

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

ESTUDO DE PLANTAS SILVESTRES COMESTÍVEIS DA REGIÃO MEDITERRÂNICA COMO FONTES DE COMPOSTOS BIOATIVOS

Elsa Cristina da Silva Moreira

Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Trabalho efetuado sob a orientação da:
Professora Doutora Anabela Romano
E co-orientação: Doutora Sandra Gonçalves

Faro
2015

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

ESTUDO DE PLANTAS SILVESTRES COMESTÍVEIS DA REGIÃO MEDITERRÂNICA COMO FONTES DE COMPOSTOS BIOATIVOS

Elsa Cristina da Silva Moreira

Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Trabalho efetuado sob a orientação da:
Professora Doutora Anabela Romano
E co-orientação: Doutora Sandra Gonçalves

Faro
2015

O documento apresentado é da inteira responsabilidade da autora

Agradecimentos

À Professora Doutora Anabela Romano, orientadora desta dissertação, o meu reconhecido agradecimento por me ter dado a oportunidade e todas as condições necessárias para que este trabalho fosse realizado. Sem ela nada teria sido possível.

À Doutora Sandra Gonçalves, coorientadora desta dissertação, agradeço pelo total apoio, disponibilidade, amabilidade, críticas construtivas e a sua entrega total a este trabalho. A sua ajuda foi, sem dúvida crucial, para que todo o trabalho fosse feito com sucesso.

Agradeço às Professoras Doutoradas Paula Andrade e Patrícia Valentão, do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, pela oportunidade única de enriquecer o meu trabalho com a análise do perfil fenólico das plantas estudadas nesta trabalho.

À Doutora Clara Grosso, do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, pela disponibilidade e fundamental ajuda na análise do perfil fenólico das plantas estudadas através de HPLC.

Agradeço à Professora Doutora Emília Costa, do Centro de Investigação Marinha e Ambiental da Universidade do Algarve, pela utilização do liofilizador que foi imprescindível para obtenção dos extratos aquosos estudados neste trabalho.

Aos melhores pais do mundo pela confiança, motivação, apoio, melhor educação, e principalmente pela determinação e garra que me transmitiram para conseguir o melhor de mim, sem dúvida que eles são a força que há em mim.

À minha colega de laboratório Joana pelo companheirismo, incentivo e entreaajuda nos momentos difíceis ao longo deste período.

À Cristina Ferraz, pelo carinho e disponibilidade.

Por fim, mas não menos importante, ao Tiago pelo suporte, carinho e estabilidade que me deu durante este tempo todo.

E, sem dúvida, à minha estrela mais brilhante, Renato, pela luz nos dias mais difíceis.

“A grande conquista é resultado de pequenas vitórias que passam despercebidas.”

Paulo Coelho

Abreviaturas

ABTS	2,2-Azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
A β	β -amilóide
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butilhidroxitolueno
ChEs	Colinesterases
DA	Doença de Alzheimer
Dm	Diabetes <i>mellitus</i>
Dmt1	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
Dmt2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DP	Doença de Parkinson
DPPH	2,2-Difenil-1-picril-hidrazila
DTNB	Ácido 5-5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)
EAA	Equivalentes de ácido ascórbico
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EQ	Equivalentes de quercetina
ET	Equivalentes de trolox
F-C	Folin-Ciocalteu
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta pressão com detetores de matriz de díodos
IATC	Iodeto de acetiltiocolina
IC ₅₀	Concentração mínima necessária para inibir 50%
L-DOPA	3,4-Di-hidroxi-L-fenilalanina
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Espécies reativas de oxigénio)
TEAC	<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
α -APP	α -Amilase pancreática de porco
α -GL	α -Glucosidase de levedura

Resumo

Atualmente as plantas silvestres comestíveis são muito procuradas com o intuito de introduzir novos sabores e texturas na alimentação, particularmente na gastronomia *gourmet*. Os benefícios para a saúde, decorrentes dos elevados níveis de compostos bioativos presentes nestas plantas, são um adicional motivo de interesse. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de extratos de dez espécies silvestres comestíveis (*Beta maritima* L., *Calendula arvensis* L., *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *nepeta*, *Helichrysum italicum* subsp. *picardii* (Boiss. & Reuter) Franco, *Mentha spicata* L., *Origanum vulgare* subsp. *virens* (Hoffmanns. & Link) Bonnier & Layens, *Oxalis pes-caprae* L., *Plantago major* L. subsp. *major*, *Scolymus hispanicus* L. e *Urtica dioica* L.) como fontes de antioxidantes e inibidores de enzimas relevantes para o tratamento da diabetes *mellitus* tipo 2, doença de Alzheimer e de Parkinson. A capacidade antioxidante de extratos aquosos e metanólicos foi avaliada pelos métodos 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), *trolox equivalents antioxidant capacity* (TEAC) e *ferric reducing antioxidant power* (FRAP), e o teor em fenóis e flavonoides totais pelos métodos Folin-Ciocalteu e $AlCl_3$, respectivamente. De um modo geral, os melhores resultados foram obtidos nos extratos metanólicos de *O. vulgare* e *M. spicata* sendo possível relacionar o teor em fenóis com a atividade antioxidante. Os extratos metanólicos foram também submetidos a outros testes, avaliação da capacidade de inibição dos enzimas α -amilase (α -APP), α -glucosidase (α -GL), acetilcolinesterase (AChE) e tirosinase e identificação dos compostos fenólicos por HPLC-DAD. *H. italicum* e *M. spicata* revelaram interesse terapêutico dado que mostraram elevada capacidade inibitória da AChE e α -GL, e capacidade inibitória moderada da α -APP. Já *O. vulgare* foi a espécie com maior potencial inibitório da tirosinase. Os ácidos clorogénico e rosmarínico, e rutina foram os compostos fenólicos mais comuns e abundantes nas espécies estudadas. Em suma, as plantas estudadas para além do seu valor nutricional revelaram-se fontes interessantes de composto bioativos.

Palavras-chave: antioxidantes, Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson, Diabetes *mellitus* tipo 2, enzimas, extratos vegetais, plantas silvestres comestíveis

Abstract

Nowadays the revival of the consumption of wild plants is closely linked with their health-promoting properties related with the high levels of bioactive compounds. The objective of this study was to evaluate the potential of extracts from ten wild edible plants (*Beta maritima* L., *Calendula arvensis* L., *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *nepeta*, *Helichrysum italicum* subsp. *picardii* (Boiss. & Reuter) Franco, *Mentha spicata* L., *Origanum vulgare* subsp. *virens* (Hoffmanns. & Link) Bonnier & Layens, *Oxalis pes-caprae* L., *Plantago major* L. subsp. *major*, *Scolymus hispanicus* L. and *Urtica dioica* L.) as relevant sources of antioxidants and inhibitors of enzymes linked with several diseases, like type 2 diabetes (Dmt2), Alzheimer's (AD) and Parkinson's disease. The antioxidant capacity of methanol and aqueous extracts was evaluated using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), *trolox equivalents antioxidant capacity* (TEAC) and *ferric reducing antioxidant power* (FRAP) methods and the total phenolics and flavonoids contents were determined by Folin-Ciocalteu and AlCl₃ assays, respectively. Overall, the best results were obtained by the methanol extracts of *O. vulgare* and *M. spicata* being possible to relate the high content of phenols with the antioxidant activity. The methanol extracts were also subjected to other tests, evaluation of the inhibition ability of the enzymes α -amylase (α -APP), α -glucosidase (α -GL), acetylcholinesterase (AChE) and tyrosinase, and identification of phenolic compounds by HPLC-DAD. Results showed that *H. italicum* and *M. spicata* species are the most promising for the therapeutic control of AD and Dmt2 since showed high inhibitory capacity of AChE and α -GL and moderate inhibitory capacity of α -APP. On the other hand, *O. vulgare* was the species with higher capacity to inhibit tyrosinase activity. The chlorogenic and rosmarinic acid and rutin were the most common and abundant phenolic compounds in the species studied. The results obtained showed that the wild plants studied are important sources of bioactive compounds.

Keywords: Antioxidants, Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, type 2 Diabete *mellitus*, Enzymes, Plant extracts, Wild edible plants.

Índice Geral

1	Introdução.....	1
1.1	Plantas silvestres comestíveis.....	1
1.1.1	Plantas estudadas.....	2
1.2	Antioxidantes.....	9
1.3	Doenças e stress oxidativo.....	11
1.3.1	Doenças neurodegenerativas.....	11
1.3.2	Diabetes <i>mellitus</i> (<i>Dm</i>).....	13
1.4	Objetivos.....	15
2	Materiais e Métodos.....	17
2.1	Preparação do material vegetal.....	17
2.2	Preparação dos extratos.....	17
2.3	Quantificação dos fenóis totais pelo método Folin-Ciocalteu (F-C).....	17
2.4	Quantificação dos flavonoides totais pelo método de cloreto de alumínio (AlCl ₃).....	18
2.5	Composição fenólica por cromatografia líquida de alta pressão com detetores de matriz de díodo (HPLC-DAD).....	18
2.6	Avaliação da capacidade antioxidante.....	19
2.6.1	Método do 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH).....	19
2.6.2	Método <i>Trolox Equivalents Antioxidant Capacity</i> (TEAC).....	20
2.6.3	Método <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> (FRAP).....	20
2.7	Inibição da α -glucosidase de levedura (α -GL).....	21
2.8	Inibição da α -Amilase Pancreática de Porco (α -APP).....	21
2.9	Inibição da acetilcolinesterase (AChE).....	22
2.10	Inibição da tirosinase.....	23
2.11	Análise estatística.....	23
3	Resultados e Discussão.....	24
3.1	Quantificação de compostos fenólicos.....	24
3.2	Avaliação da capacidade antioxidante.....	33
3.3	Inibição <i>in vitro</i> dos enzimas α -amilase e α -glucosidase.....	41
3.4	Inibição <i>in vitro</i> do enzima AChE.....	43
3.5	Inibição <i>in vitro</i> do enzima tirosinase.....	45
4	Conclusão e Perspetivas Futuras.....	48
5	Referências Bibliográficas.....	51

Índice de Figuras

- Figura 1.** Aspeto geral das espécies em estudo no seu habitat natural. Autores das fotografias: *B. maritima*, *C. arvensis*, *C. nepeta*, *O. pes-caprae*, *P. major* e *U. dioica* – A. Romano; *M. spicata*, *H. italicum* e *S. hispanicus* – T. Grevenstuk.4
- Figura 2.** Quantificação do teor em fenóis totais nos extratos metanólicos e aquosos de diferentes espécies pelo método F-C. Os valores representam a média \pm erro padrão das 3 repetições. No mesmo gráfico, valores seguidos de letras diferentes representam médias significativamente diferentes de acordo com o teste de Duncan ($P < 0,05$). Para cada espécie, valores assinalados com um asterisco (*) representam a média significativamente superior relativamente à comparação entre solventes.25
- Figura 3.** Quantificação do teor em flavonoides nos extratos metanólicos de diferentes espécies pelo método $AlCl_3$. Os valores representam a média \pm erro padrão das 3 repetições. No mesmo gráfico, valores seguidos de letras diferentes representam médias significativamente diferentes de acordo com o teste de Duncan ($P < 0,05$).27
- Figura 4.** Estrutura de ácidos hidroxicinâmicos: ácido clorogénico (**8**) e ácido rosmarínico (**21**).
.....28
- Figura 5.** Cromatograma obtido por HPLC-DAD de *M. spicata* com deteção a 320 nm. Identidades dos compostos como descrita na tabela 2.28
- Figura 6.** Espectro característico de um ácido hidroxicinâmico.30
- Figura 7.** Cromatograma obtido por HPLC-DAD de *S. hispanicus* com deteção a 350 nm. Identidade dos compostos como descrita na tabela 2.31
- Figura 8.** Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD de *B. maritima*. **A** – deteção a 280 nm; **B** – deteção a 350 nm. Identidade dos compostos como descrita nas tabelas 2 e 3 no texto.32
- Figura 9.** Espectro caraterístico da Quercetina 3-O-rutinósido (= Rutina) e a sua estrutura.33
- Figura 10.** Avaliação da atividade antioxidante dos extratos metanólicos e aquosos de diferentes espécies pelo método DPPH. Os valores representam a média \pm erro padrão das 3 repetições. No

mesmo gráfico, valores seguidos de letras diferentes representam médias significativamente diferentes de acordo com o teste de Duncan ($P < 0,05$). Para cada espécie, valores assinalados com um asterisco (*) representam a média significativamente inferior relativamente à comparação entre solventes. Controlo positivo (BHT): $IC_{50} = 462.24 \pm 0.03 \mu\text{g/ml}$ 35

Figura 11. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos metanólicos e aquosos de diferentes espécies pelo método TEAC. Os valores representam a média \pm erro padrão das 3 repetições. No mesmo gráfico, valores seguidos de letras diferentes representam médias significativamente diferentes de acordo com o teste de Duncan ($P < 0,05$). Para cada espécie, valores assinalados com um asterisco (*) representam a média significativamente superior relativamente à comparação entre solventes. 37

Figura 12. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos metanólicos e aquosos de diferentes espécies pelo método FRAP. Os valores representam a média \pm erro padrão das 3 repetições. No mesmo gráfico, valores seguidos de letras diferentes representam médias significativamente diferentes de acordo com o teste de Duncan ($P < 0,05$). Para cada espécie, valores assinalados com um asterisco (*) representam a média significativamente superior relativamente à comparação entre solventes. 39

Figura 13. Avaliação da capacidade inibitória dos extratos metanólicos para o enzima tirosinase. Valores seguidos de letras diferentes representam médias significativamente diferentes de acordo com o teste de Duncan ($P < 0,05$). Controlo positivo (ácido kójico): $94,46 \pm 1,20 \%$ a $200 \mu\text{g/ml}$ 47

Índice de tabelas

Tabela 1. Espécie, família, nome comum, distribuição geográfica e habitat das diferentes espécies em estudo.	3
Tabela 2. Composição fenólica dos extratos metólicos de <i>C. nepeta</i> , <i>C. arvensis</i> , <i>H. italicum</i> , <i>M. spicata</i> e <i>O. vulgare</i> (mg/g).....	29
Tabela 3. Composição fenólica dos extratos metanólicos de <i>B. maritima</i> , <i>O. pes-caprae</i> , <i>P. major</i> , <i>S. hispanicus</i> e <i>U. dioica</i> (mg/g).....	31
Tabela 4. Rendimentos de extração (% p/p) dos diferentes extratos estudados.	40
Tabela 5. Matriz de correlação (coeficientes de correlação de Pearson) dos resultados obtidos com os diferentes métodos.	41
Tabela 6. Capacidade inibitória da atividade dos enzimas α -amilase e α -glucosidade <i>in vitro</i> , representada em percentagem de inibição (%), dos extratos metanólicos (a 10 mg/ml) das várias espécies em estudo.	42
Tabela 7. Capacidade inibitória do enzima AChE <i>in vitro</i> , representada em percentagem de inibição (%) dos extratos metanólicos (a 10 mg/ml) das diferentes espécies em estudo.....	44

1 Introdução

1.1 Plantas silvestres comestíveis

As plantas são a base da cadeia alimentar terrestre e são consumidas diariamente em todo o mundo (Madejón, Barba-Brioso, Lepp, & Fernández-Caliani, 2011). Principalmente, em períodos de escassez de alimentos, as plantas silvestres comestíveis foram recursos alimentares importantes e contribuíram, de forma imprescindível, para a ingestão de vitaminas, minerais e oligoelementos para grande parte das populações (Polo, Tardío, Vélez-del-Burgo, Molina, & Pardo-de-Santayana, 2009; Leonti, 2012;). Plantas silvestres comestíveis são espécies de plantas utilizadas como fontes de alimentos que não são cultivadas nem domesticadas mas sim espontâneas nos seus habitats naturais (Molina et al., 2014). O consumo deste tipo de plantas foi acentuadamente reduzido com o aumento da acessibilidade a uma grande diversidade de produtos alimentares, através da evolução do comércio (Menendez-Baceta, Aceituno-Mata, Tardío, Reyes-García, & Pardo-de-Santayana, 2011). Com a disponibilidade das plantas sempre frescas, o hábito da colheita foi-se perdendo assim como o conhecimento para identificar as plantas e a forma de processá-las, o que contribuiu para o decréscimo do consumo deste tipo de plantas (Menendez-Baceta et al., 2011). Atualmente são ainda colhidas do seu habitat natural inúmeras espécies de modo a apurar ou complementar refeições diárias (Ghane, Lokhande, Ahire, & Nikam, 2009).

Se, em décadas passadas, a colheita de plantas silvestres comestíveis era um símbolo de pobreza e considerada fora de moda (Pieroni, Nebel, Santoro, & Heinrich, 2005), nos dias de hoje estas plantas têm sido redescobertas, revalorizando os produtos típicos em gastronomias locais e contribuindo para uma dieta diversificada que proporciona uma nova gama de sabores, cores e texturas (Grivetti & Ogle, 2000; Pardo-de-Santayana et al., 2007). Para além disso, o conhecimento de que a ingestão de alimentos colhidos do seu habitat natural pode proporcionar benefícios para a saúde (Sánchez-Mata et al., 2011) aumenta a procura destes vegetais. No entanto, é contrabalançada com a preocupação sobre os riscos de contaminação nos locais de colheita (Wehi & Wehi, 2010).

Para além de serem fonte de micro e macronutrientes, as plantas silvestres eram em tempos passados, também, um suporte vital para a medicina tradicional das populações locais, para o tratamento de diversas patologias, a maioria das vezes administradas através de

infusões. Hoje em dia, as plantas continuam a ser uma fonte segura para a obtenção de substâncias bioativas, anti-tumorais (Kaileh, Vanden Berghe, Boone, Essawi, & Haegeman, 2007), anti-inflamatórias e analgésicas (Bose et al., 2007), antifúngicas (Korukluoglu, Sahan, & Yigit, 2008), antibacterianas, antioxidantes, etc. (Scherer et al., 2013).

Recentemente as plantas silvestres comestíveis têm despertado interesse e atenção, devido aos potenciais benefícios para a saúde humana para além do seu contributo nutricional (Sánchez-Mata et al., 2011; Scherer et al., 2013). Por esta razão são de todo o interesse estudos que visem a descoberta de novos antioxidantes entre outros metabolitos secundários, com o objetivo de diminuir o consumo excessivo de aditivos alimentares sintéticos (Melo et al., 2015), assim como de avaliar qual o seu contributo para a medicina, através da sua atividade biológica.

1.1.1 Plantas estudadas

Neste trabalho foram estudadas 10 espécies que crescem espontaneamente da região do Algarve: *Beta maritima* L., *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *nepeta*, *Calendula arvensis* L., *Helichrysum italicum* subsp *picardii* (Boiss. & Reuter) Franco, *Mentha spicata* L., *Origanum vulgare* subsp *virens* (Hoffmanns, & Link) Bonnier & Layens, *Oxalis pes-caprae* L., *Plantago major* L. subsp *major*, *Scolymus hispanicus* L. e *Urtica dioica* L. (tabela 1) (figura 1).

Tabela 1. Espécie, família, nome comum, distribuição geográfica e habitat das diferentes espécies em estudo.

Espécie	Família	Nome comum	Distribuição geográfica	Habitat
<i>B. maritima</i>	Chenopodiaceae	Celga-brava	Mediterrâneo e norte da Europa	Zonas costeiras, salinas e abandonadas
<i>C. nepeta</i>	Lamiaceae	Erva-das-azeitonas	Mediterrâneo	Prados secos e solos não cultivados
<i>C. arvensis</i>	Asteracea	Malmequer-dos-campos	Europa e América do norte	Campos cultivados e incultos, margem dos campos e dos caminhos
<i>H. italicum</i>	Asteracea	Caril-das-areias	Sul da Península Ibérica	Matos baixos psamófilos em dunas em processo de estabilização ou paleodunas.
<i>M. spicata</i>	Lamiaceae	Hortelã	Mediterrâneo e regiões subtropicais	Lugares húmidos, margens de rios.
<i>O. vulgare</i>	Lamiaceae	Orégãos	Europa, Norte de África, América e Ásia	Solos calcários, relativamente secos e inférteis
<i>O. pes-caprae</i>	Oxalidaceae	Trevo-azedo	Itália, Grécia, Península Ibéria e norte de África	Campos cultivados, pomares, pastagens, jardins, bermas de estrada e diferentes tipos de ambientes alterados
<i>P. major</i>	Plantaginaceae	Tanchagem	Europa e norte da Ásia central	Campos cultivados e na berma da estrada
<i>S. hispanicus</i>	Asteracea	Cangarinha	Sul da Europa, Norte de África, e noroeste da França, Espanha e Turquia.	Pastagens, campos agrícolas incultos, pousios, clareiras de matos, bermas de caminhos. Em locais secos e expostos
<i>U. dioica</i>	Urticaceae	Urtiga	Todo o mundo	Regiões temperadas



Figura 1. Aspeto geral das espécies em estudo no seu habitat natural. Autores das fotografias: *B. maritima*, *C. arvensis*, *C. nepeta*, *O. pes-caprae*, *P. major* e *U. dioica* – A. Romano; *M. spicata*, *H. italicum* e *S. hispanicus* – T. Grevenstuk.

B. maritima, até à pouco denominada de *Beta vulgaris* subsp *maritima*, é uma planta bienal ou perene que cresce entre 20 a 80 cm do chão com folhas basais até 10 cm (Astroviejo et al., 1997; Biancardi, Panella, & Lewellen, 2012). As suas folhas são usadas na alimentação, cozidas em sopas, em refogados ou em esparregados, e cruas em saladas (Bor, Özdemir, & Türkan, 2003). Pensa-se que esta espécie seja a ancestral da beterraba cultivada (Richards, Reeves, Fenwick, & Panella, 2013). Na medicina tradicional é geralmente utilizada para o tratamento de distúrbios digestivos, queimaduras, dores de garganta e anemia (Benítez, González-Tejero, & Molero-Mesa, 2010; Sánchez-Mata et al., 2011; Morales et al., 2014; Romano & Gonçalves, 2015). Apesar dos trabalhos com extratos de *B. maritima* serem escassos sabe-se que têm capacidade antioxidante (Morales et al., 2014).

Mais conhecida como erva-das-azeitonas, *C. nepeta* cresce espontaneamente na zona do mediterrâneo. É uma planta perene e bastante aromática, podendo atingir os 80 cm de altura. Tem aspeto de um pequeno arbusto e flores de cor lilás, as suas folhas são ovaladas e pequenas (Astroviejo et al., 1997). Esta planta é muito usada na alimentação como tempero de carne, peixe, legumes, mas principalmente para condimentar azeitonas e daí o seu nome comum (Hammer, Laghetti, & Pistrick, 2005; Tibaldi, Fontana, & Nicola, 2013). É tradicionalmente usada na medicina para acalmar a tosse e como expetorante; tem também propriedades espasmolíticas e o seu chá alivia cólicas e gases (Hammer et al., 2005; Marongiu et al., 2010). Estudos anteriores relatam que os óleos essenciais desta espécie têm capacidade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e sedativa (Araniti, Graña, Reigosa, Sánchez-Moreiras, & Abenavoli, 2013; Formisano, Oliviero, Rigano, Saab, & Senatore, 2014; Pacifico et al., 2015), sendo os seus principais constituintes terpenos.

Malmequer-dos-campos ou *C. arvensis* é uma planta que cresce no sul da Europa e na América do Norte (Ćetković, Djilas, Čanadanović-Brunet, & Tumbas, 2004). Caracterizada pelas flores amarelo-laranja, é uma planta herbácea anual de 30 a 50 cm de altura com caules ramificados. Além de embelezar os jardins, as suas pétalas são usadas como tempero, as folhas para preparar chá e a planta inteira é usada para fins medicinais (Ćetković et al., 2004). Na medicina tradicional *C. arvensis* é usada para tratar problemas de pele, feridas e queimaduras, conjuntivite, irregularidades menstruais, varizes, úlceras duodenais e hemorroidas (Wichtl, 1994). Estas capacidades estão associadas aos seus principais compostos, os terpenos (Danielski et al., 2007; Ercetin, Senol, Erdogan Orhan, & Toker, 2012).

H. italicum é uma planta bastante aromática; o seu aroma, muito ativo, é semelhante ao do caril, daí o seu nome comum, caril-das-areias. Este subarbusto tem de altura de 12 a 33 cm e as suas folhas são lineares, esverdeadas e tomentosas a glabrescentes. Já na medicina Greco-Romana, *H. italicum* era vista como planta anti-inflamatória, anti-infeciosa e cicatrizante; os seus óleos são antialérgicos e utilizados em cosméticos, são também usados em dermatologia para alisar a pele (Appendino et al., 2007; Rigano et al., 2013; Romano & Gonçalves, 2015). Segundo estudos recentes, as suas atividades biológicas (anti-inflamatória e antioxidante) podem dever-se à presença de flavonoides e terpenos (Santos Rosa, García Gimenez, Saenz Rodriguez, & De La Puerta Vazquez, 2007). Esta aromática tem ainda uso culinário, já que as suas folhas são usadas como tempero de alimentos, carne ou saladas e os seus óleos podem ainda ser usados em gelados, doce ou até mesmo em refrigerantes (D'Abrosca et al., 2013; Romano & Gonçalves, 2015; Scognamiglio, Abrosca, Esposito, Fiorentino, & Ce, 2015).

M. spicata é uma erva aromática, vulgarmente conhecida por hortelã e é das mais plantadas no mundo inteiro. É uma planta vivaz e pode atingir os 100 cm de altura, as suas folhas são sésseis e as suas inflorescências podem ser de cor lilás, rosa ou branca. Esta espécie é intensamente usada, sendo os seus óleos essenciais matéria-prima numa vasta gama de indústrias (produtos farmacêuticos, cosméticos, alimentos e químicos) (Adersen, Gauguin, Gudiksen, & Jäger, 2006; Biswas, Chatli, & Sahoo, 2012), daí a sua importância económica. O seu uso exaustivo não é recente. Já na medicina tradicional as infusões desta aromática eram usadas para alívio de soluços, flatulência, tonturas e indigestão (Saleem, Alam, & Sultana, 2000) assim como para tratamento da febre, inflamações e bronquite (Choudhury, Kumar, & Garg, 2006). Para além disto, *M. spicata* tem um ainda amplo leque de usos biológicos, tais como, inseticida, antimicrobiano, antioxidante e antiespasmódico (Papachristos & Stamopoulos, 2002; Choudhury et al., 2006; Özgen et al., 2008; Biswas et al., 2012; Scherer et al., 2013). É também conhecida pela sua capacidade de melhorar a memória (Scherer et al., 2013). A hortelã é também utilizada na cozinha, seca ou fresca, como condimento em saladas, omeletes, etc. O licor de hortelã é usado como digestivo. Para além de todos estes usos, as suas folhas são ainda empregadas para decorar pratos, especialmente sobremesas e também em bebidas frescas. Esta planta é igualmente usada para lavar os dentes e refrescar a boca. Ramos de hortelã em água doce são ainda usados para afastar as moscas e perfumar o ambiente (Dei Cas, Pugini, & Fico, 2015). O seu óleo essencial é rico em carvona, e por isso o seu cheiro fresco característico, tendo ainda muurolene e mirceno como principais

compostos (Scherer et al., 2013). Apesar dos estudos com os seus extratos ainda serem poucos, sabe-se que têm uma excelente atividade antioxidante comparável à de antioxidantes sintéticos como por exemplo butilhidroxitolueno (BHT) (Kanatt, Chander, & Sharma, 2008; Arumugam, Murugan, Subathra, & Ramesh, 2009; Bimakr et al., 2011; Scherer et al., 2013).

O. vulgare é caracterizada pela época de floração tardia (primavera e verão) (Van Looy, Jacquemyn, Breyne, & Honnay, 2009), é uma planta vivaz podendo atingir os 90 cm, com folhas inteiras, pecioladas e ovadas. É uma erva aromática muito usada na alimentação ocidental como tempero. No entanto, também é muito usada para fins terapêuticos, nomeadamente para o tratamento de constipações, tosse, perturbações digestivas e no controlo da diabetes (Yin, Fretté, Christensen, & Grevsen, 2012; Zhang et al., 2013) devido ao seu poder antimicrobiano e antioxidante; estas propriedades estão relacionadas com o seu elevado teor em compostos fenólicos (Lemhadri, Zeggwagh, Maghrani, Jouad, & Eddouks, 2004; Zhang et al., 2013). A maior parte dos estudos realizados com esta espécie incidem na avaliação das propriedades biológicas e caracterização química do óleo essencial, sendo raros os estudos com extratos, principalmente aquosos (Martins et al., 2014). Sabe-se apenas, que os extratos de *O. vulgare* apresentam uma boa atividade antihiperlipidémica (Lemhadri et al., 2004). Os principais compostos do óleo essencial são os monoterpenos, carvacrol e timol (Zhang et al., 2013). Além disso, já foi relatado que o óleo essencial de *O. vulgare* tem um papel ativo na prevenção de desordens neurodegenerativas (Loizzo et al., 2009; Ocaña-Fuentes, Arranz-Gutiérrez, Señorans, & Reglero, 2010), apresenta boa capacidade antimicrobiana e antioxidante; no entanto apresenta alguma toxicidade (Şahin et al., 2004).

O. pes-caprae é uma espécie invasora que domina a flora dos ecossistemas florestais que tem sido utilizada na medicina tradicional de muitas regiões. É uma planta perene e caracterizada pelos seus bolbos subterrâneos, folhas em forma de trevo em roseta e flores amarelas (Signorini, Giovampaola, Bruschi, Foggi, & Tani, 2013). As folhas de *O. pes-caprae* são comidas cruas em saladas e os seus bolbos são comidos grelhados e temperados com azeite e limão, ou torrados. Nos séculos XVI e XVII os marinheiros comiam as folhas para curar o escorbuto e depois de esmagadas, eram colocadas sobre a pele para acalmar as queimaduras solares e arranhões sendo assim fundamental nos primeiros socorros dos homens do mar. Na medicina tradicional, as folhas azedas esmagadas e colocadas em água quente servem para tratamento de acne em adolescentes e para diminuir a oleosidade da pele (Roberts, 2000). Segundo Güçlütürk et al. (2012) os principais constituintes dos extratos

metanólicos e etanólicos são ácidos fenólicos e apresentam atividade antioxidante. Esta planta tem um sabor amargo pois contém ácido oxálico (Lentini & Venza, 2007; Hadjichambis et al., 2008).

P. major pertence à família Plantaginaceae. Tem um ciclo de vida longo e está distribuída pela maior parte Europa e norte da Ásia central (Nhiem et al., 2011). É uma planta perene e baixa, as suas folhas são em rosetas basilares mais ou menos ovadas e as inflorescências podem atingir os 60 cm. Apesar de ser conhecida como uma erva daninha denominada por tanchagem, *P. major* é uma planta medicinal muito antiga, utilizada essencialmente na cicatrização de feridas (Nhiem et al., 2011), no entanto também é usada para tratamentos de doenças de pele, respiratórias, infecciosas, alívio de dor e da febre e cancro (Samuelsen, 2000). É também usada como remédio para a diarreia e hemorroidas (Biosci, Mehni, & Shahdadi, 2014). As suas folhas jovens são usadas em saladas e as mais velhas são normalmente cozidas ou então adicionadas à sopa ou refogados. Os talos das inflorescências são consumidos salteados, as suas sementes também são comestíveis (Scott & Buhner, 2010). As folhas cozidas são usadas na alimentação dos porcos para aumentar os músculos e diminuir as gorduras (Dei Cas et al., 2015). De acordo com os estudos realizados anteriormente, *P. major* contém diversas classes de compostos, tais como, flavonoides e outros compostos fenólicos (Samuelsen, 2000; Piyaviriyakul, Siripong, & Vallisuta, 2014).

S. hispanicus é uma planta silvestre perene de curta duração e pode alcançar os 80 cm de altura. As suas folhas são espinhosas e dentadas, as suas inflorescências têm a tonalidade amarela. *S. hispanicus* tem um sabor suave, cresce em zonas mediterrâneas e está muito presente na alimentação, principalmente em pratos espanhóis. As suas folhas podem ser cozidas na sopa ou então fritas em azeite com alho, embora possam raramente ser comidas frescas em saladas (Guarrera, 2003; Sánchez-Mata et al., 2011; Molina et al., 2014). Esta planta é também usada na medicina tradicional para o tratamento de distúrbios digestivos (gastralgias), febre e ainda infeções oculares; tem ainda propriedades diuréticas (Ugurlu & Secmen, 2008; Morales et al., 2014;). É também relatado que as raízes de *S. hispanicus* removem cálculos dos rins (Sari & Tutar, 2010).

U. dioica é uma espécie silvestre que cresce abundantemente e pertence à família Urticaceae. É vulgarmente designada de urtiga e é conhecida pela irritação que causa na pele. Esta irritação é causada pelos pêlos urticantes (tricomas) característicos das folhas verdes em serrilhas desta espécie; esta planta perene pode atingir os 2 m (Shams et al., 2009). Está

largamente distribuída por todas as regiões temperadas do mundo e é das espécies mais proeminentes na Europa (Pinelli et al., 2008). Um dos principais interesses de *U. dioica* é que toda a planta pode ser usada para várias finalidades, como a alimentação (folhas para saladas, sopas e chás), medicamentos, cosméticos, agricultura biodinâmica, e produção têxtil (Bodros & Baley, 2008). Devido às suas propriedades medicinais, os seus extratos têm sido utilizados no tratamento de reumatismo, eczema, artrite e anemia por mais de mil anos (Chrubasik, Enderlein, Bauer, & Grabner, 1997). Estudos anteriores provam que os extratos de *U. dioica* têm efeito diurético, natriurético e hipotensores (Tahri et al., 2000). É também relatado que *U. dioica* é uma planta medicinal com potencial para tratar a doença de Alzheimer e sintomas associados (Krishnaiah, Sarbatly, & Nithyanandam, 2011; Singhal, Bangar, & Naithani, 2012) e a sua capacidade para induzir a produção de insulina (Farzami, Ahmadvand, Vardasbi, Majin, & Khaghani, 2003).

1.2 Antioxidantes

As espécies reativas de oxigénio (ROS) são produtos metabólicos cuja produção é incrementada em consequência do estilo de vida moderno, nomeadamente maus hábitos alimentares, hábitos tabagísticos, exposição a radiações eletromagnéticas e poluição (Głód, Kiersztyn, & Piszcz, 2014). O organismo possui mecanismos de defesa para estas espécies que envolvem mecanismos de prevenção, reparação, defesas físicas e antioxidantes (Valko et al., 2007).

Os radicais livres são definidos como quaisquer moléculas ou átomos com um ou mais eletrões não emparelhados (Wong, Matanjun, Ooi, & Chia, 2014), o que faz com que estas moléculas sejam altamente reativas. No entanto, as ROS podem ser prejudiciais ou benéficos para os sistemas vivos; quando estão presentes em baixas e/ou moderadas concentrações estão envolvidos em importantes funções celulares (defesa contra agentes infecciosos e sinalização celular) (Sies, 1995). Porém, quando há um excesso de ROS ou RNS (espécies reativas de azoto), ou seja, quando o equilíbrio entre a produção de espécies reativas e as defesas antioxidantes é afetado, este excesso pode danificar lípidos, proteínas celulares ou de DNA inibindo a sua função normal (Valko et al., 2007). A este desequilíbrio chamamos stress oxidativo (Sies, 1995).

Os antioxidantes eliminam os ROS e outros radicais livres porque agem como substrato para a oxidação, terminando assim as reações em cadeia (Gonçalves, Gomes, Costa, & Romano, 2013). Sendo assim, podemos definir um antioxidante como “qualquer substância que retarda, impede ou elimina o dano oxidativo de uma molécula alvo” (Gutteridge & Halliwell, 2010). Os antioxidantes são classificados como exógenos (naturais ou sintéticos) ou endógenos (Gilgun-Sherki, Melamed, & Offen, 2001). Podem-se dividir em dois grandes grupos: enzimáticos e não enzimáticos (ou baixo peso molecular); os primeiros são proteínas, tais como a catalase (CAT), glutatona-peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD). Os de baixo peso molecular são normalmente conseguidos através da dieta, como por exemplo o ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), carotenoides e outros polifenóis (Uttara, Singh, Zamboni, & Mahajan, 2009).

A ingestão de antioxidantes na dieta alimentar tem sido associada à diminuição dos riscos de doenças provocadas pelo stress oxidativo (Dall’Acqua, Cervellati, Loi, & Innocenti, 2008). O interesse em encontrar novos antioxidantes naturais para substituição dos sintéticos, como por exemplo butilhidroxianisol (BHA) e BHT, tem sido cada vez maior dado que é uma forma de diminuir os efeitos secundários destes, assim como o aumento da rentabilidade económica (Wanasundara & Shahidi, 1998; Kyung-A, Yu-Jin, Dong-Sik, Jaehyun, & Ae-Son, 2011; Melo et al., 2015). As plantas podem ser fontes de antioxidantes naturais com efeitos benéficos, nomeadamente de compostos fenólicos que possuem elevada atividade.

A utilização de antioxidantes naturais remonta à antiguidade, pois já nas eras egípcias eram usados extratos vegetais ricos em polifenóis para a preservação dos cadáveres (Scott, 1994). Nos dias de hoje, com a confirmação científica dos seus benefícios para a saúde, os compostos fenólicos têm recebido bastante atenção. Os compostos fenólicos são metabolitos secundários das plantas com elevada importância, pois são fundamentais para o crescimento, reprodução, proteção contra agentes patogénicos e predadores, para além de contribuírem para a cor da planta (Balasundram, Sundram, & Samman, 2006). Para além da atividade antioxidante, este tipo de compostos apresentam um vasto leque de propriedades biológicas: antialérgicas, antiaterogénicas, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antitrombóticas, vasodilatadoras e cardioprotetoras (Scott, 1994; Middleton, Kandaswami, & Theoharides, 2000; Manach, Williamson, Morand, Scalbert, & Rémésy, 2005; Xu, Zhang, Cao, & Lu, 2010). Dos compostos fenólicos destacam-se os flavonoides, ácidos fenólicos, taninos e tocoferóis (Angelo & Jorge, 2006).

1.3 Doenças e stress oxidativo

1.3.1 Doenças neurodegenerativas

O cérebro humano é particularmente suscetível a processos oxidativos devido à sua elevada concentração de ácidos gordos polinsaturados (Halliwell, 1992). Para além disto, os baixos níveis de enzimas antioxidantes leva a um elevado consumo do oxigénio assim como a altos níveis de metais de transição o que catalisa a formação de radicais livres (Floyd & Hensley, 2002; Pierpaoli, 2005). Esta situação desencadeia a destruição progressiva e irreversível de neurónios originando as doenças neurodegenerativas. Estas doenças têm-se tornado um problema de saúde associado com a idade, especialmente em países industrializados em que a proporção da população idosa tem aumentado (Uc & Rizzo, 2008). Entre elas, a prevalência da doença de Alzheimer (DA), a demência mais comum, e a doença de Parkinson (DP), está a aumentar (Metzler-Baddeley, 2007). Hoje em dia, os medicamentos são incapazes de parar a DA e DP, só conseguindo retardar o processo dessas doenças por tratamento sintomático e, por isso, há necessidade de descobrir novos fármacos, sendo as plantas fontes atraentes para essas substâncias.

A DA, desordem neurodegenerativa irreversível progressiva e complexa, é a demência mais comum deste século em pessoas a partir dos 60 anos (Konrath et al., 2012; Pourshojaei et al., 2015) afetando cerca de 14 milhões de pessoas na Europa e nos Estados Unidos (Hort et al., 2010). Esta doença é caracterizada pela perda de memória, disfunção cognitiva, distúrbios comportamentais e défices das atividades na vida diária (Cummings, Vinters, Cole, & Khachaturian, 1998), e a nível celular pela ocorrência de placas senis e tranças neurofibrilares (Behl, 1997). Embora a causa exata da doença seja desconhecida, pensa-se que são vários os fatores envolvidos (Pourshojaei et al., 2015), nomeadamente depósitos de β -amilóide ($A\beta$), agregação da τ -proteína, stress oxidativo e baixos níveis de acetilcolina (ACh) no hipocampo e áreas do córtex (Goedert & Spillantini, 2006). Os baixos níveis de ACh, neurotransmissor que está envolvido na memória e aprendizagem, podem resultar da acumulação de fragmentos da proteína $A\beta$ que formam placas duras interferindo com a capacidade da ACh para efetuar a transmissão sináptica (Wollen, 2010), o que leva a hipótese colinérgica (Perry et al., 1978) que diz que os níveis baixos de acetilcolina conduzem diretamente à deficiência cerebral.

A acetilcolinesterase (AChE) é um enzima que hidrolisa o neurotransmissor ACh e serve para terminar a transmissão sináptica (Pourshojaei et al., 2015). Os medicamentos

aprovados para tratamento da DA neutralizam o déficit da acetilcolina, ou seja, tentam aumentar o nível de ACh no cérebro (Heinrich & Lee Teoh, 2004). Estes fármacos têm por base a ação inibitória da AChE – tacrina, donepetil, rivastigmina e galatamina (Pourshojaei et al., 2015). No entanto, estas drogas apresentam algumas limitações, tais como hepatotoxicidade, não seletividade, baixa biodisponibilidade e efeitos secundários colinérgicos adversos (Ferreira, Proença, Serralheiro, & Araújo, 2006). Algumas substâncias extraídas das plantas mostram alguns efeitos terapêuticos quando usadas durante um longo tempo. Por exemplo a galantamina, um alcalóide da campânula-branca, foi aprovada para o tratamento da DA (Ingkaninan, Temkitthawon, Chuenchom, Yuyaem, & Thongnoi, 2003; Heinrich & Lee Teoh, 2004). Este alcalóide pode ser isolado de diversas espécies dos géneros *Galanthus* e *Nascissus* da família Amaryllidaceae, mas atualmente é produzido sinteticamente por desta forma ser mais efetivo no tratamento da DA (Konrath et al., 2012).

Nos últimos anos, tem havido diversas investigações sobre a descoberta de novos metabolitos secundários de plantas tradicionalmente usadas na medicina ou na alimentação como potenciais inibidores de AChE *in vitro*, para serem usados no tratamento da DA sem a toxicidade associada aos compostos químicos sintetizados (Ingkaninan et al., 2003; Perry, Bollen, Perry, & Ballard, 2003; Heinrich & Lee Teoh, 2004; Costa, Gonçalves, Valentão, Andrade, & Romano, 2013). Segundo Stuchbury & Münch (2005) a A β das placas senis encontradas nos cérebros de pacientes com DA podem induzir processos inflamatórios em que as ROS são libertadas, assim como outros compostos, pelo que a eliminação das ROS é uma necessidade para impedir o avanço da DA. Assim, para além da atividade inibitória da AChE, os metabolitos secundários com a sua atividade antioxidante podem neutralizar as ROS e, sendo assim, também são uteis no tratamento da DA (Ferreira et al., 2006).

A DP é uma perturbação neurodegenerativa comum que é caracterizada clinicamente por tremores, bradicinesia, rigidez e perda de reflexos posturais (Strange, 1992); quimicamente é uma degeneração dos neurónios dopaminérgicos na substância negra, que conduz a uma redução dos níveis de dopamina no estriado (Haavik & Toska, 1998). As causas do início da DP ainda são desconhecidas, no entanto existem hipóteses para a origem da doença, a nível celular como a diminuição da função mitocondrial, aumento do stress oxidativo, apoptose, excitotoxicidade e neuroinflamação, assim como a herança genética (Haavik & Toska, 1998; Olanow, 2007; Henchcliffe & Beal, 2008; Fitzpatrick, Raschke, & Emborg, 2009;). O stress oxidativo é um fator que atua na fase precoce da neurodegeneração,

pois a síntese de dopamina conduz ao stress oxidativo nos neurónios presentes na substancia negra, e, conseqüentemente, desencadeia o processo degenerativo (Czapski et al., 2014). Acredita-se também que os principais sintomas da DP são causados por uma deficiência da dopamina estriatal (Haavik & Toska, 1998). A dopamina é uma catecolamina sintetizada a partir da tirosina nos terminais dos neurónios dopaminérgicos e é a base da terapia sintomática. O tratamento com L-DOPA aumenta a dopamina no cérebro e tem sido amplamente utilizada como farmacoterapia clínica mais eficaz para a DP. No entanto, a terapia com L-DOPA quando tomada a longo prazo provoca diversas reações adversas, tais como os fenómenos *wearing-off* (diminuição da eficácia de L-DOPA) e o *on-off* (mobilidade e imobilidade em pacientes em tratamento) e a discinesia (Asanuma, Miyazaki, & Ogawa, 2003; Bhidayasiri & Tarsy, 2012).

Nos últimos anos foi demonstrado que a tirosinase desempenha um papel na formação da neuromelanina no cérebro humano, e, por isso, pode ter um papel central para a neurotoxicidade de dopamina, contribuindo então para a neurodegeneração associada à DP (Khan, 2007). Dada a toxicidade e os efeitos colaterais dos inibidores sintéticos, ácido kójico e arbutina, a pesquisa de inibidores naturais, por exemplo hidroquinonas (Uchida, Ishikawa, & Tomoda, 2014), têm aumentado uma vez que estes são mais seguros e eficazes tornando-se um alvo atrativo para o tratamento da DP (Yilmaz, Altun, Orhan, Ergene, & Citoglu, 2013).

1.3.2 Diabetes mellitus (Dm)

A Dm é um distúrbio metabólico que é caracterizado por elevados níveis de glucose no sangue (hiperglicemia) e insuficiência de produção ou ação da insulina (Maritim, Sanders, & Watkins, 2003; Asmat, Abad, & Ismail, 2015). Esta doença é normalmente classificada em dois tipos: diabetes mellitus tipo 1 (Dmt1) em que os portadores da doença são dependentes de insulina, e a diabetes mellitus tipo 2 (Dmt2) em que os pacientes não são dependentes de insulina. A Dmt1 é devido à destruição autoimune das células- β do pâncreas que conduz à deficiência absoluta da insulina; este tipo normalmente é herdado. Na Dmt2 os mecanismos que mantêm a regulação entre a sensibilidade dos tecidos com a insulina são quebrados, o que leva a uma secreção de insulina defeituosa pelas células- β pancreáticas e ação da insulina é comprometida através da resistência à insulina (American Diabetes Association, 2010; DeFronzo, 1988). Neste tipo de diabetes, determinados fatores externos, especialmente a

obesidade, são responsáveis por defeitos das células β e a resistência à insulina do tecido periférico (Asmat et al., 2015). Estima-se que haja 347 milhões de pessoas em todo o mundo com diabetes, das quais cerca de 90 % corresponde a *Dmt2*¹.

A insulina é uma proteína (hormona) sintetizada nas células β do pâncreas em resposta a vários estímulos, tais como glucose, sulfonilureias e arginina, mas a maior estimulação é a glucose (Joshi, Parikh, & Das, 2007). Os níveis elevados de glucose na corrente sanguínea estão associados a consequências macro e microvasculares que levam a doenças cardíacas, derrames, cegueira e doenças renais. Para além disto aceleram a geração de radicais livres de vários mecanismos e o desequilíbrio entre estes radicais e os sistemas de defesa de eliminação levam ao stress oxidativo e resultam em danos oxidativos e lesões teciduais.

Esta disfunção metabólica aumenta com a idade, obesidade e sedentarismo e nos últimos anos tem sido mais comum em crianças. O aparecimento, progressão e complicações relacionadas com a doença estão diretamente ligados aos efeitos tóxicos dos elevados níveis de glucose juntamente com alterações bioquímicas da glucose e metabolismo lipídico, stress oxidativo induzido por ROS, inflamações crónicas, hipoxia e isquemia (Kurban, Mehmetoglu, Yerlikaya, Gönen, & Erdem, 2011). O stress oxidativo tem um importante papel na patogénese da doença; a formação de radicais livres na diabetes por glicosilação não enzimática de proteínas, oxidação de glucose e aumento da peroxidação lipídica leva a danos em enzimas, mecanismo celular e também ao aumento da resistência à insulina (Maritim et al., 2003; Pham-Huy, He, & Pham-Huy, 2008).

A interligação entre os radicais livres e o stress oxidativo na patogénese da diabetes e as suas co-morbidades estão bem estabelecidas e portanto, antioxidantes naturais provenientes de várias plantas e os seus derivados tornaram-se uma séria opção para o tratamento da diabetes induzidas pelo stress oxidativo (Arumugam, Manaharan, Heng, Kuppusamy, & Palanisamy, 2014).

O único tratamento para a *Dmt1* é a substituição da insulina; no entanto há várias estratégias para a *Dmt2*. Dieta e exercício são as primeiras etapas para o tratamento da *Dmt2*; porém, nem sempre são o suficiente para controlar os níveis de glucose no sangue, sendo necessário o tratamento com fármacos (Perfetti, Barnett, Mathur, & Egan, 1998). Há 6 classes de fármacos antihiperglucémicos orais disponíveis: biguanidas (ex. metformina), sulfonilureia

¹ <http://www.who.int/features/factfiles/diabetes/facts/en/> (Acedido a 10.06.2015)

(ex. tolbutamida), glinides (ex. repaglinida), tiazolidinedionas (ex. pioglitazona), inibidores de dipeptil peptidase IV (DPP – 4) (ex. sitagliptina) e inibidores de α -glucosidade (ex. acarbose) (Nathan, 2007; van de Laar, 2008).

Os inibidores de α -glucosidase são fármacos que inibem a absorção de hidratos de carbono no intestino e por isso podem ser utilizados no tratamento de pacientes com Dmt2 (van de Laar, 2008). Os enzimas do tipo de α -glucosidase são responsáveis pela quebra de oligo e dissacarídeos a monossacarídeos e consequente diminuição do nível de glucose no sangue; a inibição destes enzimas reduz a taxa de absorção de monossacarídeos, reduzindo a hiperglicemia pós-pandrial (Funke & Melzig, 2006). De modo a diminuir os efeitos colaterais dos inibidores de α -glucosidase e de α -amilase sintéticos, nomeadamente diarreia, flatulência, acidose láctica e complicações no fígado (Shobana, Sreerama, & Malleshi, 2009), inibidores naturais têm sido uma fonte atraente para o controlo da hiperglicemia pós-pandrial e por isso utilizados como terapia eficaz para a hiperglicémica combatendo a Dmt2 (Kwon, Vattem, & Shetty, 2006).

1.4 Objetivos

As plantas silvestres comestíveis têm atraído recentemente a atenção do consumidor. Este interesse renovado nos alimentos silvestres está intimamente ligado à redescoberta das tradições locais e hábitos alimentares de diferentes culturas. As propriedades sensoriais únicas destes alimentos tornam-nos muito apetecíveis para utilização como novos ingredientes, aumentando a diversidade da dieta moderna e gastronomia *gourmet*. Os benefícios para a saúde, decorrentes dos elevados níveis de compostos bioativos presentes nestas plantas, são um adicional motivo do seu interesse na atualidade. Apesar disso, o potencial das plantas silvestres não está ainda convenientemente explorado. Este trabalho foi desenvolvido com o intuito de avaliar potenciais benefícios para a saúde de dez plantas silvestres comestíveis da zona mediterrânea, nomeadamente como fontes de antioxidantes e inibidores de enzimas envolvidos na DA, DP e Dm. Para tal, definiram-se os seguintes objetivos específicos:

- i. avaliar a capacidade antioxidante de extratos aquosos e metanólicos das diversas espécies recorrendo a diferentes métodos *in vitro*;

- ii. avaliar a sua capacidade para inibir *in vitro* os enzimas α -amilase, α -glucosilase, AChE e tirosinase;
- iii. quantificar os compostos fenólicos presentes nos diversos extratos.

2 Materiais e Métodos

2.1 Preparação do material vegetal

O material vegetal foi recolhido de populações naturais encontradas na região algarvia entre outubro e dezembro. Foram utilizadas as folhas de todas as espécies assim como os bolbos de *O. pes-caprae*. Todo o material foi seco numa estufa (Binder BD 115, Tuttlingen, Germany) a 40 °C e moído num moído de café (partículas < 2 mm).

2.2 Preparação dos extratos

As extrações foram efetuadas a partir de 5 g de material vegetal seco e 100 ml de metanol a 80% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) ou água. Estas ocorreram à temperatura ambiente durante 24 h com agitação (165 rpm). Após este período o solvente foi retirado por decantação e repetiu-se a extração com solvente novo. O resultante das duas extrações foi filtrado sob vácuo e o solvente removido por evaporação (Seleta, Barcelona, Spain) (extratos metanólicos) ou liofilização (Labconco free zone 6 plus, Kansas City, USA) (extratos aquosos). O resíduo obtido foi conservado a -20 °C até à sua utilização.

2.3 Quantificação dos fenóis totais pelo método Folin-Ciocalteu (F-C)

Para quantificar os fenóis totais nos extratos, foi utilizado o método F-C com base no protocolo descrito por Ainsworth & Gillespie (2007). Para este método foram preparados os reagentes tampão fosfato de potássio (75 mM; pH 7,0), carbonato de sódio (Na₂CO₃) (700 mM) (VWR, Leuven, Belgium), soluções de ácido gálgico a diferentes concentrações (0,004 a 0,5 mM) (Sigma – Aldrich, Steinheim, Germany) e também o reagente de F-C a 10% (Pancreac, Barcelona, Spain). As amostras foram preparadas a diferentes concentrações (0,1 a 10 mg/ml). Para iniciar o protocolo em cada tubo *ependorf*, foram misturados 200 µl de reagente F-C 10% com 100 µl de amostra, ácido gálgico (antioxidante *standard*) ou tampão fosfato (branco) e 800 µl de carbonato de sódio. Depois do período de incubação de 2 h à temperatura ambiente e protegidos da luz, leu-se a absorvência a 765 nm num espectrofotómetro (PG Instruments T70+, Leicestershire, United Kingdom). Os resultados

foram expressos em micromole de equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de extrato vegetal ($\mu\text{mol}_{\text{EAG}}/\text{g}_{\text{extrato}}$).

2.4 Quantificação dos flavonoides totais pelo método de cloreto de alumínio (AlCl₃)

Para quantificar os flavonoides totais, foi utilizado o método do AlCl₃ descrito por Woisky & Salatino (1998) com pequenas modificações. Para este método, foram preparados os reagentes etanol 80% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), acetato de sódio (CH₃COONa) (1 M) (Panreac, Barcelona, Spain), soluções de quercetina a diferentes concentrações (0,03125 a 0,25 mM) (Sigma – Aldrich, Steinheim, Germany) e também AlCl₃ 1%. As amostras foram preparadas em diferentes concentrações (0,1 a 10 mg/ml). Foram misturados em cada tubo 500 μl de amostra, quercetina (flavonoide *standard*) ou etanol 80% (branco), 1500 μl de etanol 80 %, 100 μl de AlCl₃ 1% e 100 μl de acetado de sódio. Após o período de incubação de 30 min à temperatura ambiente, as absorvências foram lidas a 415 nm num espectrofotômetro (PG Instruments T70+, Leicestershire, United Kingdom). Com base na equação da reta foi então possível quantificar o teor total de flavonoides presente nas amostras. Os resultados foram expressos em micromole de equivalentes de quercetina (EQ) por grama de extrato vegetal ($\mu\text{mol}_{\text{EQ}}/\text{g}_{\text{extrato}}$).

2.5 Composição fenólica por cromatografia líquida de alta pressão com detetores de matriz de díodo (HPLC-DAD)

Para a determinação da composição fenólica de cada extrato metanólico estes foram filtrados por uma membrana filtrante de politetrafluoretileno (PTFE) poro 0,45 μm (Fiorini, Ingré, França). De cada extrato foram analisados 20 μL em unidade analítica de HPLC (Gilson), recorrendo a uma coluna Spherisorb ODS2 (25.0 \times 0.46 cm; 5 μm tamanho de partícula; Waters, Milford, MA).

O sistema de eluentes usado foi água:ácido fórmico (19:1) (A) e metanol (B), estabelecendo-se o seguinte gradiente: 5% de B aos 0 min, 15% de B aos 3 min, 25% de B aos 13 min, 30% de B aos 25 min, 35% de B aos 35 min, 45% de B aos 39 min, 50% de B aos 42 min, 55% de B aos 47 min, 75% de B aos 56 min, 100% de B aos 60 min, 100% de B aos 65 min e 5% de B aos 66 min, até aos 80 min, mantendo um caudal de eluentes de 0,9 mL/min.

A detecção foi efetuada com um detetor de díodos Gilson. Os espectros foram acumulados no intervalo 200 - 400 nm e os cromatogramas foram registados a 280, 320 e 350 nm. Os dados foram processados no software Unipoint System (Gilson Medical Electronics, Villiers-le-Bel, France).

Os compostos fenólicos foram quantificados medindo as suas absorvências nos cromatogramas obtidos a 280 nm (ácido hidroxibenzoicos e catequinas), 320 (ácidos hidroxicinamicos) e a 350 nm (flavonoides) e pelo método do padrão externo, segundo a equação 1, onde C(c) é a concentração do composto na amostra, A(c) é a área do composto na amostra, A(p) é a área padrão e a C(p) é a concentração padrão. Este procedimento foi feito em triplicado.

Equação 1

$$C(c) = \frac{A(c)}{A(p)} \times C(p)$$

2.6 Avaliação da capacidade antioxidante

2.6.1 Método do 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)

Este método teve como base o protocolo descrito por Soler-Rivas & Wichers (2000). Para tal foi preparada uma solução de DPPH a 90 µM em metanol 80%. Em cada tubo *ependorf* foram misturados 30 µl da amostra a diferentes concentrações (0,1 a 10 mg/ml), metanol 80% (branco) ou BHT (inibidor *standard*), com 300 µl de DPPH que foram diluídos com 570 µl de metanol 80%. Após o período de incubação de 30 min no escuro, as absorvências foram lidas a 515 nm. O IC₅₀, concentração que causa um decréscimo de 50% de DPPH inicial, foi determinado com base na reta de regressão linear feita com as percentagens de inibição, calculadas a partir da equação 2, em função das diferentes concentrações das amostras. Os resultados foram expressos em µg de extrato por mililitro de solvente (µg/ml).

Equação 2

$$\text{Inibição (\%)} = 1 - \frac{\text{Abs}_{\text{amostra}}}{\text{Abs}_{\text{branco}}} \times 100$$

2.6.2 Método Trolox Equivalents Antioxidant Capacity (TEAC)

Com base no protocolo descrito por Re et al. (1999) prepararam-se os reagentes tampão fosfato de sódio (75 mM; pH 7) e soluções de trolox a diferentes concentrações (0,1 a 0,5 mM) (Sigma – Aldrich, Steinheim, Germany). Foi também formado o radical ABTS^{•+} (7 mM) (Sigma – Aldrich, Steinheim, Germany) numa solução de persulfato de potássio (2,45 mM) (Sigma – Aldrich, Steinheim, Germany) que foi mantida no escuro durante 12 a 16 h à temperatura ambiente. Para obtenção da solução de trabalho a solução de ABTS^{•+} foi diluída até se obter uma absorvência aproximadamente de 0,700 a 734 nm.

As amostras foram lidas em microplacas de 96 poços. Em cada poço foram misturados 10 µl de amostra (0,1 a 10 mg/ml), tampão fosfato (branco) ou trolox (antioxidante *standard*) com 190 µl da solução de trabalho ABTS^{•+}. A absorvência foi lida a 734 nm no leitor de microplacas Tecan Infinite M200 (Männedorf, Switzerland).

A capacidade antioxidante das amostras é dada pela equação 2 e os resultados são expressos em micromole de equivalentes de trolox (ET) por grama de extrato ($\mu\text{mol}_{\text{ET}}/\text{g}_{\text{extrato}}$) que são intrapolados com a reta de regressão linear determinada com as concentrações de trolox e as inibições.

2.6.3 Método Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

Este método testa a capacidade dos extratos em reduzir o ferro e o protocolo usado teve por base o trabalho de Yen & Chen (1995). Foram preparados os reagentes: tampão fosfato de potássio (200 mM; pH 6,6), ferricianeto de potássio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) 1 % (Panreac, Barcelona, Spain), ácido tricloroacético (TCA) (Sigma – Aldrich, Steinheim, Germany) 10 %, tricloreto de ferro (FeCl_3) 0,1% (VWR, Leuven, Belgium) e soluções de ácido ascórbico a diferentes concentrações (0,0625 a 0,5 mM) (Merck, Darmstadt, Germany). As amostras foram preparadas a diferentes concentrações (0,1 a 10 mg/ml). Foram misturados em cada tudo *ependorff* 100 µl de amostra, ácido ascórbico ou tampão (branco) com 250 µl de tampão e 250 µl de ferricianeto de potássio a 1% que foram incubados durante 20 min a 50°C. Depois deste período foram misturados 250 µl de TCA 10 % e a mistura foi centrifugada 3000 rpm durante 10 min. Foram retirados 400 µl do sobrenadante para um novo *ependorff* que foram misturados com 400 µl de água destilada e 80 µl de FeCl_3 0,1 %. A absorvência foi lida a 700

nm. Foi determinada a reta de regressão linear com os valores de ácido ascórbico e com base nesta quantificou-se o poder de redução das amostras. Os resultados foram expressos em micromole de equivalentes de ácido ascórbico (EAA) por grama de extrato vegetal ($\mu\text{mol}_{\text{EAA}}/\text{g}_{\text{extrato}}$).

2.7 Inibição da α -glucosidase de levedura (α -GL)

A atividade inibitória da α -GL foi quantificada pelo protocolo descrito por Kwon, Apostolidis, & Shetty (2008) com algumas modificações. Para este teste foram preparadas as soluções: tampão fosfato de potássio (100 mM; pH 6,9), substrato *p*-Nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (5 mM em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 6,9) (Sigma – Aldrich, Steinheim, Germany) e α -GL (1,0 U/ml, em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 6,9) (Sigma – Aldrich, Steinheim, Germany). As amostras foram preparadas a diferentes concentrações (0,1 a 10 mg/ml). Numa microplaca de 96 poços foram misturados 50 μ l de amostra (10 mg/ml), tampão fosfato, no caso do branco ou acarbose (inibidor *standard*), com 100 μ l da solução enzimática de α -GL, exceto nos poços correspondentes ao controlo que foram adicionados 100 μ l de tampão fosfato, a microplaca foi incubada a 25°C durante 10 min. Foram feitos os controlos dos extratos, pois estes apresentavam cor na mesma gama do comprimento de onda do espectro da medição espectrofotométrica interferindo com os resultados. Após o período de incubação, foram adicionados 50 μ l de substrato em todos os poços e incubou-se de novo durante 5 min. A absorvência foi lida a 405 nm no leitor de microplacas Tecan Infinite M200 (Männedorf, Switzerland). A percentagem de inibição da α -GL foi calculada comparativamente ao controlo sem inibidor.

2.8 Inibição da α -Amilase Pancreática de Porco (α -APP)

De modo a quantificar a atividade inibitória da α -APP foi também usado o método modificado descrito por Kwon et al. (2008). Foram preparados os reagentes tampão fosfato de sódio (20 mM; pH 6,9) com 6 mM de NaCl, DNS [1 g de DNS (Sigma – Aldrich, Steinheim, Germany), 30 g de tartarato de sódio e potássio (Panreac, Barcelona, Spain) e 20 ml de NaOH a 2 M (Merck, Germany) num volume final de 100 ml de água destilada], o substrato amido de batata a 0,5% (p/v) (Panreac, Barcelona, Spain) e a enzima α -APP (4 U.mL⁻¹) (Sigma – Aldrich, Steinheim, Germany). As amostras foram preparadas em diferentes concentrações

(0,1 a 10 mg/ml). Em tubos *eppendorf* foram misturados 40 µl de amostra (10 mg/ml), tampão (branco) ou acarbose (inibidor *standard*), com 160 µl de tampão e 200 µl de α -APP que foram incubados à temperatura ambiente durante 5 min. Após este período, foram adicionados 400 µl de amido de batata, exceto nos tubos onde foi feito o controle onde previamente foram adicionados 400 µl de DNS para a reação parar e só depois o amido de batata. O controle foi feito dado a interferência da cor dos extratos vegetais. A reação foi interrompida após 10 min à temperatura ambiente com 400 µl de DNS e todas as soluções foram incubadas a 95°C durante 10 min. Para a microplaca de 96 poços foram transferidos 50 µl de cada tudo *eppendorf* arrefecidos e diluídos com 175 µl de água destilada. A absorvência foi lida a 540 nm no leitor de microplacas Tecan Infinite M200. A percentagem de inibição da α -APP foi calculada comparativamente ao controle sem inibidor.

2.9 Inibição da acetilcolinesterase (AChE)

Tendo por base o protocolo descrito por Ellman et al. (1961), foi possível quantificar a atividade inibitória da AChE. Para este método foram preparados o tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 8,0), DTNB [ácido 5-5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)] (3 mM) (Sigma – Aldrich, Steinheim, Germany), o substrato iodeto de acetiltiocolina (IATC) (15 mM) (Electric-ell, Type VI-S, Sigma – Aldrich, Steinheim, Germany) e a enzima AChE (0,28 U/ml) (Sigma – Aldrich, Steinheim, Germany). As amostras foram preparadas a diferentes concentrações (1 a 10 mg/mL). Em microplacas de 96 poços foram misturados 125 µl de DTNB, 25 µl de substrato da enzima IATC e 50 µl de tampão com 25 µl de extrato vegetal (10 mg/ml), tampão (branco) ou galantamina (Sigma – Aldrich, Steinheim, Germany) (inibidor da AChE *standard*). À mistura reacional foram adicionados 25 µl de AChE e nos poços correspondentes ao controle foi adicionado a mesma quantidade de tampão. Os controles foram feitos devido à interferência da cor dos extratos vegetais. A leitura foi efetuada durante 5 min a 405 nm no leitor de microplacas Tecan Infinite M200 (Männedorf, Switzerland). Foram calculadas as velocidades das reações e as atividades do enzima foram calculadas comparativamente à do branco; a inibição foi depois calculada a partir da subtração da percentagem a 100%.

2.10 Inibição da tirosinase

Com base no protocolo descrito por Masuda et al. (2005) foi possível quantificar a capacidade inibitória da tirosinase. Para isso foi necessário tampão fosfato de sódio (20 mM, pH 6,8), o substrato 3,4-di-hidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA) (2,5mM) (Sigma – Aldrich, Steinheim, Germany), ácido kójico (inibidor da tirosina *standard*) (200 µg/ml) (Sigma – Aldrich, Steinheim, Germany) e a solução enzimática de tirosinase (46 U/ml). Os extratos vegetais foram preparados em tampão e em diferentes concentrações (0,05 a 25 mg/mL).

Numa microplaca de 96 poços foram misturados 80 µl de tampão, 40 µl da solução enzimática com 40 µl de extrato, tampão ou ácido kójico, e foram incubados durante 10 min à temperatura ambiente. Foi necessário preparar controlos sem enzima tendo-se substituído o volume do extrato por tampão. Após este período de incubação foram adicionados 40 µl de L-DOPA e após mais um período de incubação de 10 min à temperatura ambiente as absorvências foram lidas a 475 nm no leitor de microplacas Tecan Infinte M200 (Männedorf, Switzerland). Relativamente ao tratamento dos dados, o IC₅₀ foi determinado com base na reta de regressão linear com as percentagens de inibição, calculadas comparativamente ao controlo sem inibidor, em função das diferentes concentrações de extrato. Os resultados foram expressos em mg de extrato por mililitro de solvente (mg/ml).

2.11 Análise estatística

Todas as medições foram feitas em triplicado e repetidas pelo menos três vezes. Os resultados são apresentados sob a forma de média ± erro padrão, exceto no HPLC-DAD onde os resultados foram expressos com média ± desvio padrão. Os dados foram tratados estatisticamente, utilizando o programa SPSS para Windows, através de análise de variância (ANOVA). As diferenças significativas entre médias foram identificadas recorrendo ao teste de Duncan ou ao *T*-Test e para as correlações usou-se o teste de Pearson.

3 Resultados e Discussão

3.1 Quantificação de compostos fenólicos

Uma vez que vários trabalhos comprovam que os compostos fenólicos estão relacionados com a atividade biológica dos extratos vegetais, nomeadamente com a atividade antioxidante, neste estudo os teores em fenóis totais nos extratos estudados foram quantificados pelo método F-C, assim como os teores em flavonoides pelo método AlCl_3 (Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1997; Wong, Leong, & Williamkoh, 2006). Verificou-se que os extratos de todas as espécies possuem elevados teores em fenóis, expressos em equivalentes de ácido gálico por grama de extrato, embora se tenha verificado uma grande variação de valores entre os extratos das diferentes espécies ($38,49 \pm 1,45$ a $1597,20 \pm 24,10 \mu\text{mol}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{extrato}}$) (figura 2). Comparando os solventes de extração, à exceção de *C. nepeta*, em que o valor significativamente mais elevado foi obtido no extrato aquoso e de *O. pes-caprae*, em que não houve diferenças significativas entre os valores dos dois extratos ($P \geq 0,05$), para todas as outras espécies os valores significativamente mais elevados ($P < 0,05$) foram obtidos nos extratos metanólicos.

Analisando apenas os extratos metanólicos verifica-se que o extrato de *O. vulgare* foi o que apresentou valores significativamente mais elevados, $1597,20 \pm 24,10 \mu\text{mol}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{extrato}}$, seguindo-se os extratos de *H. italicum* e *M. spicata* com os valores de $814,23 \pm 34,14$ e $870,62 \pm 45,69 \mu\text{mol}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{extrato}}$, respetivamente. Por outro lado, os extratos com valores mais baixos foram os obtidos a partir das folhas de *O. pes-caprae*, $43,12 \pm 1,99 \mu\text{mol}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{extrato}}$, seguindo-se o obtido para o extrato de bulbos da mesma espécie e o extrato de *C. arvensis*, $105,73 \pm 6,13$ e $165,98 \pm 0,68 \mu\text{mol}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{extrato}}$, respetivamente. Relativamente aos extratos aquosos foram duas as espécies que apresentaram valores significativamente superiores, *C. nepeta* e *O. vulgare*, $801,29 \pm 24,88$ e $828,96 \pm 13,47 \mu\text{mol}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{extrato}}$, respetivamente, seguidas de *H. italicum* e *M. spicata*, $464,31 \pm 15,26$ e $489,33 \pm 6,07 \mu\text{mol}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{extrato}}$. Os valores mais baixos foram, de novo, obtidos em extratos de bulbos de *O. pes-caprae* ($43,12 \pm 1,99 \mu\text{mol}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{extrato}}$), seguido do das folhas $98,06 \pm 3,06 \mu\text{mol}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{extrato}}$ da mesma espécie.

É importante realçar que apesar de ser comum utilizar o método F-C para a quantificação de compostos fenólicos, este reagente não é específico para este grupo de

compostos pelo que pode haver interferências nos resultados (Prior, Wu, & Schaich, 2005; Ainsworth & Gillespie, 2007).

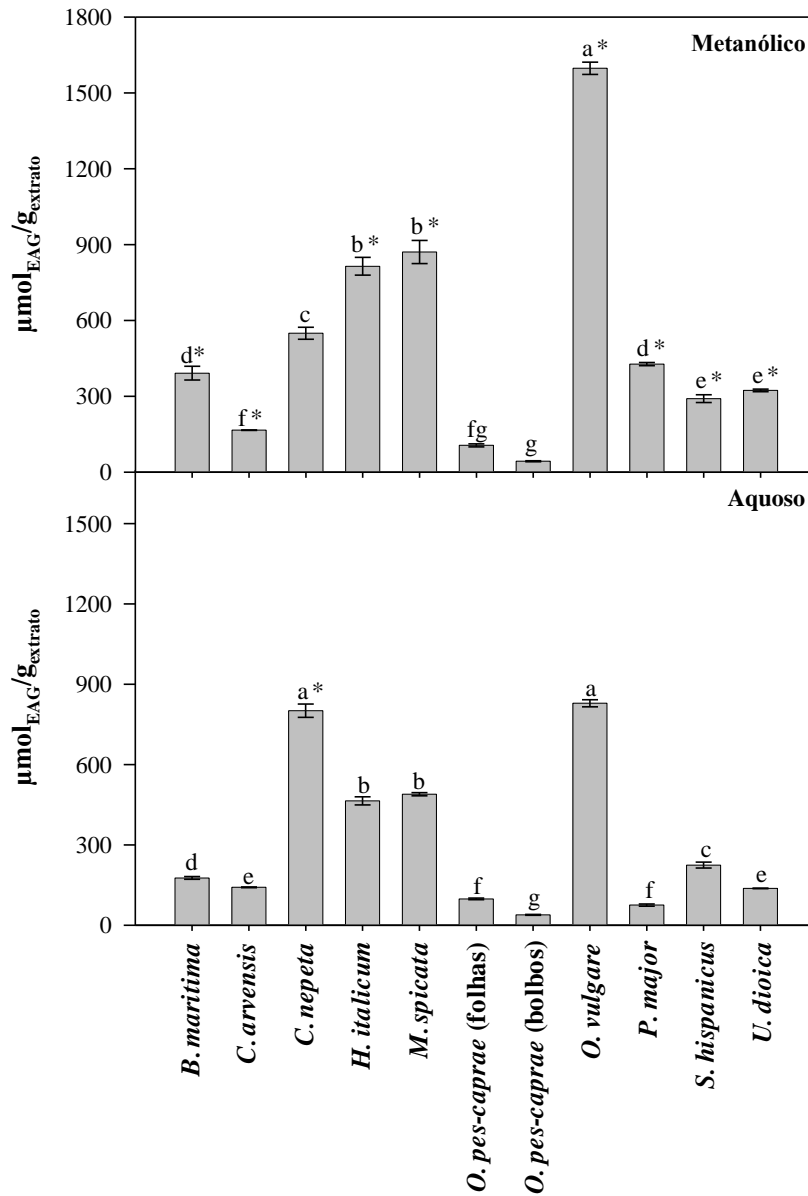


Figura 2. Quantificação do teor em fenóis totais nos extratos metanólicos e aquosos de diferentes espécies pelo método F-C. Os valores representam a média \pm erro padrão das 3 repetições. No mesmo gráfico, valores seguidos de letras diferentes representam médias significativamente diferentes de acordo com o teste de Duncan ($P < 0,05$). Para cada espécie, valores assinalados com um asterisco (*) representam a média significativamente superior relativamente à comparação entre solventes.

Os flavonoides são os principais constituintes bioativos das plantas (Woisky & Salatino, 1998), pelo que também foram quantificados pelo método AlCl_3 , no entanto, só foi possível fazê-lo nos extratos metanólicos. Pensa-se que este grupo de compostos fenólicos seja responsável pela atividade antioxidante de inúmeras espécies (Bonvehí, Coll, & Jordà, 1994). Este método não levanta dúvidas sobre as interferências que possam haver, pois são praticamente nulas (Pękal & Pyrzyńska, 2014).

Na figura 3 exibem-se os resultados, expressos em equivalentes de quercetina por grama de extrato, obtidos através do método AlCl_3 . Os valores variam entre $30 \pm 1,49$ a $224,93 \pm 4,06 \mu\text{mol}_{\text{QE}}/\text{g}_{\text{extrato}}$. O extrato que apresentou valores significativamente mais elevados ($P < 0,05$) foi o da espécie *C. nepeta*, $224,93 \pm 8,11 \mu\text{mol}_{\text{QE}}/\text{g}_{\text{extrato}}$, seguido do de *H. italicum* e *M. spicata*, $158 \pm 4,04$ e $175,13 \pm 7,38 \mu\text{mol}_{\text{QE}}/\text{g}_{\text{extrato}}$, respetivamente. Os extratos com valores significativamente mais baixos foram os de *O. pes-caprae*, ($46,40 \pm 5,89$ e $30 \pm 1,49 \mu\text{mol}_{\text{QE}}/\text{g}_{\text{extrato}}$, para folhas e bolbos, respetivamente). Os extratos das outras espécies não apresentaram diferenças significativas entre si.

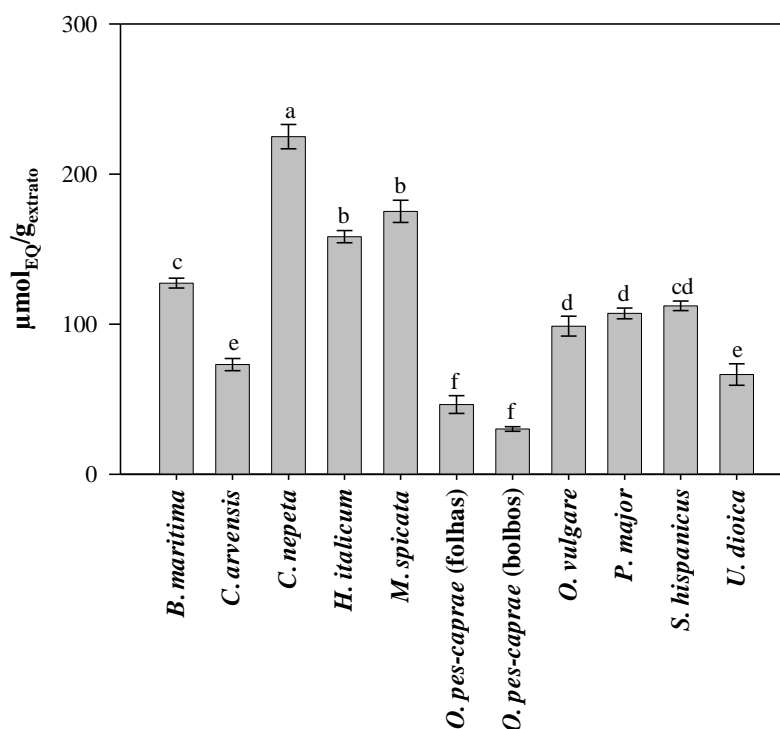


Figura 3. Quantificação do teor em flavonoides nos extratos metanólicos de diferentes espécies pelo método $AlCl_3$. Os valores representam a média \pm erro padrão das 3 repetições. No mesmo gráfico, valores seguidos de letras diferentes representam médias significativamente diferentes de acordo com o teste de Duncan ($P < 0,05$).

Os principais compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonoides) presentes nos extratos metanólicos foram preliminarmente identificados usando HPLC-DAD por comparação com padrões fenólicos puros conhecidos e expressos em mg/g de massa seca de extrato.

Os ácidos clorogénico (**8**) e rosmarínico (**21**) (figura 4) destacam-se como os compostos mais comuns e abundantes nos extratos analisados, com especial destaque para o ácido rosmarínico (**21**) presente nas três espécies estudadas da família Lamiaceae, sendo este um marcador da família (tabela 2). O extrato de *M. spicata* (figura 5) é o que tem maior teor deste ácido hidroxicinâmico seguido dos de *O. vulgare* > *H. italicum* > *C. nepeta* > *C. arvensis* (tabela 2).

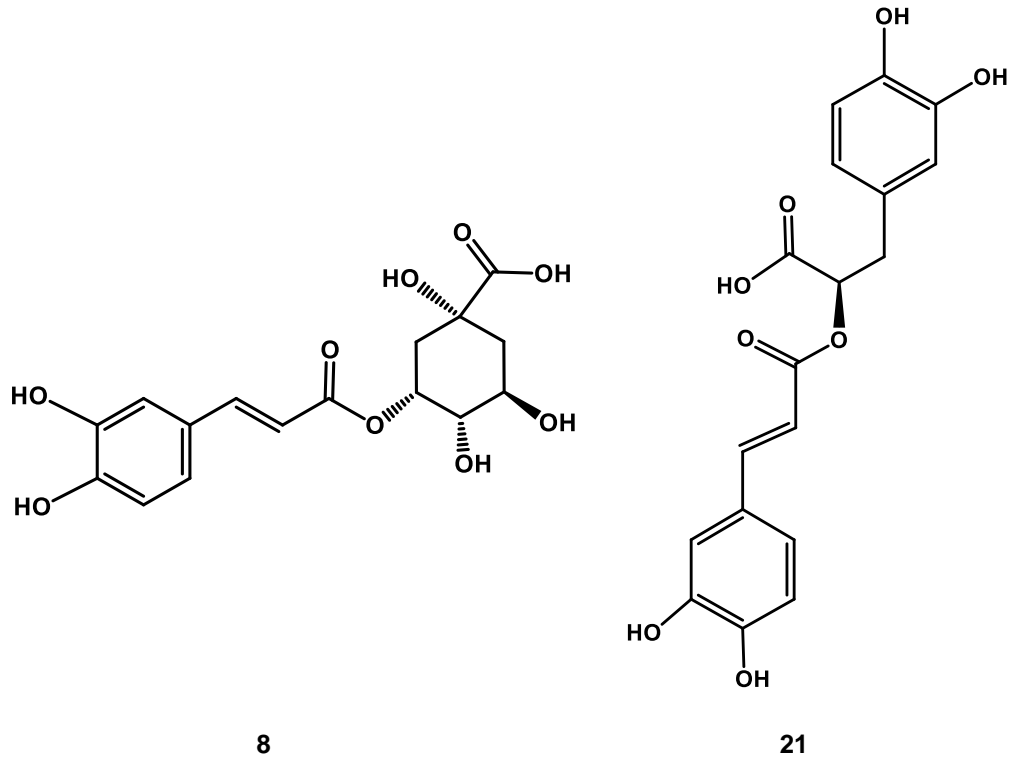


Figura 4. Estrutura de ácidos hidroxicinâmicos: ácido clorogênico (8) e ácido rosmarínico (21).

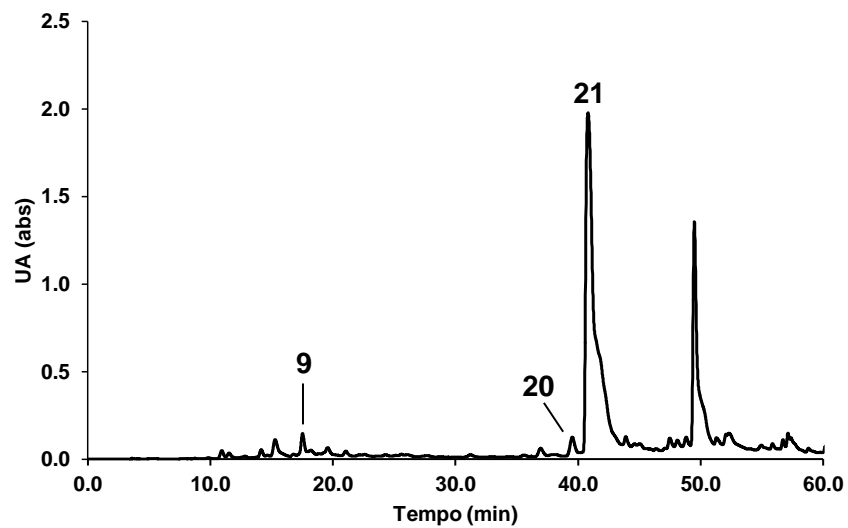


Figura 5. Cromatograma obtido por HPLC-DAD de *M. spicata* com detecção a 320 nm. Identidades dos compostos como descrita na tabela 2.

Tabela 2. Composição fenólica dos extratos metólicos de *C. nepeta*, *C. arvensis*, *H. italicum*, *M. spicata* e *O. vulgare* (mg/g).

	<i>C. nepeta</i>	<i>C. arvensis</i>	<i>H. italicum</i>	<i>M. spicata</i>	<i>O. vulgare</i>
Ácido gálgico (1)	-	-	-	-	1,19 ± 0,43
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico (2)	-	-	-	-	1,97 ± 0,33
Ácido 3- <i>o</i> -cafeoilquinico (4)	3,11 ± 0,11	-	-	-	-
(+)-Catequina (5)	-	-	-	-	1,03 ± 0,10
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico (6)	-	-	1,88 ± 0,09	-	-
Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquinico (8)	2,76 ± 0,22	4,63 ± 0,11	6,89 ± 0,86	-	-
Ácido cafeico (9)	-	-	-	1,00 ± 0,03	0,06 ± 0,002
(-)-Epicatequina (10)	-	-	-	-	4,65 ± 2,20
(-)-Epicatequina-3- <i>O</i> -galhato (11)	-	0,79 ± 0,17	-	-	-
Derivado de apigenina (13)	2,10 ± 0,10	-	-	-	-
Derivado de quercetina (19)	6,67 ± 0,71	-	-	-	-
Hesperetina-7- <i>O</i> -rutinósido (20)	-	-	-	9,78 ± 0,45	-
Ácido rosmarínico (21)	1,44 ± 0,08	0,18 ± 0,03	5,73 ± 1,30	35,63 ± 2,09	27,75 ± 0,86
Quercetina 3- <i>O</i> -galactosido (24)	-	0,57 ± 0,11	-	-	-
Quercetina 3- <i>O</i> -rutinósido (26)	5,87 ± 1,47	1,13 ± 0,30	-	-	-
Derivado de quercetina (27)	-	1,48 ± 1,09	-	-	-
Pinocembrina (35)	-	-	13,98 ± 0,88	-	-
Σ	21,95	8,78	34,48	46,41	36,65

Os valores representam a média ± desvio padrão das 3 repetições; -: não detetado;

É importante realçar, que neste estudo foram apenas identificados os principais compostos fenólicos. Nos extratos de *M. spicata*, *H. italicum*, *O. vulgare* e *O. pes-caprae* (folha) foram detetados alguns compostos com espectros característicos de ácidos hidroxicinâmicos (figura 6), no entanto não foi possível identificá-los nem quantificá-los.

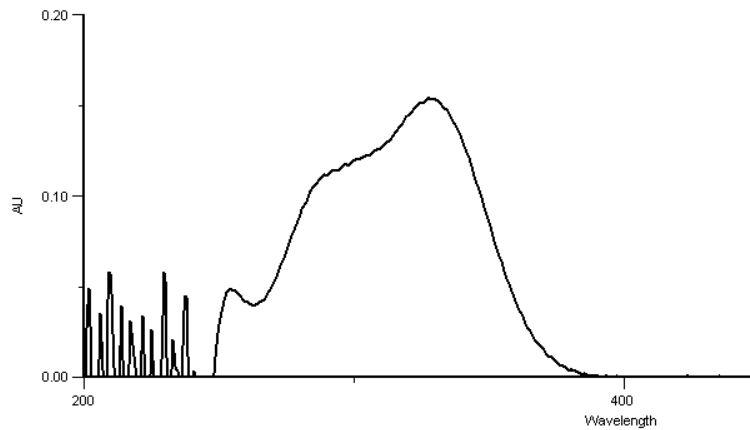


Figura 6. Espectro característico de um ácido hidroxicinâmico.

Da análise dos cromatogramas, podemos identificar o ácido clorogénico (**8**) em extratos de seis das espécies estudadas (tabela 2). O extrato de *S. hispanicus* (figura 7) é o que apresenta maior teor deste composto, seguindo-se os de *U. dioica* > *H. italicum* > *C. arvensis* > *C. nepeta* > *B. maritima*. Não foram encontrados trabalhos sobre a caracterização fenólica de extratos de *B. maritima* e de *H. italicum*, no entanto foram encontrados trabalhos com espécies do mesmo género onde este composto já tinha sido descrito (Pyo, Lee, Logendra, & Rosen, 2004; Taglialatela-Scafati et al., 2013; Ben Haj Koubaier et al., 2014). Os resultados obtidos anteriormente com *U. dioica* vão ao encontro dos resultados obtidos neste trabalho (tabela 3) (Pinelli et al., 2008). O mesmo já não acontece para *O. pes-caprae*, tendo estudos anteriores mostrado que esta espécie tem ácido clorogénico (Güçlütürk et al., 2012), mas nas condições usadas neste trabalho este não foi detetado; para além do uso de gradiente diferente a forma de extração e solvente usado podem ser responsáveis por esta diferença, uma vez que os restantes compostos são coincidentes.

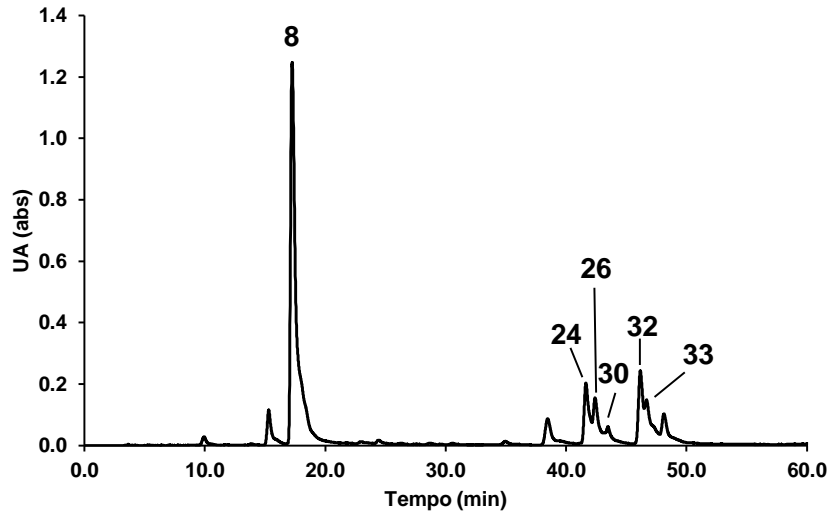


Figura 7. Cromatograma obtido por HPLC-DAD de *S. hispanicus* com detecção a 350 nm. Identidade dos compostos como descrita na tabela 2.

Tabela 3. Composição fenólica dos extratos metanólicos de *B. maritima*, *O. pes-caprae*, *P. major*, *S. hispanicus* e *U. dioica* (mg/g).

	<i>B. maritima</i>	<i>O. pes-caprae</i>		<i>P. major</i>	<i>S. hispanicus</i>	<i>U. dioica</i>
		Folha	Bolbo			
Ácido dihidroxibenzoico (3)	-	-	-	0,01 ± 0,002	-	-
Ácido 2,4-dihidroxibenzoico (7)	1,53 ± 0,19	-	-	-	-	-
Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquinico (8)	0,73 ± 0,02	-	-	-	33,30 ± 1,09	22,20 ± 0,72
Ácido <i>p</i> -cumárico (12)	-	-	-	-	-	0,14 ± 0,02
Luteolina 8- <i>C</i> -glucosido (14)	-	0,74 ± 0,02	-	-	-	-
Verbascósido (15)	-	-	-	32,37 ± 0,50	-	-
Derivado de luteolina (16)	-	1,98 ± 0,21	-	-	-	-
Luteolina 6- <i>C</i> -glucósido (17)	-	2,92 ± 0,12	-	-	-	-
Derivado de luteolina (18)	-	2,19 ± 0,09	0,12 ± 0,01	-	-	-
Derivado de apigenina (22)	-	1,27 ± 0,26	-	-	-	-
Derivado de luteolina (23)	-	-	-	3,46 ± 0,37	-	-
Quercetina 3- <i>O</i> -galactósido (24)	3,62 ± 0,29	-	-	-	2,68 ± 0,19	-
Derivado de apigenina (25)	-	-	0,22 ± 0,01	-	-	-
Quercetina 3- <i>O</i> -rutinósido (26)	5,47 ± 0,76	-	-	-	2,09 ± 0,22	1,32 ± 0,13
Derivado de quercetina (27)	-	-	-	-	-	-
Derivado de quercetina (28)	2,54 ± 0,64	-	-	-	-	-
Apigenina 7- <i>O</i> -glucósido (29)	-	0,21 ± 0,01	-	-	-	-
Campferol 3- <i>O</i> -glucosido (30)	-	-	-	-	29,34 ± 3,22	-
Derivado de campferol (31)	2,67 ± 0,38	-	-	-	-	-

Campferol 3- <i>O</i> -rutinósido (32)	3,85 ± 0,54	-	-	-	2,27 ± 0,27	0,07 ± 0,01
Isorhamnetina 3- <i>O</i> -rutinósido (33)	-	-	-	-	0,28 ± 0,03	-
Derivado de campferol (34)	3,73 ± 0,54	-	-	-	-	-
Σ	24,14	9,31	0,34	36,84	69,96	23,73

Os valores representam a média ± desvio padrão das 3 repetições; -: não detetado;

O extrato de *B. maritima* foi aquele onde foi identificado o maior número de picos (figura 8), sendo a rutina (**26**) o composto maioritário (5,47 ± 0,76 mg/g) (figura 9); todos os outros compostos aparecem em menor quantidade. A rutina (**26**) foi também encontrada nos extratos de *C. nepeta* > *S. hispanicus* > *U. dioica* > *C. arvensis*.

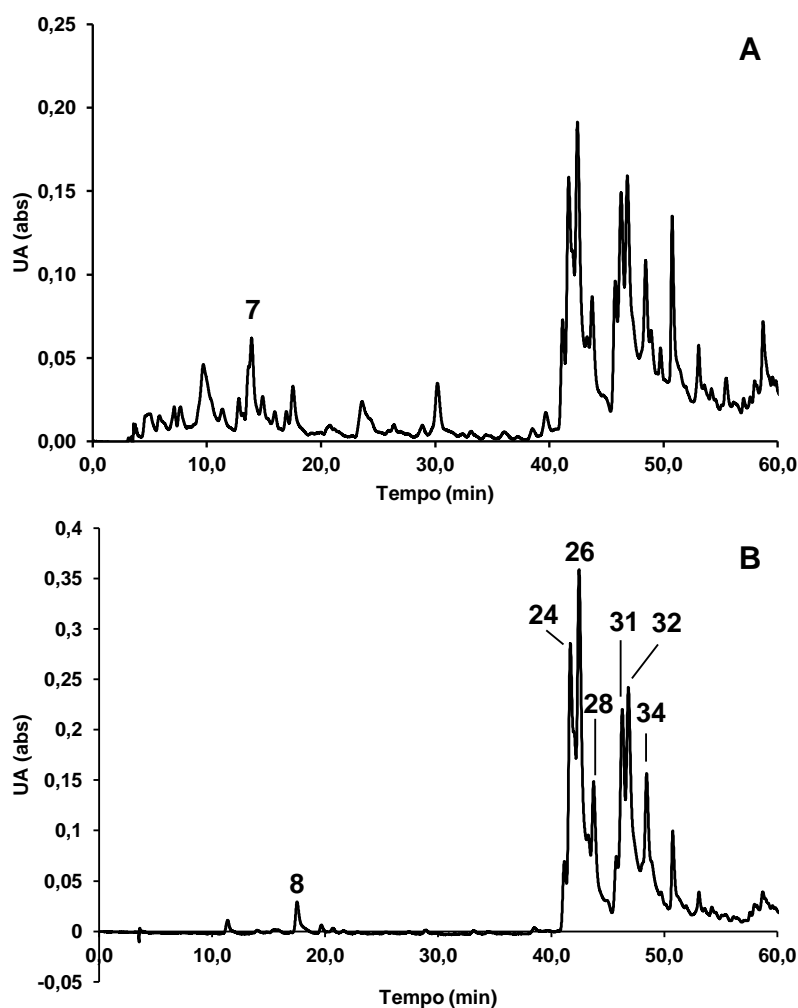


Figura 8. Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD de *B. maritima*. **A** – detecção a 280 nm; **B** – detecção a 350 nm. Identidade dos compostos como descrita nas tabelas 2 e 3 no texto.

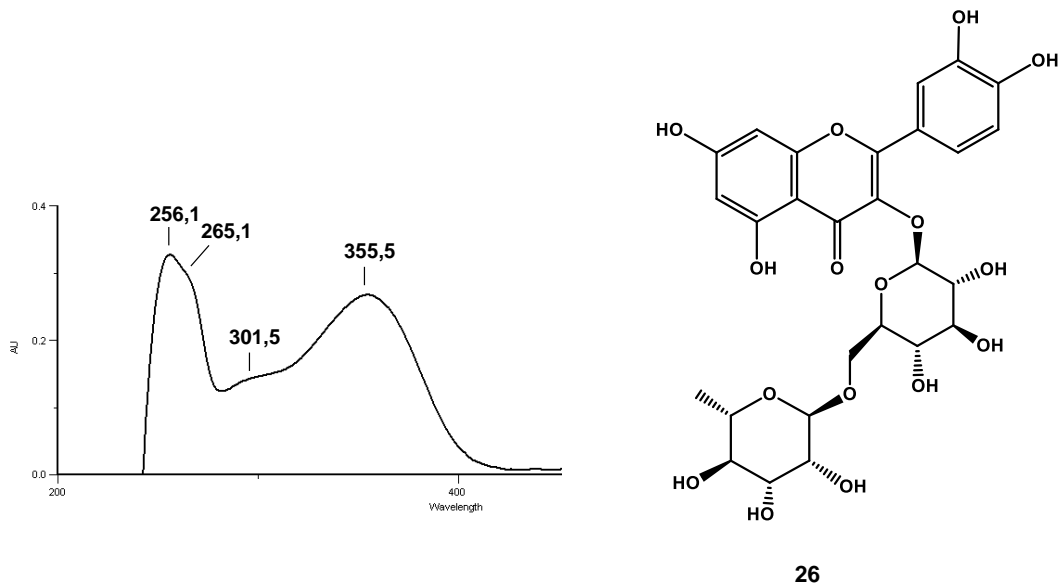


Figura 9. Espectro característico da Quercetina 3-O-rutinósido (= Rutina) e a sua estrutura.

3.2 Avaliação da capacidade antioxidante

O consumo de frutas e vegetais está relacionado com a diminuição da morbidade e mortalidade por doenças degenerativas, o que pode ser parcialmente atribuído ao poder antioxidantes dos seus metabolitos secundários (Gey, 1990; La Vecchia, Altieri, & Tavani, 2001). A necessidade de substituição dos antioxidantes sintéticos, como por exemplo BHA e BHT, por antioxidantes naturais, tem motivado a pesquisa de novas fontes de antioxidantes seguros, baratos e de origem natural, reduzindo assim a toxicidade e os riscos para a saúde (Ito et al., 1986; Safer & al-Nughamish, 1999; Li, Wong, Cheng, & Chen, 2008;). As plantas são o melhor alvo para esta procura, pois têm um vasto leque de metabolitos secundários e grande parte deles tem a desejável atividade antioxidante, assim como outros usos biológicos, desempenho terapêutico e baixa toxicidade (Li et al., 2008). Há diferentes métodos para avaliar a atividade antioxidante, mas nenhum é capaz de medir a capacidade antioxidante total. Dado que a capacidade antioxidante é influenciada por vários fatores, não é possível ser avaliada por um único método e por isso neste trabalho utilizaram-se três métodos diferentes.

A figura 10 mostra os resultados obtidos com os extratos metanólicos e aquosos de todas as espécies com o método DPPH. O DPPH é um radical livre estável e absorve a 515 nm; no entanto quando é reduzido por um antioxidante, perde essa absorção (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995; Bondet, Brand-Williams, & Berset, 1997; Wettasinghe & Shahidi,

2000). A capacidade de redução dos radicais DPPH é marcada pela mudança de cor da mistura reacional. Este método é amplamente usado para determinar a atividade antirradicalar ou antioxidante de compostos fenólicos purificados, bem como extratos naturais de plantas (Singh, Chidambara Murthy, & Jayaprakasha, 2002). Este método é usado com bastante frequência e tem uma boa reprodutibilidade, no entanto pode haver interferência da cor do DPPH com a da amostra, como acontece nas amostras que contêm antocianinas, levando a uma subestimação da atividade antioxidante (Arnao, 2000).

Todos os extratos analisados neste trabalho mostraram capacidade de inibir o radical DPPH. Em todas as espécies, a concentração necessária para inibir o radical DPPH foi sempre significativamente inferior ($P < 0,05$) nos extratos metanólicos. Analisando os resultados obtidos com os extratos metanólicos, verificou-se que o extrato que apresentou o valor de IC_{50} significativamente mais baixo foi o de *O. vulgare*, $4,64 \pm 0,13$, seguido do de *M. spicata* $8,93 \pm 0,26$ $\mu\text{g/ml}$. Por sua vez, os valores mais elevados foram obtidos para os extratos de bolbos de *O. pes-caprae*, $280,20 \pm 2,32$ $\mu\text{g/ml}$, seguidos do extrato de folhas desta espécie, $180,76 \pm 2,92$ $\mu\text{g/ml}$. No entanto, nos extratos aquosos foram quatro as espécies que apresentaram valores de IC_{50} significativamente mais baixos, *C. nepeta*, *H. italicum*, *M. spicata* e *O. vulgare*, $15,06 \pm 0,65$, $31,65 \pm 1,04$, $23,80 \pm 2,14$ e $14,68 \pm 0,90$ $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. E neste tipo de extratos, o de bolbos de *O. pes-caprae* seguido do de *P. major* foram os que apresentaram valores de IC_{50} mais elevados ($420,12 \pm 18,97$ e $265,69 \pm 3,34$ $\mu\text{g/ml}$, respectivamente).

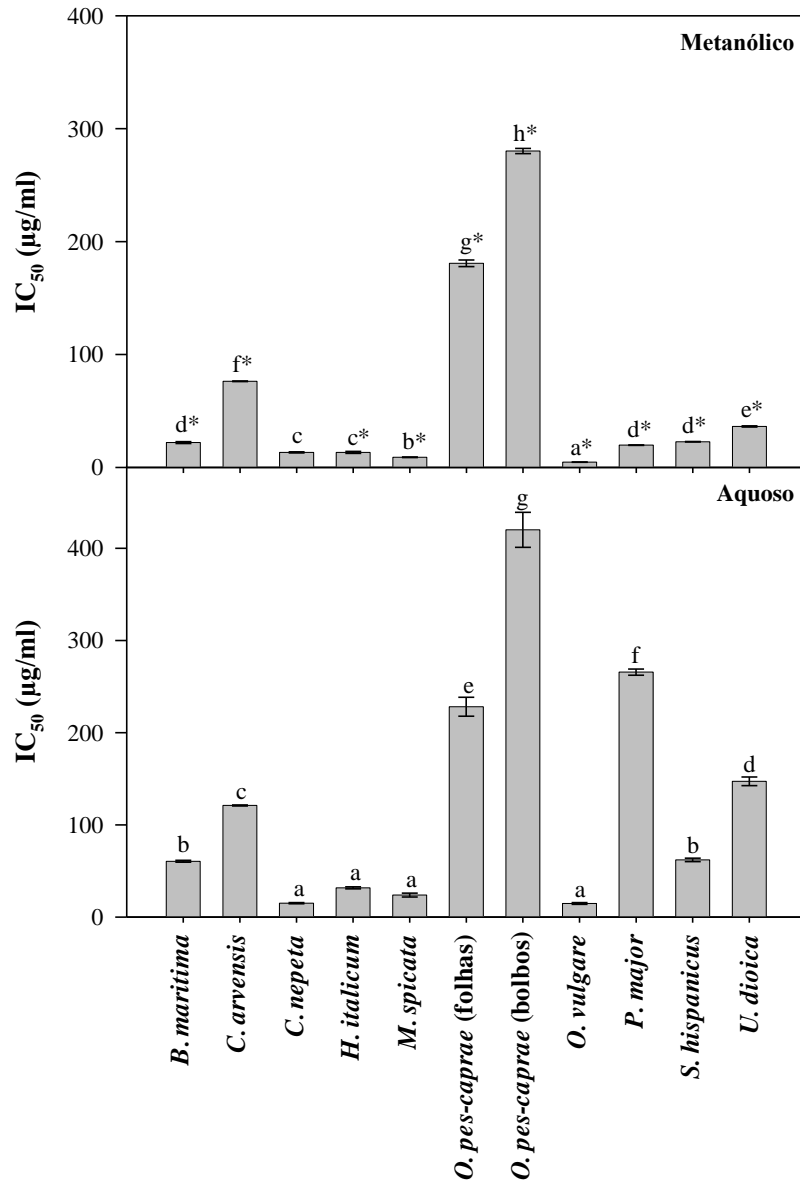


Figura 10. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos metanólicos e aquosos de diferentes espécies pelo método DPPH. Os valores representam a média \pm erro padrão das 3 repetições. No mesmo gráfico, valores seguidos de letras diferentes representam médias significativamente diferentes de acordo com o teste de Duncan ($P < 0,05$). Para cada espécie, valores assinalados com um asterisco (*) representam a média significativamente inferior relativamente à comparação entre solventes. Controlo positivo (BHT): $IC_{50} = 462,24 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$.

Na figura 11 estão representados todos os resultados referentes à inibição do radical $ABTS^{\bullet+}$. Este método é muito usado em extratos vegetais, pois o máximo de absorção de comprimento de onda é 734 nm e elimina a interferência da cor dos extratos das plantas (Awika, Rooney, Wu, Prior, & Cisneros-Zevallos, 2003; Li et al., 2008). Todos os extratos

mostraram capacidade de inibir o radical ABTS^{•+}, os valores são expressos em equivalentes de trolox por grama de extrato e variam entre $15,35 \pm 0,20$ e $1479,56 \pm 12,29$ $\mu\text{mol}_{\text{ET}}/\text{g}_{\text{extrato}}$. Os extratos metanólicos foram os que apresentaram resultados significativamente superiores ($P < 0,05$). O valor mais elevado foi obtido para o extrato de *O. vulgare* seguido do de *C. nepeta*, $1479 \pm 12,29$ e $1050,31 \pm 81,46$ $\mu\text{mol}_{\text{ET}}/\text{g}_{\text{ext}}$, respetivamente; por sua vez os valores mais baixos foram obtidos para os extratos de *C. arvensis* e de *O. pes-caprae* (folhas e bolbos) ($139,04 \pm 5,50$, $103,10 \pm 3,45$ e $54,62 \pm 3,92$ $\mu\text{mol}_{\text{ET}}/\text{g}_{\text{extrato}}$, respetivamente), seguindo-se os extratos de *U. dioica* ($258,10 \pm 12,16$ $\mu\text{mol}_{\text{ET}}/\text{g}_{\text{extrato}}$).

No caso dos extratos aquosos, são os das espécies *O. vulgare* e *C. nepeta* que exibem os valores significativamente mais elevados, $425,10 \pm 21,66$ e $414,48 \pm 16,50$ $\mu\text{mol}_{\text{ET}}/\text{g}_{\text{extrato}}$, respetivamente, seguindo-se o extrato de *H. italicum*, $358,35 \pm 13,65$ $\mu\text{mol}_{\text{ET}}/\text{g}_{\text{extrato}}$. Por sua vez, os valores mais baixos foram obtidos para os extratos de *O. pes-caprae* (folhas e bolbos) e *P. major* ($39,95 \pm 1,99$, $102,73 \pm 0,20$ e $26,46 \pm 0,63$ $\mu\text{mol}_{\text{ET}}/\text{g}_{\text{extrato}}$, respetivamente), depois dos de *B. maritima*, *C. arvensis* e *U. dioica* ($103,81 \pm 3,67$, $102,73 \pm 1,44$ e $102,92 \pm 1,61$ $\mu\text{mol}_{\text{ET}}/\text{g}_{\text{extrato}}$).

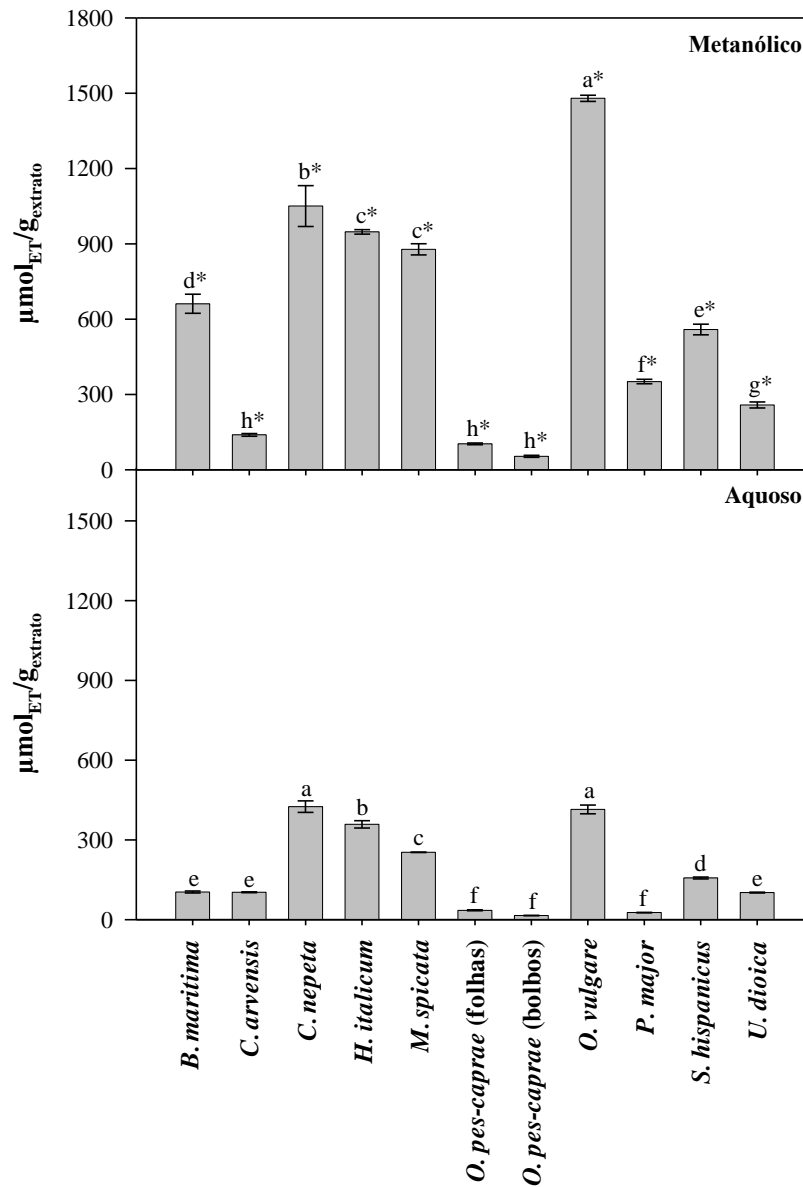


Figura 11. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos metanólicos e aquosos de diferentes espécies pelo método TEAC. Os valores representam a média \pm erro padrão das 3 repetições. No mesmo gráfico, valores seguidos de letras diferentes representam médias significativamente diferentes de acordo com o teste de Duncan ($P < 0,05$). Para cada espécie, valores assinalados com um asterisco (*) representam a média significativamente superior relativamente à comparação entre solventes.

A figura 12 representa os resultados obtidos pelo método FRAP. Este método é um ensaio simples que dá resultados reprodutíveis, é versátil e aplicado a extratos aquosos e alcoólicos de plantas (Benzie & Strain, 1996). Neste ensaio, a capacidade antioxidante é medida com base na capacidade para reduzir o ferro (III) e iões ferrosos (II) (Li et al., 2008), e

os resultados são expressos em equivalentes de quercetina, o que significa que a capacidade redutora de 1 mg de amostra é equivalente à de 1 nmol de ácido ascórbico (Ordóñez, Gomez, Vattuone, & Lsla, 2006). Os valores obtidos com este método variaram entre $1746,76 \pm 4,51$ e $29,69 \pm 0,82 \mu\text{mol}_{\text{EAA}}/\text{g}_{\text{extrato}}$. De uma forma geral, os valores são significativamente superiores nos extratos metanólicos ($P < 0,05$), exceto para a espécie *C. nepeta* em que o valor significativamente mais elevado foi obtido para o extrato aquoso.

Analisando os resultados obtidos com extratos metanólicos, verifica-se que foi o extrato de *O. vulgare* que apresentou o valor significativamente mais elevado seguido do de *M. spicata* ($1746,76 \pm 45,11$ e $996,88 \pm 13,08 \mu\text{mol}_{\text{EAA}}/\text{g}_{\text{extrato}}$, respetivamente), e os mais baixos foram exibidos pelos extratos de *O. pes-caprae* (folhas e bolbos, respetivamente $97,69 \pm 2,73$ e $48,03 \pm 1,45 \mu\text{mol}_{\text{EAA}}/\text{g}_{\text{extrato}}$) seguindo-se o extrato de *C. arvensis* ($121,86 \pm 14,56 \mu\text{mol}_{\text{EAA}}/\text{g}_{\text{ext}}$). No caso dos extratos aquosos os valores mais elevados foram obtidos para *O. vulgare* e *C. nepeta*, seguidos de *M. spicata* ($658,04 \pm 37,60$, $626,82 \pm 7,82$ e $492,80 \pm 25,22 \mu\text{mol}_{\text{EAA}}/\text{g}_{\text{extrato}}$). O extrato obtido a partir dos bolbos de *O. pes-caprae* apresentou o valor significativamente mais baixo ($29,69 \pm 0,82 \mu\text{mol}_{\text{EAA}}/\text{g}_{\text{extrato}}$), seguindo-se o extrato das folhas da mesma espécie e o de *P. major* ($81,23 \pm 1,96$ e $64,84 \pm 3,87 \mu\text{mol}_{\text{EAA}}/\text{g}_{\text{extrato}}$). Com este método não foi possível detetar capacidade antioxidante nos extratos de *C. arvensis* e de *U. dioica*.

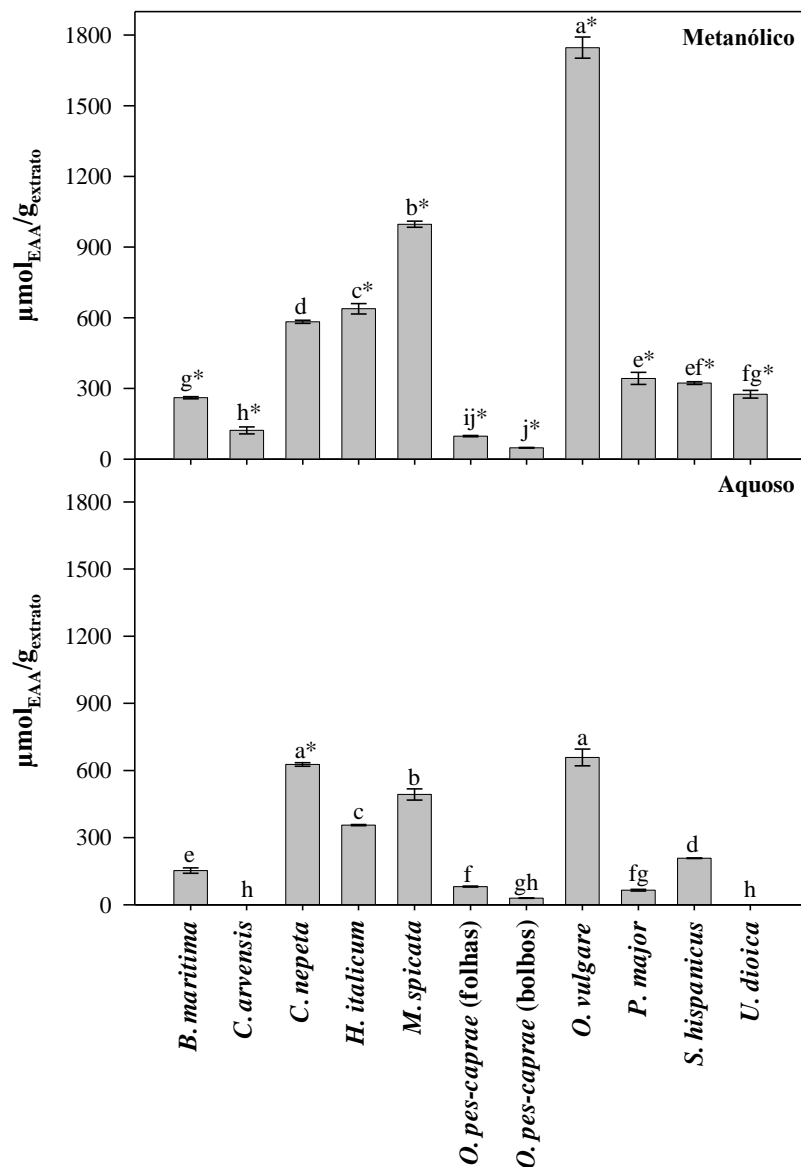


Figura 12. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos metanólicos e aquosos de diferentes espécies pelo método FRAP. Os valores representam a média \pm erro padrão das 3 repetições. No mesmo gráfico, valores seguidos de letras diferentes representam médias significativamente diferentes de acordo com o teste de Duncan ($P < 0,05$). Para cada espécie, valores assinalados com um asterisco (*) representam a média significativamente superior relativamente à comparação entre solventes.

O rendimento de uma extração por solvente, técnica mais comum para o isolamento de compostos antioxidantes e preparação de amostras vegetais, depende não só do solvente extrator mas também da temperatura a que se encontra, do tempo de contato com o material vegetal e, claro, do tipo de material vegetal e da espécie (Pinelo, Manzocco, José Nuñez, & Cristina Nicoli, 2004). A polaridade e estrutura química dos compostos extraídos também

interferem no rendimento da extração, pois estes podem ou não ser solúveis no solvente escolhido, sendo normalmente usados solventes orgânicos polares para uma maior recuperação de compostos fenólicos (Peschel et al., 2006; Sultana, Anwar, & Ashraf, 2009). No entanto, o ideal é usar vários solventes com polaridades diferentes para uma melhor análise porque não existe um solvente inteiramente satisfatório para a extração de todos os compostos antioxidantes presentes no material vegetal (Bravo, Abia, & Saura-Calixto, 1994). O metanol foi o solvente orgânico escolhido para este trabalho dado que, segundo a bibliografia, é conhecido como o mais eficaz para a extração de compostos fenólicos (Pinelo et al., 2004). O outro solvente selecionado foi a água, uma vez que as espécies em estudo são comestíveis, e este solvente é o usado na preparação das espécies para consumo. Neste trabalho, embora para maioria das espécies os rendimentos de extração obtidos com os dois solventes não variem muito (tabela 4), os extratos metanólicos apresentaram maior atividade e maior teor de compostos fenólicos e flavonoides do que os extratos aquosos, o que vai ao encontro de estudos anteriores (Costa, et al. 2013). Os extratos aquosos apresentam frequentemente atividades mais baixas, uma vez que a água apresenta baixa polaridade, o que não significa que os extratos não tenham compostos ativos (Franco et al., 2008).

Tabela 4. Rendimentos de extração (% , p/p) dos diferentes extratos estudados.

	Metanólicos	Aquosos
<i>B. maritima</i>	17,00	12,30
<i>C. arvensis</i>	21,35	25,92
<i>C. nepeta</i>	27,95	24,90
<i>H. picardii</i>	24,86	10,47
<i>M. spicata</i>	26,24	25,23
<i>O. pes-caprae</i> (folha)	46,84	44,94
<i>O. pes-caprae</i> (bolbo)	45,02	38,15
<i>O. vulgare</i>	23,89	20,99
<i>P. major</i>	20,23	21,92
<i>S. hispanicus</i>	31,00	29,37
<i>U. dioica</i>	18,41	24,43

Os compostos fenólicos são a principal classe de antioxidantes naturais e há uma relação entre o teor destes compostos com a atividade antioxidante dos extratos vegetais (Lizcano et al., 2010; Wu et al., 2011). Para que seja possível a comparação da atividade antioxidante obtida por diferentes autores é necessário que tenham sido usadas condições experimentais similares (solvente, técnica de extração, material vegetal, método, condições analíticas, formas de expressar os resultados, etc.) (Villaño, Fernández-Pachón, Troncoso, & García-Parrilla, 2005; Pérez-Jiménez et al., 2008; Terpinč, Čeh, Ulrih, & Abramovič, 2012). Dado que os trabalhos publicados sobre as espécies em estudo neste trabalho são escassos ou efetuados noutras condições, é difícil fazer uma comparação direta dos resultados.

Aplicou-se o teste de Pearson para avaliar a correlação entre os resultados obtidos com os cinco métodos testados, F-C, AlCl₃, DPPH, TEAC e FRAP (tabela 5). Verificou-se a existência de correlação significativa entre os resultados de atividade antioxidante obtidos pelos diferentes métodos, e entre estes e os valores de fenóis e flavonoides totais. Esta análise demonstra o envolvimento destes compostos na atividade antioxidante dos extratos estudados à semelhança do observado por outros autores (Zhao et al., 2006; Gonçalves, Grevenstuck, Martins, & Romano, 2015).

Tabela 5. Matriz de correlação (coeficientes de correlação de Pearson) dos resultados obtidos com os diferentes métodos.

	AlCl₃	FRAP	TEAC	DPPH
F-C	0,423*	0,971**	0,865**	-0,619**
DPPH	-0,636**	-0,551**	-0,600**	-
TEAC	0,630**	0,870**	-	
FRAP	0,376**	-		

* A correlação é significativa para P<0,05

** A correlação é significativa para P<0,01

3.3 Inibição *in vitro* dos enzimas α -amilase e α -glucosidase

A *Dm* é das doenças crónicas que mais pessoas afeta no mundo, desde crianças a idosos. Um dos tratamentos para a *Dmt2* baseia-se na diminuição da hiperglicemia pós-prandial, ou seja, retardar a absorção da glucose no intestino através da inibição dos enzimas da hidrólise de hidratos de carbono (α -amilase e α -glucosidade) (Ali, Houghton, &

Soumyanath, 2006). Atualmente são usados acarbose, miglitol e voglibose como inibidores (Nathan, 2007), os quais retardam a digestão dos hidratos de carbono e, conseqüentemente, reduzem a taxa de absorção de glicose (Rabasa-Lhoret & Chiasson, 2003). Apesar de já haver alguns compostos químicos para o tratamento desta patologia, as plantas continuam a desempenhar um papel importante no tratamento da *Dm*, especialmente em países em desenvolvimento, onde o acesso a tratamentos modernos não é fácil (Grover, Yadav, & Vats, 2002). No entanto, em países desenvolvidos também há procura de plantas, mas como uma alternativa, evitando os efeitos colaterais associados ao uso da insulina e antidiabéticos orais (Marles & Farnsworth, 1995).

Na tabela 6 apresentam-se as percentagens de inibição dos enzimas α -amilase e α -glucosidade dos extratos metanólicos das diferentes espécies estudadas.

Tabela 6. Capacidade inibitória da atividade dos enzimas α -amilase e α -glucosidade *in vitro*, representada em percentagem de inibição (%), dos extratos metanólicos (a 10 mg/ml) das várias espécies em estudo.

	α -amilase	α -glucosidade
<i>B. maritima</i>	9,43 \pm 1,28 bc	86,48 \pm 1,33 b
<i>C. arvensis</i>	11,19 \pm 1,44 bc	39,04 \pm 1,53 d
<i>C. nepeta</i>	16,45 \pm 0,94 a	66,62 \pm 1,61 c
<i>H. italicum</i>	10,03 \pm 1,87 bc	96,65 \pm 1,34 a
<i>M. spicata</i>	6,81 \pm 0,65 c	79,64 \pm 0,69 b
<i>O. pes-caprae</i> (folhas)	8,80 \pm 0,43 bc	31,88 \pm 2,33 d
<i>O. pes-caprae</i> (bolbos)	8,01 \pm 1,42 bc	35,41 \pm 7,05 d
<i>O. vulgare</i>	6,79 \pm 0,57 c	58,41 \pm 1,97 c
<i>P. major</i>	12,07 \pm 2,74 b	39,98 \pm 0,96 d
<i>S. hispanicus</i>	8,20 \pm 1,01 bc	16,14 \pm 2,76 e
<i>U. dioica</i>	10,66 \pm 0,84 bc	36,64 \pm 1,91 d

Os valores representam a média \pm erro padrão de 3 repetições. Na mesma coluna, valores seguidos de letras diferentes representam médias significativamente diferentes de acordo com o teste de Duncan $P < 0,05$. Controlo positivo (acarbose): $IC_{50} = 206,99 \pm 3,20$ e $619,47 \pm 5,36$ μ g/ml, para a α -amilase e α -glucosidade, respetivamente.

O extrato que mostrou maior capacidade de inibição do enzima α -amilase foi o de *C. nepeta* (percentagem de inibição de $16,45 \pm 0,94$ %) e os que apresentaram a menor capacidade de inibição foram os extratos de *O. vulgare* e *M. spicata* ($6,79 \pm 0,57$ e $6,81 \pm 0,65$ %, respetivamente). Não se verificaram diferenças significativas entre as percentagens de inibição obtidas com os extratos das restantes espécies ($P \geq 0,05$) Relativamente à α -glucosidase, o extrato que permitiu obter a percentagem de inibição significativamente mais elevadas foi o de *H. italicum*, seguindo-se o de *B. maritima* e *M. spicata*, $96,65 \pm 1,34$, $86,48 \pm 1,33$ e $79,64 \pm 0,69$ %, respetivamente. A menor capacidade inibitória foi exibida pelo extrato de *S. hispanicus*, $16,14 \pm 2,76$ %, seguido dos de *C. arvensis*, *O. pes-caprae* (folhas e bolbos), *P. major* e *U. dioica*, com inibições de $39,04 \pm 1,53$, $31,88 \pm 2,33$, $35,41 \pm 7,05$, $39,98 \pm 0,96$ e $36,64 \pm 1,91$ %, respetivamente.

Os resultados obtidos vão de encontro aos estudos de Kwon et al. (2006), onde se verifica que as plantas comestíveis apresentam baixa capacidade inibitória do enzima α -amilase e forte contra a atividade da α -glucosidase, podendo ser utilizadas como uma terapia eficaz para a hiperglicemia pós-prandial, com efeitos colaterais mínimos. É também relatado que a excessiva inibição de α -amilase pancreática resulta na fermentação bacteriana anormal no cólon (Bischof, 1994; Horii et al., 1986), pelo que as espécies em estudo apresentam os requisitos necessários para o tratamento desta patologia.

3.4 Inibição *in vitro* do enzima AChE

A demência afeta grande parte da população idosa sendo uma preocupação que tem motivado a pesquisa de novos agentes terapêuticos. Em doentes de Alzheimer são observados défices cognitivos e funcionais (Mota et al., 2012). Há estudos que demonstram que estes défices estão relacionados com a degeneração do sistema colinérgico, que ocorre devido à diminuição dos níveis plasmáticos de ACh (Darvesh et al., 2003). Os resultados observados com inibidores de colinesterases (ChEs) têm estimulado novas pesquisas dado que estes têm aumentado a transmissão sináptica colinérgica por inibição da AChE na fenda sináptica, diminuindo a hidrólise da ACh libertada a partir dos neurónios pré-sinápticos (Grossberg, 2003). A AChE é um enzima fundamental na propagação do impulso nervoso, inativa a ação do neurotransmissor ACh hidrolisando-o em acetato e colina (Pourshojaei et al., 2015).

Produtos naturais podem ter um maior potencial de sucesso no tratamento preventivo e/ou terapêutico por antioxidantes e/ou inibidores de ChEs. Sabe-se que os compostos fenólicos estão envolvidos no efeito protetor e doenças neurodegenerativas, dado que estes têm diferentes alvos intracelulares podendo tornar-se uma solução eficiente para reduzir a incidência da DA (Ramassamy, 2006).

Na tabela 7 estão representadas as percentagens de inibição dos extratos metanólicos das diferentes espécies em estudo.

Tabela 7. Capacidade inibitória do enzima AChE *in vitro*, representada em percentagem de inibição (%) dos extratos metanólicos (a 10 mg/ml) das diferentes espécies em estudo.

	AChE
<i>B. maritima</i>	46,92 ± 5,80 b
<i>C. arvensis</i>	22,23 ± 1,16 cd
<i>C. nepeta</i>	48,78 ± 5,21 b
<i>H. italicum</i>	78,29 ± 2,44 a
<i>M. spicata</i>	72,33 ± 2,65 a
<i>O. pes-caprae</i> (folhas)	12,53 ± 2,02 de
<i>O. pes-caprae</i> (bolbos)	30,48 ± 4,93 c
<i>O. vulgare</i>	20,11 ± 3,56 cd
<i>P. major</i>	48,79 ± 0,33 b
<i>S. hispanicus</i>	6,54 ± 2,04 e
<i>U. dioica</i>	21,09 ± 1,28 cd

Os valores representam a média ± erro padrão de 3 repetições. Na mesma coluna, valores seguidos de letras diferentes representam médias significativamente diferentes de acordo com o teste de Duncan $P < 0,05$. Controlo positivo (galantamina): $IC_{50} = 2,20 \pm 0,04 \mu\text{g/ml}$.

Os extratos que apresentaram percentagens de inibição significativamente mais elevadas foram os de *H. italicum* e *M. spicata* ($78,29 \pm 2,44$ e $72,33 \pm 2,65$ %, respetivamente), seguindo-se os de *B. maritima*, *C. nepeta* e *P. major* ($46,92 \pm 5,80$, $48,78 \pm 5,21$ e $48,79 \pm 0,33$ %, respetivamente). Por outro lado, o extrato de *S. hispanicus* ($6,54 \pm 2,04$ %) foi o menos eficiente na inibição da AChE.

Foram os extratos que apresentaram maior capacidade antioxidante que simultaneamente exibiram maior eficácia de inibição da AChE, e uma vez que apresentam estas duas atividades, podem ser considerados fortes candidatos para o tratamento da patologia. O potencial dos compostos fenólicos para inibir a atividade da AChE tem sido frequentemente relatado (Williams, Sorribas, & Howes, 2011; Costa, Gonçalves, Valentão, Andrade, & Romano, 2013). Além disso, vários autores têm relacionado o teor em ácido rosmarínico (**21**) com a atividade inibitória da AChE dos extratos (Iuvone, De Filippis, Esposito, D'Amico, & Izzo, 2006; Hamaguchi, Ono, Murase, & Yamada, 2009). Assim, esperava-se que as plantas pertencentes à família Lamiaceae tivessem fortes inibições devido à presença do ácido rosmarínico, característico desta família (Petersen, 2003); o que aconteceu para as espécies *H. italicum* e *M. spicata*, no entanto isso não se verificou na espécie *O. vulgare*. Pensa-se que poderá ter ocorrido o fenómeno Hormesis que explica que uma dose elevada de droga pode inibir o seu efeito desejável (Calabrese, Iavicoli, & Calabrese, 2013), uma vez que a concentração de ácido rosmarínico é bastante elevada juntamente com os restantes ácidos hidroxicinâmicos presentes, poderão ter desencadeado este fenómeno. Este composto descrito como inibidor da AChE (Kwon et al., 2010), atua através da barreira sangue-cérebro (Ito, Sun, Watanabe, Okamoto, & Hatano, 2008), assim como também exibe efeitos cardioprotetores, atividade inibitória da peroxidação lipídica além das atividades antioxidantes associadas à eliminação de radicais livres (Maas, Petereit, & Hensel, 2009). Há também estudos que relatam que vários flavonoides, nomeadamente quercetinas, já se relevaram bons inibidores da atividade da AChE (Brühlmann, Marston, Hostettmann, Carrupt, & Testa, 2004; Jung & Park, 2007).

3.5 Inibição *in vitro* do enzima tirosinase

A DP é uma desordem neurodegenerativa progressiva, caracterizada pela degeneração seletiva da dopamina molecular dos neurónios pigmentados. Localizados, principalmente, na substancia negra, estes neurónios, que contêm neuromelanina, são particularmente suscetíveis à degeneração, e a sua despigmentação é uma marca do estado avançado da doença (Jenner, 2003). Pensa-se que a patogénese e a progressão da neurodegeneração na substancia negra incluem stress oxidativo, disfunções mitocondriais, e inflamação e distúrbios do metabolismo proteico (Kikuchi et al., 2002). A tirosinase é um enzima chave na biossíntese de melaninas e outros compostos; catalisa a hidrolisação da tirosina a L-DOPA e a oxidação de L-DOPA a

dopaquinona (Korner & Pawelek, 1982). Vários estudos demonstram a expressão do gene da tirosinase e a sua proteína, e a sua atividade catalítica nos neurónios da substância negra (Miranda, Botti, Bonfigli, Ventura, & Arcadi, 1984; Xu et al., 1997). Este enzima tem mostrado maior atividade na substância negra, região rica em dopamina (Greggio et al., 2005). Sendo assim a pesquisa de inibidores naturais de tirosinase, principalmente de origem vegetal, têm sido cada vez mais procurados uma vez que são menos tóxicos e não exibem tantos efeitos colaterais (Yilmaz et al., 2013).

Na figura 13 apresentam-se as inibições da atividade de tirosinase. Os extratos que apresentaram maior atividade inibitória foram os de *O. vulgare*, *M. spicata* e *H. italicum*, com valores de IC₅₀ de $0,22 \pm 0,03$, $0,24 \pm 0,01$ e $0,28 \pm 0,03$ mg/ml, respetivamente, seguindo-se o de *C. arvensis* ($0,68 \pm 0,04$ mg/ml). O extrato que apresentou um IC₅₀ maior, ou seja, uma capacidade inibitória menor, foi o de *S. hispanicus*, $1,85 \pm 0,03$ mg/ml, seguido do das espécies *P. major* e *B. maritima*, $1,68 \pm 0,21$ e $1,48 \pm 0,10$ mg/ml. Porém, os valores obtidos para os extratos de *P. major* e *S. hispanicus* não apresentam diferenças significativas, assim como as restantes espécies ($P \geq 0,05$).

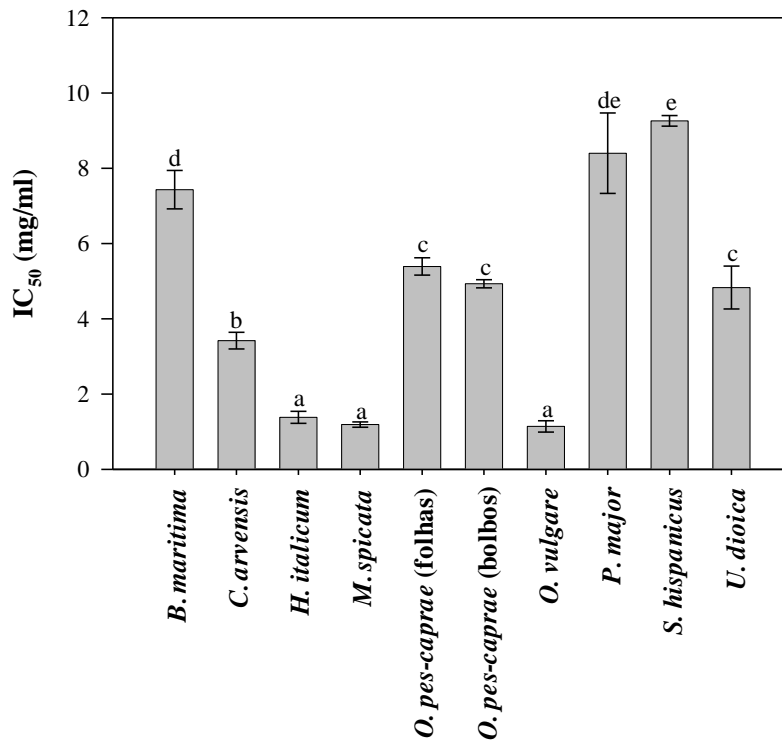


Figura 13. Avaliação da capacidade inibitória dos extratos metanólicos para o enzima tirosinase. Valores seguidos de letras diferentes representam médias significativamente diferentes de acordo com o teste de Duncan ($P < 0,05$). Controlo positivo (ácido kójico): $94,46 \pm 1,20$ % a $200 \mu\text{g/ml}$.

O enzima tirosinase é conhecido por ser um enzima multifuncional que contém cobre e pertence à superfamília oxidase. Este enzima também é responsável pela melanização nos animais, sendo o enzima chave para a regulação da melanogénese em mamíferos. Este é o processo pelo qual é produzida a melanina e, conseqüentemente, distribuída pelos melanócitos dentro dos folículos do cabelo e da pele, resultando na síntese de melanina que desempenha um papel protetor contra a fotocarcinogénese (Khan, 2007). O escurecimento da pele pode ser suprimido pelo menos parcialmente pela desativação da tirosinase levando os inibidores de tirosinase a desempenhar um papel cada vez mais importante nos produtos cosméticos e medicamentos utilizados na prevenção da hiperpigmentação (Kim & Uyama, 2005), pelo que os extratos com melhores inibições poderão ser atrativos para a indústria cosmética.

4 Conclusão e Perspetivas Futuras

Os resultados obtidos pelos diferentes métodos permitem concluir que, de uma forma geral, os extratos metanólicos das espécies estudadas possuem maior potencial antioxidante, o que sugere que os compostos bioativos são mais solúveis em solventes orgânicos polares. Relacionando os teores em compostos fenólicos e flavonoides, quantificados pelos métodos F-C e AlCl_3 , com os resultados da atividade antioxidante, medida pelos métodos DPPH, TEAC e FRAP, é possível concluir que os compostos fenólicos parecem ser os principais responsáveis pela atividade antioxidante obtida. Da análise preliminar efetuada por HPLC-DAD os compostos fenólicos mais comuns e abundantes nos extratos analisados são os ácidos clorogénico (*C. nepeta*, *C. arvensis* e *H. italicum*) e rosmarínico (*C. nepeta*, *C. arvensis*, *H. italicum*, *M. spicata* e *O. vulgare*) e quercetina 3-*O*-rutinosídeo (*B. maritima*, *C. nepeta*, *C. arvensis*, *B. maritima*, *S. hispanicus* e *U. dioica*). No entanto, não foi possível identificar todos os compostos presentes nos extratos, como desejado, devido à falta de padrões. A falta de padrões comerciais fenólicos glicosilados é uma grande barreira na análise de compostos fenólicos por HPLC-DAD, o que torna mais difícil a sua análise e a identificação de forma correta dos compostos, uma vez que não é possível a comparação entre o espectro do composto no extrato e o padrão puro. Na maior parte das vezes só é possível identificar a família a que o composto pertence. Para uma melhor análise dos extratos será necessário, em trabalhos futuros, recorrer a uma caracterização química mais detalhada recorrendo a outras técnicas analíticas.

Os extratos metanólicos de *M. spicata* e *O. vulgare* foram os que mostraram melhor capacidade antioxidante. Para uma melhor compreensão dos mecanismos de ação dos compostos fenólicos poderia ser útil, em trabalhos futuros, experimentar: i) diferentes métodos de extração assim como diferentes solventes extratantes; ii) outros métodos capazes de estimular a capacidade antioxidante, por exemplo, o método ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay*), um mecanismo HAT (*Hydrogen Atom Transfer*) que envolve o radical peróxido, o qual é bastante recorrente nos sistemas biológicos.

Todos os extratos exibiram capacidade para inibir os enzimas associados ao controlo da *Dmt2*, no entanto os extratos metanólicos de *H. italicum* e *M. spicata* foram os que mostraram maior potencial terapêutico no controlo na *Dmt2* uma vez que

mostraram mais eficácia na inibição da α -GL e capacidade moderada de inibir α -APP. *S. hispanicus* foi a planta que não apresentou valores de inibição consideráveis. Posto isto, os extratos metanólicos de *H. italicum* e *M. spicata* são candidatos para o controlo dos níveis de glicemia pós-prandial dado que inibem moderadamente a α -APP e fortemente a α -GL, condição necessária para a qualificação de um bom agente terapêutico da Dmt2, pois se houvesse uma excessiva inibição de α -APP poderia provocar alterações indesejadas na fermentação dos hidratos de carbono no cólon.

Todos os extratos mostraram alguma capacidade para inibir a atividade do enzima AChE, destacando-se os das espécies *H. italicum* e *M. spicata* como mais eficazes. O ácido rosmarínico, assim como o ácido clorogénico, poderão estar envolvidos nesta atividade, uma vez que já foi relatado que estes compostos são capazes de inibir o enzima AChE. No entanto, não foi possível compreender o porquê do extrato de *O. vulgare* também não se destacar neste ensaio dado que também tem um elevado teor de ácido rosmarínico.

Em relação ao ensaio da inibição da tirosinase, o extrato metanólico de *O. vulgare* foi o que mostrou maior potencial como agente terapêutico da DP, uma vez que ao inibir a tirosinase estamos a diminuir o excesso de produção de melanina que está associada à DP, assim como a variações de pigmentos, como sardas.

Embora os estudos sobre a capacidade de inibição dos enzimas tenham sido positivos para a avaliação da atividade biológica dos extratos metanólicos, a continuidade desta investigação é de todo interesse. Assim, será muito pertinente identificar qual ou quais os compostos com potencial terapêutico, recorrendo a espetrometria de massa, bem como proceder ao seu isolamento para melhor compreender os respetivos mecanismos de ação.

Em suma, as plantas silvestres são, sem dúvida, importantes na alimentação humana, não só pelo seu valor nutricional mas também pelos seus efeitos benéficos para a saúde humana. É irrefutável o contributo dos antioxidantes na prevenção da Dmt2, DA e DP e os resultados obtidos comprovam a importância dos extratos vegetais para várias aplicações, nomeadamente na indústria farmacêutica, alimentar, cosmética, etc. Os extratos metanólicos das espécies *M. spicata* e *H. picardii* demonstraram atividade antioxidante e potencialidade como agentes terapêuticos para o tratamento da Dmt2 e da

DA, e o da espécie *O. vulgare* mostrou potencialidade como agente terapêutico para o tratamento da DP.

5 Referências Bibliográficas

- Adersen, A., Gauguin, B., Gudiksen, L., & Jäger, A. K. (2006). Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 104(3), 418–22. doi:10.1016/j.jep.2005.09.032
- Ainsworth, E. A., & Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2(4), 875–7. doi:10.1038/nprot.2007.102
- Ali, H., Houghton, P. J., & Soumyanath, A. (2006). Alpha-amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 107(3), 449–55. doi:10.1016/j.jep.2006.04.004
- American Diabetes Association. (2010). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 33 Suppl 1(Supplement_1), S62–9. doi:10.2337/dc10-S062
- Angelo, P. M., & Jorge, N. (2006). Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. *Revista Do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)*, 66(1), 01–09. Retrieved from http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552007000100001&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
- Appendino, G., Ottino, M., Marquez, N., Bianchi, F., Giana, A., Ballero, M., ... Munoz, E. (2007). Arzanol, an anti-inflammatory and anti-HIV-1 phloroglucinol alpha-Pyrone from *Helichrysum italicum* ssp. *microphyllum*. *Journal of Natural Products*, 70(4), 608–12. doi:10.1021/np060581r
- Araniti, F., Graña, E., Reigosa, M. J., Sánchez-Moreiras, A. M., & Abenavoli, M. R. (2013). Individual and joint activity of terpenoids, isolated from *Calamintha nepeta* extract, on *Arabidopsis thaliana*. *Natural Product Research*, 27(24), 2297–303. doi:10.1080/14786419.2013.827193
- Arnao, M. B. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science & Technology*, 11(11), 419–421. doi:10.1016/S0924-2244(01)00027-9
- Arumugam, B., Manaharan, T., Heng, C. K., Kuppusamy, U. R., & Palanisamy, U. D. (2014). Antioxidant and antiglycemic potentials of a standardized extract of *Syzygium malaccense*. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2), 707–712. doi:10.1016/j.lwt.2014.06.041

- Arumugam, P., Murugan, R., Subathra, M., & Ramesh, A. (2009). Superoxide radical scavenging and antibacterial activities of different fractions of ethanol extract of *Mentha spicata* (L.). *Medicinal Chemistry Research*, 19(7), 664–673. doi:10.1007/s00044-009-9221-9
- Asanuma, M., Miyazaki, I., & Ogawa, N. (2003). Dopamine- or L-DOPA-induced neurotoxicity: The role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research*, 5(3), 165–176. doi:10.1007/BF03033137
- Asmat, U., Abad, K., & Ismail, K. (2015). Diabetes mellitus and oxidative stress — A concise review. *Saudi Pharmaceutical Journal*. doi:10.1016/j.jsps.2015.03.013
- Astroviejo, S., Aedo, C., Cirujano, S., Láinz, M., Montserrat, P., Morales, R., ... Soriano, C. (1997). *Flora Iberica: Plantas Vasculares de La Peninsula Iberica E Islas Baleares*. Madrid: C.S.I.C. Retrieved from <http://www.floraiberica.org/>
- Awika, J. M., Rooney, L. W., Wu, X., Prior, R. L., & Cisneros-Zevallos, L. (2003). Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*sorghum bicolor*) and sorghum products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(23), 6657–62. doi:10.1021/jf034790i
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191–203. doi:10.1016/j.foodchem.2005.07.042
- Behl, C. (1997). Amyloid beta-protein toxicity and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Cell and Tissue Research*, 290(3), 471–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9369525>
- Ben Haj Koubaier, H., Snoussi, A., Essaidi, I., Chaabouni, M. M., Thonart, P., & Bouzouita, N. (2014). Betalain and Phenolic Compositions, Antioxidant Activity of Tunisian Red Beet (*Beta vulgaris* L. *conditiva*) Roots and Stems Extracts. *International Journal of Food Properties*, 17(9), 1934–1945. doi:10.1080/10942912.2013.772196
- Benítez, G., González-Tejero, M. R., & Molero-Mesa, J. (2010). Pharmaceutical ethnobotany in the western part of Granada province (southern Spain): ethnopharmacological synthesis. *Journal of Ethnopharmacology*, 129(1), 87–105. doi:10.1016/j.jep.2010.02.016
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–6. doi:10.1006/abio.1996.0292

- Bhidayasiri, R., & Tarsy, D. (2012). Parkinson's Disease: "On-Off" Phenomenon. In *Movement Disorders: A Video Atlas* (pp. 14–15). Totowa, NJ: Humana Press. doi:10.1007/978-1-60327-426-5
- Biancardi, E., Panella, L. W., & Lewellen, R. T. (2012). *Beta maritima* - The Origin of Beets. New York, NY: Springer New York. doi:10.1007/978-1-4614-0842-0
- Bimakr, M., Rahman, R. A., Taip, F. S., Ganjloo, A., Salleh, L. M., Selamat, J., ... Zaidul, I. S. M. (2011). Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. *Food and Bioprocess Processing*, 89(1), 67–72. doi:10.1016/j.fbp.2010.03.002
- Biosci, I. J., Mehni, A. M., & Shahdadi, F. (2014). Phenolic compounds and antiradical properties of methanolic extracts of *Citrullus colocynthis* and *Plantago major* in Iran, 6655, 224–228.
- Bischof, H. (1994). Pharmacology of α -glucosidase inhibition. *European Journal of Clinical Investigation*, 24(S3), 3–10. doi:10.1111/j.1365-2362.1994.tb02249.x
- Biswas, A. K., Chatli, M. K., & Sahoo, J. (2012). Antioxidant potential of curry (*Murraya koenigii* L.) and mint (*Mentha spicata*) leaf extracts and their effect on colour and oxidative stability of raw ground pork meat during refrigeration storage. *Food Chemistry*, 133(2), 467–72. doi:10.1016/j.foodchem.2012.01.073
- Bodros, E., & Baley, C. (2008). Study of the tensile properties of stinging nettle fibres (*Urtica dioica*). *Materials Letters*, 62(14), 2143–2145. doi:10.1016/j.matlet.2007.11.034
- Bondet, V., Brand-Williams, W., & Berset, C. (1997). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH. Free radical method. *LWT - Food Science and Technology*, 30(6), 609–615. doi:10.1006/fstl.1997.0240
- Bonvehí, J. S., Coll, F. V., & Jordà, R. E. (1994). The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71(5), 529–532. doi:10.1007/BF02540666
- Bor, M., Özdemir, F., & Türkan, I. (2003). The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. *Plant Science*, 164(1), 77–84. doi:10.1016/S0168-9452(02)00338-2
- Bose, A., Mondal, S., Gupta, J. K., Ghosh, T., Dash, G. K., & Si, S. (2007). Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities of the ethanolic extract and its fractions of *Cleome rutidosperma*. *Fitoterapia*, 78(7-8), 515–20. doi:10.1016/j.fitote.2007.05.002

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5
- Bravo, L., Abia, R., & Saura-Calixto, F. (1994). Polyphenols as dietary fiber associated compounds. Comparative study on in vivo and in vitro properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(7), 1481–1487. doi:10.1021/jf00043a017
- Brühlmann, C., Marston, A., Hostettmann, K., Carrupt, P.-A., & Testa, B. (2004). Screening of non-alkaloidal natural compounds as acetylcholinesterase inhibitors. *Chemistry & Biodiversity*, 1(6), 819–29. doi:10.1002/cbdv.200490064
- Calabrese, E. J., Iavicoli, I., & Calabrese, V. (2013). Hormesis: its impact on medicine and health. *Human & Experimental Toxicology*, 32(2), 120–52. doi:10.1177/0960327112455069
- Ćetković, G. S., Djilas, S. M., Čanadanović-Brunet, J. M., & Tumbas, V. T. (2004). Antioxidant properties of marigold extracts. *Food Research International*, 37(7), 643–650. doi:10.1016/j.foodres.2004.01.010
- Choudhury, R. P., Kumar, A., & Garg, A. N. (2006). Analysis of Indian mint (*Mentha spicata*) for essential, trace and toxic elements and its antioxidant behaviour. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(3), 825–32. doi:10.1016/j.jpba.2006.01.048
- Chrubasik, S., Enderlein, W., Bauer, R., & Grabner, W. (1997). Evidence for antirheumatic effectiveness of Herba Urticae dioicae in acute arthritis: A pilot study. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 4(2), 105–8. doi:10.1016/S0944-7113(97)80052-9
- Costa, P., Gonçalves, S., Valentão, P., Andrade, P. B., Almeida, C., Nogueira, J. M. F., & Romano, A. (2013). Metabolic profile and biological activities of *Lavandula pedunculata* subsp. *lusitanica* (Chaytor) Franco: studies on the essential oil and polar extracts. *Food Chemistry*, 141(3), 2501–6. doi:10.1016/j.foodchem.2013.05.055
- Costa, P., Gonçalves, S., Valentão, P., Andrade, P. B., & Romano, A. (2013). Accumulation of phenolic compounds in in vitro cultures and wild plants of *Lavandula viridis* L'Hér and their antioxidant and anti-cholinesterase potential. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 57, 69–74. doi:10.1016/j.fct.2013.03.006
- Cummings, J. L., Vinters, H. V, Cole, G. M., & Khachaturian, Z. S. (1998). Alzheimer's disease: etiologies, pathophysiology, cognitive reserve, and treatment opportunities. *Neurology*, 51(1 Suppl 1), S2–17; discussion S65–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9674758>

- Czapski, G. A., Szypuła, W., Kudlik, M., Wileńska, B., Kania, M., Danikiewicz, W., & Adamczyk, A. (2014). Assessment of antioxidative activity of alkaloids from *Huperzia selago* and *Diphasiastrum complanatum* using in vitro systems. *Folia Neuropathologica / Association of Polish Neuropathologists and Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences*, 52(4), 394–406. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25574744>
- D’Abrosca, B., Buommino, E., D’Angelo, G., Coretti, L., Scognamiglio, M., Severino, V., ... Fiorentino, A. (2013). Spectroscopic identification and anti-biofilm properties of polar metabolites from the medicinal plant *Helichrysum italicum* against *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(22), 7038–46. doi:10.1016/j.bmc.2013.09.019
- Dall’Acqua, S., Cervellati, R., Loi, M. C., & Innocenti, G. (2008). Evaluation of in vitro antioxidant properties of some traditional Sardinian medicinal plants: Investigation of the high antioxidant capacity of *Rubus ulmifolius*. *Food Chemistry*, 106(2), 745–749. doi:10.1016/j.foodchem.2007.06.055
- Danielski, L., Campos, L. M. A. S., Bresciani, L. F. V., Hense, H., Yunes, R. A., & Ferreira, S. R. S. (2007). Marigold (*Calendula officinalis* L.) oleoresin: Solubility in SC-CO₂ and composition profile. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 46(2), 99–106. doi:10.1016/j.cep.2006.05.004
- Darvesh, S., Walsh, R., Kumar, R., Caines, A., Roberts, S., Magee, D., ... Martin, E. (2003). Inhibition of human cholinesterases by drugs used to treat Alzheimer disease. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, 17(2), 117–26. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12794390>
- DeFronzo, R. A. (1988). The Triumvirate: β -Cell, Muscle, Liver: A Collusion Responsible for NIDDM. *Diabetes*, 37(6), 667–687. doi:10.2337
- Dei Cas, L., Pugni, F., & Fico, G. (2015). Tradition of use on medicinal species in Valfurva (Sondrio, Italy). *Journal of Ethnopharmacology*, 163, 113–34. doi:10.1016/j.jep.2014.12.054
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95. doi:10.1016/0006-2952(61)90145-9
- Ercetin, T., Senol, F. S., Erdogan Orhan, I., & Toker, G. (2012). Comparative assessment of antioxidant and cholinesterase inhibitory properties of the marigold extracts from *Calendula arvensis* L. and *Calendula officinalis* L. *Industrial Crops and Products*, 36(1), 203–208. doi:10.1016/j.indcrop.2011.09.007

- Farzami, B., Ahmadvand, D., Vardasbi, S., Majin, F. ., & Khaghani, S. (2003). Induction of insulin secretion by a component of *Urtica dioica* leave extract in perfused Islets of Langerhans and its in vivo effects in normal and streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 89(1), 47–53. doi:10.1016/S0378-8741(03)00220-4
- Ferreira, A., Proença, C., Serralheiro, M. L. M., & Araújo, M. E. M. (2006). The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology*, 108(1), 31–7. doi:10.1016/j.jep.2006.04.010
- Fitzpatrick, K. M., Raschke, J., & Emborg, M. E. (2009). Cell-based therapies for Parkinson's disease: past, present, and future. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(9), 2189–208. doi:10.1089/ARS.2009.2654
- Floyd, R., & Hensley, K. (2002). Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiology of Aging*, 23(5), 795–807. doi:10.1016/S0197-4580(02)00019-2
- Formisano, C., Oliviero, F., Rigano, D., Saab, A. M., & Senatore, F. (2014). Chemical composition of essential oils and in vitro antioxidant properties of extracts and essential oils of *Calamintha organifolia* and *Micromeria myrtifolia*, two Lamiaceae from the Lebanon flora. *Industrial Crops and Products*, 62, 405–411. doi:10.1016/j.indcrop.2014.08.043
- Franco, D., Sineiro, J., Rubilar, M., Sánchez, M., Jerez, M., Pinelo, M., ... Núñez, M. J. (2008). Polyphenols from plant materials: Extraction and Antioxidant power. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural an Food Chemistry*, 7(8), 3210–3216.
- Funke, I., & Melzig, M. F. (2006). Traditionally used plants in diabetes therapy: phytotherapeutics as inhibitors of alpha-amylase activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16(1), 1–5. doi:10.1590/S0102-695X2006000100002
- Gey, K. F. (1990). The antioxidant hypothesis of cardiovascular disease: epidemiology and mechanisms. *Biochemical Society Transactions*, 18(6), 1041–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2088799>
- Ghane, S. G., Lokhande, V. H., Ahire, M. L., & Nikam, T. D. (2009). Indigofera glandulosa Wendl. (Barbada) a potential source of nutritious food: underutilized and neglected legume in India. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 57(1), 147–153. doi:10.1007/s10722-009-9496-1
- Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E., & Offen, D. (2001). Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*, 40(8), 959–975. doi:10.1016/S0028-3908(01)00019-3

- Glód, B. K., Kiersztyn, I., & Piszcz, P. (2014). Total antioxidant potential assay with cyclic voltammetry and/or differential pulse voltammetry measurements. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 719, 24–29. doi:10.1016/j.jelechem.2014.02.004
- Goedert, M., & Spillantini, M. G. (2006). A century of Alzheimer's disease. *Science (New York, N.Y.)*, 314(5800), 777–81. doi:10.1126/science.1132814
- Gonçalves, S., Gomes, D., Costa, P., & Romano, A. (2013). The phenolic content and antioxidant activity of infusions from Mediterranean medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, 43(1), 465–471. doi:10.1016/j.indcrop.2012.07.066
- Gonçalves, S., Grevenstuk, T., Martins, N., & Romano, A. (2015). Antioxidant activity and verbascoside content in extracts from two uninvestigated endemic *Plantago* spp. *Industrial Crops and Products*, 65, 198–202. doi:10.1016/j.indcrop.2014.12.011
- Greggio, E., Bergantino, E., Carter, D., Ahmad, R., Costin, G.-E., Hearing, V. J., ... Cookson, M. R. (2005). Tyrosinase exacerbates dopamine toxicity but is not genetically associated with Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 93(1), 246–56. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03019.x
- Grivetti, L. E., & Ogle, B. M. (2000). Value of traditional foods in meeting macro- and micronutrient needs: the wild plant connection. *Nutrition Research Reviews*, 13(1), 31–46. doi:10.1079/095442200108728990
- Grossberg, G. T. (2003). Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease:: getting on and staying on. *Current Therapeutic Research, Clinical and Experimental*, 64(4), 216–35. doi:10.1016/S0011-393X(03)00059-6
- Grover, J. K., Yadav, S., & Vats, V. (2002). Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. *Journal of Ethnopharmacology*, 81(1), 81–100. doi:10.1016/S0378-8741(02)00059-4
- Guarrera, P. M. (2003). Food medicine and minor nourishment in the folk traditions of Central Italy (Marche, Abruzzo and Latium). *Fitoterapia*, 74(6), 515–544. doi:10.1016/S0367-326X(03)00122-9
- Güçlütürk, I., Detsi, A., Weiss, E. K., Ioannou, E., Roussis, V., & Kefalas, P. (2012). Evaluation of anti-oxidant activity and identification of major polyphenolics of the invasive weed *Oxalis pes-caprae*. *Phytochemical Analysis: PCA*, 23(6), 642–6. doi:10.1002/pca.2367
- Gutteridge, J. M. C., & Halliwell, B. (2010). Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393(4), 561–4. doi:10.1016/j.bbrc.2010.02.071

- Haavik, J., & Toska, K. (1998). Tyrosine hydroxylase and Parkinson's disease. *Molecular Neurobiology*, *16*(3), 285–309. doi:10.1007/BF02741387
- Hadjichambis, A. C., Paraskeva-Hadjichambi, D., Della, A., Elena Giusti, M., De Pasquale, C., Lenzarini, C., ... Pieroni, A. (2008). Wild and semi-domesticated food plant consumption in seven circum-Mediterranean areas. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *59*(5), 383–414. doi:10.1080/09637480701566495
- Halliwell, B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of Neurochemistry*, *59*(5), 1609–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1402908>
- Hamaguchi, T., Ono, K., Murase, A., & Yamada, M. (2009). Phenolic compounds prevent Alzheimer's pathology through different effects on the amyloid-beta aggregation pathway. *The American Journal of Pathology*, *175*(6), 2557–65. doi:10.2353/ajpath.2009.090417
- Hammer, K., Laghetti, G., & Pistrick, K. (2005). *Calamintha nepeta* (L.) Savi and *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch cultivated in Italy. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *52*(2), 215–219. doi:10.1007/s10722-004-1500-1
- Heinrich, M., & Lee Teoh, H. (2004). Galanthamine from snowdrop-the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *Journal of Ethnopharmacology*, *92*(2-3), 147–62. doi:10.1016/j.jep.2004.02.012
- Henchcliffe, C., & Beal, M. F. (2008). Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. *Nature Clinical Practice. Neurology*, *4*(11), 600–9. doi:10.1038/ncpneuro0924
- Horii, S., Fukase, H., Matsuo, T., Kameda, Y., Asano, N., & Matsui, K. (1986). Synthesis and alpha-D-glucosidase inhibitory activity of N-substituted valiolamine derivatives as potential oral antidiabetic agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, *29*(6), 1038–1046. doi:10.1021/jm00156a023
- Hort, J., O'Brien, J. T., Gainotti, G., Pirttila, T., Popescu, B. O., Rektorova, I., ... Scheltens, P. (2010). EFNS guidelines for the diagnosis and management of Alzheimer's disease. *European Journal of Neurology: The Official Journal of the European Federation of Neurological Societies*, *17*(10), 1236–48. doi:10.1111/j.1468-1331.2010.03040.x
- Ingkaninan, K., Temkitthawon, P., Chuenchom, K., Yuyaem, T., & Thongnoi, W. (2003). Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, *89*(2-3), 261–264. doi:10.1016/j.jep.2003.08.008

- Ito, H., Sun, X.-L., Watanabe, M., Okamoto, M., & Hatano, T. (2008). Chlorogenic acid and its metabolite m-coumaric acid evoke neurite outgrowth in hippocampal neuronal cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(3), 885–8. doi:10.1271/bbb.70670
- Ito, N., Hirose, M., Fukushima, S., Tsuda, H., Shirai, T., & Tatematsu, M. (1986). Studies on antioxidants: Their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology*, 24(10-11), 1071–1082. doi:10.1016/0278-6915(86)90291-7
- Iuvone, T., De Filippis, D., Esposito, G., D'Amico, A., & Izzo, A. A. (2006). The spice sage and its active ingredient rosmarinic acid protect PC12 cells from amyloid-beta peptide-induced neurotoxicity. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 317(3), 1143–9. doi:10.1124/jpet.105.099317
- Jenner, P. (2003). Oxidative stress in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 53 Suppl 3, S26–36; discussion S36–8. doi:10.1002/ana.10483
- Joshi, S. R., Parikh, R. M., & Das, A. K. (2007). Insulin - history, biochemistry, physiology and pharmacology. *The Journal of the Association of Physicians of India*, 55 Suppl, 19–25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17927007>
- Jung, M., & Park, M. (2007). Acetylcholinesterase Inhibition by Flavonoids from *Agrimonia pilosa*. *Molecules*, 12(9), 2130–2139. doi:10.3390/12092130
- Kaileh, M., Vanden Berghe, W., Boone, E., Essawi, T., & Haegeman, G. (2007). Screening of indigenous Palestinian medicinal plants for potential anti-inflammatory and cytotoxic activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(3), 510–6. doi:10.1016/j.jep.2007.07.008
- Kanatt, S. R., Chander, R., & Sharma, A. (2008). Chitosan and mint mixture: A new preservative for meat and meat products. *Food Chemistry*, 107(2), 845–852. doi:10.1016/j.foodchem.2007.08.088
- Khan, M. T. H. (2007). Molecular design of tyrosinase inhibitors: A critical review of promising novel inhibitors from synthetic origins. *Pure and Applied Chemistry*, 79(12), 2277–2295. doi:10.1351/pac200779122277
- Kikuchi, A., Takeda, A., Onodera, H., Kimpara, T., Hisanaga, K., Sato, N., ... Itoyama, Y. (2002). Systemic increase of oxidative nucleic acid damage in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Neurobiology of Disease*, 9(2), 244–8. doi:10.1006/nbdi.2002.0466

- Kim, Y.-J., & Uyama, H. (2005). Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 62(15), 1707–23. doi:10.1007/s00018-005-5054-y
- Konrath, E. L., Neves, B. M., Lunardi, P. S., Passos, C. D. S., Simões-Pires, A., Ortega, M. G., ... Henriques, A. T. (2012). Investigation of the in vitro and ex vivo acetylcholinesterase and antioxidant activities of traditionally used *Lycopodium* species from South America on alkaloid extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 139(1), 58–67. doi:10.1016/j.jep.2011.10.042
- Korner, A., & Pawelek, J. (1982). Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the biosynthesis of melanin. *Science*, 217(4565), 1163–1165. doi:10.1126/science.6810464
- Korukluoglu, M., Sahan, Y., & Yigit, A. (2008). Antifungal properties of olive leaf extracts and their phenolic compounds. *Journal of Food Safety*, 28(1), 76–87. doi:10.1111/j.1745-4565.2007.00096.x
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., & Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*, 89(3), 217–233. doi:10.1016/j.fbp.2010.04.008
- Kurban, S., Mehmetoglu, I., Yerlikaya, H. F., Gönen, S., & Erdem, S. (2011). Effect of chronic regular exercise on serum ischemia-modified albumin levels and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Endocrine Research*, 36(3), 116–23. doi:10.3109/07435800.2011.566236
- Kwon, S.-H., Lee, H.-K., Kim, J.-A., Hong, S.-I., Kim, H.-C., Jo, T.-H., ... Jang, C.-G. (2010). Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. *European Journal of Pharmacology*, 649(1-3), 210–7. doi:10.1016/j.ejphar.2010.09.001
- Kwon, Y.-I., Apostolidis, E., & Shetty, K. (2008). In vitro studies of eggplant (*Solanum melongena*) phenolics as inhibitors of key enzymes relevant for type 2 diabetes and hypertension. *Bioresource Technology*, 99(8), 2981–8. doi:10.1016/j.biortech.2007.06.035
- Kwon, Y.-I., Vattam, D. A., & Shetty, K. (2006). Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 15(1), 107–18. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16500886>
- Kyung-A, H., Yu-Jin, H., Dong-Sik, P., Jaehyun, K., & Ae-Son, O. (2011). In vitro investigation of antioxidant and anti-apoptotic activities of Korean wild edible vegetable extracts and their correlation with apoptotic gene expression in HepG2 cells. *Food Chemistry*, 125(2), 483–487. doi:10.1016/j.foodchem.2010.09.037

- La Vecchia, C., Altieri, A., & Tavani, A. (2001). Vegetables, fruit, antioxidants and cancer: a review of Italian studies. *European Journal of Nutrition*, 40(6), 261–267. doi:10.1007/s394-001-8354-9
- Lemhadri, A., Zeggwagh, N.-A., Maghrani, M., Jouad, H., & Eddouks, M. (2004). Anti-hyperglycaemic activity of the aqueous extract of *Origanum vulgare* growing wild in Tafilalet region. *Journal of Ethnopharmacology*, 92(2-3), 251–6. doi:10.1016/j.jep.2004.02.026
- Lentini, F., & Venza, F. (2007). Wild food plants of popular use in Sicily. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 3(1), 15. doi:10.1186/1746-4269-3-15
- Leonti, M. (2012). The co-evolutionary perspective of the food-medicine continuum and wild gathered and cultivated vegetables. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59(7), 1295–1302. doi:10.1007/s10722-012-9894-7
- Li, H.-B., Wong, C.-C., Cheng, K.-W., & Chen, F. (2008). Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT - Food Science and Technology*, 41(3), 385–390. doi:10.1016/j.lwt.2007.03.011
- Lizcano, L. J., Bakkali, F., Begoña Ruiz-Larrea, M., & Ignacio Ruiz-Sanz, J. (2010). Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use. *Food Chemistry*, 119(4), 1566–1570. doi:10.1016/j.foodchem.2009.09.043
- Loizzo, M. R., Menichini, F., Conforti, F., Tundis, R., Bonesi, M., Saab, A. M., ... Frega, N. G. (2009). Chemical analysis, antioxidant, antiinflammatory and anticholinesterase activities of *Origanum ehrenbergii* Boiss and *Origanum syriacum* L. essential oils. *Food Chemistry*, 117(1), 174–180. doi:10.1016/j.foodchem.2009.03.095
- Maas, M., Petereit, F., & Hensel, A. (2009). Caffeic acid derivatives from *Eupatorium perfoliatum* L. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 14(1), 36–45. doi:10.3390/molecules14010036
- Madejón, P., Barba-Brioso, C., Lepp, N. W., & Fernández-Caliani, J. C. (2011). Traditional agricultural practices enable sustainable remediation of highly polluted soils in Southern Spain for cultivation of food crops. *Journal of Environmental Management*, 92(7), 1828–36. doi:10.1016/j.jenvman.2011.03.007
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1 Suppl), 230S–242S. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15640486>

- Maritim, A. C., Sanders, R. A., & Watkins, J. B. (2003). Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, *17*(1), 24–38. doi:10.1002/jbt.10058
- Marles, R. J., & Farnsworth, N. R. (1995). Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, *2*(2), 137–89. doi:10.1016/S0944-7113(11)80059-0
- Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S., Falconieri, D., Maxia, A., Gonçalves, M. J., ... Salgueiro, L. (2010). Chemical composition and biological assays of essential oils of *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *nepeta* (Lamiaceae). *Natural Product Research*, *24*(March), 1734–1742. doi:10.1080/14786410903108944
- Martins, N., Barros, L., Santos-Buelga, C., Henriques, M., Silva, S., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of *Origanum vulgare* L.: different performances regarding bioactivity and phenolic compounds. *Food Chemistry*, *158*, 73–80. doi:10.1016/j.foodchem.2014.02.099
- Masuda, T., Yamashita, D., Takeda, Y., & Yonemori, S. (2005). Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of seashore plants and identification of potent inhibitors from *Garcinia subelliptica*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *69*(1), 197–201. doi:10.1271/bbb.69.197
- Melo, P. S., Massarioli, A. P., Denny, C., Dos Santos, L. F., Franchin, M., Pereira, G. E., ... Alencar, S. M. de. (2015). Winery by-products: Extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species. *Food Chemistry*, *181*, 160–9. doi:10.1016/j.foodchem.2015.02.087
- Menendez-Baceta, G., Aceituno-Mata, L., Tardío, J., Reyes-García, V., & Pardo-de-Santayana, M. (2011). Wild edible plants traditionally gathered in Gorbeialdea (Biscay, Basque Country). *Genetic Resources and Crop Evolution*, *59*(7), 1329–1347. doi:10.1007/s10722-011-9760-z
- Metzler-Baddeley, C. (2007). A Review of Cognitive Impairments in Dementia with Lewy Bodies Relative to Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease with Dementia. *Cortex*, *43*(5), 583–600. doi:10.1016/S0010-9452(08)70489-1
- Middleton, E. J., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000). The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacol. Rev.*, *52*(4), 673–751. Retrieved from <http://pharmrev.aspetjournals.org/content/52/4/673.long>
- Miranda, M., Botti, D., Bonfigli, A., Ventura, T., & Arcadi, A. (1984). Tyrosinase-like activity in normal human substantia nigra. *General Pharmacology: The Vascular System*, *15*(6), 541–544. doi:10.1016/0306-3623(84)90212-X

- Molina, M., Tardío, J., Aceituno-Mata, L., Morales, R., Reyes-García, V., & Pardo-de-Santayana, M. (2014). Weeds and food diversity: natural yield assessment and future alternatives for traditionally consumed wild vegetables. *Journal of Ethnobiology*, 34(1), 44–67. doi:10.2993/0278-0771-34.1.44
- Morales, P., Ferreira, I. C. F. R., Carvalho, A. M., Sánchez-Mata, M. C., Cámara, M., Fernández-Ruiz, V., ... Tardío, J. (2014). Mediterranean non-cultivated vegetables as dietary sources of compounds with antioxidant and biological activity. *LWT - Food Science and Technology*, 55(1), 389–396. doi:10.1016/j.lwt.2013.08.017
- Mota, W. M., Barros, M. L., Cunha, P. E. L., Santana, M. V. A., Stevam, C. S., Leopoldo, P. T. G., & Fernandes, R. P. M. (2012). Avaliação da inibição da acetilcolinesterase por extratos de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 14(4), 624–628. doi:10.1590/S1516-05722012000400008
- Nathan, D. M. (2007). Finding new treatments for diabetes - how many, how fast... how good? *The New England Journal of Medicine*, 356(5), 437–40. doi:10.1056/NEJMp068294
- Nhiem, N. X., Tai, B. H., Van Kiem, P., Van Minh, C., Cuong, N. X., Tung, N. H., ... Kim, Y. H. (2011). Inhibitory activity of *Plantago major* L. on angiotensin I-converting enzyme. *Archives of Pharmacal Research*, 34(3), 419–23. doi:10.1007/s12272-011-0309-7
- Ocaña-Fuentes, A., Arranz-Gutiérrez, E., Señorans, F. J., & Reglero, G. (2010). Supercritical fluid extraction of oregano (*Origanum vulgare*) essentials oils: anti-inflammatory properties based on cytokine response on THP-1 macrophages. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 48(6), 1568–75. doi:10.1016/j.fct.2010.03.026
- Olanow, C. W. (2007). The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease--2007. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 22 Suppl 1, S335–42. doi:10.1002/mds.21675
- Ordóñez, A., Gomez, J., Vattuone, M., & Lsla, M. (2006). Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. *Food Chemistry*, 97(3), 452–458. doi:10.1016/j.foodchem.2005.05.024
- Özgen, U., Mavi, A., Terzi, Z., Yıldırım, A., Coşkun, M., & Houghton, P. J. (2008). Antioxidant Properties of Some Medicinal Lamiaceae (Labiatae) Species. Retrieved from <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/13880200600592061>
- Pacifico, S., Galasso, S., Piccolella, S., Kretschmer, N., Pan, S.-P., Marciano, S., ... Monaco, P. (2015). Seasonal variation in phenolic composition and antioxidant and

anti-inflammatory activities of *Calamintha nepeta* (L.) Savi. *Food Research International*, 69, 121–132. doi:10.1016/j.foodres.2014.12.019

Papachristos, D. P., & Stamopoulos, D. C. (2002). Repellent, toxic and reproduction inhibitory effects of essential oil vapours on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research*, 38(2), 117–128. doi:10.1016/S0022-474X(01)00007-8

Pardo-de-Santayana, M., Tardío, J., Blanco, E., Carvalho, A. M., Lastra, J. J., San Miguel, E., & Morales, R. (2007). Traditional knowledge of wild edible plants used in the northwest of the Iberian Peninsula (Spain and Portugal): a comparative study. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 3(1), 27. doi:10.1186/1746-4269-3-27

Pękal, A., & Pyrzyńska, K. (2014). Evaluation Of Aluminum Complexation Reaction for flavonoid content assay. *Food Analytical Methods*, 7(9), 1776–1782. doi:10.107/s121-014-9814-x

Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Taberner, M., Díaz- Rubio, M. E., Serrano, J., Goñi, I., & Saura-Calixto, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 41(3), 274–285. doi:10.1016/j.foodres.2007.12.004

Perfetti, R., Barnett, P. S., Mathur, R., & Egan, J. M. (1998). Novel therapeutic strategies for the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes/metabolism Reviews*, 14(3), 207–25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9816470>

Perry, E. K., Tomlinson, B. E., Blessed, G., Bergmann, K., Gibson, P. H., & Perry, R. H. (1978). Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. *British Medical Journal*, 2(6150), 1457–9.

Perry, N., Bollen, C., Perry, E. K., & Ballard, C. (2003). Salvia for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 75(3), 651–659. doi:10.1016/S0091-3057(03)00108-4

Peschel, W., Sánchez-Rabaneda, F., Diekmann, W., Plescher, A., Gartzía, I., Jiménez, D., ... Codina, C. (2006). An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry*, 97(1), 137–150. doi:10.1016/j.foodchem.2005.03.033

Petersen, M. (2003). Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62(2), 121–125. doi:10.1016/S0031-9422(02)00513-7

Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science : IJBS*, 4(2), 89–96. Retrieved from

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3614697&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Pieroni, A., Nebel, S., Santoro, R. F., & Heinrich, M. (2005). Food for two seasons: culinary uses of non-cultivated local vegetables and mushrooms in a south Italian village. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56(4), 245–72. doi:10.1080/09637480500146564

Pierpaoli, W. (2005). Neurodegenerative diseases: a common etiology and a common therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1057, 319–26. doi:10.1196/annals.1356.024

Pinelli, P., Ieri, F., Vignolini, P., Bacci, L., Baronti, S., & Romani, A. (2008). Extraction and HPLC analysis of phenolic compounds in leaves, stalks, and textile fibers of *Urtica dioica* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 9127–32. doi:10.1021/jf801552d

Pinelo, M., Manzocco, L., José Nuñez, M., & Cristina Nicoli, M. (2004). Solvent effect on quercetin antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 88(2), 201–207. doi:10.1016/j.foodchem.2004.01.034

Piyaviriyakul, S., Siripong, P., & Vallisuta, O. (2014). HPLC simultaneous quantification of triterpene acids for quality control of *Plantago major* L. and evaluation of their cytotoxic and antioxidant activities. *Industrial Crops and Products*, 60, 239–246. doi:10.1016/j.indcrop.2014.06.020

Polo, S., Tardío, J., Vélez-del-Burgo, A., Molina, M., & Pardo-de-Santayana, M. (2009). Knowledge, use and ecology of golden thistle (*Scolymus hispanicus* L.) in central Spain. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 5(1), 42. doi:10.1186/1746-4269-5-42

Pourshojaei, Y., Gouranourimi, A., Hekmat, S., Asadipour, A., Rahmani-Nezhad, S., Moradi, A., ... Shafiee, A. (2015). Design, synthesis and anticholinesterase activity of novel benzylidenechroman-4-ones bearing cyclic amine side chain. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 181–189. doi:10.1016/j.ejmech.2015.04.055

Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–302. doi:10.1021/jf0502698

Pyo, Y.-H., Lee, T.-C., Logendra, L., & Rosen, R. T. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cycla*) extracts. *Food Chemistry*, 85(1), 19–26. doi:10.1016/S0308-8146(03)00294-2

Rabasa-Lhoret, R., & Chiasson, J.-L. (2003). *International Textbook of Diabetes Mellitus*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. doi:10.1002/0470862092

Ramassamy, C. (2006). Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *European Journal of Pharmacology*, 545(1), 51–64. doi:10.1016/j.ejphar.2006.06.025

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231–1237. doi:10.1016/S0891-5849(98)00315-3

Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152–159. doi:10.1016/S1360-1385(97)01018-2

Richards, C. M., Reeves, P. A., Fenwick, A. L., & Panella, L. (2013). Genetic structure and gene flow in *Beta vulgaris* subspecies *maritima* along the Atlantic coast of France. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 61(3), 651–662. doi:10.1007/s10722-013-0066-1

Rigano, D., Formisano, C., Senatore, F., Piacente, S., Pagano, E., Capasso, R., ... Izzo, A. A. (2013). Intestinal antispasmodic effects of *Helichrysum italicum* (Roth) Don ssp. *italicum* and chemical identification of the active ingredients. *Journal of Ethnopharmacology*, 150(3), 901–6. doi:10.1016/j.jep.2013.09.034

Roberts, M. (2000). *Edible & Medicinal Flowers* (1 st.). David Philip, Publishers.

Romano, A., & Gonçalves, S. (2015). *Plantas silvestres comestíveis do Algarve* (1ª ed.). Universidade do Algarve.

Safer, A. M., & al-Nughamish, A. J. (1999). Hepatotoxicity induced by the anti-oxidant food additive, butylated hydroxytoluene (BHT), in rats: an electron microscopical study. *Histology and Histopathology*, 14(2), 391–406. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10212800>

Şahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M., Polissiou, M., ... Özer, H. (2004). Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*, 15(7), 549–557. doi:10.1016/j.foodcont.2003.08.009

Saleem, M., Alam, A., & Sultana, S. (2000). Attenuation of benzoyl peroxide-mediated cutaneous oxidative stress and hyperproliferative response by the prophylactic treatment of mice with spearmint (*Mentha spicata*). *Food and Chemical Toxicology*, 38(10), 939–948. doi:10.1016/S0278-6915(00)00088-0

- Samuelson, A. B. (2000). The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 71(1-2), 1–21. doi:10.1016/S0378-8741(00)00212-9
- Sánchez-Mata, M. C., Cabrera Loera, R. D., Morales, P., Fernández-Ruiz, V., Cámara, M., Díez Marqués, C., ... Tardío, J. (2011). Wild vegetables of the Mediterranean area as valuable sources of bioactive compounds. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59(3), 431–443. doi:10.1007/s10722-011-9693-6
- Santos Rosa, C., García Gimenez, M. D., Saenz Rodriguez, M. T., & De La Puerta Vazquez, R. (2007). Antihistaminic and antieicosanoid effects of oleanolic and ursolic acid fraction from *Helichrysum picardii*. *Pharmazie*, 62(6), 459–462. doi:10.1691/ph.2007.6.6704
- Sari, A. O., & Tutar, M. (2010). Effects of Light, Cold Storage, and Temperature on Seed Germination of Golden Thistle (*Scolymus hispanicus* L.). *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 15(4), 318–325. doi:10.1080/10496470903507858
- Scherer, R., Lemos, M. F., Lemos, M. F., Martinelli, G. C., Martins, J. D. L., & da Silva, A. G. (2013). Antioxidant and antibacterial activities and composition of Brazilian spearmint (*Mentha spicata* L.). *Industrial Crops and Products*, 50, 408–413. doi:10.1016/j.indcrop.2013.07.007
- Scognamiglio, M., Abrosca, B. D., Esposito, A., Fiorentino, A., & Ce, D. (2015). Chemical Composition and Seasonality of Aromatic Mediterranean Plant Species by NMR-Based Metabolomics. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2015, 9. doi:10.1155/2015/258570
- Scott, G. (1994). Atmospheric oxidation and antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 16(6), 885–886. doi:10.1016/0891-5849(94)90209-7
- Scott, T. L., & Buhner, S. H. (2010). *Invasive Plant Medicine: The Ecological Benefits and Healing Abilities of Invasives*. Healing Arts Press.
- Shams, K. M., Tichy, G., Fischer, A., Sager, M., Peer, T., Bashar, A., & Filip, K. (2009). Aspects of phytoremediation for chromium contaminated sites using common plants *Urtica dioica*, *Brassica napus* and *Zea mays*. *Plant and Soil*, 328(1-2), 175–189. doi:10.1007/s11104-009-0095-x
- Shobana, S., Sreerama, Y. N., & Malleshi, N. G. (2009). Composition and enzyme inhibitory properties of finger millet (*Eleusine coracana* L.) seed coat phenolics: Mode of inhibition of α -glucosidase and pancreatic amylase. *Food Chemistry*, 115(4), 1268–1273. doi:10.1016/j.foodchem.2009.01.042

- Sies, H. (1995). *Signalling Mechanisms — from Transcription Factors to Oxidative Stress*. (L. Packer & K. W. A. Wirtz, Eds.). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-79675-3
- Signorini, M. A., Giovampaola, E. Della, Bruschi, P., Foggi, B., & Tani, C. (2013). Karyological investigations on the South African invasive *Oxalis pes-caprae* L. (Oxalidaceae) in native and invaded areas, with special focus on Italy. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology*, 147(2), 298–305. doi:10.1080/11263504.2013.772924
- Singh, R. P., Chidambara Murthy, K. N., & Jayaprakasha, G. K. (2002). Studies on the Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punica granatum*) Peel and Seed Extracts Using in Vitro Models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(1), 81–86. doi:10.1021/jf010865b
- Singhal, A., Bangar, O., & Naithani, V. (2012). Medicinal plants with a potential to treat Alzheimer and associated symptoms. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, 2(2), 84. doi:10.4103/2231-0738.95927
- Soler-Rivas, C., & Wichers, H. J. (2000). Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 648–656.
- Strange, P. (1992). Parkinson's disease. In *Brain Biochemistry and Brain Disorders* (pp. 161–185). Oxford University Press.
- Stuchbury, G., & Münch, G. (2005). Alzheimer's associated inflammation, potential drug targets and future therapies. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 112(3), 429–53. doi:10.1007/s00702-004-0188-x
- Sultana, B., Anwar, F., & Ashraf, M. (2009). Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 14(6), 2167–80. doi:10.3390/molecules14062167
- Tagliatalata-Scafati, O., Pollastro, F., Chianese, G., Minassi, A., Gibbons, S., Arunotayanun, W., ... Appendino, G. (2013). Antimicrobial phenolics and unusual glycerides from *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum*. *Journal of Natural Products*, 76(3), 346–53. doi:10.1021/np3007149
- Tahri, A., Yamani, S., Legssyer, A., Aziz, M., Mekhfi, H., Bnouham, M., & Ziyyat, A. (2000). Acute diuretic, natriuretic and hypotensive effects of a continuous perfusion of aqueous extract of *Urtica dioica* in the rat. *Journal of Ethnopharmacology*, 73(1-2), 95–100. doi:10.1016/S0378-8741(00)00270-1

- Terpinc, P., Čeh, B., Ulrih, N. P., & Abramovič, H. (2012). Studies of the correlation between antioxidant properties and the total phenolic content of different oil cake extracts. *Industrial Crops and Products*, 39, 210–217. doi:10.1016/j.indcrop.2012.02.023
- Tibaldi, G., Fontana, E., & Nicola, S. (2013). Postharvest management affects spearmint and calamin essential oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(3), 580–6. doi:10.1002/jsfa.5836
- Uc, E. Y., & Rizzo, M. (2008). Driving and neurodegenerative diseases. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 8(5), 377–383. doi:10.1007/s11910-008-0059-1
- Uchida, R., Ishikawa, S., & Tomoda, H. (2014). Inhibition of tyrosinase activity and melanine pigmentation by 2-hydroxytyrosol. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 4(2), 141–145. doi:10.1016/j.apsb.2013.12.008
- Ugurlu, E., & Secmen, O. (2008). Medicinal plants popularly used in the villages of Yunt Mountain (Manisa-Turkey). *Fitoterapia*, 79(2), 126–31. doi:10.1016/j.fitote.2007.07.016
- Uttara, B., Singh, A. V, Zamboni, P., & Mahajan, R. T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology*, 7(1), 65–74. doi:10.2174/157015909787602823
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001
- Van de Laar, F. A. (2008). Alpha-glucosidase inhibitors in the early treatment of type 2 diabetes. *Vascular Health and Risk Management*, 4(6), 1189–95. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2663450&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Van Looy, K., Jacquemyn, H., Breyne, P., & Honnay, O. (2009). Effects of flood events on the genetic structure of riparian populations of the grassland plant *Origanum vulgare*. *Biological Conservation*, 142(4), 870–878. doi:10.1016/j.biocon.2008.12.006
- Wanasundara, U. N., & Shahidi, F. (1998). Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. *Food Chemistry*, 63(3), 335–342. doi:10.1016/S0308-8146(98)00025-9

- Wehi, P. M., & Wehi, W. L. (2010). Traditional plant harvesting in contemporary fragmented and urban landscapes. *Conservation Biology: The Journal of the Society for Conservation Biology*, 24(2), 594–604. doi:10.1111/j.1523-1739.2009.01376.x
- Wettasinghe, M., & Shahidi, F. (2000). Scavenging of reactive-oxygen species and DPPH free radicals by extracts of borage and evening primrose meals. *Food Chemistry*, 70(1), 17–26. doi:10.1016/S0308-8146(99)00269-1
- Wichtl, M. (1994). *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals* (1 st.). Scientific Publishers.
- Williams, P., Sorribas, A., & Howes, M.-J. R. (2011). Natural products as a source of Alzheimer's drug leads. *Natural Product Reports*, 28(1), 48–77. doi:10.1039/c0np00027b
- Woisky, R. G., & Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, 37(2), 99–105.
- Wollen, K. A. (2010). Alzheimer's disease: the pros and cons of pharmaceutical, nutritional, botanical, and stimulatory therapies, with a discussion of treatment strategies from the perspective of patients and practitioners. *Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic*, 15(3), 223–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21155625>
- Wong, J. Y., Matanjun, P., Ooi, Y. B. H., & Chia, K. F. (2014). Evaluation of Antioxidant Activities in Relation to Total Phenolics and Flavonoids Content of Selected Malaysian Wild Edible Plants by Multivariate Analysis. *International Journal of Food Properties*, 17(8), 1763–1778. doi:10.1080/10942912.2012.724756
- Wong, S., Leong, L., & Williamkoh, J. (2006). Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry*, 99(4), 775–783. doi:10.1016/j.foodchem.2005.07.058
- Wu, C.-R., Lin, W.-H., Hseu, Y.-C., Lien, J.-C., Lin, Y.-T., Kuo, T.-P., & Ching, H. (2011). Evaluation of the antioxidant activity of five endemic *Ligustrum* species leaves from Taiwan flora in vitro. *Food Chemistry*, 127(2), 564–71. doi:10.1016/j.foodchem.2011.01.041
- Xu, C., Zhang, Y., Cao, L., & Lu, J. (2010). Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China. *Food Chemistry*, 119(4), 1557–1565. doi:10.1016/j.foodchem.2009.09.042
- Xu, Y., Stokes, A. H., Freeman, W. M., Kumer, S. C., Vogt, B. A., & Vrana, K. E. (1997). Tyrosinase mRNA is expressed in human substantia nigra. *Brain Research*.

Molecular Brain Research, 45(1), 159–62. Retrieved from http://www.researchgate.net/publication/14111466_Tyrosinase_mRNA_is_expressed_in_human_substantia_nigra

Yen, G.-C., & Chen, H.-Y. (1995). Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their Antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(1), 27–32. doi:10.1021/jf00049a007

Yilmaz, B. S., Altun, M. L., Orhan, I. E., Ergene, B., & Citoglu, G. S. (2013). Enzyme inhibitory and antioxidant activities of *Viburnum tinus* L. relevant to its neuroprotective potential. *Food Chemistry*, 141(1), 582–8. doi:10.1016/j.foodchem.2013.03.020

Yin, H., Fretté, X. C., Christensen, L. P., & Grevsen, K. (2012). Chitosan oligosaccharides promote the content of polyphenols in Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(1), 136–43. doi:10.1021/jf204376j

Zhang, X.-L., Guo, Y.-S., Wang, C.-H., Li, G.-Q., Xu, J.-J., Chung, H. Y., ... Wang, G.-C. (2013). Phenolic compounds from *Origanum vulgare* and their antioxidant and antiviral activities. *Food Chemistry*, 152, 300–6. doi:10.1016/j.foodchem.2013.11.153

Zhao, H., Dong, J., Lu, J., Chen, J., Li, Y., Shan, L., ... Gu, G. (2006). Effects of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19), 7277–86. doi:10.1021/jf061087w