

Acknowledgments



Ainda que um ano de trabalho se resume em algumas dezenas de páginas, há muito que fica por dizer. Muito que fica por contar. Por detrás de um enorme esforço pessoal estão, sem dúvida alguma, as imensas contribuições, sugestões e comentários de pessoas que devem ser mencionadas e sem as quais esta tese se tornaria um objectivo muito mais difícil de alcançar.

À Professora Doutora Isabel Saraiva de Carvalho agradeço por toda a orientação, crítica construtiva e disponibilidade nas horas de maior dificuldade, que me acompanharam desde sempre.

À colega de laboratório Teresa Cavaco, que sempre se disponibilizou para esclarecer qualquer dúvida que me assombrasse e que sempre mostrou um sorriso amigo quando algo não corria como previsto, o meu sincero obrigado.

Agradeço também aos restantes colegas que sempre contribuíram para que o laboratório fosse mais que um lugar onde tinham de ser feitos ensaios e testes, e se tornasse algo mais dinâmico e onde todos podíamos trabalhar pacificamente.

E porque a análise estatística é também algo que merece destaque, agradeço à Doutora Katy Nicastro que, ainda que com uma ajuda não presencial, ajudou a tornar mais fácil a compreensão dos resultados.

Num cenário mais familiar agradeço aos amigos que sempre me acompanharam e ajudaram nas horas de maior desespero, lembrando-me que de uma forma ou de outra conseguiria ultrapassar até o que se avizinhava mais difícil.

À família, que nunca deixou de me receber em casa com um forte carinho e com um grande prato de gelado. Pelo apoio incondicional, pelos cuidados e pelos imensos sorrisos sempre que chegava ao terceiro andar do bloco 14, um muito obrigado.

Por último, mas não menos importante à minha companhia de todos os momentos, o meu *bom bocado*, a minha O'hana. Obrigado! Por acreditares em mim e por me fazeres acreditar, especialmente neste contra-relógio final. Pelas madrugadas acordada ao meu lado, mesmo que os olhos pedissem teimosamente para fechar. Pelas últimas semanas, em que trataste de mim ainda melhor que a mãe Â. trata do Mickey Manuel. Acima de tudo, pelo teu amor! (e agora que a tese chegou ao fim, prometo que arrumo a secretária e lavo mais vezes a loiça...)

Resumo

Desde sempre que os recursos naturais, como plantas e frutos, são usados em medicina tradicional, como agentes terapêuticos no tratamento das mais diversas patologias. Com o passar dos anos a ciência evoluiu no sentido de identificar as propriedades e os benefícios que esses recursos podem ter, efectivamente, ao nível da saúde humana, sendo ainda hoje bastante utilizados alguns tipos de medicina tradicional, como é exemplo a medicina chinesa.

Neste sentido, este estudo analisa as propriedades antioxidantes de *Portulaca oleracea*, geralmente conhecida como beldroega. Esta planta tem um crescimento natural, razão pela qual é muitas vezes considerada como uma erva daninha e está vastamente distribuída pelo mundo, o que faz dela um bom objecto de estudo. Além disso, durante séculos foi utilizada em medicinas tradicionais com os mais diversos fins, desde prevenir o escorbuto, tratar disenteria e infecções urinárias ou ainda aplicando as folhas sobre a pele para aliviar a dor e tratar úlceras, mordeduras de insectos e de cobras.

Estudos recentes demonstraram que esta planta é uma boa fonte de ómega-3 e pode desempenhar um papel importante na prevenção de ataques cardíacos e no fortalecimento do sistema imunitário, apesar da sua actividade antioxidante estar ainda muito pouco estudada.

Este trabalho teve então como objectivos confirmar a elevada actividade antioxidante da beldroega e comparar a actividade antioxidante entre diferentes partes da planta e entre duas localizações geográficas diferentes. Por fim pretendia-se confirmar se extractos desta planta tinham, efectivamente, um efeito protector ao nível das cadeias de DNA contra as agressões causadas por radicais livres.

Plantas de dois locais diferentes, um no Algarve (localização 1) outro no Alentejo (localização 2), foram colhidas no fim de Setembro e início de Outubro. As diferentes partes da planta (folhas, caules e flor) foram então separadas, secas numa estufa com circulação de ar, reduzidas a pó e procedeu-se a uma extracção aquosa. Para reproduzir da melhor forma possível as condições que as pessoas têm em casa, a extracção foi feita em água a 95°C, como acontece na confecção de chás.

Resultados relativos à actividade antioxidante total (TAA) mostram valores significativamente mais altos para a localização 2, sendo as diferenças também

significativas relativamente às partes da planta, onde os valores mais altos são representantes dos caules.

O mesmo se verificou relativamente ao conteúdo total de compostos fenólicos (TPC) e aos taninos condensados (CT). No entanto, relativamente à concentração total de flavonoides (TFC) a única diferença significativa entre as localizações foi relativa aos valores obtidos nos caules. Uma vez que os resultados referentes aos compostos fenólicos são significativas diferentes para todas as partes da planta, este facto pode indicar que as amostras da localização 2 apresentam elevadas concentrações de outros compostos fenólicos que não os flavonoides.

No que respeita às concentrações de antocianinas monoméricas (TMA) e carotenos totais (TC), ambos pigmentos naturais, os resultados são um pouco diferentes dos até então referidos. Para ambos os casos, a concentração é mais elevada na localização 1 que na localização 2. Especificamente nas antocianinas, a diferença entre as localizações é significativa e os resultados são também diferentes dos restantes no que diz respeito à parte da planta, na medida em que os valores mais altos de concentração foram encontrados nas flores, em ambos os locais. Embora não seja consistente com os resultados dos outros testes este facto está de acordo com o reportado na literatura, que refere que, normalmente, as flores e as folhas apresentam maiores concentrações de antocianinas que os caules. Quanto à concentração de carotenos, se analisarmos os três tipos de amostra em dois grupos diferentes, juntando folhas e caules no mesmo grupo e flores no outro, as diferenças entre as duas localizações passam a ser muito reduzidas, sugerindo que estes compostos estejam distribuídos de forma um pouco aleatória entre as folhas e os caules. O facto de nem as antocianinas nem os carotenos apresentarem resultados de acordo com os restantes testes sugere que na beldroega estes compostos não estejam tão relacionados com a actividade antioxidante como é defendido para outras plantas e frutos.

No que respeita aos ensaios para testar a capacidade antioxidante *in vitro*, tanto o ensaio de poder redutor (RP) como o poder antioxidante associado à redução de ferro (FRAP) apresentaram valores significativamente mais altos na localização 2. Além disso, ambos apresentaram bons coeficientes de correlação com a concentração total de compostos fenólicos, o que indica que estes compostos apresentam, de facto, uma grande responsabilidade quanto à capacidade antioxidante e poder redutor dos extractos aquosos de beldroega.

Novamente com o intuito de tentar reproduzir ao máximo as condições de utilização e de obter informações que possam ser úteis e de fácil compreensão para a população não científica, foram realizados ensaios de capacidade antioxidante *in vitro* em que foi medida a concentração mínima de extracto (mg de beldroega/ volume de solvente) necessária para capturar/inactivar 50% dos radicais livres DPPH e ABTS presentes em soluções preparadas para o efeito. Nestes ensaios, os extractos da localização 2 também apresentaram melhores resultados, uma vez que necessitavam de menor concentração de amostra que os referentes à localização 1 para capturar 50% dos radicais em solução. Relativamente à comparação entre as diferentes partes da planta, tal como em testes anteriores, foi nos caules que se obtiveram os melhores resultados.

Realizou-se ainda um teste de DNA nicking, que permite verificar se efectivamente os extractos apresentam efeito protector ao nível das cadeias de DNA. Neste teste, as cadeias de DNA são expostas a radicais hidroxil gerados pela reacção de Fenton, os quais são conhecidos por provocarem elevado stress oxidativo no DNA, levando a que as suas ligações sejam quebradas. Os resultados demonstraram que os extractos inibiram a acção dos radicais hidroxil tendo, desta forma, protegido as cadeias de DNA do stress oxidativo causado por esses radicais.

Por fim, procedeu-se à identificação de ácidos fenólicos e flavonoides por cromatografia líquida (HPLC), tendo os resultados apresentado mais compostos e em maior concentração nos extractos da localização 1 e também nas folhas e flores comparativamente com os caules. No entanto, há que referir que para realização de cromatografia líquida é necessária a realização de extracções utilizando metanol como solvente, e como defendido por vários autores devido à diferente polaridade entre metanol e água, os compostos extraídos por cada um dos solventes podem variar, assim como a concentração dos mesmos.

Em jeito de conclusão geral é possível dizer que os objectivos deste estudo foram cumpridos, sendo que tanto diferenças na localização geográfica como diferenças entre as partes da planta apresentam interferência na capacidade antioxidante, e que a beldroega é, efectivamente, uma boa fonte de compostos antioxidantes e de outros compostos com efeitos potencialmente terapêuticos, podendo o seu consumo ajudar a prevenir inúmeras doenças, não só neurológicas como Alzheimer e Parkinson, como também cardiovasculares.

Abstract

The present study analyzes the antioxidant properties of *Portulaca oleracea*, common known as purslane. This plant is an interesting object of study because it is a naturally occurring widely distributed plant and it was used for centuries in folk medicines all around the world. Samples were harvested in two different locations, one from Algarve (location 1) and another from Alentejo (location 2), and divided in three different parts: leaves, stems and flowers. Then, they were dried in an incubator, powdered and water extracts were performed and analyzed.

Total antioxidant activity, total phenolic content, condensed tannins, reducing power, and ferric-reducing antioxidant power assays showed significant higher values ($P < 0,05$) in location 2 rather than in location 1, and generally stems present the same pattern when comparing to other plant parts. Moreover, good correlations were found between TPC and all the other assays, which suggest that in purslane the antioxidant activity and reducing power are essentially due to the content of phenolic compounds. Also DPPH and ABTS assays present better results in location 2, since it was needed lower concentrations to inhibit 50% of the free radicals in solution than in location 1.

On the other hand, for total flavonoids content only stems present this significant difference and for total monomeric anthocyanins and total carotenes higher concentrations were presented by location 1. The same seems to happen with individual analysis of phenolic acids and flavonoids by liquid-chromatography, where methanol extracts were used.

Also, DNA nicking assay showed that water extracts of purslane effectively protect DNA from oxidative damage of hydroxyl radicals.

As general conclusion of this study it is possible to state that both location and plant parts have a significant interference on antioxidant activity and that *Portulaca oleracea* is a rich source of antioxidants among other compounds with a great number of potential benefits for human health.

Abbreviations

ABTS - 2,2'-Azino-bis(3ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt

AAE - ascorbic acid equivalent

CHD – Coronary heart diseases

CT – Condensed tannins

Cu – copper

DPPH - 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

DW – Dry weight

Fe³⁺ - Iron

FRAP - Ferric-reducing antioxidant power

FW – Fresh weight

GAE - gallic acid equivalent

HCl - hydrogen chloride

HDL – High-density lipoprotein

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

IC - half maximal inhibitory concentration

LB - Lysogeny broth

LDL – low-density lipoprotein

LPO – Lipid peroxidation inhibition

ME – Methanol extracts

QE - quercetin equivalent

ROS – Reactive oxygen species

RP – Reducing Power

SD – Standard deviation

TAA – Total antioxidant activity

TC – Total Carotenes

TE - Trolox equivalent

TEAC - Trolox equivalent antioxidant capacity

TFC – Total flavonoid content

TMA - total monomeric anthocyanins

TPC – Total phenoli content

TPTZ - 2,4,6-tripyridyl-2-triazine

UV/Vis – ultraviolet/ visible

WE – water extracts

Zn – zinc

Index	page
Acknowledgments.....	ii
Resumo.....	iii
Abstract.....	vii
Abbreviations.....	viii
1. Introduction.....	1
2. Literature Review	3
2.1. <i>Portulaca Oleracea</i>	3
2.2. Antioxidant Activity.....	5
2.2.1. Phenolic Compounds	7
2.2.2. Flavonoids.....	10
2.2.3. Carotenes.....	12
2.2.4. Anthocyanins.....	12
2.2.5. Tannins.....	13
3. Material and Methods.....	14
3.1. Reagents.....	14
3.2. Plant materials.....	14
3.3. Total Content Assay.....	16
3.3.1. Total Antioxidant Activity.....	16
3.3.2. Total Phenolic Content.....	16
3.3.3. Total Flavonoids Content.....	17
3.3.4. Total Carotenes	17
3.3.5. Total Monomeric Anthocyanins	17
3.3.6. Condensed tannins	19
3.4. <i>In vitro</i> Antioxidant Activity Assays.....	19
3.4.1. Reducing Power assay	19
3.4.2. Ferric-Reducing Antioxidant Power assay	21
3.4.3. Inhibition Rate Assays	21
3.4.3.1. DPPH Radical Scavenging Capacity.....	21
3.4.3.2. ABTS Radical Scavenging Capacity assay.....	22
3.4.4. DNA Nicking Assay	23
3.5 Individual Analysis Assay	23
3.5.1 Quantification of Flavonoids and Phenolic acids by High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	23

3.6. Data Statistical Analysis.....	24
4. Results.....	25
4.1. Total Content Assay.....	25
4.1.1. Total Antioxidant Activity.....	25
4.1.2. Total Phenolic Content.....	26
4.1.3. Total Flavonoids Content.....	27
4.1.4. Total Carotenes	28
4.1.5. Total Monomeric Anthocyanins	29
4.1.6. Condensed tannins	30
4.2. <i>In vitro</i> Antioxidant Activity Assays.....	30
4.2.1. Reducing Power assay	30
4.2.2. Ferric-Reducing Antioxidant Power assay	31
4.2.3. Inhibition Rate Assays	32
4.2.3.1. DPPH Radical Scavenging Capacity.....	32
4.2.3.2. ABTS Radical Scavenging Capacity assay.....	34
4.2.4. DNA Nicking Assay	35
4.3. Individual Analysis Assay	36
4.3.1. Quantification of Flavonoids and Phenolic acids by High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	36
5. Discussion.....	38
5.1. Total Content Assay.....	38
5.1.1. Total Antioxidant Activity.....	38
5.1.2. Total Phenolic Content.....	40
5.1.3. Total Flavonoids Content.....	42
5.1.4. Total Carotenes	42
5.1.5. Total Monomeric Anthocyanins	43
5.1.6. Condensed tannins	44
5.2. <i>In vitro</i> Antioxidant Activity Assays.....	44
5.2.1. Reducing Power assay	44
5.2.2. Ferric-Reducing Antioxidant Power assay	46
5.2.3. Inhibition Rate Assays	47
5.2.3.1. DPPH Radical Scavenging Capacity.....	47
5.2.3.2. ABTS Radical Scavenging Capacity assay.....	48
5.2.4. DNA Nicking Assay	48

5.3. Individual Analysis Assay	49
5.3.1. Quantification of Flavonoids and Phenolic acids by High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	49
5.4. <i>Portulaca oleracea</i> and health effects	51
6. Conclusions.....	53
References	55

Table Index

Table I – Taxonomic hierarchy of <i>Portulaca oleracea</i> (adapted from Danin et al.1978)	3
Table II – Content of phenolic acids and flavonoids in three parts of <i>Portulaca oleracea</i> from location1 and location 2	37
Table III – Total Antioxidant Activity (TAA) of <i>Portulaca oleracea</i> for two different locations in three parts of the plant (three replicates for each one).....	67
Table IV – Total Phenolic content (TPC) of <i>Portulaca oleracea</i> for two different locations in three parts of the plant (three replicates for each one).....	67
Table V – Total Flavonoids Content (TFC) of <i>Portulaca oleracea</i> for two different locations in three parts of the plant (three replicates for each one).....	67
Table VI – Total Carotenes of <i>Portulaca oleracea</i> for two different locations in three parts of the plant (three replicates for each one).....	68
Table VII – Total Monomeric Anthocyanins (TMA) of <i>Portulaca oleracea</i> for two different locations in three parts of the plant (three replicates for each one)	68
Table VIII – Condensed tannins (CT) of <i>Portulaca oleracea</i> for two different locations in three parts of the plant (three replicates for each one).....	68
Table IX – Reducing Power (RP) of <i>Portulaca oleracea</i> for two different locations in three parts of the plant (three replicates for each one).....	69
Table X – Ferric-Reducing Antioxidant Power (FRAP) of <i>Portulaca oleracea</i> for two different locations in three parts of the plant (three replicates for each one).....	69
Table XI – DPPH scavenging activity of <i>Portulaca oleracea</i> for three parts of the plant of location 1 at different concentrations. Values presented are the average of three replicates	69
Table XII – DPPH scavenging activity of <i>Portulaca oleracea</i> for three parts of the plant of location 1 at different concentrations. Values presented are the average of three replicates	70
Table XIII – ABTS scavenging activity of <i>Portulaca oleracea</i> for three parts of the plant of location 1 at different concentrations. Values presented are the average of three replicates	70

Table XIV – ABTS scavenging activity of *Portulaca oleracea* for three parts of the plant of location 1 at different concentrations. Values presented are the average of three replicates 70

Figure Index

Fig.1 – <i>Portulaca oleracea</i> leaves, stems and flowers in the field	3
Fig.2 – Representative scheme of the initiation, propagation, inhibition and termination of a free radical reactions chains, adapted from Huang et al. (2005)....	6
Fig. 3 – Different harvest locations of <i>Portulaca oleracea</i> leaves (a), stems (b) and flowers (c)	15
Fig. 4 – Water extracts of different parts of <i>Portulaca oleracea</i>	15
Fig. 5 - Spectral characteristics of anthocyanins in pH 1.0 and pH 4.5 buffers, adapted from Giusti & Wrolstad (2001)	18
Fig. 6 – Representative scheme of RP assay reaction.....	19
Fig. 7 – Representative scheme of the reaction measured in FRAP assay, adapted from Huang et al. (2005).....	20
Fig. 8 - Representative scheme of the reaction measured in DPPH assay	21
Fig. 9 – Representative scheme of the reaction measured in ABTS assay	22
Fig. 10 – Quantification of Total Antioxidant Activity (TAA) for two different locations in three parts of the plant, expressed in mg of ascorbic acid equivalents by 100g of dry weight	25
Fig.11 – Quantification of Total Phenolic Content (TPC) for two different locations in three parts of the plant, expressed in mg of gallic acid equivalents by 100g of dry weight	26
Fig. 12 – Quantification of Total Flavonoids Content (TFC) for two different locations in three parts of the plant, expressed in mg of quercetin equivalents by 100g of dry weight	27
Fig. 13 – Quantification of Total Carotenes for two different locations in three parts of the plant, expressed in mg of β -carotene equivalents by 100g of dry weight.	28
Fig. 14 – Quantification of Total Monomeric Anthocyanins (TMA) for two different locations in three parts of the plant, expressed in mg of anthocyanins equivalents by L of extract	29
Fig. 15 – Concentration of Condensed tannins (CT) for two different locations in three parts of the plant	30

Fig.16 – Quantification of Reducing Power (RP) for two different locations in three parts of the plant, expressed in mg of trolox equivalents by 100g of dry weight.....	31
Fig.17 – Quantification of Ferric-Reducing Antioxidant Power (FRAP) for two different locations in three parts of the plant, expressed in mg of trolox equivalents by 100g of dry weight.....	32
Fig.18 – Scavenging activity on DPPH radicals (%) of the extracts obtained with different plant parts of location 1.	33
Fig.19 – Scavenging activity on DPPH radicals (%) of the extracts obtained with different plant parts of location 2.	33
Fig. 20 – Scavenging activity on ABTS radicals (%) of the extracts obtained with different plant parts of location 1.	34
Fig.21 – Scavenging activity on ABTS radicals (%) of the extracts obtained with different plant parts of location 2.	34
Fig.22 – Inhibitory effects of <i>Portulaca oleracea</i> extracts on DNA nicking caused by hidroxy radicals.	35
Fig. 23 – Correlation between TAA and TPC	38
Fig. 24 – Correlation between TAA and TFC	39
Fig.25 – Correlation between TFC and TC	43
Fig.26 – Correlation between TPC and RP	45
Fig.27 – Correlation between RP and FRAP	46
Fig.28 – Correlation between TPC and FRAP	47