



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologia

# Propriedades antiproliferativas e potencial anticancerígeno de *Geranium robertianum* L.

**Cátia Alexandra Costa Guerreiro**

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho realizado sob a orientação:

**Professor Doutora Maria da Graça Costa Miguel**

2023/24



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Propriedades antiproliferativas e potencial anticancerígeno de *Geranium robertianum* L.

**Cátia Alexandra Costa Guerreiro**

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho realizado sob a orientação:

**Professora Doutora Graça Maria da Costa Miguel**

2023/24

# Propriedades antiproliferativas e potencial anticancerígeno de *Geranium robertianum* L.

## **Declaração de autoria de trabalho**

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

[Assinatura do aluno]

**Copyright© 2023** Cátia Alexandra Costa Guerreiro

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

*“Não há nada a temer na vida, apenas tratar do compreender!”*

**Marie Curie**

## **Agradecimentos**

*Após este caminho de lutas e conquistas e de muito cansaço, mas sem dúvida muito enriquecedor quero sublinhar o meu muito obrigada à professora Maria da Graça Costa Miguel que aceitou acompanhar-me e orientar-me neste tema de monografia que optei por pesquisar.*

*Quero agradecer à minha mãe que tem sido desde sempre um grande pilar e fonte de força para mim e ao meu pai que já não está entre nós, mas sempre me apoiou e agora é uma estrela que ilumina o meu caminho quando preciso de orientação.*

*Ao João, meu companheiro que sempre tem estado ao meu lado, apoiado as minhas decisões e ajudado imenso com a nossa Madalena que chegou no ano que decidi ir para a frente com este Mestrado Integrado.*

*Obrigada por todos os amigos e colegas que este curso me colocou no caminho.*

*A todos o meu muito obrigada!*

## Resumo

*As plantas desde sempre têm sido uma fonte para os mais diversos fins, desde alimentação, vestuário, construção, aquecimento, venenos, mas também para prevenir e tratar algumas patologias. A procura de produtos naturais, quer sob a forma de plantas medicinais, fármacos vegetais, extractos, óleos, exsudados ou compostos isolados, purificados continuam a interessar às mais diversas indústrias, incluindo as alimentares e as farmacêuticas, para dar resposta não só às populações que pretendem abordagens mais naturais, mas também na procura de compostos com declarada evidência de eficácia mas seguros, nem que posteriormente tenham de ser submetidos a processos de hemi-síntese a fim de garantir a segurança sem perder a eficácia.*

*A exposição a inúmeros fatores de risco e as doenças emergentes que contribuem para as alterações metabólicas do organismo têm sido um problema de extrema preocupação na saúde pública e, por este motivo, é necessário proteger o sistema imunitário e erradicar as causas que contribuem para estas alterações endógenas.*

*G. robertianum L., ou “Erva-de-São-Roberto, ou “Red Robin em língua inglesa” é uma planta nativa da Europa Central e usada pelas civilizações mais antigas como remédio para diversos distúrbios patológicos, como anti-inflamatório, antioxidante, hemostático, antidiabético, antialérgico, anticancerígeno e diurético.*

*Nesta revisão bibliográfica avaliaram-se as propriedades antioxidante, anti-inflamatória e antiproliferativa uma vez que o cancro, sendo um conjunto de doenças que desencadeia uma série de alterações endógenas, tem vindo a demonstrar uma incidência significativa, com alterações metabólicas ao nível de todos os órgãos.*

*As atividades biológicas desta espécie foram estudadas através da caracterização dos seus metabolitos secundários ativos através de ensaios de eliminação ou captura de espécies reativas, ensaios de inibição de marcadores pró-inflamatórios e, também, em ensaios de viabilidade celular e citotoxicidade em linhas de células cancerígenas.*

*Os metabolitos das várias partes da planta de G. robertianum foram extraídos por maceração, recorrendo a solventes aquosos e hidro-alcoólicos e identificados através de técnicas cromatográficas e espectrofotométricas, na maioria dos estudos.*

*A sua composição química mais abundante em flavonoides, taninos hidrolisáveis e ácidos fenólicos revelou um potencial significativo para as atividades biológicas, antioxidante, anti-inflamatória e antiproliferativa.*

**Palavras-chave:** *G.robertianum; Cancro; Antioxidante; Polifenóis; Anti-cancerígeno.*

## **Abstract**

*Plants have always been a source of interest for the most diverse purposes, both in terms of textiles and food and for the treatment and prevention of various pathologies.*

*The demand for natural products in their most varied forms, such as medicinal plants, phytotherapies, oils, exudates or even in their isolated or purified form, has been growing as the result of the emergence of various metabolic disorders inherent to lifestyle, habits, as well as exposure to pollutants and radiation. Exposure to numerous risk factors and the increase in emerging diseases has been a problem of extreme concern for public health and, therefore, it is necessary to protect the immune system and eradicate the causes that contribute to these endogenous alterations.*

*G. robertianum L., or “Erva-de-São-Roberto in portuguese”, or “Red Robin”, is a plant native to Central Europe and used by ancient civilizations as a remedy for various pathological disorders, such as anti-inflammatory, antioxidant, haemostatic, antidiabetic, antiallergic, anticancer and diuretic.*

*As cancer is a disease which, in addition to showing a significant incidence, has manifested itself not only as one but several androgenic alterations which can affect all organs. For this reason, this bibliographical review focused on evaluating the antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties.*

*The biological activities of this species were studied through the characterization of its active secondary metabolites by means of reactive species elimination or capture assays, pro-inflammatory marker inhibition assays and in cell viability and cytotoxicity assays on cancer cell lines.*

*In various studies, the most used methods and techniques for extracting and identifying metabolites from the various parts of the G. robertianum plant were maceration, using aqueous and hydro-alcoholic solvents, chromatography and spectrophotometry, respectively. Its chemical composition, rich in flavonoids, hydrolysable tannins and phenolic acids, has revealed significant potential for biological, antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative activities.*

**Keywords:** *G. robertianum*; Cancer; Antioxidant; Polyphenols; Anti-cancer.

# Índice

## Conteúdo

Agradecimentos .....	vi
Resumo.....	vii
Abstract.....	ix
Índice.....	x
Índice de figuras.....	xii
Índice de tabelas.....	xiii
Índice de quadros.....	xiv
Lista de abreviaturas e acrónimos.....	xv
1. Introdução .....	1
1.1 Stress oxidativo.....	3
1.2 Inflamação.....	6
1.3 Cancro.....	8
2. Objetivos.....	11
3. Materiais e métodos de pesquisa .....	12
4. <i>Geranium robertianum</i> .....	13
4.1 Classificação taxonómica e características morfológicas.....	13
4.2 Distribuição geográfica .....	16
4.3 Fitoquímica de <i>G. robertianum</i> L.....	17
4.3.1 Taninos.....	19
4.3.2 Flavonoides .....	21
4.3.3 Ácidos Fenólicos .....	21

4.3.4	Óleos essenciais.....	22
4.4	Extração e isolamento dos diferentes extratos de <i>G. robertianum</i> .....	25
4.5	Atividade Antioxidante da espécie <i>G. robertianum</i> .....	30
4.5.1	Ensaio antioxidante .....	30
4.6	Atividade Anti-inflamatória .....	35
4.6.1	Ensaio anti-inflamatório .....	36
4.7	Atividade anti-tumoral e antiproliferativa.....	38
4.7.1	Ensaio citotóxico .....	39
5.	Considerações finais .....	41
6.	Referências bibliográficas.....	43

## Índice de figuras

Figura 1.1 Alguns metabolitos identificados na espécie <i>G. robertianum</i> e aplicações terapêuticas na medicina tradicional e propriedades biológicas. ....	2
Figura 1.2 Diferentes fatores que induzem a formação de espécies reativas e consequências metabólicas. ....	3
Figura 1.3 Inflamação crónica como um dos fatores chave na oncogénese e progressão do tumor.....	9
Figura 4.1 <i>Geranium robertianum</i> . ....	14
Figura 4.2 Tricomas tipo I (esquerda) e tricomas tipo II de <i>G. robertianum</i> . ....	15
Figura 4.3 Tricoma tipo III. ....	15
Figura 4.4 Distribuição mundial aproximada da espécie <i>G. robertianum</i> . ....	16
Figura 4.5 Distribuição geográfica de <i>G. robertianum</i> .....	17
Figura 4.6 Esquema representando as várias classes dos compostos fenólicos. ....	18
Figura 4.7 Parte das estruturas químicas dos taninos. A: Taninos condensados e B: Taninos hidrolisáveis.....	20
Figura 4.8 Estrutura básica de um monómero de elagitanino geranino. ....	20
Figura 4.9 Estrutura química da quercetina e kaempferol. ....	21
Figura 4.10 Reação endógena da formação do ácido elágico a partir de elagitaninos. ....	22
Figura 4.11 Obtenção do ácido elágico a partir do ácido gálico. ....	22
Figura 4.12 Alguns dos monoterpenos, maioritariamente, identificados na espécie <i>G. robertianum</i> . ....	23

## Índice de tabelas

Tabela 4.1 Concentrações de polifenóis ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) obtidas dos extratos de <i>G. robertianum</i> . MF – Microfiltração; UF1 – Ultrafiltração em membrana Millipore; UF2 – Ultrafiltração em membrana polissulfona.....	26
Tabela 4.2 Teor de polifenóis ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) obtidos por ultrafiltração dos extratos de <i>G. robertianum</i> . .....	27
Tabela 4.3 Alguns dos compostos, maioritariamente, identificados e quantificados ( $\mu\text{g}/\text{g}$ ) por HPLC presentes nos extratos das folhas de <i>G. robertianum</i> . .....	27
Tabela 4.4 Teor de polifenóis ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) obtido, por UF, dos extratos das folhas de <i>G. robertianum</i> . .....	28
Tabela 4.5 Alguns dos constituintes fenólicos presentes nos extratos de <i>G. robertianum</i> obtidos por várias técnicas e/ou métodos e respetivas quantidades. ....	29
Tabela 4.6 Resultados de actividade antioxidante das diferentes partes da planta <i>G. robertianum</i> utilizadas bem como os métodos utilizados.....	32
Tabela 4.7 Valores de IC50 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) obtidos a partir de amostras contendo extratos de folhas e de caules, separadamente, contra os radicais utilizados e respetivos padrões. ....	35
Tabela 4.8 Valores de IC50 obtidos do ensaio de eliminação do radical $\text{NO}^{\bullet}$ nos extratos utilizados (folhas e caules) de <i>G. robertianum</i> e composto padrão.....	37

## **Índice de quadros**

Quadro 4.1 Classificação taxonómica da espécie <i>G. robertianum</i> . .....	13
Quadro 4.2 Exemplos de alguns metabolitos presentes na espécie <i>G.robertianum</i> . .....	18
Quadro 4.3 Técnicas usadas para medição da atividade antioxidante.....	31

## Lista de abreviaturas e acrónimos

ABTS - Ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzodiazolina-6-sulfónico)

APCs - Células Apresentadores de Antígenos

COX-2 - Ciclooxigenase 2

DHHDP - Ácido desidro-hexa-hidroxidifénico

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DPPH - 2,2-difenil-1-picrihidrazil

GS-MS - Cromatografia gasosa-Espectroscopia de massa

HHDP - Ácido hexa-hidroxidifénico

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

IL - Interleucina

iNOS - Óxido Nítrico sintase

LOX - Lipooxigenase

MS - Espectrometria de Massa

NADP – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NK - Natural Killer (*Natural Killer*)

OMS - Organização Mundial de Saúde

RE - Retículo Endoplasmático

Redox - Reações de oxidação-redução

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RNS - Espécies Reativas de Azoto (*Reactive Nitrogen Species*)

ROS - Espécies Reativas de Oxigénio (*Reactive Oxygen Species*)

SPME - Microextração em fase sólida (*Solid phase microextraction*)

TME - Microambiente Tumoral (*Tumor Microenvironment*)

TNF- $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral-alfa

XDH - Xantina Desidrogenase

XO - Xantina Oxidase



## 1. Introdução

Até meados do século XIX a natureza era a principal fonte de agentes terapêuticos utilizados pelos humanos. As plantas e os seus compostos biológicos ativos eram, por isso, uma fonte de interesse para profilaxia e terapêutica de inúmeras doenças. (1,2)

Os povos mais antigos recorriam a estas ‘mezinhas’ pois eram os recursos que tinham e só por experiências de tentativa e erro foram conhecendo algumas das propriedades terapêuticas das plantas. (1)

Atualmente, o desenvolvimento de medicamentos sintéticos tem sido um fator chave para o tratamento e prevenção de várias doenças, no entanto o estudo das propriedades terapêuticas das plantas continua a ser um alvo de interesse por parte da indústria farmacêutica. (1)

O surgimento de resistências, por exemplo, a antibióticos e a dificuldade em encontrar melhores soluções para o tratamento de várias doenças como, por exemplo, a SIDA, diabetes, cancro, entre outras, tem levado a comunidade científica à procura de mais alternativas. As fontes naturais, incluindo as plantas, podem ser mais uma resposta tornando-se, por isso, necessário isolar e identificar compostos com bioativos, com o objetivo de desenvolver novos fármacos. (1,3,4)

As plantas são consideradas fontes de compostos antioxidantes que apresentam um papel importante como fator de proteção à saúde. Alguns estudos sugerem que as propriedades terapêuticas das plantas medicinais têm sido tipicamente atribuídas ao seu conteúdo fenólico, principalmente flavonoides e ácidos fenólicos, com possível relação no papel da prevenção de doenças associadas ao stress oxidativo. Outros compostos também apresentam atividades biológicas importantes como, por exemplo, os terpenos ou alcaloides. (2,5)

A presente monografia terá como foco a espécie *Geranium robertianum* L. geralmente conhecida por “Erva-de-São-Roberto” ou “Red Robin” que há muito tem sido utilizada como terapêutica na medicina popular de vários países. Diversas propriedades têm sido reportadas para esta espécie vegetal como, por exemplo, anti-inflamatório, hemostático, antidiabético, antibacteriano, antialérgico, anticancerígeno e diurético. Propriedades estas que podem estar relacionadas com perfil químico destas espécies uma vez que estudos têm demonstrado a

presença de taninos, flavonoides, outros polifenóis, óleos essenciais, entre outros metabolitos. A figura 1.1 mostra alguns dos metabolitos referidos assim como a finalidade terapêutica antiga e a atividade biológica determinada *in vitro* e/ou *in vivo*. (6)

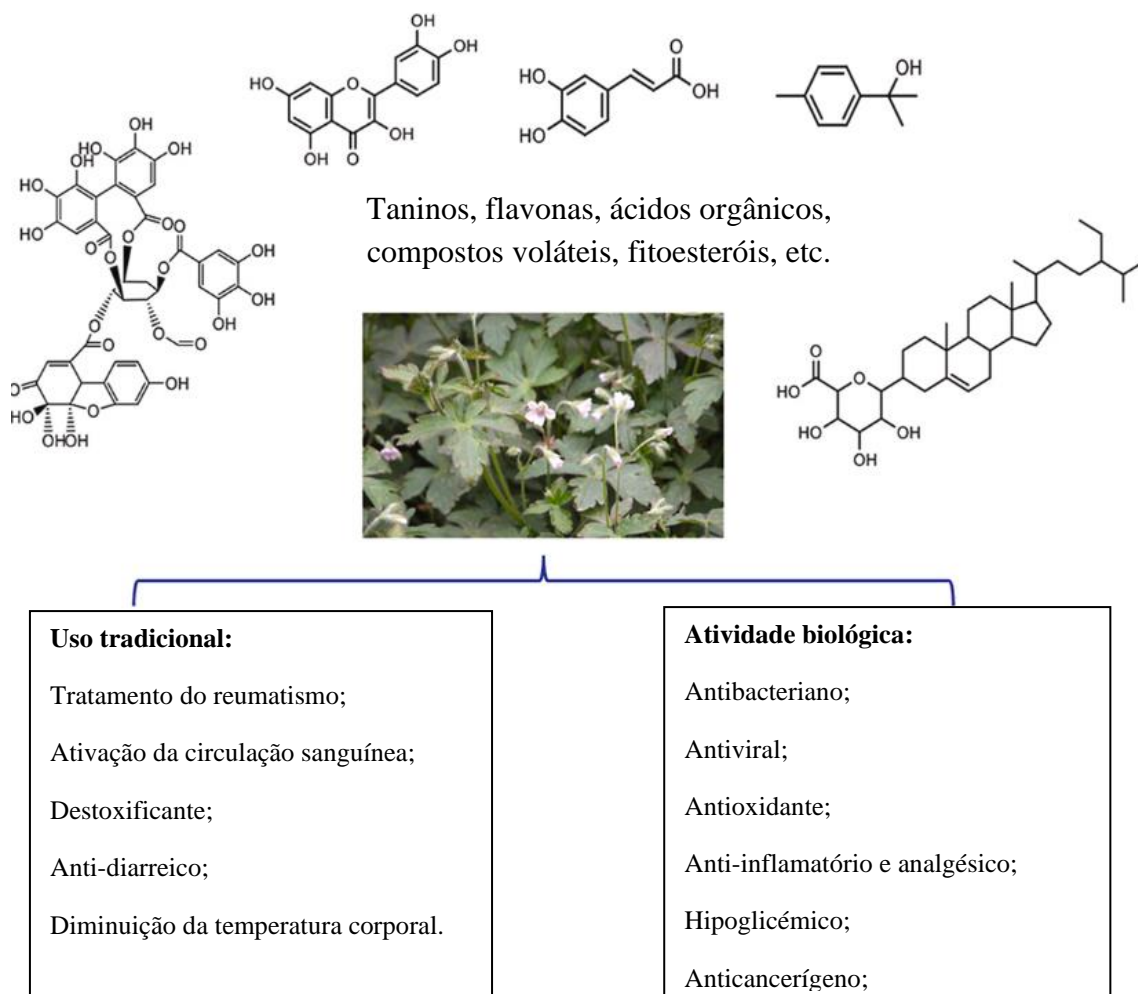


Figura 1.1 Alguns metabolitos identificados na espécie *G. robertianum* e aplicações terapêuticas na medicina tradicional e propriedades biológicas. Adaptado de [Kong, et al,2023] (7)

Estudos recentes têm demonstrado que os extratos vegetais com alguns destes metabolitos apresentam capacidade para eliminar radicais livres responsáveis pelos danos celulares e para inibir mediadores pró-inflamatórios contribuindo para a proteção celular e atrasar o aparecimento de doenças cancerígenas. (1,8)

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) o cancro é uma das principais causas de morte no mundo e caracteriza-se por um crescimento anormal e descontrolado das células desencadeando reações e mecanismos celulares inflamatórios que podem afetar qualquer parte do corpo humano. (9) Por este motivo, de forma a tentar compreender se existe relação entre a

atividade dos polifenóis neste tipo de células esta revisão bibliográfica centrar-se-á no potencial antiproliferativo e anticancerígeno da espécie *G. robertianum*.

## 1.1 Stress oxidativo

O stress oxidativo surge no organismo em consequência de vários fatores que induzem a formação de espécies reativas. Estes fatores podem ter origem exógena provenientes, por exemplo, da alimentação, fármacos ou poluição ambiental, ou podem ser uma consequência de vias endógenas decorrente de processos metabólicos como a respiração celular e/ou pela ativação de células envolvidas nos processos inflamatórios, entre outros como se pode observar na figura 1.2. (10–12)

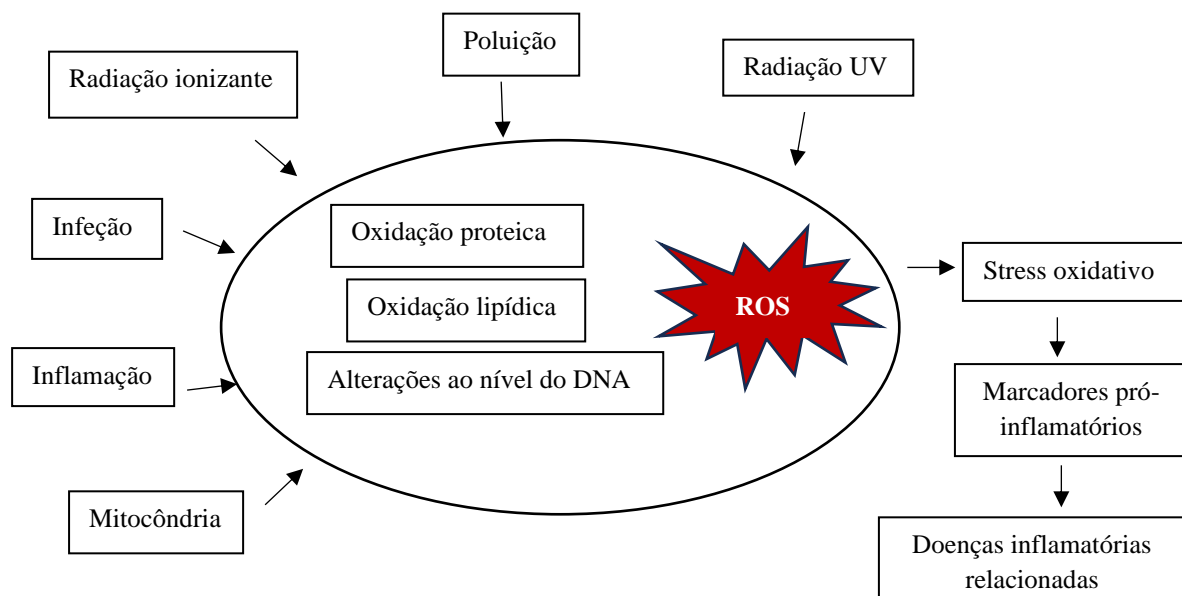


Figura 1.2 Diferentes fatores que induzem a formação de espécies reativas e consequências metabólicas. Adaptado de [Ranneh, et al, 2015] (13)

Segundo alguns autores, stress oxidativo define-se como sendo o desequilíbrio entre a produção de radicais livres e metabolitos reativos, vulgarmente designados por espécies reativas de oxigénio, azoto e cloro [do inglês *reactive oxygen species* (ROS), *reactive nitrogen species* (RNS) e *reactive chloride species* (RCS), respetivamente), e a sua eliminação por mecanismos de proteção endógenos, conhecidos por mecanismos antioxidantes. (14,15)

Este desequilíbrio resulta da incapacidade de neutralização, a tempo, destas espécies pelo sistema antioxidante endógeno, podendo causar alteração de mecanismos biológicos e, conseqüentemente, danos ao nível do DNA, proteínas, lípidos e outras biomoléculas, contribuindo para o desenvolvimento de diversos estados patológicos que estão intimamente associados à inflamação crónica. (3,4,15)

Estas espécies definem-se como moléculas que contêm um ou mais eletrões desemparelhados nas orbitais de valência e, por este motivo, são radicais que apresentam instabilidade e reagem facilmente com outras espécies químicas, podendo levar a alterações na estrutura e função celular. (12)

Em organismos aeróbios, os radicais livres são constantemente produzidos durante o funcionamento normal da célula, na maior parte sob a forma de ROS e RNS, em baixas concentrações, desempenhando um papel fundamental nos processos fisiológicos de sinalização e regulação celular. (11,16) No entanto, quando se verifica um aumento da produção de ROS/RNS por deficiência ou ausência de sistemas antioxidantes endógenos o *stress* oxidativo torna-se nocivo ao organismo. (11,12)

As ROS e RNS, segundo vários investigadores, representam a classe mais importante de radicais livres que resultam do processo de transferência de eletrões na cadeia respiratória na mitocôndria. (11)

O anião superóxido ( $O_2^-$ ) considera-se ROS “primário” uma vez que é a primeira ROS que resulta do processo de transferência de eletrões para o oxigénio molecular na cadeia respiratória mitocondrial. Posteriormente, ao interagir com outras moléculas, tende a formar outras ROS “secundárias” como o radical anião superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), o radical hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ ) e o radical anião peróxido ( $^{\cdot}ROO$ ). (11)

Relativamente às RNS destaca-se o monóxido de azoto ( $NO^{\cdot}$ ), também produzido nos tecidos biológicos resultantes da metabolização de aminoácidos por indução da enzima óxido nítrico sintase indutível (iNOS, do inglês *inducible nitric oxide synthase*) ou, também em condições hipóxicas pela cadeia respiratória mitocondrial, e o seu derivado peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ), poderoso oxidante com capacidade para danificar muitas moléculas biológicas. (11,12,17,18)

Ainda que as mitocôndrias sejam consideradas a principal fonte de origem de ROS, estas podem ter origem de várias fontes. (18) Segundo estes autores as ROS podem, também, ter origem de

sistemas celulares localizados na membrana plasmática, no citosol, nos peroxissomas e nas membranas do retículo endoplasmático. (18)

No citosol a produção de ROS é resultado de reações de oxidação-redução (Red-ox) por parte de vários componentes celulares solúveis como as catecolaminas, xantinas e enzimas como a xantina oxidase (XO). Em tecidos saudáveis, xantina desidrogenase (XDH) catalisa a oxidação da hipoxantina a xantina e depois a ácido úrico, utilizando o  $\text{NADP}^+$  como aceitador final de elétrons. Contudo, em tecidos danificados, quer por uma oxidação reversível da cisteína quer por uma proteólise induzida por iões  $\text{Ca}^{2+}$ , a enzima é convertida a xantina oxidase (XO) que transfere elétrons para o oxigénio molecular dando origem ao anião radical  $\cdot\text{O}_2^-$  durante a oxidação da hipoxantina ou xantina. (18)

Nos peroxissomas as ROS resultam, de entre outras, de reações de oxidação inerentes ao metabolismo de aminoácidos e da síntese de compostos lipídicos. Num dos estudos realizados, os investigadores utilizaram células de fígado de rato e observaram que 35% do peróxido de hidrogénio formado ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) era oriundo de enzimas oxidases peroxissomais e que 20 a 60% atravessa facilmente a membrana destes organelos para o meio circundante ainda que apresentem um elevado teor da enzima catalase (enzima envolvida na reação de degradação do  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). (18)

Os peroxissomas também contêm a enzima XO e, também, a iNOS sendo esta última uma enzima com um papel relevante na inibição do crescimento das células cancerígenas, que levam à formação dos radicais  $\cdot\text{O}_2^-$  e  $\text{NO}\cdot$ , respetivamente. Uma vez que estas espécies formadas são altamente reativas tendem a formar rapidamente as espécies  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{ONOO}^-$  que, pela reação de Fenton (reação redox em que o Ferro(II) é oxidado a Ferro(III) pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) dão origem aos radicais  $\text{OH}\cdot$ . (18)

No retículo endoplasmático liso a existência de uma cadeia transportadora de elétrons constituída por dois sistemas que atuam no metabolismo de xenobióticos e na introdução de ligações duplas nos ácidos gordos também desencadeia a produção de ROS. (18) Assim como nos lisossomas, o estudo realizado pelos mesmos autores em membranas das células do fígado de rato revelou que as flavinas, ubiquinona e citocromo do tipo b formam um sistema de transferência de elétrons em que o doador é o NADH e o aceitador final é o  $\text{O}_2$  que controla a concentração de prótons nos lisossomas de forma a manter um pH ideal e que esta cadeia transportadora de elétrons originou os radicais  $\cdot\text{OH}$ . (18)

Um outro local de extrema relevância envolvido na produção de espécies reativas é a membrana plasmática, uma vez que está, geralmente, exposta a um ambiente oxidante devido ao facto de participar em muitos processos celulares, como a adesão celular, a condutividade iónica e a sinalização celular. (10,18)

Células disfuncionais ou o aumento da permeabilidade da membrana podem levar a reações oxidativas nos componentes da membrana e consequente produção de ROS, a não ser que o sistema antioxidante endógeno esteja a funcionar eficientemente. (18)

Ainda na membrana, o metabolismo da conversão do ácido araquidónico (importante precursor de mediadores inflamatórios) em prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos é considerado uma das relevantes fontes de origem de espécies radicalares, que resultam de enzimas associadas à membrana como a lipoxigenase (LOX) e a cicloxigenase (COX). (18)

Quando surge um desequilíbrio entre a formação de radicais livres e a capacidade das células para os eliminar podem ser formados compostos com propriedades citotóxicas e, também, mutagénicas. (19)

Para que estas espécies sejam neutralizadas, evitando o stress oxidativo ao nível celular é fundamental a intervenção de enzimas e antioxidantes que mantenham o equilíbrio no sistema de defesa antioxidante. (20)

Tem sido demonstrado que há uma relação entre a produção de ROS e processos inflamatórios como a seguir se descreve.

## **1.2 Inflamação**

A inflamação define-se como uma resposta do organismo de extrema importância para proteger os tecidos contra os estímulos nocivos, ou seja, considera-se uma resposta normal à infeção. (5)

Após o contacto do agente patogénico (vírus, bactéria, alergénios, compostos químicos, entre outros) com o organismo este coloca em prática a linha de defesa anti-inflamatória. (12,13)

Esta linha de defesa, segundo a literatura, é composta por dois tipos de resposta, a resposta inata ou inespecífica e a resposta adaptativa ou específica em que ambas atuam em conjunto. (21)

A resposta inata considera-se na maior parte das vezes a primeira linha de defesa em que envolve barreiras físicas (como por exemplo a pele e a saliva) e inúmeras células fagocitárias

presentes em todos os tecidos onde se incluem os macrófagos, neutrófilos, monócitos, células dendríticas e células *Natural Killer* (NK). (21–23)

Já a resposta adaptativa define-se como uma resposta específica que engloba mecanismos de especificidade, heterogeneidade e memória. Estes mecanismos característicos deste tipo de resposta, são obtidos por linfócitos (linfócitos B e linfócitos T) e pelas moléculas solúveis por eles produzidas. (21,23)

Em condições normais a inflamação manifesta-se de forma rápida e intensa ocorrendo fenómenos como vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo e a migração de neutrófilos para o local desencadeando sintomas como vermelhidão, rubor, edema e dor com o objetivo de fagocitar o agente e reparar os tecidos danificados. Pelo que se define este tipo de inflamação como aguda. (12,23)

No entanto, quando a inflamação persiste por semanas ou meses esta passa a classificar-se como uma inflamação crónica. (21)

Na inflamação crónica os macrófagos, que podem permanecer nos tecidos durante meses ou mesmo anos funcionando como células apresentadoras de antígenos (APC's, do inglês *antigen-presenting cells*), potencializam a ativação de linfócitos pela presença de moléculas co-estimuladoras levando a uma libertação exacerbada de NO<sup>•</sup>, ROS e citocinas pró-inflamatórias como interleucinas (IL), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , do inglês *tumor necrosis factor-alpha*) e quimiocinas. Para além destas também são consequência a indução da expressão aumentada de enzimas como a COX-2, que tem expressão em tecidos inflamados. (22,23)

De entre os inúmeros mediadores envolvidos no processo inflamatório e de acordo com alguns autores (13) COX-2 e NO<sup>•</sup> são os principais biomarcadores presentes nas células que muitas das citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e TNF- $\alpha$  podem ser estimuladas a partir de vários linfócitos e leucócitos em resultado da ação de NO<sup>•</sup>. (13) Os mesmos autores referem que a génese de NO<sup>•</sup> num estado de inflamação conduzia a danos no DNA aumentando a predisposição para o cancro. Referem também, que o mesmo radical poderia regular positivamente a COX-2. (13)

COX-2 é uma enzima indutível que pode converter o ácido araquidónico em prostaglandinas (PGs), das quais se destaca a prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) que está envolvida na produção de várias citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 e a IL-1. (13)

Na inflamação crónica a predisposição das células para uma transformação oncogénica é muito elevada devido às alterações celulares dos níveis de mediadores inflamatórios. (22)

A ativação de mediadores inflamatórios leva ao aumento da produção de ROS e este tipo de ambiente inflamatório/oxidativo sustentado pode gerar um círculo vicioso e consequentes alterações/inibição de várias células vizinhas saudáveis conduzindo a processos de carcinogénese. (12)

O balanço geral dos sinais inflamatórios determina se as condições são ou não favoráveis à oncogénese, isto é, se se verificar um equilíbrio entre os vários mediadores libertados e as suas funções biológicas, então ocorrerá uma resposta no sentido da supressão do tumor, anti-tumoral, como a apoptose, a lise celular e a imunovigilância, caso contrário quando se verifica um desequilíbrio nas funções dos mediadores inflamatórios então sucedem-se fenómenos de progressão do tumor, pró-tumoral, que incluem a proliferação celular, a angiogénese, a instabilidade genómica e metástases. (22)

### **1.3 Cancro**

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) o cancro define-se como um conjunto de doenças que podem ter origem em quase todos os órgãos ou tecidos do corpo. Caracteriza-se pelo crescimento descontrolado de células anormais e proliferação das mesmas com invasão em tecidos adjacentes e órgãos, designadas por metástases. (9)

Independentemente da causa de desenvolvimento de células cancerígenas, a inflamação crónica pode ser um fenómeno de indução de instabilidade genómica que pode aumentar as probabilidades de angiogénese resultante da libertação de citocinas inflamatórias, supressão da imunidade, mutações genéticas ao nível da cadeia do DNA e ativação de vias de sinalização pelas ROS (Figura 1.3). (22–24)

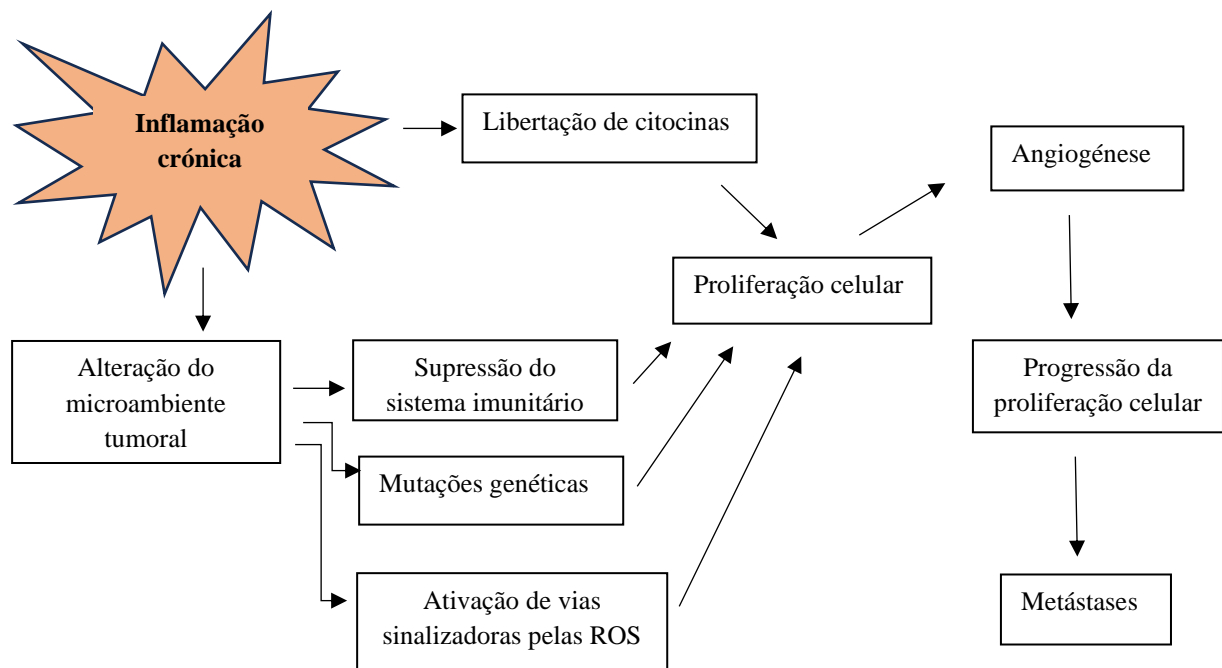


Figura 1.3 Inflamação crônica como um dos fatores chave na oncogênese e progressão do tumor. Adaptado de [Fernandes, et al, 2024] (24)

Um ambiente inflamatório prolongado com elevadas concentrações das espécies reativas contribui para um microambiente favorável à proliferação celular e ao desenvolvimento de células cancerígenas. (23)

O stress oxidativo associado ao cancro estende-se não só às células cancerígenas, mas também ao microambiente tumoral hipóxico (TME, do inglês *tumor microenvironment*) e células não cancerígenas adjacentes. (25)

As células em rápida proliferação apresentam-se com elevadas necessidades energéticas e nutricionais e esta condição metabólica conduz a um aumento exacerbado do metabolismo resultando numa produção elevada de ROS e RNS intra- e extracelulares nas mitocôndrias, retículo endoplasmático e nas membranas das células cancerígenas. (25)

As ROS e RNS, para além de funcionarem como sinalizadores celulares, como já foi referido anteriormente, também apresentam um papel muito importante na fagocitose de agentes patogénicos. No entanto, uma produção exacerbada destas espécies pode culminar em processo de morte celular por necrose ou apoptose, por interações lipídicas e proteicas e com o DNA. (25)

Segundo alguns autores, um aumento do stress oxidativo leva a que sejam desencadeadas alterações ao nível do genoma mitocondrial e conseqüentemente à origem de mutações. Essas

mutações podem levar a alterações em sequências codificantes, no número de cópias do DNA mitocondrial e na região não-codificante que participa na reparação do DNA. (23,26,27)

A constante repetição deste ciclo torna-se suscetível à acumulação de mutações, que se tornam irreversíveis e posteriormente levam à formação de células pré-cancerígenas, por inibição da apoptose. (26,27)

Alguns estudos com extratos de *G. robertianum* têm tentado demonstrar o potencial dos polifenóis como anticancerígenos através da avaliação das suas propriedades antioxidante, anti-inflamatória e anticarcinogénica, com recurso a métodos e técnicas que envolvem a captação de espécies reativas, medição do potencial inibitório dos principais marcadores biológicos e medição da viabilidade celular em linhas celulares cancerígenas e saudáveis, respetivamente. (28,29)

## **2. Objetivos**

A presente monografia tem como objetivo fazer uma pequena revisão bibliográfica sobre as atividades biológicas que têm sido atribuídas à espécie *Geranium robertianum* L., focando as atividades antiproliferativa e antioxidante, quer em ensaios de tubo quer usando linhas celulares e verificar se há alguma correlação entre as atividades e os compostos isolados e identificados.

### **3. Materiais e métodos de pesquisa**

Para a elaboração da presente monografia inicialmente foi realizada uma pesquisa bibliográfica de um relevante número de artigos em diversas bases de dados online de caráter científico. Sendo, entre outras, o PubMed, ScienceDirect, Elsevier e Scielo sobre a espécie *G.robertianum*.

Posteriormente foram selecionados os artigos previamente encontrados selecionando os estudos científicos referentes a ensaios de determinação do teor de compostos fenólicos e determinação de atividades antioxidante, anti-inflamatória e citostática.

Outras pesquisas realizadas para elaboração do tema em questão passaram pelas páginas oficiais da OMS, Sociedade Portuguesa de Botânica, Sigma Aldrich (Merck) e pelo livro “Kuby Immunology” de maneira a reunir a toda a informação necessária de encontro aos objetivos deste trabalho.

#### 4. *Geranium robertianum*

##### 4.1 Classificação taxonómica e características morfológicas

Relativamente à classificação taxonómica (Quadro 4.1) da espécie *G. robertianum* (Figura 4.1) esta é uma espécie que pertence à família *Geraniaceae* e à ordem *Geraniales*. Segundo a literatura é uma família constituída por mais de 750 espécies que estão distribuídas por todo o mundo. (30,31)

Quadro 4.1 Classificação taxonómica da espécie *G. robertianum*. (30,31)

<b><i>Geranium robertianum</i></b>	
<b>Classificação Taxonómica</b>	
<b>Reino</b>	<i>Plantae</i> - Plantas
<b>Subreino</b>	<i>Tracheobionta</i> – Plantas vasculares
<b>Sub-divisão</b>	<i>Spermatophyta</i> – Plantas de sementes
<b>Divisão</b>	<i>Magnoliophyta</i> – Plantas com flores
<b>Classe</b>	<i>Magnoliopsida</i> - Dicotiledónias
<b>Subclasse</b>	<i>Rosidae</i>
<b>Ordem</b>	<i>Geraniales</i>
<b>Família</b>	<i>Geraniaceae</i> – Família Gerânio
<b>Género</b>	<i>Geranium</i> L. - Gerânio
<b>Espécie</b>	<i>Geranium robertianum</i> L.



Figura 4.1 *Geranium robertianum*. Adaptada de [FloraOn], [Pedro, et al, 1990] (30,32)

*Geranium robertianum* é uma planta herbácea anual ou bienal, de cheiro intenso que se desenvolve em locais húmidos, mais propriamente em terrenos baldios. A sua altura pode variar de dez a sessenta centímetros, apresentando um sistema de enraizamento fibroso em que os caules se ramificam em várias direções a partir da base. (15)

O seu nome comum designa-se por “Erva-de-São-Roberto” ou “Red Robin” e é constituída por longos caules e pecíolos avermelhados, folhas verde-claro, podendo posteriormente apresentar um bordo avermelhado, com profundas lombadas, flores cor-de-rosa de cinco pétalas, cinco sépalas, cinco a dez estames e cinco carpelos que originam cinco frutos. (1)

Os frutos em forma de bico são uma característica desta família, que têm cinco mericarpos em torno de uma coluna central interna e, quando atingem o seu estado maduro, fazem lembrar um bico de cegonha. (Figura 4.1) (1,30)

Esta planta herbácea apresenta três tipos de tricomas secretores (Figura 4.2), os tricomas tipo I (Figura 4.2, imagem da esquerda), curtos (até 60  $\mu\text{m}$ ), geralmente procumbentes, são constituídos por uma célula apical oval, duas células do pé e uma célula basal, são os primeiros a desenvolver-se. (30) Os tricomas tipo II (Figura 4.2, imagem da direita), também curtos (até 60  $\mu\text{m}$ ), mas geralmente eretos, são constituídos por uma célula apical em forma de pêra, duas células de pé e uma célula basal. (30) Estes dois tricomas são abundantes em meristemas, primórdios foliares e folhas muito jovens. Os tricomas tipo III (cabeças de seta) (Figura 4.3) encontram-se nas folhas e com abundância nos caules das flores em que aquando do seu desenvolvimento são constituídos por uma célula apical vermelha alongada, cinco células pedunculadas com uma cutícula micropapilada e uma célula basal. (30)

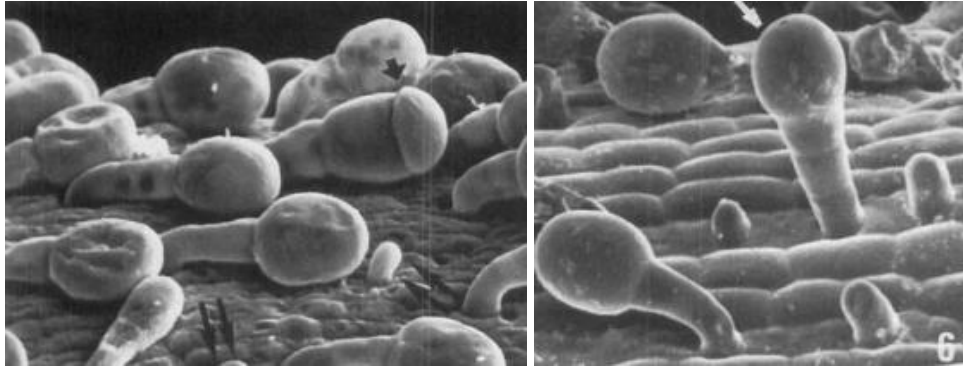


Figura 4.2 Tricomas tipo I (esquerda) e tricomas tipo II de *G. robertianum*. Adaptada de [Pedro, et al, 1990] (30)

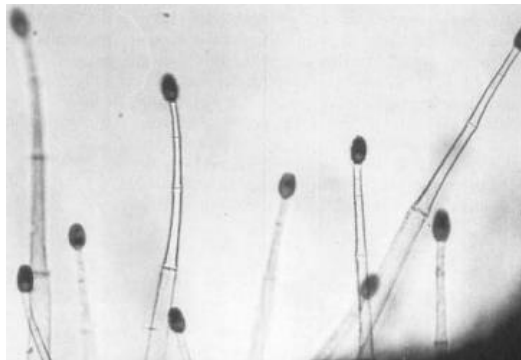


Figura 4.3 Tricoma tipo III. Adaptada de [Pedro, et al, 1990] (30)

Segundo vários estudos realizados, os processos de floração e frutificação variam muito consoante o clima onde a planta está presente geograficamente. (30,33,34) Esta planta pode atingir picos de floração e frutificação na primavera e verão, respetivamente, no entanto estes processos podem continuar, ainda que mais lentamente, até ao outono. (33,34)

As sementes desta espécie apresentam impermeabilidade à água e por este motivo a germinação depende de temperaturas mais elevadas e períodos longos em ambiente seco. Podem permanecer viáveis no solo até seis anos. (33)

As folhas da espécie *G. robertianum* contêm elevadas concentrações de cálcio, sódio e ferro e também de vitamina C. (33) A presença dos compostos fenólicos quercetina, kaempferol, ácido elágico, elagitaninos, entre muitos outros, (33) são os compostos de maior interesse nesta revisão. Os tricomas do tipo I e II segregam terpenóides e fenóis enquanto os de tipo III acumulam antocianinas na célula apical e segregam flavonóides. (33)

## 4.2 Distribuição geográfica

A espécie *G. robertianum* pode ser encontrada na Europa Central, do Norte de África, em zonas temperadas da Ásia, área atlântica da América do Norte e em zonas temperadas da América do Sul. A Figura 4.4 representa a distribuição da espécie pelas zonas anteriormente referidas. (3,35,36)

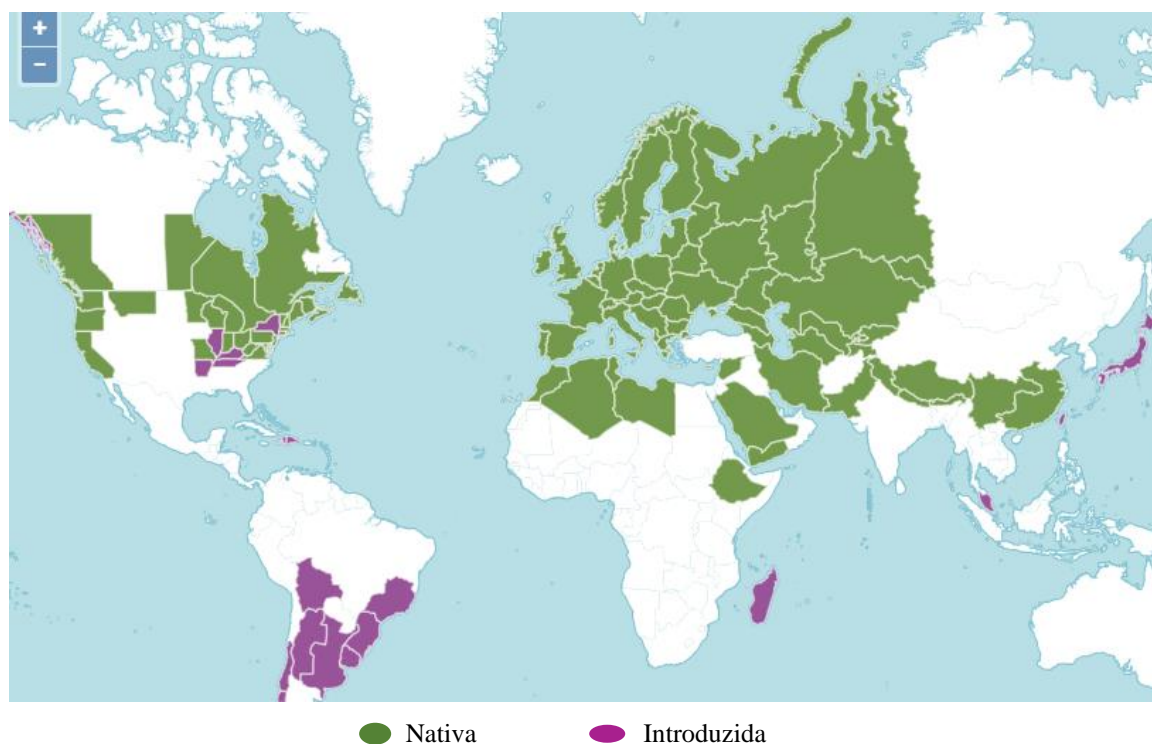


Figura 4.4 Distribuição mundial aproximada da espécie *G. robertianum*. Adaptada de [Plants of the world online] (37)

Em Portugal, segundo a Sociedade Portuguesa de Botânica (2024) a espécie *G. robertianum* pode ser encontrada em todo o território, mas maioritariamente na zona Norte, como é possível observar no mapa da Figura 4.5. (32)

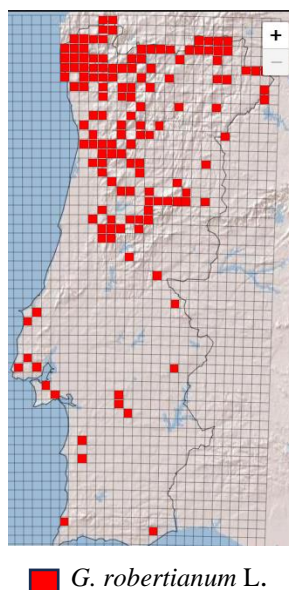


Figura 4.5 Distribuição geográfica de *G. robertianum*. Adaptada de [Plants of the world online] (37)

### 4.3 Fitoquímica de *G. robertianum* L.

Atualmente, a fitoquímica do género *Geranium* tem sido alvo de vários estudos que têm vindo a demonstrar uma predominância de constituintes fenólicos, sendo as classes de princípios ativos mais estudadas os taninos, os flavonoides e os óleos essenciais. (1,3,38)

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários e caracterizam-se pela presença de, pelo menos, um anel aromático ao qual se liga um ou mais grupos hidroxilo, podendo assim apresentar-se como uma estrutura molecular simples, um fenol, ou resultando em polímeros complexos provenientes de ligações a outros grupos funcionais, tais como grupos éter, éster ou heterósidos. (17)

Estes compostos fenólicos classificam-se como fenóis simples ou ácido fenólicos e polifenóis em que os primeiros compreendem os derivados dos ácidos benzóico e cinâmico e os segundos estão divididos em duas classes, os flavonoides e não-flavonoides. Os flavonoides subdividem-se em várias subclasses, como antocianinas, flavonas e flavonóis, entre outras, enquanto os não-flavonóides compreendem três subclasses como o linhanos, estilbenos e os taninos, como consta na Figura 4.6. (39)

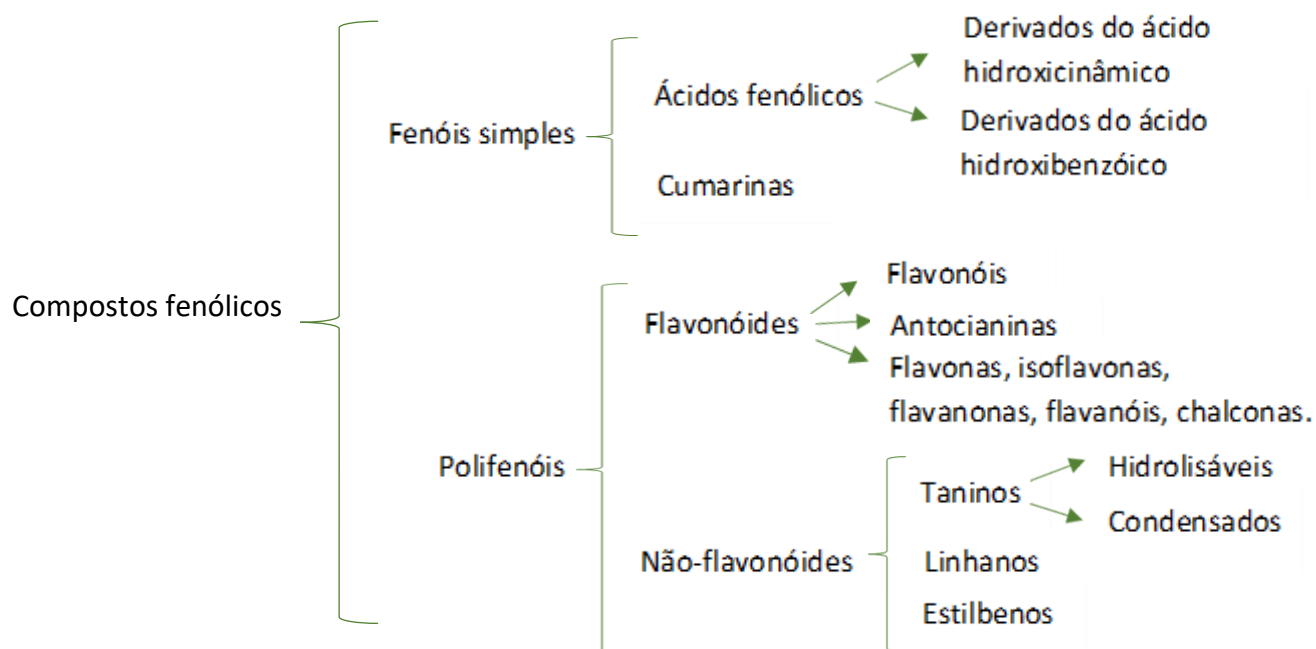
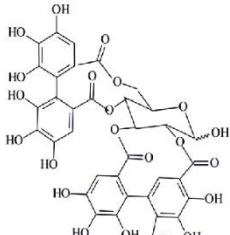


Figura 4.6 Esquema representando as várias classes dos compostos fenólicos.(40)

Quadro 4.2 Exemplos de alguns metabolitos presentes na espécie *G. robertianum*.(1,3,5,41,42)

Classe/Subclasse	Composto químico	Estrutura química
Ácidos fenólicos		
Ácidos hidroxicinâmico	Ácido cafeico	
Ácidos hidroxibenzóico	Ácido gálico	
Flavonoides		
Flavonóis	Quercetina	
	Kaempferol	
Não-flavonóides		

Taninos hidrolisáveis	<p>Elagitaninos</p> <p>Molécula central, geralmente a glucose, rodeada por unidades de ácido hexahidroxidifênico (HHDP)</p>	
-----------------------	---	---

Estes compostos fenólicos são produzidos pela maioria das plantas pois exercem funções de proteção e sustentação à planta protegendo-a contra fungos, insetos e outras ameaças externas. Para além destas funções, estes compostos têm também capacidade de agir como agentes redutores, doadores de eletrões ou átomos de hidrogénio, sequestradores de radicais livres e supressores do anião superóxido. Estas propriedades conferem-lhes a classificação de compostos antioxidantes. (17,35)

A outra classe de compostos químicos, e não menos importante, também investigada por alguns autores na *G. robertianum* são os óleos essenciais. (1,36,43) Estes compostos definem-se como substâncias lipofílicas e de odores característicos que resultam, tal como os compostos referidos anteriormente, do metabolismo secundário da planta. A sua estrutura química e compostos maioritariamente isolados serão abordados mais à frente no ponto referente aos óleos essenciais. (17)

#### 4.3.1 Taninos

Os taninos são polímeros polifenólicos naturais de elevada massa molecular (500 a 3000 Daltons), pouco solúveis em água ou em solventes orgânicos apolares. (44) Incluem-se nos metabolitos secundários produzidos pelas plantas e distinguem-se em dois grandes grupos, os taninos condensados e os taninos hidrolisáveis, Figura 4.7 (1,45)

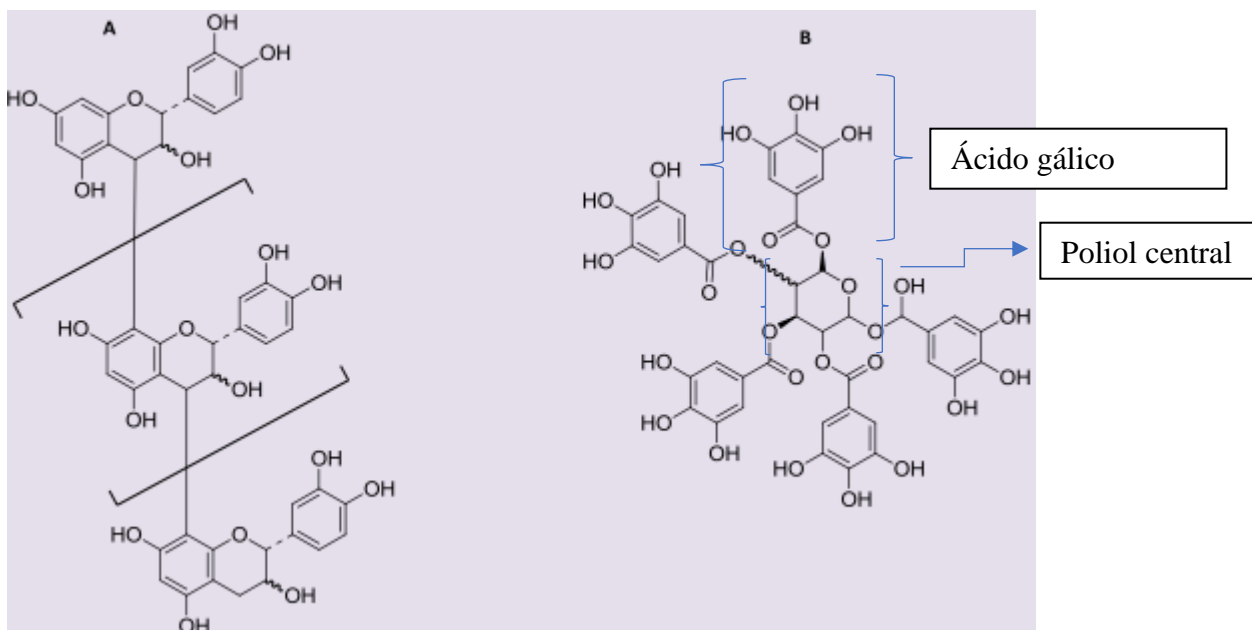


Figura 4.7 Parte das estruturas químicas dos taninos. A: Taninos condensados e B: Taninos hidrolisáveis. Adaptada de [Das, et al, 2020] (45)

Os taninos hidrolisáveis contêm uma molécula de glicose (ou outro açúcar) esterificada com ácido gálico (taninos gálicos ou galotaninos) ou ácido hexa-hidroxidifênico (HHDP) (elagitanino). (1,44) Segundo alguns estudos, os elagitaninos são mais frequentes na espécie *G. robertianum*, destacando-se o tipo geranino. (1,45) Este tipo de elagitanino é originado pela ligação entre uma unidade de HHDP, uma unidade de ácido desidro-hexa-hidroxidifênico (DHHDP) e uma unidade de ácido gálico ligado a uma molécula de glucose como se encontra representado na Figura 4.8. (1)

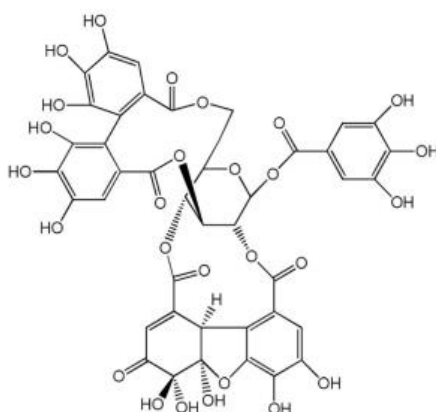


Figura 4.8 Estrutura básica de um monómero de elagitanino geranino. Adaptada de [Graça, et al, 2016] (3)

Aquele elagitanino foi isolado pela primeira vez em extratos de folhas da espécie *G. thumbergii*, espécie com tradição no Japão na terapêutica de distúrbios intestinais. (1)

### 4.3.2 Flavonoides

Os flavonoides têm sido os compostos fenólicos mais citados como os principais componentes biologicamente ativos encontrados nas espécies do género *Geranium*. (3) Apresentam-se com diferentes padrões e que se relacionam com a distribuição geográfica das espécies desta família. No entanto a quercetina e o kaempferol (Figura 4.9) são compostos predominantes na maioria das espécies desta família. (1)

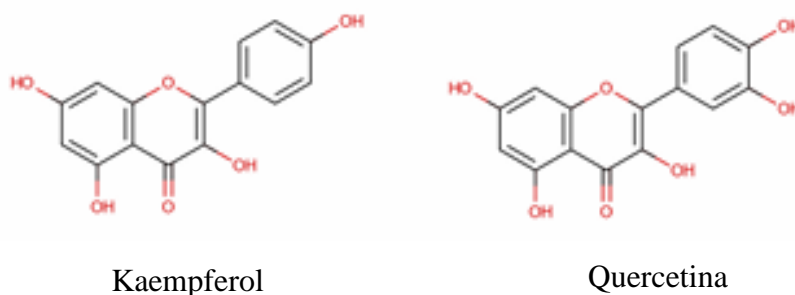


Figura 4.9 Estrutura química da quercetina e kaempferol. Adaptada de [Speisky, et al, 2023] (46)

Os flavonoides têm sido considerados antioxidantes não enzimáticos, têm demonstrado as suas propriedades farmacológicas atuando em sistemas biológicos como inibidores dos vários marcadores inflamatórios como a COX-2, a LOX, e a NADPH oxidase contribuindo, desta forma, para a saúde humana. (20,29,38)

### 4.3.3 Ácidos Fenólicos

Os ácidos fenólicos, são compostos não-flavonoides e incluem os ácidos hidrobenczóicos como o ácido elágico e o ácido gálico detetados em quantidades consideráveis em vários extratos de *G. robertianum*. Estes tipos de ácidos incluem, também, os ácidos derivados do ácido

hidroxicinâmico ainda que em concentrações menores e que também têm sido encontrados nesta espécie, como o ácido ferúlico e o ácido cafeico, entre outros. (1)

O ácido elágico resulta principalmente da hidrólise de elagitaninos endógenos libertando o intermediário HDDP (Figura 4.10) e o ácido gálico que é um precursor do ácido elágico (Figura 4.11) sendo estes dois os principais ácidos fenólicos de *G. robertianum*. (1) Estes dois compostos fenólicos vegetais endógenos apresentam características inibitórias na carcinogénese. (1)

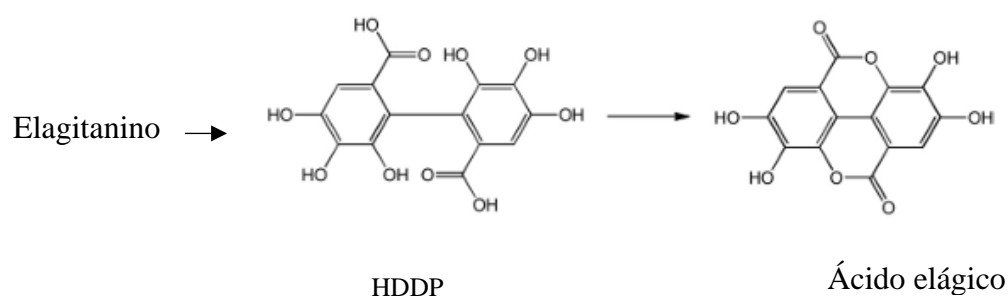


Figura 4.10 Reação endógena da formação do ácido elágico a partir de elagitaninos. Adaptada de [Graça, et al, 1016] (3)

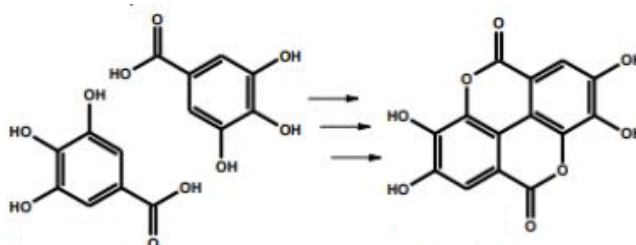


Figura 4.11 Obtenção do ácido elágico a partir do ácido gálico. Adaptada de [Jacques A, Zambiasi R, 2011] (47)

#### 4.3.4 Óleos essenciais

No que respeita à estrutura química, os óleos essenciais são sobretudo terpenos, compostos classificados com base em ligações de unidades de cinco carbonos (C5), designados isoprenos; e fenilpropanóides que têm como precursores diferentes aminoácidos como a fenilalanina, tirosina e di-hidroxifenilalanina. (48)

Os terpenos que apresentam duas unidades de isopreno designam-se por monoterpenos (C10), com três unidades, sesquiterpenos (C15) e com quatro unidades classificam-se como diterpenos

(C20). (1,48)). Estudos têm demonstrado que os monoterpenos são os compostos mais abundantes no óleo essencial de *G. robertianum*. Na Figura 4.12 apresentam-se as estruturas químicas dos monoterpenos que têm sido, maioritariamente, identificadas no seu óleo essencial. (1,4,36,42,43)

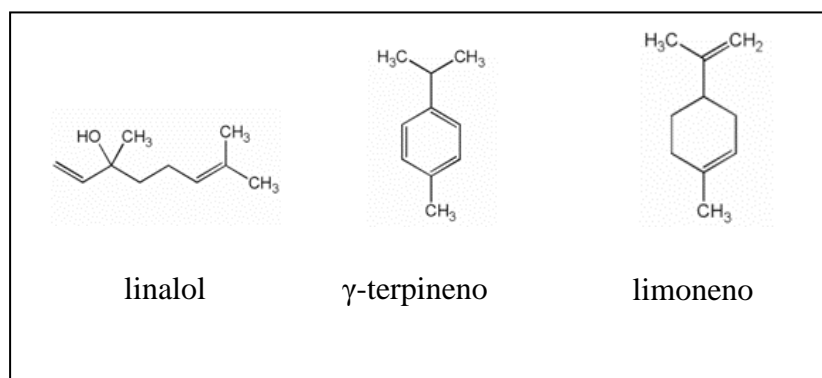


Figura 4.12 Alguns dos monoterpenos, maioritariamente, identificados na espécie *G. robertianum*. Adaptada de [Graça, et al, 2016], [Elzbieta, et al, 2017], [Pedro, et al, 1990] (1,36,43)

Os óleos essenciais são produzidos em estruturas de secreção especializadas e armazenados nos vários órgãos da planta tais como as folhas, flores, caules, raízes, rizomas, frutos e sementes. (17,48) Os métodos utilizados para a extração deste tipo de compostos variam de acordo com a localização do óleo essencial na planta, escala de extração entre outros, no entanto os mais utilizados para espécie são o método de extração por solventes orgânicos e a hidrodestilação. (1,36) Os compostos voláteis presentes no óleo essencial das partes aéreas de *G. robertianum* apresentam propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas e antimicrobianas. (1,36)

Numas amostras da planta *G. robertianum* recolhidas numa cidade da Polónia, Malin, e após secagem durante duas semanas à temperatura ambiente, os óleos essenciais foram isolados por micro-extração em fase sólida (SPME, do inglês *solid phase microextraction*) para caracterização dos óleos através dos perfis cromatográficos obtidos por GC-MS (do inglês *gas chromatography-mass spectrometry*). (36)

A análise por GC-MS levou à identificação de cento e dezassete dos cento e vinte e dois compostos detetados, os compostos voláteis com maior abundância identificados foram os

álcoois monoterpenóides, mais concretamente o linalol,  $\alpha$ -terpineol, geraniol, e os monoterpenos  $\gamma$ -terpineno, limoneno, entre outros. (36)

Em amostras recolhidas na Sérvia, não só das partes aéreas, mas também das raízes e rizomas, foi possível identificar cento e cinquenta e dois compostos das partes aéreas e cinquenta e três compostos de raízes e rizoma. (1) Os estudos identificaram, igualmente, uma grande percentagem de álcoois monoterpénicos e, também, ácidos gordos (ácido hexadecanóico) e derivados, no entanto, com uma diferença significativa, alguns dos compostos identificados nas amostras recolhidas na Polónia não se encontravam presentes nas amostras recolhidas na Sérvia, após cruzarem dados de estudos anteriormente realizados. (1) Os compostos mais abundantes no óleo essencial do estudo na Polónia não se encontravam presentes nas amostras recolhidas na Sérvia, tais como o limoneno e o  $\gamma$ -terpineno. O linalol e o geraniol foram identificados, mas em percentagens muito menores. (1) Segundo estes autores estas diferenças nas composições químicas poderão estar relacionadas com fatores ambientais e/ou variabilidade genética das amostras investigadas. (1)

Num outro estudo, o objetivo foi investigar e comparar a composição química das frações voláteis, obtidas por hidrodestilação, de partes aéreas, raízes e rizomas de várias espécies do género *Geranium* L., recolhidas no Planalto de Vlasina, Sul da Sérvia. (4) Após a separação e identificação dos compostos por GC-MS o estudo demonstrou que os sesquiterpenos eram predominantes nas partes aéreas na maioria das espécies. No entanto, o linalol e o ácido hexadecanóico foram os compostos que se revelaram predominantes em todas as partes estudadas de *G. robertianum*. (4)

A composição química dos óleos essenciais confere-lhes propriedades hidrofóbicas, o que revela ser uma propriedade importante uma vez que a hidrofobicidade permite danificar a membrana plasmática, levando à degradação da parede celular das bactérias, inibindo a sua atividade. (36) Por outro lado, terpenóides como o linalol também são responsáveis pelo potencial antioxidante dos óleos essenciais uma vez que participam na neutralização de radicais livres, contribuindo para a prevenção de algumas doenças cancerígenas. (49)

#### 4.4 Extração e isolamento dos diferentes extratos de *G. robertianum*

Os estudos realizados por vários investigadores tiveram como base extratos das diferentes partes da planta (folhas, flores, caules e raízes) de maneira a avaliar a sua capacidade, *in vitro*, para sequestrar, eliminar ou inibir o radical livre e/ou enzima utilizados. (2,14,15,35)

Num estudo, para avaliar a atividade antioxidante, as diferentes partes de plantas de *G. robertianum* (folhas, flores, caules e raízes) do Líbano, recolhidas na zona Norte, foram secas ao ar durante duas semanas e posteriormente maceradas em ciclos sucessivos com diclorometano, metanol e água durante quarenta e oito horas. (2) Os extratos foram, posteriormente, filtrados e secos por vácuo e armazenados a uma temperatura baixa (4°C) ao abrigo da luz até que fossem utilizados para avaliação da atividade antioxidante. (2) Neste estudo os compostos identificados foram, maioritariamente, o ácido elágico, ácido cafeico, ácido gálico, a quercetina e o kaempferol. (2)

Em outros estudos, onde foram avaliadas a capacidade dos antioxidantes presentes nos extratos de *G. robertianum* (num primeiro estudo) e a atividade citostática da mesma planta (segundo estudo), foram utilizadas apenas as folhas, também secas e trituradas até à obtenção de um pó fino, mas recorrendo a processos de maceração e posteriormente, concentração por microfiltração (MF) com dois tipos de membrana para obtenção dos extratos. (29,38)

No primeiro estudo os autores obtiveram, após a leitura das absorvâncias, o teor de compostos fenólicos total, a partir do extrato metanólico das folhas de *G. robertianum*. (15) O conteúdo fenólico total foi expresso em miligramas de extrato de ácido gálico por grama de peso seco (mg GAE/g de massa seca) com um valor de  $32,24 \pm 0,02$ . (15)

Para o processo de extração, no segundo estudo, os extratos foram macerados recorrendo a solventes hidroalcoólicos (50 e 70%) e após decorrer o tempo de contacto da planta com os solventes de extração a concentração em massa dos extratos nos solventes foi de 6 e 10% para o extrato aquoso e 10% para o extrato hidroalcoólico. (38)

Num passo seguinte os extratos foram concentrados por microfiltração (MF) recorrendo a membranas de celulose (Millipore) com poros de  $0,45\mu\text{m}$ . Posteriormente o extrato obtido foi concentrado por ultrafiltração (UF) com recurso a dois tipos de membrana, a Millipore (UF1) e uma membrana polimérica (polissulfona) (UF2). A Tabela 4.1 apresenta os valores das concentrações de polifenóis obtidas pelo estudo dos extratos de *G. robertianum*. (38)

*Tabela 4.1 Concentrações de polifenóis (µg/mL) obtidas dos extratos de G.robertianum. MF – Microfiltração; UF1 – Ultrafiltração em membrana Millipore; UF2 – Ultrafiltração em membrana polissulfona. Adaptada de [Neagu, et al, 2010] (38)*

<b>Amostra</b>	<b>Concentração de polifenóis total (µg/mL)</b>
Extrato aquoso a 6%	1,96
Extratos aquoso a 10%	3,19
10%_MF	3,15
10% conc_UF1	4,22
10% conc_UF2	4,68
50% extrato hidroalcoólico	4,21
70% extrato aquoso	3,28

Num estudo conduzido pelos mesmos autores, os extratos foram, também, obtidos por maceração, mas usando apenas água bidestilada como solvente e agitação mecânica esporádica. (29) Para o processo de purificação, realizaram o mesmo procedimento, mas primeiramente filtraram o extrato por papel de filtro. Os extratos e concentrados foram, da mesma forma obtidos, mas em vez de recorrerem a uma membrana de polissulfona utilizaram as duas membranas Millipore com limites diferentes. As concentrações de polifenóis obtidas estão apresentadas na Tabela 4.2. (29,38)

Tabela 4.2 Teor de polifenóis ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtidos por ultrafiltração dos extratos de *G. robertianum*. Adaptada de [Neagu, et al, 2017] (29)

Tipo de membrana	Millipore 10.000 Da	Millipore 1000 Da	
Amostra	Concentrado (C1)	Concentrado (C2)	C1 + C2 (50:50)
Extrato aquoso a 6%	745,61 $\pm$ 9,1	763,89 $\pm$ 9,3	695,55 $\pm$ 6,2

Após a obtenção dos concentrados os autores quantificaram e identificaram os diferentes compostos por HPLC (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*), Tabela 4.3. (29)

Tabela 4.3 Alguns dos compostos, maioritariamente, identificados e quantificados ( $\mu\text{g/g}$ ) por HPLC presentes nos extratos das folhas de *G. robertianum*. Adaptada de [Neagu, et al, 2017] (29)

Amostras	Ácido elágico	Ácido gálico
Extrato aquoso_MF a 6%	744,15	978,86
Conc_UF1	779,63	1056,79
Conc_UF2	900,13	1070,78
Conc_UF1 + Conc_UF2	729,13	958,43

Num outro estudo e também utilizando o sistema de membrana para obtenção dos constituintes ativos da espécie *G. robertianum* foram utilizadas as folhas como matéria-prima, também maceradas, obtiveram-se diferentes concentrações em massa do extrato (8, 10 e 15  $\mu\text{g/mL}$ ). Estes foram deixados por sete dias diluídos num solvente hidroalcoólico a diferentes percentagens (50, 70 e 96%). (50) Decorrido o tempo de contacto, foi obtido o teor de polifenóis totais presentes nas amostras através de UF com dois tipos de membranas, Millipore e Polimérica. A Tabela 4.4 apresenta o conteúdo de polifenóis totais das amostras utilizando os dois tipos de membranas acima referidos. (50)

Tabela 4.4 Teor de polifenóis ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtido, por UF, dos extratos das folhas de *G. robertianum*. Adaptada de [Neagu, et al, 2010] (50)

Teor de polifenóis ( $\mu\text{g/mL}$ )		
Tipo de membrana	Millipore 10.000 Da	Polimérica
Amostra	Concentrado	Concentrado
Extrato hidroalcoólico a 50% 8% da massa de extrato	330,61	319,43
Extrato hidroalcoólico a 50% 10% da massa de extrato	363,48	363,93
Extrato hidroalcoólico a 70% 10% da massa de extrato	437,97	397,07
Extrato hidroalcoólico a 50% 15% da massa de extrato	315,84	337,52
Extrato hidroalcoólico a 70% 15% da massa de extrato	310,73	284,55
Extrato hidroalcoólico a 96% 15% da massa de extrato	273,87	264,45

Outros estudos também identificaram e quantificaram os constituintes fenólicos mais abundantes na espécie de *G. robertianum*, através de HPLC e também por métodos como a espectrofotometria e a espectrometria de massa. (1,3) Na Tabela 4.5 apresentam-se os constituintes ativos maioritariamente isolados dos diferentes extratos e respetivo método e/ou técnica utilizados. (1,3)

Tabela 4.5 Alguns dos constituintes fenólicos presentes nos extratos de *G. robertianum* obtidos por várias técnicas e/ou métodos e respectivas quantidades. (1,3)

Parte da planta	Tipo de extrato	Composto identificado	Método/técnica de análise	Resultados
Folhas	aquoso	Ácido elágico	HPLC	744,15 µg/g
		Quercetina		1,73 µg/g
		Kaempferol		1,86 µg/g
		Ácido gálico		978,86 µg/g
Folhas	acetona e água	geranino	HPLC e espectroscopia UV	9,8 µg/g
Todas as partes da planta	aquoso	Quercetina	HPLC	4,83 µg/g
		Ácido cafeico		8,18 µg/g
Todas as partes da planta	aquoso	Quercetina	HPLC;	23,83 µg/g
		Ácido elágico	Espectrometria de massa (MS, do inglês <i>mass spectrometry</i> )	900,13 µg/g
		Ácido gálico		1070,78 µg/g
Todas as partes da planta	acetona	elagitaninos	Espectrometria UV-Vis	234 ± 16 mg/g
Todas as partes da planta	hidroalcoólico	Quercetina	HPLC;	839,2 µg/g
		Kaempferol		1434,3 µg/g
		Ácido caftárico		1669,2 µg/g
		Ácido elágico		75997,6 µg/g

Apesar das diferentes técnicas de isolamento dos compostos biológicos ativos as técnicas de extração são, na maioria dos estudos, a maceração, a frio, envolvendo solventes como a água, o metanol e/ou o diclorometano. (6,14,51) Para a purificação, os autores utilizaram diferentes

tipos de membrana, chegando os autores à conclusão de que a UF com membranas de celulose - Millipore revelou ser mais eficiente comparativamente a membrana polimérica. (38,50)

#### **4.5 Atividade Antioxidante da espécie *G. robertianum***

A capacidade antioxidante das espécies reside, sobretudo, nos seus compostos fenólicos, isto é, mais concretamente na capacidade destes compostos em sequestrar e eliminar espécies radicalares. (15,35)

##### **4.5.1 Ensaio antioxidante**

O potencial antioxidante dos extratos desta planta tem sido avaliado por vários investigadores, essencialmente com recurso aos ensaios 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzodiazolína-6-sulfónico) (ABTS). (1,5,15,38)

Estes ensaios, baseiam-se na transferência de um átomo de hidrogénio e de um eletrão e definem-se, por isso, ensaios mistos. No entanto existem outros como os que se baseiam apenas na transferência de um átomo de hidrogénio ou na transferência de um eletrão, como são exemplos o teste de capacidade de absorção de radicais de oxigénio (ORAC, do inglês *oxygen radical absorbance capacity*) e o teste do poder antioxidante redutor férrico (FRAP, do inglês *ferric reducing antioxidant power*), respetivamente. No entanto, ainda que com mecanismos diferentes todos eles são ensaios de recurso para a deteção do potencial antioxidante em ensaios *in vitro*. Estes ensaios são geralmente espectrofotométricos. Na Quadro 4.3 descreve-se de uma forma muito simples em que se baseia o método e o resultado. (2,5,15,20,35)

Segundo alguns autores, a capacidade de eliminação de radicais na presença de um antioxidante pode ser observada através de uma diminuição na absorvância da solução de DPPH com extrato comparativamente à solução do DPPH sem extrato, que apresenta valores de absorção máxima a 519 nm. (2)

Quadro 4.3 Técnicas usadas para medição da atividade antioxidante. (20)

Técnica	Ensaio da capacidade antioxidante	Método	Resultado final
Espectrometria	ORAC	Reação antioxidante induzida por radicais peroxi (2,2'-azobis-2-amidino-propano (AAPH))	Perda de fluorescência (da solução à medida que a atividade aumenta)
	FRAP	Reação antioxidante com um complexo de Fe (III)	Colorimetria (aumento da tonalidade da solução à medida que a atividade aumenta)
	DPPH	Reação antioxidante com um radical orgânico	Colorimetria (perda de coloração da solução à medida que a atividade aumenta)
	ABTS	Reação antioxidante com um radical catiónico	Colorimetria (perda de coloração da solução à medida que a atividade aumenta)

A capacidade antioxidante foi analisada, nos vários estudos, através da leitura das absorvâncias das soluções por espectrofotometria com recurso a medidas equivalentes, ou padrão, como o Trolox® (semelhante à vitamina E, mas hidrossolúvel) ou vitamina C. Podendo, posteriormente, ser quantificada, também, por outras medidas como o valor IC<sub>50</sub> – concentração necessária do composto para provocar 50% de efeito inibitório ou EC<sub>50</sub> – concentração do composto à qual se observa 50% do seu efeito máximo. (2,5,15,20)

O DPPH é um composto de cor púrpura e define-se como um radical livre estável, solúvel em metanol ou etanol ou nas respetivas soluções aquosas. Não é solúvel em água e por esse motivo o teor de água das soluções aquosas não deve exceder os 60%. (1,2,35)

Relativamente ao ensaio com ABTS, este composto é um radical de carga positiva que apresenta cor azul-esverdeada e ao ser reduzido à sua forma neutra, por um antioxidante, a solução perde intensidade ou torna-se incolor podendo ser posteriormente medido o potencial antioxidante por espectrofotometria, tal como no DPPH. No entanto o ABTS apresenta o máximo de absorção a comprimentos de onda superiores (731 nm). (20,52)

Na Tabela 4.6 podem ser observados alguns resultados de atividade antioxidante obtidos a partir de extractos de *G. robertianum* e determinados por vários métodos *in vitro*.

*Tabela 4.6 Resultados de atividade antioxidante das diferentes partes da planta G. robertianum utilizadas bem como os métodos utilizados. (2,5,15,38)*

Estudo	Parte da planta usada	Extração	Modelo	Método	Atividade antioxidante
Nº1	Folhas; flores; caules e raízes	Diclorometano; metanol; água	<i>In vitro</i>	DPPH (controlo positivo-vitamina C)	83% de inibição do radical no extrato com diclorometano das folhas ( $C_{\text{extrato}} = 1 \text{ mg/mL}$ ) (Controlo $\approx 88\%$ ) 97% de inibição do radical no extrato metanólico das raízes ( $C_{\text{extrato}} = 0,3 \text{ mg/mL}$ ) (Controlo $\approx 97\%$ ) $\approx 96\%$ de inibição do radical no extrato aquoso das folhas ( $C_{\text{extrato}} = 1 \text{ mg/mL}$ ) (Controlo $\approx 97\%$ )
Nº2	Folhas e caules	Água	<i>In vitro</i>	DPPH; ABTS (controlo positivo – Vitamina C);	$\text{DPPH}_{\text{IC50,folhas}} = 7,6 \pm 0,6 \text{ } \mu\text{g/mL}$ $\text{DPPH}_{\text{IC50,caules}} = 17,3 \pm 0,3 \text{ } \mu\text{g/mL}$ (Controlo = $4,8 \pm 0,3 \text{ } \mu\text{g/mL}$ ) $\text{ABTS}_{\text{IC50,folhas}} = 3,9 \pm 0,6 \text{ } \mu\text{g/mL}$

					ABTS <sub>IC50,caules</sub> = 5,8 ± 0.5 μg/mL (Controlo = 1,3 ± 0,2 μg/mL)
Nº3	Folhas	Metanol	<i>In vitro</i>	DPPH (Controlo positivo: hidroxitolueno butilado – BHT)	DPPH <sub>IC50</sub> = 19,98 ± 0,05 mg/mL (Controlo = 12 ± 0,13 mg/mL)
Nº4	Folhas	Água (a 6% e 10%); Água:Álcool (solução hidro- alcoólica a 50% e 70%)	<i>In vitro</i>	DPPH; ABTS (Controlo positivo – Trolox)	<b>Extrato Aquoso:</b> 6%: TEAC <sub>DPPH</sub> = 24,21 μmol Trolox/g 10%: TEAC <sub>DPPH</sub> = 223,99 21 μmol Trolox/g 6%: TEAC <sub>ABTS</sub> = 404,03 μmol Trolox/g 10%: TEAC <sub>ABTS</sub> = 768,22 μmol Trolox/g <b>Extrato hidroalcoólico:</b> 50%: TEAC <sub>DPPH</sub> = 217,06 μmol Trolox/g 70%: TEAC <sub>DPPH</sub> = 242.75 μmol Trolox/g 50%: TEAC <sub>ABTS</sub> = 1509,27 μmol Trolox/g 70%: TEAC <sub>ABTS</sub> = 782,30 μmol Trolox/g

Segundo o estudo Nº2, os autores verificaram que os extratos metanólico e aquoso das raízes e folhas, respetivamente, foram os que apresentaram maior capacidade sequestradora do radical DPPH, comparativamente ao padrão utilizado – vitamina C, com maior percentagem verificada no extrato metanólico das raízes a 0,3 mg/mL. Estes resultados demonstram, também, que o metanol e a água são bons solventes para a extração deste tipo de moléculas, como os flavonoides. (2)

No estudo Nº3, levado a cabo por outros autores, os mesmos concluíram que o extrato que revelou maior potencial antioxidante foi o extrato das folhas, tanto para o DPPH como para o ABTS, pois foi o que apresentou menor valor de IC<sub>50</sub>, isto é, a menor concentração que provoca 50% da atividade inibitória do radical. Ainda que não sejam valores melhores do que os do padrão utilizado, o ácido ascórbico ou vitamina C, são resultados que revelam um potencial

antioxidante importante. O facto de os valores de IC<sub>50</sub> para os extratos das folhas apresentarem melhores valores, poderá estar relacionado com o maior teor de compostos fenólicos totais observado no extrato das folhas (649,2 mg/g de extrato) comparativamente ao presente nos caules (536,4 mg/g de extrato). (5)

No estudo N°3, o extrato metanólico não revelou uma atividade tão significativa na eliminação de radicais DPPH ( $19,98 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$ ) comparativamente ao padrão utilizado, o BHT, ( $12 \pm 0,13 \mu\text{g/mL}$ ) em valores de IC<sub>50</sub>. (15) No entanto, é um valor que revela alguma atividade antioxidante, uma vez que nas análises de regressão os autores verificaram correlações entre a atividade de eliminação de radicais livres e o conteúdo fenólico. O valor de IC<sub>50</sub> obtido foi correlacionado com o teor fenólico total resultando num valor de  $r = 0,96$ , o que demonstra que existe uma relação entre estes compostos e a eliminação de espécies reativas. (15)

O estudo N°4 revelou uma atividade significativa independentemente dos radicais utilizados (DPPH e ABTS), no entanto a atividade dos polifenóis das amostras de *G. robertianum* contra o radical ABTS foi a que resultou em valores mais elevados, o que demonstra uma relação entre o teor de polifenóis dos extratos e a sua atividade antioxidante. O estudo revela também que o valor de atividade das amostras é também altamente dependente do método utilizado. (38)

A atividade antioxidante varia também de acordo com a parte da planta utilizada, o que é expectável, porque o tipo bem como o teor dos compostos bioactivos não é igual em toda a planta. A atividade antioxidante dos extratos de *G. robertianum* foi demonstrada, também, por outros autores noutros estudos. Num deles, foi avaliada a atividade antioxidante e anti-inflamatória dos extratos das diferentes partes da planta (folhas e caules). Os valores de IC<sub>50</sub> para os extractos das folhas foram de  $7,6 \pm 0,6$ ,  $3,9 \pm 0,6$ ,  $45,1 \pm 2,4 \mu\text{g/mL}$ , (DPPH\*, ABTS\* e OH\*, respetivamente), isto é, melhores do que aqueles observados para os extractos de caules, em que os valores de IC<sub>50</sub> foram maiores, logo atividade inferior comparativamente aos extractos das folhas ( $17,3 \pm 0,3$ ,  $5,8 \pm 0,5$ ,  $59,8 \pm 8,4 \mu\text{g/mL}$ ). (5) Como referido anteriormente, tais resultados poderão estar relacionados com o teor de constituintes fenólicos totais mais elevado no extrato das folhas (649,2 mg/g) do que no dos caules (536,4 mg/g). (5)

Para os ensaios DPPH e ABTS, o padrão utilizado foi o ácido ascórbico que, apesar de ter demonstrado melhor atividade do que ambas as amostras, a das folhas foi a que se revelou com melhor atividade, comparativamente à dos caules. (5) No ensaio de eliminação do OH\*, o padrão utilizado foi o manitol e, neste caso, ambos os extratos apresentaram valores de IC<sub>50</sub> inferiores aos do padrão utilizado ( $196,2 \pm 16,4 \mu\text{g/mL}$ ), o que demonstra um potencial antioxidante tanto

para os extratos das folhas como para os dos caules contra este radical. (5) A Tabela 4.7 apresenta os valores de IC<sub>50</sub> obtidos para as amostras contendo os extratos de folhas e de caules na presença dos radicais DPPH, ABTS e OH, tendo em conta os padrões utilizados. (5)

*Tabela 4.7 Valores de IC<sub>50</sub> (µg/mL) obtidos a partir de amostras contendo extratos de folhas e de caules, separadamente, contra os radicais utilizados e respetivos padrões. Adaptada de [Catarino, et al, 2017] (5)*

Extrato	Ensaio		
	DPPH	ABTS	OH
Folhas	7,6 ± 0,6	3,9 ± 0,6	45,1 ± 2,4
Caules	17,3 ± 0,3	5,8 ± 0,5	59,8 ± 8,4
Ácido ascórbico	4,8 ± 0,3	4,3 ± 0,2	196,2 ± 16,4

Num outro estudo com plantas de *G. robertianum*, recolhidas da zona de Santarém, Portugal, os autores avaliaram a relação entre os efeitos dos flavonoides presentes nos extratos das folhas e o potencial anti-hiperglicemia, estudando também os efeitos destes metabolitos também na eficiência da respiração mitocondrial no fígado de ratos Goto-Kakizaki (GK), um modelo de diabetes tipo 2. A administração de uma decocção de *G. robertianum* ao longo de 4 semanas não só diminuiu os níveis da glucose plasmática em 35% comparativamente ao grupo controlo que não teve contacto com o extrato, como melhorou os parâmetros da respiração mitocondrial hepática e aumentou a eficiência da fosforilação oxidativa, ou seja, melhor atividade na cadeia respiratória. (53) Estes resultados indicam uma maior eficiência na relação entre os sistemas de fosforilação e oxidação. (53)

#### 4.6 Atividade Anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória desta espécie, segundo vários investigadores, realizou-se pela avaliação do potencial inibitório dos principais marcadores biológicos da inflamação como LOX, COX-2, radical NO, HOCl e a expressão da iNOS. (1,5)

LOX e COX-2 são enzimas intervenientes na reação do ácido araquidónico que controlam a libertação de mediadores locais nos tecidos inflamados, os leucotrienos e prostaglandinas, respetivamente. (5) O NO<sup>\*</sup> é um radical que é libertado durante o processo da inflamação, induzido pela iNOS. Assim, o potencial de inibir esta enzima e/ou eliminar o radical em questão é um indicador do potencial anti-inflamatório das amostras em estudo desta espécie. (5)

#### **4.6.1 Ensaio anti-inflamatório**

##### **4.6.1.1 Ensaio de eliminação do radical HOCl<sup>\*</sup>**

Um dos oxidantes mais potentes produzido pelos neutrófilos num estado de inflamação é o HOCl<sup>\*</sup>, e desempenha, por isso, um papel relevante nestes processos metabólicos. (1)

A atividade anti-inflamatória dos constituintes fenólicos de *G. robertianum* contra este radical foi avaliada usando um extrato etanólico a 50% disponível no mercado e como controlo positivo, ou padrão, foi utilizada a quercetina. (1)

Para a apresentação dos resultados desta atividade, os autores utilizaram valores de IC<sub>50</sub>, concentração mínima necessária para inibir 50% da oxidação do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico pelo HOCl<sup>\*</sup> (1) O valor encontrado para a amostra comercial foi de 111,94 ± 1,79 μM o que demonstra uma atividade protetora contra o radical, quando comparado com o padrão utilizado, a quercetina, com valores de IC<sub>50</sub> de 34,22 ± 0,72 μM. (1)

##### **4.6.1.2 Ensaio de inibição da atividade da 5-LOX e eliminação do radical NO<sup>\*</sup>**

Num dos estudos, o extracto aquoso das folhas e dos caules de *G. robertianum*, do extrato aquoso, os autores tentaram avaliar a capacidade para inibir a enzima 5-LOX da soja e o poder de eliminação do radical NO<sup>\*</sup>, que é libertado no decurso de um estado de inflamação. (5)

Os autores testaram as atividades utilizando várias concentrações dos extractos. Usaram como referência o ácido ascórbico. Deste estudo, os autores verificaram que até uma concentração de 60 μg/mL os extractos não tinham atividade inibitória da enzima. (5) No entanto, os extractos tinham capacidade de eliminar o radical NO<sup>\*</sup>. Os resultados foram expressos em valores de

IC<sub>50</sub>. Os valores encontrados foram: IC<sub>50</sub> = 20,0 ± 0,9 µg/mL para o extrato das folhas e 24,2 ± 8,0 µg/mL para o extrato dos caules (Tabela 4.8). A referência (ácido ascórbico) tinha um valor bem mais alto (IC<sub>50</sub> 285,7 ± 15,4 µg/mL), isto é, uma atividade mais baixa comparativamente aos extractos. (5)

O facto do valor de IC<sub>50</sub> apresentar menor valor para a amostra contendo as folhas poderá indicar uma relação com o maior teor de constituintes fenólicos nestas partes da planta. (5) A Tabela 4.8 apresenta os resultados obtidos demonstrando que as atividades dos extratos foram dez vezes superiores quando comparados com as do padrão utilizado. (5)

*Tabela 4.8 Valores de IC<sub>50</sub> obtidos do ensaio de eliminação do radical NO• nos extratos utilizados (folhas e caules) de G. robertianum e composto padrão. Adaptada de [Catarino, et al, 2017] (5)*

Extratos utilizados	Valores de IC <sub>50</sub> (µg/mL)
Folhas	20,0 ± 0,9
Caules	24,2 ± 8,0
Ácido ascórbico (Padrão)	285,7 ± 15,4

#### **4.6.1.3** Ensaio de eliminação do radical NO• e efeitos na expressão da COX-2 e iNOS

Para verificar a expressão da iNOS os autores recorreram a uma linhagem de células de ratos da subfamília murinos. As células estudadas foram os macrófagos, uma vez que a expressão desta enzima está fortemente relacionada com a libertação do radical NO• pelos macrófagos. (5) No entanto, como em condições normais, estas células não expressam iNOS os investigadores recorreram a um estímulo por parte de um lipopolissacarídeo (LPS) agonista do recetor Toll-like, recetor este que apresenta um papel determinante no reconhecimento de agentes patogénicos e ativação da imunidade inata. (5,54) Em condições normais os macrófagos produzem níveis baixos de nitritos (aproximadamente 0,6 ± 0,2 µM) mas após o estímulo com LPS o estudo revelou um aumento em vinte vezes na libertação destas espécies reativas. (5)

Posteriormente foram adicionados os extratos das folhas e dos caules de *G. robertianum*, separadamente, às culturas de células de macrófagos com o LPS de maneira a analisar se se verificavam alterações nos níveis de nitritos libertados/acumulados. (5)

No final do tempo de contacto em solução, vinte e quatro horas, os autores verificaram que as amostras dos extratos de caules de *G. robertianum* apesar de não terem revelado qualquer expressão para a iNOS diminuíram significativamente os níveis do radical NO•, demonstrando que este extrato apresenta um potencial na atividade anti-inflamatória pela capacidade de eliminação deste radical. (5)

Num outro estudo, foi avaliado o potencial de extratos vegetais ricos em elagitaninos como fonte de metabolitos biodisponíveis da microbiota intestinal, as urolitinas, foi também avaliada a atividade anti-inflamatória dos metabolitos na produção de TNF- $\alpha$  e IL-6 em macrófagos derivados de uma linha celular de leucemia monocítica humana (THP-1). (55)

Após identificarem a composição dos elagitaninos dos extratos da planta de *G. robertianum*, por MS, verificaram que os compostos que apresentam o grupo HHDP com ligação ao ácido elágico são uma potencial fonte de metabolitos para a microbiota intestinal transformado-os em urolitinas. (55) No entanto, ainda não foram realizados estudos *in vivo* e *ex vivo* que revelem a capacidade dos metabolitos de *G. robertianum* se tornarem uma fonte de urolitinas, após ação da microbiota intestinal.

Relativamente ao estudo da atividade anti-inflamatória usando macrófagos derivados da linha celular THP-1 na presença de urolitinas, obtidas por incubação *ex vivo* de amostras fecais humanas com extratos aquosos de várias plantas, incluindo as de *G. robertianum*, e os autores verificaram uma inibição significativa na produção de TNF- $\alpha$  para todas as amostras onde estavam presentes urolitinas, em comparação com o composto padrão, um elagitanino puro e um grupo padrão, sem extrato. (55)

#### **4.7 Atividade anti-tumoral e antiproliferativa**

A atividade antiproliferativa foi estudada através de ensaios de viabilidade celular, *in vitro*, por avaliação da citotoxicidade dos extratos de *G. robertianum* contra células de carcinoma e células saudáveis e em linhas celulares hepáticas e de macrófagos. (1,5,29)

#### **4.7.1 Ensaio citotóxico**

Dois dos estudos avaliaram a citotoxicidade dos extratos de *G. robertianum*, recorrendo ao ensaio colorimétrico que se baseia na alteração de cor amarela do corante tetrazólio (brometo de dimetiltiazol-2-difeniltetrazólio (MTT)) para a cor roxa de cristais de formazan formados sob a ação de desidrogenases mitocondriais em células vivas. (56,57)

O reagente MTT consegue passar através da membrana celular assim como pela membrana mitocondrial interna de células vivas, provavelmente por apresentar carga positiva e estrutura lipofílica. (57)

Os cristais de formazan formados pelas células metabolicamente ativas é, segundo Neagu (29), proporcional ao número de células vivas e desta forma e por apresentar características insolúveis, torna possível a sua quantificação por espectrofotometria, sendo por isso, o teste do MTT, um ensaio considerado um indicador da viabilidade celular e proliferação celular assim como de citotoxicidade. (56–58)

##### **4.7.1.1 Ensaio de atividade citotóxica dos extratos de *G. robertianum* em células de carcinoma de laringe humano comparativamente a células saudáveis (29)**

Foi avaliada a viabilidade celular de células cancerígenas da laringe humana na presença de extratos fenólicos de *G. robertianum* de concentrações crescentes, ao fim de 24 e 48 h de contacto. (29)

No final procederam à contagem do número de células viáveis, recorrendo ao teste do MTT, tendo como referência um grupo controlo constituído por células cultivadas na ausência de extratos, consideradas com 100% de viabilidade. (29)

Os resultados demonstraram que a viabilidade celular diminuiu à medida que a concentração de extrato fenólico utilizado aumentava e ao mesmo tempo diminuía com o tempo de exposição. (29)

##### **4.7.1.2. Ensaio de citotoxicidade dos extratos de *G. robertianum* em linha celular hepática humana e linha celular de macrófagos de ratos (5)**

Neste estudo os autores também recorreram ao ensaio MTT para avaliar a citotoxicidade dos extratos de *G. robertianum* nos hepatócitos, com o objetivo de encontrar concentrações sem

citotoxicidade, comparando as concentrações de extratos das folhas com as dos caules. (5) Os resultados obtidos foram ao encontro aos esperados, uma vez que não se verificaram efeitos citotóxicos em nenhuma das concentrações testadas nas células não cancerígenas. (5)

A ausência de citotoxicidade de extratos de *G. robertianum* em células saudáveis também foi descrita num artigo de revisão, ao contrário de células cancerígenas de laringe humana onde se verificou citotoxicidade para todos os extratos estudados (hidro-alcoólicos e aquosos), o que levou os autores que há seletividade na atividade. Na mesma revisão, os autores descreveram também a correlação entre a atividade citotóxica sobre as células cancerígenas de laringe humana e o teor fenólico dos extratos. (1)

Neste estudo, os autores a partir dos extratos purificados e concentrados por processos de membrana, procederam à avaliação da citotoxicidade dos mesmos contra células de carcinoma laríngeo humanas e células saudáveis de rim de macaco. (1)

## 5. Considerações finais

O organismo vivo é dotado de mecanismos de defesa contra os mais variados agentes patogénicos. E é, por isso, necessário que todo o mecanismo de defesa consiga dar uma resposta adequada aos mais diversos estímulos de maneira a manter a homeostasia do corpo humano.

É, cada vez mais frequente a exposição a agentes causadores de alterações metabólicas e o surgimento de distúrbios patológicos assim como inúmeras doenças emergentes e, por isso, é necessário proteger ou erradicá-las do sistema imunitário.

Dentro das inúmeras doenças o cancro tem sido uma das que se tem manifestado com uma forte incidência e não sendo apenas uma doença, mas sim um conjunto de doenças e alterações metabólicas, como a inflamação ou o stress oxidativo que contribuem para a atividade citotóxica.

Este problema de elevada preocupação na saúde pública tem contribuído para que as plantas sejam uma fonte de interesse e recurso não só para a população, na medicina tradicional, mas também para a indústria farmacêutica.

Neste sentido, a presente revisão bibliográfica centrou-se nas propriedades biológicas da espécie *G. robertianum*, ainda que com poucos estudos clínicos, mas com elevado potencial e com distribuição por quase toda a Europa.

*G. robertianum* foi estudada pelas propriedades biológicas que os seus metabolitos secundários lhe atribuem, com destaque para as propriedades antioxidante, anti-inflamatória e antiproliferativa.

Os procedimentos usados para extração dos metabolitos foram similares nos vários trabalhos encontrados. A maceração é o procedimento mais usado e os solventes de extração são geralmente a água ou soluções hidro-alcoólicas. Apesar destes extratos apresentarem atividade biológica verifica-se que a concentração e/ou purificação geralmente leva a um aumento da atividade, como seria expectável, contudo, o tipo de procedimento ou material usado para a concentração origina amostras com atividades distintas.

Na maioria dos trabalhos encontrados as atividades são atribuídas a grupos fenólicos, incluindo elagitaninos, com a possibilidade de poderem ser transformados no intestino pela microbiota aí residente em urolitinas, metabolitos considerados com atividade antioxidante e anti-

inflamatória. Apesar de existirem já vários estudos sobre alguns alimentos ricos em elagitaninos que podem ser convertidos em urolitinas com interesse para a saúde humana, isto é, com atividade confirmada, para o caso de *G. robertianum* não foi possível encontrar um estudo aprofundado sobre o assunto.

Nos poucos estudos que foram realizados em linhas celulares, esta espécie demonstrou ser um potencial antiproliferativo e anti-cancerígeno, particularmente para linhas celulares cancerígenas, mas com pouca citotoxicidade para células não cancerígenas, o que mostra haver uma seletividade das amostras de *G. robertianum* para alguns tipos de células cancerígenas. Estudos mais aprofundados necessitam de ser efetuados, incluindo a utilização de compostos purificados extraídos desta espécie. Só depois desta abordagem será mais adequado avançar para ensaios *in vivo* e, posteriormente, ensaios clínicos, desde que os resultados *in vitro* confirmem a existência de atividade biológica que mereça ser averiguada para posterior utilização em medicina.

## 6. Referências bibliográficas

1. Graça VC, Ferreira ICFR, Santos PF. Phytochemical composition and biological activities of *Geranium robertianum* L.: A review. *Ind Corps Prod.* 2016, 87: 363-78.
2. Alhage J, Elbitar H. *In vitro* screening for antioxidant and antimicrobial properties of three lebanese medicinal plants crude extracts. *Pharmacogn Res.* 2019;11(2):127-33.
3. Graça VC, Barros L, Calhella RC, Dias MI, Carvalho AM, Santos-Buelga C, et al. Chemical characterization and bioactive properties of: *Geranium molle* L.: From the plant to the most active extract and its phytochemicals. *Food Funct.* 2016 May 1;7(5):2204–12.
4. Ilić M, Samardžić S, Kotur-Stevuljević J, Ušjak D, Milenković M, Kovačević N, et al. Polyphenol rich extracts of *Geranium* L. species as potential natural antioxidant and antimicrobial agents. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2021, 25(20):6283–94.
5. Catarino MD, Silva AMS, Cruz MT, Cardoso SM. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Geranium robertianum* L. decoctions. *Food Funct.* 2017, 8(9):3355–65.
6. Paun G, Neagu E, Tache A, Radu GL. Application of the Nanofiltration Process for Concentration of Polyphenolic Compounds from *Geranium robertianum* and *Salvia officinalis* extracts. *Chem Biochem Eng Q.* 2011, 25(4):453-60.
7. Kong C, Pang X, Su Z, Liu Y. Botany, ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of Erodii Herba Geranii Herba-An review. *J Ethnopharmacol.* 2023, 302:115858. doi: 10.1016/j.jep.2022.115858.
8. Apostu M, Tantarú G, Vieriu M, Panainte AD, Bibire N, Agoroaei L. Evaluation of *in vitro* Reducing Effect of Several Vegetable extracts on the digestive bioavailability of heavy metals. *Rev Chim.* 2017, 68(4):683-6.
9. Cancer Prevalence [Internet]. 2022 [cited 2024 Jul 4]. Organização Mundial de Saúde. Available from: <https://www.who.int/>
10. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. *Ann Rev Biochem.* 2017, 86:715-48.
11. Ferreira IC, Mv Abreu R. Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. *Bioanálise.* 2007, 4(2):32-9.
12. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Rad Biol Med.* 2010, 49:1603–16.
13. Ranneh Y, Ali F, Akim AM, Hamid HA, Khazaai H, Fadel A. Crosstalk between reactive oxygen species and pro-inflammatory markers in developing various chronic diseases: a review. *Appl Bio Chem.* 2017, 60: 327–38.

14. Manda G, Nechiflor MT, Neagu T-M. Reactive oxygen species, cancer and anti-cancer therapies. *Curr Chem Biol*. 2009, 3:342-366.
15. Jemia M Ben, Wannes WA, Ouchikh O, Bruno M, Kchouk ME. Antioxidant activity of Tunisian *Geranium robertianum* L. (Geraniaceae). *Nat Prod Res*. 2013;27(22):2076–83.
16. Leite ACR, Oliveira HCF, Utino FL, Garcia R, Alberici LC, Fernandes MP, et al. Mitochondrial generated nitric oxide protects against permeability transition via formation of membrane protein S-nitrosothiols. *Biochim Biophys Acta*. 2010, 1794(6-7): 1210-6.
17. Pacheco Borges L, Amorim VA. Metabolitos secundários de plantas secondary plant metabolites. *Revista Agrotecnologia*. 2020, 11(1):54-67.
18. Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM. Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. *Oxid Med Cell Longev*. 2016, 2016. doi: [10.1155/2016/1245049](https://doi.org/10.1155/2016/1245049).
19. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative Stress: Harms and benefits for human health. *Oxid Med Cell Longev*. 2017; 2017. doi: [10.1155/2017/8416763](https://doi.org/10.1155/2017/8416763).
20. Munteanu IG, Apetrei C. Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *Int J Mol Sci*. 2021, 22(7). doi: [10.3390/ijms22073380](https://doi.org/10.3390/ijms22073380).
21. Justiz Vaillant AA, Sabir S, Jan A. Physiology, Immune Response [Internet]. Stat Pearls Pub. EUA; 2024 [cited 2024 Jun 14]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539801/>.
22. Schetter AJ, Heegaard NHH, Harris CC. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis*. 2010, 31(1):37–49.
23. Owen JA, Punt J, Stranford SA, Jones PP. Kuby Immunology [Internet]. Seventh. New York: Susan Winslow; 2009 [cited 2024 Feb 20]. Available from: <https://archive.org/details/OwenKubyImmunology7thEd.2013/page/n5/mode/2up>.
24. Fernandes Q, Inchakalody VP, Bedhiafi T, Mestiri S, Taib N, Uddin S, et al. Chronic inflammation and cancer; the two sides of a coin. *Life Sci*. 2024, 338:122390. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.122390>.
25. Shah MA, Rogoff HA. Implications of reactive oxygen species on cancer formation and its treatment. *Semin Oncol*. 2021. 48:238–45.
26. Tokarz P, Blasiak J. Role of mitochondria in carcinogenesis. *Acta Biochim Pol*. 2014;61(4):671–8.

27. Vyas S, Zaganjor E, Haigis MC. Mitochondria and Cancer. *Cell*. 2016 Jul;166(3):555–66.
28. Świątek Ł, Wasilewska I, Boguszewska A, Grzegorzczak A, Rezmer J, Rajtar B, et al. Herb Robert's gift against human diseases: Anticancer and antimicrobial activity of *Geranium robertianum* L. *Pharmaceutics*. 2023, 15(5). [10.3390/pharmaceutics15051561](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15051561).
29. Neagu E, Paun G, Constantin D, Radu GL. Cytostatic activity of *Geranium robertianum* L. extracts processed by membrane procedures. *Arabian J Chem*. 2017, 10: S2547–53.
30. Pedro L, Campos P, Pais MS. Morphology, ontogeny and histochemistry of secretory trichomes of *Geranium robertianum* (Geraniaceae). *Nord J Bot*. 1990;10(5):501–9.
31. National Germplasm Resources Laboratory BMaryland. United States Department of Agriculture. Classification for Kingdom Plantae Down to *Genus Geranium* L. [Internet]. 2024 [cited 2024 Feb 14]. Available from: <https://plants.usda.gov/home/plantProfile?symbol=GERO>. 2020. United States Department of Agriculture.
32. Araújo PV, et al. *Geranium robertianum* L. - mapa de distribuição. Flora-On: Flora de Portugal Interactiva, Sociedade Portuguesa de Botânica [Internet]. 2024 [cited 2024 Jun 14]. Available from: [https://flora-on.pt/#/1geranium\\*geraniaceae\\*robertianum](https://flora-on.pt/#/1geranium*geraniaceae*robertianum).
33. Tofts RJ. *Geranium robertianum* L. *J Ecol*. 2004, 92:537-55.
34. Frey FM, Bukoski M. Floral symmetry is associated with flower size and pollen production but not insect visitation rates in *Geranium robertianum* (Geraniaceae). *Plant Species Biol*. 2014, 29(3):272–80.
35. Amaral S, Mira L, Nogueira JMF, Silva AP da, Helena Florêncio M. Plant extracts with anti-inflammatory properties-A new approach for characterization of their bioactive compounds and establishment of structure-antioxidant activity relationships. *Bioorg Med Chem*. 2009, 17(5):1876–83.
36. Gebarowska E, Politowicz J, Szumny A. Chemical composition and antimicrobial activity of *Geranium robertianum* L.essential oil. *Acta Pol Pharm*. 2017, 74(2):699-705.
37. *Geranium robertianum* L. [Internet]. 2020 [cited 2024 Jun 15]. Plants of the World Online. Available from: <https://powo.science.kew.org/>.
38. Neagu E, Păun G, Moroceanu V, Radu GL. Evaluation of antioxidant capacity of *Geranium robertianum* extracts. *Rev. Roum. Chim*. 2010, 55(6):321-5.
39. Vardhan PV, Shukla LI. Gamma irradiation of medicinally important plants and the enhancement of secondary metabolite production. *Int J Rad Biol*. 2017, 93: 967–79.

40. Kuntal D. Pharmacognosy and Phytochemistry - - I. First Edition. Nirali Prakashan; 2020. Pp. 169-182.
41. Grasel FDS, Ferrão MF, Wolf CR. Development of methodology for identification the nature of the polyphenolic extracts by FTIR associated with multivariate analysis. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2016, 153:94–101.
42. Radulović N, Dekić M, Stojanović-Radić Z. Chemical composition and antimicrobial activity of the volatile oils of *Geranium sanguineum* L. and *G. robertianum* L. (Geraniaceae). *Med Chem Res.* 2012, 21(5):601–15.
43. Pedro LG, Pais MSS, Scheffer JJC. Composition of the essential oil of *Geranium robertianum* L. *Flavour Fragr J.* 1992, 7(4):223–6.
44. Dias HP, Paiva DS, Romão W, Endringer DC. Identification of polyphenols: Sequence for teaching high school chemistry. *Rev Virtual Quim.* 2014, 6(2):467–77.
45. Das AK, Islam MN, Faruk MO, Ashaduzzaman M, Dungani R. Review on tannins: Extraction processes, applications and possibilities. *South Afr J Bot.* 2020, 135:58–70.
46. Speisky H, Arias-Santé MF, Fuentes J. Oxidation of quercetin and kaempferol markedly amplifies their antioxidant, cytoprotective, and anti-inflammatory properties. *Antioxidants.* 2023, 12(1):155. doi: [10.3390/antiox12010155](https://doi.org/10.3390/antiox12010155).
47. Jacques AC, Zambiazi RC. Phytochemicals in blackberry. *Semina:Ciencias Agrarias.* 2011, 32:245–60.
48. Doughari JH. Phytochemicals: Extraction methods, basic structures and mode of action as potential chemotherapeutic agents. In *phytochemicals – a Global Perspective of their Role in Nutrition and Health*. Ed.: Venketechwer Rao. doi: [10.5772/26052](https://doi.org/10.5772/26052).
49. Bhavaniramya S, Vishnupriya S, Al-Aboody MS, Vijayakumar R, Baskaran D. Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. *Grain Oil Sci Technol.* 2019, 2(2):49–55.
50. Neagu E, Roman GP, Radu GL, Nechifor G. Concentration of the bioactive principles in *Geranium robertianum* extracts through membranare procedures (ultrafiltration). *Rom Biotech Letters.* 2010, 15(1):5042-5048.
51. Singh R, Purkait MK. Membrane separation principles and applications. *Microfiltration membranes. Handbooks Sep Sci.* 2019, 111-146. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812815-2.00004-1>.
52. Ilyasov IR, Beloborodov VL, Selivanova IA, Terekhov RP. ABTS/PP decolorization assay of antioxidant capacity reaction pathways. *Int J Mol Sci.* 2020, 21. doi: [10.3390/ijms21031131](https://doi.org/10.3390/ijms21031131).

53. Ferreira FM, Peixoto F, Nunes E, Sena C, Seça R, Santos MS. “MitoTea”: *Geranium robertianum* L. decoctions decrease blood glucose levels and improve liver mitochondrial oxidative phosphorylation in diabetic Goto-Kakizaki rats. *Acta Biochim Pol.* 2010, 57(4):339-402.
54. Rizzi Alves PH, Togneri Ferron AJ, Costa MR, Hasimoto FK, Gregolin CS, Garcia JL, et al. Relationship between innate immune response toll-like receptor 4 (Tlr-4) and the pathophysiological process of obesity cardiomyopathy. *Arq Bras Cardiol.* 2021, 117(1):91–9.
55. Piwowarski JP, Granica S, Zwierzyńska M, Stefańska J, Schopohl P, Melzig MF, et al. Role of human gut microbiota metabolism in the anti-inflammatory effect of traditionally used ellagitannin-rich plant materials. *J Ethnopharmacol.* 2014, 155(1):801–9.
56. Lim SW, Loh HS, Ting KN, Bradshaw TD, Allaudin ZN. Reduction of MTT to Purple Formazan by Vitamin E Isomers in the absence of cells. *Trop Life Sci Res.* 2015, 26(1):111-20.
57. Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The MTT assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *Int J Mol Sci.* 2021, 22(23). doi: [10.3390/ijms222312827](https://doi.org/10.3390/ijms222312827).
58. Merck\_Sigmaaldrich [Internet]. 2024 [cited 2024 Jul 1]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/cell-proliferation-kit-i-mtt>.



