



**Diabetes: análise *in-vitro* da atividade
antioxidante e antidiabética de quatro extratos de
plantas da região do Algarve**

Cláudia Sofia Mestre Viegas

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho realizado sob orientação de:
Professora Doutora Isabel Saraiva de Carvalho

Faro, 21 de setembro de 2017



Diabetes: análise *in-vitro* da atividade antioxidante e antidiabética de quatro extratos de plantas da região do Algarve

Cláudia Sofia Mestre Viegas

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho realizado sob orientação de:
Professora Doutora Isabel Saraiva de Carvalho

Faro, 21 de setembro de 2017

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, 21 de setembro de 2017

(Cláudia Sofia Mestre Viegas)

Copyright © Cláudia Sofia Mestre Viegas

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

Agradecimentos

Antes de mais agradecer aos meus pais, os pioneiros da minha educação, pois sem eles o meu percurso académico não seria igual. Um igualmente forte reconhecimento ao meu irmão, por toda a inspiração e motivação transmitida, sem dúvida um exemplo a seguir.

O meu reconhecido agradecimento à orientadora Professora Isabel Carvalho por me ter permitido realizar este desafiante estudo tão pertinente na atualidade e pela paciência, apoio e simpatia sempre demonstrada, pois sem ela a realização deste estudo não teria tido ocorrido.

Aos colegas do laboratório *Food Science Lab*, em particular ao Ricardo, pela simpatia, boa disposição, pelo espírito de ajuda e acima de tudo pelos conhecimentos partilhados comigo.

Um especial agradecimento aos professores e profissionais que tive o privilégio de conhecer ao longo do meu percurso enquanto estudante e que contribuíram para o meu crescimento académico e profissional.

Um obrigado à equipa dos Serviços Farmacêuticos do Hospital da Luz Lisboa e à equipa da Farmácia Sousa por todos conhecimentos partilhados, atencioso acolhimento, confiança e disponibilidade sempre demonstrada.

Por fim, mas não menos importante, deixo também o meu agradecimento a todos aqueles que, de qualquer modo marcaram esta etapa que agora termina.

Resumo

A Diabetes *mellitus* (Dm) é uma doença metabólica resultante de alterações no metabolismo da glucose e/ou deficiente produção/ação da insulina. O presente trabalho tem como objetivo principal estudar *in vitro* a potencial capacidade antioxidante e antidiabética de extratos aquosos de espécies de plantas da região do Algarve (*Aristolochia baetica* L., *Chelidonium majus* L., *Dittrichia viscosa* L. e *Lavandula virilis* L.).

Os métodos usados na análise da atividade antioxidante foram: o TPC, o TFC, o TAA, o FRAP, o RP e o método do radical DPPH. Para analisar a atividade antidiabética usaram-se os ensaios enzimáticos de inibição da α – *glucosidade* e da α -*amilase*.

Segundo os resultados obtidos, das plantas estudadas, os extratos aquosos de *D. viscosa* foram os que apresentaram uma melhor atividade antioxidante (1132,99 \pm 19,54 mg TE/g ps no FRAP, 623,35 \pm 24,02 mg TE/g ps no método RP e um valor de IC₅₀ de 25,85 \pm 0,75 μ g/mL no método DPPH) bem como os mais elevados valores de conteúdo em compostos fenólicos totais obtidos (477,10 \pm 22,29 mg GAE/g ps) e dos mais elevados em flavonoides totais (22,87 \pm 1,73 mg QE/g ps). Foram também os extratos aquosos desta planta que revelaram a melhor atividade inibitória no ensaio de inibição da α -glucosidase (IC₅₀ de 0,61 \pm 0,06 mg/mL), revelando ser mais potente que o controlo positivo de acarbose que apresentou um IC₅₀ de 35,17 \pm 3,25 mg/mL. Por sua vez, os extratos aquosos de *C. majus* foram os que em geral apresentaram as piores atividades antioxidante e antidiabética.

Dado a elevada correlação obtida tanto entre o TPC como entre a atividade antioxidante e a atividade inibitória da α -glucosidase, sugere-se que os compostos fenólicos tenham uma relevante contribuição antioxidante e antidiabética na prevenção e terapêutica da Dm, nomeadamente no caso de *D. viscosa*, no entanto estudos futuros adicionais serão necessários.

Palavras-chave: Diabetes *mellitus*, Antioxidantes, Enzimas, Extratos de plantas.

Abstract

Diabetes *mellitus* (Dm) is a metabolic disease that result from changes in glucose's metabolism and/or deficient insulin production/action. The main goal of present work is to study *in vitro* the potential antioxidant capacity and antidiabetic of aqueous extracts of plants species of the Algarve region (*Aristolochia baetica* L., *Chelidonium majus* L., *Dittrichia viscosa* L. e *Lavandula virilis* L.).

The methods used in the analysis of antioxidant activity were: TPC, TFC, TAA, FRAP, RP and DPPH radical method. To analyze the anti-diabetic activity, the enzymatic inhibition assays of α -glucosidase and α -amylase were used.

According to the results, the aqueous extracts of *D. viscosa* showed the best antioxidant activity (1132,99 \pm 19,54 mg TE/g dw in FRAP, 623,35 \pm 24,02 mg TE/g dw in the RP method and an IC₅₀ value of 25,85 \pm 0,75 μ g/mL in the DPPH method) as well as the highest content values in total phenolic compounds obtained (477,10 \pm 22,29 mg GAE/g dw) and the highest in total flavonoids (22,87 \pm 1,73 mg QE/g dw). Aqueous extracts from this plant were also found to show the best inhibitory activity in the α -glucosidase inhibition assay (IC₅₀ of 0.61 \pm 0.06 mg/ml), which was shown to be more potent than the positive control acarbose which showed an IC₅₀ of 35,17 \pm 3,25 mg/mL. On the other hand, aqueous extracts of *C. majus* were the ones that presented the worst antioxidant and antidiabetic activities.

Once the high correlation obtained among the TPC, the antioxidant activity and the inhibitory activity of α -glucosidase, it is suggested that the phenolic compounds have a relevant antioxidant and antidiabetic contribution in the prevention and therapeutics of DM, namely in the case of *D. viscosa*, however additional future studies will be required.

Key-words: Diabetes *mellitus*, Antioxidants, Enzymes, Plant extracts.

Índice

Agradecimentos	iv
Resumo	v
Abstract	vi
Índice	vii
Índice de Figuras	x
Índice de Quadros	xii
Índice de Tabelas	xiii
Abreviaturas e Siglas.....	xiv
Parte I	
1. Diabetes.....	1
1.1. Descoberta e Definição....	1
1.2. Caracterização e Etiologia.....	1
1.3. Epidemiologia.....	2
1.4. Fisiopatologia.....	3
1.5. Classificação.....	4
1.6. Diagnóstico.....	4
1.7. Controlo e Tratamento.....	6
2. Radicais livres, Stress Oxidativo e Diabetes.....	7
3. Atividade Antioxidante... ..	11
3.1. Compostos Antioxidantes Naturais.....	14
4. Atividade Antidiabética.....	17
4.1. Ensaio de Inibição Enzimática.....	17
5. Uso de plantas na Terapêutica.....	19
5.1. Obtenção e produção de medicamentos.....	19
6. Caracterização das Plantas Estudadas.....	20
6.1. <i>Aristolochia baetica</i> L.....	21
6.2. <i>Chelidonium majus</i> L.....	23
6.3. <i>Dittrichia viscosa</i> L.....	24
6.4. <i>Lavandula virilis</i> L.....	25

Parte II

7. Objetivos.....	27
8. Amostras.....	27
9. Reagentes e Materiais.....	28
9.1.Reagentes.....	28
9.2. Material de Laboratório.....	28
10. Procedimento Experimental.....	29
10.1. Preparação das Amostras (extratos aquosos).....	29
10.2. Métodos Analíticos.....	30
10.2.1. Determinação Química do Conteúdo Fenólico Total (TPC).....	30
10.2.2. Determinação Química do Conteúdo de Flavonóides Total (TPF).....	32
10.2.3. Análise da Cor.....	33
10.2.4. Determinação da Atividade Antioxidante Total (TAA).....	33
10.2.5. Determinação do Potencial Antioxidante por Redução do Ião Férrico (FRAP)	34
10.2.6. Determinação do Potencial Redutor (RP).....	36
10.2.7. Determinação da Atividade de Captura de Radicais Livres (DPPH).....	38
10.2.8. Determinação da Inibição da α -glucosidade.....	40
10.2.9. Determinação da Inibição da α -amilase.....	41
11. Análise Estatística.....	43
12. Resultados e Discussão.....	44
12.1. Quantificação dos Compostos Fenólicos.....	46
12.1.1. Conteúdo Fenólico Total (TPC) e de Flavonoides Total (TFC)..	46
12.2. Avaliação da Capacidade Antioxidante <i>in vitro</i>	49
12.2.1. Atividade Antioxidante Total (TAA), Potencial Antioxidante por redução do Ião Férrico (FRAP) e Potencial Redutor (RP).....	49
12.2.2. Atividade de Captura de Radicais Livres (Método do DPPH)....	52
12.3. Avaliação da Atividade Antidiabética <i>in vitro</i>	54
12.3.1. Atividade Inibitória das Enzimas α -glucosidase e α -amilase.....	54
12.4. Análise Colorimétrica.....	58

12.5. Coeficientes de correlação linear de Pearson (r).....	61
13. Conclusões.....	65
14. Referências Bibliográficas.....	68

Índice de Figuras

Figura 2.1. Desequilíbrio celular redox.....	9
Figura 2.2. Patogénese da Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2.....	11
Figura 3.1. Resumo do papel dos antioxidantes na cadeia génese de lesão celular.....	12
Figura 3.2. Esquema exemplificativo do mecanismo de ação do antioxidante Vitamina E.....	13
Figura 3.1.1. Estrutura molecular base dos flavonóides.....	16
Figura 3.1.2. Estrutura molecular de um flavonóide da classe dos flavonóis, a quercetina.....	16
Figura 6.1. Apresentação das espécies em estudo, no seu habitat natural.....	26
Figura 10.1.1. Plantas no estado seco presentes nas caixas de arejamento.....	29
Figura 10.1.2. Extratos aquosos dispostos na ordem da esquerda para a direita.....	30
Figura 10.2.1.1. Método TPC.....	31
Figura 10.2.2.1 Método TFC.....	32
Figura 10.2.4.1. Método TAA.....	34
Figura 10.2.5.1. Método FRAP.....	35
Figura 10.2.6.1. Método RP.....	36
Figura 10.2.7.1. Mecanismo da reação do DPPH.....	38
Figura 10.2.8.1. Ensaio de inibição da <i>α-glucosidade</i>	40
Figura 12.1.1. Representação gráfica do conteúdo fenólico total obtido pelo método TPC, expresso em mg GAE/mL, dos quatro extratos aquosos das plantas estudadas.....	47
Figura 12.1.2. Representação gráfica do conteúdo em flavonoides total obtido pelo método TFC, expresso em μ g QE/mL, dos quatro extratos aquosos das plantas estudadas.....	48
Figura 12.2.1.1. Representação gráfica atividade antioxidante total (TAA) expressa em mg AAE/mL, do potencial antioxidante por redução do ião Férrico (FRAP) e do potencial redutor (RP) expressos em mg TE/mL, dos quatro extratos aquosos das plantas estudadas.....	52
Figura 12.2.2.1. Representação gráfica da atividade de captura de radicais livres avaliada pelo método DPPH expressa em IC ₅₀ (μ g/mL) dos quatro extratos aquosos das plantas estudadas.....	54

Figura 12.3.1.1. Representação gráfica da atividade de inibitória das enzimas *α -glucosidase* e *α -amilase* expressa em IC₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) dos quatro extratos aquosos das plantas estudadas.....57

Figura 12.4.1. Aspeto visual dos extratos aquosos das quatro plantas estudadas.....58

Índice de Quadros

Quadro 1.5.1. Comparação da Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1 e 2.....	5
Quadro 3.1.1. Classes e subclasses de compostos fenólicos, respetivas estruturas e exemplos.....	15
Quadro 6.1. Nome Botânico, família, nome comum, distribuição geográfica, habitat e outras considerações referentes às espécies em estudo.....	22
Quadro 8.1. - Informações relativas ao local de colheita, data de colheita e condições de cultivo das plantas usadas para a preparação dos extratos aquosos usados neste trabalho.....	28

Índice de Tabelas

Tabela 12.1. Resultados para o conteúdo em compostos extraído pelos extratos aquosos das diferentes plantas analisadas, bem como a eficácia desta extração.....	44
Tabela 12.2. Resultados obtidos nos métodos TPC, TFC, TAA, FRAP e RP para os diferentes extratos aquosos das diferentes plantas analisadas.....	45
Tabela 12.3. Resultados, expressos em IC ₅₀ , obtidos nos métodos DPPH, <i>α</i> -glucosidase e <i>α</i> -amilase para os extratos aquosos e para a Acarbose das diferentes plantas analisadas.....	45
Tabela 12.4.1. - Resultados para a intensidade da cor, expressos em absorvência e para as proporções das cores amarelo, vermelho e azul, expressos em % de cor para os extratos aquosos das diferentes plantas estudadas.....	59
Tabela 12.5.1. - Matriz de correlação (coeficientes de correlação de Pearson - r) dos resultados obtidos através dos diferentes métodos estudados.....	62

Abreviaturas e Siglas

A - Absorvência

A. baetica - *Aristolochia baetica* L.

ADA - Associação Americana da Diabetes

ANOVA - Análise da Variância

BHA - Butilhidroxianisol

BHT - Butilhidroxitolueno

C. majus - *Chelidonium majus* L.

CAT - *Catalase*

COX - *Ciclo-oxigenase*

D. viscosa - *Dittrichia viscosa* L.

DGS - Direção-Geral de Saúde

Dm - *Diabetes mellitus*

DNS - 3,5-ácido dinitrosalicílico

DPP-4 - Dipeptilpeptidase IV

DPPH - 2,2 difenil-1-picrilidrazila

dw - *dry weight*

FID - Federação Internacional da Diabetes

FRAP - Potencial Antioxidante por Redução do Ião Férrico

g - grama

GAE - Equivalentes de Ácido Gálico

GLP-1 - *Glucagon-like peptide-1*

GPx - *Glutathione Peroxidase*

GSH - Glutathione Reduzida

GSSH - Glutathione Oxidada

HbA1c - Hemoglobina Glicada A1c

IC₅₀ - Concentração Mínima Necessária para Inibir 50 %

L. viridis - *Lavandula virilis* L.

LSD - *Least Significance Difference*

mg - miligramas

mL - mililitro

NADPH - *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*

NOS - Oxido Nítrico Sintase

OMS - Organização Mundial da Saúde

pNGP - P-nitro- α -D-gluco-piranosídeo

ps - Peso Seco

PTGO - Prova de Tolerância à Glucose Oral

QE - Equivalentes de Quercetina

r – Coeficiente de Correlação de Pearson

ROS - Espécies Reativas de Oxigénio

RP - Potencial Redutor

SGLT2 - Co-transportadores de Sódio e Glucose Tipo 2

SOD - Superóxido Dismutase

TAA - Atividade Antioxidante Total

TE - Equivalentes de Trolox

TE - Equivalentes de Trolox

TFC - Conteúdo de Flavonoides Total

TPC - Conteúdo Fenólico Total

μ g - micrograma

TPTZ - 2,4,6-tripiridil-s-triazina

TZD - Tiazolidinedionas

XO - Xantina Oxidoreductase

% - por cento

PARTE I

1. Diabetes

1.1. Descoberta e Definição

A Diabetes *mellitus* (Dm) foi pela primeira vez descrita nos anos de 1500 a.C., pelos Egípcios, através do papiro de Ebers, no qual descreveram sintomas que caracterizam a poliúria (eliminação de urina em excesso) (1,2). Por seu tempo, os Médicos Indianos (400-500 a.C.) chamaram-lhe urina de mel pois atraía as formigas. Mais tarde Aretaeus (80-138 d.C.), Médico Grego, justificou a designação da doença. Segundo este, o termo Diabetes vêm da palavra grega "sifão" (correr pelo "sifão") pois estes doentes perdiam quantidades tão elevadas de líquidos através da urina que não conseguiam saciar a sede e *mellitus* pelo facto de essa urina ter um sabor doce como o mel (1). Por sua vez, o Médico Árabe Avicena (960-1037 d.C.) descreveu as suas características clínicas e algumas complicações como a neuropatia periférica, gangrena e disfunção erétil (3). E finalmente em 1812, o *New England Journal of Medicine and Surgery* reconheceu a Dm como uma patologia clínica (2).

1.2. Caracterização e Etiologia

Atualmente a Dm é uma doença crónica de natureza metabólica resultante de uma deficiência na produção e secreção de insulina pelo pâncreas ou da combinação da diminuição da resposta periférica pelos órgãos à insulina (resistência à insulina) com uma produção de insulina insuficiente para compensar a resistência. Em ambas as situações, caso a doença não se encontre controlada, ocorre um aumento anormal dos níveis de glucose sanguíneos (hiperglicémia) e distúrbios no metabolismo dos hidratos de carbono, lípidos e proteínas. Estes a longo prazo são responsáveis por causar de forma progressiva lesões em diversos órgãos do organismo, nomeadamente a nível da membrana endotelial incluindo assim os vasos sanguíneos, rins e sistema nervoso que podem originar ainda outras complicações, como as doenças cardiovasculares e renais, cataratas/retinopatia e úlceras (4–6). Além destes fatores, a presença de hiperlipidemia, hipertensão e o *stress* oxidativo também aumentam o risco de complicações (7,8).

A insulina é uma hormona de natureza proteica sintetizada pelas células β dos ilhéus de Langerhans do pâncreas endócrino em resposta a diversos estímulos (como elevados níveis de glucose em circulação, fármacos da classe das sulfonilureias e o aminoácido arginina), sendo a glucose o mais importante. É responsável pela regulação do metabolismo energético e utilização adequada de glucose através da ação em principalmente três tecidos, o hepático, o muscular e o adiposo. No fígado promove a libertação de glucose para a circulação sanguínea e acelera o seu metabolismo. Se esta existir em excesso é promovido o seu armazenamento sob a forma de glicogénio (9). Atua também por ligação aos recetores de insulina na membrana celular ativando-os e induzindo ações metabólicas variadas que facilitam a entrada da glucose presente na circulação sanguínea para o seu interior (células musculares esqueléticas e células adiposas). No caso das células cerebrais, da retina, tubulares renais, intestinais, germinativas e dos glóbulos vermelhos não é necessário a insulina, pois as suas membranas celulares são já permeáveis à glucose (10).

1.3. Epidemiologia

Nos últimos anos têm havido um aumento da incidência da *Dm*, sendo que de acordo com previsões futuras da Federação Internacional da Diabetes (FID), a tendência irá se manter, prevendo-se que em 2040, haja um aumento da incidência em cerca de 200 milhões de casos, sendo um dos principais problemas de saúde da atualidade (7).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) e da FID, atualmente cerca de 422 milhões de pessoas no mundo, o equivalente a 1 em 11 pessoas adultas, é afetada por um dos tipos de expressão da doença, sendo que quase metade (46,5%) destas pessoas não tem a doença diagnosticada. Existe também uma elevada mortalidade associada à doença, pelo que todos os anos, cerca de, 1,5 milhões de pessoas morrem devido a esta patologia (11,12).

Adicionalmente aos elevados números de mortes associadas à doença, os custos que esta acarreta para os serviços de saúde são também elevados, sendo que cerca de 12% das despesas globais (673 biliões de dólares americanos) em saúde são despendidas na gestão da doença (11).

Em Portugal, no ano de 2016, 9,2% da população estava afetada pela *Dm* (havendo maior prevalência no sexo masculino que feminino), sendo que destes, 59,8%

tinha excesso de peso, um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da doença. Além disso, cerca de 11 mil pessoas (0,11% da população nacional) morreram devido à doença e fatores associados (como a elevada glicémia), o que corresponde a 5% das mortes ocorridas durante este ano e à sexta causa de morte (13).

1.4. Fisiopatologia

Nas pessoas saudáveis, após a ingestão de uma refeição ocorre a digestão dos hidratos de carbono e absorção da glucose, o que se reflete num aumento dos seus níveis sanguíneos, que por sua vez estimula a secreção pelas células β pancreáticas de insulina resultando num aumento do transporte, biotransformação e armazenamento da glucose nos tecidos adiposo e muscular. Adicionalmente, em situações de jejum, a falta de glucose no sangue é provida pelo fígado (glucogenólise), sendo usada pelo cérebro, sem qualquer dependência da insulina. Além disso aquando do armazenamento da glucose, a insulina também inibe a secreção de glucagon pelas células α do pâncreas e baixa a concentração sérica de ácidos gordos levando a uma diminuição da produção da glucose hepática (8).

Na *Dm* a falta de insulina ou resistência à insulina pelas células no organismo resulta na redução da absorção de glucose pelos tecidos o que por sua vez resulta em hipoglicemia intracelular e hiperglicemia extracelular. A hipoglicemia intracelular provoca glucogenólise e gluconeogénese que leva à degradação das gorduras (causando cetoacidose diabética) e diminui a síntese de proteínas e gamaglobulinas (causando caquexia, polifagia e deficiente cicatrização de feridas), por outro lado a hiperglicemia extracelular pode resultar em coma hiperglicémico, e além da poliúria, entre outras complicações (cardiovasculares, renais, neuropáticas, susceptibilidade a infeções). Nestas situações, a secreção de glucagon não é inibida pela presença de glucose (14).

O aparecimento, progressão e complicações da doença estão relacionados com os efeitos "tóxicos" dos elevados níveis de glucose em circulação juntamente com alterações bioquímicas no metabolismo lipídico, *stress* oxidativo induzido por espécies reativas (radicais livres), inflamações crónicas nomeadamente a nível endotelial, hipoxia e isquemia de tecidos (15,16). Assim, um individuo diabético têm um aumento do risco para 4 vezes de doença arterial coronária (enfarte do miocárdio e angina de peito) e para 10 vezes de doença vascular periférica em relação a um individuo não

diabético o que promove um aumento de 3 a 4 vezes de hipóteses de morte por doenças cardiovasculares (16,17).

1.5. Classificação

Assim a *Dm* pode classificar-se em três tipos principais, em função do mecanismo que promove a hiperglicémia (4–6,18):

- Diabetes insulino-dependente (tipo 1) resultante da destruição autoimune das células β do pâncreas devido à presença de genes de susceptibilidade (em mais de 95% dos casos) ou de origem idiopática (menos de 5% dos casos), caracterizando-se pela ausência de produção de insulina por estas células (**Quadro 1.5.1**);
- Diabetes não insulino-dependente (tipo 2) resultante da resistência à insulina por parte das células (devido a fatores genéticos, ambientais e à inflamação) e ao aumento da libertação de glucose pelo fígado. Por outro lado, pode existir uma deficiência na secreção da insulina (devido à deposição de polipéptidos amiloides nas células β ou glicotoxicidade) que não compensa a necessidade de insulina decorrente da resistência celular (**Quadro 1.5.1**);
- Diabetes gestacional, uma forma de intolerância à glucose com início ou manifestação durante a gravidez (normalmente no 3º semestre), sendo um fator de risco para o desenvolvimento de *Dm* tipo 2 pós-gravidez. Ocorre em 2 a 10% das gravidezes.

1.6. Diagnóstico

A *Dm* é diagnosticada pela verificação de um dos seguintes critérios (4,5,19):

- Medição de valores de glucose no plasma em jejum ≥ 126 mg/dL;
- Medição de valores de glucose no plasma ocasionalmente ≥ 200 mg/dL e presença dos sintomas clássicos da doença;
- Medição de valores de glucose no plasma ≥ 200 mg/dL duas horas após a prova de tolerância à glucose oral (PTGO) com ingestão de 75 g de glucose;
- Medição da hemoglobina glicada A1c (HbA1c) $\geq 6,5\%$.

Quadro 2.5.1. Comparação da Diabetes *mellitus* tipo 1 e 2 (4,6,18).

	Tipo 1	Tipo 2
Prevalência	Cerca de 5 a 10% dos casos	Cerca de 90 a 95% dos casos
Idade de manifestação	Antes dos 30 anos, maioritariamente na infância ou adolescência	Após os 30 anos, normalmente de forma lenta e insidiosa
Predisposição genética	Reduzida	Moderada
Estilos de vida e Doenças	Associada a doença autoimune ou fatores ambientais (vírus)	Associada à excessiva ingestão alimentar, sedentarismo, obesidade, hipertensão e dislipidemia
Sensibilidade celular à insulina	Normal	Reduzida
Sinais e Sintomas	Caracterizada por cetoacidose, glicosúria, poliúria, polidipsia, fraqueza, perda de peso, polifagia e astenia	Caracterizada por glicosúria, poliúria, polidipsia e infeções fúngicas

No entanto, de acordo com a Direção-Geral de Saúde (DGS) e da Associação Americana da Diabetes (ADA), no caso de pessoas que não revelem os sintomas, o diagnóstico de diabetes não deverá ser fundamentado num único valor de glicemia em jejum ou de HbA1c anormal. Nestas situações é necessário a realização de uma segunda análise, uma a duas semanas depois, para confirmação do diagnóstico (19,20). Além disso determinados acontecimentos podem surtir em hiperglicemia pontual, nomeadamente em condições de *stress* agudo infeccioso, traumático, circulatório ou outros, sendo neste caso transitória não devendo por si só ser considerada como diagnóstico de Dm (21).

Por outro lado, a pessoa estará em risco de desenvolver Dm (ou outra doença cardiovascular) se manifestar hiperglicémia intermédia, na qual apresenta níveis de glucose no sangue superiores ao normal, não sendo, contudo, suficientemente elevados para serem classificados como Dm (22). Esta situação ocorre se (4,5,20):

- Os valores de glucose no plasma se encontrarem, em jejum, entre 100 e 125 mg/dL, situação denominada de anomalia da glicemia em jejum;

- Os valores de glucose no plasma se encontrarem, ocasionalmente, entre 140 e 199 mg/dL situação denominada de tolerância à glucose diminuída;
- A HbA1c se encontrar entre 5,7 e 6,4%.

1.7. Controlo e Tratamento

A presença da doença controlada caracteriza-se por níveis de glicémia dentro de certos limites, o mais próximos possível da normalidade, bem como a manutenção de um peso, tensão arterial e perfil lipídico adequado. De acordo com vários fatores (idade, tipo de vida, duração da doença, existência de outras doenças), definem-se que valores de glicemia cada pessoa deverá ter em jejum e depois das refeições. Assim, para a monitorização da doença devem ser regularmente medidos o nível de glucose no sangue (testes de glicémia capilar) assim como trimestralmente a determinação da HbA1c (22).

A terapêutica da *Dm*, para além da vertente farmacológica, deverá ter sempre presente a vertente não farmacológica, pelo que os estilos de vida desempenham um papel fundamental. Os objetivos do tratamento da doença baseiam-se assim no controlo da glicémia minimizando episódios de hiper ou hipoglicémia, na redução sinais e sintomas, na prevenção de futuras complicações e na melhoria da qualidade de vida (18).

Desta forma, pressupõe-se a adoção de uma dieta e refeições equilibradas, a não ingestão de álcool ou tabaco e a prática de exercício físico e caso estes não permitam isoladamente o controlo da doença, a terapêutica com fármacos que reduzam os níveis de glucose em circulação, incluindo assim a administração de insulina (na *Dm* tipo 1) e/ou fármacos anti-hiperglicémicos/hipoglicemiantes orais (na *Dm* tipo 2) (5).

Conforme referido anteriormente a abordagem terapêutica dos dois tipos principais da doença é distinta. Na *Dm* tipo 1 recorre-se quase exclusivamente à insulino-terapia maioritariamente por via subcutânea, sendo esta classificada de acordo com a sua duração de ação, em insulinas de ação curta, intermédia ou longa. Esta hormona sintética, administrada em períodos estratégicos, irá desempenhar as funções fisiológicas da insulina humana no organismo, mimetizando o perfil de libertação das células β pancreáticas (4). Assim em função da sua duração de ação irá cobrir as necessidades basais ou prandiais de insulina (18).

No caso da *Dm* tipo 2, os fármacos anti-hiperglicémicos/hipoglicemiantes orais são a primeira linha da terapêutica, podendo em casos avançados ser considerada a insulino-terapia. Em Portugal, estão atualmente disponíveis oito classes de fármacos orais distribuídas em função do seu mecanismo de ação, que são usadas em monoterapia, terapêutica dupla ou terapêutica tripla (4,18):

- Fármacos que estimulam a secreção de insulina onde se destacam as sulfonilureias como a glibenclamida, glicazida, glipizida e glimepirida;
- Fármacos que reduzem os níveis de glucose em resultado da sua ação ao nível do fígado, musculo e tecido adiposo onde se incluem as biguanidas como a metformina e as tiazolidinedionas (TZD) ou glitazonas como a rosiglitazona e a pioglitazona;
- Fármacos que atuam na absorção de glucose como os inibidores das α -glucosidases intestinais onde se destaca a acarbose;
- Fármacos que mimetizam o efeito das incretinas ou prolongam a sua ação onde se incluem os inibidores da dipeptilpeptidase IV (DPP-4) como a sitagliptina, a vildagliptina, a saxagliptina e a linagliptina e os agonistas dos receptores da GLP-1 (*glucagon-like peptide-1*) como o liraglutido;
- Fármacos que são inibidores dos co-transportadores de sódio e glucose tipo 2 (SGLT2) como a dapagliflozina.

2. Radicais Livres, Stress Oxidativo e Diabetes

A atividade metabólica (processos bioquímicos e fisiológicos) de um organismo envolve diversas reações oxidativas que resultam em parte na formação de espécies reativas. Estas espécies têm um importante papel na origem da vida e evolução biológica tanto a nível da sinalização celular como no normal crescimento e metabolismo celular, no entanto também são responsáveis por causar danos nos tecidos e promover o processo de envelhecimento. Além disso, estas moléculas contribuem para o aparecimento de diversas doenças inflamatórias e cardiovasculares e vários tipos de cancro (7,23–25).

O início da teoria dos radicais livres (espécies reativas) nos sistemas biológicos ocorreu com os trabalhos de Harman (1956), nos quais foi proposto o papel destes compostos no processo de envelhecimento. Anteriormente já Gershman *et al* (1954)

tinha mencionado a toxicidade das formas de oxigénio parcialmente reduzidas. Desde aí, o conhecimento neste assunto tem vindo a evoluir conhecendo-se a agora melhor a origem e papel destas moléculas (7).

Estas moléculas, coletivamente denominadas por espécies reativas de oxigénio (ROS) caracterizam-se pela sua reatividade e por serem capazes de receber ou doar eletrões, pois têm um eletrão de valência desemparelhado. Assim reagem com moléculas estáveis, retirando eletrões, iniciando assim reações em cadeia (15,26).

São produtos do metabolismo humano por natureza, sendo formadas continuamente a partir de reações de oxidação-redução que ocorrem no organismo, maioritariamente na respiração aeróbia (a nível mitocondrial, na cadeia transportadora de eletrões), mas também em algumas reações inflamatórias e imunes mediadas por células. Incluem radicais livres (qualquer espécie com um ou mais eletrões desemparelhados) como o anião superóxido ($O_2^- \cdot$), radicais hidroxilo ($OH \cdot$) e espécies não radicalares como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e oxigénio singlete (1O_2) (7,23,24,27,28).

Tratam-se de espécies que em baixas a moderadas concentrações desempenham importantes funções biológicas, como o relaxamento do músculo liso, metabolismo de xenobióticos e na resposta imune ("explosão respiratória" dos fagócitos para matar microrganismos) (29,30). No entanto, em elevadas concentrações são também capazes de induzir reações em cadeia a nível celular responsáveis por alterações em importantes biomoléculas como os hidratos de carbono, proteínas, lípidos (peroxidação lipídica) e ácidos nucleicos (podendo desencadear mutações). Atuam como pro-oxidantes nestas moléculas seja pela remoção de um átomo de hidrogénio deixando um eletrão desemparelhado, seja pela remoção direta de um eletrão deixando estas moléculas com eletrões desemparelhados (7,23,24,27,28).

Esta situação vai ultrapassar as defesas antioxidantes celulares produzindo uma situação denominada de *stress* oxidativo que se caracteriza por uma série de reações metabólicas onde participa o oxigénio originando um desequilíbrio celular redox entre pro-oxidantes/antioxidantes **Figura 2.1.** (7,31). Este está envolvido direta ou indiretamente no desenvolvimento e progressão de diversas doenças crónicas e degenerativas de causas multifactoriais, como a aterosclerose, *Dm*, doença de Alzheimer, enfarte agudo do miocárdio, choque séptico, doenças inflamatórias (artrite reumatoide, pancreatite e doenças inflamatórias intestinais), seja por mutações nos ácidos nucleicos, oxidação proteica ou peroxidação lipídica (7,23,24,27,29). No entanto

a progressão dessas doenças pode ser retardada pela minimização deste desequilíbrio responsável pela produção destas espécies. É neste sentido que os antioxidantes têm um relevante papel, pois mantêm os níveis de radicais livres baixos evitando que ocorra este desequilíbrio dinâmico (7,23,29,32).

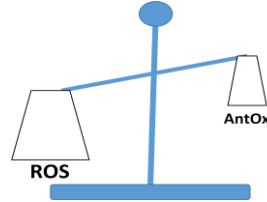


Figura 2.1. Desequilíbrio celular redox. Exemplificação/Paralelismo do desequilíbrio entre a produção de radicais livres (ROS) e a quantidade dos respetivos antioxidantes (AntOx) presentes no meio responsáveis pelo desenvolvimento do *stress* oxidativo com os pratos de uma balança.

Além disso fatores externos também contribuem para a formação destas moléculas ao ponto do ser humano estar constantemente exposto a radicais livres. As principais fontes são a poluição, radiação eletromagnética e o fumo de cigarro (24). Os fármacos como a doxorrubicina, o paracetamol e a nimesulida resultam também numa importante fonte de ROS (15).

A presença de *Dm*, caracterizada pela hiperglicémia, através da sua fisiopatologia promove o aumento do *stress* oxidativo no organismo, dado que, entre outros aspetos, é promovida a auto-oxidação da glucose e a conseqüente formação de radicais livres (17,33). No caso da *Dm* tipo 2, a hiperglicemia pós-prandial contribui adicionalmente para um aumento da produção de radicais livres, especialmente de ROS que originam lesões oxidativas nos tecidos, nomeadamente inflamação e as complicações diabéticas como a lesão endotelial, doenças cardiovasculares, nefropatia, neuropatia e retinopatia (7,8,29,34).

Assim, a hiperglicémia extracelular e hipoglicémia intracelular, em geral, estimulam a formação de ROS tanto durante a fosforilação oxidativa a nível mitocondrial (em maior quantidade, em particular o ião superóxido bastante reativo) onde existe acumulação em excesso de triglicéridos nomeadamente nas células hepáticas e musculares, como pela glicosilação de proteínas, auto-oxidação da glucose, a atividade da NADPH oxidase a nível renal e vascular (fonte de energia nos eritrócitos), a atividade da *lipo-oxigenase*, *ciclo-oxigenase* (COX) e xantina *oxidoreductase* (XO), óxido nítrico sintase (NOS) e citocromo P450. Este estado resulta num decréscimo dos níveis plasmáticos de vitaminas C e E assim como de outros

antioxidantes endógenos e na redução da função dos antioxidantes enzimáticos. No seu conjunto, estas espécies promovem o *stress* oxidativo, degenerando a secreção e ação da insulina estimulada pela glucose, acelerando assim a progressão e evolução da doença (7,15,25,31,35,36). Uma manutenção dos níveis de glucose sanguíneos normais, evitando picos pós-prandiais, reduzirá em parte o *stress* oxidativo por esta via originado (37).

Além disso, em condições fisiológicas, durante a ação da insulina são produzidos ROS que promovem a maximização da sua função fisiológica (regulação positiva), no entanto, aquando de níveis de glicemia alterados estes também regulam negativamente a sua função promovendo o desenvolvimento de resistência à insulina, compensada inicialmente pela hiperinsulinémia, a qual é um fator de risco para o desenvolvimento de *Dm* tipo 2 (15,30,31).

Por outro lado, as células β pancreáticas são particularmente sensíveis às ROS, dado que são células que têm baixos níveis de antioxidantes capazes de neutralizar eficientemente as espécies reativas (por exemplo, a regeneração da glutathione é retardada na presença de altos níveis de glucose), o que promove a disfunção das células β , um segundo fator de risco para o desenvolvimento de *Dm* tipo 2 (25,36,37).

O *stress* oxidativo têm assim um importante papel no desenvolvimento e progressão da doença (**Figura 2.2.**), desde o estado de pré-diabetes até ao diagnóstico definitivo da doença, sendo que em função dos níveis de antioxidantes e da susceptibilidade dos tecidos assim o nível de disfunção das células β e da resistência à insulina e o desenvolvimento das complicações, nomeadamente cardiovasculares (25,31,36).

Existem ainda moléculas, denominadas de biomarcadores, que ao acumularem-se no organismo, evidenciam a lesão provocada pelo *stress* oxidativo na *Dm*, entre eles o malondialdeído (formado na peroxidação lipídica), a baixa razão glutathione reduzida/oxidada (GSH/GSSG), moléculas glicadas, isoprostanos (biomarcadores da peroxidação lipídica), 3-nitro-tirosina (NO₂-Tyr) e alteração nos níveis das vitaminas A, C e E (7,25,30).

Os não enzimáticos incluem: grandes moléculas como a albumina; minerais como o zinco e o selénio; moléculas hidrossolúveis como o ácido ascórbico (vitamina C), glutathiona (GSH), bilirrubina e ácido úrico; moléculas lipossolúveis como o α -tocoferol (vitamina E), coenzima Q₁₀ e carotenoides; compostos fenólicos como os flavonoides e os ácidos fenólicos. Estes interagem com as espécies radicalares sendo consumidos durante a reação (7,23,26,29).

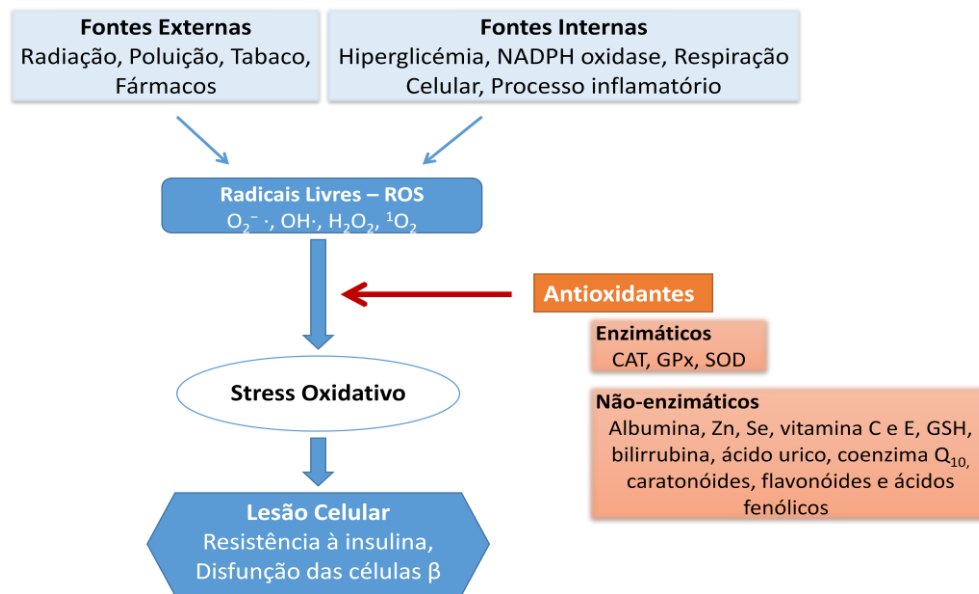


Figura 3.1. Resumo do papel dos antioxidantes na cadeia gênese de lesão celular. Adaptado de Ullah *et al*, 2016 (25). ROS- espécies reativas de oxigênio; CAT- *catalase*; GPx – glutathiona peroxidase; SOD – *superóxido dismutase*; GSH- glutathiona

Os antioxidantes também podem ser classificados em função da sua origem como endógenos ou exógenos (naturais ou sintéticos). Os antioxidantes enzimáticos, como CAT, SOD e GPx são os principais com origem endógena, responsáveis por metabolizar e eliminar intermediários tóxicos. Já os de origem exógena são maioritariamente obtidos da dieta e incluem as vitaminas C e E, carotenoides e os compostos fenólicos. Adicionalmente, em função do seu mecanismo de ação, classificam-se ainda em primários, se são capazes de doar átomos de hidrogénio ao radical tornando-o estável (flavonoides, α -tocoferol e ácido ascórbico), secundários, se reagem com os radicais iniciadores da reação e co-antioxidantes se atuam em sinergismo (ao combinar ácido ascórbico com o α -tocoferol, o primeiro é capaz de restaurar as baixas concentrações do segundo) (23,24,26).

Estes compostos eliminam os ROS e outros radicais livres através de diversos mecanismos e a vários níveis, seja por: atuarem como substrato para oxidação (doam

átomos de hidrogénio ou eletrões ao radical), finalizando assim as reações oxidativas em cadeia, ao converter estas espécies em substâncias mais estáveis e, em princípio, inofensivas ao organismo; promoverem a captura dos radicais livres; formarem quelatos com os metais (27,29,39). Além disso demonstram em maior ou menor extensão atividades anti-inflamatórias, anti-ateroscleróticas, anti-tumorais, anti-bacterianas e anti-virícas, daí a sua importância na prevenção/tratamento de diversas doenças e suas complicações como é o caso da *Dm* e outras doenças associadas ao envelhecimento (24).

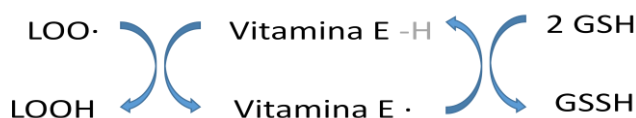


Figura 3.2. Esquema exemplificativo do mecanismo de ação do antioxidante Vitamina E perante o radical ($\text{LOO}\cdot$) formado durante a peroxidação lipídica. Adaptado de Boots, 2008 (29).

Como se verifica na **Figura 3.2.**, durante o processo, o antioxidante vitamina E doa um eletrão ao radical $\text{LOO}\cdot$, ficando na sua forma oxidada (vitamina E \cdot), que em seguida é reduzida pela GSH regenerando-se novamente a forma antioxidante da vitamina E.

Assim, cada tipo de antioxidante tem a sua atividade própria, num dado compartimento celular e produtos específicos, daí a necessidade da enorme variedade de antioxidantes (29).

A sua potência antioxidante depende da sua estrutura, tamanho dos grupos funcionais presentes e sua localização (presença de farmacóforos antioxidantes). No caso dos compostos fenólicos a deslocalização eletrónica em torno do núcleo aromático, a presença de átomos de hidrogénio nos grupos hidroxilo (-OH) adjacentes ao anel e a presença do grupo carbonilo (-C=O) estabilizam os radicais livres dado a estabilização por efeito de ressonância criada (40,41).

A obtenção destes compostos a partir da alimentação (chás, alimentos funcionais) tem sido associada à diminuição das consequências negativas provocadas pelo *stress* oxidativo no organismo humano e à prevenção de várias patologias como o cancro, doenças neurológicas e cardiovasculares (29,41). Este facto é suportado por possíveis ações sinergistas que existe entre estes compostos e outros presentes quando

presentes na matriz natural, bem como depende da sua absorção, distribuição, metabolismo e eliminação (42). Além disso evitam-se os efeitos secundários e toxicidade associados aos antioxidantes sintéticos (butilhidroxianisol - BHA e butilhidroxitolueno - BHT) (27,43,44).

No caso da *Dm*, os antioxidantes e a sua atividade têm especial importância pois o desenvolvimento e progressão da doença está associado ao *stress* oxidativo, nomeadamente a nível das células beta-pancreáticas e por outro lado as complicações da doença normalmente são acompanhadas por um aumento da produção de radicais livres e falha das defesas antioxidantes (7,24,31). A ingestão extra de antioxidantes mostrou ainda reduzir o risco de desenvolver a doença (29,45,46).

Estes compostos podem assim manter o equilíbrio pro-oxidantes/antioxidantes além de preservarem a função das células beta-pancreáticas e o mRNA insulínico (7). Adicionalmente, a combinação de fármacos hipoglicémicos promovem o controlo da glicémia prevenindo as complicações diabéticas (31).

3.1. Compostos Antioxidantes Naturais

O uso de antioxidantes de origem natural vem desde a antiguidade ainda de que de forma empírica, no entanto atualmente têm aumentado o interesse pela descoberta de novos antioxidantes desta origem, nomeadamente pelos que são isolados de plantas, com o intuito de sintetizar novos compostos mais seguros ou aperfeiçoar os já existentes (27,29,34,47).

Além disso têm sido apresentadas evidências científicas que comprovam os seus benefícios para a saúde, especialmente na prevenção de várias doenças humanas onde está implicado o *stress* oxidativo, entre as quais a *Dm*, além de diversas aplicações na cosmética (29,34,39,48).

Neste âmbito os compostos de natureza fenólica, além das vitaminas C, E e carotenoides, têm se destacado por um lado pela sua abundante distribuição nas plantas e por outro lado pelas suas propriedades biológicas como a elevada capacidade de capturar e reduzir radicais livres, inibindo ou reduzindo assim o *stress* oxidativo que a tantas doenças está associado, como é o caso da *Dm* (34,44,47,49).

Os compostos fenólicos resultam do metabolismo secundário das plantas sendo fundamentais no seu crescimento e reprodução. Além disso, contribuem para a cor da

planta (pigmentos) e são produzidos em condições específicas de maior *stress*, como situações de defesa e proteção contra agentes patogénicos e predadores (50). No organismo humano desempenham ainda uma série de atividades biológicas: anti-alérgicas, anti-aterogénicas, anti-inflamatórias, anti-microbianas, anti-trombóticas, vasodilatadoras e cardioprotetoras. Todas estas atividades retardam o envelhecimento celular (24,41).

Estes fitoquímicos englobam uma categoria diversificada de compostos que se caracterizam pelo seu anel aromático com um ou mais substituintes hidroxilos, incluindo os seus grupos funcionais. Estes grupos atuam como doadores de átomos de hidrogénio, dado as suas capacidades redutoras, quelantes de metais ou de captura de radicais sendo assim estas atividades que caracterizam estes compostos. Esta categoria de compostos pode dividir-se em duas grandes classes (**Quadro 3.1.1.**), a dos não flavonóides e a dos flavonoides (polifenóis) (29,40,49,50).

Quadro 3.1.1. Classes e subclasses de compostos fenólicos, respetivas estruturas e exemplos (29,40,41,50,51).

	Classe	Estrutura	Exemplos
Não-Flav.	Fenóis Simples	C ₆	Catecol, resorcinol
	Ácidos Fenólicos Hidroxibenzóicos	C ₆ -C ₁	Ácido gálico, vanílico e floroglucínico
	Ácidos Fenólicos Hidroxicinâmicos	C ₆ -C ₃	Ácidos cafeico, cumárico e ferúlico
	Estilbenos	C ₆ -C ₂ -C ₆	Resveratrol
Flavonoides	Flavonóis		Quercetina, catequina
	Isoflavonas		Daidzeína, genisteína
	Flavonas	(C ₆ -C ₃ -C ₆)	Luteolina
	Flavanonas		Naringenina
	Antocianinas		Cianidina, delphinidina
	Taninos condensados/proantocianidinas	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Epicatequina-(4β →8)-catequina

Os compostos fenólicos são consumidos diariamente através da fruta, de vegetais, do vinho tinto, chá verde/preto, café e do chocolate. Sendo que os flavonoides estão entre as moléculas antioxidantes mais eficientes e mais abundantes nas plantas sendo potenciais compostos para serem usados na terapia antioxidante, além de estarem

também presentes em alguns suplementos alimentares e medicamentos à base de plantas (29,49).

Os flavonoides são compostos de baixo peso molecular, tendo como elemento estrutural básico a molécula de 2-fenilcromano ($C_6-C_3-C_6$) que consiste numa estrutura de 3 anéis em que A e B são aromáticos e C é um heterociclo (**Figura 3.1.1. e 3.1.2.**). O anel A deriva da condensação de três moléculas pela via do malonato, enquanto que o anel B e C derivam da via do chiquimato. Consoante o grau de oxidação do núcleo pirânico central (anel C) assim as estruturas moleculares apresentadas e a divisão nas respetivas classes. Já as substituições nos anéis A e B resultam em diferentes compostos dentro de cada classe de flavonóides (29,40,50). É de referir que estes absorvem radiação maioritariamente na zona ultravioleta (UV).

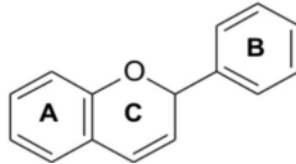


Figura 3.1.1. Estrutura molecular base dos flavonóides. Adaptado de Angelo *et al*, 2007 (40).

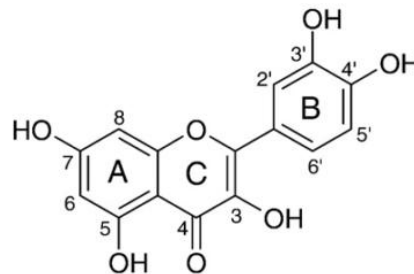


Figura 3.1.2. Estrutura molecular de um flavonóide da classe dos flavonóis, a quercetina (adaptado de Boots *et al*, 2008 (29)).

Os α -tocoferóis (vitamina E) distribuem-se principalmente pelas sementes oleaginosas e folhas de plantas, tendo atividade antioxidante. Têm uma estrutura com apenas um anel fenólico, atuando no meio biofílico da célula (40). Já o ácido ascórbico (vitamina C) funciona como antioxidante no meio aquoso da célula, devido ao seu alto poder pro-oxidante na presença de metais de transição.

Neste trabalho foram utilizados três antioxidantes como padrões para a construção das retas de calibração usadas em alguns métodos. No método do TPC usou-

se o ácido gálico, um ácido fenólico pertencente à sub classe dos ácidos hidroxibenzóicos, no método do TAA o ácido ascórbico e nos métodos RP e FRAP o Trolox (antioxidante de referencia análogo do α -tocoferol solúvel em água, com potencia antioxidante equivalente à vitamina C ou ao ácido úrico) (27,29).

4. Atividade Antidiabética

4.1. Ensaio de Inibição Enzimática

Como referido anteriormente uma das estratégias terapêuticas da Dm tipo 2 é a diminuição da hiperglicémia pós-prandial, o que pode ser conseguido pela redução da absorção de hidratos de carbono após a sua ingestão. Isto pois os hidratos de carbono são hidrolisados nos seus açúcares simples (dissacáridos) pela enzima *a-amilase* e mais tarde no monossacarídeo glicose pela *α -glucosidase* presente no trato digestivo, permitindo assim a sua absorção a nível intestinal, pois esta é a forma dos hidratos de carbono que é facilmente absorvida do trato gastrointestinal para o sangue, responsável pelo aumento da glicémia pós-prandial (52,53).

Uma das estratégias para atingir níveis de glucose no sangue normais é pela supressão da transformação dos hidratos de carbono da alimentação em glucose ou pelo retardar da absorção da glucose no intestino, o que pode ser concretizado pela inibição da atividade das enzimas *a-amilase* e *a-glucosidase* (54).

Assim ao inibir as enzimas *α -glucosidase* e *a-amilase* intestinais, é retardada a digestão/hidrólise dos polissacáridos e a posterior absorção da glucose a nível intestinal, atenuando assim o aumento plasmático de glucose pós-prandial, variações no perfil diário da glucose sanguínea e picos de insulina. Estas enzimas têm, portanto, um papel fundamental na fisiopatologia e prevenção Dm tipo 2 (55). Neste sentido serão usadas neste trabalho com o objetivo de avaliar a atividade antidiabética dos extratos pela análise da sua inibição (56,57).

O fármaco anti-hiperglicémico acarbose está aprovado na prevenção e no tratamento da Dm tipo 2 através da sua administração diária. Este atua por inibição competitiva destas enzimas (mimetiza o seu substrato) regulando a absorção da glucose a nível do intestino (58). Assim será usado como controlo positivo no presente estudo (52). No entanto dados os efeitos adversos da sua terapêutica (dor abdominal, diarreia e

flatulência) torna-se premente a procura e análise de outras alternativas com igual mecanismo de ação, nomeadamente de origem natural (55,58).

Os compostos polifenóis, presentes em diversas espécies vegetais, têm assim demonstrado potencial capacidade de inibir a atividade de diversas enzimas digestivas responsáveis pela hidrólise e absorção dos hidratos de carbono a nível do estômago e intestino, dadas as suas capacidades para se ligarem a estas enzimas (34,59).

5. Uso de Plantas na Terapêutica

5.1. Obtenção e Produção de Medicamentos

O uso de plantas com ações específicas na saúde (plantas medicinais) nomeadamente como no tratamento de doenças iniciou-se desde muito cedo, inicialmente de maneira empírica, muitas vezes através de paralelismos entre as formas das folhas, dos frutos entre outras partes, com determinadas zonas e órgãos do corpo, que revelavam potencial curativo (47,60). Pelo que o conhecimento pelo valor destas é já antigo, tendo acompanhado a própria evolução do Homem (61). Estes conhecimentos foram passando de geração em geração, via oral, sendo que com o aparecimento da escrita também foram começando a haver registos escritos, alguns dos quais ainda permanecem. Determinadas plantas passaram a ser usadas em situações e doenças concretas, começando-se a sistematizar os conhecimentos (60,61).

A partir do século XIX foram isolados os constituintes ativos de origem natural existentes nas plantas que demonstravam atividade medicinal, e iniciou-se a síntese química para obtenção de novas moléculas, pelo que nos países mais desenvolvidos (ocidentais), a utilização direta das plantas desapareceu em parte (47,60). No entanto nos finais do século passado, com o isolamento desses constituintes dotados de ação farmacológica, entra-se numa nova fase da utilização científica das plantas medicinais, passando-se progressivamente ao uso destes, após o isolamento, ou mesmo obtidos pela síntese química, em detrimento do uso da planta (61). É aumentada informação sobre os constituintes ativos e farmacologia dos fármacos vegetais havendo também um maior número de ensaios clínicos com medicamentos à base de plantas, aparecem formas farmacêuticas adaptadas ao tipo de administração, desenvolvimento de métodos analíticos que garantem um adequado controlo da qualidade e segurança assim como a existência de legislação adequada a este tipo de medicamentos (60). O uso das plantas na Medicina é em parte atribuído aos efeitos biológico dos seus metabolitos secundários, dadas as suas propriedades antioxidantes, nomeadamente dos compostos fenólicos, vitaminas C e E e carotenóides (42).

Assim nos últimos sessenta anos, em virtude de todos os progressos que desde aí ocorreram, nomeadamente nos métodos químicos e analíticos, os conhecimentos acerca das plantas medicinais aumentaram consideravelmente, no entanto ainda significa muito pouco, de entre a totalidade das plantas existentes que poderão ter interesse na Medicina. Existem muitas plantas que ainda não foram estudadas e caracterizadas, tanto para o uso direto como para servirem de referência para a síntese/semi-síntese de novos compostos farmacologicamente ativos (61,62).

Deste modo, torna-se fundamental a investigação e trabalho neste âmbito, em colaboração com etnofarmacognosistas e outros profissionais, dado que permitirá identificar e definir potenciais agentes terapêuticos tanto para uso complementar da terapia convencional como para uso isolado, nomeadamente nas doenças crónicas, tal como a *Dm*. Além de que permitirá também um maior conhecimento dos efeitos adversos de determinadas terapêuticas que as populações usam autonomamente e desde há muitos anos, a exemplo, os chás, por parecerem ser mais naturais e por isso menos tóxicos. Pois sabe-se hoje que o "natural" nem sempre é seguro (62,63).

Torna-se necessário estudar a composição das plantas medicinais e as suas potenciais propriedades no organismo a fim de avaliar a sua segurança, dado que ao contrário de um medicamento que têm na sua composição apenas um composto ativo sobre o qual se sabe o seu teor e está estudado os seus efeitos no organismo, estas poderão ter diversos compostos ativos, sobre os quais os efeitos isolados são pouco ou não conhecidos, além dos efeitos que podem ocorrer em sinergia. A incorporação destes em medicamentos/produtos de saúde só ocorrerá após todo este processo.

6. Caracterização das Plantas

Neste sentido, pretende-se no presente trabalho estudar a atividade antidiabética e antioxidante na prevenção e tratamento da doença *Dm*, através do uso *in vitro* de extratos aquosos de plantas colhidas na região Algarvia (Portugal). Para tal análise foram escolhidas quatro plantas que se caracterizam a seguir, a saber *Aristolochia baetica* L., *Chelidonium majus* L., *Dittrichia viscosa* L. e *Lavandula virilis* L..

Tratam-se de 4 espécies plantas típicas da região do Algarve sobre as quais existem ainda escassas referências documentadas em relação à sua aplicação na Medicina, nomeadamente a nível da *Dm* daí a minha escolha para o seu estudo. São

além disso plantas que me são muito familiares, pois desde sempre as vi crescer nos campos em torno da minha casa, o que suscitou ainda mais o meu interesse no estudo das suas potenciais aplicações terapêuticas (**Quadro 6.1.**).

6.1. *Aristolochia baetica* L.

A espécie *Aristolochia baetica* L. (**Figura 6.1.**) pertence à família das Aristoloqueáceas, sendo vulgarmente denominada por erva-cavalinha, balsamina, candil ou aristolóquia (**Quadro 6.1.**) (64). Os seus principais constituintes ativos são os derivados fenantrénicos azotados como o ácido aristolóquico livre e esterificado, cerca de 1% e o derivado dimetoxilado em C₈ e o ácido nor-aristolóquico. Foram encontrados também, nas raízes, IIIa-6-O-beta-D-glucosídio, cloreto de magnoflorine (alcaloide) e cinco aristolactamas (intermediárias na via biossintética do ácido aristolóquico), além da sacarose e frutose (65,66).

As plantas do género de *Aristolochia* têm já sido usadas na Medicina Chinesa dadas as suas numerosas atividades biológicas (67).

A sua raiz parece ter atividades de febrífuga (baixa a febre), emenagoga (controla o fluxo menstrual) e abortiva (68,69). Além disso, os seus extratos, realizados em solventes orgânicos (hexano, clorofórmio e acetato de etilo), apresentam-se como potentes inibidores da proliferação celular em células de cancro da mama humanas, bem como de outras células de linhagem cancerígena bem como atividades antisséticas (66). Por outro lado, têm sido descrito que a presença de ácidos aristolóquicos é responsável por problemas de nefrotoxicidade (62,67).

Quadro 6.1. Nome Botânico, família, nome comum, distribuição geográfica, habitat e outras considerações referentes às espécies em estudo.

Nome Botânico	Família	Nomes Comuns	Distribuição Geográfica	Habitat	Caracterização e Florescências
<i>Aristolochia baetica</i> L. (64,70)	Aristoloqueáceas	Erva-cavalinha, balsamina, candil ou aristolóquia.	Grande parte do Barrocal Algarvio.	Distribui-se por sebes e matas, maioritariamente em solos calcários pedregosos.	Planta herbácea vivaz, rizomatosa e trepadeira. Floresce entre dezembro e junho.
<i>Chelidonium majus</i> L. (65,71)	Papaveráceas	Celidónia, cedronha, erva-andorinha, erva-das-verrugas ou quelidónia-maior.	Portugal, e outros países da Europa, Ásia Central e Meridional.	Distribui-se por muros e paredes velhas, sebes e caminhos.	Planta herbácea vivaz. Floresce entre março e setembro.
<i>Dittrichia viscosa</i> L. (68,70,72,73)	Asteráceas	Énula-peganhosa, erva-difícil-cheirosa, tágueda, tágueda-prostrata, táveda-de-folhas-estreitas, táveda-de-folha-de-charuto ou tádega.	Sudoeste Meridional e Barlavento Algarvio.	Planta ruderal frequente encontrar nas encostas marginais, campos incultos e baldios. É endémica nas zonas secas, xistosas e arenosas.	Subarbusto densamente glanduloso pegajoso, viscoso e aromático, com numerosos renova folhosos no tronco e nos ramos velhos acastanhados. Floresce entre junho e outubro. Capítulos amarelo-citrino, folhas verdes e inflorescências secas e castanhas.
<i>Lavandula virilis</i> L. (70,74,75)	Lamiáceas	Rosmaninho-verde	Encostas da Serra Algavia, Sudoeste de Espanha e ilha da Madeira.	Charnecas e matos baixos xerofílicos, em solos geralmente ácidos e pedregosos (xistos, sienitos, mas raramente arenitos) nas encostas das serras algarvias geralmente cobertas de sobreirais, carvalhais, azinhais, medronhais ou pinhais.	Subarbusto de pequeno porte (até 75 cm), muito ramificado com numerosos ramos floríferos eretos, aromático, perenifólio e pubescente. Floresce entre abril e junho.

6.2. *Chelidonium majus* L.

A espécie *Chelidonium majus* L. (**Figura 6.1.**) pertence à família das Papaveráceas, sendo vulgarmente denominada por celidónia, cedronha, erva-andorinha, erva-das-verrugas ou quelidónia-maior (**Quadro 6.1.**) (71).

De acordo com a Farmacopeia Portuguesa (76), para efeitos terapêuticos utilizam-se as suas partes aéreas secas, inteiras ou fragmentadas, contendo no mínimo 0,6 % de alcaloides totais, expressos em quelidonina (C₂₀H₁₉NO₅) no fármaco seco (65). Os principais constituintes são os alcaloides isoquinoleicos, do tipo da benzofenantridina em 0,3 a 1% (quelidonina, maioritariamente, sanguinarina, queleritrina, berberina e coptisina); ácidos orgânicos (ácido málico, quelidónico e cítrico); flavonoides; lecitina; saponina; carotenoides, ácidos fenólicos. No látex, de cor amarelo-alaranjado, existem enzimas proteolíticas (65,76).

No que diz respeito à identificação, ensaios de qualidade e dosagem, de acordo com a Farmacopeia Portuguesa o pó é identificado microscopicamente, usando uma solução de hidrato de cloral, como contendo numerosos fragmentos de folha e macroscopicamente como verde acinzentado a verde acastanhado. Além disso, o fármaco é identificado por cromatografia em camada fina, após revelação pela solução de iodobismutato de potássio e solução de nitrito de sódio, pelo perfil de bandas castanhas. Deve ainda satisfazer os seguintes ensaios de qualidade: elementos estranhos (10,0%, no máximo), perda por secagem (10,0%, no máximo), cinzas totais (13%, no máximo). A dosagem de alcaloides totais, expressos em quelidonina, é feita por espectrofotometria a 570 nm na solução extrativa, após a adição de sal sódico cromotrópico e no líquido de compensação e usando os 0,933 como valor de referência da absorvência específica da quelidónia-major (quelidonina) (76).

Em termos de farmacologia e atividade biológica, a quelidonina (o alcalóide principal) é ligeiramente analgésico, sedativo, espasmolítico, antitússico e antiviral. Já a berberina têm atividade colagoga e outros alcaloides têm uma ação antibacteriana, anti-tumoral e queratolítica. É principalmente indicada em sintomas no sistema hepatobiliar e anorexia, sendo que os usos aprovados pela Comissão E Alemã são nos espasmos nas vias biliares e no aparelho gastrointestinal. O látex, por aplicação tópica pode tratar certos tumores cutâneos (condilomas, verrugas ou papilomas) (60).

O seu uso por via oral é contraindicado na gravidez, aleitamento e obstrução das vias biliares (60).

Verificou-se, num estudo (77), que o extrato alcoólico da planta têm efeitos anti-tumorais, anti-genotóxicos e hepato-protetores no ratinho, pelo que os autores sugerem o potencial desta para uso na terapia do cancro. Já o extrato hidroalcoólico da quelidónia-maior, mostrou ter atividade anti-tumoral e bactericida sobre as bactérias gram-positivo, nomeadamente *Bacillus anthracis* e *Staphylococci*, sendo o alcalóide sanguinarina responsável por esta atividade, dada a sua interação com o ADN (78). Por fim, o extracto etanólico das partes aéreas da planta mostrou ter propriedades inibidoras da enzima acetilcolinesterase, responsável pela degradação da acetilcolina na fenda sináptica, propriedades estas atribuídas à berberina, 8-hidroxi-di-hidroqueliterina e 8-hidroxi-di-hidrossanguinarina (79).

Recentemente, verificou-se num outro estudo (80) que a quelidonina e homoquelidonina são potentes agentes citotóxicos em linhagens celulares de cancro, destacando-se este efeito em células leucémicas. Este estudo veio confirmar um outro publicado anteriormente (81), acerca do forte potencial antioxidante e atividade antiproliferativa via apoptose nas células leucémicas. Neste é referido que os alcalóides de isoquinolina e os flavonóides podem desempenhar um papel importante tanto na quimioprevenção do cancro através da sua atividade antioxidante como na quimioterapia, como agente citotóxico e indutor de apoptose.

Constatou-se também que a quelidonina (principal alcalóide isoquinoliníco da planta) tem efeitos inibitórios profundos sobre a inflamação das vias aéreas em ratinhos, melhorando a asma alérgica nestes podendo ser um potencial agente preventivo ou terapêutico para na asma (82).

6.3. *Dittrichia viscosa* L.

A *Dittrichia viscosa* L. (**Figura 6.1.**) pertence à família das Asteráceas, sendo vulgarmente denominada por émula-peganhosa, erva-difícil-cheirosa, tágeda, tágeda-prostrata, táveda-de-folhas-estreitas, táveda-de-folha-de-charuto ou tádega (**Quadro 6.1.**) (72).

Os principais constituintes ativos são flavonóides, lactonas e ácidos sesquiterpénicos e ésteres 9-hidroxinerolidol (83).

Esta planta sofre variações anuais no seu conteúdo de açúcares solúveis, amido, lípidos totais e azoto. E perante um *stress* hídrico a concentração em compostos fenólicos nas folhas aumenta. Durante o verão verifica-se uma diminuição do amido e um

esgotamento dos lipídios totais, enquanto que os açúcares solúveis osmoticamente ativos aumentam (73).

Os extratos da *D. viscosa* estão descritos como tendo propriedades antipiréticas, antidiabéticas, antivirais, antifúngicas, antibacterianas e antissépticas. Tem sido usada para tratar feridas, lesões, edemas, contusões e distúrbios intestinais, ainda que, se usada desadequadamente possa causar complicações graves, nomeadamente dermatites de contacto (73,83,84). É ainda referido que os seus extratos exibem atividades anti-inflamatórias e de captura de radicais livres, apresentando propriedades protetoras da peroxidação lipídica em modelos de membranas (73).

6.4. *Lavandula virilis* L.

A *Lavandula virilis* L. (**Figura 6.1.**) pertence à família das Lamiáceas, sendo vulgarmente denominado rosmaninho-verde (74).

Os principais constituintes ativos são os compostos fenólicos, incluindo ácidos hidroxicinâmicos (3-O-cafeoilquínicos, 4-O-cafeoilquínicos, 5-O-cafeoilquínicos, cafeico e ácidos rosmarínico), flavonas (luteolina e luteolina-7-O-glucósido) e uma flavanona (pinocembrina) (75).

Foi verificado, em estudos fitoquímicos que o seu óleo essencial revela a presença de compostos antioxidantes e antifúngicos (7,85,86).

O ácido rosmarínico é o composto principal identificado nos extratos do rosmaninho-verde. Têm importantes atividades biológicas, tais como antioxidantes (87) e antimicrobiana (88) e neuroprotector (89). Existem ainda referências (90) que este tenha propriedades anticancerígenas preventivas no humano, através da redução da expressão do gene pro-inflamatório da *ciclo-oxigenase 2* (fator de risco para o desenvolvimento de tumores), nomeadamente em células epiteliais mamárias não malignas. Um estudo recente salienta ainda o elevado potencial terapêutico deste composto e outros derivados fenólicos na prevenção e terapêutica, em modelos experimentais, da *Dm* tipo 2 e da hiperlipidémia. Verifica-se assim que se trata de um recurso biológico com bastante interesse para as indústrias alimentar e farmacêutica (75).

Os extratos da planta revelam ainda propriedades Mediciniais como antisséptico, anti-inflamatório e antimicrobiano (91).



Figura 6.1. Apresentação das espécies em estudo, no seu habitat natural. **A** - *Aristolochia baetica* L.; **B** - *Chelidonium majus* L.; **C** - *Dittrichia viscosa* L.; **D** - *Lavandula viridis* L.

PARTE II

7. Objetivos

O presente trabalho pretende contribuir para o estudo de novas potenciais terapêuticas de origem natural que tragam benefícios para a doença Diabetes *melitus*, tais como novas fontes de antioxidantes naturais e inibidores das enzimas envolvidas na fisiopatologia da *Dm*. Assim têm como principais objetivos:

- Avaliar a potencial atividade antioxidante e antidiabética *in vitro* de extratos aquosos de quatro plantas típicas da região do Algarve;
- Enunciar qual/quais das quatro plantas estudadas têm a melhor atividade antioxidante e antidiabética *in vitro*;
- Verificar a existência de correlações entre os métodos estudados.

8. Amostras

As amostras usadas no presente trabalho dizem respeito a extratos aquosos de quatro plantas selvagens da região do Algarve (Portugal), a saber, *Aristolochia baetica L.*, *Chelidonium majus L.*, *Dittrichia viscosa L.* e *Lavandula virilis L.*

Tratam-se, à exceção de *Chelidonium majus L.*, de plantas silvestres, dado que são espécies de plantas que nasceram e reproduziram-se espontaneamente sem qualquer intervenção do Homem. Estas tinham previamente sido colhidas ainda frescas num dia sem chuva e seco. No **Quadro 8.1** encontram-se as informações referentes ao local de colheita, data de colheita e respetivas condições de cultivo das plantas usadas para a preparação dos extratos aquosos usados neste trabalho.

É ainda de referir que as plantas foram autenticadas pelo Coronel José Rosa Pinto (Herbário da Universidade do Algarve) sendo lá depositado um exemplar da planta com a função de *voucher* (ou seja foi depositado e registado na base de dados do herbário).

Quadro 8.1. Informações relativas ao local de colheita, data de colheita e condições de cultivo das plantas usadas para a preparação dos extratos aquosos usados neste trabalho.

Planta	Local da Colheita	Data da Colheita	Condições de Cultivo
<i>Aristolochia baetica</i> L.	Rocha da Pena	Maio de 2015	Planta silvestre
<i>Chelidonium majus</i> L.	Albufeira	Março de 2016	Planta cultivada
<i>Dittrichia viscosa</i> L.	Barranco do Velho	Maio de 2015	Planta silvestre
<i>Lavandula virilis</i> L.	Barranco do Velho	Maio de 2015	Planta silvestre

9. Reagentes e Materiais

9.1. Reagentes

No presente trabalho usaram-se os seguintes reagentes:

α -glucosidase (Maltase) 2000 U, 1000 U/mL, 123 U/mg em 3,2 M de sulfato de amónio fornecida pela Megazyme® (Irlanda); 4-nitrofenil- α -D-glucopiranosido, lote 10153955, ácido 3,5-dinitrosalicílico, lote 10171814, quercetina dihidratada lote J5969A, acarbose 95% lote C12Z009 fornecidos pela Alfa Aesar® (Alemanha); fosfato de sódio dibásico anidro fornecido pela Biosciences® (USA); carbonato de sódio anidro, ferrocianeto de potássio, ácido sulfúrico 95-97%, fosfato de sódio dibásico dihidratado, ácido acético glacial 100%, 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), cloreto de alumínio hexahidratado fornecidos pela Merck® (Alemanha); amido de batata solúvel, tartarato de sódio potássio tetra-hidratado, ácido tricloroacético fornecidos pela Panreac® (Espanha); cloreto de ferro (III) hexahidratado, acetato de sódio trihidratado, metano, ácido gálico monohidratado fornecidos pela VWR Prolabo® (Bélgica); ácido clorídrico Riedel-de-Haën® (Seelze); α -amilase de pâncreas de porco 16 U/mg, molibdato de amónio, 2,2 difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), reagente Folin-Ciocalteu, Trolox fornecidos por Sigma-Aldrich Co® (USA); cloreto de sódio fornecido por Scharlau® (Espanha).

9.2. Material de Laboratório

Além do material comum de laboratório foram usados os seguintes equipamentos: uma balança digital da marca Ohaus Corporation® (USA) modelo Scout Pro; uma balança analítica da marca Ohaus Corporation® (USA) modelo Explorer Pro; uma balança analítica Shimadzu® modelo AW220; um espectrofotómetro T70+ UV/Vis da marca PG Instruments Ltd (United Kingdom); uma placa de aquecimento da marca VWR®; um

banho-maria da marca VWR® modelo VWB6; um termómetro digital HI98501 Checktemp® da Hanna instruments; um vórtex de marca stuart® modelo SA8; um medidor pH da marca Hanna instruments modelo checker plus; uma estufa da marca Binder®.

10. Procedimento Experimental

O processo de recolha das plantas e extração utilizado durante os estudos preliminares e os métodos analíticos foram realizados segundo os parâmetros e protocolos estabelecidos no Laboratório *Food Science Lab* da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade do Algarve de acordo com os procedimentos descritos em seguida.

É de referir que cada ensaio, para cada planta, foi realizado em triplicado usando o mesmo extrato a fim de obter resultados concordantes e como metodologia para avaliar a sua repetibilidade. Além disso as metodologias para a determinação da capacidade antioxidante são numerosas e podem estar sujeitas a interferências, além de se basearem em fundamentos diversos. Por isso, foram aplicados vários métodos para aferir de modo mais próximo da realidade esta capacidade já que nenhum ensaio usado isoladamente para determinar a capacidade antioxidante irá refletir exatamente a “capacidade antioxidante total” de uma amostra.

10.1. Preparação das Amostras (extratos aquosos)

Para a preparação dos extratos usaram-se as plantas previamente secas no Laboratório *Food Science Lab* em caixas que permitem o arejamento, à temperatura ambiente, protegidas da luz direta e ao abrigo da humidade (**Figura 10.1.1.**).



Figura 10.1.1. Plantas no estado seco presentes nas caixas de arejamento (da esquerda para a direita, *A. baetica*, *C. majus*, *D. viscosa* e *L. virilis*).

As suas partes aéreas foram reduzidas a pó (só não foram usadas as raízes e caules mais grossos) por trituração e homogeneização usando um moinho de cozinha e

conservadas por congelamento (-20°C) em tubos tipo Falcon até ao momento da realização do extrato (infusão).

Para a realização da infusão, pesaram-se 1,5 g do extrato moído anteriormente que se colocou num saco feito a partir de uma gaze. Foram realizadas infusões dos extratos num volume de 30 mL de água destilada a uma temperatura de 95°C, durante 15 minutos, e com agitação constante de 200 rpm. Em seguida, filtrou-se o extrato aquoso com um filtro de pregas, sendo este transferido para um balão volumétrico de 25 mL na qual se fez a totalidade com água destilada (**Figura 10.1.2.**). O conteúdo foi dividido por vários tubos *Eppendorfs* e armazenado a -20°C, a fim de uma melhor conservação aquando da realização dos ensaios analíticos. Paralelamente, foram preparados *Eppendorfs* de extrato para cada planta, contendo 1 mL cada um, a fim de secagem na estufa a temperatura constante de 50°C por cerca de 72 horas, de modo a obter uma massa de resíduo seco por 1 mL de extrato.

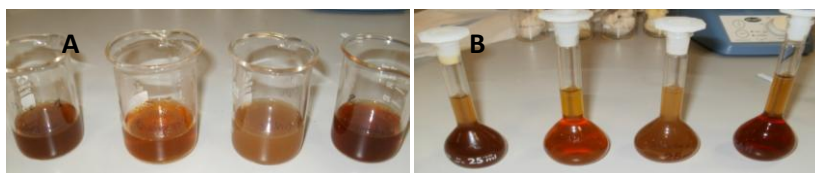


Figura 10.1.2. Extratos aquosos dispostos na ordem da esquerda para a direita, *A. baetica*, *C. majus*, *D. viscosa* e *L. virilis*. A: Amostras após infusão a 95°C por 15 minutos em 30 mL de água destilada com agitação magnética de 200 rpm a partir de 1,5 g de extrato moído. B: Extratos após diluição para 25 mL.

10.2. Métodos Analíticos

Em todos os métodos: foi utilizado como equipamento de medida do sinal na forma de absorvência e respetivo sistema informático, o espectrofotómetro T70+ UV/Vis Spectrometer, PG Instruments Ltd; os resultados são expressos relativamente ao peso seco da planta (mg/g) e em relação à concentração no extrato (mg/mL); todos os ensaios foram realizados em triplicado.

10.2.1. Determinação Química do Conteúdo Fenólico Total (TPC)

Uma dos procedimentos para avaliar o conteúdo de compostos fenólicos totais é através do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (92), conteúdo fenólico total (TPC), adaptado do método espectrofotométrico proposto por Huang *et al.* (2006).

De acordo com este método, os compostos fenólicos interagem com o reagente de Folin-Ciocalteu (complexo fosfomolibdénio/fosfotungsténio) de coloração amarela, em meio básico, através dos seus grupos hidroxilo oxidáveis, pela transferência de eletrões para o complexo resultando na formação de um complexo com uma coloração azul (**Figura 10.2.1.1.**) cuja intensidade da cor é medida espectrofotometricamente a 765 nm (93).

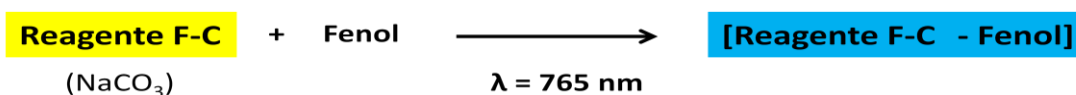


Figura 10.2.1.1. Método TPC. Mecanismo da reação de complexação do complexo fosfomolibdénio/fosfotungsténio com os fenóis presentes através dos respetivos grupos carbonilo e hidroxilo. Reagente F-C - reagente Folin-Ciocalteu

A concentração em compostos fenólicos é determinada através de uma reta de calibração, sendo que neste caso o conteúdo de fenóis foi obtido por interpolação na reta de calibração do ácido gálico. É expresso em mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) para 1 g de peso seco (ps), ou seja mg GAE/g planta. Foram usadas soluções de várias concentrações de ácido gálico na gama de concentrações de 0,0113 a 0,1017 mg/mL a fim de traçar a reta de calibração do ácido gálico ($y=9,8343x-0,0129$; $R^2=0,9918$) em absorvência versus concentração (mg/mL) de ácido gálico, que permitiu calcular os mg GAE/g ps de planta no extrato.

Para tal, procederam-se às devidas diluições dos extratos das plantas; misturou-se 0,1 mL de cada extrato aquoso com 0,5 mL da Solução Folion-Ciocalteu e 0,4 mL da solução saturada carbonato de sódio (7,5%); paralelamente preparou-se o branco contendo água destilada em vez do extrato; após as amostras permanecerem 30 minutos no escuro, leu-se a absorvência no espectrofotómetro a 765 nm, usando inicialmente o branco para tarar o aparelho.

Foram ainda preparadas as soluções dos reagentes utilizados no método:

- Solução Folion-Ciocalteu: Preparou-se uma diluição 1:10 em água destilada do reagente de Folion-Ciocalteu (armazenado a 4°C);
- Solução carbonato de sódio (7,5%): Pesou-se 7,5 g de carbonato de sódio e dissolveu-se para o volume final de 100 mL.

Este método permite quantificar o conteúdo de compostos fenólicos totais funcionando como um indicador elementar para retirar as primeiras conclusões acerca da capacidade antioxidante da amostra em estudo. Contudo têm a desvantagem da presença de outros compostos como o ácido ascórbico, açucares, aminas aromáticas ou ácidos orgânicos poderem também reduzir o reagente de Folion-Ciocalteu. Além disso alguns

compostos inorgânicos como sulfato de ferro, nitrato de potássio, fosfato de sódio ou de manganésio poderem também reagir, sobrestimando assim os resultados (42).

10.2. 2.Determinação Química do Conteúdo de Flavonoides Total (TFC)

Uma dos procedimentos para avaliar o conteúdo de flavonoides total (TFC) é através do método colorimétrico de Lamaison e Carnat respeitando as respectivas alterações efetuadas por Quettier-Deleu *et al.* (2000) que utiliza o reagente cloreto de alumínio hexahidratado ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (94).

Este método baseia-se numa reação em que os flavonoides, usando os seus grupos carbonilo e hidroxilo, formam um complexo com o ião alumínio Al (III) do reagente, originando uma coloração amarela (**Figura 10.2.2.1.**). A formação de cor permite determinar espectrofotometricamente a 430 nm a quantidade de flavonoides presentes na amostra por interpolação na reta de calibração da quercetina. O conteúdo de flavonoides totais é expresso em mg de equivalentes de quercetina (QE) para uma quantidade adequada de planta (1 g de ps)

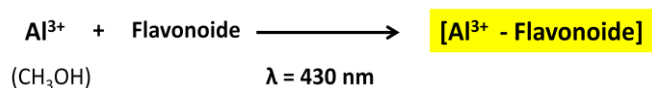


Figura 10.2.2.1 Método TFC. Mecanismo da reação de complexação do alumínio com os flavonoides presentes através dos respetivos grupos carbonilo e hidroxilo.

Foram usadas soluções de várias concentrações de QE na uma gama de concentrações de 0 a 0,0600 mg/mL para traçar a reta de calibração obtida ($y=12,631x + 0,1392$; $R^2=0,9801$) em absorvência versus concentração (mg/mL) de quercetina, que permitiu calcular os mg QE/g de planta.

Para tal, procederam-se às devidas diluições dos extratos das plantas; misturou-se 0,40 mL de cada extrato com 0,80 mL da solução de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 2 % preparando-se 3 réplicas para cada amostra; paralelamente preparou-se o branco contendo água em vez do extrato; após as amostras permanecerem 10 minutos no escuro, leu-se a absorvência no espectrofotómetro a 430 nm, contra o branco (a mesma mistura sem a amostra).

Foram preparadas as soluções reagentes utilizadas no método:

- Solução de cloreto de alumínio hexahidratado ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) a 2%: Dissolveu-se 2 g de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em metanol, perfazendo-se um volume de 100 mL com água destilada.

Apesar deste método não avaliar diretamente a capacidade antioxidante, permite quantificar um grupo específico de compostos fenólicos, os flavonoides.

10.2.3. Análise da Cor

Uma dos métodos para analisar a cor de um extrato é através do método espectrofotométrico de Kelebek (95) e Glories (96) pela medição direta da absorvência aos comprimentos de onda de 420 nm (A_{420}), 520 nm (A_{520}) e 620 nm (A_{620}), de modo a obter a proporção de amarelo, vermelho e azul, respectivamente. Após esta medição obtêm-se a intensidade da cor (InC) pelo somatório de A_{420} , A_{520} e A_{620} que será usada no cálculo da proporção de cada cor, de acordo com as seguintes expressões:

$$\%amarelo = A_{420} \times \frac{100}{InC}; \quad \%vermelho = A_{520} \times \frac{100}{InC}; \quad \%azul = A_{620} \times \frac{100}{InC}$$

Para tal, mediu-se a absorvência do branco, e em seguida de cada extrato aos comprimentos de onda de 420 nm (A_{420}), 520 nm (A_{520}) e 620 nm (A_{620}). Tendo-se calculado InC, e as respetivas proporções de cor de acordo com as expressões acima.

10.2.4. Determinação Química da Atividade Antioxidante Total (TAA)

Um dos procedimentos para avaliar a atividade antioxidante total (TAA) de um extrato é através do método colorimétrico de Prieto, Pineda e Aguilar (1999) (97) usando fosfomolibdénio.

Este método baseia-se na determinação quantitativa da capacidade antioxidante da amostra, pela redução de Molibdénio (VI) a Molibdénio (V), e conseqüente formação de um complexo verde de fosfato de Molibdénio (V) em pH ácido (**Figura 10.2.4.1**). A intensidade da cor é medida espectrofotometricamente a 695 nm e a sua concentração é determinada através de uma reta de calibração, sendo que neste caso a atividade antioxidante foi obtida por interpolação na reta de calibração do ácido ascórbico. O resultado é expresso em mg de equivalentes de ácido ascórbico (AAE) para uma quantidade adequada de amostra (1 g de ps), ou seja mg AAE/g planta. Foram usadas soluções de várias concentrações de ácido ascórbico na gama de concentrações de 0,0600 a 0,1500 mg/mL a fim de traçar a reta de calibração do ácido ascórbico ($y=5,6114x-0,0312$; $R^2 = 0,9806$) em absorvência versus concentração (mg/mL) de ácido ascórbico, que permitiu calcular os mg AAE/g de planta.

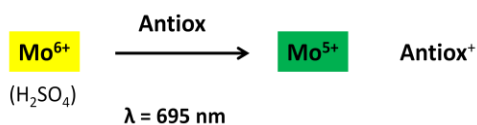


Figura 10.2.4.1. Método TAA. Mecanismo da reação de redução do molibdênio.

Antiox = composto antioxidante com 1 elétron disponível para doar ao molibdênio (Mo); Antiox⁺ = antioxidante oxidado

Para tal, procederam-se às devidas diluições dos extratos das plantas; misturou-se uma alíquota de 0,1 mL da solução da amostra com 1 mL da solução do reagente TAA, num tubo de *Eppendorf*; preparou-se paralelamente o branco; incubou-se as amostras à temperatura de 95°C durante 90 minutos; após as amostras permanecerem à temperatura ambiente, leu-se a absorvência no espectrofotómetro a 695 nm, usando inicialmente o branco (a mesma mistura sem a amostra).

Foram preparadas as soluções reagentes utilizadas no método:

- Solução Reagente TAA contendo 0,6 M de ácido sulfúrico, 28 mM de fosfato de sódio e 4 mM de molibdato de amónio: adicionou-se 3,36 mL de ácido sulfúrico concentrado a 10 mL de água destilada; em seguida dissolveu-se 0,494 g de molibdato de amónio ($[(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$) e adicionou-se 0,397 g de fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4); fez-se o volume final de 100 mL.

10.2.5. Determinação do Potencial Antioxidante por Redução do Ião Férrico (FRAP)

O método usado na determinação do potencial antioxidante por redução do ião férrico (Fe^{3+}) foi adaptado do método descrito por Benzie e Strain (1999) (98) respeitando as alterações propostas por Thaipong *et al.* (2006) (99).

Este método envolve uma reação de oxidação-redução, baseando-se na redução do ião férrico (Fe^{3+}), em ião ferroso (Fe^{2+}) pelos compostos antioxidantes presentes nos extratos das plantas e formação do complexo férrico de cor azul $[\text{Fe}-(\text{TPTZ})_2]^{2+}$, com a 2,4,6-tripiridil-S-triazina em tampão acetato em meio ácido (pH = 3,6) (**Figura 10.2.5.1.**). A quantidade de complexo produzido é medida espectrofotometricamente a 593 nm e a sua concentração é determinada através de uma reta de calibração, sendo que neste caso a atividade antioxidante foi obtida por interpolação na reta de calibração do Trolox (100). O resultado é expresso em mg de equivalentes de trolox (TE) para uma quantidade adequada de amostra (1 g de ps), ou seja mg TE/g planta. Foram usadas soluções de várias

concentrações de Trolox na gama de concentrações de 0,0090 a 0,1000 mg/mL a fim de traçar a reta de calibração do Trolox ($y=12,878x-0,0157$; $R^2 = 0,9988$) em absorvência versus concentração (mg/mL) de Trolox, que permitiu calcular os mg TE/g de planta (101).

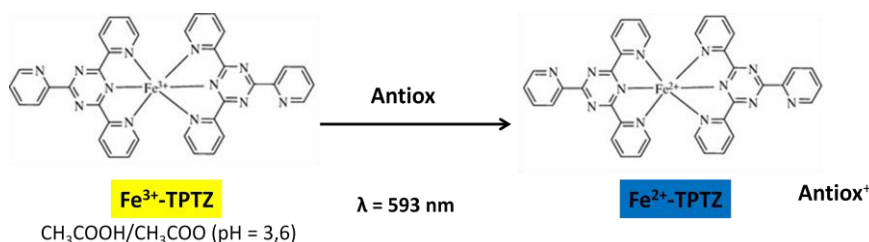


Figura 10.2.5.1. Método FRAP. Mecanismo da reação de redução do ferro.

$Antiox\cdot$ = composto antioxidante com 1 elétron disponível para doar ao ferro; $Antiox^+$ = antioxidante oxidado

Para a realização deste método foi preparada, no momento do ensaio, uma solução mistura de reagentes, a solução FRAP contendo:

- 25 mL de solução tampão acetato 300 mM preparada a partir 3,1 g de acetato de sódio e 16 mL de ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$ - pH 3,6) e armazenada a $4^\circ C$;
- 2,5 mL de solução 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) 10 mM preparada a partir de 0,078 g de TPTZ diluída em água com 84 μL de ácido clorídrico 40 mM para um volume final de 25 mL de água;
- 2,5 mL de solução de cloreto de ferro ($FeCl_3$) 20 mM preparada a partir de 0,054 g de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ em 10 mL de água. Esta solução incubou-se a $37^\circ C$.

Procederam-se às devidas diluições dos extratos das plantas; adicionou-se 0,1 mL da solução da amostra de extrato a 0,9 mL da solução FRAP num tubo de *Eppendorf*; preparou-se paralelamente o branco; incubou-se as amostras no escuro durante 30 minutos; após este período leu-se a absorvência no espectrofotómetro a 593 nm, usando inicialmente o branco (a mesma mistura sem a amostra).

Apesar deste método colorimétrico ter sido inicialmente desenvolvido para medir a atividade antioxidante dos componentes do plasma sanguíneo, têm sido também utilizado para a quantificação do poder antioxidante noutras matrizes, nomeadamente alimentares e vegetais, dado que se trata de um método de execução simples e reprodutível aliado ao baixo custo dos reagentes utilizados (98,100).

Contudo é um método pouco sensível para os constituintes antioxidantes de uma amostra pelo que aquando da interpretação dos resultados é importante notar que este procedimento avalia apenas capacidade dos constituintes da amostra participarem em

reações oxidação-redução (capacidade de redução por um mecanismo de transferência de elétrons), neste caso com o íon férrico. Ou seja, qualquer composto com um potencial redox inferior ao do par redox Fe (III)/Fe (II), pode teoricamente reduzir o Fe (III) a Fe (II), contribuindo para um resultado no ensaio falsamente elevado, pois nem todos os agentes redutores que têm a capacidade de reduzir o ferro são agentes antioxidantes. Além disso, outros constituintes antioxidantes da amostra que tenham outro mecanismo de ação antioxidante não serão quantificados (por exemplo os captadores de radicais livres ou compostos com grupos tiol que atuam por um mecanismo de transferência de elétrons), não refletindo absolutamente todo o potencial antioxidante da amostra do extrato em análise (100,102).

Outro aspeto a considerar, é a possível presença de outros compostos que absorvem no comprimento de onda em análise ou que sejam capazes de reduzir Fe (III) a Fe (II) interferindo assim com a quantificação dos constituintes antioxidantes da amostra pois induzem elevados resultados no método que não são reais (102).

10.2.6. Determinação do Potencial Redutor (RP)

O método usado na determinação do potencial redutor de cada planta foi adaptado do método espectrofotométrico inicialmente descrito por Oyaizu (103). Assim nos ensaios realizados os volumes dos reagentes foram reduzidos para metade agilizando o uso de *Eppendorfs* como meios reacionais.

Este método permite detetar a presença na amostra de compostos com capacidade redutora do ferro na forma férrica (Fe^{3+}) do complexo de ferrocianeto, à forma ferrosa (Fe^{2+}). Os antioxidantes são um exemplo de compostos com esta capacidade, evidenciando assim a relação entre o poder redutor e a capacidade antioxidante (39,104). Esta reação ocorre a pH tendencialmente neutro (pH = 6,6) caracterizando-se por uma mudança de cor, de amarelo para tonalidades de verde-azulado, dependendo da capacidade redutora dos constituintes dos diferentes extratos (39) (**Figura 10.2.6.1.**). A reação é monitorizada espectrofotometricamente a 700 nm sendo que quanto maior for a absorvência da mistura, maior o valor de concentração de compostos com potencial redutor na amostra de extrato em estudo (105,106).

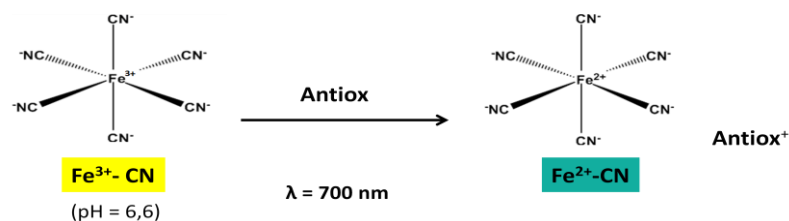


Figura 10.2.6.1. Método RP. Mecanismo da reação de redução do ferro. Método RP. Antiox = composto antioxidante com 1 elétron disponível para doar ao ferro; Antiox+ = antioxidante oxidado

A concentração do complexo verde-azulado formado é determinada através de uma reta de calibração, sendo que neste caso foi obtida por interpolação na reta de calibração do Trolox. O resultado é expresso em mg de equivalentes de Trolox (TE) para uma quantidade adequada de amostra (1 g de ps), ou seja mg TE/g planta. Foram usadas soluções de várias concentrações de Trolox na gama de concentrações de 0,0100 a 0,1000 mg/mL a fim de traçar a reta de calibração do Trolox ($y=7,1037x+0,0123$; $R^2 = 0,9962$) em absorvência versus concentração (mg/mL) de Trolox, que permitiu calcular os mg TE/g de planta.

Para a realização do método preparam-se as soluções/reagentes utilizadas no método:

- Tampão fosfato 0,2M (pH 6,6): 68,5 mL de solução aquosa de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M e 31,5 mL de solução aquosa de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M;
- Solução de ferrocianeto de potássio (1%): dissolução de 1 g de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ em 1 mL de HCl 1 M, diluído para 100 mL com água (preparada no momento). Solução de HCl 1 M preparada a partir de 8,4 mL de HCl 37% diluída para 100 mL de água destilada;
- Solução de cloreto de ferro (0,1%): dissolução de 0,1 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em 1 mL de HCl 1 M, diluído para 100 mL com água destilada (preparada no momento);
- Solução de ácido tricloroacético (10%): dissolução de 10 g de ácido tricloroacético em 100 mL de água destilada.

Procederam-se às devidas diluições dos extratos das plantas; misturou-se 0,25 mL de tampão fosfato com 0,25 mL de ferrocianeto de potássio; adicionou-se 0,1 mL de extrato e incubou-se durante 20 minutos a uma temperatura de 50°C; após este período, adicionou-se 0,25 mL de solução de ácido tricloroacético e centrifugou-se a 650 x g durante 10 minutos; recolheu-se 0,5 mL de sobrenadante, que se misturou com 0,5 mL de

água destilada e 0,1 mL de cloreto de ferro; leu-se a absorvência no espectrofotómetro a 700 nm, contra o branco (a mesma mistura sem a amostra).

10.2.7. Determinação da Atividade de Captura de Radicais Livres (Método do DPPH)

O método usado na determinação da atividade de captura de radicais livres de cada planta é adaptado do método descrito por Yen *et al* (2000) (107).

Este método permite medir a capacidade antioxidante e antirradicalar dos compostos presentes na amostra pela quantificação da capacidade destes para reduzir o radical de azoto 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH·) presente numa solução metanólica, convertendo-o em DPPH-H (espécie não radicalar mais estável, com o eletrão emparelhado) não só pela transferência de eletrões como pela doação de átomos de hidrogénio (**Figura 10.2.7.1**). Trata-se de um radical livre orgânico relativamente estável, comparativamente com outros radicais envolvidos na peroxidação lipídica como é o radical peróxido. Têm um eletrão desemparelhado deslocalizado em torno da molécula, conferindo à solução metanólica uma cor roxa e um máximo de absorção aos 517 nm (26,108).

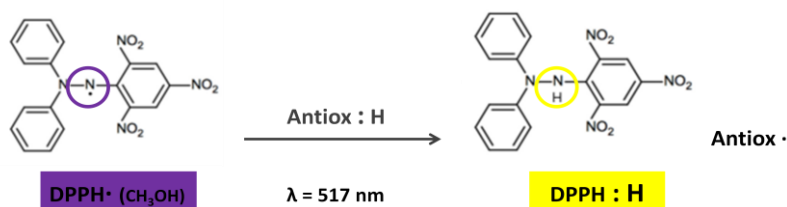


Figura 10.2.7.1. Mecanismo da reação do DPPH com o antioxidante. Adaptado de Liang, 2014 (100).

Antiox :H = composto antioxidante captador de radicais; Antiox · = radical antioxidante.

Ao ocorrer a redução do radical pelos compostos da amostra, a solução torna-se amarelada, diminuindo assim a absorvência ao comprimento de onda em análise, o que permite monitorizar a reação espectralmente, sendo que a uma maior descoloração da solução corresponde uma absorvência mais baixa e assim a uma atividade mais elevada de captura do radical livre (100,102).

O resultado final é apresentado em IC₅₀ (concentração inibitória de 50% dos radicais), ou seja, a concentração de amostra que consegue capturar e reduzir 50% dos radicais livres DPPH· presentes em solução.

Para a realização deste método usou-se como reagente uma solução metanólica de DPPH:

- 6,3912 mg de DPPH 0,16mM foi diluído em 100 mL de metanol.

Procederam-se às devidas diluições dos extratos das plantas; a cada 0,5 mL de amostra foram adicionados 0,5 mL da solução metanólica de DPPH; agitou-se vigorosamente por 1 minuto e manteve-se a reação ao abrigo da luz e à temperatura ambiente; após 30 minutos de reação, a absorvência da amostra (A_a) e do branco (A_0) (contendo água em vez da amostra) foram lidas espectrofotometricamente a 517 nm.

A percentagem de inibição (%I) é dada pela expressão seguinte:

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

O resultado é expresso em IC_{50} (concentração de extrato adequada para capturar 50% da quantidade de radicais livres DPPH· inicialmente presentes), por isso realizou-se o ensaio para várias concentrações de extrato diferentes para cada amostra a fim de traçar uma regressão linear da %I em função da concentração das amostras usadas no ensaio, de modo a obter o IC_{50} por interpolação (expressa em $\mu\text{g/mL}$).

Este método tem algumas limitações, por exemplo quando existem na amostra outras substâncias que têm o espectro de absorção que se sobrepõe ao do radical livre DPPH, a 515 nm, como é o caso dos carotenoides. Trata-se de uma reação não competitiva dado que o radical livre DPPH· atua como radical para uns compostos (sendo capturado) e oxidante para outros (sendo reduzido). Para além do DPPH· ser um radical estável que poderá não reagir com todos os antioxidantes (42,102,109). Por ter uma natureza lipofílica há uma acessibilidade limitada aos componentes hidrofílicos das amostras daí que a reação ocorra em meio alcoólico para facilitar a sua solubilidade. No entanto é necessário cuidado dado que o uso de álcool pode levar à precipitação proteínas, se presentes nos extratos. Adicionalmente poderá haver alguma interferência da cor natural dos extratos analisados com o resultado da absorção pelo radical DPPH·, o que pode afetar os resultados obtidos (100).

Por outro lado, este método tem a vantagem de envolver antioxidantes não enzimáticos, envolvendo uma metodologia simples, sendo relativamente económico e reprodutível. Assim, trata-se de um método útil para avaliar a capacidade de captura de radicais por antioxidantes não enzimáticos por parte das amostras vegetais e alimentares (100,102).

10.2.8. Ensaio de Inibição da α -glucosidade

O ensaio de inibição da α -glucosidade realizado foi adaptado dos métodos descritos por Li Huilin *et al* e Deepak Kumar *et al* com algumas modificações, nomeadamente no que diz respeito ao solvente usado na diluição das amostras (foram apenas diluídas em água) (110,111).

Este método permite avaliar *in vitro* a atividade inibitória da enzima α -glucosidade pelos extratos de plantas em estudo (**Figura 10.2.8.1**). Esta enzima é responsável pela hidrólise dos dissacarídeos em monossacarídeos (glicose) elevando assim a glicemia pós-prandial. Esta situa-se na membrana ciliada do intestino delgado, promovendo a quebra do amido e da sacarose - clivagem da ligação α 1,4 e α 1,6 - e libertando moléculas de glicose para serem absorvidas) (53,112).

O ensaio baseia-se na reação enzimática de degradação de um substrato que pode ser monitorizado espectrofotometricamente a 405 nm, pois ao ser degradado, a solução inicialmente transparente torna-se amarelada. Assim, para quantificar a atividade da enzima usou-se como substrato o P-nitro- α -D-gluco-piranosídeo (pNGP), que têm como produto o agente cromóforo p-nitrofenol de cor amarela que é quantificado espectrofotometricamente, sendo que quanto maior a intensidade da cor da solução, maior a absorvência a 405 nm e portanto menor o efeito inibitório na enzima dos extratos das plantas usados. Esta reação enzimática é interrompida previamente à quantificação pela adição de uma solução de carbonato de sódio (113).

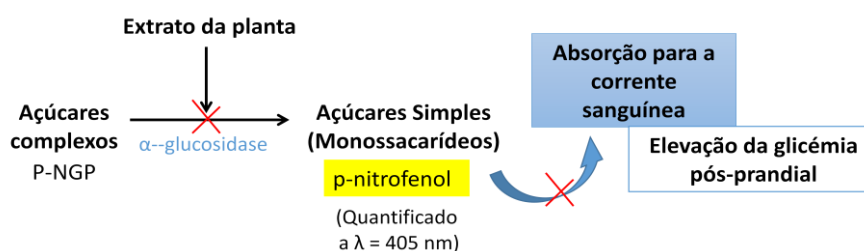


Figura 10.2.8.1. Ensaio de inibição da α -glucosidade. Esquema síntese da atividade enzimática *in vivo* de α -glucosidase, e o efeito na glicémia da sua inibição pelos extratos das plantas em estudo. Paralelamente é também apresentado o mecanismo da reação no ensaio *in vitro* usando p-NGP como substrato.

Para a realização deste método prepararam-se as soluções/reagentes:

- Solução tampão fosfato 0,1 M, pH 6,8 preparado pela adição de NaH_2PO_4 0,1 M a Na_2HPO_4 0,1 M para um pH de 6,8;

- Solução pNGP 0,5 mM preparada pela dissolução de 15 mg de pNGP em tampão fosfato 0,1 M, pH 6,8 para um volume de 100 mL;
- Solução α -glucosidade 1 U/mL preparada em tampão fosfato 0,1 M, no momento do ensaio, a partir da solução stock (1000 U/mL; 123 U/mg);
- Solução de carbonato de sódio 0,2 M preparada pela dissolução de 7,419 g de Na_2CO_3 em 100 mL de água destilada.

Procederam-se às devidas diluições dos extratos das plantas; misturou-se 150 μL de amostra com 150 μL de solução de enzima 1 U/mL e incubou-se por 10 minutos a $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$; adicionou-se à mistura 150 μL de solução pNGP 0,5 mM e incubou-se por 30 minutos a $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$; interrompeu-se a reação pela adição de 600 μL de solução de carbonato de sódio 0,2 M; preparou-se paralelamente para cada amostra de extrato um branco contendo a mesma mistura reacional anterior exceto tampão em vez de enzima e um controlo contendo água em vez da amostra; a absorvência da amostra, do respetivo branco e do controlo (A_c) foram lidas espectralmente ao comprimento de onda de 405 nm.

A absorvência da amostra real (A_a) é obtida pela diferença entre a absorvência da amostra e do respetivo branco, retirando assim o efeito da cor do extrato na quantificação da atividade enzimática. A percentagem de inibição (%I) é dada pela expressão seguinte:

$$\%I = \frac{A_c - A_a}{A_c} \times 100$$

O resultado é expresso em IC_{50} (concentração inibitória de 50% quantidade de enzima) por isso realizou-se o ensaio para várias concentrações de extrato diferentes para cada amostra (4 ensaios independentes) a fim de traçar uma regressão linear da %I em função da concentração das amostras usadas no ensaio, de modo a obter o IC_{50} por interpolação (expressa em mg/mL). Ou seja a concentração necessária de amostra para inibir 50% da quantidade de enzima α -glucosidade presente na solução. Usou-se a acarbose como controlo positivo.

10.2.9. Ensaio de Inibição da *a-amilase*

O ensaio de inibição da *a-amilase* realizado foi adaptado dos métodos descritos por Sandesh Sancheti *et al*, Filomena Conforti *et al* e Kyung-Tae Kim com algumas modificações (56,57,114).

Este método permite avaliar *in vitro* a atividade inibitória da enzima α -amilase pelos extratos de plantas em estudo. Esta enzima, presente na saliva e suco pancreático, atua de modo semelhante à α -glucosidase, sendo responsável pela hidrólise das ligações 1,6 e 1,4- α -glicosídicas dos polissacarídeos (amido) produzindo dissacarídeos α -anoméricos (maltose) que promovem o aumento da glicemia pós-prandial (53,55,114).

O ensaio de inibição da α -amilase baseia-se no princípio da degradação enzimática do substrato amido que resulta em açúcares redutores capazes de reagir e reduzir o reagente colorimétrico 3,5-ácido dinitrosalicílico (DNS) de cor amarela convertendo-o em ácido 3-amino-5-nitrosalicílico de cor vermelho-acastanhado. Este produto é quantificado espectrofotometricamente ao comprimento de onda de 540 nm permitindo assim avaliar a atividade enzimática (55,56). Assim a atividade inibitória da enzima pelos extratos será tanto maior quanto menor a quantidade de açúcares redutores produzidos, ou seja menos extensa a reação com o DNS o que se reflete numa menor mudança de cor da solução e portanto menor absorção ao comprimento de onda em análise.

Para a realização deste método prepararam-se as soluções/reagentes:

- Solução tampão fosfato 0,02 M, pH 6,9 contendo NaCl 0,0067 M preparado pela adição de NaH_2PO_4 0,02 M a Na_2HPO_4 0,02 M para um pH de 6,9 seguida da adição de NaCl;
- Solução do reagente de cor preparada pela adição lenta, com agitação, da solução A à solução B e diluição para 40 mL com H_2O (armazenada em frasco âmbar) (Solução A - Solução de tartarato de sódio potássio preparada pela dissolução com aquecimento e agitação de 12 g de tartarato de sódio potássio tetrahidratado em 8 mL de NaOH 2 M; Solução B - Solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico 96 mM preparada pela dissolução com aquecimento e agitação de 0,438 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico em 20 mL de água destilada);
- Solução de amido 2% preparada pela dissolução de 2 g de amido, com aquecimento por 15 minutos, em tampão fosfato 0,02 M, pH 6,9 para um volume de 100 mL;
- Solução α -amilase 2,4 U/mL preparada em tampão fosfato 0,02 M, no momento do ensaio, a partir do reagente stock (36 U/mg).

Procederam-se às devidas diluições dos extratos das plantas; misturou-se 100 μL da solução de amido 2% com 50 μL da solução de amostra e incubou-se durante 10 minutos a $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$; a esta mistura adicionou-se 100 μL da solução de enzima α -amilase 2,4 U/mL e incubou-se durante 5 minutos a $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$; adicionou-se 100 μL da solução reagente de cor amarela à mistura e levou-se a banho-maria a $(95 \pm 1)^\circ\text{C}$ por 15 minutos; terminou-se a

reação pela adição de 900 μL de H_2O ; preparou-se paralelamente para cada amostra de extrato um branco contendo a mesma mistura reacional anterior exceto tampão em vez de enzima e um controlo contendo água em vez da amostra; a absorvência da amostra, do respetivo branco e do controlo (A_c) foram lidas espectrofotometricamente ao comprimento de onda de 540 nm.

A absorvência da amostra real (A_a) é obtida pela diferença entre a absorvência da amostra e do respetivo branco, retirando assim o efeito da cor do extrato na quantificação da atividade enzimática, tal como no ensaio anterior.

O resultado é igualmente expresso em IC_{50} (concentração inibitória de 50% quantidade de enzima) por isso realizou-se o ensaio para várias concentrações de extrato diferentes para cada amostra (4 ensaios independentes) a fim de traçar uma regressão linear da %I em função da concentração das amostras usadas no ensaio, de modo a obter o IC_{50} por interpolação (expressa em mg/mL). Ou seja a concentração necessária de amostra para inibir 50% da quantidade de enzima α -amilase presente na solução. Usou-se a acarbose como controlo positivo.

11. Análise Estatística

Todos os resultados são expressos em média \pm desvio padrão, e resultam da análise de 3 réplicas da amostra ($n = 3$). O tratamento dos dados foi inicialmente realizado com recurso ao programa *Microsoft Office Excel 2007* para a realização dos cálculos, tabelas e gráficos. Em seguida foi usado o programa *IBM® SPSS® Statistics* versão 24 para a análise estatística dos resultados obtidos nos diferentes extratos estudados nos diferentes métodos. Para isso, recorreu-se a uma análise de variância (ANOVA) e análise de correlação bivariada entre os ensaios.

Na análise da variância (ANOVA) testa-se a hipótese nula de que as médias dos resultados das amostras dos diferentes extratos nos diferentes métodos são iguais. Para isso usou-se o teste de homogeneidade de Levene, para avaliar se as diferenças nos resultados são significativas (caso sejam, então há evidências para rejeitar a hipótese nula de variações iguais entre as várias amostras, isto é $p < 0,05$). Assim, em função dos resultados de p no teste de Levene, as diferenças significativas entre médias dos resultados obtidos foram identificadas recorrendo a testes *post hoc* (*à posteriori* - comparações múltiplas) como o teste Games-Howell no caso de $p < 0,05$ e pelo teste Fisher *least significance difference* (LSD) caso $p > 0,05$ (115,116).

Para a análise das correlações entre as variáveis determinaram-se os coeficientes de correlação linear de Pearson (r) que medem a direção e magnitude da correlação entre os ensaios.

12. Resultados e Discussão

Muitos extratos de plantas têm sido descritos como tendo propriedades medicinais. Neste trabalho pretendeu-se avaliar *in vitro* a atividade antioxidante e antidiabética de um conjunto de quatro extratos aquosos de plantas típicas da região do Algarve. Assim para concretizar os objetivos do presente trabalho submeteram-se os extratos aquosos a diversos ensaios para a avaliação da atividade antioxidante (TPC, TFC, TAA, FRAP, RP e DPPH) e a dois ensaios para a avaliação da atividade antidiabética (ensaios de inibição das enzimas *α*-glucosidase e *α*-amilase).

Além disso, foi inicialmente determinado o conteúdo em planta extraído para os extratos aquosos usados no estudo, bem como a eficácia desta extração. Os resultados encontram-se na **Tabela 12.1.**

Tabela 12.1. Resultados expressos em mg/mL para o conteúdo em compostos extraído pelos extratos aquosos das diferentes plantas analisadas, bem como a eficácia desta extração.

	<i>A. baetica</i>	<i>C. majus</i>	<i>D. viscosa</i>	<i>L. viridis</i>
Concentração de compostos (mg/mL)	9,73	8,63	13,40	9,70
Eficácia da extração (%)	12,17	10,79	16,75	12,13

Nota: Todos os resultados são expressos como média \pm desvio padrão (n = 3). *A. baetica* - *Aristolochia baetica* L.; *C. majus* - *Chelidonium majus* L.; *D. viscosa* - *Dittrichia viscosa* L.; *L. viridis* - *Lavandula viridis* L..

Na **Tabela 12.2** encontram-se os resultados obtidos, expressos na concentração média dos respetivos equivalentes associada ao respetivo desvio-padrão, nos métodos TPC, TFC, TAA, FRAP e RP e na **Tabela 12.3.** os resultados expressos em IC₅₀ médio associado ao respetivo desvio padrão, obtidos nos métodos DPPH, *α*-glucosidase e *α*-amilase para os extratos aquosos das diferentes plantas analisadas e para a Acarbose. Encontram-se ainda expressos, na forma de letra em índice, os resultados da análise

estatística da variância. Na **Tabela 12.2.** está ainda apresentada percentagem de contribuição do conteúdo de flavonoides total no conteúdo de fenóis totais.

Tabela 12.2. Resultados, expressos em concentração dos respetivos equivalentes, obtidos nos métodos TPC, TFC, TAA, FRAP e RP para os diferentes extratos aquosos das diferentes plantas analisadas.

	<i>A. baetica</i>	<i>C. majus</i>	<i>D. viscosa</i>	<i>L. viridis</i>
TPC (mg GAE/g ps)	118,80 ± 7,36 ^c	76,51 ± 3,84 ^d	477,10 ± 22,29 ^a	282,98 ± 5,37 ^b
TFC (mg QE/g ps)	25,28 ± 0,57 ^a	3,16 ± 1,11 ^d	22,87 ± 1,73 ^b	16,99 ± 0,45 ^c
TFC/TPC (%)	21,28	4,13	4,79	6,00
TAA (mg AAE/g ps)	193,30 ± 5,75 ^c	121,55 ± 5,17 ^d	704,54 ± 26,21 ^a	561,30 ± 36,28 ^b
FRAP (mg TE/g ps)	184,97 ± 4,84 ^c	130,23 ± 2,53 ^d	1132,99 ± 19,54 ^a	785,45 ± 1,11 ^b
RP (mg TE/g ps)	125,93 ± 4,21 ^c	61,86 ± 2,77 ^d	623,35 ± 24,02 ^a	438,89 ± 17,94 ^b

Nota: Todos os resultados são expressos como média ± desvio padrão (n = 3). As diferentes letras na mesma linha para as várias amostras no mesmo método (comparação das amostras no mesmo método) indicam que as amostras tem diferenças estatisticamente significativas (com p <0,05), de acordo com o teste de Levene. *A. baetica* - *Aristolochia baetica* L.; *C. majus* - *Chelidonium majus* L.; *D. viscosa* - *Dittrichia viscosa* L.; *L. viridis* - *Lavandula virilis* L.; TPC - conteúdo fenólico total; TFC - conteúdo de flavonoides total; TAA - atividade antioxidante total; FRAP; RP - potencial redutor; GAE - equivalentes de ácido gálico; QE - equivalentes de quercetina; AAE - equivalentes de ácido ascórbico; TE - equivalentes de Trolox; ps - peso seco; TFC/TPC (%) - percentagem de contribuição do conteúdo de flavonoides total no conteúdo de fenóis totais.

Tabela 12.3. Resultados, expressos em IC₅₀, obtidos nos métodos DPPH, *a-glucosidase* e *a-amilase* para os extratos aquosos e para a Acarbose das diferentes plantas analisadas.

	<i>A. baetica</i>	<i>C. majus</i>	<i>D. viscosa</i>	<i>L. viridis</i>	Acarbose
DPPH (µg/mL)	44,93 ± 3,26 ^b	125,01 ± 8,84 ^a	25,85 ± 0,75 ^d	29,52 ± 0,75 ^c	-
α-gluc (mg/mL)	3,44 ± 0,54 ^a	2,22 ± 0,43 ^b	0,61 ± 0,06 ^d	1,07 ± 0,31 ^c	35,17 ± 3,25
α-amil (mg/mL)	0,33 ± 0,10 ^d	2,52 ± 0,71 ^a	0,38 ± 0,06 ^c	1,47 ± 0,19 ^b	0,26 ± 0,03

Nota: Todos os resultados são expressos em média ± desvio padrão (n = 3). As diferentes letras na mesma linha para as várias amostras no mesmo método (comparação das amostras no mesmo método) indicam que as amostras tem diferenças estatisticamente significativas (com p <0,05), de acordo com o teste de Levene. A.

baetica - *Aristolochia baetica* L.; *C. majus* - *Chelidonium majus* L.; *D. viscosa* - *Dittrichia viscosa* L.; *L. viridis* - *Lavandula virilis* L.; DPPH - atividade de captura de radicais livres; α -gluc - ensaio de inibição da α -glucosidase; α -amil - ensaio de inibição da α -amilase.

12.1. Quantificação dos Compostos Fenólicos

12.1.1. Conteúdo Fenólico Total (TPC) e de Flavonoides Total (TFC)

Tal como já referido, os compostos fenólicos estão associados à atividade biológica dos extratos vegetais, mais concretamente à atividade antioxidante (44,49,117). Assim, o TPC foi o primeiro método realizado na qual se determinou o conteúdo fenólico total das plantas estudadas a partir dos respetivos extratos aquosos usando o reagente Folin-Ciocalteu. Em seguida realizou-se o método TFC na qual se determinou o respetivo conteúdo em flavonoides (polifenóis) totais usando o reagente cloreto de alumínio hexahidratado. Estes constituem uma subclasse do grupo dos fenóis, sendo conhecidos pelas suas propriedades particulares contra o *stress* oxidativo.

Na **Tabela 12.2.** verifica-se a partir dos resultados da análise estatística da variância para os resultados obtidos em ambos os métodos que existem diferenças significativas (com $p < 0,05$) tanto no conteúdo fenólico total como no conteúdo em flavonoides total entre as várias plantas em estudo.

Também de acordo com os resultados apresentados na **Tabela 12.2** verifica-se que no TPC o conteúdo de fenóis total variou entre 76,51 e 477 mg GAE/g ps. Sendo o extrato da planta com maior conteúdo de compostos fenólicos expresso em equivalentes de ácido gálico por grama de ps o da *D. viscosa* ($477,10 \pm 22,29$ mg GAE/g ps), destacando-se este valor das restantes plantas. É também a segunda planta com maior conteúdo de flavonoides total ($22,87 \pm 1,73$ mg QE/g peso seco).

No que diz respeito ao conteúdo de compostos fenólicos seguem-se as plantas com conteúdo decrescente *L. viridis* e *A. baetica*, sendo a *C. majus* a que têm o menor conteúdo ($76,51 \pm 3,84$ mg GAE/g ps).

O extrato da planta *A. baetica* foi o que resultou no maior conteúdo de flavonoides total ($25,28 \pm 0,57$ mg QE/g ps), seguindo-se como referido, por ordem decrescente, a *D. viscosa* e a *L. viridis*, sendo mais uma vez o extrato aquoso da *C. majus* que têm o menor conteúdo ($3,16 \pm 1,11$ mg QE/g ps).

No entanto, através das **Figuras 12.1.1. e 12.1.2** verifica-se que o extrato aquoso da planta *D. viscosa*, é para ambos os métodos o que apresenta o maior concentração dos respetivos compostos expresso em mg de composto por mL de extrato aquoso. Tal

significa que embora esta planta não seja a que apresenta um maior conteúdo em flavonoides total (por g de ps), é a que resulta através da realização da infusão na maior concentração destes compostos no extrato aquoso.

Ao comparar a contribuição do conteúdo de flavonoides no conteúdo fenólico, como se pode ver na **Tabela 12.2.** pela percentagem de contribuição do conteúdo de flavonoides total no conteúdo de fenóis totais, um elevado valor de conteúdo de flavonoides não está necessariamente associado aos maiores valores de compostos fenólicos. Isto evidencia que existem diferentes proporções de outros tipos de compostos fenólicos nos vários extratos aquosos. Assim, os extratos de *D. viscosa*, embora em destaque pelos elevados conteúdos de ambos os compostos apresenta uma contribuição de apenas 4,79% dos compostos de origem flavonoide nos de origem fenólica enquanto os extratos de *A. baetica* se distinguem pelo valor mais elevado de proporção dos compostos flavonoides nos de origem fenólica com uma proporção de 21,28%.

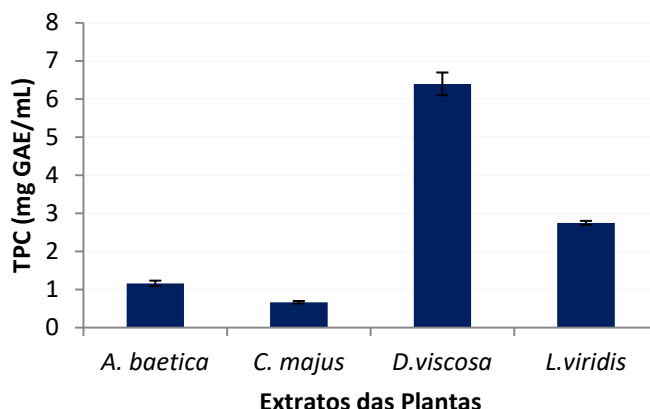


Figura 12.1.1. Representação gráfica do conteúdo fenólico total obtido pelo método TPC, expresso em mg GAE/mL, dos quatro extratos aquosos das plantas estudadas.

Nota: Todos os resultados são expressos na média associada ao respetivo desvio padrão (para n = 3). GAE - equivalentes de ácido gálico; *A. baetica* - *Aristolochia baetica* L.; *C. majus* - *Chelidonium majus* L.; *D. viscosa* - *Dittrichia viscosa* L.; *L. viridis* - *Lavandula virilis* L..

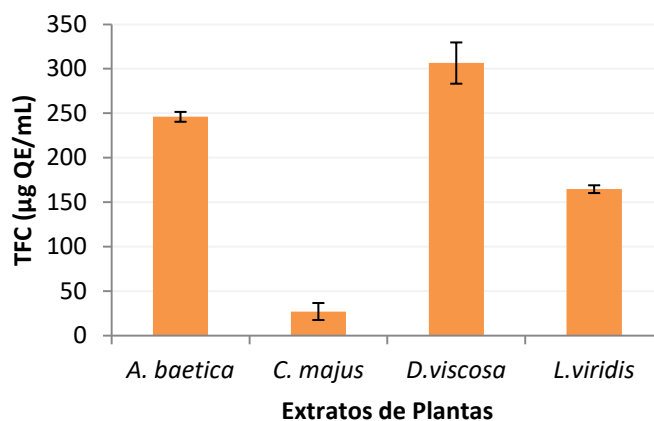


Figura 12.1.2. Representação gráfica do conteúdo em flavonoides total obtido pelo método TFC, expresso em µg QE/mL, dos quatro extratos aquosos das plantas estudadas.

Nota: Todos os resultados são expressos na média associada ao respetivo desvio padrão (para n = 3). QE - equivalentes de quercetina; *A. baetica* - *Aristolochia baetica* L.; *C. majus* - *Chelidonium majus* L.; *D. viscosa* - *Dittrichia viscosa* L.; *L. viridis* - *Lavandula virilis* L..

Uma das limitações na interpretação dos resultados obtidos no método TPC é o facto de este ser um método pouco específico tanto para os fenóis como para os antioxidantes em geral, uma vez que outras substâncias presentes na amostra, designadas de interferentes tais como aminas aromáticas e outros compostos azotados (proteínas), metais como Cu (I) ou Fe (II), elevados níveis de açúcares ou ácido ascórbico, podem reduzir o reagente Folion-Ciocalteau, resultando num falso aumento do conteúdo de fenóis total e assim erradas conclusões nos resultados (além de que a capacidade de resposta pelos compostos fenólicos ao reagente referido depende do número de grupos fenol que estes possuem) (42,47). No entanto, uma vez que se trata de um ensaio simples reproduzível e barato é aceitável para tirar as primeiras informações gerais acerca da atividade antioxidante das várias amostras em estudo (93,101,102).

Dado que estes testes colorimétricos para a determinação dos conteúdos em fenóis e flavonoides totais são pouco específicos e não permitem uma análise qualitativa das amostras, sugere-se que em trabalhos futuros se recorra a uma análise mais exata e sensível como a cromatografia líquida de alta performance acoplada à cromatografia de massa (HPLC-MS), uma vez que esta fornecerá dados que complementam a informação anteriormente obtida dando informação mais precisa e exata sobre a natureza dos diferentes compostos presentes nos extratos analisados e consequentemente quais dos constituintes têm uma maior contribuição para a atividade antioxidante (102). Assim compreender-se-ia melhor a relação entre a estrutura e a atividade dos diferentes compostos nas enzimas (*α-glucosidase* e *α-amilase*) importantes na fisiopatologia da Dm.

É de lembrar que os compostos fenólicos são uma das principais classes de antioxidantes naturais havendo uma relação estreita entre a quantidade destes compostos e a respetiva capacidade antioxidante dos extratos vegetais. Assim, a quantidade de compostos fenólicos presentes no extrato relaciona-se com a respetiva capacidade antioxidante dado que estes têm a capacidade de atuar como agentes redutores, doadores de prótons e captar moléculas oxigénio singlete (43,44,117). No entanto esta relação não é completamente clara pois o conteúdo fenólico total não incorpora todos os antioxidantes, e por outro lado, incorpora outros compostos sem atividade antioxidante. Outro facto, é que a atividade antioxidante não depende apenas da concentração dos antioxidantes em solução mas também das suas estruturas e interação com os seus "substratos" (109).

Assim de acordo com os resultados obtidos nestes dois métodos pode-se inferir que o extrato aquoso de *D. viscosa* têm a maior capacidade antioxidante.

No entanto para que seja possível a comparação da capacidade antioxidante obtida neste trabalho com a obtida por outros autores é necessário que tenham sido usadas condições experimentais equivalentes (temperatura, solvente, técnica de extração, método analítico)(39). Sendo que no caso dos trabalhos publicados sobre as espécies em estudo neste trabalho são raros ou efetuados noutras condições, é difícil fazer uma comparação direta dos resultados. Além disso existirão ainda variações no conteúdo em fenóis (tal como nos outros compostos) em relação a outros estudos devido também a fatores ambientais (exposição solar, chuvas, temperaturas, estado do solo), as condições de crescimento, o período de colheita, condições de secagem, solvente e temperaturas usadas para o processo de extração.

12.2. Avaliação da Capacidade Antioxidante *in vitro*

12.2.1. Atividade Antioxidante Total (TAA), Potencial Antioxidante por redução do Íão Férrico (FRAP) e Potencial Redutor (RP)

As metodologias para a determinação da capacidade antioxidante são múltiplas e baseiam-se em diversos fundamentos detetando diferentes aspetos desta capacidade (como a quantificação da atividade anti-radicalar, quelante de metais de transição ou potencial redutor) permitindo quantificar assim diversos tipos de compostos com atividade antioxidante. Além de que em várias situações um dado método pode estar sujeito a interferências.

Tendo em consideração isso é compreensível a discrepância entre os valores de atividade antioxidante obtidos pelos diferentes métodos para um mesmo extrato dado que resultam de diferentes mecanismos usados. Em função do mecanismo subjacente ao método assim os tipos de compostos analisados. Assim, os diferentes compostos antioxidantes de um extrato contribuem de forma diferente para a atividade antioxidante total em função do método usado.

Neste sentido, a atividade antioxidante dos extratos é dependente não só da composição do próprio extrato, mas também da metodologia seguida. Assim, atualmente estabelece-se a utilização de vários métodos em simultâneo, já que um ensaio para determinar a capacidade antioxidante usado isoladamente não irá refletir exatamente a “capacidade antioxidante total” de uma amostra.

O método do TAA quantifica a capacidade dos compostos presentes no extrato de redução do Molibdénio (VI) a Molibdénio (V) enquanto que o método do FRAP consiste em avaliar a capacidade desses compostos em reduzir o complexo de TPTZ de férrico (Fe^{3+}) a ferroso (Fe^{2+}) bem como no método do RP a redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} em que o ferro se encontra na forma de complexo de ferrocianeto. Todos os métodos funcionam como indicadores da atividade de transferência de eletrões, complementando-se na determinação da atividade antioxidante dos extratos.

Na **Tabela 12.2.** verifica-se a partir dos dados da análise estatística da variância para os resultados obtidos nos três métodos (TAA, FRAP e RP) que existem diferenças significativas (com $p < 0,05$) nas atividades antioxidantes entre as várias plantas em estudo.

Os extratos aquosos de *D. viscosa* destacaram-se entre os restantes por apresentarem os melhores resultados (**Tabela 12.2.**) nos três métodos em questão, em contraste com os resultados obtidos para os restantes extratos. No caso da atividade antioxidante total (TAA) este extrato aquoso apresentou uma elevada capacidade de redução do Mo^{6+} a Mo^{5+} ($704,54 \pm 26,21$ mg AAE/g ps), uma elevada capacidade para reduzir o complexo Fe-TPTZ (III) a Fe-TPTZ (II) no método FRAP ($1132,99 \pm 19,54$ mg TE/g ps) e ainda facilidade para reduzir o ião Fe^{3+} a Fe^{2+} no método do RP ($623,35 \pm 24,02$ mg TE/g ps). Esta elevada atividade antioxidante por mecanismos redutores é também suportada pelo elevado conteúdo de compostos fenólicos determinado no método do TPC, bem como pelas ótimas correlações dos métodos TPC com TAA, FRAP e RP, e entre estes (**Tabela 12.5.1.**), sugerindo que o mecanismo antioxidante dos fenóis será por transferência de eletrões.

É de referir que a presença de compostos antioxidantes como o ácido ascórbico, vitamina E ou carotenoides nos extratos aquosos analisados pode também ser responsável pela promoção desta atividade antioxidante apresentada sobrestimando a atividade dos fenóis.

Ainda que a capacidade de transferência de eletrões (potencial redutor) não seja o único mecanismo da atividade antioxidante, é no presente trabalho um dos estudados, permitindo depreender para já que os extratos aquosos de *D. viscosa* têm potencial interesse como antioxidantes, nomeadamente devido ao seu elevado conteúdo em compostos fenólicos.

Os extratos aquosos de *L. viridis* apresentam-se em seguida na potência antioxidante determinada por estes métodos, tendo apresentando no método do TAA $561,30 \pm 36,28$ mg AAE/g ps, do FRAP $785,45 \pm 1,11$ mg TE/g ps e no RP $438,89 \pm 17,94$ mg TE/g ps, evidenciando uma razoável atividade antioxidante, também suportada por um conteúdo de compostos fenólicos intermédio (**Tabela 12.2**).

Por sua vez, os extratos aquosos de *A. baetica* e *C. majus* apresentam os piores resultados nos métodos em questão, o que era já previsível dados os baixos conteúdos em compostos fenólicos obtidos no método do TPC (**Tabela 12.2**). Os extratos aquosos de *C. majus* foram neste aspeto fracos, apresentando valores de equivalentes de Trolox por g de peso seco em ambos os métodos do FRAP ($130,23 \pm 2,53$) e RP ($61,86 \pm 2,77$) cerca de dez vezes inferiores aos extratos de *D. viscosa*, revelando pelo menos a escassa presença de compostos com potencial de redução do ião férrico em relação aos restantes extratos aquosos analisados.

Assim, a efetividade na atividade antioxidante global, determinada pelos métodos em estudo apresenta-se de forma coerente, seguindo a seguinte ordem decrescente: *D. viscosa* > *L. viridis* > *A. baetica* > *C. majus*.

Na **Figura 12.2.1.1**, verifica-se mais uma vez que o extrato aquoso da planta *D. viscosa* é para os três métodos os que apresenta umas maiores concentrações expressos em mg de composto com atividade redutora por mL de extrato aquoso destacando-se entre estas concentração de equivalentes de Trolox obtida no método FRAP de $15,19 \pm 0,26$ mg/mL o que sugere que esta planta não só têm uma elevada potência antioxidante bem como existe uma elevada eficiência na extração destes compostos em meio aquoso (através da realização da infusão).

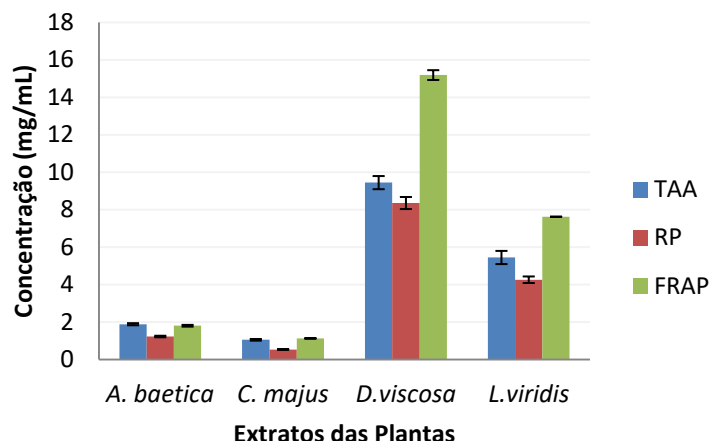


Figura 12.2.1.1. Representação gráfica atividade antioxidante total (TAA) expressa em mg AAE/mL, do potencial antioxidante por redução do íon Férrico (FRAP) e do potencial redutor (RP) expressos em mg TE/mL, dos quatro extratos aquosos das plantas estudadas.

Nota: Todos os resultados são expressos na média associada ao respetivo desvio padrão (para $n = 3$). AAE - equivalentes de ácido ascórbico; TE - equivalentes de Trolox. *A. baetica* - *Aristolochia baetica* L.; *C. majus* - *Chelidonium majus* L.; *D. viscosa* - *Dittrichia viscosa* L.; *L. viridis* - *Lavandula virilis* L.

12.2.2. Atividade de Captura de Radicais Livres (Método do DPPH)

A captura de radicais livres é um dos principais mecanismos de ação dos antioxidantes nos sistemas biológicos (27). No método do DPPH é utilizada a espécie radicalar de azoto 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH \cdot) para medir a potência de captura de radicais livres pelos compostos presentes no extrato.

Assim, quanto menores forem os valores obtidos neste método, maior será a potência de captura de radicais livres, e portanto maior a atividade antioxidante de cada extrato avaliada por este método. A concentração dos extratos aquosos necessária para capturar 50% dos radicais livres DPPH \cdot em solução (IC₅₀), encontra-se na **Tabela 12.3**. Nesta tabela verifica-se a partir dos dados da análise estatística da variância para os resultados obtidos no método do DPPH que existem diferenças significativas (com $p < 0,05$) nas atividades de captura do radical livre DPPH entre *A. baetica*, *C. majus* e *D. viscosa* ou *L. virilis*, mas entre *D. viscosa* e *L. virilis* não, para $p < 0,05$. Estes resultados sugerem um comportamento e potência de captura do radical livre DPPH para *D. viscosa* e *L. virilis* muito semelhante.

Mais uma vez os extratos aquosos de *C. majus* apresenta os piores resultados entre as plantas estudadas com um IC₅₀ de $125,01 \pm 8,84 \mu\text{g/mL}$, valor muito superior ao obtido para as outras espécies, nomeadamente em relação a *D. viscosa* ($25,85 \pm 0,75 \mu\text{g/mL}$) ou

L. virilis ($29,52 \pm 0,75 \mu\text{g/mL}$). Esta fraca potência de captura de radicais livres por parte dos extratos aquosos de *C. majus* sugere fraca capacidade antioxidante, como antioxidantes primários, revelando que estes serão pouco capazes de doar átomos de hidrogénio ao radical tornando-o estável.

Estas inferências também já tinham sido verificadas anteriormente dado o baixo conteúdo em compostos fenólicos no método do TPC, em particular de flavonóides (método do TFC), bem como no ensaio de redução do ião férrico a ferroso (método RP e FRAP). Além disso já, vários estudos mencionaram existir uma relação positiva entre os resultados obtidos no método TPC e a determinação da capacidade antioxidante através de métodos como o do radical DPPH (42,109). Adicionalmente, *C. majus* revelou também ter baixa capacidade de redução do Mo^{6+} a Mo^{5+} no método TAA. Estas conclusões tornam-se válidas dadas as correlações significantes (**Tabela 12.5.1.**) do método DPPH com os restantes métodos referidos (para um nível de $p < 0,01$), em particular do DPPH com o método do TFC ($r = -0,875$), evidenciando que o elevado valor de IC_{50} obtido no DPPH está associado a um baixo valor obtido no método do TFC.

Os extratos aquosos de *D. viscosa* e *L. virilis* posicionam-se mais uma vez com os melhores resultados entre as restantes plantas, o que sugere uma vez mais a sua elevada potência antioxidante entre as plantas estudadas. Esta ilação é suportada pelos elevados valores obtidos nos métodos anteriormente estudados (**Tabela 12.2.**) sugerindo assim conterem compostos com uma boa capacidade antioxidante, como antioxidantes primários, devido à capacidade de doar átomos de hidrogénio ao radical livre tornando-o estável.

Por seu lugar, *A. baetica* posiciona-se numa posição intermédia no que diz respeito à capacidade antioxidante por captura do radical livre DPPH. Os ensaios realizado aos extratos aquosos desta planta resultaram num IC_{50} de $44,93 \pm 3,26 \mu\text{g/mL}$ para a captura do radical DPPH, sugerindo a presença nestes extratos compostos com uma razoável potência antioxidante como antioxidantes primários.

Assim, de acordo com os resultados obtidos neste ensaio para a capacidade de captura de 50% dos radicais livres DPPH· presentes em solução, as plantas estudadas posicionam-se pela seguinte ordem decrescente: *D. viscosa* > *L. viridis* > *A. baetica* > *C. majus*. Esta relação é confirmada também na **Figura 12.2.2.1.** em apresentação gráfica. Os extratos aquosos de *D. viscosa* e *L. viridis* são assim os que apresentam uma maior capacidade de captura de radicais livres para um menor concentração de compostos antioxidantes em solução.

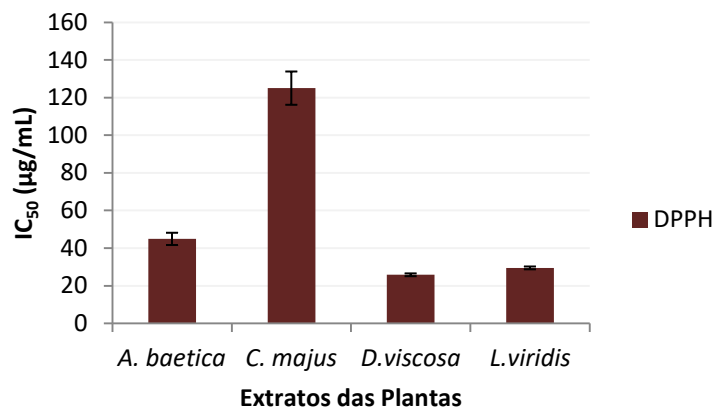


Figura 12.2.2.1. Representação gráfica da atividade de captura de radicais livres avaliada pelo método DPPH expressa em IC₅₀ (µg/mL) dos quatro extratos aquosos das plantas estudadas.

Nota: Todos os resultados são expressos na média associada ao respetivo desvio padrão (para n = 3). *A. baetica* - *Aristolochia baetica* L.; *C. majus* - *Chelidonium majus* L.; *D. viscosa* - *Dittrichia viscosa* L.; *L. viridis* - *Lavandula virilis* L..

12. 3. Avaliação da Atividade Antidiabética *in vitro*

12.3.1. Atividade Inibitória das Enzimas *α*-glucosidase e *α*-amilase

Uma vez que a exposição prolongada a elevados níveis de glicose em circulação após as refeições está associado a efeitos prejudiciais sobre as células e tecidos, podendo nomeadamente causar alterações ao nível das células β pancreáticas, o que contribuí para uma progressiva disfuncionalidade das mesmas, para determinar a potencial atividade antidiabética dos extratos aquosos das plantas em estudo recorreu-se aos ensaios de inibição das enzimas *α*-glucosidase e *α*-amilase.

Nestes métodos os resultados são expressos em IC₅₀, pelo que a menores valores de concentração de composto necessário para inibir a enzima estão associadas melhores atividades inibitórias. A concentração dos extratos aquosos necessária para inibir 50% das enzimas *α*-glucosidase e *α*-amilase presentes em solução (IC₅₀), encontram-se na **Tabela 12.3.1.1.** Nesta tabela verifica-se a partir dos dados da análise estatística da variância para os resultados obtidos no método do ensaio de inibição da *α*-glucosidase que existem diferenças significativas (com p < 0,05) nas atividades inibitórias da enzima entre *A. baetica*, *C. majus* e *D. viscosa* ou *L. virilis*, mas entre *D. viscosa* e *L. virilis* não, para p < 0,05. Estes resultados sugerem uma atividade inibitória de *α*-glucosidase para *D. viscosa* e *L. virilis* muito semelhante.

A mesma análise estatística foi realizada para os resultados obtidos no método do ensaio de inibição da *a-amilase*, constatando-se que existem diferenças significativas (com $p < 0,05$) nas atividades inibitórias da enzima entre *A. baetica*, *C. majus* e *L. virilis*, e entre *D. viscosa*, *C. majus* e *L. virilis*, mas não entre *A. baetica* e *D. viscosa*. O que sugere uma atividade inibitória de *a-amilase* para *A. baetica* e *D. viscosa* muito semelhante.

No que diz respeito à atividade antidiabética os extratos aquosos da planta *A. baetica* destacam-se pela maior atividade inibitória da enzima *a-amilase* ($IC_{50} = 0,33 \pm 0,10$ mg/mL) e pela menor atividade inibitória da enzima *a-glucosidase* ($IC_{50} = 3,44 \pm 0,54$ mg/mL), comportamento semelhante ao obtido para o fármaco padrão acarbose. Os seus extratos aquosos tinham já revelado anteriormente o maior conteúdo de flavonoides (**Tabela 12.1.1.2.**) o que sugere que estes compostos tenham um importante papel na atividade inibitória da enzima *a-amilase*. Tal inferência é também suportada pela muito forte correlação ($r = -0,918$) existente entre os métodos TFC e ensaio de inibição da *a-amilase* (**Tabela 12.5.1.**).

Por seu turno, os extratos aquosos da planta *D. viscosa* destacam-se pela maior atividade inibitória da enzima *a-glucosidase* e pela segunda maior atividade inibitória da enzima *a-amilase* com valores de IC_{50} em mg/mL de $0,61 \pm 0,06$ e $0,38 \pm 0,06$, respetivamente, entre as plantas estudadas. No entanto, no que diz respeito à atividade antidiabética por inibição das enzimas em estudo, esta é maior pela inibição da enzima *a-amilase*, dado o IC_{50} inferior. Dado que os extratos aquosos desta planta foram os que apresentaram os melhores resultados nos métodos de avaliação da capacidade antioxidante, TAA, FRAP e RP bem como DPPH, os resultados sugerem que os compostos com elevada capacidade antioxidante têm também boa atividade inibitória das enzimas, nomeadamente da *a-glucosidase*. Além disso, os extratos desta planta apresentaram também o maior conteúdo em compostos fenólicos relativamente aos restantes extratos estudados. Tais inferências são suportadas pelas fortes correlações ($r > |0,8|$) entre o ensaio de inibição da enzima *a-glucosidase* e os métodos referidos (**Tabela 12.5.1.**). A segunda maior atividade inibitória da enzima *a-amilase*, parece dever-se ao seu também elevado conteúdo em flavonoides (método TFC). Esta ilação é suportada pela muito forte correlação existente entre os métodos TFC e ensaio de inibição da *a-amilase*, como visto anteriormente.

Em relação aos extratos aquosos de *L. viridis*, verificam-se atividades antidiabéticas por inibição das enzimas *a-glucosidase* e *a-amilase* razoáveis, com valores de IC_{50} em mg/mL de $1,07 \pm 0,31$ e $1,47 \pm 0,19$, respectivamente. Assim esta planta posiciona-se numa posição intermédia em relação às outras estudadas, no que concerne ao seu potencial

antidiabético. No entanto, no que diz respeito à atividade antidiabética por inibição das enzimas em estudo, esta é maior pela inibição da enzima *α-glucosidase*. A mesma posição teve a planta no que diz respeito a conteúdo em compostos fenólicos (TPC) bem como na capacidade antioxidante (TAA, FRAP, RP e DPPH), sugerindo o contributo dos compostos fenólicos também na atividade antidiabética.

Por fim, os extratos aquosos de *C. majus* revelam mais uma vez uma fraca atividade, neste caso antidiabética, o que se pode justificar pelo seu baixo teor em compostos fenólicos. Apresentou valores de IC₅₀ em mg/mL de $2,22 \pm 0,43$ e $2,52 \pm 0,71$, para as enzimas *α-glucosidase* e *α-amilase*, respectivamente, revelando possuir compostos mais potentes em inibir a enzima *α-glucosidase*. Ainda assim os extratos aquosos desta planta revelaram-se mais potentes que os extratos aquosos das folhas de *Morinda lucida*, planta medicinal usada na África Ocidental no tratamento da Diabetes que em estudos semelhantes revelou valores de IC₅₀ de 2,00 e 2,30 mg/mL para a *α-glucosidase* e *α-amilase*, respectivamente (118).

Perante os resultados obtidos verifica-se que os extratos aquosos de *D. viscosa* e *L. viridis* são mais efetivos na inibição da enzima da *α-glucosidase*, dados os seus menores valores de IC₅₀ para esta enzima. Por outro lado, os extratos aquosos de *A. baetica* e *D. viscosa* são mais potentes a inibir a enzima da *α-amilase*.

Os extratos das plantas estudadas apresentam-se pela seguinte ordem decrescente de potência para inibir a *α-glucosidase*: *D. viscosa* > *L. viridis* > *C. majus* > *A. baetica*. E para a inibir a *α-amilase*: *A. baetica* > *D. viscosa* > *L. viridis* > *C. majus*. Na **Figura 12.3.1.1**, este posicionamento é apresentado graficamente.

Foi ainda testada a Acarbose, fármaco modelo, em ambas enzimas tendo-se verificado que a enzima *α-amilase* é bastante mais sensível, *in vitro*, a este fármaco do que a enzima *α-glucosidase*, tendo em conta os valores de IC₅₀ obtidos para cada uma das enzimas respetivamente, $0,26 \pm 0,03$ e $35,17 \pm 3,25$ mg/mL. A Acarbose revelou-se no presente trabalho um inibidor menos eficaz na inibição da enzima *α-glucosidase* em relação à *α-amilase*, o que vai de encontro ao já descrito por Shai, *et al* (119).

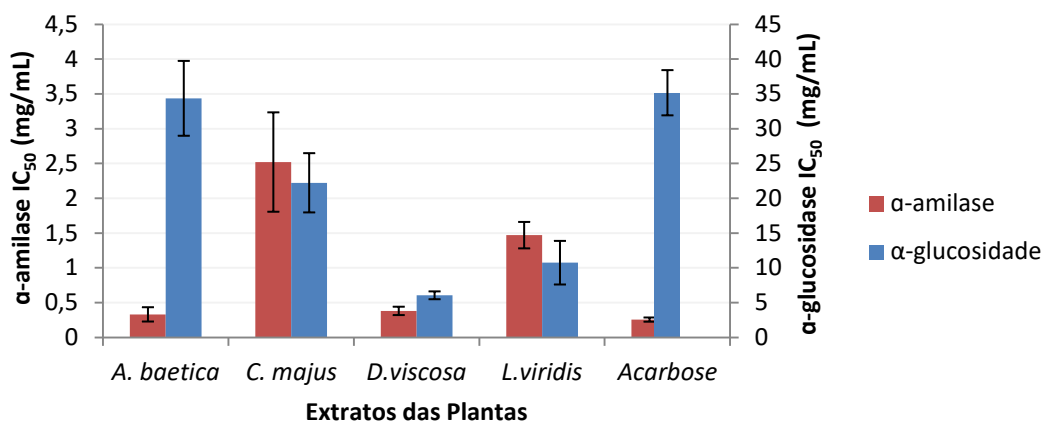


Figura 12.3.1.1. Representação gráfica da atividade de inibitória das enzimas α -glucosidase e α -amilase expressa em IC₅₀ (μg/mL) dos quatro extratos aquosos das plantas estudadas.

Nota: Todos os resultados são expressos na média associada ao respetivo desvio padrão (para n = 3). A variável dependente referente ao ensaio de inibição da α -amilase encontra-se no eixo vertical da esquerda e o referente ao da α -glucosidase está no eixo vertical direito. *A. baetica* - *Aristolochia baetica* L.; *C. majus* - *Chelidonium majus* L.; *D. viscosa* - *Dittrichia viscosa* L.; *L. viridis* - *Lavandula virilis* L..

Acrescenta-se ainda o facto dos extratos de todas as plantas estudadas serem mais potentes que a Acarbose na inibição da atividade da enzima α -glucosidase e por outro lado menos potentes na inibição da atividade enzimática de α -amilase. Num estudo realizado em 2014 por Gharreb, *et al* (34) também os extratos aquosos das plantas estudadas mostraram ter uma atividade inibitória da α -glucosidase mais potente que o controlo positivo Acarbose. Neste estudo o IC₅₀ da Acarbose é de 765 mg/mL, enquanto que os valores dos extratos estudados variam de 10,5 a 14 mg/mL. Estes resultados reforçam os resultados obtidos na presente dissertação de que os compostos constituintes dos extratos aquosos das plantas têm uma elevada potencia antidiabética, superior à do controlo positivo Acarbose.

No presente trabalho, os extratos aquosos estudados revelaram uma inibição mais potente da enzima α -amilase do que de α -glucosidase, dado os menores valores de IC₅₀ contra α -amilase. Este comportamento, no entanto não é vantajoso pois está documentado que uma forte inibição da enzima α -glucosidase e pouca inibição de α -amilase tem a vantagem de apresentar menos efeitos adversos em relação aos decorrentes da excessiva inibição de α -amilase, pois esta resulta numa fermentação bacteriana anormal dos hidratos de carbono não digeridos no cólon resultando em maior desconforto abdominal (114,120).

De acordo com os resultados obtidos e acima descritos, confirma-se assim a informação presente na literatura, referida por Gharreb, *et al* (34) e Td Bothon, *et al* (59)

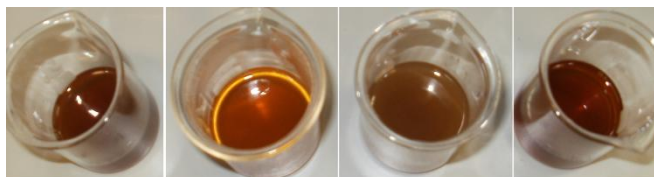
de que os compostos fenólicos demonstram capacidade de inibir a atividade de diversas enzimas digestivas responsáveis pela hidrólise e absorção dos hidratos de carbono a nível do estomago e intestino, dadas as suas capacidades para se ligarem a estas enzimas. Também Kim, *et al* (121) já tinha documentado que os compostos fenólicos, nomeadamente os flavonoides, se revelam como potentes inibidores das enzimas α -glucosidase e α -amilase.

Um outro trabalho realizado por Moradi-Afrapoli, *et al* (52) em 2012, no qual estudou as atividades antioxidantes e antidiabéticas de extratos metanólicos das partes aéreas de *Polygonum hyrcanicum*, revelou uma potente atividade inibitória da enzima α -glucosidase bem como uma excelente atividade antioxidante determinada pelos ensaios do FRAP e DPPH. Além disso, neste trabalho foram isolados e caracterizados os compostos ativos presentes, revelando uma grande proporção de flavonoides presentes, o que mais uma vez vem corroborar as ilações colocadas no presente trabalho, do papel que estes compostos podem ter como agentes antidiabéticos.

Noutro trabalho, realizado por Gao, *et al* em 2013, verificou-se que este grupo de compostos naturais, os polifenóis, também presentes no conhecido chá verde inibem a atividade das enzimas α -glucosidase e α -amilase bem como potenciam o papel da insulina no organismo.

12.4. Análise Colorimétrica

Neste ensaio de análise da cor dos vários extratos aquosos das plantas em estudo pretendeu-se perceber se a proporção de uma das cores (amarelo, vermelho e azul) está diretamente relacionada com a atividade antioxidante ou antidiabética dos extratos. Na **Figura 12.4.1.** apresenta-se o aspeto visual dos extratos aquosos de cada uma das plantas estudadas, todas diluídas 1,43 vezes em relação à concentração inicial. E na **Tabela 12.4.1.** apresenta-se os resultados para a intensidade da cor (InC) e para as proporções das cores amarelo, vermelho e azul igualmente para os extratos aquosos das diferentes plantas estudadas.



Nota: Na ordem, da esquerda para a direita, *A. baetica*, *C. majus*, *D. viscosa* e *L. viridis*.

Figura 12.4.1. Aspeto visual dos extratos aquosos das quatro plantas estudadas.

Tabela 12.4.1. - Resultados para a intensidade da cor, expressos em absorvência e para as proporções das cores amarelo, vermelho e azul, expressos em % de cor para os extratos aquosos das diferentes plantas estudadas.

	<i>A. baetica</i>	<i>C. majus</i>	<i>D. viscosa</i>	<i>L. viridis</i>
InC	2,451 ± 0,012 ^a	1,706 ± 0,010 ^b	1,414 ± 0,016 ^c	1,933 ± 0,001 ^d
% amarelo	47,19 ± 1,50 ^a	62,59 ± 1,50 ^b	69,02 ± 0,41 ^c	57,01 ± 0,96 ^d
% vermelho	30,09 ± 0,21 ^a	23,07 ± 0,44 ^b	19,85 ± 0,14 ^c	26,85 ± 0,15 ^d
% azul	22,72 ± 1,29 ^a	14,34 ± 1,08 ^b	11,13 ± 0,29 ^c	16,14 ± 0,81 ^d

Nota: Todas as amostras foram diluídas para o mesmo fator de diluição. Todos os resultados são expressos em média ± desvio padrão (n = 3). A intensidade da cor (InC) foi calculada pela soma das absorvências aos três comprimentos de onda: amarelo (420 nm), vermelho (520 nm) e azul (620 nm). A proporção de cada (%) cor foi determinada pelo produto das respetivas absorvências por 100 e dividida por InC. As diferentes letras para as várias amostras na mesma cor (comparação das amostras no mesmo para a mesma cor) indicam que as amostras tem diferenças estatisticamente significativas (com p < 0,05), de acordo com o teste de Levene. *A. baetica* - *Aristolochia baetica* L.; *C. majus* - *Chelidonium majus* L.; *D. viscosa* - *Dittrichia viscosa* L.; *L. viridis* - *Lavandula virilis* L.

A InC dos extratos aquosos permite verificar se os compostos com absorvências nos comprimentos de onda correspondentes ao amarelo, vermelho ou azul estão mais ou menos presentes. Desta forma, quanto mais elevada for a InC, maior a quantidade de compostos que absorvem a estes comprimentos de onda, nomeadamente alguns compostos fenólicos.

Na **Tabela 12.4.1.** verifica-se a partir dos dados da análise estatística da variância para os resultados obtidos para a InC e as proporções de cada cor que existem diferenças significativas (com p < 0,05) entre as várias plantas em estudo.

Verifica-se que o extrato aquoso com menor InC é o correspondente à planta *D. viscosa* (1,414 ± 0,016), planta esta que parece apresentar a maior concentração de compostos por mL de extrato (13,40 mg/mL) bem como a maior eficácia de extração (16,75%) (**Tabela 12.1.**). Apresenta também um maior conteúdo de compostos fenólicos e atividade antioxidante assim como a uma maior atividade antidiabética, tal como visto anteriormente. Uma das hipóteses para este facto poderá ser explicada por estes compostos com elevada atividade antioxidante e antidiabética presentes neste extrato aquoso não absorverem significativamente aos comprimentos de onda em análise. Esta planta, por outro lado, é a que apresenta uma maior proporção de cor amarela (69,02 ± 0,41%) no seu extrato aquoso em relação aos extratos das restantes plantas estudadas, o que sugere que os

compostos que absorvem ao comprimento de onda de 420 nm, nos quais se incluem alguns flavonoides, poderão ser responsáveis pela atividade antioxidante e antidiabética, tal como referido por Peixoto Sobrinho *et al* (122). Por outro lado apresenta as menores proporções de cor vermelho ($19,85 \pm 0,14\%$) e azul ($11,13 \pm 0,29\%$) em relação aos restantes extratos estudados.

Verifica-se ainda que para todas as plantas, a maior proporção de cor dos extratos é para o amarelo, pelo que em todas as plantas estudadas poderá haver uma significativa proporção de flavonoides. Tal se comprova também pela cor amarelo-acastanhada dos vários extratos aquosos (**Figura 12.4.1.**).

Os extratos aquosos com maior InC são os correspondentes às plantas *A. baetica* ($2,451 \pm 0,012$) e *L. viridis* ($1,933 \pm 0,001$) (**Tabela 12.4.1.**), ainda que estas plantas não se destaquem pela atividade antioxidante em relação à planta *D. viscosa*, o seu potencial é também bastante elevado. Este aspeto é também verificado através da análise visual dos extratos aquosos (**Figura 12.4.1.**) nos quais estas duas plantas apresentam uma cor mais escura. São também estas duas plantas que têm a maior proporção da cor vermelha ($30,09 \pm 0,21\%$ e $26,85 \pm 0,15\%$, respetivamente) e azul ($22,72 \pm 1,29\%$ e $16,14 \pm 0,81\%$, respetivamente), sendo no entanto as plantas que apresentam uma menor proporção de cor amarela ($47,19 \pm 1,50\%$ e $57,01 \pm 0,96\%$, respetivamente).

Por sua vez, os extratos aquosos de *C. majus* uma elevada proporção de cor amarelo ($62,59 \pm 1,50\%$) e baixas de cor vermelha ($23,07 \pm 0,44\%$) e azul ($14,34 \pm 1,08\%$), o que se assemelha aos resultados obtido para *D. viscosa*, sugerindo uma boa proporção de compostos flavonoides entre os constituintes extraídos pelo extrato aquoso. No entanto, verificou-se anteriormente que contrariamente a *D. viscosa*, esta planta era fraca no que diz respeito à atividade antioxidante e antidiabética, apresentando também um baixo conteúdo em compostos fenólicos e flavonoides em relação às restantes plantas estudadas, evidenciando assim que esta planta relativamente às restantes é a mais fraca, mas que no seu todo poderá apresentar algum potencial antioxidante. Usando o seu extrato aquoso será necessário uma maior concentração dos compostos presentes em relação aos restantes extratos para uma atividade semelhante, pois esta é também a planta que apresentou uma menor concentração de compostos por mL de extrato ($8,63 \text{ mg/mL}$) bem como menor eficácia de extração ($10,8\%$).

Assim se verifica que, no seu todo a InC é pouco condicionante da atividade antidiabética e antioxidante pois esta engloba a absorção de radiação por diversas classes de compostos presentes no extrato que absorvem aos três comprimentos de onda em estudo

correspondentes ao amarelo (420 nm), vermelho (520 nm) e azul (620 nm). No entanto, a proporção da cor amarelo para cada planta é um bom indicador do seu potencial absoluto de atividade antidiabética e antioxidante, dado que a este comprimento de onda (420 nm) muitos compostos flavonoides apresentam a sua absorção máxima.

As antocianinas absorvem particularmente na gama 450–560 nm pelo que provavelmente são um dos tipos de compostos flavonoides responsáveis pela proporção de cor vermelha/azul entre os diversos extratos estudados (123).

12.5. Coeficientes de correlação linear de Pearson (r)

A Correlação de Pearson é um método estatístico e paramétrico que permite verificar a existência e avaliar a intensidade de uma relação linear entre as variáveis quantitativas contínuas, ou seja, como estas variam em conjunto (124,125).

O valor do coeficiente varia de -1 a 1, sendo que o seu sinal (positivo ou negativo) indica o sentido da relação entre as duas variáveis (correlação positiva ou negativa), e a magnitude do seu valor indica a intensidade da relação linear entre as duas variáveis, podendo ser muito forte ($|r| > 0,9$), forte ($0,9 > |r| > 0,7$), moderada ($0,7 > |r| > 0,5$) ou fraca ($0,5 > |r| > 0,3$). Assim: se o coeficiente tiver um valor de 0 ($r=0$) não existe relação linear entre as duas variáveis, e quanto mais próximo de 1 for o seu valor absoluto, mais intensa é a relação linear entre as duas variáveis; se o coeficiente de correlação entre duas variáveis for positivo ($r > 0$) estas variam no mesmo sentido (ou seja, valores elevados de uma variável estão associados a valores elevados da outra variável; valores baixos de uma variável estão associados a valores baixos da outra variável); se o coeficiente for negativo ($r < 0$), as variáveis variam em sentido inverso (valores elevados de uma variável estão associados a valores baixos da outra variável), como é o caso quando se correlacionam métodos em que os resultados se expressam em concentração de equivalentes de um dado composto (TPC, TPC, TFC, TAA, FRAP ou RP) com métodos em que os resultados se expressam em IC_{50} (DPPH ou ensaios enzimáticos) (124,125).

Aplicou-se o teste de Pearson para avaliar a correlação entre os resultados obtidos pelos vários métodos estudados, TPC, TPC, TFC, TAA, FRAP, RP, DPPH, ensaio de inibição da *α-glucosidase* e da *α-amilase*, determinação das proporções de cor amarelo, vermelho e azul e determinação da InC, sendo que os resultados se encontram na **Tabela 12.5.1.**

Tabela 12.5.1. - Matriz de correlação (coeficientes de correlação de Pearson - r) dos resultados obtidos através dos diferentes métodos estudados.

	TPC	TFC	TAA	FRAP	RP	DPPH	α -gluc	α -amil	Am	V	Az	InC
TPC	1	0,483	0,965**	0,984**	0,985**	-0,713**	-0,811**	-0,489	0,615*	-0,591*	-0,623*	-0,622*
TFC		1	0,463	0,429	0,475	-0,875**	0,020	-0,918**	-0,325	0,292	0,347	0,336
TAA			1	0,992**	0,990**	-0,765**	-0,836**	-0,421	0,524	-0,470	-0,561	-0,546
FRAP				1	0,997**	-0,717**	-0,860**	-0,407	0,603*	-0,556	-0,631*	-0,619*
RP					1	-0,751**	-0,833**	-0,442	0,562	-0,517	-0,591*	-0,578*
DPPH						1	0,380	0,798**	0,103	-0,136	-0,071	-0,092
α -gluc							1	0,047	-0,758**	0,693*	0,798**	0,798**
α -amil								1	0,213	-0,162	-0,254	-0,231
Am									1	-0,987**	-0,989**	-0,991**
V										1	0,952**	0,980**
Az											1	0,978**
InC												1

* A correlação é significativa para um nível de $p < 0,05$ (bilateral).

** A correlação é bastante significativa para um nível de $p < 0,01$ (bilateral).

TPC - conteúdo fenólico total; TFC - conteúdo de flavonoides total; TAA - atividade antioxidante total; FRAP; RP - potencial redutor; DPPH - atividade de captura de radicais livres; α -gluc - ensaio de inibição da *a-glucosidase*; α -amil - ensaio de inibição da *a-amilase*; Am, V e Az - proporções em % das cores amarelo (420 nm), vermelho (520 nm) e azul (620 nm) nos extratos aquosos; InC - intensidade da cor.

Analisando a matriz de correlação obtida (**Tabela 12.5.1.**) as correlações muito fortes ($|r| > 0,9$), todas bastante significativas para um nível de $p < 0,01$, ocorrem entre os métodos: TPC e TAA, FRAP, RP; TFC e α -amilase; TAA e FRAP, RP; FRAP e RP. Da mesma intensidade de força, para um nível de $p < 0,01$, são as correlações entre as proporções de cores amarelo, vermelho e azul dos extratos.

Já as correlações fortes ($0,9 > |r| > 0,7$), todas bastante significativas para um nível de $p < 0,01$, ocorrem entre os métodos: TPC e DPPH, *a-glucosidase*; TFC e DPPH; TAA e DPPH, *a-glucosidase*; FRAP e RP, *a-glucosidase*; RP e DPPH, *a-glucosidase*; DPPH com todos os métodos à exceção da *a-glucosidase*; *a-glucosidase* e TAA, InC, proporção de vermelho, azul.

Por fim as correlações moderadas ($0,7 > |r| > 0,5$), significativas para um nível de $p < 0,05$, ocorrem entre os métodos: TPC com InC e proporções de amarelo, vermelho, azul; FRAP com InC e proporções de amarelo, azul; RP com InC e proporção de azul; *a-glucosidase* e proporção de vermelho.

Avaliando a correlação entre a atividade antioxidante (determinada pelos vários métodos) e o conteúdo fenólico total, verificou-se a existência de correlação bastante significativa e muito forte entre os resultados de atividade antioxidante obtidos pelos diferentes métodos (TAA, FRAP e RP) e destes com o TPC. O que sugere que os compostos fenólicos são importantes para atividade antioxidante dos extratos aquosos estudados, podendo ser indicadores do potencial antioxidante da planta, no entanto é de lembrar que apesar destes compostos serem os antioxidantes mais potentes e comuns nas plantas, poderá existir também a contribuição de outros compostos não fenólicos para a atividade antioxidante dos extratos (91). No entanto, ao contrário do esperado, dado que os compostos flavonoides são um tipo específico de fenóis, os resultados do método TFC não têm uma correlação significativa com estes métodos referidos anteriormente.

Além disso, de acordo com a matriz de correlação verifica-se também a ausência de correlação positiva significativa entre os métodos TPC e TFC o que pode explicar mais uma vez as diferenças na contribuição do conteúdo de flavonoides na composição fenólica entre os vários extratos aquosos das plantas estudadas (**Tabela 12.2.**).

Já entre o DPPH e os métodos TPC ($r = -0,713$) e TFC ($r = -0,875$) existem correlações apenas fortes ($p < 0,01$), o que ainda assim sugere que os compostos fenólicos em particular os flavonoides têm uma boa capacidade de captura de radicais livres. Semelhantes correlações ocorrem entre o método DPPH e os métodos TAA ($r = -0,765$), FRAP ($r = -0,717$) e RP ($r = -0,751$) o que indica que uma boa atividade antioxidante está igualmente associada a uma boa capacidade de captura de radicais livres. É de referir que o valor do r da correlação do método DPPH com qualquer um dos métodos anteriores têm sinal negativo dado que um maior teor de compostos antioxidantes nas amostras implicam no método DPPH uma menor concentração da amostra para a captura de 50% dos radicais (DPPH).

No que diz respeito aos métodos enzimáticos, o ensaio de inibição da *a-glucosidase* apresenta correlações bastante significativas e fortes, de sinal negativo, com os métodos do TPC, TAA, FRAP e RP. Ou seja, um maior conteúdo de compostos fenólicos e uma maior atividade antioxidante dos compostos está associada à necessidade de uma menor concentração de composto para inibir a enzima *a-glucosidase* (menor IC_{50}), revelando-se assim potentes inibidores da enzima. Estes resultados permitem deduzir que compostos com boa atividade antioxidante serão potenciais inibidores da enzima *a-glucosidase*, pelo que futuramente poderá se retirar conclusões acerca da inibição da enzima *a-glucosidase* e

respetiva atividade antidiabética a partir dos resultados obtidos através de métodos não enzimáticos que são mais económicos e simples.

O facto de não existir correlação significativa entre os ensaios de inibição da *α-glucosidase* e da *α-amilase*, sugere que os compostos responsáveis pela inibição de uma enzima são distintos dos que inibem a outra. De acordo com as correlações obtidas parece que os compostos fenólicos, com elevado poder antioxidante são os principais responsáveis pela inibição da enzima *α-glucosidase* (correlações fortes e significativas para $p < 0,01$) enquanto que os flavonoides são compostos com boa atividade inibitória da *α-amilase* ($r = -0,918$, para $p < 0,01$), sendo que um maior conteúdo destes compostos implicam a necessidade de uma menor quantidade de compostos para inibir a enzima (menor IC_{50}), revelando estes terem baixo poder antioxidante através dos métodos estudados, à exceção de por captura de radicais livres (DPPH). Este facto, permite prever, mais uma vez, ao realizar o teste do TFC (mais económico e simples) qual será a atividade dos compostos perante a enzima *α-amilase*.

As fortes e significativas correlações entre TPC e os métodos TAA, FRAP e RP deve-se principalmente ao fato destes estarem baseados em mecanismos de ação semelhantes, ou seja, na transferência de eletrões.

Por outro lado, uma boa correlação entre o TFC e o DPPH ($r = -0,875$) permite inferir que os flavonoides manifestam as suas propriedades antioxidantes pelo seu potencial de captura ou redução do radical.

No que diz respeito à correlação do ensaio de inibição da *α-glucosidase* com as proporções de cor verificam-se correlações fortes e bastante significativas ($p < 0,01$) com: a proporção de cor amarelo ($r = -0,758$) o que sugere que basta uma baixa quantidade dos compostos responsáveis por absorver na zona do amarelo, para haver uma boa capacidade de inibir a enzima *α-glucosidase*; com a cor azul ($r = 0,758$), sugerindo que os compostos que absorvem na zona da cor azul são fracos na inibição desta enzima.

Verificou-se a existência de correlações significativas e muito fortes da InC com os resultados das proporções de cor ($p < 0,01$), sendo que a proporção de cor azul apresenta uma correlação positiva ($r = 0,978$), no entanto uma maior proporção de cor amarela têm com a InC uma correlação negativa ($r = -0,991$), possivelmente pelo facto dos compostos que absorvem na zona do amarelo, terem pouco contributo na intensidade da cor, sendo que as plantas mais ricas nestes componentes apresentam extratos mais claros (**Figura 12.4.1.**). Além disso plantas com InC baixa, como é o caso de *D. viscosa* apresenta a maior atividade de inibição da *α-glucosidase*, como se verificou anteriormente, o que é suportado

pelo valor do coeficiente de correlação bastante significativo ($p < 0,01$) de 0,798 entre InC e ensaio *a-glucosidase* (menor intensidade de cor corresponde a menor valor de IC_{50} da enzima).

Além disso, a correlação entre proporção de cor amarela com as proporções de cor azul e vermelha têm também correlações bastante significativas (-0,989 e -0,987, respetivamente, para $p < 0,01$) o que indica que extratos com compostos responsáveis pela absorvência na zona da cor amarelo têm fraca absorvência na zona das cores azul e vermelho.

13. Conclusões

Uma vez que plantas têm mostrado benefícios para a saúde bem como no tratamento de doenças, dada a sua composição em compostos com propriedades biológicas, por exemplo no metabolismo dos hidratos de carbono, e por outro têm tradicionalmente sido usadas de forma empírica por diversas populações, este trabalho pretendeu estudar *in vitro* a potencial capacidade antioxidante e atividade antidiabética de extratos aquosos de quatro espécies de plantas típicas da região do Algarve.

Para concretizar este objetivo, no presente trabalho foi avaliado o potencial terapêutico de extratos realizados num solvente aquoso, facilitando a retirada de conclusões relativamente credíveis para as práticas da medicina tradicional dado que os compostos extraídos e quantificados serão equivalentes aos que serão extraídos através da realização de infusões caseiras. Ainda que a extração dos compostos ativos usando água a baixa temperatura seja a situação ideal, pois evita a degradação de possíveis compostos presentes que poderem ser sensíveis à água em ebulição ou aos solventes orgânicos. Por outro lado existe a desvantagem de consoante o solvente usado na realização do extrato, assim os diferentes compostos extraídos pelos diferentes solventes e portanto os resultados para cada planta, uma vez em função da polaridade do solvente assim os diferentes compostos extraídos, e no presente estudo foi apenas utilizada a água como solvente.

O conhecimento de espécies com potencial no tratamento ou prevenção da *Dm* é importante dado que virá permitir o potencial desenvolvimento e a formulação de produtos farmacêuticos como é o caso dos suplementos alimentares que poderão ser usados como coadjuvantes da terapêutica farmacológica antidiabética em complemento com um estilo de vida saudável com vista a manter a doença controlada, ou prevenir o seu desenvolvimento bem como poderão ser um complemento à toma de fármacos. Esta

associação à terapêutica farmacológica resultaria em melhores resultados terapêuticos bem como permitiria a redução de doses de fármacos, reduzindo assim também a sua toxicidade e os seus efeitos secundários. Resultando assim num melhor controlo da doença e uma melhor qualidade de vida para o doente.

Embora no presente trabalho tenha sido estudado o potencial antioxidante e antidiabético dos extratos aquosos da 4 plantas, outros estudos deverão ser realizados, nomeadamente estudos mais avançados onde se estabeleçam ensaios *in vivo* para confirmar a segurança e benefícios do uso destes extratos na *Dm* e otimizar o uso específico de antioxidantes em doenças associadas ao *stress* oxidativo (29).

Neste sentido, este trabalho pretendeu estudar de forma sucinta e simples potenciais atividades antioxidante e antidiabética *in vitro* de 4 espécies de plantas colhidas na região do Algarve e já utilizadas de diversas formas pela população em geral.

Assim, de forma geral, verificou-se que das plantas estudadas, os extratos aquosos de *D. viscosa* foram os que apresentaram uma melhor atividade antioxidante ($1132,99 \pm 19,54$ mg TE/g ps no FRAP, $623,35 \pm 24,02$ mg TE/g ps no método RP e um valor de IC_{50} de $25,85 \pm 0,75$ µg/mL no método DPPH) o que pode ser explicado pelos mais elevados valores de conteúdo em compostos fenólicos totais obtidos ($477,10 \pm 22,29$ mg GAE/g ps) bem como dos mais elevados em flavonoides totais ($22,87 \pm 1,73$ mg QE/g ps). Foram também os extratos aquosos desta planta que revelaram a melhor atividade inibitória no ensaio de inibição da *α-glucosidase* (IC_{50} de $0,61 \pm 0,06$ mg/mL), revelando ser mais potente que o controlo positivo de acarbose que apresentou um IC_{50} de $35,17 \pm 3,25$ mg/mL.

Os extratos aquosos de *A. baetica*, por sua vez, revelaram a melhor atividade inibitória, entre os extratos estudados, no ensaio de inibição da *α-amilase* (IC_{50} de $0,33 \pm 0,10$ mg/mL), no entanto não superaram a atividade obtida para o controlo positivo acarbose (IC_{50} de $0,26 \pm 0,03$ mg/mL).

Relativamente aos extratos aquosos de *C. majus* este foi o que apresentou a pior atividade antioxidante, pois resultou nos valores mais baixos tanto no método TPC ($76,51 \pm 3,84$ mg GAE/g ps), bem como no TFC ($3,16 \pm 1,11$ mg QE/ps) e nos métodos analisados respeitantes à atividade antioxidante ($121,55 \pm 5,17$ mg AAE/g ps no TAA; $130,23 \pm 2,53^b$ mg TE/g ps no FRAP; $61,86 \pm 2,77$ mg TE/g ps no método RP e um valor de IC_{50} de $125,01 \pm 8,84$ µg/mL no método DPPH). Em relação à atividade antidiabética revelou-se também a pior planta no ensaio de inibição da enzima *α-amilase* com um valor de IC_{50} de $2,52 \pm 0,71$ mg/mL.

Dado a elevada correlação obtida tanto entre o conteúdo em fenólicos totais e a atividade inibitória da *α-glucosidase* ($r = -0,811$) e entre a atividade antioxidante e a inibitória da *α-glucosidase* ($r = -0,836$ no método TAA, $r = -0,860$ no FRAP e $r = -0,833$ no RP), sugere-se que os compostos fenólicos tenham uma relevante contribuição antioxidante e antidiabética na prevenção e terapêutica da *Dm*.

Em estudos futuros adicionais será ainda importante determinar a sua composição analítica e caracterizar os compostos presentes nos extratos, realizando se possível o isolamento dos compostos ativos de interesse. Posteriormente seriam também úteis testes *in vivo* dos respetivos compostos ativos.

14. Referências Bibliográficas

1. Lakhtakia R. The History of Diabetes Mellitus. Sultan Qaboos Univ Med J. 2013;13(3):368–70.
2. Polonsky KS. The Past 200 Years in Diabetes The Role of the Pancreas and the Discovery of Insulin. N Engl J Med. 2012;1436714(4):1332–40.
3. Ahmed AM. History of Diabetes Mellitus. Saudi Med J. 2002;23(4):373–8.
4. Papadakis MA, McPhee SJ. Current Medical Diagnosis & Treatment. 52^a edition. The McGraw-Hill Companies I, editor. United States; 2013. 1192-1207.
5. Fauci A, Kasper D, Braunwald E, Hauser S, Longo D, Jameson J, et al. Harrison's Manual of Medicine. 17 th Edit. The McGraw-Hill Companies, editor. United States; 2009. 942-945.
6. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care. 2010;33(1).
7. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol. 2007;39(1):44–84.
8. Kangralkar VA, Patil SD, Bandivadekar RM. Oxidative stress and Diabetes: a review. Int J Pharm Appl. 2010;1(1):38–45.
9. Joshi SR, Parikh RM, Das AK. Insulin History , Biochemistry , Physiology and Pharmacology. 2007;55(December 1921):19–25.
10. Lambadiari V, Triantafyllou K, Dimitriadis GD. Insulin action in muscle and adipose tissue in type 2 diabetes: The significance of blood flow. World J Diabetes. 2015;6(4):626–33.
11. International Diabetes Federation (IDF). IDF Diabetes Atlas, 7th edition - Key messages [Internet]. IDF Diabetes Atlas, 7th edition - Key messages. 2017 [citado 25 de Março de 2017]. Obtido de: <http://www.diabetesatlas.org/key-messages.html>
12. WHO | Diabetes [Internet]. World Health Organization; 2017 [citado 25 de Março de 2017]. Obtido de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>
13. Sminkey L. WHO | Diabetes country profiles 2016 [Internet]. Portugal profile. World Health Organization; 2016 [citado 25 de Março de 2017]. Obtido de: <http://www.who.int/diabetes/country-profiles/en/#P>
14. Ozougwu JC, Obimba KC, Belonwu, Unakalamba. Journal of Physiology and Pathophysiology The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. 2013;4(4):46–57.
15. Tangvarasittichai S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. World J Diabetes. 2015;6 (3):456–80.
16. Basha B, Samuel SM, Triggler CR, Ding H. Endothelial Dysfunction in Diabetes Mellitus: Possible Involvement of Endoplasmic Reticulum Stress? Hindawi Publ Corp Exp Diabetes Res. 2012; 1–14.
17. Bajaj S, Khan A. Antioxidants and diabetes. Indian J Endocrinol Metab. Medknow

Publications; Dezembro de 2012;16(Suppl 2):S267-71.

18. Brutsaert E. Diabetes Mellitus (DM) - Endocrine and Metabolic Disorders - Merck Manuals Professional Edition [Internet]. 2017 [citado 11 de Março de 2017]. Obtido de: <http://www.merckmanuals.com/professional/endocrine-and-metabolic-disorders/diabetes-mellitus-and-disorders-of-carbohydrate-metabolism/diabetes-mellitus-dm>
19. Norma da Direção-Geral da Saúde [Internet]. Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus. 2011 [citado 25 de Março de 2017]. Obtido de: <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0022011-de-14012011.aspx>
20. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care* . 2016;39(1):13–22.
21. Alberti KGMM, Aschner P, Assal JP, Bennet PH, Groop L. Sociedade Portuguesa de Diabetologia [Internet]. Definição, Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus. 2015 [citado 25 de Março de 2017]. Obtido de: <http://www.spd.pt/index.php/grupos-de-estudo-mainmenu-30/classificacao-da-diabetes-mellitus-mainmenu-175>
22. Sociedade Portuguesa de Diabetologia [Internet]. Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes - Edição de 2016. 2016 [citado 25 de Março de 2017]. Obtido de: <http://www.spd.pt/images/bolsas/dfn2015.pdf>
23. Singh S, Singh RP. Methods of Assay of Antioxidants: An Overview. *Food Rev Int*. 2008;24(4):392–415.
24. Uttara B, Singh A V, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Curr Neuropharmacol*. 2009;7:65–74.
25. Ullah A, Khan A, Khan I. Diabetes mellitus and oxidative stress - A concise review. *Saudi Pharm J*. 2016;24:547–53.
26. Shalaby EA, Shanab SMM. Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. *African J Pharm Pharmacol*. 2013;7(10):528–39.
27. Tohma HS, Gulçin I. Antioxidant and Radical Scavenging Activity of Aerial Parts and Roots of Turkish Liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.). *Int J Food Prop*. 2010;13(4):657–71.
28. Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. 2002;80:780–7.
29. Boots AW, Haenen GRMM, Bast A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol*. 2008;585:325–37.
30. Bashan N, Kovsan J, Kachko I. Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. *Physiol Rev*. 2009;89:27–71.
31. Erejuwa OO. Oxidative Stress in Diabetes Mellitus: Is There a Role for Hypoglycemic Drugs and/or Antioxidants? *Oxidative Stress Dis*. 2012; [citado a 13 de fevereiro de 2017]. Obtido de: <http://www.intechopen.com/books/oxidative-stress-and-diseases/oxidative-stress-in-diabetes-mellitus-is-there-a-role-for-hypoglycemic-drugs-and-or-antioxidants>

32. Halliwell B. Update on Reactive Species and Antioxidants Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiol.* 2006;141:312–22.
33. Moussa SA. Oxidative Stress in Diabetes mellitus. *Rom J Biophys.* 2008;18(3):225–36.
34. 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.* Taylor & Francis; 2014;28(6):1155–64.
35. Mehta JL, Rasouli N, Sinha AK, Molavi B. Oxidative stress in diabetes: A mechanistic overview of its effects on atherogenesis and myocardial dysfunction. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38:794–803.
36. Ceriello A, Motz E. Is Oxidative Stress the Pathogenic Mechanism Underlying The Common Soil Hypothesis Revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:816–23.
37. Wright Jr. E, Scism-Bacon JL, Glass LC. Oxidative stress in type 2 diabetes: the role of fasting and postprandial glycemia. *Int J Clin Pr.* 2006;60(3):308–14.
38. Halliwell B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol.* 1995;49(10):1341–8.
39. Terpin P, Ceh B, Ulrih NP, Abramovič H. Studies of the correlation between antioxidant properties and the total phenolic content of different oil cake extracts. *Ind Crop Prod.* 2012;39:210–7.
40. Angelo PM, Jorge N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2006;66(1):1–9.
41. Lordêlo M, Silva C, Silva Costa R, Dos A, Santana S, Gabriela M, et al. Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity in plant products. *Semin Ciências Agrárias.* 2010;31(3):669–82.
42. Ndhala A, Moyo M, Staden J. Natural Antioxidants: Fascinating or Mythical Biomolecules? *Molecules.* 2010;15:6905–6930;
43. Roby MHH, Sarhan MA, Selim KAH, Khalel KI. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvicalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana officia* L.) extracts. *Ind Crops Prod.* 2013;43(1):827–31.
44. Lizcano LJ, Bakkali F, Begoña Ruiz-Larrea M, Ruiz-Sanz I. Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use. *Food Chem.* 2009;119:1566–70.
45. Matough FA, Budin SB, Hamid ZA, Alwahaibi N, Mohamed J. The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic complications. *Sultan Qaboos Univ Med J. Sultan Qaboos University; Fevereiro de 2012;12(1):5–18.*
46. Montonen J, Knekt P, Järvinen R, Reunanen A. Dietary Antioxidant Intake and Risk of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care.* 2004;27(2):362–6.
47. Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N.

- Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.* 2006;97(4):654–60.
48. Pereira RP, Fachinetto R, De Souza Prestes A, Puntel RL, Santos Da Silva GN, Heinzmann BM, et al. Antioxidant effects of different extracts from melissa officinalis, matricaria recutita and cymbopogon citratus. *Neurochem Res.* 2009;34(5):973–83.
 49. Silva EM, Souza JNS, Rogez H, Rees JF, Larondelle Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chem.* 2006;101(3):1012–8.
 50. Dewick PM. *Medicinal Natural Products - A Biosynthetic Approach*. 3^a. John Wiley & Sons Ltd, editor. United Kingdom; 2009. 166-171 p.
 51. Roberto Guedes da Silva Almeida J, Guilherme Sousa de Sá P, Leite Guimarães A, Paula de Oliveira A, Alves de Siqueira Filho J, Paviotti Fontana A, et al. Fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de Selaginella convoluta (Arn.) Spring (Selaginellaceae). *Rev Ciências Farm Básica e Apl J Basic Appl Pharm Sci.* 2012;33(4):561–6.
 52. Moradi-Afrapoli F, Asghari B, Saeidnia S, Ajani Y, Mirjani M, Malmir M, et al. In vitro α -glucosidase inhibitory activity of phenolic constituents from aerial parts of Polygonum hyrcanicum. *J Pharm Sci.* 2012;20(37).
 53. Telagari M, Hullatti K. In-vitro α -amylase and α -glucosidase inhibitory activity of Adiantum caudatum Linn. and Celosia argentea Linn. extracts and fractions. *Indian J Pharmacol. Medknow Publications;* 2015;47(4):425–9.
 54. Matsui T, Tanaka T, Tamura S, Toshima A, Tamaya K, Miyata Y, et al. r-Glucosidase Inhibitory Profile of Catechins and Theaflavins. *J Agric Food Chem.* 2007;55:99–105.
 55. Bhutkar MA, Bhise SB. In vitro assay of alfa amilase inhibitory activity of some indigenous plants. 2012;10(1):457–62.
 56. Conforti F, Statti G, Loizzo MR, Sacchetti G, Poli F, Menichini F. In Vitro antioxidant effect and inhibition of alpha-amylase of two varieties of Amaranthus caudatus seeds. *Biol Pharm Bull.* 2005;28(6):1098–102.
 57. Sancheti S, Sancheti S, Seo SY. Antidiabetic and antiacetylcholinesterase effects of ethyl acetate fraction of Chaenomeles sinensis (Thouin) Koehne fruits in streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp Toxicol Pathol.* 2013;65(1–2):55–60.
 58. Infarmed IP. Resumo das Características do Medicamento - Acarbose [Internet]. 2008 [citado 12 de Junho de 2017]. Obtido de: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=44725&tipo_doc=rcm
 59. Td Bothon F, Debiton E, Avlessi F, Forestier C, Teulade J-C, Sohounhloue DK. In vitro biological effects of two anti-diabetic medicinal plants used in Benin as folk medicine. 2013; 13(51).
 60. Roque, Odete Rodrigues Cunha AP da. *Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia*. Fundação Calouste Gulbenkian, editor. Avenida de Berna, Lisboa; 2012.
 61. Cunha AP da. *Plantas na Terapêutica, Farmacologia e Ensaio Clínicos*. Fundação

- Calouste Gulbenkian, editor. Lisboa; 2010.
62. Ekor M, Pistelli L. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Front Pharmacol.* 2014;4(177).
 63. George P. Concerns regarding the safety and toxicity of medicinal plants -An overview. *J Appl Pharm Sci.* 1(2011):40–4.
 64. *Aristolochia baetica* Linnaeus [Internet]. *NaturData - Biodiversidade Online.* 2011 [citado 16 de Junho de 2016]. Obtido de: <http://naturdata.com/Aristolochia-baetica-17321.htm>
 65. Roque, Odete Rodrigues Cunha AP da. *Plantas Medicinais da Farmacopeia Portuguesa.* Fundação Calouste Gulbenkian, editor. Avenida de Berna, Lisboa; 2011.
 66. Chaouki W, Leger DY, Eljastimi J, Beneytout J-L, Hmamouchi M, Chaouki W. Antiproliferative effect of extracts from *Aristolochia baetica* and *Origanum compactum* on human breast cancer cell line MCF-7. *Pharm Biol.* 2010;48(3):269–74.
 67. Kuo P-C, Li Y-C, Wu T-S. Chemical Constituents and Pharmacology of the *Aristolochia* (mădōu ling) species. *J Tradit Complement Med.* 2011; 2(4):249-66.
 68. Isorna JAF. *Flora Medicinal y Aromática.* Sevilla.
 69. Pinto JR, Pernes S. *Flora do Algarve - Serra do Caldeirão e Algarve.* Universidade do Algarve, editor. Faro; 2010.
 70. Afonso M da LR. *Plantas do Algarve.* Serviço Nacional de Parques R e C da N, editor. Lisboa; 1991.
 71. Portal do Jardim Botânico da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. *Chelidonium majus* [Internet]. [citado 15 de Junho de 2016]. Obtido de: http://jb.utad.pt/especie/chelidonium_majus
 72. UTAD (Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro) - Jardim Botânico. *Inula viscosa* [Internet]. [citado 16 de Junho de 2016]. Obtido de: http://jb.utad.pt/especie/inula_viscosa.
 73. Parolin P, Scotta MI, Bresch C. Biology of *Dittrichia viscosa*, a Mediterranean ruderal plant: a review. *Rev Int Botânica Exp.* 2014;83:251–62.
 74. Espécie *Lavandula viridis* [Internet]. *Biodiversidade a seus pés.* [citado 16 de Junho de 2016]. Obtido de: <http://almargem.org/biodiv/especie/lavandula-viridis/>.
 75. Costa P, Grevenstuk T, Rosa da Costa AM, Gonçalves S, Romano A. Antioxidant and anti-cholinesterase activities of *Lavandula viridis* L'Hér extracts after in vitro gastrointestinal digestion. *Ind Crops Prod.* 2014;55:83–9.
 76. Infarmed. *Farmacopeia Portuguesa IX.* Infarmed IP-Autoridade Nacional do Medicamento e outros Produtos de Saúde, editor. 2008.
 77. Bhattacharjee, N., Biswas SJ, Khuda-Bukhsh AR. Efficacy of a plant extract (*Chelidonium majus* L.) in combating induced hepatocarcinogenesis in mice. *Chem Toxicol.* 46:1474–1487.
 78. García VP, Valdés F, Ayala JH. Biosynthesis of Antitumoral and Bactericidal

- Sanguinarine. *J Biomed Biotechnol.* 2006.
79. Cho K-M, Yoo I-D, Kim W-G. 8-Hydroxydihydrochelerythrine and 8-Hydroxydihydrosanguinarine with a Potent Acetylcholinesterase Inhibitory Activity from *Chelidonium majus* L. *Biol Pharm Bull.* 2006;29:2317–20.
 80. Havelek R, Seifrtova M, Kralovec K, Krocova E, Tejkalova V, Novotny I, et al. Comparative cytotoxicity of chelidonine and homochelidonine, the dimethoxy analogues isolated from *Chelidonium majus* L. (Papaveraceae), against human leukemic and lung carcinoma cells. *Phytomedicine.* Março de 2016;23(3):253–66.
 81. Nadova S, Miadokova E, Alfoldiova L, Kopaskova M, Hasplova K, Hudecova A, et al. Potential antioxidant activity, cytotoxic and apoptosis-inducing effects of *Chelidonium majus* L. extract on leukemia cells. *Neuroendocrinol Lett.* 2008;29(5):649–652.
 82. Kim S-H, Hong J, Lee Y-C. Chelidonine, a principal isoquinoline alkaloid of *Chelidonium majus*, attenuates eosinophilic airway inflammation by suppressing IL-4 and eotaxin-2 expression in asthmatic mice. *Pharmacol Reports.* Dezembro de 2015;67(6):1168–77.
 83. Al-Qudah M, A-Jaber HI, Mayyas A, Sultan TA-O, Zarga MHA. Chemical compositions of essential oil from the Jordanian Medicinal plant *Dittrichia viscosa*. *Jordan J Chem.* 2010;5(4):343–8.
 84. Calderón-Komáromy A. Allergic Contact Dermatitis Due to *Dittrichia viscosa*. *Actas Dermosifiliogr.* 2016;107:76–8.
 85. Nica Zuzarte M, Gonç MJ, Cavaleiro C, Canhoto J, Vale-Silva L, João O Silva M, et al. Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lavandula viridis* L'Hér.
 86. Matos F, Miguel MG, Duarte J, Venâncio F. Antioxidant Capacity of the Essential Oils From *Lavandula luisieri*, *L. stoechas* subsp. *lusitanica*, *L. stoechas* subsp. *lusitanica* x *L. luisieri* and *L. viridis* Grown in Algarve (Portugal). *J Essent Oil Res.* 2009;21:327–36.
 87. Tepe B, Eminagaoglu O, Akpulat HA, Aydin E. Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia verticillata* (L.) subsp. *verticillata* and *S. verticillata* (L.) subsp. *amasiaca* (Freyn & Bornm.) Bornm. *Food Chem.* 2007;985–9.
 88. Moreno S, Scheyer T, Romano CS, Vojnov AA, Adri &, Vojnov NA. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. 2017;
 89. Ono K, Li L, Takamura Y, Yoshiike Y, Zhu L, Han F, et al. Phenolic compounds prevent amyloid β -protein oligomerization and synaptic dysfunction by site-specific binding. *J Biol Chem.* American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 27 de Abril de 2012;287(18):14631–43.
 90. Scheckel KA, Degner SC, Romagnolo DF. Rosmarinic Acid Antagonizes Activator Protein-1–Dependent Activation of Cyclooxygenase-2 Expression in Human Cancer and Nonmalignant Cell Lines. *J Nutr Nutr Dis.* 2008;138:2098–2105.
 91. Gonçalves S, Gomes D, Costa P, Romano A. The phenolic content and antioxidant

- activity of infusions from Mediterranean medicinal plants. *Ind Crops Prod.* 2013;43:465–71.
92. 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):529–38.
 93. Ainsworth EA, Gillespie KM. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nat Protoc.* 2007;2(4):875–7.
 94. Quettier-Deleu C, Gressier B, Vasseur J, Dine T, Brunet C, Luyckx M, et al. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *J Ethnopharmacol.* 2000;72(1):35–42.
 95. Kelebek, Hasim; Canbas,Ahmet; Selli S. Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of blood orange juices obtained from cvs. Moro and Sanguinello (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) grown in Turkey. *Food Chem.* 2008;107:1710–1716.
 96. Burin VM, Falcão LD, Gonzaga LV, Fett R, Rosier JP, Terezinha Bordignon-Luiz M. Colour, phenolic content and antioxidant activity of grape juice. *Cienc e Tecnol Aliment.* 2009;6(3971).
 97. 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. Academic Press;* Maio de 1999;269(2):337–41.
 98. Benzie IFF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol.* 1998;299:15–27.
 99. 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):669–75.
 100. Liang N, Kitts DD. Antioxidant Property of Coffee Components: Assessment of Methods that Define Mechanisms of Action. *Molecules.* 2014;19:19180–208.
 101. Amorati R, Valgimigli L. Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. *Free Radic Res.* 2015;49(5):633–49.
 102. Alvarez-Suarez JM, Tulipani S, Romandini S, Vidal A, Battino M. Methodological Aspects about Determination of Phenolic Compounds and In Vitro Evaluation of Antioxidant Capacity in the Honey: A Review. *Curr Anal Chem.* 2009;5:293–302.
 103. Oyaizu M. Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese J Nutr Diet.* 1986;44(6):307–15.
 104. Cheng Z, Li Y. Reducing power: the measure of antioxidant activities of reductant compounds? *Redox Rep. Taylor & Francis;* 19 de Agosto de 2004;9(4):213–7.
 105. Ferreira ICFR, Baptista P, Vilas-Boas M, Barros L. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chem.* 2007;100:1511–6.

106. Gülçin İ, Huyut Z, Elmastaş M, Aboul-Enein HY. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arab J Chem*. 2010;3(1):43–53.
107. Yen G-C, Duh P-D, Chuang D-Y. Antioxidant activity of anthraquinones and anthrone. *Food Chem*. 2000;70(4):437–41.
108. Shekhar TC, Anju G. Antioxidant Activity by DPPH Radical Scavenging Method of *Ageratum conyzoides* Linn. Leaves. *Am J Ethnomedicine*. 2014;1(4):244–9.
109. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Jorn of Agric and Food Chem*. 2005; 53:4290-4302.
110. Li H, Song F, Xing J, Tsao R, Liu Z, Liu S. Screening and structural characterization of alpha-glucosidase inhibitors from hawthorn leaf flavonoids extract by ultrafiltration LC-DAD-MS(n) and SORI-CID FTICR MS. *J Am Soc Mass Spectrom*. Agosto de 2009;20(8):1496–503.
111. Kumar D, Kumar H, Vedasiromoni JR, Pal BC. Bio-assay Guided Isolation of α -Glucosidase Inhibitory Constituents from *Hibiscus Mutabilis* Leaves. *Phytochem Anal*. Setembro de 2012;23(5):421–5.
112. Moradi-Afrapoli F, Asghari B, Saeidnia S, Ajani Y, Mirjani M, Malmir M, et al. In vitro α -glucosidase inhibitory activity of phenolic constituents from aerial parts of *Polygonum hyrcanicum*. *DARU J Pharm Sci*. BioMed Central; 2012;20(1):37.
113. Anastasia, Wheni Indrianingsih, Tachibana S, Dewi RT, Itoh K. Antioxidant and α -glucosidase inhibitor activities of natural compounds isolated from *Quercus gilva* Blume leaves. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2015;9:748–55.
114. Kim K-T, Rioux L-E, Turgeon SL. Alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibition is differentially modulated by fucoidan obtained from *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry*. 2014;98:27–33.
115. Hair JF, Black WC, Babin, Barry J.; Anderson RE. *Multivariate Data Analysis - A Global Perspective*. 7^o. Education P, editor. 2010. 473 p.
116. Guimarães, Rui Campos Cabral JAS. *Estatística - Edição Revista*. McGraw-Hill, editor. Lisboa; 1997. 427-429 p.
117. Wu C-R, Lin W-H, Hseu Y-C, Lien J-C, Lin Y-T, Kuo T-P, et al. Evaluation of the antioxidant activity of five endemic *Ligustrum* species leaves from Taiwan flora in vitro. *Food Chem*. 2011;127:564–71.
118. Kazeem MI, Adamson JO, Ogunwande IA. Modes of inhibition of α -amylase and α -glucosidase by aqueous extract of *Morinda lucida* Benth leaf. *Biomed Res Int*. Hindawi; 24 de Dezembro de 2013;2013:527570.
119. Shai LJ, Masoko P, Mokgoyho MP, Magano SR, Mogale AM, Boaduo N, et al. Yeast alpha glucosidase inhibitory and antioxidant activities of six medicinal plants collected in Phalaborwa, South Africa. *South African J Bot*. 2010;76:465–470.
120. Kwon Y-I, Apostolidis E, Shetty K. Inhibitory potential of wine and tea against α -amylase and α -glucosidase for management of hyperglycemia linked to type 2 diabetes. *J Food Biochem*. 2006;32(1):15–31.
121. Kim J-S, Kwon C-S, Son KH. Inhibition of Alpha-glucosidase and Amylase by

- Luteolin, a Flavonoid. Biosci Biotechnol Biochem. Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry; 22 de Janeiro de 2000;64(11):2458–61.
122. Peixoto Sobrinho TJ da S, Silva CHTP da, Nascimento JE do, Monteiro JM, Albuquerque UP de, Amorim ELC de. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonóides de Bauhinia cheilantha (Bongard) Steudel. Rev Bras Ciências Farm. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas; Dezembro de 2008;44(4):683–9.
 123. Kumar S, Pandey AK, Lu KP, Sastre J. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. Sci World J. Hindawi Publishing Corporation; 2013;16.
 124. Norman, Geoffrey R. Streiner DL. Biostatistics - The Bare Essentials. 3^a. Shelton, EUA: People's Medical Publishing House; 2008. 136-138 p.
 125. Bethea RM, Duran BS, Boullion TL. Statistical Methods for Engineers and Scientists. Marcel Dekker, editor. New York; 1995. 363-370 p.