



JOSÉ EDGAR LIMA PERESTRELO

Licenciado em Bioquímica

CARACTERIZAÇÃO DE
PROPRIEDADES BIOATIVAS DE
PLANTAS MEDICINAIS DA REGIÃO
AUTÓNOMA DA MADEIRA

MESTRADO EM TECNOLOGIA E SEGURANÇA ALIMENTAR

Universidade NOVA de Lisboa
outubro, 2022

CARACTERIZAÇÃO DE PROPRIEDADES BIOATIVAS DE PLANTAS MEDICINAIS DA REGIÃO AUTÓNOMA DA MADEIRA

JOSÉ EDGAR LIMA PERESTRELO

Licenciado em Bioquímica

Orientadora: Prof.^a. Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte,
Professora Auxiliar, Universidade NOVA de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof.^a. Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernandes,
Professora Associada, Universidade NOVA de Lisboa

Arguente: Prof.^a. Doutora Elisabete Muchagato Maurício,
Professora Auxiliar, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Orientadora: Prof.^a. Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte,
Professora Auxiliar, Universidade NOVA de Lisboa

MESTRADO EM TECNOLOGIA E SEGURANÇA ALIMENTAR

Universidade NOVA de Lisboa

outubro , 2022

Caracterização de propriedades bioativas de plantas medicinais da Região Autónoma da Madeira

Copyright © José Edgar Lima Perestrelo, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade NOVA de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Dedicatória

*Aos meus pais, José e Margarida, à minha querida avó Piedade, aos meus irmãos, Érica e
Matias, aos meus amigos, á família Silveira e a ti, Murilo Valentim*

Agradecimentos

A realização deste trabalho foi possível graças à colaboração e apoio de diversas pessoas, às quais manifesto o meu profundo agradecimento.

Em primeiro lugar, quero agradecer à Professora Doutora Maria Paula Duarte pela oportunidade de participar neste projeto inovador que adorei fazê-lo desde o início. Obrigado pela atenção, dedicação, paciência, pelos seus conselhos e por me ter ajudado quando precisava. Muito obrigado por me ter acompanhado ao longo de todo o mestrado. Foi um privilégio tê-la como orientadora e de ter sido seu aluno ao longo destes anos.

À Professora Doutora Ana Luísa Fernando, coordenadora deste Mestrado, por me ter proporcionado todas as condições para a realização deste trabalho.

Ao senhor Francisco Fernandes do Instituto das Florestas e Conservação da Natureza da Região Autónoma da Madeira pela ajuda fundamental na recolha das plantas para serem estudadas, pela ajuda no depósito do voucher e pela partilha de artigos científicos sobre a etnofarmacologia da Madeira que ajudaram muito na concretização deste trabalho. Sem si, nada seria possível. À Escola Secundária Jaime Moniz por ter fornecido amostras de plantas para serem analisadas neste trabalho.

À Katelene Lima por todo o apoio prestado e conhecimentos partilhados na realização dos ensaios antidiabéticos.

Às minhas amigas da faculdade Marta Dias e Rita Lopes, por todas as tardes no laboratório, em que a motivação foi mais necessária que nunca. Obrigado pelas risadas partilhadas, pelo carinho, pelos momentos de descontração e pelo vosso apoio. E acima de tudo pela vossa amizade. Sem vocês, não teria sido a mesma coisa.

À minha querida amiga Mafalda Sala, que me acompanhou durante a minha jornada académica e por ter proporcionado momentos únicos na qual nunca irei esquecer. Obrigado por me teres dado ânimo, principalmente durante a escrita desta dissertação. A tua amizade vale ouro e estarás presente no meu coração.

Ao Cláudio Fernandes, grande amigo que conheci na licenciatura de Bioquímica e o melhor parceiro musical. Quero agradecer pela amizade que temos durante estes anos. Apesar de já não estarmos juntos no mesmo mestrado, continuamos a apoiar um ao outro, a partilhar risadas e ter momentos inesquecíveis. Desejo-te muita sorte meu amigo.

E, por fim, quero fazer um agradecimento especial à minha família que, mesmo estando longe, apoiaram-me sempre nos bons e maus momentos e por terem acreditado nas minhas capacidades. Obrigado por me terem dado forças nas alturas em que me sentia cansado, frustrado, triste, desiludido e com saudades de casa. Obrigado por me terem ensinado a nunca desistir dos nossos sonhos e acreditar sempre em nós próprios.

*“Eu tentei 99 vezes e falhei, mas à centésima tentativa eu consegui.
Nunca desista dos seus objetivos mesmo que pareçam impossíveis,
a próxima tentativa pode ser vitoriosa”. (Albert Einstein)*

Resumo

As plantas são utilizadas desde os primórdios da civilização humana, por serem uma fonte rica em nutrientes e em compostos bioativos que auxiliam no combate a doenças. Atualmente, a utilização de extratos de plantas por parte das indústrias farmacêutica, alimentar e cosmética tem sido cada vez mais recorrente, devido às suas propriedades bioativas que parecem conferir benefícios para a saúde dos consumidores e aumentar a estabilidade dos produtos.

Neste trabalho foram estudados extratos hidroetanólicos de seis plantas vulgarmente utilizadas na medicina tradicional madeirense: *Cedronella canariensis* (hortelã-de-cabra), *Globularia salicina* (malfurada), *Erica arborea* (urze-molar), *Rubus ulmifolius* (silvado), *Fumaria muralis* (molarinha) e *Sideroxylon marmulano* (marmulano), com o objetivo de caracterizar melhor as suas propriedades bioativas, através da determinação do seu teor em compostos fenólicos totais e em flavonoides, e avaliação das suas atividades antioxidantes, antimicrobianas e antidiabéticas. A atividade antioxidante foi determinada através do estudo da capacidade redutora e da capacidade de sequestro dos radicais DPPH• e anião superóxido. A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método por difusão em agar e pelo método da microdiluição, utilizando diversos microrganismos patogénicos. Determinou-se a atividade antidiabética pela capacidade de inibição das enzimas α -amilase e α -glucosidase.

De entre as plantas analisadas, destaque para a urze-molar e para o marmulano, por apresentarem elevado potencial antioxidante, bem como atividade antidiabética e antimicrobiana, sendo as únicas a inibir o crescimento da totalidade das bactérias Gram-positivas testadas. Concordante com estes resultados, pode acrescentar-se que os extratos destas plantas foram também os que apresentaram maior teor em compostos fenólicos totais e flavonoides totais, o que sugere o envolvimento destes compostos nas atividades bioativas detetadas. Dos extratos estudados destaca-se igualmente o extrato de silvado por ter sido o que apresentou a maior capacidade para inibir a enzima α -glucosidase.

Este estudo contribuiu para aumentar o conhecimento sobre a flora medicinal da Madeira, bem como valorizar o conhecimento tradicional sobre as propriedades das plantas usadas pelas populações.

Palavras-chaves: Plantas medicinais, Compostos fenólicos, Atividade antimicrobiana, Atividade antioxidante, Diabetes *mellitus*, Flora da Madeira

Abstract

Plants have been used since the beginning of human civilization, as they are a rich source of nutrients and bioactive compounds that help fight diseases. Currently, the use of plant extracts by the pharmaceutical, food and cosmetic industries has been increasingly recurrent, due to their bioactive properties that seem to confer benefits to the health of consumers and increase the stability of products.

In this work, extracts of six plants commonly used in traditional Madeiran medicine: *Cedronella canariensis*, *Globularia salicina*, *Erica arborea*, *Rubus ulmifolius*, *Fumaria muralis* and *Sideroxylon marmulano*, were studied, with the aim of better characterizing their bioactive properties, by determining their content in total phenolic compounds and flavonoids, and evaluating their antioxidant, antimicrobial and antidiabetic activities. The antioxidant activity was determined through the reducing capacity and the scavenging capacity of the DPPH• radical and the superoxide anion radical. Antimicrobial activity was determined by the agar diffusion method and the microdilution method, using various pathogenic microorganisms. Antidiabetic activity was determined by the ability to inhibit α -amylase and α -glucosidase enzymes.

Among the plants analyzed, *Erica arborea* and *Sideroxylon marmulano* stand out, as they have high antioxidant potential as well as antidiabetic and antimicrobial activities, being the only ones that inhibit the growth of all the Gram-positive bacteria tested. In agreement with these results, it can be added that these plants were also the ones with the highest content of total phenolic compounds and total flavonoids, which suggests the involvement of these compounds in the bioactive activities detected. Of the extracts studied, the *Rubus ulmifolius* extract also stands out because it has the highest capacity to inhibit the α -glucosidase.

This study contributed to increase knowledge about the medicinal flora of Madeira, as well as to enhance traditional knowledge about the properties of plants used by the populations.

Keywords: Medicinal plants, Phenolic compounds, Antimicrobial activity, Antioxidant activity, Diabetes *mellitus*, Flora of Madeira

Índice

Dedicatória	V
Agradecimentos.....	VII
Resumo.....	XI
Abstract	XIII
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	XXIII
1-Introdução	1
1.1-Plantas endémicas da Madeira	2
1.1.1- <i>Cedronella canariensis</i>	3
1.1.2- <i>Globularia salicina</i>	5
1.1.3- <i>Erica arborea</i>	6
1.1.4- <i>Rubus ulmifolius</i>	8
1.1.5- <i>Fumaria muralis</i>	9
1.1.6- <i>Sideroxylon marmulano</i>	10
1.2-Agentes antimicrobianos.....	12
1.2.1- Mecanismo de ação dos antimicrobianos naturais	13
1.3- Atividade antidiabética	14
1.4- Stress Oxidativo	17
1.5-Oxidação Lipídica	19
1.5.1-Foto-oxidação	19
1.5.2-Oxidação Enzimática	20
1.5.3-Peroxidação lipídica.....	20
1.5.4-Rancidez nos alimentos.....	22
1.6- Antioxidantes	23
1.7-Metabolismo Secundário	26
1.8-Compostos Fenólicos	27
1.8.1- Classificação dos compostos fenólicos	28
1.8.1.1- Flavonoides	28
1.8.1.1.1- Flavonóis.....	31
1.8.1.1.2- Flavonas	31
1.8.1.1.3- Flavanonas	31
1.8.1.1.4- Flavan-3-óis	32
1.8.1.1.5- Antocianinas	32
1.8.1.1.6- Isoflavonas	33
1.8.1.1.7-Chalconas.....	34
1.8.1.2- Estilbenos.....	35

1.8.1.3-Ácidos fenólicos.....	36
1.8.1.4-Taninos.....	37
1.8.1.5- Lignanas.....	38
1.8.1.6-Tocoferóis	38
1.8.1.7-Cumarinas	39
1.8.2- Biossínteses dos compostos fenólicos.....	40
1.9- Processo Inflamatório	42
1.9.1- Inflamação aguda	42
1.9.2-Inflamação crónica.....	44
1.9.3-Atividade Anti-inflamatória.....	45
2-Objetivos.....	47
2.1- Objetivo geral	47
2.2- Objetivos específicos	47
3-Materiais e Métodos.....	49
3.1- Reagentes e meio de cultura	49
3.2- Material vegetal	49
3.3- Preparação dos extratos.....	50
3.4-Determinação do rendimento de extração.....	50
3.5- Quantificação total de fenóis- Método Folin Ciocalteu	50
3.6- Quantificação de flavonoides.....	51
3.7- Determinação da atividade antioxidante dos extratos.....	52
3.7.1- Determinação da capacidade de sequestro do radical DPPH•	52
3.7.2- Determinação da atividade de redução Fe(III) a Fe(II) pelo ensaio FRAP.....	53
3.7.3-Determinação da redução do Cu (II) pelo ensaio CUPRAC.....	54
3.7.4- Determinação da atividade antioxidante por sequestro do radical anião superóxido detetada pela diminuição da formação de formazano	55
3.8- Determinação da atividade antimicrobiana.....	57
3.8.1- Método de difusão em agar.....	58
3.8.2- Determinação da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição em meio líquido	59
3.9- Avaliação do potencial antidiabético	59
3.9.1- Ensaio da Inibição da α -Amilase	60
3.9.2- Ensaio da Inibição da α -Glucosidase	61
3.10- Análise Estatística.....	62
4- Resultados e Discussão.....	63
4.1- Rendimento de extração.....	63
4.2- Determinação dos fenóis totais pelo Método Folin-Ciocalteu	64
4.3- Quantificação dos Flavonoides Totais	67

4.4- Determinação da capacidade antioxidante dos diferentes extratos	70
4.4.1-Determinação da capacidade de sequestro do radical DPPH•	70
4.4.2-Determinação da atividade de redução do Fe (III) a Fe (II) pelo ensaio FRAP	74
4.4.3- Determinação da redução do Cu (II) pelo ensaio CUPRAC	76
4.4.4- Determinação da capacidade de sequestro do radical anião superóxido detetada pela diminuição da formação de formazano	78
4.5- Determinação da atividade antimicrobiana	80
4.5.1- Determinação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em agar	81
4.5.2- Determinação da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição em meio líquido	87
4.6- Determinação da atividade antidiabética	89
4.6.1- Ensaio da inibição da α -Amilase	90
4.6.2- Ensaio da inibição da α -Glucosidase	91
5-Conclusão.....	95
6-Bibliografia	97
Anexos.....	121

Índice de Figuras

Figura 1.1- Localização geográfica das Regiões da Macaronésia (Spínola & Castilho., 2018)....	3
Figura 1.2 - Hortelã-de-cabra (<i>C.canariensis</i>).....	4
Figura 1.3- Estrutura química de alguns compostos identificados nos óleos essenciais de <i>C.canarienses</i>	4
Figura 1.4- Malfurada (<i>Globularia salicina</i>).....	6
Figura 1.5- Estrutura do manitol.....	6
Figura 1.6- Estrutura da globularina.....	6
Figura 1.7- Urze-molar (<i>Erica arborea</i>).....	7
Figura 1.8- Estrutura da quercetina-3-O-rutinosídeo.....	7
Figura 1.9- Silvado (<i>Rubus ulmifolius</i>).....	8
Figura 1.10 - Molarinha (<i>Fumaria muralis</i>).....	10
Figura 1.11- Alcaloides de isoquinolina e fenóis presentes nas espécies de <i>Fumaria</i> (Soušek <i>et al.</i> , 1997).....	10
Figura 1.12 - Partes constituintes do marmulano (<i>Sideroxylon marmulano</i>): A) Folhas; B) Ramos; C) Cascas.....	11
Figura 1.13- Exemplos de compostos químicos de origem vegetal que apresentam atividade antimicrobiana (Silvia & Fernandes Júnior, 2010).....	14
Figura 1.14- Locais alvo dos agentes antimicrobianos (Silva & Fernandes Júnior, 2010).....	14
Figura 1.15- Comparação entre a diabetes tipo 1 e tipo 2 (Painscale,2022).....	15
Figura 1.16- Digestão dos hidratos de carbono catalisada pelas enzimas α -amilase e α -glucosidase (Yang <i>et al.</i> , 2019).....	17
Figura 1.17 - Superprodução de ROS (1) ocasionando stress oxidativo (2) devido à redução dos compostos antioxidantes intracelulares (3) promovendo diversas alterações: peroxidação lipídica (4), fragmentação do DNA (5) e oxidação de diferentes moléculas (Luz <i>et al.</i> , 2011).....	19
Figura 1.18- Mecanismo de foto-oxidação (Adaptado de Ahmed <i>et al.</i> ,2016).....	20
Figura 1.19- Mecanismo da oxidação lipídica (Adaptado Ramalho & Jorge, 2006).....	21
Figura 1.20 - Esquema reacional das reações de Fenton e Haber-Weiss (Wang <i>et al.</i> , 2010).....	22
Figura 1.21 - Mecanismo de ação dos antioxidantes primários por: A) Transferência de átomo de hidrogénio (Adaptado de Ramalho & Jorge); B) Doação de um eletrão (Zeb, 2020).....	24
Figura 1.22- Principais fatores que podem influenciar a acumulação de metabolitos secundários nas plantas (Gobbo-Neto & Lopes, 2007).....	27
Figura 1.23- Estrutura básica dos flavonoides: (1)- Núcleo flavana; (2)- Núcleo 4-oxo-flavonoide.....	29
Figura 1.24- Formas das antocianinas em equilíbrio, em solução aquosa, consoante o pH (Houghton <i>et al.</i> , 2021).....	33
Figura 1.25- Estrutura química das chalconas.....	34
Figura 1.26- Estrutura química dos estilbenos (Soutinho, 2012).....	35
Figura 1.27 -Conversão do trans-reversatrol em cis-reversatrol (Vázquez <i>et al.</i> , 2022).....	35
Figura 1.28 -Estrutura química dos ácidos fenólicos (Soares, 2002).....	36
Figura 1.29 -Estruturas de taninos.: A) Tanino condensado; B) Tanino hidrolisável (Dias <i>et al.</i> , 2014).....	37
Figura 1.30- Estrutura molecular das lignanas (De Souza <i>et al.</i> , 2012).....	38
Figura 1.31- Estrutura química dos tocoferóis (Piroddi <i>et al.</i> , 2012).....	39
Figura 1.32 - Estrutura molecular das cumarinas.....	40
Figura 1.33- Esquema da via de síntese dos compostos fenólicos (Resendes <i>et al.</i> , 2017).....	41
Figura 1.34 -Metabolismo do ácido araquidónico (Adaptado de Schneid, 2021).....	43
Figura 3.1- Esquema reacional da redução do molibdénio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu (Oliveira <i>et al.</i> , 2009).....	51
Figura 3.2- Formação de complexo cor-de-rosa por reação entre os flavonoides o alumínio e o nitrito (Mekonnen & Desta, 2021).....	52

Figura 3.3- Reação entre o radical DPPH• e o antioxidante para formar DPPH (Moon & Shibamoto, 2009).....	53
Figura 3.4 -Reação de formação do complexo Fe^{2+} -TPTZ após redução de Fe^{3+} devido à ação de um antioxidante (Moon & Shibamoto, 2009).....	54
Figura 3.5- Redução do complexo Cu (II)-neocuproína a Cu(I)-neocuproína, por ação dos antioxidantes da amostra (Adaptado de Bibi Sadeer <i>et al.</i> , 2020).....	55
Figura 3.6- Mecanismo de reação do NBT com superóxido para formar formazano (Bakr & Rahaman, 2016).....	56
Figura 3.7- Reações de formação do radical anião superóxido através do sistema PMS/NADH (adaptado de Nakamura <i>et al.</i> , 1992).....	56
Figura 3.8-Esquema simplificado do teste de difusão em agar.....	58
Figura 3.9- Ensaio de inibição da α -glucosidase: Mecanismo da reação no ensaio <i>in vitro</i> usando p-NGP como substrato (Lankatillake <i>et al.</i> , 2021).....	61
Figura 4.1- Reta de calibração com ácido gálico.....	64
Figura 4.2-Reta de calibração de catequina utilizada na determinação dos flavonoides totais....	67
Figura 4.3-Reta de calibração de ácido ascórbico para o ensaio FRAP.....	74
Figura 4.4- Reta de calibração de ácido ascórbico para a realização do ensaio CUPRAC.....	76
Figura 4.5- Resultados obtidos na determinação da atividade antimicrobiana contra <i>S.aureus</i>	81
Figura 4.6- Resultados obtidos na determinação da atividade antimicrobiana contra MRSA.....	81
Figura 4.7- Resultados obtidos na determinação da atividade antimicrobiana contra <i>B. cereus</i>	82
Figura 4.8- Resultados obtidos na determinação da atividade antimicrobiana contra <i>S. epidermidis</i>	82
Figura 4.9- Resultados obtidos na determinação da atividade antimicrobiana contra <i>L. monocytogenes</i>	83
Figura 4.10- Resultados obtidos na determinação da atividade antimicrobiana contra <i>E. faecalis</i>	83

Índice de Tabelas

Tabela 1.1- Compostos químicos identificados nos óleos essenciais das duas variedades de "hortelã-de-cabra".....	4
Tabela 1.2- Alguns compostos fenólicos identificados no género <i>Globularia</i>	6
Tabela 1.3-Compostos fenólicos identificados na "urze-molar".....	7
Tabela 1.4- Compostos fenólicos identificados no "silvado".....	9
Tabela 1.5- Sistema enzimático antioxidante conforme sua reação biológica e seus sítios de ação (Adaptado de Oliveira & Schoffen, 2010).....	25
Tabela 1.6- Classe de compostos fenólicos de acordo com sua estrutura química (Ângelo & Jorge, 2007).....	28
Tabela 1.7-Subclasses dos flavonoides, estrutura química e exemplo de alimentos onde cada subclasse pode ser encontrada (Campos, 2021).....	30
Tabela 4.1- Rendimento de extração obtido para os extratos das diferentes amostras.....	63
Tabela 4.2- Teor em compostos fenólicos totais nos diferentes extratos.....	64
Tabela 4.3-Teor em flavonoides totais nas diferentes amostras testadas.....	67
Tabela 4.4-Coefficiente de Pearson para as correlações entre a composição em fenóis totais e em flavonoides dos extratos estudados.....	70
Tabela 4.5- Capacidade de sequestro do DPPH• das diferentes amostras.....	71
Tabela 4.6- Coeficiente de Pearson para as correlações entre composição química e o ensaio do DPPH• para as várias amostras em estudo.....	73
Tabela 4.7- Valores obtidos com os diferentes extratos no ensaio FRAP.....	74
Tabela 4.8-Coefficiente de Pearson para as correlações entre o teor em fenóis totais, flavonoides totais, capacidade de sequestro do radical DPPH• e o ensaio FRAP.....	76
Tabela 4.9-Valores obtidos com as diferentes amostras no ensaio CUPRAC.....	77
Tabela 4.10- Coeficiente de Pearson para as correlações entre a composição química e a atividade de sequestro do radical DPPH e os ensaios FRAP e CUPRAC.....	78
Tabela 4.11-Valores de IC ₅₀ obtidos na determinação da capacidade de sequestro do superóxido nas diferentes amostras.....	79
Tabela 4.12-Coefficiente de Pearson para as correlações entre composição química e atividade antioxidante dos extratos estudados.....	80
Tabela 4.13- Diâmetro dos halos de inibição (mm) obtidos através do método de difusão em agar com extratos em estudo na concentração de 20 mg/mL.....	84
Tabela 4.14- Concentração mínima inibitória (MIC, µg/mL) e concentração mínima bactericida (MBC, µg/mL) para os extratos em análise.....	88
Tabela 4.15-Atividade inibitória de α-amilase para os extratos testados.....	90
Tabela 4.16-Coefficiente de Pearson para as correlações entre composição química e atividade de inibição da alfa-amilase dos extratos estudados.....	91
Tabela 4.17-Atividade inibitória de α-glucosidase para os extratos testados.....	92
Tabela 4.18- Coeficiente de Pearson para as correlações entre composição química e atividade antidiabética dos extratos analisados.....	93

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

- AA**- Ácido araquidónico
- Abs_{amostra}**- Absorvância da amostra
- Abs_{branco}**- Absorvância do branco
- AINES**- Anti-inflamatórios não esteroidais
- ATCC**- *American Type Culture Collection*
- COX** – Enzima Cicloxigenase
- Dm**-Diabetes *mellitus*
- DNSA**- Ácido 3,5- ditnitrosalicílico
- DPPH**- 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
- EAA**- Equivalentes de Ácido Ascórbico
- EAG**- Equivalentes de Ácido gálico
- EC**- Equivalentes de Catequina
- GLUT4**- Transporte de Glucose tipo 4
- IC₅₀**- Concentração necessária para inibir 50%
- LDL**- Lipoproteína de baixa densidade
- MDA**- Malondialdeído
- MBC**- Concentração mínima bactericida
- MIC**- Concentração mínima inibitória
- MHA** – Müller-Hinton Agar
- MRSA**-*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina
- p-NPG**- 4-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo
- ROS**- Espécies reativas de oxigénio
- UFC** - Unidades Formadoras de Colónias
- v/v**- Volume/Volume
- TE**- Equivalentes de Trolox
- TPTZ** – 2,4,6-Tris(2-piridil) -s-triazina
- TSA** – Triptona-Soja-Agar
- UV** - Ultravioleta

1-Introdução

Desde a antiguidade que o Homem utiliza as plantas não só como fonte de nutrientes, mas também como principal recurso no combate às doenças. Por experiência empírica, o Homem apercebeu-se que certas espécies de plantas tinham poderes curativos e transmitiu esse conhecimento para as gerações futuras através de registos históricos.

A primeira evidência do uso de plantas na preparação de medicamentos foi encontrada em uma laje de argila, elaborado pela civilização Suméria há aproximadamente 5000 anos, a qual continha 12 receitas medicinais referentes a mais de 250 de plantas, nomeadamente a papoula (*Papaver rhoeas*), meimendro (*Hyoscyamus niger*) e a mandrágora (*Mandragora officinarum* L.). Outros registos históricos descobertos são os livros sagrados «Vedas», escritos na Índia antiga, que mencionam receitas medicinais através de especiarias utilizadas atualmente na gastronomia mundial como a noz-moscada (*Myristica fragrans*) e o cravinho (*Syzygium aromaticum*) (Petrovska, 2012).

Atualmente, os extratos naturais têm despertado grande interesse não só na indústria farmacêutica, na produção de novos antibióticos mais potentes (Anand *et al.*, 2019), como também na indústria cosmética no fabrico de protetores solares e de cremes antienvelhecimento (Hoang *et al.*, 2021) e na indústria alimentar (Degáspari & Waszczynskyj, 2004).

Há uma nova tendência na indústria alimentar para utilizar conservantes de origem natural, na tentativa de responder aos consumidores, cada vez mais exigentes e criteriosos, na escolha do produto e de eliminar os conservantes artificiais (Packer & Luz, 2007) e os desinfetantes químicos (Gerhardt *et al.*, 2012) no processo de conservação do produto final.

A utilização de alguns conservantes sintéticos na indústria alimentar, nomeadamente o hidroxitolueno butilado (BHT), o hidroxiansiol butilado (BHA) e o terc-butil-hidroquinona (TBHQ), tem gerado grande preocupação na saúde dos consumidores, uma vez que alguns estudos indicam que o seu consumo está potencialmente relacionado com o aparecimento de cancro e de outras patologias, como aumento dos níveis de colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL) no sangue, hipertensão, alergia, asma e aumento anormal do peso do fígado (Degáspari & Waszczynskyj, 2004; Race, 2009; Silva & Lidon, 2016).

Por essa razão, têm sido efetuadas pesquisas científicas, no sentido de encontrar novos aditivos alimentares, nomeadamente antimicrobianos e antioxidantes. Uma alternativa viável seria a utilização de extratos de plantas, visto que são ricos em polifenóis e existem evidências científicas que estes compostos bioativos podem inibir as reações de degradação dos géneros alimentícios, como as reações de oxidação e impedir a proliferação de agentes microbiológicos deteriorantes de origem alimentar, responsáveis pela alteração da cor, sabor e aroma dos alimentos (Ortega-Ramirez *et al.*, 2014).

Para além disso, estes extratos podem também contribuir para desenvolver alimentos funcionais que possam conferir não só a nutrição básica para os consumidores, mas também efeitos positivos na saúde. Segundo Tzima *et al.* (2018), uma dieta rica em polifenóis, como flavonoides e ácidos hidroxicinâmicos, tem efeitos eficazes na saúde e pode conferir proteção contra o risco de desenvolvimento de diversas doenças, nomeadamente doenças degenerativas e cardiovasculares. Portanto, mais estudos são essenciais para agilizar os vários estágios de novas formulações de alimentos funcionais, melhorando os seus benefícios para a saúde e garantindo a segurança antioxidante e antimicrobiana nos alimentos.

1.1-Plantas endémicas da Madeira

O arquipélago da Madeira (figura 1.1) está localizado no noroeste do Oceano Atlântico, a 795 km a sudeste de Portugal Continental e a 600 km a oeste da Costa Africana entre 32° 24'N e 33° 07'N de latitude e 16° 16'W e 17° 16'W de longitude. É formado pelas ilhas vulcânicas da Madeira (com área de 734 km² e altitude máxima de 1861 m), Porto Santo (42 km², 517m) e os seus 6 ilhéus e o subarquipélago das Desertas (Ilhéu Chão (0,5 km², 98 m), Deserta Grande (10,3 km², 479 m) e Bugio (4 km², 384 m)) e das Selvagens, que se encontram atualmente desabitadas (Jardim & Sequeira, 2021; Spínola & Castilho, 2018).

A flora do arquipélago da Madeira é presentemente constituída por 1226 *taxa* (espécies e subespécies), dos quais 157 (12,81%) são endémicas e 259 (21,42%) são usadas como plantas medicinais. A maior parte destas espécies vegetais ocorrem na ilha da Madeira, cuja orografia permite a existência de habitats importantes, possibilitando a manutenção de um elevado número de espécies, algumas delas únicas no mundo e de elevado interesse científico (Capelo *et al.*, 2004; Rivera & Obón, 1995).

A etnofarmacologia das ilhas da Madeira e Porto Santo é de extrema importância pelas características biogeográficas desta região, que a tornam um centro de diversidade de plantas medicinais. No passado, os tempos vividos pelo povo da Ilha foram bastante árduos, devido ao isolamento geográfico e à orografia difícil. As dificuldades sentidas pela população catapultaram-na para a gestão racional dos recursos existentes, aprendendo com os seus antecessores, preservando tradições e criando receitas medicinais como cataplasma, xaropes e decoctos (Rivera & Obón, 1995; Sequeira *et al.*, 2006).

A hortelã-de-cabra (*Cedronella canariensis*), urze-rasteira (*Erica maderensis*), perpétua-branca (*Helichrysum melaleucum*), erva-do-coelho (*Pericallis aurita*), erva-branca (*Sideritis candicans*), o marmulano (*Sideroxylon marmulano*) e o piorno (*Teline maderensis*) são alguns exemplos de plantas endémicas do Arquipélago da Madeira com propriedades medicinais (Henriques *et al.*, 2017; Sequeira *et al.*, 2006).

As plantas nativas madeirenses ainda não foram estudadas em pormenor para que seja permitida a elaboração de artigos científicos relevantes e de monografias completas e modernas. As espécies são usadas empiricamente, sem respaldo científico quanto à sua eficácia e segurança. Assim, a realização de estudos científicos sobre estas plantas permitirá compreender melhor os seus efeitos bioativos e dar algum suporte à sua utilização na medicina tradicional. O estudo destas plantas poderá também permitir avaliar o seu potencial de utilização como aditivo natural na indústria alimentar.

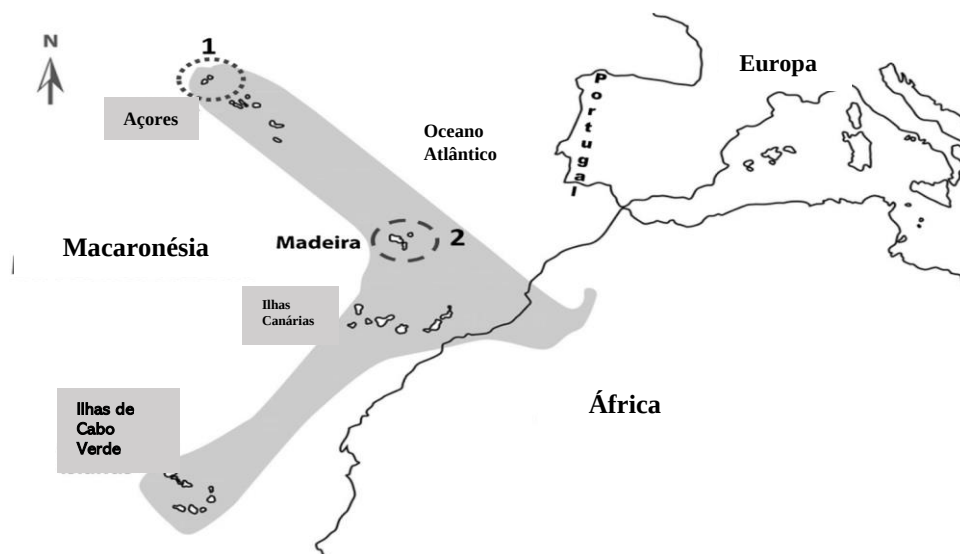


Figura 1.1-Localização geográfica das Regiões da Macaronésia (Spínola & Castilho., 2018)

1.1.1-Cedronella canariensis

A *Cedronella canariensis* (figura 1.2), mais conhecida como “hortelã-de-cabra”, é uma planta endémica das regiões da Macaronésia pertencente à família Lamiaceae. Geralmente, pode ser encontrada na ilha da Madeira e nas ilhas Canárias em locais à sombra ou em zonas rochosas ensolaradas acima dos 500 m de altitude (Henriques *et al.*, 2017). Morfologicamente, é uma planta perene, aromática, lenhosa, contém folhas trifoliadas e pecioladas, com flor com dois lábios em forma de espiral com coloração branca ou cor-de-rosa e pode crescer até 1,5 metros de altura. (Bramwell & Bramwell, 1990) A parte aérea da planta é rica em terpenos (tabela 1.1) e é usualmente empregue na medicina tradicional como agente hipoglicémico, tonificante capilar, descongestionante das vias respiratórias e hipotensivo (Darias *et al.*, 1986; Rivera & Obón, 1995).

Existem duas variedades desta espécie: *C. canariensis* var. *canariensis* e a *C. canariensis* var. *anisata*, sendo distinguíveis apenas através do cheiro (Darias *et al.*, 1989). Num estudo de López-García *et al.* (1992), foi realizada uma análise química dos óleos essenciais entre duas variedades da planta por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) e observou-se que a *C. canariensis* var. *canariensis* era rica em pinocarvona e β -pineno, enquanto

a *C. canariensis* var. *anisata* apresentou concentrações elevadas de *p*-alilo ansiol (figura 1.3). Para além disso, ambas as variedades demonstraram atividade antimicrobiana muito significativa na *Bordetella bronchiseptica* e na *Klebsiella pneumoniae*, microrganismos responsáveis por infeções no trato respiratório. Em outros estudos, foi possível constatar o efeito hipotensivo, antioxidante, hipoglicémico e diurético da planta em ensaios *in vivo* (López-García *et al.*, 1996; Zorzetto *et al.*, 2015).



Figura 1.2 - Hortelã-de-cabra (*C.canariensis*)

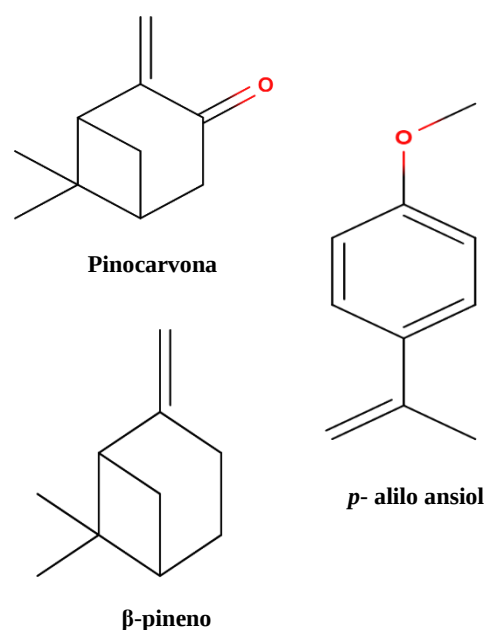


Figura 1.3 - Estrutura química de alguns compostos identificados nos óleos essenciais de *C.canariensis*

Tabela 1.1- Compostos químicos identificados nos óleos essenciais das duas variedades de” hortelã-de-cabra”

Planta	Óleos essenciais	Referências
Hortelã-de-cabra <i>Cedronella canariensis</i> ssp. <i>canariensis</i>	Pinocarvona, β -pineno, α -pineno, α -terpineol, mirtenol, óxido de cariofileno, cedronelona, limoneno	(López-Garcia <i>et al.</i> , 1992; Zorzetto <i>et al.</i> , 2015)
Hortelã-de-cabra <i>Cedronella canariensis</i> ssp. <i>anisata</i>	<i>p</i> -Alilo ansiol, pinocarvona, β -pineno, α -pineno, α -terpineol, limoneno, mirceno, cariofileno	(López-Garcia <i>et al.</i> , 1992)

1.1.2-Globularia salicina

A *Globularia salicina* (figura 1.4), também designada como “malfurada”, é uma planta endêmica das regiões da Macaronésia que faz parte da família Globulariaceae. É comumente avistada no arquipélago das Canárias e da Madeira em zonas rochosas até 500 metros de altitude e floresce entre os meses de março e novembro. Do ponto de vista da morfologia, é uma planta arbustiva, perene, com hastes lenhosas, de folhagem lanceolada e persistente, com flor de corola azulada a esbranquiçada, apresenta inflorescência axilar e produz botões no hipocótilo. Na medicina popular madeirense, acredita-se que esta planta serve para o tratamento de doenças renais, no entanto há escassez de informação acerca dessas propriedades medicinais (Ferrão & Liberato, 2015; Holländer & Jäger, 1994).

Numa pesquisa realizada por Taskova *et al.* (2006), foi possível identificar a presença de manitol (figura 1.5) na “malfurada”, um glicido que exerce efeito diurético. A espécie com grau de parentesco mais próximo à *Globularia salicina* é a *Globularia amygdalifolia* de Cabo Verde, que se encontra atualmente em vias de extinção e é usado na forma de infusão como agente hipoglicémico, purgativo, laxante e também no tratamento de doenças ao nível do rim (Cardoso, 2018). Em alguns artigos, foi possível identificar diferentes compostos fenólicos (tabela 1.2) em plantas do género *Globularia* por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por arranjo de díodos (DAD), acoplado a espectrometria de massa (MS) e usando a interface de ionização por *eletrospray* (ESI). Num estudo realizado por Asraoui *et al.* (2021) verificou-se a presença de atividade antioxidante muito significativa nos ensaios de DPPH ($IC_{50}= 12,3 \pm 3,83 \mu\text{g/mL}$) e ABTS ($IC_{50}= 37,0 \pm 2,45 \mu\text{g/mL}$), em extratos de *Globularia alypum L.*, preparados em acetato de etilo da *Globularia alypum L.*

Alguns estudos relataram a presença de 39 substâncias bioativas, entre as quais a globularina, o principal composto presente na *G. amygdalifolia* e na *G. alypum*, composto que, quando testado isoladamente, demonstrou desempenhar atividade anti-hipercolesterolemia e anti-hipertrigliceridemia em ratos (Cardoso, 2018; Jouad & Eddouks, 2002). A globularina (figura 1.6) é um derivado do catalpol, formado por um iridoide e uma unidade de glucose (Feriani *et al.*, 2017; Jouad & Eddouks, 2002).



Figura 1.4 - Malfurada (*Globularia salicina*)

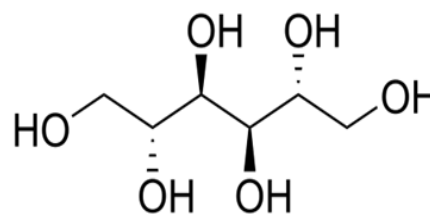


Figura 1.5- Estrutura do manitol

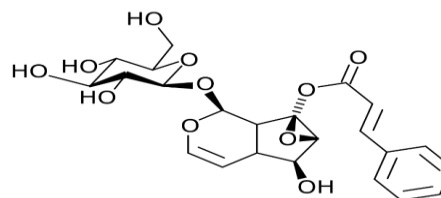


Figura 1.6- Estrutura da globularina

Tabela 1.2 - Alguns compostos fenólicos identificados no género *Globularia*

Planta (Género)	Compostos Fenólicos	Referências
Malfurada (<i>Globularia</i>)	Globularina, rutina, escutolareína, α -tocoferol, ácido gálico, quercetina-3-O-ramnose, derivados de kaempferol, vicenina-2, catequina, ácido 4-hidroxibenzoico, luteolina, diosmina, apigenina, neohesperidina, morina, ácido cinâmico, narigina, ácido <i>p</i> -cumárico, ácido protocatecuico	(Asraoui <i>et al.</i> , 2021) (Bouriche <i>et al.</i> , 2017) (Cardoso, 2018) (Frišćić <i>et al.</i> , 2016)

1.1.3-*Erica arborea*

A *Erica arborea* (figura 1.7), popularmente conhecida como “urze-molar” ou “betouro”, é um pequeno arbusto que pertence à família Ericaceae. Possui uma distribuição geográfica muito ampla, podendo ser avistada no Norte de África (Tunísia, Argélia, Marrocos), na Macaronésia (Madeira e Ilhas Canárias), na Turquia e no Médio Oriente (Fagúndez *et al.*, 2010).

É caracterizado por ser uma planta perene e arbustiva que pode medir até 4 metros de altura, com folhas lineares e muito estreitas (em forma de agulha) de 3-9 mm de comprimento. As flores apresentam uma corola largamente campanulada de cor branca, entre 2 e 2,5 mm, dispostas em panículas e possui rebentos pubescentes esbranquiçados e ramificados. Cresce em solo essencialmente ácido e pode ser encontrada nos matagais, matas e bosques (Centro de Química da Madeira, 2007a). A parte aérea da planta (caules e folhas) tem carácter antimicrobiano, antioxidante, adstringente e diurético e é muito utilizada para fins terapêuticos, nomeadamente na cicatrização de feridas, queimaduras e no tratamento de infeções urinárias (Guendouze-Bouchefa *et al.*, 2015).

O estudo sobre as propriedades bioativas nesta planta tem vindo a ganhar cada vez mais interesse. Numa pesquisa realizada por Ay *et al.* (2007), na qual foi usado o método de DPPH, foi possível observar a existência de atividade antioxidante elevada nos extratos de acetato de etilo desta planta ($IC_{50} = 5,98 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$), em comparação com os extratos metanólicos ($IC_{50} = 23,06 \pm 0,36 \mu\text{g/mL}$) e aquosos ($IC_{50} = 41,10 \pm 0,36 \mu\text{g/mL}$). Constatou-se também que a atividade antioxidante estava relacionada com a presença compostos fenólicos (tabela 1.3), nomeadamente de flavonoides.

Em outro estudo foi analisada a composição química da *E. arborea* através da técnica HPLC-DAD/ultravioleta (UV)-visível e constatou-se que o principal composto fenólico presente é a quercetina-3-O-rutinosídeo (figura 1.8) (Aires *et al.*, 2017a). A atividade anti-inflamatória da urze-molar foi demonstrada em extratos aquosos da *E. arborea*, num estudo que envolveu ensaios *in-vivo* em ratos onde o processo inflamatório tinha sido previamente, sendo os extratos administrada oralmente (Amroun *et al.*, 2021). A atividade antimicrobiana também foi relatada em ensaios realizados com extratos preparados em diferentes solventes de várias espécies de urze da Argélia. Estes extratos mostraram atividade contra bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (Guendouze-Bouchefa *et al.* 2015).



Figura 1.7- Urze-molar (*Erica arborea*)

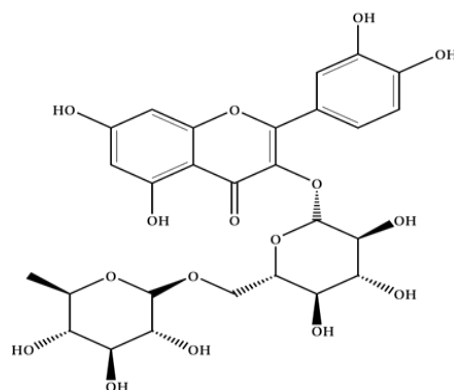


Figura 1.8- Estrutura da quercetina-3-O-rutinosídeo

Tabela 1.3 -Compostos fenólicos identificados na “urze-molar”

Planta (Género)	Compostos Fenólicos	Referências
Urze-molar (<i>Erica</i>)	Ácido clorogénico, muricetina pentosídico, miricetina-3-O-ramnósico, quercetina-3-O-glucosídico, quercetina-3-O-pentosídico, quercetina-3-O-ramnósico, quercetina-3-O-rutinosídeo epicatequina, kaempferol-3-O-rutinosídeo, ácido 5-O- <i>p</i> -coumaroilquinico, ácido elágico, luteolina-3-O-rutinosídico, ácido 5-O-cafeoilquinico	(Aires & Carvalho, 2017a) (Aires & Carvalho, 2017b) (Zengin <i>et al.</i> , 2019) (Amroun <i>et al.</i> , 2021)

1.1.4-*Rubus ulmifolius*

O *Rubus ulmifolius* (figura 1.9), também designado por “silvado”, é uma planta arbustiva e perene nativa da Ásia, Europa e das Regiões da Macaronésia e pertence à família Rosaceae (Reidel *et al.*, 2016). Na Madeira, esta planta cresce em zonas até 1300 metros de altitude com solos verdejantes, rochosos e matagais e floresce entre os meses de maio e junho (Centro de Química da Madeira, 2007b; Reidel *et al.*, 2016). Para além desta espécie, podemos encontrar no arquipélago outros tipos de silvados como o *Rubus serrae*, *Rubus suspicious* e o *Rubus vahlil* (Matzke-Hajek *et al.*, 2016).

Morfológicamente, o *Rubus ulmifolius* apresenta a seguinte descrição: “Arbusto silvestre revestido por espinhos. Emite rebentos que são aéreos, lenhosos, quase eretos e arqueados, robustos, e também eles, revestidos por espinhos robustos, direitos a falciformes e pilosos. As folhas são compostas, com os folíolos (que podem ter várias formas) inseridos no ápice do pecíolo, e são tri a pentafoliadas. Página inferior mais ou menos branca e revestida por uma camada de pelos moles, não muito compacta. O folíolo terminal é ovado, longamente peciolado e quase sempre em forma de ponta aguda e rígida, não muito comprida. A inflorescência é uma panícula terminal, piramidal, folhosa na base e com espinhos semelhantes aos dos rebentos aéreos. Flor com corola de 5 pétalas todas livres e regulares, enrugadas, com uma forma circular a obovada, de cor rosada, raramente branca. Produz frutos comestíveis (amoras), que são do tipo agregado, globuloso, de sabor ácido e com coloração preta no final da maturação” (Almargem, 2022).

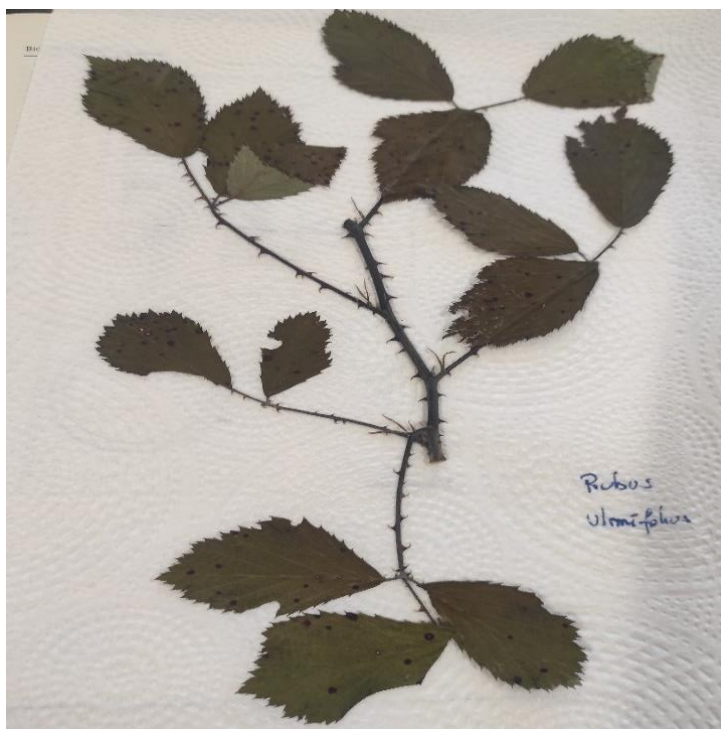


Figura 1.9- Silvado (*Rubus ulmifolius*)

Na medicina tradicional, o *Rubus ulmifolius* é bastante utilizado como antipirético, hipoglicémico e no tratamento de patologias gastrointestinais como diarreia, hemorroidas e inflamações intestinais (Ali *et al.*, 2017). Na indústria alimentar, os seus frutos são usados na produção de uma grande variedade de sumos, compotas, licores, gelados e marmeladas (da Silva *et al.*, 2019a).

Vários estudos científicos foram realizados e verificou-se que os extratos de *Rubus ulmifolius* são ricos em compostos bioativos como taninos, antocianinas, flavonoides, ácido ascórbico, alcaloides e terpenos que se encontram distribuídos na parte aérea (caule e folhas) e no fruto da planta. Estes compostos apresentaram atividade antioxidante e antipirética (Ali *et al.*, 2017; Da Silva *et al.*, 2019a; Schulz *et al.*, 2019). Por essa razão, os seus extratos podem ser incluídos futuramente na formulação de nutracêuticos ou de alimentos funcionais, como por exemplo, nos iogurtes (Martins *et al.*, 2014) e serem empregues como conservantes alimentares.

Em um estudo de Da Silva *et al.* (2019b), foi possível isolar e incorporar as antocianinas, compostos fenólicos que mudam de cor consoante o pH, dos frutos da *R. ulmifolius* nos produtos de panificação. Os resultados mostraram que esse composto apresentou boa capacidade de coloração, mantendo o valor nutricional, revelando ser uma ótima abordagem para substituição de corantes artificiais. Na tabela 1.4, apresentam-se alguns compostos fenólicos já identificados no silvado.

Tabela 1.4 - Compostos fenólicos identificados no “silvado”

Planta (Género)	Compostos Fenólicos	Referências
Silvado (<i>Rubus</i>)	Quercetina, quercetina--O-rutinosídeo, kaempferol, kaempferol-3-O-glicuronídeo, kaempferol 3-O-rutinosídeo, ácido gálico, ácido ferrúlico, naringenina hiperosídeo, catequina, ácido elágico, epicatequina, cianidina-O-pentosídico, cianidina-O-hexosídeo	(Kashchenko <i>et al.</i> , 2021) (Schulz <i>et al.</i> , 2019) (Tabarki <i>et al.</i> , 2017) (Gouveia-Figueira & Castilho, 2015) (Luís & Duarte, 2011)

1.1.5-*Fumaria muralis*

A *Fumaria muralis* (figura 1.10), vulgarmente conhecido como “molarinha”, é uma espécie de planta com flor pertencente à família Fumariaceae. É considerada uma erva daninha de pastagem, nativa das regiões temperadas e mediterrâneas da Europa Ocidental, Norte de África e das regiões da Macaronésia, podendo ser avistada em rochas, paredes, solos cultivados e nas bermas das ruas (Rivera & Obón, 1995; Tutin *et al.*, 2010).

Do ponto de vista morfológico, é descrita como uma planta anual muito ramificada, delicada, sem pelos, muitas vezes de cor verde opaca. As suas hastes são fracas, angulares e muitas vezes arrastando ou subindo. As folhas são finamente divididas muitas vezes até a nervura central, com segmentos planos, em forma de lança a pera, pálidas e opostas. A sua flor tem hastes curtas, sendo estreitas, alongadas e densas durante as fases de floração e frutificação. As flores são vermelho-rosadas com pontas vermelho-escuras (IEWF, 2022).

Na medicina tradicional madeirense, as suas infusões, misturadas com farelo de trigo, são muitas utilizada para o tratamento de dermatoses, verrugas e eczemas (Press, 1994). Nas regiões dos Balcãs, os extratos desta planta são, por exemplo, usados como antipirético e no tratamento da sífilis, lepra e patologias gastrointestinais (Vrancheva *et al.*, 2014).

Existem alguns estudos que relatam a presença de atividade antioxidante, anti tumoral, anti-inflamatória, anti-hipertensiva, antidiabética e antimicrobiana nas várias espécies de *Fumaria*, devido à presença de alcaloides de isoquinolina (figura 1.11) e de compostos fenólicos (rutina, isoquercetina, ácido cafeico e ácido protocatecuico) (Soušek *et al.*, 1997; Suau *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2020).



Figura 1.10 - Molarinha (*Fumaria muralis*)

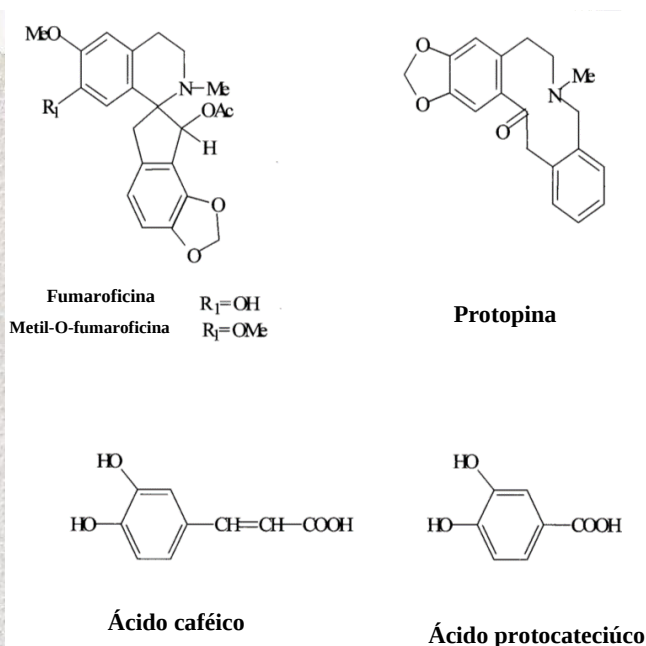


Figura 1.11- Alcaloides de isoquinolina e fenóis presentes nas espécies de *Fumaria* (Soušek *et al.*, 1997)

1.1.6-Sideroxylon marmulano

O *Sideroxylon marmulano* (figura 1.12), por vezes denominado de “barbusano”, é uma planta vascular exclusiva e pouco abundante das regiões da Macaronésia, floresce entre os meses de dezembro e janeiro e pertence à família Sapotaceae. Existem três variedades de marmulano: a

var. *mirmulano* (Madeira), onde cresce apenas em zonas íngremes e húmidas até 500 metros de altitude, a var. *canariensis* (Canárias) e a var. *marginata* (Cabo Verde) (Lobin *et al.*, 2005).

No ponto de vista morfológico, é caracterizado por ser um pequeno arbusto de 8-12 m, contendo folhas coriáceas, lustrosas e grandes (8 a 10 cm), de formato oval e de cor verde-escuro. As suas flores são rosadas e com pétalas de até 0,7 centímetros, dispostas em glomérulos axilares, sendo o fruto um drupáceo de até 1,8 centímetros de diâmetro e de cor vermelha a purpúreo (quase pretos) na fase da maturação. Na medicina tradicional madeirense, as suas cascas esmagadas em álcool são aplicadas para o alívio da dor (Centro de Química da Madeira, 2007c).

Em um estudo recente sobre a caracterização das propriedades bioativas de plantas medicinais de Cabo Verde, observou-se que o *Sideroxylon marginatum* obteve grande destaque nos resultados obtidos, relativamente na atividade antimicrobiana, antidiabética e antioxidante (Silva, 2019). Recentemente, Essoh *et al.* (2022) mostraram que extratos de *Sideroxylon marginatum* de Cabo Verde foram capazes de prevenir a produção de óxido nítrico na linha celular de macrófagos de ratinhos (RAW264.7) (atividade anti-inflamatória) e de inibir a peroxidação lipídica em homogenatos de células de cérebro de porco e a hemólise oxidativa *in vitro* de glóbulos vermelhos de ovelha (atividade antioxidante). A quercetina-O-hexosil-desoxihexosil-pentosídeo foi o composto maioritário encontrado nos extratos aquosos e hidroetanólico de *Sideroxylon marginatum* de Cabo Verde. Para além deste composto, foram também identificados outros derivados da quercetina, nomeadamente a quercetina-O-hexosilpentósido, a quercetina-O-hexosil-desoxihexosídeo e a quercetina-O-desoxihexosídeo, bem como um derivado da isorhamnetina (Essoh *et al.*, 2022).



Figura 1.12 - Partes constituintes do marmulano (*Sideroxylon marmulano*): A) Folhas; B) Ramos; C) Cascas

1.2-Agentes antimicrobianos

Embora as indústrias químicas e farmacêuticas tenham produzido uma grande variedade de antibióticos, nos últimos anos tem-se registado um aumento acelerado de microrganismos resistentes a estes medicamentos.

Um exemplo disso são as estirpes de *Staphylococcus aureus* que desenvolveram resistência à meticilina. O desenvolvimento de resistência bacteriana aos antibióticos é um processo natural resultante da pressão seletiva exercida pelo uso destes medicamentos, mas que tem sofrido uma expansão muito acelerada devido à utilização inadequada destes fármacos (Loureiro *et al.*, 2016). Devido à escassez de tratamentos eficazes para combater as infeções microbianas oportunistas (pneumonia, endocardite, choque séptico, meningite e infeções urinárias), especialmente em pacientes imunodeprimidos, tem-se estudado alternativas para reverter esta situação (Menichetti, 2005).

A contaminação microbiológica é também uma preocupação para a indústria cosmética, uma vez que estes produtos se podem tornar prejudiciais para os consumidores se estiverem contaminados com microrganismos nocivos. Vários estudos mostraram que os microrganismos mais encontrados em cosméticos são as espécies *P. aeruginosa*, *S. aureus* (causa a dermatite atópica), *E. coli*, e *Bacillus* spp., além de outras bactérias, fungos filamentosos e leveduras (Dadashi & Dehghanzadeh, 2016; Kim *et al.*, 2020).

Um dos grandes problemas do sector alimentar é a proliferação de microrganismos nos alimentos. Microrganismos patogénicos ou deteriorantes podem ser transmitidos na água e nos géneros alimentícios. O uso de aditivos assume grande importância na conservação dos alimentos durante a produção, armazenamento e consumo, não só para prevenir a contaminação bacteriana e fúngica evitando assim a transmissão de doenças, mas também para prevenir outros processos de deterioração, como por exemplo, os processos oxidativos, que causam alterações indesejáveis nas características sensoriais nos alimentos (Barboza *et al.*, 2021).

Um dos conservantes mais utilizados na indústria alimentar é o hidroxianisól butilado (BHA), um derivado de fenol que também pode ser encontrado nos produtos cosméticos. No entanto, a utilização de BHA tem gerado controvérsia, uma vez que alguns estudos recentes indicam que os produtos gerados pela biotransformação deste composto são altamente tóxicos para os ecossistemas aquáticos e são substâncias nocivas para a saúde dos consumidores (Felter *et al.*, 2021; Wang & Sun, 2022). Nos produtos cárneos, por exemplo, utilizam-se nitritos no processo de cura, devido a este conservante químico estabelecer uma forte ação inibitória do crescimento de vários microrganismos potencialmente patogénicos e causadores de intoxicações alimentares - *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., e principalmente *Clostridium botulinum*, bactéria anaeróbia responsável pela intoxicação alimentar conhecida por botulismo (Orvalho,

2010). Contudo, segundo alguns estudos, os nitritos podem originar a formação de N-nitrosaminas potencialmente cancerígenas (Sharma, 2015).

A aplicação de produtos naturais nos alimentos, em detrimento do uso de aditivos químicos e sintéticos, vem obtendo resultados promissores em relação à eficiência de inibição microbiana e tem sido amplamente estudada por poder constituir uma alternativa mais saudável. Um estudo realizado em Taiwan, no qual foi feito um teste de sensibilidade antimicrobiana a partir de vários extratos de vegetais crucíferos (Brassicaceae), permitiu verificar que esses extratos registaram diferentes graus de atividade antimicrobiana, apresentando maior efeito inibitório nas bactérias Gram-negativas do que nas Gram-positivas (Hu *et al.*, 2004).

O interesse dos consumidores por produtos mais saudáveis e orgânicos, com menos aditivos conservantes e mais próximos do natural tem impulsionado os pesquisadores e as indústrias do setor alimentar, cosmético e farmacêutico a reconsiderar os seus métodos de conservação dos produtos.

1.2.1- Mecanismo de ação dos antimicrobianos naturais

A maioria das plantas contém diversos compostos com propriedades antimicrobianas para proteção contra agentes agressores, principalmente microrganismos. As estruturas químicas de alguns compostos antimicrobianos estão ilustradas na figura 1.13.

A ação dos agentes antimicrobianos é sobretudo exercida ao nível da membrana plasmática e da parede celular de bactérias e fungos (Cowan, 1999; Silva & Fernandes Júnior, 2010), provocando danos estruturais e funcionais (figura 1.14). As substâncias ativas das plantas são capazes de:

- ❖ Alterar a estrutura fosfolipídica da membrana celular dos microrganismos;
- ❖ Desestabilizar a força protomotriz e o fluxo de eletrões;
- ❖ Inativar sistemas enzimáticos, levando à formação de substâncias tóxicas;
- ❖ Provocar danos irreversíveis no material genético de bactérias e fungos;
- ❖ Desintegrar a parede celular;
- ❖ Promover o extravasamento do conteúdo celular;
- ❖ Desencadear a morte celular

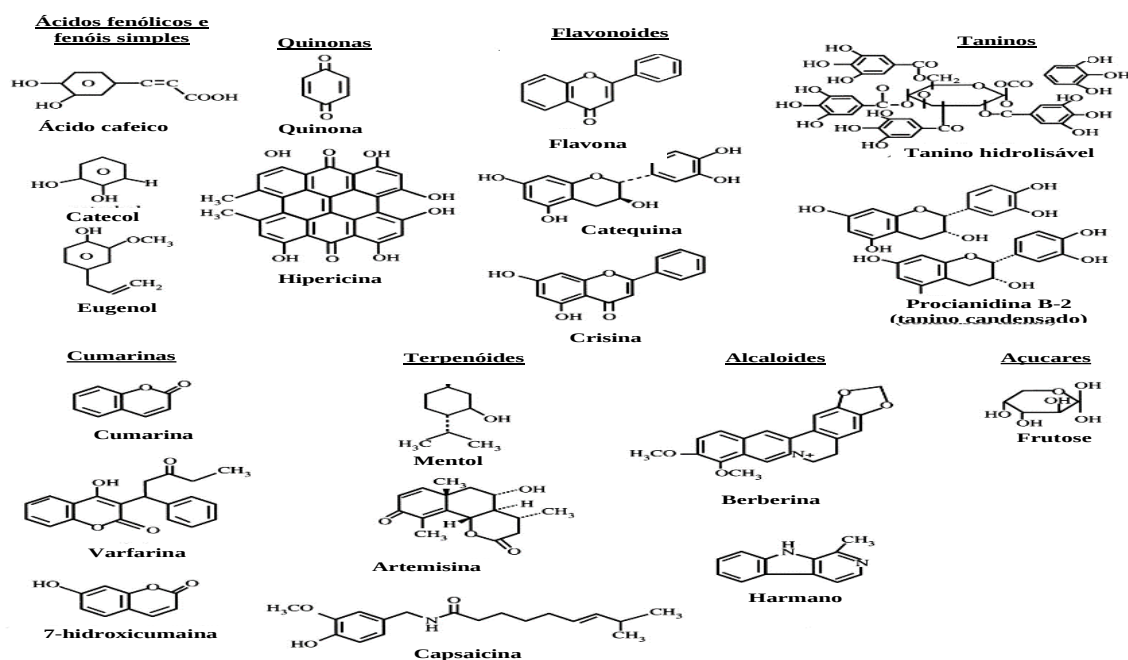


Figura 1.13 -Exemplos de compostos químicos de origem vegetal que apresentam atividade antimicrobiana (Silvia & Fernandes Júnior, 2010).

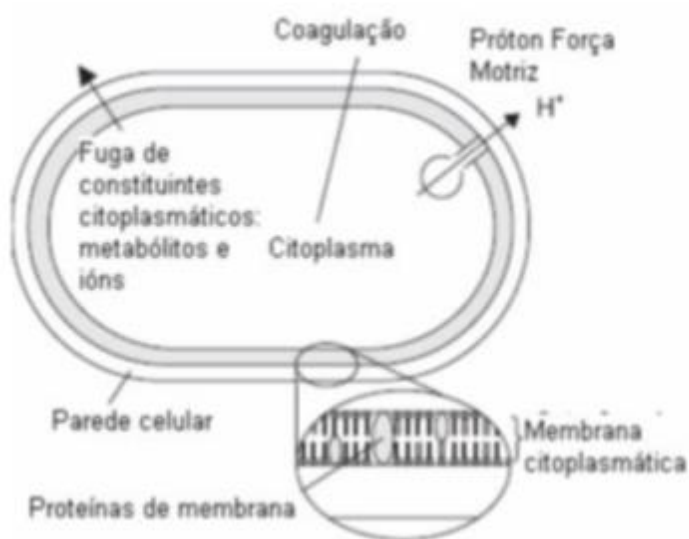


Figura 1.14- Locais alvo dos agentes antimicrobianos (Silva & Fernandes Júnior, 2010)

1.3- Atividade antidiabética

A *Diabetes mellitus (Dm)* consiste num distúrbio metabólico crónico caracterizado pelo aumento anormal dos níveis de glucose no sangue (hiperglicemia), resultante da deficiente produção e secreção de insulina pelo pâncreas ou da combinação da diminuição da resposta periférica pelos órgãos à insulina (resistência à insulina) com uma produção de insulina insuficiente para compensar a resistência (Alberti & Zimmet, 1998; Pallavi *et al.*, 2015;

Petersmann *et al.*, 2019). Estima-se que esta doença atingirá cerca de 360 milhões de pessoas em 2030 (Ahmed *et al.*, 2013).

Existem três tipos de *Dm*:

- ❖ **Tipo I**- Doença autoimune rara (prevalência de 5 a 10% dos casos) caracterizada por uma reação inflamatória local dentro e ao redor das ilhotas de Langerhans, causando a destruição seletiva das células β , responsáveis pela secreção de insulina (figura 1.15). Manifesta-se antes dos 30 anos (infância/adolescência) e está associado a fatores genéticos ou ambientais (vírus) (Viegas, 2017).
- ❖ **Tipo II**- Doença metabólica resultante da resistência periférica, uma condição na qual as células do corpo usam insulina com menos eficácia do que o normal, e ao aumento da libertação de glicose pelo fígado. À medida que a resistência à insulina se desenvolve, maior quantidade de insulina é necessária para manter os níveis de açúcar no sangue nos parâmetros normais. Com o tempo, as células beta têm menos capacidade de responder às alterações dos níveis de glicose no sangue, levando a uma escassez de insulina que impede o corpo de reduzir eficazmente os níveis de açúcar no sangue (figura 1.15). Os principais fatores de risco são a obesidade, o sedentarismo, a alimentação inadequada e a predisposição genética (Viegas, 2017; Westman, 2021).

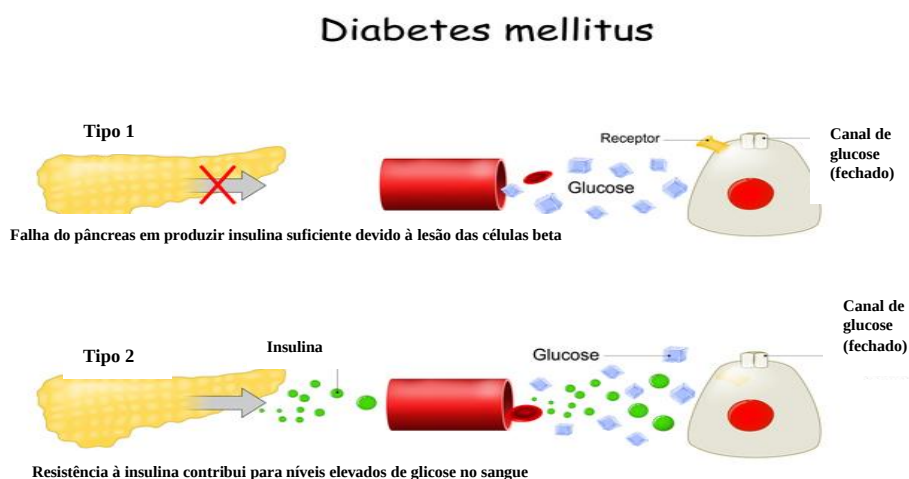


Figura 1.15- Comparação entre a diabetes tipo 1 e tipo 2 (Painscale,2022)

- ❖ **Diabetes gestacional-** Caracteriza-se pela elevação dos níveis de glucose no sangue durante a gravidez. Afeta 2 a 10% das grávidas. A diabetes gestacional pode ocorrer em qualquer fase da gravidez, mas é mais frequente a partir da 24^a semana de gestação. Durante a gravidez, as hormonas libertadas pela placenta como o lactógeno placentário, a progesterona, o cortisol, a prolactina e a hormona de crescimento ajudam no desenvolvimento do bebé, garantindo que o feto tenha um fornecimento adequado de glicose. No entanto, estas hormonas também bloqueiam a ação da insulina, tornando-a menos eficaz (Tracy *et al.*, 2005).

A insulina é uma hormona de carácter proteico composta por duas cadeias: uma cadeia A (21 aminoácidos) e uma cadeia B (30 aminoácidos), que estão ligadas entre si por pontes de diissulfureto. Esta hormona atua no tecido hepático, muscular e adiposo e tem a função de regular o transporte da glicose do sangue para o interior das células, por difusão facilitada através do transportador GLUT4, para que esta seja convertida em energia. No fígado, promove o armazenamento da glicose em forma de glicogénio, quando a taxa de glicose no sangue é elevada. Também é essencial no metabolismo dos açúcares, na síntese das proteínas e no armazenamento de lípidos (Huang & Czeck, 2007; Joshi *et al.*, 2007; Mane *et al.*, 2012).

A persistência de hiperglicemia induz a glicosilação não enzimática de proteínas, lípidios e de ácidos nucleicos, promovendo assim a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) e o desenvolvimento de complicações diabéticas, tais como a retinopatia, nefropatia, acidente vascular cerebral (AVC), angiopatia, doenças cardiovasculares, entre outros (Spínola *et al.*, 2020).

Neste contexto, uma das estratégias terapêuticas utilizadas para reduzir a hiperglicemia pós-prandial consiste na inibição de algumas enzimas digestivas, nomeadamente da α -amilase e da α -glucosidase, para diminuir a digestão e a absorção de hidratos de carbono no trato gastrointestinal após a refeição. A alfa-amilase (figura 1.16) é uma metaloenzima que contém o ião Ca^{2+} no seu centro ativo e que é responsável pela digestão do amido em humanos. Catalisa a hidrólise das ligações α -1,4-glicosídicas, convertendo o amido em maltose e em oligossacáridos. A α -amilase existe na saliva (amilase salivar) sendo também secretada pelo pâncreas (amilase pancreática). A α -glucosidase (figura 1.16), localizada no epitélio do intestino delgado catalisa a etapa final do processo digestivo dos carboidratos. Quebras as ligações α -1,4- glicosídicas dos oligossacáridos e dissacáridos (maltose e sacarose), convertendo-os em monossacáridos que são absorvidos e transportados para a corrente sanguínea (Tundis *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2019).

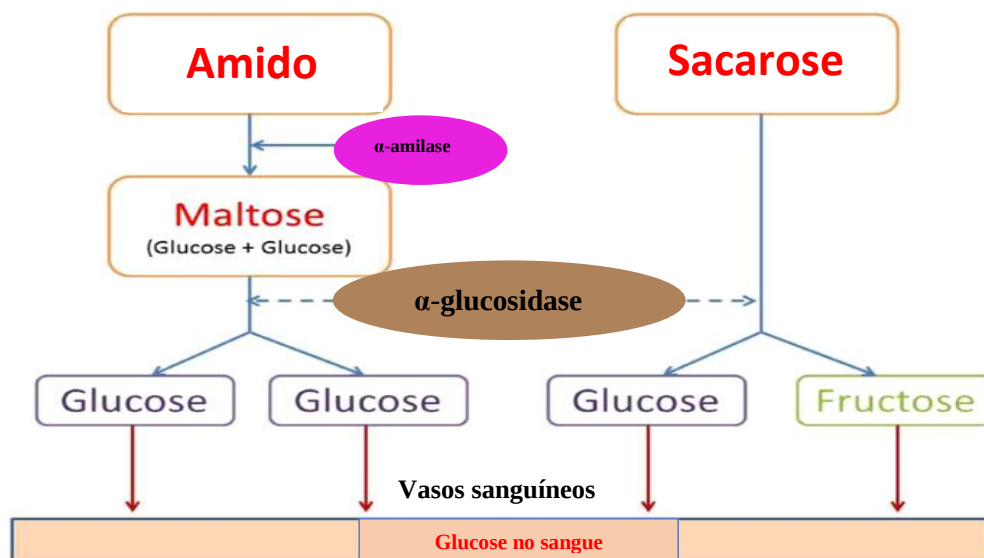


Figura 1.16 - Digestão dos hidratos de carbono catalisada pelas enzimas α -amilase e α -glucosidase (Yang *et al.*, 2019)

Atualmente, existem fármacos como a acarbose e o miglitol que são capazes de inibir a atividade das enzimas digestivas para controlar os níveis de açúcar no sangue e a obesidade. No entanto, segundo alguns dados clínicos, esses medicamentos podem causar efeitos adversos (dor abdominal, flatulência, diarreia e hepatotoxicidade), devido ao aumento da concentração de amido não digerido e de lípidos no cólon (Spínola & Castilho, 2017).

O consumo regular de vegetais está associado ao menor risco de desenvolvimento de *Dm* tipo 2, graças à presença de compostos fenólicos e de outros grupos fitoquímicos (saponinas, terpenóides, esteroides, polissacáridos) que são capazes de manter a homeostase da glicose. A fitoterapia é uma alternativa segura, barata e produz menos efeitos colaterais ao organismo que as terapias convencionais usadas no tratamento da diabetes (Arulselvan *et al.*, 2014; Tiwari *et al.*, 2013).

Num estudo realizado por Spínola *et al.* (2020), foi feita a análise *in vitro* da atividade antidiabética de extratos metanólicos da *Rumex madeirensis*. Foi possível constatar pelos autores que os extratos analisados exibiram atividades inibitórias significativas das enzimas α -amilase e α -glucosidase. Em outra pesquisa científica efetuada por Nickavar & Yousefian (2010) analisou-se a capacidade de inibição da α -amilase de 4 espécies de *Allium* (*Allium akaka* Gmel, *A. sativum*, *A. porrum* L. e *A. cepa*) e verificou-se que todas as espécies foram capazes de inibir a atividade desta enzima, apresentando os valores de IC₅₀ de 16,74, 17,95, 15,73 e 16,36 mg/mL, respetivamente.

1.4- Stress Oxidativo

As células sob condições aeróbias estão sujeitas aos efeitos paradoxais do oxigénio. Isto porque o oxigénio para além de ser crucial para os organismos aeróbios, pode ser extremamente

danoso a nível celular. Em condições fisiológicas, o oxigénio é o aceitador final de eletrões da fosforilação oxidativa, indispensável para síntese do trifosfato de adenosina (ATP). No entanto, para que ocorra a produção de energia, a molécula de O₂ sofre uma redução tetravalente, ou seja, recebe 4 eletrões na sua última camada de valência, gerando compostos intermediários instáveis denominados de espécies reativas de oxigénio (ROS) (Ferreira & Matsubara, 1997). Outros processos metabólicos como a atividade da xantina oxidase, ciclooxigenases ou lipoxigenases ou a exposição ambiental a determinados metais, pesticidas, substâncias do fumo do cigarro, entre outros, pode levar também à formação de ROS (Rasteiro, 2012).

As ROS são conhecidas por desempenharem um papel multifacetado, uma vez que podem ser prejudiciais ou benéficas para os seres vivos. Em concentrações baixas/moderadas, os efeitos benéficos ocorrem em diversos processos fisiológicos, nomeadamente na defesa contra agentes infecciosos, na regulação de sistemas de sinalização celular e na indução de uma resposta mitogénica (Barreiros *et al.*, 2006; Ferreira & Abreu, 2007). No entanto, quando há uma superprodução destas substâncias, estas passam atacar componentes celulares como proteínas, lípidos e ácidos nucleicos por reações de oxidação, ocasionando diversas alterações a nível celular como modificações nas proteínas e carboidratos, peroxidação lipídica e fragmentação do ácido desoxirribonucleico (DNA), levando as células à morte. (figura 1.17) (Luz *et al.*, 2011).

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos culminou no desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante, com objetivo de limitar os níveis intracelulares de tais espécies reativas e controlar a ocorrência de danos decorrentes (Bianchi & Antunes, 1999). O balanceamento entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes é que vai determinar como o processo se comportará no organismo: se o sistema antioxidante agir de forma eficiente e a produção de ROS se mantiverem nos níveis fisiologicamente controláveis, a homeostase é mantida. Porém, se a produção de ROS for muito elevada e o sistema de defesa for ineficiente, o sistema entra em desequilíbrio e ocorre o stress oxidativo (Vertuani *et al.*, 2004).

O stress oxidativo pode ter causas naturais, como o que ocorre em situações de exercício físico extremo, ou em processos de inflamação; mas pode também ter causas não naturais, podendo resultar da presença de xenobióticos no organismo ou de situações relacionadas com várias doenças. Segundo algumas pesquisas, o stress oxidativo está relacionado com envelhecimento precoce, desenvolvimento de vários tipos de cancro, diabetes, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (ex. Alzheimer) (Halliwell, 1996; Valko *et al.*, 2007).

Por essa razão, a manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes é uma condição essencial para o funcionamento normal e estável do organismo.

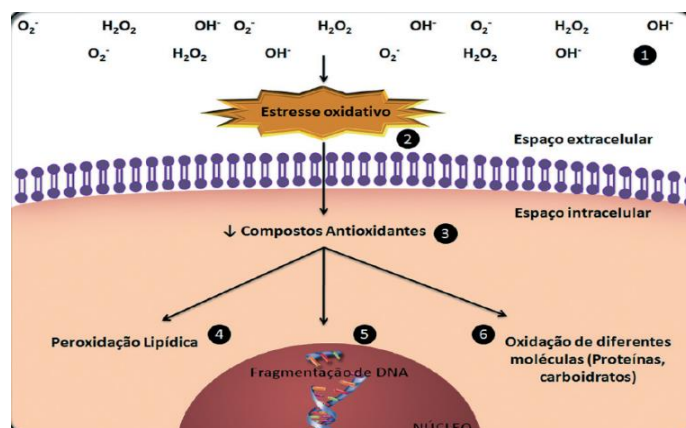


Figura 1.17 - Superprodução de ROS (1) ocasionando stress oxidativo (2) devido à redução dos compostos antioxidantes intracelulares (3) promovendo diversas alterações: peroxidação lipídica (4), fragmentação do DNA (5) e oxidação de diferentes moléculas (Luz *et al.*, 2011)

1.5-Oxidação Lipídica

Atualmente, as reações de oxidação das gorduras insaturadas no organismo humano têm sido associadas a diversas patologias. Por outro lado, a ingestão de alimentos que contêm produtos da oxidação lipídica também constitui um risco toxicológico para o ser humano. A oxidação dos ácidos gordos insaturados pode acontecer por diferentes vias, uma vez que varia em função do meio e dos agentes catalisadores.

1.5.1-Foto-oxidação

O mecanismo da foto-oxidação das gorduras insaturadas é impulsionado essencialmente pela radiação UV na presença de moléculas fotossensibilizadoras (clorofila, mioglobina, riboflavina, entre outras) que absorvem a energia luminosa de comprimento de onda na faixa do visível. Quando os óleos são expostos à radiação solar, ocorrerá foto-oxidação nos óleos brutos e refinados (Lee, 2003). Se o comprimento de onda da luz solar for inferior a 220 nm, os ácidos gordos insaturados não podem absorver a luz, mas durante a foto-oxidação, as moléculas sensibilizadoras absorvem a energia da luz e convertem o sensibilizador de estado tripleto em sensibilizador de estado singleto (Lee *et al.*, 2004). A luz fluorescente é emitida por estas moléculas e para formar os radicais, existem dois mecanismos possíveis: por excitação dos lípidos (foto-oxidação do tipo I) ou por excitação do oxigénio (foto-oxidação do tipo II) (Ahmed *et al.*, 2016, Romani *et al.*, 2017).

A foto-oxidação do tipo I é caracterizada pela transferência de um átomo de hidrogénio ou de eletrões entre um sensibilizador tripleto excitado e o substrato lipídico, formando uma mistura complexa de radicais livres e de sensibilizador singleto. Estes também podem reagir com o oxigénio tripleto ($^3\text{O}_2$), produzindo hidroperóxidos e a autooxidação pode prosseguir (figura

1.18). Na foto-oxidação do tipo II, o sensibilizador no estado tripleto reage com oxigénio tripleto para gerar o oxigénio singleto ($^1\text{O}_2$). O oxigénio singleto é significativamente mais reativo que o oxigénio tripleto e reage posteriormente com as ligações duplas dos lípidos insaturados, originando os hidroperóxidos (figura 1.18) (Ahmed *et al.*, 2016).

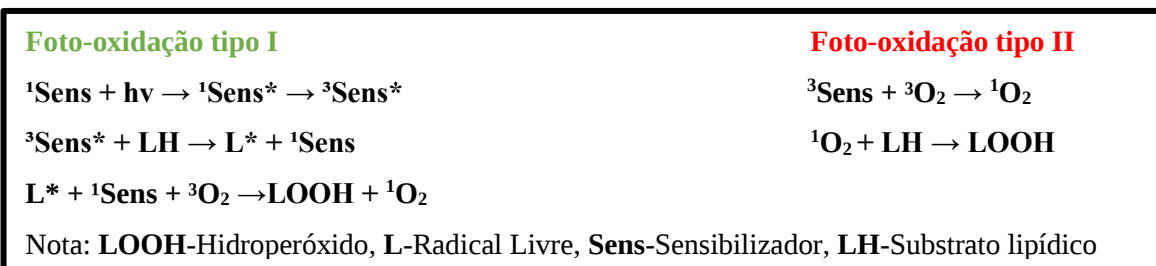


Figura 1.18- Mecanismo de foto-oxidação (Adaptado de Ahmed *et al.*, 2016)

1.5.2-Oxidação Enzimática

A oxidação por via enzimática ocorre pela ação das lipoxigenases que atuam sobre os ácidos gordos polinsaturados, catalisando a incorporação de oxigénio na cadeia hidrocarbonada polinsaturada. O resultado é a formação de peróxidos e de hidroperóxidos com duplas ligações conjugadas que podem envolver-se em diferentes reações degradativas e formar aldeídos e cetonas (Silva *et al.*, 1999).

1.5.3-Peroxidação lipídica

Os radicais livres são espécies extremamente reativas e instáveis que possuem eletrões desemparelhados na camada eletrónica de valência e que têm um tempo de vida muito curto. Nos processos biológicos, tais como a sinalização intracelular e produção de energia, há formação de uma variedade de radicais livres como (Lima & Abdalla, 2001; Zeb, 2020):

- ❖ ROS- (Anião superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), radical hidroxilo ($\text{OH}^{\bullet}$), radical peroxilo ($\text{ROO}^{\bullet}$)
- ❖ Radicais de carbono (radical triclorometilo ($\text{CCl}_3^{\bullet}$))
- ❖ Radicais de azoto (radical fenildiazina ($\text{C}_6\text{H}_5\text{N}=\text{N}^{\bullet}$), radical óxido nítrico ($\text{NO}^{\bullet}$), radical dióxido de azoto ($\text{NO}_2^{\bullet}$), radical catião nitrosilo ($\text{O}=\text{NH}_2^+$))
- ❖ Radicais de enxofre (radical tiol ($\text{RS}^{\bullet}$)).

As moléculas mais vulneráveis à ação dos radicais livres são os ácidos gordos polinsaturados dos fosfolípidos da membrana celular, devido à presença de ligações duplas que geram um enfraquecimento da ligação do hidrogénio alílico. Estas moléculas sofrem um processo denominado de peroxidação lipídica por ação das ROS, que consequentemente provoca alterações na fluidez e na permeabilidade da membrana celular (Belló, 2002).

A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação é constituída por três fases (figura 1.19) (Ramalho & Jorge, 2006):

- ❖ **Iniciação**- Ocorre a formação dos radicais livres de ácidos gordos insaturados ($R^\bullet$), devido à perda de um átomo de hidrogénio do carbono alílico da molécula;
- ❖ **Propagação**- Os radicais livres reagem com o O_2 , ocorrendo a síntese de radicais peróxilo ($ROO^\bullet$). Estes radicais induzem as reações de oxidação em cadeia, pois podem reagir com outros ácidos gordos insaturados, gerando o peróxido lipídico ($ROOH$) e outra espécie reativa ($R^\bullet$);
- ❖ **Terminação**- A peroxidação lipídica termina quando há reação entre duas espécies reativas, formando produtos termodinamicamente estáveis.

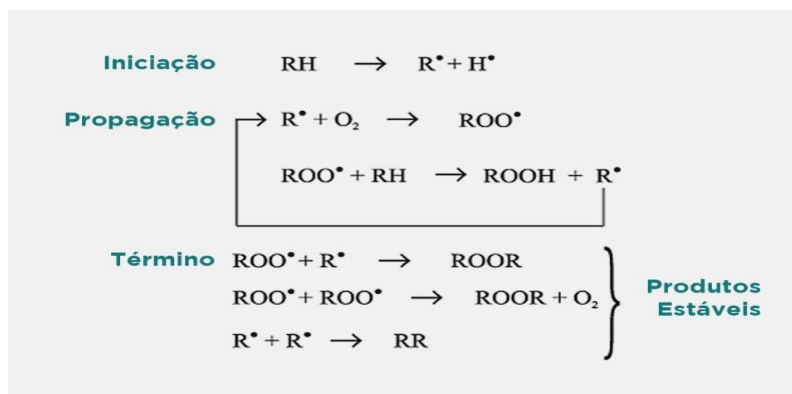


Figura 1.19- Mecanismo da oxidação lipídica (Adaptado Ramalho & Jorge, 2006)

Os peróxidos formados na peroxidação lipídica podem reagir com os metais de transição e originar aldeídos e epóxidos, substâncias que podem provocar danos irreversíveis no DNA originando o aparecimento de mutações, aberrações cromossômicas e, eventualmente, do cancro (Keller *et al.*, 2015). Um dos marcadores de stress oxidativo em sistemas vivos e de oxidação lipídica nos alimentos é o malondialdeído (MDA), um dialdeído de três carbonos, com grupos carbonilas nos carbonos C_1 e C_3 que constitui um dos principais produtos da decomposição dos hidroperóxidos dos ácidos gordos polinsaturados formados durante o processo oxidativo. A concentração de MDA, doseada nos fluídos biológicos (marcador de oxidação em sistemas vivos) ou em alimentos (marcador de oxidação lipídica em alimentos) permite estimar a intensidade da lipoperoxidação. No entanto, alguns estudos indicam que este composto é cancerígeno e mutagénico (St. Angelo *et al.*, 1996; W'sowicz *et al.*, 2004).

Os iões metálicos (ferro e cobre) também agem como pró-oxidantes, pois catalisam a formação de espécies reativas de oxigénio através das reações de Fenton e de Haber-Weiss e inibem a atividade das enzimas que participam no sistema antioxidante celular (figura 1.20). Na reação de Fenton, o Fe^{2+}/Cu^+ é oxidado a Fe^{3+}/Cu^{2+} na presença de hidroperóxidos, produzindo um radical hidroxilo e um ião hidroxilo como produtos de reação, enquanto na reação de Haber-Weiss, participam indiretamente na reação de formação do radical hidroxilo (Barbosa *et al.*, 2010).

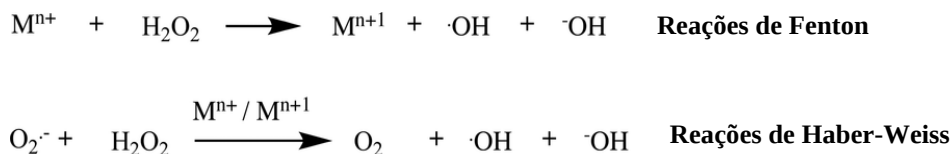


Figura 1.20 - Esquema reacional das reações de Fenton e Haber-Weiss (Wang *et al.*, 2010)

1.5.4-Rancidez nos alimentos

A peroxidação lipídica ou auto-oxidação dos alimentos é responsável pelo desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis, perdas no valor nutricional e, conforme já referido, pela formação de compostos potencialmente tóxicos (Tao, 2015). Para além disso, pode desencadear o branqueamento dos alimentos, devido à reação entre os pigmentos, especialmente os carotenoides, e os radicais livres.

A rancidez é um processo resultante da deterioração dos alimentos ricos em gordura, que origina alterações indesejáveis na cor, sabor (*off-flavours*), aroma (*off-odor*) e na consistência, levando à rejeição do produto pelos consumidores. Envolve uma série de reações químicas complexas e constitui um grande problema na indústria alimentar (Robards *et al.*, 1988).

Uma das consequências da rancidez é a formação de aldeídos, compostos químicos responsáveis pela produção de *off-flavours*. Um dos exemplos de *off-flavours* são os sabores de feijão cru, que se desenvolvem geralmente em óleo de soja, os sabores de peixe, que se desenvolvem no óleo de peixe, e os sabores cremosos ou metálicos, que podem desenvolver-se na gordura do leite (Wankenne, 2014). A rancidez pode ocorrer por diversas formas (Gaspar, 2006; Wankenne, 2014):

- ❖ **Rancidez oxidativa**, causada pela autooxidação dos triglicéridos com os ácidos gordos insaturados na presença de oxigénio, sendo o processo mais comum que leva à deterioração lipídica. Um dos principais fatores que favorecem a rancidez oxidativa são:
 - **Presença de O₂**– A rancidez oxidativa não ocorre em condições anaeróbicas;
 - **Temperatura**- Quanto maior for a temperatura, maior é a velocidade de reação.
 - **Composição lipídica**- O tipo de ácido gordo e o grau de saturação influenciam significativamente no processo de oxidação. Por exemplo, os ácidos linoleico e linolénico oxidam-se 64 a 100 vezes mais do que o ácido oleico.
 - **Exposição da luz**- Acelera as reações de oxidação;

- **Catalisadores-** A presença de metais pró-oxidantes favorece as reações de oxidação;
- **Atividade da água-** Aumenta a atividade catalítica dos metais e, por isso, aumenta o risco de oxidação.
- ❖ **Rancidez hidrolítica**, causada pela hidrólise das ligações éster por lípases ou por agentes químicos na presença de humidade. As reações hidrolíticas podem ser minimizadas por: armazenamento dos alimentos em locais frescos, boas condições de transporte, empacotamento cuidadoso e boas condições de higiene;
- ❖ **Rancidez cetónica**, suscitada pela ação de fungos, como o *Eurotium amstelodami*, que degradam os triglicéridos na presença de pequenas quantidades de água e de oxigénio, originando ácidos gordos livres que posteriormente sofrem β - oxidação e onde há formação de metil cetonas e álcoois alifáticos. Ocorre normalmente nos cocos ralados.

Na indústria alimentar, deve ser feito o controlo dos parâmetros físicos (luz, temperatura, composição atmosférica, humidade) nas várias etapas de produção a fim de evitar a rancidez. Outra forma de bloquear estas reações, retardando a formação de compostos desagradáveis, consiste na adição de agentes antioxidantes aos géneros alimentícios (Gaspar, 2006).

1.6- Antioxidantes

Para evitar os danos causados pelo stress oxidativo, os organismos biológicos desenvolveram mecanismos de defesa para neutralizar a ação dos radicais livres. Os antioxidantes são compostos naturais ou sintéticos que têm a capacidade de proteger as células contra os efeitos causados pelos radicais livres produzidos pelo organismo. Nos alimentos, os antioxidantes são utilizados para retardar os processos oxidativos, responsáveis pelas alterações indesejáveis nas características organoléticas e no valor nutricional (Luzia & Jorge, 2009; Valenzuela *et al.*, 2003).

Os antioxidantes podem ser classificados de acordo com o seu mecanismo de ação como primários ou secundários. Os antioxidantes primários são substâncias químicas (ex: compostos fenólicos) que são capazes de inibir ou retardar as reações de oxidação por inativação dos radicais livres através da doação de átomos de hidrogénio ou da transferência de um único eletrão.

No primeiro caso, a reação consiste na retirada de um átomo de hidrogénio do antioxidante (AH) por parte dos radicais livres ($RO\bullet$ e $R\bullet$), formando produtos termodinamicamente estáveis ($ROOH$ e RH). O radical inerte formado (A^*) é posteriormente estabilizado por ressonância e não tem a capacidade de iniciar ou propagar as reações de oxidação em cadeia (figura 1.21A) (Ramalho & Jorge, 2006). Já no segundo caso, o antioxidante (A) providencia um eletrão ao radical livre ($R\bullet$), formando um anião estável (R^-) e um radical

catiónico inerte ($A^{\bullet+}$) (figura 1.21B). Nesse mecanismo, a energia de ionização do antioxidante é o fator mais importante na avaliação da ação antioxidante. Quanto menor for a energia de ionização, mais fácil é a retirada do eletrão na molécula (Zeb, 2020).

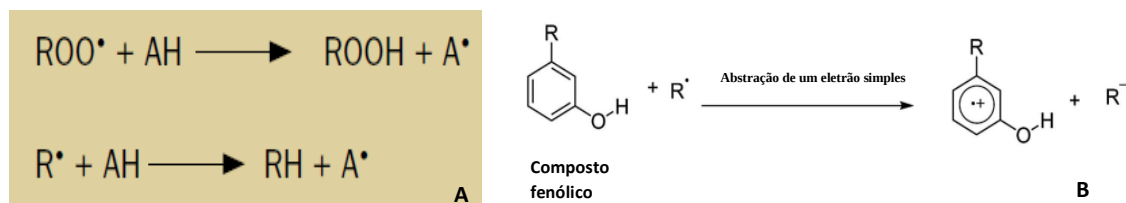


Figura 1.21 - Mecanismo de ação dos antioxidantes primários por: A) Transferência de átomo de hidrogénio (Adaptado de Ramalho & Jorge); B) Doação de um eletrão (Zeb, 2020)

Em relação aos antioxidantes secundários, eles retardam as reações de oxidação por diferentes mecanismos que incluem a sequestração do O_2 do meio, complexação com metais pró-oxidantes, absorção da radiação UV, aumento da atividade dos antioxidantes primários (sinergismo), decomposição dos hidroperóxidos para formar espécies não radiculares, inativação de enzimas oxidantes como a xantina oxidase, cicloxigenases, lipoxigenases, citocromos P450, entre outros (Cos *et al.*, 1998; Luzia & Jorge, 2009). Nos organismos biológicos, existem dois sistemas de defesa antioxidante para combater a produção excessiva de radicais livres: sistema enzimático e o sistema não enzimático. Os antioxidantes enzimáticos são em grande número e encontram-se espalhados em todo o organismo, tanto no meio intracelular como no meio extracelular. Neste sistema de defesas estão incluídas a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutatona peroxidase (GSH-Px), a glutatona redutase (GSH-R), entre outros (Ferreira & Abreu, 2007). Na tabela 1.5, encontram-se representadas as principais enzimas antioxidantes com sua ação biológica e sítio de ação. A SOD converte o radical anião superóxido em peróxido de hidrogénio que é de seguida transformado em água pela CAT nos lisossomas, ou pela GSH-Px nas mitocôndrias. Outra enzima importante é a GSH-R que regenera a glutatona (GSH) que é utilizada pela GSH-Px como doador de hidrogénio, necessário para a redução do peróxido de hidrogénio em água. Os lípidos hidroperóxidos podem ser transformados em álcoois (LOH) também pela GSH-Px. (Barbosa *et al.*, 2010; Oliveira & Schoffen, 2010).

Tabela 1.5 - Sistema enzimático antioxidante conforme sua reação biológica e seus sítios de ação (Adaptado de Oliveira & Schoffen, 2010)

Enzima (sigla)	Ação biológica	Localização
Superóxido dismutase (SOD)	Dismutação do radical anião superóxido em H_2O_2 , que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas	Abundante nas células aeróbias
Catalase (CAT)	Degrada o H_2O_2 originando água e oxigénio	Eritrócitos e baço, rins e fígado de mamíferos
Glutathione peroxidase (GSH-Px)	Catalisa a redução do H_2O_2 e de peróxidos orgânicos aos álcoois correspondentes à custa da conversão da forma reduzida da glutathione (GSH) para a forma oxidada (GSSG)	Citosol
Glutathione redutase (GSH-R)	Mantém o sistema de proteção celular integro através da redução da forma oxidada da glutathione (GSSG) para a forma reduzida (GSH)	Fígado e nódulos linfáticos

O sistema de defesa antioxidante não-enzimático inclui compostos antioxidantes de origem dietética como a glutathione (GSH), ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), carotenoides, flavonoides, minerais, entre outros. O potencial antioxidante *in vivo* dos compostos não-enzimáticos depende de algumas variáveis, como, por exemplo, a sua absorção e biodisponibilidade em condições fisiológicas, concentração plasmática ideal, tipos de radicais livres gerados no processo oxidativo e compartimento celular onde foram gerados (Ferreira & Abreu, 2007; Vizzotto *et al*, 2017).

O ácido ascórbico ou vitamina C pode reagir com o radical anião superóxido e outras espécies reativas radicalares ou não radicalares. Após doar um eletrão, a vitamina C pode se tornar num composto pró-oxidante, o radical ascorbilo, que na presença de ferro pode gerar o radical hidroxilo. Esta vitamina também atua como agente redutor, reduzindo metais como Fe^{3+} e Cu^{2+} presentes nos sítios ativos das enzimas ou nas formas livres no organismo e estimula o poder antioxidante da vitamina E e do selénio. Dentre todos os tocoferóis conhecidos, o α -tocoferol (vitamina E) tem sido considerado o biologicamente mais ativo, sendo o principal antioxidante lipossolúvel nas membranas celulares. Para além de impedir a formação de radicais de ácidos gordos insaturados, absorve os fotões emitidos pelo oxigénio singleto (Bianchi & Antunes, 1999, Rodrigo *et al.*, 2007). Os carotenoides e a vitamina A são agentes quelantes de algumas espécies reativas como radicais de azoto ($NO\bullet$, $NO_2\bullet$) e o radical hidroxilo ($OH\bullet$), inibindo a peroxidação lipídica. Fitoquímicos como as catequinas e óleos essenciais eliminam radicais livres, tais como o hidroxilo ($OH\bullet$) e peroxinitrito ($ONOOH\bullet$) e sequestram os metais pró-oxidantes (Vizzotto *et al*, 2017). O zinco é um mineral importante para a defesa antioxidante, sendo essencial para a funcionalidade e integridade das membranas, pois contribui para a proteção contra os efeitos de rutura de membranas causados pela oxidação de lípidos e proteínas, preservando também a integridade dos canais iónicos (Cruz & Soares, 2011).

O consumo de antioxidantes naturais, como os compostos fenólicos presentes na maioria das plantas tem sido associado a uma menor incidência de doenças relacionadas com o stress oxidativo (Silva *et al.*, 2010). Por exemplo, estudos *in vitro* e *in vivo* realizados com diferentes variedades de arroz mostraram potenciais efeitos benéficos para a saúde, como redução do stress oxidativo, auxílio na prevenção do cancro, doenças cardiovasculares e complicações da diabetes, entre outras doenças, relacionados com o teor de polifenóis presente no grão de cada variedade (Walter & Marchesan, 2011).

1.7-Metabolismo Secundário

As plantas produzem uma grande diversidade de produtos químicos que podem ser classificados como metabolitos primários e secundários. Os metabolitos primários são aqueles compostos que todas as plantas produzem e que estão diretamente envolvidos no crescimento e desenvolvimento. Neles estão incluídos os açúcares, aminoácidos, lípidos e nucleótidos assim como moléculas mais complexas, que são sintetizadas a partir deles, como, por exemplo, proteínas, polissacáridos ou ácidos nucleicos (García & Carril, 2011).

Os metabolitos secundários, pelo contrário, são compostos altamente específicos e desempenham um papel importante na evolução e na sobrevivência das plantas. Embora o metabolismo secundário não seja necessário para que a planta complete o seu ciclo de vida, ele desempenha um papel fundamental na interação das plantas com o meio ambiente (Cunha *et al.*, 2016). Fatores como, por exemplo, a presença de herbicidas e de agentes patogénicos, idade da planta, competição entre plantas, mudança de temperatura, exposição aos UV, índice de chuva, pH do solo ou a deficiência de nutrientes, são capazes de influenciar o teor de metabolitos secundários das plantas (figura 1.22) (Gobbo-Neto & Lopes, 2007).

Existem três grandes grupos de metabolitos secundários: terpenos, alcaloides e os compostos fenólicos. Os terpenos são metabolitos secundários derivados do isopreno (C_5H_8) e são componentes dos óleos essenciais. Conferem cheiro às plantas e são feitos a partir da via do ácido mevalónico (citoplasma) ou a partir da reação entre o piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto) (Felipe & Bicas, 2017; Resendes *et al.*, 2017). Os alcaloides são compostos de carácter básico, derivados das aminas, responsáveis pelo sabor amargo de muitas plantas e como princípio ativo de diversos medicamentos. São sintetizados a partir dos aminoácidos aromáticos pela via do ácido chiquímico (Heinrich *et al.*, 2021; Resendes *et al.*, 2017). Por último, os compostos fenólicos que são produzidos pela via do ácido chiquímico ou pela via do acetato-malonato (Randhir *et al.*, 2004).

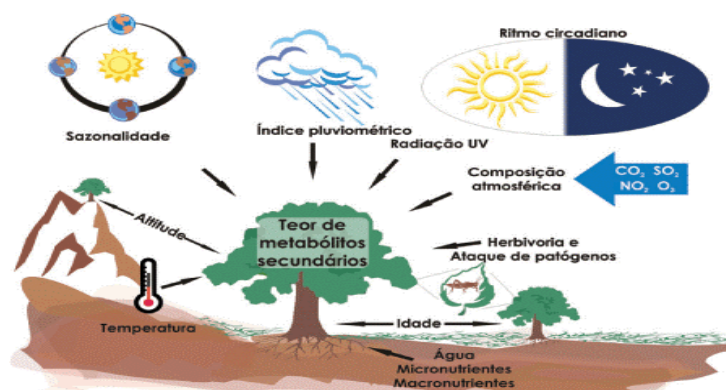


Figura 1.22 - Principais fatores que podem influenciar a acumulação de metabólitos secundários nas plantas (Gobbo-Neto & Lopes, 2007)

1.8-Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são uma classe diversificada de metabólitos secundários provenientes do catabolismo dos aminoácidos. Quimicamente, são substâncias que possuem na sua estrutura pelo menos um anel aromático ligado covalentemente a um ou mais grupos hidroxilo (-OH) (Baião *et al.*, 2017). Estão amplamente distribuídos no reino Plantae e podem existir na forma livre ou conjugados com proteínas e açúcares (De Vargas & Andrade, 2022).

Os compostos fenólicos agem como uma barreira de proteção nas plantas contra o stress oxidativo, radiação UV, predadores e agentes patogénicos (Naczki & Shahidi, 2004). São responsáveis também pelas características organolépticas (cor, adstringência, aroma) e estabilidade oxidativa nos alimentos (Ângelo & Jorge, 2007; Soares, 2002). Podem ser encontrados em diversos géneros alimentícios de origem vegetal, como, por exemplo, frutas e seus derivados como sumo, vinho, café e chá. Por serem compostos aromáticos, apresentam intensa absorção na região do UV, são facilmente oxidáveis, tanto através de enzimas vegetais específicas, como a polifenoloxidase, como por influência de metais (como ferro e manganês), da luz e do calor, promovendo assim o escurecimento de frutas e vegetais (Verruck *et al.*, 2018; Vitti *et al.*, 2019).

Vários estudos relatam que, este grupo de fitoquímicos, possui diversas propriedades bioativas, tais como atividade antimicrobiana, antioxidante, anticancerígena, anti-inflamatória e antidiabética, para além de influenciarem a composição microbiota intestinal (de Moraes Arnoso *et al.*, 2019, Kumar & Goel, 2019; Veggi, 2013).

As atividades biológicas dos compostos fenólicos dependem do seu comportamento no trato gastrointestinal. Estes compostos possuem biodisponibilidade limitada, podendo ser amplamente metabolizados. No entanto, apesar do organismo só absorver alguma parte dessas substâncias, é constatado que essas pequenas quantidades podem ser suficientes para exercer efeitos benéficos para a saúde humana (Williamson & Manach, 2005). A biodisponibilidade representa a porção de um composto que é absorvida pelo organismo e utilizada para as necessidades fisiológicas e metabólicas (Wells *et al.*, 2016). A biodisponibilidade de uma

substância depende das suas características como a solubilidade, permeabilidade, estabilidade no trato gastrointestinal e sua biotransformação (Ratnam *et al.*, 2006).

A biodisponibilidade dos diferentes grupos fenólicos difere entre si, e aqueles que existem em maiores quantidades não são necessariamente aqueles com maior disponibilidade. Durante a digestão, os polifenóis podem associar-se com outros constituintes dos alimentos tais como açúcares, lípidos, proteínas e fibras, podendo esta associação influenciar positivamente ou negativamente a sua biodisponibilidade (Rtibi *et al.*, 2017). Os compostos fenólicos mais simples, como o ácido gálico e as isoflavonas, parecerem ser mais facilmente absorvidos, enquanto os compostos fenólicos mais complexos podem ter uma absorção mais limitada (Viskupiřová *et al.*, 2008).

1.8.1- Classificação dos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos podem ser classificados de acordo com a sua estrutura química como apresentado na tabela 1.6, em que o C₆ representa o anel benzoico e o C_x representa a cadeia substituinte com X átomos de carbono. Também podem ser classificados em dois grupos: flavonóides e não-flavonóides (Verruck *et al.*, 2018).

Tabela 1.6 - Classe de compostos fenólicos de acordo com sua estrutura química (Ângelo & Jorge, 2007)

Classe	Estrutura
Fenólicos simples, benzoquinonas	C ₆
Ácidos hidroxibenzoicos	C ₆ -C ₁
Acetofenol, ácidos fenilacéticos	C ₆ -C ₂
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	C ₆ -C ₃
Nafitoquinonas	C ₆ -C ₄
Xantonas	C ₆ -C ₁ -C ₆
Estilbenos, antoquinonas	C ₆ -C ₂ -C ₆
Flavonóides, isoflavonóides	C ₆ -C ₃ -C ₆
Lignananas, neolignananas	(C ₆ -C ₃) ₂
Biflavonóides	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂
Ligninas	(C ₆ -C ₃) _n
Taninos condensados	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n

1.8.1.1- Flavonoides

Os flavonoides são os compostos mais diversificados no reino vegetal. Têm baixo peso molecular e possuem uma estrutura básica formada por 15 carbonos organizados na configuração C₆-C₃-C₆, denominado de núcleo *flavillium*. O núcleo *flavillium* consiste em dois anéis benzoicos (A e B) ligados a um anel pirânico heterocíclico (C) (figura 1.23). A classificação dos flavonoides

baseia-se nas modificações existentes no anel C, nomeadamente no seu estado de oxidação (Almeida, 2017):

- ❖ **Anel C-Pirona:** Estrutura base das leucoantocianinas e antocianinas. É denominado de núcleo flavana;
- ❖ **Anel C-Pirano:** Estrutura base das flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas e chalconas. É designada de núcleo 4-oxo-flavonoide.

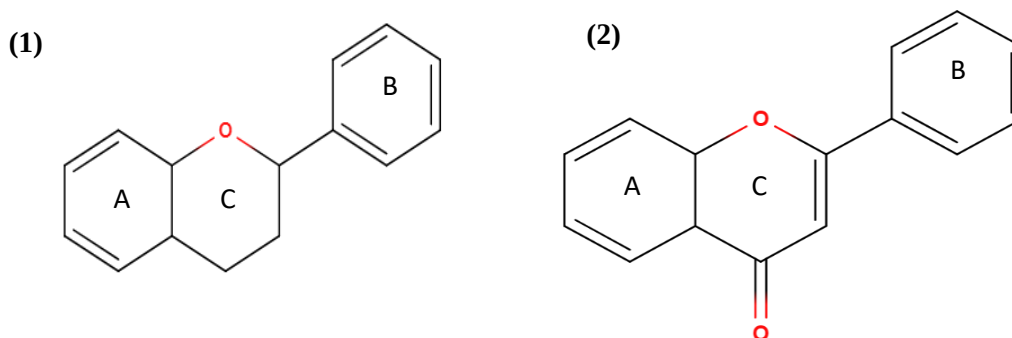
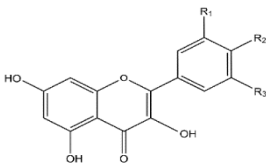
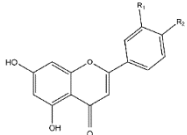
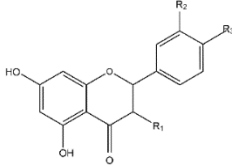
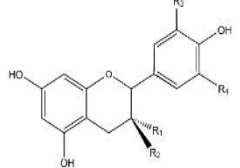
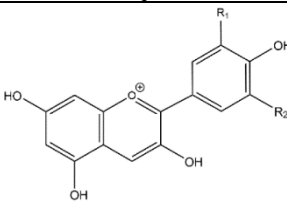
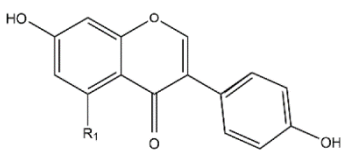


Figura 1.23- Estrutura básica dos flavonoides: (1)- Núcleo flavana; (2)- Núcleo 4-oxo-flavonoide

Substituições nos anéis A e B também originam diferentes compostos dentro de cada classe de flavonoides. Estas substituições podem incluir reações de oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação e sulfonação (Ângelo & Jorge, 2007). Os flavonoides quando estão ligados a pelo menos um açúcar são denominados de glicosídeos, mas, no caso de não haver nenhum açúcar presente, a denominação dos mesmos é de agliconas. Na dieta humana é, usualmente, sob a forma de β -glicosídeos que os flavonoides se encontram presentes (Hollman, 2004). Na tabela 1.7, encontram-se os principais tipos de flavonoides da dieta humana.

Grande parte dos flavonoides apresentam coloração amarela e avermelhada. Isto deve-se aos cromóforos conjugados presentes nas moléculas, que são responsáveis pela variação de cores das flores, sementes e frutos. Os alimentos ricos em flavonoides protegem os seres vivos contra processos oxidativos, nomeadamente da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), através da redução de radicais livres, quelação de iões metálicos e regeneração de outros antioxidantes como o α -tocoferol (vitamina E). Os flavonoides também conferem proteção contra inflamações, úlceras, viroses, formação de tumores e doenças associadas ao envelhecimento (Saigg & Silva, 2009; Sousa *et al.*, 2007).

Tabela 1.7 -Subclasses dos flavonoides, estrutura química e exemplo de alimentos onde cada subclasse pode ser encontrada (Campos, 2021)

Subclasse	Estrutura química	Exemplo de alimentos onde podem ser encontrados
<u>Flavonóis</u>	 R₁= OH; R₂= OH; R₃= H: Quercetina R₁= H; R₂= OH; R₃= H: Kaempferol R₁= OH; R₂= OH; R₃= OH: Miricetina	
<u>Flavonas</u>	 R₁= H; R₂= OH: Apigenina R₁= OH; R₂= OH: Luteolina	
<u>Flavanonas</u>	 R₁= H; R₂= H; R₃= OH: Naringenina R₁= OH; R₂= OH; R₃= OCH₃: Hesperetina	
<u>Flavan-3-óis</u>	 R₁= H; R₂= OH; R₃= H; R₄= OH: Catequina R₁= OH; R₂= H; R₃= H; R₄= OH: Epicatequina R₁= H; R₂= OH; R₃= OH; R₄= OH: Galocatequina	
<u>Antocianinas</u>	 R₁= OH; R₂= H: Cianidina R₁= H; R₂= H: Pelargonidina R₁= OCH₃; R₂= H: Peonidina R₁= OH; R₂= OH: Delfinidina R₁= OCH₃; R₂= OCH₃: Malvidina R₁= OCH₃; R₂= OH: Petunidina	
<u>Isoflavonas</u>	 R₁= H: Daidzeína R₁= OH: Genisteína	

1.8.1.1.1- Flavonóis

Das subclasses dos flavonoides, os flavonóis são os que mais existem em maior quantidade nas plantas juntamente com as flavonas, ocorrendo mais comumente na forma glicosilada. As principais moléculas representativas deste grupo são a miricetina, o kaempferol e a quercetina (Carocho & Ferreira, 2013). Eles estão presentes em uma variedade de alimentos, incluindo frutas e vegetais (Carocho & Ferreira, 2013).

Estudos realizados recentemente têm revelado os benefícios na ingestão de alimentos ricos em flavonóis, sendo referidas as suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas, antidiabéticas e antivirais contra, por exemplo, o SARS-COV-2 (Durazzo *et al.*, 2019; Mouffouk *et al.*, 2021).

1.8.1.1.2- Flavonas

As flavonas, menos abundantes que os flavonóis em frutas e vegetais, são constituídas principalmente por glicosídeos de luteolina e apigenina, sendo encontradas com maior abundância na salsa e no aipo, encontrando-se também em frutas e bebidas derivadas de plantas (infusões, chá, vinho, etc.). Estes compostos derivam diretamente das flavanonas por captação de dois átomos de hidrogénio e pela introdução de ligações duplas entre os carbonos 2 e 3 (Heim *et al.*, 2002).

Nos vegetais, elas desempenham ação protetora e de comunicação, protegendo contra as radiações UV, predadores e agentes patogénicos. Ensaio realizados em modelos animais e estudos de observação em humanos têm revelado, que estes compostos, possuem propriedades neuro-protetoras e anti-inflamatórias, podendo induzir apoptose em certos tipos de células cancerígenas (Salehi *et al.*, 2019a).

1.8.1.1.3- Flavanonas

As flavanonas são consideradas uma subclasse minoritária de flavonoides, uma vez que são exclusivas em frutas cítricas (laranja, tangerina, etc.) e seus derivados (Victor *et al.*, 2021). Elas são caracterizadas pela ausência de ligações duplas e de um centro quiral no anel C. As substâncias mais representativas desta classe são a naringenina e a hesperitina e suas formas glicosiladas correspondentes, naringina e hesperidina (Gattuso *et al.*, 2007).

Vários estudos *in vitro* e *in vivo* têm atribuído a estes fitoquímicos, efeitos antioxidantes, antitumorais, antivirais, antibacterianos, anti-inflamatórios e cardioprotetores. Por outro lado, ensaios em humanos revelaram que a atividade mais promissora da naringenina parece estar relacionada com a proteção contra doenças cardiovasculares, especialmente em pacientes já comprometidos (Salehi *et al.*, 2019b).

1.8.1.1.4- Flavan-3-óis

Os flavan-3-óis representam uma subclasse de flavonoides que existe na forma de monómeros (catequinas e epicatequinas), oligómeros ou polímeros (proantocianidinas ou taninos condensados). Ao contrário do que se verifica em muitos flavonoides, os flavan-3-óis não possuem uma ligação dupla entre os carbonos 2 e 3. As diferentes estruturas desta subclasse distinguem-se na configuração do anel C e na hidroxilação do anel B, podendo no mesmo existir um grupo hidroxilo (afzelequina, epiafzelequina), dois grupos hidroxilo (catequina, epicatequina) ou três grupos hidroxilo (galocatequina, epigallocatequina) (Panche *et al.*, 2016).

Os flavan-3-óis podem ser encontrados nos chás provenientes das folhas de *Camellia sinensis*, nos produtos à base de cacau, no feijão, na banana e no pistáchio (Fan *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017). São responsáveis pela adstringência e pelo sabor amargo nos alimentos. De acordo com Durazzo *et al.* (2019), o consumo frequente de flavan-3-óis tem sido relacionada com uma baixa incidência de doenças cardiovasculares e de cancro e com a redução do stress oxidativo.

1.8.1.1.5- Antocianinas

As antocianinas são um grupo de pigmentos vegetais hidrossolúveis derivados da antocianidinas. Estão amplamente distribuídas no reino vegetal e na maior parte das vezes estão associadas a moléculas de açúcares. Até ao momento, são conhecidas 20 antocianinas, mas apenas 6 delas são importantes na tecnologia alimentar: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina, que representam 95% das antocianinas presentes na natureza que se encontram distribuídas nos frutos silvestres como a framboesa, amora, mirtilos e morangos e em alguns legumes como a couve e a cebola (Mattioli *et al.*, 2020; Tsao, 2010).

A pigmentação das antocianinas encontradas em frutos, flores e de algumas folhas varia de diferentes tonalidades desde o vermelho, roxo a azul. Esta variação de cores depende do pH, sendo o vermelho predominante em condições ácidas e o azul em condições básicas. Outros fatores que também influenciam na coloração são a estrutura química, a luz e a temperatura, que condicionam a sua aplicação como corantes na indústria alimentar (Houghton *et al.*, 2021; Jamei & Babaloo, 2017).

A $\text{pH} < 3$, a forma predominante é o catião flavílico (AH^+) de cor vermelha. Com o aumento do pH em solução, ocorrem duas reações químicas: desprotonação do catião flavílico, levando à formação de base quinoidal (A) de cor violeta e hidratação do catião flavílico, responsável pela formação do hemiacetal (B), que por sua vez é incolor. A pH entre 7 e 8, a base quinoidal pode sofrer uma reação de ionização e dar origem à forma quinoidal aniónica, que por sua vez, possui uma cor azulada. A $\text{pH} > 8$, o hemiacetal pode sofrer uma reação de tautomerização, formando a cis-chalcona (C_c) de coloração amarelada e, por isomerização desta, a trans-chalcona (C_t) (figura 1.24). (Houghton *et al.*, 2021).

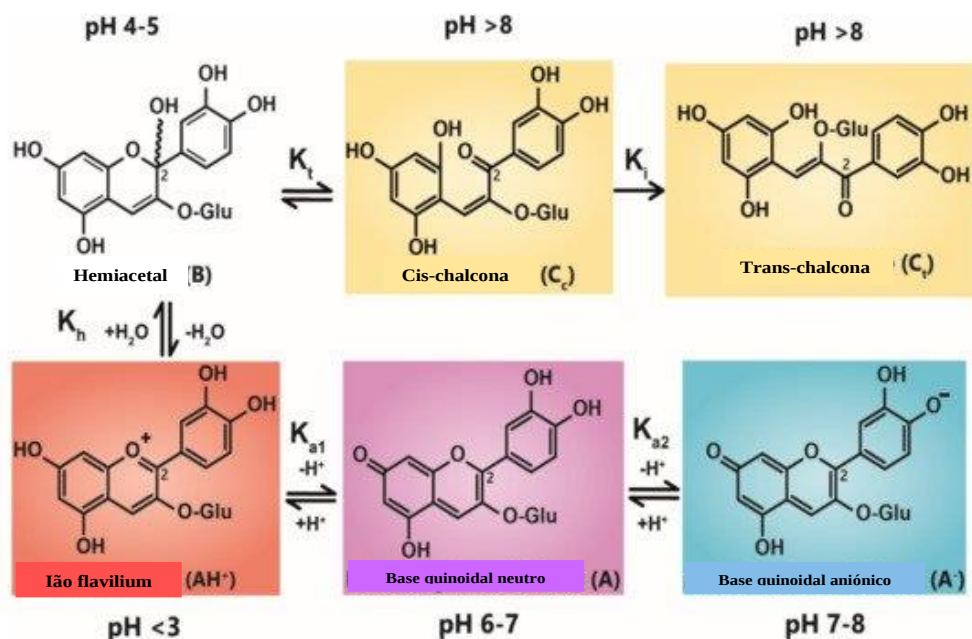


Figura 1.24 -Formas das antocianinas em equilíbrio, em solução aquosa, consoante o pH (Houghton *et al.*, 2021)

O pré-tratamento é um dos principais responsáveis pela perda das antocianinas nos alimentos, principalmente se ele é acompanhado da adição de sulfitos ou dióxido de enxofre. A adição destas substâncias resulta em uma descoloração rápida das antocianinas, que se tornam amareladas e, portanto, descaracterizadas (Degáspari & Waszczynskyj, 2004). Outros estudos relatam também que as antocianinas se degradam com o aumento da temperatura. A combinação de operações como calor, branqueamento, pasteurização e tempo reduz o teor de antocianinas de frutas e legumes. Segundo Volden *et al.* (2008), o branqueamento, fervura e cozimento, do repolho vermelho, resultou na perda de 59%, 41% e 29%, de antocianinas, respetivamente. Em outro estudo de Brownmiller *et al.* (2008), a combinação de temperaturas elevadas e de etapas de conservação como branqueamento (95°C por 3 min.) e pasteurização degradou 43% do total das antocianinas monoméricas dos mirtilos.

Além de contribuírem para a coloração de frutos e flores, as antocianinas também atuam como filtro das radiações ultravioletas das folhas. Quando consumidas na alimentação humana, as antocianinas desempenham diversas propriedades farmacológicas, como atividade antioxidante, anti-inflamatória, prevenção de doenças cardiovasculares e neurológicas, cancro e diabetes (Manach *et al.*, 2005; Soutinho, 2012).

1.8.1.1.6- Isoflavonas

Enquanto a maioria dos flavonoides tem o anel B ligado ao carbono 2 do anel C, as isoflavonas possuem a particularidade de terem o anel B ligado ao carbono 3 do anel C. As suas estruturas são similares ao estrogénio, podendo ligar-se aos recetores desta hormona (Tsao, 2010).

Por essa razão, são denominadas de fitoestrogénios e algumas publicações científicas comprovam que, ao serem introduzidas na alimentação humana, diminuem progressivamente os sintomas da menopausa como a secura vaginal e as ondas de calor (Chen *et al.*, 2019).

Os alimentos ricos em isoflavonas são as leguminosas, essencialmente a soja, onde se encontram os principais compostos desta subclasse, a genisteína e a daidzina, que existem predominantemente na forma de glicosídeos (como genistina e daidzina) (Cassidy *et al.*, 2000). Efeitos quimiopreventivos, mediados pela modulação de genes relacionados com o controlo de ciclo celular e apoptose, têm vindo a ser atribuídos à genisteína, parecendo, igualmente que este composto possa ser fundamental para prevenção da formação de tumores (Cui *et al.*, 2017).

1.8.1.1.7-Chalconas

As chalconas (figura 1.25) são compostos químicos pertencentes à família dos flavonoides. São caracterizados pela abertura do anel C, em que os outros dois anéis aromáticos são unidos por um sistema de cetona α , β - insaturada. As chalconas desempenham um papel importante na polinização, por proporcionar a coloração amarela nas flores, e são abundantemente encontradas em plantas das famílias Leguminosae, Compositae e Moraceae, bem como em frutas, chás, vinhos e outros produtos alimentares (Lima *et al.*, 2017).

As chalconas e seus derivados são substâncias de grande interesse no ponto de vista farmacológico e têm recebido uma grande atenção devido, sobretudo, a sua estrutura relativamente simples e diversidade de atividades farmacológicas que apresentam, dentre as quais podemos citar: atividade antioxidante, antimicrobiana, anticonvulsivante, anti-inflamatória e anticancerígena. As possibilidades de substituições dos anéis aromáticos das chalconas é o que permite as inúmeras atividades atribuídas (Ferreira *et al.*, 2018).

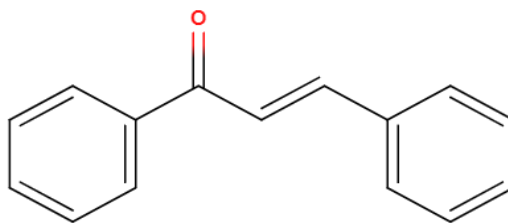


Figura 1.25- Estrutura química das chalconas

1.8.1.2- Estilbenos

Os estilbenos são diariletenos, ou seja, são hidrocarbonetos que possuem dois anéis aromáticos (A e B) ligados em cada extremidade por uma ligação dupla carbono-carbono. Apresentam uma estrutura química base C₆-C₂-C₆, em que o anel A geralmente possui dois grupos hidroxilo na posição meta, enquanto o anel B possui grupos hidroxilo e metóxi nas posições orto, meta e/ou para (figura 1.26) (Gonçalves, 2013; Soutinho, 2012).

R ₂	R ₃	R ₄	Estilbenos
H	H	H	pinosilvina
H	H	OH	resveratrol
OH	H	OH	hidroxiresveratrol
H	OH	OH	piceatanol
H	OH	OCH ₃	rapontigenina

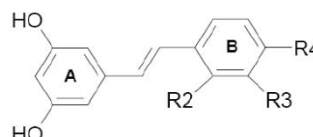


Figura 1.26- Estrutura química dos estilbenos (Soutinho, 2012)

O membro mais abundante desta família é o resveratrol, que pode ser encontrado nas uvas e no chocolate. O resveratrol é sintetizado naturalmente pela planta em resposta às agressões externas. Este composto possui dois isómeros geométricos: trans-resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) e cis-resveratrol (cis-3,5,4'-trihidroxiestilbeno). O isómero trans-resveratrol é convertido em cis-resveratrol (forma mais estável) na presença de luz UV (figura 1.27) (Vázquez *et al.*, 2022).

Nos alimentos, ele está presente em quantidades muito variáveis. No vinho tinto, por exemplo, a concentração reportada para o resveratrol foi 10,550 mg por 100 g de alimento (Goldberg *et al.*, 1996), enquanto no sumo de uva foi de apenas 0,041 mg por 100 g de alimento (Sautter *et al.*, 2005).

O resveratrol é conhecido pelas suas propriedades anti-inflamatórias, por inibir fatores pró-inflamatórios como a enzima ciclooxygenase 2 (COX-2). Também desempenha ação antioxidante, agindo na inibição da oxidação das LDL e contribui no tratamento das neoplasias atuando principalmente, no cancro do útero, ovários e colorretal (Gonçalves, 2013).

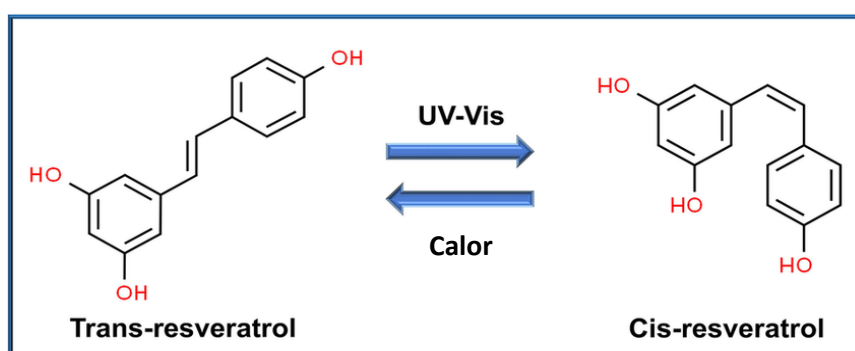


Figura 1.27 -Conversão do trans-revesratrol em cis-revesratrol (Vázquez *et al.*, 2022)

1.8.1.3-Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos são caracterizados por terem na sua estrutura molecular um anel aromático, um ácido carboxílico e um ou mais grupos hidroxilo (-OH) e/ou metóxi (R-O-CH₃), conferindo propriedades bioativas às plantas. São clivados por hidrólise ácida ou alcalina e, também por ação de enzimas (Almeida, 2017).

Os ácidos fenólicos são usados como conservantes nos alimentos (ex: ácido benzoico (E210)), devido ao seu carácter antibacteriano e antifúngico (Kumar & Goel, 2019). Por serem ácidos fracos, eles podem difundir-se na membrana celular das bactérias e alterar o pH do citoplasma, provocando consequentemente a morte celular (Hirshfield *et al.*, 2003). As propriedades bioativas dos ácidos fenólicos estão relacionadas com a quantidade e a posição (orto, meta, para) dos grupos hidroxilo. Estes compostos estão presentes na natureza na forma livre, sob a forma de ésteres ligados ao ácido tartárico ou a açúcares.

Os ácidos fenólicos podem ser derivados de:

- ❖ **Ácidos benzoicos (C₆-C₁)** - Ácido gálico, ácido salicílico, ácido vanílico, entre outros (figura 1.28).
- ❖ **Ácidos cinâmicos (C₆-C₃)** - Ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, ácido sinápico, entre outros. (figura 1.28).

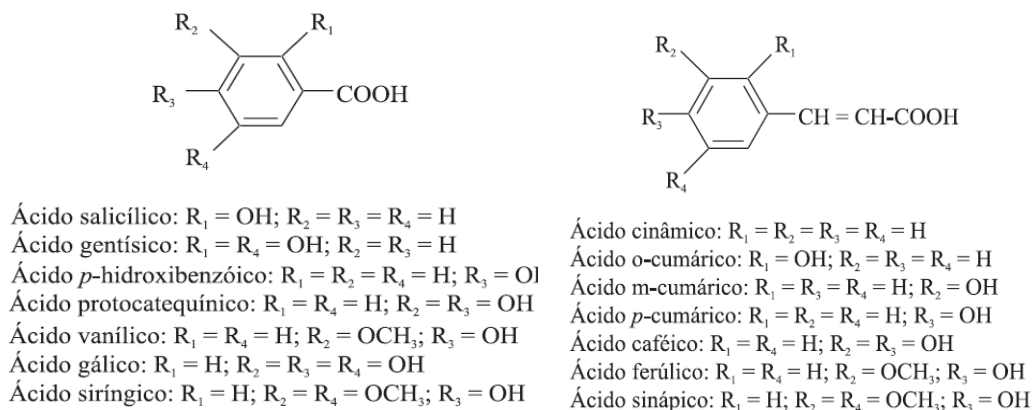


Figura 1.28 -Estrutura química dos ácidos fenólicos (Soares, 2002).

Os antioxidantes fenólicos funcionam como sequestradores de radicais e, algumas vezes, como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os derivados de ácidos hidroxicinâmicos apresentam maior efeito antioxidante do que os derivados de ácidos hidroxibenzóicos, devido à presença de uma dupla ligação na sua constituição, o que permite a estabilização dos radicais livres por ressonância (efeito mesomérico) (Degáspari & Waszczyński, 2004).

1.8.1.4-Taninos

Os taninos (figura 1.29) são uma classe de polifenóis com um peso molecular relativamente elevado (500 a 3000 Daltons) e estão presentes nas leguminosas e em frutas como as amoras, uvas e nozes. Podem ser divididos em dois subgrupos (Dias *et al.*, 2014; Naczk & Shahidi, 2004):

- ❖ **Taninos condensados**- São polímeros de catequina (flavan-3-ol) e/ou de epicatequina (flavan-3,4-diol), produtos do metabolismo secundário das plantas.
- ❖ **Taninos hidrolisáveis**- São ésteres de ácido gálico e ácido elágico ligados a uma molécula de glucose ou outro açúcar. Podem ser hidrolisadas na presença uma base, ácido ou de uma enzima. São denominados de protoantocianidas por produzirem um pigmento avermelhado da classe das antocianidinas.

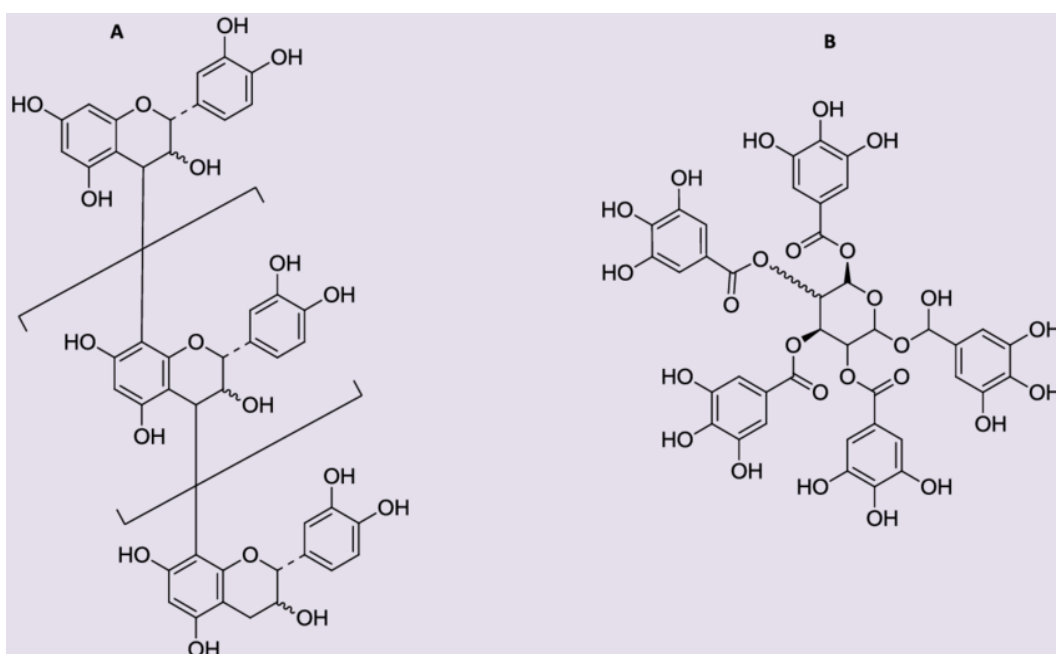


Figura 1.29 -Estruturas de taninos.: A) Tanino condensado; B) Tanino hidrolisável (Dias *et al.*, 2014)

A sensação de adstringência causada pelos vinhos, sumos de fruta, chás e outras bebidas está relacionada em grande parte com a presença de taninos, que provocam a precipitação de proteínas ricas em prolina que estão presentes na saliva, levando à perda temporária das propriedades lubrificantes (Lee *et al.*, 2012).

Ultimamente, os taninos têm gerado grande interesse, devido às suas propriedades farmacológicas. Um estudo epidemiológico recente realizado em Itália, no qual participaram 1294 indivíduos do sexo masculino, mostrou que o consumo de protoantocianidas estava inversamente associado ao risco de cancro da próstata (Praud *et al.*, 2018). Em outro estudo onde participaram 948 mulheres com idade superior a 75 anos, a ingestão de protoantocianidas foi associada a uma melhoria das funções renais (Ivey *et al.*, 2013). Os taninos também são considerados agentes

antimicrobianos potentes. Diferentes protoantocianidas isoladas dos caules de *Ephedra sinica* mostraram atividade antibacteriana tanto contra *Pseudomonas aeruginosa* (concentração mínima inibitória de 0,0835 mM) como contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (concentração mínima inibitória de 0,0817 mM) (Zang *et al.*, 2013).

1.8.1.5- Lignanas

As lignanas são polifenóis (figura 1.30) que compõem as estruturas celulares de plantas, sendo formadas pelo acoplamento de duas unidades fenilpropanoides (eugenol, álcool coniferil, isoeugenol, entre outros) (De Souza *et al.*, 2012). Encontram-se em castanhas, frutas, sementes e alguns vegetais crucíferos. Uma das maiores fontes conhecidas, no entanto, é a semente de linhaça (Steele & Monteiro, 2017). As lignanas também são fitoestrógenos, como as isoflavonas, porém, as isoflavonas são mais estudadas nesse aspeto. Segundo Cotterchio *et al.* (2006), a ingestão de lignanas foi associada ao menor risco do cancro colorretal. Para além disso, têm sido usados na formulação de medicamentos no tratamento contra a doença das chagas, causadas pelo parasita *Trypanosoma cruzi* (De Souza *et al.*, 2012).

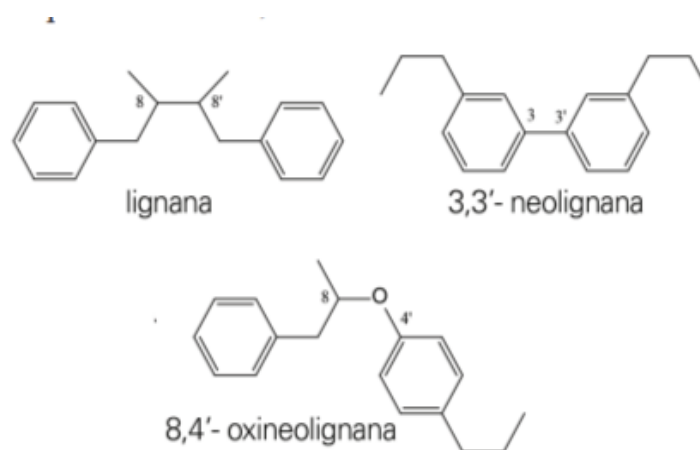


Figura 1.30 -Estrutura molecular das lignanas (De Souza *et al.*, 2012)

1.8.1.6-Tocoferóis

Os tocoferóis (figura 1.31) são compostos monofenólicos, presentes nas plantas, nos óleos vegetais e nos alimentos de origem animal e são empregues como antioxidantes na indústria alimentar. Estão agrupados em duas séries de compostos: tocóis (cadeias saturadas ligadas ao anel) e tocotrienóis (cadeias insaturadas ligadas ao anel) (Guinaz *et al.*, 2009; Piroddi *et al.*, 2012).

Existem quatro tipos de tocoferóis segundo o número e a posição dos grupos metilo no anel: α , β , γ e δ . A capacidade antioxidante dos tocoferóis é principalmente devida à capacidade de doar os seus hidrogénios fenólicos aos radicais lipídicos, interrompendo a propagação das reações de lipoperoxidação em cadeia (Jorge & Gonçalves, 1998).

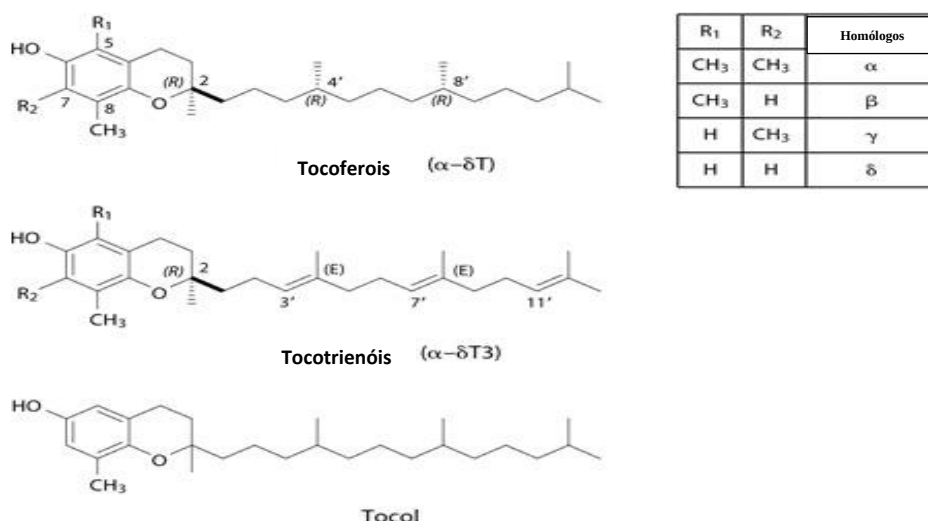


Figura 1.31 - Estrutura química dos tocoferóis (Piroddi *et al.*, 2012)

Os tocoferóis podem ser usados como aditivos alimentares. Na legislação europeia, a maioria dos géneros alimentícios não tem especificado o teor máximo de tocoferóis a ser adicionado, sendo mencionado a palavra *quantum satis*. Os únicos casos de exceção são: azeite e óleo de bagaço de azeitona refinado (α -tocoferol: 100 mg/kg), fórmulas para lactentes e de transição (10 mg/kg), alimentos à base de cereais (100 mg/kg) e alimentos destinados a crianças jovens (100 mg/kg). (Parlamento europeu, 2011). A intensidade da atividade antioxidante depende de vários fatores como a posição do grupo metilo, temperatura e concentração de tocoferóis. Segundo um estudo de Gottstein & Grosch (1990), a atividade antioxidante relativa dos tocoferóis é $\delta > \gamma > \beta > \alpha$ em gordura de porco acima de 60 °C, mas essa ordem alterou-se para $\alpha > \gamma > \beta > \delta$ entre 20 e 40 °C. Os isómeros de tocoferóis mais abundantes nos alimentos são o α -tocoferol e o γ -tocoferol.

1.8.1.7-Cumarinas

As cumarinas (figura 1.32) compreendem uma importante classe de metabolitos secundários, sendo encontradas em diversas plantas, como o guaco e a erva-doce. Quimicamente, as cumarinas são compostos orgânicos heterocíclicos amplamente estudados e caracterizados, apresentando na sua estrutura um anel pirano ligado ao benzeno com o grupo carbonilo do anel pirano na posição 2 (Franco *et al.*, 2021). São sólidos incolores com um odor doce. Na indústria alimentar eram utilizadas como aditivos, porém sua utilização foi proibida por causarem hepatotoxicidade em diversas espécies de animais (Iwata *et al.*, 2016).

As cumarinas possuem um efeito importante na fisiologia vegetal, atuando essencialmente como antioxidantes e inibidores enzimáticos. Estão envolvidas também no controlo de crescimento e na defesa contra infeções. Entre todas as propriedades farmacológicas

das cumarinas, nomeadamente da varfarina, acenocumarol e dicumarol, uma das que mais se destaca é a sua aplicação como agentes anticoagulantes. Esta ação é exercida por inibição da vitamina K, importante cofator na cascata de coagulação, impedindo a conversão de protrombina em trombina (Franco *et al.*, 2021; Dias, 2015).

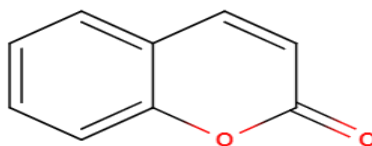


Figura 1.32 - Estrutura molecular das cumarinas

1.8.2- Biossínteses dos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são substâncias originadas no metabolismo secundário das plantas através da combinação entre duas vias metabólicas: via do ácido chiquímico e a via do acetato-malonato (figura 1.33) (Randhir *et al.*, 2004).

A síntese inicia-se com a reação de condensação entre a eritrose-4-fosfato e fosfoenolpiruvato, intermediários metabólicos da via das pentoses fosfato e da glicólise, que origina o ácido-3-dehidrochiquímico após uma série de reações. O ácido-3-dehidrochiquímico é precursor na biossíntese do ácido gálico, que posteriormente pode originar os taninos hidrolisáveis (Tohge *et al.*, 2013).

O próximo passo dessa via é a formação do ácido corísmico através da junção do ácido chiquímico e uma molécula de fosfoenolpiruvato. O ácido corísmico por sua vez gera os aminoácidos aromáticos (triptofano, fenilalanina e tirosina). A via do ácido chiquímico está presente no metabolismo de plantas, fungos e bactérias, mas não nos animais. Por essa razão, o triptofano e a fenilalanina são consideradas aminoácidos essenciais. A tirosina não é considerada aminoácido essencial, já que pode ser sintetizada a partir da fenilalanina (Almeida, 2017).

Os primeiros compostos fenólicos são formados a partir da fenilalanina. A fenilalanina perde uma amina pela ação da enzima fenilalanina amónia liase (PAL), levando à formação do ácido cinâmico, o primeiro fenilpropanóide (C₆-C₃). A PAL é regulada por vários fatores externos como baixas temperaturas, nutrientes nos solos, a luz e infeção por agentes patogénicos. Os fenilpropanóides subsequentes podem sofrer diversas transformações mediadas por enzimas que levarão à formação de outras classes de substâncias fenólicas, como as lignanas (Garcia & Carril, 2011; Tohge *et al.*, 2013).

Para a síntese de flavonoides e estilbenos, são combinados esqueletos carbónicos provenientes de duas vias: a via do ácido chiquímico e a via do acetato-malonato. Após a fenilalanina ser desaminada, hidroxilada e ligada a uma coenzima-A ocorre a formação do

coumaroil-CoA. Essa estrutura liga-se depois a três moléculas de malonil-CoA e gera uma molécula de chalcona após diversas reações catalisadas pela enzima chalcona sintetase (Resendes *et al.*, 2017; Garcia & Carril, 2011).

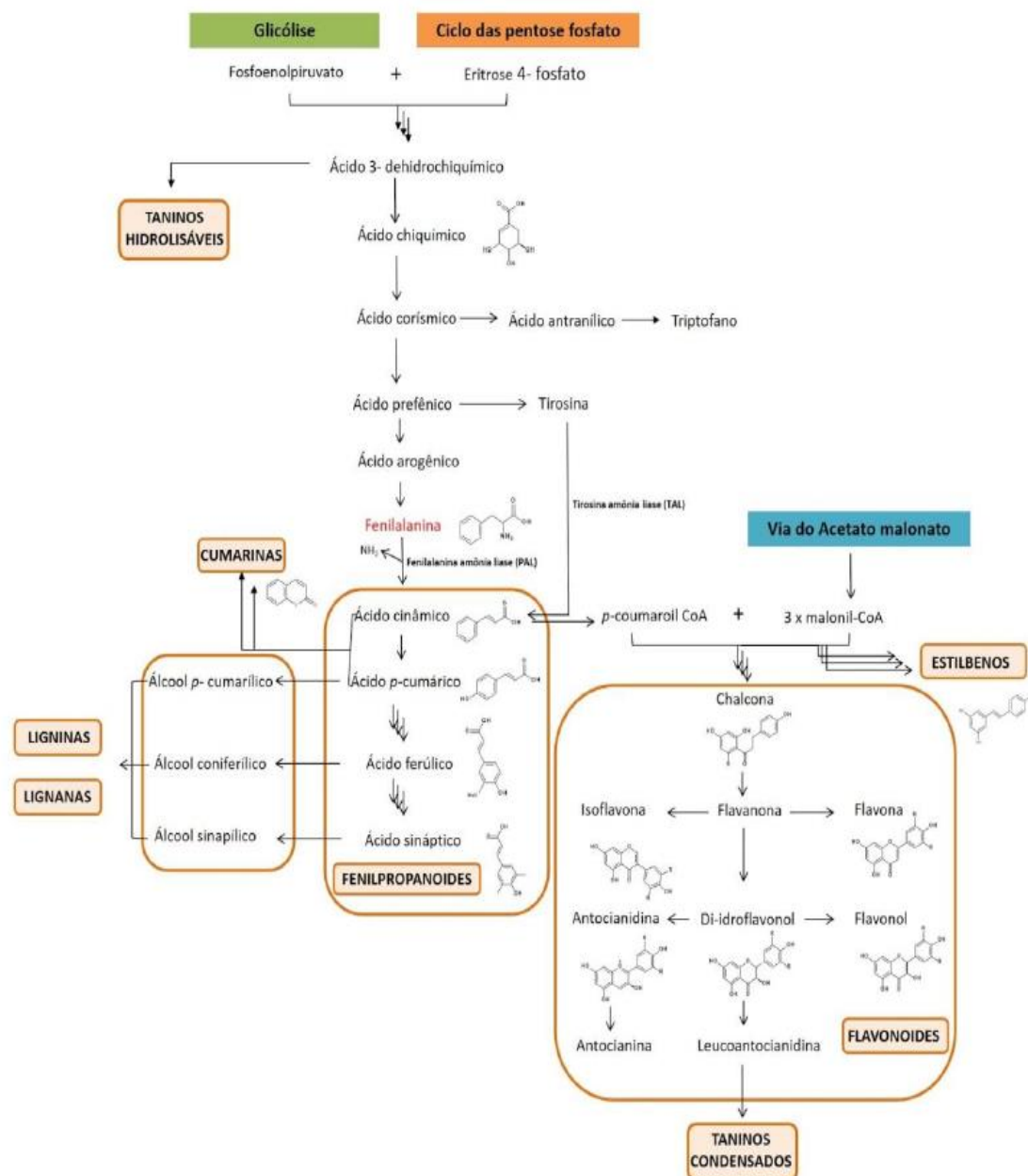


Figura 1.33- Esquema da via de síntese dos compostos fenólicos (Resendes *et al.*, 2017)

A mesma estrutura que origina a chalcona sofre uma série de reações mediadas pela estilbeno sintase, originando diversas substâncias pertencentes à classe dos estilbenos, entre elas o resveratrol. A chalcona, por sua vez, pode isomerizar-se em uma flavanona e a partir dela são formadas as classes de flavonoides. Os flavonoides possuem uma estrutura química $C_6-C_3-C_6$, onde C_6-C_3 é proveniente da via do ácido chiquímico e o outro anel C_6 da via do malonato. Os

processos biossintéticos que levam à formação da fenilalanina ocorrem nos plastos e a síntese dos fenilpropanóides e flavonoides no retículo endoplasmático liso, sendo os compostos armazenados nos vacúolos (Resendes *et al.*, 2017).

1.9- Processo Inflamatório

A inflamação é definida como uma resposta fisiológica do organismo face a uma lesão provocada por trauma, queimadura ou radiação ou por uma infeção desencadeada por agentes patogénicos (bactérias, fungos e vírus) ou por xenobióticos. Nessas situações, o organismo dá início à resposta inflamatória que tem como objetivo erradicar por completo o agente agressor, eliminar as células lesadas e tecidos danificados para iniciar o processo de cicatrização e regeneração dos tecidos e restaurar a sua função (Etienne *et al.*, 2021; Ward, 2010).

A inflamação é caracterizada por: 1) vasodilatação dos vasos sanguíneos locais, com consequente afluxo sanguíneo excessivo (hiperemia); 2) aumento da permeabilidade dos capilares, permitindo a saída de grandes quantidades de fluidos para os espaços intersticiais; 3) coagulação recorrente dos fluidos do espaço intersticial devido a quantidades excessivas de fibrinogénio e outras proteínas provenientes dos capilares; 4) migração de granulócitos e monócitos para o tecido; e 5) inchaço das células dos tecidos (Guyton & Hall, 2006).

A resposta inflamatória pode ser classificada em aguda ou crónica. De um modo geral, a resposta inflamatória aguda inicia-se em minutos e termina em horas, enquanto a resposta inflamatória crónica pode persistir durante semanas, meses ou anos (Gilroy & Lawrence, 2008).

Nalgumas situações, caso a resposta inflamatória aguda se torne excessiva ou prolongada, poderá levar a lesões relevantes nos tecidos e órgãos (Ward, 2010).

1.9.1- Inflamação aguda

A inflamação aguda pode ser definida como uma resposta rápida e inicial ao agente agressor, sendo perceptível logo nas primeiras horas da inflamação e que vai regredindo gradualmente à medida que o agente agressor vai sendo eliminado (Pinto *et al.*, 2007, Ward, 2010). Os primeiros sinais são o rubor (vermelhidão), calor, inchaço e dor (Yoon *et al.*, 2005).

Nesta fase da resposta inflamatória há uma série de eventos a decorrer tais como: perda de água, sais e proteínas do compartimento vascular, ativação das células endoteliais, interações de adesão entre leucócitos e endotélio, recrutamento de leucócitos, ativação de macrófagos tecidulares, ativação e agregação plaquetária, ativação do complemento, da coagulação e sistema fibrinolítico e libertação de proteases e oxidantes pelas células fagocíticas (Ward, 2010).

A primeira linha de defesa contra as infeções são os macrófagos existentes nos tecidos afetados, que quando ativados aumentam de tamanho e iniciam a fagocitose. De seguida um grande número de neutrófilos, provenientes da corrente sanguínea, penetram a parede celular e

infiltram-se na área lesada. Como estas células já se encontram no seu estado de maturação, são capazes de iniciar de imediato o processo de fagocitose, promovendo a eliminação do agente infeccioso. Em simultâneo com a migração dos neutrófilos, os monócitos presentes no sangue entram também no tecido lesado, onde ficam a maturar, aumentado de tamanho e transformando-se em macrófagos com as mesmas capacidades dos macrófagos tecidulares para fagocitar (Guyton *et al.*, 2006).

As alterações que ocorrem ao nível do local da inflamação são mediadas por mediadores químicos: óxido nítrico (NO), histamina, serotonina, citocinas, bradicinina, prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, fator de ativação plaquetária e substância P. A extravasação de neutrófilos é coordenada por moléculas de adesão intracelular, nomeadamente a ICAM-1, e moléculas de adesão vascular, nomeadamente a VCAM-1, quimiocinas, como a IL-8 e metabolitos gerados pela via do ácido araquidónico (AA) (figura 1.34) (Miguel, 2010; Gossiau *et al.*, 2011).

O AA é um ácido gordo polinsaturado que é libertado a partir das membranas celulares por ação da enzima fosfolipase A₂ em resposta a estímulos mecânicos, químicos ou físicos e também por mediadores de inflamação. Esta molécula serve como substrato para duas vias enzimáticas para a produção de diferentes eicosanóides: a via da enzima lipoxigenase (LOX), que resulta na formação de leucotrienos e lipoxinas e a via das enzimas ciclooxigenases (COX), que leva a formação de tromboxanos (estão envolvidos na formação de coágulos) e prostaglandinas, substâncias que estão envolvidas na patogénese da dor e da febre, além de provocarem vasodilatação arteriolar e edema (Harizi *et al.*, 2008).

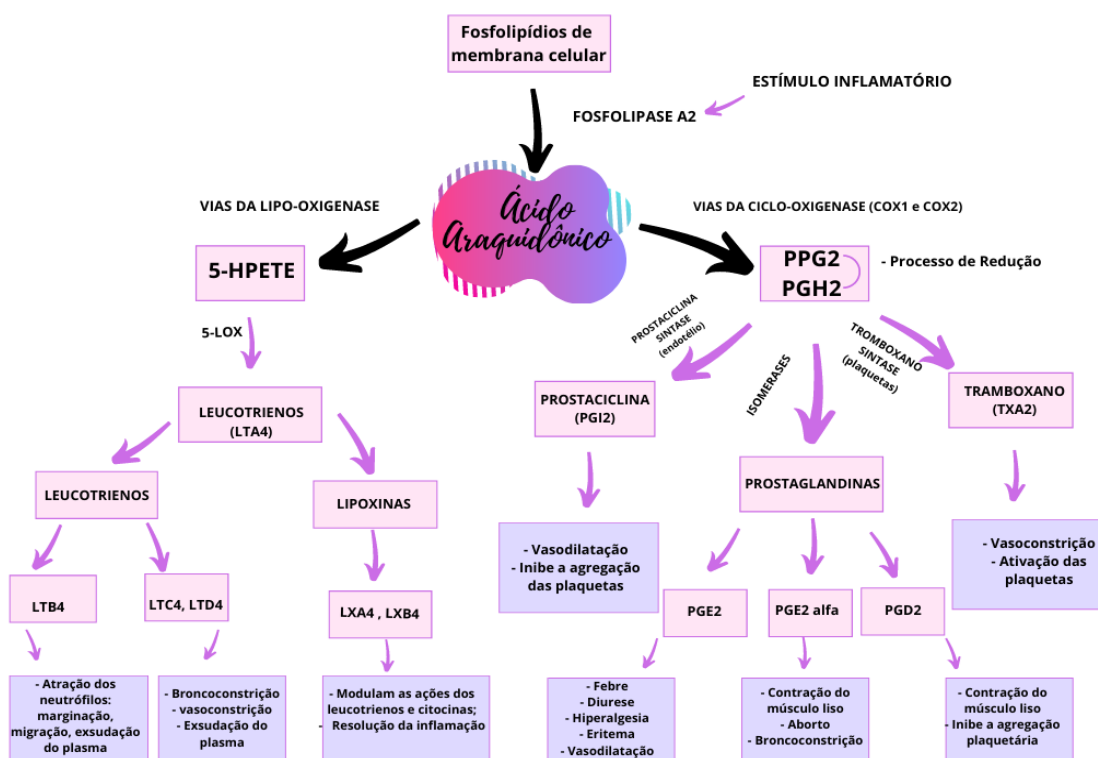


Figura 1.34 -Metabolismo do ácido araquidónico (Adaptado de Schneid, 2021)

Existem três formas conhecidas da COX: COX-1, COX-2 e COX-3. A COX-1 é uma enzima constitutiva que está presente em quase todos os tecidos (vasos sanguíneos, plaquetas, estômago, intestino, rins), atuando em diversos efeitos fisiológicos, como proteção gástrica, agregação plaquetária, homeostase vascular e manutenção do fluxo sanguíneo renal (Aranda *et al.*, 2017). Já a COX-2 é uma enzima induzida por estímulos inflamatórios, hormonas e fatores de crescimento e não é encontrada na maioria dos tecidos em condições normais. É a fonte mais importante da formação de prostanóides na inflamação e em patologias de proliferação como o cancro (Ricciotti & FitzGerald, 2011). Segundo Khan *et al.* (2002), a COX-2 é também uma enzima constitutiva, expressa em regiões glomerulares e pequenos vasos sanguíneos nos rins, confirmando assim sua importância na manutenção das funções fisiológicas cardiovasculares. Em acréscimo, sabe-se que no tecido ósseo, as prostaglandinas geradas a partir da COX-2 são responsáveis por regular o processo de formação e absorção do osso durante o processo de reparação e remodelação (Kalyvas & Tarenidou, 2008). Mais recentemente, foi descoberta uma nova isoforma da COX: a COX-3, uma variante da COX-1 que se encontra predominantemente no córtex cerebral e no coração (Chandrasekharan *et al.*, 2002) e os estudos ainda não apontaram a sua real função sobre o organismo.

A resposta inflamatória é ainda mediada pela libertação de citocinas pro-inflamatórias, como a interleucina IL-1, fator de necrose tumoral (TNF), interferão (INF)- γ , IL-6, IL-12, IL-18 e fator estimulante de colónias de granulócitos-macrófagos. Esta resposta é antagonizada por citocinas anti-inflamatórias, como o IL-4, IL-10, IL-13, INF- α e fator de crescimento transformante. O fator nuclear- κ B (NF- κ B), um fator de transcrição, que regula a expressão de vários genes que codificam citocinas pro-inflamatórias, moléculas de adesão, quimiocinas, fatores de crescimento e enzimas como a COX-2 (Mueller *et al.*, 2010).

1.9.2-Inflamação crónica

O objetivo da inflamação é a eliminação total do agente agressor e regeneração do tecido lesado. Contudo, se este mecanismo falhar, o processo inflamatório persiste, evoluindo para um estado inflamatório crónico. Esta inflamação é causada por infeções persistentes, doenças inflamatórias imuno-mediadas ou exposição prolongada a agentes tóxicos, que pode durar semanas, meses ou uma vida inteira. Caracteriza-se pela presença de linfócitos e macrófagos, que possuem um tempo de vida de meses a anos e são responsáveis pela destruição dos tecidos. Neste tipo de inflamação há a formação de granuloma, juntamente com fibrose e/ou necrose, que originam danos irreversíveis (Ward, 2010, Gossiau *et al.*, 2011) A inflamação crónica é um fator importante que contribui para uma variedade de doenças humanas, incluindo artrite reumatoide, doença periodontal, psoríase e aterosclerose.

1.9.3-Atividade Anti-inflamatória

Uma das principais causas da inflamação é o aumento na produção de prostaglandinas (PGs), sintetizadas pelas enzimas ciclooxygenases (COX) após estímulo inflamatório no tecido (Somvanshi *et al.*, 2007). Atualmente, os medicamentos mais comercializados no tratamento da inflamação são os Anti-inflamatórios Não Esteroidais (AINES).

Os AINES são ácidos orgânicos fracos, frequentemente utilizados como analgésicos, anti-inflamatórios e antipiréticos (Wannmacher & Bredemeier, 2004). O mecanismo de ação dos AINES consiste na inativação das enzimas COX, suprimindo assim a produção de prostaglandinas e de outros mediadores químicos de inflamação. A maioria dos AINES são não seletivos e atuam inibindo preferencialmente a COX-1. Devido à baixa especificidade de inibição destes compostos sobre a COX-2, o uso destes fármacos a longo prazo tem sido associado a várias complicações gastrointestinais tais como dispepsia, dor abdominal, sangramento, úlcera e perfuração gástrica ou duodenal. Portanto, a preferência pela utilização de fármacos seletivos tem sido bastante abordada, pois inibindo a ação da COX-2, pode combater-se a inflamação sem causar tantos efeitos colaterais (Carvalho *et al.*, 2004; Mendes *et al.*, 2012; Wilcox *et al.*, 1997).

Uma das alternativas que tem sido proposta é o estudo das propriedades anti-inflamatórias em plantas medicinais, na tentativa de produzir novos anti-inflamatórios. De acordo com Alberto *et al.* (2009), os extratos hidroetanólicos de plantas da família Asteraceae inibiram eficazmente a ação das enzimas COX-1 e COX-2, com valores de IC₅₀ a oscilar entre os 2,0 e os 16,7 µg/mL. Já no estudo de Eldeen & Van Staden (2008), todos os extratos de *Coleonema álbum* mostraram atividade preferencial contra COX-2 com um valor de IC₅₀ de 40 µg/ml para o extrato de acetona.

O potencial anti-inflamatória das plantas está associado à presença de flavonoides. Segundo várias pesquisas, os flavonoides apresentam inúmeras propriedades farmacológicas, entre elas atividade anti-inflamatória e hipocolesterolémica, reduzindo, assim, a inflamação e o risco de doenças cardiovasculares (Da Silva *et al.*, 2002).

Alguns monoterpenos isolados ou presentes como constituintes maioritários em óleos essenciais também têm sido reportados por inibirem a atividade das enzimas ciclooxygenases, atuando, desta forma, como substâncias bioativas com propriedade anti-inflamatórias. Como exemplo pode-se citar o óleo essencial de *Torreya nucifera*, constituído maioritariamente por limoneno, δ -3-careno e α -pineno, que apresentou atividade inibitória seletiva para a enzima COX-2, diminuindo significativamente a produção de PGE₂ (Romero & Romero, 2014).

2-Objetivos

2.1- Objetivo geral

O principal objetivo desta dissertação residiu na avaliação de propriedades bioativas de seis plantas vulgarmente utilizadas na medicina tradicional madeirense (*C. canariensis*, *G.salicina*, *E.arborea*, *R.ulmifolius*, *F.muralis* e *S.marmulano*). Esta avaliação englobou a quantificação de compostos fenólicos totais e de flavonoides totais, e a avaliação do potencial antimicrobiano, antioxidante e antidiabético dos extratos. A quantificação dos compostos fenólicos visou averiguar a possível existência de uma relação entre a intensidade das propriedades bioativas e a concentração destes compostos nos extratos. Esta investigação permitirá fornecer dados sobre estas plantas, que ainda não foram estudadas com rigor, podendo vir a contribuir para a possibilidade de futuramente poderem vir a ser utilizadas como conservantes, na formulação de nutracêuticos, produtos cosméticos e de novos fármacos.

2.2- Objetivos específicos

No âmbito deste estudo, a investigação centrou-se em algumas etapas principais:

- A) Obtenção dos extratos hidroetanólicos a partir seis plantas endémicas da Região Autónoma da Madeira
- B) Quantificação dos compostos fenólicos totais presentes nos extratos através do método de Folin-Ciocalteu
- C) Determinação da concentração de flavonoides totais presentes nos extratos através do método de complexação com o alumínio na presença de nitrito
- D) Análise da atividade antimicrobiana dos extratos hidroetanólicos das plantas medicinais sobre a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, MRSA, *Candida albicans*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Choleraesuis* pelo método de difusão em agar
- E) Determinação da concentração mínima inibitória (MIC) e da concentração mínima bactericida (MBC) através da técnica de microdiluição
- F) Avaliação da atividade antioxidante dos extratos através de vários métodos analíticos como DPPH, FRAP, CUPRAC e sequestro do radical anião superóxido
- G) Estudar o efeito antidiabético pelo método de inibição da α -amilase e α -glucosidase

3-Materiais e Métodos

3.1- Reagentes e meio de cultura

Na realização do presente trabalho foram utilizados os seguintes reagentes e meios de cultura: Acarbose (AlfaAesar, 95%), acetato de amónio (Riedel-de Haën, 98%), acetato de sódio trihidratado (Panreac, 99%), ácido acético (Panreac, 99%), ácido ascórbico (Panreac, 99%), ácido clorídrico (Panreac, 37%), ácido 3,5- ditnitrosalicílico (DNSA) (Sigma-aldrich, 98%), ácido gálico (Merck, 99,5%), amido solúvel (Sigma>99%), azul de nitrotetrazólio (NBT) (Sigma-Aldrich), *Brain Heart Infusion Agar* (BHI) (Biokar diagnostics), carbonato de sódio (Appllichem Panreac, 99,5%); catequina-monohidratada (Sigma-aldrich, 96%), cloreto de sódio (Panreac, 99,5%), cloreto de alumínio (Fluka, 99%), cloreto de cobre (II) bihidratado (Riedel-de Haën, 99%), cloreto férrico hexahidratado (Merck, 99%), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) (Sigma-Aldrich, 95%), etanol (Sigma-Aldrich, 99,8%), dinucleótido de nicotinamida e adenina na forma reduzida (NADH) (Sigma, 97%), fosfato de potássio dibásico anidro (ACS, Honeywell ≥98%), fosfato de potássio monobásico anidro (Sigma-Aldrich, ≥99%), fosfato de sódio dibásico dihidratado (Sigma-Aldrich), fosfato de potássio monobásico dihidratado (Sigma-Aldrich, ≥99%), hidróxido de sódio (BioChemic, 98%), metossulfato de fenazina (PMS) (Sigma,90%), Mueller-Hinton Agar (MHA) (Biokar diagnostics), Mueller-Hinton Broth (MHB) (Biokar diagnostics), neocuproína (Sigma), nitrito de sódio (Merck, 99%), 4-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo (p-NPG) (Sigma>99%), reagente Folin-Ciocalteu (Merck), Sabouraud Dextrose agar (SDA) (Biokar diagnostics), tartarato de potássio e sódio tetrahidratado (Sigma-Aldrich, 99%) tripiriditiazina (TPTZ) (Fluka, 99%) e Triptona-Soja-Agar (TSA) (Biokar diagnostics). Foram ainda utilizadas as enzimas α -Amilase pancreática de suíno Tipo VI-B ≥ 5 units/mg (Sigma-Aldrich) e α -glucosidase de *Sacharomyces cerevisiae* Tipo I, liofilizada, ≥ 10 units/mg proteína (Sigma-Aldrich).

Na preparação das soluções e meios de cultura utilizou-se água ultrapura, captada a partir de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Molsheim, França).

3.2- Material vegetal

As plantas em estudo foram recolhidas diretamente na Região Autónoma da Madeira. As partes aéreas (caules e folhas) da malfurada e da hortelã-de-cabra foram colhidas no Jardim Botânico da Madeira, enquanto as partes aéreas do silvado e da molarinha foram colhidas no sítio do Caminho do Amparo, zona pertencente ao concelho de Machico. A parte aérea da urze-molar foi recolhida a 1200 metros de altitude nas serras altas do Funchal. No caso do marmulano, foram coletadas separadamente as folhas, os ramos e as cascas do tronco nas freguesias de São Vicente, Jardim do Mar e no Funchal. As plantas herborizadas foram depositadas no herbário do Jardim

Botânico da Madeira, tendo sido atribuído os seguintes códigos: *Rubus ulmifolius* (MADJ 14467), *Erica arborea* (MADJ 14468), *Fumaria muralis* (MADJ 14469), *Cedronella canariensis*, (MADJ 14470), *Globularia salicina* (MADJ 14471) e *Sideroxylon marmulano* (MADJ 14472)

3.3- Preparação dos extratos

As plantas em estudo foram prensadas e deixadas a secar durante um mês. Os extratos foram preparados com o caule e folha das várias plantas, à exceção da urze molar, em que foi utilizada a flor e o marmulano em que se efetuaram extratos em separado para as folhas, ramos e casca do tronco. Inicialmente, as plantas foram reduzidas a um pó num moinho de café (Taurus Aromatic 150 W), tendo, em seguida, sido pesadas e misturadas numa solução de etanol 70% (v/v) em água, na proporção de 1:10. As misturas foram colocadas num aparelho de ultrassons (P selecta) durante uma hora à temperatura ambiente. Findo este tempo, as amostras foram deixadas sob agitação (100 rpm, incubadora orbital Innova 4000 New Brunswick Scientific), a 24 °C e ao abrigo da luz durante 22 horas. Por fim, os extratos foram centrifugados durante 25 minutos, a 8000 g e a 4°C (centrífuga Sigma 4K-15C), tendo os sobrenadantes sido recolhidos. O etanol foi posteriormente evaporado em rotavapor (BÜCHI R-200, Suíça) em banho a 45 °C (BÜCHI B490, Suíça), tendo a água remanescente sido retirada por liofilização. Os extratos secos foram conservados a -20°C. Para efetuar todos os ensaios, os extratos foram sempre reconstituídos em etanol 70% numa concentração inicial de 20 mg/mL.

3.4-Determinação do rendimento de extração

O rendimento de extração foi avaliado através da relação entre o peso de planta utilizado na preparação do extrato e o peso total de extrato no final do processo liofilização

3.5- Quantificação total de fenóis- Método Folin Ciocalteu

A determinação da composição em constituintes fenólicos dos extratos foi realizada segundo o método de Folin-Ciocalteu. A pH alcalino, os compostos fenólicos, na forma de ião fenolato, reduzem o heteropolianião molibdotungsteniofosfórico do reagente de Folin-Ciocalteu, originando um produto com uma coloração azulada e cujo pico máximo de absorção ocorre nos 765 nm (Blainski *et al.*, 2013, Koşar *et al.*, 2008), sendo a intensidade da coloração desenvolvida proporcional ao teor em compostos fenólicos (figura 3.1).

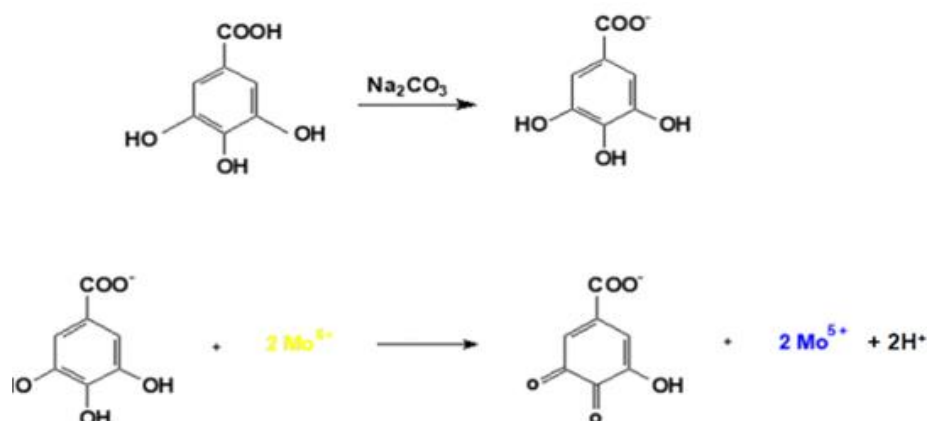


Figura 3.1-Esquema reacional da redução do molibdénio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu (Oliveira *et al.*, 2009)

A determinação foi efetuada de acordo com o procedimento descrito por Kosar *et al.* (2008). Em tubos de ensaio contendo 3 950 μL de água, pipetaram-se 50 μL de amostra numa diluição adequada, de modo que os valores de absorvância se encontrassem dentro da reta de calibração. De seguida adicionaram-se 250 μL de reagente de Folin-Ciocalteu e, após 1 minuto à temperatura ambiente, adicionaram-se 750 μL de solução de carbonato de sódio (20%, p/v). As misturas assim preparadas permaneceram duas horas no escuro e à temperatura ambiente, tendo, de seguida, sido registada a sua absorvância a 765 nm (espectrofotómetro Analytik Jena SPEKOL 1500), contra um branco preparado de forma semelhante, porém utilizando 50 μL de água MiliQ em vez de amostra. Para todas as amostras os ensaios foram realizados em triplicado, tendo sido determinada a concentração em fenóis por interpolação de uma reta de calibração, preparada da mesma forma descrita para as amostras, mas substituindo estas por soluções de ácido gálico com concentrações entre os 5 e os 50 mg/L. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de extrato seco. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

3.6- Quantificação de flavonoides

A determinação de flavonoides totais foi realizada segundo o método de complexação com o alumínio na presença de nitrito e em meio alcalino, de acordo com o método descrito por Barros *et al.* (2010). Nestas condições os flavonoides complexam com o alumínio, originando um complexo de coloração rosada, com um máximo de absorção a 510 nm, sendo a concentração de flavonoides proporcional à intensidade cor rosada formada (figura 3.2) (Azizah *et al.*, 2014; Pękal & Pyrzynska, 2014).

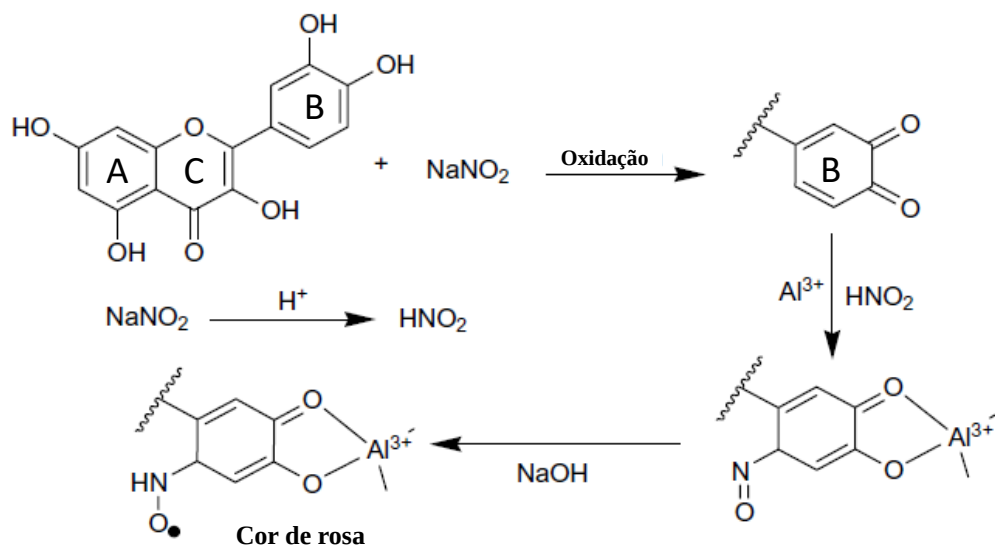


Figura 3.2- Formação de complexo cor-de-rosa por reação entre os flavonoides o alumínio e o nitrito (Mekonnen & Desta, 2021)

Em tubos de ensaio foram adicionados 2,5 mL de água miliQ, 200 μL de amostra diluída, de modo que os valores se encontrassem dentro da curva de calibração, e 150 μL de NaNO_2 (5%, p/v). A mistura foi então agitada num vortex (VWR Mixer Mini Vortex, USA). Após 6 minutos de repouso à temperatura ambiente, adicionaram-se 150 μL de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10%, p/v), tendo a mistura sido novamente agitada no vortex. Após outros 6 minutos à temperatura ambiente, adicionaram-se 2,0 mL de solução de NaOH (4%, p/v). A mistura foi então agitada novamente no vortex e incubada durante 15 minutos no escuro, à temperatura ambiente. Após o período de incubação, foi registada a absorvância a 510 nm (espectrofotómetro Analytikjena SPEKOL 1500), usando como branco a água miliQ.

Para todas as amostras os ensaios foram realizados em triplicado, tendo sido determinada a concentração em flavonoides totais por interpolação de uma reta de calibração, preparada da mesma forma descrita para as amostras, mas substituindo estas por soluções de catequina com concentrações entre os 0,015625 e 1 mM. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de catequina (EQ) por grama de extrato seco. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

3.7- Determinação da atividade antioxidante dos extratos

3.7.1- Determinação da capacidade de sequestro do radical DPPH•

O radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•) é um composto orgânico estável espectrofotometricamente, mas sensível à luz, ao oxigénio, ao pH e a alguns solventes. Tem uma cor púrpura, apresentando um máximo de absorção a 517 nm. Ao aceitar um átomo de hidrogénio

de um antioxidante, o radical vai desaparecendo, dando lugar à hidrazina correspondente, passando a cor de púrpura para amarelo (Magalhães *et al.*, 2008; Moon & Shibamoto, 2009). Deste modo, o desaparecimento da cor púrpura determina a atividade antioxidante (figura 3.3) (Prior *et al.*, 2005). Uma das limitações deste ensaio é que o radical DPPH• não existe em sistemas biológicos (Moon & Shibamoto, 2009).

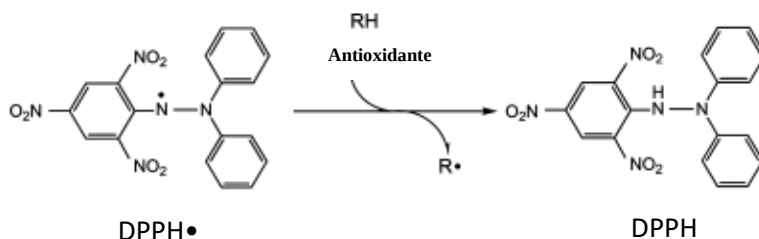


Figura 3.3-Reação entre o radical DPPH• e o antioxidante para formar DPPH (Moon & Shibamoto, 2009).

Este ensaio foi realizado de acordo com o procedimento descrito por Miceli *et al.* (2009). Foram preparadas diferentes diluições de cada um dos extratos em etanol 70%. Seguidamente, em tubos de ensaio, foram adicionados 500 µL de cada uma dessas diluições, de modo a se conseguir obter uma curva para cada uma das amostras, com 3 mL da solução DPPH• (24 mg/L em etanol). Foi realizado um controlo (ensaio em branco) da mesma forma que as amostras substituindo estas por igual volume de etanol 70%. Os tubos foram agitados no vortex e incubados no escuro à temperatura ambiente, durante 30 minutos.

Após o período de incubação, as absorvâncias foram lidas a 517 nm (espectrofotómetro Analytikjena SPEKOL 1500). A percentagem de inibição (percentagem de desativação do radical DPPH•) foi calculada através da equação 1:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{(Abs_{branco} - Abs_{amostra})}{Abs_{branco}} \times 100 \quad \text{(Equação 1)}$$

Como controlo positivo testaram-se diferentes concentrações (entre 4,375 e 140 µg/mL) de ácido ascórbico de forma semelhante às amostras. Os ensaios foram realizados em triplicado, e os resultados expressos em IC₅₀, que corresponde à quantidade de extrato responsável por 50% da descoloração do radical DPPH•. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão.

3.7.2- Determinação da atividade de redução Fe(III) a Fe(II) pelo ensaio FRAP

O ensaio de FRAP (*Ferric Reducting Antioxidant Power*) mede a capacidade dos antioxidantes para reduzir o complexo Fe(III)- tripiriditriazina de coloração amarela (Fe³⁺-TPTZ) a um complexo ferroso de coloração azul intensa Fe(II)-tripiriditriazina (Fe²⁺-TPTZ), em meio

ácido (figura 3.4) (Antolovich *et al.*, 2002; Magalhães *et al.*, 2008; Moon & Shibamoto, 2009). O poder de redução está relacionado com o grau de hidroxilação e extensão da conjugação em polifenóis (Prior *et al.*, 2005). A intensidade da coloração azul pode ser quantificada espectralmente a um comprimento de onda de 593 nm, e está linearmente relacionada com a atividade antioxidante (Antolovich *et al.*, 2002; Ramful *et al.*, 2010).

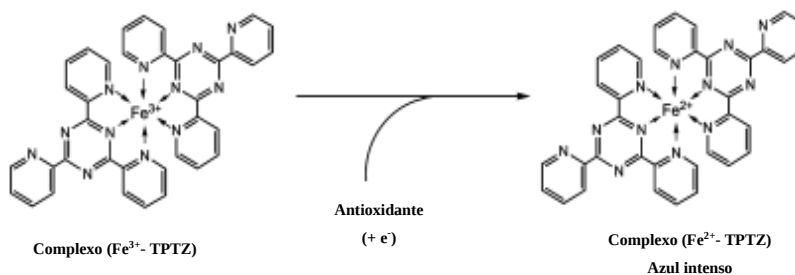


Figura 3.4 -Reação de formação do complexo Fe²⁺-TPTZ após redução de Fe³⁺ devido à ação de um antioxidante (Moon & Shibamoto, 2009).

O ensaio foi realizado de acordo com o procedimento descrito por Ramful *et al.* (2010). Primeiramente preparou-se o reagente FRAP, através da mistura de 25 mL de tampão acetato 0,25 M, 2,5 mL de solução de TPTZ (10 mM em HCl 40 mM) e 2,5 mL de cloreto de ferro (III) (FeCl₃·6H₂O, 20 mM). De seguida, em tubos de ensaio adicionaram-se 3,0 mL do reagente FRAP pré-aquecido a 37 °C, 300 µL de água mili-Q e 100 µL de cada uma das amostras, previamente diluídas de modo que as leituras ficassem dentro da reta de calibração. As misturas foram agitadas e incubadas no escuro, durante 20 minutos e a 37 °C. Durante esta incubação foi possível observar o aparecimento de uma coloração azul, cuja intensidade variava entre as várias amostras. Após a incubação fez-se a leitura da absorvância a 593 nm num espectrofotómetro (espectrofotómetro Analytikjena SPEKOL 1500), utilizando como branco a absorvância do reagente FRAP.

As amostras foram analisadas em triplicado, tendo a atividade antioxidante sido determinada por interpolação de uma reta de calibração, preparada da forma já descrita para as amostras, mas substituindo as amostras por soluções de ácido ascórbico com concentrações entre os 0,003125 e os 0,025 mg/L. Os resultados foram expressos em µg de equivalentes de ácido ascórbico (EAA)/g de extrato seco. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão.

3.7.3-Determinação da redução do Cu (II) pelo ensaio CUPRAC

O ensaio de CUPRAC (*Copper Reduction Assay*) é baseado na redução do cobre Cu²⁺ a Cu⁺, por uma ação combinada dos antioxidantes (agentes redutores) presentes na amostra (Prior *et al.*, 2005). O CUPRAC utiliza um composto, a neocuproína, que complexa com o cobre. A forma reduzida deste complexo, Cu(I)-neocuproína, apresenta uma coloração intensa com o seu

máximo de absorção a um comprimento de onda de 450 nm (figura 3.5) (Apak *et al.*, 2004; Apak *et al.*, 2006; Bibi Sadeer *et al.*, 2020).

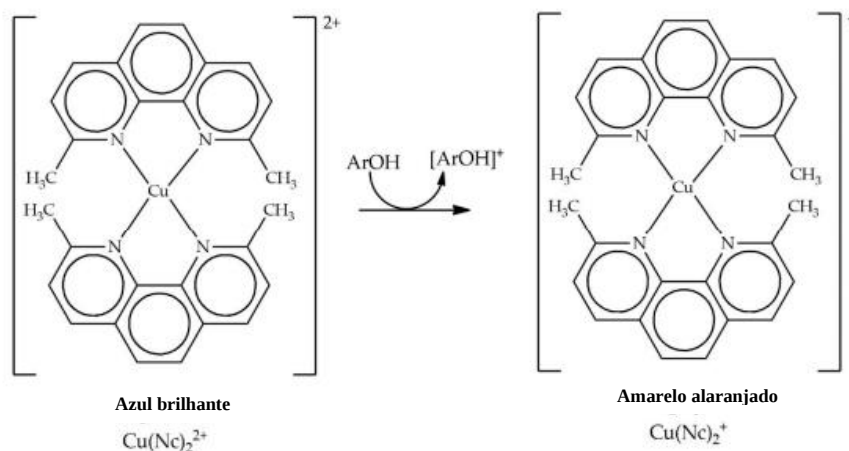


Figura 3.5-Redução do complexo Cu (II)-neocuproína a Cu(I)-neocuproína, por ação dos antioxidantes da amostra (Adaptado de Bibi Sadeer *et al.*, 2020)

Este ensaio foi realizado de acordo com o método descrito por Apak *et al.* (2004). Assim, em tubos de ensaio adicionou-se 1 mL de uma solução de cloreto de cobre (II) bihidratado 10 mM, 1 mL de solução de acetato de amónio 1 M, 1 mL de solução de neocuproína 7,5 mM em etanol 96%. De seguida, adicionaram-se 400 μL das amostras previamente diluídas e 700 μL de água miliQ. Efetuou-se um branco da mesma forma que as amostras, mas substituindo-as por 400 μL de etanol 70% (solvente das amostras). Procedeu-se a um período de incubação dos tubos de 1 hora à temperatura ambiente e, após esse período, foram medidas as absorvâncias a um comprimento de onda de 450 nm (espectrofotómetro Analytikjena SPEKOL 1500).

Foi realizada uma curva de calibração com ácido ascórbico procedendo da mesma forma que para as amostras, porém utilizando 550 μL de padrões com diferentes concentrações, entre os 12,5 e os 250 μM , 400 μL de etanol 70% e 150 μL de água Mili-Q. Todos os ensaios foram realizados em triplicado, e os resultados expressos em μg de equivalentes de ácido ascórbico por grama de extrato seco. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

3.7.4- Determinação da atividade antioxidante por sequestro do radical anião superóxido detetada pela diminuição da formação de formazano

O radical anião superóxido reage com o azul nitrotetrazólio (NBT^{2+}), reduzindo-o a formazano, um composto azul-roxeadado que apresenta um máximo de absorção a 560 nm (figura 3.6). Qualquer molécula capaz de sequestrar o radical superóxido conduz a uma diminuição na velocidade de redução do NBT, ou seja, uma diminuição da taxa de aumento da absorvância a 560 nm (Halliwell *et al.*, 1995).

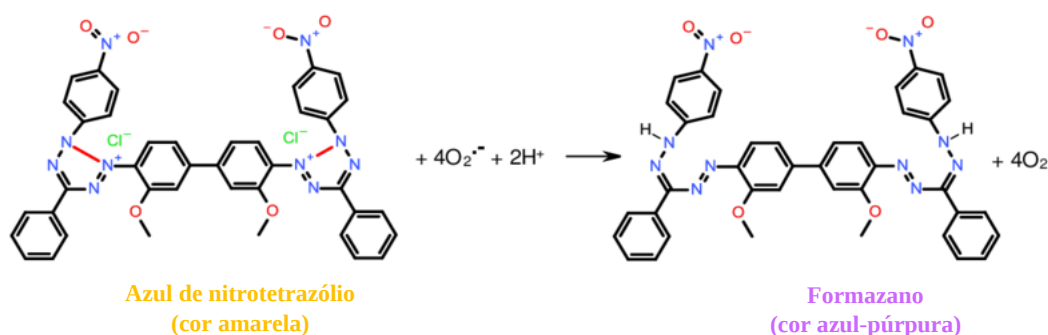


Figura 3.6- Mecanismo de reação do NBT com superóxido para formar formazano (Bakr & Rahaman, 2016).

Neste ensaio, o radical anião superóxido foi gerado pelo sistema metossulfato de fenazina (PMS)/NADH em condições aeróbias, em que o PMS após ser reduzido pelo NADH, reage com o oxigénio produzindo o radical anião superóxido (figura 3.7) (Nakamura *et al.*, 1992). Tendo em conta que o radical anião superóxido resulta da redução do oxigénio molecular e pode surgir no decurso de diversos processos metabólicos, uma das vantagens deste ensaio é a de se utilizar um oxidante com relevância fisiológica (Magalhães *et al.*, 2008).

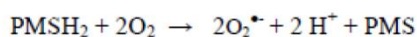
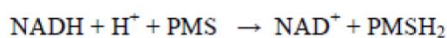


Figura 3.7- Reações de formação do radical anião superóxido através do sistema PMS/NADH (adaptado de Nakamura *et al.*, 1992).

A capacidade das amostras para sequestrar o radical anião superóxido foi avaliada de acordo com o método descrito por Valentão *et al.* (2001), com pequenas modificações. Assim, em cuvetes do espectrofotómetro adicionaram-se diferentes volumes de amostras ou das suas diluições, de forma a testar diferentes concentrações, e completou-se com água até 200 µL. Em seguida adicionaram-se 300 µL de NADH 1,66 mM em tampão fosfato (19 mM, pH 7,4), 300 µL de NBT 430 µM em tampão fosfato (19 mM, pH 7,4) e por fim tampão fosfato (19 mM, pH 7,4) para completar a 2 950 µL. A reação iniciou-se com a adição de 50 µL de PMS 162 µM em tampão fosfato (19 mM, pH 7,4) tendo-se acompanhado a variação da absorvância a 560 nm, durante dois minutos à temperatura ambiente. Realizou-se, igualmente, um ensaio controlo substituindo a amostra por igual volume de solvente da amostra (etanol 70%). As determinações foram realizadas em triplicado, no espectrofotómetro (SPEKOL 1500). A percentagem de inibição da redução do NBT de cada uma das concentrações das amostras foi calculada em relação ao controlo utilizando a seguinte expressão (equação 2):

$$\% \text{ Inibição} = \frac{(\text{Declive médio}_{\text{controlo}} - \text{Declive médio}_{\text{amostra}})}{\text{Declive médio}_{\text{controlo}}} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Em seguida foram construídas curvas de percentagem de inibição *versus* concentração de forma a determinar a concentração de extrato que provocou 50% de inibição da redução do NBT, ou seja, o valor de IC₅₀. Foi realizada um controlo positivo com ácido gálico de forma semelhante às amostras, porém utilizando padrões de ácido gálico com concentrações entre 20 e 400 µM. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão.

3.8- Determinação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi avaliada testando a atividade dos extratos face a bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC[®] 6538TM, *Staphylococcus epidermidis* ATCC[®] 1228TM, *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) ATCC[®] 33591TM, *Enterococcus faecalis* ATCC[®] 29212TM, *Listeria monocytogenes* ATCC[®] 15313TM e *Bacillus cereus* ATCC[®] 11778TM), bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC[®] 8739TM, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC[®] 9027TM e *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar Choleraesuis ATCC[®] 10708TM), e uma levedura (*Candida albicans* ATCC[®] 10231TM).

Os microrganismos foram mantidos a -70 °C em meio de cultura contendo glicerol (15%, v/v). Todos os ensaios foram realizados em esterilidade (câmara de fluxo laminar Steril - VBH), a fim de evitar contaminações. Para a realização dos ensaios, os microrganismos foram inoculados em placas de Petri contendo meio TSA, com exceção da *C. albicans* que foi inoculada em meio SDA e da *L. monocytogenes* que foi inoculada em meio BHIA. As placas foram incubadas durante 24 ou 48 horas (apenas no caso da *C. albicans*) em estufa a 35 ± 2 °C ou 30 ± 2 °C (apenas nos casos de *B. cereus* e *C. albicans*).

As suspensões iniciais para a realização dos ensaios foram preparadas a partir das colónias resultantes do crescimento de cada um dos microrganismos inoculados, transferindo-se, com o auxílio de uma ansa, colónias para um tubo de ensaio contendo 3,0 mL de meio salino (NaCl, 0,85% p/v). A turbidez da suspensão foi ajustada a cerca de 0,5 na escala de McFarland (Densitómetro Grant-Bio DEN-1B), o que corresponde a uma densidade celular de 1-2x10⁸ Unidades Formadoras de Colónias (UFC)/mL, no caso das bactérias ou 1-5x10⁶ UFC/mL no caso da levedura (Espinell-Ingroff & Cantón, 2007; Wanger, 2007).

A atividade antimicrobiana dos diferentes extratos foi avaliada através do ensaio de difusão em agar e do ensaio de microdiluição em meio líquido, tendo todos os ensaios sido realizados em triplicado.

3.8.1- Método de difusão em agar

O método de difusão em agar baseia-se no Método de Kirby-Bauer (1966). O teste de difusão em agar, designado muitas vezes por difusão em placas, é um método no qual um microrganismo é exposto a uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo com a concentração da substância utilizada. Esta técnica é bastante utilizada, sendo considerada de fácil execução, reproduzível, simples e permite testar diversas concentrações das substâncias em estudo na mesma placa. No entanto, só é aplicável em microrganismos com crescimento rápido e requer grandes quantidades de substância de teste. O método de difusão em agar é frequentemente utilizado para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos de plantas (Balouiri *et al.*, 2016; Ostrosky *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2022).

As suspensões iniciais, preparadas como anteriormente descrito, foram espalhadas nas placas de Petri com meio MHA com ajuda de zaragatoas estéreis. Em seguida, fizeram-se poços equidistantes (6 mm de diâmetro) para onde se pipetaram 45 µL das várias amostras nas concentrações máximas (20 mg/mL). Seguidamente, as placas foram colocadas em refrigeração a 4 °C, de modo a haver a difusão total dos extratos (Tepe *et al.*, 2004) e, por fim, foram incubadas em estufa (Memmert) a 35 ± 2 °C ou 30 ± 2 °C (apenas nos casos da bactéria *Bacillus cereus* e da levedura *Candida albicans*) durante 24 horas. Foram igualmente realizados ensaios controlo utilizando 45 µL de etanol 70 % (ensaio controlo). Após o tempo de incubação em estufa, os diâmetros das zonas de inibição criadas foram medidos com recurso a uma régua, e a atividade antimicrobiana foi estimada a partir desses mesmos diâmetros (figura 3.8). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

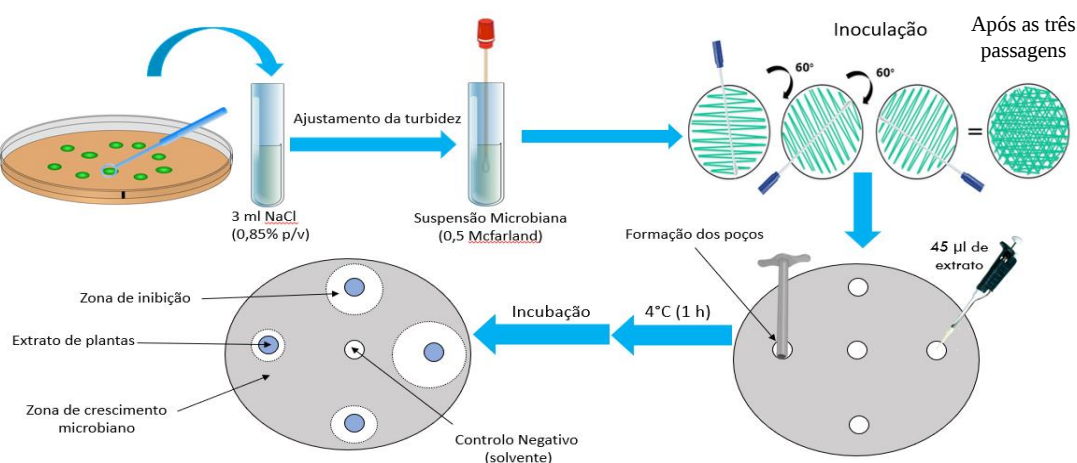


Figura 3.8-Esquema simplificado do teste de difusão em agar

3.8.2- Determinação da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição em meio líquido

Existem vários métodos disponíveis para a realização de testes antibacterianos e antifúngicos, e para a determinação das concentrações mínimas inibitórias dos agentes antimicrobianos (MIC) (Zgoda & Porter, 2001). Nos ensaios pelo método de difusão em agar a capacidade de difusão do componente antimicrobiano pode influenciar os resultados obtidos. Esta técnica também não permite determinar com exatidão a concentração mínima inibitória (MIC). O método de microdiluição baseia-se no método desenvolvido por Eloff (1998). Nesta técnica as microplacas de 96 poços são utilizadas para analisar os extratos de um modo mais sensível, realizando várias diluições em série. Este método é um método relativamente barato, é reprodutível, sensível, tendo ainda a vantagem de necessitar de uma quantidade de amostra menor, quando comparado com o método de difusão em agar e possibilitar a determinação da concentração mínima inibitória (Ostrosky *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2022).

Em placas estéreis de 96 poços (BRAND plates®) prepararam-se diluições seriadas (1:2) de cada amostra em meio MHB até um volume final de 100 µL por poço. Em seguida, cada poço foi inoculado com uma diluição de 1:10 das suspensões microbianas previamente preparadas (para atingir 10^6 UFC/mL em cada poço). As microplacas foram incubadas no escuro por 24 h, a 30 ± 2 °C (*Bacillus cereus*) ou a 35 ± 2 °C (restantes microrganismos). Foram efetuados ensaios em que se substituíram os extratos por igual volume de etanol 70% (controlo negativo). Os resultados foram analisados observando a turvação dos poços, seguido de uma repicagem para placas com meio TSA, à exceção da *L. monocytogenes* onde a repicagem foi feita para placas com meio BHIA. A partir da observação das microplacas determinou-se a concentração mínima inibitória (MIC), correspondendo à concentração mais baixa que impediu o crescimento bacteriano (ausência de turvação). A partir da observação das placas de Petri repicadas determinou-se a concentração mínima bactericida (MBC), correspondendo à concentração mais baixa para a qual não se verificou crescimento nas placas. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

3.9- Avaliação do potencial antidiabético

A atividade antidiabética dos diferentes extratos foi analisada através do ensaio de inibição de duas enzimas digestivas: α -amilase e α -glucosidase, tendo todos os ensaios sido realizados em triplicado.

3.9.1- Ensaio da Inibição da α -Amilase

Este método permite avaliar *in vitro* a atividade inibitória da enzima α -amilase pelos extratos de plantas em estudo. O ensaio de inibição da α -amilase baseia-se no princípio da degradação enzimática do substrato amido que resulta em açúcares redutores capazes de reagir e reduzir o reagente colorimétrico 3,5-ácido dinitrosalicílico (DNS) de cor amarela convertendo-o em ácido 3-amino-5-nitrosalicílico de cor vermelho-acastanhado. Este produto é quantificado espectrofotometricamente ao comprimento de onda de 540 nm, permitindo assim avaliar a atividade enzimática (Bhutkar & Bhise, 2012; Conforti *et al.*, 2005). Assim a atividade inibitória da enzima pelos extratos será tanto maior quanto menor a quantidade de açúcares redutores produzidos, ou seja, menos extensa a reação com o DNS o que se reflete numa menor mudança de cor da solução e, portanto, menor absorção ao comprimento de onda em análise.

A inibição da α -amilase foi avaliada de acordo com o método cromogénico descrito por Ferron *et al.* (2020). Diferentes diluições dos extratos em análise foram misturadas com 100 μ L da solução de enzima (0,5 mg/mL em tampão fosfato de sódio 100 mM, contendo cloreto de sódio 6,7 mM, pH 6,7), tendo as misturas sido incubadas durante 10 minutos a 37 °C. Seguidamente, adicionaram-se 100 μ L de uma suspensão de amido a 1% (p/v, previamente suspenso em tampão fosfato de sódio 100 mM, contendo cloreto de sódio 6,7 mM, pH 6,7 e fervido por 10 min) e incubou-se novamente durante mais 10 minutos a 37°C. Adicionaram-se então 200 μ L de reagente DNSA (20 mL de DNS 96 mM, 8 mL de 5,315 M de tartarato de potássio e sódio tetra-hidratado em NaOH 2 M e 12 mL de água destilada) e levou-se a banho-seco a 100 °C por 15 minutos. Findo este tempo adicionaram-se 2000 μ L de água mili-Q e registou-se o valor da absorvância a 540 nm (espectrofotómetro SPEKOL 1500).

Realizou-se um controlo negativo para medir a atividade máxima da enzima, onde a amostra foi substituída pelo solvente utilizado (etanol 70%). Prepararam-se paralelamente os brancos de cada amostra e o branco do controlo negativo, onde a enzima foi apenas adicionada após a adição do DNSA, tendo-se imediatamente realizado o aquecimento em banho-seco a 100 °C. Todos os ensaios foram realizados no mínimo em triplicado. A percentagem de inibição foi calculada através da equação 3:

$$\% \text{ Inibição} = \left[1 - \left(\frac{A_{\text{real}}}{A_{\text{controlo}}} \right) \right] * 100 \quad (\text{Equação 3})$$

Em que a absorvância da amostra real (A_{real}) é obtida pela diferença entre a absorvância da amostra e do respetivo branco, retirando assim o efeito da cor do extrato na quantificação da atividade enzimática. A absorvância do controlo (A_{controlo}) é obtido pela diferença entre a absorvância do controlo negativo e do seu respetivo branco.

Para determinar o IC_{50} , definido como a concentração final (mg/mL), na mistura reacional, que reduz a atividade enzimática em 50% efetuou-se uma reta da %I em função da concentração das amostras. A acarbose foi utilizada como controlo positivo. Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

3.9.2- Ensaio da Inibição da α -Glucosidase

O ensaio da inibição da α -Glucosidase permite avaliar *in vitro* a atividade inibitória da enzima α -glucosidase pelos extratos de plantas em estudo. Esta enzima é responsável pela hidrólise da maltose e da sacarose em monossacáridos elevando assim a glicemia pós-prandial (Moradi-Afrapoli *et al.*, 2012). O ensaio baseia-se na monitorização da reação enzimática de hidrólise da ligação glicosídica do p-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo (pNGP), com libertação do agente cromóforo p-nitrofenol, de coloração amarela, cuja libertação pode ser monitorizada espectrofotometricamente a 405 nm (figura 3.9). Quanto maior a intensidade da cor da solução, maior a absorvância a 405 nm e, portanto, menor o efeito inibitório na enzima dos extratos das plantas usados. Esta reação enzimática é interrompida previamente à quantificação, pela adição de uma solução de carbonato de sódio (Indrianingsih *et al.*, 2015).

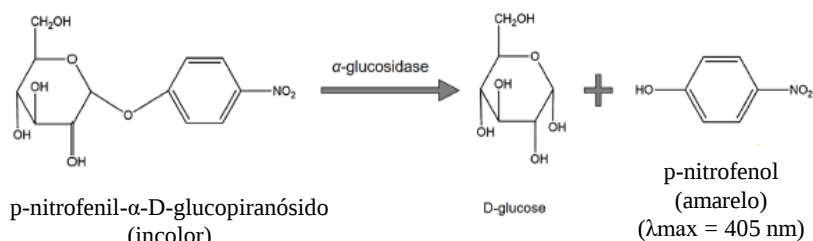


Figura 3.9- Ensaio de inibição da α -glucosidase: Mecanismo da reação no ensaio *in vitro* usando p-NGP como substrato (Lankatillake *et al.*, 2021).

A inibição da α -glucosidase foi avaliada de acordo com o método cromogénico descrito por Rouzbehan *et al.* (2017), com algumas modificações. Em microplacas de 96 poços (Greiner) adicionaram-se 125 μL de tampão fosfato (0,1 M, pH 6,9), 5 μL de solução de α -glucosidase (25 unidades/mL) e 20 μL das amostras em várias concentrações. As placas foram então incubadas por 15 min a 37 °C. A reação foi iniciada pela adição de 20 μL de solução de substrato (4-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo, 11 mM em tampão fosfato, 0,1M, pH 6,9). Após nova incubação de 15 min a 37 °C, a reação foi terminada com a adição de 80 μL de solução de carbonato de sódio a 0,2 M. Foram preparadas placas em que se substituiu a amostra por etanol 70% (controlo negativo), placas em que se substituiu a enzima por água (brancos das amostras). A absorvância foi lida em leitor de microplacas (Leitor de microplacas FLUOstar Omega) a 405 nm. Os extratos

foram analisados no mínimo em triplicado. As taxas de inibição enzimática das amostras foram calculadas de acordo com a equação 4:

$$\% \text{ Inibição} = (abs_{\text{controle}} - abs_{\text{amostra}}) / abs_{\text{controle}} * 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Em que a absorvância da amostra é obtida pela diferença entre a absorvância da amostra e do respetivo branco, retirando assim o efeito da cor do extrato na quantificação da atividade enzimática.

Para determinar o IC₅₀, definido como a concentração final (mg/mL), na mistura reacional, que reduz a atividade enzimática em 50% efetuou-se uma reta da %I em função da concentração das amostras. A acarbose foi utilizada como controlo positivo. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão.

3.10- Análise Estatística

De forma a determinar se existiam diferenças significativas entre os vários parâmetros analisados, nos extratos das diferentes plantas, realizou-se a análise paramétrica ANOVA, seguida de “Teste Tukey” ou “Teste Unequal N”, dependendo do número de replicados em análise. Antes da realização desta análise foram testados os pressupostos da análise, isto é, a normalidade dos resíduos e a homogeneidade de variâncias. Quando não se verificaram os pressupostos, os dados foram transformados (log). O nível de significância para a análise estatística efetuada foi de 0,05, tendo sido utilizado o software STATISTICA 7.0® no tratamento dos dados. Por fim, realizaram-se correlações lineares, com determinação do coeficiente linear de Pearson, para averiguar se existiam correlações entre os parâmetros calculados com recurso ao Microsoft Office Excel 365.

4- Resultados e Discussão

4.1- Rendimento de extração

Na tabela 4.1 encontram-se os valores do rendimento de extração para os diferentes extratos em análise. Os resultados mostram que a extração foi eficiente, uma vez que o rendimento do processo variou entre os 9,0 para o marmulano casca e os 29,3 % para a malfurada. Para além disso, verificou-se que o rendimento de extração variou de amostra para amostra.

A extração dos compostos bioativos das plantas pode ser efetuada através de diferentes metodologias, recorrendo a diferentes solventes, sendo que o método de extração desempenha um papel bastante relevante na recuperação destes constituintes. Fatores como o solvente utilizado, natureza da matriz vegetal, a temperatura e tempo de extração ou o tamanho das partículas são determinantes para o rendimento que se consegue obter (Pudziuelyte *et al.*, 2018).

Neste trabalho, foi escolhida a técnica de extração por ultrassons utilizando como solvente o etanol 70% (v/v). A extração com recurso a ultrassons é um método eficiente, economicamente viável, fácil de operar e amplamente aplicável para a extração de compostos biologicamente ativos, como é o caso dos compostos fenólicos. A cavitação gerada pelo ultrassom é conhecida por produzir diversos efeitos na matriz vegetal, tais como: a circulação do líquido (agitação do solvente) no sistema e a geração de turbulência que pode auxiliar no aumento da transferência de massa e causar perturbações na estrutura celular das plantas como alteração na permeabilidade, alargamento dos poros ou a quebra da parede celular (Oliveira, 2016). As cavitações acústicas produzidas pelo ultrassom facilitam a penetração do solvente nas paredes celulares da matriz vegetal, permitindo que o conteúdo intracelular seja libertado de forma eficaz e a agitação do solvente aumenta a superfície de contacto entre o solvente e os compostos alvos, permitindo maior penetração do solvente na matriz da amostra (Da Silva *et al.*, 2016).

Tabela 4.1-Rendimento de extração obtido para os extratos das diferentes amostras

Amostra	Rendimento (%)
Urze-molar	14,5
Marmulano (folha)	20,5
Marmulano (ramo)	12,0
Marmulano (casca)	9,0
Hortelã-de-cabra	15,7
Malfurada	29,3
Silvado	16,0
Molarinha	11,6

Por outro lado, as misturas de etanol e água, com uma proporção de cerca de 70% de etanol, têm mostrado ser bastante eficientes na extração de compostos bioativos de diversas

plantas, possivelmente devido à polaridade resultante da mistura destes dois solventes facilitar a dissolução dos constituintes ativos (Pudziuvelyte *et al.*, 2018).

Uma vez que as condições experimentais foram exatamente as mesmas, as diferenças verificadas resultam da diferente composição das várias espécies/frações utilizadas na preparação dos extratos, nomeadamente da diferente composição em compostos solúveis em etanol 70%, ou da maior ou menor dificuldade em efetuar a sua libertação da matriz vegetal.

4.2- Determinação dos fenóis totais pelo Método Folin-Ciocalteu

Os compostos fenólicos totais dos extratos em estudo foram determinados através do método Folin-Ciocalteu, encontrando-se os resultados obtidos na tabela 4.2. Neste ensaio foi utilizado como padrão o ácido gálico, que é um composto fenólico de importância nutracêutica, dadas as suas variadas atividades biológicas, entre elas atividade antioxidante (Prakash & Sharma, 2014). A figura 4.1 apresenta a curva de calibração com ácido gálico, utilizada na determinação dos compostos fenólicos totais presentes nas amostras testadas.

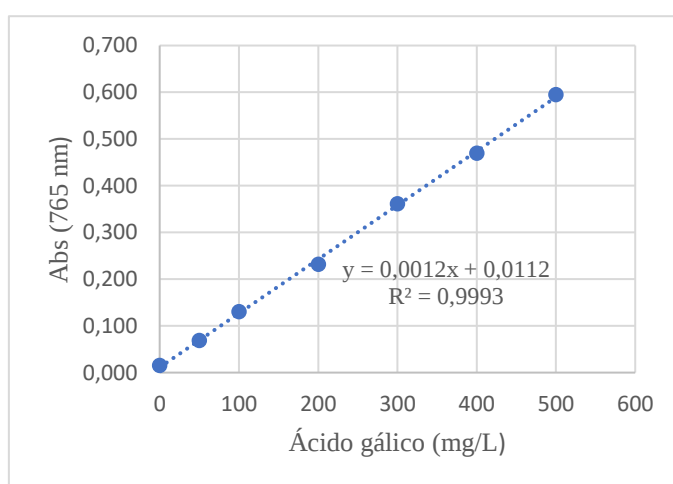


Figura 4.1-Reta de calibração com ácido gálico.

Tabela 4.2- Teor em compostos fenólicos totais nos diferentes extratos.

Amostras	Compostos fenólicos totais (mg EAG/g extrato seco)
Urze-molar	265,11 ^a ± 7,09
Marmulano (folha)	231,78 ^b ± 0,96
Marmulano (ramo)	225,11 ^b ± 19,88
Marmulano (casca)	158,44 ^c ± 4,74
Hortelã-de-cabra	78,11 ^f ± 1,46
Malfurada	86,72 ^e ± 3,18
Silvado	118,17 ^d ± 3,00
Molarinha	86,72 ^e ± 1,27

EAG: equivalentes de ácido gálico. Os valores apresentados representam a média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos (tabela 4.2) mostram uma variação significativa no teor de compostos fenólicos entre as várias amostras. Assim, os valores variaram entre os 265,11 mg EAG/g, para o extrato de urze-molar e os 78,11 mg EAG/g de extrato seco, para a hortelã-de-cabra. Desta forma o extrato de urze-molar foi o que apresentou um teor mais elevado, seguido do marmulano (folha>ramo>casca), silvado, malfurada e molarinha (contêm o mesmo teor de fenóis), e por último, com menor composição em compostos fenólicos, o extrato de hortelã-de-cabra, sendo que a maioria dos valores foram significativamente diferentes ($p < 0,05$), à exceção dos valores para o extrato de marmulano folha e marmulano casca e de malfurada e molarinha.

Em relação ao marmulano, verificou-se que os extratos das diferentes partes da planta continham teores de fenóis totais distintos entre si, sendo os extratos de folha e de ramo mais ricos em compostos fenólicos do que o extrato de casca. Os extratos de urze-molar e marmulano apresentaram um teor em compostos fenólicos cerca de 3 vezes superior aos extratos de hortelã-de-cabra, malfurada e molarinha e cerca de 2 vezes superior ao extrato de silvado.

A comparação dos valores obtidos com os dados da literatura é bastante difícil de efetuar devido à grande disparidade de solventes utilizados na obtenção dos extratos, de métodos de extração, de formas como é utilizada a planta (seca, liofilizada, fresca) na forma como se expressam os resultados (mg equivalentes de ácido gálico, de ácido cafeico, de pirogalhol, ácido p-cumárico, o ácido vanílico, etc.), ou ainda como estes se apresentam (mg de fenóis por peso de planta fresca, por peso de planta seca, por peso de extrato obtido, etc.). A comparação é também dificultada pela falta de valores para muitas das espécies estudadas. Por este motivo a comparação foi alargada a extratos de plantas do mesmo género ou da mesma família.

A avaliação do teor em compostos fenólicos totais de extratos aquosos da urze-molar (*E. arborea*) proveniente da Argélia pelo método de Folin-Ciocalteu mostrou um teor de $203,26 \pm 0,73$ mg de EAG/g de extrato (Amroun *et al.*, 2021), semelhante ao valor observado. Já outro estudo realizado por Guendouze-Bouchefa *et al.* (2015), com extratos metanólicos de três plantas da família Ericaceae, verificaram-se os seguintes resultados: $70,8 \pm 2,5$ mg de EAG/g de extrato seco para *E. arborea*, $68,2 \pm 3,2$ mg de EAG/g de extrato seco para *E. multiflora* e $179,6 \pm 6,7$ mg de EAG/g de extrato seco para *A. unedo*. Tais valores são mais baixos do que o encontrado neste estudo. O facto de, no presente trabalho, a extração ter sido efetuada com etanol 70%, enquanto no estudo de Guendouze-Bouchefa *et al.* (2015) foi efetuada com metanol, poderá contribuir para o maior valor de compostos fenólicos determinado. Em outra pesquisa sobre a caracterização fitoquímica e avaliação das propriedades antimicrobianas de extratos metanólicos de urze e feto comum provenientes da Cova da Beira, verificou-se que a quantidade de fenóis totais variou entre, aproximadamente, 68 e 150 mg equivalentes de ácido gálico por grama de extrato, sendo que as flores da urze tinham a maior quantidade de fenóis, seguida da urze (planta) e por fim, o feto comum com a menor quantidade (Santos, 2017), resultados inferiores ao da urze no presente estudo. Já Turgay & Esen (2015) encontraram um teor de fenóis totais para extratos de *Erica*

manipuliflora de 260 mg EAG/g de extrato seco, ligeiramente superior ao valor encontrado neste estudo. Assim, avaliando os resultados encontrados por outros autores para outras espécies pertencentes género *Erica* ou para a espécie *E. arborea* (urze-molar) mas com uma origem geográfica diferente, permitiram verificar que o extrato de urze-molar (*E. arborea*) da Madeira apresentou, de um modo geral, um dos mais elevados conteúdos em compostos fenólicos totais.

Dakiche *et al.* (2016) avaliaram o teor de fenóis totais de um extrato de metanol/água (70:30 (v/v)) das folhas da *Argania spinosa* L, planta pertencente à mesma família do marmulano, e o valor obtido foi de $221,393 \pm 5,697$ mg de EAG/g de extrato seco, resultado semelhante ao valor obtido neste trabalho. No entanto, os teores de fenóis totais obtidos para os extratos de marmulano da Madeira foram inferiores aos relatados por Silva (2019) para extratos de marmulano de Cabo-verde (*Sideroxylon marginatum*) preparados nas mesmas condições de extração do presente estudo ($338,4 \pm 7,4$ mg EAG/g de extrato seco).

Em relação ao silvado (*Rubus ulmifolius*), Luís *et al.* (2011) encontraram um valor de $186,8 \pm 3,8$ mg de EAG g de extrato seco para extratos metanólicos obtidos por extração Soxhlet do caule desta planta, valor mais elevado do que o registado no presente estudo. Em contrapartida, o resultado observado no silvado madeirense foi bastante superior ao obtido no estudo de Desmiaty *et al.* (2018), com outras espécies do mesmo género, nomeadamente *R. fraxinifolius* ($39,0 \pm 26,5$ mg GAE/g extrato) e *R. rosifolius* ($80,6 \pm 21,6$ mg de EAG/g de extrato).

Bouriche *et al.* (2017) determinou a quantidade de fenóis totais em vários extratos de *Globularia alypum*, planta do mesmo género da molarinha e obteve um teor de $185,05 \pm 0,01$ mg de EAG/g de extrato para extratos em metanol 80% e de $173,12 \pm 0,02$ mg de EAG/g de extrato seco para infusões aquosas, valores bastantes superiores aos obtidos com a malfurada no presente estudo.

Em uma pesquisa feita por Razavi & Kenari (2021), analisou-se a influência dos métodos de extração no teor de compostos fenólicos de extratos hidroetanólicos da *Fumaria parviflora* L e os valores variaram entre os $21,03 \pm 1,2$ e os $50,47 \pm 0,6$ mg de EAG/g de extrato, sendo o extrato obtido pela técnica de extração assistido por ultrassom o que teve os melhores resultados. Ivanov *et al.* (2014), obteve valores entre $20,20 \pm 0,2$ (*F. thuretii*) e os $30,30 \pm 0,31$ mg de EAG /g de extrato seco (*F. officinalis*). Por comparação, o teor de fenóis molarinha (*Fumaria muralis*) proveniente da Madeira é superior aos valores reportado nesses estudos.

Noutro estudo determinou-se o teor em compostos fenólicos totais de extratos hidroetanólicos de espécies da família Lamiaceae como o tomilho, sálvia, manjerição e alecrim tendo-se obtido valores que variaram entre $14,89 \pm 0,26$ e $123,43 \pm 0,78$ mg EAG/g de extrato seco (Silva, 2016). O extrato da hortelã-de-cabra, planta que pertencente à mesma família está dentro da gama de valores observados por Silva, 2016. Já Benabdallah *et al.* (2016) determinaram o teor em compostos fenólicos totais de extratos metanólicos de seis espécies de menta da Argélia

da mesma família da hortelã-de-cabra, e os valores alternaram entre os 14,66 e os 43,21 mg de EAG/ g de extrato seco, bastantes inferiores ao valor determinado na hortelã-de-cabra.

As diferenças verificadas entre os resultados obtidos neste estudo e os resultados publicados por outros autores podem dever-se a diferenças na composição específica de cada espécie ou variedade estudada, bem como a diferenças nas condições de solo e clima em que as plantas cresceram, na altura em que foram colhidas e ainda a diferenças no procedimento de extração (Che-Sulaiman *et al.*, 2017; Min *et al.*, 2015).

4.3- Quantificação dos Flavonoides Totais

A determinação dos flavonoides totais foi realizada através do método de complexação com o alumínio na presença do nitrito de sódio em meio alcalino. A figura 4.2 apresenta a reta de calibração de catequina, utilizada na quantificação dos flavonoides totais das plantas medicinais em estudo, encontrando-se os resultados obtidos para as diferentes amostras na tabela 4.3.

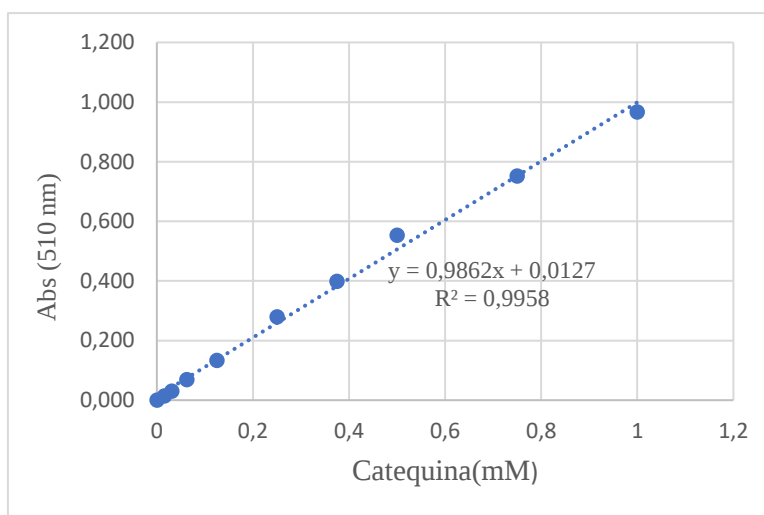


Figura 4.2-Reta de calibração de catequina utilizada na determinação dos flavonoides totais.

Tabela 4.3-Teor em flavonoides totais nas diferentes amostras testadas

Amostra	Flavonoides totais (mg EC/g extrato seco)
Urze-molar	183,65 ^a ± 4,50
Marmulano (folha)	57,38 ^c ± 1,19
Marmulano (ramo)	73,57 ^b ± 3,54
Marmulano (casca)	51,60 ^{cd} ± 3,39
Hortelã-de-cabra	51,41 ^{cd} ± 6,42
Malfurada	48,42 ^{cd} ± 3,33
Silvado	43,24 ^d ± 4,23
Molarinha	33,16 ^e ± 3,49

EC: Equivalentes de catequina, os valores apresentados representam a média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Através da análise dos resultados obtidos, é verificável uma diferença significativa do teor em flavonoides totais entre os diferentes extratos estudados. Os valores variaram entre os 33,16 e os 183,65 mg de equivalentes de catequina por g de extrato seco, sendo que os valores referentes aos extratos de marmulano casca, hortelã-de-cabra e malfurada não são significativamente diferentes entre si ($p>0,05$), situação que se opõe aos restantes valores.

O teor de flavonoides mais elevado foi mais uma vez verificado no extrato de urze-molar, seguido do ramo de marmulano, sendo os extratos de silvado e molarinha os que apresentaram os teores mais baixos. Neste caso, o teor de flavonoides da urze-molar foi cerca de 6 vezes superior ao extrato de molarinha, 4 vezes superior aos extratos de malfurada, silvado e hortelã-de-cabra e 3 vezes superior aos extratos de marmulano.

Os flavonoides são um grupo de compostos fenólicos abundantes na natureza, sendo que a grande maioria são pigmentos de plantas, capazes de exercer uma forte atividade antioxidante por possuírem propriedades redutoras, de sequestro de radicais, de quelação de metais ou de ativação de enzimas antioxidantes (Cos *et al.*, 1998, Saigg & Silva, 2009; Sousa *et al.*, 2007). O teor em flavonoides das plantas, para além de ser diferente consoante as características genéticas específicas de cada espécie, é também influenciado por outros fatores como humidade, luminosidade, temperatura, etc. Um estudo realizado com folhas da espécie *Argania spinosa L.* recolhidas em diferentes locais em Marrocos revelou uma variação no teor de flavonoides de acordo com a época de colheita. Os meses em que foram registados os teores de flavonoides mais altos, coincidiram com as épocas onde as temperaturas eram mais elevadas (meses de Verão) Para além disso, verificou-se que o teor de flavonoides era mais baixo, em locais de clima árido com pouca precipitação e de baixa altitude (Fahmi *et al.*, 2013).

Estudos realizados com extratos metanólicos de *E. arborea* (urze-molar) proveniente da Argélia (Guendouze-Bouchefa *et al.*, 2015) e com extratos etanólicos da mesma espécie proveniente de Marrocos (Amezouar *et al.*, 2013) mostraram valores de $9,5 \pm 0,1$ mg de equivalentes de quercetina/ g de extrato seco e de 54 mg equivalente de quercetina/g de extrato, respetivamente. De acordo com Guendouze-Bouchefa *et al.* (2015) verifica-se uma grande variação entre os teores de flavonoides reportados na literatura para esta espécie que, de acordo com os mesmos autores, se pode dever às diferenças nas condições geográficas e climáticas da zona onde a planta cresceu.

O método de extração é outro dos fatores que pode explicar diferenças encontradas entre diferentes autores em relação ao teor em flavonoides. Razavi & Kenari (2021), fizeram uma avaliação da influência dos métodos de extração no teor de flavonoides de extratos de *Fumaria parviflora L.* Estes autores prepararam extratos hidroetanólicos utilizando extração assistida por ultrassons, extração assistida por micro-ondas, extração com fluido supercrítico e extração com água subcrítica e obtiveram valores entre os $9,45 \pm 1,2$ mg de equivalentes de quercetina/g de

extrato, para a extração com água subcrítica e os $13,14 \pm 0,9$ mg de equivalentes de quercetina/g de extrato, para o extrato obtido pela técnica de extração assistida por ultrassons.

Asraoui *et al.* (2021) determinaram a quantidade de flavonoides totais em extratos de folhas de *Globularia alypum* L. preparados em clorofórmio e em acetato de etilo e os resultados comprovaram que os extratos em acetato de etilo ($30,2 \pm 0,55$ µg de EC/mg de extrato seco) continham quase duas vezes mais flavonoides que os extratos de clorofórmio ($18,00 \pm 0,36$ µg de EC/mg de extrato seco). Os valores relatados por Asraoui *et al.* (2021) foram inferiores aos encontrados no extrato hidroetanólico da malfurada da Madeira (*Globularia salicina*).

Dakiche *et al.*, (2016) fez também uma avaliação do teor de flavonoides totais do extrato metanólico das folhas da *Argania spinosa* L e o valor obtido foi de $66,856 \pm 3,359$ mg de EC/g de extrato seco, resultado superior ao dos extratos de casca e de folha de marmulano da Madeira, mas inferior ao resultado observado no extrato de ramo de marmulano. Tal como verificado para os fenóis totais, também no caso dos flavonoides totais, os extratos de marmulano da Madeira apresentaram teores inferiores aos relatados por Silva (2019) para extratos de marmulano de Cabo-verde (*Sideroxylon marginatum*) preparados nas mesmas condições de extração do presente estudo ($290,4 \pm 8,6$ mg EC/g de extrato seco).

Um estudo de Abu Bakar *et al.* (2016), obteve os seguintes resultados para os extratos metanólicos (80% (v/v)) dos frutos de várias espécies de silvado: $18,17 \pm 0,20$ mg de EC/g de extrato seco no *R. moluccanus*, $5,82 \pm 0,02$ mg de EC/g de extrato seco no *R. fraxinifolius* e $8,88 \pm 0,53$ mg de EC/g de extrato seco no *R. alpestris*. Tais valores são inferiores aos encontrados no presente estudo e podem indicar que os flavonoides têm tendência em se depositar em maior quantidade nas folhas e no caule.

Vábková *et al.* (2010), encontraram valores para várias cultivares da família Lamiaceae, a mesma que da hortelã-de-cabra (*Cedronella canariensis*), e os resultados obtidos mostraram valores entre 164,2 e 291,2 g de EC/100 g de extrato fresco.

Comparando o teor em flavonoides (tabela 4.3) com o teor em fenóis totais (tabela 4.2), verifica-se uma consistência em relação aos resultados dos valores encontrados para os extratos de urze-molar e marmulano, ou seja, estas plantas apresentaram valores elevados em ambos os ensaios. Um facto interessante é que a hortelã-de-cabra, apesar de ter apresentado o teor mais baixo em fenóis totais, apresentou um teor em flavonoides equiparável com o marmulano casca e mais elevado do que os extratos de malfurada, silvado e molarinha. Este facto parece indicar que os flavonoides contribuem mais para o total de fenóis da hortelã-de-cabra do que para o mesmo total para os extratos referidos anteriormente.

Para averiguar se existe uma correlação entre o teor de fenóis e o teor de flavonoides, realizaram-se várias correlações lineares, com recurso ao coeficiente linear de Pearson (Anexo I). O coeficiente linear de Pearson, é um coeficiente que mede a intensidade de associação linear

entre as variáveis e pode tomar valores entre -1 e 1, sendo que quanto mais próximo de 1 for este coeficiente, mais forte é a correlação positiva entre as variáveis (Mukaka, 2012).

O valor do coeficiente de Pearson para a correlação entre o teor em fenóis totais e o teor em flavonoides totais dos extratos das plantas estudadas (tabela 4.4) indica a existência de uma correlação forte entre o teor de fenóis totais e o teor de flavonoides totais. Os resultados obtidos para estes dois ensaios apontavam nesse sentido, uma vez que os extratos com maior teor em fenóis apresentaram também o maior teor em flavonoides.

Tabela 4.4-Coeficiente de Pearson para as correlações entre a composição em fenóis totais e em flavonoides dos extratos estudados

	Fenóis	Flavonoides
Fenóis ^a	1	
Flavonoides ^b	0,716	1

a) mg EAG/g de extrato seco; b) mg EC/g de extrato seco

4.4- Determinação da capacidade antioxidante dos diferentes extratos

Uma vez que não existe um método universal para analisar a atividade antioxidante de uma amostra, por esta poder ser exercida através de diferentes mecanismos, aplicaram-se diversos ensaios para avaliar o potencial antioxidante dos extratos. Assim, realizaram-se dois ensaios de determinação da capacidade de sequestro de espécies radicalares (sequestro dos radicais DPPH• e anião superóxido) e dois ensaios de determinação da capacidade redutora (ensaios FRAP e CUPRAC).

4.4.1-Determinação da capacidade de sequestro do radical DPPH•

A tabela 4.5 apresenta os resultados da avaliação da capacidade dos vários extratos para sequestrar o radical DPPH•. Os resultados estão expressos em IC₅₀, que indica a concentração de extrato necessária para desativar em 50% o radical DPPH•. O controlo positivo do ensaio foi realizado com ácido ascórbico.

O ácido ascórbico (vitamina C) é um composto químico que ocorre naturalmente em muitos frutos e vegetais frescos. É um antioxidante muito utilizado na indústria alimentar, cuja função é retardar as reações oxidativas que possam ocorrer nos alimentos e evitar o escurecimento de frutas e sumos, aumentando assim o seu tempo de vida útil (ASAE, 2022; Frankel, 1996). O resultado obtido para o IC₅₀ do ácido ascórbico neste ensaio foi de 11,78 ± 0,25 µg/mL, valor que é conforme com o relatado na literatura (Zadra *et al.*, 2012).

Tabela 4.5-Capacidade de sequestro do DPPH• das diferentes amostras

Amostra	DPPH•-IC ₅₀ (µg/mL)
Urze-molar	2,35 ^a ± 0,04
Marmulano (folha)	61,00 ^c ± 1,52
Marmulano (ramo)	55,77 ^b ± 2,36
Marmulano (casca)	94,87 ^d ± 2,37
Hortelã-de-cabra	148,76 ^e ± 2,16
Malfurada	142,48 ^e ± 6,51
Silvado	64,09 ^c ± 1,54
Molarinha	188,01 ^f ± 4,02

Os valores apresentados representam a média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05).

Através dos dados apresentados na tabela 4.5, todos os extratos conseguiram inibir o radical DPPH• em mais de 50%, e, por isso, foi possível determinar a quantidade de amostra necessária para sequestrar 50% do radical DPPH• presente na mistura reacional (IC₅₀) (tabela 4.5). Quanto mais pequeno for este valor, maior será a capacidade antioxidante da amostra, uma vez que um valor mais baixo significa que é necessária uma quantidade de amostra mais baixa para se conseguir a mesma percentagem de sequestro. De acordo com o teste Tukey (p<0,05), a maior parte das amostras diferiram de forma significativa, exceto o marmulano folha e o silvado e a hortelã-de-cabra e a malfurada (p>0,05). O extrato hidroetanólico da urze-molar apresentou um valor de IC₅₀ de 2,35 µg/mL, muito inferior ao dos restantes extratos analisados. Contrariamente, o extrato de molarinha apresentou o valor mais elevado de IC₅₀ (188,01 µg/mL). Assim, a urze-molar é o extrato com maior atividade antioxidante, uma vez que necessita de uma menor quantidade para provocar metade da resposta máxima. Para além disso, a sua atividade antioxidante foi bastante superior ao do ácido ascórbico, conservante utilizado nos alimentos, visto que o valor do IC₅₀ foi inferior ao do controlo positivo. Este resultado sugere que o extrato de urze-molar poderá ser uma boa alternativa aos conservantes convencionais. De acordo com os resultados obtidos neste ensaio para a capacidade de captura de 50% dos radicais livres DPPH• presentes em solução, as plantas estudadas posicionam-se pela seguinte ordem decrescente: urze-molar>marmulano (ramo>folha>casca) > silvado> malfurada >hortelã-de-cabra >molarinha.

A elevada atividade antioxidante obtida com o extrato urze-molar está de acordo com os resultados de Ay *et al.* (2007), que verificaram que os extratos de urze da Turquia (Distrito de Karaköy) apresentaram um potencial antioxidante superior ao do antioxidante sintético hidroxitolueno butilado (BHT). Pavlovic *et al.* (2009), também constatarem uma atividade antioxidante elevada em várias plantas da família *Ericaceae*, sendo que os valores do IC₅₀ oscilaram entre 7,11 e os 13,44 µg/mL, resultados superiores aos encontrados no presente trabalho para o extrato de urze-molar e, por isso, a atividade antioxidante do extrato de urze-molar em estudo é mais elevada do que os extratos das urzes estudadas por Pavlovic *et al.* (2009).

Um estudo Hebi & Eddouks (2019), obteve o valor de IC₅₀ de 248,27 µg/mL para um extrato aquoso de folhas de *Argania spinosa* L., planta da mesma família do marmulano. Este

extrato apresentou um potencial antioxidante inferior ao do antioxidante sintético BHT. Estes dados demonstram que a capacidade de sequestro do radical DPPH pelos extratos de marmulano em estudo é bastante superior à do extrato do estudo referido anteriormente. Para além da diferença da espécie, a diferença do solvente (extrato aquoso *versus* hidroetanólico) também pode contribuir para a diferença de atividade antioxidante verificada.

O resultado obtido pelo silvado ficou aquém do esperado ($IC_{50}=64,09 \pm 1,54 \mu\text{g/mL}$), uma vez que o valor do IC_{50} reportado por Dall'Acqua *et al.* (2008) para extratos metanólicos de silvado (*R. ulmifolius*) foi bastante inferior ($IC_{50} = 5,10 \pm 0,5 \mu\text{g/mL}$), sugerindo que o *R. ulmifolius* da Sardenha (Itália) possa ter um poder antioxidante superior ao do madeirense.

Num estudo realizado por Asraoui *et al.* (2021) verificou-se a presença de atividade antioxidante detetada através do ensaio do DPPH ($IC_{50}= 12,3 \pm 3,83 \mu\text{g/mL}$), em extratos de acetato de etilo da *Globularia alypum L.* O extrato de malfurada (*Globularia salicina*) em estudo apresentou um valor de IC_{50} bastante superior, sugerindo que a extração em acetato de etilo possa ser mais eficaz em extrair os compostos bioativos das espécies deste género do que o etanol 70%. No entanto, as diferenças entre espécies e origens geográficas também pode contribuir para explicar as diferenças observadas.

Ivanov *et al.* (2014) analisou a atividade antioxidante de cinco espécies do género *Fumaria* colhidas na Bulgária e verificou que o extrato etanólico de *F. officinalis* foi o extrato com maior atividade antioxidante no ensaio do DPPH ($IC_{50}= 2,39 \pm 0,04 \text{ mg/mL}$). Já Edziri *et al.* (2020) estudaram a atividade antioxidante de extratos de *F. officinalis* da Tunísia, preparados em diferentes solventes, nomeadamente acetato de etilo, clorofórmio, metanol e éter de petróleo, e verificaram que o extrato metanólico foi o que apresentou maior atividade antioxidante no ensaio do DPPH ($IC_{50}= 2,5 \pm 0,57 \mu\text{g/mL}$). O valor obtido para o extrato de molarinha (*F. officinalis*) da Madeira está entre os valores reportados por estes dois autores.

Zorzetto *et al.* (2015) avaliaram a atividade antioxidante dos óleos essenciais de *Cedronella canariensis var. canariensis L.* pelo mesmo método e os resultados não foram nada satisfatórios, já que os óleos essenciais apresentaram um IC_{50} de $615,5 \mu\text{g/mL}$, valor que foi cerca de 500 vezes mais baixo do que o do Trolox, antioxidante bastante utilizado na indústria cosmética, e cerca de quatro vezes inferior ao do extrato hidroetanólico de hortelã-de-cabra deste trabalho.

De forma a estabelecer relações entre o teor em fenólicos totais e em flavonoides totais das amostras estudadas e a sua respetiva capacidade de sequestro do radical DPPH, efetuaram-se correlações lineares entre estes parâmetros, podendo observar-se os valores do coeficiente de Pearson na tabela 4.6.

Tabela 4.6-Coeficiente de Pearson para as correlações entre composição química e o ensaio do DPPH• para as várias amostras em estudo

	Fenóis	Flavonoides	DPPH
Fenóis ^a	1		
Flavonóides ^b	0,716	1	
DPPH ^c	-0,878	-0,722	1

a) mg EAG/g de extrato seco; b) mg EC/g de extrato seco; c) IC₅₀µg/mL

Verifica-se a existência de uma correlação fortemente negativa entre o teor de fenóis e em flavonoides totais e a atividade antioxidante determinada pelo ensaio DPPH. A existência de correlações fortemente negativas entre o teor em fenóis totais e os valores de DPPH foi igualmente verificada por outros autores (Indradi *et al.*, 2017) De facto, os extratos com maior teor de fenóis totais e em flavonoides totais (urze-molar e marmulano) foram os que apresentaram valores de DPPH mais baixos, indicando assim que os polifenóis, e, em particular os flavonoides possam contribuir significativamente para a atividade antioxidante detetada. Os valores obtidos indicam a existência de uma correlação mais forte entre o teor em fenóis totais e a atividade de sequestro do radical DPPH• do que entre o teor em flavonoides e a mesma atividade de sequestro. Isto pode indicar que existam outros polifenóis, como por exemplo os ácidos fenólicos, que também contribuam de forma significativa para a capacidade antioxidante dos extratos (Santi *et al.*, 2014).

No entanto, a relação entre a atividade antioxidante e os compostos fenólicos pode não ser só quantitativa, ou seja, para além de se poder relacionar com a concentração de compostos bioativos presentes no extrato, a atividade antioxidante pode também estar relacionada com a estrutura química específica dos compostos presentes. Com efeito, os compostos bioativos não possuem todos a mesma atividade antioxidante, pelo que um aumento da concentração de um determinado composto não significa um aumento proporcional da atividade antioxidante. Por exemplo, o número de grupos hidroxilos livres presentes numa molécula é uma característica importante para doar átomos de hidrogénio, um dos mecanismos que pode estar envolvido no sequestro do radical DPPH• e de outras espécies radicalares (Santi *et al.*, 2014).

Por outro lado, quando se procede à avaliação da atividade antioxidante de um extrato complexo, é necessário considerar os efeitos sinérgicos ou antagónicos entre os diversos compostos presentes, o que torna não só, a atividade antioxidante dependente da concentração de cada composto, mas também da interação entre os diferentes compostos (Sanjust *et al.*, 2008).

Por último, é ainda necessário considerar a possibilidade de existência nos extratos de outros compostos bioativos que possam contribuir para a atividade antioxidante, como por exemplo os compostos terpénicos, alcaloides ou os carotenoides (Sanjust *et al.*, 2008).

4.4.2-Determinação da atividade de redução do Fe (III) a Fe (II) pelo ensaio FRAP

Os valores FRAP das amostras testadas foram determinados por interpolação de uma reta de calibração realizada com ácido ascórbico (figura 4.3), e encontram-se na tabela 4.7.

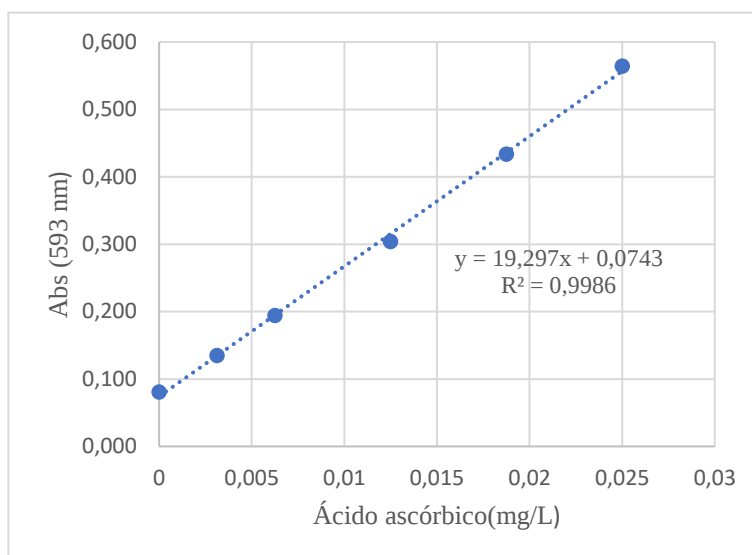


Figura 4.3- Recta de calibração de ácido ascórbico para o ensaio FRAP.

Tabela 4.7- Valores obtidos com os diferentes extratos no ensaio FRAP

Amostra	FRAP ($\mu\text{g EAA/g extrato seco}$)
Urze-molar	115,58 ^b $\pm$ 1,58
Marmulano (folha)	153,41 ^a $\pm$ 5,96
Marmulano (ramo)	142,01 ^a $\pm$ 0,30
Marmulano (casca)	118,34 ^b $\pm$ 2,85
Hortelã-de-cabra	47,94 ^d $\pm$ 1,06
Malfurada	44,05 ^e $\pm$ 1,32
Silvado	78,35 ^c $\pm$ 4,28
Molarinha	16,86 ^f $\pm$ 0,18

EAA: equivalentes de ácido ascórbico. Os valores apresentados representam a média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Após a análise dos resultados obtidos, verifica-se que os diferentes extratos apresentam valores de FRAP que variaram entre os 16,86 e os 153,41 $\mu\text{g EAA/g}$ de extrato seco, sendo que a maioria dos resultados apresentou diferenças significativas entre si ($p < 0,05$), à exceção dos valores obtidos entre os diferentes extratos de folha e ramo de marmulano e o extrato de urze molar e de casca de marmulano ($p > 0,05$). O menor valor foi obtido no extrato de molarinha e o valor mais elevado nos extratos de marmulano (folha e ramo), sendo que o extrato de folha de marmulano apresentou um valor de FRAP cerca de dez vezes superior ao extrato de molarinha.

Outros trabalhos já tinham demonstrado a presença de atividade FRAP em algumas das espécies estudadas, mas com outras origens geográficas. Assim, Amezouar *et al.* (2013),

realizaram um extrato metanólico de *Erica arborea* da região de Marrocos e obtiveram no ensaio de FRAP um valor de $9,48 \pm 0,05$ mg de equivalentes de vitamina E por grama de extrato seco. Extratos etanólicos de *F. officinalis* da Bulgária revelaram uma atividade FRAP de $161,48 \pm 2,67$ mmol equivalentes de trolox por grama de extrato seco (Ivanov et al., 2014; Al-Snafi, 2020). Zorzetto et al. (2015) obtiveram no ensaio de FRAP realizado com óleo essencial de *Cedronella canariensis* um valor de $3,8 \pm 1,4$ μ mol de equivalentes de trolox por grama de extrato seco. Mais uma vez a comparação dos valores obtidos com os dados da literatura é bastante complicada, devido à diferença na forma como se expressam os resultados (mg equivalentes de vitamina E, mmol equivalentes de trolox ou μ g EAA).

Da mesma forma outras espécies do género das espécies em estudo também já tinham revelado atividade FRAP. Assim, Srisupap & Chaicharoenpon (2021) estudaram a atividade antioxidante por diferentes ensaios nos extratos aquosos e metanólicos de diferentes partes da planta (caule, folhas, frutos, sementes e madeira) de *Manilkara kauki*, uma planta pertencente à mesma família do marmulano. Os ensaios do FRAP mostraram que no geral os extratos metanólicos tiveram maior atividade antioxidante do que os extratos aquosos, sendo que os valores variaram entre 11,96 e 211,59 mg de TE por grama de planta seca nos extratos metanólicos e entre 4,19 e 219,37 mg de TE por grama de planta nos extratos aquosos. Hanene et al. (2010) realizaram extratos de *Globularia alypum* em diferentes solventes e obtiveram valores de FRAP de 8,9 mM de equivalentes de trolox para o extrato aquoso, 8,5 mM de equivalentes de trolox para o extrato metanólico, 5,8 mM de equivalentes de trolox para o extrato de acetato de etilo e 1,1 mM de equivalentes de trolox para o extrato de éter de petróleo.

Procedendo-se à comparação entre os valores obtidos para o teor em fenóis totais (tabela 4.2), o teor em flavonoides totais (tabela 4.3), os valores do ensaio de DPPH (tabela 4.5) os valores do ensaio FRAP (tabela 4.7) é possível verificar-se que a ordem se alterou ligeiramente, ou seja, os valores mais altos foram sempre obtidos com os extratos de marmulano e de urze-molar, porém os extratos de folha e ramo de marmulano tiveram uma atividade FRAP superior ao do extrato de urze-molar, apesar de terem apresentado um teor inferior em compostos fenólicos totais.

Além do mais, no ensaio FRAP o extrato de hortelã-de-cabra teve uma atividade antioxidante semelhante ao de malfurada, tal como no ensaio DPPH, apesar de ter menor teor de fenóis totais. Este facto pode estar relacionado com o tipo de fenóis presentes, uma vez que, como já foi referido anteriormente, a atividade antioxidante varia com a estrutura química de cada composto. Já a molarinha teve uma atividade antioxidante muito fraca, tal como no ensaio de DPPH.

Na tabela 4.8 podem observar-se os valores do coeficiente de Pearson para as correlações entre o teor em fenóis e em flavonoides e o valor de FRAP, bem como entre a atividade de sequestro do radical DPPH• e a atividade de FRAP.

Tabela 4.8-Coeficiente de Pearson para as correlações entre o teor em fenóis totais, flavonoides totais, capacidade de sequestro do radical DPPH• e o ensaio FRAP

	Fenóis	Flavonoides	DPPH	FRAP
Fenóis ^a	1			
Flavonoides ^b	0,716	1		
DPPH ^c	-0,878	-0,722	1	
FRAP ^d	0,882	0,387	-0,817	1

a) mg EAG/g de extrato seco; b) mg EC/g de extrato seco; c) IC₅₀µg/mL; d) µg EAA/g de extrato seco

Mais uma vez, os valores obtidos indicam a existência de uma correlação mais forte entre o teor em fenóis totais e a atividade de FRAP do que entre o teor em flavonoides totais e a mesma atividade. Esta forte correlação sugere o envolvimento dos polifenóis na atividade de FRAP. A existência de correlações fortemente positivas entre o teor em fenóis totais e os valores de FRAP foi igualmente verificada por outros autores (Qader *et al.*, 2011).

A mais baixa correlação verificada entre os flavonoides totais e a atividade de FRAP, para além de poder estar relacionada com todos os fatores já descritos no caso do ensaio de sequestro do radical DPPH•, pode ainda indicar que existam outros polifenóis, como por exemplo os ácidos fenólicos e taninos que também contribuam de forma significativa para a capacidade redutora do extrato. Muniyandi *et al.* (2019) referem que, para além dos flavonoides, os ácidos fenólicos e os taninos também contribuem fortemente para a atividade antioxidante de extratos naturais.

Por último, a elevada correlação negativa que se verifica entre os dois ensaios antioxidantes (FRAP e DPPH•) pode sugerir o envolvimento, pelo menos parcial, dos mesmos compostos nos diferentes ensaios.

4.4.3- Determinação da redução do Cu (II) pelo ensaio CUPRAC

Os valores CUPRAC das amostras testadas foram determinados por interpolação de uma reta de calibração realizada com ácido ascórbico (figura 4.4) e encontram-se representados na tabela 4.9.

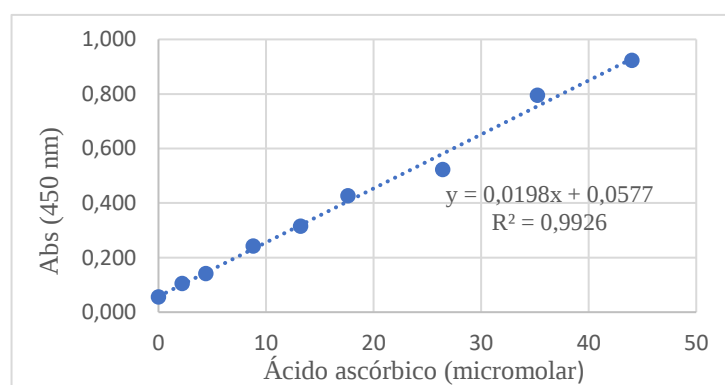


Figura 4.4- Reta de calibração de ácido ascórbico para a realização do ensaio CUPRAC

Tabela 4.9-Valores obtidos com as diferentes amostras no ensaio CUPRAC

Amostra	CUPRAC ($\mu\text{g EAA/g extrato seco}$)
Urze-molar	184,25 ^a $\pm$ 0,85
Marmulano (folha)	116,06 ^c $\pm$ 2,71
Marmulano (ramo)	127,08 ^b $\pm$ 2,39
Marmulano (casca)	77,61 ^e $\pm$ 7,46
Hortelã-de-cabra	62,37 ^f $\pm$ 1,71
Malfurada	62,59 ^f $\pm$ 0,23
Silvado	95,43 ^d $\pm$ 0,83
Molarinha	21,06 ^g $\pm$ 0,75

EAA: equivalentes de ácido ascórbico. Os valores apresentados representam a média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Analisando os resultados obtidos na tabela 4.9, verifica-se que, no geral, os valores de CUPRAC das amostras são significativamente diferentes ($p < 0,05$), à exceção dos resultados obtidos entre os extratos de hortelã-de-cabra e malfurada, que mais uma vez apresentaram semelhanças entre si ($p > 0,05$). Os valores oscilaram entre os 21,06 e os 184,25 $\mu\text{g EAA/g extrato seco}$, sendo o menor valor pertencente ao extrato de molarinha e o maior ao extrato de urze-molar.

Outros trabalhos já tinham demonstrado a presença de atividade CUPRAC em algumas das espécies estudadas, mas com outras origens geográficas ou em outras espécies do género das espécies em estudo. Assim, Suna *et al.* (2018) reportaram valores de $21,09 \pm 1,65 \mu\text{mol}$ de equivalentes de trolox/mL no ensaio CUPRAC em extratos de chá carbonatados de *Erica arborea*. Sariburun *et al.* (2010), obtiveram resultados distintos de CUPRAC em diferentes extratos proveniente de vários cultivares de frutos da *Rubus idaeus*, com os valores a oscilarem entre os 47,16 e os 108,04 μmol equivalentes de trolox/g de extrato seco. Já Rodríguez-Pérez *et al.* (2019) encontraram valores de $250,82 \pm 4,62 \text{ mg}$ equivalentes de trolox/g de extrato e $245,15 \pm 5,52 \text{ mg}$ equivalentes de trolox/g de extrato para extratos aquosos de *G. orientalis* e de *G. trichosantha*, respetivamente. Ivanov *et al.* (2014), obtiveram valores de CUPRAC a variar entre $344,55 \pm 1,17 \text{ mM}$ equivalentes de trolox/g de extrato seco num extrato hidroetanólico de *F. thuretii* e os $625,67 \pm 7,44 \text{ mM}$ equivalentes de trolox/g de extrato seco num extrato hidroetanólico de *F. officinalis*. Apak *et al.* (2006), estudou a atividade antioxidantes nos chás de algumas plantas através do método de CUPRAC e obteve o valor de 0,99 mmol equivalentes de trolox/g no chá de erva-cidreira (*Melissa officinalis*), planta pertencente á mesma família da hortelã-de-cabra. Mais uma vez os resultados encontrados na literatura são difíceis de comparar com o presente trabalho, devido à diferença de unidades em que os resultados se encontram.

Na tabela 4.10 podem observar-se os valores de coeficiente de Pearson para as correlações entre o teor de fenóis e flavonoides totais, a capacidade de sequestro do DPPH, o ensaio FRAP e o ensaio de CUPRAC.

Tabela 4.10- Coeficiente de Pearson para as correlações entre a composição química e a atividade de sequestro do radical DPPH e os ensaios FRAP e CUPRAC

	Fenóis	Flavonoides	DPPH	FRAP	CUPRAC
Fenóis ^a	1				
Flavonoides ^b	0,716	1			
DPPH ^c	-0,878	-0,722	1		
FRAP ^d	0,882	0,387	-0,817	1	
CUPRAC ^d	0,895	0,852	-0,963	0,749	1

a) mg EAG/g de extrato seco; b) mg EC/g de extrato seco; c) IC₅₀ µg/mL; d) µg EAA/g de extrato seco.

Verifica-se a existência de uma correlação fortemente positiva entre o teor de fenóis e em flavonoides totais e a atividade antioxidante determinada pelo ensaio CUPRAC e também entre os ensaios FRAP e CUPRAC. Os valores obtidos indicam a também a existência de uma correlação negativa mais forte entre a atividade do DPPH e a atividade de CUPRAC do que entre o a atividade do DPPH e a atividade de FRAP. A existência de correlações fortemente positivas entre o teor em fenóis totais e flavonoides totais e os valores de CUPRAC foi igualmente verificada por outros autores (Guler & Turgut, 2021). No entanto, a correlação entre os valores de FRAP e CUPRAC foi mais baixa, em comparação com o estudo de Danis *et al.* (2016).

Comparando os resultados do ensaio CUPRAC com os do ensaio FRAP, verifica-se alguma discordância, já que ordem de atividade dos extratos não foi idêntica. Enquanto no ensaio FRAP o extrato com maior atividade antioxidante foi o de folha de marmulano, no ensaio CUPRAC o extrato de urze-molar foi o que apresentou maior capacidade redutora. Esta discordância pode indicar de que os compostos responsáveis pelas atividades FRAP e CUPRAC não sejam maioritariamente os mesmos, ou seja, outros compostos possam ser responsáveis pela capacidade redutora, como por exemplo, antioxidantes do tipo tiol (Apak *et al.*, 2004).

Em relação aos ensaios de ferro, o CUPRAC tem a vantagem de conseguir detetar antioxidantes do tipo tiol (glutatião cisteína, etc). Por outro lado, o facto do potencial redox para o par Cu (II)-neocuproína /Cu(I)-neocuproína ser inferior ao do Fe (III)/Fe (II) com os respetivos ligandos do FRAP, faz com que determinados compostos interferentes, tais como açúcares simples ou ácido cítrico não possam ser reduzidos no CUPRAC. Este método é insensível aos parâmetros como luz solar, pH e humidade e pode ainda medir simultaneamente antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos (Apak *et al.*, 2004; Apak *et al.*, 2007).

4.4.4- Determinação da capacidade de sequestro do radical anião superóxido detetada pela diminuição da formação de formazano

Todas as amostras apresentaram capacidade de sequestrar o radical anião superóxido, uma vez que, todas as amostras conduziram a uma diminuição da velocidade de formação do

formazano, resultante da redução do NBT^{2+} pelo radical anião superóxido. Esta diminuição demonstra que as amostras possuem compostos antioxidantes, capazes de captar o radical anião superóxido gerado pelo sistema NADH/PMS, causando, deste modo, uma diminuição da extensão de redução da NBT^{2+} , com uma consequente diminuição da taxa de aumento da absorvância a 560 nm. Esta atividade é particularmente importante, uma vez que a formação desta espécie radicalar ocorre *in vivo*.

A diminuição da velocidade de redução do NBT^{2+} aumentou com o aumento da quantidade de amostra presente na mistura reacional até se atingir um patamar de saturação. A realização das curvas de percentagem de inibição da formação de formazano em função da concentração de amostra presente na mistura reacional, na qual se verificou essa percentagem de inibição, permitiu calcular a quantidade de amostra responsável por 50% de inibição da formação de formazano, ou seja, o IC_{50} para as diferentes amostras (tabela 4.11).

Tabela 4.11-Valores de IC_{50} obtidos na determinação da capacidade de sequestro do superóxido nas diferentes amostras.

Amostra	Superóxido- IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Urze-molar	$6,54^b \pm 0,65$
Marmulano (folha)	$3,25^a \pm 0,52$
Marmulano (ramo)	$6,56^b \pm 0,33$
Marmulano (casca)	$7,05^b \pm 0,56$
Hortelã-de-cabra	$215,17^d \pm 19,40$
Malfurada	$390,85^e \pm 19,87$
Silvado	$66,89^c \pm 4,13$
Molarinha	$535,33^f \pm 50,46$
Ácido gálico (controlo positivo)	$12,16 \pm 1,27$

Os valores apresentados representam a média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Analisando os dados da tabela 4.11, é possível observar que a maioria das amostras apresentaram diferentes significativas, tendo sido observadas semelhanças nos resultados obtidos entre os extratos de urze-molar, marmulano (casca) e o marmulano (ramo). Respetivamente aos valores de IC_{50} , é possível observar que os valores variaram entre os 3,25 e os 535,33 $\mu\text{g/mL}$. O extrato de marmulano (folha) apresentou o menor valor de IC_{50} , ou seja, teve maior capacidade de sequestro do radical anião superóxido, uma vez que conseguiu uma maior taxa de inibição com menor concentração de amostra, significando que é o antioxidante mais eficaz. Os extratos de marmulano (ramo), urze-molar e marmulano (casca) também apresentaram uma boa capacidade de sequestro deste radical. Destaque ainda para os extratos de marmulano e urze-molar que superaram a atividade antioxidante do controlo positivo, comprovando serem uma alternativa aos antioxidantes convencionais. Mais uma vez, o extrato de molarinha foi o que apresentou uma atividade antioxidante mais baixa, uma vez que foi o que apresentou o valor de IC_{50} mais elevado, significando por isso que é necessária uma maior quantidade desta amostra para se atingir os 50%

de inibição. Na tabela 4.12, podem-se observar os valores de coeficiente de Pearson para as correlações entre o teor de fenóis e flavonoides totais e todos os ensaios de atividade antioxidante realizados.

Tabela 4.12-Coeficiente de Pearson para as correlações entre composição química e atividade antioxidante dos extratos estudados

	Fenóis	Flavonoides	DPPH	FRAP	CUPRAC	Superóxido
Fenóis ^a	1					
Flavonóides ^b	0,716	1				
DPPH ^c	-0,878	-0,722	1			
FRAP ^d	0,882	0,387	-0,817	1		
CUPRAC ^d	0,895	0,852	-0,963	0,749	1	
Superóxido ^c	-0,756	-0,438	0,874	-0,902	-0,782	1

a) mg EAG/g de extrato seco; b) mg EC/g de extrato seco; c) IC₅₀ µg/mL; d) µg EAA/g de extrato seco.

Analisando a tabela 4.12, observa-se uma correlação fortemente positiva entre o ensaio de DPPH e o ensaio Superóxido. Em contrapartida, verifica-se uma correlação fortemente negativa entre o ensaio Superóxido e o ensaio FRAP, existindo também correlações negativas fortes entre o ensaio Superóxido e o ensaio CUPRAC bem como entre o ensaio Superóxido e o teor de fenóis. Por outro lado, verificou-se a existência de uma fraca correlação negativa entre o teor em flavonoides totais e a atividade da sequestração do anião superóxido, que pode indicar que outros polifenóis, como por exemplo os taninos (Gülçin *et al.*, 2010), sejam maioritariamente responsáveis pela capacidade de sequestro deste radical.

É reconhecido, por exemplo, que as propriedades antioxidantes da hortelã-de-cabra não advêm apenas dos polifenóis, mas advêm, igualmente de compostos terpénicos que existem nestas plantas (López-Garcia *et al.*, 1992; Zorzetto *et al.*, 2015). Apesar de não se ter efetuado nenhuma quantificação destes compostos no extrato de hortelã-de-cabra, a sua presença é bastante provável devido ao odor característico que esta apresentava. Desta forma, é possível que os compostos terpénicos da hortelã-de-cabra contribuam de forma significativa para o sequestro do radical anião superóxido.

4.5- Determinação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos diferentes extratos foi avaliada através de duas técnicas: O ensaio de difusão em agar e o ensaio pelo método de microdiluição em meio líquido.

4.5.1- Determinação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em agar

A atividade antimicrobiana avaliada através do método de difusão em agar foi determinada pela medição dos halos de inibição, em milímetros, em volta dos poços onde as diferentes amostras foram colocadas. Os resultados encontram-se representados nas figuras 4.5 a 4.10 e na tabela 4.13. Este ensaio teve como objetivo testar a sensibilidade dos microrganismos a cada um dos extratos na sua concentração máxima (20 mg/mL).

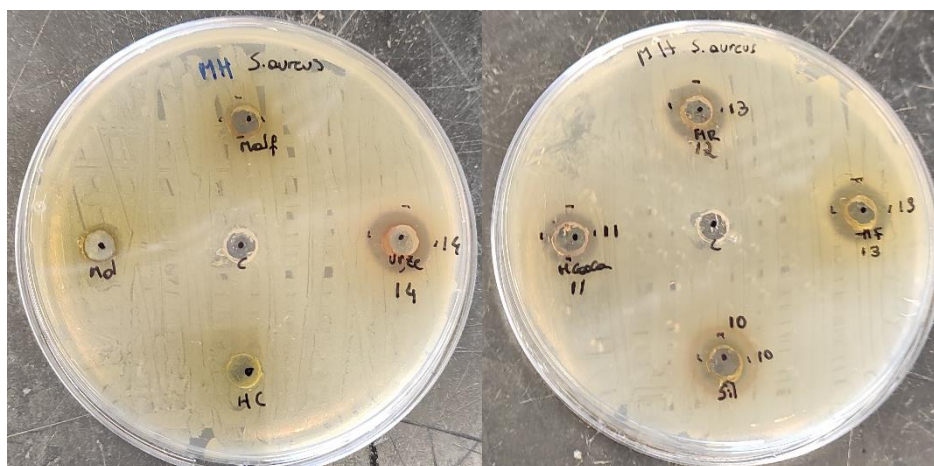


Figura 4.5- Resultados obtidos na determinação da atividade antimicrobiana contra *S.aureus*. C-controlo (etanol 70%); **Malf**- Malfurada; **Mol**-Molarinha, **HC**-Hortelã de cabra; **Urze**-Urze-molar; **MR**-Marmulano (ramo); **MF**-Marmulano (folha); **MCasca**- Marmulano (Casca); **Sil**-Silvado

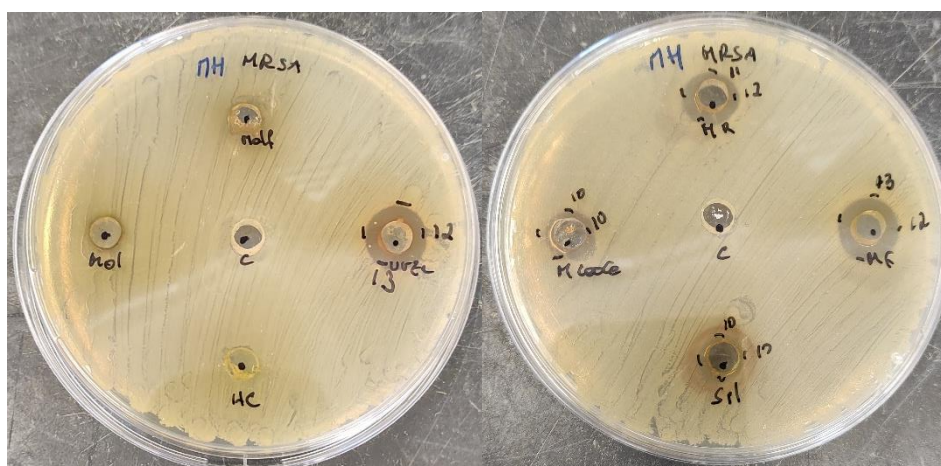


Figura 4.6- Resultados obtidos na determinação da atividade antimicrobiana contra MRSA. C-controlo (etanol 70%); **Malf**- Malfurada; **Mol**-Molarinha, **HC**-Hortelã de cabra; **Urze**-Urze-molar; **MR**-Marmulano (ramo); **MF**-Marmulano (folha); **MCasca**- Marmulano (Casca); **Sil**-Silvado

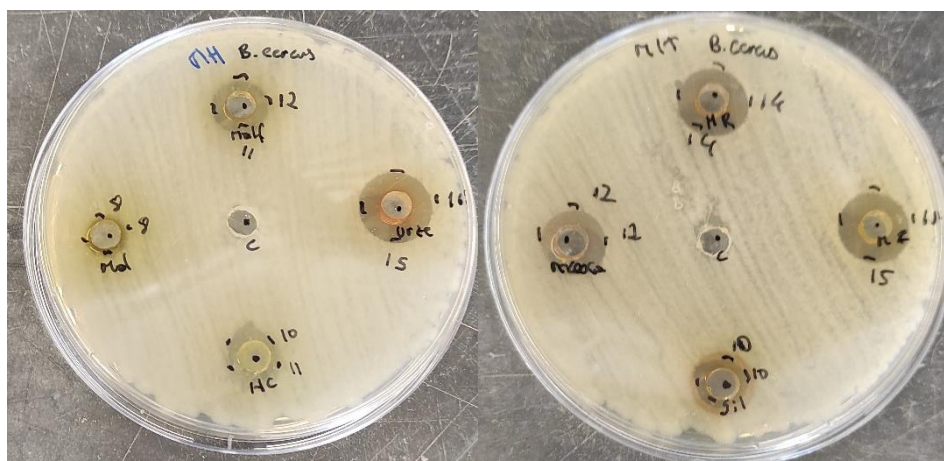


Figura 4.7- Resultados obtidos na determinação da atividade antimicrobiana contra *B. cereus*.
C-controlo (etanol 70%); **Malf**- Malfurada; **Mol**-Molarinha, **HC**-Hortelã de cabra; **Urze**-Urze-molar; **MR**-Marmulano (ramo); **MF**-Marmulano (folha); **MCasca**- Marmulano (Casca); **Sil**- Silvano

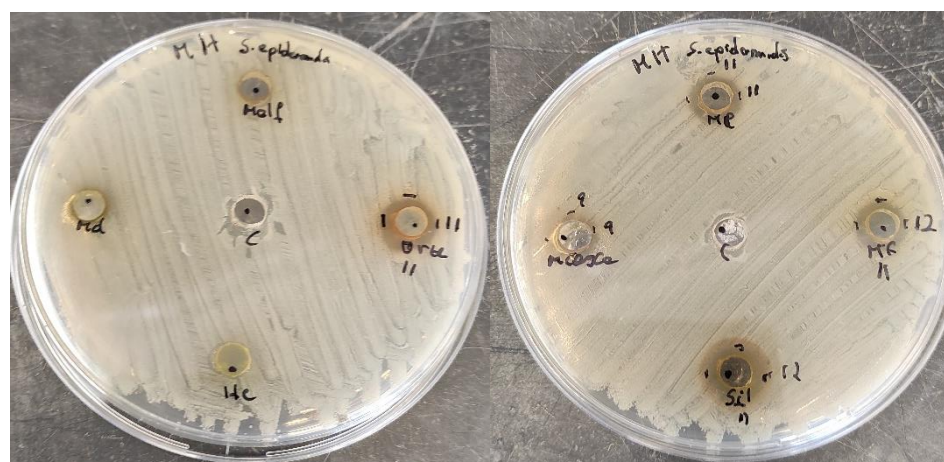


Figura 4.8- Resultados obtidos na determinação da atividade antimicrobiana contra *S. epidermidis*.
C-controlo (etanol 70%); **Malf**- Malfurada; **Mol**-Molarinha, **HC**-Hortelã de cabra; **Urze**-Urze-molar; **MR**-Marmulano (ramo); **MF**-Marmulano (folha); **MCasca**- Marmulano (Casca); **Sil**- Silvano

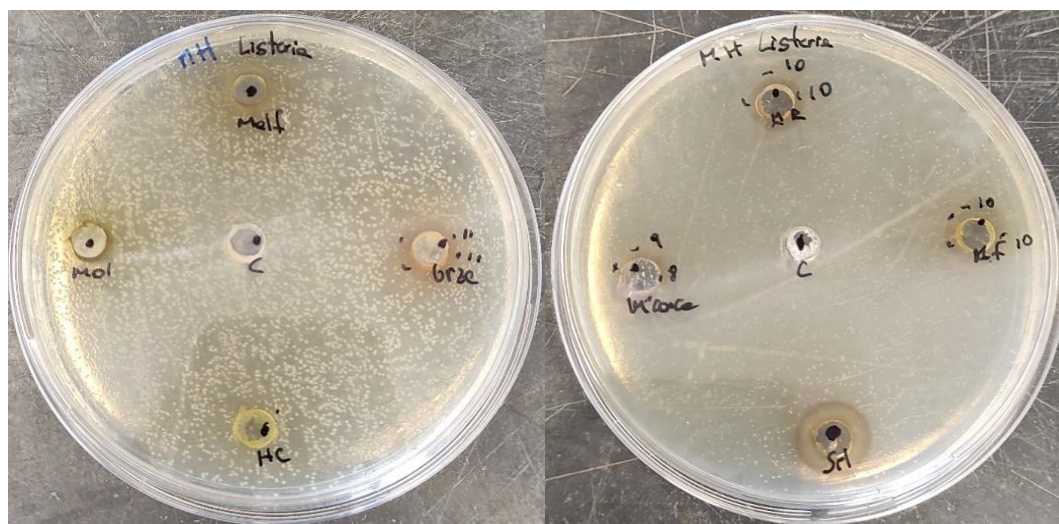


Figura 4.9- Resultados obtidos na determinação da atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes*
C-controlo (etanol 70%); **Malf**- Malfurada; **Mol**-Molarinha, **HC**-Hortelã de cabra; **Urze**-Urze-molar; **MR**-
Marmulano (ramo); **MF**-Marmulano (folha); **MCasca**- Marmulano (Casca); **Sil**- Silvado

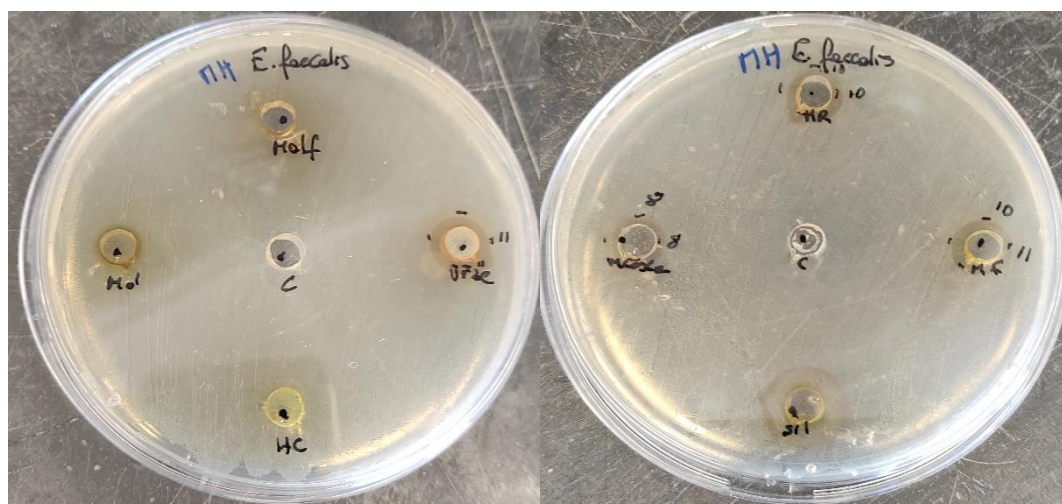


Figura 4.10- Resultados obtidos na determinação da atividade antimicrobiana contra *E. faecalis*
C-controlo (etanol 70%); **Malf**- Malfurada; **Mol**-Molarinha, **HC**-Hortelã de cabra; **Urze**-Urze-molar; **MR**-
Marmulano (ramo); **MF**-Marmulano (folha); **MCasca**- Marmulano (Casca); **Sil**- Silvado

Caracterização de propriedades bioativas de plantas medicinais da Região Autónoma da Madeira

Tabela 4.13- Diâmetro dos halos de inibição (mm) obtidos através do método de difusão em agar com extratos em estudo na concentração de 20 mg/mL

Microrganismo Amostras	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	MRSA ATCC 33591	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>S. epidermidis</i> ATCC 1228	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. coli</i> ATCC 8732	<i>S. Choleraesuis</i> ATCC 10708	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>C. albicans</i> ATCC 10231
Zona de Inibição (mm)										
Urze-molar	14 ^{b,A} ± 1	13 ^{b,A} ± 0	15 ^{a,A} ± 1	11 ^{c,B} ± 0	11 ^{c,A} ± 1	10 ^{c,A} ± 1	-	-	-	-
Marmulano (folha)	13 ^{a,b,A,B} ± 0	12 ^{b,B} ± 1	14 ^{a,A,B} ± 1	12 ^{b,A} ± 0	11 ^{c,A} ± 1	10 ^{c,A,B} ± 1	-	-	-	-
Marmulano (ramo)	12 ^{a,b,B} ± 1	12 ^{a,b,B} ± 1	13 ^{a,B} ± 1	11 ^{b,c,A,B} ± 1	11 ^{b,c,A} ± 0	10 ^{c,B} ± 0	-	-	-	-
Marmulano (casca)	11 ^{a,b,C} ± 1	11 ^{a,b,C} ± 1	10 ^{a,C} ± 0	10 ^{a,b,C} ± 1	9 ^{b,B} ± 1	8 ^{c,C} ± 0	-	-	-	-
Hortelã-de-cabra	-	-	10 ^C ± 0	-	-	-	-	-	-	-
Malfurada	-	-	11 ^C ± 1	-	-	-	-	-	-	-
Silvado	10 ^{b,C} ± 1	11 ^{a,b,B} ± 1	11 ^{a,b,C} ± 1	12 ^{a,A,B} ± 1	-	-	-	-	-	-
Molarinha	-	-	8 ^D ± 1	-	-	-	-	-	-	-
Etanol 70% (controlo negativo)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) - Sem halos de inibição. Os valores apresentados representam a média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre a atividade contra os diferentes microrganismos para o mesmo extrato (p<0,05) (diferenças na mesma linha). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre a atividade antimicrobiana dos diferentes extratos para o mesmo microrganismo (p<0,05) (diferenças na mesma coluna).

Segundo os dados obtidos, é possível observar a existência de diferenças significativas entre os resultados ($p < 0,05$). Neste ensaio, é possível reparar que nenhum dos extratos teve a capacidade de inibir o crescimento das bactérias Gram-negativas estudadas (*E. coli*, *Salmonella Choleraesuis* e *P. aeruginosa*), bem como da levedura *C. albicans*, uma vez que não foi possível observar nenhum halo de inibição. Por sua vez, os extratos de urze-molar e marmulano foram capazes de inibir o crescimento de todas as bactérias Gram-positivas estudadas (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, MRSA, *B. cereus* e *L. monocytogenes*). Os extratos de malfurada, hortelã-de-cabra e molarinha apenas apresentaram atividade antimicrobiana contra a *B. cereus*. Já o silvado conseguiu inibir o crescimento da *S. aureus*, MRSA, *B. cereus* e *L. monocytogenes*.

Os resultados do ensaio de difusão em agar são dependentes da capacidade de migração dos compostos ativos do extrato no agar, sendo que a ausência de halo pode significar ausência de atividade ou ausência de migração. No entanto, neste caso, a ausência de halo e inibição quando se testaram as bactérias Gram-negativas ou a *C. albicans* não se pode atribuir a ausência de migração, uma vez que os compostos mostraram conseguir migrar no agar quando se testaram as bactérias Gram-positivas.

Alves *et al.* (2000), ao testarem a atividade antimicrobiana de plantas medicinais do cerrado brasileiro (5 mg/poço), classificaram os extratos como ativos inativos quando o halo de inibição foi inferior a 9 mm, parcialmente ativos quando o halo de inibição se encontrava entre 9 e 12 mm, ativo quando o halo de inibição se encontrava entre 13 e 18 mm e muito ativo quando o halo era superior a 18 mm. Utilizando a mesma classificação, apesar de no presente trabalho se ter aplicado uma concentração inferior no poço (45 µL de uma solução 20 mg/mL, ou seja 0,9 mg/poço), é possível classificar o extrato de urze-molar como ativo contra as bactérias mais sensíveis (*S. aureus*, MRSA e *B. cereus*) e parcialmente ativo nas restantes bactérias Gram-positivas. O extrato de folha de marmulano pode classificar-se como ativo contra *S. aureus* e *B. cereus* e parcialmente ativo nas restantes bactérias Gram-positivas. O extrato de ramo de marmulano pode classificar-se parcialmente ativo contra todas as bactérias Gram-positivas testadas com exceção da *B. cereus* onde se mostrou ativo. Já os extratos de casca de marmulano, silvado, malfurada e hortelã-de-cabra apresentaram, no geral, atividade antimicrobiana parcialmente ativa nos microrganismos em que foi possível detetar alguma atividade. O extrato de molarinha teve uma atividade antimicrobiana inativa na *B. cereus*, e por isso, foi o extrato com potencial antimicrobiano mais fraco. O microrganismo que demonstrou maior sensibilidade no teste de difusão em agar foi o *B. cereus*, uma vez que a sua atividade microbiana foi inibida por todos os extratos aplicados. Por outro lado, a *E. faecalis* foi a bactéria Gram-positiva menos sensível aos extratos, pelo facto de se terem obtido halos de inibição menores em relação às restantes bactérias testadas.

Comparando com os dados da literatura, a atividade antimicrobiana do extrato de urze-molar reportada neste estudo foi superior aos extratos de urze testados por Santos (2017). A

capacidade antimicrobiana de um extrato depende da concentração do extrato, das estirpes bacterianas e do procedimento de elaboração dos extratos (Khaled-Khodja *et al.*, 2014). Assim, o facto de neste estudo a extração ter sido realizada em etanol (70%), e o estudo de Silva (2017) ter sido realizada em metanol pode contribuir para as diferenças observadas, sugerindo que o etanol 70% seja mais eficiente a extrair os compostos com atividade antimicrobiana.

Os resultados obtidos com os extratos de marmulano foram aquém do esperado em comparação com Silva (2019), que constatou que o extrato de marmulano de Cabo Verde teve uma atividade antimicrobiana mais forte nas bactérias Gram-positivas (halos entre 13-16 mm) e que, inclusive, conseguiu inibir o crescimento *C. albicans*. Neste caso as diferenças não podem ser atribuídas à metodologia de extração, uma vez que foi exatamente a mesma, mas podem atribuir-se à diferença de espécies (*Sideroxylon marmulano* ou *Sideroxylon marginatum*) ou de zona geográfica de origem (Madeira ou Cabo Verde).

Segundo alguns estudos, os extratos de silvado apresentaram uma significativa ação antimicrobiana contra diversas bactérias e fungos. De acordo com Rana *et al.* (2013), o extrato etanólico de folhas de *Rubus sanguineus* Friv. da Jordânia apresentou uma atividade antimicrobiana muito ativa contra *S. aureus* (halo de inibição de 20 mm) e *B. cereus* (halo de inibição de 22 mm). Para além disso, o extrato também se mostrou muito ativo contra *C. albicans* (halo de inibição de 20 mm), tendo-se mostrado inativo contra as bactérias Gram-negativas (halo < 9 mm). As diferenças de espécie, origem geográfica e metodologia de extração podem ser responsáveis pelas diferenças observadas

Num estudo de Frišćić *et al.* (2022) testaram-se extratos metanólicos, obtidos por extração soxhlet, de diferentes espécies do género *Globularia*, nomeadamente *G. alypum*, *G. punctata*, *G. cordifolia* e *G. meridionalis*, colhidas em diferentes localizações da Croácia na altura da floração. Todos os extratos testados apresentaram atividade antimicrobiana forte contra *S. aureus* e fraca contra *B. cereus*. Os extratos de algumas espécies conseguiram suprimir o crescimento de outras bactérias Gram positivas (*E. faecalis* e *B. subtilis*) e também Gram-negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*). As diferenças entre os resultados obtidos por Frišćić *et al.* (2022) e os resultados obtidos no presente estudo com a *G. salicina* da Madeira podem dever-se não só a diferenças na espécie, origem geográfica e metodologia de extração, mas também diferenças no estado de maturação da planta na altura da colheita para análise.

Em relação à molarinha, os resultados estão em concordância com os reportados por Erdogrul *et al.* (2002), uma vez que os extratos analisados também não obtiveram atividade inibitória contra as bactérias *S. aureus*, *E. coli* e *L. monocytogenes*. López-García *et al.* (1992) verificaram que os óleos essenciais da hortelã-de-cabra inibiram o crescimento de diversos microrganismos (bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos), ao contrário do extrato da hortelã-de-cabra em estudo que só inibiu a atividade *B. cereus*.

Analisando os resultados obtidos ao longo deste estudo, também é possível encontrar uma correlação positiva entre a atividade antimicrobiana e o teor em fenóis totais e também em flavonoides dos extratos. De facto, os extratos que possuem maior teor em fenóis e particularmente em flavonoides totais, ou seja, os extratos de urze-molar e folha e ramo de marmulano, foram também aqueles que apresentaram um potencial antimicrobiano mais forte, enquanto o extrato que apresentou menor teor em flavonoides totais, o extrato de molarinha, foi aquele que apresentou uma atividade antimicrobiana mais baixa. Tal facto foi também observado por Naz *et al* (2017) em que foi demonstrada a existência de ligação entre a concentração de flavonoides dos extratos e a sua capacidade antimicrobiana. Segundo Xie *et al.* (2015), os flavonoides são bem conhecidos como agentes antibacterianos contra uma ampla gama de microrganismos patogénicos e a sua atividade antibacteriana depende da sua estrutura química, nomeadamente das substituições que ocorrem nos seus anéis aromáticos. Pode notar-se também que existe uma correlação positiva entre a atividade antimicrobiana e a atividade antioxidante, pois os extratos que demonstraram maior atividade antioxidante também tiveram maior atividade antimicrobiana. Esta correlação foi igualmente reportada por Shan *et al.* (2007).

Diversos estudos sugerem que as bactérias Gram-positivas, como a *S. aureus*, sejam mais sensíveis a extratos de plantas medicinais do que bactérias Gram-negativas, como a *E. coli*. Esta diferença pode estar relacionada com as diferentes estruturas da parede celular e da membrana externa. As bactérias Gram-negativas possuem membrana externa rica em lipopolissacáridos que funciona como barreira contra a entrada de agentes antibióticos e que também está associada a enzimas do espaço periplasmático, que são capazes de destruir moléculas provenientes do exterior. O fato de as bactérias Gram-positivas não possuírem esta membrana, pode aumentar a sua sensibilidade aos agentes antimicrobianos (Cetin-Karaca *et al.*, 2015; Das *et al.*, 2012; Koohsari *et al.*, 2015).

No entanto, tal facto não significa que todas as bactérias Gram-positivas sejam sempre mais vulneráveis (Tajkarimi *et al.*, 2010), como pode também ser verificado no presente estudo, analisando os resultados obtidos relativamente a bactérias como a *E. faecalis*, *L. monocytogenes* e *S. epidermidis* que mostraram sempre uma sensibilidade inferior à *S. aureus* ou *B. cereus*.

4.5.2- Determinação da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição em meio líquido

O ensaio de difusão em agar é considerado um ensaio qualitativo uma vez que não permite quantificar a concentração exata em que os extratos inibem o crescimento microbiano. Assim, para poder determinar esta concentração, foi efetuado o ensaio de microdiluição em meio líquido.

Este ensaio só foi realizado com os extratos e com os microrganismos onde se detetou alguma atividade no ensaio de difusão em agar. O ensaio de microdiluição em meio líquido

permitiu determinar os valores de Concentração Mínima Inibitória (MIC), isto é a concentração mais baixa capaz de inibir o crescimento visível, e a concentração mínima bactericida (MBC), ou seja, a concentração mais baixa capaz de matar os microrganismos. Os valores de MIC e de MBC obtidos encontram-se representados na tabela 4.14.

Tabela 4.14-Concentração mínima inibitória (MIC, µg/mL) e concentração mínima bactericida (MBC, µg/mL) para os extratos em análise

Bactérias Amostras	<i>S. aureus</i>		MRSA		<i>E. faecalis</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>L.monocytogenes</i>		<i>B. cereus</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Urze-molar	1000	1000	500	500	1000	2000	2000	>2000	1000	2000	250	250
Marmulano (folha)	2000	2000	2000	2000	>2000	>2000	>2000	>2000	2000	2000	250	250
Marmulano (ramo)	2000	2000	1000	2000	2000	2000	2000	>2000	1000	2000	250	250
Marmulano (casca)	2000	>2000	2000	2000	2000	>2000	>2000	>2000	2000	>2000	500	500
Silvado	>2000	>2000	>2000	>2000	-	-	2000	>2000	-	-	500	500
Molarinha	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1000	1000
Hortelã-de-cabra	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1000	1000
Malfurada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2000	2000
Etanol 70% (controlo negativo)	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000

Nota: >2000 significa ausência de inibição ou morte na mais alta concentração testada (2000 µg/mL)

Analisando a tabela 4.14, é possível observar que os valores de MIC e MBC variaram entre as concentrações de 250 e 2000 µg/mL. A bactéria mais sensível a todos os extratos foi a *B. cereus*, uma vez que foi aquela que apresentou os valores mais baixos de MIC e de MBC. Por outro lado, também é possível observar que o extrato com maior potencial antimicrobiano é o de urze-molar, visto que apresentou os valores mais baixos de MIC e de MBC para todos os microrganismos testados. Segundo Pereira *et al.* (2022), o potencial antimicrobiano dos extratos naturais pode ser classificado consoante o valor de MIC obtido. Os extratos podem ser caracterizados como **inibidores fortes** (MIC até 500 µg/mL), **inibidores moderados** (MIC entre 600 e 1500 µg/mL) e **inibidores fracos** (MIC >1600 µg/mL). Utilizando esta classificação, é possível visualizar que o extrato de urze-molar obteve atividade antimicrobiana forte contra a *B.cereus* e MRSA, atividade antimicrobiana moderada contra *S.aureus*, *E. faecalis* e *L. monocytogenes* e atividade antimicrobiana fraca contra *S. epidermidis*. No caso dos extratos de marmulano, inibiram fortemente o crescimento da *B. cereus* e, no geral, apresentaram atividade fraca nas restantes bactérias Gram-positivas, à exceção do ramo de marmulano que inibiu moderadamente o crescimento da MRSA e da *L. monocytogenes*. O extrato de silvado inibiu fortemente o crescimento de *B.cereus* e fracamente o de *S. epidermidis*. No entanto, o extrato de silvado não foi capaz de provocar a inibição do crescimento ou a morte da *S. aureus* e da MRSA em nenhuma das concentrações testadas (MIC e MBC >2000 µg/mL). Em relação aos restantes

extratos, a molarinha e a hortelã-de-cabra apresentaram atividade antimicrobiana moderada na *B. cereus*, enquanto a malfurada apresentou atividade antimicrobiana fraca nesse microrganismo.

Os resultados obtidos mostram a existência atividade antimicrobiana nestes oito extratos, apresentando os extratos de urze-molar e de ramo de marmulano os resultados mais satisfatórios. Dentro dos microrganismos que foram testados encontram-se microrganismos normalmente envolvidos em infeções alimentares (*S. aureus*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes* e *B. cereus*) e/ou infeções na pele, (*S. aureus*, *E. faecalis*, *S. epidermidis*) mais ou menos graves, dependendo do estado de saúde do hospedeiro e da patogenicidade do microrganismo (Harvey, 2007). O facto destes extratos terem sido ativos contra estas bactérias, nomeadamente os extratos de urze-molar e de ramo de marmulano, sugere que eles possam ser aplicados como conservantes alimentares ou possam ser aplicados em produtos tópicos, protegendo a pele contra os microrganismos deste género. Mesmo que sozinhos não consigam garantir a total segurança dos produtos, a sua incorporação pode permitir baixar as concentrações dos conservantes sintéticos. Por sua vez, a incorporação destes extratos em produtos tópicos de utilização hospitalar poderia contribuir para a prevenção e diminuição das infeções oportunistas causadas pela exposição prolongada de antibióticos em meio hospitalar. Neste contexto destaca-se a sua ação contra a MRSA, uma bactéria multirresistente que constitui um problema sério especialmente em ambiente hospitalar. (Loureiro *et al.*, 2016). No entanto, todas estas possíveis aplicações implicam a avaliação prévia de potenciais efeitos de toxicidade que os extratos concentrados poderão exercer.

4.6- Determinação da atividade antidiabética

A exposição prolongada a elevados níveis de glicose em circulação após as refeições está associada a efeitos prejudiciais sobre as células e tecidos, podendo nomeadamente causar alterações ao nível das células β -pancreáticas, o que contribuí para uma progressiva disfuncionalidade das mesmas (Viegas, 2017). Para determinar o potencial antidiabético dos extratos hidroetanólicos das plantas em estudo recorreu-se aos ensaios de inibição das enzimas α -amilase e α -glucosidase, em comparação com a acarbose, um fármaco utilizado para controlar a glicemia. Nestes métodos os resultados são expressos em IC_{50} , que representa a concentração na mistura reacional que provoca 50% de inibição das enzimas em estudo, pelo que menores valores de IC_{50} estão associados a melhores atividades inibitórias das enzimas e, portanto, a uma melhor atividade antidiabética.

4.6.1- Ensaio da inibição da α -Amilase

Os resultados obtidos do ensaio de inibição da α -amilase para os extratos de urze-molar, marmulano (folha, ramo e casca), silvado, hortelã-de-cabra, malfurada e molarinha encontram-se na tabela 4.15.

Tabela 4.15-Atividade inibitória de α -amilase para os extratos testados

Amostra	Inibição da α -Amilase- IC ₅₀ (mg/mL)
Urze-molar	1,17 ^a $\pm$ 0,14
Marmulano (folha)	3,26 ^c $\pm$ 0,07
Marmulano (ramo)	2,08 ^b $\pm$ 0,06
Marmulano (casca)	3,31 ^c $\pm$ 0,49
Hortelã-de-cabra	>4,0
Malfurada	>4,0
Silvado	>4,0
Molarinha	>4,0
Acarbose (controlo positivo)	0,012 $\pm$ 0,001

Os valores apresentados representam a média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). >4,0 significa que a concentração mais alta testada (4,0 mg/mL) não inibiu a atividade da enzima.

De todos os extratos avaliados apenas os extratos de urze-molar e de marmulano (folha, ramo e casca) inibiram a atividade da α -amilase. O extrato de urze-molar foi o que mostrou uma atividade mais elevada, seguido do extrato de ramo de marmulano. Não se verificaram diferenças significativas nas atividades inibitórias da α -amilase entre os extratos de folha e casca de marmulano ($p > 0,05$).

A acarbose, um dos fármacos antidiabéticos atualmente disponíveis, foi utilizada como controlo positivo. O valor obtido para este controlo está de acordo com o descrito na literatura (Chakrabarti *et al.*, 2014). A atividade inibitória dos extratos foi sempre inferior à da acarbose.

O extrato de urze-molar apresentou um IC₅₀ de 1,17 $\pm$ 0,14 mg/mL. Comparando com o estudo de Nickavar & Amin, (2011), verifica-se que o extrato de urze-molar analisado apresentou uma atividade inibitória inferior, por exemplo, aos extratos de *Vaccinium arctostaphylos* (IC₅₀= 0,53 mg/mL), planta da mesma família, uma vez que foi preciso maior quantidade de extrato para inibir em 50% a atividade da enzima α -amilase. Contudo, o extrato de urze-molar revelou-se mais potente que a maioria dos extratos metanólicos de *Rumex madeirensis*, planta medicinal usada na Madeira no tratamento das diabetes, que em estudos semelhantes revelou valores de IC₅₀ de 3,030 mg/mL (folhas), 0,94 mg/mL (flores) e 1,5 mg/mL (sementes) (Spínola *et al.*, 2020).

Já os extratos de marmulano apresentaram valores de IC₅₀ entre 2,08 mg/mL (ramo) e 3,31 mg/mL (casca). Apesar de superiores aos valores apresentados pelos extratos de urze-molar ou de *Rumex madeirensis*, os extratos de marmulano mostraram-se mais eficientes a inibir a α -amilase que o extrato etanólico de *Morinda lucida* (9,10 $\pm$ 0,55 mg/mL), uma planta medicinal utilizada na África Ocidental para controlar a diabetes (Kazeem *et al.*, 2013).

Relativamente aos outros extratos não foi possível calcular com exatidão o IC₅₀, já que a inibição corresponde a esses extratos na concentração máxima utilizada (4,0 mg/mL) foi inferior a 50%. Por essa razão, supõe-se que o IC₅₀, a ser atingido, seja superior a 4,0 mg/mL.

Na tabela 4.16 podem observar-se os valores de coeficiente de Pearson para as correlações entre o teor de fenóis e flavonoides totais e o ensaio de inibição da α -amilase.

Tabela 4.16-Coeficiente de Pearson para as correlações entre composição química e atividade de inibição da alfa-amilase dos extratos estudados

	Fenóis	Flavonoides	α - Amilase
Fenóis ^a	1		
Flavonoides ^b	0,716	1	
α - Amilase ^c	-0,748	-0,905	1

a) mg EAG/g de extrato seco; b) mg EC/g de extrato de extrato seco; c) IC₅₀ mg/mL

Verificou-se uma correlação negativa forte entre o teor de fenóis totais e o ensaio da α -amilase, bem uma correlação negativa muito forte entre o teor de flavonoides totais e o ensaio da α -amilase, o que faz sentido, visto que os extratos com maior quantidade de compostos fenólicos, em particular os flavonoides, tiveram menores valores de IC₅₀, ou seja, foram aqueles tiveram maior capacidade de inibir a enzima, correlação também confirmada por Jemaa *et al.* (2017), e que sugere o envolvimento dos compostos fenólicos, particularmente dos flavonoides, nas atividades detetadas. Os polifenóis, e particularmente os flavonoides, são alguns dos agentes antidiabéticos de ocorrência natural conhecidos por apresentarem um efeito inibitório na atividade das enzimas hidrolisantes de carboidratos, em virtude da sua capacidade de se ligar a proteínas (Jemaa *et al.*, 2017).

4.6.2- Ensaio da inibição da α -Glucosidase

A enzima α -glucosidase está envolvida na hidrólise do amido a glucose. Se a degradação do amido presente na dieta ocorrer de forma mais morosa, a glucose vai sendo mais lentamente absorvida o que diminui a possibilidade de ocorrência de hiperglicemia pós-prandial (Fujisawa *et al.*, 2005). Assim, a inibição da α -glucosidase representa uma forma potencial de prevenção da diabetes tipo 2 e das suas complicações (Levetan & Pierce, 2013).

Desta forma, avaliou-se a capacidade de inibição da enzima α -glucosidase, em comparação com a acarbose, como forma de avaliar o potencial antidiabético dos extratos. Os resultados obtidos pelos extratos de plantas analisados encontram-se representados na tabela 4.17.

O valor obtido pelo controlo positivo está de acordo com o descrito na literatura (Min & Han, 2014). Os resultados obtidos permitem verificar que os extratos de silvado, urze-molar e marmulano (folha, ramo e casca) conseguiram inibir eficazmente a enzima α -glucosidase, dados os seus menores valores de IC₅₀.

Tabela 4.17-Atividade inibitória de α -glucosidase para os extratos testados

Amostra	Inibição da α -Glucosidase- IC ₅₀ (mg/mL)
Urze-molar	0,0226 ^b $\pm$ 0,0006
Marmulano (folha)	0,1422 ^e $\pm$ 0,0030
Marmulano (ramo)	0,0260 ^c $\pm$ 0,0004
Marmulano (casca)	0,0850 ^d $\pm$ 0,0013
Hortelã-de-cabra	>0,80
Malfurada	>0,80
Silvado	0,0046 ^a $\pm$ 0,0001
Molarinha	>0,80
Acarbose (controlo positivo)	0,3646 $\pm$ 0,0094

Os valores apresentados representam a média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). >0,8 significa que a concentração mais alta testada (0,80 mg/mL) não inibiu a atividade da enzima.

O extrato de silvado apresentou um IC₅₀ de 0,0046 $\pm$ 0,0001 mg/mL, demonstrando ter uma ótima capacidade de inibir a enzima. Já os extratos de marmulano (folha, ramo e casca) e urze-molar, também apresentaram resultados satisfatórios, com o valor de IC₅₀ a variar entre os 0,0226 mg/mL (urze-molar) e os 0,1422 mg/mL (marmulano folha). Todos os extratos das plantas que apresentaram atividade positiva revelaram-se mais potentes que a acarbose na inibição da atividade da enzima α -glucosidase, uma vez que foram necessárias concentrações muito inferiores ao controlo positivo para inibir a enzima. Os resultados obtidos com o extrato de silvado suportam a sua utilização na medicina tradicional como antidiabético, tal como foi referido por Khan *et al.* (2012). Tal como na experiência da α -amilase, não foi possível determinar a concentração necessária para inibir 50% da atividade enzimática pelos extratos de molarinha, malfurada e hortelã-de-cabra, uma vez que na concentração mais alta testada não houve inibição e, por isso, supõe-se que valor do IC₅₀, a ser atingido, seja superior a 0,80 mg/mL.

Os extratos de silvado, marmulano e urze-molar revelaram-se mais potentes que o extrato aquoso das folhas de *Asparagus racemosus*, planta medicinal usada na Índia no tratamento da diabetes que em estudos semelhantes revelou valores de IC₅₀ de 62,65 mg/mL para a α -glucosidase (Vadivelan *et al.*, 2019). Outro estudo realizado com extratos de acetona de plantas com potencial antidiabético, mostraram também que estes extratos apresentavam uma atividade inibitória da α -glucosidase mais potente que a acarbose (Shai *et al.*, 2011).

Na tabela 4.18 podem observar-se os valores de coeficiente de Pearson para as correlações entre o teor de fenóis e flavonoides totais e os ensaios antidiabéticos realizados. Nesta tabela é possível verificar uma correlação desprezível entre a quantidade de fenóis totais e a atividade inibitória da α -glucosidase, uma correlação positiva fraca entre a quantidade de flavonoides totais e a atividade inibitória da α -glucosidase e uma correlação positiva forte entre os resultados do ensaio da α -amilase e da α -glucosidase. As fracas correlações verificadas entre a atividade de inibição da α -glucosidase e o teor em fenóis e em flavonoides foram resultado da elevada

atividade do extrato de silvado a inibir esta enzima. Com efeito, o extrato de silvado foi o que apresentou a atividade inibitória mais elevada e apresentou um teor em fenóis e em flavonoides inferior ao dos extratos de urze-molar ou de marmulano. Este resultado que pode indicar a presença de outros compostos bioativos como terpenóides, alcaloides, carotenóides, entre outros que possam potenciar a sua ação antidiabética (Tran *et al.*, 2020).

Tabela 4.18- Coeficiente de Pearson para as correlações entre composição química e atividade antidiabética dos extratos analisados

	Fenóis	Flavonóides	α - Amilase	α - Glucosidase
Fenóis ^a	1			
Flavonóides ^b	0,716	1		
α - Amilase ^c	-0,748	-0,905	1	
α - Glucosidase ^c	0,207	-0,315	0,850	1

a) mg EAG/g de extrato seco; b) mg EC/g de extrato seco; c) IC₅₀ mg/mL

No presente trabalho, os extratos hidroetanólicos estudados revelaram uma inibição mais potente da enzima α -glucosidase do que da α -amilase. Este comportamento é vantajoso pois está comprovado que uma forte inibição da enzima α -glucosidase e pouca inibição de α -amilase tem a vantagem de apresentar menos efeitos adversos em relação aos decorrentes da excessiva inibição da α -amilase. A inibição acentuada da α -amilase resulta numa fermentação bacteriana anormal dos hidratos de carbono não digeridos no cólon, resultando em maior desconforto abdominal. (Kim *et al.*, 2014; Kwon *et al.*, 2008).

Estudos recentes mostraram que a α -amilase e a α -glicosidase podem ser inibidas por polifenóis de plantas. Assim, alimentos ricos em compostos fenólicos são componentes promissores de uma dieta saudável que pode ajudar a estabilizar os níveis flutuantes de açúcar no sangue após uma refeição, controlando a taxa e a extensão da regulação da glicose (Gulati *et al.*, 2012). Os resultados obtidos estão assim concordantes com os publicados por outros autores, que referem que os compostos fenólicos têm capacidade de inibir a atividade de diversas enzimas digestivas responsáveis pela hidrólise e absorção dos açúcares a nível do estômago e intestino, dadas as suas capacidades para se ligarem a estas enzimas (Gharreb *et al.*, 2014; Moradi-Afrapoli *et al.*, 2012). Para o tratamento da diabetes tipo 2, uma dosagem típica da acarbose é de 25 a 100 mg, três vezes ao dia. Contudo, a terapia com acarbose tem sido associada com efeitos colaterais gastrointestinais (Aoki *et al.*, 2010), e também a hepatotoxicidade quando administrada na dosagem de 100 mg, três vezes ao dia, oralmente (Hsiao *et al.*, 2006).

A capacidade de inibir as enzimas α -glucosidase e α -amilase precisa de ser validada através de modelos experimentais *in vivo*. No entanto, Andrade-Cetto *et al.* (2008) ao analisar a atividade antidiabética de algumas plantas medicinais mexicanas encontraram boas correlações entre os resultados obtidos em ensaios com ratos diabéticos e o ensaio *in vitro* de inibição da α -

glucosidase. Desta forma, os extratos de silvado, marmulano e urze-molar parecem ter potencial para ser uma alternativa à acarbose no controlo da hiperglicemia pós-prandial. A atividade antioxidante desses extratos também pode contribuir para a prevenção ou tratamento desta doença, uma vez que as lesões oxidativas estão identificadas como sendo um fator de risco para o desenvolvimento da diabetes (Sekhon-Loodu & Rupasinghe, 2019) e para os danos tecidulares causados por esta doença (Bahmani *et al.*, 2014).

5-Conclusão

Atualmente existe um interesse crescente por produtos obtidos a partir de plantas reputadas pelas suas utilizações etnobotânicas em cuidados primários de saúde e de bem-estar. Muitas das plantas medicinais, são utilizadas na extração industrial de moléculas que incorporam uma grande diversidade de produtos, designadamente produtos farmacêuticos, cosméticos, perfumes, aromas, nutracêuticos, aditivos alimentares, entre outros.

Este estudo incidiu sob seis plantas medicinais vulgarmente utilizadas na medicina tradicional madeirense: *Cedronella canariensis* (hortelã-de-cabra), *Globularia salicina* (malfurada), *Erica arborea* (urze-molar), *Rubus ulmifolius* (silvado), *Fumaria muralis* (molarinha) e *Sideroxylon marmulano* (marmulano). O objetivo do mesmo foi avaliar o teor em compostos fenólicos totais e em flavonoides, uma vez que estes têm sido indicados como alguns dos principais responsáveis pelas propriedades benéficas nos consumidores, bem como avaliar as propriedades antioxidantes, antimicrobianas, e antidiabéticas, contribuindo assim para um maior conhecimento das propriedades bioativas das plantas estudadas.

Os resultados demonstraram de todos os extratos de plantas possuem atividade antioxidante, sendo que o extrato de urze-molar e os extratos de marmulano foram aqueles que apresentaram um maior teor de compostos fenólicos e flavonoides. Estes extratos demonstraram também possuir uma maior atividade antioxidante relativamente aos restantes extratos estudados, o que sugere o envolvimento destes compostos neste tipo de atividade antioxidante (capacidade redutora e sequestro dos radicais DPPH• e anião superóxido).

No que diz respeito à ação antimicrobiana, os extratos de urze-molar e marmulano foram os únicos que inibiram o crescimento de todas as bactérias Gram-positivas testadas, o que poderá, igualmente, estar relacionado com a maior concentração que estes extratos apresentam em compostos fenólicos e em flavonoides. O facto de estes extratos terem apresentado uma elevada capacidade antioxidante e terem sido ativos contra estas bactérias, sugere a sua possível aplicação na indústria alimentar, onde podem funcionar como conservantes e como antioxidantes. No caso da sua aplicação como conservantes, uma vez que a atividade antimicrobiana foi limitada, não se tendo verificado efeito contra bactérias Gram-negativas ou contra fungos, a sua aplicação poderá ser mais interessante no sentido de permitir a redução da concentração de conservantes sintéticos.

Em relação aos resultados obtidos nos ensaios de atividade antidiabética, os extratos de urze-molar e de marmulano foram capazes de inibir ambas as enzimas enquanto o extrato de silvado foi capaz de inibir apenas a atividade da α -glucosidase. Estes extratos apresentaram pouca, ou nenhuma no caso do silvado, atividade inibitória da α -amilase e boa atividade inibitória da α -glucosidase, o que é benéfico em relação aos efeitos secundários associados à inibição das enzimas digestivas. Dentro dos extratos analisados, destaque para o silvado, urze-molar e o

marmulano, que parecem ter potencial para serem utilizados como substitutos de alguns medicamentos convencionais utilizados no tratamento da diabetes *mellitus* como a acarbose.

Em relação aos extratos de marmulano foi possível concluir que as três frações estudadas têm compostos bioativos, destacando-se, no entanto, os ramos, como sendo a fração que, de um modo geral, apresentou os resultados mais elevados na generalidade dos ensaios realizados.

Os resultados sugerem a possibilidade destas plantas, poderem ter interesse para as indústrias farmacêuticas, alimentar e de cosmética, nomeadamente através da sua utilização como alternativa aos antioxidantes e conservantes sintéticos e na formulação de nutracêuticos. Particularmente, no caso da indústria farmacêutica, os extratos analisados parecem ter também potencial para serem utilizados como alternativa aos medicamentos antidiabéticos.

Com este estudo espera-se incentivar o desenvolvimento de investigações profundas das espécies usadas na medicina tradicional na Região Autónoma da Madeira, de forma a dar suporte científico ao conhecimento empírico sobre o potencial terapêutico que estas espécies possuem.

No ponto de vista científico e numa tentativa de conjugar com os resultados já obtidos, seria interessante avaliar o perfil dos compostos fenólicos e de outros compostos, nomeadamente os terpenóides e alcaloides, com recurso a técnicas cromatográficas (HPLC, LC-MS), estudar as propriedades anti-inflamatórias, e a sua toxicidade, de forma a determinar as doses seguras de ingestão e garantir que o consumo mais elevado dessas plantas não cause nenhum efeito adverso.

O facto de um composto apresentar uma determinada atividade *in vitro* não é condição necessária e suficiente para que a mantenha nas condições fisiologias. Para que isso aconteça é necessário que ele resista ao processo de digestão gastrointestinal, que seja absorvido pelas células do intestino e que não seja rapidamente inativado nem pelas bactérias da flora intestinal, nem pelas enzimas de biotransformação humanas. Assim a validação da utilização medicinal ou como nutracêuticos destes extratos carece de estudos mais aprofundados sobre a biodisponibilidade dos seus compostos bioativos.

6-Bibliografia

- Abu Bakar, M. F., Ismail, N. A., Isha, A., & Mei Ling, A. L. (2016). Phytochemical composition and biological activities of selected wild berries (*Rubus moluccanus* L., *R. fraxinifolius* Poir., and *R. alpestris* Blume). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 1-10.
- Ahmed, D., Mughal, Q. M., Younas, S., & Ikram, M. (2013). Study of phenolic content and urease and alpha-amylase inhibitory activities of methanolic extract of *Rumex acetosella* roots and its sub-fractions in different solvents. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 26(3), 553–559.
- Ahmed, M., Pickova, J., Ahmad, T., Liaquat, M., Farid, A., & Jahangir, M. (2016). Oxidation of Lipids in Foods. *Sarhad Journal of Agriculture*, 32(3).
- Aires, A., & Carvalho, R. (2017a). Profiling of Polyphenol Composition and Antiradical Capacity of *Erica cinerea*. *Antioxidants*, 6(3), 72.
- Aires, A., & Carvalho, R. (2017b). Screening of polyphenol composition and antiradical capacity of wild *Erica arborea*: a native plant species from the Portuguese flora. *J Chromatogr Sep Tech*, 8(379), 2.
- Al-Snafi, A. E. (2020). Constituents and pharmacology of *Fumaria officinalis*-A review. *IOSR Journal of Pharmacy*, 10(1), 17-25.
- Alberti, K. G. M. M., & Zimmet, P. Z. (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. *Diabetic medicine*, 15(7), 539-553.
- Alberto, M. R., Zampini, I. C., & Isla, M. I. (2009). Inhibition of cyclooxygenase activity by standardized hydroalcoholic extracts of four Asteraceae species from the Argentine Puna. *Brazilian journal of medical and biological research*, 42, 787-790.
- Ali, N., Shaoib, M., Shah, S. W. A., Shah, I., & Shuaib, M. (2017). Pharmacological profile of the aerial parts of *Rubus ulmifolius* Schott. *BMC complementary and alternative medicine*, 17(1), 1-7.
- Almargem (2022). *Rubus ulmifolius*. <http://almargem.org/biodiv/especie/rubus-ulmifolius/>
- Almeida, D. F. L. D. S. (2017). *Estudo das vias metabólicas das plantas na síntese de pigmentos naturais* [Tese de mestrado, Universidade Fernando Pessoa]. Repositório Institucional da Universidade Fernando Pessoa. <http://hdl.handle.net/10284/6104>
- Alves, T. M. D. A., Silva, A. F., Brandão, M., Grandi, T. S. M., Smânia, E. D. F. A., Smânia Júnior, A., & Zani, C. L. (2000). Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95, 367-373.
- Amezouar, F., Badri, W., Hsaine, M., Bourhim, N., & Fougrach, H. (2013). Évaluation des activités antioxydante et anti-inflammatoire de *Erica arborea* L. du Maroc. *Pathologie Biologie*, 61(6), 254-258.
- Amroun, D., Hamoudi, M., Khenouf, S., Boutefnouchet, S., Harzallah, D., Amrane, M., & Dahamna, S. (2021). In-vivo anti-inflammatory activity and safety assessment of the

- aqueous extract of Algerian *Erica arborea* L. (Ericaceae) aerial parts. *Journal of Ethnopharmacology*, 271, 113881.
- Anand, U., Jacobo-Herrera, N., Altemimi, A., & Lakhssassi, N. (2019). A Comprehensive Review on Medicinal Plants as Antimicrobial Therapeutics: Potential Avenues of Biocompatible Drug Discovery. *Metabolites*, 9(11), 258.
- Andrade-Cetto, A., Becerra-Jiménez, J., & Cárdenas-Vázquez, R. (2008). Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(1), 27-32.
- Ângelo, P. M., & Jorge, N. (2007). Compostos fenólicos em alimentos-uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)*, 66(1), 01-09.
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127(1), 183-198.
- Aoki, K., Muraoka, T., Ito, Y., Togashi, Y., & Terauchi, Y. (2010). Comparison of adverse gastrointestinal effects of acarbose and miglitol in healthy men: a crossover study. *Internal Medicine*, 49(12), 1085-1087.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(26), 7970-7981.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Esin Karademir, S., & Erçağ, E. (2006). The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. *International journal of food sciences and nutrition*, 57(5-6), 292-304.
- Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S. E., Bektaşoğlu, B., ... & Özyurt, D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12(7), 1496-1547.
- Aranda, J. V., Salomone, F., Valencia, G. B., & Beharry, K. D. (2017). Non-steroidal anti-inflammatory drugs in newborns and infants. *Pediatric Clinics*, 64(6), 1327-1340.
- Arulselvan, P., Ghofar, H.A.A., Karthivashan, G., Halim, M.F.A., Ghafar, M.S.A., Fakurazi, S., 2014. Antidiabetic therapeutics from natural source: a systematic review. *Biomed. Prev. Nutr.* 4, 607e617
- ASAE (2022). *Antioxidantes*. <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/aditivos-alimentares/antioxidantes.aspx>
- Asraoui, F., Kounnoun, A., Cadi, H. E., Cacciola, F., Majdoub, Y. O. E., Alibrando, F., ... & Louajri, A. (2021). Phytochemical Investigation and Antioxidant Activity of *Globularia alypum* L. *Molecules*, 26(3), 759.
- Ay, M., Bahadori, F., Öztürk, M., Kolak, U., & Topçu, G. (2007). Antioxidant activity of *Erica arborea*. *Fitoterapia*, 78(7-8), 571-573.
- Azizah, D. N., Kumolowati, E., & Faramayuda, F. (2014). Penetapan kadar flavonoid metode $AlCl_3$ pada ekstrak metanol kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.). *Kartika: Jurnal Ilmiah Farmasi*, 2(2), 33-37.

- Bahmani, M., Golshahi, H., Saki, K., Rafieian-Kopaei, M., Delfan, B., & Mohammadi, T. (2014). Medicinal plants and secondary metabolites for diabetes mellitus control. *Asian Pacific journal of tropical diseases.*, 4, S687-S69.
- Baião, D.D.S, Silva de Freitas, C., Paes Gomes, L., Da Silva, D., Carolina NTF Correa, A., Ribeiro Pereira, P., ... & Margaret Flosi Paschoalin, V. (2017). Polyphenols from root, tubercles and grains cropped in Brazil: Chemical and nutritional characterization and their effects on human health and diseases. *Nutrients*, 9(9), 1044.
- Bakr, A. R., & Rahaman, M. S. (2016). Electrochemical efficacy of a carboxylated multiwalled carbon nanotube filter for the removal of ibuprofen from aqueous solutions under acidic conditions. *Chemosphere*, 153, 508-520.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71-79.
- Barbosa, G. R., Almeida, J. M. D., & Silva, N. C. C. (2021). Use of natural substrates as an alternative for the prevention of microbial contamination in the food industry. *Food Science and Technology*, 42, e05720, 1-6
- Barbosa, K. B. F., Costa, N. M. B., Alfenas, R. D. C. G., De Paula, S. O., Minim, V. P. R., & Bressan, J. (2010). Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. *Rev Nutr*, 23(4), 629-43.
- Barreiros, A. L., David, J. M., & David, J. P. (2006). Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química nova*, 29, 113-123.
- Barros, L., Carvalho, A. M., Morais, J. S., & Ferreira, I. C. (2010). Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food chemistry*, 120(1), 247-254.
- Belló, A. (2002). Dano oxidativo e regulação biológica pelos radicais livres. In *Estresse Oxidativo e Antioxidantes*. Porto Alegre, Brasil: Editora Ulbra, 15-19.
- Benabdallah, A., Rahmoune, C., Boumendjel, M., Aissi, O., & Messaoud, C. (2016). Total phenolic content and antioxidant activity of six wild *Mentha* species (Lamiaceae) from northeast of Algeria. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 6(9), 760-766.
- Bhutkar, M. A., & Bhise, S. B. (2012). In vitro assay of alpha amylase inhibitory activity of some indigenous plants. *Int. J. Chem. Sci*, 10(1), 457-462.
- Bianchi, M. D. L. P., & Antunes, L. M. G. (1999). Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de nutrição*, 12, 123-130.
- Bibi Sadeer, N., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., & Mahomoodally, M. F. (2020). The versatility of antioxidant assays in food science and safety—Chemistry, applications, strengths, and limitations. *Antioxidants*, 9(8), 709, 1-39
- Blainski, A., Lopes, G. C., & De Mello, J. C. P. (2013). Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules*, 18(6), 6852-6865.
- Bouriche, H., Kada, S., Ozen, T., Toptanci, B. Ç., Kizil, G., & Kizil, M. (2017). Phenolic content and biomolecule oxidation protective activity of *Globularia alypum* extracts. *Brazilian archives of biology and technology*, 60,1-15.

- Bramwell D, Bramwell Z. (1990). Labiatea. In Bramwell D, Bramwell Z. (Eds.), *Flores Silvestres de las Islas Canarias* (1ª edição). (pp 244-265). Rueda SL
- Brownmiller, C. I. N. D. I., Howard, L. R., & Prior, R. L. (2008). Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blueberry products. *Journal of food science*, 73(5), 72-79.
- Campos, F. A. S. (2021). *Alimentos funcionais ricos em compostos fenólicos na prevenção e controlo da Diabetes Mellitus tipo 2* [Tese de Mestrado, Universidade do Porto]. Repositório Digital da Universidade do Porto. <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/138733/2/522263.pdf>
- Capelo, J., M. M. Sequeira, R. Jardim, & J.C. Costa, J. (2004). Guia da excursão geobotânica dos V Encontros ALFA 2004 à ilha da Madeira. In: Capelo, J. A paisagem vegetal da ilha da Madeira. pp. 5 -45. Quercetea, 6: 3 -200.
- Cardoso, N. A. (2018). *Estudos das Potencialidades farmacológicas de plantas endémicas/medicinais de Cabo Verde* [Tese de Mestrado, Universidade da Beira Interior]. Repositório Digital da Universidade da Beira Interior. <https://ubibliorum.ubi.pt/handle/10400.6/9682>
- Carocho, M., & CFR Ferreira, I. (2013). The role of phenolic compounds in the fight against cancer—a review. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 13(8), 1236-1258.
- Carvalho, W. A., Carvalho, R. D. S., & Rios-Santos, F. (2004). Analgésicos inibidores específicos da ciclooxigenase-2: avanços terapêuticos. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 54, 448-464.
- Cassidy A., Hanley B., Lamuela-Raventos, RM. (2000) Isoflavones, lignans and stilbenes - origins, metabolism and potential importance to human health. *Journal Science Food Agriculture* 80(7), 1044-1062.
- Centro de Química da Madeira (2007a). *Erica arborea* L. <http://www3.uma.pt/biopolis/planta.php?id=715~>
- Centro de Química da Madeira (2007b). *Rubus ulmifolius* Schott. <http://www3.uma.pt/biopolis/planta.php?id=646>
- Centro de Química da Madeira (2007c). *Sideroxylon marmulano* Schott. <http://www3.uma.pt/biopolis/planta.php?id=242>
- Cetin-Karaca, H., & Newman, M. C. (2015). Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against Salmonella and Escherichia Coli. *Food bioscience*, 11, 8-16.
- Chakrabarti, Rituparna., Singh, Bhavtaran., Vanchhawng, Lalthanama, & Thirumurugan, Kavitha (2014). Screening of nine herbal plants for in vitro a-amylase inhibition. *Screening*, 7(4), 84-89.
- Chandrasekharan, N. V., Dai, H., Roos, K. L. T., Evanson, N. K., Tomsik, J., Elton, T. S., & Simmons, D. L. (2002). COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(21), 13926-13931.

- Che Sulaiman, I. S., Basri, M., Fard Masoumi, H. R., Chee, W. J., Ashari, S. E., & Ismail, M. (2017). Effects of temperature, time, and solvent ratio on the extraction of phenolic compounds and the anti-radical activity of *Clinacanthus nutans* Lindau leaves by response surface methodology. *Chemistry Central Journal*, 11(1), 1-11.
- Chen, L. R., Ko, N. Y., & Chen, K. H. (2019). Isoflavone supplements for menopausal women: a systematic review. *Nutrients*, 11(11), 2649.
- Conforti, F., Statti, G., Loizzo, M. R., Sacchetti, G., Poli, F., & Menichini, F. (2005). In vitro antioxidant effect and inhibition of α -amylase of two varieties of *Amaranthus caudatus* seeds. *Biological and pharmaceutical bulletin*, 28(6), 1098-1102.
- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J. P., Cimanga, K., Van Poel, B., ... & Berghe, D. V. (1998). Structure– activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of natural products*, 61(1), 71-76.
- Cotterchio, M., Boucher, B. A., Manno, M., Gallinger, S., Okey, A., & Harper, P. (2006). Dietary phytoestrogen intake is associated with reduced colorectal cancer risk. *The Journal of nutrition*, 136(12), 3046-3053.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
- Cruz, J. B. F., & Soares, H. F. (2011). Uma revisão sobre o zinco. *Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde*, 15(1), 207-222.
- Cui, S., Wang, J., Wu, Q., Qian, J., Yang, C., & Bo, P. (2017). Genistein inhibits the growth and regulates the migration and invasion abilities of melanoma cells via the FAK/paxillin and MAPK pathways. *Oncotarget*, 8(13), 21674.
- Cunha, A. L., Moura, K. S., Barbosa, J. C., & Dos Santos, A. F. (2016). Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. *Diversitas Journal*, 1(2), 175-181.
- Da Silva, C., Garcia, V. S., & Franciscato, L. S. (2016). Extração assistida por ultrassom de compostos bioativos das cascas de lichia (*Litchi chinensis* Sonn.). *RECEN-Revista Ciências Exatas e Naturais*, 18(1), 81-96.
- Da Silva, L. P., Pereira, E., Pires, T. C., Alves, M. J., Pereira, O. R., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2019a). *Rubus ulmifolius* Schott fruits: A detailed study of its nutritional, chemical and bioactive properties. *Food research international*, 119, 34-43.
- Da Silva, L. P., Pereira, E., Prieto, M. A., Simal-Gandara, J., Pires, T. C., Alves, M. J., ... & Ferreira, I. C. (2019b). *Rubus ulmifolius* Schott as a novel source of food colorant: extraction optimization of coloring pigments and incorporation in a bakery product. *Molecules*, 24(11), 2181.
- Da Silva, R. R., de Oliveira, T. T., Nagem, T. J., & Leão, M. A. (2002). Efeito de flavonóides no metabolismo do ácido araquidônico. *Medicina (Ribeirão Preto)*, 35(2), 127-133.
- Dadashi, L., & Dehghanzadeh, R. (2016). Investigating incidence of bacterial and fungal contamination in shared cosmetic kits available in the women beauty salons. *Health promotion perspectives*, 6(3), 159-163.

- Dakiche, H., Khali, M., Abu-el-Haija, A. K., Al-Maaytah, A., & Al-Balas, Q. A. (2016). Biological activities and phenolic contents of *Argania spinosa* L (Sapotaceae) leaf extract. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 15(12), 2563-2570.
- Dall'Acqua, S., Cervellati, R., Loi, M. C., & Innocenti, G. (2008). Evaluation of in vitro antioxidant properties of some traditional Sardinian medicinal plants: Investigation of the high antioxidant capacity of *Rubus ulmifolius*. *Food Chemistry*, 106(2), 745-749.
- Danis, O., Demir, S., Gunduz, C., Alparslan, M. M., Altun, S., & Yuce-Dursun, B. (2016). Synthesis of selected 3-and 4-aryl coumarin derivatives and evaluation as potent antioxidants. *Research on Chemical Intermediates*, 42(6), 6061-6077.
- Darias, V., Bravo, L., Barquin, E., Herrera, D. M., & Fraile, C. (1986). Contribution to the ethnopharmacological study of the Canary Islands. *Journal of Ethnopharmacology*, 15(2), 169-193.
- Darias, V., Bravo, L., Rabanal, R., Mateo, C. S., Luis, R. G., & Perez, A. H. (1989). New contribution to the ethnopharmacological study of the Canary Islands. *Journal of Ethnopharmacology*, 25(1), 77-92.
- Das, A., Raychaudhuri, U., & Chakraborty, R. (2012). Antimicrobial effect of edible plant extract on the growth of some foodborne bacteria including pathogens. *Nutrafoods*, 11(3), 99-104.
- De Moraes Arnoso, B. J., da Costa, G. F., & Schmidt, B. (2019). Biodisponibilidade e classificação de compostos fenólicos. *Nutrição Brasil*, 18(1), 39-48.
- De Souza, V. A., Nakamura, C. V., & Corrêa, A. G. (2012). Atividade antichagásica de lignanas e neolignanas. *Revista Virtual de Química*, 4(3), 197-207.
- De Vargas, G. C., & Andrade, E. H. B. (2022). Estudo da Atividade Antioxidante dos Compostos Fenólicos na Medicina Preventiva: Revisão de Literatura. *Visão Acadêmica*, 23(1), 55-64.
- Degáspari, C. H., & Waszczynskyj, N. (2004). Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Visão acadêmica*, 5(1), 33-40.
- Desmiaty, Y., Elya, B., Saputri, F. C., Hanafi, M., & Prastiwi, R. (2018). Antioxidant activity of *rubus fraxinifolius* poir. and *rubus rosifolius* J. Sm. leaves. *Journal of Young Pharmacists*, 10(2s), S93.
- Dias, A. R. D. S. V. G. (2015). *Cumarinas: origem, distribuição e efeitos tóxicos* [Tese de Mestrado. Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz]. Repositório Comum. <http://hdl.handle.net/10400.26/11324>
- Dias, H. P., Pavia, D. S., Romão, W., & Endringer, D. C. (2014). Identificação de Polifenóis: Sequência Pedagógica para o Ensino Médio. *Revista virtual de química*, 6(2), 467-477
- Durazzo, A., Lucarini, M., Souto, E. B., Cicala, C., Caiazzo, E., Izzo, A. A., ... & Santini, A. (2019). Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytotherapy Research*, 33(9), 2221-2243.
- Edziri, H., Guerrab, M., Anthonissen, R., Mastouri, M., & Verschaeve, L. (2020). Phytochemical screening, antioxidant, anticoagulant and in vitro toxic and genotoxic properties of aerial

- parts extracts of *Fumaria officinalis* L. growing in Tunisia. *South African Journal of Botany*, 130, 268-273.
- Eldeen, I. M. S., & Van Staden, J. (2008). Anti-inflammatory and mycobacterial activity of leaf extracts of *Coleonema album*. *South African Journal of Botany*, 74(2), 345-347.
- Erdogrul, Ö. T. (2002). Antibacterial activities of some plant extracts used in folk medicine. *Pharmaceutical Biology*, 40(4), 269-273.
- Espinel-Ingroff, A., & Cantón, E. (2007) "Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts" in Antimicrobial susceptibility testing protocols, ed. R. Schwalbe, L. Steele-Moore, A. C. Goodwin (Boca Raton, FL: CRC Press), 173–208.
- Essoh, A. P., Liberal, Â., Fernandes, Â., Dias, M. I., Pereira, C., Mandim, F., Moldão-Martins, M., Cravo, P., Duarte, M. P., Moura, Romeiras, M. M., & Barros, L. (2022). Evaluation of the Polyphenolic Composition and Bioactivities of Three Native Cabo Verde Medicinal Plants. *Pharmaceuticals*, 15(9), 1162.
- Etienne, R., Viegas, F., & Viegas Jr, C. (2021). Aspectos fisiopatológicos da inflamação e o planeamento de fármacos: uma visão geral atualizada. *Revista Virtual de Química*, 13(1), 167-191.
- Fagúndez, J., & Izco, J. (2010). Seed morphology of the European species of *Erica* L. sect. *Arsace* Salisb. ex Benth.(Ericaceae). *Acta botanica gallica*, 157(1), 45-54.
- Fahmi, F., Tahrouch, S., & Hatimi, A. (2013). Geoclimatic influences on flavonoids contents of the leaves of the argan tree Influences géoclimatiques sur la composition en flavonoides des feuilles de l'arganier *Argania spinosa*. *Journal of materials environmental science*, 4(6), 881-886.
- Fan, F. Y., Sang, L. X., & Jiang, M. (2017). Catechins and their therapeutic benefits to inflammatory bowel disease. *Molecules*, 22(3), 484.
- Felipe, L. O., & Bicas, J. L. (2017). Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. *Química Nova na Escola*, 39(2), 120-130.
- Felter, S. P., Zhang, X., & Thompson, C. (2021). Butylated hydroxyanisole: Carcinogenic food additive to be avoided or harmless antioxidant important to protect food supply?. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 121, 104887.
- Feriani, A., del Mar Contreras, M., Talhaoui, N., Gómez-Caravaca, A. M., Taamalli, A., Segura-Carretero, A., ... & Allagui, M. S. (2017). Protective effect of *Globularia alypum* leaves against deltamethrin-induced nephrotoxicity in rats and determination of its bioactive compounds using high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem quadrupole–time-of-flight mass spectrometry. *Journal of functional foods*, 32, 139-148.
- Ferrão, J. E. M., & Liberato, M. C. (2015). Dicionário de plantas medicinais. Lisbon (PT): Faculdade de Ciências Humanas (Universidade Católica Portuguesa). <http://icm.fch.lisboa.ucp.pt/resources/Documentos/CEPCEP/Dicionario,%20Letra%20C.pdf>
- Ferreira, A. L. A., & Matsubara, L. S. (1997). Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da associação médica brasileira*, 43, 61-68.

- Ferreira, I. C., & Abreu, R. (2007). Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. *Bioanálise*, 32-39.
- Ferreira, M. K. A., Fontenelle, R. O. D. S., Magalhães, F. E. A., Bandeira, P. N., de Menezese, J. E. S. A., & dos Santos, H. S. (2018). Potencial farmacológico de chalconas: uma breve revisão. *Revista Virtual de Química*, 10(5), 1-19.
- Ferron, L., Colombo, R., Mannucci, B., & Papetti, A. (2020). A new italian purple corn variety (Moradyn) byproduct extract: antiglycative and hypoglycemic in vitro activities and preliminary bioaccessibility studies. *Molecules*, 25(8), 1958.
- Franco, D. P., Pereira, T. M., Vitorio, F., Nadur, N. F., Lacerda, R. B., & Kümmerle, A. E. (2021). A Importância das Cumarinas para a Química Medicinal e o Desenvolvimento de Compostos Bioativos nos últimos anos. *Química Nova*, 44, 180-197.
- Frankel, E. N. (1996). Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. *Food chemistry*, 57(1), 51-55.
- Fršićić, M., Bucar, F., & Hazler Pilepić, K. (2016). LC-PDA-ESI-MSⁿ analysis of phenolic and iridoid compounds from *Globularia* spp. *Journal of Mass Spectrometry*, 51(12), 1211-1236.
- Fršićić, M., Petlevski, R., Kosalec, I., Madunić, J., Matulić, M., Bucar, F., ... & Maleš, Ž. (2022). *Globularia alypum* L. and Related Species: LC-MS Profiles and Antidiabetic, Antioxidant, Anti-Inflammatory, Antibacterial and Anticancer Potential. *Pharmaceuticals*, 15(5), 506.
- Fujisawa, T., Ikegami, H., Inoue, K., Kawabata, Y., & Ogihara, T. (2005). Effect of two α -glucosidase inhibitors, voglibose and acarbose, on postprandial hyperglycemia correlates with subjective abdominal symptoms. *Metabolism*, 54(3), 387-390.
- García, A. Á., & Carril, E. P. U. (2011). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (biología)*, 2(3), 119-145.
- Gaspar, C. R. B. S. (2006), *Desenvolvimento de um sensor de massa para seguir a degradação da manteiga* [Tese de Mestrado, Universidade de Aveiro]. Repositório Digital da Universidade de Aveiro. <https://ria.ua.pt/handle/10773/3005>
- Gattuso, G., Barreca, D., Gargiulli, C., Leuzzi, U., & Caristi, C. (2007). Flavonoid composition of citrus juices. *Molecules*, 12(8), 1641-1673.
- Gerhardt, C., Wiest, J. M., Girolometto, G., Silva, M. A. S. D., & Weschenfelder, S. (2012). Aproveitamento da casca de citros na perspectiva de alimentos: prospecção da atividade antibacteriana. *Brazilian Journal of Food Technology*, 15, 11-17.
- Ghareeb, D. A., ElAhwany, A. M., El-Mallawany, S. M., & Saif, A. A. (2014). In vitro screening for anti-acetylcholinesterase, anti-oxidant, anti-glucosidase, anti-inflammatory and anti-bacterial effect of three traditional medicinal plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 28(6), 1155-1164.
- Gilroy, D., & Lawrence, T. (2008). The resolution of acute inflammation: A 'tipping point' in the development of chronic inflammatory diseases. In A. Rossi, & D. Sawatzky (Ed.), *The Resolution of Inflammation* (pp. 1-18). United Kingdom: Birkhäuser Verlag AG.

- Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. (2007). Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química nova*, 30, 374-381.
- Goldberg, D. M., Tsang, E., Karumanchiri, A., Diamandis, E. P., Soleas, G., & Ng, E. (1996). Method to assay the concentrations of phenolic constituents of biological interest in wines. *Analytical Chemistry*, 68(10), 1688-1694.
- Gonçalves, M. (2013). *Síntese e propriedades farmacológicas dos derivados de estilbenos*. [Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”]. Repositório Digital da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. <http://hdl.handle.net/11449/119313>
- Gossiau, A., Li, S., Ho, C.-T., Chen, K. Y., & Rawson, N. E. (2011). The importance of natural product characterization in studies of their anti-inflammatory activity. *Molecular Nutrition and Food Research*, 55(1), 74 - 82.
- Gottstein, T., & Grosch, W. (1990). Model study of different antioxidant properties of α - and γ -tocopherol in fats. *Lipid/Fett*, 92(4), 139-144.
- Gouveia-Figueira, S. C., & Castilho, P. C. (2015). Phenolic screening by HPLC–DAD–ESI/MSn and antioxidant capacity of leaves, flowers and berries of *Rubus grandifolius* Lowe. *Industrial Crops and Products*, 73, 28-40.
- Guendouze-Bouchefa, N., Madani, K., Chibane, M., Boulekbache-Makhlouf, L., Hauchard, D., Kiendrebeogo, M., ... & Duez, P. (2015). Phenolic compounds, antioxidant and antibacterial activities of three Ericaceae from Algeria. *Industrial crops and products*, 70, 459-466.
- Guinaz, M., Milagres, R. C. R. M., Pinheiro-Sant'Ana, H. M., & Chaves, J. B. P. (2009). Tocoferóis e tocotrienóis em óleos vegetais e ovos. *Química Nova*, 32, 2098-2103.
- Gulati, V., Harding, I. H., & Palombo, E. A. (2012). Enzyme inhibitory and antioxidant activities of traditional medicinal plants: potential application in the management of hyperglycemia. *Bmc complementary and alternative medicine*, 12(1), 1-9.
- Gülçin, İ., Huyut, Z., Elmastaş, M., & Aboul-Enein, H. Y. (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian journal of chemistry*, 3(1), 43-53.
- Guler, A., & Turgut, D. Y. (2021). Fatty acids, phenolic compounds and antioxidant capacity of the seeds from nine grape cultivars (*Vitis vinifera* L.). *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 36(2), 116-125.
- Guyton, A., & Hall, J. (2006). Resistance of the Body to Infection: I. Leukocytes, Granulocytes, the Monocyte-Macrophage System, and Inflammation. In A. C. Guyton, & J. E. Hall (Eds.), *Textbook of Medical Physiology* (pp. 429-438). Philadelphia: Elsevier Saunders
- Halliwell, B. (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annual review of nutrition*, 16(1), 33-50.
- Halliwell, B., Aeschbach, R., Lörliger, J., & Aruoma, O. I. (1995). The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 33(7), 601-617.
- Hanene, J. H., Aicha, N., Ines, S. K., Eya, M., Leila, C. G., & Touhami, M. (2010). Antioxidant and antigenotoxic activities of *Globularia alypum* leaves extracts. *Journal of medicinal plants research*, 4(19), 2048-2053.

- Harizi, H., Corcuff, J. B., & Gualde, N. (2008). Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends in molecular medicine*, 14(10), 461-469.
- Harvey, R.A., Champe, P.C., Fisher, B.D., Strohl, W.A. (2007). Lippincott's illustrated reviews: microbiology. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, EUA, 438 p., ISBN:0781782155 9780781782159.
- Hebi, M., & Eddouks, M. (2019). Leaf aqueous extract of *Argania spiniosa* exhibits antihyperglycemic effect in diabetic rats. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Cardiovascular & Hematological Agents)*, 17(1), 64-71.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*, 13(10), 572-584.
- Heinrich, M., Mah, J., & Amirkia, V. (2021). Alkaloids Used as Medicines: Structural Phytochemistry Meets Biodiversity—An Update and Forward Look. *Molecules*, 26(7), 1836.
- Henriques, D., Fontinha, S., Neves, M. C., Nóbrega, H., Ferro, A., & Carvalho, M. A. A. (2017). Propagation of nine endemic plant species from Madeira Island (Portugal). *Silva Lusitana*, 25(1), 51-77. <http://hdl.handle.net/10400.13/3193>
- Hirshfield, I. N., Terzulli, S., & O'Byrne, C. (2003). Weak organic acids: a panoply of effects on bacteria. *Science progress*, 86(4), 245-270.
- Hoang, H. T., Moon, J. Y., & Lee, Y. C. (2021). Natural Antioxidants from Plant Extracts in Skincare Cosmetics: Recent Applications, Challenges and Perspectives. *Cosmetics*, 8(4), 106. doi: 10.3390/cosmetics8040106
- Holländer, K., & Jäger, E. J. (1994). Morphologie, Biologie und ökogeographische Differenzierung von *Globularia*: I. Progressionen in der Wuchsform, Infloreszenz, Blattnervatur und Verbreitung. *Flora*, 189(3), 223-254.
- Hollman, P. C. (2004). Absorption, bioavailability, and metabolism of flavonoids. *Pharmaceutical biology*, 42(1), 74-83.
- Houghton, A., Appelhagen, I., & Martin, C. (2021). Natural blues: Structure meets function in anthocyanins. *Plants*, 10(4), 726, 1-22.
- Hsiao SH, Liao LH, Cheng PN e Wu TJ (2006). Hepatotoxicidade associada à terapia com acarbose. *Annals of Pharmacotherapy*, 40 (1), 151-154.
- Hu, S. H., Wang, J. C., Kung, H. F., Wang, J. T., Lee, W. L., & Yang, Y. H. (2004). Antimicrobial effect of extracts of cruciferous vegetables. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 20(12), 591-599.
- Huang, S., & Czech, M. P. (2007). The GLUT4 glucose transporter. *Cell metabolism*, 5(4), 237-252.
- IEWF (2022). *Fumaria muralis*. http://www.iewf.org/weedid/Fumaria_muralis.htm

- Indradi, R. B., Fidrianny, I., & Wirasutisna, K. R. (2017). DPPH scavenging activities and phytochemical content of four Asteraceae plants. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 9(6), 755-759.
- Indrianingsih, A. W., Tachibana, S., Dewi, R. T., & Itoh, K. (2015). Antioxidant and α -glucosidase inhibitor activities of natural compounds isolated from *Quercus gilva* Blume leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(9), 748-755.
- Ivanov, I., Vrancheva, R., Marchev, A., Petkova, N., Aneva, I., Denev, P., ... & Pavlov, A. (2014). Antioxidant activities and phenolic compounds in Bulgarian *Fumaria* species. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(2), 296-306.
- Ivey, K. L., Lewis, J. R., Lim, W. H., Lim, E. M., Hodgson, J. M., & Prince, R. L. (2013). Associations of proanthocyanidin intake with renal function and clinical outcomes in elderly. *PLoS ONE*, 8(8), e71166.
- Iwata, N., Kainuma, M., Kobayashi, D., Kubota, T., Sugawara, N., Uchida, A., ... & Shimazoe, T. (2016). The relation between hepatotoxicity and the total coumarin intake from traditional Japanese medicines containing cinnamon bark. *Frontiers in pharmacology*, 7, 174.
- Jamei, R., & Babaloo, F. (2017). Stability of blueberry (*Cornus mas*–Yulyush) anthocyanin pigment under pH and co-pigment treatments. *International Journal of Food Properties*, 20(9), 2128-2133.
- Jardim, R., & Sequeira, M. M. D. (2021). New taxa to the flora of Madeira archipelago islands (Portugal). *Botanica Complutensis*, 45, e78245.
- Jemaa, H. B., Jemia, A. B., Khelifi, S., Ahmed, H. B., Slama, F. B., Benzarti, A., ... & Aouidet, A. (2017). Antioxidant activity and α -amylase inhibitory potential of *Rosa canina* L. *African journal of traditional, complementary and alternative medicines*, 14(2), 1-8.
- Jorge, N., J & Gonçalves, L. A. G. (1998). Aditivos utilizados em óleos e gorduras de frituras. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 32(1), 40-47.
- Joshi, S. R., Parikh, R. M., & Das, A. K. (2007). Insulin-history, biochemistry, physiology and pharmacology. *Journal-association of physicians of India*, 55(L), 19-25.
- Jouad, H., Maghrani, M., & Eddouks, M. (2002). Hypoglycaemic effect of *Rubus fruticosus* L. and *Globularia alypum* L. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 81(3), 351-356.
- Kalyvas, D. G., & Tarenidou, M. (2008). Influence of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on osseointegration. *Journal of oral science*, 50(3), 239-246.
- Kashchenko, N. I., Olennikov, D. N., & Chirikova, N. K. (2021). Metabolites of Siberian raspberries: LC-MS profile, seasonal variation, antioxidant activity and, thermal stability of *Rubus matsumuranus* phenolome. *Plants*, 10(11), 2317.
- Kazeem, M., Adamson, J., & Ogunwande, I. (2013). Modes of inhibition of α -amylase and α -glucosidase by aqueous extract of *Morinda lucida* Benth Leaf. *BioMed Research International*, 1-6.

- Keller, J., Camaré, C., Bernis, C., Astello-García, M., de la Rosa, A. P. B., Rossignol, M., ... & Guéraud, F. (2015). Antiatherogenic and antitumoral properties of *Opuntia cladodes*: inhibition of low-density lipoprotein oxidation by vascular cells, and protection against the cytotoxicity of lipid oxidation product 4-hydroxynonenal in a colorectal cancer cellular model. *Journal of physiology and biochemistry*, 71(3), 577-587.
- Khaled-Khodja, N., Boulekbache-Makhlouf, L., & Madani, K. (2014). Phytochemical screening of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae. *Industrial crops and products*, 61, 41-48.
- Khan, K. N. M., Paulson, S. K., Lefkowitz, J., Verburg, K., Maziasz, T. (2002) Fetal and neonatal renal aspects of cyclooxygenase (COX) inhibition – Reply. *Kidney International*, 62(4) 1477-1478,
- Khan, V., Najmi, A. K., Akhtar, M., Aqil, M., Mujeeb, M., & Pillai, K. K. (2012). A pharmacological appraisal of medicinal plants with antidiabetic potential. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 4(1), 27-42.
- Kim, H. W., Seok, Y. S., Cho, T. J., & Rhee, M. S. (2020). Risk factors influencing contamination of customized cosmetics made on-the-spot: Evidence from the national pilot project for public health. *Scientific reports*, 10(1), 1-9.
- Kim, K. T., Rioux, L. E., & Turgeon, S. L. (2014). Alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibition is differentially modulated by fucoidan obtained from *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry*, 98, 27-33.
- Koohsari, H., Ghaemi, E. A., Sheshpoli, M. S., Jahedi, M., & Zahiri, M. (2015). The investigation of antibacterial activity of selected native plants from North of Iran. *Journal of medicine and life*, 8(Spec Iss 2), 38-42.
- Koşar, M., Göger, F., & Can Başer, K. H. (2008). In vitro antioxidant properties and phenolic composition of *Salvia virgata* Jacq. from Turkey. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(7), 2369-2374.
- Kumar, N., & Goel, N. (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*, 24, e00370.
- Kwon, Y. I., Apostolidis, E., & Shetty, K. (2008). Inhibitory potential of wine and tea against α -amylase and α -glucosidase for management of hyperglycemia linked to type 2 diabetes. *Journal of Food Biochemistry*, 32(1), 15-31.
- Lankatillake, C., Luo, S., Flavel, M., Lenon, G. B., Gill, H., Huynh, T., & Dias, D. A. (2021). Screening natural product extracts for potential enzyme inhibitors: protocols, and the standardisation of the usage of blanks in α -amylase, α -glucosidase and lipase assays. *Plant Methods*, 17(1), 1-19.
- Lee, C. A., Ismail, B., & Vickers, Z. M. (2012). The role of salivary proteins in the mechanism of astringency. *Journal of food science*, 77(4), 381-387.
- Lee, J., Koo, N. & Min, D. B. (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive reviews in food science & food safety*, 3(1):21-33. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1541-4337.2004.tb00058.x>
- Lee, R. F. (2003). Photo-oxidation and photo-toxicity of crude and refined oils. *Spill Science & Technology Bulletin*, 8(2), 157-162.

- Levetan, C., & Pierce, S. (2013). Distinctions between the islets of mice and men: implications for new therapies for Type 1 and 2 Diabetes. *Endocrine Practice*, 19(2), 301-312
- Lima, D. C. D. S., Vale, C. R. D., Vêras, J. H., Bernardes, A., Pérez, C. N., & Chen-Chen, L. (2017). Absence of genotoxic effects of the chalcone (E)-1-(2-hydroxyphenyl)-3-(4-methylphenyl)-prop-2-en-1-one and its potential chemoprevention against DNA damage using in vitro and in vivo assays. *Plos one*, 12(2), e0171224.
- Lima, É. S., & Abdalla, D. S. P. (2001). Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Braz J Pharm Sci*, 37(3), 293-303.
- Lobin, W., Leyens, T., Santos, A., Neves, H. C., & Gomes, I. (2005). The genus *Sideroxylon* (Sapotaceae) on the Madeira, Canary Islands and Cape Verde archipelagoes. *Vieraea* 33, 119-144.
- López-García, R. E., Hernandez-Perez, M., Rabanal, R. M., Darias, V., Martín-Herrera, D., Arias, A., & Sanz, J. (1992). Essential oils and antimicrobial activity of two varieties of *Cedronella canariensis* (L.) W. et B. *Journal of ethnopharmacology*, 36(3), 207-211.
- López-García, R. E., Martín-Herrera, D., Darias, V., & Rabanal, R. M. (1996). Study of the Hypoglycaemic, Diuretic and Cardiovascular Activity of *Cedronella canariensis* var. *canariensis* (L.) W. & B. *Phytotherapy Research*, 10(6), 541-543.
- Loureiro, R. J., Roque, F., Rodrigues, A. T., Herdeiro, M. T., & Ramalheira, E. (2016). Use of antibiotics and bacterial resistances: Brief notes on its evolution. *Rev port. saúde pública*, 34, 77-84.
- Luís, Â., Domingues, F., & Duarte, A. P. (2011). Bioactive compounds, RP-HPLC analysis of phenolics, and antioxidant activity of some Portuguese shrub species extracts. *Natural Product Communications*, 6(12), 1863 – 1872.
- Luz, H. K. M., Wanderley, L. S., Faustino, L. R., da Silva, C. M. G., de Figueiredo, J. R., & Rodrigues, A. P. R. (2011). Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões. *Acta Scientiae Veterinariae*, 39(2), 1-13.
- Luzia, D. M. M., & Jorge, N. (2009). Atividade antioxidante do extrato de sementes de limão (*Citrus limon*) adicionado ao óleo de soja em teste de estocagem acelerada. *Química Nova*, 32, 946-949.
- Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., & Lima, J. L. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica chimica acta*, 613(1), 1-19.
- Manach, C.; Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A.; Remesy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 230-242,
- Mane, K., Chaluvvaraju, K. C., Niranjana, M. S., Zaranappa, T. R., & Manjuthaj, T. R. (2012). Review of insulin and its analogues in diabetes mellitus. *Journal of basic and clinical pharmacy*, 3(2), 283.
- Martínez Steele, E., & Monteiro, C. A. (2017). Association between dietary share of ultra-processed foods and urinary concentrations of phytoestrogens in the US. *Nutrients*, 9(3), 209, 1-15.

- Martins, A., Barros, L., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., Fernandes, I. P., Barreiro, F., & Ferreira, I. C. (2014). Phenolic extracts of *Rubus ulmifolius* Schott flowers: Characterization, microencapsulation and incorporation into yogurts as nutraceutical sources. *Food & function*, 5(6), 1091-1100.
- Mattioli, R., Francioso, A., Mosca, L., & Silva, P. (2020). Anthocyanins: A comprehensive review of their chemical properties and health effects on cardiovascular and neurodegenerative diseases. *Molecules*, 25(17), 3809, 1-42
- Matzke-Hajek, G., Silva, J. J. G., & Paz, R. F. (2016). The four *Rubus* species of the archipelago of Madeira (Portugal). *Museu de História Natural do Funchal*. 65, 19-30. <http://boletim.cm-funchal.pt>
- Mekonnen, A., & Desta, W. (2021). Comparative study of the antioxidant and antibacterial activities of *Rumex abyssinicus* with commercially available *Zingiber officinale* and *Curcuma longa* in Bahir Dar city, Ethiopia. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 8(1), 1-11.
- Mendes, R. T., Stanczyk, C. P., Sordi, R., Otuki, M. F., Santos, F. A. D., & Fernandes, D. (2012). Inibição seletiva da ciclo-oxigenase-2: riscos e benefícios. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 52, 774-782.
- Menichetti, F. (2005). Current and emerging serious Gram-positive infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 11, 22-28.
- Miceli, N., Trovato, A., Dugo, P., Cacciola, F., Donato, P., Marino, A., ... & Taviano, M. F. (2009). Comparative analysis of flavonoid profile, antioxidant and antimicrobial activity of the berries of *Juniperus communis* L. var. *communis* and *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. from Turkey. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(15), 6570-6577.
- Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. *Molecules*, 15 (12), 9252 - 9287.
- Min, K., Freeman, C., Kang, H., & Choi, S. U. (2015). The regulation by phenolic compounds of soil organic matter dynamics under a changing environment. *BioMed research international*, 2015.
- Min, S. W., & Han, J. S. (2014). Polyopes lancifolia extract, a potent α -glucosidase inhibitor, alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice. *Preventive Nutrition and Food Science*, 19(1), 5-9.
- Moon, J. K., & Shibamoto, T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(5), 1655-1666.
- Moradi-Afrapoli, F., Asghari, B., Saeidnia, S., Ajani, Y., Mirjani, M., Malmir, M., ... & Yassa, N. (2012). In vitro α -glucosidase inhibitory activity of phenolic constituents from aerial parts of *Polygonum hyrcanicum*. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20(1), 1-6.
- Mouffouk, C., Mouffouk, S., Mouffouk, S., Hambaba, L., & Haba, H. (2021). Flavonols as potential antiviral drugs targeting SARS-CoV-2 proteases (3CLpro and PLpro), spike protein, RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) and angiotensin-converting enzyme II receptor (ACE2). *European journal of pharmacology*, 891, 173759, 1-11.

- Mueller, M., Hobiger, S., & Jungbauer, A. (2010). Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. *Food chemistry*, 122(4), 987-996.
- Mukaka, M. M. (2012). A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi medical journal*, 24(3), 69-71.
- Muniyandi, K., George, E., Sathyanarayanan, S., George, B. P., Abrahamse, H., Thamburaj, S., & Thangaraj, P. (2019). Phenolics, tannins, flavonoids and anthocyanins contents influenced antioxidant and anticancer activities of Rubus fruits from Western Ghats, India. *Food Science and Human Wellness*, 8(1), 73-81.
- Naczki, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of chromatography A*, 1054(1-2), 95-111.
- Nakamura, S., Kato, A., & Kobayashi, K. (1992). Enhanced antioxidative effect of ovalbumin due to covalent binding of polysaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(11), 2033-2037.
- Naz, R., Ayub, H., Nawaz, S., Islam, Z. U., Yasmin, T., Bano, A., ... & Roberts, T. H. (2017). Antimicrobial activity, toxicity and anti-inflammatory potential of methanolic extracts of four ethnomedicinal plant species from Punjab, Pakistan. *BMC complementary and alternative medicine*, 17(1), 1-13.
- Nickavar, B., & Amin, G. (2011). Enzyme assay guided isolation of an α -amylase inhibitor flavonoid from *Vaccinium arctostaphylos* leaves. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 10(4), 849-853.
- Nickavar, B., Yousefian, N. (2010). Inhibitory Effects of Six *Allium* Species on α -Amylase Enzyme Activity. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 8(1), 53-57.
- Oliveira, A. C. D., Valentim, I. B., Goulart, M. O. F., Silva, C. A., Bechara, E. J. H., & Trevisan, M. T. S. (2009). Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*, 32(3), 689-702.
- Oliveira, M. C. D., & Schoffen, J. P. F. (2010). Oxidative stress action in cellular aging. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53, 1333-1342.
- Oliveira, R.S., Rocha, J.S., Pinheiro, K.H., Mendonça M.P., & Barão, C.E. (2016). Aplicação de processo ultrassom na extração de catequinas dos resíduos de chá verde. *Brazilian Journal of Food Research*, 7(3), 29-40.
- Ortega-Ramirez, L. A., Rodriguez-Garcia, I., Leyva, J. M., Cruz-Valenzuela, M. R., Silva-Espinoza, B. A., Gonzalez-Aguilar, G. A., ... & Ayala-Zavala, J. F. (2014). Potential of medicinal plants as antimicrobial and antioxidant agents in food industry: a hypothesis. *Journal of food science*, 79(2), 129-137.
- Orvalho, R. J. S. (2010). *Redução do teor de sódio em fiambre. implicações tecnológicas, organolépticas e de prazo de validade*. [Tese de Mestrado, Universidade Técnica de Lisboa]. Repositório Digital da Universidade de Lisboa.
- Ostrosky, E. A., Mizumoto, M. K., Lima, M. E., Kaneko, T. M., Nishikawa, S. O., & Freitas, B. R. (2008). Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(2), 301-307.

- Ostrosky, E. A., Mizumoto, M. K., Lima, M. E., Kaneko, T. M., Nishikawa, S. O., & Freitas, B. R. (2008). Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(2), 301-307.
- Packer, J. F., & Luz, M. (2007). Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17, 102-107.
- Painscale (2022). *Type 1 vs. Type 2 Diabetes*. <https://www.painscale.com/article/type-1-vs-type-2-diabetes>
- Pallavi, B., Chandresh, V., Kanika, K., & Tammana, T. (2015). In vitro evaluation of antidiabetic and antioxidant activity of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves. *Journal of Medicinal Plants Research*, 9(35), 929-932.
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5, e47
- Parlamento Europeu (2011). ‘Regulamento (UE) N°.1129/2011 da Comissão de 11 de Novembro de 2011 que altera o anexo II do Regulamento (CE) n°. 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho mediante o estabelecimento de uma lista da União de aditivos alimentares’, *Jornal Oficial da União Europeia*, L 295, pp. 1–177.
- Pavlović, R. D., Lakušić, B., Došlov-Kokoruš, Z., & Kovačević, N. (2009). Arbutin content and antioxidant activity of some Ericaceae species. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 64(10), 656-659.
- Pękal, A., & Pyrzynska, K. (2014). Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Analytical Methods*, 7(9), 1776-1782.
- Pereira, P., Mauricio, E. M., Duarte, M. P., Lima, K., Fernandes, A. S., Bernardo-Gil, G., & Cebola, M. J. (2022). Potential of supercritical fluid myrtle extracts as an active ingredient and co-preservative for cosmetic and topical pharmaceutical applications. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 28, 100739, 1-12.
- Petersmann, A., Müller-Wieland, D., Müller, U. A., Landgraf, R., Nauck, M., Freckmann, G., ... & Schleicher, E. (2019). Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 127(S 01), S1-S7.
- Petrovska B. B. (2012). Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy reviews*, 6(11), 1–5.
- Pinto, A. M., & Rosa, M. S. (2007). Resposta Inflamatória. Em *Fisiopatologia: Fundamentos e Aplicações*. Lisboa: LIDEL - Edições Técnicas, Lda., 185-218.
- Piroddi, M., Pilolli, F., Aritomi, M., & Galli, F. (2012). Vitamin E as a functional and biocompatibility modifier of synthetic hemodialyzer membranes: an overview of the literature on vitamin E-modified hemodialyzer membranes. *American Journal of Nephrology*, 35(6), 559-572.
- Prakash, D. & Sharma, G. (2014) ‘Phytochemicals of nutraceutical importance: Do They Defend Against Diseases?’, In: *Phytochemicals of Nutraceutical Importance*. pp. 1–24.

- Praud, D., Parpinel, M., Guercio, V., Bosetti, C., Serraino, D., Facchini, G., ... Rossi, M. (2018). Proanthocyanidins and the risk of prostate cancer in Italy. *Cancer Causes & Control*, 29(2), 261–268.
- Press, J.R. (1994). Papaveraceae. in Press, J.R. & Short, M.J. *Flora of Madeira*, pp.107
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- Pudziuvelyte, L., Jakštas, V., Ivanauskas, L., Laukevičienė, A., Ibe, C. F. D., Kursvietiene, L., & Bernatoniene, J. (2018). Different extraction methods for phenolic and volatile compounds recovery from *Elsholtzia ciliata* fresh and dried herbal materials. *Industrial Crops and Products*, 120, 286-294.
- Qader, S. W., Abdulla, M. A., Chua, L. S., Najim, N., Zain, M. M., & Hamdan, S. (2011). Antioxidant, total phenolic content and cytotoxicity evaluation of selected Malaysian plants. *Molecules*, 16(4), 3433-3443.
- Race, S. (2009). Antioxidants. The truth about BHA, BHT, TBHQ and other antioxidants used as food additives. *Saltburn by the Sea, UK: Tigmor Books*.
- Ramalho, V. C., & Jorge, N. (2006). Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química nova*, 755-760.
- Ramful, D., Baborun, T., Bourdon, E., Tarnus, E., & Aruoma, O. I. (2010). Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedro extracts of Mauritian citrus fruits: Potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology*, 278(1), 75-87.
- Rana, Z., Sawsan, O., Khaled, K., & Suzan, M. (2013). Antimicrobial activity of leaf and fruit extracts of Jordanian *Rubus sanguineus* Friv.(Rosaceae). *African Journal of Microbiology Research*, 7(44), 5114-5118.
- Randhir, R. *et al.* (2004). Stimulation of phenolics, antioxidant and antimicrobial activities in dark germinated mung bean sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Process Biochem.*, 39, 637-646.
- Rasteiro, E.M.N. (2012). *Avaliação das propriedades antioxidantes e antimutagénicas de diferentes cultivares de Vaccinium ssp, do grupo "Southern Highbush", produzidas em Portugal*. [Tese de Mestrado, Universidade Nova de Lisboa]. Repositório Digital da Universidade Nova de Lisboa. <http://hdl.handle.net/10362/7707>
- Ratnam, D. V., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K., & Kumar, M. R. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of controlled release*, 113(3), 189-207.
- Razavi, R., & Kenari, R. E. (2021). Antioxidant evaluation of *Fumaria parviflora* L. extract loaded nanocapsules obtained by green extraction methods in oxidative stability of sunflower oil. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(3), 2448-2457.
- Reidel, R., Melai, B., Cioni, P., Flamini, G., & Pistelli, L. (2016). Aroma profile of *Rubus ulmifolius* flowers and fruits during different ontogenetic phases. *Chemistry and Biodiversity*, 13, 1776–1784.

- Resendes, M.C., Rosado, D., Rosado, F.A. & de Carvalho, W.R.S (2017). Capítulo XXII-Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas. In Apostila: *VII Botânica no Inverno 2017* (pp.291-302*). Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil: s.n.
- Ricciotti, E., & FitzGerald, G. A. (2011). Prostaglandins and inflammation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 31(5), 986-1000.
- Rivera, D., & Obón, C. (1995). The ethnopharmacology of Madeira and Porto Santo Islands, a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 46(2), 73-93
- Robards, K., Kerr, A. F., & Patsalides, E. (1988). Rancidity and its measurement in edible oils and snack foods. A review. *Analyst*, 113(2), 213-224.
- Rodrigo, R., Guichard, C., & Charles, R. (2007). Clinical pharmacology and therapeutic use of antioxidant vitamins. *Fundamental & clinical pharmacology*, 21(2), 111-127.
- Rodríguez-Pérez, C., Zengin, G., Segura-Carretero, A., Lobine, D., & Mahomoodally, M. F. (2019). Chemical fingerprint and bioactivity evaluation of *Globularia orientalis* L. and *Globularia trichosantha* Fisch. & CA Mey. using non-targeted HPLC-ESI-QTOF-MS approach. *Phytochemical analysis*, 30(2), 237-252
- Romani, V. P., Martins, V. G., & Soares, L. A. D. S. (2017). Oxidação lipídica e compostos fenólicos como antioxidantes em embalagens ativas para alimentos. *VETOR-Revista de Ciências Exatas e Engenharias*, 27(1), 38-56.
- Romero, R. B., & Romero, A. L. (2014). Inibição de Ciclooxygenases 1 (COX-1) e 2 (COX-2) por Monoterpenos: um Estudo in Silico. *Journal of Health Sciences*, 16(4), 307-316.
- Rouzbehan, S., Moein, S., Homaei, A., & Moein, M. R. (2017). Kinetics of α -glucosidase inhibition by different fractions of three species of Labiatae extracts: a new diabetes treatment model. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 1483-1488.
- Rtibi, K., Selmi, S., Grami, D., Amri, M., Eto, B., El-Benna, J., ... & Marzouki, L. (2017). Chemical constituents and pharmacological actions of carob pods and leaves (*Ceratonia siliqua* L.) on the gastrointestinal tract: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 93, 522-528.
- Saigg, N. L., & Silva, M. C. (2009). Efeitos da utilização do chá verde na saúde humana. *Universitas: Ciências da Saúde*, 7(1), 69-89.
- Salehi, B., Fokou, P. V. T., Sharifi-Rad, M., Zucca, P., Pezzani, R., Martins, N., & Sharifi-Rad, J. (2019b). The Therapeutic potential of naringenin: A review of clinical trials. *Pharmaceuticals* (Basel), 12(1), pii: E11. <https://doi.org/10.3390/ph12010011>
- Salehi, B., Venditti, A., Sharifi-Rad, M., Kręgiel, D., Sharifi-Rad, J., Durazzo, A., ... Martins, N. (2019a). The therapeutic potential of apigenin. *International Journal of Molecular Science*, 20(6). pii: E1305. <https://doi.org/10.3390/ijms20061305>
- Sanjust, E., Mocci, G., Zucca, P., & Rescigno, A. (2008). Mediterranean shrubs as potential antioxidant sources. *Natural Product Research*, 22(8), 689-708.
- Santi, M. M., Sanches, F. S., Silva, J. F. M., & Santos, P. M. L. (2014). Determinação do perfil fitoquímico de extrato com atividade antioxidante da espécie medicinal *Cordia verbenacea* DC. por HPLC-DAD. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 16, 256-261.

- Santos, A. D. S. (2017). *Caraterização Fitoquímica e Avaliação das Propriedades Antimicrobianas da Urze e Feto Comum* [Tese de Mestrado, Universidade da Beira Interior]. Repositório Digital da Universidade da Beira Interior. <http://hdl.handle.net/10400.6/6386>
- Sariburun, E., Şahin, S., Demir, C., Türkben, C., & Uylaşer, V. (2010). Phenolic content and antioxidant activity of raspberry and blackberry cultivars. *Journal of food science*, 75(4), C328-C335.
- Sautter, C. K., Denardin, S., Alves, A. O., Mallmann, C. A., Penna, N. G., & Hecktheuer, L. H. (2005). Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. *Food Science and Technology*, 25, 437-442.
- Schneid, G. (2021). *Ácido araquidônico, inflamação e anti-inflamatórios*. Sanar. <https://www.sanarmed.com/acido-araquidonico-inflamacao-e-anti-inflamatorios-colunistas>
- Schulz, M., Seraglio, S. K. T., Della Betta, F., Nehring, P., Valese, A. C., Daguer, H., ... & Fett, R. (2019). Blackberry (*Rubus ulmifolius* Schott): Chemical composition, phenolic compounds and antioxidant capacity in two edible stages. *Food research international*, 122, 627-634.
- Sekhon-Loodu, S., & Rupasinghe, H. V. (2019). Evaluation of antioxidant, antidiabetic and antiobesity potential of selected traditional medicinal plants. *Frontiers in nutrition*, 6, 53,
- Sequeira, M. M., Fontinha, S. M. G. S. V., Freitas, F. I. C., Ramos, L. C., & Mateus, M. G. H. (2006). Plantas e usos tradicionais nas memórias de hoje. *Freguesia da Ilha. Edição Casa do Povo da Ilha/Parque Natural da Madeira, Portugal*.
- Shai, L. J., Magano, S. R., Lebelo, S. L., & Mogale, A. M. (2011). Inhibitory effects of five medicinal plants on rat alpha-glucosidase: Comparison with their effects on yeast alpha-glucosidase. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(13), 2863-2867.
- Shan, B., Cai, Y. Z., Brooks, J. D., & Corke, H. (2007). The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of food microbiology*, 117(1), 112-119.
- Sharma, S. (2015). Food preservatives and their harmful effects. *International journal of scientific and research publications*, 5(4), 1-2.
- Silva, L. D. D. (2016). *Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos microencapsulados de ervas aromáticas* [Tese de Bacharelado, Universidade Tecnológica Federal do Paraná]. Repositório Digital da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. <http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/15337>
- Silva, F. A., Borges, M. F. M., & Ferreira, M. A. (1999). Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química nova*, 22(1), 94-103.
- Silva, J. M. V. (2019). *Conservação e uso sustentável das plantas medicinais de Cabo Verde: valor terapêutico* [Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa]. Repositório Digital da Universidade Nova de Lisboa. <http://hdl.handle.net/10362/91476>

- Silva, M. L. C., Costa, R. S., dos Santos Santana, A., & Koblitz, M. G. B. (2010). Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Semina: Ciências Agrárias*, 31(3), 669-681.
- Silva, M. M., & Lidon, F. C. (2016). An overview on applications and side effects of antioxidant food additives. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 823-832.
- Silva, N. C. C., & Fernandes Júnior, A. J. J. O. V. A. (2010). Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, 16, 402-413.
- Soares, S. E. (2002). Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de nutrição*, 15, 71-81.
- Somvanshi, R. K., Kumar, A., Kant, S., Gupta, D., Singh, S. B., Das, U., ... & Dey, S. (2007). Surface plasmon resonance studies and biochemical evaluation of a potent peptide inhibitor against cyclooxygenase-2 as an anti-inflammatory agent. *Biochemical and biophysical research communications*, 361(1), 37-42.
- Sousa, C. M. D. M., Silva, H. R., Ayres, M. C. C., Costa, C. L. S. D., Araújo, D. S., Cavalcante, L. C. D., ... & Chaves, M. H. (2007). Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química nova*, 30, 351-355.
- Soušek, J., Vavreckova, C., Psotova, J., Ulrichova, J., & Šimánek, V. (1997). Antioxidant and antilipoperoxidant activities of alkaloid and phenolic extracts of eight *Fumaria* species. In II WOCMAP Congress Medicinal and Aromatic Plants, Part 2: Pharmacognosy, Pharmacology, *Phytomedicine, Toxicology* 501, 239-244.
- Soutinho, S. M. A. (2012). Avaliação dos compostos fenólicos e da atividade de frutos vermelhos produzidos em modo biológico [Tese de Mestrado, Instituto Politécnico de Viseu]. Repositório Digital do Instituto Politécnico de Viseu. <http://hdl.handle.net/10400.19/1770>
- Spínola, V., & Castilho, P. C. (2017). Evaluation of Asteraceae herbal extracts in the management of diabetes and obesity. Contribution of caffeoylquinic acids on the inhibition of digestive enzymes activity and formation of advanced glycation end-products (in vitro). *Phytochemistry*, 143, 29-35.
- Spínola, V., Pinto, J., & Castilho, P. C. (2018). Hypoglycemic, anti-glycation and antioxidant in vitro properties of two *Vaccinium* species from Macaronesia: A relation to their phenolic composition. *Journal of Functional Foods*, 40, 595-605.
- Spínola, V., Llorent-Martínez, E. J., & Castilho, P. C. (2020). Inhibition of α -amylase, α -glucosidase and pancreatic lipase by phenolic compounds of *Rumex maderensis* (Madeira sorrel). Influence of simulated gastrointestinal digestion on hyperglycaemia-related damage linked with aldose reductase activity and protein glycation. *Lwt*, 118, 108727.
- Srisupap, S., & Chaicharoenpong, C. (2021). In vitro antioxidant and antityrosinase activities of *Manilkara kauki*. *Acta Pharmaceutica*, 71(1), 153-162.
- St. Angelo, AJ, Vercellotti, J., Jacks, T., & Legendre, M. (1996). Oxidação de lipídios em alimentos. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36 (3), 175-224.
- Suau, R., Cabezudo, B., Rico, R., Najera, F., & López-Romero, J. M. (2002). Direct determination of alkaloid contents in *Fumaria* species by GC-MS. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 13(6), 363-367.

- Suna, S., Özcan-Sinir, G., Tamer, C. E., İncedayi, B., & Çopur, Ö. U. (2018). Antioxidant capacity and physicochemical characteristics of carbonated *Erica arborea* tea beverage. *Beverages*, 4(3), 50.
- Tabarki, S., Aouadhi, C., Mechergui, K., Hammi, K. M., Ksouri, R., Raies, A., & Toumi, L. (2017). Comparison of phytochemical composition and biological activities of *Rubus ulmifolius* extracts originating from four regions of Tunisia. *Chemistry & biodiversity*, 14(1), e1600168.
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food control*, 21(9), 1199-1218.
- Tao, L. (2015). Oxidation of polyunsaturated fatty acids and its impact on food quality and human health. *Adv. Food Technol. Nutr. Sci*, 1, 135-142.
- Taskova, R. M., Gotfredsen, C. H., & Jensen, S. R. (2006). Chemotaxonomy of Veroniceae and its allies in the Plantaginaceae. *Phytochemistry*, 67(3), 286-301.
- Tepe, B., Daferera, D., Sökmen, M., Polissiou, M., & Sökmen, A. (2004). In vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Thymus eigii* M. Zohary et PH Davis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(5), 1132-1137.
- Tiwari, A. K., Jyothi, A. L., Tejeswini, V. B., Madhusudana, K., Kumar, D. A., Zehra, A., et al. (2013). Mitigation of starch and glucose-induced postprandial glycemic excursion in rats by antioxidant-rich green-leafy vegetables' juice. *Pharmacognosy Magazine*, 9, S66–S73.
- Tohge, T., Watanabe, M., Hoefgen, R., & Fernie, A. R. (2013). Shikimate and phenylalanine biosynthesis in the green lineage. *Frontiers in plant science*, 4, 62.
- Tracy L. Setji, Ann J. Brown, Mark N. Feinglos; Gestational Diabetes Mellitus. *Clin Diabetes* 1 January 2005; 23 (1): 17–24
- Tran, N., Pham, B., & Le, L. (2020). Bioactive compounds in anti-diabetic plants: From herbal medicine to modern drug discovery. *Biology*, 9(9), 252.1-31
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246.
- Tundis, R., Loizzo, M. R., & Menichini, F. (2010). Natural products as α -amylase and α -glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 10(4), 315-331.
- Turgay, O., & Esen, Y. (2015). Antioxidant, total phenolic and antimicrobial characteristics of some species. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 21(3), 498-503.
- Tutin, T.G.; Burges, N.A.; Chater, A.O.; Edmonson, J.R.; Heywood, V.H.; Moore, D.M.; Valentine, D.H.; Walters, S.M.; Webb, D.A. (2010) Psilotaceae to Platanaceae. In *Flora Europaea*, 2nd ed.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, Volume 1, pp. 306–311.
- Tzima, K., Brunton, N. P., & Rai, D. K. (2018). Qualitative and quantitative analisais of polyphenols in Lamiaceae plants—A review. *Plants*, 7(2), 25.

- Vábková, J., & Neugebauerová, J. (2010). Nutritional parameters of selected culinary herbs (Lamiaceae). *Acta Agriculturae Serbica*, 15(29), 77-82.
- Vadivelan, R., Krishnan, R. G., & Kannan, R. (2019). Antidiabetic potential of *Asparagus racemosus* Willd leaf extracts through inhibition of α -amylase and α -glucosidase. *Journal of traditional and complementary medicine*, 9(1), 1-4.
- Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Andrade, P. B., Seabra, R. M., & Bastos, M. L. (2001). Antioxidant Activity of *Centaurium erythraea* Infusion Evidenced by Its Superoxide Radical Scavenging and Xanthine Oxidase Inhibitory Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(7), 3476-3479.
- Valenzuela, A., Nieto, S., & Sanhueza, J. (2003). Antioxidantes naturais em alimentos funcionais: Da segurança alimentar aos benefícios para a saúde. *Gorduras e Óleos*, 54 (3), 295-303.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84.
- Vázquez, B. E. R., Rodríguez-Beas, C., Iñiguez-Palomares, R. A., Santacruz-Ortega, H., Mendoza-Cruz, R., Bazán-Díaz, L. S., ... & Navarro, R. E. (2022). Spectroscopic analysis and nuclear magnetic resonance for silver nanoparticles synthesized with trans-resveratrol and cis-resveratrol. *Colloid and Polymer Science*, 300(5), 465-475.
- Veggi, P.C. (2013). *Obtenção de Compostos Fenólicos de Plantas Brasileiras Via Tecnologia Supercrítica utilizando Cossolventes e Extração Assistida por Ultrassom*. [Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas]. Repositório Digital da Universidade de Campinas". <https://bv.fapesp.br/en/dissertacoes-teses/76102/obtaining-phenolic-compounds-from-brazilian-plants-via-super>
- Verruck, S., Prudencio, E. S., & da Silveira, S. M. (2018). Compostos bioativos com capacidade antioxidante e antimicrobiana em frutas. *Revista do Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos*, 4(1), 111-124.
- Vertuani, S., Angusti, A., & Manfredini, S. (2004). The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Current pharmaceutical design*, 10(14), 1677-1694.
- Victor, M. M., Leite, J. L., Ramos, G. S., David, J. M., & Cardoso, K. V. (2021). Utilização de Biomassa em Aulas de Graduação de Química Orgânica Experimental: Extração de Flavonoides a partir de Resíduos de Cascas de Frutas Cítricas. *Química Nova*, 43, 1522-1528.
- Viegas, C. S. M. (2017). *Diabetes: análise in-vitro da atividade antioxidante e antidiabética de quatro extratos de plantas da região do Algarve* [Tese de Mestrado, Universidade do Algarve]. Repositório Digital da Universidade do Algarve. <https://sapientia.ualg.pt/handle/10400.1/10560>
- Viskupičová, J., Ondrejovič, M., & Šturdík, E. (2008). Bioavailability and metabolism of flavonoids. *Journal of Food & Nutrition Research*, 47(4), 151-162.
- Vitti, M. C. D., Preczenhak, A. P., Calaboni, C., & Kluge, R. A. (2019). Atividade enzimática e conteúdo fenólico em batatas minimamente processadas influenciados pela aplicação de antioxidantes. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 20(1), 1-14

- Vizzotto, E. (2017). Radicais livres e mecanismos de proteção antioxidante. *Disciplina de Fundamentos Bioquímicos dos Transtornos Metabólicos, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, 1-10.
- Volden, J., Borge, G. I. A., Bengtsson, G. B., Hansen, M., Thygesen, I. E., & Wicklund, T. (2008). Effect of thermal treatment on glucosinolates and antioxidant-related parameters in red cabbage (*Brassica oleracea* L. ssp. capitata f. rubra). *Food Chemistry*, 109(3), 595-605.
- Vrancheva, R. Z., Ivanov, I. G., Aneva, I. Y., Dincheva, I. N., Badjakov, I. K., & Pavlov, A. I. (2014). GC-MS based metabolite profiling of five Bulgarian *Fumaria* species. *Journal of BioScience & Biotechnology*, 3(3).
- W'sowicz, E., Gramza, A., Hêœ, M., Jeleñ, H. H., Korczak, J., Ma³ecka, M., ... & Zawirska-Wojtasiak, R. (2004). Oxidation of lipids in food. *Pol J Food Nutr Sci*, 13(54), 87-100.
- Walter, M., & Marchesan, E. (2011). Phenolic compounds and antioxidant activity of rice. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54, 371-377.
- Wang, F., Jiao, P., Qi, M., Frezza, M., Dou, Q. P., & Yan, B. (2010). Turning tumor-promoting copper into an anti-cancer weapon via high-throughput chemistry. *Current medicinal chemistry*, 17(25), 2685-2698.
- Wang, Y., Li, X., & Sun, X. (2022). The transformation mechanism and eco-toxicity evaluation of butylated hydroxyanisole in environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 231, 113179.
- Wanger, A. (2007). "Disk Diffusion Test and Gradient Methodologies", in Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols, ed. R. Schwalbe, L. Steele-Moore, A.C. Goodwin (Boca Raton, FL: CRC Press), 53–73.
- Wankenne, M. A. (2014). Os tipos e os efeitos da rancidez oxidativa em alimentos. *Food Ingredients Brasil*, 29, 38-45.
- Wannmacher, L., & Bredemeier, M. (2004). Antiinflamatórios não-esteróides: uso indiscriminado de inibidores seletivos de cicloxigenase-2. *Brasília: OPAS*, 1(2), 1-6
- Ward, P. (2010). Acute and Chronic Inflammation. In C. N. Serhan, P. A. Ward, & D. V. Gilroy (Eds.), *Fundamentals of Inflammation* (pp. 1-16). Cambridge: Cambridge University Press.
- Wells, M. L., Potin, P., Craigie, J. S., Raven, J. A., Merchant, S. S., Camire, M. E., Helliwell, K. E., Smith, A. G. & Brawley, S. H. (2016). Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. *Journal of Applied Phycology*, 29(2), 949–982.
- Westman E. C. (2021). Type 2 Diabetes Mellitus: A Pathophysiologic Perspective. *Frontiers in nutrition*, 8, 707371,
- Wilcox, C. M., Alexander, L. N., Cotsonis, G. A., & Clark, W. S. (1997). Nonsteroidal antiinflammatory drugs are associated with both upper and lower gastrointestinal bleeding. *Digestive diseases and sciences*, 42(5), 990-997.
- Williamson, G., & Manach, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 243-255.

- Xie, Y., Yang, W., Tang, F., Chen, X., & Ren, L. (2015). Antibacterial activities of flavonoids: structure-activity relationship and mechanism. *Current medicinal chemistry*, 22(1), 132-149.
- Yang, C. Y., Yen, Y. Y., Hung, K. C., Hsu, S. W., Lan, S. J., & Lin, H. C. (2019). Inhibitory effects of pu-erh tea on alpha glucosidase and alpha amylase: a systemic review. *Nutrition & Diabetes*, 9(1), 1-6.
- Yoon, J.-H., & Baek, S. J. (2005). Molecular Targets of Dietary Polyphenols with Anti-inflammatory Properties. *Yonsei Medical Journal*, 46 (5), 585 – 596
- Zadra, M., Piana, M., de Brum, T. F., Boligon, A. A., de Freitas, R. B., Machado, M. M., ... & Athayde, M. L. (2012). Antioxidant activity and phytochemical composition of the leaves of *Solanum guaraniticum* A. St.-Hil. *Molecules*, 17(11), 12560-12574.
- Zang, X., Shang, M., Xu, F., Liang, J., Wang, X., Mikage, M., & Cai, S. (2013). A-type proanthocyanidins from the stems of *Ephedra sinica* (Ephedraceae) and their antimicrobial activities. *Molecules*, 18(5), 5172-5189.
- Zeb, A. (2020). Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. *Journal of Food Biochemistry*, 44(9), e13394.
- Zengin, G., Cvetanović, A., Gašić, U., Stupar, A., Bulut, G., Senkardes, I., ... & Mahomoodally, M. F. (2019). Chemical composition and bio-functional perspectives of *Erica arborea* L. extracts obtained by different extraction techniques: Innovative insights. *Industrial Crops and Products*, 142, 111843.
- Zgoda, J. R., & Porter, J. R. (2001). A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. *Pharmaceutical Biology*, 39(3), 221-225.
- Zhang, L., Tai, Y., Wang, Y., Meng, Q., Yang, Y., Zhang, S., ... & Wan, X. (2017). The proposed biosynthesis of procyanidins by the comparative chemical analysis of five *Camellia* species using LC-MS. *Scientific reports*, 7(1), 1-10.
- Zhang, R., Guo, Q., Kennelly, E. J., Long, C., & Chai, X. (2020). Diverse alkaloids and biological activities of *Fumaria* (Papaveraceae): An ethnomedicinal group. *Fitoterapia*, 146, 104697.
- Zorzetto, C., Sánchez-Mateo, C. C., Rabanal, R. M., Lupidi, G., Bramucci, M., Quassinti, L., ... & Maggi, F. (2015). Antioxidant activity and cytotoxicity on tumour cells of the essential oil from *Cedronella canariensis* var. *canariensis* (L.) Webb & Berthel. (Lamiaceae). *Natural Product Research*, 29(17), 1641-1649.

Anexos

Anexo I- Interpretação do coeficiente de correlação de Pearson

Valor de r (+ ou -)	Interpretação
1	Correlação perfeita
0,90 a 1	Correlação muito forte
0,70 a 0,90	Correlação forte
0,50 a 0,70	Correlação moderada
0,30 a 0,50	Correlação fraca
0 a 0,30	Correlação desprezível
0	Correlação nula



2022

José Edgar Lima Perestrelo

Caracterização de propriedades bioativas de plantas medicinais da Região Autónoma da Madeira