,5 cm), rodeados de bainhas invaginantes de 15 a 45 dentes, a intervalos regulares (figura 2). Estes caules terminam num estróbilo que consiste em várias escamas dispostas em forma de escudo, munidas na face inferior de esporângios alongados que desaparecem após a produção dos esporos. Os caules estéreis, por sua vez, possuem entre 0,40 a 1,50 cm e apresentam ramificações longas e finas (Lieutaghi, 2002).

São poucos os trabalhos publicados sobre a composição química do *Equisetum telmateia* Ehrh.. Veit e colaboradores (1995) estudaram por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) as variações dos compostos fenólicos nas diferentes espécies de *Equisetum*. Os resultados obtidos permitiram classificar as espécies em três grupos diferentes, com base nas características dos flavonóis presentes. O *Equisetum telmateia* Ehrh. foi incluído nas espécies que possuem apenas derivados glicosilados do canferol. Adicionalmente, diferenciou-se das restantes espécies deste grupo por possuir glicósidos do canferol, acetilados. Foram identificados no *Equisetum telmateia* Ehrh., entre outros, os seguintes derivados do canferol: o canferol 3-O-glucósido, o canferol 3-O-ramnósido, o canferol 3-O-rutinósido, o canferol 7-O-ramnósido, o canferol 3-O-glucósido-7-O-ramnósido, o canferol 3-O-rutinósido-7-O-glucósido, o canferol 3-O-rutinósido-7-O-ramnósido, o canferol 3-O-(6''-O-acetilglucósido)-7-O-glucósido, o canferol 3,7-diglucósido e o canferol 3-O-(6''-O-acetilglucósido)-7-O-ramnósido.



**Figura 2.** *Equisetum telmateia* Ehrh.

Na medicina tradicional, esta planta é utilizada tanto interna como externamente. Internamente usa-se pelas suas propriedades diuréticas, hemostáticas, adstringentes e remineralizantes, podendo, deste modo, ser utilizada para as afecções do aparelho urinário, nas hemorragias, na diarreia e na tuberculose pulmonar, raquitismo e osteoporose, respectivamente. As tradicionais acções remineralizante e recalcificante são justificadas pela presença de ácido silícico (Lieutaghi, 2002). Utiliza-se também sob a forma de decocto para o tratamento da pedra do rim, prostatites, para as dores de estômago e cistites (Tuzlaci e Tolon, 2000). Adicionalmente, é aplicada em compressas sobre úlceras das pernas, chagas e eczemas, nas inflamações e pruridos (Lieutaghi, 2002).

## 2.2. COMPOSTOS POLIFENÓLICOS

Existem inúmeros compostos químicos de origem natural. Uns são resultantes do metabolismo primário das plantas, sendo essenciais para a manutenção dos seus processos vitais. Outros, como é o caso dos compostos fenólicos, são resultantes do metabolismo secundário e possuem importância toxicológica, farmacológica e ecológica (Mann *et al.*, 1998).

Os compostos fenólicos são classificados de acordo com o número de átomos de carbono do seu esqueleto básico (tabela 1). São conhecidos por polifenóis ou compostos polifenólicos quando do seu núcleo base, fazem parte, pelo menos, duas estruturas aromáticas.

**Tabela 1.** Algumas das classes maioritárias de compostos fenólicos encontradas nas plantas. Adaptado de Mann *et al.* (1998).

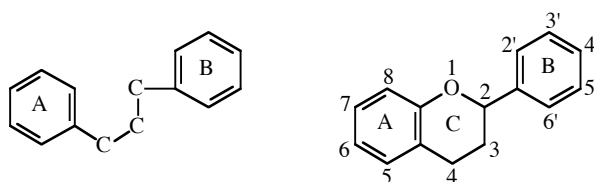
N.º átomos C	Esqueleto básico	Classe
6	C <sub>6</sub>	Fenóis Simples
7	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Ácidos fenólicos
8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Ácidos fenilacéticos
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Ácidos hidroxicinâmicos Fenilpropenos Cumarinas Isocumarinas Cromonas
14	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Estilbenos Antraquinonas
15	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonóides Isoflavonóides
18	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Linhanos
30	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	Biflavonóides
<i>n</i>	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub><i>n</i></sub> (C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub><i>n</i></sub>	Linhinas Taninos condensados

O trabalho desenvolvido incide, essencialmente, sobre o estudo de flavonóides, i.e., metabolitos com esqueleto C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Como tal, a revisão bibliográfica aqui apresentada é direccionada para esta classe de compostos.

### 2.2.1. ESTRUTURA, CLASSIFICAÇÃO E NOMENCLATURA

Os flavonóides são um grupo de polifenóis, de baixo peso molecular, que podem ser encontrados em quase todas as plantas superiores. Como referido, são produtos resultantes do metabolismo secundário das plantas e, como tal, encontram-se sempre presentes em quantidades muito pequenas.

Possuem um núcleo base constituído por 15 átomos de carbono que adquire uma configuração do tipo C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, ou seja, possuem dois anéis aromáticos ligados por uma unidade de três carbonos que pode ou não formar um terceiro anel (figura 3).



**Figura 3.** Esqueleto base dos flavonóides.

A figura 3 representa o esqueleto base dos flavonóides e o sistema de numeração utilizado para distinguir as posições dos carbonos na molécula. Os anéis são denominados por A, B e C. Por convenção, o oxigénio do anel heterocíclico - anel C - ocupa a posição 1. A numeração dos carbonos continua tal como evidenciado na figura 3. No anel B a numeração é independente da utilizada nos anéis A e C. Começa pelo carbono que se liga ao anel C (posição 1') e continua, no sentido dos ponteiros do relógio, até à posição 6'.

Os flavonóides são classificados em diferentes classes de acordo com determinadas características estruturais:

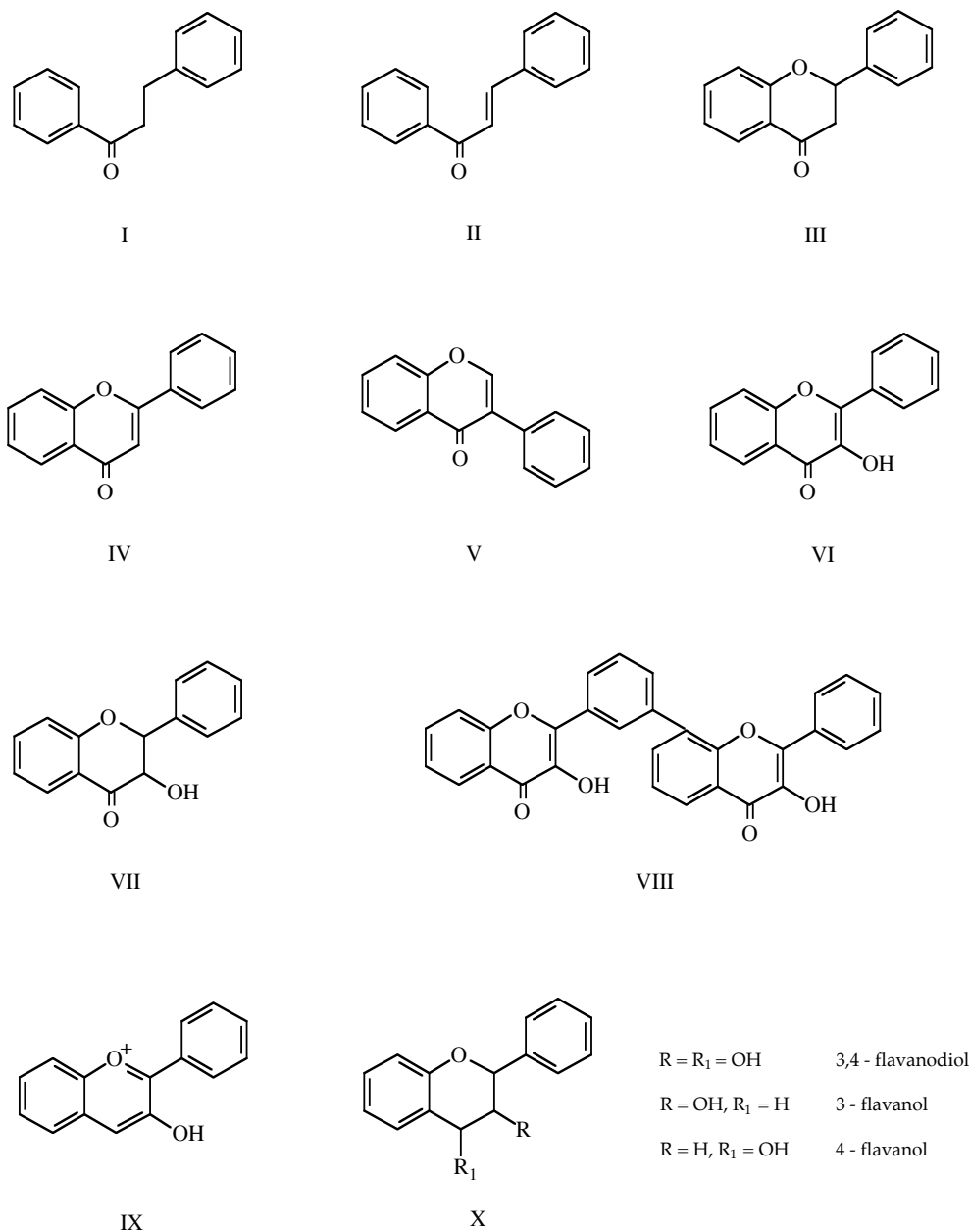
- presença/ausência do anel C;
- saturação/insaturação do anel C;
- hidroxilação ou não do anel C;
- posição de ligação do anel B;
- número de unidades monoméricas envolvidas.

Na figura 4 estão representados os núcleos base das classes de flavonóides conhecidas. As chalconas (I) e as desidrochalconas (II) representam as duas classes de flavonóides nas quais o anel C, se encontra aberto. Adicionalmente, apresentam uma função carbonilo em C<sub>4</sub>. As restantes classes de flavonóides são classificadas de acordo com as substituições que ocorrem no anel C, como foi referido anteriormente.

As flavanonas (III) são caracterizadas por possuírem o anel C saturado, uma função carbonilo em C<sub>4</sub> e o anel B ligado em C<sub>2</sub>. As flavonas (IV) por sua vez, diferem das anteriores por possuírem uma ligação dupla entre os carbonos C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub>. O anel B encontra-se ligado ao C<sub>2</sub> e, normalmente, não existe qualquer substituinte na posição C<sub>3</sub>. As isoflavonas (V) diferem das flavonas por possuírem o anel B ligado em C<sub>3</sub>.

Os flavonóis (VI) são caracterizados por possuírem o anel B ligado em C<sub>2</sub> e por apresentarem, para além do grupo carbonilo em C<sub>4</sub> e da ligação dupla entre C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub>, um grupo hidroxilo ligado ao C<sub>3</sub>. Os di-hidro-flavonóis (VII) diferem da classe anterior pela ausência da ligação dupla entre C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub>. As unidades de flavonóis podem ligar-se entre si por uma ligação C-C ou C-O; a ligação de duas unidades origina os biflavonóis (VIII).

Ainda dentro do grupo dos flavonóides pode encontrar-se a classe das antocianidinas (IX), caracterizada por apresentar uma carga positiva na unidade básica da molécula, e a classe dos flavanóis (X) caracterizada pela ausência do grupo carbonilo em C<sub>4</sub> e pela presença de um ou dois grupos hidroxilo, em C<sub>3</sub> e/ou C<sub>4</sub> (β-flavanóis, 4-flavanóis e 3,4-flavano-dióis, respectivamente).



**Figura 4.** Classes de flavonóides.

Em todas as classes dos flavonóides podem ocorrer substituições com grupos hidroxilo, metilo, malonilo, acetilo, entre outros, e com glúcidos. Grande parte dos

flavonóides aparece na natureza ligada a glúcidos, i.e., na forma glicosilada, O- e/ou C-glicosilada.

Adicionalmente, na classe dos flavanóis, podem ocorrer reacções de polimerização. Os flavanóis constituem a classe mais complexa do grupo de flavonóides (Bohm, 1998). As grandes variações estruturais, o aumento do número e da complexidade dos oligómeros e polímeros, levaram à necessidade de criar um sistema de classificação e de nomenclatura próprio (Friedrich *et al.*, 2000).

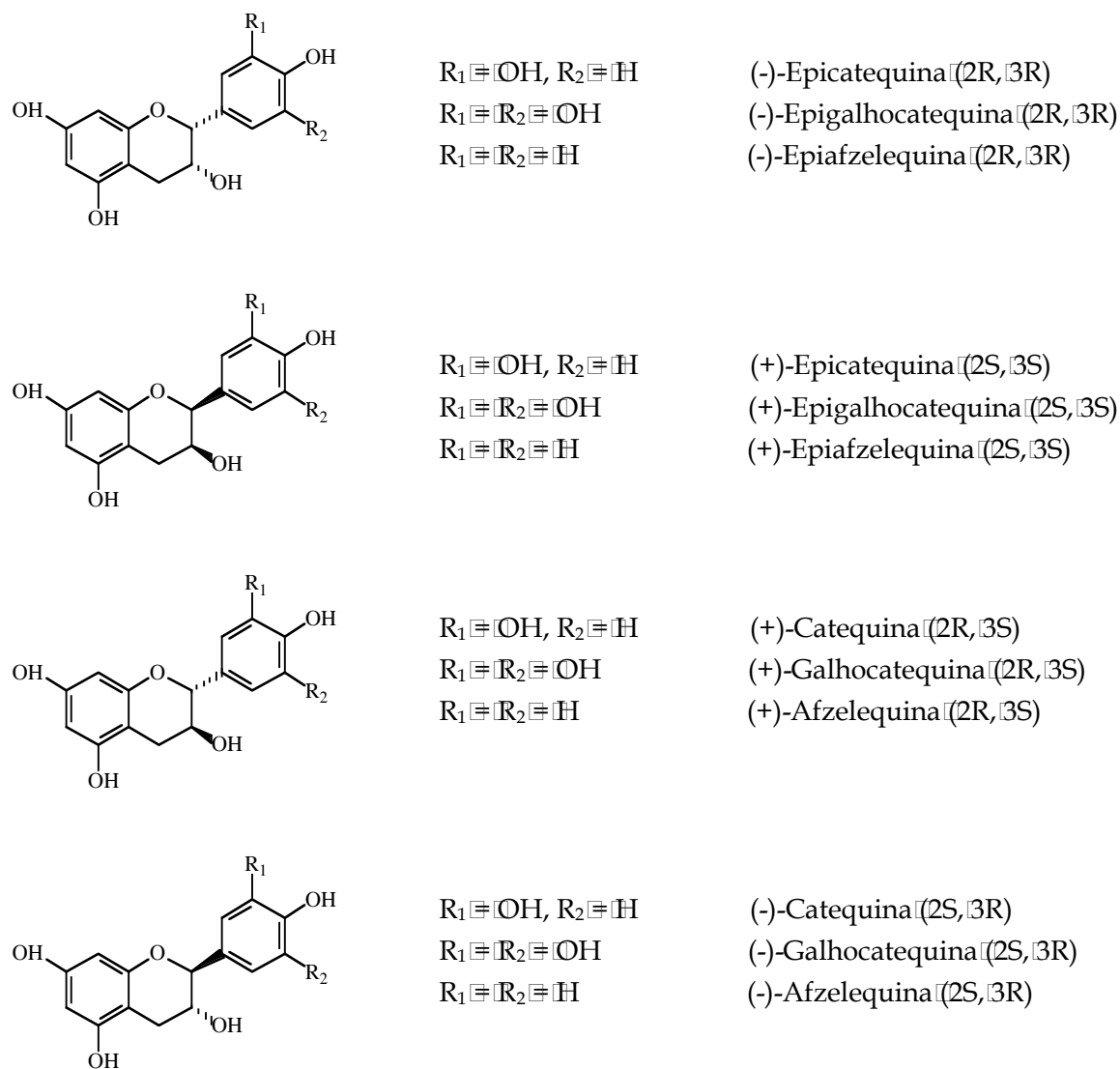
### Flavanóis e proantocianidinas

Embora existam diferentes sub-classes de flavanóis, os mais comuns na natureza são os 3-flavanóis. Classificam-se consoante o grau de hidroxilação do anel A e do anel B. Os mais conhecidos possuem um anel A floroglucinólico, e são denominados, segundo o grau de hidroxilação do anel B por afzelequinas (mono-hidroxilado), catequinas (di-hidroxilado) e galhocatequinas (tri-hidroxilado), sendo os dois últimos mais vulgarmente encontrados na natureza. Cada monómero pode apresentar quatro isómeros, dependendo da estereoquímica dos carbonos assimétricos (C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub>) do anel heterocíclico (figura 5). A estereoquímica da ligação C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> pode ser *trans* (2R,3S) ou *cis* (2R,3R) sendo a denominação, neste último caso, precedida do prefixo *epi*.

De um modo geral, a configuração apresentada pelo C<sub>2</sub> é R. As unidades de 3-flavanóis com a configuração 2S são muito raras e distinguem-se pelo prefixo enantio (*ent*-).

Estas unidades monoméricas podem polimerizar dando origem aos taninos condensados ou proantocianidinas. As ligações entre as unidades básicas de 3-flavanóis ocorrem frequentemente entre C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub> ou C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub>, sendo as primeiras estereoquimicamente favorecidas (de Bruyne *et al.*, 1999). As proantocianidinas com sub-unidades superiores mono-hidroxiladas são conhecidas por propelargonidinas, por libertarem pelargonidina quando aquecidas em meio ácido; as que possuem as sub-unidades superiores di-hidroxiladas libertam cianidina e, como tal são denominadas procianidinas (de Pascual-Teresa *et al.*, 2000). Do mesmo modo, as tri-hidroxiladas são denominadas

prodelfinidinas por libertarem delfinidina. As proantocianidinas com diferentes sub-unidades são chamadas mistas ou heterogêneas. As proantocianidinas mais comuns na natureza são as procianidinas e as prodelfinidinas (Haslam, 1989; Czochedanska *et al.*, 1980).



**Figura 5.** Estrutura das principais unidades básicas de 3-flavanóis encontradas nas plantas (de Pascual-Teresa, 1996).



Nas proantocianidinas podem ocorrer variações estruturais, com formação de uma ligação éter interflavânica adicional, C<sub>2</sub>-O-C<sub>7</sub>. Esta ligação introduz uma estabilidade conformacional mais elevada, i.e., bloqueia o isomerismo rotacional pelo qual as proantocianidinas de tipo B são reconhecidas (de Bruyne *et al.*, 1999). Estas proantocianidinas não são comuns na natureza, provavelmente, pela sua dificuldade de conversão (Lazarus *et al.*, 1999; Ferreira e Bekker, 1996).

Correntemente, as proantocianidinas são denominadas de acordo com o sistema alfanumérico introduzido por Weinges e colaboradores (1968) e desenvolvido por Haslam e colaboradores (1972). As unidades monoméricas podem apresentar ligações interflavânicas do tipo C-C (proantocianidinas do tipo B), ou, tal como referido anteriormente, possuírem uma ligação interflavânica adicional, C-O-C (proantocianidinas do tipo A).

A investigação das proantocianidinas levou ao conhecimento de novos oligómeros e polímeros. Surgiu então a necessidade de utilizar um sistema de nomenclatura mais apropriado e que não fosse demasiado complexo para este tipo de compostos (Haslam, 1989). No entanto, as hipóteses propostas, como por exemplo a nomenclatura da IUPAC, eram altamente complexas. Porter e colaboradores (1982) desenvolveram um sistema de nomenclatura bastante atractivo, ainda hoje utilizado. Neste sistema, as proantocianidinas são nomeadas de modo semelhante aos polissacarídeos, em que o C<sub>4</sub> da unidade de 3-flavanol que forma a proantocianidina é equivalente ao centro anomérico C<sub>1</sub> da unidade de açúcar dos oligossacarídeos. A ligação interflavânica e a sua direcção são indicadas entre parêntesis (4 $\square$ ). As unidades monoméricas são denominadas de acordo com a nomenclatura dos 3-flavanóis e a configuração do carbono C<sub>4</sub> é indicada pelas letras gregas,  $\alpha$  e  $\beta$ , segundo o sistema de nomenclatura IUPAC. Deste modo, algumas das procianidinas são denominadas por:

Procianidina B1: epicatequina-(4 $\beta$  $\square$  8)-catequina

Procianidina B2: epicatequina-(4 $\beta$  $\square$  8)-epicatequina

Procianidina B3: catequina-(4 $\alpha$  $\square$  8)-catequina

Procianidina B4: catequina-(4 $\alpha$  $\square$  8)-epicatequina

## 2.2.2. BIOSÍNTESE

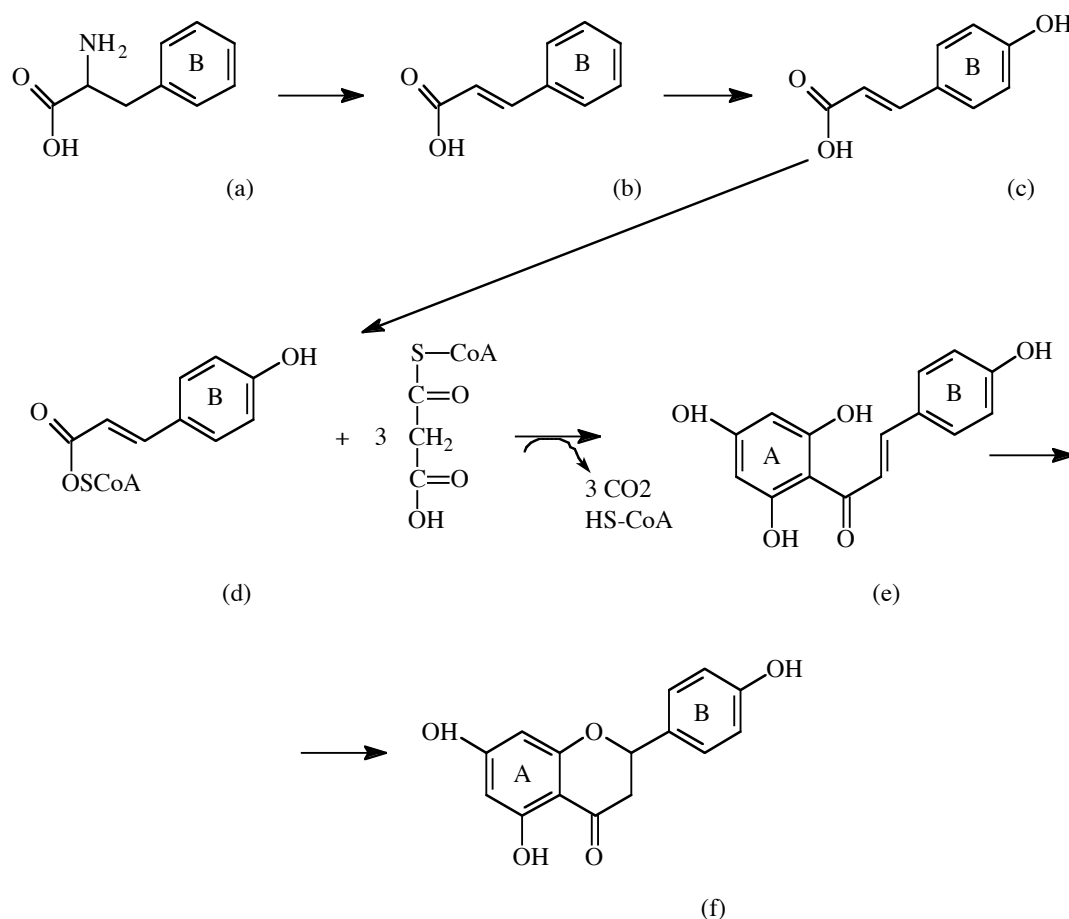
Todos os constituintes das plantas, incluindo os flavonóides, derivam dos produtos primários da fotossíntese. A fotossíntese transforma o CO<sub>2</sub> e a H<sub>2</sub>O em glúcidos que são a fonte de carbono para a síntese dos compostos orgânicos. Adicionalmente, o metabolismo destes compostos, via glicólise e ciclo do ácido cítrico, liberta a energia necessária para todas as reacções biológicas (Samuelsson, 1999).

A partir da formação dos glúcidos desenvolvem-se várias vias biossintéticas. Os flavonóides são sintetizados por combinação de duas vias; uma deriva do ácido chiquímico - *via do ácido chiquímico* - e a outra do acetato - *via do acilpolimalonato* (figura 6).

O ácido chiquímico é o precursor do composto inicial da síntese dos flavonóides, a fenilalanina (figura 6a). Este aminoácido aromático é desaminado pela fenilalanina amónia liase (PAL) a ácido cinâmico (figura 6b) que, por sua vez, é convertido a ácido *p*-cumárico (figura 6c) pela cinamato 4-hidrolase. Estas duas enzimas estão associadas; o ácido cinâmico não é libertado pela PAL mas sim transferido directamente para o centro activo da segunda enzima. Posteriormente, ocorre a adição da CoA catalisada pela *p*-cumarato-CoA ligase. O ácido *p*-cumárico é assim esterificado com a CoA e fica activo para a reacção com as moléculas de malonil CoA, formadas *via acilpolimalonato*. A via biossintética dos flavonóides propriamente dita, começa com a condensação da molécula do ácido *p*-cumárico esterificado com três moléculas de malonil CoA com formação da naringenina chalcona (figura 6e). Esta reacção é catalisada pela chalcona sintetase. Finalmente, ocorre o fecho do anel, catalisado pela chalcona isomerase, com formação da flavanona naringenina (figura 6f).

Deste modo, o anel B da estrutura dos flavonóides resulta da via do ácido chiquímico, o anel A deriva do acetato e os três átomos de carbono que os unem, derivam do fosfoenolpiruvato.

Posteriormente, através de uma sequência de hidroxilações, reduções e metilações catalisadas por várias enzimas, são formadas as diferentes classes de flavonóides (Samuelsson, 1999).



**Figura 6.** Representação esquemática da biossíntese de flavonóides. Adaptado de Samuelsson (1999).

a) fenilalanina; b) ácido cinâmico; c) ácido *p*-cumárico; d) *p*-cumaróil-CoA; e) naringenina chalcona; f) naringenina.

### 2.2.3. DISTRIBUIÇÃO E OCORRÊNCIA

Até ao momento, foram encontrados mais de 5000 flavonóides no reino vegetal. São constituintes característicos das plantas verdes e ocorrem em todas as partes das plantas, incluindo folhas, raízes, cortiça, pólen, néctar, flores, frutos e sementes. O tipo e quantidade de flavonóides encontrados varia consoante as condições de crescimento e de maturação das plantas (Cook e Sammana, 1996).

**Tabela 2.** Distribuição dos flavonóides no Reino Vegetal (Markham, 1982).

Divisão	Sub-divisão	Classe	Exemplos	Flavonóides encontrados
<i>Phaeophyta</i>			Algas castanhas	-
<i>Rodophyta</i>			Algas vermelhas	-
<i>Chlorophyta</i>			Algas verdes	-
<i>Bryophyta</i>		<i>Musci</i>		Auronas (raras <i>Funaria</i> ) Flavonas C- e O-glicosiladas Biflavona (raras <i>Dicranum</i> )
		<i>Hepaticae</i>		Di-hidro-chalconas C-glicosiladas Auronas O-glicosiladas (raras) Flavanonas O-glicosiladas (rara) Flavonas C- e O-glicosiladas Flavonóis O-glicosilados (raros)
<i>Tracheophyta</i>	<i>Lycophytina</i>		Selaginela	Flavonas O-glicosiladas Flavonas C-glicosiladas (raro) Biflavonas (apenas <i>Selaginella</i> )
	<i>Sphenophytina</i>		Cavalinhas	Flavanonas Di-hidro-flavonóis Flavonas O-glicosiladas Flavonas C-glicosiladas (vestig.) Flavonóis O-glicosilados Proantocianidinas
	<i>Pterophytina</i>	<i>Filinaceae</i>	Fetos	Chalconas, di-hidro-chalconas Flavanonas Flavonas C- e O-glicosiladas (raras) Biflavonas (raras) Flavonóis O-glicosilados Proantocianidinas, antocianinas
		<i>Gimnospermae</i>	Pinheiro	Flavanonas Flavonas C-glicosiladas Isoflavonas (raras) Di-hidro-flavonóis, flavonóis Biflavonóides Proantocianidinas, antocianinas
	<i>Angiospermae</i>	Milho Ervilheira	Chalconas, di-hidro-chalconas Auronas O-glicosilados Flavanonas C- e O-glicosilados Flavonas C- e O-glicosilados Biflavonas (raras) Isoflavonas C- e O-glicosilados Di-hidro-flavonóis O-glicosilados Flavonóis C- e O-glicosilados Proantocianidinas, antocianinas	

Lukner (1972) e Kubitzki e Gottlieb (1984) sugeriram que a origem e a evolução primárias das plantas terrestres se encontrava intimamente ligada à produção de metabolitos pela via biossintética do ácido chiquímico. Posteriormente, Jorgensen (1993) adiantou a hipótese de as plantas terrestres terem evoluído a partir das algas. Segundo este autor, os flavonóides exerceriam um papel primordial na protecção da radiação UV, o que permitiria às algas viverem em *habitats* luminosos. Estas hipóteses são corroboradas pela distribuição dos flavonóides no reino vegetal (tabela 2).

É evidente a predominância das diferentes classes de flavonóides nas plantas vasculares, sendo as mais comuns as flavonas, flavanonas, flavonóis e proantocianidinas. Ao contrário de outros flavonóides, as proantocianidinas não foram detectadas em plantas vasculares primitivas (de Pascual-Teresa, 1999).

Os flavonóides encontram-se, normalmente, como derivados glicosilados. As flavonas apigenina e luteolina aparecem, normalmente, nos grãos de cereais e em ervas aromáticas, enquanto que as flavanonas (análogos hidrogenados) hesperidina e naringenina aparecem quase exclusivamente em citrinos. Os flavonóis, quercetina e canferol, predominam nos vegetais e nos frutos e as isoflavonas nos legumes. Os 3-flavanóis encontram-se em muitas plantas, com particular evidência nas folhas de chá. Por fim, as proantocianidinas estão presentes nas maçãs, cebolas e uvas, entre outros (Pietta, 2000).

Tem sido observada uma forte tendência entre plantas relacionadas taxionomicamente e a semelhança de flavonóides que produzem. Deste modo, a informação sobre o tipo de flavonóides que ocorre numa planta pode ser prevista com base em estudos prévios de plantas semelhantes ex., mesmo género ou família (Markham, 1982). De facto, o estudo desenvolvido por Veit e colaboradores (1995) sobre diferentes espécies do género *Equisetum*, permite verificar a semelhança dos flavonóides entre as plantas deste mesmo género.

#### 2.2.4. FUNÇÕES NAS PLANTAS

A grande prevalência dos flavonóides no reino vegetal não é acidental. Estes compostos desempenham um papel primordial no desenvolvimento, crescimento e maturação das plantas, inibem a actividade de certas enzimas, afectam a fosforilação das proteínas celulares e actuam como reguladores do transporte hormonal (di Carlo *et al.*, 1999).

Para além de exercerem estas funções fisiológicas, são responsáveis pela pigmentação das flores e frutos (especialmente as antocianidinas). A coloração exibida é essencial para atrair insectos polinizadores e animais que, comendo os frutos, ajudam a dispersar as sementes. Deste modo, a coloração das flores é determinante para a reprodução sexuada das plantas, uma vez que, através da indução da polinização, proporciona a germinação dos grãos de pólen. Os flavonóides são também essenciais para o desenvolvimento do tubo polínico (Bohm, 1998). Por outro lado, os insectos são estimulados pelos flavonóides à ovoposição o que sugere a existência de uma relação de simbiose entre plantas e insectos.

Os flavonóides contribuem para a qualidade dos frutos: cor, sabor e textura, estando também envolvidos na formação dos pigmentos castanhos resultantes de oxidação decorrente do armazenamento prolongado ou do corte.

Adicionalmente, actuam como filtros da radiação ultravioleta (100-400 nm). A radiação UV-B (280-315 nm) é, das bandas de ultravioleta que atingem a superfície terrestre, a que apresenta menor comprimento de onda e maior energia. Esta radiação penetra a camada de ozono e induz danos severos nas plantas (Harborne e Williams, 2000). Cerca de 90-99% da energia ultravioleta que incide sobre as plantas é absorvida pela epiderme (Bohm, 1998). A localização dos flavonóides nesta região e a relação positiva existente entre a intensidade da radiação solar e a quantidade de flavonóides produzida pelas plantas sugere o envolvimento destes compostos na absorção da radiação UV-B (Waterman e Mole, 1994). De facto, os flavonóides, particularmente, as flavonas e os flavonóis, absorvem nos comprimentos de onda da radiação UV-B e, deste modo, protegem as plantas de um possível dano sem, por outro lado, afectarem a função fotossintética.

Estes compostos não só protegem as plantas do dano oxidativo induzido pelas radiações mas também as defendem do ataque de parasitas fúngicos, de agentes patogénicos e de herbívoros.

Existem dois tipos de compostos químicos que defendem as plantas de infecções bacterianas e fúngicas: aqueles que se encontram presentes nas plantas, i.e., compostos constitutivos, e aqueles que são sintetizados como resposta a um estímulo infeccioso. Estes compostos podem actuar como defesas pré- e pós-infecção, respectivamente (Waterman e Mole, 1994). Os flavonóides são compostos constitutivos, e muitos isoflavonóides, flavanóis, flavanonas e algumas flavonas possuem reconhecida acção antifúngica (Harborne e Williams, 2000).

Adicionalmente, os flavonóides, particularmente as proantocianidinas desempenham um papel primordial na resistência das plantas ao ataque dos herbívoros essencialmente devido às suas propriedades adstringentes.

Outras acções importantes têm sido referidas para os flavonóides. Podem actuar como precursores de substâncias tóxicas para outras plantas (Bohm, 1998), como quelantes de metais nocivos e como agentes redutores. Estão envolvidos na transferência de energia, quer ao nível da respiração quer da fotossíntese. Adicionalmente, actuam como moléculas sinalizadoras que modulam a expressão genética (di Carlo *et al.*, 1999).

#### 2.2.5. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os flavonóides encontram-se em múltiplos alimentos e bebidas (Nutrient Data Laboratory *et al.*, 2003). Actualmente, são considerados factores alimentares semi-essenciais; não são sintetizados mas são metabolizados pelos animais. A sua relevância para a Saúde Humana é ainda incerta. No entanto, vários estudos, realizados *in vitro* e/ou *in vivo*, sugerem que os flavonóides podem exercer notórias actividades fisiológicas nos mamíferos.

O mecanismo pelo qual os flavonóides exercem as suas diferentes actividades biológicas depende, essencialmente, de três propriedades características destes compostos: capacidade de complexar com moléculas incluindo macromoléculas, como

proteínas e polissacarídeos; capacidade de captar radicais livres e capacidade de complexar íons metálicos (ferro, magnésio, cobre, alumínio e cálcio, entre outros).

### Interacção com proteínas

Os taninos, nomeadamente os do tipo condensado (proantocianidinas) são caracterizados pela sua grande afinidade para proteínas. A interacção polifenol-proteína é um fenómeno de superfície, dinâmico, que pode ser irreversível ou reversível (Santos-Buelga e Scalbert, 2000). As interacções reversíveis ocorrem, principalmente, *via* ligações de hidrogénio (entre os grupos hidroxilo fenólicos do tanino - dadores de protões - e os grupos carbonilo das ligações peptídicas das proteínas - aceitadores de protões), interacções hidrofóbicas ou interacções iónicas (em muito menor percentagem) (McManus *et al.*, 1985). Oh e colaboradores (1980) demonstraram que as interacções hidrofóbicas são predominantes e ocorrem entre o núcleo aromático dos taninos e as cadeias laterais alifáticas e aromáticas dos resíduos de aminoácidos das proteínas. As interacções irreversíveis são resultado da formação de ligações covalentes (Beart *et al.*, 1985).

A força das interacções depende da estrutura da proteína e do polifenol (particularmente do tamanho molecular) e da flexibilidade conformacional dos dois compostos (Santos-Buelga e Scalbert, 2000; Hagerman *et al.*, 1998a; McManus *et al.*, 1985). Por outro lado, a estequiometria do complexo polifenol-proteína depende da concentração inicial de proteína. Com efeito, quando os polifenóis precipitam as proteínas, duas situações podem ser encontradas. Quando a proteína se encontra em baixas concentrações, o polifenol associa-se a mais do que um local da sua superfície, originando uma monocamada menos hidrofóbica do que a proteína. Pelo contrário, quando a concentração de proteína é elevada, a camada da superfície, relativamente hidrofóbica, é formada por complexação com os polifenóis e por "cross linkings" entre diferentes moléculas de proteína (McManus *et al.*, 1985; Haslam, 1974).

A capacidade dos polifenóis precipitarem proteínas está na base de muitas das suas actividades. De facto, as interacções polifenol-proteína têm sido responsabilizadas pela



adstringência e sabor amargo de determinados frutos, pela diminuição do valor nutricional de muitos vegetais e pela selecção/rejeição dos alimentos por parte dos herbívoros (Haslam, 1989). A baixa digestibilidade dos alimentos ricos em taninos (nomeadamente, taninos condensados) tem sido explicada pela precipitação das glicoproteínas salivares e inibição das enzimas digestivas. No entanto, o aumento dos níveis de algumas proteases e lipases e dos ácidos biliares, verificado após o consumo de alimentos ricos em taninos, parece contrariar este efeito “anti-nutricional”. O significado nutricional das interacções polifenol-proteína não se encontra totalmente esclarecido, no entanto, foi recentemente discutido por Santos-Buelga e Scalbert (2000).

A inibição enzimática é uma actividade que tem sido imputada não só aos taninos condensados mas também ao restante grupo de flavonóides (Schewe *et al.*, 2002; van Hoorn *et al.*, 2002; Middleton *et al.*, 2000; Zhang e Das, 1994). Esta inibição pode ser conseguida pela formação de complexos solúveis e/ou insolúveis entre o polifenol e a enzima e/ou pela complexação do polifenol com o substrato da enzima (Haslam, 1989). São inúmeras as enzimas, com relevância biológica, inibidas por flavonóides. Middleton e colaboradores (2000) destacam, entre outras, as seguintes: proteína cinase C, fosfolipase A<sub>2</sub> e C, ATPase, lipoxigenase, cicloxygenase, xantina-oxidase, proteinase, aromatase, catecol-O-metiltransferase, hialuronidase e elastase.

#### Captação de radicais livres

Os flavonóides são poderosos captadores (“scavengers”) de radicais livres. A propriedade “scavenging” destes compostos tem sido relacionada com as suas características estruturais e está associada ao seu baixo potencial redox (0,23-0,75 V), que lhes permite reduzir radicais livres (2,3-1,0 V), tornando-os mais estáveis (Chen *et al.*, 2002; Heim *et al.*, 2002; Pannala *et al.*, 2001; Pietta, 2000; Lien *et al.*, 1999; Cao *et al.*, 1997; Rice-Evans *et al.*, 1996). Apesar de se comportarem de modo diferente consoante os ensaios usados na sua avaliação, podem ser encontrados pontos comuns na relação estrutura-actividade. Assim, os estudos realizados mostram que esta actividade depende,

essencialmente, do arranjo dos grupos funcionais ligados ao núcleo principal do composto (Heim *et al.*, 2002):

- grupos hidroxilo

A configuração dos grupos hidroxilo é um dos factores determinantes para a actividade antioxidante dos flavonóides e a principal responsável pela sua capacidade de captar radicais livres (Chen *et al.*, 2002). Esta actividade depende, não só dos potenciais de redução dos radicais, mas também, da capacidade dos grupos hidroxilo dos flavonóides cederem electrões aos agentes oxidantes, segundo a reacção (Rice-Evans, 2001):



onde F-OH representa o flavonóide, R' o radical livre e F-O' o radical livre de oxigénio, resultante da oxidação do flavonóide.

Adicionalmente, a capacidade de captação dos polifenóis está, de um modo geral, positivamente correlacionada com o número de grupos hidroxilo presentes (Sroka e Cisowski, 2003; Heim *et al.*, 2002; Haenen *et al.*, 1997).

Os grupos hidroxilo podem ocorrer nos três anéis da estrutura flavonóide, no entanto, a configuração e o número dos grupos hidroxilo ligados ao anel B são, provavelmente, os que mais afectam a acção "scavenger" de espécies reactivas de oxigénio e de nitrogénio. Os compostos com estrutura catecol no anel B, i.e., *o*- ou 3',4'-di-hidroxilado, apresentam uma actividade bastante significativa, devido ao seu favorável potencial de redução. Os compostos que contêm o anel B mono-hidroxilado em posição 4', apresentam fraca actividade (Pannala *et al.*, 2001).

A substituição do anel A tem uma menor influência na actividade antioxidante dos flavonóides. A presença de grupos hidroxilo nas posições *orto* (posições 5 e 6) é responsável por uma maior actividade do que a presença nas posições *meta* (posições 5 e 7) (Chen *et al.*, 2002).

O anel heterocíclico da estrutura dos flavonóides contribui para a actividade "scavenger" quer pela presença de um grupo hidroxilo livre na posição 3, quer permitindo a conjugação com anéis aromáticos. O fecho do anel não parece influenciar

muito a actividade antioxidante, uma vez que as chalconas são antioxidantes activos. A actividade “scavenger” dos flavonóides é altamente dependente da presença do 3-OH livre (Sichel *et al.*, 1991).

Os flavonóides com o grupo catecol no anel B e com o 3-OH livre mostraram ser cerca de 10 vezes mais activos, na captação do peroxinitrito, do que o ebselen, um potente captador de espécies reactivas de nitrogénio (Heim *et al.*, 2002).

A orientação do ângulo do anel B em relação ao resto da molécula também influencia a capacidade de captar radicais livres. A presença do grupo hidroxilo livre na posição 3, restringe a molécula a certas orientações (Sichel *et al.*, 1991). Os flavonóis e os flavanóis, com o 3-OH, são planares, enquanto as flavonas e as flavanonas, sem este grupo, apresentam conformações ligeiramente diferentes. A planaridade permite a conjugação, a deslocalização electrónica e um correspondente aumento da estabilidade do radical flavonóide (Heim *et al.*, 2002).

- ligação dupla 2,3 e função 4-oxo

Os estudos realizados evidenciam que os flavonóides sem a ligação dupla 2,3 e sem a função 4-oxo são menos activos do que os correspondentes compostos com estas duas características estruturais. A presença da ligação dupla 2,3 e da função oxo e consequente conjugação entre o anel A e B, permite um efeito de ressonância do núcleo aromático que estabiliza o radical resultante do flavonóide e, deste modo, otimiza o efeito estabilizador do radical fenoxilo 3',4'-catecol. Apesar de outros elementos estruturais terem de ser considerados, a capacidade dos flavonóides para captar radicais livres, é indiscutivelmente aumentada pela presença da ligação dupla 2,3 e da função oxo (Heim *et al.*, 2002).

- glicosilação

A glicosilação dos flavonóides reduz a sua actividade, comparativamente às correspondentes geninas (Rice-Evans *et al.*, 1996; van Acker *et al.*, 1996). Plumb e colaboradores (1998) mostraram que a actividade dos flavonóides glicosilados diminuía à medida que o número de unidades de glúcidos aumentava.

Tal como na *o*-metilação, o efeito estérico da 4'-glicosilação, resulta na supressão da actividade “scavenger” da estrutura catecol do anel B.

- grau de polimerização

Os flavonóides polimerizados, como é o caso das proantocianidinas, apresentam uma complexa extensão de relações estrutura-actividade que não se encontra completamente compreendida. A sua complexidade e diversidade estrutural contribuem para a falta de esclarecimento das relações estrutura-actividade. Alguns estudos sugerem que a actividade antioxidante de monómeros, dímeros e trímeros é semelhante. No entanto, outros apontam para um aumento da actividade antioxidante até aos trímeros e para uma diminuição posterior com o aumento do tamanho molecular. A discrepância observada nos resultados de diferentes estudos deve-se, essencialmente, às diferentes metodologias seguidas, à estrutura das proantocianidinas testadas e à presença de impurezas nas fracções (Santos-Buelga e Scalbert, 2000).

#### Complexação com iões metálicos

Os iões metálicos ocorrem *in vivo* em quantidades vestigiais e são essenciais para muitas funções fisiológicas. Encontram-se como constituintes de hemeoproteínas e como cofactores de diferentes enzimas, algumas envolvidas nas defesas antioxidantes (Pietta, 2000). No entanto, intervêm activamente no metabolismo do oxigénio. Com efeito, o ferro e o cobre, livres, aumentam consideravelmente a formação das espécies reactivas de oxigénio, particularmente, através da reacção de Fenton e contribuem para a iniciação da peroxidação lipídica. Através da complexação destes iões metálicos, alguns flavonóides impedem a formação de radicais livres contribuindo, deste modo, para uma benéfica actividade antioxidante (Cook e Sammana, 1996). Adicionalmente, a complexação de um catião divalente não torna, necessariamente, o flavonóide inactivo, uma vez que o complexo formado, mantém actividade “scavenger” de radicais livres, potenciando a acção antioxidante (Heim *et al.*, 2002; Cook e Sammana, 1996).

Apesar das relações estrutura-actividade ainda não se encontrarem totalmente esclarecidas, sabe-se que a estrutura catecol é a que mais contribui para a acção quelante e que, aparentemente, existe uma pequena diferença entre a actividade quelante das geninas e dos respectivos glicósidos (Heim *et al.*, 2002; Pietta, 2000). A reacção de Fenton é fortemente inibida por flavonóides com uma estrutura 3',4'-catecol no anel B, com função 4-oxo e com grupos hidroxilo em posição 5, uma vez que, os complexos com catiões divalentes formam-se entre os grupos 5-OH e a função 4-oxo ou entre os grupos 3'- e 4'-OH da estrutura catecol dos flavonóides (Heim *et al.*, 2002).

As três propriedades descritas estão fortemente relacionadas com a reconhecida **actividade antioxidante** dos flavonóides. Com efeito, ensaios realizados *in vitro*, demonstram que os flavonóides podem actuar como antioxidantes por diferentes mecanismos que incluem:

- supressão da formação de espécies radicalares, quer por inibição das enzimas responsáveis por essa formação (Beyer e Melzig, 2003; Cioffi *et al.*, 2002; van Hoorn *et al.*, 2002; Cotelle *et al.*, 1996), quer pela complexação de metais de transição envolvidos na produção de radicais livres e na mediação da peroxidação lipídica (Gao *et al.*, 1999; van Acker *et al.*, 1998);
- acção captadora de radicais livres e de outras espécies oxidantes (Hashimoto *et al.*, 2003; Peng *et al.*, 2003; Cioffi *et al.*, 2002; Conforti *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2002; Okawa *et al.*, 2001; van den Berg *et al.*, 2000; Bors e Michel, 1999; Gao *et al.*, 1999; Hagerman *et al.*, 1998b; Plumb *et al.*, 1998; Virgili *et al.*, 1998; Salah *et al.*, 1995; Benov e Georgiev, 1994; Igile *et al.*, 1994; Husain *et al.*, 1987);
- regulação ou protecção das defesas antioxidantes (Pietta, 2000).

As propriedades dos flavonóides e a sua capacidade antioxidante têm sido relacionadas com diversas actividades biológicas, nomeadamente, a actividade anti-inflamatória (Yagi *et al.*, 2003; Amos *et al.*, 2002; Borrelli *et al.*, 2002; Bremner e Heinrich, 2002; Huss *et al.*, 2002; Schewe *et al.*, 2002; Su *et al.*, 2002; Guardia *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001; Oldenburg *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 1999; Min *et al.*, 1999; Pelzer *et*

*al.*, 1998; Sharma *et al.*, 1995; Middleton e Kandaswami, 1992; Alcaraz e Jiménez, 1988; Alcaraz e Hoult, 1985), a actividade anti-mutagénica e anti-carcinogénica (Ren *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2001; Arteel *et al.*, 2000; Joshi *et al.*, 2000; Bomser *et al.*, 1999; Feldman *et al.*, 1999; Joshi *et al.*, 1999; Valcic *et al.*, 1996; Gali *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1994), a actividade anti-aterosclerótica e de protecção cardiovascular (Bagchi *et al.*, 2003; Arts *et al.*, 2001a; Fuhrman e Aviram, 2001; Cook e Sammana, 1996; Vinson *et al.*, 1995; Duarte *et al.*, 1993; Hertog *et al.*, 1993; Kinsella *et al.*, 1993; Esterbauer *et al.*, 1992; Mangiapane *et al.*, 1992; Steinberg, 1992; Gryglewski *et al.*, 1987), a actividade anti-vírica (Shahat *et al.*, 2002; Min *et al.*, 2001b; Min *et al.*, 2001a) a actividade anti-ulcerosa (Saito *et al.*, 1998; Murakami *et al.*, 1992; Vennat *et al.*, 1989), a actividade anti-microbiana e anti-bacteriana (Foo *et al.*, 2000; Baldé *et al.*, 1991; Scalbert, 1991), entre outras.

#### 2.2.6. BIODISPONIBILIDADE

Para conhecer o verdadeiro significado biológico da actividade antioxidante dos flavonóides, é necessário compreender a sua biodisponibilidade.

O conceito de biodisponibilidade inclui a bioacessibilidade, ou seja, a quantidade de composto que após ingestão, fica disponível para ser absorvido. Consequentemente, a absorção, a distribuição, o metabolismo, a excreção e a bioactividade dos compostos são determinantes para a biodisponibilidade.

A extensão da absorção dos flavonóides depende da sua estabilidade química até atingir o local de absorção, da possível degradação por microorganismos da flora intestinal, do mecanismo de absorção e do efeito de primeira passagem. Adicionalmente, a absorção dos flavonóides é condicionada pela sua estrutura. Na natureza, todos os flavonóides, com excepção dos flavanóis, são maioritariamente encontrados sob a forma glicosilada e esta, condiciona a sua absorção (Arts *et al.*, 2004).

Na fase de pré-absorção, os flavonóides entram em contacto com dois fluidos: a saliva e o suco gástrico.

Os estudos publicados que avaliam os efeitos da saliva foram realizados com catequinas e sugerem uma modificação mínima ou nula destes compostos (Tsuchiya *et al.*, 1997). Vários estudos avaliam o comportamento de diferentes flavonóides no fluido gástrico. Nas condições ácidas do estômago (estudo *ex vivo*), as procianidinas oligoméricas (de trímeros a decâmeros) são instáveis, sofrendo degradação. As misturas resultantes são constituídas essencialmente por monómeros e dímeros mas também por alguns oligómeros (Spencer *et al.*, 2000). Os flavonóides glicosilados são aparentemente resistentes à hidrólise ácida e, deste modo, chegam intactos ao intestino delgado (Scalbert e Williamson, 2000). Do mesmo modo, as geninas não sofrem qualquer alteração na presença do suco gástrico.

Sabe-se que as geninas são absorvidas no intestino delgado, no entanto, quando se encontram na forma glicosilada, são, aparentemente, demasiado grandes e hidrofílicas para passarem a barreira intestinal por difusão passiva.

Em estudos realizados com a quercetina, Hollman e colaboradores (1995) e, posteriormente, Gee e colaboradores (1998) demonstraram que os glucósidos podem ser transportados para os enterócitos por transporte activo, através do transportador intestinal da glucose (SGLT1). Uma vez nos enterócitos, são hidrolisados, pela  $\beta$ -glucosidase citosólica, antes de entrarem na veia porta. Alternativamente, a ligação  $\beta$ -glucosídica pode ser hidrolisada, no intestino delgado, pela lactase florizina hidrolase, e deste modo a genina livre é absorvida (Day *et al.*, 2000).

Noutro estudo (Hollman *et al.*, 1999) foram administradas quercetina  $\beta$ -glucósido (300  $\mu$ moles) e quercetina  $\beta$ -rutínósido (300  $\mu$ moles), a voluntários humanos, saudáveis. O pico de concentração plasmática de quercetina foi 20 vezes superior e atingido cerca de 10 vezes mais rapidamente, após a ingestão do glucósido, do que após a administração do rutínósido. A biodisponibilidade do rutínósido foi 20% da do glucósido. Este e outros estudos revelam que flavonóides ligados a outras unidades de açúcar como ramnose ou rutinose devem atingir o cólon e ser hidrolisados pelas glicosidasas da microflora (Crespy *et al.*, 1999). Aparentemente, o mesmo acontece com flavonóides ligados a unidades de arabinose ou de xilose, apesar desta questão ainda não ter sido

especificamente estudada (Manach *et al.*, 2004). As geninas, resultantes da hidrólise que ocorre no cólon, poderão não só ser absorvidas, mas também eliminadas ou degradadas (ex. quercetina), o que conduz a uma diminuição da eficiência da absorção (Manach *et al.*, 2004; Crespy *et al.*, 1999). Como a absorção ocorre mais lentamente no cólon do que no intestino delgado, os flavonóides glicosilados com ramnose ou rutinose são, de um modo geral, absorvidos mais lentamente do que as geninas e glucósidos.

Recentemente, um estudo realizado com glicósidos de quercetina confirmou a crucialidade da natureza da unidade de glúcido, ligada ao flavonóide, na absorção pelo intestino delgado (Arts *et al.*, 2004).

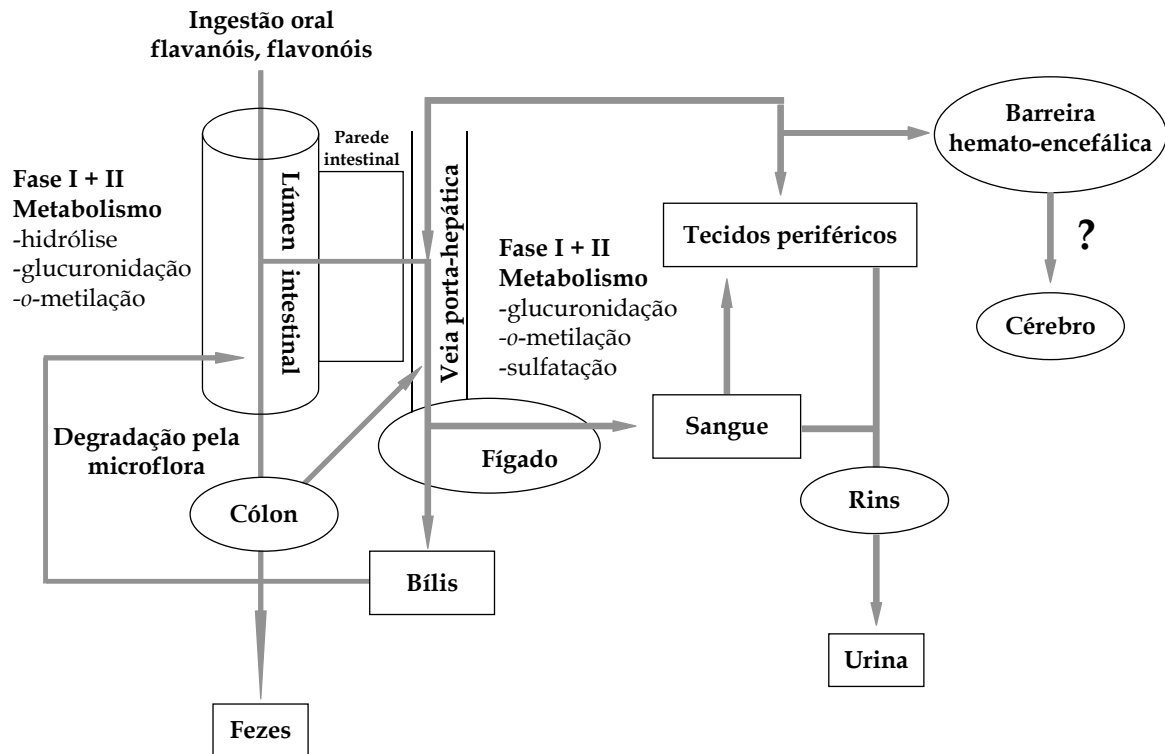
Após o processo de absorção, os flavonóides são conjugados no intestino delgado e no fígado (figura 7). Este processo inclui, principalmente, três tipos de conjugação: metilação, sulfatação e glucuronidação (Manach *et al.*, 2004). Estas reacções são catalisadas pelas enzimas catecol *o*-metiltransferases, sulfotransferases e uridina 5'-difosfato glucuronosil-transferases, respectivamente.

A catecol *o*-metiltransferase catalisa a transferência da S-adenosil-L-metionina para os flavonóides com uma estrutura catecol. Esta reacção é conhecida para a quercetina, catequina e luteolina. As sulfotransferases catalisam a transferência de uma unidade de sulfato da 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato para grupos hidroxilo. As UDP-glucuronosiltransferases são enzimas que se encontram ligadas à membrana do retículo endoplasmático em muitos tecidos e que catalisam a transferência de um ácido glucurónico do ácido UDP-glucurónico para os flavonóides (Manach *et al.*, 2004). A glucuronidação parece ser a via metabólica predominante nos humanos (Day *et al.*, 2000).

A ausência completa de geninas livres no plasma, sugere que o metabolismo dos flavonóides ocorre primariamente no intestino delgado. Com efeito, as reacções de glucuronidação, após hidrólise, podem ocorrer no jejuno ou no íleo (Stahl *et al.*, 2002) ou no interior dos enterócitos (Graefe *et al.*, 2001). Estes metabolitos podem voltar ao lúmen intestinal, no caso de se encontrarem nas células intestinais, ou entrar na corrente sanguínea, via veia porta. Uma vez na circulação, ligam-se à albumina e são transportados



para o fígado. O fígado metaboliza os compostos conjugados provenientes do intestino, resultando num aumento do grau de glucuronidação, sulfatação e metilação (Kroon *et al.*, 2004; Crespy *et al.*, 1999).



**Figura 7.** Absorção e metabolismo dos flavonóides. Adaptado de Stahl *et al.* (2002).

As concentrações plasmáticas atingidas dependem da estrutura do flavonóide e da sua origem (tabela 3).

A natureza dos conjugados transportados para dentro e para fora do fígado, ou seja, que circulam *in vivo* afecta consideravelmente os efeitos biológicos dos flavonóides (O'Leary *et al.*, 2003). Tal como referido, os metabolitos dos flavonóides não circulam sob a forma livre mas sim ligados a proteínas plasmáticas (Boulton *et al.*, 1998). A albumina é a primeira proteína responsável pela ligação, no entanto, a influência desta ligação no efeito biológico dos flavonóides é desconhecida.

**Tabela 3.** Biodisponibilidade de flavonóis em humanos. Adaptado de Manach *et al.* (2005).

Fonte	N.º indivíduos	Dose	T <sub>max</sub>	C <sub>max</sub>	T <sub>1/2</sub>	Referência
			<i>h</i>	$\mu\text{mol/L}$	<i>h</i>	
Cebolas	9*	89 mg*	---	---	---	(Hollman <i>et al.</i> , 1995)
Rutina <sup>♦</sup>	9*	100 mg*	---	---	---	(Hollman <i>et al.</i> , 1995)
Quercetina (Q) <sup>♦</sup>	9*	100 mg*	---	---	---	(Hollman <i>et al.</i> , 1995)
Cebola frita	2	64 mg*	2,9	0,65	16,8	(Hollman <i>et al.</i> , 1996)
Cebolas	9	68 mg*	0,7	0,74	28,0	(Hollman <i>et al.</i> , 1997)
Maçãs	9	107 mg*	2,5	0,3	23,0	(Hollman <i>et al.</i> , 1997)
Rutina <sup>♦</sup>	9	100 mg*	9,3	0,3	---	(Hollman <i>et al.</i> , 1997)
Cebolas	5	50 mg *	2	0,83	---	(McAnlis <i>et al.</i> , 1999)
Q 4'-glucósido	9	150 mg	<0,5	3,5	21,6	(Hollman <i>et al.</i> , 1999)
Rutina <sup>♦</sup>	9	190 mg	6	0,18	28,1	(Hollman <i>et al.</i> , 1999)
Q 3-glucósido	9	156 mg	0,6	5	18,5	(Olthof <i>et al.</i> , 2000)
Q 4'-glucósido	9	160 mg	0,45	4,5	17,7	(Olthof <i>et al.</i> , 2000)
Q <sup>♦</sup>	16	8; 20; 50 mg	2; 2,7; 4,9	0,14; 0,22; 0,29	17; 17,7; 15	(Erlund <i>et al.</i> , 2000)
Rutina <sup>♦</sup>	16	8; 20; 50 mg*	6,5; 7,4; 7,5	0,1; 0,2; 0,3	---	(Erlund <i>et al.</i> , 2000)
Cebolas	12	100 mg*	0,68	7,6	10,9	(Graefe <i>et al.</i> , 2001)
Q 4'-glucósido <sup>♦</sup>	12	100 mg*	0,7	7,0	11,9	(Graefe <i>et al.</i> , 2001)
Rutina <sup>♦</sup>	12	200 mg *	7	1,1	11,8	(Graefe <i>et al.</i> , 2001)

\*Compostos puros; \* valor expresso em equivalentes de quercetina; \*indivíduos ileostomizados  
C<sub>max</sub>, concentração máxima plasmática; T<sub>max</sub>, tempo necessário para atingir a C<sub>max</sub>; T<sub>1/2</sub>, semi-vida plasmática terminal.

A determinação da biodisponibilidade dos flavonóides nos tecidos é de extrema importância, no entanto, os estudos são escassos.

Os polifenóis já foram detectados em vários tecidos de rato, como por exemplo no cérebro, nas células endoteliais, no coração, no rim, no baço, no pâncreas, na próstata, no útero, nos ovários, nas glândulas mamárias, nos testículos, na bexiga, nos ossos e na pele. As concentrações obtidas variam entre os 30 e os 3000 ng em equivalentes de genina/g de tecido e dependem da dose administrada e do tecido em causa. Alguns estudos indicam que o tecido endotelial é um dos principais locais de acção dos flavonóides (Manach *et al.*, 2004).

A natureza dos metabolitos tecidulares pode ser diferente da dos metabolitos encontrados na corrente sanguínea, devido entre outros factores, ao metabolismo intracelular (Manach *et al.*, 2004).

Os metabolitos resultantes podem ser eliminados por via renal ou biliar. A eliminação dos metabolitos de maior peso molecular e com uma extensão de conjugação elevada ocorre, preferencialmente, por via biliar, enquanto que conjugados de menor dimensão são eliminados na urina.

As bactérias intestinais possuem  $\beta$ -glucuronidasas que podem libertar as geninas. A possível passagem das geninas na circulação entero-hepática, pode contribuir para o aumento da biodisponibilidade destes compostos. No entanto, a possível degradação bacteriana das geninas pode diminuir a reciclagem dos conjugados (Crespy *et al.*, 1999). Com efeito, a flora microbiana do cólon metaboliza extensamente as geninas, a vários ácidos aromáticos. Os flavonóis são degradados a ácidos fenilacéticos e fenilpropiónicos. As flavonas e flavanonas são degradadas, adicionalmente, a ácidos cinâmicos (Stahl *et al.*, 2002), que são posteriormente metabolizados a derivados do ácido benzóico (Manach *et al.*, 2004).

A excreção urinária dos flavonóides tem sido muito estudada em humanos e vários metabolitos têm sido encontrados. A quantidade de conjugados de flavonóis e de flavonas excretada na urina é muito baixa, cerca de 3% da quantidade ingerida (Stahl *et al.*, 2002).

#### Efeitos biológicos dos metabolitos dos flavonóides

Os flavonóides são extensamente alterados durante o efeito de primeira passagem e, como tal, as formas moleculares que atingem a circulação sanguínea e os tecidos, são diferentes das inicialmente ingeridas. A pouca informação conhecida sobre os derivados conjugados dos flavonóides presentes no plasma ou nos tecidos deve-se não só à dificuldade da sua identificação precisa mas também à ausência de padrões. Pode-se, no entanto, reflectir e especular acerca da sua actividade antioxidante.

As conjugações modificam a hidrofobicidade e a deslocalização electrónica dos flavonóides e, deste modo, a actividade antioxidante dos conjugados deverá ser diferente da actividade da respectiva genina (Manach *et al.*, 1998). A conjugação torna os flavonóides mais hidrofílicos e deste modo, afecta o seu local de acção (Manach *et al.*, 2004). Adicionalmente, a metabolização compromete e afecta grande parte dos grupos hidroxilo dos flavonóides, o que leva a uma diminuição da sua actividade (Hollman, 2001).

Vários estudos demonstraram que os conjugados da quercetina protegem significativamente a oxidação de LDL. Apesar dos efeitos dos conjugados ser cerca de metade dos efeitos da genina, foram, ainda assim, cerca de 4 vezes mais potentes que o Trolox, um análogo hidrossolúvel da vitamina E (Manach *et al.*, 1998; Morand *et al.*, 1998).

Estudos realizados *in vitro* mostram que, tanto a quercetina como dois metabolitos glucuronidados (em 3'- e 4'-) são potentes inibidores da xantina-oxidase e parecem possuir elevada actividade captadora do radical superóxido. A actividade da lipoxigenase também foi inibida por alguns glucurónidos (excepto pelo 3'-). As concentrações necessárias para que estes compostos exerçam estas actividades são inferiores às concentrações plasmáticas normalmente atingidas pela quercetina *in vivo*. Estas comparações pressupõem uma possível actividade *in vivo* para os metabolitos da quercetina (Day *et al.*, 2000).

A actividade biológica dos metabolitos dos flavonóides é corroborada pelos resultados dos estudos epidemiológicos e dos estudos clínicos (Arts *et al.*, 2001b; Arts *et al.*, 2001a; Rein *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Ferry *et al.*, 1996; Williamson *et al.*, 1996; Hertog *et al.*, 1993).

Por outro lado, tem-se estudado a hipótese do efeito biológico não ser exercido pelos metabolitos que se encontram no plasma. Pressupõe-se que os flavonóides possam ser desconjugados a nível celular, ocorrendo um possível "turnover" dos conjugados a genina livre. Esta hipótese tem sido demonstrada para compostos conjugados com o ácido glucurónico e sulfatos. Com efeito, muitos tecidos possuem a enzima  $\beta$ -glucuronidase, e existem estudos que sugerem que os glucurónidos de quercetina são hidrolisados no

fígado e no intestino delgado. A  $\beta$ -glucuronidase também se encontra presente nos lisossomas de várias células, como por exemplo dos neutrófilos. Em determinadas situações, como inflamação e stresse oxidativo, a enzima é libertada. Assim, a desglucuronidação pode ocorrer e aumentar em alguns estados patológicos, como inflamação, cancro e SIDA (Manach *et al.*, 2004). Este “turnover” dos conjugados glucurónicos às respectivas geninas no local de acção pressupõe uma relação mais próxima entre a actividade *in vitro* e *in vivo* (Graefe *et al.*, 2001).

É importante notar que, os compostos não absorvidos ou absorvidos tardiamente, como é o caso dos oligómeros das proantocianidinas, podem exercer actividades significativas ao nível do tracto gastrointestinal. A sua acção local pode ser particularmente importante no caso de doenças inflamatórias do intestino (ex. doença de Crohn) e de certos tipos de cancro.

#### 2.2.7. ANÁLISE

##### Extracção

A extracção, purificação e análise dos polifenóis é dificultada pela pequena quantidade em que estes se encontram nas plantas, pela natureza dos tecidos nos quais se localizam e pelo facto de ocorrerem, muitas vezes, acompanhados de outros compostos estruturalmente idênticos.

São vários os solventes utilizados na extracção de compostos fenólicos, a partir de tecidos vegetais. A escolha depende, particularmente, da natureza dos compostos que se pretendem extrair. Existem fenóis solúveis em solventes não polares; enquanto outros, como os glicósidos são mais solúveis em solventes polares. Apesar dos compostos fenólicos apresentarem uma grande diversidade estrutural, eles são, maioritariamente, hidroxilados pelo que comumente se usa a água, o etanol, a acetona e o metanol, isoladamente ou, misturados em diferentes combinações, particularmente, com a água. Waterman e Mole (1994) documentaram 33 tipos diferentes de extracções, utilizando

diversas combinações destes solventes, para a obtenção de extractos de plantas. Na extracção de flavonóides altamente apolares, como os metilados ou acilados, é necessário utilizar solventes como o éter, o hexano e o diclorometano (Markham, 1989).

Após a extracção, é muitas vezes necessário proceder a uma purificação dos extractos, para evitar a interferência de outros compostos que também tenham sido extraídos pelo solvente utilizado. Normalmente, eliminam-se as substâncias lipossolúveis tais como lípidos e clorofilas por lavagem do extracto com *n*-hexano ou outro solvente não polar. Posteriormente, os compostos fenólicos podem ser extraídos das soluções aquosas por partilha líquido-líquido, com acetato de etilo (Waterman e Mole, 1994).

### Análise qualitativa

#### *Separação*

As técnicas cromatográficas são as mais utilizadas na separação dos flavonóides; recorre-se à cromatografia em papel, cromatografia em camada fina, cromatografia em coluna, cromatografia líquida de alta resolução e cromatografia com fluidos supercríticos.

A cromatografia em papel (*Paper Chromatography*, PC) é a técnica mais antiga (cerca de 1901) utilizada para separar misturas de compostos polares, como é o caso dos glucósidos de flavonóides (Markham, 1989). É das técnicas mais atractivas devido ao seu baixo custo, simplicidade e bons resultados obtidos. O procedimento mais vulgarizado, que conduz a uma boa separação de misturas relativamente complexas, consiste na eluição bidimensional. Na primeira direcção são, normalmente, utilizados solventes alcoólicos (ex. butanol terciário-ácido acético-água e *n*-butanol-ácido acético-água) e na segunda, solventes aquosos (ex. ácido acético 15%).

A cromatografia em papel tem sido substituída pela cromatografia em camada fina (*Thin Layer Chromatography*, TLC) uma vez que é mais rápida, utiliza menor quantidade de solventes e de amostra, apresenta maior versatilidade, elevada

reprodutibilidade e elevado poder de resolução (Bohm, 1998). Para além da celulose, encontram-se disponíveis outras fases estacionárias para TLC (poliamida, gel de sílica, sílica de fase reversa C-8 ou C-18), que podem ser seleccionadas de acordo com o tipo de compostos presentes nas amostras. Deste modo, ao contrário da cromatografia em papel, é possível separar todos os tipos de compostos; polares e não polares. Os solventes utilizados possuem maior ou menor polaridade e, frequentemente, incorporam pequenas quantidades de ácidos.

A cromatografia em coluna (Column Chromatography, CC) é uma das técnicas de separação mais conveniente para o fraccionamento de misturas de flavonóides. As colunas podem ser preparadas com diferentes tipos de fase estacionária (Markham, 1989):

*Celulose microcristalina* ("Avicel"), utilizada na separação de geninas e mono-, di- e tri-glicósidos. A eluição ocorre, normalmente, com ácido acético a 15% ou com um gradiente de água-metanol de polaridade decrescente. Apresenta baixa capacidade de separação.

*Sílica* (partículas de tamanho entre 0,06 e 0,30 mm), muito útil na separação de flavonas metiladas, isoflavonas e flavanonas não polares e de geninas de flavonóis. É necessário proceder a uma pré-lavagem com HCl e na eluição utiliza-se benzeno-clorofórmio (1:1), seguido de clorofórmio e de ácido acético.

*Poliamida*, ideal para a separação de glicósidos de flavonas e flavonóis. É necessária uma pré-lavagem com metanol e água. A eluição pode ocorrer com diferentes gradientes: de água para metanol; de clorofórmio/metanol para metanol (glicósidos) ou de clorofórmio/etanol/metiletilcetona/acetona (40:20:5:1) para a mesma mistura com menor percentagem de clorofórmio (glicósidos e geninas).

*Sephadex LH-20*, resina de exclusão que actua por adsorção e partilha em fase directa. Muito utilizada para separar misturas complexas de flavanóis. É eluída com etanol, metanol ou acetona ou com as suas misturas aquosas.

*Amberlite XAD-7*, resina adsorvente utilizada para separar flavonóides de outros compostos não polares e de impurezas hidrossolúveis.

*Lichroprep RP-8 ou RP-18*, resina de fase reversa, utilizada na purificação de glicósidos contaminados com polissacarídeos. A eluição ocorre com metanol/água (1:1).

*Toyopearl (Fractogel) HW40*, resina adsorvente, utilizada para separar substâncias de acordo com a massa molecular. É eluída com etanol ou com metanol.

Actualmente, a técnica mais utilizada na separação de flavonóides é a cromatografia líquida de alta resolução (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Normalmente, utilizam-se colunas de fase reversa e a eluição ocorre com gradientes entre ácidos diluídos (ex. ácido acético ou ácido fórmico) e solventes orgânicos (ex. acetonitrilo ou metanol).

Recentemente, a cromatografia com fluidos supercríticos (*Supercritical Fluid Chromatography*, SFC) tem sido desenvolvida e utilizada na separação de flavonóides (Ashraf-Khorassani e Taylor, 2004; Scalia *et al.*, 1999). Esta técnica é uma adaptação da cromatografia líquida e da gasosa, na qual, o fluido supercrítico actua como solvente. As colunas capilares utilizadas são adaptadas da cromatografia gasosa e os sistemas de injeção da cromatografia líquida. A difusão dos solutos nos fluidos supercríticos é cerca de 10 vezes superior à dos solutos nos líquidos (HPLC). Não utiliza solventes orgânicos. O dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) é o fluido supercrítico mais utilizado, com as vantagens de não ser inflamável nem tóxico, ser económico e de ser transparente à radiação UV.

### ***Identificação***

A identificação dos flavonóides baseia-se essencialmente em técnicas espectroscópicas.

#### *Espectroscopia de ultravioleta (UV)*

A espectroscopia de UV é a técnica mais utilizada na identificação de flavonóides. De facto, são poucas ou nenhuma, as publicações que não recorrem a esta técnica. Apresenta



as vantagens de utilizar quantidades mínimas de composto, o que é extremamente importante na análise de flavonóides, de oferecer informações estruturais e do equipamento necessário existir em quase todos os laboratórios (Markham, 1989).

Markham publicou vários livros e artigos dedicados à análise dos flavonóides, particularmente, às suas características de absorção no UV (Markham, 1989; 1982).

A luz UV é absorvida por grupos funcionais das moléculas, conhecidos por cromóforos. De um modo geral, os flavonóides apresentam dois cromóforos, correspondentes aos anéis A (sistema benzoílo) e B (sistema cinamoílo). O anel A é responsável pelo pico de absorção que ocorre entre 250-285 nm - também conhecido por banda II - e o anel B pelo pico que ocorre entre 320-385 nm - banda I.

Os máximos de absorção e a intensidade das bandas depende da natureza do anel C, do local de ligação do anel B e da natureza dos substituintes dos anéis A e B.

Markham (1982) resumiu os efeitos das alterações estruturais dos compostos, nos respectivos espectros UV:

- alterações das substituições do anel A reflectem-se, aparentemente, na absorção da banda II; por outro lado, alterações das substituições do anel B e C, tendem a reflectir-se na absorção da banda I;
- o aumento da oxigenação (especialmente hidroxilação) resulta, normalmente, num desvio batocrómico da respectiva banda (por cada grupo adicional);
- a metilação e a glicosilação (especialmente nos hidroxilos 3, 5, 7 e 4') traduzem-se em desvios hipsocrómicos, i.e., para menores comprimentos de onda. A natureza do glúcido, normalmente, não afecta este comportamento;
- a acetilação de grupos hidroxilo fenólicos tende a anular o efeito desse grupo no espectro;
- a presença de ácidos cinâmicos e de funções acilo num flavonóide pode ser detectada pela presença de uma banda de absorção a cerca de 320 nm no espectro dos flavonóides que, por si só, não absorvem significativamente nesta região (ex. proantocianidinas, antocianidinas).

- as flavonas e os flavonóis, com o sistema 3',4'-di-hidroxilo apresentam, normalmente, um segundo pico, mais pequeno (por vezes um ombro), na banda III.

No entanto, a espectroscopia de UV apresenta limitações, particularmente, na análise de proantocianidinas, uma vez que, todos os compostos desta classe de flavonóides apresentam o mesmo espectro de UV, com apenas um máximo entre os 270-280 nm.

#### *Espectroscopia de Infravermelho (IV)*

A espectroscopia de infravermelho é raramente utilizada na análise de flavonóides. No entanto, esta técnica, na ausência de qualquer outra, pode dar boas informações sobre a estrutura do composto. Muitas características estruturais dos flavonóides podem ser reveladas pelo seu espectro de infravermelho (Bohm, 1998).

#### *Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)*

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear é uma das técnicas mais importantes para a identificação e caracterização estrutural de flavonóides. De entre os isótopos que exibem RMN, os dois utilizados na análise de flavonóides são o  $^1\text{H}$  e o  $^{13}\text{C}$ . O  $^{13}\text{C}$  tem uma abundância relativa de 1,108%, pelo que são necessárias maiores quantidades de amostra quando se utiliza o  $^{13}\text{C}$ , do que o  $^1\text{H}$ .

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de protão ( $^1\text{H}$ -RMN) é utilizada no estudo de flavonas, isoflavonas, flavanonas, di-hidro-flavonóis, flavonóis e flavanóis. Mabry e colaboradores (1970) publicaram os espectros de 128 flavonóides. A  $^1\text{H}$ -RMN distingue o grau de oxigenação dos três anéis, permite determinar o número e a posição dos grupos metoxilo, a presença e a natureza de substituintes ligados em C- e de grupos acilo, o número de glúcidos presentes na molécula e o modo de ligação ao núcleo flavonóide (ou ß) (Markham, 1989).

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono-13 ( $^{13}\text{C}$ -RMN), por sua vez, complementa a  $^1\text{H}$ -RMN, uma vez que, revela o ambiente e o número de átomos de carbono e não de protões (Markham, 1989). No entanto, a sua sensibilidade é inferior e as

quantidades de amostra necessárias são maiores do que nos métodos previamente citados. Permite identificar o número total de átomos de carbono na molécula, o número de carbonos oxigenados no núcleo flavonóide e o número de carbonos nas unidades de glúcidos. Adicionalmente, permite identificar o tipo de ligação dos glúcidos ao flavonóide (C- ou O-) e determinar os locais das ligações interglicosídicas, identificar a natureza e a posição de funções acilo e determinar o local das ligações C- (ex. C-glicósidos, biflavonóides, etc) (Markham, 1982).

A  $^{13}\text{C}$ -RMN é determinante na análise de proantocianidinas. Para além das vantagens anteriores, permite distinguir os estereoisómeros (ex. epicatequina  $\delta_{\text{C}_2}$ , 77 ppm *versus* catequina  $\delta_{\text{C}_2}$ , 84 ppm), conhecer a estereoquímica do  $\text{C}_4$  da subunidade superior de uma unidade de proantocianidina e, tal como descrevem Cai e colaboradores (1991), permite antever o grau médio de polimerização de misturas de proantocianidinas.

#### *Espectrometria de Massa (Mass Spectrometry, MS)*

A espectrometria de massa é uma técnica analítica extremamente útil na caracterização de flavonóides. Permite identificar compostos desconhecidos, elucidando acerca das suas estruturas. Apresenta elevada sensibilidade ( $< 10^{-12}$  g) e especificidade (Hostettmann *et al.*, 1997). A principal vantagem desta técnica em relação a outras, como a RMN, é a pequena quantidade de composto necessária para análise.

Através da espectrometria de massa é possível determinar a massa molecular dos flavonóides e estabelecer a distribuição das substituições nos anéis A e B. Deste modo, tem particular utilidade na determinação da natureza e local de ligação das unidades C- e O-glicósidos (Markham, 1989).

A espectrometria de massa acoplada à cromatografia líquida permite aliar a separação dos compostos com a determinação da massa molecular através da sua ionização. Os iões moleculares formados são repelidos da fonte de ionização e acelerados para a região do analisador. No analisador, os iões são separados de acordo com a sua relação massa/carga ( $m/z$ ), sendo, posteriormente, detectados. As moléculas que não sofrem ionização, são desprezadas e, portanto, não são detectadas. Os iões moleculares podem

sofrer fragmentação, dando origem a iões de massa inferior à molécula original. A natureza dos fragmentos formados depende da estrutura do composto inicial.

O tipo de ionização escolhido está relacionado com as características dos compostos a analisar e com a informação que se pretende obter. Na análise de compostos fenólicos por espectrometria de massa são essencialmente utilizados dois tipos de ionização: a ionização química a pressão atmosférica e a ionização por “electrospray”. Nestas situações, as interfaces LC/MS mais apropriadas são a “heated nebulizer” para ionização química a pressão atmosférica e a “electrospray” para a ionização por “electrospray”.

A interface de “thermospray”, utilizada extensamente nos últimos anos na análise de produtos naturais polares, como as proantocianidinas, é geralmente mais complicada no que diz respeito ao desenvolvimento do método, uma vez que, muitos parâmetros têm de ser optimizados (tipo de tampão, temperatura do vaporizador e da fonte iónica, posição e potencial dos eléctrodos). Por este motivo, a interface “thermospray” já não é vulgarmente utilizada, recorrendo-se principalmente às duas interfaces anteriormente referidas, nomeadamente para a análise de procianidinas (Rohr *et al.*, 2000).

#### Ionização química a pressão atmosférica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI*)

Com a ionização química a pressão atmosférica obtiveram-se bons resultados na análise de flavanóis, flavonas e flavonóis (de Pascual-Teresa *et al.*, 2000; Grayer *et al.*, 2000; Rohr *et al.*, 2000; Maillard *et al.*, 1996).

O acoplamento da cromatografia líquida com a MS foi usado pela primeira vez em 1974. Na APCI, o eluente que sai da coluna de HPLC, é pulverizado e, posteriormente, vaporizado num tubo submetido a altas temperaturas (vaporizador). A mistura do solvente e do soluto no estado gasoso é introduzida na fonte de ionização a pressão atmosférica (Rohr *et al.*, 2000). Na saída do vaporizador encontra-se uma agulha, sujeita a uma elevada voltagem que gera uma descarga eléctrica à superfície. Esta descarga origina iões através de uma série de reacções químicas entre as moléculas de solvente e as do gás envolvente (nitrogénio). Finalmente, estes iões reagem com as moléculas do soluto que se

encontram no estado gasoso, formando os iões que entram no analisador (de Pascual-Teresa, 1999).

Nesta técnica, a volatilização pode constituir uma dificuldade na execução do método embora, se possam usar fases móveis aquosas a elevadas pressões (obtendo-se fluxos de 1-2 mL/min). Este facto é particularmente importante na análise de proantocianidinas, uma vez que os gradientes cromatográficos, geralmente, começam com 80-100% de água.

#### Ionização por “electrospray” (*Electrospray Ionization, ESI*)

A ionização por “electrospray” também ocorre a pressão atmosférica. Apresenta a vantagem de facilitar a ionização de substâncias polares e não voláteis, termolábeis, como é o caso de muitos flavonóides. Possui elevada sensibilidade (Friedrich *et al.*, 2000). Adicionalmente, tem a vantagem de permitir detectar sempre o ião molecular dos compostos, sem qualquer fragmentação. Vários investigadores utilizam a ESI para o estudo de flavanóis e flavonóis (Shui e Leong, 2004; Gu *et al.*, 2003b; Kennedy *et al.*, 2001; Tomas-Barberan *et al.*, 2001; Wollgast *et al.*, 2001; de Pascual-Teresa *et al.*, 2000; Friedrich *et al.*, 2000; Rohr *et al.*, 2000; de Pascual-Teresa *et al.*, 1998).

A espectrometria de massa por “electrospray” foi descrita, pela primeira vez em 1984. Nesta técnica, os iões são formados no estado líquido. A amostra em solução, é passada por um capilar muito fino (diâmetro interno 0,1 mm), sujeito a determinado potencial (3-6 kV). O elevado campo eléctrico que se gera à saída do capilar conduz à formação de pequenas gotas com carga, contendo a amostra, que passam através de uma zona submetida a elevado potencial e pressão, até ao analisador. Durante esta transição, as gotículas diminuem de tamanho por evaporação do solvente. A nebulização da solução é favorecida pela utilização de um fluxo de gás envolvente (ex. nitrogénio) e pelo aquecimento controlado da fonte de ionização.

Os iões podem ser analisados em modo positivo ( $[M+H]^+$ ) ou negativo ( $[M-H]^-$ ). Os polifenóis são compostos pouco acídicos, pelo que, a ionização será favorecida pela análise no modo ião negativo. No entanto, a presença de ácido acético ou ácido fórmico nos eluentes usados na separação por HPLC, para além de melhorar a resolução

cromatográfica, aumenta a eficácia da ionização, tornando viável a análise no modo ião positivo. A formação de aductos acetato e fenolato, que, em certos casos, dificulta a interpretação dos espectros em modo ião negativo, faz com que, grande parte dos investigadores prefira usar o modo ião positivo.

A estabilidade do processo de “electrospray” é limitada para fluxos de 5-10  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

### Análise quantitativa

#### ***Fenóis Totais***

A quantificação dos fenóis totais baseia-se na medida da concentração total de hidroxilos fenólicos presentes numa amostra. Estes ensaios não oferecem qualquer informação acerca do tipo de compostos presentes (Waterman e Mole, 1994). Os métodos mais utilizados são o ensaio do azul da Prússia e o método de Folin-Denis, posteriormente modificado para Folin-Ciocalteu (Schofield *et al.*, 2001). Estes métodos foram alterados ao longo dos anos sendo, actualmente, seguida a versão adoptada pela “Association of Official Agricultural Chemists” (1975) (Waterman e Mole, 1994). De um modo geral, consistem na oxidação dos compostos fenólicos, originando uma mistura de óxidos que absorve a determinado comprimento de onda. Apresentam o inconveniente de poderem oxidar compostos facilmente oxidáveis, como é o caso do ácido ascórbico.

#### ***Proantocianidinas Totais***

A análise quantitativa das proantocianidinas pode ser levada a cabo por métodos químicos ou pela precipitação de proteínas (Hagerman e Butler, 1991). Os primeiros são mais utilizados na quantificação de taninos, enquanto que, os métodos de precipitação de proteínas revelam o potencial biológico dos taninos presentes na amostra.

*Métodos químicos*

Como os taninos são ricos em grupos fenólicos, os ensaios que quantificam estes grupos (referidos na quantificação de fenóis totais) podem ser utilizados na análise das proantocianidinas. No entanto, a ausência de especificidade para estes taninos impossibilita uma correcta determinação do seu conteúdo, nas amostras. Alternativamente, são utilizados ensaios que se baseiam nas características estruturais das proantocianidinas minimizando, deste modo, as interferências de outros compostos fenólicos.

O método do butanol ácido, descrito por Porter e colaboradores (1986), é o mais simples e o mais específico para a quantificação das proantocianidinas. Estes taninos sofrem uma despolimerização oxidativa na presença de butanol, catalisada pelo ácido clorídrico. Os produtos desta reacção - antocianidinas - são detectados espectrofotometricamente. Este método apresenta algumas limitações, descritas em Waterman e Mole (1994).

O método da vanilina (Price e Butler, 1977) também é muito utilizado na determinação das proantocianidinas. Neste ensaio, o aldeído aromático reage com as proantocianidinas sem despolimerização, formando complexos solúveis e corados. Esta reacção não ocorre unicamente com a vanilina mas também com outros aldeídos aromáticos como, por exemplo, o *p*-dimetilaminocinamaldeído (DMACA).

*Métodos baseados na capacidade de precipitar proteínas*

A ligação dos taninos a proteínas é avaliada pela quantidade de tanino precipitado por uma proteína de referência, em condições específicas. A quantidade do complexo tanino-proteína formada depende das características do tanino e das condições de reacção. Deste modo, os resultados têm de ser interpretados cuidadosamente, especialmente, quando comparados com resultados obtidos para ensaios realizados em condições diferentes. Tanto os taninos condensados como os hidrolisáveis precipitam proteínas e, como tal, este ensaio não é específico para os taninos condensados (Hagerman e Butler,

1991). A quantidade de precipitado formado pode ser avaliada pela formação de complexos corados com o ião ferro ou pelo reagente do azul da Prússia.



## 2.3. INFLAMAÇÃO

### 2.3.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DA INFLAMAÇÃO

O processo inflamatório resulta de uma resposta à destruição tecidual induzida por estímulos endógenos ou exógenos (ex. agentes infecciosos, processos de isquémia, interações antígeno-anticorpo, agentes químicos ou físicos). É um mecanismo importante, através do qual, um organismo se defende dos agentes agressores e inicia a reparação estrutural e funcional dos tecidos danificados.

A resposta inflamatória é, de um modo geral, acompanhada de diversos sinais clínicos, como edema, calor, rubor e dor e decorre em três fases distintas, mediadas por mecanismos diferentes. Os estados iniciais - inflamação aguda - são caracterizados por uma vasodilatação local e pelo aumento da permeabilidade capilar, de que resulta a formação de edema. Posteriormente, a fase sub-aguda da resposta inflamatória, que é caracterizada pelo recrutamento de leucócitos e células fagocíticas para os locais de inflamação e pela sua migração para os tecidos (Goodman e Gilman's, 2001). Uma vez nos tecidos, as células inflamatórias (ex. neutrófilos) podem ser estimuladas a libertar produtos bactericidas e de desgranulação (ex.: espécies reactivas de oxigénio e proteases), assim como, mediadores lipídicos biologicamente activos (ex.: leucotrieno B<sub>4</sub> e o factor de activação plaquetária - PAF). Adicionalmente, dependendo da natureza do agente patogénico, as células mononucleares fagocíticas podem ser estimuladas a sintetizar produtos do metabolismo do ácido araquidónico e potentes citocinas que modulam a resposta inflamatória (Sigal e Ron, 1994). Por último, na fase crónica, proliferativa, ocorre degeneração tecidual e fibrose (Goodman e Gilman's, 2001).

A resposta inflamatória é essencial para a sobrevivência aos agentes patogénicos e a várias agressões, no entanto, em determinadas situações pode ser exagerada e mantida sem nenhuma razão benéfica aparente (Goodman e Gilman's, 2001). Nestas situações, de inflamação crónica, os processos de inflamação e de reparação ocorrem simultaneamente e não consecutivamente (Wakefield e Kumar, 2001).

Com efeito, a inflamação crónica pode resultar de uma resposta aguda não neutralizada, de infecções persistentes, de uma exposição prolongada aos agentes tóxicos, endógenos ou exógenos e de doenças auto-imunes (ex.: artrite reumatóide e lúpus eritematoso). Resumidamente, é caracterizada por apresentar uma resposta exsudativa menor, por um elevado recrutamento e infiltração celular (linfócitos, células plasmáticas e, particularmente, macrófagos), por uma elevada destruição tecidual e uma proliferação celular local, numa tentativa de cicatrização, por substituição do tecido danificado por tecido conjuntivo (angiogénese e fibrose) (Wakefield e Kumar, 2001).

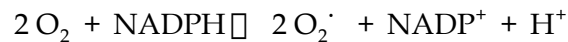
### 2.3.2. PRODUÇÃO E PAPEL DAS ESPÉCIES REACTIVAS DE OXIGÉNIO NA INFLAMAÇÃO

As espécies reactivas de oxigénio (ROS) são formadas constantemente no organismo. Apesar de nos últimos anos, ter aumentado o interesse sobre as ROS, como possíveis moléculas sinalizadoras e mediadoras da proliferação, diferenciação e das funções celulares (Jackson *et al.*, 2002), sabe-se que, quando formadas em excesso ou em ambientes inapropriados, como no caso dos processos inflamatórios crónicos, estas espécies podem ser extremamente tóxicas e desempenhar um papel importante na destruição e morte celulares. A compreensão desta dualidade de acções é fundamental para a interpretação do papel destes compostos na resposta inflamatória.

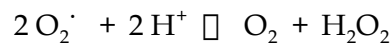
Apesar das ROS aparecerem, virtualmente, em todas as células, apenas algumas, incluindo as células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos e eosinófilos) possuem um complexo enzimático - a NADPH-oxidase - capaz de produzir e de libertar, activamente, elevadas quantidades de uma dessas espécies, que posteriormente originará outras (Splettstoesser e Schuff-Werner, 2002; Suh *et al.*, 1999). A principal função das ROS produzidas a partir da NADPH-oxidase é defender o organismo dos agentes nocivos, através da sua toxicidade ou por interferência indirecta no equilíbrio protease/antiprotease (Grisham, 1994; Weiss, 1989). No entanto, quando ocorre uma desregulação da actividade da enzima, a produção excessiva de ROS, e o consequente desequilíbrio entre oxidantes/antioxidantes, é responsável por um dano tecidual severo.

A NADPH-oxidase é um complexo enzimático constituído por seis sub-unidades diferentes. O domínio catalítico encontra-se integrado na membrana plasmática e consiste num flavocitocromo *b* (flavocitocromo *b*<sub>558</sub> ou *b*<sub>245</sub>) formado por duas sub-unidades - p22<sup>phox</sup> e gp91<sup>phox</sup> - ligadas por ligações não covalentes, numa proporção de 1:1. A sub-unidade gp91<sup>phox</sup> contém uma molécula de FAD e duas proteínas heme *b*. Os restantes componentes da enzima, GTPase Rac, p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> e p67<sup>phox</sup>, quando inactivos, encontram-se no citosol (Vignais, 2002).

A activação da NADPH-oxidase envolve a transferência das sub-unidades Rac, p47<sup>phox</sup> e p67<sup>phox</sup> do citosol para a membrana, local onde se associam ao flavocitocromo *b*. Pensa-se que esta ligação resulta na modificação da conformação da sub-unidade gp91<sup>phox</sup>, favorecendo a transferência de electrões do NADPH citosólico para o heme *b* (Vignais, 2002). O NADPH actua como dador de electrões e reduz o oxigénio molecular (O<sub>2</sub>) a anião superóxido (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>), segundo a reacção (Jones, 1994):



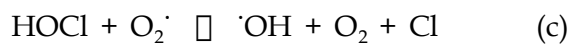
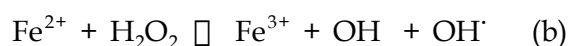
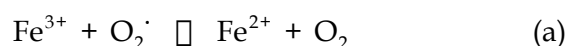
O termo explosão respiratória (“respiratory burst”) é utilizado para descrever o súbito e significativo consumo de oxigénio pelas células fagocíticas, caracterizado pela activação da NADPH-oxidase, e consequente libertação de aniões superóxido para o meio extracelular ou para dentro do vacúolo fagocítico (Vignais, 2002). O O<sub>2</sub><sup>·-</sup> libertado é rapidamente reduzido (espontânea ou enzimaticamente) a peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), uma molécula pequena, relativamente estável, que se difunde rapidamente:



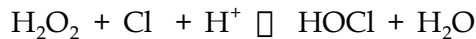
A velocidade de dismutação do O<sub>2</sub><sup>·-</sup> é máxima a pH 4,8 (k = 2x10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>) e diminui com o aumento do pH (Schiller *et al.*, 2003). Deste modo, a dismutação espontânea do O<sub>2</sub><sup>·-</sup> é favorecida pelo pH ácido do fagossoma.

A formação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é um passo intermédio para a produção das espécies altamente oxidantes, radical hidroxilo (·OH) e ácido hipocloroso (HOCl).

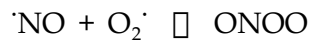
A produção biológica do radical hidroxilo ocorre, pelo menos, através de duas reacções diferentes: por reacção do peróxido de hidrogénio com o anião superóxido, na presença de metais de transição, segundo a reacção de Haber-Weiss (reacções a e b) (Weiss *et al.*, 1977) ou pela redução do ácido hipocloroso (HOCl), mediada pelo O<sub>2</sub><sup>·-</sup> (reacção c) (Arnhold, 2004).



Os neutrófilos e monócitos activados, secretam uma peroxidase, a mieloperoxidase, que usa o peróxido de hidrogénio produzido após a explosão respiratória para oxidar as iões Cl<sup>-</sup> a HOCl (Furtmuller *et al.*, 2000; Thomas, 1979), segundo a reacção:



Paralelamente, durante os processos inflamatórios, vários agentes como os lipossacarídeos bacterianos (LPS) ou citocinas (interferão- $\gamma$ , IL-1 ou TNF- $\alpha$ ), activam a iNOS (“inducible NO synthase”) que se encontra presente nos macrófagos, monócitos e noutras células, conduzindo a uma elevada produção de óxido nítrico (·NO) (Guzik *et al.*, 2003; Coleman, 2001). Apesar da produção de ·NO aparentar ser independente da produção de ROS, a interacção do ·NO com o O<sub>2</sub><sup>·-</sup> leva à formação do peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), um potente oxidante que medeia grande parte das acções tóxicas do ·NO (Splettstoesser e Schuff-Werner, 2002; Coleman, 2001):



As espécies reactivas de oxigénio desempenham um papel primordial na modulação das reacções inflamatórias. O principal objectivo das ROS libertadas pelas células fagocíticas, é defender o organismo de agentes nocivos, através de uma acção tóxica sobre os mesmos ou por interferência no balanço protease/antiprotease.

A fagocitose é um dos mecanismos, através do qual, os leucócitos recrutados para os locais de inflamação, destroem os organismos invasores e removem os agentes nocivos. Este mecanismo ocorre em três passos: 1) reconhecimento e ligação do agente invasor à célula fagocítica; 2) envolvimento com conseqüente formação de um vacúolo fagocítico e 3) morte e degradação do material incorporado. A morte dos microorganismos invasores ocorre pela elevada libertação de ROS, dentro do vacúolo fagocítico. O superóxido libertado sofre imediata dismutação e forma  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Esta espécie reactiva é insuficiente para matar todas as bactérias, no entanto, a produção do  $\cdot\text{OH}$  e, particularmente, do HOCl já o é. O HOCl é um agente anti-microbiano que destrói as bactérias por halogenação ou por peroxidação dos lípidos e proteínas (Rosen *et al.*, 2002; Winterbourn, 2002; Zhang *et al.*, 2002; Albrich *et al.*, 1981; Harrison e Schultz, 1976). Por outro lado, a sobreprodução de ROS, conduz a um desequilíbrio das defesas antioxidantes celulares, conduzindo à autoxidação das células fagocíticas e à conseqüente destruição e morte celulares (Splettstoesser e Schuff-Werner, 2002). Deste modo, as ROS podem desempenhar um papel crítico na apoptose das células fagocíticas, um dos mecanismos chave da desactivação dos neutrófilos e cessação da inflamação (Splettstoesser e Schuff-Werner, 2002).

A grande desvantagem das ROS no meio extracelular, é a sua falta de especificidade. Tanto podem actuar sobre os agentes nocivos como sobre componentes essenciais do organismo, tais como proteínas (especialmente as que contêm grupos sulfidrilos), DNA, lípidos e glúcidos. A actividade citotóxica depende da espécie reactiva em causa e da sua relação com as defesas antioxidantes. É este equilíbrio, oxidante/antioxidante que

determina a extensão do dano celular (Sigal e Ron, 1994) e que pode estar na base do processo inflamatório. Por este motivo, vários autores têm realizado estudos e encontrado relações positivas entre a actividade anti-inflamatória de determinados fármacos e a sua capacidade de captar ROS (Himmelfard, 2004; Gonçalves *et al.*, 1998; Dinis *et al.*, 1994).

### 2.3.3. PAPEL DAS ROS NAS DOENÇAS REUMÁTICAS

As doenças reumáticas englobam um vasto número de situações que têm em comum o comprometimento do sistema músculo-esquelético, ou seja, ossos, cartilagem, estruturas peri-articulares (localizadas perto das articulações como tendões e ligamentos) e/ou músculos. Das várias doenças reumáticas (osteoartrite, artrite reumatóide, gota, lúpus, febre reumática), a osteoartrite (OA) e a artrite reumatóide (AR) são, normalmente, as mais diagnosticadas. Deste modo, nesta secção, o papel das ROS é discutido, dando particular importância à AR.

A AR é caracterizada por uma sinovite crónica (i.e., inflamação das articulações) e destruição da cartilagem. A cartilagem pode ser degradada por diferentes produtos resultantes do metabolismo das células inflamatórias (enzimas e ROS) que invadem o espaço articular, durante a inflamação aguda. As ROS são produzidas por células acumuladas em quantidades elevadas nas articulações inflamadas, particularmente, pelos fibroblastos, condrócitos, macrófagos e, especialmente, neutrófilos (Schiller *et al.*, 2003). Vários estudos apontam para um aumento significativo destas espécies em doentes com AR (Wahl *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 2000). Apesar das ROS se encontrarem interligadas e todas poderem reagir com, pelo menos, uma biomolécula, possuem elevadas diferenças na sua reactividade.

#### Anião Superóxido

O anião superóxido pode actuar como redutor ou como oxidante. No entanto, no interior das células, rico em agentes redutores, actua primariamente como oxidante (Fridovich, 1997). Sabe-se que o  $O_2^{\cdot -}$  oxida os “clusters” 4Fe-4S dos centros

ativos das desidratases, como a aconitase, fumarase A e B, 6-fosfogluconato desidratase entre outras, levando à libertação de ferro. O ferro libertado pode, por sua vez, reagir com peróxidos, como o peróxido de hidrogénio, segundo a reacção de Fenton, formando o radical hidroxilo (Fridovich, 2001). Adicionalmente, o  $O_2^{\cdot -}$  reage prontamente com o  $\cdot NO$  ( $k = 5 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$ ) formando peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), um poderoso oxidante (Koppenol, 1998). Também pode reagir com heme peroxidases, como a mieloperoxidase (Schiller *et al.*, 2003) e decompor S-nitrosotióis (Aleryani *et al.*, 1998). Deste modo, o anião superóxido pode não só oxidar componentes celulares, como também formar espécies mais oxidantes (Fridovich, 2001).

Vários estudos revelam que a produção de anião superóxido contribui para a degradação da cartilagem e dos tecidos, particularmente, por acção no colagéneo (Schiller *et al.*, 2003). Esta acção não só pode ser mediada pelo superóxido, como também, por outras ROS que a partir dele se formam.

### Peróxido de Hidrogénio

O peróxido de hidrogénio difunde livremente para dentro das células produzindo severas modificações bioquímicas, incluindo a activação do “shunt” da hexose monofosfato e do ciclo da glutathione redox, a oxidação intracelular de sulfidrilos, a depleção do ATP intracelular, a oxidação do DNA, a perda do dinucleótido  $\beta$ -nicotinamida adenina, a activação da poli(ADP-ribose) polimerase, o rápido aumento do cálcio intracelular e grandes perturbações ao nível do citoesqueleto e da membrana plasmática (Hinshaw *et al.*, 1986; Hyslop *et al.*, 1986; Schraufstatter *et al.*, 1986; Spragg *et al.*, 1985; Harlan *et al.*, 1984).

O peróxido de hidrogénio reage com o cloro, numa reacção catalisada pela mieloperoxidase, formando o HOCl. Uma elevada percentagem do  $H_2O_2$  formado *in vivo* pelas células polimorfonucleadas, é halogenado pela mieloperoxidase a HOCl e, em condições ácidas a  $Cl_2$  (Jaimes *et al.*, 2001). Adicionalmente, pode reagir segundo a reacção de Fenton e formar radicais hidroxilo.

O  $H_2O_2$  exibe baixa reactividade com os aminoácidos, salvo aqueles que possuem grupos sulfidrilos (-SH), como a cisteína, que rapidamente converte nos respectivos dissulfuretos (ex. cistina) e, dependendo da estequiometria e condições da reacção, ao ácido sulfónico (Schiller *et al.*, 2003). A cisteína é muitas vezes utilizada como antioxidante por apresentar uma reactividade elevada com as ROS.

Roberts e colaboradores (1989) sugeriram que o  $H_2O_2$  reage com os proteoglicanos da cartilagem e com o ácido hialurónico, contribuindo deste modo para a sua degradação. No entanto, estes autores utilizaram quantidades muito elevadas de  $H_2O_2$  ( $> 240 \mu M$ ) o que compromete a relevância fisiológica dos resultados. Por outro lado, outros estudos indicam que o efeito do  $H_2O_2$  na cartilagem é muito fraco, mas extremamente elevado na presença de iões ferro (Schiller *et al.*, 2003).

O anião superóxido e o peróxido de hidrogénio são das espécies reactivas de oxigénio, as menos reactivas, no entanto, são capazes de difundir livremente, atravessando canais iónicos ( $O_2^{\cdot -}$ ) ou membranas plasmáticas ( $H_2O_2$ ) e afastar-se do local da sua produção.

### Radical Hidroxilo

O radical hidroxilo é de todas as espécies reactivas de oxigénio a mais reactiva. Este radical reage não especificamente com todas as moléculas biológicas com constantes de velocidade de reacção de segunda ordem de cerca de  $10^9$ - $10^{10} M^{-1}s^{-1}$  e apresenta, como tal, um tempo de vida muito pequeno.

Recentemente, Schiller e colaboradores (2003) reviram as reacções do radical hidroxilo com os aminoácidos e glúcidos presentes na cartilagem. Com efeito, o radical hidroxilo reage com todos os aminoácidos simples, dando origem a produtos estáveis com grupos carbonilo adicionais, com os aminoácidos aromáticos, com aminoácidos contendo grupos sulfidrilo, com proteínas da cartilagem como o colagénio e com glúcidos (glucose e polissacarídeos).



### Ácido Hipocloroso

Mais de 80% do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gerado pelos neutrófilos activados, é usado para formar HOCl (Whiteman *et al.*, 2003).

O ácido hipocloroso apresenta elevados níveis em doentes com artrite reumatóide. Esta espécie reactiva medeia a destruição da cartilagem, por desregulação do equilíbrio protease/antiprotease (Clark *et al.*, 1981). As metaloproteinases desempenham um papel crucial no “turnover” da matriz assim como no funcionamento de muitas proteínas. O HOCl, formado pelas células polimorfonucleares activadas, inactiva os inibidores das enzimas serina proteases, como a  $\alpha_1$ -antitripsina,  $\alpha_2$ -macroglobulina e o inibidor tecidual das metaloproteinases (Shabani *et al.*, 1998); por outro lado, activa as procloagenases, incluindo a gelatinase e a matrilisina (Michaelis *et al.*, 1992; Capodici e Berg, 1991; Peppin e Weiss, 1986). A degradação da fibronectina, mediada pela elastase, aumenta por exposição ao HOCl (Visser e Winterbourn, 1991).

Adicionalmente, o HOCl também pode contribuir para a destruição das articulações por degradação directa da *N*-acetilglucosamina e por clivagem dos proteoglicanos (Whiteman *et al.*, 2003; Woods e Davies, 2003).

Vários estudos comprovam que o HOCl reage com lípidos, peroxidando-os ou formando cloridrinas. Estas reacções são dependentes do pH e da presença de hidroperóxidos e contribuem para a patologia das doenças inflamatórias. Os alvos preferenciais são as duplas ligações dos ácidos gordos insaturados e colesterol (Spickett *et al.*, 2000). O HOCl também pode induzir a oxidação de proteínas, por reacção com os resíduos de cisteína, metionina, lisina e tirosina, e de polissacarídeos (Woods e Davies, 2003).

Os grupos tióis e tioésteres são os alvos preferenciais deste composto. Só depois de consumidos é que o HOCl afecta os grupos amina e anéis aromáticos das proteínas. Apesar de também ocorrer em sistemas celulares, a reactividade do HOCl com os glúcidos e lípidos insaturados é muito menor do que com as proteínas (Schiller *et al.*, 2003).

### Óxido Nítrico

Vários estudos detectaram níveis elevados de óxido nítrico no líquido sinovial de doentes com doenças reumáticas, comparativamente aos níveis detectados em indivíduos sãos, sugerindo um aumento na síntese de  $\text{NO}$  em indivíduos que sofrem de doenças reumáticas (Schiller *et al.*, 2003; Kinne *et al.*, 2000). Adicionalmente, em modelos animais com inflamação nas articulações, foram detectados níveis elevados de  $\text{NO}$  não só no líquido sinovial, mas também na circulação (Wahl *et al.*, 2003). Os níveis plasmáticos dos produtos de reacção do  $\text{NO}$ , nitritos e nitratos, têm sido correlacionados com a progressão da doença (Wahl *et al.*, 2003).

Schiller e colaboradores (2003), sugerem que apenas os condrócitos articulares, expressam iNOS, podendo ser estimulados a produzir elevadas quantidades de  $\text{NO}$ . No entanto, outros estudos, referem que a síntese de  $\text{NO}$  ocorre após a activação da iNOS dos macrófagos presentes na membrana sinovial inflamada (Kinne *et al.*, 2000).

O ácido hialurónico é o principal responsável pela viscosidade do fluido sinovial que actua como lubrificante e amortecedor de choques, bloqueia a perda de proteoglicanos da matriz da cartilagem para o espaço sinovial e ajuda a prevenir a invasão das células inflamatórias para o espaço articular (Moreland, 2003). Pensa-se que o  $\text{NO}$  reduz a viscosidade do ácido hialurónico, comprometendo, deste modo, a integridade da cartilagem (Schiller *et al.*, 2003).

Apesar do tempo de semi-vida do  $\text{NO}$  variar entre 1 e  $10^{-3}$ , os elevados níveis formados podem levar à produção de outras espécies reactivas, que poderão reagir com as proteínas celulares. Com efeito, apesar de pequenas concentrações de  $\text{NO}$  serem essenciais para a defesa do organismo, concentrações elevadas são tóxicas e responsáveis pela destruição do DNA, pela indução da apoptose, pela permeabilidade vascular, pela formação de espécies mais reactivas e podem favorecer uma reposta autotóxica (Wahl *et al.*, 2003).

Wahl e colaboradores (2003) testaram o efeito de inibidores das diferentes NOS e de captadores do  $\text{NO}$  na inflamação e destruição do tecido sinovial. Surpreendentemente, os inibidores específicos da iNOS mostraram ser menos eficazes do que os não específicos,

que inibiam tanto a iNOS como as cNOS. Estes resultados apontam para um envolvimento da NOS constitutiva nas sequelas resultantes da inflamação sinovial crónica e na destruição tecidual.

### Peroxinitrito

Tal como referido anteriormente, em condições de stresse oxidativo, o  $\cdot\text{NO}$  pode reagir com o  $\text{O}_2\cdot^-$  e formar o anião peroxinitrito. Uma vez que os radicais que dão origem ao peroxinitrito são formados concomitantemente pelas células endoteliais, neutrófilos e macrófagos, durante a resposta inflamatória, o seu envolvimento nos processos inflamatórios pode ser de elevada importância (Fernandes *et al.*, 2003). Consequentemente, o peroxinitrito tem sido associado a diferentes situações inflamatórias (Schiller *et al.*, 2003; Szabó, 2003; Hooper *et al.*, 2000).

O mecanismo pelo qual o peroxinitrito exerce as suas acções tóxicas tem sido estudado. Apesar de ser relativamente estável, a pH fisiológico, cerca de 20% do peroxinitrito (pKa 6,8), encontra-se na sua forma protonada, i.e., na forma de ácido peroxinitroso (ONOOH), um composto extremamente reactivo que decai rapidamente formando uma mistura de produtos reactivos, como o radical hidroxilo e o dióxido de nitrogénio (Arteel *et al.*, 1999; Pannala *et al.*, 1997; Kooy *et al.*, 1994). O peroxinitrito e os seus intermediários podem ser tóxicos pela reacção com diferentes biomoléculas, tais como lípidos, proteínas, DNA, glutatião, ascorbato, entre outras (Arteel *et al.*, 1999).

O peroxinitrito medeia a maior parte dos efeitos tóxicos do  $\cdot\text{NO}$ . Oxida grupos tióis e proteínas contendo grupos tióis, metais de transição, e vários compostos aromáticos (Szabó, 2003).

Ischiropoulos e al-Mehdi (1995) demonstraram que a reacção espontânea do peroxinitrito com proteínas resulta na nitração dos resíduos de tirosina com formação de 3-nitrotirosina. A formação da 3-nitrotirosina tem sido demonstrada, *in vivo*, em inúmeras situações inflamatórias (Arteel *et al.*, 1999).

As diferentes reacções do peroxinitrito e dos seus intermédios influenciam as funções celulares. Por exemplo, a nitração da tirosina leva à disfunção das proteínas nitrosadas,

como é o caso da superóxido dismutase e do citocromo P<sub>450</sub>. A oxidação dos grupos sulfrídeos é responsável pela inibição da aconitase mitocondrial e citosólica e de outras enzimas cruciais da cadeia respiratória mitocondrial. Adicionalmente, o peroxinitrito inibe uma série de bombas iónicas, incluindo as bombas de cálcio, os canais de cálcio-potássio e a actividade da ATPase membranar Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, contribuindo para a desregulação do balanço iónico e de uma variedade de funções celulares (Szabó, 2003).

Em suma, doenças reumáticas inflamatórias, em particular a artrite reumatóide, claramente envolvem a produção de espécies reactivas de oxigénio, que se não forem neutralizadas potenciarão o processo inflamatório. Normalmente, existe um equilíbrio entre espécies oxidante e antioxidantes, pelo que, uma vez formadas são naturalmente e prontamente neutralizadas não resultando daí nenhum dano para a célula ou para o indivíduo. O dano surge quando há excesso de produção de espécies reactivas ou défice de antioxidantes. Neste sentido, uma estratégia óbvia para o combate às doenças inflamatórias será um maior aporte de antioxidantes aos locais de inflamação.

A *Agrimonia eupatoria* L. e o *Equisetum telmateia* Ehrh. são duas plantas vulgarmente utilizadas na medicina popular, cujo mecanismo subjacente à sua actividade anti-inflamatória não está esclarecido. Será que entre os prováveis mecanismos de acção destas plantas se encontra uma significativa capacidade antioxidante? Se sim, a que compostos fitoquímicos se deve esta actividade? Para responder a estas duas questões e contribuir para o esclarecimento da actividade anti-inflamatória destas plantas desenvolvemos o trabalho experimental que a seguir se apresenta.

## **II. PARTE EXPERIMENTAL**



### 3. MATERIAIS

#### 3.1. AMOSTRAS

As amostras analisadas neste trabalho correspondem a duas plantas: a *Agrimonia eupatoria* L. e o *Equisetum telmateia* Ehrh.

As partes aéreas secas (caules e folhas) das duas plantas foram fornecidas pela empresa Segredo da Planta, Portugal. A identificação das espécies foi confirmada pelo Professor Doutor Jorge Paiva. Um exemplar de cada espécie foi catalogado e guardado no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

As plantas foram conservadas ao abrigo da luz e da humidade, no frio, a -20°C, até à sua utilização.

#### 3.2. REAGENTES

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico (“analytical grade”).

Destaca-se a origem de alguns dos reagentes usados:

Ácido L-ascórbico, **Fluka Biochemica**; ácido tricloroacético (TCA), ácido tiobarbitúrico (TBA) **Merck**; 2,2'-Azobis(2-amidinopropano)cloridrato (AAPH), **Polysciences, inc.**; hipoclorito de sódio (NaOCl), **Riedel-deHaën**; N-acetil-L-cisteína, ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA),  $\alpha_1$ -antitripsina, azul de nitrotetrazolio (NBT), L-cisteína, 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH), 2-deoxi-D-ribose, di-hidro-rodamina 123, elastase, R-ficoeritrina, fosfatidilcolina de soja, guaiacol, hipoxantina, peróxido de hidrogénio, peroxidase, N-succinil-ala-ala-ala-p-nitroanilida, superóxido dismutase (SOD), xantina, xantina-oxidase, **Sigma**; D-manitol, **SigmaUltra**.

### 3.3. PADRÕES

Os padrões de ácido gálico, catequina e quercetina foram adquiridos à **Sigma**, o de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox) à **Aldrich** e o de rutina à **Merck**.

Os padrões de flavanóis (C, EC, B1, B2, B3, B4, B7, EEC) utilizados foram isolados (de Pascual-Teresa *et al.*, 1998) e gentilmente cedidos pelo departamento de Química Analítica Bromatologia e Nutrição da Faculdade de Farmácia de Salamanca, Espanha.



## 4. MÉTODOS

### 4.1. PREPARAÇÃO DOS EXTRACTOS E DAS FRACÇÕES ENRIQUECIDAS EM POLIFENÓIS

As plantas em estudo, *Agrimonia eupatoria* L. e *Equisetum telmateia* Ehrh., foram, de um modo geral, submetidas aos mesmos procedimentos. Por este motivo, a descrição que se segue, referente à preparação dos extractos e fracções enriquecidas em polifenóis, é comum às duas plantas, assinalando-se ao longo do texto particularidades processuais referentes a cada uma delas.

A preparação das amostras consistiu em cinco passos diferentes: divisão física das plantas, preparação dos extractos, determinação do peso seco de planta, deslipidificação e extracção dos compostos fenólicos.

A divisão física do material a extrair é um dos passos críticos na preparação das amostras, uma vez que, dela depende a eficácia do processo extractivo. Neste trabalho, as partes aéreas das plantas em estudo (caules e folhas) foram pulverizadas.

Seleccionaram-se os diferentes componentes do material em proporções similares às existentes na planta inteira, de forma a garantir uma melhor amostragem. Utilizou-se o material pulverizado e de granulometria calibrada pela passagem num tamis de 2500 malhas/cm<sup>2</sup>.

Seguidamente prepararam-se os extractos de acordo com o seu uso na medicina tradicional (tabela 4). Os infusos foram preparados em canecas de infusão, de porcelana. A 4 e a 5 g de agrimónia e de equisetum, respectivamente, foram adicionados 100 mL de água destilada em ebulição. Após ligeira homogeneização com uma vareta de vidro, a caneca de infusão foi tapada e deixada em repouso durante 10 min (Chevallier, 1996). Findo este tempo, o extracto aquoso foi filtrado num funil de Büchner, sob vácuo. O filtrado obtido (infuso), foi arrefecido naturalmente e o volume aferido, com água destilada, para 100 mL.

**Tabela 4.** Formas de utilização das plantas, *Agrimonia eupatoria* L. e *Equisetum telmateia* Ehrh., na medicina tradicional (Tuzlaci e Aymaz, 2001; Tuzlaci e Tolon, 2000; Chevallier, 1996; Newall *et al.*, 1996; Fauron *et al.*, 1971; Benigni *et al.*, 1964).

	<i>Agrimonia eupatoria</i> L.	<i>Equisetum telmateia</i> Ehrh.
Infuso	4 g/100 mL H <sub>2</sub> O ferver, 10 min	5 g/100 mL H <sub>2</sub> O, 10 min
Decocto	-----	5 g/100 mL H <sub>2</sub> O, 20 min ebulição
Tintura	4 g/20 mL EtOH a 45%, 13 dias	5 g/25 mL EtOH a 25%, 13 dias

Os decoctos foram preparados apenas para o equisetum. Num balão de Erlenmeyer de 250 mL, colocaram-se 5 g de planta pulverizada, cobertas com 100 mL de água destilada. A mistura foi submetida a aquecimento em bico de Bunsen e mantida em ebulição durante 20 min. De seguida, foi filtrada em funil de Büchner, sob vácuo. O volume do decocto resultante foi completado, após arrefecimento, com água destilada, para 75 mL (Chevallier, 1996).

Para a preparação das tinturas, 4 g de agrimónia e 5 g de equisetum, foram colocadas em frascos de vidro e cobriram-se com 60 mL e 80 mL de etanol aquoso a 45% e 25%, respectivamente. Os frascos foram devidamente fechados e guardados ao abrigo da luz durante 13 dias, ao longo dos quais se procedeu a uma agitação diária (Chevallier, 1996). Uma vez terminada a extracção, procedeu-se à filtração das misturas em funil de Büchner. O volume foi medido e aferido com o solvente respectivo a cada planta e, posteriormente, reduzido, a uma temperatura inferior a 40°C, para cerca de 1/3 do volume inicial (20 mL e 25 mL, respectivamente).

O rendimento de cada extracto foi expresso em peso seco de planta, calculado a partir de três réplicas de 1 g de amostra. Utilizou-se o método gravimétrico, por perda de peso do material, em estufa aquecida a 100°C durante 24 h.

A eficácia dos métodos extractivos foi monitorizada relativamente à actividade antioxidante, por recurso ao método do DPPH (descrito na secção 4.4.1). Foi seleccionado o extracto de cada planta que evidenciou maior actividade. Desta forma, o trabalho

---

subsequente centrou-se no estudo da tintura da agrimónia (extracto hidro-alcoólico) e do infuso do equisetum (extracto aquoso).

Uma parte dos extractos seleccionados foi liofilizada, directamente ou após passagem a solução aquosa (extracto hidro-alcoólico da agrimónia). A restante parte foi, após deslipidificação, submetida a uma nova extracção para obtenção de extractos enriquecidos em polifenóis.

Com o objectivo de se obterem fracções enriquecidas em polifenóis, os extractos foram inicialmente deslipidificados com *n*-hexano, a fim de remover os contaminantes apolares, como gorduras, terpenos, clorofilas, xantofilas, etc. Posteriormente, esses extractos foram submetidos a um processo de extracção por partilha líquido-líquido, com acetato de etilo. Reuniram-se as fases orgânicas contendo os compostos fenólicos. Depois de desidratadas com sulfato de sódio anidro, foram filtradas, concentradas em presença de água até à remoção de todo o acetato de etilo e, posteriormente, liofilizadas.

A metodologia de obtenção dos extractos e das fracções foi monitorizada, pelo método do DPPH, em todas as fases do processo, ou seja, desde a preparação dos extractos até ao fraccionamento com acetato de etilo.

Ao longo deste trabalho, foram estudados os liofilizados correspondentes aos extractos e às respectivas fracções de acetato de etilo, da *Agrimonia eupatoria* L. (AT e AF, respectivamente) e do *Equisetum telmateia* Ehrh. (EI e EF, respectivamente).

## 4.2. ESTUDO PRELIMINAR DOS EXTRACTOS E DAS FRACÇÕES ENRIQUECIDAS EM POLIFENÓIS

### 4.2.1. ANÁLISE QUALITATIVA

Com o objectivo de se obter uma informação preliminar acerca dos compostos presentes nos extractos e nas fracções, recorreu-se a quatro sistemas de cromatografia em camada fina.

Os liofilizados dos extractos e das fracções foram solubilizados em metanol a 25%, numa concentração aproximada de 0,2%.

Após aplicação das amostras e padrões, as placas de TLC foram desenvolvidas em câmaras previamente saturadas com os respectivos desenvolventes e observadas sob luz visível e ultravioleta (254 e 366 nm), antes e após revelação.

#### Sistema 1

Para a pesquisa de flavanóis, da sua classificação de acordo com o grau de polimerização e do tipo de ligação interflavânica (C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub> ou C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub>), recorreu-se ao sistema cromatográfico descrito por Escribano-Bailón e colaboradores (1992), com algumas modificações.

Utilizaram-se placas de gel de sílica de 0,25 mm eluídas com uma mistura tolueno-acetona-ácido acético (3:7,5:1; v/v/v). O *p*-dimetilaminocinamaldeído a 1%, em metanol contendo ácido sulfúrico 1,5 M (DMACA) foi utilizado como revelador. Recorreu-se à catequina como composto de referência.

#### Sistema 2

O sistema utilizado, especialmente direccionado para o “screening” de flavonóides glicosilados, foi preparado segundo Wagner e colaboradores (1984).

Placas de gel de sílica, com indicador de fluorescência, 60F<sub>254</sub>, foram desenvolvidas com acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-água (100:11:11:26). As placas foram observadas ao visível e ao UV, antes e após revelação com vapores de amónia e

com o reagente de NP-PEG (*Natural products-polyethylenglycol reagent*). Este último é constituído por uma solução metanólica do éster aminoetílico do ácido difenilbórico a 1% (NP) e uma solução etanólica de polietilenoglicol 4000 a 5% (PEG), sequencialmente aspergidos sobre as placas. Como compostos de referência foram usados padrões de rutina e quercetina.

### Sistema 3

Para a pré-identificação do tipo de flavonóides presentes nos extractos e nas fracções, preparou-se o sistema previamente descrito por Mabry e colaboradores (1970).

Placas de celulose foram eluídas com a mistura *t*-butanol-ácido acético glacial-água (3:1:1; v/v/v). Utilizaram-se os reveladores anteriormente descritos, para o sistema 2. Os padrões de rutina e de quercetina foram os compostos de referência usados.

### Sistema 4

Para complementar a análise de flavonóides, preparou-se um outro sistema, igualmente descrito por Mabry e colaboradores (1970).

Placas de celulose foram eluídas com ácido acético a 15%. Utilizaram-se os reveladores anteriormente descritos, para o sistema 2. Os padrões de rutina e de quercetina foram os compostos de referência usados.

## 4.2.2. ANÁLISE QUANTITATIVA

Os métodos quantitativos apresentados neste trabalho são métodos espectrofotométricos que se baseiam em reacções colorimétricas entre os compostos a quantificar e reagentes específicos. A absorvância dos cromóforos formados é proporcional à concentração dos compostos a quantificar (Waterman e Mole, 1994). Para cada método, foi feita uma curva de calibração utilizando para o efeito concentrações diferentes do respectivo padrão, sendo a concentração dos compostos na amostra calculada por interpolação da recta. Os resultados são expressos em equivalentes de padrão.

O liofilizado dos extractos e das fracções foi solubilizado, imediatamente antes do uso, no solvente indicado pela metodologia a seguir. Todos os ensaios foram realizados, pelo menos, em triplicado.

#### DOSEAMENTO DOS FLAVONÓIS TOTAIS

O método de dosagem de flavonóis totais seguido é um método directo, que utiliza o tricloreto de alumínio em metanol (AlCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O 2%) (Lamaison e Carnat, 1990).

##### Protocolo experimental

Num tubo de ensaio protegido da luz, adicionaram-se 2 mL de tricloreto de alumínio a 2 mL de cada amostra em metanol. A mistura foi agitada em vórtice durante 1 min e, após 10 min, a absorvância foi lida a 430 nm num espectrofotómetro Hitachi, modelo U-2000.

As leituras foram realizadas contra um branco, preparado do mesmo modo, mas sem tricloreto de alumínio. Os 2 mL do reagente foram substituídos por 2 mL de metanol.

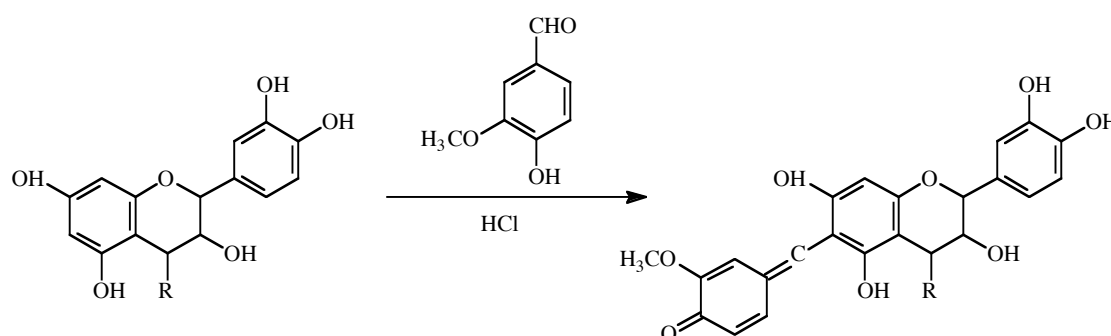
Foi construída uma curva padrão com rutina e ajustado o intervalo de absorvâncias dentro do qual estava compreendida a absorvância dos ensaios. Os resultados da concentração de flavonóides totais foram expressos em g de rutina/100 g de liofilizado.

#### DOSEAMENTO DOS FLAVANÓIS

A metodologia seguida baseia-se na detecção espectrofotométrica de compostos corados resultantes da reacção dos flavanóis com um aldeído aromático (Treutter e Feucht, 1994). Os flavanóis possuem no anel A uma densidade electrónica especialmente elevada nas posições *orto* e *para*, devido à presença de hidroxilos fenólicos. Esta característica torna-os particularmente sensíveis ao ataque electrofílico. Em meio fortemente ácido, os aldeídos aromáticos, captam protões e formam radicais electrofílicos que poderão reagir com as posições C<sub>6</sub> e C<sub>8</sub> do anel floriglucínico. Os compostos resultantes das reacções, solúveis e corados, são quantificados por espectrofotometria.

A reacção é independente do padrão de hidroxilação do anel B e limitada a flavonóides com grupos hidroxilo não substituídos *meta* orientados, com a ligação C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> saturada e sem grupo cetona em C<sub>4</sub>. Estas características tornam-na altamente específica para taninos condensados. No entanto, di-hidro-chalconas, derivados flavano e florotaninos, também reagem com a estrutura base de floroglucinol (Waterman e Mole, 1994).

Neste trabalho, a quantificação dos flavanóis foi realizada por uma técnica que utiliza o vanilinaldeído (vanilina, figura 8). A vanilina reage com os flavanóis dando origem a complexos vermelhos que absorvem a cerca de 500 nm (Julkunen-Titto, 1985). O sucesso do método depende do tipo de solvente usado, da natureza e concentração do ácido, do tempo de reacção, da temperatura, da concentração de vanilina e dos compostos de referência utilizados (Schofield *et al.*, 2001; Waterman e Mole, 1994; Porter e Woodruffe, 1984). A reacção é inibida na presença de água (Waterman e Mole, 1994).



**Figura 8.** Reacção entre um flavanol e o vanilinaldeído.

### Protocolo experimental

#### *Método da vanilina*

As misturas de reacção foram preparadas em tubos de ensaio, protegidos da luz. Adicionaram-se 3 mL de vanilina a 4% (preparada em metanol anidro) a 100 µL das amostras solubilizadas em metanol anidro. Imediatamente após agitação em vórtice durante 1 min, adicionou-se 1,5 mL de HCl concentrado. A mistura foi agitada novamente

em vórtice, durante 1 min e, passados 20 min, procedeu-se à leitura de absorvância a 500 nm num espectrofotómetro Hitachi, modelo U-2000.

Os ensaios foram lidos contra um branco, preparado do mesmo modo mas contendo 3 mL de metanol anidro em substituição dos 3 mL da solução metanólica de vanilina a 4%.

Traçou-se uma curva de calibração, usando como padrão a catequina e definiu-se o intervalo dentro do qual deviam estar compreendidas as absorvâncias dos ensaios.

Os resultados da concentração de flavanóis foram expressos em g de catequina/100 g de liofilizado.

### 4.3. IDENTIFICAÇÃO DOS POLIFENÓIS

Com a análise qualitativa pretendeu-se caracterizar o perfil fenólico de ambas as plantas. Todas as metodologias seleccionadas foram optimizadas para a separação e/ou identificação destes compostos, particularmente de polifenóis da classe dos flavonóis, flavanóis e flavonas, dada a sua representatividade nos extractos/fracções obtidos.

#### 4.3.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO (HPLC)

A cromatografia líquida de alta resolução em colunas de sílica, de fase reversa, com diferentes gradientes de eluição e sistemas de detecção, foi o método de excelência, utilizado para a separação e identificação dos polifenóis. Recorreu-se à detecção por matriz de díodos (DAD) e por espectrometria de massa (MS) e à detecção por reacção química (CRD) com o reagente DMACA, o qual permitiu confirmar a identificação dos flavanóis.

Os liofilizados das amostras foram solubilizados em metanol a 25% (HPLC/DAD) ou em água ultra-pura (HPLC/ESI-MS e HPLC/CRD). Posteriormente, as soluções foram microfiltradas através de um filtro de 0,45 µm de poro, desgaseificadas e, por fim,



injectadas. A identificação dos compostos foi feita, sempre que possível, por comparação com os respectivos padrões, preparados e injectados nas mesmas condições.

Condições utilizadas na detecção por espectrofotometria de díodos (HPLC/DAD)

Equipamento	Gilson equipado com duas bombas, modelo 305 e 306; misturador, modelo 811 B e módulo manométrico, modelo 805, com detector de UV-Vis, modelo 170 acoplado a uma estação de controlo e tratamento de dados Unipoint System.		
Fase Móvel	Eluente A - Ácido fórmico 5% em água (v/v) Eluente B - Metanol		
Pré-coluna	KS 30/4 Nucleosil 120-5, fase C-18, Macherey-Nagel		
Coluna	Coluna analítica de Waters Spherisorb <sup>®</sup> , fase ODS2, partículas de 5 µm (4,6 x 250 mm)		
Temperatura da coluna	23-24°C		
Fluxo	1 mL/min		
Volume injectado	20 µL		
Gradiente	Tempo (min)	%A	%B
	Início	95	5
	10	85	15
	15	75	25
	40	50	50
	50	20	80
	60	20	80
	70	0	100
	75	0	100
Detecção DAD	280 e 320 nm		

Condições utilizadas na detecção por espectrometria de massa com ionização por “electrospray” (HPLC/DAD/ESI-MS)

Equipamento	Hewlett-Packard 1100 composto por bomba, injector automático, sistema de termostatização de coluna e detector de díodos em circuito integrado dotado de célula de baixo fluxo para altas pressões, acoplado a uma estação de controlo e tratamento de dados HP ChemStation.			
Fase Móvel	Eluente A – Ácido acético 2,5% em água (v/v) Eluente B – Acetonitrilo/Ácido acético 2,5% (10:90; v/v) Eluente C – Acetonitrilo			
Coluna	Coluna analítica C-18, de Waters Spherisorb <sup>®</sup> , fase ODS2, partículas de 3 µm (4,6 x 150 mm)			
Temperatura da coluna	25°C			
Fluxo	0,5 mL/min			
Volume injectado	100 µL			
Gradiente	Tempo (min)	%A	%B	%C
	Início	100	0	0
	5	0	100	0
	30	0	85	15
	35	0	50	50
	40	0	50	50
	50	100	0	0
	55	100	0	0
Detecção DAD	280 e 360 nm			

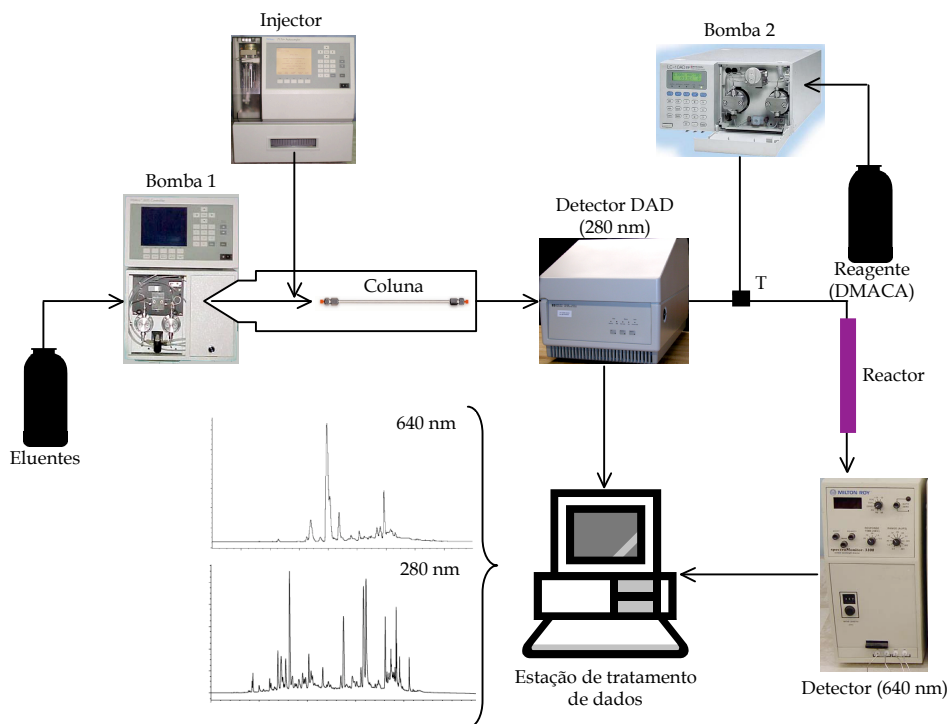
A detecção por espectrofotometria de massa foi levada a cabo num espectrómetro LCQ Finnigan equipado com fonte de ionização a pressão atmosférica (*atmospheric pressure ionization, API*) e utilizando, como interface, ionização por “electrospray” (*electrospray ionization, ESI*). As amostras, injectadas no HPLC, passam pelo

detector de díodos e, entram no espectrómetro de massa através de um tubo PEEK ligado à fonte do espectrómetro de massa.

As condições de análise foram optimizadas; a temperatura e voltagem do capilar foram de 225°C e 45 V, respectivamente. Em alguns casos, oportunamente referenciados, foi utilizada uma voltagem de 55 V.

Os espectros de massa foram obtidos em modo ião positivo e o espectrómetro programado para fazer uma série de dois varrimentos consecutivos: um espectro total de massas (“full scan”) e outro resultante da fragmentação do ião maioritário do primeiro varrimento (MS-MS).

#### Condições utilizadas na detecção após reacção química (HPLC/CRD)



**Figura 9.** Esquema do método de derivatização pós-coluna; adaptado de de Pascual-Teresa (1999).

Equipamento	Bomba Waters, modelo 600E de gradiente quaternário; injector automático Waters 717plus; detector de díodos em circuito integrado, Hewlett-Packard 1040M series II, acoplado a uma estação de tratamento de dados HP-79994A.				
Fase Móvel	Eluente A  Água Eluente B  Metanol Eluente C  ácido fórmico 5% em água (v/v) Eluente D  Metanol/cido fórmico 5% (10:90; v/v)				
Coluna	Coluna analítica C-18, de Waters Spherisorb à, fase ODS 2, partículas de 3 m (4,6 x 150 mm)				
Temperatura da coluna	30C				
Fluxo	0,5 mL/min				
Volume injectado	100 L				
Gradiente	Tempo (min)	%A	%B	%C	%D
	Incio	100	0	0	0
	10	0	0	100	0
	20	0	0	85	15
	30	0	0	85	15
	40	0	0	65	35
	45	0	0	65	35
	60	0	0	55	45
	75	0	0	0	100
	175	0	50	0	50
	180	0	80	0	20
	185	0	80	0	20
	195	100	0	0	0
	220	100	0	0	0
	225	100	0	0	0
Detecção	280 nm				

Após a separação por HPLC e detecção a 280 nm, o reagente DMACA (*p*-dimetilaminocinamaldeído a 1%, em metanol contendo ácido sulfúrico 1,5 M) foi adicionado através de uma ligação em T, por uma bomba Kontron, modelo 320, a um fluxo constante de 0,5 mL/min. A reacção química decorreu num tubo Knitted de Teflon de 9 m de comprimento e 0,5 mm de diâmetro interno, durante 2,5 min. O produto desta reacção foi detectado a 640 nm num detector de UV/Vis Shimadzu SPD-10 AS.

#### 4.4. DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE

Para os ensaios da actividade antioxidante, os liofilizados dos extractos e das fracções, da *Agrimonia eupatoria* L. e do *Equisetum telmateia* Ehrh., foram solubilizados em etanol a 45% e água, respectivamente, nas seguintes concentrações:

*Agrimonia eupatoria* L.

- × 25 mg extracto/mL
- × 4 mg fracção/mL

*Equisetum telmateia* Ehrh.

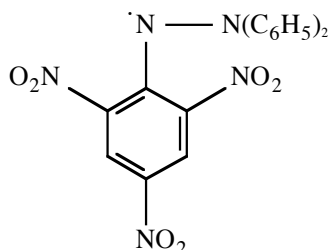
- × 50 mg extracto/mL
- × 4 mg fracção/mL

Os liofilizados do equisetum não se solubilizaram totalmente. Para garantir a total homogeneidade das soluções de trabalho, procedeu-se a uma centrifugação. Uma vez que, os resultados da capacidade antioxidante, determinados antes e após centrifugação, pelo teste geral do DPPH, foram equivalentes, os ensaios foram realizados no sobrenadante das soluções.

Todos os ensaios da actividade antioxidante foram realizados, no mínimo, em triplicado.

## 4.4.1. AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIRADICALAR

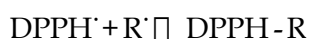
Este teste utiliza o radical livre DPPH (figura 10) e foi originalmente descrito por Blois (1958). A simplicidade, rapidez e sensibilidade do método permitem avaliar a actividade antiradicalar de muitas amostras num curto espaço de tempo e detectar a presença de compostos com actividade “scavenger”, mesmo quando presentes em concentrações muito baixas (Yokozawa *et al.*, 1998).



**Figura 10.** Estrutura do radical livre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH).

Apesar do DPPH ser um radical sem importância biológica, estas características tornam este teste num dos mais utilizados no “screening” da actividade antioxidante de amostras. Pelas vantagens apresentadas, foi o teste também utilizado para monitorizar a actividade antioxidante ao longo das diferentes etapas da obtenção dos extractos e das fracções.

O DPPH é um radical livre, estável, que apresenta, devido ao electrão desemparelhado, uma forte banda de absorção a 517 nm (em etanol). Possui a capacidade de aceitar um átomo de hidrogénio ou um electrão, tornando-se numa molécula diamagnética, i.e., estável (difenilpicril-hidrazina). Quando este radical reage com um antioxidante (AH) ou com outro radical (R'), a sua absorção diminui, resultando numa descoloração da solução, de violeta para amarelo, estequiometricamente proporcional ao número de electrões captados (Blois, 1958).



Deste modo, a absorção a 517 nm é proporcional à quantidade de DPPH residual.

#### Protocolo experimental

As misturas de reacção foram preparadas directamente em cuvetes de vidro, para leitura no espectrofotómetro. Ao volume final de reacção de 2 mL em tampão acetato (CH<sub>3</sub>COOH 0,2 M, CH<sub>3</sub>COONa 0,2 M), pH 6, contendo 100 µM de uma solução etanólica de DPPH foram adicionadas com agitação as amostras. A redução do radical foi monitorizada durante 30 min, espectrofotometricamente, pela diminuição de absorvância a 517 nm.

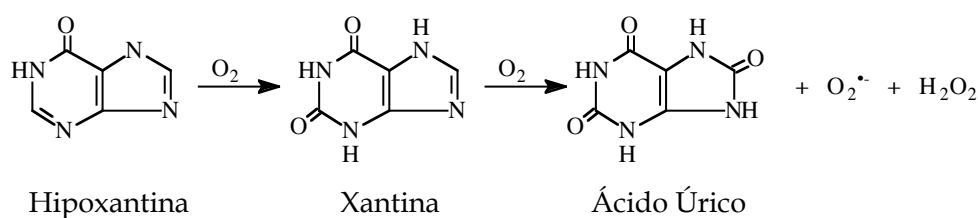
Para avaliar a capacidade de reacção, relativamente ao DPPH, prepararam-se misturas com diferentes concentrações de amostras. As absorvâncias das soluções foram lidas 5 min após o início da reacção e a percentagem de redução do radical DPPH foi avaliada tendo em consideração o valor de absorvância inicial, i.e., antes da adição da amostra.

Paralelamente utilizou-se o Trolox, análogo hidrossolúvel da vitamina E, e os resultados foram comparados com os das amostras.

#### 4.4.2. FORMAÇÃO E CAPTAÇÃO DO ANIÃO SUPERÓXIDO

O anião superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) é formado, *in vivo*, por diferentes fontes. Entre elas encontra-se a produção enzimática por algumas oxidases, como a xantina-oxidase, aldeído-oxidase e NADPH-oxidase; redutases, como a citocromo P<sub>450</sub> redutase; ou sintetases, como a NO sintetase (Fridovich, 2001). Por analogia, o método seguido utiliza o sistema xantina/xantina-oxidase para formar O<sub>2</sub><sup>•-</sup> *in vitro* (Nishikimi *et al.*, 1972).

A enzima xantina-oxidase é uma flavoproteína que, *in vivo*, catalisa a oxidação da hipoxantina a xantina na presença de oxigénio molecular, com consequente formação de ácido úrico, anião superóxido e peróxido de hidrogénio. A formação do anião superóxido foi originalmente descrita por McCord e Fridovich (1968), segundo a reacção:



O anião superóxido pode actuar como redutor ou como oxidante. A sua detecção baseia-se, normalmente, na capacidade de actuar como redutor. A metodologia seguida utiliza o sal azul de nitrotetrazolio (NBT) que, quando reduzido pelo anião superóxido, origina uma formazana ( $k = 6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) com máximo de absorção a 560 nm (Aruoma *et al.*, 1989).

Quando se adicionam, à mistura de reacção, compostos com capacidade de captar o anião superóxido, verifica-se uma diminuição da redução do NBT, que se reflecte num decréscimo da absorvância a 560 nm, a menos que esses compostos interfiram com a actividade da enzima. Para eliminar esta possibilidade, avaliaram-se os efeitos dos compostos sobre a actividade da enzima xantina-oxidase através da formação de ácido úrico a 295 nm.

#### Protocolo experimental

Em cuvetes de vidro misturaram-se diferentes quantidades de amostras ou tampão (branco), hipoxantina 100  $\mu\text{M}$  (preparada em KOH 50 mM), EDTA 1 mM e NBT 100  $\mu\text{M}$ , em tampão fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -KOH 50 mM), pH 7,4, num volume final de 1 mL. A oxidação da hipoxantina foi iniciada pela adição de 0,066 U de xantina-oxidase e a redução do NBT pelo anião superóxido, foi monitorizada, espectrofotometricamente, a 560 nm durante 150 s, num espectrofotómetro Perkin-Elmer, modelo Lambda 6.

Uma vez que a diminuição da redução do NBT, relativamente ao controlo (ausência de amostra), traduz um decréscimo do anião superóxido, os resultados são expressos em percentagem de inibição da redução do NBT.

A superóxido dismutase (SOD), enzima que catalisa a dismutação do  $O_2^{\bullet -}$  a  $H_2O_2$  e  $O_2$ , foi testada e usada como composto de referência.



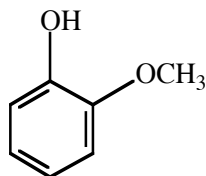
Paralelamente, foram executados ensaios controlo para detectar quaisquer interferências das amostras com o NBT ou com a enzima xantina-oxidase. A interferência com o NBT foi determinada em misturas de reacção contendo apenas amostras e NBT 100  $\mu$ M em tampão fosfato 7,4. Os efeitos das amostras na actividade da xantina-oxidase foram avaliados pela monitorização da produção de ácido úrico a 295  $\text{nm}$  durante 3 min. Para tal, diferentes concentrações das amostras foram incubadas com 0,006 U de xantina-oxidase, em cuvetes de quartzo, durante 5 min, a 25°C. De seguida, foi adicionado EDTA 1 mM em 1 mL de tampão fosfato 50 mM, pH 7,4. A reacção foi iniciada com a adição da xantina 100  $\mu$ M, preparada em KOH 50 mM.

Os resultados são expressos em percentagem de inibição da formação de ácido úrico.

#### 4.4.3. CAPTAÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÉNIO

O peróxido de hidrogénio é uma espécie de reactividade moderada que pode oxidar um vasto número de compostos orgânicos, incluindo compostos fenólicos. Estas reacções são catalisadas por peroxidases, como a catalase ou a glutatíon peroxidase.

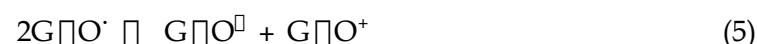
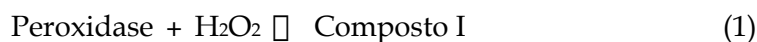
Neste método, o peróxido de hidrogénio, na presença da enzima peroxidase, induz a oxidação de um composto fenólico natural, o guaiacol (figura 11), dando lugar a um composto castanho, cuja formação pode ser monitorizada espectrofotometricamente.



**Figura 11.** Estrutura do guaiacol (2-*o*-metoxifenol).

Pelas suas características estruturais, o guaiacol actua como dador de átomos de hidrogénio. De um modo simplista, a reacção global envolve a formação de dois compostos intermediários da enzima peroxidase que oxidam o guaiacol (G-OH) por

transferência de um electrão em dois passos sequenciais, de acordo com as seguintes reacções:



Os produtos primários da reacção, radicais fenoxilo ( $\text{G-O}^\cdot$ , reacções 2 e 3), são inactivados por transformações não enzimáticas. Podem ocorrer reacções de dimerização com a formação de bifenóis (reacção 4) que são posteriormente oxidados a bifenocinonas ou reacções de dismutação (reacção 5) (Capeillere-Blandin, 1998).

Quando a concentração de peróxido de hidrogénio, no meio de reacção, decresce (ex.: na presença de “scavengers”), ocorre uma diminuição proporcional da formação do cromóforo e, conseqüentemente, da absorvância da solução. Neste caso, a absorvância da solução é usada, como medida da concentração efectiva de peróxido de hidrogénio, i.e., a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  disponível para reagir com o guaiacol.

#### Protocolo experimental

Prepararam-se, em tubos de ensaio, misturas de reacção contendo, em 1 mL de tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-KOH}$  0,15 M, pH 7,4, 50 µL da solução de guaiacol (100 µL guaiacol puro/50 mL  $\text{H}_2\text{O}$ ), 5 µL de peroxidase (5 mg/mL no mesmo tampão fosfato) e 150 µM de peróxido de hidrogénio.

Com o objectivo de otimizar a concentração de peróxido de hidrogénio no ensaio, preparou-se uma curva de calibração de peróxido de hidrogénio numa gama de concentrações de 25 µM a 200 µM.

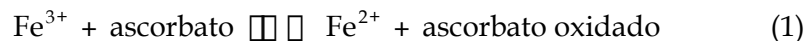
No ensaio, diferentes concentrações de amostras ou solvente (branco) foram pré-incubadas com 150  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 min, a 25°C. Passado este tempo, e após a adição do guaiacol e da peroxidase, a actividade “scavenger” foi determinada pela diminuição da absorvância a 436 nm (Aruoma *et al.*, 1989).

Os resultados estão expressos em percentagem de captação do peróxido de hidrogénio. A actividade das amostras foi comparada com a da catalase, o “scavenger” fisiológico de peróxido de hidrogénio e expressa também em equivalentes de catalase.

#### 4.4.4. FORMAÇÃO E CAPTAÇÃO DO RADICAL HIDROXILO

O método utilizado para avaliação da capacidade de captação do radical hidroxilo baseia-se na detecção de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), resultantes da degradação da desoxi-ribose, induzida pelo radical hidroxilo (OH) (Halliwell e Gutteridge, 1981).

A metodologia seguida utiliza uma mistura de Fe<sup>3+</sup>, ascorbato e peróxido de hidrogénio que, de acordo com a reacção de Fenton (reacções 1 e 2), forma radicais hidroxilo que degradam a desoxi-ribose (DR).



Os produtos resultantes, quando aquecidos em meio ácido, formam compostos que reagem com o ácido tiobarbitúrico (reacção 3). A reacção do fragmento maioritário, i.e., do malonildialdeído (MDA), com o ácido tiobarbitúrico (TBA), origina um cromóforo rosa com um máximo de absorção a 532 nm (reacções 4).

A coloração formada nesta reacção é proporcional à degradação da desoxi-ribose e, conseqüentemente, à quantidade de  $\cdot\text{OH}$  resultante da reacção de Fenton.

Compostos que tenham a capacidade de reagir com radicais hidroxilo competem com a desoxi-ribose e, deste modo, protegem-na da degradação. Conseqüentemente, verifica-se uma diminuição da absorvância a 532 nm. Por outro lado, compostos com a capacidade de complexar iões ferro também protegem a desoxi-ribose da degradação induzida pelos radicais hidroxilo, mas por interferência na reacção de Fenton, o sistema formador dos radicais.

Este método também permite avaliar a acção pró-oxidante dos compostos em estudo (Aruoma, 1996b). Nas condições do ensaio, o ascorbato, pela sua capacidade de reduzir o ião ferro, mantém uma "fonte" activa de  $\text{Fe}^{2+}$ , necessária para a formação de  $\cdot\text{OH}$ . Deste modo, a sua presença aumenta, consideravelmente, a velocidade de produção de radicais hidroxilo (reacção 1). Quando o ascorbato é omitido do ensaio, a capacidade dos compostos reduzirem o ião  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  e induzirem a formação de  $\cdot\text{OH}$  pode ser testada (acção pró-oxidante).

#### Protocolo experimental

Diferentes misturas de reacção foram preparadas em tubos de ensaio, contendo, num volume final de 1 mL em tampão fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-KOH}$ , 10 mM) pH 7,4, diferentes concentrações de amostras, 2,8 mM de 2-desoxi-ribose, 1,42 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeCl}_3$ , de preparação extemporânea. A reacção foi iniciada pela adição de 50  $\mu\text{M}$  de ascorbato, extemporaneamente preparado, e terminada, após incubação durante 60 min a 37°C, pela adição de 100  $\mu\text{L}$  de EDTA 0,1 M. Posteriormente, foram adicionados 1 mL de ácido tricloroacético 2,8% (m/v) e 1 mL de ácido tiobarbitúrico 1% (m/v), e a mistura foi submetida a nova incubação, a 100°C durante 15 min. Passado este tempo, e após 5 min de arrefecimento em banho de gelo, a absorvância das soluções foi lida a 532 nm contra um branco, contendo apenas tampão fosfato e desoxi-ribose.

Os resultados estão expressos em percentagem de protecção da desoxi-ribose.

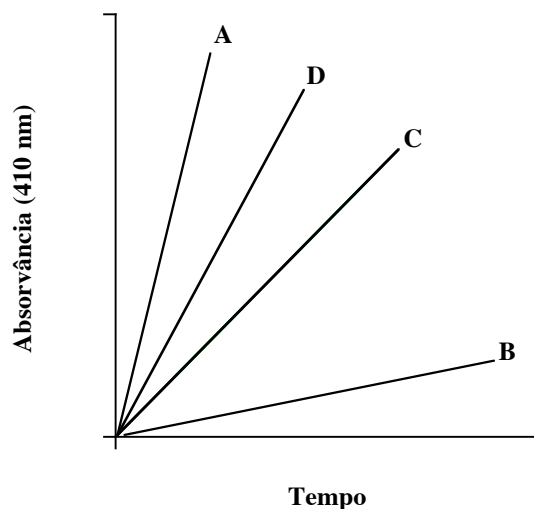
Com o objectivo de confirmar a envolvimento do radical hidroxilo na degradação da desoxi-ribose, o método foi executado com diferentes concentrações de manitol, um

“scavenger” de referência do radical. Para avaliar a acção pró-oxidante das amostras em estudo, os ensaios foram repetidos na ausência de ácido ascórbico. Outros controlos foram realizados sem  $H_2O_2$ , ferro e ácido ascórbico ou sem desoxi-ribose com o objectivo de avaliar se as amostras por si só, degradavam a desoxi-ribose ou formavam TBARS, respectivamente. Quando omitidos reagentes, o seu volume foi sempre substituído por igual volume de tampão fosfato.

#### 4.4.5. FORMAÇÃO E CAPTAÇÃO DO ÁCIDO HIPOCLOROSO

Para avaliar a capacidade de captação do ácido hipocloroso (HOCl), baseámo-nos na característica que o HOCl possui, de inactivar anti-proteases endógenas, i.e., enzimas que, através da inibição de proteases, exercem um papel primordial na prevenção do dano proteolítico tecidual (Clark *et al.*, 1981).

A reacção ocorre na presença de HOCl, de uma anti-protease ( $\alpha_1$ -antitripsina), de uma protease (elastase) e do respectivo substrato (*N*-succinil-ala-ala-ala-*p*-nitroanilida). O princípio do método utilizado pode ser explicado graficamente (figura 12).



**Figura 12.** Diagrama ilustrativo das cinéticas de reacção que ocorrem no método utilizado para avaliação da capacidade “scavenger” do ácido hipocloroso (HOCl). A = cinética da reacção catalisada pela elastase; B = cinética da reacção na presença de  $\alpha_1$ -antitripsina; C = cinética da reacção na presença de  $\alpha_1$ -antitripsina e HOCl; D = cinética da reacção na presença de HOCl [adaptado de Aruoma (1996a)].

De acordo com a figura, a elastase hidrolisa o substrato, *N*-succinil-ala-ala-ala-*p*-nitroanilida, a um composto de coloração amarela que pode ser monitorizado a 410 nm (recta 12A). A  $\alpha_1$ -antitripsina, por sua vez, inibe esta reacção por inibição da elastase (recta 12B). Na presença de ácido hipocloroso, a  $\alpha_1$ -antitripsina é inactivada e a actividade da elastase recuperada (recta 12C). A concentração de HOCl usada no ensaio deverá ser próxima da concentração fisiológica (88  $\mu$ M) sem, no entanto, inactivar a elastase (recta 12D). A capacidade de captação do HOCl, traduzida numa diminuição da actividade da elastase, situar-se-á entre as rectas B e C da figura 12.

### Protocolo experimental

O ácido hipocloroso foi preparado imediatamente antes de uso, ajustando, a pH 6,2, uma solução de hipoclorito de sódio, com ácido sulfúrico diluído. A concentração do HOCl foi posteriormente determinada espectrofotometricamente a 235 nm, usando o coeficiente de extinção molar de 100 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. A mistura de reacção, num volume final de 1 mL em tampão fosfato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-KOH, 20 mM) pH 7,4, contendo diferentes concentrações de amostra,  $\alpha_1$ -antitripsina (concentração final 0,77 mg/mL) e HOCl 66  $\mu$ M, foi incubada a 37°C durante 60 min. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de tampão fosfato, seguido de 7  $\mu$ L de elastase (0,05% preparada em tampão fosfato) e incubou-se durante mais 30 min. A actividade da elastase foi avaliada pela degradação do substrato adicionado à mistura de reacção (80  $\mu$ L de *N*-succinil-ala-ala-ala-*p*-anilida 2,5 mg/mL em tampão fosfato). O aumento da absorvância resultante foi medido a 410 nm.

Foram realizados controlos para detectar quaisquer interferências das amostras na actividade da elastase e da  $\alpha_1$ -antitripsina. A *N*-acetil-cisteína foi usada como composto de referência.

Os resultados são expressos em percentagem de inibição da actividade da elastase, em que o valor de 100% corresponde a um mínimo de absorvância, ou seja, a uma captação total do ácido hipocloroso.

#### 4.4.6. FORMAÇÃO E CAPTAÇÃO DE PEROXINITRITO

O método seguido, originalmente descrito por Kooy e colaboradores (1994), permite avaliar a capacidade de captação do peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), recorrendo à monitorização fluorimétrica da diminuição da oxidação da di-hidro-rodamina 123.

O peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) induz a oxidação da di-hidro-rodamina 123 a rodamina 123, um catião lipofílico fluorescente. O mecanismo da reacção tem por base a transferência de um electrão da di-hidro-rodamina para o peroxinitrito, com formação de um radical (DHR<sup>•</sup>), que sofre dismutação para rodamina (RH) e di-hidro-rodamina (DHR):



A rodamina 123 é um composto estável e, como tal, a sua fluorescência mantém-se constante ao longo do tempo, podendo ser monitorizada durante bastante tempo.

Na presença de “scavengers” do peroxinitrito, a intensidade de fluorescência é menor. Estes compostos competem com a di-hidro-rodamina para o peroxinitrito reduzindo, deste modo, a sua oxidação.

#### Protocolo experimental

*Síntese do peroxinitrito.* O peroxinitrito utilizado foi previamente sintetizado no laboratório de acordo com Beckman e colaboradores (1994), como descrito recentemente (Brito *et al.*, 2002).

A concentração da solução stock de peroxinitrito foi determinada espectrofotometricamente, em NaOH 0,1 M, a partir do valor da absorvidade molar  $\epsilon_{402\text{nm}} = 1670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Beckman *et al.*, 1994). A quantidade de ONOO<sup>-</sup> usada nos ensaios foi obtida a partir da solução stock, após diluição imediatamente antes de cada adição.

As misturas de reacção foram preparadas directamente em cuvetes de fluorímetro. A um volume final de 2 mL, em tampão (NaCl 90 mM, HNa<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, KCl 5 mM), pH 7,4 a 37°C, foram adicionadas diferentes quantidades de amostras (ensaio) ou

tampão (controlo) e DHR 58  $\mu$ M. De seguida, as cuvetes foram colocadas no fluorímetro (Perkin-Elmer Luminescence Spectrometer, modelo LS 50B) termostaticado a 37°C e com agitação. 40 s após o início da monitorização, a reacção de oxidação foi iniciada pela adição de ONOO 600 nM (em NaOH 0,1 M), e o aumento de fluorescência resultante da formação da rodamina, avaliado.

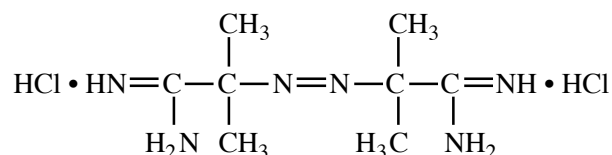
As condições de leitura da intensidade de fluorescência foram ajustadas para comprimentos de onda de excitação e de emissão de 500 e de 536 nm, com fendas de 2,5 nm e de 3,0 nm, respectivamente.

A cisteína foi testada do mesmo modo que as amostras e usada como composto de referência.

Os resultados estão expressos em quantidade de liofilizado ( $\mu$ g) necessária para inibir cerca de 50% a oxidação da DHR.

#### 4.4.7. FORMAÇÃO E CAPTAÇÃO DO RADICAL PEROXILO

Na metodologia seguida, os radicais peroxilo são formados a velocidade constante, em meio aquoso, por degradação térmica de um azo-composto hidrofílico, o AAPH (figura 13), na presença de R-ficoeritrina.



**Figura 13.** Estrutura do 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH).

A R-ficoeritrina é uma proteína fluorescente que apresenta absorção máxima a 565 nm ( $\epsilon = 19,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) e emissão de fluorescência máxima a 578 nm (Oi *et al.*, 1982). Pelas suas propriedades espectroscópicas, particularmente, o elevado coeficiente de extinção e rendimento quântico de fluorescência, pode ser rapidamente detectada, por



espectroscopia de fluorescência, mesmo em concentrações muito baixas ( $10^{-12}$  M) (Glazer, 1990).

A R-ficoeritrina é sensível ao ataque oxidativo dos radicais peróxido com perda de fluorescência, pelo que pode ser utilizada, como sonda de fluorescência, para monitorizar a formação dos radicais.

Mais ainda, na presença de “scavengers” de  $ROO\cdot$ , a R-ficoeritrina é protegida do dano oxidativo com conseqüente diminuição da perda de fluorescência pelo que se torna igualmente adequada à avaliação da capacidade “scavenger” de radicais peróxido.

#### Protocolo experimental

As misturas de reacção (volume final de 2 mL em PBS) foram preparadas directamente em cuvetes de fluorímetro. O ensaio foi realizado num fluorímetro (Perkin-Elmer Luminescence Spectrometer, modelo LS50B) termostaticado a 37°C, com agitação contínua e com comprimentos de onda de excitação e de emissão de 495 nm e de 575 nm, respectivamente e com fendas de 6 nm.

No controlo, a leitura de fluorescência foi iniciada com a incubação da R-ficoeritrina (12 nM em PBS ( $Na_2HPO_4$  20 mM, NaCl 110 mM, DTPA 100  $\mu$ M) pH 7,4, a 37°C, e com agitação contínua. Aos 7 min de incubação, adicionou-se o AAPH (concentração final de 7,5 mM) e a diminuição da fluorescência da R-ficoeritrina foi monitorizada durante 78 min. Nos diversos ensaios foram adicionadas diferentes concentrações de amostras ou compostos de referência (Trolox e quercetina), 18 min após a adição do AAPH, monitorizando-se a protecção da oxidação da R-ficoeritrina.

A solução de AAPH foi preparada em PBS imediatamente antes do seu uso.

#### 4.4.8. INIBIÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A peroxidação lipídica foi iniciada em lipossomas multilamelares, por radicais peróxido ( $ROO\cdot$ ), e avaliada pela formação de dienos conjugados (Gonçalves *et al.*, 1998).

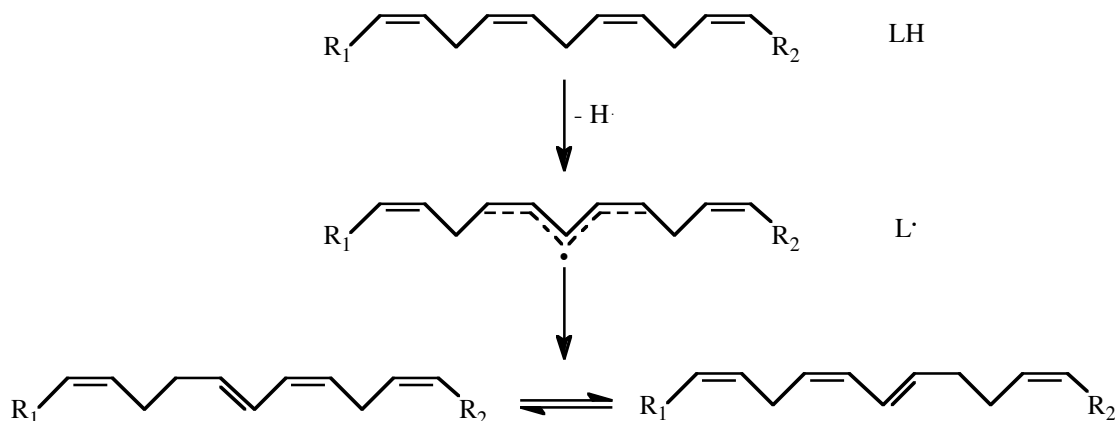
Os lipossomas multilamelares resultam da organização dos fosfolípidos em bicamadas, aparentemente análogas às encontradas nas membranas biológicas. Esta semelhança torna

os lipossomas excelentes modelos membranares, sendo utilizados como substratos lipídicos, em diversas metodologias (Gonçalves *et al.*, 1998).

Tal como no ensaio anterior, os radicais peróxido são formados em meio aquoso, a velocidade constante, por decomposição térmica do AAPH. Uma vez formados, têm potencial para remover átomos de hidrogénio do substrato lipídico (LH) iniciando a peroxidação lipídica.



O radical centrado no átomo de carbono,  $\text{L}^\cdot$ , formado neste processo, é estabilizado por rearranjo molecular, dando origem aos dienos conjugados (figura 14).



**Figura 14.** Representação da formação dos dienos conjugados.

Deste modo, a formação dos dienos conjugados, que ocorre na fase inicial da peroxidação lipídica, constitui um índice de avaliação deste processo.

Os dienos conjugados, pelas suas características estruturais, absorvem fortemente a 234 nm e, como tal, a sua formação pode ser acompanhada pela leitura da absorvância a este comprimento de onda.

### Protocolo experimental

*Preparação de lipossomas multilamelares de fosfatidilcolina.* Os lipossomas multilamelares foram preparados a partir de fosfatidilcolina de soja comercial. O liofilizado de fosfatidilcolina foi dissolvido numa quantidade de clorofórmio necessária para obter uma concentração de 62,5 mM. Para a preparação dos lipossomas, evaporou-se, em evaporador rotatório, uma alíquota (1 mL) da solução de fosfatidilcolina. A remoção de todo o solvente levou à formação de um filme de lípido, fino e homogêneo, nas paredes do balão. De seguida, adicionaram-se 12,5 mL de tampão fosfato (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 100 mM e EDTA 100 μM), pH 7,4 e procedeu-se a agitação manual (“hand-shaked method”) de forma a libertar e suspender todo o filme lipídico. Esta operação foi auxiliada por agitação com vórtice e, quando necessário, pela utilização, embora em poucos segundos, do banho de ultra-sons. Os lipossomas preparados deste modo apresentaram um aspecto leitoso.

*Peroxidação lipídica.* Após a preparação dos lipossomas, procedeu-se à execução dos ensaios de peroxidação lipídica que foram realizados em tubo de ensaio, a 37°C, num banho de água termostaticado, de acordo com o protocolo.

Os lipossomas (5 mM) foram incubados, na ausência (controlo) e na presença de amostras (ensaios), com AAPH (20 mM) em tampão fosfato, pH 7,4, num volume final de 2 mL. Imediatamente após o início da reacção, i.e., logo após a adição de AAPH (tempo zero), e de 10 em 10 min, durante 90 min, foram retiradas alíquotas de 20 μL da solução. Estas foram diluídas em 2 mL de etanol absoluto, em cuvetes de quartzo. A formação dos dienos conjugados - índice da peroxidação lipídica - foi avaliada a 234 nm, num espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 6 UV/Vis. As leituras foram feitas contra um branco, preparado da mesma forma mas sem AAPH.

#### 4.5. TRATAMENTO ESTATÍSTICO DE RESULTADOS

Todos os resultados obtidos e apresentados expressam a média de pelo menos três ensaios realizados para cada concentração e os respectivos desvios padrões. Os valores de

EC<sub>50</sub> e de IC<sub>50</sub> foram determinados por regressão linear das curvas obtidas a partir de três ou mais concentrações.

O tratamento estatístico dos resultados foi realizado usando a análise de variância, “one-way ANOVA”, seguida do teste multicomparativo de Tukey-Kramer. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para  $p \leq 0,05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. ESTUDO PRELIMINAR DOS EXTRACTOS E DAS FRACÇÕES ENRIQUECIDAS EM POLIFENÓIS

Os extractos da *Agrimonia eupatoria* L. e do *Equisetum telmateia* Ehrh. (infuso, decocto e extracto hidro-alcoólico) foram preparados de acordo com o seu uso tradicional e monitorizados relativamente à sua actividade antioxidante, pelo teste do DPPH.

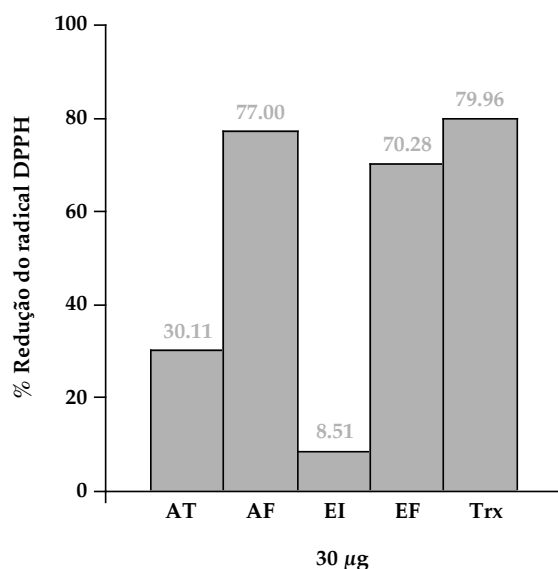
Apesar do DPPH ser um radical sem importância fisiológica, é utilizado na avaliação, *in vitro*, da capacidade antiradicalar de várias amostras. Com efeito, na presença de moléculas com capacidade de ceder um átomo de hidrogénio, a sua absorção diminui, resultando numa redução da absorvância das suas soluções. A simplicidade, a rapidez e a valiosa informação que fornece, foram alguns dos motivos pelos quais este teste foi seleccionado para a monitorização da actividade antiradicalar.

O extracto hidro-alcoólico (tintura) da agrimónia (AT) e o extracto aquoso (infuso) do equisetum (EI) foram, dos extractos testados, os mais activos. O rendimento médio, expresso em peso seco das plantas, foi de 15,8% (AT) e de 20,0% (EI), respectivamente.

Com o objectivo de se obterem fracções enriquecidas em compostos fenólicos, procedeu-se ao tratamento dos extractos da agrimónia e do equisetum, por partilha líquido-líquido com acetato de etilo. Este fraccionamento conduziu a um rendimento de 1,08% (AF) e 0,40% (EF), reportado a planta seca. Apesar do rendimento extractivo ter sido maior para equisetum (EI), o teor de compostos extraídos pelo acetato de etilo foi 2,7 vezes superior para a fracção da agrimónia (AF).

Foram igualmente observadas diferenças na actividade antioxidante, mostrando-se a agrimónia mais activa do que o equisetum. No entanto, essas diferenças foram mais significativas para os extractos, de que para as fracções (figura 15), o que indica, para as duas plantas, uma contribuição não muito distinta, dos compostos fraccionados pelo acetato de etilo, para a referida actividade. Tal como se ilustra na figura 15 a actividade

das fracções é aproximada à do padrão utilizado, o Trolox, um análogo hidrossolúvel da vitamina E.

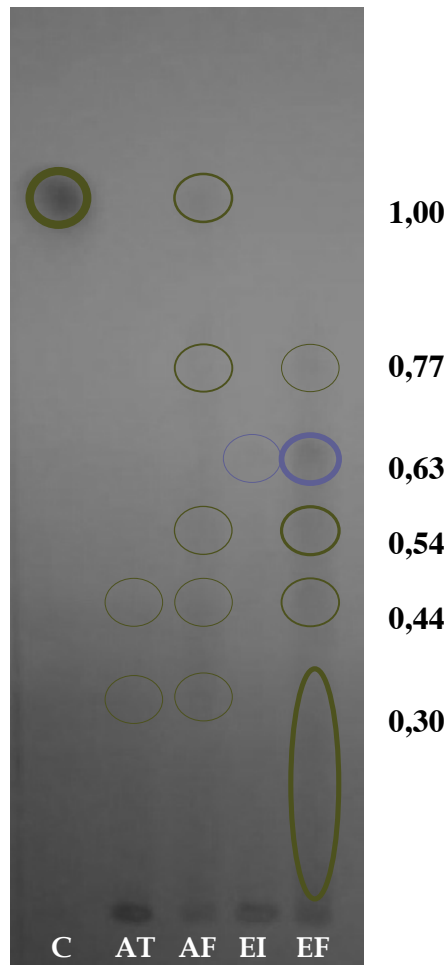


**Figura 15.** Actividade antiradicalar de 30 µg de extracto e de fracção da *Agrimonia eupatoria* L. (AT e AF, respectivamente) e do *Equisetum telmateia* Ehrh. (EI e EF, respectivamente) e do Trolox, análogo hidrossolúvel da vitamina E. Os valores, evidenciados no topo das colunas, foram obtidos a partir da regressão linear das curvas traçadas em triplicado com, pelo menos, três concentrações diferentes.

Para uma análise preliminar de flavonóides e ácidos fenólicos, recorreu-se à cromatografia de camada fina (TLC).

Para o estudo dos **flavanóis** presentes nos extractos e nas fracções recorreu-se às condições descritas no sistema 1, no qual, a migração dos compostos depende da sua massa molecular. Deste modo, através dos valores de  $R_f$ , foi possível comparar o grau de polimerização dos flavanóis presentes nas amostras. Quanto maior for a massa molecular do flavanol, ou seja, quanto mais polimerizado for o composto, menor vai ser a sua migração e, conseqüentemente, o seu  $R_f$  (Escribano-Bailón *et al.*, 1992).

A figura 16 ilustra o cromatograma obtido, após desenvolvimento e revelação. Como seria de esperar, as fracções enriquecidas em polifenóis apresentam maior número de manchas do que os respectivos extractos, devido à maior concentração de polifenóis.



**Figura 16.** Perfil cromatográfico, por TLC (fotografia a preto e branco) após desenvolvimento e revelação com o sistema 1. A intensidade das manchas é proporcional à largura do limite dos círculos e a sua coloração, equivalente à cor do limite dos círculos. À direita do perfil cromatográfico apresentam-se os valores de  $R_f$  relativos, reportados à catequina.

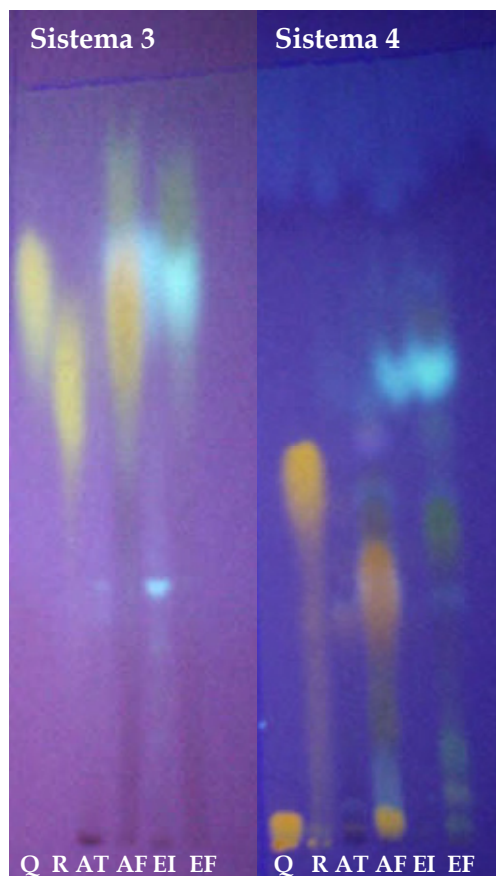
Abreviaturas: C, catequina; AT, extracto da agrimónia; AF, fracção da agrimónia; EI, extracto do equisetum, EF, fracção do equisetum.

Sistema 1: placas de gel de sílica (0,25 mm) eluídas com tolueno-acetona-ácido acético (3:7,5:1; v/v/v). Revelação com DMACA.

A elevada complexidade das amostras em estudo, impede uma separação total dos compostos. No entanto, apesar desta limitação, o  $R_f$  permite prever a presença de monómeros, dímeros e trímeros na agrimónia. Por outro lado, no equisetum é evidente a ausência de monómeros e a presença de dímeros e de trímeros. A coloração azul, obtida

para o equisetum após revelação com o DMACA, sugere a presença de derivados do tipo A, i.e., proantocianidinas com duas ligações interflavânicas.

A pesquisa de **flavonóis**, nos extractos e fracções, foi realizada nos sistemas 2, 3 e 4. As cores das manchas obtidas com os sistemas 3 e 4, visualizadas sob luz ultravioleta (254 e 366 nm) e a intensificação e/ou alteração das cores após revelação, permitiram antever algumas características estruturais dos compostos presentes nas fracções de acetato de etilo (figura 17).



**Figura 17.** Perfis cromatográficos obtidos após eluição e revelação com os sistema 3 e 4 (fotografia).

Abreviaturas: Q, quercetina; R, rutina; AT, extracto da agrimónia; AF, fracção da agrimónia; EI, extracto do equisetum; EF, fracção do equisetum.

Sistema 3: eluição com *t*-butanol-ácido acético glacial-água (3:1:1); Sistema 4: eluição com ácido acético a 15%. Revelação com NP-PEG.



Os dois sistemas cromatográficos permitiram identificar a presença de derivados da quercetina e de canferol (manchas cor de laranja e esverdeadas, respectivamente) na agrimónia e de ácidos fenólicos (manchas azuis fluorescente) e derivados do canferol (manchas esverdeadas) no equisetum.

A comparação dos valores de  $R_f$  dos compostos existentes nas amostras, com aqueles obtidos para as substâncias de referência (quercetina e rutina), permitiu prever, na agrimónia, a possível existência de quercetina e ausência de rutina (figura 17).

Os flavonóis e flavanóis existentes nos extractos e nas fracções foram globalmente quantificados por ensaios espectrofotométricos. Para cada tipo de flavonóide, foi traçada uma curva de calibração com o respectivo composto de referência, a partir da qual se calculou a equação da recta e o coeficiente de correlação,  $r^2$  (tabela 5).

**Tabela 5.** Equações das rectas de calibração, obtidas para os compostos de referência utilizados e respectivos coeficientes de correlação.

Composto	Equação da recta	Coeficiente de correlação
Rutina	$y = 17,5989x + 0,006$	0,999
Catequina	$y = 0,8512x + 0,006$	0,998

Na tabela 6 estão registadas as concentrações de flavonóis e flavanóis totais, expressas em equivalentes grama de rutina e catequina, respectivamente, por cem gramas dos liofilizados dos extractos e das fracções de acetato de etilo. Todos os valores foram calculados tendo em conta o peso dos liofilizados, reportado a peso seco de planta de que se partiu, e as diluições efectuadas.

Os resultados obtidos evidenciam uma maior concentração dos polifenóis quantificados (flavonóis + flavanóis) para os extractos da agrimónia. Porém, essa diferença é substancialmente inferior para as respectivas fracções, facto que pode corroborar a maior proximidade de actividade antioxidante das duas fracções, relativamente aos extractos, quando monitorizadas pelo DPPH. No entanto, significativas diferenças qualitativas e quantitativas foram registadas para os diferentes compostos, de *per si*, nas duas fracções.

A agrimónia apresenta maior concentração de flavanóis do que o equisetum, enquanto, neste último, se registam quantidades apreciáveis de ácidos fenólicos (figura 16 e 17) e maior concentração de flavonóis, do que na agrimónia (tabela 6).

**Tabela 6.** Resultados da quantificação de flavonóis totais e flavanóis dos extractos e das respectivas fracções de acetato de etilo da *Agrimonia eupatoria* L. e do *Equisetum telmateia* Ehrh..

	Flavonóis* <sup>a</sup> (g%)	Flavanóis* <sup>b</sup> (g%)
<i>Agrimonia eupatoria</i> L.		
Extracto	1,853 ± 0,000	12,770 ± 0,260
	0,022 ± 0,000	2,020 ± 0,041
Fracção	2,353 ± 0,000	28,985 ± 0,411
<i>Equisetum telmateia</i> Ehrh.		
Extracto	2,125 ± 0,000	3,387 ± 0,052
	0,463 ± 0,000	0,735 ± 0,000
Fracção	6,191 ± 0,000	23,153 ± 3,347

\*média ± desvio padrão de pelo menos três determinações; <sup>a</sup>concentração de flavonóis expressa em g equivalentes de rutina por 100 g de liofilizado e por 100 g de plantas seca (sombreado cinza); <sup>b</sup>concentração de flavanóis expressa em g equivalentes de catequina por 100 g de liofilizado e por 100 g de planta seca (sombreado cinza).

## 5.2. IDENTIFICAÇÃO DOS POLIFENÓIS

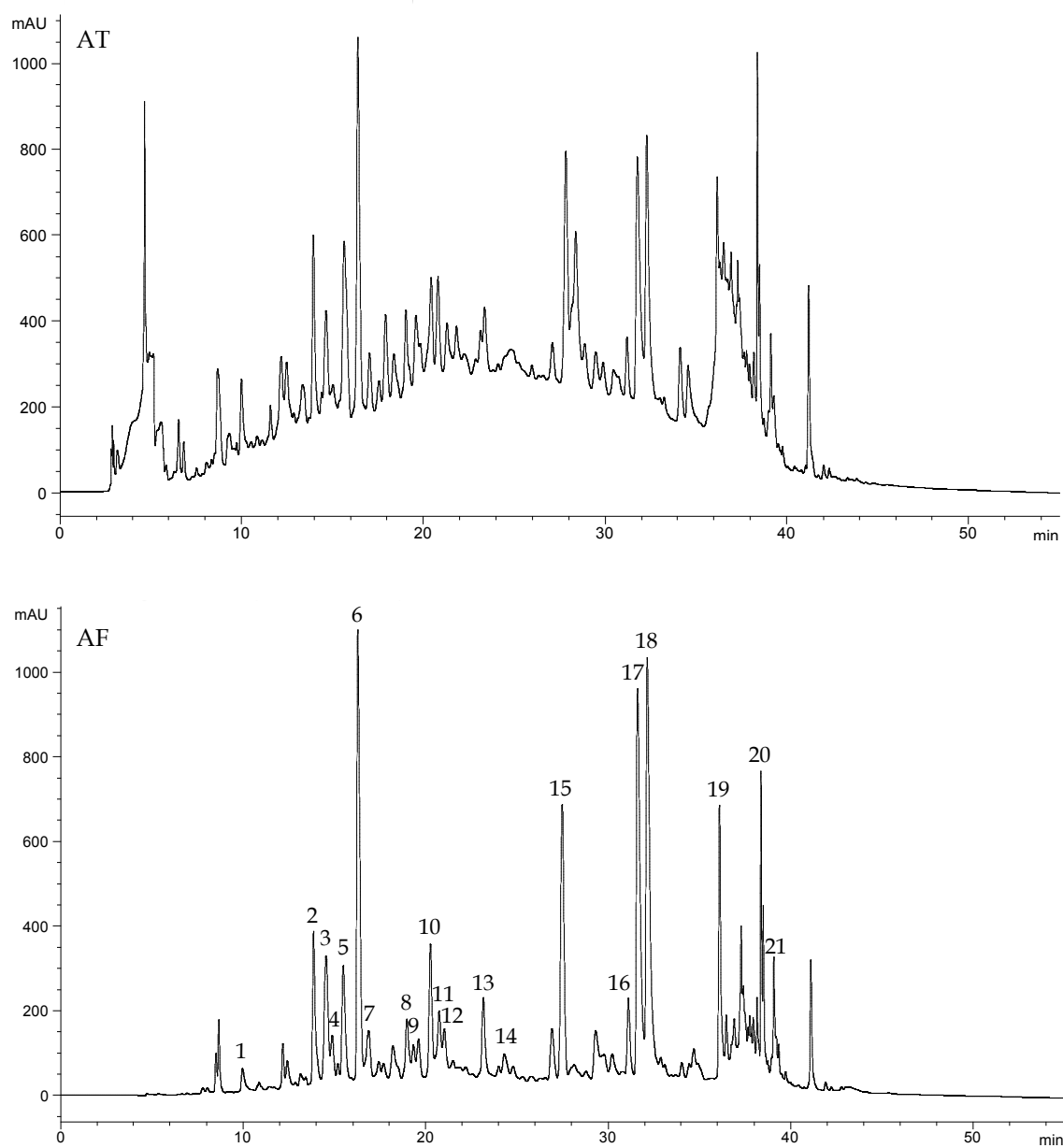
A identificação dos compostos fenólicos nos extractos e nas respectivas fracções da *Agrimonia eupatoria* L. e do *Equisetum telmateia* Ehrh. foi essencialmente baseada no seu comportamento cromatográfico em fase reversa e nas suas características espectrais, utilizando para tal, a cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), com dois diferentes sistemas de detecção (DAD e ESI-MS) e com reacção química pós-coluna, “on-line” (CRD).

Os espectros de UV oferecem informações estruturais dos compostos fenólicos, e, juntamente com os tempos de retenção, contribuem, de forma significativa, para a sua identificação em extractos complexos.

A análise das fracções da agrimónia e do equisetum permitiu inferir a presença de ácidos fenólicos do tipo hidroxicinâmico e benzóico, flavanóis e flavonóis (mono- e di-hidroxilados no anel B). Adicionalmente, na fracção da agrimónia detectam-se espectros característicos de flavonas mono-hidroxiladas no anel B.

Para a identificação dos compostos fenólicos presentes nos extractos (AT e EI) e nas fracções de acetato de etilo (AF e EF) da agrimónia e do equisetum, respectivamente, recorreu-se à HPLC/DAD/ESI-MS.

As figuras 18 e 19 ilustram os perfis cromatográficos, registados a 280 nm, e nas tabelas 7 e 8, transcrevem-se, para cada composto, o tempo de retenção, os comprimentos de onda dos máximos de absorção do espectro de UV, e o valor do ião molecular e respectivos fragmentos, obtidos em modo ião positivo, resultados que se pormenorizam e discutem em seguida.

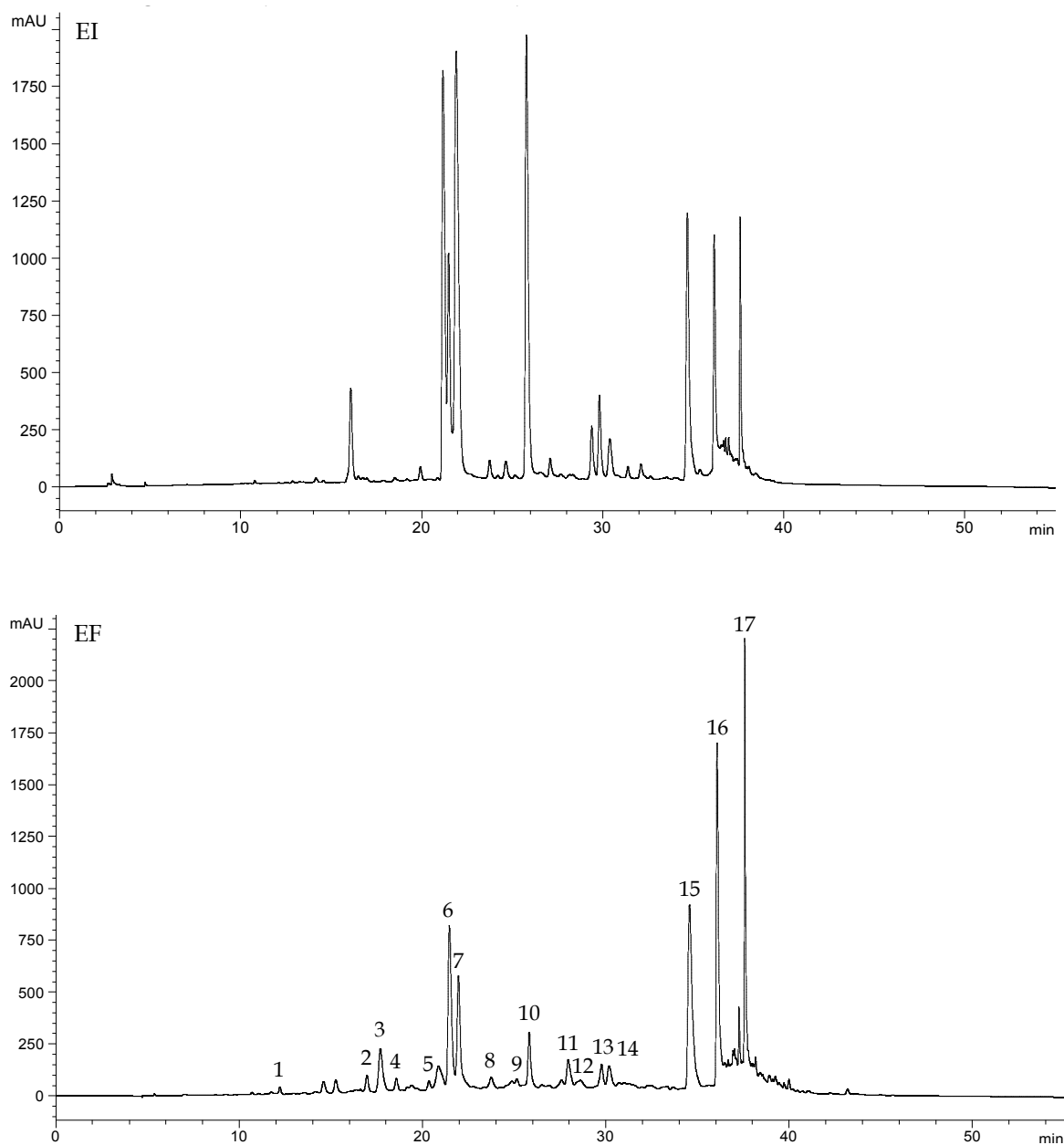


**Figura 18.** Perfis cromatográficos, registados a 280 nm, correspondentes ao extracto (AT) e à fracção de acetato de etilo (AF) da *Agrimonia eupatoria* L.

**Tabela 7.** Comportamento cromatográfico, características espectrais (UV/Vis e ESI-MS) e identificação de compostos presentes no extracto e na fracção da *Agrimonia eupatoria* L.

Compostos	t <sub>R</sub> <sup>a</sup> (min)	HPLC/DAD <sup>b</sup> (nm)	[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	HPLC/ESI-MS Fragmentos de [M+H] <sup>+</sup> [m/z (abundância relativa,%)]
1	Ácido protocatéquico	12,17	260, 294	---
2	Dímero de procianidina B1	13,85	280	427 (99), 409 (100), 291 (27), 287 (37)
3	Dímero de procianidina B3	14,54	280	453 (13), 427 (99), 409 (100), 291 (12), 287 (17)
4	Trímero de procianidina	14,87	280, 330 <sub>sh</sub>	697 (17), 577 (100), 409 (15), 287 (20)
5	Trímero de procianidina C2	15,48	280	715 (90), 697 (76), 577 (57), 427 (52), 409 (100), 287 (20)
6	Catequina	16,27	280	273 (8), 165 (86), 139 (100), 123 (81)
7	Trímero de procianidina EEC	16,86	---	715 (19), 697 (42), 577 (31), 571 (100), 427 (16), 409 (53)
8	Dímero de procianidina B2	18,99	292 <sub>sh</sub> , 310	561 (12), 453 (26), 435 (50), 427 (25), 409 (100), 291 (13), 287 (17)
9	Dímero de procianidina B6	19,35	280, 340	561 (8), 453 (67), 427 (41), 435 (88), 409 (100), 287 (40)
10	Trímero de procianidina	20,28	298 <sub>sh</sub> , 324	715 (28), 714 (100), 696 (70), 579 (29), 533 (90), 427 (23), 409 (28), 287 (21)
11	Tetramero de procianidina	20,75	288, 310	---
12	Trímero de procianidina	21,04	280	715 (9), 697 (37), 577 (100), 517 (47), 287 (12)
13	Dímero de procianidina B7	23,16	280	435 (28), 427 (65), 409 (100), 291 (17), 287 (27)
14	Trímero de procianidina C1	24,32	278	715 (53), 697 (100), 579 (33), 409 (14)
15	Ácido <i>p</i> -cumárico	27,48	298 <sub>sh</sub> , 310	358 (87), 232 (67), 192 (100)
16	6-C-glucosilapigenina	31,10	270, 338	415 (59), 397 (40), 379 (36), 367 (100), 337 (68), 313 (33), 283 (22), 271 (2)
17	Quercetina 3-O-galactósido	31,60	256, 266 <sub>sh</sub> , 294 <sub>sh</sub> , 354	303 (100), 285 (15), 257 (44), 229 (11)
18	Quercetina 3-O-glucósido	32,13	256, 264 <sub>sh</sub> , 298 <sub>sh</sub> , 354	447 (49), 429 (28), 399 (66), 376 (26), 369 (42), 345 (21), 303 (100)
19	Canferol 3-O-glucósido	36,11	265, 294 <sub>sh</sub> , 348	431 (69), 413 (41), 395 (27), 383 (72), 353 (84), 329 (79), 299 (22), 287 (100)
20	Canferol 3-O-(6'-O- <i>p</i> -cumaroil)glucósido	38,50	268, 314, 348 <sub>sh</sub>	576 (39), 565 (84), 489 (59), 473 (89), 459 (57), 447 (39), 443 (100), 433 (43)
21	Quercetina	39,09	---	---

<sup>a</sup>t<sub>R</sub>, tempos de retenção no cromatograma correspondente à fracção de acetato de etilo; <sup>b</sup>HPLC/DAD, máximos de UV; [M+H]<sup>+</sup>, íão molecular, obtido em modo íão positivo; C, catequina; EC, epicatequina; B1, EC-(4-8)-C; B2, EC-(4-8)-EC; B3, C-(4-8)-C; B6, C-(4-6)-C; B7, EC-(4-6)-C; EEC, EC-(4-8)-EC-(4-8)-C; C1, EC-(4-8)-EC-(4-8)-EC; C2, C-(4-8)-C-(4-8)-C.



**Figura 19.** Perfis cromatográficos, registados a 280 nm, correspondentes ao extracto (EI) e à fracção de acetato de etilo (EF) do *Equisetum telmateia* Ehrh.

**Tabela 8.** Comportamento cromatográfico, características espectrais (UV/Vis e ESI-MS) e identificação de compostos presentes no extracto e na fracção da *Equisetum telmateia* Ehrh.

Compostos	t <sub>R</sub> <sup>a</sup> (min)	HPLC/DAD <sup>b</sup> (nm)	[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	HPLC/ESI-MS
				Fragmentos de [M+H] <sup>+</sup> [m/z (abundância relativa,%)]
1	Ácido protocatéquico	12,24	260, 292	---
2	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	16,97	256	---
3	Tetramero de procianidina	17,70	280	1139
4	Dímero de procianidina B2	18,57	280	579
5	Derivado do ácido cafeico	20,35	292 <sub>shv</sub> , 324	---
6	Trímero de procianidina tipo A	21,47	280	865
7	Derivado do ácido cafeico	21,96	302 <sub>shv</sub> , 328	---
8	Trímero de procianidina C1	23,75	280	867
9	Trímero de proantocianidina (epi)Afz-(epi)-C-(epi)-C	25,15	280	851
10	Canferol acetil-di-hexose	25,82	266, 286 <sub>shv</sub> , 348	653
11	Trímero de proantocianidina (epi)-C-(epi)-C-(epi)Afz	27,97	282, 312	851
12	Tetramero de proantocianidina	28,61	280	1123
13	Canferol ramnósido-glucósido	29,77	266, 282 <sub>shv</sub> , 322 <sub>shv</sub> , 348	595
14	Derivado do ácido cafeico	30,18	298 <sub>shv</sub> , 328	---
15	Canferol acetilglucósido-ramnósido	34,57	266, 292 <sub>shv</sub> , 348	637
16	Canferol 3-O-glucósido	36,07	266, 294 <sub>shv</sub> , 342	449
17	Canferol 3-O-acetilglucósido	37,58	---	491

<sup>a</sup>t<sub>R</sub>, tempos de retenção no cromatograma correspondente à fracção de acetato de etilo; <sup>b</sup>HPLC/DAD, máximos de dos espectros de UV; [M+H]<sup>+</sup>, íão molecular, obtido em modo íão positivo; C, catequina; EC, epicatequina; Afz, afzelequina; B2, EC-(4<sup>o</sup> 8)-EC; C1, EC-(4<sup>o</sup> 8)-EC-(4<sup>o</sup> 8)-EC.

### 5.2.1. ÁCIDOS FENÓLICOS

Os picos 1, 8, 10 e 15 (figura 18) e 1, 2, 5 e 7 (figura 19), correspondentes aos cromatogramas da fracções da agrimónia e do equisetum, respectivamente, apresentam espectros de UV característicos de ácidos fenólicos.

Nas plantas ocorrem dois grupos principais de ácidos fenólicos: os ácidos hidroxibenzóicos (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>) e os ácidos hidroxicinâmicos (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>). Apesar de terem em comum grupos fenólicos e um grupo carboxilo, o número e a posição dos grupos hidroxilo no anel aromático permitem, dentro da classe, uma grande variedade estrutural.

Os ácidos fenólicos do tipo hidroxibenzóico apresentam, normalmente, espectros com um único máximo entre 235 e 335 nm, excepto os ácidos di-hidroxilados, que possuem dois máximos de absorção. É disto exemplo, o ácido protocatéquico e também o ácido vanílico, visto que a metilação dos hidroxilos não influencia, significativamente, o espectro. Os ácidos do tipo hidroxicinâmico, por possuírem uma conjugação adicional, ocorrem sob a forma de isómeros *cis* e *trans*, apresentando, por essa razão, dois máximos de absorção entre os 290 e 330 nm, para além de outro máximo, entre 225 e 335 nm, localizado numa zona espectral inferior. Os espectros dos ácidos hidroxicinâmicos são idênticos aos dos respectivos ésteres, mas diferem quando se encontram na forma de heterósidos, dependendo da natureza da ligação (van Sumere, 1989; Ribéreau-Gayon, 1968).

A análise espectral no UV permitiu associar, a ácidos do tipo hidroxibenzóico, os compostos correspondentes aos picos 1 (figura 18) e 1 e 2 (figura 19) e a ácidos hidroxicinâmicos, os picos 8, 10, 15 (figura 18), e 5 e 7 (figura 19). Adicionalmente, a comparação, com padrões, dos tempos de retenção e dos espectros de UV permitiu identificar o ácido protocatéquico (composto 1 da AF e da EF), o ácido *p*-hidroxibenzóico (composto 2 da EF) e o ácido *p*-cumárico (composto 15 da AF). A ausência de padrões e a fraca ionização dos ácidos fenólicos nas condições de ESI-MS utilizadas impossibilitaram a identificação dos restantes ácidos presentes nas amostras.

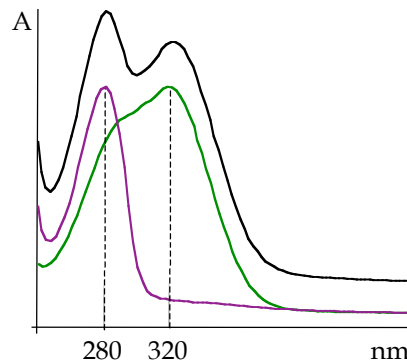
### 5.2.2. FLAVANÓIS

Os perfis dos espectros de UV dos picos 2, 3, 5, 6, 12, 13 e 14 referentes ao cromatograma da fracção da agrimónia (figura 18, AF) e 3, 4, 6, 8, 9 e 12 do cromatograma da fracção do equisetum (figura 19, EF) são característicos de 3-flavanóis.

Apesar da cromatografia líquida de alta resolução acoplada ao detector de díodos (HPLC/DAD) ser a técnica que se encontra mais vulgarizada na análise de compostos fenólicos, para os flavanóis, apresenta algumas limitações. O facto destes compostos apresentarem, de um modo geral, um espectro de UV comum a todos eles,



dificulta a sua caracterização individual. Adicionalmente, para a identificação dos compostos é necessária uma total separação dos diversos constituintes das amostras. Este requisito compromete a análise de matrizes complexas, sendo, normalmente, necessário recorrer a processos morosos de purificação e/ou de isolamento prévio dos compostos. Caso contrário, pode ocorrer a co-eluição dos flavanóis com outros compostos fenólicos, presentes em maiores quantidades ou que absorvam com maior intensidade no UV, como acontece com derivados de ácidos fenólicos. Tal facto constitui outra limitação ao uso exclusivo da HPLC/DAD. Os picos resultantes de co-eluições, apresentam espectros de UV descaracterizados, com os máximos de absorção correspondentes a cada um dos compostos que co-elui, tal como ilustra a figura 20.



**Figura 20.** Espectros de UV de um flavanol (roxo), de um derivado de ácido cafeico (verde) e da mistura dos dois compostos (preto).

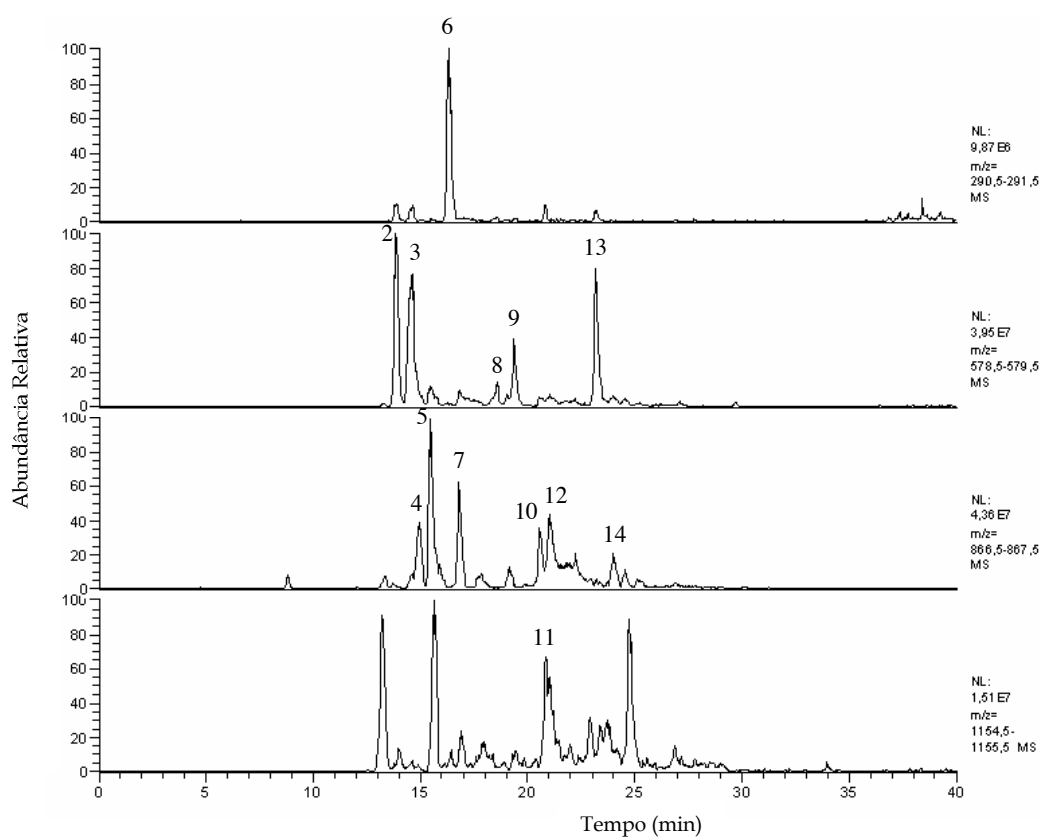
A cromatografia líquida acoplada à detecção por espectrometria de massa (HPLC/ESI-MS) é uma técnica, recentemente introduzida na análise de flavanóis, que ultrapassa estas limitações. A espectrometria de massa com ionização por “electrospray” permite obter o ião molecular de flavanóis (Wollgast *et al.*, 2001; de Pascual-Teresa *et al.*, 2000; Friedrich *et al.*, 2000) e detectar a sua presença, mesmo co-eluindo com outros compostos. Além disso, por fragmentação do ião molecular, é possível identificar o número e o tipo de sub-unidades flavânicas presentes nas proantocianidinas. A informação obtida a partir da espectrometria de massa e o tempo de

retenção permitem, frequentemente, identificar flavanóis sem necessidade do seu isolamento prévio (de Pascual-Teresa *et al.*, 1998).

Apenas a análise dos espectros de massa evidenciou a ocorrência de outros flavanóis eluídos: picos 4, 7, 8, 9, 10 e 11 da agrimónia e 11 do equisetum (tabelas 7 e 8).

### *Agrimonia eupatoria* L.

Com o objectivo de identificar os 3-flavanóis, presentes na fracção da agrimónia, obtiveram-se cromatogramas HPLC/ESI-MS para os iões moleculares equivalentes a  $m/z$  291, 579, 867 e 1155, i.e., de monómeros a tetrâmeros, respectivamente (figura 21).

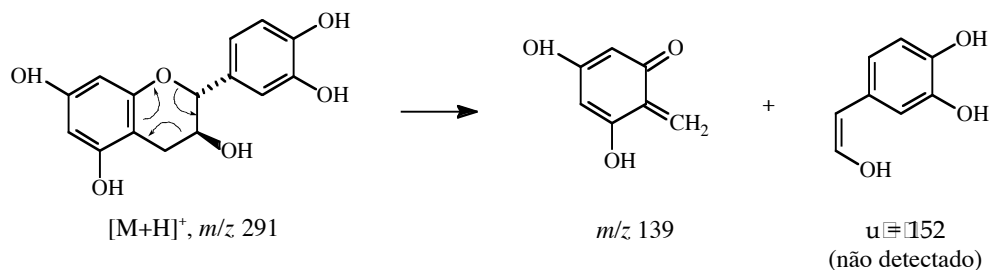


**Figura 21.** Cromatogramas LC/ESI-MS da fracção da *Agrimonia eupatoria* L.; iões moleculares correspondentes a monómeros ( $m/z$  291), dímeros ( $m/z$  579), trímeros ( $m/z$  867) e tetrâmeros ( $m/z$  1155).

Os picos da figura 21 foram numerados com base nos resultados da tabela 7, estabelecendo-se, deste modo, uma analogia com o cromatograma geral da fracção.

Os cromatogramas obtidos sugerem a ocorrência de um monómero, cinco dímeros, seis trímeros e quatro tetrâmeros, como sendo os 3-flavanóis mais representativos. Para a identificação recorreu-se aos seus comportamentos cromatográficos e aos perfis de fragmentação, que a seguir se referem.

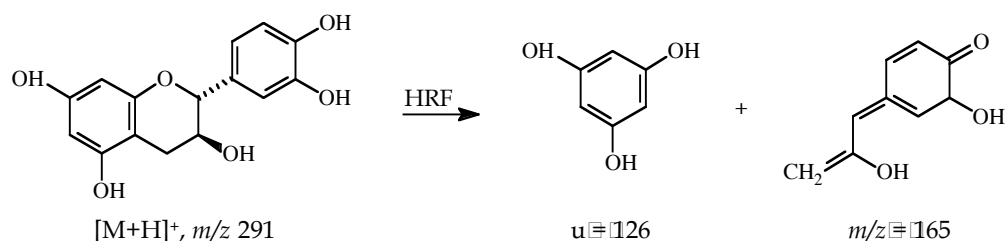
O íon molecular do composto correspondente ao pico 6 apresenta uma relação  $m/z$  de 291 que corresponde à estrutura de **monómeros do tipo catequina**. O seu comportamento cromatográfico e os espectros de UV e de massa foram semelhantes aos obtidos com o padrão de catequina. Além disso, a fragmentação resultante do íon molecular (MS-MS) originou um fragmento maioritário com uma relação  $m/z$  de 139, resultante da fissão *retro* Diels-Alder (RDA) (Hemingway e Karchesy, 1989). O mecanismo subjacente a esta fissão compreende a clivagem do anel heterocíclico (anel C), resultando na perda de 152 u.m. (figura 22). Estes resultados corroboram a presença de um 3-flavanol di-hidroxiado no anel B.



**Figura 22.** Fissão *retro* Diels-Alder (RDA) da catequina Adaptado de Hemingway e Karchesy (1989).

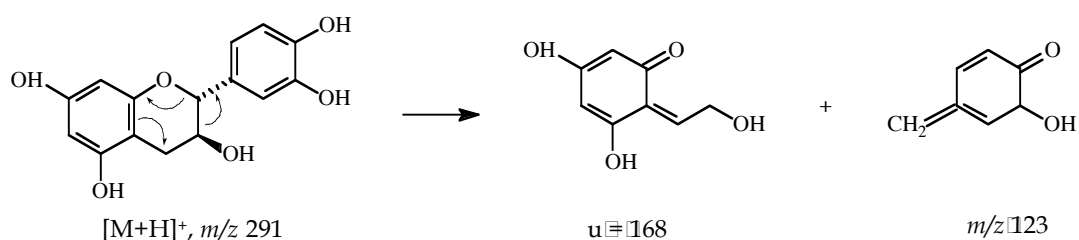
O sinal correspondente à relação  $m/z$  de 165, predominante no espectro de fragmentação da catequina (86%), tem sido interpretado de forma distinta. Alguns autores consideram que a perda de 126 u.m. se deve à eliminação do anel B e de um hidroxilo da posição C<sub>3</sub> (Fitzpatrick *et al.*, 2000), enquanto, mais recentemente, outros autores fundamentam a ocorrência de uma fissão do anel heterocíclico (HRF), entre as posições

C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub> e O-C<sub>2</sub>, com conseqüente perda do anel A (figura 23, (Shui e Leong, 2004; Gu *et al.*, 2003b).



**Figura 23.** Clivagem do anel heterocíclico da catequina entre as posições O-C<sub>2</sub> e C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>.

Adicionalmente, no espectro MS-MS da catequina, é detectado um sinal correspondente a uma relação  $m/z$  de 123 que também resulta da clivagem do anel C, mas por um mecanismo diferente. Como se observa na figura 24, neste caso, a clivagem do anel C ocorre entre O-C<sub>2</sub> e C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>, dando origem a um ião estável (Rohr *et al.*, 2000).



**Figura 24.** Clivagem do anel heterocíclico (C) da catequina entre as posições O-C<sub>2</sub> e C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>.

O fragmento minoritário (<10%), com uma relação  $m/z$  de 273, resulta da perda de uma molécula de água, em C<sub>3</sub>.

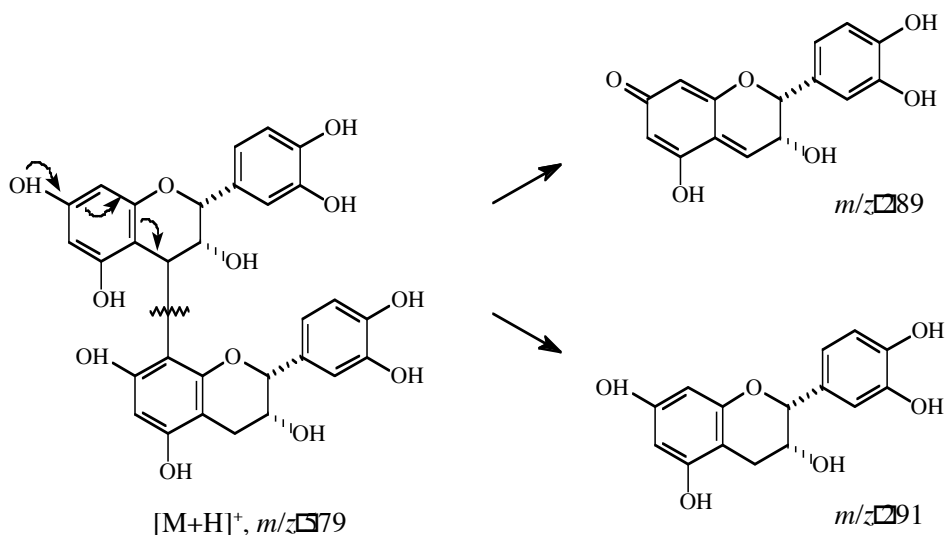
Os iões resultantes da fragmentação do composto 6 foram equivalentes aos obtidos, na fragmentação do isômero da catequina, a epicatequina, utilizando APCI (Rohr *et al.*, 2000). Recentemente, Shui e Leong (2004) obtiveram os mesmos iões na fragmentação dos dois

isómeros, epicatequina e catequina, utilizando ESI em modo íon positivo. Como as proantocianidinas são constituídas por unidades monoméricas de 3-flavanóis ligadas entre si, torna-se essencial a análise do perfil de fragmentação destas unidades estruturais e das ligações interflavânicas, para interpretar os espectros de massa dos respectivos oligómeros e dos polímeros.

Valores de  $m/z$  equivalentes a 579 sugerem a presença de **dímeros** de procianidinas do **tipo B**, i.e., com uma ligação interflavânica C-C. Os fragmentos mais abundantes, obtidos por fragmentação dos seus íons moleculares, apresentam sinais correspondentes às relações  $m/z$  de 409 e de 427. Este último fragmento resulta da fissão *retro* Diels-Alder, enquanto a sua subsequente estabilização por perda de uma molécula de água da posição C<sub>3</sub>, origina o íon maioritário dos espectros MS-MS, com a relação  $m/z$  de 409, à semelhança do que tem sido referido em proantocianidinas (Gu *et al.*, 2003b). Estes resultados sugerem que, nas condições utilizadas, a fragmentação mais susceptível de ocorrer nos dímeros é a fissão *retro* Diels-Alder.

Apesar da fissão *retro* Diels-Alder poder ocorrer na unidade superior ou inferior dos dímeros, vários trabalhos descrevem a predominância da ocorrência da RDA na unidade superior (de Pascual-Teresa *et al.*, 2000; Friedrich *et al.*, 2000). A eliminação do anel B, da unidade superior, dá origem a um íon com um sistema hiperconjugado π-π maior do que o resultante da RDA da unidade inferior e, como tal energeticamente favorável (Gu *et al.*, 2003b). Este conhecimento é de extrema importância, especialmente, no caso de proantocianidinas heterogéneas, i.e., contendo unidades de diferentes 3-flavanóis (catequinas, galhocatequinas e/ou afzelequinas). A fissão *retro* Diels-Alder de um oligómero, cuja unidade superior possui o anel B mono- (afzelequina), di- (catequina) ou tri-hidroxilado (galhocatequina), resulta na perda de 136 u.m., 152 u.m. ou 168 u.m., respectivamente. A valiosa informação obtida a partir dos fragmentos provenientes da perda destas unidades de massa tornam a RDA a fragmentação mais importante para a caracterização estrutural de oligómeros (Friedrich *et al.*, 2000).

A clivagem da ligação interflavânica ocorre, por sua vez, em menor extensão, uma vez que, os fragmentos resultantes, com valores de  $m/z$  291 e 289, apresentam-se em percentagens bastante baixas (<40%). A clivagem desta ligação começa na subunidade superior (Friedrich *et al.*, 2000) e segue o mecanismo “quinone-methide”, originalmente descrito por Hemingway e Karchesy (1989) (figura 25).



**Figura 25.** Clivagem da ligação interflavânica do dímero B2 pelo mecanismo “quinone-methide”. Adaptado de Hemingway e Karchesy (1989).

Teoricamente, os fragmentos monoméricos de 3-favanóis di-hidroxilados no anel B seriam detectados com uma  $m/z$  de 289 e de 291. No entanto, nas condições utilizadas, a clivagem da ligação interflavânica dos dímeros, deu origem a íões de  $m/z$  287 e 291. Segundo Hemingway e Karchesy (1989), este fragmento seria característico da clivagem de dímeros de tipo A, que possuem uma adicional ligação éter entre os dois monómeros. No entanto, outros autores verificaram a ocorrência deste fragmento em procianidinas do tipo B (Rohr *et al.*, 2000), justificando a sua ocorrência através de um mecanismo alternativo de oxidação, que origina uma segunda quinona no anel B do fragmento a  $m/z$  289.

Adicionalmente, nos espectros MS-MS de alguns dos dímeros, foram encontrados fragmentos com  $m/z$  de 453 e de 561 correspondentes à perda do anel B e à perda de uma molécula de água, em C3, respectivamente.

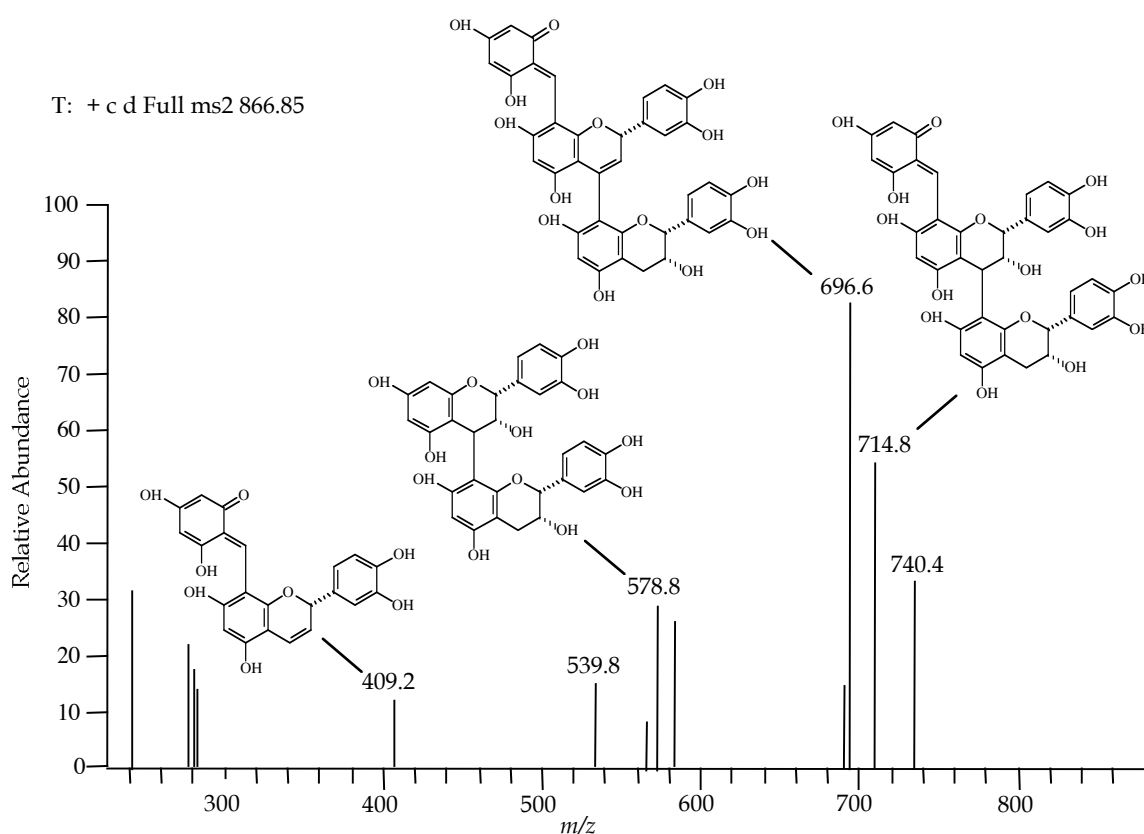
Por comparação dos espectros de UV e de massa, e do tempo de retenção dos compostos, com os obtidos com padrões, foi possível identificar os picos 2, 3, 8 e 13 (figura 18) como os dímeros epicatequina-(4 $\beta$ -8)-catequina (procianidina B1), catequina-(4 $\beta$ -8)-catequina (procianidina B3), epicatequina-(4 $\beta$ -8)-epicatequina (procianidina B2), epicatequina-(4 $\beta$ -6)-catequina (procianidina B7).

Apesar dos sinais resultantes da fragmentação do composto 9 terem sido semelhantes aos dos restantes dímeros, a ausência de padrões inviabilizou a sua identificação. No entanto, as características de eluição permitiram identificar a estrutura do composto 9. De acordo com de Pascual-Teresa e colaboradores (2000), a eluição dos flavanóis em colunas de fase reversa, segue, de um modo geral, a seguinte ordem:

- os derivados 2,3-*trans* (i.e., catequina), eluem primeiro que os correspondentes 2,3-*cis* (i.e., epicatequina);
- nas proantocianidinas com as mesmas unidades, as que possuem ligações interflavânicas 4-6, eluem posteriormente;
- flavanóis com o anel B tri-hidroxilado eluem primeiro que os respectivos di-hidroxilados.

Deste modo, o tempo de retenção do composto 9, superior ao da procianidina B2-EC-(4-8)-C, levaria a supor a existência de uma ligação interflavânica do tipo 4-6. No entanto, o composto 9 elui antes do dímero EC-(4-6)-C (procianidina B7). Como a procianidina B7 possui um derivado 2,3-*trans* na unidade inferior, a eluição antecipada do composto 9 pode ser atribuída ao facto de ter, como unidade superior, outro derivado 2,3-*trans*. Com base nestes resultados, a identificação do composto 9 foi sugerida como o dímero catequina-(4 $\beta$ -6)-catequina (procianidina B6).

Os picos 4, 5, 7, 10, 12 e 14 (figura 18, tabela 7) foram identificados como **procianidinas triméricas do tipo B** ( $m/z$  867). A figura 26 representa o perfil de fragmentação característico dos trimeros de tipo B. Tal como para os dímeros identificados, também os íons resultantes da sua fragmentação são característicos das procianidinas. Obtiveram-se fragmentos correspondentes à fissão *retro* Diels-Alder ( $m/z$  715), à fissão *retro* Diels-Alder com consequente perda de um hidroxilo em  $C_3$  ( $m/z$  697), à clivagem da ligação interflavânica com consequente perda de um monômero ( $m/z$  579) e à fissão *retro* Diels-Alder posterior à clivagem interflavânica ( $m/z$  409).



**Figura 26.** Espectro de massa após fragmentação do íon molecular de uma procianidina trimérica do tipo B. Estrutura dos fragmentos resultantes.

Com o aumento do grau de polimerização das proantocianidinas crescem as dificuldades nas suas identificações. O perfil semelhante de fragmentação dos flavanóis, o



aumento do número de isómeros, não diferenciados por espectrometria de massa, e a resultante sobreposição dos isómeros com diferentes graus de polimerização, são algumas das dificuldades que, juntamente com a ausência de padrões, inviabilizam a identificação das proantocianidinas de massa molecular elevada.

Baseados no seu comportamento cromatográfico e por comparação com o respectivo padrão o composto correspondente ao pico 7 (figura 18, AF) foi identificado como o trímero EEC (tabela 7). Os compostos correspondentes aos picos 5 e 14 foram identificados, com base nos seus comportamentos cromatográficos e por comparação com os resultados obtidos por outros autores, como sendo os trímeros catequina-(4 $\beta$ -8)-catequina-(4 $\beta$ -8)-catequina (procianidina C2) e epicatequina-(4 $\beta$ -8)-epicatequina-(4 $\beta$ -8)-epicatequina (procianidina C1), respectivamente (de Pascual-Teresa *et al.*, 1998; Treutter *et al.*, 1994; Escribano-Bailón *et al.*, 1992).

O composto correspondente ao pico 11 foi identificado como um **tetrâmero do tipo B**.

#### *Equisetum telmateia* Ehrh.

A pesquisa de monómeros ( $m/z$  291), dímeros ( $m/z$  579), trímeros ( $m/z$  867) e tetrâmeros ( $m/z$  1155) de procianidinas do tipo B, no cromatograma de massa relativo à fracção do equisetum (figura 19, tabela 8), permitiu detectar apenas dois compostos, correspondentes aos picos 4 e 8. O composto 4 foi identificado como sendo o dímero B2 por comparação das suas características espectrais e comportamento cromatográfico, com as do respectivo padrão, enquanto o composto 8 foi associado ao trímero C1, particularmente, pelo seu comportamento cromatográfico (de Pascual-Teresa *et al.*, 1998).

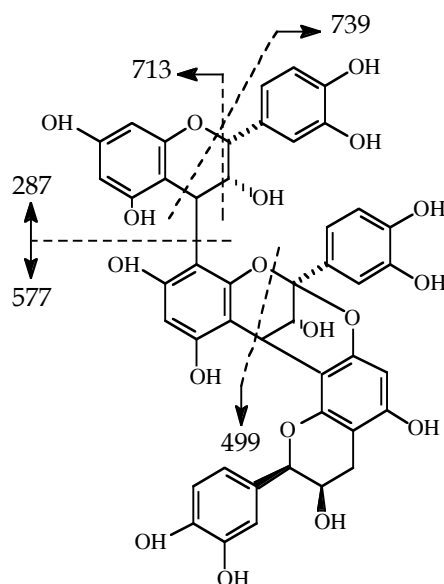
O íão molecular do composto correspondente ao pico 6 ( $m/z$  865), apresenta duas unidades de massa inferiores ao esperado para procianidinas triméricas do tipo B, sugerindo que a sua estrutura corresponde à de uma **procianidina trimérica de tipo A**, i.e., com uma ligação interflavânica adicional, C<sub>2</sub>-O-C<sub>7</sub>. Os íões relevantes para a

elucidação estrutural apresentam sinais com  $m/z$  de 739, 713 e 287. O fragmento com  $m/z$  739  $[M-126]^+$ , resulta da clivagem HRF da unidade superior. O fragmento maioritário, com  $m/z$  713  $[M-152]^+$ , resulta da fissão *retro*-Diels-Alder e apresenta menos duas unidades de massa relativamente ao fragmento correspondente, nas procianidinas do tipo B.

A fissão *retro*-Diels-Alder, nas proantocianidinas de tipo A, é condicionada pela localização da ligação éter. Se esta se encontrar entre a unidade superior e a intermédia, a RDA é inibida na unidade superior e ocorre por uma via desfavorável, na unidade intermédia (Gu *et al.*, 2003b). O facto de o fragmento maioritário deste trímero ser resultante da RDA, poderá sugerir a sua ocorrência num ambiente favorável, i.e., na unidade superior, apontando para a presença da ligação A entre a unidade intermédia e a unidade inferior. Além disso, os fragmentos detectados com  $m/z$  577 e 287, resultantes da clivagem do anel heterocíclico pelo mecanismo “quinone-methide”, corroboram a hipótese da presença da ligação A entre a unidade intermédia e a inferior.

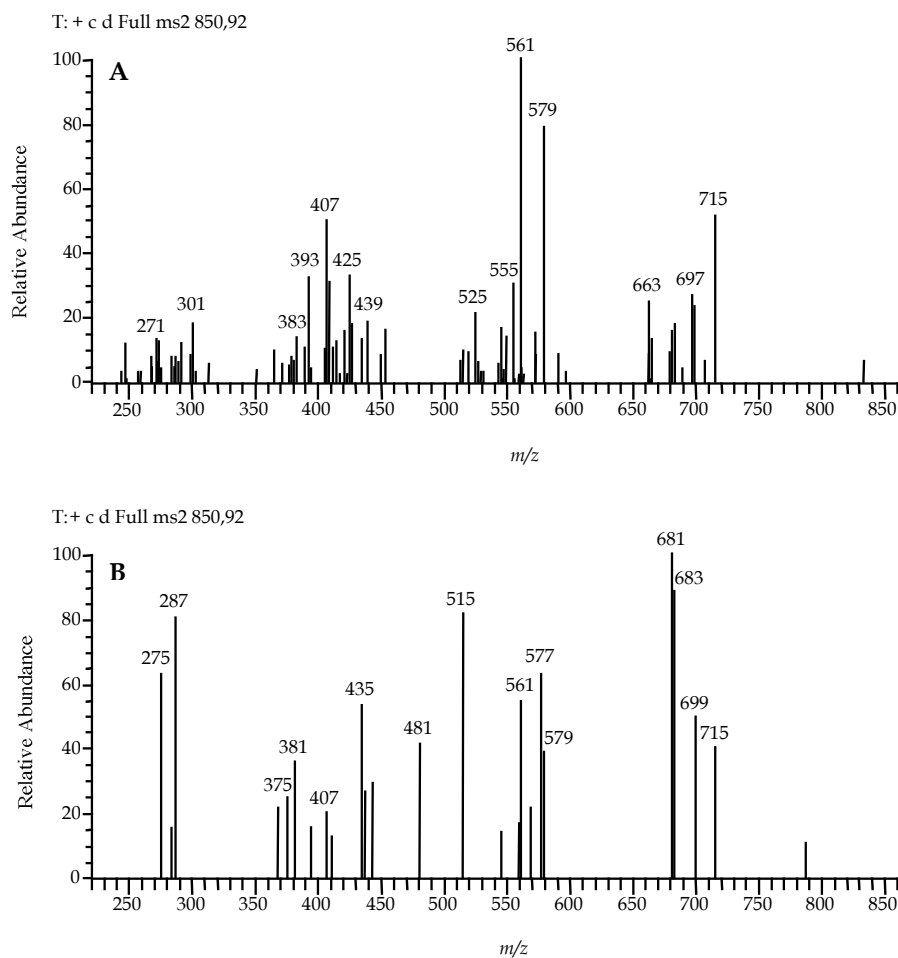
Apesar de se poder prever, através da espectrometria de massa, a sequência das unidades flavânicas em pequenos oligómeros, as posições e a estereoquímica das ligações envolvidas não pode ser elucidada (Gu *et al.*, 2003b). Com base nos resultados e nestas limitações, é proposta a estrutura (epi)catequina-(epi)catequina-A-(epi)catequina para o trímero de tipo A, correspondente ao composto 6 (figura 27), onde (epi)catequina significa que as unidades presentes tanto podem ser unidades de catequina como de epicatequina e unidas por ligações C-C e por uma ligação adicional de tipo A (-A-).

Os compostos 9 e 11 (figura 19, EF) apresentam iões moleculares com  $m/z$  de 851 (tabela 8), com menos 16 u.m. relativamente a uma procianidina trimérica. Têm os seus perfis de fragmentação bastante diferentes (figura 28), apesar de, nos dois espectros de MS-MS serem detectados, com distintas intensidades, sinais com  $m/z$  de 561 (-290 u.m.) e de 579 (-272 u.m.) reveladores da estrutura de trímeros constituídos por duas unidades (epi)catequina e uma unidade (epi)afzelequina (3-flavanol mono-hidroxilado no anel B). Os compostos 9 e 11 são, portanto, **trímeros heterogéneos**.



**Figura 27.** Estrutura proposta para o trímico de tipo A, correspondente ao composto 6, hipotetizando ligações interflavânicas C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub> e respectivas posições de fragmentação. Adaptado de Fitzpatrick *et al.* (2000).

Adicionalmente, no espectro do composto correspondente ao pico 9, foram detectados fragmentos com relações  $m/z$  de 715 e de 697 resultantes, respectivamente, da perda de 136 u.m. por RDA e da subsequente perda de água, provavelmente, ao nível do hidroxilo em C<sub>3</sub> (Gu *et al.*, 2003b). As unidades de massa perdidas por RDA (-136 u.m.), sugerem que esta cisão ocorre numa unidade mono-hidroxilada no anel B. Uma vez que se verifica, preferencialmente, na unidade superior das proantocianidinas, pode concluir-se que a (epi)afzelequina se encontra na posição superior do trímico. Deste modo, o trímico heterogéneo, correspondente ao composto 9, foi identificado como (epi)afzelequina-(epi)catequina-(epi)catequina. Os resultados apresentados evidenciam a já referida importância da RDA na identificação de proantocianidinas heterogéneas, mais concretamente, na determinação da posição das diferentes unidades.



**Figura 28.** Espectro ESI-MS-MS dos compostos correspondentes aos picos 9 (A) e 11 (B) obtidos em modo íon positivo.

No espectro do composto 11 a presença do fragmento equivalente a  $m/z$  579 indica também a existência de duas unidades de (epi)catequina ligadas entre si. Por outro lado, o fragmento a  $m/z$  411 corresponde à fissão *retro* Diels-Alder deste dímero. A perda de 152 u.m., ocorrida por RDA, é sugestiva de que as duas unidades di-hidroxiladas no anel B se localizam na posição superior do trímero, constituindo a (epi)afzelequina, a unidade inferior. O fragmento detectado a  $m/z$  435 resulta da clivagem HRF na unidade intermédia do trímero, o que também permite reforçar a existência de duas unidades de (epi)catequina contíguas e, conseqüentemente, a presença da (epi)afzelequina numa

posição extrema do trímero. O trímero heterogéneo correspondente ao composto 11 foi então identificado como (epi)catequina-(epi)catequina-(epi)afzelequina.

Os espectros de massa dos compostos correspondentes aos picos 3 e 12 também sugerem a presença de proantocianidinas **heterogéneas** (**tetrâmeros**) constituídas por três (epi)catequinas e uma (epi)afzelequina, e duas (epi)catequinas associadas a duas (epi)afzelequinas, respectivamente. No entanto, a falta de informação dos espectros de MS-MS não permite especular acerca das suas identidades.

A identificação de procianidinas foi posteriormente confirmada por HPLC/CRD. A reacção química que ocorre com o DMACA, apesar de não ser específica (outros compostos reagem com o DMACA), é altamente selectiva na análise de 3-flavanóis. A absorção dos produtos da reacção, a elevado comprimento de onda (visível, 640 nm), ultrapassa os problemas de co-eluição, com outros compostos, que se verificam por HPLC/DAD. Adicionalmente, a sensibilidade da detecção a 640 nm é, de um modo geral, superior à obtida a 280 nm, permitindo detectar 3-flavanóis em concentrações muito baixas (Treutter *et al.*, 1994).

Treutter e colaboradores (1994) mostraram que, nas mesmas condições de análise (composição dos solventes, fluxo e tempo de reacção), a razão entre as áreas dos picos obtidas a 640 e 280 nm ( $A_{640}/A_{280}$ ) é característica, relacionando-se com a estrutura química de cada procianidina. No entanto, é importante notar que, para se conseguirem interpretar os resultados obtidos por esta técnica, tem de ocorrer uma boa separação cromatográfica dos compostos. De facto, a co-eluição de diferentes compostos introduz erros no valor das áreas determinadas a 280 nm, e, como tal, as razões  $A_{640}/A_{280}$  não podem ser tidas em conta na identificação das procianidinas.

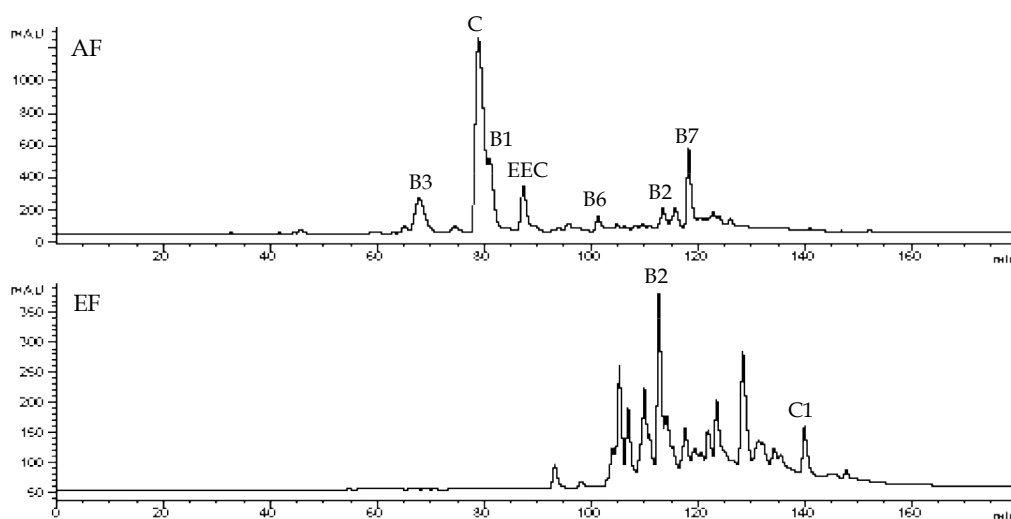
Na tabela 9 estão evidenciados os resultados obtidos com uma mistura de padrões de procianidinas. Como se observa, a procianidina B7, com uma ligação interflavânica 4-6, apresenta uma razão das áreas, superior à correspondente procianidina, com ligação 4-8 (procianidina B1), verificando-se o mesmo comportamento entre a procianidina B6 e B3.

**Tabela 9.** Resultados obtidos para diferentes 3-flavanóis, pelo método HPLC/CRD.

N.º	Composto	t <sub>R</sub> <sup>a</sup>	A <sub>640</sub> /A <sub>280</sub>
1	C-(4 $\square$ 8)-C (B3)	68,8	3,82
2	(+)-Catequina (C)	80,5	7,99
3	EC-(4 $\square$ 8)-C (B1)	83,5	6,79
4	EC-(4 $\square$ 8)-EC-(4 $\square$ 8)-C (EEC)	92,0	4,57
5	C-(4 $\square$ 8)-EC (B4)	94,9	5,21
6	C-(4 $\square$ 6)-C (B6)	100,1	4,34
7	EC-(4 $\square$ 8)-EC (B2)	113,1	5,87
8	(-)-Epicatequina (EC)	119,4	13,8
9	EC-(4 $\square$ 6)-C (B7)	122,5	9,08

<sup>a</sup>t<sub>R</sub>, tempo de retenção do cromatograma obtido a 640 nm, após a reacção com o DMACA; A<sub>640</sub>/A<sub>280</sub>, relação entre as áreas dos picos obtidos a 640 nm e 280 nm.

Para a confirmação de 3-flavanóis, anteriormente identificados, recorreu-se às suas características espectrais e comportamento cromatográfico, a 640 nm, o que é ilustrado na figura 29.



**Figura 29.** Cromatogramas, registados a 640 nm, das fracções da agrimónia (AF) e do equisetum (EF).

### 5.2.3. FLAVONÓIS

O estudo das amostras por HPLC/DAD permitiu confirmar a presença de derivados da quercetina e do canferol na agrimónia e de derivados do canferol no equisetum, o que já tinha sido sugerido nos estudos preliminares, por TLC. Apesar dos flavonóis apresentarem espectros de UV característicos, a presença de glúcidos ou grupos alifáticos acilos (ex. acetilo ou malonilo), pode não ser revelada por HPLC/DAD pois estes compostos absorvem fracamente no UV (Grayer *et al.*, 2000). Pelo contrário, a espectrometria de massa permite obter informação acerca das moléculas ligadas sem que seja necessário proceder ao seu isolamento prévio.

#### *Agrimonia eupatoria* L.

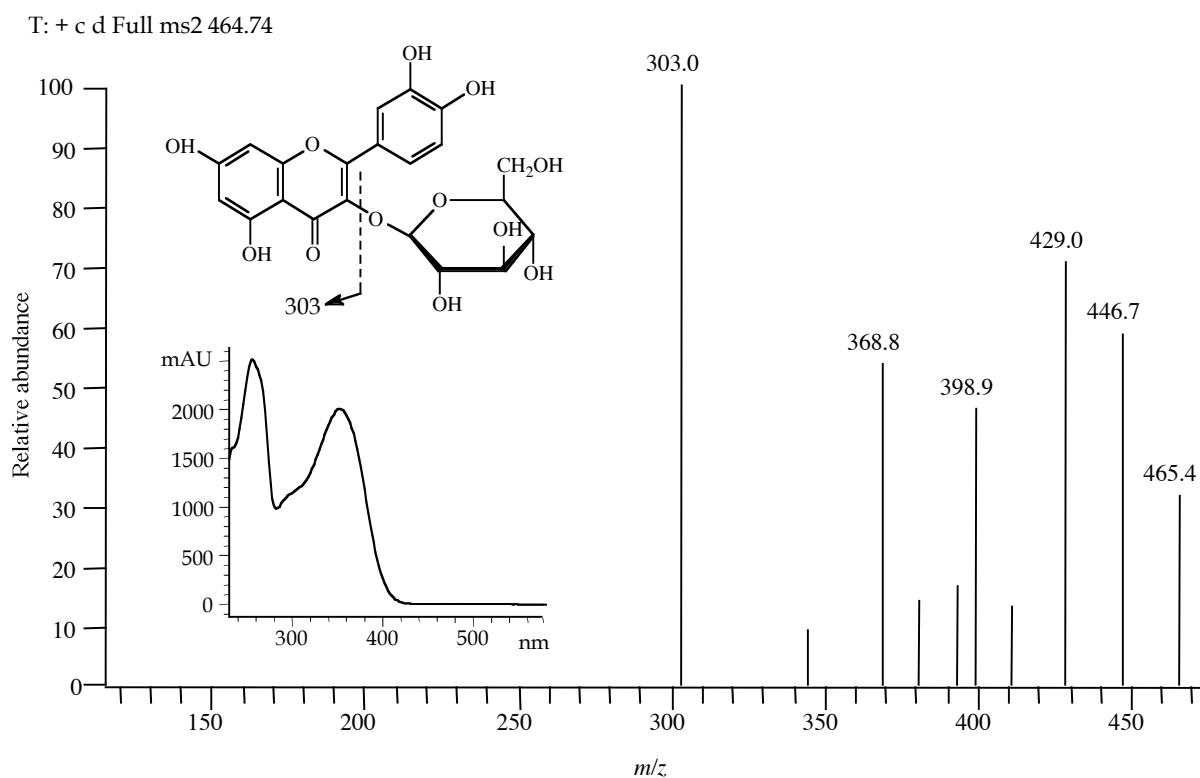
A pré-identificação da quercetina por análise das placas de TLC conduziu à sua pesquisa no cromatograma de massa da fracção da agrimónia. O  $t_R$  e o seu ião molecular ( $m/z$  330), coincidentes com os de um padrão de quercetina, permitiram identificar o composto eluído no pico 21 (figura 18, tabela 7).

Os picos 17 e 18 foram identificados como **derivados da quercetina**, com base nos espectros de UV e na presença de sinais a  $m/z$  303 (quercetina protonada), nos espectros de MS-MS.

O pico 17 apresenta no seu espectro de massa um ião com uma relação  $m/z$  de 303 e outro, com menor intensidade, com  $m/z$  de 465. Apesar do ião maioritário apresentar um valor de  $m/z$  equivalente ao da quercetina, os máximos de absorção no UV e o seu comportamento cromatográfico sugerem que seja um derivado da quercetina. Estes resultados apontam para uma fragmentação precoce dum composto com ião molecular  $m/z$  de 465, sendo o ião com  $m/z$  de 303 um produto dessa fragmentação. Tal como no espectro MS-MS do pico 18, esta fragmentação resulta na perda de 162 u.m., valor coincidente com o de uma hexose, eventualmente ligada à quercetina. Consequentemente, o fragmento com uma relação  $m/z$  de 303, a presença de um ião molecular com  $m/z$  de 465

e a perda de 162 u.m. permitem associar estes compostos à quercetina, ligada a uma hexose. Adicionalmente, a comparação dos espectros de UV dos compostos 17 e 18 com o espectro da quercetina, evidencia, para ambos, um desvio hipsocrômico da banda I, de cerca de 16 nm, apontando para a substituição do hidroxilo na posição 3 (Mabry *et al.*, 1970). Com base nestes resultados, no comportamento cromatográfico e na posterior utilização de padrões, os compostos 17 e 18 foram identificados como sendo a quercetina 3-O-galactósido (hiperósido) e a quercetina 3-O-glucósido (isoquercitrina), respectivamente.

Na figura 30 estão representados os espectros de MS-MS e de UV e o principal local de fragmentação da quercetina 3-O-glucósido.



**Figura 30.** Espectro de ESI-MS-MS e de UV, estrutura e local de fragmentação principal da quercetina 3-O-glucósido.

Os espectros de UV dos compostos 19 e 20 sugerem **derivados do canferol**.



O pico 19 apresenta um íon molecular com uma relação  $m/z$  de 449 e o seu espectro MS-MS, um fragmento com  $m/z$  de 287, correspondente ao canferol. A perda de 162 u.m., após fragmentação do íon molecular, e o desvio hipsocrômico observado na banda I do espectro de UV sugerem, tal como nos derivados da quercetina, a ligação de uma hexose ao hidroxilo fenólico em posição 3. As características de retenção e a comparação com padrões permitiram identificar o composto 19 como o canferol 3-O-glucósido.

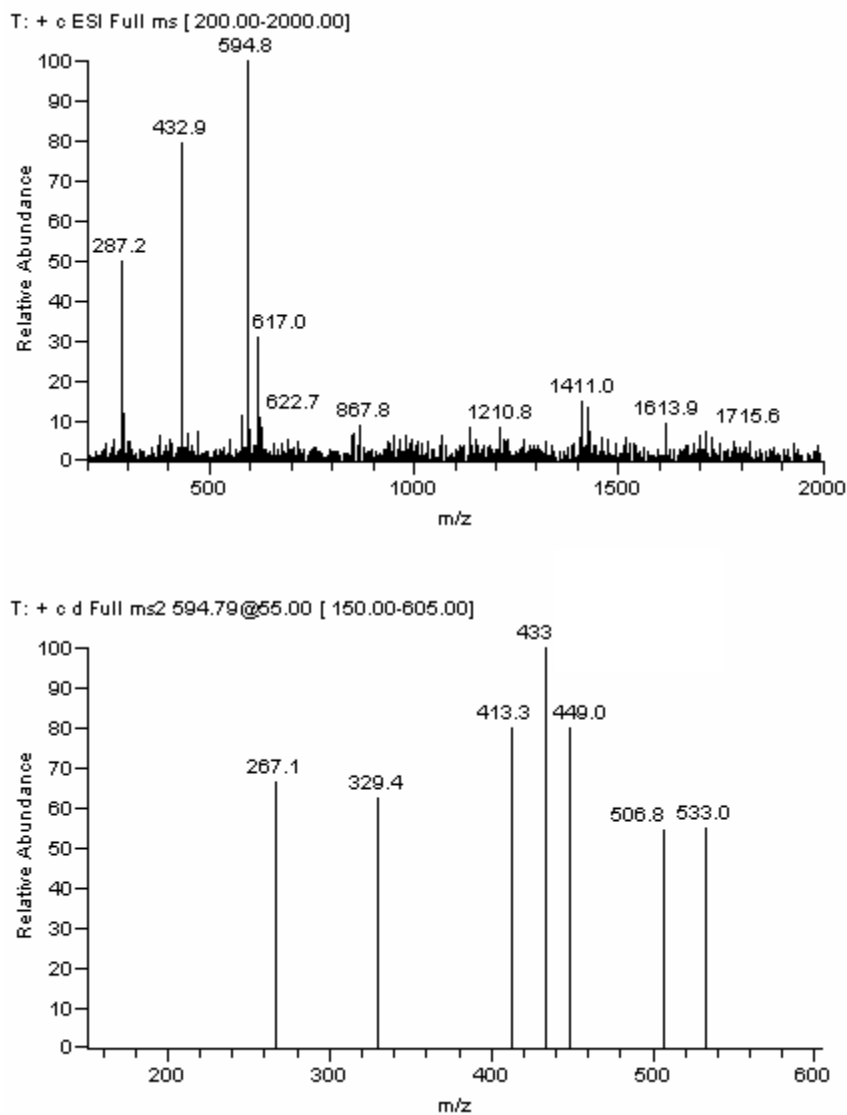
O espectro de massa do composto 20 apresenta um íon molecular com  $m/z$  de 595, 146 u.m. superior ao íon molecular do composto 19. Além disso, o seu espectro de UV, apesar de ser semelhante ao do composto 20, apresenta um máximo de absorção adicional a 314 nm. Estas características sugerem a presença de uma acilação com o ácido *p*-cumárico. Por outro lado, a eluição tardia deste composto, relativamente ao composto 19 corrobora a presença de um substituinte acilo. Com base nestas características e por comparação com o respectivo padrão, o composto 20 foi identificado como o canferol 3-O-(6''-O-*p*-cumaroil)glucósido (tilirósido).

#### *Equisetum telmateia* Ehrh.

Os picos 10, 13, 15, 16 e 17 (figura 19, EF, tabela 8) foram identificados como **derivados do canferol**, com base nos seus espectros de UV e na presença do fragmento correspondente ao canferol, com uma relação  $m/z$  de 287, nos seus espectros MS-MS.

O espectro de massa do pico 13 apresenta um valor de íon molecular com  $m/z$  de 595. Como mostra a tabela 8, o potencial de colisão utilizado (45 V) não foi suficiente para fragmentar o composto e, deste modo, recorreu-se a um potencial de colisão superior (55 V). O espectro MS-MS obtido, patente na figura 31, mostra dois sinais, com  $m/z$  de 433 e de 449, correspondentes à perda de um resíduo de hexose e de rarnose, respectivamente. De acordo com Cuyckens e colaboradores (2001), a presença do íon a  $m/z$  433 poderia estar associada à perda de um resíduo interno da rutinose [ramnosil-(1 6)-glucose]. No entanto, a elevada intensidade deste fragmento, a ausência do fragmento correspondente ao O-di-glicósido (308 u.m.) e a eluição

cromatográfica precoce, comparativamente à do padrão, canferol[3-O-rutinósido, permitiram eliminar esta possibilidade.



**Figura 31.** Espectro ESI-MS-MS do composto 13, obtido em modo íon positivo e utilizando um potencial de colisão de 55 V.

Os resultados apresentados e o perfil do espectro de UV apontam para a ligação dos glúcidos em diferentes posições da genina. Deste modo, a identificação do composto foi sugerida como o canferol[glucósido-ramnósido. A espectrometria de massa não oferece

informação sobre a localização dos resíduos de glúcidos nos compostos. No entanto, um estudo recente, realizado em modo ião negativo, aponta para uma remoção mais favorável dos resíduos osídicos localizados na posição 7, comparativamente aos que se encontram ligados em posição 3 (Llorach *et al.*, 2003).

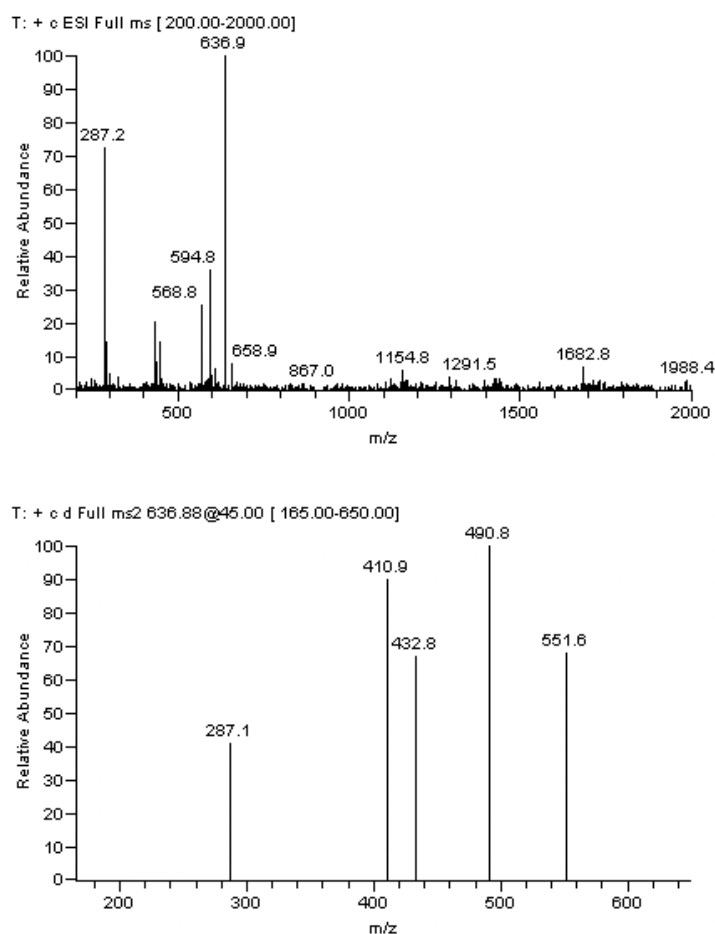
Consequentemente, o ião de fragmentação resultante da perda da ose em posição 7, apresentaria uma intensidade superior ao resultante da clivagem da ose em posição 3.

A extrapolação destes resultados para a análise do composto 13, pode sugerir que o fragmento maioritário, com  $m/z$  de 433, resulta da clivagem da ligação da glucose, que se localizaria na posição 7, e que o ião menos intenso, com  $m/z$  de 449, corresponde à libertação da ramnose da posição 3. Deste modo, caso se verifique o mesmo comportamento no modo ião positivo, poder-se-ia identificar o composto 13 como o canferol 3-O-ramnósido-7-O-glucósido.

O composto 15 mostra um ião molecular com uma relação  $m/z$  de 637 (figura 32), 42 u.m. superior ao composto 13. Este aumento pode corresponder a uma esterificação por um grupo acetilo. O espectro de UV do composto 15 apresenta os mesmos dois máximos de absorção (266 e 348 nm) do espectro referente ao composto 13, o que sugere que a ligação do grupo acetilo possa efectuar-se na porção osídica da estrutura. De facto, se a acetilação ocorresse nalgum hidroxilo fenólico, anularia o efeito desse grupo no espectro de UV (Mabry *et al.*, 1970). A presença do fragmento com uma relação  $m/z$  de 433  $[M-204]^+$  no espectro de MS-MS sugere a ligação do resíduo acetilo à molécula de glucose. Adicionalmente, a maior intensidade do fragmento com  $m/z$  de 491, correspondente à libertação da unidade de ramnose, pode sugerir a sua ligação em posição 7 e corrobora a hipótese do resíduo acetil-hexose se encontrar em posição 3. Assim, a identificação do composto foi sugerida como canferol 3-O-acetilglucósido-7-O-ramnósido.

O composto 16 mostra um ião molecular com  $m/z$  de 449 coincidente com o canferol glucósido. O seu espectro de UV ( $\lambda_{\text{max}}$  a 266 e 342 nm) e a eluição cromatográfica permitiram a sua identificação como canferol 3-O-glucósido, por comparação com uma substância padrão. O pico 17, com valor  $m/z$  de 491 (42 u.m. superiores ao pico 16) e

tempo de retenção superior, foi tentativamente identificado como canferol 3-O-acetilglucósido.



**Figura 32.** Espectro MS-MS do composto correspondente ao pico 15 da figura 19.

A análise espectral do pico 10 mostra um íon molecular com uma relação  $m/z$  de 653 e dois íons de fragmentação com  $m/z$  de 449 e de 287, correspondendo à perda de uma unidade de acetil-hexose e de acetil-di-hexose, respectivamente. Estes fragmentos sugerem a identificação do composto como um derivado canferol acetil-di-hexose, hipótese consistente com o seu comportamento cromatográfico, uma vez que, de um modo geral, um maior grau de glicosilação conduz a um menor tempo de retenção (Llorach *et al.*, 2003).

Apesar de, neste trabalho, se terem sugerido as identificações dos compostos 10, 15 e 16 e de futuras investigações serem necessárias para confirmar as posições dos resíduos de glúcidos e da ligação acetilo, a sua sequência de eluição está de acordo com o comportamento cromatográfico para estes derivados de canferol, identificados por Veit e colaboradores (1995). Além disso, os iões moleculares e a presença de alguns fragmentos obtidos nos espectros de massa são comuns às unidades estruturais que integram cada um deles.

#### 5.2.4. FLAVONAS

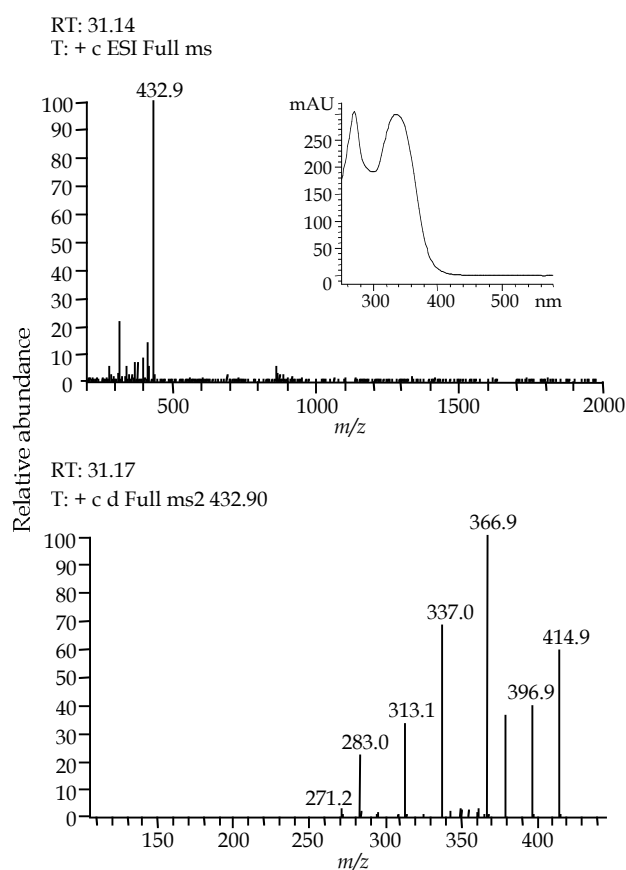
##### *Agrimonia eupatoria* L.

O composto 16 apresenta um ião molecular de  $m/z$  433 e um espectro de UV característico de flavonas (figura 33).

A banda II do espectro de UV do composto, relacionada com a absorção do anel A, aparece como um único pico, a 270 nm, o que sugere uma mono-hidroxilação no anel B, em C<sub>4</sub> (Markham, 1982).

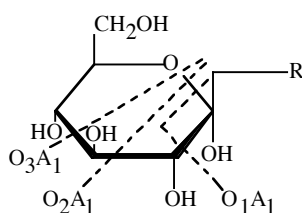
Nas condições utilizadas por HPLC/ESI-MS, o composto sofreu elevada fragmentação, resultando numa grande variedade de iões. No seu espectro de ESI-MS-MS (figura 33) são observados fragmentos com  $m/z$  de 415, 397 e de 379, correspondentes à perda de uma, duas e três moléculas de água, respectivamente e com  $m/z$  de 313 e de 283, correspondentes à perda de 120 e 150 u.m., características da fragmentação “cross-ring” de hexoses, em C-glicosilflavonas (Bakhtiar *et al.*, 1994; Domon e Costello, 1988).

Não se registou qualquer fragmento correspondente à genina, resultante da perda total da hexose (-162 u.m.). Este tipo de fragmentação é comum às C-glicosilflavonas (Grayer *et al.*, 2000).



**Figura 33.** Espectros ESI-MS-MS e UV do composto correspondente ao pico 16 da figura 18.

O baixo tempo de retenção e a elevada intensidade dos iões correspondentes às perdas de água corroboram a hipótese do composto 16 se tratar de um flavonóide C-glicosilado. Atendendo ao valor do ião molecular (433 u.m.) e à presença de uma hexose, estima-se que a genina, com  $m/z$  de 271, corresponda à apigenina.



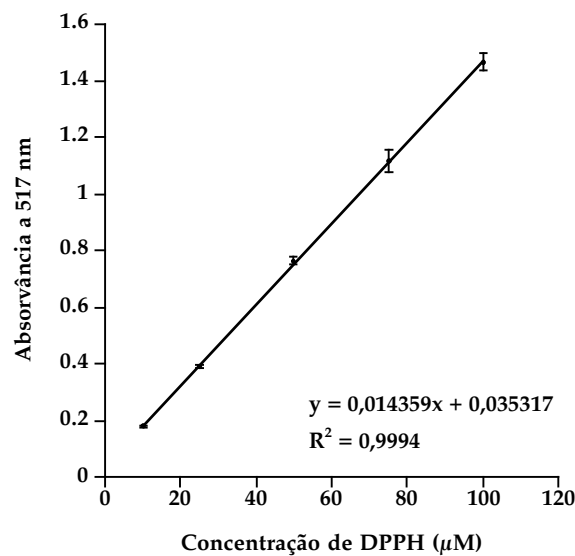
**Figura 34.** Perfil de fragmentação do resíduo de hexose de uma C-glicosilflavona (Bakhtiar *et al.*, 1994).

Vários autores diferenciam as 6-glicosilflavonas das 8-glicosilflavonas com base na presença de fragmentos característicos. Sánchez-Rabaneda e colaboradores (2003) verificaram a ausência de íons resultantes da perda de uma molécula de água nas 8-C-glicosilflavonas estudadas. A existência do fragmento com  $m/z$  415 ( $[M+H]^+-18$ ) é indicativo da perda de uma molécula de água e, conseqüentemente, a associação do composto 16 a uma 6-C-glicosilflavona. Deste modo, propõe-se, para o composto em causa, a estrutura da isovitexina (6-C-glucosilapigenina), que foi posteriormente confirmada pela análise do respectivo padrão.

### 5.3. ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE

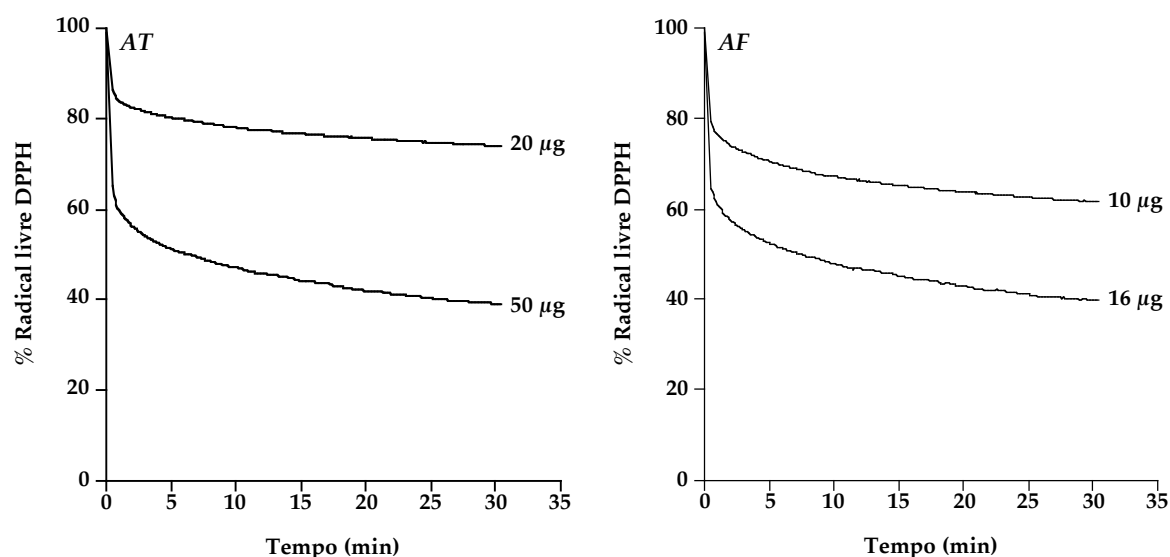
#### 5.3.1. ACTIVIDADE ANTIRADICALAR

Começou-se por testar diferentes concentrações de DPPH. Como se observa na figura 35, as soluções, no intervalo de concentrações utilizado, seguem a lei de Lambert-Beer, uma vez que, nas mesmas condições e a 517 nm, a absorvância da solução é directamente proporcional à concentração da espécie absorvente DPPH.



**Figura 35.** Variação da absorvância em função da concentração de DPPH.

Inicialmente, foram monitorizadas as cinéticas da reacção dos extractos e das fracções da agrimónia e do equisetum com o radical livre DPPH. No ensaio controlo, realizado apenas com o DPPH, a absorvância manteve-se constante ao longo do tempo de reacção (30 min). Pelo contrário, na presença das amostras, ocorreu uma diminuição da absorvância, proporcional à capacidade antiradicalar das amostras (figuras 36 e 37).



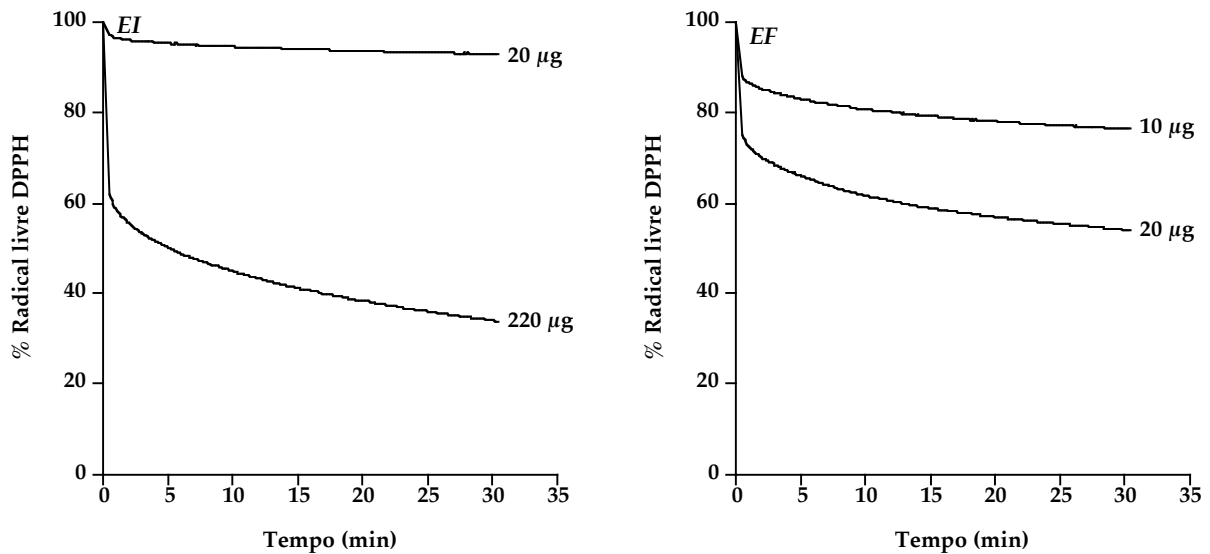
**Figura 36.** Ensaio típico dos perfis da cinética de reacção entre o DPPH e o extracto (AT) e a fracção (AF) da *Agrimonia eupatoria* L., monitorizada a 517 nm, durante 30 min. A 2 mL de tampão acetato ( $\text{CH}_3\text{COOH}$  0,2 M,  $\text{CH}_3\text{COONa}$  0,2 M) pH = 6, contendo DPPH 100  $\mu\text{M}$ , foi adicionada uma quantidade variável da amostra. Antes da adição da amostra o valor da absorvância era elevado e estável. Após adição da amostra o valor decaiu rapidamente nos primeiros minutos de reacção, mantendo-se depois praticamente estável até aos 30 min de reacção.

A evolução da cinética da reacção depende da natureza do antioxidante testado (Brand-Williams *et al.*, 1995). Como se observa nas figuras 36 e 37, os extractos e as fracções das duas plantas apresentam, de um modo geral, comportamentos semelhantes. Reagem prontamente com o DPPH, apesar de em diferentes proporções, observando-se uma diminuição brusca da absorvância a 517 nm, que corresponde a um elevado consumo do radical e conseqüente diminuição da concentração inicial de DPPH. A partir deste



período (cerca de 5 min), a velocidade de consumo de DPPH reduz drasticamente e atinge praticamente um estado estacionário.

O aumento da quantidade de extracto ou de fracção que em termos de volume de amostra adicionado foi idêntico, parece não afectar a cinética de consumo de DPPH, apenas se verifica um maior consumo para quantidades maiores de extracto ou fracções adicionadas.

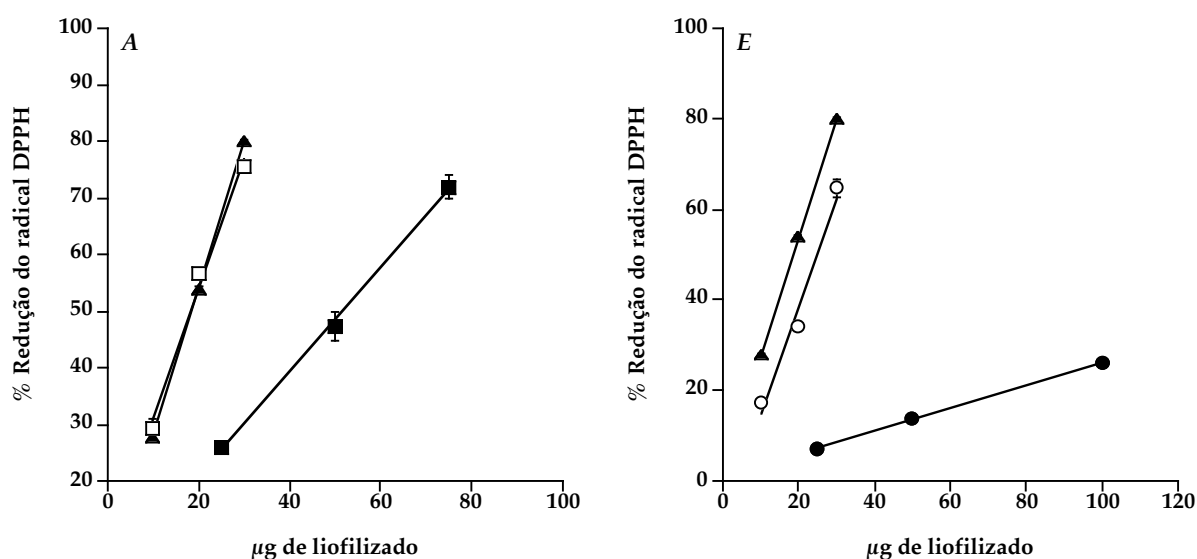


**Figura 37.** Ensaio típico dos perfis da cinética de reacção entre o DPPH e o extracto (EI) e a fracção (EF) do *Equisetum telmateia* Ehrh., monitorizada a 517 nm, durante 30 min, nas condições descritas na legenda da figura 36.

As figuras 36 e 37 evidenciam uma maior actividade das fracções comparativamente aos extractos se compararmos as quantidades, em termos de resíduo seco, utilizadas no ensaio. O extracto da agrimónia, embora menos activo que a respectiva fracção, apresenta uma eficácia antiradicalar significativa e bastante superior à do extracto do equisetum.

Com o objectivo de determinarmos a quantidade de amostra necessária para diminuir 50% da absorção inicial da solução do DPPH,  $EC_{50}$ , foi testado o efeito, de diferentes quantidades de amostra, na redução do DPPH e avaliado ao fim de 5 min de reacção. Os

valores obtidos estão graficamente representados na figura 38, e a tabela 10 evidencia os valores de EC<sub>50</sub> para cada amostra.



**Figura 38.** Percentagem de redução do DPPH, avaliada ao fim de 5 min de reacção, na presença de quantidades variáveis de extracto (■, ●) e de fracção (□, ○) da *Agrimonia eupatoria* L. (A) e do *Equisetum telmateia* Ehrh. (E). O Trolox (▲) foi utilizado como composto referência. Cada valor corresponde à média ± S.D. de pelo menos três determinações. Todos os valores foram significativamente diferentes do controlo ( $p \leq 0,01$ ). Os desvios, quando muito pequenos, estão encobertos pelo símbolo.

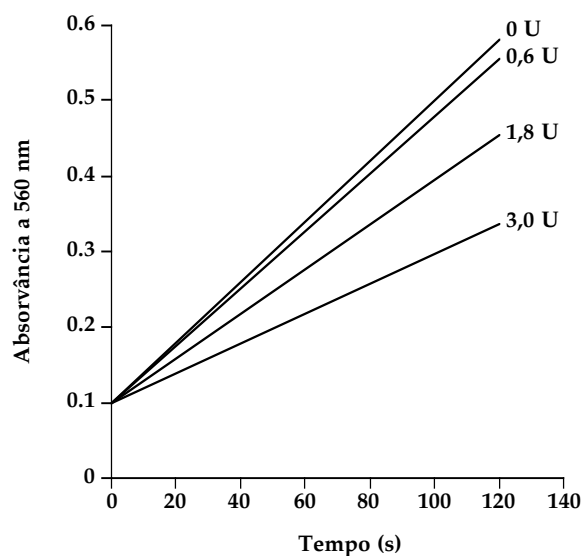
**Tabela 10.** Valores de EC<sub>50</sub>, dos extractos e das fracções da agrimónia (AT e AF, respectivamente) e do equisetum (EI e EF, respectivamente) e do Trolox. Os valores foram obtidos a partir da regressão linear das curvas traçadas em triplicado com, pelo menos três concentrações diferentes.

	EC <sub>50</sub> (µg)
AT	51,66
AF	18,34
EI	194,48
EF	21,45
Trolox	18,51

Ambas as fracções são significativamente mais activas do que os respectivos extractos ( $p \leq 0,001$ ). O potencial antioxidante das amostras foi comparado com o do Trolox, análogo hidrossolúvel da vitamina E, cujo valor de  $EC_{50}$  foi de 18,51  $\mu$ g. A comparação dos resultados obtidos permite ainda concluir que a actividade da fracção da agrimónia e do equisetum são semelhantes à do Trolox ( $p \geq 0,05$ ).

### 5.3.2. CAPACIDADE DE CAPTAÇÃO DO ANIÃO SUPERÓXIDO

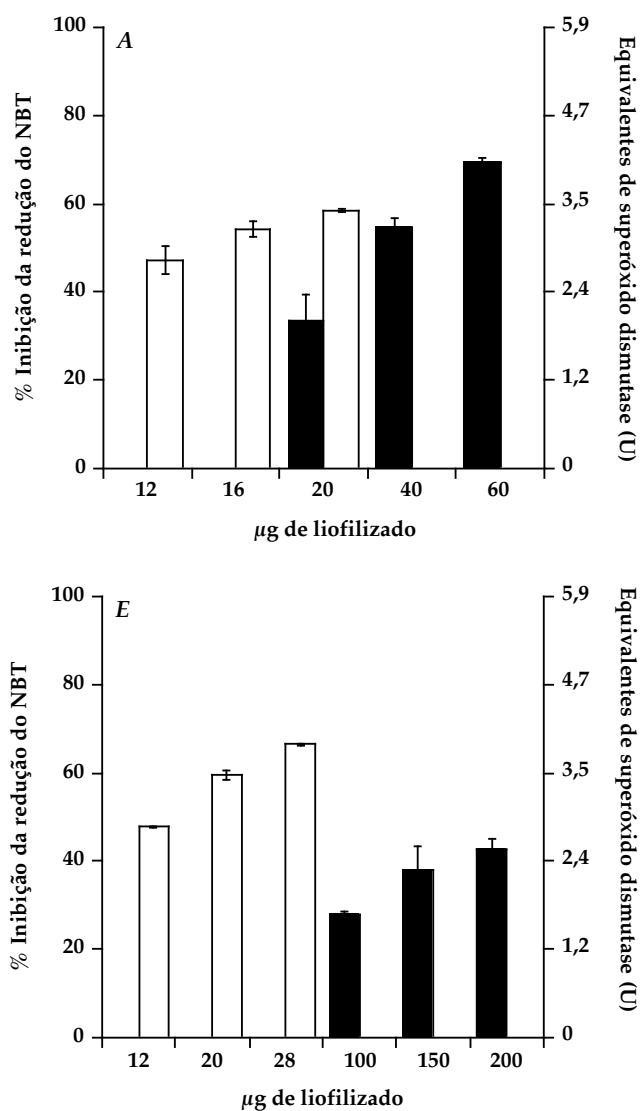
A figura 39 ilustra a cinética de formação dos aniões superóxido pelo sistema enzimático hipoxantina/xantina-oxidase, apreciada de forma contínua pela redução do NBT, a 560 nm, na ausência e na presença de superóxido dismutase (SOD). Na presença de SOD, enzima responsável pela dismutação dos aniões superóxido *in vivo*, ocorre uma diminuição da redução do NBT, evidenciada pelo decréscimo da absorvância a 560 nm, e que traduz a capacidade da superóxido dismutase neutralizar os aniões formados.



**Figura 39.** Perfil cinético da reacção de formação do anião superóxido pelo sistema enzimático hipoxantina/xantina-oxidase, na ausência (0 U) e na presença da enzima superóxido dismutase (0,6; 1,8 e 3,0 U).

Uma unidade de SOD corresponde a uma quantidade de enzima, que em 3 mL de meio de reacção, a pH 7,8 e a 25°C, com o sistema xantina-oxidase inibe em 50% a redução do citocromo c.

As actividades “scavenger” do extracto e da fracção, da agrimónia e do equisetum, foram testadas, e comparadas com a actividade da SOD. Para essa comparação ser mais evidente, a capacidade de captação do anião superóxido pelas amostras está expressa em equivalentes de superóxido dismutase (figura 40).



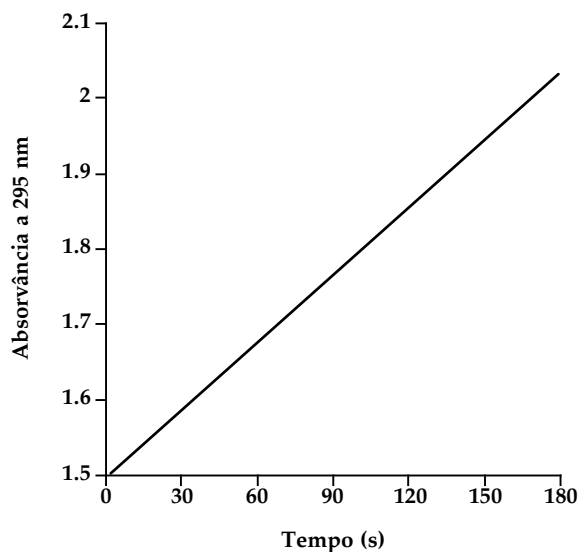
**Figura 40.** Correlação entre inibição da redução do azul de tetrazolio (NBT) e a actividade da superóxido dismutase (U) do extracto (barras pretas) e da fracção (barras brancas) da *Agrimonia eupatoria* (A) e do *Equisetum telmateia* (E). Os resultados expressam a média  $\pm$  S.D. de pelo menos três determinações. Todos os valores são significativamente diferentes do controlo ( $p \leq 0,001$ ).

Assim, na figura 40 estão representadas as actividades de ambos extractos e fracções em termos de percentagem da redução do NBT e em equivalentes de actividade superóxido dismutase. Como se pode observar, a actividade de ambos extractos e fracções depende da sua concentração. As fracções são mais activas do que os respectivos extractos, e exibem actividades “scavenger” significativas ( $p \leq 0,001$ ). As quantidades de fracção necessárias para inibir 50% da redução do NBT ( $IC_{50}$ ) são de 13,65  $\mu\text{g}$  e de 12,95  $\mu\text{g}$ , para agrimónia e para o equisetum, respectivamente.

Por outro lado, os valores de  $IC_{50}$  do extracto da agrimónia e do equisetum são de 37,14  $\mu\text{g}$  e a 243,37  $\mu\text{g}$ , respectivamente, evidenciando uma actividade “scavenger” bastante maior do extracto da agrimónia relativamente à do extracto do equisetum. Mais ainda, a diferença de actividades entre o extracto e a fracção do equisetum é muito superior à observada entre o extracto e a fracção da agrimónia, o que sugere uma forte contribuição dos constituintes presentes na fracção do equisetum, nomeadamente, dos derivados de canferol, derivados do ácido cafeico e proantocianidinas, para a capacidade de captação do radical superóxido.

A redução do NBT pode ser inibida por compostos que actuem como captadores de anião superóxido e/ou que afectem a sua formação, inibindo a actividade da enzima xantina-oxidase. Com o objectivo de clarificar o mecanismo de acção dos extractos e das fracções, foi avaliado o efeito dos mesmos na actividade da enzima, monitorizando a formação de ácido úrico a 295 nm, pelo sistema enzimático xantina/xantina-oxidase (figura 41).

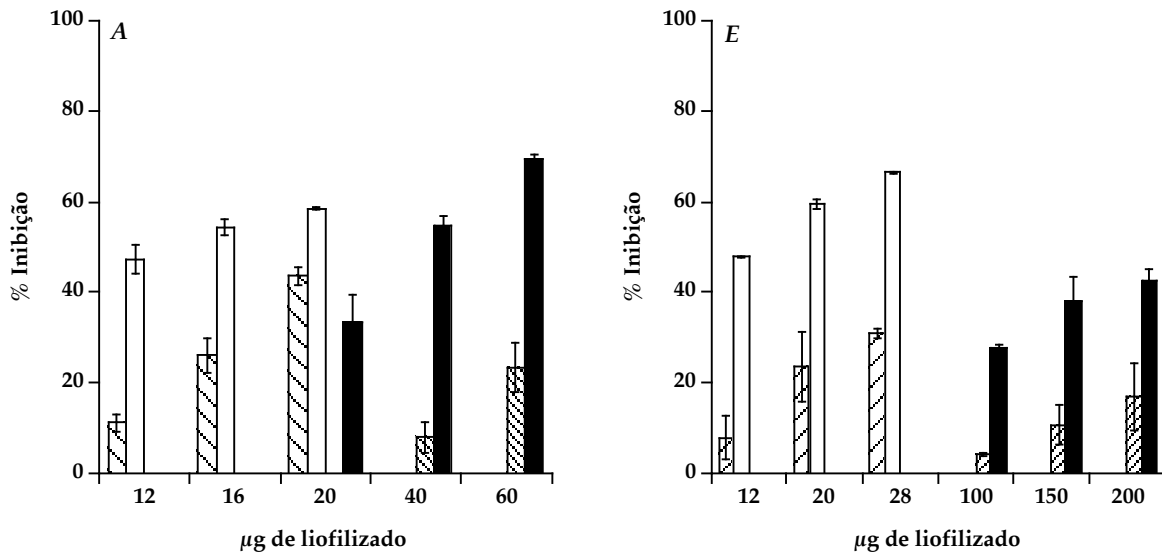
Ambos, extractos e fracções, inibiram a actividade da enzima xantina-oxidase de um modo dependente da concentração. Tal como no ensaio anterior, as fracções apresentaram maior actividade do que os respectivos extractos. Enquanto que 20  $\mu\text{g}$  da fracção da agrimónia inibiram cerca de 44% da actividade da enzima, a mesma quantidade de extracto não afectou a sua actividade. Por outro lado, 12  $\mu\text{g}$  da fracção e 150  $\mu\text{g}$  de extracto do equisetum apresentaram efeitos inibitórios aproximados, cerca de 8% e 11%, respectivamente (figura 42).



**Figura 41.** Perfil cinético da formação de ácido úrico pelo sistema enzimático xantina/xantina-oxidase. A formação do ácido úrico foi monitorizada a 295 nm durante 3 min, conforme descrito em materiais e métodos.

Estes resultados sugerem que os efeitos dos extractos e das fracções na diminuição da redução do NBT se devem não só à capacidade de reacção com o anião superóxido mas também à inibição da sua formação, por inibição parcial da enzima xantina-oxidase.

O efeito das amostras; extractos e fracções, na inibição da redução do NBT e da enzima xantina-oxidase é comparado na figura 42. A sua actividade “scavenger” pode ser estimada pela diferença entre as percentagens de inibição da redução do NBT e da xantina-oxidase. As fracções da agrimónia e do equisetum inibem de forma similar a redução do NBT (os ensaios controlo realizados mostraram que, nas concentrações testadas, nem os extractos nem as fracções reduzem directamente o NBT); no entanto, verifica-se uma maior inibição da xantina-oxidase na presença da fracção da agrimónia, pelo que, se pode inferir que a fracção do equisetum apresenta uma maior capacidade de captação do anião superóxido.



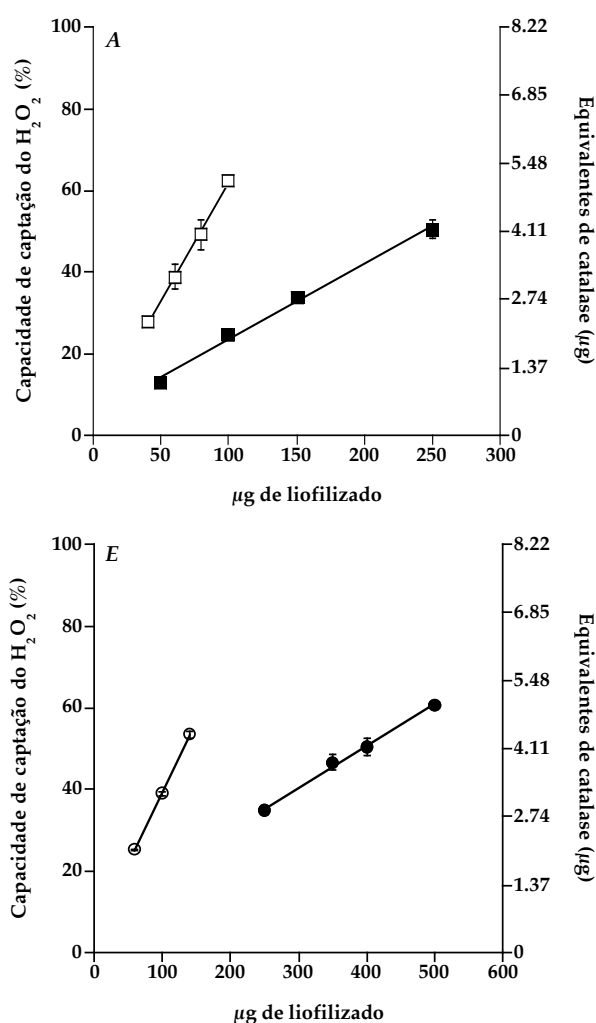
**Figura 42.** Percentagens de inibição da redução do NBT e da actividade da xantina-oxidase pelos extractos (preto e riscas estreitas, respectivamente) e pelas fracções (branco e riscas largas, respectivamente) da *Agrimonia eupatoria* (A) e do *Equisetum telmateia* (E). Todos os valores são significativamente diferentes do controlo ( $p \leq 0,001$ ).

A xantina-oxidase é uma fonte de radicais livres reconhecida, que desempenha um papel primordial na destruição tecidual, induzida pelo anião superóxido. Adicionalmente, pensa-se que as ROS, produzidas a partir da xantina-oxidase, são responsáveis pelo dano oxidativo causado durante os processos de reperfusão isquémica (Nagao *et al.*, 1999). Em condições normais, a enzima existe *in vivo* na forma desidrogenase. As células endoteliais são, provavelmente, o principal local de armazenamento desta enzima. O contacto das células endoteliais com citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL- $\beta$ ) leva à conversão da xantina desidrogenase a xantina-oxidase (Kundalic *et al.*, 2003).

Os resultados obtidos sugerem uma possível acção por parte dos extractos e, particularmente, das fracções na prevenção do dano oxidativo induzido pelas ROS produzidas por esta enzima, quer nas situações de isquémia quer nas situações inflamatórias (ex. gota).

## 5.3.3. CAPACIDADE DE CAPTAÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÉNIO

Para estudar a capacidade dos extractos e das fracções captarem o peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) começámos por otimizar as condições de reacção, i.e., a concentração de substrato oxidável e de oxidante, assim como, a linearidade entre a formação do composto resultante da oxidação do guaiacol e a concentração de peróxido de hidrogénio utilizadas.

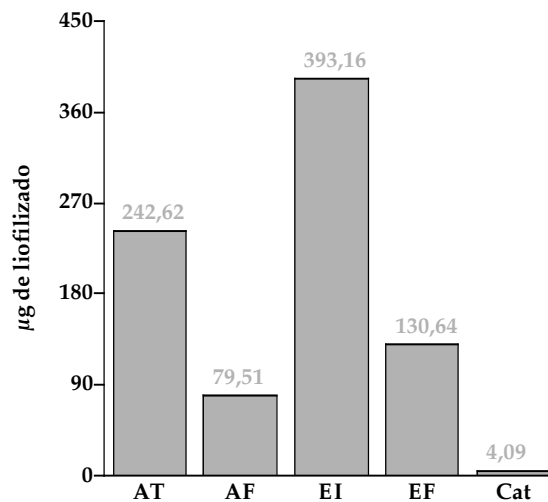


**Figura 43.** Correlação entre a capacidade de captação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e a actividade da catalase de quantidades variáveis dos extractos (símbolos a cheio) e das fracções (símbolos brancos), da agrimónia (A) e do equisetum (E). Os desvios, quando muito pequenos, são encobertos pelo tamanho do símbolo. Todos os valores foram significativamente diferentes do controlo ( $p \leq 0,001$ ).



A concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  utilizada no ensaio ( $150\ \mu\text{M}$ ) diminuiu na presença de quantidades crescentes dos extractos e das fracções, denotando uma actividade antioxidante. Esta capacidade “scavenger” do peróxido de hidrogénio, exibida pelas amostras, foi comparada com a actividade da catalase, enzima com actividade antioxidante, que é responsável pela redução de peróxido de hidrogénio a água ( $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ). A figura 43 ilustra a capacidade de captação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em função de diferentes quantidades de extractos e de fracções, assim como o seu comportamento relativamente à catalase, o “scavenger” fisiológico de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

A capacidade das fracções reagirem e captarem o peróxido de hidrogénio é significativamente superior à dos respectivos extractos. No entanto, é bastante baixa quando comparada com a actividade da catalase. Os valores de  $\text{EC}_{50}$ , calculados a partir da regressão linear das curvas da figura 43, evidenciam as grandes diferenças de actividade encontradas (figura 44).



**Figura 44.** Capacidade de captação do peróxido de hidrogénio ( $\text{EC}_{50}$ ) pelos extractos e pelas fracções da agrimónia (AT e AF, respectivamente), do equisetum (EI e EF, respectivamente) e da catalase (Cat). Os valores de  $\text{EC}_{50}$ , evidenciados no topo das colunas, foram obtidos a partir da regressão linear das curvas traçadas em triplicado com, pelo menos, três concentrações diferentes.

Estes resultados apontam para uma relativamente baixa actividade dos extractos e das fracções como “scavengers” de peróxido de hidrogénio. O peróxido de hidrogénio, apesar de apresentar baixa reactividade, difunde-se livremente *in vivo*, podendo atravessar membranas biológicas. Esta característica é extremamente importante uma vez que, na presença de pequenas quantidades de metais de transição, pode ser reduzido ao radical hidroxilo, uma das espécies radicalares mais reactivas.

#### 5.3.4. CAPACIDADE DE CAPTAÇÃO DO RADICAL HIDROXILO

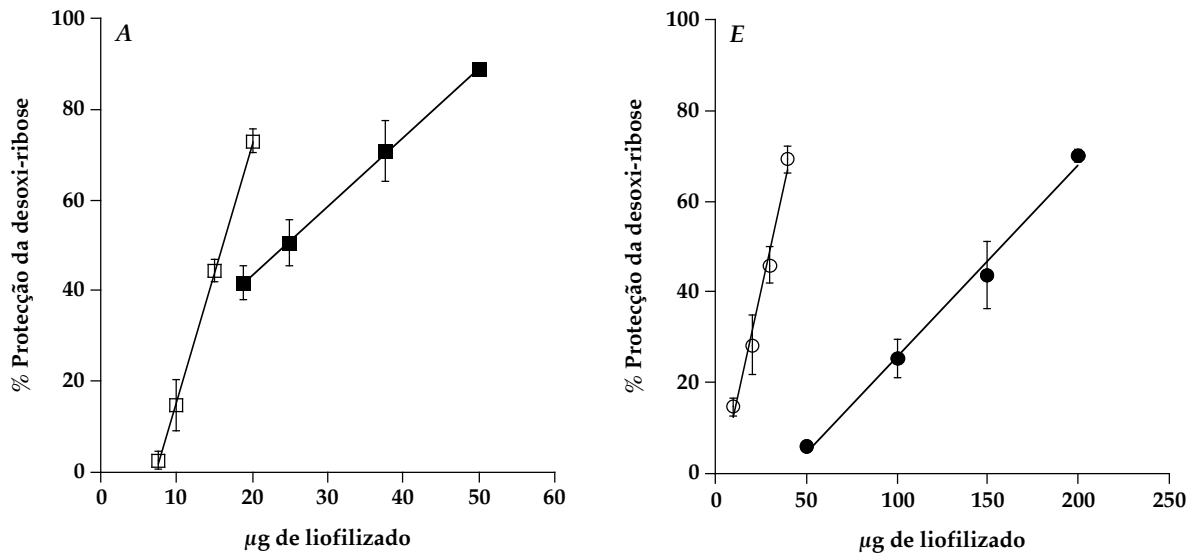
O radical hidroxilo é gerado *in vivo* a partir do peróxido de hidrogénio, na presença de pequenas quantidades de metais de transição. *In vitro*, pode igualmente formar-se por reacção entre o peróxido de hidrogénio e o ião ferro, na presença da desoxi-ribose, sendo a oxidação da desoxi-ribose o índice da quantidade de radical hidroxilo formado. Qualquer substância adicionada à mistura de reacção que possua a capacidade de reagir com o radical hidroxilo, irá competir com a desoxi-ribose e, deste modo, diminuir a velocidade de degradação do açúcar. Adicionalmente, compostos que actuem como quelantes do ferro, poderão reduzir a formação de radicais e, conseqüentemente, proteger a desoxi-ribose do dano oxidativo.

Existe muita controvérsia acerca do mecanismo e das espécies oxidantes resultantes da reacção entre o ferro livre (sem EDTA) e o peróxido de hidrogénio, nas condições de ensaio utilizadas. Alguns autores sugerem que, quando o ferro é adicionado à mistura sob a forma livre, se liga directamente à desoxi-ribose e que, deste modo, a formação dos radicais hidroxilo ocorre em locais específicos e atacam o açúcar imediatamente. Por outro lado, Winterbourn (1991) refuta esta teoria e aponta para a formação de outras espécies reactivas, como o Fe(IV).

Com o objectivo de se confirmar a formação do radical hidroxilo, testou-se o efeito de um “scavenger” do radical, o manitol. Verificou-se que, nas condições do ensaio, o manitol inibiu a degradação da desoxi-ribose, apresentando um valor de IC<sub>50</sub> de 1000 µg.

Estes resultados confirmam a formação do radical hidroxilo nas condições de ensaio utilizadas e a sua envolvimento no dano oxidativo da desoxi-ribose.

Quando os extractos e as fracções foram adicionados à mistura de reacção, observou-se igualmente uma clara e significativa protecção da degradação da desoxi-ribose, dependente das quantidades utilizadas (figura 45).



**Figura 45.** Inibição da degradação da desoxi-ribose, induzida pelos radicais hidroxilo, na presença dos extractos (●, ■) e das fracções (○, □) da agrimónia (A) e do equisetum (E). Os resultados são a média  $\pm$  S.D. de pelo menos três ensaios. Os desvios, quando muito pequenos, estão encobertos pelo símbolo. Todos os valores são significativamente diferentes do controlo ( $p \leq 0,001$ ). As condições de ensaio foram as descritas em Materiais e Métodos.

As fracções da agrimónia e do equisetum apresentam valores de  $IC_{50}$  de  $16,00 \mu\text{g}$  e  $31,05 \mu\text{g}$ , respectivamente, exibindo actividades superiores ( $p \leq 0,001$ ) à dos respectivos extractos. A diferença mais significativa é observada no equisetum. Com efeito, o extracto é o que apresenta a menor inibição da degradação da desoxi-ribose ( $IC_{50}$ , de  $157,63 \mu\text{g}$ ), mas que, no entanto, é muito superior ao valor de  $IC_{50}$  do manitol, o que sugere uma acção "scavenger" do  $\cdot\text{OH}$  considerável por parte do extracto do equisetum. Quanto à

agrimónia, o respectivo extracto exhibe um valor de IC<sub>50</sub> de 24,30 µg, cerca de 6,5 vezes superior ao do equisetum.

Os resultados apontam para uma protecção significativa da degradação da desoxi-ribose, induzida pelos radicais hidroxilo, por parte dos extractos e das fracções das duas plantas. Esta protecção pode ser devida à sua acção “scavenger” de radicais hidroxilo e/ou à acção quelante de iões ferro. Aparentemente, as células fagocíticas não produzem grandes quantidades de radicais hidroxilo na ausência de iões metálicos. No entanto, foram detectadas elevadas quantidades destes metais no fluido de doentes com artrite reumatóide. Deste modo, a agrimónia e o equisetum, poderão influenciar a concentração de radicais hidroxilo *in vivo*, em doentes com artrite reumatóide, não apenas por uma potencial acção “scavenger” dos ·OH, mas também por retardarem a sua produção.

Os ensaios controlo mostraram que nenhum dos extractos ou fracções reagiu com o TBA, nem afectava a degradação da desoxi-ribose, e que nenhum solvente interferiu com a reacção. Adicionalmente, na ausência de ascorbato, nenhum deles induziu o ciclo redox do ferro, necessário para a formação dos radicais hidroxilo e, como tal, também não apresentam potencial pró-oxidante.

#### 5.3.5. CAPACIDADE DE CAPTAÇÃO DO ÁCIDO HIPOCLOROSO

Em situações de inflamação, os neutrófilos são activados e secretam a enzima mieloperoxidase; uma heme proteína que catalisa a oxidação dos iões Cl<sup>-</sup> a ácido hipocloroso, na presença de peróxido de hidrogénio. O ácido hipocloroso (HOCl) é um poderoso agente oxidante. Dos vários alvos do HOCl a α<sub>1</sub>-antitripsina é um dos preferenciais, sendo rapidamente inactivada na sua presença, perdendo a capacidade de inibir a elastase. Esta propriedade pode e é aproveitada com sucesso para avaliar a capacidade de compostos ou extractos para captarem o HOCl, uma vez que ao captarem o ácido hipocloroso protegem a α<sub>1</sub>-antitripsina e, conseqüentemente, favorecem a inibição ainda que parcial da elastase.

As condições do ensaio foram ajustadas de modo a utilizar-se uma concentração de  $\alpha_1$ -antritripsina que inibisse cerca de 90% da actividade da elastase e uma concentração de ácido hipocloroso que fosse fisiologicamente relevante e capaz de repor a actividade da elastase, i.e., capaz de inibir a actividade da  $\alpha_1$ -antitripsina.

Posteriormente, avaliou-se o efeito do composto de referência, *N*-acetilcisteína, na actividade da elastase. A *N*-acetilcisteína inibiu a actividade da elastase, de um modo dependente da concentração, apresentando um  $IC_{50}$  de 5,65  $\mu$ g. Este efeito é consequência da sua capacidade de reacção com o ácido hipocloroso.

Após a adição dos extractos e das fracções à mistura de reacção, verificou-se uma inibição significativa da actividade da elastase, sugestiva da captação do ácido hipocloroso e consequente protecção da  $\alpha_1$ -antitripsina (tabela 11). A inibição da elastase pelos extractos e pelas fracções é dependente da quantidade dos mesmos.

De acordo com os dados da tabela 11, as fracções são mais activas que os respectivos extractos. A diferença mais significativa ocorre no equisetum: a fracção é mais activa e o extracto menos activo que a fracção e extracto da agrimónia.

Os ensaios controlo mostraram que o extracto e a fracção da agrimónia não interferem com a actividade da  $\alpha_1$ -antitripsina. No entanto, promovem uma inibição directa e, por vezes, significativa da actividade da elastase. De facto, como evidenciado na tabela 11, quando a  $\alpha_1$ -antitripsina e o ácido hipocloroso são omitidos das misturas de reacção, ocorre uma inibição da elastase, dependente da quantidade de extracto e de fracção testadas. De acordo com estes resultados, poder-se-á prever que a inibição da elastase, que ocorre no ensaio, se deve, por um lado, a uma acção “scavenger” do ácido hipocloroso e, por outro, a uma inibição directa da actividade da elastase. Esta inibição directa da actividade da elastase pode ser importante a nível fisiológico, uma vez que, durante os processos inflamatórios, as enzimas proteolíticas, como as proteases do tipo elastase, são libertadas das células fagocíticas activadas. Como resultado, ocorre um aumento da concentração da elastase que excede a concentração dos inibidores naturais, como a  $\alpha_1$ -antitripsina e  $\alpha_2$ -macroglobulina (Tixier *et al.*, 1984). A consequente fragmentação das

fibras elásticas conduz a uma perda da integridade, elasticidade e permeabilidade de vários tecidos e vasos sanguíneos.

**Tabela 11.** Capacidade de captação do ácido hipocloroso expressa em termos de percentagem de inibição da actividade da elastase e efeito inibitório na actividade da elastase e  $\alpha_1$ -antitripsina, dos extractos e fracções da *Agrimonia eupatoria* L. e do *Equisetum telmateia* Ehrh..

		µg de liofilizado	% Inibição da actividade da elastase <sup>a</sup> e % inibição da actividade da $\alpha_1$ -antitripsina <sup>b</sup>		
			E + $\alpha_1$ + HOCl <sup>a</sup>	E <sup>a</sup>	$\alpha_1$ <sup>b</sup>
		–	0	0	0
<i>Agrimonia eupatoria</i>	EXTRACTO	50,0	94,34 ± 2,52***	28,69 ± 0,55**	--
		37,5	88,09 ± 0,30***	18,48 ± 2,12	--
		25,0	72,62 ± 9,06***	12,82 ± 2,61	--
	FRACÇÃO	30,0	83,59 ± 5,66***	51,66 ± 2,95***	--
		20,0	53,66 ± 5,94***	26,02 ± 2,40**	--
		10,0	27,82 ± 0,60***	11,56 ± 4,81	--
<i>Equisetum telmateia</i>	EXTRACTO	200	71,37 ± 5,15***	--	4,90 ± 0,502
		150	55,23 ± 1,00***	--	3,62 ± 0,30
		100	46,52 ± 2,16***	--	8,95 ± 0,20
	FRACÇÃO	20	68,79 ± 0,86***	--	13,07 ± 0,80
		15	61,95 ± 5,00***	--	3,20 ± 3,51
		10	57,38 ± 2,67***	--	10,58 ± 4,32

Os resultados mostram as médias ± S.D. de, pelo menos, três determinações.

As misturas de reacção consistem em:

<sup>a</sup>tampão fosfato e elastase na presença (E +  $\alpha_1$  + HOCl) e ausência (E) de  $\alpha_1$ -antitripsina e de ácido hipocloroso;

<sup>b</sup>tampão fosfato, elastase e  $\alpha_1$ -antitripsina ( $\alpha_1$ ).

\*\*\* e \*\* indicam inibições estatisticamente significativas com  $p \leq 0.001$  e  $0.01$ , respectivamente.

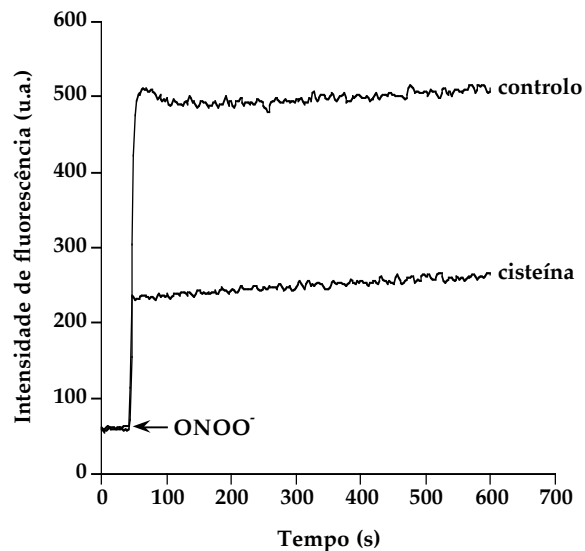
Deste modo, o extracto e, particularmente, a fracção da agrimónia podem desempenhar um papel importante na prevenção da degradação da elastina pela elastase. Já o extracto e a fracção do equisetum não interferem directamente com a actividade da elastase mas

afectam, de um modo não muito relevante e independente da concentração, a acção da  $\alpha_1$ -antitripsina.

Os resultados apresentados evidenciam que extractos e fracções da agrimónia e do equisetum captam eficazmente o ácido hipocloroso e, conseqüentemente, previnem a inibição da  $\alpha_1$ -antitripsina, contribuindo eficazmente para a prevenção do dano induzido pelo HOCl em situações inflamatórias.

### 5.3.6. CAPACIDADE DE CAPTAÇÃO DO PEROXINITRITO

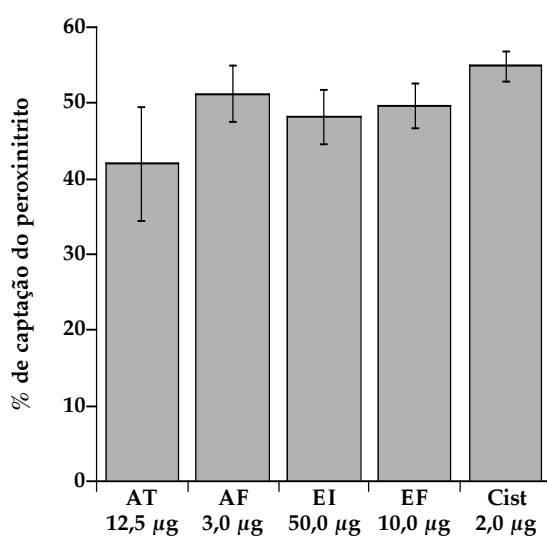
Como referido anteriormente (revisão bibliográfica), o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) é uma espécie oxidante potente e bastante reactiva, daí a necessidade e o interesse na sua inactivação. Uma forma adequada de avaliar o  $\text{ONOO}^-$  é através da medida de fluorescência da di-hidro-rodamina. A figura 46 ilustra a oxidação, induzida pelo peroxinitrito, da di-hidro-rodamina.



**Figura 46.** Perfil cinético típico da reacção de oxidação da di-hidro-rodamina (DHR) a rodamina, induzida pelo peroxinitrito, na ausência (controlo) e presença de cisteína (25  $\mu\text{M}$ ). A adição do  $\text{ONOO}^-$  600  $\mu\text{M}$  à solução tampão, contendo a DHR 58  $\mu\text{M}$  leva a um aumento da intensidade de fluorescência, que estabiliza rapidamente e se mantém durante pelo menos 10 min. Na presença de cisteína ou qualquer outro alvo do  $\text{ONOO}^-$  a intensidade de fluorescência diminui.

A fluorescência da rodamina formada mantém-se estável e inalterada durante o tempo da reacção (600 s). Na presença de cisteína (25  $\mu$ M), a oxidação da di-hidro-rodamina pelo peroxinitrito é reduzida cerca de 55%. O peroxinitrito oxida eficazmente grupos sulfridrilo proteicos e não proteicos. A cisteína, que possui um grupo sulfridrilo livre, compete com a di-hidro-rodamina para o peroxinitrito, protegendo-a, deste modo, da oxidação.

Os extractos e as fracções exibiram uma elevada actividade “scavenger” do peroxinitrito. Como se observa na figura 47, as actividades decrescem na seguinte ordem: Cisteína > AF > EF > AT > EI, apresentando valores aproximados de IC<sub>50</sub> de 2,0, 3,0, 10,0, 12,5, e 50,0  $\mu$ g de liofilizado, respectivamente.



**Figura 47.** Actividade “scavenger” do peroxinitrito exibida pelos extractos e fracções da *Agrimonia eupatoria* (AT e AF, respectivamente) e do *Equisetum telmateia* (EI e EF, respectivamente). Comparação com a actividade da cisteína. Os resultados representam a média de, pelo menos, três determinações, realizadas nas condições descritas na legenda da figura 46.

O peroxinitrito desempenha um papel relevante nos processos inflamatórios. É um mediador de muitos efeitos citotóxicos do NO, como destruição do DNA, oxidação das LDL, formação de isoprostranos e nitração da tirosina (Guzik *et al.*, 2003; Coleman, 2001). Por outro lado, o peroxinitrito é um potente mediador da modificação oxidativa de



proteínas (Ischiropoulos e al-Mehdi, 1995). A significativa actividade “scavenger” exibida pelos extractos e pelas fracções permite prever uma possível acção protectora do dano induzido *in vivo*. Adicionalmente, a capacidade de captação do anião superóxido, exibida pelos extractos e pelas fracções, contribui para uma possível prevenção da produção do ONOO .

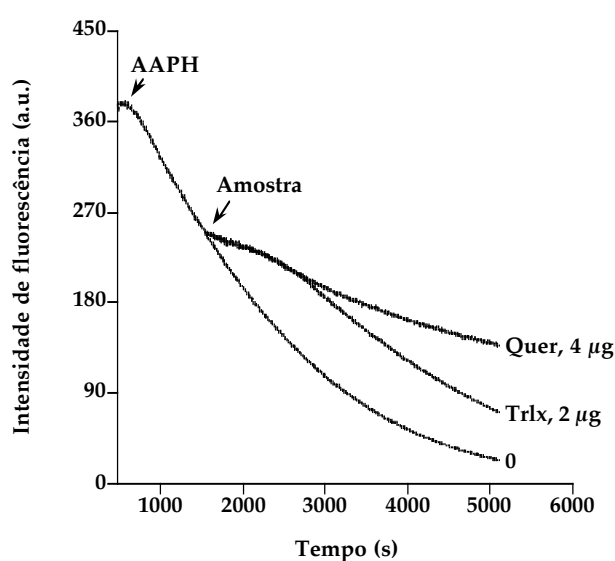
Mais uma vez, a actividade das fracções é superior à exibida pelos respectivos extractos.

### 5.3.7. CAPACIDADE DE CAPTAÇÃO DO RADICAL PEROXILO

Os aniões superóxido e radicais hidroxilo, presentes em elevadas quantidades nos locais de inflamação, possuem a capacidade de iniciar a peroxidação lipídica e, conseqüentemente, de afectar a integridade das membranas e outros componentes celulares. A peroxidação lipídica consiste em três fases diferentes, indução, propagação e termo (Gutteridge, 1984). Sucintamente, na fase inicial, átomos de hidrogénio são subtraídos dos ácidos gordos insaturados, formando radicais que reagem com o oxigénio e geram radicais peroxilo (ROO<sup>•</sup>) que mantêm a fase de propagação. Adicionalmente, estes radicais podem iniciar novos processos peroxidativos e deste modo, alimentar as reacções em cadeia. Quando os radicais reagem uns com os outros, formam produtos inertes e conduzem à fase de termo.

Para avaliarmos a capacidade de captação dos radicais peroxilo dos extractos e das fracções recorreremos a uma sonda fluorescente, a R-ficoeritrina, cuja oxidação se traduz num “quenching” de fluorescência (figura 48). Os radicais peroxilo foram formados por decomposição térmica do AAPH, como referido anteriormente na parte experimental. Nas condições do ensaio, a quantidade de radicais peroxilo formada, a velocidade constante, é directamente proporcional à concentração do AAPH e ao tempo de reacção. A velocidade de diminuição da intensidade de fluorescência é um índice do dano induzido à proteína pelos radicais formados.

Quando os antioxidantes, Trolox (Trlx) ou quercetina (Quer), são adicionados à mistura de reação, a velocidade de diminuição da intensidade de fluorescência da R-ficoeritrina é drasticamente reduzida, observando-se um período inicial de inibição da oxidação da proteína. Passado este tempo, a oxidação recomeça e a velocidade de diminuição da intensidade de fluorescência volta a aumentar, sendo idêntica à do controle no caso do Trolox. Este é o comportamento típico de um antioxidante “chain-breaking”, i.e., o antioxidante reage com os radicais parando a reação de oxidação do substrato até ao seu consumo. Uma vez esgotado o antioxidante, a cadeia prossegue a uma velocidade igual à do controle (ausência de antioxidante).

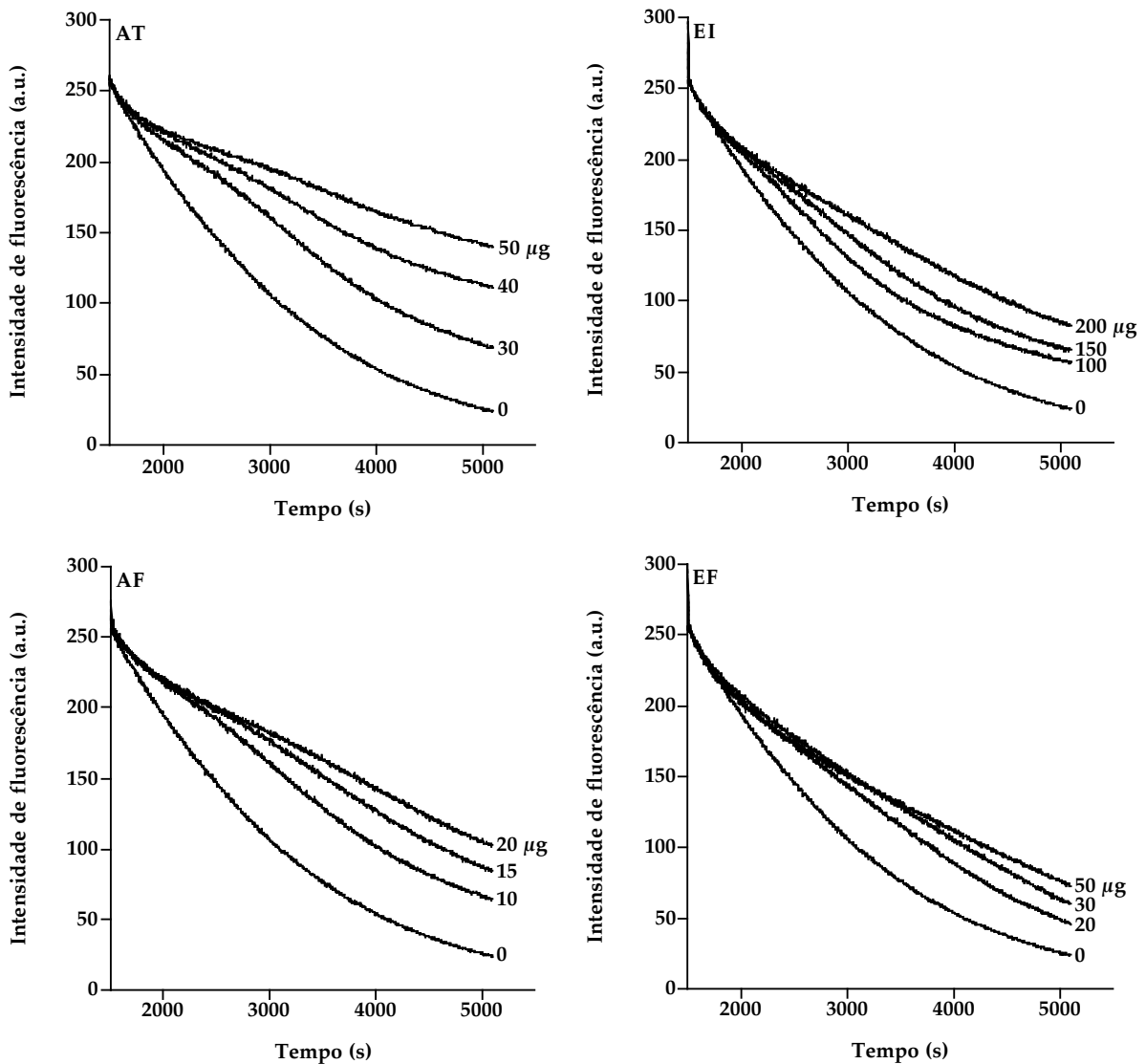


**Figura 48.** Perfil da oxidação da R-ficoeritrina induzida pelo AAPH. A adição do AAPH à solução contendo a R-ficoeritrina 12  $\mu$ M leva a um “quenching” de fluorescência da R-ficoeritrina, traduzindo a oxidação da sonda pelos radicais peróxido provenientes do AAPH. A adição de Trolox ou quercetina à solução leva a uma diminuição drástica do “quenching” de fluorescência.

Os perfis de reação observados sugerem que, tanto o Trolox como a quercetina, reagem mais rapidamente com os radicais peróxido do que a R-ficoeritrina.

Quando se adicionam, à mistura de reação, os extractos ou as fracções, da agrimónia e do equisetum, ocorre uma diminuição da velocidade do decaimento da fluorescência da

R-ficoeritrina (figura 49). Os extractos e as fracções protegeram, eficazmente, a R-ficoeritrina do dano oxidativo induzido pelos radicais peróxido, de um modo dependente da concentração, diminuindo significativamente a velocidade de decréscimo da intensidade de fluorescência.



**Figura 49.** Oxidação da R-ficoeritrina, induzida por radicais peróxido. Evidência para a protecção conferida pelos extractos e fracções da *Agrimonia eupatoria* L. (AT e AF, respectivamente) e do *Equisetum telmateia* Ehrh. (EI e EF, respectivamente). Para uma correcta interpretação dos resultados todos os ensaios foram normalizados por computador aos 1550 s do início do ensaio.

Uma vez mais, as fracções exibiram maior actividade. A fracção da agrimónia mostrou ser a mais activa e o extracto do equisetum, o menos activo. A observação das figuras sugere um comportamento diferente da agrimónia relativamente ao equisetum. Nos gráficos da figura 49 é evidente um declive menor na primeira porção das curvas o que denota um comportamento idêntico ao do Trolox, ou seja, sugere que alguns dos compostos existentes quer no extracto quer na fracção da agrimónia apresentam um comportamento, face aos radicais peroxilo, tipo “chain-breaking”.

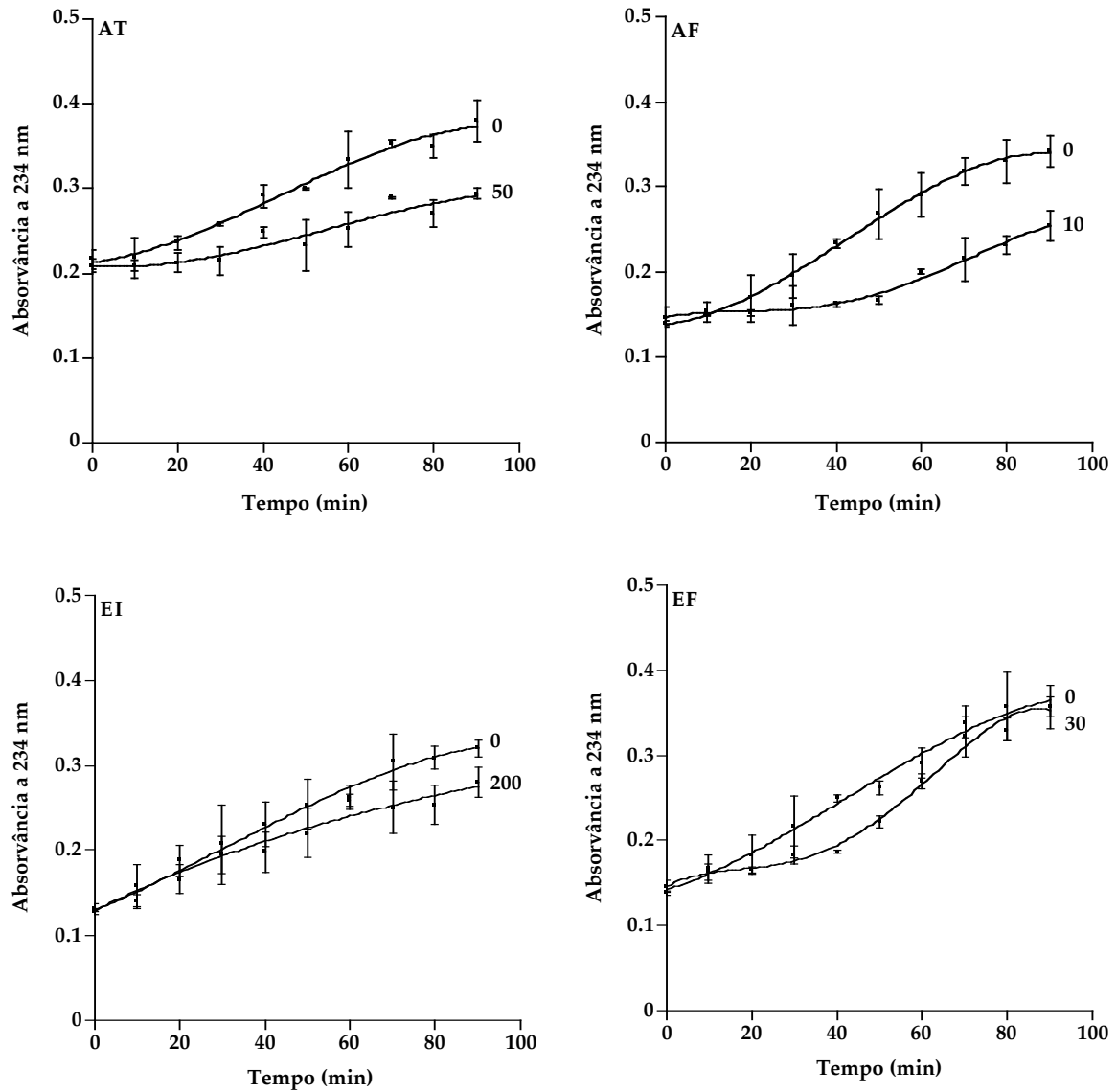
De acordo com o descrito anteriormente, ambos extractos e fracções, podem contribuir para uma prevenção da peroxidação lipídica, mais concretamente por inibição das fases de iniciação e propagação.

#### 5.3.8. CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Posteriormente, avaliámos os efeitos inibitórios, dos extractos e das fracções, na peroxidação lipídica. Para tal usámos membranas modelo, isto é, lipossomas multilamelares de fosfatidilcolina, induzimos a oxidação com radicais peroxilo provenientes do AAPH e avaliámos o dano oxidativo pela medida dos dienos conjugados. Os dienos conjugados são os produtos primários da oxidação dos ácidos gordos, como evidenciado na figura 14.

A figura 50 ilustra o efeito dos extractos e das fracções na formação dos dienos conjugados, induzida pelos radicais peroxilo. Como se pode observar, na ausência de extractos ou fracções, a peroxidação lipídica aumenta com o tempo, atingindo um máximo aparente, por volta dos 90 min.

O extracto (50 µg) e a fracção (10 µg) da agrimónia (AT e AF, respectivamente) inibem completamente a formação dos dienos conjugados durante, aproximadamente 30 e 42 min, respectivamente. Este comportamento já tinha sido observado no ensaio anterior e vem corroborar a hipótese de existência de constituintes, quer no extracto quer na fracção, que reagem com os radicais peroxilo inibindo completamente a oxidação do substrato oxidável.



**Figura 50.** Cinética de formação dos dienos conjugados em lipossomas multilamelares de fosfatidilcolina na ausência (0) e na presença dos extractos e das fracções da *Agrimonia eupatoria* L. (50 µg AT e 10 µg AF, respectivamente) e do *Equisetum telmateia* Ehrh. (200 µg EI e 30 µg EF, respectivamente). Cada ponto representa a média  $\pm$  S.D. de pelo menos três determinações.

A fracção (30 µg) do equisetum exibe um comportamento semelhante ao extracto e fracção da agrimónia, observando-se uma “lag phase” de cerca de 30 min. Pelo contrário, o extracto do equisetum (200 µg) não apresenta qualquer período inicial de inibição da

peroxidação lipídica característico dos antioxidantes “chain-breaking”. Verifica-se apenas uma inibição gradual, da quantidade de dienos formados. Este perfil aponta para uma acção retardante da peroxidação lipídica.

Os resultados mostram que os extractos e, particularmente, as fracções inibem significativamente a peroxidação lipídica induzida por radicais peróxilo. O extracto da agrimónia e ambas as fracções apresentam-se como bons captadores de radicais peróxilo. Com base nos resultados, é possível sugerir uma protecção eficaz *in vivo*, em meio aquoso, da peroxidação lipídica membranar.

## 6. DISCUSSÃO GERAL

Os mecanismos inflamatórios estão, muitas vezes, relacionados com estados de stresse oxidativo, que podem ser retardados ou prevenidos por compostos com reconhecida actividade antioxidante, como é o caso dos polifenóis. Neste sentido avaliámos ao longo deste trabalho o potencial antioxidante da *Agrimonia eupatoria* L. e do *Equisetum telmateia* Ehrh., duas plantas tradicionalmente reconhecidas pela sua actividade anti-inflamatória.

Para ambas as plantas foram preparados diferentes extractos, de acordo com o seu uso na medicina popular. Um teste geral de avaliação da actividade antioxidante (teste do DPPH), permitiu seleccionar, para a agrimónia, um extracto hidro-alcoólico e para o equisetum, um extracto aquoso. Com o objectivo de averiguar se a actividade antioxidante das plantas estaria relacionada com a presença de polifenóis, foram obtidas e caracterizadas, fracções enriquecidas em polifenóis, a partir dos respectivos extractos.

O gradiente de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), utilizado na análise dos extractos e das fracções, permitiu obter uma boa separação de diferentes classes de compostos fenólicos: ácidos fenólicos, flavanóis, flavonóis e flavonas. A retenção dos compostos seguiu, de um modo geral, a ordem decrescente de polaridade esperada para a separação de fase-reversa: ácidos cinâmicos e ácidos benzóicos, flavonóides C-glicosilados, flavonóides O-glicosilados, geninas de flavonóis (Sanchez-Rabaneda *et al.*, 2003). A separação das proantocianidinas oligoméricas com a mesma massa molecular, dos respectivos isómeros, apenas foi credível para graus de polimerização inferiores a pentâmeros.

As limitações encontradas na análise dos polifenóis por HPLC/DAD foram ultrapassadas pela detecção por espectrometria de massa. A sensibilidade desta técnica permitiu detectar e caracterizar compostos presentes em pequenas quantidades. As condições de ionização utilizadas, i.e., “electrospray” em modo ião positivo, mostraram

ser bastante úteis na análise de polifenóis, uma vez que, obteve-se sempre o íão molecular dos compostos e os espectros de massa apresentavam uma boa densidade de picos. Segundo alguns autores, estas características não são observadas utilizando outros modos de ionização, como por exemplo a APCI. Vários estudos apontam a ionização por “electrospray” como a técnica de ionização mais vantajosa e de maior sensibilidade (de Pascual-Teresa *et al.*, 2000; Friedrich *et al.*, 2000; Rohr *et al.*, 2000). O facto adicional de, nas condições utilizadas, os ácidos fenólicos não serem ionizáveis, contribui para o elevado potencial desta técnica na análise de polifenóis, particularmente, dos flavanóis que co-eluem com ácidos (de Pascual-Teresa *et al.*, 1998). No entanto, apesar de todas as vantagens descritas, foram encontradas algumas dificuldades na análise por espectrometria de massa, dos flavonóides, pela ausência de informação acerca da posição das moléculas ligadas às geninas, e das proantocianidinas, por não diferenciar estereoisómeros e não oferecer informação acerca da posição e estereoquímica da ligação interflavânica (4-6 ou 4-8).

A caracterização polifenólica das fracções permitiu identificar, pela primeira vez, os flavanóis e as proantocianidinas presentes na agrimónia e no equisetum.

A análise do perfil flavânico evidencia uma complexidade superior da fracção do equisetum à da agrimónia. A fracção da *Agrimonia eupatoria* L. apresenta, essencialmente derivados da catequina, sendo predominantes os compostos de baixo grau de polimerização (dímeros, trímeros e alguns tetrâmeros). Por outro lado, o perfil flavânico da fracção do *Equisetum telmateia* Ehrh. é caracterizado pela, extremamente rara, ausência de monómeros, pela presença de derivados da epicatequina e de proantocianidinas de elevado grau de polimerização, pela presença de proantocianidinas de tipo A e pela presença de proantocianidinas heterogéneas, constituídas por unidades de (epi)afzelequina.

A presença de proantocianidinas de tipo A e heterogéneas na fracção do equisetum é de extrema importância. Estas proantocianidinas encontram-se mal estudadas (Gu *et al.*, 2003a; Gu *et al.*, 2003b; Friedrich *et al.*, 2000; de Pascual-Teresa *et al.*, 1998), no entanto, os poucos trabalhos existentes conferem-lhes importantes actividades biológicas, como a



antioxidante, a anti-bacteriana e a anti-inflamatória (Su *et al.*, 2002; Calzada *et al.*, 2001; Foo *et al.*, 2000; Calzada *et al.*, 1999; Min *et al.*, 1999).

Adicionalmente, a análise fitoquímica permitiu identificar, na fracção da agrimónia derivados da quercetina e do canferol, assim como de uma flavona. Estudos anteriores tinham reportado a presença de alguns dos compostos identificados, no entanto, a informação sobre as técnicas de análise utilizadas é muito vaga. Outros estudos porém, apenas identificam as classes de compostos presentes.

Por outro lado, na fracção do equisetum, apenas foram detectados derivados do canferol, particularmente acetilados. Apesar destes compostos já terem sido identificados por HPLC (Veit *et al.*, 1995), as informações reportadas neste trabalho, obtidas por espectrometria de massa, corroboram e são um valioso complemento da informação anteriormente descrita.

Os polifenóis, identificados nas fracções da agrimónia e do equisetum, possuem várias actividades descritas. Aparte da reconhecida actividade antioxidante, alguns estudos atribuem-lhes actividade anti-inflamatória e, por vezes, relacionam as duas. Durante os processos inflamatórios, ocorre uma elevada produção de espécies reactivas de oxigénio pelas células fagocíticas. Esta elevada produção, leva a um desequilíbrio entre as espécies oxidantes e as defesas antioxidantes e pode conduzir a uma resposta inflamatória inadequada (Jackson *et al.*, 2002). Compostos com actividade antioxidante, que actuem quer por acção directa sobre as espécies oxidantes ou, indirectamente, inibindo a sua formação (por inibição de enzimas formadoras de ROS ou por complexação de iões metálicos), podem contribuir para um retardamento ou inibição dos processos inflamatórios.

Nos ensaios bioquímicos realizados *in vitro*, os extractos e as fracções apresentaram significativa actividade “scavenger” das espécies reactivas de oxigénio, apontando para elevados potenciais antioxidantes. Adicionalmente, mostraram, de um modo geral, inibir directamente a xantina-oxidase e inibir as reacções em cadeia da peroxidação lipídica. Estes resultados sugerem um possível envolvimento de ambos os extractos e as fracções na atenuação dos processos inflamatórios.

Os extractos exibiram menor actividade do que as respectivas fracções em todos os ensaios. As diferenças de actividade, justificadas com base nas suas composições fitoquímicas, apontam para um significativo envolvimento dos polifenóis nas actividades estudadas. Deste modo, os polifenóis identificados, parecem ser os responsáveis pela actividade anti-inflamatória proposta quer para a *Agrimonia eupatoria* L. quer para o *Equisetum telmateia* Ehrh..

Com efeito, os flavanóis e as proantocianidinas são conhecidos pela sua actividade antioxidante (Santos-Buelga e Scalbert, 2000; Haslam, 1996) e estudos recentes apontam para uma possível actividade anti-inflamatória (Gonçalves *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2001). Os flavonóis também possuem diversas actividades (ex. actividade antioxidante, inibição da xantina-oxidase, actividade anti-inflamatória, entre outras) que dependem das suas estruturas (Nijveldt *et al.*, 2001; Middleton *et al.*, 2000; di Carlo *et al.*, 1999; Nagao *et al.*, 1999). A quercetina é um dos flavonóides que possui maior actividade antioxidante (Beyer e Melzig, 2003; Chen *et al.*, 2002; van Hoorn *et al.*, 2002). Os seus derivados, apesar de apresentarem, de um modo geral, menor actividade, são potentes antioxidantes e possuem, tal como a quercetina, entre outras, actividade anti-inflamatória (El-Seedi *et al.*, 2003; Guardia *et al.*, 2001; Wei *et al.*, 2001; Mutoh *et al.*, 2000; Pelzer *et al.*, 1998; Formica e Regelson, 1995). Por outro lado, o canferol mostrou ser um potente inibidor da indução da iNOS e estimulante da cNOS, actuando, deste modo, como anti-inflamatório e anti-aterogénico, respectivamente (Olszanecki *et al.*, 2002). Vários trabalhos propõem, para o canferol e para alguns derivados acetilados, diversas actividades, tais como anti-inflamatória, antioxidante, antipirética e inibidora da xantina-oxidase (Backhouse *et al.*, 2002; van Hoorn *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2001; Husain *et al.*, 1987). Por outro lado, estudos recentes conferem actividades antioxidante e anti-inflamatória a um derivado do canferol identificado na agrimónia, o tilirósido ou canferol 3-O-(6''-O-p-coumaróil)glucósido (Sala *et al.*, 2003; Matsuda *et al.*, 2002). Adicionalmente, um dos estudos confere não só ao tilirósido mas também ao canferol 3-O-glucósido, presente em ambas as fracções, actividade hepatoprotectora (Matsuda *et al.*, 2002). Vários estudos também conferem às flavonas actividades antioxidante e anti-inflamatória. Liang e

colaboradores (1999) mostraram que a apigenina inibe a activação da COX-2 e da iNOS, podendo contribuir, deste modo, para a neutralização do processo inflamatório (Liang *et al.*, 1999). Outro estudo demonstra que a vitexina inibe a actividade da xantina-oxidase e protege o dano celular induzido pelas espécies reactivas de oxigénio (Lin *et al.*, 2002).

Apesar de todos os estudos realizados *in vitro* apontarem para um possível envolvimento dos polifenóis presentes nas amostras em estudo, na atenuação de processos inflamatórios, a actividade *in vivo*, encontra-se limitada pela sua biodisponibilidade. Com efeito, a acessibilidade de um antioxidante ao local de formação do radical e aos alvos moleculares de stress oxidativo é um factor muito importante que limita a acção “scavenger” de um composto (Maitra *et al.*, 1995). Os trabalhos realizados incidem principalmente no estudo da biodisponibilidade da quercetina e seus derivados e das proantocianidinas. A biodisponibilidade dos polifenóis identificados e os efeitos biológicos dos seus metabolitos (descritos na secção 2.2.6) permitem sugerir uma possível acção *in vivo*, antioxidante e anti-inflamatória, para a agrimónia e para o equisetum.

Os resultados deste trabalho apontam para uma elevada acção antioxidante dos extractos e das fracções de ambas as plantas, no entanto, é necessário desenvolver estudos *in vivo*, para confirmar a actividade anti-inflamatória proposta, tradicionalmente, para a *Agrimonia eupatoria* L. e para o *Equisetum telmateia* Ehrh. e que neste estudo se propõe ser devida à presença dos compostos fenólicos identificados.



## 7. CONCLUSÕES

O trabalho apresentado nesta tese teve como principal **objectivo** esclarecer se a actividade anti-inflamatória proposta para a *Agrimonia eupatoria* L. e para o *Equisetum telmateia* Ehrh. estava relacionada com a actividade antioxidante e se esta se deve, essencialmente, à presença dos polifenóis.

Dos resultados apresentados podem inferir-se as seguintes **conclusões**:

- O perfil polifenólico da *Agrimonia eupatoria* L. é caracterizado pela presença de derivados da catequina, essencialmente, de baixo grau de polimerização, de derivados da quercetina, do canferol e de flavonas.
- O perfil polifenólico do *Equisetum telmateia* Ehrh. é caracterizado pela ausência de 3-flavanóis monoméricos, pela presença de derivados da epicatequina e de proantocianidinas de elevado grau de polimerização, de proantocianidinas de tipo A, de proantocianidinas heterogéneas, constituídas por unidades de (epi)afzelequina e por derivados do canferol.
- Os extractos e as fracções enriquecidas em polifenóis, exibiram, de um modo geral, significantes actividades antioxidantes, quer pela acção “scavenger” de espécies reactivas de oxigénio, quer pela inibição directa da xantina-oxidase ou de proteases quer por inibirem as reacções em cadeia da peroxidação lipídica.
- Todos os mecanismos, descritos anteriormente, estão envolvidos na atenuação dos processos inflamatórios, sugerindo que a actividade anti-inflamatória proposta para ambas as plantas, está relacionada com a sua actividade antioxidante.
- As fracções mostraram ser significativamente mais activas do que os respectivos extractos, evidenciando o envolvimento dos polifenóis presentes nas fracções, nas

actividades referidas. Os polifenóis poderão ser os principais responsáveis pela actividade anti-inflamatória proposta para estas plantas.

- Os estudos realizados *in vitro* são limitados pela biodisponibilidade dos compostos, no entanto, vários estudos sugerem actividades significativas para os metabolitos dos compostos identificados. Este facto corrobora a hipótese de os polifenóis presentes nas fracções serem os principais responsáveis pela actividade anti-inflamatória proposta para a *Agrimonia eupatoria* L. e para o *Equisetum telmateia* Ehrh..

### **III. BIBLIOGRAFIA**





## 8. BIBLIOGRAFIA

- Albrich JM, McCarthy CA, Hurst JK. 1981. Biological reactivity of hypochlorous acid: implications for microbicidal mechanisms of leukocyte myeloperoxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 210-214.
- Alcaraz MJ, Hoult JR. 1985. Actions of flavonoids and the novel anti-inflammatory flavone, hypolaetin-8-glucoside, on prostaglandin biosynthesis and inactivation. *Biochem Pharmacol* 34, 2477-2482.
- Alcaraz MJ, Jiménez MJ. 1988. Flavonoid as anti-inflammatory agents. *Fitoterapia* 59, 25-38.
- Aleryani S, Milo E, Rose Y, Kostka P. 1998. Superoxide-mediated decomposition of biological S-nitrosothiols. *J Biol Chem* 273, 6041-6045.
- Amos S, Adamu M, Binda L, Edmond I, Kunle OF, Akah P, Wambebe C, Gamaniel K. 2002. Preliminary studies on anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of the aqueous extract of *Chrysanthellum indicum*. *Acta Pharm.* 52, 213-218.
- Arnhold J. 2004. Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. *Biochemistry (Mosc)* 69, 4-9.
- Arteel GE, Briviba K, Sies H. 1999. Protection against peroxynitrite. *FEBS Lett* 445, 226-230.
- Arteel GE, Schroeder P, Sies H. 2000. Reactions of peroxynitrite with cocoa procyanidin oligomers. *J Nutr* 130, 2100S-2104S.
- Arts IC, Sesink AL, Faassen-Peters M, Hollman PC. 2004. The type of sugar moiety is a major determinant of the small intestinal uptake and subsequent biliary excretion of dietary quercetin glycosides. *Br J Nutr* 91, 841-847.
- Arts IC, Hollman PC, Feskens EJ, Bueno de Mesquita HB, Kromhout D. 2001a. Catechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischemic heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Am J Clin Nutr* 74, 227-232.
- Arts IC, Hollman PC, Bueno De Mesquita HB, Feskens EJ, Kromhout D. 2001b. Dietary catechins and epithelial cancer incidence: the Zutphen elderly study. *Int J Cancer* 92, 298-302.
- Aruoma OI. 1996a. Characterization of drugs as antioxidant prophylactics. *Free Radic Biol Med* 20, 675-705.
- Aruoma OI. 1996b. Assessment of potential prooxidant and antioxidant actions. *JAOCS* 73, 1617-1625.
- Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. 1989. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 6, 593-597.
- Ashraf-Khorassani M, Taylor LT. 2004. Sequential fractionation of grape seeds into oils, polyphenols, and procyanidins via a single system employing CO<sub>2</sub>-based fluids. *J Agric Food Chem* 52, 2440-2444.

- Backhouse N, Delporte C, Negrete R, Feliciano SA, Lopez-Perez JL. 2002. Bioactive phenolic derivatives from *Acaena splendens* methanol extract. *Phytother Res* 16, 562-566.
- Bagchi D, Sen CK, Ray SD, Das DK, Bagchi M, Preuss HG, Vinson JA. 2003. Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mutat Res* 523-524, 87-97.
- Bakhtiar A, Gleye J, Moulis C, Fourasté I. 1994. Desorption chemical ionization mass spectrometry of C-glycosylflavones. *Phytochem Anal* 5, 86-89.
- Baldé AM, Calomme M, Pieters L, Claeys M, Vanden Berghe DA, Vlietinck AJ. 1991. Structure and antimicrobial activity relationship of double-linked procyanidins. *Planta Med* 57, A42-A43.
- Beart JE, Lilley TH, Haslam E. 1985. Polyphenol interactions. Part 2. Covalent binding of procyanidins to proteins during acid-catalysed decomposition; observations on some polymeric proanthocyanidins. *J Chem Soc Perkin Trans II*, 1439-1443.
- Beckman JS, Chen J, Ischiropoulos H, Crow JP. 1994. Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Methods Enzymol* 233, 229-240.
- Benigni R, Capra C, Cattorini PE. 1964. *Piante Medicinali - Chimica Farmacologia e Terapia*. Inverni & Della Beffa. Milano
- Benov L, Georgiev N. 1994. The antioxidant activity of flavonoids isolated from *Corylus colurna*. *Phytother Res* 8, 92-94.
- Beyer G, Melzig MF. 2003. Effects of selected flavonoids and caffeic acid derivatives on hypoxanthine-xanthine oxidase-induced toxicity in cultivated human cells. *Planta Med* 69, 1125-1129.
- Bilia AR, Palme E, Catalano S, Pistelli L, Morelli I. 1993. Constituents and biological assay of *Agrimonia eupatoria*. *Fitoterapia* LXIV, 549-550.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181, 1199-1200.
- Bohm BA. 1998. *Introduction to flavonoids*. Harwood Academic Publishers, 503.
- Bomser JA, Singletary KW, Wallig MA, Smith MA. 1999. Inhibition of TPA-induced tumor promotion in CD-1 mouse epidermis by a polyphenolic fraction from grape seeds. *Cancer Lett* 135, 151-157.
- Borrelli F, Maffia P, Pinto L, Ianaro A, Russo A, Capasso F, Ialenti A. 2002. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia* 73 Suppl 1, S53-63.
- Bors W, Michel C. 1999. Antioxidant capacity of flavanols and gallate esters: pulse radiolysis studies. *Free Radic Biol Med* 27, 1413-1426.
- Boulton DW, Walle UK, Walle T. 1998. Extensive binding of the bioflavonoid quercetin to human plasma proteins. *J Pharm Pharmacol* 50, 243-249.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss u-Technol* 28, 25-30.
- Bremner P, Heinrich M. 2002. Natural products as targeted modulators of the nuclear factor-kappa B pathway. *J Pharm Pharmacol* 54, 453-472.
- Brito P, Almeida LM, Dinis TC. 2002. The interaction of resveratrol with ferrylmyoglobin and peroxynitrite; protection against LDL oxidation. *Free Radic Res* 36, 621-631.

- Cai Y, Evans FJ, Roberts MF, Phillipson JD, Zenk MH, Gleba YY. 1991. Polyphenolic compounds from *Croton lechleri*. *Phytochemistry* 30, 2033-2040.
- Calzada F, Cedillo-Rivera R, Bye R, Mata R. 2001. Geranins C and D, additional new antiprotozoal A-type proanthocyanidins from *Geranium niveum*. *Planta Med* 67, 677-680.
- Calzada F, Cerda-Garcia-Rojas CM, Meckes M, Cedillo-Rivera R, Bye R, Mata R. 1999. Geranins A and B, new antiprotozoal A-type proanthocyanidins from *Geranium niveum*. *J Nat Prod* 62, 705-709.
- Cao G, Sofic E, Prior RL. 1997. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med* 22, 749-760.
- Capeillere-Blandin C. 1998. Oxidation of guaiacol by myeloperoxidase: a two-electron-oxidized guaiacol transient species as a mediator of NADPH oxidation. *Biochem J* 336, 395-404.
- Capodici C, Berg RA. 1991. Neutrophil collagenase activation: the role of oxidants and cathepsin G. *Agents Actions* 34, 8-10.
- Chen JW, Zhu ZQ, Hu TX, Zhu DY. 2002. Structure-activity relationship of natural flavonoids in hydroxyl radical-scavenging effects. *Acta Pharmacol Sin* 23, 667-672.
- Chevallier A. 1996. Enciclopèdia de Plantas Medicinai
- Cioffi G, D'Auria M, Braca A, Mendez J, Castillo A, Morelli I, de Simone F, de Tommasi N. 2002. Antioxidant and free-radical scavenging activity of constituents of the leaves of *Tachigalia paniculata*. *J Nat Prod* 65, 1526-1529.
- Clark RA, Stone PJ, El Hag A, Calore JD, Franzblau C. 1981. Myeloperoxidase-catalyzed inactivation of alpha 1-protease inhibitor by human neutrophils. *J Biol Chem* 256, 3348-3353.
- Coleman JW. 2001. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol* 1, 1397-1406.
- Conforti F, Statti GA, Tundis R, Menichini F, Houghton P. 2002. Antioxidant activity of methanolic extract of *Hypericum triquetrifolium* Turra aerial part. *Fitoterapia* 73, 479-483.
- Cook NC, Sammana S. 1996. Flavonoids - chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J Nutr Biochem* 7, 66-76.
- Copland A, Nahar L, Tomlinson CT, Hamilton V, Middleton M, Kumarasamy Y, Sarker SD. 2003. Antibacterial and free radical scavenging activity of the seeds of *Agrimonia eupatoria*. *Fitoterapia* 74, 133-135.
- Cotelle N, Bernier JL, Catteau JP, Pommery J, Wallet JC, Gaydou EM. 1996. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radic Biol Med* 20, 35-43.
- Crespy V, Morand C, Manach C, Besson C, Demigne C, Remesy C. 1999. Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. *Am J Physiol* 277, G120-126.
- Cuyckens F, Rozenberg R, de Hoffmann E, Claeys M. 2001. Structure characterization of flavonoid O-diglycosides by positive and negative nano-electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 36, 1203-1210.
- Czochanska Z, Foo LY, Newman RH, Porter LJ. 1980. Polymeric proanthocyanidins. Stereochemistry, structural units, and molecular weight. *J C S Perkin I*, 2278-2286.

- Day AJ, Bao Y, Morgan MR, Williamson G. 2000. Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity. *Free Radic Biol Med* 29, 1234-1243.
- de Bruyne T, Pieters L, Deelstra H, Vlietinck A. 1999. Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematics and Ecology* 27, 445-459.
- de Pascual-Teresa S. 1996. Catequinas y procianidinas en frutos inmaduros de almendras, Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Universidad de Salamanca, Salamanca, 75.
- de Pascual-Teresa S. 1999. Analisis de taninos condensados en alimentos, Departamento de Química Analítica, Bromatología y Nutrición. Faculdade de Farmácia, Salamanca.
- de Pascual-Teresa S, Rivas-Gonzalo JC, Santos-Buelga C. 2000. Prodelphinidins and related flavanols in wine. *Int J Food Sci Technol* 35, 33-40.
- de Pascual-Teresa S, Gutiérrez-Fernández Y, Rivas-Gonzalo JC, Santos-Buelga C. 1998. Characterization of monomeric and oligomeric flavan-3-ols from unripe almond fruits. *Phytochem Anal* 9, 21-27.
- di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. 1999. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci* 65, 337-353.
- Dinis TC, Madeira VM, Almeida LM. 1994. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch Biochem Biophys* 315, 161-169.
- Domon B, Costello CE. 1988. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate* 5, 397-409.
- Duarte J, Perez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Jimenez J, Tamargo J. 1993. Vasodilator effects of quercetin in isolated rat vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 239, 1-7.
- El-Seedi HR, Ringbom T, Torssell K, Bohlin L. 2003. Constituents of *Hypericum laricifolium* and their cyclooxygenase (COX) enzyme activities. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 51, 1439-1440.
- Erlund I, Kosonen T, Alfthan G. 2000. Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 56, 545-553.
- Escribano-Bailón T, Gutiérrez-Fernández Y, Rivas-Gonzalo JC, Santos-Buelga C. 1992. Characterization of procyanidins of *Vitis vinifera* variety Tinta del Pais grape seeds. *J Agric Food Chem* 40, 1794-1799.
- Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. 1992. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 13, 341-390.
- Fauron R, Moatti R, Donadieu dY. 1971. Guide Pratique de Phytothérapie - Encyclopédie Médicinale de Prescription Phytothérapique. Paris
- Feldman KS, Lawlor MD. 2000. Ellagitannin chemistry: the first total synthesis of a dimeric ellagitannin, coriariin A. *J Am Chem Soc* 122, 7396-7397.
- Feldman KS, Lawlor MD, Sahasrabudhe K. 2000. Ellagitannin chemistry. Evolution of a three-component coupling strategy for the synthesis of the dimeric ellagitannin coriariin A and a dimeric gallotannin analogue. *J Org Chem* 65, 8011-8019.

- Feldman KS, Sahasrabudhe K, Smith RS, Scheuchenzuber WJ. 1999. Immunostimulation by plant polyphenols: a relationship between tumor necrosis factor- $\alpha$  production and tannin structure. *Bioorg Med Chem Lett* 9, 985-990.
- Fernandes E, Toste SA, Lima JL, Reis S. 2003. The metabolism of sulindac enhances its scavenging activity against reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic Biol Med* 35, 1008-1017.
- Ferreira D, Bekker R. 1996. Oligomeric proanthocyanidins: naturally occurring O-heterocycles. *Nat Prod Rep*, 411-433.
- Ferry DR, Smith A, Malkhandi J, Fyfe DW, deTakats PG, Anderson D, Baker J, Kerr DJ. 1996. Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. *Clin Cancer Res* 2, 659-668.
- Fitzpatrick DF, Fleming RC, Bing B, Maggi DA, O'Malley RM. 2000. Isolation and characterization of endothelium-dependent vasorelaxing compounds from grape seeds. *J Agric Food Chem* 48, 6384-6390.
- Foo LY, Lu Y, Howell AB, Vorsa N. 2000. A-Type proanthocyanidin trimers from cranberry that inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli*. *J Nat Prod* 63, 1225-1228.
- Forey P, Lindsay R. 1997. *Plantas Mediciniais*. Plátano, 126.
- Formica JV, Regelson W. 1995. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol* 33, 1061-1080.
- FPVII. *Farmacopeia Portuguesa VII*
- Fridovich I. 1997. Superoxide anion radical ( $O_2^-$ ), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem* 272, 18515-18517.
- Fridovich I. 2001. Oxidative stress. *Encyclopedia of Life Sciences*.
- Friedrich W, Eberhardt A, Galensa R. 2000. Investigation of proanthocyanidins by HPLC with electrospray ionization mass spectrometry. *Eur Food Res Technol* 211, 56-64.
- Fuhrman B, Aviram M. 2001. Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 12, 41-48.
- Furtmuller PG, Obinger C, Hsuanyu Y, Dunford HB. 2000. Mechanism of reaction of myeloperoxidase with hydrogen peroxide and chloride ion. *Eur J Biochem* 267, 5858-5864.
- Fylaktakidou KC, Hadjipavlou-Litina DJ, Litinas KE, Nicolaidis DN. 2004. Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/antioxidant activities. *Curr Pharm Des* 10, 3813-3833.
- Gali HU, Perchellet EM, Gao XM, Karchesy JJ, Perchellet JP. 1994. Comparison of the inhibitory effects of monomeric, dimeric, and trimeric procyanidins on the biochemical markers of skin tumor promotion in mouse epidermis in vivo. *Planta Med* 60, 235-239.
- Gao Z, Huang K, Yang X, Xu H. 1999. Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochim Biophys Acta* 1472, 643-650.
- Gee JM, DuPont MS, Rhodes MJ, Johnson IT. 1998. Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free Radic Biol Med* 25, 19-25.

- Glazer AN. 1990. Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species. *Methods Enzymol* 186, 161-168.
- Gonçalves C, Dinis T, Batista MT. 2005. Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. *Phytochemistry* 66, 89-98.
- Gonçalves E, Almeida LM, Dinis TC. 1998. Antioxidant activity of 5-aminosalicylic acid against peroxidation of phosphatidylcholine liposomes in the presence of alpha-tocopherol: a synergistic interaction? *Free Radic Res* 29, 53-66.
- Goodman, Gilman's. 2001. Goodman & Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics. McGraw-Hill
- Graefe EU, Wittig J, Mueller S, Riethling AK, Uehleke B, Drewelow B, Pforte H, Jacobasch G, Derendorf H, Veit M. 2001. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J Clin Pharmacol* 41, 492-499.
- Grayer RJ, Kite GC, Aboud-Zaid M, Archer L. 2000. The application of atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography - mass spectrometry in the chemotaxonomic study of flavonoids: characterization of flavonoids from *Ocimum gratissimum* var. *gratissimum*. *Phytochem Anal* 11, 257-267.
- Grisham MB. 1994. Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. *The Lancet* 344, 859-861.
- Gryglewski RJ, Korbut R, Robak J, Swies J. 1987. On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. *Biochem Pharmacol* 36, 317-322.
- Gu L, Kelm MA, Hammerstone JF, Beecher G, Holden J, Haytowitz D, Prior RL. 2003a. Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and thiolytic degradation. *J Agric Food Chem* 51, 7513-7521.
- Gu L, Kelm MA, Hammerstone JF, Zhang Z, Beecher G, Holden J, Haytowitz D, Prior RL. 2003b. Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric studies of proanthocyanidins in foods. *J Mass Spectrom* 38, 1272-1280.
- Guardia T, Rotelli AE, Juarez AO, Pelzer LE. 2001. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Farmacol* 56, 683-687.
- Gutteridge JMC. 1984. Lipid peroxidation initiated by superoxide-dependent hydroxyl radicals using complexed iron and hydrogen peroxide. *FEBS Letters* 172, 245-249.
- Guzik TJ, Korbut R, Adamek-Guzik T. 2003. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol* 54, 469-487.
- Haenen GR, Paquay JB, Korthouwer RE, Bast A. 1997. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem Biophys Res Commun* 236, 591-593.
- Hagerman AE, Butler LG. 1991. Tannins and lignins. In: A Press (Ed.), *Herbivores their interactions with secondary plant metabolites*, 355-388.
- Hagerman AE, Rice ME, Ritchard NT. 1998a. Mechanisms of protein precipitation for two tannins, pentagalloylglucose and epicatechin-(4,8)-catechin (procyanidin). *J Agric Food Chem* 46, 2590-2595.

- Hagerman AE, Riedl KM, Jones A, Sovik KN, Ritchard NT, Hartzfeld PW, Riechel TL. 1998b. High molecular weight plant polyphenols (tannins) as biological antioxidants. *J Agric Food Chem* 46, 1887-1892.
- Halliwell B, Gutteridge JM. 1981. Formation of thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts: the role of superoxide and hydroxyl radicals. *FEBS Lett* 128, 347-352.
- Harborne JB, Williams CA. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481-504.
- Harlan JM, Levine JD, Callahan KS, Schwartz BR, Harker LA. 1984. Glutathione redox cycle protects cultured endothelial cells against lysis by extracellular generated hydrogen peroxide. *J Clin Invest* 73, 706-713.
- Harrison JE, Schultz J. 1976. Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase. *J Biol Chem* 251, 1371-1374.
- Hashimoto F, Ono M, Masuoka C, Ito Y, Sakata Y, Shimizu K, Nonaka G, Nishioka I, Nohara T. 2003. Evaluation of the anti-oxidative effect (in vitro) of tea polyphenols. *Biosci Biotechnol Biochem* 67, 396-401.
- Haslam E. 1974. Polyphenol-protein interactions. *Biochem J* 139, 285-288.
- Haslam E. 1989. Plant polyphenols. Vegetable tannins revised. Cambridge University Press, 230.
- Haslam E. 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J Nat Prod* 59, 205-215.
- Haslam E, Thompson RS, Jacques D, Tanner RJN. 1972. Plant proanthocyanidins. Part 1.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 13, 572-584.
- Hemingway RW, Karchesy JJ. 1989. Chemistry and significance of condensed tannins. Plenum Press. New York and London, 545.
- Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 342, 1007-1011.
- Himmelfard J. 2004. Linking oxidative stress and inflammation in kidney disease: which is the chicken and which is the egg? *Semin Dial*. 17, 449-454.
- Hinshaw DB, Sklar LA, Bohl B, Schraufstatter IU, Hyslop PA, Rossi MW, Spragg RG, Cochrane CG. 1986. Cytoskeletal and morphologic impact of cellular oxidant injury. *Am J Pathol* 123, 454-464.
- Hollman PC. 2001. Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects? *J Sci Food Agri* 81, 842-852.
- Hollman PC, de Vries JH, Leeuwen SD, Mengerels MJ, Katan MB. 1995. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr* 62, 1276-1282.
- Hollman PC, vd Gaag M, Mengelers MJ, van Trijp JM, de Vries JH, Katan MB. 1996. Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Radic Biol Med* 21, 703-707.

- Hollman PC, Bijlsman MN, van Gameren Y, Cnossen EP, de Vries JH, Katan MB. 1999. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoids in man. *Free Radic Res* 31, 569-573.
- Hollman PC, van Trijp JM, Buysman MN, van der Gaag MS, Mengelers MJ, de Vries JH, Katan MB. 1997. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett* 418, 152-156.
- Hooper DC, Scott GS, Zborek A, Mikheeva T, Kean RB, Koprowski H, Spitsin SV. 2000. Uric acid, a peroxynitrite scavenger, inhibits CNS inflammation, blood-CNS barrier permeability changes, and tissue damage in a mouse model of multiple sclerosis. *Faseb J* 14, 691-698.
- Hostettmann K, Wolfender J-L, Rodriguez S. 1997. Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts. *Planta Med* 63, 2-10.
- Husain SR, Cillard J, Cillard P. 1987. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry* 26, 2489-2491.
- Huss U, Ringbom T, Perera P, Bohlin L, Vasange M. 2002. Screening of ubiquitous plant constituents for COX-2 inhibition with a scintillation proximity based assay. *J Nat Prod* 65, 1517-1521.
- Hyslop PA, Hinshaw DB, Schraufstatter IU, Sklar LA, Spragg RG, Cochrane CG. 1986. Intracellular calcium homeostasis during hydrogen peroxide injury to cultured P388D1 cells. *J Cell Physiol* 129, 356-366.
- Igile GO, Oleszek W, Jurzysta M, Burda S, Fafunso M, Fasanmade AA. 1994. Flavonoids from *Vernonia amygdalina* and their antioxidant activities. *J Agric Food Chem* 42, 2445-2448.
- Ischiropoulos H, al-Mehdi AB. 1995. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. *FEBS Lett* 364, 279-282.
- Jackson MJ, Papa S, Bolanos J, Bruckdorfer R, Carlsen H, Elliott RM, Flier J, Griffiths HR, Heales S, Holst B, Lorusso M, Lund E, Oivind Moskaug J, Moser U, di Paola M, Polidori MC, Signorile A, Stahl W, Vina-Ribes J, Astley SB. 2002. Antioxidants, reactive oxygen and nitrogen species, gene induction and mitochondrial function. *Mol Aspects Med* 23, 209-285.
- Jaimes EA, Sweeney C, Raj L. 2001. Effects of the reactive oxygen species hydrogen peroxide and hypochlorite on endothelial nitric oxide production. *Hypertension* 38, 877-883.
- Jones OTG. 1994. The regulation of superoxide production by the NADPH oxidase of neutrophils and other mammalian cells. *Bioessays* 16, 919-923.
- Jorgensen R. 1993. The origin of land plants: a union of alga and fungus advanced by flavonoids? *Biosystems* 31, 193-207.
- Joshi SS, Kuszynski CA, Bagchi M, Bagchi D. 2000. Chemopreventive effects of grape seed proanthocyanidin extract on Chang liver cells. *Toxicology* 155, 83-90.
- Joshi SS, Kuszynski CA, Benner EJ, Bagchi M, Bagchi D. 1999. Amelioration of the cytotoxic effects of chemotherapeutic agents by grape seed proanthocyanidin extract. *Antioxid Redox Signal* 1, 563-570.
- Julkunen-Titto R. 1985. Phenolic constituents in leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *J Agric Food Chem* 33, 213-217.



- Kennedy JA, Hayasaka Y, Vidal S, Waters EJ, Jones GP. 2001. Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *J Agric Food Chem* 49, 5348-5355.
- Kim HK, Son KH, Chang HW, Kang SS, Kim HP. 1999. Inhibition of rat adjuvant-induced arthritis by ginkgetin, a biflavone from *Ginkgo biloba* leaves. *Planta Med* 65, 465-467.
- Kinne RW, Brauer R, Stuhlmuller B, Palombo-Kinne E, Burmester GR. 2000. Macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2, 189-202.
- Kinsella JE, Frankel EN, German B, Kanner J. 1993. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technol*, 85-89.
- Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. 1994. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med* 16, 149-156.
- Koppenol WH. 1998. The chemistry of peroxynitrite, a biological toxin. *Química Nova* 23, 326-331.
- Kroon PA, Clifford MN, Crozier A, Day AJ, Donovan JL, Manach C, Williamson G. 2004. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *Am J Clin Nutr* 80, 15-21.
- Kubitzki K, Gottlieb OR. 1984. Phytochemical aspects of angiosperm origin and evolution. *Acta Botanica Neerlandica* 33, 457-468.
- Kundalic S, Kocic G, Cosic V, Jevtovic-Stoimenov V, Dordevic VB. 2003. The role of xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase in atherogenesis in patients with hyperlipidaemia. *Jugoslav Med Biochem* 22, 151-158.
- Lamaison JL, Carnat A. 1990. Teneur en principaux flavonoïdes des fleurs et des feuilles de *Crataegus monogyna* Jacq. et de *Crataegus laevigata* (Poiret) D.C. (Rosaceae). *Pharm Acta Helv* 65, 315-320.
- Lazarus SA, Adamson GE, Hammerstone JF, Schmitz HH. 1999. High-performance liquid chromatography/mass spectrometry analysis of proanthocyanidins in foods and beverages. *J Agric Food Chem* 47, 3693-3701.
- Li WG, Zhang XY, Wu YJ, Tian X. 2001. Anti-inflammatory effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds. *Acta Pharmacol Sin* 22, 1117-1120.
- Liang YC, Huang YT, Tsai SH, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK. 1999. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis* 20, 1945-1952.
- Lien EJ, Ren S, Bui HH, Wang R. 1999. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radic Biol Med* 26, 285-294.
- Lieutaghi P. 2002. *O Grande Livro das Ervas. Temas e Debates*, 487.
- Lin CM, Chen CT, Lee HH, Lin JK. 2002. Prevention of cellular ROS damage by isovitexin and related flavonoids. *Planta Med* 68, 365-367.
- Little CV, Parsons T. 2005. Herbal therapy for treating rheumatoid arthritis. *The Cochrane Library*.
- Llorach R, Gil-Izquierdo A, Ferreres F, Tomas-Barberan FA. 2003. HPLC-DAD-MS/MS ESI characterization of unusual highly glycosylated acylated flavonoids from cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) agroindustrial byproducts. *J Agric Food Chem* 51, 3895-3899.

- Lukner M. 1972. Secondary metabolism in plants and animals. Chapman & Hall. London
- Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB. 1970. The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag New York Inc.
- Maillard M-N, Giampaoli P, Cuvelier M-E. 1996. Atmospheric pressure chemical ionization (APCI) liquid chromatography-mass spectrometry: characterization of natural antioxidants. *Talanta* 43, 339-347.
- Maitra I, Marcocci L, Droy-Lefaix MT, Packer L. 1995. Peroxyl radical scavenging activity of Ginkgo biloba extract EGb 761. *Biochem Pharmacol* 49, 1649-1655.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79, 727-747.
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans.I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 81, 230S-242S.
- Manach C, Morand C, Crespy V, Demigne C, Texier O, Regeat F, Remesy C. 1998. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Lett* 426, 331-336.
- Mangiapanne H, Thomson J, Salter A, Brown S, Bell GD, White DA. 1992. The inhibition of the oxidation of low density lipoprotein by (+)-catechin, a naturally occurring flavonoid. *Biochem Pharmacol* 43, 445-450.
- Mann J, Davidson RS, Hobbs JB, Banthorpe DV, Harborne JB. 1998. Natural products: their chemistry and biological significance. Longman, 455.
- Markham KR. 1982. Techniques of flavonoid identification. Academic Press, 113.
- Markham KR. 1989. Flavones, flavonols and their glycosides, *Methods in Plant Biochemistry*. Academic Press, 197-235.
- Matsuda H, Ninomiya K, Shimoda H, Yoshikawa M. 2002. Hepatoprotective principles from the flowers of *Tilia argentea* (linden): structure requirements of tiliroside and mechanisms of action. *Bioorg Med Chem* 10, 707-712.
- McAnlis GT, McEneny J, Pearce J, Young IS. 1999. Absorption and antioxidant effects of quercetin from onions, in man. *Eur J Clin Nutr* 53, 92-96.
- McCord JM, Fridovich I. 1968. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem* 243, 5753-5760.
- McManus JP, Davis KG, Beart JE, Gaffney SH, Lilley TH, Haslam E. 1985. Polyphenol interactions. Part 1. Introduction; some observations on the reversible complexation of polyphenols with proteins and polysaccharides. *J Chem Soc Perkin Trans II*, 1429-1438.
- Michaelis J, Vissers MC, Winterbourn CC. 1992. Different effects of hypochlorous acid on human neutrophil metalloproteinases: activation of collagenase and inactivation of collagenase and gelatinase. *Arch Biochem Biophys* 292, 555-562.
- Middleton E, Kandaswami C. 1992. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochem Pharmacol* 43, 1167-1179.
- Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 52, 673-751.

- Min BS, Tomiyama M, Ma CM, Nakamura N, Hattori M. 2001a. Kaempferol acetylramnosides from the rhizome of *Dryopteris crassirhizoma* and their inhibitory effects on three different activities of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 49, 546-550.
- Min BS, Kim YH, Tomiyama M, Nakamura N, Miyashiro H, Otake T, Hattori M. 2001b. Inhibitory effects of Korean plants on HIV-1 activities. *Phytother Res* 15, 481-486.
- Min KR, Hwang BY, Lim HS, Kang BS, Oh GJ, Lee J, Kang SH, Lee KS, Ro JS, Kim Y. 1999. (-)-Epiatzelechin: cyclooxygenase-1 inhibitor and anti-inflammatory agent from aerial parts of *Celastrus orbiculatus*. *Planta Med* 65, 460-462.
- Morand C, Crespy V, Manach C, Besson C, Demigne C, Remesy C. 1998. Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties. *Am J Physiol* 275, R212-219.
- Moreland LW. 2003. Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action. *Arthritis Res Ther* 5, 54-67.
- Murakami S, Muramatsu M, Otomo S. 1992. Gastric H<sup>+</sup>, K(+)-ATPase inhibition by catechins. *J Pharm Pharmacol* 44, 926-928.
- Mutoh M, Takahashi M, Fukuda K, Komatsu H, Enya T, Matsushima-Hibiya Y, Mutoh H, Sugimura T, Wakabayashi K. 2000. Suppression by flavonoids of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells: structure-activity relationship. *Jpn J Cancer Res* 91, 686-691.
- Nagao A, Seki M, Kobayashi H. 1999. Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Biosci Biotechnol Biochem* 63, 1787-1790.
- Newall CA, Anderson LA, Phillipson JD. 1996. *Herbal Medicines - A Guide of Health-Care Professionals*. The Pharmaceutical Press. London, 21-22.
- Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 74, 418-425.
- Nishikimi M, Appaji N, Yagi K. 1972. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem Biophys Res Commun* 46, 849-854.
- Nutrient Data Laboratory, et al. *USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods* [documento electrónico]. Beltsville: U.S. Department of Agriculture, 2003. Disponível em {<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcom>}, consultado em Setembro de 2004.
- O'Leary KA, Day AJ, Needs PW, Mellon FA, O'Brien NM, Williamson G. 2003. Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an in vitro hepatic model: the role of human beta-glucuronidase, sulfotransferase, catechol-O-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism. *Biochem Pharmacol* 65, 479-491.
- Oh HI, Hoff JE, Armstrong GS, Haff LA. 1980. Hydrophobic interaction in tannin-protein complexes. *J Agric Food Chem* 28, 394-398.
- Oi VT, Glazer AN, Stryer L. 1982. Fluorescent phycobiliprotein conjugates for analyses of cells and molecules. *J Cell Biol* 93, 981-986.

- Okawa M, Kinjo J, Nohara T, Ono M. 2001. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medicinal plants. *Biol Pharm Bull* 24, 1202-1205.
- Oldenburg B, van Kats-Renaud H, Koningsberger JC, van Berge Henegouwen GP, van Asbeck BS. 2001. Chemiluminescence in inflammatory bowel disease patients: a parameter of inflammatory activity. *Clin Chim Acta* 310, 151-156.
- Olszanecki R, Gebaska A, Kozlovski VI, Gryglewski RJ. 2002. Flavonoids and nitric oxide synthase. *J Physiol Pharmacol* 53, 571-584.
- Olthof MR, Hollman PC, Vree TB, Katan MB. 2000. Bioavailabilities of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside do not differ in humans. *J Nutr* 130, 1200-1203.
- Pannala AS, Rice-Evans CA, Halliwell B, Singh S. 1997. Inhibition of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration by catechin polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun* 232, 164-168.
- Pannala AS, Chan TS, O'Brien PJ, Rice-Evans CA. 2001. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. *Biochem Biophys Res Commun* 282, 1161-1168.
- Pelzer LE, Guardia T, Osvaldo Juarez A, Guerreiro E. 1998. Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. *Farmaco* 53, 421-424.
- Peng ZF, Strack D, Baumert A, Subramaniam R, Goh NK, Chia TF, Tan SN, Chia LS. 2003. Antioxidant flavonoids from leaves of *Polygonum hydropiper* L. *Phytochemistry* 62, 219-228.
- Peppin GJ, Weiss SJ. 1986. Activation of the endogenous metalloproteinase, gelatinase, by triggered human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 4322-4326.
- Pietta PG. 2000. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 63, 1035-1042.
- Plumb GW, de Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C, Cheynier V, Williamson G. 1998. Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: effect of polymerisation, galloylation and glycosylation. *Free Radic Res* 29, 351-358.
- Porter LJ, Woodruffe J. 1984. Haemanalysis: the relative adstringency of proanthocyanidin polymers. *Phytochemistry* 23, 1255-1256.
- Porter LJ, Hrstich LN, Chan BC. 1986. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* 25, 223-230.
- Porter LJ, Newman RH, Foo LY, Wong H, Hemingway RW. 1982. Polymeric proanthocyanidins. <sup>13</sup>C N.M.R. Studies of procyanidins. *J C S Perkin I*, 1217-1221.
- Price ML, Butler LG. 1977. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of shorgum. *J Agric Food Chem* 25, 1268.
- Ramos VA, Ramos PA, Dominguez MC. 2000. Role of oxidative stress in the maintenance of inflammation in patients with juvenile rheumatoid arthritis. *J Pediatr (Rio J)* 76, 125-132.
- Rein D, Lotito S, Holt RR, Keen CL, Schmitz HH, Fraga CG. 2000. Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *J Nutr* 130, 2109S-2114S.
- Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. 2003. Flavonoids: promising anticancer agents. *Med Res Rev* 23, 519-534.

- Ribéreau-Gayon P. 1968. Les acides-phénols et leurs dérivés, In: Les composés phénoliques des végétaux, Paris: Dunod, 87-112.
- Rice-Evans C. 2001. Flavonoid antioxidants. *Curr Med Chem* 8, 797-807.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20, 933-956.
- Roberts CR, Roughley PJ, Mort JS. 1989. Degradation of human proteoglycan aggregate induced by hydrogen peroxide. Protein fragmentation, amino acid modification and hyaluronic acid cleavage. *Biochem J* 259, 805.
- Rohr GE, Riggio G, Meier B, Sticher O. 2000. Evaluation of different detection methods modes for the analysis of procyanidins in leaves and flowers of *Crataegus* spp. Part II. Liquid chromatography-mass spectrometry. *Phytochem Anal* 11, 113-120.
- Rosen H, Crowley JR, Heinecke JW. 2002. Human neutrophils use the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to chlorinate but not nitrate bacterial proteins during phagocytosis. *J Biol Chem* 277, 30463-30468.
- Saito M, Hosoyama H, Ariga T, Kataoka S, Yamaji N. 1998. Antiulcer activity of grape seed extract and procyanidins. *J. Agric. Food Chem.* 46, 1460-1464.
- Sala A, Recio MC, Schinella GR, Manez S, Giner RM, Cerda-Nicolas M, Rosi JL. 2003. Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. *Eur J Pharmacol* 461, 53-61.
- Salah N, Miller NJ, Paganga G, Tijburg L, Bolwell GP, Rice-Evans C. 1995. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch Biochem Biophys* 322, 339-346.
- Samuelsson G. 1999. Drugs of natural origin. *Apotekarsocieteten*, 551.
- Sanchez-Rabaneda F, Jauregui O, Casals I, Andres-Lacueva C, Izquierdo-Pulido M, Lamuela-Raventos RM. 2003. Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *J Mass Spectrom* 38, 35-42.
- Santos-Buelga C, Scalbert A. 2000. Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J Sci Food Agri* 80, 1094-1117.
- Scalbert A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30, 3875-3883.
- Scalbert A, Williamson G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 130, 2073S-2085S.
- Scalia S, Giuffreda L, Pallado P. 1999. Analytical and preparative supercritical fluid extraction of Chamomile flowers and its comparison with conventional methods. *J Pharm Biomed Anal* 21, 549-558.
- Schewe T, Kuhn H, Sies H. 2002. Flavonoids of cocoa inhibit recombinant human 5-lipoxygenase. *J Nutr* 132, 1825-1829.
- Schiller J, Fuchs B, Arnhold J, Arnold K. 2003. Contribution of reactive oxygen species to cartilage degradation in rheumatic diseases: molecular pathways, diagnosis and potential therapeutic strategies. *Curr Med Chem* 10, 2123-2145.
- Schofield P, Mbugua AN, Pell AN. 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology* 91, 21-40.

- Schraufstatter IU, Hinshaw DB, Hyslop PA, Spragg RG, Cochrane CG. 1986. Oxidant injury of cells. DNA strand-breaks activate polyadenosine diphosphate-ribose polymerase and lead to depletion of nicotinamide adenine dinucleotide. *J Clin Invest* 77, 1312-1320.
- Shabani F, McNeil J, Tippet L. 1998. The oxidative inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) by hypochlorous acid (HOCl) is suppressed by anti-rheumatic drugs. *Free Radic Res* 28, 115-123.
- Shahat AA, Cos P, De Bruyne T, Apers S, Hammouda FM, Ismail SI, Azzam S, Claeys M, Goovaerts E, Pieters L, Vanden Berghe D, Vlietinck AJ. 2002. Antiviral and antioxidant activity of flavonoids and proanthocyanidins from *Crataegus sinaica*. *Planta Med* 68, 539-541.
- Sharma HM, Hanna AN, Kauffman EM, Newman HA. 1995. Effect of herbal mixture student Rasayana on lipoxygenase activity and lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 18, 687-697.
- Shui G, Leong LP. 2004. Analysis of polyphenolic antioxidants in star fruit using liquid chromatography and mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1022, 67-75.
- Sichel G, Corsaro C, Scalia M, Di Bilio AJ, Bonomo RP. 1991. In vitro scavenger activity of some flavonoids and melanins against O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. *Free Radic Biol Med* 11, 1-8.
- Sigal LH, Ron Y. 1994. Immunology and inflammation. Basic mechanisms and clinical consequences. McGraw-Hill international editions
- Singh RK, Acharya SB, Bhattacharya SK. 2000. Pharmacological activity of *Elaeocarpus sphaericus*. *Phytother Res* 14, 36-39.
- Spencer JP, Chaudry F, Pannala AS, Srail SK, Debnam E, Rice-Evans C. 2000. Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. *Biochem Biophys Res Commun* 272, 236-241.
- Spickett CM, Jerlich A, Panasencko OM, Arnhold J, Pitt AR, Stelmaszynska T, Schaur RJ. 2000. The reactions of hypochlorous acid, the reactive oxygen species produced by myeloperoxidase, with lipids. *Acta Biochim Pol* 47, 889-899.
- Splettstoesser WD, Schuff-Werner P. 2002. Oxidative stress in phagocytes -"the enemy within". *Microsc Res Tech* 57, 441-455.
- Spragg RG, Hinshaw DB, Hyslop PA, Schraufstatter IU, Cochrane CG. 1985. Alterations in adenosine triphosphate and energy charge in cultured endothelial and PD388D1 cells after oxidant injury. *J Clin Invest* 76, 1471-1476.
- Sroka Z, Cisowski W. 2003. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food Chem Toxicol* 41, 753-758.
- Stahl W, van den Berg H, Arthur J, Bast A, Dainty J, Faulks RM, Gartner C, Haenen G, Hollman P, Holst B, Kelly FJ, Polidori MC, Rice-Evans C, Southon S, van Vliet T, Vina-Ribes J, Williamson G, Astley SB. 2002. Bioavailability and metabolism. *Mol Aspects Med* 23, 39-100.
- Steinberg D. 1992. Antioxidants in the prevention of human atherosclerosis. Summary of the proceedings of a National Heart, Lung, and Blood Institute Workshop: September 5-6, 1991, Bethesda, Maryland. *Circulation* 85, 2337-2344.

- Su BN, Cuendet M, Hawthorne ME, Kardono LB, Riswan S, Fong HH, Mehta RG, Pezzuto JM, Kinghorn AD. 2002. Constituents of the bark and twigs of *Artocarpus dadah* with cyclooxygenase inhibitory activity. *J Nat Prod* 65, 163-169.
- Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D. 1999. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 401, 79-82.
- Szabó C. 2003. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicol Lett* 140-141, 105-112.
- Tapiero H, Tew KD, Ba GN, Mathe G. 2002. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomed Pharmacother* 56, 200-207.
- Thomas EL. 1979. Myeloperoxidase, hydrogen peroxide, chloride anti-microbial system: nitrogen-chlorine derivatives of bacterial compounds in bactericidal action against *Escherichia coli*. *Infect Immun* 23, 522-531.
- Tixier JM, Godeau G, Robert AM, Hornebeck W. 1984. Evidence by in vivo and in vitro studies that binding of pycnogenols to elastin affects its rate of degradation by elastases. *Biochem Pharmacol* 33, 3933-3939.
- Tomas-Barberan FA, Gil MI, Cremin P, Waterhouse AL, Hess-Pierce B, Kader AA. 2001. HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums. *J Agric Food Chem* 49, 4748-4760.
- Treutter D, Feucht W. 1994. Determination of catechins and procyanidins in plant extracts - a comparison of methods. *Acta Horticulturae* 381, 789-795.
- Treutter D, Santos-Buelga C, Gutmann M, Kolodziej H. 1994. Identification of flavan-3-ols and procyanidins by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 667, 290-297.
- Tsuchiya H, Sato M, Kato H, Okubo T, Juneja LR, Kim M. 1997. Simultaneous determination of catechins in human saliva by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* 703, 253-258.
- Tuzlaci E, Tolon E. 2000. Turkish folk medicinal plants, part III: Sile (Istanbul). *Fitoterapia* 71, 673-685.
- Tuzlaci E, Aymaz PE. 2001. Turkish folk medicinal plants, Part IV: Gonen (Balikesir). *Fitoterapia* 72, 323-343.
- Valcic S, Timmermann BN, Alberts DS, Wachter GA, Krutzsch M, Wymer J, Guillen JM. 1996. Inhibitory effect of six green tea catechins and caffeine on the growth of four selected human tumor cell lines. *Anticancer Drugs* 7, 461-468.
- van Acker SA, van Balen GP, van den Berg DJ, Bast A, van der Vijgh WJ. 1998. Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochem Pharmacol* 56, 935-943.
- van Acker SA, van den Berg DJ, Tromp MN, Griffioen DH, van Bennekom WP, van der Vijgh WJ, Bast A. 1996. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 20, 331-342.
- van den Berg R, Haenen GRMM, van den Berg H, van den Vijgh W, Bast A. 2000. The predictive value of the antioxidant capacity of structurally related flavonoids using the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. *Food Chemistry* 70, 391-395.

- van Hoorn DE, Nijveldt RJ, van Leeuwen PA, Hofman Z, M'Rabet L, de Bont DB, van Norren K. 2002. Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids. *Eur J Pharmacol* 451, 111-118.
- van Sumere CF. 1989. Phenols and phenolic acids. In: PM Dey, JB Harbone (Eds.), *Methods in plant biochemistry*. Academic Press, London, 29-73.
- Veit M, Beckert C, Hohne C, Bauer K, Geiger H. 1995. Interspecific and intraspecific variation of phenolics in the genus *Equisetum* subgenus *Equisetum*. *Phytochemistry* 38, 881-891.
- Vennat B, Gross D, Pourrat H, Pourrat A, Bastide P, Bastide J. 1989. Anti-ulcer activity of procyanidins preparation of water-soluble procyanidin-cimetidine complexes. *Pharm Acta Helv* 64, 316-320.
- Vignais PV. 2002. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* 59, 1428-1459.
- Vinson JA, Dabbagh YA, Serry MM, Jang J. 1995. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an *in vitro* oxidation model for heart disease. *J Agric Food Chem* 43, 2800-2802.
- Virgili F, Kobuchi H, Packer L. 1998. Procyanidins extracted from *Pinus maritima* (Pycnogenol): scavengers of free radical species and modulators of nitrogen monoxide metabolism in activated murine RAW 264.7 macrophages. *Free Radic Biol Med* 24, 1120-1129.
- Vissers MC, Winterbourn CC. 1991. Oxidative damage to fibronectin I. The effects of the neutrophil myeloperoxidase system and HOCl. *Arch Biochem Biophys* 285, 53-59.
- Wagner H, Bladt S, Zgainski EM. 1984. *Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas*. Springer-Verlag, 320.
- Wahl SM, McCartney-Francis N, Chan J, Dionne R, Ta L, Orenstein JM. 2003. Nitric oxide in experimental joint inflammation. Benefit or detriment? *Cells Tissues Organs* 174, 26-33.
- Wakefield D, Kumar RK. 2001. Inflammation: chronic. *Encyclopedia of Life Sciences*.
- Wang JF, Schramm DD, Holt RR, Ensunsa JL, Fraga CG, Schmitz HH, Keen CL. 2000. A dose-response effect from chocolate consumption on plasma epicatechin and oxidative damage. *J Nutr* 130, 2115S-2119S.
- Waterman PG, Mole S. 1994. *Analysis of phenolic plant metabolites*. Blackwell Scientific Publications, 237.
- Wei BL, Lu CM, Tsao LT, Wang JP, Lin CN. 2001. In vitro anti-inflammatory effects of quercetin 3-O-methyl ether and other constituents from *Rhamnus* species. *Planta Med* 67, 745-747.
- Weinges K, Kaltenhauser W, Marx H-D, Nader E, Nader F, Perner J, Seiler D. 1968. Procyanidine aus fruchten. *Liebig's Annalen* 711, 184.
- Weiss SJ. 1989. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 320, 365-376.
- Weiss SJ, King GW, LoBuglio AF. 1977. Evidence for hydroxyl radical generation by human monocytes. *J Clin Invest* 60, 370-373.
- Whiteman M, Rose P, Siau JL, Halliwell B. 2003. Nitrite-mediated protection against hypochlorous acid-induced chondrocyte toxicity: a novel cytoprotective role of nitric oxide in the inflamed joint? *Arthritis Rheum* 48, 3140-3150.



- Williamson G, Plumb GW, Uda Y, Price KR, Rhodes MJ. 1996. Dietary quercetin glycosides: antioxidant activity and induction of the anticarcinogenic phase II marker enzyme quinone reductase in Hepalcl7 cells. *Carcinogenesis* 17, 2385-2387.
- Winterbourn CC. 1991. Factors that influence the deoxyribose oxidation assay for Fenton reaction products. *Free Radic Biol Med* 11, 353-360.
- Winterbourn CC. 2002. Biological reactivity and biomarkers of the neutrophil oxidant, hypochlorous acid. *Toxicology* 181-182, 223-227.
- Wollgast J, Pallaroni L, Agazzi ME, Anklam E. 2001. Analysis of procyanidins in chocolate by reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrospray ionisation mass spectrometric and tandem mass spectrometric detection. *J Chromatogr A* 926, 211-220.
- Woods AA, Davies MJ. 2003. Fragmentation of extracellular matrix by hypochlorous acid. *Biochem J* 376, 219-227.
- Yagi A, Kabash A, Mizuno K, Moustafa SM, Khalifa TI, Tsuji H. 2003. Radical scavenging glycoprotein inhibiting cyclooxygenase-2 and thromboxane A2 synthase from *Aloe vera* gel. *Planta Med* 69, 269-271.
- Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL. 2001. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr* 21, 381-406.
- Yokozawa T, Chen CP, Dong E, Tanaka T, Nonaka GI, Nishioka I. 1998. Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochem Pharmacol* 56, 213-222.
- Zhang K, Das NP. 1994. Inhibitory effects of plant polyphenols on rat liver glutathione S-transferases. *Biochem Pharmacol* 47, 2063-2068.
- Zhang R, Brennan ML, Shen Z, MacPherson JC, Schmitt D, Molenda CE, Hazen SL. 2002. Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. *J Biol Chem* 277, 46116-46122.
- Zhu BT, Ezell EL, Liehr JG. 1994. Catechol-O-methyltransferase-catalyzed rapid O-methylation of mutagenic flavonoids. Metabolic inactivation as a possible reason for their lack of carcinogenicity in vivo. *J Biol Chem* 269, 292-299.