



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

***Acanthus mollis* como fonte de compostos biologicamente ativos**

Mariana Ribeiro Marques

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Química Medicinal

(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Prof^a. Doutora Maria Emília da Costa Cabral Amaral

Coorientadora: Prof^a. Doutora Ana Paula Coelho Duarte

Covilhã, outubro de 2016

Dedicatória

Dedico esta dissertação aos meus saudosos avós, aos meus pais e a minha irmã.

Agradecimentos

Este momento finaliza uma etapa importante para a minha vida profissional, por isso gostaria de agradecer a todos os que me ajudaram a alcançar este objetivo.

Começo por agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Emília Amaral, pela motivação, ajuda, paciência, disponibilidade e pelos conhecimentos transmitidos.

À Professora Doutora Ana Paula Duarte agradeço a disponibilidade, as sugestões e a orientação.

À Professora Doutora Luiza Granadeiro agradeço pelos conhecimentos transmitidos, pela disponibilidade e a motivação.

Aos responsáveis e colaboradores das instituições e departamentos que acolheram este trabalho, Universidade da Beira Interior, Faculdade de Ciências, Centro de Investigação em Ciências da Saúde, o meu bem-haja.

Aos meus colegas do Centro de Investigação em Ciências da Saúde, de modo particular à Cláudia, à Inês e ao João, obrigada pela motivação, pelas conversas e partilha de conhecimentos.

Aos amigos, os recentes e os de sempre, pela motivação ao longo desta etapa.

Agradeço aos meus pais, pelo vosso apoio, pela motivação e a paciência. Obrigada por demonstrarem sempre o vosso imenso orgulho em mim.

À minha irmã, obrigada pelo apoio e por me incentivares a dar o meu melhor e ser um bom exemplo para ti.

Agradeço à restante família pela motivação e apoio.

A todos os que não estão nominalmente aqui representados, mas que de alguma forma me ajudaram neste trabalho, o meu bem-haja.

Resumo

A utilização de plantas medicinais para a prevenção e o tratamento de doenças é uma das mais antigas práticas medicinais do homem. A determinação dos constituintes bioativos de uma planta com potencial terapêutico, oferece variadíssimas oportunidades para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos.

Neste contexto, o objetivo geral deste trabalho foi melhorar o conhecimento sobre as propriedades biológicas de extratos obtidos a partir do *Acanthus mollis*, L. (acanto), uma espécie sobre a qual são praticamente inexistentes estudos científicos, e a sua possível valorização como fonte de produtos naturais para uso terapêutico e/ou nutracêutico.

Neste estudo avaliou-se o potencial antioxidante e citotóxico de extratos metanólicos e etanólicos de folhas e flores do acanto. Para alguns grupos de metabolitos secundários (fenóis, flavonoides e alcaloides) determinaram-se alguns dos compostos fitoquímicos, bem como, a influência do procedimento de extração, usando a extração em Soxhlet e extração assistida por ultrassons, contemplando neste caso, o tamanho de partícula. O teor médio em fenóis totais foi avaliado pelo método do reagente de Folin-Ciocalteu; para quantificar os flavonoides totais recorreu-se ao método colorimétrico com cloreto de alumínio e o teor de alcaloides totais foi estimado pelo método do reagente de Dragendorff. A atividade antioxidante foi determinada pelo teste do 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). A avaliação da citotoxicidade foi feita pelo teste do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) para a viabilidade celular e a proliferação foi analisada através do doseamento de proteínas por ácido bicinonínico (BCA).

A maioria dos extratos estudados apresentam um teor significativo de metabolitos secundários (fenóis, flavonoides e alcaloides), sendo o método de extração por ultrassons o que apresentou melhores resultados, nomeadamente para o menor tamanho de partícula. Os resultados obtidos mostraram que o teor em fenóis totais, variou entre $57,4 \pm 7,67$ e $200,5 \pm 2,86$ miligramas de equivalentes de ácido gálico (mg EAG) por grama de matéria seca. Os flavonoides totais e os alcaloides apresentam teores que variam entre $13,8 \pm 1,03$ e $57,2 \pm 2,24$ miligramas de equivalentes de quercetina (mg EQ) por grama de matéria seca, e $50,4 \pm 0,004$ e $746,0 \pm 0,03$ miligramas de equivalentes de nitrato de pilocarpina (mg ENP) por grama de matéria seca. Os resultados para o índice de atividade antioxidante variaram entre $0,90 \pm 0,03$ e $1,61 \pm 0,31$ para os extratos, mostrando que todos eles apresentaram uma atividade antioxidante significativa.

Nos estudos de citotoxicidade todos os extratos provaram ser citotóxicos para células do adenocarcinoma da mama humano (MCF-7) e o extrato metanólico das flores, obtido por Soxhlet, apresenta toxicidade seletiva para estas células relativamente aos fibroblastos dérmicos normais humanos (NHDF).

Palavras chave: *Acanthus mollis*, L., compostos bioativos, atividade antioxidante, citotoxicidade.

Abstract

The use of medicinal plants for treatment, cure and prevention of diseases is one of the oldest medicinal practices of humanity. The evaluation of bioactive constituents on a plant with therapeutic potential, offers an extensive range of opportunities for the discovery and development of new drugs.

In this context, the broad aim of this work was to improve the knowledge on the biological properties of extracts obtained from *Acanthus mollis*, L. (acanthus), a species about which there are hardly any scientific studies and its potential value as a source of natural products for therapeutic and/or nutraceutical use.

This study evaluated the antioxidant and cytotoxic potential of methanol and ethanol extracts of leaves and acanthus flowers. For some groups of secondary metabolites (phenols, flavonoids and alkaloids) was determined some of phytochemical compounds, as well as the influence of the extraction procedure using the Soxhlet extraction and ultrasound-assisted extraction, comprising in this case the particle size.

The average of total phenolic content was estimated by the Folin-Ciocalteu colorimetric method; flavonoids were determined by aluminum chloride colorimetric method and the total alkaloid content was estimated by the method of the Dragendorff reagent. The antioxidant activity was evaluated by the 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl radical method (DPPH). Cytotoxicity was evaluated by the 3- [4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay, for cell viability and proliferation was analyzed using protein measurement using bicinchoninic acid (BCA).

The majority of the studied extracts show a significant content of secondary metabolites (phenols, flavonoids and alkaloids), being the method of extraction by ultrasounds the one that presented the best results, particularly for smaller particle size. The results obtained showed that the total phenolic content varied between 57.4 ± 7.67 and 200.5 ± 2.86 milligrams of gallic acid equivalents (mg EGA) per gram of dry matter. The total flavonoids and alkaloids present content levels ranging from 13.8 ± 1.03 and 57.2 ± 2.24 milligrams of quercetin equivalents (mg EQ) per gram of dry matter and 50.4 ± 0.004 and 746.0 ± 0.03 milligrams of pilocarpine nitrate equivalents (mg EPN) per gram of dry matter. The results for the antioxidant activity index fluctuated between 0.90 ± 0.03 and 1.61 ± 0.31 for the extracts, showing that all of them presented a significant antioxidant activity.

In the cytotoxicity studies all extracts proved to be citoxic to cells of the human breast adenocarcinoma (MCF-7) and the methanol extract from flowers by Soxhlet shows selective toxicity towards normal human dermal fibroblasts (NHDF).

Keywords:

Acanthus mollis, L., bioactive compounds, antioxidant activity, cytotoxicity.

Índice

Capítulo 1 - Introdução	12
1.1. Enquadramento e objetivos deste trabalho.....	13
1.2 Acanthus	13
1.2.1 Caraterização botânica	13
1.2.2 Principais constituintes químicos	14
1.2.3 <i>Acanthus mollis</i> , L.....	14
1.2.3.1 Uso na medicina tradicional	15
1.3 Principais constituintes das plantas	15
1.3.1 Os constituintes do metabolismo primário.....	16
1.3.2 Constituintes do metabolismo secundário	17
1.3.2.1 Compostos fenólicos	17
1.3.2.2 Alcaloides.....	20
1.3.2.3 Terpenoides	21
1.3.3 Extração de compostos bioativos	21
1.3.4 Métodos de determinação dos compostos bioativos.....	22
1.3.4.1.1 Determinação dos fenóis totais	22
1.3.4.2 Determinação dos flavonoides	22
1.3.4.3 Determinação dos alcaloides.....	23
1.4 Stress oxidativo e Antioxidantes	23
1.4.1 stress oxidativo	23
1.4.2 Antioxidantes.....	25
1.4.3 Determinação da atividade antioxidante - Método do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)	26
1.5. Atividade anticancerígena.....	27
1.5.1 O Cancro	27
1.5.1.1 Cancro da mama	27
1.5.2.1 MCF-7.....	29
1.5.2.2 NHDF	29
1.5.3 Avaliação da citotoxicidade	30
1.5.3.1 Teste do MTT	30
1.5.3.2 Quantificação de proteínas pelo ácido bicinconínico (BCA)	30
Capítulo 2 - Parte experimental	32
2.1 Colheita, Secagem e Moagem.....	33
2.2. Determinação do teor de matéria seca	33
2.3 Processos de extração.....	33
2.3.1 Extração em Soxhlet	33
2.3.2 Extração assistida por ultrassons	34
2.4 Diluição dos extratos em metanol e determinação da sua concentração.....	34

2.5. Determinação dos fenóis totais.....	35
2.6 Determinação dos flavonoides totais	36
2.7 Determinação de alcaloides.....	37
2.8 Determinação da atividade antioxidante - método do DPPH.....	38
2.9 Avaliação da citotoxicidade	40
2.9.1 Linhas celulares	40
2.9.2 Ensaio de Viabilidade celular.....	40
2.9.3 Doseamento de proteínas	40
Capítulo 3 - Resultados e Discussão	42
3.1. Rendimento de extração.....	43
3.2. Fenóis Totais.....	44
3.3. Flavonoides totais.....	45
3.4. Alcaloides.....	47
3.5 Atividade antioxidante	48
3.6.Avaliação da citotoxicidade.....	49
Capítulo 4 - Conclusões	54
e Perspetivas Futuras	54
Capítulo 5 - Referências Bibliográficas	56

Lista de Figuras

Figura 1: *Acanthus mollis* L.⁸

Figura 2: Representação esquemática das principais vias de produção dos três principais grupos de compostos bioativos das plantas, adaptado de Azmir et al (2013)¹⁴

Figura 3: Estrutura genérica de uma molécula de flavonoide³⁵.

Figura 4: Patologias humanas induzidas pelo stress oxidativo, adaptado de Pham-Huy et al (2008)

Figura 5: Reação da redução do MTT, adaptado de Riss et al (2013)⁶⁹

Figura 6: Representação esquemática do doseamento de proteínas por BCA

Figura 7: de calibração usada na quantificação dos Fenóis totais

Figura 8: Curva de calibração usada na determinação dos Flavonoides

Figura 9: Curva de calibração usada na determinação dos Alcaloides

Figura 10: Curva de calibração de DPPH usada na determinação da atividade antioxidante

Figura 11: Concentração de fenóis totais nos extratos

Figura 12: Concentração de flavonoides nos extratos

Figura 13: Concentração de alcaloides nos extratos

Figura 14: Resultados obtidos no ensaio de viabilidade (MTT) e no doseamento de proteínas (PT) para o extrato folhas(a) e das flores(b) em MeOH (metanol) Sox (Soxhlet) na gama de concentrações 0,0008 - 0,04 mg/mL em MCF-7

Figura 15: Resultados obtidos no ensaio de viabilidade (MTT) e no doseamento de proteínas (PT) para o extrato folhas (a) e das flores (b) em EtOH (etanol) Sox na gama de concentrações 0,0008 - 0,04 mg/mL em MCF-7

Figura 16: Resultados obtidos no ensaio de viabilidade (MTT) e no doseamento de proteínas (PT) para o extrato folhas (a) e das flores (b) em MeOH US-1 na gama de concentrações 0,0008 - 0,04 mg/mL em MCF-7

Figura 17: Resultados obtidos no ensaio de viabilidade (MTT) e no doseamento de proteínas (PT) para o extrato folhas (a) e das flores (b) em EtOH US-1 na gama de concentrações 0,0008 - 0,04 mg/mL em MCF-7

Figura 18: Resultados obtidos no ensaio de viabilidade (MTT) e no doseamento de proteínas (PT) para o extrato folhas (a) e das flores (b) em MeOH US-2 na gama de concentrações 0,0008 - 0,04 mg/mL em MCF-7

Figura 19: Resultados obtidos no ensaio de viabilidade (MTT) e no doseamento de proteínas (PT) para o extrato folhas (a) e das flores (b) em EtOH US-2 na gama de concentrações 0,0008 - 0,04 mg/mL em MCF-7

Figura 20: Ensaio de crescimento celular das MCF-7 para as 48 h e as 96h

Figura 21: Resultados obtidos no ensaio de viabilidade (MTT) para os extratos das folhas e flores em MeOH Soxhlet na concentração de 0,0008 mg/mL em NHDF

Lista de Tabelas

Tabela 1. Exemplos de algumas linhas celulares de cancro amplamente utilizadas com origem em diferentes tipos de células, adaptado de Ferreira et al. (2013)⁵⁹

Tabela 2. Algumas vantagens e desvantagens da utilização de linhas celulares, adaptado de Ferreira et al (2013)⁵⁹

Tabela 3. Valores dos teores de matéria seca (TMS)

Tabela 4. Valores médios das concentrações dos extratos.

Tabela 5. Rendimento das extrações para os dois métodos usados e tipos de solvente.

Tabela 6. Compostos fenólicos totais presentes nos vários extratos.

Tabela 7. Flavonoides totais presentes nos extratos do acanto.

Tabela 8. Concentração em alcaloides nos extratos estudados.

Tabela 9. Propriedades antioxidantes dos extratos do *Acanthus mollis* e dos padrões

Lista de Acrónimos

AAI	Índice de atividade antioxidante
AVE	Acidente vascular encefálico
BCA	Ácido bicinconínico
°C	Graus celsius
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2,-difeníl-1-picrihidrazil
EAG	Equivalentes de ácido gálico
ENP	Equivalentes de nitrato de pilocarpina
EQ	Equivalentes de quercetina
ER	Recetores de estrogénio
EtOH	Etanol
GSH	Glutationa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
HER2	Recetores do fator de crescimento epidérmico humano
IC ₅₀	Concentração inibitória
MCF-7	Células do adenocarcinoma da mama humano
MeOH	Metanol
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NADH	Dinucleótido de nicotiamida e adenina
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotiamida e adenina
NHDF	Fibroblastos dérmicos normais humanos
NO [·]	Óxido nítrico
·OH	Radical hidroxilo
OMS	Organização mundial de saúde
ONOO [·]	Radical peroxinitrito
PBS	Tampão fosfato salino
R [·]	Espécie radical
RNA	Ácido ribonucleico
RNS	Espécies reativas de nitrogénio
ROS	Espécies reativas de oxigénio
Sox	Soxhlet
TMS	Teor de massa seca
US-1	Extração assistida por ultrassons, com maior tamanho de partícula
US-2	Extração assistida por ultrassons, com menor tamanho de partícula

Capítulo 1 - Introdução

1.1. Enquadramento e objetivos deste trabalho

A evolução do homem através dos tempos esteve sempre acompanhada do conhecimento sobre as plantas¹. Uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade é a utilização de plantas com fins medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças².

Por definição da Organização Mundial de Saúde (OMS), planta medicinal é “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos”².

Os estudos de avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais passam por conhecer os seus constituintes bioativos³.

Os produtos naturais, tais como os extratos das plantas, quer como compostos puros ou como extratos padronizados, fornecem oportunidades ilimitadas para novas descobertas de fármacos devido à disponibilidade incomparável de diversidade química⁴⁻⁵.

Este trabalho visa estudar os extratos das folhas e das flores do *Acanthus mollis*, L. uma planta existente em algumas zonas da região da Covilhã, com a finalidade de pesquisar a presença de compostos biologicamente ativos nas partes aéreas da planta. Estas foram submetidas a dois processos de extração diferentes (extração em Soxhlet, e extração assistida por ultrassons) usando como solventes, o metanol e o etanol. Os extratos brutos foram avaliados quanto à sua composição em termos de compostos fenólicos totais, flavonoides e alcaloides. Neste estudo foram usados métodos colorimétricos: para os flavonoides (usando o cloreto de alumínio), para os fenóis totais (usando o reagente de Folin-Ciocalteu) e para os alcaloides foram quantificados usando o método do reagente de Dragendorff. A determinação da atividade antioxidante dos extratos brutos foi avaliada pelo método de sequestração do radical DPPH (2,2,-difenil-1-picrihidrazil). Este estudo será complementado com a realização de testes de citotoxicidade dos extratos obtidos usando o método MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) para analisar a viabilidade celular e o ensaio de doseamento de proteínas por BCA (ácido bicinonínico) para avaliar a proliferação celular.

1.2 *Acanthus*

1.2.1 Caracterização botânica

Segundo o sistema de classificação APG II *Acanthus* é um género botânico da família *Acanthaceae*⁶⁻⁷. Existem aproximadamente 4300 espécies de plantas com flores nesta família, nativas de regiões tropicais e temperadas, com a maior diversidade de espécies na Bacia do Mediterrâneo e Ásia⁷⁻⁹. O género compreende plantas herbáceas perenes, raramente arbustivas, com um tamanho que oscila entre 0,4 a 2 m de altura, folhas gigantes que podem

chegar a um metro de largura e flores reunidas em inflorescências do tipo rácimo, com coloração branca ou arroxeada⁸⁻⁹.

1.2.2 Principais constituintes químicos

Os lenhanos são os constituintes químicos presentes na família *Acanthaceae*, especialmente aqueles do tipo arilnaftaleno e arilnaftalida. Estes são um grupo de produtos que ocorrem naturalmente no material vegetal, caracterizados pela união de duas unidades fenilpropanoide (C₆-C₃) com ligações β-β'. O dímero fenilpropanoide pode ser pós-processado na planta, em diferentes graus de oxidação. Além disso, a ciclização pode também surgir através da introdução de uma ligação C₆-C₇' ou C₆-C₆'. Por conseguinte, os lenhanos podem ser divididos em vários subgrupos com base na sua estrutura geral. As subclasses mais comuns de lenhanos são os ariltetralinos e arilnaftalenos. Há muitas variações comuns na substituição padrão nos anéis arilo que ocorrem na natureza, incluindo metilenodioxilo, metoxilo e grupos hidroxilo⁷.

Os lenhanos têm importantes propriedades antineoplásicas e antivirais, e também exibem atividades biológicas diferentes, tais como a inibição da fosfodiesterase, a inibição da biossíntese de leucotrieno, e as actividades antivirais. Além disso, os lenhanos do tipo arilnaftalida mostraram ser citotóxicos para várias linhas celulares de cancro⁷.

1.2.3 *Acanthus mollis*, L.

O *Acanthus mollis*, L., vulgarmente conhecido como Pé de Urso, acanto ou erva-gigante é uma planta herbácea perene, nativa da região mediterrânica. Esta planta (figura 1) encontra-se amplamente distribuída por Portugal continental, Açores e Madeira¹⁰. Trata-se de uma planta robusta, simples, de 30-70 cm, levemente pubescente; folhas moles, oblongas, irregularmente penatipartidas ou penatifendidas, com os segmentos lobado-dentados, espiga densa, comprida, com as brácteas grandes e corola de 3,5-5 cm, branca¹⁰.

Na maioria das vezes o acanto é cultivado por motivos ornamentais, sendo uma das mais antigas espécies de plantas cultivadas para jardim, mas pode também crescer em estado selvagem. Na antiguidade, nomeadamente no final do século V a.c., as folhas do acanto são geralmente consideradas por historiadores como tendo sido a inspiração para os capitéis coríntios greco-romanos^{8, 10}.



Figura 1 - *Acanthus mollis*, L.⁸

1.2.3.1 Uso na medicina tradicional

As partes aéreas do acanto, principalmente as suas folhas apresentam diversas aplicações no meio popular. As infusões das folhas são tradicionalmente usadas em gargarejos para aliviar a dor de dente e as inflamações da boca. Pode também ser aplicada externamente para tratar a erisipela, as úlceras, os ferimentos e como anti-inflamatório para pernas inchadas. Cataplasmas das partes aéreas são utilizadas em problemas intestinais e as folhas quando trituradas são aplicadas externamente em contusões. A sua decocção é usada como emoliente¹⁰.

A planta é ainda utilizada em emplastro para o tratamento de queimaduras, as infusões servem para aliviar os espasmos, é relaxante/calicante¹¹. O uso das suas folhas é também mencionado como desinfetante, auxilia a cicatrização de feridas e tem propriedades diuréticas¹².

1.3 Principais constituintes das plantas

A vasta variedade de compostos químicos sintetizados dentro do reino vegetal pode ser dividida em metabolitos primários e metabolitos secundários. Os metabolitos primários são essenciais para reações bioquímicas básicas, destinadas ao crescimento e desenvolvimento¹³. Provêm do metabolismo primário os hidratos de carbono, os aminoácidos, as proteínas e os lípidos. Os metabolitos secundários não parecem ter qualquer função óbvia no crescimento e desenvolvimento da planta. No entanto, são considerados serem essenciais para a vida das plantas, alguns deles atuando como agentes de defesa contra microrganismos patogênicos, e insetos herbívoros e mamíferos¹³. Na figura 2 apresenta-se um esquema simplificado das principais vias para a produção dos três grupos principais de compostos bioativos das plantas, i.e., terpenos, alcaloides e compostos fenólicos¹⁴.

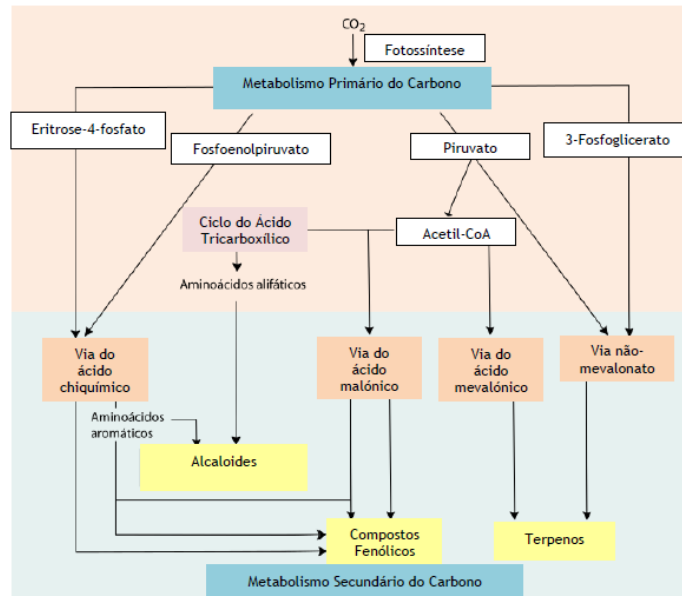


Figura 2. Representação esquemática das principais vias de produção dos três principais grupos de compostos bioativos das plantas, adaptado de Azmir et al (2013)¹⁴.

Os metabolitos secundários são provenientes das vias principais de síntese (via do ácido chiquímico, do ácido malónico, do ácido mevalónico e a via do não-melavonato), possuem diversas estruturas químicas e atividades biológicas e são uma fonte extremamente rica de compostos valiosos para uso na indústria farmacêutica, cosmética, de química fina, e nutracêuticos¹⁵⁻¹⁶. Por exemplo, a artemisinina, o paclitaxel, o ginsenosídeo, o licopeno, e o resveratrol são valiosos produtos naturais bem conhecidos, utilizados como medicamentos ou suplementos dietéticos¹⁵. Da figura 2 pode também ser observado que através da via do ácido chiquímico e a via do ácido malónico são sintetizados os compostos fenólicos. Os terpenos provêm da via do ácido mevalónico e a via do não-melavonato. Os alcaloides são produzidos a partir de aminoácidos aromáticos e alifáticos¹⁴.

Alguns dos metabolitos resultantes do metabolismo secundário são considerados compostos bioativos, pois exercem efeitos sobre os sistemas biológicos^{13, 16}. Uma definição de compostos bioativos nas plantas é: “os metabolitos secundários da planta que provocam efeitos farmacológicos e/ou toxicológicos em humanos e animais”^{13, 16}.

1.3.1 Os constituintes do metabolismo primário

As plantas sintetizam aminoácidos a partir dos elementos primários, o carbono e o oxigênio obtidos a partir de ar, hidrogênio da água no solo, formando hidratos de carbono pela fotossíntese e combinando-o com o azoto obtido a partir do solo, conduz à síntese de aminoácidos, por vias metabólicas colaterais¹⁷. O componente básico das células vivas são as proteínas formadas pela sequência de aminoácidos ingredientes fundamentais no processo de

síntese. Estudos têm demonstrado que eles podem influenciar direta ou indiretamente as atividades fisiológicas da planta¹⁷.

Os hidratos de carbono são macronutrientes cujos maiores representantes pertencem ao reino vegetal, seja na forma de hidratos de carbono complexos (amido e/ou celulose) ou na forma de açúcar como a sacarose (dissacáridos), além da glicose e da frutose, os monossacáridos mais comuns. As suas principais funções nos seres vivos são: energética (oxidação de glicose); reserva alimentar (amido e glicogênio); estrutural (celulose e quitina); genética (pentoses que fazem parte do DNA e RNA)¹.

Os lípidos constituem um amplo grupo de moléculas que ocorrem naturalmente com diversas funções biológicas; eles fornecem componentes estruturais de parede celular (sob a forma de ceras e cutina) e membrana celular, e também fornecem energia para o metabolismo¹⁸. Eles também são mediadores em muitos processos de plantas, incluindo a transdução do sinal, rearranjos do citoesqueleto, no transporte das membranas¹⁹. Estes processos são essenciais para a sobrevivência da célula, crescimento e diferenciação, e para respostas das plantas aos sinais ambientais, incluindo o stress biótico¹⁸.

1.3.2 Constituintes do metabolismo secundário

1.3.2.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são de grande importância na fisiologia da planta, exercem um dado papel na pigmentação, no sabor, no crescimento, na reprodução e na resistência a agentes patogénicos e predadores²⁰. Estruturalmente, estes compostos contêm pelo menos um anel aromático (anel fenólico), com um ou mais substituintes hidroxilos, e variam de moléculas fenólicas simples a compostos altamente polimerizados. Os compostos fenólicos que ocorrem mais na natureza estão conjugados com mono- a polissacáridos, ligado a um ou mais grupos fenólicos, e também pode ocorrer como derivados funcionais, tais como ésteres e ésteres de metilo²¹. Destacam-se pela sua atividade farmacológica, os ácidos fenólicos, os flavonoides, os taninos e os compostos quinónicos^{1, 21}. Os compostos fenólicos exibem uma vasta gama de propriedades fisiológicas, tais como efeitos antialérgicos, anti-inflamatórios, antimicrobianos, antioxidantes, anti-trombóticos, vasodilatadores e cardioprotetores²¹⁻²²

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos é devida à sua capacidade de sequestrar radicais livres, doar átomos de hidrogénio dos grupos hidroxilo fenólicos ou quelatação de cátions metálicos^{1, 13, 21, 23-24}. A estrutura destes compostos é a característica determinante para a sua atividade sequestradora e de quelatação de iões metálicos. Por exemplo, no caso dos ácidos fenólicos a atividade antioxidante depende do número e da posição dos grupos hidroxilos em relação ao grupo funcional carboxilo²¹. Outro exemplo, usando modelos experimentais confirmou que os compostos fenólicos de *Theobroma cacao* (cacau) exibiram efeitos benéficos contra a agregação plaquetária²⁵, a pressão arterial elevada²⁶,

aterosclerose²⁷, hiperglicemia e hipercolesterolemia²⁸, inflamação²⁹, hepatocarcinogênese²⁸, danos ao DNA e efeito clastogênico³⁰.

Os benefícios possíveis para a saúde resultantes da dieta com compostos fenólicos, dependem da sua absorção e metabolismo³¹, que por sua vez, é determinada pela sua estrutura, incluindo a sua conjugação com outros compostos fenólicos, grau de glicosilação / acilação, tamanho molecular e solubilidade²⁰.

Os ácidos fenólicos, destacados pela sua atividade farmacológica, são bastante abundantes nas plantas especialmente os derivados do ácido benzoico e os do ácido cinâmico, normalmente os compostos hidroxilados, alguns destes ligados a oses. São exemplo de ácidos fenólicos do ácido cinâmico na forma de heterósidos, o ácido p-cumárico, o ácido cafeico, entre outros ácidos que na forma de ésteres, são encontrados em várias plantas medicinais^{1, 13, 32}.

Tipicamente, as plantas que apresentam estes componentes são aplicadas como hipocolesteroliantes e coleréticas, ultimamente estes constituintes têm sido investigados em relação à atividade antioxidante^{1, 32}.

Os flavonoides são substâncias fenólicas hidroxiladas, representam mais de metade dos oito mil compostos fenólicos que ocorrem naturalmente nas plantas (são conhecidos por serem sintetizados pelas plantas em resposta a infecção microbiana) e constituem o maior grupo destes compostos^{21, 33}. Estes constituintes exibem um papel importante na interação da planta com o meio ambiente envolvente. Eles protegem a planta contra as radiações ultravioleta e visível, desempenhando um importante papel de defesa. Os flavonoides também possuem funções importantes na saúde humana, como estão presentes em todas as plantas, acabam por integrar todas as dietas, e o consumo de alimentos de origem vegetal pode auxiliar na prevenção de doenças degenerativas associadas com o stress oxidativo³⁴. Estes compostos têm baixo peso molecular, e a sua estrutura deriva da flavona (2-fenil- γ -cromona), que poderá conter vários grupos hidroxilo unidos aos anéis de estrutura básica C₆-C₃-C₆, sendo dois anéis fenólicos substituídos (A e B) e um pirano (cadeia heterocíclica C) acoplado ao anel A como se mostra na figura 3^{21, 35}.

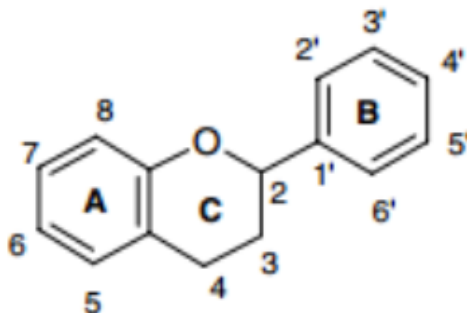


Figura 3 – Estrutura genérica de uma molécula de flavonoide³⁵.

A natureza química dos flavonoides depende da sua classe estrutural, grau de hidroxilação ou outras substituições e o grau de polimerização^{23, 33}. O recente interesse nestas substâncias tem sido estimulado pelos potenciais benefícios para a saúde decorrentes das atividades antioxidante destes compostos polifenólicos. Os grupos funcionais hidroxilo nos flavonoides medeiam os seus efeitos antioxidantes por sequestração de radicais livres e / ou por quelação de iões metálicos³³. A quelação de metais pode ser crucial na prevenção de geração de radicais que danificam biomoléculas alvo^{33, 36}. Os flavonoides podem ser divididos em diferentes subclasses: flavonas, flavanonas, flavonóis, chalconas, antocianidinas, e isoflavonas¹³. Vários flavonoides tais como, catequina, apigenina, quercetina, naringenina e rutina são relatados pela sua atividade hepatoprotetora. Extratos de plantas de diferentes espécies, ricos em flavonoides têm sido relatados por possuírem atividade antibacteriana³⁷⁻³⁸. Estes compostos são necessários para a manutenção de uma permeabilidade vascular normal e, de facto, são utilizados para certos estados patológicos em que existe um defeito na permeabilidade da parede vascular^{33, 35}. Certos membros desta classe de flavonoides afetam significativamente a função do sistema imunitário e células inflamatórias³⁹. Alguns flavonoides tais como hesperidina, apigenina, luteolina, quercetina estão referidos por possuírem efeitos anti-inflamatórios e analgésicos. Os flavonoides podem afetar especificamente a função de sistemas enzimáticos envolvidos na geração de processos inflamatórios, especialmente tirosina e proteína quinase, serina-treonina^{33, 40}.

Os taninos são compostos de origem fenólica, hidrossolúveis, mas com capacidade para formar complexos insolúveis. Estes compostos dividem-se em dois conjuntos: os hidrolisáveis (taninos gálhicos) e os condensados ou proantocianidinas^{1, 32, 41-42}. A base estrutural dos taninos hidrolisáveis é uma ose, usualmente a glucose, na qual os grupos hidroxilo se encontram esterificados pelos ácidos elágico e gálhico. Os taninos condensados por sua vez são caracterizados como polímeros de leucoantocianidinas (3,4-flavanodióis) e de catequinas monoméricas (3-flavanóis) ou oligómeros^{1, 32, 42}. Os taninos apresentam propriedades antissépticas, hemostáticas e anti-inflamatórias e também são utilizados na terapia da diarreia. Também podem ser utilizados como antídoto no envenenamento por alcaloides e metais pesados, pois conseguem precipitar estes compostos. Coloca-se a hipótese de que o mecanismo de ação dos taninos esteja ligado com a sua capacidade antioxidante, de sequestrar radicais livres e de formar complexos com macromoléculas de origem polissacarídea ou proteica e iões metálicos. Alguns testes *in vitro* propõem que os taninos participam na modulação de etapas da proliferação e divisão celular, na resposta do sistema imunitário, na coagulação e na inflamação^{1, 32}. Internamente, estes compostos, devido á formação de um complexo com proteínas e/ou polissacáridos, aumentando a impermeabilidade das mucosas o que auxilia a ação anti-ulcerosa da mucosa gástrica. Externamente, esta impermeabilização das mucosas e das camadas externas da pele, restringe as perdas de fluidos e entrava as ofensas externas, melhorando assim o processo de regeneração de tecidos^{1, 32}.

Os lenhanos são produtos do metabolismo secundário produzidos por várias plantas

para servir como moléculas de defesa contra os predadores. Quimicamente eles são dímeros de fenilpropano que, adicionalmente, exibem atividades biológicas variadas⁴³.

Os lenhanos e neolenhanos têm sido alvo de interesse na investigação ao longo dos anos, por causa da grande ocorrência em diversas espécies de plantas, da variedade de estruturas químicas e das inúmeras propriedades biológicas atribuídas a esses compostos⁴⁴. Nas plantas os lenhanos e neolenhanos desempenham um importante papel de defesa, propriedades antibacterianas e antifúngicas, têm sido apontadas a este grupo de compostos. Lenhanos do tipo ariltetrahidronaftalênicos e dibenzociclo-octânicos têm sido na maioria das vezes referidos como antimetabólitos. Dentre todos, o lenhano de ocorrência natural mais conhecido é a podofilotoxina devido ao potencial farmacológico dos derivados obtidos a partir dela na terapia contra vários tumores⁴⁴.

As antraquinonas são assim denominadas devido à existência de um grupo carbonilo no anel central do antraceno. Na maioria as antraquinonas são quinonas, com exceção dos senósidos que são diantrons. Geralmente, os compostos antraquinônicos desempenham uma ação purgativa ou laxativa, dependendo da dosagem, este efeito sente-se 10 a 12 horas após a ingestão. Ao atingirem o cólon, os heterósidos, sofrem hidrólise provocada pelas enzimas presentes na flora bacteriana, as geninas vão agir nas terminações nervosas da parede intestinal, o que leva à diminuição da reabsorção da água e promove o peristaltismo intestinal^{1, 32}.

1.3.2.2 Alcaloides

Os aminoácidos são os precursores mais importantes na origem biogenética dos alcaloides, no entanto, podem também ser originários de terpenos e esteróis^{1, 45}. Os alcaloides são compostos orgânicos cíclicos contendo azoto de baixo peso molecular e pertencem a uma extensa categoria de metabolitos secundários alcalinos^{1, 4}. Possuem um caráter lipófilico muito acentuado o que lhes permite serem solúveis em solventes orgânicos e estes compostos ao reagirem com ácidos originam sais que passam a ser solúveis em água¹. Os alcaloides formam um grupo heterogêneo de compostos orgânicos, definido pela função amina que empresta aos seus constituintes, propriedades químicas próprias, às quais se aliam uma toxicidade geralmente elevada e muitas vezes também uma ação farmacológica revelante^{41, 45}. A presença de oxigênio na maioria destes compostos confere-lhe propriedades diferenciadas, ou seja, os que são oxigenados são inodoros, não voláteis e cristalizam facilmente, os que não contêm oxigênio são líquidos, odoríferos e voláteis¹. A atividade fisiológica potente de muitos alcaloides levou à sua utilização como produtos farmacêuticos, estimulantes, narcóticos e venenos. Atualmente, os alcaloides com mais utilização clínica incluem a morfina e a codeína como analgésicos, o agente anticancerígeno vinblastina,

colchicina no tratamento da gota, a (+)tubocurarina relaxante muscular, o ajmalicina antiarrítmicas e a escopolamina sedativo⁴⁵⁻⁴⁶.

1.3.2.3 Terpenoides

Os terpenoides, são uma grande família de compostos, que inclui constituintes como os carotenoides, os esteróis e hormonas. Nos organismos vivos, os terpenoides desempenham um papel importante na respiração celular na cadeia de transporte de eletrões (ubiquinona e menaquinona), bem como na biossíntese e estabilidade da parede celular e membrana. Estes compostos são vitais para o crescimento e sobrevivência das plantas, pois desempenham uma função essencial na conversão da luz em energia química e na formação e funcionamento dos centros de reação fotossintética. Outras funções conhecidas dos terpenoides nas plantas incluem papéis importantes na resposta ao stress ou em mecanismos de defesa⁴⁷.

1.3.3 Extração de compostos bioativos

A extração é a primeira etapa de qualquer estudo de plantas medicinais e desempenha um papel crucial no resultado final, apoiado em estudos qualitativos e quantitativos de compostos bioativos^{14, 48-49}. Os métodos de extração envolvem a separação de porções de compostos bioativos presentes nos tecidos das plantas usando solventes seletivos. Durante este processo, o solvente difunde-se no material sólido e solubiliza compostos com polaridade similar^{46, 50}. A eficiência deste processo é influenciada por muitos fatores, tais como, a composição do solvente, a temperatura de extração, o tempo, o tamanho de partícula, a razão sólido/solvente, entre outros⁵⁰⁻⁵².

A extração de compostos bioativos de plantas pode ser feita por diversos processos, enquadrados em dois grandes grupos: processos convencionais e não-convencionais. Os métodos não-convencionais são considerados mais amigos do ambiente, devido à redução no uso de solventes orgânicos e sintéticos, redução do tempo processual, apresentando melhor seletividade e rendimento¹⁴. A extração assistida por ultrassons faz parte deste grupo e é considerada uma técnica simples, eficiente e uma alternativa não muito cara⁵¹. A eficiência de extração deste método para remoção dos metabolitos secundários reside no efeito de cavitação acústica produzida no solvente pela passagem de ondas ultrassónicas que conduzem à difusão do solvente através da parede celular, aumentando o conteúdo da célula, depois de quebrar as suas paredes e conseqüentemente, melhorar o contato da área superficial entre as fases sólidas e líquidas^{14, 51}.

Contudo, todas estas novas metodologias foram/são sempre comparadas com um método de extração convencional, considerado ainda hoje como um método de referência, ou seja, a extração em Soxhlet^{14, 49}. No entanto, este método apresenta algumas desvantagens,

nomeadamente, longos tempos de extração, uso de grandes quantidades de solvente, baixa seletividade e em alguns casos, decomposição térmica dos compostos termolábeis¹⁴.

1.3.4 Métodos de determinação dos compostos bioativos

A análise da classe de compostos presentes nos extratos obtidos foi feita de acordo com os métodos que de seguida se descrevem.

1.3.4.1.1 Determinação dos fenóis totais

A determinação quantitativa destes compostos é obtida por diversas técnicas espectrofotométricas, todavia a que usa o reagente de Folin-Ciocalteu é das mais utilizadas. Este reagente consiste numa mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstúico, no qual o molibdénio e o tungsténio encontram-se no estado de oxidação 6+ (com cor amarela) porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdénio azul e tungsténio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 e cuja coloração permite a medição espectrofotométrica e a determinação da concentração das substâncias redutoras, que não precisam necessariamente ter natureza fenólica⁵³⁻⁵⁴. Esta metodologia tem algumas desvantagens, pois o reagente de Folin-Ciocalteu não é específico e deteta todos os grupos fenólicos presentes nos extratos, também sofre interferência de compostos não fenólicos, como o ácido ascórbico, que tal como os compostos fenólicos são capazes de reduzir o reagente de Folin-Ciocalteu⁵⁵.

1.3.4.2 Determinação dos flavonoides

A quantificação dos flavonoides é efetuada por recurso a métodos colorimétricos, espectrofotométrico, cromatográficos, entre outros. A maior dificuldade é a separação destes compostos das matérias-primas vegetais na sua totalidade⁵⁶.

A metodologia de quantificação mais usual consiste na precipitação dos flavonoides em meio básico com cloreto de alumínio. Neste método, o catião alumínio forma complexos estáveis com os flavonoides (em solução metanólica), ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção. O complexo flavonoide-alumínio formado, absorve num comprimento de onda superior ao do flavonoide sem a presença do agente complexante ($AlCl_3$). A leitura de absorvância num comprimento de onda de 415 nm permite determinar a dosagem de flavonoides sem a interferência de outros compostos fenólicos, uma vez que estes mesmo que formem um complexo com o alumínio, absorvem a comprimentos de onda menores^{55, 57}.

1.3.4.3 Determinação dos alcaloides

Para a quantificação de alcaloides totais seguiu-se a metodologia descrita por Sreevidya e Mehrotra (2003)⁵⁸. Este procedimento usa um método espectrofotométrico rápido, fácil e simples que foi desenvolvido para o cálculo do total de alcaloides precipitados pelo reagente de Dragendorff em materiais vegetais. Este reagente trata-se de uma solução de iodeto de bismuto e potássio, isto é, o nitrato de bismuto reage com iodeto de potássio em solução ácida (normalmente através do uso de ácido acético glacial) e forma um sal com cor laranja - $K[Bil_4]$.

Neste método, os alcaloides são precipitados na forma de um complexo (alcaloide-bismuto) pelo reagente de Dragendorff, onde o bismuto forma um complexo amarelo em meio acidificado com ácido nítrico e na presença de tiourea. O complexo de cor amarela formado obedece à lei de Lambert-Beer, num λ_{max} em 435 nm. Convertem-se os valores em concentração de alcaloides totais por comparação com a curva analítica proveniente do nitrato de pilocarpina⁵⁸. Para a análise qualitativa destes compostos recorre-se aos reagentes gerais dos alcaloides, usa-se aqueles que apresentam maior sensibilidade, sendo estes, o reagente de Dragendorff, de Mayer, de Bertrand. Na pesquisa de alcaloides efetuam-se um ensaio preliminar, no qual o aparecimento de precipitados não indica a existência destes compostos pois nas condições do ensaio podem precipitar outros compostos. No ensaio decisivo só precipitam compostos alcaloides, mas perdem-se alguns alcaloides, nomeadamente os quaternários⁵⁹.

1.4 Stress oxidativo e Antioxidantes

Nas últimas três décadas houve um interesse crescente em produtos naturais vegetais quimiopreventivos. A etiologia de várias doenças degenerativas e relacionadas com o envelhecimento foi atribuído ao stress oxidativo e numerosos estudos têm sido realizados procurando os antioxidantes mais efetivos⁶⁰⁻⁶¹.

1.4.1 stress oxidativo

Em condições fisiológicas normais, observa-se um equilíbrio entre a produção de radicais livres, na sua maioria sob a forma de espécies reativas de oxigénio (ROS), e as defesas antioxidantes (enzimas e moléculas não enzimáticas)⁶².

Os ROS estão envolvidos em processos fisiológicos de sinalização e de regulação na célula, podendo ser benéficos para esta em concentrações baixas ou moderadas⁶³. Certas situações causam um desequilíbrio entre a produção de ROS e as defesas antioxidantes, devido a uma produção excessiva de ROS ou uma deficiência nas defesas antioxidantes da célula, a este desequilíbrio dá-se o nome de stress oxidativo. Este desequilíbrio entre

oxidantes e antioxidantes em favor dos primeiros pode oxidar e danificar lípidos celulares, proteínas e DNA ⁶⁴. O stress oxidativo foi já associado como causa ou como estando diretamente relacionado com várias patologias, nomeadamente o cancro (a iniciação e promoção do cancro estão associados a defeitos cromossómicos e ativação oncogénica induzida pelos radicais livres), as doenças cardiovasculares (aterosclerose, isquemia, hipertensão, cardiomiopatia, hipertrofia cardíaca e insuficiência cardíaca congestiva), as doenças neurológicas (os radicais livres são mediadores da Alzheimer, esquizofrenia, esclerose lateral amiotrófica e Parkinson), as doenças pulmonares (reforçam a inflamação por meio da ativação de diferentes quinases e fatores transcrição redox), entre outras⁶⁵⁻⁶⁶. Na figura 4 apresentam-se de forma esquemática estas e outros tipos de patologias associadas ao stress oxidativo.

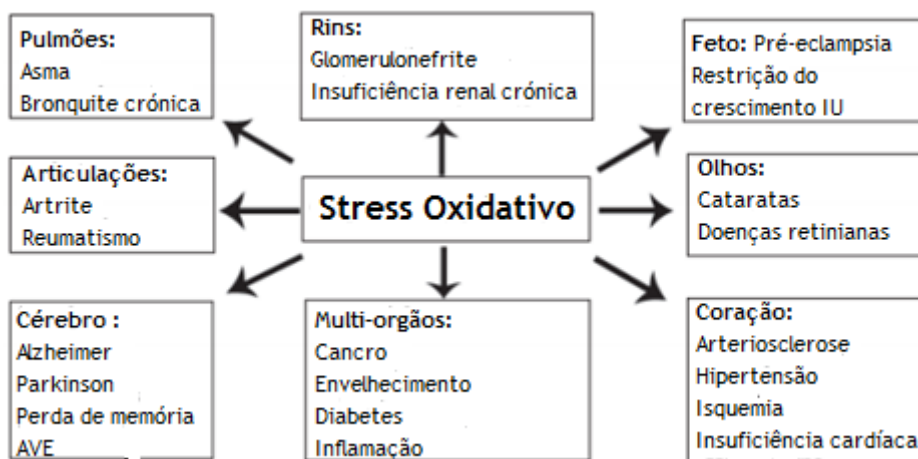


Figura 4. Patologias humanas induzidas pelo stress oxidativo, adaptado de Pham-Huy et al (2008) ⁶⁵

O stress oxidativo é iniciado pelas ROS, tais como o anião superóxido e o peróxido de hidrogénio. Nenhuma destas ROS é um oxidante forte, mas podem ser convertidos em oxidantes mais perigosos por reações adversas nos tecidos⁶⁷⁻⁶⁸. O anião superóxido pode ser produzido a partir de oxigénio molecular através diversos tipos de células, através de sistemas enzimáticos, incluindo a cadeia respiratória, a xantina oxidase, a ciclo-oxigenase e NADPH-oxidase. O produto da dismutação dos aniões superóxidos é o peróxido de hidrogénio (H₂O₂), formado quer espontaneamente ou enzimaticamente, bem como, radicais hidroxilos (·OH). A síntese do óxido nítrico mitocondrial produz óxido nítrico (NO[·]), principal responsável pelas espécies reativas de nitrogénio (RNS), que se pode combinar com o anião superóxido para formar radicais peroxinitrito (ONOO[·]), um potente agente oxidante que pode provocar fragmentação de DNA e oxidação lipídica^{64, 66, 68-69}. Portanto, a oxidação de fosfolípidos e ácidos gordos desencadeada pelos radicais livres, produz peróxidos lipídicos reativos, que por sua vez iniciam a reação em cadeia da peroxidação lipídica em membranas celulares, danificando uma larga gama de biomoléculas essenciais^{66, 68}. Estes radicais atacam alvos celulares sensíveis como lípidos, proteínas e ácidos nucleicos causando a sua inibição e

degradação acelerada. Assim, o stress oxidativo inflige múltiplos níveis de dano celular, que se propagam num ciclo vicioso⁶⁸.

1.4.2 Antioxidantes

Halliwell(1990) definiu os antioxidantes como: “substâncias que, quando presentes em baixas concentrações em comparação com a de um substrato oxidável (hidrato de carbono, lípido, proteína ou ADN), atrasam significativamente ou impedem a oxidação do referido substrato”⁷⁰.

O potencial valor dos antioxidantes levou os investigadores a procurar compostos com atividade antioxidante potente, mas baixa citotoxicidade⁷¹.

Os antioxidantes podem ser classificados em dois grandes grupos, i.e., antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Alguns desses antioxidantes são produzidos endogenamente e incluem enzimas, moléculas de baixo peso molecular e cofatores da enzima. Entre os antioxidantes não enzimáticos, muitos são obtidos de fontes dietéticas⁶⁸.

Os sistemas enzimáticos estão incluídos nos mecanismos de prevenção/proteção contra as reações dos radicais livres. São exemplos deste sistema as enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase e glutathione reductase, entre outras. A superóxido dismutase é uma das mais importantes, pois transforma o radical superóxido em peróxido de hidrogénio, que mais tarde se decompõe, por ação da catalase e da glutathione peroxidase, em água e oxigénio^{64, 68, 72-73}.

Os sistemas não-enzimático estão envolvidos na proteção contra propagação de reações oxidativas em cadeia. Fazem parte deste grupo de compostos a glutathione (GSH), o α -tocoferol (vitamina E), o ácido ascórbico (vitamina C), o ácido lipóico, os carotenoides, os flavonoides, entre outros^{64, 68}. A proteção também é garantida pela sequestração de iões metálicos. A reação em cadeia envolvida na peroxidação lipídica é bloqueada pelo α -tocoferol, através da doação de um átomo de hidrogénio originando o radical peroxilo e formando o radical α -tocoferol, este é menos reativo e pode ser reduzido a α -tocoferol por um variado número de compostos biológicos, incluindo o ácido ascórbico, a GSH e ubiquinóis⁷²⁻⁷³.

Por último temos as enzimas de reparação, estas incluem as enzimas reparadora de DNA e as enzimas reparadora de proteínas lesadas. As enzimas envolvidas na reparação de DNA são a DNA glicosilase, DNA ligase, entre outras. Estas atuam por excisão ou por recombinação. Também a ativação da polissintase (ADP-ribose) promove a reparação de DNA. No entanto em excesso ativa a morte celular, com extensa lesão ao DNA. Sistemas proteolíticos, que reconhecem proteínas lesadas, estão presentes tanto no citosol quanto na mitocôndria das células⁷²⁻⁷³.

Outro tipo de classificação dos antioxidantes foi proposto por Niki (2010) quanto ao mecanismo de ação que desempenham na célula: antioxidantes preventivos, captadores, reparadores ou de novo, atuando sequencialmente e pela ordem aqui mostrada, em termos

de linhas de defesa do organismo. Os antioxidantes preventivos atuam suprimindo a formação de ROS e RNS ou ainda captando íons metálicos como o cobre e o ferro. Os antioxidantes captadores, funcionam removendo rapidamente espécies ativas, impedindo o ataque de moléculas biologicamente essenciais. Os compostos fenólicos enquadram-se neste tipo de antioxidantes, atuando como captadores de radicais livres. Os antioxidantes reparadores atuam ao nível da reparação de lesões, da eliminação de resíduos ou da reconstituição de funções perdidas. Por último, os antioxidantes de novo, exercem uma função de adaptação de mecanismos, onde os antioxidantes apropriados são produzidos na altura certa e transferidos nas quantidades certas para as posições adequadas^{69, 72-73}.

1.4.3 Determinação da atividade antioxidante - Método do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

Os métodos de determinação da atividade antioxidante dividem-se em dois grupos; métodos baseados na reação de transferência de eletrão, no qual se inclui o método do DPPH e os métodos baseados na reação de transferência do átomo de hidrogénio⁷⁴⁻⁷⁵.

A molécula de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) é caracterizada por ser um radical livre estável em virtude da deslocalização do eletrão livre na molécula como um todo, portanto as moléculas não dimerizam, como seria o caso da maioria dos radicais livres. Esta deslocalização também proporciona à molécula de DPPH uma coloração púrpura que absorve num comprimento de onda de aproximadamente 520 nm⁷⁶.

Quando a solução de DPPH é misturada com uma substância dadora de um átomo de hidrogénio (um antioxidante ou uma espécie radicalar (R^{*}), o DPPH é reduzido formando difenilpicril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorizada pelo decréscimo da absorvância⁷⁶.

A maioria dos estudos exprime os resultados como o valor IC₅₀ definido como a quantidade de antioxidante necessário para diminuir a concentração inicial de DPPH em 50%, calculada utilizando o gráfico onde se representa a percentagem de inibição *versus* a concentração do extrato⁷⁴.

Uma nova abordagem foi proposta por Scherer & Godoy (2009) que propuseram um índice de atividade antioxidante (AAI) usando o método do DPPH, calculado como se segue e usado neste estudo:

$$AAI = \text{Concentração final DPPH}^\circ (\mu\text{g/mL}) / \text{IC}_{50} (\mu\text{g} / \text{mL})^{74}$$

1.5. Atividade anticancerígena

1.5.1 O Cancro

O cancro é uma patologia heterogénea ao nível molecular, caracterizada pelo crescimento descontrolado das células, que podem invadir e se espalhar para locais distantes no corpo, sendo uma das principais causas de morte em todo o mundo⁷⁷. De acordo com a OMS morrem cerca de 8,2 milhões de pessoas por ano com cancro, o cancro do pulmão, próstata, colo-retal, estômago e fígado os tipos de cancro mais comuns no homem, por sua vez na mulher são o cancro da mama, colo-retal, pulmão, colo do útero e do estômago.

A carcinogénese envolve principalmente três passos, iniciação, promoção e progressão. A quimioterapia é ainda considerada o mais importante tratamento para o cancro, contudo, este tipo de tratamento apresenta bastantes efeitos secundários⁷⁸.

1.5.1.1 Cancro da mama

Inicialmente o cancro da mama era classificado tendo em conta os seguintes fatores: tipo histológico, o grau do tumor, o estado linfonodal e a presença de marcadores de previsão tais como os ER (receptores de estrogénio), e mais recentemente o HER2 (receptor do fator de crescimento epidérmico humano)⁷⁹.

O cancro da mama pode ser considerado dependente de hormonas ou não dependente. As hormonas, nomeadamente os estrogénios, são importantes no desenvolvimento normal da mama, mas também podem ter um papel importante no desenvolvimento do cancro da mama. A hormona estradiol, tem uma função de destaque por estimular a divisão celular nas células da mama, influenciando ainda outras hormonas que podem estimular a divisão celular das células mamárias. Cerca de 70% dos tumores malignos da mama, mantêm a dependência hormonal expressa nas células normais, através da expressão de ER⁸⁰⁻⁸¹. Uma vez que as hormonas influenciam a divisão celular e consequentemente a proliferação celular, estas podem provocar erros genéticos devido a mutações ao acaso, por aumento do número de divisões celulares⁸².

Para o tratamento do cancro da mama existem dois tipos de tratamentos, os locais e os sistémicos. São exemplos do primeiro tipo a cirurgia e a radiação, por sua vez a quimioterapia e a terapia hormonal são exemplos do segundo tipo de tratamento. Normalmente para o tratamento desta patologia elege-se um tratamento combinado entre os dois tipos de modo a aumentar a possibilidade de sucesso⁸³.

Ao nível da terapia hormonal, utilizam-se dois tipos de bloqueadores, os bloqueadores dos ER e os bloqueadores da aromatase. O primeiro tipo de bloqueadores, são os antiestrogénios que são amplamente utilizados no tratamento de cancro da mama hormono-

dependente, atuando através de um mecanismo de inibição competitiva pela ligação aos ER's, bloqueando a ação dos estrogénios⁸⁴⁻⁸⁵. Os segundos bloqueadores, inibem a síntese de estrogénios, através da inibição enzima responsável pela sua síntese, a aromatase⁸⁵.

1.5.2 Linhas celulares

As linhas celulares de cancro têm sido amplamente usadas na investigação, estando alguns exemplos apresentados na tabela 1. O uso de linhas celulares em investigação de cancro permitiu um aumento da informação disponível sobre a regulação de genes e as vias de sinalização desta patologia. A utilização destes modelos permitiu o desenvolvimento e estudo de fármacos anticancerígenos que são atualmente utilizados na terapêutica e no desenvolvimento de novas terapias. Estes modelos também apresentam um papel importante na investigação das vias genéticas, epigenéticas e celulares, para definir potenciais marcadores moleculares, para analisar a desregulação da proliferação, apoptose e da progressão do tumor e para rastrear e caracterizar de potenciais agentes terapêuticos^{77, 79}.

Tabela 1. Exemplos de algumas linhas celulares de cancro amplamente utilizadas com origem em diferentes tipos de células, adaptado de Ferreira et al. (2013)⁷⁷

Linha celular cancerígena	Espécie		Morfologia
HeLa	<i>Homo sapiens</i>	Adenocarcinoma cervical	Epitelial
MCF-7	<i>Homo sapiens</i>	Adenocarcinoma da mama	Epitelial
U87MG	<i>Homo sapiens</i>	Glioblastoma- astrocitoma	Epitelial
HT-29	<i>Homo sapiens</i>	Adenocarcinoma do colon	Epitelial
A549	<i>Homo sapiens</i>	Carcinoma do pulmão	Epitelial
HEP-G2	<i>Homo sapiens</i>	Carcinoma hepatocelular	Epitelial
K-562	<i>Homo sapiens</i>	Leucemia mielóide crónica	Linfoblasto
Cos7	<i>Cercopithecus aethiops</i>	SV40 renal transformado	Fibroblasto
PC3	<i>Homo sapiens</i>	Adenocarcinoma da próstata	Epitelial
A375	<i>Homo sapiens</i>	Melanoma maligno	Epitelial

Como todos os modelos, as linhas celulares, apresentam vantagens e desvantagens, algumas delas são apresentadas na tabela 2.

Tabela 2. Algumas vantagens e desvantagens da utilização de linhas celulares, adaptado de Ferreira et al (2013) ⁷⁷

Vantagens	Desvantagens
Fácil de manusear e manipular	Contaminação cruzada com células HeLa
Elevada homogeneidade	Perda de heterogeneidade
Elevado grau de similaridade como o tumor no estado inicial	Instabilidade genómica
Alta variedade disponível	Possível alteração das características das células
Acessibilidade imediata	Infeção com micoplasma
Capacidade autorreplicativa ilimitada	Dificuldade em estabelecer uma linha celular a longo termo
Fácil substituição	Ambiente diferente do tumor
Reprodutibilidade dos resultados	

De seguida serão apresentados em mais detalhe as linhas celulares usadas no trabalho experimental desta dissertação.

1.5.2.1 MCF-7

A linha celular de cancro da mama mais utilizada é a MCF-7, que foi estabelecida em 1973, na *Michigan Cancer Foundation*. Esta linha deriva da efusão pleural de um paciente com cancro da mama que demonstrava conter quantidades significativas do recetor de 17 β -estradiol. Esta proteína de ligação é específica para o 17 β -estradiol e é capaz de transportar este composto para o núcleo. A linha celular MCF-7 é muito usada devido à sua sensibilidade hormonal através da expressão de ER, que a torna um modelo ideal para estudar a resposta hormonal ^{79, 86}.

1.5.2.2 NHDF

As NHDF (fibroblastos dérmicos normais humanos) são isolados da derme de prepúcio juvenil ou da pele de adultos de variados locais, tais como o peito, as coxas, o abdómen ou o rosto. Estes podem ser utilizados em estudos de doenças da pele ou de cicatrização de feridas. Esta linha celular também é muito usada na investigação de compostos com possível atividade citotóxica, em estudos de regeneração de tecidos e em engenharia de tecidos. As células da derme expressam recetores e enzimas que metabolizam os estrogénios, sendo esta é a razão pela qual as NHDF são utilizadas como controlo saudável para o cancro da mama ¹⁷.

1.5.3 Avaliação da citotoxicidade

Os passos básicos comuns a qualquer teste de citotoxicidade *in vitro* incluem: a cultura das células, a incubação destas com as amostras de compostos/extratos em estudo, a avaliação da sobrevivência das células e por último a interpretação dos resultados⁸⁷. A citotoxicidade pode ser avaliada através de teste de viabilidade celular e de proliferação. Neste trabalho para avaliar a viabilidade utilizou-se o ensaio de MTT e para a proliferação o doseamento de proteínas.

1.5.3.1 Teste do MTT

O ensaio colorimétrico do MTT é bastante útil na determinação da viabilidade celular. Os ensaios de proliferação e de viabilidade celular são particularmente importantes para aplicações de rotina, esta técnica é rápida para o screening de compostos com potencial anticancerígeno. As células viáveis com metabolismo ativo convertem o MTT no formazano, composto de cor púrpura, com um máximo de absorção próximo de 570 nm, reação apresentada na figura 5. Quando as células morrem, perdem a capacidade de converter o MTT em formazano, logo, a cor serve como um marcador apenas para as células viáveis. O mecanismo celular exato para a redução do MTT em formazano não está bem descrito, mas supõe-se que envolva a reação do composto com NADH^{87 88-89}.

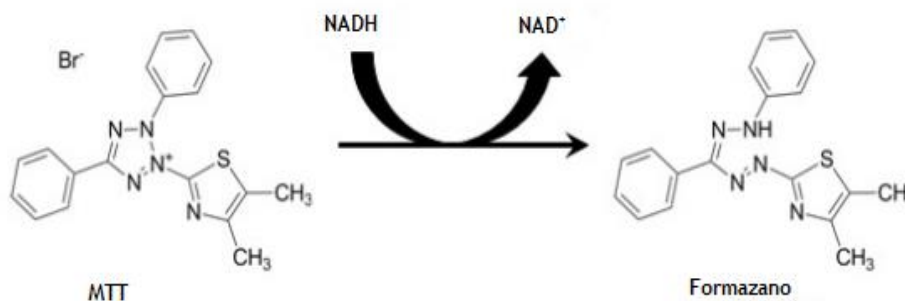


Figura 5. Reação da redução do MTT, adaptado de Riss et al (2013)⁸⁹

1.5.3.2 Quantificação de proteínas pelo ácido bicinonínico (BCA)

O doseamento de proteínas por BCA, é um método colorimétrico para o doseamento de proteínas baseado num reagente de deteção alternativo o BCA. Este método é utilizado de modo indireto para prever o número de células, contudo a absorvância lida não é proporcional ao número de células. O BCA, na forma de sal de sódio, é um composto estável, solúvel em água capaz de formar um complexo com os iões de cobre(I) de cor roxa intensa num ambiente básico. Este reagente está na base do método capaz de monitorizar a

quantidade de íons de cobre (I) que são produzidos na reação das proteínas com Cobre (II) em meio básico (Figura 6). A cor produzida a partir desta reação é estável e aumenta de forma proporcional ao longo de um amplo intervalo de concentrações crescentes de proteína^{17, 90}.

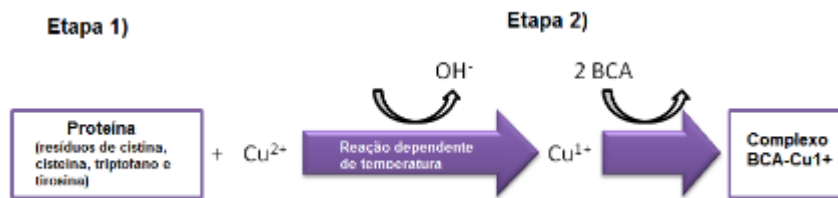


Figura 6. Representação esquemática do doseamento de proteínas por BCA¹⁷

Capítulo 2 - Parte experimental

2.1 Colheita, Secagem e Moagem

As partes aéreas (flores e folhas) do acanto foram colhidas na região da Covilhã, durante a época de floração (junho). As amostras obtidas foram secas à temperatura ambiente e sem exposição direta à luz, de modo a obter-se uma secagem homogénea. Após a secagem, as amostras foram reduzidas a pó e tamisadas. Obteve-se dois tipos de amostra com um pó mais grosseiro, retido num tamis de 2 mm e um pó mais fino com um tamanho médio de partícula de 0,5 mm. Este último foi usado exclusivamente para a extração assistida por ultrassons.

2.2. Determinação do teor de matéria seca

Após a homogeneização do pó obtido, colocou-se uma pequena quantidade de amostra numa balança de infravermelhos, para as condições de 105°C, durante 1 h (aproximação à norma NP 3185), monitorizando-se a perda de peso pelo material, indicado pelo valor do teor de matéria seca (TMS) que é lido diretamente na balança no final do tempo selecionado.

Na tabela 3 pode observar-se os valores obtidos para cada uma das amostras. Estes valores são usados para calcular a massa absolutamente seca das amostras, para as subseqüentes extrações.

Tabela 3. Valores dos teores de matéria seca (TMS)

Partes da planta	TMS, %
Folhas	90,2
Flores	91,2

2.3 Processos de extração

Efetuararam-se dois métodos de extração sólido-líquido utilizando como solventes o etanol e o metanol. Numa das extrações recorreu-se ao processo clássico de extração com extrator Soxhlet, e nas outras duas, foi usado o método dos ultrassons (método não-convencional), para as amostras com tamanhos de partículas diferentes (designada US-1 para o tamanho maior e US-2 para o menor tamanho) e os mesmos tempos de extração. Uma abordagem um pouco mais detalhada é de seguida apresentada.

2.3.1 Extração em Soxhlet

Para a extração em Soxhlet, as amostras foram pesadas para cartuchos de celulose e colocadas no interior do extrator Soxhlet; de seguida adicionaram-se os solventes referidos anteriormente, num balão de fundo redondo, obtendo-se as seguintes proporções: para as

flores 1:25 e para as folhas 1:30. A extração manteve-se até o solvente ficar incolor. Para cada uma das amostras foi feito um duplicado.

Após a extração, as amostras foram concentradas num evaporador rotativo e colocadas numa estufa ventilada a 35°C até completa secagem, validada após vários ciclos de secagem, até se obter dois valores de massa constantes. Com os valores obtidos determinam-se os rendimentos de extração.

2.3.2 Extração assistida por ultrassons

Na extração por ultrassons usou-se uma proporção fixa de 1:10, a que corresponde 5 g de amostra colocada num erlenmeyer, no qual se adicionaram 50 mL de solvente. As extrações foram feitas em duplicado, para as duas amostras tamisadas referidas no item 2.1. A extração com ultrassons, foi realizada para cada amostra em duas etapas de extração, isto é, a primeira extração com duração de 15 minutos, seguida de renovação de solvente e novamente mais 15 minutos. De notar que a temperatura do banho de ultrassons foi controlada e a água do banho ia sendo continuamente arrefecida, para garantir que a amostra no interior do erlenmeyer se mantinha entre 35° a 37°C.

Após a extração, procedeu-se como descrito anteriormente, avaliando-se de modo similar, o rendimento das extrações.

2.4 Diluição dos extratos em metanol e determinação da sua concentração

Os métodos de quantificação que se irão analisar requerem que o solvente seja o metanol, pelo que todos os extratos secos foram diluídos usando um dado volume deste solvente. De seguida, para cada uma das amostras, retirou-se uma alíquota de 5 mL para um balão volumétrico de 50 mL, perfazendo-se o volume com metanol. Com o objetivo de determinar a concentração do extrato obtido, transferiu-se uma alíquota de 5 mL para um frasco âmbar, previamente pesado, e colocou-se na estufa até completa secura. Este processo foi feito em triplicata para cada uma das amostras. Foram retirados da estufa e colocados no exsiccador com o objetivo de estabilizarem a temperatura e serem pesados para a determinação da concentração do extrato, como se mostra na tabela 4.

Tabela 4. Valores médios das concentrações dos extratos.

Método	Solvente	Parte da planta	Concentração, mg/mL
Ultrassons	Metanol	Folhas	10,4
			18,4*
		Flores	8,93
			10,3*
	Etanol	Folhas	5,4
			5,3*
		Flores	5,1
			6,9*
Soxhlet	Metanol	Folhas	41,5
		Flores	43,4
	Etanol	Folhas	33,1
		Flores	44,7

Nota: os resultados assinalados com * são referentes aos extratos de US-2

2.5. Determinação dos fenóis totais

Para a quantificação dos fenóis totais construiu-se uma curva de calibração, preparando-se as seguintes soluções, em metanol, de um padrão fenólico de controlo (o ácido gálico) com diferentes concentrações: 50, 100,125, 150, 200, 225,250, 300, 325, 350, 400 e 500 mg/L.

A 50 µL das soluções padrão adicionaram-se 450 µL de água destilada, 2,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu 0,2 N (esta solução foi preparada a partir da solução comercial de 2 N), deixou-se reagir durante 5 minutos à temperatura ambiente. Ao fim deste tempo, adicionaram-se 2 mL de solução aquosa de carbonato de sódio a 75g/L e deixou-se reagir durante uma hora e meia, num banho a 30°C com agitação intermitente. Para o branco substituiu-se os 50 µL das soluções por igual volume de metanol e seguindo-se o procedimento anteriormente descrito. Após este tempo, leram-se as absorvâncias destas misturas a 765 nm. Com os valores obtidos, construiu-se uma curva de calibração, colocando nas abcissas as concentrações de ácido gálico e nas ordenadas os valores das absorvâncias a 765nm (Figura 7). As determinações foram feitas em duplicados.

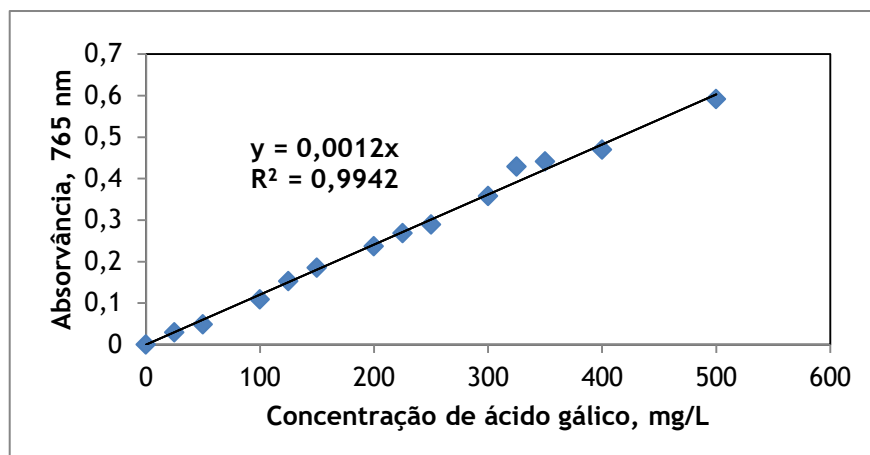


Figura 7. Curva de calibração usada na quantificação dos fenóis totais.

Para a quantificação dos fenóis totais em cada extrato, procedeu-se como descrito anteriormente, tendo em atenção que os 50 μ L iniciais são substituídos por 50 μ L dos extratos em metanol. A quantidade de fenóis totais presentes nas amostras foi calculada usando a curva de calibração e são apresentados em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de matéria seca¹⁶. Todos os ensaios foram realizados em duplicado.

2.6 Determinação dos flavonoides totais

Para a determinação dos flavonoides totais construiu-se uma curva de calibração. Para tal, prepararam-se umas soluções de quercetina, em metanol, com diferentes concentrações: 200, 150, 130, 100, 70, 50, 30, 12,5 e 6 μ g/mL.

A 500 μ L das soluções iniciais (padrões e extratos), adicionaram-se 1,5 mL de metanol, 0,1 mL de solução aquosa de cloreto de alumínio a 10%, 0,1 mL de solução aquosa de acetato de potássio 1M e 2,8 mL de água destilada. Deixou-se a reagir à temperatura ambiente por trinta minutos, com agitação intermitente. Para o branco, substituiu-se o volume inicial por igual volume de metanol e procedeu-se do mesmo modo. Após o tempo referido, leram-se as absorvâncias das misturas obtidas a 415 nm. As determinações foram feitas em duplicado.

Com os valores obtidos para as soluções padrão, construiu-se a curva de calibração, colocando no eixo das abcissas as concentrações de quercetina e no eixo das ordenadas as absorvâncias a 415 nm (Figura 8).

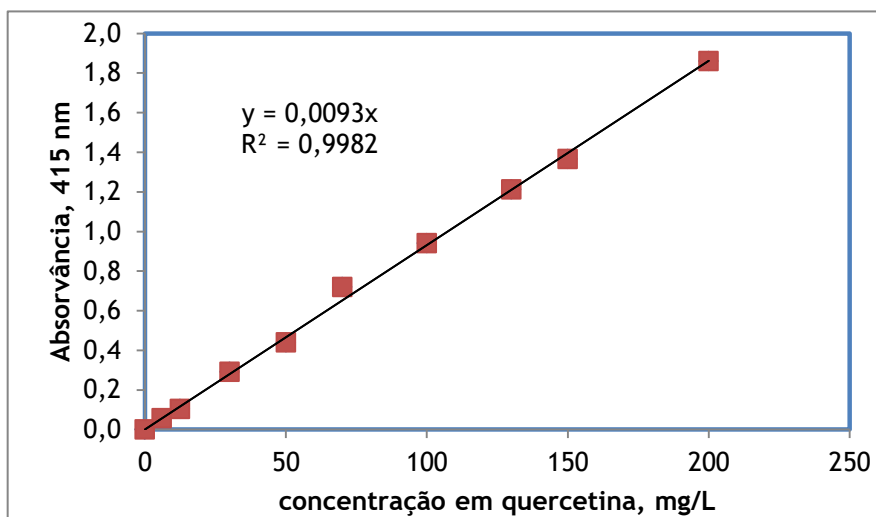


Figura 8. Curva de calibração usada para a determinação dos flavonoides totais.

A determinação de flavonoides totais presentes em cada extrato foi calculada usando a equação da curva de calibração e é apresentada em miligramas equivalentes de quercetina por gramas de matéria seca⁵⁵. Todos os ensaios foram realizados em duplicado.

2.7 Determinação de alcaloides

Para a determinação dos alcaloides nos extratos vegetais procedeu-se do seguinte modo: retiraram-se alíquotas de 10 mL de cada um dos extratos e centrifugaram-se durante 10 minutos a 3000 rpm. A 5 mL do extrato centrifugado adicionou-se 1 mL de solução de ácido clorídrico 0,1 N, agitou-se a amostra e adicionou-se 2,5 mL de reagente de Dragendorff à mistura anterior, para precipitação. O precipitado foi centrifugado durante 5 minutos a 3000 rpm. Este precipitado foi lavado com 2,5 mL de etanol, o filtrado foi descartado e o resíduo foi tratado com 2,5 mL de solução de sulfato de sódio a 1%, agitado e novamente centrifugado nas mesmas condições. O resíduo obtido foi dissolvido em 2 mL de ácido nítrico concentrado, com aquecimento se necessário. A esta amostra foi adicionada 8 mL de água destilada e 1 mL da solução anterior foi pipetado para um tubo de ensaio ao qual se adicionaram 5 mL de solução de tiourea a 3% (m/v). A absorvância destas soluções foi medida a 435 nm, contra um branco contendo 1 mL de ácido nítrico concentrado e 2,5 mL de solução de tiourea 3% m/v. Para a determinação dos alcaloides foi necessário construir uma curva calibração, para tal prepararam-se soluções padrão de nitrato de pilocarpina, em ácido clorídrico 0,1 N, com diferentes concentrações: 750, 500, 400, 250, 200, 150, e 100 mg/L, procedendo-se de acordo com o acima mencionado.

Para a curva de calibração, colocou-se no eixo das abcissas as concentrações de nitrato de pilocarpina e no eixo das ordenadas os valores das absorvâncias a 435 nm. (Figura 9)

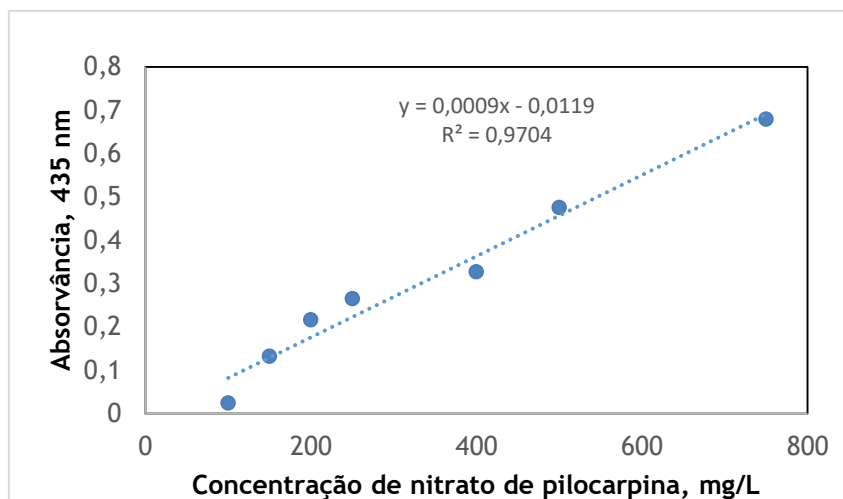


Figura 9 . Curva de calibração usada na determinação dos alcaloides

A quantificação dos alcaloides em cada extrato foi calculada usando a curva de calibração e são apresentados em miligramas equivalentes de nitrato de pilocarpina por grama de matéria seca^{16, 58}. Todos os ensaios foram feitos em duplicado.

2.8 Determinação da atividade antioxidante - método do DPPH

Para a construção da curva de calibração preparou-se uma solução-mãe de 85,6 mg/L e desta preparam-se várias diluições com diferentes concentrações de DPPH (4,28; 8,56; 17,12; 25,68; 34,24; 42,8; 51,36; 59,92; 68,48; 77,04 mg/L).

As absorvâncias destas soluções foram lidas a 517 nm, contra um branco contendo unicamente metanol, as leituras foram efetuadas em duplicados. A partir destas construiu-se a curva de calibração, colocando no eixo das abcissas as concentrações de DPPH e no eixo das ordenadas os valores das absorvâncias a 517 nm. (Figura 10)

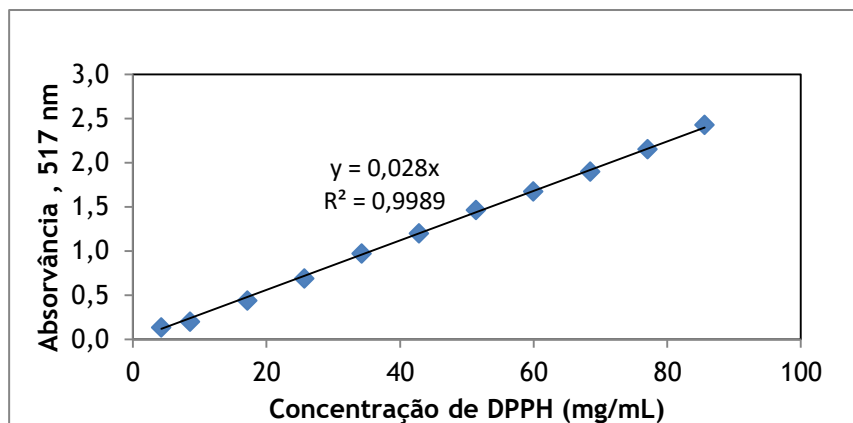


Figura 10. Curva de calibração do DPPH usada para determinar a atividade antioxidante

Para determinar a atividade antioxidante dos extratos, prepararam-se três soluções de DPPH em metanol, com concentrações de 0,2000, 0,1242 e 0,0800 mM. Posteriormente para cada uma das concentrações dos extratos (250, 200, 150, 100, 50 e 25 µg/mL) e cada uma das concentrações de DPPH, prosseguiu-se do seguinte modo: a 0,1 mL de amostra adicionou-se 3,9 mL de solução de DPPH, esta mistura foi deixada a reagir à temperatura ambiente, no escuro durante 90 minutos. Após este tempo, leram-se as absorvâncias a 517 nm. As determinações foram feitas em triplicados e o controle para cada solução de DPPH era 0,1 mL de metanol mais 3,9 mL de solução de DPPH. Por sua vez o branco consistia apenas em metanol.

Para este método foram usadas três soluções padrão, um de quercetina (500, 400, 300, 200, 100, 50 mg/L), de trolox (100, 75, 50, 25, 10 e 5 mg/L) e por fim, uma solução de ácido gálico (150, 100, 75, 50, 25 e 10 mg/L)^{16, 55, 74}

Para cada uma das amostras procedeu-se ao cálculo da percentagem de inibição de acordo com Scherer e Godoy (2009). A representação gráfica deste parâmetro *versus* a concentração na célula do espectrofotômetro, permite obter a concentração da amostra necessária para promover 50% de inibição (IC₅₀). A atividade antioxidante foi expressa em termos do índice de atividade antioxidante (AAI), e calculada a partir da seguinte fórmula:⁷⁴

$$AAI = \frac{\text{Concentração final de DPPH}}{IC_{50}} \times 100$$

De acordo com Scherer e Godoy (2009), consideraram-se extratos com uma baixa atividade antioxidante se AAI < 0,5; com atividade antioxidante moderada para 0,5 < AAI < 1,0; atividade antioxidante forte para 1,0 < AAI < 2,0 e muito forte quando AAI > 2,0.⁷⁴

2.9 Avaliação da citotoxicidade

2.9.1 Linhas celulares

As células MCF-7 e NHDF são mantidas à temperatura de 37°C numa atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂. As MCF-7 foram cultivadas no meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com uma elevada concentração de glucose e com 10% de FBS (soro fetal de bovino), 1% de antibiótico e antimicótico (10000 unidades/mL de penicilina, 10 mg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL anfotericina). As células NHDF foram cultivadas em RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute), suplementado com 10% de FBS, HEPES (0,01 M), L-glutamina (0,02 M), piruvato de sódio (0,001 M) e 1% de antibiótico e antimicótico.

2.9.2 Ensaio de Viabilidade celular

A viabilidade celular na presença dos extratos de *Acanthus mollis* foi estudada utilizando o método do MTT, de acordo com o procedimento descrito por Freshney (2010) com ligeiras modificações^{16, 91-92}. Para iniciar este ensaio as células devem apresentar 80% de confluência. Estas foram tripsinizadas e 100 µL de células foram cultivadas numa placa de 96 poços (2x10⁴ células/poço) no meio de cultura. Após 48 h da cultura, foi adicionado a solução de extrato em DMSO (dimetilsulfóxido) com concentrações de: 0,0008; 0,008; 0,02 e 0,04 mg/mL. Estes ensaios foram realizados em triplicados.

De notar que, para a linha celular MCF-7 utilizaram-se as quatro concentrações anteriormente referidas, no entanto, para a linha celular NHDF foi selecionada a primeira concentração para a qual o extrato apresentou toxicidade na linha celular MCF-7.

As células não tratadas com o extrato serviram como controlo. Depois de 48h de incubação retira-se o meio contido nos poços, lava-se os poços com PBS (tampão fosfato salino) e adiciona-se 200 µL de solução de MTT 0,5 mg/mL a cada poço e coloca-se a incubar 3 h à temperatura de 37°C. Ao fim da incubação retira-se a solução de MTT, com o maior cuidado para não aspirar os cristais de formazano obtidos. Estes são dissolvidos em 200 µL DMSO, transferidos para uma placa de leitura de absorvâncias, a 570 nm⁹².

A extensão de células não viáveis foi expressa como a percentagem de viabilidade celular em comparação com as células de controlo.

2.9.3 Doseamento de proteínas

O doseamento de proteínas é realizado utilizando um kit comercial, *BCA Protein Assay kit*⁹³, seguindo o procedimento indicado para o teste em microescala. A preparação inicial para este ensaio foi realizada de acordo com o procedimento referido no item 2.9.2 .

Depois da incubação, o meio foi descartado e as células foram lavadas com 200 μ L PBS. De seguida, 200 μ L de BCA foram adicionados a cada poço e ressuspendesse cada um dos poços durante 1 minuto, transferindo-se de imediato cada uma das amostras para os poços da placa de leitura. A cada poço desta placa adiciona-se 4 μ L de sulfato de cobre. Por fim tapa-se a placa de leitura com papel alumínio e deixa-se reagir durante 2 horas à temperatura ambiente. A leitura das absorvâncias foi efetuada a 562 nm⁹³.

A extensão de células mortas foi expressa como a percentagem de proteínas em comparação com as células de controlo.

Para garantir a viabilidade dos resultados obtidos no teste de proliferação realizou-se a curva de crescimento para a linha celular MCF-7, monitorizando-se às 48 h e 96 h o crescimento das mesma.

Capítulo 3 - Resultados e Discussão

3.1. Rendimento de extração

Os resultados dos rendimentos de extração são apresentados na tabela 5. Para a extração Soxhlet, verifica-se que o maior rendimento é obtido para o extrato metanólico das folhas de acanto e o menor rendimento para as flores. Os extratos etanólicos apresentam valores algo similares para as partes aéreas estudadas. Os rendimentos de extração obtidos neste trabalho para extração Soxhlet são maioritariamente superiores aos referidos na literatura para diferentes arbustos da floresta portuguesa⁹⁴⁻⁹⁵.

Na extração assistida por ultrassons os rendimentos para os extratos metanólicos são inferiores aos extratos etanólicos, mostrando que, este último solvente é mais eficiente nestas condições. Por outro lado, ao analisarem-se os valores para o mesmo tipo de solvente e condições processuais de temperatura e tempo, pode ver-se que a redução do tamanho de partícula influencia no rendimento de extração. Estes resultados corroboram com o referido nos trabalhos de Tiwari et al. (2011) e Hammi et al. (2015), apenas contrariado pelos extratos de flores em etanol⁵⁰⁻⁵¹.

A comparação entre os dois métodos de extração permite referir que o processo clássico de extração em Soxhlet apresenta rendimentos muito superiores ao método de extração por ultrassons usado para as condições de ensaio. O tempo de extração pode ter sido muito curto e a temperatura de extração baixa, podendo o processo de difusão do solvente dentro da parede celular não ter sido completo.

Tabela 5. Rendimento das extrações para os dois métodos usados e tipos de solvente.

Método	Solvente	Parte da planta	Rendimento, %
Ultrassons	Metanol	Folhas	2,8
			3,5*
		Flores	2,8
			4,0*
	Etanol	Folhas	11,8
			16,4*
Flores		9,4	
		7,7*	
Soxhlet	Metanol	Folhas	43,9
		Flores	32,6
	Etanol	Folhas	36,6
		Flores	39,8

Nota: os resultados assinalados com * são referentes aos extratos US-2

3.2. Fenóis Totais

Para a determinação quantitativa dos fenóis totais nos extratos do *Acanthus mollis*, L. foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu, um dos métodos de análise mais difundidos. Os resultados obtidos são mostrados na tabela 6.

Tabela 6. Compostos fenólicos totais presentes nos vários extratos.

Método	Solvente	Parte da planta	Fenóis totais (mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) /g de matéria seca)**
Ultrassons	Metanol	Folhas	106,8 ± 6,8
			200,5 ± 2,9*
		Flores	72,6 ± 3,3
			112,4 ± 3,2*
	Etanol	Folhas	59,6 ± 4,5
			79,9 ± 5,8*
Flores	57,4 ± 7,7		
	109,8 ± 2,9*		
Soxhlet	Metanol	Folhas	112,3 ± 6,3
		Flores	144,1 ± 2,5
	Etanol	Folhas	99,2 ± 0,7
		Flores	146,4 ± 3,2

Nota: os resultados assinalados com * são referentes aos extratos de US-2; ** média ± desvio padrão dos resultados

Da tabela 6 e da figura 11 para a extração por ultrassons, é bem visível que a redução do tamanho de partícula influencia na concentração de fenóis totais obtidos, chegando mesmo a obter-se uma concentração de 200,5 mg EAG/g de matéria seca para as folhas do acanto. O extrato etanólico para as flores é o que apresenta menor concentração em compostos fenólicos. O etanol (EtOH) como solvente para remoção destes compostos parece ser o menos eficiente, bem como a parte da planta em causa.

Para a extração em Soxhlet, ambos os solventes apresentam similar comportamento em termos das concentrações em fenóis totais obtidas, embora se possa dizer que o metanol (MeOH) continua a apresentar um melhor desempenho (ver fig. 11). Neste tipo de extração, e para os dois solventes, as maiores concentrações destes compostos aparecem nas flores.

Comparando ambas as técnicas extrativas para as partes estudadas da planta, a extração Soxhlet permite obter maiores valores de concentração para os fenóis totais.

Os valores apresentados na tabela 6 para o *Acanthus mollis*, L. para as várias condições ensaiadas são mais elevados que os obtidos por Alali et al.(2011) no seu estudo sobre o *Acanthus Syriacus* Boiss, para extratos aquosos (15,1 mg EAG/g) e metanólicos (15,4 mg EAG/g), usando o processo de maceração⁹⁶.

Os valores obtidos na determinação dos fenóis totais para o acanto, apresentada na tabela 6, são da mesma ordem de grandeza que os referidos por Luís et al (2011) para diferentes arbustos da floresta portuguesa⁹⁵.

Asha et al (2012) afirma que nos extrato raiz em acetato de etilo de *Acanthus ilicifolius* (planta da mesma família da planta em estudo) obtém-se cerca de 20 mg /g de compostos fenólicos, um outro autor Firdaus et al (2013) confirma a presença destes compostos em extratos de flores desta mesma planta, comparativamente a estes, os valores obtidos para os extratos de *Acanthus mollis* são muitíssimo mais altos^{78, 97}.

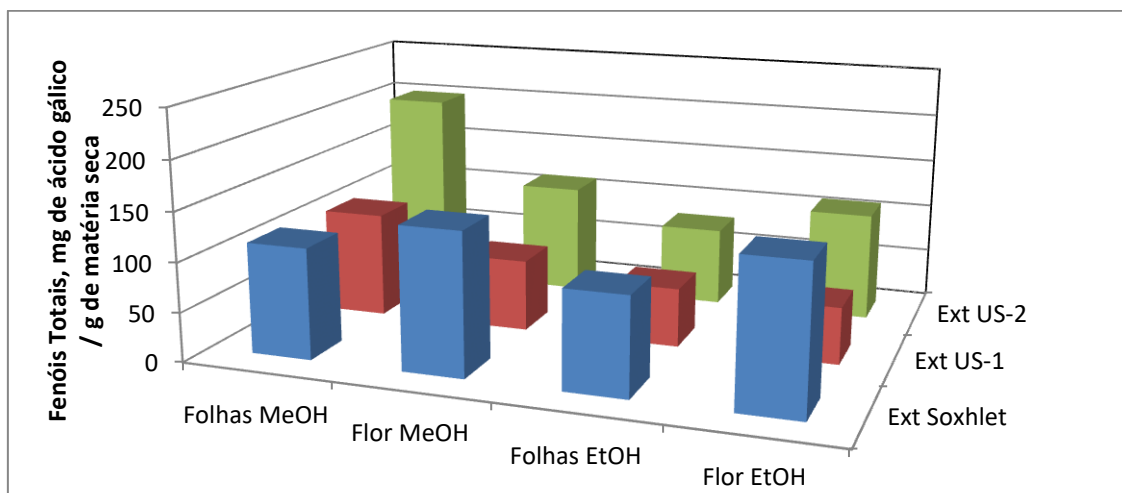


Figura 11 . Concentração de fenóis totais nos extratos

3.3. Flavonoides totais

Os flavonoides são os compostos fenólicos mais importantes, estes são muito apreciados pelo ser potencial benéfico para a saúde, devido a sua atividade biológica muito diversificada, nomeadamente como antioxidantes, pela atividade antimicrobiana e anticancerígena⁹⁸.

Como se mostra na tabela 7 e na figura 12, o método que apresentou melhores resultados foi os ultrassons, mais uma vez a redução do tamanho de partícula (US-2) apresenta concentrações em flavonoides superiores aos da extração por ultrassons com dimensão superior (US-1). O solvente que apresenta os melhores resultados foi o etanol e a parte da planta as folhas. As concentrações obtidas para o método de Soxhlet foram muito semelhantes independentemente da parte da planta utilizada e do solvente. Por sua vez, para os ultrassons, este comportamento já não se verificou, assim o solvente com melhor resultado foi o EtOH e a parte planta com maior concentração de flavonoides foram as folhas. O extrato que apresentou melhores resultados foi o de Folhas EtOH US-2 e o com menor concentração de flavonoides foi o extrato de Flores MeOH US-1.

Tabela 7. Flavonoides totais presentes nos extratos do acanto.

Método	Solvente	Parte da planta	Flavonoides totais** (mg de equivalentes de quercetina, EQ /g de matéria seca)
Ultrassons	Metanol	Folhas	16,4 ± 1,2
			27,0 ± 1,9*
		Flores	13,8 ± 1,0
			19,2 ± 1,1*
	Etanol	Folhas	50,0 ± 5,4
			57,2 ± 2,2*
Flores	19,9 ± 4,7		
	32,9 ± 1,7*		
Soxhlet	Metanol	Folhas	19,4 ± 1,0
		Flores	22,9 ± 2,0
	Etanol	Folhas	20,5 ± 1,7
		Flores	17,3 ± 0,5

Nota: os resultados assinalados com * são referentes aos extratos de US-2; ** média ± desvio padrão dos resultados

A presença de flavonoides era esperada uma vez que, Asha et al (2012) e Firduas et al (2013) confirmaram a presença dos mesmos em extratos raiz e flores de *Acanthus ilicifolius* obtidos por maceração, contudo as quantidades identificadas nos extratos de *Acanthus mollis* são superior as quantidades existentes em extratos de *Acanthus ilicifolius* apresentadas por Asha et al (2012). Por isso, coloca-se a hipótese de que o *Acanthus mollis* possa conter maior teor de flavonoides, ou que as técnicas e solventes de extração utilizados sejam mais rentáveis para a extração deste tipo de compostos ^{78, 97}.

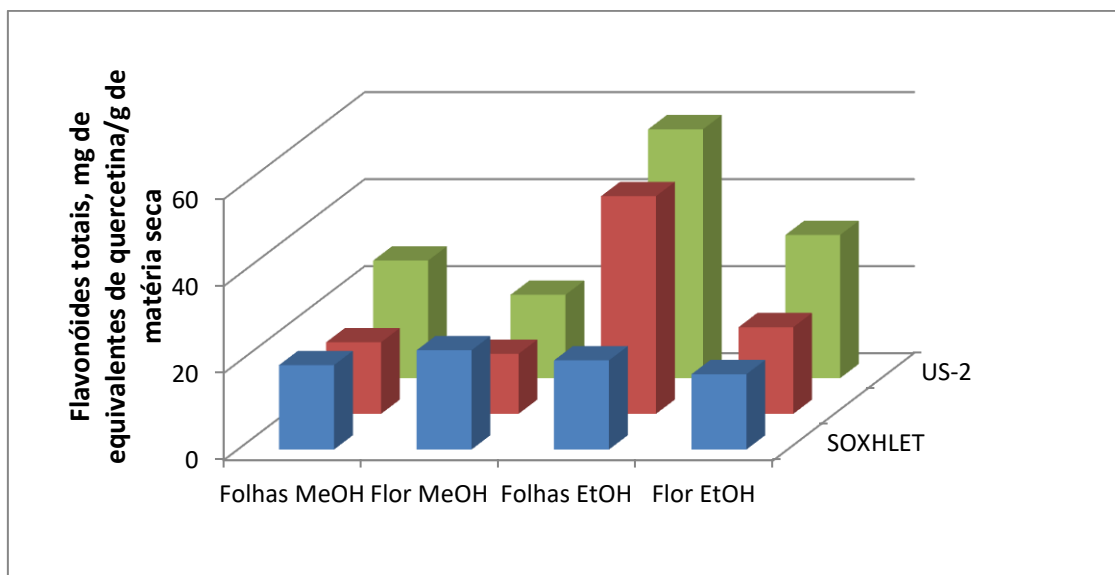


Figura 12. Concentração de flavonoides nos extratos

3.4. Alcaloides

Os alcaloides apresentam uma grande diversidade de compostos com uma vasta atividade biológica, nomeadamente atividade anticancerígena. ¹ A determinação destes compostos foi feita usando o método de Dragendorff. Na tabela 8 e na figura 13 apresentam-se as concentrações em alcaloides para cada extrato.

Tabela 8. Concentração em alcaloides nos extratos estudados.

Método	Solvente	Parte da planta	Alcaloides totais ** (mg de equivalentes de nitrato de pilocarpina, ENP /g de matéria seca)
Ultrassons	Metanol	Folhas	53,78 ± 0,006
			194,89 ± 0,009*
		Flores	152,11 ± 0,001
			285,44 ± 0,02*
	Etanol	Folhas	218,22 ± 0,098
			746,00 ± 0,03*
Flores	273,78 ± 0,063		
	50,44 ± 0,004*		
Soxhlet	Metanol	Folhas	409,33 ± 0,283
		Flores	214,33 ± 0,008
	Etanol	Folhas	185,44 ± 0,009
		Flores	496,56 ± 0,067

Nota: os resultados assinalados com * são referentes aos extratos de US-2; ** média ± desvio padrão dos resultados

Analisando a tabela 8 e a figura 13, pode observar-se que o extrato com maior concentração de alcaloides foi o obtido para as folhas de acanto em etanol com moagem fina, pelo contrário o com menor concentração foi o extrato de flores em etanol (US-2). Genericamente, a extração em Soxhlet apresenta maior teor em alcaloides extraídos para ambas as partes em estudo. De referir que o procedimento utilizado é extremamente sensível e minucioso em termos de etapas, pelo que, estes valores podem estar um pouco mais elevados.

A presença de alcaloides foi confirmada por Firdaus et al (2013) em extratos de *Acanthus ilicifolius* uma planta pertencente a mesma família da planta estudada *Acanthus mollis*, devido a esta informação realizou-se a determinação de alcaloides para os extratos em estudo⁷⁸.

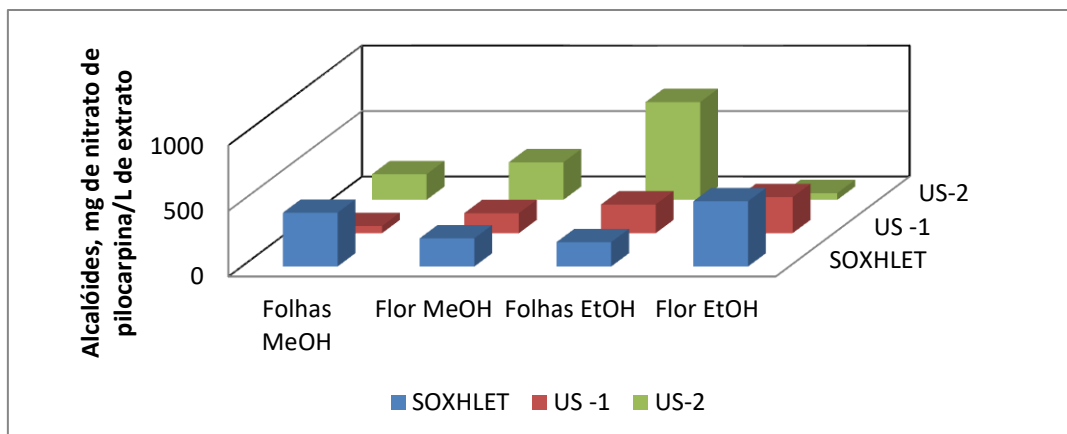


Figura 13. Concentração de alcalóides nos extratos

3.5 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada pelo método do DPPH e os resultados do método constam da tabela 10 E foram apresentados na forma de IC₅₀ (concentração de amostra necessária para inibir em 50% os radicais DPPH) e do índice de atividade antioxidante, AAI, de acordo com a classificação apresentada no item 2.8.

Tabela 9. Propriedades antioxidantes dos extratos do *Acanthus mollis* e dos padrões.

Método	Solvente	Parte da planta	IC ₅₀	AAI	Atividade antioxidante
Ultrassons	Metanol	Folhas	49,64±0,26	1,12±0,01	Forte
			34,79±1,01	1,47±0,03	Forte*
		Flores	50,35±0,20	1,11±0,01	Forte
			56,42±2,75	0,90±0,03	Moderada*
	Etanol	Folhas	49,93±0,26	1,07±0,01	Forte
			52,64±0,96	1,01±0,02	Forte*
Flores		49,13±0,70	1,13±0,03	Forte	
		45,85±2,06	1,08±0,05	Forte*	
Soxhlet	Metanol	Folhas	58,70±6,65	1,20±0,20	Forte
		Flores	47,91±6,73	1,01±0,14	Forte
	Etanol	Folhas	30,32±6,83	1,61±0,31	Forte
		Flores	39,84±2,46	1,38±0,08	Forte
Trolox			6,50±0,06	7,57±0,08	Muito Forte
Quercetina			4,93±0,14	9,67±0,42	Muito Forte
Ácido gálico			1,68±0,022	18,39±0,22	Muito Forte

Nota: os resultados assinalados com * são referentes aos extratos de US-2; ** média ± desvio padrão dos resultados

Analisando a tabela 9 e figura 14 para a extração em Soxhlet, os extratos metanolicos apresentam valores de AAI, ligeiramente inferiores aos extratos etanolicos, para ambas as partes aéreas estudadas, contudo para o mesmo tipo de solvente as folhas mostram um ligeiro incremento desta propriedade. Num estudo realizado por Firdaus et al. (2013), usando o

processo de maceração com diversos tipos de solvente, refere que o extrato metanólico das flores do *Acanthus ilicifolius* foi o que apresentou melhor eficiência antiradicalar.

A extração por ultrassons, pode dizer-se que não existe uma diferença significativa entre o uso dois tipos de solvente e mesmo entre os tamanhos de partículas. De todos os extratos o que necessita de uma concentração mais baixa para que ocorra 50% de inibição é o extrato etanólico, extraído em Soxhlet, este apresenta o AAI mais elevado, por sua vez o extrato metanólicos das folhas em Soxhlet é o que demonstra um maior valor de concentração inibitória. Os extratos mostram que detêm uma atividade antioxidante significativa, no entanto, comparativamente aos compostos padrão aqui apresentados, essa atividade é mais baixa.

3.6. Avaliação da citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade foi realizada pelos ensaios MTT e de doseamento de proteínas, numa primeira etapa só para as células MCF-7, e posteriormente para os fibroblastos.

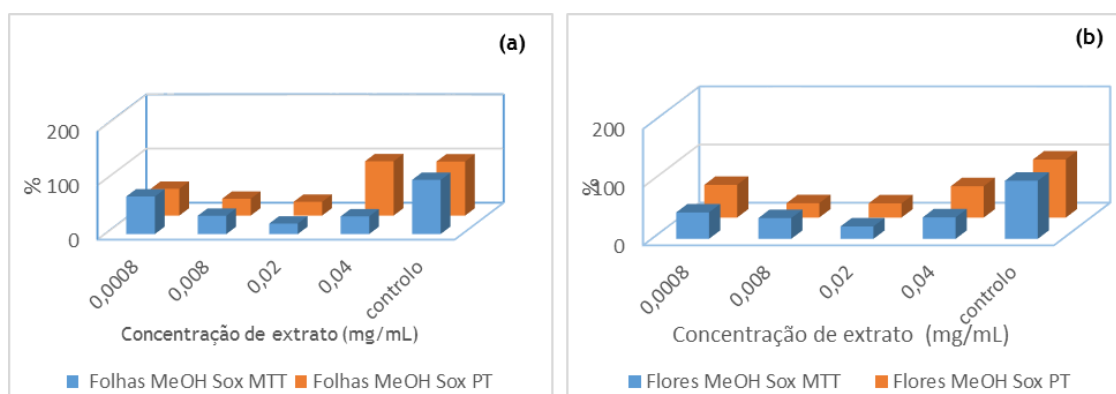


Figura 13. Resultados obtidos no ensaio de viabilidade (MTT) e no doseamento de proteínas (PT) para o extrato folhas (a) e das flores (b) em MeOH (metanol) Sox (Soxhlet) na gama de concentrações 0,0008-0,04 mg/mL em MCF-7.

Analisando os resultados apresentados na figura 13 para as folhas e para as flores observa-se uma diminuição da viabilidade celular de 31% para as folhas e de 55% para as flores, estes resultados são concordantes com a perda de proliferação celular, indicando tratar-se de dois extratos com efeito citotóxico.

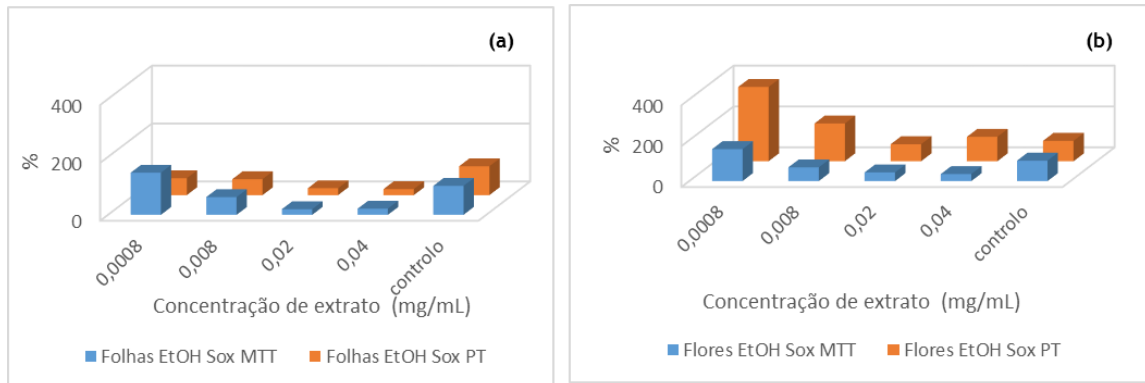


Figura 14. Resultados obtidos no ensaio de viabilidade (MTT) e no doseamento de proteínas (PT) para o extrato folhas (a) e das flores (b) em EtOH (etanol) Sox na gama de concentrações 0,0008-0,04 mg/mL em MCF-7.

Analisando a figura 14 observa-se que ambos os extratos promovem a viabilidade celular para baixas concentrações, contudo o extrato etanólico das flores promove a proliferação celular e como a viabilidade não acompanha com a mesma tendência a proliferação celular, coloca-se a hipótese da morte celular poder ser por apoptose.

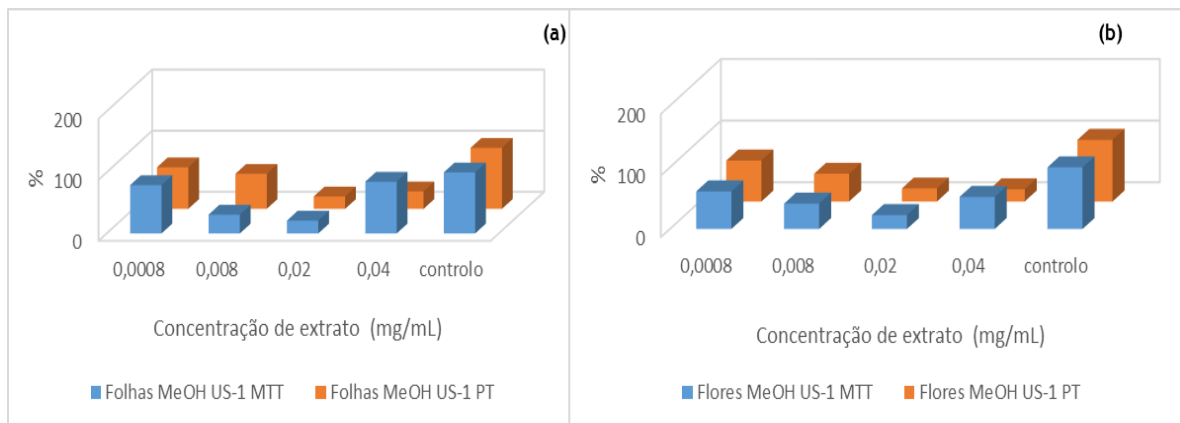


Figura 15. Resultados obtidos no ensaio de viabilidade (MTT) e no doseamento de proteínas (PT) para o extrato das folhas (a) e para o das flores (b) em MeOH US-1 (Ultrassons 1ª extração) na gama de concentrações 0,0008-0,04 mg/mL em MCF-7.

A figura 15 mostra que para ambos os extratos verifica-se uma perda de viabilidade acompanhada por uma gradual morte celular, pelo que mais uma vez estamos perante dois extratos que são tóxicos para as células MCF-7.

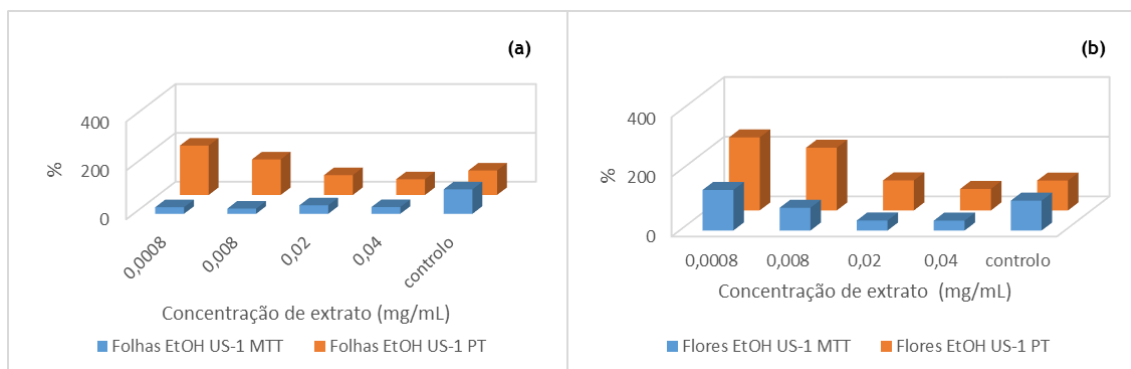


Figura 16. Resultados obtidos no ensaio de viabilidade (MTT) e no doseamento de proteínas (PT) para o extrato folhas (a) e flores (b) em EtOH US-1 na gama de concentrações 0,0008-0,04 mg/mL em MCF-7.

Ambos os extratos apresentados na figura 16 promovem a proliferação celular a baixas concentrações. Contudo, a perda de viabilidade é mais acentuada no extrato etanólico das folhas, comparativamente ao extrato das flores. Para ambos se coloca a hipótese da morte celular por apoptose, no entanto, o extrato das folhas é mais citotóxico que o das flores.

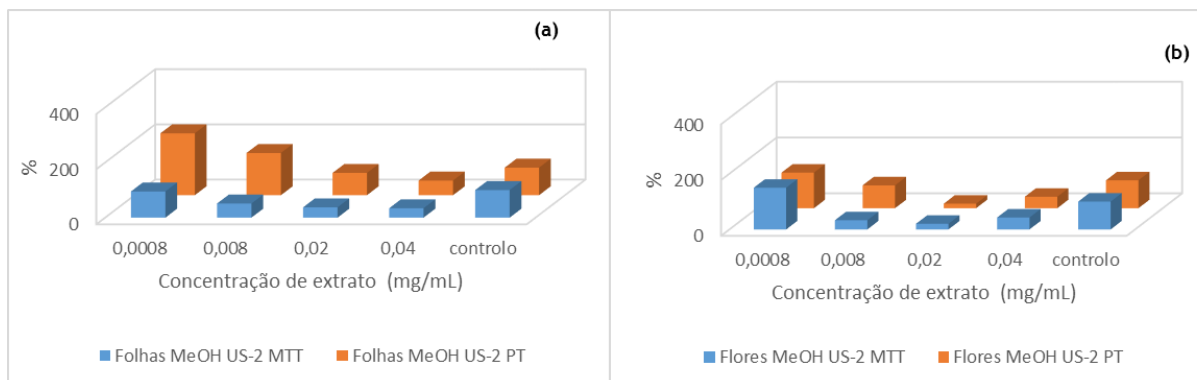


Figura 17. Resultados obtidos no ensaio de viabilidade (MTT) e no doseamento de proteínas (PT) para o extrato das folhas (a) e das flores (b) em MeOH US-2 (Ultrassons 2ª extração) na gama de concentrações 0,0008-0,04 mg/mL em MCF-7.

A figura 17 (a) mostra que para baixas concentrações o extrato metanólico das folhas favorece a proliferação celular, no entanto, a viabilidade não acompanha esta tendência, pelo que para este extrato se admite uma morte celular por apoptose. Na figura 17 (b) e para baixas concentrações, pode dizer-se que o extrato metanólico das flores favorece tanto a viabilidade como a proliferação celular.

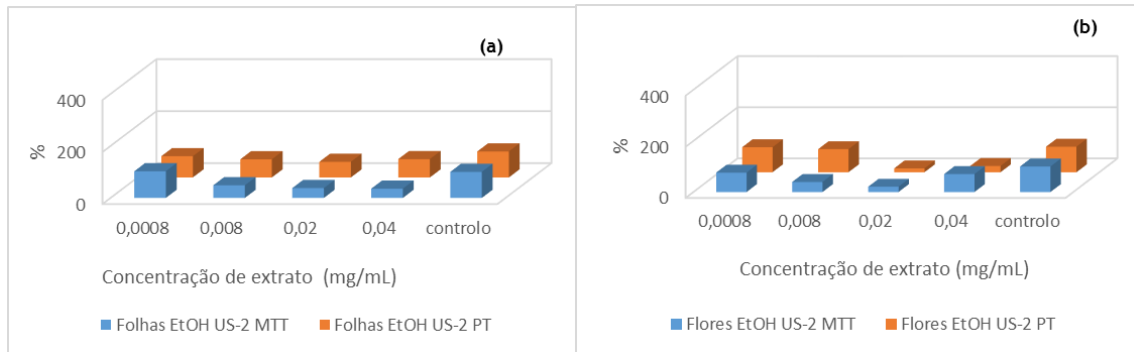


Figura 18. Resultados obtidos no ensaio de viabilidade (MTT) e no doseamento de proteínas (PT) para o extrato das folhas(a) e das flores (b) em EtOH US-2 na gama de concentrações 0,0008-0,04 mg/mL em MCF-7.

Observando a figura 18 ambos os extratos só apresentam toxicidade a partir de 0,008 a 0,02 mg/mL, podendo pois dizer-se que estes extratos apresentam um ligeiro efeito tóxico para as células MCF-7.

Como conclusão pode dizer-se que todos os extratos são tóxicos para a linha celular MCF-7, as células do adenocarcinoma da mama humana, embora os extratos etanólicos são possíveis promotores da morte celular por apoptose.

Para garantir a viabilidade dos resultados obtidos no ensaio de doseamento de proteínas pelo BCA, foi realizada um ensaio de crescimento celular (figura 19). Este ensaio garante que, qualquer alteração da percentagem de proteínas é da inteira responsabilidade dos extratos, pois o número de células aumenta para cerca do dobro entre as 48 h (quando se adiciona os extratos) e às 96 h (quando se realizar o doseamento de proteínas).

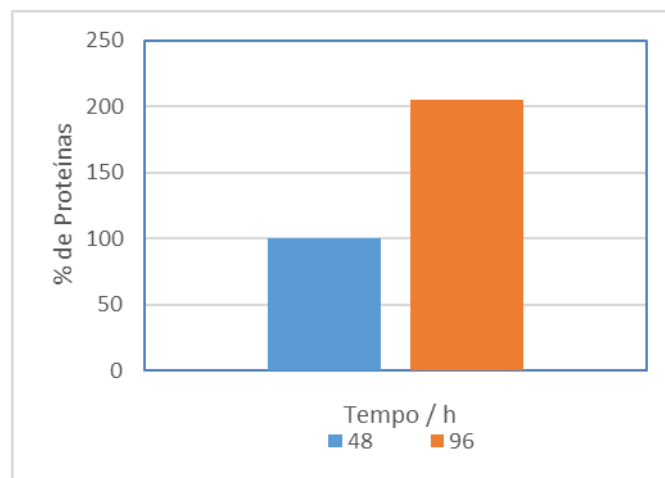


Figura 19 . Ensaio de crescimento celular das MCF-7 para as 48h e as 96 h.

Neste estudo foi ainda realizado um ensaio MTT, tomando como exemplo os extratos das folhas e das flores em MeOH Soxhlet, de modo a estudar-se o efeito destes extratos em células NHDF, para a concentração de 0,0008 mg/mL.

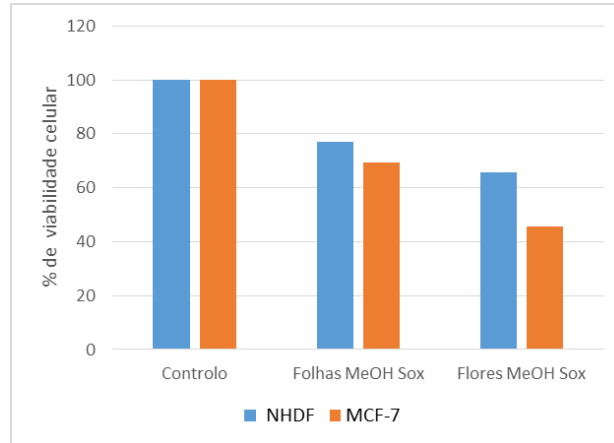


Figura 20. Resultados obtidos no ensaio de viabilidade (MTT) para os extratos Folhas e Flores em MeOH Soxhlet na concentração 0,0008 mg/mL em NHDF.

Na figura 20 apresenta-se a percentagem de viabilidade celular das células NHDF e MCF-7, incubadas com os extratos metanólicos. Como se pode observar as células em contato com o extrato das flores apresentam toxicidade seletiva para as MCF-7 o que não acontece no caso das folhas. Pelo que, o extrato metanólico das flores poderá ser estudado para o desenvolvimento de possíveis fármacos anticancerígenos.

Capítulo 4 - Conclusões e Perspetivas Futuras

Neste trabalho pretendia-se avaliar as potenciais atividades antioxidante e citotóxica de extratos obtidos a partir de *Acanthus mollis*, uma planta existente na região da Covilhã, sobre a qual a informação científica é praticamente inexistente. Com a possível valorização da mesma como fonte de compostos terapêuticos.

Para além da pesquisa da citotoxicidade e da atividade antioxidante, também se quantificou o teor de fenóis, flavonoides e alcaloides, uma vez que estes compostos se encontram descritos pelas suas possíveis atividades antioxidantes (fenóis e flavonoides) e citotóxicas.

Relativamente ao rendimento de extração o método que apresentou melhores resultados foi o processo de extração em Soxhlet. De um modo geral o processo que apresentou maior teor de metabolitos secundários em estudo, foi o processo ultrassons com menor tamanho de partícula (0,5 mm). Tendo em conta os resultados obtidos por ambos os processos de ultrassons, pode-se concluir que o tamanho de partícula influencia a quantidade de compostos extraídos, sendo que o tamanho de partícula menor favorece a extração. Ainda em relação a quantificação de fenóis, flavonoides e alcaloides, o solvente que demonstrou melhores resultados foi o EtOH.

Em relação á atividade antioxidante todos os extratos de acanto em estudo exibiram uma atividade antioxidante significativa (entre moderada e forte). Por sua vez para citotoxicidade, na linha celular MCF-7 todos os extratos demonstram citotoxicidade, no entanto os extratos Flores MeOH Sox, Flores e Folhas EtOH US-1, Folhas MeOH US-2 podem promover a morte celular por apoptose. Por fim dos extratos testados em ambas as linhas celulares, só o extrato Flores MeOH Sox apresentou citotoxicidade seletiva

Perspetivas Futuras:

- Testar a resposta das células NHDF aos restantes extratos
- Identificar, isolar e purificar os compostos existentes nos extratos
- Realizar IC₅₀ para a citotoxicidade
- Confirmar o possível efeito pro-apoptótico por citometria de fluxo

Capítulo 5 - Referências Bibliográficas

1. Cunha, A., *Farmacognosia e Fitoquímica*. 3ª ed.; Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, 2010.
2. Junior, V., Pinto, A., Plantas medicinais: Cura segura? *Química Nova* **2005**, *28*, 519-528.
3. Cechinel Filho, V., Yunes, R. A., Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova* **1998**, *21*, 99-105.
4. Chikezie, P. C.; Ibegbulem, C. O.; Mbagwu, F. N., Bioactive Principles from Medicinal Plants. *Research Journal of Phytochemistry* **2015**, *9* (3), 88-115.
5. Cos, P.; Vlietinck, A. J.; Berghe, D. V.; Maes, L., Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology* **2006**, *106* (3), 290-302.
6. Group, T. A. P., An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society* **2003**, 399-436.
7. Rezanka, T.; Rezanka, P.; Sigler, K., Glycosides of aryl-naphthalene lignans from *Acanthus mollis* having axial chirality. *Phytochemistry* **2009**, *70* (8), 1049-54.
8. http://jb.utad.pt/especie/acanthus_mollis (accessed fevereiro de 2016).
9. <http://floradaserradaarrabida.blogspot.pt/2014/01/acanto-acanthus-mollis.html> (accessed fevereiro de 2016).
10. Rivera, D., Obón, C., The ethnopharmacology of Madeira and Porto Santo Islands, a review. *Journal of Ethnopharmacology* **1995**, *46*, 73-93.
11. Parajapati, N., Kumar, U., *Agro's Dictionary of Medicinal Plants*. Agrobios, Ed. 2003.
12. Ríos, J. L., Recio, M. C., Villar, A., Antimicrobial Activity of Selected Plants Employed in the Spanish Mediterranean Area. *Journal of Ethnopharmacology* **1987**, 139-152.
13. Bernhoft, A. e. a., *Bioactive Compounds in Plants - Benefits and Risks for Man and Animals*. The Norwegian Academy of Science and Letters: Oslo, 2010.
14. Azmir, J.; Zaidul, I. S. M.; Rahman, M. M.; Sharif, K. M.; Mohamed, A.; Sahena, F.; Jahurul, M. H. A.; Ghafoor, K.; Norulaini, N. A. N.; Omar, A. K. M., Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* **2013**, *117* (4), 426-436.
15. Song, M. C.; Kim, E. J.; Kim, E.; Rathwell, K.; Nam, S.-J.; Yoon, Y. J., Microbial biosynthesis of medicinally important plant secondary metabolites. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31* (11), 1497-1509.
16. Luís, A. Pesquisa e Identificação de Compostos Bioativos em Plantas Florestais. Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2014.
17. <http://www.labome.com/method/Protein-Quantitation.html> (accessed julho de 2016).
18. Welti, R., Shah, J., Li, W., Li, M., Chen, J., Burke, J.J., Fouconnier, M., Chapma, K., Chey, M., Wang, X., Plant lipidomics: Discerning biological function by profiling plant complex lipids using mass spectrometry. *Frontiers in Bioscience* **2007**, 2494-2506.
19. Wang, X., Lipid signaling. *Plant Biology* **2004**, 329-336.
20. Bravo, L., Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews* **1998**, 317-333.
21. Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products : Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* **2006**, 191-203.
22. Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Marin, F.R., Del Rio, J. A., Uses and Properties of *Citrus* Flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1997**, *45*, 4505-4515.
23. Heim, K. E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J., Flavonoids antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **2002**, 572-584.
24. Robards, K., Prenzler, P., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W., Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry* **1999**, 401-436.
25. Buijsse, B., Feskens, E. J. M., Kok, F.J., Kromhout, D., Cocoa Intake, Blood Pressure, and Cardiovascular Mortality. *Arch Intern Med* **2006**, 411-417.
26. Kurosawa, T., Itoh, F., Nozaki, A., Nakano, Y., Katsuda, S., Osakabe, N., Tsubone, H., Kondo, K., Itakura, H., Suppressive Effect of Cocoa Powder on Atherosclerosis in Kurosawa and Kusanagi-hypercholesterolemic Rabbits. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* **2005**, *12*, 20-28.

27. Amin, I.; Faizul, H. A.; Azli, R., Effect of cocoa powder extract on plasma glucose levels in hyperglycaemic rats. *Nutrition & Food Science* **2004**, *34* (3), 116-121.
28. Ruzaidi, A.; Amin, I.; Nawalyah, A. G.; Hamid, M.; Faizul, H. A., The effect of Malaysian cocoa extract on glucose levels and lipid profiles in diabetic rats. *J Ethnopharmacol* **2005**, *98* (1-2), 55-60.
29. Yamagishi, M., Osakabe, N., Natsume, M., Adachi, T., Takizawa, T., Kumon, H., Osawa, T., Anticlastogenic activity of cacao: inhibitory effect of cacao liquor polyphenols against mitomycin C-induced DNA damage. *Food and Chemical Toxicology* **2001**, 1279-1283.
30. Rodriguez-Ramiro, I.; Ramos, S.; Lopez-Oliva, E.; Agis-Torres, A.; Bravo, L.; Goya, L.; Martin, M. A., Cocoa polyphenols prevent inflammation in the colon of azoxymethane-treated rats and in TNF-alpha-stimulated Caco-2 cells. *Br J Nutr* **2013**, *110* (2), 206-15.
31. Parr, A. J., Bolwell, G. P., Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2000**, 985-1012.
32. Cunha, A., Teixeira, F., Silva, A., Roque, O., *Plantas na Terapêutica: Farmacologia e Ensaios Clínicos*. 3ª ed.; Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, 2014.
33. Kumar, S.; Pandey, A. K., Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal* **2013**, *2013*, 1-16.
34. Pourcel, L.; Routaboul, J. M.; Cheynier, V.; Lepiniec, L.; Debeaujon, I., Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends Plant Sci* **2007**, *12* (1), 29-36.
35. Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A.A., Capasso, F., Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences* **1999**, *65*, 337-353.
36. Leopoldini, M., Russo, N., Chiodo, S., Toscano, M., Iron Chelation by the Powerful Antioxidant Flavonoid Quercetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54*, 6343-6351.
37. Mishra, A.; Sharma, A. K.; Kumar, S.; Saxena, A. K.; Pandey, A. K., Bauhinia variegata leaf extracts exhibit considerable antibacterial, antioxidant, and anticancer activities. *Biomed Res Int* **2013**, *2013*, 915436.
38. Pandey, A. K., Mishra, A.K., Mishra, A., Kumar, S., Chandra, A., Therapeutic Potential of *C. zeylanicum* Extracts: An Antifungal and Antioxidant Perspective. *International Journal Of Biological & Medical Research* **2010**, *1*, 228-233.
39. Middleton, E., Kandaswami, C., Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochemical Pharmacology* **1992**, *43*, 1167-1179.
40. Nishinzuka, Y., The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* **1988**, *334*, 661-665.
41. Costa, A., *Farmacognosia Volume I*. 6ª ed.; Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, 2002.
42. Grasel, F., Ferrão, M., Wolf, C., Ultraviolet spectroscopy and chemometrics for the identification of vegetable tannins. *Industrial Crops and Products* **2016**, *91*, 279-285.
43. Dar, A., Verma, N., Arumugam, N., An updated method for isolation, purification and characterization of clinically important antioxidant lignans - Sesamin and Sesamol, from sesame oil. *Industrial Crops and Products* **2015**, *64*, 201-208.
44. Kassuya, C. Atividade antiinflamatória e anti-nociceptiva de extratos e lignanas isolados de *Phyllanthus amarus*. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.
45. Ramawat, K. G., Dass, S., Mathur, M., The chemical diversity of bioactive molecules and therapeutic potential of medicinal plants. In *Herbal drugs : Ethomedicine to modern medicine*, Ramawat, K. G., Ed. Springer-verlag: Berlin, 2009; pp 7-31.
46. Ibegbulem Co, C. P. C., Medicinal Potentials and Toxicity Concerns of Bioactive Principles. *Medicinal & Aromatic Plants* **2015**, *04* (03).
47. Pattanaik, B., Lindberg, P., Terpenoids and Their Biosynthesis in Cyanobacteria. *Life* **2015**, 269-293.
48. Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K.M., Latha, L. Y., Extraction, Isolation and Characterization of Bioactive Compounds from Plant's Extracts. *Afr J Tradit Complement Altern Med* **2011**, *8*, 1-10.
49. Smith, R. M., Before the injection - Modern methods of sample preparation for separation techniques. *Journal of Chromatography A* **2003**, 3-27.
50. Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kuar, H., Plants Phytochemical screening and Extraction: A Review. *International Journal Pharmaceutical Sciences* **2011**, *1* (1).

51. Hammi, K. M.; Jdey, A.; Abdelly, C.; Majdoub, H.; Ksouri, R., Optimization of ultrasound-assisted extraction of antioxidant compounds from Tunisian *Zizyphus lotus* fruits using response surface methodology. *Food Chem* **2015**, *184*, 80-9.
52. Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Mason, T., Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrasonics Sonochemistry* **2004**, *11*, 261-265.
53. Sousa, C., Silva, H., Vieira-Junior, G., Ayres, M., Costa, C., Araújo, D., Cavalcante, L., Barros, E., Araújo, P., Brandão, M., Chaves, M., Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Medicinais. *Química Nova* **2007**, *30*, 351-355.
54. Cicco, N., Lanorte, M., Paraggio, M., Viggiano, M., A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal* **2009**, *91*, 107-110.
55. Luís, A. Avaliação das atividades antioxidantes e antimicrobiana de extratos de resíduos florestais. Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2009.
56. Costa, A., *Farmacognosia Volume II*. 6ª ed.; Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, 2002.
57. Marcucci, M., Woisky, R., Salatino, A., Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonoides em amostras de própolis. *Journal of Apiculture Research* **2008**.
58. Sreevidya, N., Mehotra, S., Spectrophotometric method for estimation of alkaloids precipitable with Dragendorff's reagent in plants materials. *Journal of AOAC International* **2003**, 217-222.
59. Costa, A., *Farmacognosia Volume III*. 3ªed ed.; Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, 2000.
60. Halliwell, B., Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology* **1995**, *49*, 1341-1348.
61. Soobrattee, M. A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O. I., Bahorun, T., Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research* **2005**, *579*, 200-213.
62. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Telser, J., Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2007**, *39*, 44-84.
63. Fridovich, I., Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Annals of New York Academy Sciences* **1999**, *893*, 13-18.
64. Ferreira, I., Abreu, R., Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. *Bioanálise* **2007**, *9*, 32-39.
65. Pham-Huy, L., He, H., Pham-Hey, C., Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science* **2008**, *4*, 89-96.
66. Wooton-Beard, P. C., Ryan, L., Improving public health? The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. *Food Research International* **2011**, *44*, 3135-3148.
67. Freeman, B., Crapo, J. D., Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation* **1982**, *47*, 412-426.
68. Ratnam, D., Ankola, D., Sahana, D., Kumar, M., Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release* **2006**, *113*, 189-207.
69. Nikki, E., Assessment of Antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radical Biology & Medicine* **2010**, *49*, 503-515.
70. Halliwell, B., How to characterize an antioxidant: an update. *Free radical Research Communications* **1990**, *9*, 1-32.
71. Ng, T., Liu, F., Wang, Z., Antioxidative activity of natural products from plants. *Life Sciences* **2000**, *66*, 709-723.
72. Pôrto, W. G., Radicais Livres e Neurodegeneração. Entendimento Fisiológico: Base para Nova Terapia? *Revista Neurociências* **2001**, *9*, 70-76.
73. Chorilli, M., Leonardi, G., Salgado, H., Radicais livres e antioxidantes: conceitos fundamentais para a aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas. *Res. Bras. Farm.* **2007**, *88*, 113-118.
74. Scherer, R.; Godoy, H. T., Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry* **2009**, *112* (3), 654-658.
75. Miguel, M. G., Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. *Flavour and Fragrance Journal* **2010**, *25*, 291-312.

76. Molyneux, P., The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* **2004**, *26*, 211-219.
77. Ferreira, D.; Adegá, F.; Chaves, R., The Importance of Cancer Cell Lines as in vitro Models in Cancer Methyloome Analysis and Anticancer Drugs Testing. **2013**.
78. Firdaus, M., Prihanto, A., Nurdiani, R., Antioxidant and cytotoxic activity of *Acanthus ilicifolius* flower. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **2013**, *3*, 17-21.
79. Holliday, D. L., Speirs, V, Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research* **2011**, *13*, 215-222.
80. Kirma, N. B.; Tekmal, R. R., Transgenic mouse models of hormonal mammary carcinogenesis: Advantages and limitations. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **2012**, *131* (3-5), 76-82.
81. Mufudza, C.; Sorofa, W.; Chiyaka, E. T., Assessing the effects of estrogen on the dynamics of breast cancer. *Comput Math Methods Med* **2012**, *2012*, 473572.
82. Henderson, B. E., Ross, R., Bernstein, L., Estrogens as a cause of human cancer: The Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture. *Cancer Research* **1988**, 246-2253.
83. Karn, A., Jha, A., Shrestha, S., Acharya, B., Poudel, S., Bhandari, R., Tamoxifen for breast cancer. *Journal Nepal Medical Association* **2010**, *48*, 473-572.
84. Singh, M. S.; Francis, P. A.; Michael, M., Tamoxifen, cytochrome P450 genes and breast cancer clinical outcomes. *Breast* **2011**, *20* (2), 111-8.
85. Haque, R., Ahmed, S., Fisher, A., Avila, C., Shi, J., Guo, A., Craig Cheetham, T., Schottinger, J., Effectiveness of aromatase inhibitors and tamoxifen in reducing subsequent breast cancer. *Cancer Medicine* **2012**, *49*, 62-67.
86. Brooks, S. C., Looke, E.R., Soule, H.D., Estrogen Receptor in a Human Cell Line (MCF-7) from Breast Carcinoma. *The Journal of Biological Chemistry* **1973**, *248*, 6251-6253.
87. Smitha, R., Madhusoodanan, P., Prakashkumar, R., Anticancer activity of *Acanthus illifolius* linn. From chettuva mangroves, Kerala, India. *International Journal of Bioassays* **2014**, *3*, 3452-3455.
88. Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **1983**, *65*, 55-63.
89. Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., et al, Cell Viability Assays. Sittampalam, G. S., Coussens, N. P., Nelson, H., Ed. Bethesda MD: 2013. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/?report=reader> (accessed julho de 2016).
90. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E. K., Goetze, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C., Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry* **1985**, 76-85.
91. Freshney, R., *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques and Specialized Applications*. 6^a ed.; Wiley: 2010.
92. Luis, A., Breitenfeld, L., Ferreira, S., Duarte, A. P., Domingues, F., Antimicrobial, antibiofilm and cytotoxic activities of *Hakea sericea* Schrader extracts. *Pharmacogn Mag* **2014**, *10* (Suppl 1), S6-S13.
93. Smith, P. K. BCA Protein Assay Kit. 1989.
94. Luís, A., Domingues, F., Gil, C., Duarte, A., Antioxidant activity of extracts of Portuguese shrubs : *Pterospartum tridentatum* , *Cytisus scoparius* and *Erica* spp. *Journal of Medicinal Plants Research* **2009**, *3*, 886-893.
95. Luís, A., Domingues, F., Duarte, A., Bioactive Compounds, RP-HPLC Analysis of Phenolics, and Antioxidant Activity of Some Portuguese Shrub Species Extracts. *Natural Product Communications* **2011**, *6*, 1863-1872.
96. Alali, F. Q.; Tawaha, K.; El-Elimat, T.; Syouf, M.; El-Fayad, M.; Abulaila, K.; Nielsen, S. J.; Wheaton, W. D.; Falkinham, J. O., 3rd; Oberlies, N. H., Antioxidant activity and total phenolic content of aqueous and methanolic extracts of Jordanian plants: an ICBG project. *Nat Prod Res* **2007**, *21* (12), 1121-31.
97. Asha, K. K., Mathew, S., Lakshmanan, P. T., Flavonoids and phenolic compounds in two mangrove species and their antioxidant property. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences* **2012**, *41*, 259-264.
98. Andrade, D., Gil, C., Breitenfeld, L., Domingues, F., Duarte, A. P., Bioactive extracts from *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* l. *Industrial Crops and Products* **2009**, 165-167.