



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências

# **Avaliação da atividade biológica de compostos naturais de plantas medicinais de Angola e de compostos de síntese**

**Nelson António Freitas Fernandes**

Tese para obtenção do Grau de Doutor em  
**Bioquímica**  
(3<sup>o</sup> ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor António José Geraldês de Mendonça  
Co-orientador: Prof.<sup>a</sup> Doutora Dina Isabel Malheiros Dinis de Mendonça

**Covilhã, outubro de 2013**



## Agradecimentos

A concretização das várias etapas da nossa vida é resultado não só do nosso empenho mas também do apoio, generosidade, disponibilidade e colaboração de todas as pessoas que nos rodeiam no dia-a-dia. Por isso não podia deixar de agradecer a algumas pessoas que contribuíram, de forma direta ou indireta, para a realização de mais uma etapa importante da minha vida. Assim gostaria de exprimir algumas palavras de agradecimento e profundo reconhecimento, em particular:

Aos meus orientadores, Prof. Doutor António José Geraldês de Mendonça e Prof.<sup>a</sup> Doutora Dina Isabel Malheiros Dinis de Mendonça, do Departamento de Química da Universidade da Beira Interior, pelo apoio e otimismo nos momentos de maior desânimo, pela amizade, disponibilidade e saber científico que me transmitiram ao longo destes anos em que trabalhamos em conjunto, bem como a oportunidade de realizar este trabalho.

Aos meus pais, pois sem eles não seria possível chegar a esta etapa. Obrigado por me darem mais esta oportunidade, pelo incentivo, amor que me transmitiram durante toda a minha vida, pelos gastos e por acreditarem em mim. Agradeço também à minha irmã pela amizade e palavras de força e ânimo. Em particular gostaria de deixar aqui um enorme obrigado à minha avó que já não está entre nós e que sem os seus conselhos, ensinamentos e enorme apoio nunca conseguiria chegar até aqui.

À minha namorada, Raquel Fontes pelo apoio nos momentos em que mais precisei e pela paciência, força e infinitas conversas. Aos pais da minha namorada D.<sup>a</sup> Maria e Sr. Manuel pelo apoio carinho e compreensão nos momentos mais difíceis.

A Deus pelo dom da vida e pela proteção nos momentos mais difíceis.

Aos amigos e colegas de laboratório, Laura, Ana, Ivo, Bia, Vítor e Sara com quem gostei de trabalhar a todos um muito obrigado pelos bons e divertidos momentos juntos. À Dra. Susana Ferreira, Ângelo e Prof.<sup>a</sup> Doutora Filomena, com quem gostei de trabalhar e a quem agradeço a disponibilidade e ajuda prestada na realização dos estudos microbiológicos.

À Prof.<sup>a</sup> Doutora Ana Paula Assunção Esteves, do departamento de química da Universidade do Minho, pelos compostos de síntese cedidos.

Ao meu amigo Vítor por todo o apoio, amizade e pelas palavras de ânimo que sempre me deu ao longo desta caminhada.

A todos os professores e funcionários da Universidade da Beira Interior, em particular aos professores Doutores Lúcia Silva, Jesus Rodilla, Eugénia Gallardo e Cândida Tomaz pela ajuda, simpatia e ensinamentos, e aos funcionários D.<sup>a</sup> Lucinda, D.<sup>a</sup> Otilia, Dr. Luís, D.<sup>a</sup> Margarida, D.<sup>a</sup> Magda, Eng. João e Sofia, pela amizade, ajuda e palavras de ânimo.

À Universidade da Beira Interior, em particular ao Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS) e à Unidade de Materiais Têxteis e Papeleiros (Departamento de Química) pelo material e instalações necessário à realização deste trabalho.

À cidade da Covilhã pelo seu encanto e por todas as coisas boas que me proporcionou.

A todos um muito obrigado, sem todos vocês não conseguiria alcançar esta nova etapa da minha vida.



## Resumo

Neste trabalho foram avaliadas as atividades antioxidante, antimicrobiana e de inibição da acetilcolinesterase para 8 compostos de síntese, 4 compostos naturais e 50 extratos obtidos com diferentes solventes a partir de 16 plantas recolhidas em Angola (*Hymenodictyon floribundum*; *Parinari capensis*; *Tinnea antiscorbutica*; *Eragrostis viscosa*; *Xylopia odoratissima*; *Peucedanum angolense*; *Boscia microphylla*; *Adenodolichos huillensis*; *Rhus kirkii*; *Croton gratissimus*; *Gymnosporia senegalensis*; *Solanecio manni*; *Peltophorum africanum*; *Piliostigma thonningii*; *Phragmanthera glaucocarpa* e *Solanum incanum*). O estudo da capacidade antioxidante foi realizado pelos métodos de ABTS, DPPH e valor peróxido. A concentração de compostos fenólicos foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteu e a inibição da acetilcolinesterase pelos métodos de Ellman e bioautográfico de cromatografia em camada fina. A atividade antimicrobiana foi estudada pelas técnicas de microdiluição e de difusão em disco. O extrato de ramos de *P. africanum* em acetato de etilo foi o que apresentou uma concentração mais elevada de compostos fenólicos totais ( $746,56 \pm 0,05$  mg G.A.E./g extrato). O extrato aquoso das folhas de *P. capensis* foi o que apresentou melhor reatividade contra o radical ABTS ( $EC_{50}$  de  $0,57 \pm 0,03$  mg/mL), e o extrato aquoso das raízes de *P. glaucocarpa* foi o que apresentou melhor reatividade contra o radical DPPH ( $EC_{50}$  de  $0,10 \pm 0,01$  mg/mL). Em relação ao valor peróxido o extrato aquoso das folhas de *A. huillensis* foi o que mais inibiu a formação de peróxidos ( $34,47 \pm 1,20$  meq  $O_2$ /g de amostra) a partir de óleo de girassol após oito dias em condições de oxidação. Os resultados obtidos para a atividade antimicrobiana demonstram que os extratos e compostos de síntese não possuem atividade contra o *S. aureus* ATCC 25923, a *E. coli* ATCC 25922 e a *C. albicans* ATCC 24433. Em relação à inibição da enzima acetilcolinesterase o melhor resultado foi obtido para o extrato metanólico dos ramos de *P. africanum* ( $IC_{50}$   $0,23 \pm 0,00$  mg/mL). Os compostos isolados dos extratos vegetais possuem pouca atividade antioxidante ( $EC_{50}$  alto). Em relação à inibição da acetilcolinesterase os compostos isolados dos extratos vegetais possuem também uma baixa capacidade de inibição da enzima ( $IC_{50}$  alto). Tendo em conta os resultados obtidos a *P. capensis* e *P. africanum* podem ser consideradas uma fonte promissora de novos compostos com ação de inibição da acetilcolinesterase e capacidade antioxidante.

## Palavras-chave

ABTS, DPPH, Valor peróxido, Folin-Ciocalteu, acetilcolinesterase.



## Abstract

In this work the antimicrobial, antioxidant and acetylcholinesterase inhibition by 8 synthetic compounds, 4 natural compounds and 50 plant extracts obtained with different solvents from 16 plants collected in Angola (*Hymenodictyon floribundum*; *Parinari pumila*; *Tinnea antiscorbutica*; *Eragrostis viscosa*; *Xylopi odoratissima*; *Peucedanum angolense*; *Boscia microphylla*; *Adenodolichos huillensis*; *Rhus kirkii*; *Croton gratisissimus*; *Gymnosporia senegalensis*; *Solanecio manni*; *Peltophorum africanum*; *Piliostigma thonningii*; *Phragmanthera glaucocarpa* e *Solanum incanum*) was evaluated. The study of the antioxidant capacity was performed by the ABTS, DPPH and peroxide value methods. The concentration of phenolic compounds was determined by Folin-Ciocalteu method and the acetylcholinesterase inhibition was evaluated by Ellman's and TLC bioautographic methods. Antimicrobial activity was performed by microdilution and disk diffusion methods. The extract of branches from *P. africanum* in ethyl acetate showed the higher concentration of phenolic compounds ( $746.56 \pm 0.05$  mg G.A.E./g extract). Regarding the reactivity with ABTS, the aqueous extract of the leaves from *P. capensis* showed the best reactivity against this radical, with an  $EC_{50}$  of  $0.57 \pm 0.03$  mg/mL). For DPPH, the ethyl acetate extract of the roots from *P. glaucocarpa* showed the best reactivity against the DPPH radical ( $EC_{50}$  of  $0.10 \pm 0.01$  mg/mL).

For the peroxide value, the aqueous extract of leaves from *A. huillensis* decreased the formation of peroxides ( $34.47 \pm 1.20$  meq  $O_2$ /g sample) in sunflower oil after eight days of oxidation. The results obtained for the antimicrobial activity demonstrate that the extracts and synthetic compounds did not possess activity against *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 and *C. albicans* ATCC 24433. Regarding the inhibition of acetylcholinesterase, the best result was obtained for the methanolic extract of the branches from *P. africanum* ( $IC_{50}$   $0.23 \pm 0.00$  mg/mL). The compounds isolated from the plant extracts possess a low antioxidant activity ( $EC_{50}$  high). In relation to the acetylcholinesterase inhibition, the compounds isolated from the plant extracts also have a low capacity for enzyme inhibition ( $IC_{50}$  high).

Considering the results obtained for the biological activity, the results of *P. capensis* and *P. africanum* suggest that these plants can be considered as promising source of novel compounds with antioxidant and acetylcholinesterase inhibition activity.

## Keywords

ABTS, DPPH, peroxide value, Folin-Ciocalteu, acetylcholinesterase.



# Índice

Agradecimentos .....	iii
Resumo .....	v
Abstract.....	vii
Lista de figuras .....	xv
Lista de tabelas .....	xix
Lista de gráficos.....	xxi
Lista de acrónimos.....	xxiii
<b>Capítulo 1</b>	<b>1</b>
1 Introdução	1
1.1 Plantas medicinais e produtos naturais .....	1
1.2 Produtos naturais do metabolismo primário e secundário das plantas .....	1
1.3 Importância dos produtos naturais derivados das plantas na medicina e no desenvolvimento de novos fármacos .....	2
1.4 Relação entre compostos naturais e compostos de síntese .....	3
1.5 Atividades biológicas que podem ser avaliadas utilizando produtos naturais e compostos de síntese .....	4
1.5.1 Atividade antioxidante .....	5
1.5.1.1 Radicais livres: origem e efeitos biológicos .....	5
1.5.1.2 Antioxidantes: origem e efeitos biológicos .....	8
1.5.1.3 Métodos para avaliar a capacidade antioxidante.....	10
1.5.1.3.1 Método ABTS .....	11
1.5.1.3.2 Método DPPH .....	12
1.5.1.3.3 Valor peróxido .....	15
1.5.1.3.4 Método de Folin-Ciocalteu.....	16
1.5.2 Inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase .....	17

1.5.2.1 Acetilcolina (ACh) e acetilcolinesterase (AChE) .....	17
1.5.2.2 Acetilcolinesterase na doença de Alzheimer (DA).....	20
1.5.2.3 Determinação dos parâmetros cinéticos $K_m$ e $V_{max}$ .....	23
1.5.2.4 Métodos para avaliar a atividade e inibição da AChE.....	25
1.5.2.5.1 Método de Ellman .....	26
1.5.2.5.2 Método bioautográfico de cromatografia em camada fina .....	27
1.5.3 Atividade antimicrobiana .....	28
1.5.3.1 Antimicrobianos e resistência antimicrobiana .....	28
1.5.3.2 Métodos para avaliar a atividade antimicrobiana .....	29
1.5.3.2.1 Difusão em disco .....	30
1.5.3.2.2 Microdiluição em meio de cultura .....	30
1.6 Caracterização das plantas utilizadas nos estudos de bioatividade .....	31
1.6.1 <i>Hymenodictyon floribundum</i> .....	31
1.6.2 <i>Parinari capensis</i> .....	32
1.6.3 <i>Tinnea antiscorbutica</i> .....	33
1.6.4 <i>Eragrostis viscosa</i> .....	33
1.6.5 <i>Xylopia odoratissima</i> .....	34
1.6.6 <i>Peucedanum angolense</i> .....	35
1.6.7 <i>Boscia microphylla</i> .....	36
1.6.8 <i>Adenodolichos huillensis</i> .....	36
1.6.9 <i>Rhus kirkii</i> .....	37
1.6.10 <i>Croton gratissimus</i> .....	38
1.6.11 <i>Gymnosporia senegalensis</i> .....	39
1.6.12 <i>Solanecio mannii</i> .....	40
1.6.13 <i>Peltophorum africanum</i> .....	41
1.6.14 <i>Piliostigma thonningii</i> .....	41

1.6.15 <i>Phragmanthera glaucocarpa</i> .....	42
1.6.16 <i>Solanum incanum</i> .....	43
1.7 Caracterização dos compostos de síntese (cumarinas sintéticas) utilizados nos estudos de bioatividade .....	45
1.8 Objetivos da tese .....	48
1.8.1 Objetivo geral .....	48
1.8.2 Objetivos específicos .....	48
<b>Capítulo 2</b> .....	<b>49</b>
2 Material e Métodos .....	49
2.1 Equipamentos, reagentes e estirpes.....	49
2.1.1 Equipamentos.....	49
2.1.2 Reagentes.....	50
2.1.3 Estirpes .....	51
2.2 Técnicas experimentais .....	52
2.2.1 Recolha e manuseamento das plantas.....	52
2.2.1.1 Preparação dos extratos .....	52
2.2.2 Compostos de síntese .....	53
2.2.3 Soluções dos extratos, compostos isolados dos extratos e compostos de síntese .....	54
2.2.4 Atividade Antioxidante.....	54
2.2.4.1 Método ABTS .....	54
2.2.4.1.1 Medição da absorvência das amostras.....	54
2.2.4.2 Método DPPH.....	55
2.2.4.2.1 Medição da absorvência das amostras.....	55
2.2.4.3 Valor peróxido (VP) .....	55
2.2.4.3.1 Determinação do valor peróxido para as amostras .....	55
2.2.4.4 Método Folin-Ciocalteu .....	56

2.2.4.4.1 Curva de calibração .....	56
2.2.4.4.2 Medição da absorvência das amostras .....	57
2.2.5 Atividade antimicrobiana .....	57
2.2.5.1 Ensaio de microdiluição em meio líquido.....	58
2.2.5.1.1 Atividade antifúngica.....	58
2.2.5.1.2 Atividade antibacteriana .....	59
2.2.5.2 Ensaio de difusão em disco.....	59
2.2.5.2.1 Atividade antifúngica.....	59
2.2.5.2.2 Atividade antibacteriana .....	60
2.2.6 Inibição da acetilcolinesterase (AChE) .....	60
2.2.6.1 Inibição da AChE pelo método de Ellman.....	60
2.2.6.1.1 Determinação dos parâmetros cinéticos $K_m$ e $V_{max}$ da AChE.....	60
2.2.6.1.2 Medição da absorvência das soluções de AChE com as amostras .....	61
2.2.6.2 Inibição da AChE pelo método bioautográfico de cromatografia em camada fina ...	62
2.2.6.2.1 Teste de falsos positivos devido à inibição da reação do $\alpha$ -naftol com o <i>Fast Blue B salt</i> .....	62
<b>Capítulo 3</b> .....	<b>65</b>
3 Resultados e Discussão .....	65
3.1 Extratos de plantas, compostos isolados dos extratos e compostos de síntese.....	65
3.2 Atividade antioxidante .....	67
3.2.1 Método ABTS .....	67
3.2.2 Método DPPH .....	70
3.2.3 Valor peróxido.....	74
3.2.4 Método de Folin-Ciocalteu .....	79
3.3 Atividade antimicrobiana .....	83

3.3.1 Ensaio de microdiluição em meio líquido.....	83
3.3.2 Ensaio de difusão em disco.....	85
3.4 Inibição da acetilcolinesterase .....	87
3.4.1 Método de Ellman .....	87
3.4.2 Método bioautográfico de cromatografia em camada fina .....	93
<b>Capítulo 4</b>	<b>99</b>
4.1 Conclusão.....	99
4.2 Perspetivas futuras .....	105
<b>Capítulo 5</b>	<b>107</b>
5 Referências .....	107
5.1 Bibliografia .....	107
5.2 Cibergrafia .....	137
Anexos .....	139



## Lista de figuras

<b>Figura 1:</b> Representação das estruturas dos compostos <b>ABTS</b> e <b>ABTS<sup>•+</sup></b> .....	11
<b>Figura 2:</b> Representação das estruturas do Trolox ( <b>A</b> ) e Crisina ( <b>B</b> ) .....	12
<b>Figura 3:</b> Figura 3: Radical livre DPPH e respetivas estruturas de ressonância na presença de um composto dador de átomos de hidrogénio ( <b>A-H</b> ). Ilustração da reação dada pela equação 7 .....	14
<b>Figura 4:</b> Estrutura molecular da acetilcolina.....	17
<b>Figura 5:</b> Esquema representativo do metabolismo da acetilcolina. <b>AChE</b> -acetilcolinesterase, <b>VAcHT</b> -transportador vesicular de acetilcolina, <b>ChAT</b> -colina acetil-transferase, <b>HAcHU</b> -transportador de colina de elevada afinidade, <b>nAChRs</b> - recetores nicotínicos da acetilcolina e <b>mAChRs</b> - recetores muscarínicos da acetilcolina .....	18
<b>Figura 6:</b> Representação das diferentes formas de AChE presentes nos vertebrados, <b>G</b> representa as formas globulares e <b>A</b> as formas assimétricas com as respetivas caudas de colagénio .....	19
<b>Figura 7:</b> Representação da estrutura tridimensional da acetilcolinesterase humana (hAChE). Na imagem é possível observar-se as cadeias hélice $\alpha$ e folha $\beta$ da enzima. ....	20
<b>Figura 8:</b> Representação gráfica da hipérbole descrita pela equação de Michaelis-Menten. $V_0$ é a velocidade inicial da reação enzimática, $V_{max}$ a velocidade máxima da reação enzimática, $[S]$ a concentração de substrato e $K_m$ a constante de Michaelis .....	24
<b>Figura 9:</b> Representação gráfica da linearização de Lineweaver-Burk. $V_0$ é a velocidade inicial da reação enzimática, $V_{max}$ a velocidade máxima da reação enzimática, $[S]$ a concentração de substrato, $m$ o declive da reta e $K_m$ a constante de Michaelis .....	25
<b>Figura 10:</b> Representação das reações que constituem o princípio do método de Ellman. <b>ACh</b> -acetilcolina; <b>AChE</b> - acetilcolinesterase; <b>DTNB</b> - ácido5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico); <b>TNB</b> - 5-tio-2-nitrobenzoato .....	27
<b>Figura 11:</b> Representação das reações envolvidas no método de cromatografia em camada fina que tem por base a reação da AChE com acetato de naftilo e a posterior coloração da placa de cor púrpura após a pulverização com o reagente <i>Fast Blue B salt</i> .....	28
<b>Figura 12:</b> Folhas e flores de <i>Hymenodictyon floribundum</i> .....	32
<b>Figura 13:</b> Folhas e flores de <i>Parinari capensis</i> .....	32
<b>Figura 14:</b> Folhas e flores de <i>Tinnea antiscorbutica</i> .....	33

<b>Figura 15:</b> Parte aérea de <i>Eragrostis viscosa</i> .....	34
<b>Figura 16:</b> Folhas de <i>Xylopia odoratissima</i> .....	35
<b>Figura 17:</b> Folhas e inflorescências de <i>Peucedanum angolense</i> .....	35
<b>Figura 18:</b> <i>Boscia microphylla</i> .....	36
<b>Figura 19:</b> Folhas de <i>Adenodolichos huillensis</i> .....	37
<b>Figura 20:</b> Folhas e flores de <i>Rhus kirkii</i> .....	38
<b>Figura 21:</b> Folhas de <i>Croton gratissimus</i> .....	39
<b>Figura 22:</b> Folhas e inflorescências de <i>Gymnosporia senegalensis</i> .....	39
<b>Figura 23:</b> Folhas e flores de <i>Solanecio mannii</i> .....	40
<b>Figura 24:</b> Folhas e flores de <i>Peltophorum africanum</i> .....	41
<b>Figura 25:</b> <i>Piliostigma thonningii</i> .....	42
<b>Figura 26:</b> Folhas de <i>Phragmanthera glaucocarpa</i> .....	43
<b>Figura 27:</b> Folhas, flor e fruto de de <i>Solanum incanum</i> .....	44
<b>Figura 28:</b> Esquema sobre o procedimento usado na preparação dos extratos de metanol (MeOH), hexano (Hx), clorofórmio (CHCl <sub>3</sub> ), acetato de etilo (AcOEt) e aquoso (H <sub>2</sub> O), das plantas <i>Piliostigma thonningii</i> e <i>Phragmanthera glaucocarpa</i> . PhMe- tolueno. ....	53
<b>Figura 29:</b> Placa cromatográfica obtida, através do método bioautográfico de cromatografia em camada fina realizado de acordo com Marston <i>et al.</i> (2002), para as diferentes concentrações de Eserina. A- 0,001 mg/mL, B- 0,010 mg/mL, C- 0,015 mg/mL, D- 0,020 mg/mL, E- 0,025 mg/mL, F- 0,050 mg/mL e G- 0,100 mg/mL (80:20 CHCl <sub>3</sub> -MeOH). Para todas as manchas o fator de retenção obtido foi de Rf=0,55) .....	93
<b>Figura 1A<sub>1</sub>:</b> Placas cromatográficas do método bioautográfico (A) e dos falsos positivos (B) para os compostos de síntese de 55 até 62 e para a Eserina (Es) 0,100 mg/mL.. ....	139
<b>Figura 2A<sub>1</sub>:</b> Placa cromatográficas do método bioautográfico (A) e dos falsos positivos (B) para a amostra 22 e para a Eserina (Es) 0,100 mg/mL .....	139
<b>Figura 3A<sub>1</sub>:</b> Placas cromatográficas do método bioautográfico (A) e dos falsos positivos (B) para as amostras 1; 7; 11; 13; 17; 24; 32; 35; 40; 45 e 50 e para a Eserina (Es) 0,100 mg/mL .....	140
<b>Figura 4A<sub>1</sub>:</b> Placas cromatográficas do método bioautográfico (A) e dos falsos positivos (B) para as amostras 21; 25; 30; 34; 38; 43 e 48 e para a Eserina (Es) 0,100 mg/mL. ....	140

<b>Figura 5A<sub>1</sub>:</b> Placas cromatográficas do método bioautográfico (A) e dos falsos positivos (B) para as amostras 2; 14; 18; 31; 39; 44 e 49 e para a Eserina (Es) 0,100 mg/mL .....	141
<b>Figura 6A<sub>1</sub>:</b> Placas cromatográficas do método bioautográfico (A) e dos falsos positivos (B) para as amostras 5; 9; 15; 20; 23; 28 e 36 e para a Eserina(Es) 0,100 mg/mL. ....	141
<b>Figura 7A<sub>1</sub>:</b> Placas cromatográficas do método bioautográfico (A) e dos falsos positivos (B) para as amostras 4; 6; 10; 12; 16; 19; 26; 27; 29; 33; 37; 42 e 47 e para a Eserina (Es) 0,100 mg/mL. ....	142
<b>Figura 8A<sub>1</sub>:</b> Placas cromatográficas do método bioautográfico (A) e dos falsos positivos (B) para as amostras 51, 52, 53 e 54, e para a Eserina (Es) 0,100 mg/mL .....	142



## Lista de tabelas

<b>Tabela 1:</b> Estrutura química das cumarinas sintéticas usadas nos ensaios de atividade biológica.....	46
<b>Tabela 2:</b> Reagentes utilizados no trabalho experimental como respectivo fabricante e grau de pureza.....	50
<b>Tabela 3:</b> Referências numéricas das diferentes amostras usadas nos ensaios de bioatividade .....	65
<b>Tabela 4:</b> Concentração mínima inibitória das diferentes amostras obtida nos ensaios de microdiluição para as estirpes de <i>C. albicans</i> , <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> .....	84
<b>Tabela 5:</b> Halo de inibição do crescimento microbiano para as diferentes amostras em relação às estirpes de <i>C. albicans</i> , <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> .....	86
<b>Tabela 6:</b> Parâmetros cinéticos da acetilcolinesterase na presença de 1 % de metanol ou de 1 % de DMSO.....	89
<b>Tabela 7:</b> Fatores de retenção obtidos no método bioautográfico de cromatografia em camada fina para as diferentes amostras.....	96
<b>Tabela 1A:</b> Equações e coeficientes de determinação para o cálculo do EC <sub>50</sub> das diferentes amostras no método de ABTS. <b>y</b> - percentagem de inibição (%) e <b>x</b> - concentração de amostra (mg/mL). (n=5). O valor de p foi <0,05 para todas as curvas de calibração. ....	143
<b>Tabela 2A:</b> Equações e coeficientes de determinação para o cálculo do EC <sub>50</sub> das diferentes amostras no método de DPPH. <b>y</b> - percentagem de inibição (%) e <b>x</b> - concentração de amostra (mg/mL). (n=5). O valor de p foi <0,05 para todas as curvas de calibração. ....	144
<b>Tabela 3A:</b> Equações e coeficientes de determinação para o cálculo do IC <sub>50</sub> das amostras 7, 8, 37, 38, 39, 40, 47, 49, 50, 51, 52 e Tacrina dissolvidas em metanol, no método de Ellman. <b>y</b> - percentagem de inibição (%) e <b>x</b> - concentração de amostra (mg/mL). (n=5). O valor de p foi <0,05 para todas as curvas de calibração .....	146
<b>Tabela 4A:</b> Equações e coeficientes de determinação para o cálculo do IC <sub>50</sub> das amostras 17, 23, 26, 34, 35, 37, 38, 39, 40, 49 e Tacrina dissolvidas em DMSO, no método de Ellman. <b>y</b> - percentagem de inibição (%) e <b>x</b> - concentração de amostra (mg/mL). (n=5). O valor de p foi <0,05 para todas as curvas de calibração. ....	146



## Lista de gráficos

**Gráfico 1:** EC<sub>50</sub> das diferentes amostras e do Trolox (gráfico destacado) para o método de ABTS. Os números no eixo das abcissas correspondem a amostras identificadas na tabela 3. As barras coloridas correspondem às amostras com melhores resultados em termos de EC<sub>50</sub> em relação ao ABTS\*. A verde os extratos metanólicos: 6 - *H. floribundum* (cascas); 16 - *P. capensis* (folhas). A azul o extrato aquoso: 17 - *P. capensis* (folhas). A vermelho o extrato de acetato de etilo: 43 - *P. glaucocarpa* (raízes). (n= 4; média ± σ; P< 0,05) ..... 69

**Gráfico 2:** EC<sub>50</sub> das diferentes amostras e do Trolox (gráfico destacado) para o método de DPPH. Os números no eixo das abcissas correspondem a amostras identificadas na tabela 3. As barras coloridas correspondem às amostras com melhores resultados em termos de EC<sub>50</sub> em relação ao DPPH\*. A verde os extratos metanólicos: 6 - *H. floribundum* (cascas); 16 - *P. capensis* (folhas); 19 - *R. kirkii* (folhas); 26 - *G. senegalensis* (ramos); 37 - *P. africanum* (ramos); 42 - *P. glaucocarpa* (raízes). A azul os extratos aquosos: 7 - *H. floribundum* (cascas); 17 - *P. capensis* (folhas); 40 - *P. africanum* (ramos); 45 - *P. glaucocarpa* (raízes). A vermelho os extratos de acetato de etilo: 38 - *P. africanum* (ramos); 43 - *P. glaucocarpa* (raízes); 48 - *P. thonningii* (raízes). A amarelo os extratos de hexano: 36 - *P. africanum* (ramos); 41 - *P. glaucocarpa* (raízes). A castanho os extratos de clorofórmio: 39 - *P. africanum* (ramos); 44 - *P. glaucocarpa* (raízes). A rosa o composto natural Malanósido A. (n= 4; média ± σ; P< 0,05) ... 73

**Gráfico 3:** Valor peróxido (VP) de amostras de óleo de soja e de girassol em função do tempo de oxidação (oito dias). (n= 3; média ± σ; P< 0,05) ..... 74

**Gráfico 4:** Valor peróxido das diferentes amostras e controlo (C) ao oitavo dia de oxidação para o óleo de girassol. Os números no eixo das abcissas correspondem a amostras identificadas na tabela 3. As barras coloridas correspondem às amostras com melhores resultados em termos de valor peróxido. A verde os extratos metanólicos: 6 - *H. floribundum* (cascas); 10 - *T. antiscorbutica* (parte aérea); 12 - *P. angolense* parte aérea); 16 - *P. capensis* (folhas); 19 - *R. kirkii* (folhas). A azul os extratos aquosos: 1 - *A. huillensis* (folhas); 7 - *H. floribundum* (cascas); 11 - *T. antiscorbutica* (parte aérea); 13 - *P. angolense* (parte aérea); 17 - *P. capensis* (folhas); 24 - *B. microphylla* (folhas). A vermelho os extratos de acetato de etilo: 21 - *E. viscosa* (parte aérea); 25 - *B. microphylla* (folhas). A amarelo o extrato de hexano: 9 - *H. floribundum* (cascas). A castanho os extratos de clorofórmio: 2 - *A. huillensis* (folhas); 3 - *A. huillensis* (raízes); 8 - *H. floribundum* (cascas); 14 - *P. angolense* (parte aérea); 18 - *P. capensis* (folhas). A roxo o extrato de diclorometano: 22 - *E. viscosa* (parte aérea). (n= 3; média ± σ; P< 0,05)..... 78

**Gráfico 5:** Curva de calibração para o método de Folin-Ciocalteu usada na quantificação de compostos fenólicos totais das amostras. O intervalo de concentração 0,00 - 0,05 mg G.A.E./mL foi destacado no gráfico para melhor visualização dos pontos, (n= 4; média  $\pm$   $\sigma$ ; P< 0,05) ..... 80

**Gráfico 6:** Resultado da concentração de compostos fenólicos totais para as diferentes amostras de extrato, através do método de Folin-Ciocalteu. Os números no eixo das abscissas correspondem a amostras identificadas na tabela 3. As barras coloridas correspondem às amostras com melhores resultados em termos de concentração de compostos fenólicos totais. A verde os extrato metanólicos: 16 - *P. capensis* (folhas); 26 - *G. senegalensis* (ramos); 33 - *S. incanum* (fruto); 37 - *P. africanum* (ramos). A azul os extratos aquosos: 17 - *P. capensis* (folhas); 35 - *S. incanum* (fruto); 40 - *P. africanum* (ramos). A vermelho os extratos de acetato de etilo: 30 - *C. gratissimus* (parte aérea); 34 - *S. incanum* (fruto); 38 - *P. africanum* (ramos). A castanho o extrato de clorofórmio: 39 - *P. africanum* (ramos). (n= 4; média  $\pm$   $\sigma$ ; P< 0,05) . 82

**Gráfico 7:** Representação gráfica da linearização de Lineweaver- Burk para a determinação dos parâmetros cinéticos da acetilcolinesterase na presença de 1 % de metanol. (n= 5; média  $\pm$   $\sigma$ ; P< 0,05) ..... 89

**Gráfico 8:** Representação gráfica da linearização de Lineweaver- Burk para a determinação dos parâmetros cinéticos da acetilcolinesterase na presença de 1 % de DMSO. (n= 7; média  $\pm$   $\sigma$ ; P< 0,05) ..... 90

**Gráfico 9:** IC<sub>50</sub> obtido através do método de Ellman para a Tacrina (gráfico destacado) e para as amostras 17, 23, 26, 34, 35, 37, 38, 39, 40 e 49 (tabela 3) dissolvidas em DMSO. As barras coloridas correspondem às amostras com melhores resultados em termos de IC<sub>50</sub>. A verde os extratos metanólicos: 26 - *G. senegalensis* (ramos); 37 - *P. africanum* (ramos). A vermelho o extrato de acetato de etilo: 38 - *P. africanum* (ramos). A amarelo o extrato de tolueno: 23 - *B. microphylla* (folhas). A castanho o extrato de clorofórmio: 39 - *P. africanum* (ramos). (n= 4; média  $\pm$   $\sigma$ ; P< 0,05) ..... 91

**Gráfico 10:** IC<sub>50</sub> obtido através do método de Ellman para a Tacrina (gráfico destacado) e para as amostras 7, 8, 37, 38, 39, 40, 47, 49 e 50 (tabela 3) dissolvidas em metanol. As barras coloridas correspondem às amostras com melhores resultados em termos de IC<sub>50</sub>. A verde o extrato metanólico: 37 - *P. africanum* (ramos). A vermelho o extrato de acetato de etilo: 38 - *P. africanum* (ramos). A azul o extrato aquoso: 40 - *P. africanum* (ramos). A castanho o extrato de clorofórmio: 39 - *P. africanum* (ramos). (n= 4; média  $\pm$   $\sigma$ ; P< 0,05)..... 92

## Lista de acrónimos

[I]	concentração de inibidor
[S]	concentração de substrato
ABTS	2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ABTS <sup>•+</sup>	radical ABTS
Acetil-CoA	acetil-coenzima A
ACh	aceticolina
AchE	acetilcolinesterase
AcOEt	acetato de etilo
ADN	ácido desoxiribonucleico
Ala	alanina
Amp B	anfotericina B
AO	abertura oxianiónica
AOCS	<i>american oil chemists' society</i>
APX	ascorbato peroxidase
ARN	ácido ribonucleico
Asp	aspartato
ATCC	<i>american type culture collection</i>
ATCI	iodeto de acetiltiocolina
ATP	adenosina trifosfato
BHA	butil-hidroxianisole
BHT	butil-hidroxitolueno
BSA	albumina sérica bovina
BuChE	butirilcolinesterase
CAT	catalase
ChAT	colina acetil-transferase
CIM	concentração mínima inibitória
CIP	ciprofloxacina
CLSI	<i>clinical and laboratory standards institute</i>
CUPRAC	<i>cupric ion reducing antioxidant capacity</i>

CuZnSOD	isoforma de cobre-zinco da superóxido dismutase
DA	doença de Alzheimer
DMSO	dimetilsulfóxido
DPPH	1,1-difenil-1-2-picrilhidrazilo
DPPH <sup>-</sup>	ânion 2,2-diphenil-1-picrilhidrazilo
DPPH <sup>•</sup>	radical 2,2-diphenil-1-picrilhidrazilo
DPPH-H	2,2-diphenil-1-picrilhidrazina
DTNB	reagente de Ellman (5,5'-Ditiobis(2-Ácido Nitrobenzoico))
E	enzima
EC <sub>50</sub>	metade da concentração eficiente
EeAChE	acetilcolinesterase de <i>Electrophorus electricus</i>
EI	complexo enzima-inibidor
EIS	complexo enzima-inibidor-substrato
EP	complexo enzima-produto
ES	complexo enzima-substrato
ET	transferência de elétrões
Fd	fator de diluição
FRAP	<i>ferric reducing ability of plasma</i>
G.A.E.	<i>gallic acid equivalent</i>
Gli	glicina
Glu	glutamato
GPX	glutathione peroxidase
GSH	glutathione reduzida
hAChE	acetilcolinesterase humana
HACHU	transportador de colina de elevada afinidade
HAT	transferência de átomos de hidrogénio
Hex	hexano
His	histidina
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
IC <sub>50</sub>	metade da concentração máxima de inibição

$K_m$	constante de Michaelis
$L^\bullet$	radical peroxilo
LH	ácido gordo polinsaturado
$LOO^\bullet$	radical peroxilo
LOOH	hidroperóxidos
LPIC	<i>lipid peroxidation inhibition capacity</i>
mAChRs	recetores muscarínicos da acetilcolina
MAO-B	monoamina oxidase B
MeOH	metanol
$M_{ext.}$	massa de extrato
min	minuto
MnSOD	isoforma de manganês da superóxido dismutase
MOPS	<i>4-morpholinepropanesulfonic acid</i>
MS	espectrometria de massa
nAChRs	recetores nicotínicos da acetilcolina
NADPH	forma reduzida do fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido
NCCLS	<i>national committee for clinical laboratory standards</i>
NMDA	<i>N-metil D-aspartato</i>
NOSs	sintetases do óxido nítrico
OMS	organização mundial de saúde
ORAC	<i>oxygen radical absorbance capacity</i>
P	produto
PG	propil, octil e dodecil galato
Phe	fenilalanina
PhMe	tolueno
PPA	proteína precursora amiloide
PUFAs	ácidos gordos polinsaturados
Rf	fator de retenção
RMN	ressonância magnética nuclear
RNS	espécies reativas de azoto

ROS	espécies reativas de oxigénio
RPMI	meio de cultura desenvolvido no <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
S	substrato
SA	sítio aniónico
SAC	sítio de ligação acilo
SAP	sítio aniónico periférico
SE	sítio esterático
Ser	serina
-SH	grupo tiol
SOD	superóxido dismutase
TBARS	<i>thiobarbituric acid reactive substances</i>
TBHQ	butilhidroquinona terciária
TcAChE	acetilcolinesterase de <i>Torpedo californica</i>
TEAC	<i>trolox equivalent antioxidant capacity</i>
TNB	5-tio-2-nitrobenzoato
TOSC	<i>total oxyradical scavenging capacity</i>
TR	tioredoxina redutase
TRAP	<i>total radical trapping antioxidant parameter</i>
Trp	triptofano
Tyr	tirosina
UV	ultravioleta
UV/VIS	espectroscopia ultravioleta-visível
V <sub>0</sub>	velocidade inicial da reação enzimática
VACHT	transportador vesicular de aceticolina
V <sub>ext.</sub>	volume da solução de extrato
V <sub>max</sub>	velocidade máxima da reação enzimática
VP	valor peróxido

# Capítulo 1

## 1. Introdução

### 1.1 Plantas medicinais e produtos naturais

De acordo com a definição da Organização Mundial de Saúde (OMS), planta medicinal é toda a planta no estado selvagem, ou de cultivo, que possui num ou mais dos seus órgãos, substâncias que podem ser utilizadas para fins terapêuticos ou então como precursores na síntese de fármacos (WHO, 2007). As plantas completas ou então partes tais como, por exemplo, folhas, flores, frutos, sementes, caules, cascas, raízes, rizomas, óleos essenciais e resinas podem ser utilizadas para fins medicinais (Doughari e Manzara, 2008; Mbata *et al.*, 2009; Rao, 2012).

Considera-se como produto natural os exsudados, extratos, partes ou compostos puros isolados dos organismos (Sarker *et al.*, 2006). Na maioria dos casos, o termo “produto natural” refere-se aos metabolitos secundários produzidos pelos organismos. Quanto à origem os produtos naturais podem ser provenientes tanto de fontes terrestres como marinhas e podem ter origem em plantas, animais ou microrganismos (Cannell, 1998; Dinda *et al.*, 2011).

O interesse nos produtos naturais presentes nas plantas pode não ser meramente terapêutico, uma vez que, os produtos naturais podem apresentar uma grande variedade de aplicações tais como, por exemplo, a utilização na forma de corantes, polímeros, óleos, ceras, perfumes, inseticidas e herbicidas entre outras aplicações (Buchanan *et al.*, 2000; Crozier *et al.*, 2006).

### 1.2 Produtos naturais do metabolismo primário e secundário das plantas

Os organismos vivos necessitam de sintetizar e transformar compostos orgânicos tais como, por exemplo, proteínas, glúcidos, lípidos e ácidos nucleicos de modo a obter energia que lhes permita sobreviver. Ao conjunto de vias envolvidas na transformação e síntese de compostos essenciais ao metabolismo dos organismos vivos dá-se o nome de metabolismo primário e os compostos envolvidos designam-se por metabolitos primários. No caso das plantas estes metabolitos têm papéis fundamentalmente associados à fotossíntese, respiração, crescimento e desenvolvimento da planta (Dewick, 2002). As plantas produzem no entanto uma grande diversidade de produtos naturais, e além das vias metabólicas primárias possuem também um metabolismo secundário caracterizado por um conjunto de vias metabólicas que permitem a obtenção de metabolitos secundários, que não são necessários para o metabolismo energético da planta e que apresentam funções muitas vezes desconhecidas (Buchanan *et al.*, 2000).

Normalmente os produtos naturais são isolados em pequenas quantidades e como tal a realização de bioensaios é limitada ou por vezes impossível (Dewick, 2002; Crozier *et al.*, 2006). Os metabolitos secundários dentro do reino vegetal são a principal fonte de produtos naturais farmacologicamente ativos das plantas (Buchanan *et al.*, 2000). Apesar de alguns metabolitos secundários apresentarem funções desconhecidas nas plantas, existem no entanto alguns com funções conhecidas ao nível dos mecanismos de defesa podendo apresentar uma função de repelência contra predadores, possuir uma natureza tóxica contra microrganismos patogénicos ou então podem também estar envolvidos na defesa contra o stress ambiental como por exemplo a exposição aos raios ultravioleta. As plantas produzem também compostos envolvidos na comunicação com outros organismos (Schäfer e Wink, 2009). No entanto alguns compostos podem não ser facilmente distinguidos como metabolitos primários ou secundários com base nas moléculas precursoras, estruturas químicas ou origens biossintéticas (Balunas e Kinghorn, 2005; Dias *et al.*, 2012).

Os produtos naturais de plantas podem ser divididos em quatro grupos principais de acordo com as suas origens biossintéticas. Assim consideram-se os grupos dos terpenos, dos compostos fenólicos e dos compostos de nitrogénio e enxofre. Os terpenos apresentam funções de defesa atuando como toxinas ou então como dissuasores para insetos e mamíferos que se alimentam de plantas. Fazem parte deste grupo os monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e politerpenos (Buchanan *et al.*, 2000). Quanto ao grupo dos compostos fenólicos, estes têm funções de defesa nas plantas contra pragas e doenças, e nas zonas onde os níveis de ozono são elevados as plantas aumentam o teor em compostos fenólicos nas folhas. O grupo dos compostos fenólicos é constituído por cumarinas, furanocumarinas, ligninas, flavonoides e taninos (Crozier *et al.*, 2006). O grupo dos compostos de enxofre é formado por compostos como os glucosinolatos, fitoalexinas, defensinas, lectinas e tioninas. Estes compostos estão ligados, direta ou indiretamente, à defesa das plantas relativamente a ataques por parte de microrganismos. No que diz respeito ao grupo dos compostos de nitrogénio, este é constituído pelos alcaloides, glucósidos cianogénicos e aminoácidos não proteicos, que são formados a partir de aminoácidos comuns. Desempenham uma função importante na defesa da planta contra herbívoros e podem apresentar toxicidade para os seres humanos (Mazid *et al.*, 2011).

### **1.3 Importância dos produtos naturais derivados das plantas na medicina e no desenvolvimento de novos fármacos**

A utilização terapêutica de produtos naturais derivados de fontes vegetais e animais, com origem terrestre ou marinha, é tão antiga quanto a civilização humana (Rates, 2001). O conhecimento sobre a utilização de plantas pelos seres humanos é baseado em milhares de anos de experiência na utilização das plantas específicas e da sua forma de utilização em determinadas doenças (Dias *et al.*, 2012; Zerabruk e Yirga, 2012). Assim o conhecimento sobre a utilidade terapêutica das plantas foi passando oralmente através das gerações e as

aplicações terapêuticas à base de plantas podem tomar a forma de tinturas, chás, fumos ou vapores, óleos essenciais e pós (Ningthoujam *et al.*, 2013).

Atualmente o uso terapêutico de plantas requer o isolamento, caracterização química e análise da bioatividade dos compostos farmacologicamente ativos presentes nas plantas (Balunas e Kinghorn, 2005).

Em termos medicinais, as plantas podem conter uma variedade de compostos químicos que podem atuar de forma individual, sinérgica ou aditiva (Gurib-Fakim, 2006). As plantas podem fornecer compostos que podem ser usados no tratamento de sintomas como, por exemplo, a hipertensão (McCurdy e Scully, 2005) e a inflamação (Moyo *et al.*, 2010). Podem ser utilizadas também no tratamento de doenças neurológicas como por exemplo a doença de Alzheimer (DA) (Aremu *et al.*, 2011) e no tratamento de doenças respiratórias (Ningthoujam *et al.*, 2013), cardiovasculares (Butler, 2005), cancro e diabetes (Butler, 2004). Além disso podem também apresentar uma variedade de atividades biológicas como por exemplo antifúngica, antibacteriana, antiviral, antiparasitária e antioxidante (Butler, 2005; Jaberian *et al.*, 2013).

O desenvolvimento de novos fármacos pode ser realizado por síntese química e combinatória ou então através da modelação molecular (Balunas e Kinghorn, 2005). Também se podem obter novos compostos úteis terapêuticamente após isolamento a partir de plantas ou outras fontes naturais. O processo de obtenção de novos compostos a partir das plantas inicia-se com a recolha e identificação das plantas de interesse por um botânico ou etnobotânico. Depois procede-se à preparação dos extratos a partir das plantas, à realização de ensaios de atividade biológica e ao isolamento, purificação e caracterização dos eventuais compostos ativos presentes nos extratos vegetais (Phillipson, 2001; Balunas e Kinghorn, 2005). Os compostos ativos isolados podem depois ser usados diretamente como medicamento, sob a forma de produto natural, ou então ser usado como produto a ser transformado por síntese química de modo a melhorar a sua atividade ou a diminuir a toxicidade (Phillipson, 2001; Orhan *et al.*, 2004). Os produtos naturais podem assim ser um ponto de partida para novos compostos sintéticos com diversas estruturas (Aremu *et al.*, 2011).

#### **1.4 Relação entre compostos naturais e compostos de síntese**

A classificação dos compostos químicos como naturais ou sintéticos tem por base a sua ocorrência na natureza (Topliss *et al.*, 2002). Como os compostos obtidos a partir de fontes naturais apresentam por vezes elevada toxicidade, no final do século XIX começou a pesquisa de compostos com características menos tóxicas, e no século XX o uso de substâncias sintéticas como fármacos generalizou-se (Topliss *et al.*, 2002; Thomas, 2007; Ortholand e Ganesan, 2004).

O surgimento de novas doenças, a disponibilidade dos produtos naturais e o aumento da resistência por parte dos patógenos aos compostos utilizados tornou urgente o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos com novos mecanismos de ação (Winter e

Tang, 2012). A modificação de produtos naturais, com vista a melhorar as suas propriedades biológicas, ou a síntese total de compostos análogos, serve como ponto de partida para a obtenção de novos agentes terapêuticos. Simultaneamente os compostos sintéticos têm um papel cada vez mais importante na descoberta de novos agentes terapêuticos, uma vez que, a síntese química tem proporcionado uma vasta coleção de substâncias sintéticas (Topliss *et al.*, 2002; Ortholand e Ganesan, 2004).

Os fármacos produzidos por modificação de produtos naturais são geralmente classificados como substâncias sintéticas, embora possam ser considerados como compostos intermediários no que diz respeito ao carácter entre substâncias naturais e sintéticas (Marienhagen e Bott., 2013). Deste modo compostos naturais e sintéticos são considerados como complementares, no que diz respeito à procura de novas substâncias com fins terapêuticos (Winter e Tang, 2012; Marienhagen e Bott., 2013).

A estrutura molecular de um composto é a razão pela qual este exhibe atividades biológicas desejáveis e/ou indesejáveis. Deste modo a origem dos compostos é pouco relevante, e apesar de existirem compostos sintéticos extremamente tóxicos, muitas substâncias químicas com elevada toxicidade são produtos naturais, como por exemplo o oxigénio uma substância essencial para a vida mas que pode ser tóxico para os seres humanos (Santos, 2012). Compostos com propriedades tóxicas também são úteis por exemplo na desinfeção de microrganismos e algumas substâncias consideradas como tóxicas são utilizadas na medicina em doses cuidadosamente controladas. A classificação de um composto como tóxico tem por base a dose, pois a toxicidade não tem relação com a origem natural ou sintética de um composto (Topliss *et al.*, 2002; Santos, 2012).

Apesar do interesse por parte das empresas farmacêuticas nas técnicas de síntese química e modelação molecular para a obtenção de novos compostos com propriedades terapêuticas, os produtos naturais obtidos, em particular a partir das plantas medicinais, continuam a ser uma importante fonte de novos compostos químicos (Phillipson, 2001).

## **1.5 Atividades biológicas que podem ser avaliadas utilizando produtos naturais e compostos de síntese**

A procura por novos compostos biologicamente ativos para o uso em áreas como por exemplo a medicina e agricultura, é a razão pela qual a pesquisa fitoquímica e o desenvolvimento de compostos sintéticos são importantes (Cseke *et al.*, 2006). Os ensaios biológicos permitem determinar a atividade de compostos naturais e sintéticos e, como tal, podem ser realizados no sentido de identificar quais os compostos sintéticos relevantes ou no caso de extratos de plantas, quais os promissores. Relativamente aos bioensaios, estes devem ser rápidos, simples de realizar, fornecer dados quantificáveis e facilmente interpretáveis; ser automatizados e económicos. Além disso as técnicas utilizadas devem ter baixos limites de deteção uma vez que no caso de extratos naturais a concentração dos compostos químicos presentes é desconhecida. É de salientar também que os bioensaios devem ser compatíveis

com as características físico-químicas de um dado composto e não devem ser afetados por solventes; valores extremos de pH; força iónica; nem pela coloração dos extratos naturais assim como devem incorporar sempre o uso de controlos positivos e negativos (Cseke *et al.*, 2006; Gad, 2005).

No caso de produtos naturais os bioensaios podem ser realizados em paralelo com o fracionamento dos extratos, e as frações individuais por sua vez podem ser submetidas a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) ou espectrometria de massa (MS) de modo a identificar-se as estruturas dos compostos presentes nas frações. (Cseke *et al.*, 2006).

Avaliar diferentes atividades biológicas é importante, uma vez que, os compostos naturais ou sintéticos podem demonstrar diferentes atividades biológicas (Cannell, 1998). Existe uma variedade de atividades biológicas que podem ser testadas com produtos naturais e compostos sintéticos. Assim, podem ser avaliadas as atividades relacionadas com doenças causadas por microrganismos tais como, por exemplo, atividade antibacteriana, antifúngica, antiparasitária e antiviral (Mukhtara *et al.*, 2008; Eldeen *et al.*, 2005). Podem ser testadas atividades relacionadas com a área neurológica como, por exemplo, a atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase envolvida na doença de Alzheimer, atividade inibitória da enzima monoamina oxidase B (MAO-B) envolvida na doença de Parkinson e atividade analgésica (McCurdy e Scully, 2005; Stafforda *et al.*, 2008). As atividades inseticida, herbicida (Cutler, 1988), antitumoral, antioxidante (Aremu *et al.*, 2011), antidiabética, antiosteoporose (Gurib-Fakim, 2006) e antiinflamatória (Eldeen *et al.*, 2005) também podem ser testadas. Além disso, podem ser avaliadas atividades relacionadas com doenças cardiovasculares (Gopal e Michel, 2008), metabólicas (Butler, 2005) e ainda atividades como, por exemplo, a toxicidade e alergenicidade (Crozier *et al.*, 2006).

De todas as atividades que podem ser avaliadas com os compostos naturais e sintéticos, apenas serão descritas as que se apresentam descritas nos objetivos da tese.

## **1.5.1 Atividade antioxidante**

### **1.5.1.1 Radicais livres: origem e efeitos biológicos**

Um radical livre é um ião, átomo ou molécula capaz de existência independente e que contém um ou mais eletrões desemparelhados numa orbital atómica ou molecular (Halliwell e Gutteridge, 2008; Penna *et al.*, 2009) Os radicais podem ser formados por perda de um eletrão ou por quebra de uma ligação covalente em que um eletrão do par de ligação permanece em cada átomo. Este processo é conhecido como quebra homolítica da ligação covalente e a energia necessária para dissociar ligações covalentes pode ser disponibilizada pelo calor, radiação ultravioleta ou radiação ionizante (Halliwell e Gutteridge, 2008).

A evolução dos processos metabólicos aeróbios (respiração e fotossíntese) conduziu inevitavelmente à produção de espécies reativas de oxigénio (ROS). Por exemplo, a adição de um eletrão à molécula de oxigénio ( $O_2$ ) forma o radical anião superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) (Matés e

Sánchez-Jiménez, 2000; Apele e Hirt, 2004; Valko *et al.*, 2007).

As espécies reativas de oxigénio são radicais livres muito reativos, que podem atuar como oxidantes ou redutores, dependendo da natureza da espécie alvo. Quando um radical livre reage com um composto não radicalar forma-se um novo radical e nesta situação podem ocorrer reações em cadeia que podem ter efeitos nefastos sobre biomoléculas ou estruturas como, por exemplo, membranas (Laguerre *et al.*, 2007). O termo espécies reativas de oxigénio (ROS), inclui não só os radicais de oxigénio mas também alguns derivados de oxigénio não radicalares que podem originar radicais, tais como o peróxido de di-hidrogénio ( $H_2O_2$ ), ácido hipocloroso (HOCl) e o ozono ( $O_3$ ). Também foram identificadas espécies reativas de nitrogénio, cloro, bromo e enxofre (Gomes *et al.*, 2005; Halliwell e Gutteridge, 2008).

A homeostasia do oxigénio nos tecidos é mantida através de uma série de reações de oxidação-redução envolvendo a transferência de eletrões entre duas espécies químicas: as que perdem eletrões (são oxidadas) e as que ganham eletrões (são reduzidas) (Gomes *et al.*, 2005). Quando a homeostasia do oxigénio não é mantida, o ambiente celular fica sob stress oxidativo, ou seja, com um excesso de ROS disponível na célula (Kregel *et al.*, 2007).

As espécies reativas de oxigénio podem ter origem a nível endógeno e exógeno. A nível endógeno uma das principais fontes de radicais livres é a mitocôndria. Durante a síntese de ATP verifica-se a redução de  $O_2$  a água por um mecanismo que envolve quatro eletrões. Contudo pode ocorrer a redução de  $O_2$  apenas com um ou dois eletrões originando-se anião superóxido ou peróxido de di-hidrogénio que pode depois ser convertido em ROS (Ji, 1999; Cadenas e Davies, 2000; Valko *et al.*, 2006). A produção de ROS pode também ocorrer a nível do retículo endoplasmático, onde a NADPH-citocromo P450 redutase pode ceder eletrões ao  $O_2$  dando origem ao anião superóxido. A produção intracelular de ROS inclui também as reações que envolvem oxidases dos peroxisomas, em particular a xantina oxidase, que catalisa a oxidação da xantina, hipoxantina ou acetaldeído a ácido úrico, composto este que por sua vez leva à produção de radical superóxido (Del Río *et al.*, 2002; Blokhina *et al.*, 2003). As infeções por organismos patogénicos levam à ativação de células envolvidas no processo inflamatório (neutrófilos, macrófagos e eosinófilos) e estas células usam o oxigénio para produzir radicais livres como o anião superóxido e também HOCl e  $H_2O_2$  (Matés e Sánchez-Jiménez, 2000; Kouakou-Siransy *et al.*, 2010).

No que diz respeito à produção exógena de ROS, a radiação ultravioleta (UV) (Dröge, 2002) e a exposição a xenobióticos em particular compostos clorados, agentes carcinogénicos e barbitúricos, também promovem a produção de ROS (Gomes *et al.*, 2005; Ara e Nur, 2009).

As espécies reativas de nitrogénio, nos sistemas biológicos são originadas principalmente a partir do óxido nítrico gerado por ação das sintetases do óxido nítrico (NOSs) (Valko *et al.*, 2007). Estas enzimas provocam a redução da arginina a citrulina, com formação de óxido nítrico ( $NO^*$ ) que ao reagir com o radical anião superóxido origina o anião peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). Quando reage com  $O_2$  forma-se o radical dióxido de nitrogénio  $2NO_2^*$ , que ao reagir com uma molécula de óxido nítrico forma o radical anião hiponitrito  $ONNO^{*-}$  (Valko *et al.*, 2007; Halliwell e Gutteridge, 2008).

As plantas produzem continuamente ROS como subprodutos de várias vias metabólicas localizadas em diferentes compartimentos celulares, e também através da ativação de várias oxidases e peroxidases. Sob condições fisiológicas estáveis, as ROS são eliminadas por diferentes componentes de defesa antioxidante que se encontram por vezes confinados em compartimentos específicos (Gara *et al.*, 2003). O equilíbrio entre a produção e a eliminação das ROS pode ser perturbado por uma série de fatores desde ambientais de origem biótica até aos originados, por infeção por vírus, fungos ou bactérias, levando à produção de ROS que vão atuar diretamente sobre os microrganismos. Processos abióticos, decorrentes de um excesso ou déficit no ambiente físico-químico, como por exemplo baixas ou altas temperaturas, e a luminosidade também afetam os níveis de ROS (Apele e Hirt, 2004).

A nível dos efeitos biológicos, as espécies reativas de oxigénio e de nitrogénio estão envolvidas em diferentes funções biológicas tais como a transdução de sinal, neurotransmissão, relaxação do músculo liso, indução da apoptose, agregação plaquetária, modelação da pressão sanguínea, controlo do sistema imunológico, processos de aprendizagem e memória, regulação do crescimento celular e metabolismo de xenobióticos (Apele e Hirt, 2004; Gomes *et al.*, 2005). Podem também ser usadas como marcadores de infertilidade masculina (Agarwal *et al.*, 2006). No entanto quando são produzidas em quantidades elevadas ou as defesas antioxidantes estão em déficit, estas espécies reativas tornam-se prejudiciais, provocando a oxidação de biomoléculas tais como lípidos, proteínas, glúcidos e ácidos nucleicos (Ogunlana *et al.*, 2008). As espécies reativas estão também envolvidas no envelhecimento e algumas doenças como cancro (Matés e Sánchez-Jiménez, 2000; Nishikawa, 2008), diabetes mellitus (Maritim *et al.*, 2003), doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (Di Matteo e Esposito, 2003), e doenças cardiovasculares (Kumar e Chattopadhyay, 2007; Jeong *et al.*, 2010).

No caso particular dos lípidos, estes podem também ser oxidados por uma variedade de espécies reativas (Laguerre *et al.*, 2007). A peroxidação lipídica é um processo complexo que ocorre na presença de iniciadores como os radicais livres, calor, luz e iões metálicos. Pode ocorrer por três vias reacionais: (i) auto-oxidação não enzimática mediada por radicais livres; (ii) foto-oxidação não enzimática e não radicalar e (iii) oxidação enzimática, provocando assim a deterioração oxidativa de ácidos gordos polinsaturados (PUFAs). Estes são ácidos gordos que contêm duas ou mais ligações duplas. Os ácidos gordos monoinsaturados e mesmo os saturados também podem ser oxidados embora mais dificilmente (Laguerre *et al.*, 2007; Halliwell e Gutteridge, 2008).

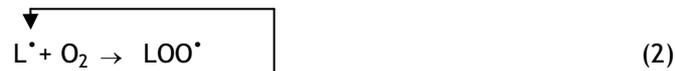
Da reação de oxidação de lípidos resultam hidroperóxidos, que são produtos primários da reação entre o oxigénio e ácidos gordos insaturados, e que desempenham um papel central na auto-oxidação dos lípidos. Produtos secundários como aldeídos, polímeros e cetonas podem também ser formados (Tsiaka *et al.*, 2013). As concentrações de aldeídos e cetonas aumentam inicialmente, mas tendem depois a diminuir em resultado da sua degradação (Antolovich *et al.*, 2002).

A formação de hidroperóxidos e compostos voláteis ocorre em três etapas:

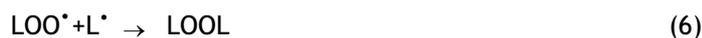
1. **Iniciação:** Fatores externos como calor, radiação ionizante e agentes químicos como iões metálicos, radicais livres e metaloproteínas desencadeiam a oxidação lipídica. Verifica-se a quebra homolítica da ligação do hidrogénio na posição  $\alpha$  relativamente à ligação dupla no ácido gordo polinsaturado (LH), de acordo com a equação 1.



2. **Propagação:** Sob condições aeróbias, o radical livre peroxilo ( $\text{L}^\bullet$ ) reage com o  $\text{O}_2$  originando o radical peroxilo ( $\text{LOO}^\bullet$ ), que ao reagir com uma molécula de outro ácido gordo polinsaturado ( $\text{L}_x\text{H}$ ), forma um hidroperóxido ( $\text{LOOH}$ ) e um novo radical peroxilo ( $\text{L}_x^\bullet$ ), que reage de igual modo com o oxigénio molecular (equações 2 e 3). Ocorre assim a chamada reação em cadeia, e a produção máxima de peróxidos marca o início da fase de terminação.



3. **Terminação:** Nesta etapa dois radicais livres combinam-se formando produtos estáveis (equações 4, 5 e 6), tais como hidrocarbonetos, aldeídos, álcoois e cetonas voláteis (Laguerre *et al.*, 2007).



As membranas que rodeiam células e organelos e os ácidos gordos que circulam na corrente sanguínea possuem grandes quantidades de ácidos gordos polinsaturados (PUFAs) e por isso encontram-se sob constante risco de sofrerem peroxidação lipídica (Blokina *et al.*, 2003; Halliwell e Gutteridge, 2008).

### 1.5.1.2 Antioxidantes: origem e efeitos biológicos

Antioxidante é qualquer composto que em pequenas concentrações, quando em comparação com o composto alvo a ser oxidado, diminui a velocidade de oxidação ou inativa espécies oxidantes (Laguerre *et al.*, 2007; Poljšake e Raspor, 2008).

Os antioxidantes podem ser classificados de acordo com as suas propriedades durante as diferentes etapas no processo de oxidação, e uma vez que atuam por diferentes mecanismos podem ser divididos em dois grandes tipos de antioxidantes: antioxidantes primários e secundários (Scheibmeir *et al.*, 2005). Os antioxidantes primários retardam a oxidação, por

cedência de átomos de hidrogénio ou eletrões aos radicais livres convertendo-os em compostos mais estáveis. Estes antioxidantes são considerados agentes redutores (Maisuthisakul *et al.*, 2007). Os antioxidantes secundários atuam por ligação a iões metálicos necessários à formação de ROS; por remoção de oxigénio das espécies reativas e/ou dos seus precursores; por conversão de hidroperóxidos em espécies não radicalares e por absorção de radiação ultravioleta (Scheibmeir *et al.*, 2005; Das e Das, 2006; Maisuthisakul *et al.*, 2007).

A nível celular, os sistemas de defesa antioxidante podem ser enzimáticos como, por exemplo, as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX), catalase (CAT), tioredoxina reductase e ascorbato peroxidase (APX) que vão converter as ROS em moléculas mais estáveis como a água e o dióxigénio (Matés e Sánchez-Jiménez, 2000; Blokhina *et al.*, 2003; Laguerre *et al.*, 2007). No entanto o sistema de defesa antioxidante também pode ser não enzimático, este grupo é representado por moléculas como, por exemplo, carotenoides, flavonoides, polifenóis, e alguns metais como o selénio, magnésio, zinco e cobre (Valko *et al.*, 2007). Os sistemas enzimáticos e não enzimáticos atuam em conjunto para garantir o equilíbrio redox das células. Além disso, uma vez que não é possível aumentar a atividade dos antioxidantes endógenos, o uso de antioxidantes exógenos provenientes da dieta é fundamental, a fim de aumentar as defesas das células contra os radicais livres (Valko *et al.*, 2006; Poljšake e Raspor, 2008).

Considerando que o stress oxidativo está envolvido na patologia da DA, os antioxidantes, em particular os de origem natural, também podem ser usados para minimizar a degeneração neuronal e deste modo prevenir o desenvolvimento ou retardar a progressão da doença de Alzheimer (Howes *et al.*, 2003; Noridayu *et al.*, 2011; Omena *et al.*, 2012).

Os antioxidantes são ainda importantes, por exemplo, na preservação dos lípidos dos alimentos (Halliwell e Gutteridge, 2008). Por exemplo na escolha de um antioxidante que previna a oxidação dos lípidos em emulsões lipídicas, há que ter em conta as propriedades do antioxidante. Antioxidantes hidrofílicos em geral são pouco eficazes em termos de proteção de lípidos em emulsões (Schwarz *et al.*, 2000).

Os antioxidantes butil-hidroxitolueno (BHT), butil-hidroquinona terciária (TBHQ), butil-hidroxianisol (BHA), propil, octil e dodecil galato (PG) são exemplos de antioxidantes sintéticos utilizados na preservação dos alimentos (Özen e Kinalioğlu, 2008; Naphade *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2009). No entanto têm surgido preocupações sobre os eventuais efeitos adversos que os antioxidantes sintéticos apresentam, tais como, toxicidade e carcinogenicidade (Kosar *et al.*, 2007; Özen e Kinalioğlu, 2008). Devido a preocupações com a segurança sobre o uso de antioxidantes sintéticos, os antioxidantes naturais obtidos principalmente a partir de materiais vegetais, tornaram-se mais interessantes (Maisuthisakul *et al.*, 2007; Mariod *et al.*, 2010). Para além das enzimas antioxidantes produzidas pelas células vegetais, as plantas possuem também uma variedade de antioxidantes naturais, tais como por exemplo: compostos fenólicos derivados do metabolismo secundário (Huda-Faujan *et al.*, 2007; Francisco e Resurreccion, 2009). O tocoferol (vitamina E) é um antioxidante natural lipossolúvel presente na membrana das células e que as protege da peroxidação

lipídica (Scheibmeir *et al.*, 2005). Os carotenóides  $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno também atuam como antioxidantes naturais (Das e Das, 2006; Su *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009).

O ácido ascórbico (vitamina C) é também um exemplo de antioxidante natural lipossolúvel, que reage com radicais hidroxilo e superóxido (Padayatty *et al.*, 2003; Bouayed *et al.*, 2007; Poljšake e Raspor, 2008).

### 1.5.1.3 Métodos para avaliar a capacidade antioxidante

O termo 'capacidade antioxidante' pode significar a capacidade que um composto tem para inativar radicais livres ou então pode significar o quanto, e por quanto tempo é que os compostos antioxidantes ou substâncias contendo antioxidantes conseguem atrasar a oxidação (Niki, 2010; Fraga *et al.*, 2013). Ambas as definições são diferentes e como tal é importante salientar qual é de facto a capacidade que está a ser avaliada. O resultado da capacidade antioxidante depende do método utilizado e das condições em que decorre o ensaio (Niki, 2010).

Existem vários métodos utilizados para determinar a capacidade antioxidante de extratos vegetais tais como, por exemplo, o método ABTS (Miller *et al.*, 1993) que tem a designação de TEAC quando os resultados são apresentados como equivalentes de Trolox pelo facto de que se usa como padrão o Trolox (Antolovich *et al.*, 2002; Cai *et al.*, 2004). Os métodos de DPPH (Blois, 1958), FRAP, ORAC (Thaipong *et al.*, 2006), TBARS (Huda-Faujan *et al.*, 2007), CUPRAC, LPIC, TRAP (Prior e Cao 1999; Böhm e Schlesier, 2004),  $\beta$ -caroteno, valor peróxido e TOSC, também podem ser usados para avaliar a capacidade antioxidante de extratos vegetais (Roginsky e Lissi, 2005; Singh e Singh, 2008; Niki, 2010). O método de Folin-Ciocalteu (Folin e Ciocalteu, 1927) também pode ser usado como ferramenta para avaliar a capacidade antioxidante de extratos na medida em que permite quantificar a concentração total de compostos fenólicos numa amostra, e uma vez que existe uma relação direta entre a concentração de fenóis e a capacidade antioxidante (Stratil *et al.*, 2007).

Com base nas reações químicas envolvidas, os ensaios de capacidade antioxidante podem ser divididos em duas categorias de métodos, uma em que os métodos se baseiam na transferência de átomos de hidrogénio (HAT) e outra em que os métodos têm por base a transferência de eletrões (ET). Os ensaios baseados em ET envolvem uma reação redox, em que o oxidante funciona como indicador do final da reação. Nos ensaios que têm por base HAT utiliza-se um radical livre sintético, um composto oxidável e um antioxidante. Ambas as categorias são usadas para medir a capacidade de remoção de um radical (ou oxidante), e não a capacidade antioxidante da amostra (Huang *et al.*, 2005).

De todos os métodos que podem ser usados para avaliar a capacidade antioxidante de compostos naturais e sintéticos, apenas será feita referência aos que se apresentam descritos nos objetivos específicos desta tese.

### 1.5.1.3.1 Método ABTS

Este método foi descrito em 1993 (Miller *et al.*, 1993) e tem aplicação na determinação da capacidade antioxidante tanto em produtos alimentares como extratos de plantas e compostos puros (Prior e Cao, 1999; Antolovich *et al.*, 2002; Roginsky e Lissi, 2005; Yoo *et al.*, 2007). O ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) é um composto quimicamente estável, solúvel em água e que se apresenta incolor na forma reduzida. Pode ser convertido no catião radicalar estável (figura 1) de cor azul-esverdeada ABTS<sup>•+</sup> (forma oxidada), por reações de oxidação com radicais orgânicos ou inorgânicos e espécies não radicalares como por exemplo espécies de cloro e bromo (Erel, 2004).

A oxidação de ABTS pode também ser conseguida por via enzimática na presença de, por exemplo, peroxidases ou através da utilização de proteínas não enzimáticas contendo grupos heme como na metamioglobina e meta-hemoglobina (Prior e Cao 1999). Oxidantes como o dióxido de manganês e persulfato de potássio podem também ser usados para produzir o radical ABTS<sup>•+</sup> (Osman *et al.*, 2006<sup>a</sup>). O radical ABTS<sup>•+</sup> pode ainda ser gerado por meios eletroquímicos. Um outro método consiste na produção fotoquímica a partir de soluções aquosas de ABTS, por incidência de radiação ultravioleta (UV) a 254 nm (Lee *et al.*, 2008), no entanto este método é influenciado pelo pH da solução utilizada, bem como pela presença de oxigénio dissolvido (Re *et al.*, 1999; Arts *et al.*, 2004; Böhm e Schlesier, 2004; Osman *et al.*, 2006<sup>b</sup>). Após a mistura de amostra com a solução de ABTS<sup>•+</sup>, a reação completa-se geralmente após um período de 1 min (Lee *et al.*, 2008).

O método de ABTS é aplicado na determinação da capacidade antioxidante em compostos hidrofílicos e lipofílicos (Pannala *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2011<sup>a</sup>). Quando o ABTS<sup>•+</sup> é misturado com uma substância capaz de ceder electrões, é reduzido à sua forma original (ABTS incolor), ao passo que a substância é oxidada. Esta característica é o princípio básico dos métodos que usam o ABTS (Erel, 2004; Roginsky e Lissi, 2005; Osman *et al.*, 2006<sup>b</sup>; Singh e Singh, 2008).

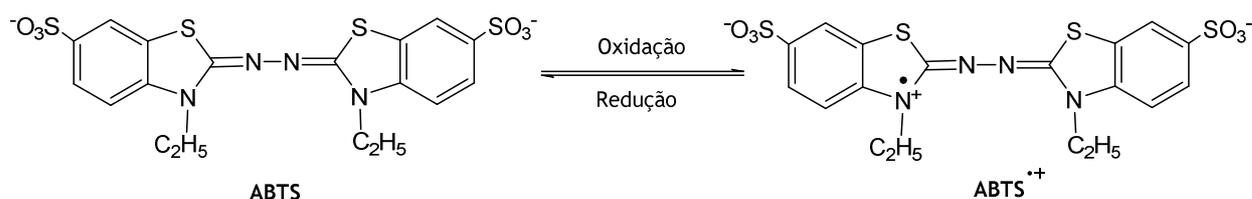


Figura 1: Representação das estruturas dos compostos ABTS e ABTS<sup>•+</sup>.

O ABTS<sup>•+</sup> apresenta bandas de absorção com máximos aos comprimentos de onda de 414, 645, 650, 734, 805, e 820 nm, ao passo que o ABTS apresenta absorção máxima a 342 nm. A capacidade relativa dos antioxidantes dadores de átomos de hidrogénio, em impedir a acumulação de radicais ABTS<sup>•+</sup>, pode ser medida espectrofotometricamente a 414 ou 734 nm. A monitorização do ABTS<sup>•+</sup> a 414 nm resulta em limites de deteção baixos. As interferências de compostos das amostras são minimizadas efetuando leituras de absorvência a 734 nm (Re *et al.*, 1999; Antolovich *et al.*, 2002; Labrinea e Georgiou, 2004).

Alguns antioxidantes são capazes de retardar a formação de  $ABTS^{\bullet+}$  e outros de remove-lo dando origem a outros radicais. No entanto, podem existir compostos antioxidantes capazes de exercer as duas funções (Böhm *et al.*, 2004).

No método ABTS é usual usar-se como padrão o Trolox (figura 2A) ou o ácido ascórbico, (Pannala *et al.*, 2001). Os resultados do método de ABTS podem ser expressos por comparação com concentrações conhecidas destes dois compostos. No caso do Trolox os resultados são expressos como valor TEAC. O TEAC é igual à concentração milimolar de uma solução de Trolox que apresenta capacidade antioxidante equivalente a uma solução 1,0 mM da substância a ser investigada. Ou seja, reflete a capacidade relativa de um antioxidante em remover o  $ABTS^{\bullet+}$ , comparada com a do Trolox. No entanto, o valor de TEAC depende do tempo de incubação e da diferença entre a concentração de  $ABTS^{\bullet+}$  e a quantidade de amostra (Antolovich *et al.*, 2002; Yoo *et al.*, 2007; Singh e Singh, 2008). O valor TEAC pode não se correlacionar exatamente com a capacidade antioxidante, por exemplo, o composto Crisina (figura 2B), possui um valor de TEAC alto ao passo que a capacidade antioxidante é relativamente baixa. Esta situação deve-se ao facto de que da reação com a Crisina forma-se um radical que reage rapidamente com uma segunda molécula de  $ABTS^{\bullet+}$ , contribuindo assim para o valor de TEAC (Arts *et al.*, 2004). O TEAC tem como vantagens o facto de permitir o estudar o efeito do pH sobre os mecanismos antioxidantes e não ser afetado pela força iónica (Prior *et al.*, 2005).

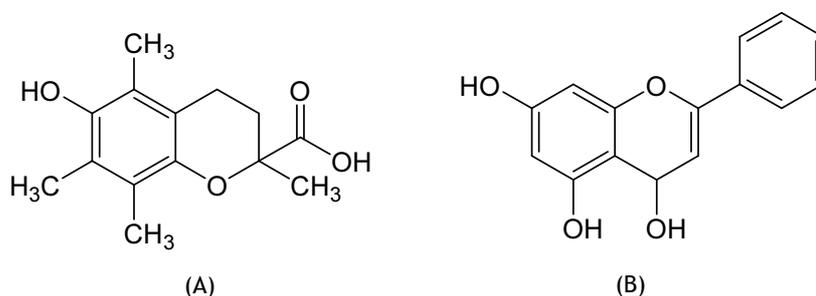


Figura 2: Representação das estruturas do Trolox (A) e Crisina (B)

A vantagem do método ABTS consiste na sua relativa simplicidade, no entanto, a pequena seletividade do  $ABTS^{\bullet+}$  é uma limitação do método, uma vez que, o radical  $ABTS^{\bullet+}$  reage com qualquer composto aromático hidroxilado, independentemente da sua real capacidade antioxidante (Roginsky e Lissi, 2005).

### 1.5.1.3.2 Método DPPH

Este método foi descrito por Blois em 1958 (Blois, 1958) e usa o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH<sup>•</sup>) (figura 3), de cor violeta e estável, para se avaliar a capacidade antioxidante de produtos naturais e compostos puros. A estabilidade do radical é resultado da deslocalização do eletrão livre sobre parte da molécula (Ionita, 2003; Molyneux, 2004; Villaño *et al.*, 2007). Esta deslocalização é responsável pela cor violeta intensa, idêntica à de  $KMnO_4$ .

O DPPH• é caracterizado por possuir um espectro de UV-visível, com máximo de absorção, entre os 515 - 520 nm. O anião (DPPH<sup>-</sup>) pode também ser oxidado a radical DPPH. Na sua forma reduzida (2,2-difenil-1-picrilhidrazina (DPPH-H)), apresenta uma cor amarelo-laranja (Ionita, 2003).

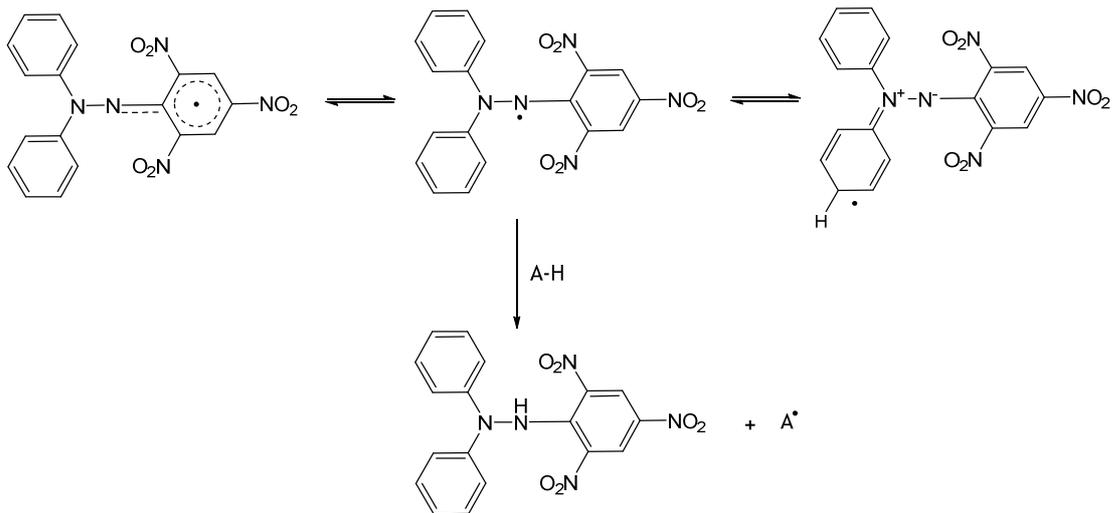
Dado que o DPPH• pode ser armazenado, pois não dimeriza nem reage com o oxigênio, apesar de sofrer alguma degradação, é importante na investigação, em particular na determinação de propriedades antioxidantes de amins, fenóis (Beh *et al.*, 2012), compostos naturais em extratos de plantas, fármacos e produtos alimentares (Ionita, 2003; Scalzo, 2008).

O radical livre DPPH possui a capacidade de abstrair hidrogênios, originando como produto DPPH-H, com a perda da cor violeta, ou seja, a reação de transferência do próton causa um decréscimo na intensidade de absorção e a solução perde a cor inicial. Deste modo, a adição de um antioxidante resulta numa diminuição de absorvência proporcional à concentração e atividade do composto antioxidante (Ionita, 2003; Molyneux, 2004; Villaño *et al.*, 2007; Scalzo, 2008; Locatelli *et al.*, 2009). A equação 7 e a figura 3 representam a reação do radical DPPH com uma molécula dadora de prótons (AH).



onde DPPH-H é a forma reduzida do DPPH• e A• um radical livre que pode reagir em seguida com outro radical, produzida numa reação paralela, originando um composto não radicalar. A figura 3 ilustra um exemplo da reação dada pela equação 7. Analisando a estrutura do DPPH• (figura 3), é de esperar que este possa reagir com outro radical livre de três modos diferentes: pela ligação aos átomos de nitrogênio do radical; por ligação na posição *para* do anel fenil ou por ligação no substituinte picril (Molyneux, 2004).

No método de DPPH o mecanismo reacional entre os antioxidantes e o DPPH• depende da conformação estrutural do antioxidante (Bondet *et al.*, 1997; Molyneux, 2004). Há compostos químicos como, por exemplo, o *o*-metoxifenol, que reagem reversivelmente com o radical DPPH o que pode originar valores anormalmente baixos de capacidade antioxidante (Huang, *et al.*, 2005).



**Figura 3:** Radical livre DPPH e respectivas estruturas de ressonância na presença de um composto dador de átomos de hidrogênio (A-H). Ilustração da reação dada pela equação 7.

Um parâmetro introduzido na interpretação dos resultados do método DPPH é a concentração "eficiente" ou valor EC<sub>50</sub>, definida para este método como a concentração de amostra que reduz em 50 % a atividade inicial do DPPH<sup>•</sup>, medida pela cor. Nesta situação, quanto maior a capacidade antioxidante, menor é o valor de EC<sub>50</sub> (Molyneux, 2004). Os resultados são geralmente apresentados em termos de percentagem de captação de DPPH<sup>•</sup> (Q), por vezes designado como a percentagem de inibição, que é dado pela equação 8:

$$Q = \frac{(Abs_0 - Abs_c)}{Abs_0} \times 100 \quad (8)$$

onde Abs<sub>0</sub> é a absorvência inicial da amostra e Abs<sub>c</sub> é a absorvência da amostra passado um determinado tempo de reação (Molyneux, 2004; Villaño *et al.*, 2007; Locatelli *et al.*, 2009).

Os padrões mais usados no método de DPPH são o ácido ascórbico e α-tocoferol. No entanto pode também ser usado o Trolox, usado inicialmente apenas para o método ABTS (Molyneux, 2004; Villaño *et al.*, 2007).

No que diz respeito ao tempo de realização do método, originalmente foi recomendado um tempo de reação de 30 minutos (Blois, 1958), no entanto pode-se acompanhar a reação até que esta termine (Molyneux, 2004; Katalinic *et al.*, 2006). Relativamente ao solvente a ser utilizado, o método funciona igualmente bem com metanol ou etanol, nenhum dos quais apresenta interferências com a reação (Molyneux, 2004). O método DPPH tem como vantagem a simplicidade e rapidez (Prior *et al.*, 2005). A principal desvantagem é que vários fatores podem influenciar o método e a interpretação dos dados experimentais, tais como, por exemplo, o solvente usado, o pH do meio, a concentração de DPPH<sup>•</sup> e das amostras e a sobreposição dos espectros das amostras com o espectro do DPPH (Prior *et al.*, 2005; Locatelli *et al.*, 2009).

O método de DPPH pode ser usado na previsão da estabilidade oxidativa de óleos, considerando os valores iniciais de absorvência do DPPH, a taxa de formação de radicais livres, a concentração inicial de compostos antioxidantes e o tempo de oxidação necessário para o consumo dos antioxidantes (Lee *et al.*, 2007).

### 1.5.1.3.3 Valor peróxido

Os óleos e lípidos dos alimentos sofrem auto-oxidação quando em contato com o ar, durante as etapas de processamento, transporte e armazenamento, o que causa a deterioração do sabor, odor, cor, textura, aparência e também uma diminuição do valor nutricional dos alimentos (Setiowaty *et al.*, 2000).

Lípidos, como ácidos gordos polinsaturados livres e colesterol são alvos fáceis para os radicais livres. A peroxidação lipídica induz perturbações e alterações nas membranas biológicas e os produtos secundários da peroxidação lipídica podem provocar alterações em biomoléculas tais como, proteínas e ADN, resultando num eventual desenvolvimento de várias doenças. Assim, é fundamental o uso de antioxidantes para reduzir a peroxidação lipídica (Niki, 2010). Além disso as alterações de sabor e toxicidade nos alimentos são resultado dos produtos secundários das reações de oxidação dos lípidos (Antolovich *et al.*, 2002).

O valor peróxido (VP) consiste na concentração de peróxidos em miliequivalentes por 1000 g de amostra, que oxidam iodeto de potássio em solução (Strochkova *et al.*, 2001). O VP surge assim como uma característica da qualidade dos óleos e gorduras alimentares, e além disso permite quantificar a quantidade de hidroperóxidos e peróxidos de oxigénio em gorduras e óleos. O VP aumenta durante a fase de propagação e depois decresce na fase de terminação da oxidação lipídica (Setiowaty *et al.*, 2000; Antolovich *et al.*, 2002; Laguerre *et al.*, 2007).

O método de referência para a determinação do VP, consiste no método da *American Oil Chemists' Society (Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, 1997)*.

O valor peróxido é um método iodométrico que usa como solvente uma mistura de ácido acético com isooctano ou clorofórmio. A primeira fase do método consiste na reação de oxidação de KI, que deve estar em excesso, com os hidroperóxidos e peróxidos de oxigénio presentes na amostra. A segunda etapa consiste na titulação volumétrica dos aniões triiodeto libertados com o tiosulfato de sódio usando como indicador uma solução de amido (Setiowaty *et al.*, 2000; Strochkova *et al.*, 2001; Antolovich *et al.*, 2002).

O método pode ser aplicado na avaliação da capacidade antioxidante de compostos químicos ou extratos de plantas durante o início da oxidação lipídica. A capacidade antioxidante é verificada através de uma redução na oxidação, isto é do valor peróxido em relação à amostra controlo que não possui antioxidante (Antolovich *et al.*, 2002). As limitações do método são nomeadamente a falta de sensibilidade e seletividade, a possível incorporação de iodo nas ligações insaturadas o que conduz a resultados mais baixos, a oxidação do iodeto pelo oxigénio dissolvido e as variações na reatividade com os diferentes

peróxidos e hidroperóxidos (Antolovich *et al.*, 2002; Laguerre *et al.*, 2007). A exposição à luz e à temperatura podem levar à decomposição de hidroperóxidos o que afeta os resultados (Strochkova *et al.*, 2001).

#### 1.5.1.3.4 Método de Folin-Ciocalteu

Os compostos fenólicos são um grupo complexo, mas importante, de compostos que ocorrem naturalmente nas plantas, originários do metabolismo secundário destas (Harnly *et al.*, 2007). Possuem diversas propriedades biológicas como, por exemplo, atividade antioxidante, anti-cancerígena (Jin e Mumper, 2010), proteção cardiovascular (Wijngaard *et al.*, 2009) e anti-inflamatória (Zhang *et al.*, 2011). As plantas sintetizam estes compostos através do seu metabolismo secundário como resposta ao stress induzido pelo ataque de microrganismos, predadores e também como resposta aos níveis de radiação UV (Khoddami *et al.*, 2013).

O método de Folin-Ciocalteu (Folin e Ciocalteu, 1927) é o mais usado na determinação da concentração total de compostos fenólicos (Stratil *et al.*, 2007). A quantificação de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu envolve a oxidação de fenóis em meio básico pelo reagente de Folin-Ciocalteu de cor amarela. Este reagente consiste na mistura dos ácidos fosfomolibdico ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) e fosfotúngstico ( $H_3W_{12}O_{40}$ ). Da reação de oxidação resulta um composto de cor azul (molibdotungstosfosfato), cuja absorção máxima é diretamente proporcional à composição quantitativa de compostos fenólicos (Ikawa *et al.*, 2003; Cicco *et al.*, 2009).

Este método baseia-se na transferência de eletrões do composto antioxidante para o agente oxidante, que neste caso é o reagente de Folin-Ciocalteu, e no correspondente aumento de absorvência a 750 nm (Magalhães *et al.*, 2006).

Esta técnica não apresenta especificidade na quantificação dos diferentes tipos de compostos fenólicos. Além disso, existem outras substâncias que reagem com o reagente de Folin-Ciocalteu, provocando interferências no método, nomeadamente as aminas alifáticas terciárias, aminoácidos como a tirosina e o triptofano, hidroxilaminas, hidrazinas, certas purinas, dióxido de enxofre, ácido ascórbico, sacarose e diversos agentes redutores orgânicos e inorgânicos (Ikawa *et al.*, 2003; Carbot *et al.*, 2005; Roginsky e Lissi, 2005; Magalhães *et al.*, 2006; Remóne *et al.*, 2009).

A aplicação do método de Folin-Ciocalteu requer a realização de uma curva de calibração para a qual se usam diferentes concentrações de uma solução de ácido gálico dissolvido em água e os resultados são apresentados em equivalentes de ácido gálico (Atoui *et al.* 2005). A principal vantagem do método consiste no facto de ser um método sensível uma vez que se baseia na formação de um produto corado (Roginsky e Lissi, 2005).

A formação de precipitados é a principal desvantagem deste método, podendo ser minimizados efetuando centrifugação e filtração da solução onde se determina a absorvência, que por vezes podem reduzir a coloração formada (Cicco *et al.*, 2011).

## 1.5.2 Inibição da atividade da acetilcolinesterase

### 1.5.2.1 Acetilcolina (ACh) e acetilcolinesterase (AChE)

A acetilcolina (figura 4) é uma molécula orgânica que atua como neurotransmissor nas junções neuromusculares, nos gânglios periféricos, no sistema nervoso central e também como mediador das ações parassimpáticas do sistema nervoso autônomo (Brady *et al.*, 2012).

A nível neuronal a ACh é sintetizada nos terminais axonais a partir da acetilcoenzima A (acetil-CoA) e colina (figura 5), numa reação catalisada pela colina acetil-transferase (ChAT; EC 2.3.1.6). A ChAT cerebral é uma proteína globular que é sintetizada no retículo endoplasmático rugoso do corpo celular e depois é transportada para o terminal nervoso onde permanece concentrada no citoplasma (Purves *et al.*, 2012).

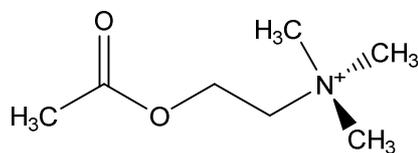
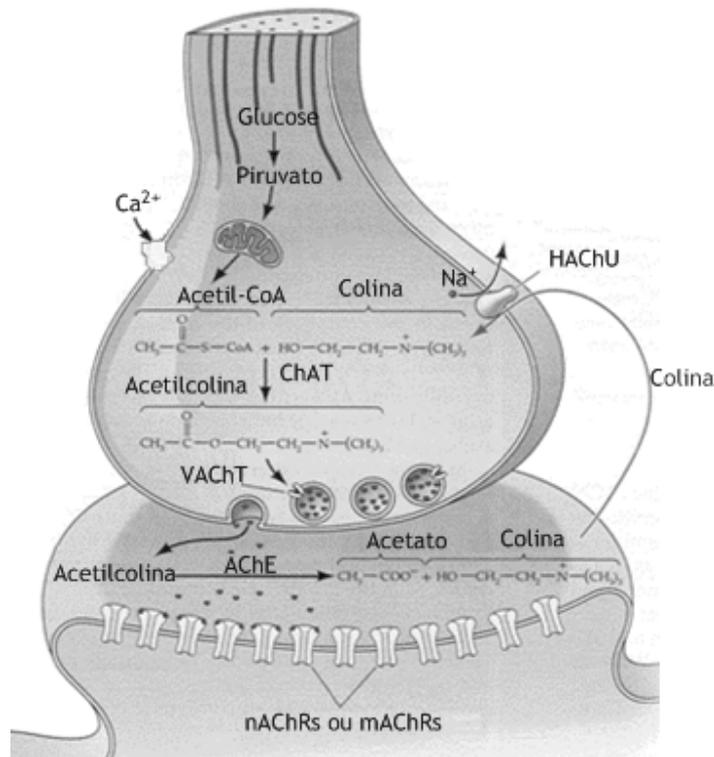


Figura 4: Estrutura da molécula da acetilcolina.

Após a síntese de ACh, um transportador vesicular (VAcHT) transporta as moléculas de acetilcolina para dentro de vesículas, onde permanecem concentradas. A libertação de ACh das vesículas ocorre nas terminações nervosas. Quando se dá a despolarização do neurónio o  $Ca^{2+}$  entra no terminal pré-sináptico o que promove a fusão das vesículas com a membrana plasmática do terminal axonal, provocando a libertação da ACh para a fenda sináptica por exocitose. O  $Ca^{2+}$  intracelular é depois captado pelas mitocôndrias ou removido do terminal por bombas de cálcio (Purves *et al.*, 2012). A acetil-CoA é sintetizada nas mitocôndrias a partir do piruvato obtido a partir da glucose (glicólise) e depois é transportada para o citoplasma onde depois é usada na síntese de ACh (Martini *et al.*, 2012).

A colina pode ser encontrada no plasma uma vez que os tecidos não neuronais podem sintetizar colina a partir da reação de metilação de etanolamina. No entanto a colina não atravessa a barreira hematoencefálica, e a maior fonte de colina deriva da hidrólise de acetilcolina pela acetilcolinesterase na fenda sináptica. O transporte de colina para os terminais nervosos pode efetuar-se através de dois sistemas, um em que o transportador apresenta elevada afinidade para a captação de colina e é dependente de  $Na^+$  e  $Cl^-$  e um segundo sistema de transporte em que o transportador possui baixa afinidade para a captação de colina e é independente de  $Na^+$  e  $Cl^-$  (Purves *et al.*, 2012; Brady *et al.*, 2012).

A ACh pode exercer os seus efeitos através de dois recetores. Os recetores nicotínicos (nAChRs) que são canais catiónicos não seletivos e os recetores muscarínicos (mAChRs), que são recetores metabotrópicos (Purves *et al.*, 2012).



**Figura 5:** Esquema representativo do metabolismo da acetilcolina. **AChE**- acetilcolinesterase, **VACHT**- transportador vesicular de acetilcolina, **ChAT**- colina acetil-transferase, **HACHU**- transportador de colina de elevada afinidade, **nAChRs**- receptores nicotínicos da acetilcolina e **mAChRs**- receptores muscarínicos da acetilcolina (adaptado de Purves *et al.*, 2012).

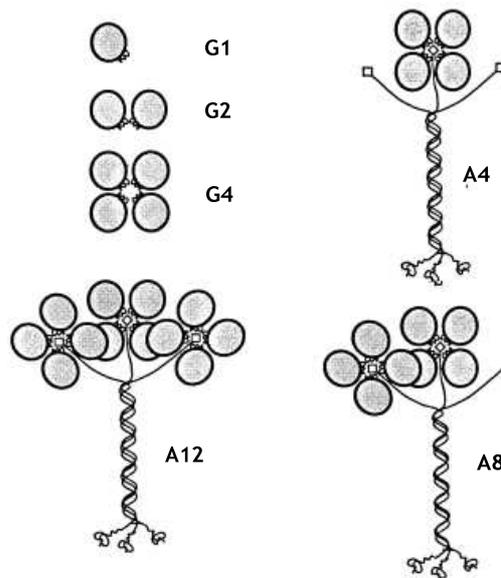
A acetilcolina é removida das sinapses através da hidrólise enzimática pela acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7), uma hidrolase de serina que pertence à família de proteínas  $\alpha/\beta$  hidrolases (Legary, 2000). A AChE possui uma atividade catalítica elevada (cerca de 5000 moléculas de ACh por molécula de AChE, por segundo), o que provoca uma rápida diminuição da concentração de ACh, que é convertida em acetato e colina (Squire *et al.*, 2008).

A AChE é encontrada principalmente nas junções neuromusculares e sinapses colinérgicas dos sistemas nervoso central e periférico (Purves *et al.*, 2012). No entanto, também pode ser encontrada nos eritrócitos e células da placenta (Silman e Sussman, 2005). Além da sua função tradicional, está também envolvida na adesão celular, ativação de neurónios dopaminérgicos, regulação da apoptose e formação das fibras  $\beta$ -amilóide (Soreq *et al.*, 2001; Johnson e Moore, 2006).

A AChE possui uma variedade de formas moleculares que apresentam a mesma subunidade catalítica e que podem ser geradas por três processos: *splicing* alternativo de um único gene, oligomerização das subunidades catalíticas e associações com subunidades não catalíticas (Chatonnet e Lockridget, 1989; Dvira *et al.*, 2010).

As várias formas de AChE presentes nos órgãos elétricos das espécies *Torpedo californica* (TcAChE) e *Electrophorus electricus* (EeAChE) são estruturalmente semelhantes às formas presentes nos vertebrados e podem ser divididas em duas classes (figura 6) designadas por formas globulares (G) e assimétricas (A) (Sussman e Silman, 1992; Legary, 2000). As formas

globulares são constituídas por monómeros (G1), dímeros (G2) e tetrâmeros (G4), estruturas com uma, duas ou quatro subunidades catalíticas, respetivamente. As formas assimétricas possuem uma cauda de colagénio e são constituídas por quatro (A4), oito (A8) ou doze (A12) subunidades catalíticas. As formas multiméricas são mantidas juntas por ligações covalentes dissulfureto (Mimori *et al.*, 1997; Bourne *et al.*, 1999; Rakonczay, 2003; Tripathi e Srivastava, 2008; Gorfe *et al.*, 2009; Brady *et al.*, 2012).

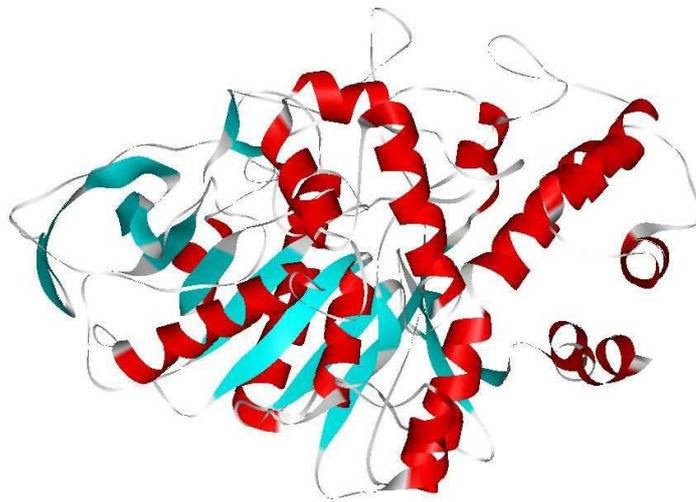


**Figura 6:** Representação das diferentes formas de AChE presentes nos vertebrados, G representa as formas globulares e A as formas assimétricas com as respetivas caudas de colagénio. (adaptado de Legary, 2000;).

A enzima AChE pode existir na forma solúvel e no cérebro humano as formas de AChE mais abundantes são a G4 e G1 sendo que a G4 é a principal forma responsável pela degradação da acetilcolina, e na doença de Alzheimer existe uma perda seletiva da AChE membranar na forma G4, apesar da forma G1 se manter inalterada (Chatonnet e Lockridget, 1989; Rakonczay, 2003; Houghton *et al.*, 2006; Tripathi e Srivastava, 2008).

A estrutura atômica tridimensional da AChE foi descrita em 1991 (Sussman *et al.*, 1991), usando-se como modelo a TcAChE. Na figura 7 encontra-se representada a estrutura da acetilcolinesterase humana (hAChE), que é idêntica à da TcAChE (Kim *et al.*, 2011). O sítio ativo da AChE é composto por cinco sítios de ligação, assim pode ser observada uma abertura oxianiónica (AO) que é formada pelos aminoácidos Gli 121, Gli 122 e Ala 204 e cuja função é a de estabilizar o estado de transição do substrato através de ligações de hidrogénio, e um sítio esterático (SE) que é composto pela tríade catalítica Ser 203, His 447 e Glu 334 e cuja função é a de catálise enzimática. Um outro local de ligação do substrato é o sítio aniónico (SA), que é formado pelos aminoácidos Trp 86, Tyr 133, Tyr 337 e Phe 338 e cuja função é a de ligar a parte de amónio quaternária da ACh e de outros ligandos ao sítio catalítico através de interações catiónicas com os eletrões  $\pi$  dos grupos aromáticos. Os outros dois sítios de ligação que podem ser encontrados na AChE são o sítio de ligação acilo (SAC), formado por Phe 295 e

Phe 297 e que é responsável pela ligação do grupo acetilo da Ach e também pela seletividade do substrato. Pode ser encontrado ainda o sítio aniônico periférico (SAP) constituído por Tyr 72, Asp 74, Tyr 124, Trp 286 e Tyr 341, que se situa em torno da entrada do sítio catalítico e que tem como função acelerar a hidrólise da acetilcolina quando esta se encontra em baixas concentrações (Sussman *et al.*, 1991). Como a catálise se inicia após a ligação temporária do substrato ao SAP, este local de ligação pode também funcionar como sítio de ligação para inibidores competitivos e não competitivos da AChE, dificultando a entrada de acetilcolina para o sítio catalítico. Concentrações elevadas de substrato vão também provocar inibição enzimática por ligação ao SAP uma vez que pode ocorrer as seguintes situações: bloqueio físico da entrada de moléculas adicionais de substrato, repulsão entre as moléculas de substrato ou alterações conformacionais na molécula de proteína por interação entre os sítios catalítico e periférico (Sussman *et al.*, 1991; Johnson e Moore, 2006; Dvira *et al.*, 2010; Kozurkova *et al.*, 2011).



**Figura 7:** Representação da estrutura tridimensional da acetilcolinesterase humana (hAChE). Na imagem é possível observar-se as cadeias hélice  $\alpha$  e folha  $\beta$  da enzima (adaptado de *Protein Data Bank* ID: 1B41; <http://www.rcsb.org>).

### 1.5.2.2 Acetilcolinesterase na doença de Alzheimer (DA)

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva relacionada com a idade que apresenta uma prevalência estimada em 36 milhões de pessoas em todo o mundo (Hu *et al.*, 2013). É caracterizada clinicamente pela perda progressiva das capacidades cognitivas tais como, por exemplo, memória, atenção, competências linguísticas e habilidades intelectuais (van der Beek e Kamphuis, 2008; Samadi *et al.*, 2010). No entanto, características como alterações comportamentais e de personalidade, desorientação, depressão e dificuldades em atividades diárias também fazem parte dos sintomas observados em pessoas com DA (Paula *et al.*, 2009; Piaceri *et al.*, 2012).

Em termos neuropatológicos a DA é caracterizada pela presença de placas senis extracelulares formadas por agregados de péptidos amiloides ( $A\beta_{42}$ ), emaranhados

intraneuronais formados por agregações de proteínas *tau* hiperfosforiladas, perda de neurónios colinérgicos do prosencéfalo basal, redução nos níveis de colina acetil-transferase e de neurotransmissores, tais como a acetilcolina, serotonina e noradrenalina (van der Beek e Kamphuis, 2008; Paula *et al.*, 2009; Foster *et al.*, 2012; Martin *et al.*, 2013; Teles *et al.*, 2013). Mutações no gene precursor da PPA (cromossoma 21), no gene da presenilina 1 (cromossoma 14) e no gene da presenilina 2 (cromossoma 1) são responsáveis pela hereditariedade autossómica dominante da DA (Williams *et al.*, 2003).

Apesar dos vários fatores importantes na patologia da doença de Alzheimer, a sua etiologia ainda é pouco compreendida e como tal muitas hipóteses têm surgido relativamente à fisiopatologia da DA, nomeadamente a hipótese  $\beta$ -amiloide (Wilquet e Strooper, 2004; Randall *et al.*, 2010), hipótese *tau* (Maccioni *et al.*, 2010), hipótese inflamatória (Heneka *et al.*, 2007), hipótese vascular (Milionis *et al.*, 2008), hipótese do colesterol (Mohandas *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2013), hipótese do stress oxidativo (Smith e Perry, 1995; Praticò, 2002; Roy e Rauk, 2005), hipótese glutamatérgica (Mohandas *et al.*, 2009) e hipótese colinérgica (Contestabile, 2011; Craig *et al.*, 2011). De todas as hipóteses, apenas a hipótese colinérgica explica a relação entre os níveis de acetilcolina e o papel da acetilcolinesterase no desenvolvimento da DA. Segundo esta hipótese (Contestabile, 2011), a doença de Alzheimer é resultado da perda da atividade colinérgica no sistema nervoso central, geralmente associada com a redução dos níveis de acetilcolina nas fendas sinápticas por ação da acetilcolinesterase. Também há perda da atividade da enzima colina acetil-transferase envolvida na síntese de acetilcolina, bem como a perda dos recetores nicotínicos, mas não dos muscarínicos, da acetilcolina. A perda de atividade colinérgica vai ser responsável pelos sintomas de disfunção e cognitivos característicos da DA (Contestabile, 2011; Craig *et al.*, 2011).

De acordo com a hipótese  $\beta$ -amilóide (Randall *et al.*, 2010), os péptidos  $A\beta_{42}$  também podem inibir a síntese da acetilcolina e como tal reduzir a neurotransmissão colinérgica (Dawbarn *et al.*, 2007). O sistema colinérgico também pode exercer um impacto sobre o processamento de proteína precursora amilóide, inibindo a produção de péptidos  $A\beta$  amiloidogénicos por inibição da  $\beta$ -secretase, e pode também inibir as enzimas responsáveis pela fosforilação da proteína *tau*. Estes factos permitem estabelecer uma ligação entre as hipóteses colinérgica, *tau* e  $\beta$ -amilóide (Auld *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2004; Mohandas *et al.*, 2009).

O sistema colinérgico desempenha um papel importante na doença de Alzheimer e devido ao nível baixo de acetilcolina no cérebro de pessoas com DA, o uso de inibidores de colinesterase como terapia de reposição colinérgica tem permitido restaurar o equilíbrio colinérgico através do aumento dos níveis de acetilcolina e da função dos seus recetores (Upadhyaya *et al.*, 2010). Na doença de Alzheimer os inibidores da AChE permitem aumentar a ACh disponível através da inibição da hidrólise enzimática pela AChE (Giacobini, 2004). O inibidor ideal de colinesterase deve ser específico para a região cerebral (córtex cerebral e hipocampo) e deve apresentar efeitos mínimos sobre o sistema colinérgico periférico e

também ausência de toxicidade (Çokuğraş, 2003; Giacobini, 2004).

Alguns dos inibidores da acetilcolinesterase usados no tratamento sintomático de pessoas com a DA são: Tacrina (Cognex<sup>®</sup>); Donepezil (Aricept<sup>®</sup>); Rivastigmina (Exelon<sup>®</sup>) e a Galantamina (Reminyl<sup>®</sup>) que é um alcaloide natural obtido a partir da planta *Galanthus nivalis*. Os compostos naturais Huperzina A (alcalóide isolado a partir da planta *Huperzia serrata*) e Eserina (alcalóide isolado a partir da planta *Physostigma venenosum*), também podem ser usados na inibição da AChE (Liston *et al.*, 2004; Mehta *et al.*, 2012; Bajda *et al.*, 2013; Szymański *et al.*, 2013). A Huperzina A também se liga aos recetores N-metil-D-aspartato (NMDA). A memantina (Axura<sup>®</sup>), um fármaco que não pertence à classe dos inibidores de colinesterase, também é usado no tratamento sintomático da DA, atuando através do bloqueio dos recetores NMDA prevenindo assim a morte neuronal (Coleman *et al.*, 2008; Ma e Gang, 2008; Hu *et al.*, 2013). No entanto os inibidores de AChE além da curta duração dos efeitos apresentam desvantagens nomeadamente alguns efeitos secundários como, por exemplo, náuseas, vômitos, diarreia, insónias, anorexia, convulsões e hepatotoxicidade (Mehta *et al.*, 2012). A Tacrina é um exemplo de composto que raramente é utilizado devido à hepatotoxicidade que apresenta (Zeiger *et al.*, 1997), assim como o Metrifonato, um composto que também pode ser usado como inibidor da AChE, mas que não é utilizado devido a efeitos secundários relacionados com fraqueza muscular (Holden e Kelly, 2002; Racchi *et al.*, 2004; Mehta *et al.*, 2012). Devido ao facto de os inibidores de AChE apresentarem efeitos adversos e de existirem poucos fármacos para o tratamento dos sintomas da doença de Alzheimer, torna-se assim fundamental a pesquisa de novos compostos para o tratamento sintomático da DA (Mukherjee *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2010; Chaiyana *et al.*, 2012).

Muitas plantas e os seus constituintes são usados na medicina tradicional para melhorar a função cognitiva e aliviar os sintomas da DA (Adewusi *et al.*, 2010). Galantamina e Donepezil são exemplos de fármacos com origem natural direta ou indireta usados para esse efeito, demonstrando assim a importância da natureza como fonte de novos compostos bioativos que podem ser usados no seu estado natural, ou então como bases para desenvolvimento de outros fármacos no tratamento da DA. Na medicina tradicional é comum usar-se misturas de plantas e neste caso os compostos podem atuar em sinergia com outros compostos da mesma planta ou então com compostos de outras espécies de plantas (Howes *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2006; Mukherjee *et al.*, 2007; Fallarero *et al.*, 2008; Adewusi *et al.*, 2011<sup>a</sup>; Adewusi *et al.*, 2011<sup>b</sup>; Chaiyana e Okonogi, 2012; Sharififar *et al.*, 2012).

As cumarinas são exemplos de compostos que podem ser encontrados em várias espécies de plantas e que apresentam uma ampla gama de atividades biológicas (Anand *et al.*, 2012). As cumarinas naturais e sintéticas podem apresentar capacidade em inibir a enzima AChE, um exemplo é a Ensaculina, um derivado de cumarina que retarda ou impede a progressão da neurodegeneração na doença de Alzheimer (Fallarero *et al.*, 2008; Razavi *et al.*, 2013).

Os inibidores da AChE, além da ação terapêutica no tratamento sintomático da DA, também podem ter outras aplicações como, por exemplo, na agricultura onde podem ser usados como inseticidas (Houghton *et al.*, 2006).

### 1.5.2.3 Determinação dos parâmetros cinéticos $K_m$ e $V_{max}$

A maioria das enzimas são proteínas com funções catalíticas, que podem ser sintetizadas pelas células animais, vegetais e também pelos microrganismos (Payan, 2004). No entanto existe ácido ribonucleico (ARN) que também pode desempenhar funções catalíticas (Johnston *et al.*, 2001).

Nas reações químicas as enzimas vão aumentar a velocidade com que se atinge o estado de equilíbrio da reação, sem afetar o estado de equilíbrio e sem serem gastas durante a reação. Também facilitam a formação e a estabilização dos estados de transição (Quintas *et al.*, 2008). A complexidade da estrutura das enzimas determina a sua especificidade em relação ao substrato e às reações que catalisam (Tymoczko *et al.*, 2010).

A reação enzimática pode ser descrita em termos gerais pela equação 9, em que **E** corresponde à enzima, **S** ao substrato, **P** ao produto, **ES** ao complexo enzima-substrato e **EP** ao complexo enzima-produto. Os complexos **ES** e **EP** designam-se por intermediários da reação enzimática, e a equação 9 pode ser simplificada de acordo com a equação 10.



Em 1913, Leonor Michaelis e Maud L. Menten (Michaelis e Menten, 1913) demonstraram que a velocidade inicial de uma reação enzimática varia com a concentração de substrato e propuseram a equação 11 para a velocidade inicial de uma reação enzimática.

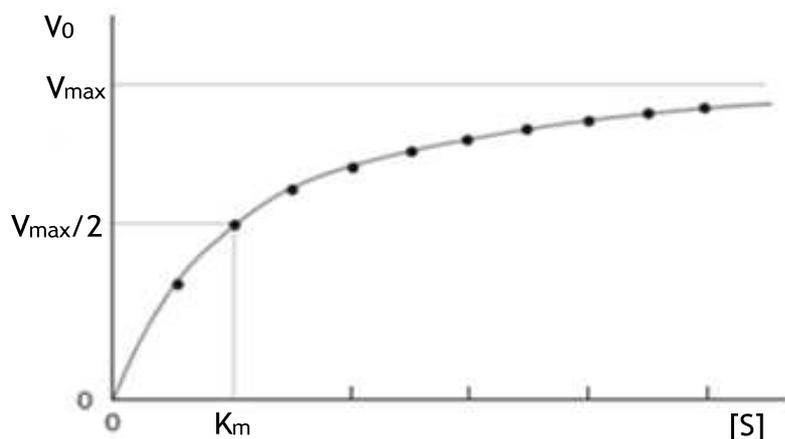
$$V_0 = V_{max} \times \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad (11)$$

onde  $V_0$  é a velocidade inicial da reação enzimática;  $V_{max}$  a velocidade máxima da reação enzimática,  $[S]$  a concentração de substrato e  $K_m$  a constante de Michaelis que é definida pela equação 12, onde  $k_1$ ,  $k_{-1}$  e  $k_2$  são as constantes de velocidade da equação 10 (Voet e Voet, 2011).

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (12)$$

A equação 11, denominada equação de Michaelis-Menten, descreve uma hipérbole (figura 8), onde é possível observar que a constante de Michaelis corresponde à concentração de substrato à qual se atinge metade da velocidade máxima da reação enzimática.

O valor de  $K_m$  depende do substrato e das condições de reação como, por exemplo pH, temperatura e força iónica, e traduz a afinidade da enzima para o substrato desde que  $k_{-1} > k_2$ . Para valores elevados a afinidade é baixa e para valores baixos a afinidade é alta. A  $V_{max}$  é atingida para concentrações elevadas de substrato, ou seja, quando toda a enzima está ligada ao substrato, e como tal depende neste caso da concentração da enzima livre (Murray *et al.*, 2009).

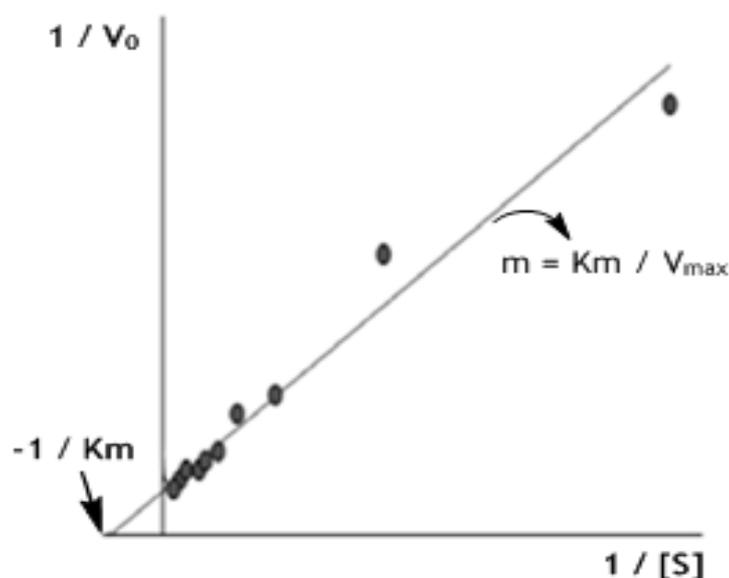


**Figura 8:** Representação gráfica da hipérbole descrita pela equação de Michaelis-Menten.  $V_0$  é a velocidade inicial da reação enzimática,  $V_{max}$  a velocidade máxima da reação enzimática,  $[S]$  a concentração de substrato e  $K_m$  a constante de Michaelis (adaptado de Voet *et al.*, 2011).

A determinação dos parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{max}$  pode ser feita através da representação gráfica da equação de Michaelis-Menten, contudo este método de cálculo de  $K_m$  e  $V_{max}$  apresenta como principal desvantagem o facto de que não ser fácil estimar corretamente os valores dos parâmetros cinéticos com exatidão. O processo mais fácil de determinar os parâmetros cinéticos consiste na linearização da equação de Michaelis-Menten. O método de linearização mais utilizado é o de Lineweaver-Burk (Lineweaver e Burk, 1934; Voet *et al.*, 2011). A figura 9 representa a linearização de Lineweaver-Burk.

A linearização de Lineweaver-Burk (equação 13) consiste na inverção da equação de Michaelis-Menten (equação 11). Apesar de ser mais fácil obter os parâmetros cinéticos através do método de Lineweaver-Burk, este método apresenta como principal desvantagem a distorção do erro experimental para valores pequenos de  $V_0$ , cujos erros experimentais mesmo sendo pequenos na linearização se traduzem em erros enormes em relação ao eixo das ordenadas (Quintas *et al.*, 2008; Voet *et al.*, 2011; Bisswanger, 2011).

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} \quad (13)$$



**Figura 9:** Representação gráfica da linearização de Lineweaver-Burk.  $V_0$  é a velocidade inicial da reação enzimática,  $V_{max}$  a velocidade máxima da reação enzimática,  $[S]$  a concentração de substrato,  $m$  o declive da reta e  $K_m$  a constante de Michaelis (adaptado de Bisswanger, 2011).

#### 1.5.2.4 Métodos para avaliar a atividade e inibição da AChE

Os métodos qualitativos e quantitativos que permitem avaliar a atividade e inibição da AChE podem ser usados na indústria farmacêutica, na pesquisa de compostos para o tratamento dos sintomas da doença de Alzheimer e também no controlo alimentar e do meio ambiente, em particular na monitorização da potencial exposição a pesticidas organofosforados ou carbamatos e tóxicos com ação neuronal (Miao *et al.*, 2010; Pohanka *et al.*, 2011).

Existem vários métodos que permitem determinar a atividade e inibição da enzima AChE. Os métodos podem ser colorimétricos, em que podem ser usadas técnicas de espectroscopia ultravioleta-visível (UV/VIS) como, por exemplo, o método de Ellman (Ellman *et al.*, 1961). Também podem ser usadas técnicas com base em nanopartículas coloidais de ouro (Au) (Pavlov *et al.*, 2005), técnicas fluorométricas (Rhee *et al.*, 2003<sup>a</sup>) e de espectrometria de massa (Miao *et al.*, 2010). Podem ser também usados métodos cromatográficos como, por exemplo, a cromatografia em camada fina (Marston *et al.*, 2002; Giovanni *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2011), cromatografia líquida de alta eficiência com deteção por espectrometria de massa (Ingkaninan *et al.*, 2000; Jong *et al.*, 2006; Mroczek *et al.*, 2009) e cromatografia em fase gasosa com deteção por espectrometria de massa (Berkov *et al.*, 2008).

Métodos com base em técnicas eletroquímicas, radiométricas, calorimétricas, de quimioluminescência e de eletroforese capilar podem também ser usados para avaliar a inibição da enzima AChE, assim como dispositivos tais como, por exemplo, biossensores e chips (Birman, 1985; Milkani *et al.*, 2011; Cuarteroa *et al.*, 2012; Pundir e Chauhan, 2012; Silva *et al.*, 2013).

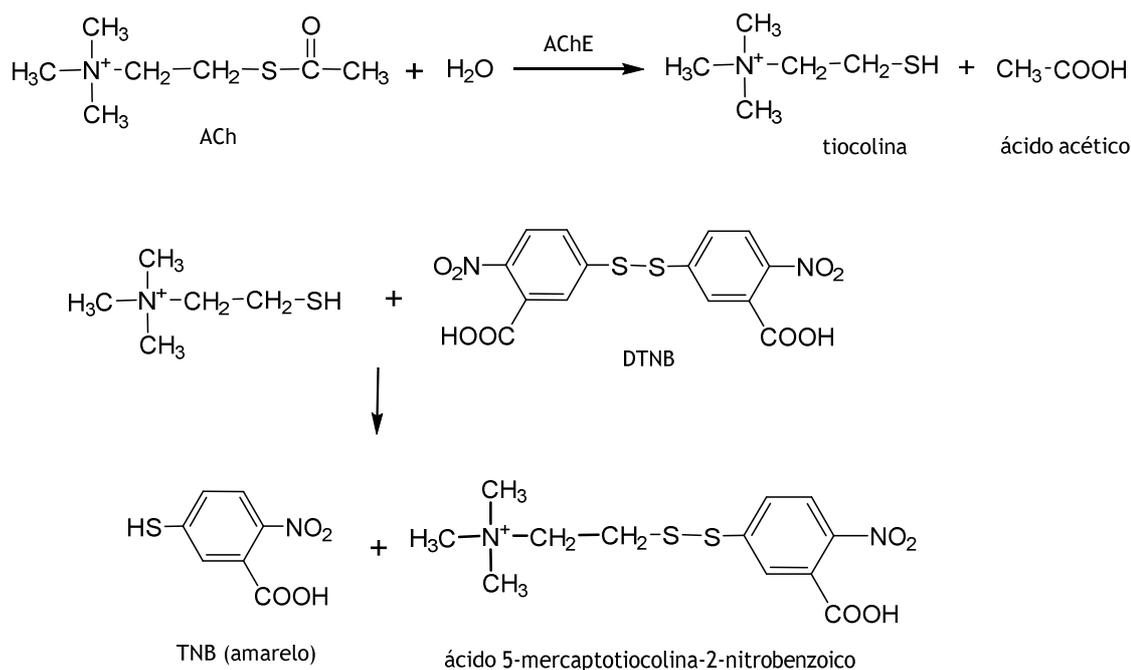
As atividades biológicas de compostos naturais e sintéticos obtidos com os diferentes métodos podem ser bastante variáveis. Por exemplo, resultados de inibição positivos obtidos com ensaios em microplacas através do método de Ellman podem ser negativos usando o método de cromatografia em camada fina (Giovanni *et al.*, 2008), tais divergências podem ser resultado das diferenças entre os protocolos experimentais ou então resultado da interação ou dos compostos ou da enzima com a sílica da placa cromatográfica. Assim a escolha do método usado no rastreamento de potenciais inibidores da AChE é crucial, e o método usado deve ser rápido, estável, reproduzível, barato e simples em termos de execução (Giovanni *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2013).

De todos os métodos que podem ser usados para avaliar a atividade e inibição da AChE em relação a extratos de plantas e compostos de síntese, apenas serão descritos os que se apresentam descritos nos objetivos específicos desta tese.

#### **1.5.2.4.1 Método de Ellman**

O método de Ellman (Ellman *et al.*, 1961) é muito utilizado, geralmente com algumas alterações relativamente ao método proposto inicialmente. Neste método a AChE hidrolisa a ACh para produzir tiocolina que por sua vez reage com o reagente de Ellman (DTNB) para produzir um composto de cor amarela designado por ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB), cuja intensidade de cor medida a 412 nm é proporcional à atividade da enzima. A figura 10 representa as reações que constituem o princípio do método de Ellman (Miao *et al.*, 2010; Pohanka *et al.*, 2011).

As principais vantagens do método de Ellman são a sua simplicidade, o rigor, o aumento contínuo da intensidade de cor em função do tempo de incubação e o custo relativamente baixo (Miao *et al.*, 2010). Além disso, pode ser facilmente adaptável para analisadores automáticos e para leitores de placas, o que permite o processamento rápido de um grande número de amostras. As desvantagens incluem o facto de os grupos tiol (-SH) presentes em amostras biológicas poderem reagir com DTNB e ACh. Em termos experimentais o pH do meio deve estar compreendido entre 7,8 e 8,0 e a temperatura entre os 25 e 37°C (Miao *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2011<sup>b</sup>). Estas condições permitem evitar alterações na atividade enzimática e o aumento da hidrólise espontânea de substrato a temperaturas elevadas e pH alcalino (Miao *et al.*, 2010). Os resultados são afetados quando são utilizadas amostras coloridas ou hidrofóbicas pelo que estes dois fatores, além de limitar o uso do método, devem ser eliminados para se evitar resultados incorretos (Ellman *et al.*, 1961; Miao *et al.*, 2010; Pohanka *et al.*, 2011).



**Figura 10:** Representação das reações que constituem o princípio do método de Ellman. **ACh**- acetilcolina; **AChE**- acetilcolinesterase; **DTNB**- ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico); **TNB**- 5-tio-2-nitrobenzoato (adaptado de Miao *et al.*, 2010).

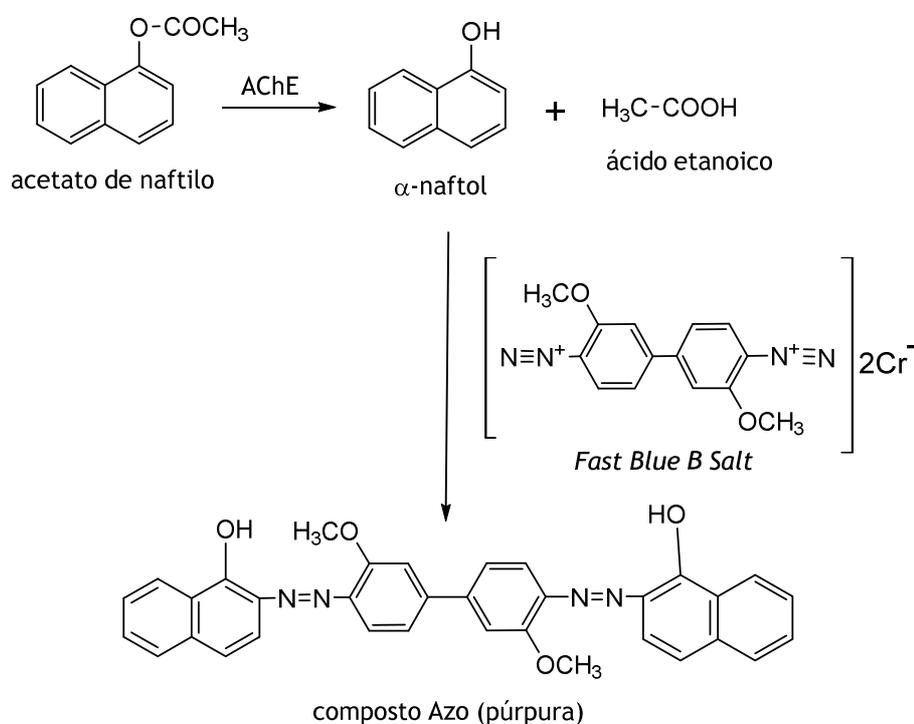
#### 1.5.2.4.2 Método bioautográfico de cromatografia em camada fina

Este método permite obter informação rápida sobre a atividade e inibição da AChE por inibidores complexos e mistura de potenciais inibidores contidos nos produtos naturais (Miao *et al.*, 2010), pelo que é muito usado na pesquisa de potenciais inibidores da AChE presentes em extratos de plantas (Yang *et al.*, 2011). Ao usar-se a placa de cromatografia os constituintes presentes nos extratos são isolados e podem ser detetados diretamente sobre a placa tanto qualitativa como semi-quantitativamente. Existem duas variantes deste método, uma tem por base a formação de uma cor amarela na placa cromatográfica que é devido às reações que constituem o princípio do método de Ellman (Miao *et al.*, 2010). A outra tem por base a reação da AChE com acetato de naftilo e a posterior coloração da placa de cor púrpura após a pulverização com o reagente *Fast Blue B salt* (figura 11) (Marston *et al.*, 2002). Em ambos os casos, a presença de inibidores é observada pelo aparecimento de manchas brancas na placa cromatográfica corada. A segunda variante surgiu devido ao facto de as manchas brancas serem mais facilmente visíveis numa placa corada de púrpura do que de amarelo (Rhee *et al.*, 2003<sup>b</sup>; Yang *et al.*, 2009).

Ambas as variantes podem dar origem a resultados considerados como falsos-positivos e no caso da variante que usa o reagente *Fast Blue B salt* os falsos positivos são resultado da inibição da reação do  $\alpha$ -naftol com o reagente *Fast Blue B salt*. Nos dois casos pode ocorrer inativação da enzima por ligação à sílica da placa o que origina falsos positivos (Giovanni *et al.*, 2008). Deste modo é fundamental realizar sempre em simultâneo ensaios que permitam distinguir os falsos positivos (Marston *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2009).

No caso particular da variante que usa o reagente *Fast Blue B salt*, o ensaio de detecção de falsos positivos consiste em pulverizar a placa cromatográfica com 1-naftol e *Fast Blue B salt*, e o aparecimento de manchas brancas indica falsos positivos (Rhee *et al.*, 2003<sup>b</sup>; Yang *et al.*, 2009).

A fim de estabelecer limites de detecção para os métodos cromatográficos, diferentes concentrações de inibidores conhecidos da acetilcolinesterase devem ser usadas (Marston *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2009). A concentração que produz uma mancha pouco perceptível é definida como o limite mínimo de detecção. A vantagem destes métodos é que são rápidos e simples de usar e além disso permitem analisar vários extratos de plantas em simultâneo, bem como identificar, isolar e purificar os compostos ativos presentes nos extratos. No entanto existem algumas desvantagens como o consumo elevado de enzima que torna o processo caro (Marston *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2011).



**Figura 11:** Representação das reações envolvidas no método de cromatografia em camada fina que tem por base a reação da AChE com acetato de naftilo e a posterior coloração da placa de cor púrpura após a pulverização com o reagente *Fast Blue B salt* (adaptado de Miao *et al.*, 2010).

### 1.5.3 Atividade antimicrobiana

#### 1.5.3.1 Antimicrobianos e resistência antimicrobiana

O termo antibiótico refere-se a todas as substâncias com ação antimicrobiana (Sousa, 2006). A resistência dos microrganismos aos antibióticos deve-se ao facto de os microrganismos possuírem a capacidade de se adaptar às condições do meio ambiente em que vivem e em alguns casos podem desenvolver resistência simultânea a dois ou mais

antibióticos, tornando o tratamento de infecções difícil e dispendioso (Alanis, 2005). A resistência das bactérias aos antibióticos é devido às barreiras características da sua organização celular e às mudanças genéticas que ocorrem através de mutações ou por introdução de nova informação genética (Ferreira *et al.*, 1998). Os fungos também desenvolvem resistência aos antibióticos antifúngicos que, tal como nas bactérias, surge devido ao tratamento prolongado e às mutações na célula fúngica que também estão envolvidas no desenvolvimento de resistência por parte dos fungos (Alanis, 2005; Paphitou, 2013). Devido à resistência das bactérias e fungos aos antimicrobianos disponíveis, torna-se fundamental a pesquisa de novos compostos antibacterianos e antifúngicos eficazes com novos mecanismos de ação e sem efeitos secundários (Adwan *et al.*, 2010).

As plantas usadas na medicina tradicional para tratar as doenças causadas pelos microrganismos podem conter uma grande variedade de compostos que permitem inibir o crescimento ou matar os microrganismos como, por exemplo, a planta *Cryptolepis sanguinolenta* que possui alcaloides que apresentam atividade contra bactérias Gram-negativas e leveduras (Wallace, 2004). Compostos como, por exemplo, flavonoides, taninos e cumarinas são também exemplos de substâncias que podem ser encontradas nas plantas e que apresentam atividade antimicrobiana (Ncube *et al.*, 2008; Saleem *et al.*, 2010).

Por vezes os compostos antimicrobianos encontrados nas plantas possuem pouca atividade antimicrobiana quando usados sozinhos, mas em conjunto com antibióticos podem aumentar o efeito dos mesmos (Muraina *et al.*, 2009; Adwan *et al.*, 2010; Othmana *et al.*, 2011; Sindhu e Manorama, 2012; Soniya *et al.*, 2013).

### **1.5.3.2 Métodos para avaliar a atividade antimicrobiana**

As técnicas para se avaliar a sensibilidade dos microrganismos aos antimicrobianos podem ser, por exemplo, técnicas de difusão em poço de agar, difusão em disco, diluição em agar, microdiluição e macrodiluição em meio de cultura, gradiente antimicrobiano (Etest), bioautográficas, curvas de morte, radiométricas, turbidez e citometria de fluxo (Jorgensen *et al.*, 2009; Das *et al.*, 2010; Othmana *et al.*, 2011; Panda, 2012). Algumas técnicas são consideradas qualitativas como, por exemplo, as técnicas de difusão e bioautográficas. Por outro lado, as técnicas de diluição são consideradas quantitativas uma vez que permitem a determinação da concentração inibitória mínima, que é usada para avaliar a utilidade do agente antimicrobiano no combate da infecção (Ncube *et al.*, 2008).

No caso de existir uma pequena quantidade de amostra, a técnica de difusão em disco é a mais adequada. As técnicas de diluição em meio líquido são a melhor opção para se determinar a atividade de compostos puros polares e não polares, mas a solubilidade nestes casos é importante (Ríos *et al.*, 2005; Othmana *et al.*, 2011; Panda, 2012).

Após a determinação da atividade antimicrobiana de um extrato de planta, se os resultados são positivos deve-se identificar os compostos ativos e realizar ensaios que permitam determinar os mecanismos de ação e ensaios de toxicidade e eventuais interações

com antibióticos comuns (Ríos *et al.*, 2005). Fatores como, por exemplo, composição do meio de cultura, pH, disponibilidade de oxigénio, quantidade de inóculo, condições de incubação e solubilidade de extratos vegetais podem influenciar os resultados dos ensaios antimicrobianos (Othmana *et al.*, 2011).

De todas as técnicas que podem ser usadas para avaliar a sensibilidade dos fungos e bactérias em relação a extratos de plantas e compostos de síntese, apenas serão descritas as que se apresentam nos objetivos específicos desta tese.

#### **1.5.3.2.1 Difusão em disco**

A difusão em disco é adequada para a identificação de extratos com potencial atividade antimicrobiana (Sánchez *et al.*, 2010). O teste de difusão em disco consiste na aplicação de discos previamente impregnados com solução de extrato vegetal na concentração desejada, sobre um meio de cultura solidificado e inoculado com o microrganismo de teste. A presença de halos de inibição indica que o extrato de planta possui ação antimicrobiana em relação ao microrganismo testado (Panda, 2012). Esta técnica apresenta como vantagens o facto de ser fácil de executar, económica e não requer equipamento especial. Tem como desvantagens a falta de automatização dos ensaios e nem todas as bactérias com crescimento lento podem ser testadas com precisão por esta técnica (Ncube *et al.*, 2008).

#### **1.5.3.2.2 Microdiluição em meio de cultura**

Esta técnica permite avaliar a atividade antimicrobiana de extratos de plantas e compostos puros e é usada para se determinar a concentração mínima inibitória (Ncube *et al.*, 2008). A solução de extrato é preparada usando-se normalmente como solvente o DMSO, no entanto solventes como o metanol e a acetona também podem ser utilizados pois geralmente dissolvem completamente os extratos e não inibem o crescimento dos microrganismos. A técnica consiste em efetuar diluições seriadas da solução de extrato em meio de cultura líquido com o objetivo de se obter uma gama de concentrações. A concentração de amostra que provoca ausência de turvação no meio é considerada como sendo a concentração mínima inibitória em relação ao microrganismo testado (Jorgensen e Ferraro, 2009; Panda, 2012). Durante a execução da técnica deve realizar-se um controlo de crescimento do inóculo para se verificar se a inibição é resultado da presença das amostras e não da inviabilidade dos microrganismos, um controlo do meio de cultura para se verificar potencial contaminação do meio, um controlo da amostra para se verificar a existência de possível contaminação. Deve ser realizado também um controlo positivo contendo um antibiótico ou antifúngico de referência (Ncube *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 2010). Esta técnica apresenta algumas vantagens como, por exemplo, a obtenção de resultados quantitativos, a sensibilidade para pequenas quantidades de extrato, a capacidade de distinguir entre os efeitos bacteriostático e bactericida e o reduzido volume de amostra e reagentes necessários.

As principais desvantagens do método de microdiluição devem-se ao facto de não se poderem usar solventes que reajam com plásticos ou alterem o pH do meio de cultura, nem amostras coloridas pois interferem com a leitura dos resultados. Uma outra desvantagem é que alguns microrganismos podem aderir à base do poço e outros permanecer em suspensão interferindo assim nos resultados (Ncube *et al.*, 2008).

## 1.6 Caracterização das plantas utilizadas nos estudos de bioatividade

Nos estudos realizados utilizaram-se extratos de *Hymenodictyon floribundum*; *Parinari capensis*; *Tinnea antiscorbutica*; *Eragrostis viscosa*; *Xylopia odoratissima*; *Peucedanum angolense*; *Boscia microphylla*; *Adenodolichos huillensis*; *Rhus kirkii*; *Croton gratissimus*; *Gymnosporia senegalensis*; *Solanecio manni*; *Peltophorum africanum*; *Piliostigma thonningii*; *Phragmanthera glaucocarpa* e *Solanum incanum*. À data de 31 de agosto de 2013 não foram encontrados na *Web of Knowledge* estudos de bioatividade com os órgãos usados destas plantas.

### 1.6.1 *Hymenodictyon floribundum*

O *Hymenodictyon floribundum* (Hochst. & Steud.) B. L. Rob. (figura 12) é uma árvore de pequeno porte que cresce nas montanhas rochosas da província da Huíla (Angola). Pertence ao género *Hymenodictyon* que possui 22 espécies e à família Rubiaceae que reúne mais de seis mil espécies distribuídas por todo o planeta centrando-se a sua expressão máxima a nível dos trópicos, onde é representada por plantas lenhosas cujas cascas são usadas no tratamento de estados febris (Bossard, 1996). Poucos estudos têm sido efetuados ao género *Hymenodictyon*, contudo no que diz respeito ao *H. floribundum*, foram obtidos a partir das cascas glicosídeos derivados da escopolatina, escopolina e do  $\beta$ -sitosterol em particular o 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosil- $\beta$ -sitosterol e a lupenona (Mitaine-Offer *et al.*, 2003). Ainda em relação ao *H. floribundum* foi encontrado nas folhas dois novos iridoídeos, o floribundano A e B e os compostos conhecidos de lupenona, escopoletina e 4,5-di-hidroblumenol A (Borges *et al.*, 2010). Algumas das espécies pertencentes a este género, são usadas na medicina tradicional como por exemplo o *H. excelsum* que é usado como adstringente e febrífugo tendo-se isolado das cascas desta espécie um apioglucósido da escopolatina, o xerobosídeo (Borges *et al.*, 2010). Relativamente ao *H. floribundum* não foram encontrados estudos com as cascas desta planta sobre a sua atividade biológica.



**Figura 12:** Folhas e flores de *Hymenodictyon floribundum* ([http://www.zimbabweflora.co.zw/speciesdata/image-display.php?species\\_id=155120&image\\_id=2](http://www.zimbabweflora.co.zw/speciesdata/image-display.php?species_id=155120&image_id=2), acessado em 09-10-2013).

### 1.6.2 *Parinari capensis*

A *Parinari capensis* Harv. subsp. *capensis*, também conhecida pelo sinónimo de *Parinari pumila* Mildbr. (figura 13), é uma planta pertencente à família Chrysobalanaceae, género *Parinari*. Trata-se de uma árvore de pequeno porte que pode ser encontrada no sul de África e na província da Huíla (Angola), onde cresce nos planaltos (Borges, 2008; <http://www.ville-ge.ch/musinfo/bd/cjb/afrika/details.php?langue=an&id=7799>, acessado em 19-09-2013).

A *P. capensis* subsp. *capensis* é usada na medicina tradicional no tratamento de doenças de pele (Wet *et al.*, 2013) e possui atividade antimalárica (Uys *et al.*, 2002), no entanto, algumas espécies do género *Parinari* são utilizadas na medicina tradicional no tratamento da diarreia, malária e mordedura de cobra, por exemplo, a *Parinari capensis* subsp. *incohata* é usada no tratamento de infeções respiratórias (Silva *et al.*, 2012; York *et al.*, 2012; Cheikhyoussef *et al.*, 2013).



**Figura 13:** Folhas e flores de *Parinari capensis* ([http://www.zimbabweflora.co.zw/speciesdata/species.php?species\\_id=125500](http://www.zimbabweflora.co.zw/speciesdata/species.php?species_id=125500), acessado em 09-10-2013).

Em relação à *P. pumila* foram identificadas em toda a planta lactonas do tipo diterpeno (Uys *et al.*, 2002), no entanto na planta colhida em Angola foram isolados e identificados em extratos de hexano e tolueno das folhas os compostos fitol,  $\beta$ -sitosterol, 3-epi- $\alpha$ -amirina e 18-acetoxi-16- $\beta$ -hidroxi-ent-kaurano (Saraiva, 2004). Relativamente à *P. pumila* não foram encontrados estudos com as folhas desta planta sobre a sua atividade biológica.

### 1.6.3 *Tinnea antiscorbutica*

A *Tinnea antiscorbutica* Welv. (figura 14) é uma planta pertencente à família Labiatea, que é constituída por cerca de 3200 espécies, e ao género *Tinnea* que engloba 19 espécies, todas de origem africana. A *T. antiscorbutica* é um semiarbusto que cresce nos planaltos da província da Huíla e cujas folhas ou novos rebentos são usadas no tratamento e prevenção do escorbuto (Bossard, 1996; Borges, 2008).



**Figura 14:** Folhas e flores de *Tinnea antiscorbutica* (<http://actd.iict.pt/view/actd:LISC060415>, acedido em 09-10-2013).

Recentemente foram isolados três novos neo-clerodanos (antiscorbuticano A, B e C) a partir do extrato metanólico de *T. antiscorbutica* e os compostos conhecidos glutinol, friedelina, pinocembrina, artemetina, penduletina, crisosfenol D e 5-hidroxi-3,6,7,4'-tetrametoxiflavona (Borges, 2008). Relativamente à *T. antiscorbutica* não foram encontrados estudos com a parte aérea desta planta sobre a sua atividade biológica.

### 1.6.4 *Eragrostis viscosa*

*Eragrostis viscosa* (Retz.) Trin. (figura 15) é uma espécie vegetal pertencente à família Poaceae, também conhecida por Gramineae, e género *Eragrostis*. A família Poaceae, formada por plantas monocotiledóneas consiste em mais de 600 géneros e aproximadamente 9000 espécies. A *E. viscosa* é mais específica do sul de África, no entanto esta espécie foi também assinalada no norte dos Camarões e na Malásia. Em Angola esta espécie de planta encontra-se nas zonas de clima semiárido, região sudoeste do país. O povo autóctone da região faz um uso etnofarmacológico desta espécie de planta devido ao facto que causa envenenamento das cobras. Além disso o gado não a come, talvez devido ao facto de que por ser viscosa, esta não ser agradável ao paladar ou por outra razão ainda por descobrir (Sebastião *et al.*, 2010).



**Figura 15:** Parte aérea de *Eragrostis viscosa* (<http://plants.jstor.org/visual/kbot00000727>, acessado em 09-10-2013).

O gênero *Eragrostis* está pouco estudado quimicamente, no entanto o estudo de extratos de *E. viscosa* em tolueno, hexano e diclorometano, permitiu isolar dez compostos com predominância para compostos diterpênicos com esqueleto labdano. Sete destes compostos são 8,15-epoxilabdano, um novo tipo de éter cíclico que foram caracterizados como novos compostos naturais e os três restantes compostos já conhecidos, o 3 $\beta$ -(3'',4''-dihidroxi)-(E)-cinamoiloxilup-20(29)-eno, a ambreinolida e o 3-(2',3',4',6'-tetra-acetil- $\beta$ -glucopiranosiloxi)- $\beta$ -sitosterol) (Sebastião, 2007; Sebastião *et al.*, 2010). Relativamente à *E. viscosa*, não foram encontrados estudos com a parte aérea desta planta, no que diz respeito à inibição da enzima acetilcolinesterase nem de determinação de EC<sub>50</sub>, no que diz respeito à atividade antioxidante.

### 1.6.5 *Xylopi*a *odoratissima*

*Xylopi*a *odoratissima* Welw. Ex Oliver (figura 16) é uma planta pertencente à família Annonaceae, uma família de plantas floridas, e ao gênero *Xylopi*a (Robson, 1960; Fernandes, 2003). Este gênero é constituído por cerca de 160 espécies que ocorrem nos trópicos, especialmente na África, Ásia e América do Sul e Central (Moreira *et al.*, 2003). Em termos de aplicações das plantas pertencentes ao gênero *Xylopi*a, por exemplo, a *X. aethiopica*, pode ser usada no tratamento de infecções da pele e no tratamento da tosse e febre. A *X. brasiliensis*, uma árvore de grande porte localizada no sudeste do Brasil, é um outro exemplo de planta pertencente ao gênero *Xylopi*a, que é utilizada na medicina popular como sedativo e analgésico. A *X. aromática* é um outro exemplo de planta do gênero *Xylopi*a, usada na medicina tradicional. A *X. aromática* é uma árvore de pequeno porte encontrada na América Central e do Sul, cujo fruto é usado em produtos alimentícios, perfumes e cosméticos, devido ao seu aroma (Stashenko *et al.*, 2004; Karioti *et al.*, 2004). Da raiz da *X. africana* foram isolados flavonoides com atividade antibactericida contra as estirpes de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium smegmatis* (Anam, 1994). Várias partes da *Xylopi*a *aromatica* têm sido objeto de estudos sobre a sua composição química por apresentarem

várias classes de produtos naturais, incluindo alcaloides, acetogeninas e diterpenos (Fernandes, 2003). Relativamente à *X. odoratissima*, não foram encontrados estudos com as folhas desta planta sobre a sua atividade biológica.



**Figura 16:** Folhas de *Xylopiya odoratissima* (<http://actd.iict.pt/view/actd:LISC016344>, acessado em 09-10-2013).

### 1.6.6 *Peucedanum angolense*

O *Peucedanum angolense* Welw. ex Ficalho Cannon (figura 17) é uma planta pertencente à família Apiaceae, também conhecida como Umbelliferae e ao género *Peucedanum*. O género *Peucedanum* encontra-se distribuído pela europa, ásia e África, e é caracterizado por possuir frutos achatados com asas laterais mais ou menos desenvolvidas (Spalik *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2000).



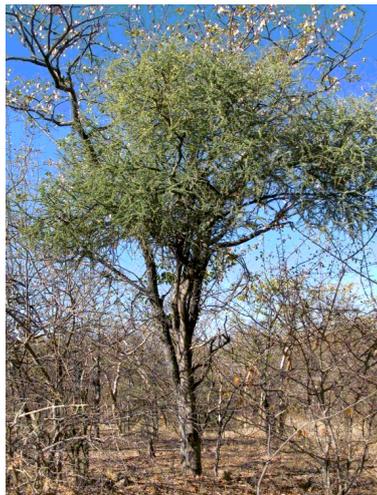
**Figura 17:** Folhas e inflorescências de *Peucedanum angolense*, ([http://www.europeana.eu/portal/record/11614/K\\_\\_Herbarium\\_Catalogue\\_\\_K000272664.html](http://www.europeana.eu/portal/record/11614/K__Herbarium_Catalogue__K000272664.html), acessado em 20-10-2013).

A família Apiaceae apresenta características botânicas peculiares tais como inflorescências em forma de umbela (inflorescências em forma de guarda chuva), e frutos secos divididos em dois mericarpos, possui cerca de 450 géneros e 3700 espécies (Zhou *et al.*, 2009). As plantas pertencentes a esta família encontram-se amplamente distribuídas em regiões de clima temperado onde muitas vezes são utilizadas como especiarias e medicamentos, devido à presença de metabolitos secundários como cumarinas, óleos essenciais e sesquiterpenos. Por exemplo, o *P. japonicum* apresenta propriedades diuréticas,

laxativas e sedativas e o *P. praeruptorum* é usado na medicina tradicional chinesa em distúrbios alimentares e dores no peito (Miyazawa *et al.*, 1996). Relativamente ao *P. angolense*, não foram encontrados estudos com a parte aérea desta planta sobre a sua atividade biológica e composição fitoquímica.

### 1.6.7 *Boscia microphylla*

A *Boscia microphylla* Oliv. (figura 18) é uma planta pertencente à família Capparaceae e género *Boscia*, que se apresenta na forma de árvore ou arbusto. A família Capparaceae possui cerca de 40-45 géneros e 700-900 espécies, cujos membros apresentam uma diversidade considerável no que diz respeito ao local onde habitam sendo mais visíveis em habitats tropicais sazonalmente secos. Por exemplo as plantas do género *Cleome*, que pertencem à família Capparaceae, apresentam diversas propriedades medicinais importantes sendo úteis no tratamento de processos inflamatórios e do reumatismo, apresentando também propriedades analgésicas, antioxidantes e antibacterianas (Albarelo *et al.*, 2006). Relativamente à *B. microphylla*, não foram encontrados estudos com as folhas desta planta sobre a sua atividade biológica e composição fitoquímica.



**Figura 18:** *Boscia microphylla* ([http://www.southernafricanplants.net/plantdata\\_sub.php?Mspec\\_ID=798&PHPSESSID=pbj5sggf2di2oavs qlcvrjj274#](http://www.southernafricanplants.net/plantdata_sub.php?Mspec_ID=798&PHPSESSID=pbj5sggf2di2oavs qlcvrjj274#), acedido em 09-10-2013).

### 1.6.8 *Adenodolichos huillensis*

O *Adenodolichos huillensis* Torre (figura 19) é uma planta que pertence à família Fabaceae também conhecida por Leguminosae e ao género *Adenodolichos*, encontrando-se na forma de ervas e arbustos (Mackinder *et al.* 2001). A Fabaceae é a terceira maior família de plantas no mundo, compreendendo cerca de 730 géneros e 19300 espécies. Grande parte da diversidade de espécies de Fabaceae está concentrada nas regiões tropicais e subtropicais (Ata *et al.*, 2009; Estrella *et al.*, 2010). A maioria das plantas pertencentes a esta família possui flores que são caracterizadas por terem um único eixo de simetria (Citerne *et al.*, 2006).



**Figura 19:** Folhas de *Adenodolichos huillensis* (<http://actd.iict.pt/view/actd:LISC001902>, acessado em 09-10-2013).

A *Caesalpinia bonduc*, um exemplo de planta da família Fabaceae, abundante nas regiões tropicais e subtropicais da ásia, é usada na medicinal tradicional e os extratos aquosos e etanólicos das suas sementes possuem efeitos hiperglicémicos na diabetes tipo 2 (Wagstaff *et al.*, 1999).

O género *Canavalia*, um outro exemplo pouco conhecido da família Fabaceae, possui cerca de 50 espécies e apresenta importantes aplicações como, por exemplo, a forragem, adubação e controlo da erosão (Sahai, 2009). Relativamente ao *A. huillensis* não foram encontrados estudos com as folhas desta planta sobre a sua atividade biológica e composição fitoquímica.

### **1.6.9 *Rhus kirkii***

*Rhus kirkii* Oliv. (figura 20) é uma espécie vegetal, na forma de ervas e arbusto, que pertencente à família Anacardiaceae e ao género *Rhus* (Fernandes e Fernandes, 1966), que pode ser encontrada na Angola, nomeadamente na província de Huambo. *Sumac* é o nome comum atribuído às espécies do género *Rhus*. Este género contém mais de 250 espécies de plantas que podem ser encontradas em regiões de clima temperado e tropical. Várias espécies têm sido utilizadas para fins medicinais. Por exemplo a *R. glabra* é tradicionalmente usada por povos nativos da América do Norte no tratamento de doenças como a sífilis, gonorreia, disenteria e gangrena. Por exemplo, o extrato etanólico obtido a partir da madeira de *R. verniciflua* exibe atividade antioxidante em culturas de células neuronais (Rayne e Mazza, 2007). No que diz respeito à *R. kirkii*, não foram encontrados estudos com as folhas desta planta sobre a sua atividade biológica e composição fitoquímica.



**Figura 20:** Folhas e flores de *Rhus kirkii* (<http://actd.iict.pt/view/actd:LISC001411>, acedido em 09-10-2013).

### 1.6.10 *Croton gratissimus*

*Croton gratissimus* Burch (figura 21) é uma planta que pertence à família Euphorbiaceae e ao género *Croton*, com cerca de 1200 espécies que se encontram na forma de árvores, arbustos, ervas e lianas, nos mais variados ecossistemas tropicais e subtropicais dos continentes americano, africano e asiático. Cerca de 50 espécies podem ser encontradas na África, mas apenas 10 são nativas da flora do sul de África (Block *et al.*, 2004; Mulholland *et al.*, 2010; Robert *et al.*, 2010; Zou *et al.*, 2010; Rossi *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2012; Azevedo *et al.*, 2013).

A *C. gratissimus* é uma árvore que cresce nas encostas rochosas das regiões mais quentes e secas do sul de África e as folhas produzem um aroma agradável idêntico à lavanda pelo que são usadas no fabrico de perfumes. Todas as partes da planta possuem valor medicinal e a espécie *C. gratissimus* pode ser usada no tratamento de várias doenças e sintomas. As folhas são usadas no tratamento da tosse, as raízes no tratamento de dores no peito, tosse, febre e doenças sexualmente transmissíveis como, por exemplo, sífilis. As cascas são usadas para tratar o sangramento nas gengivas, inflamação da pele (Ndhlala *et al.*, 2013) e dores de ouvido (Vuuren *et al.*, 2008). A *C. gratissimus* possui também diversas bioatividades como, por exemplo, analgésica, febrífuga, afrodisíaca, purgativa, emética, soporífera, antiplasmódica e antimicrobiana (Mulholland *et al.*, 2010; Langat *et al.*, 2011). As cascas, raízes e folhas de *C. gratissimus* podem ser usadas separadamente ou em combinação com cascas, raízes e folhas de outras espécies de plantas pertencentes a géneros diferentes (Vuuren *et al.*, 2008).

Em estudos fitoquímicos podem ser encontrados nos extratos de *C. gratissimus* (obtidos a partir dos caules, cascas e folhas) cembranolidas (Ndhlala *et al.*, 2013), lupeol e  $\alpha$ -glutinol (Langat *et al.*, 2011). No género *Croton* podem ser encontrados compostos como, por exemplo kauranos, labdanos, clerodanos, terpenos, pimaranos, isoquinolinas alcaloides (Mulholland *et al.*, 2010) e terpenoides (Peixoto *et al.*, 2013). Relativamente a esta planta, não foram encontrados estudos com a parte aérea desta planta sobre a sua atividade biológica.



**Figura 21:** Folhas de *Croton gratissimus* (<http://actd.iict.pt/view/actd:LISC053042>, acessido em 09-10-2013).

### 1.6.11 *Gymnosporia senegalensis*

*Gymnosporia senegalensis* (Lam.) Loes. (figura 22) é uma planta que pertence à família Celastraceae e ao género *Gymnosporia*, cujas espécies diferem umas das outras em aspetos tais como a presença de espinhos e o tamanho das folhas. A *G. senegalensis* pode apresentar-se na forma de arbusto ou árvore e é encontrada nas regiões áridas, tropicais e subtropicais da África, América e Ásia (Pistelli *et al.*, 1998; Lindsey *et al.*, 2006; Sosa *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2010).



**Figura 22:** Folhas e inflorescências de *Gymnosporia senegalensis* (<http://actd.iict.pt/view/actd:LISC054570>, acessido em 09-10-2013).

As raízes, folhas, caules e cascas da planta *G. senegalensis* são usadas na medicina tradicional africana por via oral e/ou tópica para tratar diversas doenças e sintomas como, por exemplo, malária, tumores, pneumonia, tuberculose, doenças inflamatórias, dores no peito e ouvidos, reumatismo, disenteria e diarreia, mordeduras de cobra, infeções oculares, feridas e doenças respiratórias (Hussein *et al.*, 1999; Lindsey *et al.*, 2006; Sosa *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2010).

Em termos de atividade biológicas a *G. senegalensis* apresenta atividade antimalárica, leishmanicida, antiplasmódica, antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória, anti-tumoral e

anti-leucémica (Pistelli *et al.*, 1998; Lindsey *et al.*, 2006; Matu *et al.*, 2006; Sosa *et al.*, 2007; Jain *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2010).

Em termos fitoquímicos podem ser encontrados nas folhas da *G. senegalensis* alcaloides, terpenos, compostos fenólicos e esteroides, nas cascas da raiz podem ser encontrados triterpenos ( $\beta$ -amirina, lupenona, e  $\beta$ -sitosterol) e cumarinas, nas cascas do tronco foi isolado pristimerina e taninos (Pistelli *et al.*, 1998; Hussein *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2010).

### 1.6.12 *Solanecio mannii*

*Solanecio mannii* (Hook.f.) C. Jeffrey é uma planta também conhecida pelo sinónimo de *Crassocephalum multicorymbosum* (Klatt) S. Moore (figura 23) (<http://www.ville-ge.ch/musinfo/bd/cjb/africa/details.php?langue=en&id=104100>, acessado 19/09/2013). Trata-se de uma planta que pertence à família Asteraceae e ao género *Solanecio* formado por 17 espécies de plantas que podem ser encontradas nas regiões tropicais da África e Madagascar, na forma de ervas perenes, arbustos ou pequenas árvores (Asres *et al.*, 2008). As flores de muitas espécies da família Asteraceae são usadas como local de abrigo para várias espécies de insetos (Panero *et al.*, 2008).



**Figura 23:** Folhas e flores de *Solanecio mannii* (<http://actd.iict.pt/view/actd:LISC038108>, acessado em 09-10-2013).

As folhas de *S. mannii* são utilizadas no tratamento da epilepsia, e as raízes são usadas no tratamento do cancro, pneumonia, epilepsia e a febre tifóide (Asres *et al.*, 2008). As folhas de *C. multicorymbosum* também são usadas na medicina tradicional africana para o tratamento de várias condições inflamatórias (Chagnon *et al.*, 1983).

Em termos fitoquímicos podem ser encontrados compostos como, por exemplo, alcaloides, diterpenos, cumarinas, flavonoides, lactonas e poliacetilenos em espécies da família Asteraceae (Emerenciano *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2005; Taiwe *et al.*, 2012). No que diz respeito à *S. mannii* não foram encontrados estudos com os ramos desta planta, relativamente à atividade biológica e composição fitoquímica.

### 1.6.13 *Peltophorum africanum*

*Peltophorum africanum* Sound. (figura 24) é uma planta que pertence à família Fabaceae, também conhecida como Leguminosae e ao género *Peltophorum*. Trata-se de uma árvore de folha caduca que pode ser encontrada nas áreas tropicais do sul de África, em particular nas áreas de pastagens arborizadas. A família Fabaceae é constituída por mais de 490 espécies de plantas medicinais, a maioria dos quais são usadas na medicina tradicional em humanos e animais domésticos. Algumas espécies de plantas desta família possuem propriedades farmacêuticas importantes e como tal são usadas em produtos farmacêuticos (Schmidt *et al.*, 2002; Bizimenyera *et al.*, 2005; Bizimenyera *et al.*, 2007; Ahmad *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2010).



**Figura 24:** Folhas e flores de *Peltophorum africanum* (<http://davesgarden.com/guides/pf/showimage/23587/>, acessado em 09-10-2013).

As raízes e cascas de *P. africanum* são tradicionalmente usadas para tratar feridas, diarreia, helmintoses, disenteria, dores nas costas e articulações e dores de garganta, ascite, depressão, cólicas e infertilidade (Bizimenyera *et al.*, 2007). As raízes e cascas são usadas no combate ao HIV (Bizimenyera *et al.*, 2006). Os extratos de raízes e cascas da *Peltophorum africanum* possuem também atividade anti-inflamatória, antibacteriana (em particular contra o *S. aureus*), nematocida e antioxidante (Ahmad *et al.*, 2006; Dandapat *et al.*, 2012).

Em estudos fitoquímicos isolaram-se da *P. africanum* glicosídeos a partir das folhas (Sherbeiny *et al.*, 1977; Raj *et al.*, 2012), e das sementes foram isolados compostos polifenólicos, o composto ácido trans-4-hidroxipípecólico e vários flavonoides como, por exemplo, o 4-arilflavan-3-ol (Bizimenyera *et al.*, 2005). Dos extratos das cascas e folhas isolaram-se cumarinas. Foram também obtidas da *P. africanum* compostos derivados do ácido gálico e catequinas (Bizimenyera *et al.*, 2007; Bahia *et al.*, 2010). No que diz respeito à *P. africanum* não foram encontrados estudos com os ramos desta planta, relativamente à atividade biológica e composição fitoquímica.

#### 1.6.14 *Piliostigma thonningii*

A *Piliostigma thonningii* (Schumach.) Milne-Redhead, também conhecida como *Bauhinia thonningii* Schum. & Thonn. (figura 25), trata-se de uma árvore que pertence à família Caesalpiniaceae e ao género *Piliostigma* e encontra-se espalhada por toda a África tropical (Schmidt *et al.*, 2002; Brummitt *et al.*, 2007).

Na medicina tradicional, as folhas de *B. thonningii* são usadas no tratamento de úlceras gástricas, febre, disenteria, diarreia, malária, lepra, dores de garganta e dentes (Abdelwahab *et al.* 2013). As raízes são também usadas no tratamento de feridas, doenças respiratórias, mordeduras de cobra e doenças de pele. Extratos da casca, folhas e raiz são usados no tratamento da tosse e as folhas possuem atividade antimicrobiana e antioxidante (Nguta *et al.*, 2013).



**Figura 25:** *Piliostigma thonningii* (<http://www.feedipedia.org/node/265>, acessado em 09-10-2013).

Em termos fitoquímicos foram isolados das folhas de *P. thonningii* alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos, glicosídeos, terpenos e glúcidos. Os extratos da casca do caule contêm alcaloides, antocianinas, antraquinonas, betacianinas, flavonoides, saponinas e esteroides (Abdelwahab *et al.* 2013).

No que diz respeito à *P. thonningii*, não foram encontrados com as raízes desta planta, sobre a atividade biológica e composição fitoquímica.

#### 1.6.15 *Phragmanthera glaucocarpa*

A *Phragmanthera glaucocarpa* (Peyr.) Balle (figura 26) é um arbusto que pertence à família Loranthaceae e ao género *Phragmanthera* (<http://www.ville-ge.ch/musinfo/bd/cjb/africa/details.php?langue=an&id=25250>, acessado em 19-09-2013). A família Loranthaceae é constituída por 77 géneros e 950 espécies de plantas epífitas, distribuídas por todos os continentes. Apresentam-se como pequenos arbustos que vivem como hemiparasitas sobre os galhos, ramos ou raízes de árvores e arbustos selvagens e/ou de cultivo, de onde recolhem água e sais minerais necessários para o seu desenvolvimento. Algumas espécies invadem o xilema da planta hospedeira, de onde retiram a matéria orgânica do seu hospedeiro, no entanto, algumas são capazes de produzir glúcidos e, portanto, não dependem da matéria

orgânica do seu hospedeiro e invadem apenas o floema (Arruda *et al.*, 2006; Obiang *et al.*, 2006).

As plantas que pertencem à família Loranthaceae apresentam várias aplicações na medicina tradicional como, por exemplo, a espécie *Struthanthus concinnus* que é usada no tratamento de doenças respiratórias (pneumonia e tuberculose), a espécie *Loranthus micranthus* que é utilizada na medicina tradicional para tratar o cancro, gripe e outras infecções virais e também apresenta atividade antioxidante e antidiabética (Gupta *et al.*, 2012) e a espécie *Viscum álbum* que é usada na medicina tradicional para tratar doenças cardiovasculares, artrite, dor de cabeça, epilepsia e distúrbios do sistema nervoso. A *V. álbum* também possui também atividade anti-tumoral, anti-inflamatória, antibacteriana e antioxidante (Leitão *et al.*, 2013).



**Figura 26:** Folhas de *Phragmanthera glaucocarpa* (<http://actd.iict.pt/view/actd:LISC051794>, acedido em 09-10-2013).

Em termos fitoquímicos podem ser encontrados nas plantas que pertencem à família Loranthaceae compostos tais como, por exemplo, lectinas, flavonoides, alcaloides, terpenoides, saponinas, taninos, fitoesteróis, vitaminas e antraquinonas (Ouedraogo *et al.*, 2011; Gupta *et al.*, 2012).

No que diz respeito à *P. glaucocarpa*, não foram encontrados estudos com as raízes desta planta, relativamente à sua atividade biológica e composição fitoquímica.

#### **1.6.16 *Solanum incanum***

O *Solanum incanum* L. (figura 27) é uma planta que pertence à família Solanaceae e ao género *Solanum*. A família Solanaceae é constituída por uma grande variedade de plantas que podem ser usadas como fonte valiosa de legumes como, por exemplo, a batata (*S. tuberosum*), beringela (*S. melongena*) e tomate (*S. lycopersicum*), no entanto, algumas espécies podem ser usadas como plantas ornamentais e medicinais. A planta *S. incanum* é um arbusto que pode apresentar espinhos e cujos frutos são considerados comestíveis. O *S. incanum* encontra distribuído por toda a África continental e Ásia (Behera *et al.*, 2002; Poczar

*et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011; Manase *et al.*, 2012).

A planta inteira de *S. incanum* é utilizada na medicina tradicional africana e chinesa para o tratamento de várias doenças como, por exemplo, conjuntivite, inflamações e doenças hepáticas crônicas, e além disso possui também atividade antibacteriana e antioxidante (Wu *et al.*, 2011; Manase *et al.*, 2012).



**Figura 27:** Folhas, flor e fruto de *Solanum incanum* (<http://flora.huji.ac.il/browse.asp?lang=en&action=specie&specie=SOLINC&fileid=9419>, acessado em 09-10-2013).

As plantas que pertencem à família *Solanaceae* apresentam várias aplicações na medicina tradicional. Os frutos da espécie *Solanum lycocarpum* são usados na medicina tradicional brasileira para o tratamento da diabetes, obesidade, diminuição dos níveis de colesterol e possuem atividade diurética, sedativa, anti-epilética e anti-inflamatória (Mota *et al.*, 2010). A espécie *S. nigrum* é usada para tratar inflamação, edema e cancro do fígado (Ding *et al.*, 2012). A espécie *S. surattense* usada na medicina tradicional indiana para curar doenças respiratórias, gonorreia, reumatismo, febre, asma, tosse e dores no peito e também possui atividade anti-hiperglicêmica (Muruhan *et al.*, 2013). Várias espécies de *Solanum* em África possuem propriedades tóxicas e são usadas para induzir o aborto (Fukuhara *et al.*, 2004; Schwarz *et al.*, 2005).

Relativamente a estudos fitoquímicos, os frutos de *S. incanum* possuem solasonina e solamargina que são glicoalcaloides do tipo esteroide, e também saponinas (Kuo *et al.*, 2000; Fukuhara *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2011; Manase *et al.*, 2012). Os compostos solamargina e solasonina possuem propriedades anticancerígenas tanto *in vitro* como *in vivo*, no entanto, os glicoalcaloides são compostos tóxicos e afetam principalmente o sistema nervoso (por inibição da enzima colinesterase) e também o sistema gastrointestinal por ação das saponinas de glicoalcaloides (Wu *et al.*, 2011). Apesar dos frutos maduros de *S. incanum* não serem tóxicos, os frutos verdes apresentam toxicidade e os sinais clínicos de intoxicação incluem salivação, diarreia, cólicas, inchaço, estomatite, taquicardia, câibras e paralisia. Algumas espécies do género *Solanum* estão associadas com uma doença degenerativa do cerebelo em bovinos caracterizada por quedas, tremores musculares e convulsões (Thaiyah *et al.*, 2011).

## 1.7 Caracterização dos compostos de síntese (cumarinas sintéticas) utilizados nos estudos de bioatividade

As cumarinas são compostos que podem ser obtidos a partir de microrganismos e também do metabolismo secundário das plantas pertencentes a famílias tais como, por exemplo, Apiaceae, Asteraceae, Fabiaceae, Rosaceae, Rubiaceae, Rutaceae e Solanaceae. A maioria das cumarinas usadas comercialmente são sintetizadas a partir do salicilaldeído, no entanto, grande parte pode ser isolada a partir das sementes de *Coumarouna odorata* (Hoult *et al.*, 1996; Lake *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2008; Smyth *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2013; Patil *et al.*, 2013). Estes compostos apresentam um odor característico a feno, no entanto, algumas cumarinas apresentam um odor a baunilha e como tal são usadas como potenciador de aroma em muitos produtos alimentares e bebidas alcoólicas. Na natureza ocorre frequentemente a conjugação das cumarinas com açúcares ou ácidos o que leva à perda do odor característico das cumarinas aromáticas (Hoult *et al.*, 1996; Lake *et al.*, 1999; Born *et al.*, 2003; Felter *et al.*, 2006; Sproll *et al.*, 2008).

As cumarinas podem ser classificadas em cumarinas simples, furanocumarinas, piranocumarinas, cumarinas substituídas no anel de pirona e dímeros de cumarina (Smyth *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2013).

As cumarinas e respetivos derivados sintéticos possuem múltiplas atividades biológicas, devido à sua diversidade estrutural, tais como, por exemplo, atividade antibacteriana (Smyth *et al.*, 2009), antifúngica (Sardari *et al.*, 1999), anticoagulante (Smyth *et al.*, 2006), antiviral, inseticida, anti-leucémica, antioxidante, anti-inflamatória, hepatoprotetora, antialérgica, antiasmática, antidiabética, antidepressiva, diurética (Anand *et al.*, 2012), anti-tumoral (Bhattacharyya *et al.*, 2009) e também atividade inibitória das enzimas ciclooxigenase (Stefani *et al.*, 2012), acetilcolinesterase (Fallarero *et al.*, 2008), anidrase carbónica (Davis *et al.*, 2013) e monoamina oxidase (Patil *et al.*, 2013).

Algumas cumarinas podem ser usadas para tratar lesões cutâneas, enfarte do miocárdio e acidente vascular cerebral. Por exemplo, derivados sintéticos de 4-hidroxycumarina (como, por exemplo, a varfarina) são usados como anticoagulantes na prevenção e tratamento da trombose e embolia. A 7-hidroxycumarina é um exemplo de cumarina que possui efeitos inibitórios sobre o crescimento de linhas celulares tumorais do pulmão, renais, mama e medula óssea (Lin *et al.*, 2013). A toxicidade das cumarinas em humanos deve-se principalmente às doses elevadas que são usadas nas terapias clínicas. Após a administração oral as cumarina são rapidamente absorvidas a partir do trato gastrointestinal e distribuídas por todo o organismo. A eliminação ocorre através da via urinária, principalmente na forma de 7-hidroxycumarina (Finn *et al.*, 2002; Felter *et al.*, 2006).

Neste trabalho efetuaram-se testes de atividade de novas cumarinas sintéticas (tabela 1) cedidas pela Professora Doutora Ana Paula Assunção Esteves do departamento de química da Universidade do Minho. Não foram encontrados estudos sobre a sua atividade biológica.

**Tabela 1:** Estrutura química das cumarinas sintéticas usadas nos ensaios de atividade biológica.

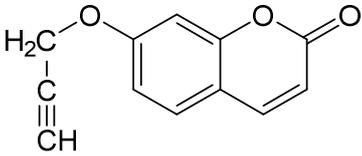
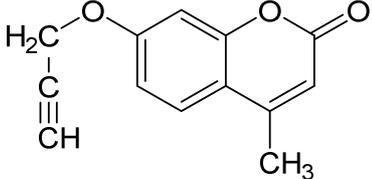
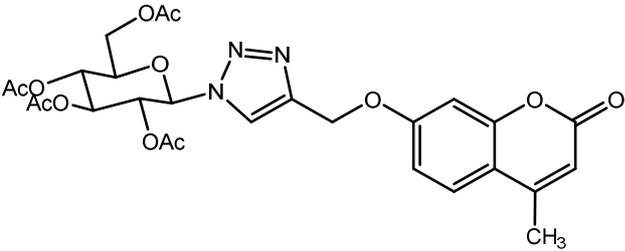
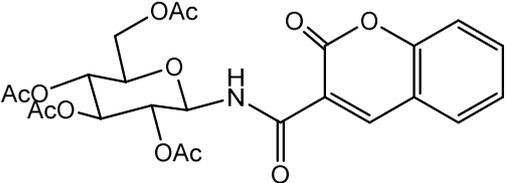
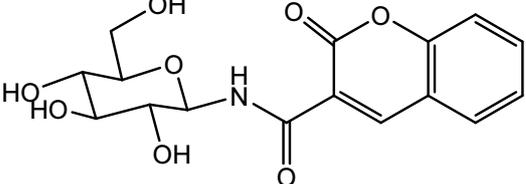
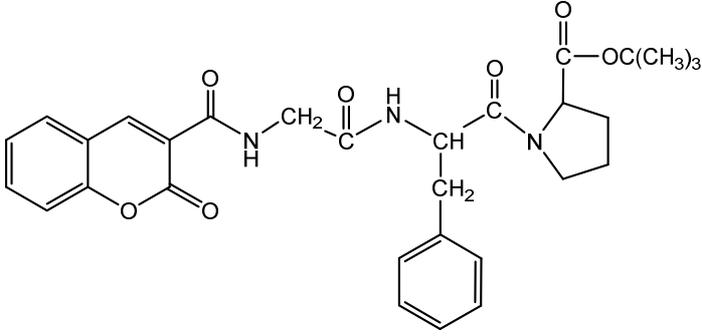
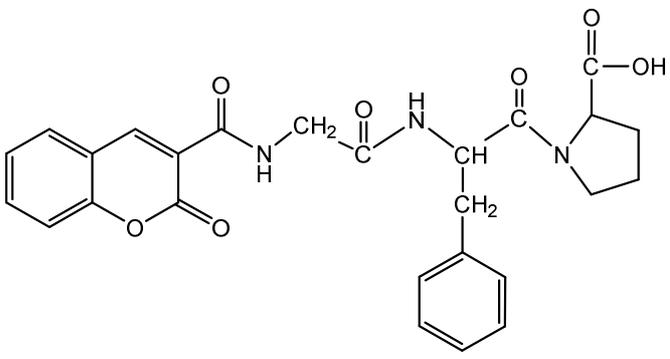
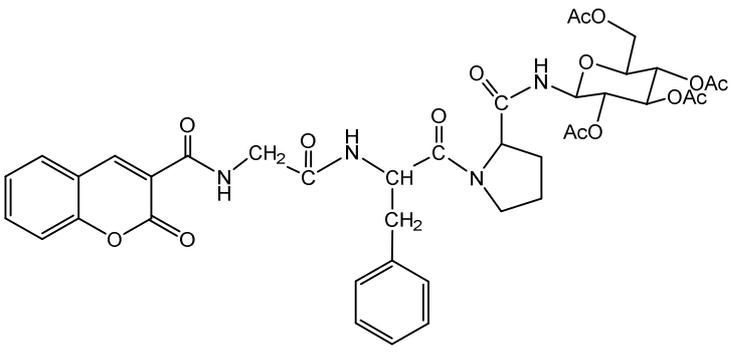
Composto	Estrutura
C-1	
C-2	
C-3	
C-4	
C-5	

Tabela 1 (continuação): Estrutura química das cumarinas sintéticas usadas nos ensaios de atividade biológica.

Composto	Estrutura
C-6	
C-7	
C-8	

## 1.8 Objetivos da tese

### 1.8.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo a avaliação da atividade antimicrobiana, antioxidante e de inibição da enzima acetilcolinesterase por parte de 8 compostos de síntese, 4 compostos naturais isolados de extratos vegetais e de 50 extratos obtidos com diferentes solventes a partir de 16 plantas (*Hymenodictyon floribundum*, *Parinari capensis*, *Tinnea antiscorbutica*, *Eragrostis viscosa*, *Xylopiya odoratissima*, *Peucedanum angolense*, *Boscia microphylla*, *Adenodolichos huillensis*, *Rhus kirkii*, *Croton gratissimus*, *Gymnosporia senegalensis*, *Solanecio mannii*, *Peltophorum africanum*, *Piliostigma thonningii*, *Phragmanthera glaucocarpa* e *Solanum incanum*) recolhidas em Angola. Os compostos de síntese estudados (tabela 1) são cumarinas e foram cedidos pela Professora Doutora Ana Paula Assunção Esteves do departamento de química da Universidade do Minho.

### 1.8.2 Objetivos específicos

- Preparar extratos metanólicos de *Piliostigma thonningii* e *Phragmanthera glaucocarpa* por maceração, e a partir destes obter os extratos de clorofórmio, hexano, acetato de etilo e aquoso.
- Determinar a concentração de compostos fenólicos totais em extratos de diferentes plantas usando o método de Folin-Ciocalteu e também a capacidade antioxidante dos diferentes extratos de cada planta e dos compostos de naturais isolados, usando os métodos de ABTS e DPPH.
- Efetuar uma avaliação da inibição da peroxidação lipídica por parte dos diferentes extratos de cada planta através da determinação do valor peróxido de amostras de óleo de girassol comercial submetidas durante 8 dias a condições de temperatura que promovem a oxidação.
- Avaliar a atividade antibacteriana dos diferentes extratos de cada planta e compostos de síntese para as estirpes de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922 e também a atividade antifúngica para a estirpe de *Candida albicans* ATCC 24433 através de ensaios de difusão em disco e de microdiluição.
- Determinar a inibição da enzima acetilcolinesterase por parte dos diferentes extratos de cada planta, compostos isolados e compostos de síntese usando dois métodos *in vitro*: o método de Ellman e o método bioautográfico de cromatografia em camada fina.

# Capítulo 2

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Equipamentos, reagentes e estirpes

#### 2.1.1 Equipamentos

Na execução do trabalho experimental, para além do material corrente de laboratório, foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Autoclave Uniclave 88 (A.J. Costa (Irmãos) Lda.) usada na esterilização dos materiais e meios utilizados nos ensaios da atividade antimicrobiana.
- Balança analítica (Kern), (Sartorius) e AE260 Delta Range (Mettler) usadas nas pesagens dos diferentes extratos e reagentes necessários.
- Banho termostático (Thermo Haake) usado para manter a temperatura de 37 °C no espectrofotómetro Shimadzu.
- Block heater (Stuart), usado no método do valor peróxido para provocar a oxidação térmica das amostras.
- Câmara de refrigeração (Dagard) usada na conservação de soluções preparadas e reagentes a 4 °C.
- Densitómetro (Biomérieux) utilizado para acertar a densidade ótica das suspensões de microrganismos a 0,5 MacFarland.
- Destilador de água Autostill Freshman (Jencons), usado na obtenção de água destilada para a preparação das soluções usadas nos ensaios.
- Destilador para destilação de solventes (Rotoquímica), utilizado na destilação do hexano comercial.
- Espectrofotómetro evolution 160 UV-vis (Thermo scientific) usado nas determinações espectrofotométricas para os métodos Folin-Ciocalteu, ABTS e DPPH.
- Espectrofotómetro Shimadzu UV-1700 (Pharmaspec) usado nas determinações espectrofotométricas para o método de Ellman.
- Estufa (Memmert) usada na secagem de reagentes para a preparação de soluções para o método de Folin-Ciocalteu e na incubação da enzima a 37 °C no método bioautográfico de cromatografia em camada fina.
- Estufa (Selecta) usada na incubação de placas para o crescimento dos diferentes microrganismos a 37 °C.
- Evaporador rotativo VV 2000 (Heidolph), utilizado na concentração dos diferentes extratos.

- Frigorífico (Candy) usado na conservação de reagentes e microrganismos usados nos ensaios da atividade antimicrobiana.
- Frigorífico Inspire Frost Free (Electrolux) usado na conservação de reagentes à temperatura de -20 °C.
- Lâmpada UV (Camag) utilizada na análise das placas de cromatografia em camada fina.
- Placa de aquecimento com agitação (Bunsen) usada na preparação das diferentes soluções e nas determinações do valor peróxido.
- Potenciômetro (Metrohm) usado nas medições do pH das soluções preparadas.
- Purificador de água MILLI-Q (MILLIPORE) usado na obtenção de água Milli-Q (0,054 µS/cm a 25 °C) para a preparação das soluções usadas nos ensaios.
- Secador de cabelo AHD110 (Lauson) usado na secagem das placas de cromatografia em camada fina.
- Vortex Mixer (Fisher scientific) e (Labnet) usados na homogeneização das soluções preparadas.

### 2.1.2 Reagentes

Na tabela 2 encontram-se os diversos produtos químicos, tal como o respetivo fabricante e grau de pureza, utilizados no decurso do trabalho experimental.

**Tabela 2:** Reagentes utilizados no trabalho experimental com o respetivo fabricante e grau de pureza.

Reagente	Fabricante	Pureza %
Acetato de etilo	Carlo Erba	99,9
Clorofórmio	Carlo Erba	99,0
Hexano	Valente e Ribeira Lda.	a
Metanol	Carlo Erba	99,9
Tolueno	Carlo Erba	99,5
Etanol	Manuel Vieira & C <sup>a</sup> (Irmão) Lda.	99,9
Acetona	Absolve	99,7
Cloreto de sódio	Merck	99,5
Sulfato de sódio anidro	Carlo Erba	99,6
Ácido gálgico monohidratado	Aldrich	98,0
Ácido 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6- sulfónico) (ABTS)	Sigma	98,0
Carbonato de sódio anidro	Fluka	98,0
Persulfato de potássio	Aldrich	99,0
Folin-Ciocalteu	Sigma	a
2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)	Sigma	a
Ácido acético	Riedel	99,8

a- dado não fornecido

**Tabela 2 (continuação):** Reagentes utilizados no trabalho experimental com o respectivo fabricante e grau de pureza.

<b>Reagente</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Pureza %</b>
Óleo de Girassol 3 ás	Fula	a
Óleo de soja	Olisoja	a
Tacrina	Sigma	99,0
Ácido ditionitrobenzóico	Sigma	98,0
<i>Fast Blue B salt</i>	Sigma	95,0
Eserina	Sigma	99,0
1-Naftol	Sigma	98,0
1-Naftil acetato	Sigma	98,0
Acetilcolinesterase tipo V-S de <i>Electrophorus electricus</i>	Sigma	a
Ácido fosfomolibdico	Sigma	99,9
Ácido ditionitrobenzóico	Sigma	98,0
Tiosulfato de sódio	Merck	97,0
Amido solúvel	Sigma	a
Trolox	Sigma	97,0
Tampão MOPS	Sigma	99,5
Meio RPMI 1640	Biochrom AG Instamed	a
Meio Sabouraud Dextrose	Oxoid	a
Meio Mueller-Hinton	Liofilchem	a
Meio Brain Heart Infusion	Liofilchem	a
Agar bacteriológico Europeo	Conda Pronadisa	a
Dimetilsulfóxido	Sigma	99,5
Azul-de-metileno	Himedia	a
Glucose	Sigma	99,5
Anfotericina B	Sigma	80,0
Ciprofloxacina	Sigma	98,0
Iodeto de acetiltiocolina	Sigma	98,0

a- dado não fornecido

### 2.1.3 Estirpes

Nos ensaios de microbiologia as estirpes de referência foram obtidas na *American Type Culture Collection* (ATCC). Os microrganismos testados foram os seguintes:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Bactéria gram-positiva).
- *Escherichia coli* ATCC 25922 (Bactéria gram-negativa).
- *Candida albicans* ATCC 24433 (levedura).

## 2.2 Técnicas experimentais

### 2.2.1 Recolha e manuseamento das Plantas

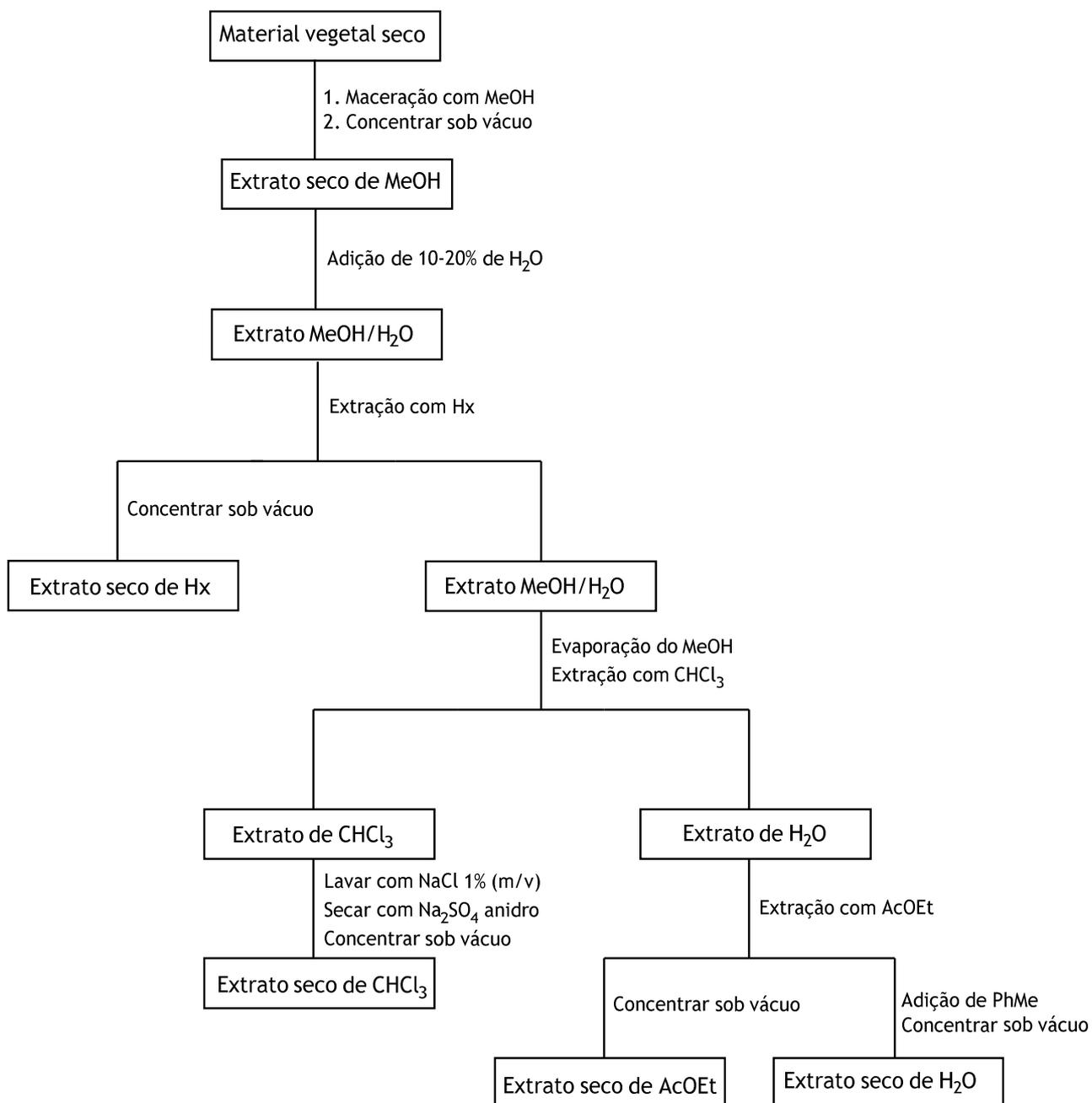
As plantas em estudo, *Hymenodictyon floribundum* (cascas), *Parinari capensis* (folhas), *Tinnea antiscorbutica* (parte aérea), *Eragrostis viscosa* (parte aérea), *Xylopia aromatissima* (folhas), *Peucedano angolense* (parte aérea), *Boscia microphylla* (folhas), *Adenodolichos huillensis* (raízes e folhas), *Rhus kirkii* (folhas), *Croton gratissimus* (parte aérea), *Gymnosporia senegalensis* (ramos), *Solanecio manni* (ramos), *Pelthospharum africana* (ramos) e *Solanum incanum* (fruto) foram recolhidas em Angola, na província de Huíla, e depositadas no herbário de Lubango. As plantas *Piliostigma thonningii* (raízes), *Phragmanthera glaucocarpa* (raízes) foram recolhidas em Angola, na província de Uíge, e depositadas no herbário de Luanda. Após recolha as plantas foram secas à sombra e à temperatura ambiente, com exceção do fruto da planta *Solanum incanum* que foi conservado em metanol logo após a colheita.

#### 2.2.1.1 Preparação dos extratos

Na preparação dos diferentes extratos das plantas *Piliostigma thonningii* e *Phragmanthera glaucocarpa*, inicialmente procedeu-se à trituração das raízes das diferentes plantas e de seguida usou-se o processo de maceração a frio em metanol para se obter os extratos metanólicos das raízes das plantas *Piliostigma thonningii* (617,67 g) e *Phragmanthera glaucocarpa* (548,78 g). A partir dos extratos metanólicos procedeu-se à obtenção dos extratos aquoso, clorofórmio, hexano e de acetato de etilo, de acordo com o esquema representado na figura 28.

Para as restantes plantas, com exceção da *Eragrostis viscosa*, os diferentes extratos foram obtidos em trabalhos anteriores usando-se o mesmo procedimento de extração e de obtenção dos diferentes extratos (Almeida, 2008; Borges, 2008; Gonçalves, 2008).

No caso particular da planta *E. viscosa*, os extratos usados foram obtidos por Sebastião (Sebastião, 2007). O extrato de acetato de etilo de *E. viscosa* foi obtido a quente usando a extração em soxhlet e o extrato de diclorometano foi obtido por maceração em diclorometano.



**Figura 28:** Esquema sobre o procedimento usado na preparação dos extratos de metanol (MeOH), hexano (Hx), clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>), acetato de etilo (AcOEt) e aquoso (H<sub>2</sub>O), das plantas *Piliostigma thonningii* e *Phragmanthera glaucocarpa*. PhMe- tolueno.

### 2.2.2 Compostos de síntese

Os compostos de síntese usados nos diferentes ensaios (tabela 1) são oito compostos com estrutura base de cumarina e foram obtidos por síntese química no Departamento de Química da Universidade do Minho. Os compostos apresentavam-se como pós brancos e foram utilizados sem serem submetidos a qualquer outro procedimento.

### 2.2.3 Soluções dos extratos, compostos isolados dos extratos e compostos de síntese

A partir dos extratos obtidos em 2.2.1.1, prepararam-se soluções (1 g/mL) em metanol ou dimetilsulfóxido, a partir das quais se prepararam por diluição outras soluções. Para os compostos de síntese procedeu-se de igual modo.

### 2.2.4 Atividade Antioxidante

Na avaliação da atividade antioxidante das diferentes amostras utilizaram-se três métodos *in vitro* sendo dois espectrofotométricos com os radicais ABTS<sup>••</sup> (Re *et al.*, 1999) e DPPH<sup>•</sup> (Villaño *et al.*, 2007); e o método iodométrico de determinação do valor peróxido de acordo com o método Cd 8-53 da *American Oil Chemists' Society (Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, 1997)*. Realizou-se ainda a determinação da concentração de compostos fenólicos totais nos diferentes extratos de cada planta, pelo método de Folin-Ciocalteu (Folin e Ciocalteu, 1927).

#### 2.2.4.1 Método ABTS

As soluções das diferentes amostras usadas nas determinações de atividade antioxidante pelo método ABTS foram preparadas no intervalo de concentrações de 0,025-50 mg/mL usando como solvente metanol.

##### 2.2.4.1.1 Medição da absorvência das amostras

A 5 mL de uma solução de ABTS (7 mM), adicionaram-se 88 µL de persulfato de potássio (140 mM). Esta solução foi depois mantida no escuro durante 12-16 h, após o que se diluiu com etanol 50 % (v/v) até se obter uma absorvência de cerca de 0,7 a 734 nm. A solução de ABTS<sup>••</sup> foi preparada antes de cada ensaio. Para as amostras, foram pipetados para cada célula 3 mL da solução de ABTS<sup>••</sup> e 30 µL da solução de amostra. Realizou-se também ao mesmo tempo, um ensaio para a solução de ABTS<sup>••</sup> com o objetivo de observar o comportamento do ABTS<sup>••</sup> ao longo de 15 min. Assim para a respectiva célula pipetou-se 3 mL da solução de ABTS<sup>••</sup> e 30 µL de metanol. Como branco para acertar o espectrofotómetro a zero de absorvência utilizou-se 3030 µL de metanol na célula.

Mediram-se as absorvências das células a 734 nm, durante 15 min (aos tempos de 1 min, 5 min, 10 min e 15 min), tendo-se realizado ensaios em quadruplicado para cada amostra. A percentagem de captação do ABTS<sup>••</sup> foi calculada através da equação 14. Como padrão foi usado uma solução de Trolox de concentração igual à das amostras.

$$\% \text{ de captação} = \frac{((\text{Absorvência ABTS}_{900s}) - (\text{Absorvência ABTS} + \text{Amostra}_{900s}))}{\text{Absorvência ABTS}_{900s}} \times 100 \quad (14)$$

onde (Absorvência  $ABTS_{900s}$ ) corresponde à absorvência do radical ABTS aos 15 min de reação na presença de 30  $\mu$ L metanol (controle), e (Absorvência ABTS + Amostra $_{900s}$ ) corresponde à absorvência do radical ABTS na presença de 30  $\mu$ L amostra dissolvida em metanol.

Usando o mesmo procedimento aplicado na determinação da percentagem de captação do radical  $ABTS^{\bullet+}$  calculou-se o  $EC_{50}$  das diferentes amostras. O  $EC_{50}$  para este método é definido como a concentração de amostra que reduz a absorvência do ABTS a 50 % do valor máximo inicial. Assim, para se calcular o  $EC_{50}$  das diferentes amostras efetuou-se a determinação da percentagem de captação do radical ABTS, em quadruplicado, para diferentes concentrações de amostra. Após a obtenção dos resultados traçou-se um gráfico de percentagem de inibição (%) em função da concentração de amostra (mg/mL) e uma vez obtida a equação do gráfico (tabela 1A) procedeu-se à determinação da concentração que apresenta cinquenta por cento de captação do  $ABTS^{\bullet+}$ . Os resultados do  $EC_{50}$  em mg/mL foram expressos como média  $\pm \sigma$  (gráfico 1).

#### **2.2.4.2 Método DPPH**

As soluções das diferentes amostras usadas nas determinações do método DPPH foram preparadas no intervalo de concentrações de 0,025-50 mg/mL usando como solvente metanol.

##### **2.2.4.2.1 Medição da absorvência das amostras**

Pipetou-se para cada célula 2700  $\mu$ L da solução de DPPH $^{\bullet}$  (40  $\mu$ M) e 200  $\mu$ L da solução de amostra. Realizou-se também em simultâneo com os ensaios das amostras, um ensaio para a solução de DPPH $^{\bullet}$ . Este teve como finalidade observar o comportamento do DPPH ao longo dos 15 min, assim para a respetiva célula pipetou-se 2700  $\mu$ L da solução de DPPH e 200  $\mu$ L de metanol. O branco consistiu em 2900  $\mu$ L de metanol.

Mediram-se as absorvências das células com as amostras, branco e a solução de DPPH $^{\bullet}$  a 515 nm, durante 15 min (aos tempos de 1 min, 5 min, 10 min e 15 min), tendo-se realizado ensaios em quadruplicado para cada amostra. A percentagem de captação do DPPH $^{\bullet}$  foi calculada usando a expressão dada pela equação 14, adaptada ao DPPH nas mesmas condições. Como padrão foi usado uma solução de Trolox de concentração igual à das amostras, e o  $EC_{50}$  das diferentes amostras para este método, definido como a concentração de amostra que reduz a absorvência do DPPH a 50 % do valor máximo inicial, foi calculado seguindo o mesmo método usado para o método ABTS, através das equações dos respetivos gráficos (tabela 2A) e os resultados de  $EC_{50}$  obtidos em mg/mL foram expressos como média  $\pm \sigma$  (gráfico 2).

##### **2.2.4.3 Valor peróxido (VP)**

As soluções das diferentes amostras usadas nas determinações do valor peróxido foram preparadas na concentração de 0,01 g/mL usando como solvente metanol.

### 2.2.4.3.1 Determinação do valor peróxido para as amostras

Inicialmente procedeu-se à determinação do número de dias necessários para obter um valor peróxido de cerca de 100 meq O<sub>2</sub>/g de amostra lipídica, para amostras de óleo alimentar de girassol e de soja adquiridos numa superfície comercial (gráfico 3).

Esta etapa teve como objetivo determinar qual seria o melhor modelo para se proceder à oxidação e determinação da capacidade de inibição da oxidação lipídica por parte das diferentes amostras. Assim num tubo de vidro com rolha adicionou-se 22 mL de óleo e de seguida colocou-se a oxidar a 80 °C, na ausência de luz. Durante o tempo de oxidação procedeu-se à determinação do valor peróxido das amostras aos dias 0; 2; 5; 6; 7 e 8. Em cada ensaio pesou-se 2,5 g da amostra de óleo oxidada para um balão de Erlenmeyer de 250 mL e em seguida adicionou-se 15 mL da solução de ácido acético/clorofórmio (2:3). Agitou-se para dissolver e adicionou-se 250 µL de solução saturada de iodeto de potássio. Voltou-se a agitar durante 1 minuto e depois adicionou-se 15 mL de água destilada e 250 µL de solução de amido 1 % (m/v). Procedeu-se depois à titulação com Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0,01 N até a cor desaparecer.

Uma vez determinado o modelo de ensaio (gráfico 3) e o número de dias (8 dias) procedeu-se à realização dos ensaios para as diferentes amostras. Assim para as amostras adicionou-se num tubo de vidro com rolha 20 mL de óleo de comercial e 2 mL da solução de amostra na concentração de 0,01 g/mL. Em seguida colocou-se a oxidar durante 8 dias a 80 °C e procedeu-se às determinações do valor peróxido aos dias 0; 2; 4; 6 e 8. A determinação do valor peróxido para as amostras foi realizada de igual modo como descrito para os óleos de girassol e soja. Ao mesmo tempo procedeu-se também à realização de um ensaio “controlo” que continha 20 mL de óleo e 2 mL de metanol. O valor peróxido (VP) ao oitavo dia de oxidação foi calculado de acordo com o método Cd 8-53 da AOCS, através da equação 15.

$$\text{Valor peróxido} = \frac{(VC_{\text{final}} - VA_{\text{final}} \times N \times 1000)}{(\text{g}) \text{ Amostra}} \quad (15)$$

onde N é a normalidade da solução de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> usada, VC<sub>final</sub> e VA<sub>final</sub> o volume da solução de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> gasto na titulação de controlo e amostra ao fim dos oito dias de oxidação, respetivamente. Os resultados obtidos foram realizados em triplicado para cada amostra analisada e foram expressos em meq O<sub>2</sub>/g de amostra como média ± σ (gráfico 4).

### 2.2.4.4 Método de Folin-Ciocalteu

As soluções das diferentes amostras vegetais foram preparadas na concentração de 0,05 mg/mL usando como solvente metanol.

#### 2.2.4.4.1 Curva de calibração

Pipetaram-se 0; 5; 10; 20; 40; 80; 120; 160; 200 e 400 µL de uma solução de ácido gálico (5 mg/mL) para diferentes balões e perpez-se o volume final de 10 mL com água destilada. De cada solução foram pipetados 400 µL para tubos de ensaio, aos quais se adicionou 2000 µL de

reagente de Folin-Ciocalteu (1/10). Passados 8 min adicionaram-se 1600 µL de carbonato de sódio 7,5% (m/v) a cada tubo de ensaio. Os tubos de ensaio foram agitados no vórtex após o que foram incubadas a 90 min à temperatura ambiente até a solução adquirir uma cor azul. De seguida leu-se a absorvência das células contendo as amostras a 765 nm, sendo o branco a solução que não continha ácido gálico. Para a curva de calibração (gráfico 5) determinou-se a absorvência de cada solução de ácido gálico em função da concentração da solução dada em mg G.A.E./mL. Os ensaios foram realizados em quadruplicado para cada solução de ácido gálico.

#### 2.2.4.4.2 Medição da absorvência das amostras

A medição da absorvência das amostras realizou-se de acordo procedimento descrito em 2.2.4.4.1, pipetando-se 400 µL da solução de amostra na concentração de 0,05 mg/mL e utilizando-se como branco uma solução que continha 400 µL de água destilada. Os ensaios foram realizados em quadruplicado para cada amostra, e os resultados obtidos através da curva de calibração foram expressos em mg (G.A.E.) /g de extrato ± σ (gráfico 6) de acordo com a equação 16.

$$\text{mg (G.A.E.) / g extrato} = \frac{\text{mg (G.A.E.) / mL amostra} \times V_{\text{ext.}} (\text{mL}) \times Fd}{M_{\text{ext.}} (\text{g})} \quad (16)$$

onde  $V_{\text{ext.}}$  corresponde ao volume da solução de extrato (0,4 mL),  $M_{\text{ext.}}$  a massa de extrato e  $Fd$  o factor de diluição da solução de extrato.

#### 2.2.5 Atividade antimicrobiana

Todo o material e meios necessários para a realização das experiências foram esterilizados na autoclave, com exceção do meio RPMI usado no crescimento de leveduras, que devido à sua constituição não pode ser autoclavado e foi filtrado perto do bico de *bunsen* em condições assépticas usando um filtro com uma membrana de 0,20 µm. As manipulações das diferentes amostras e estirpes foram realizadas perto do bico de *bunsen* de modo a garantir as condições de esterilidade. As concentrações usadas de extratos e compostos de síntese foram preparadas usando como solvente dimetilsulfóxido (DMSO) filtrado previamente perto do bico de *bunsen* com seringa e respetivo filtro com uma membrana de 0,20 µm.

Na determinação da atividade antimicrobiana das diferentes amostras usou-se ensaios de microdiluição segundo a norma CLSI M07-A9 (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2012) para a atividade antibacteriana e a norma CLSI M27-A3 (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2008) para a atividade antifúngica. Efetuou-se ainda uma avaliação qualitativa através de ensaios de difusão em disco segundo a norma NCCLS M44-A (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*, 2004) para a atividade antifúngica e a norma

NCCLS M2-A8 (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*, 2003) para a atividade antibacteriana.

Como controlo positivo nos ensaios de difusão em disco para a *C. albicans* foi usado o antifúngico comercial Anfotericina B na concentração 3,2 mg/mL em DMSO. Para a *E. coli* e *S. aureus* o antibiótico comercial Ciprofloxacina na concentração 1 mg/mL em H<sub>2</sub>O foi usado como controlo positivo.

### **2.2.5.1 Ensaios de microdiluição em meio líquido**

Nos ensaios de microdiluição em meio líquido as diferentes amostras foram dissolvidas, perto do bico de bunsen em condições assépticas, com DMSO estéril para uma concentração de 100 mg/mL. A partir desta solução preparou-se uma diluição usando meio RPMI para uma concentração final de 2 mg/mL com 2 % de DMSO para os ensaios da atividade antifúngica. O mesmo procedimento foi realizado para a atividade antibacteriana, usando meio Mueller-Hinton pH 7,4 em vez de meio RPMI.

#### **2.2.5.1.1 Atividade antifúngica**

Inicialmente procedeu-se à repicagem das leveduras em meio *Sabouraud Dextrose Agar* a pH 5,6 ± 0,2 e depois incubou-se durante 48 h na estufa a 37 °C. Após este tempo suspendeu-se as leveduras numa solução de NaCl 0,85 % (m/v) estéril e acertou-se a densidade ótica da suspensão a 0,5 unidades da escala de MacFarland usando-se o densitómetro. Uma vez ajustada a densidade ótica da suspensão celular realizou-se a uma diluição da suspensão na proporção de 1:50 usando meio RPMI. Da diluição 1:50 realizou-se em seguida uma diluição na proporção de 1:20 usando RPMI. Esta última diluição constituiu a solução de inóculo para os ensaios de microdiluição.

Na realização do teste de microdiluição em placas de 96 poços, reservou-se para cada amostra duas filas de poços. Assim foram adicionados 100 µL de meio RPMI a cada poço, com exceção do primeiro poço, onde apenas se adicionou 100 µL de solução de amostra na concentração de 2 mg/mL. Em seguida adicionou-se a partir do segundo poço de cada fila 100 µL de amostra e efetuaram-se diluições sucessivas nos restantes poços. Por fim adicionou-se a todos os poços de uma fila 100 µL de inóculo homogeneizado e na outra fila 100 µL de meio RPMI, esta segunda fila continha apenas diluições da amostra em meio, sem adição da estirpe testada, e serviu como branco (controlo negativo da amostra). Em todas as placas realizaram-se ensaios em quadruplicado do controlo negativo do meio e do controlo positivo dos inóculos. O volume final de todos os poços foi de 200 µL. Realizaram-se os ensaios em triplicado para cada amostra e estirpe testada e no final das pipetagens incubaram-se as placas a 37 °C durante 48 h. Após este período de tempo observaram-se os resultados e a concentração mínima inibitória foi determinada como sendo a menor concentração na qual ocorreu inibição de crescimento, expressa em mg/mL (tabela 4).

### 2.2.5.1.2 Atividade antibacteriana

Na realização do teste de microdiluição em placas de 96 poços para a atividade antibacteriana procedeu-se tal como descrito em 2.2.5.1.1, mas com algumas alterações. Assim procedeu-se à repicagem de cada estirpe de bactérias em meio *Brain Heart Infusion Agar* a pH  $7,4 \pm 0,2$  e colocou-se a incubar durante 24 h na estufa a 37 °C. Após este tempo suspendeu-se respetivamente cada estirpe de bactérias numa solução de NaCl 0,85 % (m/v) estéril e acertou-se a densidade ótica da cada suspensão a 0,5 unidades da escala de MacFarland. Uma vez ajustada a densidade ótica da cada suspensão celular, procedeu-se a uma diluição das respetivas estipes usando meio *Mueller-Hinton* pH 7,4 na proporção de 1:100. Esta diluição constituiu a solução de inóculo a ser usada nos ensaios de microdiluição. O volume de meio *Mueller-Hinton* e de amostra adicionado a cada poço foi de 50 µL. O volume final de todos os poços foi de 100 µL e o tempo de incubação das placas foi de 24 h a 37 °C. Os resultados foram realizados em triplicado para cada amostra e estirpe testada e expressos como concentração mínima inibitória em mg/mL (tabela 4).

### 2.2.5.2 Ensaios de difusão em disco

Nos ensaios de difusão em disco as diferentes amostras foram dissolvidas, perto do bico de bunsen em condições assépticas, com DMSO estéril para uma concentração de 100 mg/mL.

#### 2.2.5.2.1 Atividade antifúngica

A repicagem das leveduras, incubação e preparação da suspensão celular foi realizada de acordo com 2.2.5.1.1. De seguida mergulhou-se uma zaragatoa estéril na suspensão e girou-se várias vezes. Retirou-se o excesso de inóculo apertando a zaragatoa firmemente contra a parede interna do tubo, acima do nível do líquido. Em seguida inoculou-se a superfície seca de uma placa de agar *Mueller-Hinton* com 2 % de glucose e 0,5 µg/mL de azul-de-metileno passando a zaragatoa em toda a superfície estéril do agar, girando a placa aproximadamente 60° de cada vez, de modo a obter-se uma distribuição uniforme do inóculo. No final passou-se a zaragatoa na margem da placa de agar e antes da colocação dos discos esperou-se aproximadamente 5 minutos para que houvesse uma diminuição de humidade na placa.

Previamente impregnou-se discos com 20 µL de cada solução de amostra (2 mg/disco). Como controlo positivo usou-se discos impregnados com 20 µL de solução de Anfotericina B para uma concentração de 0,064 mg/disco e como controlo negativo usou-se discos com 20 µL de dimetilsulfóxido (20 µL/disco). Os discos foram depois colocados na superfície da placa de agar semeada pressionando cada disco de encontro à placa de maneira a assegurar um contato completo com a superfície de agar. A distribuição dos diferentes discos efetuou-se de maneira a que a distância entre cada um fosse uniforme (quatro discos por placa). Por fim inverteram-se as placas e colocaram-se a incubar na estufa a 37 °C durante 48 h. Após este período de tempo mediram-se os respetivos halos de inibição.

O halo de inibição foi considerado a área sem crescimento detetável a olho nu, medida em milímetros (mm) (tabela 5). Os ensaios foram realizados em triplicado para cada amostra, em relação a cada estirpe testada.

#### **2.2.5.2.2 Atividade antibacteriana**

Na realização dos ensaios de difusão em disco para a atividade antibacteriana seguiu-se o mesmo procedimento descrito em 2.2.5.2.1, mas com algumas alterações. A repicagem das bactérias, incubação e preparação da suspensão celular foi realizada de acordo com 2.2.5.1.2. A superfície de uma placa de agar *Mueller-Hinton* foi depois inoculada passando a zaragatoa em toda a superfície estéril do agar. Como controlo positivo usaram-se discos contendo 20 µL de solução de Ciprofloxacina para uma concentração de 0,02 mg/disco. Após a distribuição dos diferentes discos, as placas foram invertidas e colocadas na estufa a 37 °C durante 24 h. Após este período de tempo os respetivos halos de inibição foram medidos em milímetros (tabela 5), considerando a área sem crescimento detetável a olho nu. Os ensaios foram realizados em triplicado para cada amostra, em relação a cada estirpe testada.

#### **2.2.6 Inibição da acetilcolinesterase (AChE)**

Na avaliação da inibição da enzima acetilcolinesterase pelas diferentes amostras usou-se dois métodos *in vitro*: o método de Ellman (Ellman *et al.*, 1961) e o método bioautográfico de cromatografia em camada fina (Marston *et al.*, 2002).

Uma vez que as diferentes amostras apresentam solubilidades diferentes, os ensaios de inibição da acetilcolinesterase foram realizados usando como solventes o metanol e o dimetilsulfóxido (DMSO). Os ensaios com estes dois solventes permitiram também avaliar o efeito do metanol e do DMSO na determinação da inibição da acetilcolinesterase.

##### **2.2.6.1 Inibição da AChE pelo método de Ellman**

O método de Ellman tem por base a reação da enzima acetilcolinesterase com o substrato iodeto de acetiltiocolina (ATCI) e a sua posterior conversão em tiocolina. A tiocolina reage com o ácido ditionitrobenzóico (DTNB) levando à formação de um anião de cor amarela (ácido nitrobenzóico), o qual absorve radiação a 412 nm.

##### **2.2.6.1.1 Determinação dos parâmetros cinéticos $K_m$ e $V_{max}$ da AChE**

Os parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{max}$  da AChE (tabela 6) foram determinados através das velocidades de hidrólise de soluções de substrato, na presença de 1 % de DMSO ou metanol. Em células de vidro de 500 µL adicionou-se 421 µL de uma solução de reagente de Ellman de concentração 0,15 mM (em tampão fosfato 0,1 M e pH 7,4), 37 µL de uma solução de acetilcolinesterase de atividade 0,037 U/mL (preparada com uma solução tampão fosfato de concentração 0,1 M e pH 7,4 contendo BSA 1% (m/v)) e 5 µL de DMSO ou metanol.

De seguida deixou-se incubar durante 5 minutos a 37 °C. Após a incubação iniciou-se a reação enzimática por adição de 37 µL de uma solução de ATCI preparada em água Milli-Q para um intervalo de concentrações entre 50-400 mg/mL quando o solvente foi o DMSO e 100-450 mg/mL quando o solvente foi o metanol. O volume total nas células foi de 500 µL e após a adição da solução de ATCI registou-se o aumento da absorvência a 412 nm a 37 °C durante 180 segundos. O ensaio em branco consistiu em pipetar 37 µL de tampão fosfato 0,1 M e pH 7,4. As velocidades de reação foram determinadas pelo declive da reta de absorvência entre os 0-180 segundos.

Os parâmetros cinéticos foram depois determinados através da equação obtida pela representação gráfica do duplo recíproco de Lineweaver-Burk (Lineweaver e Burk, 1934) (gráficos 7 e 8). Os ensaios foram realizados em quadruplicado para cada solução de substrato.

### 2.2.6.1.2 Medição da absorvência das soluções de AChE com as amostras

A medição da absorvência das soluções de AChE com as amostras foi realizada de acordo com o mesmo procedimento descrito em 2.2.6.1.1, mas com algumas alterações. As soluções de amostra foram preparadas em DMSO ou metanol com concentrações entre 0,01 mg/mL e 50 mg/mL e a reação enzimática iniciou-se por adição de 37 µL de uma solução de ATCI preparada em água Milli-Q para uma concentração final igual ao valor de  $K_m$  da AChE ( $K_m=0,19$  mM para o metanol e  $K_m=0,07$  mM para o DMSO) determinado previamente de acordo como o ponto 2.2.6.1.1.

O volume total nas células foi de 500 µL e após à adição da solução de ATCI registou-se o aumento da absorvência a 412 nm a 37 °C durante 180 segundos. O ensaio em branco consistiu em pipetar 5 µL de DMSO ou metanol em vez da solução de amostra.

Uma solução de tacrina em DMSO ou metanol de concentração igual à solução de amostra foi utilizada como controlo positivo. A percentagem de inibição enzimática foi calculada usando a equação 17.

$$\% \text{ Inibição} = \frac{VB_{180s} - VA_{180s}}{VB_{180s}} \times 100 \quad (17)$$

onde  $VB_{180s}$  e  $VA_{180s}$ , correspondem à velocidade da reação enzimática do ensaio em branco e da amostra aos 180 segundos, respectivamente. Os ensaios foram realizados em quadruplicado.

Através da percentagem de inibição da AChE calculou-se o  $IC_{50}$  para as diferentes amostras. Após a obtenção da percentagem de inibição traçou-se um gráfico de percentagem de inibição (%) em função da concentração de amostra (mg/mL), e uma vez obtida a equação do gráfico (tabelas 3A e 4A) procedeu-se à determinação da concentração que apresenta cinquenta por cento de inibição da atividade da AChE. Os resultados do  $IC_{50}$  obtidos em mg/mL foram depois expressos como media  $\pm \sigma$  (gráficos 9 e 10).

### 2.2.6.2 Inibição da AChE pelo método bioautográfico de cromatografia em camada fina

A inibição da AChE por parte das diferentes amostras usando o método bioautográfico de cromatografia em camada fina foi realizado de acordo com Marston *et al.* (2002) com algumas modificações.

Uma solução de enzima acetilcolinesterase 30 U/mL foi preparada usando uma solução de BSA 1 mg/mL preparada com tampão Tris-ácido clorídrico de concentração 0,05 M e pH 7,8. Diariamente preparou-se por diluição com tampão Tris-ácido clorídrico de concentração 0,05 M e pH 7,8 uma solução de trabalho de AChE com uma atividade de 6,7 U/mL. Preparou-se também diariamente uma solução do composto acetato de 1-naftilo em etanol com uma concentração de 2,5 mg/mL e a solução de *Fast Blue B salt* em água Milli-Q de igual concentração à do acetato de 1-naftilo.

Aplicou-se 15 µL das diferentes amostras (5 mg/mL) numa placa de cromatografia em camada fina (placa cromatográfica de sílica gel 60F<sub>254</sub>) e eluiu-se com a mistura de solventes testada previamente como sendo a que para cada caso permitia a eluição da amostra. Após a eluição das amostras as placas foram secas na totalidade. De seguida pulverizou-se as placas cromatográficas com a solução de enzima e colocaram-se num recipiente fechado contendo um pouco de água, mas sem contactarem com a água. O recipiente foi depois incubado a 37 °C durante 20 min numa estufa e após a incubação as placas foram retiradas do recipiente e secas. Em seguida, as placas foram pulverizadas com a solução de acetato de 1-naftilo e secas. Após secagem pulverizou-se novamente a placa com a solução de *Fast Blue B salt*. O aparecimento de manchas brancas contrastando com o fundo púrpura indicou inibição da enzima acetilcolinesterase (anexo 1 figuras 1A<sub>1</sub>-8A<sub>1</sub>). Eserina na concentração entre 0,001-0,100 mg/mL foi usada como padrão (figura 29). Os ensaios foram realizados em triplicado para cada amostra testada.

#### 2.2.6.2.1 Teste de falsos positivos devido à inibição da reação do α-naftol com o *Fast Blue B salt*

O produto formado pela reação entre a AChE e o acetato 1-naftil é o α-naftol (Marston *et al.* 2002). Este composto reage com o *Fast Blue B salt* produzindo-se um composto de cor púrpura. Caso ocorra inibição da reação enzimática pelos compostos presentes nos extratos, ou por parte dos compostos de síntese, a reação do α-naftol com o reagente *Fast Blue B salt* não ocorre e deste modo aparecem manchas brancas na placa. No entanto, o resultado da inibição da reação entre o α-naftol e o reagente *Fast Blue B salt* pode não ser devido aos extratos ou compostos de síntese usados e neste caso o surgimento de manchas brancas trata-se assim de um falso positivo. Deste modo para se garantir que o surgimento de manchas brancas num fundo púrpura não seria um falso positivo mas sim o resultado da inibição da enzima pelas diferentes amostras usadas procedeu-se à realização de ensaios para a deteção de falsos positivos de acordo com Yang *et al.* (2009).

Preparou-se uma solução de 1-naftol de concentração 1,5 mg/mL tendo como solvente uma mistura de etanol (20 mL) e água Milli-Q (30 mL). De seguida procedeu-se à aplicação das amostras nas placas cromatográficas e à respetiva eluição com a mistura de solventes testada previamente. Após a eluição as placas foram secas na totalidade. Seguidamente procedeu-se à pulverização das placas com a solução de 1-naftol e à sua secagem. Por fim, as placas foram pulverizadas com a solução de *Fast Blue B salt*. O surgimento de manchas brancas indicou que o resultado obtido era um falso positivo (anexo 1 figuras 1A<sub>1</sub>-8A<sub>1</sub>).



# Capítulo 3

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1 Extratos de plantas, compostos isolados dos extratos e compostos de síntese

Na tabela 3 encontram-se os diferentes extratos de plantas, compostos isolados e compostos de síntese utilizados nos ensaios de bioatividade. Para cada amostra de extrato, composto de síntese e composto isolado foi atribuída uma codificação numérica.

Os compostos Vincosamida, ácido 3-O-B-D-fucopiranosilquinóvico e ácido 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosilquinóvico, isolados e purificados a partir do extrato de acetato de etilo de *P. thonningii*, e o composto Malanósido A, isolado e purificado a partir do extrato de acetato de etilo de *P. africanum*, foram cedidos pela mestra Laura Isabel Nave Canelo do departamento de química da Universidade da Beira Interior.

**Tabela 3:** Referências numéricas das diferentes amostras usadas nos ensaios de bioatividade.

Planta	Extrato	Número
<i>Adenodolichos huillensis</i>	H <sub>2</sub> O (folhas)	1
	CHCl <sub>3</sub> (folhas)	2
	CHCl <sub>3</sub> (raízes)	3
	MeOH (folhas)	4
	Hex (folhas)	5
<i>Hymenodictyon floribundum</i>	MeOH (cascas)	6
	H <sub>2</sub> O (cascas)	7
	CHCl <sub>3</sub> (cascas)	8
	Hex (cascas)	9
<i>Tinnea antiscorbutica</i>	MeOH (parte aérea)	10
	H <sub>2</sub> O (parte aérea)	11
<i>Peucedano angolense</i>	MeOH (parte aérea)	12
	H <sub>2</sub> O (parte aérea)	13
	CHCl <sub>3</sub> (parte aérea)	14
<i>Parinari capensis</i>	Hex (folhas)	15
	MeOH (folhas)	16
	H <sub>2</sub> O (folhas)	17
	CHCl <sub>3</sub> (folhas)	18
<i>Rhus kirkii</i>	MeOH (folhas)	19
<i>Xylopiya odoratissima</i>	PhMe (folhas)	20
<i>Eragrostis viscosa</i>	AcOEt (parte aérea)	21
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (parte aérea)	22

**Tabela 3** (continuação): Referências numéricas das diferentes amostras usadas nos ensaios de bioatividade.

<b>Planta</b>	<b>Extrato</b>	<b>Número</b>
<i>Boscia microphylla</i>	PhMe (folhas)	23
	H <sub>2</sub> O (folhas)	24
	AcOEt (folhas)	25
<i>Gymnosporia senegalensis</i>	MeOH (ramos)	26
<i>Solanecio mannii</i>	MeOH (ramos)	27
<i>Croton gratissimus</i>	Hex (parte aérea)	28
	MeOH (parte aérea)	29
	AcOEt (parte aérea)	30
	CHCl <sub>3</sub> (parte aérea)	31
	H <sub>2</sub> O (parte aérea)	32
<i>Solanum incanum</i>	MeOH (fruto)	33
	AcOEt (fruto)	34
	H <sub>2</sub> O (fruto)	35
<i>Peltophorum africanum</i>	Hex (ramos)	36
	MeOH (ramos)	37
	AcOEt (ramos)	38
	CHCl <sub>3</sub> (ramos)	39
	H <sub>2</sub> O (ramos)	40
<i>Phragmanthera glaucocarpa</i>	Hex (raízes)	41
	MeOH (raízes)	42
	AcOEt (raízes)	43
	CHCl <sub>3</sub> (raízes)	44
	H <sub>2</sub> O (raízes)	45
<i>Piliostigma thonningii</i>	Hex (raízes)	46
	MeOH (raízes)	47
	AcOEt (raízes)	48
	CHCl <sub>3</sub> (raízes)	49
	H <sub>2</sub> O (raízes)	50
<b>Composto isolado</b>		<b>Número</b>
Vincosamida		51
Ácido 3-O-β-D-fucopiranosilquinóvico		52
Ácido 3-O-α-L-ramnopiranosilquinóvico		53
Malanósido A		54
<b>Composto de síntese</b>		<b>Número</b>
C-1		55
C-2		56
C-3		57
C-4		58
C-5		59
C-6		60
C-7		61
C-8		62

## 3.2 Atividade antioxidante

### 3.2.1 Método ABTS

Este método tem por base o facto de o  $ABTS^{•+}$ , na presença de substâncias hidrofílicas ou lipofílicas capazes de cederem eletrões ou átomos de hidrogénio, ser reduzido à sua forma original ABTS (Miller *et al.*, 1993; Luo *et al.*, 2011<sup>a</sup>).

A capacidade que uma amostra tem para converter o  $ABTS^{•+}$  em ABTS é dada pelo valor de  $EC_{50}$ . Este é definido como a concentração de amostra necessária para captar 50 % do  $ABTS^{•+}$  e converte-lo em ABTS. Quanto menor for o valor de  $EC_{50}$ , maior é a capacidade antioxidante da amostra (Villaño *et al.*, 2007).

Durante a realização dos ensaios não foi possível determinar o  $EC_{50}$  para as amostras número 3 (extrato de clorofórmio das raízes de *A. huillensis*), 8 (extrato de clorofórmio das cascas de *H. floribundum*), 9 (extrato de hexano das cascas de *H. floribundum*), 14 (extrato de clorofórmio da parte aérea de *P. angolense*) e 22 (extrato de diclorometano da parte aérea de *E. viscosa*) (tabela 3) devido à ausência de solubilidade no meio utilizado no método, para as amostras número 53 (ácido 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosilquinóvico), 54 (Malanósido A), 55 (cumarina sintética 1), 56 (cumarina sintética 2), 57 (cumarina sintética 3), 58 (cumarina sintética 4), 59 (cumarina sintética 5), 60 (cumarina sintética 6), 61 (cumarina sintética 7) e 62 (cumarina sintética 8) (tabela 3) devido à indisponibilidade de amostra. Os ensaios para as diferentes amostras foram realizados em quadruplicado e o  $EC_{50}$  em mg/mL foi apresentado como média  $\pm \sigma$ .

Inicialmente procedeu-se à determinação da percentagem de captação do  $ABTS^{•+}$  de acordo com 2.2.4.1.1, para diferentes concentrações de amostra. De seguida, para se avaliar qual ou quais as amostras com melhor capacidade em captar o  $ABTS^{•+}$ , determinou-se o valor de  $EC_{50}$  das diferentes amostras (gráfico 1) através da equação obtida pela construção do gráfico de percentagem de captação do  $ABTS^{•+}$  (%) em função da concentração de amostra (mg/mL) (anexo 2 tabela 1A). Através do coeficiente de determinação obtido para cada equação (anexo 2 tabela 1A) analisou-se a relação entre a concentração de amostra e a percentagem de captação do  $ABTS^{•+}$ , tendo-se obtido uma relação linear entre as variáveis X e Y estatisticamente significativa para 95% de probabilidade (Gonçalves,2001).

Para o composto usado como referência (Trolox) o valor de  $EC_{50}$  encontrado na literatura em relação ao radical ABTS varia entre 2,00  $\mu$ g/mL (Li *et al.*, 2012) e 0,03 mg/mL (Ko *et al.*, 2009). O valor de  $EC_{50}$  obtido para o Trolox nos ensaios para o método de ABTS foi de 2,78  $\pm$  0,10  $\mu$ g/mL (gráfico 1).

Considerando o valor de  $EC_{50}$  obtido para o Trolox em relação ao  $ABTS^{•+}$ , é possível observar através do gráfico 1 que os melhores resultados de  $EC_{50}$  em termos de captação do  $ABTS^{•+}$  foram obtidos para as amostras número 43 (extrato de acetato de etilo das raízes de *P. glaucocarpa*) com um valor de  $EC_{50}$  de 1,06  $\pm$  0,29 mg/mL, 16 (extrato metanólico das folhas de *P. capensis*) com um valor de  $EC_{50}$  de 0,78  $\pm$  0,03 mg/mL, 6 (extrato metanólico das cascas

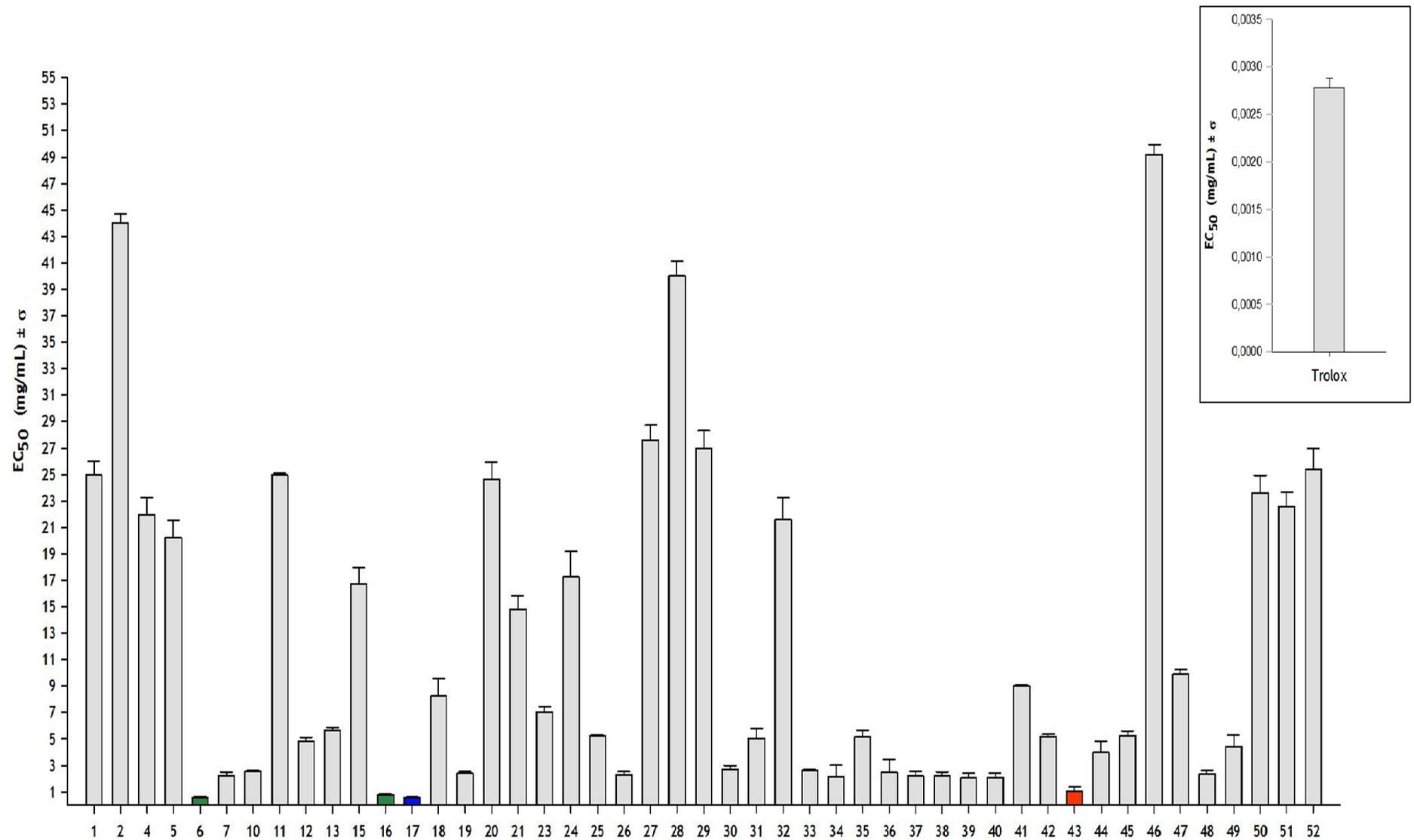
de *H. floribundum*) com um valor de EC<sub>50</sub> de 0,60 ± 0,03 mg/mL e 17 (extrato aquoso das folhas de *P. capensis*) com um valor de EC<sub>50</sub> de 0,57 ± 0,03 mg/mL. Destes resultados é possível observar-se que o valor de EC<sub>50</sub> mais baixo foi obtido para a amostra número 17, o que significa que esta amostra possui, em relação às restantes amostras, a melhor capacidade em captar o ABTS<sup>•+</sup> e converte-lo em ABTS, ou seja, o conjunto dos compostos presentes nesta amostra apresentam uma boa reatividade com o radical ABTS.

Como as amostras número 6, 16, 17 e 43 são constituídas por misturas de compostos (anexo 1 figuras 3A<sub>1</sub>, 4 A<sub>1</sub> e 7A<sub>1</sub>), a realização de novos ensaios após a separação, caracterização e identificação dos compostos isolados destas amostras poderá originar melhores resultados em termos de reatividade dos compostos isolados com o ABTS<sup>•+</sup>. A sinergia entre as moléculas presentes nos extratos vegetais pode contribuir para a capacidade antioxidante do extrato (Fallarero *et al.*, 2008; Sharififar *et al.*, 2012).

De facto em relação à amostra número 17 foram já isolados e identificados os compostos fitol, β-sitosterol e compostos do tipo kaurano, amirina (Saraiva, 2004). Assim a realização de novos ensaios com os compostos isolados da amostra número 17 permite avaliar qual, ou quais, os compostos responsáveis pela reatividade com o ABTS<sup>•+</sup>, ou então se a reatividade da amostra número 17 é devido à sinergia entre os diferentes compostos que possui.

De facto a sinergia entre compostos foi observada em particular para a amostra número 48 (extrato de acetato de etilo das raízes de *P. thonningii*), de onde foi isolada a Vincosamida (amostra número 51) e o ácido 3-O-B-D-fucopiranosilquinóico (amostra número 52). Analisando os resultados de EC<sub>50</sub> é possível observar que as amostras isoladas possuem um EC<sub>50</sub> superior à da amostra número 48, o que significa que o resultado obtido para a amostra número 48 pode ser explicado pela sinergia entre os compostos presentes nesta amostra.

As amostras número 7 (extrato aquoso das cascas de *H. floribundum*), 10 (extrato metanólico da parte aérea de *T. antiscorbutica*), 19 (extrato metanólico das folhas de *R. kirkii*), 26 (extrato metanólico dos ramos de *G. senegalensis*), 30 (extrato de acetato de etilo da parte aérea de *C. gratissimus*), 31 (extrato de clorofórmio da parte aérea de *C. gratissimus*), 33 (extrato metanólico do fruto de *S. incanum*), 34 (extrato de acetato de etilo do fruto de *S. incanum*), 36 (extrato de hexano dos ramos de *P. africanum*), 37 (extrato metanólico dos ramos de *P. africanum*), 38 (extrato de acetato de etilo dos ramos de *P. africanum*), 39 (extrato de clorofórmio dos ramos de *P. africanum*), 40 (extrato aquoso dos ramos de *P. africanum*) e 48 (extrato de acetato de etilo das raízes de *P. thonningii*), apesar de apresentarem valores de EC<sub>50</sub> mais altos (entre 1,94-2,69 mg/mL), relativamente ao Trolox e às amostras com melhores resultados, também apresentaram alguma capacidade em captar o ABTS<sup>•+</sup> o que significa que estas amostras possuem na sua composição compostos que reagem com o radical ABTS. Para estas amostras a interação entre os diferentes compostos presentes na sua constituição pode ser a razão pela qual as diferentes amostras apresentam baixa reatividade com o radical ABTS. As restantes amostras apresentaram pouca reatividade com o ABTS<sup>•+</sup>, uma vez que, os valores de EC<sub>50</sub> obtidos são consideravelmente altos em comparação com o Trolox e com as amostras referidas anteriormente.



**Gráfico 1:** EC<sub>50</sub> das diferentes amostras e do Trolox (gráfico destacado) para o método de ABTS. Os números no eixo das abcissas correspondem a amostras identificadas na tabela 3. As barras coloridas correspondem às amostras com melhores resultados em termos de EC<sub>50</sub> em relação ao ABTS\*. A verde os extratos metanólicos: 6 - *H. floribundum* (cascas); 16 - *P. capensis* (folhas). A azul o extrato aquoso: 17 - *P. capensis* (folhas). A vermelho o extrato de acetato de etilo: 43 - *P. glaucocarpa* (raízes). (n= 4; média ± σ; P< 0,05).

### 3.2.2 Método DPPH

Neste método o DPPH<sup>•</sup> na presença de substâncias capazes de ceder átomos de hidrogénio ou elétrons é convertido na forma reduzida DPPH-H e o EC<sub>50</sub> neste caso permite avaliar a capacidade que uma amostra tem para ceder átomos de hidrogénio ou elétrons ao DPPH<sup>•</sup> (Villaño *et al.*, 2007).

Durante a realização dos ensaios não foi possível determinar o EC<sub>50</sub> para as amostras número 3 (extrato de clorofórmio das raízes de *A. huillensis*), 8 (extrato de clorofórmio das cascas de *H. floribundum*), 9 (extrato de hexano das cascas de *H. floribundum*), 14 (extrato de clorofórmio da parte aérea de *P. angolense*) e 22 (extrato de diclorometano da parte aérea de *E. viscosa*) (tabela 3) devido à ausência de solubilidade no meio utilizado no método, e para as amostras número 55 (cumarina sintética 1), 56 (cumarina sintética 2), 57 (cumarina sintética 3), 58 (cumarina sintética 4), 59 (cumarina sintética 5), 60 (cumarina sintética 6), 61 (cumarina sintética 7) e 62 (cumarina sintética 8) (tabela 3) devido à indisponibilidade de amostra. Os ensaios para as diferentes amostras foram realizados em quadruplicado e o EC<sub>50</sub> em mg/mL foi apresentado como média ±  $\sigma$ .

Inicialmente procedeu-se à determinação da percentagem de captação do DPPH<sup>•</sup> de acordo com 2.2.4.2.1, para diferentes concentrações de amostra. De seguida, para se avaliar qual ou quais as amostras com melhor capacidade em captar o DPPH<sup>•</sup>, determinou-se o valor de EC<sub>50</sub> das diferentes amostras (gráfico 2) através da equação obtida pela construção do gráfico de percentagem de redução do DPPH<sup>•</sup> (%) em função da concentração de amostra (mg/mL) (anexo 2 tabela 2A). Através do coeficiente de determinação obtido para cada equação (anexo 2 tabela 2A) analisou-se a relação entre a concentração de amostra e a percentagem de captação do DPPH<sup>•</sup>, tendo-se obtido uma relação linear entre as variáveis X e Y estatisticamente significativa para 95% de probabilidade (Gonçalves, 2001).

O Trolox foi usado como composto de referência, e os valores de EC<sub>50</sub> encontrados na literatura para o Trolox em relação ao radical DPPH variam entre 5,00 µg/mL (Li *et al.*, 2012) e 6,00 µg/mL (Li *et al.*, 2009). O valor de EC<sub>50</sub> obtido para o Trolox nos ensaios para o método de DPPH foi de 5,04 ± 0,10 µg/mL (gráfico 2).

Considerando o valor de EC<sub>50</sub> obtido para o Trolox em relação ao radical DPPH, através do gráfico 2 é possível observar que os melhores resultados, em termos de captação do radical DPPH, foram observados para as amostras número 19 (extrato metanólico das folhas de *R. kirkii*) com um valor de EC<sub>50</sub> de 0,19 ± 0,06 mg/mL, 36 (extrato de hexano dos ramos de *P. africanum*) com um valor de EC<sub>50</sub> de 0,10 ± 0,01 mg/mL, 42 (extrato metanólico das raízes de *P. glaucocarpa*) com um valor de EC<sub>50</sub> de 0,10 ± 0,02 mg/mL e 45 (extrato aquoso das raízes de *P. glaucocarpa*) com um valor de EC<sub>50</sub> de 0,10 ± 0,01 mg/mL. Os resultados obtidos para as amostras número 19, 36, 42 e 45 sugerem que estas possuem na sua composição compostos com uma boa reatividade em relação ao radical DPPH, ou seja, melhor capacidade em captar o radical DPPH e converte-lo em DPPH-H. Como as amostras para as quais se registou melhores resultados em termos de captação do DPPH<sup>•</sup> são constituídas por misturas de compostos (anexo 1 figuras 1A<sub>1</sub> e 8A<sub>1</sub>), a realização de novos ensaios para o radical DPPH com

os compostos isolados das diferentes amostras permite avaliar qual ou quais os compostos responsáveis pela reatividade das diferentes amostras em relação ao DPPH<sup>\*</sup>.

Em particular a amostra número 54 (Malanósido A) foi isolada da amostra número 38 (extrato de acetato de etilo dos ramos de *P. africanum*), no entanto o EC<sub>50</sub> da amostra número 38 é mais baixo do que o composto isolado, apesar de ambas as amostras apresentarem bons resultados em termos de captação do radical DPPH. Estes resultados sugerem assim que para a amostra número 38 a reatividade como o DPPH<sup>\*</sup> é resultado da sinergia entre a amostra número 54 e os outros compostos presentes na sua constituição.

O mesmo pode ser observado em relação às amostras número 51 (vincosamida), 52 (ácido 3-O-B-D-fucopiranosilquinóvico) e 53 (ácido 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosilquinóvico) que foram isoladas da amostra número 48 (extrato de acetato de etilo das raízes de *P. thonningii*), os compostos isolados apresentaram um valor de EC<sub>50</sub> superior em relação ao valor da amostra de onde foram isolados, sugerindo assim que para a amostra número 48 a reatividade com o radical DPPH é devido à sinergia entre os compostos número 51, 52 e 53, em particular do composto número 51 que destes três foi o que apresentou um EC<sub>50</sub> mais baixo, o que sugere que este composto é responsável em grande parte pela boa reatividade da amostra número 48 em relação ao radical DPPH.

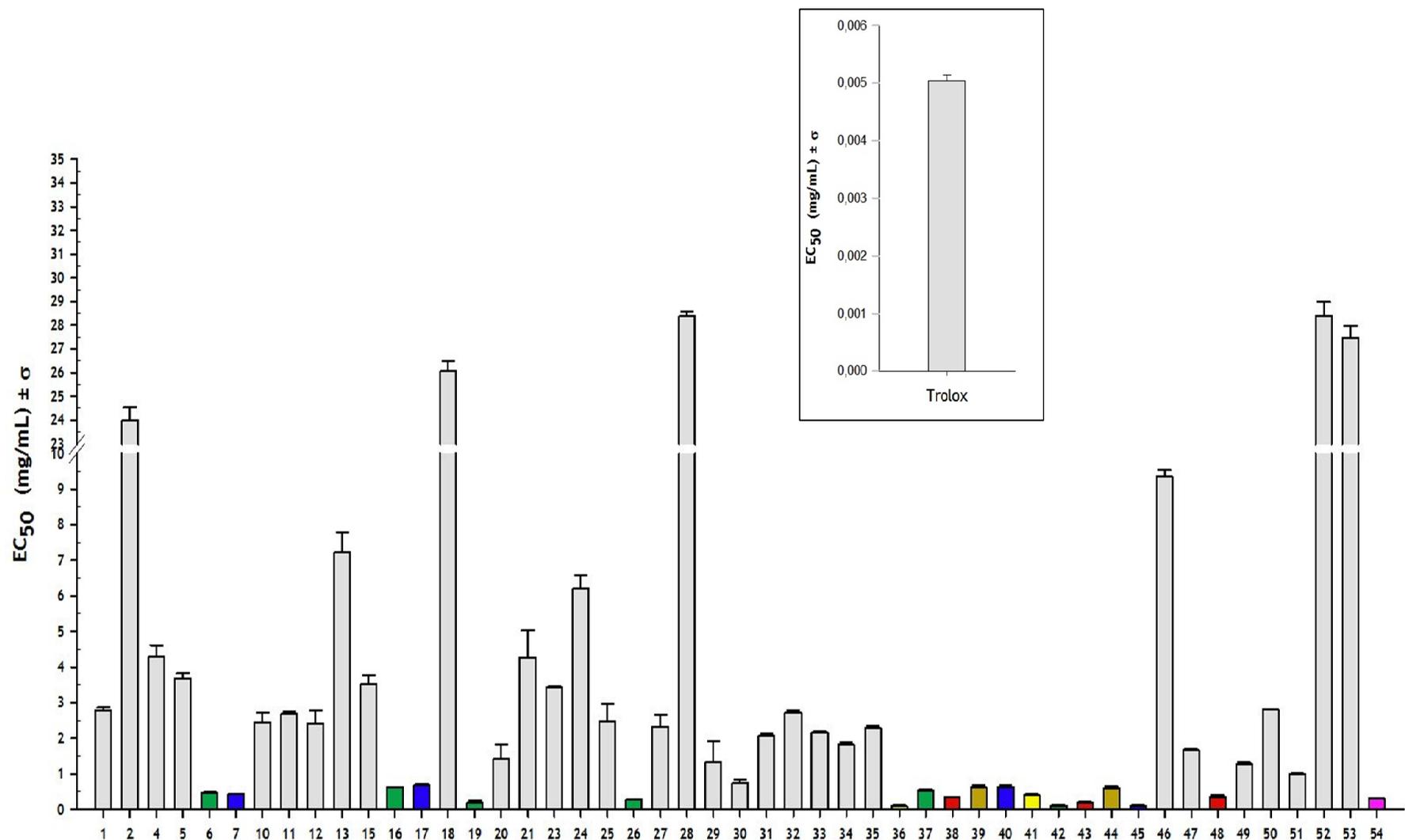
Para a amostra número 17 (extrato aquoso das folhas de *P. capensis*), como foram já isolados e identificados os compostos fitol,  $\beta$ -sitosterol e compostos do tipo kaurano, amirina (Saraiva, 2004), a realização de novos ensaios após o isolamento dos compostos presentes nesta amostra permitirá avaliar qual, ou quais, os compostos responsáveis pela reatividade com o DPPH<sup>\*</sup>, ou então se a reatividade da amostra número 17 é devido à sinergia entre os diferentes compostos que possui.

As amostras número 6 (extrato metanólico das cascas de *H. floribundum*), 7 (extrato aquoso das cascas de *H. floribundum*), 16 (extrato metanólico das folhas de *P. capensis*), 17 (extrato aquoso das folhas de *P. capensis*), 26 (extrato metanólico dos ramos de *G. senegalensis*), 37 (extrato metanólico dos ramos de *P. africanum*), 38 (extrato de acetato de etilo dos ramos de *P. africanum*), 39 (extrato de clorofórmio dos ramos de *P. africanum*), 40 (extrato aquoso dos ramos de *P. africanum*), 41 (extrato de hexano das raízes de *P. glaucocarpa*), 43 (extrato de acetato de etilo das raízes de *P. glaucocarpa*), 44 (extrato de clorofórmio das raízes de *P. glaucocarpa*), 48 (extrato de acetato de etilo das raízes de *P. thonningii*) e 54 (Malanósido A) (gráfico 2) apesar de terem valores de EC<sub>50</sub> altos (entre 0,20 - 0,63 mg/mL), relativamente ao Trolox e às amostras com melhores resultados, também demonstraram alguma capacidade em captar o DPPH<sup>\*</sup> e converte-lo em DPPH-H, o que significa que estas amostras possuem na sua composição compostos que reagem com o radical DPPH. As restantes amostras apresentaram pouca reatividade com o DPPH<sup>\*</sup>, uma vez que, os valores de EC<sub>50</sub> obtidos são consideravelmente altos em comparação com o Trolox e com as amostras referidas anteriormente.

Analisando os resultados entre os métodos de ABTS e DPPH é possível observar-se que as amostras número 6, 16, 17 e 43 apresentaram bons resultados contra os radicais livres dos dois métodos usados. No entanto, amostras como, por exemplo, as amostras número 41 (extrato de hexano das raízes de *P. glaucocarpa*), 42 (extrato metanólico das raízes de *P. glaucocarpa*) e 45 (extrato aquoso das raízes de *P. glaucocarpa*) apresentaram melhores resultados no método de DPPH do que no método de ABTS.

Para algumas amostras como, por exemplo, as amostras número 2 (extrato de clorofórmio das folhas de *A. huillensis*), 28 (extrato de hexano da parte aérea de *C. gratissimus*), 46 (extrato de hexano das raízes de *P. thonningii*) e 51 (Vincosamida) os valores de EC<sub>50</sub> obtidos em relação ao método de DPPH são mais baixos do que os valores obtidos para o método de ABTS, apesar dos valores para estas amostras indicarem uma baixa reatividade nos dois métodos. A diferente reatividade das amostras nos dois métodos deve-se ao facto de que os dois radicais livres usados possuem propriedades e reatividades diferentes.

No caso particular da amostra número 51, o isolamento melhorou apenas a reatividade com o radical DPPH, o que sugere que a estrutura molecular dos compostos também pode influenciar a reatividade com os radicais livres.

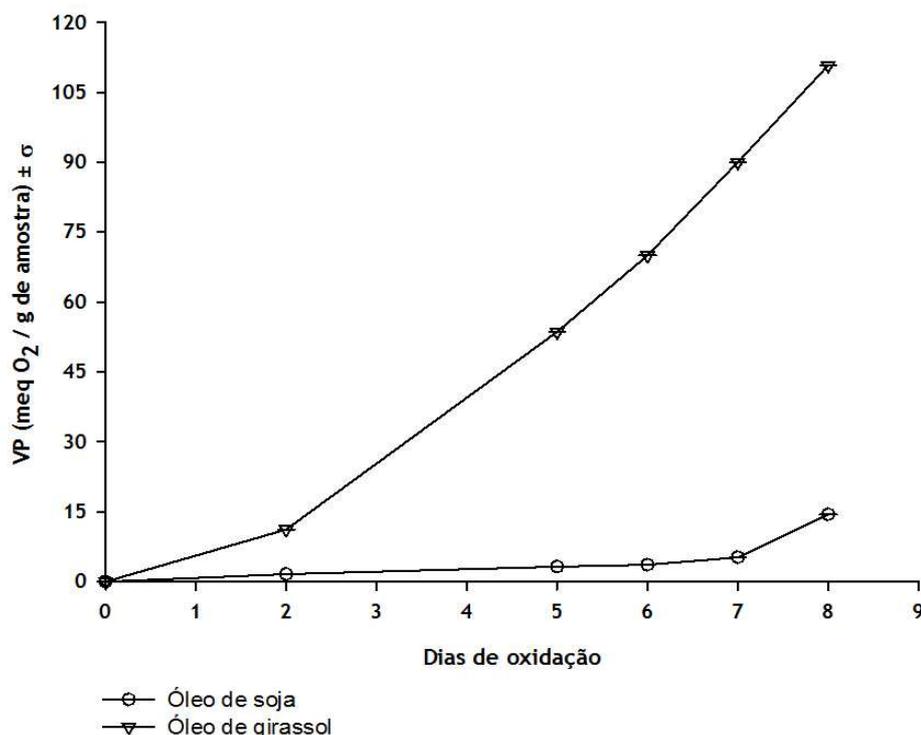


**Gráfico 2:** EC<sub>50</sub> das diferentes amostras e do Trolox (gráfico destacado) para o método de DPPH. Os números no eixo das abscissas correspondem a amostras identificadas na tabela 3. As barras coloridas correspondem às amostras com melhores resultados em termos de EC<sub>50</sub> em relação ao DPPH\*. A verde os extratos metanólicos: 6 - *H. floribundum* (cascas); 16 - *P. capensis* (folhas); 19 - *R. kirkii* (folhas); 26 - *G. senegalensis* (ramos); 37 - *P. africanum* (ramos); 42 - *P. glaucocarpa* (raízes). A azul os extratos aquosos: 7 - *H. floribundum* (cascas); 17 - *P. capensis* (folhas); 40 - *P. africanum* (ramos); 45 - *P. glaucocarpa* (raízes). A vermelho os extratos de acetato de etilo: 38 - *P. africanum* (ramos); 43 - *P. glaucocarpa* (raízes); 48 - *P. thonningii* (raízes). A amarelo os extratos de hexano: 36 - *P. africanum* (ramos); 41 - *P. glaucocarpa* (raízes). A castanho os extratos de clorofórmio: 39 - *P. africanum* (ramos); 44 - *P. glaucocarpa* (raízes). A rosa o composto natural Malanósido A. (n= 4; média ± σ; P< 0,05).

### 3.2.3 Valor peróxido

A determinação do valor peróxido permite avaliar o estado de oxidação de uma amostra lipídica (Strochkova *et al.*, 2001). Inicialmente procedeu-se à determinação do número de dias necessários para se obter uma oxidação de cerca de 100 meq O<sub>2</sub>/g de amostra lipídica, em amostras comerciais de óleo de girassol e soja. Foi obtido ao fim de oito dias de oxidação um valor de 110,80 meq O<sub>2</sub>/g de amostra para a amostra de óleo de girassol e um valor de 14,40 meq O<sub>2</sub>/g de amostra para a amostra de óleo de soja (gráfico 3). Tendo em conta o facto de que a amostra de óleo de soja demora mais tempo a atingir um valor peróxido de cerca de 100 meq O<sub>2</sub>/g de amostra, a amostra de óleo de girassol foi assim escolhida como modelo para estudar o efeito das diferentes amostras sobre a oxidação do óleo de girassol.

A amostra de óleo de soja é mais resistente á oxidação, pelo facto de que o teor de ácidos gordos totais insaturados e polinsaturados é menor do que o óleo de girassol (Martins *et al.*, 2006).



**Gráfico 3:** Valor peróxido (VP) de amostras de óleo de soja e de girassol em função do tempo de oxidação (oito dias). (n= 3; média ± σ; P< 0,05).

Em termos experimentais, a diminuição da oxidação de uma amostra de óleo de girassol por parte das diferentes amostras foi determinada de acordo com 2.2.4.3.1.

Durante a realização dos ensaios não foi possível determinar o valor peróxido para as amostras número 5 (extrato de hexano das folhas de *A. huillensis*), 56 (cumarina sintética 2), 57 (cumarina sintética 3), 58 (cumarina sintética 4), 59 (cumarina sintética 5), 60 (cumarina sintética 6), 61 (cumarina sintética 7), e 62 (cumarina sintética 8) (tabela 3) devido à

ausência de solubilidade no óleo de girassol e para as amostras número 51 (Vincosamida), 52 (ácido 3-O-β-D-fucopiranosilquinóico), 53 (ácido 3-O-α-L-rhamnopiranosilquinóico) e 54 (Malanósido A) (tabela 3) devido à indisponibilidade de amostra.

Os resultados (gráfico 4) foram realizados em triplicado e expressos em meq O<sub>2</sub>/g de amostra como média ± σ ao oitavo dia de oxidação da amostra de óleo de girassol.

Como o VP aumenta durante a fase de propagação e decresce na fase de terminação da oxidação lipídica (Laguerre *et al.*, 2007), a realização de um ensaio sem amostra (controle) é fundamental uma vez que permite avaliar a fase em que se encontra a oxidação da amostra lipídica. Se no controle a oxidação da amostra lipídica diminui ao longo dos oito dias significa que a fase em questão é a de terminação. Pelo contrário, se aumenta significa que a amostra lipídica se encontra na fase de propagação. Além disso, o ensaio de controle é também fundamental para se poder comparar os resultados obtidos. Nos ensaios o valor peróxido obtido para o controle ao oitavo dia de oxidação foi de 139,39 ± 3,33 meq O<sub>2</sub>/g de amostra (gráfico 4).

Analisando o gráfico 4, e em comparação com o valor peróxido obtido para o controle ao fim de oito dias de oxidação da amostra de óleo de girassol, é possível observar que os melhores resultados para as amostras em termos de valor peróxido ao oitavo dia de oxidação foram obtidos com as amostras número 45 (extrato aquoso das raízes de *P. glaucocarpa*) com um valor peróxido de 131,40 ± 1,05 meq O<sub>2</sub>/g de amostra, 12 (extrato metanólico da parte aérea de *P. angolense*) com um valor peróxido de 117,87 ± 3,77 meq O<sub>2</sub>/g de amostra, 9 (extrato de hexano das cascas de *H. floribundum*) com um valor peróxido de 117,07 ± 3,76 meq O<sub>2</sub>/g de amostra, 11 (extrato aquoso da parte aérea de *T. antiscorbutica*) com um valor peróxido de 112,00 ± 3,57 meq O<sub>2</sub>/g de amostra, 14 (extrato de clorofórmio da parte aérea de *P. angolense*) com um valor peróxido de 101,87 ± 3,25 meq O<sub>2</sub>/g de amostra, 16 (extrato metanólico das folhas de *P. capensis*) com um valor peróxido de 98,27 ± 3,16 meq O<sub>2</sub>/g de amostra, 25 (extrato de acetato de etilo das folhas de *B. microphylla*) com um valor peróxido de 91,47 ± 2,91 meq O<sub>2</sub>/g de amostra, 8 (extrato de clorofórmio das cascas de *H. floribundum*) com um valor peróxido de 88,93 ± 2,83 meq O<sub>2</sub>/g de amostra, 22 (extrato de diclorometano da parte aérea de *E. viscosa*) com um valor peróxido de 83,07 ± 2,65 meq O<sub>2</sub>/g de amostra, 19 (extrato metanólico das folhas de *R. kirkii*) com um valor peróxido de 80,93 ± 2,58 meq O<sub>2</sub>/g de amostra, 10 (extrato metanólico da parte aérea de *T. antiscorbutica*) com um valor peróxido de 75,60 ± 2,41 meq O<sub>2</sub>/g de amostra, 21 (extrato de acetato de etilo da parte aérea de *E. viscosa*) com um valor peróxido de 74,13 ± 2,36 meq O<sub>2</sub>/g de amostra, 24 (extrato aquoso das folhas de *B. microphylla*) com um valor peróxido de 72,53 ± 2,33 meq O<sub>2</sub>/g de amostra, 2 (extrato de clorofórmio das folhas de *A. huillensis*) com um valor peróxido de 67,60 ± 2,16 meq O<sub>2</sub>/g de amostra, 3 (extrato de clorofórmio das raízes de *A. huillensis*) com um valor peróxido de 67,20 ± 2,15 meq O<sub>2</sub>/g de amostra, 13 (extrato aquoso da parte aérea de *P. angolense*) com um valor peróxido de 57,47 ± 1,83 meq O<sub>2</sub>/g de amostra, 17 (extrato aquoso das folhas de *P. capensis*) com um valor peróxido de 55,73 ± 1,77 meq O<sub>2</sub>/g de amostra, 6 (extrato metanólico das cascas de *H. floribundum*) com um valor peróxido de

55,20 ± 1,76 meq O<sub>2</sub>/g de amostra, 7 (extrato aquoso das cascas de *H. floribundum*) com um valor peróxido de 54,80 ± 1,81 meq O<sub>2</sub>/g de amostra, 18 (extrato de clorofórmio das folhas de *P. capensis*) com um valor peróxido de 52,53 ± 1,67 meq O<sub>2</sub>/g de amostra e 1 (extrato aquoso das folhas de *A. huillensis*) com um valor peróxido de 34,47 ± 1,20 meq O<sub>2</sub>/g de amostra.

Do conjunto de melhores resultados, as amostras número 1, 6, 7, 13, 17 e 18 são as que apresentaram um valor peróxido mais baixo ao final dos oito dias de oxidação. Os resultados para estas amostras sugerem que os compostos que fazem parte da sua constituição possuem uma boa capacidade em diminuir a oxidação do óleo de girassol. Assim o isolamento, identificação dos compostos e realização de novos ensaios com os compostos isolados permite avaliar qual ou quais os compostos responsáveis pela capacidade de diminuição a oxidação da amostra de óleo de girassol, ou se o efeito de diminuição é resultado da sinergia entre os diferentes compostos. No caso particular das amostras número 17 (Saraiva, 2004), 21 e 22 (Sebastião, 2007) foram já identificados os compostos presentes nestas amostras.

A amostra número 15 (extrato de hexano das folhas de *P. capensis*), apesar do valor peróxido alto, também apresenta capacidade em diminuir a oxidação do óleo de girassol ao fim dos oito dias de oxidação, o que sugere que esta amostra em particular possui compostos que provocam uma pequena diminuição do valor peróxido do óleo de girassol. Ensaios com os compostos isolados desta amostra poderão dar origem a melhores resultados em termos de diminuição do valor peróxido. As restantes amostras em relação ao ensaio controlo e às amostras com melhores resultados, apresentaram um valor peróxido ao oitavo dia de oxidação superior ao do controlo, o que significa que estas amostras apresentam um efeito contrário ao desejado, ou seja, um efeito pro-oxidante. Nestes casos os compostos da amostra vão contribuir para o aumento da oxidação do óleo de girassol.

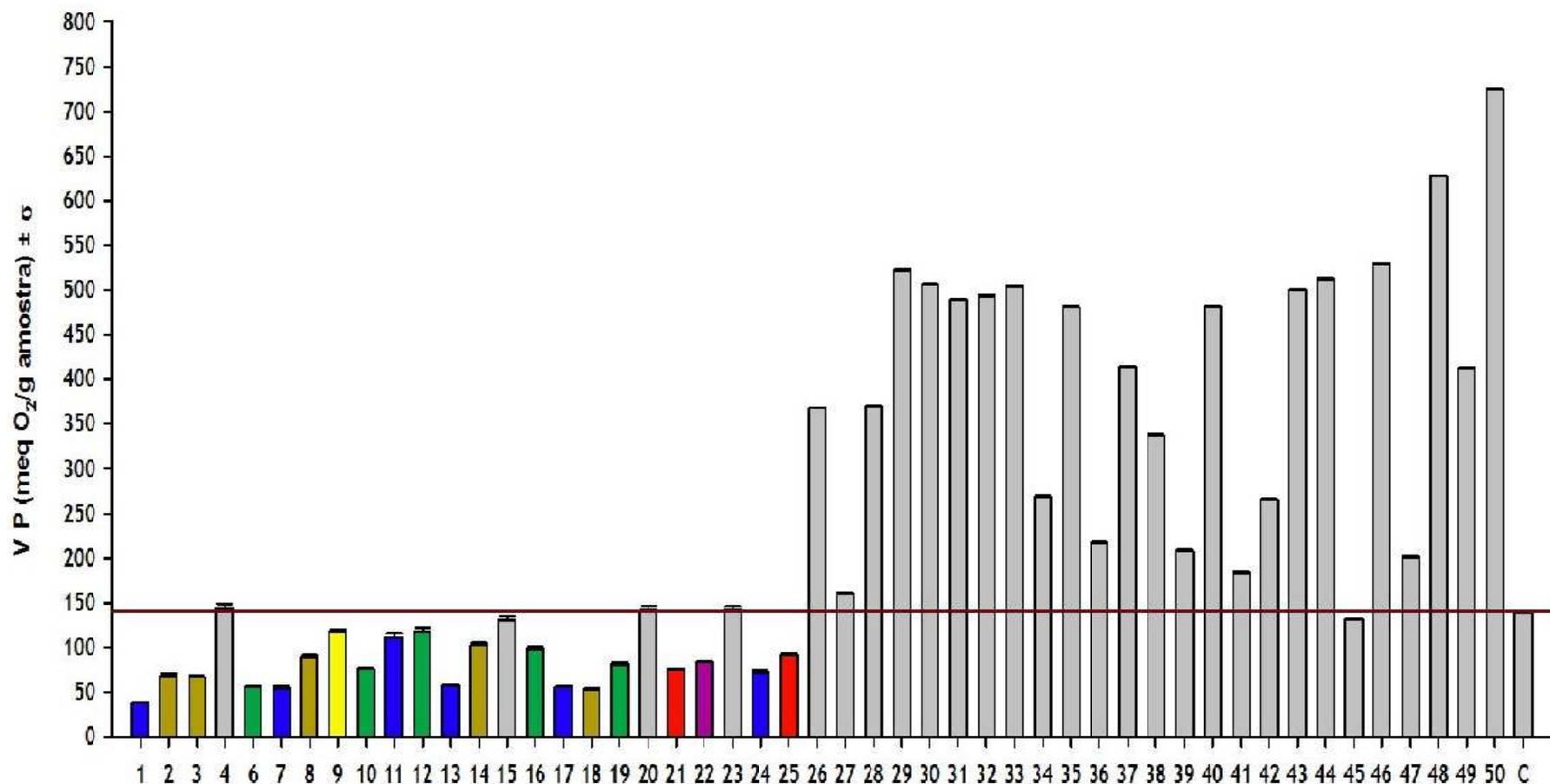
Como o óleo de girassol usado possui na sua composição, de acordo com a informação fornecida pela marca comercial no rótulo da garrafa, 51 mg de vitamina E, que é um antioxidante lipossolúvel, através do gráfico 3 é possível observar-se que na fase inicial da oxidação a vitamina E atua prevenindo a oxidação do óleo de girassol, no entanto, com o decorrer de dias de oxidação esse efeito diminui. Para as amostras em que se observou melhores resultados em termos de diminuição do valor ao fim dos oito dias de oxidação, é possível colocar-se a hipótese de que os compostos presentes nas amostras atuam, numa fase inicial da oxidação, em sinergia com a vitamina E provocando a redução da oxidação lipídica. A realização de ensaios, mas com amostras lipídicas sem qualquer tipo de antioxidante, é importante para se avaliar o efeito da vitamina E nos resultados obtidos com as diferentes amostras.

Comparando os valores obtidos para o valor peróxido com os valores de EC<sub>50</sub> obtidos para os métodos de ABTS e DPPH é possível observar-se que algumas das amostras como, por exemplo, para as amostras número 6, 7, 16 e 17 apresentaram bons resultados nos três métodos, ou seja, apresentaram capacidade em captar os radicais livres ABTS e DPPH e em reduzir a formação de peróxidos durante a oxidação lipídica.

A realização de novos ensaios nos três métodos, como os compostos isolados destas quatro amostras, permitirá avaliar qual ou quais os compostos com capacidade em captar os radicais DPPH e ABTS e em reduzir a oxidação lipídica.

Algumas amostras como, por exemplo, a amostra número 1, 2, 11 e 13 apresentaram uma boa capacidade em diminuir a oxidação do óleo de girassol aos oito dias de oxidação, no entanto, em relação aos métodos de ABTS e DPPH estas amostras não apresentaram boa capacidade em captar os radicais livres de ABTS e DPPH. Os resultados dos três métodos em relação a estas amostras sugerem assim que os compostos presentes nestas amostras não apresentam boa capacidade antioxidante contra os radicais livres ABTS e DPPH, mas que pelo contrário reduzem a oxidação dos ácidos gordos insaturados.

Pelo contrário, as amostras número 36 (extrato de hexano dos ramos de *P. africanum*), 38 (extrato de acetato de etilo dos ramos de *P. africanum*), 40 (extrato aquoso dos ramos de *P. africanum*) e 43 (extrato de acetato de etilo das raízes de *P. glaucocarpa*) apresentaram boa capacidade antioxidante contra os radicais livres ABTS e DPPH, no entanto, relativamente á redução da oxidação do óleo de girassol apresentarm um efeito pro-oxidante. Estes resultados sugerem que os compostos presentes nas amostras número 36, 38, 40 e 43 vão contribuir para a oxidação dos ácidos gordos insaturados do óleo de girassol. A realização de novos ensaios com os compostos isolados destas amostras é importante para se determinar qual ou quais os compostos responsáveis pelo efeito observado com as amostras número 36, 38, 40 e 43.



**Gráfico 4:** Valor peróxido das diferentes amostras e controlo (C) ao oitavo dia de oxidação para o óleo de girassol. Os números no eixo das abcissas correspondem a amostras identificadas na tabela 3. As barras coloridas correspondem às amostras com melhores resultados em termos de valor peróxido. A verde os extratos metanólicos: 6 - *H. floribundum* (cascas); 10 - *T. antiscorbutica* (parte aérea); 12 - *P. angolense* parte aérea); 16 - *P. capensis* (folhas); 19 - *R. kirkii* (folhas). A azul os extratos aquosos: 1 - *A. huillensis* (folhas); 7 - *H. floribundum* (cascas); 11 - *T. antiscorbutica* (parte aérea); 13 - *P. angolense* (parte aérea); 17 - *P. capensis* (folhas); 24 - *B. microphylla* (folhas). A vermelho os extratos de acetato de etilo: 21 - *E. viscosa* (parte aérea); 25 - *B. microphylla* (folhas). A amarelo o extrato de hexano: 9 - *H. floribundum* (cascas). A castanho os extratos de clorofórmio: 2 - *A. huillensis* (folhas); 3 - *A. huillensis* (raízes); 8 - *H. floribundum* (cascas); 14 - *P. angolense* (parte aérea); 18 - *P. capensis* (folhas). A roxo o extrato de diclorometano: 22 - *E. viscosa* (parte aérea). (n= 3; média ± σ; P< 0,05).

### 3.2.4 Método de Folin-Ciocalteu

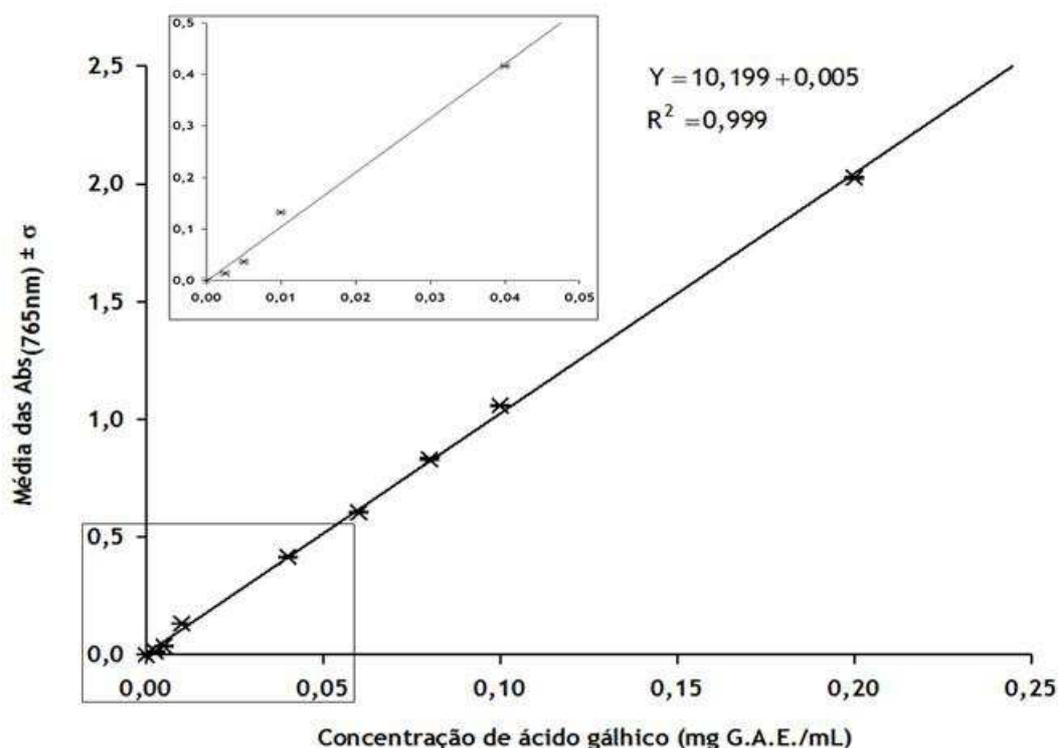
Para o método de Folin-Ciocalteu, a nível experimental determinou-se inicialmente a curva de calibração (gráfico 5) de acordo com 2.2.4.4.1. Para as amostras 1 a 25 (tabela 3) a concentração total de compostos fenólicos foi determinada através de valores anteriormente obtidos de acordo com 2.2.4.4.1 e 2.2.4.4.2 (Fernandes, 2010).

A quantificação de compostos fenólicos totais nas restantes amostras foi obtida através da curva de calibração apresentada no gráfico 5, por substituição dos valores experimentais das absorvências obtidas de acordo com 2.2.4.4.2 na equação  $y=10,199x+0,005$  ( $R^2=0,999$ ) da curva de calibração. Os resultados obtidos para todas as amostras (gráfico 6) foram realizados em quadruplicado e expressos em mg G.A.E./g extrato seco como média  $\pm \sigma$ , onde G.A.E. significa equivalentes de ácido gálglico.

A concentração de compostos fenólicos totais nas diferentes amostras vegetais variou entre  $15,30 \pm 0,39$  mg G.A.E./g extrato e  $746,56 \pm 0,45$  mg G.A.E./g extrato. A partir do gráfico 6 é possível observar que as amostras que apresentaram uma concentração mais elevada de compostos fenólicos foram as amostras número 38 (extrato de acetato de etilo dos ramos de *P. africanum*) com uma concentração de  $746,56 \pm 0,45$  mg G.A.E./g extrato, 37 (extrato metanólico dos ramos de *P. africanum*) com uma concentração de  $631,38 \pm 0,77$  mg G.A.E./g extrato, 17 (extrato aquoso das folhas de *P. capensis*) com uma concentração de  $549,27 \pm 0,45$  mg G.A.E./g extrato, 33 (extrato metanólico do fruto de *S. incanum*) com uma concentração de  $521,57 \pm 0,62$  mg G.A.E./g extrato, 39 (extrato de clorofórmio dos ramos de *P. africanum*) com uma concentração de  $499,60 \pm 0,61$  mg G.A.E./g extrato, 35 (extrato aquoso do fruto de *S. incanum*) com uma concentração de  $493,33 \pm 0,80$  mg G.A.E./g extrato, 30 (extrato de acetato de etilo da parte aérea de *C. gratissimus*) com uma concentração de  $460,91 \pm 0,38$  mg G.A.E./g extrato, 26 (extrato metanólico dos ramos de *G. senegalensis*) com uma concentração de  $444,17 \pm 0,24$  mg G.A.E./g extrato, 34 (extrato de acetato de etilo do fruto de *S. incanum*) com uma concentração de  $395,02 \pm 0,50$  mg G.A.E./g extrato, 40 (extrato aquoso dos ramos de *P. africanum*) com uma concentração de  $389,79 \pm 0,65$  mg G.A.E./g extrato, 16 (extrato metanólico das folhas de *P. capensis*) com uma concentração de  $365,12 \pm 0,52$  mg G.A.E./g extrato, 29 (extrato metanólico da parte aérea de *C. gratissimus*) com uma concentração de  $306,12 \pm 0,46$  mg G.A.E./g extrato, 27 (extrato metanólico dos ramos de *S. manii*) com uma concentração de  $296,71 \pm 0,62$  mg G.A.E./g extrato, 43 (extrato de acetato de etilo das raízes de *P. glaucocarpa*) com uma concentração de  $280,42 \pm 0,15$  mg G.A.E./g extrato, 31 (extrato de clorofórmio da parte aérea de *C. gratissimus*) com uma concentração de  $276,84 \pm 0,50$  mg G.A.E./g extrato, 32 (extrato aquoso da parte aérea de *C. gratissimus*) com uma concentração de  $202,90 \pm 0,61$  mg G.A.E./g extrato, 7 (extrato aquoso das cascas de *H. floribundum*) com uma concentração de  $216,93 \pm 0,51$  mg G.A.E./g extrato, 6 (extrato metanólico das cascas de *H. floribundum*) com uma concentração de  $202,43 \pm 0,61$  mg G.A.E./g extrato, 1 (extrato aquoso das folhas de *A. huillensis*) com uma concentração de  $202,33 \pm 0,30$  mg G.A.E./g extrato, 19 (extrato metanólico das folhas de *R. kirkii*) com uma concentração de  $199,86 \pm 0,41$  mg G.A.E./g extrato e 10 (extrato metanólico da parte aérea

de *T. antiscorbutica*) com uma concentração de  $197,08 \pm 0,60$  mg G.A.E./g extrato. As restantes amostras apresentaram uma concentração de compostos fenólicos totais considerada baixa.

Através do coeficiente de determinação obtido para a equação obtida pela curva de calibração (gráfico 5) verificou-se que se obteve uma relação linear entre a concentração de ácido gálico e as absorvências das soluções de ácido gálico estatisticamente significativa para 95% de probabilidade (Gonçalves,2001).



**Gráfico 5:** Curva de calibração para o método de Folin-Ciocalteu usada na quantificação de compostos fenólicos totais das amostras. O intervalo de concentração 0,00 - 0,05 mg G.A.E./mL foi destacado no gráfico para melhor visualização dos pontos, (n= 4; média ± σ; P< 0,05).

Geralmente quanto maior é a concentração de compostos fenólicos totais nos extratos, melhor é a capacidade antioxidante (Li *et al.*, 2009). Assim ao comparar-se os resultados obtidos nos métodos de ABTS (gráfico 1) e DPPH (gráfico 2) com os resultados obtidos para o método de Folin-Ciocalteu (gráfico 6) é possível observar-se que algumas das amostras como, por exemplo, as amostras número 16 (extrato metanólico das folhas de *P. capensis*), 17 (extrato aquoso das folhas de *P. capensis*), 26 (extrato metanólico dos ramos de *G. senegalensis*), 37 (extrato metanólico dos ramos de *P. africanum*), 38 (extrato de acetato de etilo dos ramos de *P. africanum*), 39 (extrato de clorofórmio dos ramos de *P. africanum*) e 40 (extrato aquoso dos ramos de *P. africanum*) apresentaram melhores resultados em termos de reatividade com o radical ABTS e que essa reatividade pode ser resultado dos compostos fenólicos presentes na sua constituição, uma vez que, estas amostras possuem também uma concentração de compostos fenólicos totais alta. O mesmo pode ser dito para estas amostras em relação ao método de DPPH.

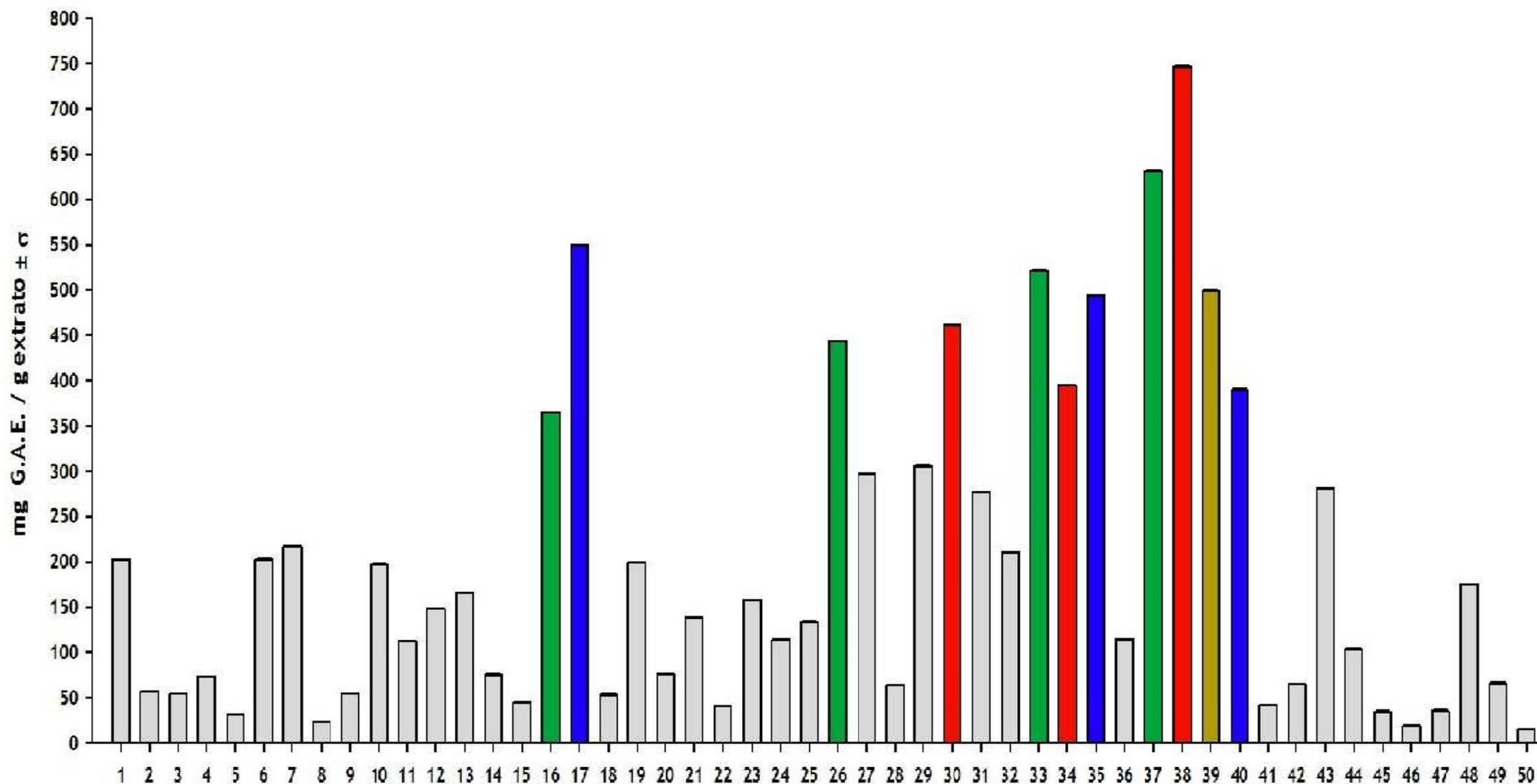
Em relação ao valor peróxido para as amostras número 16, 17, 26, 37, 38, 39 e 40, apenas as amostras número 16 e 17 é que apresentaram capacidade em reduzir a oxidação do óleo de girassol ao fim de oito dias de oxidação. Assim para as amostras número 16 e 17 pode colocar-se a hipótese de que a reatividade com os radicais ABTS e DPPH, bem como a capacidade de redução da oxidação dos ácidos gordos insaturados do óleo de girassol, é em grande parte devido aos compostos fenólicos presentes nestas duas amostras.

As amostras número 26, 30, 37, 38, 39 e 40 apresentaram uma concentração elevada de compostos fenólicos o que também explica os valores de EC<sub>50</sub> baixos nos métodos de ABTS e DPPH. No valor peróxido estas amostras apresentaram um efeito pro-oxidante, o que pode ser devido ao facto dos compostos fenólicos presentes nestas amostras serem muito hidrofílicos e não se aproximarem dos ácidos gordos insaturados do óleo de girassol ou então os compostos fenólicos podem ter-se degradado durante os ensaios e originado compostos pro-oxidantes.

As amostras número 6 (extrato metanólico das cascas de *H. floribundum*), 7 (extrato aquoso das cascas de *H. floribundum*), 19 (extrato metanólico das folhas de *R. kirkii*) e 43 (extrato de acetato de etilo das raízes de *P. glaucocarpa*) são exemplos de amostras com uma concentração de compostos fenólicos que não é das mais altas, no entanto apresentaram bons resultados em relação ao ABTS e DPPH o que significa que os poucos compostos fenólicos que estas amostras possuem, apresentam uma boa reatividade contra os radicais livres de ABTS e DPPH. Destas amostras apenas a amostra número 43 apresentou um efeito pro-oxidante em relação ao valor peróxido, podendo esse efeito ser explicado pelos mesmos motivos referidos anteriormente. As amostras número 6, 7 e 19 apresentaram boa capacidade em reduzir a oxidação do óleo de girassol pelo que os compostos fenólicos presentes nestas amostras podem ser em grande parte os responsáveis por esse efeito.

No método de DPPH é também possível observar-se que as amostras número 41 (extrato de hexano das raízes de *P. glaucocarpa*), 42 (extrato metanólico das raízes de *P. glaucocarpa*), 44 (extrato de clorofórmio das raízes de *P. glaucocarpa*) e 45 (extrato aquoso das raízes de *P. glaucocarpa*) apresentaram capacidade em captar o radical DPPH, apesar da concentração em compostos fenólicos totais ser baixa. Estes resultados sugerem que para estas amostras a reatividade como o radical DPPH é devido a compostos de natureza não fenólica ou então os compostos fenólicos presentes apresentam uma reatividade elevada com o radical DPPH. Destas quatro amostras, o mesmo pode ser dito em relação à amostra número 45, mas para o método de ABTS.

No método de Folin-Ciocalteu as amostras número 27, 29, 31, 32, 33, 34 e 35 apresentaram uma concentração alta de compostos fenólicos, no entanto, para estas amostras não foi observada reatividade com os radicais ABTS e DPPH, nem capacidade de diminuição da oxidação lipídica, o que sugere que os compostos de natureza fenólica presentes nestas amostras possuem baixa reatividade em termos de atividade antioxidante e de redução da oxidação de amostras de natureza lipídica.



**Gráfico 6:** Resultado da concentração de compostos fenólicos totais para as diferentes amostras de extrato, através do método de Folin-Ciocalteu. Os números no eixo das abcissas correspondem a amostras identificadas na tabela 3. As barras coloridas correspondem às amostras com melhores resultados em termos de concentração de compostos fenólicos totais. A verde os extrato metanólicos: 16 - *P. capensis* (folhas); 26 - *G. senegalensis* (ramos); 33 - *S. incanum* (fruto); 37 - *P. africanum* (ramos). A azul os extratos aquosos: 17 - *P. capensis* (folhas); 35 - *S. incanum* (fruto); 40 - *P. africanum* (ramos). A vermelho os extratos de acetato de etilo: 30 - *C. gratissimus* (parte aérea); 34 - *S. incanum* (fruto); 38 - *P. africanum* (ramos). A castanho o extrato de clorofórmio: 39 - *P. africanum* (ramos). (n= 4; média  $\pm$   $\sigma$ ; P< 0,05).

### 3.3 Atividade antimicrobiana

#### 3.3.1 Ensaios de microdiluição em meio líquido

Nos ensaios de microdiluição em meio líquido, a actividade antifúngica e antibacteriana das diferentes amostras foi realizada conforme descrito em 2.2.5.1.1 para a estirpe de *C. albicans* e 2.2.5.1.2 para as estirpes de *S. aureus* e *E. coli*.

Relativamente aos extratos de *A. huillensis*, *H. floribundo*, *P. capensis*, *P. angolense* e *E. viscosa* (tabela 3), a determinação da actividade antifúngica e antibacteriana foi realizada em trabalhos anteriores por Almeida e Vieira (Almeida, 2008; Vieira, 2010), respetivamente, através dos mesmos procedimentos e para as mesmas estirpes. Durante a realização dos ensaios não foi possível determinar a actividade antifúngica e antibacteriana para as amostras número 10 (extrato metanólico da parte aérea de *T. antiscorbutica*), 11 (extrato aquoso da parte aérea de *T. antiscorbutica*), 19 (extrato metanólico das folhas de *R. kirkii*), 20 (extrato de tolueno das folhas de *X. odoratissima*), 23 (extrato de tolueno das folhas de *B. microphylla*), 24 (extrato aquoso das folhas de *B. microphylla*), 25 (extrato de acetato de etilo das folhas de *B. microphylla*), 55 (cumarina sintética 1), 56 (cumarina sintética 2), 58 (cumarina sintética 4), 60 (cumarina sintética 6), 61 (cumarina sintética 7) e 62 (cumarina sintética 8) (tabela 3) devido à ausência de solubilidade no solvente usado, e para as amostras número 51 (Vincosamida), 52 (ácido 3-O-β-D-fucopiranosilquinóvico), 53 (ácido 3-O-α-L-ramnopiranosilquinóvico) e 54 (Malanósido A) (tabela 3) devido à quantidade de amostra disponível. Na tabela 4 encontram-se os resultados de concentração mínima inibitória das diferentes amostras em que ainda não foi avaliada a actividade antimicrobiana através dos ensaios de microdiluição em meio líquido.

Os resultados obtidos nos ensaios de microdiluição em meio líquido (tabela 4) foram realizados em triplicado e expressos em termos de concentração mínima inibitória (CIM) dada em mg/mL. Foram realizados ensaios de controlo do meio, que tiveram como finalidade verificar eventual contaminação do meio de cultura e deste modo evitar falsos negativos. Foram também realizados ensaios de controlo do inóculo, estes ensaios serviram para verificar a existência de possível morte celular e evitar assim falsos positivos devido à inviabilidade das estirpes. Com o objetivo de se verificar possível contaminação do extrato realizaram-se ensaios constituídos apenas por amostra e meio.

Nos ensaios de microdiluição em meio líquido nenhuma das amostras estudadas (tabela 4) inibiu o crescimento da *E. coli* e do *S. aureus*. O mesmo resultado foi obtido em trabalhos anteriores para os extratos de *A. huillensis*, *H. floribundo*, *P. capensis*, *P. angolense* e *E. viscosa*, respetivamente (Almeida, 2008; Vieira, 2010). Para a *C. albicans*, apenas a amostra número 35 (extrato aquoso do fruto de *S. incanum*) apresentou actividade com um valor de CIM de 1,00 mg/mL.

**Tabela 4:** Concentração mínima inibitória das diferentes amostras obtida nos ensaios de microdiluição para as estirpes de *C. albicans*, *S. aureus* e *E. coli*. (n= 3).

Amostras	Concentração mínima inibitória (CIM) (mg/mL)		
	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
26	—	—	—
27	—	—	—
28	—	—	—
29	—	—	—
30	—	—	—
31	—	—	—
32	—	—	—
33	—	—	—
34	—	—	—
35	1,00	—	—
36	—	—	—
37	—	—	—
38	—	—	—
39	—	—	—
40	—	—	—
41	—	—	—
42	—	—	—
43	—	—	—
44	—	—	—
45	—	—	—
46	—	—	—
47	—	—	—
48	—	—	—
49	—	—	—
50	—	—	—
57	—	—	—
59	—	—	—

— não se observou inibição

Dado que a composição química da amostra número 35 é já conhecida (Kuo *et al.*, 2000; Fukuhara *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2011; Manase *et al.*, 2012), a realização de novos ensaios de microdiluição em meio líquido para a *C. albicans*, com os compostos isolados da amostra número 35, permitirá avaliar qual ou quais os compostos responsáveis pelo valor de CIM obtido para esta amostra.

As restantes amostras não apresentaram atividade contra a *C. albicans*. Em reação à *C. albicans* o mesmo resultado foi obtido para os extratos de *A. huillensis*, *H. floribundo*, *P. capensis*, *P. angolense* e *E. viscosa*, respetivamente (Almeida, 2008; Vieira, 2010).

A solubilidade das amostras nos meios de cultura dos microrganismos é um fator importante para realização deste método, uma vez que, a precipitação de compostos dificulta a observação e interpretação dos resultados. Também a coloração das amostras não deve ser muito intensa pois deste modo não permite visualizar a turvação do meio de cultura quando não ocorre inibição de crescimento.

A eventual interação dos constituintes do meio de cultura com os componentes das amostras também interfere com a interpretação dos resultados. Nos casos em que se verificam problemas de solubilidade das amostras nos meios de cultura, as técnicas de difusão em disco e em ágar podem ser consideradas como uma opção para se avaliar a atividade antimicrobiana das amostras.

### 3.3.2 Ensaios de difusão em disco

Nos ensaios de difusão em disco a atividade antifúngica e antibacteriana das diferentes amostras foi realizada conforme descrito em 2.2.5.2.1 para a estirpe de *C. albicans* e 2.2.5.2.2 para as estirpes de *S. aureus* e *E. coli*. As atividades antifúngica e antibacteriana, não foram determinadas para as amostras número 10 (extrato metanólico da parte aérea de *T. antiscorbutica*), 11 (extrato aquoso da parte aérea de *T. antiscorbutica*), 19 (extrato metanólico das folhas de *R. kirkii*), 20 (extrato de tolueno das folhas de *X. odoratissima*), 23 (extrato de tolueno das folhas de *B. microphylla*), 24 (extrato aquoso das folhas de *B. microphylla*), 25 (extrato de acetato de etilo das folhas de *B. microphylla*), 55 (cumarina sintética 1), 56 (cumarina sintética 2), 58 (cumarina sintética 4), 60 (cumarina sintética 6), 61 (cumarina sintética 7) e 62 (cumarina sintética 8) (tabela 3) devido à ausência de solubilidade no solvente usado e para as amostras número 51 (Vincosamida), 52 (ácido 3-O-B-D-fucopiranosilquinóico), 53 (ácido 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosilquinóico) e 54 (Malanósido A) devido à indisponibilidade de amostra. Os resultados obtidos para os halos de inibição de crescimento celular foram realizados em triplicado e expressos em milímetros (mm).

Relativamente aos extratos de *A. huillensis*, *H. floribundo*, *P. capensis*, *P. angolense* e *E. viscosa* (tabela 3), tal como em 3.3.1, a determinação da atividade antifúngica e antibacteriana foi realizada em trabalhos anteriores (Almeida, 2008; Vieira, 2010), através dos mesmos procedimentos e estirpes, mas com algumas alterações a nível dos controlos positivos para a atividade antibacteriana. Assim nos trabalhos realizados anteriormente para as plantas *A. huillensis*, *H. floribundo*, *P. capensis* e *P. angolense* foi usado como controlo positivo para a atividade antibacteriana a Tetraciclina com a qual foi obtido um halo de inibição de crescimento para a *E. coli* de 26 mm e de 29 mm para o *S. aureus* (Almeida, 2008). Para a *E. viscosa* como controlo positivo para a atividade antibacteriana foi usada a Ampicilina com a qual foi obtido um halo de inibição de 31 mm para o *S. aureus* e de 13 mm para a *E. coli* (Vieira, 2010).

Na tabela 5 encontram-se os resultados de halos de inibição de crescimento microbiano das diferentes amostras em que ainda não foi avaliada a atividade antimicrobiana através dos ensaios de difusão em disco. Para as amostras da tabela 5 foi usado na atividade antifúngica como controlo positivo de inibição do crescimento microbiano a Amfotericina B (Amp B), cujo intervalo de referência para o halo de inibição se situa entre os 15 mm (Casals, 1979) e os 28 mm (Singh *et al.*, 2009). Para a atividade antibacteriana das amostras da tabela 5, como controlo positivo usou-se a Ciprofloxacina (CIP), cujos intervalos de referência indicados na

norma CLSI M100-S23 (*Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013*) se situam entre os 22-30 mm para o *S. aureus* e os 30-40 mm para a *E. coli*.

Os halos de inibição do crescimento microbiano obtidos com os controlos positivos usados na determinação da atividade antimicrobiana das diferentes amostras (tabela 5) foram de 17 mm para a Amp B em relação à *C. albicans*, 33 mm para a CIP em relação à *E. coli* e 28 mm para a CIP em relação ao *S. aureus*. Como controlo negativo de inibição de crescimento celular no método de difusão em disco usou-se o dimetilsulfóxido (DMSO), que tal como esperado não apresentou halos de inibição para as três estirpes testadas.

**Tabela 5:** Halo de inibição do crescimento microbiano para as diferentes amostras em relação às estirpes de *C. albicans*, *S. aureus* e *E. coli*. (n= 3).

Amostras	Diâmetro da zona de inibição de crescimento (mm)		
	Microrganismos		
	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
26	—	—	—
27	—	—	—
28	—	—	—
29	—	—	—
30	—	—	—
31	—	—	—
32	—	—	—
33	—	—	—
34	—	—	—
35	—	—	—
36	—	—	—
37	—	7	—
38	—	7	—
39	—	7	—
40	—	7	—
41	—	—	—
42	—	—	—
43	—	—	—
44	—	—	—
45	—	—	—
46	—	—	—
47	—	—	—
48	—	—	—
49	—	—	—
50	—	—	—
57	—	—	—
59	—	—	—
Amp B	17	a	a
CIP	a	28	33

— não se observou halos de inibição

a - não determinado

Tal como foi observado para o método de microdiluição, as diferentes amostras não apresentaram atividade contra a *C. albicans* e *E. coli*. Igual resultado foi também obtido em trabalhos realizados anteriormente para os extratos de *A. huillensis*, *H. floribundo*, *P. capensis*, *P. angolense* e *E. viscosa*, respetivamente (Almeida, 2008; Vieira, 2010). No entanto, no método de microdiluição a amostra número 35 (extrato aquoso do fruto de *S. incanum*)

apresentou inibição do crescimento da *C. albicans*, pelo que seria de esperar o mesmo resultado em relação à difusão em disco. Contudo, tal não se verificou a eventual explicação para o sucedido poderá ser a difusão limitada dos compostos presentes no extrato ao longo do meio sólido. Para que ocorra inibição de crescimento, os compostos devem difundir-se livremente no meio sólido, e fatores como a espessura do meio, espalhamento do inóculo e arrastamento viscoso dos compostos interferem com os resultados. Quando os dois primeiros fatores são controlados ao longo do ensaio, os resultados dependem então da difusão dos compostos no meio sólido (Bonev *et al.*, 2008).

Em relação ao *S. aureus*, Almeida em 2008 observou halos de inibição de crescimento para as amostras número 2 (extrato de clorofórmio das folhas de *A. huillensis*) com um halo de inibição de 7 mm; 3 (extrato de clorofórmio das raízes de *A. huillensis*) com um halo de inibição de 9 mm e 8 (extrato de clorofórmio das cascas de *H. floribundum*) com um halo de inibição de 8 mm (Almeida, 2008), no entanto, como os valores obtidos eram menores que o valor obtido para a Tetraciclina e inferiores ao valor mínimo do intervalo para este antibiótico (15-18 mm), Almeida considerou assim que as amostras em causa não apresentavam atividade antibacteriana contra o *S. aureus*.

Igual resultado foi também observado por Vieira em 2010 para o *S. aureus* em relação às amostras número 21 (extrato de acetato de etilo da parte aérea de *E. viscosa*) com um halo de inibição de 8 mm e 22 (extrato de diclorometano da parte aérea de *E. viscosa*) com um halo de inibição de 10 mm, que também apresentaram halos de inibição de crescimento em relação ao *S. aureus* (Vieira, 2010). No entanto, uma vez que os valores dos halos para as amostras em causa eram inferiores ao valor mínimo do intervalo da Ampicilina (27-35 mm) e do valor obtido pela Ampicilina em relação ao *S. aureus*, Vieira considerou que as amostras em causa não apresentavam atividade antibacteriana contra este micorganismo.

Em relação à tabela 5 é possível observar-se que as amostras número 40 (extrato aquoso dos ramos de *P. africanum*), 37 (extrato metanólico dos ramos de *P. africanum*), 38 (extrato de acetato de etilo dos ramos de *P. africanum*) e 39 (extrato de clorofórmio dos ramos de *P. africanum*) apresentaram igual halo de inibição de crescimento microbiano em relação ao *S. aureus*, com um valor de halo de inibição de 7 mm. No entanto, uma vez que os halos obtidos para estas amostras são inferiores ao valor mínimo do intervalo para a Ciprofloxacina (22-30 mm) e do valor obtido pela Ciprofloxacina em relação ao *S. aureus*, considerou-se que as amostras não apresentavam atividade antibacteriana em relação ao *S. aureus*.

### 3.4 Inibição da acetilcolinesterase

#### 3.4.1 Método de Ellman

A inibição da acetilcolinesterase pelas diferentes amostras foi avaliada pelo método de Ellman de acordo com 2.2.6.1.2. Inicialmente determinou-se a velocidade da reação enzimática para diferentes concentrações de amostra, ao fim de 180 segundos de reação

enzimática, através da construção dos gráficos de absorvência em função do tempo de reação enzimática em segundos. As velocidades obtidas foram depois usadas para calcular a percentagem de inibição de acordo como a equação 17. Os valores de IC<sub>50</sub> nos solventes metanol e DMSO foram depois determinados através das equações (anexo 2 tabelas 3A e 4A) obtidas pela construção de gráficos de percentagem de inibição da AChE (%) em função da concentração de amostra (mg/mL). Os resultados de IC<sub>50</sub> em mg/mL foram realizados em quadruplicado e expressos como média ± σ (gráficos 9 e 10).

Durante a realização dos ensaios para o método de Ellman, devido a problemas de solubilidade das diferentes amostras efetuaram-se duas determinações de IC<sub>50</sub>, uma usando como solvente o metanol e outra o DMSO.

Apenas para as amostras 7 (extrato aquoso das cascas de *H. floribundum*), 8 (extrato de clorofórmio das cascas de de *H. floribundum*), 17 (extrato aquoso das folhas de *P. capensis*), 23 (extrato de tolueno das folhas de *B. microphylla*), 26 (extrato metanólico dos ramos de *G. senegalensis*), 34 (extrato de acetato de etilo do fruto de *S. incanum*), 35 (extrato aquoso do fruto de *S. incanum*), 37 (extrato metanólico dos ramos de *P. africanum*), 38 (extrato de acetato de etilo dos ramos de *P. africanum*), 39 (extrato de clorofórmio dos ramos de *P. africanum*), 40 (extrato aquoso dos ramos de *P. africanum*), 47 (extrato metanólico das raízes de *P. thonningii*), 49 (extrato de clorofórmio das raízes de *P. thonningii*), 50 (extrato aquoso das raízes de *P. thonningii*), 51 (Vincosamida) e 52 (ácido 3-O-B-D-fucopiranosilquinóvico) foi possível determinar o IC<sub>50</sub> nos solventes metanol e DMSO. Para as restantes amostras não foi possível calcular o IC<sub>50</sub> nestes dois solventes devido à ausência de solubilidade no meio utilizado no método de Ellman. Para as amostras 51 (Vincosamida), 52 (ácido 3-O-B-D-fucopiranosilquinóvico), 53 (ácido 3-O-α-L-ramnopiranosilquinóvico) e 54 (Malanósido A) não foi possível calcular o IC<sub>50</sub> em DMSO devido à indisponibilidade de amostra.

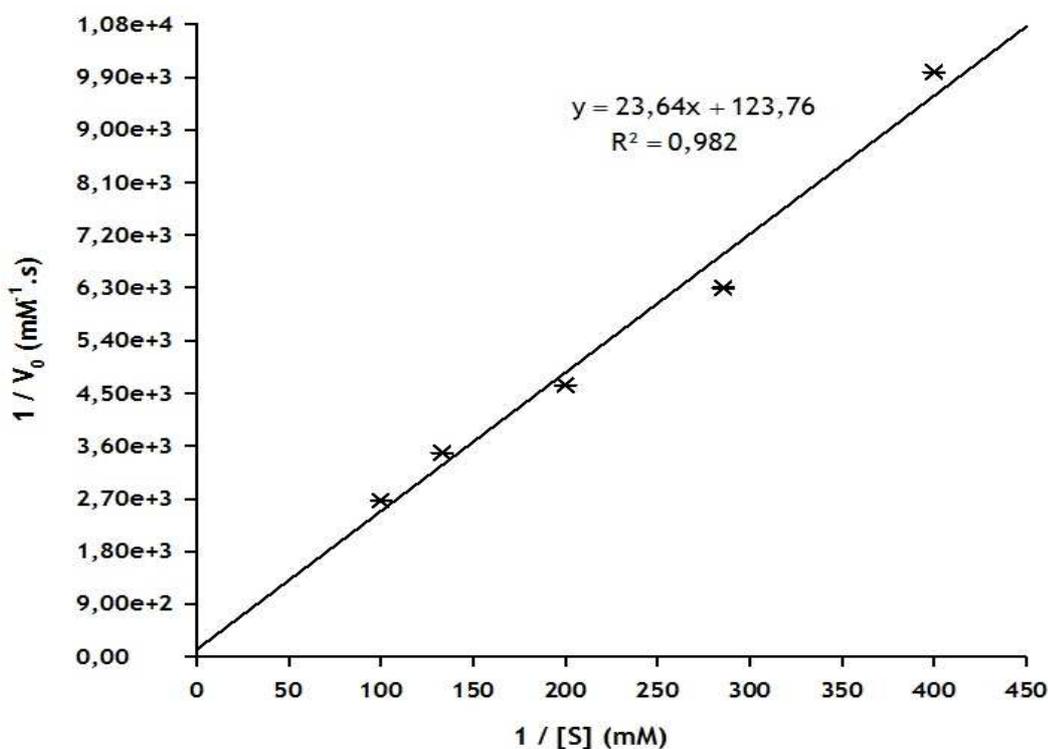
Como composto de referência foi usado o inibidor da AChE Tacrina dissolvido em metanol ou DMSO conforme os casos. O valor de IC<sub>50</sub> obtido, em relação à AChE, para a Tacrina dissolvida em DMSO (gráfico 9) foi de 0,02 ± 0,00 µg/mL e para a Tacrina dissolvida em metanol (gráfico 10) foi de 0,02 ± 0,00 µg/mL. Considerando que na literatura o valor de IC<sub>50</sub> encontrado para a Tacrina em DMSO é de 0,01 µg/mL (Giovanni *et al.*, 2008), o valor obtido é mais alto do que a referência. O valor de referência do IC<sub>50</sub> para a Tacrina em metanol é de 0,02 µg/mL (Chen *et al.*, 2013), e neste caso o valor encontra-se de acordo com o valor encontrado na literatura. A diferença entre o valor obtido para o DMSO e o da referência bibliográfica pode ser explicada, pelas diferentes condições experimentais, em particular as diferentes percentagens de solventes usadas nos ensaios. A percentagem de DMSO e de metanol usada foi de 1 %, no entanto, Giovanni e colaboradores usaram 1,6 % de DMSO, e Chen e colaboradores usaram 3 % de metanol. Dado que o valor de IC<sub>50</sub> da Tacrina dissolvida em metanol é igual ao valor encontrado na referência bibliográfica, apesar das diferentes condições experimentais em termos da percentagem usada de solventes, é possível observar-se que, ao contrário do DMSO, o metanol não influencia a atividade da AChE.

A determinação dos parâmetros cinéticos da AChE na presença de 1 % de metanol ou DMSO (tabela 6) foi realizada de acordo com 2.2.6.1.1. Através da linearização de Lineweaver-Burk os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  da acetilcolinesterase, para o solvente metanol, foram obtidos usando a equação do gráfico 7. Para o solvente DMSO, os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  da acetilcolinesterase foram obtidos através da equação dada pela representação do gráfico de Lineweaver-Burk (gráfico 8). Na tabela 6 encontram-se os resultados dos parâmetros cinéticos da acetilcolinesterase nos solventes metanol e DMSO.

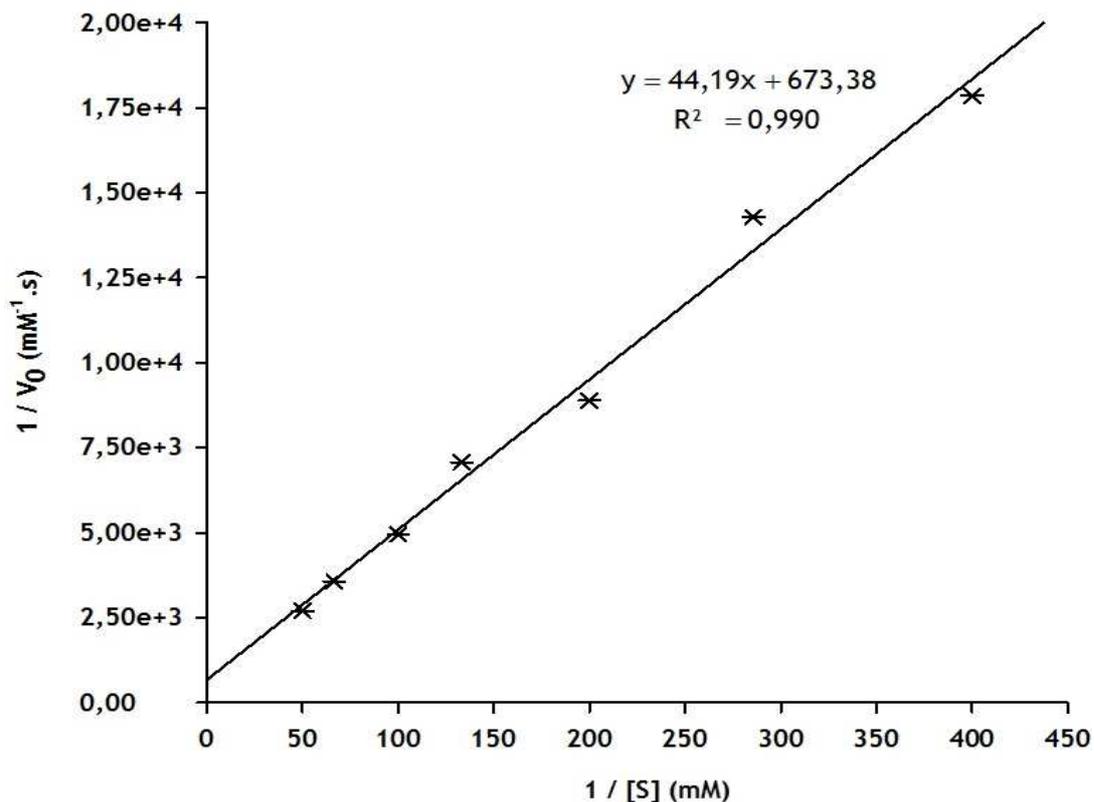
**Tabela 6:** Parâmetros cinéticos da acetilcolinesterase na presença de 1 % de metanol ou de 1 % de DMSO.

Parâmetros cinéticos da acetilcolinesterase		
	$K_m$ (mM $\pm$ $\sigma$ )	$V_{max}$ (mM <sup>-1</sup> .s $\pm$ $\sigma$ )
Metanol (1%)	0,19 $\pm$ 0,01	8,08E <sup>-3</sup> $\pm$ 2,00E <sup>-4</sup>
DMSO (1%)	0,07 $\pm$ 0,01	1,49E <sup>-3</sup> $\pm$ 1,75E <sup>-4</sup>

Analizando os resultados de  $K_m$  e  $V_{max}$  para o DMSO e metanol constata-se que os valores obtidos com o solvente DMSO são menores do que os valores obtidos com metanol, o que significa que o DMSO afeta a atividade da enzima acetilcolinesterase. De facto é conhecido que mesmo para baixas percentagens o DMSO interfere consideravelmente com a cinética da acetilcolinesterase (Giovanni et al., 2008).



**Gráfico 7:** Representação gráfica da linearização de Lineweaver- Burk para a determinação dos parâmetros cinéticos da acetilcolinesterase na presença de 1 % de metanol. (n= 5; média  $\pm$   $\sigma$ ; P < 0,05).



**Gráfico 8:** Representação gráfica da linearização de Lineweaver- Burk para a determinação dos parâmetros cinéticos da acetilcolinesterase na presença de 1 % de DMSO. (n= 7; média  $\pm$   $\sigma$ ;  $P < 0,05$ ).

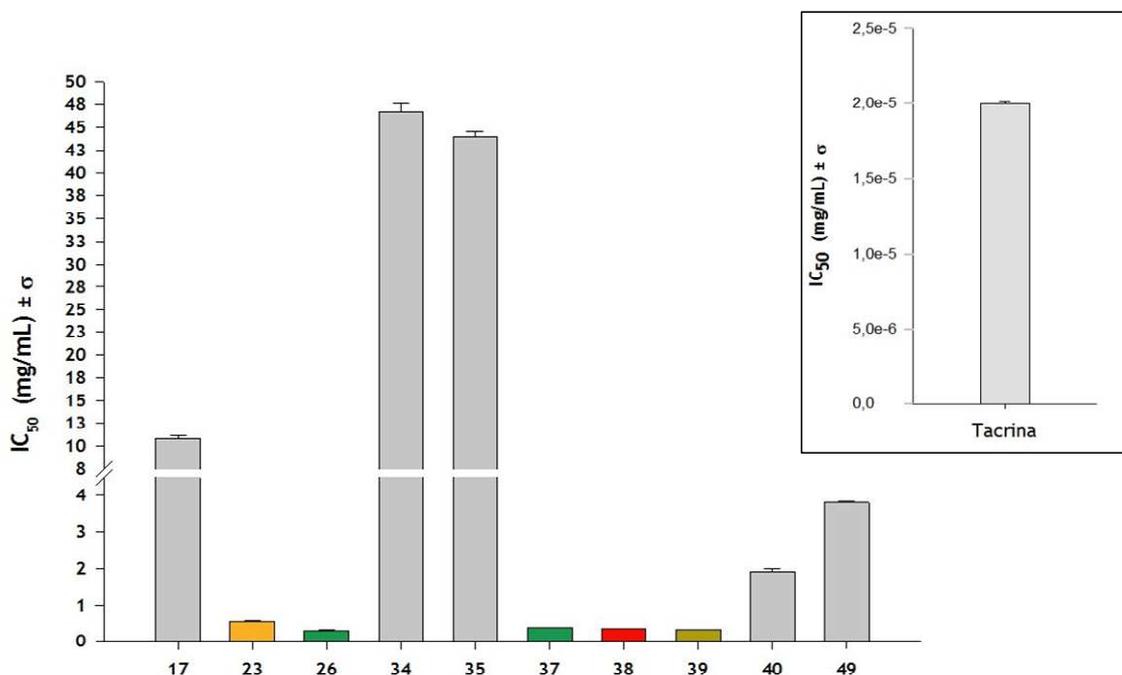
No gráfico 9 encontram-se os valores de  $IC_{50}$  obtidos para a Tacrina e amostras dissolvidas em metanol, e no gráfico 10 estão representados os valores de  $IC_{50}$  obtidos para a Tacrina e amostras dissolvidas em DMSO. Através dos gráficos 9 e 10 é possível observar que o número de amostras para as quais foi possível determinar o  $IC_{50}$  em relação à inibição da acetilcolinesterase é limitada. Assim com o solvente metanol foi possível determinar o  $IC_{50}$  apenas para onze amostras e dez para o DMSO. A precipitação dos extratos para as concentrações mais elevadas foi a principal razão para o número limitado de amostras em que se conseguiu determinar o  $IC_{50}$  através do método de Ellman.

Nos gráficos 9 e 10 é possível observar-se que as amostras para as quais foi possível determinar-se o  $IC_{50}$  variam quando se usa metanol ou DMSO, com exceção das amostras 37 (extrato metanólico dos ramos de *P. africanum*), 38 (extrato de acetato de etilo dos ramos de *P. africanum*), 39 (extrato de clorofórmio dos ramos de *P. africanum*), 40 (extrato aquoso dos ramos de *P. africanum*) e 49 (extrato de clorofórmio das raízes de *P. thonningii*) que apresentaram boa solubiliadade nos dois solventes. Esta diferença deve-se ao facto de o DMSO e o metanol serem solventes com propriedades físico-químicas diferentes, pelo que a interação com os diferentes compostos nos extratos também vai ser diferente.

Através do gráfico 9 e comparando com o  $IC_{50}$  obtido para a Tacrina dissolvida em DMSO, é possível verificar que os melhores resultados de  $IC_{50}$  foram obtidos para as amostras número 23 (extrato de tolueno das folhas de *B. microphylla*) com um  $IC_{50}$  de  $0,55 \pm 0,00$  mg/mL, 37 (extrato metanólico dos ramos de *P. africanum*) com um  $IC_{50}$  de  $0,38 \pm 0,00$  mg/mL, 38 (extrato de acetato de etilo dos ramos de *P. africanum*) com um  $IC_{50}$  de  $0,35 \pm 0,00$  mg/mL,

39 (extrato de clorofórmio dos ramos de *P. africanum*) com um IC<sub>50</sub> de 0,33 ± 0,00 mg/mL e 26 (extrato metanólico dos ramos de *G. senegalensis*) com um IC<sub>50</sub> de 0,30 ± 0,00 mg/mL.

Os valores de IC<sub>50</sub> obtidos para estas amostras dissolvidas em DMSO são mais altos do que o valor obtido para o composto de referência. Tais resultados podem ser explicados pela influência do DMSO na atividade da enzima acetilcolinesterase.



**Gráfico 9:** IC<sub>50</sub> obtido através do método de Ellman para a Tacrina (gráfico destacado) e para as amostras 17, 23, 26, 34, 35, 37, 38, 39, 40 e 49 (tabela 3) dissolvidas em DMSO. As barras coloridas correspondem às amostras com melhores resultados em termos de IC<sub>50</sub>. A verde os extratos metanólicos: 26 - *G. senegalensis* (ramos); 37 - *P. africanum* (ramos). A vermelho o extrato de acetato de etilo: 38 - *P. africanum* (ramos). A amarelo o extrato de tolueno: 23 - *B. microphylla* (folhas). A castanho o extrato de clorofórmio: 39 - *P. africanum* (ramos). (n= 4; média ± σ; P< 0,05).

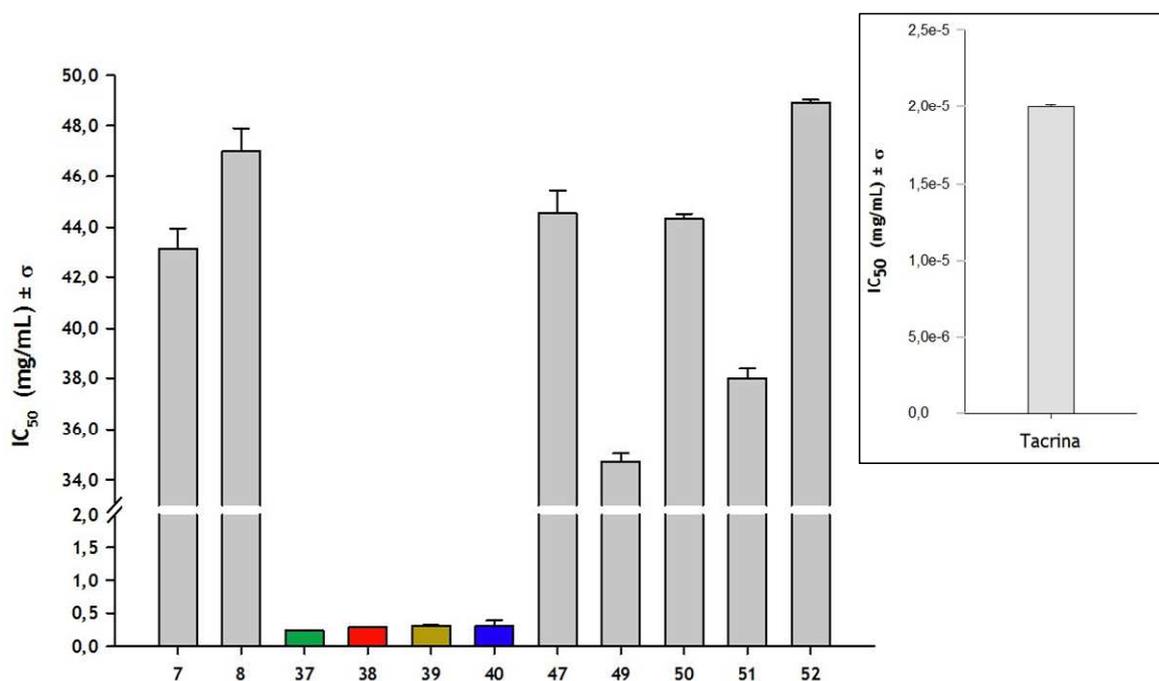
Como as amostras do gráfico 9 com bons resultados são constituídas por mistura de compostos (anexo1 figuras 4A<sub>1</sub>, 5A<sub>1</sub>, 6A<sub>1</sub> e 7A<sub>1</sub>) o isolamento dos compostos presentes na sua constituição e a realização de novos ensaios pode originar valores menores de IC<sub>50</sub>.

As restantes amostras apresentaram um valor de IC<sub>50</sub> elevado pelo que apresentam uma baixa capacidade de inibição da atividade da AChE.

Das cinco amostras dissolvidas em DMSO com melhores resultados em termos de inibição da AChE, apenas as amostras número 26, 37, 38 e 39 apresentaram uma concentração elevada de compostos fenólicos totais. Para estas amostras a inibição da AChE pode ser devido aos compostos fenólicos presentes na sua constituição. Em relação á atividade antioxidante apenas as amostras número 26 e 38 apresentaram melhor capacidade em captar os radicais livres de DPPH e ABTS. Em relação ao valor peróxido todas as amostras com melhores resultados em termos de inibição da AChE apresentaram um efeito pro-oxidante.

Em relação ao gráfico 10, os melhores resultados de IC<sub>50</sub> comparando com o valor da Tacrina dissolvida em metanol foram obtidos para as amostras número 39 (extrato de

clorofórmio dos ramos de *P. africanum*) com um valor de  $IC_{50}$  de  $0,30 \pm 0,00$  mg/mL, 40 (extrato aquoso dos ramos de *P. africanum*) com um valor de  $IC_{50}$  de  $0,29 \pm 0,00$  mg/mL, 38 (extrato de acetato de etilo dos ramos de *P. africanum*) com um valor de  $IC_{50}$  de  $0,27 \pm 0,00$  mg/mL e 37 (extrato metanólico dos ramos de *P. africanum*) com um valor de  $IC_{50}$  de  $0,23 \pm 0,00$  mg/mL. As restantes amostras apresentaram uma baixa capacidade de inibição da atividade da AChE, uma vez que, os valores de  $IC_{50}$  são elevados. Para as amostras número 37, 38 e 40 observou-se uma boa capacidade de inibição da AChE, no entanto os valores de  $IC_{50}$  são maiores do que o valor para a Tacrina. Tais resultados podem ser explicados pela influência do DMSO na atividade da enzima acetilcolinesterase.



**Gráfico 10:**  $IC_{50}$  obtido através do método de Ellman para a Tacrina (gráfico destacado) e para as amostras 7, 8, 37, 38, 39, 40, 47, 49 e 50 (tabela 3) dissolvidas em metanol. As barras coloridas correspondem às amostras com melhores resultados em termos de  $IC_{50}$ . A verde o extrato metanólico: 37 - *P. africanum* (ramos). A vermelho o extrato de acetato de etilo: 38 - *P. africanum* (ramos). A azul o extrato aquoso: 40 - *P. africanum* (ramos). A castanho o extrato de clorofórmio: 39 - *P. africanum* (ramos). (n= 4; média  $\pm \sigma$ ; P < 0,05).

O isolamento e purificação dos diferentes compostos que fazem parte das amostras com melhores resultados, bem como a realização de novos ensaios, é fundamental para se averiguar qual ou quais os compostos responsáveis pela capacidade de inibição da AChE. As amostras número 51 (Vincosamida) e 52 (Ácido 3-O-B-D-fucopiranosilquinóvico) foram isoladas da amostra número 48 (extrato de acetato de etilo das raízes de *P. thonningii*). Para a amostra 48 não foi possível avaliar o efeito sobre a AChE devido à formação de precipitados durante o ensaio, no entanto é possível verificar que, neste caso, os compostos isolados da amostra número 48 apresentam uma baixa capacidade em inibir a acetilcolinesterase.

As amostras dissolvidas em metanol com melhor capacidade em inibir a atividade da AChE apresentaram uma concentração elevada de compostos fenólicos totais, pelo que, a

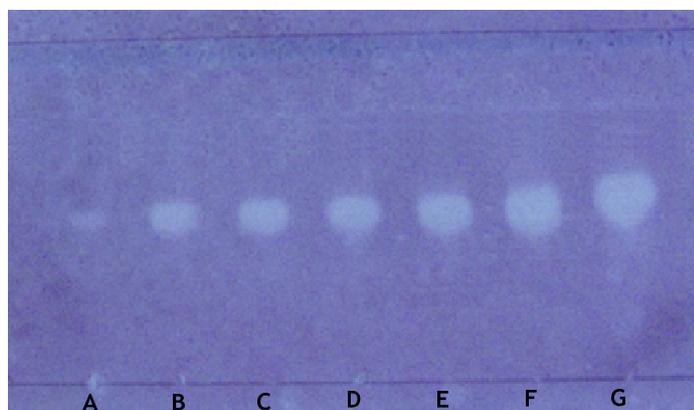
capacidade destas amostras em inibir a atividade da AChE é em grande parte devido aos compostos fenólicos presentes na sua constituição.

Em relação à atividade antioxidante, das amostras com melhores resultados apenas a amostra número 38 apresentou melhor capacidade em captar os radicais livres de DPPH, no entanto, em relação aos radicais livres de ABTS a capacidade de captação destes radicais é idêntica entre as amostras número 37, 38, 39 e 40. No que diz respeito à redução da oxidação dos ácidos gordos insaturados do óleo de girassol as amostras com melhores resultados em termos de inibição da AChE apresentaram-se como pro-oxidantes.

### 3.4.2 Método bioautográfico de cromatografia em camada fina

A inibição da acetilcolinesterase pelos diferentes extratos e compostos de síntese através do método bioautográfico de cromatografia em camada fina foi determinada de acordo com 2.2.6.2 e 2.2.6.2.1. Os solventes utilizados e as respectivas proporções foram determinadas em ensaios prévios de modo a que houvesse separação máxima dos componentes de cada amostra de extrato. Nas amostras em que se observou inibição calculou-se o fator de retenção ( $R_f$ ) (tabela 7) das respectivas manchas obtidas nas placas (anexo 1 figuras 1A<sub>1</sub>-8A<sub>1</sub>).

O inibidor da acetilcolinesterase Eserina foi usado como composto de referência para se definir o limite mínimo de deteção, ou seja, para se determinar a concentração mínima de amostra que produz uma mancha perceptível a olho nú. A concentração mínima de Eserina em que foi possível detetar-se uma mancha branca foi de 0,001 mg/mL (figura 29).



**Figura 29:** Placa cromatográfica obtida, através do método bioautográfico de cromatografia em camada fina realizado de acordo com Marston *et al.* (2002), para as diferentes concentrações de Eserina. A- 0,001 mg/mL, B- 0,010 mg/mL, C- 0,015 mg/mL, D- 0,020 mg/mL, E- 0,025 mg/mL, F- 0,050 mg/mL e G- 0,100 mg/mL (80:20 CHCl<sub>3</sub>-MeOH). Para todas as manchas o fator de retenção obtido foi de  $R_f=0,55$ .

Através da tabela 7 é possível observar que existe um grande número de amostras capazes de inibir a atividade da acetilcolinesterase, e no caso dos extratos vegetais essa capacidade de inibição é na maior parte dos casos devido a mais do que um composto presente no extrato (anexo 1 figuras 1A<sub>1</sub>-8A<sub>1</sub>). Assim as amostras vegetais para as quais se registou mais do que um composto com capacidade para inibir a acetilcolinesterase foram as amostras número 9 (extrato de hexano das cascas de *H. floribundum*) com dois fatores de retenção ( $R_{f1}= 0,26$ ;

Rf<sub>2</sub>= 0,67), 20 (extrato de tolueno das folhas de *X. odoratissima*) com dois fatores de retenção (Rf<sub>1</sub>= 0,26; Rf<sub>2</sub>= 0,44), 22 (extrato de diclorometano da parte aérea de *E. viscosa*) com dois fatores de retenção (Rf<sub>1</sub>= 0,24; Rf<sub>2</sub>= 0,78), 28 (extrato de hexano da parte aérea de *C. gratissimus*) com três fatores de retenção (Rf<sub>1</sub>= 0,26; Rf<sub>2</sub>= 0,44; Rf<sub>3</sub>= 0,72), 29 (extrato metanólico da parte aérea de *C. gratissimus*) com dois fatores de retenção (Rf<sub>1</sub>= 0,25; Rf<sub>2</sub>= 0,45), 31 (extrato de clorofórmio da parte aérea de *C. gratissimus*) com três fatores de retenção (Rf<sub>1</sub>= 0,49; Rf<sub>2</sub>= 0,61; Rf<sub>3</sub>= 0,75), 44 (extrato de clorofórmio das raízes de *P. glaucocarpa*) com dois fatores de retenção (Rf<sub>1</sub>= 0,54; Rf<sub>2</sub>= 0,61), 48 (extrato de acetato de etilo das raízes de *P. thonningii*) com dois fatores de retenção (Rf<sub>1</sub>= 0,50; Rf<sub>2</sub>= 0,56) e 50 (extrato aquoso das raízes de *P. thonningii*) com dois fatores de retenção (Rf<sub>1</sub>= 0,17; Rf<sub>2</sub>= 0,49).

Para as amostras número 2 (extrato de clorofórmio das folhas de *A. huillensis*), 5 (extrato de hexano das folhas de *A. huillensis*), 12 (extrato metanólico da parte aérea de *P. angolense*), 15 (extrato de hexano das folhas de *P. capensis*), 17 (extrato aquoso das folhas de *P. capensis*), 21 (extrato de acetato de etilo da parte aérea de *E. viscosa*), 23 (extrato de tolueno das folhas de *B. microphylla*), 27 (extrato metanólico dos ramos de *S. mannii*), 30 (extrato de acetato de etilo da parte aérea de *C. gratissimus*) e 36 (extrato de hexano dos ramos de *P. africanum*), apenas um factor de retenção foi registado (anexo 1 figuras 3A<sub>1</sub>, 4 A<sub>1</sub>, 5 A<sub>1</sub>, 6 A<sub>1</sub> e 7 A<sub>1</sub>), no entanto, isso não significa que o resultado seja devido a um só composto pois podem existir nos extratos diferentes compostos com fatores de retenção próximos, o que originam manchas sobrepostas. Para estes casos será necessário a realização de novos ensaios usando diferentes porporções de solventes de modo a obter uma melhor separação possível dos compostos presentes nessas amostras.

A capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase (tabela 7) foi também observada para as amostras número 55 (cumarina sintética 1) com um Rf= 0,13; 56 (cumarina sintética 2) com um Rf= 0,88; 60 (cumarina sintética 6) com um Rf= 0,88; 61 (cumarina sintética 7) com um Rf= 0,25 e 62 (cumarina sintética 8) com um Rf= 0,75 (anexo 1 figura 1 A<sub>1</sub>).

No método de Ellman não foi possível observar o efeito destes compostos em relação à enzima devido à ocorrência de precipitação das amostras nos solventes utilizados no método. No caso dos compostos puros isolados dos extratos vegetais, apenas as amostras número 52 (ácido 3-O-β-D-fucopiranosilquinóvico) com um Rf= 0,25 e amostra número 53 (ácido 3-O-α-L-ramnopiranosilquinóvico) com um Rf= 0,25 apresentaram capacidade em inibir a acetilcolinesterase pelo método bioautográfico de cromatografia em camada fina (anexo 1 figura 8 A<sub>1</sub>).

As amostras número 17 (extrato aquoso das folhas de *P. capensis*), 23 (extrato de tolueno das folhas de *B. microphylla*), 50 (extrato aquoso das raízes de *P. thonningii*) e 52 (ácido 3-O-β-D-fucopiranosilquinóvico) apresentaram resultados positivos nos métodos de Ellman e bioautográfico, apesar de no método de Ellman os resultados para estas amostras indicarem uma baixa inibição da AChE (IC<sub>50</sub> altos). Para as amostras que deram resultados positivos no método de Ellman em metanol e DMSO, e não se observou inibição da enzima pelo método

bioautográfico como, por exemplo, a amostra número 51 (Vincosamida), foram propostas algumas hipóteses (Giovanni *et al.*, 2008) que ajudam a explicar estes resultados obtidos.

A possibilidade de inativação dos compostos após interação com a sílica da placa cromatográfica e a alteração de conformação da enzima após a adsorção nas placas podem ser as razões pelas quais as amostras com resultados positivos no método de Ellman não apresentam inibição da AChE no método bioautográfico. A alteração de conformação da enzima pode em alguns casos facilitar a interação entre a enzima e o inibidor e noutros dificultar essa interação, o que faz com que se observe diferentes resultados entre os dois métodos.

Em relação à amostra número 48 (extrato de acetato de etilo das raízes de *P. thonningii*) é possível observar-se que esta apresenta inibição da AChE com dois fatores de retenção. As amostras 52 (ácido 3-O-β-D-fucopiranosilquinóico) e 53 (ácido 3-O-α-L-ramnopiranosilquinóico) também inibem a enzima e foram isoladas da amostra número 48. No entanto, não é possível dizer se os dois fatores de retenção obtidos para a amostra número 48 correspondem às amostras número 52 e 53.

**Tabela 7:** Fatores de retenção obtidos no método bioautográfico de cromatografia em camada fina para as diferentes amostras.

<b>Amostras</b>	<b>Inibição</b>	<b>Rfs</b>	<b>Solventes (%)</b>
1	N	–	70:30 (CHCl <sub>3</sub> -MeOH)
2	S	0,46	80:20 (CHCl <sub>3</sub> -MeOH)
3	N	–	
4	N	–	
5	S	0,26	80:20 (Hex-AcOEt)
6	N	–	
7	N	–	70:30 (CHCl <sub>3</sub> -MeOH)
8	W	–	80:20 (CHCl <sub>3</sub> -MeOH)
9	S	0,26	80:20 (Hex-AcOEt)
		0,67	
10	N	–	
11	N	–	70:30 (CHCl <sub>3</sub> -MeOH)
12	S	0,25	80:20 (Hex-AcOEt)
13	N	–	70:30 (CHCl <sub>3</sub> -MeOH)
14	N	–	80:20 (CHCl <sub>3</sub> -MeOH)
15	S	0,26	80:20 (Hex-AcOEt)
		–	
16	N	–	
17	S	0,78	70:30 (CHCl <sub>3</sub> -MeOH)
18	N	–	80:20 (CHCl <sub>3</sub> -MeOH)
19	N	–	
20	S	0,26	80:20 (Hex-AcOEt)
		0,44	
21	S	0,9	95:5 (AcOEt-MeOH)
22	S	0,24	90:10 (CHCl <sub>3</sub> -AcOEt)
		0,78	
23	S	0,26	80:20 (Hex-AcOEt)
24	N	–	70:30 (CHCl <sub>3</sub> -MeOH)
25	N	–	95:5 (AcOEt-MeOH)
26	N	–	
27	S	0,25	
28	S	0,26	80:20 (Hex-AcOEt)
		0,44	
		0,72	
29	S	0,25	
		0,45	
30	S	0,59	95:5 (AcOEt-MeOH)

S - inibição observada; N - inibição não observada; W - amostra indisponível.

**Tabela 7 (continuação):** Fatores de retenção obtidos no método bioautográfico de cromatografia em camada fina para as diferentes amostras.

Amostras	Inibição	Rfs	Solventes (%)
		0,49	
31	S	0,61	80:20 (CHCl <sub>3</sub> -MeOH)
		0,75	
32	N	—	70:30 (CHCl <sub>3</sub> -MeOH)
33	N	—	80:20 (Hex-AcOEt)
34	N	—	95:5 (AcOEt-MeOH)
35	N	—	70:30 (CHCl <sub>3</sub> -MeOH)
36	S	0,26	80:20 (Hex-AcOEt)
37	N	—	
38	N	—	95:5 (AcOEt-MeOH)
39	N	—	80:20 (CHCl <sub>3</sub> -MeOH)
40	N	—	70:30 (CHCl <sub>3</sub> -MeOH)
41	W	—	80:20 (Hex-AcOEt)
42	N	—	80:20 (Hex-AcOEt)
43	N	—	95:5 (AcOEt-MeOH)
		0,54	
44	S	0,61	80:20 (CHCl <sub>3</sub> -MeOH)
45	N	—	70:30 (CHCl <sub>3</sub> -MeOH)
46	W	—	80:20 (Hex-AcOEt)
47	N	—	
		0,5	
48	S	0,56	95:5 (AcOEt-MeOH)
49	N	—	80:20 (CHCl <sub>3</sub> -MeOH)
		0,17	
50	S	0,49	70:30 (CHCl <sub>3</sub> -MeOH)
51	N	—	
		0,25	
52	S	0,25	90:10 (CHCl <sub>3</sub> -MeOH)
53	S	0,25	
54	N	—	
		0,13	
55	S	0,13	
		0,88	
56	S	0,88	70:30 (AcOEt-MeOH)
57	N	—	
		0,88	
58	S	0,88	
59	N	—	
		0,75	
60	S	0,75	
		0,75	
61	S	0,75	95:5 (CHCl <sub>3</sub> -MeOH)
62	S	0,75	

S - inibição observada; N - inibição não observada; W - amostra indisponível.



# Capítulo 4

## 4.1 Conclusão

A descoberta de novos compostos com ação farmacológica tem, atualmente, suscitado interesse em particular devido ao aumento da resistência por parte dos microrganismos, assim como a diminuição do número de novos agentes antimicrobianos e ainda devido ao envolvimento das espécies reativas de oxigênio produzidas *in vivo* no desenvolvimento de algumas doenças. A toxicidade dos fármacos usados atualmente no tratamento dos sintomas da doença de Alzheimer constitui igualmente uma das razões pelas quais a pesquisa de novos compostos é fundamental.

Ao longo dos tempos diversas patologias foram tratadas com recurso a plantas medicinais. Os produtos naturais obtidos a partir das plantas podem ser usados, como compostos puros ou extratos vegetais, no tratamento de algumas doenças como, por exemplo, a doença de Alzheimer. As plantas proporcionam assim oportunidades quase ilimitadas para o surgimento de novos compostos, e a modificação de produtos naturais com vista a melhorar as suas propriedades biológicas ou a síntese total de compostos, também funciona como um ponto de partida para a obtenção de novos compostos com ação farmacológica.

Assim considerando a utilidade das plantas e dos compostos de síntese, como fonte de novos compostos com ação farmacológica, este trabalho de investigação consistiu principalmente no estudo da atividade antioxidante, antimicrobiana e de inibição da acetilcolinesterase por parte de cinquenta extratos vegetais de dezasseis plantas medicinais angolanas, quatro compostos naturais isolados de extratos vegetais e oito cumarinas de síntese.

No estudo da atividade antioxidante, das amostras que apresentaram uma maior reatividade com o ABTS<sup>•+</sup>, apenas as amostras número 16 (extrato metanólico das folhas de *P. capensis*) e 17 (extrato aquoso das folhas de *P. capensis*) é que apresentaram uma concentração mais elevada em compostos fenólicos. Assim para estas amostras pode se concluir que a reatividade com o ABTS<sup>•+</sup> é devido aos compostos de natureza fenólica que possuem.

As amostras número 6 (extrato metanólico das cascas de *H. floribundum*) e 43 (extrato de acetato de etilo das raízes de *P. glaucocarpa*) também apresentam uma boa reatividade com o ABTS<sup>•+</sup>, apesar da concentração de compostos fenólicos totais não ser das mais altas. Há que ter também em conta que o efeito antioxidante das amostras vegetais pode não ser resultado de um único composto, mas sim da sinergia entre os diferentes compostos presentes nas amostras vegetais. A amostra número 38 (extrato de acetato de etilo dos ramos de *P. africanum*) é um exemplo de amostra com uma concentração elevada em compostos fenólicos totais e um EC<sub>50</sub> alto para o ABTS<sup>•+</sup>. Para esta amostra em particular pode-se concluir que o EC<sub>50</sub> alto para o ABTS<sup>•+</sup> é devido à baixa reatividade dos compostos fenólicos presentes na amostra com o radical ABTS.

Em relação ao método de DPPH, das amostras que apresentaram melhor reatividade com o DPPH<sup>\*</sup>, as amostras número 16 (extrato metanólico das folhas de *P. capensis*), 17 (extrato aquoso das folhas de *P. capensis*), 37 (extrato metanólico dos ramos de *P. africanum*), 38 (extrato de acetato de etilo dos ramos de *P. africanum*), 39 (extrato de clorofórmio dos ramos de *P. africanum*) e 40 (extrato aquoso dos ramos de *P. africanum*) foram as que apresentaram uma concentração maior em compostos fenólicos totais. Assim para estas amostras pode-se concluir que a reatividade com o DPPH<sup>\*</sup> é em grande parte resultado dos compostos de natureza fenólica presentes nas amostras, em particular para a amostra número 38, cuja concentração de compostos fenólicos totais foi a mais alta de todas as amostras vegetais. Para a *P. africanum* estudos fitoquímicos realizados anteriormente identificaram que esta planta continha nas cascas, folhas e sementes compostos fenólicos e cumarinas (Bizimenyera *et al.*, 2005; Bizimenyera *et al.*, 2007; Bahiaa *et al.*, 2010).

Algumas amostras como, por exemplo, as amostras número 30 (extrato de acetato de etilo da parte aérea de *C. gratissimus*), 33 (extrato metanólico do fruto de *S. incanum*), 34 (extrato de acetato de etilo do fruto de *S. incanum*) e 35 (extrato aquoso do fruto de *S. incanum*) possuem uma concentração em compostos fenólicos totais elevada e um EC<sub>50</sub> alto para o DPPH<sup>\*</sup>. Para estas amostras pode-se concluir que o EC<sub>50</sub> alto para o DPPH<sup>\*</sup> é devido à baixa reatividade dos compostos fenólicos presentes nas amostras com o DPPH<sup>\*</sup>. As amostras número 36 (extrato de hexano dos ramos de *P. africanum*), 41 (extrato de hexano das raízes de *P. glaucocarpa*), 42 (extrato metanólico das raízes de *P. glaucocarpa*), 44 (extrato de clorofórmio das raízes de *P. glaucocarpa*) e 45 (extrato aquoso das raízes de *P. glaucocarpa*) apresentaram boa reatividade com os radicais de DPPH, no entanto a concentração de compostos fenólicos totais para estas amostras é baixa, deste modo, é possível concluir-se que para estas amostras a reatividade com os radicais DPPH é devido a compostos de natureza não fenólica.

Ao efetuar-se a comparação dos resultados obtidos para o ABTS e DPPH pode-se concluir que as amostras número 16 (extrato metanólico das folhas de *P. capensis*), 17 (extrato aquoso das folhas de *P. capensis*), 37 (extrato metanólico dos ramos de *P. africanum*), 38 (extrato de acetato de etilo dos ramos de *P. africanum*), 39 (extrato de clorofórmio dos ramos de *P. africanum*) e 40 (extrato aquoso dos ramos de *P. africanum*) são os que se apresentam como fontes promissoras de compostos fenólicos com propriedades antioxidantes. Pode-se também concluir que as amostras número 6 (extrato metanólico das cascas de *H. floribundum*) e 43 (extrato de acetato de etilo das raízes de *P. glaucocarpa*) podem ser consideradas como fontes de compostos de natureza não fenólica com propriedades antioxidantes.

Para os compostos isolados dos extratos vegetais, em relação ao DPPH apenas os compostos Vincosamida (amostra 51) e Malanósido A (amostra 54) apresentaram capacidade em inibir o DPPH<sup>\*</sup>. As amostras número 51 (Vincosamida), 52 (ácido 3-O-β-D-fucopiranosilquinóvico) e 53 (ácido 3-O-α-L-ramnopiranosilquinóvico) foram isoladas da amostra número 48 (extrato de acetato de etilo das raízes de *P. thonningii*), para estas três amostras é possível observar-se pelos valores de EC<sub>50</sub> que o isolamento dos compostos na

amostra número 48 (extrato de acetato de etilo das raízes de *P. thonningii*) não melhorou a sua reatividade com o radical DPPH. Estes resultados permitem assim confirmar o facto de que o resultado da amostra número 48 é devido à sinergia entre compostos que possui. A amostra número 54 (Malanósido A) foi isolada da amostra número 38 (extrato de acetato de etilo dos ramos de *P. africanum*) e comparando os resultados para estas duas amostras em relação ao DPPH é possível concluir que a reatividade da amostra número 38 é em grande parte devida à amostra número 54. Em relação ao ABTS apenas foi possível determinar o EC<sub>50</sub> para as amostras número 51 (Vincosamida) e 52 (ácido 3-O-β-D-fucopiranosilquinóico), no entanto estas amostras apresentaram uma reatividade baixa em relação ao ABTS<sup>\*\*</sup>, tendo-se observado, tal como, para o DPPH o mesmo efeito de sinergia entre os compostos em relação à amostra número 48. Para os compostos isolados, em relação à atividade antioxidante pode-se concluir que estes possuem uma atividade baixa quando isolados, e que essa atividade aumenta por efeito de sinergia com outros compostos.

O método do valor peróxido permite avaliar o efeito das amostras em relação à diminuição da oxidação de uma amostra lipídica, assim quanto menor for valor peróxido ao fim de oito dias de oxidação, melhor será a capacidade da amostra em retardar a oxidação da amostra de óleo de girassol. A amostra número 1 (extrato aquoso das folhas de *A. huillensis*) revelou-se ser a mais eficaz em diminuir a oxidação do óleo de girassol ao fim de oito dias de oxidação. Esta amostra pode ser assim considerada como fonte promissora de compostos que permitem diminuir a oxidação de uma amostra lipídica. Para a amostra número 1 observou-se uma concentração de compostos fenólicos totais alta, pelo que se pode concluir que a diminuição da oxidação do óleo de girassol é em grande parte devido aos compostos fenólicos presentes nesta amostra. O mesmo resultado foi observado para as amostras número 6 (extrato metanólico das cascas de *H. floribundum*), 7 (extrato aquoso das cascas de *H. floribundum*), 10 (extrato metanólico da parte aérea de *T. antiscorbutica*), 13 (extrato aquoso da parte aérea de *P. angolense*), 16 (extrato metanólico das folhas de *P. capensis*), 17 (extrato aquoso das folhas de *P. capensis*) e 19 (extrato metanólico das folhas de *R. kirkii*). Destas amostras o melhor resultado em termos de diminuição da oxidação do óleo de girassol foi registado para as amostras número 6, 7, 13, 16 e 17. As amostras número 2 (extrato de clorofórmio das folhas de *A. huillensis*), 3 (extrato de clorofórmio das raízes de *A. huillensis*), 8 (extrato de clorofórmio das cascas de *H. floribundum*), 9 (extrato de hexano das cascas de *H. floribundum*), 18 (extrato de clorofórmio das folhas de *P. capensis*) e 22 (extrato de diclorometano da parte aérea de *E. viscosa*) apresentaram capacidade em diminuir o valor peróxido do óleo de girassol, no entanto, para estas amostras registou-se uma concentração de compostos fenólicos totais baixa, pelo que pode-se concluir que para estas amostras a diminuição da oxidação lipídica é efetuada por compostos de natureza não fenólica presentes nestas amostras.

Algumas amostras como, por exemplo, a amostra número 26 (extrato metanólico dos ramos de *G. senegalensis*), 29 (extrato metanólico da parte aérea de *C. gratissimus*), 36 (extrato de hexano dos ramos de *P. africanum*), 39 (extrato de clorofórmio dos ramos de *P.*

*africanum*), 46 (extrato de hexano das raízes de *P. thonningii*), 49 (extrato de clorofórmio das raízes de *P. thonningii*) e 50 (extrato aquoso das raízes de *P. thonningii*) apresentaram um efeito pro-oxidante, pelo que se pode concluir que as amostras com efeito pro-oxidante não apresentam compostos com capacidade em diminuir a oxidação lipídica e como tal não são consideradas como fontes de compostos capazes de diminuir a oxidação do óleo de girassol. Pelo contrário as amostras número 1 (extrato aquoso das folhas de *A. huillensis*), 6 (extrato metanólico das cascas de *H. floribundum*), 7 (extrato aquoso das cascas de *H. floribundum*), 13 (extrato aquoso da parte aérea de *P. angolense*), 17 (extrato aquoso das folhas de *P. capensis*) e 18 (extrato de clorofórmio das folhas de *P. capensis*) podem ser consideradas como fontes promissoras de compostos com capacidade em diminuir a oxidação do óleo de girassol ao fim de oito dias de oxidação.

Relativamente aos compostos de síntese usados, não foi possível avaliar o efeito antioxidante em relação aos métodos de ABTS, DPPH e valor peróxido devido principalmente a problemas de solubilidade. Para os compostos isolados dos extratos vegetais não foi possível determinar o valor peróxido devido à quantidade disponível.

No que diz respeito à investigação da atividade antimicrobiana dos diferentes extratos, os resultados obtidos nestes e em ensaios anteriores (Almeida, 2008; Vieira, 2010) demonstraram que para as estipes de microrganismos usados nenhum dos extratos apresentou atividade antimicrobiana considerada significativa, pelo que se pode concluir que os extratos analisados não possuem compostos com ação antimicrobiana para os microrganismos usados. Relativamente aos compostos de síntese não foi possível realizar ensaios de atividade antimicrobiana devido a problemas de solubilidade e no caso dos compostos isolados à quantidade disponível.

Em relação à inibição de atividade da acetilcolinesterase, os resultados obtidos nos dois métodos usados são diferentes. As diferenças são devido à solubilidade das amostras, que influenciam apenas as determinações no método de Ellman, e também podem ser devido à inativação dos compostos, no método bioautográfico, após interação com a sílica da placa e à alteração de conformação da enzima após a adsorção à placa cromatográfica.

No método de Ellman verificou-se que o DMSO em comparação com o metanol influencia a atividade da acetilcolinesterase, uma vez que, os parâmetros cinéticos com o DMSO diminuem. Segundo o método de Ellman, as amostras que apresentaram melhor capacidade em inibir a AChE, nos dois solventes usados, foram as amostras número 23 (extrato de tolueno das folhas de *B. microphylla*), 26 (extrato metanólico dos ramos de *G. senegalensis*), 37 (extrato metanólico dos ramos de *P. africanum*), 38 (extrato de acetato de etilo dos ramos de *P. africanum*), 39 (extrato de clorofórmio dos ramos de *P. africanum*) e 40 (extrato aquoso dos ramos de *P. africanum*). Destas amostras apenas a amostra 40 é que apresentou melhor resultado em metanol do que em DMSO. Para as amostras número 23 e 26 apenas foi possível determinar o efeito de inibição no DMSO pois em metanol ocorria a formação de precipitados. Destas amostras, apenas a amostra número 23 apresentou capacidade em inibir a AChE tanto no método de Ellman como no método bioautográfico. Para as amostras número 26, 37, 38, 39

e 40 não foi observada inibição da AChE no método bioautográfico, pelo que para estas amostras poderá ser colocada a hipótese de existir inativação dos compostos presentes nestas amostras, por ligação à placa cromatográfica ou então perda de atividade devido à separação dos compostos (efeito de sinergia). Ainda no método bioautográfico é possível observar-se que para algumas amostras vegetais a inibição é devido à presença de mais do que um composto (anexo 1 figuras 1A<sub>1</sub> - 8A<sub>1</sub>).

Ao analisar os dados obtidos entre o método bioautográfico e de Ellman é possível observar-se que apenas as amostras número 17 (extrato aquoso das folhas de *P. capensis*), 23 (extrato de tolueno das folhas de *B. microphylla*) e 50 (extrato aquoso das raízes de *P. thonningii*) apresentam resultados positivos nos dois métodos, pelo que se pode concluir que estas amostras possuem compostos promissores em termos de inibição da AChE. De facto no método bioautográfico, para as amostras número 9 (extrato de hexano das cascas de *H. floribundum*), 20 (extrato de tolueno das folhas de *X. odoratissima*), 22 (extrato de diclorometano da parte aérea de *E. viscosa*), 28 (extrato de hexano da parte aérea de *C. gratissimus*), 29 (extrato metanólico da parte aérea de *C. gratissimus*), 31 (extrato de clorofórmio da parte aérea de *C. gratissimus*), 44 (extrato de clorofórmio das raízes de *P. glaucocarpa*), 48 (extrato de acetato de etilo das raízes de *P. thonningii*) e 50 (extrato aquoso das raízes de *P. thonningii*) foi observado mais do que um fator de retenção, pelo que se pode concluir que a inibição da AChE por parte destas amostras é resultado de mais do que um composto. As plantas estudadas podem ser uma fonte importante de novos inibidores da AChE, uma vez isolados e purificados os compostos químicos presentes nos extratos que inibem a AChE.

Em relação aos compostos de síntese número 55 (cumarina sintética 1), 56 (cumarina sintética 2), 60 (cumarina sintética 6), 61 (cumarina sintética 7) e 62 (cumarina sintética 8), no método bioautográfico deram resultados positivos, mas no método de Ellman esse efeito não foi possível observar-se na medida em que devido a problemas de solubilidade não foi possível efetuar os ensaios.

Relativamente aos compostos isolados das amostras vegetais, no método bioautográfico apenas as amostras número 52 (ácido 3-O-β-D-fucopiranosilquinóico) e 53 (ácido 3-O-α-L-ramnopiranosilquinóico) apresentaram capacidade em inibir a acetilcolinesterase. As amostras número 51 (Vincosamida) e 54 (Malanósido A), no método bioautográfico não apresentaram capacidade de inibir a AChE, no entanto, no método de Ellman foi possível observar que estas amostras inibiam a enzima. Para estas amostras poderá ser colocada a hipótese de inativação dos compostos por ligação à placa cromatográfica.

De todas as amostras com capacidade em inibir a AChE nos métodos de Ellman e bioautográfico, apenas as amostras número 17 (extrato aquoso das folhas de *P. capensis*), 26 (extrato metanólico dos ramos de *G. senegalensis*), 27 (extrato metanólico dos ramos de *S. manii*), 29 (extrato metanólico da parte aérea de *C. gratissimus*), 30 (extrato de acetato de etilo da parte aérea de *C. gratissimus*), 31 (extrato de clorofórmio da parte aérea de *C. gratissimus*), 37 (extrato metanólico dos ramos de *P. africanum*), 38 (extrato de acetato de

etilo dos ramos de *P. africanum*), 39 (extrato de clorofórmio dos ramos de *P. africanum*) e 40 (extrato aquoso dos ramos de *P. africanum*) são as que apresentam uma concentração de compostos fenólicos totais alta, pelo que para estas amostras pode-se concluir que a ação de inibição da AChE pode ser resultado dos compostos fenólicos que possuem. No entanto para as amostras número 2 (extrato de clorofórmio das folhas de *A. huillensis*), 5 (extrato de hexano das folhas de *A. huillensis*), 9 (extrato de hexano das cascas de *H. floribundum*), 15 (extrato de hexano das folhas de *P. capensis*), 20 (extrato de tolueno das folhas de *X. odoratissima*), 22 (extrato de diclorometano da parte aérea de *E. viscosa*), 28 (extrato de hexano da parte aérea de *C. gratissimus*), 36 (extrato de hexano dos ramos de *P. africanum*) e 50 (extrato aquoso das raízes de *P. thonningii*) foi observado que a concentração de compostos fenólicos totais é baixa, pelo que neste caso para estas amostras pode-se concluir que a inibição da AChE é devido a compostos de natureza não fenólica.

Ao efetuar-se a comparação dos resultados obtidos pelo método bioautográfico e de Ellman pode-se concluir que as amostras número 17 (extrato aquoso das folhas de *P. capensis*), 23 (extrato de tolueno das folhas de *B. microphylla*), 26 (extrato metanólico dos ramos de *G. senegalensis*), 27 (extrato metanólico dos ramos de *S. manni*), 28 (extrato de hexano da parte aérea de *C. gratissimus*), 29 (extrato metanólico da parte aérea de *C. gratissimus*), 30 (extrato de acetato de etilo da parte aérea de *C. gratissimus*), 31 (extrato de clorofórmio da parte aérea de *C. gratissimus*), 37 (extrato metanólico dos ramos de *P. africanum*), 38 (extrato de acetato de etilo dos ramos de *P. africanum*), 39 (extrato de clorofórmio dos ramos de *P. africanum*), 40 (extrato aquoso dos ramos de *P. africanum*), 44 (extrato de clorofórmio das raízes de *P. glaucocarpa*), 48 (extrato de acetato de etilo das raízes de *P. thonningii*) e 50 (extrato aquoso das raízes de *P. thonningii*) podem ser consideradas como fontes promissoras de compostos com capacidade em inibir a atividade da acetilcolinesterase. As amostras número 52 (ácido 3-O-β-D-fucopiranosilquinóico), 53 (ácido 3-O-α-L-ramnopiranosilquinóico), 55 (cumarina sintética 1), 56 (cumarina sintética 2), 58 (cumarina sintética 4), 60 (cumarina sintética 6), 61 (cumarina sintética 7) e 62 (cumarina sintética 8) também podem ser consideradas como compostos promissores em termos de inibição da acetilcolinesterase.

Globalmente a amostra número 17 (extrato aquoso das folhas de *P. capensis*) apresenta atividade antioxidante e de inibição da AChE.

Tendo em conta os resultados obtidos nos ensaios de atividade biológica, os resultados das plantas *P. capensis* e *P. africanum* sugerem que estas plantas podem ser consideradas como uma fonte promissora de novos compostos com ação antioxidante e de inibição da acetilcolinesterase. Os resultados dos extratos das plantas *A. huillensis* e *P. angolense* sugerem que estas plantas podem ser consideradas como fontes promissoras de compostos com capacidade em inibir a oxidação lipídica.

## 4.2 Perspetivas futuras

Em termos de perspetivas para trabalhos futuros, deve efetuar-se o isolamento, purificação e caracterização de cada um dos compostos presentes nos diferentes extratos, sobretudo nos de *P. capensis*, *B. microphylla*, *X. odoratissima*, *P. thonningii*, *H. floribundum*, *E. viscosa*, *C. gratissimus*, *P. glaucocarpa*, *S. mannii*, *P. africanum*, *A. huillensis* e *P. thonningii*, com o objetivo de se elucidar qual ou quais os compostos que apresentam propriedades antioxidantes e de inibição da acetilcolinesterase.

O tipo de inibição enzimática por parte dos diferentes extratos, compostos de síntese e também compostos isolados deve ser também estudado.

Uma vez que ocorreram problemas de solubilidade durante a realização dos ensaios tanto com extratos como com compostos de síntese, outros solventes devem ser também testados de maneira a que seja possível realizar os ensaios para as diferentes amostras, ou então outros métodos que permitam realizar os ensaios devem ser considerados.

Em termos de trabalhos futuros e considerando que há poucos estudos sobre a bioatividade dos extratos e compostos destas plantas devem ser usadas outras estirpes de microrganismos nos testes de suscetibilidade, e devem ser também testadas, por exemplo, a atividade antiviral, cancerígena, citotóxica e inseticida. O estudo da inibição de outras enzimas envolvidas em outras doenças deve ser considerado em trabalhos futuros.

Dado que algumas plantas são usadas na medicina tradicional, as interações entre os extratos das plantas e os fármacos usados noutras terapias devem ser também avaliadas tanto *in vivo* como *in vitro*.

Assim, o estudo fitoquímico das plantas angolanas deve continuar, não só devido aos resultados prometedores como fonte de antioxidantes naturais e de compostos inibidores da acetilcolinesterase, mas também eventualmente devido a possíveis aplicações dos compostos isolados em outras áreas como, por exemplo, saúde e agroalimentar.



# Capítulo 5

## 5 Referências

### 5.1 Bibliografia

Abdelwahab, S. I., Taha, M. M., Abdulla, M. A., Nordin, N., Hadi, A. H., Mohan, S., Jayapalan, J. J., and Hashim, O. H. (2013). Gastroprotective mechanism of *Bauhinia thonningii* Schum. *Journal of Ethnopharmacology* 148: 277-286.

Adewusi, E. A., Moodley, N., and Steenkamp, V. (2010). Medicinal plants with cholinesterase inhibitory activity: A Review. *African Journal of Biotechnology* 9: 8257-8276.

Adewusi<sup>a</sup>, E. A., Steenkamp, V., and Moodley, N. (2011). Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activity of selected southern African medicinal plants. *South African Journal of Botany* 77: 638-644.

Adewusi<sup>b</sup>, E. A. and Steenkamp, V. (2011). In vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from southern Africa. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 4: 829-835.

Adwan, G., Shanab, B.A., and Adwan, K. (2010). Antibacterial activities of some plant extracts alone and in combination with different antimicrobials against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 3:266-269.

Agarwal, A., Gupta, S., and Sikka, S., (2006). The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 18: 325-332.

Ahmad, I., Aqil, F. and Owais, M. (2006). *Modern Phytomedicine: Turning Medicinal Plants into Drugs*, 1<sup>st</sup> ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim, Germany.

Alanis, A. J. (2005). Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era ?. *Archives of Medical Research* 36: 697-705.

Albarello, N., Simões, C., Rosas, P. F., Castro, T. C., Gianfaldoni, M. G., Callado, C. H. and Mansur, E. (2006). In vitro propagation of *Cleome spinosa* (*Capparaceae*) using explants from nursery-grown seedlings and axenic plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 42: 601-606.

Almeida, P. A. N. (2008). *Preparação de extratos de plantas medicinais angolanas e avaliação da sua actividade biológica*. Tese de licenciatura. Universidade da Beira Interior. Covilhã, Portugal.

- Anam, E. M. (1994). 2'-Hydroxy-3'-benzylouvarinol, 2'-hydroxy-5'-benzylisouvarinol-A and 2'-hydroxy-5'-benzylisouvarinol-B: three novel tetra-C-benzylated flavanones from the root extract of *Xylopia africana* (Benth) Oliver (*Annonaceae*). *Indian Journal of Chemistry* 33 B: 1009-1011.
- Anand, P., Singh, B. and Singh, N. (2012). A review on coumarins as acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 20: 1175-1180.
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S. and Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* 127: 183-198.
- Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K. and Ryan, D. (2000). Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst* 125: 989-1009.
- Apele, K. and Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399.
- Ara, N. and Nur, H. (2009). In Vitro Antioxidant Activity of Methanolic Leaves and Flowers Extracts of *Lippia Alba*. *Research Journal of Medicine and Medical Sciences* 4: 107-110.
- Aremu, A. O., Amoo, S. O., Ndhlala, A. R., Finnie, J. F. and Van Staden, J. (2011). Antioxidant activity, acetylcholinesterase inhibition, iridoid content and mutagenic evaluation of *Leucosidea sericea*. *Food Chemistry Toxicology* 49: 1122-1128.
- Arruda, R., Carvalho, L. N. and Del-Clar, K. (2006). Host specificity of a Brazilian mistletoe, *Struthanthus aff. polyanthus* (*Loranthaceae*), in cerrado tropical savanna. *Flora* 201: 127-134.
- Arts, M. J., Haenen, G. R., Voss, H. P. and Bast, A. (2004). Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. *Food Chemistry Toxicology* 4: 45-49.
- Asres, K., Sporer, F. and Wink, M. (2008). Occurrence of pyrrolizidine alkaloids in three Ethiopian *Solanecio* species. *Biochemical Systematics and Ecology* 36: 399-407.
- Ata, A., Gale, E. M. and Samarasekera, R. (2009). Bioactive chemical constituents of *Caesalpinia bonduc* (*Fabaceae*). *Phytochemistry Letters* 2: 106-109.
- Atoui, A. K., Mansouri, A., Boskou, G. and Kefalas, P. (2005). Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry* 89: 27-36.
- Auld, D. S., Kornecook, T. J., Bastianetto, S. and Quirion, R. (2002). Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to  $\beta$ -amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Progress in Neurobiology* 68: 209-245.

- Azevedo, M. M., Chaves, F. C., Almeida, C. A., Bizzo, H. R., Duarte, R. S., Takaki, G. M., Alviano, C. S. and Alviano, D. S. (2013). Antioxidant and Antimicrobial Activities of 7-Hydroxycalamenene-Rich Essential Oils from *Croton cajucara* Benth. *Molecules* 18: 1128-1137.
- Bahia, M. V., David, J. M., Rezende, L. C., Guedes, M. L. S. and David, J. P. (2010). A C-glucoside benzoic acid derivative from the leaves of *Peltophorum dubium*. *Phytochemistry Letters* 3: 168-170.
- Bajda, M., Więckowska, A., Hebda, M., Guzior, N., Sotriffer, C. A. and Malawska, B. (2013). Structure-Based Search for New Inhibitors of Cholinesterases. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 5608-5632.
- Balunas, M. J. and Kinghorn, A. D. (2005). Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences* 78: 431-441.
- Beh, L. K., Zakaria, Z., Beh, B. K., Ho, W. Y., Yeap, S. K. and Alitheen, N. B. (2012). Comparison of total phenolic content and antioxidant activities of freeze-dried commercial and fresh fruit juices. *Journal of Medicinal Plants Research* 48: 5857-5862.
- Behera, T. K. and Singh, N. (2002). Inter-specific crosses between eggplant (*Solanum melongena* L.) with related *Solanum* species. *Scientia Horticulturae* 95: 165-172.
- Berkov, S., Bastida, J., Nikolova, M., Viladomat, F. and Codina, C. (2008). Rapid TLC/GC-MS Identification of Acetylcholinesterase Inhibitors in Alkaloid Extracts. *Phytochemical Analysis* 19: 411-419.
- Bhattacharyya, S. S., Paul, S., Mandal, S. K., Banerjee, A., Boujedaini, N. and Bukhsh, A. K. (2009). A synthetic coumarin (4-Methyl-7 hydroxy coumarin) has anti-cancer potentials against DMBA-induced skin cancer in mice. *European Journal of Pharmacology* 614: 128-136.
- Birman, S. (1985). Determination of acetylcholinesterase activity by a new chemiluminescence assay with the natural substrate. *Biochemistry Journal* 225: 825-828.
- Bisswanger, H. (2011). *Practical Enzymology*, 2<sup>nd</sup> ed. Wiley-Blackwell. Weinheim, Germany.
- Bizimenyera, E. S., Aderogba, M. A., Eloff, J. N. and Swan, G. E. (2007). Potential of neuroprotective antioxidant-based therapeutics from *Peltophorum africanum* sord (*Fabaceae*). *African Journal Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 4: 99-106.
- Bizimenyera, E. S., Githiori, J. B., Eloff, J. N. and Swan, G. E. (2006). In vitro activity of *Peltophoru africanum* Sond. (*Fabaceae*) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. *Veterinary Parasitology* 142: 336-343.

Bizimenyera, S. E., Swan, G. E., Chikoto, H. and Eloff, J.N. (2005). Rationale for using *Peltophorum africanum* (Fabaceae) extracts in veterinary medicine. South African Veterinary 76: 54-58.

Block, S., Baccelli, C., Tinant, B., Meervelt, L. V., Rozenbergd, R., Jiwan, J. L., Labres, G., Gilletf, P. M. and Leclercq, J. Q. (2004). Diterpenes from the leaves of *Croton zambesicus*. Phytochemistry 65: 1165-1171.

Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 181: 1199-1200.

Blokhina, O., Viroinen, E. and Gerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. Annals of Botany 91: 179-194.

Böhm, V. and Schlesier, K. (2004). Methods to evaluate the antioxidant activity. Quality Handling and Evaluation 3: 55-71.

Bondet, V., Brand-Williams, W. and Berset, C. (1997). Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH• Free Radical Method. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie 30: 609-615.

Boney, B., Hooper, J. and Parisot, J., (2008). Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 61: 1295-1301.

Borges, C. M. (2008). Estudo da composição química de plantas medicinais da província da Huíla (Angola). Tese de Doutoramento. Universidade da Beira Interior. Covilhã, Portugal.

Borges, C. M., Diakanawm, C. and de Mendonça, D. I. (2010). Iridoids from *Hymenodictyon floribundum*. Journal of Brazilian Chemical Society 6: 1121-1125.

Born, S. L., Api, A. M., Ford, R. A., Lefever, F. R. and Hawkins, D. R. (2003). Comparative metabolism and kinetics of coumarin in mice and rats. Food and Chemical Toxicology 41: 247-258.

Bossard, E. (1996). Medicine Traditionnelle au Centre et a l'Ouest de l'Angola. Ministério da Ciência e Tecnologia, Instituto de Investigação Científica Tropical, Vol. 1. Lisboa, Portugal.

Bouayed, J., Piri, K., Rammal, H., Dicko, A., Desor, F., Younos, C. and Soulimani, R. (2007). Comparative evaluation of the antioxidant potential of some Iranian medicinal plants. Food Chemistry 104: 364-368.

Bourne, Y., Grassi, J., Bougis, P. E. and Marchot, P. (1999). Conformational Flexibility of the Acetylcholinesterase Tetramer Suggested by X-ray Crystallography. The Journal of Biological Chemistry 274: 30370-30376.

- Brady, S. T., Siegel, G. J., Albers, R. W. and Price, D. I. (2012). Basic neurochemistry principles of molecular, cellular and medical neurobiology. Academic Press (Elsevier). New York, United States of America.
- Brummitt, R. K., Chikuni, A. C., Lock, J. M. and Polhill, R. M. (2007). Leguminosae. Flora Zambesiaca volume 3, parte 2. (<http://apps.kew.org/efloras/namedetail.do?qry=namelist&flora=fz&taxon=10794&nameid=2752>, acedido em 19-09-2013).
- Buchanan, B., Gruissem, W. and Jones, R. (2000). Biochemistry & Molecular Biology of Plants, 1<sup>st</sup> ed. American Society of Plant Physiologists. Rockville, United States of America.
- Butler, M. S. (2004). The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. Journal of Natural Products 67: 2141-2153.
- Butler, M. S. (2005). Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. Natural Product Reports 22: 162-195.
- Cadenas, E. and Davies, K. J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. Free Radical Biology & Medicine 29: 222-230.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., and Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. Life Sciences 74: 2157-2184.
- Cannell, R. J. (1998). Methods in biotechnology: Natural Products Isolation, 1<sup>st</sup> ed. Humana Press Totowa. New Jersey, United States of America.
- Carbot, T. K., Jauregui, O., Gimeno, E., Castellote, A. I., Raventós, R. M. and Sabater, M.C. (2005). Characterization and Quantification of Phenolic Compounds in Olive Oils by Solid-Phase Extrac-tion, HPLC-DAD, and HPLC-MS/MS. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 4331-4340.
- Casals, J. B. (1979). Tablet sensitivity testing of pathogenic fungi. Journal of Clinical Pathology 32: 719-722.
- Chagnon, M., Ndibwami, A., Dubé, S. and Bumaya, A. (1983). Activite Anti-Inflammatoire d'Extraits de *Crassocephalum multicorymbosum*. Planta Medica 49: 255-256.
- Chaiyana, W. and Okonogi, S. (2012). Inhibition of cholinesterase by essential oil from food plant. Phytomedicine 19: 836-839.
- Chatonnet, A. and Lockridget, O. (1989). Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. Biochemistry Journal 260: 625-634.

Cheikhyoussef, A. and Embashu, W. (2013). Ethnobotanical knowledge on indigenous fruits in Ohangwena and Oshikoto regions in Northern Namibia. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 9: 2-12.

Chen, Y., Sun, J., Huang, Z., Liao, H., Peng, S., Lehmann, J. and Zhang Y. (2013). Design, synthesis and evaluation of tacrine-flurbiprofen-nitrate trihybrids as novel anti-Alzheimer's disease agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 21: 2462-2470.

Cicco, N. and Lattanzio, V. (2011). The Influence of Initial Carbonate Concentration on the Folin-Ciocalteu Micro-Method for the Determination of Phenolics with Low Concentration in the Presence of Methanol: A Comparative Study of Real-Time Monitored Reactions. *American Journal of Analytical Chemistry* 2: 840-848.

Cicco, N., Lanorte, M. T., Paraggi, M., Viggiano, M. and Lattanzio, V. (2009). A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal* 91: 107-110.

Citerne, H. L., Pennington R. T. and Cronk, Q. C. (2006). An apparent reversal in floral symmetry in the legume *Cadia* is a homeotic transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 32: 12017-12020.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2008). Norma CLSI M27-A3. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard: third edition. Volume 22, n° 15. Wayne, Pennsylvania.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2012). Norma CLSI M07-A9. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard: ninth edition. Volume 29, n° 2. Wayne, Pennsylvania.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2013). Norma CLSI M100-S23. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. Volume 33, n° 1. Wayne, Pennsylvania.

Çokuğraş, A. N. (2003). Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance. *Turkish Journal of Biochemistry* 28: 54-61.

Coleman, B. R., Ratcliffe, R. H., Oguntayo, S. A., Shi, X., Doctor, B. P., Gordon, R. K. and Nambiar, M. P. (2008). [±]-Huperzine A treatment protects against N-methyl-d-aspartate-induced seizure/status epilepticus in rats. *Chemico-Biological Interactions* 175: 387-395.

Contestabile, A. (2011). The history of the cholinergic hypothesis. *Behavioural Brain Research* 2: 334-340.

- Costa, F. B. D., Terfloth, L. and Gasteiger, J. (2005). Sesquiterpene lactone-based classification of three *Asteraceae* tribes: a study based on self-organizing neural networks applied to chemosystematics. *Phytochemistry* 66: 345-353.
- Craig, L. A., Hong, N.S. and McDonald, R. J. (2011). Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 35: 1397-1409.
- Crozier, A., Clifford, M. N. and Ashihara, H. (2006). *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*, 1<sup>st</sup> ed. Wiley-Blackwell. Oxford, United Kingdom.
- Cseke, L. J., Kirakosyan, A., Kaufman, P. B., Warber S. L., Duke, J. A. and Brielmann, H. L. (2006). *Natural Products from Plants*, 2<sup>nd</sup> ed. CRC Press Taylor and Francis Group. New York, United States of America.
- Cuartero, M., Ortuño, J. A., García, M. S. and Cánovas, F. G. (2012). Assay of acetylcholinesterase activity by potentiometric monitoring of acetylcholine. *Analytical Biochemistry* 421: 208-212.
- Cutler, H. G. (1988). *Biologically Active Natural Products: Potential Use in Agriculture*. 1<sup>st</sup> ed. Volume 380. American Chemical Society. Washington, United States of America.
- Dandapat, R., Jena, B. S. and Negi, P.S. (2012). Antimutagenic and antibacterial activities of *Peltophorum ferrugineum* flower extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 1: S778-S782
- Das, K., Tiwari, R. K. and Shrivastava, D. K. (2010). Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *Journal of Medicinal Plants Research* 2: 104-111.
- Das, S. and Das, D. K. (2006). *Antioxidant Paradox*. Society for Free Radical Research India. Bulletin 5: 8-11.
- Davis, R. A., Vullo, D., Maresca, A., Supuran, C. T. and Poulsen, S. A. (2013). Natural product coumarins that inhibit human carbonic anhydrases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 21: 1539-1543.
- Dawbarn, D. and Allen, S. J. (2007). *Neurobiology of Alzheimer Disease (Molecular and Cellular Neurobiology Series)*, 3<sup>rd</sup> ed. Oxford University Press. Oxford, United Kingdom.
- Del Río, L. A., Corps, J., Sandalio, L. M., Palma, J. M., Gómez, M. and Barroso, J. B. (2002). Reactive oxygen species, antioxidants systems and oxide in peroxisomes. *Journal of Experimental Botany* 53: 1255-1272.

Dewick, P. M. (2002). *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 2<sup>nd</sup> ed. John Wiley & Sons. New York, United States of America.

Di Matteo, V. and Esposito, E. (2003). Biochemical and therapeutic effects of antioxidants in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. *Current Drug Target CNS Neurological Disorders* 2: 95-107.

Dias, D. A., Urban, S. and Roessner, U. (2012). A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. *Metabolites* 2: 303-336.

Dinda, B., Debnath, S. and Banik, R. (2011). Naturally Occurring Iridoids and Secoiridoids. An Updated Review, Part 4. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 59: 803-833.

Ding, X., Zhu, F. S., Li, M. and Gao, S. G. (2012). Induction of apoptosis in human hepatoma SMMC-7721 cells by solamargine from *Solanum nigrum* L. *Journal of Ethnopharmacology* 139: 599-604.

Doughari, J. H. and Manzara, S. (2008). In vitro antibacterial activity of crude leaf extracts of *Mangifera indica* Linn. *African Journal of Microbiology Research* 2: 067-072.

Dröge, W. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews* 82: 47-95.

Dvira, H., Silman, I., Harel, M., Rosenberry, T. L. and Sussman, J. L. (2010). Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. *Chemico-Biological Interactions* 187: 10-22.

Eldeen, I. M., Elgorashi, E. E. and Staden, J. V. (2005). Antibacterial, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and mutagenic effects of extracts obtained from some trees used in South African traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 102: 457-464.

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., and Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7: 88-95.

Emerenciano, V. P., Militão, J. S. L. T., Campos, C. C., Romoff, P., Kaplan, M. A. C., Zambon, Z. and Brant, A. J. C. (2001). Flavonoids as chemotaxonomic markers for *Asteraceae*. *Biochemical Systematics and Ecology* 29: 947-957.

Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry* 37: 277- 228.

Estrella, M., Cabezas, F. J., Aedo, C. and Velayos, M. (2010). The *Papilionoideae* (*Leguminosae*) of Equatorial Guinea (Annobón, Bioko and Río Muni). *Folia Geobot* 45: 1-57.

- Fallarero, A., Oinonen, P., Gupta, S., Blom, P., Galkin, A., Mohan, G. C. and Vuorela, P. M. (2008). Inhibition of acetylcholinesterase by coumarins: The case of coumarin 106. *Pharmacological Research* 58: 215-221.
- Felter, S. P., Vassallo, J. D., Carlton, B. D. and Daston, G. P. (2006). A safety assessment of coumarin taking into account species-specificity of toxicokinetics. *Food and Chemical Toxicology* 44: 462-475.
- Fernandes, N. A. (2010). *Actividade antioxidante de plantas medicinais Angolanas*. Tese de mestrado. Universidade da Beira Interior. Covilhã, Portugal.
- Fernandes, N. M. (2003). *Estudo da composição química das folhas da *Xylopiya adoratissima**. Tese de licenciatura. Universidade da Beira Interior. Covilhã, Portugal.
- Fernandes, R. and Fernandes, A. (1966). Anacardiaceae. *Flora Zambesiaca*, volume 2, parte 2. (<http://apps.kew.org/efloras/namedetail.do?qry=namelist&flora=fz&taxon=1887&nameid=4648>, acedido em 19-09-2013).
- Ferreira, A., Proença, C., Serralheiro, M. L. and Araújo, M. E. (2006). The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology* 108: 31-37.
- Ferreira, W. and Sousa, J. (1998), 1<sup>a</sup> ed. *Microbiologia*. LIDEL, Lisboa, Portugal.
- Finn, G. J., Kenealy, E., Creaven, B. S. and Egan, D. A. (2002). In vitro cytotoxic potential and mechanism of action of selected coumarins, using human renal cell lines. *Cancer Letters* 183: 61-68.
- Folin, O. and Ciocalteu, V. (1927). Tyrosine and tryptophan determinations in proteins. *Journal of Biological Chemistry* 73: 672-649.
- Foster, P. S., Branch, K. K., Witt, J. C., Giovannetti, T., Libon, D., Heilman, K. M. and Drago, V. (2012). Acetylcholinesterase inhibitors reduce spreading activation in dementia. *Neuropsychologia* 50: 2093-2099.
- Fraga, C. G., Oteiza, P. I. and Galleano, M., (2013). In vitro measurements and interpretation of total antioxidant capacity. *Biochimica et Biophysica Acta*. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.06.030.
- Francisco, M. L. and Resurreccion, A. V. (2009). Total phenolics and antioxidant capacity of heat-treated peanut skins. *Journal of Food Composition and Analysis* 22: 16-24.
- Fukuhara, K., Shimizu, K. and Kubo, I. (2004). Arudonine, an allelopathic steroidal glycoalkaloid from the root bark of *Solanum arundo* Mattei. *Phytochemistry* 65: 1283-1286.

- Gad, S. C. (2005). Drug Discovery Handbook, 1<sup>st</sup> ed. John Wiley & Sons. New Jersey, Canada.
- Gao, T., Yao, H., Song, J., Liu C., Zhu, H. M., Pang, X., Xu, H. and Chen, S. (2010). Identification of medicinal plants in the family *Fabaceae* using a potential DNA barcode ITS2. *Journal of Ethnopharmacology* 130: 116-121.
- Gara, L. D., Pinto, M. C. and Tommasi, F. (2003). The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 863-870.
- Giacobini, E. (2004). Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. *Pharmacological Research* 50: 433-440.
- Giovanni, S. D., Borloz, A., Urbain, A., Marston, A., Hostettmann, K., Carrupt, P. A. and Reist, M. (2008). In vitro screening assays to identify natural or synthetic acetylcholinesterase inhibitors: Thin layer chromatography versus microplate methods. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 33: 109-119.
- Gomes, A., Fernandes, E. and Lima, J. L. (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 65: 45-80.
- Gonçalves, M. L. S. S. (2001). Métodos Instrumentais para análise de soluções: Análise Quantitativa, 4<sup>a</sup> ed. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa, Portugal.
- Gonçalves, M. R. C. (2008). Estudo da actividade antioxidante em extractos de plantas de Angola, hipericão e em amostras de café. Tese de licenciatura. Universidade da Beira Interior. Covilhã, Portugal.
- Gopal, R. K. and Michel, M. J. (2008). Bioactive Molecules and Medicinal Plants, 1<sup>st</sup> ed. Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co. KG. Berlin, Germany.
- Gorfe, A. A., Lu, B., Yu, Z. and McCammon, J. A. (2009). Enzymatic Activity versus Structural Dynamics: The Case of Acetylcholinesterase Tetramer. *Biophysical Journal* 97: 897-905.
- Gupta, G., Kazmi, I., Afzal, M., Rahman, M., Saleem, S., Ashraf, M. S., Khusroo, M. J., Nazeer, K., Ahmed, S., Mujeeb, M., Ahmed, Z. and Anwar, F. (2012). Sedative, antiepileptic and antipsychotic effects of *Viscum album* L.(*Loranthaceae*) in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology* 141: 810- 816.
- Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* 27: 1-93.
- Hall, J. C., Sytsma, K. J. and Iltis, H. H. (2002). Phylogeny of *Capparaceae* and *Brassicaceae* based on chloroplast sequence data. *American Journal of Botany* 89: 1826-1842.

Halliwell, B. and Gutteridge, J. (2008). *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4<sup>th</sup> ed. New York, United States of America.

Hanes, C. S. (1932). Studies on plant amylases: The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. *Biochemical Journal* 5: 1406-1421.

Harnly, J. M., Bhagwat, S. and Lin, L. Z. (2007). Profiling methods for the determination of phenolic compounds in foods and dietary supplements. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389: 47-61.

Heneka, M. T. and O'Banion, M. K. (2007). Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroimmunology* 184: 69-91.

Hodzic, Z., Pasalic, H., Memisevic, A., Srabovic, M., Saletovic, M. and Poljakovic, M. (2009). The Influence of Total Phenols Content on Antioxidant Capacity in the Whole Grain Extracts. *European Journal of Scientific Research* 3: 471-477.

Holden, M. and Kelly, C. (2002). Use of cholinesterase inhibitors in dementia. *Advances in Psychiatric Treatment* 8: 89-96.

Houghton, P. J., Ren, Y. and Howes, M. J. (2006). Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural Product Reports* 23: 181-199.

Hoult, R. S. and Payd, M. (1996). Pharmacological and Biochemical Actions of Simple Coumarins: Natural Products with Therapeutic Potential. *General Pharmacology* 4: 713-722.

Howes, M. J., Perry, N. S. and Houghton, P. J. (2003). Plants with Traditional Uses and Activities, Relevant to the Management of Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders. *Phytotherapy Research* 17: 1-18.

Hu, Y., Zhang, J., Chandrashankra, O., Fanny, C. F. and Nancy, Y. (2013). Design, synthesis and evaluation of novel heterodimers of donepezil and huperzine fragments as acetylcholinesterase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 3: 676-683.

Huang, D., Ou, B. and Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 1841-1856.

Huda-Faujan, N., Noriham, A., Norrakiah, A. S. and Babji, A. S. (2009). Antioxidant activity of plants methanolic extracts containing phenolic compounds. *African Journal of Biotechnology* 3: 484-489.

Hussein, G., Nakamura, N., Meselhy, M. R. and Hattori, M. (1999). Phenolics from *Maytenus senegalensis*. *Phytochemistry* 50: 689-694.

Ikawa, M., Schaper, T. D., Dollard, C. A. and Sasner, J. J. (2003). Utilization of Folin-Ciocalteu Phenol Reagent for the Detection of Certain Nitrogen Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 1811-1815.

Ingkaninan, K., Best, C. M., van der Heijden, R., Hofte, A. J., Karabatak, B. Irth, H., Tjaden, U. R., van der Greef, J. and Verpoorte, R. (2000). High-performance liquid chromatography with on-line coupled UV, mass spectrometric and biochemical detection for identification of acetylcholinesterase inhibitors from natural products. *Journal of Chromatography A* 872: 61-73.

Ionita, P. (2005). Is DPPH Stable Free Radical a Good Scavenger for Oxygen Active Species? *Chemical Papers* 59: 11-16.

Jaberian, H., Piri, K. and Nazari, J. (2013). Phytochemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of some medicinal plants. *Food Chemistry* 136: 237-244.

Jain, N., Light, M. E. and Van Staden, J. (2008). Antibacterial activity of hairy-root cultures of *Maytenus senegalensis*. *South African Journal of Botany* 74: 163-166.

Jeong, C. H., Choi, G. N., Kim, J. H., Kwak, J. H., Kim, D. O., Kim, Y. J. and Heo, H. J. (2010). Antioxidant activities from the aerial parts of *Platycodon grandiflorum*. *Food Chemistry* 118: 278-282.

Ji, L. L. (1999). Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Society for Experimental Biology and Medicine* 3: 283-292.

Jin, D. and Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Review Molecules* 15: 7313-7352.

Johnson, G. and Moore, S. W. (2006). The Peripheral Anionic Site of Acetylcholinesterase: Structure, Functions and Potential Role in Rational Drug Design. *Current Pharmaceutical Design* 12: 217-222.

Johnston, W. K., Unrau, P. J., Lawrence, M. S., Glasner, M. E. and Bartel, D. P. (2001). RNA-Catalyzed RNA Polymerization: Accurate and General RNA-Templated Primer Extension. *Science* 292: 1319-1325.

Jong, C. F., Derks, R. J., Bruyneel, B., Niessen, W. and Irth, H. (2006). High-performance liquid chromatography-mass spectrometry-based acetylcholinesterase assay for the screening of inhibitors in natural extracts. *Journal of Chromatography A* 1112: 303-310.

Jorgensen, J. H. and Ferraro, M. J. (2009). Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases* 49: 1749-1755.

- Karioti, A. H.-L., D., Mensah, M. L., Fleischer, T. C. and Skaltsa, H. (2004). Composition and Antioxidant Activity of the Essential Oils of *Xylopi aethiopica* (Dun) A. Rich. (*Annonaceae*) Leaves, Stem Bark, Root Bark, and Fresh and Dried Fruits, Growing in Ghana. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 8094-8098.
- Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T. and Jukic, M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry* 94: 550-557.
- Khoddami, A., Wilkes, M. A. and Roberts, T. H. (2013). Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules* 18: 2328-2375.
- Kim, S., Lee, Y., Lazar, P., Son, M., Baek, A., Thangapandian, S., Jeong, N. Y., Yoo, Y. H. and Lee, K. W. (2011). Binding conformation prediction between human acetylcholinesterase and cytochrome c using molecular modeling methods. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 29: 996-1005.
- Ko, H. J., Song, A., Lai, M. N. and Ng, L. T. (2009). Antioxidant and Antiradical Activities of Wu Ling Shenin a Cell Free System. *The American Journal of Chinese Medicine* 4: 815-828.
- Kosar, M., Bozan, B., Temelli, F. and Baser, K. H. (2007). Antioxidant activity and phenolic composition of sumac (*Rhus coriaria* L.) extracts. *Food Chemistry* 103: 952-959.
- Kouakou-Siransy, G., Sahpaz, S., Irié-Nguessan, G., Datte, Y. J., Kablan, J., Gressier, B. and Bailleul, F. (2010). Oxygen species scavenger activities and phenolic contents of four West African plants. *Food Chemistry* 118: 430-435.
- Kozurkova, M., Hamulakova, S., Gazova, Z., Paulikova, H. and Kristian, P. (2011). Neuroactive Multifunctional Tacrine Congeners with Cholinesterase, Anti-Amyloid Aggregation and Neuroprotective Properties. *Pharmaceuticals* 4: 382-441.
- Kregel, K. C. and Zhang, H. J. (2007). An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *American Journal of Physiology- Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 292: 18-36.
- Kumar, A. and Chattopadhyay, S. (2007). DNA damage protecting activity and antioxidant potential of pudina extract. *Food Chemistry* 100: 1377-1384.
- Kumar, N. S., Mukherjee, P. K., Bhadra, S. and Saha, B. P. (2010). Acetylcholinesterase enzyme inhibitory potential of standardized extract of *Trigonella foenum graecum*L and its constituents. *Phytomedicine* 17: 292-295.
- Kuo, K. W., Hsu, S. H., Li, Y. P., Lin, W. L., Liu, L. F., Chang, L. C., Lin, C. C., Lin, C. N. and Sheu, H. M. (2000). Anticancer Activity Evaluation of the *Solanum Glycoalkaloid* Solamargine. *Biochemical Pharmacology* 60: 1865-1873.

- Labrinea, E. P. and Georgiou, C. A. (2004). Stopped-flow method for assessment of pH and timing effect on the ABTS total antioxidant capacity assay. *Analytica Chimica Acta* 526: 63-68.
- Laguerre, M., Lecomte, J. and Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research* 46: 244-282.
- Lake, B. G. (1999). Coumarin Metabolism, Toxicity and Carcinogenicity: Relevance for Human Risk Assessment. *Food and Chemical Toxicology* 37: 423-453.
- Langat, M. K., Crouch, N. R., Smith, P. J. and Mulholland, D. A. (2011). Cembranolides from the Leaves of *Croton grattissimus*. *Journal of Natural Products* 74: 2349-2355.
- Lee, C. and Yoon, J. (2008). UV direct photolysis of 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) in aqueous solution: Kinetics and mechanism. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 197: 232-238.
- Lee, J. M., Chung, H., Chang, P. S. and Lee, J. H. (2007). Development of a method predicting the oxidative stability of edible oils using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). *Food Chemistry* 103: 662-669.
- Lee, S.-B. and Rasmussen, S. K. (2000). Molecular markers in some medicinal plants of the *Apiaceae* family. *Euphytica* 114: 87-91.
- Legary, C. (2000). Why So Many Forms of Acetylcholinesterase?. *Microscopy Research and Technique* 72: 49-56.
- Leitão, F., Moreira, D. L., Almeida, M. Z. and Leitão, S. G. (2013). Secondary metabolites from the mistletoes *Struthanthus marginatus* and *Struthanthus concinnus* (Loranthaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 48: 215-218.
- Li, X. and Chen, C. (2012). Systematic Evaluation on Antioxidant of Magnolol in vitro. *International Research Journal of Pure & Applied Chemistry* 1: 68-76.
- Li, X., Wu, X. and Huang, L. (2009). Correlation between Antioxidant Activities and Phenolic Contents of *Radix Angelicae Sinensis* (Danggui). *Molecules* 14: 5349-5361.
- Lin, H. C., Tsai, S. H., Chen, C. S., Chang, Y. C., Lee, C. M., Lai, Z. Y. and Lin, C. M. (2008). Structure-activity relationship of coumarin derivatives on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities. *Biochemical Pharmacology* 75: 1416-1425.
- Lin, Y., Sun, X., Yuan, Q. and Yan, Y. (2013). Combinatorial biosynthesis of plant-specific coumarins in bacteria. *Metabolic Engineering* 18: 69-77.

- Lindsey, K. L., Budesinsky, M., Kohout, L. and van Staden, J. (2006). Antibacterial activity of maytenonic acid isolated from the root-bark of *Maytenus senegalensis*. *South African Journal of Botany* 72: 473- 477.
- Lineweaver, H. and Burk, D. (1934). The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *Journal of the American Chemical Society* 3: 658-666.
- Liston, D. R., Nielsen, J. A., Villalobos, A., Chapin, D., Jones, S. B., Hubbard, S. T., Shalaby, I. A., Ramirez, A., Nason, D. and White, W. F. (2004). Pharmacology of selective acetylcholinesterase inhibitors: implications for use in Alzheimer's disease. *European Journal of Pharmacology* 486: 9-17.
- Liu, C. C., Kanekiyo, T., Xu, H. and Bu, G. (2013). Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nature Reviews Neurology* 9:106-18.
- Locatelli, M., Gindro, R., Travaglia, F., Coisson, J. D., Rinaldi, M. and Arlorio, M. (2009). Study of the DPPH scavenging activity: Development of a free software for the correct interpretation of data. *Food Chemistry* 114: 889-897.
- Luo<sup>a</sup>, W., Li, Y. P., He, Y., Huang, S. L., Li, D., Gu, L. Q. and Huang, Z. S. (2011). Synthesis and evaluation of heterobivalent tacrine derivatives as potential multi-functional anti-Alzheimer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* 46: 2609-2616.
- Luo<sup>b</sup>, A., Ge, Z., Fan, Y., Luo, A., Chun, Z. and He, X. J. (2011). In Vitro and In Vivo Antioxidant Activity of a Water-Soluble Polysaccharide from *Dendrobium denneanum*. *Molecules* 16: 1579-1592.
- Ma, X. and Gang, D. R. (2008). In vitro production of huperzine A, a promising drug candidate for Alzheimer's disease. *Phytochemistry* 69: 2022-2028.
- Maccioni, R. B., Farías, G., Morales, I. and Navarrete, L. (2010). The Revitalized Tau Hypothesis on Alzheimer's Disease. *Archives of Medical Research* 41: 226-231.
- Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., Lima, J. L. and Rangel, A. O. (2006). Automatic Method for the Determination of Folin-Ciocalteu Reducing Capacity in Food Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 5241-5246.
- Maisuthisakul, P., Suttajit, M. and Pongsawatmanit, R. (2007). Assessment of phenolic content and free radicals scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chemistry* 100: 1409-1418.
- Mackinder, B. Pasquet, R., Polhill, R. and Verdcourt, B. (2001). Leguminosae. *Flora Zambesiaca* volume 3, parte 5. (<http://apps.kew.org/efloras/namedetail.do?qry=namelist&flora=fz&taxon=2529&nameid=6329>, acedido 19/09/2013).

- Manase, M. J., Offer, A. C., Pertuit, D., Miyamoto, T., Tanaka, C., Delemasure, S., Dutartre, P., Mirjolet, J. F., Duchamp, O. and Dubois, M. A. (2012). *Solanum incanum* and *S. heteracanthum* as sources of biologically active steroid glycosides: Confirmation of their synonymy. *Fitoterapia* 83: 1115-1119.
- Marienhagen, J. and Bott, M. (2013). Metabolic engineering of microorganisms for the synthesis of plant natural products. *Journal of Biotechnology* 163: 166-178.
- Mariod, A. A., Ibrahim, R. M., Ismail, M. and Ismail, N. (2010). Antioxidant activities of phenolic rich fractions (PRFs) obtained from black mahlab (*Monechma ciliatum*) and white mahlab (*Prunus mahaleb*) seedcakes. *Food Chemistry* 118: 120-127.
- Maritim, A. C., Sanders, R. A. and Watkins, J. B. (2003). Diabetes, Oxidative Stress, and Antioxidants: A Review. *Journal of Biochemistry Molecular Toxicology* 17: 1-15.
- Marston, A., Kissling, J. and Hostettmann, K. (2002). A Rapid TLC Bioautographic Method for the Detection of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitors in Plants. *Phytochemical Analysis* 13: 51-54.
- Martin, L., Latypova, X., Wilson, C. M., Magnaudeix, A., Perrin, M. L., Yardin, C. and Terro, F. (2013). Tau protein kinases: Involvement in Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews* 12: 289-309.
- Martini, F. H., Timmons, M. J. and Tallitsch, R. B. (2012). *Human anatomy*. 7<sup>th</sup> ed, Benjamin Cummings. New York, United States of America.
- Martins I., Porto A. and Oliveira L. (2006). *Tabela da Composição de Alimentos*. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge - Departamento de Alimentação e Nutrição. Lisboa, Portugal.
- Matés, J. M. and Sánchez-Jiménez, F. M. (2000). Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 32: 157-170.
- Matkowski, A. and Piotrowska, M. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the *Lamiaceae*. *Fitoterapia* 77: 346-353.
- Matu, E. N., Lindsey, K. L. and van Staden, J. (2006). Micropropagation of *Maytenus senegalensis* (Lam.) Excell. *South African Journal of Botany* 72: 409-415.
- Mazid, M., Khan, T. A. and Mohammad, F. (2011). Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine* 3: 232-249.

- Mbata, T. I., Duru, C. M. and Onwumelu, H. A. (2009). Antibacterial activity of crude seed extracts of *Buchholzia coriacea* E. on some pathogenic bacteria. *Journal of Developmental Biology and Tissue Engineering* 1: 001-005.
- McCurdy, C. R. and Scully, S. S. (2005). Analgesic substances derived from natural products (natureceuticals). *Life Sciences* 78: 476-484.
- Mehta, M., Adem, A. and Sabbagh, M. (2012). New Acetylcholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease. *International Journal of Alzheimer's Disease* 2012: 1-8.
- Miao, Y., He, N. and Zhu, J. J. (2010). History and New Developments of Assays for Cholinesterase Activity and Inhibition. *Chemical Reviews* 9: 5216-5234.
- Michaelis, L. and Menten, M.L. (1913). Die kinetik der invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift* 49: 333-369.
- Milionis, H. J., Florentin, M. and Giannopoulos, S. (2008). Metabolic Syndrome and Alzheimer's Disease: A Link to a Vascular Hypothesis?. *CNS Spectrums* 7: 606-613.
- Milkani, E., Lambert, C. R. and McGimpsey, W. G. (2011). Direct detection of acetylcholinesterase inhibitor binding with an enzyme-based surface plasmon resonance sensor. *Analytical Biochemistry* 408: 212-219.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V. and Milner, A. (1993). A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity and its Application to Monitoring the Antioxidant Status in Premature Neonates. *Clinical Science* 84: 407-412
- Mimori, Y., Nakamura, S. and Yukawa, M. (1997). Abnormalities of acetylcholinesterase in Alzheimer's disease with special reference to effect of acetylcholinesterase inhibitor. *Behavioural Brain Research* 83: 25-30.
- Mitaine-Offer, A. C., Tapondjou, L. A., Djoukeng, J. D., Bouda, H. and Lacaille-Dubois, M. A. (2003). Glycoside derivatives of scopoletin and  $\beta$ -sitosterol from *Hymenodictyon floribundum*. *Biochemical Systematics and Ecology* 31: 227-228.
- Miyazawa, M., Shimamura, H., Bhuvu, R. C., Nakamura, S. and Kameoka, H. (1996). Antimutagenic Activity of Falcarindiol from *Peucedanum praeruptorum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 3444-3448.
- Mohandas, E., Rajmohan, V. and Raghunath, B. (2009). Neurobiology of Alzheimer's disease. *Indian Journal of Psychiatry* 1: 55-61.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant Activity. *Journal of Science and Technology* 26: 211-219.

Moreira, I. C., Lago, J. H., Young, M. C. and Roque, N. F. (2003). Antifungal Aromadendrane Sesqui-terpenoids from the Leaves of *Xylopia brasiliensis*. *Journal of Brazilian Chemical Society* 5: 828-831.

Mota, M. R., Schwarz, A., Bernardi, M. M., Maiorka, P. C. and Spinosa, H. S. (2010). Toxicological evaluation of 10% *Solanum lycocarpum* St. Hill fruit consumption in the diet of growing rats: Hematological, biochemical and histopathological effects. *Experimental and Toxicologic Pathology* 62: 549-553.

Moyo, M., Ndhlala, A. R., Finnie, J. F. and Staden, J. V. (2010). Phenolic composition, antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Sclerocarya birrea* and *Harpephyllum caffrum* (*Anacardiaceae*) extracts. *Food Chemistry* 123: 69-76.

Mroczek, T. (2009). Highly efficient, selective and sensitive molecular screening of acetylcholinesterase inhibitors of natural origin by solid-phase extraction-liquid chromatography/electrospray ionisation-octopole-orthogonal acceleration time-of-flight-mass spectrometry and novel thin-layer chromatography-based bioautography. *Journal of Chromatography A* 1216: 2519-2528.

Mukherjee, P. K., Kumar, V., Mal, M. and Houghton, P. J. (2007). Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine* 14: 289-300.

Mukhtara, M., Arshad, M., Ahmad, M., Pomerantz, R. J., Wigdahl, B. and Parveen, Z. (2008). Antiviral potentials of medicinal plants. *Virus Research* 131: 111-120.

Mulholland, D. A., Langat, M. K., Crouch, M. K., Coley, H. M., Mutambi, E. M. and Nuzillard, J. M. (2010). Cembranolides from the stem bark of the southern African medicinal plant, *Croton gratissimus* (*Euphorbiaceae*). *Phytochemistry* 71: 1381-1386.

Muraina, I. A., Picard, J. and Eloff, J. N. (2009). Development of a reproducible method to determine minimum inhibitory concentration (MIC) of plant extract against a slow-growing mycoplasmas organism. *Phytomedicine* 16: 262-264.

Murray, R. K., Bender, D. A., Botham, K. M., Kennelly, P. J., Rodwell, V. W. and Weil, P. A. (2009). *Harpers Illustrated Biochemistry*, 28 ed., McGraw-Hill Companies, Inc., New York. United States of America.

Muruhan, S., Selvaraj, S. and Viswanathan, P. K. (2013). In vitro antioxidant activities of *Solanum surattense* leaf extract. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 1: 28-34.

Naphade, S. S., Khadabadi, S. S., Deore, S. L., Jagtap, N. S. and Hadke, S. P. (2009). Antioxidant activity of different extracts of plant *Tricholepis Glaberrima* DC (*Asteraceae*). *International Journal of Pharm-Tech Research* 3: 502-505.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (2003). Norma NCCLS M2-A8. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard: Eighth Edition. Volume 20, n° 1. Wayne, Pennsylvania.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (2004). Norma NCCLS M44-A. Reference method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; approved guideline. Volume 24, n° 15. Wayne, Pennsylvania.

Ncube, N. S., Afolayan, A. J. and Okoh, A. I. (2008). Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. African Journal of Biotechnology 12: 1797-1806.

Ndhkala, A. R., Aderogba, M. A., Ncube, B. and Staden, J. V. (2013). Anti-Oxidative and Cholinesterase Inhibitory Effects of Leaf Extracts and Their Isolated Compounds from Two Closely Related Croton Species. Molecules 18: 1916-1932.

Nguta, J. M., Mbaria, J. M. and Mvula, W. D. (2013). Brine shrimp toxicity and in vitro antimicrobial activity of *Piliostigma thonningii* (Schum.) Milne-Redh. [*Leguminosae-Caesalpinioideae*] from Kenya and Malawi against some pathogens of human and veterinary importance. Journal of Veterinary Medicine and Animal Health 9: 251-256.

Niki, E. (2010). Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. Free Radical Biology & Medicine 49: 503-515.

Ningthoujam, S. S., Talukdar, A. D., Potsangbam, K. S. and Choudhury, M. D. (2013). Traditional uses of herbal vapour therapy in Manipur, North East India: An ethnobotanical survey. Journal of Ethnopharmacology 147: 136-147.

Nishikawa, M. (2008). Reactive oxygen species in tumor metastasis. Cancer Letters 266: 53-59.

Noridayu, A. R., Hii, Y. F., Faridah, A., Khozirah, S. and Lajis, N. (2011). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of *Pluchea indica* Less. International Food Research Journal 3: 925-929.

Obiang, N. L. E. and Sallé, G. (2006). Faut-il éradiquer *Phragmanthera capitata*, parasite des hévéas en Afrique ?. Comptes Rendus Biologies 329: 185-195.

Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society (1997). Method Cd 8-53. Peroxide Value method: 4th ed. D. Firestone, American Oil Chemists' Society; Champaign, United States of America.

Ogunlana, O. E., Ogunlana, O. and Farombi, O. E. (2008). Assessment of the Scavenging Activity of Crude Methanolic Stem Bark Extract of *Newbouldia Laevis* on Selected Free Radicals. Advances in Natural and Applied Sciences 2: 249-254.

Omena, C. M., Valentim, I. B., Guedes, G. S., Rabelo, L. A., Mano, C. M., Bechara, E. J., Sawaya, A. C., Trevisan, M. T., Costa, J. G., Ferreira, R. C., Sant'Ana, A. E. and Goulart, M. O. (2012). Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities of ethanol extracts of peel, pulp and seeds of exotic Brazilian fruits. *Food Research International* 49: 334-344.

Orhan, I., Sener, B., Choudhary, M. I. and Khalid, A. (2004). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 91; 57-60.

Ortholand, J. Y. and Ganesan, A. (2004). Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. *Current Opinion in Chemical Biology* 8: 271-280.

Osman<sup>a</sup>, A. M., Wong, K. K., Hill, S. J. and Fernyhough, A. (2006). ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: Isolation and structural elucidation of covalent adduct. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 346:321-329.

Osman<sup>b</sup>, A. M., Wong, K. K., Hill, S. J. and Fernyhough, A. (2006). Isolation and the characterization of the degradation products of the mediator ABTS-derived radicals formed upon reaction with polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 340: 597-603.

Othmana, M., Loh, H. S., Wiart, C., Khoo, T. J., Lim, K. H. and Ting, K. N. (2011). Optimal methods for evaluating antimicrobial activities from plant extracts. *Journal of Microbiological Methods* 84: 161-166.

Ouedraogo, M., Ruiz, M., Vardelle, E., Carreyre, H., Coustard, J. M., Potreau, D., Sawadogo, L. L., Cognard, C., Becq, F., Vandebrouck, C. and Bescon, J. (2011). From the vasodilator and hypotensive effects of an extract fraction from *Agelanthus dodoneifolius* (DC) Danser (*Loranthaceae*) to the active compound dodoneine. *Journal of Ethnopharmacology* 133: 45-352.

Özen, T. and Kinalioğlu, K. (2008). Determination of antioxidant activity of various extracts of *Parmelia saxatilis*. *Biologia* 63: 211-216.

Padayatty, S. J., Katz, A., Wang, Y.; Eck, P., Kwon, O., Lee, J. H., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S. K. and Levine, M. (2003). Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention. *Journal of the American College of Nutrition* 1: 18-35.

Panda, S. K. (2012). Screening methods in the study of antimicrobial properties of medicinal plants. *International Journal of Biotechnology and Research* 1; 1-35.

- Panero, J. L. and Funk, V.A. (2008). The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies: Major clades of the *Asteraceae* revealed. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47: 757-782.
- Pannala, A. S., Chan, T. S., O'Brien, P. J. and Rice-Evans, C. A. (2001). Flavonoid B-Ring Chemistry and Antioxidant Activity: Fast Reaction Kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 282: 1161-1168.
- Paphitou, N. I. (2013). Antimicrobial resistance: action to combat the rising microbial challenges. *International Journal of Antimicrobial Agents* 42S: S25-S28.
- Patil, P. O., Bari, S. B., Firke, S. D., Deshmukh, P. K., Donda, S. T. and Patil, D. A. (2013). A comprehensive review on synthesis and designing aspects of coumarin derivatives as monoamine oxidase inhibitors for depression and Alzheimer's disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 21: 2434-2450.
- Paula, V. J., Guimarães, F. M., Diniz, B. S. and Forlenza, O. V. (2009). Neurobiological pathways to Alzheimer's disease Amyloid-beta, *Tau* protein or both?. *Dementia & Neuropsychologia* 3: 188-194.
- Pavlov, V., Xiao, Y. and Willner, I. (2005). Inhibition of the acetylcholine esterase-stimulated growth of Au nanoparticles: nanotechnology-based sensing of nerve gases. *Nano Letters* 4: 649-53.
- Payan, F. (2004). Structural basis for the inhibition of mammalian and insect  $\alpha$ -amylases by plant protein inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta* 1696: 171-180.
- Peixoto, R. N., Guilhon, G. M., Zoghbi, M. G., Araújo, I. S., Uetanabaro, A. P., Santos, L. S. and Brasil, D. S. (2013). Volatiles, A Glutarimide Alkaloid and Antimicrobial Effects of *Croton pullei* (*Euphorbiaceae*). *Molecules* 18: 3195-3205.
- Penna, C., Mancardi, D., Rastaldo, R. and Pagliaro, P. (2009). Cardioprotection: A radical view Free radicals in pre and postconditioning. *Biochimica et Biophysica Acta* 1787: 781-793.
- Pereira, S., Contini, S. T., Coppede, J., Pereira, P., Bertoni, B., França, S. and Pereira, A. M. (2012). An ent-Kaurane-Type Diterpene in *Croton antisiphiliticus* Mart. *Molecules* 17: 8851-8858.
- Phillipson, J. D. (2001). Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry* 56: 237-243.
- Piaceri, I., Rinnoci, V., Bagnoli, S., Failli, Y. and Sorbi S. (2012). Mitochondria and Alzheimer's disease. *Journal of the Neurological Sciences* 322: 31-34.

- Pistelli, L., Venturi, R., Marsili, A. and Morelli, I. (1998). Alkaloids and coumarins from *Gymnosporia senegalensis* var. *spinosa* (*Celastraceae*). *Biochemical Systematics and Ecology* 26: 677-679.
- Poczaj, P., Cernák, I., Gorji, A. M., Nagy, S., Taller, J. and Polgár, Z. (2010). Development of intron targeting (IT) markers for potato and cross-species amplification in *Solanum nigrum* (*Solanaceae*). *American Journal of Botany* 97: e142-e145.
- Pohanka, M., Hrabínova, M., Kuca, K. and Simonato, J. P. (2011). Assessment of Acetylcholinesterase Activity Using Indoxylacetate and Comparison with the Standard Ellman's Method. *International Journal of Molecular Sciences* 12: 2631-2640.
- Poljšake, B. and Raspor, P. (2008). The antioxidant and pro-oxidant activity of vitamin C and trolox in vitro: a comparative study. *Journal of Applied Toxicology* 28: 183-188.
- Praticò, D. (2002). Alzheimer's disease and oxygen radicals: new insights. *Biochemical Pharmacology* 63: 563-567.
- Prior, R. L. and Cao, G. (1999). In vivo total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology & Medicine* 27: 1173-1181.
- Prior, R. L., Wu, X. and Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 4290-4302.
- Pundir, C. S. and Chauhan, N. (2012). Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review. *Analytical Biochemistry* 429: 19-31.
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., La Mantia, A. S., Mc Namara, J. and White, L. (2012). *Neuroscience*. 5<sup>th</sup> ed. I. Sinauer Associates. New York, United States of America.
- Qin, L. X., Chao, J., Yan, S. Y., Li, Y. M. and Gang, C. X. (2009). Analysis of synthetic antioxidants and preservatives in edible vegetable oil by HPLC/TOF-MS. *Food Chemistry* 113: 692-700.
- Quintas, A., Halpern, M. J. e Freire, A. P. (2008). *Bioquímica - Organização Molecular da Vida*, 1<sup>a</sup> ed. Lidel. Lisboa, Portugal
- Racchi, M., Mazzucchelli, M., Porrello, E., Lanni, C. and Govoni, S. (2004). Acetylcholinesterase inhibitors: novel activities of old molecules. *Pharmacological Research* 50: 441-451.

- Raj, M. K., Duraipandiyan, V., Agustin, P. and Ignacimuthu, S. (2012). Antimicrobial activity of bergenin isolated from *Peltophorum pterocarpum* DC. flowers. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*: S901-S904.
- Rakonczay, Z. (2003). Potencies and selectivities of inhibitors of acetylcholinesterase and its molecular forms in normal and Alzheimer's disease brain. *Acta Biologica Hungarica* 2: 183-189.
- Randall, A. D., Witton, J., Booth, C., Hynes-Allen, A. and Brown, J. T. (2010). The functional neurophysiology of the amyloid precursor protein (APP) processing pathway. *Neuropharmacology* 59: 243-267.
- Rao, V. (2012). *Phytochemicals - A global perspective of their role in nutrition and health*, 1<sup>st</sup> ed. InTech. Rijeka, Croatia.
- Rates, S. M. (2001). Plants as source of drugs. *Toxicon* 39: 603-613.
- Rayne, S. and Mazza, G. (2007). Biological Activities of Extracts from *Sumac* (*Rhus* spp.): A Review. *Plant Foods for Human Nutrition* 62: 165-175.
- Razavi, S. F., Khoobi, M., Nadri, H., Sakhteman, A., Moradi, A., Emami, S., Foroumadi, A. and Shafiee, A. (2013). Synthesis and evaluation of 4-substituted coumarins as novel acetylcholinesterase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* 64: 252-259.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* 26: 1231-1237.
- Remóne, M. A., González, B. A., Rosa, Z. R., Lacueva, A. C., Estruch, R., González, M. A., Espino and R.J.D., R.M.L. (2009). Rapid Folin-Ciocalteu method using microtiter 96-well plate cartridges for solid phase extraction to assess urinary total phenolic compounds, as a biomarker of total polyphenols intake. *Analytica Chimica Acta* 634: 54-60.
- Rhee<sup>a</sup>, I. K., Appels, N., Luijendijk, T., Irth, H. and Verpoorte, R. (2003). Determining Acetylcholinesterase Inhibitory Activity in Plant Extracts Using a Fluorimetric Flow Assay. *Phytochemical Analysis* 14: 145-149.
- Rhee<sup>b</sup>, I. K., van Rijn, R. M. and Verpoorte, R. (2003). Qualitative Determination of False-positive Effects in the Acetylcholinesterase Assay using Thin Layer Chromatography. *Phytochemical Analysis* 14: 127-131.
- Ríos, J. L. and Recio, M. C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 100: 80-84.

Robert, S., Baccelli, C., Devel, P., Dogné, J. M. and Leclercq, J. Q. (2010). Effects of leaf extracts from *Croton zambesicus* Müell. Arg. on hemostasis. *Journal of Ethnopharmacology* 128: 641-648.

Robson, N. K. (1960). *Annonaceae*. *Flora Zambesiaca* 1: 104-149.

Roginsky, V. and Lissi, E. A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry* 92: 235-254.

Rossi, D., Guerrini, A., Maietti, S., Bruni, R., Paganetto, G., Poli, F., Scalvenzi, L., Radice, M., Saro, K. and Sacchetti, G. (2011). Chemical fingerprinting and bioactivity of Amazonian Ecuador *Croton lechleri* Müll. Arg. (*Euphorbiaceae*) stem bark essential oil: A new functional food ingredient?. *Food Chemistry* 126: 837-848.

Roy, S. and Rauk, A. (2005). Alzheimer's disease and the 'ABSENT' hypothesis: mechanism for amyloid  $\beta$  endothelial and neuronal toxicity. *Medical Hypotheses* 65: 123-137.

Sahai, K. (2009). Reproductive biology of two species of *Canavalia* DC. (*Fabaceae*)-A non-conventional wild legume. *Flora* 204: 762-768.

Saleem, M., Nazir, M., Ali, M. S., Hussain, H., Lee, Y. S., Riaz, N. and Jabbar, A. (2010). Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. *Natural Product Reports* 27: 238-254.

Samadi, A., Contelles, J. M., Soriano, E., Pérez, M. A., Chioua, M., Romero, A., Lafuente, L. G., Gandía, L., Roda, J. M., López, M. G., Villarroya, M., García, A. G. and de los Ríos, C. (2010). Multipotent drugs with cholinergic and neuroprotective properties for the treatment of Alzheimer and neuronal vascular diseases. I. Synthesis, biological assessment, and molecular modeling of simple and readily available 2-aminopyridine-, and 2-chloropyridine-3,5-dicarbonitriles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 18: 5861-5872.

Sánchez, J. G. and Kouznetsov, V. V. (2010). Antimycobacterial susceptibility testing methods for natural products research. *Brazilian Journal of Microbiology* 41: 270-277.

Santos, P. P. (2012). *Química Orgânica*. Volume 1. 1ª Ed. Instituto Superior Técnico Press. Lisboa, Portugal.

Saraiva, A. C. (2004). Estudo da composição química das folhas da *Parinari pumila*. Tese de licenciatura. Universidade da Beira Interior. Covilhã, Portugal.

Sardari, S., Mori, Yoki, Horita, K., Micetich, R. G., Nishibe, S. and Daneshtalab, M. (1999). Synthesis and Antifungal Activity of Coumarins and Angular Furanocoumarins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 7: 1933-1940.

- Sarker, S. D., Latif, Z., and Gray, A. I. (2006). *Methods in biotechnology 20: Natural Products Isolation*, 2<sup>nd</sup> ed. Humana Press Totowa. New Jersey, United States of America.
- Scalzo, R. L. (2008). Organic acids influence on DPPH· scavenging by ascorbic acid. *Food Chemistry* 107: 40-43.
- Schäfer, H. and Wink, M. (2009). Medicinally important secondary metabolites in recombinant microorganisms or plants: Progress in alkaloid biosynthesis. *Biotechnology Journal* 4: 1684-1703.
- Scheibmeir, H. D., Christensen, K., Whitaker, S. H., Jegaethesan, J., Clancy, R. and Pierce, J. D. (2005). A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive and Critical Care Nursing* 21: 24-28.
- Schmidt, E., Lötter, M. and McClelland, W. (2002). *Trees and Shrubs of Mpumalanga and Kruger National Park*. Johannesburg Jacana. South Africa.
- Schwarz, A., Soares, M. R., Flório, J. C., Bernardi, M. M. and Spinosa, H. S. (2005). Rats exposed to *Solanum lycocarpum* fruit in utero and during lactation: Neurochemical, behavioral and histopathological effects. *Neurotoxicology and Teratology* 27: 861-870.
- Schwarz, K., Huang, S. W., German, J. B., Tiersch, B., Hartmann, J. and Frankel, E. N. (2000). Activities of Antioxidants Are Affected by Colloidal Properties of Oil-in-Water and Water-in-Oil Emulsions and Bulk Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 4874-4882.
- Sebastião, N. N. (2007). *Avaliação química da Eragrostis viscosa (Lubango/Angola)*, Tese de Doutoramento. Universidade da Beira Interior. Covilhã, Portugal.
- Sebastião, N. S., Cordeiro, I. J., dos Santos, A. F., Gaspar, J. F., Martins, C., Rueff, J., Diakanamwa, C., Sant'Ana, A. E. and de Mendonça, D. I. (2010). 8,15-epoxylabdane and norlabdane diterpenoids from *Eragrostis viscosa*. *Phytochemistry* 71: 798-803.
- Setiowaty, G., Che, M. Y., Jinap, S. and Moh, M. H. (2000). Quantitative Determination of Peroxide Value in Thermally Oxidized Palm Olein by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Phytochemical Analysis* 11: 74-78.
- Sharififar, F., Moshafi, M. H., Shafazand, E. and Koohpayeh, A. (2012). Acetyl cholinesterase inhibitory, antioxidant and cytotoxic activity of three dietary medicinal plants. *Food Chemistry* 130: 20-23.
- Sherbeiny, A. E. A. E., Ansari, M. A. E., Nawwar, M. A. M. and Sayed, N. H. E. (1997). Flavonol glycosides and flavonol glucoside gallates from *Peltophorum africanum*. *Planta Medica* 32: 165-170.

Silman, I. and Sussman, J. L. (2005). Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology* 5: 293-302.

Silman, I. and Sussman, J. L. (2008). Acetylcholinesterase: How is structure related to function?. *Chemico-Biological Interactions* 175: 3-10.

Silva, G., Taniça, M., Rocha, J., Serrano, R., Gomes, E. T., Sepodes, B. and Silva, O. (2010). In vivo anti-inflammatory effect and toxicological screening of *Maytenus heterophylla* and *Maytenus senegalensis* extracts. *Human and Experimental Toxicology* 30: 693-700.

Silva, G., Taniça, M., Rocha, J., Serrano, R., Gomes, E. T., Sepodes, B. and Silva, O. (2010). In vivo anti-inflammatory effect and toxicological screening of *Maytenus heterophylla* and *Maytenus senegalensis* extracts. *Human and Experimental Toxicology* 30: 693-700.

Silva, J. B., Menezes, I. R., Coutinho, H. D., Rodrigues, F. F., Costa, J. G. and Felipe, C. F. (2012). Antibacterial and antioxidant activities of *Licania tomentosa* (Benth.) Fritsch (*Chrysobalanaceae*). *Archives of Biological Science Belgrade* 2: 459-464.

Silva, J. I., Moraes, M. C., Vieira, L. C., Corrêa, A. G., Cass, Q. B. and Cardoso, C. L. (2013). Acetylcholinesterase capillary enzyme reactor for screening and characterization of selective inhibitors. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 73: 44-52.

Sindhu, S. and Manorama, S. (2012). Antimicrobial activity of *Polycarphaea corymbosa* Lam. (*Caryophyllaceae*) against human pathogens. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 8: 4014-4019.

Singh, S. and Singh, R. P. (2008). In Vitro Methods of Assay of Antioxidants: An Overview. *Food Reviews International* 24: 392-415.

Singh, V., Praveen, V., Banga, J. and Tripathi, C. K. (2009). Antimicrobial activities of microbial strains isolated from soil of stressed ecological niches of Eastern Uttar Pradesh, India. *Indian Journal of Experimental Biology* 4: 298-303.

Smith, M. A. and Perry, G. (1995). Free radical damage, iron, and Alzheimer's disease. *Journal of the Neurological Sciences* 134: 92-94.

Smyth, T., Ramachandran, V. N. and Smyth, W. F. (2009). A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. *International Journal of Antimicrobial Agents* 33: 421-426.

Smyth, W. F., Ramachandran, V. N., Hack, C. J., Joyce, C. and O'Kane, E. (2006). A study of the analytical behaviour of selected synthetic and naturally occurring coumarins using liquid chromatography, ion trap mass spectrometry, gas chromatography and polarography and the construction of an appropriate database for coumarin characterisation. *Analytica Chimica Acta* 564: 201-210.

- Soniya, M., Kuberan, T., Anitha, S. and Sankareswari, P. (2013). In vitro antibacterial activity of plant extracts against Gram positive and Gram negative pathogenic bacteria. *International Journal of Microbiology and Immunology Research* 1: 001-005.
- Soreq, H. and Seidman, S. (2001). Acetylcholinesterase - new roles for an old actor. *Nature Reviews, Neuroscience* 2: 294-302.
- Sosa, S., Morelli, C. F., Tubaro, A., Cairolì, P., Speranza, G. and Manitto, P. (2007). Anti-inflammatory activity of *Maytenus senegalensis* root extracts and of maytenoic acid. *Phytomedicine* 14: 109-114.
- Sousa, J. C. (2006). *Manual de Antibióticos Antibacterianos*. Universidade Fernando Pessoa. Portugal.
- Spalik, K., Reduron, J.-P. and Downie, S. R. (2004). The phylogenetic position of *Peucedanum sensu lato* and allied genera and their placement in tribe Selineae (*Apiaceae*, subfamily *Apioideae*). *Plant Systematics and Evolution* 243: 189-210.
- Sproll, C., Ruge, W., Andlauer, C., Godelmann, R. and Lachenmeier, D. W. (2008). HPLC analysis and safety assessment of coumarin in foods. *Food Chemistry* 109: 462-469.
- Squire, L., Berg, D., Bloom, F., Lac, S., Ghosh, A., and Spitzer, N. (2008). *Fundamental neuroscience*. Elsevier. New York, United States of America.
- Stafforda, G. I., Pedersen, M. E., Staden, J. V. and Jäger, A. K. (2008). Review on plants with CNS-effects used in traditional South African medicine against mental diseases. *Journal of Ethnopharmacology* 119: 513-537.
- Stashenko, E. E., Jaramillo, B. E. and Martínez, J. R. (2004). Analysis of volatile secondary metabolites from Colombian *Xylopiá aromática* (Lamarck) by different extraction and headspace methods and gas chromatography. *Journal of Chromatography A* 1025: 105-113.
- Stefani, H. A., Gueogjan, K., Manarin, F., Farsky, S. H., Schpector, J. Z., Caracelli, I., Rodrigues, S. R., Muscará, M. N., Teixeira, S. A., Santin, J. R., Machado, I. D., Bolonheis, S. M., Curi, R. and Vinolo, M. A. (2012). Synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of 3-(triazolyl)-coumarin derivatives: Effect on inducible nitric oxide synthase. *European Journal of Medicinal Chemistry* 58: 117-127.
- Stratil, P., Klejduš, B. and Kubáň, V. (2007). Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. *Talanta* 71: 1741-1751.
- Strochkova, E. K. and Kuselman, Y. I. (2001). Redox-potentiometric determination of peroxide value in edible oils without titration. *Talanta* 54: 411-416.

- Su, X. Y., Yu, Zh. and Liu, W.R. (2009). In vitro and in vivo antioxidant activity of *Pinus koraiensis* seed extract containing phenolic compounds. *Food Chemistry* 117: 681-686.
- Sussman, J. L. and Silman, I. (1992). Acetylcholinesterase: structure and use as a model for specific cation-protein interactions. *Current Opinion in Structural Biology* 2: 721-729.
- Sussman, J. L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L. and Silman, I. (1991). Atomic Structure of Acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: A Prototypic Acetylcholine-Binding Protein. *Science* 253: 872-879.
- Szymański, P., Skibiński, R., Inglot, T., Bajda, M., Jończyk, J., Malawska, B. and Olasik, E. M. (2013). New Tacrine Analogs as Acetylcholinesterase Inhibitors -Theoretical Study with Chemometric Analysis. *Molecules* 18: 2878-2894.
- Taiwe, G. S., Bum, E. N., Talla, E., Dimo, T., Sidiki, N., Dawe, A., Nguimbou, R. M., Dzeufiet, P. D. D. and Waard, M. D. (2012). Evaluation of antinociceptive effects of *Crassocephalum bauchiense* Hutch (*Asteraceae*) leaf extract in rodents. *Journal of Ethnopharmacology* 141: 234-241.
- Teixeira, D. M., Canelas, V. C., Canto, A. M., Teixeira, J. M. and Dias, C. B. (2009). HPLC-DAD Quantification of Phenolic Compounds Contributing to the Antioxidant Activity of *Maclura pomifera*, *Ficus carica* and *Ficus elastica* Extracts. *Analytical Letters* 42: 2986-3003.
- Teles, A. P. and Takahashi, J. A. (2013). *Paecilomide*, a new acetylcholinesterase inhibitor from *Paecilomyces lilacinus*. *Microbiological Research* 4: 204-210.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L. and Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 669-675.
- Thaiyah, A. G., Nyaga, P. N., Maribei, J. M., Ngatia, T. A., Kamau, J. P. and Kinyuru, J. M. (2011). Acute, sub-chronic and chronic toxicity of *Solanum incanum* L in sheep in Kenya. *The Kenya Veterinarian* 1: 1-8.
- Thomas, G. (2007). *Medicinal Chemistry: An Introduction*, 2<sup>nd</sup> ed. Wiley-Interscience. West Sussex, United Kingdom.
- Topliss, J. G., Clark, A. M., Eenst, E., Hufford, C. D., Johnston, G. A., Rimoldi, J. M. and Weimann, B. J. (2002). Natural and synthetic substances related to human health. *Pure and Applied Chemistry* 10: 1957-1985.
- Tripathi, A. and Srivastava, U. C. (2008). Acetylcholinesterase: A versatile enzyme of nervous system. *Annals of Neurosciences* 15: 106-111.

- Tsiaka, T., Christodouleas, D. C. and Calokerinos, A. C. (2013). Development of a chemiluminescent method for the evaluation of total hydroperoxide content of edible oils. *Food Research International*, doi:10.1016/j.foodres.2013.08.036
- Tymoczko, J. L., Berg, J. M. and Stryer, L. (2010). *Biochemistry: A Short Course*. 1<sup>st</sup> ed, W. H. Freeman and Company. New York, United States of America.
- Upadhyaya, P., Seth, V. and Ahmad, M. (2010). Therapy of Alzheimer's disease: An update. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 6: 408-421.
- Uys, A. C., Malan, S. F., Van Dyk, S. and Van Zyl, R. L. (2002). Antimalarial compounds from *Parinari capensis*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 12: 2167-2169.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. and Telser, T. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39: 44-84.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncola, J., Izakovic, M. and Mazura, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160: 1-40.
- Van der Beek, E. M. and Kamphuis, P. J. (2008). The potential role of nutritional components in the management of Alzheimer's Disease. *European Journal of Pharmacology* 585: 197-207.
- Vieira, L. I. (2010). Avaliação bioguiada de extratos de *Eragrostis viscosa*. Tese de mestrado. Universidade da Beira Interior. Covilhã, Portugal.
- Villaño, D., Fernández-Pachón, M. S., Moyá, M. L., Troncoso, A. M. and García-Parrilla, M. C. (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* 71: 230-235.
- Voet, D., and Voet, J. G. (2011). *Biochemistry*, 4<sup>th</sup> ed. John Wiley & Sons, Inc. New York, United States of America.
- Vuuren, F. V. and Viljoen, A. M. (2008). In vitro evidence of phytosynergy for plant part combinations of *Croton gratissimus* (*Euphorbiaceae*) used in African traditional healing. *Journal of Ethnopharmacology* 119: 700-704.
- Wagstaff, S. J., Heenan, P. B. and Sanderson, M. J. (1999). Classification, origins, and patterns of diversification in New Zealand *Carmichaelinae* (*Fabaceae*). *American Journal of Botany* 86: 1346-1356.
- Wallace, J. R. (2004). Antimicrobial properties of Plant Secondary Metabolites. *Proceedings of the Nutrition Society* 63: 621-629.

Wang, T., Jónsdóttir, R. and Ólafsdóttir, G. (2009). Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweed. *Food Chemistry* 116: 240-224.

Wet, H., Nciki, S. and van Vuuren, S. (2013). Medicinal plants used for the treatment of various skin disorders by a rural community in northern Maputaland. South Africa. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 9: 2-9.

WHO (2007). World Health Organization guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues. WHO Press. Geneva, Switzerland.

Wijngaard, H. H., Rößle, C. and Brunton, N. (2009). A survey of Irish fruit and vegetable waste and by products as a source of polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry* 116: 202-207.

Williams, B. R., Nazarians, A. and Gill, M. A. (2003). Review of Rivastigmine: A Reversible Cholinesterase Inhibitor. *Clinical Therapeutics* 25: 1634-53.

Wilquet, V. and Strooper, B. (2004). Amyloid-beta precursor protein processing in neurodegeneration. *Current Opinion in Neurobiology* 14: 582-588.

Winter, J. M. and Tang, Y. (2012). Synthetic biological approaches to natural product biosynthesis. *Current Opinion in Biotechnology* 23: 736-743.

Wu, C. H., Liang, C. H., Shiu, L. Y., Chang, L. C., Lin, T. S., Lan, C. C., Tsai, J. C., Wong, K. J., Lin, T. K., Chang, N. S. and Sheu, H. M. (2011). *Solanum incanum* extract (SR-T100) induces human cutaneous squamous cell carcinoma apoptosis through modulating tumor necrosis factor receptor signaling pathway. *Journal of Dermatological Science* 63: 83-92.

Yan, Z. and Feng, J. (2004). Alzheimer's Disease: Interactions Between Cholinergic Functions and  $\beta$ -amyloid. *Current Alzheimer Research* 1: 241-248.

Yang, Z. D., Song, Z. W., Ren, J., Yang, M. J. and Li, S. (2011). Improved Thin-layer Chromatography Bioautographic Assay for the Detection of Acetylcholinesterase Inhibitors in Plants. *Phytochemical Analysis* 22: 509-515.

Yang, Z., Zhang, X., Duan, D., Song, Z., Yang, M. and Li, S. (2009). Modified TLC bioautographic method for screening acetylcholinesterase inhibitors from plant extracts. *Journal of Separation Science* 32: 3257-3259.

Yoo, K. M., Kim, D. O. and Lee, C. Y. (2007). Evaluation of different methods of antioxidant measurement. *Food Science and Biotechnology* 2: 177-182.

York, T., van Vuuren, S. F. and Wet, H. (2012). An antimicrobial evaluation of plants used for the treatment of respiratory infections in rural Maputaland, KwaZulu-Natal. *South African Journal of Ethnopharmacology* 144: 118-127.

Zeiger, E., Erexson, G., Mortelmans, K. and Thilagar, A. (1997). Genetic toxicity studies of 1,2,3,4-tetrahydro-9-acridinamine (tacrine). *Mutation Research* 393: 189-197.

Zerabruk, S. and Yirga, G. (2012). Traditional knowledge of medicinal plants in Gindeberet district, Western Ethiopia. *South African Journal of Botany* 78: 165-169.

Zhang, L., Ravipati, A. S., Koyyalamudi, S. R., Jeong, S., Reddy, N., Smith, P. T., Bartlett, J., Shanmugam, K., Münch, G. and Wu, M. J. (2011). Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants containing phenolic and flavonoid compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 12361-12367.

Zhou, J., Gong, X., Downie, S. R. and Peng, H. (2009). Towards a more robust molecular phylogeny of Chinese *Apiaceae* subfamily *Apioideae*: Additional evidence from nrDNA ITS and cpDNA intron (rpl16 and rps16) sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 53: 56-68.

Zou, G. A., Su, Z. H., Zhang, H. W., Wang, Y., Yang, J. S. and Zou, Z. M. (2010). Flavonoids from the Stems of *Croton caudatus* Geisel. var. *tomentosus* Hook. *Molecules* 15: 1097-1102.

## 5.2 Cibergrafia

(<http://apps.kew.org/efloras/namedetail.do?qry=namelist&flora=fz&taxon=1887&nameid=4648>, acessado 19/09/2013)

(<http://apps.kew.org/efloras/namedetail.do?qry=namelist&flora=fz&taxon=10794&nameid=27527>, acessado em 19-09-2013)

(<http://www.ville-ge.ch/musinfo/bd/cjb/africa/details.php?langue=an&id=25250>, acessado em 19-09-2013)

(<http://apps.kew.org/efloras/namedetail.do?qry=namelist&flora=fz&taxon=2529&nameid=6329>, acessado 19/09/2013)

(<http://www.ville-ge.ch/musinfo/bd/cjb/africa/details.php?langue=an&id=104100>, acessado 19/09/2013)

(<http://www.ville-ge.ch/musinfo/bd/cjb/africa/details.php?langue=an&id=7799>, acessado em 19-09-2013)

(<http://www.rcsb.org>, acessado em 8-10-2013)

([http://www.zimbabweflora.co.zw/speciesdata/image-display.php?species\\_id=155120&image\\_id=2](http://www.zimbabweflora.co.zw/speciesdata/image-display.php?species_id=155120&image_id=2), acessado em 09-10-2013)

([http://www.zimbabweflora.co.zw/speciesdata/species.php?species\\_id=125500](http://www.zimbabweflora.co.zw/speciesdata/species.php?species_id=125500), acessado em 09-10-2013)

(<http://actd.iict.pt/view/actd:LISC060415>, acessado em 09-10-2013)

(<http://plants.jstor.org/visual/kbot00000727>, acessado em 09-10-2013)

(<http://actd.iict.pt/view/actd:LISC016344>, acessado em 09-10-2013)

([http://www.europeana.eu/portal/record/11614/K\\_\\_\\_Herbarium\\_Catalogue\\_\\_\\_K000272664.html](http://www.europeana.eu/portal/record/11614/K___Herbarium_Catalogue___K000272664.html), acedido em 20-10-2013)

([http://www.southernafricanplants.net/plantdata\\_sub.php?Mspec\\_ID=798&PHPSESSID=pbj5sggf2di2oavs qlcvrjj274#](http://www.southernafricanplants.net/plantdata_sub.php?Mspec_ID=798&PHPSESSID=pbj5sggf2di2oavs qlcvrjj274#), acedido em 09-10-2013)

(<http://actd.iict.pt/view/actd:LISC001902>, acedido em 09-10-2013)

(<http://actd.iict.pt/view/actd:LISC001411>, acedido em 09-10-2013)

(<http://actd.iict.pt/view/actd:LISC053042>, acedido em 09-10-2013)

(<http://actd.iict.pt/view/actd:LISC054570>, acedido em 09-10-2013)

(<http://actd.iict.pt/view/actd:LISC038108>, acedido em 09-10-2013)

(<http://davesgarden.com/guides/pf/showimage/23587/>, acedido em 09-10-2013)

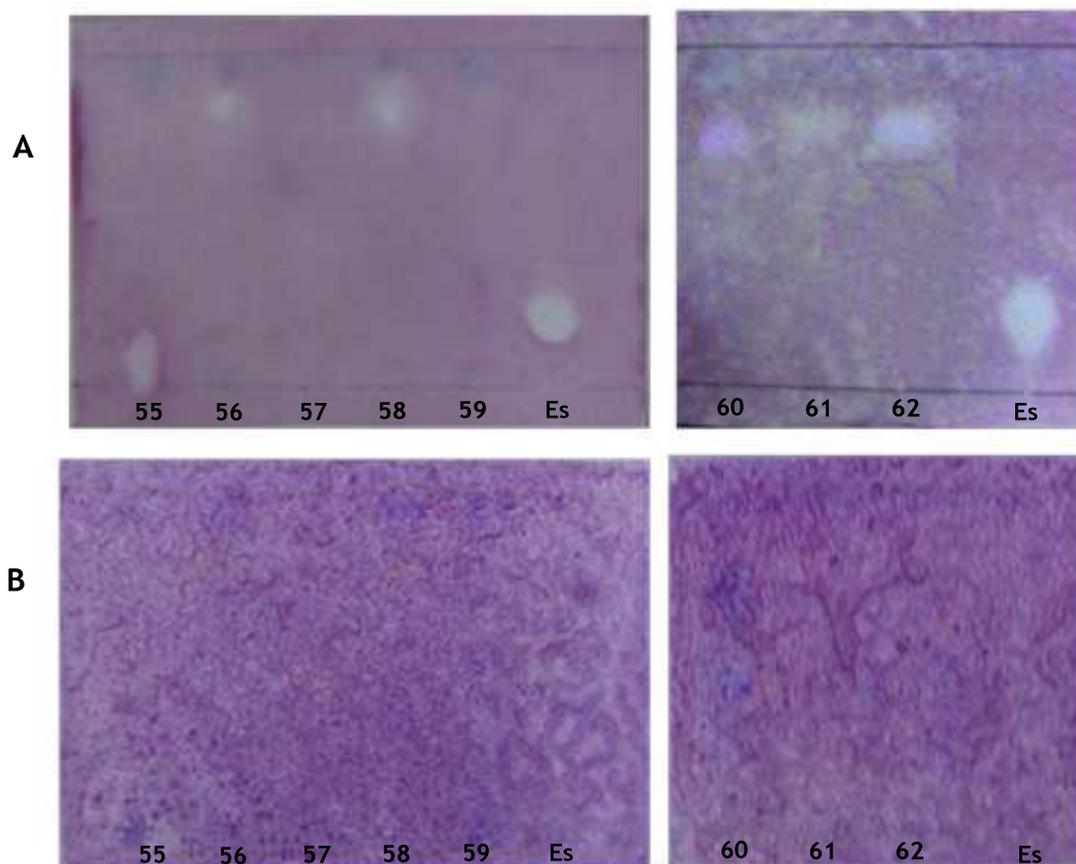
(<http://www.feedipedia.org/node/265>, acedido em 09-10-2013)

(<http://actd.iict.pt/view/actd:LISC051794>, acedido em 09-10-2013)

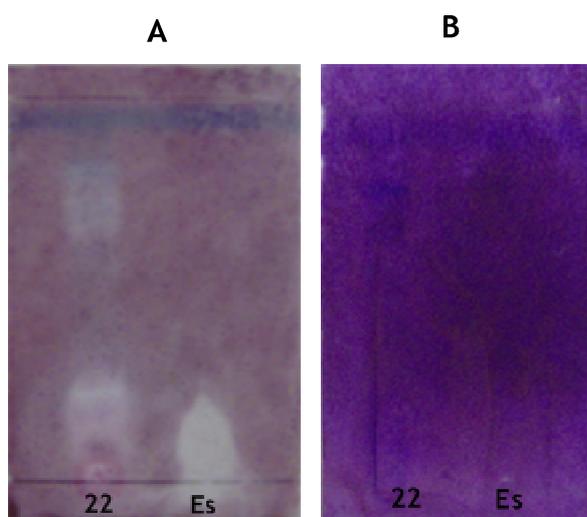
(<http://flora.huji.ac.il/browse.asp?lang=en&action=specie&specie=SOLINC&fileid=9419>, acedido em 09-10-2013)

## Anexos

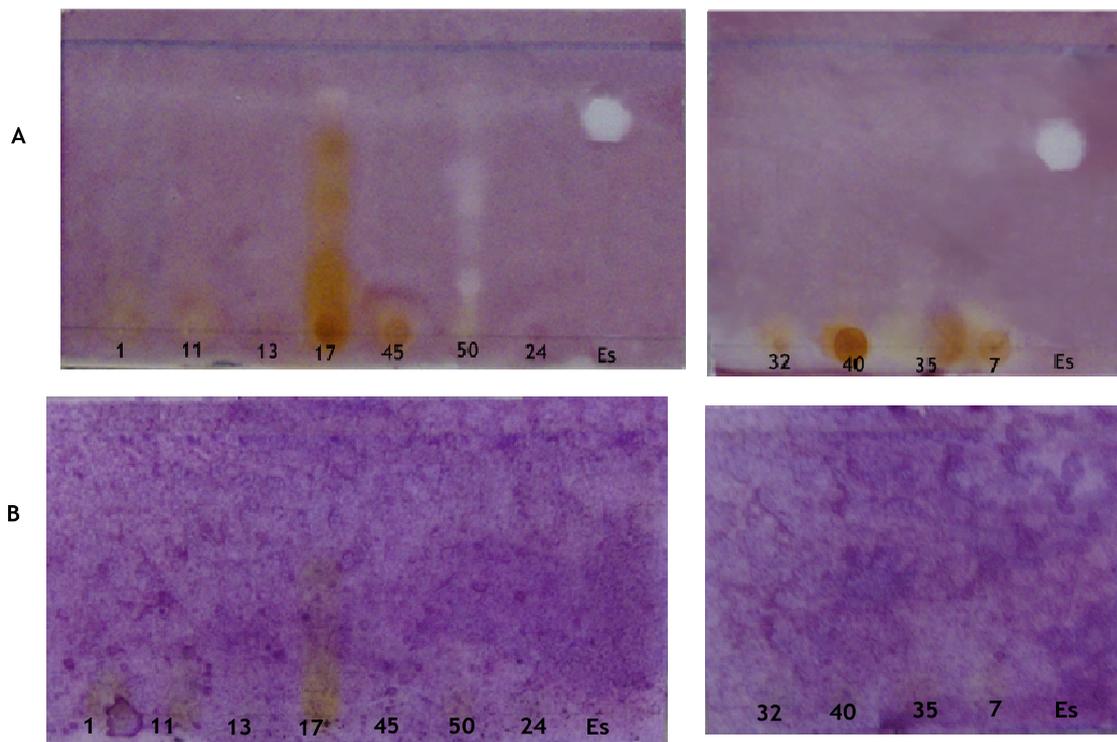
### Anexo 1



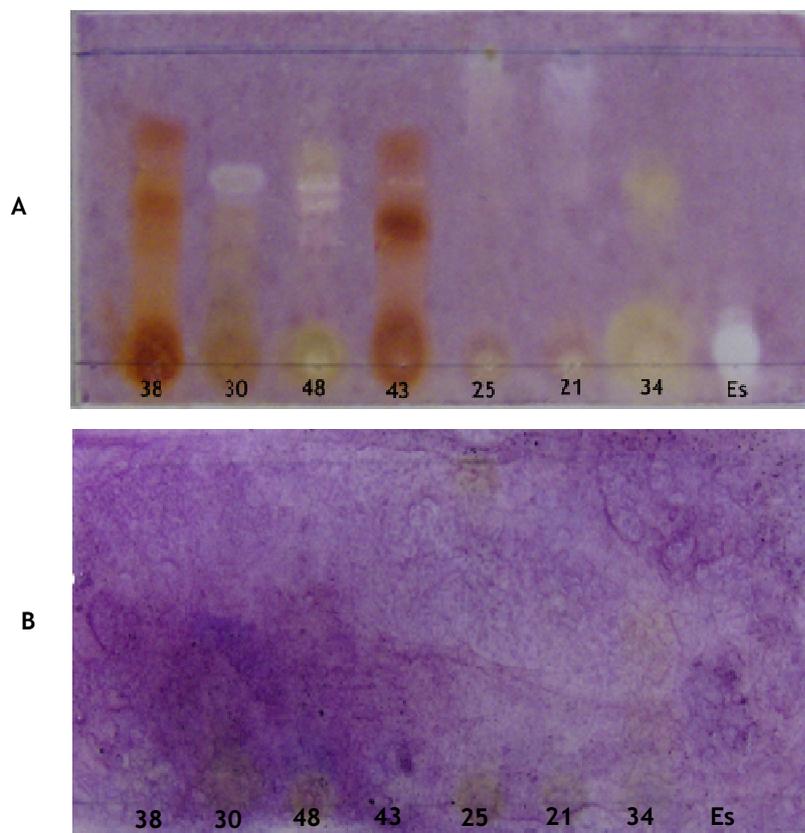
**Figura 1A<sub>1</sub>:** Placas cromatográficas do método bioautográfico (A) e dos falsos positivos (B) para os compostos de síntese de 55 até 62 e para a Eserina (Es) 0,100 mg/mL.



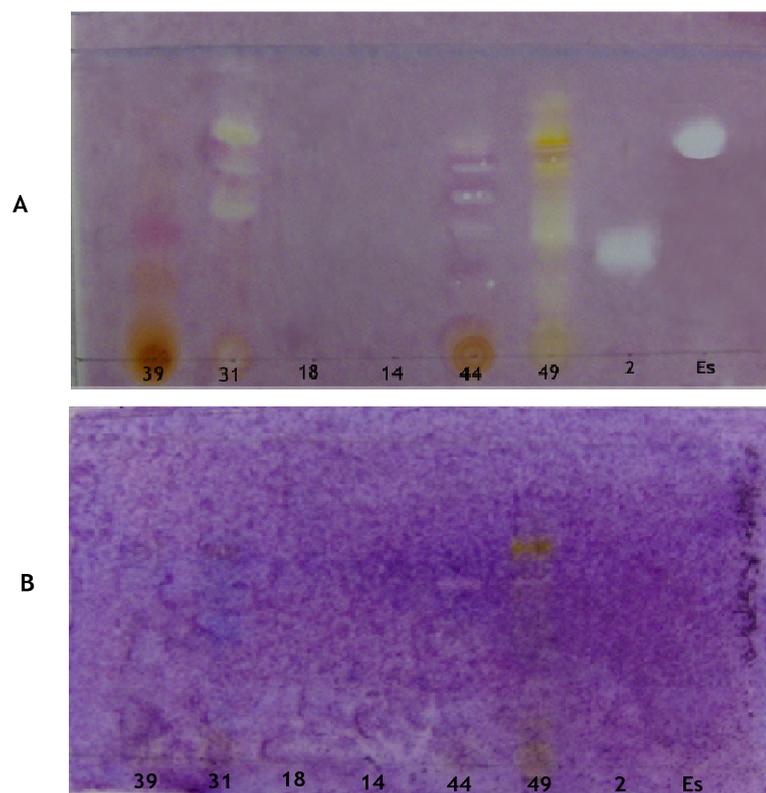
**Figura 2A<sub>1</sub>:** Placa cromatográficas do método bioautográfico (A) e dos falsos positivos (B) para a amostra 22 e para a Eserina (Es) 0,100 mg/mL.



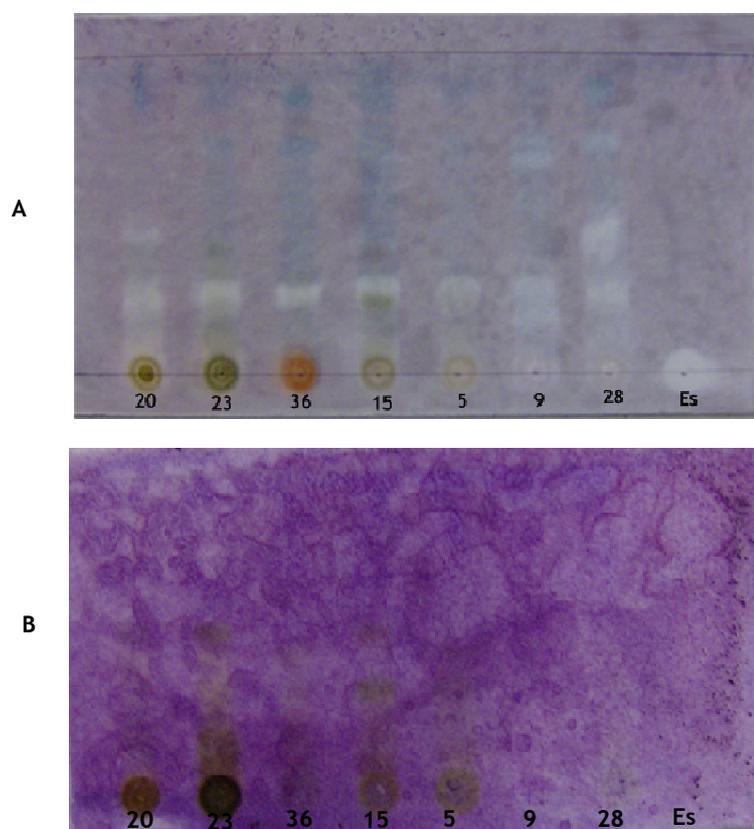
**Figura 3A<sub>1</sub>:** Placas cromatográficas do método bioautográfico (A) e dos falsos positivos (B) para as amostras 1; 7; 11; 13; 17; 24; 32; 35; 40; 45 e 50 e para a Eserina (Es) 0,100 mg/mL.



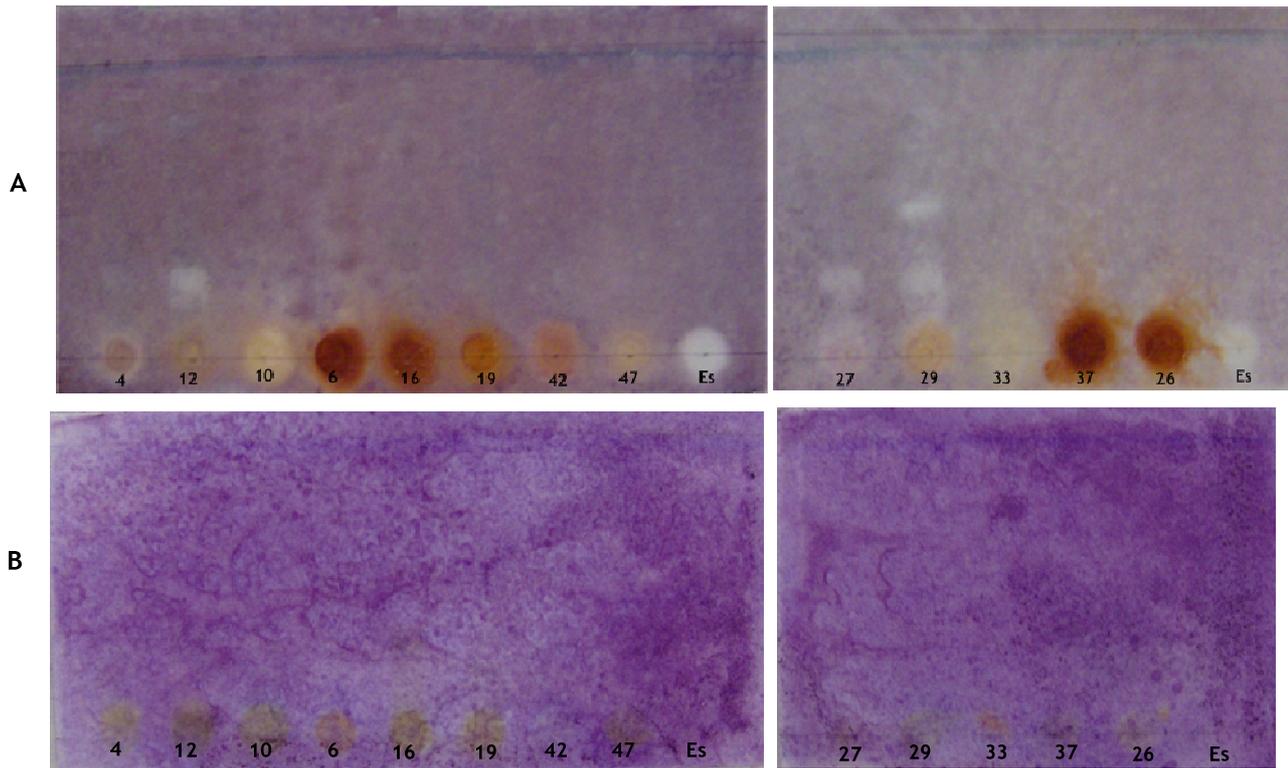
**Figura 4A<sub>1</sub>:** Placas cromatográficas do método bioautográfico (A) e dos falsos positivos (B) para as amostras 21; 25; 30; 34; 38; 43 e 48 e para a Eserina (Es) 0,100 mg/mL.



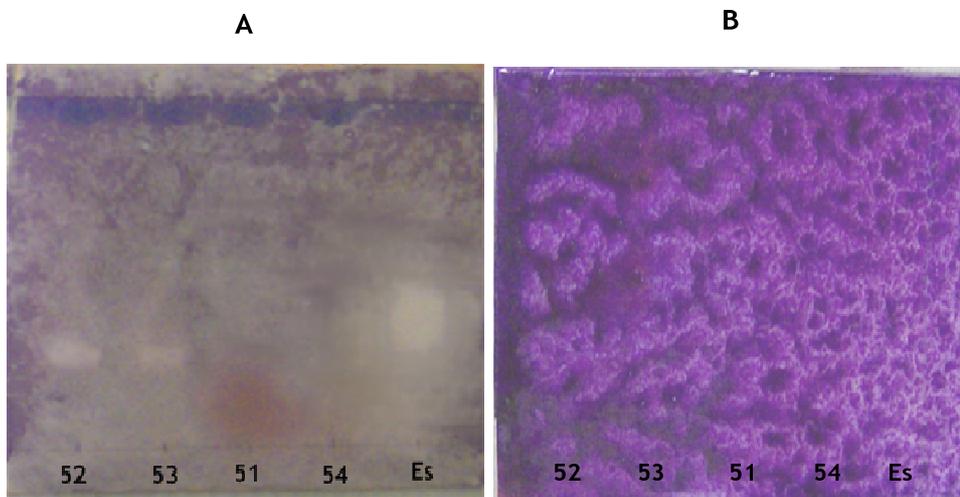
**Figura 5A:** Placas cromatográficas do método bioautográfico (A) e dos falsos positivos (B) para as amostras 2; 14; 18; 31; 39; 44 e 49 e para a Eserina (Es) 0,100 mg/mL.



**Figura 6A:** Placas cromatográficas do método bioautográfico (A) e dos falsos positivos (B) para as amostras 5; 9; 15; 20; 23; 28 e 36 e para a Eserina (Es) 0,100 mg/mL



**Figura 7A<sub>1</sub>:** Placas cromatográficas do método bioautográfico (A) e dos falsos positivos (B) para as amostras 4; 6; 10; 12; 16; 19; 26; 27; 29; 33; 37; 42 e 47 e para a Eserina (Es) 0,100 mg/mL.



**Figura 8A<sub>1</sub>:** Placas cromatográficas do método bioautográfico (A) e dos falsos positivos (B) para as amostras 51, 52, 53 e 54, e para a Eserina (Es) 0,100 mg/mL.

## Anexo 2

**Tabela 1A:** Equações e coeficientes de determinação para o cálculo do EC<sub>50</sub> das diferentes amostras no método de ABTS. y - percentagem de inibição (%) e x- concentração de amostra (mg/mL). (n=5). O valor de p foi <0,05 para todas as curvas de calibração.

Amostra	Equação	Coefficiente de determinação
1	$y = 1,99x + 0,25$	$R^2 = 0,999$
2	$y = 1,14x - 0,23$	$R^2 = 0,998$
4	$y = 1,79x + 10,63$	$R^2 = 0,914$
5	$y = 1,98x + 9,93$	$R^2 = 0,939$
6	$y = 81,24x + 1,65$	$R^2 = 0,986$
7	$y = 18,28x + 9,92$	$R^2 = 0,949$
10	$y = 18,41x + 3,50$	$R^2 = 0,993$
11	$y = 1,985x + 0,41$	$R^2 = 0,999$
12	$y = 9,47x + 4,54$	$R^2 = 0,987$
13	$y = 9,13x - 1,63$	$R^2 = 0,994$
15	$y = 2,57x + 6,61$	$R^2 = 0,933$
16	$y = 63,13x + 0,49$	$R^2 = 0,991$
17	$y = 85,02x + 1,25$	$R^2 = 0,989$
18	$y = 6,04x + 0,28$	$R^2 = 0,993$
19	$y = 19,20x + 3,62$	$R^2 = 0,991$
20	$y = 2,14x - 2,97$	$R^2 = 0,943$
21	$y = 3,08x + 4,40$	$R^2 = 0,986$
23	$y = 6,17x + 6,60$	$R^2 = 0,916$
24	$y = 2,57x + 5,70$	$R^2 = 0,948$
25	$y = 9,41x + 0,80$	$R^2 = 0,999$
26	$y = 18,67x + 7,35$	$R^2 = 0,967$
27	$y = 1,70x + 3,21$	$R^2 = 0,994$
28	$y = 1,23x + 0,91$	$R^2 = 0,995$
29	$y = 1,28x + 15,58$	$R^2 = 0,999$
30	$y = 15,04x + 9,62$	$R^2 = 0,958$
31	$y = 8,44x + 7,35$	$R^2 = 0,915$
32	$y = 1,74x + 12,50$	$R^2 = 0,935$
33	$y = 18,16x + 2,44$	$R^2 = 0,996$
34	$y = 19,82x + 7,31$	$R^2 = 0,912$
35	$y = 9,55x + 0,92$	$R^2 = 0,999$
36	$y = 17,00x + 7,57$	$R^2 = 0,974$
37	$y = 16,89x + 15,29$	$R^2 = 0,936$
38	$y = 18,12x + 9,27$	$R^2 = 0,969$

**Tabela 1A (continuação):** Equações e coeficientes de determinação para o cálculo do EC<sub>50</sub> das diferentes amostras no método de ABTS. y - percentagem de inibição (%) e x- concentração de amostra (mg/mL). (n=5). O valor de p foi <0,05 para todas as curvas de calibração.

Amostra	Equação	Coefficiente de determinação
39	$y = 17,07x + 14,55$	$R^2 = 0,944$
40	$y = 16,92x + 14,74$	$R^2 = 0,941$
41	$y = 5,47x + 0,86$	$R^2 = 0,999$
42	$y = 9,54x + 0,88$	$R^2 = 0,993$
43	$y = 46,01x + 1,35$	$R^2 = 0,995$
44	$y = 10,00x + 9,91$	$R^2 = 0,904$
45	$y = 8,95x + 3,10$	$R^2 = 0,981$
46	$y = 0,98x + 1,92$	$R^2 = 0,985$
47	$y = 4,95x + 0,46$	$R^2 = 0,999$
48	$y = 18,74x + 5,72$	$R^2 = 0,966$
49	$y = 9,30x + 9,10$	$R^2 = 0,918$
50	$y = 2,02x + 2,30$	$R^2 = 0,975$
51	$y = 1,71x + 11,49$	$R^2 = 0,924$
52	$y = 1,86x + 2,66$	$R^2 = 0,991$
Trolox	$y = 1,69E^{+4}x + 2,90$	$R^2 = 0,990$

**Tabela 2A:** Equações e coeficientes de determinação para o cálculo do EC<sub>50</sub> das diferentes amostras no método de DPPH. y - percentagem de inibição (%) e x - concentração de amostra (mg/mL). (n=5). O valor de p foi <0,05 para todas as curvas de calibração.

Amostra	Equação	Coefficiente de determinação
1	$y = 16,56x + 3,91$	$R^2 = 0,999$
2	$y = 1,71x + 9,12$	$R^2 = 0,986$
4	$y = 10,48x + 5,10$	$R^2 = 0,949$
5	$y = 13,61x - 0,01$	$R^2 = 0,999$
6	$y = 83,67x + 9,84$	$R^2 = 0,980$
7	$y = 76,90x + 17,41$	$R^2 = 0,998$
10	$y = 17,06x + 8,35$	$R^2 = 0,965$
11	$y = 17,90x + 2,13$	$R^2 = 0,998$
12	$y = 16,22x + 10,86$	$R^2 = 0,940$
13	$y = 5,89x + 7,48$	$R^2 = 0,973$
15	$y = 15,46x - 4,37$	$R^2 = 0,955$
16	$y = 80,77x - 0,07$	$R^2 = 0,999$
17	$y = 116,86x - 28,29$	$R^2 = 0,919$

**Tabela 2A (continuação):** Equações e coeficientes de determinação para o cálculo do EC<sub>50</sub> das diferentes amostras no método de DPPH. y - porcentagem de inibição (%) e x - concentração de amostra (mg/mL). (n=5). O valor de p foi <0,05 para todas as curvas de calibração.

Amostra	Equação	Coefficiente de determinação
18	$y = 1,03x + 22,79$	$R^2 = 0,966$
19	$y = 1,39E^{+2}x + 23,57$	$R^2 = 0,891$
20	$y = 27,34x + 11,26$	$R^2 = 0,938$
21	$y = 8,75x + 12,69$	$R^2 = 0,921$
23	$y = 12,77x + 6,11$	$R^2 = 0,974$
24	$y = 7,36x + 4,32$	$R^2 = 0,982$
25	$y = 16,14x + 9,93$	$R^2 = 0,956$
26	$y = 33,12x + 40,67$	$R^2 = 0,999$
27	$y = 8,75x + 29,60$	$R^2 = 0,962$
28	$y = 1,67x + 2,56$	$R^2 = 0,997$
29	$y = 34,05x + 4,53$	$R^2 = 0,986$
30	$y = 34,23x + 24,08$	$R^2 = 0,991$
31	$y = 15,97x + 16,86$	$R^2 = 0,939$
32	$y = 15,76x + 7,20$	$R^2 = 0,933$
33	$y = 16,71x + 14,04$	$R^2 = 0,999$
34	$y = 13,16x + 25,85$	$R^2 = 0,978$
35	$y = 14,70x + 16,24$	$R^2 = 0,999$
36	$y = 5,01E^{+2}x - 0,51$	$R^2 = 0,997$
37	$y = 103,85x - 4,00$	$R^2 = 0,954$
38	$y = 145,91x + 1,85$	$R^2 = 0,992$
39	$y = 82,76x - 0,48$	$R^2 = 0,999$
40	$y = 83,23x - 2,43$	$R^2 = 0,972$
41	$y = 108,49x + 6,61$	$R^2 = 0,941$
42	$y = 461,24x + 3,88$	$R^2 = 0,989$
43	$y = 202,74x + 9,45$	$R^2 = 0,932$
44	$y = 77,63x + 3,42$	$R^2 = 0,976$
45	$y = 559,10x + 5,91$	$R^2 = 0,949$
46	$y = 5,52x - 1,53$	$R^2 = 0,991$
47	$y = 29,67x + 0,59$	$R^2 = 0,999$
48	$y = 1,30E^{+2}x + 4,68$	$R^2 = 0,975$
49	$y = 37,13x + 2,38$	$R^2 = 0,990$
50	$y = 17,66x + 0,49$	$R^2 = 0,999$
51	$y = 49,14x + 0,51$	$R^2 = 0,991$
52	$y = 1,695x + 1,866$	$R^2 = 0,999$
53	$y = 1,596x + 6,181$	$R^2 = 0,988$
54	$y = 1,53E^{+2}x + 3,47$	$R^2 = 0,995$
Trolox	$y = 9,97E^{+4}x - 0,19$	$R^2 = 0,996$

**Tabela 3A:** Equações e coeficientes de determinação para o cálculo do IC<sub>50</sub> das amostras 7, 8, 37, 38, 39, 40, 47, 49, 50, 51, 52 e Tacrina dissolvidas em metanol, no método de Ellman. y - percentagem de inibição (%) e x - concentração de amostra (mg/mL). (n=5). O valor de p foi <0,05 para todas as curvas de calibração.

Amostra	Equação	Coefficiente de determinação
7	$y = 1,16x + 0,00$	$R^2 = 0,999$
8	$y = 0,99x + 3,10$	$R^2 = 0,955$
37	$y = 168,36x + 11,28$	$R^2 = 0,921$
38	$y = 165,15x + 5,41$	$R^2 = 0,983$
39	$y = 151,00x + 4,74$	$R^2 = 0,981$
40	$y = 165,62x + 1,97$	$R^2 = 0,974$
47	$y = 1,14x - 0,85$	$R^2 = 0,997$
49	$y = 1,29x + 5,27$	$R^2 = 0,926$
50	$y = 1,11x + 0,73$	$R^2 = 0,998$
51	$y = 1,37x - 2,08$	$R^2 = 0,981$
52	$y = 1,04x - 1,02$	$R^2 = 0,995$
Tacrina	$y = 2,00E^{+06}x + 18,65$	$R^2 = 0,908$

**Tabela 4A:** Equações e coeficientes de determinação para o cálculo do IC<sub>50</sub> das amostras 17, 23, 26, 34, 35, 37, 38, 39, 40, 49 e Tacrina dissolvidas em DMSO, no método de Ellman. y - percentagem de inibição (%) e x - concentração de amostra (mg/mL). (n=5). O valor de p foi <0,05 para todas as curvas de calibração.

Amostra	Equação	Coefficiente de determinação
17	$y = 4,94x - 3,56$	$R^2 = 0,941$
23	$y = 95,69x - 2,63$	$R^2 = 0,965$
26	$y = 1,34E^{+2}x + 10,20$	$R^2 = 0,942$
34	$y = 1,17x - 4,38$	$R^2 = 0,937$
35	$y = 1,07x + 3,10$	$R^2 = 0,961$
37	$y = 141,63x - 3,82$	$R^2 = 0,963$
38	$y = 137,77x + 1,78$	$R^2 = 0,915$
39	$y = 1,24E^{+2}x + 9,21$	$R^2 = 0,946$
40	$y = 21,49x + 9,04$	$R^2 = 0,916$
49	$y = 12,42x + 2,77$	$R^2 = 0,993$
Tacrina	$y = 2,00E^{+06}x + 15,83$	$R^2 = 0,985$