



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina

***MARINE PHOTOSYNTHETIC ORGANISMS FROM THE
PORTUGUESE COAST AS SOURCES OF ANTITUMOURAL
COMPOUNDS***

Andreia Filipa Rodrigues Lopes

Tese para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biomédicas

2016



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina

***MARINE PHOTOSYNTHETIC ORGANISMS FROM THE
PORTUGUESE COAST AS SOURCES OF ANTITUMOURAL
COMPOUNDS***

Andreia Filipa Rodrigues Lopes

Tese para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biomédicas

Trabalho efetuado sob a orientação de:


Professor Doutor João Carlos Serafim Varela

Doutora Luísa Margarida Batista Custódio

2016

Marine photosynthetic organisms from the Portuguese coast as sources of antitumoural compounds

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.



(Andreia Filipa Rodrigues Lopes)

Copyright ©, todos os direitos são reservados à autora Andreia Filipa Rodrigues Lopes

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor João Varela pela sua compreensão demonstrada perante a minha situação de mudança de orientação em que, apesar das circunstâncias, depositou um voto de confiança em mim e no meu trabalho e me aceitou para a realização da tese no laboratório do grupo de investigação de Biotecnologia Marinha (MarBiotech, CCMAR). Um obrigado mesmo muito sincero! Sem si nada disto teria sido possível e o Mestrado em Ciências Biomédicas não teria sido concluído. Obrigada também pela orientação e apoios prestados durante todo este percurso.

À Doutora Luísa Custódio (MarBiotech, CCMAR) pela sua orientação, sugestões, esclarecimentos, críticas, compreensão, amizade e sobretudo pela sua disponibilidade e simpatia em todos os momentos que a chateei no decorrer da dissertação. Sem si, também não poderia ter concluído esta tese! Foi realmente uma excelente orientadora, obrigada por tudo.

À professora Doutora Gabriela Silva devo também o maior dos agradecimentos! Graças a todo o seu apoio e compreensão, na altura mais difícil de todo este percurso, foi-me possível tomar a decisão que veio mudar o rumo do meu trabalho e vida. Sem si, medicina não seria um sonho realizado e sem si, o mestrado em Ciências Biomédicas poderia, também, não ter passado de um sonho. Obrigada por ter acreditado em mim, obrigada pelo seu esforço na solução do problema e, mais que tudo, obrigada por toda a preocupação e ajuda.

Aos meus colegas de laboratório Marta Oliveira, Tamara Santos, Luís Brito, Fernando Gonçalo, Maria Rodrigues, Catarina Pereira, Catarina Duarte e Hugo Pereira obrigada pela calorosa receção e sincera amizade.

À Maria João Rodrigues obrigada ainda por todo o apoio facultado no laboratório, transmissão de conhecimentos e compreensão nos momentos em que mais a chateei com dúvidas.

Aos meus amigos Patrícia Martins, Bárbara Silva, David Brito, Ana Fernandes e Raquel Dias, obrigada pela vossa sincera amizade e todo o apoio que me prestaram.

Ao meu namorado Fábio Maricato por todo o apoio, compreensão e confiança que demonstrou ao longo deste processo. Mesmo nas alturas em que eu não acreditava em mim nunca deixou de me dar força e acreditar que eu era capaz. Por vezes, palavras de carinho e confiança são o segredo para continuar sempre em frente quando tudo parece que se está a desmoronar à nossa volta. Obrigada por todas as palavras e gestos de amor, confiança e carinho. Obrigada por estares lá sempre que eu preciso.

Aos meus pais e irmã o mais sincero e profundo agradecimento! Todo o sucesso que tive devo-o principalmente à minha família, as pessoas mais importantes da minha vida, deram-me todo o apoio necessário e confiaram nas minhas capacidades, realizando um grande esforço para me possibilitarem esta oportunidade, é a eles que devo tudo! Obrigada mãe, pai e mana, obrigada por nunca desistirem de mim.

A todos aqueles que contribuíram para que este projeto fosse mais um desafio cumprido, um obrigada muito especial!

ABREVIATURAS

A-549	Células humanas de cancro do pulmão
AA	Atividade antioxidante
ABTS	Ácido 2,2'-azino- <i>bis</i> -(3-etilbenzotiacolina-6-sulfónico)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AI	Atividade inibitória
AlCl₃	Cloreto de alumínio
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
AQ	Atividade quelante
ARNm	Ácido ribonucleico mensageiro
BHA	2,3-terc-butil-4-hidroxianisol
BHT	Butilhidroxilotolueno
Caco-2	Células de adenocarcinoma coloretal
CAE/g DW	<i>Caffeic acid equivalents per gram of dry weight</i>
CE/g DW	<i>Catechin equivalents per gram of dry weight</i>
COX-2	Cicloxygenase-2
dH₂O	Água destilada
DLD-1	Células do adenocarcinoma humano de cólon
DMACA	P-dimetilaminocinamaldeído
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EP	Erro padrão
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EUA	Estados Unidos da América
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
F-C	<i>Folin-Ciocalteu</i>

FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GAE/g DW	<i>Gallic acid equivalents per gram of dry weight</i>
H₂O	Água
HCl	Ácido clorídrico
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
hACAT	Transferase acil-colesterol
HeLa	Células de adenocarcinoma humano
HepG2	Células de hepatocarcinoma humano
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
HS578T	Células de cancro da mama
HT-29	Células de adenocarcinoma do cólon
IC₅₀	Índice de concentração
iNOS	Sintase do óxido nítrico induzível
IS	Índice de seletividade
K-562	Células de leucemia mielogénica
MeOH	Metanol
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PV	Pirotecol violeta
QE/g DW	<i>Quercetin equivalents per gram of dry weight</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
S17	Células de medula óssea murina
SH-SY5Y	Células de neuroblastoma humano
T47D	Células de carcinoma do ducto mamário
TA	Temperatura ambiente
THP1	Células humanas de leucemia monocítica aguda
UV	Ultravioleta
VIH	Vírus da imunodeficiência humana

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	14
1.1. PRODUTOS NATURAIS NA MEDICINA	14
1.2. PLANTAS HALÓFITAS	16
1.3. CARACTERÍSTICAS E APLICAÇÕES	17
1.4. ESPÉCIES DE HALÓFITAS USADAS NESTE TRABALHO	18
1.5. CANCRO	24
1.6. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	27
1.7. OBJETIVOS	28
2. MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1. RECOLHA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS E PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS	30
2.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL <i>IN VITRO</i>	30
CULTURA E MANUTENÇÃO DAS LINHAS CELULARES	30
DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR	31
DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE DOS EXTRATOS	32
2.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	32
MÉTODO DE DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)	32
MÉTODO DE ABTS•+ [ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiacolina-6-sulfónico)]	34
2.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE QUELANTE	34
2.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DESPIGMENTANTE	35
DETERMINAÇÃO DA INIBIÇÃO DA TIROSINASE	35
2.6. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA	36
DETERMINAÇÃO DE DIFERENTES GRUPOS DE COMPOSTOS FENÓLICOS	36

TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS (TFT)	37
TEOR TOTAL DE FLAVONA E FLAVONOL	38
TEOR TOTAL DE TANINOS	38
2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
3. RESULTADOS	39
3.1. ATIVIDADE CITOTÓXICA <i>IN VITRO</i>	39
3.2. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	42
3.3. ATIVIDADE QUELANTE	46
3.4. ATIVIDADE DESPIGMENTANTE	49
3.5. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA	51
4. DISCUSSÃO	54
4.1. ATIVIDADE CITOTÓXICA <i>IN VITRO</i>	54
4.2. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	57
4.3. ATIVIDADE QUELANTE	61
4.4. ATIVIDADE DESPIGMENTANTE	63
4.5. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA	65
5. CONCLUSÃO / PERSPETIVAS FUTURAS	70
6. BIBLIOGRAFIA	72

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 - Atividade citotóxica <i>in vitro</i> (viabilidade celular, %) de diferentes extratos de espécies de halófitas testadas a 125 µg/mL para cinco linhas celulares.	40
Tabela 3.2 – Efeito da aplicação de extratos de diferentes espécies de halófitas em cinco linhas celulares (resultados expressos em IC ₅₀ , µg/mL).....	41
Tabela 3.3 - Valores de seletividade dos extratos de diferentes espécies de halófitas para as diferentes linhas celulares, calculados com os valores de viabilidade celular obtidos após aplicação da maior concentração testada, 125 µg/mL (Tabela 3.1)	42
Tabela 3.4 - Valores de seletividade dos extratos de diferentes espécies de halófitas para as diferentes linhas celulares, calculados com os valores de IC ₅₀ (Tabela 3.2).....	42
Tabela 3.5 - Atividade antioxidante (AA, %) determinada através dos métodos de DPPH e ABTS dos diferentes extratos de espécies de halófitas, testados a uma concentração de 1 mg/mL.....	44
Tabela 3.6 - Atividade antioxidante determinada através dos métodos de DPPH e ABTS (IC ₅₀ , mg/mL) de diferentes extratos de espécies de plantas halófitas.....	45
Tabela 3.7 - Atividade quelante (AQ, %) do Cu ²⁺ e do Fe ²⁺ (mg/mL) de diferentes extratos de espécies de plantas halófitas aplicados à concentração de 1 mg/mL.	47
Tabela 3.8 - Atividade quelante do Cu ²⁺ e do Fe ²⁺ expressa em valores de IC ₅₀ (mg/mL).....	49
Tabela 3.9 - Atividade inibitória (AI, %) da tirosinase para os diferentes extratos de plantas halófitas a uma concentração de 1 mg/mL e respetivos valores de IC ₅₀ (mg/mL).....	50
Tabela 3.10 – Caracterização fitoquímica dos diferentes extratos de espécies de halófitas.	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Processo de neoplasia.....	25
--	-----------

RESUMO

O aparecimento e agravamento de várias doenças, tais como o cancro, diabetes e doenças cardíacas, tem vindo a aumentar ao longo do tempo, levando a uma crescente necessidade de pesquisa de novos compostos com aplicações biomédicas, principalmente de origem natural. As plantas halófitas possuem um enorme potencial biotecnológico por descobrir, sendo consideradas um grande reservatório, praticamente inexplorado, de novas moléculas bioativas ou novas fontes de compostos conhecidos. Assim, este trabalho teve como principal objetivo a avaliação do potencial antitumoral *in vitro* de extratos naturais de 25 espécies de halófitas. Adicionalmente, foram avaliadas outras atividades biológicas destes extratos, nomeadamente as suas propriedades antioxidantes e despigmentantes *in vitro*. O perfil fitoquímico dos extratos também foi estudado pela avaliação do seu conteúdo em diferentes grupos fenólicos.

A atividade citotóxica *in vitro* foi avaliada pelo método de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) usando linhas celulares tumorais de mamíferos (HepG2: hepatocarcinoma humano; HeLa: adenocarcinoma humano; THP1: leucemia monocítica aguda humana; SH-SY5Y: neuroblastoma humano) e uma linha celular de origem não tumoral (S17: linha celular de medula óssea de murino). A atividade antioxidante foi investigada pelos métodos de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), e também determinando o potencial quelante dos iões ferro (Fe^{2+}) e cobre (Cu^{2+}). O perfil fitoquímico incluiu a determinação do conteúdo total de fenólicos, flavonóis, taninos, flavonas e flavonol por espectrofotometria. Por fim, foi avaliado o potencial despigmentante dos extratos através da atividade inibitória da enzima tirosinase.

Dos resultados obtidos é evidente que a espécie *Inula crithmoides* é uma potencial candidata para a pesquisa de compostos anticancerígenos e as espécies *Convolvulus (Calystegia) soldanella*, *Frankenia laevis*, *F. pulverulenta*, *Lythrum salicaria* e *Pistacia lentiscus* apresentam um melhor potencial para serem usadas como fonte de moléculas e/ou produtos inovadores com aplicações em diferentes áreas, como a nutracêutica e cosmética, uma vez que apresentaram os melhores resultados para todas as atividades testadas.

Palavras-chave: halófitas, biocompostos, cancro, antioxidantes

ABSTRACT

The onset and exacerbation of several diseases like cancer, cardiac diseases and diabetes has increased over time, leading to an increasing need for the research of new compounds with biomedical applications, namely those of natural origin. Halophytes have a high biotechnological potential and are considered an almost unexplored reservoir of novel bioactive molecules, or new sources of known compounds. Therefore, this work aimed to evaluate the *in vitro* antitumoral potential of natural extracts from 25 species of halophytes. Additionally, it was evaluated other biological activities of these extracts, namely the *in vitro* antioxidant and skin whitening properties. The phytochemical profile of the extracts was also assessed through the evaluation of their content in different phenolic groups.

The *in vitro* cytotoxic activity was evaluated by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method using mammalian cell lines from tumoral origin (HepG2: human hepatocarcinoma; HeLa: human adenocarcinoma; THP1: human acute monocytic leukemia; SH-SY5Y: human neuroblastoma) and one cell line from non-tumoural origin (S17: murine stromal cell line). Antioxidant activity was evaluated by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) assays, and also by determining the chelating potential on iron (Fe^{2+}) and copper (Cu^{2+}) ions. Phytochemical profiling included the determination of the total content in phenolics, flavonoids, tannins, flavone and flavonol by spectrophotometric assays. Skin whitening potential was evaluated by the inhibitory activity of the enzyme tyrosinase.

From our results it is clear the species *Inula crithmoides* hold the potential to be a source of antitumoral compounds, while *Convolvulus (Calystegia) soldanella*, *Frankenia laevis*, *F. pulverulenta*, *Lythrum salicaria* and *Pistacia lentiscus* have the highest potential to be used as source of molecules and/or innovative products with potential applications in different areas, such as nutraceutical and cosmetic, since they allowed the best results for all tested activities.

Key words: halophytes, biocompounds, tumor, antioxidant

1. INTRODUÇÃO

1.1. PRODUTOS NATURAIS NA MEDICINA

Diversos produtos naturais, incluindo plantas, animais e minerais têm sido a base do tratamento de várias doenças humanas. Historicamente, a maioria das novas drogas tiveram origem a partir de produtos naturais (metabólitos secundários) e de compostos derivados de produtos naturais (Lahlou, 2013). O uso de plantas como agentes medicinais data de 2600 AC com os registos mais antigos do seu uso na Mesopotâmia. Estes documentos relatam o uso de vários medicamentos baseadas em plantas, cerca de 1000 no caso da Mesopotâmia. No entanto, só no início do século XVIII foram isolados os primeiros princípios ativos das plantas, entre os quais a morfina, atropina, colquicina e estricnina (Newman e Cragg, 2004).

Em 1826, E. Merck produziu o primeiro produto comercial natural puro, a morfina. Entre 1983 e 1994, 41% das novas drogas aprovadas tiveram a sua origem em produtos naturais, demonstrando o seu papel crucial na medicina. É importante salientar que desde 1940, cerca de 175 fármacos antitumorais foram desenvolvidos e estão disponíveis comercialmente nos Estados Unidos da América (EUA), Europa e Japão; 65% destes fármacos tiveram a sua origem a partir de produtos naturais, ou seja, produtos puros naturais (14% do total), semissintéticos ou moléculas sintéticas com farmacóforos de produtos naturais. (Miller, 2000; Lamari e Cordopatis, 2008).

Os investigadores sempre tiveram fácil acesso à vida terrestre da qual a maioria dos produtos farmacêuticos, bem-sucedidos, de origem natural resultam. No entanto, aproximadamente 71% do planeta é coberto por oceanos, sendo que os organismos marinhos englobam sensivelmente metade da biodiversidade total na Terra. Assim sendo, os ecossistemas marinhos representam uma potencial fonte de biocompostos para a criação de novos fármacos (Faulkner, 2002; Blunt *et al.*, 2005; Demain e Valshnav, 2011).

Atualmente, os organismos marinhos constituem o principal alvo de investigação na procura de novos compostos bioativos com potencial aplicação no tratamento de diversas doenças, sendo que muitos deles contém moléculas com importantes atividades

biológicas tais como antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória e antibacteriana (Haefner, 2003; Jha e Zi-Rong, 2004; Gerwick e Bradley, 2012).

Organismos marinhos, como as esponjas, tunicados, algas, corais moles, aplísias, microalgas, entre outros, têm sido utilizados para extração de vários compostos bioativos (Haefner, 2003; Donia e Hamann, 2003). Como tal, a pesquisa de compostos bioativos em organismos marinhos possibilitou o isolamento de mais de 10.000 metabolitos, muitos dos quais com propriedades farmacodinâmicas (Fuesetani, 2000).

Até ao momento, foram identificados compostos bioativos em mais de onze géneros de esponjas, sendo que três desses géneros (*Haliclona*, *Petrosia* e *Discodemia*) produzem compostos antitumorais e anti-inflamatórios (Blunt *et al.*, 2004). Dos compostos descobertos, a espongouridina é um inibidor potente de tumores obtido da esponja *Tectitethya crypta*. A partir deste composto foi sintetizada uma nova classe de análogos de nucleosídeos de arabinose, um dos quais é incorporado no ácido desoxirribonucleico (ADN) celular e tem como função inibir as ADN polimerases responsáveis pela replicação do ADN. Este medicamento já se encontra em uso clínico no tratamento do linfoma “não-Hodgkin” e da leucemia mielocítica aguda (Ireland *et al.*, 1993).

A ziconotida (Prialt®) é um análogo sintético de um ω -conopéptido que deriva de produtos químicos marinhos e constitui o terceiro medicamento na lista de fármacos dos EUA, sendo usado como analgésico em pacientes com vírus da imunodeficiência humana (VIH) e cancro (Staats *et al.*, 2004). Este fármaco recebeu a sua aprovação pela autoridade reguladora *Food and Drug Administration* (FDA) em 23 de dezembro de 2004 e pela *European Medicines Agency* (EMA) a 21 de fevereiro de 2005, resulta do estudo pré-clínico e clínico de conotoxinas derivadas do gastrópode marinho, *Conus magus*.

Outro medicamento de origem natural é o Yondelis® utilizado para o tratamento do cancro de ovário (Newman e Cragg, 2004). Este medicamento foi desenvolvido a partir da trabectedina, um composto que se pensava oriundo do tunicado *Ecteinascidia turbinata* no entanto, evidências recentes mostraram que este composto origina da relação

simbiótica microbiana com o tunicado (Schmidt e Donia, 2010; Rocha-Martin *et al.*, 2014).

A investigação de produtos naturais continua a explorar uma variedade de estruturas importantes, que podem ser usadas como modelos para o desenvolvimento de novos fármacos pela indústria farmacêutica. Não há dúvida de que os produtos naturais têm sido, e irão ser, fontes importantes de novos compostos farmacêuticos sendo que atualmente é amplamente reconhecida a importância dos organismos marinhos e o seu potencial biomédico (Fotini e Cordopatis, 2008; Lahlou, 2013). As plantas halotolerantes, que se desenvolvem em zonas de forte influência marítima, são igualmente uma fonte bastante promissora de compostos com diversas aplicações biomédicas. No entanto, esse potencial encontra-se ainda pouco explorado. Deste modo, neste trabalho irá ser abordado o potencial biomédico destes organismos.

1.2. PLANTAS HALÓFITAS

As halófitas são plantas, essencialmente terrestres, capazes de crescer e se reproduzir em solos salinos contendo concentrações de cloreto de sódio entre os 0.5 e os 1.0 M, e ocasionalmente até 1.7 M (Flowers *et al.* 2010). Estas plantas são normalmente encontradas em zonas de forte influência marítima, tais como dunas ou encostas rochosas, depressões salinas e salinas costeiras. São caracterizadas por alta plasticidade fisiológica, sendo capazes de prosperar sob condições de *stress* provocadas pelo biótopo onde se encontram, tais como secura, temperaturas extremas e excessiva luminosidade (Ksouri *et al.*, 2011; Ksouri *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.* 2014; Redondo-Gómez *et al.*, 2010).

Existem mais de 2500 espécies de halófitas conhecidas, podendo estas ser classificadas como plantas extremófilas: halófitas, halófilas, xerófitas e xero-halófitas, dependendo de vários fatores entre os quais os seus requisitos de sal, mecanismos adaptativos e/ou características do biótopo (Ksouri *et al.*, 2011; Ksouri *et al.*, 2012). Estas espécies desenvolveram características fisiológicas que as permite reter e adquirir água, proteger as células de danos causados pela acumulação de espécies reativas de oxigénio (ROS) e manter a homeostasia iónica permitindo-as adaptar-se às condições desfavoráveis do biótopo. Elas biossintetizam diferentes metabolitos, primários e

secundários, como vitaminas, terpenoides, fenólicos, polissacáridos e glicosídeos, que apresentam diversas atividades biológicas tais como antimicrobiana, antialérgica, anticarcinogénica e anti-inflamatória. Deste modo, estes compostos podem ter várias aplicações, podendo ser cruciais na prevenção de várias doenças entre as quais o cancro, inflamação crónica, doenças neurodegenerativas e doenças cardiovasculares (Flowers *et al.*, 2010; Ksouri *et al.*, 2011; Ksouri *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.* 2014).

1.3. CARACTERÍSTICAS E APLICAÇÕES

Os ambientes salinos proporcionam condições desfavoráveis às plantas que conseqüentemente desenvolvem desordens metabólicas e processos de senescência, ligados a uma produção elevada e consecutiva acumulação de espécies reativas de oxigénio (ROS) (Menezes-Benavente *et al.*, 2004; Ksouri *et al.*, 2011; Ksouri *et al.*, 2012).

As halófitas possuem um sistema antioxidante poderoso que lhes possibilita resistir e extinguir estas ROS tóxicas, permitindo-lhes sobreviver a essas condições ambientais desfavoráveis. Alguns dos mecanismos de proteção destes compostos antioxidantes incluem a inibição do início ou propagação da reação oxidativa em cadeia, atrasando a oxidação de lípidos e de outras moléculas e conseqüente produção de radicais livres (Ksouri *et al.*, 2011; Ksouri *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.* 2014).

Os compostos antioxidantes podem ter diversas aplicações a nível da indústria agroalimentar, como aditivos alimentares em gorduras e óleos e em indústrias de processamento de alimentos para prevenção da sua deterioração; da indústria farmacêutica como suplementos alimentares e da cosmética como cremes de loção para o corpo, protetores da pele da luz solar e produtos antienvhecimento (Carolina e Jorge, 2011; Sindhi *et al.*, 2013). Assim, é de enorme interesse a identificação de novas fontes de antioxidantes naturais, tanto por razões económicas como de segurança, para substituição de antioxidantes sintéticos considerados potencialmente carcinogénicos como o 2,3-terc-butil-4-hidroxianisol (BHA). Quando comparados aos antioxidantes sintéticos, os naturais são considerados mais seguros, mais aceites pelos consumidores e, além de protegerem óleos vegetais contra a oxidação lipídica, também lhes conferem propriedades

nutracêuticas. Por isso, a aplicação de antioxidantes extraídos de fontes naturais em óleos vegetais tem sido amplamente investigada (Carolina e Jorge, 2011).

Alguns exemplos de plantas halófitas com atividade antioxidante incluem a *Cakile marítima*, *Eryngium maritimum*, *Crithmum maritimum*, *Mesembryanthemum edule* e o *Limonium algarvense* (Oueslati *et al.*, 2012; Meot-Duros *et al.*, 2009; Falleh *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.* 2015, 2016). Como tal, as halófitas apresentam-se excelentes fontes de antioxidantes naturais a serem exploradas (Tepe *et al.*, 2006; Ksouri *et al.*, 2011; Ksouri *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.* 2014).

Além de fonte de antioxidantes naturais, as halófitas têm sido utilizadas na medicina tradicional. Vários estudos efetuados em diferentes espécies demonstraram o seu potencial uso no tratamento de várias doenças como cancro (*Artemisia scopariae*), infeções microbianas (*M. edule*) e redução da pressão sanguínea (*Salsola kali*), sendo que muitos destes usos foram confirmados em estudos *in vitro* (Ksouri *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.* 2014). Tendo em conta a enorme diversidade de halófitas e o relativo baixo número de compostos bioativos identificados, é fácil compreender o enorme potencial biomédico por descobrir, sendo consideradas um grande reservatório praticamente inexplorado de novas moléculas bioativas ou novas fontes de compostos conhecidos (Ksouri *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.* 2014).

1.4. ESPÉCIES DE HALÓFITAS USADAS NESTE TRABALHO

Várias espécies de plantas halófitas como por exemplo a *A. scopariae*, *C. marítima*, *M. edule* e *S. kali*, foram descritas na literatura como detentoras de diversas atividades biológicas: antioxidantes, antimicrobianas, antitumorais, entre outras. Assim, é de enorme interesse a investigação do potencial biomédico de plantas ainda desconhecidas, como as espécies usadas neste trabalho, em que pouco ou nenhum estudo foi realizado de modo a detetar atividades biológicas interessantes para a saúde humana. Estas plantas constituem potenciais reservatórios de novas moléculas bioativas e foram selecionadas tendo em conta determinadas características como a sua confluência, edibilidade, atividades biológicas e aplicações de medicina tradicional descritas na literatura.

Devido à enorme diversidade de espécies de halófitas e ao baixo conhecimento sobre as mesmas, dentro do leque de espécies investigadas neste trabalho apenas é conhecida informação para as seguintes:

***Arthrocnemum macrostachyum* (Caryophyllales, Chenopodiaceae)**

Esta espécie consiste num arbusto perene comum nas costas do sudoeste da Ibéria, nas regiões do Mediterrâneo, pelo Médio Oriente e Ásia (Redondo-Gómez *et al.* 2010a). Sabe-se que a mesma possui a capacidade de acumular cádmio nas suas raízes, e pode ser vantajosa para restabelecer locais contaminados por este composto (Redondo-Gómez *et al.* 2010b). É considerada uma planta medicinal, contendo metabolitos com atividade antioxidante para o radical DPPH, e também atividade quelante do ferro e cobre (Custódio *et al.* 2012).

***Centaurium erythraea* (Gentianales, Gentianaceae)**

Esta planta é bienal com cerca de meio metro de altura, encontrada na Europa (incluindo a Escócia, Suécia e países mediterrânicos) e partes da Ásia ocidental e África do norte. O uso de *C. erythraea* na medicina tradicional tem sido descrito na farmacopeia de 23 países diferentes, sendo usada para o tratamento da asma, eczema, reumatismo, feridas e chagas, bem como para reduzir o espasmo do músculo liso gastrointestinal e distúrbios digestivos (perda de apetite, desconforto do estômago e indigestão) (Jerkovic *et al.*, 2012).

Estudos fitoquímicos prévios revelaram a presença de uma variedade de metabolitos secundários na planta, muitos dos quais são conhecidos por exibirem importantes atividades biológicas tais como antimicrobiana, antimutagénica e antioxidante (Jerkovic *et al.*, 2012). Outros estudos revelaram que uma infusão desta espécie tem atividade antioxidante efetiva traduzida na capacidade de captar o radical superóxido e inibir, não competitivamente, a xantina oxidase; que um extrato aquoso da planta apresenta efeitos anti-inflamatórios e antipiréticos em ratos; e que a infusão da mesma também apresenta atividade antibacteriana, revelando que o *Bacillus megaterium* exibiu a maior sensibilidade para esta infusão (Jerkovic *et al.*, 2012).

***Convolvulus (Calystegia) soldanella* (Solanales, Convolvulaceae)**

É uma planta anual ou bienal com flor, de até 15 cm de altura, com época de floração entre junho e setembro. Esta espécie é nativa de Portugal Continental e frequentemente encontrada em prados ralos, pousios, bermas de caminhos e locais secos sobre substratos arenosos. No Japão, a espécie *C. japonica* é usada como medicamento tradicional pela população chinesa para fins diuréticos, antipiréticos ou laxativos (Tori *et al.*, 1999). Vários estudos do perfil de fenólicos foram efetuados nestas espécies e outras do mesmo género, numa tentativa de compreender as suas diversas aplicações medicinais onde foram descobertos inúmeros compostos flavonoides, especialmente glicósidos da quercetina e do canferol (Tori *et al.*, 1999; Ahn *et al.*, 2012). Um estudo realizado com várias espécies de plantas revelou que o extrato metanólico da espécie *C. soldanella* tem forte atividade inibitória da produção de óxido nítrico, e também suprime significativamente a expressão tanto ao nível da transcrição, como da tradução, da sintase de óxido nítrico induzida (iNOS) (Kim *et al.*, 2004).

***Frankenia laevis* e *F. pulverulenta* (Caryophyllales, Frankeniaceae)**

Existe pouca informação relativa a possíveis utilizações de espécies pertencentes ao género *Frankenia*, no entanto, foram realizados estudos fitoquímicos para a identificação de diversos flavonoides e fenólicos nas espécies *F. thymifolia*, *F. pulverulenta* e *F. laevis* (Harborne, 1975; Hussein, 2004; Harkat *et al.*, 2007). Zampini *et al.* mostrou que a espécie *F. triandra* tem atividade antibacteriana importante contra *Morganell morganii*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Outro estudo realizado com a *F. thymifolia* revelou que esta é rica em polifenóis, ácidos gordos e taninos, possuindo atividade antioxidante e quelante do ferro, para além disso o extrato clorofórmico desta espécie possui atividade antibacteriana contra a *Staphylococcus aureus* e *E. faecium* (Wided *et al.*, 2011).

***Inula crithmoides* (Asterales, Asteraceae)**

A *Inula crithmoides* é um arbusto pequeno, de até 1 m de altura, com folhas suculentas lineares. É frequente em pântanos litorais salgados, praias de mar, leitos de rios de água salgada e falésias costeiras na região do Mediterrâneo e da costa Atlântica

até às Ilhas Britânicas. Ela aparece em comunidades que crescem em solos salinos, com uma textura siltosa e alagadas temporariamente, a maioria em áreas litorâneas, uma vez que requer temperaturas amenas (Gil *et al.*, 2014). É uma planta amplamente utilizada na medicina tradicional devido principalmente aos seus efeitos hepatoprotetores, sendo que as suas partes aéreas são usadas para o tratamento de várias doenças (Abdel-Wahhab *et al.*, 2008). Dos estudos efetuados nesta espécie, um deles avaliou o efeito protetor do extrato aquoso das suas partes aéreas, contra a mutagenicidade e *stress* oxidativo provocados pela ocratoxina A, onde se provou que o extrato da *I. crithmoides* foi eficaz neutralizando o *stress* oxidativo e fornecendo proteção contra a citotoxicidade em ratinhos machos (Abdel-Wahhab *et al.* 2008); outro estudo demonstrou que esta espécie apresenta elevada atividade antioxidante e antimicrobiana (Jallali *et al.*, 2013).

A *I. viscosa*, outra espécie pertencente ao mesmo género, possui várias aplicações como planta medicinal no Mediterrâneo, na Espanha e Jordânia. Esta espécie é usada como agente antissarna e anti-inflamatório, como cicatrizante, antipirético, antisséptico, para tratamento de diabetes, para problemas gastroduodenais, anti-helmíntico, expetorante, diurético, para o tratamento de bronquite, tuberculose, anemia e cataplasma para a dor reumática. É ainda usada como um indutor do aborto e da esterilidade feminina (Ksouri *et al.*, 2011).

***Limoniastrum monopetalum* (Plumbaginales, Plumbaginaceae)**

Esta espécie consiste numa planta perenifólia que pode atingir até 1.8 m, é encontrada em depressões salinas costeiras e áreas planas costeiras sujeitas a chuvas periódicas e inundações. É uma planta medicinal em que o seu chá de folhas exhibe propriedades antidisentéricas contra doenças infecciosas ou parasitas que causam diarreias sangrentas e dolorosas (Chaieb e Boukhris, 1998; Ksouri *et al.*, 2011). Os seus ramos eram tradicionalmente usados para tingir o cabelo e bronzear a pele. É também utilizada para arranjos ornamentais pelas suas flores e rápido crescimento (Lieth e Mochtchenko, 2002; Ksouri *et al.*, 2011).

***Lythrum salicaria* (Myrtales, Lythraceae)**

É uma planta herbácea perene distribuída amplamente pelo Norte e Noroeste do Irão nas zonas húmidas perto de córregos (Manayi *et al.*, 2013). As suas flores têm sido usadas como plantas medicinais para o tratamento de diarreias, disenteria, inflamação do intestino, hematuria, leucorreia, epistaxis e dismenorreia, sendo ainda usada para limpeza de impetigo, eczema, lúpus e inflamação do aparelho genital feminino (Manayi *et al.*, 2013).

Estudos efetuados nesta espécie demonstraram que a mesma possui atividades antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes, anti-inflamatórias, antinociceptivas e efeitos citotóxicos (Manayi *et al.*, 2013). Outros estudos efetuados com extratos da mesma demonstraram uma diminuição dos níveis de glucose sanguíneos em ratos e coelhos hiperglicémicos e normoglicémicos através do aumento de secreção de insulina, reduzindo também os níveis de “triglicéridos” plásmicos (Manayi *et al.*, 2013).

O ácido betulínico e seus derivados extraídos (acetato de etil), isolados desta espécie, exibem atividades supressivas da transferase de acil-colesterol (hACAT) sugerindo que esta planta possa ser útil para o tratamento e prevenção da hipercolesterolemia e aterosclerose (Manayi *et al.*, 2013).

***Mesembryanthemum crystallinum* (Caryophyllales, Aizoaceae)**

Esta espécie é uma planta com flor suculenta prostrada coberta por grandes células vesiculares acumuladoras de sal, conferindo-lhe um aspeto reluzente distinto. É conhecida pelas suas atividades antissépticas sendo também utilizada como planta medicinal para o tratamento de infeções oculares (Chaieb e Boukhris, 1998; Ksouri *et al.*, 2011).

***Panicum repens* (Poales, Poaceae)**

É uma gramínea perene resistente que pode atingir até 1 m de altura, pensando-se ser nativa da Europa ou Austrália, sendo distribuída largamente pelos trópicos e subtropicais (Holm *et al.*, 1997). Um estudo acerca do potencial efeito hipolipidémico de um extrato etanólico desta espécie foi realizado em ratos com colesterol alto (hiperlipidemia induzida pela dieta), onde se observou que este diminuía

significativamente o aumento dos níveis lipídicos sanguíneos (colesterol total, colesterol LDL e “triglicéridos”) consequentemente diminuindo o índice aterogénico e também aumentava os níveis do chamado colesterol “bom” (colesterol HDL) (El-Tantawy *et al.*, 2015). Neste estudo foi também realizada uma análise de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) dos fenólicos e flavonoides que revelaram a presença de diversos ácidos fenólicos, rutina, quercetina e apigenina-7-glucósido (El-Tantawy *et al.*, 2015).

***Pistacia lentiscus* (Sapindales, Anacardiaceae)**

É conhecida como uma planta medicinal tradicional, encontrada na zona do Mediterrâneo e usada amplamente para a produção de um óleo essencial a partir das suas bagas (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2013; Mezni *et al.*, 2014). As suas bagas são ricas em antocianinas que lhes conferem capacidade antioxidante e induzem a autofagia das células, um mecanismo que confere quimioprevenção. A sua resina exhibe atividades anti-inflamatórias e antioxidantes em indivíduos com doença de Crohn e as suas folhas são usadas para o tratamento de eczema, diarreia e infeções na garganta (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2013; Mezni *et al.*, 2014).

***Salsola sp. e S. vermiculata* (Caryophyllales, Amaranthaceae)**

Existe pouca informação relativa a possíveis utilizações de espécies pertencentes ao género *Salsola*. Sabe-se no entanto que a *S. kali* é extremamente resistente, crescendo em ambientes radioativos e resistindo a pesticidas. É útil para fitorremediação devido à sua hiperacumulação de cádmio, sendo também usada como planta medicinal pelas suas propriedades hipotensivas (Ksouri *et al.*, 2011). Plantas pertencentes a este género são usadas na medicina tradicional como anti-hipertensivos, antibacterianos, antitumorais e consumidas para o tratamento de infeções por ténias (Rasheed *et al.*, 2013).

***Spergularia rubra* (Caryophyllales, Caryophyllaceae)**

É uma planta com flor perene com ramos até 40 cm, encontrada em zonas seixosas e em areias marítimas, marismas salinos secos. Esta espécie é distribuída por todo o mundo, sendo a sua infusão utilizada como diurético. O potencial antidiabético, anticolinesterase e antioxidante foi avaliado num extrato hidroetanólico desta espécie

onde se observou uma resposta dose-dependente para o DPPH e radicais superóxido e óxido nítrico; o mesmo efeito foi observado no ensaio inibitório da α -glucosidase e contra a acetilcolinesterase e butirilcolinesterase (Vinholes *et al.*, 2011). Estas atividades podem ser devidas à presença de diferentes metabolitos como flavonas, ácidos orgânicos e ácidos gordos.

***Typha domingensis* (Thyphales, Typhaceae)**

É uma planta aquática florida perene com cerca de 2.5 m de altura comum nas zonas húmidas de águas rasas, solos molhados, pântanos e brejos. Na Turquia, plantas da espécie *Typha* são usadas para parar hemorragias; o seu pólen é usado para curar feridas, remover estase e hematémese e são frequentemente recomendadas para curar epistaxes e hemorragias uterinas. No Paquistão, o pólen tem sido também ingerido oralmente para aumentar o fluxo de urina, baixar a febre, prevenir hemorragias assim como curar feridas (Sardar *et al.*, 2014). Outros estudos efetuados nesta espécie demonstraram que extratos metanólicos do seu pólen têm um elevado potencial antioxidante (Sardar *et al.*, 2014).

Relativamente às restantes espécies: *Aster tripolium* e *Lactuca sp.* (Asteraceae); *Cladium mariscus* (Cyperaceae); *Halopeplis amplexicaulis* (Chenopodiaceae); *Salicornia fragilis*, *S. ramosissima*, *S. perennis* subespécie *perennis* e *S. p.* subespécie *alpini* (Amaranthaceae); *Puccinellia maritima*, *Spartina versicolor* e *Sporobolus sp.* (Poaceae) não existem relatos das suas utilizações tanto para as espécies como para os respetivos géneros.

1.5. CANCRO

O cancro é uma doença que afeta milhões de pessoas no mundo, apresentando em 2014 uma incidência de cerca de 31.000 pessoas em Portugal (World Health Organization - Cancer Country Profiles, 2014). As taxas de incidência e mortalidade têm apresentado um aumento progressivo ao longo dos anos, como tal torna-se imperativa uma investigação constante nesta área. Caracteriza-se por uma proliferação anormal das células originada por mutações nos mecanismos de controlo dos processos de proliferação e diferenciação celular (Salmon e Sartorelli, 2003). Segundo a teoria multifásica da

carcinogénese conhecida por iniciação-promoção-proliferação, uma única célula que sofra alterações genéticas produzidas por diversos mecanismos, como a inativação de genes supressores de tumores, ativação de oncogenes, inativação de genes responsáveis pela apoptose e mutações produzidas por agentes químicos, físicos e biológicos, pode tornar-se uma célula tumoral e eventualmente cancerígena (Brentani e Coelho, 1998). Estas alterações são passíveis de serem reparadas pelos mecanismos enzimáticos da célula ou serem removidas pelo processo de apoptose; caso não seja possível, seguem para uma fase de promoção. Na fase de promoção, as células iniciadas podem ainda ser eliminadas pela apoptose; caso tal não se verifique, segue-se uma fase de progressão, considerada irreversível, de instabilidade genética, apresentando mudanças nas características bioquímicas e morfológicas das células (Dixon e Kopras, 2004). Em suma, a célula cancerígena perde a sua função em consequência da ausência de diferenciação, proliferando de forma incontrolada, invadindo os tecidos adjacentes e metastizando (Figura 1).

Atualmente, os tratamentos disponíveis para o cancro exibem elevadas taxas de efeitos secundários, sendo que os produtos naturais derivados de plantas medicinais têm

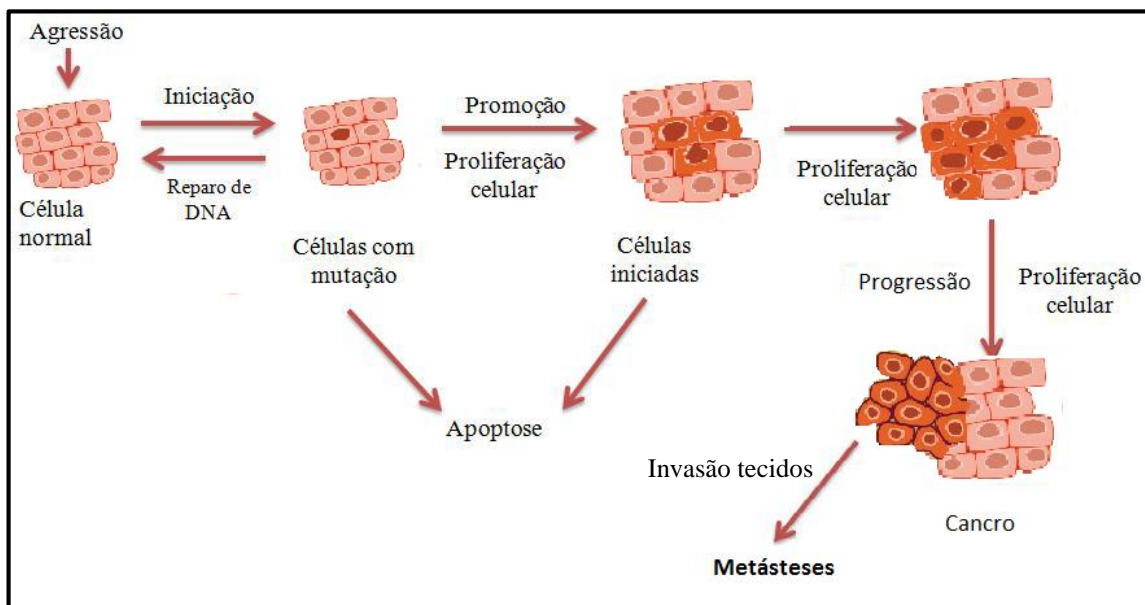


Figura 1 - Processo de neoplasia. Inicialmente a célula normal sofre uma agressão (agentes: químicos, físicos, etc.) que poderá levar a mutações na célula que podem ser reparadas por mecanismos enzimáticos ou removidas pelo processo de apoptose. Caso não haja eliminação ou reparação, estas seguem para uma fase de promoção em que as células iniciadas poderão ainda ser eliminadas por apoptose, caso tal não se verifique segue-se uma fase de progressão irreversível com perda das funções celulares. Posteriormente poderá haver a progressão para outros tecidos e metastização. (Dixon e Kopras, 2004). Adaptado de Oliveira *et al.* (2007).

ganho importância no tratamento desta doença (Boopathy e Kathiresan, 2010). Existem diversas classes de fármacos disponíveis para o tratamento mas nenhuma delas demonstra eficácia na eliminação das células cancerígenas sem afetar os restantes tecidos não cancerígenos (Salmon e Sartorelli, 2003). No entanto pensa-se que a estimulação do sistema imunitário responsável pela eliminação de células cancerígenas possa ser desencadeada através, por exemplo, de compostos com atividade antioxidante (Xiao *et al.*, 2010).

O dano no ADN é considerado um dos passos mais importantes originários do cancro, sendo que muitos destes danos são de natureza oxidativa. Estima-se que uma célula humana típica pode experienciar até um milhão de alterações no seu ADN por dia (Clancy, 2008). A maquinaria de reparação do ADN remove a maioria destes danos mas, ao longo dos anos, as lesões oxidativas do ADN vão acumulando, constituindo um risco de cancro (Sithranga e Kathiresan, 2010). Possíveis compostos bioativos presentes em plantas halófitas podem desempenhar um papel fundamental na prevenção dos vários mecanismos bioquímicos associados e responsáveis pelas doenças provocadas pelo *stress* oxidativo das células, como as neurodegenerativas e vários tipos de tumores.

Estudos realizados em plantas halófitas onde foi avaliado o seu potencial antitumoral revelaram, por exemplo, que a espécie *Artemisia* apresenta atividade antiproliferativa em células HS578T (células de cancro da mama) (Choi *et al.*, 2013); a espécie *Arthrocnemum indicum* bloqueia o ciclo celular na fase G₂/M mostrando um efeito antiproliferativo significativo (Boulaaba *et al.*, 2013); outro estudo demonstrou que os extratos de n-hexano e de metanol (MeOH) aquoso (85%) da espécie *Glehnia littoralis* exibem um elevado efeito antiproliferativo, induzindo apoptose e reduzindo a expressão do ácido ribonucleico mensageiro (ARNm) da cicloxigenase (COX-2), Bcl-2 e da sintase do óxido nítrico induzível (iNOS) (Um *et al.*, 2010); outra espécie, a *Tamarix gallica*, inibe a proliferação de células humanas de cancro do cólon (Boulaaba *et al.*, 2013); por fim, outro estudo avaliando a atividade antitumoral da espécie *Zygophyllum album* demonstrou que o seu extrato de diclorometano apresentou uma capacidade antiproliferativa interessante contra células humanas de cancro do pulmão (A-549) e células do adenocarcinoma humano de cólon (DLD-1) (Ksouri *et al.*, 2013).

1.6. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O metabolismo normal das células produz ROS, resultantes dos processos de produção de energia, fagocitose, sinalização intercelular, regulação do crescimento celular e síntese de substâncias biológicas importantes (ADN, lípidos, proteínas e glícidos). No entanto, o seu excesso no organismo tem efeitos prejudiciais como a peroxidação dos lípidos membranares e a destruição de proteínas estruturais, enzimas, glícidos e ácidos nucleicos (Hussain *et al.*, 1987; Nanji *et al.*, 1994).

Quando existe um desequilíbrio entre os compostos oxidantes, produzidos pelo organismo, e antioxidantes, endógenos e ingeridos pela dieta, há a formação de radicais livres que leva a um *stress* oxidativo. Estes radicais podem ser produzidos no citoplasma, mitocôndrias ou na membrana celular e são responsáveis pelo desencadear de várias doenças nos organismos. No entanto, os organismos estão dotados de diferentes mecanismos de proteção como, por exemplo, diversas enzimas (superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase) catalisadoras de reações de desintoxicação destes radicais livres (Halliwell e Aruoma, 1987). Os processos de oxidação no organismo podem ser evitados através do uso de compostos antioxidantes para prevenção ou redução das reações oxidativas. A introdução de dietas ricas em compostos antioxidantes tais como o α -tocoferol, ácido ascórbico, flavonoides, carotenoides, compostos polifenólicos e glutathione poderão diminuir os riscos de desenvolvimento da maior parte das doenças nos seres humanos como a artrite reumatoide, diabetes, cancro, entre outras (Ferreira e Matsubara, 1997).

Os antioxidantes em pequenas quantidades podem apresentar grande potencial profilático e terapêutico para diversas doenças causadas por ROS, revelando-se de enorme interesse para futuras investigações (Noguchi e Niki, 2000; Kil *et al.*, 2009). Sabe-se que estas espécies reativas de oxigénio estão relacionadas com doenças como a artrite, o choque hemorrágico, doenças cardíacas, cataratas, disfunções cognitivas, envelhecimento e cancro, podendo ser a sua causa ou o seu fator agravante (Halliwell *et al.*, 1995; Bianchi e Antunes, 1999; Shu e Lung, 2008). Como tal, e constituindo as halófitas uma potencial fonte destes compostos, é importante a realização de estudos que visem detetar a sua presença nas diferentes espécies para futuras aplicações biomédicas.

As doenças neurodegenerativas como o Alzheimer, Parkinson e Esclerose múltipla afetam os neurónios cerebrais por diferentes mecanismos, constituindo o envelhecimento o maior fator de risco para a sua ocorrência (Pérez-Hernández *et al.*, 2016). O stress oxidativo é uma das maiores causas de dano e morte neuronais (Pérez-Hernández *et al.*, 2016). A neuroproteção é um mecanismo que tem sido desenvolvido para combater várias doenças neurodegenerativas e traumatológicas (Kwon *et al.*, 2000). Atualmente, um grande número de plantas medicinais tem sido avaliado para o seu potencial terapêutico em doenças neurodegenerativas, mostrando que os seus extratos brutos ou compostos puros isolados possuem propriedades efetivas para tratamento das mesmas, devido à presença de metabolitos secundários das plantas como polifenóis, alcaloides e terpenos (Pérez-Hernández *et al.*, 2016).

Problemas hiperpigmentantes da pele como o melasma, a hiperpigmentação pós-inflamatória, fitofotodermatoses, entre outros, constituem um grupo de doenças ligadas a alterações no pigmento da melanina e são uma fonte frequente de queixas nas consultas de dermatologia (Cestari *et al.*, 2014). Os antioxidantes inibem a tirosinase pela sua própria oxidação e inibem as reações químicas que levam à formação da melanina, alterando o tipo de melanina formada e exibindo um efeito clareador da pele (Sung *et al.*, 2009).

1.7. OBJETIVOS

Existem mais de 2500 espécies conhecidas de plantas halófitas, constituindo um recurso vasto para a pesquisa de biocompostos. No entanto, existe pouca informação relativa às potenciais aplicações destas espécies. Contudo, em alguns países algumas destas espécies são utilizadas em medicina tradicional, o que constitui uma forte evidência do seu elevado potencial para futuras pesquisas que visem a confirmação destas aplicações. Neste sentido, é necessário e de extrema importância desenvolver estudos direcionados nas halófitas como forma de valorizar e beneficiar das potenciais atividades biológicas que os seus compostos bioquímicos poderão apresentar. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo principal a avaliação do potencial antitumoral *in vitro* de extratos naturais preparados a partir de diversas espécies de plantas halófitas comuns no

Algarve. O objetivo secundário consistiu em avaliar outras atividades biológicas relevantes para a saúde humana, nomeadamente as suas propriedades *in vitro* antioxidantes, neuroprotetoras e despigmentantes, bem como fazer uma avaliação preliminar do perfil fitoquímico dos extratos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. RECOLHA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS E PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

Foi recolhida a parte aérea de 25 espécies de plantas halófitas no Sul de Portugal, perto da praia de Faro, Ludo e Castro Marim, em junho de 2012, nomeadamente *S. vermiculata*, *F. pulverulenta*, *H. amplexicaulis*, *S. ramosissima*, *S. perennis subsp. perennis*, *S. perennis subsp. alpini*, *P. lentiscus*, *L. monopetalum*, *A. macrostachyum*, *S. fragilis*, *C. erythraea*, *Salsola sp.*, *P. marítima*, *S. versicolor*, *Lactuca sp.*, *M. cristalinum*, *I. crithmoides*, *L. salicaria*, *T. domingensis*, *C. soldanella*, *A. tripolium*, *P. repens*, *S. rubra*, *F. laevis*, *C. mariscus* e *Sporobolus sp.* A classificação taxonómica foi confirmada pelo Dr. Manuel J. Pinto (Museu Nacional de História Natural, Universidade de Lisboa, Jardim Botânico, Portugal). As amostras foram secas em estufas a 40°C durante 3 dias e pulverizadas, sendo posteriormente armazenadas a -20°C.

A preparação dos extratos foi realizada da seguinte maneira: o pó seco da amostra (2,5 g) foi misturado com uma solução aquosa de 80% de acetona (25 mL) e homogeneizada durante 1 hora usando um agitador IKA Ultra-Turrax T10B, à temperatura ambiente (TA). As amostras foram então filtradas procedendo-se à recolha do sobrenadante. A extração foi repetida 3 vezes e os sobrenadantes foram filtrados e combinados. Os extratos orgânicos foram então evaporados num evaporador rotativo sob pressão controlada e temperatura baixa adequada ao ponto de ebulição do solvente acetona (56°C). Os extratos secos foram pesados, ressuspensos em MeOH para se obter uma concentração final de 100 mg/mL e armazenados a -20°C. Alíquotas dessa solução foram posteriormente evaporadas e ressuspensas em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 25 mg/mL, para utilização nos diferentes bioensaios.

2.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO* CULTURA E MANUTENÇÃO DAS LINHAS CELULARES

Neste trabalho foram utilizadas quatro linhas celulares tumorais humanas, e uma linha celular não tumoral. As linhas celulares tumorais usadas foram: a HepG2 (hepatocarcinoma humano), HeLa (adenocarcinoma humano), THP1 (leucemia monocítica aguda humana) e SH-SY5Y (neuroblastoma humano). A linha celular não tumoral utilizada foi a S17 (medula óssea de murino). A linha celular HepG2 foi gentilmente cedida pela Professora Vera Ribeiro Marques e a S17 pelo Dr. Nuno Rodrigues dos Santos (ambos do CBME, Universidade do Algarve).

As células foram cultivadas e mantidas em meio de cultura adequado, nomeadamente Meio Eagle Modificado por Dulbecco – DMEM, para as HepG2, HeLa, SH-SY5Y e S17; e meio RPMI1640 para as THP1 suplementado com 10% (v/v) de *Fetal Bovine Serum* (FBS) inativado por aquecimento, 1% de L-glutamina (2 mM), 1% de penicilina (50 U/mL) e estreptomicina (50 µg/mL). Todas as linhas celulares foram mantidas numa incubadora a 37°C, com atmosfera humidificada e com 5% de CO₂. O meio de cultura das células foi mudado a cada 2-3 dias e as células utilizadas a uma confluência não inferior a 70-80%.

DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Foi feita a avaliação dos extratos em termos da sua capacidade de inibição da viabilidade celular pelo método de brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) desenvolvido por Mosmann, 1983. Este método baseia-se na clivagem dos sais de tetrazólio em sais de formazão pelas desidrogenases presentes nas mitocôndrias de células viáveis (Mosmann, 1983). As células foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas durante 24 horas a 37°C, com atmosfera humidificada com 5% de CO₂. As linhas celulares de HepG2, HeLa, SH-SY5Y e S17 foram semeadas a uma densidade de 5×10^3 células/poço, sendo que as THP1 foram semeadas a uma densidade de 10×10^3 células/poço. Após este período, as células foram incubadas durante 72 horas com 100 µL dos extratos a várias concentrações (125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81; 3,91; 1,95 e 0,98 µg/mL) no meio de cultura correspondente a cada linha celular. Foram utilizados dois tipos distintos de controlo negativo: células em meio de cultura, de maneira a poder avaliar a proliferação normal das células *versus* a proliferação das células

com os extratos e, células tratadas com DMSO à concentração mais alta presente nos extratos para efetuar o cálculo da viabilidade celular.

Duas horas antes do final do período de incubação, foram adicionados a cada poço 20 µL de MTT (5 mg/mL em *phosphate buffered saline* – PBS), incubados por mais 2 horas a 37°C e depois foram adicionados 150 µL de DMSO a cada poço para dissolver os sais de formazão formados. A absorvância foi medida no final das 2 horas a 590 nm num leitor de microplacas BioTek Synergy 4.

Os resultados foram expressos em termos de viabilidade celular (%), calculada em relação às células tratadas com DMSO. Foram também expressos sob a forma de IC₅₀ (µg/mL), concentração necessária para inibir 50% da viabilidade celular. Como controlo positivo foi utilizado o etopósido, um composto antitumoral utilizado a nível clínico para tratamento de diversos tumores, tais como sarcoma de Ewing, cancro de pulmão, cancro testicular e linfoma.

DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE DOS EXTRATOS

Os extratos que apresentaram inibição da viabilidade celular das linhas tumorais utilizadas superior a 50% para a concentração de 125 µg/mL foram testados na linha celular não tumoral S17, de maneira a determinar-se o índice de seletividade (IS) em relação às células tumorais. O IS foi então determinado utilizando a seguinte equação (Kay, 1991):

$$IS = \frac{VNT}{VT}$$

em que VNT refere-se à viabilidade celular nas células não tumorais (S17) e VT à viabilidade celular nas células tumorais (HepG2, HeLa, THP1 e SH-SY5Y).

2.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

MÉTODO DE DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

Neste método é avaliada a capacidade de captação do radical livre DPPH·. O DPPH· consiste num radical livre estável capaz de aceitar um eletrão e apresenta uma absorção característica a 517 nm (violeta). Neste procedimento determina-se a capacidade dos compostos antioxidantes em reduzir o DPPH·, resultando na formação de difenilpicril-hidrazina (DPPH· reduzido) pela perda do eletrão desemparelhado para os compostos antioxidantes. Observa-se assim uma perda de cor, sendo que o violeta passa a rosa ou amarelo, e conseqüentemente uma diminuição da absorvância medida a um comprimento de onda de 517 nm (Brand-Williams *et al.*, 1995; Hou *et al.*, 2004; Elmastas *et al.*, 2007; Saha *et al.*, 2008; Chattopadhyay *et al.*, 2009).

Para este trabalho foi usado o método desenvolvido por Brand-Williams *et al.* (1995) e adaptado a placas de 96 poços por Moreno *et al.* (1998). Numa placa transparente de 96 poços foram adicionados 22 µL dos extratos nas concentrações de 1; 0,75; 0,5; 0,25 e 0,125 mg/mL com 200 µL de solução de DPPH· (120 µM) em MeOH, e incubadas no escuro à TA durante 30 min. Em algumas amostras foram testadas concentrações adicionais de 0,063; 0,031 e 0,016 mg/mL para poder ser calculada a concentração inibitória para 50% (IC₅₀). Foram usados como controlo positivo a solução de antioxidante sintético E321, butilhidroxilotolueno (BHT), na concentração de 1 mg/mL e como controlo negativo uma solução contendo DMSO em vez dos extratos. Antes do período de incubação foi feita uma leitura a 517 nm para controlo de cor (22 µL de extrato e 200 µL de MeOH).

A absorvância foi medida no final dos 30 min utilizando um leitor de placas BioTek Synergy 4 a 517 nm e os resultados foram expressos como atividade antioxidante (%) relativamente ao controlo negativo e como IC₅₀, (mg/mL), sendo esta a concentração capaz de reduzir o radical livre DPPH· em 50%.

A atividade antioxidante foi calculada segundo a fórmula:

$$AA (\%) = 100 - \frac{100 \times ABS}{ABS_{controlo\ negativo}}$$

em que $ABS = ABS_{extrato} - ABS_{controlo\ de\ cor}$.

MÉTODO DE ABTS^{•+} [ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiacolina-6-sulfónico)]

Neste método a atividade antioxidante foi avaliada utilizando o radical ácido ABTS^{•+} adaptando o procedimento descrito por Re *et al.* (1999). O radical ABTS^{•+} é um catião originado pela oxidação do ABTS com o persulfato de potássio, e reduzido na presença de um hidrogénio dador de eletrões.

Foi preparada uma solução de ABTS a 7 mM, utilizando como agente oxidante uma solução aquosa de persulfato de potássio a 2,6 mM. Esta solução foi incubada durante 12-16 horas no escuro à TA dando origem à solução mãe do radical catiónico ABTS^{•+}. A solução de ABTS^{•+} foi depois diluída em etanol até se obter uma absorvância de 0,70, medida utilizando o leitor de placas BioTek Synergy 4 a 734 nm obtendo-se assim a solução trabalho de ABTS^{•+}.

Numa placa transparente de 96 poços foram adicionados 10 µL de cada extrato, nas concentrações de 1; 0,75; 0,5; 0,25 e 0,125 mg/mL. A reação foi iniciada juntando 190 µL da solução de trabalho ABTS^{•+} e a absorvância medida a 734 nm após 6 min. Foram usados como controlo positivo a solução de antioxidante sintético BHT e como controlo negativo uma solução de DMSO. À semelhança do ensaio de DPPH[•], os resultados foram expressos como atividade antioxidante (%) relativamente ao controlo negativo e como IC₅₀ (mg/mL), concentração capaz de reduzir o radical livre ABTS^{•+} em 50%. A atividade antioxidante foi calculada segundo a seguinte fórmula:

$$AA (\%) = 100 - \frac{100 \times ABS_{extrato}}{ABS_{controlo\ negativo}}$$

2.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE QUELANTE

A avaliação da atividade quelante dos iões metálicos Fe²⁺ e Cu²⁺ foi efetuada nos extratos às concentrações de 1; 0,75; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,063 mg/mL através da adaptação do método descrito por Megías *et al.* (2009). A atividade quelante contra o Fe²⁺ foi determinada pela formação do complexo Fe²⁺-ferrozina, e a atividade quelante contra o Cu²⁺ foi determinada usando o pirocatecol violeta (PV). Como controlo positivo foi utilizado o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), um agente quelante sintético, na

concentração de 1 mg/mL. Como controlo negativo foi utilizado o DMSO em substituição dos extratos.

Para a determinação da atividade quelante do Fe^{2+} , em placas de 96 poços foram adicionados 200 μ L de água destilada, 30 μ L de extrato e 30 μ L de uma solução aquosa de cloreto de ferro ($FeCl_2$ 0,1 mg/mL) e incubou-se durante 30 min à TA. De seguida foi adicionado a cada poço 12,5 μ L de uma solução aquosa de ferrozina (40 mM) e incubado à TA por um período de 10 min. A leitura da absorvância foi feita a um comprimento de onda de 562 nm, num leitor de microplacas BioTek Synergy 4, em duas fases, uma primeira, antes da incubação e uma última após os 10 min de incubação, para poder ser feito o controlo da cor.

Para a atividade quelante do Cu^{2+} , em placas de 96 poços foram adicionados sequencialmente 200 μ L de tampão acetato de sódio (50 mM, pH 6), 100 μ L de sulfato de cobre ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), 30 μ L de extrato e 6 μ L de PV (4 mM em tampão acetato de sódio a 50 mM, pH 6). De seguida foi efetuada a leitura da absorvância a 632 nm, num leitor de microplacas BioTek Synergy 4. Para controlo de cor foi lida a absorvância a 632 nm antes de se adicionar o PV. Os resultados foram expressos como atividade quelante (%) relativamente ao controlo negativo e como valores de IC_{50} (mg/mL).

A atividade quelante foi calculada segundo a fórmula:

$$AQ (\%) = 100 - \frac{100 \times ABS}{ABS_{controlo\ negativo}}$$

em que $ABS = ABS_{extrato} - ABS_{controlo\ de\ cor}$.

2.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DESPIGMENTANTE

DETERMINAÇÃO DA INIBIÇÃO DA TIROSINASE

A avaliação da inibição da tirosinase foi realizada baseada no método descrito por Nerya *et al.* (2003). A tirosinase é uma enzima envolvida na biossíntese da melanina, e por consequência realiza um papel importante na determinação da cor de pele e cabelo.

A melanina é formada pela combinação de reações catalisadas enzimaticamente e químicas que juntas constituem a melanogénese, que é iniciada pela oxidação da tirosina a dopaquinona catalisada pela tirosinase (Chang, 2009). A inibição da tirosinase indica a capacidade que o extrato tem de inibir a produção de melanina, isto é, o seu potencial despigmentante. Por sua vez o oposto, ou seja, verificar-se uma não inibição da sua atividade, pode indicar o potencial bronzeador (aumentar a produção de melanina) desse extrato.

Os extratos foram testados às concentrações de 1; 0,75; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,063 mg/mL e foram utilizados como controlo positivo uma solução de arbutina na concentração de 1 mg/mL em tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 6.5). Como controlo negativo foi utilizado o DMSO em vez dos extratos. Em placas de 96 poços foram misturados 70 µL dos extratos e 3 µL de tirosinase (333 U/mL em tampão fosfato de potássio, 50 mM, pH 6,5) e incubou-se por 5 min à TA. Foram depois adicionados 110 µL do substrato L-Tirosina (2 mM em H₂O) e incubou-se por um período adicional de 30 min à TA. A leitura da absorvância foi realizada a um comprimento de onda de 492 nm num leitor de microplacas BioTek Synergy 4. Antes do período de incubação foi feita uma leitura a 492 nm para controlo de cor. Os resultados foram expressos como atividade inibitória (%) relativamente ao controlo negativo e como valores de IC₅₀, (mg/mL), concentração de inibidor necessário para inibir 50% da atividade enzimática.

A atividade inibitória foi calculada segundo a fórmula:

$$AI (\%) = 100 - \frac{100 \times ABS}{ABS_{controlo\ negativo}}$$

em que $ABS = ABS_{extrato} - ABS_{controlo\ de\ cor}$.

2.6. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

DETERMINAÇÃO DE DIFERENTES GRUPOS DE COMPOSTOS FENÓLICOS

A determinação de diferentes grupos fenólicos foi realizada segundo o método de Mazza *et al.*, (1999), adaptado a placas de 96 poços. Através deste ensaio foram avaliados

2 grupos fenólicos diferentes, nomeadamente: os derivados do ácido hidroxicinâmico e os flavonóis.

Em placas de 96 poços foram adicionados 20 μL dos extratos a uma concentração de 1 mg/mL, 20 μL de uma solução aquosa de etanol (95%, v/v) contendo 0,1 μL HCl e 160 μL de HCl (2%). Foi lida a absorvância a 320 nm (derivados do ácido hidroxicinâmico) e 360 nm (flavonóis) num leitor de microplacas BioTek Synergy 4.

Os resultados foram calculados através de retas de calibração feitas com o respetivo padrão para cada grupo de fenólicos, isto é, o teor de derivados do ácido hidroxicinâmico foi determinado por interpolação da absorvância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido cafeico (ácido fenólico) e expressa como miligramas de equivalentes de ácido cafeico por grama de peso seco de extrato (CAE/g DW) e o teor de flavonóis foi determinado com a curva de calibração da quercetina (flavonoide) e expressa como miligramas de equivalentes de quercetina por grama de peso seco de extrato (QE/g DW).

TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS (TFT)

A determinação do teor de fenólicos totais foi realizada segundo o método de Velioglu *et al.* (1998). Este método baseia-se na transferência de eletrões num meio alcalino de compostos fenólicos para complexos de ácido fosfomolibdico / fosfotúngstico para formar complexos azuis detetados a uma absorvância de 760 nm (Dai *et al.*, 2010). O teor de fenólicos totais foi determinado por interpolação da absorvância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico e expressa como miligramas de equivalentes de ácido gálico (ácido tri-hidroxibenzóico) por grama de peso seco de extrato (GAE/g DW).

Para efetuar este ensaio foram adicionados, em placas transparentes de 96 poços, 5 μL dos extratos na concentração de 10 mg/mL, 100 μL de reagente F-C (Folin-Ciocalteu diluído 10x v/v em H_2O) e incubado à TA durante 10 min. No final do período de incubação foram adicionados 100 μL de carbonato de sódio (75 g/L em H_2O destilada – dH_2O) e incubado mais 90 min à TA. Por fim foi realizada a leitura da absorvância a 725 nm num leitor de microplacas BioTek Synergy 4.

TEOR TOTAL DE FLAVONA E FLAVONOL

A determinação do teor de flavona e flavonol foi realizada segundo o método de Boulanouar *et al.* (2013), modificado a 96 poços.

Em placas de 96 poços foram adicionados 50 μ L dos extratos à concentração de 1 mg/mL com 50 μ L de uma solução a 2% de cloreto de alumínio (AlCl_3) em etanol e incubado durante 1 hora à TA. A leitura da absorvância foi feita a 420 nm num leitor de microplacas BioTek Synergy 4.

Os resultados foram calculados com base na curva de calibração usando a quercetina (flavonol) como padrão e expressos como mg QE/g DW.

TEOR TOTAL DE TANINOS

A determinação do teor de taninos foi realizada segundo o método de Li *et al.*, 1996, adaptado a placas de 96 poços (Zou *et al.*, 2011). Em placas de 96 poços foram adicionados 10 μ L dos extratos à concentração de 1 mg/mL, 200 μ L de *p*-dimetilaminocinamaldeído (DMACA) (1%), 100 μ L de HCl (37%) e incubou-se durante 15 min à TA. De seguida procedeu-se à leitura da absorvância a 640 nm num leitor de microplacas BioTek Synergy 4.

Os resultados foram calculados com base na curva de calibração usando diferentes concentrações de catequina (polifenol) como padrão e expressos como mg CE/g DW.

2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os ensaios foram realizados em sextuplicados e os resultados expressos como média \pm erro padrão (EP). Para a determinação das concentrações de inibição (IC_{50}) dos diferentes extratos foi usado o *software* GraphPad Prism v. 6.0 (GraphPad Software, CA). Foram realizadas análises de variância (ANOVA) para avaliar diferenças usando a plataforma de Statistical Package for Social Sciences® (SPSS v. 23, IBM), e a significância entre médias foi analisada pelo teste de Duncan ($p < 0.05$).

3. RESULTADOS

3.1. ATIVIDADE CITOTÓXICA *IN VITRO*

A atividade citotóxica *in vitro* dos extratos de espécies de plantas halófitas foi avaliada em quatro linhas celulares tumorais nomeadamente HepG2, HeLa, THP1 e SH-SY5Y através do método de MTT. Inicialmente todos os extratos foram testados na concentração de 125 µg/mL, após um período de incubação de 72h. Os extratos que apresentaram inibição da viabilidade celular das linhas tumorais utilizadas igual ou inferior a 50% para a concentração de 125 µg/mL foram testados em concentrações inferiores (62,5; 31,25; 15,63; 7,81; 3,91; 1,95 e 0,98 µg/mL) nas respetivas linhas para cálculo do IC₅₀ e na linha celular não tumoral S17 de maneira a avaliar a seletividade dos mesmos. Os valores de inibição da viabilidade celular encontram-se na Tabela 3.1.

Dos 26 extratos avaliados observa-se que, para a linha celular HeLa, apenas a espécie *C. soldanella* reduziu significativamente a viabilidade celular (14,3% na maior concentração testada); para a linha HepG2 também esta espécie apresentou valor inferior a 50% de viabilidade celular (19,4%); já para a linha celular THP1, as espécies *C. soldanella* e *I. crithmoides* apresentaram ambas valores inferiores a 50% de viabilidade celular, com valores de 44,5% e 52%, respetivamente. Por fim, para a linha SH-SY5Y, as espécies *C. soldanella*, *I. crithmoides* e *L. salicaria* reduziram significativamente a viabilidade celular, com valores de 31,1%, 50,3% e 43,3%, respetivamente. Para estas espécies, que apresentaram valores iguais ou inferiores a 50% de viabilidade celular, foi testado o seu efeito na linha celular não tumoral S17, tendo-se verificado que reduziam significativamente a viabilidade celular, para valores inferiores a 50%.

Em suma, da análise da Tabela 3.1 pode concluir-se que o extrato da espécie *I. crithmoides* diminui a viabilidade celular nas linhas tumorais THP1 e SH-SY5Y, mas mais significativamente nesta última; a *L. salicaria* diminui a viabilidade apenas da linha SH-SY5Y; e a *C. soldanella* diminui a viabilidade celular de todas as linhas tumorais, sendo o seu efeito mais pronunciado nas linhas HepG2, HeLa e SH-SY5Y.

Tabela 3.1 - Atividade citotóxica *in vitro* (viabilidade celular, %) de diferentes extratos de espécies de halófitas testadas a 125 µg/mL para cinco linhas celulares.

Espécie/composto	HepG2	HeLa	THP1	SH-SY5Y	S17
<i>A. macrostachyum</i>	129 ± 0,65 ^{hijkl}	231 ± 1,69 ^g	84,8 ± 9,67 ^{abcdefgh}	95,8 ± 2,38 ^{ghijk}	ne
<i>A. tripolium</i>	111 ± 1,80 ^{efg}	286 ± 5,24 ^h	74,3 ± 0,62 ^{abcdef}	46,9 ± 1,02 ^{abc}	ne
<i>C. soldanella</i>	18,2 ± 0,48^a	14,3 ± 0,09^a	27,7 ± 0,47^a	31,1 ± 0,20^a	16,9 ± 0,83^b
<i>C. erythraea</i>	139 ± 2,20 ^{ijkl}	148 ± 2,47 ^{cd}	81,0 ± 10,53 ^{abcdefgh}	115 ± 3,76 ^k	ne
<i>C. mariscus</i>	99,2 ± 1,35 ^{de}	268 ± 5,02 ^h	64,4 ± 6,69 ^{abcde}	69,2 ± 1,68 ^{cdef}	ne
<i>F. laevis</i>	71,4 ± 0,80 ^b	74,9 ± 0,33 ^b	143 ± 2,03 ^{ij}	80,6 ± 1,56 ^{efghi}	ne
<i>F. pulverulenta</i>	139 ± 3,47 ^{ijkl}	172 ± 2,92 ^e	121 ± 6,73 ^{efghi}	62,2 ± 1,48 ^{bcdef}	ne
<i>H. amplexicaulis</i>	111 ± 2,06 ^{efg}	132 ± 1,51 ^c	100 ± 2,90 ^{bcdefghi}	62,4 ± 2,02 ^{bcdef}	ne
<i>I. crithmoides</i>	102 ± 1,10 ^{def}	178 ± 2,88 ^e	29,0 ± 0,57^{ab}	27,4 ± 0,72^{abcd}	13,7 ± 0,50^b
<i>L. monopetalum</i>	143 ± 4,24 ^{kl}	172 ± 1,91 ^e	129 ± 16,58 ^{fghi}	62,2 ± 3,26 ^{bcdef}	ne
<i>L. salicaria</i>	55,8 ± 0,52 ^b	77,6 ± 0,74 ^b	57,4 ± 1,30 ^{abc}	43,2 ± 1,04^{ab}	49,6 ± 0,57^a
<i>Lactuca sp.</i>	128 ± 1,47 ^{hijk}	457 ± 4,02 ⁱ	75,3 ± 3,80 ^{efghi}	478 ± 30,31 ^l	ne
<i>M. cristalinum</i>	89,4 ± 1,10 ^{cd}	127 ± 1,40 ^c	183 ± 6,05 ^{abcdefg}	102 ± 2,47 ^{ijk}	ne
<i>P. lentiscus</i>	118 ± 1,61 ^{ghi}	168 ± 1,25 ^{de}	68,6 ± 16,80 ^{jk}	68,8 ± 2,93 ^{cdef}	ne
<i>P. marítima</i>	134 ± 1,44 ^{ijkl}	199 ± 2,23 ^f	118 ± 5,75 ^{abcdef}	105 ± 1,48 ^{jk}	ne
<i>P. repens</i>	94,1 ± 1,71 ^{def}	138 ± 1,73 ^c	76,1 ± 2,69 ^{efghi}	74,4 ± 1,46 ^{defgh}	ne
<i>S. fragilis</i>	136 ± 1,20 ^{ijkl}	175 ± 2,80 ^e	118 ± 8,68 ^{abcdefg}	98,4 ± 2,84 ^{hijk}	ne
<i>S. p. subsp alpini</i>	136 ± 4,05 ^{ijkl}	176 ± 0,43 ^e	130 ± 8,42 ^{defghi}	84,9 ± 2,88	ne
<i>S. p. subsp perennis</i>	148 ± 4,74 ^l	204 ± 2,56 ^f	111 ± 17,96 ^{hi}	87,3 ± 1,07 ^{fghij}	ne
<i>S. ramosíssima</i>	137 ± 3,70 ^{ijkl}	168 ± 2,55 ^{de}	61,8 ± 11,82 ^{cdefghi}	68,8 ± 2,26 ^{cdef}	ne
<i>S. rubra</i>	99,1 ± 1,49 ^{de}	95,7 ± 0,72 ^b	191 ± 7,69 ^{abcd}	71,8 ± 1,34 ^{cdefg}	ne
<i>Salsola sp.</i>	98,8 ± 1,02 ^{de}	231 ± 1,78 ^g	223 ± 49,89 ^k	56,2 ± 2,07 ^{bcde}	ne
<i>Sporobolus sp</i>	80,3 ± 1,37 ^{bc}	247 ± 4,84 ^g	114 ± 16,05 ^k	81,1 ± 2,60 ^{efghi}	ne
<i>S. vermiculata</i>	102 ± 1,07 ^{def}	235 ± 1,76 ^g	80,4 ± 10,41 ^{defghi}	75,6 ± 1,63 ^{efgh}	ne
<i>S. versicolor</i>	145 ± 0,97 ^{kl}	225 ± 1,61 ^g	214 ± 3,80 ^{abcdefgh}	107 ± 4,47 ^{jk}	ne
<i>T. domingensis</i>	122 ± 1,70 ^{hij}	137 ± 2,64 ^c	84,8 ± 8,12 ^k	50,4 ± 1,64 ^{abcd}	ne

Os valores representam média ± erro padrão (EP) de 6 replicados. Foram avaliados extratos metanólicos (MeOH) das diferentes espécies de halófitas. HepG2 (cancro hepático), HeLa (cancro cervical), THP1 (leucemia monocítica aguda), SH-SY5Y (neuroblastoma) e S17 (estroma de medula óssea murina). A negrito encontram-se as espécies/compostos que demonstraram atividade. ne, não efetuado. O tratamento estatístico foi feito para cada método entre diferentes extratos. Para a mesma coluna, letras diferentes são significativamente diferentes (Teste Duncan, $p < 0,05$).

Pode ainda observar-se que a linha mais suscetível a estas espécies é a SH-SY5Y que apresenta viabilidades celulares muito baixas para as três espécies que demonstraram citotoxicidade. Pelo contrário, a linha que se apresentou mais resistente foi a THP1 cujos valores de viabilidade celular rondam os 50%. Da análise da viabilidade celular para a linha não tumoral S17, não se verificou seletividade dos extratos testados.

Para as espécies *I. crithmoides*, *C. soldanella* e *L. salicaria*, que apresentaram viabilidades iguais ou inferiores a 50%, foi calculado o respetivo IC₅₀ para cada linha celular. Os resultados são apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Efeito da aplicação de extratos de diferentes espécies de halófitas em cinco linhas celulares (resultados expressos em IC₅₀, µg/mL).

Espécie/composto	HepG2	HeLa	THP1	SH-SY5Y	S17
<i>C. soldanella</i>	6,60 ± 0,11	67,9 ± 1,42	118 ± 1,38	59,7 ± 1,45 ^b	12,0 ± 0,08 ^c
<i>I. crithmoides</i>	nd	nd	0,06 ± 0,03	83,9 ± 4,10 ^a	57,5 ± 1,32 ^b
<i>L. salicaria</i>	nd	nd	nd	91,7 ± 2,67 ^a	96,9 ± 6,50 ^a
Etopósido	5,43 ± 0,10	7,10 ± 0,2	1,82 ± 0,06	65,6 ± 0,90	0,08 ± 0,01

Os valores representam médias ± EP de 6 replicados. Foram avaliados extratos metanólicos (MeOH) das diferentes espécies de halófitas. HepG2 (cancro hepático), HeLa (cancro cervical), THP1 (leucemia monocítica aguda), SH-SY5Y (neuroblastoma) e S17 (estroma de medula óssea murina). O tratamento estatístico foi feito para cada método entre diferentes extratos. Para a mesma coluna, letras diferentes são significativamente diferentes (Teste Duncan, $p < 0.05$). nd, IC₅₀ não determinado.

O valor de IC₅₀ é a concentração necessária para inibir 50% da viabilidade celular. Da análise da Tabela 3.2 pode observar-se que a espécie *C. soldanella* é mais citotóxica para a linha celular HepG2 e menos citotóxica para a THP1. Comparando os valores de IC₅₀ desta espécie com os do etopósido para cada uma das linhas celulares, observa-se que o etopósido é significativamente mais citotóxico para todas as linhas celulares, exceto para a SH-SY5Y em que a *C. soldanella* foi mais citotóxica. A *I. crithmoides* é bastante citotóxica para a linha THP1 comparativamente com as restantes linhas celulares. Esta espécie também é mais citotóxica quando comparada com o etopósido. Quanto à *L. salicaria*, pode observar-se que esta é mais citotóxica para a linha SH-SY5Y comparativamente com a linha não tumoral S17.

Relativamente à seletividade dos extratos para as linhas tumorais, calculada com as percentagens de viabilidade celular obtidas após aplicação da maior concentração

testada, 125 µg/mL (Tabela 3.3), verificou-se que estas espécies não apresentam seletividade significativa para nenhuma das linhas celulares testadas.

Tabela 3.3 - Valores de seletividade dos extratos de diferentes espécies de halófitas para as diferentes linhas celulares, calculados com os valores de viabilidade celular obtidos após aplicação da maior concentração testada, 125 µg/mL (Tabela 3.1).

Espécie/composto	HepG2	HeLa	THP1	SH-SY5Y
<i>C. soldanella</i>	0,87	1,18	0,38	0,53
<i>I. crithmoides</i>	nd	Nd	0,47	0,50
<i>L. salicaria</i>	nd	Nd	nd	1,15

Foram avaliados extratos metanólicos (MeOH) das diferentes espécies de halófitas. HepG2 (cancro hepático), HeLa (cancro cervical), Thp1 (leucemia monocítica aguda), (SH-SY5Y) neuroblastoma. nd, seletividade não determinada. O cálculo da seletividade foi realizado a partir os valores de viabilidades celulares (%) na Tabela 3.1.

Quanto à seletividade dos extratos para as linhas tumorais, calculada com os valores de IC₅₀ (Tabela 3.4), verificou-se a *I. crithmoides* é significativamente seletiva para a linha tumoral THP1 em relação à linha não tumoral (S17). Para além disso, observa-se que o etopósido apresenta uma seletividade muito inferior à da *I. crithmoides* para a linha tumoral THP1. No entanto, também se observa que o etopósido não apresenta seletividade significativa para as linhas celulares HepG2, HeLa e SH-SY5Y.

Tabela 3.4 - Valores de seletividade dos extratos de diferentes espécies de halófitas para as diferentes linhas celulares, calculados com os valores de IC₅₀ (Tabela 3.2).

Espécie/composto	HepG2	HeLa	THP1	SH-SY5Y
<i>C. soldanella</i>	1,82	0,18	0,10	0,20
<i>I. crithmoides</i>	nd	Nd	958	1,06
<i>L. salicaria</i>	nd	Nd	-	1,06
Etopósido	0,02	0,01	8.55	0,001

Foram avaliados extratos metanólicos (MeOH) das diferentes espécies de halófitas. HepG2 (cancro hepático), HeLa (cancro cervical), Thp1 (leucemia monocítica aguda), (SH-SY5Y) neuroblastoma. nd, seletividade não determinada. O cálculo da seletividade foi realizado a partir dos valores de IC₅₀ da Tabela 3.2.

3.2. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Neste trabalho foi avaliada a atividade antioxidante por não termos obtido resultados favoráveis de atividade citotóxica. As ROS estão relacionadas com o desenvolvimento de várias doenças, entre elas o cancro, sendo interessante avaliar a

atividade antioxidante dos extratos e suas possíveis aplicações como redutoras destas espécies. Esta foi avaliada através dos métodos de DPPH e ABTS, sendo que inicialmente todos os extratos foram testados a uma concentração de 1 mg/mL e os resultados encontram-se na Tabela 3.5. Os extratos que apresentaram valores de atividade antioxidantes superiores a 50% para esta concentração, foram testados em concentrações inferiores (1; 0,75; 0,5; 0,25; 0,125; 0,063; 0,031 e 0,016 mg/mL) para cálculo dos valores de IC₅₀ (Tabela 3.6).

Dos 26 extratos avaliados, treze apresentaram uma atividade antioxidante superior a 50% para a concentração de 1 mg/mL (Tabela 3.5), sendo que sete espécies apresentaram valores superiores ao controlo positivo BHT nessa mesma concentração (82,3%). As espécies que apresentaram valores de atividade antioxidante para o DPPH superiores a 50% foram: *A. tripolium* (84,8%), *C. soldanella* (62,5%), *C. mariscus* (90,4%), *F. laevis* (94,4%), *F. pulverulenta* (97,8%), *L. monopetalum* (80,1%), *L. salicaria* (93,8%), *Lactuca sp.* (82,2%), *P. lentiscus* (92,6%), *Salsola sp.* (81%), *Sporobolus sp.* (61,6%), *S. vermiculata* (76,8%) e *T. domingensis* (83,8%), sendo que as espécies *F. pulverulenta*, *P. lentiscus*, *L. salicaria*, *F. laevis* e *C. mariscus*, apresentaram valores estatisticamente superiores ao obtido com o controlo positivo utilizado (BHT: 82,3%).

Relativamente ao método de ABTS verificou-se que das 26 espécies estudadas, nove apresentaram uma atividade antioxidante superior a 50% para a concentração de 1 mg/mL (Tabela 3.5), sendo que quatro destas espécies apresentaram atividades antioxidantes superiores a 90% e apenas uma apresentou um valor superior ao controlo positivo (BHT: 95,3%). As espécies que apresentaram valores de atividade antioxidante superiores a 50% foram: *C. mariscus* (93,8%), *F. laevis* (93,8%), *F. pulverulenta* (87,4%), *L. monopetalum* (69,5%), *L. salicaria* (95,1%), *P. lentiscus* (95,5%), *Salsola sp.* (56,6%), *S. vermiculata* (72,7%) e *T. domingensis* (93,8%), sendo que a espécie *L. salicaria* apresentou uma atividade antioxidante (95,1%), semelhante à do controlo positivo BHT (95,3%).

Tabela 3.5 - Atividade antioxidante (AA, %) determinada através dos métodos de DPPH e ABTS dos diferentes extratos de espécies de halófitas, testados a uma concentração de 1 mg/mL.

Espécie/composto	DPPH	ABTS
<i>A. macrostachyum</i>	20,6 ± 1,75 ^{ij}	28,0 ± 1,24 ^f
<i>A. tripolium</i>	84,8 ± 2,22^{cd}	36,0 ± 3,78 ^e
<i>C. soldanella</i>	62,5 ± 3,47^f	20,0 ± 0,36 ^{ghi}
<i>C. erythraea</i>	9,87 ± 0,67 ^k	11,1 ± 0,52 ^{jk}
<i>C. mariscus</i>	90,4 ± 1,25^{bc}	93,8 ± 0,10^{ab}
<i>F. laevis</i>	94,4 ± 0,13^{ab}	93,8 ± 0,03^{ab}
<i>F. pulverulenta</i>	97,8 ± 0,12^a	87,4 ± 1,20^b
<i>H. amplexicaulis</i>	3,2 ± 2,73 ^l	18,0 ± 1,13 ^{hij}
<i>I. crithmoides</i>	48,4 ± 1,50 ^g	14,3 ± 2,43 ^{ijk}
<i>L. monopetalum</i>	80,1 ± 1,07^{de}	69,5 ± 1,93^c
<i>L. salicaria</i>	93,8 ± 0,89^{ab}	95,1 ± 0,08^a
<i>Lactuca sp.</i>	82,2 ± 2,93^{de}	36,6 ± 2,01 ^e
<i>M. cristalinum</i>	9,29 ± 1,48 ^{kl}	13,4 ± 1,06 ^{ijk}
<i>P. lentiscus</i>	92,6 ± 2,07^{ab}	95,5 ± 0,05^a
<i>P. marítima</i>	16,1 ± 1,14 ^{jk}	11,6 ± 1,25 ^{jk}
<i>P. repens</i>	20,5 ± 1,83 ^{ij}	9,56 ± 1,73 ^k
<i>S. fragilis</i>	30,6 ± 0,29 ^h	20,6 ± 0,41 ^{fghi}
<i>S. p. alpini</i>	21,1 ± 1,92 ^{ij}	22,3 ± 0,40 ^{fgh}
<i>S. p. perennis</i>	15,6 ± 4,85 ^{jk}	27,4 ± 0,59 ^{fg}
<i>S. ramosissima</i>	27,2 ± 3,21 ^{hi}	27,8 ± 0,30 ^f
<i>S. rubra</i>	22,2 ± 1,60 ^{ij}	sa
<i>Salsola sp.</i>	81,0 ± 1,07^{de}	56,6 ± 1,27^d
<i>Sporobolus sp</i>	61,6 ± 2,56^f	25,1 ± 1,26 ^{fgh}
<i>S. vermiculata</i>	76,8 ± 1,75^e	72,7 ± 2,39^c
<i>S. versicolor</i>	18,6 ± 1,19 ^j	20,9 ± 1,08 ^{fghi}
<i>T. domingensis</i>	83,8 ± 1,40^{cde}	93,8 ± 0,10^{ab}
BHT	82,3 ± 1,51^{de}	95,3 ± 0,07^a

Os valores apresentados representam médias ± EP de 12 replicados para cada espécie/composto. Foram avaliados extratos metanólicos (MeOH) das diferentes espécies de halófitas. A AA do BHT é apresentada para a concentração de 1 mg/mL. A negrito encontram-se os extratos que apresentaram valores de AA superiores a 50%. O tratamento estatístico foi feito para cada método entre diferentes extratos. sa, sem atividade. Para a mesma coluna, letras diferentes são significativamente diferentes (Teste Duncan, $p < 0.05$).

Pode ainda observar-se que as espécies *C. mariscus*, *F. laevis*, *F. pulverulenta*, *L. monopetalum*, *L. salicaria*, *P. lentiscus*, *Salsola sp.*, *S. vermiculata* e *T. domingensis* demonstraram atividade antioxidante para ambos os métodos DPPH e ABTS, sendo que as espécies *C. mariscus*, *F. laevis*, *F. pulverulenta*, *L. salicaria*, *P. lentiscus* e *S. vermiculata* apresentaram valores de atividade antioxidante bastante semelhantes para ambos os métodos.

Pela análise da Tabela 3.6 observa-se que as espécies *P. lentiscus*, *L. salicaria* e *F. pulverulenta* que apresentaram valores de atividade antioxidante de DPPH superiores ao controlo positivo BHT na concentração de 1 mg/mL (0,10 mg/mL), apresentam valores de IC₅₀ inferiores ou semelhantes ao mesmo.

Tabela 3.6 - Atividade antioxidante determinada através dos métodos de DPPH e ABTS (IC₅₀, mg/mL) de diferentes extratos de espécies de plantas halófitas.

Espécie/composto	DPPH	ABTS
<i>A. tripolium</i>	0,44 ± 0,05 ^{de}	-
<i>C. soldanella</i>	0,88 ± 0,03 ^f	-
<i>C. mariscus</i>	0,23 ± 0,04 ^{bc}	0,32 ± 0,01 ^c
<i>F. laevis</i>	0,19 ± 0,02 ^{bc}	0,18 ± 0,01 ^b
<i>F. pulverulenta</i>	0,10 ± 0,00 ^{ab}	0,15 ± 0,03 ^b
<i>L. monopetalum</i>	0,57 ± 0,02 ^e	0,77 ± 0,03 ^e
<i>L. salicaria</i>	0,03 ± 0,00 ^a	0,05 ± 0,00 ^a
<i>Lactuca sp.</i>	0,54 ± 0,02 ^{de}	-
<i>P. lentiscus</i>	0,12 ± 0,07 ^{abc}	0,28 ± 0,03 ^c
<i>Salsola sp.</i>	0,41 ± 0,02 ^d	0,73 ± 0,01 ^e
<i>Sporobolus sp.</i>	0,82 ± 0,03 ^f	-
<i>S. vermiculata</i>	0,57 ± 0,02 ^e	0,70 ± 0,01 ^e
<i>T. domingensis</i>	0,26 ± 0,02 ^c	0,41 ± 0,01 ^d
BHT	0,10 ± 0,00^{ab}	0,10 ± 0,00^a

Os valores apresentados representam as médias ± EP. Foram avaliados extratos metanólicos (MeOH) das diferentes espécies de halófitas. O tratamento estatístico foi feito para cada método entre diferentes extratos. Para a mesma coluna, letras diferentes são significativamente diferentes (Teste Duncan, $p < 0,05$). -, IC₅₀ não foi calculado.

Apesar das espécies *F. laevis* e *C. mariscus* terem também apresentado valores de atividade antioxidante superiores ao BHT, apresentam valores de IC₅₀ superiores ao mesmo (0,10 mg/mL), o que significa que é necessária uma maior concentração das

mesmas para reduzirem o DPPH em 50% comparativamente ao controlo positivo. Para o método de ABTS observa-se também que os valores mais baixos de IC₅₀ são os das espécies *F. pulverulenta*, *P. lentiscus*, *L. salicaria* e *F. laevis* com valores inferiores a 0,30 mg/mL, sendo que a espécie *L. salicaria* apresenta o valor de IC₅₀ mais baixo (0,05 mg/mL).

3.3. ATIVIDADE QUELANTE

A atividade quelante foi avaliada em busca de novas aplicações biomédicas para os extratos uma vez que não foram obtidos resultados favoráveis para a atividade citotóxica. Com a avaliação desta atividade fomos testar o potencial dos extratos como neuroprotetores. A atividade quelante do Fe²⁺ foi determinada pela formação do complexo Fe²⁺-ferrozina, e a atividade quelante do Cu²⁺ foi determinada usando o PV. Inicialmente todos os extratos foram avaliados a uma concentração de 1 mg/mL (Tabela 3.7). Para os extratos que apresentaram valores de atividade quelante superiores a 50% para esta concentração, foram testados em concentrações inferiores (1; 0,75; 0,5; 0,25; 0,125; 0,063; 0,031 e 0,016 mg/mL) para o cálculo do IC₅₀ (Tabela 3.8).

Dos 26 extratos testados apenas duas espécies apresentaram uma atividade quelante do Fe²⁺ superior a 50% para a concentração de 1 mg/mL e quatro espécies apresentaram uma atividade quelante do Cu²⁺ superior a 50% para a concentração de 1 mg/mL. As espécies que apresentaram atividades quelantes do Cu²⁺ superiores a 50% foram a *F. pulverulenta* (92,4%), *F. laevis* (78,1%), *L. salicaria* (94,5%) e *P. lentiscus* (90,7%). As espécies *F. pulverulenta* (92,4%), *L. salicaria* (94,5%) e *P. lentiscus* (90,7%) apresentaram valores iguais ou superiores a 90%, ainda que não tenham sido superiores ao controlo positivo EDTA (96,3%). A espécie com maior atividade quelante do Cu²⁺ foi a *L. salicaria* apresentando um valor de 94,4%, valor mais próximo ao do controlo positivo EDTA (96,3%).

Tabela 3.7 - Atividade quelante (AQ, %) do Cu²⁺ e do Fe²⁺ (mg/mL) de diferentes extratos de espécies de plantas halófitas aplicados à concentração de 1 mg/mL.

Espécie/composto	Cu ²⁺	Fe ²⁺
<i>A. macrostachyum</i>	22,4 ± 0,26 ^{fgh}	29,6 ± 2,47 ^d
<i>A. tripolium</i>	27,2 ± 3,80 ^{ef}	5,71 ± 2,04 ^{hij}
<i>C. soldanella</i>	24,2 ± 4,23 ^{fg}	11,2 ± 1,54 ^{fgh}
<i>C. erythraea</i>	11,5 ± 1,34 ^k	12,9 ± 1,21 ^{efgh}
<i>C. mariscus</i>	28,1 ± 1,87 ^{ef}	8,01 ± 2,43 ^{ghij}
<i>F. laevis</i>	78,1 ± 0,67^c	39,5 ± 2,39 ^c
<i>F. pulverulenta</i>	92,4 ± 0,31^{ab}	70,8 ± 1,26^b
<i>H. amplexicaulis</i>	27,0 ± 1,27 ^{ef}	2,11 ± 2,62 ^j
<i>I. crithmoides</i>	13,8 ± 1,42 ^{jk}	12,4 ± 1,26 ^{fgh}
<i>L. monopetalum</i>	39,7 ± 0,50 ^d	19,6 ± 1,26 ^e
<i>L. salicaria</i>	94,9 ± 0,12^{ab}	72,2 ± 1,38^b
<i>Lactuca sp.</i>	30,4 ± 0,40 ^c	3,59 ± 1,28 ^{ij}
<i>M. cristalinum</i>	24,4 ± 0,40 ^{fg}	33,2 ± 0,79 ^{cd}
<i>P. lentiscus</i>	90,7 ± 0,35^b	35,2 ± 2,56 ^{cd}
<i>P. marítima</i>	21,2 ± 2,50 ^{ghi}	12,3 ± 1,03 ^{fgh}
<i>P. repens</i>	16,6 ± 3,37 ^{ijk}	6,21 ± 1,71 ^{hij}
<i>S. fragilis</i>	17,2 ± 0,53 ^{hij}	8,30 ± 1,34 ^{ghij}
<i>S. p. alpini</i>	20,0 ± 0,43 ^{ghi}	14,7 ± 2,39 ^{efg}
<i>S. p. perennis</i>	19,4 ± 1,39 ^{ghi}	Sa
<i>S. ramosissima</i>	22,9 ± 0,47 ^{fgh}	5,79 ± 1,53 ^{hij}
<i>S. rubra</i>	11,4 ± 0,97 ^k	14,0 ± 2,03 ^{efg}
<i>Salsola sp.</i>	27,4 ± 0,59 ^{ef}	10,6 ± 1,85 ^{fghi}
<i>Sporobolus sp</i>	28,0 ± 0,45 ^{ef}	16,2 ± 1,25 ^{ef}
<i>S. vermiculata</i>	27,5 ± 0,64 ^{ef}	8,41 ± 0,90 ^{ghij}
<i>S. versicolor</i>	18,8 ± 0,38 ^{ghij}	11,7 ± 1,59 ^{fgh}
<i>T. domingensis</i>	23,6 ± 2,42 ^{fg}	12,7 ± 2,13 ^{efgh}
EDTA	96,3 ± 1,11^a	100 ± 0,05^a

Os valores apresentados representam médias ± EP de 6 replicados para cada extrato. Foram avaliados extratos metanólicos (MeOH) das diferentes espécies de halófitas. A AQ do controlo positivo EDTA é apresentada para a concentração de 1 mg/mL. A negrito encontram-se as espécies/compostos que apresentaram valores de AQ superiores a 50%. O tratamento estatístico foi feito para cada método entre diferentes extratos. Para a mesma coluna, letras diferentes são significativamente diferentes (Teste Duncan, $p < 0.05$). sa, sem atividade.

Relativamente à atividade quelante do Fe^{2+} , as espécies *F. pulverulenta* e *L. salicaria* apresentaram valores superiores a 50%. A espécie *L. salicaria* foi a mais ativa, apresentando um valor de 72,2% e a espécie *F. pulverulenta* apresentou uma atividade de 70,8%, sendo que nenhuma destas espécies apresentaram valores próximos do controlo positivo EDTA (100%). As espécies *F. pulverulenta* e *L. salicaria* apresentaram atividade quelante para ambos os iões Fe^{2+} e Cu^{2+} , a *F. pulverulenta* apresenta atividades quelantes de 92,4% e 70,8% para o Fe^{2+} e Cu^{2+} , respetivamente, e a *L. salicaria* apresenta atividades de 94,9% e 72,2%, respetivamente para o Fe^{2+} e Cu^{2+} , apresentando-se ambas as espécies mais ativas para o Cu^{2+} comparativamente ao Fe^{2+} .

Da análise da Tabela 3.8 observa-se que a espécie *L. salicaria* apresenta o valor mais baixo de IC_{50} (0,17 mg/mL) e mais próximo ao valor do EDTA (0,10 mg/mL) relativamente ao Cu^{2+} . As restantes espécies apresentaram valores de atividade quelante para o Cu^{2+} de 0,29 mg/mL (*P. lentiscus*), 0,30 mg/mL (*F. pulverulenta*) e 0,44 mg/mL (*F. laevis*). Relativamente ao Fe^{2+} , a espécie *L. salicaria* apresentou o IC_{50} mais baixo (0,21 mg/mL) e mais próximo do EDTA (0,10 mg/mL) e a espécie *F. pulverulenta* apresentou um IC_{50} de 0,50 mg/mL. A *L. salicaria* apresentou valores muito próximos de IC_{50} para ambos os iões Fe^{2+} e Cu^{2+} (0,17 e 0,21 mg/mL, respetivamente). Os valores mais baixos de IC_{50} relativos à atividade quelante do Fe^{2+} e do Cu^{2+} estão associados aos valores mais altos de atividades quelantes.

Quanto ao Cu^{2+} observa-se que as espécies que apresentaram valores mais baixos de IC_{50} são *L. salicaria*, *F. pulverulenta*, *P. lentiscus* e *F. laevis*, por ordem decrescente, e relativamente ao Fe^{2+} , as espécies *L. salicaria* e *F. pulverulenta* apresentam os valores mais baixos de IC_{50} , do menor para o maior.

Tabela 3.8 - Atividade quelante do Cu^{2+} e do Fe^{2+} expressa em valores de IC_{50} (mg/mL).

Espécie/composto	Cu^{2+}	Fe^{2+}
<i>F. laevis</i>	$0,44 \pm 0,01^a$	-
<i>F. pulverulenta</i>	$0,30 \pm 0,01^b$	$0,50 \pm 0,03^b$
<i>L. salicaria</i>	$0,17 \pm 0,00^c$	$0,21 \pm 0,01^b$
<i>P. lentiscus</i>	$0,29 \pm 0,01^b$	-
EDTA	$0,10 \pm 0,00^a$	$0,10 \pm 0,00^a$

Os valores representam média \pm EP para cada extrato. Foram avaliados extratos metanólicos (MeOH) das diferentes espécies de halófitas. O tratamento estatístico foi feito para cada método entre diferentes extratos. Para a mesma coluna, letras diferentes são significativamente diferentes (Teste Duncan, $p < 0.05$). -, IC_{50} não foi calculado.

3.4. ATIVIDADE DESPIGMENTANTE

Esta atividade foi avaliada com o intuito de testarmos novas aplicações biomédicas para os extratos uma vez que não foram obtidos resultados interessantes para o objetivo principal deste trabalho. Através da avaliação desta atividade ensaiamos o potencial dos extratos como despigmentantes para aplicação de diversas doenças dermatológicas.

A atividade despigmentante dos extratos de plantas halófitas foi avaliada pelo método de inibição da tirosinase segundo Nerya *et al.* (2003). Inicialmente todos os extratos foram testados a uma concentração de 1 mg/mL (Tabela 3.9). Os extratos que apresentaram valores de inibição da tirosinase superiores a 50% para esta concentração, foram testados em concentrações inferiores (1; 0,75; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,063 mg/mL) para cálculo do IC_{50} (Tabela 3.9).

Dos 26 extratos avaliados apenas uma espécie (*P. lentiscus*) apresentou uma atividade inibitória da tirosinase superior a 50% para a concentração de 1 mg/mL (89,5%), significativamente superior à atividade do controlo positivo utilizado, arbutina (67,5%). O valor de IC_{50} para esta espécie foi de 0,23 mg/mL, inferior ao obtido para a arbutina (0,48 mg/mL).

Tabela 3.9 - Atividade inibitória (AI, %) da tirosinase para os diferentes extratos de plantas halófitas a uma concentração de 1 mg/mL e respetivos valores de IC₅₀ (mg/mL).

Espécies/compostos	Tirosinase	IC ₅₀
<i>A. macrostachyum</i>	sa	-
<i>A. tripolium</i>	15,9 ± 1,54 ^{fghi}	-
<i>C. soldanella</i>	10,9 ± 0,65 ^{hij}	-
<i>C. erythraea</i>	15,8 ± 1,14 ^{fghi}	-
<i>C. mariscus</i>	24,8 ± 0,64 ^{de}	-
<i>F. laevis</i>	34,3 ± 1,49 ^c	-
<i>F. pulverulenta</i>	40,3 ± 0,89 ^c	-
<i>H. amplexicaulis</i>	15,1 ± 1,08 ^{fghi}	-
<i>I. crithmoides</i>	2,77 ± 2,92 ^k	-
<i>L. monopetalum</i>	6,64 ± 0,75 ^{jk}	-
<i>L. salicaria</i>	53,0 ± 6,17 ^b	-
<i>Lactuca sp.</i>	2,61 ± 1,19 ^k	-
<i>M. cristalinum</i>	sa	-
<i>P. lentiscus</i>	89,5 ± 0,72^a	0,23 ± 0,02
<i>P. marítima</i>	17,3 ± 4,42 ^{efghi}	-
<i>P. repens</i>	9,21 ± 1,27 ^{ijk}	-
<i>S. fragilis</i>	22,4 ± 2,79 ^{def}	-
<i>S. p. alpini</i>	sa	-
<i>S. p. perennis</i>	18,8 ± 0,78 ^{efgh}	-
<i>S. ramosissima</i>	12,7 ± 1,08 ^{ghij}	-
<i>S. rubra</i>	16,7 ± 1,76 ^{fghi}	-
<i>Salsola sp.</i>	19,0 ± 1,71 ^{efg}	-
<i>Sporobolus sp</i>	9,32 ± 0,48 ^{ijk}	-
<i>S. vermiculata</i>	21,2 ± 1,45 ^{def}	-
<i>S. Versicolor</i>	5,54 ± 1,76 ^{jk}	-
<i>T. domingensis</i>	26,9 ± 2,07 ^d	-
Arbutina	67,5 ± 4,06^b	0,48 ± 0,02

Os valores representam média ± EP de 6 replicados para cada espécie/composto. Foram avaliados extratos metanólicos (MeOH) das diferentes espécies de halófitas. O controlo positivo foi testado na mesma concentração dos extratos (1 mg/mL). A negrito encontram-se as espécies/compostos que apresentaram valores de AQ superiores a 50%. sa, sem atividade. -, IC₅₀ não calculado. O tratamento estatístico foi feito para cada método entre diferentes extratos. Para a mesma coluna, letras diferentes são significativamente diferentes (Teste Duncan, $p < 0,05$).

3.5. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

A caracterização química foi efetuada de maneira a compreendermos o teor de determinados compostos químicos que poderão estar relacionados com as atividades citotóxica, antioxidante, neuroproteção e despigmentante avaliadas neste trabalho. Para a caracterização química dos extratos foi determinado o seu conteúdo total de fenólicos, flavonóis, flavonas/flavonol e taninos por espectrofotometria. A Tabela 3.10 apresenta uma compilação dos resultados obtidos para os diferentes ensaios realizados de caracterização fitoquímica dos extratos utilizados neste trabalho.

Relativamente ao teor de derivados do ácido hidroxicinâmico pode observar-se que todas as espécies possuem este tipo de composto, especialmente as espécies *A. tripolium*, *C. soldanella*, *L. salicaria*, *Lactuca sp.* e *Sporobolus sp.* com valores superiores a 45 mg CAE/g DW. A espécie *L. salicaria* foi a que apresentou o teor mais elevado deste grupo de compostos (69,7 mg CAE/g DW). As restantes espécies de plantas halófitas apresentaram valores entre os 20 e os 45 mg CAE/g DW, excetuando as espécies *P. repens* (17,1 mg CAE/g DW) e *S. fragilis* (9,79 mg CAE/g DW) que apresentaram valores inferiores.

Quanto ao teor em flavonóis verificou-se que na generalidade as espécies de halófitas estudadas possuem baixos níveis do mesmo, não tendo sido detetado este grupo de compostos nas espécies *A. macrostachyum*, *P. lentiscus*, *I. crithmoides*, *P. repens*, *S. fragilis* e *S. p. alpini*. A espécie que apresenta maior teor em flavonóis é a *Sporobolus sp.* com um teor de 46,0 mg QE/g DW, seguida da *Salsola sp.* (32,3 mg QE/g DW) e da *C. soldanella* (28,3 mg QE/g DW). A espécie com menor teor desta classe de compostos é a *S. versicolor* com um teor inferior a 1 mg QE/g DW, sendo que as restantes espécies apresentam valores entre 1 e 25 mg QE/g DW.

Das 26 espécies estudadas, praticamente todas apresentaram teores de fenólicos totais muito elevados, sendo que quinze espécies apresentaram valores superiores a 100 mg de GAE/g DW e, oito destas espécies apresentaram valores acima de 200 mg GAE/g DW. Quanto às restantes espécies apresentaram valores também muito elevados, acima dos 50 mg GAE/g DW, excetuando a *C. erythraea* (44,6 mg GAE/g DW), *H. amplexicaulis* (38,9 mg GAE/g DW) e *S. fragilis* (39,7 mg GAE/g DW). As espécies com valores mais elevados e mais significantes de fenólicos totais são a *L. salicaria* (279 mg GAE/g DW),

seguida da *C. mariscus* (254 mg GAE/g DW), *F. laevis* (253 mg GAE/g DW) e da *F. pulverulenta* (239 mg GAE/g DW).

Tabela 3.10 – Caracterização fitoquímica dos diferentes extratos de espécies de halófitas.

Espécies	Ácido Hidroxicinâmico (mg CAE/g DW)	Flavonóis (mg QE/g DW)	Fenólicos Totais (mg GAE/g DW)	Flavonas / Flavonóis (mg QE/ g DW)	Taninos (mg CE/ g DW)
<i>A. macrostachyum</i>	21,7 ± 0,37 ⁿ	Nd	59,4 ± 0,98 ^b	4,62 ± 0,27 ^{gh}	nd
<i>A. tripolium</i>	62,9 ± 1,49^b	9,91 ± 1,10 ^{ij}	223 ± 2,63^d	3,71 ± 0,50 ^{hi}	nd
<i>C. soldanella</i>	49,7 ± 0,59^c	28,3 ± 0,71^c	145 ± 4,32^f	12,7 ± 0,39 ^d	nd
<i>C. erythraea</i>	24,9 ± 1,29 ^{klm}	3,27 ± 1,40 ^{lm}	44,6 ± 1,61 ^q	4,63 ± 0,18 ^{g,hi}	nd
<i>C. mariscus</i>	34,5 ± 0,78 ^g	11,9 ± 0,84 ^{hi}	254 ± 2,26^b	13,8 ± 0,20 ^d	38,7 ± 2,21^a
<i>F. laevis</i>	39,4 ± 0,47 ^f	16,2 ± 0,43 ^{fg}	253 ± 1,52^b	12,8 ± 0,31 ^d	nd
<i>F. pulverulenta</i>	44,4 ± 1,03 ^{de}	25,6 ± 1,42 ^{cd}	239 ± 4,61^c	13,7 ± 0,17 ^d	nd
<i>H. amplexicaulis</i>	27,1 ± 0,95 ^{jk}	24,0 ± 1,18 ^d	38,9 ± 0,78 ^q	18,1 ± 0,25^c	nd
<i>I. crithmoides</i>	33,0 ± 0,67 ^{gh}	nd	141 ± 3,83^{fg}	1,26 ± 0,08 ^k	nd
<i>L. monopetalum</i>	30,8 ± 0,67 ^{hj}	12,7 ± 0,72 ^{hi}	249 ± 1,41^p	13,8 ± 0,26 ^d	6,63 ± 0,80 ^b
<i>L. salicaria</i>	69,7 ± 0,81^a	13,2 ± 0,75 ^{ghi}	279 ± 3,04^a	4,38 ± 0,13 ^{ghi}	nd
<i>Lactuca sp.</i>	51,9 ± 0,52^c	20,3 ± 0,65 ^e	115 ± 2,21^j	10,6 ± 0,24 ^e	nd
<i>M. cristalinum</i>	26,5 ± 0,35 ^{jkl}	5,30 ± 0,32 ^{kl}	93,7 ± 2,84 ^{kl}	2,96 ± 0,08 ^{ij}	nd
<i>P. lentiscus</i>	21,8 ± 0,82 ⁿ	nd	130 ± 3,59^{hi}	8,18 ± 0,31 ^f	7,85 ± 0,80 ^b
<i>P. marítima</i>	23,5 ± 0,34 ^{mn}	2,18 ± 0,44 ^{lm}	83,0 ± 2,23 ^{mn}	3,25 ± 0,11 ^{hi}	nd
<i>P. repens</i>	17,1 ± 0,61 ^o	nd	97,4 ± 2,53 ^k	0,43 ± 0,09 ^k	nd
<i>S. fragilis</i>	9,79 ± 1,14 ^p	nd	39,7 ± 1,46 ^q	nd	nd
<i>S. p. alpini</i>	22,4 ± 0,71 ^{mn}	nd	67,6 ± 2,16 ^{op}	0,56 ± 0,05 ^k	nd
<i>S. p. perennis</i>	24,1 ± 1,02 ^{lmn}	1,10 ± 1,36 ^{mn}	75,7 ± 2,25 ^{no}	4,62 ± 0,28 ^{ghi}	nd
<i>S. ramosíssima</i>	33,6 ± 1,56 ^{gh}	7,27 ± 1,79 ^{jk}	74,2 ± 2,49 ^{no}	4,52 ± 0,18 ^{ghi}	nd
<i>S. rubra</i>	30,6 ± 0,94 ^{hj}	13,6 ± 0,98 ^{gh}	85,3 ± 1,72 ^{lm}	5,93 ± 0,11 ^g	nd
<i>Salsola sp.</i>	42,6 ± 0,73 ^e	32,3 ± 0,89^b	231 ± 3,61^{cd}	20,5 ± 0,15^b	nd
<i>Sporobolus sp</i>	46,8 ± 1,29^d	46,0 ± 1,49^a	180 ± 4,93^e	26,4 ± 0,43^a	nd
<i>S. vermiculata</i>	31,6 ± 0,89 ^{gh}	17,8 ± 1,01 ^{ef}	134 ± 2,62^{gh}	13,3 ± 0,25 ^d	nd
<i>S. versicolor</i>	28,0 ± 0,97 ^{ij}	0,83 ± 1,10 ^{mn}	123 ± 4,43^{ij}	1,68 ± 0,39 ^{jk}	nd
<i>T. domingensis</i>	31,9 ± 0,36 ^{gh}	12,7 ± 0,52 ^{hi}	230 ± 2,92^{cd}	10,4 ± 0,07 ^{ef}	43,4 ± 1,74^a

Extratos metanólicos (MeOH) das diferentes espécies de halófitas. Absorvâncias lidas a 320nm (derivados do ácido hidroxicinâmico – equivalentes de ácido cafeico), 360nm (flavonóis – equivalentes de quercetina), 725nm (fenólicos totais – equivalentes de ácido gálico), 420nm (flavonas/flavonóis – equivalentes de quercetina) e 640nm (taninos – equivalentes de catequina). Os valores representam média ±

EP de 6 replicados para a concentração de 1 mg/mL (ácido hidroxicinâmico, flavonóis, flavona/flavonol e taninos) e de 10 mg/mL (fenólicos totais). A negrito apresentam-se as espécies com maior teor detetado para cada grupo de fenólicos. nd, não detetado. O tratamento estatístico foi feito para cada método entre diferentes extratos. Para a mesma coluna, letras diferentes são significativamente diferentes (Teste Duncan, $p < 0,05$).

Relativamente ao teor em flavonas / flavonóis, as espécies de halófitas incluídas neste trabalho possuem baixo teor na sua constituição sendo que na *S. fragilis* não foi detetado este grupo de compostos. A espécie que apresenta maior teor é a *Sporobolus sp.* com um teor de 26,4 mg QE/g DW, seguida da *Salsola sp.* (20,5 mg QE/g DW) e da *H. amplexicaulis* (18,1 mg QE/g DW). As espécies com um teor mais reduzido de flavonas / flavonóis são a *P. repens* e *S. p. alpini* com um teor inferior a 1 mg QE/g DW, sendo que as restantes espécies apresentam valores entre 1 e 14 mg QE/g DW.

Por fim, as espécies *C. mariscus*, *L. monopetalum*, *P. lentiscus* e *T. domingensis* são as únicas que apresentaram na sua composição taninos, especialmente a *T. domingensis* (43,4 mg CE/g DW), seguida de *C. mariscus* (38,7 mg CE/g DW), de *P. lentiscus* (7,85 mg CE/g DW) e da *L. monopetalum* (6,63 mg CE/g DW).

4. DISCUSSÃO

4.1. ATIVIDADE CITOTÓXICA *IN VITRO*

A atividade citotóxica *in vitro* das espécies de halófitas foi avaliada em quatro linhas celulares tumorais, HepG2, HeLa, THP1 e SH-SY5Y através do método de MTT. O método colorimétrico de MTT baseia-se na capacidade das células vivas reduzirem o MTT em sais de formazão (Mosmann, 1983). Esta redução ocorre principalmente a nível da mitocôndria pela ação da enzima succinato desidrogenase, fornecendo assim uma medida da função mitocondrial da célula. Assim, quanto menor a viabilidade da célula, menor será a quantidade de sais de formazão formados, resultando numa menor absorvância.

Diversas plantas halófitas foram já descritas como tendo atividade citotóxica, entre elas a espécie *Artemisia* (células de cancro da mama), *Arthrocnemum indicum* (adenocarcinoma coloretal), *Glehnia littoralis* e *Tamarix gallica* (adenocarcinoma do cólon), *Zygophyllum album* (cancro do pulmão e adenocarcinoma humano de cólon) e *J. acutus* (hepatocarcinoma humano) (Choi *et al.*, 2013; Um *et al.*, 2010; Boulaaba M. *et al.*, 2013; Ksouri *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2014).

Para as quatro linhas celulares tumorais testadas, os melhores resultados foram obtidos com os extratos de *I. crithmoides*, *L. salicaria* e *C. soldanella*, onde se verificou uma redução significativa da viabilidade celular, após tratamento com a concentração de 125 µg/mL. A espécie *C. soldanella* reduziu a viabilidade celular em todas as linhas tumorais avaliadas, apresentando-se mais citotóxica nas linhas HeLa e HepG2. De forma a se avaliar o potencial antitumoral destes extratos foram calculados os respetivos IC₅₀ e testados os extratos na linha celular não tumoral (S17), à concentração de 125 µg/mL, para avaliação da sua seletividade.

Relativamente à seletividade dos extratos destas espécies, verificou-se que, quando calculadas a partir dos valores de IC₅₀, a *I. crithmoides* revelou ser significativamente seletiva para a linha tumoral THP1 relativamente à linha celular não tumoral (S17), sendo que as restantes espécies não se revelaram seletivas (Tabela 3.4). No entanto, quando calculadas a partir dos valores de viabilidade celular à concentração

de 125 µg/mL, esta espécie (*I. crithmoides*) não se revelou ser seletiva nesta mesma linha em relação à linha S17, tal como o observado nas restantes espécies avaliadas. Isto significa que, para a concentração de 125 µg/mL, a *I. crithmoides* apresenta-se igualmente citotóxica para a linha tumoral THP1 e para a linha não tumoral (S17), mas em concentrações menores já se revela significativamente mais seletiva para a linha tumoral (THP1) em relação à linha S17.

Segundo dos Santos *et al.* (2010), todos os extratos naturais que exibam valores de IC₅₀ inferiores a 30 µg/mL são considerados fontes promissoras de compostos antitumorais. A *I. crithmoides* apresentou um IC₅₀ de 0,06 µg/mL para a linha tumoral THP1 e, como já foi referido anteriormente, esta espécie é significativamente seletiva para esta linha em relação à linha não tumoral. Assim sendo, esta espécie revela-se uma fonte promissora de compostos antitumorais. No entanto, este resultado poderá ser um erro, tendo em conta que só foram utilizadas diluições até 0,98 µg/mL, pelo que este resultado deverá ser confirmado, testando-se o seu efeito com diluições inferiores. Um estudo de Abdel-Wahab *et al.* (2008) mostrou que um extrato aquoso da *I. crithmoides* foi seguro na neutralização do *stress* oxidativo induzido pela ocratoxina A (carcinogénico renal) e forneceu proteção contra a sua citotoxicidade em ratinhos machos. Para além disso, neste trabalho, o extrato de *I. crithmoides* revelou-se significativamente mais seletivo para esta linha tumoral que o controlo positivo (etopósido), indutor de morte de células tumorais. O etopósido é um dos compostos mais potentes utilizado no tratamento de vários tipos de cancro como o dos testículos e dos ovários (Hande, 1998). Neste estudo, o etopósido revelou ser seletivo também para a linha THP1 (8,55), mas em comparação com a seletividade da *I. crithmoides* (958), esta espécie é 112 vezes mais seletiva que o mesmo.

Tendo em conta os resultados obtidos neste estudo para a espécie *I. crithmoides*, que devem ser confirmados com diluições inferiores a 0,98 µg/mL, esta revela-se uma potencial candidata para o desenvolvimento de novos estudos de avaliação do seu potencial uso como droga anticancerígena ou como composto “guia” para a semi-síntese ou síntese total de novos fármacos com eficiências / seletividades mais elevadas. A pesquisa de compostos antitumorais e novos estudos de atividade antitumoral para esta

espécie devem ser desenvolvidos também com diferentes métodos de extração (metanol, água, éter, entre outros) e outras linhas tumorais. Desta forma, a este trabalho deveriam seguir-se outros com o objetivo de confirmar a seletividade deste extrato, proceder à sua caracterização química detalhada, de forma a se fazer a desreplicação e assim evitar a pesquisa de compostos já conhecidos, e se novos compostos forem detetados, prosseguir com o seu isolamento e identificação.

Apesar dos restantes resultados obtidos para as diferentes linhas tumorais não se terem demonstrado seletivos comparativamente à linha não tumoral, o composto anticancerígeno etopósido apresenta também citotoxicidade para as células S17. Para além disso, este composto também não se revelou seletivo para as linhas HepG2, HeLa e SH-SY5Y em relação às S17, mas a espécie *C. soldanella* mostrou ser mais seletiva para a linha tumoral HepG2 e as espécies *I. crithmoides* e *L. salicaria* também foram mais seletivas para a linha SH-SY5Y, em comparação com o etopósido. No entanto, são descritos diferentes níveis de sucesso com este medicamento no tratamento de diversos tipos de cancro (Hande, 1998). Como tal, estas espécies poderão também ser potenciais alvos de pesquisa de compostos anticancerígenos, devendo-se fazer a caracterização química detalhada para se evitar a pesquisa de compostos já conhecidos e, caso se descubram novos compostos, proceder ao seu isolamento e identificação.

A espécie *C. soldanella*, para além de reduzir drasticamente a viabilidade celular nas linhas tumorais HepG2 e HeLa, também apresentou um IC₅₀ inferior a 30 µg/mL para a linha HepG2 e, como já referido anteriormente, segundo dos Santos *et al.*, este extrato é considerado uma fonte promissora de compostos antitumorais. Avaliando a sua seletividade, observa-se que esta espécie apresenta uma seletividade para a linha tumoral HepG2 muito superior ao etopósido (1,82 vs. 0,02). Assim sendo, e tendo em conta que esta espécie apresenta compostos fenólicos na sua constituição que têm potencial antitumoral (Ahn, 2012), pode ser interessante realizar um fracionamento bioguiado para separação dos compostos tóxicos para a linha tumoral dos não tóxicos para a linha não tumoral, após desreplicação das amostras, e posterior pesquisa da sua citotoxicidade para as diferentes linhas tumorais.

A maior parte dos fármacos utilizados para o tratamento de diversos cancros possuem valores de citotoxicidade para as células não tumorais superiores aos das células tumorais, tal como o observado neste estudo para o etoposido. Tendo isto em mente e verificando-se uma evidente redução drástica da viabilidade celular para as linhas HepG2 e HeLa (*C. soldanella*) e SH-SY5Y (*L. salicaria*), poderá ser interessante efetuar-se um estudo mais dirigido para a busca e isolamento de compostos anticancerígenos nestas espécies. Através de um fracionamento bioguiado, separando os compostos tóxicos para as linhas tumorais daqueles tóxicos para as linhas celulares não tumorais, pode-se identificar os compostos responsáveis pela atividade citotóxica. Para além disso, estudos efetuados na espécie *L. salicaria* mostram que esta tem atividade antitumoral, sendo que o extrato de etil acetato é altamente citotóxico para a linha celular T47D (carcinoma do ducto mamário) e o extrato de clorofórmio fracionado é citotóxico para a linha K-562 (leucemia) e HT-29 (Mahnaz *et al.*, 2011); compostos identificados nesta espécie têm também atividades antitumorais para as linhas tumorais HT-29 e K-562, sendo que o crescimento e proliferação destas linhas é predominantemente influenciado por compostos derivados do triterpeno e esteroides desta planta (Manayi *et al.*, 2013).

A *P. lentiscus* é a espécie mais investigada para a atividade antitumoral, sendo esta eficaz contra as células do cancro coloretal, de próstata e leucemia (Bozorgi *et al.*, 2013). Neste estudo não obtivemos reduções na viabilidade celular das linhas celulares tumorais avaliadas, este fato poderá ter a ver com o tipo de extração utilizada (acetona) e com a parte da planta investigada (parte aérea). Outros fatores também poderão estar envolvidos na falta de atividade antitumoral verificada neste estudo, uma vez que a produção de compostos por parte destas plantas está intimamente relacionada com o *stress* a que são submetidas, a altura em que a planta terá sido colhida e as características do biótopo aquando da colheita, podem influenciar a produção de compostos que lhes permite sobreviver em condições ambientais desfavoráveis.

4.2. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada através dos métodos de DPPH e ABTS. Ambos consistem na medição da capacidade de captação/neutralização de

radicais livres, observando-se uma perda de cor e conseqüentemente uma diminuição da absorvância medida a um comprimento de onda de 517nm (DPPH) e a 734nm (ABTS) (Brand-Williams *et al.*, 1995; Re *et al.* (1999); Hou *et al.*, 2004; Elmastas *et al.*, 2007; Saha *et al.*, 2008; Chattopadhyay *et al.*, 2009).

A composição de um extrato em termos de compostos com atividade antioxidante depende dos métodos de extração e do solvente utilizado. A acetona, solvente usado na extração das halófitas, tem uma elevada polaridade, portanto será de esperar que os extratos apresentem elevados compostos polares extraídos. Quanto maior a constituição em substâncias polares maior a capacidade antioxidante dos extratos (Alves *et al.*, 2010), portanto será de esperar que os extratos destas espécies tenham elevadas atividades antioxidantes.

Com o método do DPPH, das treze espécies que se revelaram ativas, as espécies *F. pulverulenta*, *P. lentiscus*, *L. salicaria*, *F. laevis* e *C. mariscus* apresentaram valores de atividade antioxidante superiores ao controlo positivo BHT. Estudos prévios também exibiram atividade antioxidante de extratos polares da *L. salicaria*, corroborando os resultados deste estudo (Coban *et al.*, 2003; Tunalier *et al.*, 2007; Manayi *et al.*, 2013). O mesmo também se verificou para a *P. lentiscus* que vários estudos de diferentes partes da planta mostraram atividade antioxidante (Hosseinzadeh *et al.*, 2012; Bozorgi *et al.*, 2013). Relativamente às espécies *F. pulverulenta* e *F. laevis*, até à data não há relatos de propriedades antioxidantes, no entanto, para a espécie *F. thymifolia* L., pertencente ao mesmo género, um estudo mostrou que a sua atividade antioxidante era tanto maior quanto maior a polaridade do extrato, sendo que o extrato de metanol conduziu a melhores resultados de atividade antioxidante comparativamente ao de clorofórmio (Wided *et al.*, 2011). Tendo em conta este fato, para as espécies que demonstraram atividades antioxidantes superiores à do controlo positivo isto pode ser devido à seletividade do solvente para extração de certos grupos fenólicos. De fato, vários estudos mostraram que a natureza dos solventes, notavelmente a polaridade, têm diferentes capacidades de extração e qualidades de compostos fenólicos nas plantas (Wided *et al.*, 2011).

As espécies que também mostraram atividade antioxidante para o DPPH (inferior ao controlo positivo) foram: *A. tripolium*, *C. soldanella*, *L. monopetalum*, *Lactuca sp.*,

Salsola sp., *Sporobolus sp.*, *S. vermiculata* e *T. domingensis*. Um estudo realizado com duas espécies diferentes de *Limoniastrum* mostrou que o extrato metanólico da *L. monopetalum* não tem atividade antioxidante para o DPPH (Debouba *et al.*, 2013); no entanto neste estudo foi demonstrado que o extrato de acetona possui atividade antioxidante bastante elevada para o DPPH (80,1%) próxima do controlo positivo (BHT: 82,3%). Este fato pode ter a ver com o tipo de compostos extraídos com cada um dos solventes e de acordo com os resultados aqui obtidos, o extrato acetónico parece ter uma maior seletividade para compostos polares com propriedades antioxidantes comparativamente ao extrato metanólico. Relativamente à *Lactuca sp.* não há relatos da sua atividade antioxidante, no entanto, a espécie *L. sativa* possui elevadas atividades antioxidantes para o DPPH (Liu *et al.*, 2007). Também para a *A. tripolium* não há relatos de atividade antioxidante, no entanto diferentes extratos (etil acetato, butanol, metanol, aquoso) da espécie *A. scaber* mostraram atividade antioxidante do DPPH tendo-se obtido os valores mais elevados para o etil acetato, composto mais polar (Thiruvengadam *et al.*, 2014), e também mostrou atividade para o ABTS com o extrato metanólico (Lee *et al.*, 2013).

Relativamente ao ABTS, nove espécies apresentaram atividade antioxidante, nomeadamente *C. mariscus*, *F. laevis*, *F. pulverulenta*, *L. monopetalum*, *L. salicaria*, *P. lentiscus*, *Salsola sp.*, *S. vermiculata* e *T. domingensis*, das quais apenas a *L. salicaria* apresentou um valor superior ao controlo positivo BHT (95,3%). Todas as espécies que apresentaram atividade antioxidante para o ABTS também tiveram atividade antioxidante para o DPPH; no entanto, as espécies *Salsola sp.*, *Lactuca sp.*, *L. monopetalum*, *C. soldanella* e *A. tripolium* apresentaram valores de atividade antioxidante díspares para ambos os métodos com diferenças superiores a 20% de atividade antioxidante de um método para o outro, sendo mais ativas no método de DPPH. Segundo Alves *et al.* (2010), o tempo de reação necessário para a sequestração dos radicais é um fator importante na eficiência antirradicalar, sendo que quanto maior o tempo de incubação maior será a eficiência e consequentes atividades antioxidantes. Como tal, a diferença entre os períodos de incubação utilizados para os dois métodos, 30 min no método de DPPH e 6 min no caso do ABTS pode explicar as diferenças na atividade antioxidante para os dois radicais. As espécies *A. tripolium*, *C. soldanella*, *Lactuca sp.* e *Sporobolus sp.* foram

apenas ativas para o método de DPPH, apresentando valores inferiores a 50% para o ABTS. Isto também poderá ser explicado com a eficiência antirradicalar e o tempo de incubação, no entanto, também poderá ser devido à capacidade antirradicalar dos constituintes do extrato, sendo que poderão ter um maior teor em compostos capazes de reduzir o radical DPPH em comparação com o ABTS.

Um estudo efetuado com extratos aquosos e metanólicos da *S. vermiculata* também não mostraram atividades antioxidantes do ABTS para esta espécie (Alali *et al.*, 2007), no entanto o extrato acetónico desta espécie revelou ter atividades antioxidantes elevadas neste trabalho (76,8%). Tal como o explicado anteriormente, isto pode significar que o extrato acetónico tem uma maior seletividade para compostos polares antioxidantes em comparação com o metanólico. Já para a espécie *Salsola sp.* não há relatos de atividades antioxidantes, tendo sido a primeira vez que esta atividade é descrita para esta espécie. Outro estudo mostrou que a *T. domingensis* também possui elevada atividade antioxidante, revelando que as frações de hexano, etil acetato e metanol tiveram valores elevados de equivalentes do Trolox (padrão no método de ABTS) (Sardar *et al.*, 2014).

As espécies *F. pulverulenta*, *L. salicaria* e *P. lentiscus* tiveram valores de IC₅₀ semelhantes ou inferiores ao controlo positivo BHT para ambos os métodos, sendo que a *L. salicaria* foi a única espécie com um valor inferior ao BHT. As atividades antioxidantes para estas espécies foram descritas também por outros autores, como já referido anteriormente, assim sendo, as espécies *F. pulverulenta*, *P. lentiscus* e *L. salicaria* têm o maior potencial antioxidante comparativamente com as restantes espécies que demonstraram também atividade antioxidante. A *L. salicaria* é, realmente, a espécie de maior destaque uma vez que apresenta valores superiores de atividade antioxidante e IC₅₀ inferiores aos do controlo positivo para ambos os métodos avaliados, e também diversos estudos demonstraram o seu potencial antioxidante (Coban *et al.*, 2003; Tunalier *et al.*, 2007; Manayi *et al.*, 2013).

Para as espécies *C. mariscus*, *C. soldanella* e *Sporobolus sp.*, até à data não há informações sobre as suas propriedades antioxidantes, nem para os respetivos géneros, tendo sido pela primeira vez aqui descrito o seu potencial antioxidante.

Sabe-se que os compostos antioxidantes têm diversas aplicações a nível das indústrias farmacêuticas, alimentares e cosméticas. A busca de antioxidantes naturais para substituição de antioxidantes sintéticos usados na indústria alimentar para conservação dos alimentos tem-se revelado intensiva e de grande importância, tendo em conta os riscos associados ao uso de antioxidantes sintéticos (Sindhi *et al.*, 2013). Também na indústria farmacêutica, a pesquisa de compostos antioxidantes naturais se revela importante tendo em conta que cada vez mais doenças estão associadas a processos oxidativos como o cancro, diabetes, doenças neurodegenerativas, entre outras (Sindhi *et al.*, 2013). Já na cosmética, este tipo de compostos são usados em cremes e loções para retardar o processo de envelhecimento e para proteção contra os raios solares (Sindhi *et al.*, 2013). As plantas são cada vez mais utilizadas para a pesquisa deste tipo de compostos, assim sendo as espécies *S. vermiculata*, *F. pulverulenta*, *P. lentiscus*, *L. monopetalum*, *Salsola sp.*, *L. salicaria*, *T. domingensis*, *F. laevis* e *C. mariscus* revelam-se cada vez mais promissoras para a pesquisa e isolamento deste tipo de compostos uma vez que constituem um reservatório natural dos mesmos.

4.3. ATIVIDADE QUELANTE

O ferro e o cobre são dois íões importantes para o funcionamento normal dos organismos. Sabe-se que o excesso de ferro no organismo, principalmente a nível cerebral, está associado ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson (Dexter *et al.*, 1987; Riederer *et al.*, 1989; Connor *et al.*, 1992) e a doença de Alzheimer (Connor *et al.*, 1992; Qian e Wang, 1998; Thompson *et al.*, 2003). Relativamente ao cobre, sabe-se que a sua acumulação nomeadamente no líquido cefalorraquidiano pode provocar a doença de Alzheimer e muitas outras doenças neurológicas (Roos *et al.*, 2006).

A atividade quelante do Fe^{2+} foi determinada pela formação do complexo Fe^{2+} -ferrozina, e a atividade quelante do Cu^{2+} foi determinada usando o PV. Pela avaliação da atividade quelante dos íões metálicos Fe^{2+} e Cu^{2+} de vários extratos de diferentes espécies de halófitas e, comparando os resultados obtidos para ambos, verifica-se que as espécies mais ativas foram a *F. pulverulenta*, *P. lentiscus*, *L. salicaria* e a *F. laevis*, sendo que a

F. pulverulenta e a *L. salicaria* apresentaram atividade quelante para ambos os iões. A *L. salicaria* revelou ser a mais ativa para ambos os iões com valores de IC₅₀ próximos ao controlo positivo EDTA.

As espécies *F. laevis*, *F. pulverulenta*, *L. salicaria* e *P. lentiscus* apresentam atividades quelantes do Cu²⁺ muito elevadas e tendo em conta que compostos com atividade quelante para este ião podem ser usados para contrariar o início e/ou progressão da doença de Alzheimer (Roos *et al.*, 2006), revelam-se muito promissoras para a pesquisa de compostos para o seu tratamento. De fato existem evidências que suportam uma ligação entre o aumento da concentração de iões cobre e geração de ROS em pacientes com Alzheimer e na morte celular neuronal (Gaeta *et. Hider*, 2005). Estes dados indicam que a acumulação de cobre tem um impacto significativo na geração de ROS e pode ser em parte responsável pelo aumento nos parâmetros globais de *stress* oxidativo observados no Alzheimer (Custódio *et al.*, 2012).

Relativamente à atividade quelante do ferro, as espécies *L. salicaria* e *P. lentiscus* apresentaram-se as mais ativas para este ião tal como já descrito na literatura. Um estudo realizado para a *L. salicaria* avaliou o seu potencial quelante para o Fe²⁺ como medida de atividade antioxidante onde se verificou que um extrato de etanol (70%) das flores desta espécie possui uma boa atividade redutora para este ião (Jamshidi *et al.*, 2013). Quanto à espécie *P. lentiscus* não há relatos do seu potencial quelante, no entanto a espécie *P. atlantica* subsp. *mútica* apresenta atividade quelante à concentração de 1 mg/mL quase quatro vezes menor comparativamente ao EDTA a 0,037 mg/mL, tendo capacidade ligeiramente eficaz para ligação ao ferro (Bozorgi *et al.*, 2013). Tendo em conta os resultados aqui obtidos e os descritos na literatura, estas espécies constituem fortes candidatas à pesquisa de compostos quelantes do ferro para tratamento de diversas doenças neurodegenerativas, incluindo o Parkinson e o Alzheimer. De fato, níveis anormalmente elevados de ferro foram demonstrados em diversas doenças neurodegenerativas, sendo que os níveis elevados de ferro no cérebro tem sido implicado como um dos maiores geradores de ROS capazes de danificar moléculas biológicas como lípidos, hidratos de carbono, proteínas e ácidos nucleicos (Qian e Wang, 1998). O *stress* oxidativo que resulta de níveis elevados de ferro e, possivelmente também de defeitos nos

mecanismos de defesa antioxidantes, acredita-se ser uma das causas responsáveis pela morte neuronal em doenças neurodegenerativas, sendo que a sobre-expressão do recetor para a lactotransferrina no cérebro está associada aos níveis elevados de ferro intraneuronal e à degeneração dos neurónios dopaminérgicos na doença de Parkinson (Qian e Qin, 1998).

Para as espécies *F. laevis* e *F. pulverulenta*, nada é sabido acerca do seu potencial quelante para estes iões, assim como também nada é sabido para o respetivo género, tendo sido descrito neste trabalho, pela primeira vez, o seu potencial promissor como quelantes do cobre.

Das restantes espécies de halófitas avaliadas, as espécies *T. domingensis* e *A. macrostachyum* estão descritas como detentoras de atividade quelante para os iões Cu^{2+} e Fe^{2+} , respetivamente (Sardar *et al.*, 2014; Custódio *et al.*, 2012); no entanto, neste trabalho, não obtivemos resultados favoráveis à atividade quelante para estas espécies. A atividade quelante depende do solvente usado para extração dos compostos devido à presença de diferentes potenciais antioxidantes no extrato, sendo que os compostos que apresentam polaridades mais elevadas são responsáveis pela atividade quelante destes iões (Sardar *et al.*, 2014). Neste estudo o solvente utilizado para extração foi a acetona, pelo que seria de esperar uma forte composição em compostos polares para estes extratos e consequentes elevadas atividades quelantes, no entanto o mesmo não se observou, tendo-se obtido poucas espécies com atividade quelante neste trabalho. Isto poderá ser explicado, uma vez mais, pelas condições de colheita das plantas e da parte da planta utilizada na investigação, sendo que a altura em que a planta terá sido colhida e as características do biótopo aquando da colheita podem influenciar a produção de compostos que lhes permite sobreviver em condições ambientais desfavoráveis e, também, as diferentes partes da planta usadas para o estudo poderão conter teores diferentes de compostos com atividade quelante.

4.4. ATIVIDADE DESPIGMENTANTE

A atividade despigmentante dos extratos de plantas halófitas foi avaliada pelo método de inibição da tirosinase segundo Nerya *et al.* (2003). A tirosinase é uma enzima

envolvida na biossíntese da melanina, e por consequência realiza um papel importante na determinação da cor de pele, da íris e cabelo.

A tirosinase é uma importante enzima responsável pela formação da melanina, catalisando as duas primeiras etapas na melanogénese em mamíferos. Para além da pigmentação da pele é também responsável por reações de escurecimento enzimático em frutos danificados durante o seu manuseio e processamento pós-colheita. Os inibidores da tirosinase são importantes tanto para o seu uso na cosmética como na indústria alimentar (Chang, 2009). Os produtos de branqueamento de pele podem ser usados para a cosmética a fim de se obter uma aparência mais clara de pele mas também podem ser usados para o tratamento de doenças de pigmentação como o melasma ou a hiperpigmentação pós-inflamatória (Smit *et al.*, 2009; Gillbro *et al.*, 2011).

A espécie *P. lentiscus* foi a única que mostrou atividade inibitória da tirosinase, tendo apresentado uma inibição muito superior ao controlo positivo arbutina. A arbutina é um O- β -D-glucósido da hidroquinona, sendo usada como uma substância farmacêutica muito importante com propriedades desinfetantes (em doenças genito-urinárias) e também despigmentantes como agentes de clareamento da pele (Pop *et al.*, 2009). Esta espécie para além de possuir uma atividade inibitória da tirosinase muito superior à arbutina (67,5% vs. 89,5%, respetivamente) também possui um valor de IC₅₀ significativamente inferior comparativamente com este composto revelando ser necessária uma quantidade muito menor deste extrato para inibir 50% da atividade da tirosinase. Até à data, não existem relatos de atividade inibitória da tirosinase para esta espécie, nem mesmo para o seu género (Bozorgi *et al.*, 2013), sendo aqui descrito pela primeira vez o seu potencial promissor como agente de clareamento da pele. A hidroquinona, um efetivo agente clareador da pele, foi banida do mercado devido a preocupações sérias na sua segurança, tendo sido associada com mutagenicidade e aumento da incidência de ocronose nos países Africanos (Smit *et al.*, 2009). A arbutina é uma forma glicosilada da hidroquinona que também apresenta citotoxicidade para as células, por este motivo um derivado da arbutina foi sintetizado mostrando uma citotoxicidade muito inferior a esta (Smit *et al.*, 2009).

Somando este fato ao resultado obtido pela *P. lentiscus* comparativamente à arbutina na inibição da tirosinase e tendo em conta que, hoje em dia, é perceptível utilização de diferentes produtos naturais na grande variedade de produtos despigmentantes disponíveis comercialmente (Smit *et al.*, 2009), esta espécie é uma potencial fonte de biocompostos mais seguros para tratamento de doenças provocadas pela acumulação de melanina, para uso na cosmética ou na indústria alimentar. Pelo que é impreterível o estudo da mesma para isolamento dos seus componentes ativos e o seu efeito na inibição da tirosinase e redução da pigmentação.

Relativamente às outras espécies utilizadas neste trabalho, até à data também não há relatos de atividade inibitória da tirosinase, no entanto, para o género *Salicornia*, a espécie *S. herbacea* mostrou ter atividade para esta enzima. Segundo Sung *et al.* (2009) esta espécie inibiu a tirosinase em 54% comparativamente à arbutina, exibindo um maior e mais potente efeito inibitório que a mesma (Sung *et al.*, 2009; Smit *et al.*, 2009).

4.5. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

Para a caracterização química dos extratos foi determinado o seu conteúdo total de fenólicos, flavonóis, flavonas/flavonol e taninos por espectrofotometria. Os compostos fenólicos são constituídos pelo menos por um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilo ligados e são classificados como flavonoides e não-flavonoides. Os flavonoides são compostos polifenólicos cujas subclasses principais são as flavonas, os flavonóis, isoflavonas, flavanonas e antocianidinas; os não-flavonoides compreendem os ácidos fenólicos (Del Rio *et al.*, 2013). Como tal, nos ensaios de caracterização fitoquímica dos extratos de plantas halófitas foi avaliado o seu teor em compostos fenólicos não flavonoides (ácido hidroxicinâmico, fenóis totais e taninos) e flavonoides (flavona e flavonóis). Para avaliação do teor em fenóis totais foi usado o método de F-C que mede fenólicos totais e outros substratos de oxidação, sendo que os outros substratos de oxidação presentes numa amostra podem interferir na mensuração dos fenólicos totais de uma maneira inibitória, aditiva ou de reforço (Dai *et al.*, 2010).

Dentro dos flavonoides, os flavonóis ocorrem amplamente pelo reino das plantas sendo os mais comuns a quercetina, canferol, isoramnetina e a miricetina (Del Rio *et al.*,

2013). As flavonas são estruturalmente semelhantes aos flavonóis. Relativamente aos compostos não flavonoides, os ácidos fenólicos constituem outra classe principal de fenólicos no reino das plantas e, ocorrem na forma de esteres, glicósidos ou amidos, mas raramente na forma livre. Os derivados do ácido hidroxicinâmico constituem compostos fenólicos das paredes celulares das plantas desempenhando um papel crítico durante o crescimento da planta, protegendo-a contra infeção, feridas e radiação ultra violeta (UV) (Dai e Mumper, 2010; Tsao, 2010; Del Rio *et al.*, 2013).

Estudos referentes à quercetina mostraram que os seus metabolitos (quercetina-3-O-sulfato, quercetina-3-O-glucuronida e isoramnetina-3-O-glucuronida) têm atividade antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral e modulação da função endotelial (Del Rio *et al.*, 2013). Vários estudos têm sido conduzidos com o objetivo de avaliar o efeito de alimentos ricos em flavonoides em fatores de risco de doenças cardiovasculares, incluindo hipertensão, disfunção endotelial, metabolismo dos lípidos e ativação de plaquetas, onde se verificou que componentes como a quercetina e os flavan-3-ols têm a capacidade de melhorar a função vascular, diminuir a pressão sanguínea, aumentar os níveis de colesterol HDL e diminuir níveis de colesterol LDL (Del Rio *et al.*, 2013).

Os taninos são outros compostos não flavonoides e podem dividir-se em dois grupos, taninos hidrolizáveis e taninos condensados, possuindo um grande potencial para formar ligações com outros oxidantes de plantas (Del Rio *et al.*, 2013). Estudos realizados em elagitaninos, subgrupo dos taninos, relacionaram a sua presença com atividades antiproliferativas em células HeLa (Ross *et al.*, 2007). McDougall *et al.* sugeriu que o composto principal relacionado com a inibição do crescimento de células tumorais pode ser os elagitaninos do género *Rubus* (framboesa, amora ártico, amoras silvestres) e morango (Dai e Mumper, 2010; Del Rio *et al.*; 2013).

Neste trabalho, a espécie *I. crithmoides* revelou-se uma forte candidata para a pesquisa de compostos anticancerígenos e segundo Abdel-Wahab *et al.* (2008) um extrato aquoso desta espécie foi seguro na neutralização do *stress* oxidativo da ocratoxina A (carcinogénico renal) e forneceu proteção contra a sua citotoxicidade em ratinhos machos. Relativamente à caracterização química desta espécie observa-se que a mesma é significativamente rica em fenólicos totais. Segundo Del Rio *et al.* (2013) estes

compostos têm diversas atividades descritas incluindo atividade antitumoral e, como tal, a atividade antitumoral da espécie *I. crithmoides* poderá ser atribuída a estes compostos. De fato, extratos ricos em fenólicos ou polifenóis isolados de diferentes plantas edíveis têm sido estudados num número de linhas celulares tumorais representando diferentes fases evolutivas do cancro. Extratos de frutos silvestres (amoras, framboesas, mirtilos, morangos) e os polifenóis isolados de morangos incluindo antocianinas, canferol, quercetina, esteres de ácido comárico e elágico, mostraram inibir o crescimento de linhas celulares tumorais da mama, do cólon, da próstata e de cancro oral humano com diferentes sensibilidades entre linhas celulares (Dai e Mumper, 2010). Segundo Ross *et al.* (2006), os elagitaninos relacionam-se com a inibição do crescimento de células tumorais e portanto, seria de esperar que as espécies que contivessem taninos na sua constituição se apresentassem mais citotóxicas para a linha HeLa, no entanto o mesmo não se verificou, possivelmente porque a sua constituição em taninos é relativamente baixa comparada com os restantes compostos fenólicos.

A atividade antioxidante relatada das frutas tem sido atribuída também aos polifenóis. Estes suprimem a geração de radicais livres reduzindo a taxa de oxidação pela inibição da formação ou desativando espécies reativas e precursores dos radicais livres (Dai e Mumper, 2010; Del Rio *et al.*; 2013). Neste trabalho, as espécies que apresentaram atividade antioxidante correspondem às espécies que se mostraram mais ricas em compostos fenólicos, sendo que as espécies *F. pulverulenta*, *P. lentiscus*, *L. salicaria*, *F. laevis* e *C. mariscus*, que apresentaram valores superiores e mais significantes que o controlo positivo BHT para o método de DPPH foram também as que apresentaram os valores mais elevados de teor de fenólicos totais na sua constituição. Esta observação poderá ser sugestiva de que estes compostos (fenólicos totais) serão os responsáveis pela atividade antioxidante destas plantas, tendo em conta que as mesmas apresentaram valores muito inferiores de teores para os restantes compostos fenólicos. Um estudo realizado com a *F. thymifolia* mostrou que esta é rica em polifenóis, ácidos gordos e taninos, possuindo atividades antioxidante e quelante do ferro (Wided *et al.*, 2011). Vários estudos mostraram que a natureza dos solventes, notavelmente a polaridade, têm diferentes capacidades de extração e qualidades de compostos fenólicos nas plantas (Wided *et al.*, 2011). De acordo com o observado neste trabalho, Bozorgi *et al.* (2013)

também mostrou que a espécie *P. lentiscus* é rica em compostos fenólicos totais (ácido gálico) e em catequina e epicatequina, sendo que o ácido gálico foi introduzido como composto antioxidante e antimutagénico. Estes resultados corroboram os nossos, uma vez que esta espécie é mais rica em fenólicos totais (ácido gálico) e possivelmente estes serão os responsáveis pela sua atividade antioxidante. Investigações do perfil fitoquímico da *L. salicaria* mostram que a mesma possui ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, antocianinas, glicósidos, triterpenóides e ácidos orgânicos, sendo que os taninos seriam o maior componente desta espécie (Jamshidi *et al.*, 2013). Este trabalho demonstrou que esta espécie foi das mais ricas em derivados do ácido hidroxicinâmico e em fenólicos totais, não tendo demonstrado a presença de taninos. Esta diferença entre o descrito na literatura e o observado neste trabalho relativamente à constituição em taninos desta espécie poderá ter a ver com a época e condições de colheita desta espécie ou até mesmo com o tipo de solvente utilizado na extração. A atividade antioxidante desta espécie pode ser atribuída principalmente à presença de compostos fenólicos (Jamshidi *et al.*, 2013). Os fenólicos, como produtos de metabolitos secundários das plantas, são de elevado interesse nas indústrias farmacêuticas e alimentares devido à sua atividade antioxidante (Jamshidi *et al.*, 2013).

Em suma, na literatura os compostos fenólicos são intensivamente estudados e associados à prevenção de várias doenças crónicas como compostos antioxidantes. Relativamente às espécies aqui testadas para procura de compostos fenólicos, verificou-se que as espécies mais ricas em compostos flavonoides foram a *C. soldanella*, *Salsola sp.* e *Sporobolus sp.*, revelando que estas poderão ser potenciais fontes promissoras de novos compostos desconhecidos e boas candidatas para a pesquisa de possíveis aplicações na prevenção de certas doenças cardiovasculares e de vários tipos de cancro. A realização de uma caracterização química detalhada (metabolómica) destas espécies pode revelar-nos quais os compostos responsáveis pelas suas diferentes atividades e, para além disso, potenciais aplicações futuras. De fato, um estudo realizado na espécie *C. soldanella* mostrou que é constituída por inúmeros compostos flavonoides, especialmente glicósidos do canferol (Ahn *et al.*, 2012); outro estudo realizado em espécies do género *salsola* mostraram que espécies deste género são ricas em flavonoides, terpenóides, alcaloides, saponinas, antraquinonas e hidratos de carbono (Munir *et al.*, 2014).

Os compostos não flavonoides são os mais associados com as atividades antioxidantes e antitumorais, pelo que as espécies mais ricas nestes compostos (*A. tripolium*, *C. mariscus*, *F. laevis*, *F. pulverulenta*, *I. crithmoides*, *L. monopetalum*, *L. salicaria*, *Lactuca sp.*, *P. lentiscus*, *Sporobolus sp.*, *S. vermiculata*, *S. versicolor* e *T. domingensis*) poderão ser potenciais fontes promissoras de compostos conhecidos e, eventualmente, desconhecidos, e também boas candidatas a investigações mais dirigidas para a pesquisa de possíveis aplicações antitumorais noutras linhas celulares ainda não testadas. Estudos realizados nas espécies *P. lentiscus*, *L. salicaria* e espécies pertencentes ao género *Frankenia*, mostraram que entre os constituintes destas espécies, elas seriam ricas em compostos não flavonoides (fenólicos totais), tal como referido anteriormente (Wided *et al.*, 2011; Bozorgi *et al.*, 2013; Jamshidi *et al.*, 2013). Relativamente à *A. tripolium* não há relatos do seu perfil fitoquímico, no entanto, a espécie *A. glehni* revelou possuir derivados do canferol e ácidos fenólicos no seu extrato de água etanol (7:3) (Nugroho *et al.*, 2012). A *Lactuca sativa* é rica em fenólicos totais (Liu *et al.*, 2005), o mesmo se observa neste trabalho para a espécie *Lactuca sp.* Segundo Rasheed *et al.* (2013) espécies do género *Salsola* apresentaram-se ricas em derivados do ácido hidroxicinâmico, flavonoides, derivados de ácidos gordos e alcaloides (Rasheed *et al.*, 2013), neste trabalho a espécie *S. vermiculata* apenas se revelou rica em fenólicos totais, sendo que estas diferenças para a literatura poderão ter a ver, mais uma vez, com o tipo de extração efetuada, com as condições de colheita e com as partes estudadas da planta. Por fim, um estudo efetuado à *T. domingensis* foi de encontro aos achados neste trabalho, revelando que esta espécie é rica em fenólicos totais para os diferentes tipos de extração utilizados (hexano, metanol, clorofórmio, etil acetato e água) (Sardar *et al.*, 2014).

Para as espécies *C. mariscus*, *I. crithmoides*, *Sporobolus sp.* e *S. versicolor* e seus respetivos géneros não foram encontrados relatos do seu perfil fitoquímico.

5. CONCLUSÃO / PERSPETIVAS FUTURAS

Várias espécies de plantas halófitas foram descritas na literatura como tendo diversas atividades biológicas tais como antioxidante, antimicrobiana e antitumoral. Este trabalho teve como objetivos a avaliação do potencial antitumoral *in vitro* de extratos naturais de diversas espécies de plantas halófitas comuns no Algarve e avaliação das suas propriedades antioxidantes, neuroprotetoras e despigmentantes *in vitro*, bem como fazer uma avaliação preliminar do perfil fitoquímico dos extratos.

O cancro é uma doença que afeta milhões de pessoas no mundo, sendo que as taxas de incidência e mortalidade têm apresentado um aumento progressivo ao longo dos anos, como tal torna-se imperativa uma investigação constante nesta área. Neste trabalho, os resultados obtidos para a atividade antitumoral sugerem que a espécie *I. crithmoides* é uma potencial candidata para o desenvolvimento de novos estudos de avaliação do seu potencial uso como droga anticancerígena ou como composto “guia” para a semi-síntese ou síntese total de novas drogas efetivas. Esta espécie é também significativamente rica em fenólicos totais descritos na literatura como detentores de diversas atividades incluindo atividade antitumoral. A este trabalho devem seguir-se outros com o objetivo de confirmar a seletividade da *I. crithmoides*, proceder à sua caracterização química detalhada, de forma a se fazer a desreplcação e assim evitar a pesquisa de compostos já conhecidos, e se novos compostos forem detetados, prosseguir com o seu isolamento e identificação. A pesquisa de compostos antitumorais e novos estudos de atividade antitumoral para esta espécie devem ser desenvolvidos também com diferentes métodos de extração (metanol, água, éter, entre outros) e diferentes linhas tumorais.

O metabolismo normal das células produz ROS e o seu excesso no organismo tem efeitos prejudiciais. As plantas cada vez mais têm sido utilizadas para a pesquisa de compostos naturais de antioxidantes. Os resultados obtidos neste estudo mostram que as espécies *S. vermiculata*, *F. pulverulenta*, *P. lentiscus*, *L. monopetalum*, *Salsola sp.*, *L. salicaria*, *T. domingensis*, *F. laevis* e *C. mariscus* são fontes promissoras de compostos antioxidantes, constituindo fortes reservatórios naturais para a pesquisa e isolamento destes compostos.

Pela avaliação da atividade quelante dos iões metálicos Fe^{2+} e Cu^{2+} as espécies *F. pulverulenta*, *P. lentiscus*, *L. salicaria* e a *F. laevis* são fontes de potenciais biocompostos para tratamento de doenças causadas por acumulo destes iões metálicos.

Os produtos de branqueamento de pele podem ser usados para a cosmética a fim de se obter uma aparência mais clara de pele mas também podem ser usados para o tratamento de doenças de pigmentação como o melasma ou a hiperpigmentação pós inflamatória. Os resultados obtidos para a atividade despigmentante mostram que a *P. lentiscus* é uma potencial fonte de biocompostos mais seguros para tratamento de doenças provocadas pela acumulação de melanina, para uso na cosmética ou na indústria alimentar.

Os compostos fenólicos são intensivamente estudados e associados à prevenção de várias doenças crónicas como compostos antioxidantes. As espécies *C. soldanella*, *Salsola sp.* e *Sporobolus sp.*, são fontes promissoras de compostos flavonoides e excelentes candidatos para futuras pesquisas em possíveis aplicações para prevenção de doenças cardiovasculares e de vários tipos de cancro. Os compostos não flavonoides são os mais associados com as atividades antioxidantes e antitumorais e as espécies *A. tripolium*, *C. soldanella*, *C. mariscus*, *F. laevis*, *F. pulverulenta*, *I. crithmoides*, *L. monopetalum*, *L. salicaria*, *Lactuca sp.*, *P. lentiscus*, *Salsola sp.*, *Sporobolus sp.*, *S. vermiculata*, *S. versicolor* e *T. domingensis* são potenciais alvos de investigações mais dirigidas à pesquisa de possíveis aplicações antitumorais noutras linhas celulares ainda não testadas e diferentes métodos de extração.

Em suma, este trabalho mostra o forte potencial biomédico destas plantas como fontes naturais de compostos com possíveis aplicações em diversas atividades biológicas como antioxidantes, despigmentantes, neuroprotetoras e antitumorais, assim sendo podem ser usadas na prevenção e tratamento de várias doenças como o cancro, inflamação, Alzheimer, Parkinson, melasma, entre outras. Neste contexto, as espécies halófitas têm sido consideradas uma fonte importante de novos compostos ativos com aplicações na indústria farmacêutica, alimentar e cosmética.

6. BIBLIOGRAFIA

Abdel-Wahhab, M. A., Abdel-Azim, S. H., & El-Nekeety, A. A. (2008). Inula crithmoides extract protects against ochratoxin A-induced oxidative *stress*, clastogenic and mutagenic alterations in male rats. *Toxicol*, 52(4), 566–573. <http://doi.org/10.1016/j.toxicol.2008.07.006>

Ahn, Nu-Ri, Ko Jung-Moon, Cha Hyeon-Cheol (2012). Comparison of Flavonoid Profiles between Leaves and Stems of *Calystegia soldanella* and *Calystegia japonica*. *American Journal of Plant Science*, 3 (8), 1073.

Alali, F. Q., Tawaha, K., El-Elimat, T., Syouf, M., El-Fayad, M., Abulaila, K., Oberlies, N. H. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of aqueous and methanolic extracts of Jordanian plants: an ICBG project. *Natural Product Research*, 21(12), 1121–1131. <http://doi.org/10.1080/14786410701590285>

Alves, C. Q., David, J. M., David, J. P., Bahia, M. V., & Aguiar, R. M. (2010). Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Quimica Nova*, 33(10), 2202–2210. <http://doi.org/10.1590/S0100-40422010001000033>

Bianchi, M. D. L. P., & Antunes, L. M. G. (1999). Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição*, 12(2), 123–130. <http://doi.org/10.1590/S1415-52731999000200001>

Boulaaba, M., Mkadmini, K., Tsolmon, S., Han, J., Smaoui, A., Kawada, K., Abdelly, C. (2013). In vitro antiproliferative effect of arthrocnemum indicum extracts on CACO-2 cancer cells through cell cycle control and related phenol LC-TOF-MS Identification. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013. <http://doi.org/10.1155/2013/529375>

Boulanouar, B., Abdelaziz, G., Aazza, S., Gago, C., Miguel, M.G., 2013. Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. *Ind. Crops Prod.* 46, 85–96.

Bozorgi, M., Memariani, Z., Mobli, M., Salehi Surmaghi, M. H., Shams-Ardekani, M. R., & Rahimi, R. (2013). Five pistacia species (*P. vera*, *P. atlantica*, *P. terebinthus*, *P. khinjuk*, and *P. lentiscus*): A review of their traditional uses, phytochemistry, and pharmacology. *The Scientific World Journal*, 2013. <http://doi.org/10.1155/2013/219815>

Brand-Williams W, Cuvelier M E and Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*. 28: 25-30.

Brentani RR, Chammas R, Coelho FRG. 1998. Mecanismos de invasão e metástases. In: Brentani M N, Coelho F R G, Iyeyasu H and Kowalski L P. ed. - *Bases da Oncologia*. 1.a ed. São Paulo, Livraria e Editora Marina. p.91-98.

Brown M R, Jeffrey S W, Volkman J K, Dunstan GA. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Nutritional properties of microalgae for mariculture. Aquaculture*.15: 315-331.

Carolina, A., & Jorge, N. (2011). Cogumelos : compostos bioativos e propriedades antioxidantes *Mushrooms : Bioactive Compounds and Antioxidant Properties*, 375–384.

Chaieb M, Boukhris M. (1998). Flore succincte et illustree des zones arides et sahariennes de Tunisie. *Associations pour la protection de la nature et de l'environnement*, Sfax.

Chang, T.-S. (2009). An updated review of tyrosinase inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(6), 2440–75. doi:10.3390/ijms10062440

Chattopadhyay N, Ghosh T, Sinha S, Chattopadhyay K, Karmakar P and Ray B. 2009. Polysaccharides from *Turbinaria conoides*: Structural feats and antioxidant capacity. *Food Chemistry*. doi: 10.1016.2009.

Choi, E., Park, H., Lee, J., & Kim, G. (2013). Anticancer, antiobesity, and anti-inflammatory activity of *Artemisia* species in vitro. *Journal of Traditional Chinese Medicine = Chung I Tsa Chih Ying Wen Pan / Sponsored by All-China Association of*

Traditional Chinese Medicine, *Academy of Traditional Chinese Medicine*, 33(1), 92–7.
[http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0254-6272\(13\)60107-7](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0254-6272(13)60107-7)

Chopra K and Kuhad A. 2007. Curcumin attenuates diabetic encephalopathy in rats. Behavioral and biochemical evidences, *European Journal of Pharmacology*. 576: 34-42.

Clancy, S. (2008) DNA damage & repair: mechanisms for maintaining DNA integrity. *Nature Education* 1(1):103

Coban T, Citoglu GS, Sever B, Iscan M: Antioxidant activities of plants used in traditional medicine in Turkey. *Pharm Biol* 2003, 41:608–613.

Connor J R, Snyder B S, Beard J L, Fine R E and Mufson E J. 1992. Regional distribution of iron and iron-regulatory proteins in the brain in aging and Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience Research*. 31: 327-335.

Custódio, L., Ferreira, A. C., Pereira, H., Silvestre, L., Vizetto-Duarte, C., Barreira, L., Varela, J. (2012). The marine halophytes *Carpobrotus edulis* L. and *Arthrocnemum macrostachyum* L. are potential sources of nutritionally important PUFAs and metabolites with antioxidant, metal chelating and anticholinesterase inhibitory activities. *Botanica Marina*, 55(3), 281–288. doi:10.1515/bot-2012-0098

Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313–7352. doi:10.3390/molecules15107313

Danks D. M. 1989. Disorders of copper transport. In *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (Scriver, C. R, Beaudet, A. L, Sly, W. S. and Valle, D. eds.). McGraw-Hill. New York. pp. 1411-1432.

Debouba M, Zouari S, Zouari N. Evaluation of Antioxidant Status of Two *Limoniastrum* Species Growing Wild in Tunisian Salty Lands. *Antioxidants*. 2013;2(3):122-131. doi:10.3390/antiox2030122.

Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P. E., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(14), 1818–92. doi:10.1089/ars.2012.4581

Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2011). Natural products for cancer chemotherapy. *Microbial Biotechnology*, 4(6), 687–699. <http://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00221.x>

Descarries L, Gisiger V, and Steriade M. 1997. Diffusion transmission by acetylcholine in CNS. *Progress in Neurobiology*. 53: 603-625.

Dexter D T, Wells F R, Agid F, Agid Y, Lees A J, Jenner P and Marsden CD. 1987. Increased nigral iron content in post mortem parkinsonian brain. *The Lancet*. 2: 1219-1220.

Dixon K and Koprass E. 2004. Genetic alterations and DNA repair in human carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*. 14: 441-448.

Dos Santos Júnior, H.M.; Oliveira, D.; de Carvalho, D.A.; Pinto, J.; Campos, V.; Mourão, A.; Pessoa, C.; de Moraes, M.O.; Costa-Lotufo, L.V. Evaluation of native and exotic Brazilian plants for anticancer activity. *J. Nat. Med.* 2010, 64, 231–238.

Donia M and Hamann M T. 2003. Marine natural products and their potential applications as antiinfective agents. *The Lancet*. 3: 338-348.

Elmastas M, Isildak O, Turkekul I and Temur N. 2007. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis*. 20: 337-345.

El-Tantawy, W., Temraz, A., Hozaien, H., *et al.* (2015). Anti-hyperlipidemic activity of an extract from roots and rhizomes of *Panicum repens* L. on high cholesterol diet-induced hyperlipidemia in rats. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 70(5-6), pp. 139-144. Retrieved 9 Feb. 2016, from doi:10.1515/znc-2014-4147

Falleh, H., Ksouri, R., Medini, F., Guyot, S., Abdelly, C., & Magné, C. (2011). Antioxidant activity and phenolic composition of the medicinal and edible halophyte *Mesembryanthemum edule* L. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 1066–1071. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.03.018>

Faulkner D J. 2002. Marine natural products. *Natural Product Reports*.19:1-48.

Feder J N. 1996. A novel MHO class I-like gene is mutated in patients with hereditary hemochromatosis. *Nature Genetics*. 13: 399-408.

Ferreira A L A e Matsubara L S. 1997. Radicais livres: Conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica do Brasil*. 43: 61-68.

Flowers, T.J.; Galal, H.K.; Bromham, L. Evolution of halophytes: Multiple origins of salt tolerance in land plants. *Funct. Plant Biol.* 2010, 37, 604–612.

Fuesetani N. 2000. In *Drugs from the Sea*. Fuesetani M. (Ed). Basel: Karger. 1: 1-5.

Gaeta, A. and R.C. Hider. 2005. The crucial role of metal ions in neurodegeneration: the basis for a promising therapeutic strategy. *Br. J. Pharm.* 146 : 1041 – 1059.

Gerwick, William H., Moore, B. H. (2013). Products Drug Discovery and Chemical Biology. *ACS Chemical Biology*, 19(1), 85–98. <http://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.12.014.Lessons>

Gil, R., Bautista, I., Boscaiu, M., Lidón, A., Wankhade, S., Sánchez, H., Vicente, O. (2014). Responses of five Mediterranean halophytes to seasonal changes in environmental conditions. *AoB Plants*, 1–18. <http://doi.org/10.1093/aobpla/plu049>

Gillbro, J. M., & Olsson, M. J. (2011). The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents--existing and new approaches. *International Journal of Cosmetic Science*, 33(3), 210–21. doi:10.1111/j.1468-2494.2010.00616.x

Haefner B. 2003. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discovery Today*. 8: 536-44.

Halliwell B, Aeschbach R, Löliger J and Aruoma O I. 1995. The characterization of antioxidants. *Food Chemistry and Toxicology*. 33: 601-617.

Hande K R. 1998. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II 538 inhibitor. *Eur J Cancer*. 34: 1514-1521.

Harborne J.B. (1975). Flavonoids bi sulfates and their co-occurrences with ellagic-acid in the Bixaceae Frankeniaceae and related families. *Phytochem. (Oxford)*. 14: 1331-1338.

Harkat H, Haba H, Marcourt L, Long C, Benkhaled M (2007). An unusual lignan sulfate and aromatic compounds from *Frankenia thymifolia* Desf. *Bioch. Syst. Ecol.*, 35: 176-179.

Holm L.G., Plucknett D.L., Pancho J.V. and J.P. Herberger. 1977. *The world's worst weeds: distribution and biology*. Honolulu: University Press of Hawaii. 609 p.

Hosseinzadeh, H., Tabassi, S. A. S., Moghadam, N. M., Rashedinia, M., & Mehri, S. (2012). Antioxidant activity of *Pistacia vera* fruits, leaves and gum extracts. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 11(3), 879–887.

Hou W, Wu W, Yang C, Chen H, Liu S, and Lin Y. 2004. Antioxidant activities of leaf extracts of *Liriope spicata* L. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. 45: 285-290.

Hussain S R, Cillar J and Cillard P. 1987. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry*. 26: 2489-2491.

Hussein SAM (2004). Phenolic sodium sulfates of *Frankenia leavis* L. *Pharmazie*. 59: 304.

Ireland C, Copp B, Foster M, McDonald L, Radisky D and Swersey J. 1993. In *Marine Biology*. Attaway D, Zeborsky O. Plenum Press: New York. .I:1-43.

Jallali, I., Zaouali, Y., Missaoui, I., Smeoui, A., Abdelly, C., & Ksouri, R. (2014). Variability of antioxidant and antibacterial effects of essential oils and acetonic extracts of two edible halophytes: *Crithmum maritimum* L. and *Inula crithmoïdes* L. *Food Chemistry*, 145, 1031–1038. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.034>

Jamshidi, M., Shabani, E., Hashemi, Z., & Ebrahimzadeh, M. A. (2014). Evaluation of three methods for the extraction of antioxidants from leaf and aerial parts of *Lythrum salicaria* L. (Lythraceae). *International Food Research Journal*, 21(2), 783–788.

Jerković, I., Gašo-Sokač, D., Pavlović, H., Marijanović, Z., Gugić, M., Petrović, I., & Kovač, S. (2012). Volatile organic compounds from *Centaurium erythraea* rafn (Croatia) and the antimicrobial potential of its essential oil. *Molecules*, 17(2), 2058–2072. <http://doi.org/10.3390/molecules17022058>

Jha, R. K., & Zi-rong, X. (2004). Marine Drugs. *Marine Drugs*, 2(1), 123–146. <http://doi.org/10.3390/md90x000x>

Kato I, Dnistrian A M, Schwartz M, Toniolo P, Koenig K, Shore R E, Zeleniuch E-J A, Akhmedkhanov A and Riboli E. 1999. Iron intake, body iron stores and colorectal cancer risk in women: a nested case-control study. *International Journal of Cancer*. 80: 693-698.

Kawashima K and Fujii T. 2000. Extraneural cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacology and therapeutics*. 86: 29-48.

Kay R A. 1991. Microalgae as food and supplement. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 30: 555- 573.

Kil H Y, Seong E S, Ghimire B K, Chung IM, Kwon S S, Goh E J, Heo K, Kim M, Lim J D, Lee D and Yu C Y. 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of crude sorghum extract. *Food Chemistry*. 115: 1234-1239.

Kim Y, Min HY, Park HJ, Lee EJ, Park EJ, Hwang HJ, Jin C, Lee YS, Lee SK. (2004). Suppressive effects of nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase

(iNOS) gene expression by *Calystegia soldanella* methanol extract on lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 cells. *Eur J Cancer Prev.* 2004 Oct; 13(5):419-24.

Kwon YH, Mansberger SL and Coffi GA. 2000. Retinal Ganglion Cell Death in Glaucoma: Mechanisms and Neuroprotective Strategies. *Medline.* 13.

Ksouri, W. M., Medini, F., Mkadmini, K., Legault, J., Magné, C., Abdelly, C., & Ksouri, R. (2013). LC-ESI-TOF-MS identification of bioactive secondary metabolites involved in the antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of the edible halophyte *Zygophyllum album* Desf. *Food Chemistry*, 139(1-4), 1073–1080. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.047>

Ksouri, R., Maoui, A. S., Soda, H. I., & Bdely, C. a. (2012). Utilization of Halophyte Species as New Sources of Bioactive Substances, 44(i), 41–44.

Ksouri, R., Ksouri, W. M., Jallali, I., Debez, A., Magné, C., Hiroko, I., & Abdelly, C. (2011). Medicinal halophytes: potent source of health promoting biomolecules with medical, nutraceutical and food applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32(4), 1–38. doi:10.3109/07388551.2011.630647

Kwon YH, Mansberger SL and Coffi GA. 2000. Retinal Ganglion Cell Death in Glaucoma: Mechanisms and Neuroprotective Strategies. *Medline.* 13.

Lahlou, M. (2013). The success of natural products in drug discovery. *Pharmacology & Pharmacy*, 4(June), 17–31. <http://doi.org/10.4236/pp.2013.43A003>

Lamari, F. N., & Cordopatis, P. (2008). Exploring the Potential of Natural Products in Cancer Treatment. *Anticancer Therapeutics*, (NOVEMBER 2008), 1–16. <http://doi.org/10.1002/9780470697047.ch1>

Levin L A. 1999. Direct and indirect approaches to neuroprotective therapy of glaucomatous optic neuropathy. *Survey of Ophthalmology.* 43: 98-101.

Lee, Y. J., Kim, D. B., Lee, J. S., Cho, J. H., Kim, B. K., Choi, H. S., ... Lee, O. H. (2013). Antioxidant activity and anti-adipogenic effects of wild herbs mainly

cultivated in Korea. *Molecules*, 18(10), 12937–12950.
<http://doi.org/10.3390/molecules181012937>

Li, Y.G., Tanner, G., Larkin, P., 1996. The DMACA-HC1 Protocol and the threshold Proanthocyanidin Content for Bloat Safety in Forage Legumes. *J. Sci. Food Agric.* 70, 89–101.

Li H B, Jiang Y and Chen F. 2002. Isolation and purification of lutein from the microalga *Chlorella Vulgaris* by extraction after saponification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 1070-1072.

Libby R T, Gould D B, Anderson MG and João SW. 2005. Complex genetics of glaucoma susceptibility. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 6: 15-44.

Lieth H, Mochtchenko M. (2002). Halophyte uses in different climates IV. Cash crop halophytes for future halophytes growers. Leiden: Backhuys Publishers. pp. 34–41.

Lilies G. 1996. Gambling on marine biotechnology. *Bioscience*. 46: 250-253.

Liu, X., Ardo, S., Bunning, M., Parry, J., Zhou, K., Stushnoff, C., Kendall, P. (2007). Total phenolic content and DPPH radical scavenging activity of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in Colorado. *LWT-Food Science and Technology*, 40(APRIL), 552–557. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.09.007>

Liu Y, Zhao C, Li H, Yu M, Gao J, Wang L, Yongong Zhai Y . 2010. Cytotoxicity and apoptosis induced by a new podophyllotoxin glucoside in human hepatoma (HepG2) cells. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 88: 472-479.

Mahnaz Khanavi, T. M. and P. S. R. C., Mana Moshteh, T. M. and P. S. R. C., Azadeh Manayi, T. M. and P. S. R. C., Mohamad Reza Shams Ardekani, T. M. and P. S. R. C., Mahdi Vazirian, T. M. and P. S. R. C., Ajani, Y., & Ostad, S. N. (2011). Cytotoxic activity of *Lythrum salicaria*. *Research Journal of Biomedical Sciences* 6 (2): 55-57. ISSN: 1815-8846.

Manayi, A., Khanavi, M., Saiednia, S., Azizi, E., Mahmoodpour, M. R., Vafi, F., Hadjiakhoondi, A. (2013). Biological activity and microscopic characterization of *Lythrum salicaria* L. *Daru: Journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*, 21(1), 61. doi:10.1186/2008-2231-21-61

Massoulie J. 2002. The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neurosignals*. 11: 130-143.

Mazza, G., Fukumoto, L., Delaquis, P., Girard, B., Ewert, B., 1999. Anthocyanins, phenolics, and color of cabernet franc, merlot, and pinot noir wines from British Columbia. *J. Agric. Food Chem.* 47, 4009–4017.

Megías C, Pastor-Cavada E, Torres-Fuentes C, Girón-Calle J, Alaiz M, Juan R, Pastor J and Javier V. 2009. Chelating, antioxidant and antiproliferative activity of *Vicia sativa* polyphenol extracts. *European Food Research and Technology*. 230: 353-359.

Menezes-Benavente, L.; Teixeira, F.K.; Kamei, C.L.A.; Margis-Pinheiro, M. Salt stress induces altered expression of genes encoding antioxidant enzymes in seedlings of a Brazilian indica rice (*Oryza. sativa* L.). *Plant Sci*. 2004, 166, 323–331.

Meot-Duros, L., Cérantola, S., Talarmin, H., Le Meur, C., Le Floch, G., & Magné, C. (2010). New antibacterial and cytotoxic activities of faltarindiol isolated in *Crithmum maritimum* L. leaf extract. *Food and Chemical Toxicology*, 48(2), 553–557. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2009.11.031>

Mesulam M M, Guillozet A, Shaw P and Levey A. 2002. Acetylcholinesterase Knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience*. 110: 627-639.

Mezni, F., Khouja, M. L., Gregoire, S., Martine, L., Khaldi, a, & Berdeaux, O. (2014). Effect of growing area on tocopherols, carotenoids and fatty acid composition of *Pistacia lentiscus* edible oil. *Natural Product Research*, 28(16), 1225–30. doi:10.1080/14786419.2014.895724

Miao Z Q, Liu X Z, Li S D and He M X. 2003. *Dactylella pseudoclavata* sp., a new nematode-trapping fungus. *Canadian Journal of Botany*. 81: 452-456.

Miller, J. B. *The Pharmaceutical Century: Ten Decades of Drug Discovery*, Supplement to ACS Publications, 2000, 21-63.

Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C.S., Vojnov, A., 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radic. Res.* 40, 223–231.

Mosmann T. 1983. Rapid colometric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and citotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65: 55-63.

Munir U, Perveen A, Qamarunnisa S. 2014. Comparative pharmacognostic evaluation of some species of the genera *Suaeda* and *Salsola* leaf (Chenopodiaceae). *Pak J Pharm Sci.* 2014 Sep; 27(5):1309-15.

Nanji A A, Sadrzadeh SM, Dannenberg AJ. 1994. Livermicromal fatty acid composition in ethanol-fed injury. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 18: 1024-1028.

Newman D J and Cragg G M.. 2004. Marine Natural Products and Related Compounds in Clinical and Advanced Preclinical Trials. *Journal of Natural Products*. 67: 1216-1238.

Noguchi N and Niki E. 2000. Forum: Therapeutic Applications of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Human Disease. *Free Radical. Journal of Biology and Medicine*. 28: 1538-1546.

Nugroho A, Kim MH, Choi J, Choi JS, Jung WT, Lee KT, Park HJ. 2012. Phytochemical studies of the phenolic substances in *Aster glehni* extract and its sedative and anticonvulsant activity. *Arch Pharm Res.* 2012 Mar; 35(3):423-30. doi: 10.1007/s12272-012-0304-7. Epub 2012 Apr 5.

Oliveira P A, Colaço A, Chaves R, Guedes-Pinto H, De-La-Cruz L F P and Lopes C. 2007. Chemical carcinogenesis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 79: 593-616.

Oueslati, S., Ksouri, R., Falleh, H., Pichette, A., Abdelly, C., & Legault, J. (2012). Phenolic content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of the edible halophyte *Suaeda fruticosa* Forssk. *Food Chemistry*, 132(2), 943–947. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.072>

Pérez-hernández, J., Zaldívar-machorro, V. J., Villanueva-porras, D., Vega-ávila, E., & Chavarría, A. (2016). A potential alternative against neurodegenerative diseases: Phytodrugs Jesús Pérez-H, 2016. <http://doi.org/10.1155/2016/8378613>

Pinero D J, Hu J and Conno R J R. 2000. Alterations in the interaction between iron regulatory proteins and their iron responsive element in normal and Alzheimer's diseased brains. *Cellular and Molecular Biology*. 46: 761-776.

Pop, C., Vlase, L., & Tamas, M. (2009). Natural resources containing arbutin. Determination of arbutin in the leaves of *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch. acclimated in Romania. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 37(1), 129–132.

Qian Z M and Wang Q. 1998. Expression of iron transport proteins and excessive iron accumulation in the brain in neurodegenerative disorders. *Brain Research Reviews*. 27: 257-267.

Rasheed, D. M., El Zalabani, S. M., Koheil, M. a, El-Hefnawy, H. M., & Farag, M. a. (2013). Metabolite profiling driven analysis of *Salsola* species and their anti-acetylcholinesterase potential. *Natural Product Research*, 27(24), 2320–7. [doi:10.1080/14786419.2013.832676](https://doi.org/10.1080/14786419.2013.832676)

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, and Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26: 1231-1237.

Redondo-Gómez, S.; Mateos-Naranjo, E.; Figueroa, M.E.; Davy, A.J. Salt stimulation of growth and photosynthesis in an extreme halophyte *Arthrocnemum macrostachyum*. *Plant Biol.* 2010, 12, 79–87.

Riederer P, Sofic E, Rausch WD, Schmidt B, Reynolds G P, Jellinger K and Youdim M B. 1989. Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains. *Journal of Neuroscience Research.* 52: 515-520.

Rocha-Martin, J., Harrington, C., Dobson, A. D. W., & O’Gara, F. (2014). Emerging strategies and integrated systems microbiology technologies for biodiscovery of marine bioactive compounds. *Marine Drugs* (Vol. 12). <http://doi.org/10.3390/md12063516>

Rodrigues, MJ., Gangadhar, K. N., Vizetto-Duarte, C., Wubshet, S. G., Nyberg, N. T., Barreira, L., Custódio, L. (2014). Maritime halophyte species from southern Portugal as sources of bioactive molecules. *Marine Drugs*, 12 (4), 2228–44. doi:10.3390/md12042228

Rodrigues MJ, Soszynski A, Martins A, Rauter AP, Neng NR, Nogueira JMF, Varela J, Barreira L, Custódio L. 2015. Unravelling the antioxidant potential and the phenolic composition of organs of *Limonium algarvense*. *Industrial Crops and Products.* 77:315–332.

Rodrigues MJ, Neves V, Martins A, Rauter AP, Neng NR, Nogueira JMF, Varela J, Barreira L, Custódio L. 2016. In vitro antioxidant and anti-inflammatory properties of *Limonium algarvense* flowers’ infusions and decoctions: a comparison with green tea (*Camellia sinensis*). *Food Chemistry*, 200: 322–329.

Rodríguez-Pérez, C., Quirantes-Piné, R., Amessis-Ouchemoukh, N., Madani, K., Segura-Carretero, a, & Fernández-Gutierrez, a. (2013). A metabolite-profiling approach allows the identification of new compounds from *Pistacia lentiscus* leaves. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 77, 167–74. doi:10.1016/j.jpba.2013.01.026

Roos PM, Vesterberg O and Nordberg M. 2006 .Metals in motor neuron diseases. *Experimental Biology and Medicine.* 231: 1481-1487.

Rosa A, Deidda D, Serra A, Deiana M, M Dessì A and Pompei R. 2005. Omega-3 fatty acid composition and biological activity of three microalgae species. *Journal of Food Agriculture and Environment*. 3: 120-124.

Ross, H.A.; McDougall, G.J.; Stewart, D. Antiproliferative activity is predominantly associated with ellagitannins in raspberry extracts. *Phytochemistry* 2007, 68, 218-228.

Sahaa M R, Hasana S M R, Aktera R, Hossaina M M, Alamb M S, Alam M A, and Mazumderc M E H. 2008. In vitro free radical scavenging activity of methanol extract of the leaves of *Mimusops elengi* linn. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*. 6: 197-200.

Salmon S E and Sartorelli A C. 2003. Quimioterapia do câncer. In Katzung B G (Ed.) *Farmacologia básica e clínica*. 8.^a Edição. Rio de Janeiro. Guanabara. 55: 803-832.

Sanchez-Chavez G and Salceda R. 2000. Effect of streptozotocin-induced diabetes on activities of cholinesterase in the rat retina. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*. 49: 283-287.

Sardar, A. A., Khan, Z. U. D., Perveen, A., Farid, S., & Khan, I. U. (2014). In vitro antioxidant potential and free radical scavenging activity of various extracts of pollen of *Typha domigensis* Pers. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27(2), 279–284.

Schmidt, E. W., & Donia, M. S. (2010). Life in cellulose houses: Symbiotic bacterial biosynthesis of ascidian drugs and drug leads. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(6), 827–833. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.10.006>

Shu C-H, L and Lung M-Y. 2008. Effect of culture pH on the antioxidant properties of *Antrodia camphorate* in submerged culture. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*. 39: 1-8.

Sindhi, V., Gupta, V., Sharma, K., Bhatnagar, S., Kumari, R., & Dhaka, N. (2013). Potential applications of antioxidants - A review. *Journal of Pharmacy Research*, 7(9), 828–835. <http://doi.org/10.1016/j.jopr.2013.10.001>

Sithranga Boopathy, N., & Kathiresan, K. (2010). Anticancer drugs from marine flora: An overview. *Journal of Oncology*, 2010, 214186. <http://doi.org/10.1155/2010/214186>

Smit, N., Vicanova, J., & Pavel, S. (2009). The hunt for natural skin whitening agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(12), 5326–49. [doi:10.3390/ijms10125326](https://doi.org/10.3390/ijms10125326)

Soreq H and Seidman S. 2001. Acetylcholinesterase - new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience*. 2: 294-302.

Staats P S, Yearwood T, Charapata S G, Presley R W, Wallace M S, Byas- Smith M, Fisher R, Bryce D A, Mangieri E A, Luther R R, Mayo M, McGuire D and Ellis D. 2004.

Sung, J.-H., Park, S.-H., Seo, D.-H., Lee, J.-H., Hong, S.-W., & Hong, S.-S. (2009). Antioxidative and skin-whitening effect of an aqueous extract of *Salicornia herbacea*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73(3), 552–556. <http://doi.org/10.1271/bbb.80601>

Tepe B, Sokmen M, Akpulat HA, Yumrutas O, Sokmen A. (2006). Screening of antioxidative properties of the methanolic extracts of *Pelargonium endlicherianum* Fenzl, *Verbascum wiedemannianum* Fisch. and Mey., *Sideritis libanotica* Labill. Subsp. *lineraris* (Bentham) Borm., *Centaurea mucronifera* DC. and *Hieracium cappadocicum* Freyn from Turkish flora. *FoodChem*, 98, 9–13.

Thiruvengadam M, Praveen N, Yu B, Kim S and Chung I. 2014. Polyphenol composition and antioxidant capacity from different extracts of *Aster scaber*. *Acta Biologica Hungarica*. 65 (2). DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/ABiol.65.2014.2.3>

Thompson K, Menzies S, Muckenthaler M, Torti FM, Madeira T, Torti SV, Hentze MW, Beard J and J Connor. 2003. Mouse brains deficient in H-ferritin have normal iron concentration but a profile of iron deficiency and increased evidence of oxidative *stress*. *Journal of Neuroscience Research*. 71: 46-63.

Tori, M., Ohara, Y., Nakashima, K., & Sono, M. (2000). Caffeic and coumaric acid esters from *Calystegia soldanella*. *Fitoterapia*, 71(4), 353–359. [http://doi.org/10.1016/S0367-326X\(99\)00174-4](http://doi.org/10.1016/S0367-326X(99)00174-4)

Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–1246. <http://doi.org/10.3390/nu2121231>

Tunalier Z, Kosar M, Kupeli E, Calis I, Can Baser KH. 2007. Antioxidant, antiinflammatory, anti-nociceptive activities and composition of *Lythrum salicaria* L. extracts. *J Ethnopharmacol*, 110:539–547.

Um, Y. R., Kong, C.-S., Lee, J. I., Kim, Y. A., Nam, T. J., & Seo, Y. (2010). Evaluation of chemical constituents from *Glehnia littoralis* for antiproliferative activity against HT-29 human colon cancer cells. *Process Biochemistry* (Amsterdam, Netherlands), 45 (1), 114–119. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.08.016>

Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B.D., 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *J. Agric. Food Chem.* 46, 4113–4117.

Vinholes, J., Grosso, C., Andrade, P. B., Gil-Izquierdo, A., Valentão, P., Pinho, P. G. De, & Ferreres, F. (2011). In vitro studies to assess the antidiabetic, anti-cholinesterase and antioxidant potential of *Spergularia rubra*. *Food Chemistry*, 129(2), 454–462. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.098>

Vulpe C D and Packman S. 1995 Cellular copper transport. *Annual Review of Nutrition*. 15: 293-322.

Wided, M. K., Feten, C., Rawya, M. R., Feten, M., Yosr, Z., Nejla, T., Chedly, A. (2011). Antioxidant and antimicrobial properties of *Frankenia thymifolia* Desf.

fractions and their related biomolecules identification by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) and high performance liquid chromatography (HPLC). *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(24), 5754–5765.

Xiao R, Power R F, Mallonnee D, Crowdus C, Brennan K M, Ao T, Pierce J L and Dawson K A. 2010. A comparative transcriptomic study of vitamin E and an algae-based antioxidant as antioxidative agents: Investigation of replacing vitamin E with the algae based antioxidant in broiler diets. *Poultry Science*. 90: 136-146.

Yamaguchi K. 1997. Recent advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: a review. *Journal of Applied Phycology*. 8: 487-502.

Zampini IC, Cuello S, Alberto MR, Ordoñez RM, Almeida R, Solorzano E, Isla MI (2009). Antimicrobial activity of selected plant species from “the Argentine Puna” against sensitive and multi-resistant bacteria. *J. Ethnopharm.*, 124: 499-505.

Zou, J.Y., Chang, S.K.C., Gu, Y., Qian, S.Y., 2011. Antioxidant activity and phenolic compositions of lentil (*Lens culinaris* var. Morton) extract and its fractions. *Agric. Food Chem.* 59, 2268–2276.