

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
QUÍMICA E BIOQUÍMICA



Ciências
ULisboa

Estudos de Bioatividade de Decocções de *Centaurium erythraea*

Laura Rodrigues Guedes

Mestrado em Química
Especialização em Química

Dissertação orientada por:
Professora Doutora Maria Luísa Mourato Oliveira Marques Serralheiro
Doutora Maria da Conceição Monteiro André de Oliveira

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha orientadora, a Professora Doutora Maria Luísa Serralheiro, pela sabedoria e empenho com que sempre me orientou, pela confiança que depositou em mim e no meu trabalho, por todo o esforço que fez para me proporcionar as melhores condições para o desenvolvimento desta dissertação e por me ter apoiado sempre.

À Doutora Maria da Conceição Oliveira, co-orientadora desta dissertação, pelo apoio científico na parte de espetrometria de massa e por ter permitido que analisasse as minhas amostras no nanoLC- QqToF do qual é responsável.

À Doutora Rita Pacheco, por todo o conhecimento transmitido, pelo seu espírito crítico que com toda a certeza enriqueceu o meu trabalho, por me ter acompanhado desde o início e pela incansável ajuda em todos os passos do trabalho, em especial nos diversos ensaios com as linhas celulares.

Ao Professor Pedro Vaz e ao Professor Carlos Borges, pela ajuda e disponibilidade demonstradas ao longo do trabalho na parte da análise dos dados de espetrometria de massa.

Ao Doutor Pedro Falé, pela ajuda na realização e na análise dos resultados obtidos por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.

Um obrigada especial à Ana Assunção, ao André Silva, ao Luís Almeida, à Elsa Brito, à Joana Henriques e ao Luís Gomes, os melhores colegas de laboratório, por terem facilitado a minha integração no laboratório no primeiro ano, por todos os momentos de boa-disposição e pela entejuda. Apesar de não terem estado comigo este ano, não vão ser esquecidos!

Quero agradecer também aos meus colegas de laboratório deste ano: à Anna Goll, à Angela Abalsamo, à Louise Prost-boucle, à Magda Granosik, ao Riccardo Ottalevi e, em especial, à Rosamaria Tarsitani e à Serena Sciara, que sem dúvida nenhuma alegraram os meus dias e tornaram o trabalho muito mais divertido, mostrando-me que podemos alcançar os nossos sonhos sempre com um sorriso no rosto!

Ao Bruno Soares, à Joana Catarro e, em particular, à Rebeca Esperança André e à Violeta Railean, pelo companheirismo, paciência, por ao longo deste ano me ajudarem sempre que se tornava difícil e pelo seu total apoio no solucionar de dúvidas que foram aparecendo ao longo do trabalho, mas sobretudo obrigada pela amizade!

À Inês e à Vanessa, tal como a Rebeca, por me terem apoiado e acompanhado desde o início e por me terem feito sorrir nos momentos mais difíceis um beijinho do tamanho do mundo. Estarão sempre na minha memória e no meu coração!

À Filipa, que é, de longe, uma das pessoas mais importantes da minha vida, obrigada por tudo! Sempre me apoiou e está lá sempre que é preciso. As idas ao estádio, as férias, as saídas, as viagens, as histórias que ficam para mais tarde recordar, todos os momentos que passámos e as gargalhadas que partilhámos... Tu sabes que é para a vida!

À minha família um eterno obrigada, principalmente aos meus pais e irmã, por nunca me terem deixado desistir de lutar pelos meus objetivos, pelos conselhos, força e coragem, por acreditarem em mim e por estarem sempre lá.

A todos aqueles que, de uma forma ou de outra, me ajudaram e apoiaram o meu sincero agradecimento!

Resumo

O uso de plantas para fins medicinais tem, nos últimos anos, voltado a desempenhar um papel de elevada importância, devido às potencialidades que os compostos resultantes do metabolismo secundário apresentam para a saúde humana. Tendo como base esta realidade, iniciou-se este trabalho experimental, que se centrou no estudo de *Centaureum erythraea*.

Começou-se, então, com o processo de decocção desta planta, o que permitiu a obtenção de um extrato aquoso. Este extrato foi posteriormente purificado através da precipitação de mucilagens com etanol, obtendo-se um sobrenadante constituído maioritariamente por compostos fenólicos (sobrenadante). Foi ainda purificado através da recolha de frações por HPLC-DAD, que permitiu obter uma fração rica em xantonas (fração III), tendo sido este último o método de purificação que apresentou melhores resultados.

Tendo em conta que a maioria dos artigos disponíveis para consulta referem o metanol como solvente utilizado para a extração dos compostos, preparou-se também dois novos extratos recorrendo ao metanol e ao etanol, de forma a comparar o perfil cromatográfico com o extrato aquoso e perceber se os diferentes solventes resultariam na extração de diferentes compostos. Observou-se, então, que o perfil obtido através da análise por HPLC-DAD é bastante semelhante para os três extratos, sendo as maiores diferenças associadas à quantidade de compostos extraídos. Para além disso, fez-se a identificação dos compostos existentes na decocção de *C. erythraea* através de LC-MSⁿ. O extrato aquoso desta planta é caracterizado, principalmente, pela presença de secoiridoides, como a swertiamarina, o gentiopicrósido e o swerósido, e de xantonas, como a di-hidroxi-dimetoxixantona e a di-hidroxi-tetrametoxixantona.

Paralelamente, foi quantificada a composição fenólica de cada um dos extratos recorrendo-se ao método que tem como base a reação dos grupos fenólicos com o reagente de Folin-Ciocalteu, tendo-se obtido para o extrato aquoso 20 µg de fenóis/mg de extrato e para a fração III 16 µg de fenóis/mg de extrato, valores expressos em equivalentes de ácido gálico. Realizaram-se também estudos no âmbito da valorização farmacológica de *C. erythraea*, nomeadamente da sua capacidade antioxidante através da inibição da eliminação do radical DPPH, da lipoperoxidação e da captura do radical óxido nítrico. O extrato aquoso revelou, através do método do DPPH, uma percentagem de inibição de 25 %, para uma concentração de 50 µg/mL, e a fração III de 18 %. Para o ensaio da peroxidação lipídica, para uma concentração de 400 µg/mL, o extrato aquoso inibiu a lipoperoxidação em 32 % e entre os extratos orgânicos, que apresentaram valores inferiores ao do extrato aquoso, não foram encontradas diferenças significativas. Já no ensaio da inibição da captura de radicais de óxido nítrico, o extrato aquoso revelou um EC₅₀ = 775 µg/mL e o extrato etanólico foi o que apresentou um melhor potencial antioxidante, com um EC₅₀ = 565 µg/mL.

Neste trabalho experimental, procedeu-se ainda ao estudo da atividade inibitória da acetilcolinesterase, através do método de Ellman, obtendo-se um valor de 54% no extrato aquoso, para uma concentração de 500 µg/mL, e de 60 % na fração III, para a mesma concentração. Estudou-se também a atividade inibitória da HMG-CoA redutase, para a qual o extrato aquoso revelou uma percentagem de inibição de 48 % e a fração III de 27 %, para uma concentração de 10 µg/mL.

Fizeram-se ainda estudos com o intuito de se avaliar a capacidade antitumoral de *C. erythraea* em linhas células humanas do cancro do fígado (Hep-G2), concluindo-se que nenhum dos extratos estudados foi citotóxico e que a fração III foi aquele que apresentou um maior potencial antitumoral, com um IC₅₀ = 1,04 mg/mL, enquanto o extrato aquoso apresentou um IC₅₀ = 1,57 mg/mL.

Mais ainda, em estudos preliminares, observou-se que a fração III induz alterações a nível proteico em células do hepatocarcinoma e que existe uma relação inversa entre a quantidade de DNA e a quantidade de proteína. Estudos adicionais poderão indicar em que proteínas ocorrem estas modificações e se poderão ter influência no tratamento do cancro.

Em suma, com este trabalho experimental, é possível concluir que a extração dos compostos bioativos, com água ou com os solventes orgânicos estudados, é semelhante. Este facto revela-se bastante vantajoso, dado que permite compreender que o uso desta planta, sob a forma de “chá”, possibilita a ingestão de compostos fenólicos reportados na literatura como importantes para a saúde humana, quando extraídos com solventes orgânicos. Para além disso, o extrato aquoso demonstrou ser bastante promissor para a inibição da biossíntese do colesterol. Foi possível, ainda, chegar à conclusão que a fração rica em xantonas possui uma boa atividade biológica, podendo desempenhar um papel importante na Doença de Alzheimer ou para facilitar a digestão através do aumento dos movimentos peristálticos.

Palavras-chave: *Centaurium erythraea*, Gentiopicrosido, Xantonas, Bioatividades e Proteómica

Abstract

The use of plants for medicinal purposes has, in recent years, returned to play a very important role, due to the potential that the compounds resulting from the secondary metabolism present for human health. Based on this reality, we began this experimental work that focused on the study of *Centaurium erythraea*.

This work started with the decoction process of this plant, which allowed to obtain an aqueous extract. The extract was then purified by the precipitation of mucilages with ethanol, obtaining a supernatant constituted mainly by phenolic compounds (supernatant). It was also purified by the collection of fractions by HPLC-DAD, which allowed to obtain a fraction rich in xanthenes (fraction III), the latter being the purification method that presented better results.

Taking into account that most of the articles available refer to methanol as the solvent used for the extraction of the compounds, two new extracts were also prepared using methanol and ethanol, in order to compare the chromatographic profile with the aqueous extract and to understand if the different solvents would result in the extraction of different compounds. It was then verified that the profile obtained by HPLC-DAD analysis is very similar for the three extracts, the largest differences being associated with the amount of extracted compounds. In addition, the compounds in the decoction of *C. erythraea* were identified by LC-MSⁿ. The aqueous extract of this plant is characterized, mainly, by the presence of secoiridoids, such as swertiamarin, gentiopicroside and sweroside, and xanthenes, such as di-hydroxy-dimethoxyxanthone and di-hydroxy-tetramethoxyxanthone.

At the same time, the phenolic composition of each extract was quantified using the method based on the reaction of the phenolic groups with the Folin-Ciocalteu reagent, obtaining for the aqueous extract and for fraction III 20 µg of phenols/mg of extract and 16 µg of phenols/mg of extract, respectively, values expressed as gallic acid equivalents. Studies have also been carried out in the field of pharmacological valorization of *C. erythraea*, namely its antioxidant capacity by inhibiting the elimination of the DPPH radical, lipoperoxidation and the capture of the nitric oxide radical. The aqueous extract revealed by the DPPH method an inhibition percentage of 25 % at a concentration of 50 µg/mL and fraction III of 18 %. In the lipid peroxidation assay, at a concentration of 400 µg/mL, the aqueous extract inhibited lipoperoxidation in 32 % and, among the organic extracts, which presented lower values than the aqueous extract, no significant differences were found. For the nitric oxide radical capture inhibition test, the aqueous extract showed an EC₅₀ = 775 µg/mL and the ethanolic extract showed the highest antioxidant potential with an EC₅₀ = 565 µg/mL.

In this experimental work the acetylcholinesterase inhibitory activity was also studied by the Ellman method, obtaining a value of 54 % in the aqueous extract, at a concentration of 500 µg/mL, and of 60 % in fraction III, for the same concentration. The inhibitory activity of HMG-CoA reductase was also studied and for this study the aqueous extract showed an inhibition percentage of 48 % and fraction III percentage of 27 %, for a concentration of 10 µg / mL.

Further studies were conducted to evaluate the antitumor capacity of *C. erythraea* in human liver cancer cell lines (Hep-G2), concluding that none of the extracts studied were cytotoxic and that fraction III was the one that presented a higher antitumor potential, with an IC₅₀ = 1,04 mg/mL, while the aqueous extract had an IC₅₀ = 1,57 mg/mL.

Moreover, in preliminary studies, it was found that fraction III induces changes at the protein level in hepatocarcinoma cells and that there is an inverse relation between the amount of DNA and the amount of protein. Further studies may indicate in which proteins these modifications occur and whether they may influence the treatment of cancer.

In summary, with this experimental work, it is possible to conclude that by using water or by using the organic solvents studied, the extraction of the bioactive compounds is similar. This conclusion is very beneficial, since it allows us to understand that the use of this plant under "tea" form enables the ingestion of phenolic compounds reported in the literature as important for human health, when extracted with organic solvents. Moreover, the aqueous extract has been shown to be very promising for inhibition of cholesterol biosynthesis. It was also possible to conclude that the xanthone-rich fraction has a good biological activity and may play an important role in Alzheimer's disease or to facilitate digestion by increasing peristaltic movements.

Keywords: *Centaurium erythraea*, Gentiopicroside, Xanthenes, Bioactivities and Proteomics

Índice

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Agradecimentos..... | I |
| Resumo..... | III |
| Abstract..... | V |
| Índice de Figuras..... | IX |
| Índice de Esquemas..... | XI |
| Índice de Tabelas..... | XII |
| Lista de Abreviaturas e Siglas..... | XIII |
| 1 – INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1 – <i>Centaurium erythraea</i> (Fel da Terra)..... | 3 |
| 1.2 – Metabolitos secundários..... | 3 |
| 1.2.1 – Ácidos fenólicos..... | 4 |
| 1.2.2 – Flavonoides..... | 5 |
| 1.2.3 – Xantonas..... | 6 |
| 1.2.4 – Terpenoides..... | 7 |
| 1.2.4.1 – Secoiridoides..... | 7 |
| 1.3 – Mucilagens..... | 8 |
| 1.4 – Atividades biológicas..... | 8 |
| 1.4.1 – Atividade antioxidante..... | 8 |
| 1.4.2 – Acetilcolinesterase..... | 10 |
| 1.4.3 – HMG-CoA redutase..... | 12 |
| 1.5 – Potencial anticancerígeno dos compostos fenólicos..... | 13 |
| 2 – OBJETIVOS..... | 15 |
| 3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL..... | 19 |
| 3.1 – Reagentes..... | 21 |
| 3.2 – Equipamento..... | 21 |
| 3.3 – Preparação dos extratos de <i>C. erythraea</i> | 22 |
| 3.3.1 – Preparação do extrato aquoso de <i>C. erythraea</i> | 22 |
| 3.3.2 – Preparação do extrato metanólico e etanólico de <i>C. erythraea</i> | 22 |
| 3.4 – Condições analíticas do HPLC-DAD..... | 22 |
| 3.4.1 – Análise qualitativa do extrato aquoso de <i>C. erythraea</i> | 23 |
| 3.4.2 – Ensaio enzimático da inibição da HMG-CoA redutase..... | 23 |
| 3.4.3 – Análise qualitativa do conteúdo peptídico celular..... | 24 |
| 3.5 – Condições analíticas do LC-MS..... | 24 |
| 3.6 – Análise do DNA por espectroscopia de FTIR..... | 25 |
| 3.7 – Purificação dos compostos fenólicos do extrato aquoso de <i>C. erythraea</i> | 25 |
| 3.7.1 – Recolha de frações no HPLC..... | 25 |
| 3.7.2 – Precipitação das mucilagens..... | 25 |
| 3.8 – Quantificação dos compostos bioativos da infusão de <i>C. erythraea</i> | 26 |
| 3.8.1 – Quantificação dos fenóis totais..... | 26 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.9 – Determinação da atividade antioxidante da infusão de <i>C. erythraea</i> | 27 |
| 3.9.1 Capacidade de redução do radical DPPH..... | 27 |
| 3.9.2 – Inibição da lipoperoxidação: Método dos TBARS | 28 |
| 3.9.3 – Inibição da captura de radicais de óxido nítrico | 28 |
| 3.10 – Determinação da atividade enzimática da infusão de <i>C. erythraea</i> | 29 |
| 3.10.1– Inibição da acetilcolinesterase..... | 29 |
| 3.10.2– Inibição da HMG-CoA redutase..... | 30 |
| 3.11 – Ensaios em linhas celulares do carcinoma hepatocelular | 31 |
| 3.11.1– Determinação da citotoxicidade nas células Hep-G2 | 31 |
| 3.11.2– Extração e quantificação do DNA | 32 |
| 3.11.3– Eletroforese em gel de poliacrilamida unidimensional | 33 |
| 3.12 – Análise estatística | 34 |
| 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO | 35 |
| 4.1 – Métodos de extração dos compostos fenólicos | 37 |
| 4.2 – Caracterização dos extratos de <i>C. erythraea</i> por HPLC-DAD | 37 |
| 4.3 – Identificação de compostos de <i>C. erythraea</i> por LC-MS..... | 43 |
| 4.4 – Quantificação dos fenóis totais | 52 |
| 4.5 – Determinação da atividade antioxidante | 54 |
| 4.5.1 – Capacidade de redução do radical DPPH..... | 54 |
| 4.5.2 – Inibição da lipoperoxidação: Método dos TBARS | 56 |
| 4.5.3 – Inibição da captura de radicais de óxido nítrico | 57 |
| 4.6 – Determinação da atividade enzimática..... | 60 |
| 4.6.1 – Inibição da acetilcolinesterase..... | 60 |
| 4.6.2 – Inibição da HMG-CoA redutase..... | 61 |
| 4.7 – Ensaios em linhas celulares do carcinoma hepatocelular humano..... | 64 |
| 4.7.1 – Determinação da citotoxicidade em células Hep-G2 | 64 |
| 4.7.2 – Extração e quantificação do DNA..... | 65 |
| 4.7.3 – Análise do DNA por espectroscopia de FTIR..... | 67 |
| 4.7.4 – Análise qualitativa do conteúdo peptídico celular..... | 68 |
| 4.7.5 – Eletroforese em gel de poliacrilamida unidimensional | 69 |
| 5 – CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS..... | 73 |
| Referências Bibliográficas | 77 |
| Anexos..... | 87 |

Índice de Figuras

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1.1 – Planta Fel da Terra (<i>Centaurium erythraea</i>) ^[5] | 3 |
| Figura 1.2 – Via biossintética dos compostos fenólicos, que têm origem na via das pentoses-fosfato e na glicólise, adaptado de ^[19] | 4 |
| Figura 1.3 – Exemplos de ácidos hidroxibenzóicos, adaptado de ^[17] | 5 |
| Figura 1.4 – Exemplos de ácidos hidroxicinâmicos, adaptado de ^[17] | 5 |
| Figura 1.5 – Estrutura base do flavonoide, onde são visíveis os três anéis (A, B e C) e a numeração dos átomos de carbono e oxigénio, adaptado de ^[16] | 6 |
| Figura 1.6 – Estrutura base da xantona, onde são visíveis os três anéis (A, B e C) e a numeração dos carbonos que podem sofrer substituição, adaptado de ^[25] | 6 |
| Figura 1.7 – Via biossintética putativa dos irdoides monoterpénoides, que têm como precursor obrigatório a loganina, adaptado de ^[30] | 7 |
| Figura 1.8 – Estrutura química do iridoide (A), que sofre clivagem oxidativa e dá origem ao secoiridoide (B), adaptado de ^[33] | 8 |
| Figura 1.9 – Espécies reativas de oxigénio e nitrogénio que são geradas no corpo humano..... | 9 |
| Figura 1.10 – A formação de placas amiloides e de emaranhados neurofibrilares contribui para a degradação de neurónios, adaptado de ^[46] | 10 |
| Figura 1.11 – Reação de biossíntese do neurotransmissor acetilcolina, adaptado de ^[52] | 11 |
| Figura 1.12 – Reação de hidrólise do éster da acetilcolina catalisada pelo enzima acetilcolinesterase, dando origem a colina e ácido acético ^[52] | 11 |
| Figura 1.13 – Mecanismo de ação da atorvastatina, onde há inibição competitiva da HMGR..... | 13 |
| Figura 3.1 – Reação do ácido gálico, composto padrão, com o molibdénio, constituinte do reagente de Folin-Ciocalteu, adaptado de ^[73] | 26 |
| Figura 3.2 – Princípio do teste da capacidade de redução do radical livre DPPH na presença de uma amostra com propriedades antioxidantes, adaptado de ^[73] | 27 |
| Figura 3.3 – Esquema representativo da reação enzimática da AChE, para a determinação da atividade do enzima, através do método de Ellman, adaptado de ^[81] | 29 |
| Figura 3.4 – Representação esquemática da reação enzimática da HMGR, adaptado de ^[83] | 30 |
| Figura 3.5 – Estruturas químicas do MTT e do seu produto reduzido formazan, adaptado de ^[84] | 31 |
| Figura 3.6 – Esquema ilustrativo da extração do DNA das células Hep-G2, adaptado de ^[85] | 33 |
| Figura 4.1 – Cromatograma de HPLC-DAD do extrato aquoso de <i>C. erythraea</i> | 38 |
| Figura 4.2 – Cromatogramas de HPLC-DAD obtidos para a primeira, segunda e terceira fração..... | 38 |
| Figura 4.3 – Cromatograma de HPLC de <i>C. erythraea</i> para cada método de recolha utilizado..... | 39 |
| Figura 4.4 – Cromatograma de HPLC obtido para a análise de <i>C. erythraea</i> e da fração III..... | 40 |
| Figura 4.5 – Cromatograma de HPLC obtido para a análise do extrato aquoso, do sobrenadante e do precipitado..... | 41 |
| Figura 4.6 – Cromatograma de HPLC-DAD dos diferentes extratos obtidos através da utilização de diferentes solventes: H ₂ O, MeOH e EtOH..... | 42 |
| Figura 4.7 – Cromatograma iónico total e cromatogramas iónicos extraídos dos iões identificados no ensaio LC-ESI(-) MS/MS do extrato de <i>C. erythraea</i> | 43 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 4.8 – Espectro ESI(-)MS/MS do ião precursor m/z 389,1102 do composto 1 [$C_{16}H_{22}O_{11}$]. | 44 |
| Figura 4.9 – Espectro ESI(-)MS/MS do ião precursor m/z 551,1417 do composto 3 cafeioil-6'-secologanósido. | 45 |
| Figura 4.10 – Estrutura química dos compostos 1 e 3, identificados por LC-MS/MS no extrato de <i>C. erythraea</i> , como secologanósido (A) e cafeioil-6'-secologanósido (B), respetivamente. | 45 |
| Figura 4.11 – Cromatograma iónico total e cromatogramas iónicos extraídos dos iões identificados no ensaio LC-ESI(+)MS/MS do extrato de <i>C. erythraea</i> . | 46 |
| Figura 4.12 – Espectro ESI(+)-MS/MS da molécula protonada m/z 375 da swertiamarina. | 47 |
| Figura 4.13 – Espectro ESI(+)-MS/MS da molécula protonada m/z 357 do gentiopicrósido. | 48 |
| Figura 4.14 – Espectro ESI(+)-MS/MS da molécula protonada m/z 359 do swerósido. | 49 |
| Figura 4.15 – Estrutura química do composto 3 identificado por LC-MS/MS, no extrato aquoso de <i>C. erythraea</i> , como mono-hidroxi-tetrametoxixantona- <i>O</i> -pentosilhexósido. | 50 |
| Figura 4.16 – Espectro ESI(-)-MS/MS da molécula protonada m/z 273 da tri-hidoxi-monometoxixantona. | 50 |
| Figura 4.17 – Espectros ESI(\pm)-MS/MS dos iões precursores m/z 641 e 643 provenientes da molécula trihidoxi-monometoxi xantona- <i>O</i> -pentosilhexósido. | 51 |
| Figura 4.18 – Quantificação dos fenóis totais para cada um dos extratos, métodos de recromatografia e de purificação dos compostos fenólicos. | 53 |
| Figura 4.19 – Percentagem de atividade antioxidante, pela captura do radical DPPH, para as diferentes amostras. | 54 |
| Figura 4.20 – Percentagem da inibição da peroxidação lipídica para os diferentes extratos em estudo, aquoso, metanólico e etanólico. | 57 |
| Figura 4.21 – Valores de EC_{50} ($\mu g/mL$) para a capacidade de captura dos radicais de óxido nítrico dos extratos em estudo, bem como do sobrenadante do extrato aquoso. | 58 |
| Figura 4.22 – Valores de inibição do enzima AChE para as diferente amostras em estudo. | 60 |
| Figura 4.23 – Valores de inibição do enzima HMGR para o extrato aquoso e para a fração III. | 62 |
| Figura 4.24 – Valores de IC_{50} para os extratos em estudo, bem como para a fração III. | 64 |
| Figura 4.25 – Alteração na coloração das células Hep-G2 após 24 h de contacto com a fração III, com o extrato aquoso e com meio (controlo), respetivamente. | 66 |
| Figura 4.26 – Espectro obtido através da análise por espectroscopia de FTIR para as células em contacto com meio (controlo), com o extrato aquoso e com a fração III. | 68 |
| Figura 4.27 – Cromatograma adquirido para a análise dos péptidos obtidos durante a extração do DNA das células em contacto apenas com meio, com o extrato aquoso e com a fração III. | 69 |
| Figura 4.28 – Análise eletroforética desnaturante (SDS-PAGE), normalizada pela quantidade de DNA, das proteínas totais de células Hep-G2. | 70 |
| Figura 4.29 – Gráfico da intensidade (<i>pixel</i>) de cada banda obtida no gel de eletroforese, normalizado pela quantidade de DNA, em função da distância percorrida (cm) para as células controlo, em contacto com o extrato aquoso, com a fração III e com o sobrenadante. | 71 |

Índice de Esquemas

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Esquema 4.1 - Proposta de mecanismo de fragmentação para a molécula protonada m/z 375 da swertiamarina. | 47 |
| Esquema 4.2 - Proposta das vias de fragmentação da molécula protonada m/z 357 do gentipicrósido..... | 48 |
| Esquema 4.3 - Proposta da via de fragmentação para a molécula protonada m/z 359 do swerósido. | 49 |
| Esquema 4.4 - Proposta de fragmentação para o ião precursor m/z 273 da tri-hidroxi-monometoxixantona..... | 51 |
| Esquema 4.5 - Proposta de fragmentação para o ião precursor m/z 641 e m/z 643 da molécula mono-hidoxi-tetrametoxixantona- <i>O</i> -pentosilhexósido..... | 52 |

Índice de Tabelas

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 3.1 – Gradientes utilizados nos diferentes métodos de recolha e análise das amostras por HPLC-DAD..... | 23 |
| Tabela 3.2 – Gradiente utilizado durante o ensaio da inibição da HMG-CoA redutase..... | 23 |
| Tabela 3.3 – Gradiente utilizado na análise qualitativa dos péptidos obtidos durante a extração do DNA. | 24 |
| Tabela 3.4 – Gradiente utilizado durante as análises por LC-HRMS/MS..... | 24 |
| Tabela 4.1 – Rendimentos obtidos para os diferentes métodos de extração, em percentagem (%) e mg de extrato/g de folha, e para a purificação do extrato aquoso com etanol..... | 37 |
| Tabela 4.2 – Proposta de identificação (modo ESI negativo) de compostos presentes no extrato de <i>C. erythraea</i> | 44 |
| Tabela 4.3 - Proposta de identificação (modo ESI positivo) de compostos presentes no extrato de <i>C. erythraea</i> | 46 |
| Tabela 4.4 – Quadro resumo da quantidade de fenóis e das atividades biológicas encontradas para os diferentes extratos em estudo e para a fração III, nomeadamente da capacidade de redução do radical DPPH, da inibição da lipoperoxidação e da captura de radicais NO | 59 |
| Tabela 4.5 – Quadro resumo da quantidade de fenóis e das atividades biológicas encontradas para os diferentes extratos em estudo e para a fração III, nomeadamente inibição da AChE e da HMGR..... | 63 |
| Tabela 4.6 – Valores obtidos para a concentração de DNA ($\mu\text{g/mL}$) e para a razão entre as absorvências a 260 nm e 280 nm para as diferentes amostras, células em contacto apenas com meio (controlo), com o extrato aquoso e com a fração III. | 66 |
| Tabela 4.7 – Frequências e modos vibracionais de alguns grupos funcionais de moléculas visíveis na região de infravermelho no espectro eletromagnético, adaptado de ^[116;117;122] | 67 |
| Tabela 4.8 – Valores da distância percorrida (cm), peso molecular (kDa) e da área das bandas correspondentes às proteínas das células em contacto com o meio (controlo), com o extrato aquoso, com a fração III e com o sobrenadante..... | 71 |

Lista de Abreviaturas e Siglas

| | |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Abs | Absorvência |
| ACh | Acetilcolina |
| AChE | Acetilcolinesterase |
| AChI | Iodeto de acetiltiocolina |
| ACN | Acetonitrilo |
| BuChE | Butirilcolinesterase |
| Ch | Colina |
| ChAT | Colina-Acetiltransferase |
| ChE | Colinesterase |
| DA | Doença de Alzheimer |
| DMAPP | Difosfato de dimetilalilo, do inglês <i>dimethylallyl pyrophosphate</i> |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DPPH | 2,2-difenil-1-picrilhidrazil |
| DTT | Ditiotreitol |
| DTNB | 5-5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzóico), do inglês <i>5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)</i> |
| EC ₅₀ | Concentração eficaz (do inglês <i>effective concentration</i>) que representa 50 % da extinção do radical |
| ESI | Ionização por eletrospray, do inglês <i>electrospray ionisation</i> |
| FBS | Soro bovino fetal, do inglês <i>fetal bovine serum</i> |
| FCR | Reagente de Folin-Ciocalteu, do inglês <i>Folin-Ciocalteu reagent</i> |
| FTIR | Espetroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i> |
| GAE | Equivalentes de ácido gálico, do inglês <i>gallic acid equivalents</i> |
| HDL | Lipoproteína de alta densidade, do inglês <i>high density lipoprotein</i> |
| HMG-CoA | 3-Hidroxi-3-Metilglutaril Coenzima A |
| HMGR | HMG-CoA Redutase |
| HPLC-DAD | Cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de fotodíodos, do inglês <i>high performance liquid chromatography with diode array detector</i> |
| IC ₅₀ | Concentração inibitória (do inglês <i>inhibitory concentration</i>) que representa 50 % de inibição |
| IPP | Pirofosfato de isopentenilo, do inglês <i>isopentenyl pyrophosphate</i> |
| LC-MS ⁿ | Cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massa <i>tandem</i> |
| LDL | Lipoproteína de baixa densidade, do inglês <i>low density lipoprotein</i> |

| | |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MC | Morte celular |
| MTT | Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, do inglês <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i> |
| MS | Espetrometria de massa, do inglês <i>mass spectrometry</i> |
| m/z | Razão massa/carga do ião |
| NADPH | Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina |
| PBS | Tampão fosfato salino, do inglês <i>phosphate-buffered saline</i> |
| PM | Peso molecular |
| PPP | Via das pentoses-fosfato, do inglês <i>pentose phosphate pathway</i> |
| PSA | Persulfato de amônio |
| RNS | Espécies reativas de nitrogénio, do inglês <i>reactive nitrogen species</i> |
| ROS | Espécies reativas de oxigénio, do inglês <i>reactive oxygen species</i> |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio, do inglês <i>sodium dodecyl sulfate</i> |
| SNP | Nitroprussiato de sódio |
| TBARS | Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, do inglês <i>thiobarbituric acid reactive substances</i> |
| TEMED | Tetrametiletilenodiamina |
| TFA | Ácido trifluoracético, do inglês <i>trifluoroacetic acid</i> |
| t_R | Tempo de retenção |
| TRIS | Tris(hidroximetil)aminometano, do inglês <i>Tris(hydroxymethyl)aminomethane</i> |
| UV-Vis | Espetroscopia de ultravioleta-visível |

1 - INTRODUÇÃO

1.1 – *Centaurium erythraea* (Fel da Terra)

A *Centaurium erythraea* (*C. erythraea*), comumente conhecida como Fel da Terra (Figura 1.1), é uma das mais importantes espécies de plantas farmacológicas pertencentes à família Gentianaceae^[1]. Esta família é constituída por cerca de 360 espécies, distribuídas por regiões temperadas da Ásia, Europa e América^[2]. A *C. erythraea* é uma planta herbácea comum nas zonas mediterrânicas, ou seja, em todos os países do Sul da Europa e Norte de África, encontrando-se normalmente em prados calcários secos, na periferia de florestas e em dunas^[3;4].



Figura 1.1 - Planta Fel da Terra (*Centaurium erythraea*)^[5].

A medicina tradicional sempre considerou diversos tipos de plantas como fonte terapêutica, usando-as no tratamento de várias doenças. A *C. erythraea* é uma planta utilizada para fins medicinais há mais de 2000 anos, como, por exemplo, para tratar problemas relacionados com a digestão, os rins, a pressão sanguínea, o estômago ou outras patologias, como cólicas abdominais ou diabetes. O uso desta planta tem sido também descrito na farmacopeia de vários países Europeus e Americanos, tendo sido nomeada “A planta medicinal do ano de 2004”^[6;7]. Atualmente, esta espécie encontra-se em vias de extinção devido à sua sobre-exploração para a produção de infusões tónicas, tinturas, loções, pós ou chás, assim como à deterioração do seu habitat natural^[3;6].

Diversos estudos fitoquímicos, realizados anteriormente, permitiram concluir que a *C. erythraea* apresenta na sua composição química swertiamarina, swerósido, amarogentina, gentiopicrosido e gentianina, compostos que lhe conferem o sabor amargo característico^[8;9]. Esta planta apresenta uma grande diversidade de metabolitos secundários, entre os quais flavonoides, ácidos fenólicos, secoiridoides e derivados de xantonas^[8], que são essenciais para a variedade das atividades biológicas desta planta (antimicrobiana, anti-inflamatória, antimutagénica e antioxidante)^[9;10].

1.2 – Metabolitos secundários

Segundo a Organização Mundial de Saúde, cerca de 7000 dos compostos químicos utilizados na fitoterapia são derivados de fontes vegetais^[11]. De facto, as plantas são uma fonte rica em metabolitos bioativos, como é o caso dos metabolitos secundários, que são responsáveis pelo odor, sabor e cor específicos das plantas^[12]. Estes compostos consistem numa série de moléculas orgânicas de baixo peso molecular, que, normalmente, não possuem um papel fundamental nos processos metabólicos essenciais das plantas^[12;13]. Contudo, apesar de não participarem diretamente no crescimento e desenvolvimento das plantas, os compostos susoditos são importantes para que estas possam interagir com o meio ambiente, visando a sua adaptação e defesa^[13;14]. Existem diversos fatores ambientais, tais como radiação ou temperatura, que apresentam influência no metabolismo secundário, induzindo

variações na composição fitoquímica de cada planta, mesmo dentro da mesma espécie ^[1;14]. Uma grande variedade de metabolitos secundários é obtida a partir dos metabolitos primários, como, por exemplo, hidratos de carbono, lípidos e aminoácidos ^[12].

Dos metabolitos secundários estudados, sabe-se que os compostos fenólicos são os que existem em maior abundância nas plantas ^[15]. Do ponto de vista estrutural, estes compostos possuem pelo menos um anel aromático que contém um ou mais grupos hidroxilo substituintes e, devido a esta variedade estrutural, são denominados geralmente de polifenóis. Grande parte destes compostos encontra-se conjugada com mono e polissacáridos, estando ligados a um ou mais grupos fenólicos, o que origina tanto moléculas mais simples como moléculas de elevado grau de polimerização ^[16;17].

Os compostos fenólicos são produtos do metabolismo secundário e derivam essencialmente da via das pentoses-fosfato (PPP), do chiquimato e do fenilpropanóide. A PPP é uma das mais importantes fontes de energia e de intermediários metabólicos para os processos biossintéticos. Por sua vez, a via do chiquimato converte os produtos obtidos na PPP e na glicólise (eritrose-4-fosfato e fosfoenolpiruvato, respetivamente) em aminoácidos aromáticos, como por exemplo a fenilalanina ^[18]. Posteriormente, estes aminoácidos sofrem uma desaminação, que origina ácidos cinâmicos, e tornam-se os precursores da via do fenilpropanóide, dando origem a uma grande variedade de metabolitos secundários (Figura 1.2) ^[19;20].

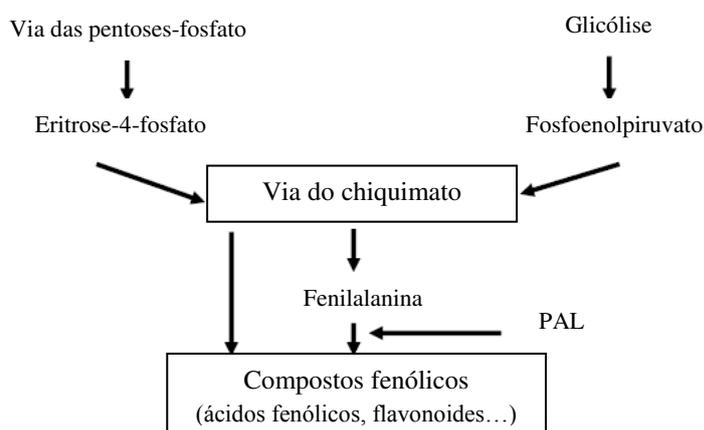


Figura 1.2 –Via biossintética dos compostos fenólicos, que têm origem na via das pentoses-fosfato e na glicólise, adaptado de ^[19].

Devido às suas propriedades medicinais, tais como a atividade anti-inflamatória, anticancerígena e antioxidante ^[21;22], o interesse nos compostos fenólicos tem vindo a aumentar, nomeadamente, no seu papel na prevenção e/ou no tratamento de doenças como o cancro, Doença de Alzheimer ou hipercolesterolemia ^[22].

Os metabolitos secundários podem ser classificados em várias categorias, entre elas os ácidos fenólicos e os flavonoides, que são considerados as principais substâncias de natureza fenólica, bem como as xantonas, que, a par dos secoiridoides, apresentam uma distribuição mais discreta ^[17].

1.2.1 – Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos são um tipo de compostos orgânicos que se caracterizam por terem na sua estrutura um anel benzénico, um grupo carboxílico e um ou mais grupos hidroxilo e/ou metoxilo ^[17]. Estes podem ser divididos em dois subgrupos: os ácidos hidroxibenzóicos, com sete átomos de carbono, e os ácidos hidroxicinâmicos, com nove átomos de carbono ^[19]. Os primeiros incluem os

ácidos gálico, protocatecuico, vanílico, siríngico e *p*-hidroxibenzoico, que têm em comum a estrutura C₆-C₁, estando na Figura 1.3 a estrutura de três deles ^[16].

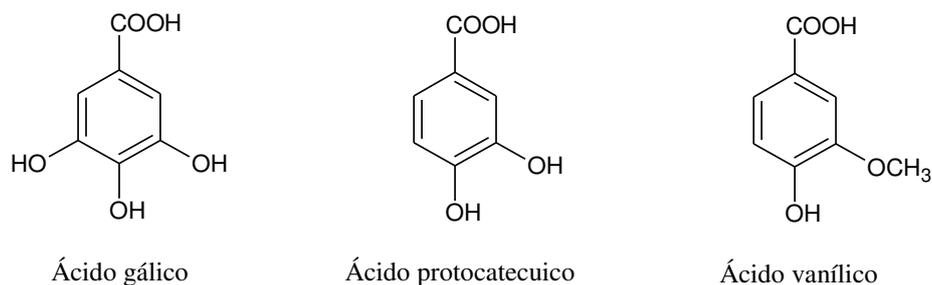


Figura 1.3 – Exemplos de ácidos hidroxibenzoicos, adaptado de ^[17].

Por outro lado, os ácidos hidroxicinâmicos têm na sua estrutura aromática uma cadeia lateral de três átomos de carbonos (C₆-C₃), sendo os ácidos cafeico, ferúlico e sinápico os mais comuns e os reportados para *C. erythraea* (Figura 1.4) ^[17]. Os ácidos hidroxicinâmicos encontram-se habitualmente na natureza na forma combinada, sendo a ligação éster entre a função carboxílica do ácido fenólico e um grupo alcoólico de um composto orgânico um dos principais tipos de ligação ^[17].

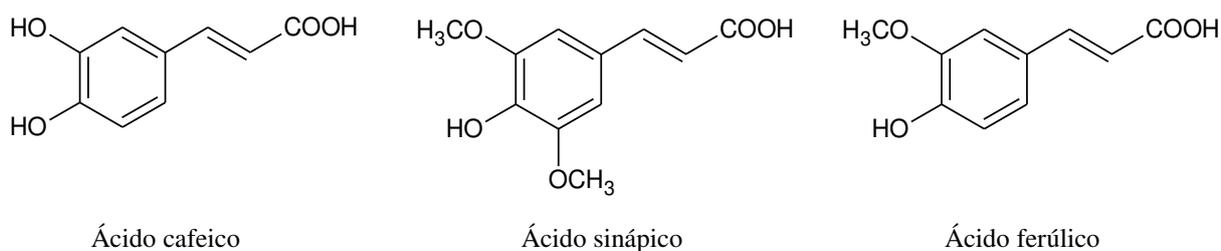


Figura 1.4 - Exemplos de ácidos hidroxicinâmicos, adaptado de ^[17].

Os ácidos supramencionados apresentam um maior potencial antioxidante quando comparados com os ácidos hidroxibenzoicos correspondentes, uma vez que a dupla ligação fora do anel presente nos ácidos hidroxicinâmicos participa na estabilidade do radical por ressonância e garante maior capacidade de doação do próton ^[17;20].

1.2.2 – Flavonoides

Os flavonoides são os metabolitos secundários que existem em maior quantidade nas plantas, sendo responsáveis por mais de metade dos 8000 compostos fenólicos que existem naturalmente ^[17]. Estes compostos apresentam um baixo peso molecular e são constituídos por quinze átomos de carbono (C₆-C₃-C₆), que formam dois anéis aromáticos (A e B). Estes anéis estão ligados por uma cadeia de três átomos de carbono, que normalmente criam um anel central de pirano, dando origem a um terceiro anel (C) ^[16;17]. O anel A é derivado da via do acetato/malonato, enquanto os anéis B e C são derivados da via do chiquimato, ou seja, estes compostos têm origem numa via biossintética mista. Deste modo, a hidroxilação alternada no anel A, ou seja, nas posições 5 e 7, e a hidroxilação na posição 4', nas posições 3',4' ou nas posições 3', 4', 5' no anel B, são o padrão de substituição mais frequente (Figura 1.5).

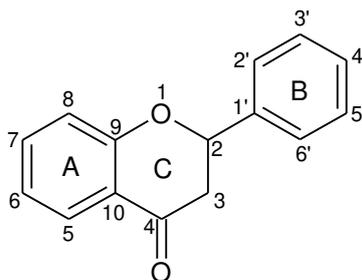


Figura 1.5 - Estrutura base do flavonoide, onde são visíveis os três anéis (A, B e C) e a numeração dos átomos de carbono e oxigênio, adaptado de ^[16].

As principais classes de flavonoides, resultantes das variações no grau de saturação e no facto de o anel C estar aberto ou fechado, são os flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis, antocianidinas e isoflavonas, sendo os dois primeiros os que apresentam uma maior diversidade estrutural ^[16]. Para além disso, tanto o anel A como o anel B podem sofrer substituições, de forma a dar origem a diferentes compostos pertencentes à família dos flavonoides, entre as quais oxigenação, glicosilação, acilação, alquilação e sulfatação ^[17].

1.2.3 – Xantonas

As xantonas são uma classe de compostos fenólicos característica das espécies pertencentes à família Gentianaceae, que, tal como referido anteriormente, é onde se inclui a *C. erythraea* ^[1]. Apresentam uma estrutura global muito semelhante à dos flavonoides, com treze átomos de carbono ($C_6-C_1-C_6$), na qual os dois anéis benzénicos estão ligados por um átomo de carbono, que dá origem, então, ao sistema aromático tricíclico (Figura 1.6) ^[23;24]. Apresentam a mesma via biossintética mista que os flavonoides, onde o anel A é originado pela via do acetato e os anéis B e C pela via do chiquimato ^[25]. Deste modo, os padrões de substituição mais comuns são a presença de grupos oxigenados nas posições 1 e 3 do anel A, e nas posições 5, 6 e/ou 7 do anel B ^[23].

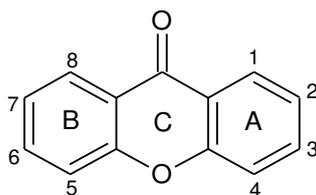


Figura 1.6 – Estrutura base da xantona, onde são visíveis os três anéis (A, B e C) e a numeração dos carbonos que podem sofrer substituição, adaptado de ^[25].

Vários estudos demonstraram que as xantonas possuem propriedades biológicas significativas, incluindo atividades antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória, antialérgica e antibacteriana ^[1;23]. Para além disso, têm sido realizados vários estudos sobre as propriedades quimiopreventivas e quimioterapêuticas destes compostos, concluindo-se que estes são capazes de inibir vários alvos moleculares nas células tumorais, incluindo cinases, ciclo-oxigenases e ácido desoxirribonucleico polimerases (DNA- polimerases) ^[24;26]. De facto, as xantonas são uma classe de polifenóis que, devido à sua natureza heterocíclica oxigenada e à diversidade de grupos funcionais, possuem propriedades farmacológicas muito bem documentadas ^[27].

1.2.4 – Terpenoides

Os terpenoides, constituídos por unidades de isopreno (C_5), são a maior classe de metabolitos secundários conhecidos, com cerca de 50000 compostos identificados, sendo que estudos fitoquímicos realizados em *C. erythraea* revelaram a presença de monoterpénoides (C_{10}), sesquiterpenoides (C_{15}), diterpenoides (C_{20}) e triterpenoides (C_{30})^[14;28]. A síntese de terpenoides pode dar-se por duas vias distintas: a via do mevalonato e a via não-mevalonato, que vão produzir pirofosfato de isopentenilo (IPP) e difosfato de dimetilalilo (DMAPP), respetivamente. Neste caso, a presença de acetilcoenzima A (acetil-CoA), na via do IPP, e de piruvato mais gliceraldeído-3-fosfato, na via do DMAPP, é essencial para a síntese de terpenoides nas plantas^[14;29]. O enzima geranyl difosfato sintase catalisa a reação de condensação entre o IPP e o DMAPP, dando origem ao geranyl difosfato, que, posteriormente, dá origem ao geraniol (álcool monoterpénico), um importante componente na síntese de secoiridoides^[30].

1.2.4.1 – Secoiridoides

Os iridoides são monoterpénoides constituídos por um esqueleto ciclopentano-[C]-pirano, que pode apresentar na sua estrutura oito, nove ou dez átomos de carbono e que são geralmente encontrados como glucosídeos, sendo, por isso, solúveis em água^[31]. Apenas algumas famílias possuem os enzimas necessários para dar origem ao anel ciclopentano característico dos iridoides^[31]. A biossíntese dos iridoides passa pela loganina, que é o precursor biossintético obrigatório dos secoiridoides^[31]. Numa primeira fase, ocorre a oxidação do geraniol, reação catalisada pelo enzima geraniol 8-oxidase do citocromo P-450, que dá origem a 8-oxogeraniol. Este, por sua vez, através do enzima iridoide sintase, leva à produção de nepetalactol, que se encontra em equilíbrio com o iridodial. De seguida, ocorrem diversas reações de oxidação e hidrólise, até se formar o ácido logânico. O próximo passo na via biossintética é catalisado pelo loganilo *O*-metiltransferase, sendo que a loganina é posteriormente convertida em secologanina (Figura 1.7)^[30;32].

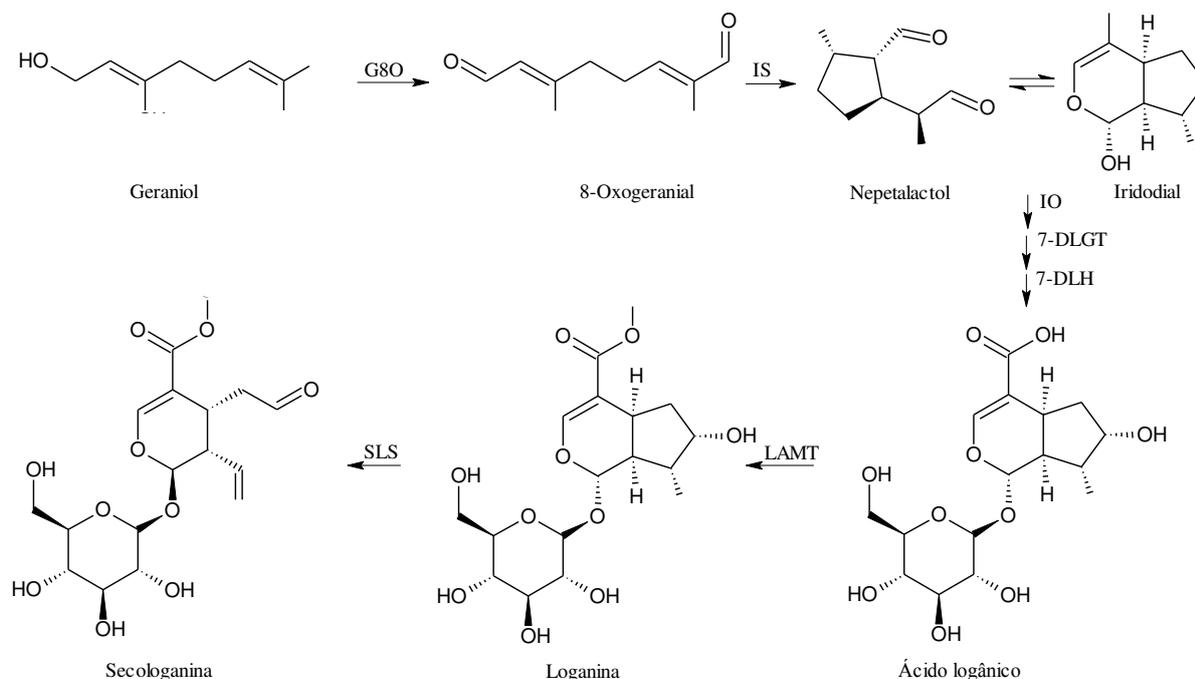


Figura 1.7 – Via biossintética putativa dos iridoides monoterpénicos, que têm como precursor obrigatório a loganina. Adaptado de^[30]. Abreviaturas: G8O – Geraniol 8-oxidase; IS – Iridoide sintase; IO – Iridoide oxidase; 7-DLGT – 7-desoxiloganetilo glucosiltransferase; 7-DLH – 7-desoxiloganilo hidroxilase; LAMT – Loganilo *O*-metiltransferase; SLS – Secologanina sintase.

Introdução

A formação dos secoiridoides tem origem na clivagem oxidativa da ligação existente entre os carbonos 6 e 7 do anel pentagonal dos iridoides (Figura 1.8), sendo um importante metabolito secundário pertencente à classe dos terpenos ^[33].

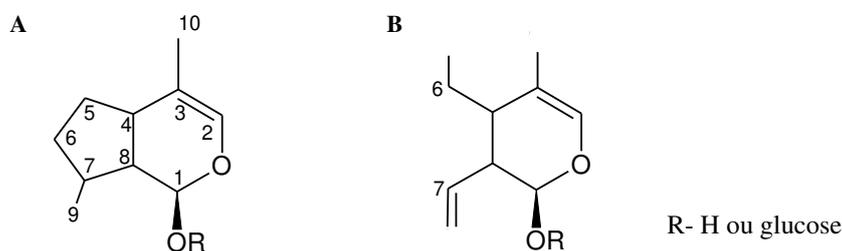


Figura 1.8 – Estrutura química do iridoide (A), que sofre clivagem oxidativa e dá origem ao secoiridoide (B), adaptado de ^[33].

Pensa-se que os efeitos terapêuticos associados à *C. erythraea* estão relacionados com os secoiridoides, entre eles o gentiopicrosido, a swertiamarina e o swerósido. Os secoiridoides apresentam várias atividades biológicas, tais como antifúngica, antibacteriana e hepatoprotetora ^[1;34].

1.3 – Mucilagens

As mucilagens são um tipo de fibra solúvel, com elevado peso molecular e altamente ramificadas, que podem ser obtidas a partir de plantas, fungos ou sinteticamente ^[35]. Na sua constituição apresentam um polissacárido heterogéneo constituído principalmente por D-galactose, L-ramnose, D-xilose e L-arabinose ^[36;37], o que lhes confere uma elevada variabilidade de constituintes químicos. Esta, por sua vez, promove uma multiplicidade de funções fisiológicas nas plantas, atuando, por exemplo, como reservas de energia ^[38]. Estes biopolímeros possuem a capacidade de formar redes moleculares capazes de armazenar uma grande quantidade de água ^[39]. Deste modo, graças ao facto de a água se conseguir ligar aos grupos hidroxilo das mucilagens por pontes de hidrogénio, estas podem dar origem a soluções viscosas e a géis, fazendo com que a mistura de polissacáridos seja bastante utilizada na indústria alimentar, farmacêutica e cosmética ^[37;39]. De facto, o interesse industrial nas mucilagens tem vindo a aumentar, devido à sua biodisponibilidade, à sua não toxicidade e aos efeitos benéficos que estas apresentam na saúde dos consumidores ^[37].

1.4 – Atividades biológicas

1.4.1 – Atividade antioxidante

Naturalmente, o metabolismo aeróbio das células leva à formação de espécies reativas, resultando numa necessidade constante da inibição e/ou eliminação destas espécies, de modo a manter a homeostasia ^[40]. Todavia, em certos casos, há um desequilíbrio entre os pro-oxidantes e os antioxidantes, com favorecimento dos primeiros, o que leva a uma situação de stress oxidativo ^[19;41]. Assim sendo, devido à produção descontrolada de radicais livres (espécie molecular com um eletrão desemparelhado numa orbital molecular, que apresenta maior instabilidade e reatividade do que as espécies não radicalares), existem diversos tipos de moléculas que sofrem alterações na sua estrutura

e/ou função, incluindo lípidos, proteínas e ácidos nucleicos, dando origem a processos de mutagénese, carcinogénese, peroxidação lipídica e fragmentação de proteínas [26;40;42]. Esta falha existente nos mecanismos de defesa antioxidantes contribui para o desenvolvimento de várias doenças, nomeadamente diabetes, cancro e doenças neurodegenerativas e cardiovasculares [19;41].

As células são capazes de gerar espécies reativas de oxigénio (ROS) através de fontes endógenas (mitocôndrios, peroxissomas ou sistemas enzimáticos) e exógenas (fatores ambientais, metais ou radiação) [22]. A maior parte do oxigénio molecular (O_2) total consumido pelos mamíferos dá origem à formação de água, contudo existe uma pequena parte que não é completamente reduzida, devido à libertação de eletrões ao longo da cadeia respiratória, formando-se diversas espécies intermediárias [42]. As formas mais frequentes de ROS incluem o anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o anião radical superóxido (O_2^{2-}), o radical hidroxilo (HO^{\cdot}) e o peróxido de hidrogénio não radicalar (H_2O_2). Para além das ROS, existe também a formação de espécies reativas de nitrogénio (RNS), onde se inclui o radical óxido nítrico (NO^{\cdot}) e o anião peroxinitrito ($ONOO^-$) (Figura 1.9) [22;26].

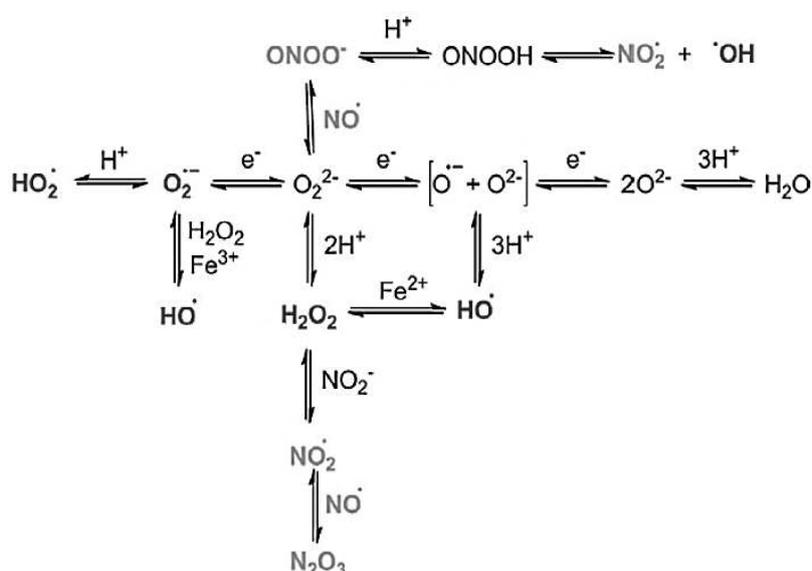


Figura 1.9 – Espécies reativas de oxigénio e nitrogénio que são geradas no corpo humano, adaptado de [22].

Deste modo, os organismos aeróbios apresentam sistemas de proteção de forma a minimizar os efeitos nefastos das espécies reativas [40]. Entre as diversas defesas antioxidantes encontram-se enzimas endógenas (superóxido dismutase e catalase), antioxidantes endógenos não enzimáticos (glutaciona e ácido úrico), proteínas de ligação de metal (albumina e transferrina) e antioxidantes dietéticos (vitaminas e compostos fenólicos) [22;26].

Hoje em dia, a maior parte dos antioxidantes são produzidos sinteticamente, como é o caso do butil-hidroxianisol (BHA) e o butil-hidroxitolueno (BHT), todavia, devido à sua toxicidade e pelo facto de serem menos potentes do que os agentes antioxidantes naturais, estes têm sido cada vez menos utilizados [19;43]. A classe dos compostos fenólicos, amplamente distribuídos na natureza, é uma das classes de antioxidantes com maior interesse [41]. Neste caso em particular, o mecanismo de ação mais importante está relacionado com a elevada capacidade que estes têm para inibir ou eliminar radicais livres gerados *in vivo*, quebrando assim o ciclo de formação de novos radicais [17;20]. Esta importante característica pode ser explicada pela facilidade com que estes compostos doam o átomo de hidrogénio do grupo hidroxilo fenólico, dando origem a um radical fenoxilo, que é seguidamente estabilizado pelo deslocamento do eletrão desemparelhado. A atividade antioxidante destes compostos pode estar também associada à sua possibilidade em quelatar iões metálicos, contudo esta

característica pode também conferir-lhes um caráter pro-oxidante. Este fenómeno ocorre quando estes compostos quelatam metais e a sua atividade catalítica aumenta ou, então, quando há uma redução dos iões metálicos, havendo, conseqüentemente, a formação de radicais livres ^[41].

1.4.2 – Acetilcolinesterase

A Doença de Alzheimer (DA), descrita pela primeira vez, em 1901, por Alois Alzheimer, é a causa mais comum de demência nos idosos, sendo vista como uma consequência inevitável do aumento da idade ^[44]. De facto, esta patologia está descrita como uma doença degenerativa progressiva do sistema nervoso central, caracterizada especialmente pela deterioração mental senil prematura ^[45].

A verdadeira natureza desta doença é ainda desconhecida, não obstante, a nível bioquímico, existem duas características patológicas identificadas, a formação extracelular de placas amiloides e a formação intracelular de emaranhados neurofibrilares ^[46;47]. A proteína precursora de amiloide pode sofrer proteólise, gerando a proteína β -amiloide, que, por sua vez, sofre uma clivagem proteolítica promovida pelos enzimas β -secretase (no domínio extracelular) e γ -secretase (no domínio transmembranar), dando origem a um péptido neurotóxico insolúvel, que se deposita na região extracelular e leva à formação das placas senis ^[48;49]. Por sua vez, os emaranhados neurofibrilares são pequenos novelos proteicos que se acumulam no citoplasma do neurónio, sendo formados pela proteína Tau, que é essencial na sua estrutura e estabilização ^[45;49]. Esta capacidade de estabilização da proteína Tau é determinada pelo grau de fosforilação da mesma e, quando esta se encontra hiperfosforilada, perde a afinidade para a tubulina (proteína dos microtúbulos), promovendo a desagregação dos microtúbulos e o rompimento da estrutura das células nervosas. Tal evento permite uma desordem no processamento das sinapses e, posteriormente, a morte dos neurónios, levando à formação dos emaranhados neurofibrilares (Figura 1.10) ^[48;50].

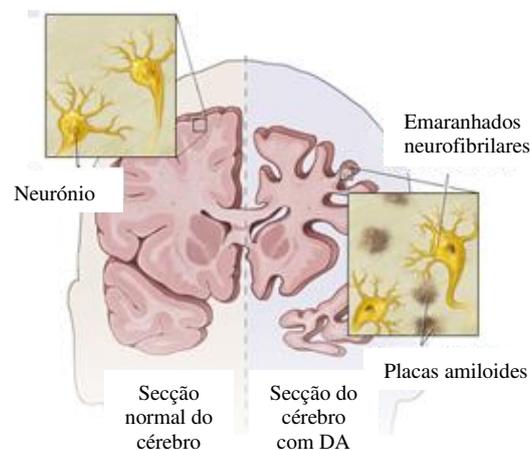


Figura 1.10 - A formação de placas amiloides e de emaranhados neurofibrilares contribui para a degradação de neurónios e, conseqüentemente, para o aparecimento de sintomas associados à Doença de Alzheimer. Adaptado de ^[46].

A nível celular ocorre uma redução substancial dos níveis de neurotransmissores colinérgicos, sendo o decréscimo de ACh (acetilcolina) o processo mais importante associado à DA ^[44;51]. Efetivamente, a ACh é o neurotransmissor mais abundante no corpo humano e é também considerado como o neurotransmissor primário no cérebro, sendo responsável pela transmissão colinérgica. A quantidade de ACh existente nas sinapses depende de dois enzimas, a colina-acetiltransferase (ChAT) e a colinesterase (ChE) ^[47]. O primeiro catalisa a síntese deste neurotransmissor, transferindo um grupo acetilo, a partir da Acetil-CoA, para a colina (Ch), na região terminal dos neurónios (Figura

1.11) ^[52]. De seguida, a ACh é transportada do citoplasma para a vesícula sináptica através da adenosina trifosfato e, posteriormente, é libertada através de impulsos nervosos para a fenda sináptica, ligando-se ao recetor colinérgico muscarínico ou nicotínico ^[47;51].

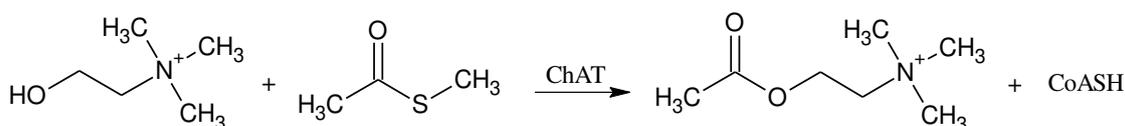


Figura 1.11 – Reação de biosíntese do neurotransmissor acetilcolina, adaptado de ^[52].

O segundo grupo de enzimas mais importante é o da ChE, que inativa a ACh através da hidrólise dos neurotransmissores que não se encontram ligados aos recetores, dando origem a ácido acético e a Ch (Figura 1.12), sendo este último recapturado nas terminações nervosas, sintetizando novamente ACh ^[50]. As ChE existem sob duas formas, a acetilcolinesterase (AChE), que hidrolisa mais rapidamente a ACh, e a butirilcolinesterase (BuChE), que hidrolisa mais rapidamente a butirilcolina ^[53].

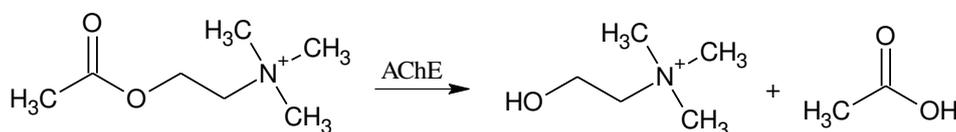


Figura 1.12 – Reação de hidrólise do éster da acetilcolina catalisada pelo enzima acetilcolinesterase, dando origem a colina e ácido acético ^[52].

Tendo em conta que estudos neuroquímicos realizados em indivíduos com esta doença demonstraram um défice no enzima ChAT, que leva a um decréscimo na produção de ACh e, por isso, a uma disfunção colinérgica cortical, seria necessário o desenvolvimento de terapias que aumentassem a quantidade deste neurotransmissor nas fendas sinápticas. Neste âmbito, ao longo das últimas décadas, várias estratégias têm sido estudadas, incluindo a utilização de precursores de ACh, que visam o aumento da biodisponibilidade de Ch, de libertadores de ACh, que facilitam a sua libertação dos terminais pré-sinápticos, e de inibidores da colinesterase, que pertencem à família das α/β -hidrolases ^[47;54]. De salientar que os agentes farmacológicos desenvolvidos que apresentam os resultados mais promissores se encontram relacionados com o uso destes inibidores, uma vez que estes visam o aumento da disponibilidade sináptica de ACh através da inibição dos seus principais enzimas catalíticos (AChE e BuChE), impedindo, então, a degradação da ACh ^[54].

Assim, têm sido propostas várias substâncias psicoativas com o intuito de preservar e restabelecer a cognição, o comportamento e habilidades funcionais dos doentes. Contudo, os fármacos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA), como o Donepezilo ou a Rivastigmina, apenas permitem retardar a taxa de progressão da doença, possibilitando uma melhoria temporária do estado funcional dos pacientes ^[50].

Para além de desempenhar um papel de elevada importância na DA, a AChE demonstra ser também importante em pacientes com problemas gastrointestinais. A atividade peristáltica ao longo do intestino é influenciada pelos sistemas nervosos simpático e parassimpático, que inibem e estimulam a motilidade gastrointestinal, respetivamente, através da secreção de numerosos neurotransmissores, nomeadamente a ACh, que é o principal neurotransmissor excitatório das camadas musculares ^[55;56]. Alterações que possam ocorrer nos fatores que controlam a motilidade gastrointestinal resultam em perturbações intestinais, tais como obstipação grave e pseudo-obstrução dos intestinos ^[55].

Com o objetivo de minimizar estes problemas, podem ser utilizados inibidores da AChE, que visam o aumento da motilidade intestinal, uma vez que as pequenas contrações musculares que ocorrem ao longo do sistema digestivo se encontram relacionadas com a libertação de ACh^[57]. Deste modo, através da inibição da hidrólise deste neurotransmissor, é possível aumentar estas pequenas contrações, levando a um aumento da motilidade do cólon^[56]. A neostigmina (inibidor sintético reversível da AChE) e a piridostigmina (inibidor de ação prolongada da AChE) são dois dos inibidores mais utilizados no tratamento de problemas gástricos, promovendo a motilidade gastrointestinal^[55;58].

1.4.3 – HMG-CoA Redutase

A doença cardiovascular é uma das principais causas de morte nos países ocidentais, sendo que o risco de contrair esta doença tem vindo a aumentar em indivíduos com concentrações elevadas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) no plasma^[59;60]. De referir que, para além do LDL, existem outras duas lipoproteínas de elevada importância para o organismo humano, os triglicéridos e as proteínas de alta densidade (HDL)^[60].

O colesterol é uma molécula biológica de elevada importância nas células vivas, servindo como um componente estrutural da membrana celular e como um precursor da vitamina D, ácidos biliares e diferentes hormonas, ou seja, é crucial para um bom funcionamento celular^[61]. Aproximadamente 70 % do colesterol total no corpo humano tem origem na biossíntese endógena e o restante é ingerido na dieta^[62]. A síntese endógena do colesterol é regulada maioritariamente pela glicoproteína transmembranar 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase ou HMGR) existente no fígado, através da via do mevalonato, na qual catalisa um passo essencial na produção de colesterol^[60;63].

Vários milhões de adultos possuem um nível de colesterol elevado, gerando um mercado bilionário de fármacos destinados à redução e ao controlo dos níveis de colesterol total no soro sanguíneo^[62]. Para os indivíduos com elevados níveis de colesterol LDL, as mudanças nos hábitos alimentares e no estilo de vida não são suficientes e, por isso, é necessário iniciar-se uma terapia à base de medicamentos que permitam a redução da produção ou o aumento da absorção de colesterol^[59;61]. Uma das classes de fármacos mais utilizada é a das estatinas, onde se inclui a sinvastatina ou a atorvastatina, que são inibidores da HMGR no processo de conversão da HMG-CoA em mevalonato. De facto, os inibidores seletivos de HMGR representam o padrão mais elevado no tratamento da hipercolesterolemia, ou seja, no combate ao aumento da concentração de colesterol LDL no sangue^[62;63]. Esta inibição competitiva da HMGR leva ao bloqueio da síntese de colesterol no fígado (Figura 1.13), uma vez que as células hepáticas têm de compensar os níveis reduzidos de colesterol no sangue, ativando a proteína de ligação a elemento regulador de esterol (SREBP). Esta ativação estimula a transcrição do gene recetor de LDL e os níveis aumentados deste recetor na superfície do hepatócito levam à remoção de partículas LDL do plasma sanguíneo, internalizando-as para o fígado^[62;65]. Neste local estas partículas vão ser degradadas e sujeitas a um novo processamento do colesterol, originando uma redução dos níveis de colesterol LDL na circulação sistémica e, eventualmente, do risco de doenças cardiovasculares^[63;64].

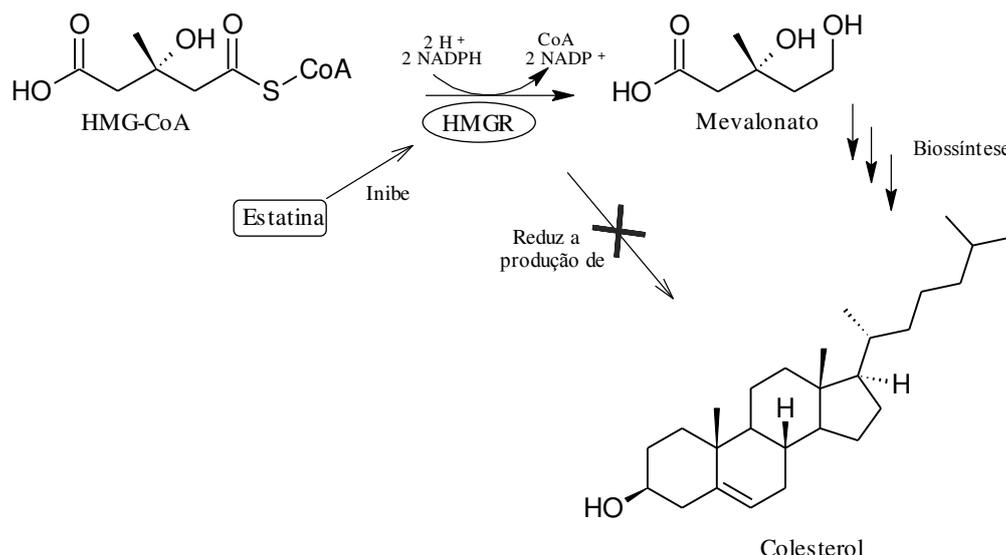


Figura 1.13 - Mecanismo de ação da atorvastatina, onde há inibição competitiva da HMGR, que leva à diminuição dos níveis de mevalonato e, consequentemente, à diminuição da produção de colesterol.

1.5 – Potencial anticancerígeno dos compostos fenólicos

O cancro é causado pela proliferação descontrolada e rápida de células anormais ou mutadas, que são estrutural e funcionalmente diferentes das células normais, dando origem a um tumor ^[65;66]. As células normais reproduzem-se de forma ordenada através de um processo denominado meiose e, quando necessário, ou seja, quando crescem demasiado, estas células param de se desenvolver através da inibição por contacto ^[66;67]. Se houver um defeito ou uma mutação numa das células, esta sofre um processo de morte programada, denominado apoptose, sendo que a célula morta é substituída por uma nova célula ^[65;67]. Todavia, existem situações em que as mutações do DNA das células as tornam resistentes à apoptose e/ou levam a que estas sofram uma replicação mais rápida, originando novas células que contêm a mesma mutação ^[67]. Estas modificações ocorrem no código genético celular, especificamente no ganho de função dos proto-oncogenes (estimulam o crescimento, a divisão e a sobrevivência das células) e na perda de função dos genes supressores de tumores (ajudam a prevenir o crescimento celular e promovem a reparação do DNA) ^[66;68].

Atualmente, o cancro continua a ser uma das principais causas de morte a nível mundial. Segundo a Organização Mundial de Saúde, em 2015, cerca de 8,8 milhões de pessoas morreram de cancro em todo o mundo, sendo que os cancros mais comumente diagnosticados são os do pulmão (19 %), do fígado (9,0 %) e do colo-retal (8,8 %) ^[69]. Estima-se que o elevado índice de massa corporal, o estilo de vida sedentário, o consumo de álcool, o uso de tabaco e a baixa ingestão de frutas e vegetais sejam responsáveis por cerca de 30 % das mortes por cancro ^[22]. Existem mais de cem tipos de cancro para os quais os principais tipos de tratamento são a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia, que apresentam apenas benefícios limitados, devido à metástase, à quimiorresistência e a problemas de toxicidade ^[26]. Assim, com o intuito de se desenvolverem novas terapias, tem-se realizado diversos estudos que visam o uso de compostos fenólicos existentes nas plantas, uma vez que estes são conhecidos por serem fortes antioxidantes, o que pode prevenir o dano oxidativo de determinadas biomoléculas, como o DNA, lípidos e proteínas ^[16;26]. De facto, muitas plantas têm sido avaliadas em estudos clínicos e estão atualmente a ser investigadas fitoquimicamente para se compreender as suas ações antitumorais contra vários tipos de cancro, nomeadamente na quimioprevenção ^[65].

Introdução

A quimioprevenção, conceito introduzido, na década de 70, por Sporn, diz respeito à inibição ou à reversão da carcinogénese através do uso de agentes farmacologicamente ativos, como é o caso dos polifenóis provenientes da dieta ^[70].

A carcinogénese é um processo com múltiplas etapas, no qual ocorrem diferentes alterações moleculares e celulares, tendo sido descritas três etapas: a iniciação (exposição e interação das células com um agente carcinogénico), a promoção (replicação das células anormais) e a progressão do tumor (crescimento descontrolado das células, envolvendo a conversão de células pré-malignas em células neoplásicas e o crescimento de novos vasos sanguíneos (angiogénese)) ^[66;71]. Uma das formas mais eficazes de prevenir o cancro é através do bloqueio da interação do DNA da célula alvo com o agente carcinogénico, o que pode ser conseguido pela eliminação das ROS. Na segunda etapa, é importante interromper ou retardar a divisão celular e, por fim, na fase mais tardia da carcinogénese, a interrupção da angiogénese e a tentativa de impedir que as células malignas invadam os tecidos saudáveis podem ser potencialmente úteis ^[70;71].

Sob condições patofisiológicas, a geração de ROS, a partir dos mitocôndrios, pode contribuir para a alteração do equilíbrio do estado redox intracelular e, conseqüentemente, para a amplificação do fenótipo das células tumorais ^[16;42]. Assim sendo, parece evidente que o stress oxidativo leva à desregulação de compostos responsáveis por coordenar a proliferação e a morte celular, desempenhando um papel fundamental em diversas doenças atuais, como por exemplo doenças autoimunes, doença de Parkinson ou cancro ^[19]. De facto, foi provado por Pisoschi *et al.* que as células tumorais apresentam uma maior quantidade de ROS do que as células saudáveis e, para além disso, que estas espécies são responsáveis pela manutenção do fenótipo do cancro ^[41].

2 – OBJETIVOS

O uso de plantas sob a forma de “chá” para o tratamento de determinadas doenças tem uma tradição milenar e, hoje em dia, continuam a ser amplamente utilizadas na medicina tradicional. A *Centaurium erythraea* é uma planta medicinal de elevada importância, sendo que o estudo dos seus compostos bioativos tem sido alvo de investigação no tratamento de doenças microbianas e inflamatórias.

Assim sendo, esta dissertação visa contribuir para o conhecimento de algumas das atividades biológicas da decocção de *Centaurium erythraea*, nomeadamente da sua capacidade em facilitar a digestão através do aumento da motilidade gástrica, do seu papel na terapia da Doença de Alzheimer e na redução de doenças em que as espécies reativas de oxigénio possam desempenhar um papel importante (por exemplo, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas). Para dar cumprimento a estes objetivos procedeu-se então à:

- Análise dos diferentes extratos por HPLC-DAD e identificação, por espetrometria de massa, dos compostos responsáveis pelas atividades biológicas do extrato aquoso;
- Aplicação de métodos de purificação, nomeadamente precipitação das mucilagens e recolha de frações por HPLC do extrato aquoso;
- Determinação da atividade antioxidante, pela inibição da redução do radical DPPH, da lipoperoxidação e da captura de radicais de óxido nítrico;
- Pesquisa da atividade inibitória dos enzimas acetilcolinesterase e HMG-CoA redutase;
- Avaliação da capacidade antitumoral em células Hep-G2;
- Análise das diferenças nas proteínas produzidas pelas células da referida linha celular, na presença dos compostos da decocção.

3 – PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1 – Reagentes

Para a análise dos extratos, recolha das frações, análise do conteúdo peptídico celular e para o ensaio da atividade enzimática da HMG-CoA redutase, por cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de fotodíodos (HPLC-DAD), foi utilizado MeOH da Riedel-de Haën™, acetonitrilo (ACN) da Carlo Erba, dihidrogenofosfato de potássio e ácido trifluoroacético (TFA) da Merck e também água Millipore (resistividade 18,2 MΩ cm, a 25 °C), que foi retirada de um sistema de purificação de água *Milli-Q Academic* da Merck.

Na análise por espectrometria de massa (MS), os eluentes utilizados foram ácido fórmico, água e ACN da Fisher Scientific, Optima™.

Na precipitação das mucilagens utilizou-se etanol 96 % da Carlo Erba e na quantificação dos fenóis totais recorreu-se ao ácido gálico da Sigma. Os padrões comerciais usados ao longo do trabalho foram o BHT, a quercetina, a rutina e a galantamina da Sigma e o gentiopicrósido da TransMIT.

Nos ensaios da determinação da atividade enzimática adquiriu-se a acetilcolinesterase (AChE), o iodeto de acetilcolina (AChI), o 5-5'-ditiobis(2-ácido nitrobenóico) (DTNB) e o *kit* do ensaio da HMG-CoA Redutase à Sigma, o tris(hidroximetil)-aminometano (Tris) e o cloreto de sódio à Merck e o cloreto de magnésio hexahidratado à Panreac.

Nos ensaios de atividade antioxidante utilizou-se 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) da Sigma, dihidrogeno fosfato de potássio e cloreto de sódio da Merck, cloreto de potássio da Fluka, ácido tiobarbitúrico, peróxido de hidrogénio, hidrogeno fosfato de sódio e 1-butanol da Panreac, sulfato de ferro (II), MeOH e ácido tricloroacético da Riedel-de Haën™, hidróxido de sódio da J. T. Baker e nitroprussiato de sódio e reagente de Griess da VWR Chemicals.

Para os ensaios com as linhas celulares, o antimicótico (100x, com 10000 U/mL de penicilina, 10 mg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina B), o azul de tripano e o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-1-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) são da Sigma, o meio RPMI, o soro bovino fetal (FBS), a tripsina (10x) e a L-glutamina (2 mM) da Lonza e o MeOH da Riedel-de Haën™.

Na quantificação do DNA foi utilizado o EZNA® Tissue DNA Kit da VWR - Omega Bio-tek, isopropanol da Merck, etanol da Carlo Erba e DNA dos testículos de salmão da Sigma.

Nas eletroforeses utilizou-se Tris e ácido acético glacial da Merck, MeOH da Riedel-de Haën™, persulfato de amónio (PSA), glicina e dodecil sulfato de sódio (SDS) da Sigma, glicerol da Promega, marcador de proteínas NZYBlue e tetrametiletlenodiamina (TEMED) da NZYTech, ditiotreitól (DTT) da GE Healthcare Life Sciences, azul de bromofenol da Panreac, azul brilhante de Coomassie R-250 da Bio-RAD e acrilamida/bis (29:1) da Amresco.

3.2 – Equipamento

Na precipitação das mucilagens utilizou-se uma centrífuga Beckman® J2-21M/E, com um rotor JA-20.1. Para amostras de menor volume usou-se uma centrífuga Minispin® 5415D da Eppendorf®.

Os ensaios de citotoxicidade e da inibição da lipoperoxidação foram realizados num leitor de microplacas TECAN® Sunrise e os ensaios da inibição da acetilcolinesterase, da redução do radical livre DPPH e da captura de radicais de óxido nítrico, bem como a quantificação dos fenóis totais e do DNA foram realizados num espectrofotómetro Shimadzu® UV-160A.

Ao longo de todo o trabalho experimental usou-se uma balança Sartorius® BP 110 S, exceto na pesagem das folhas de *C. erythraea*, em que se utilizou uma balança Sartorius® BP 1200. Usou-se também um vortex Heidolph® REAX 2000, um ultra-sons Elma® Transsonic 460/H e uma placa de aquecimento com agitação Agimatic-N JP Select®. Para as medições do pH utilizou-se um medidor da

WTW inoLab[®] e para incubação das amostras utilizou-se um banho da GFL[®] 1083. As amostras foram concentradas num evaporador rotativo Büchi[®] Rotavapor R-200, acoplado a um sistema de vácuo Büchi[®] B-169 e a um banho Büchi[®] B-490 e foram secas num liofilizador Heto[®] PowerDry LL 3000, acoplado a uma bomba Edwards RV3.

Para os ensaios com as linhas celulares, as condições de esterilidade foram garantidas graças à câmara de fluxo laminar Esco[®] Class II Biohazard Safety Cabinet e as células foram incubadas numa estufa Shel Lab CO₂ Series da Sheldon Mfg.Inc[®]. A visualização e contagem das células foi realizada num microscópio ótico MOTIC[®] AE21.

Para a análise proteica das células Hep-G2 recorreu-se ao sistema “Mini-Protein 3 cell” da Bio-Rad e, por último, os géis obtidos foram fotografados no processador de imagem ImageQuant LAS 500 de GE Healthcare Life Sciences[®].

3.3 – Preparação dos extratos de *C. erythraea*

3.3.1 – Preparação do extrato aquoso de *C. erythraea*

Com o intuito de se preparar o extrato aquoso fez-se uma decocção de todas as partes da planta *C. erythraea*, adquirida comercialmente ao Celeiro Dieta. Deste modo, pesou-se 95 g da planta e adicionou-se 950 mL de água destilada, deixando-se ferver durante 10 minutos, de modo a extrair-se os compostos existentes na amostra. Ao fim deste tempo, deixou-se a infusão arrefecer e filtrou-se com papel de filtro N^o1 da Whatman, posteriormente, a solução aquosa foi liofilizada. Ao longo de todo o trabalho, o liofilizado foi mantido a – 20 °C.

3.3.2 – Preparação do extrato metanólico e etanólico de *C. erythraea*

O extrato metanólico foi preparado tendo como base o método descrito por Bozunovic *et al.* [72], mas com pequenas alterações. No primeiro passo, a planta foi moída com um almofariz e pilão e a cada 100 mg adicionou-se 1 mL de MeOH. Posteriormente, os compostos foram extraídos por sonicação, durante 10 minutos, seguindo-se um passo de centrifugação a 10000 g, durante o mesmo período de tempo. Após a filtração da amostra com filtros de membrana GHP (polipropileno, hidrofóbica) da Acrodisc, o MeOH foi removido no evaporador rotativo, a 37 °C, adicionou-se 2 mL de água Milli-Q e o extrato foi finalmente seco no liofilizador. Para a obtenção do extrato etanólico procedeu-se de igual forma, mas, em vez de se utilizar MeOH, usou-se EtOH. Mais uma vez, os extratos foram mantidos a – 20 °C durante a realização de todo o trabalho.

3.4 – Condições analíticas do HPLC-DAD

As análises dos extratos por HPLC, bem como a recolha das frações, a análise dos péptidos obtidos durante a extração do DNA das células tumorais e o ensaio enzimático da HMGR foram efetuados num VWR-Hitachi Elite LaChrom[®], equipado com uma coluna LiChroCART[®] RP-18, 100 Å, 250 x 4 mm, 5 µm (Merck), um injetor automático L-2200, um forno de coluna L-2300 e um detetor de fotodíodos (DAD) L-2455. O *software* utilizado na aquisição dos dados foi o EZChrom Elite[®].

3.4.1 – Análise qualitativa do extrato aquoso de *C. erythraea*

Na análise das amostras por HPLC utilizou-se uma fase móvel constituída por um sistema binário, que, dependendo do método de recolha, era composto por MeOH ou ACN (A) e por 0,05 % v/v de TFA em água (B), tal como se pode observar na Tabela 3.1. Durante as corridas, os eluentes foram usados de modo a criar um gradiente que permitisse a separação dos compostos da *C. erythraea*. O método 1 foi utilizado apenas na parte inicial do trabalho para a recolha das frações, enquanto os métodos 2 e 3 apresentados foram utilizados para a recolha e recromatografia do extrato aquoso obtido no final da coluna. Para além disso, o método 3 foi o método escolhido para a análise da maior parte das amostras, tal como se vai discutir mais à frente. Para cada corrida foram injetados 25 µL e a deteção foi realizada entre os 200 e os 500 nm, durante 30 minutos.

Tabela 3.1 – Gradientes utilizados nos diferentes métodos de recolha e análise das amostras por HPLC-DAD.

| Método | Tempo (minutos) | % A | % B | Fluxo (mL/min) |
|--------------------------|-----------------|-----|-----|----------------|
| 1 (MeOH + TFA) | 0 | 20 | 80 | 1 |
| | 20 | 80 | 20 | |
| | 25 | 80 | 20 | |
| | 28 | 20 | 80 | |
| | 30 | 20 | 80 | |
| 2 (MeOH + TFA) | 0 | 20 | 80 | 0,8 |
| | 20 | 80 | 20 | |
| | 25 | 80 | 20 | |
| | 28 | 20 | 80 | |
| | 30 | 20 | 80 | |
| 3 (ACN + TFA) | 0 | 8 | 92 | 0,8 |
| | 20 | 28 | 72 | |
| | 25 | 55 | 45 | |
| | 28 | 8 | 92 | |
| | 30 | 8 | 92 | |

3.4.2 – Ensaio enzimático da inibição da HMG-CoA redutase

Durante os ensaios cinéticos da HMG-CoA redutase utilizou-se um gradiente de eluição (Tabela 3.2) com fase móvel de MeOH (A) e KH₂PO₄ 100 mM em água (B). Para cada corrida foi utilizado um fluxo de 0,8 mL/min e foram injetados 25 µL das diferentes soluções. A deteção foi realizada entre os 200 e os 500 nm, durante 30 minutos.

Tabela 3.2 – Gradiente utilizado durante o ensaio da inibição da HMG-CoA redutase

| Tempo (minutos) | % A | % B | Fluxo (mL/min) |
|-----------------|-----|-----|----------------|
| 0 | 5 | 95 | 0,8 |
| 15 | 30 | 70 | |
| 20 | 80 | 20 | |
| 23 | 80 | 20 | |
| 27 | 5 | 95 | |
| 30 | 5 | 95 | |

3.4.3 – Análise qualitativa do conteúdo peptídico celular

Na análise do conteúdo peptídico das células Hep-G2 utilizou-se uma fase móvel composta por ACN (A) e por 0,05 % v/v de TFA em água (B), tal como se pode observar na Tabela 3.3. Para cada corrida foi utilizado um fluxo de 0,8 mL/min e injetados 25 µL da solução da amostra obtida durante a extração do DNA. A deteção foi realizada entre os 200 e os 500 nm, durante 45 minutos.

Tabela 3.3 – Gradiente utilizado na análise qualitativa dos péptidos obtidos durante a extração do DNA.

| Tempo (minutos) | % A | % B | Fluxo (mL/min) |
|-----------------|-----|-----|----------------|
| 0 | 0 | 100 | |
| 20 | 30 | 70 | |
| 30 | 80 | 20 | |
| 35 | 80 | 20 | 0,8 |
| 40 | 30 | 70 | |
| 42 | 0 | 100 | |
| 45 | 0 | 100 | |

3.5 – Condições analíticas do LC-MS

O extrato aquoso de *C. erythraea* foi analisado por cromatografia líquida de alta resolução e espectrometria de massa *tandem* de alta resolução (LC-HRMS/MS), usando um sistema Ultimate 3000 RSLCnano (Thermo Fischer Scientific, Idstein, Alemanha) acoplado a um espectrómetro de massa quadrupolo-tempo de voo (QqToF) Impact II, equipado com uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI) (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). A separação cromatográfica foi realizada numa coluna Kinetex C18, 100 Å, 150 x 2,1 mm, 1,7 µm (Phenomenex, Califórnia, EUA), sendo que a coluna e o amostrador automático foram mantidos a 35 °C e 10 °C, respetivamente. Foi utilizado um gradiente de eluição (Tabela 3.4) com fase móvel de 0,1 % v/v de ácido fórmico em água (A) e 0,1 % v/v de ácido fórmico em ACN (B).

Tabela 3.4 – Gradiente utilizado durante as análises por LC-HRMS/MS.

| Tempo (minutos) | % A | % B | Fluxo (µL/min) |
|-----------------|-----|-----|----------------|
| 0 | 95 | 5 | |
| 1,5 | 95 | 5 | |
| 13 | 25 | 75 | |
| 18 | 0 | 100 | 150 |
| 21 | 0 | 100 | |
| 23 | 95 | 5 | |
| 30 | 95 | 5 | |

Os espectros de massa de alta resolução foram adquiridos nos modos de ESI positivo e negativo, com os seguintes parâmetros experimentais: voltagem do capilar: + 4,5 e – 2,5 kV; *offset*: – 500 V; gás nebulizador (N₂): 40 psi; gás de secagem (N₂): 4,0 L/min; temperatura do gás de secagem: 200 °C. Os espectros foram adquiridos num intervalo entre *m/z* 100-1000 e no modo de aquisição *data dependent* (auto MS/MS) com um varrimento de 3 Hz.

A calibração interna foi realizada no modo de alta precisão (HPC), utilizando uma solução de formato de sódio 10 mM, introduzida na fonte de iões no início de cada aquisição, através de um *loop* de 20 μL , usando uma válvula de seis portas.

A aquisição e processamento de dados foram realizados utilizando o *software* DataAnalysis 4.1 (Bruker Daltoniks).

3.6 – Análise do DNA por espectroscopia de FTIR

As análises por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foram efetuadas num espectrofotómetro Nicolet™ FTIR spectrometers da *Thermo Electron Corporation*® com detetor DTGS, recorrendo ao acessório “Smart Multibounce HATR” da *Thermo Electron Corporation*®. Os espectros foram adquiridos a 32 *scans*, entre os números de onda 900 e 3100 cm^{-1} e com uma resolução de 4 cm^{-1} . Os espectros foram adquiridos através do *software* OMNIC.

Como *background* utilizou-se o tampão de eluição fornecido no *kit* de extração do DNA. Durante a análise do DNA das diferentes amostras (controlo, extrato aquoso e fração III) aplicou-se um volume de 300 μL no cristal de ATR, de forma a garantir que o sinal era suficiente para confirmar que não existiam proteínas e que o DNA estava puro.

3.7 – Purificação dos compostos fenólicos do extrato aquoso de *C. erythraea*

Tendo como objetivo separar as mucilagens dos restantes compostos, de forma a trabalhar apenas com os fenóis totais, procedeu-se a dois métodos de purificação do extrato aquoso de *C. erythraea*, nomeadamente, a recolha de frações utilizando HPLC-DAD e a precipitação das mucilagens com etanol. Deste modo, amplifica-se a sensibilidade dos bioensaios realizados através do aumento da concentração dos compostos referidos.

3.7.1 – Recolha de frações no HPLC

Neste método de purificação usou-se uma solução de 10 mg/mL do extrato aquoso obtido anteriormente (de acordo com o capítulo 3.3.1), estando as condições utilizadas descritas no método 1 do ponto 3.4.1 (eluentes MeOH + TFA, fluxo 1 mL/min) para as várias injeções realizadas. Foram recolhidas três frações: a primeira dos 0 aos 7 minutos, a segunda dos 7 aos 9 minutos e, por fim, a terceira dos 9 aos 30 minutos. Depois de várias recolhas, cada uma das frações foi concentrada no evaporador rotativo, a 37 °C, e seca no liofilizador. Posto isto, foram feitas soluções de 1 mg/mL com água *Milli-Q* e cada uma das frações foi analisada por HPLC-DAD.

3.7.2 – Precipitação das mucilagens

Tendo por base o artigo de Ghanem *et al.* [38] procedeu-se, então, à precipitação das mucilagens, adaptando alguns dos passos descritos no artigo referido. Deste modo, para fins qualitativos, começou por preparar-se uma solução de 10 mg/mL do extrato obtido anteriormente (de acordo com o capítulo 3.3.1), ao qual se adicionou etanol numa proporção de 1:5. A solução foi colocada em gelo durante 8 h e, posteriormente, foi centrifugada a 4 °C, durante 30 min, a 3500 g. De seguida, separou-se o

sobrenadante do precipitado e lavou-se o precipitado, fazendo-se uma nova extração das mucilagens da água de lavagem, utilizando o mesmo procedimento. Adicionaram-se os novos sobrenadante e precipitado aos obtidos anteriormente, concentrou-se a solução no evaporador rotativo, a 37 °C, e, por fim, a amostra foi seca no liofilizador. Tanto o sobrenadante como o precipitado foram analisados por HPLC-DAD, na concentração de 1 mg/mL.

3.8 – Quantificação dos compostos bioativos da infusão de *C. erythraea*

3.8.1 – Quantificação dos fenóis totais

Nesta parte do trabalho experimental utilizou-se o método que tem como base a reação dos grupos hidroxilo dos fenóis com o reagente de Folin-Ciocalteu (FCR). Este método centra-se numa reação de oxidação-redução, em meio alcalino, devido à presença de Na₂CO₃. Nesta reação, os ácidos fosfomolibdicos presentes no FCR, no qual o molibdénio se encontra no estado de oxidação VI, são reduzidos a uma mistura de óxidos de molibdénio por eletrões provenientes dos compostos fenólicos, fazendo então com que a cor da mistura reacional passe de amarelo a azul (Figura 3.1) [73;74]. A coloração do meio de reação, que é proporcional ao teor de compostos fenólicos existentes na amostra, pode ser avaliada espectrofotometricamente a 760 nm.

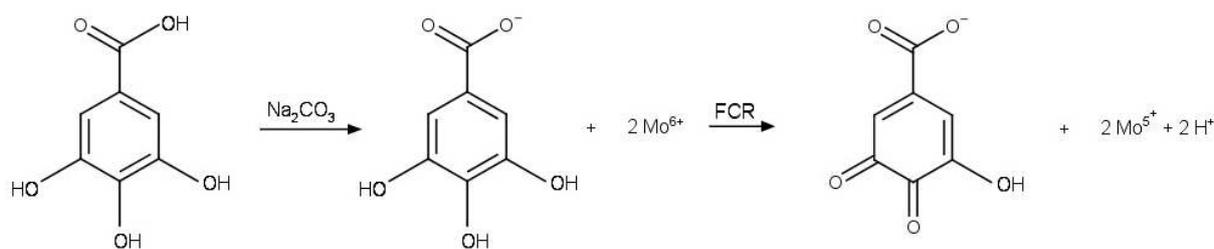


Figura 3.1 – Reação do ácido gálico, composto padrão, com o molibdénio, constituinte do reagente de Folin-Ciocalteu, que é reduzido de Mo⁶⁺ para Mo⁵⁺, adaptado de [74].

A quantificação dos fenóis totais foi realizada em triplicado, adotando o método descrito por Lee *et al.* [43], com pequenas alterações. Primeiramente, foi feita uma reta de calibração, tendo como padrão o ácido gálico. Para isso, adicionou-se, num *ependorf*, 1350 µL de água *Milli-Q*, 30 µL da solução padrão a diferentes concentrações (10 - 500 µL/mL), 30 µL de FCR e agitou-se vigorosamente no vortex. Esperou-se três minutos, adicionou-se mais 90 µL de Na₂CO₃ 2 % e incubou-se durante 2 h, a 4 °C, em agitação contínua. Posteriormente, leram-se as absorvências a 760 nm e traçou-se uma reta de calibração da absorvência em função da concentração de ácido gálico (Anexo 1), obtendo-se a seguinte equação:

$$\text{Abs} = 0,0398 c - 0,0069 \quad [\text{Eq. 3.1}]$$

Em que *Abs* diz respeito à absorvência a 760 nm e *c* à concentração de equivalentes de ácido gálico (GAE µg/mL).

De seguida, quantificaram-se os grupos fenólicos existentes nas amostras em estudo. Para tal, procedeu-se de igual forma à descrita anteriormente, mas, em vez de se adicionar 30 µL da solução de ácido gálico, juntou-se o mesmo volume das diferentes amostras com uma concentração de 5 mg/mL. Substituiu-se o valor de absorvência obtido na equação da reta de calibração para o ácido gálico e

obteve-se, então, a quantidade de fenóis pretendida. De referir que os ensaios foram realizados em triplicado e que os resultados obtidos são apresentados em μg de fenóis/mg de extrato, expressos em equivalentes de ácido gálico.

3.9 – Determinação da atividade antioxidante da infusão de *C. erythraea*

3.9.1 Capacidade de redução do radical DPPH

Este método baseia-se na transferência de eletrões, ou de radicais de hidrogénio, de um composto antioxidante existente no extrato para o radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH), dando origem a uma molécula diamagnética estável [74]. Quando o radical reage com o agente redutor há a formação de uma nova ligação, alterando a cor da solução, que perde a sua coloração púrpura, ficando com uma tonalidade amarelada (Figura 3.2). Como se trata de um método colorimétrico, a reação pode ser seguida espectralmente a 517 nm, comprimento de onda a que o DPPH oxidado absorve [74;75]. Assim sendo, quanto menor for a absorvência a este comprimento de onda, maior vai ser a capacidade antioxidante da amostra em estudo.

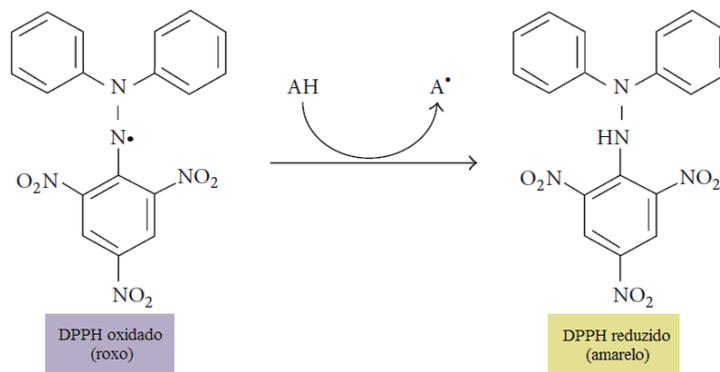


Figura 3.2 - Princípio do teste da capacidade de redução do radical livre DPPH na presença de uma amostra com propriedades antioxidantes, adaptado de [73].

A capacidade antioxidante do extrato de *C. erythraea* foi avaliada utilizando o método descrito por Falé *et al.* [76]. Adicionou-se 10 μL da solução de amostra com uma concentração de 5 mg/mL a 1 mL da solução de DPPH (0,002 % em MeOH), incubaram-se as soluções à temperatura ambiente durante 30 min e, de seguida, mediu-se a absorvência das diferentes amostras no leitor de microplaca a 517 nm, contra um branco que, em vez de 10 μL da solução de amostra, tinha o mesmo volume de água *Milli-Q*. Como padrão utilizou-se BHT, rutina e quercetina. Mais uma vez, todos os ensaios foram realizados em triplicado.

De forma a calcular a percentagem de atividade antioxidante de cada amostra utilizou-se a seguinte expressão:

$$AA (\%) = 100 \times ((A_{\text{DPPH}} - A_{\text{amostra}})/A_{\text{DPPH}}) \quad [\text{Eq. 3.2}]$$

Em que AA (%) corresponde à percentagem de atividade antioxidante, A_{amostra} diz respeito à absorvência de cada uma das amostras e A_{DPPH} à da solução controlo.

3.9.2 – Inibição da lipoperoxidação: Método dos TBARS

A peroxidação lipídica é um processo no qual os radicais livres capturam eletrões dos lípidos, estando associada a situações de stress oxidativo devido à produção não controlada de ROS ^[77]. Um dos grupos de moléculas que mais facilmente oxidam é a dos ácidos gordos polinsaturados, que são de elevada importância para a boa função celular ^[78].

A inibição da oxidação lipídica foi avaliada em triplicado através do método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) descrito por Tokur *et al.* ^[78], com pequenas otimizações. Neste ensaio avaliou-se, então, a capacidade antioxidante das diferentes amostras através da diminuição da lipoperoxidação induzida por ferro no salmão, que é conseguida graças à reação de Fenton ^[78;79]:



Deste modo, o primeiro passo consistiu na pesagem de 1 g de salmão que foi homogeneizado em 9 mL de tampão fosfato salino, pH = 7,4 (PBS 1x, com NaCl 137 mM, fosfato 10 mM e KCl 2,7 mM), ao qual se adicionou 1 mL da solução da amostra em estudo, na concentração de 5 mg/mL. Agitou-se vigorosamente e adicionou-se 1 mL de FeSO₄ 15 mM e 2 mL de uma solução de H₂O₂ 1 mM. Para além das amostras, realizaram-se dois ensaios controlo nas mesmas condições, um deles com oxidação total, que em vez do extrato continha 1 mL de água *Milli-Q*, e o outro sem oxidação, que continha novamente 1 mL de água *Milli-Q* e também 3 mL de PBS 1x, em vez de 1 mL de FeSO₄ e 2 mL de H₂O₂. As misturas foram incubadas num banho a 37 °C, durante 1 h. Findada esta hora, retirou-se uma alíquota de 500 µL e adicionou-se 250 µL de uma solução de 1 % m/v de ácido tiobarbitúrico em NaOH 0,05 M e 250 µL de uma solução de 2,8 % m/v de ácido tricloroacético em água. De seguida, as misturas foram incubadas num banho de água a ferver, durante 10 minutos, e, posteriormente, arrefecidas em gelo. Adicionou-se 2 mL de n-butanol, o que originou a formação de duas fases e, quando a fase de n-butanol ficou translúcida, leu-se a absorvência a 535 nm. Neste ensaio, o padrão comercial utilizado foi o BHT. Por fim, a percentagem de inibição da peroxidação lipídica foi calculada de acordo com a equação 3.2 e é proporcional ao valor de absorvência, ou seja, quanto maior for este valor, maior será a capacidade de inibição da lipoperoxidação.

3.9.3 – Inibição da captura de radicais de óxido nítrico

O método utilizado no estudo da inibição da captura de radicais de óxido nítrico (NO[•]) baseia-se no princípio de que o nitroprussiato de sódio (SNP), numa solução de pH = 7,2, se decompõe, gerando espontaneamente NO[•], que, em condições aeróbias, vai reagir com o oxigénio para produzir iões nitratos (NO₃⁻) e nitritos (NO₂⁻) ^[79;80]. Os compostos que possuem a capacidade de capturar o NO[•] competem com o oxigénio e há uma diminuição da produção dos iões nitrito ^[81].

Deste modo, a atividade sequestradora de radicais de óxido nítrico foi realizada em triplicado segundo o método modificado descrito por Sakat *et al.* ^[80]. Para isso, adicionou-se 900 µL de SNP (20 mM), dissolvido em PBS 1x, a 500 µL da solução da amostra em estudo com diferentes concentrações. Para além das amostras e do padrão comercial rotina, realizaram-se dois ensaios controlo, um deles com 500 µL de amostra e 900 µL de água e o outro com 500 µL de água e 900 µL de SNP. As misturas foram incubadas durante 2h30, a 25 °C, e, posteriormente, adicionou-se 900 µL de reagente de Griess. A absorvência do cromóforo que se formou com cloridrato de naftiletilenodiamina foi imediatamente lida a 450 nm. Mais uma vez, a percentagem de inibição foi calculada de acordo com a equação 3.2. Neste caso, depois de se efetuar os cálculos referidos,

representou-se graficamente a AA (%) em função da concentração de extrato (mg/mL). Através da equação da reta obtida, substituiu-se o “y” por 50 para cada uma das amostras e obtém-se a concentração mínima necessária para o antioxidante extinguir 50 % do radical (EC₅₀).

3.10 – Determinação da atividade enzimática da infusão de *C. erythraea*

3.10.1 – Inibição da acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase (AChE) é responsável pela hidrólise da ACh em colina e acetato, logo a inibição deste enzima levará a uma menor destruição da ACh, que é um neurotransmissor essencial para a comunicação entre os neurónios (neurotransmissão). Assim, neste estudo, pretende-se calcular a velocidade de reação da tiocolina com o DTNB, através do método de Ellman, nomeadamente o aparecimento do ião 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB) ^[82], que tem uma cor amarelada e um pico de absorvência a 405 nm (Figura 3.3).

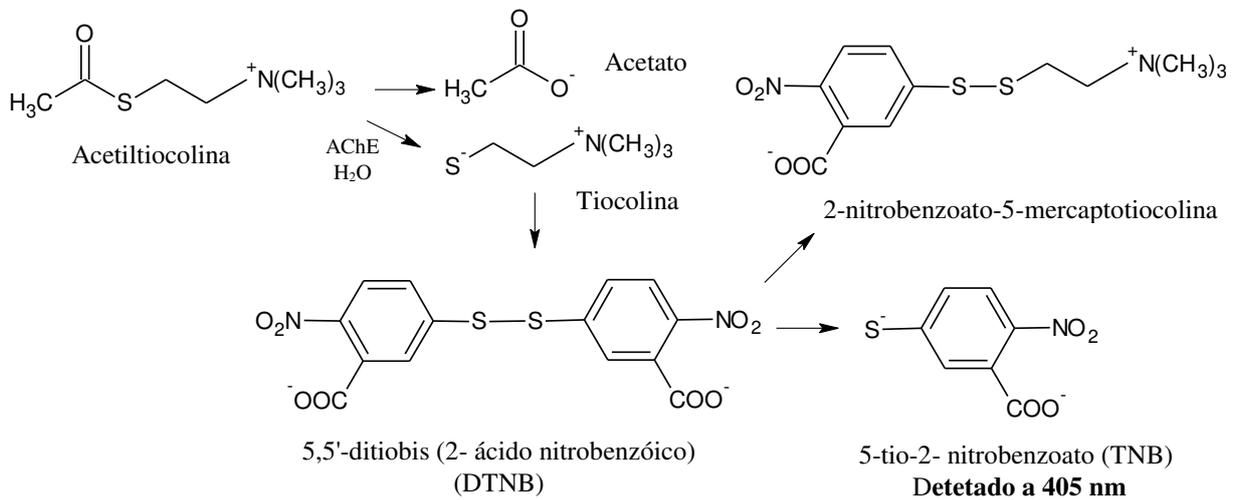


Figura 3.3 – Esquema representativo da reação enzimática da AChE, para a determinação da atividade do enzima, através do método de Ellman, adaptado de ^[82].

Para se determinar a inibição da atividade enzimática da AChE usou-se o método descrito por Falé *et al.* ^[76]. Primeiramente, para se calcular a atividade enzimática sem inibidor, ou seja, o controlo, que corresponde à atividade máxima (100 %), adicionou-se 350 µL/325 µL de tampão Tris 50 mM, pH = 8, na *cuvette* de trás e frente, respetivamente, 100 µL de água *Milli-Q* e 25 µL de uma solução de enzima (1,33 U/mL), na *cuvette* da frente. Incubou-se durante 15 minutos à temperatura ambiente e, seguidamente, adicionou-se em ambas as *cuvettes* 75 µL de uma solução de AChI (0,33 mg/mL em água) e 475 µL de DTNB (1,2 mg/mL em tampão Tris com sais (0,1 M NaCl e 0,02 M MgCl₂)). A absorvência foi lida no espectrofotómetro a 405 nm, durante 4 minutos, com intervalos de 10 segundos. De referir que a atividade inicial do enzima deve ser entre os 0,10-0,12 UA/min. Todos os ensaios foram realizados em triplicado e utilizou-se a galantamina como padrão comercial. O mesmo procedimento foi feito com as diferentes amostras, mas, em vez de se adicionar 100 µL de água *Milli-Q*, adicionou-se o mesmo volume de uma solução das várias amostras com uma concentração de 5 mg/mL.

Para se calcular a percentagem de inibição da atividade enzimática na presença de cada amostra recorreu-se à seguinte equação:

$$I (\%) = 100 - (V_{\text{amostra}} / V_{\text{controle}}) \times 100 \quad [\text{Eq. 3.3}]$$

Na qual $I (\%)$ diz respeito à percentagem de inibição da AChE, V_{amostra} é a velocidade da reação contendo o extrato (inibidor) e V_{controle} é a velocidade inicial da reação sem inibidor.

3.10.2 – Inibição da HMG-CoA redutase

A HMG-CoA redutase (HMGR) é o enzima chave na redução de HMG-CoA em mevalonato e CoA e, conseqüentemente, na biossíntese de esteroides e terpenoides, ou seja, é responsável pela produção de colesterol ^[83,84]. Neste ensaio pretende-se, então, avaliar a diminuição da absorvência a 340 nm, que representa a oxidação do fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) pela subunidade catalítica da HMGR na presença do substrato HMG-CoA (Figura 3.4).



Figura 3.4 – Representação esquemática da reação enzimática da HMGR, adaptado de ^[83].

Para se determinar a inibição da atividade enzimática da HMGR usou-se o método descrito por Mozzicafreddo *et al.* ^[83], como pequenas modificações. Em primeiro lugar, para se calcular a atividade enzimática máxima (100 %), ou seja, sem inibidor, adicionou-se 915 µL de tampão (1x) fornecido no *kit*, 20 µL de NADPH (16,67 mg/mL), 60 µL de HMG-CoA e 5 µL HMGR (0,50 mg/mL). De seguida, retiraram-se alíquotas aos 0, 1, 2, 4 e 6 minutos, a reação foi parada adicionando-se 50 % de MeOH e cada uma das amostras foi analisada por HPLC, recorrendo-se ao método descrito no ponto 3.4.2. A diminuição da absorvência do cofator NADPH foi monitorizada a 340 nm, avaliando-se a diminuição da área dos picos ao longo do tempo, que permitiu fazer uma regressão linear e obter a velocidade da reação. Todos os ensaios foram realizados em triplicado. O mesmo procedimento foi aplicado para o extrato aquoso e para a fração III, na concentração final de 10 µg/mL, mas em vez dos 915 µL de tampão, adicionou-se 815 µL de tampão e 100 µL da solução do inibidor em estudo.

Para a quantificação do NADPH, e conseqüente cálculo da percentagem de inibição da atividade enzimática na presença do extrato aquoso e da fração III, recorreu-se à equação 3.3, descrita no ponto 3.10.1.

3.11 – Ensaios em linhas celulares do carcinoma hepatocelular

Durante este trabalho experimental, utilizou-se a linha celular Hep-G2 (ATCC[®]HB-8065), do carcinoma hepatocelular humano. As células foram colocadas a crescer numa estufa com uma atmosfera de 5 % de CO₂, a 37 °C, em meio RPMI suplementado com 10 % de FBS, 1 % de antimicótico e 1 % de L-glutamina. As células cresceram em frascos T75, tendo-se trocado o meio a cada 48/72 h, até se atingir uma confluência de, aproximadamente, 90 %.

3.11.1 – Determinação da citotoxicidade nas células Hep-G2

Para os ensaios de citotoxicidade recorreu-se ao método colorimétrico de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-1-il)-2,5-difenil-tetrazólio), um composto de cor amarela que dá como produto o formazan, um composto de cor roxa. O MTT, carregado positivamente, tem a capacidade de penetrar as células viáveis, que, graças ao seu metabolismo ativo, convertem o MTT em cristais de formazan (Figura 3.5) ^[85]. Estes cristais são insolúveis em água, portanto utiliza-se MeOH para a sua dissolução e regista-se os valores de absorvência a 595 nm. Quando as células morrem perdem esta capacidade de conversão do MTT, assim sendo, quanto maior for a citotoxicidade da amostra em estudo, menor o número de células viáveis e o valor de absorvência registado.

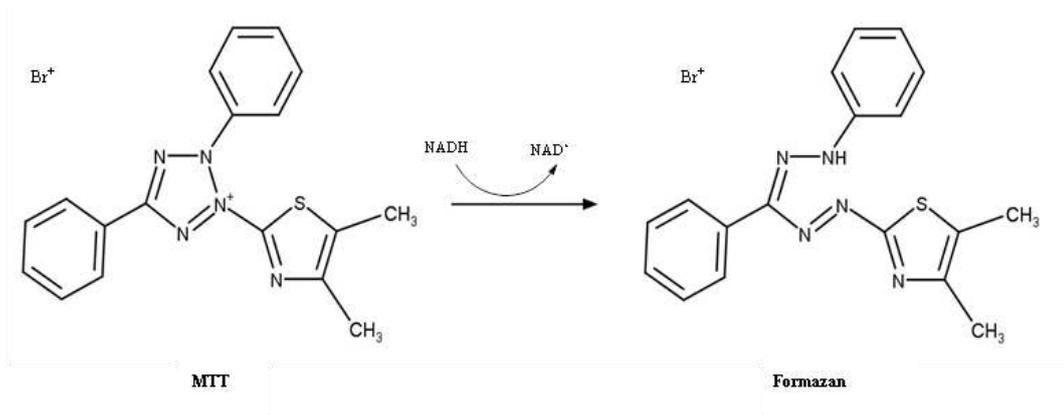


Figura 3.5 – Estruturas químicas do MTT e do seu produto reduzido formazan, adaptado de ^[84].

Quando as células aderiram ao fundo do poço e atingiram a confluência pretendida, tal como referido anteriormente, descartou-se o meio e lavaram-se as células com PBS 1x. De seguida, as células foram incubadas com 2 mL de tripsina 2x numa atmosfera de 5 % de CO₂, a 37 °C, durante 5 minutos, de forma a quebrar as ligações peptídicas que facilitam a aderência das células ao frasco. Posteriormente, contou-se o número de células viáveis num hemacitómetro, recorrendo-se a uma solução de azul de tripano, que vai corar a membrana das células inviáveis. Preparou-se uma suspensão celular com uma concentração final de 50x10⁴ cel/mL, a qual foi cultivada em microplacas de 96 poços, tendo-se adicionado 100 µL de suspensão em cada poço, e incubada durante 48 h, nas condições acima descritas.

Findado este tempo, retirou-se o meio de cultura e adicionou-se em cada poço 100 µL de solução de extrato a diferentes concentrações dissolvido em meio RPMI e a microplaca foi novamente incubada durante 24 h, numa atmosfera de 5 % de CO₂, a 37 °C. Ao fim deste tempo, retirou-se o meio de cultura, que foi substituído por uma solução de MTT (0,5 mg/mL) dissolvido em meio RPMI suplementado com 1 % de antimicótico e 1 % de L-glutamina e deixado a incubar nas mesmas

condições durante 2 h. Foi efetuado também um ensaio de controlo negativo, que corresponde a 100 % de viabilidade celular, em que as células foram incubadas apenas com 100 µL do referido meio.

Para finalizar, retirou-se a solução de MTT, adicionou-se 100 µL de MeOH a cada um dos poços, para dissolver os cristais de formazan, e leu-se a absorvência a 595 nm, com referência a 630 nm, num leitor de microplacas. A percentagem de morte celular foi calculada através da seguinte equação:

$$MC (\%) = 100 - (A_{\text{amostra}} / A_{\text{controlo}}) \times 100 \quad [\text{Eq. 3.4}]$$

Na qual $MC (\%)$ diz respeito à percentagem de morte celular, A_{amostra} é a absorvência registada para as células que estiveram em contacto com o extrato e A_{controlo} é absorvência registada para as células controlo.

3.11.2 – Extração e quantificação do DNA

Para a extração do DNA genómico das células recorreu-se ao protocolo fornecido pela EZNA[®] Tissue DNA Kit [86]. Em primeiro lugar, tal como descrito no ponto 3.11, as células foram cultivadas em frascos T75 até atingirem uma confluência de, aproximadamente, 90 %. De seguida, substituiu-se o meio de cultura por uma nova solução contendo a amostra (0,5 mg/mL em meio) e, no frasco das células controlo, adicionou-se apenas meio de cultura, sendo que, para ambos os casos, se utilizou meio RPMI sem FBS. De referir que as amostras estudadas foram o extrato aquoso, a fração III e o sobrenadante e que, para cada um dos casos, utilizaram-se dois frascos T75, de forma a ter material suficiente para os ensaios a serem realizados, exceto para o sobrenadante, em que, devido a um imprevisto laboratorial, se utilizou apenas um frasco T75, para o estudo do perfil proteico das células e não para a extração do DNA.

Ao fim de 24 h de incubação, as células de cada frasco T75 foram tripsinizadas, tal como descrito anteriormente, transferidas para um *ependorf* e lavadas duas vezes com PBS 1x. Por fim, reuniram-se as células dos dois *ependorfs* obtidos para as amostras e controlo e estas foram ressuspensas em 400 µL de PBS 1x, tendo-se dividido o volume final obtido em dois novos *ependorfs*, de forma a garantir a mesma quantidade de células, aproximadamente, nos dois ensaios distintos a realizar. Um dos *ependorfs* foi utilizado para a extração e quantificação do DNA e outro para estudar o perfil proteico das células (guardado a – 80 °C para posterior análise).

De seguida, adicionou-se ao *ependorf*, utilizado para a extração do DNA, 25 µL da solução de OB protease, agitou-se vigorosamente no vortex, adicionou-se mais 220 µL de tampão BL e incubou-se a 70 °C, durante 10 minutos. No passo seguinte, adicionou-se mais 220 µL de etanol 100 %, agitou-se no vortex, transferiu-se toda a amostra para uma mini coluna HiBind[®] DNA fornecida no *kit* e centrifugou-se à velocidade máxima (16100 g), durante 1 minuto. Posteriormente, retirou-se o filtrado (fração peptídica, que foi guardada a – 80 °C para posterior análise), adicionou-se 500 µL de tampão HBC e centrifugou-se à mesma velocidade durante 30 segundos. O filtrado foi descartado, adicionou-se 700 µL de tampão de lavagem de DNA e centrifugou-se à velocidade máxima, durante 30 segundos, repetindo-se este passo mais uma vez. A coluna foi centrifugada 16100 g durante 2 minutos, de forma a remover qualquer vestígio de etanol. Finalmente, adicionou-se 200 µL de tampão de eluição, previamente aquecido a 70 °C, deixou-se 2 minutos à temperatura ambiente e centrifugou-se à velocidade máxima durante 1 minuto, repetindo-se novamente este passo de eluição do DNA (Figura 3.6).

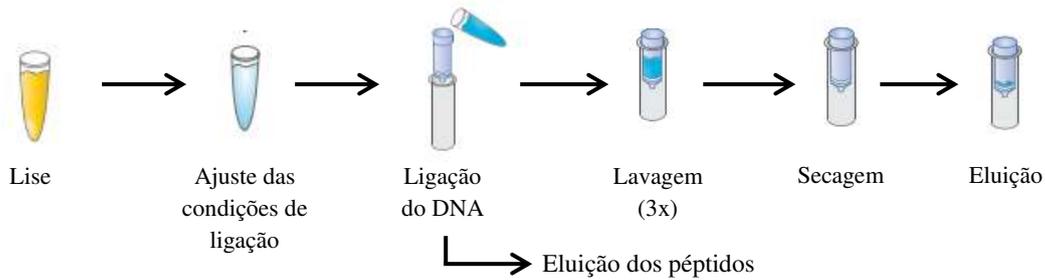


Figura 3.6 - Esquema ilustrativo da extração do DNA das células Hep-G2, adaptado de ^[85].

Obteve-se, então, um volume final de 400 μL da solução de DNA e, a partir desta, fez-se uma nova solução com um fator de diluição de 1/20, da qual se leu a absorvência a 260 nm e 280 nm. A concentração de DNA foi calculada através da seguinte expressão:

$$[\text{DNA}] = \text{Abs}_{260\text{nm}} \times 50 \times \text{FD} \quad [\text{Eq. 3.5}]$$

Em que $[\text{DNA}]$ diz respeito à concentração de DNA, em $\mu\text{g}/\text{mL}$, $\text{Abs}_{260\text{nm}}$ à absorvência a 260 nm e FD ao fator de diluição aplicado.

3.11.3 – Eletroforese em gel de poliacrilamida unidimensional

Para estudar o perfil proteico da linha celular Hep-G2 foi necessária uma preparação das células, utilizando-se os *ependorfs* obtidos no ponto 3.11.2, que se encontrava armazenado a -80°C . Em primeiro lugar, adicionou-se tampão de lise (5,05 mL de H_2O + 1,15 mL de tampão Tris-HCl 0,5 M, pH = 6,8, + 61 mg de DTT), de forma a que a concentração final de DNA dentro do *ependorf* fosse, aproximadamente, de 3000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tanto para as células controlo, como para as que estiveram em contacto com as diferentes amostras. É importante que a concentração de DNA seja aproximada ao valor referido, uma vez que se fizeram ensaios com menor concentração (dados não apresentados), mas não se obtiveram bandas visíveis nos géis de eletroforese analisados. De seguida, as células foram lisadas por sonicação, durante 10 minutos, e centrifugadas a 10000 g, durante 5 minutos, tendo-se retirado 500 μL do sobrenadante, ao qual se adicionou 10 μL de azul de bromofenol 0,2 % (p/v), 100 μL de SDS 10 % (p/v) e 100 μL de glicerol. Por fim, ferveu-se as diferentes amostras durante 5 minutos, num banho a 100°C .

Os géis de eletroforese foram preparados utilizando-se um gel de concentração de 4 % e um gel de resolução de 10 % acrilamida-bis, onde se aplicou 5 μL de marcador de peso molecular e 20 μL de cada uma das amostras normalizadas a partir da concentração de DNA. Realizou-se a corrida de eletroforese utilizando-se tampão Tris-HCl 0,0025 M, contendo 0,192 M de glicina, a pH 8,3, com uma diferença de potencial de 100 V, durante, aproximadamente, 2h30. Findado este tempo, os géis foram corados com uma solução aquosa de azul de Comassie R-250 40 %, metanol 50 % e ácido acético glacial 10 %, durante 1 h. Posteriormente, retirou-se esta solução e adicionou-se uma nova solução descorante, contendo ácido acético glacial 10 %, metanol 40 % e água destilada 50 %, durante 1 h. Ao fim deste tempo, a solução descorante foi substituída e permaneceu em contacto com os géis durante a noite. Finalmente, fez-se o registo fotográfico dos géis usando o aparelho *ImageQuant*.

Procedimento Experimental

Para a análise do gel de eletroforese foi utilizado o *software* ImageJ. Para calcular o peso molecular foi traçada uma reta de calibração com marcador eletroforético (Anexo 2), obtendo-se a seguinte equação:

$$\log(PM) = - 0,2848 d + 2,2686 \quad [\text{Eq. 3.6}]$$

Onde *PM* corresponde ao peso molecular e *d* à distância de migração das bandas. Os ensaios foram realizados em duplicado.

3.12– Análise estatística

Ao longo do trabalho, os resultados são expressos como média \pm desvio padrão. As diferenças estatísticas entre os grupos foram avaliadas pela análise de variância de um fator (ANOVA), disponível no *software* Microsoft Office 2013[®]. No tratamento estatístico, utilizou-se um nível de probabilidade de $p \leq 0,05$ como uma diferença significativa.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para dar cumprimento ao objetivo principal deste trabalho, ou seja, estudar a bioatividade de *C. erythraea*, procedeu-se à preparação do extrato aquoso desta planta. Tendo em conta que, na maior parte da bibliografia consultada, esta planta foi estudada recorrendo à extração dos compostos com metanol e etanol, estes extratos serão também preparados para comparação com a decocção. Os extratos obtidos, tanto o aquoso como os orgânicos, serão analisados cromatograficamente para identificar compostos existentes aos quais se possa atribuir as atividades biológicas, nomeadamente para combater doenças em que as espécies oxidantes desempenhem um papel crucial ou para facilitar a digestão através da inibição do enzima AChE. Para além disso, vai avaliar-se a atividade antitumoral dos extratos e possíveis alterações na expressão de proteínas em células Hep-G2. Foi, então, sob estas premissas que todo o trabalho laboratorial foi desenvolvido.

4.1 – Métodos de extração dos compostos fenólicos

Para a obtenção dos extratos aquoso, metanólico e etanólico de *C. erythraea* recorreu-se aos métodos de extração descritos no ponto 3.3.1, para o primeiro caso, e no ponto 3.3.2, para os dois últimos extratos. Já a purificação do extrato aquoso, recorrendo à purificação dos compostos fenólicos através da precipitação das mucilagens, ao qual se deu o nome “Sobrenadante”, foi realizada através do método descrito no ponto 3.7.2. Os rendimentos obtidos para os diferentes processos de extração dos compostos estão apresentados na Tabela 4.1, bem como para a purificação do extrato aquoso.

Tabela 4.1 – Rendimentos obtidos para os diferentes métodos de extração, em percentagem (%) e mg de extrato/g de folha, e para a purificação do extrato aquoso com etanol.

| Tipo de Extrato | η (%) | η (mg de extrato/g de planta) |
|-----------------|------------|------------------------------------|
| Aquoso | 19,31 | 193 |
| Metanólico | 17,06 | 171 |
| Etanólico | 13,21 | 132 |
| Sobrenadante | 84,51 | 845* |

* mg de extrato/g de extrato aquoso

Observando-se os resultados obtidos é possível afirmar que a extração dos compostos dos compostos bioativos com água é o método que permite obter um maior rendimento. Já o método de purificação deste extrato, através da precipitação das mucilagens, demonstrou um elevado rendimento, havendo perda de, aproximadamente, 15 % em mucilagens. Esta quantidade é muito pouca e, por isso, os cromatogramas obtidos por HPLC no caso do extrato aquoso e do sobrenadante são praticamente iguais, tal como se vai estudar no próximo capítulo.

4.2 – Caracterização dos extratos de *C. erythraea* por HPLC-DAD

A planta *C. erythraea* é uma espécie herbácea utilizada há muitos anos na medicina tradicional, sendo uma das espécies farmacológicas mais importantes da família Gentianaceae, devido às suas propriedades medicinais. Para um estudo preliminar do extrato aquoso, preparou-se uma solução de 1 mg/mL, a partir do liofilizado, que foi analisada por HPLC-DAD. O cromatograma do extrato está representado na Figura 4.1 e as condições de análise utilizadas, com os eluentes MeOH e TFA, a 1 mL/min, estão descritas no ponto 3.4.1 (método 1).

Resultados e discussão

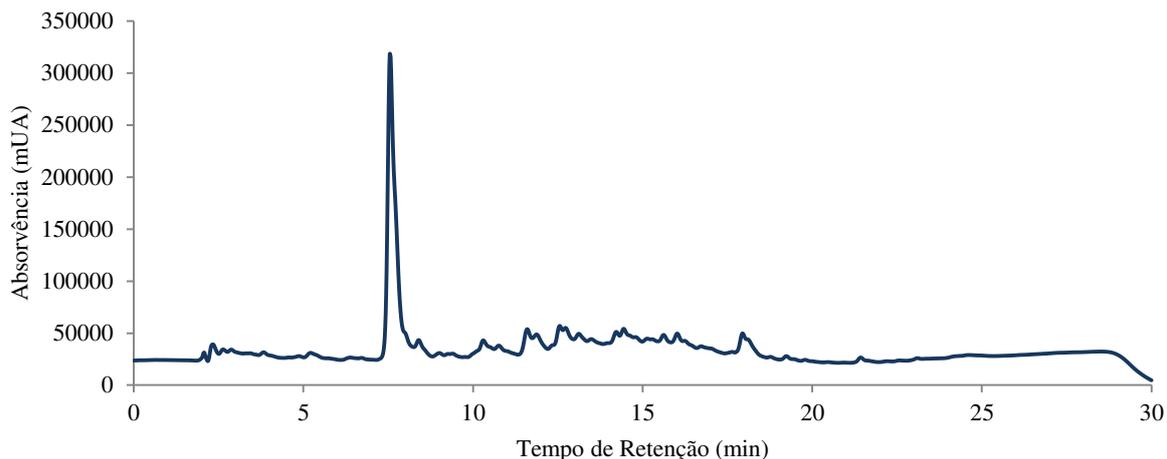


Figura 4.1 – Cromatograma de HPLC-DAD do extrato aquoso de *C. erythraea*, na concentração de 1 mg/mL.

O passo seguinte do trabalho consistiu na purificação do extrato aquoso através da recolha de três frações no HPLC, dos 0 aos 7 minutos, dos 7 aos 9 minutos e, por fim, dos 9 aos 30 minutos, utilizando-se novamente os eluentes MeOH e TFA e secando-se as soluções obtidas no evaporador rotativo, de acordo com o ponto 3.7.1. Assim, fizeram-se novamente soluções de cada uma das frações, com uma concentração de 1 mg/mL, que foram analisadas por HPLC-DAD, de acordo com o ponto 3.4.1 (método 1). Os cromatogramas resultantes desta análise estão representados na Figura 4.2.

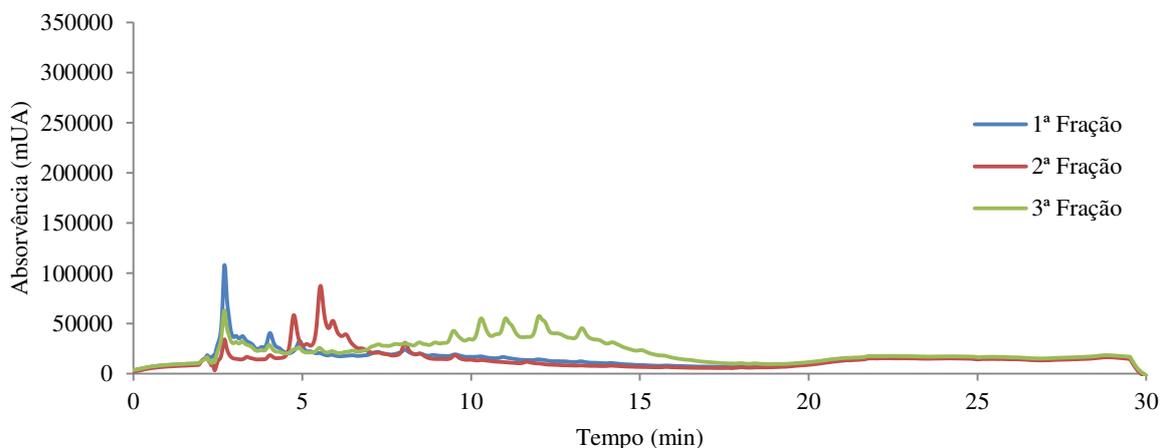


Figura 4.2 – Cromatogramas de HPLC-DAD obtidos para a primeira, segunda e terceira fração, na concentração de 1 mg/mL.

Através da análise comparativa do perfil cromatográfico das três frações obtidas, conclui-se que estas não são semelhantes ao cromatograma obtido para o extrato aquoso, principalmente a 2ª fração, com tempo de retenção entre os 7 e os 9 minutos, em que era suposto estar presente o pico maioritário aos 7,54 minutos, observado na Figura 4.1. Aparentemente, este pico degradou-se noutros compostos, provavelmente por hidrólise ácida, uma vez que, como só se recolheu ao tempo de retenção referido, seria impossível a obtenção de um pico antes dos 7 minutos, o que não se observa. Tendo em conta que os secoiridoides, principais constituintes desta fração, como se vai concluir no capítulo seguinte, se encontram nas plantas na sua forma glucosilada e que, com um ácido fraco, a ligação entre o anel pirano e o açúcar pode ser quebrada, podemos concluir que esta hidrólise é bastante provável, dado que durante a análise por HPLC se usa o TFA, que é um ácido forte. Para além disso, também o perfil cromatográfico da 3ª fração se revelou diferente do inicial, o que se pode dever, mais uma vez, à

presença do TFA, que em conjunto com a temperatura do evaporador rotativo, mesmo a 37 °C, originou a hidrólise ácida dos compostos constituintes do extrato.

Estes resultados levantaram uma problemática na realização deste trabalho, sendo então necessário perceber de que forma os diferentes eluentes utilizados nos métodos de recolha por HPLC (MeOH ou ACN) poderiam, ou não, influenciar os compostos existentes inicialmente, bem como se os métodos de secagem da amostra, ou seja, liofilizador ou evaporador rotativo, teriam também eles efeito nos compostos observados nos cromatogramas de HPLC-DAD. Para isso, recorreu-se aos métodos 2 (MeOH e TFA) e 3 (ACN e TFA), descritos no ponto 3.4.1, com um fluxo de 0,8 mL/min, de forma a obter picos mais bem separados. Em vez de se recolher as frações, recolheu-se o extrato na sua totalidade, secou-se e fizeram-se novas soluções das diferentes amostras, na concentração de 1 mg/mL, que foram recromatografadas. Os cromatogramas obtidos estão representados na Figura 4.3.

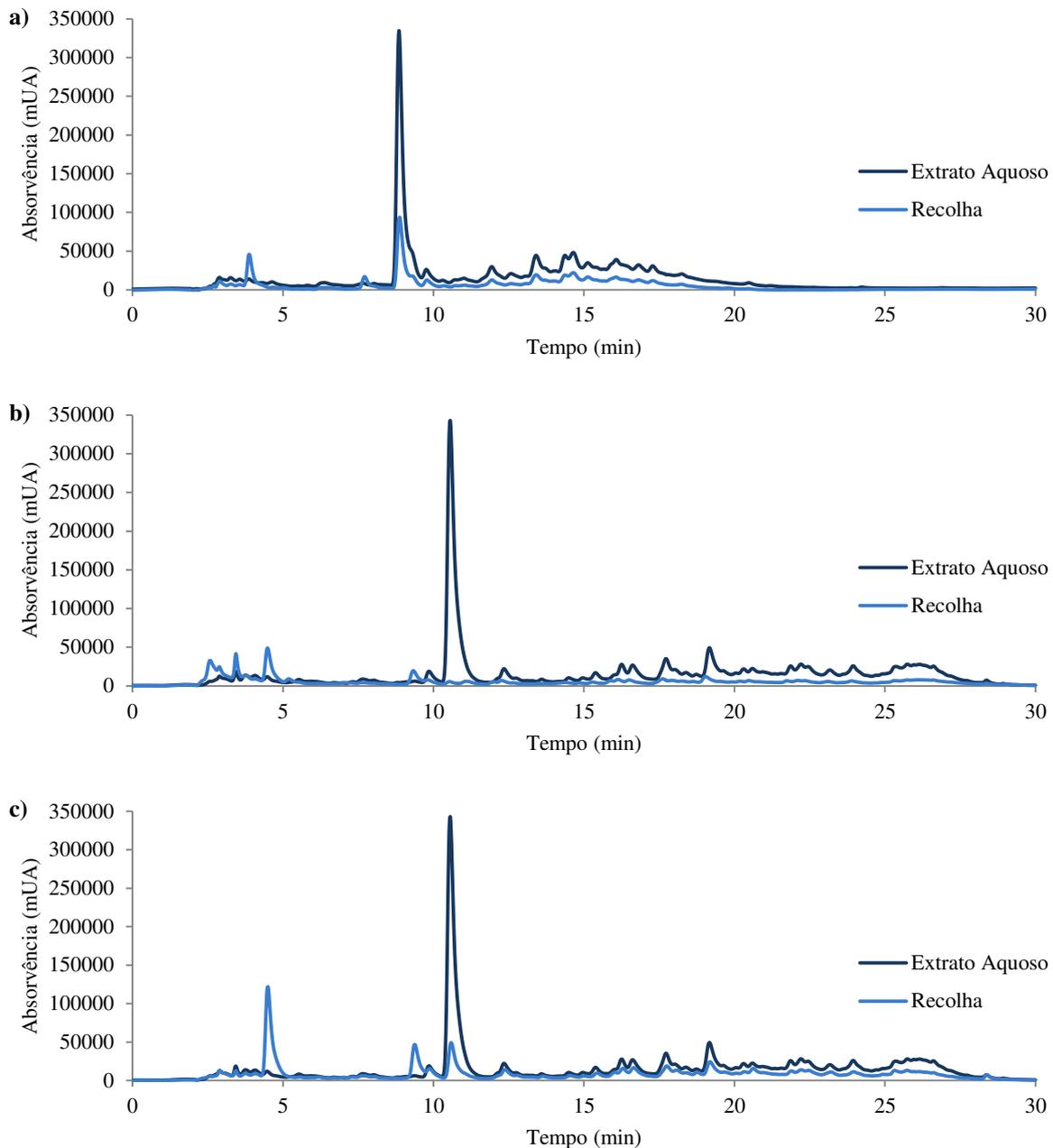


Figura 4.3 - Cromatograma de HPLC de *C. erythraea* para cada um dos métodos de recolha utilizado: a) MeOH+TFA, seco no liofilizador; b) ACN+TFA, seco no evaporador rotativo; c) ACN+TFA, seco no liofilizador, concentração de 1 mg/mL.

Tendo em conta que para a obtenção das três frações referidas anteriormente se tinha utilizado como eluentes MeOH e TFA e que as amostras tinham sido concentradas no evaporador rotativo antes de serem secas no liofilizador, obtendo-se cromatogramas tão diferentes do inicial, neste ponto do trabalho começou-se pela utilização dos mesmos eluentes, contudo as amostras foram secas apenas no liofilizador (MeOH + TFA Lio). O cromatograma obtido para este método de recolha está presente na Figura 4.3 a). Observou-se novamente que o pico maioritário sofreu uma hidrólise, existindo numa quantidade muito inferior após a recolha e secagem, e que há o aparecimento de dois novos picos, com tempo de retenção 3,87 e 7,63 minutos. Contudo, a partir dos 10 minutos, o perfil cromatográfico é bastante semelhante ao do extrato aquoso.

De seguida, tendo em consideração que o MeOH é mais polar do que o ACN, logo o tempo de retenção dos compostos hidrófobos em fase reversa vai aumentar, e que possui a capacidade de fazer reações de esterificação a pH ácido, substituiu-se um eluente pelo outro, testando-se mais uma vez se o evaporador rotativo tinha influência nos compostos. O cromatograma obtido para a amostra eluída com ACN e TFA seca no evaporador rotativo (ACN + TFA Evap) está representado na Figura 4.3 b), onde se pode observar que estes eluentes resultam num cromatograma com picos mais bem resolvidos e separados para o cromatograma do extrato aquoso. Para além disso, o cromatograma obtido para a amostra depois de recolhida e seca não é de todo semelhante ao extrato aquoso, havendo degradação total do composto maioritário. Deste modo, na recolha seguinte utilizou-se os mesmos eluentes, mas secou-se as amostras apenas no liofilizador (ACN + TFA Lio), estando o cromatograma presente na Figura 4.3 c). Neste caso, acontece o mesmo que nas outras amostras, ou seja, há degradação dos compostos, principalmente do composto maioritário, todavia, a partir 11,47 minutos, o perfil cromatográfico de ambas as amostras é praticamente igual.

Os resultados obtidos nesta fase do trabalho revelaram-se bastante importantes na compreensão da estabilidade do extrato aquoso durante o processo de purificação dos compostos fenólicos através da recolha de frações por HPLC. De facto, pela análise dos cromatogramas da Figura 4.2 e 4.3 b) conclui-se que o evaporador rotativo é um passo crítico na secagem das amostras. Mais ainda, tendo em conta que os eluentes ACN e TFA, com o processo de secagem apenas no liofilizador, permitiram uma melhor resolução dos picos e que, neste caso, a parte final no cromatograma era bastante semelhante ao inicial, fez-se uma nova recolha da fração apenas entre os 11,5 e os 30 minutos, à qual se deu o nome de “Fração III”, utilizando o método 3, descrito no ponto 3.4.1, e secando-se a amostra apenas no liofilizador. Este método passou também a ser utilizado na análise dos extratos obtidos em fases posteriores do trabalho. O cromatograma obtido para a análise da fração III está representado na Figura 4.4, onde é possível observar que o perfil cromatográfico desta fração se assemelha bastante ao do extrato aquoso, para o mesmo intervalo de tempo.

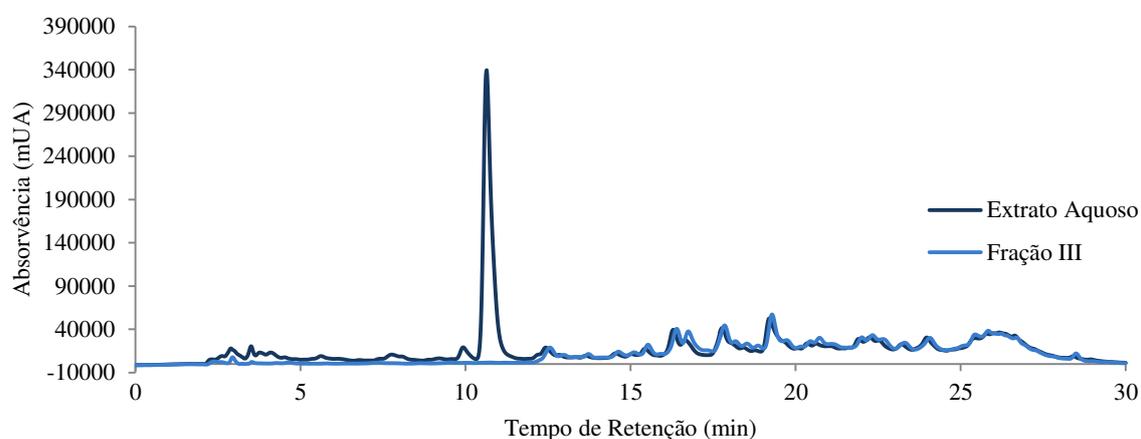


Figura 4.4 - Cromatograma de HPLC obtido para a análise de *C. erythraea* e da fração III, na concentração de 1 mg/mL.

Segundo um projeto realizado anteriormente no grupo ^[87], e tal como vamos ver mais à frente (ponto 4.3 – Identificação de compostos de *C. erythraea*), o pico maioritário que se observa durante a análise por HPLC corresponde ao gentiopicrósido. Tendo em conta que não foi possível obter este composto de forma intacta, optou-se por recolher apenas a fração III e adquirir o gentiopicrósido comercialmente, de forma a simular aquela que seria a fração II. Em relação à fração I, com os diferentes métodos aqui testados, não foi possível obtê-la de forma intacta, pelo que se optou por realizar os ensaios de bioatividade apenas com o gentiopicrósido e a fração III.

Como se pode observar pelos resultados sumarizados na Tabela 4.1 (ponto 4.1), o extrato aquoso foi aquele que apresentou um maior rendimento e, por isso, este extrato foi utilizado na purificação dos compostos bioativos através da precipitação com etanol, de acordo com o método descrito no ponto 3.7.2, obtendo-se o extrato ao qual se deu o nome “Sobrenadante”. Neste âmbito, foram injetadas soluções do extrato aquoso, do sobrenadante e do precipitado, com uma concentração de 1 mg/mL, estando os cromatogramas apresentados na Figura 4.5.

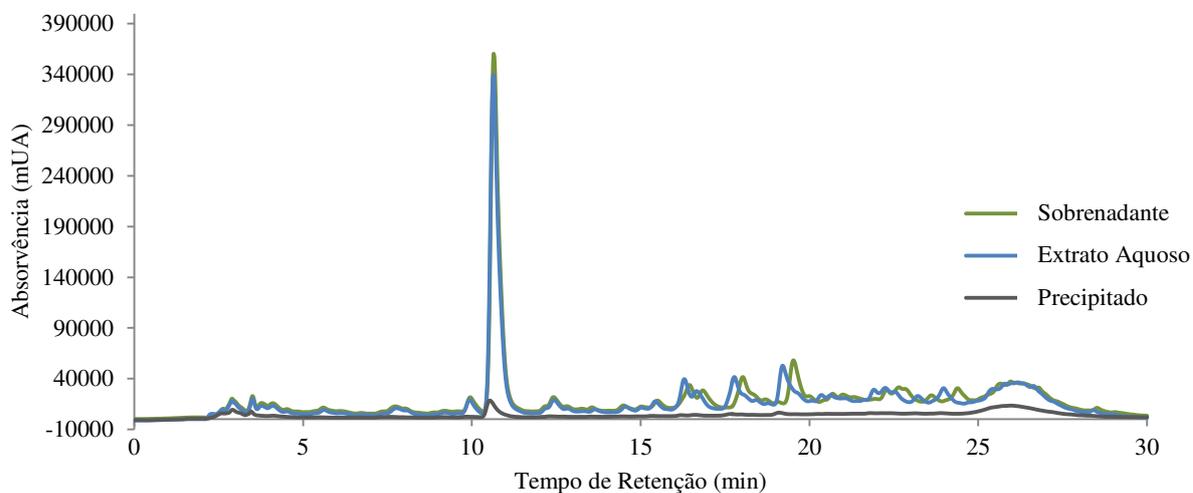


Figura 4.5 - Cromatograma de HPLC obtido para a análise do extrato aquoso, do sobrenadante e do precipitado, na concentração de 1 mg/mL.

Analisando os cromatogramas obtidos, observa-se que o perfil cromatográfico do extrato aquoso e do sobrenadante é bastante semelhante. Observa-se também que existe uma ligeira diferença no valor de absorvência entre o pico maioritário do sobrenadante e do extrato aquoso ($t_R = 10,64$ min), que, no caso do sobrenadante, aparece com maior intensidade (aproximadamente 8 %). Estes resultados sugerem que a purificação de *C. erythraea*, através da precipitação das mucilagens com etanol, não permite obter um extrato mais rico em compostos bioativos por mg de extrato, contrariamente ao que era esperado, visto que durante a purificação se estão a precipitar os biopolímeros, que não absorvem no UV-vis e, portanto, era expectável uma maior concentração dos compostos fenólicos, ou seja, a existência de picos com maior absorvência no caso do sobrenadante.

No caso do precipitado não foram detetados picos, à exceção do pico aos 10,51 minutos, o que indica que, durante o processo de purificação, houve uma pequena quantidade do composto (aproximadamente 0,3 %) que ficou precipitada junto com as mucilagens. O facto de não existirem picos no cromatograma do precipitado seria de esperar, dado que, tal como referido, as mucilagens que o constituem não absorvem no intervalo de comprimento de onda em estudo ^[39].

Resultados e discussão

Tendo em conta que a maioria dos artigos disponíveis para consulta, que contêm a identificação dos compostos de *C. erythraea*, referem o metanol como solvente utilizado durante método de extração dos compostos fenólicos, o próximo passo deste trabalho consistiu na obtenção dos extratos usando metanol e também etanol. Assim, pretendeu-se avaliar se os compostos extraídos com água seriam os mesmos do que aqueles extraídos com os solventes orgânicos. Para isso, recorreu-se ao método descrito no ponto 3.3.2 e obtiveram-se os extratos metanólico e etanólico, que, numa primeira fase, foram analisados também por HPLC-DAD. Os cromatogramas obtidos para estes extratos, bem como para o extrato aquoso, encontram-se na Figura 4.6.

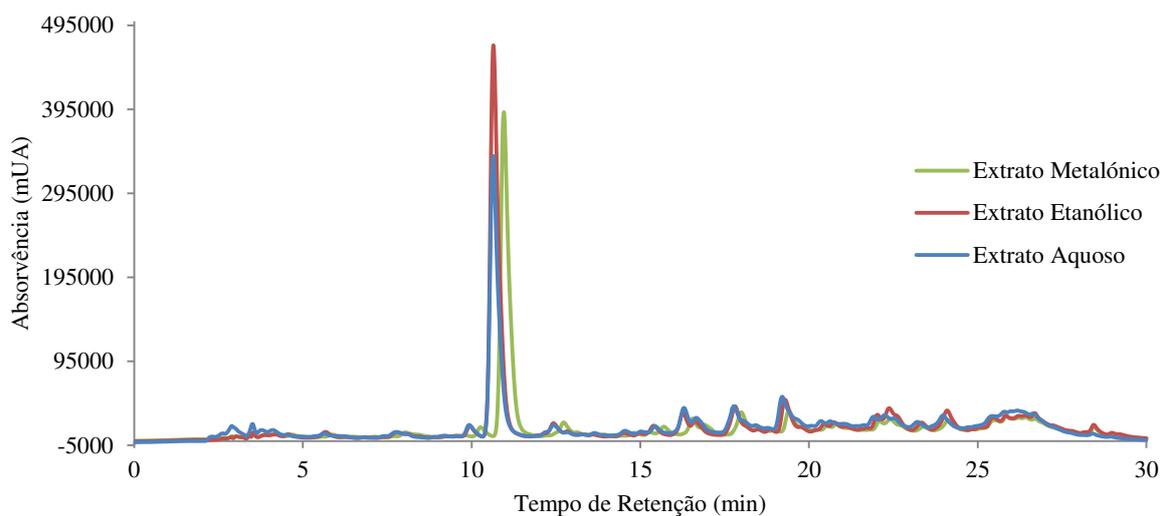


Figura 4.6 – Cromatograma de HPLC-DAD dos diferentes extratos obtidos através da utilização de diferentes solventes: H₂O, MeOH e EtOH, na concentração de 1 mg/mL

Tal como aconteceu para o sobrenadante, o perfil cromatográfico das três amostras é bastante semelhante, sendo a maior diferença entre elas a absorvência do pico maioritário, que, no caso do extrato etanólico, é maior, seguindo-se o extrato metanólico (90 %) e, por fim, o extrato aquoso (77 %). Para além disso, os compostos do extrato aquoso que eluem ao tempo de retenção entre os 2 e os 4 minutos apresentam uma absorvência ligeiramente superior à dos extratos metanólico e etanólico. Em contraste, os compostos do extrato aquoso que eluem entre os 28 e 29 minutos têm uma absorvência mais baixa. É importante realçar estas diferenças, uma vez que, como só se realizou a análise dos compostos por espetrometria de massa para o extrato aquoso, dado que por HPLC os cromatogramas foram idênticos, variando ligeiramente a quantidade de cada um dos compostos, estas mudanças visíveis no cromatograma obtido por HPLC-DAD podem explicar as diferentes atividades biológicas encontradas para estes extratos.

4.3 – Identificação de compostos de *C. erythraea* por LC-MS

Após a análise da decocção de *C. erythraea* por HPLC-DAD, seguiu-se a sua análise por LC-MS/MS, com o intuito de se identificar os compostos bioativos responsáveis pela atividade desta planta. O método utilizado durante as corridas está descrito no ponto 3.5. De referir que esta espécie está documentada como contendo quantidades consideráveis de compostos fenólicos, nomeadamente xantonas e secoiridoides como constituintes principais [40].

A análise dos cromatogramas iónicos totais (TICs) do extrato aquoso, obtidos por ESI em modo negativo e positivo, levou à identificação de vários picos atribuídos a compostos fenólicos característicos de *C. erythraea*. Os iões fragmento obtidos na análise MS/MS do extrato, ao serem comparados com resultados reportados na literatura [72;88;28], permitiram a identificação inequívoca de doze compostos (cinco secoiridoides, seis xantonas e um flavonoide). Esta identificação é suportada pelos valores das massas precisas e respetivos erros e por vias de fragmentação, que foram também comparadas com dados da literatura. Nas Figuras 4.7 e 4.11 estão apresentados os ESI(-)TIC e ESI(+)TIC, respetivamente, bem como os cromatogramas iónicos extraídos (EIC) para cada um dos iões identificados. Nas Tabelas 4.2 e 4.3 sumariza-se a informação obtida para cada um dos picos cromatográficos, no modo positivo e negativo, respetivamente.

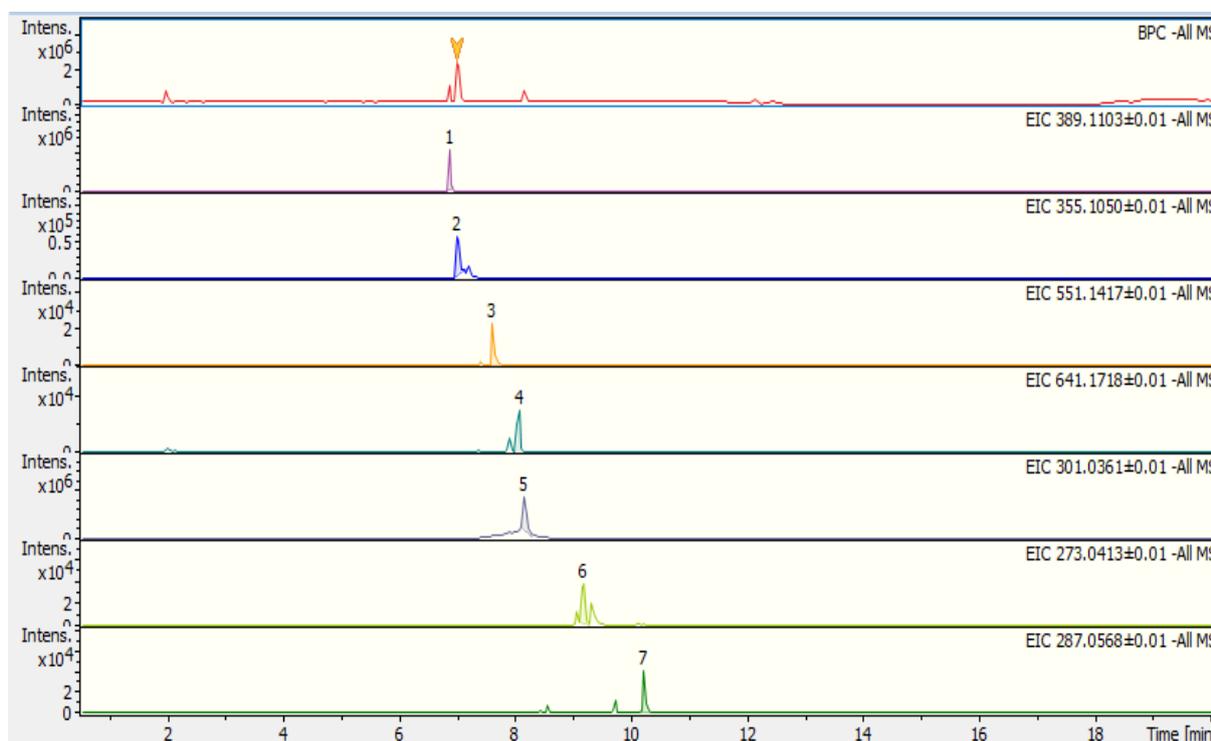


Figura 4.7 – Cromatograma iónico total e cromatogramas iónicos extraídos dos iões identificados no ensaio LC-ESI(-)-MS/MS do extrato de *C. erythraea*.

Resultados e discussão

Tabela 4.2 – Proposta de identificação (modo ESI negativo) de compostos presentes no extrato de *C. erythraea*.

| Pico | Identificação | t _R (min) | Fórmula Molecular | Experimental [M-H] ⁻ m/z | Δ ppm | MS/MS iões fragmento [m/z (intensidade %)] |
|------|---------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------|----------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | Secologanósido | 6,9 | C ₁₆ H ₂₂ O ₁₁ | 389,1102 | -3,1 | 345 (9); 209 (9); 183 (37); 165 (74); 139 (28); 121 (100) |
| 2 | Gentiopicrosido | 7,0 | C ₁₆ H ₂₀ O ₉ | 355,1050 | -4,2 | 179 (100); 161 (17); 141 (34); 119 (30) |
| 3 | Cafeioil-6'- secologanósido | 7,7 | C ₂₅ H ₂₈ O ₁₄ | 551,1417 | -2,0 | 507 (66); 393 (80); 389 (51); 345 (44); 323 (51); 301 (40); 281 (68); 161 (100) |
| 4 | Mono-hidroxi- -tetrametoxixantona- -O-pentossilhexósido | 8,1 | C ₃₄ H ₃₄ O ₁₇ | 641,1738 | -2,3 | 347 (59); 332 (100); 317 (23) |
| 5 | Quercetina | 8,2 | C ₁₅ H ₁₀ O ₇ | 301,0362 | -2,7 | - |
| 6 | Tri-hidroxi- -monometoxixantona | 9,2 | C ₁₄ H ₁₀ O ₆ | 273,0413 | -3,1 | 258 (100); 257 (20); 230 (10); 229 (17) |
| 7 | Di-hidroxi- -dimetoxixantona | 10,3 | C ₁₅ H ₁₂ O ₆ | 287,0568 | -2,5 | 272 (22); 257 (100); 229 (22) |

No ESI(-)TIC do extrato de *C. erythraea* (Figura 4.7) observa-se um pico a t_R = 6,9 min, correspondente à molécula desprotonada [M-H]⁻ com m/z 389, identificada como secologanósido (pico 1). O espectro MS/MS do ião precursor m/z 389 mostrou seis iões fragmento maioritários com m/z 345, m/z 209, m/z 183, m/z 165, m/z 139 e m/z 121, conforme se apresenta na Figura 4.8.

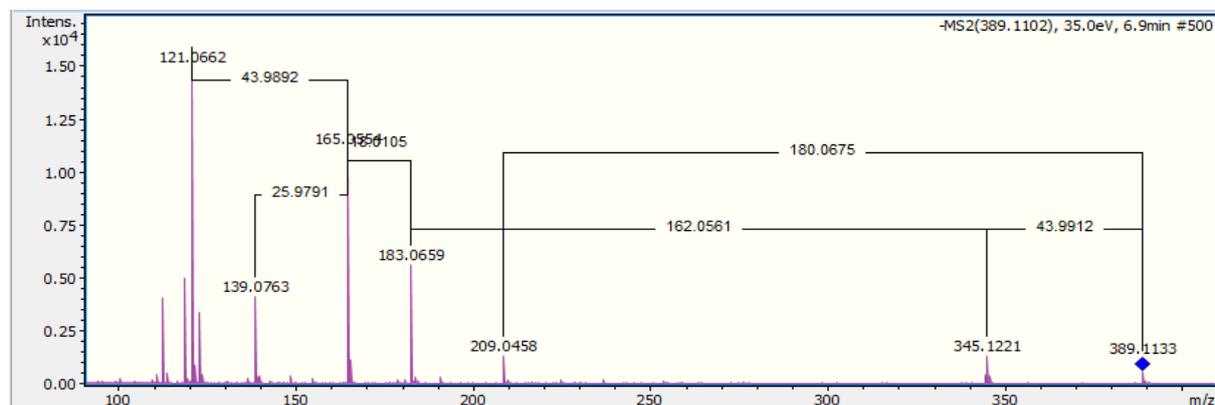


Figura 4.8 - Espectro ESI(-)-MS/MS do ião precursor m/z 389,1102 do composto 1 secologanósido.

Dado a presença de grupos ácidos na molécula, o pico a m/z 345 corresponde à perda de uma molécula de CO₂ (-44 u) por parte das moléculas desprotonadas. O ião fragmento a m/z 209 resulta da perda de uma molécula de hexose (-180 u), enquanto a perda conjugada de CO₂ e do resíduo da hexose [(44+162) u] origina o fragmento a m/z 183. Estas fragmentações comprovam a presença do anel glucosídico na estrutura do composto 1.

A perda de água por parte do ião fragmento m/z 183 é responsável pelo aparecimento no espectro MS/MS do pico a m/z 165. Este último pode sofrer duas vias de fragmentação distintas, uma perdendo CO₂ e a outra perdendo C₂H₂, dando origem aos picos m/z 121 (pico base) e m/z 139, respetivamente.

No cromatograma referido (Figura 4.7), observa-se o pico **3** a $t_R = 7,7$ min, correspondente a uma molécula desprotonada $[M-H]^-$ com m/z 551, atribuído ao composto cafeioil-6'-secologanósido. O espectro MS/MS do ião precursor m/z 551, apresentado na Figura 4.9, mostra oito fragmentos maioritários a m/z 507, m/z 393, m/z 389, m/z 345, m/z 323, m/z 301, m/z 281 e m/z 161.

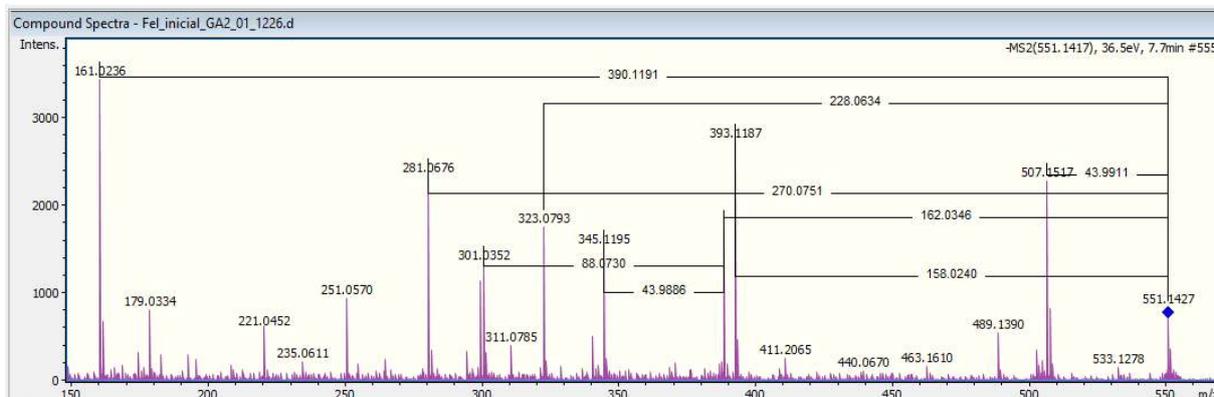


Figura 4.9 - Espectro ESI(-)-MS/MS do ião precursor m/z 551,1417 do composto **3** cafeioil-6'-secologanósido.

O pico a m/z 507 corresponde a um ião fragmento resultante de moléculas desprotonadas por perda de CO_2 , enquanto a perda de uma molécula de secologanósido ($C_{16}H_{22}O_{11}$) origina o fragmento m/z 161 (pico base do espectro) e a perda de $C_6H_6O_5$ leva à formação do ião fragmento m/z 393.

A perda da unidade cafeioil (-162 u) leva à formação do ião m/z 389, que, por perda de uma ou duas moléculas de CO_2 , produz os iões m/z 345 e 301, respetivamente. O ião m/z 323 corresponde à perda da unidade iridoide ($C_{10}H_{12}O_6$) presente na estrutura da molécula, enquanto o fragmento m/z 281 ($C_{13}H_{13}O_7$) resulta de quebra de uma ligação interna do tipo $^{0,2}X^-$ na unidade glucosídica^[89], com perda de $C_{12}H_{14}O_7$.

As estruturas propostas para o secologanósido e para o cafeioil-6'-secologanósido estão representadas na Figura 4.10.

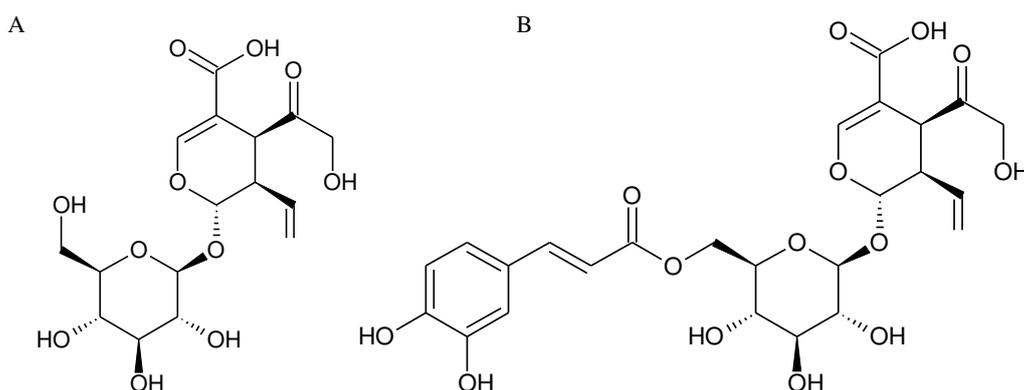


Figura 4.10 – Estrutura química dos compostos **1** e **3**, identificados por LC-MS/MS no extrato de *C. erythraea*, como secologanósido (A) e cafeioil-6'-secologanósido (B), respetivamente.

Resultados e discussão

Como já foi referido, o extrato de *C. erythraea* foi também analisado por LC-ESI(+)-ESI/MS, tendo-se identificado sete compostos, os três primeiros correspondentes a secoiridoídes glucósidos e os outros quatro a xantonas e seus derivados glucósidos (Figura 4.11 e Tabela 4.3).

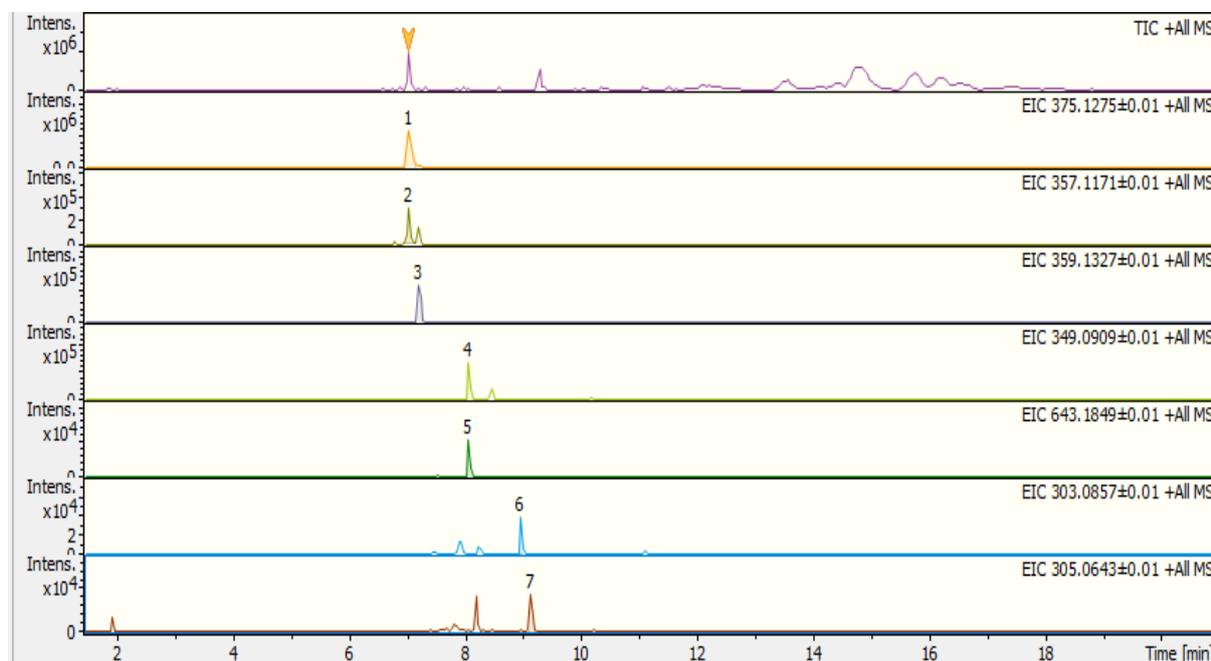


Figura 4.11 – Cromatograma iónico total e cromatogramas iónicos extraídos dos iões identificados no ensaio LC-ESI(+)-MS/MS do extrato de *C. erythraea*.

Tabela 4.3- Proposta de identificação (modo ESI positivo) de compostos presentes no extrato de *C. erythraea*.

| Pico | Identificação | t_R (min) | Fórmula Molecular | Experimental $[M+H]^+$ m/z | Δ ppm | MS/MS iões fragmento [m/z (intensidade %)] |
|------|-----------------------------------------------------------------------|----------------|----------------------|---------------------------------|-----------------|------------------------------------------------------|
| 1 | Swertiamarina | 7,1 | $C_{16}H_{22}O_{10}$ | 375,1275 | 2,9 | 195 (9); 177 (100); 167 (17) |
| 2 | Gentiopicrosido | 7,1 | $C_{16}H_{20}O_9$ | 357,1171 | 2,6 | 177(100); 163 (70); 149 (45) |
| 3 | Swerósido | 7,2 | $C_{16}H_{22}O_9$ | 359,1327 | 2,8 | 197 (100); 179 (50); 177 (63); 149 (41); 127 (84) |
| 4 | Di-hidroxi- -tetrametoxixantona | 8,1 | $C_{17}H_{16}O_8$ | 349,0909 | 2,6 | 334 (47); 319 (100); 301(12); 291 (9) |
| 5 | Mono-hidroxi- -tetrametoxixantona- - <i>O</i> -pentosilhexósido | 8,1 | $C_{28}H_{34}O_{17}$ | 643,1849 | 3,1 | 349 (100) |
| 6 | Mono-hidroxi- -trimetoxixantona | 9,0 | $C_{16}H_{14}O_6$ | 303,0857 | 1,9 | 288 (100); 273 (25) 245 (40) |
| 7 | Tri-hidroxi- -dimetoxixantona | 9,1 | $C_{15}H_{12}O_7$ | 305,0643 | 4,2 | 256 (45); 230 (10); 212 (7) |

No cromatograma iônico total identificou-se um pico a $t_R = 7,1$ min, que corresponde a dois compostos que coeluem: a swertiamarina, composto **1** ($[M+H]^+$ a m/z 375), e o gentiopicróside, composto **2**, identificado pela molécula protonada m/z 357 e pelo dímero $[2M+H]^+$ m/z 713. Os dois íons precursores foram analisados por MS/MS, tendo-se observado que a molécula protonada da swertiamarina (Figura 4.12) se dissocia via três íons fragmento maioritários com m/z 195, m/z 177 e m/z 167. No caso da molécula protonada do gentiopicróside (Figura 4.13), observa-se também a formação de três íons fragmento maioritários com m/z 177, m/z 163 e m/z 149.

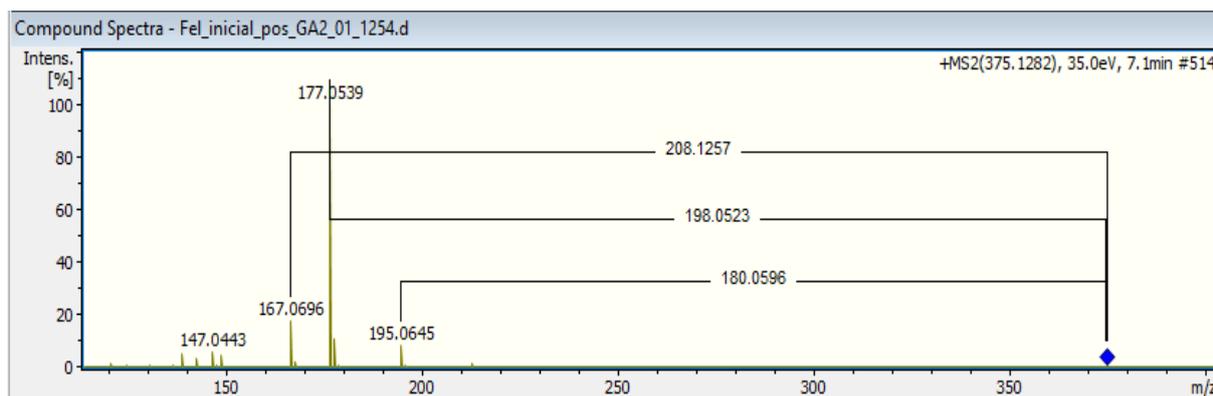
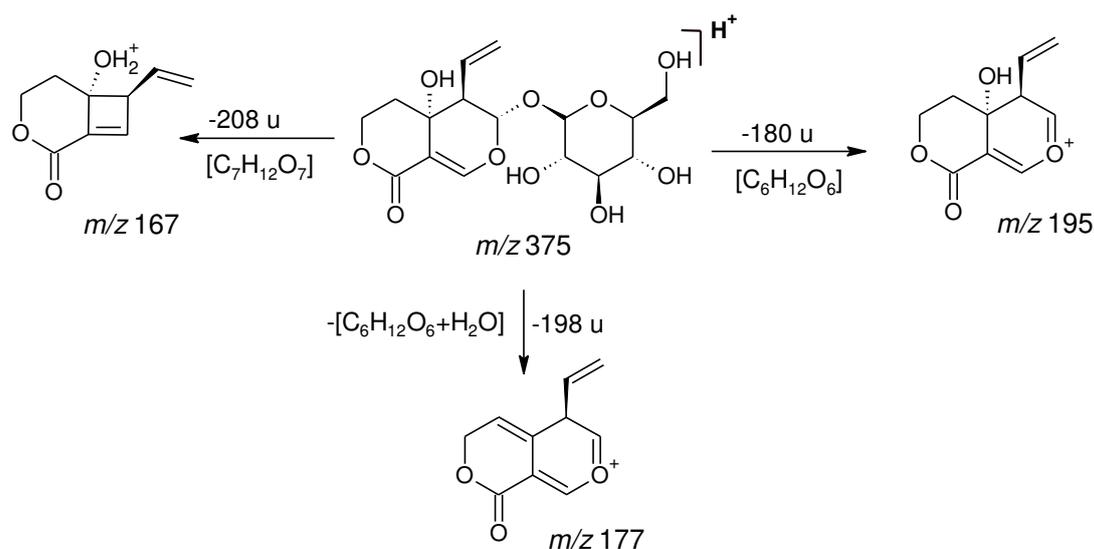


Figura 4.12 – Espectro ESI(+)-MS/MS da molécula protonada m/z 375 da swertiamarina.

No espectro MS/MS do precursor m/z 375, o pico a m/z 195 (perda de 180 u a partir das moléculas protonadas) resulta da perda de uma hexose, comprovando a presença de um anel glucosídico na molécula. A perda conjugada de uma molécula de hexose e de água explica a formação do fragmento a m/z 177 (pico base do espectro).

Como é visível no Esquema 4.1, uma via de fragmentação diferente por parte da molécula protonada está associada à formação de íons m/z 167 (perda de $C_7H_{12}O_7$). No Esquema 4.1 apresenta-se uma proposta do mecanismo de fragmentação para a molécula protonada da swertiamarina.



Esquema 4-1 - Proposta de mecanismo de fragmentação para a molécula protonada m/z 375 da swertiamarina.

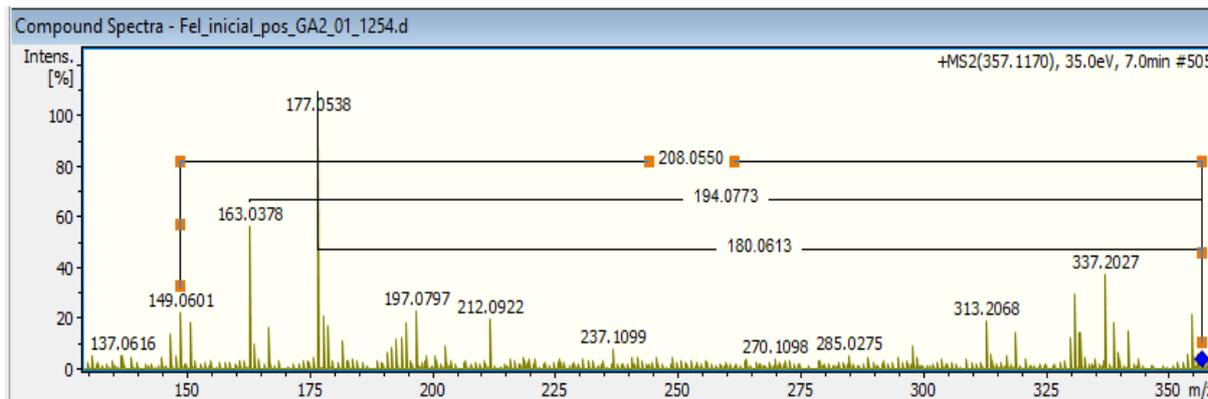
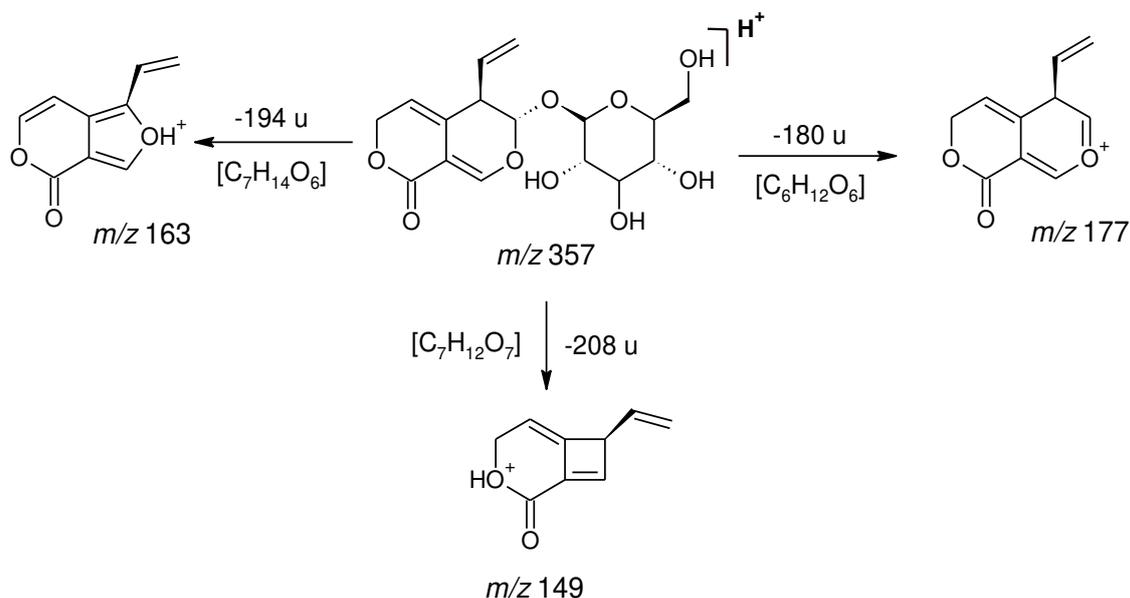


Figura 4.13 - Espectro ESI(+)-MS/MS da molécula protonada m/z 357 do gentipicrósido.

Na Figura 4.13 e no Esquema 4.2 apresenta-se, respetivamente, o espectro MS/MS e uma proposta de vias de fragmentação para a molécula protonada do gentipicrósido.

As fragmentações resultam da quebra de ligações na unidade secoiridoide presente na molécula, conforme elucidado no esquema 4.2. A perda da hexose conduz à formação do ião m/z 177, enquanto as perdas de 194 u e de 208 u levam, respetivamente, à formação dos fragmentos m/z 163 e m/z 149. O gentipicrósido já tinha sido identificado na análise LC-ESI(-)-MS/MS do extrato (pico 2, $t_R = 7,0$ min, Tabela 4.2),



Esquema 4-2 - Proposta das vias de fragmentação da molécula protonada m/z 357 do gentipicrósido.

O pico 3, a $t_R = 7,2$ min, foi atribuído ao swerósido. O espectro MS mostrou uma molécula protonada a m/z 359, que, quando sujeita a dissociações induzidas por colisão, gerou no espectro MS/MS (Figura 4.14) cinco picos maioritários atribuídos aos iões fragmento m/z 197, m/z 179, m/z 177, m/z 149 e m/z 127.

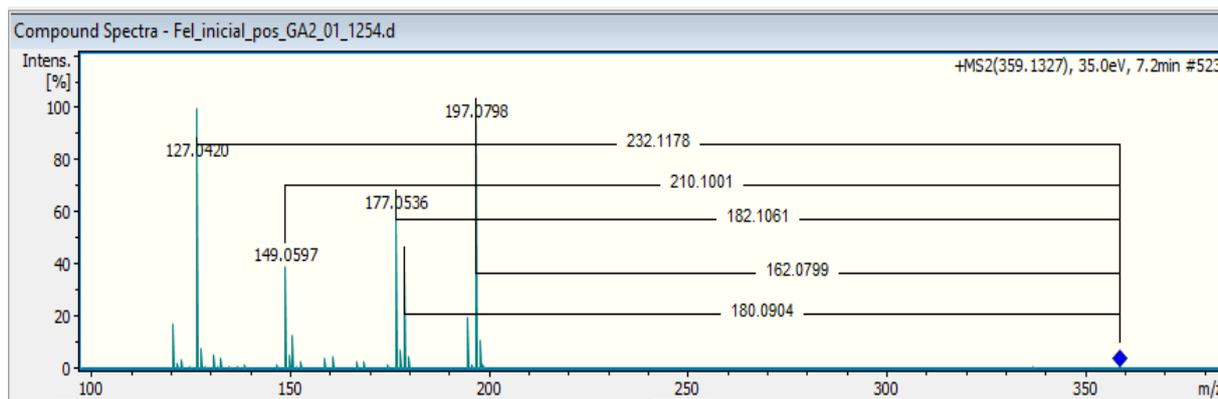
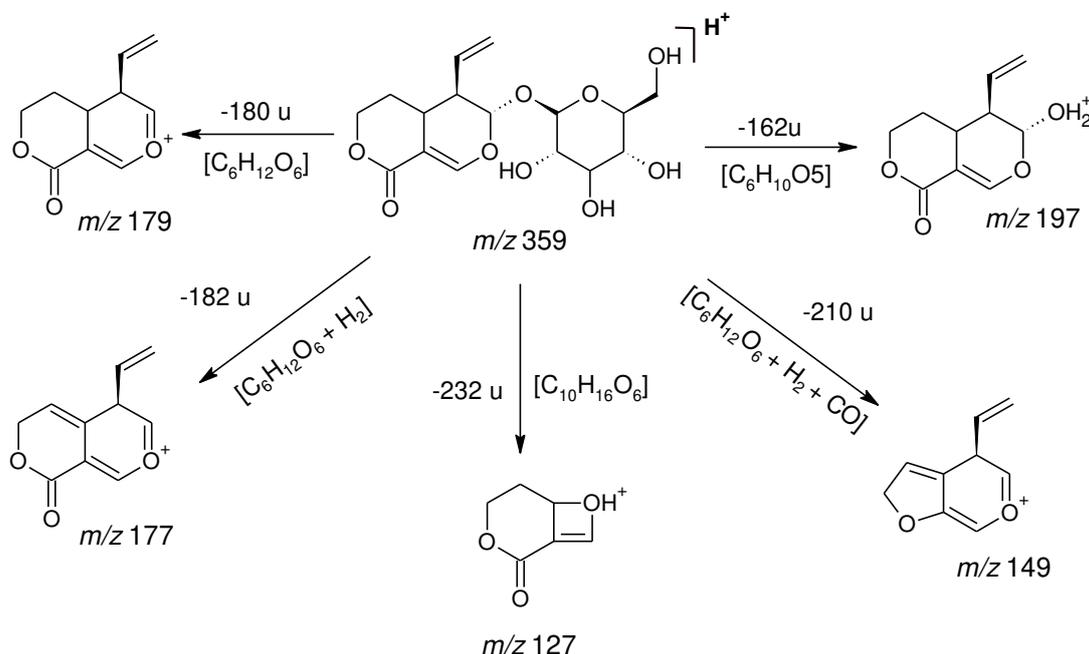


Figura 4.14 - Espectro ESI(+)-MS/MS da molécula protonada m/z 359 do swerosídeo.

O pico a m/z 197 (pico base) corresponde a iões fragmento resultantes da perda do resíduo da hexose (- 162 u) por parte de moléculas protonadas, uma vez mais indicativa da presença de um anel glucosídico na molécula. A perda da unidade hexose e a perda conjugada de hexose e de uma molécula de H_2 resultam no aparecimento dos picos a m/z 179 e m/z 177, respetivamente. O fragmento m/z 149 pode ser formado diretamente a partir do ião precursor por perda concertada de 210 u ou, então, pode resultar da perda de uma molécula de CO pelo fragmento m/z 177. A formação do ião fragmento m/z 127 pode ser explicada por uma reação do tipo retro-Diels-Alder com cisão de ligações C-O no anel central, com perda de 232 u. A proposta de fragmentação está apresentada no Esquema 4.3.



Esquema 4-3 - Proposta da via de fragmentação para a molécula protonada m/z 359 do swerosídeo.

Nos dois ensaios LC-MS/MS foram identificadas no total seis xantonas: na análise em modo ESI(-) foram caracterizadas três xantonas, compostos **4** ($t_R = 8,1$ min), **6** ($t_R = 9,2$ min) e **7** ($t_R = 10,3$ min) listados na Tabela 4.2; no modo ESI(+) identificaram-se mais quatro xantonas (Tabela 4.3), compostos **4** e **5**, que coeluem a $t_R = 8,1$ min, e os compostos **6** ($t_R = 9,0$ min) e **7** ($t_R = 9,1$ min). É importante realçar que os compostos **4** (Tabela 4.2) e **5** (Tabela 4.3) correspondem

Resultados e discussão

ao mesmo composto, uma xantona glucósida com MM = 642,17 g/mol, cuja estrutura é apresentada na Figura 4.15.

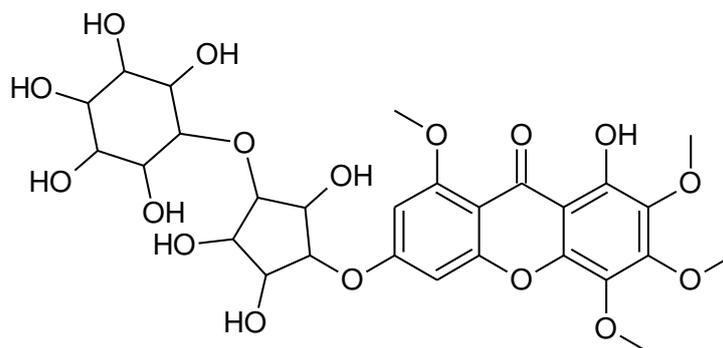


Figura 4.15 - Estrutura química do composto **5** identificado por LC-MS/MS, no extrato aquoso de *C. erythraea*, como mono-hidroxi-tetrametoxixantona-*O*-pentosilhexósido.

Dado as xantonas conterem no core central um grupo carbonilo e grupos metoxi e hidroxilo como substituintes, a fragmentação observada nos espectros MS/MS apresenta perdas características do radical CH_3 e de pequenas moléculas neutras, como CH_4 , CO e CHO . No caso das xantonas glucósidas, observa-se ainda as fragmentações características associadas às unidades glucósidas presentes na molécula.

O composto **6**, Figura 4.7 e Tabela 4.2, atribuído à tri-hidroxi-monometoxixantona, com $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 273, apresenta no espectro MS/MS iões fragmento a m/z 258, m/z 257, m/z 230 e m/z 229 (Figura 4.16). A proposta de fragmentação apresenta-se no Esquema 4.4

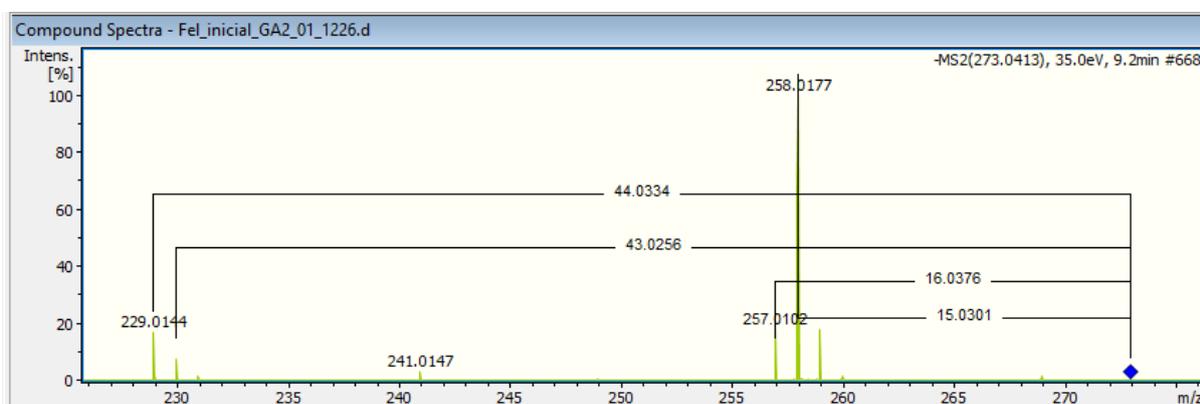
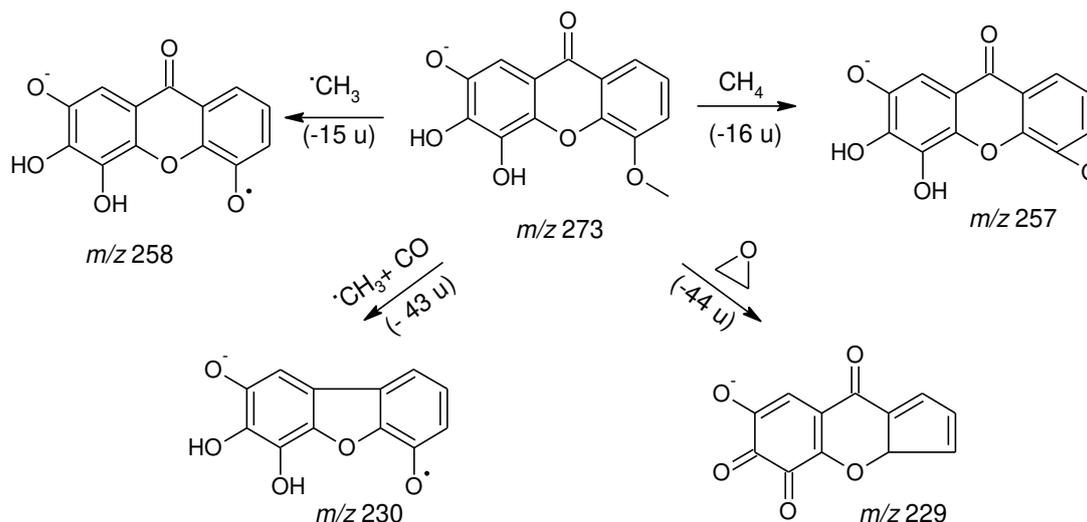


Figura 4.16 - Espectro ESI(-)-MS/MS da molécula protonada m/z 273 da tri-hidroxi-monometoxixantona.



Esquema 4-4 - Proposta de fragmentação para o íon precursor m/z 273 da tri-hidroxi-monometoxixantona.

Conforme acima referido, a $t_R = 8,1$ min foi identificado, em ambos os modos de ionização, uma mono-hidroxi-tetrametoxixantona-*O*-pentosilhexósido, que no ESI(-)-TIC mostra uma molécula desprotonada a m/z 641 e no ESI(+)-TIC apresenta a molécula protonada a m/z 643, compostos **4** e **5** listados nas Tabelas 4.2 e 4.3, respetivamente. Ambos os íões precursores foram analisados por MS/MS com vista à caracterização estrutural da molécula em estudo.

O precursor m/z 641 gerou três íões fragmento a m/z 347, m/z 332 e m/z 301 (Figura 4.17). O passo fundamental do mecanismo de fragmentação é a perda do resíduo da unidade glucósida (-294 u) conjugada com a perda de grupos CH_3 , CH_4 e CHO provenientes dos substituintes presentes na molécula. Por sua vez, a molécula protonada m/z 643 originou apenas um fragmento a m/z 349, que resulta da perda de 294 u, indicando que o íon formado é muito estável. Os mecanismos prováveis de fragmentação estão apresentados no Esquema 4.5.

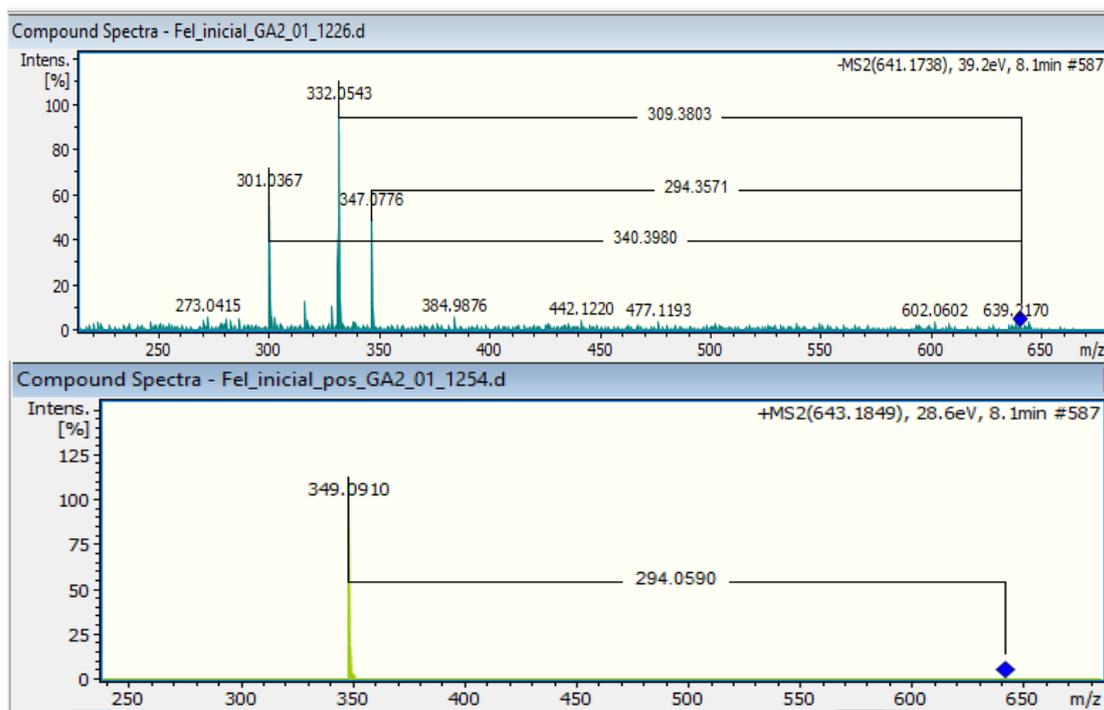
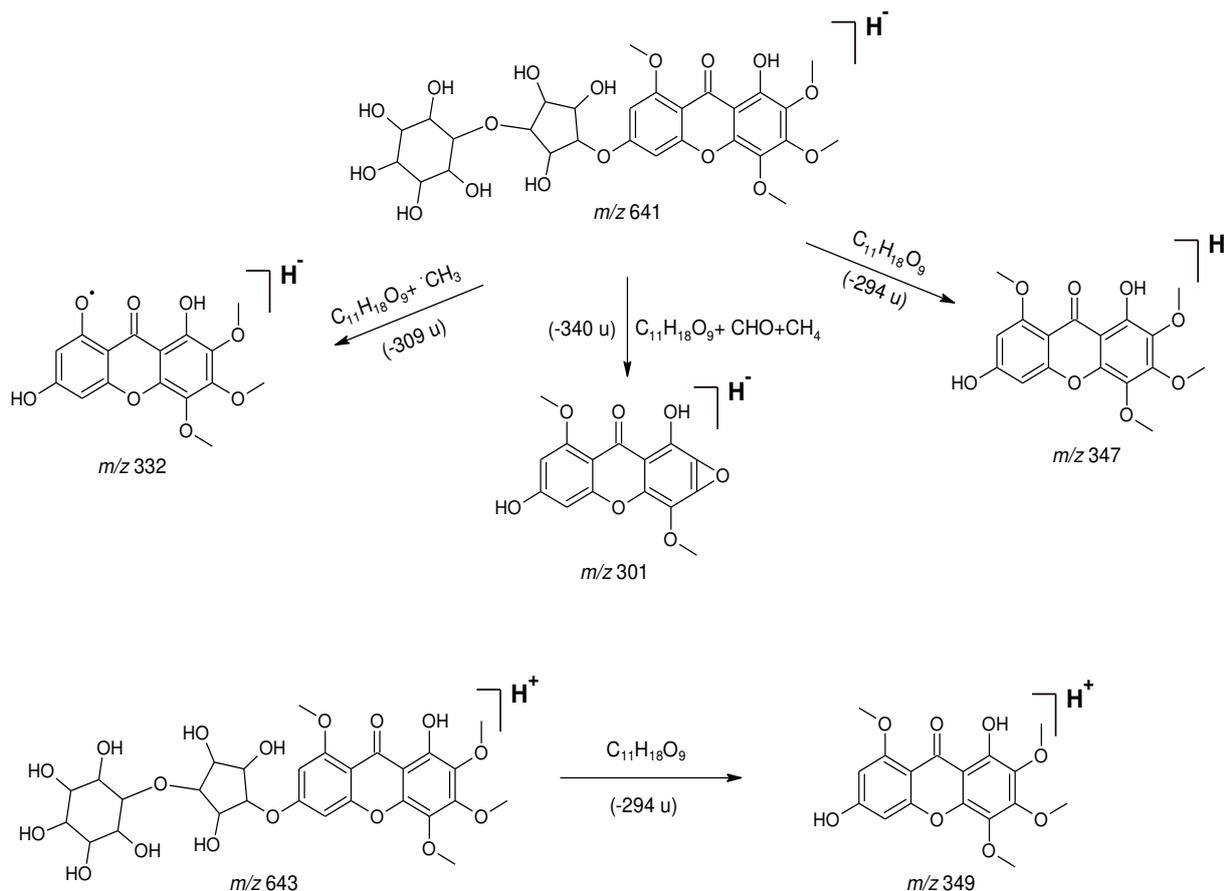


Figura 4.17 - Espectros ESI(±)-MS/MS dos íões precursores m/z 641 e 643 provenientes da molécula mono-hidroxi-tetrametoxixantona-*O*-pentosilhexósido.



Esquema 4-5 - Proposta de fragmentação para o íon precursor m/z 641 e m/z 643 da molécula mono-hidoxi-tetrametoxixantona-*O*-pentosilhexósido.

Com esta análise do extrato aquoso por espectrometria de massa, conclui-se que a fração II apresenta na sua constituição iridoides e que a fração III é constituída maioritariamente por xantonas, o que está de acordo com os artigos de Bozunovic *et al.* [72] e de Aberham *et al.* [34].

4.4 – Quantificação dos fenóis totais

Para a determinação dos fenóis totais recorreu-se ao método de Folin-Ciocalteu para cada uma das amostras, tal como descrito no ponto 3.8.1. Depois de realizados os referidos cálculos, obteve-se os valores de fenóis totais (μ g de GAE/mg de extrato), que se encontram na Figura 4.18. Estes valores são apresentados como a média de três ensaios independentes e o desvio padrão associado às medições, sendo que as amostras estatisticamente diferentes encontram-se identificadas com letras diferentes.

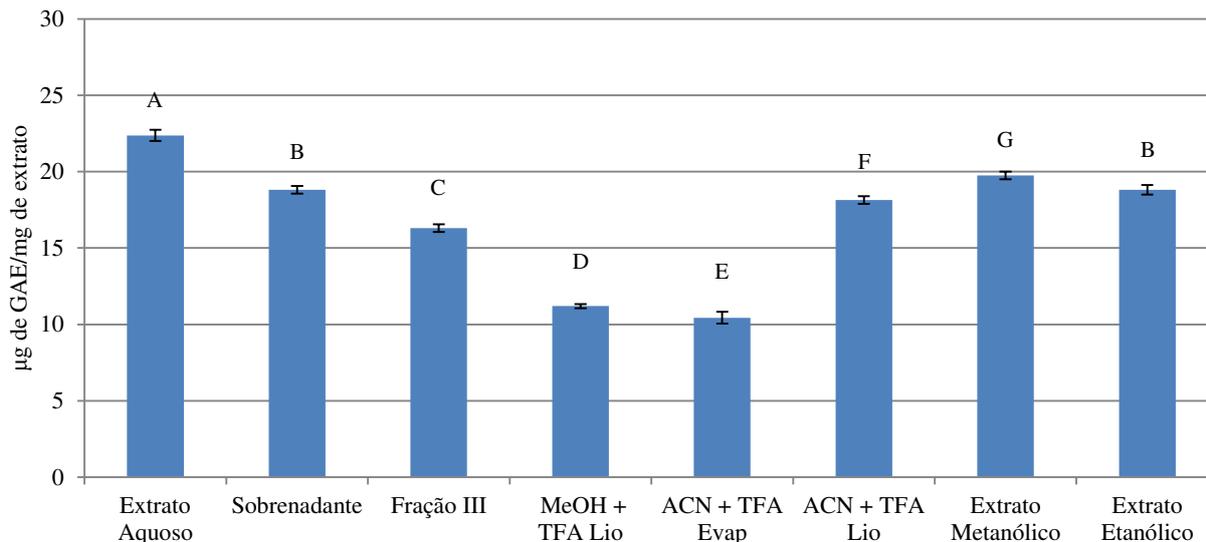


Figura 4.18 – Quantificação dos fenóis totais para cada um dos extratos, métodos de recromatografia e de purificação dos compostos fenólicos. Para cada valor, letras diferentes dizem respeito a amostras estatisticamente diferentes, com nível de confiança de 95 %.

Analisando os resultados obtidos, observa-se que a quantidade de fenóis totais detetada por este método é bastante baixa, o que seria de esperar, uma vez que o método de Folin-Ciocalteu baseia-se na quantificação dos grupos hidroxilo dos fenóis presentes no extrato e, através dos resultados de HPLC e LC-MS, sabíamos que alguns dos compostos, como é o caso do gentiopicrósido, da swertiamarina ou do swerósido, não apresentam estes grupos. Ainda assim, observa-se que, dos três métodos de extração estudados, aquele que apresenta melhor valor de quantidade de fenóis totais extraídos é o método com água ($22,37 \pm 0,36$ µg de GAE/mg de extrato), seguido do metanol ($19,76 \pm 0,25$ µg de GAE/mg de extrato) e, por fim, do etanol ($18,81 \pm 0,31$ µg de GAE/mg de extrato), valores que são estatisticamente diferentes.

É possível afirmar também que a purificação do extrato através da precipitação das mucilagens com etanol (sobrenadante) levou a uma ligeira diminuição, de aproximadamente 16 %, da quantidade de fenóis, quando comparada com o extrato aquoso. Este resultado não era esperado, uma vez que, com a purificação dos compostos fenólicos, seria expectável que a quantidade de GAE/mg de extrato no caso do sobrenadante fosse superior à do extrato aquoso, porque, ao retirarem-se os biopolímeros, a massa de amostra que fica é mais rica em compostos fenólicos. Mesmo assim, a quantidade de fenóis obtidos através deste método de purificação revelou ser estatisticamente igual ao extrato etanólico.

Mais ainda, dos três métodos de recromatografia estudados, o ACN + TFA liofilizado foi aquele que apresentou um valor de µg de GAE/mg de extrato mais parecido com o do extrato que foi injetado inicialmente (extrato aquoso), o que sugere que utilizar os eluentes ACN e TFA durante a corrida de HPLC para a recolha da amostra e secá-la no liofilizador é o melhor método, tal como se tinha referido anteriormente pela análise dos diferentes cromatogramas.

Comparando com o valor reportado na literatura para a mesma planta ($49,63 \pm 0,28$ mg de GAE/g de extrato)^[90], este é significativamente mais elevado para os extratos aquoso e para o extrato metanólico e etanólico ($105,54 \pm 0,84$ e $69,42 \pm 0,55$ mg de GAE/g de extrato, respetivamente)^[91]. Esta diferença pode dever-se ao facto de, no artigo, terem utilizado as partes aéreas da planta (folhas e flores), que são mais ricas em polifenóis, enquanto neste trabalho se utilizou a planta na sua totalidade. Para além disso, a altura sazonal em que a planta é coletada e, tal como já foi referido anteriormente, os fatores ambientais podem influenciar os metabolitos secundários das plantas da mesma espécie e,

consequentemente, a quantidade de fenóis totais. Em comparação com a *Gentiana lutea*, planta da mesma família da *C. erythraea*, observa-se que esta apresenta uma quantidade de fenóis totais de $0,996 \pm 0,28 \mu\text{g}$ de GAE/mg de extrato aquoso^[92], que é bastante inferior ao valor encontrado para a planta em estudo.

4.5 – Determinação da atividade antioxidante

A produção de radicais livres está diretamente relacionada com a oxidação em alimentos e sistemas biológicos. Os compostos fenólicos têm a capacidade de influenciar diferentes biomarcadores de stress oxidativo, sendo que os mecanismos biológicos associados a estes possíveis efeitos têm sido atribuídos às propriedades antioxidantes destes compostos. Deste modo, nesta etapa do trabalho, pretende-se estudar a capacidade dos polifenóis em reduzir o radical DPPH, em inibir a peroxidação de lípidos e em inibir a captura de radicais de óxido nítrico.

4.5.1 – Capacidade de redução do radical DPPH

Para a determinação da atividade antioxidante, segundo o método do DPPH, de cada amostra em estudo recorreu-se ao procedimento descrito no ponto 3.9.1. Os resultados da percentagem de captura dos radicais livres estão presentes na Figura 4.19, para uma concentração final de $50 \mu\text{g/mL}$. Estes valores são apresentados como a média de três ensaios independentes e o desvio padrão associado às medições. As amostras estatisticamente diferentes encontram-se identificadas com letras diferentes.

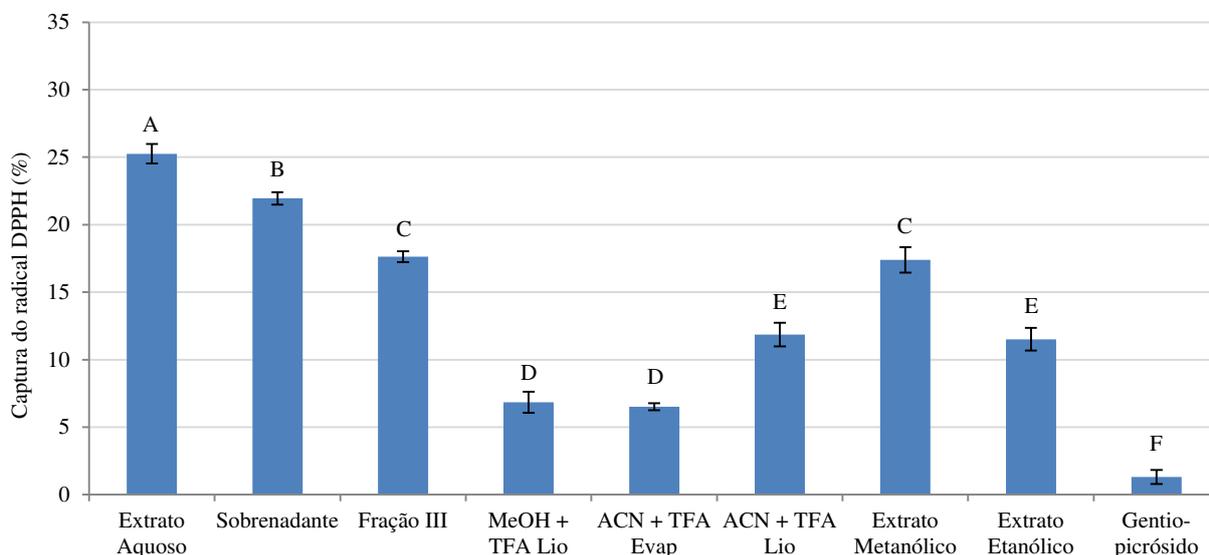


Figura 4.19 – Percentagem de atividade antioxidante, pela captura do radical DPPH, para as diferentes amostras, na concentração final de $50 \mu\text{g/mL}$. Os padrões comerciais BHT, rutina e quercetina apresentam um EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) de $9,89 \pm 0,11$, $6,27 \pm 0,09$ e $3,23 \pm 0,07$, respetivamente. Para um nível de confiança de 95 % A, B, C, D, E e F são estatisticamente diferentes.

Através dos resultados obtidos pode constatar-se que o extrato aquoso é aquele que apresenta uma maior percentagem de captura de radicais livres, de aproximadamente 25 %, enquanto o sobrenadante apresenta uma percentagem de inibição de cerca de 22 %. Estes resultados sugerem que

durante o processo de precipitação das mucilagens há compostos com boa atividade antioxidante que ficam retidos nas mucilagens ou, então, que alguns dos compostos que constituem as mucilagens possuem a capacidade de reduzir o radical DPPH.

Mais uma vez, o método de recolha com os eluentes ACN e TFA, seguido de secagem com o liofilizador, é o método que apresenta uma melhor percentagem dos três métodos de recromatografia estudados, tendo até valores semelhantes ao extrato etanólico, tal como se observou no ensaio da quantificação dos fenóis totais.

Em relação à fração III, esta apresenta um valor de captura do radical estatisticamente semelhante ao extrato metanólico e melhor do que o extrato etanólico, o que sugere que os compostos que constituem esta fração possuem grupos que são bons doadores de prótons. Através dos resultados obtidos por espetrometria de massa concluiu-se que algumas das xantonas, que constituem esta fração, apresentam na sua estrutura grupos hidroxilo, que podem facilmente fornecer prótons ao radical DPPH, o que vai ao encontro dos resultados obtidos neste estudo. De facto, foi reportado que algumas xantonas, como a tri-hidroxi-monometoxi xantona ou a tri-hidroxi-dimetoxixantona, ambas identificadas neste estudo, possuem uma atividade antioxidante promissora ^[93].

O padrão gentiopicrosido apresenta uma baixa atividade biológica, já que, para a mesma concentração (50 µg/mL), a percentagem de inibição é de apenas 1 %, enquanto para os padrões comerciais BHT, rutina e quercetina o valor de EC₅₀ é de 9,89 µg/mL, de 6,27 µg/mL e de 3,23 µg/mL, respetivamente. Este resultado seria de esperar, uma vez que este composto não tem prótons que possam estabilizar o radical livre DPPH. Apesar disso, os resultados obtidos não estão de acordo com os dados reportados na literatura, em que o valor de EC₅₀ para o gentiopicrosido é de 75 µg/mL e para a quercetina é de 0,08 µg/mL ^[94], sendo, no entanto, possível concluir em ambos os casos que o gentiopicrosido não apresenta uma boa atividade antioxidante. Para além disso, é importante realçar que estudos realizados com secoiridoides de *C. erythraea* revelaram que nem a swertiamarina nem o swerósido, identificados por espetrometria de massa neste trabalho, apresentam atividade antioxidante ^[8] e, portanto, estes dados, aliados ao facto de a atividade do gentiopicrosido ser praticamente inexistente, podem explicar a baixa atividade antioxidante deste extrato quando comparado com os padrões comerciais acima referidos.

O valor de EC₅₀ reportado na literatura para a mesma espécie, no caso do extrato aquoso, é de 254,68 ± 0,42 µg/mL ^[90], para o extrato metanólico é de 58,34 ± 2,86 µg/mL e para o extrato etanólico é de 328,25 ± 5,59 µg/mL ^[91]. Admitindo que nos encontramos na zona de linearidade, o EC₅₀ para o extrato aquoso seria de, aproximadamente, 100 µg/mL, para o extrato metanólico seria de 145 µg/mL e para o extrato etanólico seria de 220 µg/mL. Deste modo, comparando os dados reportados na literatura com os obtidos durante este trabalho experimental, é possível afirmar que estes são melhores do que aqueles reportados para os extratos aquoso e etanólico, sendo necessária uma menor quantidade de amostra para obter uma resposta de captura do radical DPPH de 50 %.

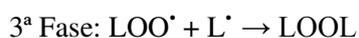
Relativamente a outros extratos aquosos ricos em xantonas e iridoides, como *Colchicum turcicum*, que, para uma concentração de 50 µg/mL, apresenta uma percentagem de redução do radical DPPH de 16 % ^[95], ou como *Swertia chirata*, também pertencente à família Gentianaceae, que apresenta um valor de EC₅₀ = 150 µg/mL ^[96], podemos afirmar que *C. erythraea* possui um maior poder antioxidante.

4.5.2 – Inibição da lipoperoxidação: Método dos TBARS

O mecanismo associado à lipoperoxidação ocorre em três fases distintas: a iniciação, a propagação e a finalização ^[41]. Na fase inicial, os radicais livres vão interagir com os ácidos gordos polinsaturados dos fosfolípidos membranares, ocorrendo a captação de um hidrogénio alílico, que resulta na formação de um radical lipídico (L[•]). Este radical pode sofrer um rearranjo molecular, dando origem a um dieno conjugado ^[77].

Durante a fase de propagação, os radicais lipídicos reagem com o oxigénio, originando radicais peróxido lipídicos (LOO[•]), que possuem a capacidade para remover hidrogénio dos ácidos gordos polinsaturados, formando-se hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e um novo L[•]. A decomposição dos LOOH, catalisada por metais de transição, resulta no aparecimento de radicais alcóxido (LO[•]) e peróxido (LOO[•]), amplificando o processo de propagação ^[41;77].

Por último, na fase de finalização, a cascata de reações em cadeia acaba quando dois radicais se combinam para formar uma espécie não radicalar ou quando as defesas antioxidantes intervêm ^[41].



Contudo, existem situações em que o radical peróxido pode sofrer uma ciclização intramolecular, seguida de quebra de ligações, dando origem a compostos como o malondialdeído (MDA). No procedimento que seguimos, o sulfato ferroso estimulou a peroxidação dos lípidos do músculo de salmão, resultando na formação de MDA, que é considerado o principal marcador da lipoperoxidação. De seguida, o MDA reage com o TBA, levando à mudança de cor da solução para rosa, que pode ser seguida espectrofotometricamente ^[97;98]. Para além de permitir quantificar o MDA, o método utilizado permite também a quantificação de outras espécies reativas ao TBA, daí o seu nome “Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)”. Na presença de antioxidantes, a formação deste cromóforo diminui, o que é expresso como atividade antioxidante. De referir ainda que se utilizou salmão para avaliar a lipoperoxidação, uma vez que possui muitos ácidos gordos polinsaturados, o que o torna um bom modelo de simulação para perceber a influência do extrato no ser humano.

Com o intuito de se determinar a atividade antioxidante, segundo o método dos TBARS, dos diferentes extratos em estudo (aquoso, metanólico e etanólico), recorreu-se ao procedimento descrito no ponto 3.9.2. De salientar que apenas se realizou este ensaio para as amostras referidas, dado que é necessário uma grande quantidade de amostra, e, nos outros casos, esta quantidade não era suficiente. Os resultados obtidos para a percentagem de inibição da lipoperoxidação estão presentes na Figura 4.20, para uma concentração final de 400 µg/mL. Estes valores são apresentados como a média de três ensaios independentes e o desvio padrão associado às medições, sendo que as amostras estatisticamente diferentes encontram-se identificadas com letras diferentes.

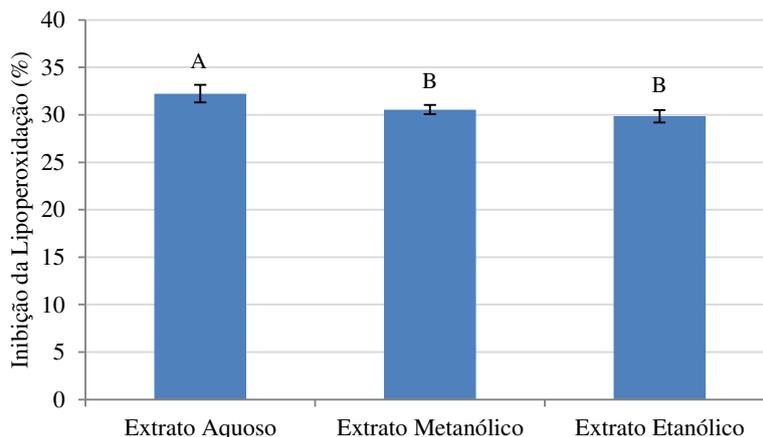


Figura 4.20 – Percentagem da inibição da peroxidação lipídica para os diferentes extratos em estudo, aquoso, metanólico e etanólico, numa concentração final de 400 µg/mL. No caso do padrão comercial BHT o IC₅₀ é de 49,09 ± 0,31 µg/mL. Para um nível de confiança de 95 %, A e B dizem respeito a diferenças significativas.

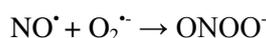
Através dos resultados obtidos conclui-se que as três amostras possuem a capacidade de proteger os lípidos contra a peroxidação e, tal como aconteceu no ensaio anterior, para a mesma concentração, o extrato aquoso apresenta uma maior atividade antioxidante quando comparado com o extrato metanólico e etanólico, sendo que entre estes os dois não existem diferenças significativas. O valor de percentagem de inibição reportado na literatura para o extrato aquoso de *C. erythraea*, na concentração de 2 mg/mL, é de 70,40 ± 0,89^[90], o que sugere que neste trabalho o extrato aquoso apresenta um maior poder de inibição da peroxidação lipídica. Contudo, o método utilizado durante os ensaios aqui apresentados é diferente do utilizado pelos investigadores do referido artigo, o que poderá explicar os valores de inibição tão diferentes.

Relativamente ao padrão comercial BHT, cuja concentração correspondente a 50 % de inibição (IC₅₀) é de 49,09 µg/mL, os extratos possuem uma capacidade antioxidante bastante inferior.

Relativamente a outras plantas medicinais, como *Phyllanthus fraternus*, que, para uma concentração de 500 µg/mL, apresenta um valor de inibição de 18,22 ± 1,05 µg/mL para o extrato aquoso^[99] e de 20,76 ± 1,05 µg/mL para o extrato metanólico^[99], podemos concluir que a *C. erythraea* exibe uma maior capacidade de inibir a formação de peróxidos lipídicos.

4.5.3 – Inibição da captura de radicais de óxido nítrico

O NO[•] é considerado um radical devido ao seu eletrão não emparelhado, podendo apresentar atividades antitumorais e funcionando como mensageiro neuronal e vasodilatador^[81]. Quando o radical livre de óxido nítrico se encontra no interior da célula é capaz de reagir com o oxigénio molecular, ou com uma ROS, como o radical superóxido (O₂^{•-}), levando à formação de RNS extremamente reativas, como é o caso do anião peroxinitrito (ONOO⁻)^[81;80].



No método descrito, o NO[•] é gerado pelo NPS em solução, sendo que, na presença de um antioxidante ou de um eliminador de NO[•], a quantidade formada de iões nitrito será menor.

Com o objetivo de se determinar a atividade antioxidante, segundo o método da captura de radicais de óxido nítrico, das diferentes amostras em estudo (sobrenadante e extratos aquoso, metanólico e etanólico) recorreu-se ao procedimento descrito no ponto 3.9.3. De referir que, mais

uma vez, apenas se realizou este ensaio para as amostras referidas, visto que não existia a quantidade de amostra necessária para os outros extratos. Os resultados obtidos para a atividade sequestradora de radicais de óxido nítrico estão representados na Figura 4.21. Estes valores são apresentados como a média de três ensaios independentes e o desvio padrão associado às medições, sendo que as amostras estatisticamente diferentes encontram-se identificadas com letras diferentes.

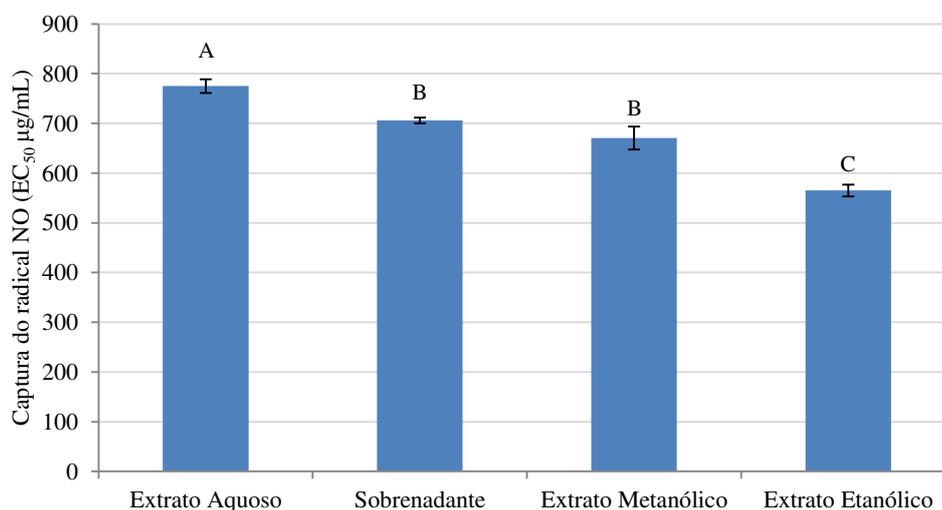


Figura 4.21 - Valores de EC₅₀ (µg/mL) para a capacidade de captura dos radicais de óxido nítrico dos extratos em estudo, bem como do sobrenadante. No caso do padrão comercial rutina o EC₅₀ é de 313,67 ± 5,11 µg/mL. Para cada valor, letras diferentes dizem respeito a diferenças significativas, com intervalo de confiança de 95 %.

Ao contrário dos resultados obtidos pelos métodos do DPPH e dos TBARS, neste caso o extrato etanólico é aquele que apresenta uma melhor atividade antioxidante (EC₅₀ = 565 µg/mL), enquanto o extrato aquoso é aquele que exibe um maior valor de EC₅₀ (EC₅₀ = 775 µg/mL). Esta diferença pode dever-se ao facto de o extrato etanólico, apesar de ter uma menor quantidade de fenóis, ter na sua composição uma maior quantidade de gentiopicrósido e, possivelmente, este composto tem um mecanismo semelhante ao dos flavonoides, como a curcumina^[100], e é capaz de capturar diretamente o radical NO, o que origina uma menor formação de iões nitrito para reagir com o reagente de Griess.

O padrão comercial rutina demonstra ter um EC₅₀ = 314 µg/mL, ou seja, possui uma maior capacidade de captura de radicais NO, quando comparado com os extratos aqui em estudo.

Comparativamente a outros extratos, como por exemplo *Swertia chirata*, também pertencente à família Gentianaceae, que no caso do extrato metanólico apresenta um valor de EC₅₀ = 870 µg/mL^[101], podemos concluir que *C. erythraea* (EC₅₀ = 670 µg/mL) possui uma maior capacidade antioxidante, avaliando a capacidade captadora de radicais NO. Contudo, para o extrato aquoso, o valor de EC₅₀ reportado para *Swertia chirata* é de 411 µg/mL^[96], sendo que neste caso o extrato em estudo demonstra uma atividade antioxidante menos promissora.

Na Tabela 4.4 encontra-se resumida a informação da atividade biológica para os diferentes extratos (aquoso, metanólico e etanólico), bem como para a fração III, de forma a facilitar uma análise comparativa entre todos os dados recolhidos até a este ponto do trabalho.

Tabela 4.4 – Quadro resumo da quantidade de fenóis ($\mu\text{g GAE/mg extrato}$) e das atividades biológicas encontradas para os diferentes extratos em estudo e para a fração III, nomeadamente da capacidade de redução do radical DPPH ($50 \mu\text{g/mL}$), da inibição da lipoperoxidação ($400 \mu\text{g/mL}$) e da captura de radicais NO ($\text{EC}_{50} \mu\text{g/mL}$). Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão.

| | Fenóis totais ($\mu\text{g GAE/mg extrato}$) | Atividade Antioxidante | | |
|--------------------|---------------------------------------------------|------------------------|------------------|---------------------------------------------|
| | | DPPH (%) | TBARS (%) | NO's ($\text{EC}_{50} \mu\text{g/mL}$) |
| Fração III | 16,31 \pm 0,25 | 17,63 \pm 0,41 | - | - |
| Extrato Aquoso | 22,37 \pm 0,36 | 25,25 \pm 0,72 | 32,23 \pm 0,93 | 774,93 \pm 13,75 |
| Extrato Metanólico | 19,76 \pm 0,25 | 17,40 \pm 0,95 | 30,55 \pm 0,48 | 670,33 \pm 23,10 |
| Extrato Etanólico | 18,81 \pm 0,31 | 11,51 \pm 0,84 | 29,85 \pm 0,64 | 565,06 \pm 11,78 |

Analisando os resultados sumariados, observa-se que existe uma relação linear entre os valores da quantidade de fenóis totais e a atividade antioxidante para os diferentes extratos pelo método do DPPH e dos TBARS ($R^2 = 0,9677$ e $R^2 = 0,9991$, respetivamente (Anexo 3)), o que vai ao encontro da informação obtida através dos artigos consultados. De facto, está reportado que existe uma correlação entre estes dois fatores, com Senol *et al.* e Bouyahya *et al.* a relatarem que a elevada atividade antioxidante está diretamente relacionada com os altos teores de fenóis totais ^[90;100]. Ao longo do trabalho constatou-se que, de um modo geral, o extrato aquoso, que apresenta uma maior quantidade de fenóis por miligrama de extrato, demonstrou um maior poder antioxidante, exceto no ensaio da inibição da captura de radicais de óxido nítrico. Neste ensaio observou-se uma relação inversa entre a quantidade de fenóis e o poder antioxidante, com o extrato etanólico a apresentar uma melhor atividade. Os resultados aqui obtidos sugerem que os grupos fenólicos não são essenciais para a atividade captadora de radicais NO, tal como já tinha sido demonstrado por Sreejayan *et al.* ^[100]. Esta observação é interessante, uma vez que as atividades antioxidantes são, normalmente, atribuídas à natureza fenólica dos compostos que constituem os extratos naturais.

Mais ainda, os secoiridoides glicosilados, como o gentiopicrósido ou o swerósido, não apresentam atividade antioxidante pelo método do DPPH ^[8;101], uma vez que as propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos estão diretamente ligadas à sua estrutura e, como explicado anteriormente, estes compostos não possuem protões que possam estabilizar o radical livre DPPH. De facto, através dos cromatogramas obtidos para os extratos aquoso, metanólico e etanólico (Figura 4.6), observa-se que o extrato aquoso é aquele que apresenta menor quantidade de gentiopicrósido e, tendo em conta que este composto é praticamente inerte para o ensaios dos fenóis totais e da redução do radical DPPH, é possível compreender o porquê de o extrato aquoso possuir maior quantidade de fenóis e uma melhor capacidade antioxidante. Deste modo, é possível explicar também os valores obtidos para a fração III, que não apresenta na sua constituição estes compostos e que possui praticamente a mesma atividade que o extrato metanólico, chegando a ser melhor do que o extrato etanólico. Para além disso, os derivados de xantonas estão reportados como tendo uma atividade antioxidante bastante promissora ^[27;92].

Em suma, os resultados obtidos nesta parte trabalho demonstram que os três métodos realizados (DPPH, TBARS e NO's) foram adequados e confiáveis na avaliação da atividade antioxidante de *C. erythraea*. A variação encontrada nos valores apresentados pode ser atribuída às diferenças nos

perfis fenólicos (qualitativos e quantitativos) entre os diferentes extratos estudados. Para se ter um conhecimento mais aprofundado sobre estas diferenças, é importante realizar estudos complementares com os extratos em estudo, como a espectrometria de massa, que permitissem identificar os compostos que são diferentes entre estas amostras e justificar os valores de atividade, também eles distintos.

4.6 – Determinação da atividade enzimática

A inibição da acetilcolinesterase (AChE) pode influenciar o processo neurodegenerativo, bem como a motilidade gastrointestinal, dado existirem recetores de acetilcolina, um dos principais neurotransmissores colinérgicos, ao longo dos sistemas nervosos central e periférico. A inibição deste enzima leva a que a acetilcolina não seja degradada, potenciando o seu papel no corpo humano, tal como referido anteriormente. Por sua vez, a HMG-CoA redutase (HMGR) catalisa um passo limitante na síntese do colesterol e, quando este enzima é inibido, há uma redução dos níveis de síntese de colesterol, o que pode desempenhar um importante papel na redução do risco de doenças cardiovasculares. Recentemente tem crescido o interesse na procura de inibidores de origem natural que possam vir a substituir o uso dos inibidores sintéticos. Deste modo, nesta parte do trabalho, o principal objetivo foi avaliar a capacidade de inibição enzimática das amostras em estudo.

4.6.1 – Inibição da acetilcolinesterase

A atividade inibitória da AChE foi avaliada, para as diferentes amostras em estudo, através do método descrito no ponto 3.10.1. Os resultados para a percentagem de inibição da AChE estão presentes na Figura 4.22, para uma concentração final de 500 µg/mL. Para cada uma das amostras foram feitas três medições independentes, estando os valores apresentados como a média e o desvio padrão associado às medições, sendo que as amostras estatisticamente diferentes encontram-se identificadas com letras diferentes.

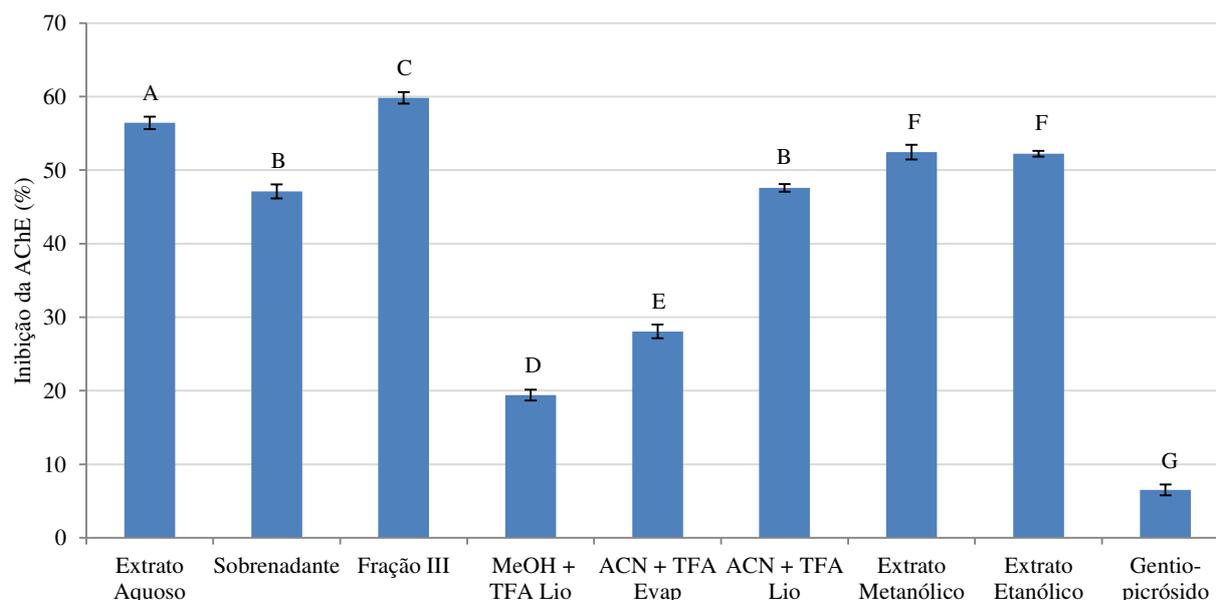


Figura 4.22 – Valores de inibição do enzima AChE para as diferente amostras em estudo, numa concentração final de 500 µg/mL. No caso do padrão comercial galantamina, o IC_{50} é de $0,118 \pm 0,003$ µg/mL. Para cada valor, letras diferentes dizem respeito a amostras estatisticamente diferentes, com nível de confiança de 95 %.

Como se pode observar, para a mesma concentração, a amostra que revelou um maior poder inibitório foi a fração III (60 %), seguida do extrato aquoso (56 %). Pensa-se que os flavonoides não induzem modificações na estrutura terciária do enzima, o que significa que o processo de inibição da AChE ocorre devido ao bloqueio do centro ativo do enzima ^[49]. Tendo em conta que as xantonas, principais constituintes da fração III, apresentam a mesma via biossintética e uma estrutura semelhante à dos flavonoides, podemos presumir que irão ter um comportamento semelhante de inibição do enzima. Urbain *et al.*, durante os seus estudos, concluíram que a 1,5,8-tri-hidroxi-3-metoxixantona, pertencente também à família Gentianaceae, apresenta valores de inibição do enzima praticamente iguais aos do padrão comercial galantamina ^[104], o que realça mais uma vez o papel que estes compostos podem ter no tratamento de problemas de digestão e até da Doença de Alzheimer.

Comparando os dois solventes orgânicos utilizados para a extração dos compostos, observa-se que os valores obtidos são estatisticamente iguais, o que sugere que o uso de metanol ou etanol não tem influência na capacidade de inibição do enzima AChE.

Tal como se observou nos outros ensaios de atividade biológica, o método de recromatografia que permitiu o melhor resultado foi aquele em que se utilizou ACN e TFA, com o liofilizador como processo de secagem, não havendo diferenças estatísticas entre esta amostra e o sobrenadante.

O padrão gentiopicrósido demonstrou ser praticamente inativo para este ensaio, apresentando uma inibição de, aproximadamente, 7 % na concentração de 500 µg/mL. Este resultado está de acordo com os dados reportados na literatura para o mesmo composto, em que o gentiopicrósido não revelou atividade durante os ensaios de inibição da AChE ^[102]. Já o padrão comercial galantamina possui um $IC_{50} = 0,118$ µg/mL, o que significa que a planta *C. erythraea*, apesar de ter capacidade de inibir o enzima AChE, possui uma menor capacidade inibitória.

Não tendo sido possível encontrar outros estudos em que se utilize *C. erythraea*, comparou-se os valores obtidos com outros extratos pertencentes à família Gentianaceae, como por exemplo *Swertia longifolia*, em que o extrato aquoso revelou uma percentagem de inibição de 2 % e o extrato metanólico de 11 %, para uma concentração de 300 µg/mL ^[105], o que sugere que a planta *C. erythraea* possui um maior poder inibitório.

4.6.2 – Inibição da HMG-CoA redutase

Neste ensaio preliminar, avaliou-se a atividade inibitória da HMGR apenas para o extrato aquoso e para a fração III, através do método descrito no ponto 3.10.2. Os resultados para a percentagem de inibição da HMGR estão presentes na Figura 4.23, para uma concentração final de 10 µg/mL. Na realização deste ensaio, foram feitas três medições independentes, estando o valor apresentado como a média e o desvio padrão associado às medições. As amostras são estatisticamente diferentes e encontram-se identificadas com as letras A e B.

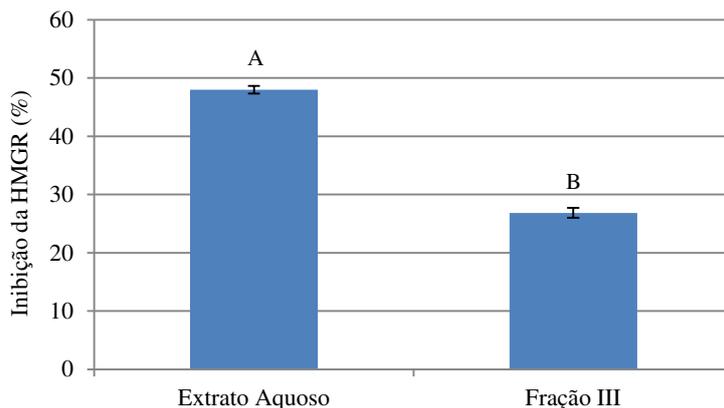


Figura 4.23 - Valores de inibição do enzima HMGR para o extrato aquoso e para a fração III, numa concentração final de 10 $\mu\text{g/mL}$. No caso do padrão comercial sinvastatina, o IC_{50} é de 0,2 $\mu\text{g/mL}$ ^[108]. Para cada valor, letras diferentes dizem respeito a amostras estatisticamente diferentes, com nível de confiança de 95 %.

Através dos resultados obtidos conclui-se que ambas as amostras possuem a capacidade de inibir o enzima HMGR. O extrato aquoso apresentou uma percentagem de inibição de $47,99 \pm 0,47$ e a fração III de $26,86 \pm 0,87$, respetivamente, para uma concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. Tal como referido, a HMGR catalisa um passo limitante na síntese do colesterol e, quando são administradas estatinas a pacientes que sofrem de hipercolesterolemia, a redução inicial na síntese do colesterol leva à ativação da proteína de ligação a elemento regulador de esterol, levando, conseqüentemente, à regulação positiva da HMGR e do recetor LDL^[84]. Estes fatores resultam em níveis normais de síntese de colesterol devido à presença de inibidor e ao aumento da expressão do recetor LDL, que provoca uma redução nos níveis de colesterol^[59]. Neste estudo, a inibição competitiva do enzima pode refletir o potencial de *C. erythraea* na redução da síntese do colesterol. Estudos de *docking in silico* reportam que a swertiamarina, identificada neste trabalho, atua a nível de vários enzimas e fatores de transcrição envolvidos no metabolismo da glucose e dos lípidos, incluindo a inibição da HMGR^[106]. Já Peffley *et al.* observaram que os monoterpénidos derivados da via do mevalonato das plantas controlam a síntese da HMGR através de um mecanismo que parece modular a eficiência da tradução do mRNA^[107], o que pode explicar os valores determinados neste ensaio. Todavia, na bibliografia consultada, não foi possível encontrar estudos que reportem o papel das xantonas na inibição deste enzima.

O fármaco sinvastatina apresenta um IC_{50} de 0,2 $\mu\text{g/mL}$ ^[108] e, neste caso, o extrato aquoso apresentou, aproximadamente, 48 % para uma concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. Conclui-se que *C. erythraea* possui uma menor atividade, contudo, o fármaco é um composto puro e o extrato em estudo é uma mistura natural de vários compostos, podendo ser uma alternativa ao fármaco referido.

Mais uma vez não foi possível encontrar, na bibliografia consultada, estudos relativos a este ensaio com *C. erythraea*. Singh *et al.* durante as suas investigações concluíram que, para uma concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, o chá preto e o chá verde inibiam em 43 % e 34 %, respetivamente, a HMGR^[109], ou seja, *C. erythraea* possui uma maior atividade inibitória. Tendo em conta que ambos os chás estão reportados como redutores dos níveis de colesterol em pessoas que os consomem várias vezes ao dia^[108;109], podemos concluir que o extrato aqui estudado terá o mesmo efeito, visto apresentar um melhor potencial inibitório.

De salientar que se decidiu realizar este ensaio, em descontínuo, no HPLC, enquanto o da inibição da AChE foi realizado no espectrofotómetro, uma vez que existem fenóis que possuem a capacidade de absorver a 340 nm, que é onde se encontra também o pico correspondente ao NADPH. Para além disso, o espectrofotómetro não tem sensibilidade suficiente para detetar as diferentes velocidades de reação do consumo de NADPH, dado que estas são muito baixas.

Na Tabela 4.5 encontra-se sintetizada a informação da inibição da atividade enzimática da AChE e da HMGR para os diferentes extratos (aquoso, metanólico e etanólico), bem como para a fração III, de forma a facilitar uma análise comparativa entre ambos os ensaios.

Tabela 4.5 - Quadro resumo da quantidade de fenóis (μg GAE/mg extrato) e das atividades biológicas encontradas para os diferentes extratos em estudo e para a fração III, nomeadamente inibição da AChE (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e da HMGR (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão.

| | Fenóis totais (μg GAE/mg extrato) | AChE (%) | HMGR (%) |
|--------------------|--------------------------------------------------|------------------|------------------|
| Fração III | 16,31 \pm 0,25 | 59,81 \pm 0,95 | 26,86 \pm 0,87 |
| Extrato Aquoso | 22,37 \pm 0,36 | 56,43 \pm 0,84 | 47,99 \pm 0,47 |
| Extrato Metanólico | 19,76 \pm 0,25 | 52,44 \pm 0,99 | - |
| Extrato Etanólico | 18,81 \pm 0,31 | 52,23 \pm 0,39 | - |

Analisando os resultados resumidos, observa-se que não existe uma relação direta entre a quantidade de fenóis totais e a capacidade de inibição do enzima AChE ($R^2 = 0,1308$ (Anexo 4)), uma vez que é a fração III, que possui menor concentração de fenóis, a amostra que mais inibiu a AChE, para a mesma concentração. Estes resultados dão ênfase à potencialidade de as xantonas poderem ser utilizadas no tratamento da DA. Por outro lado, quando se avaliou a capacidade de inibição do enzima HMGR, foi o extrato aquoso que se revelou o mais promissor. A fração III apresentou praticamente metade da percentagem de inibição do extrato aquoso, o que parece sugerir que o potencial inibitório de *C. erythraea* se deve sobretudo aos monoterpenoides que esta planta possui na sua composição.

Investigações recentes relacionam a DA com alterações na homeostase do colesterol, após o reconhecimento de que o colesterol pode influenciar a produção, agregação e eliminação da proteína β -amiloide no cérebro ^[112]. A produção e a eliminação desta proteína são reguladas por um grande grupo de genes e, naturalmente, a desregulação destes genes aumenta o risco de contrair DA e pode também acelerar a progressão da mesma ^[113]. A hipercolesterolemia é sugerida como sendo um fator de risco para a DA, uma vez que leva ao aumento da produção da proteína β -amiloide mediada pelas γ e β -secretases ^[114]. A presença do alelo $\epsilon 4$ da apolipoproteína E, proteína transportadora de colesterol, é também considerada um fator de risco, dado estar associado à formação de placas amiloides e de emaranhados neurofibrilares ^[111;112]. Estudos sobre o efeito das estatinas nos níveis plasmáticos de colesterol sugerem que estas possuem a capacidade de impedir a produção e eventual deposição da proteína β -amiloide, reduzindo significativamente o desenvolvimento da DA ^[111;113]. Deste modo, os resultados acima discutidos sugerem que o extrato aquoso de *C. erythraea* possui compostos que podem ser utilizados no tratamento da DA, não só através da inibição do enzima AChE, como também através da redução dos níveis de colesterol e, conseqüentemente, da produção da proteína β -amiloide.

4.7 – Ensaios em linhas celulares do carcinoma hepatocelular humano

Durante este trabalho experimental, realizaram-se ensaios *in vitro* em células do cancro do fígado, com o objetivo de se determinar, pelo método do MTT, a citotoxicidade dos extratos aquoso, metanólico e etanólico, bem como da fração III e do sobrenadante. Realizaram-se também ensaios preliminares que visaram estudar a influência dos extratos no conteúdo proteico da linha celular Hep-G2, recorrendo-se à normalização pela quantidade de DNA para a realização da eletroforese SDS-PAGE e também ao HPLC-DAD para a análise dos péptidos obtidos durante a extração do DNA. Para além disso, a técnica de FTIR foi utilizada de modo a confirmar se esta extração foi bem sucedida.

4.7.1 – Determinação da citotoxicidade em células Hep-G2

O potencial citotóxico dos três extratos em estudo, bem como da fração III e do sobrenadante, foi avaliado em células Hep-G2, que permitem mimetizar as células presentes no fígado, através do método do MTT, descrito no ponto 3.11.1. Este é um ensaio colorimétrico que permite medir a redução do MTT (caracterizado pela sua cor amarela) à sua forma insolúvel formazan (de cor roxa), pelo enzima mitocondrial succinato desidrogenase nas células viáveis. Em todos os casos, a gama de concentração estudada variou entre os 0,1 mg/mL e os 2 mg/mL, tendo sido possível determinar o IC₅₀ para todas as amostras (Figura 4.24), exceto para o sobrenadante, em que a concentração mais elevada (2 mg/mL) resultou numa atividade citotóxica de apenas 42 %. Para cada uma das amostras foram feitas três microplacas, estando os valores apresentados como a média e o desvio padrão associado às medições. As amostras estatisticamente iguais encontram-se identificadas com a mesma letra.

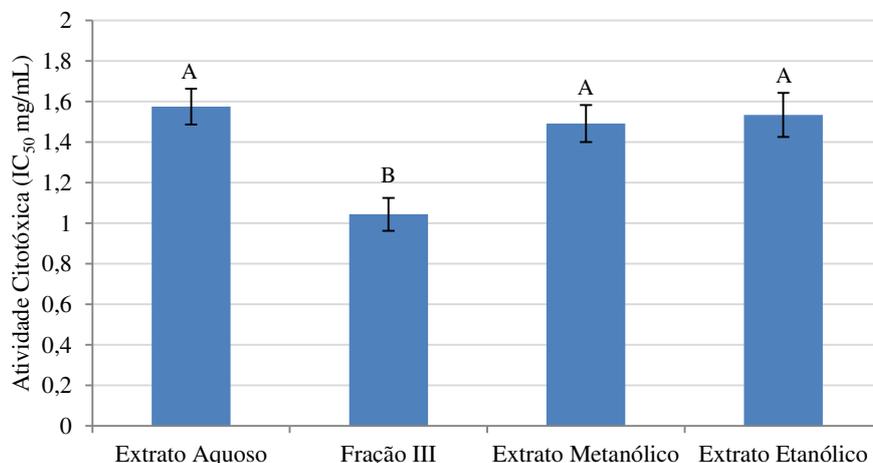


Figura 4.24 - Valores de IC₅₀ para os extratos em estudo, bem como para a fração III. O padrão gentiopicrósido, na concentração final de 0,1 mg/mL, apresenta uma citotoxicidade de 7 % ± 0,4, enquanto o sobrenadante proveniente do extrato aquoso, na concentração final de 2 mg/mL, tem uma atividade citotóxica de 42 % ± 2,1. Para cada valor, letras diferentes dizem respeito a diferenças significativas, com intervalo de confiança de 95 %.

Analisando os resultados obtidos, conclui-se que nenhuma das amostras se revelou citotóxica, dado que concentrações superiores a 0,1 mg/mL não são consideradas tóxicas para células humanas quando se utilizam compostos de extratos de plantas ^[116]. Em anexo (Anexo 5) encontram-se os perfis citotóxicos em linhas celulares Hep-G2 para os extratos aquoso, metanólico e etanólico e para a fração III, sendo visível que a atividade citotóxica aumentou de um modo dependente da dose para as quatro

amostras em estudo. Para além disso, a extração dos compostos de *C. erythraea* com os diferentes solventes (água, metanol e etanol) mostrou ter um comportamento estatisticamente igual, o que parece indicar que a atividade citotóxica desta planta é independente do método de extração. Já em comparação com o sobrenadante, em que, como referido, não foi possível calcular o valor de IC_{50} , observa-se que o extrato aquoso possui um maior potencial antitumoral ($IC_{50} = 1,57$ mg/mL). Este resultado pode dever-se ao facto de, no extrato aquoso, ainda existirem as fibras que foram removidas no sobrenadante, sendo que estas fibras, em vez de estarem em solução, podem encontrar-se mais perto das células, atraindo os grupos hidroxilo dos compostos fenólicos. Comparativamente à *Swertia longifolia*, que para o extrato aquoso e metanólico das partes aéreas desta planta também não apresenta citotoxicidade na linha celular Hep-G2 ^[105], podemos concluir que os extratos aqui em estudo apresentam um comportamento bastante semelhante.

Mais ainda, a fração III ($IC_{50} = 1,04$ mg/mL) é a que apresenta melhor atividade citotóxica, uma vez que é preciso uma menor concentração de amostra para obter a mesma resposta, ou seja, para demonstrar um valor de citotoxicidade de 50 %. Tendo em conta que esta fração é composta maioritariamente por xantonas, este facto pode indicar que este grupo de moléculas tem uma influência direta na atividade citotóxica. De facto, segundo Panda *et al.* os derivados de xantonas são conhecidos pelo seu potencial citotóxico, uma vez que podem estar associados com a paragem do ciclo celular e, quanto mais oxigénios a xantona tiver, maior vai ser o seu potencial citotóxico ^[93].

Para além disso, o padrão gentiopicrósido, para uma concentração de 0,1 mg/mL, apresenta uma atividade citotóxica de apenas 7 % e, como é um dos compostos maioritários desta planta, pode explicar o baixo potencial citotóxico da *C. erythraea* e o porquê de a fração III, que não contém gentiopicrósido, apresentar uma melhor atividade. Na bibliografia consultada não foi possível encontrar valores de citotoxicidade para o gentiopicrósido nesta linha celular, contudo Tian *et al.*, durante as suas pesquisas, concluíram que este composto é um potente agente citotóxico e que contribui para a inibição da proliferação de células do cancro do ovário OVCAR-3. Além do mais, o gentiopicrósido levou a uma perda do potencial da membrana mitocondrial e à alteração dos níveis de expressão de várias proteínas relacionadas com a apoptose, como o NF- κ B ou o citocromo c ^[117].

4.7.2 – Extração e quantificação do DNA

A escolha da estratégia de normalização pode influenciar a precisão das conclusões biológicas durante o processamento dos dados metabolómicos e proteómicos a partir de extratos celulares. A normalização a partir da concentração total de proteínas, da contagem celular, do peso celular ou da concentração de DNA são os métodos mais comumente utilizados. Contudo, a normalização a partir da concentração proteica varia drasticamente em amostras extraídas de metabolitos de linhas celulares aderentes e, para além disso, este tipo de normalização pode “mascarar” o efeito dos compostos fenólicos na expressão proteica, uma vez que se aplica sempre a mesma concentração no gel de eletroforese, não sendo possível observar se existem diferenças ou não. Por outro lado, a normalização pela contagem de células (com azul de tripano) pode tornar-se difícil para as linhas celulares que crescem em aglomerados, como é o caso das células Hep-G2, ainda assim, dependendo do tipo de linha celular, a normalização por contagem ou por peso de células pode ser a melhor alternativa. Deste modo, acredita-se que a normalização através da concentração de DNA fornece dados mais precisos e robustos, sendo um métodos amplamente aplicável para normalizar dados metabolómicos e proteómicos ^[118].

Para o estudo da ação dos compostos na linha celular Hep-G2 utilizou-se uma concentração das diferentes amostras abaixo do valor de IC_{50} , tendo-se decidido trabalhar com 0,5 mg/mL. Após 24 h de incubação, e através do método descrito no ponto 3.11.2, foi possível fazer a extração do DNA das

células. Na Figura 4.25 observa-se as células que foram recolhidas dos frascos T75 onde cresceram, sendo visível que as células que estiveram em contacto com a fração III passaram a ter uma cor amarela, quando comparadas com as células controlo (em contacto apenas com meio), e o mesmo acontece para as células em contacto com o extrato aquoso, que passaram a ter uma coloração mais acastanhada. Isto pode dever-se ao facto de os compostos fenólicos que constituem ambas as amostras ficarem aderidos às proteínas das membranas celulares, uma vez que se retirou o meio que estava dentro de cada um dos frascos T75 e as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x, o que impossibilitaria a existência de vestígios de amostra em solução que fossem responsáveis pela diferença de cor observada.



Figura 4.25 – Alteração na coloração das células Hep-G2 após 24 h de contacto com a fração III, com o extrato aquoso e com meio (controlo), respetivamente.

Após a obtenção do DNA, fez-se uma diluição de 1/20 da solução obtida e leu-se a absorvência a 260 nm e 280 nm, de forma a calcular a concentração de DNA, bem como a razão entre as duas absorvências. Para o cálculo da concentração de DNA recorreu-se à equação 3.5, apresentada no ponto 3.11.2. É importante calcular a razão entre as absorvências referidas, uma vez que o DNA é considerado puro apenas se esta razão foi superior a 1,8^[119]. Na Tabela 4.6 estão resumidos os valores encontrados para as diferentes amostras em estudo.

Tabela 4.6 – Valores obtidos para a concentração de DNA ($\mu\text{g/mL}$) e para a razão entre as absorvências a 260 nm e 280 nm para as diferentes amostras, células em contacto apenas com meio (controlo), com o extrato aquoso e com a fração III.

| Amostra | Concentração de DNA ($\mu\text{g/mL}$) | $\text{Abs}_{260\text{nm}}/\text{Abs}_{280\text{nm}}$ |
|----------------|------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Controlo | 473 | 1,82 |
| Extrato Aquoso | 302 | 1,85 |
| Fração III | 235 | 1,87 |

Os resultados obtidos parecem sugerir que as células em contacto apenas com meio (controlo) são as que apresentam uma maior quantidade de DNA, tendo aproximadamente o dobro do DNA das células em contacto com a fração III e cerca de 40 % mais DNA do que as células em contacto com o extrato aquoso. Matsumoto *et al.* observaram que o número de grupos hidroxilo nas xantonas está relacionado com a capacidade antiproliferativa, que, por sua vez, está associada à interrupção do ciclo celular^[120]. Já Shen *et al.* investigaram a capacidade das xantonas de se intercalarem com o DNA, o que vai impedir a amplificação do DNA e, conseqüentemente, a proliferação das células cancerígenas^[121]. Estes fatores poderão explicar, então, os diferentes valores obtidos para a quantidade de DNA nas amostras em estudo. Com o intuito de se avaliar se as diferentes concentrações de DNA se devem efetivamente a uma menor quantidade do mesmo, analisou-se, por UV-vis, entre os 200 nm

e os 400 nm, DNA dos testículos de salmão (50 µg/mL) nativo e desnaturado a 95 °C, durante 10 minutos. Através do espectro obtido (Anexo 6) foi possível calcular a razão $Abs_{260\text{nm}}/Abs_{280\text{nm}}$ para ambos os casos, tendo-se constatado que esta razão é semelhante. Para o DNA nativo a razão foi de 1,80 e para o desnaturado de 1,76. Deste modo, conclui-se que o DNA extraído a partir das células em estudo está efetivamente em menor quantidade quando estas estão em contacto com o extrato aquoso e com a fração III, não se encontrando desnaturado.

O DNA não é a única molécula que pode absorver a luz UV a 260 nm, uma vez que o RNA, que é co-eluído durante o processo de purificação, também tem uma grande absorvência a este comprimento de onda. Por sua vez, os aminoácidos aromáticos presentes nas proteínas absorvem a 280 nm ^[119]. Ambos os contaminantes, se presentes na solução de DNA, contribuirão para possíveis alterações na razão $Abs_{260\text{nm}}/Abs_{280\text{nm}}$. Deste modo, o próximo passo deste trabalho consistiu na análise das soluções obtidas durante a extração do DNA, de forma a comprovar que estas não estariam contaminadas com proteínas e que os ácidos nucleicos que absorvem a 260 nm dizem respeito ao DNA e não ao RNA (distinguíveis por FTIR).

4.7.3 – Análise do DNA por espectroscopia de FTIR

A técnica de espectroscopia de FTIR foi utilizada para confirmar se, durante o processo de extração de DNA, este foi obtido de forma pura, ou seja, se não existiam proteínas ou RNA a contaminar o produto obtido. Assim, recorreu-se à técnica de ATR-FTIR, descrita no ponto 3.6, para a análise do DNA obtido a partir das células em contacto apenas com meio, com o extrato aquoso e com a fração III, uma vez que esta é uma técnica rápida, precisa e que permite a análise das amostras sem as destruir, o que é uma das grandes vantagens. O espectro obtido (Figura 4.26) foi analisado com maior detalhe na região correspondente às ligações típicas entre o fosfato e a ribose, ou seja, entre os 1300 e os 900 cm^{-1} , e na região característica das proteínas amida I e amida II (Tabela 4.7). Em anexo (Anexo 7) apresenta-se o espectro total, entre os 900 e 3100 cm^{-1} para as três amostras em estudo.

Tabela 4.7 – Frequências e modos vibracionais de alguns grupos funcionais de moléculas visíveis na região de infravermelho no espectro eletromagnético, adaptado de ^[116;117;124].

| Nº de onda (cm^{-1}) | Modo vibracional |
|---------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| ~1652 | Estiramento (C=O) da Amida I |
| ~1540 | Deformação (N-H) da Amida II |
| ~1120 | Estiramento (C-O) da ribose do RNA |
| ~1084 | Estiramento simétrico (PO_2^-) dos ácidos nucleicos |
| ~1045 | Estiramento (CO) da ribose dos ácidos nucleicos |

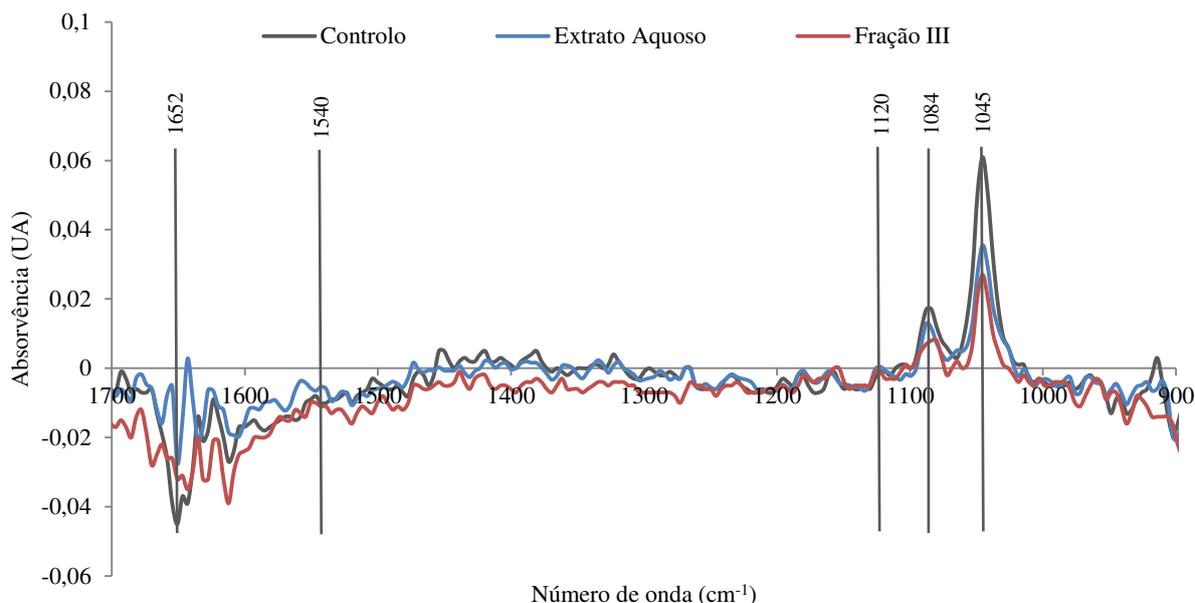


Figura 4.26 – Espectro obtido através da análise por espectroscopia de FTIR para as células em contacto com meio (controlo), com o extrato aquoso e com a fração III.

Analisando os resultados obtidos para a análise do DNA extraído das células das amostras em estudo, observa-se que, para os três casos, o DNA foi extraído com sucesso. De facto, as duas bandas maioritárias, que surgem a 1045 cm^{-1} e a 1084 cm^{-1} , são características do estiramento da ribose dos ácidos nucleicos e do estiramento simétrico dos ácidos nucleicos, respetivamente, e, tendo em conta que a banda a 1120 cm^{-1} , que diz respeito ao estiramento da ribose do RNA, tem uma contribuição tão baixa, podemos afirmar que as duas bandas maioritárias correspondem predominantemente ao DNA.

No que diz respeito às bandas características das proteínas, nomeadamente amida I e amida II, que surgem aos 1652 cm^{-1} e 1540 cm^{-1} , respetivamente, vemos que a contribuição destas bandas é significativamente baixa, quando comparada com a das bandas que correspondem ao DNA, o que sugere que não existe proteína nas amostras em estudo, comprovando-se que estas estão de facto puras e que o método de extração foi eficaz.

É possível observar ainda que o perfil dos espectros para as três amostras é bastante semelhante, todavia as bandas que correspondem ao DNA, no caso do espectro do controlo, apresentam uma intensidade superior à das outras duas amostras, o que está de acordo com os dados obtidos anteriormente (Tabela 4.6). É visível também que, para o espectro da fração III, na região dos 1084 cm^{-1} , o pico sofre um ligeiro desvio para um menor número de onda, o que está de acordo com a proposta feita em 4.7.2, que sugere que não há desnaturação do DNA, mas sim uma interação fraca dos compostos desta fração com a dupla hélice do DNA, originando uma reorientação dos grupos fosfato^[124].

4.7.4 – Análise qualitativa do conteúdo peptídico celular

Após as 24 h de incubação das células com as duas amostras (extrato aquoso e fração III), o DNA das células viáveis foi extraído, bem como o das células controlo, de acordo com o ponto 3.11.2. De acordo com as instruções fornecidas no *kit* da VWR, o DNA fica agarrado na coluna e, durante o processo de lavagem, saem os péptidos, que ficaram guardados a -80 °C para posterior análise. Com

efeito, na Figura 4.27, pode ver-se o cromatograma parcial resultante da hidrólise das proteínas (fração peptídica), que foi analisada por HPLC-DAD (cromatograma total no Anexo 8), seguindo-se o método descrito no ponto 3.4.3, com o intuito de se averiguar se os compostos destas amostras teriam efeito nas proteínas das células. De referir que a quantidade de proteína injetada é equivalente à quantidade de DNA extraído, visto que a solução analisada foi a obtida diretamente durante o procedimento de extração do DNA.

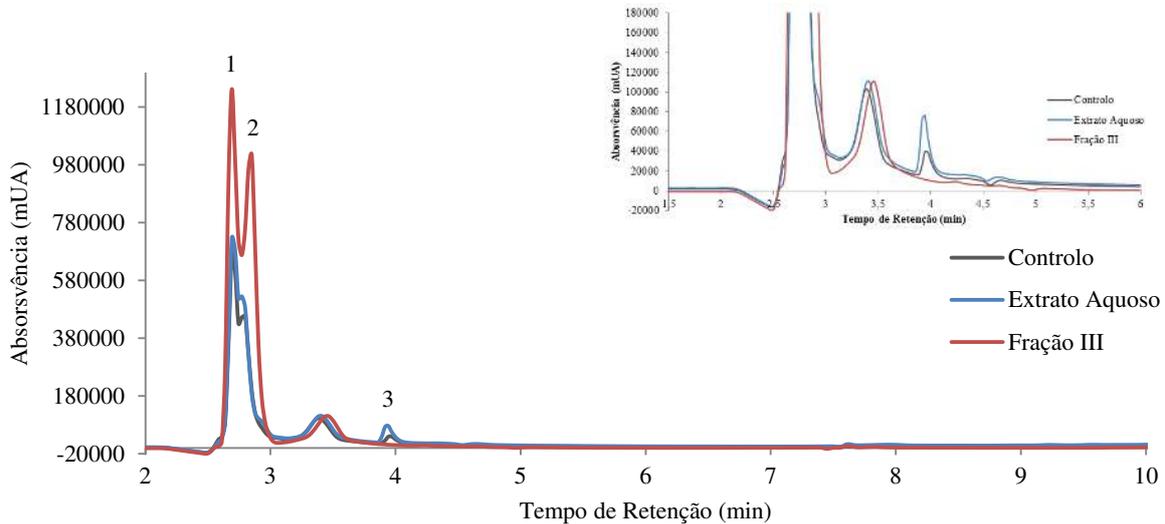


Figura 4.27 – Cromatograma adquirido para a análise dos péptidos obtidos durante a extração do DNA das células em contacto apenas com meio (controlo), com o extrato aquoso e com a fração III.

Através dos cromatogramas parciais apresentados observa-se que, quando as células estão expostas ao extrato aquoso, o seu perfil proteico é bastante semelhante ao do das células controlo, havendo apenas um aumento da intensidade dos péptidos ao tempo de retenção 3,92 minutos (Pico 3). Em contraste, quando as células estiveram em contacto com a fração III, houve um aumento considerável dos péptidos aos 2,69 (Pico 1) e 2,85 minutos (Pico 2), enquanto os péptidos que eluem aos 3,92 minutos parecem ter desaparecido. Desde já é possível afirmar que as xantonas parecem ter influência na expressão proteica em células Hep-G2.

4.7.5 – Eletroforese em gel de poliacrilamida unidimensional

Com o intuito de se compreender o efeito molecular do extrato aquoso, da fração III e do sobrenadante nas células Hep-G2, realizou-se um estudo preliminar sobre o efeito destas amostras no perfil proteico da referida linha celular. Deste modo, após 24 h de incubação, as células foram lisadas, de acordo com o ponto 3.11.3, obtendo-se o conteúdo proteico a ser analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE). Através desta técnica obteve-se um eletroforegrama (Figura 4.28), que permitiu a análise das subunidades polipeptídicas, sendo possível avaliar se a amostra em estudo induz alterações a nível da expressão proteica. De salientar, mais uma vez, que, para a realização desta eletroforese, as amostras foram normalizadas pela quantidade de DNA, para uma concentração de 3000 µg/mL. No caso do sobrenadante, a normalização foi feita tendo em conta que o DNA é equivalente àquele extraído das células em contacto com o extrato aquoso, dado que a única diferença na composição de ambas as amostras é a presença/ausência de mucilagens.

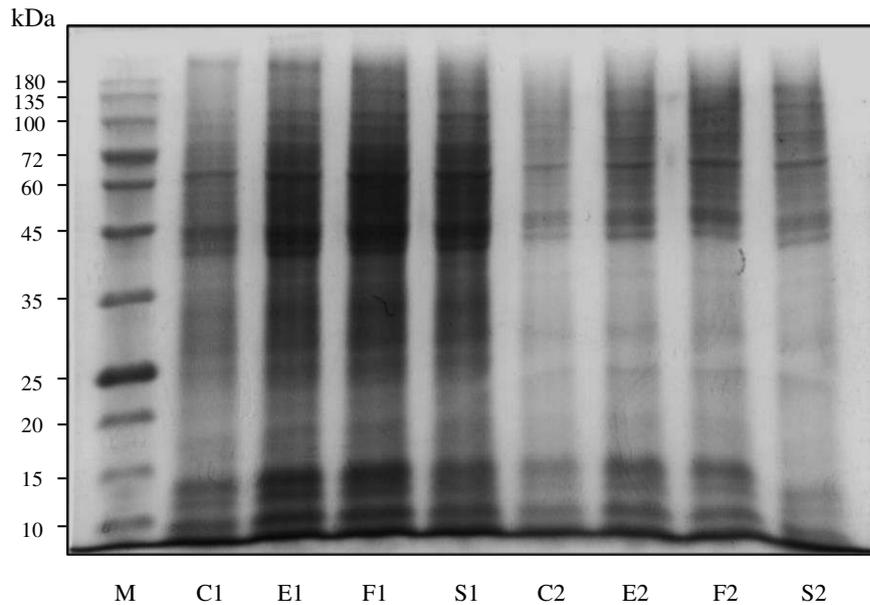


Figura 4.28 – Análise eletroforética desnaturante (SDS-PAGE), normalizada pela quantidade de DNA, das proteínas totais de células Hep-G2, após 24h de contacto com as amostras em estudo: M – Marcador de peso molecular; C1 e C2 – Expressão proteica das células expostas apenas a meio de cultura, concentração total e diluição 1/2, respetivamente; E1 e E2 – Expressão proteica das células expostas ao extrato aquoso, concentração total e diluição 1/2, respetivamente; F1 e F2 – Expressão proteica das células expostas à fração III, concentração total e diluição 1/2, respetivamente; S1 e S2 – Expressão proteica das células expostas ao sobrenadante, concentração total e diluição 1/2, respetivamente.

Analisando o eletroforegrama obtido, observa-se que a expressão proteica foi semelhante nas três amostras em estudo, contudo a intensidade das bandas de cada um dos poços difere consoante as condições a que as células estiveram sujeitas durante as 24 h. A intensidade das bandas das proteínas das células controlo é menor quando comparada com a das amostras, no entanto a sua quantidade de DNA é superior, tal como se discutiu no ponto 4.7.2. A intensidade das bandas das proteínas quando as células estiveram em contacto com a fração III é ligeiramente superior. Esta comparação entre as diferentes intensidades foi corroborada recorrendo ao programa *ImageJ*, que permitiu obter a intensidade de cada banda para as diferentes amostras e controlo (Figura 4.29).

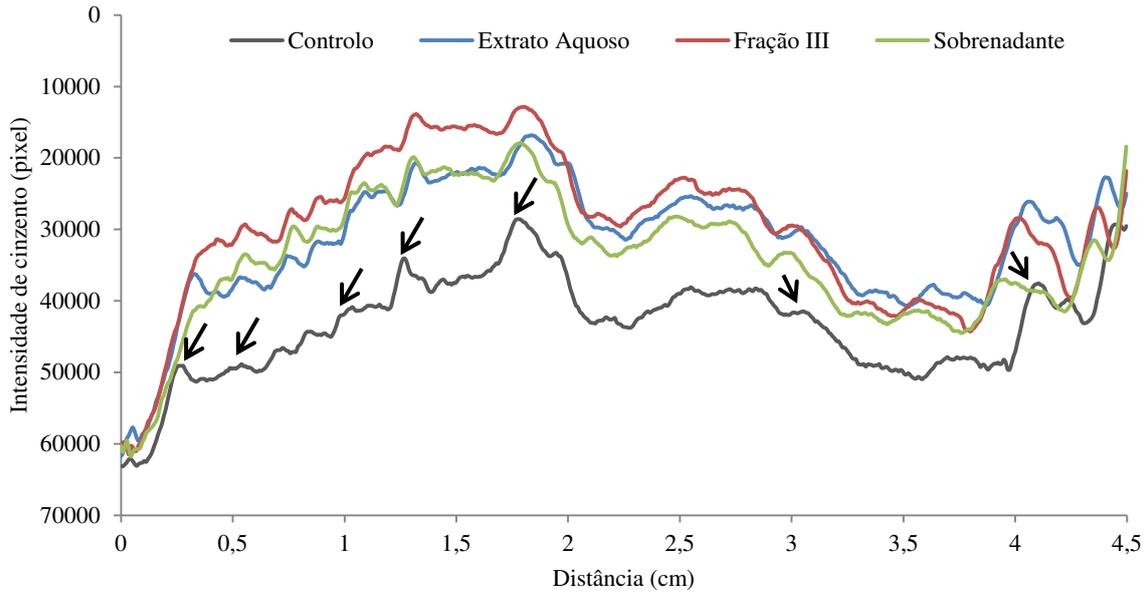


Figura 4.29 – Gráfico da intensidade (*pixel*) de cada banda obtida no gel de eletroforese, normalizado pela quantidade de DNA, em função da distância percorrida (cm) para as células controlo, em contacto com o extrato aquoso, com a fração III e com o sobrenadante.

Analisando os dados obtidos, observa-se que o perfil proteico para as diferentes amostras é bastante idêntico, sendo difícil perceber em que proteínas ocorrem modificações. Todavia, é possível realçar zonas onde parece estar a existir alguma alteração a nível proteico em relação às células controlo, assinaladas com setas. Assim sendo, o próximo passo consistiu na análise da intensidade destas bandas, através do cálculo das suas áreas, o que vai permitir concluir com maior precisão se houve, de facto, alterações ou não (Tabela 4.8). Para além disso, com recurso à equação 3.6, calculou-se também o peso molecular aproximado destas bandas.

Tabela 4.8 - Valores da distância percorrida (cm), peso molecular (kDa) e da área das bandas correspondentes às proteínas das células em contacto com o meio (controlo), com o extrato aquoso, com a fração III e com o sobrenadante.

| Distância (cm) | PM (kDa) | Área das bandas (u.a.) | | | |
|----------------|----------|------------------------|----------------|------------|--------------|
| | | Controlo | Extrato Aquoso | Fração III | Sobrenadante |
| 0,2 | 162,79 | 529 | 919 | - | - |
| 0,5 | 133,72 | 157 | 174 | 257 | 294 |
| 1,0 | 96,34 | 383 | 647 | 454 | 812 |
| 1,3 | 79,13 | 521 | 257 | 232 | 304 |
| 1,7 | 60,88 | 2694 | 1869 | 1666 | 1918 |
| 3,0 | 25,95 | 397 | 590 | 793 | 747 |
| 4,0 | 13,47 | 1654 | 2457 | 3065 | 1586 |

Tendo em conta os dados obtidos, tanto pela Figura 4.29 como pela Tabela 4.8, é possível observar que o perfil da expressão proteica nos quatro casos não apresenta grandes variações, uma vez que se confirmou a presença das mesmas bandas para os diferentes casos, exceto para uma das proteínas. No entanto, quando as células estiveram em contacto com a fração III e com o sobrenadante, existe uma banda a, aproximadamente, 163 kDa que desaparece. Quando as células estiveram em contacto com o extrato aquoso, essa mesma banda aparece com maior intensidade, sendo que ambos os resultados estão de acordo com os obtidos pela análise por HPLC, em que há o desaparecimento de um péptido no caso da fração III e, no extrato aquoso, esse péptido aparece com uma absorvência maior (Figura 4.27). Contudo, estes resultados não são indicativos de que as células deixam de produzir esta proteína, podem apenas indicar que a sua expressão é tão baixa que a eletroforese deixa de ser sensível para a detetar.

Não foi possível encontrar estudos nesta área que relacionassem as xantonas identificadas neste trabalho experimental e possíveis alterações na proteómica das células cancerígenas, contudo, Fu *et al.* concluíram, durante as suas investigações, que a 1,3,6,7-tetra-hidroxixantona tem influência no crescimento celular e na apoptose de células do carcinoma hepatocelular ^[125]. Os estudos de proteómica realizados por estes investigadores revelaram que dezoito proteínas sofrem alterações a nível de expressão quando se encontram em contacto com a xantona referida, o que poderá também ter influência na viabilidade celular. Uma das proteínas que sofre alterações é a 14-3-3 σ , associada em diversos processos biológicos, incluindo a progressão do ciclo celular e a morte celular. Deste modo, o silenciamento desta proteína desempenha um papel fundamental no desenvolvimento do carcinoma.

Em suma, os resultados obtidos nesta parte do trabalho revelaram-se bastante promissores, sendo possível constatar que tanto o extrato aquoso como a fração III são responsáveis por alterações nas proteínas das células Hep-G2, sendo necessário recorrer a ensaios mais específicos, como a espetrometria de massa, de modo a perceber que proteínas estão a sofrer alterações e que modificações são estas. É importante realçar também que todos os métodos de normalização têm uma grande probabilidade de não funcionar se o número de células for muito baixo, devida à baixa sensibilidade dos métodos utilizados.

Para além disso, apesar de os cromatogramas obtidos por HPLC-DAD para o extrato aquoso e para o sobrenadante serem praticamente iguais, o seu comportamento a nível celular é bastante diferente. De facto, não foi possível calcular o valor de IC₅₀ para o sobrenadante usando a mesma gama de concentração que foi utilizada para as restantes amostras, enquanto na eletroforese foi possível observar diferenças a nível da expressão proteica para ambas as amostras. Das amostras avaliadas nesta parte do trabalho, foi a fração III, rica em xantonas, que se revelou a mais promissora, apresentando uma maior atividade citotóxica e revelando uma maior capacidade de interferir na expressão das proteínas celulares. De realçar que, o facto de as células que estiveram em contacto com esta fração, apresentarem uma menor quantidade de DNA, se pode dever à capacidade que as xantonas têm de se intercalar com o DNA, podendo influenciar o desenvolvimento do carcinoma. Assim, a diferença de valores no passo de quantificação, pode significar que existe um menor número de células após as células estarem em contacto com as respetivas amostras.

Na extração do DNA, e conseqüente análise dos péptidos por HPLC, existe um grande obstáculo a ser ultrapassado, que é o facto de não sabermos qual a protease responsável pela quebra das proteínas, uma vez que o *kit* utilizado não descreve qual é, e, para além disso, se a protease não for específica, mais difícil vai ser identificar a proteína que sofre alterações através de apenas um péptido.

5 – CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

O trabalho laboratorial discutido nesta dissertação permitiu concluir que a planta *Centaurium erythraea* possui compostos, nomeadamente xantonas, que apresentam atividades biológicas com potencial aplicação a doenças cardiovasculares e neurodegenerativas.

Após a obtenção do extrato aquoso desta planta, recorreram-se a dois processos de purificação, que permitiram trabalhar com uma amostra constituída apenas por compostos fenólicos (Sobrenadante) e com outra rica em xantonas (Fração III). Este trabalho permitiu também perceber que os eluentes, utilizados durante a análise dos extratos por HPLC-DAD, levam a uma alteração dos compostos iniciais, muito provavelmente por hidrólise ácida, e que isto se traduz em bioatividades totalmente diferentes. Concluiu-se neste estudo que os eluentes ACN e TFA são os que originam menos perda de atividade biológica e que o uso do evaporador rotativo para secar as amostras pode levar também a uma possível degradação dos compostos, sendo, por isso, mais benéfico secar as amostras no liofilizador.

Já a utilização dos solventes orgânicos (metanol e etanol) para a extração dos compostos, de um modo geral, não se demonstrou mais vantajosa, quer nos estudos de avaliação da atividade antioxidante e enzimática, quer na determinação da citotoxicidade. Com base no perfil cromatográfico obtido para estes dois casos e para o extrato aquoso, verifica-se que a maior diferença é a quantidade de composto maioritário extraído (gentiopicróside).

Através da quantificação dos fenóis totais, observou-se que o extrato aquoso é aquele que apresenta uma maior quantidade destes compostos por mg de extrato.

A fração III foi a que permitiu obter melhores resultados nos ensaios enzimáticos de inibição da AChE, bem como nos ensaios em células Hep-G2. De facto, a fração III foi a que apresentou um maior potencial citotóxico das diferentes amostras estudadas, apesar de nenhuma delas se ter revelado citotóxica. Para além disso, nos ensaios preliminares realizados, observou-se que as células que estiveram em contacto com esta fração apresentaram diferenças mais significativas no perfil proteico, havendo alterações na quantidade de algumas proteínas e, na eletroforese, há uma banda que desaparece, quando se compara o poço do controlo com o da fração III. Por HPLC-DAD analisou-se qualitativamente o conteúdo peptídico celular, tendo-se observado, mais uma vez, que existem alterações a nível das proteínas. Conclui-se, então, que as xantonas se podem qualificar para o desenvolvimento de agentes preventivos e terapêuticos no combate ao cancro, nomeadamente na inibição da proliferação em células Hep-G2.

Por sua vez, o extrato aquoso revelou ser um inibidor bastante promissor da HMGR e demonstrou também a melhor atividade antioxidante para os ensaios de eliminação do radical DPPH e para a inibição da lipoperoxidação, tendo-se verificado uma correlação entre a quantidade de fenóis totais e a atividade antioxidante de *C. erythraea*. É importante realçar ainda que não interessa apenas concentrar os compostos fenólicos por miligrama de extrato, mas também conseguir otimizar ao máximo as atividades biológicas das amostras.

Em suma, tendo por base os resultados obtidos nesta dissertação, pode presumir-se, então, que esta planta poderia ajudar nos mecanismos endógenos de defesa e de proteção do corpo humano contra o stress oxidativo. A ingestão desta infusão contribuirá para o aumento das defesas antioxidantes do organismo, protegendo-o dos efeitos deletérios causados pelas espécies reativas de oxigénio, bem como para o tratamento de doenças cardiovasculares e do foro digestivo.

Conclusão e perspectivas futuras

Os resultados obtidos ao longo deste trabalho laboratorial revelaram-se bastante promissores, principalmente nos estudos de proteómica. Assim, seria importante realizar mais alguns estudos:

- Avaliar a capacidade de inibição da captura de radicais de óxido nítrico com o gentiopicrósido e com a curcumina, de forma a explicar molecularmente o facto de, neste ensaio, a capacidade antioxidante ter sido diferente;

- Analisar a fração III por espetrometria de massa, com o objetivo de identificar mais derivados de xantonas que sejam responsáveis pela bioatividade desta fração;

- Pesquisar métodos que permitam obter xantonas isoladas, aperfeiçoando os métodos de recolha e secagem das amostras;

- Realizar de novo os ensaios de citotoxicidade e da análise do perfil proteico com as xantonas isoladas;

- Estudar se os compostos fenólicos existentes neste extrato possuem a capacidade de atravessar a membrana celular;

- Identificar a proteína que sofreu alterações quando as células estiveram em contacto com a fração III e com o sobrenadante;

- Estudar a interação da fração III com DNA puro, por UV-vis, espectroscopia de FTIR e de fluorescência, de forma a avaliar se os derivados de xantonas se intercalam com o DNA, impedindo, então, que as células se reproduzam;

- Realizar eletroforeses bidimensionais, utilizando as amostras estudadas neste trabalho, de forma a obter informação mais específica acerca das alterações das proteínas celulares, tornando mais fácil identificar em que proteínas ocorrem modificações;

- Elucidar o alvo biológico exato dos derivados de xantonas, o que proporcionará melhores oportunidades para que esses compostos sejam desenvolvidos como potentes fármacos na luta contra o cancro.

Referências Bibliográficas

1. Siler, B. *et al.* Secoiridoid glycosides as a marker system in chemical variability estimation and chemotype assignment of *Centaureum erythraea* Rafn from the Balkan Peninsula. *Ind. Crops Prod.* **40**, 336–344 (2012).
2. He, Y. M. *et al.* The anti-inflammatory secoiridoid glycosides from *Gentianae Scabrae Radix*: The root and rhizome of *Gentiana scabra*. *J. Nat. Med.* **69**, 303–312 (2015).
3. Subotić, A., Jevremović, S. & Grubišić, D. Influence of cytokinins on in vitro morphogenesis in root cultures of *Centaureum erythraea*-Valuable medicinal plant. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. **120**, 386–390 (2009).
4. Brudzińska-Kosior, A. *et al.* Metal contents in *Centaureum erythraea* and its biometry at various levels of environmental pollution. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **80**, 349–354 (2012).
5. Mifsud, S. http://www.maltawildplants.com/GENT/Centaureum_erythraea.php. (2010).
6. Piatczak, E., Wielanek, M. & Wysokinska, H. Liquid culture system for shoot multiplication and secoiridoid production in micropropagated plants of *Centaureum erythraea* Rafn. *Plant Sci.* **168**, 431–437 (2005).
7. Tahraoui, A., Israili, Z. H. & Lyoussi, B. Acute and sub-chronic toxicity of a lyophilised aqueous extract of *Centaureum erythraea* in rodents. *J. Ethnopharmacol.* **132**, 48–55 (2010).
8. Kumarasamy, Y., Nahar, L., Cox, P. J., Jaspars, M. & Sarker, S. D. Bioactivity of secoiridoid glycosides from *Centaureum erythraea*. *Phytomedicine* **10**, 344–347 (2003).
9. Bruneton, J. Composés phénoliques, shikimates, acétates. in *Pharmacognosie: phytochimie, plantes médicinales* (ed. Tec&Doc) (Lavoisier, 2009).
10. Jerković, I. *et al.* Volatile organic compounds from *Centaureum erythraea* rafn (Croatia) and the antimicrobial potential of its essential oil. *Molecules* **17**, 2058–2072 (2012).
11. Rai, A. *et al.* High-throughput sequencing and de novo transcriptome assembly of *Swertia japonica* to identify genes involved in the biosynthesis of therapeutic metabolites. *Plant Cell Rep.* **35**, 2091–2111 (2016).
12. Ramakrishna, A. & Ravishankar, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal. Behav.* **6**, 1720–1731 (2011).
13. Tiwari, R. & Rana, C. S. Plant secondary metabolites: a review. *Int. J. Eng. Res. Gen. Sci.* **3**, 661–670 (2015).
14. Olivoto, T. *et al.* Plant secondary metabolites and its dynamical systems of induction in response to environmental factors : A review. *African J. Agric. Res.* **12**, 71–84 (2017).
15. Sluis, W. G. van der. Chemotaxonomical Investigations of the Genera *Blackstonia* and *Centaureum* (Gentianaceae). in *Plant Systematics and Evolution* **149**, 253–286 (1985).
16. Huang, W.-Y., Cai, Y.-Z. & Zhang, Y. Natural Phenolic Compounds From Medicinal Herbs and Dietary Plants: Potential Use for Cancer Prevention. *Nutr. Cancer* **62**, 1–20 (2010).
17. Balasundram, N., Sundram, K. & Samman, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* **99**, 191–203 (2006).
18. Randhir, R., Lin, Y. T. & Shetty, K. Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **13**, 295–307 (2004).
19. Ghasemzadeh, A. & Ghasemzadeh, N. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *J. Med. Plants Res.* **5**, 6697–6703 (2011).
20. Castellano, G., Tena, J. & Torrens, F. Classification of Phenolic Compounds by Chemical Structural Indicators and Its Relation to Antioxidant Properties of *Posidonia Oceanica* (L.) Delile. *MATCH Commun. Math. Comput. Chem.* **67**, 231–250 (2012).

Referências Bibliográficas

21. Deng, J. *et al.* Extraction Optimization of Polyphenols from Waste Kiwi Fruit Seeds (*Actinidia chinensis* Planch.) and Evaluation of Its Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties. *Molecules* **21**, (2016).
22. Roleira, F. M. F. *et al.* Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. *Food Chem.* **183**, 235–258 (2015).
23. Gutierrez-Orozco, F. & Failla, M. L. Biological activities and bioavailability of mangosteen xanthenes: A critical review of the current evidence. *Nutrients* **5**, 3163–3183 (2013).
24. Shagufta & Ahmad, I. Recent insight into the biological activities of synthetic xanthone derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **116**, 267–280 (2016).
25. Jiang, D.-J., Dai, Z. & Li, Y.-J. Pharmacological Effects of Xanthenes as Cardiovascular Protective Agents. *Cardiovasc. Drug Rev.* **22**, 91–102 (2004).
26. Shan, T. *et al.* Xanthenes from Mangosteen Extracts as Natural Chemopreventive Agents: Potential Anticancer Drugs. *Curr. Mol. Med.* **11**, 666–677 (2011).
27. Franklin, G., Conceição, L. F. R., Kombrink, E. & Dias, A. C. P. Xanthone biosynthesis in *Hypericum perforatum* cells provides antioxidant and antimicrobial protection upon biotic stress. *Phytochemistry* **70**, 60–68 (2009).
28. Banjanac, T., Dragicevic, M. & Siler, B. Chemodiversity of two closely related tetraploid *Centaureum* species and their hexaploid hybrid: Metabolomic search for high-resolution taxonomic classifier. *Phytochemistry* **140**, 27–44 (2017).
29. Vranová, E., Coman, D. & Gruissem, W. Network Analysis of the MVA and MEP Pathways for Isoprenoid Synthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **64**, 665–700 (2013).
30. Miettinen, K. *et al.* The seco-iridoid pathway from *Catharanthus roseus*. *Nat. Commun.* **5**, 1–11 (2014).
31. Jensen, S. R. & Schripsema, J. Chemotaxonomy and pharmacology of Gentianaceae. in *Gentianaceae Systematics and Natural History* **4**, 573–631 (Cambridge University Press, 2002).
32. Geu-Flores, F. *et al.* An alternative route to cyclic terpenes by reductive cyclization in iridoid biosynthesis. *Nature* **492**, 138–142 (2012).
33. Sampaio-Santos, M. I. & Kaplan, M. A. C. Biosynthesis Significance of Iridoids in Chemosystematics. *J. Braz. Chem. Soc.* **12**, 144–153 (2001).
34. Aberham, A., Pieri, V., Croom, E. M., Ellmerer, E. & Stuppner, H. Analysis of iridoids, secoiridoids and xanthenes in *Centaureum erythraea*, *Frasera caroliniensis* and *Gentiana lutea* using LC-MS and RP-HPLC. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **54**, 517–525 (2011).
35. Morton, J. F. Mucilaginous plants and their uses in medicine. *J. Ethnopharmacol.* **29**, 245–266 (1990).
36. Balke, D. T. & Diosady, L. L. Rapid aqueous extraction of mucilage from whole white mustard seed. *Food Res. Int.* **33**, 347–356 (2000).
37. Assi, O. *et al.* Characterization of the Mucilages of Four Food Plants, *Abelmoschus esculentus*, *Beilschmiedia mannii*, *Corchorus olitorius*, and *Irvingia gabonensis*, from Côte d'Ivoire. *Biotechnol. J. Int.* **19**, 1–10 (2017).
38. Edmond Ghanem, M. *et al.* Mucilage and polysaccharides in the halophyte plant species *Kosteletzkya virginica*: Localization and composition in relation to salt stress. *J. Plant Physiol.* **167**, 382–392 (2010).
39. Sepúlveda, E., Sáenz, C., Aliaga, E. & Aceituno, C. Extraction and characterization of mucilage in *Opuntia* spp. *J. Arid Environ.* **68**, 534–545 (2007).
40. Valentão, P. *et al.* Antioxidant Activity of *Centaureum erythraea* Infusion Evidenced by Its

- Superoxide Radical Scavenging and Xanthine Oxidase Inhibitory Activity. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 3476–3479 (2001).
41. Pisoschi, A. M. & Pop, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur. J. Med. Chem.* **97**, 55–74 (2015).
 42. Sabharwal, S. S. & Schumacker, P. T. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nat. Rev. Cancer* **14**, 709–721 (2014).
 43. Lee, C. *et al.* Antioxidant Activity of Brown Soybean Ethanolic Extracts and Application to Cooked Pork Patties. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* **36**, 359–368 (2016).
 44. Sugimoto, H., Yamanishi, Y., Iimura, Y. & Kawakami, Y. Donepezil hydrochloride (E2020) and other acetylcholinesterase inhibitor. *Curr. Med. Chem.* **7**, 303–339 (2000).
 45. Yiannopoulou, K. G. & Papageorgiou, S. G. Current and future treatments for Alzheimer's disease. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* **6**, 19–33 (2013).
 46. Pescosolido, N., Pascarella, A., Buomprisco, G. & Rusciano, D. Critical Review on the Relationship between Glaucoma and Alzheimer's Disease. *Adv. Ophthalmol. Vis. Syst.* **1**, 1–14 (2014).
 47. Tribut, O., Polard, E., Ferrer, D. B. & Allain, H. Clinically Significant Drug Interactions with Cholinesterase Inhibitors. *CNS Drugs* **17**, 947–963 (2003).
 48. Massoud, F. & Gauthier, S. Update on the Pharmacological Treatment of Alzheimer's Disease. *Curr. Neuropharmacol.* **8**, 69–80 (2010).
 49. Roseiro, L. B., Rauter, A. P. & Serralheiro, M. L. M. Polyphenols as acetylcholinesterase inhibitors: Structural specificity and impact on human disease. *Nutr. Aging* **1**, 99–111 (2012).
 50. Racchi, M., Mazzucchelli, M., Porrello, E., Lanni, C. & Govoni, S. Acetylcholinesterase inhibitors: Novel activities of old molecules. *Pharmacol. Res.* **50**, 441–451 (2004).
 51. Holden, M. & Kelly, C. Use of cholinesterase inhibitors in dementia. *Adv. Psychiatr. Treat.* **8**, 89–96 (2002).
 52. Karczmar, A. G. *Exploring the vertebrate central cholinergic nervous system.* (Springer, Boston, 2007). doi:10.1007/978-0-387-46526-5
 53. Miao, Y., He, N. & Zhu, J.-J. History and New Developments of Assays for Cholinesterase Activity and Inhibition. *Chem. Rev.* **110**, 5216–5234 (2010).
 54. Tsopelas, N. D. & Marin, D. B. Cholinergic Treatments of Alzheimer's Disease. *Funct. Neurobiol. Aging* **1**, 475–486 (2001).
 55. O'Dea, C. J., Brookes, J. H. & Wattoo, D. A. The efficacy of treatment of patients with severe constipation or recurrent pseudo-obstruction with pyridostigmine. *Int. J. Colorectal Dis.* **12**, 540–548 (2010).
 56. Bharucha, A. E. *et al.* A randomised controlled study of the effect of cholinesterase inhibition on colon function in patients with diabetes mellitus and constipation. *Gut* **62**, 708–715 (2013).
 57. Choudhury, A., Rahyead, A. & Kammermeier, J. The use of pyridostigmine in a child with chronic intestinal pseudo-obstruction. *Pediatrics* **141**, 404–407 (2018).
 58. Kim, T. S. *et al.* Acute colonic pseudo-obstruction in postchemotherapy complication of brain tumor treated with neostigmine. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **29**, 420–422 (2007).
 59. Leuven, S. I. van & Kastelein, J. J. Atorvastatin. *Expert Opin. Pharmacother.* **6**, 1191–1203 (2005).
 60. Miles, B. Review of Lipoproteins. 1–6 (2003).
 61. Lin, S.-H., Huang, K.-J., Weng, C.-F. & Shiuan, D. Exploration of natural product ingredients as inhibitors of human HMG-CoA reductase through structure-based virtual screening. *Drug*

Referências Bibliográficas

- Des. Devel. Ther.* **9**, 3313–3324 (2015).
62. da Costa, R. F. *et al.* Explaining statin inhibition effectiveness of HMG-CoA reductase by quantum biochemistry computations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14**, 1389–1398 (2012).
63. Singh, N., Tamariz, J., Chamorro, G. & Medina-Franco, J. L. Inhibitors of HMG-CoA reductase: current and future prospects. *Mini-Reviews Med. Chem.* **9**, 1272–1283 (2009).
64. Harrington, P. J. Lipitor® (Atorvastatin Calcium). in *Pharmaceutical Process Chemistry for Synthesis: Rethinking the Routes to Scale-Up* 294–359 (John Wiley & Sons, Inc, 2011). doi:10.1002/9780470909775.ch9
65. Sharma, H., Parihar, L. & Parihar, P. Review on cancer and anticancerous properties of some medicinal plants. *J. Med. Plants Res.* **5**, 1818–1835 (2011).
66. Kopnin, B. P. Targets of oncogenes and tumor suppressors: key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. *Biochem. Biokhimiia* **65**, 2–27 (2000).
67. Kalyanaraman, B. Teaching the basics of cancer metabolism: Developing antitumor strategies by exploiting the differences between normal and cancer cell metabolism. *Redox Biol.* **12**, 833–842 (2017).
68. Lee, E. Y. H. P. & Muller, W. J. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, 1–18 (2010).
69. No Title. Available at: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. (Accessed: 6th September 2018)
70. Benetou, V., Lagiou, A. & Lagiou, P. Chemoprevention of cancer: current evidence and future prospects. *F1000Research* **4**, 1–10 (2015).
71. Ramos, S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol. Nutr. Food Res.* **52**, 507–526 (2008).
72. Bozunovic, J., Zivkovic, S., Glamoclija, J. & Ciric, A. In vitro and in vivo transformations of *Centaurium erythraea* secoiridoid glucosides alternate their antioxidant and antimicrobial capacity. *Ind. Crop. Prod.* **111**, 705–721 (2018).
73. Agbor, G., Vinson, J. & Donnelly, P. Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay. *Int. J. Food Sci. Nutr. Diet.* **3**, 147–156 (2014).
74. Oliveira, A. C. De *et al.* Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Quim. Nova* **32**, 689–702 (2009).
75. Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, E. M., Garrido, J. & Borges, F. Hydroxycinnamic acid antioxidants: An electrochemical overview. *Biomed Res. Int.* **2013**, 1–11 (2013).
76. Falé, P. L. *et al.* Antioxidant and anti-acetylcholinesterase activity of commercially available medicinal infusions after in vitro gastrointestinal digestion. *J. Med. Plants Res.* **7**, 1370–1378 (2013).
77. Gonçalves, S., Gomes, D., Costa, P. & Romano, A. The phenolic content and antioxidant activity of infusions from Mediterranean medicinal plants. *Ind. Crops Prod.* **43**, 465–471 (2013).
78. Tokur, B. & Korkmaz, K. The effects of an iron-catalyzed oxidation system on lipids and proteins of dark muscle fish. *Food Chem.* **104**, 754–760 (2007).
79. Dorđević, M. *et al.* *Centaurium erythraea* methanol extract protects red blood cells from oxidative damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* **202**, 172–183 (2017).
80. Sakat, S. S., Juvekar, A. R. & Gambhire, M. N. In-vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of methanol extract of *Oxalis corniculata* linn. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2**, 146–155 (2010).

81. Boora, F., Chirisa, E. & Mukanganyama, S. Evaluation of Nitrite Radical Scavenging Properties of Selected Zimbabwean Plant Extracts and Their Phytoconstituents. *J. Food Process.* **2014**, 1–7 (2014).
82. Frasco, M. F., 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**, 360–375 (2005).
83. Mozzicafreddo, M., Cuccioloni, M., Eleuteri, A. M. & Angeletti, M. Rapid reverse phase - HPLC assay of HMG-CoA reductase activity. *J. Lipid Res.* **51**, 2460–2463 (2010).
84. Baskaran, G. *et al.* HMG-CoA reductase inhibitory activity and phytoconstituent investigation of *Basella alba* leaf extract as a treatment for hypercholesterolemia. *Drug Des. Devel. Ther.* **9**, 509–517 (2015).
85. Stockert, J. C., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., Horobin, R. W. & Villanueva, Á. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem.* **114**, 785–796 (2012).
86. Omega Bio-Tek. E. Z. N. A. ® Gel Extraction Kit Manual. 1–16 (2016).
87. Barata, S. V. *Centaurium erythraea* : Identificação de compostos e atividades biológicas Agradecimentos. (FCUL, 2014).
88. Valentao, P., Areias, F., Amaral, J., Andrade, P. & Seabra, R. Tetraoxygenated xanthenes from *Centaurium erythraea*. *Nat. Prod. Lett.* **14**, 319–323 (2000).
89. Domon, B. & Costello, C. E. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconj. J.* **5**, 397–409 (1988).
90. Assia, B. *et al.* Polyphenols Content and Antioxidant Activities of Selected Algerian Plants Used for Gastro-duodenal Ulcers. *Der Pharma Chem.* **8**, 88–99 (2016).
91. Bouyahya, A., Bakri, Y., Belmehdi, O. & Et-t, A. Phenolic extracts of *Centaurium erythraea* with novel antiradical, antibacterial and antileishmanial activities. *Asian Pacific J. Trop. Dis.* **7**, 433–439 (2017).
92. Nastasijević, B. *et al.* Inhibition of myeloperoxidase and antioxidative activity of *Gentiana lutea* extracts. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **66**, 191–196 (2012).
93. Panda, S. S., Chand, M., Sakhuja, R. & Jain, S. C. Xanthenes as Potential Antioxidants. *Curr. Med. Chem.* **20**, 4481–4507 (2013).
94. Kumarasamy, Y., Nahar, L. & Sarker, S. D. Bioactivity of gentiopicoside from the aerial parts of *Centaurium erythraea*. *Fitoterapia* **74**, 151–154 (2003).
95. Kiliç, I., Yesiloglu, Y. & Bayrak, Y. Investigation on the antioxidant activity of roots and stem of *colchicum turcicum* L. *Asian J. Chem.* **26**, 5–9 (2014).
96. Attanayake, A. P. & Jayatilaka, K. A. P. W. Evaluation of antioxidant properties of 20 medicinal plant extracts traditionally used in Ayurvedic medicine in Sri Lanka. *Indian J. Tradit. Knowl.* **15**, 50–56 (2016).
97. Zeb, A. & Ullah, F. A Simple Spectrophotometric Method for the Determination of Thiobarbituric Acid Reactive Substances in Fried Fast Foods. *J. Anal. Methods Chem.* **2016**, 1–5 (2016).
98. Venkatachalam, H., Nayak, Y. & Jayashree, B. S. Evaluation of the Antioxidant Activity of Novel Synthetic Chalcones and Flavonols. *Int. J. Chem. Eng. Appl.* **3**, 216–219 (2012).
99. Upadhyay, R., Chaurasia, J. K., Tiwari, K. N. & Singh, K. Antioxidant property of aerial parts and root of *phyllanthus fraternus* webster, an important medicinal plant. *Sci. World J.* **2014**, 1–7 (2014).
100. Sreejayan, N. & Rao, M. N. A. Nitric oxide scavenging activity by curcuminoids. *J Pharm*

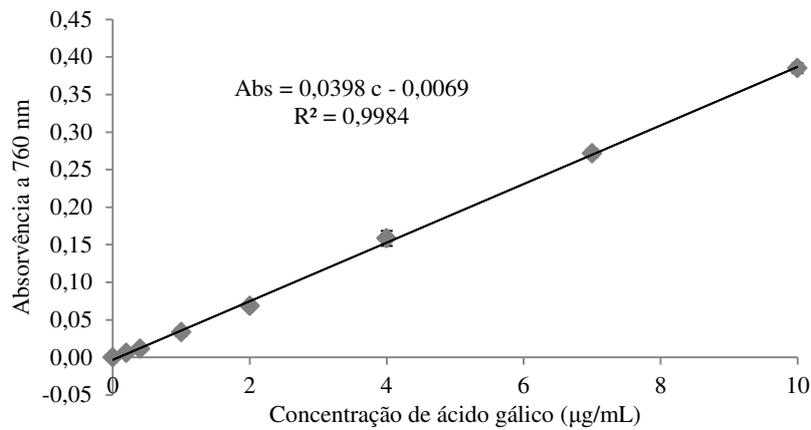
Referências Bibliográficas

- Pharmacol* **49**, 105–107 (1997).
101. Ham, B., Bharti, V. & Mehta, A. Investigation of Antioxidant Potential of Methanolic Extract of *Swertia chirata*. **4**, 1345–1355 (2014).
 102. Senol, F. S., Yagci Tuzun, C., Toker, G. & Orhan, I. E. An in vitro perspective to cholinesterase inhibitory and antioxidant activity of five *Gentiana* species and *Gentianella caucasea*. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **63**, 802–812 (2012).
 103. Šiler, B. *et al.* Centauries as underestimated food additives : Antioxidant and antimicrobial potential. *Food Chem.* (2014). doi:10.1016/j.foodchem.2013.10.007
 104. Urbain, A., Marston, A., Queiroz, E. F., Ndjoko, K. & Hostettmann, K. Xanthones from *Gentiana campestris* as new acetylcholinesterase inhibitors. *Planta Med.* **70**, 1011–1014 (2004).
 105. Hajimehdipoor, H., Esmaeili, S., Shekarchi, M., Emrarian, T. & Naghibi, F. Investigation of some biologic activities of *swertia longifolia* boiss. *Res. Pharm. Sci.* **8**, 253–259 (2013).
 106. Bhatt, J., Vaidya, H., Khanna, V., Patel, N. & Goyal, R. In silico docking studies for designing potent anti-diabetic derivatives of swertiamarin with enzyme HMG COA reductase. *Mol. Cytogenet.* **7**, 97 (2014).
 107. Peffley, D. M. & Gayen, A. K. Plant-Derived Monoterpenes Suppress Hamster Kidney Cell 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Synthesis at the Post- Transcriptional Level. *J. Nutr.* **133**, 38–44 (2003).
 108. Falé, P. L. *et al.* Evaluation of cholesterol absorption and biosynthesis by decoctions of *Annona cherimola* leaves. *J. Ethnopharmacol.* **150**, 718–723 (2013).
 109. Singh, D. K., Banerjee, S. & Porter, T. D. Green and black tea extracts inhibit HMG-CoA reductase and activate AMP kinase to decrease cholesterol synthesis in hepatoma cells. *J. Nutr. Biochem.* **20**, 816–822 (2009).
 110. Zheng, X.-X. *et al.* Green tea intake lowers fasting serum total and LDL cholesterol in adults : a meta-analysis of 14 randomized controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.* **94**, 601–610 (2011).
 111. Davies, M. J. *et al.* Black Tea Consumption Reduces Total and LDL Cholesterol in Mildly Hypercholesterolemic Adults. *Am. Soc. Nutr. Sci.* **133**, 3298–3302 (2003).
 112. Wood, W. G., Igbavboa, U. & Eckert, G. P. Is Hypercholesterolemia a Risk Factor for Alzheimer’s Disease? *Mol. Neurobiol.* **31**, 185–192 (2005).
 113. Saravi, S., Saravi, S. & Arefidoust, A. The beneficial effects of HMG-CoA reductase inhibitors in the processes of neurodegeneration. *Metab. Brain Dis.* **32**, 949–965 (2017).
 114. Goldstein, F. C. *et al.* Effects of hypertension and hypercholesterolemia on cognitive functioning in patients with Alzheimer’s disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **22**, 336–342 (2008).
 115. Refolo, L. M. *et al.* Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer’s amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol. Dis.* **7**, 321–331 (2000).
 116. Okonogi, S., Duangrat, C. & Anuchpreeda, S. Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. *Food Chem.* **103**, 839–846 (2007).
 117. Tian, H., Liu, L., Yang, T. J. & Wang, Y. Q. Gentiopicroside inhibits cancer cell growth in OVCAR-3 ovary cancer cells through the mediation of apoptosis, loss of mitochondrial transmembrane potential and NF- κ B signalling pathway. *Biomed. Res.* **27**, 413–418 (2016).
 118. Silva, L. P. *et al.* Measurement of DNA concentration as a normalization strategy for metabolomic data from adherent cell lines. *Anal. Chem.* **85**, 9536–9542 (2013).
 119. Thermo Fisher Scientific. NanoDrop Spectrophotometers Nucleic Acid. (2010). doi:10.1038/160852a0

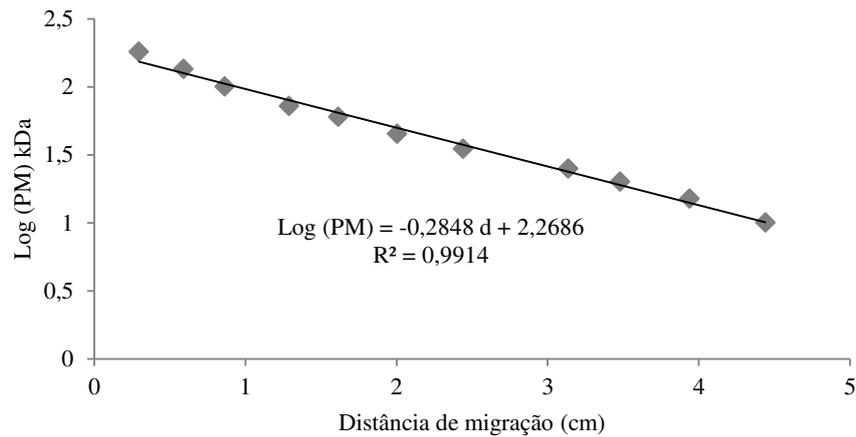
120. Matsumoto, K. *et al.* Xanthenes induce cell-cycle arrest and apoptosis in human colon cancer DLD-1 cells. *Bioorganic Med. Chem.* **13**, 6064–6069 (2005).
121. Shen, R., Wang, W. & Yang, G. DNA binding property and antitumor evaluation of xanthone with dimethylamine side chain. *J. Fluoresc.* **24**, 959–966 (2014).
122. Bellisola, G. & Sorio, C. Infrared spectroscopy and microscopy in cancer research and diagnosis. *Am. J. Cancer Res.* **2**, 1–21 (2012).
123. Kretlow, A. *et al.* FTIR-microspectroscopy of prion-infected nervous tissue. *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 948–959 (2006).
124. Saito, S. T., Silva, G., Pungartnik, C. & Brendel, M. Study of DNA-emodin interaction by FTIR and UV-vis spectroscopy. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **111**, 59–63 (2012).
125. Fu, W. M. *et al.* Apoptosis induced by 1,3,6,7-tetrahydroxyxanthone in Hepatocellular carcinoma and proteomic analysis. *Apoptosis* **17**, 842–851 (2012).

Anexos

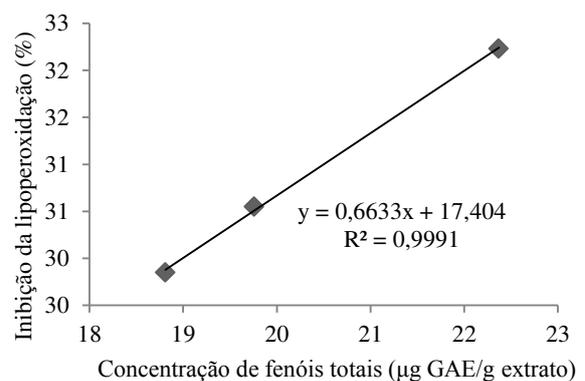
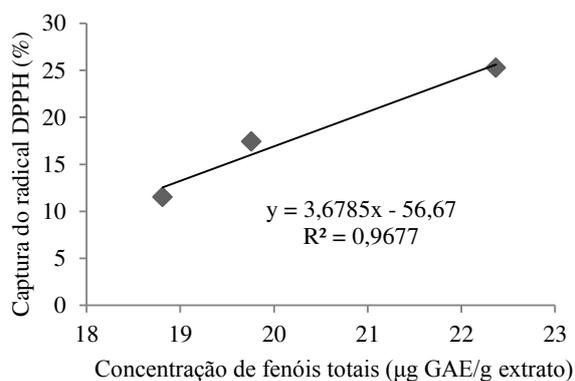
Anexo 1: Retas de calibração dos fenóis totais, onde *Abs* diz respeito à absorvência a 760 nm e *c* à concentração de ácido gálico ($\mu\text{g/mL}$)



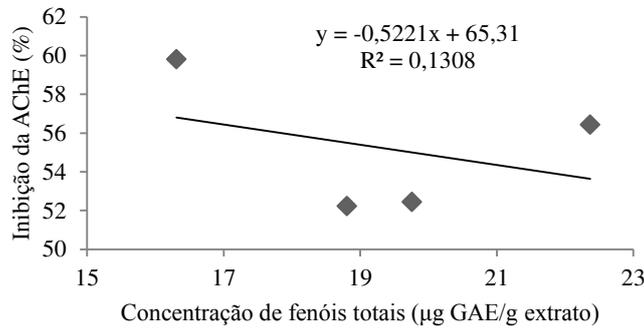
Anexo 2: Retas de calibração da eletroforese, onde $\text{Log}(PM)$ representa o logaritmo do peso molecular, em kDa, e *d* a distância de migração, em cm, das bandas relativas ao marcador



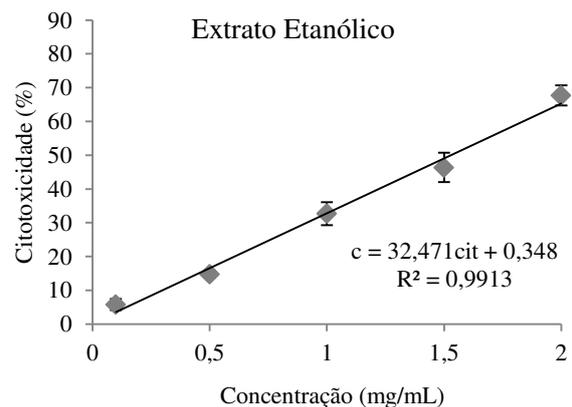
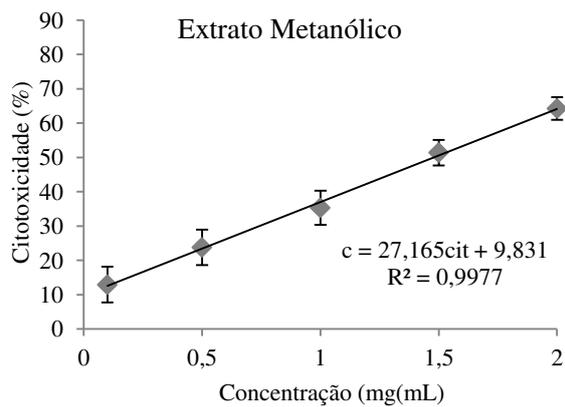
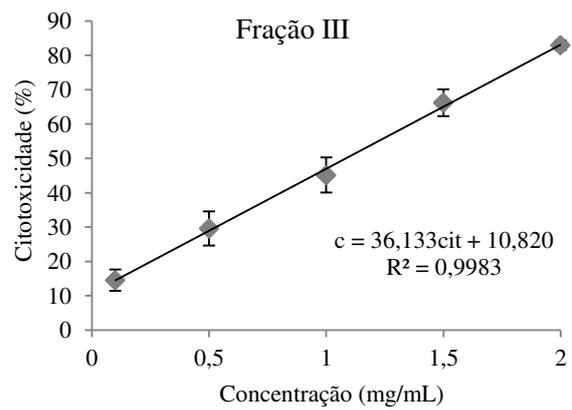
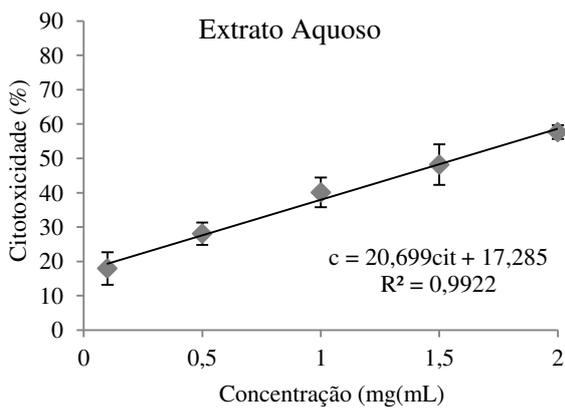
Anexo 3: Correlação entre os valores de atividade antioxidante e a concentração de fenóis existente em cada extrato

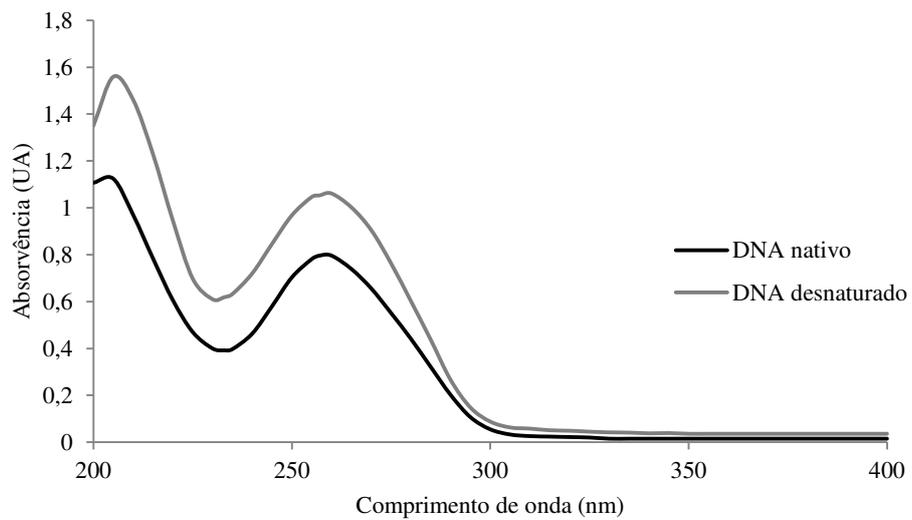


Anexo 4: Correlação entre os valores de atividade enzimática e a concentração de fenóis existente em cada extrato

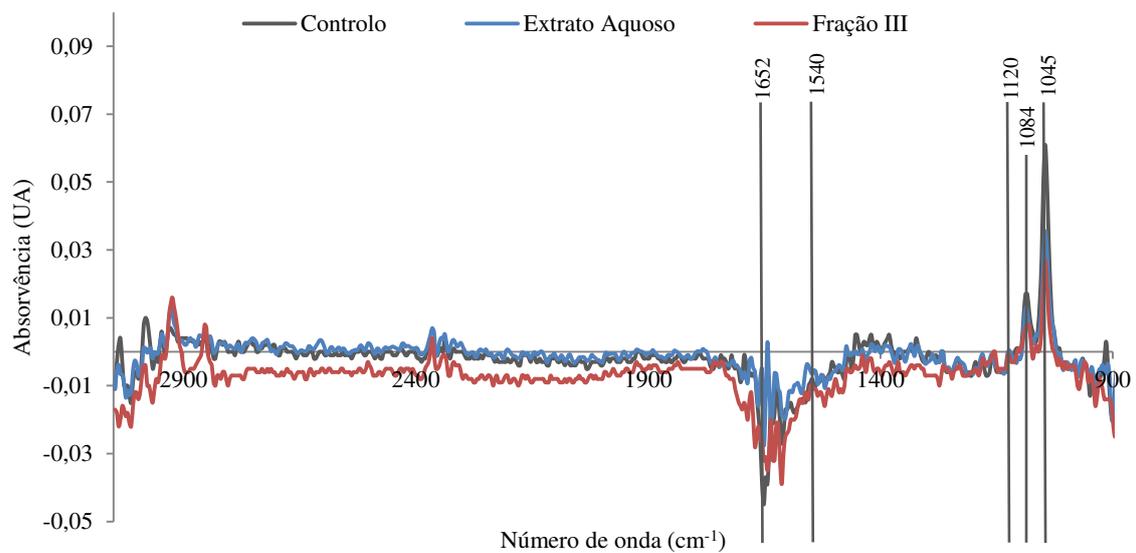


Anexo 5: Perfis citotóxicos em linhas celulares Hep-G2 para os extratos aquoso, metanólico e etanólico e para a fração III, onde c representa a concentração, em mg/mL, e cit diz respeito à citotoxicidade, em %.



Anexo 6: Espectro UV-vis do DNA dos testículos de salmão

Anexo 7: Espectro obtido através da análise por espectroscopia de FTIR para as células em contacto com meio (controlo), com o extrato aquoso e com a fração III.



Anexo 8: Cromatograma da análise dos péptidos obtidos durante a extração do DNA

