



ISSN: 2230-9926

Available online at <http://www.journalijdr.com>

IJDR

International Journal of Development Research

Vol. 11, Issue, 11, pp. 52094-52100, November, 2021

<https://doi.org/10.37118/ijdr.23379.11.2021>



RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

ATIVIDADES INIBIDORAS DE UREASE E DE ACETILCOLINESTERASE DE CHÁS COMERCIALIZADOS EM SACHÊS

Guilherme Augusto Basconi Scandelai^{1,*}, Adriano Lopes Romero², Stephani Caroline Beneti* e Rafaelle Bonzanini Romero²

¹Departamento Acadêmico de Engenharia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná - câmpus Campo Mourão; ²Departamento Acadêmico de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná - câmpus Campo Mourão

ARTICLE INFO

Article History:

Received 03rd August, 2021

Received in revised form

17th September, 2021

Accepted 20th October, 2021

Published online 30th November, 2021

Key Words:

Alimentos Funcionais,
Inibição Enzimática,
Substâncias Bioativas.

*Corresponding author:

Guilherme Augusto Basconi Scandelai

ABSTRACT

Os chás são alimentos funcionais que apresentam várias propriedades benéficas à saúde, tais como para o tratamento de úlcera péptica causada por *Helicobacter pylori* e Doença de Alzheimer. O presente trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* e *in silico* as atividades inibidoras de urease e acetilcolinesterase de chás comercializados em sachês: preto (*Camelliasinensis*), erva doce (*Pimpinellaanisum*), verde (*Camelliasinensis*), hortelã (*Menthaspicata*), boldo (*Peumusboldus*), camomila (*Matricariachamomilla*), capim cidreira (*Melissa officinalis*) e mate (*Ilexparaguariensis*). Observou-se que, entre os chás avaliados, os chás preto e verde (*Camelliasinensis*) e mate (*Ilexparaguariensis*) apresentaram percentual de inibição da enzima urease de 91,68, 84,75 e 83,32% e de acetilcolinesterase de 28,84, 27,74 e 34,45%, respectivamente. 30 substâncias bioativas, indicadas na literatura, que aparecem com frequência nesses três chás foram estudadas *in silico*. Nos estudos de ancoragem molecular observou-se: (i) que 13 das substâncias avaliadas interagem no sítio ativo da enzima urease, com destaque para as substâncias quercetina, ácido cafeico e ácido ursólico; (ii) nove potenciais substâncias inibidoras da enzima acetilcolinesterase. Os resultados obtidos permitiram definir três chás com potencial de inibição de urease e acetilcolinesterase, assim como entender quais substâncias estão envolvidas com essas bioatividades.

Copyright © 2021, Fernanda Farias Costa et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Citation: Guilherme Augusto Basconi Scandelai, Adriano Lopes Romero, Stephani Caroline Beneti e Rafaelle Bonzanini Romero. "Atividades inibidoras de urease e de acetilcolinesterase de chás comercializados em sachês", *International Journal of Development Research*, 11, (11), 52094-52100.

INTRODUCTION

Vivenciamos uma contradição no contexto da Saúde, ao passo que muitas pesquisas sobre alimentação saudável são produzidas e socializadas, observa-se um aumento da parcela da população mundial que desenvolvem doenças decorrentes à má alimentação. Uma das linhas de pesquisas que tem chamado a atenção de vários pesquisadores da academia e da indústria alimentícia refere-se ao consumo de alimentos funcionais. São classificados como alimentos funcionais todos os alimentos ou bebidas que, consumidos na alimentação cotidiana, podem trazer benefícios fisiológicos específicos, com a capacidade de regular funções corporais de forma a auxiliar na proteção contra diversas doenças (Cândido & Campos, 2005). Os chás, bebidas preparadas por infusões de plantas que possuem características agradáveis como aroma e sabor, o que contribuiu para a popularização dessa bebida (Braibante et al., 2014),

são considerados alimentos funcionais devido às suas propriedades medicinais (Valenzuela, 2004). Há várias propriedades reportadas para os diferentes chás, tais como antioxidantes, anti-inflamatória, antialérgica, anticarcinogênica (Croge et al., 2020) e neuroprotetora (Mandel & Youdim, 2004). Essas propriedades medicinais estão relacionadas à presença de flavonoides, catequinas, polifenóis, alcaloides, vitaminas e sais minerais (Schmitz et al., 2005). Há indícios de que alguns chás podem contribuir para o tratamento de doenças causadas por *H. pylori*, uma bactéria Gram-negativa que coloniza a mucosa gástrica causando infecção. Essa bactéria é capaz de se fixar no estômago e elevar o pH local, sendo a urease produzida por ela a responsável por esta fixação. Isso faz com que a urease seja considerada o atributo biológico mais importante dessa bactéria, uma vez que sem essa enzima a *H. pylori* não conseguiria colonizar a mucosa gástrica (Silva et al., 2015).

Nesse sentido, a busca por substâncias inibidoras de urease pode contribuir para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento de erradicação da *H. pylori* (Knezevic et al., 2018). Várias outras atividades inibidoras de enzimas são reportadas para chás comumente consumidos, tal como a inibição de acetilcolinesterase, uma enzima que finaliza o processo de sinapse colinérgica hidrolisando o neurotransmissor acetilcolina. A acetilcolina é um neurotransmissor capaz de transmitir, modular e amplificar sinais (informação) entre neurônios e outras células do organismo. A não funcionalidade desses neurotransmissores afeta a comunicação entre os neurônios, comprometendo o estado físico e mental do indivíduo. Essa perda pode estar envolvida com a Doença de Alzheimer, uma doença que se caracteriza por gerar um distúrbio progressivo da memória e outras funções cognitivas, afetando o funcionamento ocupacional e social do indivíduo (Sámano et al., 2012). Os inibidores de colinesterases são os principais fármacos licenciados para o tratamento da Doença de Alzheimer, cujo mecanismo de ação baseia-se na inibição das enzimas acetil e butirilcolinesterase, visando o aumento da disponibilidade sináptica de acetilcolina (Forlenza, 2005). Atualmente, os progressos em Química Computacional (estudos *in silico*) vêm se destacando pelo desenvolvimento de algoritmos de cálculos químico-quânticos eficientes para o estudo de propriedades farmacêuticas e de farmacologia *in silico* (Sant'Anna, 2009; Carneiro et al., 2016; Lagorce et al., 2017; Strada et al., 2021). No contexto da Ciência dos Alimentos (Zhang et al., 2020), os estudos *in silico* têm contribuído para se explicar as bioatividades apresentadas por alimentos funcionais (Cavaliere & Cozzini, 2018). No contexto apresentado, e levando em consideração o aumento do consumo de alimentos funcionais em uma dieta convencional, o presente trabalho teve como objetivo avaliar, *in vitro* e *in silico*, se chás comercializados em sachês possuem atividades inibidoras de urease e de acetilcolinesterase.

METODOLOGIA

Avaliação *in vitro* das atividades inibidoras de urease e de acetilcolinesterase: Utilizou-se oito tipos de chás: (i) preto (*Camelliasinensis*), erva doce (*Pimpinellaanisum*), verde (*Camelliasinensis*) e hortelã (*Menthaspicata*) da marca Dr. Oetker®; (ii) boldo (*Peumusboldus*), camomila (*Matricariachamomilla*) e capim cidreira (*Melissa officinalis*) da marca Chá Prenda®; (iii) mate (*Ilexparaguariensis*) da marca Matte Leão®.

Preparação dos chás: Para a preparação do chá utilizou-se 240 mL de água mineral previamente aquecida até próximo ao ponto de ebulição. Após o aquecimento, um sachê de chá foi mantido em infusão por 5 minutos. Após o tempo indicado, o sachê foi retirado da solução, que foi reservada até atingir a temperatura ambiente.

Preparação do extrato de urease: Para a obtenção do extrato enriquecido em urease, 10 gramas de soja (adquirida em supermercado) foram trituradas, em um liquidificador com 100 mL de água destilada, por 5 minutos. Após a trituração, o extrato foi filtrado e diluído em um fator de 500, sendo esse o extrato final utilizado para as análises.

Avaliação *in vitro* de inibição de urease: A determinação da atividade inibidora de urease seguiu o procedimento proposto por Weatherburn (1967). O reagente A foi preparado dissolvendo 2,5 g de fenol e 12,5 mg de nitroprussiato de sódio em água destilada (q.s.p. 250 mL). O reagente B foi preparado dissolvendo 1,25 g de hidróxido de sódio e 1,05 mL de hipoclorito de sódio (10%) em água destilada (q.s.p. 250 mL). Em um tubo de ensaio foi colocado 200 µL de solução urease e 200 µL do chá a ser avaliado, sendo mantido em banho-maria à 37 °C por 20 minutos. Após o contato, foi adicionado 200 µL de solução aquosa de ureia 6 g/L, sendo mantido por mais 20 minutos em banho-maria. Após o tempo indicado, foram adicionados 1000 µL do reagente A e 1000 µL do reagente B, sendo novamente mantido por mais 20 minutos em banho-maria. Para o controle, foi adicionado 200 µL de água destilada ao invés dos chás, sendo repetido todos os procedimentos anteriores.

O padrão de inibição utilizado foi a tiourea (solução aquosa em 200 ppm). Ao término dos procedimentos, foi realizada leituras em um espectrofotômetro UV-Vis (PG Instruments, modelo T70+) no comprimento de onda de 630 nm. Os valores de absorção foram convertidos em percentual de inibição utilizando a Equação 1:

$$I(\%) = 100 - \left[\left(\frac{A_{amostra}}{A_{controle}} \right) * 100 \right] \quad (\text{Equação 1})$$

Na qual $A_{amostra}$ é a absorção observada no teste com o chá e $A_{controle}$ é a absorção observada no teste com o controle.

Preparação do extrato de acetilcolinesterase: Para a obtenção do extrato enriquecido em acetilcolinesterase, foram utilizadas baratas da espécie *Gromphadorhina portentosa*, popularmente conhecida como barata de Madagascar. Para isso utilizou-se a metodologia adaptada de Nogueira (2015). Alguns espécimes de baratas foram colocadas no congelador por 45 minutos, seguida da remoção da cabeça e antenas com o auxílio de estilete e pinça. O extrato bruto foi obtido a partir da maceração das cabeças utilizando solução tampão Tris-HCl 0,5 mol/L pH 7,5. O material foi agitado utilizando Vortex e posteriormente centrifugado a 4000 rpm por 35 minutos. O sobrenadante obtido nesse processo foi utilizado como extrato enriquecido em acetilcolinesterase. Após o procedimento, o extrato foi diluído na proporção 1:50 utilizando a solução tampão Tris-HCl, sendo esse o extrato final utilizado para as análises.

Avaliação *in vitro* de inibição de acetilcolinesterase: Os testes de inibição de acetilcolinesterase foram realizados a partir de adaptação do método colorimétrico de Hestrin (1949). Inicialmente, em um tubo de ensaio foi adicionado 250 µL de extrato de acetilcolinesterase e 250 µL de doçá a ser avaliado. Essa mistura foi mantida em banho-maria à 37°C, por 30 minutos. Após o tempo indicado foi adicionado 250 µL de solução aquosa de cloreto de acetilcolina 0,01 mol/L, deixando novamente em banho-maria por 10 minutos. Após o tempo indicado, foi adicionado 500 µL de solução aquosa de NaOH 3,5 mol/L e 500 µL de solução aquosa de hidroxilamina 2 mol/L. Após 5 minutos em contato em banho-maria, foi adicionado 500 µL de solução aquosa de HCl (1:1) e 500 µL de solução aquosa de cloreto férrico 0,37 mol/L. Para o controle, foi adicionado 250 µL de água destilada ao invés de chá, sendo repetido todos os procedimentos anteriores. Ao término dos procedimentos, foi realizada leituras em um espectrofotômetro UV-Vis (PG Instruments, modelo T70+) no comprimento de onda de 540 nm. Os valores de absorção foram convertidos em percentual de inibição de acetilcolinesterase utilizando a Equação 1.

Avaliação *in silico* das atividades inibidoras de urease e de acetilcolinesterase: 30 substâncias (Figura 1), comumente reportadas nos chás estudados, tiveram suas propriedades farmacocinéticas e potencial de inibição das enzimas ureases e acetilcolinesterase avaliadas.

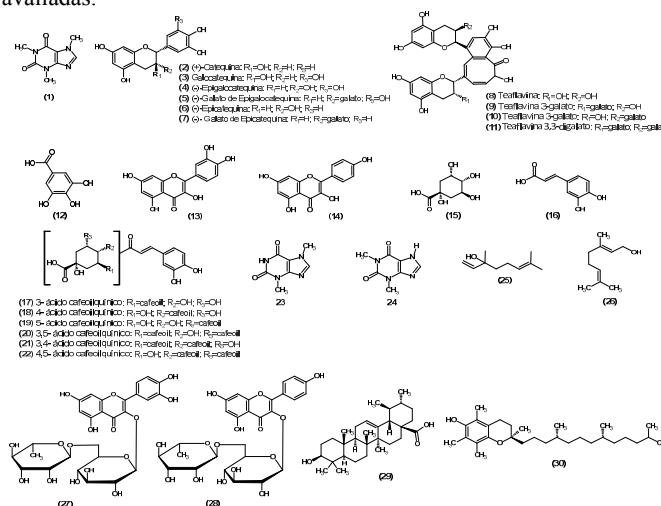


Figura 1. Estrutura molecular dos substâncias 1-30

Modelagem das estruturas moleculares: a ferramenta ChemSketch, disponibilizada pela empresa ACD/Labs, foi utilizada para desenhar as estruturas moleculares das substâncias **1-30**, gerar os respectivos códigos SMILES, bem como as estruturas tridimensionais, que foram salvas em formato “.mol”.

Determinação de propriedades moleculares: As propriedades moleculares das substâncias 1-30 foram determinadas utilizando a ferramenta Molinspiration (<https://www.molinspiration.com/>). As propriedades moleculares determinadas estão relacionadas à biodisponibilidade de substâncias administradas por via oral: miLogP (coeficiente de partição octanol-água); TPSA (área de superfície polar topológica); MM (massa molar); nALH (número de aceptores de ligação de hidrogênio) e nDLH (número de doadores de ligação de hidrogênio). Segundo Lipinski *et al.* (1997) substâncias que violam mais do que uma das “regra dos cinco” (miLogP $\leq 5,00$; TPSA $\leq 140 \text{ \AA}^2$; MM $\leq 500 \text{ g/mol}$; nALH ≤ 10 e nDLH ≤ 5) apresentarão problemas de biodisponibilidade se administrado por via oral.

Predição de propriedades farmacocinéticas: a ferramenta admet SAR (<http://lmm.d.ecust.edu.cn/admet2>) foi utilizada para determinação de propriedades ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) das substâncias **1-30**.

Estudo de ancoragem molecular: a ferramenta GEMDOCK (<http://gemdock.life.nctu.edu.tw/dock/igemdock.php>) foi utilizada para estudos de ancoragem molecular das substâncias **1-30** com as enzimas urease (PDB: 6ZJA) e acetilcolinesterase (PDB: 4EY6). As interações das substâncias **1-30** com as enzimas urease e acetilcolinesterase foram estudadas utilizando a ferramenta Chimera UCSF (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação *in vitro* de inibição de urease: Os percentuais de inibição de urease e de acetilcolinesterase observados para oito chás comercializados em sachês são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Percentual de inibição de urease e de acetilcolinesterase dos chás avaliados

Amostras	I (%) de urease	I (%) de acetilcolinesterase
Controle	-	-
<i>P. anisum</i> (ervadoce)	-	4,59
<i>M. spicata</i> (hortelã)	-	5,83
<i>M. officinalis</i> (cidreira)	-	8,30
<i>M. chamomilla</i> (camomila)	-	14,66
<i>P. boldus</i> (boldo)	2,00	23,14
<i>I. paraguariensis</i> (mate)	83,32	27,74
<i>C. sinensis</i> (verde)	84,75	28,84
<i>C. sinensis</i> (preto)	91,68	34,45
Inibidor padrão (tioureia)	53,08	-

Os percentuais de inibição de urease obtidos para os chás mate (*I. paraguariensis*), verde e preto (*C. sinensis*), são maiores do que o observado para o inibidor padrão (tioureia), indicando que esses chás possuem substâncias químicas, capazes de inibir a enzima urease, em quantidade maior do que no teste com tioureia ou de forma mais eficiente do que essa substância. Uma investigação conduzida por Cwikla *et al.* (2010) mostrou que o óleo essencial de *P. anisum* é ineficaz, *in vitro*, contra as bactérias *H. pylori* e *Campylobacter jejuni*. Um estudo avaliou a suscetibilidade *in vitro* de 15 cepas de *H. pylori* à diferentes extratos vegetais, dentre eles, o extrato metanólico das folhas de *M. spicata*. O extrato de hortelã apresentou uma fraca inibição, com concentração mediana inibitória variando de 25 a 100 $\mu\text{g/mL}$ (Mahady *et al.*, 2005). Esses estudos indicam que *P. anisum* e *M. spicata* são, assim como observado no presente trabalho, ineficazes para inibição de urease. Knezevic *et al.* (2018) observaram que o óleo essencial de *M. officinalis* possui atividade *in vitro* frente à *H. pylori*. A atividade observada foi dependente não apenas da composição do

óleo essencial, mas também das propriedades da cepa. Contendo predominantemente óxido de geraniol (25,1%), nerol (19,4%) e óxido de cariofileno (10,6%), *M. officinalis* inibiu o crescimento de duas cepas de *H. pylori* a partir da concentração de 4 $\mu\text{L/mL}$. Outra planta que apresenta alto efeito inibitório sobre a urease é a camomila. Em um estudo *in vitro* utilizando o óleo essencial dessa planta observou-se inibição do crescimento de *H. pylori* em baixas concentrações ($< 0,0075\%$). Os MIC₅₀ e MIC₉₀ relatados para o óleo essencial de *M. chamomilla* frente à *H. pylori* foram 62,5 mg/mL e 125,0 mg/mL, respectivamente. Além disso, verificou-se que o óleo essencial influencia as propriedades morfológicas e fermentativas dessa bactéria (Weseler *et al.*, 2005). Segundo Pastene *et al.* (2014), o extrato aquoso de *P. boldus* tem uma potente propriedade anti-*H. pylori* ao inibir a atividade da urease e sua adesão às células gástricas humanas. Esses autores, usando uma abordagem guiada por ensaios *in vitro* e *in vivo*, consideraram que tais atividades estão associadas à presença de procianidinas oligoméricas. Essas substâncias inibem a urease de *H. pylori* de uma maneira dependente da concentração, por meio de um mecanismo de inibição competitiva e reversível. Curiosamente, a inibição também resultou na dependência do flavan-3-ol que forma essas procianidinas. Apesar de *M. officinalis* e *M. chamomilla* terem resultados positivos descritos na literatura para inibição de urease, no presente estudo encontrou-se uma fraca inibição para os chás obtidos dessas ervas. Esse fato pode estar relacionado ao método de extração, uma vez que a partir dos métodos de destilação obtêm-se substâncias com caráter apolar, enquanto a infusão ou maceração com água, por exemplo, produz extratos aquosos contendo, majoritariamente, substâncias com caráter polar. Além da possibilidade de ter substâncias diferentes em ambas extrações, a concentração desses substâncias também pode ser diferente, podendo fazer com que a substância ativa que inibe a urease não esteja presente no extrato aquoso ou que esteja presente em pequena quantidade.

Cogo *et al.* (2010) investigaram a atividade antibacteriana de extrato etanólico de *I. paraguariensis* frente a 11 isolados clínicos de *H. pylori*. O teste *in vitro* mostrou uma inibição potente, MIC₅₀ $< 0,625 \text{ mg/mL}$ e MIC₉₀ de 2,5 mg/mL. Uma investigação realizada por Schubert *et al.* (2006) demonstrou que *I. paraguariensis*, amplamente consumida como parte da dieta no Brasil na forma de chá e chimarrão, apresenta várias substâncias, tais como substâncias fenólicas, triterpenos e flavonóides, que apresentam atividade antimicrobiana. O resultado obtido no presente trabalho corrobora com as informações reportadas na literatura, uma vez que o chá mate apresentou, entre os chás avaliados, um dos maiores percentuais de inibição de urease. Matsubara *et al.* (2003) verificaram que extratos metanólicos de *C. sinensis* (chá verde e chá preto) são, entre os 77 alimentos avaliados, os melhores inibidores de urease de *H. pylori*, apresentando IC₅₀ de 13 $\mu\text{g/mL}$ e IC₅₀ de 56 $\mu\text{g/mL}$ para os chás verde e preto, respectivamente. As catequinas galato de epigalocatequina, galato de galocatequina, galocatequina e epigalocatequina, presentes nos chás verde e preto, foram consideradas as substâncias responsáveis pela inibição observada. O mecanismo de inibição de urease por catequinas pode estar associado aos grupos funcionais hidroxila e cetona, presentes nessas substâncias, que podem interagir com íons níquel no sítio ativo da enzima (Higdon & Frei, 2003). Apesar de serem produzidos a partir da mesma planta, os dois chás (verde e preto) resultaram em percentuais de inibição diferentes. Tal fato pode estar relacionado a diversidade de métodos de crescimento, colheita e beneficiamento utilizados para obtenção dos chás. A ordem relativa de inibição enzimática, diferente da observada na literatura, pode ser atribuída ao solvente de extração utilizado, assim como as particularidades das fontes vegetais utilizadas para produção dos chás, que apesar de serem da mesma espécie produzem metabólitos secundários ligeiramente diferentes ou em concentrações diferentes.

Avaliação *in vitro* de inibição de acetilcolinesterase: Assim como observado para a avaliação de inibição de urease, os percentuais de inibição de acetilcolinesterase (Tabela 1) obtidos para os chás mate (*I. paraguariensis*), verde e preto (*C. sinensis*) são maiores do que para os demais chás avaliados, o que indica que esses chás possuem substâncias químicas capazes de inibir a enzima.

Tabela 2. Propriedades moleculares, calculadas na ferramenta Molinspiration, das substâncias 1-30

Substâncias	miLogP	TPSA	MM	nALH	nDLH	nviolações
1	0,06	61,84	194,19	6	0	0
2	1,37	110,37	290,27	6	5	0
3	1,08	130,60	306,27	7	6*	1
4	1,08	130,60	306,27	7	6	1
5	2,25	197,36	458,38	11	8	3
6	1,37	110,37	290,27	6	5	0
7	2,54	177,13	442,38	10	7	2
8	1,63	217,59	578,53	12	9	4
9	2,79	284,35	730,63	16	11	4
10	2,79	284,35	730,63	16	11	4
11	3,96	351,11	882,74	20	13	4
12	0,59	97,98	170,12	5	4	0
13	1,68	131,35	302,24	7	5	0
14	2,17	111,12	286,24	6	4	0
15	-2,33	118,21	192,17	6	5	0
16	0,94	77,75	180,16	4	3	0
17	-0,45	164,74	354,31	9	6	2
18	-0,67	164,74	354,31	9	6	2
19	-0,45	164,74	354,31	9	6	2
20	1,42	211,28	516,46	12	7	4
21	1,21	211,28	516,46	12	7	4
22	1,21	211,28	516,46	12	7	4
23	-0,95	72,69	180,17	6	1	0
24	-0,01	72,69	180,17	6	1	0
25	3,21	20,23	154,25	1	1	0
26	3,20	20,23	154,25	1	1	0
27	-1,06	269,43	610,52	16	10	4
28	-0,57	249,20	594,52	15	9	4
29	6,79	57,53	456,71	3	2	1
30	9,04	29,46	430,72	2	1	1

*As violações à regra dos cinco são indicadas em vermelho.

Tabela 3. Propriedades farmacocinéticas das substâncias 1-30 calculadas na ferramenta admet SAR

PARAMETROS	Compostos																														
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)	(18)	(19)	(20)	(21)	(22)	(23)	(24)	(25)	(26)	(27)	(28)	(29)	(30)	
Absorção																															
Absorção no intestino humano	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Caco-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
Biodisponibilidade oral humana	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
Metabolização																															
Substrato CYP3A4	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Substrato CYP2C9	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Substrato CYP2D6	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Inibição de CYP3A4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibição de CYP2C9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibição de CYP2C19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibição de CYP2D6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibição de CYP1A2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Promiscuidade inibitória de CYP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Toxicidade																															
Carcinogenicidade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mutagenese de Ames	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Hepatotoxicidade	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
Toxicidade Oral Aguda	II	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	III	II	II	III	IV	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III

Segundo Hajimehdipoor *et al.* (2013), que avaliaram *in vitro* extratos aquosos de nove plantas comumente usadas na medicina tradicional iraniana, o extrato aquoso de *M. chamomilla* não possui efeito inibitório frente à enzima acetilcolinesterase. Em outro estudo, que avaliou a inibição *in vitro* de extratos aquosos e metanólicos de 11 plantas frente à enzima acetilcolinesterase, dentre elas *P. anisum*, *M. officinalis* e *M. spicata*, observou-se que *M. spicata* em concentração de 0,1 mg/mL foi a única planta que exibiu inibição da enzima, reduzindo a atividade enzimática em 15% (Adersen *et al.*, 2006). Esses estudos indicam que *M. chamomilla*, *P. anisum* e *M. officinalis* são, assim como observado no presente trabalho, ineficazes para a inibição de acetilcolinesterase.

O extrato aquoso de *P. boldus* apresentou, *in vitro*, IC₅₀ de 0,93 mg/mL frente à enzima acetilcolinesterase. Os extratos aquosos de *P. boldus* são constituídos principalmente por flavonoides glicosilados, embora a boldina e outros derivados da aporfina possam ser detectados em pequenas quantidades (Fale *et al.*, 2012). Em relação à *M. spicata* e *P. boldus*, os resultados obtidos no presente trabalho são corroborados por dados reportados na literatura, que indicam que os extratos dessas plantas apresentam moderada inibição da enzima acetilcolinesterase. Raghavendra *et al.* (2015) verificaram que o chá verde (*C. sinensis*), em diferentes concentrações, inibe *in vitro* a enzima acetilcolinesterase.

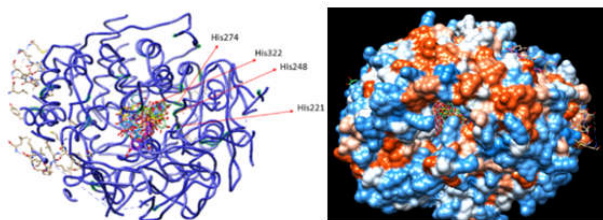


Figura 2. Resultado do estudo de ancoragem molecular das substâncias 1-30 com a enzima urease

O extrato aquoso de chá verde inibiu, dependente da dose, a atividade da acetilcolinesterase com um valor de IC_{50} de 42,05 $\mu\text{g/mL}$. Os autores defendem que, os efeitos benéficos do chá verde são atribuídos principalmente ao alto teor de polifenóis, tais como as catequinas. Em relação ao chá preto (*C. sinensis*), Ray & De (2012) observaram que os extratos aquosos do chá e seus polifenóis possuem atividade inibitória de acetilcolinesterase. Nesse estudo, a infusão e a decocção de cada variedade de chá inibiram a acetilcolinesterase de maneira dependente da dose. Em geral, a atividade observada para o chá obtido por decocção foi significativamente maior do que a da infusão. No presente estudo, os dois chás (verde e preto) resultaram em percentuais de inibição próximos. Tal observação pode ser explicada pelo fato dos dois produtos serem obtidos da mesma espécie (*C. sinensis*) e apenas se diferenciar pelos métodos de crescimento, colheita e beneficiamento da planta. Em relação à *I. paraguariensis*, observa-se que o chá mate possui várias substâncias, tais como o ácido clorogênico, que podem ser responsáveis pelas várias atividades biológicas e farmacológicas reportadas na literatura. O ácido clorogênico apresenta, por exemplo, uma forte inibição da enzima acetilcolinesterase com um valor de IC_{50} de 98,17 $\mu\text{g/mL}$ (Santos *et al.*, 2015). Essa substância deve ser a responsável pela moderada atividade inibidora de acetilcolinesterase observada, no presente trabalho, para o chá mate.

Propriedades farmacocinéticas: As propriedades moleculares, relacionadas à biodisponibilidade oral, das substâncias 1-30 são apresentadas na Tabela 2.

Pode-se observar que 16 das substâncias avaliadas (1-4, 6, 12-16 e 23-26, 29 e 30) não violam os parâmetros estabelecidos por Lipinski *et al.* (1997) para substâncias com boa biodisponibilidade oral. Desse modo, é improvável que essas 16 substâncias apresentem problemas de biodisponibilidade por essa via de administração. Para as demais substâncias observa-se violação de dois, três ou quatro dos parâmetros relacionados à regras dos cinco de Lipinski. De modo geral, as violações são resultantes do número de hidroxilas presentes nas moléculas, que aumentam o número de aceptores de ligação de hidrogênio e o número de doadores de ligação de hidrogênio, aumentando as possibilidades de interação com o meio aquoso extramembranar, o que interfere diretamente na redução da permeabilidade em membranas. Além disso, algumas das substâncias avaliadas, tais como as teaflavinas e os derivados do ácido cafeoilquinico, possuem elevada massa molar, diminuindo a possibilidade de transposição em membranas celulares. As propriedades farmacocinéticas relacionadas aos processos de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade calculadas para as substâncias 1-30 são apresentadas na Tabela 3. Quanto ao processo de absorção, observa-se que apenas duas das substâncias avaliadas (4 e 5) não apresentam resultado positivo para absorção no intestino humano. Cinco das substâncias (16, 25, 26, 29 e 30) avaliadas apresentaram resultados positivos para o modelo de absorção em células Caco-2. Oito das substâncias avaliadas (1, 12, 15, 16, 23, 24, 29 e 30) apresentaram resultado positivo para o modelo de biodisponibilidade oral. Ao compararmos esses últimos resultados com os obtidos na ferramenta Molinspiration observa-se que o algoritmo utilizado pela ferramenta admetSAR indicou um menor número de substâncias biodisponíveis.

As células Caco-2 constituem um parâmetro importante de absorção de fármacos no intestino, assim, se a magnitude de permeabilidade das substâncias a essas células for baixa, é improvável a absorção efetiva da substância (YEE, 1997). Quanto ao processo de metabolização, observou-se que apenas as substâncias 13 e 14 apresentaram promiscuidade inibitória do citocromo P450, atuando como substratos e inibidores de algumas das isoformas da proteína P450. Esse resultado indica que, com exceção das substâncias 13 e 14, os produtos naturais avaliados não são biotransformados e podem atuar, sem uma diminuição da concentração plasmática, em bioreceptores no organismo. Quanto aos parâmetros de toxicidade, a toxicidade oral aguda para as substâncias 2-11 e 16 foi classificada como categoria IV ($5000 \text{ mg/kg} \leq LD_{50}$); para as substâncias 1, 13, 14 e 23 foi classificada como categoria II ($50 \text{ mg/kg} \leq LD_{50} \leq 500 \text{ mg/kg}$); as demais substâncias foram classificadas como categoria III ($500 \text{ mg/kg} \leq LD_{50} \leq 5000 \text{ mg/kg}$). Esses resultados indicam que as substâncias 1-30 não possuem toxicidade oral aguda acentuada. Observou-se que nenhuma das substâncias avaliadas apresentaram resultado positivo para o modelo de carcinogenicidade; seis das substâncias avaliadas (2, 6, 13, 14, 27 e 28) apresentaram resultado positivo para o modelo de mutagenicidade de Ames; 18 das substâncias avaliadas (1, 3-5, 7-11, 13, 14, 20-24) apresentaram resultado positivo para o modelo de hepatotoxicidade. Esses resultados sugerem que os chás mate, verde e preto devem ser consumidos com cautela, uma vez que há substâncias que podem causar efeitos colaterais indesejados.

Estudos de ancoragem molecular: No que se refere à inibição da enzima urease (PDB ID: 6ZJA), Cunha *et al.* (2021) mostraram que o complexo formado entre a substância 2- $\{[1-(3,5\text{-dimetilfenil})-1H\text{-imidazol-2-il]sulfanil}\}$ -*N*-hidroxiacetamida e a enzima urease se estabelece nos bolsões onde os íons Ni^{2+} estão presentes, interagindo com os resíduos de aminoácidos His321, His322 e His221. Ao monitorar essas histidinas presentes no sítio ativo da urease, observou-se que 13 das substâncias avaliadas (7-13, 16, 19, 20, 27-29) interagem com esses resíduos de aminoácidos. As interações entre as substâncias 1-30 e a região em torno do sítio ativo foram exploradas utilizando a ferramenta Chimera (Figura 2). Pode-se observar um aglomerado de substâncias na região central da enzima, e algumas substâncias em bolsões próximos à superfície da enzima.

Na Figura 2 são indicadas as interações dos pares de resíduos de aminoácidos His136-His138 e His248-His274 com os íons Ni^{2+} . Essa região é fundamental para a hidrólise da ureia, dessa forma, substâncias que se ancoram próximas aos íons Ni^{2+} podem atuar como inibidores de urease. Entre as substâncias que se ancoraram no sítio ativo, as que apresentaram maior interação com a enzima urease foram as teaflavinas 11, 10 e 9. No entanto, essas três substâncias apresentam quatro violações à regra dos cinco de Lipinski, o que indica que os resultados de inibição enzimática observados *in vitro* e *in silico* podem não ser observados *in vivo*, uma vez que essas substâncias possuem propriedades moleculares que limitam sua transposição em membranas. Para as substâncias 13 (quercetina), 16 (ácido cafeico) e 29 (ácido ursólico), por outro lado, apesar de interagirem mais fracamente com a enzima urease do que as substâncias 9-11, não há indicativo de problemas de biodisponibilidade oral. O segundo estudo de ancoragem molecular foi realizado utilizando a enzima acetilcolinesterase (PDB ID: 4EY6), cujos resíduos de aminoácidos Trp86, Glu202, Ser203, Trp286, Phe297, Tyr337, Phe338, Tyr341 e His447 estão localizados no bolsão do sítio ativo da enzima (Cheung *et al.*, 2012). As interações entre as substâncias 1-30 e a enzima acetilcolinesterase foram exploradas utilizando a ferramenta Chimera (Figura 3).

Observou-se que há nove substâncias que interagem no sítio ativo da enzima acetilcolinesterase. Dessas nove substâncias, apenas a 18 possui indicativo de problemas em relação à biodisponibilidade oral. Em relação à energia de interação com a enzima, as substâncias 4 e 25 são as que interagem mais fortemente e mais fracamente, respectivamente, com os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima.

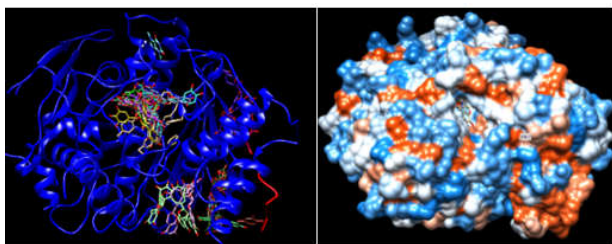


Figura 3. Resultado do estudo de ancoragem molecular das substâncias 1-30 com a enzima acetilcolinesterase

Ao relacionar os resultados *in silico* e *in vitro*, pode-se inferir que há várias substâncias presentes nos chás avaliados que possuem potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase. Vale ressaltar, no entanto, que os testes *in vitro* indicam que o potencial de inibição de urease é maior do que o potencial de inibição de acetilcolinesterase. Ainda assim, os resultados obtidos nesse trabalho corroboram com os estudos que indicam a importância dos alimentos funcionais para a saúde do ser humano.

CONCLUSÃO

Observou-se que, entre os oito chás comercializados em sachês avaliados no presente estudo, três tipos de chás {mate (*I.paraguariensis*), verde e preto (*C.sinensis*)} apresentaram, *in vitro*, potencial de inibição das enzimas urease e acetilcolinesterase. Tais resultados corroboram com dados da literatura que indicam que alguns tipos de chás possuem potencial para o tratamento da Doença de Alzheimer e de úlceras pépticas causadas pela bactéria *H. pylori*.

Ao realizar os estudos *in silico*, observou-se que várias das substâncias comumente indicadas na literatura como constituinte dos chás mate (*I.paraguariensis*), verde e preto (*C.sinensis*) apresentam propriedades moleculares e farmacocinéticas adequadas para substâncias apresentarem bioatividade no organismo humano. Os estudos de ancoragem molecular indicam que, entre as 30 substâncias avaliadas:

13 possuem potencial de inibição da enzima urease e 9 possuem potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase. Duas substâncias (ácido gálico e quercetina) apresentaram potencial de inibição das duas enzimas avaliadas, as demais substâncias apresentaram uma ou outra bioatividade. Tal fato, sugere a importância da diversidade estrutural presente em produtos naturais para a promoção de atividades biológicas e farmacológicas, indicando que o mecanismo de ação envolve mais do que uma substância bioativa, ao contrário do que se observa em medicamentos comercializados por indústrias farmacêuticas. Concluímos que os testes *in vitro* e *in silico* são complementares e convergem para explicar o mecanismo de ação dos chás mate, verde e preto enquanto inibidores de urease e de acetilcolinesterase. Além disso, entre as duas bioatividades, observa-se que os chás mencionados possuem um maior potencial de ação sobre a enzima urease do que sobre a enzima acetilcolinesterase. Dessa forma, estudos *in vivo* são necessários para comprovar a ação desses chás e a efetividade relativa à fármacos comerciais inibidores de urease e de acetilcolinesterase.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

Adersen, A., Gauguin, B., Gudiksen, L., & Jäger, A. K. 2006. Screening of plants used in danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 104 (3), 418-422. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.09.032>.

- Braibante, M. E. F., Silva, D., Braibante, H. T. S., & Pazinato M. S. 2014. A química dos chás. *Química Nova na Escola*, 36(3) 168-175. <https://dx.doi.org/10.5935/0104-8899.20140019>.
- Candido, L. M. B., & Campos, A. M. 2005. Alimentos funcionais. Uma revisão. *Boletim da Revista Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29(3), 193-203.
- Carneiro, S. S., Lima, A. R., Marinho, M. M., & Marinho, E. S. 2016. In silico study of the therapeutic agent in the treatment of non-hodgkin's lymphomas, peripheral t-cell belinostat, a semi-empirical approach. *Imperial Journal of Interdisciplinary Research*, 2(8), 1645-1648.
- Cavaliere, F., & Cozzini, P. 2018. New in silico trends in food toxicology. *Chemical Research in Toxicology*, 31, 992-993. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00133>.
- Cheung, J., Rudolph, M. J., Burshteyn, F., Cassidy, M. S., Gary, E. N., Love, J., & Height, J. J. 2012. Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands. *Journal of medicinal chemistry*, 55(22), 10282-10286. <https://doi.org/10.1021/jm300871x>.
- Cogo, L. L., Monteiro, C. L. B., Miguel, M. D., Miguel, O. G., Cunico, M. M., Ribeiro, M. L., Camargo, E. R., Kussen, G. M. B., Nogueira, K. S., & Costa, L. M. D. 2010. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plant extracts traditionally used for the treatment of gastrointestinal disorders. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 304-309. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000200007>.
- Croge, C. P., Cuquel, F. L., & Pinto, P. T. M. 2020. Yerba mate: cultivation systems, processing and chemical composition. A review. *Scientia Agricola*, 78(5), 1-11. <https://doi.org/10.1590/1678-992X-2019-0259>.
- Cunha, E. S., Chen, X., Sanz-Gaitero, M., Mills, D. J., & Luecke, H. 2021. Cryo-EM structure of *Helicobacter pylori* urease with an inhibitor in the active site at 2.0 Å resolution. *Nature communications*, 12(1), 1-8. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20485-6>.
- Cwikla, C., Schmidt, K., Matthias, A., Bone, K. M., Lehmann, R., & Tiralongo, E. 2010. Investigations into the antibacterial activities of phytotherapeutics against *Helicobacter pylori* and *Campylobacter jejuni*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 24(5), 649-656. <https://doi.org/10.1002/ptr.2933>.
- Fale, P. L. A., Amaral, F., Madeira, P. A., Silva, M. S., Florêncio, M. H., Frazão, F. N., & Serralheiro, M. L. M. 2012. Acetylcholinesterase inhibition, antioxidant activity and toxicity of *Peumus boldus* water extracts on HeLa and Caco-2 cell lines. *Food and chemical toxicology*, 50(8), 2656-2662. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.04.049>.
- Forlenza, O. V. 2005. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. *Archives of Clinical Psychiatry*, 32(3), 137-148. <https://doi.org/10.1590/S0101-60832005000300006>.
- Hajimehdipoor, H., Tehranifar, T., & Shafaroodi, H. 2013. Acetylcholinesterase inhibitory effect of some medicinal herbs used in Iranian traditional medicine for memory improvement. *Global Journal of Botanical Science*, 1(1), 18-21. <https://doi.org/10.12974/2311-858X.2013.01.01.3>.
- Hestrin, S. 1949. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical application. *Journal of biological Chemistry*, 180(1), 249-261. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)56740-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)56740-5).
- Higdon, J. V., & Frei, B. 2003. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(1), 89-143. <https://doi.org/10.1080/10408690390826464>.
- Knezevic, P., Sabo, V. A., Simin, N., Lesjak, M., & Mimica-Dukic, N. 2018. A colorimetric broth microdilution method for assessment of *Helicobacter pylori* sensitivity to antimicrobial agents. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 152, 271-278. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.02.003>.
- Lagorce, D., Douguet, D., Miteva, M. A., & Villoutreix, B. O. 2017. Computational analysis of calculated physicochemical and

- ADMET properties of protein-protein interaction inhibitors. *Scientific reports*, 7(1), 1-15. <https://doi.org/10.1038/srep46277>.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. 1997. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews*, 23(1-3), 3-25. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(96\)00423-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00423-1).
- Mahady, G. B., Pendlant, S. L., Stoia, A., Hamill, F. A., Fabricant, D., Dietz, B. M., & Chadwick, L. R. 2005. In vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to botanical extracts used traditionally for the treatment of gastrointestinal disorders. *Phytotherapy Research: an International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 19(11), 988-991. <https://doi.org/10.1002/ptr.1776>.
- Mandel, S., & Youdim, M. B. H. 2004. Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(3), 304-317. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.012>.
- Matsubara, S., Shibata, H., Ishikawa, F., Yokokura, T., Takahashi, M., Sugimura, T., Wakabayashi, K. 2003. Suppression of *Helicobacter pylori*-induced gastritis by green tea extract in Mongolian gerbils. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 310(3), 715-719. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.09.066>.
- Nogueira, P. R. R. B. 2015. Imobilização de acetilcolinesterase para construção de biossensores de pesticidas. Dissertação de Mestrado (Engenharia Ambiental), Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Fluminense.
- Pastene, E., Parada, V., Avello, M., Ruiz, A., & García, A. 2014. Catechin-based procyanidins from *Peumus boldus* Mol. aqueous extract inhibit *Helicobacter pylori* urease and adherence to adenocarcinoma gastric cells. *Phytotherapy Research*, 28(11), 1637-1645. <https://doi.org/10.1002/ptr.5176>.
- Raghavendra, H. L., Prashith, K. T. R., & Khanum, F. 2015. Acetylcholinesterase inhibitory activity of green tea polyphenols. *Science, Technology and Arts Research Journal*, 3(4), 141-142. <https://doi.org/10.4314/star.v3i4.20>.
- Ray, S., & De, B. 2012. Acetylcholinesterase inhibitory properties of black tea and its polyphenolic components. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(3), 334-337.
- Sámano, C., Cifuentes, F., & Morales, M. A. 2012. Neurotransmitter segregation: Functional and plastic implications. *Progress in Neurobiology*, 97, 277-287. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2012.04.004>.
- SantAnna, C. M. R. 2009. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de substâncias bioativos: Uma introdução. *Revista Virtual de Química*, 1(1), 49-57. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20090007>.
- Santos, E. C. S., Bicca, M. A., Blum-Silva, C. H., Costa, A. P. R., Santos, A. A., Schenkel, E. P., Reginatto, F. H., & Lima, T. C. M. 2015. Anxiolytic-like, stimulant and neuroprotective effects of *Ilex paraguariensis* extracts in mice. *Neuroscience*, 292, 13-21. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.02.004>.
- Schmitz, W., Saito, A. Y., Estevão, D., & Saridakis, H. O. 2005. O chá verde e suas ações como quimioprotetor. *Semina: Ciências biológicas e da saúde*, 26(2), 119-130. <https://dx.doi.org/10.5433/1679-0367.2005v26n2p119>.
- Schubert, A., Zanin, F. F., Pereira, D. F., & Athayde, M. L. 2006. Variação anual de metilxantinas totais em amostras de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. (Erva-mate) em Ijuí e Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. *Química Nova*, 29(6), 1233-1236. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000600016>.
- Strada, M. F., Gabriel, B. G., Romero, R. B. & Romero, A. L. 2021. Propriedades farmacocinéticas e farmacologia *in silico* de cafeatos monoterpênicos idealizados. *International Journal of Development Research*, 11(10), 50904-50909. <https://doi.org/10.37118/ijdr.23137.10.2021>.
- Silva, D. A., Silva Mikalowski, F. B., Suzuki, R. M., Romero, R. B., & Romero, A. L. 2015. Efeito de óleos essenciais sobre a enzima urease: um estudo *in vitro* e *in silico*. *Colloquium Exactarum*, 7(3), 39-47. <https://doi.org/10.5747/ce.2015.v07.n3.e127>.
- Valenzuela, A. B. 2004. El consumo de te y la salud: Características y propiedades benéficas de esta bebida milenaria. *Revista Chilena de Nutrición*, 31(2), 72-82. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182004000200001>.
- Weatherburn, M. W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*, 39(8), 971-974. <https://doi.org/10.1021/ac60252a045>.
- Weseler, A., Geiss, H. K., Saller, R., & Reichling, J. J. D. P. 2005. A novel colorimetric broth microdilution method to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of antibiotics and essential oils against *Helicobacter pylori*. *Die Pharmazie-an International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 60(7), 498-502.
- Zhang, Y., Aryee, A. N., & Simpson, B. K. 2020. Current role of *in silico* approaches for food enzymes. *Current Opinion in Food Science*, 31, 63-70. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.11.003>.
- Yee, S. 1997. In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man - fact or myth. *Pharmaceutical Research*, 14(6), 763-766. <https://doi.org/10.1023/A:1012102522787>.
