

## PLANTAS AROMÁTICAS E MEDICINAIS COMO ANTIOXIDANTES NATURAIS: MÉTODOS DE ANÁLISE\*

M. G. Miguel

Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais, Universidade do Algarve, Campus de Gambelas, 8005-139 Faro Portugal

### OXIDAÇÃO E ANTIOXIDANTES: CONCEITOS GERAIS

No dia a dia, fala-se cada vez mais em antioxidantes e na sua importância não só na alimentação e saúde, como nas indústrias alimentar, farmacêutica, dos plásticos, nos óleos de lubrificação e em muitas outras áreas. A aplicação dos antioxidantes é tão vasta que é difícil encontrar uma definição para o termo antioxidante.

Na tecnologia alimentar, um antioxidante é definido como uma substância que, em pequenas quantidades, é capaz de impedir ou retardar significativamente a oxidação de materiais facilmente oxidáveis como, por exemplo, as gorduras (Becker *et al.*, 2004). Resumindo, um antioxidante é usado para inibir a peroxidação lipídica e, conseqüentemente, a rancidez dos alimentos. Contudo, não são apenas os lípidos as únicas macromoléculas que podem sofrer oxidação, outras moléculas ou substratos podem sofrer oxidação. Antioxidante pode, então, ser definido como sendo uma substância que, quando presente em concentrações pequenas comparativamente às do substrato oxidável, impede ou atrasa significativamente a oxidação do substrato. Esta definição é muito mais ampla porque inclui muitas macromoléculas vulneráveis à oxidação, como sejam os lípidos, os hidratos de carbono, as proteínas, o DNA, entre outras. A partir desta definição, em termos biológicos, qualquer molécula que seja capaz de retardar ou impedir a acção de agentes oxidantes pode ser considerada um antioxidante. Nestas condições, uma substância que seja capaz de inibir uma enzima oxidante específica, ou que reaja com agentes oxidantes antes que estes danifiquem outras moléculas, ou que forme complexos com iões metálicos perniciosos ou que seja mesmo capaz de reparar sistemas como as proteínas transportadoras de ferro, pode ser considerada um antioxidante (Halliwell e Gutteridge, 1999; MacDonald-Wicks *et al.*, 2006).

Não só é difícil definir o termo antioxidante, como também não existe um antioxidante universal. Por exemplo, o ascorbato é capaz de proteger os lípidos plasmáticos contra a peroxidação, provocada pelo fumo do tabaco, mas não é capaz de evitar os danos provocados nas proteínas. Por causa desta complexidade a definição de antioxidante tem de ser ampla (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Em conclusão, nenhuma das definições atrás referidas descreve o conceito de actividade antioxidante e não há nenhuma definição aceite internacionalmente para o termo antioxidante ou capacidade antioxidante (MacDonald-Wicks *et al.*, 2006).

Se há antioxidantes, então é porque há agentes oxidantes. O que é, então, um agente oxidante? Um agente oxidante é aquele que oxida outra substância química, isto é, que é capaz de lhe tirar electrões ou hidrogénio ou dar oxigénio. Ao contrário, um agente redutor é aquele que é capaz de reduzir outra substância química, isto é, que é capaz de lhe dar electrões, hidrogénio ou que é capaz de lhe remover oxigénio. Um antioxidante pode, então, ser definido também em termos mecanísticos. Nestas condições, um antioxidante é aquele que é capaz de dar hidrogénio ou electrões (Halliwell e Gutteridge, 1999; MacDonald-Wicks *et al.*, 2006).

Em termos termodinâmicos, a acção antioxidante depende do potencial de redução padrão. Este parâmetro determina a possibilidade que um determinado composto tem para poder reduzir quimicamente um outro composto. A Tabela 1 representa os valores de potenciais de redução padrão de algumas espécies biologicamente relevantes.

Um sistema com um potencial de redução padrão  $E^{\circ}$  é capaz de reduzir um sistema com um potencial de redução padrão  $E^{\circ}$  menos negativo, com um potencial de redução padrão de zero ou positivo.

---

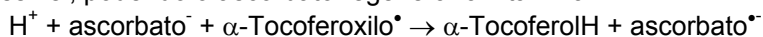
\* In: Figueiredo AC, JG Barroso, LG Pedro (Eds), 2007, *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais*. Curso Teórico-Prático, pp. 106-136, 3ª Ed., Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa, Portugal.

Tabela 1. Potenciais de redução de algumas espécies reactivas oxigenadas (ERO), a pH = 7.

ERO <sup>a</sup>	Par redox	E°/mV
Radical hidroxilo	•OH, H <sup>+</sup> /H <sub>2</sub> O	+2310
Radical alcoxilo alifático	•OR, H <sup>+</sup> /H <sub>2</sub> O	+1600
Radical peróxido alquílico	•OOR, H <sup>+</sup> /ROOH	+1000
Radical glutationilo	GS <sup>•</sup> /GS <sup>-</sup>	+920
Ácido gordo poli-insaturado	PUFA <sup>•</sup> , H <sup>+</sup> /PUFA-H	+600
Vitamina E	•OT, H <sup>+</sup> /TOH	+480
Vitamina C (Asc)	Asc <sup>••</sup> , H <sup>+</sup> /Asc	+282
Complexo ferro	Fe <sup>3+</sup> EDTA/Fe <sup>2+</sup> EDTA	+120
Superóxido	O <sub>2</sub> /O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	-330
Glutationo oxidado	RSSR/RSSR <sup>••</sup>	-1500
Radiação ionizante	H <sub>2</sub> O/e <sup>-</sup> <sub>aq</sub>	-2870

<sup>a</sup> As espécies reactivas oxigenadas estão listadas de modo que o potencial oxidante mais forte está no topo da tabela e o potencial redutor mais forte está em baixo. As espécies reactivas oxigenadas que estão no topo da tabela podem remover electrões de espécies reduzidas que se encontram no fundo da tabela. O balanço destas espécies na célula é muito importante na manutenção das boas condições celulares e, portanto, da saúde (Temple *et al.*, 2005).

Da Tabela 1 é possível, então, dizer que o sistema radical ascorbato/ascorbilo é capaz de reduzir o sistema radical tocoferoxilo/ $\alpha$ -tocoferol, por aquele possuir um potencial de redução menos positivo. Assim, a reacção do ascorbato (forma iónica a pH = 7,4) é termodinamicamente possível, podendo o ascorbato regenerar a vitamina E:



A acção oxidante depende também das constantes de velocidade. Por exemplo, o radical hidroxilo é um oxidante muito forte não só por causa do potencial de redução muito elevado (+2310 mV), como também pelas constantes de velocidade relativamente elevadas (Gardès-Albert e Jore, 2005). A Tabela 2 representa alguns valores de constantes de velocidade dos radicais hidroxilo com vários substratos biológicos.

Tabela 2. Constantes de velocidade dos radicais hidroxilo com vários substratos biológicos (Gardès-Albert e Jore, 2005).

Substrato biológico	Constante de velocidade k (HO <sup>•</sup> + substrato) mol <sup>-1</sup> .L.s <sup>-1</sup>
Guanina	9,2 x 10 <sup>9</sup>
Citosina	4,9 x 10 <sup>9</sup>
DNA	4,0 x 10 <sup>8</sup>
Triptofano (pH = 6,9)	1,4 x 10 <sup>10</sup>
Tirosina (pH = 7,8)	1,0 x 10 <sup>10</sup>
Cisteína (pH = 5,5)	4,0 x 10 <sup>10</sup>
Albumina	2,3 x 10 <sup>10</sup>
Hemoglobina	3,6 x 10 <sup>10</sup>
Linoleato	1,1 x 10 <sup>10</sup>
Ribose	1,6 x 10 <sup>9</sup>
Glucose	7,4 x 10 <sup>8</sup>
Ascorbato	1,1 x 10 <sup>10</sup>

O radical hidroxilo é capaz de reagir com as bases do DNA, com os aminoácidos constituintes das proteínas e ainda com os ácidos gordos poli-insaturados lipídicos.

A ordem de grandeza das constantes de velocidade (10<sup>10</sup> mol<sup>-1</sup>.L.s<sup>-1</sup>) é característica de reacções limitadas apenas pelo movimento das moléculas. Esta ordem de grandeza verificada para o radical hidroxilo com muitos substratos revela que há reacção logo que ocorra uma colisão entre as duas entidades, isto é, com uma energia de activação praticamente nula. Os radicais hidroxilo são de uma extrema reactividade, com uma difusão muito pequena, o que significa que reagem praticamente no local onde são produzidos ou apenas a algumas dezenas de nanómetros

de distância. Os radicais hidroxilo têm ainda uma meia-vida muito curta, não ultrapassando alguns microssegundos ( $10^{-6}$  s) (Gardès-Albert e Jore, 2005).

O radical hidroxilo combina-se rapidamente com qualquer molécula que se encontre próxima, contudo, como as reacções radiculares são em cadeia, os danos podem ir até locais relativamente longínquos comparativamente ao sítio de formação dos radicais hidroxilo (Deshpande *et al.*, 1995).

### ESPÉCIES REACTIVAS OXIGENADAS

O oxigénio pode actuar como um agente oxidante apesar da sua baixa reactividade devido aos *spin* paralelos dos electrões nas duas orbitais de valência  $\pi^*$  2p antiligantes (Fig. 1).

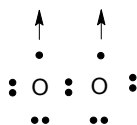


Fig. 1. Oxigénio no estado fundamental

Esta situação restringe a aceitação de electrões, ao mesmo tempo, de moléculas que vão ser oxidadas e que contêm pares de electrões de *spin* opostos. Isto vai de encontro ao princípio de Pauli que postula o seguinte: apenas os electrões com *spin* opostos (números quânticos diferentes) podem formar um par de electrões (Fig. 2).

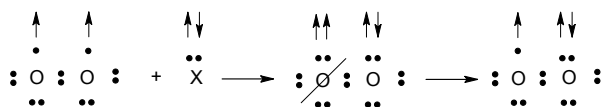


Fig. 2. Reacção do oxigénio com uma molécula X. O oxigénio no estado fundamental reage com uma molécula (X) que vai ser oxidada para originar o radical superóxido

Os produtos altamente reactivos resultantes da redução do oxigénio são conhecidos como espécies reactivas oxigenadas. Estas espécies incluem radicais livres: superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ), hidroperoxilo ( $HO_2^{\bullet}$ ), carbonato ( $CO_3^{\bullet-}$ ), peroxilo ( $RO_2^{\bullet}$ ), alcoxilo ( $RO^{\bullet}$ ), radical dióxido de carbono ( $CO_2^{\bullet-}$ ) e o oxigénio singleto ( $^1\Sigma_g^+O_2$ ) e moléculas não radiculares de reactividade elevada: peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), ácido hipocloroso ( $HOCl$ ), ácido hipobromoso ( $ROBr$ ), ozono ( $O_3$ ),  $^1O_2$  singleto ( $^1\Delta_gO_2$ ), peróxidos orgânicos ( $ROOH$ ), peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), peroxinitrato ( $O_2NOO^-$ ), ácido peroxinitroso ( $ONOOH$ ), peroxomonocarbonato ( $HOOCO_2^-$ ), nitrosoperoxycarbonato ( $ONOOCO_2^-$ ), entre outros. O peroxinitrito, o peroxinitrato e o ácido peroxinitroso apesar de terem sido considerados espécies reactivas oxigenadas são também classificados como espécies reactivas azotadas. No presente texto, serão considerados como espécies reactivas azotadas. Os ácidos hipocloroso e hipobromoso podem também ser classificados como espécies reactivas cloradas e brominadas, respectivamente (Halliwell, 2006).

A reactividade elevada daquelas espécies baseia-se na especificidade das suas configurações electrónicas. Deste modo, os radicais livres, contendo electrões desemparelhados nas orbitais de valência, facilmente formam pares com outros electrões de *spin* opostos (Fig. 3).

Na espécie reactiva oxigenada não radicalar  $^1O_2$  (oxigénio singleto), os electrões  $\pi^*$  (antiligantes) têm *spin* antiparalelos, tendo sido obtida a partir do  $O_2$  no estado fundamental após absorção de energia (Fig. 4).

Do exposto, na molécula de  $^1O_2$  não há restrições de *spin*, sendo a sua capacidade oxidante considerável (Edreva, 2005), como se verifica na Fig.5.

As espécies são facilmente interconvertíveis. Os metais de transição (Fe, Cu, Mn...) que têm electrões desemparelhados nas orbitais de valência aceitam e dão electrões simples, promovendo, assim, a transferência de um electrão para o  $O_2$  e a interconversão das espécies reactivas oxigenadas. A reacção de Fenton, um componente do ciclo de Haber-Weiss, consiste na conversão do peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) a  $HO^{\bullet}$  promovida pelo  $Fe^{2+}$  (Fig.6). Na reacção de

Fenton, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  sofre uma cisão heterolítica. Ao aceitar um electrão do  $\text{Fe}^{2+}$  parte do peróxido de hidrogénio é reduzida ao radical livre hidroxilo ( $\text{HO}^\bullet$ ), sendo o  $\text{Fe}^{2+}$  oxidado a  $\text{Fe}^{3+}$ . A outra parte do peróxido de hidrogénio é o anião hidroxilo  $\text{HO}^-$ . No passo seguinte  $\text{Fe}^{3+}$  é reduzido a  $\text{Fe}^{2+}$  por aceitar um electrão do radical livre superóxido  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e este é oxidado a  $\text{O}_2$ .

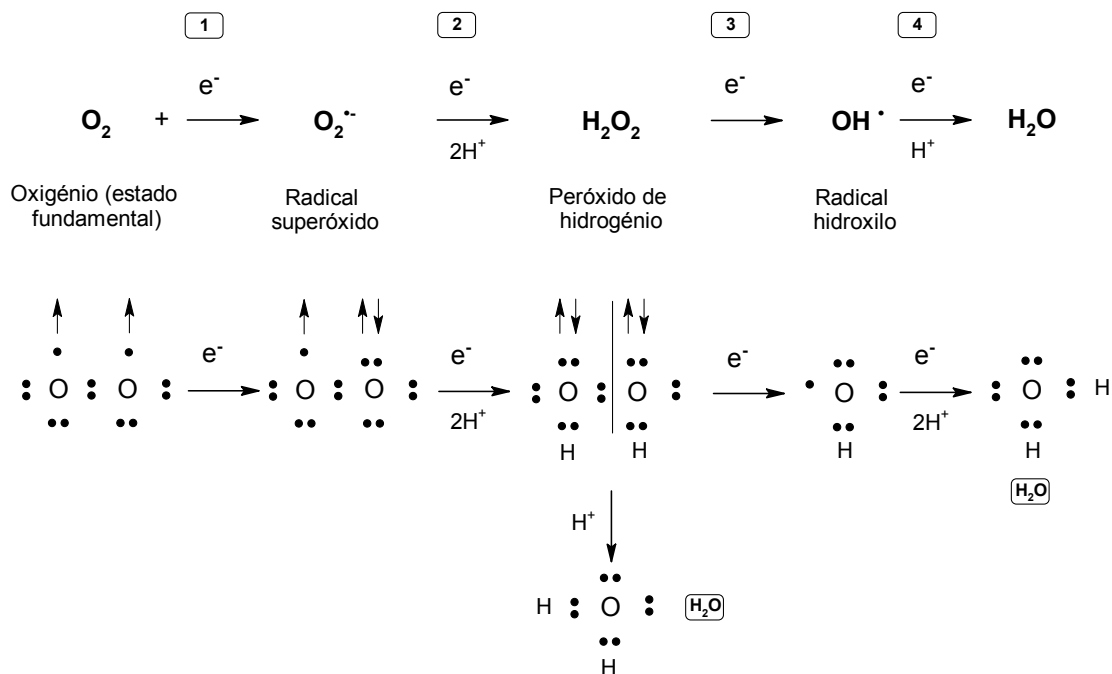


Fig. 3. Redução do oxigénio. A redução do oxigénio ( $\text{O}_2$ ) que ocorre em 4 passos consecutivos origina espécies reactivas oxigenadas e duas moléculas de água ( $\text{H}_2\text{O}$ ). No primeiro passo, forma-se o superóxido por aceitação de um electrão. Este passo é endotérmico e, portanto, é um passo limitante. Os passos seguintes são exotérmicos e, conseqüentemente, espontâneos. A protonação do superóxido origina o radical hidroperóxido ( $\text{HO}_2^\bullet$ ). No segundo passo, o superóxido é reduzido ao aceitar um electrão e protonado por  $2\text{H}^+$ , resultando daqui a formação de peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). No terceiro passo, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  sofre uma cisão heterolítica em que um átomo de oxigénio recebe os dois electrões da ligação covalente quebrada. Esta metade é protonada formando-se água ( $\text{H}_2\text{O}$ ). A outra metade recebe um electrão e é transformada em radical livre hidroxilo ( $\text{HO}^\bullet$ ). No quarto passo, o radical hidroxilo  $\text{HO}^\bullet$  recebe um electrão e, após protonação, origina uma molécula de água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) (Edreva, 2005).

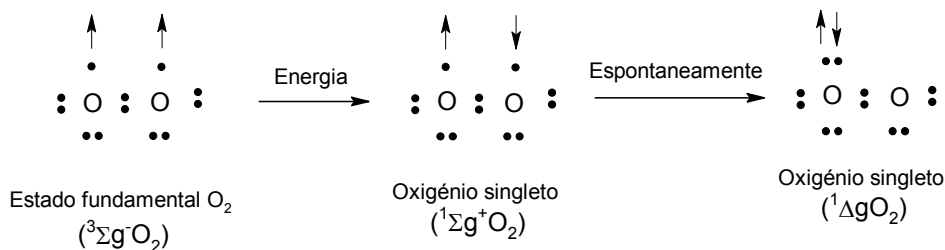


Fig. 4. Formação do oxigénio singlete.

O radical livre superóxido  $\text{O}_2^{\bullet-}$  reduz o  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  produzindo  $\text{O}_2$  ou sofre uma conversão em  $\text{H}_2\text{O}_2$  quer de uma forma espontânea ou por catálise enzimática. Este processo designa-se por dismutação.

A produção de radicais hidroxilo na reacção de Fenton é responsável por danos importantes nos sistemas biológicos porque este radical é um dos mais reactivos, atacando e danificando quase todas as moléculas dos seres vivos. A grande reactividade do radical hidroxilo parece dever-se à sua meia-vida muito curta nos sistemas biológicos, combinando-se rapidamente com

qualquer molécula que se encontre próxima, contudo, como as reacções radiculares são em cadeia, os danos podem ir até locais relativamente longínquos comparativamente ao sítio de formação dos radicais hidroxilo (Deshpande *et al.*, 1995). A Fig. 7 representa de uma forma sucinta as principais fontes das espécies reactivas oxigenadas.

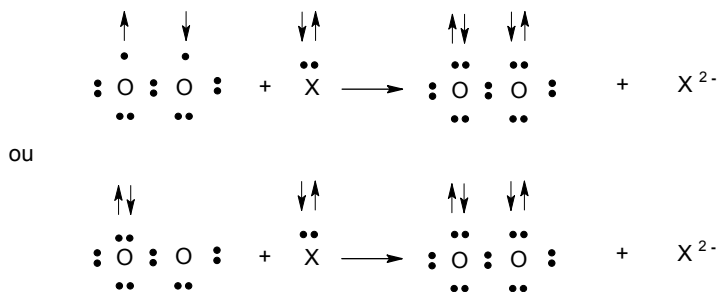


Fig. 5. Reactividade do oxigénio singleto.

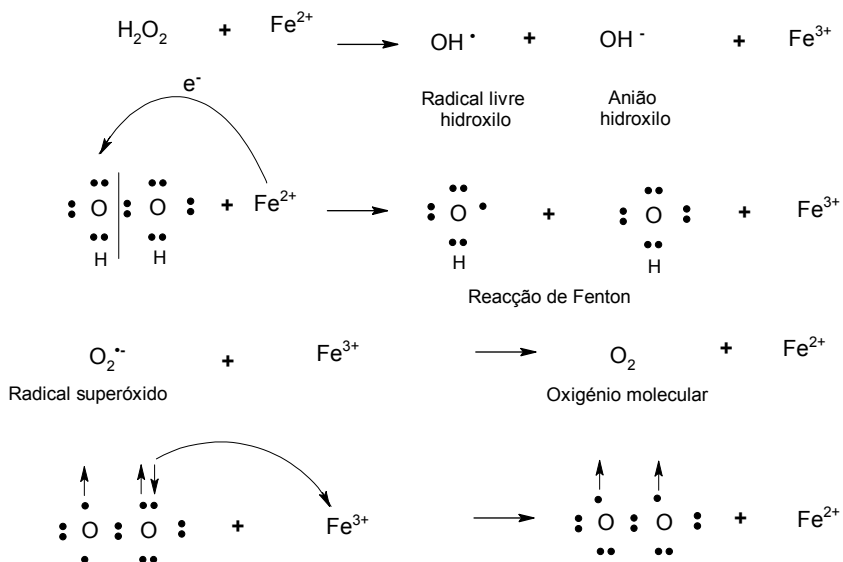
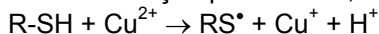


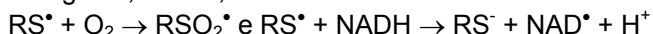
Fig. 6. Reacção de Fenton.

### OUTROS RADICAIS LIVRES

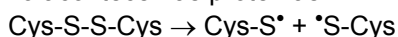
Para além das espécies reactivas oxigenadas radiculares, altamente oxidantes, existem outros radicais livres onde os electrões desemparelhados estão centrados noutros átomos, para além do oxigénio. Existem radicais livres em que o electrão desemparelhado está centrado em átomos como o enxofre, carbono ou azoto. Os compostos tiol (R-SH) oxidam na presença de iões de metais de transição para formar, entre outros produtos, radicais tiilo (RS<sup>•</sup>):



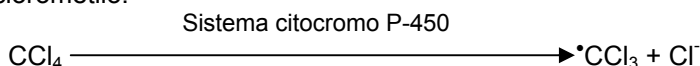
Estes radicais com enxofre são consideravelmente reactivos e podem facilmente combinar-se com oxigénio, NADH, ácido ascórbico:



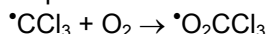
Os radicais tiilo podem também ser formados por cisão homolítica das ligações dissulfureto como acontece nas proteínas:



Os radicais livres, em que o electrão desemparelhado está no átomo de carbono, são formados em muitos sistemas biológicos durante a metabolização de alguns xenobióticos, como por exemplo, o tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) pelos microsomas hepáticos, originando o radical triclorometilo:



O radical triclorometilo muitas vezes reage rapidamente com oxigénio originando os correspondentes radicais peróxido:



Os radicais livres centrados no átomo de azoto, como, por exemplo, o radical fenildiazina ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{N}=\text{N}\cdot$ ), é formado durante a oxidação da fenilhidrazina nos eritrócitos (Deshpande *et al.*, 1995).

As células também são capazes de produzir espécies azotadas reactivas a partir da reacção do radical óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ) com  $\text{O}_2^{\cdot-}$  para formar peroxinitrilo ( $\text{ONOO}\cdot$ ) e o radical dióxido de azoto ( $\text{NO}_2\cdot$ ), que é capaz de nitrar aminoácidos aromáticos, provocar lesões no DNA e oxidar tióis (Temple *et al.* 2005).

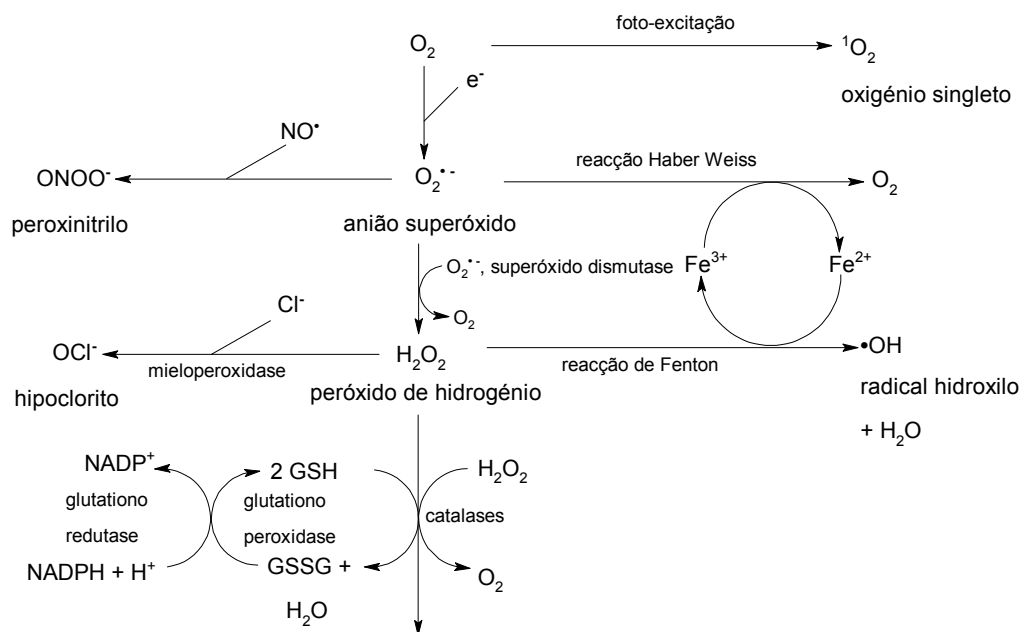


Fig. 7. Espécies reactivas oxigenadas formadas nas células. A mieloperoxidase é produzida pelos neutrófilos como um sistema de defesa celular contra os microrganismos (Temple *et al.*, 2005).

### ORIGEM E EFEITOS BIOLÓGICOS DOS RADICAIS LIVRES

As espécies reactivas oxigenadas produzidas pelas células eram tradicionalmente considerados produtos tóxicos do metabolismo, podendo alterar os constituintes lipídicos, proteicos ou o DNA das células. Para se protegerem dos efeitos perniciosos eventualmente provocados pelas espécies reactivas oxigenadas, as células possuem várias enzimas antioxidantes:

- superóxido dismutase (SOD), que reduz  $\text{O}_2^{\cdot-}$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$
- catalase e glutatióno peroxidase, que reduz  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ .

Para além destes sistemas enzimáticos existem outras moléculas não enzimáticas antioxidantes: vitaminas C, A e E, carotenóides, lipoato, tióis como o glutatióno (GSH), ubiquinona, tioredoxina (Trx), glumarredoxina, bilirrubina, hormonas sexuais (estrogénios), ácido úrico, melaninas e melatonina (Beaudeux e Vasson, 2005; Thérond e Bonnefont-Rousselot, 2005).

A alimentação tem um papel primordial para prevenir a produção de radicais livres. A prevenção nutricional do stress oxidante e das suas consequências implica a optimização dos aportes em antioxidantes na alimentação. Os benefícios de uma alimentação rica em frutos e legumes são reconhecidos e atribuídos ao teor relativamente elevado em antioxidantes (Prior, 2003). Deste modo, uma alimentação rica em antioxidantes, em micronutrientes (vitaminas C, E, carotenóides, selénio, zinco) e outros microconstituintes (fenóis, flavonóides, sulfuretos de alho,

entre outros) diminui o aparecimento de cancro, de doenças cardiovasculares e de doenças degenerativas (Hu, 2003; Riboli e Norat, 2003; Roussel *et al.*, 2005).

O stress oxidativo intracelular surge por haver um desequilíbrio no balanço entre a produção das espécies reactivas oxigenadas e a capacidade antioxidante da célula para impedir as lesões oxidativas. Uma produção excessiva de espécies reactivas oxigenadas e/ou uma deficiência nos sistemas protectores antioxidantes são responsáveis pelos mecanismos fisiopatológicos de várias doenças (arterosclerose, doenças neurodegenerativas...) (Beaudeux e Vasson, 2005).

A produção das espécies reactivas oxigenadas nas células dos mamíferos é, sobretudo, de origem enzimática que estão presentes em diversos locais da célula: NAD(P)H oxidase membranar, complexo enzimático mitocondrial da cadeia respiratória, xantina oxidase, enzimas da via do ácido araquidónico (lipoxigenases, cicloxigenases), enzimas do retículo endoplasmático (citocromo P<sub>450</sub>), mieloperoxidase dos lisossomas, glicolato oxidase, urato oxidase, hidroxiácido oxidase, entre outras enzimas presentes nos peroxissomas e citocromo oxidases presentes no núcleo (Beaudeux e Vasson, 2005). Existem outros componentes biológicos capazes de produzir espécies reactivas oxigenadas como, por exemplo, o superóxido: as catecolaminas e o ácido ascórbico na presença de metais de transição em quantidades vestigiais, a hemoglobina, a mioglobina, as flavinas (FADH<sub>2</sub>, FMNH<sub>2</sub>), os tióis, as semiquinonas, o Fe<sup>2+</sup> e o Cu<sup>2+</sup> (Schröder e Krutmann, 2005).

A produção de espécies reactivas oxigenadas não tem só uma origem metabólica. As radiações UV, IV, a radiação ionizante, a poluição atmosférica, a nutrição, entre outros factores são igualmente responsáveis pelo stress oxidativo (Nohl *et al.*, 2005).

As espécies reactivas oxigenadas para além de serem produtos potencialmente tóxicos do metabolismo são igualmente moléculas essenciais à regulação celular. O receptor da insulina é um exemplo de receptor activado pelas espécies reactivas oxigenadas. A actividade deste receptor requer a sua fosforilação, que pode ser assegurada, na ausência da insulina, por concentrações relativamente elevadas de espécies reactivas oxigenadas (>0,1 mM). Concentrações mais baixas (<0,1 mM) não são suficientes para desencadear uma fosforilação do receptor na ausência da insulina, mas amplificam a resposta da célula a uma concentração baixa da insulina (100 nM). Estes dados parecem mostrar que o sinal redox celular pode assegurar uma função de co-regulador da activação do receptor da insulina em condições fisiológicas (Beaudeux e Vasson, 2005).

Os radicais livres têm uma reactividade com uma meia-vida muito curta e um raio de acção também muito baixo. No entanto, quando estas moléculas reagem com compostos não radiculares, formam-se radicais novos que, por sua vez, também reagem. Daqui resulta uma reacção em cadeia provocando efeitos biológicos longe do local onde se iniciou a primeira reacção. Um exemplo, é a peroxidação lipídica em que os radicais secundários e os produtos de degradação podem provocar efeitos nocivos muito longe do local inicial de produção do radical livre. Os compostos carbonilo de baixo peso molecular (formaldeído, acetaldeído, acroleína, malonaldeído, glioxal e metilo de glioxal) são compostos resultantes da peroxidação lipídica e que são bastante reactivos capazes de formar aductos rapidamente com biomoléculas (proteínas, fosfolípidos e DNA) (Shibamoto, 2006).

A peroxidação lipídica está associada a várias doenças: cancro, mutagénese, doença de Alzheimer, artrite, inflamação, diabetes, arterosclerose, SIDA, entre outras. O próprio processo de envelhecimento parece dever-se, em parte, também à peroxidação lipídica (Shibamoto, 2006).

Os diferentes modos dos radicais livres provocarem danos celulares incluem:

- ligação covalente dos radicais livres a enzimas membranares e/ou receptores, modificando assim as actividades dos componentes das membranas;
- ligação covalente dos radicais livres aos componentes da membrana provocando alterações da estrutura celular e afectando a função da membrana;
- distúrbio dos processos de transporte através da ligação covalente, oxidação dos grupos tiol ou alteração da relação ácidos gordos poli-insaturados/proteína;
- iniciação da peroxidação lipídica dos ácidos gordos poli-insaturados com efeitos directos na estrutura membranar alterando a sua permeabilidade, modificando as interacções lípido-proteína e formação de produtos de degradação bioactivos que podem igualmente

interferir na fluidez, estrutura e na função da membrana (Deshpande *et al.*, 1995; Boonstra e Post, 2004).

Todos os componentes celulares como sejam os lípidos, as proteínas, os ácidos nucleicos e os hidratos de carbono podem ser danificados por terem reagido com espécies reactivas oxigenadas, originando danos metabólicos e celulares (Zwart *et al.* 1999; Boonstra e Post, 2004). As reacções dos radicais livres com as várias macromoléculas podem provocar diversos danos (Fig. 8).

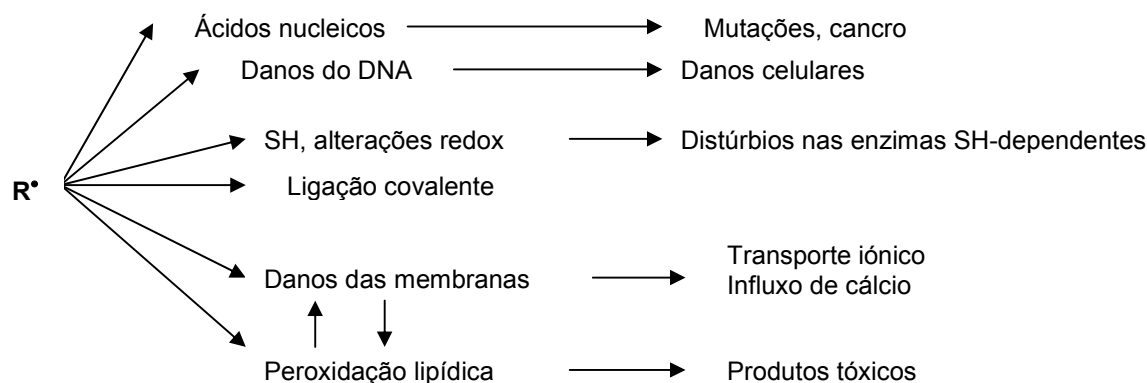


Fig. 8. Radicais livres e danos celulares (adaptado de Deshpande *et al.*, 1995).

#### DETERMINAÇÃO *IN VITRO* DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE

São diversos os métodos analíticos e os substratos utilizados para a determinação da actividade antioxidante de uma amostra. Por vezes, os valores obtidos por diferentes métodos não são comparáveis e tal pode dever-se a vários factores: a) estrutura física do sistema, b) natureza do substrato para a oxidação, c) presença de componentes que interactivam, d) modo de indução da oxidação, e) método analítico para medir a oxidação (Frankel e Meyer, 2000; Becker *et al.*, 2004).

Para os alimentos, alguns autores propõem um esquema que inclui três passos principais na avaliação antioxidante das amostras: quantificação e identificação dos compostos fenólicos nos produtos alimentares ou nos de dieta, quantificação da capacidade de captar radicais dos diferentes antioxidantes usando mais do que um método e considerando o efeito do solvente no mecanismo do antioxidante, e avaliação da capacidade do antioxidante para inibir ou parar a oxidação lipídica em sistemas modelo adequados (Becker *et al.*, 2004).

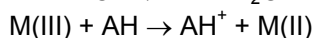
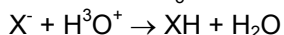
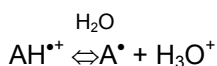
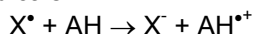
Os antioxidantes podem desactivar os radicais por dois mecanismos principais: Por transferência de átomos de hidrogénio e/ou por transferência de um electrão. Ambos os mecanismos podem ocorrer em simultâneo e o mecanismo dominante é determinado pela estrutura do antioxidante e pelas suas propriedades, solubilidade e coeficiente de partilha e pelo sistema de solventes. A energia de dissociação da ligação e o potencial de ionização são dois factores que determinam o mecanismo e a eficácia dos antioxidantes (Wright *et al.*, 2001; Prior *et al.*, 2005).

No método que se baseia na transferência de átomos de hidrogénio, o antioxidante captura o radical, dando-lhe um átomo de hidrogénio:  $X^{\bullet} + AH \rightarrow XH + A^{\bullet}$ . A reactividade relativa deste mecanismo é determinada pela energia de dissociação da ligação do hidrogénio do antioxidante, dominando para compostos com um intervalo de energia de dissociação de  $\approx -10$  kcal/mol e um potencial de ionização inferior a  $-36$  kcal/mol. Este mecanismo é independente do pH e do solvente, sendo geralmente um processo rápido, e completo em poucos segundos ou minutos. A presença de agentes redutores, incluindo metais, é um problema para este método porque pode originar uma reactividade aparentemente elevada e que está errada (Prior *et al.*, 2005).

No método que se baseia na transferência de um electrão verifica-se que há capacidade para transferir um electrão para reduzir qualquer composto, incluindo metais, grupos carbonilo e



radicais:



Neste método, depois da transferência do electrão com a consequente formação de um catião radical  $AH^{\bullet+}$ , há rapidamente uma desprotonação reversível. Em praticamente todas as amostras ocorrem os dois mecanismos: o que se baseia na transferência de um hidrogénio e o que se baseia na transferência de um electrão, sendo o balanço determinado pela estrutura do antioxidante e pelo pH. A reactividade relativa do método em que se verifica uma transferência de electrão baseia-se na desprotonação e no potencial de ionização do grupo funcional reactivo (Lemańska *et al.*, 2001; Wright *et al.*, 2001; Prior *et al.*, 2005). Os métodos em que há transferência de electrão dependem do pH do sistema. Geralmente, verifica-se uma diminuição do potencial de ionização quando há um aumento dos valores de pH, o que reflecte uma maior capacidade de transferência de electrões com a desprotonação. O mecanismo antioxidante é predominantemente do tipo de transferência de electrão se os valores do potencial de ionização são superiores a -45 kcal/mol.

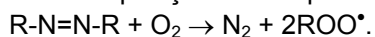
As reacções que se baseiam na transferência de electrões são geralmente lentas e os cálculos não são baseados em termos cinéticos. Quando  $AH^{\bullet+}$  tem uma vida relativamente elevada, podem ocorrer as reacções secundárias que interfere com o ensaio, podendo levar mesmo a toxicidade ou mutagenicidade *in vivo* (Sartor *et al.*, 1999).

### Métodos que se baseiam na transferência de um hidrogénio

Existem diversos métodos que se baseiam na transferência de hidrogénio, mas apenas irão ser referidos dois no presente trabalho: método “oxygen radical absorbance capacity” (ORAC) e o método “total radical-trapping antioxidant parameter” (TRAP). Em ambos os casos, há um gerador de radicais que, por acção do calor se decompõe originando um fluxo constante de radicais peróxido. Estes actuam sobre um substrato. O antioxidante adicionado ao sistema vai competir com o substrato para os radicais e inibir ou retardar a oxidação do substrato. Nos métodos referidos no presente trabalho há quatro aspectos comuns: a) a presença do gerador de radicais, geralmente AAPH; b) um substrato para monitorizar (UV ou fluorescência) o progresso da reacção; c) a presença do antioxidante; d) recolha dos parâmetros cinéticos reaccionais para quantificação da actividade antioxidante. A quantificação da actividade antioxidante, nos dois casos, é diferente: o método ORAC utiliza a área abaixo da curva cinética (AUC), ao passo que o método TRAP utiliza o tempo *lag* (Huang *et al.*, 2005).

#### “Oxygen radical absorbance capacity” (ORAC)

Neste ensaio mede-se a capacidade antioxidante ou a capacidade de absorvância dos radicais peróxido presentes nas amostras. O radical peróxido reage com um composto fluorescente para formar um produto não fluorescente, que é passível de ser quantificado por fluorescência. Neste método há uma fonte controlável que produz os radicais peróxido, geralmente, a termod decomposição do composto  $\alpha, \alpha'$ -azodiisobutiramidina, 2HCl (AAPH):



Uma substância fluorescente, como a B-ficoeritrina (B-PE), fluoresceína ou diclorofluoresceína oxidam na presença dos radicais peróxido, formando-se compostos não fluorescentes. Os produtos de oxidação da fluoresceína induzidos pelos radicais peróxido podem ser identificados por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS). Outra forma mais simples de quantificar a actividade antioxidante consiste na utilização de um espectrofluorímetro, medindo a diminuição da fluorescência nos comprimentos de onda de excitação e de emissão de 485 nm e 528 nm, respectivamente:

$ROO^\bullet + \text{substância fluorescente (fluoresceína)} \rightarrow ROOH + \text{fluoresceína oxidada (sem fluorescência)}$ .

A reacção é seguida durante intervalos de tempo regulares (1 minuto) até 30 minutos ou mais de reacção. A presença de um antioxidante impede a perda de fluorescência da fluoresceína, uma vez que esta não é oxidada pelos radicais peróxilo.

Este método inicialmente não podia ser usado com antioxidantes lipofílicos, que são particularmente importantes no impedimento da peroxidação lipídica. Deste modo, o método ORAC teve de ser adaptado de modo a poder ser usado quer por antioxidantes hidrofílicos, quer lipofílicos. Para tal, utilizam-se soluções de 50 % acetona/50 % água (v/v), contendo 7 % de  $\beta$ -ciclodextrinas metiladas, para solubilizar os antioxidantes. A utilização das ciclodextrinas permite aumentar a solubilidade dos antioxidantes lipofílicos (vitamina E ou antioxidantes fenólicos lipofílicos) em soluções aquosas (Huang *et al.*, 2002). Outros autores referem a utilização de outros geradores de radicais peróxilo: BO-DIPY 665/676 [4,4-difluoro-3,5-bis(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno] ou AMVN [2,2'-azobis(2,4-dimetilvaleronitrilo)]. As reacções podem ocorrer em sistemas com lipossomas, ou em sistemas constituídos por misturas de octano e butironitrilo. Com estes compostos foi possível determinar a capacidade antioxidante de alguns carotenóides (Naguib, 2000), apesar de ser cerca de 100 vezes menos sensível comparativamente aos restantes geradores de radicais peróxilo (MacDonald-Wicks *et al.*, 2006).

O método em si, consiste em adicionar às amostras, aos controlos e aos padrões (Trolox em diferentes concentrações) uma solução de fluoresceína e por a incubar, durante um intervalo de tempo determinado, a 37 °C, e adicionar o gerador de radicais peróxilo (AAPH). A intensidade da fluorescência é seguida durante 30 minutos ou mais a 37 °C e a pH = 7,4. À medida que a reacção progride, a fluoresceína é consumida e a intensidade da fluorescência do substrato vai diminuindo. Na presença do antioxidante, a fluorescência não ocorre ou, então, acontece mas de uma forma mais lenta. Com estes dados constrói-se, no final, uma curva da intensidade da fluorescência em função do tempo. A actividade antioxidante pode ser calculada do seguinte modo:

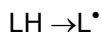
- Cálculo das áreas sob as curvas atrás obtidas (AUC) do branco e da amostra para calcular AUC real ( $AUC_{amostra} - AUC_{branco}$ );
- Gráfico padrão de AUC em função da concentração do Trolox (linear ou quadrática entre 0,78 e 12,6  $\mu$ M Trolox)
- Cálculo dos equivalentes Trolox da amostra usando a curva padrão referida em b).

Trolox é um composto hidrossolúvel análogo da vitamina E.

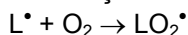
#### “Total radical-trapping antioxidant parameter” (TRAP)

“Total radical-trapping antioxidant parameter” (TRAP) foi inicialmente usado para avaliar a capacidade antioxidante do plasma. O método é baseado nas propriedades de compostos azo-, como o ABAP de, ao decomporem-se, produzirem um fluxo de radicais peróxilo, a uma temperatura determinada. Estes radicais peróxilo têm energia suficiente para retirar um hidrogénio a um substrato lipídico, iniciando-se, assim, a peroxidação lipídica:

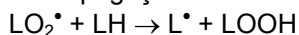
- Iniciação (formação do radical livre)



- Reacção do radical com o oxigénio



- Propagação



O consumo do oxigénio dissolvido é o marcador da taxa da peroxidação lipídica e, portanto, uma medição indirecta da capacidade do plasma para inibir a reacção. A fase *lag* induzida pelo plasma no consumo de oxigénio é comparada com a fase *lag* induzida por uma quantidade conhecida de Trolox (análogo hidrossolúvel do  $\alpha$ -tocoferol). Neste ensaio, o TRAP é expresso em micromoles de radicais peróxilo capturados por um litro de plasma (Ghiselli *et al.*, 2000).

Em vez do plasma, pode utilizar-se um substrato externo: R-PE, uma proteína extraída de *Corallina officinalis* (Ghiselli *et al.*, 2000).

Neste método utiliza-se como geradores de radicais peróxilo os compostos AAPH ou ABAP (2,2'-diazobis-(2-amidinopropano). Como composto passível de sofrer oxidação utiliza-se o R-PE

e que é monitorizado fluorimetricamente ( $\lambda_{exc.} = 495 \text{ nm}$  e  $\lambda_{emissão} = 575 \text{ nm}$ ), ou o ABTS [ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolona-6-sulfónico)] que é monitorizado lendo a variação da absorvância (Bartosz *et al.*, 1998; Prior *et al.*, 2005). Outro substrato que pode ser utilizado é o AMVN, útil para geradores de radicais peróxido lipossolúveis. Também pode ser o diacetato de diclorofluoresceína, que na presença de AAPH, é oxidado e hidrolisado para produzir diclorofluoresceína, que é fluorescente. Se há um aumento da fluorescência significa que está a ocorrer oxidação (Huang *et al.*, 2005).

A capacidade antioxidante de uma amostra é expressa em equivalentes Trolox (micromoles de radicais peróxido capturados por litro de solução), através da seguinte equação:

$$C_{\text{Trolox}}/T_{\text{Trolox}} = X/T_{\text{amostra}}$$

Esta equação é obtida a partir de um gráfico que representa a diminuição da fluorescência, por exemplo, do R-PE, em função do tempo, na presença da amostra e, posteriormente, do Trolox. Assim,  $C_{\text{Trolox}}$  é a concentração do Trolox;  $T_{\text{Trolox}}$  é a fase *lag* induzida pelo Trolox e  $T_{\text{amostra}}$  é a fase *lag* induzida pela amostra. Os antioxidantes reagem com os radicais peróxido 100 vezes mais rapidamente quando comparado com o R-PE. No final da fase *lag*, quando todo o antioxidante tenha sido completamente usado, R-PE começa a ser oxidado que se detecta pela perda das suas propriedades fluorescentes de uma forma linear. Quando a fluorescência do R-PE é cerca de metade do valor inicial adiciona-se o Trolox e segue-se a reacção até que a diminuição da fluorescência volte a ser linear. A fase *lag* é calculada extrapolando o declive da oxidação máxima do R-PE antes e depois da adição do Trolox, até à intersecção dos declives das fases de indução da amostra e do Trolox. X é a capacidade antioxidante da amostra. X é depois multiplicado por 2 (factor estequiométrico do Trolox: este reage com duas moléculas de peróxido) e pelo factor de diluição da amostra para dar o valor TRAP em  $\mu\text{mol/l}$ . (Ghiselli *et al.*, 1995).

Este método foi introduzido para medir o estágio antioxidante total do plasma humano. Vários autores têm utilizado este método para analisar a influência do consumo do chá, do vinho tinto e do tomate na actividade antioxidante do plasma humano, seguindo a cinética de oxidação através da diminuição da fluorescência do R-PE num determinado intervalo de tempo (90 minutos) (Serafini *et al.*, 1996, 1998; Pellegrini *et al.*, 1999). Este método também tem sido utilizado para a avaliação *in vitro* da actividade antioxidante de bebidas e alimentos (Serafini *et al.*, 1997; Ghiselli *et al.*, 1998; Pietta *et al.*, 1998).

### Métodos que se baseiam na transferência de um electrão

Os métodos que se baseiam neste princípio são os mais populares. Nestes métodos há um oxidante (substrato) que retira um electrão do antioxidante, provocando uma alteração da cor do substrato. A tonalidade da solução é proporcional à capacidade antioxidante. A variação da absorvância em função da concentração do antioxidante, origina uma recta, cujo declive reflecte a capacidade redutora (expressa como equivalentes Trolox ou equivalentes de ácido gálico).

Neste grupo destacam-se os seguintes métodos: quantificação dos fenóis totais, o método TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), o método FRAP (ferric ion reducing antioxidant power), o método DMPD (*N,N*-dimethyl-*p*-phenylenediamine), o método da capacidade de redução do Cu(II) e o método do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) (MacDonald-Wicks *et al.*, 2006).

### Quantificação dos fenóis totais pelo reagente Folin-Ciocalteu

Geralmente é necessário extrair os compostos polifenólicos quando se quer determinar a actividade. Muitas vezes, esta extracção faz-se utilizando soluções metanólicas ou etanólicas contendo alguma água. Uma identificação dos compostos fenólicos nos alimentos pode facilitar a quantificação da capacidade antioxidante ou a discussão da potencial actividade antioxidante. Geralmente para este procedimento recorre-se à cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a uma coluna de fase reversa e com um detector ultra-violeta – visível (Merken e Beecher, 2000; Mattila e Kumpulainen, 2002). Contudo, estes métodos, muitas vezes, só permitem quantificar compostos fenólicos simples, estando ainda apenas disponíveis, como padrões, compostos de baixa massa molecular (Becker *et al.*, 2004).

A quantificação dos fenóis totais é geralmente feita pelo método de Folin-Ciocalteu que se baseia no número de grupos fenólicos ou noutros potenciais grupos oxidáveis presentes nos compostos da amostra. A natureza química do reagente de Folin-Ciocalteu não é conhecida exactamente, mas crê-se que contenha hetero-polifosforungstato-molibdatos. Sequências de reacções de redução reversíveis envolvendo um ou dois electrões, originam espécies azuis, muito possivelmente  $(\text{FenóisMoW}_{11}\text{O}_{40})^{-4}$ . Crê-se que o Mo é mais fácil de ser reduzido no complexo e as reacções de transferência do electrão ocorrem entre os agentes redutores e o Mo(VI):  $\text{Mo(VI)} + e^- \rightarrow \text{Mo(V)}$ . Os compostos fenólicos só reagem com o reagente de Folin-Ciocalteu em meio básico. Esta é a razão pela qual é necessário adicionar carbonato de sódio para que a solução fique com um pH próximo de 10. A este pH forma-se o anião fenolato a partir do composto fenólico, por perda do protão. O ião fenolato é capaz de reduzir o reagente de Folin-Ciocalteu, formando-se compostos azuis. Estes são independentes da estrutura dos compostos fenólicos (Huang *et al.*, 2005).

Vários são os padrões que podem servir de referência para comparar com as amostras: ácido gálgico, catequina, ácido tânico, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido vanílico, entre outros (Vinson *et al.*, 2001; Katsube *et al.*, 2003; Maranz *et al.*, 2003; Mingfu *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2003; Prior *et al.*, 2005).

#### “Trolox equivalent antioxidant capacity” (TEAC) ou método ABTS

Neste método utiliza-se um oxidante que é o  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ , que se forma por oxidação do ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico ( $\text{ABTS}^{2-}$ ) por acção do persulfato de potássio (Re *et al.*, 1999). Para obter o  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  que é estável, dissolve-se 7 mmol de amónio de ABTS em água e adiciona-se 2,45 mmol de persulfato de potássio. Esta mistura permanece durante 12-16 horas até ficar com uma coloração azul escura. Esta solução é diluída com etanol ou tampão (pH = 7,4) até que a absorvância atinja 0,7 num comprimento de onda de 734 nm. A um mililitro da solução resultante adiciona-se 10  $\mu\text{l}$  da amostra. A absorvância é lida a 30 °C, ao fim de 1, 4 e 6 minutos. Faz-se um gráfico da variação da absorvância em função da concentração do antioxidante. Deve obter-se uma recta. A concentração de antioxidante que dê a mesma variação percentual de absorvância do  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  que 1 mM de Trolox é o TEAC.

$\text{ABTS}^{\bullet+}$  pode ser formado usando o persulfato de amónio que oxida o  $\text{ABTS}^{2-}$ , mas existem outras formas, igualmente químicas (ex: dióxido de manganésio, ABAP), mas também enzimáticas (ex: metmioglobina, hemoglobina ou peroxidase de rábano-bastardo). A forma química de produção ou requer muito tempo (16 horas para o persulfato de potássio) ou temperaturas elevadas (60 °C para o ABAP) (Prior *et al.*, 2005).

Os valores TEAC para antioxidantes puros não mostram uma relação clara entre os valores TEAC e o número de electrões que um antioxidante pode dar. Por exemplo, enquanto os valores TEAC para o ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol, glutationo, e ácido úrico são 1,05, 0,97, 1,28 e 1,01, respectivamente; para o ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, os valores TEAC são 1,90 e 2,00, respectivamente. Nestes últimos compostos estão, portanto envolvidos dois electrões. Contudo, o ácido cafeico, com uma estrutura química muito semelhante ao do ácido ferúlico, tem um valor TEAC de 1,00. A estrutura química muito semelhante do campferol e da quercetina é outro bom exemplo da diferença entre os valores de TEAC que eles apresentam. Para o primeiro o valor é de 1,00, enquanto para o segundo o valor é de 3,00 (Huang *et al.*, 2005).

Este método permite que a capacidade antioxidante das amostras possa ser determinada quer em fases aquosas quer em fases lipídicas (MacDonald-Wicks *et al.*, 2006).

Termodinamicamente, um composto é capaz de reduzir o  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  se tiver um potencial redox inferior ao do  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  (0,68 V). Muitos polifenóis têm potenciais redoxes mais baixos e, portanto, são capazes de reagir com o  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  (Prior *et al.*, 2005).

#### Método DMPD (N,N-dimethyl-p-phenylenediamine)

É um método semelhante ao do TEAC, só que o  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  é substituído pelo  $\text{DMPD}^{\bullet+}$ , que é corado ( $\lambda = 505 \text{ nm}$ ) e estável. O catião radicalar é obtido a partir do DMPD na presença de cloreto férrico e num meio ácido. Um composto antioxidante é capaz de descorar a solução por

fazer desaparecer o  $\text{DMPD}^{*+}$ . A reação é rápida (menos de 10 minutos) e é proporcional à concentração do antioxidante. A capacidade antioxidante é expressa como equivalentes Trolox usando uma curva de calibração com diferentes concentrações de Trolox. Este método é usado para medir compostos hidrofílicos. Este método tem sido usado para medir a capacidade antioxidante de vinhos, frações hidrossolúveis do tomate, infusões de chá verde e sumo de romã (Fogliano *et al.*, 1999; Gil *et al.*, 2000). Uma condicionante deste método é a interferência dos ácidos orgânicos, principalmente o ácido cítrico, presentes nalguns extractos. Nestes casos, o método tem de ser usado com muito cuidado, segundo a opinião de alguns autores (Gil *et al.*, 2000).

#### “Ferric ion reducing antioxidant power” (FRAP)

Neste método, um sal férrico,  $\text{Fe(III)(TPTZ)}_2\text{Cl}_3$  (TPTZ = 2,4,6-tripiridil-s-triazina), é utilizado como agente oxidante. O potencial redox do sal  $\text{Fe(III)}$  é de aproximadamente 0,70 V. A diferença entre este método e o do TEAC é que este ocorre em pH neutro, ao passo que o método FRAP ocorre em meio ácido (pH = 3,6).

O oxidante é preparado misturando TPTZ (2,5 ml, 10 mM em 40 mM HCl), 25 ml de tampão acetato e 2,5 ml de  $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (20 mM). A solução final possui 1,67 mM de  $\text{Fe(III)}$  e 0,83 mM de TPTZ (Huang *et al.*, 2005).

Neste método, utilizam-se 300  $\mu\text{l}$  do reagente FRAP preparado na altura, 10  $\mu\text{l}$  de amostra e 30  $\mu\text{l}$  de água destilada ou metanol. Se a amostra tiver capacidade redutora consegue transformar o  $\text{Fe(III)}$  a  $\text{Fe(II)}$  que apresenta uma absorvância máxima a 593 nm. As leituras são feitas durante 4 minutos, em intervalos de tempo regulares. A variação da absorvância é dada pela fórmula:  $\Delta A = A_{4\text{min}} - A_{0\text{min}}$  e comparada com a  $\Delta A$  de uma solução padrão de  $\text{Fe(II)}$ .  $\Delta A$  é proporcional à concentração do antioxidante. Uma unidade FRAP é definida como a redução de uma mole de  $\text{Fe(III)}$  a  $\text{Fe(II)}$ . Os valores FRAP para o ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol e ácido úrico são de 2,0; ao passo que o valor FRAP para a bilirrubina é de 4,0. Isto quer dizer que uma mole de ácido ascórbico é capaz de reduzir 2 moles de  $\text{Fe(III)}$  e que uma mole de bilirrubina é capaz de reduzir 4 moles de  $\text{Fe(III)}$ . Contudo, quer a bilirrubina quer o ácido ascórbico são dadores de 2 electrões. Quando a bilirrubina é oxidada, transforma-se em beliverdina, por perda de 2 átomos de hidrogénio, que tem uma absorção máxima a 593 nm com um coeficiente de extinção  $\varepsilon = 1 \times 10^4$ , comparável à do  $\text{Fe(II)(TPTZ)}_2$  (Huang *et al.*, 2005).

O tempo geralmente utilizado no método FRAP (4 minutos) para a determinação da capacidade antioxidante dos polifenóis determinados em solução aquosa ou metanólica revelou-se não ser suficiente, precisando de muitas horas. Os polifenóis com este comportamento incluíam na sua composição o ácido cafeico, ácido tânico, ácido ferúlico, ácido ascórbico e quercetina (Pulido *et al.*, 2000).

O método FRAP não é capaz de medir a capacidade antioxidante de compostos tiólicos, como seja o glutatono (Prior *et al.*, 2005).

#### Método da capacidade de redução do $\text{Cu(II)}$

Este método não tem sido muito usado ou, então, não tem sido muito descrito. O ensaio baseia-se na redução do  $\text{Cu(II)}$  a  $\text{Cu(I)}$  pelo antioxidante presente na amostra. O  $\text{Cu(I)}$  formado é complexado com um reagente cromogénico, a batocuproína (2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolina). Este complexo tem uma absorvância máxima a 490 nm. Uma mole de  $\alpha$ -tocoferol é capaz de reduzir 2 moles de  $\text{Cu(II)}$  a  $\text{Cu(I)}$  (Huang *et al.*, 2005).

#### Método do $\text{DPPH}^*$ (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

O radical  $\text{DPPH}^*$  é um dos muito poucos radicais orgânicos azotados estáveis comercializáveis. Este radical apresenta uma absorção máxima a 515 nm. Após redução do radical, na presença de um antioxidante, há uma descoloração que pode ser seguida espectrofotometricamente.

Tecnicamente este ensaio é simples. A uma solução metanólica do radical  $\text{DPPH}^*$  (3,9 mL,

25 mg/L), de cor roxa, é adicionado 0,1 mL da amostra e a reacção é seguida, medindo a absorvância a 515 nm, durante 30 minutos ou até que a cor permaneça estável. A percentagem de DPPH remanescente é calculada do seguinte modo:  $\%DPPH_{rem} = 100 \times [DPPH]_{rem}/[DPPH]_{t=0}$

$\%DPPH_{rem}$  é proporcional às concentrações do antioxidante, e a concentração que é responsável pela diminuição do DPPH inicial de 50 % define-se como sendo  $EC_{50}$ . O tempo necessário para que a cor estabilize, utilizando a concentração  $EC_{50}$ , é calculado a partir da curva cinética e definido como  $T_{EC50}$ . Existe, ainda, o parâmetro EA (eficiência anti-radicalar) que expressa a capacidade antioxidante de um determinado antioxidante e que é calculado do seguinte modo:  $EA = (1/EC_{50})T_{EC50}$  (Sánchez- Moreno *et al.*, 1998).

Apesar da simplicidade do método, existem algumas desvantagens: o DPPH\* é um radical azotado bastante estável e, portanto, com muito pouca semelhança com os radicais peróxido envolvidos na peroxidação lipídica; os antioxidantes podem reagir rapidamente *in vivo* com os radicais peróxido e lentamente com o radical DPPH\*. A cinética da reacção entre DPPH\* e antioxidante não é linear para diferentes concentrações de DPPH\*, logo o cálculo do  $EC_{50}$  é, muitas vezes, problemático. (MacDonald-Wicks e *tal.*, 2006).

Inicialmente pensava-se que o DPPH\* era reduzido à correspondente hidrazina quando reagia com substâncias dadores de hidrogénio. Contudo, estudos mais recentes têm mostrado que o que existe principalmente é uma transferência rápida de electrão dos iões fenóxido da amostra para o DPPH\*. A remoção do átomo de hidrogénio do composto fenólico pelo DPPH\* é marginal porque ocorre muito lentamente na presença de solventes com capacidade para formar ligações de hidrogénio, como é o caso do metanol. A presença acidental de ácidos ou bases no metanol pode influenciar bastante o equilíbrio de ionização dos fenóis e provocar uma redução ou um aumento das constantes de velocidade, respectivamente (Huang *et al.*, 2005).

No método do DPPH\* pode haver compostos que reajam de uma maneira reversível com o radical DPPH\*, o que pode dar valores de capacidade antioxidante falsamente baixos. Um exemplo é o eugenol ou outros compostos fenólicos com uma estrutura similar (o-metoxifenol) (Huang *et al.* 2005). Isto quer dizer que moléculas fenólicas pequenas que tenham um efeito estérico menos importante e, conseqüentemente, com melhor acesso ao radical apresentam valores aparentemente mais elevados. A interpretação dos resultados é, ainda, difícil para compostos que apresentem espectros que se sobreponham aos do DPPH\* a 515 nm, como acontece, por exemplo, com os carotenóides (Prior *et al.*, 2005).

### Ensaio para a detecção da captação de radicais livres

A quantificação da captação de radicais pode ser avaliada por diversos métodos.

#### Captação de espécies reactivas oxigenadas e nitrogenadas

Há sete espécies reactivas principais que interactivam e danificam as macromoléculas quer em alimentos quer nos organismos vivos: anião superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), radical peróxido ( $ROO^{\bullet}$ ), radical hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ), oxigénio singlete ( $^1O_2$ ), óxido nítrico ( $^{\bullet}NO$ ) e peroxinitrito ( $ONOO^{\bullet}$ ) (MacDonal-Wicks *et al.*, 2006).

#### **Captação do radical anião superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ )**

O ião superóxido é incapaz de iniciar a oxidação lipídica directamente, mas é capaz de originar outro radical muito mais reactivo, o radical hidroxilo, desde que esteja na presença de iões metálicos, que já consegue oxidar os lípidos. A determinação da capacidade de captar aniões superóxido deve ser interpretada com muito cuidado porque a formação destas entidades químicas ocorre de uma forma constante, não sendo, portanto, atingido um equilíbrio. Deste modo e de acordo com alguns autores, quantificar os radicais superóxido pelos métodos até agora desenvolvidos, é problemático (Frankel e Meyer, 2000; MacDonal-Wicks *et al.*, 2006).

A actividade captadora de aniões superóxido por um antioxidante é medida em termos de inibição de formação de  $O_2^{\bullet-}$ . A formação desta espécie reactiva oxigenada pode ser conseguida através do sistema hipoxantina-xantina oxidase ou de um sistema não enzimático em que se

utiliza o metossulfato de fenazina na presença de NADH e oxigénio molecular. Em ambos os métodos, o superóxido formado reduz o azul de nitrotetrazólio em formazam a pH = 7,4 à temperatura ambiente. A formação de formazam é seguida espectrofotometricamente a 560 nm. Qualquer substância que reaja com o anião superóxido impede a formação de formazam (Sánchez-Moreno, 2002).

A xantina oxidase é uma das fontes principais de formação de espécies reactivas oxigenadas *in vivo*. A xantina oxidase em situações normais ocorre nos tecidos sob a forma de xantina desidrogenase que transfere electrões ao NAD, oxidando a xantina ou a hipoxantina em ácido úrico. Em condições de stress, a xantina desidrogenase é convertida em xantina oxidase que produz superóxido também a partir da xantina ou hipoxantina, mas a transferência de electrões não é para o NAD, mas sim para o oxigénio molecular transformando-o em anião superóxido (Sánchez-Moreno, 2002). Esta metodologia tem sido adaptada de modo a poder usar-se uma microplaca. Nestas condições, utiliza-se o citocromo c em vez do azul de nitrotetrazólio e a leitura da absorvância é feita a 530 nm. O citocromo c, para além de poder ser reduzido pelo anião superóxido, pode ser reduzido directamente pelos antioxidantes, o qual pode também inibir a xantina oxidase. Este método não é adequado para quantificar antioxidantes não enzimáticos (Huang *et al.*, 2005).

A função principal do sistema (hipo)xantina/xantina oxidase é a de oxidar a xantina ou a hipoxantina a ácido úrico. Portanto, a inibição da actividade da xantina oxidase é quantificada pela avaliação da produção do ácido úrico, que se forma simultaneamente com o anião superóxido (Kweon *et al.*, 2001). Alguns autores consideram que há determinados antioxidantes que actuam apenas por captação do superóxido directamente sem inibirem a função da xantina oxidase (Unno *et al.*, 2000).

Para comparar os ensaios, é útil comparar a inibição obtida do antioxidante com a inibição obtida pela superóxido dismutase, ou, então, comparar a inibição do antioxidante com a inibição de antioxidantes padrão (ácido ascórbico ou  $\alpha$ -tocoferol).

É importante estabelecer uma relação de substrato (hipoxantina) e enzima adequada, para assegurar que se formam as quantidades óptimas do radical superóxido. Se houver muito substrato, ocorre uma transferência de dois electrões o que leva à formação de hidroperóxido e, portanto, reacções laterais indesejadas que podem interferir nos resultados finais (MacDonal-Wicks *et al.*, 2006).

O azul de nitrotetrazólio pode ser substituído por cloreto de hidroxilamónio. A formação de nitrilo a partir do hidroxilamónio é seguida medindo a absorvância a 530 nm. A produção de nitrilo é inibida por moléculas capazes de reagir com o anião superóxido (Wang e Jiao, 2000). Quer utilizando o azul de nitrotetrazólio quer o cloreto de hidroxilamónio, a diminuição da absorvância revela uma actividade captadora de aniões superóxido (Sánchez-Moreno, 2002).

A capacidade de inibição da produção do anião superóxido pode também ser avaliada usando o ácido  $\alpha$ -cetometiollbutírico. A decomposição deste composto provocado pelo superóxido liberta eteno, que é quantificado por cromatografia gás-líquido. Neste método utiliza-se como fonte geradora de aniões superóxido, o sistema (hipo)xantina/xantina oxidase (Kruedener *et al.*, 1995; Lavelli *et al.*, 1999; 2000). Utilizando ainda este sistema, a captação do superóxido pode ser avaliada por espectrometria de ressonância de *spin* electrónico. Neste sistema, o superóxido é captado pelo 5,5-dimetil-1-pirrolina *N*-óxido (DMPO), formando-se um aducto DMPO-OH que é detectado por ressonância de *spin* electrónico. Utiliza-se como padrão interno o óxido de manganésio (Sánchez-Moreno, 2002; MacDonal-Wicks *et al.*, 2006).

### Captação do radical hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ )

Existem vários métodos para determinar a capacidade de captar radicais hidroxilo. O teste da desoxirribose é um exemplo. Neste método há uma mistura de cloreto férrico e ácido etilenodiamina-tetracético (EDTA) que, na presença de ácido ascórbico, reage para formar um complexo  $Fe^{2+}$ -EDTA mais ascorbato oxidado. O peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) adicionado reage com o  $Fe^{2+}$ -EDTA formando  $Fe^{3+}$ -EDTA e  $HO^{\bullet}$  (reacção de Fenton:  $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + HO^{\bullet} + HO^{\bullet}$ ). Os radicais hidroxilo não sendo captados por nenhum dos reagentes mencionados

atacam o açúcar desoxirribose, degradando-o em diversos fragmentos. Alguns destes fragmentos são capazes de reagir com o ácido tiobarbitúrico, após aquecimento e a pH ácido, originando um pigmento rosa susceptível de ser quantificado por espectrofotometria (Sánchez-Moreno, 2002). Compostos que sejam capazes de captar os radicais hidroxilo impedem a formação do cromagénio. O método da desoxirribose pode ser modificado não adicionando o ácido ascórbico. Nestas condições é possível saber se as próprias amostras têm actividade pró-oxidante, porque os compostos em estudo substituem o ácido ascórbico na reacção de Fenton (Hagerman *et al.*, 1998). Alguns compostos inibem a formação do cromagénio não por reacção com os radicais hidroxilo, mas por terem formado complexos estáveis com o ião metálico o que impede a formação dos radicais hidroxilo. Para identificar os compostos que complexam os iões metálicos, não se adiciona o EDTA (Hagerman *et al.*, 1998; Sánchez-Moreno, 2002). Na ausência de capacidade complexante dos compostos em análise, os iões ferro são complexados pela desoxirribose, provocando danos provocados pelos radicais hidroxilo. Se as substâncias em estudo têm capacidade quelante, complexando o ferro, os danos provocados pelo radical hidroxilo são menores e a coloração rosa é mais ténue.

Alguns autores utilizaram uma mistura de tetracloro-hidroquinona e peróxido de hidrogénio que hidroxila o ácido salicílico para formar o ácido 2,3- e 2,5-di-hidroxibenzóico, um processo que é inibido pelos agentes captadores de radicais hidroxilo (Zhu *et al.*, 2000).

O grupo hidroxilo pode, ainda, ser detectado utilizando moléculas detectoras, geralmente, com ligações N=O que reagem com o radical. Um exemplo é o 5,5-dimetilpirrolina-N-óxido (DMPO), que reage com o radical hidroxilo, originando o radical mais estável e com um espectro característico DMPO-OH<sup>\*</sup>, utilizando o método da ressonância de *spin* electrónico (Sánchez-Moreno, 2002). Estes aductos que se formam são estáveis e relativamente mais fáceis de se determinarem do que os próprios radicais hidroxilo que têm uma vida muito curta. Na presença de um captador de radicais hidroxilo diminui o sinal DMPO-OH<sup>\*</sup> na ressonância de *spin* electrónico.

O radical hidroxilo é muito reactivo, portanto, a capacidade de uma molécula captar tal radical é irrelevante *in vivo*. É preferível, então, desenvolver métodos que permitam detectar compostos com capacidade de captar iões metálicos porque previne a reacção que leva à formação de radicais hidroxilo. Um composto que se comporte deste modo acaba por ser um antioxidante preventativo. Ou *et al.* (2002) desenvolveu um método para medir a capacidade quelante dos compostos que denominou por HORAC: Hydroxyl (HO), radical (R), averting (A), capacity (C). O radical hidroxilo é gerado através de uma reacção Fenton mediada pelo Co(II), e a produção do radical é confirmada indirectamente por hidroxilação do ácido *p*-hidroxibenzóico que é medido por cromatografia líquida de alta resolução acoplado a espectrometria de massa. A capacidade captadora é medida usando um composto fluorescente, a fluoresceína, tal como para o método ORAC. A curva que representa a diminuição da fluorescência da fluoresceína é controlada quer na ausência quer na presença do antioxidante, sendo, depois, a área sob as curvas (AUC) calculadas por integração. A actividade do antioxidante é calculada subtraindo o AUC do branco do AUC da amostra antioxidante. O método quantitativo é o mesmo do que foi usado para o método ORAC, excepto no padrão utilizado. No método HORAC utiliza-se o ácido gálico. O valor HORAC está relacionado directamente com a capacidade do antioxidante para quelatar iões metálicos, e a capacidade para formar um complexo estável entre o Co(II) e o antioxidante. A capacidade para impedir a formação de radicais hidroxilo de uma substância deve-se sobretudo à sua capacidade para quelatar metais (Huang *et al.*, 2005).

#### **Captação de peróxido de hidrogénio**

Um dos métodos mais comuns utiliza uma peroxidase do rábano-bastardo e o peróxido de hidrogénio para oxidar a escopoletina num produto não fluorescente. A presença de uma molécula capaz de captar o peróxido de hidrogénio impede a oxidação da escopoletina (Sánchez-Moreno, 2002). No entanto, alguns autores consideram que a natureza desta inibição pode ser ambígua por três razões principais: o antioxidante pode reagir directamente com o peróxido de hidrogénio, o antioxidante pode reagir com intermediários formados da enzima e do peróxido de hidrogénio e o antioxidante pode inibir a peroxidase do rábano-bastardo (Martínez-Tomé *et al.*, 2001; Huang *et*



*al.*, 2005).

Há também métodos não enzimáticos para a determinação da captação de peróxido de hidrogénio que se baseiam na reacção de quimioluminescência do luminol ou da lucigenina com o hipoclorito. Este ensaio baseia-se na oxidação do luminol pelo hipoclorito de sódio (NaOCl) em diazaquinona, que é depois convertida, pelo peróxido de hidrogénio, em aminofalato excitado. Esta reacção tem um sinal de luminiscência muito curto (2 s) num comprimento de onda máximo de 431 nm (MacDonald-Wicks *et al.*, 2006). No caso da lucigenina, está é convertida, pelo peróxido de hidrogénio, em *N*-metilacridona excitada (Costa *et al.*, 2005).

Outros ensaios têm sido usados para a determinação do peróxido de hidrogénio. Wang e Jiao (2000) usaram um método que media a reacção directa do peróxido de hidrogénio com o titânio (IV). O complexo Ti-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado era dissolvido em ácido sulfúrico e medido a 410 nm. Os autores utilizaram este método para determinar a capacidade de captação de peróxido de hidrogénio de diversos sumos de fruta.

### **Captação de oxigénio singleto**

O oxigénio singleto é geralmente formado na presença de luz e de fotossensibilizadores. Pensa-se que o oxigénio singleto é responsável pelos danos na pele dependentes da radiação UV, pela formação de cataratas e pela fotossensibilidade resultante da ingestão ou absorção de fitoquímicos, fármacos e pesticidas que actuam como fotossensibilizadores. A formação de oxigénio singleto, *in vivo*, sem a presença da luz parece ser resultado da dismutação espontânea do anião superóxido. Quimicamente o oxigénio singleto pode ser gerado através da decomposição não fotoquímica do peróxido de hidrogénio pelos metais ou pelo hipoclorito (Huang *et al.*, 2005; MacDonald-Wicks *et al.*, 2006).

O oxigénio singleto pode interactuar com outras moléculas de duas maneiras principais: ou reage quimicamente com as referidas moléculas, formando, por exemplo, endoperóxidos, ou pode transferir a sua energia de excitação, voltando ao estado fundamental enquanto a outra molécula fica no estado excitado. Este fenómeno designa-se por “quenching” do oxigénio singleto. No laboratório são usadas várias moléculas como “quenching” ou captadores de oxigénio singleto: histidina, DABCO, difenilisobenzofurano e azida (Halliwell e Gutteridge, 1999).

O oxigénio singleto emite fosforescência característica a 1270 nm. A diminuição da intensidade da luz emitida tem sido usada para medir a capacidade de remoção de oxigénio singleto por um determinado composto. Wang e Jiao (2000) determinaram a capacidade de captação do oxigénio singleto por parte de vários sumos de fruta utilizando um método espectrofotométrico em que utilizaram como agentes produtores de oxigénio singleto uma mistura de hipoclorito de sódio e de peróxido de hidrogénio. A *N,N*-dimetil-*p*-nitrosoanilina foi usado como aceitador selectivo de oxigénio singleto. A quantidade de oxigénio singleto formado foi determinado medindo a diminuição da absorvância do aceitador selectivo a 440 nm. A eficácia relativa de remoção (% inibição na produção de oxigénio singleto) foi calculada através da diferença da absorvância da *N,N*-dimetil-*p*-nitrosoanilina com e sem a adição do sumo de fruta.

### **Captação do óxido nítrico (\*NO)**

A actividade captadora dos radicais de óxido nítrico pode ser medida num espectrofluorímetro registando a oxidação do 4,5-diaminofluoresceína induzida pelo óxido nítrico, a triazolofluoresceína, utilizando como comprimentos de onda de excitação e de emissão 495 nm e 521 nm, respectivamente (Nagata *et al.*, 1999; Fernandes *et al.*, 2003).

### **Captação de peroxinitrito**

O proxinitrito (ONOO-) não é um oxidante forte, em contrapartida, a forma protonada, o ácido peroxinitroso, já é um oxidante muito forte. A pH fisiológico, o ácido peroxinitroso rearranja de modo a formar nitrato, uma forma menos oxidante. Quer o peroxinitrito quer o ácido peroxinitroso são capazes de nitrar ou de hidroxilar compostos aromáticos, como a tirosina, originando a nitrotirosina. Sob condições fisiológicas, o peroxinitrito também forma um aducto com o dióxido de

carbono dissolvido nos fluidos corporais. O aducto parece ser responsável pelos danos oxidativos das proteínas (Huang *et al.*, 2005).

Existem dois métodos principais para medir a captação de peroxinitrito: inibição da nitração da tirosina e inibição da oxidação da di-hidro-rodamina 123. Alguns autores (Pannala *et al.*, 1998) mediram a capacidade antioxidante da catequina e de outros compostos polifenólicos determinando as alterações na concentração da tirosina a 275 nm e da 3-nitrotirosina (o produto principal da nitração da tirosina) a 430 nm na presença de várias concentrações do antioxidante. Simultaneamente fizeram uma confirmação por HPLC separando e quantificando a nitro-tirosina.

O outro método consiste na oxidação da di-hidro-rodamina 123, pelo peroxinitrito, a rodamina 123 que é fluorescente. A intensidade da fluorescência é medida num espectrofluorímetro utilizando como comprimentos de onda de excitação e de emissão 500 nm e 536 nm, respectivamente (Kooy *et al.*, 1994). Os antioxidantes inibirão a oxidação da di-hidro-rodamina 123 induzida pelo peroxinitrito. A oxidação da di-hidro-rodamina 123 pelo peroxinitrito é rápida. A reacção é linear e dependente da concentração. O produto final é estável (MacDonald-Wicks *et al.*, 2006).

### **Avaliação da capacidade de inibir ou retardar a oxidação lipídica**

Contrariamente aos testes que se baseiam na captura de radicais livres, na avaliação da capacidade de inibir a oxidação lipídica é necessária a presença de substratos lipídicos. A avaliação dos antioxidantes nestes sistemas lipídicos pode fazer-se ou medindo as alterações das concentrações dos compostos que vão sendo oxidados, o desaparecimento do oxigénio ou a formação de produtos de oxidação (Becker *et al.*, 2004).

Na avaliação da capacidade antioxidante de um composto, pode quantificar-se o desaparecimento dos reagentes, ou a formação de radicais ou a formação de produtos de oxidação primários ou secundários, dependendo do estágio de oxidação (Becker *et al.*, 2004). Muitas vezes, a correlação entre os métodos (absorção de oxigénio, índice de peróxidos, aparecimento de produtos secundários) é muito baixa porque não correspondem ao mesmo estágio de evolução da oxidação.

Num processo de auto-oxidação, consideram-se normalmente três fases: iniciação, propagação e terminação. Na iniciação há o desaparecimento dos substratos de oxidação (oxigénio, ácido gordo), no processo de propagação há o aparecimento dos produtos primários de oxidação: os peróxidos e na terminação há o aparecimento dos produtos secundários de oxidação, obtidos por recombinação e cisão a partir dos peróxidos (epóxidos, compostos voláteis) (Berset e Cuvelier, 1996).

A auto-oxidação é um sistema dinâmico, que evolui no tempo e onde há uma cadeia de transformações dos produtos da reacção. Uma das dificuldades, para medir um estado de oxidação definido, é o de determinar em que momento se deve efectuar a medição. Geralmente, procura avaliar-se o “período de indução” da reacção, isto é, o tempo necessário para atingir quer uma alteração de gosto, quer uma aceleração brusca da velocidade reaccional. A medição não pode, pois, ser pontual, é necessário seguir-se a reacção ao longo do tempo, devendo, ainda, ser representativa da duração de vida do produto.

A avaliação da estabilidade oxidativa pode ser feita nas condições normais de armazenamento (testes de estabilidade em tempo real) ou recorrendo a condições padronizadas de oxidação acelerada (oxigenação intensiva, tratamento térmico e/ou catálise metálica) que permitem estimar de forma rápida a estabilidade oxidativa do lípido ou a eficácia de um antioxidante (testes acelerados) (Silva *et al.*, 1999).

Nos testes de oxidação acelerada, a temperatura e a oxigenação são factores muito importantes: a velocidade de oxidação depende da concentração em oxigénio cuja solubilidade decresce com a elevação da temperatura. Na presença de um antioxidante, a energia de activação da reacção aumenta (o antioxidante diminui a velocidade da reacção). O índice de protecção global medido a temperaturas elevadas, para um determinado antioxidante, será, geralmente, menor do que quando medido a temperaturas mais baixas (Frankel *et al.*, 1994). A eficácia dos antioxidantes pode depender, assim, da temperatura à qual foi sujeito. Por exemplo, o

$\alpha$ -tocoferol é mais eficaz como antioxidante a temperaturas inferiores a 60 °C, contrariamente ao que se verifica com os seus isómeros  $\gamma$ - e  $\delta$ -tocoferóis. Também o ácido ascórbico não protege o ácido linoleico de uma oxidação quando se encontra a temperaturas elevadas, mas à temperatura ambiente funciona como um agente anti-radicalar em meio metanólico (Berset e Cuvelier, 1996).

A Tabela 3 refere alguns testes de estabilidade convencionais bem como as condições de trabalho.

Tabela 3. Testes de estabilidade convencionais bem como as condições de trabalho (adaptado de Frankel, 1993)

Teste	Condições	Características
Armazenamento à T ambiente	T ambiente, P atmosférica	Muito lento
Luz	T ambiente, P. atmosférica	Mecanismo diferente
Presença de metais	T ambiente, P atmosférica	Maior decomposição
Método da pesagem	30-80 °C, P atmosférica	Ponto crítico duvidoso
Forno Schaal	60-70 °C, P atmosférica	Menos problemas
Uptake oxigénio	80-100 °C, P atmosférica	Mecanismo diferente
Bomba de oxigénio (ASTM) <sup>a</sup>	99 °C, 65-115 psi O <sub>2</sub>	Mecanismo diferente
Oxigénio activo (AOM)	98 °C, borbulhamento de ar	Mecanismo diferente
Rancimat <sup>b</sup>	100-140 °C	Ponto crítico duvidoso

<sup>a</sup> ASTM, American Society for Testing Materials

<sup>b</sup> Produzido pelo METROM Lda., CH-9100, Herisau, Suíça

T, temperatura

P, pressão

Os testes de estabilidade à temperatura ambiente apesar de serem os que mais se aproximam das condições reais de armazenamento dos alimentos apresentam a desvantagem de serem extremamente lentos e, portanto, pouco práticos. Em condições de oxidação lenta, a reprodutibilidade dos resultados pode ficar comprometida por diversas variáveis que são difíceis de controlar em condições de armazenamento prolongadas.

Apesar dos métodos que utilizam a luz ou metais serem ensaios relativamente rápidos apresentam problemas. O mecanismo da foto-oxidação é diferente do da auto-oxidação. Na foto-oxidação há a formação de diversos precursores aromáticos que originam diferentes produtos voláteis. A oxidação catalisada por metais pode originar uma elevada proporção de compostos carbonílicos em comparação com os hidroperóxidos primários.

O método do ganho de peso que se baseia no aumento do peso devido à absorção do oxigénio, não é muito sensível. O ponto crítico requer um nível de oxidação acima do ponto onde se começa a detectar o cheiro a ranço resultante da deterioração oxidativa das gorduras. O teste do forno de Schaal apresenta menos limitações e, geralmente, o ponto crítico representa um grau de oxidação mais baixo e os resultados relacionam-se razoavelmente bem com os tempos de prateleira. A 60 °C, o número de reacções secundárias é mínimo comparativamente a temperaturas mais elevadas. As temperaturas elevadas dos testes "oxygen uptake", bomba de oxigénio, método do oxigénio activo e método Rancimat fazem com que os dados obtidos não sejam muito seguros porque o mecanismo da oxidação lipídica altera bastante a temperaturas elevadas. Os níveis de ácidos voláteis que se mede, por exemplo, no Rancimat só são significativos a temperaturas elevadas e, portanto, não são relevantes em condições normais de armazenamento.

As principais limitações nos testes de estabilidade que utilizam temperaturas elevadas são:

- As taxas de oxidação tornam-se dependentes da concentração do oxigénio porque a solubilidade deste gás diminui no caso de temperaturas elevadas;
- A oxidação ocorre rapidamente o que provoca alterações drásticas na disponibilidade do oxigénio;
- O período de indução ocorre a um nível de oxidação muito alto e muito antes do ponto em que os componentes finais, com cheiro característico, sejam detectados;
- Podem ocorrer reacções secundárias, tais como polimerização e ciclização, que não são

- relevantes em condições de temperaturas de armazenamento normais;
- Compostos voláteis, tais como o BHA ou o BHT, também se perdem a temperaturas elevadas;
  - Os antioxidantes fenólicos presentes em extractos naturais também se degradam a temperaturas elevadas (Frankel, 1993).

## ANÁLISE DOS SUBSTRATOS DE OXIDAÇÃO

### Medição do consumo de oxigénio

O estudo cinético do consumo de oxigénio permite medir o tempo relativo à fase de iniciação e o seu comportamento sob o efeito de antioxidante. Os métodos são geralmente manométricos (manómetro de Warburg), polarográficos ou gravimétricos, medindo-se o aumento do peso resultante da fixação do oxigénio aos ácidos gordos. A principal limitação destes métodos deve-se à existência, em meios complexos, de reacções secundárias, elas próprias consumidoras de oxigénio. Por outro lado, a produção de compostos voláteis por decomposição dos peróxidos a temperaturas relativamente elevadas pode falsear os resultados (Rajalakshmi e Narasimhan, 1995; Berset e Cuvelier, 1996).

Os métodos de absorção de oxigénio têm por base o facto da oxidação das gorduras se traduzir num consumo mensurável de oxigénio atmosférico. Vários são os métodos, referindo-se aqui apenas alguns. No ensaio com a bomba de oxigénio, a amostra é colocada numa bomba de aço inoxidável, a qual está ligada a um registador de pressão. O processo oxidativo é acelerado pelo oxigénio sobre pressão (65-115 psi O<sub>2</sub>) e pelo aquecimento (99 °C). Como há absorção de oxigénio, a pressão no interior da bomba diminui.

No método da pesagem, a amostra é rigorosamente pesada e incubada em estufa (30-80 °C) na ausência de luz. Determina-se o aumento do peso da amostra, resultante da adição de oxigénio, em intervalos de tempo regulares, durante o período de incubação (Silva *et al.*, 1999).

### Doseamento dos ácidos gordos não oxidados residuais

Geralmente, faz-se a cinética de desaparecimento de um ou de vários ácidos gordos insaturados presentes na amostra, após extracção, metilação e cromatografia em fase gasosa. Este método tem dois pontos críticos: a dificuldade da extracção da matéria gorda e as possíveis perdas quando se procede a derivatização (Berset e Cuvelier, 1996).

## Análise de peróxidos

### Medição do índice de peróxidos (IP)

Os hidroperóxidos, produtos primários da oxidação, são intermediários transitórios instáveis, sobretudo a temperaturas elevadas ou na presença de metais, originando compostos com grupos carbonilo e hidroxilados. Ao longo do tempo, o índice de peróxidos passa por um máximo. Isto quer dizer que um índice de peróxidos baixo não significa uma taxa de oxidação baixa, porque pode ser o sinal de uma alteração já mais avançada do lípido.

O índice de peróxidos exprime-se em miliequivalentes de oxigénio activo por Kg de matéria gorda. Existem dois métodos principais para quantificar os peróxidos: o método iodométrico e o método colorimétrico.

### Método iodométrico

Os hidroperóxidos ou os peróxidos formados são avaliados iodometricamente, isto é, faz-se reagir a amostra com uma solução aquosa saturada de iodeto de potássio. Na presença de peróxidos há libertação de iodo que é titulado com uma solução padrão de tiosulfato de sódio.

Neste método existem dois factores que podem contribuir para erros:

- O iodo libertado pode fixar-se às ligações duplas dos ácidos gordos insaturados,

originando um valor de peróxidos menor;

- O oxigénio presente no meio pode fazer libertar o iodo a partir do iodeto de potássio, originando valores de índice de peróxidos elevados.

A titulação volumétrica do iodo na presença do amido (indicador) pode ser substituída por um método potenciométrico com a ajuda de um eléctrodo de platina (Berset e Cuvelier, 1996).

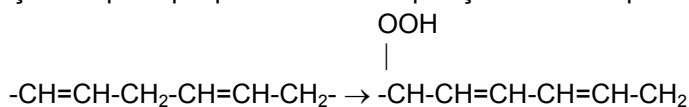
No método do oxigénio activo (AOM), também conhecido pelo nome do teste de Swift, faz-se passar uma corrente de ar purificada pela matéria gorda aquecida a 98 °C num banho de óleo e o teor de peróxidos é determinado a intervalos de tempo regulares pelo método iodométrico. Mede-se o tempo necessário para atingir um valor de índice de peróxidos de 100. Este método tem merecido algumas críticas porque a formação e a decomposição dos peróxidos não decorrem à mesma velocidade. A temperaturas superiores 60-70 °C a decomposição dos peróxidos é mais rápida do que a formação. A decomposição dos peróxidos formados a partir de ácidos gordos poli-insaturados é também mais rápida relativamente aos dos ácidos gordos mono-insaturados ou di-insaturados. Por esta razão, a determinação do índice de peróxidos não está indicada para avaliar o estado de oxidação dos óleos de peixe, fortemente insaturados, porque o índice de peróxidos seria sempre muito baixo Berset e Cuvelier, 1996).

### Método colorimétrico

Os peróxidos presentes oxidam o Fe(II) a Fe(III) que se doseia posteriormente sob a forma de cloreto ou de tiocianato férrico (Berset e Cuvelier, 1996).

### Determinação dos dienos conjugados

A oxidação dos ácidos gordos poli-insaturados é acompanhada de uma deslocação das ligações duplas que passam de uma posição malónica para uma posição conjugada:



Os dienos conjugados absorvem a 232 nm. Os produtos secundários de oxidação, principalmente as  $\alpha$ -dicetonas ou as cetonas insaturadas têm um máximo de absorção a 268 nm. Esta distinção permite diferenciar os estádios de evolução da oxidação: quando os valores de absorvância a 232 nm forem grandes, tal significa que o teor em peróxidos é elevado. Se a absorvância a 268 nm é elevada comparativamente à encontrada para o comprimento de onda de 232 nm, então, os produtos secundários da oxidação predominam. Neste método pode haver interferência porque podem existir vários compostos na amostra que absorvam fortemente a 200-220 nm (Berset e Cuvelier, 1996).

### Outros métodos

A análise de peróxidos pode, ainda, ser seguida através de outros métodos:

- Método calorimétrico que se efectua entre 80 a 140 °C e sob um fluxo de oxigénio, para avaliar o tempo de indução correspondente à formação rápida de hidroperóxidos. As limitações são as mesmas que aquelas referidas para os métodos que utilizam temperaturas elevadas.
- Método de quimioluminiscência que mede os fotões produzidos durante a transição dos electrões, do estado excitado para o estado fundamental, no decurso da formação dos peróxidos. Na presença de um antioxidante, a quantidade de luz detectada é sempre mais fraca. Por falta de sensibilidade dos aparelhos de medição, é necessário aumentar artificialmente o rendimento em fotões ou aquecendo o produto, ou eliminando com um flash de luz ou adicionando um oxidante forte (hidroperóxido exógeno ou hipoclorito de sódio). Parece não haver, contudo, relação simples entre o teor de peróxidos e a intensidade da quimioluminiscência, que depende também da estrutura dos compostos.
- Cromatografia líquida de alta resolução permite separar e dosear os hidroperóxidos produzidos, utilizando colunas de fase inversa. Detectores UV ou amperométricos

podem ser usados nesta metodologia.

- Termólise em que se analisam, por cromatografia em fase gasosa, os produtos voláteis formados por termodecomposição dos hidroperóxidos, quer directamente, quer após derivatização sob a forma de 2,4,6 triclorofenil-hidrazonas. Neste método é necessário que os hidroperóxidos não tenham começado a decompor-se no momento do choque térmico (Berset e Cuvelier, 1996).

### **Análise dos produtos secundários da oxidação**

No decurso da decomposição dos peróxidos formam-se compostos de natureza muito diversa: aldeídos, cetonas, hidróxi-ácidos, hidrocarbonetos e polímeros. Enquanto que os hidroperóxidos são incolores e inodoros, muitos dos compostos resultantes da decomposição dos hidroperóxidos apresentam um odor desagradável.

#### Análise dos compostos aldeídicos

A natureza dos aldeídos e as suas proporções relativas dependem muito do ácido gordo oxidado. Existem dois métodos colorimétricos muito usados para quantificar os aldeídos formados: teste do ácido 2-tiobarbitúrico e o índice de *p*-anisidina.

#### Teste do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA)

Neste método uma molécula de malonaldeído reage com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico formando-se um complexo avermelhado que absorve a 532-535 nm. Os resultados são expressos em unidades de absorvância por unidade de peso da amostra ou em “valor de ácido tiobarbitúrico” definido como o peso, em miligramas, de malonaldeído por quilograma de amostra. Neste caso, a padronização é feita com a ajuda de 1,1,3,3-tetrametoxipropano.

O malonaldeído forma-se unicamente a partir de ácidos gordos que possuam pelo menos 3 ligações duplas. Este teste não será adequado para os derivados do linoleato ou do oleato. O malonaldeído não é o único produto de oxidação que reage com o ácido tiobarbitúrico. Os 4-hidroxialcenais, os 2,4-alcadienais e os 2-alcenais formam também um cromogénio que absorve no mesmo comprimento de onda. Deste modo, prefere-se chamar ao teste do ácido tiobarbitúrico o método das espécies reactivas ao ácido tiobarbitúrico.

A reacção tem de ter lugar em meio ácido (pH = 1-2) e a uma temperatura elevada ( $\approx 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) para acelerar a velocidade e aumentar a sensibilidade.

Existem vários compostos que podem interferir com este método: a sacarose e a glucose que apresentam um efeito sinérgico sobre as espécies reactivas ao ácido tiobarbitúrico. O malonaldeído pode, ainda, complexar-se com proteínas, aminas, não podendo reagir ao ácido tiobarbitúrico (Berset e Cuvelier, 1996).

#### Índice de *p*-anisidina (IpA)

A *p*-anisidina, em meio acético, forma um complexo amarelo com os dienais conjugados. Esta reacção ocorre principalmente com o *trans*-2, *trans*-4-decadienal, proveniente do ácido linoleico. O índice de *p*-anisidina é definido como 100 vezes a absorvância, medida a 350 nm, de uma solução resultante da reacção de 1 g de lípido em 100 ml de solvente que contém a *p*-anisidina.

O valor do índice de *p*-anisidina está muitas vezes associado à do índice de peróxidos para dar o valor Totox (valor de oxidação total):  $\text{Totox} = 2(\text{IP}) + 1(\text{IpA})$

Esta combinação permite associar os peróxidos, que representam o potencial de degradação da qualidade organoléptica, e os aldeídos representativos de um estado de deterioração já efectivo. Considera-se que um corpo gordo bem conservado deve ter um valor Totox inferior a 10 (Berset e Cuvelier, 1996).

O índice carbonilo é uma medida dos compostos de carbonilo formados durante a oxidação da gordura. Este método baseia-se na reacção, em meio ácido, dos compostos de carbonilo com a 2,4-dinitrofenil-hidrazina e a formação dos respectivos compostos derivados que são corados (2,4-

dinitrofenil-hidrazonas). A determinação é feita por espectrofotometria.

### Dosagem dos compostos voláteis

Os compostos voláteis, hidrocarbonetos (pentano, hexano, etano), aldeídos (pentanal, hexanal, 2-octenal, 2-nonenal) ou cetonas (1,5-octadieno-3-ona, 1-octeno-3-ona) resultam da decomposição dos peróxidos. Estes compostos são determinados por cromatografia em fase gasosa, usando "head-space". O pentano é o hidrocarboneto que geralmente se determina e provém da degradação do ácido linoleico. O hexanal é outra espécie também determinada por este método.

Quanto à determinação dos ácidos voláteis, o método utilizado não é a cromatografia mas antes um método condutivimétrico. Neste caso, registam-se as variações da condutividade de uma água destilada na qual se recolhem os ácidos de baixa massa molecular, como por exemplo, o ácido fórmico, produzido a uma temperatura de 110-130 °C sob acção de ar ou de oxigénio. Os aparelhos Rancimat (Suíça) e OSI (Estados- Unidos) são baseados neste princípio. Este método tem inconvenientes porque só dá bons resultados para valores de índice de peróxidos superiores a 100, isto é, quando há já uma degradação significativa do lípido. Para além disso, as condições térmicas do ensaio originam produtos da decomposição que não são da mesma natureza que os que se formam numa situação de armazenamento normal (Berset e Cuvelier, 1996).

### **Outros métodos (Teste do $\beta$ -caroteno-ácido linoleico)**

Neste método há uma co-oxidação do  $\beta$ -caroteno pelo ácido linoleico submetido a uma oxidação intensa. O sistema é constituído por uma emulsão de  $\beta$ -caroteno, ácido linoleico, Tween 40 e água destilada, para além das amostras. A capacidade antioxidante destas é revelada espectrofotometricamente a 470-490 nm, ao longo do tempo. Quanto maior a descoloração do  $\beta$ -caroteno e, conseqüentemente, quanto menor forem os valores de absorvância observados, menor é a capacidade antioxidante da amostra. Os carotenóides puros são susceptíveis à oxidação que, após cisões, levam à formação de uma mistura complexa de compostos. Esta reacção de oxidação é responsável pela descoloração característica dos carotenóides (Berset e Cuvelier, 1996; Halliwell e Gutteridge, 1999).

### **Influência do meio no comportamento dos antioxidantes**

A eficácia dos antioxidantes é função da sua natureza química, das interacções que desenvolvem com o meio, do pH, da temperatura, dos surfactantes e do tipo de substrato lipídico. Assim, a actividade dos diferentes tipos de antioxidantes pode variar significativamente dependendo do tipo de lípido: triacilgliceróis, metil ésteres, ácidos gordos livres ou lípidos incorporados em várias partículas biológicas tais como lipoproteínas ou microssomas hepáticos. Os compostos fenólicos podem ter quer uma acção antioxidante quer uma acção pró-oxidante dependendo do substrato lipídico utilizado e das condições do ensaio. A catequina pura e os galhatos de catequina do chá-verde são eficazes na inibição da oxidação das LDL e dos lipossomas de lecitina, contudo, apresentavam uma acção pró-oxidante em emulsões de óleo em água (Teissedre *et al.*, 1996; Frankel *et al.*, 1997; Huang e Frankel., 1997).

A actividade antioxidante é fortemente afectada pela composição do sistema, e a actividade relativa dos antioxidantes de diferentes polaridades varia significativamente em diferentes sistemas multifásicos. Assim se explica o "paradoxo polar": os antioxidantes polares, como o Trolox (derivado carboxílico do  $\alpha$ -tocoferol), o ácido ascórbico, ácido carnósico e ácido rosmarínico são melhores antioxidantes em lípidos do que os correspondentes antioxidantes lipofílicos  $\alpha$ -tocoferol e palmitato de ascorbilo. A ordem de reactividade é contrária a esta se o sistema for uma emulsão de óleo em água. Este fenómeno interfacial foi explicado pelas diferenças na afinidade dos antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos para o ar, óleo e água. Num lípido, os antioxidantes hidrofílicos podem ser mais eficazes por estarem orientados na interface óleo-ar, ao passo que os lipofílicos estão dissolvidos na gordura, longe do ar, elemento responsável pela oxidação lipídica. Numa emulsão óleo em água, os antioxidantes hidrofóbicos

estão localizados no óleo e na interface óleo-água onde protegem melhor do que os antioxidantes hidrofílicos. Estes ficam na fase aquosa, não sendo, portanto, capazes de proteger de uma forma adequada os lípidos na interface água-óleo (Frankel e Meyer, 2000).

Mas os sistemas lipídicos podem ser mais complexos do que as situações atrás referidas. Por exemplo, uma mistura de ácido ascórbico/lecitina de soja e tocoferóis tem um efeito antioxidante sinérgico num sistema constituído por óleo de peixe refinado. A lecitina não só funciona como um emulsionante para melhorar o contacto entre o ácido ascórbico e o tocoferol, como também participa no ciclo de oxidação-redução mediando a recuperação do tocoferol a partir do radical tocoferoxilo e do ácido ascórbico. Contudo, a mistura antioxidante ternária não era eficaz em maioneses enriquecidas com óleo de peixe. Neste caso, o ácido ascórbico encontrava-se na fase aquosa sem possibilidade, portanto, de poder regenerar o tocoferol.

Em conclusão, a eficácia de um antioxidante em sistemas multifásicos ou biológicos é afectada por factores determinados pelo fenómeno interfacial, porque são responsáveis pela localização e orientação dos antioxidantes por partição entre a fase aquosa e a fase lipofílica e por interacção com o emulsionante na interface (Frankel e Meyer, 2000).

## ANTIOXIDANTES NATURAIS

É cada vez maior a procura de compostos de origem natural por serem considerados pelo grande público menos prejudiciais para a saúde. Contudo, os antioxidantes de origem natural não têm só vantagens. Por exemplo, estes compostos têm de ser purificados para terem uma maior actividade o que encarece o processo. Quase sempre é necessária esta purificação, não só para obter uma maior actividade como ainda para garantir as propriedades do antioxidante que, caso esteja sob a forma não purificada, podem surgir interacções entre os componentes do extracto que não são desejadas. É ainda de referir que em muitos casos a segurança destes antioxidantes de origem natural não é, ainda, totalmente conhecida. Estes antioxidantes podem alterar a cor, o sabor e o aroma do produto alimentar (Rajalakshmi e Narasimhan, 1995).

A maioria dos antioxidantes naturais é constituída por compostos fenólicos que, com a excepção dos tocoferóis, contêm grupos activos em posição *o*-, enquanto os antioxidantes sintéticos têm tais grupos em posição *p*-. Os grupos de compostos de origem natural mais importantes são os flavonóides e seus derivados em extractos de plantas, os compostos fenólicos em plantas aromáticas e especiarias, proteínas e hidrolisados de proteínas, péptidos, aminoácidos e produtos da reacção de Maillard.

## Plantas aromáticas

Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos presentes nas plantas aromáticas, o que dificulta determinar qual ou quais os componentes responsáveis pela actividade antioxidante de alguns destes óleos. Muitas são as referências que descrevem a actividade antioxidante dos óleos essenciais extraídos de várias plantas pertencentes a diversas espécies, colhidas em diferentes locais e épocas de desenvolvimento (Ruberto *et al.*, 2000; Dorman *et al.*, 2000; Candan *et al.*, 2003; Mau *et al.*, 2003; Miguel *et al.*, 2003a, Miguel *et al.*, 2003b; Dorman e Deans, 2004; Miguel *et al.*, 2004; Miliauskas *et al.*, 2004; Mensah *et al.*, 2004; Şahin *et al.*, 2004; Agnani *et al.*, 2005; Faleiro *et al.*, 2005; Miguel *et al.*, 2005; Ricci *et al.*, 2005; Sacchetti *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2005; Tepe *et al.*, 2005a; Tepe *et al.*, 2005b). Estes são apenas alguns exemplos a partir do ano 2000. Sabendo que a composição química destes óleos, constituída por dezenas ou mesmo centenas de compostos, varia em função de vários factores: idade da planta, parte da planta, estágio de desenvolvimento, local de crescimento, época de colheita, quimiotipo, entre outros, torna difícil obter um produto com características bem definidas de modo a ser usado em qualquer indústria que necessite de utilizar antioxidantes. Para além destes factores, há a acrescentar ainda as diversas formas de determinar a capacidade antioxidante que tem originado resultados, por vezes, díspares (Ruberto e Baratta, 2000; Puertas-Mejía *et al.*, 2002; Pizzale *et al.*, 2002). A Tabela 4 refere os testes geralmente utilizados para a determinação da actividade antioxidante dos óleos essenciais de várias espécies de *Thymus*.



Tabela 4. Testes utilizados na determinação da actividade antioxidante dos óleos essenciais de várias espécies de *Thymus* e *Thymbra*.

Espécie de <i>Thymus</i> e <i>Thymbra</i>	Teste	Referências
<i>T. albicans</i>	Índice de peróxidos	Miguel <i>et al.</i> (2003a,b)
	TBARS, sistema micelar	Miguel <i>et al.</i> (2007)
<i>T. caespititius</i>	TBARS	Miguel <i>et al.</i> (2004)
<i>T. camphoratus</i>	TBARS	Miguel <i>et al.</i> (2004)
	Índice de acidez e índice de peróxidos	Miguel <i>et al.</i> (2005)
	TBARS, sistema micelar	Miguel <i>et al.</i> (2007)
<i>T. capitatus</i>	TABRS, DPPH	Bounatirou <i>et al.</i> ( <i>in press</i> )
<i>T. carnosus</i>	Índice de peróxidos	Miguel <i>et al.</i> (2003a,b)
	TBARS, sistema micelar	Miguel <i>et al.</i> (2007)
<i>T. eigi</i>	Fenóis totais, DPPH, DPPH em TLC, $\beta$ -caroteno-ácido linoleico (espectrofotométrico)	Tepe <i>et al.</i> (2004)
<i>T. guyonii</i>	TBARS, DPPH	Hazzit <i>et al.</i> (2006)
<i>T. mastichina</i>	Índice de peróxidos	Miguel <i>et al.</i> (2003a,b)
	TBARS	Miguel <i>et al.</i> (2004)
	Índice de acidez e índice de peróxidos	Miguel <i>et al.</i> (2005)
	TBARS, sistema micelar	Miguel <i>et al.</i> (2007)
<i>T. munbyanus</i>	TBARS, DPPH	Hazzit <i>et al.</i> (2006)
<i>T. numiticus</i>	TBARS, DPPH	Hazzit <i>et al.</i> (2006)
<i>T. pallescens</i>	TBARS, DPPH	Hazzit <i>et al.</i> (2006)
<i>T. serpyllum</i>	Rancimat, DPPH, TBARS e $\beta$ -caroteno-ácido linoleico (espectrofotométrico)	Kulisc <i>et al.</i> (2005a,b)
<i>T. spathulifolius</i>	DPPH e $\beta$ -caroteno-ácido linoleico (espectrofotométrico) e fenóis totais	Sokmen <i>et al.</i> (2004)
<i>T. sypyleus</i> subsp. <i>sypyleus</i> var. <i>sypyleus</i> e <i>T. sypyleus</i> subsp. <i>sypyleus</i> var. <i>rosulans</i>	DPPH e $\beta$ -caroteno-ácido linoleico (espectrofotométrico)	Tepe <i>et al.</i> (2005b)
<i>T. vulgarae</i> L	DPPH, FRAP	Julić e Miloš (2005)
<i>T. vulgaris</i>	DPPH e $\beta$ -caroteno-ácido linoleico (espectrofotométrico) e em agar, por difusão	Dapkevicius <i>et al.</i> (1998)
	Índice de peróxidos, Rancimat	Simandi <i>et al.</i> (2001)
	DPPH e $\beta$ -caroteno-ácido linoleico (espectrofotométrico)	Sacchetti <i>et al.</i> (2004)
	Rancimat, DPPH, TBARS e $\beta$ -caroteno-ácido linoleico (espectrofotométrico)	Kulisc <i>et al.</i> (2005a,b)
	$\beta$ -caroteno-ácido linoleico (espectrofotométrico), DPPH, quimioluminiscência (luminol) para superóxido	Sacchetti <i>et al.</i> (2005)
<i>T. x-citriodorus</i>	DPPH, DPPH em TLC, radicais hidroxilo, TBA	Bonzi <i>et al.</i> (2006)
<i>T. x-citriodorus</i>	$\beta$ -caroteno-ácido linoleico (espectrofotométrico), DPPH, quimioluminiscência (luminol) para superóxido	Sacchetti <i>et al.</i> (2005)
<i>T. x-porlock</i>	DPPH e $\beta$ -caroteno-ácido linoleico (espectrofotométrico)	Gachkar <i>et al.</i> (2007)
<i>Thymbra capitata</i>	Índice de peróxidos	Miguel <i>et al.</i> (2003a,b)
	Índice de acidez e índice de peróxidos	Miguel <i>et al.</i> (2005)
	TBARS	Faleiro <i>et al.</i> (2005)

Todos os factores atrás referidos mais os aromas que, geralmente, os óleos essenciais possuem, tornam, por vezes, complicado a sua aplicação na Indústria Alimentar, ou mesmo noutras indústrias como sejam a indústria farmacêutica e a da cosmética. Ruberto e Baratta (2000) estudaram a capacidade antioxidante de cada um dos vários constituintes possíveis dos

óleos essenciais utilizando dois métodos de quantificação: método que mede a formação dos componentes primários da oxidação (hidroperoxidienos) e os componentes secundários da oxidação (malonaldeído) de uma matriz lipídica. Estes autores testaram 98 componentes puros, constituintes naturais presentes em muitos óleos essenciais e que se dividem em 6 grandes subgrupos: monoterpenos não oxigenados, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos não oxigenados, sesquiterpenos oxigenados, derivados do benzeno e componentes não isoprenóides. Geralmente os monoterpenos não oxigenados são considerados possuir fraca ou nenhuma actividade antioxidante, contudo, estes autores verificaram que os monoterpenos monocíclicos terpinoleno,  $\alpha$ - e  $\gamma$ -terpineno e o bicíclico sabineno possuíam actividade antioxidante considerável em ambos os testes ensaiados. Dos monoterpenos oxigenados testados (34), o timol e o carvacrol foram os que, de longe, apresentaram a melhor actividade antioxidante, o que não foi estranho uma vez que são compostos fenólicos. Outros componentes do mesmo grupo também apresentaram actividade, mas geralmente com uma capacidade menor quando comparado com estes dois isómeros fenólicos. Tais compostos foram os álcoois alílicos (álcool perilílico, nerol, *cis*-verbenol e geraniol). O linalol possuía actividade pro-oxidante.

Nos sesquiterpenos, só alguns oxigenados apresentavam alguma actividade apreciável, segundo os mesmos autores, sendo mais uma vez os álcoois alílicos os que apresentavam uma maior actividade. O nerolidol possuía actividade pro-oxidante.

Entre os derivados do benzeno, os fenólicos foram os que apresentaram melhor actividade, como por exemplo, o eugenol. Contudo, estes compostos pareceram ser mais eficazes na prevenção da formação dos produtos primários de oxidação do que na prevenção da formação dos produtos secundários da oxidação.

Nos componentes não isoprenóides, a *cis*-jasmona foi a que apresentou melhor actividade antioxidante. Os resultados destes autores pareceram indicar que os componentes dos óleos que possuam átomos de hidrogénio disponíveis, como acontece nos compostos fenólicos ou nos álcoois alílicos, são bons no impedimento da formação de hidroperoxidienos.

Contudo, estes dados não devem excluir o estudo do óleo essencial no seu todo, porque é assim que ele é geralmente usado, tendo, portanto, sempre em atenção os efeitos de antagonismo, de adição, de potenciação ou de sinergismo.

## REFERÊNCIAS

- Agnaniet H., T. Makani, A. Akagah, C. Menut, J. M. Bessière (2005) Volatile constituents and antioxidant activity of essential oils from *Lippia multiflora* Mold. growing in Gabon. *Flavour and Fragrance Journal* 20: 34-38.
- Bartosz G., A Janaszewska., D Ertel, M Bartosz (1998) Simple determination of peroxy radical-trapping capacity. *Biochemical Molecular Biology International* 46: 519-528.
- Beaudeau JL, MP Vasson (2005) Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène. In: Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. (eds. J. Delattre, J.-L. Beaudeau, D. Bonnefont-Rousselot, Editions TEC & DOC, Lavoisier, Paris.
- Becker, EM, LR Nissen, LH Skibsted (2004) Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *European Food Research and Technology* 219: 561-571.
- Berset C, ME Cuvelier (1996) Méthodes d'évaluation du degré d'oxydation des lipides et de mesure du pouvoir antioxydant. *Science des aliments* 16: 219-245.
- Boonstra J, JA Post (2004) Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 337: 1-13.
- Bounatirou S, S Smiti, MG Miguel, L Faleiro, MN Rejeb, M Neffati, MM Costa, AC Figueiredo, JG Barroso, LG Pedro. Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities of the Essential Oils Isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. *Food Chemistry* (2007, *in press*).
- Bozin B, N Mimica-Dukic, N Simin, G Anackov (2006) Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae species and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 1822-1828.
- Candan F, M Unlu, B Tepe, D Daferera, M Polissiou, A Sökmen, HA Akpulat (2003) Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology* 87: 215-220.

- Costa D, A Gomes, S Reis, JLFC Lima, E Fernandes (2005) Hydrogen peroxide scavenging activity by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Life Sciences* 76: 2841-2848.
- Dapkevicius A, R Venskutonis, TA van Beek, JPH Linssen (1998) Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77: 140-146.
- Deshpande SS, US Deshpande, DK Salunkhe (1995) Nutritional and health aspects of food antioxidants. . In: Food Antioxidants, Technological, Toxicological and Health Perspectives. (eds. D. L. Madhavi, S. S. Deshpande, D. K. Salunkhe), Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, Hong Kong.
- Dorman, HJD, AC Figueiredo, JG Barroso, SG Deans (2000) *In vitro* evaluation of antioxidant activity of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal* 15: 12-16.
- Dorman, HJD, SG Deans (2004) Chemical composition, antimicrobial and in vitro antioxidant properties of *Monarda citriodora* var. *citriodora*, *Myristica fragrans*, *Origanum vulgare* ssp. *hirtum*, *Pelargonium* sp. and *Thymus zygis* oils. *Journal of Essential Oil Research* 16: 145-150.
- Edreva, A. (2005) Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 106: 119-133.
- Faleiro L, G Miguel, S Gomes, L Costa, F Venâncio, A Teixeira, AC Figueiredo, JG Barroso, LG Pedro (2005) Antibacterial and antioxidant activities of essential oils isolated from *Thymbra capitata* L. (Cav.) and *Origanum vulgare* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 8162-8168.
- Fernandes E, SA Toste, JLFC Lima, S Reis (2003) The metabolism of sulindac enhances its scavenging activity against reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radical Biology & Medicine* 35: 1008-1017.
- Fogliano V, V Verde, G Randazzo, A Ritieni (1999) Method for measuring antioxidant activity and its application to monitor the antioxidant capacity of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 1035-1040.
- Frankel E, S Huang, J Kanner, B German (1994) Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 1054-1059.
- Frankel EN (1993) In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. *Trends in Food Science & Technology* 4: 220-225.
- Frankel EN, AS Meyer (2000) The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 1925-1941.
- Frankel EN, SW Huang, R Aeschbach (1997) Antioxidant activity of green teas in different lipid systems. *Journal of American Oil Chemistry Society* 74: 1309-1315.
- Gachkar L, D Yadegari, MB Rezaei, M Taghizadeh, SA Astaneh, I Rasooli (2007) Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry* 102: 898-894.
- Gardès-Albert M, D Jore (2005) Aspects physicochimiques des radicaux libres centrés sur l'oxygène. In: Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. (eds. J. Delattre, J.-L. Beaudeau, D. Bonnefont-Rousselot, Editions TEC & DOC, Lavoisier, Paris.
- Ghiselli A, M Nardini, A Baldi, C Scaccini (1998) Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 361-367.
- Ghiselli A, M Serafini, F Patella, C Scaccini (2000) Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radical Biology & Medicine* 29: 1106-1114.
- Ghiselli A, M Serafini, G Maiani, E Azzimi, A Ferro-Luzzi (1995) A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radical Biology & Medicine* 18: 29-36.
- Gil MI, FA Tomás-Barberán, B Hess-Pierce, DM Holcroft, AA Kader (2000) Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 4581-4589.
- Hagerman AE, KM Riedl, GA Jones, KN Sovik, NT Ritchard, PW Hartzfeld, TL Richel (1998) High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 1887-1892.
- Halliwell B (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry* 97: 1634-1658.
- Halliwell B.; JMC Gutteridge (1999) Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press.
- Hazzit M, A Baaliouamer, AL Faleiro, MG Miguel (2006) Composition of the essential oils of *Thymus* and *Origanum* species from Algeria and their antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 6314-6321;
- Hu FB. (2003) Plant-based food and prevention of cardiovascular diseases. *American Journal of Clinical Nutrition* 78: 544-552.
- Huang D, B Ou, MO Hampsch-Woodill, JA Flanagan, EK Deemer (2002) Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated  $\beta$ -

- cyclodextrin as the solubility enhancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 1815-1821.
- Huang D, B Ou, RL Prior (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 1841-1856.
- Huang S W; EN Frankel (1997) Antioxidant activity of tea catechins in different lipid systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 3033-3038.
- Katsube N, K Iwashita, T Tsushida, K Yamaki, M Kobori (2003) Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 68-75.
- Kooy NW, JA Royall, H Ischiropoulos, JS Beckman (1994) Peroxynitrite-mediated oxidation of dehydrorhodamine 123. *Free Radical Biological & Medicine* 16: 149-156.
- Kruedener S, H Schemepp, EF Elstner (1995) Gas chromatographic differentiation between myeloperoxidase activity and Fenton-type oxidants. *Free Radical Biology & Medicine* 19: 141-146.
- Kulisic T, A Radonic, M Milos (2005) Antioxidant properties of thyme (*Thymus vulgaris* L.) and wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) essential oils. *Italian Journal of Food Science* 17: 315-324.
- Kulisic T, A Radonic, M Milos (2005) Inhibition of lard oxidation by fractions of different essential oils. *Grasas y Aceites* 56: 284-291.
- Kweon MH, HJ Hwang, HCH Sung (2001) Identification and antioxidant activity of novel chlorogenic acid derivatives from Bamboo (*Phyllostachys edulis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 4646-4655.
- Lavelli V, C Peri, A. Rizzolo (1999) Evaluation of radical scavenging activity of fresh and air-dried tomatoes by three model reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 3826-3831.
- Lavelli V, C Peri, A. Rizzolo (2000) Antioxidant activity of tomato products as studied by model reactions using xanthine oxidase, myeloperoxidase, and copper-induced lipid peroxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 1442-1448.
- Lemańska K., H Szymusiak, B Tyrakowska, R Zieliński, AEM Soffers, MCM Rietjens (2001) The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radical Biology & Medicine* 31: 869-881.
- MacDonald-Wicks LK, LG Wood, ML Garg (2006) Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of Science of Food Agriculture* 86: 2046-2056.
- Maranz S; Z Wiesman, N Garti,(2003) Phenolic constituents of shea (*Vitellaria paradoxa*) kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 6268-6273.
- Martínéz-Tomé M, F Garcia-Carmona, MA Murcia (2001) Comparison of the antioxidants and pro-oxidants activities of broccoli amino acids with those of common food additives. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81: 1019-1026.
- Mattila P, J Kumpulainen (2002) Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 3660-3667.
- Mau JL, EYC Lai, NP Wang, CC Chen, CH Chang, CC Chyau (2003) Composition and antioxidant activity of the essential oil from *Curcuma zedoaria*. *Food Chemistry* 82: 583-591.
- Mensah AY, PJ Houghtou, GNA Akyirem, TC Fleischer, MLK Mensah, K Sarpong, R Adosraku (2004) Evaluation of the antioxidant and free radical scavenging properties of *Secamone afzelli* Rhoem. *Phytotherapy Research* 18: 1031-1032.
- Merken HM, GR Beecher (2000) Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 577-599.
- Miguel G, M Simões, AC Figueiredo, JG Barroso, LG Pedro, L Carvalho (2004) Composition and antioxidant activities of the essential oils of *Thymus caespititius*, *Thymus camphoratus* and *Thymus mastichina*. *Food Chemistry* 86: 183-188.
- Miguel MG, AC Figueiredo, MM Costa, DS Martins, JG Barroso, L Pedro, (2003b) Antioxidant activity of the essential oils isolated from *Thymbra capitata* (L.) Cav. on olive and sunflower oils. *Grasas Y Aceites* 54: 219-225.
- Miguel MG, AC Figueiredo, MM Costa, DS Martins, JG Barroso, L Pedro (2003a) Effect of the volatile constituents isolated from *Thymus albicans*, *T. mastichina*, *T. carnosus* and *Thymbra capitata* in sunflower oil. *Nahrung/Food* 30: 397-401.
- Miguel MG, M Falcato-Simões, AC Figueiredo, JM Barroso, LG Pedro, LM Carvalho (2005) Evaluation of the antioxidant activity of *Thymbra capitata*, *Thymus mastichina* and *Thymus camphoratus* essential oils. *Journal Food Lipids* 12: 181-197.
- Miguel MG, LA Costa, AC Figueiredo, JG Barroso, LG Pedro (2007) Assessment of the antioxidant ability of *Thymus albicans*, *Th. mastichina*, *Th. camphoratus* and *Th. carnosus* essential oils by TBARS and Micellar Model systems, *Natural Product Communications* (Special Edition), 2: 399-406.
- Miliauskas GP, R Venskutonis, TA van Beek (2004) Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry* 85: 231-237.

- Mingfu W, JE Simon, IF Aviles, K He, Q Zheng, Y Tadmor (2003) Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 601-608.
- Nagata N, K Momose, Y Ishida (1999) Inhibitory effects of catecholamines and antioxidants on the fluorescence reaction of 4,5-diaminofluorescein, DAF-2, a novel indicator of nitric oxide. *Journal of Biochemistry* 125: 658-661.
- Naguib YMA (2000) Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 1150-1154.
- Nakamura Y, S Tsuji, Y Tonogai (2003) Method for analysis of tannic acid and its metabolites in biological samples: application to tannic acid metabolism in the rat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 331-339.
- Nohl L, AV Kozlov, L Gille, K Staniek (2005) Endogenous oxidant-generating systems. In: Oxidants and Antioxidant Defense Systems. The Handbook of Environmental Chemistry (ed. Tilman Grune), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Ou B, M Hampsch-Woodill, J Flanagan, EK Deemer, RL Prior, D Huang (2002) Novel fluorimetric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 2772-2777.
- Pannala AS, R Razaq, B Halliwell, S Singh, CA Rice-Evans (1998) Inhibition of peroxynitrite dependent tyrosine nitration by hydroxycinnamates: nitration or electron donation? *Free Radical Biology & Medicine* 24: 594-606.
- Pellegrini N, P Rizo, M Porcini (1999) Tomato consumption does not affect the total antioxidant capacity of plasma. *Nutrition* 16: 268-271.
- Pietta P, P Simonetti, P Mauri (1998) Antioxidant activity of selected medicinal plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 4487-4490.
- Pizzale L, R Bortolomeazzi, S Vichi, E Überegger, LS Conte (2002) Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *S. fruticosa*) and oregano (*Origanum onites* and *O. onites*) extracts related to their phenolic compound content. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82: 1645-1651.
- Prior RL (2003) Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *American Journal of Clinical Nutrition* 78: 570-579.
- Prior RL, X Wu, K Schaich (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 4290-4302.
- Puertas-Mejía M, S Hillebrand, E Stashenko, P Winterhalter (2002) *In vitro* radical scavenging activity of essential oils from Columbian plants and fractions from orégano (*Origanum vulgare* L.) essential oil. *Flavour and Fragrance Journal* 17: 380-384.
- Pulido R, L Bravo, F Saura-Calixto (2000) Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 3396-3402.
- Rajalakshmi D, S Narasimhan (1995) Food antioxidants: sources and methods of evaluation. In: Food Antioxidants, Technological, Toxicological and Health Perspectives. (eds. D. L. Madhavi, S. S. Deshpande, D. K. Salunkhe), Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, Hong Kong.
- Re R, N Pellegrini, A Proteggente, A Pannala, M Yang, C Rice-Evans (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biological & Medicine* 26: 1231-1237.
- Riboli E, T Norat (2003) Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *American Journal of Clinical Nutrition* 78: 559-570.
- Ricci D, D Fraternali, L Giamperi, A Bucchini, F Epifano, G Burini, M Curini (2005) Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium marum* (Lamiaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 98: 195-200.
- Roussel AM, J Nève, I Hininger (2005) Antioxydants et nutrition. In Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. (Eds.: Jacques Delattre, Jean-Louis Beaudeau, Dominique Bonnefont-Rousselot). Editions TEC & DOC. Lavoisier, Paris.
- Ruberto G, MT Baratta, SG. Deans, HJD. Dorman (2000) Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* essential oils. *Planta Medica* 66: 687-693.
- Ruberto, G.; Baratta, M. T. (2000) Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry* 69: 167-174.
- Sacchetti G, A Medici, S Maietti, M Radice, M Muzzoli, S Manfredini, E Braccioli, R Bruni (2004) Composition and functional properties of the essential oil of Amazonian basil, *Ocimum micranthum* Willd, Labiatae in comparison with commercial essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 3486-3491.
- Sacchetti G, S Maietti, M Muzzoli, M Scaglianti, S Manfredini, M Radice, R Bruni (2005) Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry* 91: 621-632.

- Şahin F, M Güllüce, D Daferera, A Sokmen, M Sokmen, M Polissiou, G Agar, H Özer (2004) Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the eastern Anatolia region of Turkey. *Food Chemistry* 15: 549-557.
- Sánchez-Moreno C (2002) Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International* 8: 121-137.
- Sánchez-Moreno C, JA Larrauri, F Saura-Calixto (1998) A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 76: 270-276.
- Sartor V, PT Henderson, GB Schuster (1999) Radical cation transport and reaction in RNA/DANN hybrid duplexes: effect of global structure on reactivity. *Journal of American Chemical Society* 121: 11027-11033.
- Schröder P, J Krutman (2005) Environmental oxidative stress – Environmental sources of ROS. In: Oxidants and Antioxidant Defense Systems. The Handbook of Environmental Chemistry (ed. Tilman Grune), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Serafini M, A Ghiselli, A Ferro-Luzzi (1996) *In vivo* antioxidant effect of green and black tea in man. *European Journal of Clinical Nutrition* 50: 28-32.
- Serafini M, G Maiani, A Ferro-Luzzi (1997) Effect of ethanol on red wine tannin-protein (BSA) interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 3148-3151.
- Serafini M, G Maiani, A Ferro-Luzzi (1998) Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. *Journal of Nutrition* 128: 1003-1007.
- Shibamoto T (2006) Analytical methods for trace levels of reactive carbonyl compounds formed in lipid peroxidation systems. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41: 12-25.
- Silva FAM, MFM Borges, MA Ferreira (1999) Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova* 22: 94-103.
- Simandi B, V Hajdu, K Peredi, B Czukur, A Nobik-Kovacs, A Kery (2001) Antioxidant activity of pilot-plant alcoholic and supercritical carbon dioxide extracts of thyme. *European Journal of Lipid Science Technology* 103: 355-358.
- Singh G, S Maurya, C Catalan, MP Lampasona (2005) Studies on essential oils, Part 42: chemical, antifungal, antioxidant and sprout suppressant studies on ginger essential oil and its oleoresin. *Flavour and Fragrance Journal* 20: 1-6.
- Sokmen A, M Gulluce, HA Akpulat, D Daferera, B Tepe, M Polissiou, M Sokmen, F Sahin (2004) The *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Chemistry*, 15: 627-634.
- Teissedre PL, EN Frankel, AL Waterhouse, H Peleg, JB German (1996) Inhibition of *in vitro* human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines. *Journal of Science of Food Agriculture* 70: 55-61.
- Temple MD, GG Perrone, IW Dawes (2005) Complex cellular responses to reactive oxygen species. *TRENDS in Cell Biology* 15: 319-326.
- Tepe B, D Daferera, A Sokmen, M Sokmen, M Polissiou (2005a) Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry* 90: 333-340.
- Tepe B, D Daferera, M Sokmen, M Polissiou, A Sokmen (2004) *In vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Thymus eiggsi* M. Zohary et P. H. Davis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 1132-1137.
- Tepe B, M Sokmen, HA Akpulat, D Dafarera, M Polissiou, A Sokmen (2005b) Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*. *Journal of Food Engineering* 66: 447-454.
- Thérond P, D Bonnefont-Rousselot (2005) Systèmes antioxydants endogènes. In Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. (Eds.: Jacques Delattre, Jean-Louis Beaudeux, Dominique Bonnefont-Rousselot). Editions TEC & DOC. Lavoisier, Paris.
- Unno T, A Sugimoto, T Kakuda (2000) Scavenging effect of tea catechins and their epimers on superoxide anion radicals generated by a hypoxanthine and xanthine oxidase system. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 601-606.
- Vinson JA, XH Su, L Zubik, P Bose (2001) Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 5315-5321.
- Wang SY, H Jiao (2000) Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 5677-5684.
- Wright JS, ER Johnson, GA DiLabio (2001) Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *Journal of American Chemical Society* 123: 1173-1185.
- Zhu BZ, N Kitrosky, M Chevion (2000) Evidence of production of hydroxyl radicals by pentachlorophenol metabolites and hydrogen peroxide. A metal-independent organic Fenton reaction. *Biochemical Biophysical*

*Research Communications* 270: 942-946.

Zwart LL, JHN Meerman, JNM Commandeur, NPE Vermeulen (1999) Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology & Medicine* 26: 202-226.

---