

**CATARINA ATAÍDE ROCHA FERREIRA**

**ACTIVIDADES INIBITÓRIA DE COLINESTERASES E  
ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE PLANTAS  
UTILIZADAS COMO CHÁS**

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Doutora Maria de Fátima Frazão

Orientador parte experimental: Prof.<sup>a</sup> Doutora Maria Luísa Serralheiro

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias**

**Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde**

**Lisboa**

**2012**

**CATARINA ATAÍDE ROCHA FERREIRA**

**ACTIVIDADES INIBITÓRIA DE COLINESTERASES E  
ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE PLANTAS  
UTILIZADAS COMO CHÁS**

Monografia apresentada para a obtenção de grau de

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Doutora Maria de Fátima Frazão

Orientador parte experimental:

Prof.<sup>a</sup> Doutora Maria Luísa Serralheiro

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias**

**Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde**

**Lisboa**

**2012**

## **Agradecimentos**

Esta monografia foi fruto de vários contributos, sem os quais não teria sido possível realizá-la.

O meu muito obrigado à Prof.<sup>a</sup> Doutora Maria de Fátima Frazão que para além de orientadora deste trabalho despertou o meu interesse por esta área de trabalho e tem sido uma influência positiva, despendendo o seu valioso tempo, disponibilidade, energia, apoio e sabedoria.

Agradeço à Prof.<sup>a</sup> Doutora Maria Luísa Serralheiro por orientar toda a parte experimental e permitir realizar o trabalho no Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências. Também pela sua boa disposição, disponibilidade e partilha de conhecimento.

Aos colegas de laboratório do Departamento de Química e Bioquímica em especial ao Doutor Pedro Falé que foi vital desde o início ao fim deste trabalho, pela paciência e ajuda no trabalho experimental e tratamento de dados; à Ana Margarida Rodrigues, Francesca Amaral e Pedro Cleto pelo espírito de entreajuda e bom ambiente de trabalho.

Ao Engenheiro Moniz da Ponte dos Serviços de Desenvolvimento Agrário da Secretaria Regional de Agricultura e Florestas do Governo Regional dos Açores por ter cedido amavelmente um estudo sobre o cultivo de *Annona cherimola* na Ilha de São Miguel.

Ao Sidónio por ter estado presente neste longo percurso, pela paciência, ânimo e apoio nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos e família que ajudaram a ultrapassar os momentos mais complicados, especialmente à minha mãe, pai e irmã pelo apoio ao longo desta jornada.

A todos os que directa ou indirectamente contribuíram para este trabalho.

A todos vós, Obrigado

## Resumo

Nos últimos séculos perdeu-se o interesse por uso de plantas medicinais nos países desenvolvidos, devido à evolução da síntese química de fármacos. Ressurgiu recentemente este uso para desenvolvimento de novos fármacos de patologias com múltiplos mecanismos fisiopatológicos associados devido às actividades simultâneas dos extractos.

Dos potenciais usos medicinais explorou-se a inibição da acetilcolinesterase (AChE) para problemas gastrointestinais e para terapêutica da doença de Alzheimer com menos efeitos secundários, e menor toxicidade associada.

Realizou-se um estudo de actividades antioxidante e inibitória de AChE onde as duas espécies estudadas de plantas tiveram actividade. A decocção de *A. cherimola* apresentou capacidade de actividade mais elevada de inibir Ache com um  $IC_{50}$  de  $0,627 \pm 0,028$  mg/mL e antioxidante com um  $EC_{50}$  de  $15,435 \pm 0,184$  mg/mL. Nenhum dos extractos perdeu actividade com o metabolismo *in vitro* gástrico e pancreático.

Na biodisponibilidade verificou-se que a maior parte dos compostos permeia até determinada extensão a monocamada de células Caco-2 com excepção do glucósido da quercetina. A via de transporte predominante dos compostos estudados parece ser difusão paracelular passiva.

**Palavras-chave:** Acetilcolinesterase; extractos aquosos; antioxidante; chá; metabolismo *in vitro*; biodisponibilidade; Caco-2; Alzheimer; *Fraxinus angustifolia*; *Annona cherimola*;

## Abstract

In the last centuries the use of medicinal plants in the developed countries was lost due to the progress of drug chemical synthesis. It surfaced recently because of research and development of new drugs for diseases with multiple causes, since plant extracts seem to have simultaneous actions.

From the potential medicinal uses, the inhibition of AChE was explored to treat gastrointestinal problems and for Alzheimer's disease with less side effects and toxicity.

A study of the inhibition of AChE and antioxidant activity was made, where the two species of plants showed activity. The highest activity in AChE inhibition was from *A. cherimola* decoction with an  $IC_{50}$  of  $0,627\pm 0,028$  mg/mL and antioxidant activity with an  $EC_{50}$  of  $15,435\pm 0,184$  mg/mL. None of the extracts lost activity after gastric and pancreatic *in vitro* metabolism.

In the bioavailability, most of the compounds pass through to a certain extent the Caco-2 cell monolayer with the exception of the quercetin glucoside. The dominant transport pathway for the studied compounds appears to be paracellular passive diffusion.

**Keywords:** Acetylcholinesterase; aqueous extracts, antioxidant, tea, *in vitro* metabolism, bioavailability, Caco-2; Alzheimer; *Fraxinus angustifolia*; *Annona cherimola*;

## Abreviaturas e siglas

A $\beta$	Proteína $\beta$ -amilóide ( <i>Amyloid <math>\beta</math>-protein</i> )
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AChI	Iodeto de acetiltiocolina
BHA	Butil-hidroxianisol
BHI	Do inglês <i>Brain Heart Infusion</i>
BHT	Hidroxitolueno butilado ( <i>Butylated hydroxytoluene</i> )
BuChE	Butirilcolinesterase
EC <sub>50</sub>	Concentração eficiente ( <i>Efficient concentration</i> ) correspondente a 50% de extinção do radical
D. A.	Doença de Alzheimer
DMEM	Do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil ( <i>2,2-diphenylpicrylhydrazyl</i> )
DTNB	5,5'-Ditiobis[2-ácido nitrobenzóico]
FBS	Soro fetal bovino ( <i>Fetum bovine serum</i> )
HBSS	Do inglês <i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HCl	Ácido clorídrico
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfónico
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta resolução ( <i>High Precision Liquid Chromatography-Diod Array Detector</i> )
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória ( <i>Inhibitory concentration</i> ) correspondente a 50% de inibição
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Cloreto de magnésio hexahidratado
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-1-il]-2,5-difenil-tetrazólio
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
Papp	Coefficiente de permeabilidade aparente
PBS	Tampão de sais de fosfatos (do inglês <i>Phosphates buffer solution</i> )
Pen-Strep	Penicilina e estreptomicina ( <i>Penycilin and streptomycin</i> )
ROS	Espécies reactivas de oxigénio ( <i>Reactive oxygen species</i> )
TFA	Ácido trifluoracético
Tr	Tempo de retenção

## Índice

Agradecimentos .....	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iii
Abreviaturas e siglas.....	iv
1 Introdução – Utilização de plantas para fins medicinais .....	1
2 Objectivos .....	4
3 Revisão bibliográfica .....	5
3.1 Sistema colinérgico.....	5
3.1.1 Sistema colinérgico e tracto gastrointestinal.....	5
3.1.2 Sistema colinérgico e doença de Alzheimer .....	6
3.1.3 Inibidores de acetilcolinesterase em extractos de plantas .....	7
3.2 Stress oxidativo e antioxidantes .....	9
3.2.1 Antioxidantes no tratamento da doença de Alzheimer.....	9
3.3 Actividades biológicas de polifenóis .....	11
3.4 Potencial utilização de <i>F. angustifolia</i> e <i>A. cherimola</i> para fins medicinais ....	14
4 Procedimento experimental.....	17
4.1 Materiais .....	17
4.1.1 Material vegetal.....	17
4.1.2 Reagentes .....	17
4.1.3 Linha celular.....	17
4.1.4 Equipamento.....	17
4.2 Método.....	18
4.2.1 Preparação de extractos .....	18
4.2.2 Análise dos extractos por HPLC-DAD .....	18
4.2.3 Inibição AChE e actividade antioxidante .....	18
4.2.4 Digestão gastrointestinal in vitro.....	20
4.2.5 Estudo de biodisponibilidade e de permeação da barreira intestinal .....	21
4.3 Análise de dados.....	21
5 Resultados e Discussão.....	22
5.1 Identificação dos compostos maioritários dos extractos aquosos de <i>F. angustifolia</i> e <i>A. cherimola</i> .....	22
5.2 Actividades, digestões e biodisponibilidade dos extractos de <i>F. angustifolia</i> e <i>A. cherimola</i> .....	24
6 Conclusão .....	35
6.1 Perspectivas futuras.....	35
7 Referências bibliográficas .....	36



## 1 Introdução – Utilização de plantas para fins medicinais

Desde o início dos tempos que existem registos de Homens a utilizarem produtos naturais (plantas, animais e minerais) para fins medicinais. A utilização de plantas começou de modo empírico e gradualmente através da experimentação as plantas de maior interesse foram sendo seleccionadas e esse conhecimento foi sendo transmitido de geração em geração. Inicialmente a transmissão era feita de modo oral, mais tarde de modo escrito. [1]

Os primeiros documentos escritos consideram-se as placas de barro onde se encontram copiados em caracteres cuneiformes documentos sumérios e babilónicos, preservados no *British Museum*, datados de cerca de 3000 anos antes da era cristã. Outro documento relevante é o papiro de “Ebers”, decifrado em 1873 que inicia declarando “Aqui começa o livro relativo à preparação dos remédios para todas as partes do corpo humano”, sendo este o primeiro tratado médico egípcio conhecido descrevendo a utilização de sene, zimbro, funcho e rícínio. Demonstra um profundo conhecimento plantas medicinais e tóxicas.[2]

Galeno, médico da corte do Imperador romano Marco Aurélio deixou um legado de formas farmacêuticas precursoras de muitas ainda utilizadas hoje em dia. Dioscórides escreve “*De Materia Medica*” em 54 e 68 DC, descrevendo os usos e ilustrando cerca de 600 plantas. Em 1563 Garcia de Orta imprime em Goa a sua obra onde enuncia fármacos até aí nunca descritos como a *Rauwolfia serpentina*, que só no séc. XX é que passa a ser utilizada para extracção do alcaloide reserpina.[1]

No séc. XIX iniciou-se o isolamento e compostos com actividade farmacológica e síntese química para obtenção de novas moléculas, desde modo o interesse no uso medicinal de plantas diminuiu muito nos países ocidentais, enquanto nos em desenvolvimento continuou a ter um grande peso.[1]

Por volta dos anos 60 surge um reavivado interesse em plantas medicinais, que para além do uso clássico de infusões, cozimentos e tinturas, surgem novos fármacos vegetais em formas farmacêuticas mais elaboradas como comprimidos, cápsulas e nebulizados. Este fenómeno verifica-se devido ao aumento da informação sobre os compostos activos, farmacologia e maior número de ensaios clínicos, tal como novas formas de administração e formas farmacêuticas. Para tal acontecer foi necessário uma garantia de controlo de qualidade e métodos analíticos para estes produtos à base de plantas e a actualização das Farmacopeias que até então eram as fontes mais utilizadas de plantas para uso medicinal. O aumento de investigação nesta área

e o aparecimento de publicações especializadas com rigor científico e qualidade também foram grandes contributos para o desenvolvimento e regresso do uso de plantas medicinais.[1]

Quando os actuais métodos de isolamento identificam e evidenciam as acções farmacológicas dos compostos das plantas é possível correlacionar um extracto com a sua actividade biológica. A indústria farmacêutica tem utilizado este conhecimento para obter um composto de uma planta já utilizada numa determinada terapêutica, como por exemplo no caso da dedaleira a partir da qual foi possível extrair a digoxina (cardiotónico) e formular um novo medicamento. No entanto a planta medicinal devido à complexidade de compostos presentes (nem todos biologicamente activos) podem apresentar compostos que influenciam a acção de outros, podendo evitar oxidação ou hidrólise dos biologicamente activos. Também podem influenciar na absorção, em sistemas enzimáticos ou até mesmo facilitar a passagem através de membranas, por estes motivos considera-se que o extracto de uma dada planta possa conter uma maior actividade do que o composto activo isolado. [1]

Como escrito em Rodrigues (2011) *“Apesar do grande número de espécies vegetais existentes no planeta, a maioria é desconhecida sob o ponto de vista científico, sendo que entre 250-500 mil espécies vegetais, somente cerca de 5% têm sido estudadas fitoquimicamente (...)”*, como tal a etnofarmacologia pode ter um papel relevante. É um campo de investigação interdisciplinar que contempla a observação, identificação, descrição e investigação experimental dos ingredientes e efeitos destes de drogas indígenas, é de elevada importância no estudo da medicina tradicional, sendo uma exploração científica interdisciplinar de agentes biologicamente activos tradicionalmente utilizados ou observados pelo Homem.[3]

A medicina tradicional caracteriza-se pela soma do conhecimento e prática baseada na teoria, crenças e experiências características de diferentes culturas, que são utilizadas para manter saúde tal como para prevenir, diagnosticar melhorar ou tratar doenças físicas ou mentais. Já medicamentos à base de plantas incluem desde plantas, partes destas, preparações de plantas tal como produtos naturais que contenham material vegetal como ingrediente activo. Em alguns países Asiáticos e Africanos, cerca de 80% da população ainda depende deste tipo de medicina e preparações como cuidado de saúde primário e os medicamentos à base de plantas são a forma mais lucrativa da medicina tradicional (quer em países desenvolvidos como em vias de desenvolvimento) gerando bilhões de dólares de lucro. [4]

Para além do uso tradicional de séculos de existência é de enorme importância estudar os mecanismos de acção e segurança das plantas medicinais, pois podem ser de vital importância em doenças cujas moléculas químicas já não conseguem manter uma terapêutica eficaz, como no caso dos antibióticos. Saber o que uma chávena de chá contém hoje é possível, garantir que é seguro e que até pode melhorar a qualidade de vida.

## 2 Objectivos

Rever a utilização de extractos de plantas pela sua actividade inibitória de colinesterases e actividade antioxidante. Também foi pesquisada a informação existente sobre a composição e as utilizações tradicionais de extractos aquosos de *Fraxinus angustifolia* e *Annona cherimola*, para determinar os seus potenciais como inibidores da actividade enzimática da acetilcolinesterase e actividade antioxidante.

Determinar experimentalmente as actividade inibitória da acetilcolinesterase e antioxidante de extractos aquosos de *F. angustifolia* e *A. cherimola*, preparados como infusões e decocções. Quantificar as alterações destas actividades quando sujeitos a digestão *in vitro* por suco gástrico e suco pancreático, e analisar a biodisponibilidade dos compostos dos extractos;

### 3 Revisão bibliográfica

#### 3.1 Sistema colinérgico

O sistema colinérgico caracteriza-se pela presença de várias enzimas e dos neurotransmissores butirilcolina e acetilcolina (ACh), a última é sintetizada a partir de acetil-coA e colina pela colina acetiltransferase (ChAT). A colina presente no sistema nervoso central (SNC) foi transportada pela circulação sanguínea após os precursores (glicerofosfocolina, fosforilcolina e a fosfatidilcolina) a terem originado. [5] Para além desta fonte de colina é possível a recaptação após a libertação e degradação de ACh, que após síntese é armazenada em vesículas sinápticas no interior do neurónio pré-sináptico. O ciclo de vida da ACh inicia-se com o aumento da sua concentração na vesícula, libertação do conteúdo desta por exocitose para a fenda sináptica e ligação desta com os seus receptores colinérgicos, presentes em ambas as membranas (pré e pós-sináptica). Após efectuar a ligação e desencadear o seu efeito, é hidrolisada na fenda sináptica pela acetilcolinesterase (AChE) em colina e acetato, a colina recaptada e inicia-se um novo ciclo.[5, 6]

No sistema colinérgico existem dois tipos de colinesterases: as enzimas com elevada afinidade para a ACh; e as enzimas com elevada afinidade para a butirilcolina. As primeiras encontram-se em todas as sinapses colinérgicas e ligadas à membrana neuronal (AChE), já as segundas ou butirilcolinesterases (BChE) estão presentes em todos os tecidos, no entanto a AChE apresenta maior eficiência catalítica que se deve às suas diferentes isoformas (globulares ou assimétricas).[6]

Os efeitos desencadeados pela ACh foram classificados em 1914 por *Dale* em efeitos muscarínicos e nicotínicos, de acordo com as ligações que os subtipos de receptores colinérgicos eram capazes de efectuar (com nicotina e muscarina) com elevada afinidade. [6] Os receptores colinérgicos nicotínicos intervêm em diversos processos como no desenvolvimento neuronal, o processo de aprendizagem e memória; já os receptores colinérgicos muscarínicos quando activados no sistema nervoso periférico (SNP) induzem o relaxamento dos vasos sanguíneos, diminuição da frequência e força cardíaca e constrição das vias respiratórias; no sistema nervoso central (SNC) estão envolvidos também em funções cognitivas (memória; atenção; aprendizagem), em respostas emocionais, na modulação do sono e estado de vigília.[6]

##### 3.1.1 Sistema colinérgico e tracto gastrointestinal

O sistema digestivo caracteriza-se pela sua capacidade de autorregulação através de hormonas produzidas e neurotransmissores do sistema nervoso vegetativo (simpático

ou parassimpático). Portanto estas hormonas e neurotransmissores estão sempre em contínua interacção, estimulando ou inibindo as funções digestivas: função hepática, pancreática ou regulação da motilidade. O sistema nervoso vegetativo tem elevada importância no normal funcionamento do aparelho digestivo, como tal o efeito de algumas plantas (nocivo ou benéfico) directamente ou indirectamente sobre o sistema nervoso vegetativo pode alterar o bom funcionamento do sistema digestivo.[2]

O sistema colinérgico tem um papel fundamental na homeostase entérica, sendo a ACh através do sistema nervoso parassimpático, um dos reguladores biológicos de transporte iónico intestinal. Para além da AChE, existe nos mamíferos uma segunda enzima colinérgica já referida, a butirilcolinesterase que não é específica, mas é abundante no intestino contribuindo também para a degradação da ACh. Apesar do sistema nervoso entérico ser secundário no tracto GI, quando existe estímulo colinérgico de nervos extrínsecos que projectam fibras para o intestino passa a haver um controlo dos acontecimentos fisiológicos a decorrer no intestino. Para além desta estimulação nervosa a ACh é um importante regulador do fluxo de iões, que condiciona a direcionalidade dos movimentos de água no intestino.[5]

Os inibidores de AChE como estimulam a motilidade gastrointestinal podem ser utilizados na terapêutica de problemas associados a uma motilidade gastrointestinal inadequada como procinéticos. [7].

### **3.1.2 Sistema colinérgico e doença de Alzheimer**

A doença de Alzheimer (D. A.) caracteriza-se por uma doença neurodegenerativa progressiva com modificações neuroquímicas em várias vias bioquímicas como no sistema colinérgico observadas, indicando uma disfunção colinérgica nestes doentes relacionada com as alterações de aprendizagem, memória e processos cognitivos característicos desta doença.[6, 8]

A terapêutica utilizada nesta doença com mais sucesso tem sido a “hipótese colinérgica”. [8] Farmacologicamente os inibidores da AChE como o donepezilo e a tacrina, inibem a AChE e aumentam a concentração de ACh na fenda sináptica. Um antagonista não competitivo do receptor glutaminérgico tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), a memantina é utilizada desde o estado moderado a grave da doença. Apesar de a tacrina melhorar para além da cognição, apatia, ansiedade e distúrbios mentais é hepatotóxica e é necessário monitorizar a função hepática para realizar ajustes de dose, enquanto o donepezilo tem menos efeitos secundários. No entanto os efeitos secundários destes fármacos englobam desde náuseas, vómitos e diarreias a bradicardia e tonturas, para além de terem como contra indicado doença ulcerosa

péptica, alcoolismo e doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC). Estes fármacos acabam por só estabilizar o estado do doente por um curto período de tempo.[6].

Devido à problemática da terapêutica actual existe uma procura de novas moléculas em plantas medicinais com actividade biológica neste sistema. Como tal as plantas utilizadas tradicionalmente como potenciadores de memória e inibidores de AChE têm potencial para desenvolver terapias sem a toxicidade associada a compostos sintetizados quimicamente.[8]

A D. A. está também associada a um processo inflamatório que é desencadeado pela presença de proteínas  $\beta$ -amilóide (A $\beta$ ), que liberta radicais livres de oxigénio (ROS) e outros compostos, capazes de actuar como mensageiro secundário na inflamação e danificar constituintes celulares. A utilização de antioxidantes pode atenuar as vias de inflamação (captando ROS) sendo útil no tratamento da D. A.. [8]

Como referido anteriormente o renovado interesse em plantas medicinais (pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos) para estas patologias com múltiplos mecanismos fisiopatológicos, prende-se para além de uma redução dos efeitos adversos, nas actividades simultâneas demonstradas pelos extractos.[9]

### **3.1.3 Inibidores de acetilcolinesterase em extractos de plantas**

Uma grande variedade de plantas tem apresentado actividade inibidora reversível de AChE e podendo ser relevantes para o tratamento de doenças neurodegenerativas, como *Bacopa monniera* e *Ginkgo biloba* que são estimulantes cognitivos bem conhecidos na medicina tradicional indiana e chinesa.[10]

A *Salvia* é das plantas mais investigadas para o tratamento de demência, tem um dos géneros mais numerosos da família Lamiaceae e cresce em várias partes do mundo, para além da actividade inibitória da AChE, tem actividade nicotínica.[10]

O alcaloide huperzina A é um potente inibidor reversível utilizado na China para tratamento de miastenia gravis e D. A., este alcaloide provém de um musgo (*Huperzia serrata*) que era utilizado para tratar hematuria, contusões, entorses e num estudo verificou-se que melhorava os processos de retenção da memória em ratos idosos cognitivamente débeis. Noutro estudo duplo cego já utilizando a huperzina A isolada, verificou-se melhorias significativas na memória e comportamento de pacientes de D. A., sendo mais selectivo para AChE do que para BChE e menos tóxica do que os inibidores de síntese (tacrina e donepezilo).[10]

Com a descoberta da galantamina, um alcalóide inibidor competitivo e reversível da AChE, a partir dos bolbos e flores de *Galanthus woronowii*, a maioria dos estudos têm-se centrado em inibidores alcalóides como o mencionado e a fisiostigmina, sendo que actualmente mais de 35 alcalóides foram testados e apresentaram actividade inibitória de AChE. Para além dos alcalóides têm-se verificado inibição com terpenóides, cumarinas e glicósidos, especificamente em chás (infusão) constata-se um efeito inibitório dramático com polifenóis. [10, 11]

Como descrito em Okello *et al.* (2004), o chá preto e verde têm a actividade inibitória de AChE, sendo o chá verde o mais potente. Já o café foi o inibidor mais fraco dos três apresentando valores de IC<sub>50</sub> de 0,41±0,004 mg/mL; 0,06±0,005 mg/mL para o chá preto e 0,03±0,004 mg/mL para o chá verde. Para a inibição da BChE ambos os chás demonstraram inibição dependente de concentração: 0,05±0,005 mg/mL e 0,05±0,007 mg/mL para o chá verde e preto respectivamente, quanto ao café não apresentou qualquer tipo de inibição nesta enzima. Vários estudos demonstraram que ambos os chás possuem propriedades antioxidantes, anticarcinogénica, neuroprotectora e hipocolesterolémica, o estudo enunciado acrescenta à lista potencial de melhorar a função colinérgica podendo ter um minorar os efeitos de deficit de ACh, como a perda de funções cognitivas.[12] .

Para além do estudo anterior, em Bilušid *et al.* (2008) verificou-se o efeito inibidor de AChE associado ao efeito antioxidante para apurar os benefícios dos efeitos em simultâneo. Testaram infusões aquosas (chá) de 1,36 g/L e averiguaram que polifenóis como os flavonóides presentes na noqueira (*Juglans regia L.*), podem ser responsáveis pela actividade anti-amiloidogénica e que a salva (*Salvia officinalis L.*), perpétua (*Helichrysum arenarium L.*) e hortelã-pimenta (*Mentha piperita L.*) apresentam inibição AChE reduzida (27-33%). Os extractos aquosos deste estudo que apresentaram maior inibição da enzima foram de noqueira e de morango (*Fragaria x ananassa L.*).[11]

Antes de se poder recomendar o uso de rotina destes compostos e extractos, é necessário avaliar a toxicidade potencial e eficácia clínica em ensaios maiores para obtenção de mais dados, pois os existentes não são suficientes para o correcto uso com o mínimo de riscos.[10]

## 3.2 Stress oxidativo e antioxidantes

Actualmente existe uma grande preocupação com o uso de antioxidantes, e a necessidade de fazerem parte de um organismo equilibrado. Os agentes oxidantes ou radicais livres, responsáveis pelo stress oxidativo ao nível celular, são átomos de hidrogénio com um protão e um único electrão. As espécies reactivas de oxigénio (ROS) são todos aqueles em que o electrão desemparelhado se encontra no oxigénio, como no caso do superóxido ( $O_2\cdot^-$ ) e hidroxilo ( $OH\cdot$ ), mas também derivados de oxigénio não radicais como peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ). Para o azoto também ocorre o mesmo fenómeno reagindo o óxido nítrico ( $NO\cdot$ ) directamente com determinadas moléculas.[13].

Radicais livres e outras espécies reactivas são frequentemente gerados *in vivo* ou oriundos de fonte externa e contribuem para o envelhecimento celular e doença coronária, através da destabilização de membranas, quebra de ADN e por oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL). A existência dos radicais é equilibrada por sistemas antioxidantes de defesa, auxiliado por mecanismos de reparação que implicam enzimas como a superóxido dismutase ou a catálase, também pode ser equilibrada exogenamente pelo consumo de antioxidantes como o  $\alpha$ -tocoferol ou vitamina C. As lesões causadas nos tecidos em caso de doença ou não, provocam um desequilíbrio entre oxidantes/antioxidantes desencadeando stress oxidativo, que por sua vez pode causar danos a moléculas essenciais como dependendo do grau dos danos e moléculas afectadas pode agravar um estado patológico ou mesmo desenvolver-se um.[13, 14].

### 3.2.1 Antioxidantes no tratamento da doença de Alzheimer

A D. A., descrita anteriormente possui vários mecanismos biológicos que podem explicar a relação entre antioxidantes provenientes da alimentação e a doença. Uma das possibilidades é a diminuição de stress oxidativo no cérebro, reduzindo assim danos causados no ADN, neurónios e acumulação de  $A\beta$ . [15] Prevenindo estes danos as probabilidades de risco de demência diminuem consideravelmente. A D. A. está associada a risco cardiovascular e a aterosclerose, esta última desencadeia-se por processos oxidativos (lipoperoxidação), deste modo ao ingerir uma elevada quantidade de antioxidantes o papel da aterosclerose na D. A. é reduzido.[15]

O foco da investigação em antioxidantes de plantas medicinais está relacionado com a extracção a baixo custo destes compostos, podendo substituir os de uso industrial sintéticos como o butil-hidroxianisol (BHA) e hidroxitolueno butilado (BHT) em que alguns estudos evidenciam a possibilidade de propriedades cancerígenas.[14]

Vários extractos de plantas são ricos em compostos polifenólicos (flavonóides) que protegem a planta da radiação ultravioleta, demonstram elevados efeitos antioxidantes, havendo ligação entre alguns compostos e capacidade destes captarem radicais livres formados durante o processo inflamatório. [9, 14]

### 3.3 Atividades biológicas de polifenóis

Qualquer organismo vivo possui vias bioquímicas essenciais ao seu funcionamento, na base destas vias estão inúmeros constituintes químicos, sejam estes hormonas, transportadores ou até mesmo energia. As plantas também possuem constituintes químicos das vias metabólicas comuns a todas as plantas, no entanto para lidar com desafios do seu meio ambiente, para ganhar vantagem na competição por nutrientes, na defesa contra radiação ultravioleta e agressão de agentes patogénicos produzem metabolitos secundários. [16, 17]

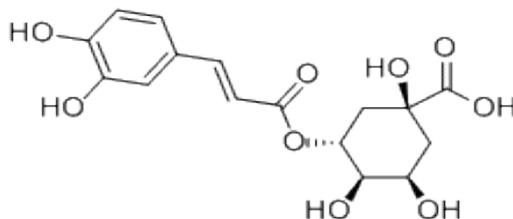
Os polifenóis são constituintes do metabolismo secundário, caracterizam-se por anéis aromáticos hidroxilados com uma cadeia lateral variável. [18] A sua síntese pode ser obtida por duas vias, a do acetato ou a via do xiquimato.[2]

Os fenóis simples são o grupo de polifenóis com menor ocorrência nas plantas com excepção das Eriáceas e Rosáceas que são caracterizadas pela presença de derivados de hidroquinona, que tem actividade antisséptica.[2]

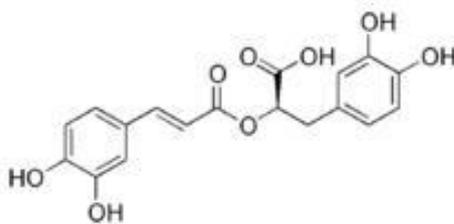


**Figura 3.1:** Estrutura química de hidroquinona. Figura adaptada de <http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---H/Hydroquinone.htm> a 22-10-2012;

Os ácidos fenólicos são mais abundantes, e distinguem-se em derivados de ácido benzoico ou em derivados de ácido cinâmico. Os ácidos gálico e salicílico são derivados de ácido benzoico, o ácido salicílico é utilizado para estados febris, gripais e dores articulares. [2] Os derivados de ácidos cinâmicos incluem ácidos como o cumárico, cafeico, ferrúlico e sináptico e ácidos sob a forma de ésteres e álcoois como o ácido clorogénico e ácido rosmarínico que é utilizado como hipocolesteromiante e recentemente como antioxidante. [17]

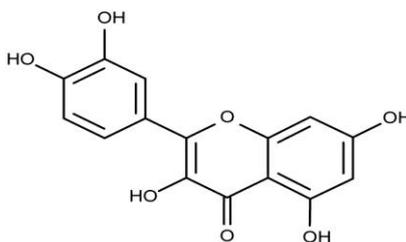


**Figura 3.2:** Estrutura química de ácido clorogénico. Figura adaptada de [http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB2478906.htm](http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB2478906.htm) a 22-10-2012;

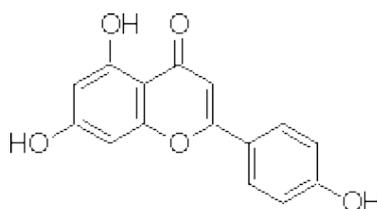


**Figura 3.3:** Estrutura química de ácido rosmarínico. Figura adaptada de <http://rosmarinicacid.com/> a 22-10-2012;

Os flavonóides são os polifenóis mais conhecidos e são essencialmente os pigmentos das plantas, têm uma estrutura de dois anéis aromáticos unidos por três carbonos. Estes dividem-se em seis subclasses consoante a funcionalidade da sua estrutura química: flavonóis; flavonas; isoflavonas; flavanonas; antocianidinas e flavanóis (proantocianidinas e catequinas). [17] A apigenina e luteolina pertencem às flavonas; a quercetina aos flavonóis e a catequina e epicatequina aos flavanóis. A acção biológica dos flavonóides é antioxidante, anti-inflamatória e inibitória de vários sistemas enzimáticos. [2, 17]



**Figura 3.4:** Estrutura química de quercetina. Figura adaptada de <http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---Q/Quercetin.htm> a 22-10-2012;

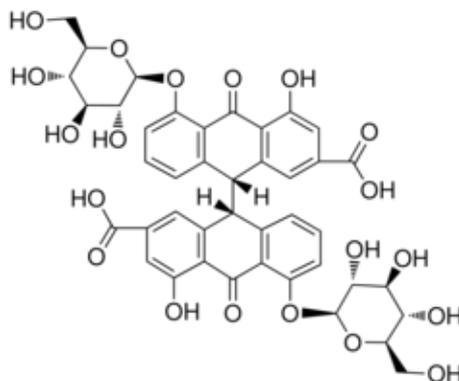


**Figura 3.5:** Estrutura química de apigenina. Figura adaptada de <http://www.activebiochem.com/Product/Apigenin.html> a 22-10-2012

Os isoflavonóides têm distribuição reduzida sendo característicos da família das Fabáceas. As isoflavonas e cumestanos são os de interesse terapêutico deste grupo pela capacidade de se ligarem aos receptores estrogénicos. [2]

As antroquinonas têm compostos como as quinonas e diantronas (formadas por duas unidades quinónicas com o seu grupo carbonilo), a importância deste grupo deve-se essencialmente aos senósidos (que são diantronas) que têm uma acção laxativa. [2] O

uso destes compostos para problemas de obstipação está generalizado, quer seja em produto natural, quer seja em fármacos comercializados com estes compostos.



**Figura 3.6:** Estrutura química de senósido A. Figura adaptada de <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/FLUKA/68909?lang=pt&region=PT> a 22-10-2012

Os polifenóis possuem mais grupos de compostos que até diferem de autor para autor. A relevância de abordar estes grupos deve-se aos seus efeitos biológicos de um ponto de vista terapêutico, portanto sendo estes os grupos de compostos fenólicos mais usados para fins curativos.

### 3.4 Potencial utilização de *F. angustifolia* e *A. cherimola* para fins medicinais

*F. angustifolia* e *A. cherimola*, evidenciados nesta revisão bibliográfica, são considerados bons candidatos a uma análise experimental de actividades (inibitória de AChE e antioxidante), devido à sua rica composição em compostos fenólicos, flavonóides verificados em Atmani *et al.* (2008) e Jyothi *et al.* (2011). A presença destes compostos comprova que estas plantas têm um elevado potencial para estas actividades, pois de acordo com Hernandez *et al.* (2010) os flavonóides para além de serem activos para actividade antioxidante, também o são para inibição de AChE. [14]. Recentemente Falé *et al.* (2012) descreveu que a inibição dos flavonóides para com esta enzima, está relacionada com a sua ligação a resíduos de aminoácidos no local de ligação activo da enzima. [19]

O *Fraxinus angustifolia* pertence à família Oleaceae, é cultivado em Portugal ao longo de cursos de água e vales. Surge na Europa em regiões não mediterrânicas, em bosques húmidos, as partes utilizadas são as folhas (folíolos) e lenho. Os compostos activos descritos para a família das Oleáceas são principalmente taninos e iridóides, mas o que distingue o género *Fraxinus* das restantes espécies da família é a presença de cumarinas. [1, 20]

O *F. angustifolia* tem uso tradicional por populações rurais na Argélia, que utilizam a casca pelas suas propriedades anti-inflamatórias, também utilizam esta planta com fins digestivos e antioxidantes. [14] Desde o tempo de Hipócrates que se utiliza folhas e casca de *F. excelsior* nativo da Europa como diurético e para reumatismo [20].

Em Atmani *et al.* (2008) verificou-se um elevado conteúdo em taninos, fenóis e flavonóides, respectivamente por ordem concentração. Já em Kostova *et al.* (2006) confirmou-se a presença de 155 compostos diferentes, em que 78 pertenciam ao grupo das cumarinas ou ao grupo dos secoiridóides no género *Fraxinus*; para o *F. angustifolia* foram identificadas 8 cumarinas, 19 secoiridóides, 4 lignanos, 3 flavonóides e 9 compostos fenólicos simples.[20]

A *A. cherimola* pertence à família das Annonaceae e género *Annona*, é originária de regiões sub-tropicais da América do sul (Equador e Peru). [21] Em Portugal esta espécie existe nas Regiões Autónomas devido às condições edafoclimáticas das ilhas (invernos suaves com ausência de geadas), foi introduzida na Madeira em 1897 e nos Açores nos finais do séc. XIX. A produção da fruta desta planta na Madeira tem um importante papel económico, pela produção anual de 1000 toneladas por ano que é

exportada. É uma árvore de porte globoso, com folha semi-caduca e com fruto em forma de coração, carnudo, aromático com sementes negras. É cultivada em solos ligeiros, profundos e frescos. [19, 21]

A *Annona cherimola* é cultivada desde os tempos do império Inca (cerca de 1200 AC) e existem evidências antropológicas que sugerem que o fruto desta planta era comum na dieta Inca. [22] No México a *A. cherimola* faz parte da flora medicinal e é utilizada para úlceras estomacais ou duodenais, diarreia e para combater parasitas. [23] Na Itália o fruto é utilizado na medicina tradicional como insecticida, como antimicrobiano, para doenças intestinais e problemas de pele. Também existem registos de uso para tratamento de problemas relacionados com o sistema nervoso, nomeadamente, como calmante, anticonvulsivante e tranquilizante (últimos da medicina tradicional mexicana). [24] Em Martínez-Vázquez *et al.*, (2012) foi provado em modelo animal as propriedades calmantes e anticonvulsivantes do extracto de hexano, mostrando evidências através do uso tradicional e modelo animal de que os compostos permeiam a barreira hemato encefálica. [23-26]

Em Jyothi *et al.* (2011) são enunciados vários estudos dos diferentes usos tradicionais desta planta como: antiparasitário pela ingestão de uma decocção de folhas e actividade antitumoral por ser uma fonte de compostos citotóxicos como acetogeninas, annomolina e annocherimolina (compostos isolados de sementes oriundas do Perú). A annomolina apresenta uma citotoxicidade selectiva contra a linha celular do cancro da próstata humano (PC-3), enquanto a annocherimolina apresenta potencial citotóxico elevado para as linhas celulares de cancro da mama (MCF-7) e do colón (HT-29).[19]

Os compostos isolados das folhas, e caules de *A. cherimola* enunciados em Jyothi *et al.* (2011) foram alcalóides, flavonóides, glicósidos, saponinas e taninos.

Nos usos tradicionais de acordo com as referências bibliográficas, o *F. angustifolia* é utilizado para fins digestivos e de obstipação e a *A. cherimola* para doenças intestinais e como calmante. Estas acções demonstram a capacidade dos extractos destas plantas estarem presentes nos locais fisiológicos do sistema colinérgico, evidenciando mais uma vez o potencial de inibição de AChE por parecer haver capacidade de permear até ao SNC e sistema nervoso entérico.[1, 14, 24, 26].

A confirmação de algumas alegações do uso tradicional através de ensaios *in vitro* das actividades biológicas, demonstram a importância de estudar estes extractos, pois deles podem surgir compostos activos muito vantajosos para terapêutica de doenças para as quais já existia uso. Como exemplo de um percurso semelhante temos a

galantamina, em que o composto isolado do extracto, neste momento é comercializado para terapêutica da D. A.. [11]

Como para haver actividade biológica é necessário que os extractos sejam sujeitos ao tracto GI, permeiem as membranas da barreira intestinal e entrem em circulação sanguínea mantendo-se activos, foi necessário verificar se a metabolização do sistema digestivo não altera quimicamente os compostos ao ponto de perderem as suas propriedades. Para simular a permeabilidade e metabolismo do epitélio intestinal foi utilizado o modelo de monocamadas de células Caco-2, por ser um dos modelos mais utilizados para estudos de biodisponibilidade.[27]

## 4 Procedimento experimental

### 4.1 Materiais

#### 4.1.1 Material vegetal

Foram utilizadas folhas e caules secos de freixo comercializado como chá em Portugal da marca “Diética”, adquirido por volta de Outubro de 2012. A colheita foi efectuada em Portugal.

As folhas de anona utilizadas foram colhidas em Maio de 2012 em Ponta Delgada, sendo estas folhas frescas de rebentos novos.

#### 4.1.2 Reagentes

Utilizou-se para HPLC-DAD água para cromatografia, metanol e ácido trifluoroacético (TFA) da Merck<sup>®</sup>. Apigenina, luteína, ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido rosmarínico, 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), AChE tipo VI-S, de enguia eléctrica, 5,5'-Ditiobis(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB), iodeto de acetilcolina (AChI) e tampão HEPES, pancreatina de pâncreas de porco, brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-1-il]-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) e dimetilsulfóxido (DMSO) e pepsina da Sigma Aldrich<sup>®</sup>

O NaCl e MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O vieram da Panreac<sup>®</sup>.

O fosfato de sódio dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) e o fosfato de sódio monobásico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) da Merck<sup>®</sup>

O DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*); glutamina; Pen-Strep (penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 U/mL); tripsina; PBS (tampão de sais fosfato); HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) e FBS (Fetum Bovine Serum) foram adquiridos à Lonza<sup>®</sup>.

#### 4.1.3 Linha celular

A linha celular utilizada foi Caco-2 (ATCC#HTB-37), tratando-se de uma linha de células epiteliais do adenocarcinoma colo-rectal. Foi cultivado em DMEM suplementado com 10% de FBS, 100U/mL de penicilina, 100U/mL de estreptomicina e 2 mM de L-glutamina a 37°C numa atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. A cada 48-72 horas o meio de cultura foi renovado. Nos estudos foram usadas as passagens 20-30.

#### 4.1.4 Equipamento

Para todas as operações essenciais utilizou-se um Heto<sup>®</sup> PowerDry 3000, para liofilizar as amostras, uma centrífugadora Mini Spin F45-12-11 da Eppendorf<sup>®</sup>.

Análise por HPLC-DAD foi realizada num VWR-Hitachi LaChrom Elite<sup>®</sup> equipado com uma coluna LiChroCART<sup>®</sup> 250-4 LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP-8 (5µm) (Merck) e *software* EZChrom Elite<sup>®</sup> (Agilent Technologies 2007).

Para espectrofotometria usou-se um espectrofotómetro M350 Double Beam UV-Vis Spectrophotometer e um espectrofotómetro multi-canal leitor de microplacas Tecan<sup>®</sup>Sunrise.

## 4.2 Método

### 4.2.1 Preparação de extractos

Para a preparação dos extractos efectuou-se uma decocção das folhas de ambas as plantas e uma infusão de *Fraxinus angustifolia*. Para a decocção colocou-se 10g de folhas em 100 mL de água destilada em ebulição durante 10 minutos. Para a infusão foi colocado 100 mL de água destilada em ebulição sobre 10 g de folhas e ao fim de 10 minutos foi filtrada em papel de filtro *Whatman* 1, efectuou-se o mesmo procedimento para a decocção.

### 4.2.2 Análise dos extractos por HPLC-DAD

A análise por HPLC-DAD foi realizada com um gradiente de eluição composto por solução A (metanol) e solução B (TFA em água MiliQ) com o seguinte método: 0 minutos: 20% A e 80% B; 20 minutos: 80% A e 20% B; 25 minutos: 80% A e 20% B; 28 minutos: 20% A e 80% B; 30 minutos: 20% A e 80% B para o extracto de *A. Cherimola*. Para o extracto de *F. angustifolia* o método utilizado foi: 0 minutos: 5% A e 95% B; 20 minutos: 50% A e 50% B; 23 minutos: 70% A e 30% B; 25 minutos: 70% A e 30% B; 28 minutos: 5% A e 95% B. Ambos os métodos utilizaram um fluxo de 1 mL/minuto, volume de injeção de 25 µL de soluções de 1 mg/mL.

### 4.2.3 Inibição AChE e actividade antioxidante

A actividade enzimática da acetilcolinesterase foi medida utilizando uma adaptação do método de Ellman, descrito em Ingkaninan *et al.* (2003); 325 µl de solução tampão HEPES 50 mM (pH 8,0), 100 µl de amostra (extrato liofilizado diluído em água ou proveniente de alíquotas da digestão enzimática) e 2,5 µl de solução de acetilcolinesterase (solução de 0,26 U/mL) foram pipetados para uma *cuvette* e a incubar durante 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado 75 µL de solução AChI (0,023 mg/mL) e 475 µL de solução DTNB (3 mM). A absorvência a 405 nm foi lida durante 5 minutos em intervalos de 30 segundos, contra um branco (em vez de possuir solução enzimática esta foi substituída o mesmo volume de

tampão HEPES 50 mM (pH 8,0) sendo assim calculada a velocidade inicial da reacção.

Efectuou-se um ensaio de controlo da reacção utilizando água destilada em vez de extracto, considerando-se este ensaio como tendo a actividade máxima (100%).

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

A percentagem de inibição da enzima foi calculada utilizando a fórmula acima em que: I é a percentagem de inibição da enzima AChE;  $V_{\text{amostra}}$  é a velocidade inicial da reacção com extracto;  $V_{\text{controlo}}$  é a velocidade inicial da reacção de controlo. Com esta fórmula calculou-se o valor de  $IC_{50}$  para cada planta

O ensaio foi efectuado em triplicado para cada de amostra e quando a densidade óptica da solução era elevada ao ponto de não permitir a leitura no espectrofotómetro, foi adaptado o volume da amostra (até 200  $\mu$ L) e o volume final corrigido para 1 mL ajustando o tampão colocado no início e efectuando um ensaio de controlo nas mesmas condições.

A actividade antioxidante dos extractos foi determinada pelo método DPPH [28], onde foram adicionados 25  $\mu$ L de extracto a 2,5 mL de solução metanólica de DPPH (0,002% DPPH em metanol). Incubou-se durante 30 minutos à temperatura ambiente e a absorvência foi lida a 517nm contra um branco de metanol em vez da solução metanólica de DPPH.

O ensaio de controlo efectuou-se com água destilada no lugar do extracto e a actividade deste ensaio representou os 100% de actividade. Os cálculos foram efectuados com a seguinte fórmula:

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

Onde AA representa a actividade antioxidante;  $A_{\text{controlo}}$  é a absorvência da solução de DPPH e  $A_{\text{amostra}}$  é a absorvência da amostra.

Tal como no ensaio anterior, este ensaio foi efectuado em triplicado para cada amostra (várias concentrações). Para o cálculo de 50% de actividade antioxidante ( $EC_{50}$ ) recorreu-se a uma análise da regressão linear, onde se verificou a actividade antioxidante em função da concentração do extracto.

#### **4.2.4 Digestão gastrointestinal in vitro**

##### ***4.2.4.1 Digestão por suco gástrico artificial***

O metabolismo *in vitro* por suco gástrico foi adaptado de Yamamoto *et al.* (1999). Adicionou-se 2,5 mL de suco gástrico ao mesmo volume de extracto. Esta solução ficou a incubar a 37°C durante 4 horas, onde amostras de 100 µL foram retiradas no início e de hora em hora, a estas foi adicionado 900 µL de metanol gelado a fim de parar a reacção. Estas amostras foram centrifugadas a 5000 G durante 5 minutos, recolheu-se o sobrenadante e utilizou-se este para análise de HPLC-DAD, ensaios de actividade antioxidante e inibitória de AChE. Este procedimento foi efectuado em triplicado e com ensaio de controlo, no qual em vez de extracto utilizou-se água destilada.

O suco gástrico (100 mL) consistia em 320 mg de pepsina, 200 mg de NaCl em HCl (pH=1,2)

##### ***4.2.4.2 Digestão por suco pancreático artificial***

O metabolismo *in vitro* por suco pancreático foi adaptado de Yamamoto *et al.* (1999). Adicionou-se 2,5 mL de suco pancreático ao mesmo volume de extracto. Esta solução ficou a incubar a 37°C durante 4 horas, onde amostras de 100 µL foram retiradas no início e de hora em hora, a estas foi adicionado 900 µL de metanol gelado a fim de parar a reacção. Estas amostras foram centrifugadas a 5000 G durante 5 minutos, recolheu-se o sobrenadante e utilizou-se este para análise de HPLC-DAD, ensaios de actividade antioxidante e inibitória de AChE, tal como no metabolismo gástrico. O ensaio foi executado em triplicado e no controlo substituiu-se o extracto por igual volume de água destilada.

O suco pancreático consistia em 250 mg de pancreatina em 10 mL de tampão sódio-fosfato 50 mM a pH=8,0

Para ambos os metabolismos foram retiradas simultaneamente alíquotas de 200 µL, centrifugadas nas mesmas condições e o sobrenadante utilizado para actividade inibitória da AChE e antioxidante com ensaios de controlo. Os ensaios foram efectuados em triplicado e com concentrações correspondentes a 50% de actividade para cada um dos ensaios e plantas.

#### **4.2.5 Estudo de biodisponibilidade e de permeação da barreira intestinal**

Para os ensaios de transporte e metabolismo as células Caco-2 foram semeadas em placas *transwell* numa densidade de  $2-4 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> em 12 poços de *transwell* com 10,5mm de diâmetro e 0,4 µm de tamanho de poro (BD Falcon™).

As monocamadas formavam-se por volta dos 21-26 dias e a sua integridade foi avaliada pela medição da permeabilidade de vermelho fenol. As membranas eram consideradas aptas para uso quando a permeabilidade do vermelho fenol passava do lado apical para o basolateral menos de 1% em uma hora. Antes de este ensaio ter sido efectuado a viabilidade celular foi testada pelo método MTT anteriormente referido, para garantir que a membrana das células se mantinha íntegra. Todas as concentrações utilizadas demonstraram 0% de toxicidade.

Após retirar o meio, procedeu-se à lavagem do poço com HBSS para retirar todo o meio de cultura. Do lado apical retira-se o HBSS e adiciona-se 500 µL de solução extracto dissolvido em HBSS. No lado baso-lateral coloca-se 1,5 mL de HBSS e incuba-se durante 6 horas a 37°C. Recolhem-se as amostras de ambos os lados do poço para análise em HPLC-DAD e adicionou-se 1 mL de HBSS para ressuspender as células do filtro, que são sujeitas a ultrassons para lisar e em seguida são centrifugadas a 5000 G durante 10 minutos. Recolhe-se o sobrenadante e analisa-se por HPLC-DAD, com as restantes amostras.

Os ensaios foram realizados em triplicado e o controlo foi efectuado utilizando solução de HBSS sem extracto colocada no lado apical.

O coeficiente de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) foi determinado utilizando a seguinte equação:

$$P_{app} = (dQ/dt)/(A \times C_0)$$

A relação  $dQ/dt$  é a constante da taxa de permeabilidade (µmol/s); A é a área da superfície da membrana (cm<sup>2</sup>) e  $C_0$  é a concentração inicial do composto (µM). A permeação do lado apical para o basolateral, foi calculada com base na proporção que permeou através da monocamada do extracto inicial. Traduz-se na divisão da concentração do lado basolateral, pela concentração do lado apical. [29]

### **4.3 Análise de dados**

O tratamento dos dados foi efectuado em Microsoft® Excel 2007, os resultados foram expressos como média ± desvio padrão e a análise da variância (*one-way ANOVA*) foi realizada com  $p = 0,05$ .

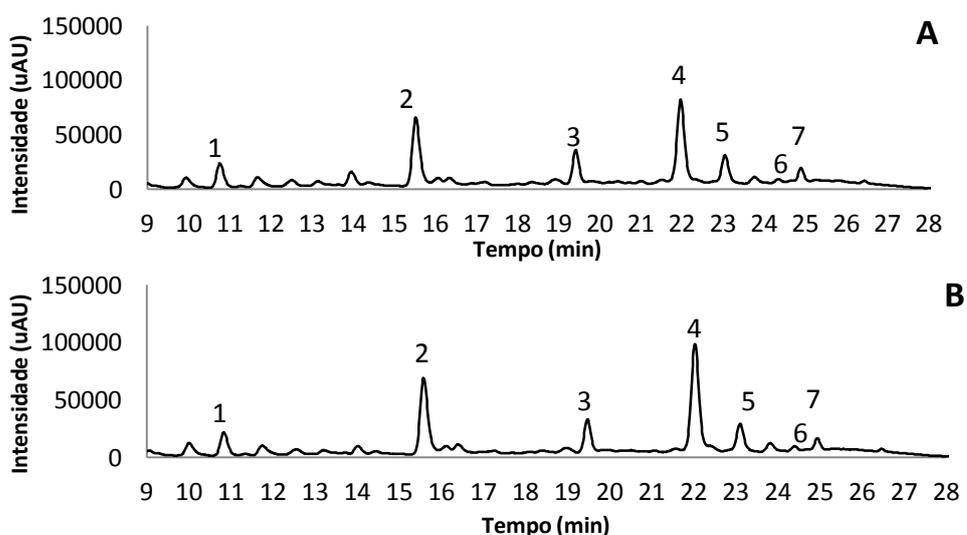
## 5 Resultados e Discussão

O trabalho desenvolvido sobre actividade inibitória de colinesterases de extractos aquosos inclui trabalho experimental incidindo sobre duas espécies de plantas utilizadas na medicina tradicional em Portugal. Uma variedade é comercializada em farmácias e espaços saúde (*F. angustifolia*) e outra segundo o uso tradicional é efectuada a “apanha” de folhas de rebentos novos para efectuar a decocção e ingerir no próprio dia. Dado o seu uso é de vital importância verificar as utilizações descritas na etnobotânica, deste modo acumulando conhecimento sobre plantas medicinais Portuguesas das quais não existem estudos suficientes.

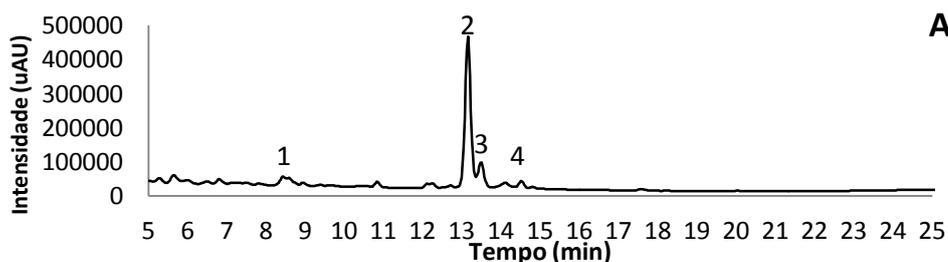
Como na preparação das plantas medicinais para consumo humano são mais comuns as extracções aquosas, foram testados extractos em infusão e extractos em decocção dado que muitas vezes o que é vulgarmente conhecido como “chá de ervas” tanto pode significar infusão como decocção.

### 5.1 Identificação dos compostos maioritários dos extractos aquosos de *F. angustifolia* e *A. cherimola*

Os extractos foram analisados por HPLC-DAD. Por comparação com padrões conhecidos foi possível identificar dois compostos, ácido clorogénico em *F. angustifolia* e rutina em *A. cherimola*. Portanto as identificações dos compostos maioritários dos extractos foram efectuadas em LC/MS e estão representados nas tabelas 5.1; 5.2. A composição obtida de *F. angustifolia* é muito semelhante à reportada para outras espécies de *Fraxinus*. [30]



**Gráfico 5.1:** **A:** Cromatograma de HLPC-DAD de *F. angustifolia* decocção; **B:** Cromatograma de HLPC-DAD de *F. angustifolia* infusão. Picos maioritários de 1 a 7.



**Gráfico 5.2: A:** Cromatograma de HPLC-DAD de *A. cherimola* decocção. Picos maioritários de 1 a 4.

Como se pode verificar pelos cromatogramas apresentados (Gráficos 5.1 e 5.2) o *F. angustifolia* apresenta sete picos maioritários quer para a infusão quer para a decocção e a *A. cherimola* dois. A identificação destes picos encontra-se nas tabelas 5.1 e 5.2.

**Tabela 5.1:** Identificação e iões detectados por LC/MS dos picos maioritários do cromatograma de HPLC-DAD de extracto aquoso de *F. angustifolia*.

Pico	Tr (min)	Ião Precursor	Ião Produto MS <sup>2</sup> /MS <sup>3</sup>	Composto
1	10,73	[M-H] 353	191 (100), 179 (88), 135 (6)	Ácido 3-O-cafeoilquínico (ácido clorogénico)
2	15,52	[M-H] 353	191 (100), 179 (7), 135 (1)	Ácido 5-O-cafeoilquínico (ácido neoclorogénico)
3	19,44	[M-H] 623	507 (2), 461 (100), 315 (1) [MS <sup>3</sup> 461: 315 (100), 297 (8), 195 (2), 179 (3), 161 (46), 153 (4), 135 (66)]	Isorhamnetina 3-rutinosido
4	21,97	[M-H] 609	343 (6), 301 (100), 271 (4), 255 (3), 179 (2) [MS <sup>3</sup> 301: 271 (77), 255 (43), 229 (4), 193 (4), 179 (100), 151 (38)]	Hesperidina
5	23,04	[M-H] 539	507 (2), 403 (2), 377 (100), 345 (6), 307 (34), 275 (15) [MS <sup>3</sup> 377: 345 (22), 307 (100), 275 (41), 149 (3)]	Oleuropeina
6	24,33	[M-H] 593	327 (2), 285 (100), 257 (3), 229 (1), 213 (1) [MS <sup>3</sup> 285: 285 (63), 267 (38), 257 (100), 255 (27), 241 (27), 239 (11), 229 (35), 213 (15), 199 (9), 197 (8), 163 (8), 151 (3)]	Luteolina-7-rutinosido (Veronicastrosido)
7	24,893	[M-H] 569	523 (83), 385 (100), 223 (18), 205 (1)	Ligstrosido

**Tabela 5.2:** Identificação e iões detectados por LC/MS dos picos maioritários do cromatograma de HPLC-DAD de decocção de *A. cherimola*.

Pico	TR	Ião Precursor	Ião Produto MS <sup>2</sup> /MS <sup>3</sup>	Composto
1	8,42	[M-H] 353	(353) 191 / (191) 127	Ácido clorogénico
2	13,14	[M-H] 609	(609) 301 / (301) 271, 255, 179, 151	Rutina
3	13,49	[M-H] 463	(463) 301 / (301) 271, 255, 179, 151	Quercetina glicosido
4	14,48	[M-H] 593	(593) 285 / (285) 257	Veronicastrosido

## 5.2 Actividades, digestões e biodisponibilidade dos extractos de *F. angustifolia* e *A. cherimola*

A avaliação da actividade inibitória de AChE nos extractos aquosos de *F. angustifolia* e *A. cherimola* foi efectuado através do método de Ellman modificado. Este trata-se de um método colorimétrico que mede a velocidade de reacção de hidrólise de acetiltiocolina (análogo do substrato de AChE) em ácido acético e tiocolina, esta última vai reagir com DTNB que provoca a mudança de cor.[11]

Em cada um dos extractos foi determinado um valor de concentração deste que inibe 50% da actividade da enzima ( $IC_{50}$ ). O valor de  $IC_{50}$  menor foi o do extracto de *A. cherimola* que apresentou uma concentração de  $0,627 \pm 0,028$  mg/mL e o maior valor de  $IC_{50}$  (que corresponde ao extracto com menor actividade) foi a decocção de *F. angustifolia* com  $1,176 \pm 0,065$  mg/mL (tabela 5.3).

O valor referência utilizado para esta actividade foi a galantamina dado ser um alcalóide autorizado na Europa para tratamento da D. A.. Atendendo que se trata de um composto isolado a partir de um extracto, possui um valor muito baixo de  $IC_{50}$  ( $0,21 \cdot 10^{-3} \pm 0,02 \cdot 10^{-3}$  mg/mL) quando comparado com um extracto aquoso que é uma mistura de vários compostos, em que alguns podem não possuir esta actividade.[31]

Existem pouco estudos acerca das actividades da *A. cherimola*, incidindo os poucos que existem essencialmente na actividade antioxidante. Portanto não foi encontrada nenhuma referência bibliográfica a ensaios de inibição de AChE por extractos desta espécie. O pico claramente maioritário deste extracto foi identificado como rutina e para este flavonóide já foi determinada a actividade inibitória de AChE, apresentando  $IC_{50}$  de  $0,086 \pm 0,004$  mg/mL. [31] Para além de rutina existem outros glicósidos de quercetina, flavonóide que é inibidor da acetilcolinesterase. [32]

O valor de  $IC_{50}$  de *A. cherimola* pode parecer díspar quando comparado ao valor de referência (galantamina), no entanto o extracto apresenta uma elevada actividade antioxidante. É também importante referir que o valor terapêutico depende também da biodisponibilidade dos compostos e dos seus efeitos secundários. Como a inibição da AChE pela rutina foi calculada anteriormente em Hernandez *et al.* (2010), foi possível quantificar a concentração de rutina no extracto por HPLC-DAD, estimando-se que a rutina é responsável por cerca de 70% da actividade do extracto. Comparando com outras decocções, como um estudo de várias espécies de hipericão de Hernandez *et al.* (2010) variam entre  $0,62 \pm 0,06$  a  $1,79 \pm 0,37$  mg/mL para decocções. O  $IC_{50}$  *A.*

*cherimola* apresenta actividade inibitória e uma actividade com uma concentração baixa dentro da gama e ordem de valores para decocções.

Segundo Vinutha *et al.* (2007) os resultados obtidos indicaram que os extratos metanólicos são mais activos do que extratos aquosos e a maioria dos estudos efectuados para esta actividade recaí sobre extractos com solventes orgânicos

As concentrações da infusão e decocção de *F. angustifolia* são muito semelhantes, demonstrando que nesta actividade biológica não são significativamente diferentes quer se utilize um tipo de extracto ou o outro. Tal como no caso anterior não foram encontrados registos de estudos inibitórios de AChE para esta espécie, apesar de ter indicações que apontam para uma possível actividade a nível colinérgico (problemas do tracto GI) e devido ao seu conteúdo em polifenóis.[1, 14]

O valor de IC<sub>50</sub> da decocção de *F. angustifolia* (tabela 5.3) é o que demonstra menor capacidade inibitória dos três extractos e tal como na *A. cherimola* não se encontra em valores da mesma ordem que a galantamina, devido ao elevado grau de pureza do composto isolado utilizado. Mas de acordo com outros registos de inibição de AChE de extractos aquosos como nas infusões de noqueira, hortelã-pimenta, morango, salva, perpétua e cidreira (mencionadas anteriormente) com inibições inferiores a 50% para uma concentração de 1,36 mg/mL, a concentração com menor capacidade inibitória de *F. angustifolia* é inferior à do estudo apresentando uma boa capacidade inibitória. [11] A outra comparação efectuada foi novamente com os valores de IC<sub>50</sub> de espécies de hiperião que devido à sua extensa utilização a nível mundial para depressão indicam ter actividade inibitória, colocando os valores de *F. angustifolia* abaixo do limite superior obtidos em Hernandez *et al.* (2010).

A presença de polifenóis nos compostos de *F. angustifolia* também contribuem para esta inibição, como relatado em [32] a actividade inibitória dos flavonóides deve-se à sua ligação aos resíduos de aminoácidos no local activo da AChE.

Desde modo comprova-se a capacidade de inibir a AChE com uma concentração aceitável de *F. angustifolia*.

**Tabela 5.3:** Actividade inibitória de acetilcolinesterase (IC<sub>50</sub>) pelo método de Ellman (em mg/mL) e actividade antioxidante em concentração eficiente (EC<sub>50</sub>) pelo método DPPH (expressa em µg/mL) de extractos aquosos de folhas de *F. angustifolia* e *A. cherimola*. Valores de EC<sub>50</sub> e IC<sub>50</sub> ± d.p. de 3 ensaios.

Extractos	Inibição de AChE (IC <sub>50</sub> )			Actividade antioxidante (EC <sub>50</sub> )		
		(mg/ml)		(ug/mL)		
<i>Fraxinus angustifolia</i>	Infusão	1,066	± 0,019	22,224	± 0,557	
	Decocção	1,176	± 0,065	22,156	± 0,747	
<i>Annona cherimola</i>	Decocção	0,627	± 0,028	15,435	± 0,184	
<b>Galantamina</b>		0,21*10 <sup>-3</sup>	± 0,02*10 <sup>-3</sup>		-	
<b>BHT</b>			-	15,700	± 0,200	

Para a actividade antioxidante cujos valores estão representados na tabela 5.3, foi utilizado o método DPPH. Este método é um método colorimétrico no qual a cor roxa de DDPH muda para amarelo quando o seu electrão desemparelhado, é emparelhado com um átomo de hidrogénio do potencial antioxidante.[14]

Para este ensaio foi utilizado como valor de referência um antioxidante utilizado a nível industrial, especialmente na indústria alimentar e como se pode verificar o valor de EC<sub>50</sub> deste antioxidante (tabela 5.3) é da mesma ordem de valores dos extractos. [14, 33]

Como uma das plantas em estudo apresenta como composto maioritário rutina, verificou-se num estudo de actividade antioxidante a acção da rutina comparativamente com BHT. Em Yang (2008) utilizando concentrações de 0,05 mg/mL o BHT demonstrou uma actividade de 68,4% enquanto a rutina demonstrou 11,6% de actividade, atendendo que os EC<sub>50</sub> andam na ordem dos 0,02 a 0,015 mg/mL os extractos apresentam elevado potencial antioxidante. Provavelmente o baixo valor de EC<sub>50</sub> de *A. cherimola* em muito se deve ao seu composto maioritário dado que a rutina tem elevado poder antioxidante em sistemas *in vitro*. [34]

Para a actividade antioxidante existem estudos disponíveis para ambas as espécies em estudo. [14, 25] Em Atmani *et al.* (2008) determinou-se em extractos etanólicos da polpa da fruta e da pele de *A. cherimola* pelo método DPPH, o valor com maior potencial de 57,7±1,9 µg/mL, valor de EC<sub>50</sub> muito superior ao verificado para decocção desta espécie. Como enunciado anteriormente os extractos de solventes orgânicos têm tendência a mostrar actividade mais elevada consoante os compostos que

extraem, comparativamente aos extractos aquosos. [35] O facto de se verificar um  $EC_{50}$  tão baixo para a decocção de *A. cherimola* demonstra a elevada capacidade antioxidante desta planta, que se deve aos polifenóis presentes cujo poder redutor resultante dos grupos hidroxilo são responsáveis pela actividade antioxidante. [36]

Para o *F. angustifolia* os valores de  $EC_{50}$  da decocção e da infusão voltam a não ser significativamente diferentes e andam na ordem de valores do padrão utilizado. Em Atmani *et al.* (2008) foram estudadas fases aquosas de extractos orgânicos obtidos por maceração com etanol do lenho da planta e a melhor capacidade antioxidante foi de 10  $\mu\text{g/mL}$  e 10,04  $\mu\text{g/mL}$ , obtidos da fase aquosa oriundos de extracções por acetato de etilo e clorofórmio respectivamente. Os  $EC_{50}$  de *F. angustifolia* são um pouco superiores a estes resultados, mas continuam a demonstrar actividade. Comparando com outros extractos semelhantes como os de hipericão de Hernandez *et al.* (2010) que variam entre  $9 \pm 0,2$  a  $18,4 \pm 0,8$   $\mu\text{g/mL}$  os valores de *F. angustifolia* já se encontram próximos do intervalo de valores, demonstrando que extractos aquosos têm boa capacidade antioxidante aproximando-se do valor de BHT.

Muitos extractos de plantas têm vindo a ser testados para actividade antioxidante, em alguns casos superando o BHA (aditivo alimentar semelhante ao BHT) este facto torna importante identificar os compostos fenólicos responsáveis pela actividade não só para a indústria farmacêutica, mas como para aditivos alimentares e cosmética. [14, 24]

**Tabela 5.4:** Actividade inibitória de acetilcolinesterase ( $IC_{50}$ ) e actividade antioxidante ( $EC_{50}$ ) expressos em % de extractos aquosos de folhas de *F. angustifolia* e *A. cherimola* depois de incubados em suco gástrico e pancreático artificial durante 4 horas. Valores de  $EC_{50}$  e  $IC_{50} \pm$  d.p. de 3 ensaios.

Extractos		Actividade após digestão (%)							
		Gástrico				Pancreático			
		AChE		DPPH		AChE		DPPH	
<i>F. angustifolia</i>	Infusão	99,6	$\pm$ 2,9	113,0	$\pm$ 18,0	107,8	$\pm$ 13,9	103,9	$\pm$ 9,6
	Decocção	97,3	$\pm$ 1,3	109,540	$\pm$ 17,533	88,8	$\pm$ 13,6	88,9	$\pm$ 9,4
<i>A. cherimola</i>	Decocção	107,2	$\pm$ 3,7	99,0	$\pm$ 9,2	106,4	$\pm$ 6,5	94,0	$\pm$ 8,9

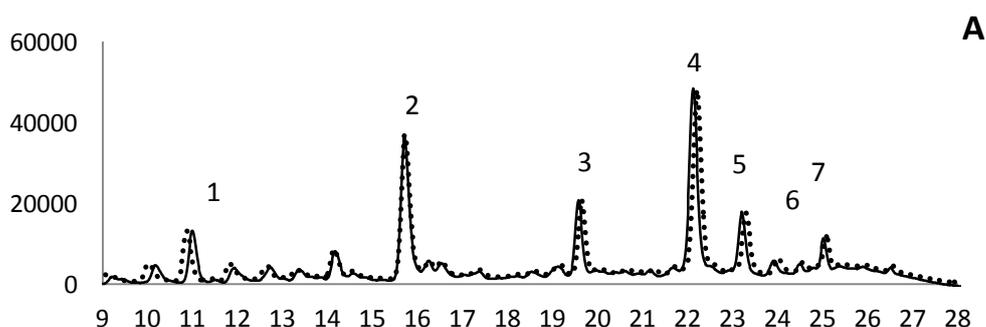
O metabolismo *in vitro* com sucos gástrico e pancreático artificiais, pretendem simular as condições a que são sujeitos os extractos no caso de ingestão. Com este estudo é possível determinar se não existe degradação dos compostos ao longo do tracto GI.

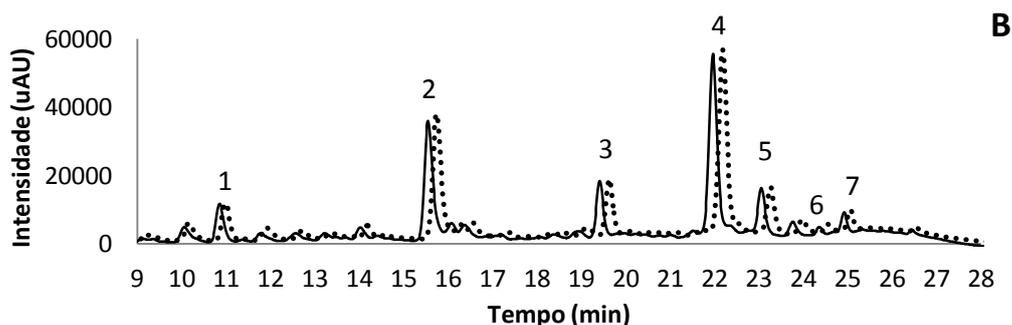
Na digestão por suco gástrico artificial os extractos foram sujeitos a digestão durante 4 horas, apesar de uma digestão gástrica ter uma duração menor, este tempo permite verificar bioconversões.[27]

Os extractos metabolizados por suco gástrico foram analisados por HPLC-DAD e testados para as actividades AChE e antioxidante para verificar se de facto houve deterioração de compostos. Como se pode verificar nos cromatogramas (gráficos de 5.3 a 5.4) e nos gráficos das áreas dos cromatogramas (gráficos 5.6 e 5.7) os extractos aquosos mantiveram-se estáveis ao longo das 4 horas de incubação. Deste modo podemos afirmar que nenhum dos compostos dos extractos foi sujeito a hidrólise perante as condições acídicas do estômago.[27]

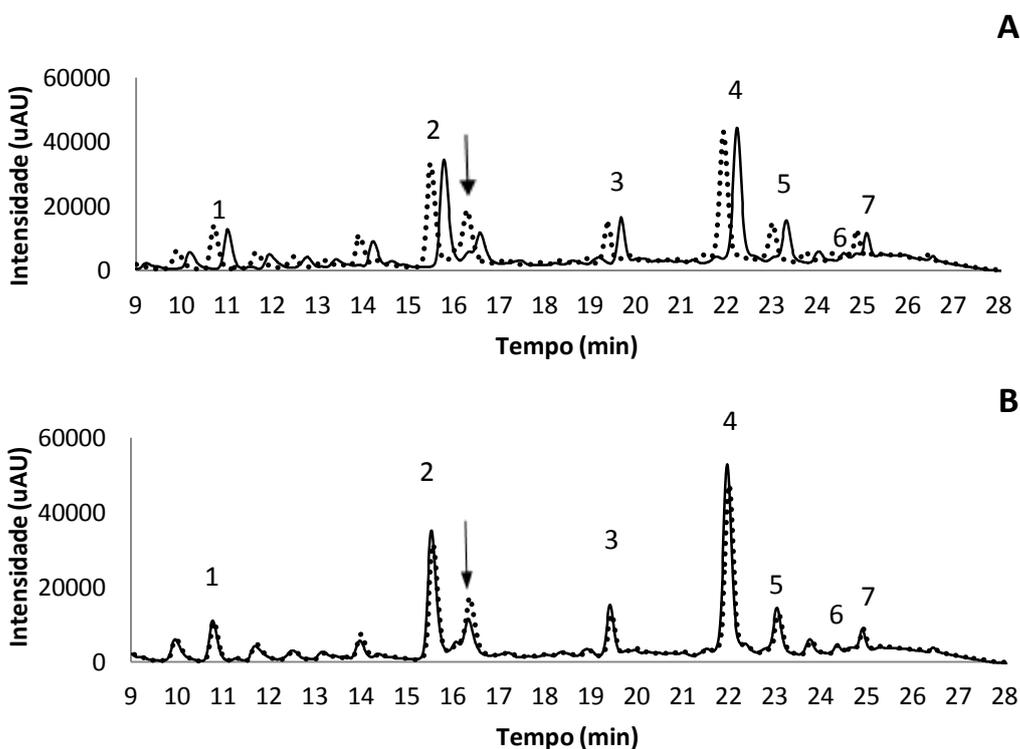
Os valores das actividades  $IC_{50}$  e  $EC_{50}$  apresentadas na tabela 5.4 confirmam que apesar de existir variações, estas não são significativas (tendo em conta o desvio padrão). Os extractos mantêm a sua actividade inibitória de AChE e antioxidante, o que era esperado, pois a análise de HPLC-DAD não demonstrou degradação de compostos na presença de suco gástrico artificial (gráficos 5.3 e 5.5 **A**).

Na digestão com suco pancreático artificial os extractos também foram sujeitos a 4 horas de metabolismo e posteriormente à análise por HPLC-DAD, actividade AChE e antioxidante. Nos cromatogramas resultantes da acção do suco pancreático visíveis nos gráficos 5.4 e 5.5 **B**, observando os perfis não se verifica degradação ao longo das 4 horas dos compostos (gráficos 5.6 **B** e 5.7 **B**). No entanto verifica-se aos 16,26 minutos, um ligeiro aumento assinalado nos gráficos 5.6 **B** e 5.7 **B** dos extractos de *F. angustifolia*. Este aumento deve-se à presença de resíduos de pancreatina do suco que naquele tempo de retenção interfere aumentando o pico do composto.





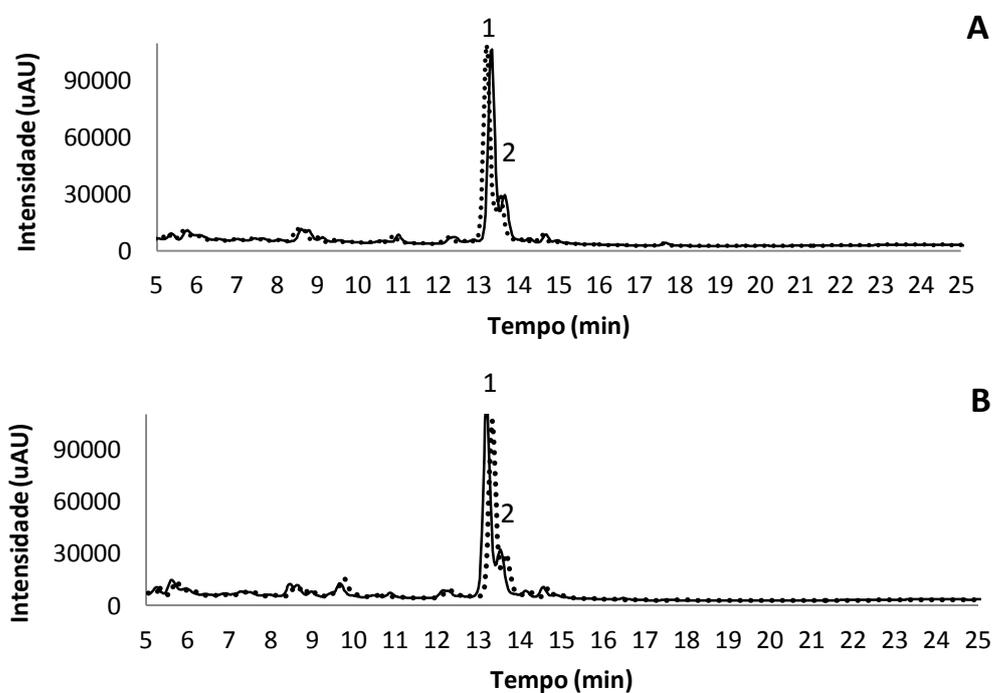
**Gráfico 5.3:** Cromatogramas de HPLC-DAD antes [...] e após [ ] 4 horas de incubação com suco gástrico artificial. **A:** decocção de *F. angustifolia*; **B:** infusão de *F. angustifolia*;



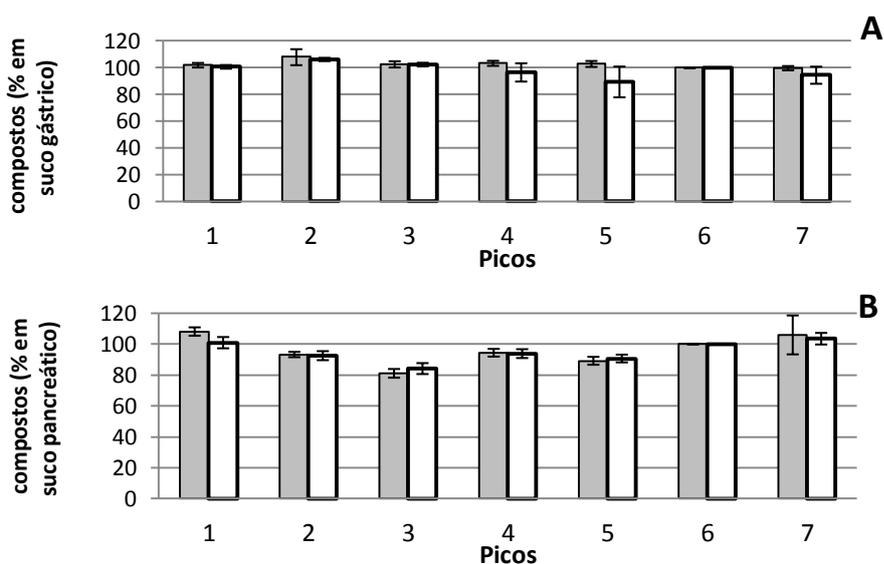
**Gráfico 5.4:** Cromatogramas de HPLC-DAD antes [...] e após [ ] 4 horas de incubação com suco pancreático artificial. **A:** decocção de *F. angustifolia*; **B:** infusão de *F. angustifolia*; ↓:resíduos de pancreatina

Relativamente às actividades biológicas apresentadas na tabela 5.4 para o metabolismo pancreático, não foram verificadas diferenças significativas à semelhança do metabolismo gástrico. Apesar da presença do suco pancreático artificial nos cromatogramas de *F. angustifolia*, as actividades dos extractos contendo suco pancreático não se alteraram corroborando que os compostos não sofreram deterioração durante as 4 horas de incubação.

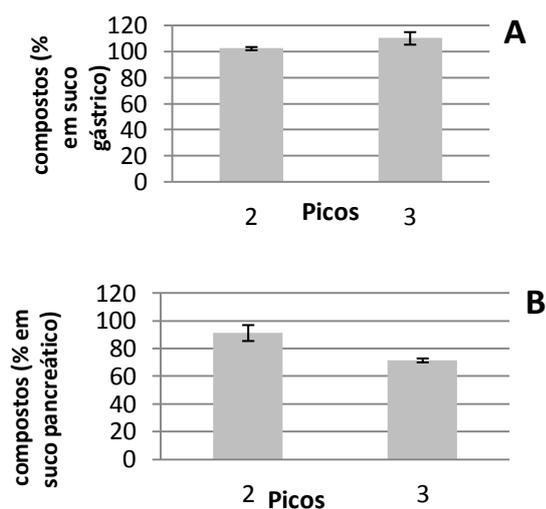
De acordo com Bouayed *et al.* (2011) os flavonóides de extractos aquosos tendem a ser estáveis em condições de metabolização gástrica e pancreática e segundo Crespy *et al.* (2011) a maior parte dos polifenóis chegam intactos ao intestino delgado, por resistirem à hidrólise gástrica e pancreática, comprovando os resultados obtidos.



**Gráfico 5.5:** Cromatogramas de HPLC-DAD antes [...] e após [...] 4 horas de incubação. **A:** decocção de *A. cherimola* em suco gástrico artificial; **B:** decocção de *A. cherimola* em suco pancreático artificial.



**Gráfico 5.6:** Variação na área dos picos (%) após 4 horas de incubação. **A:** ■ decocção e □ infusão de *F. angustifolia* em suco gástrico artificial; **B:** ■ decocção e □ infusão de *F. angustifolia* em suco pancreático.



**Gráfico 5.7:** : Variação na área dos picos (%) após 4 horas de incubação. **A:** decocção de *A. cherimola* em suco gástrico artificial; **B:** decocção de *A. cherimola* em suco pancreático artificial.

Os estudos *in vivo* com recurso a animais de laboratório e a humanos têm custos considerados e um elevado tempo de estudo, a utilização de células Caco-2 é vista como uma alternativa viável para estudos de transporte e biodisponibilidade de compostos de origem vegetal. [29] Dado que a biodisponibilidade oral tem grande influência na eficácia biológica de “chás”, utilizaram-se células Caco-2 dispostas em monocamada diferenciadas em enterócitos. [37, 38]. O estudo do transporte através da permeação da membrana efectuou-se do compartimento do pólo apical para o compartimento do pólo basal.

A viabilidade celular para este ensaio foi confirmada por ensaio de MTT em Caco-2 para o *F. angustifolia* que foi testado até 2 mg/mL e não apresentou citotoxicidade. [39] Para a *A. cherimola* foi efectuado um ensaio preliminar que não demonstrou toxicidade.

Para os picos 1 e 4 de *A. cherimola* e 6 de *F. angustifolia* as biodisponibilidades não foram determinadas devido à reduzida área dos picos, ampliando em muito o erro da análise. Este ensaio foi efectuado em concentrações não tóxicas para manter a integridade da membrana, por esse motivo as concentrações não foram aumentadas.

Os resultados das biodisponibilidades em percentagem estão representados nos gráficos 5.8A a 5.10A e a biodisponibilidade aparente ( $P_{app}$ ) nos gráficos 5.8B a 5.10B.

Os compostos de *F. angustifolia*: verbascosido, oleuropeina e o ligstrosido foram significativamente menos permeáveis que a hesperidina (composto maioritário), rutinósido e ácido cafeoilquínico (isómero de ácido clorogénico).

Konishi e Kobayashi (2004), propôs que o ácido clorogénico e cafeico permeiam monocamadas de células Caco-2 por difusão paracelular, o que não contraria os dados obtidos. Para o composto maioritário de *F. angustifolia* observou-se um estudo de Kobayashi *et al.* (2008) no qual a hesperidina apresenta uma distribuição de  $0,58\pm 0,08\%$  para o compartimento basolateral e de  $0,85\pm 0,37\%$  para o interior das células, valores muito inferiores ao verificados nos gráficos 5.8A e 5.9A em que a permeação foi de cerca dos 4%. Esta diferença significativa de valores verifica-se devido ao tempo de incubação com o extracto, em que no estudo comparativo as células só estiveram na presença da solução de hesperidina durante 40 minutos e no caso do extracto de *F. angustifolia* foram 6 horas de contacto entre o extracto e a monocamada. Estes dados suportam a teoria de Kobayashi *et al.* (2008) hesperidina é absorvida paracelularmente, um tipo de transporte comum não saturável, permitindo que um longo período de incubação aumente o transporte deste composto.

No entanto é necessário lembrar que a absorção e biodisponibilidade de fitoquímicos podem ser alteradas pela matriz do material vegetal. [17]

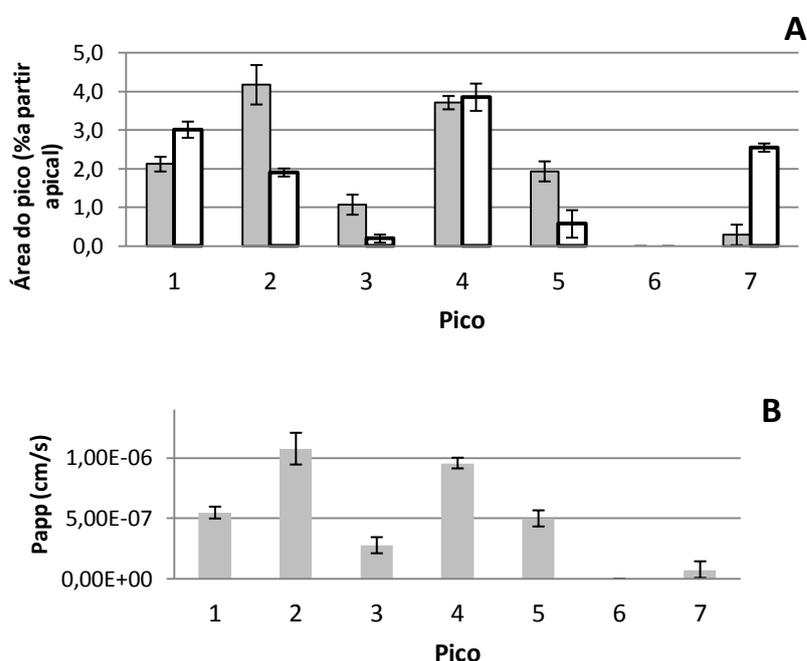
Quanto ao fenómeno de acumulação no interior das células em Tian *et al.* (2008) os glicósidos de flavonóides apresentaram uma baixa taxa de acumulação, inferior a 5%. Os valores deste estudo não foram concordantes, pois apesar de os compostos com maiores valores de acumulação estarem todos abaixo dos 5%, comparativamente com os restantes compostos que apresentam acumulações residuais; o ácido cafeoilquínico, a hesperidina e o ligstrosido apresentaram acumulação entre os 4 e 3% na infusão e decocção de *F. angustifolia*. Destes três compostos só a hesperidina é que se trata de um glicósido.

No caso da *A. cherimola* como explicado anteriormente só foram estudados o pico de rutina e do glicósido de quercetina. De acordo com Tian *et al.* (2008) um estudo da permeabilidade intestinal de 36 flavonóides o valor de  $P_{app}$  de rutina do lado apical para o basolateral foi inferior a de  $5\times 10^{-7}$  cm/s o limite de detecção de flavonóides, considerando que não existia permeação. O valor de  $P_{app}$  obtido para a rutina foi da mesma ordem de grandeza ( $2,288\times 10^{-7}\pm 2,220\times 10^{-8}$ ), consideramos que ainda existia permeação.

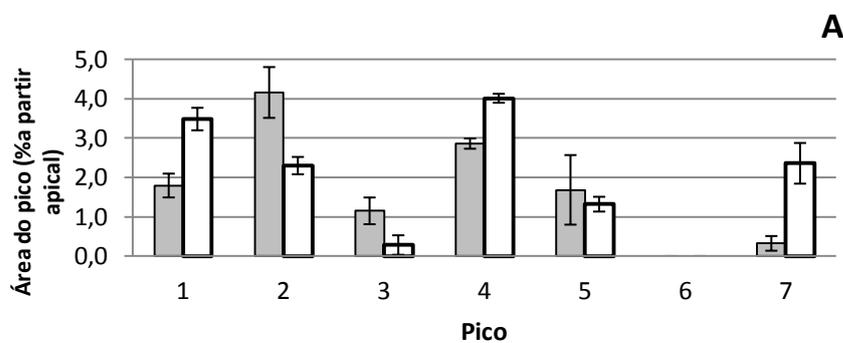
Em Tian *et al.* (2008) o valor de  $P_{app}$  para a quercetina foi de  $3,91\pm 0,21$  cm/s, enquanto seu glicósido no presente estudo demonstrou uma permeação muito reduzida, com valores dentro do erro do método, como se pode observar pelo desvio padrão semelhante ao valor de  $P_{app}$ .

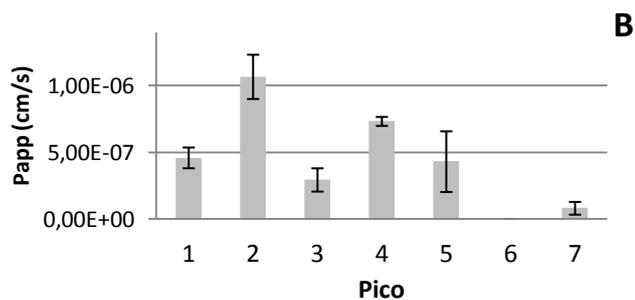
A maioria dos compostos dos extractos aquosos permearam até determinada extensão a barreira intestinal, podendo chegar assim às sinapses gastrointestinais e corrente sanguínea.

Devido à baixa permeação dos compostos nas 6 horas de ensaio, o mecanismo de permeação predominante poderá ser de difusão passiva paracelular, semelhante ao reportado por vários autores para a permeação da maioria dos flavonóides glicosilados e ácidos fenólicos no modelo Caco-2. [38, 40, 41] A permeabilidade intestinal passiva de polifenóis depende de vários factores como a lipofilicidade, tamanho molecular e capacidade de formar pontes de hidrogénio.[38]

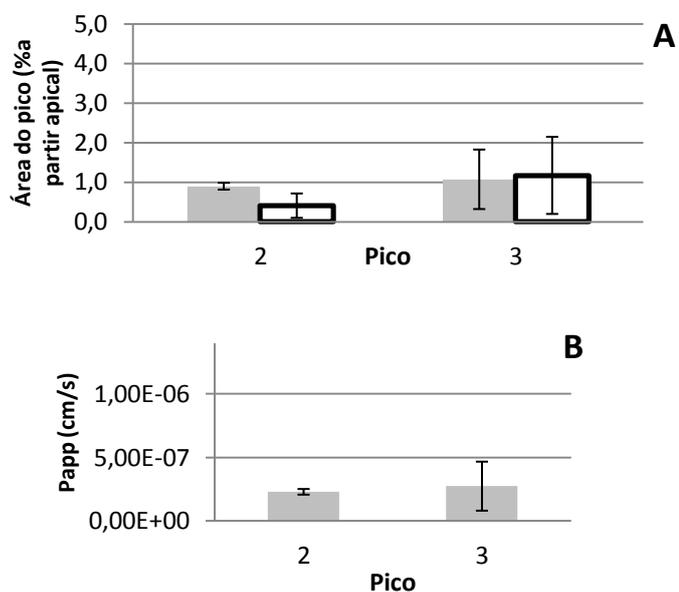


**Gráfico 5.8:** Variação na área dos picos de decoção de *F. angustifolia* 6 horas na presença de células Caco-2; **A:** Em %, pólos: ■ Basolateral □ Células; **B:** P<sub>app</sub> de decoção de *F. angustifolia*; Áreas representadas em % em relação à área inicial (pólo apical).





**Gráfico 5.9:** Variação na área dos picos de infusão de *F. angustifolia* 6 horas na presença de células Caco-2; **A:** Em %, pólos: ■ Basolateral □ Células; **B:**  $P_{app}$  de infusão de *F. angustifolia*; Áreas representadas em % em relação à área inicial (pólo apical).



**Gráfico 5.10:** Variação na área dos picos de decoção de *A. cherimola* 6 horas na presença de células Caco-2; **A:** Em %, pólos: ■ Basolateral □ Células; **B:**  $P_{app}$  de decoção de *A. cherimola*; Áreas representadas em % em relação à área inicial (pólo apical).

Para desenvolvimento e pesquisa de novos fármacos tem-se verificado uma procura por moléculas que desencadeiem múltiplas actividades, atendendo que a maioria das patologias não tem um único mecanismo fisiopatológico associado, mas sim várias vias bioquímicas envolvidas. [42] Devido a essa procura cada vez se recorre a chás, devido à sua mistura de compostos.

## 6 Conclusão

Na maioria dos estudos existentes de actividade inibitória de AChE com extractos vegetais a extracção é efectuada com solventes orgânicos. No presente estudo a extracção foi efectuada com água, e a composição dos extractos foi diferente da normalmente encontrada em extractos alcoólicos ou óleos essenciais. Como a ingestão de plantas medicinais é feita na sua maioria sob forma de “chá de ervas” é relevante conhecer as potencialidades destes extractos.

As menções efectuadas em estudos de etnobotânica das utilizações relacionadas com stress oxidativo de *F. angustifolia* e *A. cherimola*, podem ser devidas à presença de polifenóis com elevada actividade antioxidante nos extractos aquosos destas plantas.

A *A. cherimola* possui vários estudos que indicam a sua utilização para patologias relacionadas com o sistema nervoso, experimentalmente verificou-se que o extracto inibe a AChE com um valor de IC<sub>50</sub> relativamente baixo.

Os compostos dos extractos são capazes de atravessar o tracto GI e barreira intestinal intactos, mantendo a actividade dos extractos.

As actividades observadas tornam as plantas promissoras para a terapêutica de patologias relacionadas com stress oxidativo e inibição de AChE, tais como D. A. e distúrbios G. I.

Os extractos apresentam múltiplas actividades, o que é uma estratégia indicada para o tratamento da D. A..

### 6.1 Perspectivas futuras

Seria muito interessante dar continuidade a este tema e verificar *in vivo* se as actividades se mantêm e se desencadeiam em simultâneo, quer das espécies estudadas, quer das espécies descritas na literatura. Desenvolver uma formulação que aumente a biodisponibilidade dos diversos compostos presentes e verificar se existe acção sinérgica que actue nas várias vias da D. A..

## 7 Referências bibliográficas

1. Cunha, A., Silva, A., Roque, O., *Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia*, ed. Edição. 2009, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
2. Cunha, A., Teixeira, F., Silva, A., Roque, O., *Plantas na Terapêutica Farmacologia e Ensaio Clínico*, ed. Edição. 2010, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 15-22; 251.
3. Heinrich, M., Gibbons, S., *Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2001(53): p. 425-432.
4. WHO. *Traditional medicine*. Fact sheet 2008 [cited 2012 15-10-12]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>.
5. Hirota, C., McKay, D., *Cholinergic regulation of epithelial ion transport in the mammalian intestine*. British Journal of Pharmacology, 2006(149): p. 463–479.
6. Ventura, A., Abreu, P., Freitas, R., Sathler, P., *Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo*. Revista Psiquiatria Clínica, 2009. **37**(2): p. 66-72.
7. Jarvie, E., Celtek, S., Sanger, G., *Potential by cholinesterase inhibitors of cholinergic activity in rat isolated stomach and colon*. Pharmacological Research, 2008. **58**(5-6): p. 297-301.
8. Ferreira, A., Proença, C., Serralheiro, M., Araújo, M., *The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal*. Journal of Ethnopharmacology, 2006(108): p. 31-37.
9. Falé, P., Borges, C. Madeira, P., Ascensão, L., *Rosmarinic acid, scutellarein 4'-methyl ether 7-O-glucuronide and (16S)-coleon E are the main compounds responsible for the antiacetylcholinesterase and antioxidant activity in herbal tea of *Plectranthus barbatus* ("falso boldo")*. Food Chemistry, 2008(114): p. 798-805.
10. Mukherjee, P., Kumar, K., Mal, M., Houghton, P., *Acetylcholinesterase inhibitors from plants*. Phytomedicine, 2007(14): p. 289-300.
11. Bilušid, T., Katalinid, V., Uzelac, V., Ljubenkov, I., Kriško, A., Dejanovid, B., Jukid, M., Politeo, O., Pifat, G. Milos, M., *Antioxidant and acetylcholinesterase inhibiting activity of several aqueous tea infusions in vitro*. Food Technology and Biotechnology, 2008. **46**(4): p. 368-375.
12. Okello, E., Savelev, S., Perry, E., *In vitro Anti-β-secretase and Dual Anti-cholinesterase Activities of *Camellia sinensis* (tea) Relevant to Treatment of Dementia*. Phytotherapy Research, 2004(18): p. 624-627.
13. Halliwell, B., *Free Radicals and Other Reactive Species in Disease*, in eLS. 2001, John Wiley & Sons, Ltd.
14. Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Karima Ayouni, Hakima Lounis, Hania Boudaoud, Nadjat Debbache, Djebbar Atmani, *Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plant*. Food Chemistry, 2008(112): p. 303-309.
15. Engelhart, M., Geerlings, M., Ruitenberg, A., Swieten, J., *Dietary Intake of Antioxidants and Risk of Alzheimer Disease*. American Medical Association, 2002. **287**(24): p. 3223-3229.
16. Samuelsson, G., *Drugs of natural origin*. 5th revised edition ed. 2004, Stockholm: Apotekarsocieteten.
17. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., *Polyphenols: food sources and bioavailability*. The American Journal of Clinical Nutrition, 2004(79): p. 727-747.

18. Pinto, J., Almeida, C., Carrilho, E., Figueira, M., Gonçalves, M., Martins, A., Mesquita, M., Soares, M., Soveral, G., Silva, O., *Nutracêuticos e alimentos funcionais*. 1ª edição ed. 2010, Lisboa: Lidel-edições técnicas. 15-36.
19. Jyothi, B., Venkatesh, K., Chakrapani, P., Rani, A., *Phytochemical and Pharmacological potential of Annona cherimola- A Review*. International Journal of Phytomedicine, 2011(3): p. 439-447.
20. Kostova, I., Iossifova, T., *Chemical components of Fraxinus species*. Fitoterapia, 2006(78): p. 85-106.
21. Ponte, M., *A cultura da Anoneira - Contribuição para o seu estudo*. 2010, Serviço de desenvolvimento agrícola de S. Miguel, Divisão dos Estudos Agro-rurais.
22. Gupta-Elera, G., Garrett, A., Martinez, A., Robison, R., O'Neill, K., *The antioxidant properties of the cherimoya (Annona cherimola) fruit*. Food Research International, 2011(44): p. 2205-2209.
23. Castillo-Juárez, I., González, V., Jaime-Aguilar, H., Martínez, G., Linares, E., Bye, R., Romero, I., *Anti-Helicobacter pylori activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders*. Journal of Ethnopharmacology, 2009(122): p. 402-405.
24. Barreca, D., Laganà, G., Ficarra, S., Tellone, E., Leuzzi, U., Galtieri, A., Bellocco, E., *Evaluation of the antioxidant and cytoprotective properties of the exotic fruit Annona cherimola Mill. (Annonaceae)*. Food Research International, 2011(44): p. 2302-2310.
25. Loizzo, M., Tundis, R., Bonesi, M., Menichini, F., Mastellone, V., Avallone, L., Menichini, F., *Radical scavenging, antioxidant and metal chelating activities of Annona cherimola Mill. (cherimoya) peel and pulp in relation to their total phenolic and total flavonoid contents*. Journal of Food Composition and Analysis, 2012(25): p. 179-184.
26. Martínez-Vázquez, M., Estrada-Reyes, R., Escalona, A., Velázquez, I., Martínez-Mota, L., Moreno, J., Heinze, J., *Antidepressant-like effects of an alkaloid extract of the aerial parts of Annona cherimolia in mice*. Journal of Ethnopharmacology, 2012(139): p. 164-170.
27. Porfírio, S., Falé, P., Madeira, P., Florêncio, M., *Antiacetylcholinesterase and antioxidant activities of Plectranthus barbatus tea, after in vitro gastrointestinal metabolism*. Food Chemistry, 2010(122): p. 179-187.
28. Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., Polissiou, M., *Antimicrobial and antioxidant activities of essential oil and various extracts of Salvia tomentosa Miller (Lamiaceae)*. Food Chemistry, 2005. **90**: p. 333-340.
29. Qiang, Z., Ye, Z., Hauck, C., Murphy, P., *Permeability of rosmarinic acid in Prunella vulgaris and ursolic acid in Salvia officinalis extracts across Caco-2 cell monolayers*. Journal of Ethnopharmacology, 2011. **137**(3): p. 1107-1112.
30. Sanz, M., Simón, B., Cadahía, E., Esteruelas, E., Muñoz, A., Hernández, T., Estrella, I., Pinto, E., *LC-DAD/ESI-MS/MS study of phenolic compounds in ash (Fraxinus excelsior L. and F. americana L.) heartwood. Effect of toasting intensity at cooperage*. Journal of Mass Spectrometry, 2012(47): p. 905-918.
31. Hernandez, M., Falé, P., Araújo, M., Serralheiro, M., *Acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of the water extracts of several Hypericum species*. Food Chemistry, 2010(120): p. 1076-1082.
32. Falé, P., Ascensão, L., Serralheiro, M., Haris, P., *Interaction between Plectranthus barbatus herbal tea components and acetylcholinesterase: binding and activity studies*. Food & Function, 2012.
33. Mata, A., Proença, C., Ferreira, A., Serralheiro, M., Nogueira, J., Araújo, M., *Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices*. Food Chemistry, 2007(103): p. 778-786.
34. Yang, J., Guo, J., Yuan, J., *In vitro antioxidant properties of rutin*. LWT, 2008(41): p. 1060-1066.

35. Vinutha, B., Prashanth, D., Salma, K., Sreeja, S. L., Pratiti, D., Padmaja, R., Radhika, S., Amit, A., Venkateshwarlu, K., Deepak, M., *Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007. **109**(2): p. 359-363.
36. Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G., *Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids*. *Free Radical Biology and Medicine*, 1996(20): p. 933-956.
37. Garcia, M., Flowers, C., Cook, J., *The Caco-2 cell culture system can be used as a model to study food iron availability*. *The Journal of Nutrition*, 1995: p. 251-258.
38. Tian, X., Yang, X., Yang, W., Wang, K., *Studies of intestinal permeability of 36 flavonoids using Caco-2 cell monolayer model*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2008. **367**(58-64).
39. Liu, Y., Peterson, D., Kimura, H., Schubert, D., *Mechanism of Cellular 3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction*. *Journal of Neurochemistry*, 1997. **69**: p. 581 —593.
40. Stenberg, P., Luthman, K., Artursson, P., *Virtual screening of intestinal drug permeability*. *Journal of Controlled Release*, 2000. **65**(1-2): p. 231-243.
41. Konishi, Y., Kobayashi, S., *Transepithelial Transport of Chlorogenic Acid, Caffeic Acid, and Their Colonic Metabolites in Intestinal Caco-2 Cell Monolayers*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004. **52**(9): p. 2518-2526.
42. Reynolds, C., Tounge, B., Bembenek, S., *Ligand Binding Efficiency: Trends, Physical Basis, and Implications*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2008. **51**(8): p. 2432-2438.