

# Determination of the chemical composition and *in vitro* activity of *Laurus azorica* against aging-related diseases

Dissertação de Mestrado

Maria Francisca Fortuna Soares Albergaria Lucas

Mestrado em

**Ciências Biomédicas**



# Determination of the chemical composition and *in vitro* activity of *Laurus azorica* against aging-related diseases

Tese de Mestrado

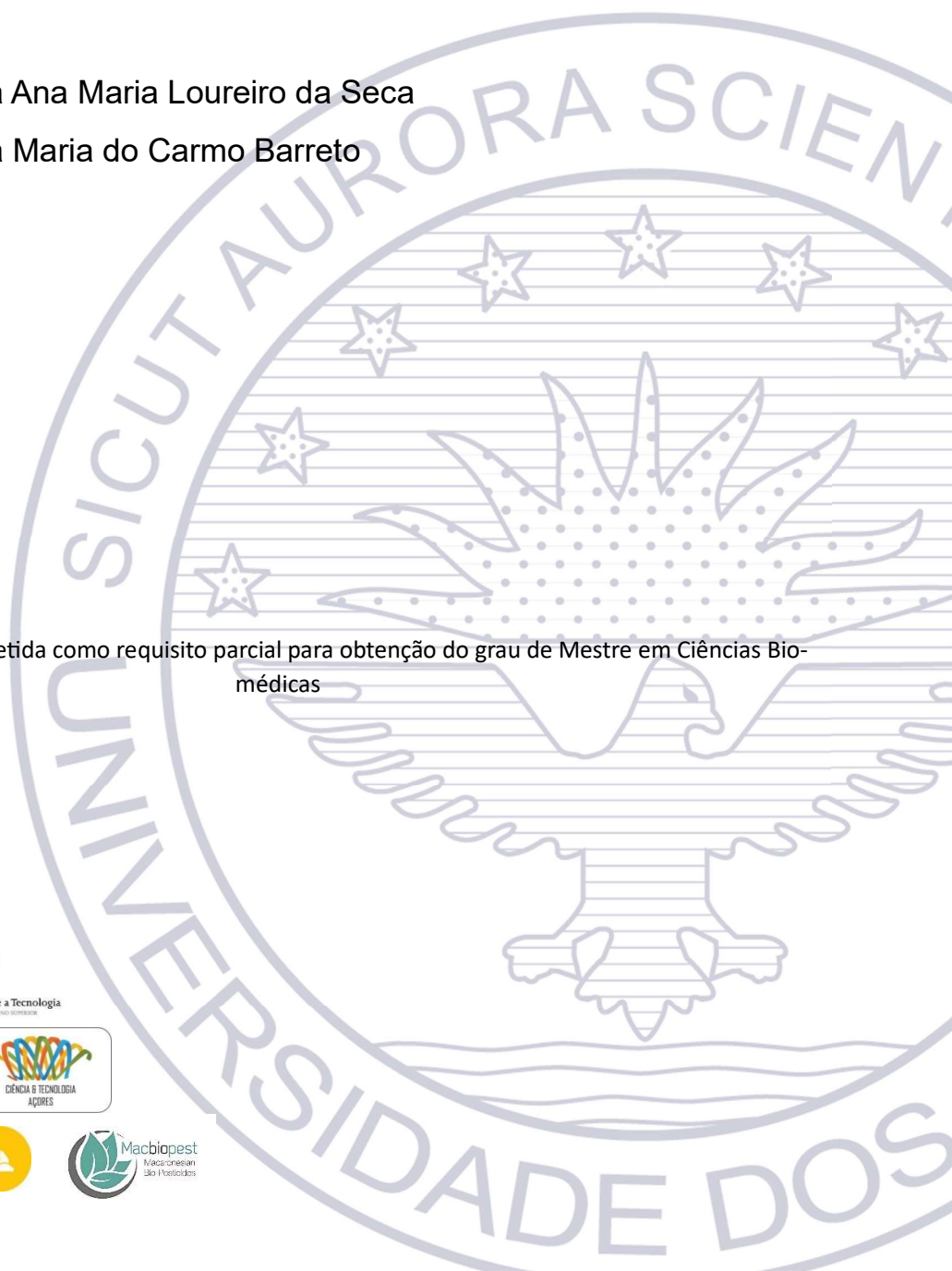
Maria Francisca Fortuna Soares Albergaria Lucas

## Orientadores

Professora Doutora Ana Maria Loureiro da Seca

Professora Doutora Maria do Carmo Barreto

Tese de Mestrado submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Bio-médicas



## Agradecimentos

Para expressar a minha gratidão a todos aqueles que, de algum modo, possibilitaram a concretização desta tese.

Em primeiro lugar, quero agradecer às minhas orientadoras, Doutora Ana Maria Loureiro da Seca e Doutora Maria do Carmo Roque Lino Felgueiras Barreto, por me acolherem neste grupo, pela aceitação deste projeto e a confiança que me concederam. Gostaria também de reconhecer a disponibilidade e auxílio demonstrados para conseguir ultrapassar quaisquer dificuldades surgidas.

Agradeço de igual forma aos meus colegas de laboratório, Gonçalo, Wilson e Mariana. Pela disponibilidade e conhecimentos que foram preciosos no desenvolvimento deste trabalho, pelos bons convívios e, sobretudo, pela vossa amizade. Agradeço também à Sra. Helena Figueiredo, pela sua simpatia e prontidão em ajudar.

Um agradecimento ao projeto MACBIOPEST (MAC2/1.1a/289), programa Interreg MAC 2014–2020 cofinanciado pela DRCT (Governo Regional dos Açores), bem como à FCT—Fundação para a Ciência e Tecnologia, União Europeia, QREN, FEDER e COMPETE, por meio do financiamento do centro cE3c (UIDB/00329/2020-2024 e UID/00329/2025) e do LAQV-REQUIMTE (UIDB/50006/2020 e UIDP/50006/2020). Um agradecimento também ao Governo Regional dos Açores (DRCT M1.1.A/FUNC.UI&D/010/2021-2024) por financiar o Grupo de Biodiversidade dos Açores.

Agradeço imensamente os meus pais, sem os quais esta conquista não seria possível. Pelas palavras de incentivo, pelo apoio constante, por acreditarem em mim. Vocês são o meu maior exemplo de dedicação e perseverança. Este trabalho também é vosso.

Não poderia deixar de agradecer a toda a família, em especial ao Manuel, pela sua ajuda.

Por último, mas não menos importante, um especial agradecimento ao Miguel. A tua paciência, apoio e carinho foram essenciais para chegar até aqui. Obrigada por me dares confiança e trazeres sorrisos nos momentos mais difíceis, seres o meu refúgio, o meu melhor amigo.

# Index

<b>Abstract .....</b>	<b>3</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>4</b>
<b>Abbreviations.....</b>	<b>5</b>
<b>Chapter I: Introduction.....</b>	<b>7</b>
1.1. <b>The aging process.....</b>	<b>7</b>
1.1.1. <b>Intrinsic and extrinsic aging .....</b>	<b>7</b>
1.1.2. <b>Biological theories of aging: role of reactive oxygen species .....</b>	<b>8</b>
1.2. <b>Aging-related diseases .....</b>	<b>10</b>
1.2.1. <b>Diabetes mellitus .....</b>	<b>11</b>
1.2.2. <b>Alzheimer’s disease.....</b>	<b>13</b>
1.3. <b>The use of natural products in drug discovery for antiaging .....</b>	<b>15</b>
1.3.1. <b>Natural antidiabetic compounds .....</b>	<b>15</b>
1.3.2. <b>Natural neuroprotective compounds.....</b>	<b>18</b>
1.4. <b><i>Laurus nobilis</i> specialized metabolites and bioactivities.....</b>	<b>20</b>
1.5. <b><i>Laurus novocanariensis</i> specialized metabolites and bioactivities.....</b>	<b>26</b>
1.6. <b><i>Laurus azorica</i> specialized metabolites and bioactivities.....</b>	<b>27</b>
1.7. <b>Objectives .....</b>	<b>30</b>
<b>Chapter II: Materials and Methods .....</b>	<b>31</b>
2.1. <b>Chemicals.....</b>	<b>31</b>
2.2. <b>Plant material.....</b>	<b>31</b>
2.3. <b>Extract preparation .....</b>	<b>31</b>
2.4. <b>Phytochemical study .....</b>	<b>32</b>
2.4.1. <b>Liquid/liquid partition of extracts.....</b>	<b>32</b>
2.4.2. <b>Chlorophyll removal from extracts.....</b>	<b>32</b>
2.4.3. <b>Chromatographic isolation of specialized metabolites .....</b>	<b>33</b>
2.5. <b>Identification of isolated compounds by spectroscopic techniques .....</b>	<b>35</b>
2.5.1. <b>Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) .....</b>	<b>35</b>
2.5.2. <b>Mass spectrometry (MS) .....</b>	<b>35</b>
2.6. <b>Biological activities .....</b>	<b>35</b>
2.6.1. <b>ABTS radical scavenging activity.....</b>	<b>35</b>
2.6.2. <b>DPPH radical scavenging activity .....</b>	<b>36</b>
2.6.3. <b>Hydroxyl radical (OH<sup>•</sup>) scavenging activity .....</b>	<b>36</b>
2.6.4. <b>Superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) radical scavenging assay.....</b>	<b>37</b>
2.6.5. <b><math>\alpha</math>-Amylase inhibition activity.....</b>	<b>37</b>

2.6.6.	<b>Lipase Inhibition Activity</b> .....	38
2.6.7.	<b><math>\alpha</math> – Glucosidase inhibition activity</b> .....	38
2.6.8.	<b>Anticholinesterase activity</b> .....	39
2.7.	<b>Statistical analysis</b> .....	39
<b>Chapter III: Results and Discussion</b> .....		<b>40</b>
3.1.	<b>Comparison of extraction methods</b> .....	40
3.2.	<b>Structural characterization of isolated compounds of <i>L. azorica</i>'s extracts</b> .....	41
3.2.1.	<b>Compound A: costunolide</b> .....	42
3.2.2.	<b>Compound B: reynosin</b> .....	45
3.2.3.	<b>Compound C: 1<math>\beta</math>-hydroxy arbusculin A</b> .....	49
3.3.	<b>Biological activities of <i>L. azorica</i> extracts and compounds</b> .....	52
3.3.1.	<b>Antioxidant activity</b> .....	53
3.3.2.	<b>Antidiabetic and antidyslipidemic activity</b> .....	55
3.3.3.	<b>Anticholinesterasic activity</b> .....	57
<b>Conclusions and Future Perspectives</b> .....		<b>61</b>
<b>References</b> .....		<b>63</b>

## Abstract

The aging process is characterized by the progressive decline in physiological functions, marked by a diminished ability of the body to combat oxidative stress and cellular damage. This vulnerability increases the risk of developing metabolic disorders, like diabetes mellitus and dyslipidemia and the onset of neurodegenerative disorders, like Alzheimer's disease. Most of the pharmaceutical solutions available for these diseases have compounds found in nature as their active principle, often produced by plants. *Laurus azorica*, a plant endemic to the Azores archipelago, is poorly characterized in regard to its anti-aging-related disorders potential. In this work, a phytochemical and antiaging potential study of *Laurus azorica* extracts was conducted. Acetone, ethyl acetate and ethanolic leaf extracts, prepared by ultrasound-assisted extraction using different extraction time, were fractioned and pure compounds analyzed by spectroscopic techniques. Three sesquiterpenic lactones, costunolide, reynosin and 1 $\beta$ -hydroxy arbusculin A were isolated and their chemical structures elucidated, with the latter being isolated for the first time in this species. Concerning antioxidant effect, ethanol extracts showed the greatest antioxidant potential in the ABTS and DPPH assays, with IC<sub>50</sub> values comparable to the positive control (Trolox) for the ABTS assay. As for the superoxide scavenging assay, only the ethanol extract (2-LA\_3) from shortest extraction time exhibited significant antioxidant activity (IC<sub>50</sub> = 42.61  $\pm$  2.06  $\mu$ g/mL), about twice the IC<sub>50</sub> value of the positive control gallic acid (IC<sub>50</sub> = 24.22  $\pm$  1.98  $\mu$ g/mL). Overall, results indicated an enhancement in antioxidant activity with the employment of a shorter time extraction method. Antidiabetic and antidyslipidemic potential were tested by  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and lipase inhibition assays, but none of the tested samples showed activity at the maximum tested concentration (250  $\mu$ g/mL). Regarding anticholinesterasic activity, inhibition of AChE and BuChE was evaluated. As for the extracts, despite not exhibiting the greatest anticholinesterasic activity, only the ethanol extracts were dual inhibitors. Costunolide demonstrated the greatest neuroprotective potential of all tested samples, not only being a dual inhibitor, but also presenting the lowest IC<sub>50</sub> for BuChE assay (IC<sub>50</sub> = 25.38  $\pm$  1.80  $\mu$ g/mL), comparable to the standard donepezil (IC<sub>50</sub> = 17.77  $\pm$  0.77  $\mu$ g/mL). This research shows encouraging outcomes for *L.azorica* therapeutic use.

**Keywords:** *Laurus azorica*, ultrasound-assisted extraction, specialized metabolites, antidiabetic, anticholinesterasic, antioxidant

## Resumo

O processo de envelhecimento é caracterizado pelo declínio progressivo das funções fisiológicas, marcado por uma diminuição da capacidade do organismo para combater o stress oxidativo e os danos celulares. Esta vulnerabilidade aumenta o risco de desenvolver distúrbios metabólicos, incluindo diabetes mellitus e dislipidemia, e o aparecimento de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer. A maioria das soluções farmacêuticas disponíveis para estas doenças tem como princípio ativo compostos encontrados na natureza, frequentemente produzidos por plantas. *Laurus azorica*, uma planta endémica do arquipélago dos Açores, está pouco caracterizada no que diz respeito ao seu potencial antienvelhecimento. Neste trabalho, foi realizado um estudo fitoquímico e do potencial antienvelhecimento dos extratos de *L. azorica*. Extratos de acetona, acetato de etilo e etanol das folhas desta planta, preparados por extração assistida por ultrassons utilizando diferentes tempos de extração, foram fracionados e analisados por técnicas espectroscópicas. Foram isoladas três lactonas sesquiterpénicas, costunolide, reinosina e 1 $\beta$ -hidroxi-arbusculina A, e as suas estruturas químicas foram elucidadas, sendo a última isolada pela primeira vez nesta espécie. No que diz respeito ao efeito antioxidante, os extratos etanólicos apresentaram o maior potencial antioxidante nos ensaios ABTS e DPPH, com valores de IC<sub>50</sub> comparáveis ao controlo positivo (Trolox) para o ensaio ABTS. Quanto ao ensaio do radical superóxido, apenas o extrato etanólico (2-LA\_3) do tempo de extração mais curto apresentou uma atividade antioxidante significativa (IC<sub>50</sub> = 42,61  $\pm$  2,06  $\mu$ g/mL), cerca do dobro do valor IC<sub>50</sub> do controlo positivo, ácido gálico (IC<sub>50</sub> = 24,22  $\pm$  1,98  $\mu$ g/mL). Em geral, os resultados indicaram um aumento da atividade antioxidante com o emprego de um método de extração de tempo mais curto. O potencial antidiabético e antidislipidémico foi testado por ensaios de inibição da  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glicosidase e lipase, mas nenhuma das amostras testadas mostrou atividade à concentração máxima testada (250  $\mu$ g/mL). Relativamente à atividade anticolinesterásica, foi avaliada a inibição da AChE e da BuChE. Dos extratos, apesar de não apresentarem a melhor atividade anticolinesterásica, apenas os extratos etanólicos foram inibidores duplos. O costunolide demonstrou o maior potencial neuroprotetor de todas as amostras testadas, não só por ser um inibidor duplo, mas também por apresentar o IC<sub>50</sub> mais baixo para o ensaio da BuChE (IC<sub>50</sub> = 25,38  $\pm$  1,80  $\mu$ g/mL), comparável ao padrão donepezil (IC<sub>50</sub> = 17,77  $\pm$  0,77  $\mu$ g/mL). Esta investigação mostra resultados encorajadores para a utilização terapêutica de *L.azorica*.

**Palavras-chave:** *Laurus azorica*, extração por ultrassons, metabolitos especializados, antidiabético, anticolinesterásico, antioxidante