

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica



**ESTUDOS DE METABOLISMO *IN VITRO* DE
EXTRACTOS AQUOSOS DE SÃO ROBERTO,
Geranium robertianum.
APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS NA DOENÇA DE
ALZHEIMER.**

Inês de Sousa Lima

MESTRADO EM BIOQUÍMICA

Lisboa

2009

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica



**ESTUDOS DE METABOLISMO *IN VITRO* DE
EXTRACTOS AQUOSOS DE SÃO ROBERTO,
Geranium robertianum.
APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS NA DOENÇA DE
ALZHEIMER.**

Inês de Sousa Lima

MESTRADO EM BIOQUÍMICA

Dissertação de estágio orientada pela Professora Doutora Maria
Luísa Mourato Oliveira Marques Serralheiro

Lisboa

2009

***To see the World in a Grain of Sand
And Heaven in a Wild Flower
Hold Infinity in the palm of your hand
And Eternity in an hour***

William Blake, Auguries of Innocence

Agradecimentos

Este trabalho só foi possível graças ao apoio de inúmeras pessoas que me rodeiam e até ao sacrifício de alguns.

Quero agradecer à minha orientadora, Professora Luísa Serralheiro pelo acompanhamento, disponibilidade, apoio e crítica atenta que foram essenciais para a realização deste trabalho.

À Professora Ana Rosa Lino por me ter recebido no seu laboratório e apoiado sempre com total disponibilidade e atenção. Ao Dr. Pedro Vaz por me ter acompanhado e ter sido sempre extremamente prestável e atento.

Ao meu colega Pedro Falé por me ter integrado e apoiado nos primeiros passos dentro do laboratório, sendo uma presença constante em todos os momentos.

Devo ao Departamento de Química e Bioquímica as condições indispensáveis à realização deste trabalho.

Às minhas colegas Sara, Rita e Susana pela Amizade, entreajuda, carinho e todos os momentos de boa-disposição que me ajudaram a seguir em frente sempre com optimismo e alegria.

A todos os meus amigos que de uma forma ou de outra me apoiaram, encorajando-me a seguir em frente e a nunca desistir, mostrando por mim uma Amizade e carinho imensuráveis.

À Chia pela enorme Amizade demonstrada durante todo este ano nos mais pequenos gestos de carinho e palavras de apoio e encorajamento, mesmo nos momentos de maior desânimo.

Aos meus avós, Zeca e Henrique, pela constante presença na minha vida, acompanhando-me em todos os momentos decisivos, pelo seu carinho e Amor. À minha avó Fernanda e ao meu avô Floriano pela sua Amizade e optimismo em relação ao meu sucesso.

Ao meu pai, Zé, pelo seu Amor, Amizade e companheirismo; pela sua atitude descontraída e a sua disponibilidade para me ajudar mesmo quando a mim já me faltam as forças para continuar.

À minha mãe, Cinda, uma pessoa que eu admiro, respeito e amo profundamente, cujas conversas intermináveis, conselhos, palavras de força e Amor incondicional me permitiram até hoje ultrapassar todos os obstáculos com que fui confrontada e nunca desistir de lutar por aquilo em que acredito e desejo.

Ao João pelo seu Amor, apoio incondicional; pelas conversas e conselhos; pela paciência e carinho com que sempre me trata e pela forma única de me surpreender e fazer sorrir, como só ele.

A todos os que sempre acreditaram no meu sucesso e me apoiaram nesse sentido o meu mais sincero MUITO OBRIGADA!

Resumo

O objectivo deste trabalho foi o estudo do metabolismo *in vitro* de extractos aquosos de *Geranium robertianum* e actividades biológicas com aplicações terapêuticas na Doença de Alzheimer.

O aumento das doenças neurodegenerativas na população leva à necessidade de encontrar novas terapêuticas. Uma área em expansão é o estudo de plantas medicinais, como o *G. robertianum*, utilizado na medicina tradicional portuguesa e cuja caracterização exaustiva permitirá a compreensão das suas potencialidades como agente terapêutico.

Determinou-se a concentração de *G. robertianum* necessária para inibir 50% da actividade do enzima acetilcolinesterase, obtendo-se $765,88 \pm 15,39$ µg/mL. Simultaneamente, calculou-se a concentração de extracto aquoso responsável por 50% de extinção do radical DPPH, $6,53 \pm 0,58$ µg/mL. A análise destas actividades biológicas para cada fracção maioritária mostrou que o seu efeito sinérgico promove as actividades globais apresentadas.

Seguidamente, caracterizou-se a planta relativamente ao tipo e estrutura dos principais compostos. Quantificaram-se os fenóis totais, obtendo-se um valor de $106,96 \pm 2,37$ µg de equivalentes de pirogalol / mg de extracto. A análise por espectrometria de massa permitiu concluir que as principais moléculas presentes em *G. robertianum* são o ácido sinápico glucuronado, quercitrina, ácido gálico, ácido elágico e cianidina.

O estudo do metabolismo *in vitro* de extractos aquosos de *G. robertianum* mostrou que não há metabolização pelos sucos gástrico e pancreático, bem como por células Caco-2. A digestão por β-glucuronidase de *E. coli* permitiu comprovar a existência de ácido sinápico glucuronado. Adicionalmente verificou-se que durante todo o metabolismo o extracto aquoso mantém as suas actividades biológicas de relevância. O estudo da reacção de glucuronidação, típica de metabolismo hepático, permitiu concluir que os polifenóis existentes no extracto não sofrem glucuronidação e, mais uma vez, mostrou a presença do composto glucuronado no extracto.

Finalmente estudou-se a actividade antimicrobiana de *G. robertianum*, concluindo-se que 12,99 mg/mL e 19,70 mg/mL de extracto inibem 50% do crescimento de *S. mutans* e *S. sobrinus*, respectivamente. Simultaneamente estudou-se a inibição do enzima glucosiltransferase isolado das estirpes bacterianas, verificando-se que 8,27 mg/mL e mais de 10 mg/mL inibem 50% da actividade do enzima extraído de *S. mutans* e *S. sobrinus*, respectivamente.

Assim, concluiu-se que o extracto aquoso de *G. robertianum* possui actividades biológicas passíveis de aplicação na Doença de Alzheimer. Estudos adicionais poderão indicar como garantir a chegada do extracto ou seus componentes aos tecidos-alvo e elucidar acerca de mecanismos celulares e moleculares através dos quais este exerce os seus efeitos biológicos.

Palavras-chave: *Geranium robertianum*, Doença de Alzheimer, polifenóis, acetilcolinesterase, actividade antioxidante, metabolismo.

Abstract

This work focused on the study of the *in vitro* metabolism of aqueous extracts of *Geranium robertianum* and its biological activities, relevant to the Alzheimer's disease therapeutics.

The increase of neurodegenerative diseases within the world population urges the research of new therapeutic strategies. A field of research is that of medicinal plants, such as *G. robertianum*, widely used in Portuguese folk medicine. However, an extensive characterization of this plant is required, in order to understand its potentialities as a therapeutic agent.

G. robertianum was screened for its acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant activities. At a concentration of $765,88 \pm 15,39 \mu\text{g/mL}$ the enzyme activity was inhibited in 50% and at a value of $6,53 \pm 0,58 \mu\text{g/mL}$ 50% of the free radical DPPH was scavenged. The analysis of these biological activities, for each major component of the aqueous extract, showed that a synergetic effect between them accounts for the global activities determined.

Afterwards, the plant was characterized according to the type and chemical structure of its main components. It was determined that there were $106,96 \pm 2,37 \mu\text{g}$ pyrogallol equivalents of phenolic compounds in 1 mg of aqueous extract. Mass spectrometry analysis showed that *G. robertianum* contained glucuronized sinapic acid, quercitrin, gallic acid, ellagic acid and cyanidin.

The study of the *in vitro* metabolism of aqueous extracts of *G. robertianum* showed that there is no metabolization by the gastric and pancreatic juices, as well as by Caco-2 cells. Additionally, the digestion by an *E. coli* β -glucuronidase allowed the confirmation of the glucuronized sinapic acid presence. Furthermore, the biological activities of interest maintain their values during the entire metabolic pathway. The study of the hepatic metabolism showed that the polyphenols present do not under go glucuronidation and, once again, confirmed the presence of a glucuronide in the aqueous extract.

Finally the antimicrobial activity of *G. robertianum* was studied. At a concentration of 12,99 mg/mL and 19,70 mg/mL of extract 50% of the growth of *S. mutans* and *S. sobrinus* was inhibited, respectively. Simultaneously the inhibition of the glucosyltransferase enzyme, isolated from the bacterial strains, was determined. At a concentration of 8,27 mg/mL (*S. mutans*) and over 10 mg/mL (*S. sobrinus*) 50% of enzyme activity was inhibited.

We have concluded that the aqueous extract of *G. robertianum* has biological activities with interest for Alzheimer's disease. Additional studies will be necessary to understand how the aqueous extract can reach the tissues and determine through which cellular and molecular mechanisms the aqueous extract can exert its biological effects.

Keywords: *Geranium robertianum*, Alzheimer's disease, polyphenols, acetylcholinesterase, antioxidant activity, metabolism.

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	iii
Abstract.....	v
Índice.....	vii
Índice de Figuras.....	xi
Índice de Tabelas.....	xv
Abreviaturas.....	xvii
Capítulo I – Introdução.....	1
1. Fitoterapia e Doenças Neurodegenerativas.....	3
2. Revisão Bibliográfica do Género <i>Geranium</i>	4
2.1. Distribuição Geográfica.....	4
2.2. Estrutura e Fisiologia.....	4
2.2.1. Morfologia.....	4
2.2.2. Dados Fisiológicos.....	5
2.2.3. Caracterização Bioquímica.....	5
2.3. Usos etnobotânicos de <i>Geranium robertianum</i>	6
3. Doença de Alzheimer.....	7
3.1. Epidemiologia e Factores de Risco.....	7
3.2. Genética.....	8
3.3. Patogénese.....	8
3.4. Acetilcolinesterase e AD.....	11
3.5. Inflamação e AD.....	13
3.6. Tratamento.....	14
4. Actividades Biológicas dos Polifenóis.....	16
4.1. Classificação Estrutural e Absorção.....	17
4.2. Stress Oxidativo e Doenças Neurodegenerativas.....	18
4.3. Propriedades Inibitórias de Acetilcolinesterase de Compostos Fenólicos.....	20
4.4. Propriedades Antioxidantes de Compostos Fenólicos.....	20
4.5. Propriedades Anti-cariogénicas de Compostos Fenólicos.....	21
5. Objectivos.....	24
Capítulo II – Materiais e Métodos.....	25
1. Material Vegetal.....	27
2. Material Celular e Bacteriano.....	27
3. Reagentes.....	27
4. Preparação do Extracto.....	28
5. HPLC Analítico e Preparativo.....	28
6. Inibição da Actividade de Acetilcolinesterase.....	29
7. Actividade Antioxidante – Método do DPPH.....	30

8.	Quantificação de Fenóis Totais.....	31
9.	Identificação dos Compostos Maioritários do Extracto Aquoso de <i>G. robertianum</i> por Espectrometria de Massa (MS).....	32
10.	Digestão do Extracto Aquoso de <i>G. robertianum</i> pelos Sucos Digestivos, <i>in vitro</i> , e determinação das actividades inibitória de AChE e antioxidante.....	33
10.1.	Digestão do Extracto de <i>G. robertianum</i> pelo Suco Gástrico, <i>in vitro</i>	33
10.2.	Digestão do Extracto de <i>G. robertianum</i> pelo Suco Pancreático, <i>in vitro</i>	33
11.	Digestão do Extracto de <i>G. robertianum</i> por células Caco-2.....	34
11.1.	Ensaio de Citotoxicidade em Células Caco-2.....	34
11.2.	Digestão do Extracto de <i>G. robertianum</i> por células Caco-2, <i>in vitro</i>	35
12.	Digestão do <i>G. robertianum</i> por β -glucuronidase de <i>E. Coli</i>	36
13.	Digestão do Extracto de <i>G. robertianum</i> por Homogenato de Fígado.....	36
13.1.	Preparação do Homogenato de Fígado.....	36
13.2.	Glucuronidação da quercetina e <i>Geranium robertianum</i>	37
14.	Determinação da actividade antimicrobiana de <i>G. robertianum</i>	37
14.1.	Determinação do MIC (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>) para as estirpes <i>Streptococcus mutans</i> e <i>Streptococcus sobrinus</i>	37
14.2.	Exacção e isolamento da glucosiltransferase extracelular de <i>Streptococcus mutans</i> e <i>Streptococcus sobrinus</i>	38
14.3.	Determinação da inibição da formação de glucano insolúvel em água pela glucosiltransferase.....	38
15.	Análise Estatística.....	39
Capítulo III – Resultados e Discussão.....		41
1.	Actividades Biológicas do extracto aquoso de <i>Geranium robertianum</i>	44
1.1.	Determinação da Actividade Inibitória de Acetilcolinesterase (AChE).....	44
1.2.	Determinação da Actividade Antioxidante.....	45
1.3.	Quantificação de Fenóis Totais.....	46
1.4.	Análise do extracto de <i>G. robertianum</i> por HPLC e determinação das actividades inibitórias de AChE e antioxidante de cada um dos compostos maioritários.....	48
2.	Identificação dos compostos maioritários de <i>G. robertianum</i> por espectrometria de massa (MS).....	52
3.	Metabolismo <i>in vitro</i> do extracto de <i>G. robertianum</i>	56
3.1.	Digestão do extracto de <i>G. robertianum</i> pelo suco gástrico artificial.....	56
3.2.	Digestão do extracto de <i>G. robertianum</i> pelo suco pancreático artificial.....	58
3.3.	Digestão do extracto de <i>G. robertianum</i> por células Caco-2.....	63
3.4.	Digestão do extracto de <i>G. robertianum</i> por β -glucuronidase de <i>E. Coli</i>	67
3.5.	Suco Gástrico, Suco Pancreático e Células Caco-2 – Análise Integrada de Resultados.....	70
3.6.	Metabolismo hepático de Fase II – Glucuronidação do extracto de <i>G. robertianum</i>	

4.	Actividade antimicrobiana do extracto de <i>G. robertianum</i>	75
4.1.	Determinação da inibição do crescimento de <i>Streptococcus mutans</i>	75
4.2.	Determinação da inibição do crescimento de <i>Streptococcus sobrinus</i>	77
4.3.	Inibição da actividade de glucosiltransferase (GTF) de <i>S. mutans</i>	78
4.4.	Inibição da actividade de glucosiltransferase (GTF) de <i>S. sobrinus</i>	79
5.	Síntese do Metabolismo <i>in vitro</i> de <i>Geranium robertianum</i> e actividades biológicas	81
Capítulo VI – Conclusões e Perspectivas Futuras		85
1.	Conclusões	87
2.	Perspectivas Futuras	88
Bibliografia.....		91
Anexos		I
Anexo 1		III
Anexo 1A: Espectro MS obtido para o branco da primeira fracção maioritária		III
Anexo 1B: Perfil Cromatográfico da quinta fracção maioritária após recolha por HPLC preparativas e identificação por MS		III
Anexo 2.....		IV
Anexo 2A: Perfis cromatográficos obtidos para as 0 horas e 4 horas de digestão pelo suco gástrico.....		IV
Anexo 2B: Ensaio de citotoxicidade e viabilidade celular – MTT.....		V
Anexo 2C: Perfis Cromatográficos obtidos para as 0 e 6 horas de digestão por HBSS.....		V
Anexo 2D: Perfis Cromatográficos obtidos para as 0 e 6 horas de digestão por células Caco-2.....		VI
Anexo 2E: Glucuronidação do extracto aquoso de <i>G. robertianum</i>		VII
Anexo 2F: Reglucuronidação do extracto aquoso de <i>G. robertianum</i>		VIII

Índice de Figuras

Figura 1: Distribuição mundial de <i>G. robertianum</i> . Fonte: Tofts R.J., 2004.....	4
Figura 2: Conjunto de fotografias que retratam a erva de São Roberto ou <i>Geranium robertianum</i> . Fonte: adaptado de http://en.wikipedia.org e http://www.bioimages.org.uk	5
Figura 3: Placas e NFTs no córtex cerebral de um doente com AD. Fonte: adaptado de Blennow K. <i>et al.</i> , 2006.....	8
Figura 4: A acção neurotóxica de A β envolve a geração de espécies reactivas de oxigénio (do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i> , ROS) e interrupção da homeostase do cálcio. Fonte: adaptado de Mattson M. P., 2004.	10
Figura 5: Estrutura 3D do acetilcolinesterase de <i>Torpedo californica</i> . Resíduos Trp84 e Trp279 a azul, Ser200 a vermelho e Phe288 e Phe290 a preto. Fonte: Silman, R. e Sussman, J. L., 2005.....	12
Figura 6: Inibidores de AChE utilizados na terapêutica de AD. Fonte: Adaptado de Ibach B. e Haen E., 2004.....	15
Figura 7: Classificação e estrutura de polifenóis. Fonte: Adaptado de Ramassamy, C., 2006. .	17
Figura 8: Características estruturais típicas de flavonóides (a negrito) promotoras da neutralização efectiva de radicais livres e quelatação de metais. Fonte: Adaptado de Gomes, A <i>et al.</i> , 2008.	21
Figura 9: Esquema reaccional que ilustra a reacção da AChE com a acetiltiocolina, resultando, no final, no produto corado, TNB. Fonte: adaptado de Frasco <i>et al.</i> , 2005.....	29
Figura 10: Esquema representativo da extinção do DPPH na presença de uma amostra com capacidade de captação do radical. Fonte: adaptado de Molyneux P., 2004.	30
Figura 11: Percentagem de inibição do enzima AChE na presença de concentrações crescentes de extracto de <i>G. roebrtianum</i> (ensaio realizado em triplicado).....	44
Figura 12: Percentagem de extinção do radical livre DPPH, reflexo da actividade antioxidante, em função de concentrações crescentes de extracto aquoso de <i>G. robertianum</i> (ensaio realizado em triplicado).....	45
Figura 13: Curva de calibração utilizada para o cálculo do conteúdo em fenóis totais do extracto aquoso de <i>G. robertianum</i> (ensaio realizado em triplicado).	47
Figura 14: Perfil cromatográfico obtido para uma solução de <i>G. robertianum</i> 1mg/mL.	48
Figura 15: Espectros de absorção UV-Vis obtidos para os primeiro ($t_r=3,93$ min) e segundo ($t_r=12,86$ min) picos maioritários.	49

Figura 16: Espectros de absorção UV-Vis obtidos para os terceiro ($t_r=13,52$ min) e quarto ($t_r=14,55$ min) picos maioritários.	49
Figura 17: Espectro de absorção UV-Vis obtidos para o quinto pico maioritário ($t_r=20,48$ min).	49
Figura 18: Espectro de massa (MS) obtido em modo positivo para a primeira fracção maioritária ($t_r = 3,93$ min).	52
Figura 19: Estrutura da molécula presente na primeira fracção maioritária.	53
Figura 20: Espectro de massa (MS/MS) obtido em modo positivo para o composto maioritário 5 ($t_r = 20,48$ min).	54
Figura 21: Esquema de fragmentação proposto para a fracção maioritária 5, considerando o espectro de massa obtido.	54
Figura 22: Perfis cromatográficos de uma solução de <i>G. robertianum</i> (1 mg/mL) às 0 horas (cinza) e 4 horas (preto) de digestão pelo suco gástrico artificial. 1: ácido sinápico glucuronado; 2/3/4: quercitrina, ácido elágico e ácido gálico; 5: cianidina.	56
Figura 23: Inibição de AChE pelo extracto de <i>G. robertianum</i> (1000 $\mu\text{g/mL}$), ao longo das 4 horas de digestão pelo suco gástrico (ensaio realizado em triplicado, $P < 0,05$).	57
Figura 24: Actividade antioxidante do extracto de <i>G. robertianum</i> (10 $\mu\text{g/mL}$), ao longo das 4 horas de digestão pelo suco gástrico (ensaio realizado em triplicado, $P < 0,05$).	57
Figura 25: Perfil cromatográfico de uma solução de <i>G. robertianum</i> (1 mg/mL) às 0 horas de digestão pelo suco pancreático artificial. 1: ácido sinápico glucuronado; 2/3/4: quercitrina, ácido elágico e ácido gálico; 5: cianidina.	59
Figura 26: Perfil cromatográfico de uma solução de <i>G. robertianum</i> (1 mg/mL) às 4 horas de digestão pelo suco pancreático artificial. 1: ácido sinápico glucuronado; 2/3/4: quercitrina, ácido elágico e ácido gálico; 5: cianidina.	59
Figura 27: Inibição de AChE pelo extracto de <i>G. robertianum</i> (1000 $\mu\text{g/mL}$), ao longo das 4 horas de digestão pelo suco pancreático (ensaio realizado em triplicado, $P < 0,05$).	61
Figura 28: Actividade antioxidante do extracto de <i>G. robertianum</i> (10 $\mu\text{g/mL}$), ao longo das 4 horas de digestão pelo suco pancreático (ensaio realizado em triplicado, $P < 0,05$).	61
Figura 29: Perfil cromatográfico de uma solução aquosa de extracto de <i>G. robertianum</i> (1 mg/mL) às 0 horas (cinza) e 6 horas (preto) de digestão por células Caco-2. 1: ácido sinápico glucuronado; 2/3/4: quercitrina, ácido elágico e ácido gálico; 5: cianidina.	64
Figura 30: Inibição de AChE pelo extracto de <i>G. robertianum</i> (1000 $\mu\text{g/mL}$), ao longo das 6 horas de digestão por células Caco-2 (ensaio realizado em triplicado, $P < 0,05$).	65
Figura 31: Actividade antioxidante do extracto de <i>G. robertianum</i> (10 $\mu\text{g/mL}$), ao longo das 6 horas de digestão por células Caco-2 (ensaio realizado em triplicado, $P < 0,05$).	65

- Figura 32: Perfil cromatográfico correspondente ao interior das células Caco-2, após 6 horas em contacto com o extracto de *G. robertianum* 10 mg/mL. 1: ácido sinápico glucuronado; 2/3/4: quercitrina, ácido elágico e ácido gálgico; 5: cianidina.66
- Figura 33: Espectro de absorção UV-Visível obtido para a cianidina encontrada no lisado celular, ao fim de 6 horas de ensaio.....67
- Figura 34: Perfil cromatográfico obtido para o extracto de *G. robertianum* (1 mg/mL) antes da acção de β -glucuronidase. 1: ácido sinápico glucuronado; 2/3/4: quercitrina, ácido elágico e ácido gálgico; 5: cianidina.68
- Figura 35: Perfil cromatográfico obtido para o extracto de *G. robertianum* (1 mg/mL) depois da acção de β -glucuronidase. 1: ácido sinápico glucuronado ausente; 2/3/4: quercitrina, ácido elágico e ácido gálgico; 5: cianidina.69
- Figura 36: Perfil cromatográfico obtido para a quercetina 400 mM após reacção de glucuronidação. Identificado com QG1, QG2 e QG3 estão os derivados de quercetina glucuronados.....72
- Figura 37: Espectros UV-Visível correspondentes à quercetina e seus derivados glucuronados.72
- Figura 38: Perfis cromatográficos obtidos para uma solução aquosa de *G. robertianum* 2mg/mL não sujeita a glucuronidação (preto) e sujeita a glucuronidação (cinza). 1: ácido sinápico glucuronado; 2/3/4: quercitrina, ácido elágico e ácido gálgico; 5: cianidina.73
- Figura 39: Perfis cromatográficos obtidos para soluções aquosas de *G. robertianum* 1 mg/mL desglucuronada (cinza) e reglucuronada (preto) por acção dos enzimas hepáticos. 1: ácido sinápico glucuronado; 2/3/4: quercitrina, ácido elágico e ácido gálgico; 5: cianidina.74
- Figura 40: Gráfico que ilustra o crescimento bacteriano (Abs_{630nm}) em função da concentração de extracto de *G. robertianum* adicionado ao meio de cultura (ensaio realizado em triplicado).....76
- Figura 41: Gráfico que ilustra o crescimento bacteriano (Abs_{630nm}) em função da concentração de extracto de *G. robertianum* adicionado ao meio de cultura (ensaio realizado em triplicado).....77
- Figura 42: Gráfico que traduz a % de inibição da formação do glucano insolúvel em água, às 18h de ensaio, em função da concentração de *G. robertianum* presente na mistura reaccional. Tendo em conta que a inibição do GTF é proporcional à inibição do glucano o IC_{50} corresponde à concentração de extracto para a qual à inibição de 50% da formação do glucano (ensaio realizado em triplicado).....78
- Figura 43: Gráfico que traduz a % de inibição da formação do glucano insolúvel em água, às 18h de ensaio, em função da concentração de *G. robertianum* presente na mistura reaccional. Tendo em conta que a inibição do GTF é proporcional à inibição do glucano o

IC ₅₀ corresponde à concentração de extracto para a qual à inibição de 50% da formação do glucano (ensaio realizado em triplicado).....	79
Figura 44: Diagrama esquemático do metabolismo de polifenóis no organismo. Fonte: adaptado de Spencer J. P. E. (2009).....	82

Índice de Tabelas

Tabela 1: Gradiente utilizado para as corridas de HPLC analíticas	28
Tabela 2: Gradiente utilizado para as corridas de HPLC preparativas.....	29
Tabela 3: Características do extracto aquoso de <i>G. robertianum</i>	48
Tabela 4: Tempos de retenção e máximos de absorção UV-Visível apresentados pelas 5 fracções maioritárias.....	50
Tabela 5: Actividades inibitória de AChE e antioxidante obtidas para os cinco picos maioritários, a partir de uma solução de 1000 µg/mL (AChE) e 10 µg/mL (antioxidante).....	51
Tabela 6: Razões m/z maioritárias, obtidas em modo positivo, para cada uma das fracções de <i>G. robertianum</i> estudadas e respectivos compostos e estruturas propostas.	55
Tabela 7: Percentagem de inibição do enzima AChE e extinção do radical livre DPPH ao longo das digestões pelos sucos digestivos artificiais e células Caco-2. As amostras utilizadas para a determinação da inibição enzimática e actividade antioxidante tinham concentrações de 1000 µg/mL e 10 µg/mL, respectivamente.	70
Tabela 8: Resumo das características antimicrobianas e inibitórias de GTF apresentadas pelo extracto aquoso de <i>G. robertianum</i>	79

Abreviaturas

Aβ	do inglês <i>amyloid β-protein</i>
Ach	do inglês <i>acetylcholine</i>
AChE	do inglês <i>acetylcholinesterase</i>
AChI	do inglês <i>acetylthiocholine iodide</i>
AD	do inglês <i>Alzheimer's Disease</i>
ANOVA	do inglês <i>Analysis of Variance</i>
APP	do inglês <i>amyloid β-protein precursor</i>
ApoE	Apolipoproteína E
ATP	do inglês <i>adenosine triphosphate</i>
BHI	do inglês <i>Brain Heart Infusion</i>
BHT	do inglês <i>Butylated hydroxytoluene</i>
BSA	do inglês <i>Bovine Serum Albumine</i>
BuChE	do inglês <i>butyrylcholinesterase</i>
ChAT	do inglês <i>choline acetyltransferase</i>
CRP	do inglês <i>C reactive protein</i>
DAD	do inglês <i>Diode Array Detector</i>
DMEM	do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle' Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	do inglês <i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i>
DTNB	do inglês <i>5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)</i> ou reagente de Ellman
EC	do inglês <i>Enzyme Comission Number</i>
EC₅₀	concentração correspondente a 50% de extinção do radical
ESI	do inglês <i>Electrospray Ionization</i>
FBS	do inglês <i>Foetal Bovine Serum</i>
FDA	do inglês <i>Food Drug Administration</i>
GC-MS	do inglês <i>Gas Cromatography – Mass Spectrometry</i>
GTF	glucosiltransferase
HBSS	do inglês <i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HPLC	do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IC₅₀	concentração correspondente a 50% de inibição do enzima
ICR	do inglês <i>Ion Cyclotron Resonance</i>
IFN-γ	do inglês <i>interferon – γ</i>

IL-1	interleucina-1
IL-6	interleucina-6
iNOS	do inglês <i>inducible nitric oxide synthase</i>
LPS	lipopolissacárido
MAP	do inglês <i>Microtubule-Associated Protein</i>
MIC	do inglês <i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
MTT	do inglês <i>Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide</i>
MS	do inglês <i>Mass Spectrometry</i>
m/z	razão massa/carga do ião
NFT	do inglês <i>neurofibrillary tangles</i>
nNOS	do inglês <i>neuronal nitric oxide synthase</i>
NO	do inglês <i>nitric oxide</i>
NSAIDs	do inglês <i>Non-steroidal anti-inflammatory drugs</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAPS	do inglês <i>3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate</i>
PBS	do inglês <i>Phosphates Buffer Solution</i>
Pen-Strep	Penicilina e Estreptomicina
PMSF	do inglês <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
PSEN 1/2	do inglês <i>presenilin proteins 1/2</i>
RNS	do inglês <i>reacting nitrogen species</i>
ROS	do inglês <i>reactive oxygen species</i>
RP-HPLC	do inglês <i>Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
TFA	do inglês <i>trifluoroacetic acid</i>
TNF- α	do inglês <i>tumour necrosis factor-α</i>
t _r	tempo de retenção
UA	unidades de absorvência
UDPGA	do inglês <i>UDP-glucuronic acid</i>
UV-Vis	Ultravioleta-visível

Capítulo I – Introdução

1. Fitoterapia e Doenças Neurodegenerativas

Na sociedade contemporânea, o número de pessoas que sofrem de demência e/ou outras doenças neurodegenerativas está a aumentar dramaticamente, devido ao prolongamento da esperança média de vida que gera uma população envelhecida. Uma dessas doenças neurodegenerativas, que afecta a maioria da referida população, é a Doença de Alzheimer (do inglês *Alzheimer's Disease*, AD), sendo que, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 35 milhões de pessoas deverão ser afectadas pela patologia até 2010. A AD caracteriza-se por uma elevada perda de memória e incapacidade de desempenhar múltiplas funções emocionais e cognitivas.

Antes do desenvolvimento da medicina moderna, era comum o recurso a medicamentos de origem natural, especialmente de origem vegetal, para o tratamento de doenças relacionadas com o Sistema Nervoso Central (SNC). Nas sociedades ocidentais, tem-se verificado um aumento do interesse na medicina natural, recorrendo-se a plantas com propriedades medicinais como fonte de tratamento (fitoterapia), por se achar que este tipo de tratamento é menos invasivo e propício a efeitos adversos, quando comparado com os tradicionais fármacos (Adams *et al.*, 2007).

É possível considerar a Europa como o local de nascimento da medicina ocidental moderna. Com a industrialização houve um claro desenvolvimento de fármacos, equipamentos hospitalares e instituições de cuidados de saúde, como hospitais e lares. Contudo, não se deve esquecer que existe uma grande tradição de fitoterapia, que data de há milhares de anos e que representava a principal estratégia terapêutica adoptada para o tratamento de inúmeras patologias.

Na Europa, entre as plantas estudadas como benéficas para o tratamento de doenças neurodegenerativas, encontra-se a *Salvia* sp. indicada para quem sofre de uma mente e memória fracas. Espécies de *Salvia* como a *Salvia officinalis* e *Salvia lavandulaefolia* parecem ter actividade colinérgica dupla, inibindo os enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE), bem como actividades nicotínica, antioxidante, anti-inflamatória, estrogénica e glutamérgica. Também espécies de *Melissa*, como *Melissa officinalis* (Lamiaceae), parecem ter uma excelente actividade colinérgica e espécies do género *Corydalis* (Papaveraceae), muito utilizado na Dinamarca, provaram possuir compostos alcalóides com elevado poder inibitório de AChE. Na Ásia, é possível encontrar descrições de inúmeras plantas utilizadas na Medicina Tradicional Chinesa para tratamento de patologias associadas ao SNC, sendo que muitas destas plantas e seus compostos bioactivos têm vindo a ser adoptados pela medicina ocidental (Adams *et al.*, 2007).

Na literatura há relatos de inúmeras plantas com elevado potencial inibitório de AChE (Barbosa Filho J.M. *et al.*, 2006; Mukherjee P.K. *et al.*, 2007) e, por isso, relevantes para o tratamento de doenças neurodegenerativas como a AD. Tendo em conta que esta patologia afecta uma cada vez maior percentagem da população, é de extrema importância continuar a investigação de

plantas utilizadas na medicina tradicional e cujos compostos bioactivos possam ser úteis na terapia associada à doença. O estudo do *Geranium robertianum*, pelo grupo de Radicais, Saúde e Nutrição, mostrou que esta planta parece possuir compostos bioactivos e actividades biológicas de interesse e relevantes para o tratamento sintomático da AD, pelo que a continuação do estudo das suas propriedades medicinais se tornou imperativo.

2. Revisão Bibliográfica do Género *Geranium*

2.1. Distribuição Geográfica

A erva de São Roberto ou *Geranium robertianum* é uma planta pertencente à família das Geraniaceae e que se encontra amplamente distribuída pela Europa, donde é originária. O *G. robertianum* encontra-se também noutras partes do mundo, como países asiáticos (Japão, China), Estados Unidos da América (EUA), países sul-americanos (Chile) e Nova Zelândia (Figura 1) (Tofts R.J., 2004).

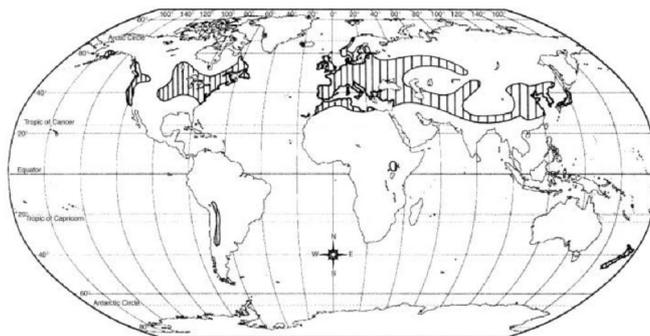


Figura 1: Distribuição mundial de *G. robertianum*. Fonte: Tofts R.J., 2004.

2.2. Estrutura e Fisiologia

2.2.1. Morfologia

As plantas que constituem a espécie *Geranium robertianum* apresentam várias diferenças morfológicas, como relativas ao grau de pilosidade, ao tipo de crescimento (erecto ou prostrado) e às partes florescentes. O *G. robertianum* é uma planta anual ou bianual, que pode atingir uma altura de 10-45 cm, com caules finos, avermelhados e glandulares que se ramificam com facilidade. Os pedúnculos alongados ramificam-se em dois ou três pés que, por sua vez, se ramificam também. As flores, de tonalidades rosadas, e compostas por cinco pétalas de diâmetro entre 1,5 – 2 cm, são pequenas e crescem duas por pedúnculo. As folhas, triangulares, têm 3 a 5 segmentos lobolados e, entre o final do Verão e início do Outono, adquirem uma tonalidade avermelhada (Figura 2).



Figura 2: Conjunto de fotografias que retratam a erva de São Roberto ou *Geranium robertianum*. **Fonte:** adaptado de <http://en.wikipedia.org> e <http://www.bioimages.org.uk>.

2.2.2. Dados Fisiológicos

O *Geranium robertianum* tem uma grande capacidade de adaptação a diferentes condições geográficas e, por isso, a ambientes com diferentes composições relativas ao tempo de exposição à luz solar, altitude, temperatura e nutrição. Existem vários relatos que mostram a capacidade do *G. robertianum* crescer em ambientes variados, sendo possível encontrá-lo em bosques, matos, rochas e até em paredes (*Compendium of Medicinal Plants*, National Institute of Industrial Research, Índia).

2.2.3. Caracterização Bioquímica

O *Geranium robertianum* é uma planta cuja composição bioquímica não está exaustivamente caracterizada. No entanto, é possível encontrar algumas referências quanto ao principal tipo de compostos que constituem esta planta.

Tofts, R.J. (2004) escreveu um artigo em que reúne alguma informação quanto à caracterização bioquímica do *G. robertianum*. Recorrendo a este artigo, é possível observar que a planta não contém alcalóides, a folhagem parece conter elevadas concentrações de iões como cálcio, sódio e ferro, sendo também rica em vitamina C. É ainda possível verificar que compostos polifenólicos, como quercetina, canferol, ácido elágico, ácido cafeico, ácido ferrúlico e ácido gálgico, foram identificados em *G. robertianum*, além de ácido málico e ácido acético. Nas partes aéreas de desta planta, identificaram-se inúmeros flavonóides, como quercitina-3-O-galactósido (isoquercitrina), quercitina-3-O-ramnogalactósido, quercitina-3-O-ramnoglucósido (glucoramnósido), quercitina-3-O-ramnósido (quercitrina), quercitina-3-O-rutinósido (rutina), quercitina-4'-O-glucósido, quercitina-7-O-glucósido (quercimeritrina), canferol-3-O-glucósido, canferol-3-O-ramnogalactósido e canferol-3-O-rutinósido. A juntar aos compostos referidos acima, foi igualmente identificado em *G. robertianum* um óleo essencial, taninas, e um

composto denominado *geraniin* (*Compendium of Medicinal Plants*, National Institute of Industrial Research, Índia).

Estudos recentes sobre *G. robertianum* originário da Geórgia, realizados por Kobakhidze, K. B. e Alaniya, M. D. (2004), permitiram identificar os ácidos elágico, cafeico, gálico e flavonóides como a hiperina (quercetina-3-galactósido), quercetina e canferol.

Finalmente, um estudo realizado por Ivancheva, S. e Petrova, A. (2005) na Bulgária sobre 11 espécies do género *Geranium*, entre elas o *G. robertianum*, permitiu identificar diversos flavonóides. No caso do *G. robertianum* identificou-se de novo o canferol e a quercetina mas também flavonóides como o canferol 3-metiléter, canferol 4'-metiléter, canferol 3,7,4'-trimetiléter e alguns flavonóides derivados da quercetina como a quercetina 3,7-dimetiléter, a quercetina 3,3'-dimetiléter e a quercetina 3,7,3'-trimetiléter. Outros flavonóides identificados foram o canferol 3-ramnósido, a quercitrina (quercetina 3-ramnósido) e a rutina (quercetina 3-rutinósido).

Relativamente à caracterização desta planta em Portugal, Amaral *et al.* (2009) procederam à caracterização do *G. robertianum*, adquirido numa Farmácia Homeopática de Lisboa, concluindo que os seus principais componentes são a acetovanilona, o ácido siríngico, a 3', 4' – dimetoxiflavona, o homoeriodictiol, o éster metílico de ácido ferrúlico, o éster etílico de ácido ferrúlico e o canferol.

Ainda que já haja alguma informação acerca do tipo de moléculas presentes nesta espécie vegetal é ainda importante uma caracterização completa do tipo e estrutura química dos compostos presentes na planta, bem como do seu comportamento durante o metabolismo, uma vez que esta é utilizada na medicina popular portuguesa.

2.3. Usos etnobotânicos de *Geranium robertianum*

São os pés em flor que se utilizam medicinalmente, preparando-se infusões, decoções e unguentos. As principais utilizações da erva de São Roberto são anti-hemorrágicas e diuréticas, existem também relatos do poder terapêutico desta planta no tratamento de distúrbios do sistema urinário, principalmente a nível dos rins e bexiga (*Compendium of Medicinal Plants*, National Institute of Industrial Research).

Especificamente é possível encontrar descrições de como na Irlanda a erva de São Roberto foi utilizada, no início, no tratamento de uma febre característica de gado bovino. Mais tarde, compreendeu-se que esta planta era também extremamente útil para humanos; na Irlanda é possível encontrar inúmeros registos que apontam para uma ampla utilização da erva de São Roberto, que varia de condado para condado. As utilizações são variadas, sendo possível encontrar referências a problemas renais, dores de costas, inflamações da garganta e tosses, hemorragias, dores reumáticas, entre outras. No Reino Unido existem registos de utilização de erva de São Roberto para doenças como gota e problemas de estômago, entre outros. Existem igualmente relatos de que os dois lados da folha da erva de São Roberto têm diferentes acções

terapêuticas: um permite a eliminação do tecido danificado e o outro alivia e cura o tecido (*Medicinal Plants in Folk Tradition: An Ethnobotany of Britain & Ireland*; David Elliston Allen, Gabrielle Hatfield).

Não se encontraram registos da utilização desta planta no tratamento sintomático de doenças relacionadas com o SNC. No entanto, foi possível verificar, por estudos realizados no grupo, que esta planta tem uma boa capacidade inibitória de acetilcolinesterase (do inglês *acetylcholinesterase*, AChE), o que pode vir a ser útil no tratamento sintomático da AD (resultados não publicados).

3. Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer é a causa mais comum de demência na população envelhecida e, de acordo com a OMS, afecta actualmente cerca de 18 milhões de pessoas. As estimativas apontam para que a maior percentagem de pessoas afectadas se encontre nos países desenvolvidos, devido ao aumento da esperança média de vida e ao conseqüente envelhecimento da população. Com efeito mais de 50% das pessoas que sofrem de AD vivem hoje nos países desenvolvidos e espera-se que, em 2025, esta percentagem aumente para 70%.

3.1. Epidemiologia e Factores de Risco

Tendo em conta a importância da AD nas sociedades ocidentais, têm sido realizados inúmeros estudos epidemiológicos, com o objectivo de identificar factores de risco e/ou contextos que permitam explicar a maior ou menor probabilidade de desenvolver AD. Para além do envelhecimento existem outros factores que parecem influenciar o desenvolvimento da patologia, sendo que muitos se relacionam com: uma diminuída capacidade de reserva do cérebro gerada por um tamanho reduzido do mesmo; baixo nível de escolaridade; tipo de ocupação profissional; baixa capacidade mental nos primeiros anos de vida; e reduzidas actividades mental e física nos anos de vida mais avançados (Blennow K. *et al.*, 2006).

Existem outros factores de risco associados a doenças vasculares, como hipercolesterolemia, hipertensão, aterosclerose, doenças cardíacas, consumo de tabaco, obesidade e diabetes. A dúvida que permanece, quando se fala destes factores de risco, é se a sua influência no desenvolvimento da patologia se faz potenciando os processos patogénicos típicos de AD, ou permitindo o desenvolvimento de patologias cerebrovasculares que, em paralelo com um desenvolvimento silencioso de AD, promovem o mais rápido desenvolvimento desta (Blennow K. *et al.*, 2006).

3.2. Genética

A AD é uma doença genética heterogénea, havendo uma forma familiar e uma forma esporádica.

A forma familiar de AD é uma doença autossómica dominante cuja manifestação acontece, tipicamente, antes dos 65 anos. A primeira mutação genética identificada correspondia ao gene que codifica para a proteína precursora amilóide (do inglês *amyloid precursor protein*, APP), que está localizado no cromossoma 21. Para além desta, foi possível identificar duas mutações em dois genes com elevado grau de homologia, a presenilina 1 (do inglês *presenilin 1*, PSEN 1) e a presenilina 2 (do inglês *presenilin 2*, PSEN2), e que estão presentes na maioria dos casos de AD familiar. No entanto, a forma familiar de AD é bastante rara, sendo a sua ocorrência <1% (Blennow K. *et al.*, 2006).

A forma esporádica de AD relaciona-se com o alelo $\epsilon 4$ da apolipoproteína E (ApoE). Dois grupos de investigação verificaram que este alelo influencia a idade de manifestação da doença. Modificações em cópias deste alelo levam a uma manifestação da doença 10 anos mais cedo que o esperado. O mecanismo molecular promotor da patologia não é ainda explícito: a ApoE é uma molécula transportadora de colesterol no cérebro, sendo a ApoE4 a variante menos eficiente na reutilização de lípidos membranares e reparação neuronal. Esta apolipoproteína parece ser essencial para a deposição de proteína β -amilóide (do inglês *amyloid- β protein*, A β), promovendo a formação de fibras e de placas A β , que provavelmente actuam como um chaperone patológico (Blennow K. *et al.*, 2006).

3.3. Patogénese

Ao observar um corte histológico do cérebro de um doente com AD é possível constatar a existência de lesões características, como placas senis e feixes neurofibrilares (NFTS), além de uma degeneração de neurónios e sinapses (figura 3).

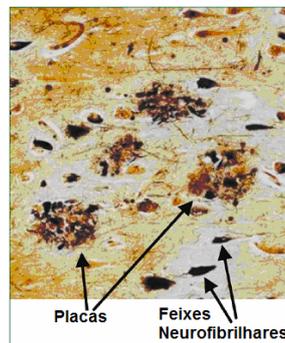


Figura 3: Placas e NFTs no córtex cerebral de um doente com AD. **Fonte:** adaptado de Blennow K. *et al.*, 2006.

Na literatura estão descritos vários mecanismos patogénicos para a formação das lesões características de AD. Entre os mecanismos encontram-se os que descrevem a agregação e deposição de A β , originando placas senis; hiperfosforilação da proteína tau, formando os NFTS; disfunção neurovascular e outros mecanismos, como ciclo celular disfuncional, processos inflamatórios, stress oxidativo e disfunções mitocondriais (Blennow K. *et al.*, 2006).

Uma das principais características de doentes com AD consiste no aumento da produção e acumulação de formas neurotóxicas de A β , devido a alterações no processamento proteolítico da proteína APP. A APP é produzida em todo o organismo, sendo que a quantidade de proteína produzida depende do desenvolvimento e estado fisiológico das células. A APP é uma proteína integral de membrana com um domínio transmembranar, uma grande porção N-terminal glicosilada e extracelular e uma curta porção C-terminal citoplasmática. A A β está localizada à superfície celular ou no lado luminal das membranas do retículo endoplasmático (do inglês *endoplasmic reticulum*, ER) e aparelho de Golgi, sendo que parte do péptido está embebido na membrana (Mattson M.P., 2004).

Inicialmente, pensou-se que a A β encontrada nas placas senis era uma proteína anormal. Estudos posteriores permitiram concluir que era produzida constitutivamente, durante o metabolismo celular normal, sendo formada a partir da clivagem da APP pelos enzimas β -secretase e γ -secretase. A A β torna-se tóxica pois, ao invés de ser degradada ou sofrer *clearance*, agrega-se, formando placas. Estudos realizados permitiram concluir que as sinapses são particularmente susceptíveis a efeitos adversos, provocados pela agregação de A β . Como exemplo, é possível destacar a desregulação dos transportadores sinápticos de iões e glucose, e estudos electrofisiológicos que mostram que a agregação de A β potencia uma desregulação da plasticidade sináptica. Para além destes factores, a agregação de A β pode promover danos neuronais, por indução de stress oxidativo e disrupção da homeostase celular do cálcio (figura 4) (Mattson M.P., 2004).

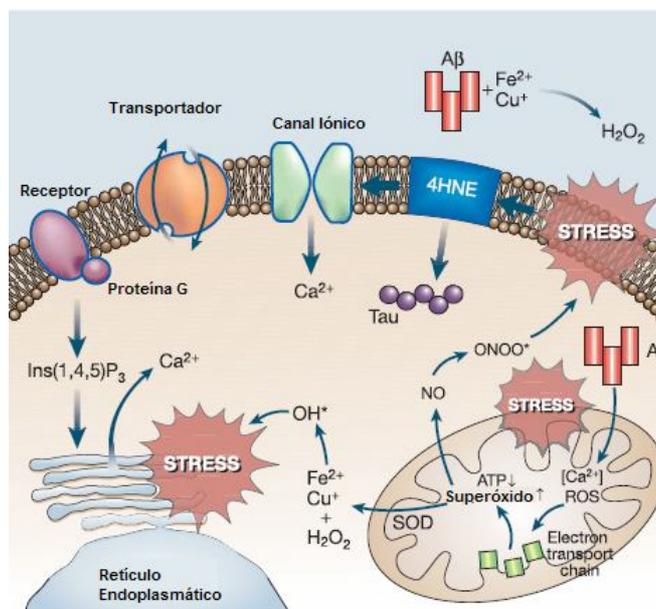


Figura 4: A acção neurotóxica de A β envolve a geração de espécies reactivas de oxigénio (do inglês *Reactive Oxygen Species*, ROS) e interrupção da homeostase do cálcio. **Fonte:** adaptado de Mattson M. P., 2004.

Quando ocorre agregação de A β , há stress oxidativo ao nível da membrana celular, promovendo-se a peroxidação lipídica e consequente geração de 4-hidroxinonenal (do inglês *4-hydroxynonenal*, 4HNE), um aldeído neurotóxico que modifica covalentemente proteínas nos resíduos de cisteína, lisina e histidina. Algumas das proteínas modificadas são transportadores membranares, receptores membranares, proteínas de ligação a GTP (proteína G) e canais iónicos. As modificações oxidativas da proteína tau, promovidas pelo 4HNE e outras espécies reactivas de oxigénio (do inglês *reactive oxygen species*, ROS), provocam a agregação desta mesma proteína, induzindo a formação de NFTs. A A β gera stress oxidativo mitocondrial e desregulação da homeostase do cálcio, resultando na diminuição da actividade da cadeia transportadora de electrões, produção aumentada de superóxido e diminuição da produção de ATP (do inglês *Adenosine Triphosphate*). O superóxido é convertido em peróxido de hidrogénio (H₂O₂) que reage com Fe²⁺ ou Cu⁺, produzindo o radical hidroxilo (OH[•]), um potente indutor de stress oxidativo, promotor de danos a nível do ER (Mattson M.P., 2004).

Ao mesmo tempo que se identificava a proteína A β como principal componente das placas senis, concluiu-se que o principal componente dos NFTs era a proteína tau hiperfosforilada. A proteína tau é uma MAP (do inglês *Microtubule-associated protein*), uma das principais proteínas associadas a microtúbulos presente num neurónio maduro. A função desta proteína é promover a agregação e correcto funcionamento dos microtúbulos e a sua actividade biológica depende do seu grau de fosforilação. Na AD e em outras patologias relacionadas com elas, globalmente denominadas tauopatias, a proteína tau encontra-se anormalmente hiperfosforilada e acumula-se no cérebro sob a forma de feixes intracelulares em que a proteína pode formar pares de filamentos helicoidais (do inglês *paired helical filaments*, PHF),

twisted ribbons e/ou estruturas filamentosas (Iqbal K. *et al.*, 2005). A hiperfosforilação de tau inicia-se intracelularmente, com a captação de proteínas tau normais e de outras MAPs, o que promove a desagregação dos microtúbulos e a consequente incapacidade de um transporte axonal eficiente, comprometendo, por isso, as funções sinápticas e neuronais (Blennow K. *et al.*, 2006).

Em suma, as principais características patológicas associadas à AD são a formação de placas senis ou placas β -amilóides e feixes neurofibrilares. Para além destas características existem outros factores que têm vindo a ser associados à patologia, como deficiências nas proteínas reguladoras do ciclo celular, processos de inflamação, stress oxidativo e perda de função mitocondrial, com consequente disrupção do metabolismo energético neuronal.

3.4. Acetilcolinesterase e AD

Para além das características genéticas e patogénicas associadas à AD, existe outra característica da patologia. A AD caracteriza-se por uma perda marcada de neurónios colinérgicos e respectivas projecções corticais. A função sináptica colinérgica parece ser especialmente afectada pela neurotoxicidade provocada pela formação de placas senis. Por sua vez, a perda de vesículas sinápticas nos terminais axónicos parece preceder a perda de neurónios colinérgicos. A deterioração progressiva da extensa e densa inervação colinérgica presente no córtex cerebral contribui para os claros distúrbios cognitivos e comportamentais, observados em doentes com AD. Esta perda acentuada de neurónios colinérgicos está associada a níveis diminuídos do neurotransmissor acetilcolina (do inglês *acetylcholine*, ACh), do enzima limitante na síntese de ACh, a colina acetiltransferase (do inglês *choline acetyltransferase*, ChAT) e do enzima responsável pela hidrólise de ACh, acetilcolinesterase (do inglês *acetylcholinesterase*, AChE, **E.C. 3.1.1.7.**). Paralelamente, os níveis cerebrais de um outro enzima responsável pela hidrólise de ACh, o butirilcolinesterase (do inglês *butyrylcholinesterase*, BuChE), mostram um aumento progressivo e significativo em doentes com AD (Lane R.M. *et al.*, 2006).

A acetilcolina é um neurotransmissor presente nas fendas sinápticas que é libertado em resposta à estimulação nervosa, ligando-se a receptores pós-sinápticos. Para ser inactivada, esta molécula sofre clivagem, numa reacção catalizada pela AChE, resultando uma molécula de colina e um grupo acetilo (Randall *et al.*, 2000). Em doentes com AD, os níveis de acetilcolina estão bastante diminuídos, o que indica uma actividade aumentada de AChE ou níveis diminuídos do neurotransmissor nas fendas sinápticas.

Estas observações permitiram a formulação de uma hipótese colinérgica da AD, em que se dá especial ênfase à deficiente neurotransmissão colinérgica, relacionando-a também com as duas principais características patogénicas de AD. Nitsch *et al.*, em 1992, concluíram que a transfecção de linhas celulares humanas com receptores muscarínicos (agentes colinérgicos) aumentava a actividade da via não-amiloidogénica, impedindo a formação de placas senis ou

placas β -amilóides. Também se verificou que era possível manipular o metabolismo da APP, recorrendo a agentes colinérgicos, tanto em cérebro humano, como em neurónios de cérebro fetal. Estas conclusões permitiram compreender a importância da modulação colinérgica do metabolismo da APP, como uma forma de evitar o desenvolvimento da patogénese.

Nas junções neuromusculares o processo de neurotransmissão – a libertação de ACh, difusão ao longo da fenda sináptica, interacção irreversível com o receptor de ACh nicotínico e, finalmente, a sua hidrólise pela AChE – ocorre em poucos milisegundos, o que implica que todo o processo tem de ser altamente regulado, tanto a nível espacial como temporal. Atendendo ao seu papel fisiológico, a AChE tem um elevado tempo de *turnover*, especialmente para uma hidrolase de serina, actuando a uma velocidade próxima da de difusão e promovendo a hidrólise rápida do substrato. Para além disto, a AChE ocorre em várias formas moleculares, diferindo na estrutura quaternária e modo de ancoragem à sinapse. O padrão de expressão de AChE varia de tecido para tecido, provavelmente para ir ao encontro das necessidades individuais dos diferentes tipos de sinapses.

Apesar do seu rápido modo de actuação, o centro activo deste enzima é de difícil acesso, localiza-se numa cavidade estreita e funda rodeada por 14 resíduos de aminoácidos conservados. O principal elemento da parte aniónica do centro activo não é um aglomerado de resíduos carregados negativamente mas um único resíduo – Trp84; para além deste, o principal elemento da parte periférica aniónica, na parte superior da cavidade, é o Trp279. O bolso acilo, responsável pela ligação do grupo acetilo da ACh, tem dois elementos principais – Phe288 e Phe290. A hidrólise é conseguida por uma tríade catalítica Glu237-His440-Ser200, semelhante à encontrada noutras hidrolases de serina. Finalmente, existe uma estrutura específica, responsável pela estabilização do estado de transição, e idêntica à encontrada noutras hidrolases de serina (figura 5) (Silman R. e Sussman J. L., 2005).

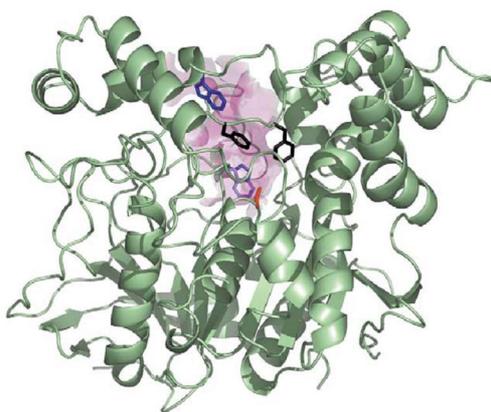


Figura 5: Estrutura 3D do acetilcolinesterase de *Torpedo californica*. Resíduos Trp84 e Trp279 a azul, Ser200 a vermelho e Phe288 e Phe290 a preto. **Fonte:** Silman, R. e Sussman, J. L., 2005

Como consequência do seu importante papel fisiológico, o enzima AChE é alvo de inúmeras toxinas de origem natural e fármacos sintéticos como alcalóides (p.ex.: galantamina e – (-) huperzina A)) e a toxina fasciculina. O enzima AChE é alvo de fármacos indicados para o tratamento de doenças neuromusculares e, no tratamento da AD, é o alvo escolhido para melhorar a deficiência colinérgica associada à patologia. Bloquear a hidrólise de ACh, através da inibição do enzima AChE, leva ao aumento da concentração do neurotransmissor e melhoria da função colinérgica. O tratamento de doentes com AD por meio de inibidores de AChE promove melhorias nos sintomas manifestados pelos mesmos, nomeadamente melhoria das funções cognitivas e comportamentais. Apesar de inúmeras estratégias terapêuticas terem sido já testadas, com a esperança de aumentar as funções colinérgica e cognitiva, a inibição de AChE tem sido a que tem mostrado mais efeitos benéficos para o doente.

3.5. Inflamação e AD

A inflamação é um processo complexo, espoletado em resposta a danos ou traumas, e caracterizado por rubor, calor, inchaço e dor. Este processo fisiológico envolve inúmeras células do sistema imunitário e mediadores. As células do sistema imunitário que participam neste processo são linfócitos, cuja constante recirculação assegura um aumento da probabilidade de encontrar o antigénio específico, e neutrófilos, primeiras células do sistema imunitário que migram para o local da inflamação. Dentro dos mediadores envolvidos na resposta inflamatória destacam-se: quimiocinas, moléculas quimioattractoras e activadoras da extravasão de leucócitos; mediadores enzimáticos plasmáticos, como a bradicinina e fibrinopéptidos, responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular; e citocinas (IL-1, interleucina-1, IL-6, interleucina-6 e TNF- α , *tumour necrosis factor- α*) responsáveis pela mediação de muitas das características locais e sistémicas da resposta inflamatória aguda.

Em doentes com AD foi possível identificar a inflamação cerebral como uma característica recorrente. No entanto, esta inflamação não apresenta as características acima referidas, sendo definida como inflamação crónica. A inflamação a que estão sujeitos os doentes com AD caracteriza-se pela presença de elevadas quantidades de monócitos e células da micróglia, típicas do SNC.

Em doentes com AD o aumento da vulnerabilidade do tecido cerebral promove os processos inflamatórios, o que é comprovado pela expressão aumentada de proteínas inflamatórias como factores do complemento, proteínas de fase aguda e citocinas pró-inflamatórias. São as células da micróglia, os macrófagos residentes no SNC (astrócitos e neurónios), as responsáveis pela produção de mediadores inflamatórios como a IL-1, a IL-6 e TNF- α , bem como outras moléculas promotoras da resposta inflamatória (prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, factores de coagulação, espécies reactivas de oxigénio – ROS, proteína reactiva-C, etc.). Vários estudos recentes, em que se administravam fármacos anti-inflamatórios a doentes com AD, apontam para uma cada vez mais provável correlação entre inflamação e neurodegeneração (Stuchbury, G. e Münch, G., 2005).

Vários investigadores sugerem que a inflamação pode ser induzida pelas características patogénicas da doença, ou seja, pela proteína A β encontrada nas placas senis e pela proteína tau hiperfosforilada encontrada nos feixes neurofibrilares. Acredita-se que estas características patogénicas promovem a activação de células da glia para produzirem citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1, IL-6) e proteínas de inflamação reactivas (proteína C-reativa, CRP). Os níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias e CRP vão, posteriormente, estimular a células da glia, de forma autócrina ou parácrina, para que estas produzam mais proteína A β , proteína tau e moléculas pró-inflamatórias. Assim, agravam-se as características patogénicas, resultando numa neurodegeneração (Kramer, A. R. *et al.*, 2008).

Atendendo ao papel desempenhado pela inflamação no desenvolvimento da AD, é possível pensar na administração de fármacos anti-inflamatórios, tradicionalmente utilizados no tratamento de outras patologias, para conseguir uma terapia anti-inflamatória eficiente. Existem já alguns ensaios clínicos em que se comprovou a eficácia do uso de anti-inflamatórios não esteróides (NSAIDs) ou estatinas no combate à inflamação, mas mais estudos são necessários (Vasto, S. *et al.*, 2008). Das inúmeras terapias anti-inflamatórias conhecidas, a utilização de antioxidantes está algo divulgada, sendo também necessária mais investigação. Os antioxidantes neutralizam as ROS extracelulares e, dependendo da permeabilidade membranar, ROS intracelulares, evitando que estas moléculas provoquem danos celulares ou actuem como segundos mensageiros no processo inflamatório. Ao neutralizar as ROS, os antioxidantes evitam a activação de factores de transcrição potencialmente citotóxicos para as células. Estudos realizados até à data deixam dúvidas quanto à correlação entre administração de antioxidantes e risco reduzido de AD. No entanto, é necessária mais investigação pois, se estas moléculas forem eficientes no tratamento sintomático de AD, representam um tratamento de reduzida toxicidade para o doente e, por estarem amplamente distribuídas na Natureza, são mais fáceis de isolar e obter em elevadas quantidades.

O *G. robertianum* parece ser constituído maioritariamente por polifenóis, que serão caracterizados posteriormente (4.), cujo poder antioxidante é relevante, bem como a sua baixa toxicidade para o organismo. Por reunirem estas duas características, os compostos presentes nesta planta podem vir a representar uma alternativa para o tratamento sintomático de AD, desde que administrados em quantidades moderadamente elevadas.

3.6. Tratamento

O conhecimento das deficiências no processo de neurotransmissão, típicos de AD, levou ao desenvolvimento de fármacos cujo objectivo é aliviar os sintomas manifestados pelos doentes e que estão associados ao processo de neurotransmissão. A FDA (*Food and Drug Administration*), entidade norte-americana responsável pela fiscalização da segurança e eficiência de fármacos, produtos biológicos e dispositivos médicos, aprovou, desde 1993, diversos fármacos cujo objectivo é melhorar os processos de neurotransmissão e os distúrbios cognitivos e comportamentais observados. Entre eles destacam-se os inibidores de AChE. O

avanço na investigação da patogénese molecular de AD permitiu desenvolver outro tipo de fármacos cuja finalidade é modificar as características patogénicas da doença e que estão em fase de ensaios clínicos. Os dados epidemiológicos permitiram sugerir outros fármacos, alguns dos quais foram testados em ensaios aleatórios. Finalmente, existem evidências de que adoptar um estilo de vida e dieta saudáveis, bem como um estímulo intelectual constante, podem contribuir para a prevenção de AD ou para uma progressão mais lenta da patologia.

Inibidores de Acetilcolinesterase

Atendendo à hipótese colinérgica, foi desenvolvida uma estratégia terapêutica que consiste no aumento da disponibilidade de ACh, através da inibição de AChE. Os inibidores de colinesterase podem ser classificados de acordo com a sua eficácia farmacológica, sendo possível distinguir inibidores de colinesterase não selectivos (inibem de igual modo AChE e BuChE) e inibidores mais selectivos para AChE (inibem AChE em concentrações inferiores às necessárias para inibir BuChE). Para além desta é possível a classificação dos inibidores de acordo com o modo bioquímico de inibição: inibidores reversíveis (donepezil, galantamina), inibidores pseudo-irreversíveis (rivastigmina) e inibidores irreversíveis (organofosfatos) (Ibach B. e Haen E., 2004).

Os inibidores de AChE aprovados para uso clínico são o donepezil, rivastigmina e galantamina (figura 6). Os inibidores donepezil e galantamina são inibidores selectivos de AChE. A rivastigmina inibe os dois enzimas responsáveis pela hidrólise de ACh, AChE e BuChE, com uma afinidade semelhante. A galantamina apresenta uma característica importante e que é a capacidade de modular aloesticamente os receptores pré-sinápticos nicotínicos.

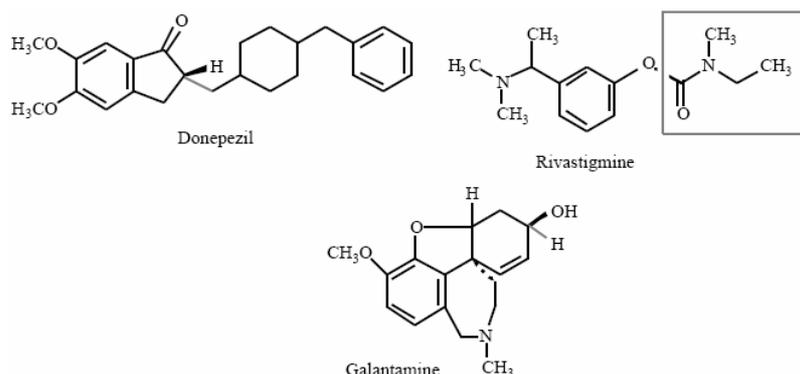


Figura 6: Inibidores de AChE utilizados na terapêutica de AD. **Fonte:** Adaptado de Ibach B. e Haen E., 2004.

O donepezil e a galantamina são metabolizados por enzimas hepáticos do citocromo P450, podendo interagir com fármacos indicados para a inibição desses mesmos enzimas, o que promove efeitos adversos. A rivastigmina tem um metabolismo não-hepático, levando a que

interacções com outros medicamentos sejam raras. O tempo de meia vida destes fármacos varia (máximo de 100h, mínimo de 1h), implicando a toma de uma ou mais doses por dia. A sua eficácia tem sido testada através de inúmeros ensaios clínicos, pelo que é possível concluir que não existem grandes diferenças entre os inibidores de AChE.

Tendo em conta o mecanismo de acção dos inibidores de AChE, não se espera uma inibição da progressão da AD, mas sim um alívio de alguns dos sintomas manifestados, como os distúrbios cognitivos.

Quanto aos efeitos secundários associados aos fármacos destacam-se efeitos a nível gastrointestinal, como náuseas, vómitos e diarreia. Os efeitos secundários parecem ser possíveis de diminuir, caso se inicie o tratamento com baixas doses de inibidor, aumentando-as de forma gradual ou, alternativamente, se a toma dos fármacos for feita em conjunto com uma refeição.

Outras estratégias terapêuticas, cujo objectivo é o aumento da neurotransmissão colinérgica, consistem na administração de colina, lecitina, agonistas dos receptores muscarínicos (M1), nicotina ou agonistas da nicotina. Estas estratégias têm sido úteis no aumento da memória e atenção em indivíduos jovens, mas mostraram-se ineficazes em doentes com AD (Blennow K. *et al.*, 2006).

Actualmente, as terapias mais comuns e aprovadas para o tratamento de AD são as que têm como objectivo melhorar os sintomas apresentados pelos doentes, sendo os fármacos mais utilizados os inibidores de AChE. Ainda que estes fármacos melhorem, a curto prazo, as capacidades cognitivas dos doentes não impedem a progressão da doença. Assim, é essencial explorar novas terapias e novos alvos terapêuticos, tais como a inibição da formação de placas senis ou β -amilóides, actuando a nível da proteína A β ; e inibição da formação de NFTs, actuando a nível da fosforilação da proteína tau; outras abordagens incluem terapia génica, através da modulação da expressão dos genes envolvidos na patologia.

4. Actividades Biológicas dos Polifenóis

Os polifenóis, que se pensa serem os principais constituintes do *Geranium robertianum*, caracterizam-se por serem os compostos mais ricos em antioxidantes presentes na dieta. De facto, é possível encontrá-los em elevadas quantidades em frutos, vegetais, bebidas (chá, vinho e sumos), plantas e algumas ervas aromáticas. Apesar da sua ampla distribuição, a investigação dos seus efeitos benéficos na saúde teve início apenas na década de 90 do século XX. Os polifenóis têm despertado o interesse de consumidores e produtores devido aos inúmeros estudos epidemiológicos que associam o seu consumo à prevenção de doenças crónicas. Para além disto, a investigação dos efeitos neuroprotectivos associados ao consumo de polifenóis tem aumentado consideravelmente, concluindo-se que estes compostos têm capacidade de proteger células neuronais em modelos *in vivo* e *in vitro*, através de diferentes alvos intracelulares (Singh, M. *et al.*, 2008).

4.1. Classificação Estrutural e Absorção

Os polifenóis são metabolitos secundários presentes em plantas e que têm um papel essencial na fisiologia das mesmas, contribuindo para a sua pigmentação, crescimento, reprodução e resistência a patógenos e predadores. Cerca de 10 000 compostos fenólicos de origem vegetal foram identificados, desde moléculas simples a compostos altamente polimerizados. Dos compostos fenólicos e polifenóis, os flavonóides são o principal grupo, tendo sido, até à data, identificados cerca de 2000 flavonóides simples. Os flavonóides podem ser divididos em várias classes, tendo em conta a sua estrutura molecular (figura 7). Assim, é possível distinguir antocianinas, pigmentos hidrossolúveis responsáveis pela pigmentação de flores e frutos; e antoxantinas, pigmentos desprovidos de cor. Este último grupo de flavonóides pode ser dividido em flavonóis, flavanas, flavanóis, flavonas e isoflavonas (Ramassamy C., 2006 e Rossi L. *et al.*, 2008).

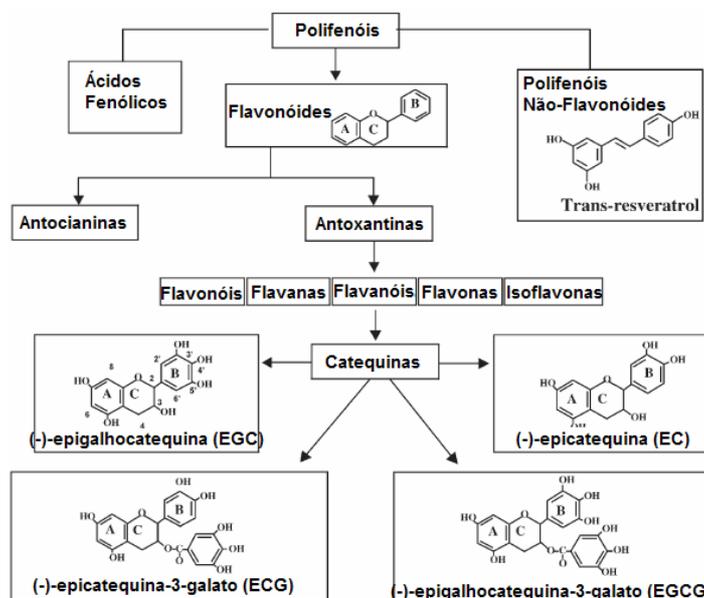


Figura 7: Classificação e estrutura de polifenóis. **Fonte:** Adaptado de Ramassamy, C., 2006.

Os polifenóis de origem natural encontram-se, na maioria das vezes, conjugados com um ou mais açúcares, geralmente ligados aos grupos hidroxilos. Estas glicosilações são responsáveis pela alteração das propriedades físicas, químicas e biológicas dos polifenóis simples, determinando a absorção pelo intestino delgado. A absorção pelo intestino delgado depende também do tamanho molecular, grau de polimerização (formação de taninas), ligação a proteínas ou fibras alimentares e solubilidade. No intestino, os polifenóis estão sujeitos à acção dos enzimas digestivos α -amilase, glicosidasas e proteases, que promovem a sua degradação. No entanto existem polifenóis cujas características, por exemplo elevado peso molecular, impedem a acção dos enzimas digestivos promovendo uma fraca absorção dos mesmos. A

administração oral de polifenóis pode levar a que a disponibilidade dos mesmos na circulação sistémica seja bastante reduzida, uma vez que a maioria dos polifenóis sofre metabolização pelos enzimas digestivos, gerando metabolitos secundários cujas propriedades terapêuticas são bastante diminuídas. Finalmente, a absorção de polifenóis pelo epitélio gastrointestinal promove a biotransformação pelos enzimas hepáticos, havendo metilação e/ou conjugação com ácido glucurónico e/ou sulfato. Estes aspectos são de extrema importância quando se pretende estudar a presença de polifenóis no cérebro, após ingestão oral, uma vez que a metabolização pode alterar as características e propriedades destas moléculas permitindo, ou não, a passagem da circulação sistémica para o cérebro, através da transposição da barreira hemato-encefálica.

A relevância dos polifenóis no tratamento de doenças neurodegenerativas e protecção do cérebro envelhecido torna-se importante se houver uma permeação eficiente da barreira hemato-encefálica, que tem como função o controlo estrito do influxo de metabolitos, nutrientes e fármacos para o cérebro. Estudos acerca desta capacidade dos polifenóis são ainda escassos, havendo algumas evidências de que, por exemplo, as catequinas existentes no chá verde podem ser encontradas em cérebro de ratinho, após administração oral. Também flavonóides presentes em citrinos, como naringenina e hesperidina, conseguem atravessar a barreira hemato-encefálica; no entanto, os seus conjugados com ácido glucurónico e glicósidos já não atravessam esta barreira de forma eficiente. É necessária mais investigação acerca da permeabilidade da barreira hemato-encefálica aos polifenóis para uma melhor compreensão da possibilidade de administração de polifenóis e de quais os metabolitos que realmente promovem uma melhoria de sintomas, *in vivo* (Rossi L., *et al.* 2008).

4.2. Stress Oxidativo e Doenças Neurodegenerativas

Tal como foi descrito anteriormente, a AD é a mais comum forma de demência senil, afectando uma elevada percentagem da população envelhecida e sendo caracterizada por uma progressiva perda de memória e incapacidade cognitiva. Existem inúmeras evidências que sugerem que o stress oxidativo, induzido por espécies reactivas de oxigénio (ROS) ou por espécies reactivas de azoto (RNS), está envolvido no declínio cognitivo e perda neuronal, típicos de AD.

As ROS (peróxido de hidrogénio – H_2O_2 ou o anião superóxido – O_2^-) são moléculas intermediárias na redução do oxigénio molecular a água, pelo que constituem produtos inevitáveis em inúmeros processos celulares aeróbios como a cadeia transportadora de electrões em mitocôndrios. Em comparação com outros tecidos, o cérebro tem uma elevada probabilidade de formar ROS, uma vez que consome mais 20% de oxigénio que todos os órgãos durante a respiração mitocondrial. As ROS são extremamente nocivas para as macromoléculas, e podem reagir entre si na presença de iões metálicos como cobre e ferro, originando o radical hidroxilo, OH^\bullet . No cérebro, as ROS aumentam a expressão do enzima sintase de óxido nítrico indutível (iNOS) e a acção da NOS neuronal constitutiva (nNOS),

promovendo a formação do radical óxido nítrico (NO). Este radical é precursor de outras RNS, também elas promotoras de deficiências neuronais. Quando há produção de ROS e RNS em excesso, pode ocorrer oxidação de lípidos de membrana polinsaturados, proteínas e ácidos nucleicos, destruindo as suas estruturas. Alterações estruturais nestas macromoléculas impedem o desempenho das suas funções, interferindo com o correcto metabolismo celular, num processo denominado stress (Rossi L., *et al.* 2008).

O stress oxidativo é reparado, em sistemas biológicos, por uma gama de antioxidantes endógenos como enzimas (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) e compostos de baixo peso molecular (glutathione). O cérebro tem níveis relativamente baixos de enzimas antioxidantes e, durante o envelhecimento, torna-se progressivamente mais susceptível a stress oxidativo, devido à acumulação de metais de transição com poder redox e a alterações na expressão de genes codificantes para enzimas antioxidantes. Assim, com o envelhecimento, há acumulação de macromoléculas com danos oxidativos, sendo um dos principais contributos para o processo de envelhecimento e desenvolvimento de doenças associadas à idade, de que é exemplo a AD (Rossi L., *et al.* 2008).

Outro fenómeno, aparentemente associado ao envelhecimento e neurodegeneração, é a inflamação, tal como já foi referido anteriormente. Este processo também se relaciona com a produção de ROS, as quais actuam como moléculas sinalizadoras responsáveis pela activação de várias cascatas de sinalização e, conseqüente, indução da expressão de genes inflamatórios. A inflamação é uma característica comum dos cérebros envelhecidos, envolvendo a activação da microglia e astrócitos, sendo que a neuroinflamação promovida por stress oxidativo está associada a AD.

Tendo em conta o papel dos alimentos ricos em antioxidantes na diminuição das ROS e RNS em circulação, é cada vez mais aceite que uma dieta rica neste tipo de produtos promove a diminuição da quantidade de espécies radicalares em circulação. Assim, a capacidade de captar radicais livres e até de quelatação de metais, por parte de moléculas antioxidantes, torna-as extremamente importantes e leva a que cada vez mais os especialistas recorram a alimentos ricos nestas moléculas, muitas vezes denominados alimentos funcionais, como complemento a uma vida saudável.

Existem cada vez mais evidências que apontam para que o estilo de vida saudável, e em especial a dieta seguida, pode ser o ponto-chave na prevenção de danos oxidativos, que contribuem para o desenvolvimento de inúmeras patologias, como doenças cardiovasculares, cancro e doenças neurodegenerativas. Hoje em dia, muitas plantas e frutos são considerados alimentos funcionais uma vez que o seu consumo regular pode proteger o organismo do aparecimento ou progressão de certas patologias.

4.3. Propriedades Inibitórias de Acetilcolinesterase de Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos, presentes em quantidades consideráveis em espécies vegetais, são também responsáveis pela inibição do enzima AChE. Deste modo, semelhante tipo de compostos pode representar uma alternativa aos habituais fármacos de origem química, tradicionalmente utilizados no tratamento sintomático da AD.

Uma pesquisa mais pormenorizada permitiu recolher alguma informação relativamente a estudos de inibição de AChE, realizados com inúmeras espécies vegetais. Em 2003, Ingkaninan *et al.*, analisaram a capacidade inibitória de acetilcolinesterase de 32 plantas utilizadas na medicina tradicional tailandesa como remédios rejuvenescedores e neurotónicos. Os investigadores concluíram que uma concentração de 0,1 mg/mL de extractos metanólicos de raízes de *Stephania suberosa* Forman. e *Tabernaemontana divaricata* L. inibia em 90% a actividade de AChE, o que mostra que os seus constituintes, entre eles compostos fenólicos, inibem de forma significativa o enzima. Também Vinutha *et al.*, em 2007, estudaram a inibição de AChE por 76 extractos metanólicos e aquosos de plantas medicinais indianas. Os seus resultados permitiram verificar que extractos metanólicos tendem a ser mais activos que os aquosos, os valores de IC₅₀ obtidos são bastante aceitáveis e mostram, mais uma vez, que as moléculas que existem nestas plantas, entre eles compostos fenólicos, inibem de forma razoável o enzima, sendo adequados para a melhoria da função cognitiva.

Assim, é expectável que os compostos fenólicos, através do seu elevado poder antioxidante e actividade inibitória de AChE, podem constituir uma alternativa eficaz na melhoria da função cognitiva, extremamente deteriorada em pacientes com AD, e na diminuição da inflamação do cérebro, associada a estas patologias.

4.4. Propriedades Antioxidantes de Compostos Fenólicos

Como já foi referido, os polifenóis, que existem em abundância em alguns alimentos funcionais como frutas, legumes e bebidas, como chá, vinho e sumos de frutas, mostraram possuir actividade antioxidante, quelante e actividade anti-inflamatória, tendo sido recomendada a sua ingestão para protecção do cérebro.

O poder antioxidante, apresentado por estas moléculas, parece estar relacionado com o número de grupos hidroxilo presentes nos anéis aromáticos A e B e com a presença de uma ligação dupla C2-C3 (figura 8). Já foi possível concluir que um maior poder antioxidante parece estar relacionado com a presença de 3 a 6 grupos hidroxilo. O mecanismo antioxidante baseia-se na doação de um átomo de hidrogénio e na formação de um radical fenoxil, que sofre estabilização por libertação de hidrogénio ou reacção com outro radical (Gomes A. *et al.*, 2008).

A actividade quelante, apresentada por certos polifenóis, permite a quelatação de metais de transição com poder redox, como ferro e cobre. Esta característica depende da presença de grupos carboxílicos ou hidroxílicos e, indirectamente, contribui para o poder antioxidante

apresentado, uma vez que a quelatação de metais impede a sua participação como catalisadores, em reacções de formação de radicais (Gomes A. *et al.*, 2008).

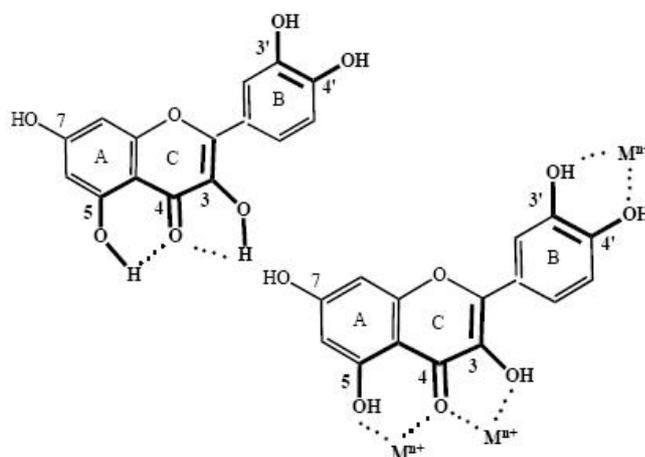


Figura 8: Características estruturais típicas de flavonóides (a negrito) promotoras da neutralização efectiva de radicais livres e quelatação de metais. **Fonte:** Adaptado de Gomes, A *et al.*, 2008.

Estudos epidemiológicos sugerem que os polifenóis de origem vegetal têm uma elevada eficiência como agentes neuroprotectores, quando comparados com suplementos vitamínicos equivalentes. Ensaio clínico realizados mostram que a administração de polifenóis ricos em poder antioxidante pode representar uma estratégia promissora no tratamento de AD. No entanto, é necessária mais investigação e ensaios clínicos para comprovar a sua eficiência. Tendo em conta a baixa toxicidade e grande variedade de fontes de antioxidantes, a administração destas moléculas pode não só desempenhar um papel no tratamento de AD mas também representar uma alternativa viável para doentes aos quais não podem ser administrados fármacos sintéticos, devido aos efeitos secundários nocivos.

4.5. Propriedades Anti-cariogénicas de Compostos Fenólicos

Paralelamente a uma possível utilização do *G. robertianum* no alívio dos sintomas associados a AD, graças a uma presença elevada de polifenóis, esta planta pode vir ainda a desempenhar um papel importante na prevenção de doenças orais.

As cáries dentárias e doenças periodonticas são as mais comuns doenças infecciosas transmissíveis. O grupo mutans de streptococci orais é constituído por sete estirpes bacterianas: *Streptococcus cricetus*, *S. rattus*, *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. downei*, *S. macacae* e *S. ferus*. As cáries dentárias são promovidas maioritariamente por duas estirpes bacterianas, *S. mutans* e *S. sobrinus*, que se encontram à superfície do dente, sendo que estudos epidemiológicos mostraram uma maior presença de *S. mutans* em placas dentárias (Igarashi T., *et al.*, 2000).

Estes microrganismos, classificados como os agentes etiológicos primários na formação da placa bacteriana, promovem a sua formação em duas fases: ligação inicial e reversível da célula bacteriana à superfície do dente e posterior adesão irreversível e dependente de sacarose. A glucosiltransferase é o enzima responsável pela segunda fase do processo, utilizando a sacarose como substrato e formando frutose (resíduos de glucose com ligações $\alpha(1-3)$) e glucano (resíduos de glucose com ligações $\alpha(1-6)$) (Tsai *et al.*, 2007).

Um dos mais importantes factores de virulência é a capacidade destas estirpes produzirem glucosiltransferases (GTFs), enzimas capazes de sintetizar glucano insolúvel em água, a partir de sacarose. A síntese de glucano permite a adesão firme das bactérias à superfície do dente, promovendo a formação da placa dentária. Outro factor de virulência, essencial para o desenvolvimento da cárie dentária, é a tolerância destas estirpes bacterianas ao ambiente ácido que as rodeia, promovido pela formação de produtos ácidos durante o metabolismo de hidratos de carbono da dieta. Assim, uma estratégia eficaz para a prevenção de cáries dentárias deveria consistir num controlo eficaz do crescimento e virulência típicos de *S. mutans* e *S. sobrinus* (Song, J. *et al.*, 2006).

O tratamento actual para esta doença infecciosa consiste na redução e/ou eliminação das colónias bacterianas à superfície dos dentes ou entre estes, através da escovagem diária e limpezas de dentes frequentes. Existem vários agentes anti-sépticos utilizados na inibição do crescimento bacteriano, como a Clorexidina ®; no entanto, estes agentes promovem diversos efeitos adversos como vómitos, diarreia, bem como a promoção de desequilíbrios na flora oral e intestinal. Para além disto, têm-se desenvolvido várias estirpes resistentes a agentes antimicrobianos, o que justifica a investigação crescente de novos agentes deste tipo, de origem natural, específicos para os patogénios orais e inofensivos para o hospedeiro (Alviano W. *et al.*, 2008 e Chung *et al.*, 2006).

As plantas utilizadas na medicina tradicional têm-se mostrado uma fonte promissora de compostos com actividade antimicrobiana. Desde muito cedo na história mundial que as populações utilizam produtos de origem natural na higiene dentária, nomeadamente na prevenção de cáries e deterioração dos dentes. As doenças orais caracterizam-se por um desequilíbrio entre espécies oxidantes (ROS) e antioxidantes pois, durante a infecção, há um aumento na produção das ROS, que não é de todo acompanhado pela quantidade de antioxidantes presentes na saliva. Este desequilíbrio pode promover a destruição de tecidos e o aumento da infecção. As plantas medicinais, devido a uma composição rica em antioxidantes, podem ter um papel importante na prevenção das cáries dentárias, uma vez que promovem o equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, evitando o aumento da infecção.

Existem vários exemplos de plantas medicinais utilizadas. Um desses exemplos é o da planta *Rosmarinus officinalis L.*, uma especiaria e planta medicinal muito utilizada em todo o mundo e que, devido a uma composição rica em antioxidantes, mostra ter uma boa actividade antimicrobiana, promovendo a prevenção de cáries dentárias. Esta planta gera uma eficiente

inibição do crescimento de *S. mutans* e *S. sobrinus*, inibindo também a actividade dos enzimas GTF (Tsai P. *et al.*, 2007).

Outras substâncias, como a própolis, produto acastanhado e resinoso produzido por abelhas (*Apis mellifera*), também já provaram ser eficiente na inibição do crescimento bacteriano. A própolis é produzida pelas abelhas a partir da cera secretada e recorrendo à vegetação que rodeia a colmeia. Esta substância permite a formação dos favos que consituem a colmeia e contribui para as condições de assepsia da mesma. Ainda que a composição química da própolis varie com o ambiente em que se situa a colmeia, foram já identificados vários polifenóis, nomeadamente flavonóides, responsáveis por uma eficiente actividade microbiana em relação aos *Streptococci* atrás referidos (Uzel *et al.*, 2005).

As cáries dentárias e a placa dentária são doenças infecciosas que podem, caso não sejam tratadas atempadamente, promover o desenvolvimento de um processo inflamatório. Tal como já foi dito anteriormente, a inflamação é uma característica de AD e parece promover a neurodegeneração. Caso as cáries dentárias não sejam tratadas e se desenvolva uma inflamação, é possível pensar numa passagem dos factores pró-inflamatórios através da barreira hemato-encefálica e a promoção da inflamação a nível cerebral, o que potencia este processo fisiológico em cérebros de pacientes com AD ou com especial predisposição para tal tipo de doenças neurodegenerativas. Assim, é extremamente útil e urgente encontrar agentes antimicrobianos capazes de prevenir as doenças orais e, deste modo, diminuir a probabilidade de um processo inflamatório generalizado.

Particularmente no caso da medicina dentária, vários estudos apontam para uma possível utilização de plantas medicinais e outras substâncias de origem natural, como medidas preventivas de doenças orais, em especial doenças relacionadas com placa dentária, por exemplo as cáries dentárias. Por conseguinte, é de especial interesse verificar se o *Geranium robertianum* também actua eficazmente na prevenção destas e formação de placa microbiana.

5. Objectivos

A erva de São Roberto, ou *Geranium robertianum*, é uma planta utilizada na medicina popular portuguesa; no entanto, são ainda desconhecidos quais os principais componentes que a constituem e se algum deles pode representar um composto bioactivo de interesse terapêutico, principalmente no tratamento de doenças neurodegenerativas como a AD.

O trabalho experimental que se apresenta teve como principal objectivo a determinação das actividades biológicas de *G. robertianum* que possam ser relevantes na terapêutica da AD. Outro dos principais objectivos foi a identificação do tipo e estrutura de compostos presentes nesta planta e a determinação das actividades biológicas de cada um deles, para concluir se existe um composto responsável pelas actividades biológicas de todo o extracto aquoso. Outro objectivo consistiu no estudo do metabolismo gastrointestinal e hepático do extracto aquoso de *G. robertianum*, de forma a verificar se havia alterações na constituição do mesmo, bem como nas actividades biológicas de maior relevância. Paralelamente, analisou-se a possibilidade de aplicação do extracto aquoso de *G. robertianum* na prevenção das cáries dentárias e na inibição da formação da placa dentária.

Em resumo, para cumprir os objectivos propostos, fizeram-se os seguintes estudos:

- **Determinação das actividades biológicas do extracto aquoso de *G. robertianum*:** capacidade inibitória de acetilcolinesterase, actividade antioxidante;
- **Identificação do tipo e estrutura dos compostos presentes no extracto aquoso de *G. robertianum*:** quantificação dos compostos fenólicos totais, análise do extracto por HPLC e identificação das fracções maioritárias, identificação por MS da estrutura química dos compostos presentes nas fracções maioritárias;
- **Determinação das actividades biológicas de cada fracção maioritária:** capacidade inibitória de AChE e actividade antioxidante;
- **Metabolismo gastrointestinal *in vitro* do extracto aquoso de *G. robertianum*:** digestão pelo suco gástrico, pancreático, células Caco-2 e β -glucuronidase de *E. coli*. As alterações no extracto aquoso foram monitorizadas através dos perfis cromatográficos obtidos por HPLC;
- **Determinação das actividades biológicas do extracto durante o metabolismo gastrointestinal:** capacidade inibitória de AChE e actividade antioxidante;
- **Metabolismo Hepático – reacção de Fase II:** glucuronidação de *G. robertianum* e monitorização das alterações observadas pelos perfis cromatográficos obtidos por HPLC;
- **Estudo das propriedades antimicrobianas do extracto:** inibição do crescimento de *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus* e inibição do enzima glucosiltransferase, responsável pela formação do glucano insolúvel em água;

Capítulo II – Materiais e Métodos

1. Material Vegetal

A planta *Geranium robertianum* ou Erva de São Roberto foi comprada à Erva Pura – Nutrição Natural e Dietética, Lda. Por ser de origem comercial não foi possível reunir informações respeitantes à data e local da sua colheita. Esta é comercializada na sua totalidade, ou seja raízes, cascas, caules e sementes.

2. Material Celular e Bacteriano

A linha celular de adenocarcinoma colorrectal, ATCC#HBT-37, foi gentilmente cedida pelo Professor Carlos Farinha do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, e mantida em meio DMEM (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com 10% FBS (do inglês *Foetal Bovine Serum*), 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina e 2mM de L-glutamina, a 37°C e numa atmosfera contendo 5% de CO₂ e cerca de 60% de humidade relativa.

As estirpes bacterianas *Streptococcus sobrinus* (CETC 4010) e *Streptococcus mutans* (CETC 479) foram obtidas da *Coleccion Espanõla de Cultivos Tipo*. Lote 21-10-1998. As estirpes bacterianas foram cultivadas em meio *Brain Heart Infusion* (BHI), sob condições anaeróbias, asseguradas pelo desarejamento com azoto livre de oxigénio, através de filtros esteréis de 0,2 µm.

3. Reagentes

Todos os reagentes utilizados no decorrer do trabalho eram *pro-analysis*. O enzima acetilcolinesterase tipo VI-S, isolado de enguia eléctrica contendo 349 U/mg sólido e 411 U/mg de proteína; o 5,5'-*dithiobis [2-nitrobenzoic acid]* (DTNB); o iodeto de acetiltiocolina (AChI); o 2,2-Di (4-*tert-octylphenyl*) -1-picrylhydrazyl (DPPH); o tampão Hepes; a pancreatina, isolada de pâncreas de porco; o *Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide* (MTT); a quercetina dihidratada; o *uridine 5'-diphos-phoglucuronic acid trisodium salt* (UDPGA); a BSA (*Bovine Serum Albumine*); o reagente de Folin-Ciocalteu; a azida de sódio; o PMSF (*phenylmethanesulfonyl fluoride*); a galantamina e a β-glucuronidase de *E. coli* tipo IX-A, foram adquiridas à Sigma. A pepsina, contendo 0,53 U/mg, o BHI (*Brain Heart Infusion*) e a sacarose foram adquiridas à Fluka; os sais de fosfato de potássio, ácido trifluoroacético e acetonitrilo foram adquiridos à Merck; os sais de cloreto de sódio, cloreto de magnésio hexahidratado, hidrogenocarbonato de sódio, o ácido clorídrico e dimetilsulfóxido (DMSO) foram obtidos na Riedel – de Haën; o sulfato de amónia foi obtido na Panreac; o β-mercaptoetanol e o pirogalol foram adquiridos à BDH Biochemicals. O DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*), PBS (*Phosphates Buffer Solution*), tripsina, FBS (*Foetal Bovine Serum*), glutamina e Pen-Strep (penicilina e estreptomicina) foram adquiridos à Lonza

(Merck). O metanol utilizado no decorrer de todo o trabalho era *HPLC grade* e foi adquirido à Fisher Scientific.

4. Preparação do Extracto

Os extractos de *Geranium robertianum*, utilizados no decorrer do trabalho, foram preparados como decocções. Para a preparação dos extractos, utilizou-se material vegetal finamente triturado que se adicionou a água destilada a ferver e se deixou, durante 10 minutos continuamente, em ebulição nessa mesma água. As quantidades de material vegetal e água destilada foram sempre calculadas com o objectivo de se obter uma concentração de extracto de planta de 0,1g/mL.

Após a fervura filtrou-se por gravidade e depois por vácuo, recorrendo-se a papel de filtro *Whatman*. Posteriormente, iniciou-se o processo de liofilização recorrendo ao liofilizador *Heto Power Dry LL 3000*. A liofilização é um processo de desidratação utilizado para assegurar a preservação de materiais delicados. Consiste no do extracto, seguido de uma diminuição da pressão circundante e aumento da temperatura, para permitir que haja uma sublimação da água presente na amostra.

O processo de liofilização leva à obtenção de extracto seco e em pó e, aquando da sua conclusão, determina-se o peso seco do extracto, para calcular a razão extracto seco/planta (p/p). No caso do *G. robertianum*, o rendimento da extracção foi de, aproximadamente, 103,8 mg de extracto/g de planta.

5. HPLC Analítico e Preparativo

As análises por HPLC foram efectuadas num cromatógrafo líquido *Finnigan™ Surveyor® Plus Modular LC System* equipado com uma coluna *Purospher® STAR RP-18* da Merck, por sua vez, a análise dos resultados obtidos foi feita recorrendo ao software *Xcalibur*.

Para as corridas de HPLC utilizaram-se dois eluentes: A – Metanol, B – Água Ácida (Ácido Trifluoroacético 0,1 M; pH 2,5). Através da variação da percentagem de cada um dos eluentes, ao longo do tempo da corrida de HPLC, criou-se um gradiente susceptível de gerar uma separação eficiente dos diferentes componentes do extracto de erva de São Roberto. Nas tabelas 1 e 2 apresentam-se os gradientes utilizados para o HPLC analítico e preparativo.

Tabela 1: Gradiente utilizado para as corridas de HPLC analíticas

t (min)	Fluxo (mL/min)	Metanol (%)	Acetonitrilo (%)	H ₂ O Ácida (%)
0	1	0	10	90
20	1	15	25	60
22	1	80	10	10
28	1	0	10	90

Tabela 2: Gradiente utilizado para as corridas de HPLC preparativas

t (min)	Fluxo (mL/min)	Metanol (%)	H ₂ O Ácida (%)
0	0,5	20	80
20	0,5	80	20
25	0,5	80	20
30	0,5	20	80

No caso da corrida de HPLC analítica, o objectivo era obter um cromatograma com o máximo de resolução possível; assim, injectaram-se 25 µL de uma solução aquosa de *G. robertianum* 2 mg/mL, preparada a partir de uma solução-mãe de 10 mg/mL. Para as corridas de HPLC preparativas, o objectivo era reunir amostra suficiente para estudos posteriores; assim, injectaram-se 25 µL de uma solução de extracto 5 mg/mL, preparada a partir de uma solução-mãe de 10 mg/mL. A detecção foi feita por DAD (*Diode Array Detector*) entre os 200 e 600nm.

6. Inibição da Actividade de Acetilcolinesterase

A determinação da inibição da actividade de AChE, por soluções aquosas de extracto *G. robertianum* a diferentes concentrações, foi efectuada recorrendo-se ao método descrito por Ingkaninan *et al* (2003), com algumas adaptações. O esquema reaccional que permite seguir a actividade de AChE encontra-se apresentado na figura 9.

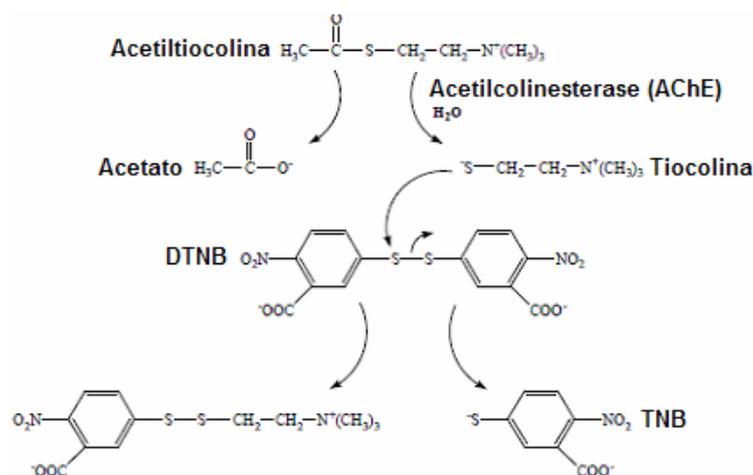


Figura 9: Esquema reaccional que ilustra a reacção da AChE com a acetiltiocolina, resultando, no final, no produto corado, TNB. **Fonte:** adaptado de Frasco *et al.*, 2005.

Numa cuvette adicionaram-se 325 µL de tampão Hepes (50mM, pH 8), 100 µL de extracto e 25 µL de solução de AChE, contendo 0,26 U/mL. Seguiu-se um período de incubação de 15 minutos. Terminado este período, adicionaram-se 75 µL de AChI (0,023mg/mL) e 475 µL de DTNB 3 mM. Foi medida a absorvência a 405 nm durante 5 minutos num espectrofotómetro de duplo feixe UV-Vis M350 da *Camspec*. A leitura de absorvência ao longo do tempo permitiu

determinar a velocidade inicial da reacção que, posteriormente, permitirá o cálculo da percentagem de inibição do enzima.

Os ensaios foram realizados em triplicado, para cada concentração de extracto escolhida, e acompanhados de um branco em que se substituiu o enzima pelo tampão Hepes, por ter sido esta a solução em que se havia preparado o enzima. Foi também realizado um ensaio controlo em que se substituiu o extracto por água destilada e em que se considerou que o enzima tinha 100% de actividade.

Para determinar a percentagem de inibição da actividade do enzima, pela solução de extracto, recorreu-se à seguinte equação:

$$I (\%) = 100 - (v_{\text{amostra}}/v_{\text{controlo}}) \times 100$$

onde I(%) é a inibição enzimática em percentagem, v_{amostra} é a velocidade inicial da reacção contendo a solução de extracto e v_{controlo} é a velocidade inicial da reacção controlo.

A concentração de extracto, para a qual há inibição de 50% da actividade do enzima (IC_{50}), foi calculada recorrendo a um gráfico de inibição do enzima (%) em função da concentração de extracto de *G. robertianum*.

7. Actividade Antioxidante – Método do DPPH

A determinação da actividade antioxidante do extracto de *G. robertianum* foi feita recorrendo ao método descrito por Tepe *et al.* (2007), e baseia-se na redução do radical livre estável DPPH. O DPPH é um radical livre estável, devido à deslocalização do seu electrão por toda a molécula, o que também justifica o forte tom violeta apresentado pela molécula em solução. Na presença de uma substância com propriedades antioxidantes, e por isso capaz de doar um protão, o DPPH é reduzido, perdendo a sua cor violeta (deve permanecer uma tonalidade amarela, típica do grupo picril), tal como descrito na figura 10 (Molyneux P., 2004).

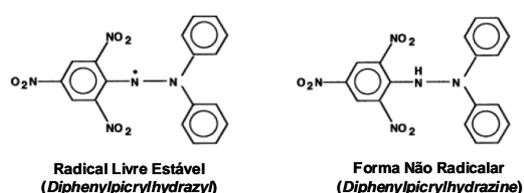


Figura 10: Esquema representativo da extinção do DPPH na presença de uma amostra com capacidade de captação do radical. **Fonte:** adaptado de Molyneux P., 2004.

A reacção representada esquematicamente acima pode ser seguida por espectroscopia UV-Visível, através de medições de absorvência a 517 nm.

Assim, para determinar a actividade antioxidante pelo extracto, adicionaram-se 25 µL de solução de extracto a 2,5 mL de solução metanólica de DPPH 0,002% (m/v), seguindo-se um período de incubação de 30 minutos. No fim do período de incubação, mediu-se a absorvência a 517 nm no espectrofotómetro UV-Vis de feixe duplo.

Os ensaios foram realizados em triplicado e para diferentes concentrações de *G. robertianum*. Cada triplicado foi acompanhado de um branco em que se substituiu a solução metanólica de DPPH 0,002% (m/v) por metanol. Foi realizado um ensaio controlo em que se substituiu a solução de extracto por água destilada.

Para calcular a % de extinção de DPPH ou actividade antioxidante recorre-se à equação apresentada em seguida,

$$AA(\%) = ((A_{DPPH} - A_{amostra}) / A_{DPPH}) \times 100$$

onde AA(%) é a actividade antioxidante, A_{DPPH} é a absorção da solução de DPPH contra o branco e $A_{amostra}$ é a absorção do extracto contra o branco. Tal como no ensaio utilizado para a determinação da inibição de AChE pelo extracto, o ensaio controlo representa o DPPH a 100%.

A concentração de extracto, para a qual a actividade antioxidante é de 50% (EC_{50}), foi determinada recorrendo a um gráfico de actividade antioxidante (%) em função da concentração de extracto de *G. robertianum*.

8. Quantificação de Fenóis Totais

Para a determinação da quantidade de fenóis totais seguiu-se o procedimento descrito por Oktay *et al.* (2003), com algumas adaptações. Utilizou-se o reagente Folin-Ciocalteu e, como composto fenólico padrão, recorreu-se ao pirogalol.

Adicionaram-se 100 µL de solução de extracto de *G. robertianum*, 1mg/mL, a 4,5 mL de água destilada e 100 µL de reagente Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos de incubação adicionaram-se 3 mL de Na_2CO_3 2% (m/v) e iniciou-se um período de incubação de 2 horas com agitação periódica. Terminado o segundo período de incubação mediu-se a absorvência a 760 nm, recorrendo-se ao mesmo espectrofotómetro UV-Vis utilizado para os ensaios anteriores. Como na actividade inibidora de AChE e na determinação da actividade antioxidante, também este ensaio foi realizado em triplicado.

Paralelamente ao ensaio com a solução de *G. robertianum*, foi necessário construir uma curva de calibração. Esta permite determinar a quantidade de fenóis totais na solução de extracto, como microgramas de equivalentes de pirogalol por miligrama de peso seco de extracto. Tendo

como objectivo a construção da curva de calibração realizaram-se 6 ensaios em triplicado e idênticos ao descrito acima, utilizando-se concentrações de pirogalol de 100 µg/mL, 200 µg/mL, 400 µg/mL, 600 µg/mL, 800 µg/mL, 1000 µg/mL.

A curva de calibração foi feita recorrendo a um gráfico de Abs_{760 nm} em função da concentração de pirogalol. A quantificação de fenóis totais do extracto foi feita através da substituição do valor de Abs_{760 nm} determinado para a solução de extracto (1mg/mL) na equação obtida para a curva de calibração.

9. Identificação dos Compostos Maioritários do Extracto Aquoso de *G. robertianum* por Espectrometria de Massa (MS)

Todas as experiências de ESI-MS foram feitas utilizando um espectrómetro de massa *ion trap* LCQ Duo da *Thermo Finnigan* e um espectrómetro de massa ApexQe FTICR da *Bruker Daltonics*.

No espectrómetro de massa *ion trap* LCQ Duo as amostras foram introduzidas, através de uma seringa (velocidade de fluxo 5 mL/min), no capilar de aço inoxidável da fonte de ESI. A voltagem aplicada na fonte foi de 4,5 kV, a voltagem do capilar foi de 10 V e a temperatura do mesmo atingiu os 220 °C. Todos os parâmetros do espectrómetro de massa foram ajustados com o objectivo de otimizar as razões sinal-ruído para os iões de interesse. A optimização dos iões precursores é crucial para a posterior experiência de MS/MS. O azoto foi utilizado como gás nebulizador e gás de secagem na fonte. Todos os espectros foram adquiridos em modo positivo, numa gama de razão massa/carga de 50 – 500 e o tempo de aquisição de espectros médio foi de 1 minuto. As experiências de MS² foram feitas com hélio e a energia de colisão gradualmente aumentada até que, tanto o ião precursor, como o produto pudessem ser observados no espectro MS², ainda que a intensidade do pico precursor fosse reduzida, comparada com a sua intensidade inicial. O software Xcalibur™ foi utilizado para adquirir e processar os espectros.

As experiências de ESI-MS foram também levadas a cabo no espectrómetro de massa ApexQe FTICR da *Bruker Daltonics*, equipado com uma fonte de ionização de *electrospray* e um magneto supercondutor. As amostras foram introduzidas, através de uma bomba de infusão da *KD Scientific*, com uma velocidade de fluxo de 120 µL·h⁻¹. O vácuo foi mantido através de bombas mecânicas, seguidas de bombas turbomoleculares em duas regiões distintas: na fonte de ionização (mantida ≈ a 6.0×10⁻⁶ mbar) e na região celular (mantida a ≈ 4.0×10⁻¹⁰ mbar). O espectrómetro de massa foi calibrado utilizando uma solução de polietilenoglicol de 2.8×10⁻⁶ mol·L⁻¹, adquirida à Sigma, em metanol HPLC *grade*, adquirido à Panreac, e acidificada com 0,1% (v/v) de ácido fórmico, adquirido à Fluka.

Os espectros de massa foram adquiridos no modo positivo, com um tamanho de aquisição de 512k, na gama de razão massa/carga de 50-500. A velocidade de fluxo do gás nebulizador foi ajustada para 2.5 L·min⁻¹, a velocidade de fluxo do gás de secagem foi ajustada para 4.0

L·min⁻¹, a uma temperatura de 220 °C. A voltagem do capilar foi ajustada para 4200 V e a voltagem do spray ajustada para 3800 V. Os parâmetros relativos à fonte de ionização, célula de colisão e célula ICR (do inglês *Ion Cyclotron Resonance*), foram otimizados com o objectivo de assegurar a mais elevada abundância possível de iões de interesse. Todos os espectros de massa apresentados resultam da média de 32 espectros. Os iões foram acumulados na célula de colisão durante 1 segundo, antes de serem transferidos para a célula de ICR.

10. Digestão do Extracto Aquoso de *G. robertianum* pelos Sucos Digestivos, *in vitro*, e determinação das actividades inibitória de AChE e antioxidante

10.1. Digestão do Extracto de *G. robertianum* pelo Suco Gástrico, *in vitro*

Mimetizou-se o processo de digestão, seguindo o procedimento descrito por Yamamoto *et al.* (1999), com algumas modificações. A dois mililitros e meio de suco gástrico artificial adicionaram-se 2,5 mL de solução de extracto de *G. robertianum* (10 mg/mL). Seguiu-se um período de incubação de 4 horas a 37°C. Às 0h, 1h, 2h, 3h e 4h foram retirados 100 µL da mistura reaccional que se adicionaram a 900 µL de água gelada, para parar a reacção, e foram analisados por HPLC, recorrendo ao método apresentado na tabela 1.

Para determinar as actividades inibitórias de AChE e antioxidante após a digestão, fez-se uma reacção controlo, em que se substituiu o *G. robertianum* por água, e que se submeteu ao mesmo período e condições de incubação. Aos tempos mencionados anteriormente, retiraram-se 850 µL de cada uma das misturas reaccionais e analisou-se a inibição de acetilcolinesterase e actividade antioxidante, como descrito em 6. e 7., respectivamente.

Todos os ensaios, digestões e determinação das actividades inibitórias de AChE e actividade antioxidante, foram realizados em triplicado. Cem mililitros de suco gástrico são constituídos por 320 mg de pepsina, 200 mg de NaCl, pH 1,2.

10.2. Digestão do Extracto de *G. robertianum* pelo Suco Pancreático, *in vitro*

Seguiu-se o método descrito por Yamamoto *et al.* (1999), com modificações, para estudar a digestão pelo suco pancreático. Dois mililitros e meio de suco pancreático foram adicionados a 2,5 mL de solução de extracto de *G. robertianum* (10 mg/mL). Seguiu-se um período de incubação de 4 horas a 37°C. Às 0h, 1h, 2h, 3h e 4h retiraram-se 100 µL da mistura reaccional que se adicionaram a 900 µL de água gelada. As amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 9000 rpm e o sobrenadante foi recolhido e analisado por HPLC, recorrendo ao método descrito na tabela 1.

Para determinar as actividades inibitórias de AChE e antioxidante, durante a digestão pelo suco pancreático, foi necessário fazer uma reacção controlo em que se substituiu o extracto por água, e que se submeteu às mesmas condições e período de incubação. Aos tempos

mencionados, retiraram-se 850 µL de cada uma das misturas reaccionais. As amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 9000 rpm, o sobrenadante foi recolhido e analisado para determinar a inibição de acetilcolinesterase e actividade antioxidante, como descrito em 6. e 7., respectivamente.

Também aqui todos os ensaios foram realizados em triplicado. Cem mililitros de suco pancreático são constituídos por 250 mg de pancreatina dissolvidos em 10 mL de tampão K-fosfatos 50 mM, pH 8.

11. Digestão do Extracto de *G. robertianum* por células Caco-2

11.1. Ensaio de Citotoxicidade em Células Caco-2

O crescimento de células Caco-2 foi feito recorrendo ao método descrito por Kern *et al.* (2003). Semearam-se células Caco-2 em meio de cultura DMEM suplementado com 10% soro bovino (FBS), 100U/mL penicilina, 100U/mL estreptomicina e 2mM L – glutamina, a 37°C em atmosfera com 5% CO₂. As células foram recolhidas depois do processo de tripsinização e repicadas a cada 48h.

Os ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular foram realizados pelo método do MTT (do inglês *Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide*), baseados no procedimento descrito por Chen P.-J. *et al.* (2008). Este método colorimétrico reflecte a actividade de um enzima mitocondrial crítico para as actividades químicas e mecânicas das células, o succinato desidrogenase. As células vivas têm capacidade para reduzir o MTT a azul de tripano, através da acção do succinato desidrogenase, enquanto que as células mortas não conseguem realizar este processo. A solubilização do azul de tripano por DMSO permite a obtenção de uma solução corada que pode ser quantificada espectrofotometricamente. Assim, a redução do MTT pode ser determinada de forma quantitativa e utilizada como indicador da viabilidade celular (Huamin J. *et al.*, 2002).

Em microplacas de 96 poços semearam-se 1200 células/poço em 100 µL de meio e deixaram-se crescer até que se atingisse cerca de 90% de confluência. Depois de atingida a confluência desejada, substituiu-se o meio de cultura por meio suplementado com diferentes concentrações de extracto (0,6 mg/mL; 0,8 mg/mL; 1 mg/mL; 1,2 mg/mL; 1,5 mg/mL; 3 mg/mL; 5 mg/mL; 7 mg/mL e 10 mg/mL).

Seguiu-se um período de incubação de 48h em que as células permaneceram em contacto com o extracto. Terminado este período, removeu-se o meio suplementado com extracto e adicionaram-se 50 µL de PBS para lavar as células de restos de extracto. O PBS foi substituído por 100 µL de meio suplementado com 10% solução de MTT 5mg/mL em PBS. Incubou-se durante 2h, aspirou-se o meio e colocou-se 100 µL de DMSO em cada poço.

Após 2h de incubação, leu-se a absorvência a 570 nm (referência 630 nm) num leitor de microplacas *Tecan Sunrise*. A viabilidade foi quantificada em relação a um controlo tratado com meio.

11.2. Digestão do Extracto de *G. robertianum* por células Caco-2, *in vitro*

A linha celular epitelial de adenocarcinoma colorrectal é utilizada para mimetizar o epitélio gastrointestinal e assim verificar se o extracto é degradado pelo mesmo. Para estudar a digestão por células Caco-2, utilizou-se o método descrito por Konishi *et al.* (2008), com modificações. As células Caco-2 foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% FBS, 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina e 2 mM de L-glutamina, e mantidas a 37°C e numa atmosfera contendo 5% de CO₂, recorrendo-se a uma estufa *Shel Lab CO₂ Series* da *Sheldon Mfg. Inc.* O meio de cultura foi trocado, na primeira vez, após 72 horas, e nas vezes seguintes, a cada 48 horas, durante 15 dias.

Para o ensaio de digestão, semearam-se aproximadamente 2×10^4 células em caixas de Petri de 4 cm de diâmetro, durante 15 dias, até que se atingisse 90% de confluência. Aquando do início do ensaio, removeu-se todo o meio DMEM e lavaram-se as células com 1 mL de HBSS. Posteriormente, adicionaram-se 2,5 mL de HBSS contendo 10 mg/mL de extracto de *G. robertianum*. As células, em contacto com o extracto, foram deixadas a incubar a 37°C e numa atmosfera contendo 5% de CO₂, durante 6 horas. Às 0h, 1h, 2h, 4h e 6h, retiraram-se amostras de 100 µL do meio e adicionaram-se a 900 µL de água gelada, seguiu-se uma centrifugação a 9000 rpm durante 10 minutos e recolha do sobrenadante para análise por HPLC, pelo método apresentado na tabela 1. Para levar a cabo este ensaio, era necessário assegurar as condições de esterilidade, o que foi possível utilizando uma câmara de fluxo laminar *Esco Class II Biohazard Safety*.

Como se pretendia determinar se o extracto, em contacto com as células Caco-2, perdia actividade inibitória de AChE ou antioxidante, retiraram-se, aos tempos mencionados, 275 µL de meio que se submeteram a uma centrifugação de 9000 rpm, durante 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e adicionado a 275 µL de HBSS, para posterior determinação da actividade inibitória de AChE e antioxidante, como descrito em 6. e 7. do presente capítulo, respectivamente.

No final do ensaio, ou seja após as 6h, removeu-se o meio restante e lavaram-se as células com 1 mL de HBSS. Adicionou-se 1 mL de uma solução 1:10 TFA 0,1M / metanol e seguiu-se um período de incubação de 30 min. Terminado o período de incubação, recolheram-se as células e foram submetidas a cinco ciclos de sonicação de dois minutos cada. As células foram centrifugadas a 9000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante recolhido e analisado por HPLC.

Em paralelo a este ensaio, realizou-se um ensaio controlo, exactamente idêntico mas na ausência de células Caco-2 e sem a determinação das actividades biológicas de relevância às

diferentes horas de digestão. O objectivo do ensaio era verificar que o extracto aquoso de *G. robertianum* não era degradado por células Caco-2.

12. Digestão do *G. robertianum* por β -glucuronidase de *E. Coli*

Durante o processo digestivo, ocorrem as reacções de conjugação, de que são exemplo a glucuronidação e sulfatação, mas também podem ocorrer reacções de desconjugação, tal como a desglucuronidação promovida pela β -glucuronidase (**EC. 3.2.1.31**) de *E. coli*, típicas da microflora intestinal.

Assim, pretendeu-se determinar se algum dos constituintes do extracto de *G. robertianum* era passível de sofrer uma reacção de desglucuronidação. Paralelamente a este objectivo, pretendeu-se também determinar a actividade inibitória de AChE e antioxidante do extracto desglucuronado, bem como verificar se a reacção de desglucuronidação é reversível, submetendo a mistura reaccional final a uma reacção de conjugação, como descrito em 12.2. e a uma reacção de trans-glucuronidação por contacto com células Caco-2, como descrito em 11.3. do presente capítulo.

Preparou-se uma mistura reaccional contendo 1400 μ L de uma solução 10 mg/mL de *G. robertianum*, 140 μ L de β -glucuronidase de *E. coli* (10 mg/mL), 140 μ L de tampão k-fosfatos (10 mM pH 7,4) e 1120 μ L de água. Prepararam-se dois controlos: um contendo 300 μ L de uma solução de *G. robertianum* 10 mg/mL, 60 μ L de tampão e 240 μ L de água e, outro, constituído por 2400 μ L de água, 120 μ L de β -glucuronidase de *E. coli* e 120 μ L de tampão.

Depois de preparadas as misturas reaccionais, seguiu-se um período de incubação de 2h a 37°C. Terminado o período de incubação, recolheram-se as várias amostras e centrifugaram-se a 9000 rpm, durante 10 minutos. Recolheu-se o sobrenadante que foi analisado por HPLC. Determinaram-se ainda as actividades inibitórias de AChE e antioxidante, como descrito em 6. e 7., respectivamente. Por fim, o sobrenadante também foi sujeito a uma reacção de glucuronidação e trans-glucuronidação.

13. Digestão do Extracto de *G. robertianum* por Homogenato de Fígado

13.1. Preparação do Homogenato de Fígado

Para a preparação do homogenato de fígado, seguiu-se o método descrito por Justino *et al.* (2004), com algumas alterações. Foram utilizados ratinhos Balb-C *naïve, specific pathogen free*, com 6 semanas, e mortos com injeção letal. Os ratinhos foram adquiridos ao biotério do IGC (Instituto Gulbenkian de Ciência), em condições de esterilidade, e os fígados gentilmente cedidos pelo Professor Luís Graça, coordenador da Unidade de Imunologia Celular do Instituto de Medicina Molecular.

O objectivo é obter um extracto de fígado livre de células, para que assim se isolem os enzimas hepáticos responsáveis pela metabolização do extracto e do controlo de quercetina. Os fígados de ratinho foram recolhidos em PBS e o homogenato feito em tampão k-fosfatos (10mM 2-mercaptoetanol pH 7,4), atendendo a que por 1 g de tecido se adicionam 2,5 mL de tampão, e recorrendo ao homogeneizador *B-Brown*. O homogenato foi centrifugado durante 90 minutos a 11000 rpm e a 4°C, numa centrífuga *Eppendorf 5804 R*. O conteúdo proteico do sobrenadante foi determinado pelo método de Lowry O. *et al.* (1951) e o restante sobrenadante liofilizado e armazenado a -20°C.

13.2. Glucuronidação da quercetina e *Geranium robertianum*

Para concluir se havia ou não glucuronidação de algum dos compostos de *G. robertianum*, preparou-se uma mistura reaccional contendo 100 µL de UDPGA, 200 µL de uma solução aquosa de *G. robertianum* 10 mg/mL, 450 µL de tampão k-fosfatos (10 mM pH 7,4) e 250 µL de extracto de fígado 20 mg/mL. Preparou-se também uma mistura reaccional controlo, em que se substituiu os 100 µL de UDPGA e os 250 µL de extracto de fígado por tampão k-fosfatos.

Preparou-se também uma mistura reaccional contendo 100 µL de UDPGA, 100 µL de uma solução de quercetina 400 mM, 550 µL de tampão k-fosfatos (10mM pH 7,4) e 250 µL de extracto de fígado 20 mg/mL. Esta mistura reaccional foi acompanhada do respectivo controlo em que se substituiu os 100 µL de UDPGA e os 250 µL de extracto de fígado por tampão.

Preparou-se ainda uma última mistura reaccional contendo apenas 250 µL de extracto de fígado de concentração 20 mg/mL e 750 µL de tampão k-fosfatos (10mM pH 7,4).

As diferentes reacções foram iniciadas pela adição do extracto de fígado e deixadas a incubar durante 1h a 37°C. Terminado o período de incubação, as amostras foram congeladas para assegurar a paragem da reacção. Seguiu-se a descongelação das amostras e sua centrifugação a 9000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e analisado por HPLC, recorrendo ao método apresentado na tabela 1.

14. Determinação da actividade antimicrobiana de *G. robertianum*

14.1. Determinação do MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) para as estirpes *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*

A actividade bacteriostática do extracto de *G. robertianum* foi determinada através do cálculo do valor MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*). O procedimento utilizado foi o descrito por Tsai *et al.* (2007), com algumas modificações.

As estirpes *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, provenientes de culturas deixadas *overnight*, foram ajustadas para 1×10^6 unidades formadoras de colónias (CFU) /mL, ou seja, cerca de 0,5 UA a 630 nm. O extracto de *G. robertianum* foi diluído em série em meio BHI, para

concentrações finais de 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 mg/mL. Em microplacas estéreis de 96 poços adicionaram-se 100 µL de extracto de *G. robertianum* a 100 µL de suspensão bacteriana. Realizou-se um branco, para cada concentração de extracto utilizada, em que se substituiu o inóculo bacteriano por meio. Para além deste fez-se um ensaio controlo em que se substituiu o extracto de *G. robertianum* por meio, sem adição do mesmo. Seguiu-se um período de incubação de 48h, a 37°C, e em condições anaeróbias. Terminado o período de incubação, o crescimento de *S. sobrinus* e *S. mutans* foi estimado espectrofotometricamente a 630 nm, utilizando um leitor de microplacas *Tecan Sunrise*.

O MIC foi definido como a concentração mínima de extracto para a qual a turbidez era <0,05 UA. Para a determinação da concentração de extracto para a qual há 50% de inibição de crescimento, construiu-se um gráfico de inibição do crescimento (%) em função da concentração de extracto (mg/mL). Todos os ensaios foram realizados em triplicado, tanto para as diferentes concentrações de extracto escolhidas, como para os controlos.

14.2. Extração e isolamento da glucosiltransferase extracelular de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*

Para se obter o enzima glucosiltransferase (GTF-I) extracelular, seguiu-se o método descrito por Tsai *et al.* (2007), com algumas modificações. As estirpes *S. mutans* e *S. sobrinus* em crescimento activo foram incubadas *overnight* em 1000 mL de meio BHI, a 37°C, e em condições anaeróbias. Terminado o período de incubação, as bactérias foram removidas por centrifugação a 8000 g e a 4°C, recorrendo-se a uma centrífuga *Beckman J2-21 ME*. O pH do sobrenadante da cultura foi ajustado para 6,8, por adição de NaOH. O sobrenadante foi tratado com sulfato de amónio a 50% (m/v) durante 1h e a 4°C, seguindo-se uma nova centrifugação a 8000 g e a 4°C. O precipitado foi recolhido e dialisado contra PBS, pH 6,8 contendo 1mM de PMSF (*phenylmethylsulfonyl fluoride*), como inibidor de proteases, e 0,01% de azida de sódio. O dialisado final foi utilizado como GTF-I extracelular e armazenado a -20°C.

14.3. Determinação da inibição da formação de glucano insolúvel em água pela glucosiltransferase

A quantificação do glucano sintetizado foi feita seguindo o método descrito por Tsai *et al.* (2007), com algumas modificações. As misturas reaccionais continham 1,5 mL de uma solução de sacarose 0,1M como substrato e 500 µL de GTF-I, todas preparadas em PBS (pH 6). Extractos aquosos de *G. robertianum*, com diferentes concentrações finais (2, 4, 6, 8 e 10 mg/mL), foram testados para verificar se inibiam a síntese de glucano insolúvel em água. As misturas reaccionais foram incubadas a 37°C, durante 18h. Às 0h, 1h, 2h, 3h e 18h, determinou-se a quantidade de glucano insolúvel em água, por medições espectrofotométricas a 550 nm.

O ensaio foi feito em triplicado para cada concentração de extracto escolhida e um branco do ensaio, em que não houve adição de GTF-I, foi também realizado. Para além destes ensaios,

fez-se um ensaio controlo, em que não houve adição de extracto de *G. robertianum*. Neste último ensaio, considerou-se que o enzima apresentava 100% de actividade e, por isso, a formação de glucano insolúvel em água era 100%.

A inibição da formação de glucano insolúvel em água foi determinada recorrendo à seguinte fórmula:

$$I(\%) = 100 - (A_{\text{amostra}}/A_{\text{controlo}}) \times 100$$

onde I (%) representa a % de inibição do glucano insolúvel em água, A_{amostra} representa a absorvência da amostra contendo extracto de *G. robertianum* e A_{controlo} representa a absorvência da mistura reaccional sem extracto de *G. robertianum*.

A concentração de extracto, para a qual há inibição de 50% da actividade do enzima (IC_{50}) foi determinada recorrendo a um gráfico de inibição do enzima (%) em função da concentração de extracto de *G. robertianum* (mg/mL).

15. Análise Estatística

Todos os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão, tendo sido utilizado o software Microsoft © Excel 2002.

Adicionalmente realizou-se uma análise estatística ANOVA (do inglês *Analysis of Variance*) com um nível de significância $P < 0,05$.

Capítulo III – Resultados e Discussão

A investigação previamente realizada no nosso grupo de investigação indicia que infusões de *G. robertianum* possuem propriedades terapêuticas úteis, principalmente devido à inibição de AChE e elevada actividade antioxidante. Assim, preparou-se uma infusão de *G. robertianum* e analisou-se o extracto obtido no que diz respeito a actividades biológicas como inibição de AChE e actividade antioxidante, tendo-se também efectuado a quantificação de fenóis totais (subcapítulo 1). A determinação destas actividades biológicas justificaria a utilização do *G. robertianum* ou dos seus compostos maioritários na terapêutica de AD.

Atendendo a que não existe muita bibliografia disponível acerca da planta em estudo pretendeu-se identificar os compostos maioritários, isolados por HPLC, recorrendo à espectrometria de massa (MS) (subcapítulo 2). A identificação dos compostos maioritários de *G. robertianum* permite tirar conclusões acerca das propriedades apresentadas pelo extracto bruto; isto é, permite concluir se existe um composto bioactivo maioritário ou se é a acção conjunta dos vários componentes da planta que leva às actividades biológicas observadas.

Numa fase posterior do trabalho pretendeu-se estudar o metabolismo *in vitro* do *G. robertianum*. Esta planta é utilizada como infusão e a sua entrada no organismo faz-se por via oral. Assim, atendendo a que o objectivo final é a sua utilização como inibidor de AChE no cérebro, é imperativo determinar se o extracto sofre metabolização, com formação de novos compostos e degradação de outros ou se, pelo contrário, se mantém constante durante todo o processo de digestão e metabolismo. Tendo isto em conta, realizaram-se estudos de digestão do extracto de *G. robertianum* pelos sucos digestivos artificiais; para determinar se o extracto também poderia sofrer alterações em contacto com o epitélio do tracto gastrointestinal, utilizaram-se células Caco-2, mimetizadoras do mesmo, que se mantiveram em contacto com o extracto para verificar a sua estabilidade. Finalmente estudou-se a reacção de glucuronidação, típica do metabolismo hepático, e ainda a reacção de desglucuronidação por β -glucuronidases de *E. coli*, típica da microflora intestinal. Tendo em conta que o principal objectivo era determinar se o extracto aquoso mantinha as suas actividades biológicas originais, determinou-se a inibição de AChE e actividade antioxidante ao longo de todos os processos metabólicos estudados (subcapítulo 3).

Numa última etapa do trabalho estudou-se a actividade antimicrobiana do extracto de *G. robertianum*. Atendendo a que existem inúmeras referências bibliográficas que apontam para a utilização de plantas como complemento à higiene oral, evitando a formação de cáries e da placa bacteriana, realizaram-se estudos de inibição do crescimento bacteriano, bem como de inibição da actividade dos enzimas bacterianos, para determinar se o *G. robertianum* também pode ser aplicado a estas patologias orais (subcapítulo 4).

1. Actividades Biológicas do extracto aquoso de *Geranium robertianum*

1.1. Determinação da Actividade Inibitória de Acetilcolinesterase (AChE)

Existem várias referências bibliográficas que apontam para a utilização de plantas medicinais no tratamento sintomático de AD através da abordagem mais conhecida, a inibição da actividade de AChE (Lin H. Q. *et al.*, 2008; Orhan, I. *et al.* 2007; Vinutha, B. *et al.*, 2007; Adams M. *et al.*, 2007; Mukherjee P. K. *et al.*, 2007; Adersen A. *et al.*, 2006; Barbosa Filho J. M. *et al.*, 2006; Ingkaninan K. *et al.*, 2003; Howes M. *et al.*, 2003). Sendo a AD a forma mais comum de demência e a doença neurodegenerativa que afecta a maior percentagem da população envelhecida analisou-se a inibição de AChE pelo extracto aquoso de *G. robertianum*. A maioria dos estudos de inibição de AChE por plantas medicinais são efectuados recorrendo a extractos metanólicos ou etanólicos. Neste trabalho escolheu-se preparar extractos aquosos pois o *G. robertianum* é tomado, na medicina popular, sob a forma de infusão e a preparação deste tipo de extractos permite estudar de forma mais fiável o que acontece *in vivo*.

Especificamente, analisou-se a inibição de AChE por diferentes concentrações de extracto (500; 600; 700; 800 e 900 µg/mL) com o objectivo de determinar o valor de IC₅₀, ou seja, a concentração de extracto para a qual há inibição de 50% da actividade enzimática. Na figura 11 apresenta-se o gráfico que traduz a inibição da actividade enzimática, para concentrações crescentes de *G. robertianum*.

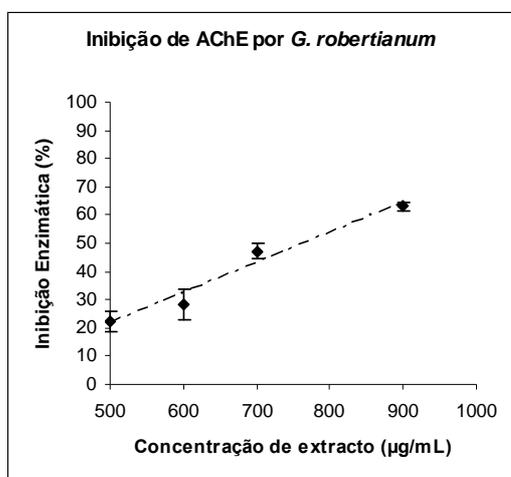


Figura 11: Percentagem de inibição do enzima AChE na presença de concentrações crescentes de extracto de *G. robertianum* (ensaio realizado em triplicado).

Através da equação obtida ($y = 0,1065x - 31,669$, $r^2 = 0,964$) é possível determinar um valor de IC₅₀ para o extracto de *G. robertianum*. Assim, o valor de IC₅₀ obtido foi de $765,88 \pm 15,39$ µg/mL. Na literatura existem vários valores de IC₅₀

determinados para plantas medicinais; no entanto, como já foi referido, esses valores são calculados, geralmente, recorrendo a extractos metanólicos e/ou etanólicos, o que impossibilita uma análise comparativa entre esses valores e os resultados obtidos durante o presente trabalho. Uma pesquisa mais exaustiva permitiu reunir algumas referências a determinações de IC₅₀ para extractos aquosos de plantas. Ao observar essas referências é possível concluir que o valor de IC₅₀ obtido para o *G. robertianum* é bastante superior ao obtido para a *Ficus religiosa* L. (73,69 µg/mL) (Vinutha, B. *et al.*, 2007) e para o *Caulis spatholobi* (85 µg/mL) (Lin, H. Q. *et al.*, 2008). Também Mata *et al.* (2007) determinaram o IC₅₀ de várias plantas medicinais, tendo obtido os valores seguintes: *Foeniculum vulgare* – $1490,0 \pm 0,3$ µg/mL; *Mentha spicata* – $721,0 \pm 0,1$ µg/mL; *Mentha pulegium* – $1581,0 \pm 53,6$ µg/mL; *Rosmarinus officinalis* – $769,0 \pm 3,9$

$\mu\text{g/mL}$; e *Thymus serpyllum* – $348,0 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$. Os valores obtidos por Mata *et al.* são semelhantes e da mesma ordem de grandeza que os obtidos para o extracto aquoso de *G. robertianum*, o que indica que o extracto aquoso em estudo é um bom inibidor de AChE.

Para ser possível tirar conclusões em relação ao poder inibitório de AChE do extracto de *G. robertianum* determinou-se o valor de IC_{50} de um dos fármacos utilizados no tratamento sintomático de AD, o alcalóide galantamina. Este fármaco, cuja estrutura se encontra na figura 6, apresenta um valor de IC_{50} de $0,22 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$. O valor obtido é bastante inferior ao obtido para o extracto de *G. robertianum*. Esta diferença de valores pode estar relacionada com o facto do extracto ser constituído por vários compostos, alguns dos quais podem ter pouca actividade, enquanto a galantamina comercializada é um alcalóide altamente específico e de elevado grau de pureza. Finalmente, o facto da galantamina provocar alguns efeitos adversos como náuseas, tonturas e, em casos esporádicos, episódios de anorexia, depressão, cefaleias e perda de peso justifica a procura de alternativas menos invasivas e propícias a estes efeitos secundários.

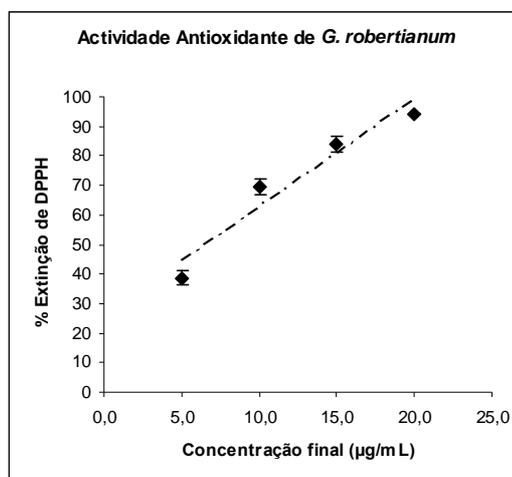
1.2. Determinação da Actividade Antioxidante

A AD é uma doença neurodegenerativa à qual está associado um estado de inflamação crónica. Existem estudos que apontam para a hipótese de que a elevada produção de moléculas pró-inflamatórias promova a neurodegeneração típica da doença (Stuchbury, G. e Münch, G., 2005). É essencial encontrar formas de diminuir este estado de inflamação, através de uma terapêutica anti-inflamatória eficaz, por, p.e., administração de compostos com propriedades antioxidantes.

Assim, analisou-se o extracto de *G. robertianum* para determinar a sua actividade antioxidante, recorrendo ao método do DPPH já descrito (7. Capítulo II). Determinou-se a % de extinção de DPPH na presença de diferentes concentrações finais de extracto (20, 15, 10 e 5 $\mu\text{g/mL}$). Verificou-se que existe uma proporcionalidade directa entre a concentração de extracto e a % de extinção de DPPH, tal como apresentado na figura 12.

Figura 12: Percentagem de extinção do radical livre DPPH, reflexo da actividade antioxidante, em função de concentrações crescentes de extracto aquoso de *G. robertianum* (ensaio realizado em triplicado).

Através da equação obtida ($y = 3,6278x + 26,239$, $r^2 = 0,936$) é possível determinar um valor de EC_{50} ou seja, o valor para o qual se extingue 50% do radical livre DPPH. O valor de EC_{50} obtido para o extracto de *G. robertianum* foi de $6,53 \pm 0,58 \mu\text{g/mL}$.



Para poder tirar conclusões acerca do valor obtido é necessário compará-lo com valores determinados para outras espécies vegetais. Ao fazer esta comparação é possível determinar se o extracto de *G. robertianum* apresenta uma actividade antioxidante representativa, justificando assim a sua importância na terapêutica sintomática de AD.

Na literatura é possível encontrar exemplos de espécies vegetais para as quais se determinou o EC₅₀; Enayat e Banerjee (2009) determinaram o EC₅₀ de diferentes partes da planta *Salix aegyptiaca* L., tendo obtido valores de 25 µg/mL e 50 µg/mL, para folhas e cascas da planta, respectivamente. Também Subhasree *et al.* (2009) determinaram a extinção do radical DPPH para três espécies vegetais, *Centella asiatica*, *Pisonia alba*, *Sauropus androgynus*, tendo obtido valores EC₅₀ de cerca de 200 µg/mL para as duas primeiras espécies e de 100 µg/mL para a terceira espécie. Finalmente, Chew *et al.* (2009) também determinaram valores de EC₅₀ para as folhas e flores de várias plantas medicinais chinesas, obtendo valores de 27 ± 5 µg/mL (flores) e 61 ± 10 µg/mL (folhas) de *B. kockiana*, 118 ± 24 µg/mL (flores) e 50 ± 5 µg/mL (folhas) de *C. pulcherrima* e 96 ± 16 µg/mL (flores) e 94 ± 11 µg/mL (folhas) de *C. surattensis*. Mata *et al.* (2007) estudaram a actividade antioxidante de cinco extractos aquosos, dois de duas espécies de *Mentha* (EC₅₀ – 8,9 ± 0,2 µg/mL e 5,7 ± 0,4 µg/mL), um de *Thymus serpyllum* (EC₅₀ – 31,6 ± 0,8 µg/mL), um de *Foeniculum vulgare* (EC₅₀ – 48,0 ± 0,1 µg/mL) e um de *Rosmarinus officinalis* (EC₅₀ – 36,0 ± 0,1 µg/mL). Finalmente, o padrão utilizado para comparar valores de EC₅₀ é o do BHT (*butylated hydroxytoluene*), composto orgânico lipofílico utilizado na indústria alimentar como aditivo alimentar antioxidante, e cujo valor de EC₅₀ é, de acordo com Enayat e Banerjee (2009), 26 µg/mL.

Pelos valores apresentados é possível concluir que o extracto aquoso de *G. robertianum* apresenta uma elevada actividade antioxidante. Esta característica do extracto permite justificar a utilização do mesmo, ou seus componentes individuais, no tratamento sintomático de AD. Ainda que o seu IC₅₀ não seja comparável ao da galantamina, o seu EC₅₀ é, quando comparado com o padrão BHT, bastante inferior, ou seja reflexo de uma muito superior actividade antioxidante.

Reunidas estas duas primeiras características do extracto de *G. robertianum*, o IC₅₀ e EC₅₀, é possível concluir que a planta parece apresentar compostos que, de uma forma aparentemente sinérgica, contribuem para uma inibição aceitável do enzima AChE e uma actividade antioxidante muito superior à observada para outras espécies vegetais e mesmo para o padrão amplamente utilizado na indústria alimentar.

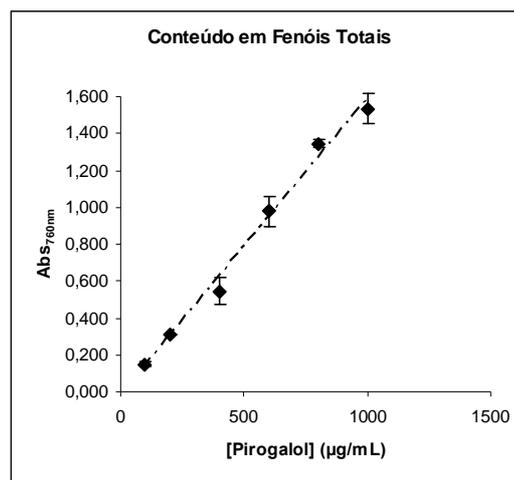
1.3. Quantificação de Fenóis Totais

Os compostos fenólicos, tal como explicado em 4. (capítulo I), são extremamente abundantes na Natureza, principalmente em espécies vegetais, e uma excelente fonte de compostos com propriedades antioxidantes, devido à presença de grupos hidroxilo capazes de reduzir espécies radicalares. Uma forma de concluir que tipo de compostos podem estar presentes no *Geranium*

robertianum é a determinação dos fenóis totais. Através da determinação deste parâmetro é possível concluir se o extracto tem na sua composição polifenóis, como ácidos fenólicos e flavonóides.

Para determinar o conteúdo em compostos fenólicos seguiu-se o procedimento descrito por M. Oktay *et al.* (2003) e apresentado em 8. (Capítulo II), tendo-se utilizado o pirogalol como composto fenólico padrão. Na figura 13 apresenta-se a curva de calibração obtida para o composto fenólico padrão, a partir da qual se determinou o conteúdo em compostos fenólicos de *G. robertianum*.

Figura 13: Curva de calibração utilizada para o cálculo do conteúdo em fenóis totais do extracto aquoso de *G. robertianum* (ensaio realizado em triplicado).



Para determinar o conteúdo em fenóis totais do *G. robertianum* utilizou-se uma solução de extracto de 1 mg/mL e, recorrendo à equação obtida para a curva de calibração ($y = 0,0016x - 0,0218$, $r^2 = 0,99$), foi possível determinar um valor de $106,96 \pm 2,37$ µg de equivalentes de pirogalol / mg de extracto.

Na bibliografia disponível é possível encontrar inúmeras referências a cálculos de conteúdos fenólicos totais; sendo que, na maioria dos casos, o composto padrão utilizado é o ácido gálgico. Orhan *et al.* (2009) determinou o conteúdo em compostos fenólicos para três plantas, *Salvia triloba*, *Teucrium polium* e *Melissa officinalis*, obtendo, respectivamente, $10,9 \pm 0,7$, $107,8 \pm 1,4$, $68,7 \pm 1,5$ mg de equivalentes de ácido gálgico / g de extracto. Também Enayat e Banerjee (2009) determinaram o conteúdo em compostos fenólicos para diferentes partes da planta *Salix aegyptiaca* L., tendo obtido 163 ± 3 (folhas) e 139 ± 1 (cascas) mg de equivalentes de ácido gálgico / g de amostra. Finalmente, Oktay *et al.* (2003) haviam determinado o conteúdo em compostos fenólicos para o *Foeniculum vulgare*, tendo obtido um valor de 21 µg de equivalentes de ácido gálgico / mg de extracto.

Ao comparar o valor obtido para o *G. robertianum* é possível concluir que esta planta tem uma composição rica em compostos fenólicos, o que pode também justificar a elevada actividade antioxidante obtida para o extracto. Assim, é possível fazer uma síntese das características do extracto de *G. robertianum*, como apresentado na tabela 3.

Tabela 3: Características do extracto aquoso de *G. robertianum*

	IC ₅₀ (µg/mL)	EC ₅₀ (µg/mL)	Fenóis Totais (µg de *EP/mg de extracto)
<i>G. robertianum</i>	765,88 ± 15,39	6,53 ± 0,58	106,96 ± 2,37

*(EP: Equivalentes de Pirogalol)

1.4. Análise do extracto de *G. robertianum* por HPLC e determinação das actividades inibitórias de AChE e antioxidante de cada um dos compostos maioritários

Um dos principais objectivos deste trabalho era a identificação dos compostos maioritários presentes no extracto aquoso de *G. robertianum* e determinação das suas actividades inibitórias de AChE e antioxidante. Para identificar os compostos maioritários do extracto fez-se HPLC analítico em que se injectaram 25 µL de uma solução de *G. robertianum* 1 mg/mL, obtendo o cromatograma apresentado na figura 14.

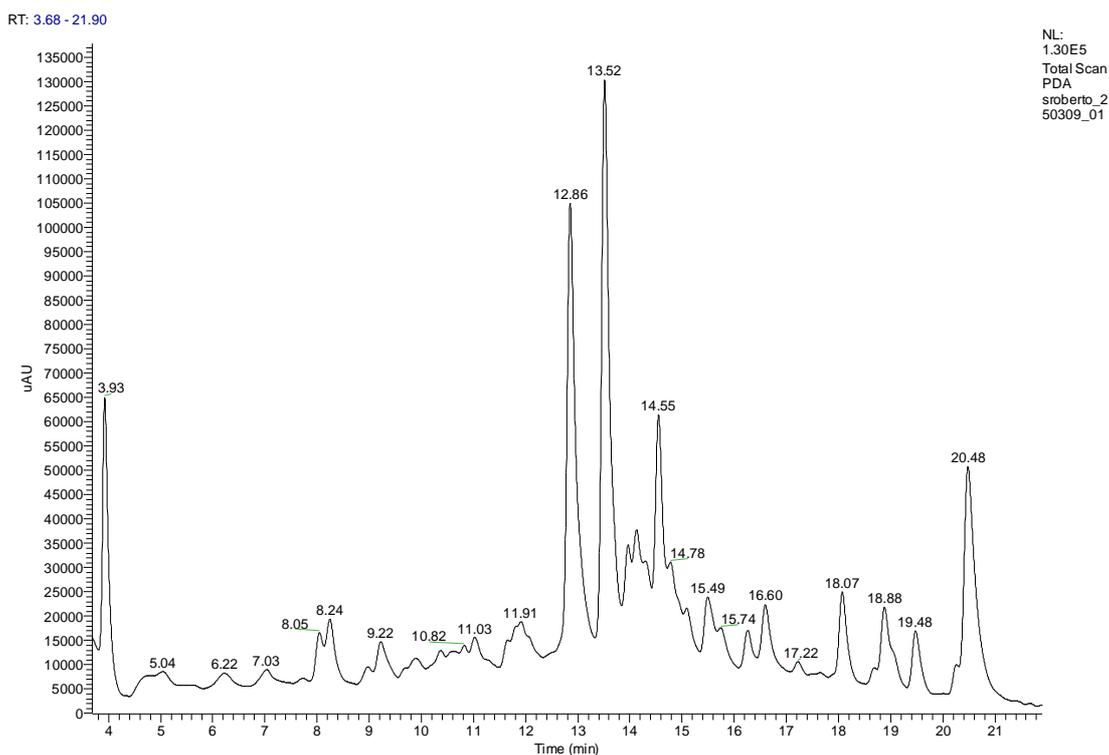


Figura 14: Perfil cromatográfico obtido para uma solução de *G. robertianum* 1mg/mL.

A partir do cromatograma obtido foi possível concluir que o extracto de *G. robertianum* é bastante complexo, sendo possível identificar cinco picos maioritários. Os picos maioritários são o de 3,93 min, o de 12,86 min, o de 13,52 min, o de 14,55 min e o de 20,48 min, cujos espectros de absorção UV-Vis se apresentam nas cinco figuras seguintes.

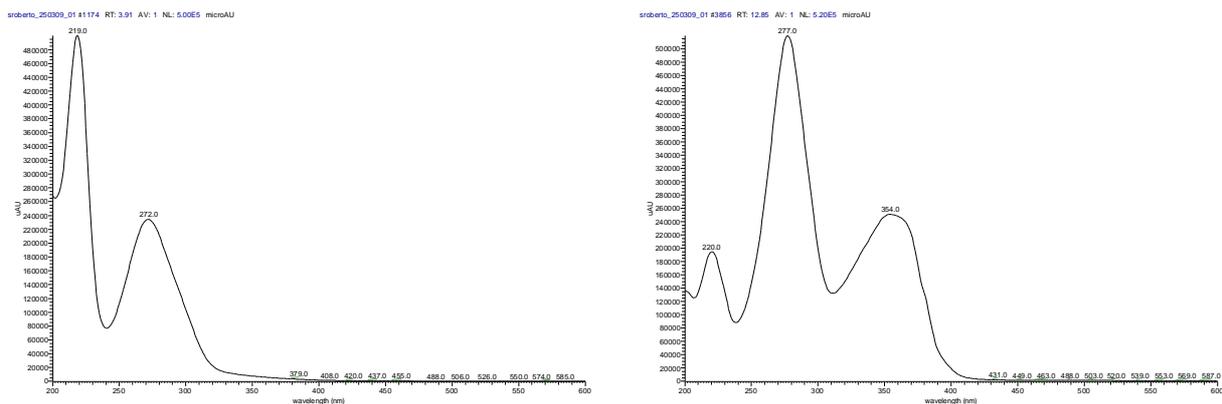


Figura 15: Espectros de absorção UV-Vis obtidos para os primeiro ($t_r=3,93$ min) e segundo ($t_r=12,86$ min) picos maioritários.

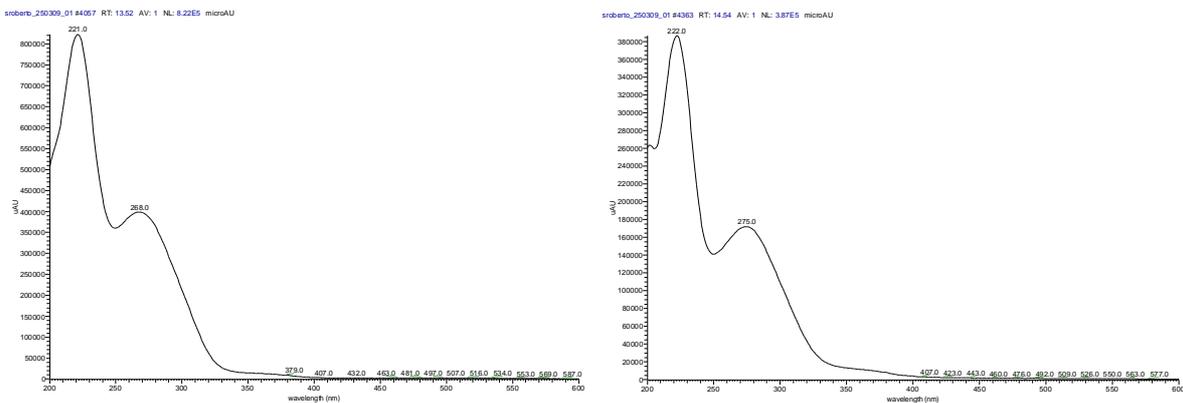


Figura 16: Espectros de absorção UV-Vis obtidos para os terceiro ($t_r=13,52$ min) e quarto ($t_r=14,55$ min) picos maioritários.

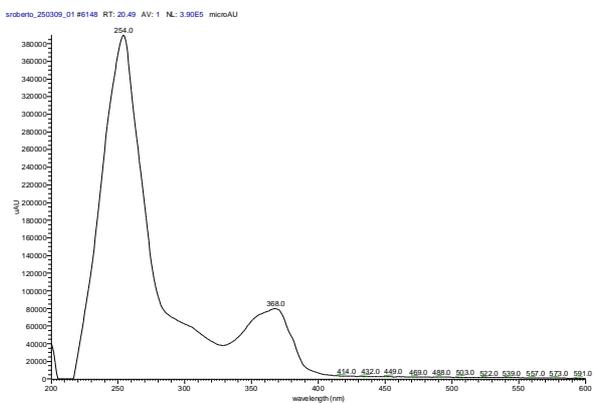


Figura 17: Espectro de absorção UV-Vis obtidos para o quinto pico maioritário ($t_r=20,48$ min).

Ao observar os espectros UV-Vis dos cinco picos maioritários é possível concluir que os compostos 1, 3 e 4 têm espectros bastante semelhantes, o que indica que poderão pertencer, por exemplo, ao mesmo tipo de polifenóis. Pelo contrário, os picos 2 e 5 têm espectros bastante distintos. A identificação destes compostos só foi conseguida através da espectrometria de massa (MS), que será apresentada e discutida em 2..

Na tabela 4 apresentam-se os picos/fracções maioritários (as) e os seus respectivos máximos de absorção na gama UV-Visível.

Tabela 4: Tempos de retenção e máximos de absorção UV-Visível apresentados pelas 5 fracções maioritárias

t_r (minutos)	Máximos de Absorção (nm)
3,93	219; 272
12,86	220; 277; 354
13,52	221; 268
14,55	222; 275
20,48	254; 368

Ao observar a tabela 4 e os espectros apresentados nas figuras 15 a 17 é possível concluir que os espectros e respectivos máximos de absorvência correspondem a polifenóis, uma vez que estes absorvem na região ultravioleta (100 – 400 nm). Realmente, C. Proestos *et al.*, em 2006, identificaram por RP-HPLC (HPLC de fase reversa) e GC-MS (cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa) os compostos fenólicos presentes em 5 plantas aromáticas. Durante o trabalho concluíram que os derivados do ácido benzóico mostram um máximo de absorção a 246 – 262 nm e um ombro entre 290 – 315 nm, enquanto que o ácido gálgico apresenta um máximo a 271 nm. Para além disto explicam também que os flavonóides apresentam duas bandas características: a Banda II, com um máximo entre 240 – 285 nm, parece ter origem no anel A e a Banda I, com um máximo entre 300 – 550 nm parece ser atribuída à presença do anel B (figura 8). Neste sentido os compostos com t_r igual a 3,93, 13,52 e 14,55 minutos poderão corresponder a derivados do ácido benzóico ou a uma molécula como o ácido gálgico. Quanto aos compostos de t_r igual a 12,86 e 20,48 minutos parecem corresponder a flavonóides, uma vez que têm máximos de absorção nas gamas correspondentes à Banda I e à Banda II.

Estas primeiras observações não permitem identificar o polifenol correspondente a cada fracção maioritária. Assim, fizeram-se HPLC's de inúmeros padrões, tais como ácido ferrúlico, quercetina e rutina para se verificar se algum destes tinha tempo de retenção idêntico ao obtido para os compostos maioritários. Dos vários padrões analisados nenhum tinha tempo de retenção exactamente idêntico ao dos picos maioritários, nem os espectros de absorção eram

perfeitamente coincidentes (resultados não apresentados). Concluiu-se que a única forma de conseguir uma identificação correcta destes compostos seria através de MS.

Depois de determinados quais os picos do extracto de *G. robertianum* considerados maioritários pretendeu-se verificar se algum desses compostos contribuíria de forma mais significativa para as actividades inibitória de AChE e antioxidante obtidas (1.1. e 1.2., respectivamente). Para isto foi necessário isolar os diferentes compostos, através de corridas de HPLC preparativas em que se injectaram 25 µL de uma solução de 5 mg/mL, até se ter reunido volume significativo.

Os valores de IC₅₀ e EC₅₀ obtidos para o extracto foram, respectivamente, 765,88 ± 15,39 µg/mL e 6,53 ± 0,58 µg/mL pelo que se escolheu determinar a actividade inibitória de AChE e antioxidante recorrendo a soluções de cada uma das fracções maioritárias de 1000 µg/mL e 10 µg/mL, respectivamente. Os valores obtidos para as fracções encontram-se apresentados na tabela 5.

Tabela 5: Actividades inibitória de AChE e antioxidante obtidas para os cinco picos maioritários, a partir de uma solução de 1000 µg/mL (AChE) e 10 µg/mL (antioxidante).

Pico	Inibição de AChE (%)	Actividade Antioxidante (%)
1	---	---
2	23,52±1,83	48,43±5,68
3	25,28±0,33	43,35±2,14
4	31,45±0,60	38,34±1,67
5	---	---

Relativamente às fracções 1 e 5 não foi possível determinar as actividades inibitória de AChE e antioxidante pois os picos sofriam degradação imediatamente após a recolha, o que foi comprovado através de análises por HPLC em que os picos correspondentes a 1 e 5 estavam ausentes (Anexo 1B).

Analisando os resultados obtidos para os restantes picos é possível concluir que o extracto não possui um composto maioritário responsável pelas actividades obtidas mas que deve ser a acção sinérgica dos diversos compostos que promove os valores de IC₅₀ e EC₅₀ obtidos (tabela 3). No entanto, é possível verificar que a actividade antioxidante correspondente ao segundo composto maioritário é bastante elevada, visto que para uma concentração de 10 µg/mL se atinge 50% de extinção do radical DPPH.

2. Identificação dos compostos maioritários de *G. robertianum* por espectrometria de massa (MS)

O *Geranium robertianum* é uma planta medicinal muito utilizada em algumas regiões de Portugal e noutros países, como por exemplo o Reino Unido. No entanto, apesar de ser uma espécie vegetal utilizada há vários anos na medicina popular e ser possível encontrar referência à sua utilização em livros de divulgação, pouco se sabe acerca dos compostos presentes no *G. robertianum*, havendo já algumas referências bibliográficas que apontam para uma constituição rica em polifenóis.

Em 2000 I. Ivancheva e A. Petrova (2000), na Bulgária, estudaram 11 espécies de *Geranium*, entre elas o *G. robertianum*, concluindo que esta planta possuía flavonóides como o canferol e derivados do canferol (p.e.: canferol 3-metil éter e canferol 3,7 – dimetil éter) bem como derivados de quercetina (p.e.: quercetina 3,7 – dimetil éter e quercetina 3, 7, 3' – trimetil éter). Na Geórgia, em 2004, K. Kobakhidze e M. Alaniya (2004) estudaram os polifenóis de *G. robertianum*, tendo identificado ácido elágico, ácido cafeico, ácido gálico, hiperina, quercetina e canferol. Finalmente, em 2009, S. Amaral *et al.* (2009) estudaram extractos de plantas, entre eles o de *G. robertianum*, para identificar propriedades anti-inflamatórias das mesmas e quais os compostos presentes responsáveis pelas mesmas; os autores concluíram que o *G. robertianum* era constituído por 3 flavonóides, 3',4' – dimetoxiflavona, homoeriodictiol e canferol, sendo também possível identificar ácido síringico e derivados do ácido ferrúlico (ácido ferrúlico metil éter e ácido ferrúlico etil éter).

No presente trabalho um dos principais objectivos era identificar os compostos considerados maioritários. Para isto isolaram-se os compostos recorrendo à técnica de HPLC e procedeu-se à identificação recorrendo à espectrometria de massa (MS). Através dos espectros de massa obtidos identificaram-se as razões massa/carga de maior importância e, atendendo a que o extracto de *G. robertianum* é rico em polifenóis, pesquisou-se a correspondência com polifenóis conhecidos.

Na figura 18 apresenta-se o espectro de massa obtido para o primeiro composto maioritário ($t_r = 3,93$).

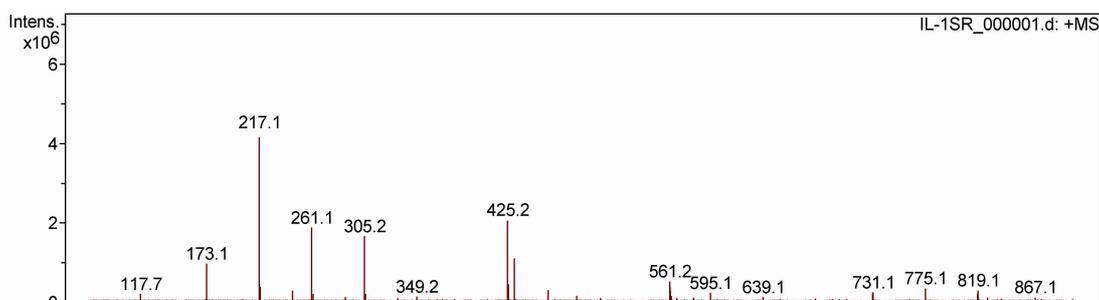


Figura 18: Espectro de massa (MS) obtido em modo positivo para a primeira fracção maioritária ($t_r = 3,93$ min).

A observação detalhada do espectro de MS da primeira fracção maioritária permitiu concluir que o pico de razão m/z igual a 425,2 era o maioritário, pois todos os outros foram excluídos por comparação com um branco (Anexo 1A). O branco correspondia ao espectro de massa obtido para uma amostra de HPLC em que se substituiu o extracto de *G. robertianum* por água. Atendendo a que não foram efectuadas experiências de MS^2 , o que é imperativo para a confirmação da molécula, apenas se pode propor uma estrutura para o composto maioritário presente na fracção 1. Assim, na figura 19, apresenta-se a estrutura proposta para a primeira fracção maioritária.

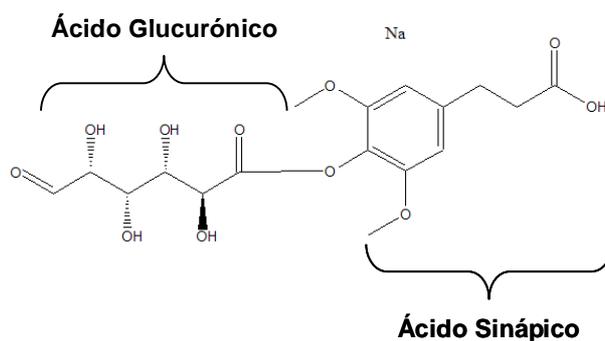


Figura 19: Estrutura da molécula presente na primeira fracção maioritária.

Realmente, sem um espectro de MS^2 a identificação do composto maioritário da primeira fracção torna-se menos precisa do que o que seria desejável. No entanto, tal como será apresentado no ponto 3.4. do presente capítulo, o estudo da desglucuronidação do extracto aquoso de *G. robertianum* por uma β -glucuronidase de *E. coli* permitiu concluir que o composto maioritário desta fracção é uma molécula glucuronada. Associando este facto ao espectro UV-Vis, que apresenta algumas das bandas típicas de ácidos fenólicos indica que uma molécula deste tipo pode ser realmente a principal componente da primeira fracção. Finalmente, a comparação da m/z medida, 425,2, com o padrão isotópico esperado para a molécula proposta levou a obtenção de um erro <5 ppm, o que indica que a molécula proposta pode realmente ser a molécula maioritária presente na primeira fracção.

Na figura 20 apresenta-se o espectro de massa obtido para o quinto composto maioritário ($t_r = 20,48$ min).

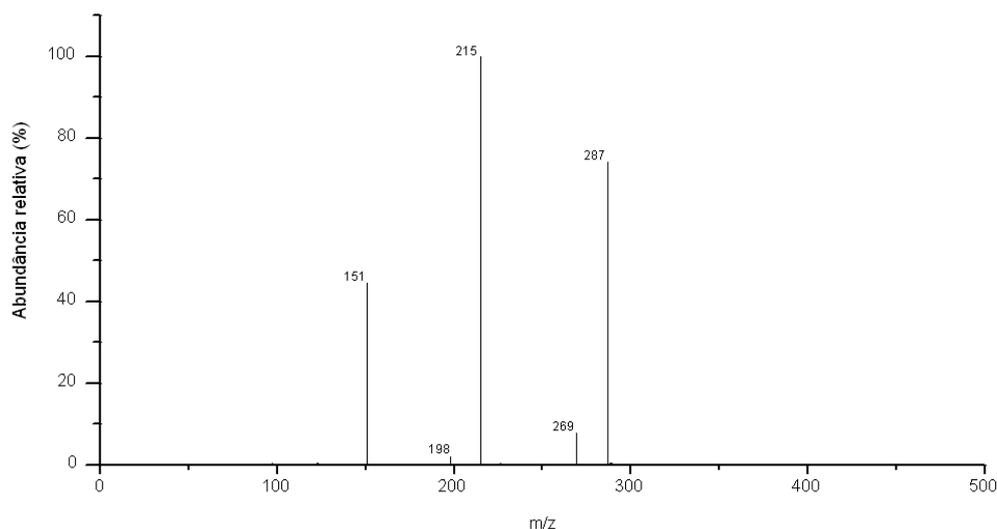


Figura 20: Espectro de massa (MS/MS) obtido em modo positivo para o composto maioritário 5 ($t_r = 20,48$ min).

Considerando o espectro de massa obtido propôs-se o esquema de fragmentação apresentado na figura 21.

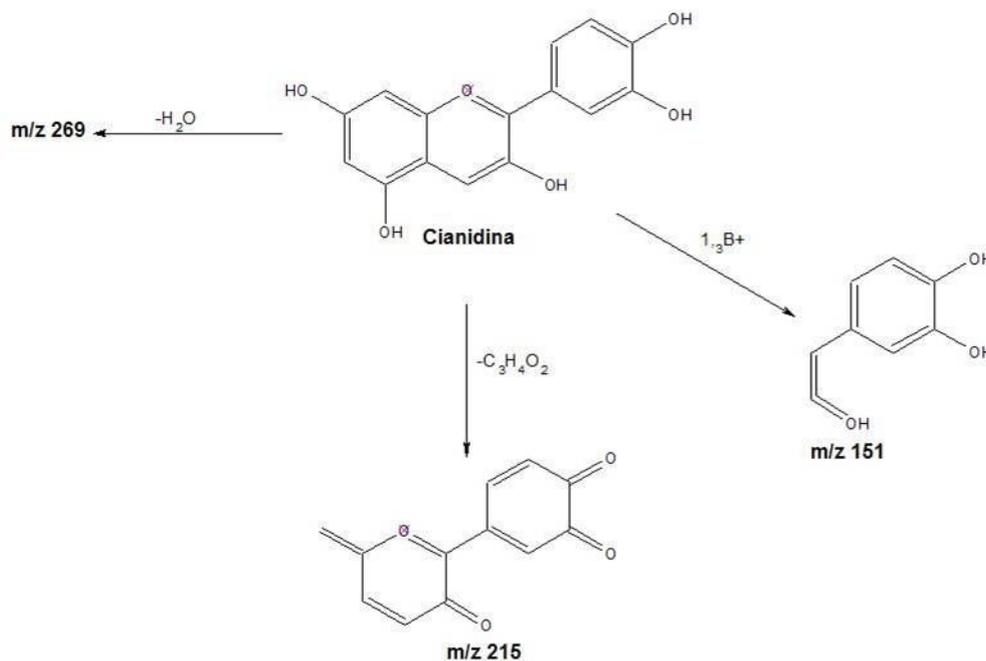


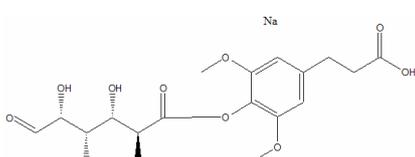
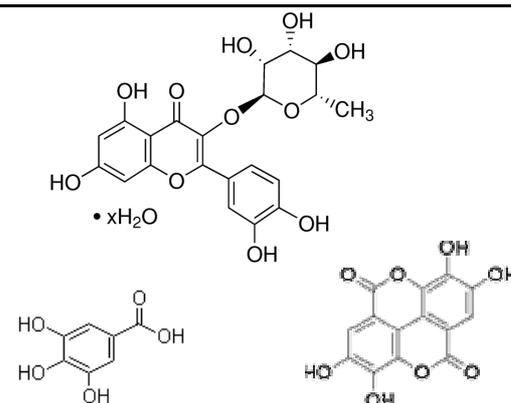
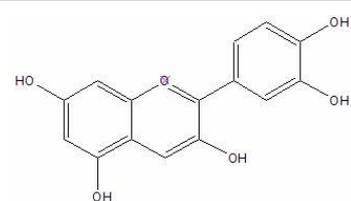
Figura 21: Esquema de fragmentação proposto para a fração maioritária 5, considerando o espectro de massa obtido.

Assim, a molécula presente na fração maioritária 5 deve ser a cianidina. A cianidina é uma molécula orgânica de origem natural, um tipo específico de antocianidina e um pigmento avermelhado encontrado maioritariamente em bagas de frutos, mas não limitado a estes. E, tal

como apresentado na figura 2, o *G. robertianum* caracteriza-se por ter, em determinadas épocas do ano, folhas avermelhadas. As cianidinas são moléculas bastante instáveis, devido à carga positiva a elas associada; este facto foi verificado aquando da identificação desta fracção. Efectivamente, pouco tempo depois de recolher a fracção por corridas de HPLC preparativas, foi possível verificar, pelos espectros de massa que se iam adquirindo, que estava a haver degradação da fracção em estudo. Ao injectar o volume de fracção restante comprovou-se a degradação da mesma (Anexo 1B). Finalmente, este tipo de molécula tem um elevado poder antioxidante, devido aos grupos hidroxilo disponíveis para a captação de radicais livres, o que contribui para a justificação do valor de EC₅₀ obtido, bastante inferior ao de outras plantas medicinais (tabela 3).

Na tabela 6 apresentam-se as razões m/z obtidas por MS e os polifenóis propostos para essas mesmas razões. Ao observar a tabela é possível concluir que o extracto de *G. robertianum* deve ser constituído, maioritariamente, por polifenóis. No entanto, no que diz respeito à identificação dos compostos maioritários 1, 2, 3, e 4 é essencial continuar a identificação por MS, através da obtenção de espectros de massa MS² que permitam confirmar o composto através de padrões de fragmentação.

Tabela 6: Razões m/z maioritárias, obtidas em modo positivo, para cada uma das fracções de *G. robertianum* estudadas e respectivos compostos e estruturas propostas.

t _r (min)	m/z	Composto proposto	Estrutura Composto
3,93	425,2	Ácido sinápico glucuronado	
12,86 13,52 14,55	449; 193; 303	Quercitrina ou Astragalina; Ácido Gálgico; Ácido Elágico	
20,48	287	Cianidina	

3. Metabolismo *in vitro* do extracto de *G. robertianum*

3.1. Digestão do extracto de *G. robertianum* pelo suco gástrico artificial

Um dos objectivos do trabalho era verificar se o extracto aquoso de *G. robertianum* sofria degradação durante a digestão pelo suco gástrico artificial, ou se havia formação de novos compostos. Para atingir o objectivo proposto seguiu-se o procedimento descrito em 10.1. (Capítulo II).

Ao analisar os resultados foi possível, através dos perfis cromatográficos obtidos para as 0 e 4 horas de digestão (figura 22), concluir que não existe degradação do extracto quando em contacto com este suco digestivo (cromatogramas apresentados em separado no Anexo 2A). Efectivamente, o extracto aquoso de *G. robertianum* (10 mg/mL) provou ser bastante estável quando em contacto com o suco gástrico artificial, sendo necessário determinar as actividades biológicas de maior relevância para assegurar que se mantêm semelhantes às apresentadas pelo extracto aquoso original.

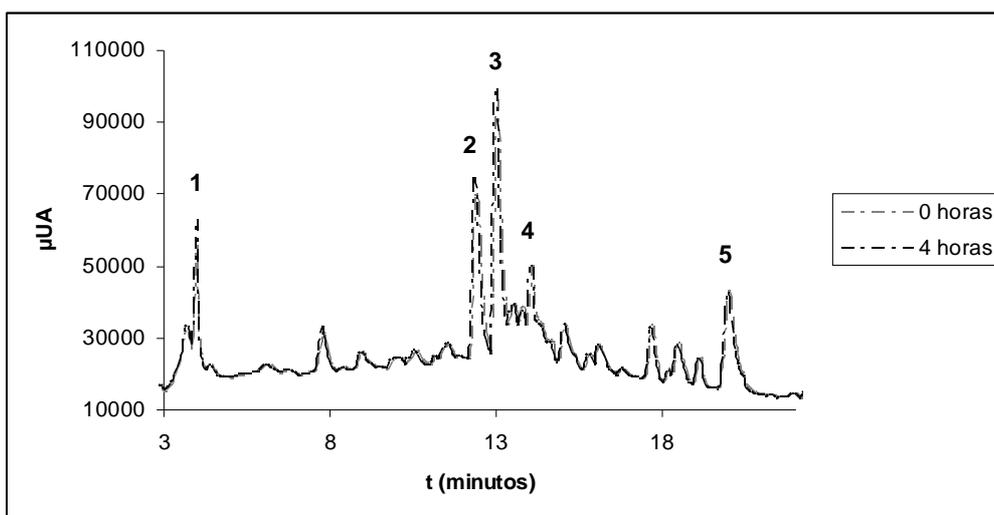
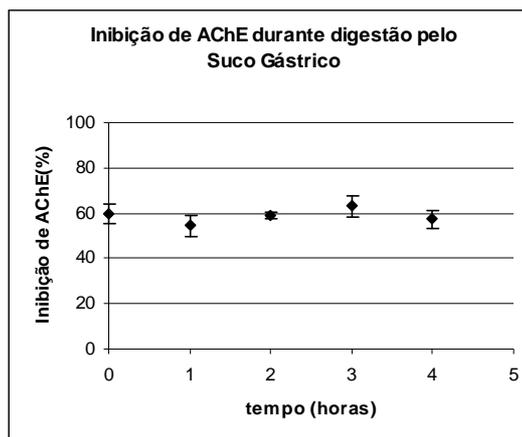


Figura 22: Perfis cromatográficos de uma solução de *G. robertianum* (1 mg/mL) às 0 horas (cinza) e 4 horas (preto) de digestão pelo suco gástrico artificial. 1: ácido sinápico glucuronado; 2/3/4: quercitrina, ácido elágico e ácido gálico; 5: cianidina.

Analisando de uma forma mais detalhada os dois cromatogramas obtidos é possível concluir que o extracto de *G. robertianum* é bastante estável na presença do suco gástrico artificial, não havendo degradação significativa de nenhum dos picos maioritários. Atendendo a que os picos maioritários do extracto são polifenóis, este resultado era já esperado uma vez que, de acordo com Scalbert *et al.* (2002) e Gomes *et al.* (2008), este tipo de moléculas é bastante estável quando em contacto com o suco gástrico, sendo resistente ao pH ácido característico do mesmo.

Paralelamente à análise do extracto aquoso de *G. robertianum* às diferentes horas de digestão, pretendia-se determinar se o extracto em digestão perdia alguma das suas actividades biológicas: inibitória de AChE e antioxidante. Para atingir este objectivo seguiu-se o procedimento descrito em 6. e 7. (Capítulo II) e os resultados obtidos apresentam-se nas figuras 23 (Actividade Inibitória de AChE) e 24 (Actividade Antioxidante). A determinação das actividades biológicas mais relevantes foi feita recorrendo a concentrações de amostra próximas dos valores obtidos para o IC₅₀ e EC₅₀. Assim utilizaram-se amostras de concentrações 1000 µg/mL (inibição de AChE) e 10 µg/mL (actividade antioxidante).

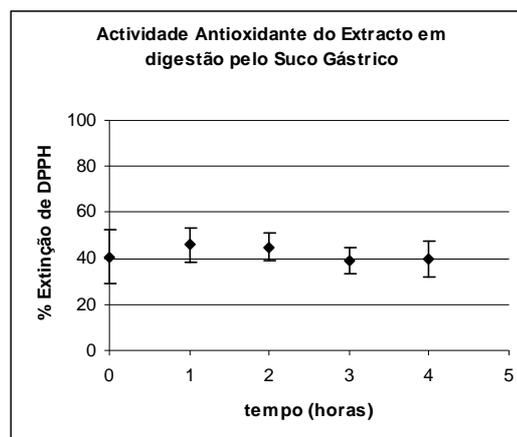
Figura 23: Inibição de AChE pelo extracto de *G. robertianum* (1000 µg/mL), ao longo das 4 horas de digestão pelo suco gástrico (ensaio realizado em triplicado, P <0,05).



Ao observar a figura 23 é possível concluir que, durante a digestão pelo suco gástrico, não há perda de actividade inibitória de AChE por parte do extracto de *G. robertianum*, quando comparado com o extracto original (tabela 3). No entanto, a análise estatística realizada permitiu verificar que existem diferenças significativas entre as diferentes horas do ensaio de digestão pelo suco gástrico *in vitro*.

Tendo em conta os perfis cromatográficos apresentados em cima, os resultados obtidos para a actividade inibitória de AChE são os esperados, uma vez que não parece ter havido alterações das fracções maioritárias. Sendo o extracto tão estável na presença do suco gástrico era de esperar que se mantivesse a inibição enzimática observada *para* o extracto aquoso original.

Figura 24: Actividade antioxidante do extracto de *G. robertianum* (10 µg/mL), ao longo das 4 horas de digestão pelo suco gástrico (ensaio realizado em triplicado, P <0,05).



No que diz respeito à actividade antioxidante (figura 24) é possível observar que a % de extinção do radical DPPH se mantém estável durante a digestão pelo suco gástrico, tal como foi comprovado pela realização da análise estatística adequada, que permitiu concluir que não existem diferenças significativas entre os valores de actividade antioxidante obtidos para as diferentes horas de ensaio.

Tendo em conta que os perfis cromatográficos obtidos para as 0 e 4 horas são perfeitamente coincidentes (figura 22), é de esperar que durante a digestão pelo suco digestivo a actividade antioxidante se mantenha constante, tal como observado na figura 24.

Em suma, ao submeter o extracto de *G. robertianum* a uma digestão pelo suco gástrico artificial (pH 1,2) foi possível concluir que o extracto é estável na presença deste suco digestivo (figura 22), mantendo o seu perfil cromatográfico durante as 4 horas de digestão. Também o pico 5, identificado como cianidina, é bastante estável durante a digestão pelo suco gástrico, o que não seria de esperar devido à sua estrutura instável; no entanto, o facto de estar presente em simultâneo com todas as outras moléculas do extracto aquoso deve promover a sua estabilidade. No que diz respeito às actividades biológicas características do extracto, inibição do enzima AChE e actividade antioxidante, foi possível verificar que não há uma perda acentuada de actividade biológica. A percentagem de inibição do enzima AChE, para uma solução de 1000 µg/mL, era superior a 50% (figura 23). Finalmente, no que diz respeito à actividade antioxidante observou-se que a solução de 10 µg/mL mantém uma percentagem de extinção de DPPH de 40 – 50% durante toda a digestão (figura 24), não havendo perda significativa desta actividade biológica, durante as 4 horas de ensaio.

3.2. Digestão do extracto de *G. robertianum* pelo suco pancreático artificial

Para além da digestão com o suco gástrico também se pretendeu estudar o metabolismo do extracto aquoso de *G. robertianum* pelo suco pancreático artificial, monitorizando por HPLC possíveis alterações do mesmo. Para atingir o objectivo proposto seguiu-se o procedimento já descrito em 10.2. (Capítulo II).

Tal como se observou na presença do suco gástrico, o extracto de *G. robertianum* é também estável na presença do suco pancreático artificial, o que foi possível concluir através da observação dos perfis cromatográficos obtidos para as 0 e 4 horas de digestão (figura 25 e 26).

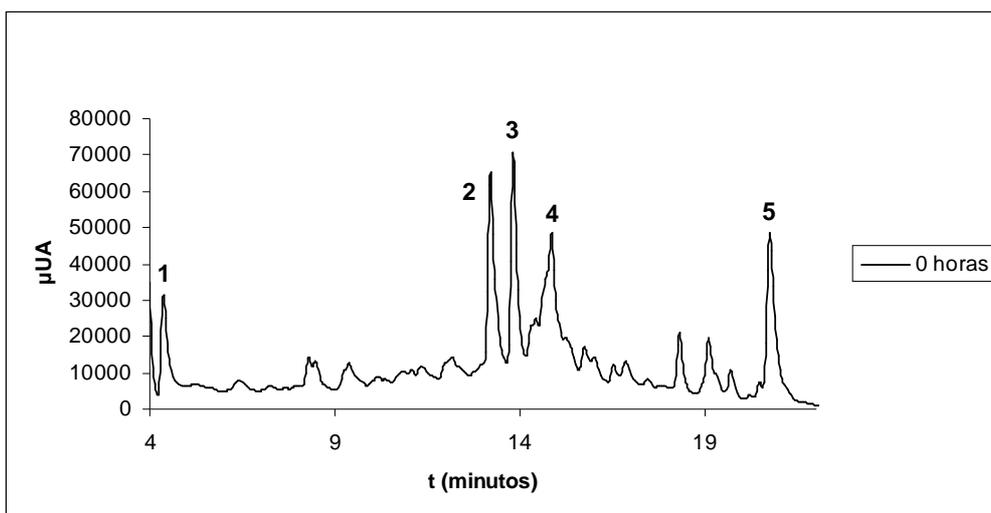


Figura 25: Perfil cromatográfico de uma solução de *G. robertianum* (1 mg/mL) às 0 horas de digestão pelo suco pancreático artificial. **1:** ácido sinápico glucuronado; **2/3/4:** quercitrina, ácido elágico e ácido gálico; **5:** cianidina.

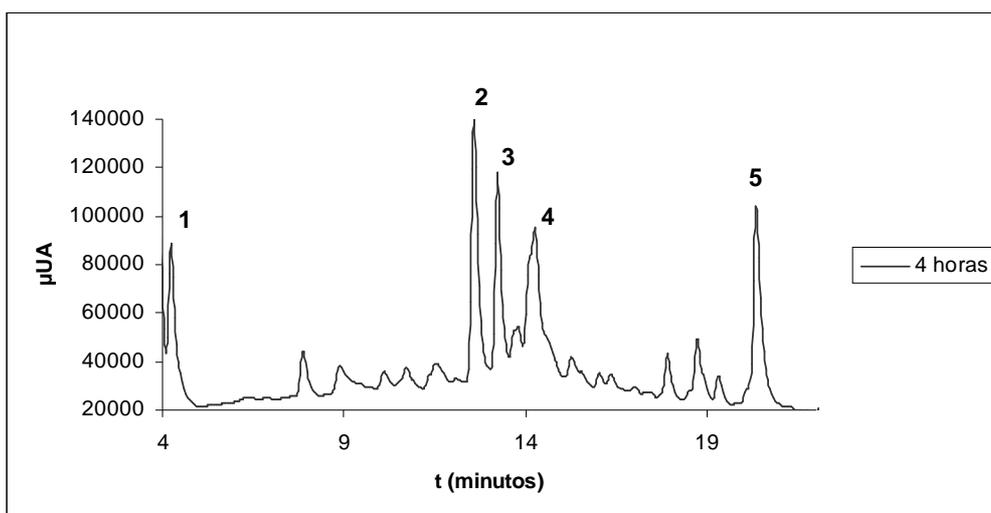


Figura 26: Perfil cromatográfico de uma solução de *G. robertianum* (1 mg/mL) às 4 horas de digestão pelo suco pancreático artificial. **1:** ácido sinápico glucuronado; **2/3/4:** quercitrina, ácido elágico e ácido gálico; **5:** cianidina.

Ao analisar os dois cromatogramas obtidos de forma mais detalhada é possível concluir que não há degradação de nenhuma das fracções maioritárias, sendo até possível observar um aumento de intensidade dos picos 2 e da cianidina, quando comparados com o cromatograma obtido para o extracto original (figura 14).

No que diz respeito ao pico 2 há um claro aumento de intensidade entre as 0 e as 4 horas de digestão. No entanto, ao comparar os cromatogramas das figuras 25 e 26 com o cromatograma do extracto original (figura 14), é possível observar que existem vários picos minoritários, cujos

t, estão compreendidos entre os 4 e 8 minutos, que parecem estar completamente ausentes no cromatograma do extracto em digestão pelo suco pancreático. Deste modo, sugere-se que algum destes picos minoritários seja metabolizado, quando em contacto com o suco digestivo artificial, originando o pico 2. Finalmente, a cianidina também sofre um aumento de intensidade ao longo de 4 horas de digestão pelo suco pancreático *in vitro*. Ao observar as figuras 25 e 26 verifica-se que há um aumento de intensidade das 0 horas para as 4 horas.

O aumento destas fracções maioritárias não está relacionado com a solução de suco pancreático artificial utilizada, uma vez que os enzimas aí presentes, amilases, lipases, ribonucleases, proteases e tripsina, catalisam reacções não relacionadas com o tipo e estrutura dos polifenóis, não podendo ser responsáveis pela sua metabolização. Deste modo, o que pode ter despoletado este aumento de intensidades e, conseqüentemente, a quantidade da fracção maioritária 2 e da cianidina, é uma concentração da amostra durante a digestão. Realmente, o extracto de *G. robertianum* não é imediatamente dissolvido em água, ficando sempre pequenas partículas em suspensão, que podem implicar o recurso a ultra-sons para assegurar a completa dissolução do extracto. Atendendo a que não há agitação da mistura reaccional durante as 4 horas de digestão, é possível considerar que há uma precipitação gradual de componentes do extracto, levando a que, às últimas horas da digestão, se recolha uma muito maior quantidade de amostra que às primeiras horas da mesma. Se se considerar que a cada hora de digestão se recolhem 950 µL de amostra é possível especular que às últimas horas de digestão o volume da mistura reaccional está bastante diminuído e, por isso, há maior probabilidade de entrar em contacto com o extracto de *G. robertianum* que foi precipitando.

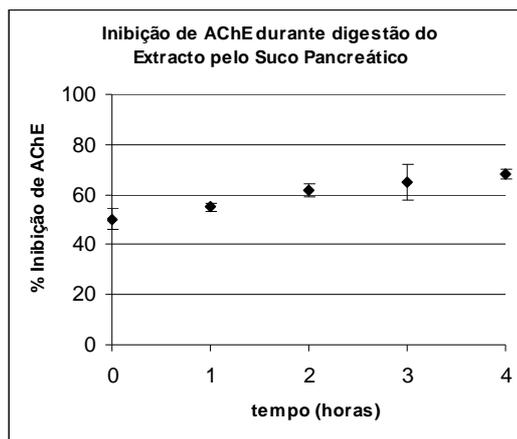
Relativamente ao pico 4, o aumento da sua intensidade pode estar relacionado com a degradação quase total de um pico minoritário imediatamente anterior a si (figura 14). Ao comparar os perfis cromatográficos obtidos para as 0 e 4 horas de digestão (figuras 25 e 26) e comparando-os com o cromatograma obtido para o extracto original (figura 14) é possível verificar que os dois picos imediatamente anteriores ao pico 4 estão ausentes, e que a quarta fracção maioritária apresenta uma resolução muito pobre, o que indica que deve ter havido junção destes três picos. Efectivamente, é possível pensar que os picos minoritários imediatamente anteriores possam estar estruturalmente relacionados com o pico 4 e, aquando da digestão pelo suco pancreático, sofrer degradação e originar o pico maioritário.

Relativamente aos picos 1 e 3, estes mantêm-se bastante estáveis durante a digestão pelo suco pancreático, quando comparados com o extracto de *G. robertianum* original (figura 14).

Tal como no caso da digestão pelo suco gástrico (3.1.), também se pretendia verificar se o extracto perdia as suas actividades originais de inibição de AChE e actividade antioxidante. Assim, recorreu-se aos procedimentos descritos em 6. e 7. (Capítulo II) para se determinar as actividades inibitória de AChE e antioxidante, respectivamente.

Na figura 27 apresenta-se o gráfico que traduz a variação da actividade inibitória de AChE, para uma solução de 1000 µg/mL, ao longo das 4 horas de digestão.

Figura 27: Inibição de AChE pelo extracto de *G. robertianum* (1000 µg/mL), ao longo das 4 horas de digestão pelo suco pancreático (ensaio realizado em triplicado, $P < 0,05$).

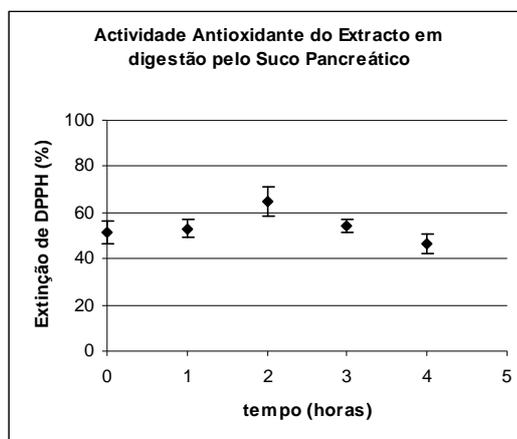


Ao analisar a figura 27 verifica-se que há um aumento da inibição de AChE pela solução aquosa de *G. robertianum* submetida a uma digestão pelo suco pancreático, tendo sido comprovado através de uma análise estatística adequada que estas diferenças na % de inibição do enzima são significativas. Realmente, às 0 horas de digestão, a solução de 1000 µg/mL inibe cerca de 50% da actividade do enzima mas, às 4 horas de digestão a solução de igual concentração inibe, aproximadamente, 70% da actividade enzimática.

Atendendo a que se observou um aumento de intensidade dos picos maioritários ao longo da digestão, é compreensível que esta seja acompanhada de aumento da actividade inibitória de AChE, uma vez que já tinha sido possível concluir que é a actividade sinérgica dos vários compostos presentes no extracto de *G. robertianum* que contribui para a inibição global do enzima. Se se considerar que há uma concentração da amostra ao longo da digestão, devido à precipitação gradual do extracto de *G. robertianum*, por ausência de agitação, também se justifica que ocorra este aumento da inibição da actividade enzimática.

Também no caso da digestão pelo suco pancreático pretendeu-se determinar a actividade antioxidante do extracto ao longo deste processo digestivo *in vitro*. Assim, calculou-se a actividade antioxidante de uma amostra de concentração 10 µg/mL às diferentes horas de digestão (figura 28).

Figura 28: Actividade antioxidante do extracto de *G. robertianum* (10 µg/mL), ao longo das 4 horas de digestão pelo suco pancreático (ensaio realizado em triplicado, $P < 0,05$).



A análise da figura 28, que traduz a actividade antioxidante do extracto ao longo da digestão, mostra que, ao contrário da inibição do enzima AChE, esta não aumenta ao longo da digestão. Observa-se um aumento da actividade antioxidante até às 2 horas de digestão, seguida da sua até um valor semelhante ao apresentado às 0 horas. A análise realizada para o estudo das diferenças observadas na % de

inibição de AChE permitiu concluir que as diferenças observadas na % de extinção do DPPH ao longo da digestão são também significativas.

Assim, no caso da actividade antioxidante, sugere-se que algum composto minoritário que sofre degradação/metabolização durante a digestão, potencia a diminuição da actividade antioxidante ao longo das diferentes horas de ensaio. O que foi observado para a actividade antioxidante do extracto em digestão pelo suco pancreático é semelhante ao observado para a digestão pelo suco gástrico. Esta ligeira diminuição da actividade antioxidante pode estar relacionada, como já foi explicado, com a metabolização de algum composto minoritário mas também com as condições em que o extracto é mantido. O extracto utilizado para a determinação das actividades biológicas apresentadas em 1.1. e 1.2. foi feito em H₂O enquanto que, aquando da digestão pelo suco gástrico *in vitro*, este é mantido em contacto com uma solução de pH ácido (1,2) e, durante a digestão pelo suco pancreático artificial, o extracto está em contacto com uma solução de pH básico (8) e na presença de tampão k-fosfatos.

Em suma, ao submeter o extracto de *G. robertianum* a uma digestão pelo suco pancreático artificial (pH 8) concluiu-se que o extracto e seus compostos maioritários (ácido sinápico glucuronado, quercitrina, ácido gálico, ácido elágico e cianidina) são bastante estáveis (figuras 25 e 26). Efectivamente foi possível observar, através dos perfis cromatográficos obtidos, que há um aumento da intensidade de alguns dos compostos maioritários, quando se compara o perfil cromatográfico obtido às 0 horas com o das 4 horas. Atendendo a que o suco pancreático não promove, só por si, a formação destes compostos, é possível pensar que será a degradação/metabolização de vários picos minoritários que promove o aumento de intensidade observado para os compostos maioritários ou, tal como explicado acima, ocorre uma concentração da amostra devido à precipitação gradual do extracto de *G. robertianum*.

No que diz respeito à actividade inibitória de AChE é possível verificar que a % de inibição do enzima aumenta ao longo da digestão, atingindo valores próximos de 80% às 4 horas de digestão (figura 27). Estes valores de inibição da actividade enzimática, obtidos para uma amostra de concentração 1000 µg/mL, mostram que o extracto aquoso é bastante estável, mesmo quando em digestão pelo suco pancreático. Finalmente, a determinação da actividade antioxidante permitiu concluir que, ao contrário do que se verificou para a inibição da actividade enzimática, há uma ligeira diminuição da actividade antioxidante do extracto durante a digestão. A extinção de DPPH atinge os 65%, às 2 horas, diminuindo a % de extinção do radical até às 4 horas de ensaio (figura 28). No caso desta actividade biológica a degradação/metabolização de compostos minoritários deve promover a diminuição da actividade antioxidante.

3.3. Digestão do extracto de *G. robertianum* por células Caco-2

Outro objectivo do presente trabalho era verificar se o extracto de *G. robertianum* em contacto com a linha celular Caco-2 sofria qualquer tipo de alteração, visível através do perfil cromatográfico obtido.

A linha celular humana Caco-2 tem sido utilizada extensivamente ao longo dos últimos 20 anos como um modelo *in vitro* da barreira intestinal. A linha celular parental, originalmente obtida de um adenocarcinoma colorrectal, sofre um processo de diferenciação espontânea, quando em cultura, promovendo a formação de monocamadas celulares, que apresentam diversas características morfológicas e funcionais típicas de enterócitos maduros.

O modelo celular Caco-2 é utilizado para determinar a absorção de fármacos em estudo e os mecanismos de transporte e metabolismo de fármacos e químicos. A FDA reconheceu este modelo como o adequado para determinar a classificação de um composto de acordo com o seu perfil de absorção e sua integração no *Biopharmaceutics Classification System*. Para além da sua utilidade como modelo de absorção, as células Caco-2 são muito úteis para estudar o metabolismo de fármacos e, mais recentemente, têm sido utilizadas para determinar os mecanismos de efluxo de conjugados de Fase II de fármacos e produtos naturais. Contudo, as células Caco-2 nem sempre expressam quantidades adequadas de transportadores e/ou enzimas, o que pode promover o aparecimento de vias metabólicas alternativas ou a predisposição para o transporte via um determinado intermediário ou metabolização por uma via metabólica particular. Tendo isto em conta, tem sido estudada a manipulação genética desta linha celular, para tornar os estudos de absorção e metabolismo mais eficientes e correctos. (Hu M. *et al.*, 2008)

Antes de iniciar o estudo da digestão de *G. robertianum* por células Caco-2 foi necessário determinar se esta mesma espécie vegetal não é citotóxica. Com esse objectivo seguiu-se o procedimento descrito em 11.1. (Capítulo II) e verificou-se que, para as concentrações de extracto aquosos utilizadas (0,6 mg/mL – 10 mg/mL), a viabilidade celular era sempre superior a 90% (Anexo 2B). Deste modo, foi possível concluir que o extracto de *G. robertianum* não é tóxico para as células Caco-2, tornando possível a realização do ensaio de digestão do extracto por estas células utilizando uma concentração inicial de 10 mg/mL de extracto aquoso de planta.

Previamente ao estudo de digestão de *G. robertianum* por células Caco-2 verificou-se se o extracto aquoso não era degradado pela solução salina HBSS em que se iria realizar a digestão pelas células. Assim, seguiu-se o procedimento descrito em 11.2. (Capítulo II) e verificou-se que o extracto aquoso de *G. robertianum* era estável na presença de HBSS (Anexo 2C). Estavam então reunidas todas as condições necessárias à realização do ensaio.

No presente trabalho, tal como apresentado em 11.2. (Capítulo II), semearam-se as células em caixas de Petri durante cerca de 15 dias, altura em que as células estão polarizadas de forma heterogénea e diferenciadas, permanecendo aderentes à superfície da caixa de Petri (Kern S.

et al., 2003). Nesta altura foi possível iniciar o ensaio, promovendo o contacto entre as células e o extracto de *G. robertianum* durante 6 horas. Os perfis cromatográficos obtidos para as 0 e 6 horas (figura 29) permitem observar que não há degradação nem diminuição da concentração de nenhum dos compostos considerados maioritários (ácido sinápico glucuronado, quercitrina, ácido gálgico, ácido elágico e cianidina), mantendo-se o perfil cromatográfico estável ao longo do tempo do ensaio (Cromatogramas apresentados em separado Anexo 2D).

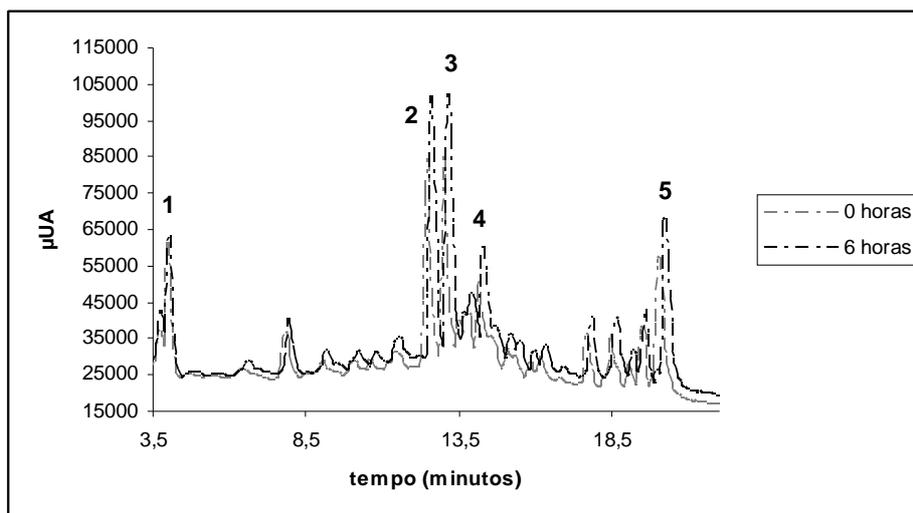


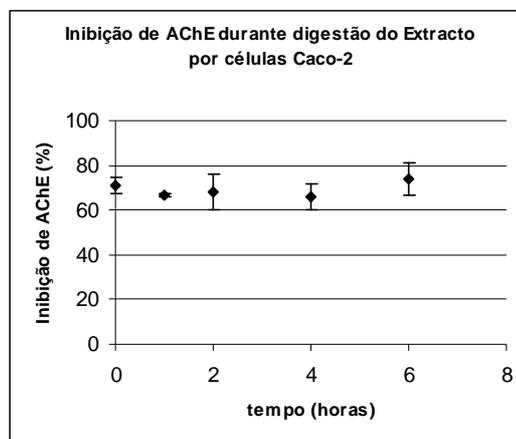
Figura 29: Perfil cromatográfico de uma solução aquosa de extracto de *G. robertianum* (1 mg/mL) às 0 horas (cinza) e 6 horas (preto) de digestão por células Caco-2. **1:** ácido sinápico glucuronado; **2/3/4:** quercitrina, ácido elágico e ácido gálgico; **5:** cianidina.

Os resultados obtidos, e apresentados na figura 29, estão de acordo com a bibliografia. Atendendo a que os compostos presentes em *G. robertianum* são principalmente polifenóis, era de esperar que não sofressem alterações na presença de células Caco-2, pois este tipo de compostos é bastante estável no tracto gastrointestinal. No entanto, existem estudos que indicam que os polifenóis conseguem permear as membranas das células Caco-2, principalmente se estiverem puros e em soluções tamponadas, ao invés de presentes numa mistura complexa como o “chá” ou outra bebida (Cilla A. *et al.*, 2009). Assim, seria possível considerar que os polifenóis presentes em quantidades moderadas no extracto aquoso de *G. robertianum* pudessem permear as membranas celulares, ainda que em quantidades bastante diminuídas. Este tipo de compostos tem uma estrutura química complexa, elevado peso molecular, entre outras características que dificultam a absorção pela barreira gastrointestinal, excepto se existirem enzimas específicos capazes de metabolizar os polifenóis, tornando-os moléculas mais simples e de fácil absorção. (Scalbert e Williamson, 2000; Scalbert *et al.*, 2002)

Também no caso da digestão por células Caco-2 pretendeu-se verificar se havia ou não perda das actividades biológicas atribuídas ao extracto de *G. robertianum* original (tabela 3). Para isso seguiu-se o procedimento descrito em 6. e 7. e determinou-se, respectivamente, a

actividade inibitória de AChE e antioxidante, ao longo da digestão (figuras 30 e 31). Tendo em conta que, através da análise por HPLC, foi possível concluir que não havia degradação dos compostos maioritários de *G. robertianum* na presença de células Caco-2, esperava-se que as actividades inibitória de AChE e antioxidante apresentem valores semelhantes aos obtidos para o extracto original.

Figura 30: Inibição de AChE pelo extracto de *G. robertianum* (1000 µg/mL), ao longo das 6 horas de digestão por células Caco-2 (ensaio realizado em triplicado, $P < 0,05$).

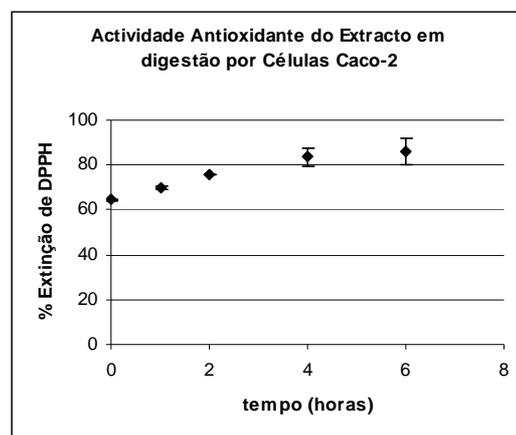


Ao analisar a figura 30 é possível concluir que, tal como esperado, não há qualquer perda de actividade inibitória de AChE pelo extracto de *G.*

robertianum, 1000 µg/mL, em digestão por células Caco-2. Efectivamente, durante as 6 horas de ensaio os valores de inibição da actividade enzimática mantêm-se entre 60 – 80% e, o recurso à análise estatística adequada, permitiu concluir que as diferenças observadas entre os valores de inibição de AChE ao longo das 6 horas não são significativas.

Para além da determinação desta última actividade biológica, inibição do enzima acetilcolinesterase, pretendeu-se, como realizado para todas as digestões efectuadas, determinar a actividade antioxidante ao longo das 6 horas de digestão (figura 31).

Figura 31: Actividade antioxidante do extracto de *G. robertianum* (10 µg/mL), ao longo das 6 horas de digestão por células Caco-2 (ensaio realizado em triplicado, $P < 0,05$).



A observação da figura 31 permite observar um aumento significativo da actividade antioxidante de *G. robertianum*, ao longo das 6 horas de digestão por células Caco-2, como comprovado pela análise estatística efectuada. Deste modo, é possível concluir que o extracto não perde a sua actividade antioxidante original, havendo um ligeiro aumento da mesma ao longo da digestão por células Caco-2.

Tendo em conta que os perfis cromatográficos se mantêm idênticos (figura 29) seria de esperar que as actividades biológicas de relevância se mantivessem constantes ao longo das 6 horas de ensaio. Realmente, ao analisar a figura 30 é possível verificar que a actividade inibitória de acetilcolinesterase se mantém aproximadamente constante ao longo do tempo, havendo uma

% de inibição do enzima de cerca de 70%; no que diz respeito à actividade antioxidante, a observação da figura 31 mostra um ligeiro aumento desta actividade biológica, ao longo do ensaio, com uma % de extinção de DPPH de 60% às 0h e, aproximadamente, 90% às 6h. Este aumento da actividade antioxidante não era esperado, podendo dever-se ao contacto do extracto com a solução salina HBSS ou ao facto de, ao longo do ensaio, o extracto aquoso de *G. robertianum* precipitar no fundo da caixa de Petri, o que implica que a recolha de amostra às 4 e 6h é acompanhada de uma maior quantidade de extracto. Tendo em conta esta possibilidade seria de esperar que a actividade inibitória de AChE também aumentasse ao longo das 6 horas, mas a determinação da actividade antioxidante é muito mais sensível a oscilações na concentração de extracto.

Ao fim das 6 horas de ensaio rebentaram-se as células Caco-2, através da adição de uma solução TFA: MeOH (1:10) e ciclos de sonicação, para se determinar se o extracto de *G. robertianum* tinha conseguido permear a membrana celular. Na figura 32 apresenta-se o cromatograma correspondente ao interior das células ao fim das 6 horas de ensaio.

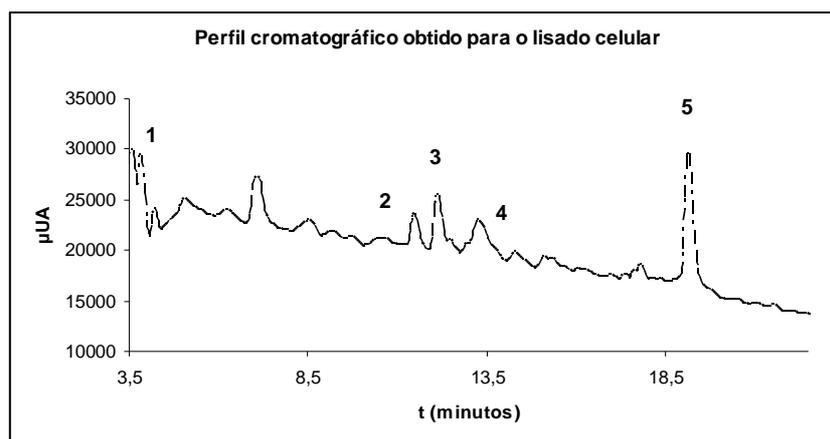


Figura 32: Perfil cromatográfico correspondente ao interior das células Caco-2, após 6 horas em contacto com o extracto de *G. robertianum* 10 mg/mL. **1:** ácido sinápico glucuronado; **2/3/4:** quercitrina, ácido elágico e ácido gálgico; **5:** cianidina.

Ao observar o cromatograma obtido é possível verificar que todos os compostos do extracto de *G. robertianum* conseguem permear a membrana das células Caco-2, ainda que de uma forma muito ténue. Os picos numerados de 1 a 5 representam as fracções maioritárias; no entanto, a intensidade correspondente a cada um deles é muito inferior à correspondente no exterior das células (figura 29). O pico correspondente ao quinto pico maioritário, a cianidina, é o que apresenta maior intensidade, ainda que muito inferior à original.

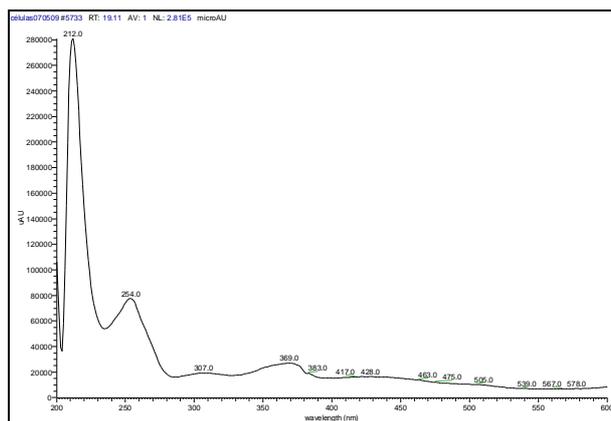


Figura 33: Espectro de absorção UV-Visível obtido para a cianidina encontrada no lisado celular, ao fim de 6 horas de ensaio.

Ao observar o espectros UV-Vis correspondente à quinta fracção maioritária, a cianidina (figura 33), é possível verificar que os máximos de absorção se mantêm idênticos aos apresentados para o extracto original (figura 17), ainda que com muito menor intensidade, o que comprova que, efectivamente, este composto conseguiu permear as membranas celulares. Deste modo é possível concluir que ainda que em pequena escala há entrada dos compostos maioritários do extracto aquoso de *G. robertianum*.

Em suma, o extracto de *G. robertianum* não é metabolizado pelas células Caco-2 ou por enzimas extracelulares ou outros compostos que possam ser secretados para o exterior, estando ausente a degradação de qualquer dos compostos maioritários, como é possível verificar pela comparação dos perfis cromatográficos às 0 e 6 horas de digestão (figura 29). No entanto, há permeação das moléculas de ácido sinápico glucuronado, quercitrina, ácido gálgico, ácido elágico e cianidina, ainda que em quantidades vestigiais. No que diz respeito às actividades biológicas do extracto foi possível verificar que a inibição de AChE se mantêm estável ao longo da digestão; a percentagem de inibição enzimática é de aproximadamente 70% para uma solução de extracto de 1000 µg/mL. Finalmente, a actividade antioxidante, para uma amostra de concentração 10 µg/mL, parece aumentar ligeiramente ao longo da digestão, o que pode estar relacionado com um concentração da amostra ao longo do tempo. Efectivamente, atendendo a que os perfis cromatográficos se mantêm estáveis, o aumento da % de extinção de DPPH de 60% (0h) para cerca de 90% (6h) pode-se dever a essa concentração de amostra na caixa de Petri.

3.4. Digestão do extracto de *G. robertianum* por β -glucuronidase de *E. Coli*

Numa última etapa do estudo do metabolismo gastrointestinal do extracto aquoso de *G. robertianum* estudou-se a sua digestão pelo enzima β -glucuronidase de *E. coli*, um enzima típico da microflora do tracto digestivo. Como A. Gomes *et al.* (2008) descrevem, o

metabolismo de polifenóis está também dependente da microflora intestinal que promove a metabolização de polifenóis associados a ramnose, arabinose ou xilose, originando as respectivas agliconas que, por sua vez, são metabolizadas a ácidos fenólicos. Estes compostos aromáticos podem ser absorvidos pelo cólon e conjugados com glicina, ácido glucurónico e sulfato. De acordo com estes autores, o equilíbrio entre a absorção de polifenóis e o seu metabolismo mostra que a maioria das formas encontradas *in vivo* são produtos de clivagem das reacções metabólicas promovidas pelos enzimas bacterianos do cólon e subsequente metabolismo hepático. Assim, a microflora existente ao longo do sistema digestivo parece ter um papel preponderante na metabolização de polifenóis.

Tendo em conta a importância atribuída à microflora do sistema digestivo e, atendendo a que os compostos maioritários de *G. robertianum* são polifenóis, estudou-se a digestão de uma solução aquosa de *G. robertianum* por uma β -glucuronidase, responsável pela hidrólise do ácido β -D-glucurónico, de *E. coli*. Com este objectivo seguiu-se o protocolo descrito em 12. (Capítulo II) e, nas figuras 34 e 35, apresentam-se os perfis cromatográficos correspondentes ao *G. robertianum* não sujeito à acção do enzima e sujeito à acção da β -glucuronidase.

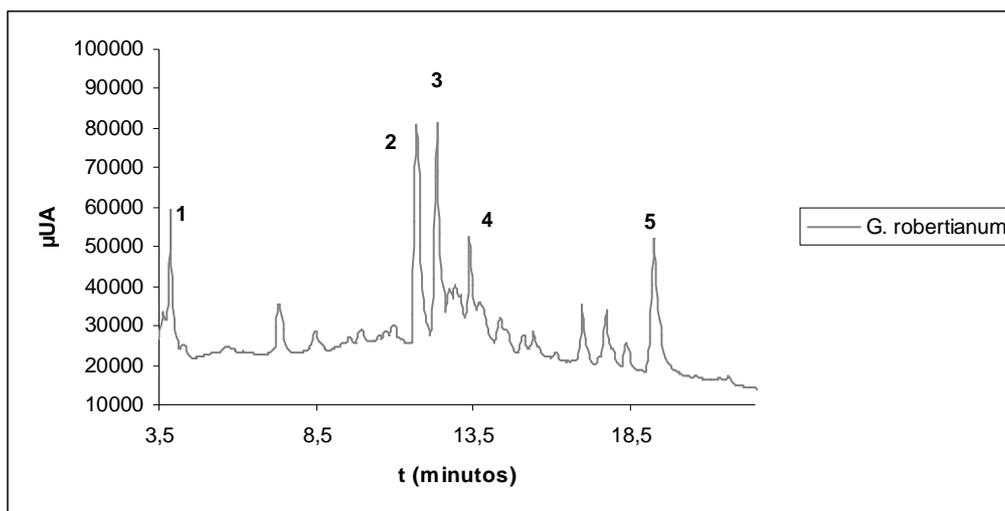


Figura 34: Perfil cromatográfico obtido para o extracto de *G. robertianum* (1 mg/mL) antes da acção de β -glucuronidase. **1:** ácido sinápico glucuronado; **2/3/4:** quercitrina, ácido elágico e ácido gálico; **5:** cianidina.

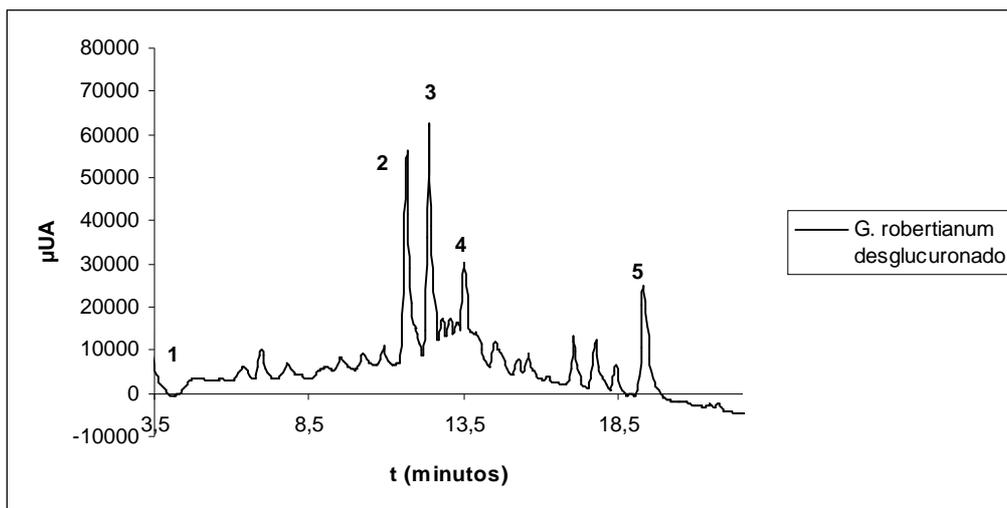


Figura 35: Perfil cromatográfico obtido para o extracto de *G. robertianum* (1 mg/mL) depois da acção de β -glucuronidase. **1:** ácido sinápico glucuronado ausente; **2/3/4:** quercitrina, ácido elágico e ácido gálico; **5:** cianidina.

Observando os dois perfis cromatográficos (figuras 34 e 35), é possível verificar que apenas o pico 1 parece sofrer a acção do enzima β -glucuronidase. Efectivamente, ao observar a figura 35 é possível verificar a ausência deste pico. Este pico foi identificado previamente (2.) e contém na sua estrutura um ácido glucurónico (tabela 6); assim, a sua ausência após a acção do enzima β -glucuronidase corrobora que o pico 1 será o ácido sinápico glucuronado, um ácido monoidroxicinâmico.

Tal como para as outras digestões também aqui se pretendeu verificar se havia ou não perda de actividade biológica, após a digestão com o enzima β -glucuronidase. Assim, determinou-se a inibição de AChE e actividade antioxidante, recorrendo aos procedimentos descritos em 6. e 7. (Capítulo II), respectivamente. A inibição de AChE foi feita com uma amostra de *G. robertianum* de concentração 1000 μ g/mL, obtendo-se uma inibição de $67,16 \pm 1,43$ %. A actividade antioxidante é proporcional à % de extinção do DPPH e, tal como para as outras digestões, utilizou-se uma amostra de *G. robertianum* de concentração 10 μ g/mL, obtendo-se uma % de extinção de $47,83 \pm 1,23$ %. Ao observar os valores obtidos para as duas actividades biológicas em análise é possível concluir que não há uma perda significativa de actividade biológica, quando comparando com o extracto aquoso de *G. robertianum* original (tabela 3).

Em suma, o extracto de *G. robertianum* em contacto com a β -glucuronidase de *E. coli* mantêm-se bastante estável, com excepção do primeiro pico maioritário, que parece estar ausente após acção enzimática (figuras 34 e 35). Relativamente às actividades biológicas, estas mantêm-se mesmo após a acção enzimática, o que indica que o primeiro pico maioritário não é determinante nem significativo para as actividades biológicas apresentadas pelo extracto de *G. robertianum*.

3.5. Suco Gástrico, Suco Pancreático e Células Caco-2 – Análise Integrada de Resultados

Na tabela 7 apresenta-se um resumo das alterações observadas para as actividades biológicas de maior relevância ao longo das diferentes horas de digestão pelos sucos digestivos artificiais e células Caco-2.

Tabela 7: Percentagem de inibição do enzima AChE e extinção do radical livre DPPH ao longo das digestões pelos sucos digestivos artificiais e células Caco-2. As amostras utilizadas para a determinação da inibição enzimática e actividade antioxidante tinham concentrações de 1000 µg/mL e 10 µg/mL, respectivamente.

tempo (horas)	Suco Gástrico		Suco Pancreático		Caco-2	
	AChE (%)	DPPH (%)	AChE (%)	DPPH (%)	AChE (%)	DPPH (%)
0	59,74±4,26	40,76±11,49	50,13±4,34	51,21±4,90	70,90±3,84	64,49±0,38
1	54,52±4,67	45,77±7,37	54,91±1,70	53,02±3,92	66,87±0,67	69,93±0,74
2	58,87±1,62	44,86±6,15	61,75±2,52	64,75±6,65	67,95±7,81	75,81±0,25
3	63,03±4,66	38,97±5,84	65,00±6,93	54,26±2,80	---	---
4	57,20±3,72	39,65±7,94	68,25±1,81	46,50±4,30	65,93±6,11	83,56±4,28
6	---	---	---	---	73,93±7,45	85,90±5,70

Ao observar a tabela-resumo é possível concluir que não há perda significativa das actividades biológicas de maior relevância. Isto é extremamente importante pois o objectivo final é que o extracto mantenha estas propriedades intactas, para assim aumentar as probabilidades de absorção do mesmo, entrada na corrente sanguínea e transporte para tecidos-alvo onde estas actividades biológicas possam ser relevantes, por exemplo locais de inflamação.

Analisando de forma mais detalhada a tabela 7 é possível verificar que o facto de não haver perda de actividade biológica é concordante com a ausência de degradação de qualquer um dos compostos maioritários, perante as várias digestões realizadas (figuras 22, 26, 25, 29, 34 e 35); para além disto, a reacção de desglucuronidação permitiu verificar o desaparecimento do pico maioritário 1, sugerindo que este deve conter um glucurónido na sua estrutura (figura 35), o facto das actividades biológicas se manterem semelhantes às obtidas para o extracto original permitiu concluir que esta primeira fracção maioritária não é essencial para as actividades apresentadas pelo extracto aquoso. No que diz respeito à inibição enzimática, esta é de um modo geral mais alta durante a digestão pelo suco pancreático e para a digestão por células Caco-2. No entanto, os valores obtidos permitem verificar que não há perda de capacidade inibitória de AChE ao longo dos diferentes ensaios, parecendo existir antes uma activação. Finalmente, a extinção de DPPH, reflexo da actividade antioxidante do extracto, é ligeiramente inferior para as digestões pelos sucos digestivos artificiais e bastante superior quando analisada a mesma actividade para a digestão por células Caco-2. Os valores obtidos podem

levar a concluir que há perda de actividade antioxidante durante a digestão pelo suco gástrico, talvez devido às condições do ensaio (pH 2) mas que esta mesma actividade recupera os seus valores normais aquando das duas digestões seguintes.

Atendendo a que a digestão é um processo contínuo, seria interessante utilizar sempre a mesma amostra de *G. robertianum* e mimetizar todo o processo digestivo, desde as secreções salivares, passando pelo sucos gástrico e pancreático e até promovendo a interacção com sais biliares, uma vez que os polifenóis podem talvez ser excretados pela bÍlis. Estudos idênticos já foram feitos por Laurent C. *et al.* (2007), para flavonóides extraídos de sementes de uva, e permitem tirar conclusões mais específicas acerca da efectiva metabolização dos polifenóis presentes na amostra.

3.6. Metabolismo hepático de Fase II – Glucuronidação do extracto de *G. robertianum*

O presente trabalho consistia no estudo do metabolismo *in vitro* de extractos aquosos de *G. robertianum* e sua possível aplicação na terapêutica da AD. Atendendo a que estes extractos aquosos entram no organismo humano por via oral, é fundamental assegurar que, ao estarem sujeitos às vias metabólicas típicas do tracto gastrointestinal e fígado, não perdem as suas propriedades originais ou que os metabolitos resultantes possuem propriedades equivalentes.

Para além de estarem sujeitos às condições dos sucos digestivos, os polifenóis, principais constituintes de *G. robertianum*, podem sofrer reacções metabólicas adicionais, ao longo da digestão. Uma primeira etapa no metabolismo deste tipo de compostos, anterior à absorção, é a desglucuronidação por uma β -glucuronidase (3.4.) ou quebra das moléculas complexas por acção de outros enzimas hidrolíticos presentes no intestino delgado. No entanto, no fígado estes compostos podem sofrer reacções de glucuronidação e sulfatação, reacções de fase II do metabolismo hepático, entre outras reacções de destoxificação; havendo a possibilidade de reglucuronidação de moléculas previamente desglucuronadas pelo enzima presente no intestino. Os polifenóis conjugados podem passar para a bÍlis, através da circulação entero-hepática, e chegar posteriormente ao cólon, onde a presença da microflora pode promover modificações extensivas, através de hidrólises, clivagem dos anéis e desidroxilação. Esta metabolização leva à formação de polifenóis de baixo peso molecular, cujas actividades biológicas podem estar bastante diminuídas ou alteradas. (Justino G. C. *et al.*, 2004)

Assim, pretendeu-se estudar o efeito das reacções típicas do metabolismo hepático nos compostos presentes no extracto aquoso de *G. robertianum*. Especificamente, estudou-se a reacção de glucuronidação, recorrendo aos procedimentos descritos em 12. (Capítulo II). Utilizou-se o extracto de fígado como fonte do enzima glucuronosiltransferase e recorreu-se ao respectivo co-factor, o ácido UDP-glucurónico (UDPGA) para obter compostos glucuronados e, uma vez que G. C. Justino *et al.* (2004) apresentam os resultados obtidos para a glucuronidação da quercetina, escolheu-se fazer um controlo positivo com este flavonóide, permitindo assim concluir se o extracto de fígado se encontra ou não activo.

Na figura 36 apresenta-se o cromatograma obtido para a quercetina glucuronada. Da observação do cromatograma é possível verificar que houve glucuronidação do flavonóide, sendo possível observar os três compostos glucuronados a que faz referência Justino G. C. *et al.* (2004).

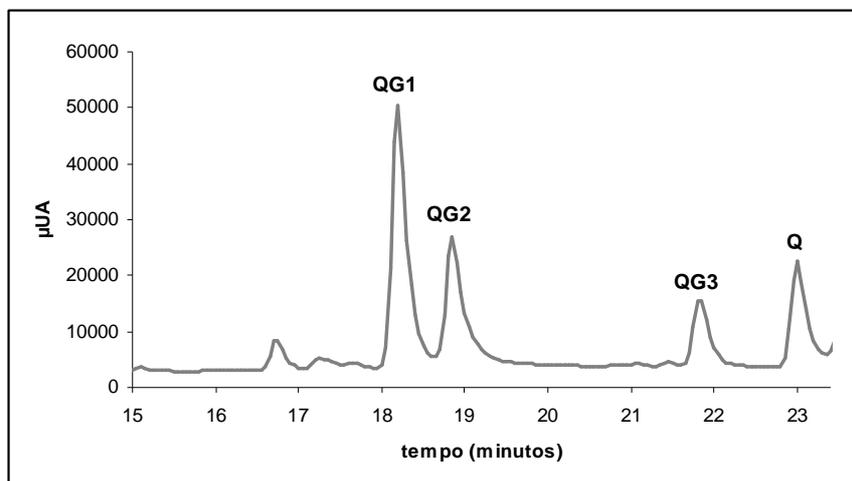


Figura 36: Perfil cromatográfico obtido para a quercetina 400 mM após reacção de glucuronidação. Identificado com QG1, QG2 e QG3 estão os derivados de quercetina glucuronados.

Na figura 37 apresentam-se os espectros UV-Visível obtidos para a quercetina e os respectivos compostos glucuronados. Ao observar a figura é possível verificar uma alteração nos espectros em relação ao espectro da quercetina. Também esta alteração é semelhante ao observado por Justino G. C. *et al.* (2004).

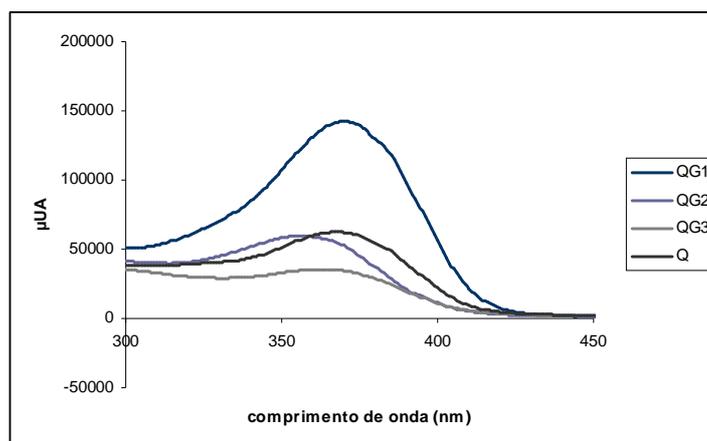


Figura 37: Espectros UV-Visível correspondentes à quercetina e seus derivados glucuronados.

Todas estas observações permitiram concluir que as reacções de glucuronidação estavam a ocorrer adequadamente, sendo assim possível submeter o extracto de *G. robertianum* à mesma reacção de metabolismo hepático. Na figura 38 apresentam-se os cromatogramas correspondentes ao extracto de *G. robertianum* original e ao extracto de *G. robertianum* após glucuronidação (Cromatogramas apresentados em separado no Anexo 2E).

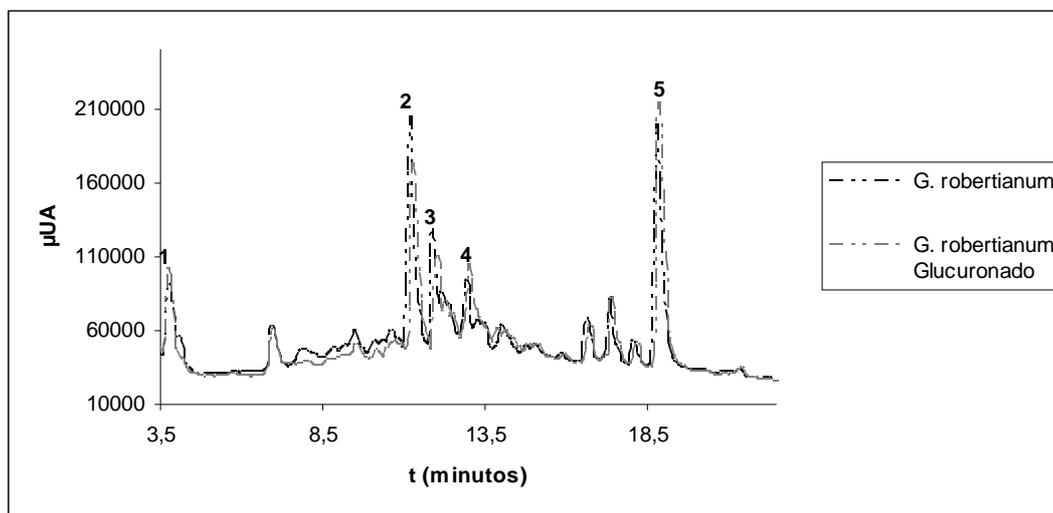


Figura 38: Perfis cromatográficos obtidos para uma solução aquosa de *G. robertianum* 2mg/mL não sujeita a glucuronidação (preto) e sujeita a glucuronidação (cinza). **1:** ácido sinápico glucuronado; **2/3/4:** quercitrina, ácido elágico e ácido gálgico; **5:** cianidina.

Observando os perfis cromatográficos obtidos é possível concluir que não existem diferenças significativas entre o extracto original e o extracto que sofreu glucuronidação. Realmente, os dois perfis cromatográficos são até bastante semelhantes. No entanto, ao comparar ambos os perfis com o perfil obtido para o extracto original (figura 14) verifica-se que há um aumento considerável da intensidade dos picos 2 e 5, acompanhado de uma diminuição mínima da intensidade do pico 3. Tendo em conta que o extracto utilizado para o HPLC analítico (figura 14) e para o ensaio de glucuronidação (figura 38) foi o mesmo, esta diferença de intensidades só pode estar relacionada com a concentração utilizada para o HPLC analítico (1 mg/mL) e para a glucuronidação (2 mg/mL) ou com as condições a que está sujeito o extracto.

Se se observar os perfis cromatográficos obtidos para as diferentes fases do estudo do metabolismo *in vitro* é possível concluir que o composto correspondente ao pico 5 sofre um aumento claro de intensidade ao longo da digestão. Efectivamente, a intensidade deste pico é de cerca de 30000 µA durante a digestão pelo suco gástrico artificial (1 mg/mL), atingindo cerca de 210000 µA durante a reacção de glucuronidação (2 mg/mL). Assim, devem existir compostos minoritários no extracto de *G. robertianum* que sofrem reacções de glucuronidação, originando compostos com t_r muito semelhante ao do pico 5.

Finalmente, pretendeu-se verificar se o extracto que havia sofrido desglucuronidação pela β -glucuronidase de *E. coli* (figuras 35 e 36) era passível de ser reglucuronado, quando em contacto com o fígado de ratinho. Na figura 39, apresentam-se os cromatogramas correspondentes ao extracto de *G. robertianum* desglucuronado (cinza) e reglucuronado (preto) (Cromatogramas apresentados em separado no Anexo 2F).

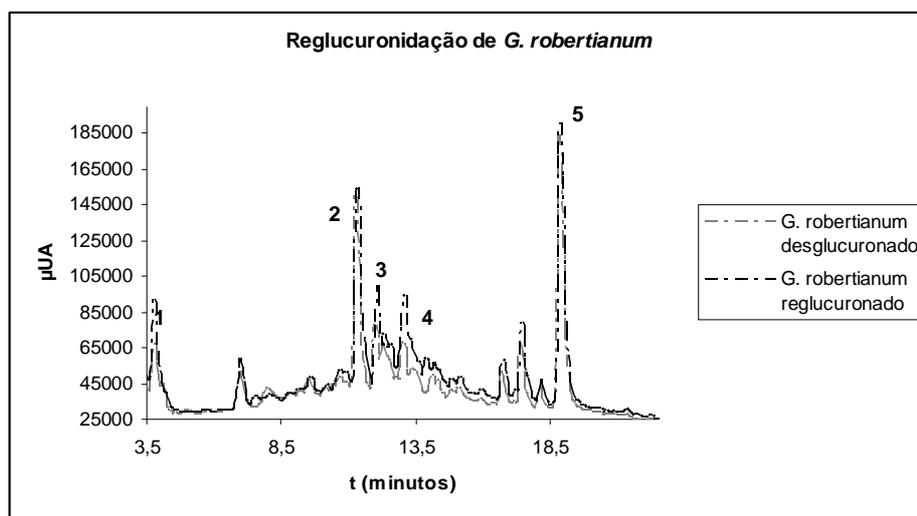


Figura 39: Perfis cromatográficos obtidos para soluções aquosas de *G. robertianum* 1 mg/mL desglucuronada (cinza) e reglucuronada (preto) por acção dos enzimas hepáticos. **1:** ácido sinápico glucuronado; **2/3/4:** quercitrina, ácido elágico e ácido gálico; **5:** cianidina.

Observando os perfis cromatográficos é possível observar que, para o *G. robertianum* desglucuronado (linha cinza), está presente a molécula constituinte da fracção 1, o ácido sinápico glucuronado, que estava completamente ausente aquando do estudo da desglucuronidação do extracto por uma β -glucuronidase de *E. coli* (figura 35). No entanto, nota-se que ao sofrer reglucuronidação esta fracção aumenta significativamente de intensidade (Anexo 2F) de 70000 para mais de 100000 μ UA. Assim, é possível pensar que realmente a molécula atribuída a este pico (ácido sinápico glucuronado) sofre desglucuronidação, cuja extensão varia de um ensaio para o outro (figura 35 e 39), e que, quando sujeito a uma nova reacção de glucuronidação, regressa aos valores de intensidade originais (figura 39). Quanto aos restantes picos maioritários, mantêm-se estáveis durante a reacção de desglucuronidação, logo também não sofrem alterações aquando deste ensaio.

Em suma, ao estudar a reacção de glucuronidação foi possível compreender que o extracto de fígado obtido estava activo, através de um controlo positivo de quercetina em que foi possível obter os três compostos glucuronados idênticos aos obtidos por G. C. Justino *et al.* (2004) (figuras 36 e 37). No que diz respeito ao extracto aquoso de *G. robertianum*, foi possível concluir que não existem no mesmo compostos susceptíveis de sofrer glucuronidação. Ao observar a figura 38 é possível verificar que os perfis cromatográficos correspondentes ao

extracto original e glucuronado são perfeitamente coincidentes. De notar que, ao comparar os perfis cromatográficos obtidos para este ensaio (figura 38) com o perfil cromatográfico obtido para o extracto original (figura 14), há um claro aumento de intensidade dos picos 2 e 5. Este aumento pode ter origem nas diferentes concentrações de extracto utilizadas, 1 mg/mL para o extracto original e 2 mg/mL para o ensaio de glucuronidação, ou ser consequência das diferentes condições a que o extracto aquoso é sujeito: extracto dissolvido em água para o extracto original e extracto dissolvido em água e tampão k-fosfatos 10 mM pH7,4 para o ensaio de glucuronidação.

4. Actividade antimicrobiana do extracto de *G. robertianum*

O último objectivo deste trabalho experimental era verificar se o extracto aquoso de *G. robertianum* tinha propriedades antimicrobianas. Especificamente pretendia-se verificar se o extracto aquoso da planta em estudo inibia o crescimento de duas estirpes bacterianas, *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus*, responsáveis pelo aparecimento de cáries dentárias e promotoras do desenvolvimento da placa dentária. Simultaneamente pretendia-se estudar a inibição do enzima glucosiltransferase (GTF), sintetizado pelas estirpes bacterianas acima referidas, e responsável pela formação do glucano insolúvel em água, constituinte da placa dentária.

Existem inúmeras referências bibliográficas que indicam a utilização de plantas medicinais no tratamento e prevenção de doenças orais como as cáries e a placa dentária. Efectivamente, Song, Ju-H. *et al.* (2006) estudaram o efeito da planta *Polygonum cuspidatum* na viabilidade bacteriana e factores de virulência de *S. mutans* e *S. sobrinus*, concluindo que extractos metanólicos desta planta possuem actividade inibitória. Também Tsai Po-J. *et al.* (2006) estudaram os efeitos inibitórios de extractos de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) no crescimento e actividade de GTF de *S. sobrinus*; os autores verificaram que esta planta inibia o crescimento de *S. sobrinus*, evitando o desenvolvimento da cárie dentária, e poderia vir a eliminar a placa dentária através da inibição da actividade do glucosiltransferase. Finalmente, também Alviano W. *et al.* (2007) estudaram o potencial antioxidante de extractos de plantas medicinais brasileiras e as suas actividades inibitórias de bactérias orais.

4.1. Determinação da inibição do crescimento de *Streptococcus mutans*

Para a inibição do crescimento de *S. mutans* seguiu-se o procedimento descrito em 14.1. (Capítulo II). O objectivo era determinar o MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*), que corresponde à concentração de extracto para a qual UA <0,005.

Na figura 40 apresenta-se o gráfico que traduz a absorvência a 630 nm (comprimento de onda para o qual é possível quantificar o crescimento bacteriano) em função da concentração de extracto (mg/mL) adicionada ao meio de cultura. A partir do gráfico obtido foi possível

extrapolar qual a concentração de extracto de *G. robertianum* para a qual a inibição do crescimento é inferior a 0,05 UA.

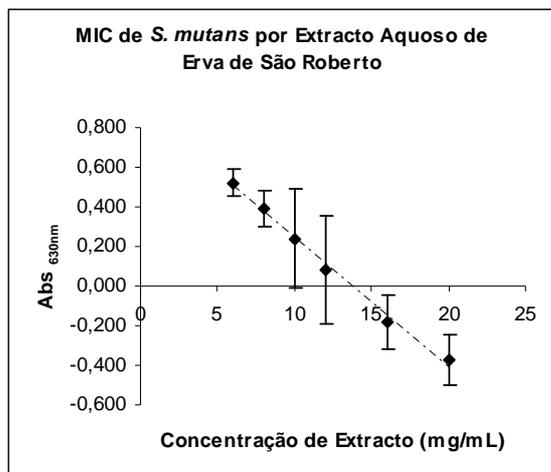


Figura 40: Gráfico que ilustra o crescimento bacteriano (Abs_{630nm}) em função da concentração de extracto de *G. robertianum* adicionado ao meio de cultura (ensaio realizado em triplicado).

Ao observar a figura 40 é possível concluir que para concentrações de *G. robertianum* superiores a 10 mg/mL se começa a evidenciar a inibição do crescimento

bacteriano. Recorrendo à equação obtida ($y = -0,0652x + 0,8966$, $r^2 = 0,993$) foi possível determinar, com mais precisão, qual a concentração de extracto correspondente ao MIC, obtendo-se um valor de 12,99 mg/mL.

Atendendo a que o extracto de *G. robertianum* possui uma cor bastante forte, é possível justificar os desvios apresentados na figura 40 como interferência do extracto com a leitura de absorbância. Para esclarecer os desvios apresentados pretendeu-se fazer uma contagem de células bacterianas ao microscópio, recorrendo a uma câmara de contagem Neubauer, mas, ao iniciar o processo de contagem, tornou-se claro que não era possível contar as células bacterianas presentes nas preparações contendo baixas concentrações de extracto. No entanto, através da observação microscópica das preparações contendo as diferentes concentrações de extracto, foi possível observar a quase ausência de células para concentrações mais elevadas de extracto.

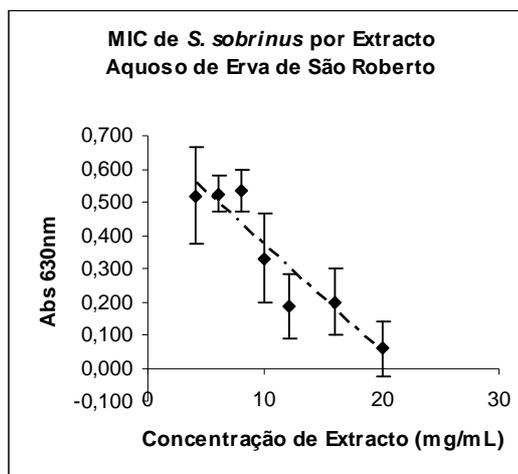
Na literatura encontram-se referências a outros valores de MIC, obtidos para diferentes espécies vegetais. Song, Ju-H. *et al.* (2006) determinaram o MIC para extractos metanólicos de *Polygonum cuspidatum*, chegando a valores entre 1 a 2 mg/mL. Também Tsai Po-J. *et al.* (2006) determinaram o MIC para extractos aquosos e metanólicos de alecrim, obtendo valores de 16 e 4 mg/mL, respectivamente. Finalmente, Alviano W. *et al.* (2007) determinaram o MIC para extractos aquosos de quatro plantas medicinais brasileiras, *Aristolochia cymbifera* Duch. – $16 \pm 0,3$ mg/mL, *Caesalpinia pyramidalis* Tul. – 8 mg/mL, *Cocos nucifera* Linn. – 4 mg/mL e *Ziziphus joazeiro* Mart. – 16 mg/mL. Comparando os valores de MIC obtidos pelos vários autores e o valor obtido para o extracto aquoso de *G. robertianum*, é possível concluir que esta planta apresenta uma boa actividade inibitória de *S. mutans*. Verifica-se que, para extractos metanólicos e etanólicos de plantas medicinais, se obtém sempre valores de MIC muito baixos; no entanto, pôde-se verificar que, dentro dos extractos aquosos, o extracto de *G. robertianum* apresenta uma concentração mínima inibitória de *S. mutans* muito semelhante às já determinadas.

4.2. Determinação da inibição do crescimento de *Streptococcus sobrinus*

Tendo em conta que as cáries dentárias são promovidas, maioritariamente, por duas estirpes bacterianas, *S. mutans* e *S. sobrinus*, pretendeu-se determinar o MIC para esta segunda estirpe bacteriana.

Preparou-se meio contendo *G. robertianum* em concentrações idênticas às utilizadas na determinação do MIC de *S. mutans*, para assim ser possível observar qual a estirpe bacteriana mais sensível à presença do extracto da planta em estudo. Na figura 41 apresenta-se o gráfico que traduz o crescimento bacteriano em função da concentração de *G. robertianum*.

Figura 41: Gráfico que ilustra o crescimento bacteriano (Abs_{630nm}) em função da concentração de extracto de *G. robertianum* adicionado ao meio de cultura (ensaio realizado em triplicado).



Ao observar a figura 41 denota-se uma ligeira tendência no crescimento bacteriano, em função da concentração de *G. robertianum* presente. É possível notar que, para

concentrações de *G. robertianum* de 4, 6 e 8 mg/mL, o crescimento bacteriano parece não ser influenciado pela presença do extracto. Já para as concentrações de extracto superiores é possível observar uma diminuição do crescimento bacteriano, o que se traduz por uma diminuição nos valores de absorvência. Tendo em conta a equação obtida ($y = -0,0323x + 0,6861$, $r^2 = 0,873$) foi possível determinar com mais precisão qual a concentração de extracto correspondente ao MIC, obtendo-se um valor de 19,70 mg/mL.

Também no caso de *S. sobrinus* existe na literatura referência a valores de MIC determinados para outras espécies vegetais. Tal como para a estirpe *S. mutans*, Song, Ju-H. *et al.* (2006) determinaram o MIC de *S. sobrinus* para extractos metanólicos de *Polygonum cuspidatum*, chegando a valores entre 2 a 4 mg/mL. Tsai Tzung-H. *et al.* (2008) determinaram o MIC de *S. sobrinus* para extractos metanólicos de várias plantas medicinais (Jasmim, Lavanda, Chá Verde, entre outras) obtendo sempre valores superiores a 8 mg/mL. Atendendo a que os valores obtidos na bibliografia se referem exclusivamente a extractos metanólicos, não é possível fazer uma comparação directa com o valor obtido para o *G. robertianum*. No entanto, é possível concluir que, tendo em conta que os extractos metanólicos permitem uma extracção mais eficiente dos compostos das espécies vegetais, é de esperar que os valores de MIC obtidos para extractos metanólicos sejam muito inferiores aos obtidos para extractos aquosos.

4.3. Inibição da actividade de glucosiltransferase (GTF) de *S. mutans*

Para além de se pretender determinar a actividade antimicrobiana de *G. robertianum* também se tinha como objectivo determinar a actividade inibitória do enzima glucosiltransferase (GTF), isolado de *S. mutans*, pelo extracto. Efectivamente, a placa dentária resulta da formação de glucano a partir de sacarose, numa reacção catalisada pelo enzima GTF produzido pelas estirpes bacterianas cariogénicas. Logo, para assegurar a prevenção do aparecimento de placa dentária, é imperativa a inibição do enzima responsável pela sua formação. Assim, criou-se um novo objectivo, determinar se o extracto aquoso de *G. robertianum*, para além de impedir o crescimento bacteriano, possuía actividade inibitória do enzima glucosiltransferase extraído de ambas as estirpes bacterianas.

Para atingir o objectivo proposto seguiram-se os protocolos descritos em 14.2. e 14.3. (Capítulo II), quantificando-se espectrofotometricamente a quantidade de glucano insolúvel em água formado na presença de diferentes concentrações de extracto de *G. robertianum* (2, 4, 6, 8 e 10 mg/mL). O objectivo final é determinar o valor de IC₅₀, ou seja, qual a concentração de *G. robertianum* responsável pela inibição de 50% da actividade do enzima GTF. O valor de IC₅₀ foi determinado recorrendo ao gráfico apresentado na figura 42, que traduz a inibição (%) do glucano insolúvel em água, às 18 horas de ensaio, em função da concentração (mg/mL) de *G. robertianum* presente. Atendendo a que a inibição do glucano é proporcional à inibição do enzima assume-se que 50% de inibição do glucano corresponde a 50% de inibição enzimática.

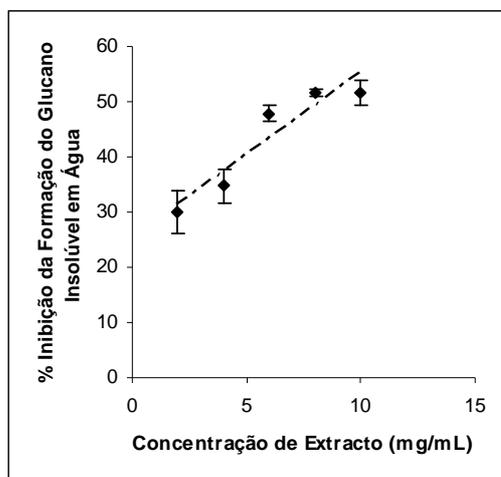


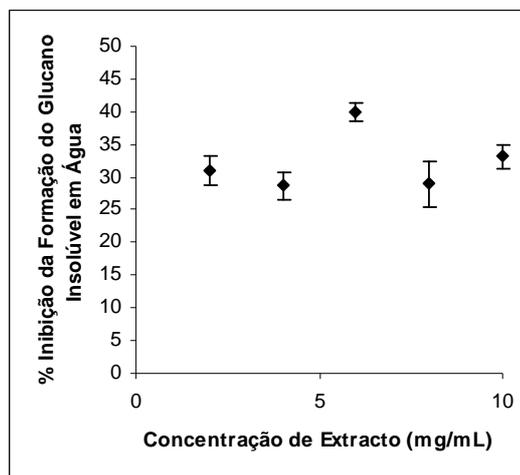
Figura 42: Gráfico que traduz a % de inibição da formação do glucano insolúvel em água, às 18h de ensaio, em função da concentração de *G. robertianum* presente na mistura reaccional. Tendo em conta que a inibição do GTF é proporcional à inibição do glucano o IC₅₀ corresponde à concentração de extracto para a qual à inibição de 50% da formação do glucano (ensaio realizado em triplicado).

Através da observação do gráfico é possível verificar que, para concentrações superiores de *G. robertianum* (6, 8 e 10 mg/mL), há uma inibição enzimática, às 18 horas de ensaio, ligeiramente superior a 50%. Realmente, recorrendo à equação obtida ($y = 3,0037x + 25,165$, $r^2 = 0,884$), é possível determinar um valor de IC₅₀ de, aproximadamente, 8,27 mg/mL.

4.4. Inibição da actividade de glucosiltransferase (GTF) de *S. sobrinus*

O enzima GTF é comum a diversas estirpes de bactérias cariogénicas. Assim, tal como foi descrito em 4.3., pretendeu-se determinar a actividade inibitória de GTF, isolado de *S. sobrinus*, pelo extracto de *G. robertianum*. Na figura 43 apresenta-se o gráfico que traduz a inibição do glucano insolúvel em água, reflexo da inibição enzimática, na presença de concentrações crescentes de extracto de *G. robertianum*.

Figura 43: Gráfico que traduz a % de inibição da formação do glucano insolúvel em água, às 18h de ensaio, em função da concentração de *G. robertianum* presente na mistura reaccional. Tendo em conta que a inibição do GTF é proporcional à inibição do glucano o IC_{50} corresponde à concentração de extracto para a qual a inibição de 50% da formação do glucano (ensaio realizado em triplicado).



Ao observar a figura 43 é possível concluir que o extracto de *G. robertianum* não inibe de forma eficiente a formação de glucano insolúvel em água. Qualquer que seja a concentração de extracto adicionada à mistura reaccional a inibição enzimática, às 18 horas de ensaio, nunca ultrapassa os 40%, o que impede a determinação de um valor de IC_{50} . Este facto pode estar relacionado com uma saturação do centro activo do enzima, que acontecerá para baixas concentrações de extracto, e que impede a inibição do mesmo, ainda que haja um aumento claro da concentração de *G. robertianum*.

Na tabela 8 apresenta-se um resumo das propriedades antimicrobianas e inibitórias de GTF apresentadas pelo extracto aquoso de *G. robertianum*.

Tabela 8: Resumo das características antimicrobianas e inibitórias de GTF apresentadas pelo extracto aquoso de *G. robertianum*

	MIC (mg/mL)	IC_{50} GTF (mg/mL)
<i>S. mutans</i>	12,99	8,27
<i>S. sobrinus</i>	19,70	≥ 10

Em suma, o extracto de *G. robertianum* apresenta um MIC mais baixo para a estirpe de *S. mutans* e é também para esta estirpe que é possível calcular um IC_{50} . No que diz respeito à estirpe *S. sobrinus* o MIC é bastante superior e foi impossível a determinação do IC_{50} .

Comparando os valores de MIC obtidos para as duas estirpes com os valores existentes na bibliografia é possível concluir que, atendendo a que estamos a trabalhar com extractos

aquosos, estão dentro do esperado. Efectivamente, no caso de *S. mutans*, Song, Ju-H. *et al.* (2006) determinaram o MIC para extractos metanólicos de *Polygonum cuspidatum*, determinando valores entre 1 a 2 mg/mL. Também Tsai Po-J. *et al.* (2006) determinaram o MIC para extractos aquosos e metanólicos de alecrim, obtendo valores de 16 e 4 mg/mL, respectivamente. Finalmente, Alviano W. *et al.* (2007) determinaram o MIC para extractos aquosos de quatro plantas medicinais brasileiras, *Aristolochia cymbifera* Duch. – 16±0,3 mg/mL, *Caesalpinia pyramidalis* – 8 mg/mL Tul., *Cocos nucifera* Linn. – 4 mg/mL e *Ziziphus joazeiro* Mart. – 16 mg/mL. No caso da estirpe *S. sobrinus* não foi possível encontrar valores de MIC para extracto aquosos de plantas medicinais havendo, no entanto, determinações para extractos metanólicos: Song, Ju-H. *et al.* (2006) determinaram o MIC para extractos metanólicos de *Polygonum cuspidatum*, chegando a valores entre 2 a 4 mg/mL e Tsai Tzung-H. *et al.* (2008) determinaram o MIC para extractos metanólicos de várias plantas medicinais (Jasmim, Lavanda, Chá Verde, entre outras) obtendo sempre valores superiores a 8 mg/mL.

Relativamente à inibição da formação do glucano insolúvel em água, através da inibição da actividade do glucosiltransferase, foi feito em 2000 (Yanagida A. *et al.*, 2000) um estudo sobre a inibição do enzima GTF extraído de *S. mutans* e *S. sobrinus* por polifenóis e taninos presentes em maçãs. Durante este estudo os autores verificaram que ácidos fenólicos como o ácido p-coumárico, ácido cafeico e ácido clorogénico só inibem o enzima GTF, extraído de ambas as estirpes, com concentrações superiores a 1000 µg/mL, o que também acontece o ácido gálgico. Neste trabalho os autores concluíram que polifenóis de baixo peso molecular, como os referidos atrás, não inibem o enzima GTF, excepto algumas agliconas como a quercetina e, por exemplo, o ácido elágico. Pelo contrário polifenóis de elevado peso molecular (como o ácido tânico, IC₅₀ (*S. mutans*) = 20 µg/mL e IC₅₀ (*S. sobrinus*) = 0,4 µg/mL), especialmente oligómeros superiores a trimeros apresentam uma boa inibição de GTF. Assim, atendendo a que o extracto de *G. robertianum* não é rico em polifenóis de elevado peso molecular é de esperar que a inibição do GTF não seja da ordem observada para o ácido tânico mas bastante superior. De acordo com estes autores o ácido elágico inibe eficientemente o GTF (IC₅₀ (*S. sobrinus*) = 20 µg/mL); no entanto, a sua quantidade no extracto aquoso de *G. robertianum* não deve ser proporcional à presente em maçãs, daí que o valor de IC₅₀ obtido para o mesmo não seja semelhante aos obtidos pelos autores.

No que diz respeito à inibição de GTF não foi possível encontrar referências a determinações de IC₅₀ de plantas medicinais. No entanto, atendendo aos resultados obtidos é possível pensar que o extracto de *G. robertianum* inibe consideravelmente o enzima extraído de *S. mutans*, não conseguindo inibir de forma eficiente o mesmo enzima extraído de *S. sobrinus*.

5. Síntese do Metabolismo *in vitro* de *Geranium robertianum* e actividades biológicas

Actualmente tem sido dada uma importância crescente aos polifenóis presentes na dieta, devido ao seu possível papel na prevenção de doenças degenerativas, como a AD mas também cancro e doenças cardiovasculares. Este papel tem sido atribuído aos polifenóis, devido a estudos epidemiológicos e clínicos realizados, bem como à identificação de características estruturais e mecanismos de acção. Entre eles encontra-se o elevado poder redutor, que permite a regeneração de outros agentes antioxidantes e protecção das células contra danos oxidativos. A estrutura química dos polifenóis influencia o seu potencial redox, sendo que polifenóis com um elevado número de grupos hidroxilo associados aos anéis aromáticos parecem ter um elevado poder redutor. No entanto, as diferenças na absorção de polifenóis com características estruturais distintas pelo sistema digestivo são muito mais ténues, sendo imperativo o estudo da biodisponibilidade destas moléculas, bem como os estudos dos seus efeitos biológicos após digestão (Scalbert *et al.*, 2002). Atendendo a que os compostos identificados no extracto aquoso de *G. robertianum* têm uma elevada actividade antioxidante e estruturas químicas ricas em grupos hidroxilo livres, é realmente fundamental estudar o seu metabolismo e verificar a sua biodisponibilidade no organismo, especialmente em locais de inflamação, bem como verificar se as actividades biológicas a ele associadas se mantêm mesmo após digestão.

As agliconas podem ser absorvidas ao nível do intestino delgado mas, atendendo a que na Natureza os polifenóis encontram-se na forma de ésteres, glicósidos ou polímeros não podem ser absorvidos na sua forma nativa tendo de ser hidrolizados por enzimas intestinais ou pela microflora do cólon (Manach *et al.*, 2004). No entanto, é necessário ter em conta que, quando a microflora está envolvida a eficiência de absorção pode ser comprometida, uma vez que os enzimas presentes podem vir a degradar as agliconas a simples ácidos aromáticos (Manach *et al.*, 2004).

Finalmente, durante o processo digestivo, os polifenóis sofrem, muitas vezes, reacções de conjugação no intestino delgado e fígado. Estes processos incluem metilação, sulfatação e glucuronidação e representam o metabolismo de destoxificação, comum a muitos xenobióticos, que tem como objectivo diminuir a toxicidade e facilitar a excreção pela bÍlis e urina, através do aumento da hidrofobicidade. Estes processos de destoxificação são extremamente eficientes e mesmo as agliconas estão geralmente, ausentes no sangue, ou presentes em baixas concentrações, depois de consumo de polifenóis em doses nutricionais (Manach *et al.*, 2004).

O metabolismo de polifenóis ocorre através de uma via metabólica comum (figura 44) em que no estômago parece ocorrer unicamente clivagem dos oligómeros em monómeros. De facto, durante o metabolismo simulado do extracto aquoso de *G. robertianum* não ocorrem alterações estruturais dos compostos, uma vez que as moléculas maioritárias, ácido sinápico glucuronado, quercitrina, ácido gálhico, ácido elágico e cianidina, já eram elas próprias monómeros.

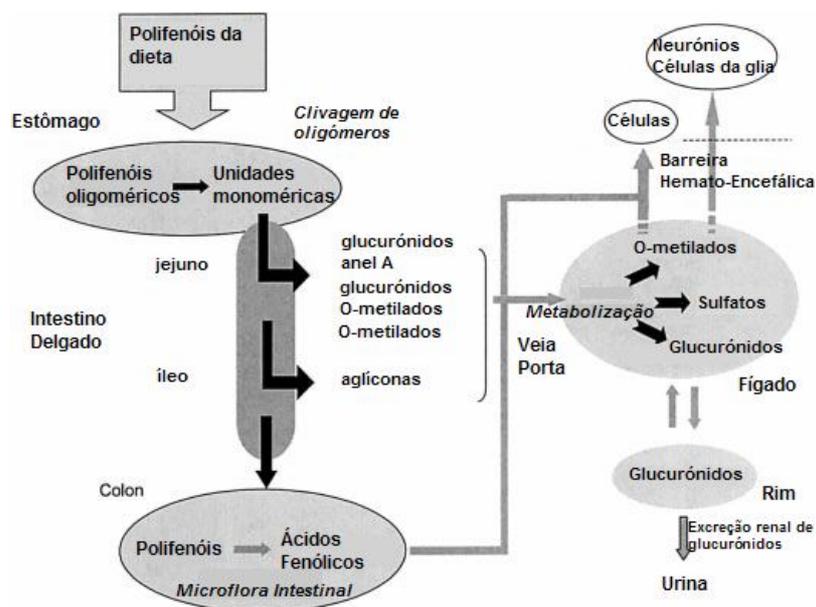


Figura 44: Diagrama esquemático do metabolismo de polifenóis no organismo. **Fonte:** adaptado de Spencer J. P. E. (2009).

O suco pancreático lançado no intestino delgado não provoca qualquer alteração estrutural. A bibliografia (Spencer, 2009) refere que os monómeros polifenólicos poderão ser glucuronados ao atravessar a parede intestinal, ou os polifenóis poderão ser transformados em ácidos fenólicos pelas bactérias intestinais e serem absorvidos como tal, entrando assim na corrente sanguínea. Ao chegarem ao fígado serão novamente glucuronados, sulfatados ou metilados, com vista à sua excreção.

Este tipo de metabolismo não parece ocorrer com os compostos existentes no extracto aquoso de *G. robertianum*. Os ácidos fenólicos como o sinápico e elágico não atravessaram a barreira intestinal em grande quantidade. Ainda que não tenha sido utilizado o sistema convencional para estudos de transporte, permeabilidade e biodisponibilidade (o sistema Transwell®) não se verificou diminuição da concentração de qualquer um destes ácidos no meio de cultura das células e a quantidade encontrada no seu interior foi meramente vestigial.

É também referido na bibliografia que os flavonóides atravessam a barreira intestinal depois de desglicosilados por enzimas presentes na mucosa do jejuno ou íleo e glucuronados por UDP glucuroniltransferases presentes nessa mesma mucosa (Spencer *et al.*, 1999). No presente trabalho a quercitrina, uma molécula de quercetina com um ramnósido na posição 3, foi capaz de permear a membrana celular, ainda que em quantidade vestigial. De facto, existem outros trabalhos que referem situações semelhantes à encontrada no decorrer deste trabalho (Hollman *et al.*, 1995).

É também referido que os ácidos fenólicos serão glucuronados no fígado, fase II do metabolismo de destoxificação (Spencer, 2009); no entanto, os ensaios efectuados com

extracto de fígado, na presença de UDP-glucurónido, não indicam a ocorrência deste tipo de metabolismo, excepto para o ácido sinápico, após desglucuronidação. Os resultados obtidos podem ser compreendidos uma vez que os ácidos fenólicos são já hidrossolúveis e portanto não haverá necessidade de os tornar mais hidrofílicos com dispêndio de ácido glucurónido celular.

Dos estudos de metabolismo deste trabalho verifica-se que os ácidos fenólicos conseguem atravessar o tubo digestivo sem alterações (suco gástrico e pancreático artificiais). Poderão eventualmente sofrer modificações (principalmente polifenóis como a quercitrina e cianidina) mas são todos capazes de atravessar a barreira gastrointestinal, ainda que sempre em quantidade vestigial. Quando em circulação os polifenóis que constituem o extracto aquoso de *G. robertianum* não parecem sofrer metabolização pelo fígado, ou pelo menos por uma das reacções típicas deste órgão, uma vez que *in vitro* não houve alterações aquando da glucuronidação.

Uma vez que o metabolismo exercido sobre todas as moléculas presentes no extracto é baixo ou quase inexistente, nas condições de análise, os compostos terão possibilidade de exercer as suas actividades biológicas de relevância. Realmente, durante todo o metabolismo o extracto de *G. robertianum* mantém uma boa inibição do enzima acetilcolinesterase, bem como uma excelente actividade antioxidante. Tanto a quercitrina como os ácidos gálgico e elágico são capazes de inibir o AChE e qualquer um deles apresenta uma elevada actividade antioxidante (tabela 5). No entanto, este tipo de compostos não é capaz de inibir eficazmente os enzimas glucosiltransferases extraídos de *S. mutans* e *S. sobrinus*, o que está de acordo com resultados da bibliografia (Yanagida A. *et al.*, 2000) em que este tipo de compostos provou ser o mais fraco inibidor enzimático.

Capítulo VI – Conclusões e Perspectivas Futuras

1. Conclusões

O objectivo deste trabalho era o estudo do metabolismo *in vitro* do extracto aquoso de *Geranium robertianum*, bem como a determinação das suas principais actividades biológicas passíveis de ser aplicadas à terapêutica de AD, ao longo dos diferentes processos metabólicos. Também se pretendeu fazer uma caracterização desta planta, no que diz respeito ao tipo de moléculas que a constituem. Simultaneamente, determinaram-se as actividades antimicrobianas deste extracto, passíveis de ser aplicadas a doenças orais.

O extracto aquoso de *G. robertianum* tem actividade inibitória de acetilcolinesterase ($IC_{50} = 765,9 \pm 15,4 \mu\text{g/mL}$) semelhante aos valores descritos na bibliografia para outras plantas medicinais e forte actividade antioxidante ($EC_{50} = 6,5 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$), superior à obtida para plantas medicinais e moléculas utilizadas comercialmente como antioxidantes, BHT.

Finalmente, quantificaram-se os fenóis totais, obtendo-se um valor de $106,96 \pm 2,37$ equivalentes de pirogaloil/mg de extracto, concluindo-se que o extracto aquoso de *G. robertianum* tem um razoável conteúdo em fenóis totais.

Identificaram-se os compostos maioritários presentes no extracto aquoso de *G. robertianum*: ácido sinápico glucuronado, quercitrina, ácido gálgico, ácido elágico e cianidina. Para três dos compostos maioritários, a quercitrina, ácido gálgico e ácido elágico, foi possível determinar a actividade inibitória de AChE e antioxidante, que mostrou ser relevante. O ácido sinápico glucuronado e a cianidina provaram ser muito instáveis.

Dos estudos de metabolismo concluiu-se que as moléculas presentes no extracto aquoso de *G. robertianum* não sofrem alterações na presença dos sucos gástrico e pancreático, nem são degradadas por eventuais compostos/moléculas secretados/as pelas células Caco-2, mimetizadoras do epitélio gastrointestinal. No entanto, as moléculas do *G. robertianum* são capazes de permear as células, ainda que se tenha verificado que isto acontece em quantidades vestigiais. Durante todo o metabolismo estudado as actividades biológicas de relevância mantiveram-se constantes.

O ensaio de desglucuronidação permitiu comprovar que a fracção maioritária 1 deveria ser composta por um molécula glucuronada, uma vez que houve perda desta durante o ensaio. No entanto, também aqui as actividades biológicas se mantiveram muito próximas das originais, o que indica que esta fracção não é decisiva para as actividades biológicas apresentadas pelo extracto aquoso.

Dos estudos de inibição da microflora dentária concluiu-se que o extracto é capaz de inibir o crescimento de ambas as estirpes (*S. mutans* e *S. sobrinus*) com valores de MIC semelhantes aos da bibliografia. Os resultados obtidos permitiram concluir que o extracto de *G. robertianum* inibe de forma eficiente o crescimento de *S. mutans*, bem como a formação de glucano insolúvel em água extraído dessa mesma estirpe bacteriana. Relativamente à estirpe *S. sobrinus* o extracto não mostrou a mesma eficiência, o que comprova que o enzima

glucosiltransferase isolado de cada estirpe bacteriana têm características estruturais diferentes, como o local de ligação do inibidor.

Assim, o extracto aquoso de *Geranium robertianum* apresenta actividades biológicas bastante atractivas e passíveis de ser aplicadas à terapêutica de AD, uma vez que o extracto é bastante estável durante o metabolismo e consegue, ainda que em pequena quantidade, permear as células da barreira gastrointestinal. Finalmente, o estudo das propriedades antimicrobianas do extracto aquoso permitiu concluir que, pelo menos relativamente à estirpe *S. mutans*, este pode representar uma alternativa aos comuns antisépticos, ou pelo menos um complemento para uma higiene oral de excelência.

2. Perspectivas Futuras

Os resultados apresentados no decorrer deste trabalho permitem concluir que o extracto aquoso de *G. robertianum* pode vir a representar uma alternativa ou complemento ao tratamento sintomático de AD, bem como na manutenção de uma higiene oral adequada. No entanto, é possível pensar em vários estudos adicionais que permitem uma melhor caracterização desta planta e seu metabolismo.

Uma comprovação da estrutura das moléculas presentes no extracto aquoso de *G. robertianum*, por MS², pode elucidar acerca das actividades biológicas apresentadas pelo mesmo e até permitir a descoberta de outras actividades biológicas de interesse, p.e. anti-virais ou anti-carcinogéneas.

Relativamente ao metabolismo do extracto aquoso de *G. robertianum*, as próximas etapas propostas são a digestão pela bÍlis, estudos de absorção do extracto através do transporte transepitelial e ainda a digestão pela microflora do cólon, particularmente pelas esterases existentes neste órgão. Ainda se pode propor a realização de um estudo contínuo de metabolismo desde a ingestão oral do extracto até à sua expulsão pelo organismo, monitorizando as alterações ao longo de cada etapa da digestão, controlando os níveis dos componentes do extracto no plasma sanguíneo e determinando a percentagem do mesmo que é expulso pela urina e fezes. Finalmente, também se pode considerar a realização de um estudo exaustivo do metabolismo hepático de *G. robertianum*, o estudo de reacções de Fase I como oxidação, redução e hidrólise e o estudo de reacções de Fase II como metilação, sulfatação e acetilação.

Spencer (2009) explica que existem vários estudos que indicam que há uma transferência significativa de polifenóis do lúmen do intestino delgado para a circulação mesentérica, e que durante este transporte há uma extensa metabolização e conjugação dos polifenóis. Para realizar estes estudos recorre-se ao modelo celular Caco-2 ou a preparações de intestino delgado de rato, sendo que este último tem provado ser o modelo mais eficiente e informativo no que diz respeito aos eventos que ocorrem no jejuno e íleo. Este modelo é extremamente útil no estudo de transferência dos polifenóis da dieta, e seus glicósidos, bem como para

determinar as taxas de absorção dos mesmos. Assim, a utilização de qualquer um destes modelos seria extremamente útil para a continuação do estudo do metabolismo de *G. robertianum*.

As doenças neurodegenerativas são caracterizadas por um estado de inflamação acentuado, que pode ser diminuído pela acção de moléculas com actividade antioxidante, como polifenóis. Atendendo a que o extracto aquoso é composto, maioritariamente, por polifenóis e apresenta uma excelente actividade antioxidante, seria também útil realizar um estudo, semelhante ao feito por Vafeiadou *et al.* (2009). Neste trabalho se estimulam células da glia com lipopolissacáridos (LPS) e interferão γ (IFN- γ), promovendo o processo inflamatório e causando a produção de TNF- α , expressão de iNOS, produção de óxido nítrico e activação de cascatas de sinalização celulares. Assim seria possível tirar conclusões relativamente à acção anti-inflamatória do extracto aquosos em células da glia activadas e através de que mecanismos de sinalização celular se produz essa acção.

Para além dos estudos já propostos seria também vantajoso incorporar o extracto aquoso de *G. robertianum*, ou seus componentes individuais, em lipossomas marcados com anticorpos específicos para locais de inflamação ou outros tecidos-alvo, para assim aumentar a eficácia do extracto aquoso na inibição enzimática e/ou actividade anti-inflamatória. Os lipossomas são amplamente utilizados nos dias de hoje, sendo vesículas de tamanho variável, rodeadas de uma membrana lípidica natural ou sintética, uni ou multilamelar e dentro das quais é possível introduzir um volume adequado da amostra de interesse. Ao marcar os lipossomas com anticorpos específicos é possível monitorizar a eficiência do transporte do extracto aquoso de *G. robertianum*, recorrendo a técnicas histoquímicas.

Finalmente, tirando partido desta elevada actividade antioxidante, apresentada pelo *G. robertianum*, seria extremamente útil o estudo do extracto aquoso quando aplicado a outras doenças caracterizadas por um estado inflamatório extremo, p.e. artrite reumatóide e aterosclerose, bem como doenças auto-imunes.

Bibliografia

Artigos

- Adams M., Gmünder F., Hamburguer M., **Plants traditionally used in age related brain disorders – A survey of ethnobotanical literature**, *Journal of Ethnopharmacology* 113 (2007) 363-381;
- Adersen A., Gaugin B., Gudiksen L., Jäger A. K., **Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase inhibitory activity**, *Journal of Ethnopharmacology* 104 (2006) 418-422;
- Akdemir Z., Tatlı İ., Saracoğlu İ., İsmailoğlu U., Şahin-Erdemli İ., Çalış İ., **Polyphenolic compounds from *Geranium pratense* and their free radical scavenging activities**, *Phytochemistry* 56 (2001) 189-193;
- Alviano W., Alviano D., Diniz C., Antonioli A., Alviano C., Farias L., Carvalho M., Souza M., Bolognese A., **In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria used in Brazilian folk medicine**, *Archives of Oral Biology* 53 (2008) 545-552;
- Amaral S., Mira L., Nogueira J. M. F., Silva A., Florêncio M. H., **Plant extracts with anti-inflammatory properties – A new approach for characterization of their bioactive compounds and establishment of structure-antioxidant activity relationships**, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17 (2009) 1876-1883;
- Ammar R., Bhourri W., Sghaier M., Boubaker J., Skandrani I., Neffati A., Bouhlef I., Kilani S., Mariotte Anne-M., Chekir-Ghedira L., Dijoux-Franca Marie-G., Ghedira K., **Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L. (*Rhamnaceae*): A structure-activity relationship study**, *Food Chemistry* 116 (2009) 258-264;
- Barbosa Filho J. M., Medeiros K. C. P., Diniz M. F. F. M., Batista L. M., Athayde-Filho P. F., Silva M. S., da-Cunha V. L., Silva Almeida J. R. G., Quintans-Júnior L. J., **Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase**, *Brazilian Journal of Pharmacology* 16 (2) (2006) 258-285;
- Behl C., **Amyloid β -protein toxicity and oxidative stress in Alzheimer's disease**, *Cell & Tissue Research* 290 (1997) 471-480;
- Blennow K., de Leon M. J., Zetterberg H., **Alzheimer's Disease**, *Lancet* 368 (2006) 387-403;
- Chen Pei-J., Moore T., Nesnow S., **Cytotoxic effects of propiconazole and its metabolites in mouse and human hepatoma cells and primary mouse hepatocytes**, *Toxicology in Vitro* 22 (2008) 1476-1483;
- Chew Yik-L., Goh Joo-K., Lim Yau-Y., **Assessment of in vitro antioxidant capacity and polyphenolic composition of selected medicinal herbs from Leguminosae family in Peninsular Malaysia**, *Food Chemistry* 116 (2009) 13-18;

- Citron M., **Strategies for Disease Modification in Alzheimer's Disease**, *Nature Reviews Neuroscience* 5 (2004) 677-685;
- Chong Z., Li F., Maiese K., **Stress in the brain: novel cellular mechanisms of injury linked to Alzheimer's disease**, *Brain Research Reviews* (2004);
- Cummings J., **Alzheimer's disease**, *The New England Journal of Medicine* 351 (2004) 56-67;
- Ellis J. M., **Cholinesterase Inhibitors in the Treatment of Dementia**, *Journal of the American Osteopathic Association* 3 (2005) 145-157;
- Enayat S., Banerjee S., **Comparative antioxidant activity of extracts from leaves, bark and catkins of *Salix aegyptiaca* sp.**, *Food Chemistry* 116 (2009) 23-28;
- Francis P. T., Palmer A. M., Snape M., Wilcock G., **The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress**, *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatric* 66 (1999) 137-147;
- Frasco M., Fournier D., Carvalho F., Guilhermino L., **Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity**, *Biomarkers* 10 (2005) 360-375;
- Fodorea C. S., Vlase L., Leucuta S. E., Tamas M., **Phytochemical Study on Some Polyphenols of *Geranium pyrenaicum***, *Chemistry of Natural Compounds* 41(4) (2005) 322-324 (ABSTRACT);
- Garzón G., Wrolstad R., **Major anthocyanins and antioxidant activity of Nasturtium flowers (*Tropaeolum majus*)**, *Food Chemistry* 114 (2009) 44-49;
- Gomes A., Fernandes E., Lima J. L. F. C., Mira L., Corvo M. L., **Molecular Mechanisms of Anti-Inflammatory Activity Mediated by Flavonoids**, *Current Medicinal Chemistry* 15 (2008) 1586-1605;
- Hollman P., de Vries J., van Leeuwen S., Mengelers M., Katan M., **Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers**, *The American Journal of Clinical Nutrition* 62 (1995) 1276-1282;
- Howes Melanie-J., Houghton P., **Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function**, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 75 (2003) 513-527;
- Ibach B., Haen E., **Acetylcholinesterase Inhibition in Alzheimer's Disease**, *Current Pharmaceutical Design* 10 (2004) 231-251;
- Ingkaninan K., Temkitthawon P., Chuenchom K., Yuyaem T., Thongnoi W., **Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies**, *Journal of Ethnopharmacology* 89 (2003) 261-264;

- Iqbal K., Alonso A., Chen S., Chochan M. O., El-Akkad E., Gong C., Khatoon S., Li B., Liu F., Rahman A., Tanimukai H., Grundke-Iqbal I., **Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies**, *Biochimica et Biophysica Acta* 1739 (2005) 198-210;
- Ivancheva S., Petrova A., **A chemosystematic study of eleven *Geranium* species**, *Biochemical Systematics and Ecology* 28 (2000) 255-260;
- Ji H., Zhang H., **Theoretical evaluation of flavonoids as multipotent agents to combat Alzheimer's disease**, *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* 767 (2006) 3-9;
- Justino G., Santos M., Canário S., Borges C., Florêncio M., Mira L., **Plasma quercetin metabolites: structure-antioxidant activity relationships**, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 432 (2004) 109-121;
- Kamer A., Craig R., Dasanayake A., Brys M., Glodzik-Sobanska L., de Leon M., **Inflammation and Alzheimer's disease: Possible role of periodontal diseases**, *Alzheimer's & Dementia* 4 (2008) 242-250;
- Kern S., Bennett R., Needs P., Mellon F., Kroon P., Garcia-Conesa Maria-T., **Characterization of Metabolites of Hydroxycinnamates in the in Vitro Model of Human Small Intestinal Epithelium Caco-2 Cells**, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (2003) 7884-7891;
- Kobakhidze K. B., Alaniya M. D., **Flavonoids from *Geranium robertianum***, *Chemistry of Natural Compounds* 40(1) (2004) 89;
- Küpeli E., Tatli I., Akdemir Z., Yesilada E., **Estimation of antinociceptive and anti-inflammatory activity of *Geranium pratense* subsp. *finitimum* and its phenolic compounds**, *Journal of Ethnopharmacology* 114 (2007) 234-240;
- LaFerla F. M., Oddo S., **Alzheimer's disease: A β , tau and synaptic dysfunction**, *Trends in Molecular Medicine* 4 (2005) 170-176;
- Lane R. M., Potkin S. G., Enz A., **Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia**, *International Journal of Neuropsychopharmacology* 9 (2006) 101-124;
- Laurent C., Besançon P., Caporiccio B., **Flavonoids from a grape seed extract interact with digestive secretions and intestinal cells as assessed in an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model**, *Food Chemistry* 100 (2007) 1704-1712;
- Lin H. Q., Ho M. T., Lau, Wong K. K., Shaw P. C., Wan D. C. C., **Anti-acetylcholinesterase activities of traditional Chinese medicine for treating Alzheimer's disease**, *Chemico-Biological Interactions* 175 (2008) 352-354;
- Liu H., Qiu N., Ding H., Yao R., **Polyphenols contents and antioxidant capacity of 68 Chinese herbals suitable for medical or food uses**, *Food Research International* 41 (2008) 363-370;

- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J., **Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent**, *The Journal of Biological Chemistry* (1951);
- Mata A., Proença C., Ferreira A. R., Serralheiro M. L., Nogueira J. M., Araújo M., **Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices**, *Food Chemistry* 103 (2007) 778-786;
- Mattson M. P., **Pathways towards and away from Alzheimer's disease**, *Nature* 430 (2004) 631-639;
- Molyneux P., **The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity**, *Songklanakarinn Journal of Science and Technology* 26 (2004) 211-219;
- Mukherjee P., Kumar V., Mal M., Houghton P. J., **Acetylcholinesterase inhibitors from plants**, *Phytotherapy* 14 (2007) 289-300;
- Oktay M., Gülçin I., Küfrevioğlu Ö. I., **Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts**, *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* 36 (2003) 263-271;
- Okuda T., **Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants**, *Phytochemistry* 66 (2005) 2012-2031;
- Orhan I., Kartal M., Naz Q., Ejaz A., Yilmaz G., Kan Y., Konuklugil B., Sener B., Choudhary I., **Antioxidant and anticholinesterase evaluation of selected Turkish *Salvia* species**, *Food Chemistry* 103 (2007) 1247-1254;
- Orhan I., Kartal M., Abu-Asaker M., Şenol F., Yilmaz G., Şener B., **Free radical scavenging properties and phenolic characterization of some edible plants**, *Food Chemistry* 114 (2009) 276-281;
- Petti S., Scully C., **Polyphenols, oral health and disease: A review**, *Journal of Dentistry* 37 (2009) 413-423;
- Pourmorad F., Hosseinimehr S., Shahabimajd N., **Antioxidant activity, phenol and flavonoids contents of some selected Iranian medicinal plants**, *African Journal of Biotechnology* 5 (2006) 11412-1145;
- Racchi M., Mazzucchelli M., Porrello E., Lanni C. Govoni S., **Acetylcholinesterase inhibitors: novel activities of old molecules**, *Pharmacological Research* 50 (2004) 441-451;
- Ramassamy C., **Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: A review of their intracellular targets**, *European Journal of Pharmacology* 545 (2006) 51-64;
- Resende R., Moreira P., Proença T., Deshpande A., Busciglio J., Pereira C., Resende Oliveira C., **Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer disease**, *Free Radical Biology & Medicine* 44 (2008) 2051-2057;

- Roberson E. D., Mucke L., **100 Years and Counting: Prospects for Defeating Alzheimer's Disease**, *Science* 314 (2006) 781-784;
- Rossi L., Mazzitelli S., Arciello M., Capo C. R., Rotilio G., **Benefits from Dietary Polyphenols for Brain Aging and Alzheimer's Disease**, *Neurochemical Research* 33 (2008) 2390-2400;
- Scalbert A., Morand C., Manach C., Rémésy C., **Absorption and metabolism of Polyphenols in the gut and impact on health**, *Biomedicine Pharmacotherapy* 56 (2002) 276-282;
- Scalbert A., Johnson I. A., Saltmarsh M., **Polyphenols: antioxidants and beyond**, *The American Journal of Clinical Nutrition* 81 (2005) 215S-217S;
- Scalbert A., Williamson G., **Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols**, *Journal of Nutrition* 130 (2000) 2073S-2085S;
- Scarpini E., Scheltens P., Feldman H., **Treatment of Alzheimer's disease: current status and new perspectives**, *Lancet Neurology* 2 (2003) 539-547;
- Silman I., Sussman J.L., **Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology**, *Current Opinion in Pharmacology* 5 (2005) 293-302;
- Silman I., Sussman J. L., **Acetylcholinesterase: How is structure related to function?**, *Chemico-Biological Interactions* 175 (2008) 3-10;
- Silman I., Futerman A., **Modes of attachment of acetylcholinesterase to the surface membrane**, *European Journal of Biochemistry* 170 (1987) 11-22;
- Singh M., Arseneault M., Sanderson T., Murthy V., Ramassamy C., **Challenges for Research on Polyphenols from Foods in Alzheimer's Disease: Bioavailability, Metabolism, and Cellular and Molecular Mechanisms**, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (2008) 4855-4873;
- Song Ju-H., Kim Shin-K., Chang Kee-W., Han Seong-K., Yi Ho-K., Jeon Jae-G., **In vitro inhibitory effects of *Polygonum cuspidatum* on bacterial viability and virulence factors of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus***, *Archives of Oral Biology* 51 (2006) 1131-1140;
- Spencer J. P. E., **Metabolism of Tea Flavonoids in the Gastrointestinal Tract**, *The Journal of Nutrition, Proceedings of the Third International Scientific Symposium on Tea and Human Health: Role of Flavonoids in the Diet* (2003);
- Stuchbury G., Münch G., **Alzheimer's associated inflammation, potential drug targets and future therapies**, *Journal of Neural Transmission* 112 (2005) 429-453;
- Subhasree B., Baskar R., Keerthana R., Susan R., Rajasekaran P., **Evaluation of antioxidant potential in selected green leafy vegetables**, *Food Chemistry* 115 (2009) 1213-1220;
- Sugimoto H., **The new approach in development of anti-Alzheimer's disease drugs via the cholinergic hypothesis**, *Chemico-Biological Interactions* 175 (2008) 204-208;

- Sussman J., Silman I., **3D structure-function of proteins involved in cholinergic transmission**, *Proteins, Lipids and Membranes*;
- Tofts R. J., ***Geranium robertianum* L.**, *Journal of Ecology* 92 (2004) 537-555;
- Tsai Po-J., Tsai Tzung-H., Ho Su-C., ***In vitro* inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus sobrinus***, *Food Chemistry* 105 (2007) 311-316;
- Vafeiadou K., Vauzour D., Lee H. Y., Rodriguez-Mateos A., Williams R. J., Spencer J. E. P., **The citrus flavanone naringenin inhibits inflammatory signalling in glial cells and protects against neuroinflammatory injury**, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 484 (2009) 100-109;
- Vasto S., Candore G., Listì F., Balistreri C., Colonna-Romano G., Malavolta M., Lio D., Nuzzo D., Mocchegiani E., Di Bona D., Caruso C., **Inflammation, genes and zinc in Alzheimer's disease**, *Brain Research Reviews* 58 (2008) 96-105;
- Vinutha B., Prashanth D., Salma K., Sreeja S. L., Pratiti D., Padmaja R., Radhika S., Amit A., Venkateshwarlu K., Deepak M., **Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity**, *Journal of Ethnopharmacology* 109 (2007) 359-363;
- Yamamoto Y., Takahashi Y., Kawano M., Iizuka M., Matsumoto T., Saeki S., Yamaguchi H., ***In vitro* digestibility of levan and its hypocholesterolemic effects in rats**, *Journal of Nutritional Biochemistry* 10 (1999) 13-18;
- Yanagida A., Kanda T., Tanabe M., Matsudaira F., Cordeiro J., **Inhibitory effects of Apple Polyphenols and Related Compounds on Cariogenic Factors of Mutans Streptococci**, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (2000) 5666-5671;
- Zhao B., **Natural Antioxidants Protect Neurons in Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease**, *Neurochemical Research*, published online 06 January 2009.

Livros

- Allen D., Hatfield G., **Medicinal plants in folk tradition: an ethnobotany of Britain & Ireland**, Timber Press (2004);
- National Institute of Industrial Research, **Compendium of Medicinal Plants** (2004).

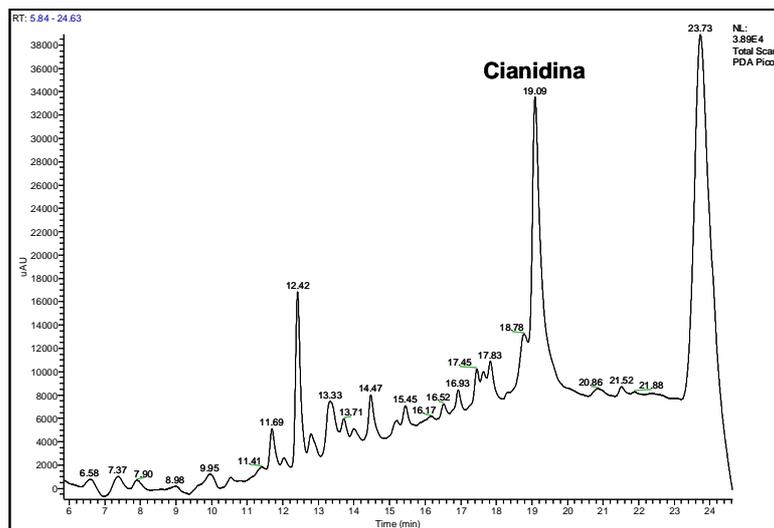
Anexos

Anexo 1

Anexo 1A: Espectro MS obtido para o branco da primeira fracção maioritária



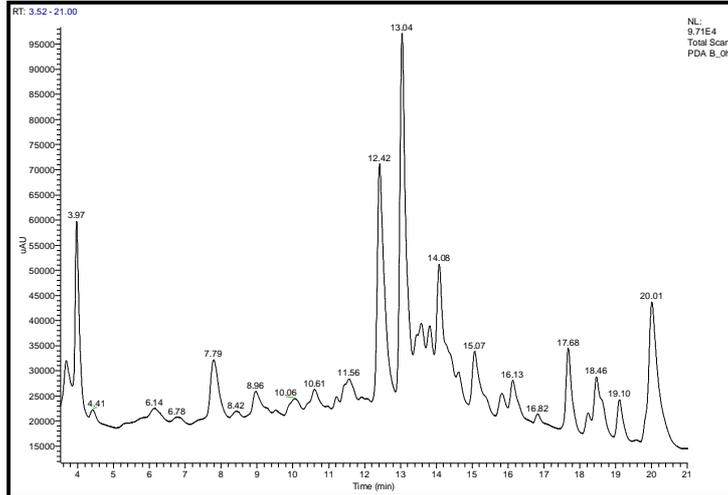
Anexo 1B: Perfil Cromatográfico da quinta fracção maioritária após recolha por HPLC preparativas e identificação por MS



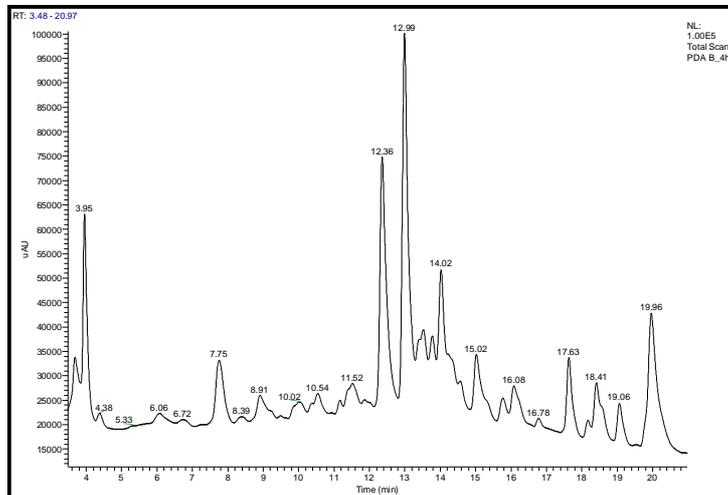
Anexo 2

Anexo 2A: Perfis cromatográficos obtidos para as 0 horas e 4 horas de digestão pelo suco gástrico

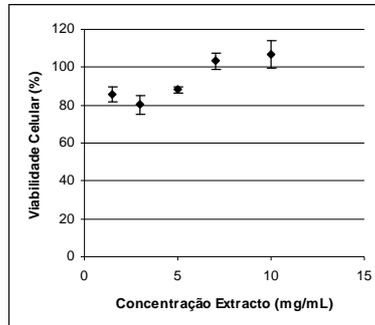
Perfil cromatográfico de uma solução de *G. robertianum* às 0 horas de digestão pelo suco gástrico



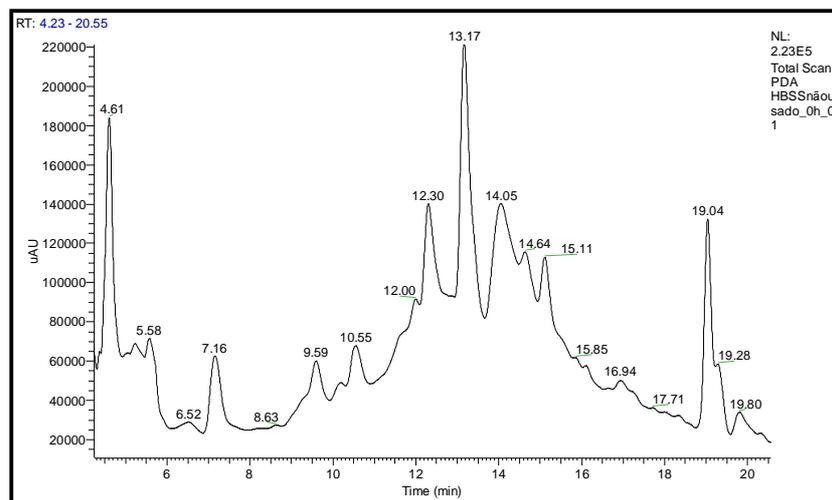
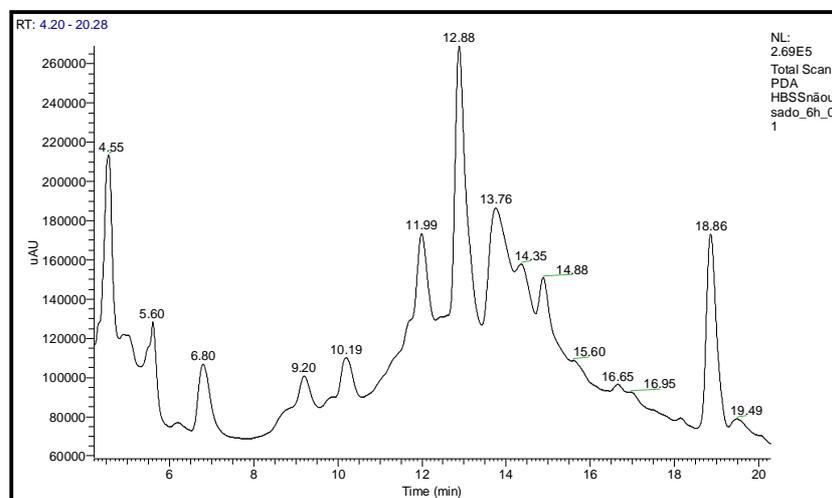
Perfil cromatográfico de uma solução de *G. robertianum* às 4 horas de digestão pelo suco gástrico



Anexo 2B: Ensaio de citotoxicidade e viabilidade celular – MTT

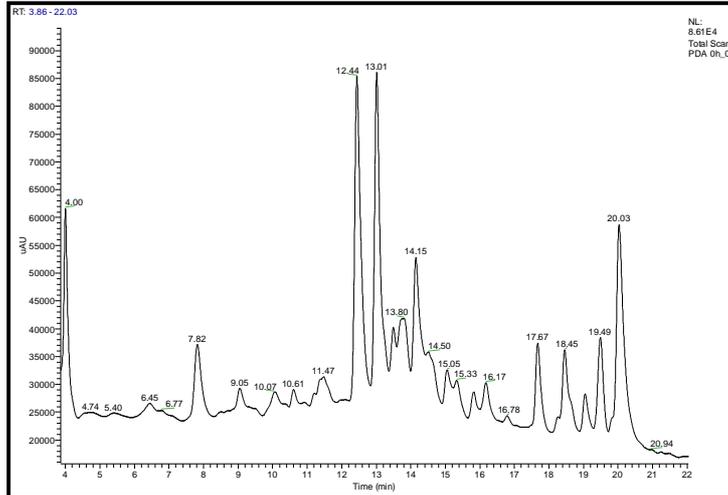
Viabilidade celular (%) na presença de concentrações crescentes de *G. robertianum*

Anexo 2C: Perfis Cromatográficos obtidos para as 0 e 6 horas de digestão por HBSS

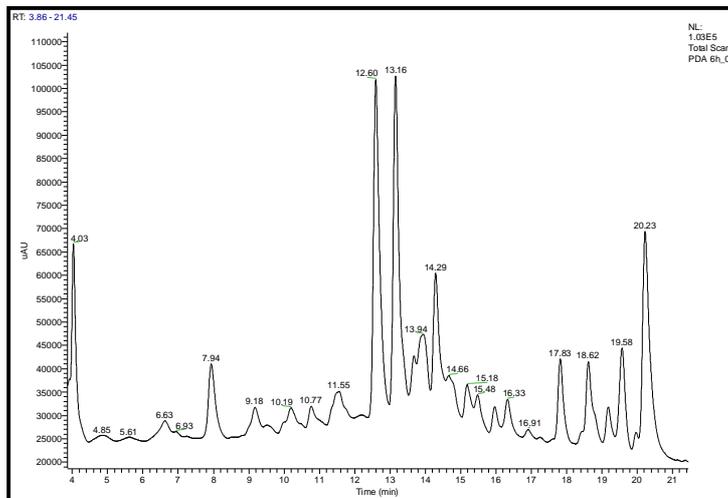
Perfil cromatográfico de uma solução de *G. robertianum* às 0 horas de digestão por HBSSPerfil cromatográfico de uma solução de *G. robertianum* às 6 horas de digestão por HBSS

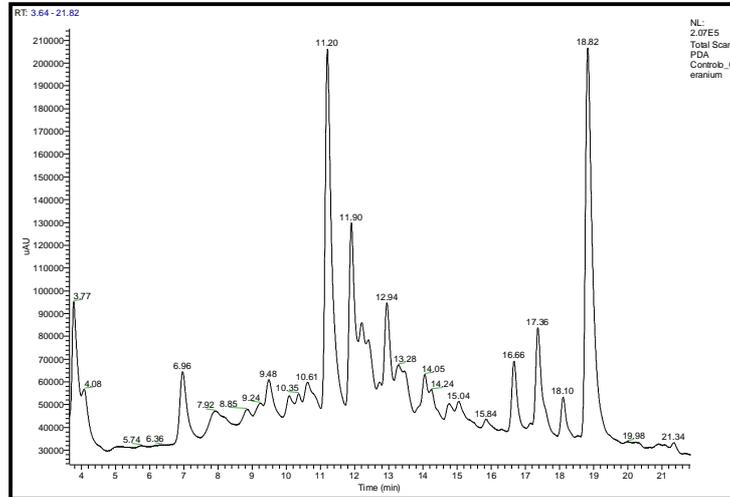
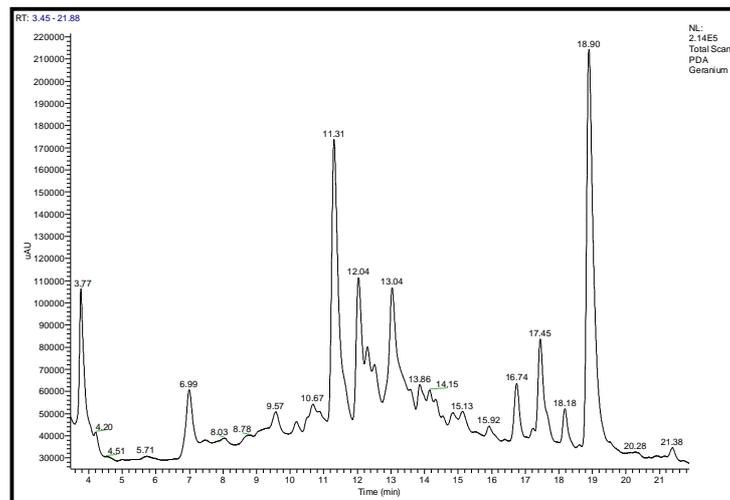
Anexo 2D: Perfis Cromatográficos obtidos para as 0 e 6 horas de digestão por células Caco-2

Perfil cromatográfico de uma solução de *G. robertianum* às 0 horas de digestão por células Caco-2



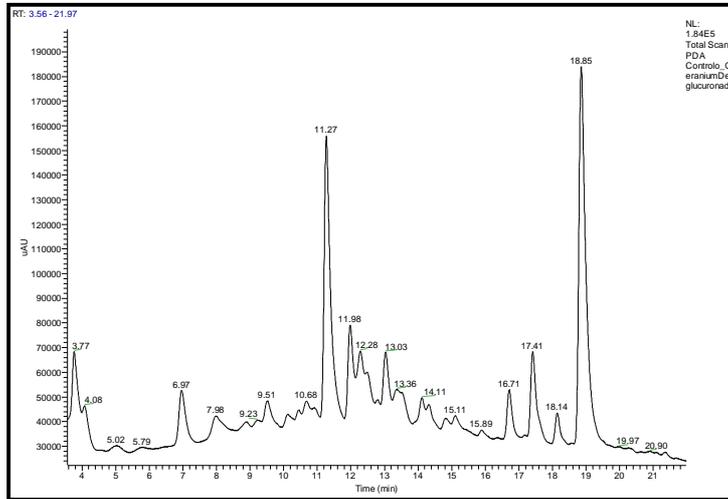
Perfil cromatográfico de uma solução de *G. robertianum* às 6 horas de digestão por células Caco-2



Anexo 2E: Glucuronidação do extracto aquoso de *G. robertianum*Perfil cromatográfico de uma solução de *G. robertianum* não sujeita a glucuronidaçãoPerfil cromatográfico de uma solução de *G. robertianum* sujeita a glucuronidação

Anexo 2F: Reglucuronidação do extracto aquoso de *G. robertianum*

Perfil cromatográfico de uma solução de *G. robertianum* não sujeita a reglucuronidação



Perfil cromatográfico de uma solução de *G. robertianum* sujeita a reglucuronidação

