



**Doença de Alzheimer: análise *in vitro* da
atividade antioxidante e anticolinesterásica de
cinco extratos de plantas da região do Algarve**

Eva Cristiana Ferreira Fortunato

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:
Professora Doutora Isabel Saraiva de Carvalho

2016



**Doença de Alzheimer: análise *in vitro* da
atividade antioxidante e anticolinesterásica de
cinco extratos de plantas da região do Algarve**

Eva Cristiana Ferreira Fortunato

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:
Professora Doutora Isabel Saraiva de Carvalho

2016

Declaração de autoria de trabalho

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

Universidade do Algarve, 28 de Setembro de 2016

(Eva Fortunato)

Copyright © Eva Cristiana Ferreira Fortunato

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

Agradecimentos

Acima de tudo quero agradecer às principais pessoas impulsionadoras pelo meu futuro, as quais sem elas nada do que alcancei teria sido possível. Muito obrigada pais.

E também à pessoa que me serve de modelo a seguir, aquela que esteve sempre lá para amparar quedas e celebrar vitórias, que me ajudou com todo o seu conhecimento e amor. O meu ídolo. Muito obrigada mana.

Um especial agradecimento à minha orientadora, professora Isabel, por toda a ajuda e dedicação e por me ter dado a oportunidade de ter feito parte de um projecto laboratorial tão aliciante.

Bem como um agradecimento a todos os colegas da FSLab que tão prontamente me ajudaram e aconselharam durante todo o tempo de execução dos métodos laboratoriais.

Um agradecimento a todos os professores da Universidade do Algarve por, de uma forma directa e indirecta, me terem dado as melhores bases e conhecimentos que um aluno poderia pedir.

Um obrigada às grandes amigas que Faro me deu, Marta e Sara. Sem elas estes 5 anos não teriam sido os mesmos!

Obrigada ao Rúben, por toda a força e apoio incondicional, e por ter acreditado sempre em mim e nas minhas capacidades.

E por fim um obrigada às amigas de Lisboa, que apesar da distância nestes anos estiveram sempre lá.

“Action without vision is only passing time, vision without action is merely day dreaming but vision with action can change the world.” -

Nelson Mandela

Resumo

A doença de Alzheimer é uma das principais formas de demência na população idosa, caracterizada por depósitos extracelulares do péptido beta-amilóide, diminuição do neurotransmissor acetilcolina e *stress* oxidativo.

Este trabalho surge com o objetivo de avaliar a atividade inibitória da acetilcolinesterase e butirilcolinesterase (através do método colorimétrico de Ellman) bem como a atividade antioxidante (pelos métodos DPPH, FRAP, RP e TAA) de extratos aquosos de cinco plantas da região do Algarve.

Os resultados demonstraram que o extrato de *Myrtus communis* L. obteve o maior teor em fenólicos e flavonoides totais ($718,89 \pm 8,74$ mg GAE/g peso seco e $18,83 \pm 0,83$ mg QE/g peso seco, respetivamente) bem como uma potente atividade antioxidante (IC_{50} de $15,10 \pm 1,95$ μ g/mL no DPPH) e a melhor atividade inibitória contra a acetilcolinesterase (IC_{50} $0,82 \pm 0,23$ mg/mL).

O extrato de *Rubus ulmifolius* Schott e *Geranium purpureum* Vill exibiram a melhor atividade antibutirilcolinesterase ($4,62 \pm 2,94$ mg/mL e $5,72 \pm 2,90$ mg/mL, respetivamente), contudo a inibição de todos os extratos analisados continua a ser fraca comparado com o controlo positivo, tacrina (IC_{50} : $21,26 \pm 3,60$ μ g/mL contra AChE e $22,26 \pm 0,98$ μ g/mL contra BChE).

O extrato de *Olea europaea* var. *sylvestris* obteve fracos resultados enquanto que o de *Portulaca oleracea* L. não mostrou nenhuma atividade anticolinesterásica, obtendo os valores mais baixos em fenólicos totais ($68,33 \pm 1,77$ mg GAE/g peso seco) e capacidade antioxidante muito reduzida (IC_{50} $325,99 \pm 3,04$ μ g/mL no método DPPH), indicando assim que ambos os extratos apresentam um reduzido potencial terapêutico para doenças neurológicas.

A alta correlação entre o conteúdo em fenólicos totais, a atividade antioxidante e a inibição da acetilcolinesterase sugerem a contribuição significativa dos compostos fenólicos presentes nos extratos analisados, principalmente no de *M. communis*, como potenciais fontes de moléculas para o tratamento desta doença, embora estudos futuros sejam necessários.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer, Antioxidantes, Acetilcolinesterase, Butirilcolinesterase, Extratos de plantas

Abstract

Alzheimer's disease is the most common form of dementia in the elderly. It's pathologically characterized by extracellular deposits of beta-amyloid peptide, loss of neurotransmitters like acetylcholine and oxidative stress.

The present study aimed to evaluate both acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory effects (using Ellman's colorimetric assay) as well as antioxidant activities (screened by DPPH, FRAP, RP and TAA assays) by aqueous extracts of five plants growing in Algarve.

The results showed that the *Myrtus communis* L. extract revealed the highest total phenolic and flavonoids contents ($718,89 \pm 8,74$ mg GAE/g dry weight and $18,83 \pm 0,83$ mg QE/g dry weight, respectively) as the best antioxidant activity (IC_{50} of $15,10 \pm 1,95$ μ g/mL on DPPH method) and the most significant acetylcholinesterase (IC_{50} $0,82 \pm 0,23$ mg/mL) inhibitory activity.

The *Rubus ulmifolius* Schott and *Geranium purpureum* Vill. extracts showed the best antibutyrylcholinesterase activity ($4,62 \pm 2,94$ mg/mL and $5,72 \pm 2,90$ mg/mL, respectively), however, the inhibition of all these extracts are still very weak compared to positive control, Tacrine (IC_{50} : $21,26 \pm 3,60$ μ g/mL against AChE and $22,26 \pm 0,98$ μ g/mL against BChE).

Olea europaea var. *sylvestris* extract demonstrated poor results while *Portulaca oleracea* extract exhibited the lowest total phenolic contents ($68,33 \pm 1,77$ mg GAE/g dry weight) and the lowest antioxidant capacity (IC_{50} $325,99 \pm 3,04$ μ g/mL in DPPH method), but it didn't show any capacity of inhibition of both cholinesterase enzymes, which indicate that these two extracts don't have so many therapeutic potential for neurological diseases.

The high correlation between the total phenolic content and the antioxidant methods and acetylcholinesterase inhibition suggest the significant contribution of phenolics present in extracts, especially on *M. communis* extract, as potential sources of bioactive molecules for Alzheimer's disease treatment, although further investigations are needed.

Key-words: Alzheimer's disease, antioxidants, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, plants's extracts

Índice Geral

Agradecimentos	iv
Resumo	v
Abstract	vi
Índice Geral	vii
Índice de Figuras	ix
Índice de Quadros	x
Índice de Tabelas.....	xi
Índice de Abreviaturas.....	xii
1. Introdução.....	1
2. Epidemiologia da Doença de Alzheimer.....	2
3. Fisiopatologia da Doença de Alzheimer	3
4. Tratamento farmacológico na Doença de Alzheimer.....	6
5. Compostos fitoquímicos.....	9
6. Os antioxidantes e o seu papel na Doença de Alzheimer	12
7. Fitoterapia na Doença de Alzheimer	16
7.1. Plantas estudadas	17
7.1.1 <i>Geranium purpureum</i> Vill.....	17
7.1.2 <i>Myrtus communis</i> L.	18
7.1.3 <i>Olea europaea</i> var. <i>sylvestris</i> (Mill.) Lehr.....	19
7.1.4 <i>Portulaca oleraceae</i> L.....	21
7.1.5 <i>Rubus ulmifolius</i> Schott	21
8. Material e Métodos.....	22
8.1. Reagentes	22
8.2. Equipamento.....	23
8.3. Material Vegetal	23

8.4. Preparação dos extratos.....	24
9. Metodologia	25
9.1. Determinação do conteúdo em fenólicos totais (TPC)	25
9.2. Determinação do conteúdo em flavonoides totais (TFC).....	25
9.3. Determinação da atividade antioxidante total (TAA).....	26
9.4. Determinação do poder redutor (RP).....	27
9.5. Determinação do poder antioxidante de redução do ferro pelo método FRAP.....	28
9.6. Determinação da atividade de captura de radicais avaliada pelo método DPPH ...	29
9.7. Determinação da atividade inibitória da acetilcolinesterase (AChE).....	31
9.8. Determinação da atividade inibitória da butirilcolinesterase (BChE)	34
9.9. Análise estatística	36
10. Resultados e Discussão.....	37
10.1. Conteúdo em fenólicos totais (TPC) e em flavonoides totais (TFC)	38
10.2. Atividade antioxidante total (TAA), poder redutor (RP) e poder antioxidante de redução do ferro (FRAP).....	42
10.3. Atividade de captura de radicais (DPPH).....	47
10.4. Atividade inibitória da acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) 49	
10.5. Coeficientes de correlação de Pearson (R).....	54
10.6. Análise de agrupamento hierárquico (HCA).....	56
11. Conclusão geral	59
12. Referências bibliográficas.....	61

Índice de Figuras

Figura 3.1. Esquema da cascata amilóide.	4
Figura 3.2. Figura ilustrativa dos processos biológicos que acontecem nos neurónios, axónios e sinapse no cérebro dos doentes com Doença de Alzheimer.	5
Figura 5.1. Estruturas básicas do subgrupo dos ácidos fenólicos não flavonoides	10
Figura 5.2. Estruturas básicas do subgrupo dos flavonoides.....	10
Figura 5.3. Estrutura básica dos flavonoides.....	11
Figura 6.1. Classificação dos compostos antioxidantes	13
Figura 6.2. Esquema ilustrativo do aumento da suscetibilidade de desenvolver doença de Alzheimer, devido a um aumento da produção das espécies reativas de oxigénio e mecanismos de stress oxidativo.....	15
Figura 9.3.1. Esquema representativo da reação de redução do molibdénio VI em V	26
Figura 9.4.1. Esquema representativo da reação de redução do Fe ³⁺ em Fe ²⁺ , através do método RP.....	27
Figura 9.5.1. Esquema representativo da reação de redução do ferro, através do método FRAP	28
Figura 9.6.1. Esquema representativo da atividade de captura de radicais avaliada pelo método DPPH.....	30
Figura 9.7.1. Esquema representativo da determinação da atividade inibitória da acetilcolinesterase	32
Figura 10.1.1. Representação gráfica do conteúdo em fenólicos totais (TPC) dos cinco extratos aquosos analisados.	39
Figura 10.1.2. Representação gráfica do conteúdo em flavonoides (TFC) dos cinco extratos aquosos analisados.	40
Figura 10.2.1. Representação gráfica da atividade antioxidante total (TAA) dos cinco extratos aquosos analisados.	44
Figura 10.2.2. Representação gráfica do poder redutor (RP) e do poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) dos cinco extratos aquosos analisados, expressos em mg TE/ g de peso seco.	45
Figura 10.3.1. Representação gráfica da atividade de captura de radicais dos cinco extratos aquosos analisados, avaliada pelo método DPPH e expressa em IC ₅₀	49
Figura 10.4.1. Representação gráfica, expressa em IC ₅₀ , da atividade inibitória da acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) pelos cinco extratos aquosos analisados.	51

Figura 10.6.1. Dendrograma obtido pela Análise de Cluster Hierárquica (HCA) para todas as amostras de extratos aquosos analisados.....	57
Figura 10.6.2. Dendrograma obtido pela Análise de Cluster Hierárquica (HCA) para todos os métodos estudados	58

Índice de Quadros

Quadro 8.3. Local, data de colheita, condições de cultivo e respectivas partes analisadas dos cinco extratos de plantas estudados	24
--	----

Índice de Tabelas

Tabela 9.7.1. Volume de reagentes utilizados na determinação da atividade inibitória da acetilcolinesterase	33
Tabela 9.8.1. Volumes usados para cada reagente e respectiva absorvência obtida na determinação da atividade inibitória da butirilcolinesterase.....	35
Tabela 10.1. Resultados obtidos para o método TPC, TFC, TAA, RP e FRAP dos diferentes extratos aquosos analisados.....	37
Tabela 10.2. Valores expressos em IC ₅₀ dos diferentes extratos aquosos analisados, obtidos para o método DPPH, AChE e BChE	38
Tabela 10.5.1. Coeficientes de correlação de Pearson (R) entre os diferentes métodos estudados	55

Índice de Abreviaturas

- A β – β -amilóide
- AAE – Equivalentes de ácido ascórbico
- AChE – Acetilcolina
- AINEs – Anti-inflamatórios não esteróides
- ANOVA – Análise de Variância
- APP – Proteína precursora amiloide
- ATCI – Acetilcolina
- BACE1 – β -secretase
- BChE – Butirilcolinesterase
- BTCI – Butiriltocolina
- COX2 – Ciclooxigenase 2
- DA – Doença de Alzheimer
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- DPPH – 2,2 difenil-1-picrilidrazila
- DTNB – 5,5'- dithiobis (ácido 2-nitrobenzoico)
- EROs – Espécies reativas de oxigênio
- FDA – *Food and Drug Administration*
- FRAP – Poder antioxidante de redução do ferro
- GAE – Equivalentes de ácido gálico
- GP – *Geranium purpureum* Vill;
- HCA – Análise de *clusters* hierárquica
- HCl – Ácido clorídrico
- HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência
- MC – *Myrtus communis* L.
- mAChR – Recetores muscarínicos
- NFTs – “Novelos” neurofibrilhares
- NMDA – Recetor N-metil-D-aspartato
- OEV – *Olea europaea var. sylvestris* (Mill.) Lehr;
- OMS – Organização Mundial de Saúde
- PO – *Portulaca oleracea* L.
- QE – Equivalentes de quercetina
- R – Coeficiente de correlação de Pearson
- RP – Poder redutor
- RU – *Rubus ulmifolius* Schott ;

TAA – Atividade antioxidante total
TCA – Ácido Tricloroacético
TE – Equivalentes de Trolox
TFC – Conteúdo em flavonoides totais
TLC – Cromatografia em camada fina
TPTZ – 2,4,6-tripiridil-s-triazina
TNF- α – Fator alfa de necrose tumoral
TPC – Conteúdo em fenólicos totais

1. Introdução

Descrito há mais de cem anos por Alois Alzheimer, a doença de Alzheimer (DA) é um distúrbio neurodegenerativo crónico observado essencialmente em pessoas com idade mais avançada, sendo caracterizada por uma perda progressiva de memória e de funções cognitivas, que afeta a vida pessoal e social do doente e que num estadio mais avançado pode levar a um estado vegetativo e morte precoce.^{1,2}

A causa que desencadeia a DA ainda não é totalmente conhecida, contudo um dos processos que se encontra bem estudado e relacionado com esta demência é a presença de placas beta-amilóide extracelulares bem como uma diminuição do neurotransmissor acetilcolina na fenda sináptica associado a um processo inflamatório e de *stress* oxidativo, o que contribui para um défice cognitivo nestes doentes.^{3,4}

Dado que a idade é o principal fator na maioria dos casos de DA, o *stress* oxidativo está, inevitavelmente, envolvido na patogénese desta doença. O cérebro é tremendamente sensível ao *stress* oxidativo devido à sua constituição rica em oxigénio e ácidos gordos peroxidáveis bem como a uma relativa escassez de mecanismos antioxidantes. Assim, as células neuronais encontram-se mais suscetíveis ao *stress* oxidativo comparadas com outros tecidos do resto do corpo, fazendo com que o dano oxidativo seja dos eventos mais precoces na patogénese da DA, pelo que a descoberta de uma molécula que tenha como alvo a diminuição do *stress* oxidativo acoplado à capacidade de inibição das enzimas colinesterásicas seja o ideal na prevenção e tratamento sintomático desta patologia.³

As atuais opções farmacoterapêuticas para a DA são muito reduzidas, limitando-se apenas ao uso de inibidores colinesterásicos como tratamento sintomático desta patologia. Estes fármacos aumentam as funções colinérgicas por inibirem a degradação da acetilcolina, porém, devido aos seus efeitos adversos significativos surge, cada vez mais, a necessidade de encontrar novas abordagens terapêuticas, especialmente através do uso de plantas para fins medicinais.^{5,6}

Diversos estudos têm associado uma dieta rica em antioxidantes à diminuição e prevenção do risco de doenças cardiovasculares, cancro e doenças neurodegenerativas causadas pelo *stress* oxidativo como a doença de Alzheimer.⁷ Os compostos bioativos mais associados ao possível efeito protetor das plantas são os compostos fenólicos e os flavonoides devido à presença de um anel aromático com pelo menos um grupo hidroxilo,

permitindo modular assim a atividade tanto de enzimas como de recetores, o que pode constituir um multi-alvo na descoberta de novas moléculas para o tratamento da DA.⁸

Assim, a presente dissertação surge com o principal objetivo de analisar a atividade antioxidante e anticolinesterásica de extratos aquosos de cinco plantas da região do Algarve, nomeadamente *Myrtus communis* L., *Olea europaea* var. *sylvestris* (Mill.) Lehr., *Rubus ulmifolius* Schott, *Geranium purpureum* Vill., e *Portulaca oleracea* L., a fim de encontrar a melhor planta que possa ser usada como infusão em chás com possíveis efeitos profiláticos na doença de Alzheimer.

Para isso utilizaram-se diversos métodos espectrofotométricos tais como determinação do conteúdo em fenólicos totais (TPC) e em flavonoides totais (TFC), determinação da atividade antioxidante (através dos métodos TAA, FRAP, RP e DPPH) e determinação da atividade inibitória da acetilcolinesterase e butirilcolinesterase pelo método de Ellman.

2. Epidemiologia da Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer é a causa mais comum de demência em todo o mundo, com particular foco na população idosa, e conseqüentemente é das maiores causas de mortalidade e morbidade nesta faixa etária.⁹ A sua incidência e prevalência aumenta exponencialmente com a idade a partir dos 65 anos, acentuando-se a partir dos 85 anos, especialmente no sexo feminino e em indivíduos negros.¹⁰

Esta doença tem vindo a ter uma prevalência cada vez maior devido ao aumento da esperança média de vida, sendo diagnosticada a cada 70 segundos e prevendo-se que em 2050 passe para os 33 segundos. Os últimos dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2012, apontam para 35,6 milhões de pessoas em todo o mundo que sofram desta demência¹¹ e segundo a Direção Geral de Saúde (DGS) estima-se ainda que existam cerca de 153 mil portugueses diagnosticados com DA e que este número duplique até 2030 e triplique até 2050, dado Portugal ser um dos países mais envelhecidos da Europa.¹²

Inerentemente por ser uma patologia de longo termo e prevalência, os custos associados também são elevados¹¹ e, como tal, devido a todos estes fatores económicos, demográficos e sociais, a DA tem-se vindo a tornar uma das patologias mais emergentes na procura de novas formas de tratamento mais eficazes e seguras.

3. Fisiopatologia da Doença de Alzheimer

A manifestação clínica mais significativa e mais precoce para o diagnóstico desta demência é a perda seletiva de memória, nomeadamente de acontecimentos mais recentes. Outros défices cognitivos podem surgir, com ou depois da perda de memória, tais como afasia (perturbação da formulação e compreensão da linguagem que é caracterizada por repetições de frases, discursos mais lentos e com maior dificuldade em encontrar a palavra pretendida) e perda de noção visoespacial (por exemplo, mais dificuldade em relacionar os ponteiros do relógio com as horas correspondentes) e num estadió mais avançado, pode-se observar alterações na personalidade (perda de interesse, apatia), psicoses e mesmo problemas motores (como por exemplo apraxia).²

Biologicamente, as causas e mecanismos para esta demência neurodegenerativa ainda são desconhecidos existindo um longo período pré-sintomático entre as alterações bioquímicas no cérebro e o desenvolvimento dos sintomas clínicos específicos da DA.

Estudos clínicos sugerem que esta doença neurodegenerativa é uma consequência patológica da clivagem de uma proteína de membrana, a proteína precursora amilóide (APP) que consequentemente leva à formação do péptido β -amilóide ($A\beta$). Estes péptidos vão-se aglomerando e dão origem a placas senis que acabam por atingir áreas cerebrais responsáveis por determinados processos cognitivos, tais como a memória e a aprendizagem.² Esta clivagem é catalisada sequencialmente por proteases, primeiro pela β -secretase e de seguida pela γ -secretase, que, dependente do sítio de clivagem da γ -secretase, resultam na formação de um composto menos tóxico ($A\beta_{38-40}$, que em circunstâncias normais representa cerca de 95% do total do péptido $A\beta$ produzido) ou num produto final mais agregado e consequentemente mais tóxico ($A\beta_{42}$). Assim, desencadeia-se a cascata amilóide que leva a processos inflamatórios e oxidativos, culminando em morte neuronal.^{2,13} A APP pode ser também clivada pela α -secretase resultando num produto solúvel e não tóxico, como se pode observar pela Figura 3.1.

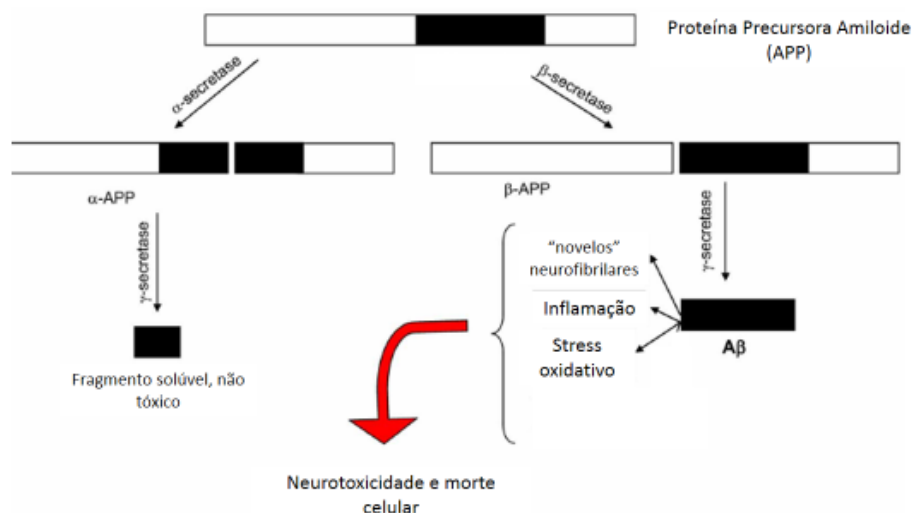


Figura 3.1. Esquema da cascata amilóide. Adaptado de Massoud et al. (2010) ¹⁴

A deposição e respetiva acumulação desses agregados do péptido β -amilóide, formando as placas senis na fenda sináptica, compromete a transmissão colinérgica originando uma diminuição na produção de acetilcolina transferase que, conseqüentemente, leva à diminuição da síntese e concentração da acetilcolina (neurotransmissor indispensável à comunicação interneuronal, sendo a substância mais decisiva quer no desempenho cognitivo como no mecanismo de memória e de aprendizagem). ¹³ O péptido $A\beta$ leva também a uma ativação anormal da microglia que resulta na libertação de fatores pró-inflamatórios e citotóxicos, nomeadamente interleucinas, fator alfa de necrose tumoral (TNF- α), ciclooxigenase 2 (COX2), óxido nítrico e espécies reativas de oxigénio (EROs). ¹⁵

Assim, para além da acumulação do péptido $A\beta$, a “hipótese colinesterásica” tem sido a que tem demonstrado mais evidências clínicas na etiologia desta demência, sendo caracterizada por baixos níveis do neurotransmissor acetilcolina no cérebro devido à presença em grandes quantidades da enzima acetilcolinesterase (AChE). Esta enzima catalisa a acetilcolina em tiocolina e ácido acético, originando uma diminuição de acetilcolina na fenda sináptica, pelo que uma das estratégias farmacológicas passa pela inibição da AChE, o que conseqüentemente leva a um aumento das funções colinérgicas nos doentes com DA. Contudo, estes inibidores da AChE apenas conseguem atenuar os sintomas desta doença neurodegenerativa, não tendo qualquer efeito de cura ou reversão da mesma. ⁴

O cérebro humano contém duas formas principais das enzimas colinesterases: acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE), capazes de hidrolisar, respetivamente, a acetilcolina e a butirilcolina. A AChE, na sua forma solúvel, encontra-se essencialmente na fenda sináptica e nas membranas sinápticas e a BChE está essencialmente associada a células da glia. Num estadio mais avançado da doença, os níveis de AChE diminuem em cerca de 85% e a BChE passa a representar a enzima colinesterásica mais predominante nas regiões cerebrais, fazendo com que, por essa razão, o interesse em procurar novos alvos inibitórios da BChE começa a ganhar cada vez mais impacto.¹⁶

Outra questão importante é a presença da proteína tau, associada normalmente à estabilidade dos microtúbulos nos axónios que são responsáveis pela integridade celular e por um eficiente transporte neuronal.¹⁷ O péptido A β leva à hiperfosforilação da proteína tau que conseqüentemente induz a formação de “novelos” neurofibrilares (NFTs) insolúveis nas células nervosas. Estes NFTs acoplado a um transporte axonal deficiente na DA resultam na quebra dos microtúbulos originando défices na comunicação entre neurónios, podendo levar à morte dos mesmos. (Figura 3.2)^{17,18}

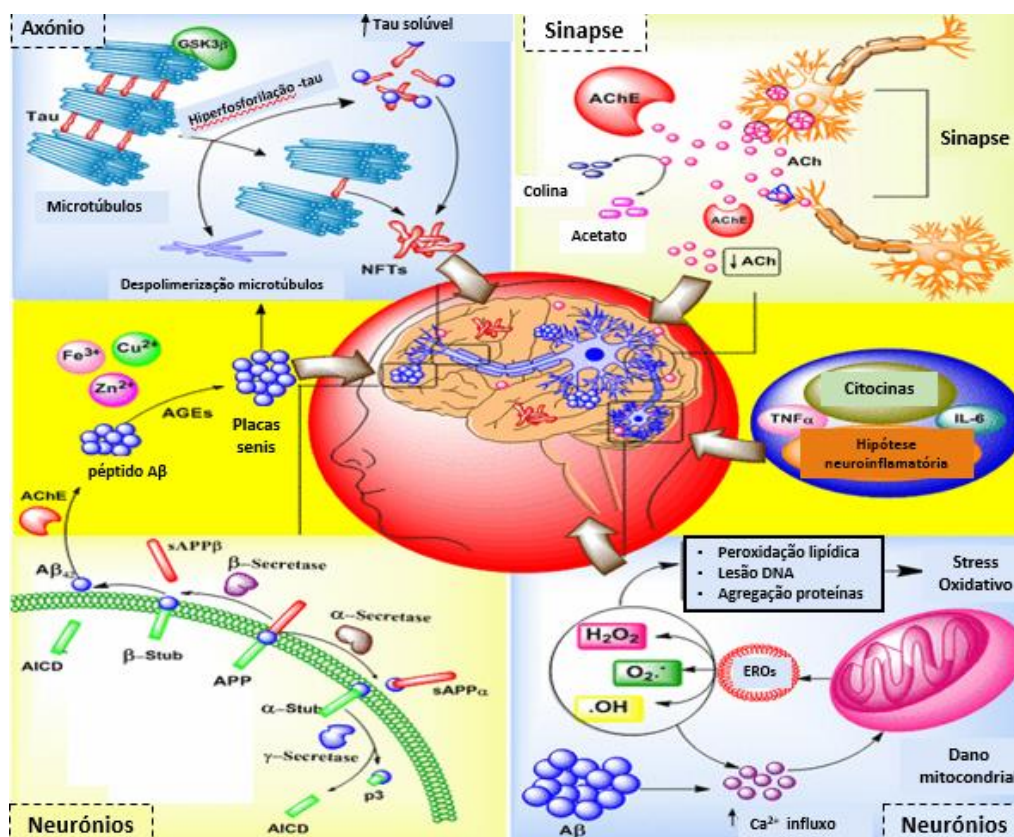


Figura 3.2. Figura ilustrativa dos processos biológicos que acontecem nos neurónios, axónios e sinapse no cérebro dos doentes com doença de Alzheimer. Adaptado de Singh et al. (2016)¹⁸

O maior fator de risco para o desenvolvimento da DA é a idade, contudo existem outros fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento desta demência, que se podem dividir em três categorias: genéticos, adquiridos e ambientais. Doentes com familiares em 1^a grau que tenham sofrido desta patologia têm cerca de 30% de risco acrescido de desenvolver precocemente esta desordem, normalmente a partir dos 45 anos.⁹ Esta hereditariedade autossomal-dominante está relacionada com uma mutação rara nos genes envolvidos na produção do péptido A β , mais precisamente na apolipoproteína E - gene APOE alelo ϵ 4, uma das três formas de ApoE responsáveis pelo transporte de colesterol. Aqueles que herdaram apenas um gene ApoE ϵ 4 têm três vezes mais risco de desenvolver DA enquanto que se for dois genes ApoE ϵ 4 o risco aumenta para 15 vezes mais.¹⁹ Outro fator de risco genético é a ocorrência de uma mutação PSEN1 (mutação na presenilina, produto formado juntamente com o péptido A β quando ocorre a clivagem endoproteolítica da proteína APP).²

A nível dos fatores adquiridos encontram-se várias comorbidades, nomeadamente hipertensão, hipercolesterolemia, diabetes mellitus tipo 2, trauma cerebral, obesidade ou problemas cardiovasculares.^{20,21} Relativamente aos fatores ambientais destacam-se a exposição a ambientes poluídos, pesticidas e fumo de tabaco que aumentam consideravelmente o risco de desenvolvimento de demências.²² Para além destes fatores de risco identificados, alguns estudos têm demonstrado que um estilo de vida saudável, aliado à prática de exercício físico e uma alimentação equilibrada ao longo do ciclo de vida têm um papel importante na prevenção e progressão da DA.

A progressão da doença varia de pessoa para pessoa e depois de diagnosticada, a esperança média de vida é entre três a oito anos.²

4. Tratamento farmacológico na Doença de Alzheimer

O tratamento atual para a DA é uma terapêutica sintomática que tem como objetivo melhorar a qualidade de vida e atrasar a progressão da doença, diminuindo assim os sintomas inerentes. Contudo ainda não existe cura para esta patologia pelo que, inevitavelmente, a doença progride em todos os doentes.⁴

Seria então de esperar que uma terapêutica com agonistas dos recetores colinérgicos ou precursores da acetilcolina fossem eficazes, todavia estudos demonstraram o contrário: reduzida eficácia e muitos efeitos adversos.³

Por seu lado, os inibidores das colinesterases demonstraram um aumento da disponibilidade sináptica da acetilcolina, através da inibição das suas principais enzimas, as acetilcolinesterases, e demonstraram também efeitos adversos mais favoráveis em relação aos agonistas dos recetores colinérgicos, como é o caso da redução do risco de hepatotoxicidade, o que se traduz numa melhor tolerabilidade e maior eficácia terapêutica. Porém, estes fármacos por outro lado encontram-se limitados à mesma pelos seus efeitos adversos, essencialmente gastrointestinais e por problemas associados à sua biodisponibilidade. Estima-se que cerca de 40% dos doentes com DA não respondam eficazmente a nenhum dos inibidores colinesterásicos (não mostraram qualquer melhoria nos sintomas característico desta demência) enquanto que apenas 20% demonstraram uma resposta favorável a esta terapêutica convencional.^{3,23}

Como tal, os inibidores colinesterásicos são os únicos fármacos que se encontram atualmente aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) no tratamento sintomático da DA, à exceção do fármaco tacrina, o primeiro a ser aprovado, e que atualmente a sua administração já não é recomendada por se ter comprovado os altos riscos de hepatotoxicidade e margem terapêutica estreita.

A terapêutica é exclusivamente feita pela administração de fármacos inibidores da acetilcolinesterase (donepezilo, rivastigmina ou galantamina num estadio ligeiro a moderado), e numa fase avançada por antagonistas do recetor N-metil-D-aspartato (NMDA) – como a memantina.²³

A escolha entre os três fármacos inibidores da acetilcolinesterase é baseada no custo e na tolerabilidade do doente uma vez que a eficácia parece ser semelhante entre eles. As reações adversas gerais para esta classe farmacológica são efeitos colinérgicos, principalmente alterações gastrointestinais, tais como, náuseas, cefaleias, vômitos, perda de apetite, tonturas, entre outras, e como tal deve ser aconselhado a sua administração concomitante com as refeições. O donepezilo é um inibidor reversível selectivo da AChE, a rivastigmina é o único inibidor tanto da AChE como BChE e a galantamina consegue estimular os receptores nicotínicos (os quais a AChE também tem afinidade) e inibir as enzimas colinesterásicas.²³

Tanto a rivastigmina como a galantamina têm origem em moléculas de produtos naturais, mais concretamente em alcalóides. A rivastigmina é sintetizada a partir da

fisiostigmina e o alcalóide galantamina é obtido da espécie *Galanthus nivalis* L., pertencente à família Amaryllidaceae. Uma vez que estes potentes fármacos são uma importante estratégia farmacoterapêutica da DA diversos estudos têm vindo a desenvolver-se focados na identificação de compostos presentes naturalmente nas plantas que possam ter atividade anticolinesterásica e consequentemente constituir uma potencial fonte de novas moléculas mais efetivas na inibição da AChE. ²⁴

Os compostos que demonstram ter efeito contra a AChE são também usados no tratamento da miastenia gravis ou ataxia, onde também existe um défice do neurotransmissor acetilcolina. ²³

Esta patologia tem vindo a tornar-se um problema de saúde pública, não só devido ao aumento da sua prevalência mundial bem como longa duração e custos elevados de tratamento; o que aliado aos dados estatísticos anteriormente fornecidos, vêm reforçar a importância de decisões terapêuticas individualizadas baseadas na resposta clínica e efeitos secundários sentidos por cada doente. Assim, como a etiologia da doença ainda é desconhecida e consequentemente não há um tratamento curativo, muitos estudos têm sido feitos com o intuito de encontrar uma opção terapêutica ideal.

O uso de outro tipo de classes farmacológicas na profilaxia da DA já foi alvo de muitos estudos, contudo todos eles deram resultados inconclusivos. Devido a diversos fatores de risco, já anteriormente referidos, pensou-se que fármacos usados tradicionalmente para esses fins pudessem mostrar efeitos positivos. Um desses exemplos foi o uso de estatinas, medicamentos clássicos usados no tratamento de hipercolesterolémia, nomeadamente o uso de atorvastatina em doentes com DA leve a moderada, os quais já têm sido referidos como agentes imunomoduladores e neuroprotetores, com propriedades antioxidantes.²⁵ Os resultados mostraram que os 63 doentes aos quais era administrada atorvastatina 80mg por dia ao longo de 1 ano mostraram uma diminuição de sintomas ²⁶ contudo outro estudo, desta vez com 640 doentes, sujeitos ao mesmo fármaco e à mesma dosagem durante 72 semanas, os quais tomavam simultaneamente donepezilo, os resultados mostraram que não houve qualquer influência cognitiva. ²⁷

Dado que existe um forte componente inflamatório nesta demência, a classe farmacológica mais abordada têm sido os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs). Alguns estudos epidemiológicos sugerem que o uso de AINEs a longo-termo podem prevenir o desenvolvimento da DA.²⁸ Contudo a maioria dos estudos têm demonstrado igualmente resultados inconclusivos e devido a muitos problemas que possam existir com

a administração crónica de AINEs, nomeadamente problemas gástricos graves e cardíacos, esta possível estratégia terapêutica complementar não parece viável.

Investigações recentes têm apontado para o interesse da administração de anticorpos monoclonais como o solanezumab e aducanumab, ou para a inibição da β -secretase (BACE1) uma vez que esta enzima é das principais responsáveis pela iniciação da cascata amilóide e formação do péptido A β .^{29,30} Outro dos novos interesses de estudos é relativo aos receptores muscarínicos (mAChR), aos quais a acetilcolina tem afinidade, que se encontram no sistema nervoso central e estão envolvidos em processos de memória, aprendizagem e controlo motor. A ativação destes recetores pode atenuar a sintomatologia da DA e regular alguns mecanismos como a hiperfosforilação da proteína tau.³¹

Alternativamente, os produtos fitoterapêuticos têm vindo a tomar um papel importante na procura de novos agentes preventivos e/ou protetores desta demência. O uso de plantas para fins terapêuticos é conhecido desde o início da civilização humana com a finalidade de prevenção e tratamento de diversas doenças, como por exemplo no tratamento de desordens neurológicas, como é o caso da DA.⁶

Outro ponto crucial que explica a falha da maioria da terapêutica da DA é o tempo. Pensa-se que a acumulação das placas amilóides tende a acontecer muitos anos antes dos primeiros sintomas, causando neuroinflamação, enquanto que a proteína tau está mais envolvida em estádios mais avançados da doença. Assim os doentes ao serem assintomáticos, o diagnóstico torna-se mais tardio e a terapêutica tem menor probabilidade de ser eficaz, sobretudo pela atual terapêutica ser só a nível sintomático.

5. Compostos fitoquímicos

Até há três décadas atrás, Portugal era um país essencialmente pouco desenvolvido, especialmente no interior do país, onde as pessoas frequentemente não tinham acesso a cuidados de saúde primários tão facilmente e como tal recorriam a medicinas alternativas como medicamentos à base de plantas.³² Desde então, o interesse crescente em encontrar fontes de antioxidantes naturais tem vindo a aumentar devido essencialmente às suas capacidades de inibir ou diminuir o *stress* oxidativo e consequentemente ser útil na prevenção de doenças neurodegenerativas.

O reino vegetal oferece uma vasta presença de antioxidantes naturais, contudo pouco se sabe sobre o uso prático da maioria deles. Muitas plantas e respetivas infusões são usadas na medicina tradicional devido às propriedades antioxidantes e farmacológicas dos compostos que as constituem.⁶ Esses componentes nutricionais conhecidos por terem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias têm tido um interesse crescente nos últimos anos como possíveis agentes neuroprotetores que possam prevenir ou diminuir a progressão da DA. Contudo, estes compostos, ao não serem suportados com evidências clínicas de estudos em larga escala, o seu uso deve ser recomendado com considerável precaução.

Esses metabolitos bioativos podem ser taninos, alcaloides ou compostos fenólicos. Os compostos fenólicos podem ser divididos em dois grandes grupos: os flavonoides e os não flavonoides.⁸ Os flavonoides, com base nas diferentes estruturas moleculares que possam adquirir, podem ser subdivididos em seis grupos: os flavonóis (o mais comum a quercetina), flavanóis (catequina), flavonas, isoflavonas, antocianinas e flavanonas; e os não flavonoides em ácido hidroxibenzóico, ácido hidroxicinâmico e estilbenos (Figura 5.1 e 5.2).³³

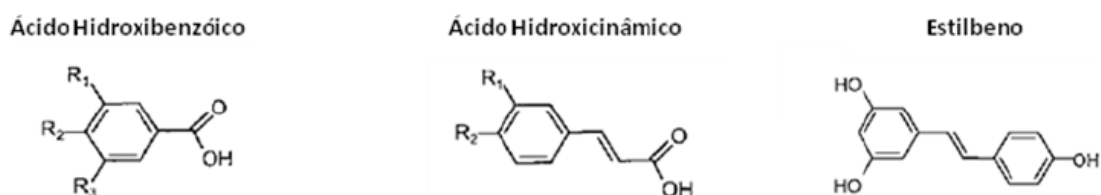


Figura 5.1. Estruturas básicas do subgrupo dos ácidos fenólicos não flavonoides. Adaptado de Angelo et al. (2007)³³

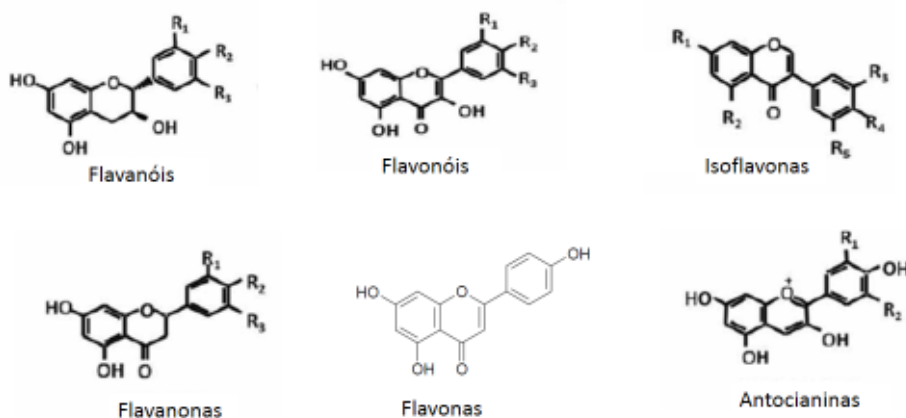


Figura 5.2. Estruturas básicas do subgrupo dos flavonoides. Adaptado de Albarracin et al. (2013)⁷

Os flavonoides são das classes de metabolitos secundários mais abundantes no reino vegetal, podendo encontrar-se em diferentes partes das plantas, tais como nas folhas, flores, frutos, caules, raízes ou sementes. Estes compostos fitoquímicos de baixo peso molecular são caracterizados por terem uma estrutura com dois anéis aromáticos (A e B) e um anel heterocíclico (C), como se pode observar na Figura 5.3. O anel A é formado através da condensação de três moléculas que derivam do ácido malónico, enquanto que o anel B e C derivam da via do chiquimato.³⁴

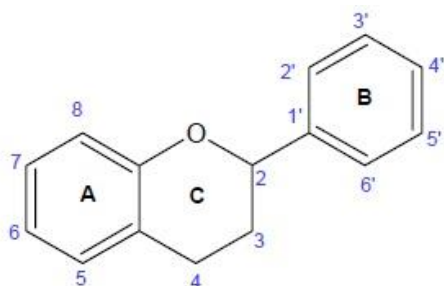


Figura 5.3. Estrutura básica dos flavonoides. Adaptado de Choi et al. (2014)³⁴

Estes compostos fenólicos apresentam uma ampla variedade de efeitos benéficos, nomeadamente efeito antioxidante e anti-inflamatório, devido à capacidade de apresentarem grupos hidroxilo ligados a um anel aromático na sua constituição, permitindo assim atuar como agentes de captura de radicais bem como agentes redutores ou agentes quelantes de metais de transição (que permite prevenir o envolvimento desses metais em reações de Fenton originando concentrações elevadas do radical hidroxilo), de inibirem a peroxidação lipídica bem como modular mecanismos de sinalização celular e expressão genética.³⁵

Recentemente, estudos têm demonstrado que o consumo rico em compostos fenólicos e flavonoides está associado a uma diminuição de demência, favorecendo a memória e a aprendizagem. Os flavonoides podem constituir assim uma das chaves para a descoberta de novas moléculas para o desenvolvimento de novas terapêuticas para a doença de Alzheimer.

Estes compostos presentes naturalmente nos extratos de plantas quando ingeridos pelos humanos são absorvidos, metabolizados e eliminados muito rapidamente, pelo que inerentemente a sua biodisponibilidade é relativamente fraca, atingindo concentrações

plasmáticas muito reduzidas.³⁶ Se a isto juntarmos o facto de que para estes compostos serem ativos contra doenças neurodegenerativas têm que ter a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, e de esta barreira ter uma permeabilidade extremamente sensível, muitos dos compostos fenólicos que apresentam resultados *in vitro* positivos, não o demonstram *in vivo*. Assim têm sido desenvolvidas estratégias como a encapsulação em β -ciclodextrinas com uma porção fenólica, onde parece haver proteção não só de reações de redução-oxidação bem como aumento da solubilidade³⁷ ou da formulação dos compostos bioativos em nanopartículas lipídicas permitindo uma melhor penetração no cérebro.³⁸

A quercetina, pertencente ao subgrupo dos flavonóis, é um dos compostos mais abundantes na dieta humana e devido à sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, às suas propriedades anti-inflamatórias (regulação da expressão do COX-2) e efeito antioxidante, pode ter influência significativa nos efeitos neuroprotetores.³⁹

6. Os antioxidantes e o seu papel na Doença de Alzheimer

Com o passar do tempo tem crescido o interesse na procura de compostos naturais com propriedades antioxidantes derivadas de plantas a fim de originar e aperfeiçoar novas moléculas sintéticas. Os compostos naturais antioxidantes são distribuídos abundantemente nas plantas sendo capazes de intervir neutralizando as reações oxidativas mediadas por radicais livres a fim de proteger o organismo humano de potenciais doenças tendo sido por isso propostos, cada vez mais, o seu uso como uma alternativa na prevenção de doenças neurológicas.⁸

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que uma dieta mediterrânica, rica em antioxidantes, apresenta menor prevalência da DA sendo por isso mais efetiva na prevenção do desenvolvimento desta demência. Muitos destes benefícios derivados do consumo de uma dieta rica em compostos antioxidantes resulta da capacidade dos compostos fenólicos na doação de um átomo de hidrogénio, ação quelante de catiões metálicos ou, muitas das vezes, de um sinergismo entre os compostos naturais como ácido fenólicos, flavonoides e vitaminas.^{40,41} Para além dos antioxidantes não-enzimáticos provenientes da dieta, existem enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, a catalase e a glutatona peroxidase. (Figura 6.1)

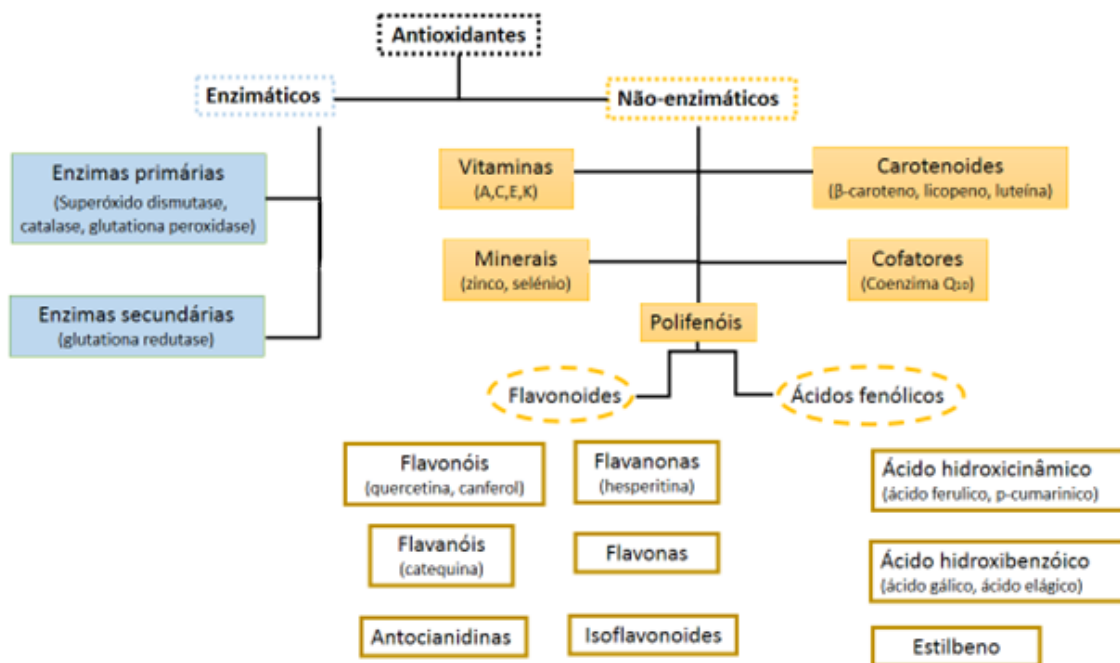


Figura 6.1. Classificação dos compostos antioxidantes

Nesta dissertação foram utilizados três fortes antioxidantes como padrões na construção das retas de calibração. O ácido gálico, um ácido fenólico pertencente ao sub grupo do ácido hidroxibenzóico, foi usado no método TPC, o ácido ascórbico no método TAA e o trolox no método RP e FRAP.

O ácido ascórbico, vulgarmente conhecido por vitamina C, é dos antioxidantes solúveis em água mais potentes, constituindo uma chave essencial na prevenção do *stress* oxidativo. A sua concentração é maior no cérebro e nas glândulas supra-renais do que nos outros órgãos, contudo o organismo humano não tem a capacidade de produzir ácido ascórbico pelo que é imprescindível uma fonte externa suficiente.⁴²

O trolox é um antioxidante análogo do tocoferol (vitamina E), solúvel em água, que tem a capacidade de reduzir a peroxidação lipídica nos sistemas membranares. Consegue ainda captar radicais livres e inibir mecanismos oxidativos que poderiam levar a doenças degenerativas.⁴³

A teoria dos radicais livres no processo de *aging* foi formulada pela primeira vez em 1950 por Harman.⁴⁴ A partir daí, diversos estudos têm relacionado o *stress* oxidativo como um mecanismo de desequilíbrio ligado intimamente com patologias relacionadas com a idade, nomeadamente a DA.

O cérebro é particularmente vulnerável ao *stress* oxidativo, uma vez que requer grandes quantidades de oxigénio por unidade de peso, e também devido à presença de um

alto conteúdo em ácidos gordos polinsaturados que são extremamente suscetíveis à peroxidação lipídica e à oxidação por compostos como oxigénio, ferro ou cobre. ^{44,45} Assim à medida que envelhecemos, as nossas defesas vão enfraquecendo também, havendo menor capacidade de neutralizar os efeitos prejudiciais dos compostos oxidantes em excesso no nosso organismo, sendo necessário um aporte externo de compostos antioxidantes.

Os compostos antioxidantes atuam na prevenção e eliminação das espécies reativas de oxigénio (EROs), produzidas essencialmente durante a cadeia transportadora de eletrões, durante o metabolismo aeróbico. Estima-se que cerca de 2% do oxigénio consumido durante o metabolismo aeróbico é convertido em radicais livres, nomeadamente no radical superóxido (O_2^-), no radical hidroxilo (OH^\bullet) e peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o que leva à lesão da mitocôndria, e conseqüentemente, à formação de uma maior quantidade de EROs em condições patológicas. ⁴⁶

As EROs têm um efeito benéfico como não benéfico nos sistemas biológicos. ⁴⁷ São benéficas porque constituem um componente integral na sinalização celular e são essenciais para o normal crescimento e metabolismo celular, quando em quantidades moderadas, permitindo que haja um nível reduzido de *stress* oxidativo. O *stress* oxidativo ocorre de um desequilíbrio entre um balanço dinâmico da produção de radicais livres e do nível de antioxidantes capazes de capturar esses radicais, resultando num excesso de EROs que conseguem reagir rapidamente e oxidar a maioria das biomoléculas presentes no organismo humano, resultando num dano nas estruturas lipídicas, proteínas e DNA. ⁸ Assim em condições patológicas, a mitocôndria é a fonte primária de radicais livres e as EROs o primeiro alvo de *stress* oxidativo (Figura 6.2). ⁷

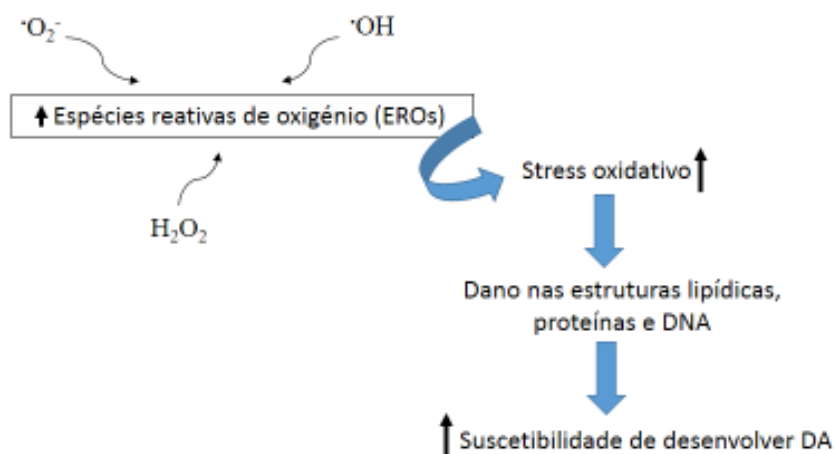


Figura 6.2. Esquema ilustrativo do aumento da suscetibilidade de desenvolver Doença de Alzheimer, devido a um aumento da produção das espécies reativas de oxigênio e mecanismos de *stress oxidativo*. Adaptado de Albarracin et al. (2013) ⁷

A teoria do *stress oxidativo* nas doenças neurodegenerativas propõe que um excesso de radicais livres leva à morte das células nervosas devido à acumulação de dano oxidativo mitocondrial. Mais especificamente, o dano do DNA mitocondrial e proteínas causados por processos oxidativos, resulta em dois grandes efeitos: atenuação da síntese de ATP e aumento das EROs. Estes defeitos no metabolismo energético da mitocôndria resultam numa diminuição de fosfatos, numa deterioração do potencial de membrana e numa disrupção da homeostasia do cálcio. O cálcio contribui para a normal funcionalidade dos neurónios e é sequestrado pelas mitocôndrias pelo que uma desregulação do cálcio mitocondrial juntamente com altos níveis de EROs têm sido observados frequentemente na DA. ⁴⁸

Apesar do uso relativamente seguro de compostos antioxidantes encontrados na dieta (frutas e vegetais), como forma de tratamento de algumas doenças, a sua eficácia tem sido limitada pela dificuldade de encontrar uma concentração ativa no cérebro que não leve a tantos efeitos adversos. ⁷

7. Fitoterapia na Doença de Alzheimer

Diversos estudos têm associado e demonstrado a relação direta entre a composição rica em flavonoides ou outros compostos fenólicos e a atividade anticolinesterásica dos extratos de plantas.^{5,40,49}

Os compostos fenólicos como o ácido cafeico, ácido clorogénico (ácido hidroxicinamico) e flavonoides como a quercetina têm sido descritos como dos inibidores mais potentes tanto contra a atividade da AChE como BChE.⁵⁰

Os flavonoides são uma das classes de compostos mais abundantes nas plantas e dos mais responsáveis pela atividade antioxidante das próprias e conseqüentemente importantes na atividade biológica para os humanos. Estudos levados a cabo por Khan *et al.* (2009) demonstraram que a quercetina é o flavonoide mais potente na inibição das enzimas colinesterásicas, tendo a capacidade de inibir competitivamente *in vitro* tanto a AChE como BChE, com valores de IC₅₀ de 353,85 µM e 420,76 µM respetivamente. No mesmo estudo foi ainda utilizada a galantamina como controlo positivo a qual apresentou um valor de IC₅₀ de 0,75 µM. Contudo outro tipo de flavonoides, como a rutina ou o canferol mostraram serem inefetivos contra ambas as enzimas.⁵¹

No caso da DA, alguns fenólicos naturais parecem conseguir interferir com alguns mecanismos enzimáticos envolvidos na formação de agregados beta-amilóide derivados da proteína APP.⁵² Os flavonoides miricetina, quercetina, canferol e apigenina demonstraram inibir a atividade *in vitro* da enzima responsável pela clivagem da proteína APP (BACE-1) contudo apenas a quercetina e miricetina apresentaram resultados *in vivo* e *in vitro* semelhantes, com concentrações não citotóxicas nas células neuronais.⁵³

Além de ser importante a presença de um grupo hidroxilo e de um grupo aromático, a presença de um açúcar glicosídico bem como a sua posição também é importante na atividade anticolinesterásica dos flavonoides. Assim, o número de xantonas está relacionado com a capacidade de inibir tanto a AChE como a BChE e se a xantona tiver sete açúcares torna-se ainda mais ativa contra as enzimas colinesterásicas.⁵¹

Como tal, vários estudos têm sido desenvolvidos, ao longo destas últimas décadas, a fim de se encontrar metabolitos bioativos presentes nas plantas que possam atuar como inibidores colinesterásicos apresentando um bom balanço de inibição entre ambas as enzimas, AChE e BChE, em que resulte a máxima eficácia e mínima toxicidade.

7.1. Plantas estudadas

As folhas de *Ginkgo Biloba* (ação de flavonoides e dos terpenos como ginkgolides) e os frutos da espécie *Lycium Barbarum* (vulgarmente conhecidos como bagas de Goji) têm sido fortemente estudados e usados como estimuladores de memória devido aos seus elevados efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, demonstrando uma melhoria no retardamento dos sintomas característicos da DA, tanto comparado com placebo como com inibidores colinesterásicos, nomeadamente com Rivastigmina e Donepezilo.⁵⁴

Outras plantas também têm demonstrado uma potente atividade anticolinesterásica, nomeadamente da família Lamiaceae como a *Melissa officinalis* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Salvia officinalis* L. ou *Lavandula angustifolia* Miller, em que os principais compostos com efeitos neuroprotetores são os compostos fenólicos, nomeadamente o ácido hidroxicinâmico (como o ácido rosmarínico, ácido ferúlico, cafeico e clorogénico),^{5,6} bem como a família Amaryllidaceae, cujos principais componentes bioativos responsáveis pela atividade inibitória colinesterásica são os alcaloides.²⁴ Os alcaloides com maior atividade inibitória da acetilcolinesterase são a epinorgalantamina, assoanina, palmatina, vaganina, sanguinina e a huperzina A.⁵⁵

Neste trabalho de dissertação foram analisados cinco extratos aquosos das seguintes plantas colhidas na região do Algarve, Portugal: *Geranium purpureum* Vill., *Myrtus communis* L., *Olea europaea* var. *sylvestris* (Mill.) Lehr., *Rubus ulmifolius* Schott e *Portulaca oleracea* L.

7.1.1 *Geranium purpureum* Vill.

A espécie *Geranium purpureum* Vill., pertencente à família Geraniaceae, é uma planta aromática muito abundante na zona mediterrânica e submediterrânica, que cresce espontaneamente durante todo o ano essencialmente em áreas secas e montanhosas.⁵⁶ Popularmente conhecida como Erva de São Roberto, as infusões das partes aéreas desta planta eram usadas, na medicina antiga, essencialmente em problemas gástricos e digestivos como acidez gástrica, gastrites e dores de estômago, mas também em estados gripais e em úlceras.^{57,58}

A sua constituição rica em compostos fenólicos como ácido gálico, ácido cafeico, hidroxitirosol (o metabolito em maior abundância, representando cerca de 10% da constituição total da Erva de São Roberto), bem como em taninos, óleos essenciais e flavonoides como a quercetina, canferol e rutina ⁵⁶, atribui a esta planta importantes propriedades terapêuticas, entre as quais, protetor gástrico, efeito antioxidante, antibacteriano (nomeadamente contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* e *Staphylococcus aureus*) ⁵⁹ antidiabético, antisséptico, anti-inflamatório e anti-proliferativo. ⁵⁷

7.1.2 *Myrtus communis* L.

Outra planta estudada foi a murta, que pertence à família Myrtaceae e mais especificamente à espécie *Myrtus communis* L.. É uma planta comum na flora mediterrânica predominante no Centro e Sul de Portugal continental. ⁶⁰

A murta tem sido usada na medicina tradicional como agente anti-inflamatório (nomeadamente em doenças inflamatórias crónicas, com inibição significativa das enzimas ciclo-oxigenase (COX)), antinociceptivo (devido sobretudo à presença rica em flavonoides), ⁶¹ agente antioxidante, antisséptico, antimicrobiano, e também com efeito hipoglicemiante e adstringente. ^{62,63} As infusões das folhas eram usadas tradicionalmente como tratamento de eczema, psoríase, asma ou infeções urinárias enquanto que as decocções para lavagens vaginais e enemas. ⁶⁴ Por serem ricos em taninos, os extratos desta planta devem ser usados com precaução e em concentrações moderadas, uma vez que o efeito adstringente causado pelos taninos pode originar também perturbações digestivas como náuseas ou vómitos. ⁶⁰

Extratos das folhas desta planta aromática são constituídos essencialmente por compostos fenólicos como taninos, ácidos fenólicos (ácido cafeico, elágico, gálico e ferúlico) e por flavonoides (essencialmente miricetina mas também quercetina, catequinas e os seus derivados, como por exemplo miricetina-3-d-galactosido) ⁶²

Alguns estudos demonstraram que os extratos de folhas de *M. communis* apresentavam maior atividade antioxidante e maior conteúdo fenólico comparado com os extratos de outras partes da mesma planta. ^{65,66} A variação das condições de infusão como o tempo e a temperatura afetam a extração e conseqüentemente o teor fenólico obtido. Assim, estudos demonstraram que o facto de aumentar o tempo de infusão favorece uma maior eficácia na extração dos compostos bioativos da *M. communis* tendo-se verificado

que extrações aquosas de quinze minutos eram mais eficientes tanto na extração de compostos fenólicos como de flavonoides, como também na maior capacidade de captura do radical DPPH.⁶⁴ Tal sobreposto foi também usado nesta dissertação tendo todas as extrações aquosas sido submetidas a quinze minutos de extração.

7.1.3 *Olea europaea* var. *sylvestris* (Mill.) Lehr.

A Oliveira (*Olea europaea* L., Oleaceae) é uma das árvores mais conhecidas e utilizadas nos países mediterrânicos com um grande valor económico, histórico e cultural. A primeira utilização das suas folhas remonta do século XIX onde eram usadas como infusões ou decocções aquosas a fim de tratar febres causadas pela malária.⁶⁷

Desde então, estudos têm demonstrado o seu potencial efeito como anti hipertensor, hipoglicemiante, contra infeções antimicrobiana principalmente contra *H. pylori*, bem como infeções do trato respiratório e intestinal, ação antiviral, tratamento da gota, anticancerígeno, entre outros.⁶⁷

De acordo com a literatura é nas folhas de oliveira que se encontram a maior concentração de compostos fenólicos⁶⁸, principais responsáveis pelas potenciais atividades antioxidantes das folhas de oliveira.⁶⁹

Em Portugal, a *O. europaea* pode ser dividida em duas variedades, a var. *europaea* e var. *sylvestris* (vulgarmente designada por zambujeiro).⁶⁰ A variedade *europaea* da espécie é a planta cultivada, que foi desenvolvida pelo homem em todas partes da bacia mediterrânea a partir da variedade *sylvestris*.

Nas extrações aquosas realizadas neste trabalho de dissertação apenas foram utilizadas folhas de *O. Europaea* var. *sylvestris*, contudo é importante de salientar que toda a literatura encontrada, tanto sobre a constituição das folhas de oliveira como os testes realizados, se referiam à espécie cultivada (var. *europaea*) e não sobre a espécie nativa (var. *sylvestris*) que foi a utilizada neste trabalho de dissertação, o que constitui uma limitação não só para a comparação dos resultados obtidos com outros autores mas também para a identificação, através do método HPLC, dos metabolitos bioativos presentes nesta variedade de planta o qual também não foi possível realizar nesta dissertação.

Apenas um estudo elaborado por Altinyay et al. (2011) testou a atividade antioxidante dos extratos aquosos das folhas de *O. europaea* var. *sylvestris*. o qual detetou uma atividade antioxidante semelhante à da oleuropeína. Porém esta atividade apenas foi testada qualitativamente e não quantitativamente, através do método qualitativo DPPH-TLC, onde numa placa TLC de sílica gel foi pulverizada uma solução de 0,2% de DPPH e a oleuropeína foi usada como *standard*.⁷⁰

Existem essencialmente cinco grupos de compostos bioativos presentes nas folhas de *O. europaea* L.: os compostos fenólicos (tirosois, hidroxitirosois, vanilina, ácido vanílico e ácido cafeico); seicoiridoides (oleuropeína e verbascósido) os flavonóis (rutina); flavon-3-ol (catequinas) e flavonas (luteolina, diosmetina, apigenina, luteolin-7-*O*-glucosido, diosmetina-7-*O*-glucosido e apigenina-7-*O*-glucosido).⁶⁷ De todos estes, o composto mais abundante nas folhas de *O. europaea* é a oleuropeína, seguido do hidroxitirosois e das flavonas-7-glucosídeos (especialmente a luteolina-7-*O*-glucosido), os quais são encontrados em grandes quantidades nas folhas de oliveiras cultivadas em diferentes zonas de Portugal.^{71,72}

Num estudo realizado por Wang et al. (2011) foram identificados e isolados três constituintes das folhas de *O. europaea* L., através do método DPPH-HPLC, como os que apresentavam a maior atividade antioxidante de todos os compostos presentes nas folhas de oliveira: oleuropeína, luteolina-7-*O*-glucosido e verbascósido.⁷³ Apesar da oleuropeína ser o constituinte em maior abundância nas folhas de oliveira, a sua presença por si só, não constitui um grande potencial efeito antioxidante. Existe portanto um possível efeito sinérgico entre os compostos seicoiridoides juntamente com os flavonóides e fenólicos.⁷⁴ São descritos alguns benefícios terapêuticos relativos à oleuropeína, nomeadamente a capacidade de diminuir a peroxidação lipídica, melhorar o metabolismo lipídico, bloquear os canais cálcio e atuar diretamente na prevenção de problemas cardíacos e obesidade.⁷⁵ Foi demonstrado ainda em testes *in vivo* em modelos com ratos, que a oleuropeína tem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica.⁷⁶ A oleuropeína é um composto pouco polar pelo que é mais eficientemente extraído das folhas de oliveira por solventes orgânicos. Contudo, verificou-se em alguns estudos que extrações aquosas conseguiam extrair, aproximadamente, 80% de oleuropeína comparado com extrações alcoólicas, não havendo diferenças nos valores de TPC entre ambos os extratos.⁷⁷

7.1.4 *Portulaca oleraceae* L.

A beldroega (*Portulaca oleraceae* L.) é uma planta anual que se pode encontrar espalhada em todo o mundo, desde Europa, China até Austrália. O seu consumo mais comum é em saladas mas também pode ser usada em chá ou em sopas.⁷⁸

O seu uso é cada vez mais abundante devido a ser uma fonte rica em compostos que apresentam efeitos benéficos para saúde como os ácidos gordos ómega-3 e ómega-6, vitaminas e minerais especialmente cálcio e potássio, β -carotenos, ácido ascórbico e α -tocoferol. Esta planta é também constituída em grandes quantidades por ácidos orgânicos, alcaloides, flavonoides (essencialmente flavonol-O-glicosidos, apigenina, miricetina, quercetina e luteolina), terpenoides (conhecidos como ginkgolidos) e compostos fenólicos.^{78,79}

Diversas propriedades biológicas têm sido atribuídas a esta planta, nomeadamente efeito antibacteriano, analgésico e anti-inflamatório, antiséptico, antiespasmódico, diurético, relaxante muscular, broncodilatador e antitússico.⁸⁰ Também tem sido usada no tratamento de lesões dermatológicas e picadas de insectos ou cobra e em doenças cardiovasculares.⁷⁸ Os extratos aquosos demonstraram ainda efeito neuroprotetor, através da diminuição de produção de EROs e aumento da atividade antioxidante de algumas enzimas.⁸¹

As folhas apresentam uma maior concentração de compostos fenólicos do que os caules, o que sugere que nas folhas a síntese de metabolitos secundários é mais preponderante. Os extratos aquosos de folhas de beldroega demonstraram ainda não apresentar nenhuma citotoxicidade ou genotoxicidade e têm sido considerados seguros para o consumo diário.⁸²

7.1.5 *Rubus ulmifolius* Schott

Por fim a última planta analisada nesta dissertação pertence à espécie *Rubus ulmifolius* Schott, família Rosaceae, sendo popularmente conhecida como amoreira silvestre ou silva. As suas folhas são tradicionalmente utilizadas por terem uma ação diurética, antidiabética, anti-inflamatória, antitússica, antidiarreica, analgésica (nomeadamente na diminuição das dores menstruais) ou ação antisséptica bucal em aftas

e gengivites.^{58,83,84} Estudos recentes demonstraram ainda propriedades antimicrobianas, não só contra *Helicobacter pylori*⁸⁵ como contra *Staphylococcus aureus*.⁸⁶

As folhas de *R. ulmifolius* possuem uma forte atividade antioxidante, devido essencialmente à sua constituição rica em ácido cafeico, ácido ferrúlico, quercetina, canferol e ácido elágico, tal como foi reportado por dois estudos diferentes com folhas de amoreira silvestre em Itália.^{84,85} Panizzi et al. (2002) relacionou ainda a presença de flavonoides, nomeadamente a quercetina e o canferol como principais metabolitos na prevenção de colesterolémia e cancro.⁸⁶

O ácido elágico é um dos compostos presentes nas folhas de silva em maior concentração e conseqüentemente é associado a maiores valores no método TAA, obtidos por Martini et al. (2009). Os compostos glucosilados, como por exemplo a quercetina 3-O- β -glucopiranosido, apresentaram valores de TAA menores do que as suas formas livres (quercetina).⁸⁵ Por seu lado, o composto canferol-3-O-(p-cumarol)- β -D-glucopiranosido, ao ter na sua constituição um grupo cumarínico, adquire, provavelmente, a sua forte atividade antioxidante. Contudo mais estudos são precisos para investigar as propriedades farmacológicas dos extratos desta planta.⁸⁴

8. Material e Métodos

8.1. Reagentes

Neste estudo foram utilizados os seguintes reagentes: Acetilcolinesterase (AChE) de *Electrophorus electricus* tipo V-S, Butirilcolinesterase de soro de cavalo (BChE), iodeto de Acetilcolina (ATCI), iodeto de Butirilcolina (BTCl), que foram adquiridos através da Sigma-Aldrich Co.[®] (St. Louis, MO, EUA). O 2,2 difenil-1-picrilidrazila (DPPH), trolox, reagente Folin-Ciocalteu, ácido gálico, molibdato de amónio, quercetina foram comprados na Sigma-Aldrich Co.[®] (Reino Unido). O carbonato de sódio, 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), cloreto de alumínio hexahidratado, etanol, ácido sulfúrico, tampão fosfato de sódio, ferrocianeto de potássio, cloreto de ferro foram adquiridos na Merck (Alemanha); e o cloridrato de tacrina, 5,5'-ditiobis (ácido nitrobenzoico) (DTNB), adquiridos através da Alfa Aesar[®] (Alemanha).

8.2. Equipamento

O equipamento usado neste estudo foram uma balança digital e uma balança analítica da marca Ohaus[®] modelo Explorer Pro, um espectrofotómetro T70+ UV/VIS, uma placa de aquecimento da VWR[®], um termómetro digital HI98501 Checktemp[®] da Hanna instruments, um medidor pH 2001 da Crison e a Estufa da marca Binder[®]

8.3. Material Vegetal

Para a elaboração deste trabalho foram utilizados extratos de cinco plantas da região do Algarve (Portugal), nomeadamente, *Myrtus communis* L., *Olea europaea* var. *silvestris* (Mill.) Lehr., *Rubus ulmifolius* Schott, *Geranium purpureum* Vill., e *Portulaca oleracea* L.

À exceção da *Portulaca oleracea* L., todas as plantas estudadas são plantas silvestres, uma vez que são espécies de plantas que nasceram e reproduziram-se espontaneamente sem qualquer intervenção do Homem.

A *Myrtus communis* L. foi colhida na Universidade do Algarve, Campus de Gambelas – Faro (N 37° 2' 45.316'' W 7° 58' 29.953'') enquanto que as outras plantas foram colhidas na Fonte de Benémola – Loulé (N 37° 11' 56.206'' W 8° 0' 15.512''). A *Portulaca oleracea* por sua vez, apesar de também ser considerada uma planta silvestre, mais concretamente uma planta daninha (cresce onde não é desejável), a espécie desta planta utilizada neste trabalho foi cultivada, regada e adquirida no mercado municipal de Faro (N 37° 01' 13.4'' W 7° 55' 44.9'').

No quadro seguinte (Quadro 8.3) encontram-se esquematizados o local, data de colheita, as condições de cultivo e respetivas partes das plantas usadas para a preparação dos extratos usada nesta dissertação. O material vegetal foi autenticado pelo Coronel José Rosa Pinto (Ualg - Herbário da Universidade do Algarve).

Quadro 8.3. Local, data de colheita, condições de cultivo e respetivas partes analisadas dos cinco extratos de plantas estudados

Planta	Local de colheita	Data de colheita	Condições de cultivo	Parte usada
<i>Myrtus Communis</i> L.	Universidade do Algarve, Campus de Gambelas (Faro)	2014	Não Cultivada	Folhas
<i>Olea Europaea</i> var. <i>Sylvestris</i> (Mill.) Lehr.	Fonte Benémola (Loulé)	2014	Não Cultivada	Folhas
<i>Rubus Ulmifolius</i> Schott	Fonte Benémola (Loulé)	2014	Não Cultivada	Folhas
<i>Geranium Purpureum</i> Vill.	Fonte Benémola (Loulé)	2014	Não Cultivada	Parte aérea
<i>Portulaca Oleracea</i> L.	Mercado de Faro	2015	Cultivada	Folhas

8.4. Preparação dos extratos

Todas as plantas foram secas na estufa a temperatura constante de 45° C durante setenta e duas horas. No caso da *Portulaca oleracea* L., foi necessário deixá-la a secar na estufa durante nove dias, provavelmente por ser a única planta regada e como tal apresentava um grande conteúdo aquoso na sua constituição.

Depois das plantas estarem secas, procedeu-se à redução das mesmas a pó através do auxílio de um moinho de cozinha. Para a preparação dos extratos foram utilizadas, em todas as plantas secas, apenas as folhas, exceto no caso do *Geranium purpureum* Vill. o qual foi utilizada toda a parte aérea (folhas, flores e caule).

Pesou-se 2 g de planta seca e dissolveu-se em 30 mL de água destilada durante 15 minutos a uma temperatura de 95° C e com agitação constante de 200 rpm. Após efetuadas todas as extrações, estas foram filtradas com papel de filtro e guardadas em Eppendorfs no frio a -20° C até uso futuro. Paralelamente colocou-se na estufa 3 Eppendorfs, com 1 mL de extrato aquoso em cada um, durante uma semana a temperatura constante de 60°C, a fim de se poder calcular, posteriormente, o peso seco de cada extrato.

9. Metodologia

9.1. Determinação do conteúdo em fenólicos totais (TPC)

A determinação do conteúdo em fenólicos totais (TPC) foi adaptada do método espectrofotométrico proposto por Huang et al. (2006). Neste método foram preparadas uma solução de reagente Folin-Ciocalteu e uma solução saturada de Carbonato de Sódio 7,5%.⁸⁷

Cada extrato (0,1 mL) foi misturado com 0,50 mL de solução de Folin-Ciocalteu e 0,4 mL de solução saturada de Carbonato de Sódio (7,5%). Após 30 minutos no escuro e à temperatura ambiente, as absorvências foram lidas no espectrofotómetro a 765 nm, contra um branco. Todas as análises foram realizadas em triplicado.

A quantificação dos compostos fenólicos totais foi realizada através de uma curva de calibração de ácido gálico, sendo os valores expressos em mg equivalentes de ácido gálico (GAE) /g de peso seco.

9.2. Determinação do conteúdo em flavonoides totais (TFC)

A determinação do teor em flavonoides totais (TFC) foi efetuada de acordo com o método espectrofotométrico descrito por Lamaison et al. (1990) e com as devidas alterações efetuadas por Quettier-Deleu et al. (2000).

Neste método foi preparado uma solução metanólica de cloreto de alumínio 2%, a qual (0,8 mL) foi misturada com a solução de extrato aquoso (0,4 mL). As amostras foram deixadas 10 minutos no escuro e à temperatura ambiente, procedendo-se posteriormente às leituras das absorvências, no espectrofotómetro, a 430 nm, contra um branco. As análises foram efetuadas em triplicado.⁸⁸

A quantificação dos flavonoides totais foi efetuada através de uma curva de calibração com quercetina, sendo os valores expressos em mg equivalentes de quercetina (QE) /g de peso seco.

9.3. Determinação da atividade antioxidante total (TAA)

Este método, utilizado para determinar a atividade antioxidante total presente em diferentes extratos de plantas, foi realizado de acordo com o descrito por Prieto et al. (1999), no qual há monitorização da capacidade dos compostos antioxidantes da amostra analisada de reduzirem o molibdénio VI em molibdénio V, originando um complexo fosfato/molibdénio V de coloração verde.⁸⁹

Assim, à medida que a solução de fosfato de molibdénio se reduz, esta passa a adquirir uma coloração verde em vez da amarela como se observava inicialmente (Figura 9.3.1). A absorvência do complexo originado é determinada espectrofotometricamente a 695 nm, e valores maiores indicam uma atividade maior do complexo fosfomolibdénio, ou seja, maior presença de atividade antioxidante nos extratos em estudo.

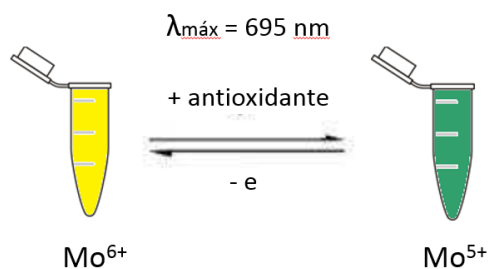


Figura 9.3.1. Esquema representativo da reação de redução do molibdénio VI em V

Para a realização deste método procedeu-se à preparação do reagente TAA, através da adição de 3,36 mL de Ácido sulfúrico 0,6M a 10 mL de água destilada seguida da adição de 0,494 g de molibdato de amónio 4mM e 0,397 g de fosfato de sódio 28mM, perfazendo-se o volume para 100 mL.⁸⁹

Para a determinação da atividade antioxidante total (TAA) misturou-se 0,1 mL de amostra de extrato com 1 mL de reagente TAA num Eppendorf. A mistura foi incubada a 95° C durante 90 minutos e, posteriormente, foram lidas as absorvências das amostras a 695 nm.

Para o cálculo da atividade antioxidante utilizou-se uma curva de calibração com Ácido Ascórbico e a respetiva atividade antioxidante foi expressa em mg equivalentes de Ácido Ascórbico (AAE) / g peso seco.

9.4. Determinação do poder redutor (RP)

Este método colorimétrico, descrito inicialmente por Oyaizu em 1986, tem como principal objetivo detetar espectrofotometricamente a presença de compostos redutores (por exemplo antioxidantes) pela sua habilidade para reduzir o ferro férrico (Fe^{3+}), presente no complexo de ferrocianeto, em ferro ferroso (Fe^{2+}).⁹⁰

Esta reação de redução ocorre a pH ligeiramente neutro (pH = 6,6) e é caracterizada por uma mudança de cor, de amarela para tons de azul ou azul-esverdeado, dependendo da capacidade do poder redutor dos diferentes extratos (Figura 9.4.1). Quanto maior for a absorvência da mistura, ou seja quanto maior forem as miligramas equivalentes de Trolox (TE) por grama de peso seco, maior poder redutor da amostra de extrato em estudo.^{90,91}

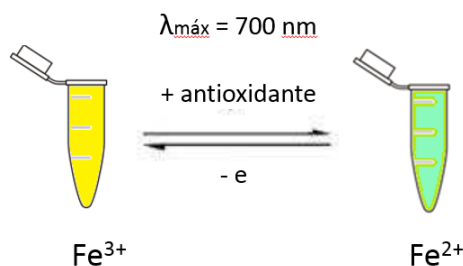


Figura 9.4.1. Esquema representativo da reação de redução do Fe^{3+} em Fe^{2+} , através do método RP

O teste realizado foi adotado do método descrito por Oyaizu (1986) com pequenas alterações, concretamente, os volumes de todos os reagentes foram diminuídos para metade. Foi necessário preparar várias soluções nomeadamente solução de cloreto férrico (0,1% m/v), tampão fosfato 0,2M (pH 6,6), solução ferrocianeto de potássio (1%, m/v), solução de Ácido Tricloroacético (TCA) (10%, m/v) e solução de HCl 1M.

Procedeu-se à adição de 0,25 mL de tampão fosfato, 0,25 mL de ferrocianeto de potássio e 0,1mL de extrato e incubou-se a 50° C. Após 20 minutos, adicionou-se 0,25 mL de solução TCA e centrifugou-se a 650 x g durante 10 minutos. Recolheu-se 0,5 mL de sobrenadante, o qual foi misturado com 0,5 mL de água destilada e 0,1 mL de cloreto de ferro. As absorvências foram lidas espectrofotometricamente a 700 nm e a atividade do poder redutor foi determinada com base numa reta de calibração com Trolox, sendo os resultados expressos em mg equivalentes de Trolox (TE) / g de peso seco.

9.5. Determinação do poder antioxidante de redução do ferro pelo método FRAP

O método FRAP é baseado no mesmo fundamento teórico que o método RP, isto é, no poder redutor do ferro por parte de compostos presentes nos extratos de plantas. Contudo, no método FRAP, o potencial de redução dos compostos antioxidantes é medido com base na capacidade de redução do complexo férrico-tripridiltriazina (Fe^{3+} -TPTZ) na sua forma ferrosa (Fe^{2+} -TPTZ). Para que esta reação ocorra é necessário a presença de uma solução tampão que confira um pH ácido, originando como produto final um complexo reduzido de cor azul intensa, que pode ser monitorizado espectrofotometricamente a 593 nm.⁹²

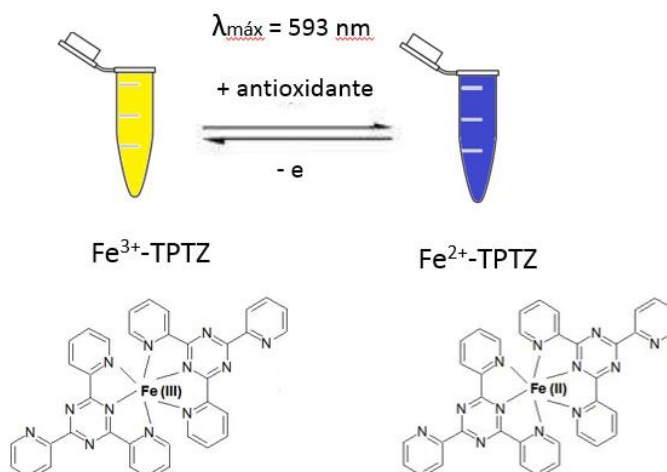


Figura 9.5.1. Esquema representativo da reação de redução do ferro, através do método FRAP

O método FRAP realizado neste estudo foi descrito por Benzie et al. (1999), com algumas modificações propostas por Thaipong et al. (2006).

Os reagentes preparados para a execução deste método foram tampão acetato 300 mM, solução cloreto de ferro (FeCl_3) 20 mM e 2,4,6-tripridil-*s*-triazina (TPTZ) 10 mM em 40 mM de HCl. De seguida, procedeu-se à mistura destes reagentes: 25 mL de tampão acetato, 2,5 mL de TPTZ e 2,5 mL de cloreto de ferro, os quais foram incubados a 37° C. Esta mistura passa a ser designada de solução FRAP.⁹³

Foram adicionados 0,1 mL de amostra de extrato a 0,9 mL da mistura anteriormente preparada (solução FRAP). Após 30 minutos no escuro, foi lida a absorvência a 593 nm.

A determinação da atividade antioxidante foi feita com base numa reta de calibração com Trolox e os resultados foram expressos em mg equivalentes de Trolox (TE) / g peso seco.

Embora este método tenha sido desenvolvido originalmente com o intuito de determinar o poder antioxidante do plasma⁹², tem-se verificado uma alta reprodutibilidade do método, aliado à simplicidade de execução e ao seu custo reduzido devido aos reagentes serem de fácil preparo e acesso.⁹⁴

Porém na interpretação dos resultados deste método é importante ter em conta que este teste em específico mede a capacidade dos compostos antioxidantes (agentes redutores) de atuarem por um mecanismo de transferência de eletrões, o que pode não refletir necessariamente a atividade antioxidante da amostra do extrato em análise, uma vez que, os compostos antioxidantes podem ter vários mecanismos de ação (entre eles, transferência de átomos de hidrogénio) e como tal podem existir compostos antioxidantes presentes nos extratos que não estão a ser detetados, como é o caso da maioria dos agentes fenólicos ou compostos contendo grupos tióis que exibem uma atividade antioxidante por um mecanismo de doação de átomos de hidrogénio e não por transferência de eletrões.⁹⁵

Assim, nem todos os agentes redutores que têm a capacidade de reduzir o ferro são antioxidantes e nem todos os compostos antioxidantes são capazes de reduzir o ferro (como é o caso da glutathione, constituída por grupos tióis). Além disso, uma vez que este método não inclui na sua metodologia nenhum substrato oxidável, não se consegue obter informações sobre as propriedades protetoras dos antioxidantes pela sua capacidade de destoxificação das espécies reativas em oxigénio.⁹⁴

9.6. Determinação da atividade de captura de radicais avaliada pelo método DPPH

A determinação da atividade de captura de radicais livres pelos extratos aquosos em estudo foi realizada através do método DPPH, descrito por Yen et al. (2000). A maior vantagem deste método é o facto de ser fácil, económico e rápido na monitorização da atividade de captura de radicais por parte de antioxidantes não-enzimáticos.

Para a realização deste método foi preparada uma solução metanólica de DPPH 0,16 mM, procedendo-se de seguida à mistura de 0,5 mL dessa solução com 0,5 mL de

amostra de extrato. A mistura foi mantida no escuro, à temperatura ambiente, e após 30 minutos leu-se espectralmente a absorvência a 517 nm.⁹⁶

A atividade de redução do radical livre DPPH• foi determinada através do IC₅₀, através da seguinte fórmula:

$$\% I = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100;$$

Em que A₀ corresponde à absorvência do controlo (branco) e A_t à absorvência do extrato. O IC₅₀ foi determinado através de uma regressão linear entre a percentagem de absorvência calculada (%I) e a respetiva concentração de extrato.

O 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH•) é um radical estável, de cor roxa, cuja absorção máxima se situa a 517 nm. Este radical sintético é relativamente mais estável comparado com outras espécies que têm um papel importante no mecanismo de *stress* oxidativo nos sistemas biológicos como é o caso do radical superóxido ou espécies hidroxilo.⁹⁷

Os compostos antioxidantes presentes nos extratos reagem com o radical DPPH• reduzindo-o, devido não só à transferência de eletrões como doação de átomos de hidrogénio que permite a neutralização do radical livre.⁹⁵ Consequentemente verifica-se uma alteração da cor da solução, de roxa para amarela, resultando numa diminuição da absorvência. Assim, uma descoloração da solução final indica a potencial atividade de captura do radical DPPH• dos compostos antioxidantes, ou seja, absorvências mais baixas indicam uma atividade mais elevada de captura do radical livre.

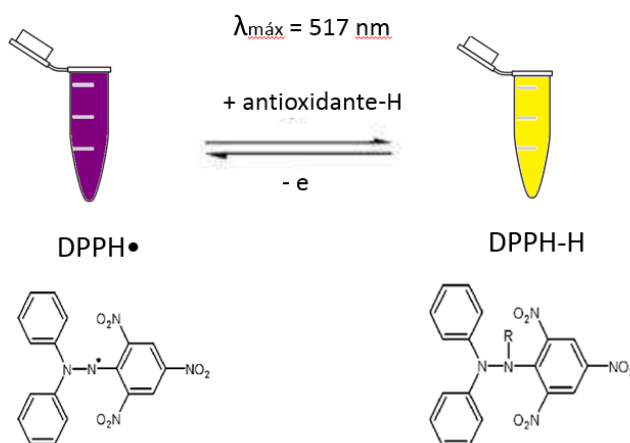


Figura 9.6.1. Esquema representativo da atividade de captura de radicais avaliada pelo método DPPH

Contudo há algumas limitações deste método que se devem ter em conta, tais como a possível interferência entre a absorção do radical DPPH• e a cor natural presente nos extratos de plantas analisados; bem como o facto de o DPPH• ao ser um radical lipofílico vai ter uma acessibilidade limitada aos componentes hidrofílicos que possam estar presente nas amostras de extrato, pelo que é sempre necessário a preparação de uma solução alcoólica de DPPH•, para permitir a máxima solubilidade e fidedignidade dos resultados obtidos, porém tem-se que ter cuidado uma vez que o uso de etanol pode levar à precipitação de compostos presentes nos extratos nomeadamente proteínas.⁹⁴ Outra das limitações deste método reside no facto do radical DPPH• não apresentar nenhuma semelhança com o radical peroxil que reage reativamente na peroxidação lipídica, pelo que muitos antioxidantes que reagem fortemente e rapidamente com os radicais peroxil podem reagir lentamente ou mesmo serem inertes ao DPPH•.⁷³ Por fim, pode haver ainda a dificuldade de avaliar radicais livres biológicos, dado o DPPH• ser um radical livre sintético bem como dificuldade de detetar substâncias pró-oxidantes, uma vez que só há monitorização do poder redutor do antioxidante (e qualquer composto ao doar um eletrão, oxida-se).⁹⁴

9.7. Determinação da atividade inibitória da acetilcolinesterase (AChE)

O método que permite a avaliação *in vitro* da atividade inibitória das enzimas acetilcolinesterases e butirilcolinesterases pelos extratos de plantas foi originalmente proposto por Ellman et al. em 1961.⁹⁸

Neste método colorimétrico, também designado por método de Ellman, o iodeto de Acetilcolina (ATCI) e o iodeto de Butirilcolina (BTCI), análogos do substrato natural acetilcolina e butirilcolina respetivamente, são usados como substratos da reação, e o 5,5'- dithiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (vulgarmente designado por DTNB ou Reagente de Ellman) é utilizado para a monitorização da atividade colinesterásica.^{98,99}

A hidrólise do substrato ATCI ou BTCI, pela acetilcolinesterase ou butirilcolinesterase respetivamente, origina como produtos da reação tiocolina e acetato. A tiocolina reage com o DTNB, resultando na formação de um composto amarelo (ião 5-

thio-2-nitrobenzoico), que é lido espectralmente a 412 nm, como se pode observar na Figura 9.7.1.

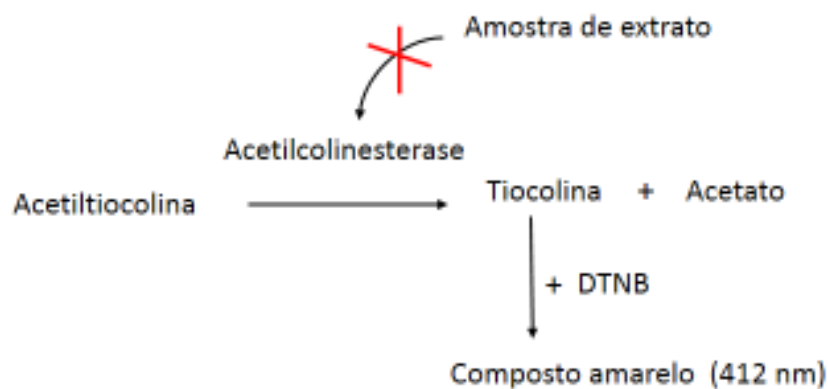


Figura 9.7.1. Esquema representativo da determinação da atividade inibitória da acetilcolinesterase

O objetivo desta metodologia consiste em avaliar a capacidade dos diferentes extratos em estudo de competirem com a enzima, inibindo-a. Assim, a amostra de extrato ao ter maior afinidade para o substrato, leva a que a enzima não se consiga ligar, logo não há hidrólise do substrato, resultando consequentemente no aumento da concentração de acetilcolina na fenda sináptica.

Dado que a DA é caracterizada por uma atividade catalítica excessiva das acetilcolinesterases e butirilcolinesterases, levando a uma diminuição de acetilcolina no tecido cerebral, a capacidade dos extratos em inibirem a atividade dessas enzimas permite constituir uma nova fonte para a descoberta de moléculas que propiciem uma terapêutica profilática mais seletiva e efetiva da DA.

Neste estudo, a determinação da atividade inibitória enzimática pela acetilcolinesterase (AChE) foi realizada utilizando uma adaptação do método de Ellman et al. (1961) descrito por Sancheti et al. (2010), onde foram preparadas as seguintes soluções: solução tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8); solução tampão fosfato de sódio (pH 7,2); solução enzimática de AChE 0,03 U/mL em tampão Tris-HCl; solução do substrato ATCI 1,8 mM em água miliQ e DTNB 0,3 mM (Reagente de Ellman). Foi ainda preparada uma solução de Tacrina 10 mM que foi utilizada como controlo positivo.

Dado que este teste se trata de um método colorimétrico caracterizado pela formação de uma solução amarela originada quando ocorre inibição da enzima, e como

os extratos aquosos apresentam por si só uma cor natural amarelada, foi necessário preparar, para além de um Branco (Controlo) e Amostra do Extrato aquoso, um Eppendorf com uma amostra designada de Cor Natural.

O Branco funcionou como um ensaio de controlo da reação, considerando-se como tendo a atividade máxima inibitória (100%) e utilizou-se água destilada (solvente) em vez de extrato. A amostra de Cor Natural ajuda a evitar falsos positivos, através da medição da absorvência referente à cor presente naturalmente nos extratos e não da cor resultante da inibição enzimática, por isso apenas se misturou o extrato de cada planta e o tampão, não havendo presença de enzima naquela amostra.

Na Tabela 9.7.1 encontram-se esquematizadas as quantidades de reagentes que foram adicionadas a cada Eppendorf.

Tabela 9.7.1. Volume de reagentes utilizados na determinação da atividade inibitória da acetilcolinesterase

	V _{ACHE} (μL)	V _{EXTRATO} (μL)	V _{TAMPÃO TRIS-HCL} (μL)
Branco	100	50 (água destilada)	900
Amostra de extrato	100	50	900
Cor natural do extrato	-	50	1000

As misturas foram incubadas a 4° C durante 30 minutos e de seguida adicionou-se, a todos os Eppendorfs, 100 μL de DTNB e 100 μL de substrato ATCI. Levou-se ao banho a 37° C e após 20 minutos as absorvências foram lidas espectrofotometricamente a 412nm. O ensaio foi efetuado em triplicado para cada amostra de extrato.

A percentagem de inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) foi determinada através da seguinte fórmula:

$$\% I = \frac{A_0 - (A_s - A_n)}{A_0} \times 100;$$

Em que A₀ corresponde à absorvência do Branco (Controlo); A_s à absorvência da Amostra de Extrato e A_n à absorvência correspondente à Cor Natural. O IC₅₀ foi determinado através de uma regressão linear entre a percentagem de absorvência calculada (%I) e a respetiva concentração de extrato, para cada planta estudada.

9.8. Determinação da atividade inibitória da butirilcolinesterase (BChE)

Os métodos baseados para a determinação da inibição da atividade enzimática da butirilcolinesterase (BChE) foram os mesmos utilizados para a acetilcolinesterase (AChE).^{98,100} Contudo, verificou-se que, com a concentração utilizada de enzima BChE e volumes propostos por Sancheti et al. (2010), a absorvência do branco (controlo) era muito reduzida (cerca de 0,328), e como tal não seria possível determinar os valores de IC₅₀ para os diferentes extratos aquosos, uma vez que com uma absorvência tão reduzida torna-se difícil conseguir obter pontos que nos permitam traçar uma reta de calibração com um R² razoável, podendo encontrar-se abaixo do limite de deteção. Assim, manteve-se a concentração inicial de substrato BTCI de 0,5 mM, da solução tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8) e do DTNB 0,3 mM, alterando-se apenas a concentração da solução da enzima BChE de 0,1 U/mL para 1 U/mL.

Relativamente aos volumes usados foram feitas várias alterações, modificando-se sequencialmente os volumes dos diferentes reagentes (Enzima, Substrato e Reagente de Ellman), a fim de perceber quais as condições ótimas para se obter a máxima absorvência possível da mistura. A solução tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8) foi adicionada à mistura sempre com o mesmo volume ajustado de 600 µL. As diferentes misturas controlo foram lidas espectrofotometricamente a 412 nm, após 4° C durante 30 minutos seguidas de 20 minutos a 37° C.

Na Tabela 9.8.1. encontram-se listados os diferentes volumes usados para cada reagente e a respetiva absorvência obtida. Como se pode observar a melhor absorvência obtida com um menor volume possível verificou-se quando se usou 100 µL de enzima butirilcolinesterase (BChE), 300 µL de substrato iodeto de Butiriltiocolina (BTCI) e 200 µL de DTNB (Reagente de Ellman).

Tabela 9.8.1. Volumes usados para cada reagente e respetiva absorvência obtida na determinação da atividade inibitória da butirilcolinesterase

V Enzima BChE 1 U/mL (μ L)	V substrato BTCI 0,5 mM (μ L)	V DTNB 0,3 mM (μ L)	Abs (412 nm)
100	100	100	0,433
400	400	400	1,156
400	100	400	0,523
100	400	400	1,150
100	400	100	0,600
100	400	200	0,996
100	200	200	0,810
100	300	200	0,975

Tal como para o método da determinação da inibição da atividade da acetilcolinesterase, neste caso, para a butirilcolinesterase, também foram preparadas três amostras: uma com o branco (controlo), outra com a amostra de extrato aquoso e outra relativa à cor natural presente nos extratos.

No caso da amostra do extrato aquoso foi adicionado 100 μ L de enzima butirilcolinesterase (BChE), 50 μ L de extrato e 600 μ L de tampão Tris-HCl 50 mM. Para o branco misturou-se 100 μ L de BChE, 600 μ L de tampão Tris-HCl 50 mM e 50 μ L de água destilada e para a amostra da cor natural, misturou-se 50 μ L de extrato e 700 μ L de tampão.

As misturas foram incubadas a 4° C durante 30 minutos e de seguida adicionaram-se, a todos os Eppendorfs, 200 μ L de DTNB e 300 μ L de substrato BTCI. Levou-se ao banho a 37° C e após 20 minutos as absorvências foram lidas espectrofotometricamente a 412nm.

O ensaio foi efetuado em triplicado para cada amostra de extrato. Foi ainda utilizado como controlo positivo uma solução de cloridrato de tacrina 10 mM.

A percentagem de inibição da atividade da enzima butirilcolinesterase (BChE) foi determinada através da seguinte fórmula:

$$\% I = \frac{A_0 - (A_s - A_n)}{A_0} \times 100;$$

Em que A_0 corresponde à absorvência do Branco (Controlo); A_s à absorvência da Amostra de Extrato e A_n à absorvência correspondente à Cor Natural. O IC_{50} foi determinado através de uma regressão linear entre a percentagem de absorvência calculada (%I) e a respetiva concentração de extrato, para cada planta estudada.

9.9. Análise estatística

Todas as análises foram feitas em triplicado e todos os resultados são expressos em média \pm desvio padrão para $n=3$.

O tratamento dos dados obtidos foi realizado com o auxílio do programa Excel (Microsoft Office 2013) da Microsoft®, para a elaboração de tabelas e gráficos, e com o programa SPSS® Statistics 23 da IBM®, o qual foi utilizado com o objetivo de analisar estatisticamente os resultados obtidos em todos os extratos estudados nos diferentes métodos. Para isso, recorreu-se a uma análise de variância (ANOVA), análise de correlação bivariada e uma análise de *clusters* hierarquizada.

Na análise de variância (ANOVA) testaram-se as diferenças significativas entre todos os extratos estudados nos diferentes métodos, nomeadamente através do teste de Levene, o qual avalia a homogeneidade de variância, permitindo verificar se a significância é superior ou inferior a 0,05 e aplicar, respetivamente, o teste LSD (*Least Significant Difference*) ou Games-Howell (análises post-hoc). Assim, os valores obtidos são considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$, ou seja, quando o valor de p é menor que 5% temos evidências para rejeitar a hipótese de igualdade de variâncias.

Relativamente à correlação bivariada, esta foi feita através da análise do coeficiente de correlação de Pearson (R) que mede o grau de relação linear (direção – positiva ou negativa, e magnitude da correlação – numa escala de 0 a 1) entre todos os métodos estudados neste trabalho.

Por fim ainda foi realizada a análise de *clusters* hierárquica (HCA) que tem como principal objetivo combinar, num dendrograma, as diferentes plantas de acordo com as suas semelhanças bem como os diferentes métodos realizados.

10. Resultados e Discussão

Na Tabela 10.1 encontram-se os resultados obtidos para os diferentes métodos analisados, entre eles, TPC, TFC, TAA, RP e FRAP, e na Tabela 10.2 encontram-se os resultados obtidos, expressos em IC₅₀, para o método DPPH, AChE e BChE, relativos aos cinco extratos aquosos de plantas colhidas na região do Algarve, Portugal.

Tabela 10.1. Resultados obtidos para o método TPC, TFC, TAA, RP e FRAP dos diferentes extratos aquosos analisados

	TPC (mg GAE / g peso seco)	TFC (mg QE / g peso seco)	TAA (mg AAE / g peso seco)	RP (mg TE / g peso seco)	FRAP (mg TE / g peso seco)
MC	718,89 ± 8,74 ^a	18,83 ± 0,83 ^a	478,75 ± 9,88 ^a	590,88 ± 7,68 ^a	1459,14 ± 8,05 ^a
OEV	147,21 ± 1,37 ^b	12,61 ± 0,13 ^b	351,24 ± 7,82 ^b	284,26 ± 3,58 ^b	342,55 ± 5,88 ^b
RU	397,35 ± 7,77 ^c	12,36 ± 0,86 ^b	828,22 ± 9,57 ^c	528,41 ± 7,05 ^c	1542,09 ± 9,72 ^c
GP	454,43 ± 9,07 ^d	24,71 ± 1,96 ^c	573,30 ± 8,92 ^d	388,88 ± 5,96 ^d	1145,56 ± 8,33 ^d
PO	68,33 ± 1,77 ^e	2,64 ± 0,30 ^d	131,49 ± 6,24 ^e	60,52 ± 3,15 ^e	180,07 ± 8,84 ^e

Nota: Os resultados são expressos em média ± desvio padrão (n = 3). Letras diferentes na mesma coluna implicam diferenças significativas (p < 0,05) entre as amostras, de acordo com o teste de Levene.

MC = *Myrtus communis* L.; OEV = *Olea europaea* var. *sylvestris* (Mill.) Lehr; RU = *Rubus ulmifolius* Schott; GP = *Geranium purpureum* Vill; PO = *Portulaca oleacea* L.; GAE = equivalentes de ácido gálico; QE = equivalentes de quercetina; AAE = equivalentes de ácido ascórbico; TE = equivalentes de trolox.

Tabela 10.2. Valores expressos em IC₅₀ dos diferentes extratos aquosos analisados, obtidos para o método DPPH, AChE e BChE

	DPPH (µg/mL)	AChE (mg/mL)	BChE (mg/mL)
MC	15,10 ± 1,95 ^a	0,82 ± 0,23 ^a	13,54 ± 4,07 ^a
OEV	80,30 ± 2,83 ^b	31,31 ± 1,30 ^b	20,35 ± 2,04 ^b
RU	22,69 ± 0,88 ^c	2,60 ± 1,02 ^c	4,62 ± 2,94 ^c
GP	20,33 ± 2,33 ^d	9,82 ± 2,47 ^d	5,72 ± 2,90 ^d
PO	325,99 ± 3,04 ^e	n.d.	n.d.
Trolox	6,41 ± 1,13 ^f	-	-
Tacrina (µg/mL)	-	21,26 ± 3,60	22,26 ± 0,98

Nota: Os resultados são expressos em média ± desvio padrão (n = 3). Letras diferentes na mesma coluna implicam diferenças significativas (p <0,05) entre as amostras, de acordo com o teste de Levene.

MC = *Myrtus communis* L.; OEV = *Olea europaea* var. *sylvestris* (Mill.) Lehr; RU = *Rubus ulmifolius* Schott ; GP = *Geranium purpureum* Vill; PO = *Portulaca oleracea* L; Controlos positivos: Trolox para o DPPH e Tacrina para o AChE e BChE. n.d. = não determinável

10.1. Conteúdo em fenólicos totais (TPC) e em flavonoides totais (TFC)

Na Tabela 10.1 encontram-se os valores estatísticos obtidos tanto para o método TPC como TFC. Relativamente aos valores obtidos para o conteúdo de fenólicos totais (TPC) não se verificaram diferenças significativas (p <0,05) entre todos os extratos aquosos estudados. Por sua vez, no conteúdo em flavonoides totais (TFC) observa-se que

o extrato de MC e GP são estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$) tal como acontece para o extrato de OEV e RU.

O extrato aquoso de *Myrtus Communis* L. (MC) foi o que apresentou, entre os diferentes extratos de plantas estudados, um maior conteúdo em fenólicos totais ($718,89 \pm 8,74$ mg GAE/ g peso seco), e foi a segunda planta que apresentou um maior valor em flavonoides totais ($18,83 \pm 0,83$ mg QE/ g peso seco), como se pode observar pela Figura 10.1.1 e 10.1.2, respetivamente.

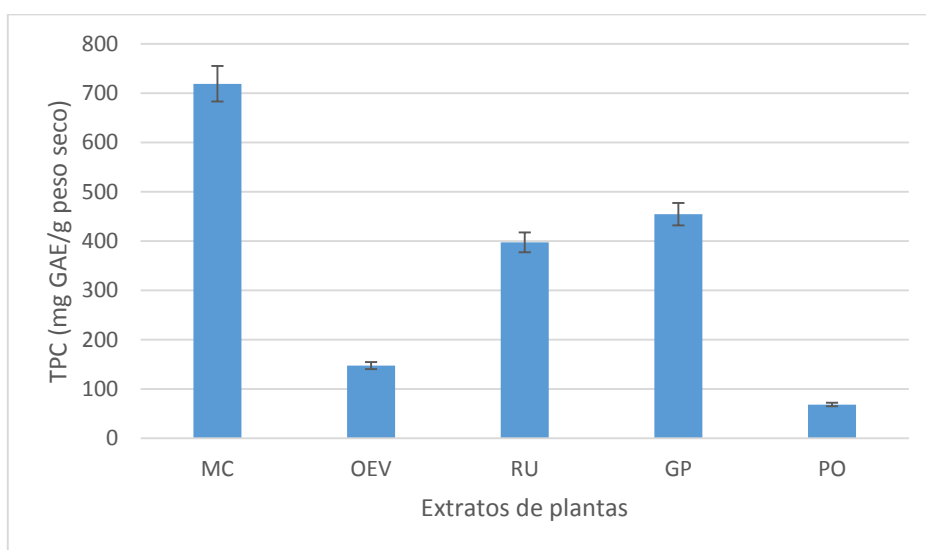


Figura 10.1.1. Representação gráfica do conteúdo em fenólicos totais (TPC) dos cinco extratos aquosos analisados.

Nota: Os resultados são expressos em média e respetivo desvio padrão ($n = 3$). MC = *Myrtus communis* L.; OEV = *Olea europaea* var. *sylvestris* (Mill.) Lehr; RU = *Rubus ulmifolius* Schott; GP = *Geranium purpureum* Vill; PO = *Portulaca oleracea* L.; GAE = equivalentes de ácido gálico

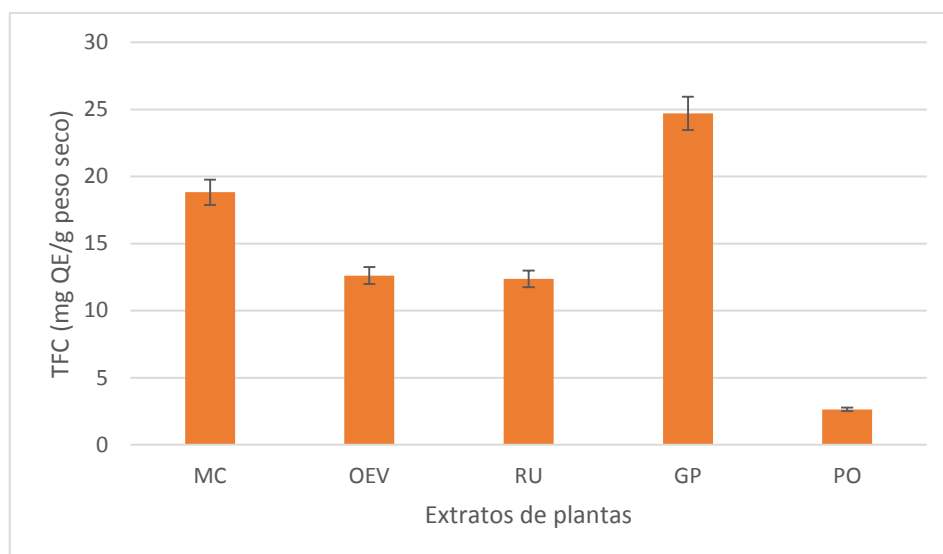


Figura 10.1.2. Representação gráfica do conteúdo em flavonoides (TFC) dos cinco extratos aquosos analisados.

Nota: Os resultados são expressos em média e respetivo desvio padrão (n = 3). MC = *Myrtus communis* L.; OEV = *Olea europaea* var. *sylvestris* (Mill.) Lehr; RU = *Rubus ulmifolius* Schott; GP = *Geranium purpureum* Vill; PO = *Portulaca oleracea* L.; QE = equivalentes de quercetina

O valor obtido, nesta dissertação, para o extrato de MC no método TPC foi significativamente superior aos obtidos tanto por Messaoud et al. (2012), que analisou extratos aquosos das folhas de murta colhida na Tunísia, registando um valor de $179,55 \pm 8,84$ mg GAE/ g peso seco⁶⁴ como por Amessis-Ouchemoukh et al. (2014) que analisou extratos metanólicos de murta algeriana no qual obteve $285,73 \pm 2,28$ mg GAE/g peso seco de fenólicos totais. No caso do conteúdo em flavonoides totais, os valores obtidos nesta dissertação vão de acordo com os obtidos por Amessis-Ouchemoukh et al. (2014) ($24,868 \pm 0,415$ mg QE/g peso seco), pelo que se pode verificar que tanto o solvente aquoso como o metanólico têm uma capacidade semelhante de extrair os flavonoides presentes no extrato de MC.⁴⁰

Estas variações no conteúdo em fenólicos totais são influenciadas por diversos fatores tais como fatores ambientais (exposição solar, chuvas, temperaturas, estado do solo), as condições de crescimento, o período de colheita e o solvente usado para o processo de extração, mas também pode ser devido ao reagente Folin-Ciocalteu, utilizado na determinação do conteúdo em fenólicos totais (TPC), que ao reagir com vários interferentes presentes nas amostras, nomeadamente com proteínas, elevados

teores de açúcar, compostos não fenólicos como o ácido ascórbico, compostos azotados ou grupos tióis, pode resultar numa expressão aumentada do conteúdo em fenólicos totais e consequentemente numa interpretação errada dos resultados obtidos.

O *Geranium purpureum* Vill. (GP) foi a planta que apresentou, de todos os extratos analisados, o maior conteúdo em flavonoides totais ($24,71 \pm 1,96$ mg QE/ g peso seco) e apresentou também um valor de $454,43 \pm 9,07$ mg GAE/ g peso seco no método TPC, teor este consideravelmente superior aos extratos metanólicos colhidos por Proestos et al. (2013) na Grécia ($120,5 \pm 3,7$ mg GAE/ g peso seco)¹⁰¹ pelo que ou há maior capacidade de extração dos compostos fenólicos quando o solvente é aquoso ou no Algarve existiram condições mais favoráveis que propiciaram um maior teor em conteúdo fenólicos.

A *Portulaca oleracea* L. (PO) obteve, tanto no método TPC como TFC, os valores mais baixos de todas plantas estudadas, $68,33 \pm 1,77$ mg GAE/ g peso seco e $2,64 \pm 0,30$ mg QE/ g peso seco, respetivamente.

Apesar de tanto o extrato de *Rubus ulmifolius* Schott (RU) como de *Olea europaea* var. *sylvestris* (Mill.) Lehr (OEV) apresentarem valores semelhantes no conteúdo em flavonoides totais (Figura 10.1.2), observou-se um conteúdo em fenólicos totais cerca de três vezes maior no extrato de RU do que no extrato de OEV. (Figura 10.1.1).

O valor obtido neste trabalho no método TPC para o extrato de OEV ($147,21 \pm 1,37$ mg GAE/ g peso seco) não se encontra muito diferenciado do obtido por Goldsmith et al. (2015) para extratos aquosos de *O. europaea* L. cultivadas ($230,15 \pm 6,85$ mg GAE/g de peso seco), pelo que se pode verificar que ambas as espécies, cultivadas como não cultivadas (OEV) têm uma constituição semelhante em compostos fenólicos.⁷⁷

Tan et al. (2014) observou ainda que o extrato de etanol a 50% de oliveira contém cerca de duas vezes mais flavonoides do que o extrato aquoso, o que tal facto sugere que a maioria dos compostos presentes nas folhas de oliveira são flavonoides pouco polares ou compostos sensíveis ao calor que foram degradados durante o processo de extração aquoso.¹⁰²

Assim, ordenando o conteúdo em fenólicos totais, de forma decrescente tem-se que $MC > GP > RU > OEV > PO$ (mg GAE/ g peso seco) e o conteúdo em flavonoides: $GP > MC > OEV \approx RU > PO$ (mg QE/ g peso seco).

Teoricamente numa extração aquosa, os compostos fenólicos, que normalmente formam estruturas complexas com proteínas ou açúcares, ao serem expostos a elevadas temperaturas ocorre hidrólise desses complexos e/ou hidrólise das ligações glicosídicas dos fenólicos condensados, tornando-os mais disponíveis.¹⁰³ Contudo, certos artigos

demonstraram o contrário, nomeadamente em extrações aquosas de *P. oleracea* L. que apresentaram uma perda significativa do conteúdo fenólico total, talvez devido ao facto de a água, ao contrário do metanol, não ter tanta habilidade de inibir a ação da polifenol-oxidase que causa oxidação e evaporação dos compostos fenólicos.¹⁰⁴ Tal facto pode ser então uma explicação para os valores significativamente reduzidos de compostos fenólicos e flavonoides obtidos para a PO.

Apesar dos valores obtidos para os extratos de PO terem sido reduzidos, comparado com os extratos das outras plantas examinadas, estes conseguiram apresentar um teor de compostos fenólicos superior aos extratos aquosos analisados por Nagarani et al. (2014) e Uddin et al. (2012), $19,25 \pm 0,11$ e $14,2 \pm 0,9$ mg GAE/g peso seco respetivamente^{105,106}

Uma vez que as análises colorimétricas para a determinação do conteúdo tanto em fenólicos como flavonoides totais não são específicas e podem existir interferentes, uma análise mais sensível, como a cromatografia líquida de alta performance associada a cromatografia de massa (HPLC-MS), seria uma boa opção de complementaridade a fim de dar uma informação mais precisa sobre a identificação dos diferentes compostos presentes nos extratos analisados e consequentemente quais dos constituintes têm uma maior contribuição para a atividade antioxidante, permitindo assim estudar a interação entre a relação estrutura-função destes diferentes compostos com as enzimas (AChE e BChE) responsáveis pela progressão da doença de Alzheimer.

10.2. Atividade antioxidante total (TAA), poder redutor (RP) e poder antioxidante de redução do ferro (FRAP)

Os valores observados (Figura 10.2.1) mostram que a maior atividade antioxidante total (TAA) registou-se no extrato de *R. ulmifolius* (RU) ($828,22 \pm 957$ mg AAE/ g peso seco), apresentando assim uma elevada capacidade de redução de molibdénio VI a molibdénio V. Além disso, o extrato aquoso de RU também foi o que apresentou um dos maiores poder de redução do Fe^{3+} no método RP ($528,41 \pm 7,05$ mg TE/g peso seco) e maior habilidade para reduzir o complexo TPTZ-Fe (III) em TPTZ-Fe (II) no método FRAP ($1542,09 \pm 9,72$ mg TE/g peso seco), como se pode observar tanto pela Figura 10.2.2 como Tabela 10.2. Verifica-se ainda que os diferentes tipos de extratos de todas as plantas estudadas são significativamente diferentes ($p < 0,05$) (Tabela 10.2.).

Estes valores aumentados vão de acordo com a literatura pesquisada obtidos por Martini et al. (2009), em que também determinaram que a elevada capacidade antioxidante do extrato de *R. ulmifolius*, obtida essencialmente pelo método TAA, se devia à presença de grandes quantidades de ácido elágico nas folhas de silva bem como de canferol-glucopiranosídico (ao ter na sua constituição um grupo cumarínico, adquire, provavelmente, a sua forte atividade antioxidante),⁸⁴ enquanto que valores reduzidos eram essencialmente observados quando os extratos continham mais flavonoides glucosilados, como por exemplo a quercetina 3-O- β -glucopiranoside, do que as suas formas livres (quercetina).⁸⁵

Dado na literatura pesquisada ter sido reportados elevados teores em compostos fenólicos, especialmente ácido cafeico e gálico para extratos de MC, GP e RU^{56,62}, e dado estes componentes terem propriedades neuroprotetoras^{6,55} já seria de esperar uma atividade antioxidante forte.

O maior poder redutor do Fe³⁺ (tanto no método RP como FRAP) foram observados para o extrato RU e MC (Figura 10.2.2). Tal facto seria de esperar, uma vez que ambos os extratos tinham apresentado o maior conteúdo em fenólicos totais (TPC) e, dado que o TPC, RP e FRAP estarem muito bem correlacionados entre si (Tabela 10.5.1.), pode-se afirmar que os compostos fenólicos totais são dos mais responsáveis pela redução do ferro.

A efetividade na atividade antioxidante total, pelo método TAA, segue a seguinte ordem decrescente: RU > GP > MC > OEV > PO; pelo método RP: MC > RU > GP > OEV > PO e para o método FRAP: RU > MC > GP > OEV > PO.

A capacidade de redução do ferro pode servir como um indicador significativo da potencial atividade antioxidante de um determinado extrato, contudo este mecanismo não é exclusivo da formação de atividade antioxidante. Existem outros mecanismos antioxidantes pelos quais os extratos podem atuar e os quais não foram contemplados nos métodos abordados neste trabalho, como é o caso da capacidade de decomposição de peróxidos ou captura do anião superóxido, nomeadamente na medição da atividade inibitória da peroxidação lipídica; ou atividade de captura do radical NO; ou atividade quelante do ferro. Além disso, as espécies capazes de reduzir o ferro muitas vezes são também capazes de reagir com os precursores dos peróxidos, prevenindo a formação de peróxidos.¹⁰⁷

Os taninos são também bons antioxidantes capazes de reduzir os iões metálicos como o Fe^{3+} a Fe^{2+} e também inibem a 5-lipoxigenase, enzima envolvida no metabolismo do ácido araquidónico, importante na fisiologia da inflamação.¹⁰⁸

Dado que na literatura é reportada a constituição rica em flavonoides e taninos em extratos de MC e RU, é possível que haja um sinergismo entre ambos os metabolitos bioativos enaltecendo a atividade antioxidante.^{60,84}

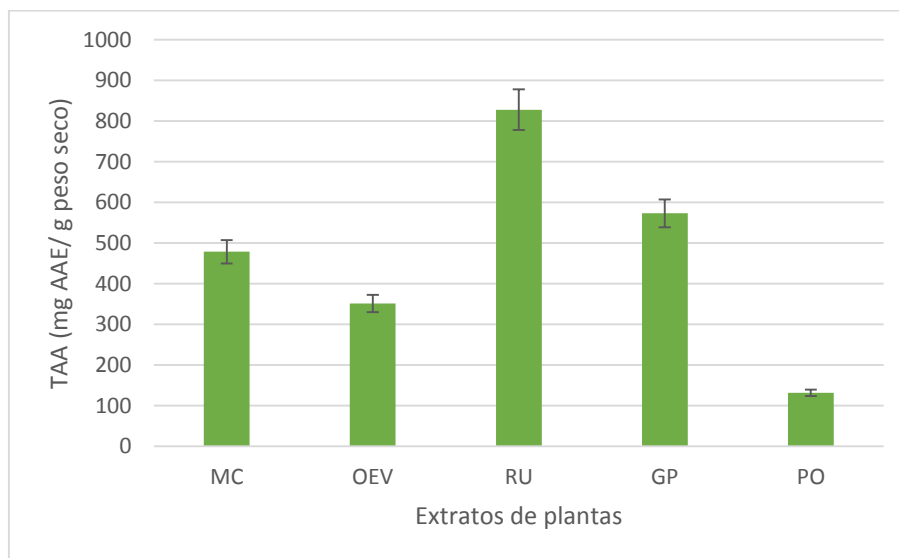


Figura 10.2.1. Representação gráfica da atividade antioxidante total (TAA) dos cinco extratos aquosos analisados.

Nota: Os resultados são expressos em média e respetivo desvio padrão (n = 3). MC = *Myrtus communis* L.; OEV = *Olea europaea* var. *sylvestris* (Mill.) Lehr; RU = *Rubus ulmifolius* Schott; GP = *Geranium purpureum* Vill; PO = *Portulaca oleracea* L; AAE = equivalentes de ácido ascórbico

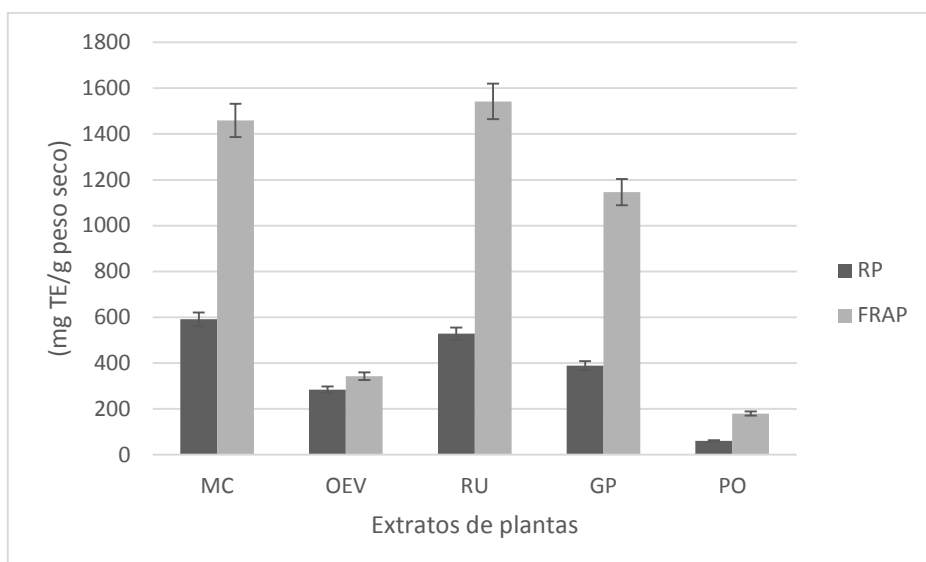


Figura 10.2.2. Representação gráfica do poder redutor (RP) e do poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) dos cinco extratos aquosos analisados, expressos em mg TE/ g de peso seco

Nota: Os resultados são expressos em média e respetivo desvio padrão (n = 3). MC = *Myrtus communis* L.; OEV = *Olea europaea* var. *sylvestris* (Mill.) Lehr; RU = *Rubus ulmifolius* Schott ; GP = *Geranium purpureum* Vill; PO = *Portulaca oleracea* L.; TE = equivalentes de trolox

O extrato de PO tem apresentado os valores mais baixos em todos os métodos realizados (Tabela 10.1 e Tabela 10.2.), com significativas diferenças de valores entre métodos, por exemplo, no método FRAP a sua concentração é cerca de oito vezes menor que no extrato RU (o qual apresentou maior concentração em mg TE/ g peso seco nesse mesmo método) e no método RP a diferença de concentrações entre o extrato PO e MC são aproximadamente de dez vezes.

Pode-se assim verificar que os antioxidantes presentes no extrato de PO analisada são fracos redutores do Fe^{3+} , e devido à concentração de fenólicos e particularmente em flavonoides neste extrato de planta ser tão reduzido, comparado com os outros extratos analisados, já seria de esperar que a sua capacidade antioxidante não seria tão forte como as outras plantas.

De acordo com alguns estudos, a *P. oleracea* L. apresenta um alto teor nutritivo, sendo as suas folhas ricas em compostos antioxidantes como ómega-3, ácido ascórbico, α -tocoferol e β -carotenos. Ora, o trolox ao ser um análogo sintético do α -tocoferol (vitamina E) e ao ser usado como padrão de compostos antioxidantes (no método FRAP e RP), seria de esperar que a PO apresentasse um alto poder antioxidante, o que não se verificou.

No caso de um estudo elaborado por Uddin et al. (2012), foi observado que nas folhas em desenvolvimento desta planta existia um conteúdo mais elevado em compostos fenólicos, devido ao facto de os compostos de proteção, tais como os antioxidantes, serem essenciais para as fases iniciais de crescimento das plantas. Assim, as plantas nesta fase são metabolicamente mais ativas e como tal exigem maiores concentrações de compostos essenciais para o seu desenvolvimento. Contudo, nas plantas maduras também se verificou uma atividade antioxidante considerável, talvez devido ao *stress* oxidativo característico da fase final de vida desta espécie. Além disso, nesse mesmo estudo, nos extratos aquosos observou-se uma menor capacidade de extração dos compostos fenólicos comparado com os extratos metanólicos, uma vez que os compostos fenólicos são mais facilmente evaporados em solventes aquosos, e conseqüentemente ao não serem extraídos não podem atuar por captura de radicais e originar uma ação antioxidante. ¹⁰⁶

Porém, se a extração da *P. oleracea* se realizar a 80 °C observa-se que os extratos aquosos têm um maior poder de extração dos compostos fenólicos do que quando o solvente usado é metanol. Isto pode ser explicado devido à hidrólise das ligações glicosídicas e éster dos flavonoides e taninos condensados ocorrer próximo da temperatura de ebulição da água (100°C). Dado que neste trabalho de dissertação realizado todos os extratos foram feitos a 95°C, as ligações glicosídicas e éster dos flavonoides podem ter sido hidrolisáveis e como tal os valores obtidos no método TPC e TFC, e conseqüentemente nos métodos que avaliam a capacidade antioxidante do extrato, terem sido mais baixos do que se esperava, comparativamente com outros estudos. ¹⁰⁹

Além disso, como a espécie de beldroega utilizada foi adquirida no mercado, é difícil obter informações detalhadas sobre as suas condições de colheita, características de maturação ou solo, não sabendo ao certo se as folhas estudadas estariam num estadio maduro ou não. Como tal, uma das possíveis explicações para os valores reduzidos obtidos da sua atividade antioxidante (Tabela 10.1.), prende-se com o facto de que o extrato de PO utilizado foi o único extrato de uma planta cultivada, o que, durante o seu crescimento pode não ter desenvolvido mecanismos de defesa suficientes para combater agentes exógenos e como tal não ter precisado de adquirir uma constituição rica em antioxidantes.

10.3. Atividade de captura de radicais (DPPH)

A concentração dos extratos aquosos necessária para capturar 50% dos radicais livres DPPH• em solução (IC₅₀), encontra-se na Tabela 10.2. Assim, quanto menores forem os valores obtidos neste método, maior a atividade de captura de radicais, logo maior a atividade antioxidante de cada extrato.

Neste trabalho, valores de IC₅₀ próximos ou menores que 6,41 µg/mL (IC₅₀ do trolox, que foi usado como controlo positivo) são considerados como ótima atividade de captura do radical DPPH•. Como tal, de acordo com os respetivos valores de IC₅₀ obtidos neste método (Tabela 10.2.), a efetividade da atividade dos extratos aquosos analisados decresce de acordo com a seguinte ordem: MC > GP > RU > OEV > PO, com os respetivos valores de 15,10 ± 1,95; 20,33 ± 2,33; 20,33 ± 2,33; 80,30 ± 2,83 e 325,99 ± 3,04 µg/mL. Analisando os resultados estatísticos deste método, é possível concluir que todas as plantas analisadas são estatisticamente diferentes entre si (p < 0,05).

Mais uma vez, o extrato de PO apresenta a pior atividade de todas as plantas, com uma diferença de concentrações substancialmente elevada em comparação com todas as outras estudadas, pelo que a sua habilidade para doar prótons que possam reagir como redutores de radicais livres e conseqüentemente como antioxidantes primários, é diminuta. Os valores reduzidos obtidos pela PO, tanto para o método TPC como TFC, estão diretamente relacionados com os valores, também reduzidos, obtidos para os diferentes métodos antioxidantes analisados (o que também é confirmado pela Correlação de Pearson (R) que se encontra na Tabela 10.5.1). Uma vez que os fenólicos e flavonoides, ao serem dos compostos mais importantes pela capacidade antioxidante das plantas¹⁰⁵, e o extrato de beldroega analisado ter sido o com menor teor desses mesmos compostos, vai haver conseqüentemente uma menor habilidade de captura de radicais, logo menor efeito antioxidante.

Extratos aquosos de PO também foram analisados e colhidos em Bragança por Oliveira et al. (2009), no qual foi demonstrado que valores reduzidos da sua atividade antioxidante poderia dever-se à presença em maiores quantidade de ácido oxálico, devido ao um efeito negativo na recta de calibração que apresentavam na captura de radicais pelo método DPPH, ou seja, amostras com maiores valores de ácido oxálico exibiam menor poder antioxidante.⁷⁸ Apesar da beldroega estudada nesta dissertação ter sido cultivada num ponto extremo a Bragança, os valores obtidos no método DPPH foram também

reduzidos, pelo que existe a possibilidade de os extratos de PO de Faro terem na sua constituição grandes quantidades de ácido oxálico ou outros interferentes que impeçam de ter uma capacidade de captura de radicais DPPH• tão elevada como os outros extratos de plantas estudados.

Por seu turno, o extrato aquoso de MC analisado por Messaoud et al. (2012) obteve um valor de IC₅₀ de 282,53 ± 2,33 µg/mL no método DPPH⁶⁴, ou seja, uma atividade antioxidante preponderantemente menor comparada com o extrato de MC estudado nesta dissertação (15,10 ± 1,95 µg/mL). Uma explicação possível para esta diferença de concentrações pode prender-se devido ao grande teor de compostos fenólicos presentes nos extratos aquosos do Algarve relativo aos da Tunísia por Messaoud et al. (2012), ou pela possível maior concentração em taninos que também são dos constituintes das folhas de murta mais responsáveis pela redução do radical livre DPPH•, tal como foi descrito por Yoshimura et al. (2008).⁶²

De acordo com alguns artigos consultados, extratos aquosos de plantas mais ricas em flavonoides (um dos maiores grupos pertencentes aos compostos fenólicos, que incluem tanto partes polares como apolares) são menos potente em sequestrar o radical DPPH•, em comparação com solventes alcoólicos ou orgânicos, uma vez que, teoricamente, extrações aquosas são mais ricas em compostos fenólicos polares de baixo peso molecular essencialmente.⁴⁰ Porém tal não se verificou neste trabalho, uma vez que o extrato de MC foi o que obteve maiores valores em flavonoides totais bem como melhor capacidade de sequestrar o radical DPPH•.

Contudo apesar das suas comprovadas propriedades antioxidantes, pouco se sabe sobre os mecanismos de absorção ou distribuição no organismo dos compostos fenólicos e conseqüentemente da sua biodisponibilidade.

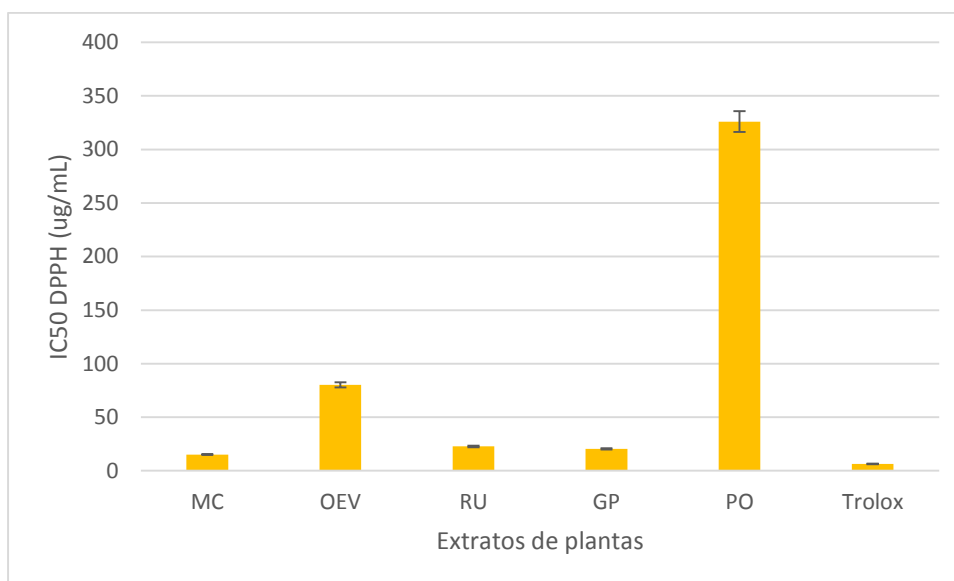


Figura 10.3.1. Representação gráfica da atividade de captura de radicais dos cinco extratos aquosos analisados, avaliada pelo método DPPH e expressa em IC₅₀

Nota: Os resultados são expressos em média e respetivo desvio padrão (n = 3). MC = *Myrtus communis* L.; OEV = *Olea europaea* var. *sylvestris* (Mill.) Lehr; RU = *Rubus ulmifolius* Schott; GP = *Geranium purpureum* Vill; PO = *Portulaca oleracea* L ; Trolox usado como controlo positivo

10.4. Atividade inibitória da acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE)

Um dos métodos mundialmente usados a fim de testar a capacidade anticolinesterásica *in vitro* é pelo método de Ellman, dado a sua rapidez, facilidade e eficácia.⁹⁸ A maioria da literatura indica que os compostos detetados que possuem uma promissora atividade inibitória contra a AChE pertencem ao grupo de alcaloides, contudo cada vez mais têm sido os estudos que relacionam a presença de compostos fenólicos e flavonoides com uma possível atividade anticolinesterásica.

De acordo com os valores obtidos de IC₅₀ para o método AChE (Tabela 10.2.), verifica-se que a MC é o extrato de planta que apresenta uma menor concentração (0,82 ± 0,23 mg/mL) logo maior capacidade de inibir a enzima acetilcolinesterase, seguida do extrato de RU (2,60 ± 1,02 mg/mL) e GP (9,82 ± 2,47 mg/mL), enquanto que, por último, o extrato aquoso de OEV precisa de uma concentração de 31,31 ± 1,30 mg/mL para inibir eficazmente 50% da enzima AChE.

Todos os extratos de plantas estudados são estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$) e todos mostraram valores de IC_{50} muito superiores ao controlo positivo (Tacrina, $21,26 \pm 3,60 \mu\text{g/mL}$), o que indica que, apesar de terem atividade anticolinesterásica, a atividade dos extratos aquosos analisados é pouco potente, não tendo uma capacidade tão forte de inibição da AChE como este antigo fármaco. Para além disso, extratos com valores de IC_{50} superiores a $0,5 \text{ mg/ml}$ são considerados ativamente fracos pelo que todos os extratos analisados não são potencialmente fortes inibidores colinesterásicos.²⁴

Relativamente ao extrato de PO, não foi possível determinar espectrofotometricamente o seu IC_{50} , uma vez que para a sua concentração inicial de peso seco ($25,47 \text{ mg/mL}$) não se obteve qualquer atividade inibitória contra a AChE e BChE. Este resultado obtido é semelhante ao registado por Boga et al. (2011), em que extratos aquosos de PO, colhidos em Istambul (Turquia), não apresentaram nenhuma atividade contra a AChE.⁹⁹ De acordo com o mesmo estudo por Boga et al. (2011) o extrato aquoso de PO a $200 \mu\text{g/mL}$ apenas apresentou uma ligeira atividade inibitória contra a BChE (3%), tendo sido esta inibição maior quando o solvente usado foi diclorometano (20%) e etanol (30%), o que comparativamente ao obtido por este trabalho de dissertação é uma inibição substancialmente mais forte, apesar de continuar a não ser preponderante.

A atividade da enzima acetilcolinesterase pode ser exacerbada por um aumento dos radicais livres e consequentemente aumento do *stress* oxidativo. A maior parte da literatura pesquisada descreve os ácidos gordos ómega-3 como inibidores colinesterásicos, contudo os resultados *in vivo* obtidos por Moneim et al. (2012) em ratos, demonstraram o contrário, nomeadamente que os extratos de beldroega, ricos tanto em ómega-3 como ómega-6, causavam um aumento significativo da AChE em todas as regiões cerebrais, à exceção do cerebelo.¹¹⁰ Pode-se assumir assim que os diversos resultados obtidos sobre a atividade anticolinesterásica da *Portulaca oleracea* L. são inconclusivos, o que vem corroborar os resultados também obtidos nesta dissertação.

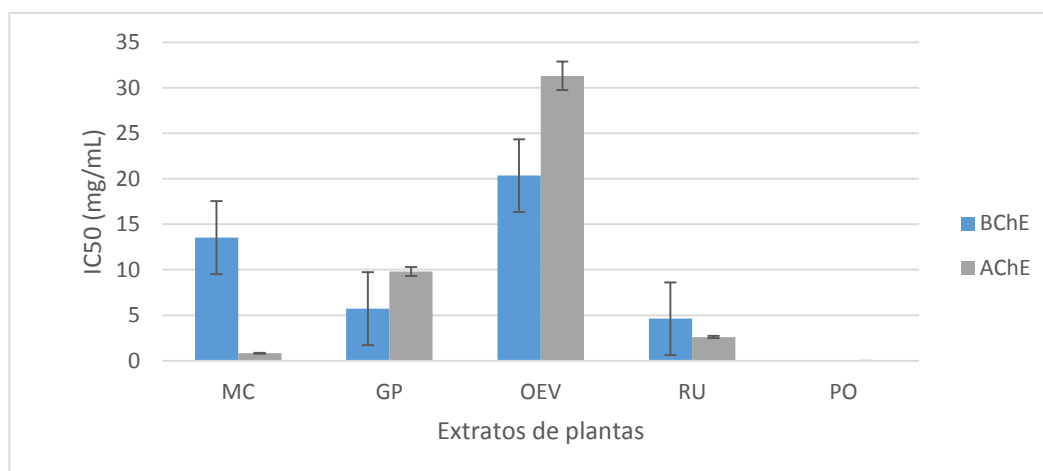


Figura 10.4.1. Representação gráfica, expressa em IC₅₀, da atividade inibitória da acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) pelos cinco extratos aquosos analisados.

Nota: Os resultados são expressos em média e respetivo desvio padrão (n = 3). MC = *Myrtus communis* L.; OEV = *Olea europaea* var. *sylvestris* (Mill.) Lehr; RU = *Rubus ulmifolius* Schott ; GP = *Geranium purpureum* Vill; PO = *Portulaca oleracea* L

Relativamente à análise da atividade inibitória da butirilcolinesterase (BChE), os extratos mais potentes em inibir a atividade desta enzima foram o RU e GP, com valores de IC₅₀ de 4,62 ± 2,94 e 5,72 ± 2,90 mg/mL respetivamente (Tabela 10.2.).

A MC apresentou um valor de IC₅₀ para a BChE (13,54 ± 4,07 mg/mL) bem mais elevado do que tinha apresentado para a AChE (0,82 ± 0,23 mg/mL), pelo que se pode afirmar que este extrato de MC analisado apresenta um efeito mais eficaz na inibição da AChE do que na inibição da BChE. De acordo com a literatura pesquisada, apenas dois estudos até ao momento, analisaram *in vitro* o efeito neuroprotetor das folhas de *M. communis*. Um deles foi realizado por Tumen et al. (2012), cuja planta foi colhida na Turquia e analisou tanto a sua capacidade inibitória contra a AChE e BChE.¹¹¹ Contudo nesse estudo, apenas foram analisadas extrações em diclorometano, acetona, metanol e acetato de etilo, e não em solvente aquoso como foi feito neste trabalho de dissertação. Os extratos de folhas de *M. communis* a 200 µg/mL não apresentaram nenhuma capacidade de inibir a BChE em qualquer solvente analisado por Tumen et al. (2012)., enquanto que os extratos em acetona foram os que apresentaram melhor capacidade de inibir a AChE (cerca de 40%), seguidos dos extratos em metanol (35%), acetato de etilo (25%) e por fim diclorometano (18%).

No outro estudo, elaborado por Amessis-Ouchemoukh et al. (2014), o extrato metanólico de *M. communis* alcançou valores de IC₅₀ muito reduzidos (0,03 ± 0,00 µg/mL)⁴⁰ e a uma concentração de 0,5 mg/ml, o extrato metanólico apresentou cerca de 92% de inibição colinesterásica, uma inibição semelhante à de extratos da família Lamiaceae, que são uma das famílias de plantas mais estudadas com maior atividade anticolinesterásica.⁵⁵

Comparando com os resultados obtidos por outros estudos, tanto os extratos metanólicos como acetónicos apresentaram maior capacidade de inibir a AChE, ou seja, menores valores de IC₅₀ comparados com os valores obtidos pelos extratos aquosos deste trabalho de dissertação, o que sugere que solventes orgânicos têm uma maior capacidade de extrair de uma forma mais eficiente os compostos ativos que possuem atividade anticolinesterásica.^{112,113}

Tanto no estudo por Tumen et al. (2012) como neste trabalho de dissertação, o conteúdo em fenólicos totais dos extratos de folhas de MC relacionou-se diretamente com a inibição das enzimas colinesterásicas, principalmente contra a AChE, mesmo utilizando-se solventes diferentes em ambos os trabalhos. Este facto é suportado pelos resultados obtidos nesta dissertação, em que a MC apresentou o maior conteúdo em fenólicos totais (Tabela 10.1) como a maior capacidade inibitória da AChE em relação a todos os extratos analisados (Tabela 10.2), conjuntamente pela boa correlação entre ambos os métodos (R= 0,894). Assim a atividade inibitória da AChE obtida pelo extrato de murta pode ser atribuída à sua composição química rica em flavonoides, ácidos fenólicos e taninos, bem como a um possível sinergismo de interação entre estes compostos.^{6,40} Um dos flavonoides que pode ser um dos mais responsáveis pela capacidade de inibir a AChE é a quercetina-3-*O*-β-D-glucopiranosido, presente tanto em extratos de *M. communis* como em extratos de folhas de *Ginkgo biloba*. Este flavonoide é um dos principais constituintes de *G. biloba*, uma planta milenar usada para patologias neurodegenerativas como em suplementos alimentar para aumentar e estimular as capacidades cognitivas, cuja atividade de inibição da AChE ronda valores de IC₅₀ de 57,8µg/mL.¹¹⁴

O extrato de OEV apresentou uma fraca capacidade de inibição de ambas as enzimas colinesterásicas (IC₅₀ de 31,31 ± 1,30 mg/mL contra a AChE e 20,35 ± 2,04 mg/mL contra a BChE), acoplado de uma reduzida eficácia na redução do radical DPPH (IC₅₀ de 80,30 ± 2,83µg/mL) bem como menor atividade antioxidante tanto pelo método TAA, RP e FRAP, em comparação com os outros extratos analisados, como já foi visto

anteriormente. Nos extratos aquosos estudados desta planta observou-se um teor em compostos fenólicos reduzido, pelo que seria de esperar que não tivesse uma atividade antioxidante tão forte como os outros extratos. E dado os compostos fenólicos serem dos principais responsáveis pela inibição das enzimas acetilcolinestárias ($R = 0,894$), tais resultados também seriam de esperar. Aliás, o extrato de OEV só obteve melhores resultados que o extrato de PO, em praticamente todos os métodos, pelo que os compostos bioativos desta planta colhida no Algarve não parecem demonstrar grande interesse na profilaxia de doenças neurodegenerativas como a DA.

O extrato de RU foi o que obteve uma capacidade de inibição de ambas as enzimas mais próximas entre si ($2,60 \pm 1,02$ mg/mL contra a AChE e $4,62 \pm 2,94$ mg/mL contra a BChE), contudo não foi encontrada nenhuma literatura relativa à possível atividade anticolinesterásica das folhas desta planta, apenas estudos em plantas da mesma família, esta atividade foi atribuída à presença de flavonoides em grandes quantidades, especialmente da quercetina.¹¹⁵

Todos os extratos aquosos analisados foram significativamente ($p < 0,05$) menos ativos que o controlo positivo (tacrina, $22,26 \pm 0,98$ µg/mL) na capacidade de inibir a BChE.

A utilização do fármaco tacrina como *standard* apresenta algumas limitações. Por um lado este já não se encontra aprovado pela FDA para o tratamento sintomático da DA, não por falta de eficácia mas por efeitos adversos consideráveis. Por outro lado, não há estudos que comprovem a sua real capacidade de inibição *in vivo* da butirilcolinesterase, sendo que o único fármaco com essa capacidade comprovada é a rivastigmina.¹¹⁶ Contudo aquando da elaboração desta dissertação, era o único fármaco disponível no laboratório e como tal optou-se pela sua utilização como controlo positivo tanto na determinação da atividade inibitória da AChE como da BChE.

A variação na concentração de compostos fenólicos nas diferentes espécies de plantas pode ser atribuída a diversas razões, entre elas, a escolha do solvente usado na extração, uma vez que existem diferentes solubilidades dos compostos fenólicos, as possíveis interações dos compostos fenólicos com outros constituintes presentes, a formação de um complexo insolúvel ou o grau de polimerização dos compostos fenólicos, bem como o período de maturação e da colheita, as condições de crescimento, o estado do solo e os fatores ambientais (exposição solar, temperatura, etc). Aliado a estas variabilidades, à fraca capacidade de inibição de ambas as enzimas colinesterásicas e à dificuldade dos metabolitos bioativos atravessarem a barreira hematoencefálica, as doses

de um único composto fenólico necessárias para produzir um efeito benéfico *in vivo*, são muitas vezes maiores que as doses correspondentes às que se encontram nas plantas, o que sugere que as atividades obtidas resultem de um sinergismo tanto no mecanismo de absorção como na ação farmacológica para que ocorra uma ação positiva com concentrações reduzidas e não tóxicas.

10.5. Coeficientes de correlação de Pearson (R)

Através das correlações de Pearson (R) obtidas na Tabela 10.5.1 é possível observar que as correlações se podem distinguir pela sua direção (positivas ou negativas) e pela sua magnitude (fortes ou fracas, caracterizadas numa escala de 0 a 1).

Assim, correlações negativas sugerem que existe uma relação inversamente proporcional entre métodos, isto é, quando uma variável aumenta a outra diminui. As correlações negativas foram detetadas, como seria de esperar, no método DPPH, AChE e BChE (Tabela 10.5.1), uma vez que os valores expressos nestes métodos são em IC₅₀, e como tal valores mais elevados de IC₅₀ significam menor atividade dos extratos (proporcionalidade inversa), ao contrário do que acontece nos outros testes (TPC, TFC, TAA, RP e FRAP), em que valores mais altos indicam uma maior concentração ou atividade, e por isso apresentam correlações positivas entre si.

Relativamente à magnitude das correlações, quanto mais próximos os valores estiverem de 1 (ou -1, caso seja uma correlação negativa) mais forte é a correlação linear entre as duas variáveis. Existe uma escala de valores absolutos para o coeficiente de correlação de Pearson (R), pelo que, se o valor de R estiver entre 0,00 - 0,19 a correlação é muito fraca; entre 0,20 - 0,39 é fraca; 0,40 - 0,59 é uma correlação moderada; entre 0,60 - 0,79 é forte e finalmente entre 0,80 - 1,0 diz-se que é uma correlação muito forte.¹¹⁷

Analisando a Tabela 10.5.1 observa-se que existem correlações muito fortes entre TPC, RP, FRAP e AChE; entre TPC, DPPH, AChE e RP; e entre BChE e TAA, apresentando sempre correlações significativas a $p < 0,01$. Por outro lado, as correlações fracas foram observadas entre TPC e BChE, e entre TFC, AChE e BChE. Verificou-se ainda que existe uma correlação consideravelmente forte (0,723) entre ambas as enzimas colinesterásicas (AChE e BChE).

Tabela 10.5.1. Coeficientes de correlação de Pearson (R) entre os diferentes métodos estudados

	TPC	TFC	TAA	RP	FRAP	DPPH	AChE	BChE
TPC	1	0,733**	0,559*	0,894**	0,876**	-0,740**	-0,894**	-0,353
TFC		1	0,534*	0,665**	0,628*	-0,830**	-0,310	-0,360
TAA			1	0,805**	0,868**	-0,802**	-0,666*	-0,882**
RP				1	0,936**	-0,896**	-0,925**	-0,449*
FRAP					1	-0,788**	-0,989**	-0,765**
DPPH						1	0,963**	0,783**
AChE							1	0,723**
BChE								1

* Correlação significativa a $p < 0,05$

** Correlação significativa a $p < 0,01$

As elevadas correlações entre o TPC e RP ($R= 0,894$) e entre o TPC e FRAP ($R= 0,876$) sugerem que uma das principais fontes responsáveis pela atividade antioxidante dos extratos de plantas estudados são os compostos fenólicos. Porém, verifica-se que os flavonoides não são dos compostos fenólicos que contribuem maioritariamente para essa atividade ($R= 0,665$ para TFC e RP; e $R= 0,628$ para TFC e FRAP), pelo que outros compostos fenólicos não-flavonoides podem ser responsáveis por essa atividade antioxidante observada, nomeadamente o ácido gálico, ácido ferúlico ou elágico.

A Tabela 10.4.1 mostra ainda que o método DPPH se correlaciona bem tanto com o método RP ($R= 0,896$) como com o método FRAP ($R= 0,788$), pelo que, os antioxidantes presentes nos extratos analisados tiveram a capacidade de reduzir não só o radical livre DPPH como o ião férrico (Fe^{3+}), mostrando uma boa capacidade antioxidante medida por qualquer destes três métodos.

Relativamente à atividade inibitória da AChE pelos diferentes extratos de plantas estudados, observa-se que os compostos fenólicos são determinantes nessa atividade ($R=0,894$), contudo os flavonoides, por sua vez, têm pouca ou praticamente nenhuma influência nessa inibição enzimática ($R=0,310$). Também se observam correlações significativamente elevadas entre a atividade inibitória da AChE e o método DPPH, FRAP e RP ($R= 0,963$; $0,989$ e $0,925$ respetivamente), o que sugere uma grande

capacidade dos antioxidantes (compostos fenólicos não-flavonoides), presentes nos extratos analisados, de atuarem não só através da inibição da acetilcolinesterase (AChE) mas também por mecanismos de redução de radicais livres. Como a correlação entre o DPPH e AChE é positiva, indica que quanto maior a capacidade dos constituintes dos extratos em reduzir o radical DPPH, maior a capacidade de inibição da acetilcolinesterase, o que se verificou especialmente no extrato de MC.

Por seu turno, a atividade inibitória da BChE mostrou uma fraca correlação tanto com o TPC ($R= 0,353$) como com o TFC ($R= 0,360$). Como tal, a atividade da BChE detetada nos extratos de plantas analisados deve-se a outros compostos que não os fenólicos, como por exemplo, os taninos ou alcaloides, referidos noutros artigos como os compostos mais responsáveis por constituírem propriedades antioxidantes e anticolinesterásicas às plantas. ⁶ A melhor correlação da BChE foi com o método TAA ($R= 0,882$), indicando que os compostos antioxidantes capazes de inibir a butirilcolinesterase (BChE) também foram capazes de reduzir o molibdénio VI.

10.6. Análise de agrupamento hierárquico (HCA)

A análise de agrupamento hierárquico (HCA) tem como principal objetivo determinar as semelhanças entre as diferentes amostras analisadas através da apresentação dos resultados na forma de um dendrograma, no qual as amostras são agrupadas hierarquicamente em função da sua similaridade. Como tal, quanto menor a distância entre as amostras maior a similaridade entre elas (medidas através da distância euclidiana ao quadrado).

Foram então elaborados dois dendrogramas, um relativo aos diferentes extratos aquosos analisados (Figura 10.6.1) e outro relativo aos métodos utilizados (Figura 10.6.2).

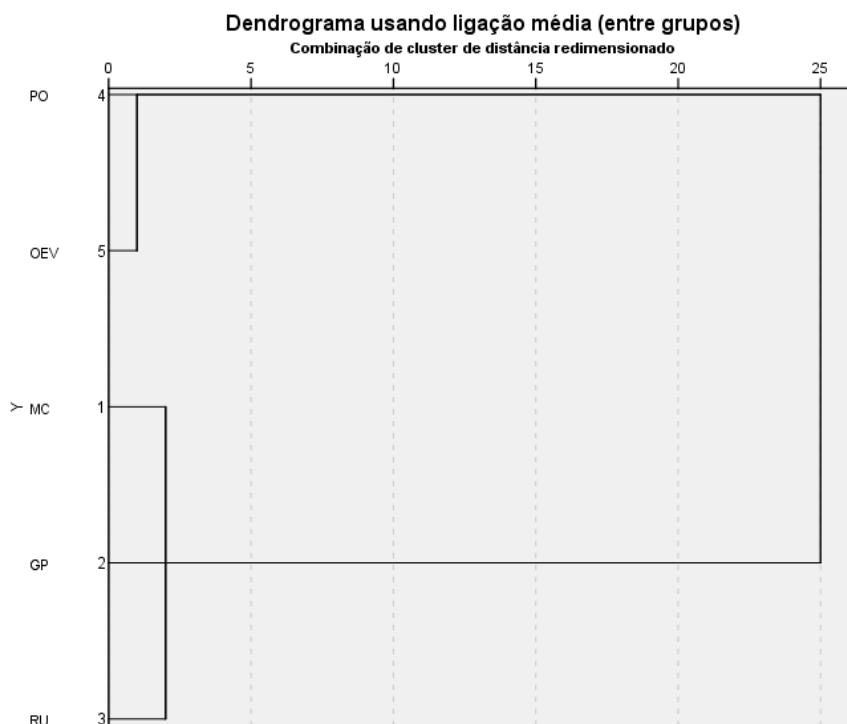


Figura 10.6.1. Dendrograma obtido pela Análise de Cluster Hierárquica (HCA) para todas as amostras de extratos aquosos analisados.

Nota: MC = *Myrtus communis* L.; OEV = *Olea europaea* var. *sylvestris* (Mill.) Lehr; RU = *Rubus ulmifolius* Schott; GP = *Geranium purpureum* Vill; PO = *Portulaca oleracea* L

Pode-se observar, através da Figura 10.6.1, que existem dois *clusters* agrupados pela sua similaridade. Assim, os extratos de PO e OEV encontram-se num dos grupos, apresentando mais semelhanças entre si, o que seria de esperar pois foram as plantas que, de uma forma geral, obtiveram os valores mais reduzidos em todos os métodos. Por outro lado, o segundo grupo de *cluster* agrupa o extrato aquoso de MC, GP e RU, em que o extrato de MC relaciona-se melhor com o GP do que com o RU, e vice-versa, devido à menor distância entre eles. Verifica-se ainda que estes três extratos apresentam uma menor proximidade entre si do que o extrato PO e OEV entre si.

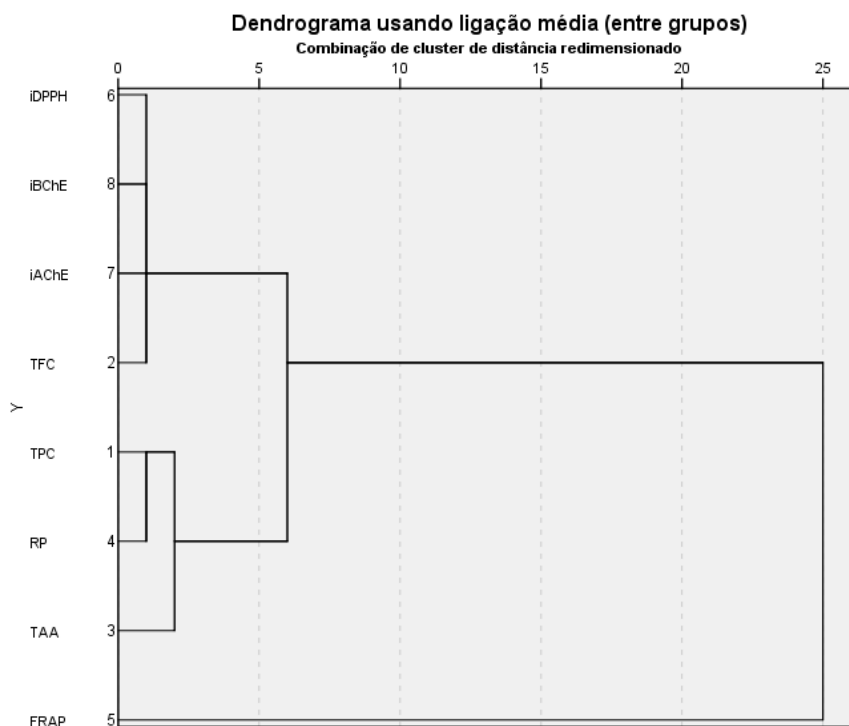


Figura 10.6 2. Dendrograma obtido pela Análise de Cluster Hierárquica (HCA) para todos os métodos estudados

Nota: TPC = Conteúdo em fenólicos totais; TFC = Conteúdo em flavonoides totais; TAA = atividade antioxidante total; RP = poder redutor; FRAP = poder antioxidante de redução do ferro; iDPPH = inverso da capacidade de captura de radicais livres DPPH; iAChE = inverso da atividade inibitória contra a acetilcolinesterase; iBChE = inverso da atividade inibitória contra a butirilcolinesterase

Uma vez que no método DPPH, AChE e BChE os resultados são expressos em IC_{50} , e como tal as concentrações obtidas são inversamente proporcionais à atividade dos extratos, foi necessário calcular o inverso dos valores obtidos para os respetivos métodos (iDPPH, iAChE e iBChE) com o intuito de elaborar uma comparação e organização mais fidedigna do dendrograma relativo aos métodos utilizados.

Assim, através da análise da Figura 10.6.2, observa-se que existem três *clusters* agrupados pela sua similaridade: o método DPPH, AChE, BChE e TFC estão agrupados no primeiro *cluster*, seguidos do método TPC, RP e TAA no *cluster* 2 e no último grupo encontra-se isolado num *cluster* o método FRAP. Estes agrupamentos vão de acordo com a dimensão dos valores obtidos, isto é, por exemplo, as atividades antioxidantes obtidas nos métodos TAA e RP tiveram valores de grandeza mais semelhantes entre si do que no método FRAP.

11. Conclusão geral

Dado que a doença de Alzheimer não tem uma etiologia conhecida e é uma doença patologicamente complexa, o uso de fármacos multifuncionais torna-se uma abordagem cada vez mais viável para a melhoria da qualidade de vida destes doentes. Como tal, extratos de plantas e os seus respetivos componentes bioativos que possuam atividade antioxidante, anti-inflamatória e anticolinesterásica tornam-se um ponto de partida para a descoberta e síntese de novos e mais eficientes inibidores colinesterásicos.

De uma forma geral, o extrato aquoso de *Myrtus communis* L. foi o que apresentou, de todos os extratos analisados, uma melhor atividade antioxidante ($590,88 \pm 7,68$ mg TE/g peso seco no método RP e $1459,14 \pm 8,05$ mg TE/g peso seco no FRAP e um valor de IC_{50} de $15,10 \pm 1,95$ μ g/mL no método DPPH); bem como a melhor capacidade anticolinesterásica (IC_{50} de $0,82 \pm 0,23$ mg/mL contra a acetilcolinesterase e $13,54 \pm 4,07$ mg/mL contra a butirilcolinesterase). Tal resultado pode ser explicado pelos valores elevados obtidos tanto em conteúdo de fenólicos totais ($718,89 \pm 8,74$ mg GAE/g peso seco) como em flavonoides totais ($18,83 \pm 0,83$ mg QE/peso seco). Apesar de ter sido o extrato com melhores resultados obtidos, estes valores continuam a apontar para uma fraca capacidade de inibição de ambas as enzimas colinesterásicas, comparado com o IC_{50} obtido para o controlo Tacrina ($21,26 \pm 3,60$ μ g/mL contra a AChE e $22,26 \pm 0,98$ μ g/mL contra a BChE), bem como com valores obtidos por outros estudos e com a literatura pesquisada no decorrer desta dissertação.

Por outro lado, o extrato aquoso de *Portulaca oleracea* L. foi o que apresentou os valores mais baixos tanto no método TPC ($68,33 \pm 1,77$ mg GAE/g peso seco) como TFC ($2,64 \pm 0,30$ mg QE/peso seco) e consequentemente a pior atividade antioxidante em todos os métodos analisados (de salientar o elevado IC_{50} obtido no método DPPH – $325,99 \pm 3,04$ μ g/mL). Além disso, este extrato analisado também não apresentou qualquer capacidade *in vitro* de inibição nem da acetilcolinesterase nem da butirilcolinesterase, pelo menos a uma concentração de 25,47 mg/mL. O extrato aquoso de *Olea europaea* var. *sylvestris* (Mill.) Lehr. (OEV) também obteve das menores concentrações em fenólicos totais bem como das piores atividades antioxidantes e das mais fracas capacidades de inibição de ambas as enzimas colinesterásicas, pelo que ambos os extratos parecem ter pouco interesse em doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer.

Em relação ao extrato analisado de *Geranium purpureum* Vill. (GP), este foi o que apresentou o maior conteúdo em flavonoides totais ($24,71 \pm 1,96$ mg QE/ g peso seco), apresentando também uma atividade inibitória superior contra a butirilcolinesterase (IC_{50} de $5,72 \pm 2,90$ mg/mL) do que contra a acetilcolinesterase (IC_{50} de $9,82 \pm 2,47$ mg/mL). Por seu turno, o extrato de *Rubus ulmifolius* Schott (RU) foi o que obteve a melhor inibição da butirilcolinesterase (IC_{50} de $4,62 \pm 2,94$ mg/mL) e uma inibição da acetilcolinesterase também interessante (IC_{50} de $2,60 \pm 1,02$ mg/mL), com uma boa atividade antioxidante (IC_{50} de $22,69 \pm 0,88$ μ g/mL no método DPPH).

Dado a elevada correlação obtida tanto entre o conteúdo em fenólicos totais e a atividade inibitória da AChE ($R = 0,894$) e entre a atividade antioxidante e a inibitória da AChE ($R=0,963$ no método DPPH, $R=0,989$ no FRAP e $R=0,925$ no RP), pensa-se que os compostos fenólicos tenham uma contribuição preponderante para a atenuação dos sintomas da DA. Contudo, estudos futuros são necessários para isolar e identificar individualmente os compostos dos diferentes extratos aquosos analisados, uma vez que a composição exata responsável pela atividade antioxidante e anticolinesterásica destes cinco extratos estudados é, atualmente, desconhecida. Para além disso, testes *in vivo* são também fundamentais para investigar tanto a eficácia como a segurança, e possível aplicabilidade como futuras moléculas na profilaxia ou tratamento da doença de Alzheimer.

12.Referências bibliográficas

1. Stelzmann RA, Schnitzlein HN, Murtagh FR. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "über eine eigenartige erkankung der hirnrinde." *Clin Anat.* 1995;8(6):429-431.
2. Kasper D, Fauci A, Longon D. *Harrison Medicina Interna: Cap.350: Doença de Alzheimer E Outras Demências.* 18th ed. (McGraw-Hill, ed.). Rio de Janeiro; 2013.
3. Chopra K, Misra S, Kuhad A. Current perspectives on pharmacotherapy of Alzheimer's disease. *Expert Opin Pharmacother.* 2011;12(3):335-350.
4. Goodman & Gilman's. Cap.10: Anticholinesterase Agents. In: Goodman, L. S., Gilman A, ed. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics.* 12th ed. New York: McGraw-Hill; 2011:239-243.
5. Vladimir-Knežević S, Blažeković B, Kindl M, et al. Acetylcholinesterase Inhibitory, Antioxidant and Phytochemical Properties of Selected Medicinal Plants of the Lamiaceae Family. *Molecules.* 2014;19(1):767-782.
6. Ferreira A, Proença C, Serralheiro MLM, Araújo MEM. The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *J Ethnopharmacol.* 2006;108(1):31-37.
7. Albarracin SL, Stab B, et al. Effects of natural antioxidants in neurodegenerative disease. *Nutr Neurosci.* 2013:1-9.
8. Ghareeb DA, ElAhwany AMD, El-mallawany SM, Saif AA. *In vitro* screening for anti-acetylcholinesterase, anti-oxidant, anti-glucosidase, anti-inflammatory and anti-bacterial effect of three traditional medicinal plants. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 2014;28(6):1155-1164.
9. Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. Alzheimer's disease. *Lancet.* 2011;377(9770):1019-1031.
10. Sosa-Ortiz AL, Acosta-Castillo I, Prince MJ. Epidemiology of Dementias and Alzheimer's Disease. *Arch Med Res.* 2012;43(8):600-608.
11. World Health Organization and Alzheimer's Disease International. *WHO / Dementia: A Public Health Priority.* World Health Organization; 2012.
12. DIREÇÃO-GERAL DA SAÚDE L. PORTUGAL Saúde Mental em Números – 2015. In: *Programa Nacional Para a Saúde Mental.* ; 2015.
13. Nalivaeva NN, Turner AJ. The amyloid precursor protein: A biochemical enigma in brain development, function and disease. *FEBS Lett.* 2013;587(13):2046-2054.
14. Massoud F, Gauthier S. Update on the pharmacological treatment of Alzheimer's disease. *Curr Neuropharmacol.* 2010;8(1):69-80.
15. Graeber MB, Streit WJ. Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010;119(1):89-105.

16. Menichini F, Tundis R, Loizzo MR, et al. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibition of ethanolic extract and monoterpenes from *Pimpinella anisoides* V Brig. (Apiaceae). *Fitoterapia*. 2009;80(5):297-300.
17. Hanger DP, Anderton BH, Noble W, et al. Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med*. 2009;15(3):112-119.
18. Singh M, Kaur M, Chadha N, Silakari O. Hybrids: a new paradigm to treat Alzheimer's disease. *Mol Divers*. 2016;20(1):271-297.
19. Raber J, Huang Y, et al. ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology. *Neurobiol Aging*. 2004;25(5):641-650.
20. Cechetto DF, Hachinski V, Whitehead SN. Vascular risk factors and Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother*. 2008;8(5):743-750.
21. Xu WL, von Strauss E, Qiu CX, Winblad B, Fratiglioni L. Uncontrolled diabetes increases the risk of Alzheimer's disease: a population-based cohort study. *Diabetologia*. 2009;52(6):1031-1039.
22. DeKosky ST, Gandy S, S G, et al. Environmental Exposures and the Risk for Alzheimer Disease. *JAMA Neurol*. 2014;71(3):273.
23. Lanctôt KL, Rajaram RD, Herrmann N. Therapy for Alzheimer's Disease: How Effective are Current Treatments? *Ther Adv Neurol Disord*. 2009;2(3):163-180.
24. Murray AP, Faraoni MB, Castro MJ, Alza NP, Cavallaro V. Natural AChE Inhibitors from Plants and their Contribution to Alzheimer's Disease Therapy. *Curr Neuropharmacol*. 2013;11(4):388-413.
25. Butterfield DA, Barone E, Mancuso C. Cholesterol-independent neuroprotective and neurotoxic activities of statins: Perspectives for statin use in Alzheimer disease and other age-related neurodegenerative disorders. *Pharmacol Res*. 2011;64(3):180-186.
26. Sparks DL, Sabbagh MN, Connor DJ, et al. Atorvastatin for the Treatment of Mild to Moderate Alzheimer Disease. *Arch Neurol*. 2005;62(5):753.
27. Feldman HH, Doody RS, Kivipelto M, et al. Randomized controlled trial of atorvastatin in mild to moderate Alzheimer disease: LEADe. *Neurology*. 2010;74(12):956-964.
28. Wang J, Tan L, Wang H-F, et al. Anti-Inflammatory Drugs and Risk of Alzheimer's Disease: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *J Alzheimer's Dis*. 2015;44(2):385-396.
29. Selkoe DJ, Hardy J, Andersen O, et al. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med*. 2016;8(6):595-608.
30. Siemers ER, Sundell KL, et al. Phase 3 solanezumab trials: Secondary outcomes in mild Alzheimer's disease patients. *Alzheimer's Dement*. 2016;12(2):110-120.
31. Foster DJ, Choi DL, Conn PJ, Rook JM. Activation of M1 and M4 muscarinic receptors as potential treatments for Alzheimer's disease and schizophrenia. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2014;10:183-191.
32. Camejo-Rodrigues J, Ascensão L, Bonet MÀ, Vallès J. An ethnobotanical study

- of medicinal and aromatic plants in the Natural Park of “Serra de São Mamede” (Portugal). *J Ethnopharmacol.* 2003;89(2-3):199-209.
33. Angelo PM, Jorge N. Phenolic compounds in foods-A brief review. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 66:1-9.
 34. Choi S-M, Kim BC, Cho Y-H, et al. Effects of Flavonoid Compounds on β -amyloid-peptide-induced Neuronal Death in Cultured Mouse Cortical Neurons. *Chonnam Med J.* 2014;50(2):45-51.
 35. Mitjavila MT, Moreno JJ. The effects of polyphenols on oxidative stress and the arachidonic acid cascade. Implications for the prevention/treatment of high prevalence diseases. *Biochem Pharmacol.* 2012;84(9):1113-1122.
 36. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr.* 2005;81(1 Suppl):230S-242S.
 37. Mourtzinou I, Salta F, Yannakopoulou K, Chiou A, Karathanos VT. Encapsulation of Olive Leaf Extract in β -Cyclodextrin. 2007.
 38. Ishisaka A, Ichikawa S, Sakakibara H, et al. Accumulation of orally administered quercetin in brain tissue and its antioxidative effects in rats. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(7):1329-1336.
 39. Huebbe P, Wagner AE, Boesch-Saadatmandi C, Sellmer F, Wolfram S, Rimbach G. Effect of dietary quercetin on brain quercetin levels and the expression of antioxidant and Alzheimer’s disease relevant genes in mice. *Pharmacol Res.* 2010;61(3):242-246.
 40. Amessis-Ouchemoukh N, Madani K, Falé PLV, Serralheiro ML, Araújo MEM. Antioxidant capacity and phenolic contents of some Mediterranean medicinal plants and their potential role in the inhibition of cyclooxygenase-1 and acetylcholinesterase activities. *Ind Crops Prod.* 2014;53:6-15.
 41. Gu Y, Luchsinger JA, Stern Y, Scarmeas N. Mediterranean diet, inflammatory and metabolic biomarkers, and risk of Alzheimer’s disease. *J Alzheimers Dis.* 2010;22(2):483-492.
 42. Harrison FE, Bowman GL, Polidori MC. Ascorbic acid and the brain: rationale for the use against cognitive decline. *Nutrients.* 2014;6(4):1752-1781.
 43. Farmanzadeh D, Najafi M. Novel Trolox derivatives as antioxidant: A DFT investigation. *J Serbian Chem Soc.* 2016;81(3):277-290.
 44. Harman D. Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *Sci Aging Knowl Environ.* 2002;2002(37):14.
 45. Floyd R, Hensley K, et al. Oxidative stress in brain aging Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging.* 2002;23(5):795-807.
 46. Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem.* 2002;80(5):780-787.
 47. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 2000;408(6809):239-247.

48. Swerdlow RH, Burns JM, Khan SM. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis. *J Alzheimers Dis.* 2010;20 Suppl 2(Suppl 2):S265-79.
49. Singh M, Kaur M, Kukreja H, Chugh R, Silakari O, Singh D. Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: From nerve toxins to neuroprotection. *Eur J Med Chem.* 2013;70:165-188.
50. Oboh G, Agunloye OM, Akinyemi AJ, Ademiluyi AO, Adefegha SA. Comparative Study on the Inhibitory Effect of Caffeic and Chlorogenic Acids on Key Enzymes Linked to Alzheimer's Disease and Some Pro-oxidant Induced Oxidative Stress in Rats' Brain-In Vitro. *Neurochem Res.* 2013;38(2):413-419.
51. Khan MTH, Orhan I, Şenol FS, et al. Cholinesterase inhibitory activities of some flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies. *Chem Biol Interact.* 2009;181(3):383-389.
52. Kostomoiri M, Fragkouli A, Sagnou M, et al. Oleuropein, an Anti-oxidant Polyphenol Constituent of Olive Promotes α -Secretase Cleavage of the Amyloid Precursor Protein (A β PP). *Cell Mol Neurobiol.* 2013;33(1):147-154.
53. Shimmyo Y, Kihara T, Akaike A, Niidome T, Sugimoto H. Flavonols and flavones as BACE-1 inhibitors: Structure–activity relationship in cell-free, cell-based and in silico studies reveal novel pharmacophore features. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2008;1780(5):819-825.
54. Rainer M, Mucke H, Schlaefke S. Ginkgo biloba extract EGb 761 in the treatment of dementia: a pharmaco-economic analysis of the Austrian setting. *Wien Klin Wochenschr.* 2013;125(1-2):8-15.
55. Mukherjee PK, Kumar V, Mal M, Houghton PJ. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine.* 2007;14(4):289-300.
56. ŞÖHRETOĞLU D, SAKAR MK, STERNER O. Polyphenolic compounds from *Geranium purpureum* Vill. growing in Turkey. *Turkish J Chem.* 2011;35(5):809-814.
57. Neves JM, Matos C, Moutinho C, Queiroz G, Gomes LR. Ethnopharmacological notes about ancient uses of medicinal plants in Trás-os-Montes (northern of Portugal). *J Ethnopharmacol.* 2009;124(2):270-283.
58. Novais M., Santos I, Mendes S, Pinto-Gomes C. Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal). *J Ethnopharmacol.* 2004;93(2):183-195.
59. Proestos C, Boziaris IS, Nychas G-JE, Komaitis M. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chem.* 2006;95(4):664-671.
60. Proença da Cunha A, Pereira da Silva A RO. *Plantas E Produtos Vegetais Em Fitoterapia.* 4th ed. (Fundação Calouste Gulbenkian, ed.). Lisboa; 2012.
61. Hosseinzadeh H, Khoshdel M, Ghorbani M, et al. Antinociceptive, anti-inflammatory effects and acute toxicity of aqueous and ethanolic extracts of *Myrtus communis* L. Aerial parts in mice. *J Acupunct Meridian Stud.* 2011;4(4):242-247.

62. Yoshimura M, Amakura Y, Tokuhara M, Yoshida T. Polyphenolic compounds isolated from the leaves of *Myrtus communis*. *J Nat Med*. 2008;62(3):366-368.
63. Dairi S, Madani K, Aoun M, et al. Antioxidative Properties and Ability of Phenolic Compounds of *Myrtus communis* Leaves to Counteract *In Vitro* LDL and Phospholipid Aqueous Dispersion Oxidation. *J Food Sci*. 2014;79(7):C1260-C1270.
64. Messaoud C, Laabidi A, Boussaid M. *Myrtus communis* L. Infusions: The Effect of Infusion Time on Phytochemical Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Activities. *J Food Sci*. 2012;77(9):C941-C947.
65. Aidi Wannas W, Mhamdi B, Sriti J, et al. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food Chem Toxicol*. 2010;48(5):1362-1370.
66. Gardeli C, Vassiliki P, Athanasios M, Kibouris T, Komaitis M. Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chem*. 2008;107(3):1120-1130.
67. Benavente-García O, Castillo J, Lorente J, Ortuño A, Del Rio J. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chem*. 2000;68(4):457-462.
68. Rubió L, Valls R-M, Macià A, et al. Impact of olive oil phenolic concentration on human plasmatic phenolic metabolites. *Food Chem*. 2012;135(4):2922-2929.
69. de Bock M, Thorstensen EB, Derraik JGB, Henderson H V., Hofman PL, Cutfield WS. Human absorption and metabolism of oleuropein and hydroxytyrosol ingested as olive (*Olea europaea* L.) leaf extract. *Mol Nutr Food Res*. 2013;57(11):2079-2085.
70. Altinyay, Çiğdem, Ayşegül Güvenç and MLA. Antioxidant activities of oleuropein and the aqueous extracts of *Olea europaea* L. Varieties growing in turkey. *Turkish J Pharm Sci*. 2011;8.
71. Meirinhos J, Silva BM, Valentão P, et al. Analysis and quantification of flavonoidic compounds from Portuguese olive (*Olea europaea* L.) leaf cultivars. *Nat Prod Res*. 2005;19(2):189-195.
72. Pereira AP, Ferreira IC, Marcelino F, et al. Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) Leaves. *Molecules*. 2007;12(5):1153-1162.
73. Wang X, Li C, Liu Y, Li H, Di D. Efficient method for screening and identification of radical scavengers in the leaves of *Olea europaea* L. *Biomed Chromatogr*. 2011;25(3):373-380.
74. Goulas V, Papoti VT, Exarchou V, Tsimidou MZ, Gerothanassis IP. Contribution of Flavonoids to the Overall Radical Scavenging Activity of Olive (*Olea europaea* L.) Leaf Polar Extracts. 2010.
75. Soler-Rivas C, Espen JC, Wichers HJ. Oleuropein and related compounds. *J Sci Food Agric*. 2000;80(7):1013-1023.
76. Serra A, Rubió L, Borràs X, Macià A, Romero M-P, Motilva M-J. Distribution of

- olive oil phenolic compounds in rat tissues after administration of a phenolic extract from olive cake. *Mol Nutr Food Res*. 2012;56(3):486-496.
77. Goldsmith C, Vuong Q, Sadeqzadeh E, Stathopoulos C, Roach P, Scarlett C. Phytochemical Properties and Anti-Proliferative Activity of *Olea europaea* L. Leaf Extracts against Pancreatic Cancer Cells. *Molecules*. 2015;20(7):12992-13004.
78. Oliveira I, Valentão P, Lopes R, Andrade PB, Bento A, Pereira JA. Phytochemical characterization and radical scavenging activity of *Portulaca oleracea* L. leaves and stems. *Microchem J*. 2009;92(2):129-134.
79. Xiang L, Xing D, Wang W, Wang R, Ding Y, Du L. Alkaloids from *Portulaca oleracea* L. *Phytochemistry*. 2005;66(21):2595-2601.
80. Chan K, Islam M., Kamil M, et al. The analgesic and anti-inflammatory effects of *Portulaca oleracea* L. subsp. *sativa* (Haw.) Celak. *J Ethnopharmacol*. 2000;73(3):445-451.
81. Hongxing Z, Nancai Y, Guofu H, et al. Neuroprotective effects of purslane herb aqueous extracts against d-galactose induced neurotoxicity. *Chem Biol Interact*. 2007;170(3):145-152.
82. Yen G., Chen H., Peng H. Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of emerging edible plants. *Food Chem Toxicol*. 2001;39(11):1045-1053.
83. Gudej J, Tomczyk M. Determination of flavonoids, tannins and ellagic acid in leaves from *Rubus* L. species. *Arch Pharm Res*. 2004;27(11):1114-1119.
84. Dall'Acqua S, Cervellati R, Loi MC, Innocenti G. *Evaluation of in Vitro Antioxidant Properties of Some Traditional Sardinian Medicinal Plants: Investigation of the High Antioxidant Capacity of Rubus Ulmifolius*. Vol 106.; 2008.
85. Martini S, D'Addario C, Colacevich A, et al. Antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* strains and antioxidant properties of blackberry leaves (*Rubus ulmifolius*) and isolated compounds. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;34(1):50-59.
86. Panizzi L, Caponi C, Catalano S, Cioni P., Morelli I. In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. *J Ethnopharmacol*. 2002;79(2):165-168.
87. Huang Y-C, Chang Y-H, Shao Y-Y. Effects of genotype and treatment on the antioxidant activity of sweet potato in Taiwan. *Food Chem*. 2006;98(3):529-538.
88. Quettier-Deleu C, Gressier B, Vasseur J, et al. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *J Ethnopharmacol*. 2000;72(1):35-42.
89. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Anal Biochem*. 1999;269(2):337-341.
90. Oyaizu M. Studies on products of browning reaction--antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese J Nutr*. 1986.

91. Sun J, Liu S, Zhang C, et al. Chemical Composition and Antioxidant Activities of *Broussonetia papyrifera* Fruits. Hart JP, ed. *PLoS One*. 2012;7(2):e32021.
92. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power"; the FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996;239(1):70-76.
93. Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Hawkins Byrne D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J Food Compos Anal*. 2006;19(6):669-675.
94. Liang N, Kitts DD. Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action. *Molecules*. 2014;19(11):19180-19208.
95. Shalaby EA, Shanab SMM. Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. *African J Pharm Pharmacol*. 2013;7:528-536.
96. Yen G-C, Duh P-D, Chuang D-Y. Antioxidant activity of anthraquinones and anthrone. *Food Chem*. 2000;70(4):437-441.
97. Zengin G, Guler GO, Aktumsek A, et al. Enzyme Inhibitory Properties, Antioxidant Activities, and Phytochemical Profile of Three Medicinal Plants from Turkey. *Adv Pharmacol Sci*. 2015;2015:1-8.
98. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 1961;7(2):88-95.
99. Boğa M, Hacibekiroğlu I, Kolak U. Antioxidant and anticholinesterase activities of eleven edible plants. *Pharm Biol*. 2011;49(3):290-295.
100. Sancheti S, Sancheti S, Um B-H, Seo S-Y. 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -d-glucose: A cholinesterase inhibitor from *Terminalia chebula*. *South African J Bot*. 2010;76(2):285-288.
101. Proestos C, Zoumpoulakis P, Sinanoglou VJ. Determination of Plant Bioactive Compounds. Antioxidant Capacity and Antimicrobial Screening. 2013;2(1):26-35.
102. Tan SP, Parks SE, Stathopoulos CE, Roach PD. Extraction of Flavonoids from Bitter Melon. *Food Nutr Sci*. 2014;5(5):458-465.
103. Roy MK, Juneja LR, Isobe S, Tsushida T. Steam processed broccoli (*Brassica oleracea*) has higher antioxidant activity in chemical and cellular assay systems. *Food Chem*. 2009;114(1):263-269.
104. Rawson A, Hossain MB, Patras A, Tuohy M, Brunton N. Effect of boiling and roasting on the polyacetylene and polyphenol content of fennel (*Foeniculum vulgare*) bulb. *Food Res Int*. 2013;50(2):513-518.
105. Nagarani G, Abirami A, Nikitha P, Siddhuraju P. Effect of hydrothermal processing on total polyphenolics and antioxidant potential of underutilized leafy vegetables, *Boerhaavia diffusa* and *Portulaca oleracea*. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2014;4(Suppl 1):S468-77.
106. Uddin MK, Juraimi AS, Ali ME, Ismail MR. Evaluation of antioxidant properties and mineral composition of Purslane (*Portulaca oleracea* L.) at different growth stages. *Int J Mol Sci*. 2012;13(8):10257-10267.

107. Lee Y-J, Kim D-B, Lee J, et al. Antioxidant Activity and Anti-Adipogenic Effects of Wild Herbs Mainly Cultivated in Korea. *Molecules*. 2013;18(10):12937-12950.
108. Okuda T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry*. 2005;66(17):2012-2031.
109. Oboh G. Effect of blanching on the antioxidant properties of some tropical green leafy vegetables. *LWT - Food Sci Technol*. 2005;38(5):513-517.
110. Moneim A, Nasr I, Dkhil M. Neuronal activities of *Portulaca oleracea* in adult rats. *J Med Plants Res*. 2012;6(16):3162-3168.
111. Tumen I, Senol FS, Orhan IE. Inhibitory potential of the leaves and berries of *Myrtus communis* L. (myrtle) against enzymes linked to neurodegenerative diseases and their antioxidant actions. *Int J Food Sci Nutr*. 2012;63(4):387-392.
112. Orhan I, Şener B, Choudhary M., Khalid A. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 2004;91(1):57-60.
113. Adewusi EA, Moodley N, Steenkamp V. Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activity of selected southern African medicinal plants. *South African J Bot*. 2011;77(3):638-644.
114. Ding X, Ouyang M-A, Liu X, et al. Acetylcholinesterase Inhibitory Activities of Flavonoids from the Leaves of *Ginkgo biloba* against Brown Planthopper. *J Chem*. 2013;2013:1-4.
115. Jung M, Park M. Acetylcholinesterase inhibition by flavonoids from *Agrimonia pilosa*. *Molecules*. 2007;12(9):2130-2139.
116. Onor ML, Trevisiol M, Aguglia E. Rivastigmine in the treatment of Alzheimer's disease: an update. *Clin Interv Aging*. 2007;2(1):17-32.
117. Mukaka MM. Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Med J*. 2012;24(3):69-71.