



**Universidade do Algarve**  
**Faculdade de Ciências e Tecnologia**

**Novas Fontes de Antioxidantes e Inibidores de Enzimas  
Relevantes para o Tratamento da Diabetes *mellitus* tipo 2 e  
Doença de Alzheimer**

Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

**Patrícia Filipa Santos Costa**

Faro, Dezembro de 2009



**Universidade do Algarve**  
**Faculdade de Ciências e Tecnologia**

**Novas Fontes de Antioxidantes e Inibidores de Enzimas  
Relevantes para o Tratamento da Diabetes *mellitus* tipo 2 e  
Doença de Alzheimer**

Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

**Orientador: Professora Doutora Anabela Romano**

**Co-orientadores: Professor Doutor José Belo**

**Doutora Sandra Gonçalves**

**Patrícia Filipa Santos Costa**

Faro, Dezembro de 2009

O documento apresentado é da inteira responsabilidade da autora

---

## Agradecimentos

O meu reconhecido agradecimento à Professora Doutora Anabela Romano, por ter proporcionado todas as condições necessárias para que este estudo fosse realizado no laboratório de Biotecnologia Vegetal, sob sua orientação, e pelos úteis conhecimentos transmitidos.

À Doutora Sandra Gonçalves, co-orientadora deste trabalho, por todo o apoio, ajuda prestada, pelas críticas sempre tão atempadas quanto construtivas e pelo tempo generosamente dedicado a esta dissertação, o meu puro agradecimento.

Ao Professor Doutor José Belo, co-orientador deste trabalho, agradeço toda a simpatia e disponibilidade durante a realização de parte do trabalho prático, nomeadamente, no que respeita aos testes *in vivo*.

Ao Doutor Nuno Santos o meu sincero agradecimento pela preciosa e fundamental ajuda na administração intraperitoneal nos ratinhos.

Ao Biotério do CBME/UAlg, especialmente, à Dra. Sara Marques, por me ter acompanhado durante a realização dos testes *in vivo*.

Agradeço, ainda, à Dra. Lisa Gonçalves, do Laboratório de Embriologia e Manipulação Genética, por gentilmente ter participado numa fase inicial dos testes *in vivo*.

Aos meus pais, irmãs e restante família por me terem transmitido o sentido de responsabilidade, determinação e exigência.

Aos meus colegas de laboratório pela amabilidade, boa disposição e pelo espírito de entreatajuda que partilharam comigo.

Agradeço, ainda, a todos os que, sem reservas, contribuíram para que este estudo rumasse a bom porto.

Ao Samuel, por todo o seu incondicional apoio e por me fazer sentir sempre tão especial...Obrigada!

*“Não toques nunca música má e, salvo quando as circunstâncias o obriguem, tão pouco a oiças.*

*Estuda as obras dos grandes mestres.*

*Se todos quisessem ser primeiro violinos, seria impossível organizar uma orquestra.*

*Respeita o lugar de cada um.*

*Ama o instrumento que tocas, mas não sejas tão vão que penses ser o melhor de todos.*

*Conforme vais progredindo na arte, procura familiarizar-te mais com as partituras do que com os artistas.*

*Pensa que não és o único no mundo; portanto sê modesto.*

*Tu não pensaste ou fizeste coisa que outros não tenham pensado ou feito antes de ti.*

*E, no caso de isto acontecer, considera-o um dom de Deus que tens de partilhar com os demais.*

*O estudo não tem fim.”*

Robert Schumann (1810-1856)

Prefácio do “Álbum para a Juventude” Opus 68



## Abreviaturas

AAPH: *2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride*

Abs : absorvência

ABTS: *2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)*

A.C.: Antes de Cristo

ACh: acetilcolina

AChE : acetilcolinesterase

APP: proteína precursora de amilóide

A $\beta$ :  $\beta$ -amilóide

BSA: albumina de soro bovino

BuChE : butirilcolinesterase

°C: graus centígrados

CAT: catalase

CBME/Ualg: Centro de Biomedicina Molecular e Estrutural/ Universidade do Algarve

CBTC: cloreto de butirilticolina

CDF: Curva de Decréscimo de Fluorescência

ChEs : colinesterases

CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono

d: densidade

DA : Doença de Alzheimer

*Dm*: Diabetes *mellitus*

*Dmt1*: Diabetes *mellitus* tipo 1

*Dmt2* : Diabetes *mellitus* tipo 2

DNA: ácido desoxirribonucleico

DTNB: ácido 5-5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico)

*EC* : classificação enzimática

F-C: Folin-Ciocalteu

FDA: *Food and Drug Administration*

g: grama

GAE: *Galic Acid Equivalentents*

GPx: glutationa peroxidase

GS: cromatografia gasosa  
GS-MS: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa  
HAT: *Hydrogen Atom Transfer*  
HO<sup>•</sup>: radical hidroxilo  
H<sub>2</sub>O: água  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogénio  
IATC: iodeto de acetiltiocolina  
IC<sub>50</sub>: concentração mínima necessária para inibir 50 %  
Kg: quilograma  
L: litro  
M: molar  
mg: miligrama  
min: minuto  
mL: mililitro  
mM: milimolar  
nm: nanómetro  
O<sub>2</sub><sup>•-</sup>: radical superóxido  
ORAC: *Oxygen Radical Absorbance Capacity*  
PBS : *Phosphate Buffered Saline*  
p/p : peso/peso  
PS: Placas Senis  
p/v : peso/volume  
RNS: espécies reactivas de azoto  
ROS: espécies reactivas de oxigénio  
rpm: rotações por minuto  
s: segundos  
SD: Solúvel em Detergente  
SET: *Single Electron Transfer*  
SOD: superóxido dismutase  
SS: Solúvel em Sal  
TE: *Trolox Equivalents*  
TEAC: *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*

TNF: tranças neurofibrilares

VIH: Vírus da Imunodeficiência Humana

v/v: volume/volume

WHO: *World Health Organization*

$\alpha$ -APP:  $\alpha$ -Amilase Pancreática de Porco

$\alpha$ -GIR :  $\alpha$ -Glucosidase extraída de Intestino de Rato

$\alpha$ -GL:  $\alpha$ -Glucosidase de Levedura

$\Delta A$ : variação de absorvência ( $Abs_{final} - Abs_{inicial}$ )

$\mu\text{mol}$  : micromole

$\mu\text{L}$ : microlitro

%: percentagem

## Resumo

A descoberta de novas fontes naturais de origem vegetal de antioxidantes e inibidores enzimáticos interessantes para o tratamento da Doença de Alzheimer e Diabetes *mellitus* tipo 2, constituiu o objectivo principal deste estudo. Foram avaliados os extractos metanólicos das seguintes espécies: *C. albidus*, *D. lusitanicum*, *L. viridis*, *Q. suber*, *R. ponticum* subsp. *baeticum* e *R. aculeatus* e o extracto aquoso de todas as espécies à excepção de *L. viridis* e *R. ponticum*. O extracto hexânico de *D. lusitanicum* e o óleo essencial de *L. viridis* foram igualmente investigados. A capacidade antioxidante dos compostos foi avaliada com base nos métodos TEAC e ORAC e o teor em polifenóis pelo método F-C. As espécies *C. albidus* e *Q. suber* foram as mais promissoras e o extracto hexânico e óleo essencial de *D. lusitanicum* e *L. viridis*, respectivamente, os menos relevantes. Os melhores resultados foram, no geral, obtidos com o método ORAC e extracto metanólico. Os valores indicam que existe uma clara relação entre o teor em polifenóis e a actividade antioxidante. O potencial farmacológico do material vegetal no controlo da Dmt2 foi avaliado pela capacidade de inibição das enzimas  $\alpha$ -APP,  $\alpha$ -GL e  $\alpha$ -GIR. Os extractos aquoso e metanólico de *C. albidus*, *Q. suber* e *R. aculeatus* e o extracto metanólico de *R. ponticum* revelaram interesse terapêutico. O método colorimétrico descrito por Ellman *et al.* (1961) permitiu demonstrar que o óleo e extracto metanólico de *L. viridis* são potentes inibidores das enzimas AChE e BuChE *in vitro*. O extracto metanólico exibiu perfil terapêutico *ex vivo* quando administrado a ratinhos de laboratório na concentração de 50 mg.Kg<sup>-1</sup>, apresentando maior eficiência na inibição das enzimas AChE e BuChE. Todos os extractos demonstraram potencial farmacológico, no entanto, o conhecimento em detalhe da composição química será crucial para a compreensão dos seus mecanismos de acção.

Palavras-chave: Antioxidantes, Doença de Alzheimer, Diabetes *mellitus* tipo 2, Enzimas, Extractos vegetais.

## Abstract

The discovery of new natural sources from plant origin of antioxidants and enzyme inhibitors interesting for the treatment of Alzheimer's Disease and type 2 Diabetes *mellitus* was the main goal of this study. The methanol extract of *C. albidus*, *D. lusitanicum*, *L. viridis*, *Q. suber*, *R. ponticum* subsp. *baeticum* and *R. aculeatus*, and the aqueous extract of all species with exception of *L. viridis* and *R. ponticum* were evaluated. The hexane extract of *D. lusitanicum* and the essential oil of *L. viridis* were also investigated. The antioxidant capacity of the extracts was evaluated by the TEAC and ORAC assays and the phenolic content was determined by the F-C method. *C. albidus* and *Q. suber* were the most active and the hexane extract and essential oil of *D. lusitanicum* and *L. viridis*, respectively, the least relevant. The best results were overall obtained with ORAC assay and methanol extract and the results demonstrated a high correlation between phenolic content and antioxidant activity. The pharmacological potential of the extracts at the management of *Dmt2* was evaluated based on the inhibitory effect on  $\alpha$ -APP,  $\alpha$ -GL and  $\alpha$ -GIR enzymes. Aqueous and methanol extracts of *C. albidus*, *Q. suber* e *R. aculeatus* as well as methanol extract of *R. ponticum* revealed therapeutic interest. The colorimetric method previously described by Ellman *et al.* (1961) showed that the essential oil and methanol extract of *L. viridis* are potent inhibitors *in vitro* of AChE and BuChE enzymes. The methanol extract showed *ex vivo* therapeutic profile when administered to mice at a concentration of 50 mg.Kg<sup>-1</sup>, with higher efficiency in inhibiting AChE and BuChE enzymes. All the extracts showed pharmacological prospective, however, the knowledge in detail of chemical composition is crucial to understand the mechanisms of action.

Keywords: Antioxidants, Alzheimer's Disease, type 2 Diabetes *mellitus*, Enzymes, Plant extracts.

# Índice

|   | Página |
|---|--------|
| 1. Patologias .....   | 1      |
| 1.1. Doença de Alzheimer (DA) .....   | 1      |
| 1.1.1. Características neuropatológicas da doença .....   | 1      |
| 1.1.2. Doença de Alzheimer e stress oxidativo.....  | 3      |
| 1.1.3. Terapias .....   | 4      |
| 1.2. Diabetes <i>mellitus</i> (Dm) .....  | 4      |
| 1.2.1. Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1 e tipo 2: causas e consequências.....                        | 5      |
| 1.2.2. Diabetes <i>mellitus</i> e stress oxidativo.....   | 6      |
| 1.2.3. Terapias .....   | 6      |
| 2. Antioxidantes .....  | 7      |
| 2.2. Métodos para avaliação <i>in vitro</i> da capacidade antioxidante de extractos vegetais .....  | 10     |
| 2.2.1. ORAC .....   | 10     |
| 2.2.2. TEAC.....  | 11     |
| 2.2.3. F-C.....   | 12     |
| 3. Plantas: da medicina tradicional à medicina moderna .....  | 14     |
| 3.1. Plantas estudadas .....  | 15     |
| 3.1.1. <i>Cistus albidus</i> L.....   | 19     |
| 3.1.2. <i>Drosophyllum lusitanicum</i> L. (Link.).....  | 19     |
| 3.1.3. <i>Lavandula viridis</i> L'Hér .....   | 20     |
| 3.1.4. <i>Quercus suber</i> L. ....   | 21     |
| 3.1.5. <i>Rhododendron ponticum</i> subsp. <i>baeticum</i> (Boissier & Reuter) Handel-Mazzetti..... | 21     |
| 3.1.6. <i>Ruscus aculeatus</i> L. ....  | 22     |
| 4. Objectivo .....  | 22     |
| 5. Materiais e Métodos .....  | 24     |
| 5.1. Preparação do material vegetal .....   | 24     |
| 5.2. Extracção por solvente.....  | 24     |
| 5.3. Extracção aquosa .....   | 25     |
| 5.4. Extracção do óleo essencial .....  | 25     |
| 5.5. Avaliação da actividade antioxidante <i>in vitro</i> .....                                     | 25     |
| 5.6. Inibição <i>in vitro</i> da $\alpha$ -Amilase Pancreática de Porco ( $\alpha$ -APP).....       | 28     |

|  |    |
|--|----|
| 5.7. Inibição <i>in vitro</i> da $\alpha$ -Glucosidase de Levedura ( $\alpha$ -GL) e $\alpha$ -Glucosidase extraída de Intestino de Rato ( $\alpha$ -GIR)..... | 29 |
| 5.8. Inibição <i>in vitro</i> das enzimas AChE e BuChE.....  | 30 |
| 5.9. Inibição <i>ex vivo</i> das enzimas AChE e BuChE .....  | 31 |
| 6. Resultados e Discussão .....  | 34 |
| 6.1. Avaliação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i> .....  | 34 |
| 6.2. Inibição <i>in vitro</i> das enzimas $\alpha$ -APP, $\alpha$ -GL e $\alpha$ -GIR.....   | 39 |
| 6.3. Inibição <i>in vitro</i> das enzimas AChE e BuChE.....  | 48 |
| 6.4. Inibição <i>ex vivo</i> das enzimas AChE e BuChE .....  | 55 |
| 7. Conclusão e Perspectivas Futuras .....  | 60 |
| 8. Referências Bibliográficas .....  | 63 |

## Índice de Figuras

- Figura 1.** Principais características patológicas da DA **(a)** PS; **(b)** TNF (*Adaptado de* [http://www.alz.org/alzheimers\\_disease\\_4719.asp](http://www.alz.org/alzheimers_disease_4719.asp). Acedido a 30.05.09).....página 2
- Figura 2.** Mecanismo de oxidação da fluoresceína na presença de AAPH (Ou *et al.*, 2001).....página 11
- Figura 3.** Princípio de avaliação da capacidade antioxidante com base no método TEAC (*Adaptado de* Huang *et al.*, 2005).....página 12
- Figura 4.** Aspecto das espécies em estudo, no seu habitat natural.....página 17
- Figura 5.** **(a)** Extracções Soxhlet. **(b)** Evaporador rotativo sob vácuo.....página 24
- Figura 6.** Representação das curvas de decréscimo de fluorescência para determinação da actividade ORAC de uma amostra (*Adaptado de* Gillespie *et al.*, 2007).....página 26
- Figura 7.** Imagem da microplaca transparente de 96 poços, com a mistura reaccional que permitiu avaliar a actividade antioxidante do material vegetal, pelo método TEAC.....página 27
- Figura 8.** Imagem da microplaca transparente de 96 poços, com a mistura reaccional que permitiu avaliar o teor em polifenóis presente no material vegetal, pelo método F-C.....página 28
- Figura 9.** Imagem da microplaca transparente de 96 poços, com a mistura reaccional que permitiu avaliar a inibição da enzima  $\alpha$ -APP *in vitro*.....página 29
- Figura 10.** Imagem da microplaca transparente de 96 poços, com a mistura reaccional que permitiu avaliar a inibição das enzimas  $\alpha$ -GL e  $\alpha$ -GIR *in vitro*.....página 30
- Figura 11.** Modelo *in vivo* utilizado neste estudo (ratinho de laboratório; *Mus musculus*, da estirpe C57BL/6 Black).....página 33
- Figura 12.** Imagem da microplaca transparente de 96 poços, com a mistura reaccional que permitiu a quantificação proteica pelo método de Bradford.....página 33
- Figura 13.** Imagem da microplaca transparente de 96 poços, com a mistura reaccional que permitiu avaliar a inibição das enzimas AChE e BuChE *ex vivo*.....página 33

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Figura 14.</b> Comparação da capacidade dos extractos aquoso e metanólico de <i>C. albidus</i> inibirem <i>in vitro</i> as enzimas $\alpha$ -APP, $\alpha$ -GL e $\alpha$ -GIR. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão de 3 repetições..... | página 41 |
| <b>Figura 15.</b> Comparação da capacidade dos extractos aquoso, metanólico e hexânico de <i>D. lusitanicum</i> inibirem <i>in vitro</i> as enzimas $\alpha$ -GL e $\alpha$ -GIR. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão de 3 repetições.....  | página 42 |
| <b>Figura 16.</b> Comparação da capacidade do óleo essencial e do extracto metanólico de <i>L. viridis</i> inibirem <i>in vitro</i> as enzimas $\alpha$ -GL e $\alpha$ -GIR. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão de 3 repetições.....       | página 43 |
| <b>Figura 17.</b> Comparação da capacidade dos extractos, aquoso e metanólico de <i>Q. suber</i> inibirem <i>in vitro</i> as enzimas $\alpha$ -APP, $\alpha$ -GL e $\alpha$ -GIR. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão de 3 repetições.....  | página 44 |
| <b>Figura 18.</b> Capacidade do extracto metanólico de <i>R. ponticum</i> subsp. <i>baeticum</i> inibir <i>in vitro</i> as enzimas $\alpha$ -APP, $\alpha$ -GL e $\alpha$ -GIR. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão de 3 repetições.....    | página 45 |
| <b>Figura 19.</b> Comparação da capacidade dos extractos aquoso e metanólico de <i>R. aculeatus</i> inibirem <i>in vitro</i> as enzimas $\alpha$ -GL e $\alpha$ -GIR. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão de 3 repetições.....              | página 46 |
| <b>Figura 20.</b> Inibição da actividade das enzimas AChE e BuChE <i>in vitro</i> pelos extractos aquoso e metanólico de <i>C. albidus</i> . Os valores representam a média $\pm$ erro padrão de 3 repetições.....                                       | página 49 |
| <b>Figura 21.</b> Inibição da actividade das enzimas AChE e BuChE <i>in vitro</i> pelos extractos aquoso, metanólico e hexânico de <i>D. lusitanicum</i> . Os valores representam a média $\pm$ erro padrão de 3 repetições.....                         | página 50 |
| <b>Figura 22.</b> Inibição da actividade das enzimas AChE e BuChE <i>in vitro</i> pelos extractos aquoso e metanólico de <i>Q. suber</i> . Os valores representam a média $\pm$ erro padrão de 3 repetições.....   | página 51 |
| <b>Figura 23.</b> Inibição da actividade das enzimas AChE e BuChE <i>in vitro</i> pelo extracto metanólico de <i>R. ponticum</i> subsp. <i>baeticum</i> . Os valores representam a média $\pm$ erro padrão de 3 repetições.....                          | página 52 |

**Figura 24.** Inibição da actividade das enzimas AChE e BuChE *in vitro* pelos extractos aquoso e metanólico de *R. aculeatus*. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 repetições.....página 53

## Índice das Tabelas

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Tabela 1.</b> Resumo das características dos métodos de avaliação do teor total de fenóis (F-C) e avaliação da actividade antioxidante (ORAC e TEAC).....   | página 13 |
| <b>Tabela 2.</b> Plantas usadas na medicina tradicional com importantes contribuições na medicina moderna ( <i>Adaptado de Gurib-Fakim, 2006</i> ).....  | página 16 |
| <b>Tabela 3.</b> Família, nome comum, distribuição geográfica, habitat e outras observações referentes às espécies em estudo.....  | página 18 |
| <b>Tabela 4.</b> Quantificação do teor em polifenóis pelo método F-C e avaliação da actividade antioxidante do material vegetal com base nos métodos, TEAC e ORAC.....   | página 35 |
| <b>Tabela 5.</b> Inibição da actividade das enzimas AChE e BuChE <i>in vitro</i> , representada em valores de IC <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> ), pelo óleo e extracto metanólico da espécie <i>L. viridis</i> e, ainda, pelo inibidor <i>standard</i> Galantamina. Os valores representam a média ± erro padrão de 3 repetições..... | página 54 |
| <b>Tabela 6.</b> Efeito do extracto metanólico e Galantamina na actividade das enzimas AChE e BuChE, após 120 min da administração intraperitoneal. Os valores representam a média ± erro padrão de 3 repetições.....  | página 56 |

# 1. Patologias

## 1.1. Doença de Alzheimer (DA)

No ano de 1907, Alois Alzheimer (1864-1915), psiquiatra e neurologista alemão, descobria uma das maiores formas de demência da actualidade (Markesbery, 1997), a doença de Alzheimer (DA) (Behl, 1997). Estima-se que a DA afecte mais de 24 milhões de pessoas em todo o mundo<sup>1</sup>, cerca de 7,3 milhões de europeus, de entre os quais, 90 mil são portugueses<sup>2</sup>. A incidência da DA aumenta bruscamente com o avanço da idade, e a doença tem uma duração de, aproximadamente, oito anos e meio, ao fim dos quais o paciente acaba por morrer (Frank & Gupta, 2005).

A DA resulta de uma série de eventos patológicos que comprometem irremediavelmente o cérebro causando o declínio de faculdades cognitivas, como a memória e alterações comportamentais, consequências da perda progressiva de neurónios em diferentes regiões do cérebro (Behl, 1997; Benzi & Moretti, 1998; Mantle *et al.*, 2000).

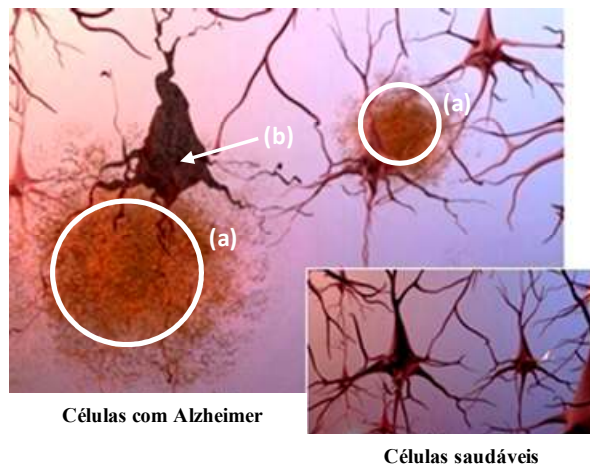
### 1.1.1. Características neuropatológicas da doença

Estudos histopatológicos *post mortem* comprovam que as tranças neurofibrilares (TNF) e placas senis (PS) são as principais alterações da doença (Behl, 1997). As PS são depósitos extracelulares, constituídos maioritariamente pela proteína  $\beta$ -amilóide (A $\beta$ ). Este péptido de 39-43 aminoácidos resulta da clivagem proteolítica da proteína precursora de amilóide (APP), uma glicoproteína transmembranar. Os mais abundantes são os fragmentos A $\beta$  (1-40) e A $\beta$  (1-42) sendo este último mais neurotóxico. O péptido  $\beta$  amilóide induz a activação das células da glia, disfunção sináptica e conduz à perda neuronal (Selkoe, 1996; Felician & Sandson, 1999; Klafki *et al.*, 2006). As TNF são compostas por formas agregadas e hiperfosforiladas da proteína *tau*, normalmente associada à estabilização dos microtúbulos axonais. A hiperfosforilação destas proteínas poderá contribuir para a destabilização da estrutura dos microtúbulos, transporte axonal anómalo e, conseqüentemente, morte celular (Figura 1) (Trojanowski & Lee, 1995; Johnson & Jenkins, 1996; Behl, 1997; Benzi & Moretti, 1998; Francis *et al.*, 1999).

---

<sup>1</sup> <http://www.alzheimer.ca/english/media/adfacts2007.htm#footnote4> (Acedido a 30.05.09)

<sup>2</sup> <http://www.alzheimerportugal.org/scid/webAZprt/defaultCategoryViewOne.asp?categoryID=898> (Acedido a 10.09.09)



**Figura 1.** Principais características patológicas da DA **(a)** PS; **(b)** TNF (*Adaptado de [http://www.alz.org/brain\\_portuguese/10.asp](http://www.alz.org/brain_portuguese/10.asp). Acedido a 30.05.09*).

Para além da acumulação de PS e TNF existe, também, alteração ao nível dos sistemas neurotransmissores, sendo o sistema colinérgico o mais lesado (Francis *et al.*, 1999; White & Ruske, 2002).

Nas últimas duas décadas, a hipótese que defende o possível envolvimento do sistema colinérgico com funções cognitivas, como a memória e a aprendizagem, tem ganho consistência (Blokland, 1996; White & Ruske, 2002). As lesões no sistema colinérgico, nomeadamente, a perda excessiva de neurónios, diminuição dos níveis de acetilcolina (ACh) e de acetilcolina transferase (os seus níveis encontram-se reduzidos em áreas como córtex cerebral, hipocampo e amígdala) (Bartus *et al.*, 1982; Felician & Sandson, 1999) resultam num défice progressivo e irreversível da função colinérgica, sobretudo perda de memória, distúrbios neurológicos e neuropsiquiátricos (White & Ruske, 2002; Hostettmann *et al.*, 2006).

A ACh actua como um neurotransmissor capaz de estabelecer impulsos nervosos entre as células. Após transmitir o impulso é inactivada, por hidrólise, por uma enzima, a acetilcolinesterase (AChE), produzindo colina e acetato. Este processo é fundamental para que o sistema recupere a capacidade de resposta a um novo estímulo (Wilkinson *et al.*, 2004). O cérebro humano contém duas colinesterases (ChEs): a AChE, que hidrolisa especificamente a acetilcolina na fenda sináptica e a butirilcolinesterase (BuChE), que para além da acetilcolina hidrolisa outros ésteres de colina (Taylor & Radić, 1994; Mesulam *et al.*, 2002; Wilkinson *et al.*, 2004). Enquanto a AChE está presente em

maiores concentrações no cérebro humano que a BuChE, esta última, embora exista no cérebro, predomina essencialmente no fígado, intestino, coração e pulmões (Chatonnet & Lockridge, 1989; Talessa, 2001; Mesulam *et al.*, 2002). As ChEs existem em diferentes formas moleculares, incluindo as poliméricas que se dividem em duas classes: globulares e assimétricas. As formas globulares consistem em G<sub>1</sub> (citossólica), G<sub>2</sub> e G<sub>4</sub> (ligada à membrana), quando estão presentes um, dois ou quatro monómeros globulares, respectivamente. As formas assimétricas (formas de associação dos tetrâmeros) são classificadas como A<sub>4</sub>, A<sub>8</sub> e A<sub>12</sub> (Atack *et al.*, 1986; Massoulié *et al.*, 1993).

Apesar da controvérsia quanto à relevância da BuChE no tratamento da DA, muitos investigadores defendem que esta enzima tem um papel activo no melhoramento do sistema colinérgico. As enzimas AChE e BuChE foram encontradas nas PS e TNF de cérebros portadores da doença (Mesulam *et al.*, 2002).

### **1.1.2. Doença de Alzheimer e stress oxidativo**

São claras as evidências quanto ao envolvimento dos radicais livres na patogénese da DA (Markesbery, 1997; Mantle *et al.*, 2000; Butterfield *et al.*, 2001). O cérebro é particularmente vulnerável aos processos oxidativos devido ao seu elevado consumo de oxigénio (aproximadamente, 20 % do oxigénio total consumido pelo homem), elevado teor de ácidos gordos polinsaturados (muito sensíveis à oxidação), quantidades elevadas de iões metálicos (catalisam a formação de radicais livres) e baixo nível de defesas antioxidantes endógenas (Behl, 1997; Markesbery, 1997; Floyd & Hensley, 2002). Elevadas quantidades de espécies reactivas afectam várias moléculas biológicas, nomeadamente, DNA, proteínas e lípidos (Behl, 1997; Praticò & Delanty, 2000). Tem sido sugerida a associação entre a toxicidade do A $\beta$  e o aumento de espécies reactivas, incluindo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NO<sub>2</sub>, o que pode provocar o desencadeamento de eventos neurotóxicos (Behl, 1997). Valko *et al.* (2007) referem que os metais, como o cobre (Cu), zinco (Zn) e ferro (Fe) têm um papel activo na acumulação de A $\beta$ . Por exemplo o Cu<sup>+</sup>, que catalisa a formação do radical hidroxilo (OH $\cdot$ ), quando associado ao péptido A $\beta$  (cujos locais de ligação têm elevada afinidade para o Cu<sup>+</sup>) pode contribuir para o aumento do stress oxidativo no cérebro de vítimas da DA. Por tudo isto, os antioxidantes poderão ser preponderantes na prevenção e tratamento da doença.

### 1.1.3. Terapias

Dado o possível envolvimento da disfunção colinérgica com a DA, melhorar a neurotransmissão colinérgica constitui uma base racional para o tratamento dos sintomas da doença (Kása *et al.*, 1997; Felician & Sandson, 1999). Isto pode ser feito (i) estimulando a síntese de acetilcolina, através do uso de precursores, como a colina; (ii) aumentando os níveis de acetilcolina por inibição das ChEs; ou (iii) estimulando a função dos receptores nicotínicos e muscarínicos (Felician & Sandson, 1999; Mantle *et al.*, 2000). Actualmente, a farmacoterapia mais usada baseia-se na utilização de inibidores das ChEs. Está demonstrado que estes estabilizam os sintomas próprios da doença, possibilitando uma melhor qualidade de vida aos portadores da patologia (Felician & Sandson, 1999). O Donepezil (Kelly *et al.*, 1997), Galantamina (Scott & Goa, 2000) e Rivastigmina (Gottwald & Rozanski, 1999) são exemplos de inibidores colinesterásicos disponíveis para o tratamento, aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA). No entanto, os efeitos secundários associados a estes fármacos, nomeadamente, problemas gastrointestinais e cardiorespiratórios (Chattipakorn *et al.*, 2007), reforçam a necessidade de encontrar novos substitutos, especialmente de origem natural, com elevada actividade inibidora e efeitos secundários reduzidos. A Galantamina, utilizada neste estudo como controlo positivo, é prova da importância dos produtos naturais de origem vegetal. Este inibidor, comercialmente conhecido por Reminyl® (Mantle *et al.*, 2000), consiste num alcalóide isolado de várias plantas, entre as quais a espécie *Galanthus nivalis* (Harvey, 1995), e é um inibidor específico, reversível e competitivo da AChE. Apesar dos seus benefícios no melhoramento da transmissão colinérgica, a Galantamina provoca náuseas como efeitos secundários (Mantle *et al.*, 2000).

## 1.2. Diabetes *mellitus* (Dm)

A Dm é uma desordem metabólica crónica caracterizada pela produção deficiente de insulina (hormona responsável pela utilização eficiente de glucose pelo organismo) pelas células  $\beta$  pancreáticas, produzidas nas ilhas de Langerhans, ou pela resistência periférica das células à acção da insulina, que conduz a níveis de glucose no sangue anormalmente elevados (hiperglicémia) (WHO, 1980). A hiperglicémia crónica conduz a danos nos tecidos e a complicações patofisiológicas, nomeadamente, doenças cardiovasculares (Brownlee & Cerami, 1981). A obesidade, um estilo de vida sedentário

e uma dieta rica em gorduras são factores de risco para a *Dmt2* (Lenhard & Gottschalk, 2002). Segundo dados da WHO<sup>3</sup>, mais de 180 milhões de pessoas no mundo são portadoras da *Dm*, estimando-se uma duplicação deste valor até 2030.

A glucose é a principal fonte de energia necessária para assegurar as funções vitais dos mamíferos. Estes seres vivos desenvolveram sistemas sofisticados responsáveis pelo controlo dos níveis de glucose, prevenindo a hipoglicémia (baixos níveis de glucose no sangue) durante períodos de jejum e evitando os níveis elevados de glucose após uma refeição. O consumo periférico da glucose pelos músculos cardíaco, esquelético e tecido adiposo, bem como a regulação hormonal da produção de glucose pelo fígado mantêm os níveis normais de glicémia. Uma redução nas vias metabólicas da glucose pode desencadear uma deficiência no seu metabolismo, o início da hiperglicémia e, conseqüentemente, a *Dm* (Tiwari & Rao, 2002).

### **1.2.1. Diabetes *mellitus* tipo 1 e tipo 2: causas e conseqüências**

A *Dm* é classificada em dois tipos: tipo 1 (*Dmt1*) e tipo 2 (*Dmt2*). Na *Dmt1*, insulino-dependente, a produção de insulina é escassa ou nula sendo, portanto, necessária insulino-terapia<sup>4</sup>. A sua etiopatogenia resulta de um processo autoimune dirigido contra as células  $\beta$  pancreáticas. Este processo de autoimunidade é desencadeado por factores ambientais em indivíduos geneticamente susceptíveis. O gene que codifica para a insulina, localizado no cromossoma 11, contribui cerca de 10% para a susceptibilidade da *Dmt1* (Bell *et al.*, 1984). Alguns estudos indicam que um factor ambiental (por exemplo, uma infecção viral na infância ou adolescência) pode provocar a destruição, pelo sistema imunitário, das células  $\beta$  pancreáticas (Foulis *et al.*, 1991; Achenbach *et al.*, 2005). A *Dmt2*, não insulino-dependente, representa cerca de 90-95 % dos casos de Diabetes (Goldstein, 2007). De acordo com os resultados do ‘Estudo da Prevalência da Diabetes em Portugal’, cerca de um terço da população portuguesa tem *Dmt2* ou é pré-diabético<sup>5</sup>. Na *Dmt2* existe alteração na produção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas, ou resistência à actividade da insulina (resistência à insulina) que conduzem à hiperglicémia (WHO, 1980; Reimann *et al.*, 2009). A incapacidade de ligação da insulina aos receptores dos tecidos-alvo poderá constituir uma das causas implícitas na *Dmt2* (Surampudi *et al.*, 2009). Este tipo de Diabetes

---

<sup>3</sup> <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html> (Acedido a 20.07.09)

<sup>4</sup> <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html> (Acedido a 20.07.09)

<sup>5</sup> <http://www.spd.pt/images/rpd%20junho%202009-1.pdf> (Acedido a 17.08.09)

causa alterações no metabolismo de hidratos de carbono, lípidos e proteínas (WHO, 1980). Quando as células  $\beta$  pancreáticas não são capazes de compensar a resistência à insulina, por aumento da sua produção, há diminuição da tolerância à glucose e, conseqüentemente, aumenta a hiperglicémia pós-prandial (os níveis de glucose no sangue após refeição) (Tiwari & Rao, 2002; Gerich, 2003).

### **1.2.2. Diabetes *mellitus* e stress oxidativo**

O stress oxidativo tem um papel activo no desencadeamento de complicações associadas à *Dm* (Baynes, 1991; Rösen *et al.*, 2001; Valko *et al.*, 2007). Uma das maiores complicações da *Dm* é o surgimento de doenças cardiovasculares, nefropatia (Rahimi *et al.*, 2005), neuropatia e retinopatia (Kowluru & Abbas, 2003).

A hiperglicémia (Valko *et al.*, 2007), oxidação celular e redução das defesas antioxidantes são factores que estimulam o aumento de stress oxidativo na *Dm* (Kashiwagi *et al.*, 1994; Rösen *et al.*, 2001; Rahimi *et al.*, 2005). Os danos causados pelo stress oxidativo poderão estar envolvidos na destruição das células  $\beta$  (Szaleczky *et al.*, 1999), particularmente vulneráveis ao stress oxidativo por possuírem baixos níveis de sistemas antioxidantes capazes de neutralizar eficientemente as espécies reactivas (Kaneto *et al.*, 1999). Sabe-se, por exemplo, que a regeneração da glutathiona é retardada na presença de altos níveis de glucose conduzindo a um défice no sistema de defesa antioxidante. Dado o envolvimento do stress oxidativo na Diabetes, os antioxidantes poderão contribuir positivamente para o controlo da doença (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2000).

### **1.2.3. Terapias**

O tratamento da Diabetes foca-se na regulação dos níveis de glucose no sangue. Estimular as células  $\beta$  pancreáticas a libertar insulina, aumentar a competência e sensibilidade dos receptores de insulina, impedir a formação de radicais livres e melhorar a utilização de glucose pelos órgãos e tecidos, são algumas estratégias utilizadas para conseguir esse controlo (Liu & Wang, 1996; Zhao, 1999). Uma das terapias mais utilizadas no tratamento da *Dm*2 é a diminuição da hiperglicémia pós-prandial. É possível estabilizar os níveis de glicémia por redução da absorção de hidratos de carbono após a sua ingestão. Os hidratos de carbono são hidrolisados por amilases em dextrinas ou oligossacáridos que mais tarde são convertidos em glucose

por reacções de hidrólise catalisadas pela  $\alpha$ -glucosidase presente no intestino. Os açúcares simples são então absorvidos no epitélio intestinal e, posteriormente, passam para a corrente sanguínea (Saito *et al.*, 1998). A inibição destas enzimas atrasa a digestão de hidratos de carbono prolongando assim o tempo de digestão destes, com consequente redução da taxa de absorção de glucose (Apostolidis *et al.*, 2007).

A Acarbose e o Miglitol são clinicamente usados no tratamento da Dmt2 (Ani & Naidu, 2008). A Acarbose foi usada neste estudo como inibidor da  $\alpha$ -amilase (Wilcox & Whitaker, 1984) e  $\alpha$ -glucosidase (Schmidt *et al.*, 1977). Contudo, estes inibidores provocam complicações no fígado, acidose láctica, diarreia e flatulência (Ani & Naidu, 2008; Shobana *et al.*, 2009), o que torna importante a pesquisa de novas alternativas. Com base na medicina tradicional, em que são conhecidas mais de 400 espécies de plantas com actividade hipoglicémica (Bailey & Day, 1989), muitos investigadores têm participado na descoberta de inibidores de enzimas digestivas de origem vegetal (Ali *et al.*, 2006; Mai & Chuyen, 2007; Shobana *et al.*, 2009).

## **2. Antioxidantes**

Segundo Halliwell & Gutteridge (1989), “antioxidantes são substâncias que, mesmo presentes em baixas concentrações relativamente a um substrato oxidável, inibem ou previnem significativamente a oxidação desse mesmo substrato”. Esta definição inclui enzimas como a catalase, grandes e pequenas moléculas, como a albumina e o ácido ascórbico, respectivamente, e algumas hormonas, como a angiotensina (Prior *et al.*, 2005).

Como consequência da exposição constante aos radicais livres, e com o objectivo de controlar os seus níveis intracelulares, os organismos desenvolveram mecanismos de defesa, que envolvem, mecanismos de prevenção, de reparação, defesas físicas e defesas antioxidantes (Sies, 1993; Valko *et al.*, 2007). Relativamente às defesas antioxidantes Singh & Singh (2008), baseando-se em estudos de vários autores, classificaram os antioxidantes com base na sua origem, natureza e modo de acção. Relativamente à sua origem, dividem-se em endógenos e exógenos. Os primeiros eliminam directamente espécies reactivas, e incluem as enzimas glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). A vitamina C, E e  $\beta$ -caroteno, constituem os antioxidantes exógenos e são, maioritariamente, provenientes da dieta. Estes neutralizam as ROS antes que se inicie a peroxidação lipídica. Classificando os

antioxidantes de acordo com a sua natureza química podem ser enzimáticos, preventivos ou *scavengers*. Os antioxidantes enzimáticos, como a SOD, CAT e GPx actuam em ROS específicas, convertendo-as em substâncias mais estáveis e, em princípio, inofensivas ao organismo. Os antioxidantes preventivos evitam que os electrões não partilhados de promotores oxidativos e iões metálicos de transição acelerem a formação de radicais livres. Por fim, os antioxidantes *scavengers* induzem a formação de produtos de baixa energia incapazes de se propagarem. Com base no modo de acção, os antioxidantes classificam-se como primários, secundários ou co-antioxidantes. Os antioxidantes primários doam um átomo de hidrogénio rapidamente a um radical lipídico, formando um radical mais estável. Os secundários reagem com radicais de iniciação ou reduzem os níveis de oxigénio.

Recentemente, Uttara *et al.* (2009) classificaram os antioxidantes naturais em dois grandes grupos: enzimáticos e não-enzimáticos. Os enzimáticos, como por exemplo as enzimas SOD, CAT e GPx. Os antioxidantes não-enzimáticos, moléculas de baixo peso molecular, como ácido ascórbico e linoléico, polifenóis e carotenóides, são obtidos, principalmente, da dieta.

Em sistemas biológicos existe um equilíbrio entre a produção de espécies reactivas e defesas antioxidantes (Halliwell, 1992), crucial para a sobrevivência e bom funcionamento celular (Valko *et al.*, 2007). Uma alteração deste equilíbrio, ou seja, a incapacidade dos antioxidantes prevenirem a oxidação de substratos oxidáveis, gera a formação de espécies reactivas, como espécies reactivas de oxigénio (ROS) e espécies reactivas de azoto (RNS). A este desequilíbrio dá-se o nome de *stress oxidativo* (Sies, 1993). As espécies reactivas derivadas de oxigénio, são as de maior interesse neste estudo por representarem maior relevância em sistemas biológicos (Miller *et al.*, 1990; Frank & Gupta, 2005).

As ROS têm origem em vários processos fisiológicos e bioquímicos, de entre os quais, a respiração celular, onde o oxigénio é apenas parcialmente reduzido. Embora grande parte das ROS sejam produtos metabólicos, factores externos como a poluição ambiental, radiação electromagnética e tabagismo contribuem para o aumento da formação destas moléculas (Berg *et al.*, 2004; Singh & Singh, 2008; Uttara *et al.*, 2009). A designação de ROS inclui os radicais livres de oxigénio, como os radicais superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ) e hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ), e espécies não radicalares que contêm oxigénio, como o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) (Singh & Singh, 2008). Radicais livres são moléculas

ou espécies que possuem um ou mais electrões não partilhados (Halliwell, 1992). Essa configuração faz dos radicais livres moléculas altamente reactivas, instáveis e com um tempo meia-vida muito curto ( $10^{-9}$  s). Face a um tempo meia-vida curto os antioxidantes não têm tempo de actuar sob os radicais antes que estes interajam com outras moléculas (Valko *et al.*, 2007; Uttara *et al.*, 2009).

Nem todas as espécies reactivas são imediatamente removidas após a sua formação, pois a concentrações moderadas, as ROS são imprescindíveis em várias funções biológicas, como a defesa contra infecções, inflamações e sistemas de sinalização celular (Matés *et al.*, 1999). Uma produção anormalmente elevada destas espécies, ou uma deficiência dos mecanismos antioxidantes, ocasionará danos em moléculas biológicas, incluindo DNA, lípidos e proteínas, afectando a integridade celular (Sies, 1993; Valko *et al.*, 2007). Modificações em proteínas, que resultam na perda das suas funções, destruição da estrutura da membrana celular, alteração ao nível das bases do DNA e peroxidação lipídica são alguns exemplos de lesões provocadas por espécies reactivas (Berg *et al.*, 2004; Singh & Singh, 2008). Os danos oxidativos induzidos nas células e tecidos têm sido relacionados com várias doenças degenerativas como a Diabetes (Baynes, 1991), DA (Markesbery, 1997) Parkinson (Halliwell, 1992), doenças inflamatórias (Singh & Singh, 2008), cardiovasculares (Dhalla *et al.*, 2000) e carcinogénese (Dreher & Junod, 1996).

Nas últimas décadas, os antioxidantes de origem natural têm suscitado um interesse geral. Vários estudos científicos comprovam a eficácia destas substâncias na preservação de produtos alimentares contra danos oxidativos, diversas aplicações na cosmética, bem como efeitos biológicos, incluindo a prevenção de várias doenças humanas, entre as quais a DA e Dm (Frankel & Meyer, 2000; Halliwell, 2000; Singh & Singh, 2008; Zhao, 2009).

Níveis baixos de antioxidantes e a toxicidade de alguns sintéticos, como o butilhidroxianisol e o butilhidroxitolueno, conduzem à procura de novas fontes naturais. Existem inúmeras plantas com actividade antioxidante significativa (Hollman, 2001). Os efeitos adversos reduzidos, baixa toxicidade e rentabilidade económica associados aos antioxidantes de origem vegetal, são factores que atraem o interesse de diferentes investigadores, das mais vastas áreas, na sua pesquisa (Frankel & Meyer, 2000; Halliwell, 2000; Singh & Singh, 2008; Zhao, 2009).

## 2.2. Métodos para avaliação *in vitro* da capacidade antioxidante de extractos vegetais

A necessidade de avaliar a capacidade antioxidante de amostras biológicas, alimentos e produtos naturais, conduziu ao desenvolvimento de vários métodos *in vitro*. Até ao presente, não existe um método capaz de avaliar a capacidade antioxidante total de uma amostra graças à complexidade da reacção entre antioxidantes, radicais livres e substratos (Frankel & Finley, 2008).

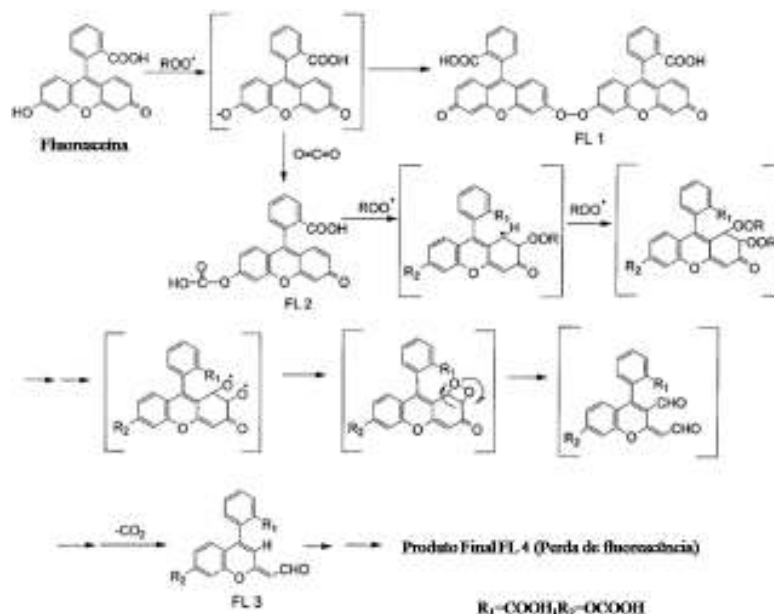
Segundo Prior *et al.* (2005), o primeiro ponto a considerar na selecção de um método é a natureza da reacção química. A neutralização dos radicais livres pelos antioxidantes pode ser feita por dois mecanismos: por transferência de um átomo de hidrogénio (HAT – *Hydrogen Atom Transfer*), com reacções habitualmente rápidas e que envolvem um radical livre sintético, uma sonda molecular e um antioxidante; ou por transferência de um electrão (SET – *Single Electron Transfer*) responsável pela redução de compostos, como metais e radicais. Os mecanismos SET são geralmente lentos, pelo que necessitam de longos períodos de tempo para que a reacção seja completa. É vantajoso desenvolver métodos com os dois mecanismos, pois abrangendo maior diversidade de radicais consegue-se uma melhor aproximação do que se considera a medição da capacidade antioxidante total (Prior *et al.*, 2005).

De entre os métodos capazes de estimar a capacidade antioxidante, neste trabalho foram seleccionados os métodos ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay*) e TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*). O método ORAC foi escolhido por representar um mecanismo HAT, que envolve o radical peroxilo, com bastante abundância nos sistemas biológicos, e o método TEAC por apresentar um mecanismo SET (Huang *et al.*, 2005; Prior *et al.*, 2005). Segundo vários autores (Rice-Evans *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008), os polifenóis estão relacionados com a acção antioxidante de muitas espécies. Para estimar a possível contribuição dos polifenóis eventualmente presentes no material vegetal para a actividade antioxidante foi utilizado o método Folin-Ciocalteu (F-C) (Tabela 1).

### 2.2.1. ORAC

O método ORAC, descrito por Cao *et al.* (1993) e mais tarde melhorado por Ou *et al.* (2001), consiste numa reacção entre o radical peroxilo (induzido pelo AAPH-[2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride], a 37°C) e uma sonda fluorescente, a

fluoresceína. À medida que a reacção ocorre, a fluoresceína é consumida pelo radical, registando-se um decréscimo da intensidade de fluorescência (Figura 2) A acção do radical é inibida na presença de um antioxidante. O método ORAC tem sido muito usado na indústria alimentar, tendo sido recentemente desenvolvido um protocolo para a avaliação da capacidade antioxidante de extractos vegetais (Prior *et al.*, 2005; Gillespie *et al.*, 2007).

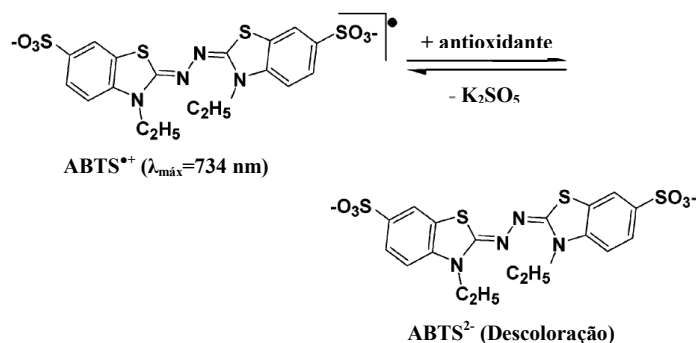


**Figura 2.** Mecanismo de oxidação da fluoresceína na presença de AAPH (Ou *et al.*, 2001).

### 2.2.2. TEAC

O método TEAC, inicialmente descrito por Miller *et al.* (1993) e mais tarde melhorado por Re *et al.* (1999), baseia-se na capacidade de uma amostra anular o radical catião  $ABTS^{\bullet+}$ , de coloração azul/verde em solução e com máximo de absorvência a 734 nm. O radical catião  $ABTS^{\bullet+}$  é produto da oxidação do ABTS [2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)] pelo persulfato de potássio ( $K_2S_2O_8$ ) antes da adição de espécies antioxidantes (Figura 3). Originalmente, a metahemoglobina era usada como espécie oxidante, mas mais tarde, foi descoberto que o  $K_2S_2O_8$  exercia o mesmo efeito, com a vantagem de ser menos dispendioso, constituindo uma melhoria ao processo (Re *et al.*, 1999; Singh & Singh, 2008). A actividade antioxidante das amostras é quantificada pela capacidade de descoloração do radical catião  $ABTS^{\bullet+}$  e os resultados são relacionados com a actividade do trolox (antioxidante *standard*), nas mesmas condições. Este método é especialmente

interessante para os extractos vegetais, pois graças ao máximo de absorção (734 nm), são anuladas quaisquer interferências inerentes à cor dos extractos (Awika *et al.*, 2003).



**Figura 3.** Princípio de avaliação da capacidade antioxidante com base no método TEAC (Adaptado de Huang *et al.*, 2005).

### 2.2.3. F-C

Originalmente este método era usado para a análise de proteínas, sendo mais tarde aplicado também na quantificação de compostos fenólicos presentes no vinho (Huang *et al.*, 2005). Este método quantifica compostos fenólicos numa amostra, com base numa reacção entre estes e um reagente colorimétrico (Folin & Ciocalteu, 1927). O reagente F-C é reduzido durante a transferência de um electrão das substâncias antioxidantes, com formação de compostos de cor azul (Huang *et al.*, 2005), os quais são identificados espectrofotometricamente a, aproximadamente, 760 nm (Ainsworth & Gillespie, 2007). Não sendo o reagente F-C específico para compostos fenólicos, existem outras substâncias capazes de causar interferência nos resultados (Prior *et al.*, 2005; Ainsworth & Gillespie, 2007). Para além disso, a resposta ao reagente F-C por parte dos compostos fenólicos vai depender do número de grupos fenólicos que estes últimos possuem (Singleton *et al.*, 1999). Recentemente, Ainsworth & Gillespie (2007) desenvolveram um protocolo específico para extractos vegetais.

**Tabela 1.** Resumo das características dos métodos de avaliação do teor total de fenóis (F-C) e avaliação da actividade antioxidante (ORAC e TEAC).

|             | <b>Princípio</b>  | <b>Vantagens</b>  | <b>Limitações</b>   |
|-------------|---|---|---|
| <b>F-C</b>  | Medição da capacidade de reduzir o reagente F-C (Huang <i>et al.</i> , 2005)                                | Aplicável a compostos hidrofílicos e lipofílicos (Huang <i>et al.</i> , 2005)<br>Simples e reprodutível (Huang <i>et al.</i> , 2005; Prior <i>et al.</i> , 2005)  | Interferência de substâncias (por exemplo, aminas aromáticas, açúcares e ácido ascórbico) que poderão sobrestimar o teor de compostos fenólicos na amostra (Prior <i>et al.</i> , 2005) |
| <b>TEAC</b> | Medição da descoloração do radical catião ABTS <sup>•+</sup> por antioxidantes (Singh & Singh, 2008)        | Aplicável a compostos hidrofílicos e lipofílicos (Huang <i>et al.</i> , 2005)<br>Rápido e simples (Singh & Singh, 2008)   | O radical catião ABTS <sup>•+</sup> não existe em sistemas biológicos de mamíferos (Singh & Singh, 2008)  |
| <b>ORAC</b> | Capacidade dos antioxidantes anularem o consumo de fluoresceína pelo radical peróxido (Singh & Singh, 2008) | Conjuga o tempo de inibição e o decréscimo da actividade dos radicais livres por acção dos antioxidantes (Huang <i>et al.</i> , 2005; Prior <i>et al.</i> , 2005)<br>Simples, económico e rápido (Huang <i>et al.</i> , 2005; Prior <i>et al.</i> , 2005) | Preferência à actividade de antioxidantes hidrofílicos na neutralização de radicais peróxido (Singh & Singh, 2008)  |

### 3. Plantas: da medicina tradicional à medicina moderna

Desde o início da sua existência que o homem encontrou nas plantas abrigo, alimento, fragrâncias, condimentos e propriedades terapêuticas (Gurib-Fakim, 2006). Desde os tempos pré-históricos que as plantas constituem a base da medicina tradicional de vários povos, como testemunha o *Papiro Ebers*, um documento egípcio escrito por volta de 1500 A.C. (Newman *et al.*, 2000; Gurib-Fakim, 2006). O interesse na natureza como uma fonte potencial de agentes quimioterapêuticos continua no presente, representando os produtos naturais e os seus derivados mais de 50 % dos medicamentos aplicados clinicamente em todo o mundo (Gurib-Fakim, 2006).

Muitas substâncias bioativas extraídas de plantas demonstram actividades antidepressivas, antidiabéticas (Nijveldt *et al.*, 2001; Anekonda & Reddy, 2005), antioxidantes (Wang *et al.*, 1999), antiproliferativas (Srinivas *et al.*, 2004), analgésicas, anti-inflamatórias (Hajhashemi *et al.*, 2003), antimicrobianas (Didry *et al.*, 1998) e antivirais (Abad *et al.*, 1997). A somar a estes benefícios, os produtos de origem vegetal em geral, apresentam eficácia, efeitos secundários diminutos e são, também, economicamente atraentes, relativamente aos produtos sintéticos (Manach *et al.*, 2005).

As propriedades medicinais das plantas têm sido associadas à presença de polifenóis, ácido ascórbico, tocoferol,  $\beta$ -caroteno, flavonóides, antocianinas, e outros constituintes fenólicos (Salah *et al.*, 1995; Manach *et al.*, 2005; Vatterm *et al.*, 2005). Actualmente, mais de 35000 espécies de plantas são mundialmente utilizadas por possuírem mais de 4000 estruturas polifenólicas, terpenos e outros fitoquímicos (Nijveldt *et al.*, 2001), o que continua a motivar o interesse dos investigadores para novas pesquisas.

Pode afirmar-se que a medicina tradicional tem contribuído positivamente para a descoberta de novos remédios. A partir de plantas utilizadas convencionalmente como forma de terapia, vários investigadores avançaram com a identificação e isolamento de princípios bioactivos hoje aplicados clinicamente. *Catharanthus roseus*, nativa do Sudeste de Madagáscar, é um exemplo clássico de uma planta usada por pessoas locais como agente hipoglicémico, e que contribui para a medicina moderna. Dos mais de 75 alcalóides que possui, dois são usados no tratamento da leucemia infantil e doença de Hodgkin's com resultados bastante positivos (Tabela 2) (Gurib-Fakim, 2006). Muitos

investigadores acreditam que grande parte dos produtos naturais com elevado valor económico, não foram ainda explorados quanto à sua actividade farmacológica (Capasso *et al.*, 2000; Gurib-Fakim, 2006).

Nos países subdesenvolvidos, a medicina tradicional continua a ser preponderante, como consequência da dificuldade de importação de medicamentos. Porém, hoje a utilização de plantas medicinais como primeira forma de tratamento aumentou significativamente em países industrializados. A insatisfação relativamente à medicina convencional, ou a crença de que os produtos naturais são mais seguros comparativamente aos sintéticos poderão estar na origem deste aumento (Capasso *et al.*, 2000; Raskin *et al.*, 2002). Contudo, ao contrário da crença popular, o uso das plantas medicinais não é isento de risco. Para além do princípio activo, a mesma planta pode conter outras substâncias tóxicas. Também as preparações inadequadas, presença de contaminantes (por exemplo, pesticidas e metais pesados) e automedicação são factores a ter em conta aquando da utilização dos extractos vegetais (Capasso *et al.*, 2000).

O incremento do consumo deste tipo de produtos tem apresentado como reflexos um aumento do número de estudos relativos aos vários aspectos relacionados com a sua qualidade, eficácia e segurança e a consciencialização do risco associado à sua comercialização, caso não sejam implementadas medidas legislativas de forma a assegurar, sobretudo, a sua segurança e qualidade (Capasso *et al.*, 2000).

Vários estudos comprovam a eficácia de terapias com base em extractos vegetais tanto na DA (Mantle *et al.*, 2000; Mata *et al.*, 2007) como na Dm (Grover *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004; Bhandari *et al.*, 2008). Para além das qualidades acima mencionadas, existem compostos capazes de atravessar a barreira hemato-encefálica, um factor extremamente importante no caso da DA. Estas vantagens enaltecem a importância das plantas e, conseqüentemente, corroboram a necessidade de uma pesquisa incessante de novos agentes terapêuticos.

### **3.1. Plantas estudadas**

Neste trabalho foram estudadas 6 espécies: *Cistus albidus* L., *Drosophyllum lusitanicum* L. (Link.), *Lavandula viridis* L'Hér., *Quercus suber* L., *Rhododendron ponticum* subsp. *baeticum* (Boissier & Reuter) Handel-Mazzetti e *Ruscus aculeatus* L. (Figura 4) (Tabela 3).

**Tabela 2.** Plantas usadas na medicina tradicional com importantes contribuições na medicina moderna (*Adaptado de Gurib-Fakim, 2006*).

| <b>Nome botânico</b>            | <b>Aplicação tradicional</b>                       | <b>Origem</b>    | <b>Aplicação na medicina</b>        | <b>Compostos biologicamente activos</b> |
|---------------------------------|--|------------------|-------------------------------------|---|
| <i>Adhatoda vasica</i>          | Antiespasmódico, antiséptico, insecticida          | Índia, Sri Lanka | Antiespasmódico, supressor de tosse | Vasicina                                |
| <i>Catharanthus roseus</i>      | Diabetes   | Madagáscar       | Quimioterapia                       | Vincristina                             |
| <i>Condrodendron tomentosum</i> | Veneno para setas (usados para caçar pelos Índios) | Brasil, Perú     | Efeito letárgico a nível muscular   | D-Tubocurarina                          |
| <i>Gingko biloba</i>            | Asma, antihelmíntico                               | Este da China    | Demência, deficiências cerebrais    | Gingkolídeos                            |
| <i>Harpagophytum procumbens</i> | Febre, inflamações                                 | Sul de África    | Dor, reumatismo                     | Harpagoside, ácido cafeico              |
| <i>Podophyllum peltatum</i>     | Laxativo, infecções na pele                        | América do Norte | Quimioterapia                       | Podofilotoxina, lignanos                |



Figura 4. Aspecto das espécies em estudo, no seu habitat natural.

Tabela 3. Família, nome comum, distribuição geográfica, habitat e outras observações referentes às espécies em estudo.

| Espécie                                      | Família                | Nome comum              | Distribuição geográfica                              | Habitat   | Observações  |
|--|------------------------|-------------------------|--|---|--|
| <i>C. albidus</i>                            | <i>Cistaceae</i>       | Roselha-Grande          | Península Ibérica e bacia mediterrânica              | Zonas bastante secas  | Arbusto que forma moitas compactas; as folhas são planas, oblongas e elípticas; as flores são rosado-purpurascentes                      |
| <i>D. lusitanicum</i>                        | <i>Drosophyllaceae</i> | Erva-pinheira orvalhada | Ocidente da Península Ibérica e Noroeste de Marrocos | Locais arenosos ou secos  | Planta lenhosa na base, com folhas sésseis, todas revestidas de pêlos grandulosos insectívoros vermelhos                                 |
| <i>L. viridis</i>                            | <i>Lamiaceae</i>       | Rosmaninho-verde        | Península Ibérica                                    | Charnecas e matos baixos xerofílicos, em solos geralmente xistosos        | Sub-arbusto aromático, com numerosos ramos floríferos erectos; as folhas são verdes e dimórficas; as flores brancas e pequenas           |
| <i>Q. suber</i>                              | <i>Fagaceae</i>        | Sobreiro                | Península Ibérica e florestas mediterrânicas         | Solos xistosos ou arenosos, em zonas secas com alguma influência marítima | Árvore perenifólia, monóica e robusta; as folhas são denticuladas e discolores; o fruto é uma glande de maturação anual.                 |
| <i>R. ponticum</i><br>subsp. <i>baeticum</i> | <i>Ericaceae</i>       | Adelfeira               | Sodoeste de Espanha e Centro e Sul de Portugal       | Margens de cursos de água ou ainda sob coberto de carvalhais              | Este arbusto tem copa ampla e densa com folhas persistentes, grandes e coriáceas; as flores, muito vistosas, estão dispostas em corimbos |
| <i>R. aculeatus</i>                          | <i>Liliaceae</i>       | Gilbardeira             | Zona mediterrânica                                   | Penhascos costeiros e regiões florestais                                  | Sub-arbusto rizomatoso; as folhas são largamente ovadas e lanceoladas, espinescentes no ápice, onde nascem as flores e frutos            |

### 3.1.1. *Cistus albidus* L.

O género *Cistus* pertence à família *Cistaceae* e é característico de áreas degradadas na região mediterrânica (Robles & Garzino, 1998; Dimas *et al.*, 2000; Attaguile *et al.*, 2004). As espécies deste género têm sido usadas tradicionalmente em vários países (Turquia, Itália, Grécia e Espanha) no tratamento da diarreia, úlcera péptica e doenças de pele (Sánchez de Rojas *et al.*, 1995; Attaguile *et al.*, 2004; Güvenç *et al.*, 2005). Os seus óleos essenciais (Bouamama *et al.*, 2006) têm aplicações na cosmética e fragrâncias desde a antiguidade (Guenther, 1952). Estudos farmacológicos mostram que extractos de folhas do género *Cistus* têm propriedades antimicrobianas (Güvenç *et al.*, 2005; Bouamama *et al.*, 2006) contra muitas bactérias e fungos, responsáveis por doenças infecciosas em humanos (Koch, 1981; Bouamama *et al.*, 2006). A somar a estas propriedades, este género apresenta também actividade antioxidante (Attaguile *et al.*, 2000) e antiviral (Abad *et al.*, 1997).

Alguns estudos anteriores revelam que a espécie *C. albidus* contém na sua composição química flavonóides (De Pascual *et al.*, 1978; Qa'dan *et al.*, 2003; Castells *et al.*, 2004). Os polifenóis estão também presentes noutras espécies do mesmo género, sendo os mais abundantes quercetina, caempferol e proantocianidinas (Attaguile *et al.*, 2004). Robles & Garzino (1998) analisaram por cromatografia gasosa (GC) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS), os óleos essenciais extraídos das folhas de *C. albidus* tendo identificado o composto  $\alpha$ -zingibereno como o principal constituinte.

### 3.1.2. *Drosophyllum lusitanicum* L. (Link.)

*D. lusitanicum* é uma planta carnívora que pertence à família *Drosophyllaceae*, endémica do ocidente da Península Ibérica e Noroeste de Marrocos, onde o clima é muito quente e árido. Esta espécie produz grandes quantidades de plumbagina (Nahálka *et al.*, 1998; Budzianowski *et al.*, 2002; Grevenstuk *et al.*, 2008), uma naftoquinona de cor amarela (5-hidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona), que apresenta um leque variado de actividades biológicas, nomeadamente, actividade anti-inflamatória (Checker *et al.*, 2009), antiproliferativa (Srinivas *et al.*, 2004) e antimicrobiana (Didry *et al.*, 1998; Paiva *et al.*, 2003; Shin *et al.*, 2007; Gonçalves *et al.*, 2009). O extracto hexânico de *D. lusitanicum*, cujo composto maioritário é a plumbagina, também já foi testado quanto às suas actividades biológicas. Estudos precedentes sugerem que este extracto poderá ser

aplicado no tratamento de doenças infecciosas em humanos, graças à sua actividade antimicrobiana (Gonçalves *et al.*, 2009). O seu potencial insecticida e os seus efeitos fitotóxicos foram também já estudados (Gonçalves *et al.*, 2009). Baseados nas aplicações farmacológicas e no valor económico, Nahálka e colaboradores (1996) produziram plumbagina através da cultura de células em suspensão da espécie *D. lusitanicum*.

De acordo com estudos realizados anteriormente, as folhas de *D. lusitanicum* contêm também flavonóides (luteolina, leucocianidina, leucodelphinidina) (Juniper *et al.*, 1989) e outros compostos fenólicos.

### 3.1.3. *Lavandula viridis* L'Hér

Desde a antiguidade que existem registos terapêuticos para diversas espécies de *Lavandula*, representando ainda hoje, uma das plantas medicinais mais populares e de elevado valor económico (Boelens, 1995; Büyükkuroğlu *et al.*, 2003). Óleos essenciais extraídos de algumas destas plantas possuem uma panóplia de propriedades biológicas, com uma aplicabilidade que vai desde perfumes e cosmética à indústria farmacêutica. Para além da aromaterapia, apresentam efeitos antibacterianos, antifúngicos, sedativos e antidepressivos. Podem ainda ser aplicados em queimaduras e picadas de insectos (Cavanagh & Wilkinson, 2002). Para além dos óleos, os extractos aquosos de flores e extractos de folhas de algumas plantas deste género aparecem referenciados na literatura como tendo efeito neuroprotector (Büyükkuroğlu *et al.*, 2003) e actividade anti-inflamatória e analgésica (Hajhashemi *et al.*, 2003), respectivamente.

*L. viridis* é um arbusto aromático endémico do Sudoeste da Península Ibérica. Cresce em ambientes secos e solos pobres em nutrientes (Franco, 1971). Para além do seu valor ornamental, esta espécie tem suscitado interesse pelo seu óleo essencial. Através de análise por GC e GC-MS, os constituintes dos óleos identificados foram sesquiterpenos e monoterpenos, como, 1,8-cineol, cânfora,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, borneol,  $\Delta^3$ -careno e  $\alpha$ -terpineol (Nogueira & Romano, 2002). Estudos levados a cabo no laboratório comprovam a sua actividade antimicrobiana.

### 3.1.4. *Quercus suber* L.

*Q. suber*, abundante na Península Ibérica e florestas mediterrânicas, é uma árvore de grande valor económico, sobretudo pela produção de cortiça e bolota (Afonso, 1991). Em Portugal, são produzidas por ano aproximadamente 185000 toneladas de cortiça, representando mais de 50 % da produção mundial (Pinto *et al.*, 2009). A cortiça reúne excelentes propriedades, nomeadamente a aplicabilidade no isolamento térmico e acústico (Cordeiro *et al.*, 1998). Nos últimos tempos, moléculas extraídas da cortiça têm suscitado o interesse da indústria cosmética (Coquet *et al.*, 2008). A lenhina, polissacáridos, taninos e suberina são os seus principais constituintes (Pereira, 1988; Cordeiro *et al.*, 1998). Está cientificamente comprovado que extractos de cortiça podem ser aplicados como agentes antimutagénicos (Křižková *et al.*, 1999).

Trabalhos anteriores revelam que os extractos aquosos de folhas do género *Quercus* possuem actividade antimicrobiana (Okuda *et al.*, 1992). Recentemente foi demonstrado por Rocha-Guzmán *et al.* (2009) que as folhas de algumas espécies são ricas em compostos antioxidantes capazes de atrasar o processo oxidativo. Além disso, folhas de *Q. suber* já revelaram eficácia na protecção contra danos gástricos em modelos *in vivo* (Khenouf *et al.*, 2003). Ito *et al.* (2002) isolaram e identificaram nas folhas de *Q. suber* taninos e outros polifenóis, nomeadamente, pedunculagina, telimagrandina I, telimagrandina II, quercetina e quercitrina.

### 3.1.5. *Rhododendron ponticum* subsp. *baeticum* (Boissier & Reuter) Handel-Mazzetti

*R. ponticum* é uma espécie invasiva em muitos países incluindo Inglaterra, Irlanda, Bélgica e França. A subsp. *baeticum* é endémica do Sul da Península Ibérica (Mejías *et al.*, 2002). *R. ponticum* subsp. *baeticum* é um arbusto pertencente à família *Ericacea*, conhecida como adelfeira (Sul de Portugal) ou loendro (Norte de Portugal). É uma espécie rara e ameaçada e dado o interesse, nacional e internacional, (Alexandra & Helge, 2004) à volta desta planta por testemunhar a flora do Terciário, começou a ser protegida em 1971 pela Reserva Botânica de Cambarinho (Decreto-Lei 364/71).

As propriedades biológicas do género *Rhododendron* têm sido demonstradas em vários estudos. Extractos metanólicos de folhas de algumas espécies possuem actividades analgésicas, antiespasmódicas (Ullah *et al.*, 2007) e anti-VIH (Kashiwada *et*

*al.*, 2001). Segundo o estudo levado a cabo por Erdemoglu e colaboradores (2003), os extractos de folhas de *R. ponticum* exibem elevada actividade anti-inflamatória.

Não há quaisquer registos científicos quanto à composição química e nada se sabe sobre as propriedades biológicas da espécie *R. ponticum* subsp. *baeticum*.

### 3.1.6. *Ruscus aculeatus* L.

A espécie *R. aculeatus* é um arbusto pertencente à família *Liliacea* e comum na zona da Europa mediterrânica e África (Mimaki *et al.*, 1998; Di Lazzaro *et al.*, 2001; Longo & Vasapollo, 2005). As propriedades farmacológicas dos extractos da espécie *R. aculeatus* são conhecidas desde os nossos antepassados. Tradicionalmente, as folhas e rizomas desta espécie eram usados como compostos diuréticos e laxantes. Estudos precedentes revelam que os extractos desta espécie podem ser aplicados na prevenção e tratamento de insuficiência venosa (Mimaki *et al.*, 1998; Di Lazzaro *et al.*, 2001) e, para além disso, participam na formulação de anti-inflamatórios e agentes vasoconstritores (Mashour *et al.*, 1998; Longo & Vasapollo, 2005). Trabalhos científicos já comprovaram que as antocianinas, presentes nos frutos desta espécie são compostos bioactivos com actividades anti-inflamatória e antioxidante (Wang *et al.*, 1999).

Os compostos farmacologicamente activos são as saponinas esteróidais, maioritariamente presentes no rizoma e raízes da planta (Di Lazzaro *et al.*, 2001; Longo & Vasapollo, 2005). Biologicamente estes compostos são agentes antifúngicos, antimicrobianos, anti-inflamatórios e anticarcinogénicos. Muitas plantas contendo saponinas na sua composição são usadas na medicina Chinesa no tratamento do cancro, Diabetes e doenças cardiovasculares (Salunke *et al.*, 2006).

## 4. Objectivo

Com a finalidade de contribuir para a descoberta de novos agentes terapêuticos para a DA e Dm, assim como novas fontes de antioxidantes naturais, neste estudo avaliou-se a actividade de 6 espécies de plantas, inseridas em famílias com um vasto leque de aplicações biológicas. Para a concretização desta pesquisa definiram-se os seguintes objectivos específicos:

- i) Preparar extractos vegetais;

- ii) Avaliar a sua actividade antioxidante *in vitro*;
- iii) Estudar a sua capacidade para inibir *in vitro* as enzimas  $\alpha$ -amilase pancreática e  $\alpha$ -glucosidase (de levedura e de extracto comercial de intestino de rato);
- iv) Avaliar o seu efeito na inibição das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE) *in vitro* e *ex vivo*.

## 5. Materiais e Métodos

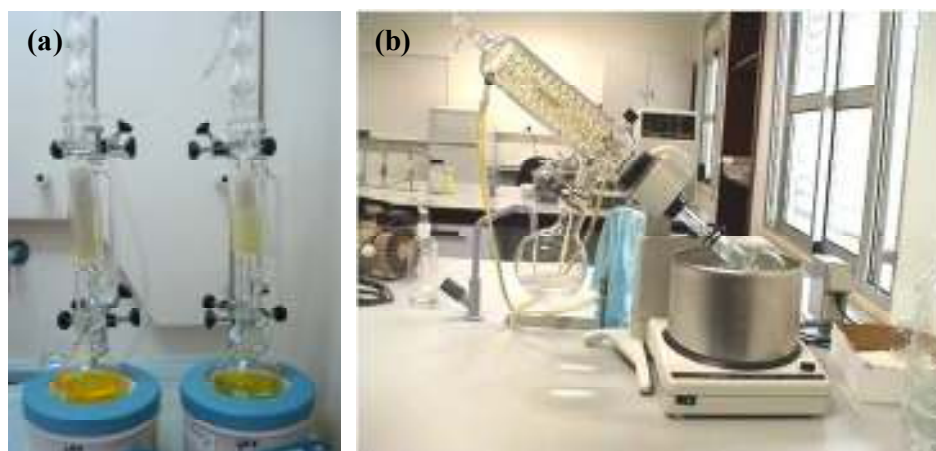
### 5.1. Preparação do material vegetal

Folhas das espécies *C. albidus*, *D. lusitanicum*, *Q. suber* e *R. ponticum* subsp. *baeticum* e a parte aérea das espécies *R. aculeatus* e *L. viridis* foram recolhidas de populações naturais localizadas na região algarvia. À excepção de *D. lusitanicum* e *L. viridis* (extracção do óleo essencial) em que o material vegetal foi utilizado fresco, o material foi seco a 40 °C, durante 48 h e macerado.

### 5.2. Extracção por solvente

Os extractos metanólicos de todas as espécies foram preparados por extracção Soxhlet. Para a espécie *D. lusitanicum* foi também preparado extracto hexânico pelo mesmo método de extracção. O material vegetal (10 mg) foi introduzido num cartucho de extracção selado com algodão, de modo a evitar perdas de material no decorrer do processo. Foram adicionados em cada extracção 150 mL de metanol (HPLC-grade, Fluka, Buchs, Switzerland) ou hexano (Riedel-de Haën, Buchs, Switzerland). Cada extracção operou durante 5 h de acordo com o esquema de montagem representado na Figura 5 (a).

Após a extracção, o solvente foi evaporado num evaporador rotativo sob vácuo a 50 °C e 90 rpm (Figura 5 (b)). O resíduo sólido foi ressuspenso em água, liofilizado e o resíduo seco obtido foi conservado a -20 °C até à sua utilização.



**Figura 5.** (a) Extracções Soxhlet. (b) Evaporador rotativo sob vácuo.

### **5.3. Extracção aquosa**

O material vegetal de *C. albidus*, *D. lusitanicum*, *Q. suber* e *R. aculeatus* foi seco a 40 °C durante 48 h, macerado e utilizado para preparar extractos aquosos. Para tal, foram adicionadas 5 g de material em 100 mL de água destilada. A extracção decorreu à temperatura ambiente durante 24 h e com agitação. Após este período, e depois de filtrados sob vácuo, os extractos foram liofilizados e o resíduo seco armazenado a -20 °C.

### **5.4. Extracção do óleo essencial**

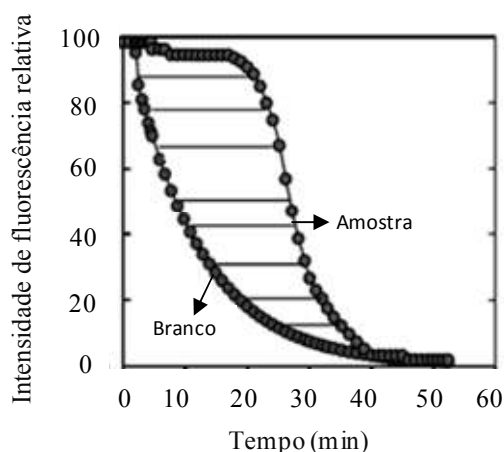
Para além do extracto metanólico no caso da espécie *L. viridis* foi também isolado o óleo essencial por hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger. A 150 g de material vegetal fresco foram adicionados 1,5 L de água destilada. A mistura foi aquecida a 200-250 °C, durante 4 h. O óleo obtido (d=0,94) foi armazenado a -20 °C. O rendimento de extracção foi de 1.32 % (p/p).

### **5.5. Avaliação da actividade antioxidante *in vitro***

#### **✓ Protocolo ORAC**

O ensaio ORAC foi levado a cabo de acordo com o protocolo descrito por Gillespie *et al.* (2007). Como reagentes foram utilizados o tampão fosfato de potássio (75 mM, pH 7,0), fluoresceína (Panreac, Spain) (0,08 mM), AAPH (Across, USA) (150 mM) e trolox (Calbiochem, USA & Canada) (*6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid*). O material vegetal foi ressuspenso em tampão fosfato de potássio (75 mM, pH 7,0). As medições foram feitas em microplacas pretas de 96 poços (NUNC, Rochester, New York, USA) e as leituras no leitor Infinite 200 microplate reader (Tekan, Grödig, Austria). Em cada poço foram adicionados 150 µL de fluoresceína e 25 µL de extracto vegetal a diferentes concentrações (0,001-0,1 mg.mL<sup>-1</sup>), tampão fosfato (branco) ou antioxidante *standard* (trolox) (6,25-50 µM). Após um período de incubação de 10 min, a 37 °C, foi adicionada a solução AAPH (25 µL) em todos os poços preenchidos. A reacção foi lida imediatamente a seguir, a cada minuto, durante 90 min, a um comprimento de onda de excitação e emissão de 485 nm e 530 nm, respectivamente. As medições foram feitas em triplicado e repetidas três vezes. O

tratamento de resultados foi realizado com o suporte informático NCSS 2007, e o valor ORAC de cada extracto foi determinado por subtração da área abaixo da CDF (curva de decréscimo de fluorescência) da amostra ou de trolox, no caso da curva padrão, à área de CDF do branco ( $CDF_{amostra} - CDF_{branco}$ ), como representado na Figura 6. Os resultados foram traduzidos em micromole de equivalentes de trolox por grama de extracto ( $\mu\text{mol}_{\text{TE}} \cdot \text{g}_{\text{ext.}}^{-1}$ ).



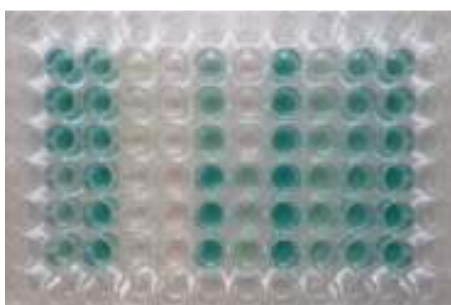
**Figura 6.** Representação das curvas de decréscimo de fluorescência para determinação da actividade ORAC de uma amostra ( *Adaptado de Gillespie et al., 2007*).

### ✓ Protocolo TEAC

De acordo com o protocolo descrito por Re *et al.* (1999), para a formação do radical catião  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  fez-se reagir uma *tablet* de ABTS (Sigma, USA) com uma solução de persulfato de potássio (Merck) (2,45 mM), agente oxidante, obtendo-se a concentração final de 7 mM. Esta solução foi mantida no escuro, à temperatura ambiente, durante 12-16 h. A solução de trabalho  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  foi obtida por diluição com  $\text{H}_2\text{O}$  destilada até se atingir a absorvência  $0,70 \pm 0,02$ , a 734 nm. Preparou-se também o tampão fosfato de potássio (75 mM, pH 7,0) e as diluições de trolox (0,1-0,5 mM). Seguidamente, foram adicionados nos respectivos poços 10  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato (branco), trolox (antioxidante *standard*) ou amostra (anteriormente preparada) a várias concentrações (0,01-10  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). A reacção teve início 1 min após a adição de 190  $\mu\text{L}$  de solução trabalho  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ . A absorvência foi lida a 734 nm e a 30 °C (Figura 7). Foram feitos triplicados para todas as amostras assim como três repetições. A capacidade antioxidante das amostras é dada pela Equação (1),

$$Capacidade \cdot antioxidante = \left( \frac{Abs_{734}^{Branco} - Abs_{734}^{Amostra}}{Abs_{734}^{Branco}} \right) \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

Os resultados, expressos em micromole de equivalentes de trolox por grama de extracto ( $\mu\text{mol}_{\text{TE}} \cdot \text{g}_{\text{ext.}}^{-1}$ ), foram obtidos com base na recta de regressão determinada com os valores de trolox e tendo em conta os factores de diluição.

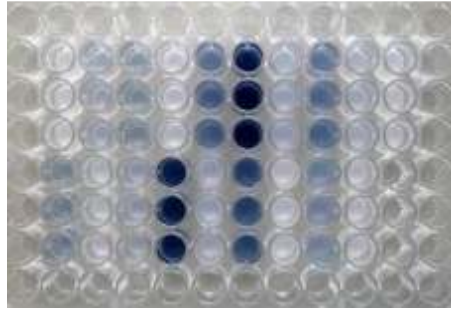


**Figura 7.** Imagem da microplaca transparente de 96 poços, com a mistura reaccional que permitiu avaliar a actividade antioxidante do material vegetal, pelo método TEAC.

### ✓ Protocolo F-C

Este método foi baseado no protocolo descrito por Ainsworth & Gillespie (2007). Primeiramente foram preparados os reagentes tampão fosfato de potássio (75 mM, pH 7,0), carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (VWR, Leuven, Belgium) (700 mM) e diferentes diluições de ácido gálico (Fluka, Buchs, Spain) (4  $\mu\text{M}$ -0,5 mM). Foram misturados 100  $\mu\text{L}$  de amostra a diferentes concentrações (0,01-10  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), ácido gálico (antioxidante *standard*) ou tampão fosfato (branco) e 200  $\mu\text{L}$  de reagente F-C 10 % (v/v) (Fluka, Buchs, Switzerland) em tubos *ependorf*. Foram acrescentados 800  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (700 mM) em cada tubo. Após um período de incubação de 2 h, à temperatura ambiente, foram extraídos de cada tubo *ependorf* 200  $\mu\text{L}$  de solução e transferidos para uma microplaca transparente de 96 poços. A absorvência foi lida a 765 nm e todas as medições foram feitas em triplicado e repetidas três vezes (Figura 8).

Relativamente ao tratamento de resultados, depois de feita a correcção das absorvências obtidas, por subtracção à média das absorvências do branco, determinou-se a recta de regressão linear com os valores do ácido gálico *standard*. Com base na equação da recta associada e tendo em conta os factores de diluição, quantificou-se o teor em fenóis presente nas amostras. Os resultados foram expressos em micromole de equivalentes de ácido gálico (GAE) por grama de extracto vegetal ( $\mu\text{mol}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}_{\text{ext.}}^{-1}$ ).



**Figura 8.** Imagem da microplaca transparente de 96 poços, com a mistura reaccional que permitiu avaliar o teor em polifenóis presente no material vegetal, pelo método F-C.

Os resultados obtidos pelos métodos TEAC, ORAC e F-C foram tratados estatisticamente com base no programa SPSS para Windows versão 15, através da análise de variância.

### 5.6. Inibição *in vitro* da $\alpha$ -Amilase Pancreática de Porco ( $\alpha$ -APP)

Com base no trabalho realizado por Kwon *et al.* (2008), preparou-se tampão fosfato de sódio (20 mM, pH 6,9) com NaCl (Fluka Chemika) (6 mM), uma solução  $\alpha$ -APP (4 U.mL<sup>-1</sup>) (EC 232.565.6, Type VI-B, Sigma, Germany), amido de batata a 0,5 % (p/v) (Pancreac Quimica Sal, Spain) (substrato), reagente DNS [1 g DNS (EC 210.204.3, Sigma, Germany), 30 g tartarato de sódio e potássio (Merck), 20 mL NaOH 2 M (Merck, Germany), perfazendo um volume final de 100 mL com H<sub>2</sub>O destilada] e Acarbose (Sigma, Steinheim) (inibidor da  $\alpha$ -amilase *standard*). O material vegetal, a Acarbose e a enzima  $\alpha$ -APP foram ressuspendidas em tampão fosfato de sódio (20 mM, pH 6,9). O ensaio começou com a adição de 40  $\mu$ L de extracto vegetal (previamente preparado nas concentrações 1-10 mg.mL<sup>-1</sup>), tampão fosfato de sódio (branco) ou Acarbose (50-1000  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) em tubos *eppendorf*. Seguidamente a todos os tubos *eppendorf* foram acrescentados 160  $\mu$ L de tampão e 200  $\mu$ L de solução enzimática ( $\alpha$ -APP). As misturas foram incubadas durante 10 min, à temperatura ambiente. Após o período de incubação, adicionaram-se 400  $\mu$ L de amido de batata a todos os tubos *eppendorf*, excepto os correspondentes ao controlo dos extractos, neste caso, adicionaram-se 400  $\mu$ L de DNS em primeiro, com o objectivo de interromper a reacção e então, depois, 400  $\mu$ L de amido de batata. Foi efectuado o controlo dos extractos pelo facto da maioria apresentar tonalidades correspondentes a comprimentos de onda inseridos na mesma gama do espectro da medição espectrofotométrica, interferindo nos resultados. Todas as misturas foram incubadas 10 min a temperatura ambiente. A

reacção foi interrompida com a adição de 400 µL de DNS aos restantes tubos *ependorf* e todas as soluções foram incubadas em banho-maria a 85-90 °C durante 10 min. Preparou-se uma microplaca transparente de 96 poços com 175 µL de H<sub>2</sub>O destilada (estéril) em todos os poços, para os quais se transferiram 50 µL de cada tubo *ependorf* previamente arrefecidos e a absorvência lida a 540 nm (Figura 9). Para todas as amostras foram realizados triplicados e três repetições independentes. A percentagem de inibição da α-APP pelos extractos e óleo essencial é dada pela Equação (2):

$$\%Inibição = \left( \frac{Abs_{540}^{Controlo} - (Abs_{540}^{Amostra} - Abs_{540}^{Cor-amostra})}{Abs_{540}^{Controlo}} \right) \times 100 \quad \text{Equação (2)}$$



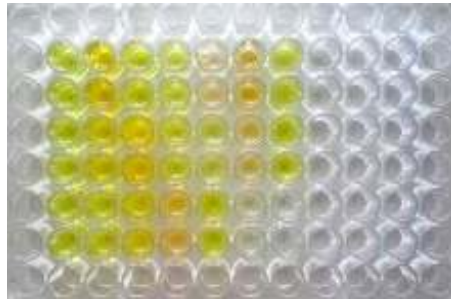
**Figura 9.** Imagem da microplaca transparente de 96 poços, com a mistura reaccional que permitiu avaliar a inibição da enzima α-APP *in vitro*.

### **5.7. Inibição *in vitro* da α-Glucosidase de Levedura (α-GL) e α-Glucosidase extraída de Intestino de Rato (α-GIR)**

Para avaliar a inibição das enzimas digestivas α-GL e α-GIR foi necessário tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 6,9), o substrato *p-Nitrophenyl-α-D-glucopyranoside* (Sigma) (5 mM), Acarbose (Sigma) (inibidor da α-glucosidase *standard*), α-GL (1,0 U.mL<sup>-1</sup>, em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 6,9) (*EC 232.604.7*, Type I, Sigma) ou α-glucosidase obtida a partir de um extracto comercial de intestino de rato (*Rat intestinal acetone powder*) (Sigma). Para a preparação da fonte enzimática de origem animal foram homogeneizadas 0,033 g de extracto cru em 1 mL de NaCl 0,9 % (p/v) (Fluka Chemical) e centrifugados (Heraeus Megafuge 1.0 R, Germany) a 4000 rpm a 4 °C durante 15 min. O sobrenadante, diluído em tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 6,9), na proporção 1:10, foi usado como fonte enzimática. De acordo com Kwon *et al.* (2008), 50 µL de extracto vegetal (previamente preparado e ressuspenso em tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 6,9), nas

concentrações 10; 5; 1 e 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>), 100 µL de tampão fosfato de potássio (branco), Acarbose (125-1000 µg.mL<sup>-1</sup>) e 100 µL da solução enzimática foram incubados numa microplaca transparente de 96 poços durante 10 min, a 25 °C. Após o período de incubação foram adicionados 50 µL de substrato em todos os poços. A mistura reaccional foi incubada a 25 °C durante 10 min, no caso da α-GL e a 37 °C durante 30 min, no caso da α-GIR. Para ambas as enzimas, antes e após a adição do substrato, foram feitas leituras de absorvência a 405 nm e, posteriormente, comparadas com o branco (Figura 10). A percentagem de inibição da acção das enzimas, foi calculada através da Equação (3), e resultou de triplicados e três repetições.

$$\% \text{Inibição} = \left( \frac{\Delta A_{405}^{\text{Branco}} - \Delta A_{405}^{\text{Amostra}}}{\Delta A_{405}^{\text{Branco}}} \right) \times 100 \quad \text{Equação (3)}$$



**Figura 10.** Imagem da microplaca transparente de 96 poços, com a mistura reaccional que permitiu avaliar a inibição das enzimas α-GL e α-GIR *in vitro*.

### **5.8. Inibição *in vitro* das enzimas AChE e BuChE**

A actividade inibidora da acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE) foi quantificada de acordo com o método colorimétrico anteriormente descrito por Ellman *et al.* (1961), com algumas modificações. Os extractos vegetais foram previamente preparados e ressuspendidos em tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 8,0). A AChE (Electric-eel, EC 3.1.1.7, Type VI-S, Sigma) (0,28 U.mL<sup>-1</sup>, em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 8,0) e a BuChE (*horse-serum*, EC 3.1.1.8, Sigma) (0,28 U.mL<sup>-1</sup> em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 8,0) foram usadas como fonte enzimática para os substratos iodeto de acetiltiocolina (IATC) (EC 217.474.1, Sigma, Steinheim) (15 mM) e cloreto de butiriltiocolina (CBTC) (EC 205.749.9, Fluka, Steinheim) (15 mM), respectivamente. Inicialmente, foram adicionados, numa microplaca transparente de 96 poços, 125 µL DTNB (ácido 5-5'-ditiobis-(2-

nitrobenzóico)) (Sigma) (3 mM), 25 µL de IATC ou 25 µL de CBTC, 50 µL de tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 8,0) e 25 µL de amostra (1-10 mg.mL<sup>-1</sup>), tampão fosfato de sódio (branco) ou Galantamina (Sigma) (inibidor da AChE e BuChE *standard*). Por fim, foram acrescentados 25 µL de AChE ou 25 µL de BuChE e a reacção foi lida de imediato. O produto formado (tiocolina) pela reacção entre o substrato e a enzima reagiu com o DTNB, também designado por reagente de Ellman, formando o composto amarelo anião 5-tio-2-nitrobenzoato, detectável a 405 nm. Dada a interferência da cor característica dos extractos, foi feito um controlo para estes, que consistiu na adição de 225 µL de tampão fosfato de sódio e 25 µL de extracto vegetal. A leitura foi efectuada em intervalos de 15 s, durante 5 min. Foram feitos triplicados para todas as amostras e cada ensaio repetido três vezes. Depois de subtraída a absorvência da cor dos respectivos extractos, a actividade colinesterásica foi determinada com base no declive da recta e a percentagem de inibição foi calculada comparativamente ao controlo sem inibidor (branco). As elevadas actividades exibidas pela espécie *L. viridis*, conduziram à determinação dos valores de IC<sub>50</sub>, ou seja, a concentração mínima necessária para inibir 50 % da actividade enzimática.

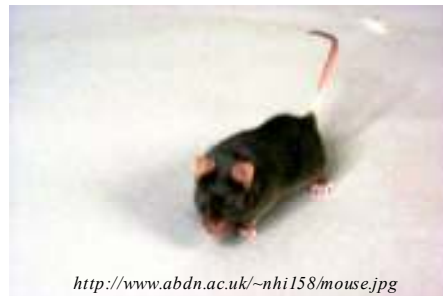
### **5.9. Inibição *ex vivo* das enzimas AChE e BuChE**

Os testes *ex vivo* foram realizados no Biotério do CBME/UAlg. Para a concretização deste ensaio foram necessários 12 ratinhos (*Mus musculus*, da estirpe C57BL/6 Black, machos de 4-6 meses, 25-30 g) (Figura 11). Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas, a temperatura e humidade controladas e com acesso a alimentação normal. Para o estudo da actividade inibidora das ChEs, os animais foram divididos em 4 grupos (n=3). Todos os procedimentos foram executados de acordo com os procedimentos internos do Biotério, em conformidade com as normas internacionais e a Direcção Geral de Veterinária. Todos os ratinhos foram injectados intraperitonealmente, com um volume de 100 µL. Dois grupos receberam as doses de extracto metanólico de *L. viridis* (previamente preparado) de 50 mg.Kg<sup>-1</sup> e 100 mg.Kg<sup>-1</sup>, dissolvidas na solução salina PBS (*Phosphate Buffered Saline*). Aos restantes dois grupos foi administrada a concentração de 5 mg.Kg<sup>-1</sup> de Galantamina, também dissolvida em solução salina, e 100 µL de PBS, controlos positivo e negativo, respectivamente. Os animais foram sacrificados por asfixia com CO<sub>2</sub>, 120 min após a administração intraperitoneal.

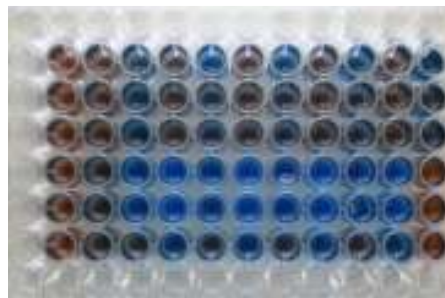
O modo de preparação do tecido cerebral e extracção dos sobrenadantes foi realizado de acordo com Chattipakorn *et al.* (2007) e Papandreou *et al.* (2009), com algumas alterações. O tecido cerebral foi extraído e colocado imediatamente no gelo. Seguidamente foi pesado e homogeneizado em 10 % (p/v) de tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,6) e centrifugado a 4000 rpm, a 4 °C, durante 30 min. Após este período recolheu-se o sobrenadante, correspondendo à fracção SS (*Solúvel em Sal*). Posteriormente, adicionou-se ao *pellet* 10 % (p/v) de tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,6) contendo 1 % (v/v) de Triton X-100 (Marke Rohm and Hass, Switzerland) para a obtenção da segunda fracção e a mistura foi submetida ao mesmo processo da fracção SS. Recolheu-se o sobrenadante relativo à fracção SD (*Solúvel em Detergente*). O detergente não iónico Triton X-100 foi utilizado na extracção da fracção SD em conjunto com elevadas concentrações de sal, para maior solubilização da AChE presente nos tecidos cerebrais de ratinho (Ho & Ellman, 1969; Rieger & Vigny, 1976). Os sobrenadantes foram mantidos a -20 °C até serem utilizados como fonte enzimática. A concentração de proteína presente nas amostras foi quantificada pelo método de Bradford, usando a proteína BSA (Sigma) como *standard* (0,1-1 mg.mL<sup>-1</sup>) (Figura 12). Para isso, foram adicionados 5 µL de cada concentração de BSA, amostra ou tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,6) (branco) em cada poço de uma microplaca transparente de 96 poços. Seguidamente adicionaram-se 250 µL de reagente Bradford em todos os poços preenchidos. Após um período de incubação de 30 min a temperatura ambiente, a reacção foi lida a 595 nm. Os resultados foram determinados com base na recta de regressão, determinada com os valores obtidos para a proteína BSA, nas várias concentrações.

A determinação da actividade colinesterásica foi baseada no método descrito por Ellman *et al.* (1961) e adaptado para determinar a actividade enzimática presente no tecido cerebral. A reacção teve início com a adição de 125 µL de DTNB (0,25 mM) e 25 µL de IATC (0,5 mM) ou 25 µL de CBTC (0,5 mM), substratos frequentemente usados para a determinação da actividade *in vitro* da AChE ou BuChE, respectivamente, e 50 µL de tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,6). Por último, adicionaram-se 50 µL de sobrenadante nos respectivos poços. A reacção foi seguida de imediato no leitor de microplacas e o produto da reacção foi quantificado a um comprimento de onda de 405 nm em intervalos de 15 s, durante 5 min (Figura 13). A actividade colinesterásica foi calculada utilizando o coeficiente de extinção do produto da reacção e foi expressa

em moles de substrato hidrolisado / min / g proteína. Os resultados finais foram expressos em percentagem de inibição e resultaram da comparação entre os resultados obtidos para os grupos tratados (com extracto e Galantamina) e o grupo controlo (sem inibidor). Foram feitos triplicados para todas as amostras, assim como, três repetições independentes.



**Figura 11.** Modelo *in vivo* utilizado neste estudo (ratinho de laboratório; *Mus musculus*, da estirpe C57BL/6 Black).



**Figura 12.** Imagem da microplaca transparente de 96 poços, com a mistura reaccional que permitiu a quantificação proteica pelo método de Bradford.



**Figura 13.** Imagem da microplaca transparente de 96 poços, com a mistura reaccional que permitiu avaliar a inibição das enzimas AChE e BuChE *ex vivo*.

## 6. Resultados e Discussão

### 6.1. Avaliação da capacidade antioxidante *in vitro*

As espécies reactivas induzem danos em biomoléculas que poderão desencadear uma série de patologias. O reconhecimento da eficácia de antioxidantes de origem natural na neutralização destas espécies desperta o interesse dos investigadores. A toxicidade inerente a alguns antioxidantes sintéticos, como o butilhidroxianisol e o butilhidroxitolueno, corrobora a importância dos antioxidantes naturais como alternativa (Ito *et al.*, 1986; Li *et al.*, 2008). As plantas apresentam-se como fortes candidatas a esta substituição pela variedade extraordinária de metabolitos secundários que produzem, muitos com actividade antioxidante (por exemplo, polifenóis) (Ainsworth & Gillespie, 2007). Dentro de uma panóplia de métodos disponíveis para testar a actividade antioxidante de uma amostra, não existe um único método capaz de avaliar a capacidade antioxidante total (Frankel & Meyer, 2000). Os métodos diferem em termos de princípios e condições experimentais, consequentemente, dependendo do método os antioxidantes têm contribuições diferentes quanto ao seu potencial antioxidante (Cao & Prior, 1998). A acção antioxidante dos extractos vegetais é fortemente dependente não só da metodologia seguida, mas também da composição do próprio extracto (Li *et al.*, 2008). Como referido anteriormente, os métodos são classificados de acordo com os mecanismos HAT e SET. Este estudo teve por base os métodos ORAC e TEAC com mecanismos HAT e SET, respectivamente. Dada a relação sugerida por vários autores entre o teor em fenóis numa amostra e o seu potencial antioxidante, utilizou-se o método colorimétrico F-C para a quantificação de fenóis (Katalinic *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008). Na Tabela 4 apresentam-se os resultados obtidos para os testes F-C, TEAC e ORAC.

**Tabela 4.** Quantificação do teor em polifenóis pelo método F-C e avaliação da actividade antioxidante do material vegetal com base nos métodos, TEAC e ORAC.

|  | F-C<br>( $\mu\text{mol}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}_{\text{ext.}}^{-1}$ ) | TEAC<br>( $\mu\text{mol}_{\text{TE}} \cdot \text{g}_{\text{ext.}}^{-1}$ ) | ORAC<br>( $\mu\text{mol}_{\text{TE}} \cdot \text{g}_{\text{ext.}}^{-1}$ ) |
|--|---|---|---|
| <b><i>C. albidus</i></b>                         |   |   |   |
| Aquoso   | 1404,13 ± 119,85 c,d  | 1101,95 ± 37,55 d   | 1340,57 ± 65,33 e*  |
| Metanólico                                       | 1459,53 ± 53,33 c   | 1677,67 ± 48,78 c   | 1685,64 ± 46,16 d ns  |
| <b><i>D. lusitanicum</i></b>                     |   |   |   |
| Aquoso   | 952,81 ± 89,10 e  | 304,27 ± 2,47 f   | 729,03 ± 64,49 g*   |
| Metanólico                                       | 1188,06 ± 52,96 d   | 432,23 ± 6,71 f   | 764,18 ± 61,18 g*   |
| Hexânico   | 20,16 ± 1,62 i  | 20,94 ± 1,73 g  | 50,66 ± 0,91 j*   |
| <b><i>L. viridis</i></b>                         |   |   |   |
| Óleo essencial                                   | 28,43 ± 0,87 i  | 11,12 ± 1,66 g  | 247,28 ± 26,53 i*   |
| Metanólico                                       | 893,01 ± 17,09 e,f  | 967,18 ± 22,57 e  | 2858,39 ± 70,97 c*  |
| <b><i>Q. suber</i></b>                           |   |   |   |
| Aquoso   | 2535,30 ± 150,44 b  | 1892,48 ± 59,57 b   | 3624,00 ± 60,25 a*  |
| Metanólico                                       | 2945,53 ± 86,47 a   | 3576,08 ± 106,75 a*   | 3071,80 ± 104,13 b  |
| <b><i>R. ponticum</i> subsp. <i>baeticum</i></b> |   |   |   |
| Metanólico                                       | 419,28 ± 16,34 h  | 402,07 ± 12,54 f  | 467,11 ± 45,13 h ns   |
| <b><i>R. aculeatus</i></b>                       |   |   |   |
| Aquoso   | 688,50 ± 19,08 f,g  | 370,11 ± 36,76 f  | 992,95736 ± 100,60 f*   |
| Metanólico                                       | 614,93 ± 97,82 g,h  | 440,77 ± 47,19 f  | 891,76517 ± 53,90 f,g*  |

ns- não significativo

Os valores representados com a mesma letra (comparação entre espécies dentro do mesmo método), bem como indicados com asterísco (\*) (comparação entre os métodos TEAC e ORAC), não apresentam diferenças estatisticamente significativas pelo Teste de Duncan para  $P < 0,05$ .

No geral, todas as espécies apresentaram elevada quantidade de polifenóis, expressos em equivalentes de ácido gálico por grama de extracto, com uma grande variação de valores ( $20,16 \pm 1,62$  a  $2945,53 \pm 86,47 \mu\text{mol}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}_{\text{ext.}}^{-1}$ ). A espécie *Q. suber* foi a que apresentou valores significativamente mais elevados ( $P < 0,05$ ),  $2945,53 \pm 86,47$  e  $2535,30 \pm 150,44 \mu\text{mol}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}_{\text{ext.}}^{-1}$ , para os extractos metanólico e aquoso, respectivamente, seguida da espécie *C. albidus* com valores de  $1459,53 \pm 53,33$

$\mu\text{mol}_{\text{GAE}\cdot\text{g}_{\text{ext.}}^{-1}}$  para o extracto metanólico e  $1404,13 \pm 119,85 \mu\text{mol}_{\text{GAE}\cdot\text{g}_{\text{ext.}}^{-1}}$  para o extracto aquoso. O extracto metanólico de *D. lusitanicum* apresentou, também, um elevado teor em polifenóis ( $1188,06 \pm 52,96 \mu\text{mol}_{\text{GAE}\cdot\text{g}_{\text{ext.}}^{-1}}$ ). Como esperado, os valores mais baixos foram registados no extracto hexânico de *D. lusitanicum* ( $20,16 \pm 1,62 \mu\text{mol}_{\text{GAE}\cdot\text{g}_{\text{ext.}}^{-1}}$ ) e no óleo de *L. viridis* ( $28,43 \pm 0,87 \mu\text{mol}_{\text{GAE}\cdot\text{g}_{\text{ext.}}^{-1}}$ ). Relativamente às restantes espécies, não houve diferenças significativas entre o extracto metanólico da espécie *L. viridis* e os extractos aquosos das espécies *D. lusitanicum* e *R. aculeatus* e entre os extractos metanólicos de *R. ponticum* e *R. aculeatus*. Os polifenóis fazem parte da composição química das folhas das espécies *Q. suber* (Ito *et al.*, 2002), *C. albidus* (De Pascual *et al.*, 1978) e *D. lusitanicum* (Juniper *et al.*, 1989; Budzianowski *et al.*, 2002), o que fundamenta os elevados valores observados.

Embora o método F-C seja muito utilizado na quantificação de compostos fenólicos, a interpretação dos resultados obtidos deve ter em conta que este método não é específico para fenóis sendo que outras substâncias podem reduzir o reagente F-C. Para além disso, a capacidade de resposta dos compostos fenólicos ao reagente F-C é dependente do número de grupos fenol que possuem (Singleton *et al.*, 1999).

Relativamente à actividade antioxidante todos os extractos revelaram capacidade de inibir os radicais  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  e peróxido. No geral, os valores do método ORAC são estatisticamente superiores ( $P < 0,05$ ) aos valores obtidos pelo método TEAC. Os valores são expressos em equivalentes de trolox, o que significa que são necessárias micromoles de trolox para traduzir a mesma actividade antioxidante de uma grama de extracto (Ou *et al.*, 2001). Os resultados do método ORAC variam de  $50,66 \pm 0,91$  a  $3624,00 \pm 60,25 \mu\text{mol}_{\text{TE}\cdot\text{g}_{\text{ext.}}^{-1}}$ , enquanto no método TEAC os valores variam entre  $11,12 \pm 1,66$  e  $3576,08 \pm 106,75 \mu\text{mol}_{\text{TE}\cdot\text{g}_{\text{ext.}}^{-1}}$ . As variações dependem da espécie, do solvente de extracção e das condições do teste (Peschel *et al.*, 2006). As espécies *Q. suber* e *C. albidus* possuem maior capacidade de neutralizar os radicais  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  e peróxido. Na espécie *Q. suber*, o extracto metanólico alcançou valores mais elevados comparativamente ao extracto aquoso ( $3576,08 \pm 106,75$  e  $1892,48 \pm 59,57 \mu\text{mol}_{\text{TE}\cdot\text{g}_{\text{ext.}}^{-1}}$ , respectivamente), contrariamente ao método ORAC onde o extracto aquoso se mostrou mais eficaz na inibição do radical peróxido ( $3624,00 \pm 60,25 \mu\text{mol}_{\text{TE}\cdot\text{g}_{\text{ext.}}^{-1}}$ ). No que respeita à espécie *C. albidus*, as actividades mais elevadas pertencem ao extracto metanólico em ambos os métodos ( $1677,67 \pm 67 \mu\text{mol}_{\text{TE}\cdot\text{g}_{\text{ext.}}^{-1}}$  e  $1685,64 \pm 46,16 \mu\text{mol}_{\text{TE}\cdot\text{g}_{\text{ext.}}^{-1}}$ , para os métodos TEAC e ORAC, respectivamente). O óleo da

espécie *L. viridis* e extracto hexânico da espécie *D. lusitanicum* exibiram os valores mais baixos de actividade.

Em resumo, as actividades mais elevadas observaram-se geralmente no método ORAC e para os extractos metanólicos, tal como aconteceu no estudo de Grevenstuk *et al.* (2009), o que significa que os compostos antioxidantes presentes nos extractos, embora tenham capacidade de neutralizar tanto o radical catião ABTS<sup>•+</sup> como o peróxido, têm preferência por mecanismos baseados na transferência de um átomo de hidrogénio (HAT) e por solventes orgânicos polares (Peschel *et al.*, 2006; Hayouni *et al.*, 2007; Grevenstuk *et al.*, 2009). O método TEAC é de interesse para os extractos vegetais, pois anula quaisquer interferências inerentes à cor dos extractos, graças ao máximo de absorção associado (Awika *et al.*, 2003). Apesar de, normalmente, a reacção entre compostos antioxidantes e o radical catião ABTS<sup>•+</sup> ser rápida, a diversidade de antioxidantes presentes nos extractos torna os tempos de resposta variáveis, podendo existir compostos bioactivos com reacções mais lentas (Prior *et al.*, 2005). Zulueta *et al.* (2009) necessitaram de aumentar o tempo de reacção de algumas espécies para que a inibição do radical catião ABTS<sup>•+</sup> fosse completa. Quanto ao método ORAC além de utilizar radicais livres biologicamente relevantes é o único capaz de conjugar, simultaneamente, o tempo de inibição e o decréscimo da actividade dos radicais livres por acção dos antioxidantes, mas tem a desvantagem de apresentar preferência para antioxidantes hidrofílicos (Singh & Singh, 2008).

A técnica de extracção por solventes é a mais utilizada para isolar compostos de material vegetal (Sultana *et al.*, 2009). Para extrair antioxidantes com diferentes estruturas químicas, é fundamental o uso de solventes de diferentes polaridades (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008). Água, metanol, etanol e acetona, são solventes habitualmente usados na extracção de compostos antioxidantes (Sun & Ho, 2005). O metanol é conhecido por ser o mais eficaz na extracção de compostos fenólicos (Pinelo *et al.*, 2004). Os resultados obtidos estão de acordo com a afirmação anterior, pois de todas as extracções efectuadas, foi a que utilizou o metanol como solvente extractante a mais eficiente na recuperação de compostos fenólicos, graças à maior solubilidade destes compostos em solventes orgânicos polares (Peschel *et al.*, 2006). O rendimento de extracção quando se utiliza água como solvente é baixo para antioxidantes com baixa polaridade. Os extractos aquosos não apresentaram, geralmente, actividades muito elevadas, mas isto não implica que não contenham compostos activos. O que poderá

acontecer é que as concentrações em que se encontram em solução são tão reduzidas que não permitem que a sua actividade se reflecta nos resultados (Franco *et al.*, 2008). O facto de os óleos serem constituídos maioritariamente por compostos voláteis (Nogueira & Romano, 2002), justifica os baixos valores observados no óleo de *L. viridis*. O solvente *n*-hexano é selectivo para compostos apolares, como a plumbagina, cuja actividade antioxidante é bastante reduzida ou praticamente inexistente. Os valores obtidos podem ser influenciados pela eficiência da extracção que é sensível à temperatura ou tempo de contacto. Existem outras técnicas alternativas ao processo de extracção Soxhlet, como a extracção assistida por microondas, que necessita de menor quantidade de solvente e tem elevado rendimento de extracção, sem alterar o poder antioxidante dos extractos (Spigno & De Faveri, 2009) e a extracção com fluídos supercríticos em que o solvente é seguro, pode ser removido facilmente e é, também, uma técnica interessante para extrair diferentes antioxidantes (Grigonis *et al.*, 2005; Gelmez *et al.*, 2009).

Wojdyło *et al.*, 2007 concluíram que os extractos vegetais ricos em quercetina, têm acção antioxidante. Atendendo ao facto de que estes compostos foram anteriormente identificados nas folhas de *Q. suber* (Ito *et al.*, 2002) e *C. albidus* (De Pascual *et al.*, 1978), provavelmente também estarão na origem dos elevados valores obtidos neste estudo. Estes resultados estão de acordo com trabalhos anteriores em que outras espécies do género *Cistus* (Attaguile *et al.*, 2000) e *Quercus* (Rocha-Guzmán *et al.*, 2009) demonstraram poder antioxidante, sugerindo que existe alguma similaridade de metabolitos secundários entre espécies do mesmo género.

O óleo da espécie *L. viridis* e extracto hexânico de *D. lusitanicum* apresentaram os valores mais baixos relativos ao teor em fenóis e também de poder antioxidante, o que sugere que os compostos presentes no óleo e extracto hexânico (compostos voláteis e plumbagina, respectivamente) praticamente não têm actividade antioxidante. Grevenstuk *et al.* (2009) constataram que o extracto hexânico de outra planta carnívora, *Drosera intermedia*, quase não possuía actividade antioxidante. Por detrás do elevado valor de actividade do extracto aquoso da espécie *Q. suber*, no método ORAC, poderão estar outros compostos, para além dos polifenóis, capazes de inibir fortemente o radical peróxido, e que não são contabilizados no caso dos extractos metanólicos, porque talvez sejam menos solúveis em solventes orgânicos polares.

Tem sido demonstrado por vários estudos que os polifenóis têm um papel influente no potencial antioxidante dos extractos vegetais (Katalinic *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008). Com base na análise dos resultados obtidos pelos três métodos, F-C, TEAC e ORAC, verifica-se que os mesmos são concordantes com estudos anteriores, pois as espécies que no método F-C apresentaram maior teor em polifenóis foram as que revelaram maior potencial antioxidante. Contudo, dadas as influências dos solventes nos mecanismos da reacção (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008) e métodos de extracção nas actividades biológicas, o desconhecimento da composição química dos extractos em análise e sabendo que as propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos estão directamente relacionadas com a sua estrutura (Rice-Evans *et al.*, 1997), é crucial que se aprofunde o estudo nas espécies mais promissoras, com alteração de variáveis como o solvente e o método e, mais importante ainda, averiguar qual ou quais os compostos responsáveis pela inibição dos radicais. Segundo Pérez-Jiménez *et al.* (2008), os valores de actividade antioxidante só podem ser comparados caso não haja alterações quanto aos solventes, métodos e condições analíticas. Para além destas espécies serem pouco estudadas quanto às suas propriedades biológicas, é difícil que todas as condições anteriormente referidas sejam mantidas de autor para autor, o que dificulta a comparação de resultados.

## **6.2. Inibição *in vitro* das enzimas $\alpha$ -APP, $\alpha$ -GL e $\alpha$ -GIR**

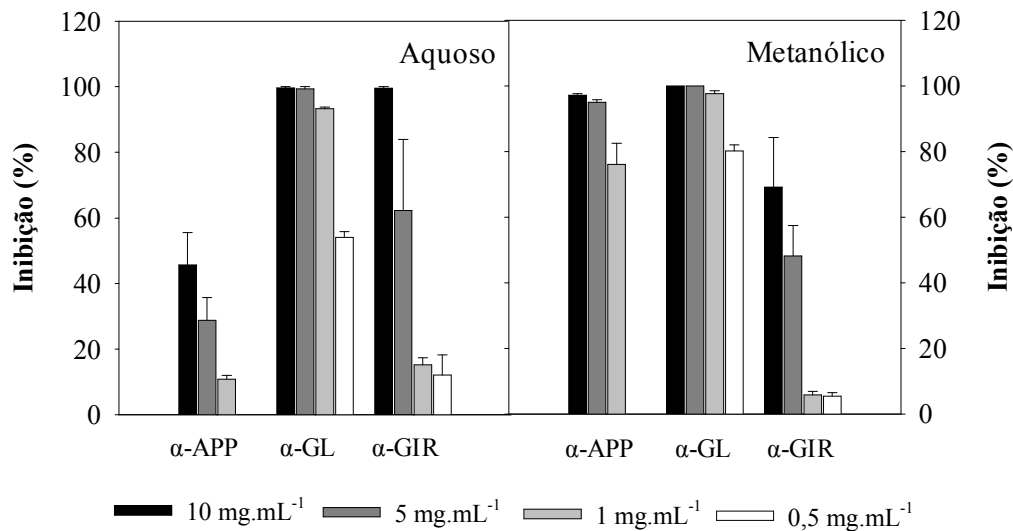
A *Dm* é uma doença crónica causada pelo défice de insulina, absoluto ou relativo, que afecta mais de 180 milhões de pessoas no mundo<sup>6</sup>. A *Dmt2* é a forma mais comum de *Dm* representando cerca de 90-95 % dos casos (Goldstein, 2007). Caracteriza-se pela alteração na produção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas, ou resistência à actividade da insulina (resistência à insulina), que conduz à hiperglicémia (WHO, 1980; Reimann *et al.*, 2009). A  $\alpha$ -amilase pancreática e  $\alpha$ -glucosidase são enzimas envolvidas na degradação e absorção intestinal dos hidratos de carbono, respectivamente. Inibidores destas enzimas interferem com a sua acção enzimática, prolongando o período de digestão dos hidratos de carbono o que, conseqüentemente, reduz a taxa de absorção de glucose (Hasenah *et al.*, 2006).

As espécies *C. albidus*, *D. lusitanicum*, *L. viridis*, *Q. suber*, *R. ponticum* subsp. *baeticum* e *R. aculeatus* foram avaliadas quanto à sua actividade antidiabética. Os

---

<sup>6</sup><http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html> (Acedido a 20.07.09)

resultados dos testes de inibição *in vitro* das enzimas  $\alpha$ -APP,  $\alpha$ -GL e  $\alpha$ -GIR realizados para a espécie *C. albidus* estão representados na Figura 14. Ambos os extractos se revelaram eficientes na inibição das três enzimas. O extracto aquoso de *C. albidus* provou ser forte na inibição das enzimas  $\alpha$ -GL e  $\alpha$ -GIR, embora no caso da  $\alpha$ -GIR os elevados valores de inibição se tenham verificado apenas para as concentrações elevadas (10 e 5 mg.mL<sup>-1</sup>). Apesar da enzima  $\alpha$ -APP ter sido inibida por este extracto, este valor é reduzido quando comparado com o resultado obtido para o extracto metanólico. O extracto metanólico, por sua vez, para além da  $\alpha$ -APP, demonstrou elevadas percentagens de inibição para as enzimas  $\alpha$ -GL e  $\alpha$ -GIR. Verificou-se uma dependência entre as percentagens de inibição e a concentração de extracto para a  $\alpha$ -APP e  $\alpha$ -GIR, em ambos os extractos. Em suma, a actividade da enzima  $\alpha$ -APP foi mais afectada pelo extracto metanólico, a enzima  $\alpha$ -GIR foi mais inibida pelo extracto aquoso e ambos os extractos reduziram eficientemente a actividade da  $\alpha$ -GL. Embora tanto o extracto aquoso como o metanólico tenham revelado um forte controlo das enzimas envolvidas na regulação dos níveis de glucose pós-prandial, o extracto aquoso de *C. albidus* destacou-se pelas elevadas percentagens de inibição da  $\alpha$ -GL e uma inibição moderada da  $\alpha$ -APP. Krentz & Bailey (2005) referem que uma estratégia eficaz no controlo da *Dmt2* passa por uma inibição moderada da  $\alpha$ -amilase e uma forte inibição da  $\alpha$ -glucosidase. Se a inibição da  $\alpha$ -amilase for elevada, a excessiva degradação de hidratos de carbono desencadeará problemas ao nível da fermentação bacteriana no cólon (Horii *et al.*, 1987). A actividade destes extractos poderá estar relacionada com alguns compostos identificados nesta espécie. Tal como referido anteriormente, a espécie *C. albidus* é rica em flavonóides e segundo Tadera *et al.* (2006), alguns flavonóides inibem fortemente a actividade de enzimas responsáveis pela hidrólise de hidratos de carbono. Compostos como a quercetina e caempferol foram anteriormente identificados em várias espécies do género *Cistus* (Attaguile *et al.*, 2000). Recentemente Tadera *et al.* (2006) provaram que a quercetina reduz bastante a actividade da enzima  $\alpha$ -GIR.

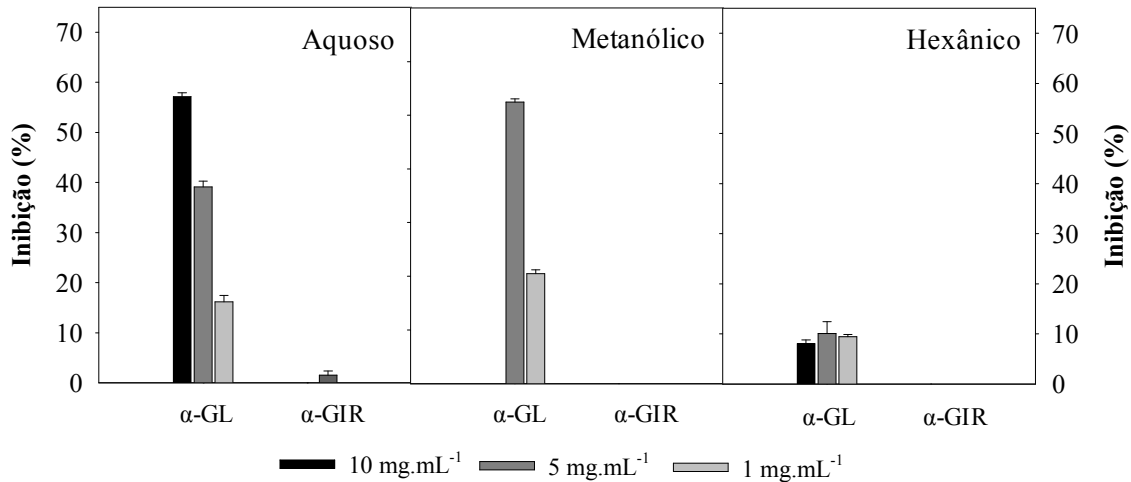


**Figura 14.** Comparação da capacidade dos extractos aquoso e metanólico de *C. albidus* inibirem *in vitro* as enzimas  $\alpha$ -APP,  $\alpha$ -GL e  $\alpha$ -GIR. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 repetições.

A Figura 15 exhibe os resultados referentes à espécie *D. lusitanicum*. Dos três extractos avaliados (aquoso, metanólico e hexânico), nenhum inibiu a enzima  $\alpha$ -APP. O extracto aquoso, embora tenha sido o único capaz de reduzir a acção da  $\alpha$ -GIR, apresentou um valor de inibição insignificante. Em relação à enzima  $\alpha$ -GL, este extracto mostrou-se mais activo para a concentração mais elevada (10 mg.mL<sup>-1</sup>), perdendo actividade com o decréscimo da concentração. Quanto ao extracto metanólico, apenas inibiu a  $\alpha$ -GL com uma percentagem de inibição de  $52,46 \pm 0,60$  % na concentração de 5 mg.mL<sup>-1</sup>, decaindo para menos de metade na concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup>. Esta actividade foi mais elevada comparativamente à registada no extracto aquoso, talvez porque o extracto metanólico extrai mais substâncias bioactivas. Não foi possível avaliar a capacidade do extracto metanólico inibir a enzima  $\alpha$ -GL na concentração de 10 mg.mL<sup>-1</sup> devido à interferência da cor do extracto. Por último, o extracto hexânico, tal como o extracto metanólico, também só conseguiu inibir a  $\alpha$ -GL, exibindo percentagens de inibição praticamente nulas para as três concentrações. O extracto hexânico extrai maioritariamente plumbagina, uma naftoquinona. Os resultados mostraram que, apesar das inúmeras propriedades biológicas que possui, a plumbagina não apresentou influência considerável na actividade das enzimas em estudo.

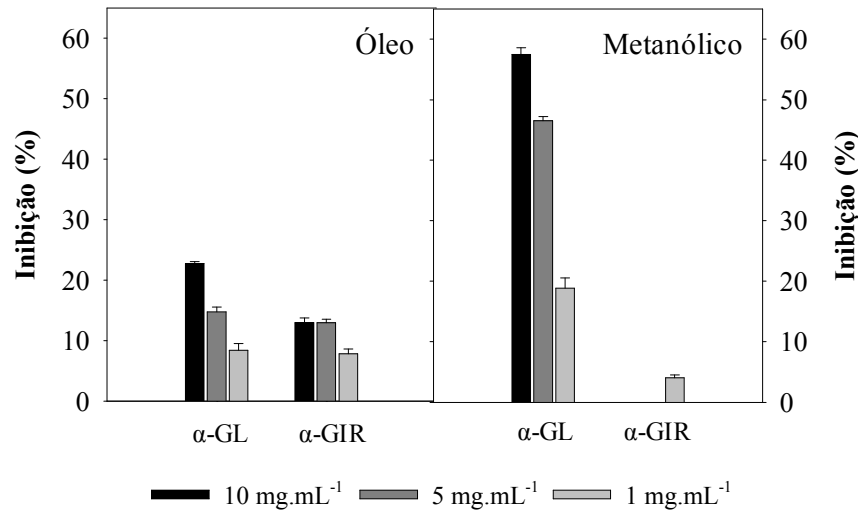
Concluindo, os extractos aquoso e metanólico apresentaram os resultados mais relevantes. Considerando o estudo de Shobana *et al.* (2009) e de Kim *et al.* (2000), o composto luteolina inibe as enzimas  $\alpha$ -APP e  $\alpha$ -GL. Tal como referido anteriormente,

este composto está presente nas folhas de *D. lusitanicum* (Juniper *et al.*, 1989), e poderá ser responsável pela actividade dos extractos aquoso e metanólico na inibição da  $\alpha$ -GL. Contudo, neste estudo nenhum extracto foi eficaz na inibição da  $\alpha$ -APP.



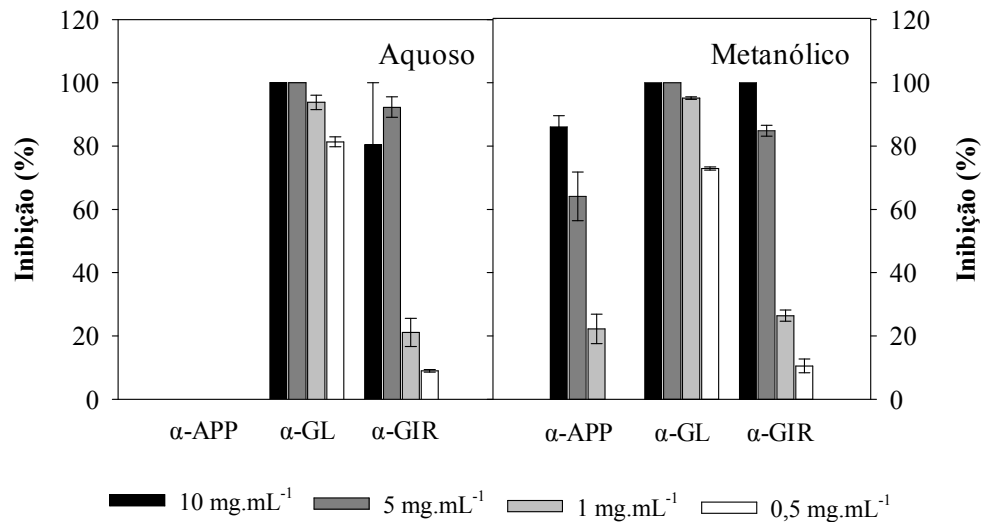
**Figura 15.** Comparação da capacidade dos extractos aquoso, metanólico e hexânico de *D. lusitanicum* inibirem *in vitro* as enzimas  $\alpha$ -GL e  $\alpha$ -GIR. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 repetições.

Na Figura 16 apresentam-se as inibições das actividades enzimáticas pela espécie *L. viridis*. Em primeira análise, não houve inibição da enzima  $\alpha$ -APP pelo óleo e extracto metanólico. No caso da  $\alpha$ -GL, o óleo não inibiu muito além de 20 % da actividade enzimática, para a maior concentração (10 mg.mL<sup>-1</sup>). Os óleos desta espécie estão bem caracterizados, sabendo-se que contêm sesquiterpenos e monoterpenos (Nogueira & Romano, 2002), o que sugere que estes não são relevantes para o tratamento da *Dmt2* baseado no controlo dos níveis de glucose pós-prandial. O extracto metanólico, reduziu mais a acção da  $\alpha$ -GL nas concentrações de 10 e 5 mg.mL<sup>-1</sup>, que a acção da  $\alpha$ -GIR, cujo valor de inibição foi praticamente nulo. A dependência entre o aumento da concentração e o incremento da inibição registou-se apenas para a enzima  $\alpha$ -GL. Apesar de nenhum dos casos (óleo e extracto metanólico) ter mostrado relevância no controlo da hiperglicémia pós-prandial, o extracto metanólico respondeu melhor à inibição das enzimas envolvidas nesse controlo.



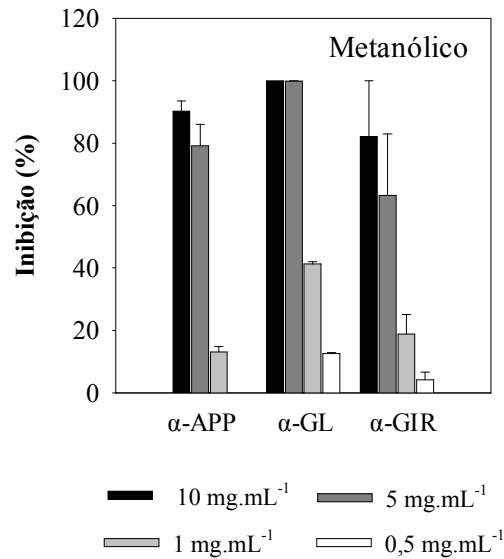
**Figura 16.** Comparação da capacidade do óleo essencial e do extracto metanólico de *L. viridis* inibirem *in vitro* as enzimas  $\alpha$ -GL e  $\alpha$ -GIR. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 repetições.

Os extractos, aquoso e metanólico, da espécie *Q. suber* também foram testados (Figura 17). Comparando as enzimas  $\alpha$ -GL e  $\alpha$ -GIR, o extracto aquoso mostrou uma acção inibidora mais forte na actividade da  $\alpha$ -GL, nomeadamente, nas concentrações de 1 e 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>, com valores de inibição de  $93,80 \pm 2,25$  e  $81,34 \pm 1,56$  %, respectivamente. Este extracto não inibiu a  $\alpha$ -APP. Quanto ao extracto metanólico revelou-se um excelente inibidor das três enzimas  $\alpha$ -APP,  $\alpha$ -GL e  $\alpha$ -GIR. Nas concentrações de 10 e 5 mg.mL<sup>-1</sup>, este extracto inibiu em mais de metade a acção da  $\alpha$ -APP. Comparando as enzimas  $\alpha$ -GL e  $\alpha$ -GIR, as diferenças mais notórias focam-se nas concentrações de extracto mais baixas (1 e 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>), inibindo mais a acção da enzima  $\alpha$ -GL ( $95,16 \pm 0,39$  e  $72,90 \pm 0,47$  %, respectivamente). Registou-se uma dependência entre o aumento da concentração do extracto e o incremento da percentagem de inibição das enzimas  $\alpha$ -APP e  $\alpha$ -GIR. No geral, o extracto metanólico revelou-se o melhor candidato para a inibição da actividade das enzimas em estudo, podendo contribuir positivamente para a regulação dos níveis de glucose pós-prandial. Vários estudos têm demonstrado a contribuição positiva de compostos fenólicos para o controlo da *Dmt2* via inibição de enzimas relacionadas com a digestão e absorção de hidratos de carbono (Tadera *et al.*, 2006; Ani & Naidu, 2008; Kwon *et al.*, 2008). Vários polifenóis, como taninos (Kandra *et al.*, 2004) e quercetina (Tadera *et al.*, 2006) já provaram ser potentes inibidores das enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glucosidase. Estes compostos foram já isolados das folhas de *Q. suber* por Ito *et al.* (2002), o que indica que estes poderão contribuir para a elevada actividade manifestada.



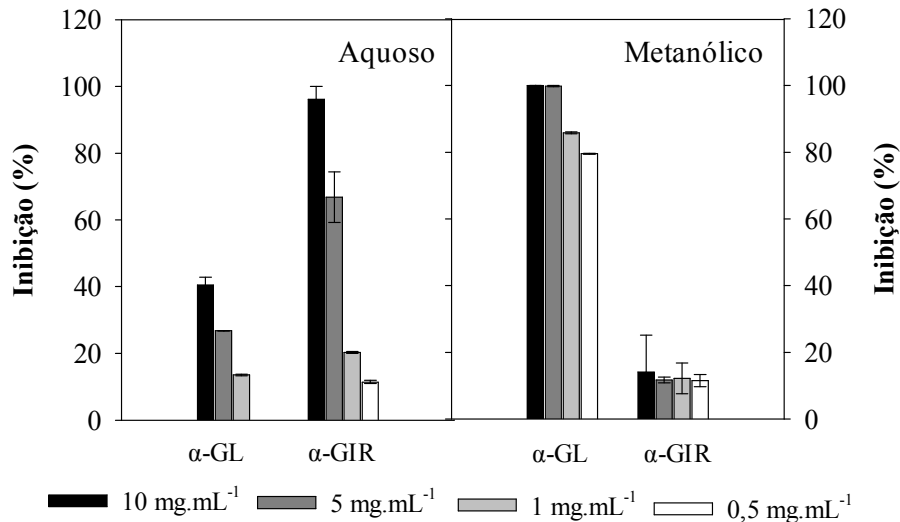
**Figura 17.** Comparação da capacidade dos extractos aquoso e metanólico de *Q. suber* inibirem *in vitro* as enzimas  $\alpha$ -APP,  $\alpha$ -GL e  $\alpha$ -GIR. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 repetições.

Na Figura 18 apresentam-se os resultados obtidos com a espécie *R. ponticum* subsp. *baeticum*. O extracto metanólico desta espécie apresentou potencial para reduzir tanto a degradação de hidratos de carbono, como a sua absorção intestinal, pela inibição da actividade das enzimas  $\alpha$ -APP e  $\alpha$ -GL/ $\alpha$ -GIR, respectivamente. Constatou-se uma dependência entre a concentração de extracto e a percentagem de inibição da acção da  $\alpha$ -APP e  $\alpha$ -GIR. Nas concentrações de 10 e 5 mg.mL<sup>-1</sup>, o extracto influenciou grandemente as actividades das três enzimas, com especial destaque para a  $\alpha$ -GL cuja actividade foi totalmente inibida (100,00  $\pm$  0,00 e 99,86  $\pm$  0,08 %, respectivamente). Em todos os casos foi evidente o decréscimo acentuado para as concentrações de 1 e 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>.



**Figura 18.** Capacidade do extracto metanólico de *R. ponticum* subsp. *baeticum* inibir *in vitro* as enzimas  $\alpha$ -APP,  $\alpha$ -GL e  $\alpha$ -GIR. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 repetições.

A espécie *R. aculeatus* também foi avaliada quanto à sua capacidade em reduzir *in vitro* as actividades das várias enzimas em estudo (Figura 19). Tanto o extracto aquoso como o metanólico, não foram eficientes na inibição da actividade da  $\alpha$ -APP nas concentrações estudadas. Por sua vez, o extracto aquoso mostrou-se mais eficiente na inibição da enzima  $\alpha$ -GIR, e o extracto metanólico melhor na inibição da  $\alpha$ -GL. No extracto aquoso houve um incremento de inibição dependente do aumento da concentração. Este extracto foi melhor na inibição da  $\alpha$ -GIR, comparativamente à da  $\alpha$ -GL. Tendo em conta que as respostas enzimáticas de origem animal *in vitro* são preferíveis em termos de indicação dos benefícios do extracto para a saúde, o extracto aquoso revelou-se um regulador promissor da absorção de hidratos de carbono. Contrariamente ao extracto aquoso, o extracto metanólico foi claramente melhor na inibição da enzima  $\alpha$ -GL. Os compostos bioactivos já identificados no rizoma desta espécie são as saponinas esteróidais, havendo referências da sua importância no tratamento do cancro, Diabetes e doenças cardiovasculares pela medicina Chinesa (Salunke *et al.*, 2006). Nada se sabe sobre a composição química das folhas da espécie *R. aculeatus*, mas assumindo que a distribuição das saponinas esteróidais inclui a parte aérea, é possível que estes compostos contribuam significativamente para a inibição exibida por esta espécie.



**Figura 19.** Comparação da capacidade dos extractos aquoso e metanólico de *R. aculeatus* inibirem *in vitro* as enzimas  $\alpha$ -GL e  $\alpha$ -GIR. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 repetições.

Resumindo, a actividade da enzima  $\alpha$ -APP foi mais afectada por extractos metanólicos e a enzima  $\alpha$ -GIR por extractos aquosos. Quanto à actividade da  $\alpha$ -GL foi inibida tanto por extractos aquosos como metanólicos. As diferenças nas potencialidades de cada extracto estão interligadas com as solubilidades de cada solvente. Neste caso, os compostos com mais afinidade para a água, têm maior capacidade de inibir a actividade da  $\alpha$ -GIR, ao passo que os metanólicos foram melhores a inibir a acção da  $\alpha$ -APP. Relativamente à Acarbose (controlo positivo), foram determinados os valores de IC<sub>50</sub>. Os resultados mostraram que a concentração de Acarbose necessária para inibir 50 % da actividade das enzimas  $\alpha$ -APP,  $\alpha$ -GL e  $\alpha$ -GIR é  $206,99 \pm 3,20$ ;  $619,47 \pm 5,36$  e  $229,74 \pm 10,94 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente. Tal como no estudo de Oki *et al.* (1999) a Acarbose foi menos eficaz na inibição da enzima de origem microbiana quando comparada com a de origem animal. Estes resultados sugerem que os efeitos na inibição dependem da origem enzimática. Tal como aconteceu no estudo de Kwon e colaboradores (2008), o material vegetal foi mais eficaz na inibição da enzima  $\alpha$ -GL quando comparada com a  $\alpha$ -GIR. De acordo com estudos recentes, compostos polifenólicos inibidores da  $\alpha$ -glucosidase de origem microbiana não são eficientes na inibição da  $\alpha$ -glucosidase de mamífero, pela diferença ao nível do reconhecimento molecular no centro activo destas enzimas (Gao & Kawabata, 2005). Com base nesta informação, e dada a maior relevância na relação entre o extracto e a enzima  $\alpha$ -glucosidase de origem animal, neste trabalho foram testadas ambas as enzimas e comparados os resultados.

De todas as plantas estudadas, as espécies *C. albidus*, *Q. suber*, *R. ponticum* subsp. *baeticum* e *R. aculeatus* apresentaram as percentagens de inibição mais elevadas. Muitas plantas têm demonstrado o seu potencial antidiabético *in vitro* e *in vivo* (Jung *et al.*, 2006). Os polifenóis, um dos maiores grupos de metabolitos secundários produzidos pelas plantas, interagem eficientemente com proteínas e inibem a actividade enzimática (Gao & Kawabata, 2005). Este grupo de compostos naturais, também inibe a  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glucosidase (Mai & Chuyen, 2007). Para além destes, os terpenóides e alcalóides são outros compostos naturais que manifestam igualmente potencial antidiabético (Jung *et al.*, 2006).

Recapitulando, o controlo da Dmt2 passa por uma inibição moderada da enzima  $\alpha$ -amilase pancreática e uma forte inibição da enzima  $\alpha$ -glucosidase (Krentz & Bailey, 2005), neste sentido o extracto aquoso de *C.albidus* merece especial atenção. Os extractos avaliados neste estudo resultam de uma mistura de compostos, pelo que a actividade elevada evidenciada poderá resultar da acção de dois ou mais compostos (sinergismo) (Ani & Naidu, 2008) ou, pelo contrário, no caso das espécies com baixos níveis de inibição, resultar da anulação de actividades entre compostos (antagonismo) e, portanto, a actividade real destes extractos estar sobrestimada ou subestimada; daí a importância da caracterização química dos extractos.

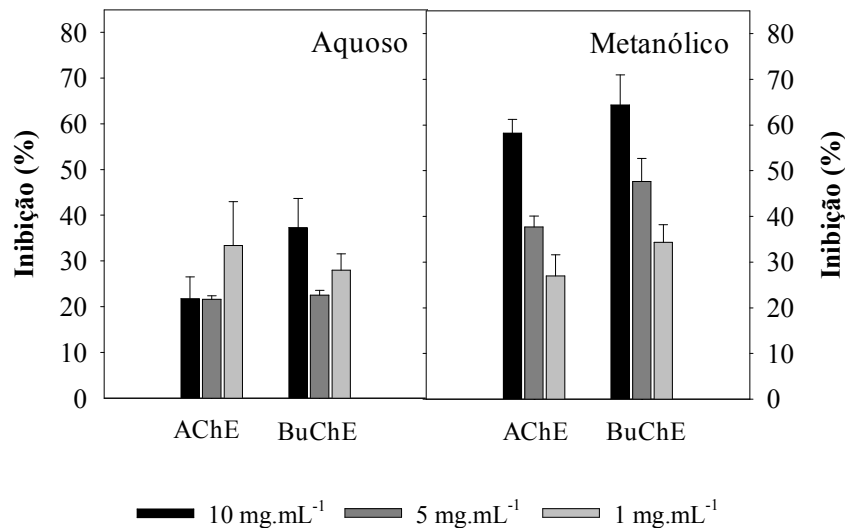
O stress oxidativo parece estar relacionado com uma série de doenças e a Dm não é excepção. A hiperglicémia (Valko *et al.*, 2007), oxidação celular e redução das defesas antioxidantes (Szaleczky *et al.*, 1999) são factores que estimulam o aumento de stress oxidativo na Dm (Kashiwagi *et al.*, 1994; Rösen *et al.*, 2001; Rahimi *et al.*, 2005). Estudos evidenciam que o stress oxidativo conduz à resistência de insulina (Singh *et al.*, 2008), danos nos tecidos e complicações associadas à doença (Rösen *et al.*, 2001). O envolvimento do stress oxidativo na Dm sugere que os antioxidantes poderão contribuir positivamente para o controlo da doença (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2000). Resultados obtidos *in vivo* em trabalhos anteriores demonstram que os compostos polifenólicos extraídos das plantas reduzem o stress oxidativo graças às suas potencialidades como antioxidantes e previnem danos celulares em animais diabéticos (Fukuda *et al.*, 2004). Curiosamente, duas das espécies mais promissoras no presente estudo, *C. albidus* e *Q. suber*, ocuparam os valores mais elevados de acção antioxidante, determinados no ponto 6.1.. Mai & Chuyen (2007) sugerem que um bom agente antidiabético deve ter tanto actividades hipoglicémicas como antioxidantes, sem efeitos secundários.

### 6.3. Inibição *in vitro* das enzimas AChE e BuChE

A DA é a doença neurodegenerativa com maior prevalência durante o envelhecimento. Cada vez mais frequente, esta doença é temida por todos na actualidade. Clinicamente é definida pela perda de várias funções cognitivas, resultado da perda excessiva de neurónios em várias regiões do cérebro associadas ao sistema cognitivo (Benzi & Moretti, 1998; Felician & Sandson, 1999). Actualmente, a regulação do sistema colinérgico é a forma mais comum de prevenção ou atenuação dos sintomas típicos da doença. Muitos investigadores acreditam que se as ChEs forem inibidas, a ACh não é hidrolisada tão rapidamente aumentando os seus níveis o que, consequentemente, melhora o sistema colinérgico (Felician & Sandson, 1999). Os inibidores colinesterásicos clinicamente usados são eficientes em atenuar os sintomas, mas os efeitos secundários associados e a sua incapacidade de bloquear a progressão da doença, obriga à pesquisa de novos substitutos (Chattipakorn *et al.*, 2007). Foi com o objectivo de contribuir para a descoberta de novos inibidores de origem vegetal que neste trabalho se testaram os extractos das espécies *C. albidus*, *D. lusitanicum*, *L. viridis*, *Q. suber*, *R. ponticum* subsp. *baeticum* e *R. aculeatus*.

Ambos os extractos de *C. albidus* inibiram consideravelmente a acção das enzimas AChE e BuChE (Figura 20). A inibição pelo extracto metanólico revelou dependência da concentração e a inibição da actividade enzimática foi ligeiramente mais elevada na BuChE. O extracto aquoso foi pouco eficiente na inibição de ambas as enzimas. A AChE foi mais inibida na concentração de extracto de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  e a enzima BuChE na concentração de  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$ , com valores de inibição inferiores a 40 % em ambos os casos.

A inibição superior por parte do extracto metanólico sugere que os compostos bioactivos apresentam maior solubilidade em solventes orgânicos polares (Carpinella *et al.*, 2009). Tal como referido anteriormente, os flavonóides foram identificados por Pascual *et al.* (1978) nesta espécie. Vários flavonóides, de entre os quais a quercetina e xantonas, já se revelaram bons inibidores da actividade da AChE (Brühlmann *et al.*, 2004; Jung & Park, 2007; Orhan *et al.*, 2007). Neste estudo, tanto a AChE como a BuChE foram consideravelmente inibidas, sugerindo que a actividade exibida, sobretudo pelo extracto metanólico, poderá resultar para além da quercetina, da presença de outros compostos bioactivos.



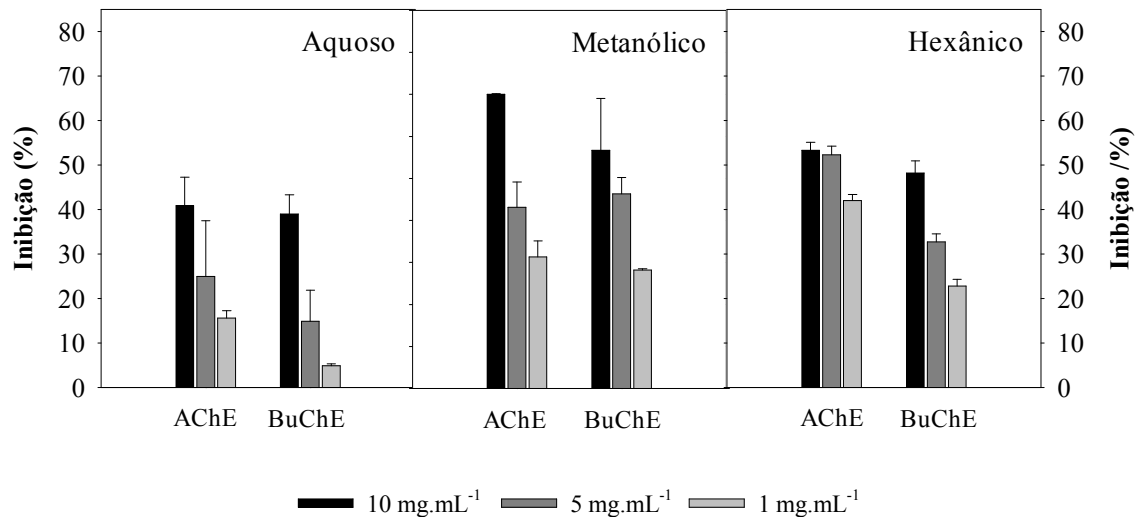
**Figura 20.** Inibição da actividade das enzimas AChE e BuChE *in vitro* pelos extractos aquoso e metanólico de *C. albidus*. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 repetições.

Os extractos da espécie *D. lusitanicum* também foram estudados e os resultados encontram-se reunidos na Figura 21. Ambas as enzimas foram inibidas pelos três extractos. A melhor inibição foi exibida pelo extracto metanólico, seguido do extracto hexânico e, por último, o aquoso. Exceptuando a acção do extracto hexânico para a AChE, em todos os outros casos a eficiência de inibição exibiu dependência da concentração de extracto. A forte redução da actividade enzimática pelo extracto metanólico foi semelhante para as duas enzimas apresentando valores de inibição que rondam os 70 %, para a concentração mais elevada. Das folhas desta espécie já foram extraídos flavonóides e, tal como acima citado, tem sido cientificamente comprovada a sua capacidade de reduzir a acção das ChEs. Com base nesta informação, e sendo o metanol, de todos os solventes utilizados, o mais eficiente na extracção de flavonóides, tudo indica que existe uma provável contribuição destes compostos na inibição enzimática.

O extracto hexânico influenciou mais a actividade da AChE comparativamente à BuChE, sobretudo nas concentrações de 5 e 1 mg.mL<sup>-1</sup> ( $52,30 \pm 1,97$  e  $41,97 \pm 1,38$  %, respectivamente). Para além do potencial antimicrobiano e insecticida já comprovados, o extracto hexânico demonstrou neste ensaio capacidade de reduzir a actividade das ChEs. Se a plumbagina é o composto maioritário no extracto hexânico da espécie *D. lusitanicum*, e se este demonstrou actividade neste estudo, os resultados sugerem que, para além das actividades anti-inflamatória (Checker *et al.*, 2009), antiproliferativa

(Srinivas *et al.*, 2004), antimicrobiana (Didry *et al.*, 1998; Paiva *et al.*, 2003; Gonçalves *et al.*, 2009) e antifúngica (Shin *et al.*, 2007), a plumbagina influencia também a actividade das ChEs.

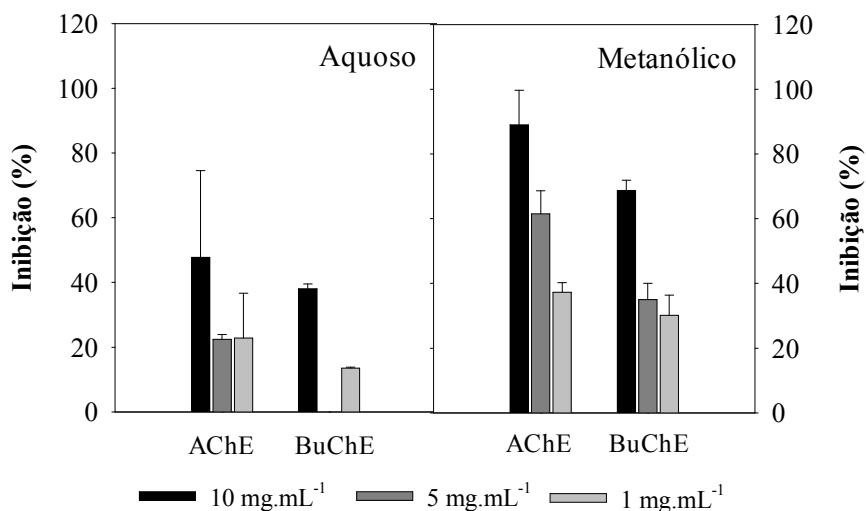
O extracto aquoso foi o que apresentou os valores de inibição mais baixos. Na concentração mais elevada, este extracto afectou apenas cerca de 40 % da actividade de ambas as enzimas e na concentração mais baixa as inibições foram irrelevantes.



**Figura 21.** Inibição da actividade das enzimas AChE e BuChE *in vitro* pelos extractos aquoso, metanólico e hexânico de *D. lusitanicum*. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 repetições.

A Figura 22 reúne os valores de inibição obtidos com os extractos de *Q. suber*. A actividade do extracto aquoso revelou-se instável para ambas as enzimas, com maior incidência na BuChE. O extracto aquoso apresentou o valor mais alto de inibição da AChE na concentração de 10 mg.mL<sup>-1</sup> ( $47,76 \pm 26,72$  %), com as concentrações mais baixas a decaírem para cerca de metade do valor de inibição. No caso da BuChE, na concentração mais elevada o extracto exibiu actividade moderada, na concentração de 5 mg.mL<sup>-1</sup> não mostrou actividade e na concentração mais baixa (1 mg.mL<sup>-1</sup>) teve actividade inibidora insignificante. O extracto metanólico foi, de facto, mais eficiente que o extracto aquoso, com redução da actividade da AChE e BuChE em  $89,05 \pm 10,57$  e  $68,75 \pm 3,11$  %, respectivamente, para a concentração mais elevada. Comparando ambas as enzimas, na concentração intermédia o extracto metanólico foi mais eficiente na inibição da enzima AChE ( $61,52 \pm 7,15$  %). Neste extracto o incremento da inibição enzimática dependeu do aumento da concentração do extracto.

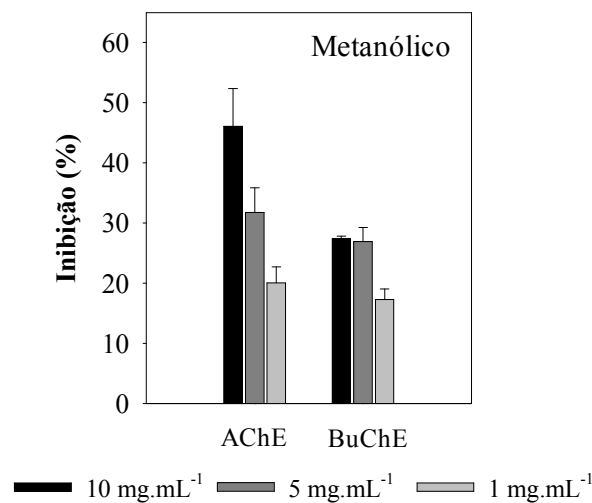
Tal como acima indicado, a quercetina já revelou, em estudos anteriores, capacidade de inibir a AChE (Jung & Park, 2007). Sabendo que este composto foi anteriormente identificado nas folhas desta espécie (Ito *et al.*, 2002), é possível que tenha uma contribuição para a actividade mostrada pelo extracto. Sendo a DA uma doença complexa e multifactorial, agentes terapêuticos com vários mecanismos e locais de acção, como os polifenóis, são entendidos como potenciais agentes terapêuticos. A importância dos compostos fenólicos no tratamento de doenças neurodegenerativas está demonstrada em diversos estudos que foram compilados por Ramassamy (2006).



**Figura 22.** Inibição da actividade das enzimas AChE e BuChE *in vitro* pelos extractos aquoso e metanólico de *Q. suber*. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 repetições.

Os resultados de inibição obtidos com o extracto metanólico de *R. ponticum* subsp. *baeticum* (Figura 23) indicam que a acção da enzima AChE foi a mais afectada e que apenas neste caso houve dependência entre o aumento da concentração de extracto e o incremento da percentagem de inibição. A acção da BuChE foi fracamente inibida, sem atingir valores de inibição superiores a 30 %. No estudo de Orhan *et al.* (2004), extractos da mesma espécie, na concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup>, reduziram a acção das enzimas AChE e BuChE em  $93,03 \pm 1,12$  e  $95,23 \pm 1,28$  %, respectivamente, valores bastante elevados quando comparados com os obtidos neste trabalho ( $20,08 \pm 2,66$  e  $17,29 \pm 1,75$  %, para a AChE e BuChE, respectivamente). Existem factores que podem justificar a diferença destes resultados. É importante considerar a diferença ao nível das subespécies e suas origens, pois no caso de Orhan *et al.* (2004) foi estudada a espécie *R. ponticum* subsp. *ponticum*, endémica da Turquia e no presente trabalho a espécie *R.*

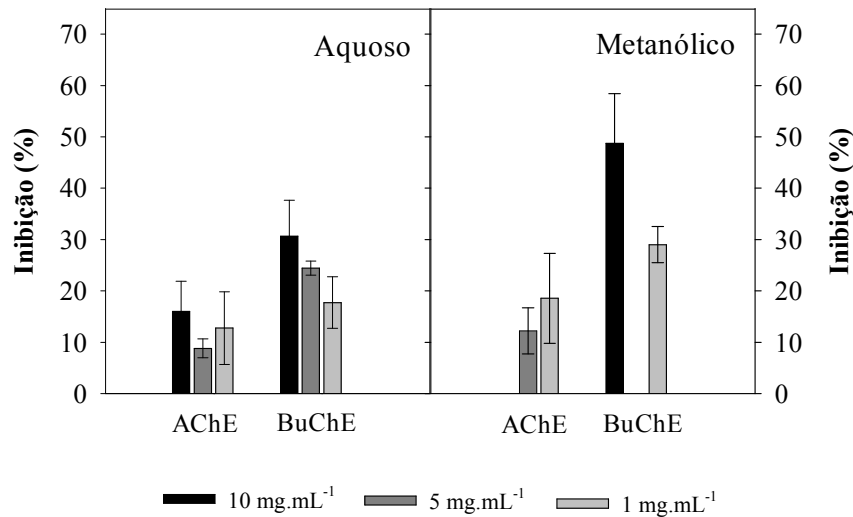
*ponticum* subsp. *baeticum*, endémica de Portugal. As diferenças de crescimento e condições ambientais influenciam consideravelmente a bioactividade das plantas (McGraw & Furedi, 2005). Além disso, Orhan *et al.* (2004) utilizaram toda a planta como amostra e os métodos de extracção, bem como as preparações das amostras também foram diferentes. Estes autores referem que a família *Ericaceae*, à qual pertence a espécie *R. ponticum* subsp. *baeticum*, possui elevado teor em alcalóides, responsáveis pela inibição das ChEs. Não é possível tirar conclusões mais concretas sobre quais os compostos responsáveis pela actividade deste extracto, pelo desconhecimento da sua composição química.



**Figura 23.** Inibição da actividade das enzimas AChE e BuChE *in vitro* pelo extracto metanólico de *R. ponticum* subsp. *baeticum*. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 repetições.

Os extractos aquoso e metanólico de *R. aculeatus* também foram investigados (Figura 24). O extracto aquoso mostrou-se um inibidor moderado na acção da BuChE, com dependência entre o aumento da concentração e o incremento da percentagem de inibição. A inibição da AChE foi instável, com percentagens de inibição diminutas em todas as concentrações. O extracto metanólico desta espécie, revelou instabilidade na inibição de ambas as enzimas, com actividade nula quando testado nas concentrações de 10 e 5 mg.mL<sup>-1</sup> para a AChE e BuChE, respectivamente. A percentagem mais elevada foi alcançada durante a inibição da BuChE, com a concentração mais elevada a inibir cerca de metade da acção enzimática. Lee *et al.* (2009) demonstraram em testes *in vivo* que saponinas esteróidais são responsáveis pelo aumento dos níveis de ACh no hipocampo, melhorando a memória e aprendizagem. As saponinas constituem um vasto

grupo de metabolitos secundários, com uma panóplia de propriedades biológicas. Além disso, estes compostos variam nas estruturas químicas, as quais determinam a polaridade, a hidrofobicidade e actividade destes compostos, logo, a existirem na parte aérea desta espécie podem ser saponinas que não respondem a este tipo de inibição.



**Figura 24.** Inibição da actividade das enzimas AChE e BuChE *in vitro* pelos extractos aquoso e metanólico de *R. aculeatus*. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 repetições.

A espécie *L. viridis* foi, de todas as espécies estudadas, a que demonstrou níveis mais elevados de inibição das ChEs (Tabela 5), e por esse motivo foram determinados os valores de IC<sub>50</sub>, que equivale à concentração de extracto necessária para inibir 50 % da actividade enzimática. Estudos anteriores comprovam que o óleo essencial e extractos de vários solventes de outras espécies do género *Lavandula* têm capacidade de inibir as enzimas AChE e BuChE (Adersen *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2006; Dohi *et al.*, 2009). À semelhança das conclusões de Orhan *et al.* (2008) e Mata *et al.* (2007), o óleo é o mais eficiente na inibição das ChEs comparativamente a extractos de vários solventes. Contrariamente aos resultados obtidos por Orhan *et al.* (2008) para a espécie *Rosmarinus officinalis* (da mesma família que *L. viridis*), neste estudo a actividade da AChE foi mais inibida que a da BuChE. A concentração de óleo necessária para inibir metade da actividade da AChE foi de  $142.32 \pm 9.43 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , um valor bastante reduzido quando comparado com o da espécie *Lavandula officinalis* (IC<sub>50</sub>=820  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) obtido por Dohi *et al.* (2009). Nogueira & Romano (2002) identificaram os compostos 1,8-cineol (18,2 - 25,1 %), cânfora (9,1 - 15,7 %),  $\alpha$ -pineno (8,8 - 14,1 %), borneol (4,1 - 4,8 %),  $\Delta^3$ -careno (1,0 - 6,5 %),  $\beta$ -pineno (1,2 - 5,6 %) e  $\alpha$ -terpineol (0,8 -

4,2 %) no óleo de *L. viridis*. Os compostos 1,8-cineol, cânfora e  $\alpha$ -pineno já provaram anteriormente que são potentes inibidores das enzimas AChE e BuChE (Savelev *et al.*, 2003; Orhan *et al.*, 2008; Dohi *et al.*, 2009). A elevada actividade exibida pelo óleo pode ser o somatório de várias actividades de um conjunto de compostos. As propriedades biológicas características de uma amostra não têm obrigatoriamente que advir de um único composto (Orhan *et al.*, 2008). Mata *et al.* (2007), comprovaram esta possibilidade quando verificaram que a actividade do composto maioritário isolado do óleo essencial de *R. officinalis* era inferior à do óleo. Savelev *et al.* (2003) investigaram as interacções entre os vários compostos incluindo 1,8-cineol, cânfora,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno e borneol. Observaram sinergismo entre o composto 1,8-cineol e  $\alpha$ -pineno e antagonismo entre 1,8-cineol e cânfora, o que levou a concluir que a actividade exibida pelo óleo de *Salvia lavandulaefolia* era consequência da interacção entre compostos. O extracto metanólico também se mostrou bastante efectivo na inibição das ChEs, com valores de IC<sub>50</sub> de  $244.55 \pm 16.26$  e  $285.28 \pm 15.97$   $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , para a AChE e BuChE, respectivamente.

**Tabela 5.** Inibição da actividade das enzimas AChE e BuChE *in vitro*, representada em valores de IC<sub>50</sub> ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), pelo óleo e extracto metanólico da espécie *L. viridis* e, ainda, pelo inibidor *standard* Galantamina. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 repetições.

|                            | IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) |                    |
|----------------------------|---|--------------------|
|                            | AChE  | BuChE              |
| <b>Óleo essencial</b>      | 142,32 $\pm$ 9,43                                     | 214,24 $\pm$ 12,55 |
| <b>Extracto metanólico</b> | 244,55 $\pm$ 16,26                                    | 285,28 $\pm$ 15,97 |
| <b>Galantamina</b>         | 1,56 $\pm$ 0,004                                      | 3,60 $\pm$ 0,45    |

Segundo Adersen *et al.* (2006) determinados compostos presentes nos óleos essenciais também podem ser extraídos com metanol, o que pode explicar a elevada actividade exibida pelo extracto metanólico. Os valores de IC<sub>50</sub> da Galantamina obtidos para a AChE foram da mesma ordem de grandeza dos obtidos por Ingkaninan *et al.* (2003) comprovando a reprodutibilidade do método. Embora para muitos autores a relevância da BuChE no melhoramento do sistema colinérgico seja bastante

controversa, a inibição da acção desta enzima é importante para o aumento dos níveis de ACh no cérebro. No que respeita ao papel da AChE a opinião é unânime. Os resultados obtidos demonstram que *L. viridis* é um excelente candidato ao tratamento da DA, no que diz respeito ao melhoramento do sistema colinérgico.

#### **6.4. Inibição *ex vivo* das enzimas AChE e BuChE**

Os resultados obtidos com a espécie *L. viridis in vitro* foram bastante encorajadores e, por isso, avançou-se com esta espécie para os testes *in vivo*. Embora seja do maior interesse o estudo *in vivo* dos efeitos de ambos, do óleo essencial e do extracto metanólico, nesta fase inicial optou-se por testar o extracto metanólico pela facilidade da sua dissolução em PBS o que facilitou a sua administração nos ratinhos.

Os melhores resultados foram obtidos com a fracção SD e em animais tratados com 50 mg.Kg<sup>-1</sup> de extracto metanólico (Tabela 6), com percentagens de inibição de 64,63 ± 16,47 e 90,57 ± 4,80 % para as enzimas AChE e BuChE, respectivamente. Este resultado aponta para que o maior número de compostos presentes no extracto mais concentrado (100 mg.Kg<sup>-1</sup>) anulem o efeito de outros que noutras condições seriam, talvez, mais activos. Após 120 min da administração de Galantamina os valores de inibição foram inferiores para ambas as fracções e em ambas as enzimas, quando comparados com os obtidos com a aplicação de 50 mg.Kg<sup>-1</sup> de extracto. A concentração de Galantamina testada (5 mg.Kg<sup>-1</sup>) foi seleccionada com base no estudo de Geerts *et al.* (2005). Embora não se possa fazer uma comparação directa entre os resultados obtidos com a Galantamina e o extracto, visto tratar-se de um composto puro e um extracto bruto, respectivamente, testados a concentrações diferentes, verificou-se que os valores de inibição obtidos com a Galantamina são inferiores. Este resultado parece indicar que o extracto metanólico mantém a sua actividade por um período de tempo superior, condição importante no tratamento da DA. Geerts *et al.* (2005) referem que a Galantamina tem um efeito máximo na actividade enzimática, aproximadamente, 30 min após administração. Efectivamente, pouco tempo após a administração de Galantamina, os animais ficaram praticamente imóveis, recuperando o seu estado normal ao longo dos 120 min. Este grupo de animais foi o único que apresentou alteração de comportamento após administração intraperitoneal.

**Tabela 6.** Efeito do extracto metanólico e Galantamina na actividade das enzimas AChE e BuChE, após 120 min da administração intraperitoneal. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 repetições.

|                            |                         | % Inibição       |                   |                   |                   |
|----------------------------|-------------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                            |                         | AChE             |                   | BuChE             |                   |
| Tratamento                 |                         | SS               | SD                | SS                | SD                |
| <b>Extracto metanólico</b> | 50 mg.Kg <sup>-1</sup>  | ni               | 64,63 $\pm$ 16,47 | 41,28 $\pm$ 21,69 | 90,57 $\pm$ 4,80  |
|                            | 100 mg.Kg <sup>-1</sup> | 10,24 $\pm$ 5,15 | 37,22 $\pm$ 3,39  | ni                | 63,69 $\pm$ 18,17 |
| <b>Galantamina</b>         | 5 mg.Kg <sup>-1</sup>   | 13,03 $\pm$ 6,88 | 43,90 $\pm$ 28,68 | 21,70 $\pm$ 4,50  | 44,47 $\pm$ 6,65  |

ni- não inibiu

No geral, a actividade da BuChE foi mais afectada pelas duas concentrações de extracto, bem como pelo controlo positivo. Esta enzima representa apenas 20% da actividade colinesterásica no cérebro (Giacobini, 2004), o que poderá significar que a quantidade de extracto que possivelmente atingiu o cérebro foi suficiente para a elevada inibição desta enzima. Relativamente às fracções, foi na SD que se registaram os valores mais elevados de inibição enzimática em todos os casos. Estes resultados são concordantes com trabalhos similares (Papandreou *et al.*, 2009). De acordo com Rieger & Vigny (1976) a fracção solúvel em sal (SS) e em detergente (SD) contém essencialmente as isoformas G1 e G4, respectivamente. Segundo o estudo de Das *et al.* (2005) a isoforma G4 da enzima AChE presente no hipocampo parece ter um papel activo na memória e aprendizagem e consideram-na como um alvo molecular interessante no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para a DA. Se a actividade da isoforma G4 de ambas as enzimas foi a mais afectada neste trabalho, tal facto poderá apontar o extracto metanólico como um possível agente terapêutico no que respeita à melhoria da função cognitiva.

Há que salientar que elevados níveis de inibição de ChEs não significam forçosamente melhor performance cognitiva. As enzimas AChE e BuChE existem em várias regiões do cérebro, algumas com baixo envolvimento no sistema colinérgico, tais como a substância nigra e cerebelo (Silman & Sussman, 2005). Neste estudo, o homogeneizado do tecido cerebral não resultou de áreas seleccionadas com base no seu envolvimento na função colinérgica, mas o cérebro como um todo. Existem

determinados factores que podem, de alguma forma, interferir com os resultados. Perry e colaboradores (2002) apontam a possibilidade de uma sobreprodução de AChE por parte dos cérebros de ratinhos saudáveis, para compensar a inibição enzimática. Além disso, não há garantias de que são os constituintes bioactivos do extracto vegetal testado a atingir o cérebro do ratinho ou se estes são metabolizados antes de atingir o cérebro e são os metabolitos resultantes os responsáveis pela inibição da AChE e BuChE. Neste estudo, também não houve a oportunidade de averiguar quais as áreas do cérebro nas quais o extracto metanólico actuou. Para o cabal esclarecimento destas dúvidas serão necessários outros estudos, por exemplo, histológicos e análises de actividade enzimática, que estabeleçam a distribuição do extracto nas diferentes regiões do cérebro e que determinem quais os compostos ou metabolitos que conseguem, efectivamente, atravessar a barreira hemato-encefálica (Perry *et al.*, 2002). Também teria sido interessante avaliar a capacidade inibidora do extracto na corrente sanguínea e após vários períodos de administração, no sentido de averiguar se a inibição é reversível à semelhança da Galantamina (Chattipakorn *et al.*, 2007).

O que se testou neste estudo foi o extracto total, ou seja, avaliou-se a actividade de uma série de compostos, que juntos podem aumentar o poder de inibição ou, pelo contrário, camuflar a actividade de compostos que, isolados seriam mais activos. Futuramente será interessante avaliar primeiramente qual a composição química do extracto metanólico, seguidamente identificar qual ou quais os compostos responsáveis pela diminuição dos níveis das ChEs. Tal como acima indicado, são igualmente necessários estudos que estabeleçam a distribuição do extracto no cérebro e que determinem quais os compostos ou metabolitos que conseguem chegar ao cérebro (Perry *et al.*, 2002). Com base numa pesquisa na base de dados *ISI Web Knowledge*, não há registos de estudos que comprovem a importância desta espécie no tratamento da DA. Assim, este estudo mostra, pela primeira vez, o valor da espécie *L. viridis* como potencial agente terapêutico da DA.

Resumindo, os extractos metanólicos das espécies *L. viridis* e *Q. suber* e o óleo de *L. viridis* revelaram-se como potenciais inibidores de ChEs *in vitro*. Relativamente aos ensaios *ex vivo*, o extracto metanólico de *L. viridis* apresentou resultados encorajadores. No geral, os extractos metanólicos apresentaram melhores resultados,

indicando que os compostos bioactivos são mais solúveis em solventes orgânicos polares.

A análise dos resultados deve ser cuidadosa, em primeiro lugar porque a constituição da maioria dos extractos é desconhecida, e depois porque não foi realizado qualquer teste com o objectivo de identificar falsos-positivos. Com base no método colorimétrico de Ellman *et al.* (1961) foram avaliados possíveis inibidores de ChEs. Todavia, Wang *et al.* (2007) referem que este método não distingue que tipo de reacção é inibida pela amostra, se a reacção enzimática se a reacção química entre o DTNB e a tiocolina, podendo formar falsos-positivos. Futuramente será necessário esclarecer este assunto usando, por exemplo, o método descrito por Rhee *et al.* (2003), especialmente para os extractos que permitiram os melhores resultados. No que respeita aos resultados da inibição enzimática *ex vivo* há que ter em atenção a preliminariedade dos testes. O número de animais testados por grupo (n=3) foi reduzido o que deve ser tido em conta na interpretação dos resultados obtidos. Para além disso, a variação do peso dos animais, bem como as idades (25-30 g e 4-6 meses, respectivamente), factores extremamente importantes, obrigam a cuidados reforçados aquando da análise dos resultados. Por outro lado, não se sabe até que ponto a injeção provocou algum tipo de stress nos animais que interfira com os resultados.

O reino das plantas proporciona uma imensidão de compostos biologicamente activos. Plantas como *Physostigma venenosum*, *Ginkgo Biloba*, *Huperzia serrata* e *Galanthus nivalis* são exemplos das cerca de 500000 espécies que provavelmente contêm compostos relevantes para o tratamento da DA (Mantle *et al.*, 2000). Os alcalóides são conhecidos pelo elevado potencial na inibição das ChEs e inúmeros estudos têm vindo a confirmar a importância destes compostos (Adersen *et al.*, 2006; Mukherjee *et al.*, 2007). Contudo, os efeitos tóxicos associados aos alcalóides orientaram a pesquisa para produtos naturais não-alcalóides (Hostettmann *et al.*, 2006). A maioria dos compostos não-alcalóides presentes nas plantas são terpenóides. Os monoterpenos e sesquiterpenos por exemplo são relevantes na atenuação dos sintomas típicos da DA (Hostettmann *et al.*, 2006). Os terpenóides são muitas vezes os constituintes maioritários dos óleos essenciais (Hostettmann *et al.*, 2006) e o caso do óleo de *L. viridis* não é excepção. Para além destes, polifenóis, incluindo flavonóides também têm dado provas quanto à sua capacidade de reduzir a acção das enzimas AChE e BuChE (Oinonen *et al.*, 2006; Jung & Park, 2007). As regiões importantes de um inibidor colinesterásico aparentam ter um átomo de azoto carregado positivamente,

situação típica nos alcalóides. Contudo, as propriedades demonstradas por compostos não-alcalóides revelam que a ausência de um átomo de azoto na estrutura, não é factor limitante para a inibição das ChEs. Ainda assim, a relação entre as enzimas e estes compostos não está bem estudada (Houghton & Howes, 2005).

A DA é uma doença multifactorial e, por isso, agentes terapêuticos com mais do que uma propriedade serão de interesse acrescido. Como já foi dito, os radicais livres têm um papel activo no progresso da DA (Markesbery, 1997; Mantle *et al.*, 2000). A vulnerabilidade do cérebro ao stress oxidativo torna os antioxidantes agentes relevantes no controlo dos radicais livres. A actividade do extracto metanólico de *L. viridis* é duplamente importante para a terapia da doença, pois para além de inibir as enzimas AChE e BuChE *in vitro* e *ex vivo*, também demonstrou actividade antioxidante, o que o torna realmente importante no tratamento desta doença. Ao actuar como composto antioxidante, este extracto pode prevenir a acumulação do péptido A $\beta$  (constituente maioritário das placas senis), que segundo muitos autores se encontra associada ao stress oxidativo (Behl, 1997). Outras espécies, nomeadamente a *C. albidus* e *Q. suber* são particularmente interessantes para a DA, pela elevada acção antioxidante, talvez devido à presença de flavonóides na sua composição química, nomeadamente, quercetina. O Fe é um metal que contribui para o aumento do stress oxidativo no cérebro *via* acumulação do péptido A $\beta$  e a quercetina já provou que tem capacidade de se complexar com iões metálicos originando espécies neutras ou mais estáveis (Nijveldt *et al.*, 2001) contribuindo, desta forma, para a prevenção de vários danos biológicos.

## 7. Conclusão e Perspectivas Futuras

A realização desta dissertação teve como principal objectivo avaliar o potencial das espécies *C. albidus*, *D. lusitanicum*, *L. viridis*, *Q. suber*, *R. ponticum* subsp. *baeticum* e *R. aculeatus* como fontes naturais de antioxidantes e inibidores enzimáticos relevantes para o tratamento da Diabetes *mellitus* tipo 2 e Doença de Alzheimer.

A metodologia adoptada para avaliar a actividade antioxidante permitiu identificar as espécies *C. albidus* e *Q. suber* como as fontes mais promissoras de compostos antioxidantes, e as espécies *D. lusitanicum* e *L. viridis*, nomeadamente, o extracto hexânico e o óleo, respectivamente, como as menos eficientes na neutralização dos radicais  $ABTS^{\bullet+}$  e peróxido. De todos os solventes extractantes utilizados o metanol foi o mais adequado para este ensaio por apresentar, na maioria das vezes, os melhores resultados, sugerindo que a solubilidade das substâncias bioactivas destas espécies aumenta em solventes orgânicos polares. Foi através do método ORAC que se registaram os níveis de actividade antioxidante mais eminentes, o que sugere que a maioria dos compostos antioxidantes presentes no material vegetal tem preferência por um mecanismo baseado na transferência de um hidrogénio (HAT). Relacionando o teor em compostos fenólicos, quantificado pelo método F-C, e a actividade antioxidante, tudo indica que os compostos fenólicos são os principais responsáveis pela acção antioxidante evidenciada. Os resultados foram suficientemente positivos ao ponto de justificar trabalhos futuros incidindo sobretudo nos seguintes pontos:

- Caracterização e isolamento do composto ou compostos bioactivos, o que permitirá compreender melhor os mecanismos de reacção;
- Avaliação da actividade antioxidante com base em outros métodos, dada a complexidade dos compostos antioxidantes, a diversidade de radicais livres, ou ainda, a especificidade de cada método;
- Estudo de diferentes solventes extractantes e métodos de extracção, como extracção assistida por microondas e extracção com fluidos supercríticos.

Ambos os extractos aquoso e metanólico das espécies *C. albidus*, *Q. suber*, *R. aculeatus* e o extracto metanólico de *R. ponticum* subsp. *baeticum* revelaram interesse farmacológico, pela capacidade de atenuar a actividade de enzimas relevantes na regulação da Dmt2. Os extractos metanólicos mostraram-se mais efectivos na inibição da  $\alpha$ -APP, os aquosos inibiram mais a acção da enzima  $\alpha$ -GIR, e a actividade da  $\alpha$ -GL

foi afectada por ambos. O extracto hexânico e o óleo essencial das espécies *D. lusitanicum* e *L. viridis*, respectivamente, não apresentaram valores de inibição consideráveis para nenhuma das três enzimas. O extracto aquoso de *C. albidus* é um forte candidato ao controlo dos níveis de glicémia pós-prandial, por inibir moderadamente a  $\alpha$ -APP e fortemente as enzimas  $\alpha$ -GL e  $\alpha$ -GIR. Esta é uma condição essencial na qualificação de um bom agente terapêutico da Dmt2, dado que a inibição excessiva de  $\alpha$ -amilase poderia provocar alterações indesejadas na fermentação bacteriana dos hidratos de carbono no cólon. A acção da  $\alpha$ -GL foi, geralmente, mais inibida que a da  $\alpha$ -GIR. Geralmente, o extracto inibidor da  $\alpha$ -glucosidase de origem microbiana não foi eficiente na inibição da acção da  $\alpha$ -glucosidase de origem animal, provavelmente, devido à diferença ao nível do reconhecimento molecular no centro activo destas enzimas. Os polifenóis, incluindo os flavonóides quercetina e luteolina, os taninos, e as saponinas esteróidais, poderão estar na origem da actividade exibida por alguns extractos.

Finalmente, com base no método colorimétrico Ellman *et al.* (1961), foi possível avaliar o contributo das mesmas espécies no tratamento da DA, mais concretamente ao nível do sistema colinérgico, pela inibição da AChE e BuChE *in vitro*, e *ex vivo* apenas no caso da espécie *L. viridis*. Os resultados foram positivos, com todas as espécies a apresentarem inibição face à actividade das duas enzimas, embora geralmente, os valores mais elevados tenham correspondido à maior concentração. Uma vez mais, os resultados mais interessantes obtidos nos testes *in vitro*, para ambas as enzimas, foram alcançados pelo extracto metanólico. A espécie *L. viridis* foi a que se revelou mais eficaz no aumento dos níveis de acetilcolina, pela inibição das enzimas AChE e BuChE *in vitro*. Polifenóis e monoterpenos poderão contribuir para as elevadas actividades exibidas neste ensaio. Relativamente aos testes *ex vivo* a actividade das enzimas AChE e BuChE foi afectada pelo extracto metanólico de *L. viridis*. O extracto foi mais eficiente na concentração de 50 mg.Kg<sup>-1</sup> que na concentração de 100 mg.Kg<sup>-1</sup>, possivelmente devido a interacções comprometedoras entre compostos. Contrariamente aos resultados *in vitro*, aqui o extracto metanólico reduziu mais a acção da BuChE, o que sugere diferenças nos mecanismos *in vitro* e *in vivo*. A fracção SD, que contém essencialmente a isoforma G4, foi a que permitiu os melhores resultados em todos os casos. Tendo em conta que a isoforma G4 tem sido sugerida como um alvo molecular no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, e o seu envolvimento em funções

cognitivas, como a memória e aprendizagem, os resultados obtidos são bastante encorajadores. Embora este estudo tenha contribuído positivamente para a avaliação da actividade biológica do extracto metanólico de *L. viridis*, a continuidade nesta investigação é de todo o interesse e deve incidir sobretudo nos seguintes pontos:

- Estudo exaustivo quanto à identificação de qual ou quais os compostos com potencial terapêutico;
- Realização de testes que detectem falsos-positivos, frequentes no teste de Ellman *et al.* (1961);
- Seria vantajoso que no futuro fossem concretizados testes que avaliassem a actividade neuroprotectora dos extractos que apresentaram maior actividade antioxidante;
- Relativamente aos testes *ex vivo*, após identificação dos compostos bioactivos, perceber quais os compostos ou metabolitos que, efectivamente, chegam ao cérebro e determinar quais as áreas do cérebro onde actuam, aplicando, por exemplo, análises de actividade enzimática, técnicas histológicas, imunocitoquímicas e de biologia molecular;
- Estudar outras técnicas de extracção das fracções provenientes do tecido cerebral, por exemplo, com alteração do detergente Triton X-100;
- Evitar variações de idade e peso dos animais, para que os resultados possam ser discutidos com maior segurança.

Em conclusão, os extractos aquoso e metanólico das espécies *C. albidus* e *Q. suber*, e os extractos metanólicos das espécies *L. viridis* e *R. ponticum* subsp. *baeticum* demonstraram actividade antioxidante e perfil terapêutico tanto no tratamento da Dmt2 como da DA. Com base no contributo indiscutível dos antioxidantes na prevenção de ambas as doenças, estes resultados corroboram a importância dos extractos em termos de aplicações farmacológicas. O óleo essencial de *L. viridis* apresentou os valores mais baixos de actividade antioxidante e praticamente não inibiu as enzimas  $\alpha$ -APP,  $\alpha$ -GL e  $\alpha$ -GIR. Contudo, foi o melhor inibidor da AChE e BuChE *in vitro*. Relativamente ao extracto metanólico de *L. viridis*, para além da actividade antioxidante que demonstrou, revelou ainda bons níveis de inibição da AChE e BuChE *ex vivo*.

## 8. Referências Bibliográficas

Abad MJ, Bermejo P, Villar A, Sanchez Palomino S, Carrasco L (1997). Antiviral activity of medicinal plant extracts. *Phytotherapy Research* 11: 198-202.

Achenbach P, Bonifacio E, Koczwara K, Ziegler AG (2005). Natural history of type 1 diabetes. *Diabetes* 54: 25-31.

Adsersen A, Gauguin B, Gudiksen L, Jäger AK (2006). Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology* 104: 418-422.

Afonso MLR (1991). Plantas do Algarve. Serviço Nacional de Parques, Reservas e Conservação da Natureza. Lisboa.

Ainsworth EA, Gillespie KM (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols* 2: 875-877.

Alexandra E, Helge B (2004). Comparison of native and invasive *Rhododendron ponticum* populations: growth, reproduction and morphology under field conditions. *Flora* 199: 120-133.

Ali H, Houghton PJ, Soumyanath A (2006).  $\alpha$ -Amylase inhibitory of some Malaysian plants used to treat Diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *Journal of Ethnopharmacology* 107: 449-455.

Anekonda TS, Reddy PH (2005). Can herbs provide a new generation of drugs for treating Alzheimer's disease?. *Brain Research Reviews* 50: 361-376.

Ani V, Naidu KA (2008). Antihyperglycemic activity of polyphenolic components of black/bitter cumin *Centratherum anthelminticum* (L.) Kuntze seeds. *European Food Research and Technology* 226: 897-903.

Apostolidis E, Kwon Y-I, Shetty K (2007). Inhibitory potential of herb, fruit, and fungal-enriched cheese against key enzymes linked to type 2 Diabetes and hypertension. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8: 46-54.

Atack JR, Perry EK, Bonham JR, Candy JM, Perry RH (1986). Molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the aged human central nervous system. *Journal of Neurochemistry* 47: 263-277.

- Attaguile G, Russo A, Campisi A, Savoca F, Acquaviva R, Ragusa N, Vanella A (2000). Antioxidant activity and protective effect on DNA cleavage of extracts from *Cistus incanus* L. and *Cistus monspeliensis* L. *Cell Biology and Toxicology* 16: 83-90.
- Attaguile G, Perticone G, Mania G, Savoca F, Pennisi G, Salomone S (2004). *Cistus incanus* and *Cistus monspeliensis* inhibit the contractile response in isolated rat smooth muscle. *Journal of Ethnopharmacology* 92: 245-250.
- Awika JM, Rooney LW, Wu XL, Prior RL, Cisneros-Zevallos L (2003). Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 6657-6662.
- Bailey CJ, Day C (1989). Traditional plant medicines as treatments for Diabetes. *Diabetes Care* 12: 553-564.
- Bartus RT, Dean RL, Beer B, Lippa AS (1982). The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217: 408-414. IN White KG, Ruske AC (2002). Memory deficits in Alzheimer's disease: the encoding hypothesis and cholinergic function. *Psychonomic Bulletin & Review* 9: 426-437.
- Baynes JW (1991). Role of oxidative stress in development of complications in Diabetes. *Diabetes* 40: 405-412.
- Behl C (1997). Amyloid  $\beta$ -protein toxicity and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Cell and Tissue Research* 290: 471-480.
- Bell GI, Horita S, Karam JH (1984). A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent Diabetes mellitus. *Diabetes* 33: 176-183. IN Reimann M, Bonifacio E, Solimena M, Schwarz PEH, Ludwig B, Hanefeld M, Bornstein SR (2009). An update on preventive and regenerative therapies in Diabetes mellitus. *Pharmacology & Therapeutics* 121: 317-331.
- Benzi G, Moretti A (1998). Is there a rationale for the use of acetylcholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer's disease?. *European Journal of Pharmacology* 346: 1-13.
- Berg D, Youdim MBH, Riederer P (2004). Redox imbalance. *Cell and Tissue Research* 318: 201-213.

- Bhandari MR, Jong-Anurakkun N, Hong G, Kawabata J (2008).  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitory activities of Nepalese medicinal herb Pakhanbhed (*Bergenia ciliata*, Haw.). *Food Chemistry* 106: 247-252.
- Blokland A (1996). Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? *Brain Research Reviews* 21: 285-300.
- Boelens MH (1995). Chemical and sensory evaluation of *Lavandula* oils. *Perfumer & Flavorist* 20: 23-51. IN Nogueira JMF, Romano A (2002). Essential oils from micropropagated plants of *Lavandula viridis*. *Phytochemical Analysis* 13: 4-7.
- Bonnefont-Rousselot D, Bastard JP, Jaudon Mc, Delattre J (2000). Consequences of the Diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. *Diabetes & Metabolism* 26: 163-176.
- Bouamama H, Noël T, Villard J, Benharref A, Jana M (2006). Antimicrobial activities of the leaf extracts of two Moroccan *Cistus* L. species. *Journal of Ethnopharmacology* 104: 104-107.
- Brownlee M, Cerami A (1981). The biochemistry of the complications of Diabetes mellitus. *Annual Review Biochemistry* 50: 385-432. IN Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39: 44-84.
- Brühlmann C, Marston A, Hostettmann K, Carrupt P-A, Testa B (2004). Screening of non-alkaloidal natural compounds as acetylcholinesterase inhibitors. *Chemistry & Biodiversity* 1: 819-829.
- Budzianowski J, Budzianowska A, Kromer K (2002). Naphthalene glucoside and other phenolics from the shoot and callus cultures of *Drosophyllum lusitanicum*. *Phytochemistry* 61: 421-425.
- Butterfield DA, Drake J, Pocernich C, Castegna A (2001). Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid  $\beta$ -peptide. *Trends in Molecular Medicine* 7: 548-554.
- Büyükokuroğlu ME, Gepdiremen A, Hacimüftüoğlu A, Oktay M (2003). The effects of aqueous extract of *Lavandula angustifolia* flowers in glutamate-induced neurotoxicity of cerebellar granular cell culture of rat pups. *Journal of Ethnopharmacology* 84: 91-94.

- Cao G, Alessio HM, Cutler RG (1993) Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine* 14: 303-311.
- Cao G, Prior RL (1998). Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical Chemistry* 44: 1309-1315.
- Capasso R, Izzo AA, Pinto L, Bifulco T, Vitobello C, Mascolo N (2000). Phytotherapy and quality of herbal medicines. *Fitoterapia* 71: 58-65.
- Carpinella MC, Androne DG, Ruiz G, Palacios SM (2009). Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plant extracts from Argentina. *Phytotherapy Research* (em impressão)
- Castells E, Peñuelas J, Valentine DW (2004). Are phenolic compounds released from the Mediterranean shrub *Cistus albidus* responsible for changes in N cycling in siliceous and calcareous soils?. *New Phytologist* 162: 187-195.
- Cavanagh HMA, Wilkinson JM (2002). Biological activities of Lavender essential oil. *Phytotherapy Research* 16: 301-308.
- Chatonnet A, Lockridge O (1989). Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochemistry Journal* 260: 625-634.
- Chattipakorn S , Pongpanparadorn A, Pratchayasakul W, Pongchaidacha A, Ingkaninan K, Chattipakorn N (2007). *Tabernaemontana divaricata* extract inhibits neuronal acetylcholinesterase activity in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 110: 61-68.
- Checker R, Sharma D, Sandur SK, Khanam S, Poduval TB (2009). Anti-inflammatory effects of plumbagin are mediated by inhibition of NF-kappaB activation in lymphocytes. *International Immunopharmacology* 9: 949-958.
- Coquet C, Ferré E, Peyronel D, Dal Farra C, Farnet AM (2008). Identification of new molecules extracted from *Quercus suber* L. cork. *Comptes Rendus Biologies* 331: 853-858.
- Cordeiro N, Belgacem MN, Silvestre AJD, Neto CP, Gandini A (1998). Cork suberin as a new source of chemicals. 1. Isolation and chemical characterization of its composition. *International Journal of Biological Macromolecules* 22: 71-80.
- Das A, Dikshit M, Nath C (2005). Role of molecular isoforms of acetylcholinesterase in learning and memory functions. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 81: 89-99.

Decreto de Lei n.º 364/71 de 25 de Agosto, *Diário da República* n.º 200-1.ª Série. Ministério da Economia - Secretaria de Estado da Agricultura, Direcção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas.

De Pascual TJ *et al.* (1978). Componentes de *C. albidus* L.. *Anales de Química* 74: 345-350. IN Robles C, Garzino S (1998). Essential oil composition of *Cistus albidus* leaves. *Phytochemistry* 48: 1341-1345.

Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T (2000). Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Journal of Hypertension* 18: 655-673. IN Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39: 44-84.

Di Lazzaro A, Morana A, Schiraldi C, Martino A, Ponzzone C, De Rosa M (2001). An enzymatic process for the production of the pharmacologically active glycoside desglucodesrhamnoruscin from *Ruscus aculeatus* L. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11: 307-314.

Didry N, Dubreuil L, Trotin F, Pinkas M (1998). Antimicrobial activity of aerial parts of *Drosera peltata* Smith on oral bacteria. *Journal of Ethnopharmacology* 60: 91-96.

Dimas K, Demetzos C, Angelopoulou D, Kolokouris A, Mavromoustakos T (2000). Biological activity of myricetin and its derivatives against human leukemic cell lines *in vitro*. *Pharmacological Research* 42: 475-478.

Dohi S, Terasaki M, Makino M (2009). Acetylcholinesterase inhibitory activity and chemical composition of commercial essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 4313-4318.

Dreher D, Junod AF (1996). Role of oxygen free radicals in cancer development. *European Journal of Cancer* 32A: 30-38.

Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7: 88-95 IN Orhan I, Aslan S, Kartal M, Şener B, Başer KHC (2008). Inhibitory effect of Turkish *Rosmarinus officinalis* L. on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes. *Food Chemistry* 108: 663-668.

- Erdemoglu N, Küpeli E, Yeşilada E (2003). Anti-inflammatory and antinociceptive activity assessment of plants used as remedy in Turkish folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 89: 123-129.
- Felician O, Sandson TA (1999). The neurobiology and pharmacotherapy of Alzheimer's disease. *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* 11: 19-31.
- Ferreira A, Proença C, Serralheiro MLM, Araújo MEM (2006). The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology* 108: 31-37.
- Floyd RA, Hensley K (2002). Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiology of Aging* 23: 795-807.
- Folin O, Ciocalteu V (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Journal of Biological Chemistry* 73: 627-650.
- Foulis AK, McGill M, Farquharson MA (1991). Insulinitis in type 1 (insulin dependent) Diabetes *mellitus* in man-macrophages, lymphocytes, and interferon- $\gamma$  containing cells. *Journal of Pathology* 165: 97-103.
- Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK (1999). The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 66:137-147.
- Franco D, Sineiro J, Rubilar M, Sánchez M, Jerez M, Pinelo M, Costoya N, Núñez MJ (2008). Polyphenols from plant materials: extraction and antioxidant power. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 7: 3210-3216.
- Franco JA (1971). Nova flora de Portugal Continente e Açores. Volume I. Sociedade de Astória, Lda. Lisboa.
- Frank B, Gupta S (2005). A review of antioxidants and Alzheimer's disease. *Annals of Clinical Psychiatry* 17: 269-286.
- Frankel E, Meyer A (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 1925-1941.

- Frankel EN, Finley JW (2008). How to standardize the multiplicity of methods to evaluate natural antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 4901-4908.
- Fukuda T, Ito H, Yoshida T (2004). Effect of the walnut polyphenol fraction on oxidative stress in type 2 Diabetes mice. *BioFactors* 21: 251-253.
- Gao H, Kawabata J (2005).  $\alpha$ -Glucosidase inhibition of 6-hydroxyflavones. Part 3: Synthesis and evaluation of 2,3,4-trihydroxybenzoyl-containing flavonoid analogs and 6-aminoflavones as  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13: 1661-1671.
- Geerts H, Guillaumat P-O, Grantham C, Bode W, Anciaux K, Sachak S (2005). Brain levels and acetylcholinesterase inhibition with galantamine and donepezil in rats, mice, and rabbits. *Brain Research* 1033: 186-193.
- Gelmez N, Kincal NS, Yener ME (2009). Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of antioxidants from roasted wheat germ based on yield, total phenolic and tocopherol contents, and antioxidant activities of the extracts. *Journal of Supercritical Fluids* 48: 217-224.
- Gerich JE (2003). Clinical significance, pathogenesis, and management of postprandial hyperglycemia. *Archives of Internal Medicine* 163: 1306-1316.
- Giacobini E (2004). Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. *Pharmacological Research* 50: 433-440.
- Gillespie KM, Chae JM, Ainsworth EA (2007). Rapid measurement of total antioxidant capacity in plants. *Nature Protocols* 2: 867-870.
- Goldstein BJ (2007). Clinical translation of “a diabetes outcome progression trial”: ADOPT appropriate combination oral therapies in type 2 Diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 92: 1226-1228.
- Gonçalves S, Quintas C, Gaspar MN, Nogueira JMF, Romano A (2009). Antimicrobial activity of *Drosophyllum lusitanicum*, an endemic Mediterranean insectivorous plant. *Natural Product Research* 23: 219-229.
- Gottwald MD, Rozanski RI (1999). Rivastigmine a brain region selective acetylcholinesterase inhibitor for treating Alzheimer’s disease: review and current status. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 8: 1673-1682.

- Grevenstuk T, Gonçalves S, Nogueira JMF, Romano A (2008). Plumbagin recovery from field specimens of *Drosophyllum lusitanicum* (L.) Link. *Phytochemical Analysis* 19: 229-235.
- Grevenstuk T, Gonçalves S, Almeida S, Coelho N, Quintas C, Gaspar MN, Romano A (2009). Evaluation of the antioxidant and antimicrobial properties of *in vitro* cultured *Drosera intermedia* extracts. *Natural Product Communications* 4: 1-6.
- Grigonis D, Venskutonis PR, Sivik B, Sandahl M, Eskilsson CS (2005). Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass (*Hierochloë odorata*). *Journal of Supercritical Fluids* 33: 223-233.
- Grover JK, Yadav S, Vats V (2002). Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. *Journal of Ethnopharmacology* 81: 81-100.
- Guenther E (1952). *The essential oils*, Vol. 6. D. Van Nostrand Co., New York, pp. 45-52.
- IN Sánchez de Rojas VR, Ortega T, Villar A (1995). Inhibitory effects of *Cistus populifolius* on contractile responses in the isolated rat duodenum. *Journal of Ethnopharmacology* 46: 59-62.
- Gurib-Fakim A (2006). Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* 27: 1-93.
- Güvenç A, Yılmaz S, Özkan AM, Erdurak CS, Coşkun M, Yılmaz G, Okuyama T, Okada Y (2005). Antimicrobiological studies on Turkish *Cistus*. species. *Pharmaceutical Biology* 43: 178-183.
- Hajhashemi V, Ghannadi A, Sharif B (2003). Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. *Journal of Ethnopharmacology* 89: 67-71.
- Halliwell B & Gutteridge JMC (1989). Free radicals in biology and medicine (2nd edn) Clarendon Press, Oxford. IN Sies H (1993). Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry* 215: 213-219.
- Halliwell B (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of Neurochemistry* 59: 1609-1623.
- Halliwell B (2000). Antioxidant paradox. *Lancet* 355: 1179-1180.

- Harvey AL (1995). The pharmacology of galanthamine and its analogues. *Pharmacology Therapeutic* 68: 113-128.
- Hasenah A, Houghton PJ, Soumyanath A (2006).  $\alpha$ -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat Diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *Journal of Ethnopharmacology* 107: 449-455.
- Hayouni EA, Abedrabba M, Bouix M, Hamdi M (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus Coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry* 105: 1126-1134.
- Ho IK & Ellman GL (1969). Triton solubilized acetylcholinesterase of brain. *Journal of Neurochemistry* 16: 1505-1513.
- Hollman PCH (2001). Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects?. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81: 842-852.
- Horii S, Fukasse K, Matsua T, Kameda K, Asano N, Masui Y (1987). Synthesis and  $\alpha$ -D-glucosidase inhibitory activity of N-substituted valiolamine derivatives as potent oral antidiabetic agents. *Journal of Medicinal Chemistry* 29: 1038-1046. IN Apostolidis E, Apostolidis E, Kwon Y-I, Shetty K (2007). Inhibitory potential of herb, fruit, and fungal-enriched cheese against key enzymes linked to type 2 Diabetes and hypertension. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 8: 46-54.
- Hostettmann K, Borloz A, Urbain A, Marston A (2006). Natural product inhibitors of acetylcholinesterase. *Current Organic Chemistry* 10: 825-847.
- Houghton PJ, Howes M-J (2005). Natural products and derivatives affecting neurotransmission relevant to Alzheimer's and Parkinson's disease. *Neurosignals* 14: 6-22.
- Huang D, Ou B, Prior RL (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assay. *Journal Agricultural and Chemistry* 53: 1841-1856.
- Ingkaninan K, Temkitthawon P, Chuenchom K, Yuyaem T, Thongnoi W (2003). Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *Journal of Ethnopharmacology* 89: 261-264.

- Ito H, Yamaguchi K, Kim T-H, Khennouf S, Gharzouli K, Yoshida T (2002). Dimeric and trimeric hydrolyzable tannins from *Quercus coccifera* and *Quercus suber*. *Journal of Natural Products* 65: 339-345.
- Ito N, Hirose M, Fukushima S, Tsuda H, Shirai T, Tatematsu M (1986). Studies on antioxidants: their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology* 24: 1071-1082. IN Li H-B, Wong C-C, Cheng K-W, Chen F (2008). Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT- Food Science and Technology* 41: 385-390.
- Johnson GW, Jenkins SM (1996). Tau protein in normal and Alzheimer's disease brain. *Alzheimer's Disease Review* 1: 38-54.
- Jung M, Park M, Lee HC, Kang Y-H, Kang EK, Kim SK (2006). Antidiabetic agents from medicinal plants. *Current Medicinal Chemistry* 13: 1203-1218.
- Jung M & Park M (2007). Acetylcholinesterase inhibition by flavonoids from *Agrimonia pilosa*. *Molecules* 12: 2130-2139.
- Juniper BE, Robins RJ, Joel DM (1989). The Carnivorous Plants. Academic Press, London. IN Budzianowska J, Budzianowska A, Kromerb K (2002). Naphthalene glucoside and other phenolics from the shoot and callus cultures of *Drosophyllum lusitanicum*. *Phytochemistry* 61: 421-425.
- Kandra L, Gyémánt G, Zajác Á, Batta G (2004). Inhibitory effects of tannin on human salivary  $\alpha$ -amylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 319: 1265-1271.
- Kaneto H, Kajimoto Y, Fujitani Y, Sakamoto K, Matsuhisa M, Yamasaki Y, Hori M (1999). Oxidative stress induces p21 expression in pancreatic islet cells: possible implication in beta-cell dysfunction. *Diabetologia* 42: 1093-1097.
- Kása P, Rakonczay Z, Gulya K (1997). The cholinergic system in Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology* 52: 511-535.
- Kashiwada Y, Yamazaki K, Ikeshiro Y *et al.* (2001). Isolation of rhododaurichromic acid B and the anti-HIV principles rhododaurich romonic acid A and rhododaurichromentic acids from *Rhododendron dauricum*. *Tetrahedron* 57: 1559-1563. IN Ullah F, Hussain H, Hussain J, Bukhari IA, Tareq M, Khan H, Choudhary MI, Gilani AH, Ahmad VU (2007). Tyrosinase inhibitory pentacyclic triterpenes and

analgesic and spasmolytic activities of methanol extracts of *Rhododendron collettianum*. *Phytotherapy Research* 21: 1076-1081.

Kashiwagi A, Asahina T, Ikebuchi M, Tanaka Y, Takagi Y, Nishio Y, Kikkawa R, Shigeta Y (1994). Abnormal glutathione metabolism and increased cytotoxicity caused by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in human umbilical vein endothelial cells cultured in high glucose medium. *Diabetologia* 37: 264-269. IN Rösen P, Nawroth PP, King G, Möller W, Tritschler HJ, Packer L (2001). The role of oxidative stress in the onset and progression of Diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 17: 189-212.

Katalinic V, Milos M, Kulisic T, Jukic M (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry* 94: 550-557.

Kelly CA, Harvey RJ, Cayton H (1997). Drug treatments for Alzheimer's disease. *British Medical Journal* 314: 693-694.

Khennouf S, Benabdallah H, Gharzouli K, Amira S, Ito H, Kim T-H, Yoshida T, Gharzouli A (2003). Effect of tannins from *Quercus suber* and *Quercus coccifera* leaves on ethanol-induced gastric lesions in mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 1469-1473.

Kim JS, Kwon C-S, Son KH (2000). Inhibition of alpha-glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid. *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry* 64: 2458-2461.

Klafki H-W, Staufenbiel M, Kornhuber J, Wiltfang J (2006). Therapeutic approaches to Alzheimer's disease. *Brain* 129: 2840-2855.

Koch AL (1981). Evolution of antibiotic resistance gene function. *Microbiological Reviews* 45: 355-378.

Kowluru RA, Abbas SN (2003). Diabetes-induced mitochondrial dysfunction in the retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 44: 5327-5334.

Krentz AJ, Bailey CJ (2005). Oral antidiabetic agents: current role in type 2 Diabetes mellitus. *Drugs* 65: 385-41. IN Apostolidis E, Kwon Y-I, Shetty K (2007). Inhibitory potential of herb, fruit, and fungal-enriched cheese against key enzymes linked to type 2 Diabetes and hypertension. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8: 46-54.

- Křižková L, Lopes MH, Polónyi J, Belicová A, Dobias J, Ebringer L (1999). Antimutagenicity of a suberin extract from *Quercus suber* cork. *Mutation Research* 446: 225-230.
- Kwon Y-I, Apostolidis E, Shetty K (2008). *In vitro* studies of eggplant (*Solanum melongena*) phenolics as inhibitors of key enzymes relevant for type 2 Diabetes and hypertension. *Bioresource Technology* 99: 2981-2988.
- Lee B, Jung K, Kim B-H (2009). Timosaponin AIII, a saponin isolated from *Anemarrhena asphodeloides*, ameliorates learning and memory deficits in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 93: 121-127.
- Lenhard JM, Gottschalk WK (2002). Preclinical developments in type II Diabetes. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54: 199-212.
- Li H-B, Wong C-C, Cheng K-W, Chen F (2008). Antioxidant properties *in vitro* and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT- Food Science and Technology* 41: 385-390.
- Li WL, Zheng HC, Bukuru J, De Kimpe N (2004). Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of Diabetes *mellitus*. *Journal of Ethnopharmacology* 92: 1-21.
- Liu RY, Wang GQ (1996). A survey on drugs synthesized for antidiabetes. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University* 13: 148-153. IN Li WL, Zheng HC, Bukuru J, De Kimpe N (2004). Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of Diabetes *mellitus*. *Journal of Ethnopharmacology* 92: 1-21.
- Longo L, Vasapollo G (2005). Determination of anthocyanins in *Ruscus aculeatus* L. Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 475-479.
- Mai TT, Chuyen NV (2007). Anti-hyperglycemic activity of an aqueous extract from flower buds of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry* 71: 69-76.
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition* 81: 243S-255S.

- Mantle D, Pickering AT, Perry EK (2000). Medicinal plant extracts for the treatment of dementia: a review of their pharmacology, efficacy and tolerability. *CNS Drugs* 13: 201-213.
- Markesbery WR (1997). Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radical Biology & Medicine* 23: 134-147.
- Mashour NH, Lin GI, Frishman WH (1998). Herbal medicine for the treatment of cardiovascular disease. *Archives of Internal Medicine* 158: 2225-2234.
- Massoulié J, Pezzementi L, Bon S, Krejci E, Vallette FM (1993). Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in Neurobiology* 41:31-91. IN Moral-Naranjo MT, Cabezas-Herrera J, Vidal CJ (1996). Molecular forms of acetyl- and butyrylcholinesterase in normal and dystrophic mouse brain. *Journal of Neuroscience Research* 43: 224-234.
- Mata AT, Proença C, Ferreira AR, Serralheiro MLM, Nogueira JMF, Araújo MEM (2007). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chemistry* 103: 778-786.
- Matés JM, Pérez-Gómez C, De Castro IN (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry* 32: 595-603.
- McGraw JB, Furedi MA (2005). Deer browsing and population viability of a forest understory plant. *Science* 307: 920-922. IN Anekonda TS, Reddy H (2005). Can herbs provide a new generation of drugs for treating Alzheimer's disease? *Brain Research Reviews* 50: 361-376.
- Mejías JA, Arroyo J, Ojeda F (2002). Reproductive ecology of *Rhododendron ponticum* (Ericaceae) in relict Mediterranean populations. *Botanical Journal of the Linnean Society* 140: 297-311.
- Mesulam M, Guillozet A, Shaw P, Quinn B (2002). Widely spread butyrylcholinesterase can hydrolyze acetylcholine in the normal and Alzheimer brain. *Neurobiology of Disease* 9: 88-93.
- Miller DM, Buettner GR, Aust SD (1990). Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free radical Biology & Medicine* 8: 95-108. IN Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and

antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39: 44-84.

Miller NJ, Rice-Evans CA, Davies MJ, Gopinathan V, Milner AA (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science* 84: 407-412.

Mimaki Y, Kuroda M, Kameyama A, Yokosuka A, Sashida Y (1998). Aculeoside B, a new bisdesmosidic spirostanol saponin from the underground parts of *Ruscus aculeatus*. *Journal of Natural Products* 6: 1279-1282.

Mukherjee PK, Kumar V, Mal M, Hought PJ (2007). Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine* 14: 289-300.

Nahálka J, Blanárik P, Gemeiner P, Matúsová E, Partlová I (1996). Production of plumbagin by cell suspension cultures of *Drosophyllum lusitanicum* Link. *Journal of Biotechnology* 49: 153-161.

Nahálka J, Nahálková J, Gemeiner P, Blanárik P (1998). Elicitation of plumbagin by chitin and its release into the medium in *Drosophyllum lusitanicum* Link suspension cultures. *Biotechnology Letters* 20: 841-845.

Newman BJ, Cragg GM, Snader KM (2000). The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Product Reports* 17: 215-234.

Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DEC, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PAM (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition* 74: 418-425.

Nogueira JMF, Romano A (2002). Essential oils from micropropagated plants of *Lavandula viridis*. *Phytochemical Analysis* 13: 4-7.

Oinonen PP, Jokela JK, Hatakka AI, Vuorela PM (2006). Linarin, a selective acetylcholinesterase inhibitor from *Mentha arvensis*. *Fitoterapia* 77: 429-434.

Oki T, Matsui T, Osajima Y (1999). Inhibitory effect of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors varies according to its origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 550-553.

Okuda T, Yoshida T, Hatano T (1992). Pharmacologically active tannins isolated from medicinal plants. *Basic Life Science* 59: 539-569. IN Ito H, Yamaguchi K, Kim T-H,

- Khenouf S, Gharzouli K, Yoshida T (2002). Dimeric and trimeric hydrolyzable tannins from *Quercus coccifera* and *Quercus suber*. *Journal of Natural Products* 65: 339-345.
- Orhan I, Şener B, Choudhary MI, Khalid A (2004). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 91: 57-60.
- Orhan I, Kartal M, Tosun F, Sener B (2007) Screening of various phenolic acids and flavonoid derivatives for their anticholinesterase potential. *Z Naturforsch C*. 62: 829-832.
- Orhan I, Aslan S, Kartal M, Şener B, K. Başer HC (2008). Inhibitory effect of Turkish *Rosmarinus officinalis* L. on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes. *Food Chemistry* 108: 663-668.
- Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior R (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 4619-4626.
- Paiva SR, Figueiredo MR, Aragão TV, Kaplan MAC (2003). Antimicrobial activity *in vitro* of plumbagin isolated from *Plumbago* species. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98: 959-961.
- Papandreou MA, Dimakopoulou A, Linardaki ZI, Cordopatis P, Klimis-Zacas D, Margarity M, Lamari FN (2009). Effect of a polyphenol-rich wild blueberry extract on cognitive performance of mice, brain antioxidant markers and acetylcholinesterase activity. *Behavioural Brain Research* 198: 352-358.
- Pereira H (1988). Chemical composition and variability of cork from *Quercus suber* L.. *Wood Science and Technology* 22: 211-218.
- Pérez-Jiménez J, Arranz S, Taberner M, Díaz- Rubio ME, Serrano J, Goñi I, Saura-Calixto F (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. *Food Research International* 41: 274-285.
- Perry NSL, Houghton PJ, Jenner P, Keith A, Perry EK (2002). *Salvia lavandulaefolia* essential oil inhibits cholinesterase *in vivo*. *Phytomedicine* 9: 48-51.
- Peschel W, Sánchez-Rabaneda F, Diekmann W, Plescher A, Gartzia I, Jiménez D, Lamuela-Raventós R, Buxaderas S, Codina C (2006). An industrial approach in the

search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry* 97: 137-150.

Pinelo M, Manzocco L, Nuñez MJ, Nicoli MC (2004). Solvent effect on quercetin antioxidant capacity. *Food Chemistry* 88: 201-207.

Pinto PCRO, Sousa AF, Silvestre AJD, Neto CP, Gandini A, Eckerman C, Holmbom B (2009). *Quercus suber* and *Betula pendula* outer barks as renewable sources of oleochemicals: a comparative study. *Industrial Crops and Products* 29: 126-132.

Praticò D, Delanty N (2000). Oxidative injury in diseases of the central nervous system: focus on Alzheimer's disease. *American Journal of Medicine* 109: 577-585.

Prior RL, Wu X, Schaich K (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 4290-4302.

Qa'dan F, Peterit F, Nahrstedt A (2003). Prodelphinidin trimers and characterization of a proanthocyanidin oligomer from *Cistus albidus*. *Pharmazie* 58: 416-419.

Rahimi R, Nikfar S, Larijani B, Abdollahi M (2005). A review on the role of antioxidants in the management of Diabetes and its complications. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 59: 365-373.

Ramassamy C (2006). Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *European Journal of Pharmacology* 545: 51-64.

Raskin I, Ribnicky DM, Komarnytsky S, Ilic N, Poulev A, Borisjuk N, Brinker A, Moreno DA, Ripoll C, Yakoby N, O'Neal JM, Cornwell T, Pastor I, Fridlender B (2002). Plants and human health in the twenty-first century. *TRENDS in Biotechnology* 20: 522-531.

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

Reimann M, Bonifacio E, Solimena M, Schwarz PEH, Ludwig B, Hanefeld M, Bornstein SR (2009). An update on preventive and regenerative therapies in Diabetes mellitus. *Pharmacology & Therapeutics* 121: 317-331.

- Rhee IK, van Rijn RM, Verpoorte R (2003). Qualitative determination of false-positive effects in the acetylcholinesterase assay using Thin Layer Chromatography. *Phytochemical Analysis* 14: 127-131.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* 2: 152-159.
- Rieger F, Vigny M (1976). Solubilization and physicochemical characterization of rat brain acetylcholinesterase: development and maturation of its molecular forms. *Journal of Neurochemistry* 27: 121-129.
- Robles C, Garzino S (1998). Essential oil composition of *Cistus albidus* leaves. *Phytochemistry* 48: 1341-1345.
- Rocha-Guzmán NE, Gallegos-Infante JA, González-Laredo RF, Reynoso-Camacho R, Ramos-Gómez M, Garcia-Gasca T, Rodríguez-Muñoz ME, Guzmán-Maldonado SH, Medina-Torres L, Lujan-García BA (2009). Antioxidant activity and genotoxic effect on HeLa cells of phenolic compounds from infusions of *Quercus resinosa* leaves. *Food Chemistry* 115: 1320-1325.
- Rösen P, Nawroth PP, King G, Möller W, Tritschler HJ, Packer L (2001). The role of oxidative stress in the onset and progression of Diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 17: 189-212.
- Saito N, Sakai H, Sekihara H, Yajima Y (1998). Effect of an alpha-glucosidase inhibitor (voglibose), in combination with sulphonylureas, on glycemic control in type 2 Diabetes patients. *Journal of International Medical Research* 26: 219-232.
- Salah N, Miller NJ, Paganga G, Tijburg L, Bolwell GP, Rice-Evans C (1995). Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 322: 339-346.
- Salunke DB, Hazra BG, Pore VS (2006). Steroidal conjugates and their pharmacological applications. *Current Medicinal Chemistry* 13: 813-847.
- Sánchez de Rojas VR, Ortega T, Villar A (1995). Inhibitory effects of *Cistus populifolius* on contractile responses in the isolated rat duodenum. *Journal of Ethnopharmacology* 46: 59-62.

- Savelev S, Okello E, Perry NSL, Wilkins RM, Perry EK (2003). Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 75: 661-668.
- Schmidt DD, Frommer W, Junge B, Müller L, Wingender W, Truscheit E (1977). New complex oligosaccharides of microbial origin. *Naturwissenschaften* 64: 535-536. IN Al Kazaz M, Desseaux V, Marchis-Mouren G, Prodanov E, Santimone M (1998). The mechanism of porcine pancreatic  $\beta$ -amylase inhibition of maltopentaose hydrolysis by acarbose, maltose and maltotriose. *European Journal of Biochemistry* 252: 100-107.
- Scott LJ, Goa KL (2000). Galantamine: a review of its use in Alzheimer's disease. *Drugs* 60: 1095-1122.
- Selkoe DJ (1996). Amyloid  $\beta$ -protein and the genetics of Alzheimer's disease. *Journal of Biological Chemistry* 271: 18295-18298.
- Shin K-S, Lee S, Cha B (2007). Antifungal activity of plumbagin purified from leaves of *Nepenthes ventricosa x maxima* against phytopathogenic fungi. *The Plant Pathology Journal* 23: 113-115.
- Shobana S, Sreerama YN, Malleshi NG (2009). Composition and enzyme inhibitory properties of finger millet (*Eleusine coracana* L.) seed coat phenolics: mode of inhibition of  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic amylase. *Food Chemistry* 115: 1268-1273.
- Sies H (1993). Strategies of antioxidant defense. *European Journal Biochemistry* 215: 213-219.
- Silman I, Sussman JL (2005). Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology* 5: 293-302.
- Singh I, Carey AL, Watson N, Febbraio MA, Hawley JA (2008). Oxidative stress-induced insulin resistance in skeletal muscle cells is ameliorated by gamma-tocopherol treatment. *European Journal of Nutrition* 47: 387-392.
- Singh S, Singh RP (2008). *In vitro* methods of assay of antioxidants: an overview. *Food Reviews International* 24: 392-415.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 29: 152-178. IN Wong SP, Leong LP, Koh JHW (2006).

Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry* 99: 775-783.

Spigno G, De Faveri DM (2009). Microwave-assisted extraction of tea phenols: a phenomenological study. *Journal of Food Engineering* 93: 210-217.

Srinivas P, Gopinath G, Banerji A, Dinakar A, Srinivas G (2004). Plumbagin induces reactive oxygen species, which mediate apoptosis in human cervical cancer cells. *Molecular Carcinogenesis* 40: 201-211.

Sultana B, Anwar F, Ashraf M (2009). Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules* 14: 2167-2180.

Sun T, Ho C (2005). Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chemistry* 90: 743-749.

Surampudi PN, John-Kalarickal J, Fonseca VA (2009). Emerging concepts in the pathophysiology of type 2 Diabetes mellitus. *Mount Sinai Journal of Medicine* 76: 216-226.

Szaleczky E, Prechl J, Fehér J, Somogyi J (1999). Alterations in enzymatic antioxidant defence in Diabetes mellitus - a rational approach. *Postgraduate Medicine* 75: 13-17.

Tadera K, Minami Y, Takamatsu K, Matsuoka T (2006). Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase by flavonoids. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 52: 149-153.

Talessa VN (2001). Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mechanisms of Aging and Development* 122: 1961-1969.

Taylor P, Radić Z (1994). The cholinesterases: from genes to proteins. *Annual Review Pharmacology Toxicology* 34: 281-320. IN Talessa VN (2001). Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mechanisms of Aging and Development* 122: 1961-1969.

Tiwari AK & Rao JM (2002). Diabetes mellitus and multiple therapeutic approaches of phytochemicals: present status and future prospects. *Current Science* 83: 30-38.

Trojanowski JQ, Lee VM-Y (1995). Phosphorylation of paired helical filament tau in Alzheimer's disease neurofibrillary lesions: focusing on phosphatases. *Journal of Federation of American Societies for Experimental Biology* 9: 1570-1576.

Ullah F, Hussain H, Hussain J, Bukhari IA, Tareq M, Khan H, Choudhary MI, Gilani AH, Ahmad VU (2007). Tyrosinase inhibitory pentacyclic triterpenes and analgesic and

spasmolytic activities of methanol extracts of *Rhododendron collettianum*. *Phytotherapy Research* 21: 1076-1081.

Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology* 7: 65-74.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39: 44-84.

Vattem DA, Ghaedian R, Shetty K (2005). Enhancing health benefits of berries through phenolic antioxidant enrichment: focus on cranberry. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 14: 120-130.

Wang H, Nair MG, Strasburg GM, Chang Y-C, Booren AM, Gray JI, DeWitt DL (1999). Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from Tart Cherries. *Journal of Natural Products* 62: 294-296.

White KG, Ruske AC (2002). Memory deficits in Alzheimer's disease: The encoding hypothesis and cholinergic function. *Psychonomic Bulletin & Review* 9: 426-437.

WHO Expert Committee on Diabetes *mellitus*: second report. (1980). *World Health Organization Technical Report Series* 646: 1-80.

Wilcox ER, Whitaker JR (1984). Some aspects of the mechanism of complexation of red kidney bean  $\alpha$ -amylase inhibitor and  $\alpha$ -amylase. *Biochemistry* 23: 1783-1791. IN Al Kazaz M, Desseaux V, Marchis-Mouren G, Prodanov E, Santimone M (1998). The mechanism of porcine pancreatic  $\beta$ -amylase inhibition of maltopentaose hydrolysis by acarbose, maltose and maltotriose. *European Journal of Biochemistry* 252: 100-107.

Wilkinson DG, Francis PT, Schwam E, Payne-Parrish J (2004). Cholinesterase inhibitors used in the treatment of Alzheimer's disease: the relationship between pharmacological effects and clinical efficacy. *Drugs Aging* 21: 453-478.

Wojdyło A, Oszmiański J, Czemerys R (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry* 105: 940-949.

Wong SP, Leong LP, Koh JHW (2006). Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry* 99: 775-783.

Zhao SY (1999). Drugs to treat Diabetes. *Guowai Yiyao-Hechengyao, Shenghuayao, Zhiji* 20: 130-135. IN Li WL, Zheng HC, Bukuru J, De Kimpe N (2004). Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of Diabetes mellitus. *Journal of Ethnopharmacology* 92: 1-21.

Zulueta A, Esteve MJ, Frígola A (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry* 114: 310-316.

**Sites consultados:**

<http://www.alzheimer.ca/english/media/adfacts2007.htm#footnote4> (Acedido a 30.05.09)

[http://www.alz.org/brain\\_portuguese/10.asp](http://www.alz.org/brain_portuguese/10.asp) (Acedido a 30.05.09)

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html> (Acedido a 20.07.09)

<http://www.spd.pt/images/rpd%20junho%202009-1.pdf> (Acedido a 17.08.09)

<http://www.alzheimerportugal.org/scid/webAZprt/defaultCategoryViewOne.asp?categoryID=898> (Acedido a 10.09.09)