

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Mara Alexandra Matias Nunes

CÔABONECARE

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOSTEOPORÓTICO
DE PLANTAS DO VALE DE CÔA

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Medicinal,
orientada pela Professora Célia Margarida dos Santos Cabral e
pela Professora Patrícia Dias Mendonça Rijo e apresentada ao
Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia

setembro de 2023

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Mara Alexandra Matias Nunes

CÔABONECARE

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOSTEOPORÓTICO
DE PLANTAS DO VALE DE CÔA

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Medicinal,
orientada pela Professora Célia Margarida dos Santos Cabral e
pela Professora Patrícia Dias Mendonça Rijo e apresentada ao
Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia

setembro de 2023

Agradecimentos

É com grande satisfação que expresso os meus agradecimentos a todos os que contribuíram de forma significativa para a realização deste trabalho.

Primeiramente, gostaria de expressar a minha gratidão à minha orientadora, Professora Doutora Célia Cabral, por ter aceitado receber-me no seu grupo, orientar a minha dissertação, pela transmissão de conhecimentos, disponibilidade durante todo o percurso, por me encorajar a aceitar novos desafios e a encontrar sempre uma solução. À minha coorientadora, Professora Doutora Patrícia Rijo, por me acolher no seu grupo e aceitar a colaboração. Pela disponibilidade, ajuda e conhecimentos transmitidos.

Às Doutoradas Lillian Barros e Maria Inês Dias do laboratório para a sustentabilidade e tecnologia da região da montanha (SusTEC), do Centro de Investigação da Montanha (CIMO), integrado no Instituto Politécnico de Bragança (IPB), pela análise por LC-DAD-ESI/MSn do perfil fenólico dos extratos estudados.

Um especial agradecimento aos membros do grupo MitoXT pelo espírito de equipa e ajuda que demonstraram. Ao Doutor José Teixeira, Heloísa Gerardo e Luís Grilo pelo apoio e paciência despendido para a realização dos ensaios. Ao Doutor Paulo Oliveira por me ter permitido realizar parte do meu trabalho no seu grupo.

À Adriana, um agradecimento especial por tudo o que me ensinou, pelo tempo e paciência que perdeu comigo, por todas as hipóteses que discutiu comigo e por toda a mentoria durante a minha passagem pelo laboratório.

Ao grupo Plants4Health por me ter recebido, pelo apoio, paciência e disponibilidade durante a minha passagem.

Ao grupo Bio.Natural por me ter acolhido tão prontamente. Um grande agradecimento à Vera por todos os conselhos e ajuda transmitida. À Márcia e à Gabi por toda a simpatia, amizade e apoio.

À Doutora Rafaela e à Professora Doutora Andreia, um grande agradecimento por toda a paciência, compreensão e amizade transmitidas

Aos meus pais, quero expressar o meu amor e gratidão pela infindável paciência e apoio incondicional. As palavras nunca serão suficientes para agradecer tudo o que me permitiram alcançar e para descrever a importância que vocês têm na minha vida e nos meus sucessos acadêmicos.

À minha pessoa, Márcio, sem ti este trajeto teria sido muito mais difícil. Obrigado por todo o amor, apoio emocional, paciência e resiliência para me mostrares que era capaz.

A todos os meus amigos em particular, Joana, Beatriz, Hélder, Mariana, Rafa, Rita e Ana pelo apoio, pelos bons momentos e pelas partilhas constantes, um grande obrigado.

Esta dissertação foi apoiada por:



Fundação para a Ciência e
Tecnologia

Projetos estratégicos: UIDB/04539/2020, UIDP/04539/2020, LA/P/0058/2020 (CIBB), UIDB/04567/2020, UIDP/04567/2020 e projeto C^oaMedPlants COA/BRB/0019/2019



Coimbra Institute for Clinical and
Biomedical Research



Faculdade de Medicina da
Universidade de Coimbra



Instituto politécnico de Bragança



Centro de Neurociências e Biologia
Celular da Universidade de Coimbra



Research Center for Biosciences &
Health Technologies



Projeto C^oaMedPlants
COA/BRB/0019/2019

Índice

Índice de Figuras	vii
Índice de Tabelas	xi
Abreviaturas e Símbolos.....	xiii
Resumo	xvii
Abstract.....	xix
I. Introdução.....	1
I.1 Tecido Ósseo.....	1
I.1.1 O processo de remodelação óssea	2
I.1.2 Espécies reativas de oxigénio (ROS) e Mitocôndria.....	7
I.2 Osteoporose	9
I.2.1 Epidemiologia e Patofisiologia.....	10
I.2.2 Atuais Terapias	16
I.3 Plantas Medicinais e compostos naturais.....	19
I.3.1 Compostos naturais bioativos.....	20
I.3.2 Estudos com Plantas Medicinais na Osteoporose.....	22
I.3.3 Equisetum ramosissimum Desf.	22
I.3.4 Urtica	24
II. Objetivos.....	29
III. Materiais e Métodos	31
III.1 Reagentes	31
III.2 Material Vegetal	33
III.3 Métodos de extração	34
III.4 Caracterização química dos extratos.....	35
III.4.1 LC-DAD-ESI/MSn.....	35
III.4.2 Avaliação de alcaloides pelo reagente de Dragendorff	36
III.4.3 Quantificação de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu .	36
III.5 Avaliação antioxidante pelo método DPPH	37
III.6 Fracionamento	38
III.6.1 Cromatografia em camada fina e preparativa (TLC e PTLC).....	39
III.7 Linha celular e condições de cultura.....	39
III.7.1 Raw 264.7.....	39
III.8 Ensaio de toxicidade.....	40

III.8.1	Avaliação da atividade metabólica – Alamar Blue™	40
III.8.2	Avaliação da densidade celular - Sulforodamina B.....	41
III.9	Produção de espécies Reativas de Oxigênio (ROS)	41
III.9.1	ROS Mitocondrial - MitoSOX	41
III.9.2	ROS Intracelular - DCFDA	42
III.10	Processo de diferenciação celular	44
III.10.1	Marcador celular: Fosfatase ácida resistente ao tartarato - TRAP	44
III.10.2	Avaliação dos parâmetros bioenergéticos mitocondriais	44
III.10.3	Quantificação dos níveis de ATP	47
III.11	Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	47
III.11.1	Western Blot.....	47
III.11.2	PCR.....	50
III.11.3	qt-PCR	52
III.11.4	Catalase.....	53
III.12	Análise estatística.....	53
IV.	Resultados.....	55
IV.1	Fitoquímica	55
IV.1.1	Extrações	55
IV.1.2	Fracionamento	63
IV.2	Ensaio <i>in vitro</i>	67
IV.2.1	Toxicidade	67
IV.2.2	Diferenciação.....	69
IV.2.3	Avaliação dos parâmetros bioenergéticos mitocondriais	70
IV.2.4	Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	80
V.	Discussão.....	91
VI.	Conclusão	99
VII.	Perspetivas Futuras	101
VIII.	Referências	103
Anexos	113
Anexo 1	– Análise do perfil fenólico dos extratos por LC-DAD-ESI/MSn.....	113
Anexo 2	– Análise do perfil metabólicos celular por <i>Seahorse XF</i>	117

Índice de Figuras

Figura 1 - Estrutura do tecido ósseo. Adaptada em BioRender	1
Figura 2 – A unidade básica multicelular e o processo de remodelação óssea. Adaptada em BioRender	2
Figura 3 - Formação e diferenciação de osteoclastos. Adaptada em BioRender	3
Figura 4 - Células originárias dos osteoblastos. Adaptada de Biorender	6
Figura 5 – Algumas espécies reativas de oxigénio e as fontes endógenas das mesmas. Adaptada em BioRender.....	8
Figura 6 - Processo de desregulação na osteoporose. Adaptada de BioRender	11
Figura 7 - Reação de Fenton com Fe ²⁺ . Adaptada em BioRender	15
Figura 8 - Estruturas de fitoestrogénios mais comuns	21
Figura 9 - <i>Equisetum ramosissimum</i> Desf. (foto obtida no decurso do projeto CÔaMedPlants na região do Vale do CÔa).....	23
Figura 10 - <i>Urtica dioica</i> L. (foto obtida no decurso do projeto CÔaMedPlants na região do Vale do CÔa).....	25
Figura 11 - <i>Urtica urens</i> L. (foto obtida no decurso do projeto CÔaMedPlants na região do Vale do CÔa).....	27
Figura 12 - Reação da nicotina com o reagente de Dragendorff. Adaptado de Raal <i>et al.</i> , 2020	36
Figura 13 - Constituintes do reagente de Folin-Ciocalteu (A); Reação de oxidação-redução do ácido gálico com o reagente (B). Adaptado de Kupina <i>et al.</i> , 2018 e Mikołajczak <i>et al.</i> , 2021	37
Figura 14 - Reação de oxidação-redução do DPPH com a quercetina, que é estabilizada por ressonância	38
Figura 15 - Reação de redução da resazurina pelas enzimas desidrogenase. Adaptada de BioRender	40
Figura 16 - Reação de oxidação da sonda <i>MitoSOX red</i> pelo anião superóxido. A cinzento encontra-se assinalada o substituinte catiónico responsável pela interação com os ácidos nucleicos. Adaptado de Villaverde <i>et al.</i> , 2019.....	42
Figura 17 - Reação de oxidação da sonda DCFDA por ROS intracelulares. Adaptado de Nova <i>et al.</i> , 2020.....	43
Figura 18 - Esquema dos parâmetros avaliados no ensaio <i>Seahorse XF Cell Mito Stress</i> : respiração basal, consumo de oxigénio associado a ATP, fuga de prótons, consumo máximo de oxigénio e a capacidade respiratória restante, adaptada do website da Agilent (Agilent Technologies, CA, EUA) (cima) e representação da cadeia transportadora de eletrões (baixo), adaptada de BioRender.....	46
Figura 19 - Mecanismo de ação do kit para avaliar a viabilidade celular através da medição dos níveis de ATP. Adaptada do website da Promega.....	47
Figura 20 - A separação de fases após a adição de clorofórmio à solução em TRIzol™. Criada em BioRender.....	50
Figura 21 - Revelação por TLC das extrações realizadas por decocção (D), simples e exaustiva e por maceração hidroetanólica (EHA), simples e exaustiva das três espécies sob luz UV a 366	

nm após revelação com ácido sulfúrico e a 254 nm. A banda à esquerda corresponde às extrações simples (s) e à direita, à extração exaustiva (e)..... 57

Figura 22 - TLC correspondente ao extrato que apresentou a presença de alcaloides. A seta indica a banda na qual se encontram..... 59

Figura 23 - Quantificação dos fenólicos totais através do método de Folin-Ciocalteu dos extratos obtidos por decocção (A) e por maceração hidroetanólica (B). Os valores são apresentados em mg/g de extrato em equivalentes de ácido gálico relativos a 6 réplicas de 2 ensaios independentes..... 61

Figura 24 - Avaliação da capacidade de captação de agentes radicais pelo ensaio de DPPH do extratos obtidos por decocção (A) e por maceração hidroetanólica (B). Os valores são expressos correspondem a 6 réplicas de 2 ensaios independentes..... 62

Figura 25 - Representação da obtenção de frações dos extratos estudados (A). Exemplo representativo da eluição e divisão das frações do extrato hidroetanólico da espécie ER (B)... 63

Figura 26 - Quantificação dos fenólicos totais através do método de Folin-Ciocalteu das frações obtidas dos extratos por decocção (A) e por maceração hidroetanólica (B). Os valores são apresentados em mg/g de extrato em equivalentes de ácido gálico relativos a 6 réplicas de 2 ensaios independentes..... 64

Figura 27 - Avaliação da atividade metabólica das RAW 264.7 na presença dos extratos ER, UD e UU obtidos por decocção (D) e maceração hidroetanólica (EHA) ao fim de 24h e 5 dias. Todos os ensaios estão normalizados em % de controlo. Foram realizado 4 réplicas de 2 ensaios independentes. **** $p < 0,0001$; *** $p \leq 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ 68

Figura 28 - Avaliação da capacidade inibitória dos extratos em osteoclastos maduros em RAW 264.7 após exposição a RANKL e/ou E2 e/ou extratos hidroetanólicos. Imagens obtidas ao fim de 6 dias de exposição de 3 réplicas de 1 ensaio independente. Legenda: A – sem fatores de diferenciação; B – com a presença de RANKL; C – com a presença de estradiol; D – com ambos os fatores de diferenciação; AE/BE/DE – as condições descritas e com extrato da espécie ER; AD/BD/DD - as condições descritas e com extrato da espécie UD.; AU/BU/DU - as condições descritas e com extrato da espécie UU..... 70

Figura 29 – Parâmetros da respiração mitocondrial – consumo de oxigénio não mitocondrial e respiração basal - de células RAW 264.7 após exposição a RANKL e/ou E2 e/ou extratos hidroetanólicos durante 24h, de 6 ou mais réplicas de 1 ensaio independente, na presença e/ou ausência de fatores de diferenciação sem extratos (A); na presença de extratos sem fatores de diferenciação (B); na presença de extratos e do fator RANKL (C); na presença de extratos e ambos os fatores de diferenciação (D) Todos os ensaios estão normalizados em % de controlo. **** $p < 0,0001$; *** $p \leq 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; Gráfico A: Preto vs. controlo; Cinzento vs. RANKL 71

Figura 30 - Parâmetros da respiração mitocondrial – respiração máxima e disrupção do potencial de membrana - de células RAW 264.7 após exposição a RANKL e/ou E2 e/ou extratos hidroetanólicos durante 24h, de 6 ou mais réplicas de 1 ensaio independente, na presença e/ou ausência de fatores de diferenciação sem extratos (A); na presença de extratos sem fatores de diferenciação (B); na presença de extratos e do fator RANKL (C); na presença de extratos e ambos os fatores de diferenciação (D). Todos os ensaios estão normalizados em % de controlo. **** $p < 0,0001$; *** $p \leq 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Gráfico A: Preto vs. controlo; Cinzento vs. RANKL 73

Figura 31 - Parâmetros da respiração mitocondrial – produção de ATP e capacidade respiratória restante - de células RAW 264.7 após exposição a RANKL e/ou E2 e/ou extratos hidroetanólicos durante 24h, de 6 ou mais réplicas de 1 ensaio independente, na presença e/ou ausência de fatores de diferenciação sem extratos (A); na presença de extratos sem fatores de diferenciação (B); na presença de extratos e do fator RANKL (C); na presença de extratos e ambos os fatores de

diferenciação (D). Todos os ensaios estão normalizados em % de controlo. ****p< 0,0001; ***p≤ 0,001; **p< 0,01 ;*p< 0,05. Gráfico A: Preto vs. controlo; Cinzento vs. RANKL 74

Figura 32 – Avaliação da produção de ATP de células RAW 264.7 após exposição a RANKL e/ou E2 e/ou extratos hidroetanólicos durante 24h, de 8 réplicas de 1 ensaio independente, na presença e/ou ausência de fatores de diferenciação sem extratos (A); na presença de extratos sem fatores de diferenciação (B); na presença de extratos e do fator RANKL (C); na presença de extratos e ambos os fatores de diferenciação (D). Todos os ensaios estão normalizados em % de controlo. ****p< 0,0001; **p< 0,01. Gráfico A: Preto vs. controlo; Cinzento vs. RANKL..... 75

Figura 33 - Parâmetros da respiração mitocondrial – consumo de oxigénio não mitocondrial e respiração basal - de células RAW 264.7 após exposição a RANKL e/ou E2 e/ou extratos hidroetanólicos durante 72h, de 6 ou mais réplicas de 1 ensaio independente, na presença e/ou ausência de fatores de diferenciação sem extratos (A); na presença de extratos sem fatores de diferenciação (B); na presença de extratos e do fator RANKL (C); na presença de extratos e ambos os fatores de diferenciação (D). Todos os ensaios estão normalizados em % de controlo. ****p< 0,0001; ***p≤ 0,001; **p< 0,01 ;*p< 0,05; Gráfico A: Preto vs. controlo; Cinzento vs. RANKL 77

Figura 34 - Parâmetros da respiração mitocondrial – respiração máxima e disrupção do potencial de membrana - de células RAW 264.7 após exposição a RANKL e/ou E2 e/ou extratos hidroetanólicos durante 72h, de 6 ou mais réplicas de 1 ensaio independente, na presença e/ou ausência de fatores de diferenciação sem extratos (A); na presença de extratos sem fatores de diferenciação (B); na presença de extratos e do fator RANKL (C); na presença de extratos e ambos os fatores de diferenciação (D). Todos os ensaios estão normalizados em % de controlo. ****p< 0,0001; ***p≤ 0,001; **p< 0,01 ;*p< 0,05. Gráfico A: Preto vs. controlo; Cinzento vs. RANKL 78

Figura 35 - Parâmetros da respiração mitocondrial – respiração associada à produção de ATP e capacidade respiratória restante - de células RAW 264.7 após exposição a RANKL e/ou E2 e/ou extratos hidroetanólicos durante 72h, de 6 ou mais réplicas de 1 ensaio independente, na presença e/ou ausência de fatores de diferenciação sem extratos (A); na presença de extratos sem fatores de diferenciação (B); na presença de extratos e do fator RANKL (C); na presença de extratos e ambos os fatores de diferenciação (D). Todos os ensaios estão normalizados em % de controlo. ****p< 0,0001; ***p≤ 0,001; **p< 0,01 ;*p< 0,05. Gráfico A: Preto vs. controlo; Cinzento vs. RANKL 80

Figura 36 – Avaliação da produção de ROS mitocondrial e do stress oxidativo por acumulação de ROS intracelular - de células RAW 264.7 após exposição a RANKL e/ou E2 e/ou extratos hidroetanólicos durante 24h, de 5 réplicas de 1 ensaio independente, na presença e/ou ausência de fatores de diferenciação sem extratos (A); na presença de extratos sem fatores de diferenciação (B); na presença de extratos e do fator RANKL (C); na presença de extratos e ambos os fatores de diferenciação (D). Todos os ensaios estão normalizados em % de controlo. ****p< 0,0001; ***p≤ 0,001; **p< 0,01 ;*p< 0,05. Gráfico A: Preto vs. Controlo..... 81

Figura 37 – Detecção e avaliação qualitativa de enzimas antioxidantes, catalase e SOD2 em células RAW 264.7 após exposição a RANKL e/ou E2 e/ou extratos hidroetanólicos durante 24h. Imagem representativa de 1 ou mais réplicas de 2 ensaios independentes, na presença e/ou ausência de fatores de diferenciação sem extratos (A); na presença de extratos sem fatores de diferenciação (B); na presença de extratos e do fator RANKL (C); na presença de extratos e ambos os fatores de diferenciação (D)..... 83

Figura 38 - Avaliação da expressão génica da enzima antioxidante superóxido dismutase 1 (SOD1) de células RAW 264.7 após exposição a RANKL e/ou E2 e/ou extratos hidroetanólicos durante 24h, de 3 réplicas de 1 ensaio independente, na presença e/ou ausência de fatores de diferenciação sem extratos (A); na presença de extratos sem fatores de diferenciação (B); na presença de extratos e do fator RANKL (C); na presença de extratos e ambos os fatores de

diferenciação (D). A normalização foi feita com o gene b2m ****p< 0,0001; ***p≤ 0,001; **p< 0,01 ;*p< 0,05. Gráfico A: preto – vs. Controlo; cinzento – vs. RANKL..... 84

Figura 39 - Avaliação da produção de ROS mitocondrial e do stress oxidativo por acumulação de ROS intracelular - de células RAW 264.7 após exposição a RANKL e/ou E2 e/ou extratos hidroetanólicos durante 48h, de 5 réplicas de 1 ensaio independente, na presença e/ou ausência de fatores de diferenciação sem extratos (A); na presença de extratos sem fatores de diferenciação (B); na presença de extratos e do fator RANKL (C); na presença de extratos e ambos os fatores de diferenciação (D). Todos os ensaios estão normalizados em % de controlo. ****p< 0,0001; ***p≤ 0,001; **p< 0,01 ;*p< 0,05. Gráfico A: Preto vs. Controlo; Cinzento vs. RANKL 85

Figura 40 - Avaliação da produção de ROS mitocondrial e do stress oxidativo por acumulação de ROS intracelular - de células RAW 264.7 após exposição a RANKL e/ou E2 e/ou extratos hidroetanólicos durante 72h, de 5 ou mais réplicas de 2 ensaios independentes, na presença e/ou ausência de fatores de diferenciação sem extratos (A); na presença de extratos sem fatores de diferenciação (B); na presença de extratos e do fator RANKL (C); na presença de extratos e ambos os fatores de diferenciação (D). Todos os ensaios estão normalizados em % de controlo. 86

Figura 41 - Detecção e avaliação qualitativa de enzimas antioxidantes, catalase e SOD2 em células RAW 264.7 após exposição a RANKL e/ou E2 e/ou extratos hidroetanólicos durante 72h. Imagem representativa de 6 réplicas de 1 ensaio independente, na presença e/ou ausência de fatores de diferenciação sem extratos (A); na presença de extratos sem fatores de diferenciação (B); na presença de extratos e do fator RANKL (C); na presença de extratos e ambos os fatores de diferenciação (D). 87

Figura 42 - Avaliação da atividade da enzima catalase por redução de H₂O₂ - de células RAW 264.7 após exposição a RANKL e/ou E2 e/ou extratos hidroetanólicos durante 72h, de pelo menos 2 réplicas de 1 ensaio independente, na presença e/ou ausência de fatores de diferenciação sem extratos (A); na presença de extratos sem fatores de diferenciação (B); na presença de extratos e do fator RANKL (C); na presença de extratos e ambos os fatores de diferenciação (D). Todos os ensaios estão normalizados em % de controlo 88

Figura 43 - Avaliação da expressão génica da enzima SOD1 de células RAW 264.7 após exposição a RANKL e/ou E2 e/ou extratos hidroetanólicos durante 72h, de 3 réplicas de 1 ensaio independente, na presença e/ou ausência de fatores de diferenciação sem extratos (A); na presença de extratos sem fatores de diferenciação (B); na presença de extratos e do fator RANKL (C); na presença de extratos e ambos os fatores de diferenciação (D). A normalização foi feita com o gene b2m ****p< 0,0001; ***p≤ 0,001; **p< 0,01 ;*p< 0,05. Gráfico A: preto – vs. Controlo; cinzento – vs. RANKL 89

Figura A 1 - Perfis metabólicos celulares obtidos por *Seahorse XF* em células submetidas a condições de ensaio por 24h. Análise do rácio do consumo de oxigénio (esquerda) e do rácio de acidez do meio extracelular (direita) na presença e/ou ausência de fatores de diferenciação sem extratos (A); na presença de extratos sem fatores de diferenciação (B); na presença de extratos e do fator RANKL (C); na presença de extratos e ambos os fatores de diferenciação (D). 117

Figura A 2 - Perfis metabólicos celulares obtidos por *Seahorse XF* em células submetidas a condições de ensaio por 72h. Análise do rácio do consumo de oxigénio (esquerda) e do rácio de acidez do meio extracelular (direita) na presença e/ou ausência de fatores de diferenciação sem extratos (A); na presença de extratos sem fatores de diferenciação (B); na presença de extratos e do fator RANKL (C); na presença de extratos e ambos os fatores de diferenciação (D). 118

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Anticorpos primários usados na análise por <i>Western Blot</i>	49
Tabela 2 - Anticorpos secundários utilizados na análise por <i>Western Blot</i>	49
Tabela 3 - <i>Primers</i> de referência utilizados na quantificação em tempo real da reação em cadeia da polimerase (<i>qt-PCR</i>).....	52
Tabela 4 – Rendimentos (η) de extração obtidos pelos dois métodos avaliados, das três espécies em estudo. Os rendimentos apresentados reportam aos extratos avaliados <i>in vitro</i> – simples e à extração exaustiva das plantas.	55
Tabela 5 - Avaliação da presença de alcaloides nos extratos pela aplicação do reagente de Dragendorff nos extratos obtidos por decocção (D) e maceração hidroetanólica (EHA). ...	58
Tabela 6 - Avaliação da capacidade de redução do DPPH pelas frações obtidas dos extratos por decocção (D) e por maceração hidroetanólica (EHA).	65
Tabela A 1 - Composição fenólica dos extratos obtidos por extração simples da espécie <i>Equisetum ramosissimum</i> Desf. (ER) obtidos por decocção (D) e maceração hidroetanólica (EHA) por LC-DAD-ESI/MSn. nd – não detetado	114
Tabela A 2 - Composição fenólica dos extratos obtidos por extração simples da espécie <i>Urtica dioica</i> L. (UD) obtidos por decocção (D) e maceração hidroetanólica (EHA) por LC-DAD-ESI/MSn. nq – não quantificado	115
Tabela A 3 - Composição fenólica dos extratos obtidos por extração simples da espécie <i>Urtica urens</i> L. (UU) obtidos por decocção (D) e maceração hidroetanólica (EHA) por LC-DAD-ESI/MSn	116

Abreviaturas e Símbolos

λ	Comprimento de onda
η	Rendimento
1,25(OH) ₂ D ₃	Vitamina D ₃
a.a	aminoácidos
ACN	Acetonitrilo
AcOH	Ácido acético
Acp5	Gene da fosfatase ácida 5, resistente ao tartarato (<i>acid phosphatase 5, tartrate resistant</i>)
ADP	Adenosina Di-fosfato (<i>Adenosine Diphosphate</i>)
ALP	Fosfatase alcalina (<i>Alcaline phosphatase</i>)
ATP	Adenosina Tri-fosfato (<i>Adenosine Triphosphate</i>)
BAM15	((2-fluorofenil)6-[(2-fluorofenil)amino](1,2,5-oxadiazolo[3,4-e]pirazin-5-ilo)}amina)
BMD	Densidade de massa óssea (<i>Bone Mass Density</i>)
BMM	Macrófagos derivados de medula óssea (<i>Bone Marrow Macrophages</i>)
BMPs	Proteínas morfogenéticas do osso (<i>Bone Morphogenic Proteins</i>)
BPs	Bi-fosfonatos (<i>Biphosphonates</i>)
BSA	Albumina de soro de bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CAT	Catalase
CCl ₃	Clorofórmio
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar (complementary Deoxyribonucleic acid)
c-fms	receptor do fator estimulador de colónias 1 (Colony-stimulating factor 1 receptor)
CM-H ₂ DCFDA	(2',7'-diacetato diclorodihidrofluoresceína)
COL-I	Colagénio tipo I
COX	Ciclo-oxigenase
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
CTE	Cadeia transportadora de eletrões da mitocôndria
Ctsk	Gene que codifica a proteína Catepsina K
D	Decocção
DCF	(2',7'-diclorofluoresceína)
DMAB	Desonumab
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido (<i>Dimethyl sulfoxide</i>)
DNA	ácido desoxirribonucleico (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DTT	Ditiotreitol (<i>dithiothreitol</i>)
E2	17 β -estradiol
ECAR	Rácio de acidez extracelular (<i>Extracellular Acidification Rate</i>)
EHA	Extração hidroetanólica

ER	<i>Equisetum ramosissimum</i> Desf.
ER α	Recetor de estrogénio alfa
ER β	Recetor de estrogénio beta
FC	Folin-Ciocalteu
Fe ²⁺ /Fe ³⁺	Ião férrico/ ião ferroso
FoxO	Família de fatores de transcrição (<i>Forkhead box O</i>)
GPx	Glutathiona peroxidase
H ₂ DCF	(2',7'-diclorodihidrofluoresceína)
IFN- γ	Interferão-gamma
IFNGR	Recetor do interferão-gamma (<i>Interferon-gamma receptor</i>)
IL	Interleucinas
KO-OPG	Modelo com o gene OPG deletado (<i>knock-out OPG</i>)
LC	Cromatografia líquida (<i>Liquid Chromatography</i>)
M-CSF	Fator de estimulação de formação de colónias em macrófagos (<i>Macrophage colony stimulating factor</i>)
MeOH	Metanol
MMP9	Matriz metalopeptidase 9 (<i>Matrix metallopeptidase 9</i>)
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro (<i>messenger Ribonucleic acid</i>)
MS	Espectrometria de massa (<i>Mass spectrometry</i>)
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado (<i>Oxidized Nicotiamide Adenine Dinucleotide</i>)
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido (<i>Reduced Nicotiamide Adenine Dinucleotide</i>)
NADP ⁺	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado (<i>Oxidized Nicotiamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>)
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido (<i>Reduced Nicotiamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>)
NFATc1	Fator nuclear de células T ativadas (<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>)
NF-k β	Fator nuclear kappa β (<i>Nuclear factor-kappa β</i>)
NOXs	NADPH oxidases
NTC	<i>No Template Control</i>
OBs	Osteoblastos
OCN	Osteocalcina
OCR	Rácio do consumo de oxigénio (<i>Oxygen Consumption Rate</i>)
OCs	Osteoclastos
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPG	Osteoprotegerina
OPN	Osteopontina
PB	Tampão fosfato
PBS	Tampão de fosfato salino (<i>Phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Reação da polimerase em cadeia (<i>polymerase chain reaction</i>)
PTH	Hormona paratiroidal (<i>Parathyroid hormone</i>)
PTLC	Cromatografia preparativa em camada (<i>Preparative Thin Layer Chromathography</i>)
PVDF	Fluoreto de polivinilideno

qRT-PCR	Reação da polimerase em cadeia em tempo real (<i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>)
RANK	Recetor ativador do fator nuclear kappa B (<i>Receptor activator of nuclear factor kappa B</i>)
RANKL	Ligando do recetor ativador de fator nuclear kappa β (<i>Receptor activator of nuclear factor kappa β ligand</i>)
RIPA	Tampão do ensaio de radioimunoprecipitação
RNS	Espécies reativas de azoto (<i>Reactive Nitrogen Species</i>)
ROS	Espécies reativas de oxigénio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (<i>Sodium Dodecyl Sulphate-polyacrylamide gel</i>)
SEM	Desvio padrão das médias (<i>Standard Error of the Mean</i>)
SOD1	Superóxido dismutase 1
SOD2	Superóxido dismutase 2
SRB	Sulforodamina B
TBS-T	Tampão salino de Tris suplementado com Tween 20 (<i>Tris-buffered saline supplemented with Tween 20</i>)
TCA	Ácido tricarbóxico (<i>Tricarboxylic acid</i>)
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TLC	Cromatografia em camada fina (<i>Thin Layer Chromatography</i>)
TNF	Fator de necrose tumoral (<i>Tumor necrosis factor</i>)
TRAF	Fator associado ao recetor de necrose tumoral (<i>Tumor necrosis factor receptor-association factor</i>)
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato (<i>Tartrate Resistant Acid Phosphatase</i>)
UBMs	Unidades básicas multicelulares
UD	<i>Urtica dioica</i> L.
UV	Ultravioleta
UU	<i>Urtica urens</i> L.

Resumo

Os osteoclastos são células especializadas na reabsorção óssea com mitocôndrias robustas e ativas. O RANKL é essencial para a diferenciação e ativação dos osteoclastos, incluindo a promoção da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) envolvidas na formação e atividade dos osteoclastos. A diminuição dos níveis de estrogênio durante a menopausa aumenta a suscetibilidade à osteoporose. As terapias atuais para a osteoporose têm limitações, o que exige o desenvolvimento de alternativas mais seguras e acessíveis. Neste estudo, obtiveram-se extratos por decocção e maceração hidroetanólica, a partir de plantas endógenas do Vale do Côa (*Equisetum ramosissimum* Desf. (ER), *Urtica dioica* L. (UD), *Urtica urens* L. (UU)) e avaliou-se o seu potencial inibitório na osteoclastogênese. Através da análise por LC-DAD-ESI/MSn, foram identificados flavonoides e ácidos fenólicos nos extratos. Procedeu-se à extração e análise da composição química dos extratos, à quantificação de compostos fenólicos e à avaliação da atividade antioxidante. Foram realizados ensaios *in vitro* em células RAW 264.7 expostas aos extratos obtidos em concentrações entre 1 mg/mL e 0,063 mg/mL ao longo de 5 dias para avaliar a citotoxicidade. Observou-se a diminuição da atividade metabólica das células expostas aos extratos aquosos de todas as espécies de plantas, sugerindo que os extratos induzem condições de *stress*. Por outro lado, os extratos hidroetanólicos não demonstraram citotoxicidade até à concentração máxima testada (1 mg/mL) para ER e UD, e para UU, não foi observada toxicidade em concentrações até 0,125 mg/mL. Verificou-se que os extratos que não apresentaram toxicidade têm capacidade de inibir a diferenciação dos osteoclastos e têm influência na atividade mitocondrial, provocando uma diminuição na respiração celular quando as células são expostas a RANKL, o que pode indicar o seu efeito inibitório na diferenciação numa fase inicial. A atividade antioxidante também foi avaliada *in vitro*, mas são necessários mais estudos para concluir o mecanismo de ação dos extratos e compreender como eles podem inibir a diferenciação dos osteoclastos, como foi observado.

Palavras-chave: osteoporose; osteoclastos; espécies reativas de oxigênio (ROS); plantas medicinais; atividade antioxidante

Abstract

Osteoclasts are specialized cells in bone resorption with robust and active mitochondria. RANKL is essential for osteoclast differentiation and activation, including promoting the production of reactive oxygen species (ROS) involved in osteoclast formation and function. The decline in estrogen levels during menopause increases the susceptibility to osteoporosis. Current therapies for osteoporosis have limitations, requiring the development of safer and more accessible alternatives. In this study, we obtained decoction and ethanolic maceration extracts from plants indigenous to the C a Valley (*Equisetum ramosissimum* Desf. (ER), *Urtica dioica* L. (UD), *Urtica urens* L. (UU)) and explored their potential for treating osteoporosis. Through LC-DAD-ESI/MSn phenolic compound analysis, flavonoid and phenolic acids were identified in the extracts. Plants extractions were performed, their chemical composition analysed, and their antioxidant activity assessed. Subsequently, the extracts cytotoxicity was evaluated to gain insights into their inhibitory effects on osteoclast differentiation. Using RAW 264.7 cells exposed to aqueous and ethanolic extracts at concentrations ranging from 1 mg/mL to 0.063 mg/mL over a 5-day period, we observed a decrease in cell metabolic activity when cells were exposed to decoction extracts from all plant species, which can be hypothesized to stress conditions. Conversely, the ethanolic extracts demonstrated no cytotoxicity until 1 mg/mL for ER and UD, and for UU, no toxicity was observed with concentrations up to 0.125 mg/mL. Data showed that these extracts inhibit osteoclast differentiation and have influence in mitochondrial activity, inhibiting it when cells are exposed to RANKL what may indicate their inhibitory potential in early-stage differentiation. Antioxidant activity was evaluated but more studies are needed to conclude the extracts mechanism of action to understand how they can inhibit osteoclast differentiation, as showed.

Keywords: osteoporosis; osteoclasts; reactive oxygen species (ROS); medicinal plants; antioxidant activity

I. Introdução

I.1 Tecido Ósseo

A nossa estrutura esquelética carece de constante adaptação a múltiplas alterações fisiológicas e ambientais (Niedermair *et al.*, 2020). Tem diversas funções no nosso corpo tais como oferecer estrutura e suporte, permitir o armazenamento de minerais, ser o local de produção de células hematopoiéticas e a principal fonte de células estaminais mesenquimais. Além disso, a sua estrutura rígida oferece a proteção de órgãos como cérebro, pulmões e coração (Qiu *et al.*, 2019; Bilgiç *et al.*, 2020). No entanto a matéria orgânica que a compõem confere alguma flexibilidade, o que previne o risco de fraturas. Além disso, as diferentes formas dos ossos - achatados, longos, curtos e irregulares - também determinam a sua função no organismo. Ao nível macroscópico, pode ser classificado de acordo com a sua densidade, como cortical – compacto - ou trabecular – esponjoso (**Figura 1**) (Bilgiç *et al.*, 2020).

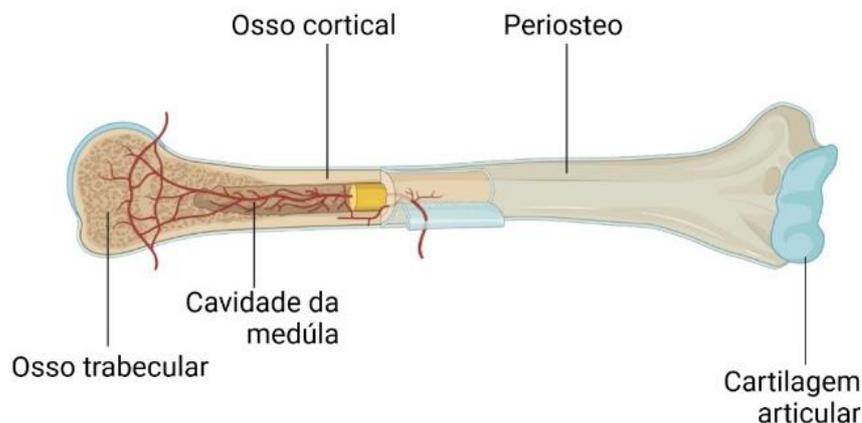


Figura 1 - Estrutura do tecido ósseo. Adaptada em BioRender

Desta forma, o osso é um órgão vivo constituído por um teor de material mineral (cerca de 65%) e de material orgânico (cerca de 35%). O teor mineral é maioritariamente caracterizado por cristais de cálcio e fósforo na forma de hidroxiapatite e alguns iões como sódio, flúor e magnésio. A constituição orgânica contém maioritariamente fibras de colagénio e em menor quantidade, glicoproteínas e proteoglicanos (Mzid, *et al.* 2017; Bilgiç *et al.* 2020). Como tal, o osso é um tecido formado e absorvido continuamente, desde a fase embrionária à fase adulta. A sua remodelação ocorre por um mecanismo adaptativo que permite o controlo da massa óssea e da sua arquitetura (Mzid *et al.*, 2017).

O processo é regulado por um conjunto de células especializadas nas regiões designadas por unidades básicas multicelulares (UBMs) (Niedermair *et al.*, 2020; Tresguerres *et al.*, 2020).

1.1.1 O processo de remodelação óssea

As diferentes unidades que constituem o osso (o perióstio, o osso trabecular, o cortical, a medula óssea e a placa de crescimento epifisária) estão conectadas por uma rede de fibras nervosas sensoriais, adjacentes aos vasos sanguíneos, mas são independentes da vascularização, como terminações nervosas livres. Encontram-se envolvidos na angiogénese e na diferenciação da matriz óssea num organismo adulto (Niedermair *et al.*, 2020).

O processo de remodelação ocorre em 3 fases consecutivas - reabsorção, reversão e formação (Niedermair *et al.*, 2020). É realizado por osteoclastos (OCs) e osteoblastos (OBs) e ocorre nas UBMs que são constituídas por OBs, OCs, osteócitos, células do revestimento ósseo e vasos sanguíneos (**Figura 2**).

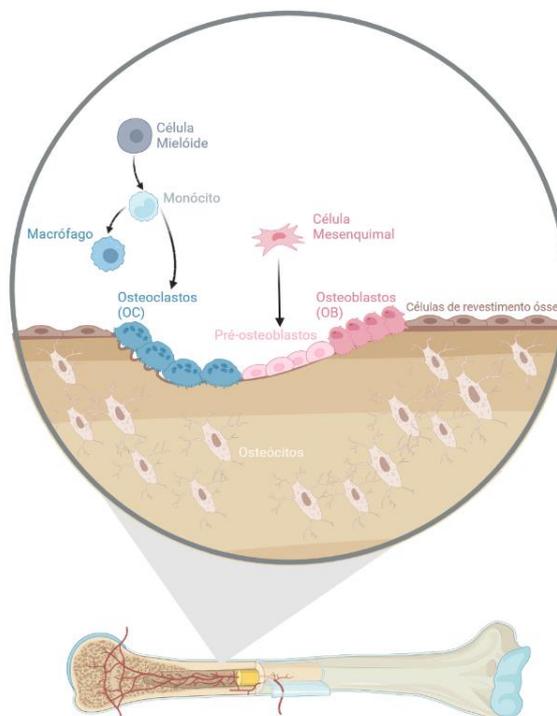


Figura 2 – A unidade básica multicelular e o processo de remodelação óssea. Adaptada em BioRender

O osso é um tecido bastante dinâmico. A sua manutenção consiste num ciclo de remoção do osso mais antigo e substituição por osso novo de modo que a homeostase mineral se mantenha, assim como uma boa integridade da estrutura óssea (Tresguerres *et al.*, 2020).

O principal motivo desta remodelação é a libertação de cálcio e outros fatores de crescimento como BMPs e outros, armazenados na matriz mineralizada do osso, para a circulação sanguínea, o que permite a regulação da homeostase mineral. O propósito secundário é a substituição de tecido ósseo antigo ou danificado por tecido novo, preservando a integridade do esqueleto e a massa óssea. O tecido ósseo renova entre 3-10% /ano logo, todo o esqueleto é completamente renovado a cada 10 anos (Tresguerres *et al.*, 2020).

1.1.1.1 Osteoclastos

Os osteoclastos são células multinucleadas originadas a partir de células estaminais hematopoiéticas (Elson *et al.*, 2022). Encontram-se envolvidos na reabsorção óssea (Chen *et al.*, 2020) e contribuem para a qualidade óssea, sendo as únicas células com a propriedade de reabsorção. Produzem enzimas cuja função é a dissolução ácida de sais minerais do tecido ósseo e a degradação de matéria orgânica (Zhou *et al.*, 2021). A sua função na homeostase óssea foi elucidada do estudo da osteopetrose, que é uma patologia caracterizada por uma densidade óssea anormal e excessiva, que se deve à fraca reabsorção por parte dos OCs (Durdan *et al.*, 2022). A sua diferenciação e ativação é determinada por duas citocinas: RANKL, o ligando do recetor ativador do fator nuclear $\text{K}\beta$ e M-CSF, um fator que estimula a colonização de macrófagos (**Figura 3**) (Durdan *et al.*, 2022).

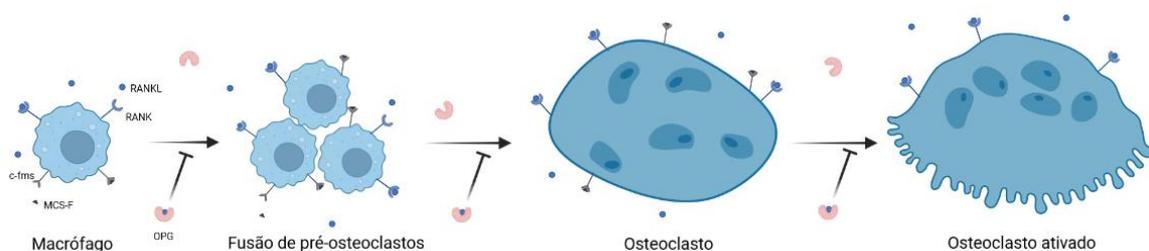


Figura 3 - Formação e diferenciação de osteoclastos. Adaptada em BioRender

A osteoclastogênese é iniciada pela ligação do RANKL ao recetor ativador do fator nuclear $K\beta$ RANK, e do ligando M-CSF ao seu recetor. Isto leva a um aumento da expressão das proteínas c-Fos e NFATc1, ambas cruciais na diferenciação e ativação de osteoclastos maduros, além de estimularem a expressão de genes específicos dos OCs, como o Acp5, responsável pela expressão da TRAP (fosfatase ácida resistente ao tartarato). A polarização dos OCs aumenta a expressão da TRAP e promove a sua secreção a partir da borda ondulada do osteoclasto para a lacuna de reabsorção. A isoforma 5a da TRAP secretada na lacuna é ativada pela catepsina K e transformada na sua isoforma 5b, a forma ativa e passível de correlacionar, enquanto marcador da remodelação e densidade mineral óssea, com o número de OCs (Mira-Pascual *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2020).

Os fatores solúveis, quer libertados pela matriz óssea durante a reabsorção, quer secretados pelos OCs, foram os primeiros mecanismos propostos para o acoplamento de reabsorção-formação (Mira-Pascual *et al.*, 2020). Os fatores secretados pelos OCs, além da TRAP já mencionada cuja função é auxiliar a acidificação da lacuna de reabsorção e facilitar a dissolução de proteínas da matriz óssea, são metaloproteínases como a MMP9 e a protease catepsina K, ambas capazes de degradar proteínas da matriz como o colagénio (Mira-Pascual *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2020).

1.1.1.2 Osteoblastos

Os osteoblastos são células originadas a partir de células estaminais mesenquimais e por via de pré-osteoblastos – células com uma morfologia alongada e que têm capacidade de proliferação. Os OBs caracterizam-se por uma morfologia cubóide, um núcleo redondo, um complexo de Golgi e um retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido, sem capacidade de proliferação e responsável pela síntese das proteínas da matriz osteoide. Quando a matriz mineraliza, os OBs ficam envolvidos nela e originam o tecido osteoide (Moreira CA *et al.*, 2019; Tresguerres *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2021). São maioritariamente responsáveis por sintetizar e secretar componentes da matriz óssea como fosfatase alcalina (ALP), osteocalcina (OCN) e colagénio. Estas células não funcionam isoladas e por isso costumam ser encontradas em grupos cubóides ao longo da

superfície óssea, muitas vezes unidas por junções *gap* (Chen *et al.*, 2020; Moreira CA *et al.*, 2019).

Primeiro, um grupo de osteoclastos reabsorve a matriz óssea. Em seguida, os osteoblastos preparam a superfície do osso que se encontra exposta para a deposição de novo osso ao libertar proteínas como ALP e OCN. Por fim, os OBs depositam como osteoides não mineralizados que se irão mineralizar e originar o osso lamelar (**Figura 2**) (Niedermair *et al.*, 2020).

A homeostase óssea depende da reabsorção do osso por OCs e a formação do mesmo por OBs. A desregulação deste processo pode provocar o desenvolvimento de patologias como a osteoporose ou a osteopetrose. Assim, os mecanismos que regulam a comunicação entre OCs e OBs são críticos. Já foi demonstrado que os OCs e os OBs comunicam entre si por diferentes meios. Esta ocorre por contacto direto (*tight junctions*), citocinas e por interação através da matriz celular (Chen *et al.*, 2018).

No entanto, estudos mais recentes reportam que os processos de formação e reabsorção óssea podem ocorrer de forma independente. Além das formas já descritas como células imunitárias (macrófagos), hormonas sistémicas (estradiol e hormona paratiroidal) e citocinas locais (RANKL e interleucinas, IL), o sistema nervoso tem-se revelado um regulador crítico no metabolismo e remodelação do osso (Niedermair *et al.*, 2020).

As células na medula óssea estão funcionalmente divididas em células que se encontram envolvidas no metabolismo ósseo e em células hematopoiéticas, correspondentes à corrente sanguínea e à resposta imunitária. Ambas partilham o microambiente na medula óssea e interagem durante a sua atividade no sistema esquelético. Os osteoclastos e as células imunitárias partilham progenitores e vários reguladores comuns. Os linfócitos T, B, as citocinas, as quimiocinas e as moléculas coestimuladoras interagem com células imunitárias sob condições fisiológicas e patológicas, onde o sistema de sinalização RANK/RANKL/osteoprotegerina (OPG), atua como intermediário na regulação da formação e reabsorção óssea. (Zhou *et al.*, 2021).

1.1.1.3 Osteócitos e células de revestimento ósseo

Quando os osteoblastos deixam de formar nova matriz, podem ficar envolvidos na matriz mineralizada e transformar-se em osteócitos, dar origem a células do revestimento ósseo ou sofrer apoptose (**Figura 4**) (Tresguerres *et al.*, 2020).

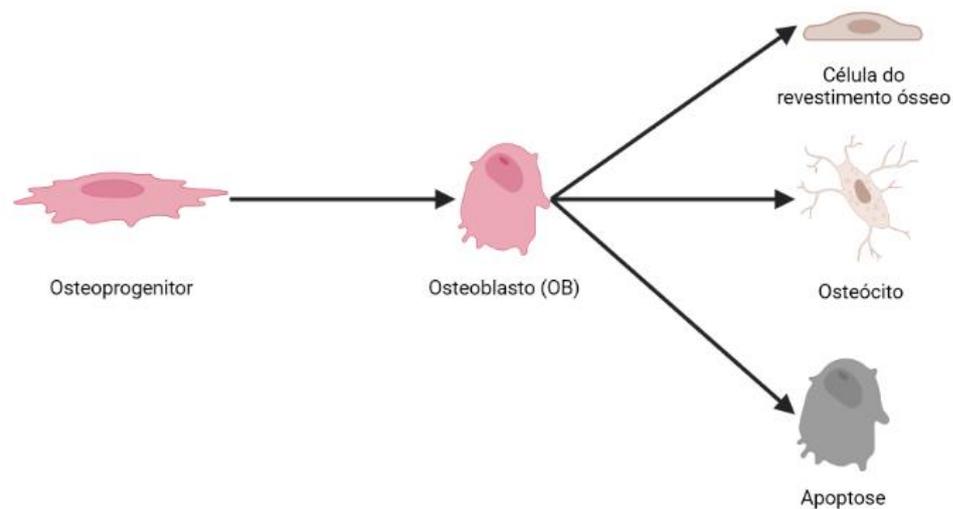


Figura 4 - Células originárias dos osteoblastos. Adaptada de Biorender

Os osteócitos correspondem a cerca de 90-95% das células ósseas na estrutura esquelética de um adulto e comparativamente com as restantes células ósseas, têm uma longevidade elevada. Encontram-se interligados na lacuna mineral e rodeados por fluído ósseo que deriva de plasma sanguíneo e mantém a viabilidade óssea ao providenciar nutrientes e oxigénio. É também uma via para a sinalização entre os osteócitos e diferentes partes do corpo de sinais como fósforo inorgânico, hormona paratiroidal (PTH), estradiol (E2) ou vitamina D (1,25(OH)₂ D3) (Tresguerres *et al.*, 2020). Têm a capacidade de regular a formação óssea ao sintetizarem proteínas envolvidas na formação, como a colagenase-I (COL-I) e a OCN, e na mineralização como a ALP; conseguem recrutar células mesenquimais para locais danificados por sinalização de osteopontina (OPN); controlam o complexo Wnt/ β -catenina – que promove a função osteoblástica (Tresguerres *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2022). Em simultâneo, são capazes de induzir a reabsorção óssea ao libertarem uma proteína, a esclerostina que inibe a via Wnt/ β -catenina e estimula a produção de RANKL nos próprios osteócitos (Tresguerres *et al.*, 2020).

A células de revestimento ósseo têm uma forma achatada e cobrem a superfície do osso onde, em condições normais, não ocorre nem formação nem reabsorção do mesmo (Tresguerres *et al.*, 2020).

1.1.1.4 O sistema RANK/RANKL/OPG

A descoberta do recetor RANK e das proteínas RANKL e OPG foi um grande marco na biologia do osso. Atualmente, o sistema RANK/RANKL/OPG é conhecido pelo seu papel na maturação de osteoclastos, modelação e remodelação óssea (Epsley *et al.*, 2021; Tresguerres *et al.*, 2020).

É amplamente conhecido que os osteoblastos regulam a diferenciação dos osteoclastos por meio do complexo RANKL-RANK. O RANKL é expresso nos OBs, enquanto o RANK é um recetor presente nos OCs e pré-osteoclastos. A sinalização RANKL-RANK ativa o processo de osteoclastogénese, estimula a diferenciação dos pré-osteoclastos em OCs maduros, ativa-os e inibe a sua apoptose. Esta interação desencadeia uma cascata de sinalização mediada pelo fator 6 associado ao recetor TNF, TRAF6. A sua ativação ativa o NF- κ B que, em cadeia, ativa NFATc1. Estes fatores promovem a produção de marcadores de OCs. Esta interação RANKL-RANK é inibida pela OPG, um antagonista secretado pelos OBs em simultâneo com o RANKL. A OPG liga-se ao RANKL e impede sua interação com o RANK, inibindo assim a osteoclastogénese e consequentemente a reabsorção óssea (Tresguerres *et al.*, 2020; Epsley *et al.*, 2021).

No entanto, estudos recentes têm debatido essa ideia, pois confirmaram que os osteócitos são responsáveis pela maior parte da produção de RANKL e formação de OCs no osso trabecular. Além disso, os OBs secretam RANKL e M-CSF em resposta a citocinas inflamatórias, glucocorticoides, deficiência de estrogénio e hiperparatiroidismo (Epsley *et al.*, 2021; Tresguerres *et al.*, 2020).

1.1.2 Espécies reativas de oxigénio (ROS) e Mitocôndria

Durante o processo de uso de oxigénio em condições normais, fisiológicas e metabólicas, cerca de 5% do oxigénio é convertido a espécies reativas de oxigénio (ROS) como o anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogénio (H_2O_2), radical hidroxilo ($\cdot OH$)

e óxido nítrico (NO) (**Figura 5**) (Marques-Carvalho *et al.*, 2023; May *et al.*, 2018). Estas espécies exercem *stress* oxidativo nas células e provocam danos, por vezes irreversíveis, nos tecidos o que origina diversas disfunções e patologias. É descrito que as ROS têm capacidade de iniciar peroxidação de lípidos e outras biomoléculas como ácidos nucleicos, proteínas e carboidratos. As espécies antioxidantes atuam ao neutralizar o efeito destas espécies ao captarem, inibirem e prevenir a sua formação (May *et al.*, 2018).

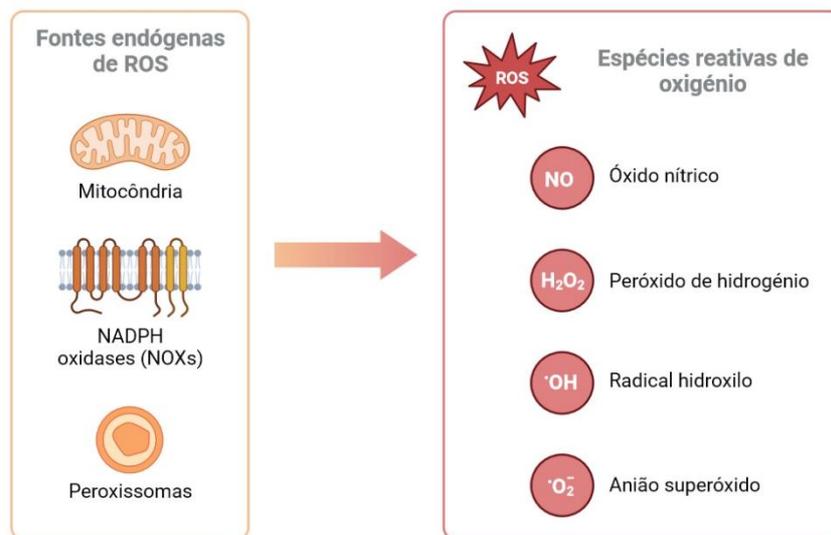


Figura 5 – Algumas espécies reativas de oxigênio e as fontes endógenas das mesmas. Adaptada em BioRender

Contrariamente aos OCs, não há muitas evidências de *eustress* oxidativo – o *stress* necessário à sinalização de processos redox - em OBs nem na formação óssea, mas crê-se que uma peroxorredoxina citoplasmática responsável por degradar H₂O₂ regula negativamente a diferenciação de OBs através da BMP2, uma proteína que promove a diferenciação osteoblástica (Marques-Carvalho *et al.*, 2023; Kim *et al.*, 2019). Sabe-se que o anião superóxido é responsável por destabilizar o cluster de Fe-S da aconitase, uma enzima envolvida no ciclo de Krebs, o que afeta a atividade mitocondrial. (Marques-Carvalho *et al.*, 2023)

As fraturas ósseas estão associadas a inflamação e isquemia – fluxo sanguíneo e de oxigênio insuficiente, fatores que estimulam a oxidação a radicais livres. Estas ROS que são geradas no ambiente ósseo promovem a formação de osteoclastos e a reabsorção óssea (Irgin *et al.*, 2016).

1.1.2.1 ROS em Osteoclastos

Os maiores produtores de H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$ são as enzimas NADPH oxidases (NOXs) e a cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria (CTE). Nesta, há produção de $O_2^{\cdot-}$ quando há fuga de elétrons ao longo da cadeia, que reagem com O_2 . O $O_2^{\cdot-}$ é posteriormente reduzido a H_2O_2 . Os maiores contribuidores de ROS na mitocôndria são os complexos I e III. Ambos produzem $O_2^{\cdot-}$, o complexo I para a matriz mitocondrial e o III para o exterior da matriz e no espaço intermembranar. A sua redução a H_2O_2 ocorre pelas enzimas dismutase superóxido Cu/Zn (SOD1) e dismutase superóxido de manganês (SOD2). A SOD1 expressa-se no citosol e no espaço intermembranar e a SOD2 na matriz mitocondrial. O H_2O_2 é reduzido a água por enzimas como a catalase (CAT) e peroxidases (Marques-Carvalho *et al.*, 2023).

Foi identificado que M-CSF e RANKL, as duas citocinas essenciais ao desenvolvimento de OCs induzem um aumento nos níveis de ROS como H_2O_2 em pré-osteoclastos e OCs o que potencia a sua formação, ativação e sobrevivência. Este aumento de ROS tem sido associado à biogênese mitocondrial. Além disto, o RANKL aumenta rapidamente a atividade do complexo I e a respiração mitocondrial. Acredita-se que o ROS citoplasmático, produzido por NOXs, também contribui para a osteoclastogênese. O RANKL também atua na inibição da expressão de enzimas antioxidantes como a SOD1 ao afetar a via FoxO – uma família de fatores de transcrição que controla os níveis das espécies reativas de oxigênio ao estimular a expressão de enzimas antioxidantes (Marques-Carvalho *et al.*, 2023).

1.2 Osteoporose

Macroscopicamente, existem dois tipos de tecidos ósseos no nosso organismo: o cortical, que corresponde à parte exterior do osso que é compacta e o trabecular, que é denominada de região esponjosa e se encontra no interior do osso. (Bădilă *et al.*, 2022; Bilgiç *et al.*, 2020)

A osteoporose, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), é uma doença óssea sistêmica e metabólica muito comum que se caracteriza pela redução de massa óssea e detrimento da microarquitetura do osso, o que tem como consequência maior fragilidade da estrutura óssea e um aumento da suscetibilidade de fraturas (Kim *et al.*,

2019; Satpathy *et al.*, 2021). Esta patologia pode ser classificada como primária ou secundária. A classificação primária é referente à osteoporose na menopausa (tipo 1) e a secundária à osteoporose senil (tipo 2), associada ao envelhecimento. Mas, uma vez que ambas surgem em períodos muito semelhantes, o que as tornam difíceis de identificar corretamente, estas designações são usadas apenas por conveniência (Kim *et al.*, 2019).

É uma doença que afeta majoritariamente mulheres em fase pós-menopausa (Satpathy *et al.*, 2021). Dados de 2021 revelam que cerca de 200 milhões de mulheres no mundo sofrem de osteoporose e crê-se que este número duplique até 2050 (Zhou *et al.*, 2021). Esta patologia tem a adversidade do seu diagnóstico não ser evidente com base nos critérios aplicados uma vez que pode não ter em consideração outros fatores de risco. Segundo a OMS, define-se a osteoporose através da medição da densidade mineral óssea em casos onde o desvio padrão é superior a 2,5 (Clynes *et al.*, 2020; Satpathy *et al.*, 2021).

1.2.1 Epidemiologia e Patofisiologia

A população está cada vez mais envelhecida. Estima-se que haja um aumento de cerca de 11% de pessoas com mais de 50 anos até 2034 e com 75 ou mais - no caso dos homens em 42% e nas mulheres 29%. Tendo a osteoporose associada ao envelhecimento, é expectável que a sua incidência na população se intensifique, interferindo com a qualidade de vida das pessoas. Desta forma, é necessário encontrar terapias eficazes (Kanis *et al.*, 2021)

É uma patologia multifatorial que envolve processos inflamatórios. A inflamação é geralmente associada a uma promoção da reabsorção óssea que leva a uma arquitetura óssea deteriorada devido ao desequilíbrio da regulação óssea. Um conjunto de mecanismos locais e sistémicos, particularmente os que envolvem citocinas inflamatórias têm sido elucidados. As interleucinas inflamatórias incluindo IL-1, IL-6 e TNF- α têm mostrado um efeito significativo no processo de remodelação óssea, majoritariamente no sentido de reabsorção. OCs ativos originam espécies como $O_2^{\cdot -}$ e H_2O_2 , que promovem a inflamação e *stress* oxidativo (Epsley *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2020; Satpathy *et al.*, 2018; 2021). Há ainda um aumento dos níveis de malondialdeído no sangue, um marcador de peroxidação lipídica, com o desenvolvimento de osteoporose (Satpathy *et al.*, 2018; 2021).

A osteoporose pós-menopausa refere-se a mulheres que, após a menopausa, devido à atrofia ovárica, degeneração funcional e déficit dos níveis de estrogénio - o que permite o rápido aumento dos níveis de RANKL -, sofrem uma rápida redução de massa óssea e alterações estruturais do osso trabecular, o que se traduz em maior fragilidade óssea (**Figura 6**). (Zhou *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2020)

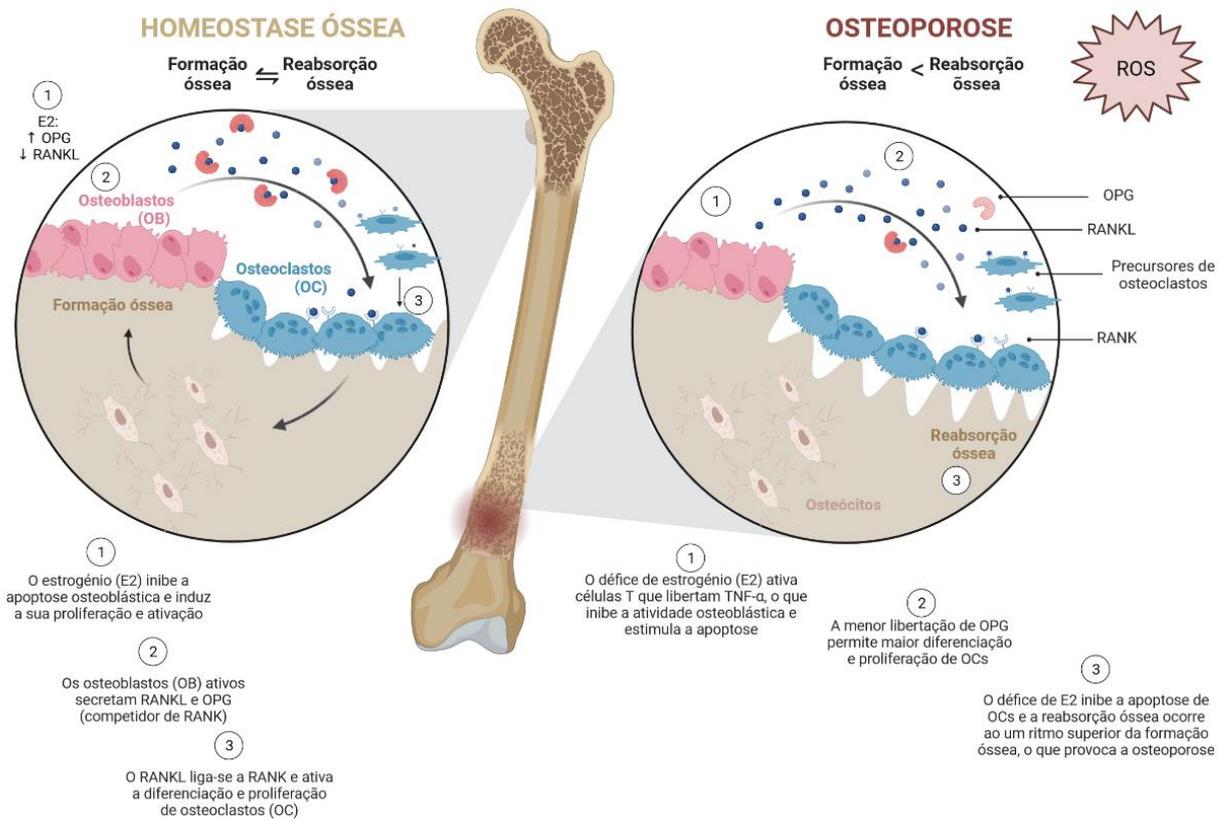


Figura 6 - Processo de desregulação na osteoporose. Adaptada de BioRender

O modelo animal utilizado em estudos de osteoporose pós-menopausa é constituído por fêmeas ovariectomizadas (o que induz a patologia). No entanto, apresenta diversas limitações como ser um modelo associado a elevados níveis de TNF- α e IL-1, citocinas que regulam positivamente a osteoclastogénese e por isso não são o modelo mais indicado para o estudo da sinalização ativada por RANKL (Zhao *et al.*, 2020).

Um outro modelo animal para o estudo da osteoporose pós-menopausa são animais no quais é deletado o gene responsável pela síntese de osteoprotegerina (KO-

OPG), onde a perda de massa óssea severa se deve ao elevado rácio RANKL/OPG (Zhao *et al.*, 2020)

1.2.1.1 A mitocôndria na osteoporose

Sob condições fisiológicas, a mitocôndria é responsável pela produção de energia e por regular a homeostase de cálcio. Quando o funcionamento da mitocôndria é alterado, a atividades das células correspondentes também, o que pode acelerar o desenvolvimento da osteoporose. Exemplo disto é, em condições de *stress* oxidativo, as mitocôndrias dos OBs apresentarem má-formações o que irá inibir a formação e diferenciação destas células. Por outro lado, ao nível da reabsorção óssea, a divisão excessiva da mitocôndria pode acelerar o desenvolvimento da osteoporose por permitir uma rápida diferenciação dos OCs (Yan *et al.*, 2023).

1.2.1.2 Fatores de Risco

A síndrome metabólica é um conjunto de condições médicas que consistem em obesidade central, hiperglicemia, hipertensão e dislipidemia, onde cada atua no tecido ósseo de forma diferente (Chakuleska *et al.*, 2022). Com o envelhecimento e outras condições como a perda de hormonas gonadais, o rácio de reabsorção excede o de formação, o que resulta na diminuição da massa óssea.

1.2.1.2.1 Absorção de Cálcio e Vitamina D

A absorção de cálcio e vitamina D é crucial na manutenção da mineralização adequada do osso. A deficiência de cálcio ativa uma resposta pelo organismo numa produção exacerbada da PTH. Esta desregulação pode estimular a osteoclastogénese ao aumentar a produção de RANKL pelos OBs, o que leva à reabsorção óssea com o fim de restabelecer os níveis de cálcio sérico (Epsley *et al.*, 2021).

A vitamina D tem um papel fisiológico adicional de regular o sistema imunitário e já demonstrou ter uma função anti-inflamatória em doenças como artrite reumatoide. Baixos níveis de vitamina D relacionam-se com níveis superiores de inflamação. As

células imunitárias têm a capacidade de converter a vitamina D à sua forma ativa - 1,25(OH)₂D₃, que atua como um esteroide ao ligar-se ao recetor nuclear de vitamina D, expresso em macrófagos, células dendríticas e linfócitos (Epsley *et al.*, 2021).

Isto irá desencadear um círculo vicioso de reabsorção constante, superior à capacidade de formação óssea. Desta forma, a deficiência destes nutrientes pode afetar negativamente a mineralização óssea de forma independente do ciclo de remodelação óssea (Epsley *et al.*, 2021).

I.2.1.2.2 Estilo de vida e exercício físico

Um estilo de vida sedentário e hábitos não saudáveis como consumo excessivo de álcool e tabaco contribui negativamente para a saúde óssea. Estudos sugerem que o consumo excessivo de álcool influencia a perda de densidade óssea e aumenta o risco de fraturas. O consumo de tabaco demonstra promover a produção excessiva de PTH, que promove a libertação de cálcio logo, a reabsorção óssea, e inibe o níveis de 1,25(OH)₂D₃, o que inibe a formação óssea (Pouresmaeili *et al.*, 2018).

Nos últimos anos, o exercício físico tem sido reconhecido como uma abordagem no combate à osteoporose. Estudos têm demonstrado que o exercício físico efetivamente controla e previne a osteoporose e tem sido apontado como uma potencial intervenção estratégica para ultrapassar complicações pós-menopausa devido às mudanças metabólicas, especialmente dos níveis de estrogénio. Apesar de o mecanismo de regulação de estrogénio pelo exercício físico não ser claro, estudos demonstraram que a prática regular de exercício físico atua positivamente no níveis de estradiol. No entanto, estes resultados têm sempre variáveis associadas como o estado fisiológico e o esforço do exercício realizado (Zhou *et al.*, 2021).

O exercício físico também pode atenuar citocinas inflamatórias por regular positivamente citocinas anti-inflamatórias, que afetam o metabolismo ósseo. Exercício de alta intensidade e baixo impacto tem sido reportado como estimulador de respostas à transformação de marcadores ósseos e citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α , sugerindo uma correlação entre esta forma de exercício e as respostas esqueléticas e imunes (Zhou *et al.*, 2021).

I.2.1.2.3 Glucocorticoides

O uso prolongado de glucocorticoides sintéticos afeta a saúde óssea. Foi observado que ao fim de 3 meses de terapia aceleram a reabsorção óssea. Atuam ao promover a expressão de RANKL e inibir a expressão de OPG. Também estimulam a expressão de um inibidor da via de sinalização Wnt, que é essencial à diferenciação osteoblástica e inibem a expressão do gene responsável pela formação óssea e síntese de COL-I (Pouresmaeili *et al.*, 2018).

I.2.1.2.4 Ferroptose

A ferroptose é definida como a forma regulada de morte celular dependente de ferro que ocorre com a acumulação letal de ROS tal que, compromete os sistemas de reparação da peroxidação lipídica dependentes de glutathione. Afeta morfologicamente a mitocôndria tornando-a mais deprimida, com menor densidade membranar e menor atividade. A ferroptose foi reportada associada à progressão de diversas doenças que incluem a degeneração de órgãos (Gao *et al.*, 2022). Têm crescido evidências de que a ferroptose e a osteoporose estão correlacionadas. Pacientes diagnosticados com osteoporose apresentam excesso de ferro e uma maior acumulação de ROS (Feng *et al.*, 2021; Gao *et al.*, 2022).

Num estudo realizado num modelo não celular e independente de enzimas, o ferro aparentou inibir o crescimento de cristais de hidroxiapatite, o que sugeriu um efeito inibitório do íon ferroso, Fe^{2+} . A acumulação de Fe^{2+} por desregulação da homeostase férrica catalisa a formação de ROS, principalmente $^{\cdot}OH$ e $^{\cdot}OH$ pela reação do íon com H_2O_2 , denominada de reação de Fenton (**Figura 7**). A mitocôndria é a principal fonte de ROS, uma vez que resultam do seu normal funcionamento para o metabolismo das células (Gao *et al.*, 2022).

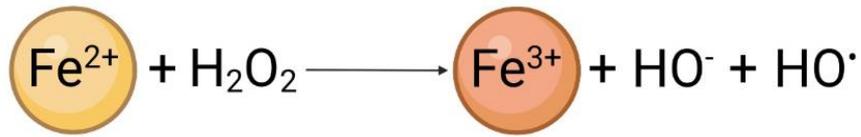


Figura 7 - Reação de Fenton com Fe^{2+} . Adaptada em BioRender

Foi reportado que a acumulação iões férrico/ferroso ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$) induz a via apoptótica de OBs ao promover o aumento de ROS intracelular (Feng *et al.*, 2021). Estudos desenvolvidos na modelação da ferroptose para o tratamento da osteoporose apresentam esta via como uma terapia promissora na prevenção e controlo da doença, com menos efeitos secundários (Gao *et al.*, 2022).

1.2.1.3 Menopausa

A osteoporose pós-menopausa tem tido uma incidência crescente devido a uma vida mais sedentária, fatores ambientais, puberdade precoce e distúrbios ováricos (Satpathy *et al.*, 2021).

O sistema hormonal feminino têm uma influência crucial na saúde e qualidade de vida da mulher. A sua desregulação ao nível de estrogénio durante toda a vida é um fator determinante no desenvolvimento de doenças associadas ao envelhecimento como a obesidade, doenças autoimunes e osteoporose, onde nesta última tem um papel crucial (Mzid *et al.*, 2017; Satpathy *et al.*, 2018; Słupski *et al.*, 2021). Na osteoporose pós-menopausa, o défice de estrogénio ativa as células T e aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias como $\text{TNF-}\alpha$, que demonstra inibir componentes da matriz óssea como colagénio e ALP, o que inibe a atividade osteoblástica (Chen *et al.*, 2020; Satpathy *et al.*, 2021). Na fase inicial após a menopausa, cerca de 20% da massa óssea perdida é devido ao défice ovárico (Anjaneyulu *et al.*, 2018).

O *stress* oxidativo é um fator considerado patogénico em diversas doenças inclusive na osteoporose, comum na “síndrome pós-menopausa”. Acredita-se que a diminuição de estrogénio no organismo relacionado com a transição para a menopausa é responsável por desencadear o *stress* oxidativo (Zhou *et al.*, 2021; Chakuleska *et al.*, 2022). Foi demonstrado que o estrogénio consegue inibir a perpetuação de ROS e proteger a estrutura óssea ao inibir a oxidação do organismo (Zhou *et al.*, 2021).

Estudos *in vivo* demonstram, em modelos com ovariectomia bilateral, que há um desequilíbrio redox que se caracteriza pelo aumento dos marcadores de peroxidação lipídica e pela diminuição da atividade de enzimas antioxidantes (Chakuleska *et al.*, 2022). ROS como H_2O_2 e $\cdot OH$ são produtos do metabolismo da célula e da atividade de enzimas como a catalase, glutathione peroxidase (GPx) e as SOD, todas enzimas responsáveis pela remoção de radicais livres das células (Zhou *et al.*, 2021).

O envelhecimento da população, que tem aumentado continuamente, correlaciona-se com aumento do número de mulheres no período de menopausa. Nesta fase, tal como o risco de osteoporose aumenta, o risco de acidentes vasculares cerebrais (AVC) também (Wattanathorn *et al.*, 2018).

Já foi reportado que um distúrbio na regulação do stress oxidativo desempenha um papel crucial ao estimular a incidência de AVCs e osteoporose em mulheres na menopausa. Como tal, o efeito antioxidante tem sido um dos alvos na intervenção profilática e terapêutica. Diversos estudos na última década em ratos fêmea ovariectomizados têm demonstrado que, substâncias que possuem atividade antioxidante, são promissoras enquanto agentes terapêuticos no tratamento e prevenção de AVCs e osteoporose (Wattanathorn *et al.*, 2018; Satpathy *et al.*, 2021; Kalia *et al.*, 2014).

1.2.2 *Atuais Terapias*

Existem vários tratamentos disponíveis para a inibição e controlo da osteoporose como tratamentos hormonais, estrogénio ou análogos sintéticos da PTH, bi-fosfonatos e anticorpos. Estes atuam como anti-reabsorção, promotores da formação óssea ou ambos (Satpathy *et al.*, 2021).

1.2.2.1 *Tratamento hormonal*

O tratamento hormonal por reposição dos níveis de estrogénio é o tratamento mais eficiente para mulheres em fase pós-menopausa, de modo a limitar a perda óssea e a ocorrência de fraturas. No entanto, a longo prazo, este tipo de terapia tem efeitos adversos ao se encontrar associado a elevadas hipóteses de desenvolver cancro da mama, no cérvix, endométrio e nos ovários bem como à ocorrência de AVCs e doenças cardíacas

(Anjaneyulu *et al.*, 2018; Satpathy *et al.*, 2021). Tem ainda contraindicações em doentes hepáticos e/ou com embolias venosas (Satpathy *et al.*, 2021).

Já os análogos da PTH como a teriparatida, são muito onerosos e a necessidade de injeções diárias aumentam o risco de efeitos adversos como o desenvolvimento de osteossarcoma (Satpathy *et al.*, 2021).

1.2.2.2 Bi-fosfonatos

Os bi-fosfonatos (BPs) são pequenas moléculas anti-reabsorptoras que reduzem o número de osteoclastos funcionais na superfície do osso através de diferentes mecanismos, incluindo efeitos na sua diferenciação, maturação e apoptose. Adicionalmente, certos BPs prejudicam a sinalização da proteína G dos OCs e as funções do citoesqueleto, o que leva à desagregação do compartimento da medula óssea e compromete a sua atividade. No entanto, por muito que estas terapias reduzam eficazmente a perda de massa óssea, também apresentam efeitos adversos uma vez que se encontram ligadas a uma redução de OBs e formação óssea. Há ainda a hipótese de alguns BPs terem efeitos diretos na inibição da formação óssea. A redução de OBs após a terapia anti-reabsorptora também está associada à menor indução de formação óssea pela PTH (Durdan *et al.*, 2022).

Os bi-fosfonatos de toma oral atuam ao associar-se aos cristais de hidroxapatite e inibir a reabsorção óssea pelos OCs, mas observou-se que o seu uso prolongado se encontra associado a efeitos adversos como a necrose do maxilar, fraturas femorais atípicas e úlceras no trato digestivo. Como tal, tem ocorrido um decréscimo do uso de BPs nos últimos anos (Słupski *et al.*, 2021; Satpathy *et al.*, 2021).

1.2.2.3 Outros Tratamentos

As terapias por anticorpos também já foram implementadas. Um dos anticorpos é o Denosumab (DMAB) que é um anticorpo neutralizante do RANKL e que bloqueia a diferenciação e funcionamento dos OCs, além de induzir a fissão de OCs multinucleados. Tudo isto com o objetivo de diminuir o número de OCs e com isso, a reabsorção óssea. (Durdan *et al.*, 2022)

Outro fármaco anti-reabsorção é o odanacatib, um inibidor específico da protease dos OCs, cathepsina K, que inibe a degradação das proteínas mediada pela reabsorção sem interferir noutros processos dos OCs. Este fármaco não reduz o número de OCs e, contrariamente a outros fármacos como DMAB e BPs, também não interfere no número de OBs nem na formação óssea. Posto isto, este fármaco permite demonstrar que a inibição da reabsorção óssea é possível ao manter os OCs funcionais e com isto proteger a formação óssea. Contudo, os seus estudos foram interrompidos na fase 3 de ensaios por ocorrer um aumento de episódios cardiovasculares (Durdan *et al.*, 2022).

O eldecalcitol é um análogo ativo da vitamina D3 que possui propriedades anti-reabsorção. Foi demonstrado num estudo com ratos fêmea ovariectomizados que este fármaco diminui parâmetros bioquímicos e histológicos da reabsorção óssea. O seu uso como um tratamento para a osteoporose têm apresentado controvérsia, uma vez que, apesar de demonstrar atividade calcémica, se encontra associado à atividade osteoclástica. Até à data percebeu-se que o eldecalcitol induz a expressão de citocinas pró-osteoclastogénicas como RANKL, mas que o seu modo de ação pró-osteoblástico depende do ambiente em que atua. Assim, o seu efeito pode estar relacionado com outras substâncias libertadas durante a remodelação óssea (Bu *et al.*, 2019).

O interferão- γ (IFN- γ) secretado pelos linfócitos T é um fator anti-inflamatório importante que tem sido usado no tratamento da osteoporose severa. O IFN- γ liga-se ao recetor IFNGR expresso na superfície dos OCs e exerce um efeito inibidor na reabsorção óssea. Já nos OBs, o IFN- γ estimula a síntese de OCN e ALP, estimulando a formação óssea. No entanto, efeitos secundários e o custo elevados são algumas limitações deste tratamento (Zhou *et al.*, 2021).

Maioritariamente, as terapias que são atualmente usadas no tratamento da osteoporose pós-menopausa têm ação inibitória na diferenciação e atividade de OCs. No entanto, estes fármacos anti-reabsorção apresentam eficácia moderada, têm efeitos secundários relevantes e não têm a capacidade de recuperar a massa óssea já perdida (Zhao *et al.*, 2020). Como tal, é necessário compreender melhor os mecanismos acoplados à reabsorção e à formação do osso de modo a desenvolver novas estratégias terapêuticas para a manutenção óssea ao longo da vida e potenciar a acumulação de massa óssea em condições de perda severa (Durdan *et al.*, 2022).

A terapia antioxidante tem sido muito investigada devido ao seu efeito no metabolismo do osso. Apresenta ser uma abordagem promissora como terapia de inibição da atividade osteoclástica e na promoção da atividade osteoblástica. Também tem demonstrado um papel benéfico em suprimir os danos causados por ROS durante a recuperação óssea (Irgin *et al.*, 2016). Mas mesmo esta tem as suas limitações: Apesar dos antioxidantes sintéticos apresentarem maior estabilidade e baixo custo, a longo prazo apresentam efeitos secundários no sistema reprodutor, alergias e problemas gastrointestinais, o que pode aumentar a probabilidade de desenvolver cancro (Jaiswal *et al.*, 2022).

Como os diversos agentes terapêuticos utilizados em doentes de osteoporose apresentam efeitos secundários, alguns métodos alternativos têm sido estudados através do uso de diversos extratos ou compostos de origem natural (Kim *et al.*, 2019; Satpathy *et al.*, 2021).

I.3 Plantas Medicinais e compostos naturais

A Humanidade sempre usou plantas com fins medicinais. Nas antigas civilizações, em todos os continentes foram encontrados indícios disso. Assim, mesmo com o avanço da medicina e da farmacologia, especialmente em países em desenvolvimento, o uso da medicina tradicional prevalece (Chaachouay *et al.*, 2019).

Devido à segurança, eficácia, aceitação cultural e melhor compatibilidade com o organismo por provocar menos efeitos secundários, segundo a OMS cerca de 80% da população utiliza plantas medicinais como cuidado de saúde primário. No entanto, só cerca de 5% de todas as espécies vegetais foram investigadas em relação à sua segurança e eficácia na medicina tradicional (Shah *et al.*, 2021; Yusuf *et al.*, 2020). Em contraste com os fármacos sintéticos baseados na ação de um composto, a medicina natural apoia-se em efeitos sinérgicos de vários compostos que atuam num ou vários alvos de ação terapêutica. Além disso, a diversidade de compostos bioativos permite a variedade de efeitos descritos associado a extratos, sem esquecer as diferentes combinações que podem ser feitas tendo em conta a necessidade do paciente (Bessa Pereira *et al.*, 2012).

A procura por medicina de origem natural tem crescido bastante em países desenvolvidos e como tal, muitas companhias farmacêuticas têm concentrado a sua pesquisa em novos metabolitos como potenciais fármacos e *leads*. Alguns medicamentos bastante conhecidos e atuais foram descobertos com base em plantas medicinais. Caso disso é a aspirina, um anti-inflamatório; a morfina e a salicina que são analgésicos; a digoxina que é um glicosídeo cardiotónico; a artimisina e o quinino que são anti-maláricos, o paclitaxel e a vincristina que são anti-neoplásicos e a efedrina que é broncodilatadora e estimulante adrenérgica (Yusuf *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2019).

1.3.1 Compostos naturais bioativos

Mesmo com todos os avanços terapêuticos, há um decréscimo na taxa de tratamento da osteoporose, devido à falta de implementação de estratégias de tratamento e prevenção bem como à adequada comunicação dos efeitos adversos alarmantes das atuais terapias. Adicionalmente, em relação a outras patologias, a osteoporose não atrai elevados níveis de atenção por parte de prestadores de saúde e organizações governamentais, por ser uma patologia cujos tratamentos são onerosos (Curtis *et al.*, 2022; Słupski *et al.*, 2021).

Os fitoquímicos são responsáveis pela atividade terapêutica de espécies vegetais. Produtos que derivam de plantas medicinais, quer isolados, quer na forma de extratos, tornam possível desenvolver potenciais fármacos (Shah *et al.*, 2021). Os fitoestrogénios são compostos não esteroides presentes nas plantas, que apresentam atividade biológica estrogénica ou não estrogénica. Podem dividir-se em dois grupos: flavonóides como isoflavonas, cumestróis e prenilflavonóides; ou não flavonóides como os lignanos, que são precursores de flavonóides (**Figura 8**) (Słupski *et al.*, 2021).

Têm sido um grande foco por serem compostos naturais, não esteroides, mas que podem apresentar atividade mimética de estrogénio. Por isso apresentam-se como substitutos efetivos na redução da fragilidade e perda óssea. Diversos estudos recomendam que uma dieta rica em fitoestrogénios pode ter uma ação protetora contra a osteoporose pós-menopausa e doenças cardiovasculares (Anjaneyulu *et al.*, 2018; Satpathy *et al.*, 2021). O grupo de fitoestrogénios flavonóides incluem maioritariamente isoflavonas, que exercem o seu efeito terapêutico devido à sua afinidade ao recetor de

estrogénio beta (ER- β), o que se acredita serem mais seletivas para as células ósseas. No entanto também contém cumestróis, flavanonas, chalconas e flavonas (Słupski *et al.*, 2021). Apesar de serem considerados mais seguros, podem produzir efeitos secundários semelhantes à suplementação com estrogénio, apresentando efeitos secundários como o desenvolvimento de cancro da mama e ovários (Satpathy *et al.*, 2021; Słupski *et al.*, 2021).

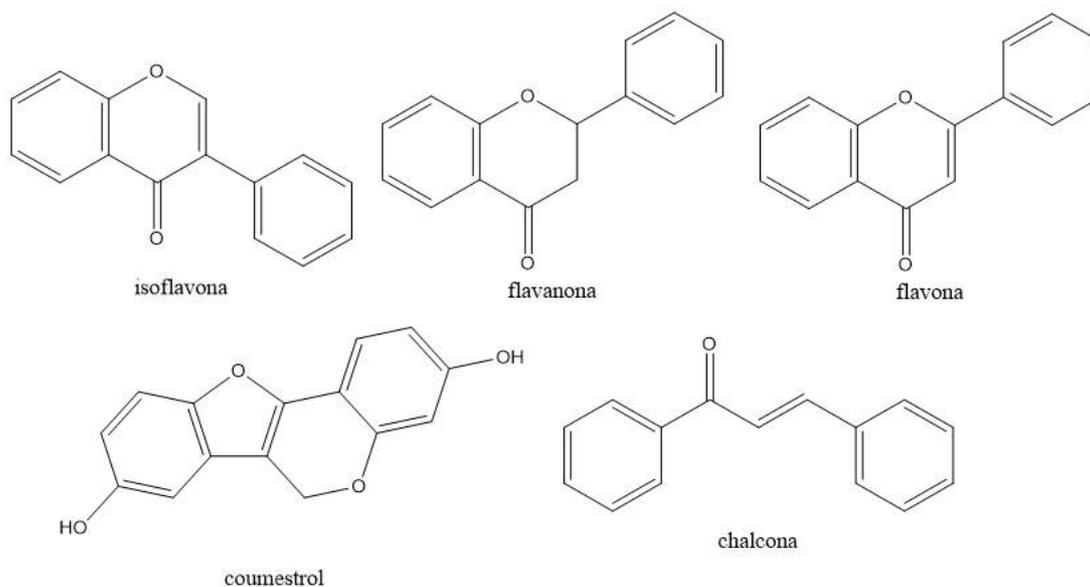


Figura 8 - Estruturas de fitoestrogénios mais comuns

Estudos epidemiológicos têm evidenciado uma correlação direta entre o consumo de compostos fenólicos, nomeadamente ácidos fenólicos, flavonóides, taninos e antocianinas e efeitos benéficos na saúde, maioritariamente propriedades anti-inflamatórias, o que confere potencial terapêutico em inflamação crónica particularmente por captar eletrões de espécies reativas de azoto (RNS) e ROS (Carvalho *et al.*, 2017; Słupski *et al.*, 2021).

O uso de medicina à base de plantas nas estratégias de regeneração óssea tem sido avaliado. Existe evidência de ensaios *in vitro* e *in vivo* com vários produtos derivados de plantas que têm efeitos positivos no metabolismo do osso. A eficácia de extratos de plantas como substitutos ósseos também já foi reportada (Bessa Pereira *et al.*, 2012).

1.3.2 Estudos com Plantas Medicinais na Osteoporose

Um estudo realizado com o extrato das folhas de *Morinda citrifolia* L. proveniente da Tailândia sugere que o mesmo apresenta um efeito antiosteoporótico por melhorar a densidade osteoblástica e os níveis séricos de Ca^{2+} , OCN e ALP, que atuam na formação óssea e mineralização. Em simultâneo, a densidade osteoclástica diminuiu. Este estudo foi conduzido em ratos fêmea ovariectomizados com um extrato obtido por maceração durante 72h (Wattanathorn *et al.*, 2018).

Foram reportados compostos ativos com efeito estimulador na formação óssea através de uma ação anabólica em ossos osteoporóticos (Zhao *et al.*, 2020; Bethesda 2012). O icariin – um bioativo isolado de uma espécie chinesa do género *Epimedium* - apresenta ter um efeito estimulador na ativação de osteoblastos em modelos KO-OPG. Investigações com ácido oleanólico indicam que este inibe fases mais avançadas da osteoclastogénese e a ativação de c-Fos e NFATc1 em macrófagos derivados da medula óssea (BMM). Diminui ainda a ativação de genes osteoclásticos como TRAP, Ctsk (referente à catepsina K) e MMP9 e atenuou a perda de massa óssea no modelo KO-OPG ao diminuir a densidade de osteoclastos (Zhao *et al.*, 2020).

Estudos *in vitro* em co-cultura com precursores de OCs e com OBs demonstraram que o extrato metanólico de *Equisetum arvense* aparenta ter um efeito negativo na osteoclastogénese (Costa-Rodrigues *et al.*, 2012).

Desta forma, as plantas têm-se revelado promissoras por serem ricas em metabolitos que apresentam bioatividade e com potencial para desenvolver novas terapias.

1.3.3 *Equisetum ramosissimum* Desf.

O género *Equisetum* é conhecido pelo seu elevado teor de sílica (estima-se que cerca de 20-25% do seu peso seco é sílica) (Sadowska *et al.*, 2020).

A espécie *Equisetum ramosissimum* Desf. (ER) é um feto perene que pertence à família Equisetaceae. Esta planta cresce habitualmente em solos húmidos e encontra-se maioritariamente junto às margens do rio ou locais pantanosos. O seu caule é vertical com ramificações tal que a sua estrutura a torna vulgarmente conhecida por cavalinha

ramificada (**Figura 9**). Encontra-se em diferentes partes do mundo sendo tradicionalmente utilizada na África do Sul sob decocção dos rizomas para a infertilidade feminina e como pasta feita a partir dos ramos para tratar ossos fraturados ou deslocados. Foi reportado que as comunidades *Zulu* usam a seiva como analgésico em dores de dentes e como cicatrizante em extrações dentárias. É também reportado a decocção e/ou infusão das suas partes aéreas para doenças urológicas, inflamações, cicatrização (aplicação das cinzas pelas tribos), doenças reumáticas, hipertensão e para fortalecimento de ossos fragilizados. Está ainda descrita pelas suas propriedades antioxidantes, pela sua capacidade de captar espécies radicais; anti-inflamatórias, diuréticas, hemostáticas, antimicrobianas e antivirais (Boeing *et al.*, 2021; Ojha *et al.*, 2021; Shah *et al.*, 2021; Szuman *et al.*, 2020).



Figura 9 - *Equisetum ramosissimum* Desf. (foto obtida no decurso do projeto CÔaMedPlants na região do Vale do CÔa).

Em extratos hidroetanólicos já foram identificados flavonóides (na forma livre e glicosilada) como camferol, quercetina e apigenina. Também se identificaram ácidos fenólicos como o ácido chiquímico, cafeóilo, *p*-hidroxibenzóico, ferúlico, que é reportado como nefroprotetor, e derivados de ácido cafeico. Foi reportada ainda a presença de alcalóides (Boeing *et al.*, 2021; Shah *et al.*, 2021). Em extratos metanólicos foram identificados alcalóides, saponinas, taninos e flavonóides (Ismail *et al.*, 2020).

1.3.4 *Urtica*

Poucas espécies do género *Urtica* têm a sua composição fitoquímica descrita além da *Urtica dioica* L. São conhecidas pelas suas propriedades irritantes, mas após serem processadas, secas ou cozinhadas, perdem-na tornando-se fontes de alimento (Carvalho *et al.*, 2017; Taheri *et al.*, 2022). Despertaram interesse quando foi descoberto que são ricas em polifenóis como flavonóides, ésteres de ácido cafeico, cumarinas e taninos; também contém triterpenos, lignanos, ceramidas, polissacáridos, ácidos gordos, minerais, vitaminas e aminoácidos (Maaroufi *et al.*, 2017; Maksimović *et al.*, 2019; Shah *et al.*, 2021; Taheri *et al.*, 2022).

As espécies *Urtica dioica* L. e *Urtica urens* L. pertencem à família Urticaceae. São plantas perenes que se caracterizam pelas suas folhas em forma de coração com bordas serradas e cobertas de tricomas, que crescem aos pares verticalmente. A colheita ocorre durante o período de floração e são usadas secas na medicina tradicional com fins analgésicos em dores articulares. No entanto, apresentam contradições gastrointestinais e reações alérgicas caso não sejam devidamente processadas (Maaroufi *et al.*, 2017; Maksimović *et al.*, 2019). Crescem em diversos ambientes, mas preferem solos ricos em azoto. São perenes e crescem em sombras difusas, solos húmidos e terrenos baldios. Distribuem-se pelo mundo inteiro, mas encontram-se maioritariamente na Europa, África, Ásia e América do Norte (Subba *et al.*, 2022).

1.3.4.1 *Urtica dioica* L.

A *Urtica dioica* L. (UD) (**Figura 10**) é a única espécie de *Urtica* que é cultivada comercialmente para fins farmacêuticos da qual a extração de clorofilas e fibras já é comercializada. Até à data foram descritos diversos metabolitos desta espécie incluindo flavonóides como kamferol, quercetina, rutina (na forma livre e glicosilada), taninos, derivados de ácido chiquímico e outros fenólicos como *p*-cumaroílo, cafeoílo e feruoílo bem como fenilpropanóides. Além disto foram reportadas saponinas, carotenóides, clorofilas, esteróis, ácidos gordos, proteínas, vitaminas e minerais como cálcio, potássio, magnésio, fósforo, ferro, enxofre, zinco, manganês, cobre e níquel (Carvalho *et al.*, 2017; Farag *et al.*, 2013; Kalia *et al.*, 2014; Subba *et al.*, 2022). É usada na medicina tradicional para variadas patologias incluindo artrite reumatoide, osteoartrite e infeções microbianas.

Contém compostos farmacologicamente ativos como flavonóides e derivados de ácidos hidroxicinâmicos como ésteres cafeólicos, ácido cafeico, scopoletina, sitoesterol e minerais que estimulam o sistema imunitário e apresentam efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios – que se deve ao seu efeito inibitório da NF- κ B, antimicrobianos, antivirais e analgésicos (Irgin *et al.*, 2016; Kalia *et al.*, 2014; Subba *et al.*, 2022; Taheri *et al.*, 2022). Ultimamente os efeitos antioxidantes têm sido estudados devido aos seus efeitos no metabolismo ósseo. As terapias deste gênero aparentam ser promissoras na inibição da atividade osteoclástica e na promoção da atividade osteoblástica. Além disto, também demonstraram ser capazes de suprimir os efeitos nocivos de ROS em células, durante a cicatrização óssea. Pode ser benéfica para mulheres na fase de menopausa ao atuar como um restaurador de flutuações hormonais e como coagulante ao controlar hemorragias excessivas (Irgin *et al.*, 2016; Subba *et al.*, 2022).



Figura 10 - *Urtica dioica* L. (foto obtida no decurso do projeto CÔaMedPlants na região do Vale do CÔa).

A sua decocção é relatada para dissolver pedras de oxalato de cálcio nos rins. Infusões desta espécie também costumam ser usadas para hemorragias nasais e menstruais, diabetes, reumatismo, eczema, anemia e queda de cabelo. As folhas são reportadas como hipotensivas, anti-inflamatórias, diuréticas e imunomoduladoras e analgésicas. As suas raízes e folhas são usadas para o tratamento de hiperplasia prostática. Foi realizado um estudo *in vivo* que implicou a administração de extratos aquosos no qual se verificou que a administração sistêmica pode estimular a regeneração óssea e reduzir

a inflamação, incluindo a peroxidação lipídica (Farag *et al.*, 2013; Irgin *et al.*, 2016; Jaiswal *et al.*, 2022; Khare *et al.*, 2012; Kregiel *et al.*, 2018; Shah *et al.*, 2021).

Estudos demonstram que os extratos obtidos das folhas limitam a produção de citocinas inflamatórias e previnem a ativação das cicloxigenases, COX-1 e COX-2. O extrato aquoso das raízes também exibe propriedades anti-inflamatórias ao suprimir as COX, citocinas e a peroxidação lipídica (Subba *et al.*, 2022). A decocção das folhas e dos caules em quantidades controladas é indicado para o tratamento de pequenas lesões cutâneas. É também usada para controlo de hemorragias menstruais em mulheres, reumatismo e falta de energia muscular. Em preparações alcoólicas é usado para hepatites crónicas e obstipação. A administração de extratos hidroetanólicos a 80% por via oral apresentaram em ensaios *in vivo* resultados positivos para a atividade antioxidante podendo promover inclusive, a atividade de enzimas antioxidantes como SOD e GPx. Estes resultados também foram obtidos em ensaios *in vitro* (Jaiswal *et al.*, 2022; Kalia, Joshi *et al.*, 2014; Khare *et al.*, 2012; Taheri *et al.*, 2022).

Além das atividades já mencionadas demonstra ainda atividade antidiabética, anti-endometriótica e nefroprotetora, diurética e antiulcerosa (Taheri *et al.*, 2022).

1.3.4.2 Urtica urens L.

A espécie *Urtica urens* L. (UU) (**Figura 11**) distribui-se geograficamente pela América do Norte, Europa, Médio Oriente e Oceânia. É tradicionalmente usada como anti-hipoglicémica, antioxidante, hepatoprotetora, antiviral, antimicrobiana, diurética, hipotensora, anticoagulante e nefroprotetora. É descrita com aplicação terapêutica em anemias, úlceras, artrite e reumatismo. Tem descrito como atividade farmacológica propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (Maaroufi *et al.*, 2017; Mzid *et al.*, 2017; Seadawy, *et al.*, 2018; Taheri *et al.*, 2022).



Figura 11 - *Urtica urens* L. (foto obtida no decurso do projeto CÔaMedPlants na região do Vale do CÔa).

Foi realizado um estudo que demonstrou que os extratos aquosos são menos ricos em compostos antioxidantes comparativamente aos extratos hidroetanólicos, mas foi demonstrado *in vivo* que extratos etanólicos têm propriedades analgésicas (Taheri *et al.*, 2022; Maaroufi *et al.*, 2017).

Um estudo de Mzid *et al.*, 2017, consistiu na administração de extratos etanólicos de UU a ratos. Observou-se uma diminuição significativa dos níveis de cálcio e fosfato na urina o que sugere os seus efeitos benéficos no metabolismo destes iões. Isto pode ter efeito na atividade osteoclástica bem como a nível hormonal. Foi demonstrado também que houve um aumento de hidroxiprolina, estradiol e das vitaminas D e E, que são indicadores benéficos para a formação óssea (Mzid *et al.*, 2017). O seu efeito protetor e atividade anti-inflamatória encontra-se normalmente associado ao elevado teor de compostos fenólicos e pode dever-se à sua atividade antioxidante bem como à inibição de mediadores inflamatórios. (Mzid *et al.*, 2017; Mzid *et al.*, 2017).

II. Objetivos

Localizado a nordeste de Portugal e banhado pelo Rio Douro, o Vale do Côa é conhecido mundialmente pelo seu património de arte rupestre, mas também é muito rico em património genético vegetal. De forma a valorizar a região e comprovar cientificamente a medicina tradicional, os objetivos deste trabalho são avaliar as diferenças entre dois métodos de extração diferentes de três espécies endógenas da região, caracterizar quimicamente a composição dos extratos obtidos incluindo a avaliação da atividade antioxidante e a composição fenólica dos mesmos e fracionar os extratos de modo a identificar as frações com maior teor de compostos fenólicos. *In vitro*, avaliar a toxicidade dos extratos em células RAW 264.7, precursoras de osteoclastos e testar a sua capacidade inibitória na osteoclastogénese, avaliar o seu impacto na respiração celular e nas defesas antioxidantes *in vitro* e estudar o mecanismo de ação dos extratos nas células RAW 264.7 e no processo de diferenciação em osteoclastos.

III. Materiais e Métodos

III.1 Reagentes

REAGENTE	REFERÊNCIA	MARCA
<i>Agilent Seahorse XF Calibrant</i> , ph=7.4	100840-000	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EUA)
Água destilada DNase/RNase Free	10977-035	Gibco (Waltham, MA, EUA (Fisher Scientific))
Ácido gálico	398225	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Acetato (sol.) 2,5 M; pH 5,2	3863	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Antibiótico/Antimicótico	15240-062	Gibco (Waltham, MA, EUA (Fisher Scientific))
Albumina de soro de Bovino (BSA)	23209	Thermo Scientific (Waltham, MA, EUA)
Ácido acético glacial	131008.1611	PanReacAppliChem (Barcelona, Espanha)
Ácido fosfórico de Naftol AS-BI (sol.)	3871	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Ácido tricloroacético (TCA)	T0699	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Antimicina A	A8674	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Azul tripano	T8154	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
BAM15	SML 1760-5MG	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Bicarbonato de sódio	S6014	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
<i>CellTiter- Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay kit</i>	G7570	Promega (Madison, WI, EUA)
<i>Clarity[™] Western ECL Substrate</i>	170-5061	Bio-Rad (Hercules, CA, EUA)
Cloreto de Sódio (NaCl)	S/3160/63	Fischer Scientific (Waltham, MA, EUA)
Clorofórmio	650498	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
CM-H ₂ DCFDA	C6827	Waltham, MA, EUA
Cocktail de inibidores de protease (PIC)	P8340	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
17β-estradiol (E2)	E1024	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
D-(+)-Glucose	G7021	Sigma (St. Louis, MO, EUA)

Dimetilsulfóxido (DMSO)	D/4121/PB17	Fischer Scientific (Waltham, MA, EUA)
Ditiotreitol (DTT)	D9163	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Dodecil sulfato de sódio (SDS)	161-0301	Bio-Rad (Hercules, CA, EUA)
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM)	D5030	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
<i>Fast Garnet GBC Base</i> (sol.)	3872	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Fluoreto de fenilmetilsufonil (PMSF)	P7626	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Fosfato de sódio dibásico (Na ₂ HPO ₄)	1.06580.1000	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Fosfato de sódio monobásico (NaH ₂ PO ₄)	SODH-01A-500	Labkem (Barcelona, Espanha)
Formalina	HT501128-4L	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
HEPES	H4034	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
<i>iScript</i> TM cDNA kit de síntese	1708890	Bio-Rad (Hercules, CA, EUA)
Isopropanol	190764	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
L-Glutamina	G3126	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
<i>Leukocyte Acid Phosphatase</i> (TRAP) kit	387A-1KT	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
RANKL	R0525	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Metanol	M/4000/17	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
<i>MitoSOX</i> TM Red	M36008	Fischer Scientific (Waltham, MA, EUA)
Nitrito de sódio (sol.)	914	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Oligomicina	75351	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Ortofosfato de potássio di-hidrogenado (KH ₂ PO ₄)	P/4806/60	Waltham, MA, EUA
Peróxido de hidrogénio (sol.)	95294	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Persulfato de amónia (APS)	1708.0020	Gerbu (Heidelberg, Alemanha)
<i>Pierce</i> TM 660 nm	22660	Thermo Scientific (Waltham, MA, EUA)
Piruvato de sódio	P2256	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Ponceau S	P3504	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Reagente de Dragendorff	44578	Fluka/ Sigma (St. Louis, MO, EUA)
<i>RNeasy Mini kit</i>	74104	Qiagen (Hilden, Alemanha)

Rotenona	R8875	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Soro Fetal de Bovino (FBS)	S1810	Biowest (Nuaille, França)
Sal sódico de Sulforodamina B (SRB)	S9012	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Sal sódico de Resazurina	R7017	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Tartarato (sol.)	3873	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Tetrametiletilenodiamina (TEMED)	MB03501	Nzytech (Lisboa, Portugal)
TLC Silica gel 60 F ₂₅₄	1055540001	Merck (Darmstadt, Alemanha)
TLC Silica gel 60 RP-18 F _{254S}	1055590001	Merck (Darmstadt, Alemanha)
<i>TripleXtractor</i>	GB23.0200	Grisp (Porto, Portugal)
Tris-Base	BP152-1	Fischer Scientific (Waltham, MA, EUA)
Triton X-100	T9284	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Tris-HCl	T3253	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Tripsina-EDTA 0,05%, Phenol Red	T4049	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
TRIzol	15596026	Invitrogen (Waltham, MA, EUA (Fisher Scientific))
Tween® 20	P9416	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
<i>Seahorse XF^e96 sensor cartridges</i>	102418-000 B	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EUA)
<i>Seahorse XF^e96 V3-PS TC-Treated Cell Culture Microplates</i>	101085-004	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EUA)
<i>Seahorse XF Calibrant Solution</i>	100840-000	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EUA)
Silica gel 60 G para preparativas	107731	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Solução de Acrilamida/Bis 40%	161-0148	Bio-Rad (Hercules, CA, EUA)
<i>SsoFast™ EvaGreen® Supermix</i>	172-5204	Bio-Rad (Hercules, CA, EUA)

III.2 Material Vegetal

O material vegetal utilizado neste estudo foi colhido pelo Dr. Mário Pedro Marques, do iCBR/CIBB da Universidade de Coimbra, na região do Vale do Côa. As plantas foram secas em local protegido da luz, à temperatura ambiente, o que permite preservar compostos termolábeis. De todas as espécies estudadas foram produzidos

exemplares de herbário que se encontram depositados no Herbário da Universidade de Aveiro (AVE). Para a obtenção dos extratos, foram utilizadas as partes aéreas das plantas em estudo.

III.3 Métodos de extração

O processo de extração de plantas medicinais tem o propósito de obter metabolitos secundários que podem ser compostos bioativos como alcaloides, flavonóides, terpenos, saponinas, esteroides e glicósidos do material inicialmente inerte ou inativo (Abubakar *et al.*, 2020).

Os extratos foram obtidos através de dois processos diferentes: decocção e maceração hidroetanólica de acordo com Martins-Gomes *et al.*, 2018 e Ziani *et al.*, 2019. A decocção é um processo extrativo que utiliza água em ebulição e que permite obter compostos pouco voláteis, polares e hidrofílicos. Apresenta como vantagens o uso de um solvente ecológico e em comparação com a maceração, pode facilitar a extração de determinados compostos bioativos; é um solvente amplo para compostos polares, além de disponível e não tóxico. Tem como inconvenientes permitir o crescimento bacteriano nos extratos e poder provocar a hidrólise de compostos durante a extração, além de poder degradar compostos termolábeis pelo uso de calor (Abubakar *et al.*, 2020; Hidayat *et al.*, 2021). A maceração é um método bastante simples, por norma mais demorado que a decocção. É adequado à extração de compostos termolábeis uma vez que ocorre à temperatura ambiente. Tem a vantagem de, no caso da extração hidroetanólica, ter afinidade para extrair compostos com polaridade intermédia e de preservar contra microrganismos. É mais adequado à extração de compostos fenólicos. Apresenta como inconveniente o uso de solventes orgânicos e o tempo de extração além de não ter afinidade para compostos muito lipossolúveis (Abubakar *et al.*, 2020; Hidayat *et al.*, 2021).

A decocção teve como objetivo mimetizar o método extrativo tradicionalmente usado (Martins-Gomes *et al.*, 2018; Ziani *et al.*, 2019). As extrações decorreram a 3,3% (m/v). A mistura foi submetida à temperatura de ebulição com agitação magnética durante 20 min. Depois a solução foi recolhida e o solvente evaporado até à secura. Os extratos foram refrigerados até futura análise. A biomassa foi extraída até à exaustão.

A maceração hidroetanólica a 80% é um outro método de extração que permite avaliar a influência da capacidade extrativa de compostos polares e hidrofílicos, mas também alguns aromáticos e apolares com afinidade para o etanol como compostos fenólicos (Martins-Gomes *et al.*, 2018; Ziani *et al.*, 2019). As extrações decorreram a 4% (m/v). A mistura foi submetida a agitação durante 1h ao abrigo da luz, decantada para um balão de fundo redondo e à biomassa remanescente foi adicionado igual volume de solvente para repetir o processo extrativo. Por fim, o solvente foi evaporado até à secura. Os extratos foram refrigerados até futura análise. A biomassa foi extraída até à exaustão.

III.4 Caracterização química dos extratos

A construção de perfis metabólicos permite ganhar uma visão mais ampla sobre a composição bioquímica, neste contexto, dos metabolitos produzidos pelas plantas (Farag *et al.*, 2013). Assim, foi realizada uma identificação e quantificação dos compostos fenólicos pela técnica de LC-DAD-ESI/MSⁿ e pelo método de Folin-Ciocalteu (FC), a avaliação qualitativa de alcaloides bem como a monitorização de outros metabolitos.

III.4.1 LC-DAD-ESI/MSⁿ

A técnica de LC-DAD-ESI/MSⁿ é um método analítico hifenado, que combina a capacidade de separação cromatográfica líquida (LC), adequada à análise de compostos não voláteis e/ou termolábeis com a capacidade de identificação e análise da massa de cada composto detetado por espectrometria de massa (MS) (Tilvi *et al.*, 2014). É um método com diversas aplicações incluindo a análise de amostras complexas como extratos de plantas. Tem a vantagem de ser um método sensível, reprodutível e pouco demorado (Ziani *et al.*, 2019).

A identificação e quantificação de compostos fenólicos foi feita em colaboração com o laboratório para a sustentabilidade e tecnologia da região da montanha (SusTEC), do Centro de Investigação da Montanha (CIMO), integrado no Instituto Politécnico de Bragança (IPB). O método encontra-se descrito em anexo.

III.4.2 Avaliação de alcaloides pelo reagente de Dragendorff

Para a detecção qualitativa de alcaloides foi utilizado o reagente de Dragendorff. Este é um reagente colorimétrico preparado a partir da dissolução de nitrato de bismuto num ácido fraco como por exemplo, ácido acético. Esta solução é misturada com uma solução concentrada de iodeto de potássio. Em meio ácido, na presença de alcaloides (compostos azotados) produz um precipitado vermelho alaranjado (**Figura 12**) (Raal *et al.*, 2020). Para tal, aplicou-se a amostra numa placa cromatográfica de camada fina (TLC) e mergulhou-se, numa placa de Petri com reagente de Dragendorff até cobrir. Retirou-se o excesso e secou-se a placa. A nicotina foi usada como controlo positivo.

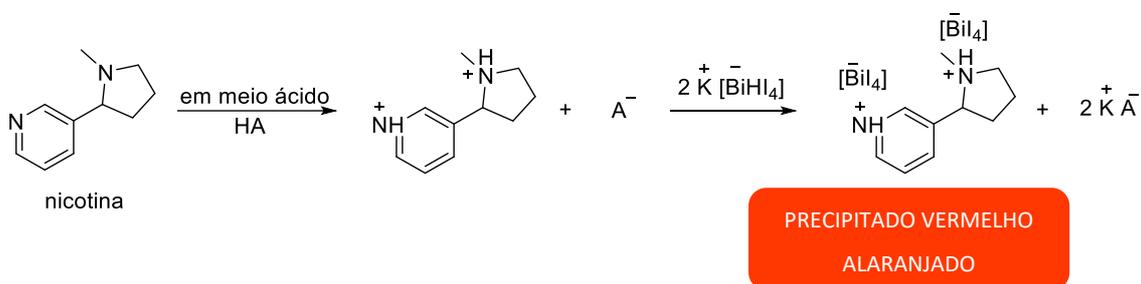


Figura 12 - Reação da nicotina com o reagente de Dragendorff. Adaptado de Raal *et al.*, 2020

III.4.3 Quantificação de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu

Foi quantificada a composição fenólica de cada um dos extratos com base nas reações dos grupos hidroxilo presentes em fenóis com o reagente de Folin-Ciocalteu (FC). Este ensaio baseia-se na reação de oxidação-redução, em meio alcalino conseguido pela adição de Na_2CO_3 . Nesta reação, os ácidos fosfomolibdicos e os heteropoliácidos fosfotúngsticos, onde os metais se encontram no estado de oxidação VI, presentes no reagente, são reduzidos a óxidos pelos e^- provenientes dos compostos fenólicos, o que provoca uma alteração colorimétrica do meio da reação, de amarelo a azul, proporcional ao teor de compostos fenólicos presentes na amostra (**Figura 13**) (Mikołajczak *et al.*, 2021; Kupina *et al.*, 2018).

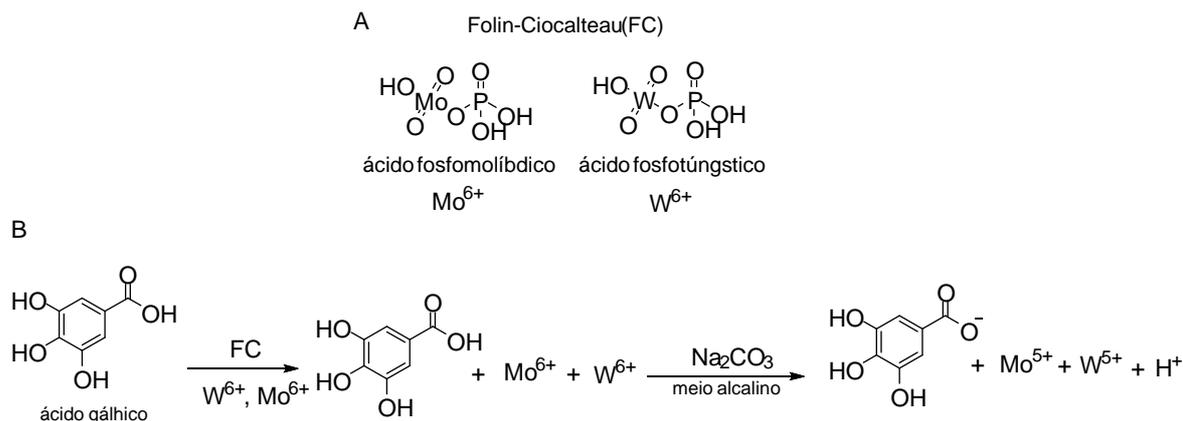


Figura 13 - Constituintes do reagente de Folin-Ciocalteu (A); Reação de oxidação-redução do ácido gálgico com o reagente (B). Adaptado de Kupina *et al.*, 2018 e Mikołajczak *et al.*, 2021

O método de avaliação foi adaptado de Tiago *et al.*, 2022. A avaliação do teor foi realizada a 766 nm. O ensaio foi realizado em duplicado, com três réplicas. Em primeiro foi obtida uma reta de calibração com ácido gálgico como padrão, a diferentes concentrações. Prepararam-se então soluções com 7,5 μL de solução padrão, 592,5 μL de água Milli-Q e 100 μL de FC, que incubou durante 7 min à temperatura ambiente, no escuro. Em seguida adicionou-se 300 μL de Na_2CO_3 que incubou durante 30 min no escuro, a 37°C. Posteriormente, as absorvâncias foram lidas a 766 nm no espectrofotômetro Hitachi UH530 UV/Vis (VWR, PA, EUA) e a reta de calibração traçada. Em seguida, foram quantificados os extratos. Para tal, preparou-se as soluções tal como descrito para o padrão, mas foram colocados 7,5 μL de amostra à concentração de 8 mg/mL. A mesma avaliação foi realizada para as frações obtidas de cada amostra a 10 mg/mL. O cálculo do teor de compostos fenólicos foi realizado através das curvas de calibração previamente obtidas em cada ensaio realizado e os resultados são apresentados em mg/g de extrato, expressos em equivalentes de ácido gálgico.

III.5 Avaliação antioxidante pelo método DPPH

É um ensaio bastante simples, pouco oneroso e largamente utilizado para avaliar a atividade antioxidante de compostos naturais. Este método baseia-se na transferência eletrônica entre um composto antioxidante presente na amostra e o radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), dando origem a uma molécula diamagnética estável. Quando a reação ocorre, há formação de uma nova ligação, amina-hidrogénio, o que provoca uma alteração da cor da solução, de púrpura a amarelo (**Figura 14**). Por ser uma

reação colorimétrica, esta reação pode ser monitorizada por espectrofotometria, a 517nm (Hussen *et al.*, 2023).

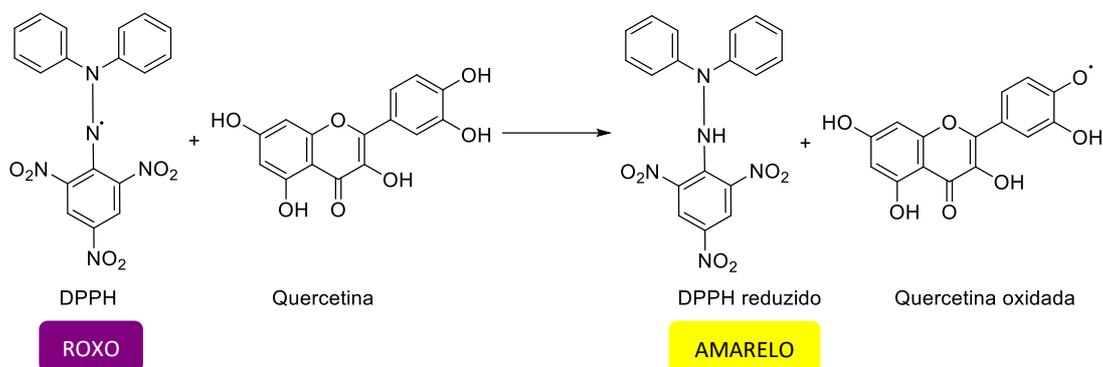


Figura 14 - Reação de oxidação-redução do DPPH com a quercetina, que é estabilizada por ressonância.

A avaliação da atividade antioxidante dos extratos foi realizada segundo o método descrito em Ntungwe *et al.*, 2021. Para tal, foram preparadas *cuvettes* com 990 μL de uma solução de DPPH em MeOH e 10 μL de extrato a 1 mg/mL. As soluções foram deixadas as incubar à temperatura ambiente no escuro durante 30min e lidas a 517 nm no espectrofotômetro Hitachi UH530 UV/Vis (VWR, PA, EUA). Cada amostra foi feita em triplicado. Uma solução de quercetina a 1 mg/mL foi usada como controlo positivo. A solução de 990 μL de DPPH em MeOH + 10 μL de MeOH foi usada como a absorvância da solução de DPPH (100%).

O cálculo da capacidade de captação do radical foi realizado através da seguinte fórmula:

$$AA\% = \frac{A_{100} - (A_{Amostra} - A_{Branco})}{A_{100}}$$

Onde a AA% corresponde à percentagem de atividade antioxidante, $A_{Amostra}$ diz respeito à absorvância de cada amostra e A_{100} à da solução controlo.

III.6 Fracionamento

Em concordância com os objetivos estabelecidos, após a obtenção e avaliação dos extratos, prosseguiu-se ao fracionamento dos mesmos, por TLC.

III.6.1 Cromatografia em camada fina e preparativa (TLC e PTLC)

A TLC é uma técnica simples, rápida e pouco onerosa que permite identificar o tipo de compostos presentes numa amostra. A migração dos compostos ocorre de acordo com a afinidade dos mesmos à fase estacionária e à fase móvel, o que fornece informação sobre a sua polaridade. O índice de retenção é dado pela razão entre a distância percorrida pelo soluto e a distância percorrida pela frente do solvente e permite inferir sobre o tipo de compostos presentes na amostra.

O fracionamento dos extratos foi realizado em sílica de fase normal e de fase reversa. Para tal, usou-se placas de sílica gel 60 e de sílica gel 60 RP-18, respetivamente. Como fase móvel foram utilizadas misturas dos eluentes acetonitrilo, metanol e água (combinações e proporções diferentes, de acordo com o extrato fracionado). As eluições foram feitas em câmara previamente saturada com a respetiva fase móvel. O fracionamento foi realizado por observação da eluição e com o auxílio de uma lâmpada CAMAG® UV a 254 e 366 nm e após revelação com uma mistura ácida de ácido sulfúrico conc./ MeOH (1:1) a 366 nm. As frações depois de separadas e lavadas da sílica foram confirmadas por TLC.

III.7 Linha celular e condições de cultura

III.7.1 Raw 264.7

Neste projeto foi utilizada a linha celular RAW 264.7 de macrófagos do modelo biológico *Mus musculus* adquirida pela ATCC (Manassas; VA; catalog#TIB-71). As células foram conservadas a -80°C, em N₂ líquido. Os macrófagos RAW 264.7 foram mantidos em cultura em frascos de 75 cm² em meio DMEM suplementado com 25 mM de D-Glucose, 4 mM de L-Glutamina, 1 mM de piruvato de sódio, 18 mM de bicarbonato de sódio, 0,1 mM NaH₂PO₄, 10% FBS e 1 % Penicilina/Estreptomicina com um pH compreendido entre 7,2-7,4, a 37°C em atmosfera húmida de 5% CO₂.

III.8 Ensaios de toxicidade

III.8.1 Avaliação da atividade metabólica – Alamar Blue™

O ensaio de viabilidade celular com resazurina ou o ensaio de Alamar Blue™ tem sido amplamente utilizado em estudos de viabilidade celular e citotoxicidade. A resazurina é um indicador redox usado para avaliar células metabolicamente ativas. Este composto azul não fluorescente é convertido em resorufina (de cor *fuschia*) na presença de células metabolicamente ativas (**Figura 15**). Ainda não são exatamente conhecidas as enzimas responsáveis pela reação, que podem ser citosólicas ou mitocondriais (Gutiérrez *et al.*, 2017). Crê-se que o corante é reduzido por desidrogenases que necessitam de NAD(P)H para catalisar a reação, ocorrendo uma transferência de elétron pela enzima para a resazurina, que é reduzida a resorufina. Esta conversão pode ser detetada pela alteração colorimétrica e avaliada por espectrofotometria. A técnica tem como vantagens a sua rapidez, fiabilidade, sensibilidade, reprodutibilidade e custo, além de não ser destrutiva, o que permite utilizar as células para outros ensaios (Costa *et al.*, 2021).

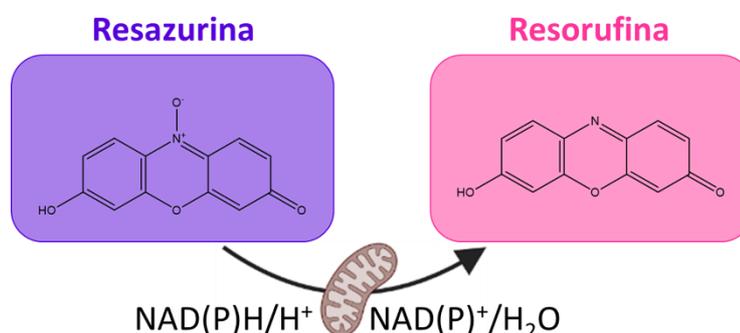


Figura 15 - Reação de redução da resazurina pelas enzimas desidrogenase. Adaptada de BioRender

O ensaio de Alamar Blue™ foi utilizado após o tratamento das células com os extratos para avaliar a toxicidade dos mesmos. Para tal foi aspirado o meio e adicionados 100 μL de novo meio com resazurina a 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Foi também adicionado a 3 poços sem células em cada placa, meio com resazurina como controlo positivo. De seguida, incubou-se a placa no escuro por 2-3h e leu-se a fluorescência a 540 nm e 590 nm no leitor de placas de poços Cytation™ 3 (BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA).

III.8.2 Avaliação da densidade celular - Sulforodamina B

A sulforodamina B (SRB) é um aminoxanteno de coloração *fuchsia*, com dois grupos sulfônicos que se ligam aos resíduos de aminoácidos (a.a.) básicos sob condições ligeiramente acídicas e dissociam-se sob condições básicas. A ligação é estequiométrica e como tal a quantidade de corante extraído após a ligação é proporcional à massa celular (Fernandes *et al.*, 2021).

A avaliação foi realizada após a fixação das células no fim de cada ensaio, como forma de normalização dos mesmos. Para tal, foi utilizado o ensaio de SRB. A solução de TCA a 10% foi descartada e os poços cuidadosamente lavados com água destilada. As placas foram colocadas na estufa durante 20 min para secar. Em seguida adicionou-se 50 μL e incubou-se no escuro durante 30 min. Descartou-se a solução e os poços foram lavados com AcOH 1% até todo o corante livre ser descartado. A placa foi novamente colocada por 20 min. na estufa para secar. Posteriormente foram adicionados 200 μL de Tris-Base 10 mM e transferidos 100 μL para uma placa não estéril onde foi realizada leitura da absorvância a 510 nm e do background a 620 nm no leitor de placas Cytation™ 3 (BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA).

III.9 Produção de espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

III.9.1 ROS Mitochondrial - MitoSOX

A produção de ROS mitocondrial foi avaliada num ensaio com a sonda *MitoSOX Red*. O dihidroetídio (ou hidroetidina), pode ser oxidado por espécies reativas como o superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) a etídio, que consequentemente se liga ao DNA mitocondrial e produz fluorescência. O *MitoSOX Red* é um derivado de dihidroetídio com um substituinte de trifenilfosfônio catiónico. Esta sonda positivamente carregada rapidamente se acumula na mitocôndria e pode ser utilizada para detetar a produção de ROS (em particular de $\text{O}_2^{\cdot-}$) por fluorometria (Kauffman *et al.*, 2016; Villaverde *et al.*, 2019). O produto oxidado denomina-se de 2-hidroxi-etídio e emite fluorescência a 580 nm após ser excitado a 510nm (**Figura 16**).

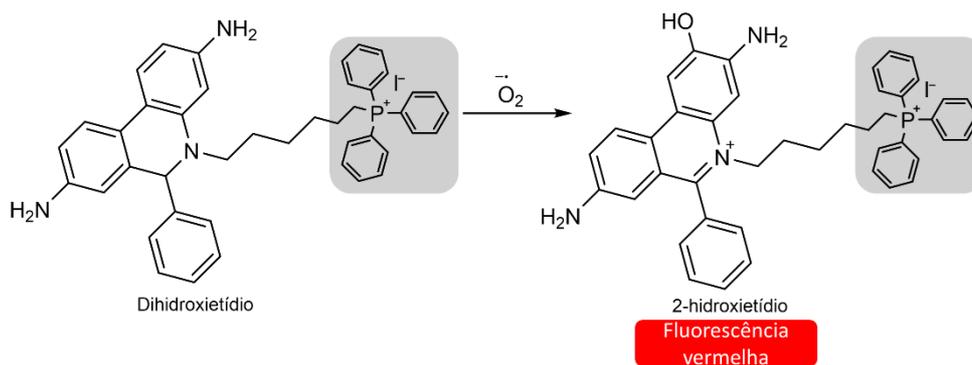


Figura 16 - Reação de oxidação da sonda *MitoSOX red* pelo anião superóxido. A cinzento encontra-se assinalada o substituinte catiónico responsável pela interação com os ácidos nucleicos. Adaptado de Villaverde *et al.*, 2019

Para este ensaio as células RAW 264.7 foram plaqueadas em placas de 96 poços pretas de fundo transparente a uma densidade de $6,25 \times 10^4$ células/cm² e tratadas com RANKL (30 ng/mL); E2 (10^{-8} M); RANKL (30 ng/mL) + E2 (10^{-8} M) e os três extratos: ER 1 mg/ml; UD 1 mg/mL e UU 0,125 mg/mL. Os ensaios foram realizados na presença de RANKL e E2 para induzir a diferenciação em osteoclastos e na presença de extratos para avaliar a influência na produção de ROS, fator necessário à diferenciação celular. A produção de ROS foi avaliada ao fim de 24h e de 48h.

A sonda foi preparada com uma concentração final de 5 mM em DMSO. Ao fim do tempo de incubação, o meio foi aspirado, as células lavadas com PBS 1x e foi adicionado novo meio com sonda que incubou por 30 min no escuro. De seguida, realizou-se a leitura da fluorescência a 510 nm e 580 nm no leitor de placas de poços Cytation™ 3 (BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA). Após as leituras, as células foram fixadas *overnight* com ácido tricloroacético (TCA) 10% a 4°C.

III.9.2 ROS Intracelular - DCFDA

A produção de ROS intracelular foi avaliada com o uso da sonda CM-H₂DCFDA (2',7'-diacetato diclorodihidrofluoresceína) que não apresenta fluorescência nesta forma. A sonda entra na célula por difusão passiva. Os grupos acetato são clivados por esterases intracelulares e originam H₂DCF (2',7'-diclorodihidrofluoresceína) que não apresenta fluorescência. Os grupos clorometil reagem com a molécula glutatona e outros tióis. A subsequente oxidação por ROS origina um aducto fluorescente, DCF (2',7'-

diclorofluoresceína) no interior da célula, que permite, através da medição fluorimétrica, avaliar a produção de ROS intracelular (**Figura 17**) (Nova *et al.*, 2020).

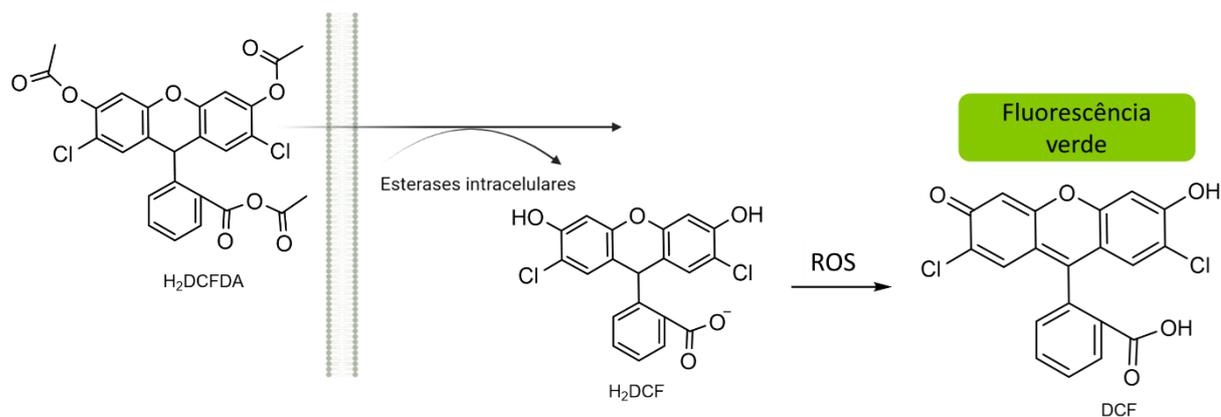


Figura 17 - Reação de oxidação da sonda DCFDA por ROS intracelulares. Adaptado de Nova *et al.*, 2020

As células RAW 264.7 foram plaqueadas em placas de 96 poços pretas de fundo transparente, com uma densidade de $6,25 \times 10^4$ células/cm² e tratadas com RANKL (30 ng/mL); E2 ($10^{-8}M$); RANKL (30 ng/mL) + E2 ($10^{-8}M$) e os três extratos: ER 1 mg/ml; UD 1 mg/mL e UU 0,125 mg/mL. Os ensaios foram realizados na presença de RANKL e E2 para induzir a diferenciação em osteoclastos e na presença de extratos para avaliar a influência na produção de ROS, fator necessário à diferenciação celular. A produção de ROS foi avaliada ao fim de 24h e de 48h.

A sonda foi preparada com uma concentração final de 5 mM em DMSO. O meio das células foi descartado e foi adicionado novo meio DMEM simplificado com sonda. Realizou-se a leitura cinética durante 1h da fluorescência a 485 nm e 528 nm no leitor de placas de poços Cytation™ 3 (BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA) e no leitor de placas Synergy™ HT (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, United States). Após as leituras, as células foram fixadas *overnight* com TCA a 10% e mantidas a 4°C ou com 1% AcOH/MeOH e mantidas a -20°C.

III.10 Processo de diferenciação celular

III.10.1 Marcador celular: Fosfatase ácida resistente ao tartarato - TRAP

A fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) é uma metaloenzima que existe como duas isoformas: 5a e 5b. A isoforma 5a é não clivada e altamente glicolisada. Contém um domínio que constitui um *loop* com cerca de 20 a.a., com a atividade catalítica restrita. Esta isoforma pode ser clivada por excisão proteolítica pós-translacional na isoforma 5b, que não contém o *loop* da isoforma 5a e que apresenta uma atividade catalítica muito superior. Não é específica com os substratos fosfato e por isso, a localização das vesículas e a sua ativação por proteólise é sugerida como forma de limitar a sua função a um grupo mais específico de substratos. A catepsina K é uma enzima que pertence à classe das proteinases de cisteína que coexiste com a TRAP em osteoclastos (Reithmeier *et al.*, 2020).

A isoforma 5b é um biomarcador com correlação ao número de OCs e 5a de inflamações crónicas. A TRAP é traduzida como uma proteína monomérica, a isoforma 5a, a qual contém um *loop* peptídico que interage com o local ativo para inibir a atividade da fosfatase. A clivagem proteolítica deste *loop* resulta na isoforma 5b dimérica, com atividade de fosfatase muito superior. A TRAP 5b tem sido mencionada como capaz de regular a migração dos osteoclastos por desfosforilação da OPN (Mira-Pascual *et al.*, 2020).

Para obter OCs maduros, foram plaqueadas RAW 264.7 durante 5 e 6 dias com RANKL (30 ng/mL) e/ou com E2 (10^{-8} M) e/ou os extratos em estudo nas condições já definidas. Os osteoclastos foram fixados com 10% de Formalina, permeados com 0,1% Triton X-100 e corados para a TRAP com o kit *Leukocyte Acid Phosphatase Assay* segundo as instruções do fabricante (387A, Sigma-Aldrich).

III.10.2 Avaliação dos parâmetros bioenergéticos mitocondriais

A atividade mitocondrial foi avaliada através da medição do rácio de consumo de oxigénio (OCR) e o rácio de acidificação do meio extracelular (ECAR) pelo *XFe96 Extracellular Flux Analyzer* (Agilent, CA, EUA). A medição destes parâmetros permite avaliar a respiração mitocondrial no caso do OCR e a ECAR é influenciada por

parâmetros como a glicólise e a liberação de CO₂ por funcionamento do ciclo de Krebs (Caines *et al.*, 2022; Salabei *et al.*, 2014; Stel *et al.*, 2020). O ensaio foi realizado em células RAW 264.7 plaqueadas em microplacas de cultura celular *Seahorse XFe96* a uma densidade de $6,25 \times 10^4$ células/cm². A diferenciação foi induzida após a exposição RANKL (30 ng/mL) e/ou com E2 (10⁻⁸ M) e/ou os extratos em estudo nas condições previamente definidas durante 24h e 72h. Células não diferenciadas nem expostas a extratos foram utilizadas como controle.

No dia anterior ao ensaio a *cartridge* com sensor Seahorse XFe96 foi hidratada com 200 µL de água Milli-Q e deixada durante a noite a 37°C numa incubadora sem atmosfera controlada.

No dia do ensaio, a água foi removida, foram adicionados 200 µL de *Seahorse XF Calibrant* e a *cartridge* incubou por 1h antes de serem adicionadas as soluções do ensaio. Enquanto isso, foi preparado o meio do ensaio. 100 mL de DMEM foram suplementados com 25 mM de glicose, 4 mM de glutamina e 1 mM de piruvato de sódio e ajustados a pH 7,4. Em seguida, a placa onde as células foram plaqueadas foi cuidadosamente lavada com o meio preparado e as soluções do ensaio foram adicionadas aos poços. A placa foi incubada a 37°C sem atmosfera de CO₂.

Durante o ensaio foram injetados nos poços, Oligomicina (3µM), BAM15 ((2-fluorofenil)6-[(2-fluorofenil)amino](1,2,5-oxadiazolo[3,4-e]pirazin-5-ilo)}amina) (2µM) e uma mistura de Rotenona (2µM) e Antimicina A (2µM).

A Oligomicina é um inibidor da ATPsintase (complexo V), a unidade responsável pela produção de ATP em resposta ao fluxo de H⁺ segundo o gradiente. É o primeiro composto a ser injetado após as medições basais. Este afeta o fluxo de elétrons através da CTE, aumentando o potencial de membrana de forma a culminar numa diminuição da respiração mitocondrial. Esta diminuição está relacionada com a produção celular de ATP (Amorim *et al.*, 2021).

O BAM15 atua como um protonóforo desacoplador da mitocôndria, ao perturbar o gradiente de prótons e com isso, o potencial membranar. É adicionado após a oligomicina e perturba o gradiente da membrana ao permitir a passagem de H⁺ de forma independente do complexo V. Isto provoca um aumento da atividade da CTE, como resposta ao *stress* provocado, o se traduz na atividade máxima da mesma e por consequência, do complexo IV para tentar restaurar o gradiente (Divakaruni *et al.*, 2014).

A Rotenona e a Antimicina A são inibidores do complexo I e III, respetivamente. Esta mistura é a última a ser injetada no ensaio e provoca uma diminuição brusca do consumo de oxigénio uma vez que a inibição destes complexos interrompe a CTE (Amorim *et al.*, 2021). Desta forma, o consumo de oxigénio detetado é devido a processos externos à mitocôndria (**Figura 18**).

A normalização dos ensaios foi realizada pela avaliação da densidade celular em cada poço e os resultados analisados no *software Version Wave Desktop 2.6* (Agilent, Santa Clara, CA, EUA).

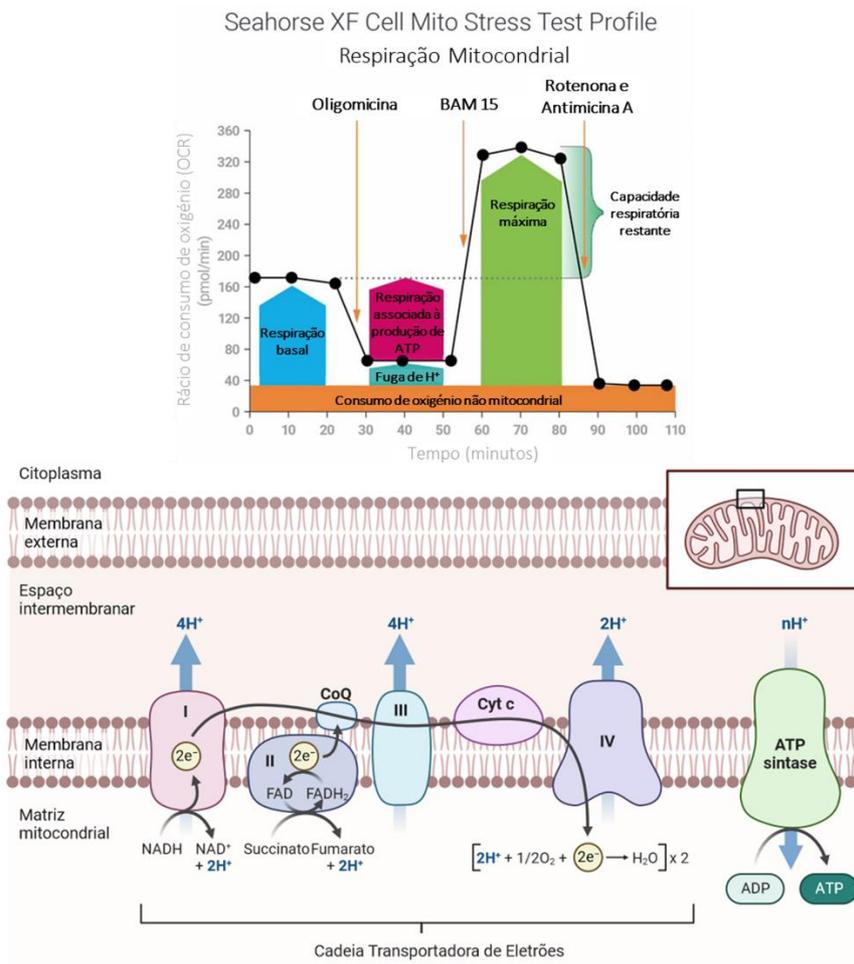


Figura 18 - Esquema dos parâmetros avaliados no ensaio *Seahorse XF Cell Mito Stress*: respiração basal, consumo de oxigénio associado a ATP, fuga de protões, consumo máximo de oxigénio e a capacidade respiratória restante, adaptada do website da Agilent (Agilent

Technologies, CA, EUA) (cima) e representação da cadeia transportadora de elétrons (baixo), adaptada de BioRender

III.10.3 Quantificação dos níveis de ATP

A avaliação dos níveis de ATP intracelulares foi realizada por um ensaio baseado na luminescência da luciferina-luciferase (**Figura 19**) através do *kit CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay* (G7570, Promega), de acordo com o protocolo do fabricante e adaptado de Marques-Carvalho *et al.*, 2023. Para tal, RAW 264.7 foram plaqueadas numa placa de 96 poços de paredes brancas com RANKL e/ou E2 e/ou extratos durante 24h. O meio de cultura foi substituído por 100 µl de reagente do ensaio. (tampão e substrato *CellTiter-Glo*). As amostras extraídas foram agitadas durante cerca de 2 min num agitador orbital para auxiliar a lise celular promovida pelo reagente, e de seguidas foram incubadas por 10 min à temperatura ambiente. A luminescência da oxiluciferina foi monitorizada no leitor de microplacas Cytation™ 3 (BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA).

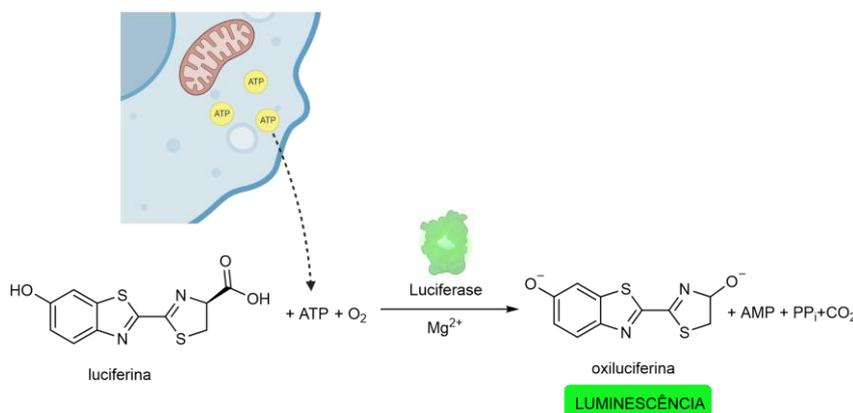


Figura 19 - Mecanismo de ação do kit para avaliar a viabilidade celular através da medição dos níveis de ATP. Adaptada do website da Promega

III.11 Atividade antioxidante *in vitro*

III.11.1 Western Blot

A técnica de *Western blot* – também conhecida por imunoblot de proteínas – é um método para identificar e quantificar uma proteína específica numa mistura complexa extraída de lisados celulares. As proteínas desnaturadas são separadas por eletroforese e transferidas para uma membrana de fixação proteica de PVDF onde a proteína alvo é

detetada por um anticorpo específico, através do complexo anticorpo:proteína que se forma. Os anticorpos têm um papel fundamental na técnica ao contribuírem para a precisão, reprodutibilidade e especificidade do método (Meftahi *et al.*, 2021).

Células RAW 264.7 foram plaqueadas em placas de 6 poços com uma densidade de $6,25 \times 10^4$ células/cm² e tratadas com RANKL (30 ng/mL) e/ou E2 (10^{-8} M) e/ou os extratos em estudo nas condições previamente definidas, por 24h e 72h. Após tratamento, as células foram lavadas com PBS e mantidas a -80°C. A extração da proteína foi realizada com a adição de 75 µL de tampão RIPA com inibidores de proteases (PMSF, PIC, NaF, NAM, butirato de sódio) e detergente (DOC) para quebrar as interações entre proteínas. Após recolha da amostra dos poços com esta solução, os *eppendorfs* foram deixados 1h em gelo a incubar onde foi feita agitação das amostras a cada 15 min. Após o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas a 4°C durante 10 min à velocidade máxima. Recolheu-se o sobrenadante (onde se encontrava a proteína) para um novo *eppendorf* e o *pellet* foi descartado.

A quantificação da proteína foi realizada numa placa de 96 poços com o reagente Pierce 33660 de acordo com as instruções do fabricante. Foi colocado 10 µL de amostra (diluída de 1:5) e 150 µL de reagente em cada poço. Colocou-se a curva padrão de BSA em PBS nas concentrações de 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,063 mg/mL e todas as condições do ensaio. A placa foi colocada a agitar durante 1 min e repousou 5 min antes da leitura da absorvância a 660 nm.

A amostras com quantidade definida de proteína (15 µg) foram preparadas em solução de *Laemmli Blue SDS 6x* (1,88 mL de 1M Tris HCl, 0,63g de SDS, 7,9 mL de glicerol e 0,003 g de azul de bromofenol para um volume final de 10 mL), um corante que auxilia na desnaturação da proteína, com uma concentração final de 2 mg/mL e DTT (reagente com capacidade de estabilizar enzimas e proteínas devido a grupos de enxofre livres) a 50 mM. Esta técnica foi realizada para detetar as enzimas catalase e SOD2. A normalização foi feita por Ponceau S. Por não interferir com as enzimas analisadas, as amostras foram fervidas a seco a 95°C.

A eletroforese foi feita em tampão de corrida 1x (25 mM Tris base, 190 mM glicina e 0,1% SDS) num gel de poliacrilamida (PAGE) 10% com 1,5mm de espessura e 15 poços. O gel de *stacking* preparado foi de 4% PAGE. Esta técnica tem como objetivo separar as diferentes proteínas presentes na amostra através do seu peso molecular.

Quanto maior o percurso de migração da proteína ao longo do gel, menor o seu peso molecular. Após a eletroforese, a membrana de PVDF foi ativada (para otimizar as condições de imobilização) com MeOH, água destilada e tampão de transferência antes de realizar o *blot*. Esta técnica tem o objetivo de transferir as proteínas do gel para uma membrana de suporte sólido, inerte, de PVDF, na posição de migração onde ficou durante a separação por PAGE. A transferência para a membrana ocorre por interações dipolo-dipolo e hidrofóbicas. Tem a vantagem de ser adequada para pequenas proteínas, apresenta elevada capacidade de ligação, força mecânica e estabilidade química. Não apresenta desvantagens relevantes. (cytiva, 2022)

Uma vez que a transferência das proteínas para a membrana se encontra completa, é necessário confirmá-lo através de um corante proteico. Assim, foi utilizado Ponceau S 0,5%. Este corante é rápido, estável e reversível com água. No entanto apresenta baixa sensibilidade. Bloquearam-se os espaços na membrana não ocupados por proteína com albumina de soro de bovino (BSA) para diminuir as interações não específicas com os anticorpos.

Tabela 1 - Anticorpos primários usados na análise por *Western Blot*

ANTICORPO PRIMÁRIO	PESO MOLECULAR DA PROTEÍNA	ORIGEM
Catalase (ab1877)	60 kDa	Coelho
Superóxido dismutase mitocondrial 2 (SOD2) (ab16956)	22/25 kDa	Ratinho

Tabela 2 - Anticorpos secundários utilizados na análise por *Western Blot*

ANTICORPO SECUNDÁRIO
<i>Anti-mouse IgG (H+L) Antibody</i>
<i>Anti-Rabbit IgG (H+L) Antibody</i>

Como as proteínas se encontram separadas e transferidas para a membrana, realizou-se a detecção das enzimas catalase e SOD2 através de anticorpos primários específicos indicados na **Tabela 1**. Estes foram preparados em 2,5% de BSA em TBS-T, com diluição 1:1000. A incubação da membrana com os anticorpos ocorreu *overnight*, a 4°C. Seguiu-se a lavagem da membrana em TBS-T para remover o excesso de anticorpo que não se

ligou, para não haver interferência no sinal detetado. Incubou-se a membrana nos respectivos anticorpos secundários (**Tabela 2**), (diluídos de 1:5000 em TBS-T) durante 1h à temperatura ambiente. Lavou-se a membrana em TBS-T para remover excesso de anticorpo que não se ligou especificamente. As imagens foram obtidas no programa *Chemblot*. A proteína total foi visualizada pela marcação com o corante de Ponceau S.

III.11.2 PCR

O RNA celular foi extraído com o reagente TRIzol™. Este reagente é uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina que permite o isolamento de RNA, DNA e proteínas a partir de amostras biológicas.

Foram plaqueadas $6,25 \times 10^4$ células/cm² em placas de 6 poços, cada poço com uma condição, num total de 13 condições. As células foram tratadas e recolhidas ao fim de 24h. A cada poço foi adicionado, após aspirar o meio, 1 mL de TRIzol™, recolhido para *eppendorfs* e guardado a -80°C.

As amostras foram processadas de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen, Hilden, Alemanha). Para tal foram adicionados 200 µL de CCl₃ e agitados 15s. Deixou-se a incubar à temperatura ambiente durante 2-3 min. Centrifugou-se a 12 000 g durante 15 min, a 4°C. A amostra foi dividida em 3 fases: uma mais densa, corada onde se encontram as proteínas, uma interfase branca e densa correspondente ao DNA e uma fase aquosa incolor onde se encontra o RNA (**Figura 20**).

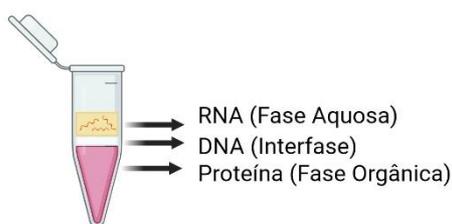


Figura 20 - A separação de fases após a adição de clorofórmio à solução em TRIzol™. Criada em BioRender

Foram retirados 350 µl da fase aquosa e transferidos para um *eppendorf*. A estes foi adicionado igual volume de EtOH 70%. A mistura foi transferida para a coluna *RNeasy Mini Spin Column* colocada num tubo coletor e centrifugada a 8 000 g, 15 min, 4°C para que o RNA fique retido na membrana da coluna. Descartou-se a solução no tubo de colheita. Adicionou-se 350 µL de *buffer RW1* (constituído por sal de guanidina e etanol que permite a lavagem de RNA e a remoção de biomoléculas como carboidratos,

proteínas e ácidos gordos, enquanto moléculas de RNA grandes permanecem retidas na coluna de sílica). Centrifugou-se 15 s a 8 000 g, 4°C. Descartou-se a solução no tubo de colheita.

Adicionou-se 10 µL de DNase I e 70 µL de *buffer* RDD (para digerir DNA retido na coluna sem afetar o RNA retido), por amostra na membrana da coluna e deixou-se a incubar 15 min à temperatura ambiente.

Foi adicionado 350 µL de *buffer* RW1 à coluna e centrifugou-se durante 15s a 8 000 g, 4°C. Descartou-se a solução no tubo de colheita. Adicionou-se 500 µL da solução etanólica de *buffer* RPE (Usado para a remoção de sais que possam ficar retidos na membrana provenientes do uso anterior de *buffer* para limpeza da amostra). Centrifugou-se por 15s a 8 000 g, 4°C. Descartou-se a solução no tubo de colheita e readicionou-se 500 µL da mesma solução de *buffer* à coluna. Centrifugou-se durante 2 min a 8 000 g, 4°C. Descartou-se o tubo de colheita e centrifugou-se novamente à velocidade máxima durante um 1min para secar a membrana. Colocou-se a coluna num *ependorf* e adicionou-se 50 µL de água sem RNase na membrana da coluna, para eluir o RNA da membrana. Centrifugou-se por 1 min a 8 000 g, 4°C. Descartou-se a coluna e guardou-se o *ependorf* em gelo.

A quantificação de ácidos nucleicos foi realizada na NanoDrop™ (Thermo Scientific, MA, EUA) . Para tal foi medida a absorvância de 1 µL de cada amostra. O branco foi obtido por medição de 1 µL de água sem RNases. Os ácidos nucleicos apresentam um pico de absorvância a 260 nm. Assim a concentração destes pode ser determinada segundo a lei de *Lambert-Beer*.

A absorvância a 260 nm (A260) dos ácidos nucleicos corresponde às regiões aromáticas inerentes à sua estrutura. A 280 nm (A280), o pico de absorvância corresponde maioritariamente a proteínas e compostos fenólicos. A absorvância a 230 nm (A230) é devido a diversos grupos orgânicos como fenóis, TRIZol e sais caotrópicos como o sal de guanidina utilizado no processo de purificação do RNA.

O rácio A260/A280 é utilizado para determinar a contaminação da amostra por proteínas e o rácio A260/A230 é indicativo da presença de outros contaminantes orgânicos (Shen, 2019).

Para conservar as amostras numa forma mais estável, uma vez que o RNA é bastante instável e suscetível de degradação, utilizou-se o kit *iScript cDNA synthesis* para transcrever o RNA em cDNA. Foram seguidas as instruções do fabricante (BioRad, CA, EUA). Para tal, determinou-se o volume necessário para 2 µg de RNA e em *eppendorfs* de 200 µL adicionou-se a solução de RNA e os constituintes do kit: uma mistura que contem diferentes *primers* e oligo(dT), uma enzima - transcriptase reversa - otimizada para a síntese de cDNA e água sem nuclease num volume total de 40 µL. Todas as amostras foram guardadas a -20°C.

III.11.3 *qt-PCR*

A expressão génica foi avaliada através da amplificação do gene por *qt-PCR*. As amostras de cDNA foram colocadas numa placa de 96 poços de PCR juntamente com os *primers* a serem testados, água sem DNase/RNase e *EvaGreen supermix*. Foram adicionados 2,5 µL de amostra de cDNA; 0,05 µL de cada *primer*, *foward* e *reverse*; 2,4 µL de água sem DNase/RNase e 5 µL de *EvaGreen supermix*.

Tabela 3 - *Primers* de referência utilizados na quantificação em tempo real da reação em cadeia da polimerase (*qt-PCR*)

GENE	DESCRIÇÃO	<i>FORWARD</i> <i>PRIMER</i>	<i>REVERSE</i> <i>PRIMER</i>
B2m	Precursor da microglobulina 2 beta	ATGGGAAGCCG AACATACTG	CAGTCTCAGTG GGGGTGAAT
SOD1	Superóxido dismutase 1	AAGAGAGGCAT GTTGGAGACC	CGGCCAATGAT GGAATGCTC

Os controlos negativos foram realizados pelo mesmo método ao substituir o volume de amostra por volume de água sem DNase/RNase e designados por NTC. Os *primers* utilizados e as respetivas sequências encontram-se na **Tabela 3**.

A amplificação foi feita num sistema de *real-time* PCR CFX 96 (BioRad, CA, EUA), com um ciclo inicial de 30s a 95°C para ocorrer desnaturação, seguido de 40 ciclos de 5s à mesma temperatura para a ligação do *primers* e multiplicação e por fim, 5s a 60°C para reestruturação e extensão. O gene B2m foi usado como referência para normalizar a

expressão do gene avaliado. A normalização foi realizada pelo método *delta threshold cycle* (ΔCt) de acordo com Kim *et al.*, 2020.

III.11.4 *Catalase*

A atividade enzimática da catalase foi determinada por um método espectroscópico desenvolvido por Grilo *et al.*, 2020. Para este ensaio, células RAW 264.7 foram plaqueadas em placas de 6 poços e tratadas com as condições já mencionadas. Após o período de incubação, foram lavadas com PBS, raspadas e centrifugadas a 250 g durante 4 min. O *pellet* foi ressuspendido em 100 μ l de um tampão fosfato (PB) e agitou-se. A quantificação de proteína na amostra foi realizada pelo método de BSA e após a quantificação, as mesmas foram diluídas para uma concentração final de 300 μ g/mL. Para a reação 20 μ L de amostra, 180 μ L de PB e 100 μ L de H₂O₂ a 90 mM foram adicionados a cada poço de uma placa de 96 poços de fundo preto *Greiner Fluotrac*. O ensaio começou pela leitura basal da absorvância a 240 nm para *background*. Em seguida, foi adicionado H₂O₂ e monitorização da sua decomposição por um ensaio cinético a 412 nm no leitor de placas de poços Cytation™ 3 (BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA). As leituras decorreram durante 2,5 min, em intervalos de 15s. A atividade máxima da catalase foi determinada por regressão exponencial correspondente aos primeiros 90s do ensaio. A partir da equação obtida, foi realizada a regressão linear para os primeiros 15s. O declive desta última equação representa a atividade máxima da catalase.

III.12 Análise estatística

Os dados referentes à análise fitoquímica dos extratos são apresentados em valor médio \pm SEM com o número de ensaios realizados, indicados nas legendas correspondentes a cada figura no capítulo dos resultados. Os dados relativos aos ensaios *in vitro* foram analisados no programa *GraphPad Prism 8.0.1* e apresentados em valores médios \pm SEM com o número de ensaios realizados, indicados nas legendas correspondentes a cada figura no capítulo dos resultados. Os dados foram comparados por *one-way* ANOVA ou *two-way* ANOVA. Foi considerada significância estatística para $p < 0,05$.

IV. Resultados

IV.1 Fitoquímica

IV.1.1 Extrações

Para as plantas selecionadas, *Equisetum ramosissimum* Desf. (ER), *Urtica dioica* L. (UD) e *Urtica urens* L. (UU), foram estudados dois métodos de extração: a decocção (D) que corresponde à mimetização dos métodos usados na medicina tradicional (obtenção de chá) e maceração hidroetanólica com etanol 80% (EHA), para efeitos comparativos da extração de compostos e bioatividade dos extratos obtidos. Adicionalmente, estudou-se duas metodologias diferentes para cada um dos métodos: a extração simples, baseada na metodologia descrita em Martins-Gomes *et al.*, 2018 e Ziani *et al.*, 2019, onde na decocção é realizada uma extração e na maceração são realizadas duas extrações consecutivas com a renovação do solvente extrator; e a extração exaustiva, que designa a extração consecutiva da planta, com renovação do solvente extrator entre cada extração, de modo a conseguir extrair toda a biomassa possível (Martins-Gomes *et al.*, 2018).

Tabela 4 – Rendimentos (η) de extração obtidos pelos dois métodos avaliados, das três espécies em estudo. Os rendimentos apresentados reportam aos extratos avaliados *in vitro* – simples e à extração exaustiva das plantas.

DECOCÇÃO (D)			MACERAÇÃO HIDROETANÓLICA 80% (EHA)		
Extração	Simple	Exaustiva	Extração	Simple	Exaustiva
Espécie	η / % (m/m)		Espécie	η / % (m/m)	
<i>Equisetum ramosissimum</i> Desf. (ER)	18,6	32 ¹	<i>Equisetum ramosissimum</i> Desf. (ER)	15,3	23,6 ¹
<i>Urtica dioica</i> L. (UD)	23,4	52,7 ¹	<i>Urtica dioica</i> L. (UD)	15,8	19,7 ¹
<i>Urtica urens</i> L. (UU)	18,6	24 ²	<i>Urtica urens</i> L. (UU)	13,8	18,6 ¹

¹ corresponde ao η global das 5 extrações realizadas; ² corresponde ao η global das 4 extrações realizadas

Os rendimentos (η) obtidos encontram-se na **Tabela 4**. De forma geral, denota-se que o rendimento obtido pelo método de decocção é superior à maceração. Mais se conclui, tal como expectável, que o rendimento obtido por extração exaustiva é superior à extração simples, uma vez que se extraí mais biomassa por esta metodologia. No entanto, à exceção do caso UD_D, o aumento do rendimento não justifica o gasto de tempo e materiais adjacente. Assim, observa-se que a extração simples, para ambos os métodos apresenta como vantagem a extração eficiente de compostos. Também se observa que a planta UD apresenta o maior rendimento para ambos os métodos de extração. O método de maceração hidroetanólica simples é resultante de uma extração dupla da biomassa, com renovação de solvente de extração. Denota-se que, para se obter um η semelhante ao método de decocção, a extração dupla é adequada. Mais se repara que a extração exaustiva por este método apresenta um aumento de η de biomassa pouco significativo. Relativamente à espécie UU, ainda pelo método de decocção, o rendimento obtido é muito inferior, o que revela que a maioria dos compostos que podem ser obtidos por este método extrativo se encontram na 1ª extração. A sua extração até à exaustão só requereu 4 extrações. No outro método e para as restantes plantas em ambos os métodos a exaustão ocorreu após 5 extrações.

IV.1.1.1 Avaliação da composição química

IV.1.1.1.1 Avaliação qualitativa das extrações

Todas as extrações realizadas foram acompanhadas por TLC para monitorizar o processo. Para todos os extratos obtidos por EHA o melhor sistema de eluição encontrado entre os diversos testados foi de MeOH:ACN (1:1). Para os extratos obtidos por D, o melhor sistema para ER foi MeOH:H₂O (7:3) e para UD e UU foi H₂O:MeOH (8,5:1,5). Na **Figura 21** encontram-se representados os TLCs realizados pelos dois métodos de extração avaliados: decocção - realizados em sílica de fase reversa ou maceração - realizados em sílica de fase normal. À esquerda encontram-se as fotografias referentes aos extratos obtidos por D e à direita por EHA.

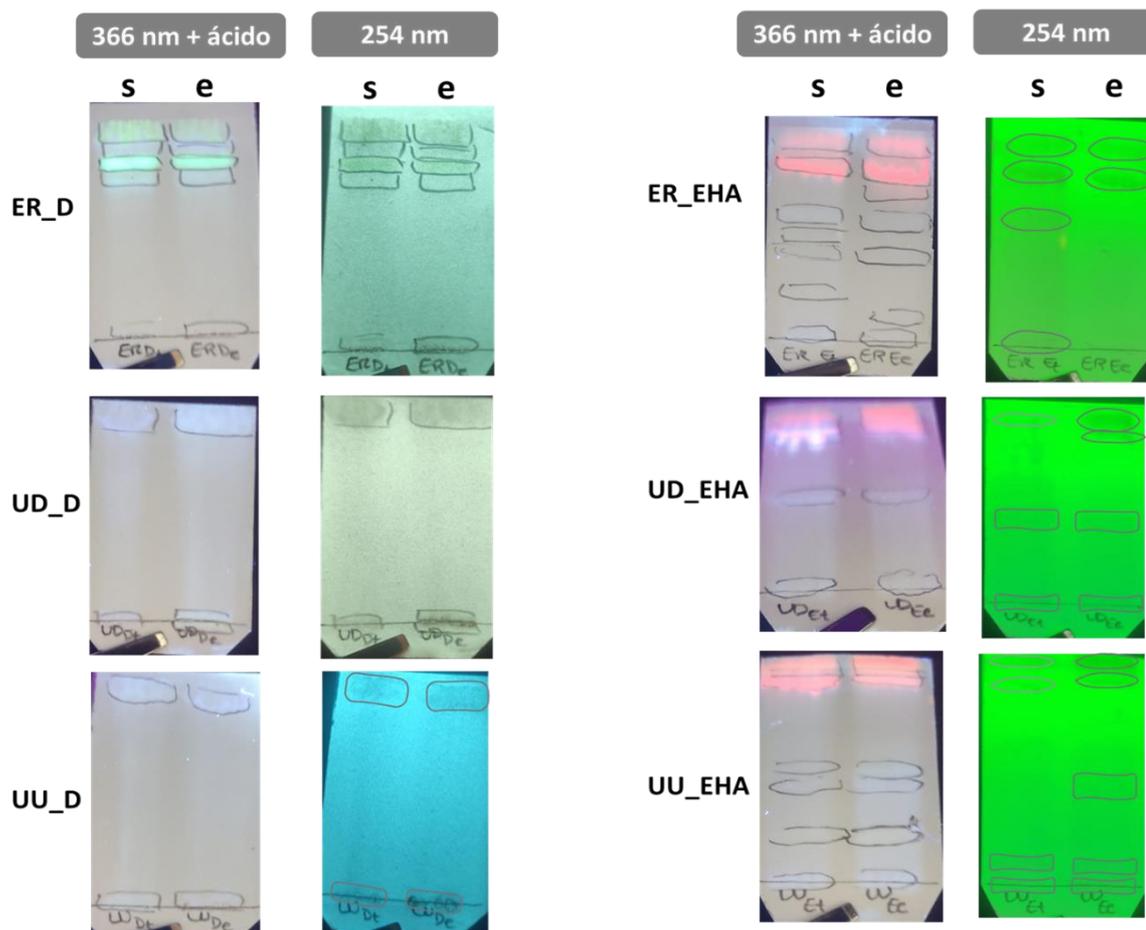


Figura 21 - Revelação por TLC das extrações realizadas por decocção (D), simples e exaustiva e por maceração hidroetanólica (EHA), simples e exaustiva das três espécies sob luz UV a 366 nm após revelação com ácido sulfúrico e a 254 nm. A banda à esquerda corresponde às extrações simples (s) e à direita, à extração exaustiva (e).

Ao comparar os métodos extrativos observa-se que o método EHA permite a extração de maior diversidade de compostos, o que se observa pelo número total de bandas na figura. Enquanto os extratos obtidos por decocção apresentam entre 2 a 5 bandas, para as espécies *Urtica* e *Equisetum*, respectivamente; os extratos obtidos por EHA apresentam cerca de 6 a 8 bandas. Pela cor das manchas, também é possível notar que as classes de compostos extraídos pelos dois métodos, D e EHA, são diferentes. Na extração por D, encontram-se manchas amarelas observadas em ER_D, no topo e UD_D no ponto de aplicação, que não existem nas mesmas plantas extraídas por EHA (ER_EHA e UD_EHA). A mesma coloração é notada em UU_EHA, na segunda mancha a contar de baixo, mas não em UU_D. Esta cor amarela pode ser indicativa de terpenos. Da mesma forma há extração de clorofilas (identificadas pela fluorescência vermelha/alaranjada) pelo método EHA, algo que não é observado no método D, e que as mesmas revelam

menor polaridade, entre as manchas identificadas após a eluição. Observam-se também manchas com fluorescência azul claro/esverdeado em todos os extratos obtidos (por D e EHA) que podem corresponder a compostos fenólicos. Essas são observadas nos dois métodos de extração. Ainda por comparação da metodologia de extração, simples ou exaustiva, repara-se por TLC que não existe uma diferença notória da diversidade de compostos extraídos. No entanto, seria necessária uma análise mais detalhada dos diferentes metabolitos secundários, incluindo a monitorização com outros agentes reveladores além do utilizado, bem com a avaliação com padrões adequados para poder confirmar a presença das diversas classes de compostos.

IV.1.1.1.2 Avaliação qualitativa da presença de alcaloides

Por os alcaloides serem uma classe de compostos que se encontram associados à toxicidade (Bates *et al.*, 2017; Kurimoto *et al.*, 2022), a sua presença foi avaliada. Para tal, foi realizado um ensaio qualitativo nos extratos obtidos utilizando o revelador de Dragendorff.

Tabela 5 - Avaliação da presença de alcaloides nos extratos pela aplicação do reagente de Dragendorff nos extratos obtidos por decocção (D) e maceração hidroetanólica (EHA).

D		EHA	
Extrato	Deteção de alcaloides	Extrato	Deteção de alcaloides
ER_D_s	-	ER_EHA_s	-
ER_D_e	-	ER_EHA_e	+
UD_D_s	-	UD_EHA_s	-
UD_D_e	-	UD_EHA_e	-
UU_D_s	-	UU_EHA_s	-
UU_D_e	-	UU_EHA_e	-
Nicotina	++	Nicotina	++

- negativo; + positivo; ++ controlo positivo; s – simples; e - exaustiva

Os resultados qualitativos encontram-se na **Tabela 5**. A nicotina foi utilizada como controlo positivo no ensaio. De todos os extratos analisados, foi apenas detetada a

presença de alcaloides no extrato ER_EHA_e. Isto significa que neste caso, a extração exaustiva permitiu a obtenção de outros compostos que não foram obtidos na extração simples da mesma amostra (ER_EHA_s). De seguida, estudou-se a eluição da amostra ER_EHA_s em TLC de fase normal para avaliar qual das manchas poderia corresponder aos alcaloides, onde se observou que das 8 manchas identificadas, apenas são detetados numa que corresponde ao ponto de aplicação, tal como assinalado na

Figura 22, o que indica que os alcaloides presentes neste extrato são bastante polares pois apresentam mais afinidade para a fase estacionária (sílica) do que p.e. as clorofilas, que se encontram na frente de solvente.

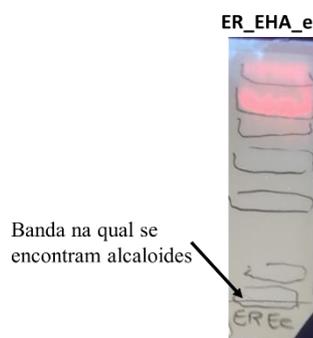


Figura 22 - TLC correspondente ao extrato que apresentou a presença de alcaloides. A seta indica a banda na qual se encontram.

IV.1.1.1.3 Identificação de compostos fenólicos

Em colaboração com o IPB, foi realizada a identificação de compostos fenólicos presentes em cada um dos extratos, de acordo com os objetivos definidos sobre a avaliação desta classe de compostos nos extratos e do potencial antioxidante adjacente, pela técnica de LC-DAD-ESI/MSn. As tabelas com a identificação relativa a cada espécie encontram-se em anexo (**Tabela A 1**, **Tabela A 2** e **Tabela A 3**).

Para ER foram identificados maioritariamente flavonóides nomeadamente o kamferol, a quercetina na forma glicosilada - a mais comum de ser encontrada nas plantas, e cupressuflavona. Da classe dos ácidos fenólicos foi identificado ácido ferúlico, na forma glicosilada e livre.

Na espécie UD os ácidos fenólicos foram identificados como os compostos maioritários, seguidos dos flavonóides. Como flavonóides identificaram-se apigenina, quercetina, rutina, luteonina e isoharmetina, na forma glicosilada. Como ácidos fenólicos

foram identificados ácido cafeico, ácido clorogénico e derivados na forma glicosilada e ácido elenólico na forma glicosilada.

Já na espécie UU apenas foram identificados ácidos fenólicos: ácido ferúlico, ácido clorogénico e derivados deste.

Os derivados de ácido clorogénico são um grupo de polifenóis esterificados que resultam da união de um ácido hidroxicinâmico (como o ácido cafeico, ferúlico ou *p*-coumarínico) com o ácido quinínico por uma ligação éster, reportados pela sua atividade antioxidante (Lu *et al.*, 2020).

Foi também determinada a concentração de compostos fenólicos (em anexo nas **Tabelas A1, A2 e A3**) nesta análise, onde se registou uma concentração inferior nos extratos por decocção do que nos extratos por maceração hidroetanólica para as três plantas. Os extratos da planta UD revelaram maior teor de compostos fenólicos totais entre todos os extratos analisados.

IV.1.1.1.4 Quantificação dos compostos fenólicos

Através do método de Folin-Ciocalteu quantificou-se o teor de compostos fenólicos presentes nos extratos obtidos. Como se observa na **Figura 23** à exceção do extrato UD, para os extratos obtidos por decocção observou-se que os extratos resultantes de extrações exaustivas apresentavam maior teor em compostos fenólicos que os extratos obtidos por extração simples (**gráfico A**). Já nos extratos obtidos por maceração, o teor de compostos fenólicos é superior nos extratos que resultam da extração exaustiva para todas as espécies (**gráfico B**). Isto reforça que a extração maioritária de compostos fenólicos em UD_D é conseguida na primeira 1ª extração, face às restantes 4. Tal indica que outros compostos que não pertencem a esta classe são extraídos em maior quantidade na extração exaustiva.

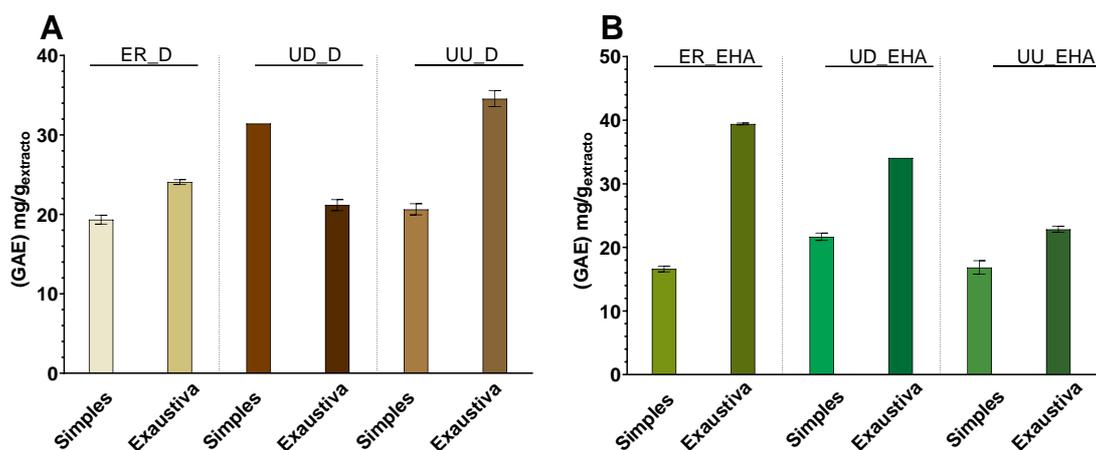


Figura 23 - Quantificação dos fenólicos totais através do método de Folin-Ciocalteu dos extratos obtidos por decocção (A) e por maceração hidroetanólica (B). Os valores são apresentados em mg/g de extrato em equivalentes de ácido gálgico relativos a 6 réplicas de 2 ensaios independentes.

De um modo geral, entre todos os extratos, a espécie UD apresenta maior teor de compostos fenólicos, o que é concordante com os valores obtidos pela análise por LC-DAD-ESI/MSn. No entanto, a quantificação de compostos fenólicos totais realizada para os extratos resultantes da extração simples por LC-DAD-ESI/MSn revelou teores de compostos fenólicos muito inferiores, que não são concordantes com os dados obtidos pelo método de Folin-Ciocalteu realizado. Este ensaio baseia-se na reação redox entre grupos hidroxilo e os ácidos do reagente (Mikołajczak *et al.*, 2021; Kupina *et al.*, 2018). Assim, a diferença de resultados pode ser justificada por dois motivos: a quantificação por LC-DAD-ESI/MSn é mais sensível devido ao uso de padrões idênticos ou estruturalmente similares para cada composto identificado, o que previne a sobrestimação dos resultados. No método FC, a quantificação foi realizada através de um padrão de ácido gálgico, o que pode ser uma limitação. Além disto, a quantificação de compostos fenólicos totais por LC-DAD-ESI/MSn reporta à soma de ácidos fenólicos e de flavonóides. Grupos como os taninos abrangem diversas moléculas de grandes dimensões de natureza fenólica, que contém diversos grupos hidroxilo e carboxilo (Das *et al.*, 2020) que podem interferir no ensaio. A sua presença não foi determinada nos extratos e por isso não é possível afirmar, mas caso existam, podem reagir neste ensaio devido à sua composição, o que não ocorre na quantificação por LC-DAD-ESI/MSn. Também a presença de outros compostos que contém grupos hidroxilo, bem como outros interferentes como aminas, cetonas, aldeídos, vitaminas, entre outros pode levar à

sobrestimação do teor de compostos fenólicos presentes nos extratos (Palacios *et al.*, 2021).

IV.1.1.1.5 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos

De modo a relacionar a detecção dos compostos fenólicos e a sua atividade antioxidante, foi realizado o ensaio com o radical DPPH. Em comparação com a quercetina (**Figura 24**), todos os extratos avaliados apresentam uma atividade antioxidante muito baixa (inferior a 15%).

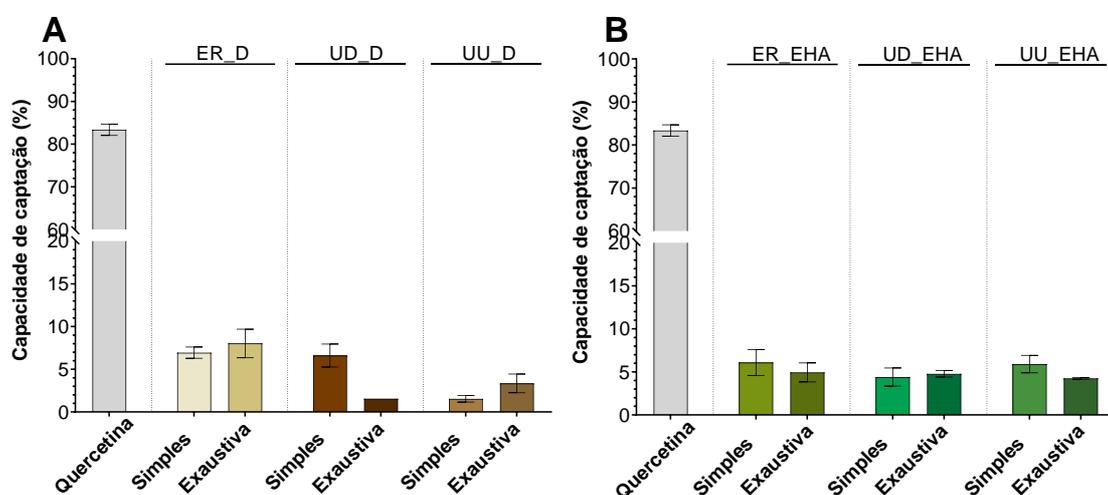


Figura 24 - Avaliação da capacidade de captação de agentes radicais pelo ensaio de DPPH do extratos obtidos por decocção (A) e por maceração hidroetanólica (B). Os valores são expressos correspondem a 6 réplicas de 2 ensaios independentes.

Isto correlaciona-se com o baixo teor de compostos fenólicos detetados nos extratos. A proporção de compostos fenólicos determinada por FC e da atividade antioxidante é concordante para os extratos obtidos por decocção. Já nos extratos obtidos por EHA o mesmo não se verifica, pois, os extratos resultantes da extração exaustiva demonstraram maior teor de compostos fenólicos, em comparação com os extratos obtidos por extração simples, mas a atividade antioxidante é superior nos extratos que resultam da extração simples. Isto pode ser resultado de interações sinérgicas entre compostos, a existência de compostos que possam mascarar a atividade antioxidante dos compostos fenólicos presentes ou indicar que a atividade antioxidante não está apenas ligada ao teor de compostos fenólicos, podendo também resultar de outros compostos presentes nos

extratos como clorofilas, o que se encontra reportado na literatura (Ebrahimi *et al.*, 2023; Lanfer-Marquez, Barros *et al.*, 2005; Pérez-Gálvez *et al.*, 2020).

IV.1.2 Fracionamento

O fracionamento foi realizado em placas de sílica gel com o objetivo de determinar em que região se encontrava o maior teor de compostos fenólicos bem como tentar retirar compostos que, por interações sinérgicas, possam mascarar a atividade antioxidante descrita relativamente a esta classe de compostos. As frações foram definidas em 2 ou 3 frações, de acordo com a sua polaridade, por observação sob a lâmpada de UV. Na **Figura 25** encontra-se o esquema ilustrativo (A) de como as frações foram recolhidas. As eluições foram realizadas com as fases móveis otimizadas na monitorização das extrações. Os extratos obtidos pelo método de decocção foram separados em duas frações tal como os extratos de maceração da espécie ER. Os extratos das plantas UD e UU obtidos por maceração foram divididos em três frações.

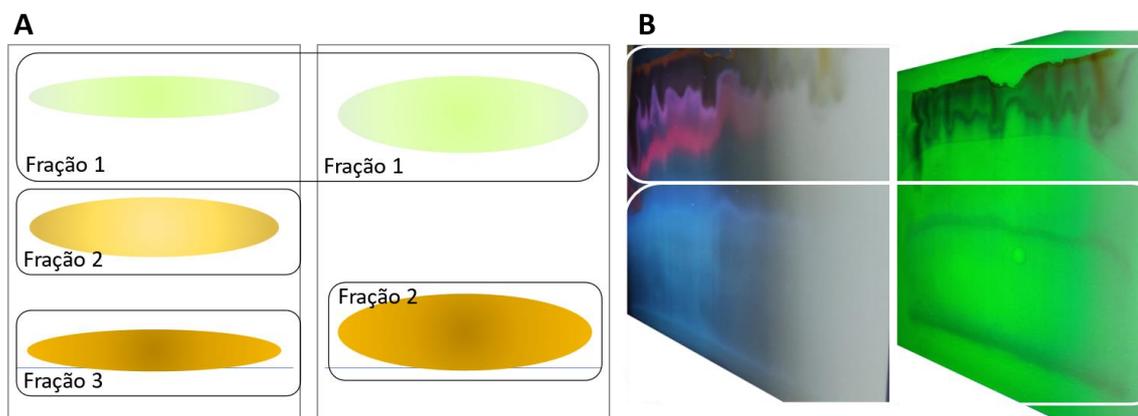


Figura 25 - Representação da obtenção de frações dos extratos estudados (A). Exemplo representativo da eluição e divisão das frações do extrato hidroetanólico da espécie ER (B).

IV.1.2.1 Quantificação dos compostos fenólicos após fracionamento

De modo a confirmar as frações onde se encontrava maior teor de compostos fenólicos, foi realizada a sua quantificação em cada uma das frações obtidas (**Figura 26**). Para os extratos da planta ER, observa-se que a primeira fração tem maior teor de compostos fenólicos. Para os extratos UD e UU obtidos por decocção, o teor de compostos fenólicos é superior na segunda fração, contrariamente a ER. A segunda fração destes extratos, uma vez que o fracionamento foi realizado em sílica modificada, ou seja,

numa fase estacionária apolar, corresponde à fração menos polar. (**gráfico A - Figura 26**). No extrato UD obtido por maceração, segundo o **gráfico B - Figura 26**, o teor de compostos fenólicos é superior na primeira fração, decrescendo entre frações. Isto é concordante com o comportamento observado nos extratos obtidos por D de que o maior teor de compostos fenólicos se encontra na fase menos polar, uma vez que a primeira fração corresponde à menos polar e a terceira à mais polar, porque o fracionamento dos extratos obtidos por EHA foi realizado em sílica, de caráter muito polar. O extrato de UU obtido por EHA apresenta um teor de compostos fenólicos nas duas primeiras frações semelhante e bastante próximo do teor determinado na primeira fração do extrato UD.

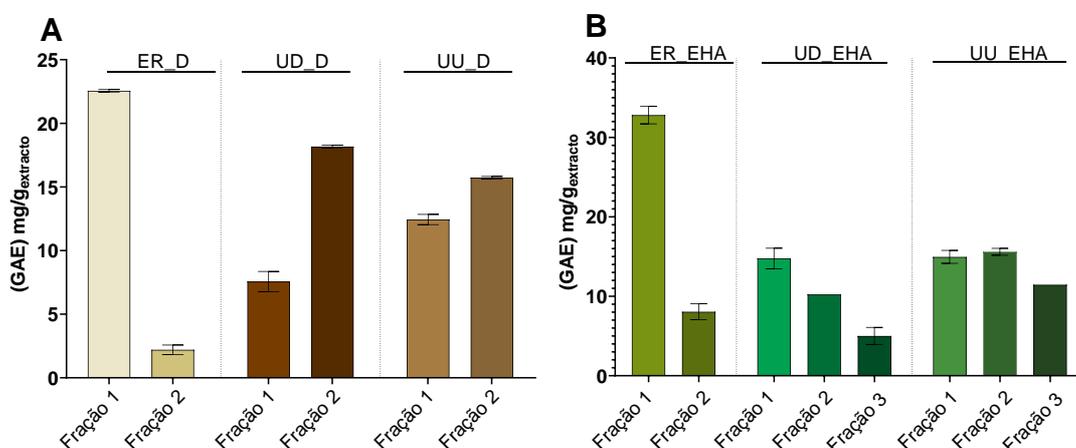


Figura 26 - Quantificação dos fenólicos totais através do método de Folin-Ciocalteu das frações obtidas dos extratos por decocção (A) e por maceração hidrotanólica (B). Os valores são apresentados em mg/g de extrato em equivalentes de ácido gálico relativos a 6 réplicas de 2 ensaios independentes.

IV.1.2.2 Avaliação da capacidade antioxidante das frações obtidas

Em complemento à quantificação de compostos fenólicos e para perceber se a atividade antioxidante é potenciada com o fracionamento, realizou-se a avaliação da mesma nas frações obtidas de cada extrato qualitativamente, por comparação colorimétrica com a quercetina, usada como controlo positivo do ensaio.

Tabela 6 - Avaliação da capacidade de redução do DPPH pelas frações obtidas dos extratos por decocção (D) e por maceração hidroetanólica (EHA).

D		EHA	
Extrato	Redução do DPPH	Extrato	Redução do DPPH
ER_D_F1	+	ER_EHA_F1	+
ER_D_F2	-	ER_EHA_F2	-
UD_D_F1	+	UD_EHA_F1	+
UD_D_F2	-	UD_EHA_F2	-
UU_D_F1	+	UD_EHA_F3	-
UU_D_F2	-	UU_EHA_F1	-
Quercetina	++++	UU_EHA_F2	-
		UU_EHA_F3	-
		Quercetina	++++

- sem ocorrência de redução; + com alguma atividade de redução; +++++ controlo positivo; F1 – fração 1; F2 – fração 2; F3 – fração 3

Tal como esperado, tendo em conta a baixa atividade antioxidante apresentada pelos extratos, as frações também não apresentaram atividade antioxidante significativa (**Tabela 6**). No entanto, foi observado que a primeira fração de cada um dos extratos apresenta maior teor de compostos com atividade antioxidante, quer nos extratos obtidos por D, quer por EHA. Aqui se denota a natureza dos extratos obtidos por diferentes métodos. A primeira fração de extratos obtidos por decocção corresponde à fração mais polar; já a mesma fração dos extratos obtidos por EHA corresponde à fração menos polar. Assim, denota-se efetivamente que o método de extração bem como o solvente extrator utilizado influenciam o perfil dos extratos obtidos. Para ER_D e ER_EHA, a atividade antioxidante analisada é concordante com o maior teor de compostos fenólicos. Para os extratos UD_D e UU_D obtidos por decocção, o teor de compostos fenólicos não é concordante com a atividade observada (**gráfico A - Figura 26 e Tabela 6**). No extrato UD_EHA obtido por maceração, segundo o **gráfico B - Figura 26 e a Tabela 6**), o teor de compostos fenólicos é concordante com a atividade antioxidante observada. No entanto, UU_EHA apresenta um teor de compostos fenólicos nas duas primeiras frações próximo ao teor determinado na primeira fração do extrato UD_EHA, mas a atividade não se revelou a mesma. Tal pode reforçar que a atividade antioxidante não é exclusiva

nem inteiramente dependente dos compostos fenólicos, e que outras classes de compostos podem contribuir para esse efeito. Apenas no extrato UU_EHA não foi observada uma alteração colorimétrica na primeira fração, como nos outros extratos fracionados.

A avaliação *in vitro* realizada com os extratos obtidos prosseguiu com os extratos completos obtidos por extração simples, de acordo com os objetivos previamente definidos, não tendo ocorrido a avaliação das frações. Tal encontra-se mencionado nas perspectivas futuras.

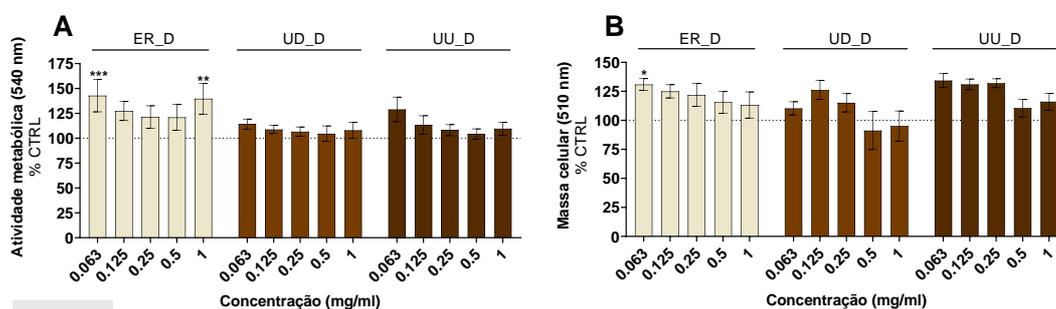
IV.2 Ensaios *in vitro*

IV.2.1 Toxicidade

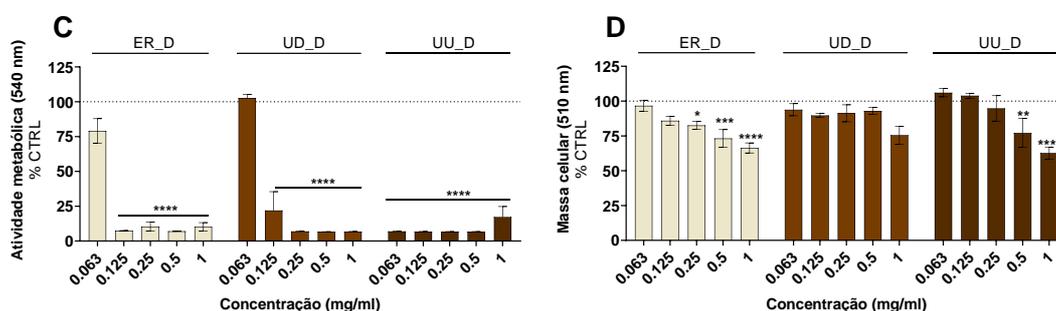
A avaliação da citotoxicidade dos extratos obtidos foi realizada em células precursoras de osteoclastos, macrófagos RAW 264.7 (Kong *et al.*, 2019), ao fim de 24h e 5 dias (tempo médio desta linha celular necessário à diferenciação em osteoclastos) de incubação através do método de Alamar-Blue™. Observou-se que a atividade metabólica ao fim de 24h, bem como a massa celular nos poços não é afetada e como tal não indica toxicidade a nenhuma concentração testada (**Figura 27 – gráficos A e B; E e F**). No entanto, ao fim dos 5 dias, a capacidade metabólica das células na presença dos extratos aquosos revela-se comprometida com os extratos das três espécies, a todas as concentrações, excetuando a concentração mínima testada para o extrato aquoso da espécie UD (**gráfico C**). Tais valores revelam citotoxicidade dos extratos, mas, por avaliação do ensaio de massa celular (SRB) utilizado para normalização, é expectável na presença de toxicidade, que os valores de densidade celular sejam concordantes, o que não foi observado (**gráfico D**). Também a morfologia das células foi observada ao microscópio e as mesmas apresentavam-se normais. Isto permite inferir que a baixa atividade metabólica possa ocorrer, não por morte celular, mas por um ambiente de *stress*. Numa situação como esta, uma forma de se protegerem contra condições adversas pode ser a conservação de energia através da diminuição dos seus processos celulares, incluindo o metabolismo, sem provocar imediatamente a morte celular. Também se pode dar o caso de ocorrer a redução extensiva a hidroresorufina - que é um processo reversível, que não apresenta fluorescência e por isso poder levar a uma subestimação da atividade metabólica (Gutiérrez *et al.*, 2017). Relativamente aos extratos hidroetanólicos, a atividade metabólica e a densidade celular mostram-se concordantes. Observa-se que os extratos das espécies ER e UD não apresentam citotoxicidade até à concentração máxima testada (1 mg/mL). A espécie UU apresentou toxicidade em concentrações superiores a 0,125 mg/mL. (**gráficos G e H**). Desta forma, para se prosseguir com a avaliação do potencial inibitório dos extratos na diferenciação das RAW 264.7 em osteoclastos, decidiu-se fazer a avaliação com a maior concentração não tóxica dos extratos hidroetanólicos de cada uma das espécies. Assim, todos os ensaios reportados a partir deste ponto foram realizados com os extratos hidroetanólicos ER e UD a 1 mg/mL e UU a 0,125 mg/mL.

Extratos aquosos

24h

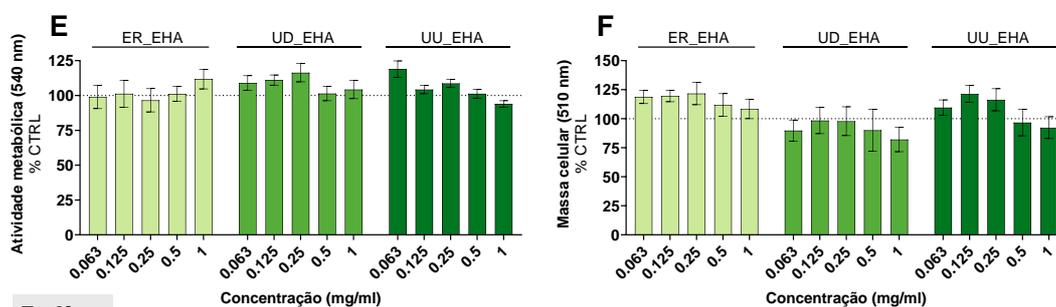


5 dias



24h

Extratos hidroalcoólicos



5 dias

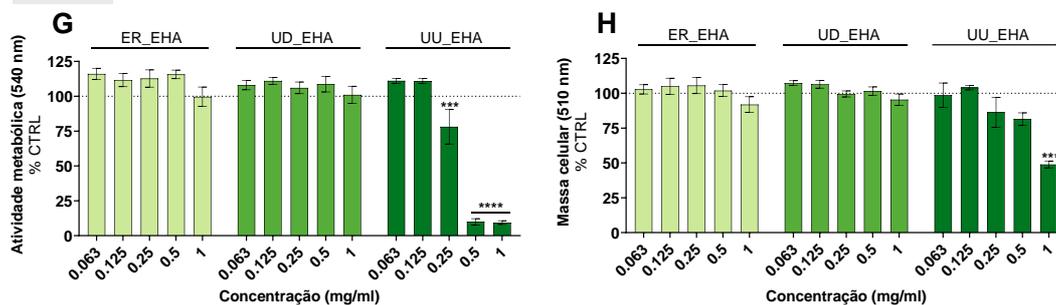


Figura 27 - Avaliação da atividade metabólica das RAW 264.7 na presença dos extratos ER, UD e UU obtidos por decocção (D) e maceração hidroetanólica (EHA) ao fim de 24h e 5 dias. Todos os ensaios estão normalizados em % de controle. Foram realizado 4 réplicas de 2 ensaios independentes. **** $p < 0,0001$; *** $p \leq 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

IV.2.2 Diferenciação

Para avaliar o efeito dos extratos na diferenciação dos osteoclastos, células RAW 264.7 foram plaqueadas na presença de fatores de diferenciação e/ou extratos e incubadas por 5 e 6 dias. Como forma de avaliação, foi escolhido um marcador celular conhecido - a TRAP, uma glicoproteína responsável pela migração dos osteoclastos maduros. Na **Figura 28** encontram-se representadas imagens obtidas após a coloração das células com o *kit*. É notória a diferença morfológica entre um macrófago, ou seja, uma célula não diferenciada e um osteoclasto maduro (**Figura 28A e 27B**). Na presença do fator responsável pela diferenciação osteoclástica (RANKL) observa-se, na **Figura 28B**, um osteoclasto maduro após a exposição das células ao fator de diferenciação, como expectável. Da mesma forma, na presença de estradiol (**Figura 28C**) não se observam alterações, uma vez que o estradiol não estimula a diferenciação e na **Figura 28D**, onde se observa a formação de osteoclastos menos desenvolvidos e com uma morfologia estrelada, devido ao efeito inibitório do estradiol na sua formação. A presença de extratos sem fatores de diferenciação não afeta a morfologia celular como se observa nas **Figuras 28AE, 28AD e 28AU** e por isso não apresenta ter um efeito significativo na linha de macrófagos. No entanto, quando presentes num meio com RANKL, é notório o seu potencial inibitório. É possível observar com clareza a total inibição da formação de osteoclastos na presença do extrato UD (**Figura 28BD**) em toda a área observada dos poços. Na presença dos extratos ER e UU (**Figura 28BE e 28BU**, respetivamente) denota-se um efeito inibitório da formação de osteoclastos pela sua morfologia estrelada e menores dimensões, mas não total. Estas alterações morfológicas podem corresponder a osteoclastos não maduros ou com a sua atividade comprometida. As **Figura 28DE, 28DD e 28DU** são concordantes, reforçando o impacto negativo dos extratos na diferenciação osteoclástica.

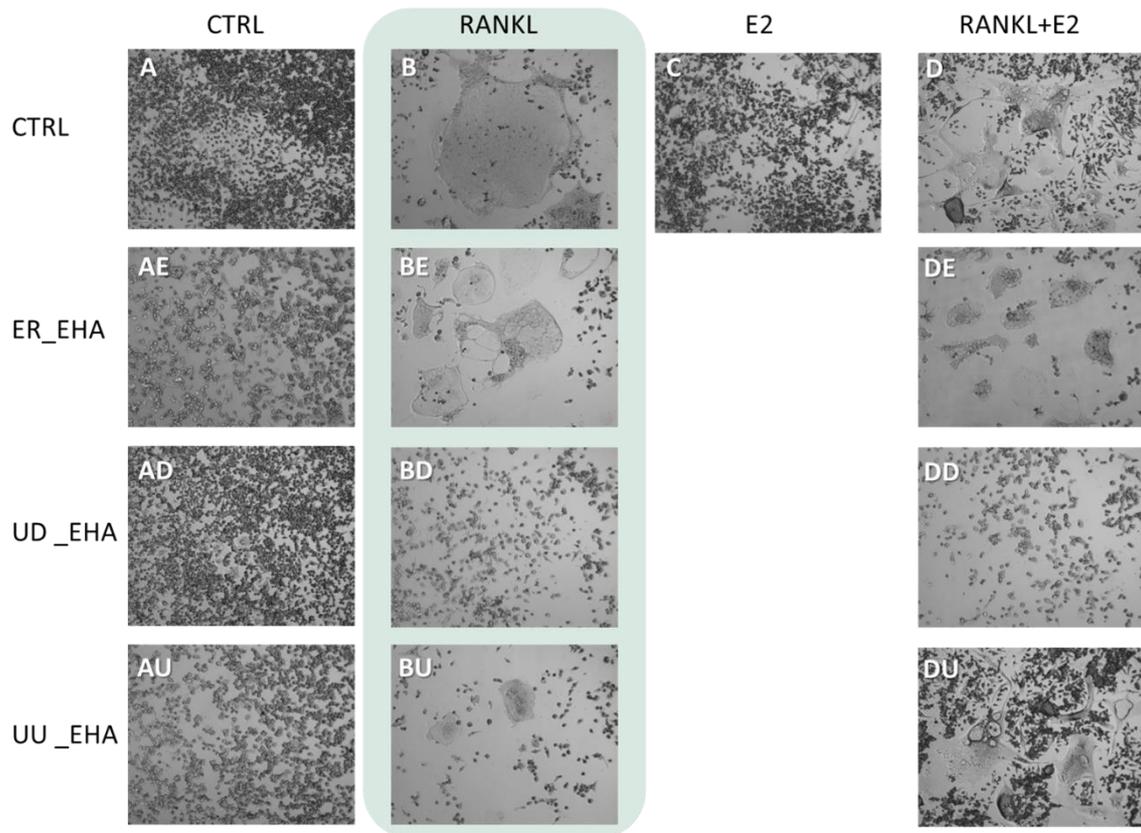


Figura 28 - Avaliação da capacidade inibitória dos extratos em osteoclastos maduros em RAW 264.7 após exposição a RANKL e/ou E2 e/ou extratos hidroetanólicos. Imagens obtidas ao fim de 6 dias de exposição de 3 réplicas de 1 ensaio independente. Legenda: A – sem fatores de diferenciação; B – com a presença de RANKL; C – com a presença de estradiol; D – com ambos os fatores de diferenciação; AE/BE/DE – as condições descritas e com extrato da espécie ER; AD/BD/DD - as condições descritas e com extrato da espécie UD.; AU/BU/DU - as condições descritas e com extrato da espécie UU.

IV.2.3 Avaliação dos parâmetros bioenergéticos mitocondriais

IV.2.3.1 Avaliação dos parâmetros bioenergéticos mitocondriais 24h

Existe uma correlação entre a atividade mitocondrial e a osteoclastogênese. O bom funcionamento da atividade mitocondrial é essencial à diferenciação e formação de osteoclastos maduros e funcionais. É reportado que a osteoclastogênese ocorre associada ao aumento da massa mitocondrial, devido à maior necessidade energética e que a biogênese mitocondrial (aumento de mtDNA) se encontra associada a este processo. Além disto, também é reportado a promoção de fatores de regulação associados à biogênese mitocondrial. Adicionalmente, a atividade do complexo I da CTE é estimulada

e por consequência a respiração mitocondrial aumenta (Da *et al.*, 2021; Yan *et al.*, 2023). Também se sabe que o estradiol, em fases iniciais da diferenciação osteoclástica inibe o aumento da respiração mitocondrial e a atividade dos complexos da CTE, com foco no complexo I, induzidos por RANKL (Marques-Carvalho *et al.*, 2023). Com base nesta informação, foi avaliada a respiração mitocondrial pelo teste *Mito Stress* ao fim de 24h. Os gráficos dos perfis bioenergéticos dos quais foram obtidas as figuras abaixo encontram-se em anexo (**Figura A 1**). Nas **Figuras 29, 30 e 31** encontram-se representados os parâmetros associados à respiração celular das células RAW 264.7 ao fim de 24h de incubação com as condições de ensaio.

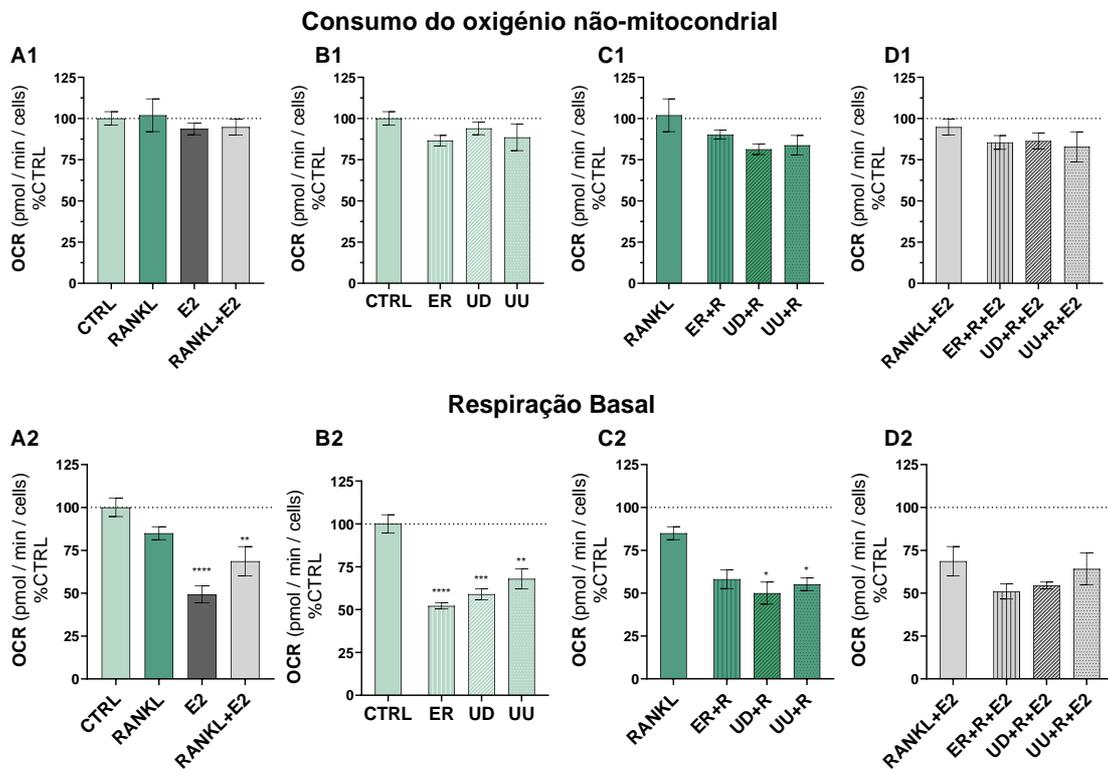


Figura 29 – Parâmetros da respiração mitocondrial – consumo de oxigênio não mitocondrial e respiração basal - de células RAW 264.7 após exposição a RANKL e/ou E2 e/ou extratos hidroetanólicos durante 24h, de 6 ou mais réplicas de 1 ensaio independente, na presença e/ou ausência de fatores de diferenciação sem extratos (A); na presença de extratos sem fatores de diferenciação (B); na presença de extratos e do fator RANKL (C); na presença de extratos e ambos os fatores de diferenciação (D) Todos os ensaios estão normalizados em % de controle. **** $p < 0,0001$; *** $p \leq 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; Gráfico A: Preto vs. controle; Cinzento vs. RANKL

Não foram encontradas diferenças significativas no consumo de oxigênio não mitocondrial em nenhuma das condições testadas. Este consumo de oxigênio é referente

à atividade de NOXs, presentes na membrana celular, que são responsáveis pela transferência eletrônica entre NADPH e O₂, o que origina ROS como O₂^{-•} e H₂O₂ (Marques-Carvalho *et al.*, 2023). Assim, é possível considerar que a atividade destas enzimas não se encontra alterada. A respiração basal (**Figura 29**) diminuiu em comparação ao controlo, com a exposição a E2; RANKL e E2; e aos extratos (**gráficos A2 e B2**). A exposição das células aos extratos UD e UU na presença de RANKL (*vs.* RANKL) também provocou uma diminuição deste parâmetro (**gráfico C2**). Tal pode indicar que a alteração de ambiente pode provocar condições de *stress* para as células e isto influenciar a capacidade de resposta energética das mesmas, o que se traduz por menor atividade da CTE.

A avaliação da respiração máxima corresponde à capacidade de resposta da CTE quando submetidas a situações de elevada demanda energética. Ao fim das 24h não se observa diferenças significativas nas diferentes condições (**Figura 30, gráficos A1-D1**), exceto em dois casos: quando se encontram expostas ao extrato ER (por comparação com o controlo, **gráfico B1**) e quando estimuladas por RANKL, na presença de UD (*vs.* RANKL, **gráfico C1**), onde há decréscimo da respiração máxima que pode significar uma menor capacidade da atividade da CTE das células.

A disrupção do potencial de membrana (*proton leak*) permite inferir sobre o bom funcionamento das proteínas responsáveis pela homeostase do gradiente bem como da integridade da membrana. Adicionalmente, permite compreender a atividade da CTE através dos H⁺ libertados que resultam do seu funcionamento. Estes H⁺ atravessam a membrana onde os complexos se encontram embebidos para o espaço intermembranar, o que influencia o potencial de membrana. Sabe-se que a exposição a E2 inibe a atividade do complexo I e por consequência, a atividade da CTE (Marques-Carvalho *et al.*, 2023; Kim *et al.*, 2020). Deste modo, há uma diminuição deste parâmetro como expectável, mesmo quando ocorre estimulação com RANKL (**Figura 30 – gráfico A2**). A presença de extratos no meio, quer por comparação ao controlo (**Figura 30 - gráfico B2**), quer por comparação com a estimulação com RANKL (**gráfico C2**), provocam uma diminuição deste parâmetro, o que pode indicar que a integridade da membrana não é comprometida, mas que a atividade da CTE pode ser inibida pela adição dos extratos, o que pode ocorrer de uma maneira semelhante a E2, sem provocar necessariamente uma disfunção da cadeia. Mas, a menor atividade da CTE também pode significar uma disfunção na respiração

mitocondrial pelo que são necessários ensaios mais específicos para concluir sobre este efeito.

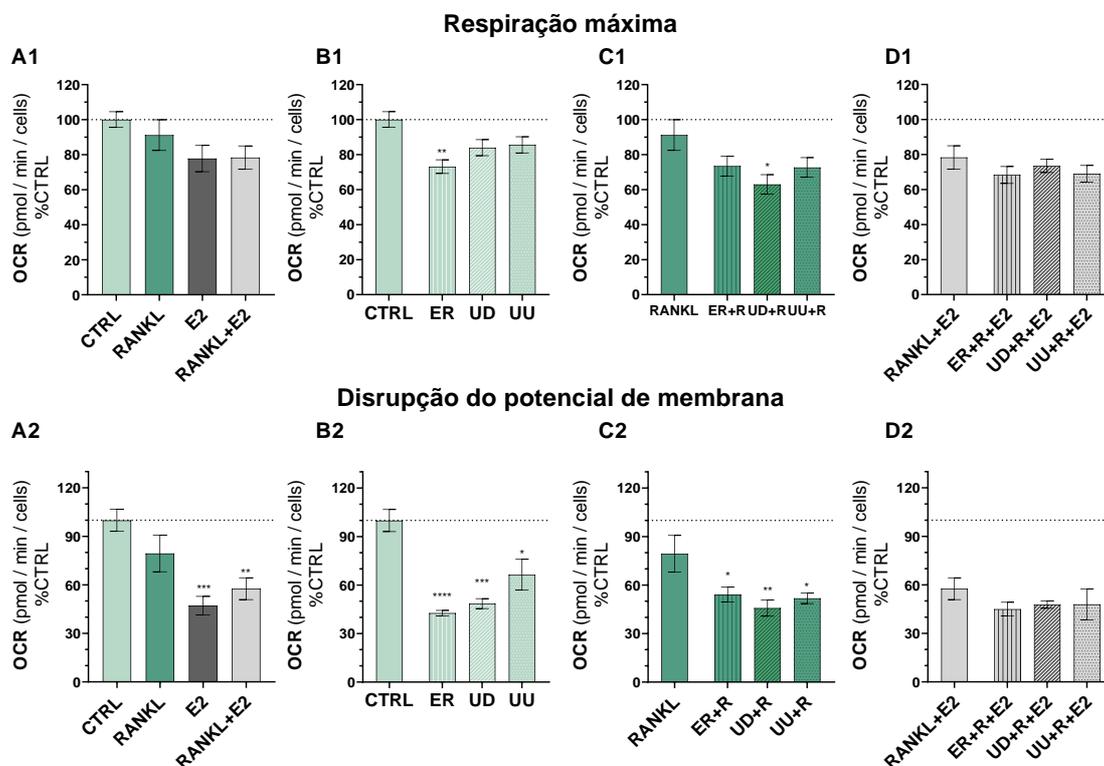


Figura 30 - Parâmetros da respiração mitocondrial – respiração máxima e disrupção do potencial de membrana - de células RAW 264.7 após exposição a RANKL e/ou E2 e/ou extratos hidroetanólicos durante 24h, de 6 ou mais réplicas de 1 ensaio independente, na presença e/ou ausência de fatores de diferenciação sem extratos (A); na presença de extratos sem fatores de diferenciação (B); na presença de extratos e do fator RANKL (C); na presença de extratos e ambos os fatores de diferenciação (D). Todos os ensaios estão normalizados em % de controle. **** $p < 0,0001$; *** $p \leq 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Gráfico A: Preto vs. controle; Cinzento vs. RANKL

O complexo I, presente na membrana interna da mitocôndria, oxida NADH para fornecer e^- à CTE a fim de reduzir oxigênio a água e para repor NAD^+ necessária ao processo de glicólise. Como consequência, a libertação de e^- por parte do complexo I pode originar a formação do anião superóxido. Na formação de osteoclastos, estas espécies são importantes. Ao avaliar todos os parâmetros, E2 parece ter um efeito inibitório na respiração mitocondrial, possivelmente por inibir o complexo I da CTE, que é concordante com o descrito (Marques-Carvalho *et al.*, 2023; Kim *et al.*, 2020). Da mesma forma se observa que os extratos exercem um efeito semelhante ao E2, no entanto não é possível concluir se atuam por inibição da CTE ou por *stress* celular.

Relativamente às necessidades energéticas, é expectável que E2 atue tal que a produção de ATP associada à respiração seja inibida, uma vez que a atividade do complexo I tem influência sobre a produção energética e que a presença de RANKL não permite uma inibição tão significativa (**Figura 31 - gráfico A1**). Da mesma forma se observa que a exposição aos extratos provoca uma diminuição do consumo de oxigénio associado à produção de ATP, o que se pode correlacionar com uma diminuição da atividade da ATPsintase (*vs.* controlo) (**gráfico B1**) e quando estimuladas por RANKL (**gráfico C1**), fator responsável por estimular a respiração e consequentemente a produção de ATP pelo complexo V, o que pode reforçar a ação inibitória da atividade da CTE por parte dos extratos. (Marques-Carvalho *et al.*, 2023).

A capacidade respiratória restante, que reporta à capacidade que a célula pode ter na resposta a situações de *stress* inesperadas, não permite identificar mecanismos específicos de ação, uma vez que pode depender de diversos parâmetros (Divakaruni *et al.*, 2014). Ao fim de 24h, não foi observada nenhuma diferença significativa (**Figura 31, gráficos A2 – D2**).

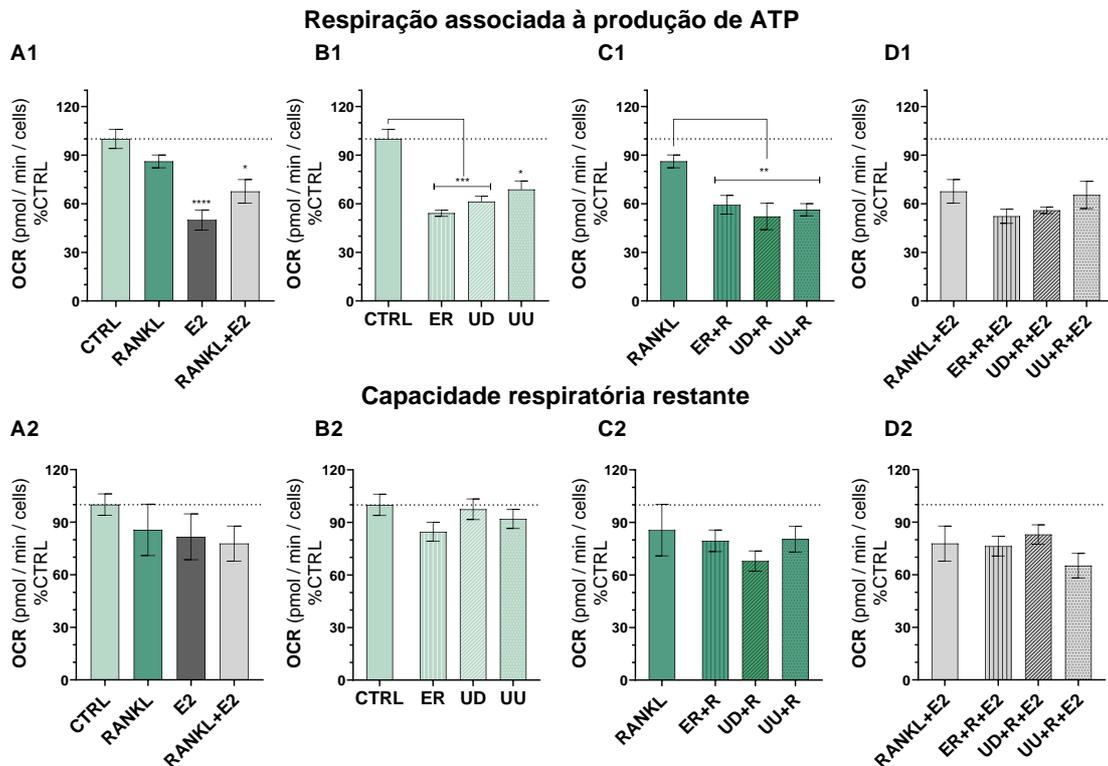


Figura 31 - Parâmetros da respiração mitocondrial – produção de ATP e capacidade respiratória restante - de células RAW 264.7 após exposição a RANKL e/ou E2 e/ou extratos hidroetanólicos durante 24h, de 6 ou mais réplicas de 1 ensaio independente, na presença e/ou ausência de fatores de diferenciação sem extratos (A); na presença de extratos sem fatores de diferenciação (B); na

presença de extratos e do fator RANKL (C); na presença de extratos e ambos os fatores de diferenciação (D). Todos os ensaios estão normalizados em % de controlo. ****p<0,0001; ***p<0,001; **p<0,01 ;*p<0,05. Gráfico A: Preto vs. controlo; Cinzento vs. RANKL

A medição da produção de ATP neste ensaio encontra-se diretamente relacionada com a viabilidade celular. Por análise da **Figura 32**, é possível observar que ao fim de 24h não se verificam diferenças significativas por comparação ao controlo. No **gráfico A**, é possível observar um aumento da produção de ATP quando as células são expostas a RANKL. Uma vez que o mesmo estimula a atividade mitocondrial e induz uma maior necessidade energética para a diferenciação celular de osteoclastos, tal é esperado. (Marques-Carvalho, Sardão, *et al.*, 2023). Também se verificam diferenças na presença de E2 e RANKL por comparação apenas à exposição a RANKL. Tal é esperado pois E2 tem um papel inibidor da atividade da CTE, em particular no complexo I, que RANKL promove numa fase inicial da diferenciação. No **gráfico C** é possível observar que os extratos têm um efeito inibitório na produção de ATP, o que pode demonstrar o seu impacto na atividade da CTE, quando as células são expostas a RANKL. Por fim, no **gráfico D** é de notar que entre os 3 extratos, UD tem um efeito inibitório significativo na produção de ATP, o que pode ser concordante com as imagens obtidas na **Figura 28** relativamente à capacidade de inibição da osteoclastogénese, que indica ser independente de E2.

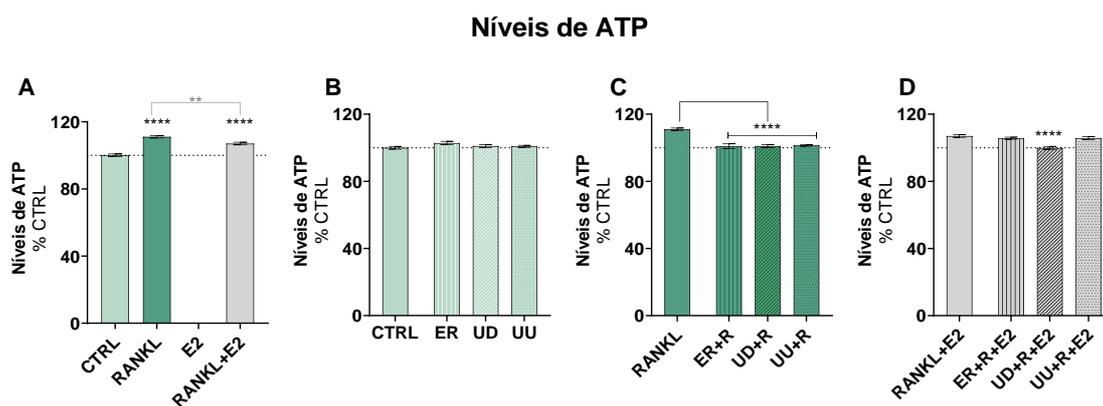


Figura 32 – Avaliação da produção de ATP de células RAW 264.7 após exposição a RANKL e/ou E2 e/ou extratos hidroetanólicos durante 24h, de 8 réplicas de 1 ensaio independente, na presença e/ou ausência de fatores de diferenciação sem extratos (A); na presença de extratos sem fatores de diferenciação (B); na presença de extratos e do fator RANKL (C); na presença de

extratos e ambos os fatores de diferenciação (D). Todos os ensaios estão normalizados em % de controlo. ****p< 0,0001; **p< 0,01. Gráfico A: Preto vs. controlo; Cinzento vs. RANKL

IV.2.3.2 Avaliação dos parâmetros bioenergéticos mitocondriais 72h

O mesmo ensaio *Mito Stress* foi realizado também ao fim de 72h (tempo onde a formação de células diferenciadas já é notado) de incubação das células RAW 264.7 com as condições de ensaio, onde as diferenças são mais notórias. Os gráficos dos perfis bioenergéticos dos quais foram obtidas as figuras abaixo encontram-se em anexo (**Figura A 2**). O consumo de oxigénio não mitocondrial (**Figura 33 – gráfico A1**) é muito superior às condições controlo. Tal ocorre porque o fator RANKL estimula a produção de ROS para que a osteoclastogénese ocorra (Marques-Carvalho *et al.*, 2023). Na presença de E2 a estimulação por RANKL demonstra-se inibida. A adição de extratos a células expostas a RANKL (**gráfico C1**) demonstra que todos os extratos têm capacidade de diminuir o consumo de oxigénio não mitocondrial, o que pode indicar que interferem na atividade de enzimas como as NOXs, presentes na membrana celular. Os extratos UD e UU, quando combinados com os fatores RANKL e E2 após 3 dias de incubação, demonstram um aumento do consumo de oxigênio extra mitocondrial (**gráfico D1**).

O parâmetro da respiração basal apresenta-se de acordo com o esperado. A respiração basal aumenta na presença de RANKL uma vez que ao fim de 72h, já se inicia a formação de osteoclastos. Estas células, por comparação às RAW 264.7 são muito maiores e, portanto, com maiores necessidades energéticas. Na presença de E2 há uma diminuição, que se verifica ao comparar as condições RANKL e RANKL+E2, no entanto não é conhecido o mecanismo como o E2 atua nos níveis de ROS (**Figura 33 – gráfico A2**). A presença de UU (**gráfico B2**) demonstra diminuir a respiração basal. Para avaliar o efeito dos extratos quando as células são estimuladas com RANKL, observa-se no **gráfico C2**, em comparação com células apenas expostas a RANKL, que ER provoca uma diminuição muito significativa; UD e UU apresentam valores próximos de controlo. Isto pode ser justificado por ER apresentar um comportamento semelhante a E2 e por isso a sua ação poder ser mimética à ação do estradiol. UD e UU aparentam inibir a diferenciação de forma independente da ação do estradiol. No **gráfico D2** observa-se que

a presença dos extratos em simultâneo com RANKL e E2 provoca um aumento da respiração basal na presença do extrato UD.

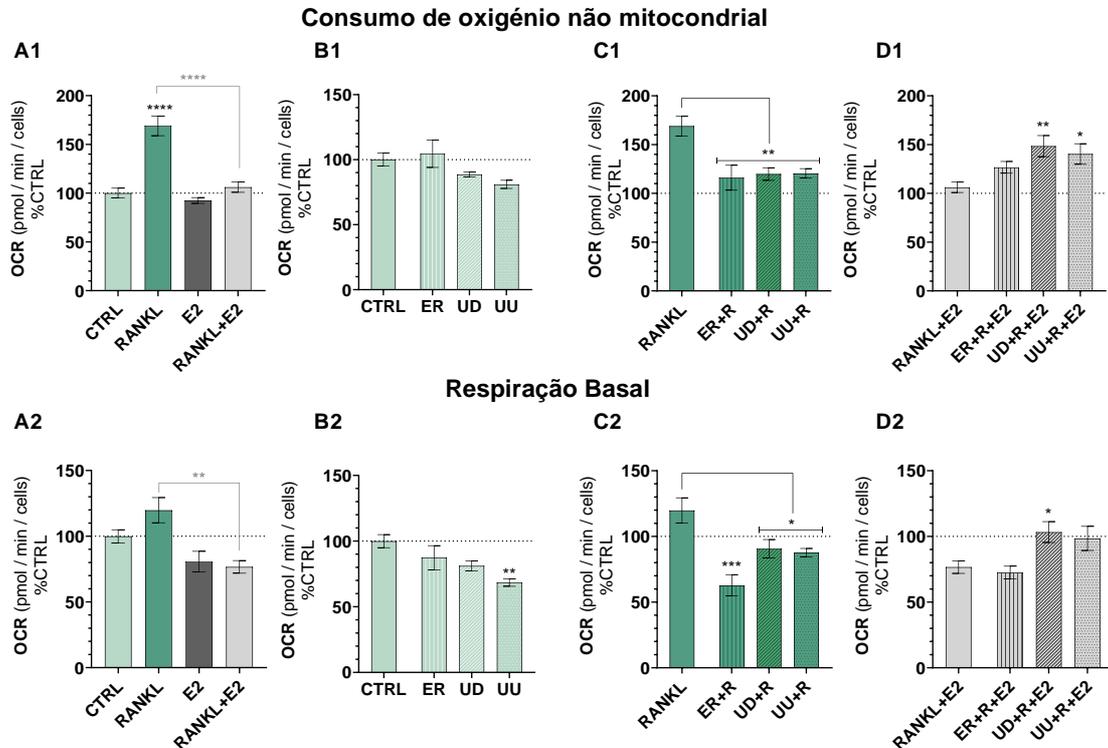


Figura 33 - Parâmetros da respiração mitocondrial – consumo de oxigénio não mitocondrial e respiração basal - de células RAW 264.7 após exposição a RANKL e/ou E2 e/ou extratos hidroetanólicos durante 72h, de 6 ou mais réplicas de 1 ensaio independente, na presença e/ou ausência de fatores de diferenciação sem extratos (A); na presença de extratos sem fatores de diferenciação (B); na presença de extratos e do fator RANKL (C); na presença de extratos e ambos os fatores de diferenciação (D). Todos os ensaios estão normalizados em % de controlo. **** $p < 0,0001$; *** $p \leq 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; Gráfico A: Preto vs. controlo; Cinzento vs. RANKL

Relativamente à avaliação da capacidade de resposta da respiração celular a condições energéticas exigentes (**Figura 34**), denota-se que na presença de RANKL, a resposta é elevada, tal como esperado uma vez este fator estimula tal parâmetro e que torna os osteoclastos em células com elevadas necessidades energéticas e, portanto, com mitocôndrias bem desenvolvidas, o que permite uma maior resposta. Mais uma vez se observa que a presença de E2 juntamente com RANKL influencia o consumo de oxigénio a valores próximos ao controlo (vs. RANKL) (**gráfico A1**). A presença dos extratos UD e UU, por comparação ao controlo, provoca uma diminuição do consumo de oxigénio. Tal pode ocorrer pelos mesmos provocarem uma diminuição na atividade da CTE que pode

ser indicativo de uma resposta a um estímulo de *stress* por partes das células à presença dos extratos (**gráfico B1**). No **gráfico C1** a presença de extratos provoca uma diminuição deste parâmetro (*vs.* RANKL) a valores próximos de controlo, o que pode indicar o seu efeito inibitório na diferenciação celular. Já na presença de RANKL e E2, a adição de extratos não apresentam alterar este parâmetro (**gráfico D1**).

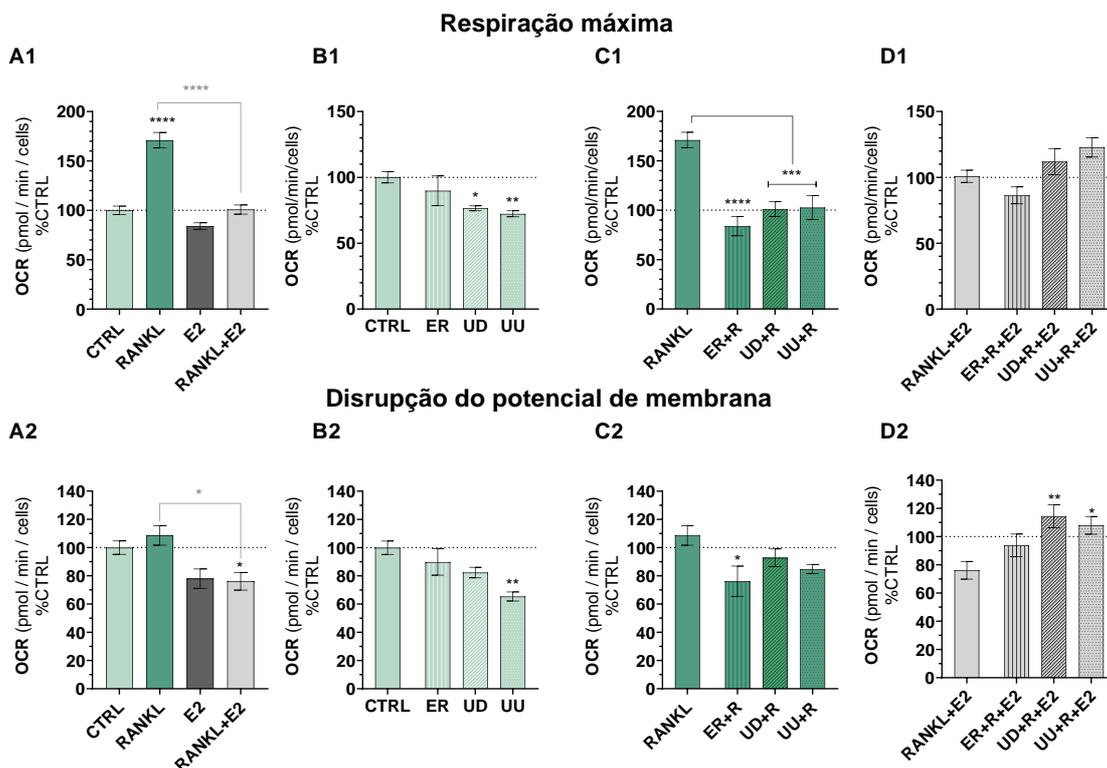


Figura 34 - Parâmetros da respiração mitocondrial – respiração máxima e disrupção do potencial de membrana - de células RAW 264.7 após exposição a RANKL e/ou E2 e/ou extratos hidroetanólicos durante 72h, de 6 ou mais réplicas de 1 ensaio independente, na presença e/ou ausência de fatores de diferenciação sem extratos (A); na presença de extratos sem fatores de diferenciação (B); na presença de extratos e do fator RANKL (C); na presença de extratos e ambos os fatores de diferenciação (D). Todos os ensaios estão normalizados em % de controlo. **** $p < 0,0001$; *** $p \leq 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Gráfico A: Preto vs. controlo; Cinzento vs. RANKL

A integridade da membrana e a passagem de H^+ independente do complexo V é avaliada pelo parâmetro da disrupção do potencial de membrana. Mais uma vez os parâmetros revelam-se de acordo com todos os anteriores analisados. No **gráfico B2** da **Figura 34** denota-se que UU provoca a diminuição da passagem de H^+ ; no **gráfico C2**, onde as células se encontram expostas a RANKL, há alteração na presença do extrato ER. Já na condição com RANKL+E2 (**gráfico D2**), há alterações significativas na presença de UD e UU. Isto pode permitir reforçar que o extrato UU provoca a inibição da atividade

da CTE, em condições de controlo; que ER pode atuar por um mecanismo de ação semelhante a E2 e que os extratos UD e UU têm ação sobre a atividade da CTE, por um mecanismo independente de E2. Há ainda também a hipótese de que a presença dos extratos possa provocar alguma resposta de *stress*. Para que se possam concluir a sua influência são necessários ensaios mais específicos.

A atividade da CTE associada à atividade do complexo V também se mostra concordante com os perfis observados, onde a adição de E2 juntamente com RANKL diminui o consumo estimulado por RANKL (**Figura 35 - gráfico A1**). Por comparação ao controlo, UU diminui a atividade da CTE que, em linha com o anteriormente discutido, pode demonstrar uma ação inibitória da atividade do complexo I (**gráfico B1**). No **gráfico C1** observa-se que todos os extratos diminuem a atividade da CTE, o que se reflete na atividade da ATPsintase, por comparação à sua atividade quando exposta a RANKL. Já no **gráfico D1**, há um aumento da atividade do complexo quando exposto aos extratos UD e UU. Isto pode resultar de um efeito de *stress* provocado pelos extratos nas células, no entanto, não é possível concluir exatamente o seu efeito apenas por avaliação deste parâmetro.

A capacidade respiratória restante, que se traduz na capacidade de atividade da CTE a estímulos inesperados de *stress*, demonstra que a estimulação com RANKL se traduz numa maior atividade, em resposta à exigência energética promovida, como expectável (**Figura 35 – gráfico A2**). Em contrapartida, a presença de E2 após a estimulação com RANKL diminui a atividade da CTE, o que também se encontra de acordo com a literatura (Marques-Carvalho *et al.*, 2023; Kim *et al.*, 2020; Marques-Carvalho *et al.*, 2023). A presença dos extratos UD e UU (**gráfico B2**) provoca uma diminuição deste parâmetro, o que pode reforçar o seu papel inibitório no desenvolvimento mitocondrial e a possibilidade destes atuarem na inibição da atividade do complexo I. No **gráfico C2** observa-se, em concordância com os parâmetros anteriores, a diminuição da atividade da CTE quando as células se encontram expostas a RANKL e aos extratos (*vs.* RANKL). Desta análise pode-se colocar mais uma vez, a hipótese de que os extratos podem atuar na inibição da osteoclastogénese de uma forma semelhante a E2 ou até por um mecanismo independente. No entanto, para tal se avaliar com rigor e robustez, ensaios mais específicos são necessários.

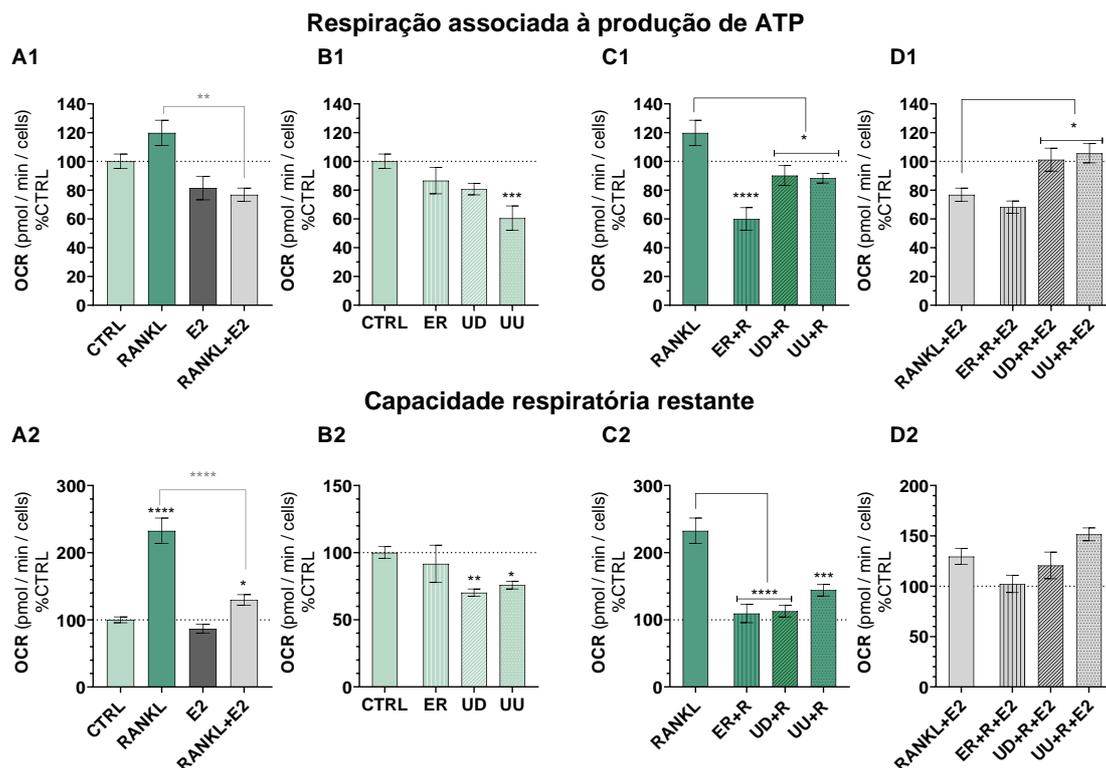


Figura 35 - Parâmetros da respiração mitocondrial – respiração associada à produção de ATP e capacidade respiratória restante - de células RAW 264.7 após exposição a RANKL e/ou E2 e/ou extratos hidroetanólicos durante 72h, de 6 ou mais réplicas de 1 ensaio independente, na presença e/ou ausência de fatores de diferenciação sem extratos (A); na presença de extratos sem fatores de diferenciação (B); na presença de extratos e do fator RANKL (C); na presença de extratos e ambos os fatores de diferenciação (D). Todos os ensaios estão normalizados em % de controle. **** $p < 0,0001$; *** $p \leq 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Gráfico A: Preto vs. controle; Cinzento vs. RANKL

IV.2.4 Avaliação da atividade antioxidante in vitro

A avaliação da produção de ROS - espécies essenciais à formação e maturação de osteoclastos, foi avaliada espectrofotometricamente, através de duas sondas, uma capaz de medir a quantidade de ROS mitocondrial, com maior especificidade para o anião superóxido cuja produção resulta maioritariamente da atividade dos complexos I e III da CTE (Marques-Carvalho *et al.*, 2023) e outra para a medição das diferentes ROS intracelulares, maioritariamente resultantes da atividade das NOXs (Marques-Carvalho *et al.*, 2023). A medição da produção de ROS mitocondrial foi realizada ao fim de 24h e 48h e a intracelular ao fim de 24h, 48h e 72h, após incubação com as condições de ensaio.

IV.2.4.1 Atividade antioxidante 24h

Por avaliação da **Figura 36 - gráfico A1**, denota-se que a exposição das células a RANKL induz um aumento do níveis de $O_2^{\cdot-}$, como esperado pois este fator induz maior atividade mitocondrial, que resulta num aumento da produção de ROS, necessárias à osteoclastogénese (Marques-Carvalho *et al.*, 2023). A adição de E2 diminui a produção e acumulação de ROS. Assim os resultados obtidos vão de acordo ao expectável. A adição dos extratos ER e UD, por comparação com o controlo (**gráfico B1**), provocou um aumento da presença de $O_2^{\cdot-}$. Tal pode ocorrer pela alteração das condições do meio poderem induzir uma resposta ao *stress* como forma de adaptação. No entanto, no **gráfico C1** a adição dos extratos ER e UU com RANKL demonstra que os extratos têm um efeito inibitório na acumulação ou produção de $O_2^{\cdot-}$, o que pode ser consequência da presença de compostos antioxidantes que captam os eletrões dos radicais livres ou a diminuição da atividade do complexo I.

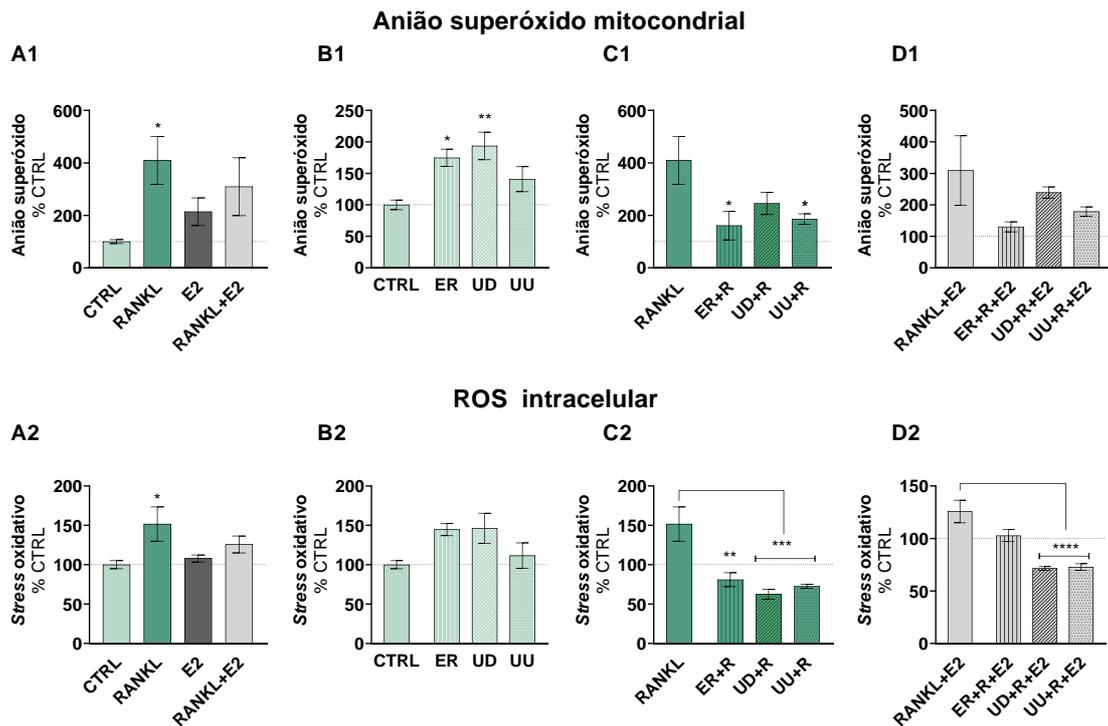


Figura 36 – Avaliação da produção de ROS mitocondrial e do stress oxidativo por acumulação de ROS intracelular - de células RAW 264.7 após exposição a RANKL e/ou E2 e/ou extratos hidroetanólicos durante 24h, de 5 réplicas de 1 ensaio independente, na presença e/ou ausência de fatores de diferenciação sem extratos (A); na presença de extratos sem fatores de diferenciação (B); na presença de extratos e do fator RANKL (C); na presença de extratos e ambos os fatores

de diferenciação (D). Todos os ensaios estão normalizados em % de controle. **** $p < 0,0001$; *** $p \leq 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Gráfico A: Preto vs. Controle

Em relação ao *stress* oxidativo provocado pela presença de ROS no espaço intracelular (**gráfico A2**), o comportamento foi concordante com os **gráfico A1**. A discrepância na adição de RANKL não é tão notória, uma vez que este tem um grande impacto na estimulação da mitocôndria de modo a responder às necessidades energéticas para a osteoclastogênese. Neste parâmetro, a adição de extratos não demonstrou alterações nos níveis de ROS intracelulares (**gráfico B2**). ER demonstrou inibir a presença destas espécies a nível intercelular na presença de RANKL (**gráfico C2**) No entanto, a adição de extratos e fatores de diferenciação (**gráficos C2 e D2**) demonstram que os extratos UD e UU diminuem a presença ou até mesmo a produção destas espécies na presença de RANKL e E2, o que pode permitir reforçar a hipótese de que UD e UU podem atuar de forma independente de E2.

Relacionado com a produção de ROS encontra-se a expressão e atividade das enzimas envolvidas nas defesas antioxidantes. Assim, foi realizada a análise por *Western Blot* de duas destas enzimas: a catalase (CAT) e a superóxido dismutase 2 (SOD2). Na **Figura 37**, para a catalase, observa-se por comparação ao controle, que a exposição das células RAW 264.7 a RANKL demonstra, por observação da **coluna A**, menor intensidade da banda o que se relaciona com a quantidade de catalase, como descrito na literatura (Marques-Carvalho *et al.*, 2023). Já a exposição apenas aos extratos (**coluna B**) em comparação com a banda da condição controle, apresenta maior intensidade o que se pode relacionar com uma maior quantidade de proteína na presença dos extratos ER e UD, mas menor quando expostas a UU. Já na **coluna C**, a presença de extratos quando as células são expostas a RANKL provoca uma maior intensidade da banda, o que se pode relacionar com o aumento da quantidade de proteína (em comparação com RANKL). Já quando expostas a todas as variáveis (**coluna D**), a intensidade da banda na presença de ER é superior às bandas resultantes da presença de UD e UU, o que pode indicar maior quantidade de proteína. No entanto, a intensidade das bandas UD e UU da **coluna D** aparentam ser menor (*vs.* RANKL+E2). Assim é possível sugerir que os extratos podem ter uma ação positiva na expressão da enzima, mas que ER pode demonstrar maior benefício, uma vez que na presença de RANKL e E2 apresenta uma banda mais intensa.

No caso da SOD2, ao comparar a **coluna A**, a exposição a RANKL diminui a intensidade da banda o que se pode traduzir na diminuição da quantidade de SOD2, por comparação ao controlo. Já a adição de E2, aumenta a intensidade da mesma da mesma tal que, na presença de ambos os fatores, em comparação apenas à exposição a RANKL, a intensidade da banda é maior o que pode significar que a quantidade de proteína é superior. Já na **coluna B**, quando as células são expostas aos extratos, a intensidade das bandas relativas à SOD2 diminui significativamente. O mesmo acontece na **coluna C**, onde a sua intensidade diminui, mesmo em comparação com a exposição apenas a RANKL. Na **coluna D**, o mesmo se verifica, principalmente na presença de ER. Na presença de UD e UU a intensidade não diminui tão significativamente, o que pode reforçar os dados obtidos na avaliação de ROS intracelular (**Figura 36 - gráfico D2**). Estas diminuições de intensidade podem relacionar-se com menor quantidade de proteína. No entanto, como a quantificação não foi realizada, não é possível afirmá-lo.

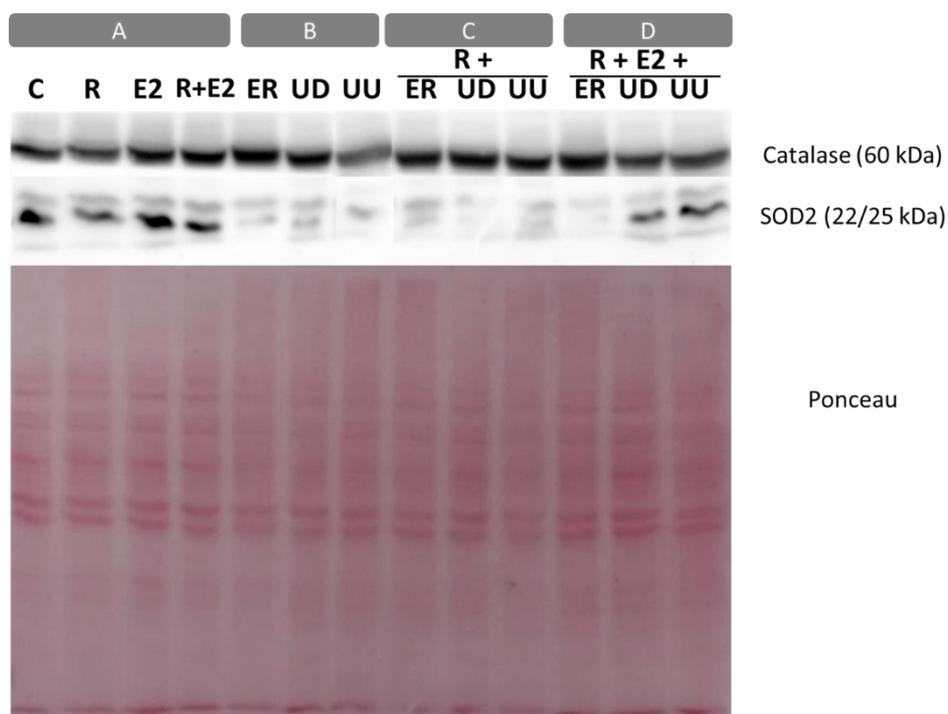


Figura 37 – Detecção e avaliação qualitativa de enzimas antioxidantes, catalase e SOD2 em células RAW 264.7 após exposição a RANKL e/ou E2 e/ou extratos hidroetanólicos durante 24h. Imagem representativa de 1 ou mais réplicas de 2 ensaios independentes, na presença e/ou ausência de fatores de diferenciação sem extratos (A); na presença de extratos sem fatores de diferenciação (B); na presença de extratos e do fator RANKL (C); na presença de extratos e ambos os fatores de diferenciação (D).

Na **Figura 38** encontra-se a expressão génica da enzima SOD1, com atividade antioxidante, obtida pela quantificação de transcritos de PCR. Nota-se aqui que a expressão não altera significativamente na presença de fatores ou de extratos (**gráficos A e B**). No entanto, no **gráfico A** depreende-se o papel inibidor de E2 (na condição RANKL+E2) no aumento da expressão do gene SOD1 provocado por RANKL, o que demonstra coerência com a produção de ROS. Os **gráficos B e C** indicam que a exposição aos extratos não provoca alterações significativas na expressão génica da enzima. Na condição com o extrato UD (**gráfico C**) não é possível retirar conclusões, seria necessário repetir o ensaio. Por fim, no **gráfico D** denota-se que a presença de ER provoca a sub-expressão do gene, mas UU aumenta a sua expressão. Aqui já é possível colocar a hipótese de que as diferentes constituições dos extratos têm efeito na expressão das enzimas. No entanto, mais estudos são necessários para se poder retirar conclusões.

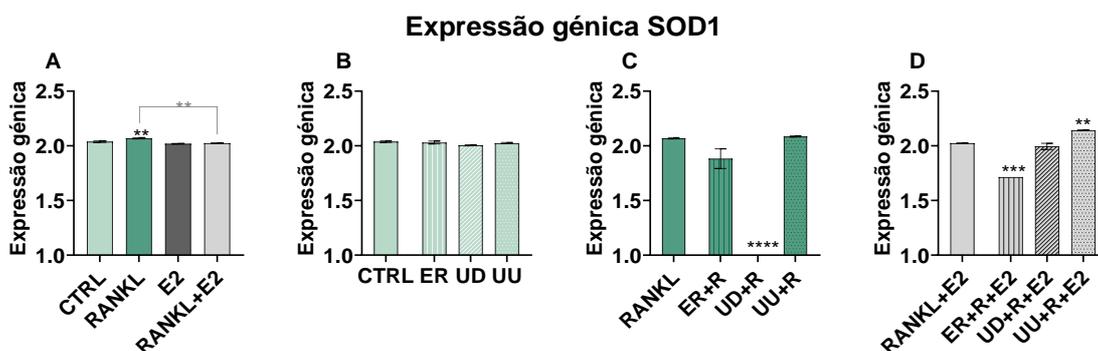


Figura 38 - Avaliação da expressão génica da enzima antioxidante superóxido dismutase 1 (SOD1) de células RAW 264.7 após exposição a RANKL e/ou E2 e/ou extratos hidroetanólicos durante 24h, de 3 réplicas de 1 ensaio independente, na presença e/ou ausência de fatores de diferenciação sem extratos (A); na presença de extratos sem fatores de diferenciação (B); na presença de extratos e do fator RANKL (C); na presença de extratos e ambos os fatores de diferenciação (D). A normalização foi feita com o gene b2m ****p< 0,0001; ***p≤ 0,001; **p< 0,01 ; *p< 0,05. Gráfico A: preto – vs. Controlo; cinzento – vs. RANKL

IV.2.4.2 Atividade antioxidante 48h

Na **Figura 39** encontra-se a avaliação dos mesmos parâmetros após 48h das células RAW 264.7 expostas às condições de ensaio. No **gráfico A1**, a produção ou acumulação de $O_2^- \cdot$ é concordante com o expectável, onde o fatores, no caso de RANKL já provocaram o estímulo e E2 já iniciou a sua ação inibitória. No **gráfico B1**, por comparação ao fim de 24h, apenas ER apresenta um efeito significativo o que pode

sugerir que este extrato interfere com a atividade da SOD2, que se expressa na matriz mitocondrial e é responsável pela redução de $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 (Marques-Carvalho *et al.*, 2023). Já quando expostas aos fatores de diferenciação e aos extratos, em concordância com a avaliação às 24h, todos os extratos provocam uma diminuição dos níveis de $O_2^{\cdot-}$ (**gráfico C1**), o que pode sugerir que os extratos têm uma ação inibitória na CTE, contrariamente a RANKL (Marques-Carvalho *et al.*, 2023) ou que não têm uma ação negativa na atividade da enzima SOD2.

Relativamente à avaliação de ROS citosólico, os resultados são concordantes com os observados para a avaliação de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial. Observa-se no **gráfico A2** que E2 exerce um efeito inibitório sobre as ROS, mas ainda não é conhecida a forma como tal ocorre (Marques-Carvalho *et al.*, 2023). A presença de extratos não demonstra alterações significativas em nenhuma das condições analisadas. (**gráficos B2-D2**).

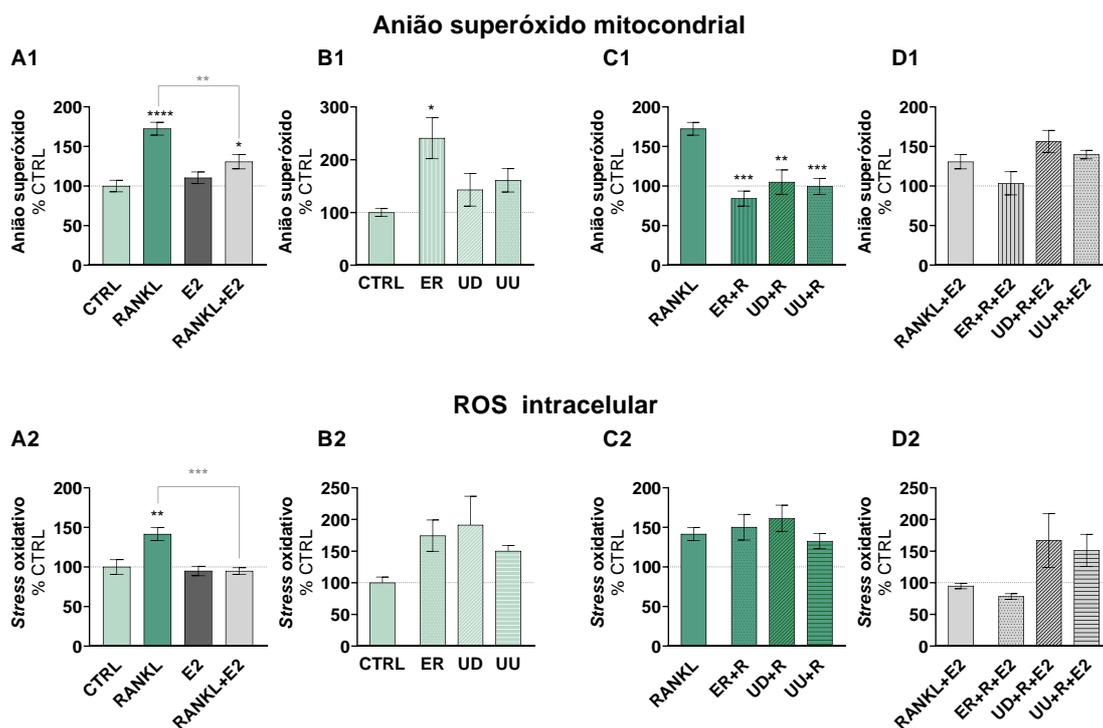


Figura 39 - Avaliação da produção de ROS mitocondrial e do stress oxidativo por acumulação de ROS intracelular - de células RAW 264.7 após exposição a RANKL e/ou E2 e/ou extratos hidroetanólicos durante 48h, de 5 réplicas de 1 ensaio independente, na presença e/ou ausência de fatores de diferenciação sem extratos (A); na presença de extratos sem fatores de diferenciação (B); na presença de extratos e do fator RANKL (C); na presença de extratos e ambos os fatores de diferenciação (D). Todos os ensaios estão normalizados em % de controlo. **** $p < 0,0001$; *** $p \leq 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Gráfico A: Preto vs. Controlo; Cinzento vs. RANKL

IV.2.4.3 Atividade antioxidante 72h

Após exposição das células RAW 264.7 às condições de ensaio por 72h, avaliou-se o teor de ROS intracelular. Após 3 dias, é expectável que a formação de osteoclastos se tenha iniciado, mesmo que ainda não se apresentem maduros nem ativos. De uma forma geral, não se observou diferenças relevantes no teor de ROS em nenhuma das condições (**Figura 40**). Seria esperado que a exposição a RANKL provocasse um aumento significativo nos níveis de ROS no citosol, uma vez que é reportado a necessidade de H₂O₂ intracelulares para o desenvolvimento e bom funcionamento dos osteoclastos (AlQranei *et al.*, 2020; Marques-Carvalho *et al.*, 2023). Acredita-se que a resposta aos fatores de diferenciação possa ter influência do soro utilizado no meio de cultura, que foi diferente neste ensaio. Mais ensaios são necessários para se poder retirar conclusões.

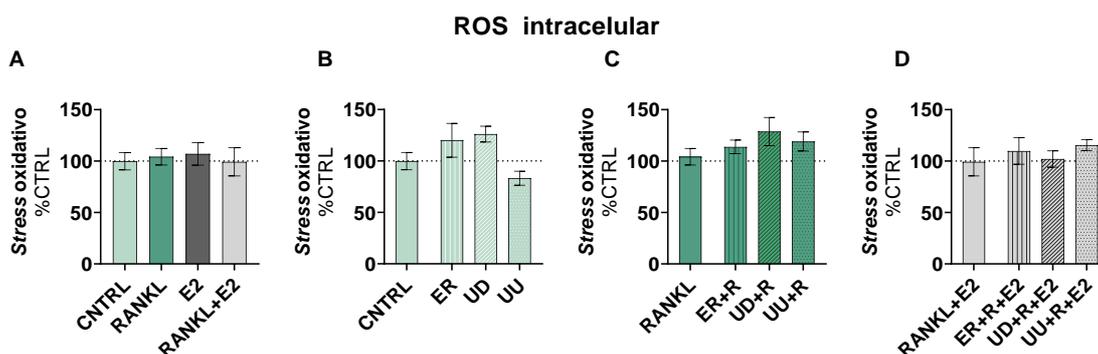


Figura 40 - Avaliação da produção de ROS mitocondrial e do stress oxidativo por acumulação de ROS intracelular - de células RAW 264.7 após exposição a RANKL e/ou E2 e/ou extratos hidroetanólicos durante 72h, de 5 ou mais réplicas de 2 ensaios independentes, na presença e/ou ausência de fatores de diferenciação sem extratos (A); na presença de extratos sem fatores de diferenciação (B); na presença de extratos e do fator RANKL (C); na presença de extratos e ambos os fatores de diferenciação (D). Todos os ensaios estão normalizados em % de controlo.

A avaliação por *Western Blot* das enzimas CAT e SOD2 também foi realizada após 72h de incubação com as condições de ensaio. Na **Figura 41**, para a catalase, observa-se por comparação ao controlo que a exposição das células RAW 264.7 a RANKL é concordante com o resultado após 24h (**coluna A**). Já a exposição apenas aos extratos (**coluna B**), ao comparar com o controlo, não demonstra alterações significativas em relação à intensidade das bandas. Na **coluna C**, a presença de extratos quando as células são expostas a RANKL aumenta a intensidade das bandas o que se pode relacionar com um aumento da quantidade de proteína, o que é concordante com os resultados

observados ao fim de 24h. Já quando expostas a todas as variáveis (**coluna D**), a intensidade da banda é superior na presença dos 3 extratos o que pode indicar maior quantidade de proteína. Assim, coloca-se a hipótese de que os extratos podem exercer um efeito positivo na expressão da catalase. No entanto, o mecanismo pelo qual atuam não é conhecido.

Relativamente à SOD2, ao comparar a **coluna A**, a exposição a RANKL diminui a intensidade da banda por comparação ao controlo, mas a presença de ambos os fatores diminui mais ainda a intensidade da banda (vs. RANKL), o que se pode relacionar com a quantidade de proteína expressa. Como a SOD2 se encontra na matriz mitocondrial, pode colocar-se a hipótese de que tal pode ocorrer em resposta a uma diminuição da atividade da CTE, que se pode relacionar com menor produção de O_2^- .

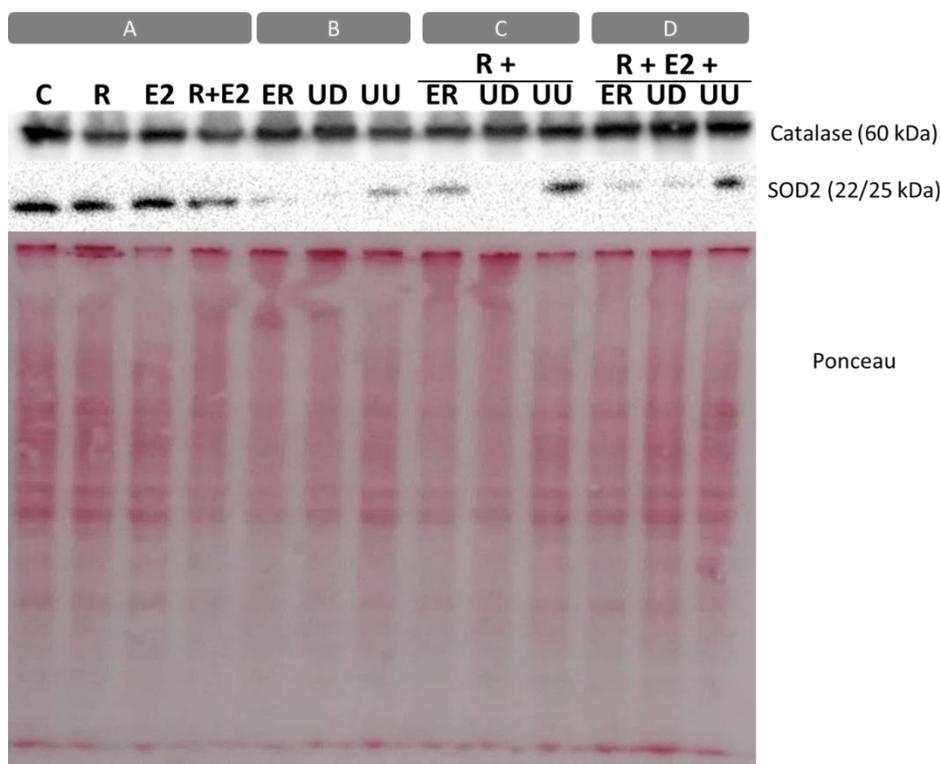


Figura 41 - Detecção e avaliação qualitativa de enzimas antioxidantes, catalase e SOD2 em células RAW 264.7 após exposição a RANKL e/ou E2 e/ou extratos hidroetanólicos durante 72h. Imagem representativa de 6 réplicas de 1 ensaio independente, na presença e/ou ausência de fatores de diferenciação sem extratos (A); na presença de extratos sem fatores de diferenciação (B); na presença de extratos e do fator RANKL (C); na presença de extratos e ambos os fatores de diferenciação (D).

Na **coluna B**, quando as células são expostas aos extratos, a intensidade das bandas relativas à SOD2 diminui significativamente, tal como observado ao fim de 24h. O mesmo acontece nas **colunas C e D**, onde a sua intensidade diminui consideravelmente,

mesmo em comparação com a exposição apenas a RANKL. A exceção é observada nas condições com RANKL e UU; RANKL, E2 e o extrato UU, o que não foi observado ao fim das 24h, onde a intensidade da banda é maior. Ao se relacionar a intensidade da banda com maior quantidade de proteína pode-se colocar a hipótese de que este extrato não tem um efeito negativo na expressão da enzima SOD2, o que já não se demonstra possível para os extratos ER e UD. No entanto, a quantificação seria necessária para se poder confirmar a relação direta da intensidade das bandas e da quantidade de proteína.

A atividade da catalase foi avaliada ao fim de 72h (**Figura 42**), segundo o método descrito por (Grilo *et al.*, 2020), de forma a perceber, mais do que a existência da proteína, o seu desempenho e integridade sob as diferentes condições. RANKL, ao estimular a produção de ROS, tem como consequência inibir a atividade antioxidante e é descrito que a atividade da catalase é inibida pela estimulação da produção e manutenção de H₂O₂ por RANKL (Marques-Carvalho *et al.*, 2023). E2 atua na promoção da atividade antioxidante. Os dados obtidos não apresentaram significância estatística. Será necessário reavaliar a sua atividade e tentar perceber se a composição do meio de cultura pode ter influência na resposta do ensaio.

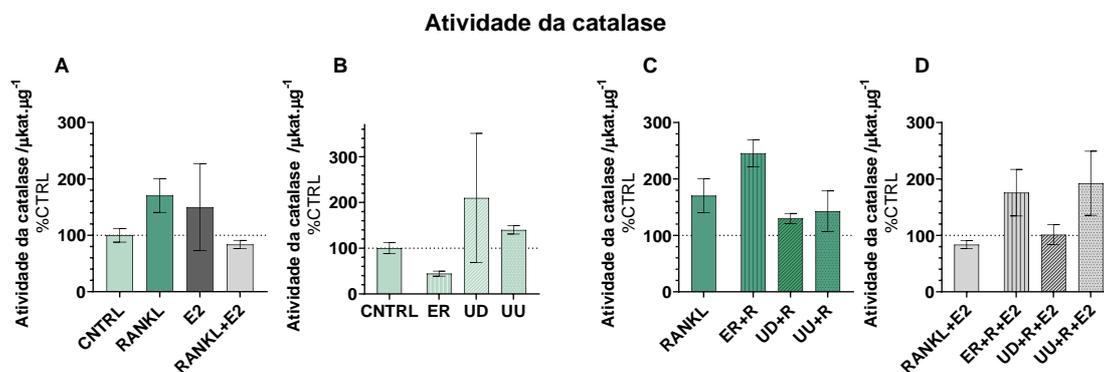


Figura 42 - Avaliação da atividade da enzima catalase por redução de H₂O₂ - de células RAW 264.7 após exposição a RANKL e/ou E2 e/ou extratos hidroetanólicos durante 72h, de pelo menos 2 réplicas de 1 ensaio independente, na presença e/ou ausência de fatores de diferenciação sem extratos (A); na presença de extratos sem fatores de diferenciação (B); na presença de extratos e do fator RANKL (C); na presença de extratos e ambos os fatores de diferenciação (D). Todos os ensaios estão normalizados em % de controlo

Na **Figura 43** encontra-se a expressão gênica da enzima SOD1, obtida pela quantificação de transcritos de PCR, após 72h de incubação com as condições de ensaio. Não se verificam alterações significativas no **gráfico A**. No **gráfico B** repara-se que a presença de extratos provoca um aumento da expressão do gene da enzima, o que pode indicar que a composição dos extratos pode regular positivamente a expressão de SOD1. No **gráfico C** não se observa alterações da expressão (*vs.* RANKL) o que indica que os extratos não exercem uma influência significativa quando as células estão expostas a RANKL. Por fim, no **gráfico D** denota-se que a presença de ER provoca um aumento de expressão do gene e UU diminui a sua expressão, dados contrários à expressão do gene ao fim de 24h. Assim, pode-se colocar a hipótese de que estes extratos tem diferentes efeitos na regulação da expressão da SOD1.

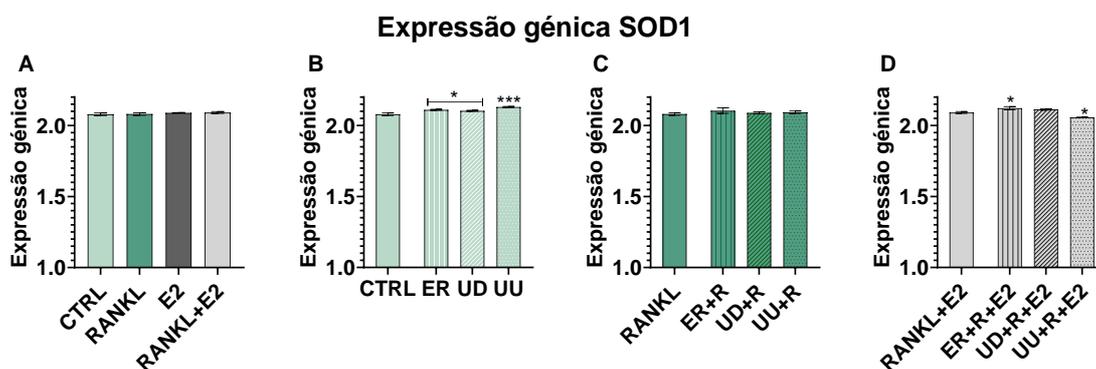


Figura 43 - Avaliação da expressão gênica da enzima SOD1 de células RAW 264.7 após exposição a RANKL e/ou E2 e/ou extratos hidroetanólicos durante 72h, de 3 réplicas de 1 ensaio independente, na presença e/ou ausência de fatores de diferenciação sem extratos (A); na presença de extratos sem fatores de diferenciação (B); na presença de extratos e do fator RANKL (C); na presença de extratos e ambos os fatores de diferenciação (D). A normalização foi feita com o gene b2m **** $p < 0,0001$; *** $p \leq 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Gráfico A: preto – *vs.* Controlo; cinzento – *vs.* RANKL

V. Discussão

A medicina tradicional, aliada ao vasto património vegetal, é muito predominante na região do Vale do Côa. A osteoporose, que é uma patologia associada à desregulação da homeostase óssea encontra-se associada a fatores como a idade e alterações hormonais, no caso de mulheres após a menopausa. Assim, este estudo teve como foco a validação científica dos métodos de extração reportados, decocção e extração hidroetanólica, bem como a avaliação do potencial dos extratos como abordagem terapêutica, com foco na inibição da reabsorção óssea excessiva.

A comparação de diferentes métodos de extração bem como dos diferentes solventes extratores é fundamental pois influencia o tipo de compostos que são extraídos e permite então determinar a abordagem mais eficaz na obtenção de extratos ricos em compostos bioativos seguros. Neste estudo avaliou-se dois métodos de extração: a decocção (D), que mimetiza a preparação tradicional de chás medicinais e a maceração hidroetanólica a 80% (EHA), que é realizada sem fonte de calor – o que permite a preservação de compostos termolábeis – em três espécies endógenas da região e que se encontram descritas com potencial antioxidante e promissoras ao objetivo do estudo: *Equisetum ramosissimum* Desf. (ER); *Urtica dioica* L. (UD) e *Urtica urens* L. (UU). Foi avaliada a sua extração simples como descrita por Martins-Gomes *et al.*, 2018 e Ziani *et al.*, 2019 e a sua extração exaustiva. O acompanhamento das extrações por TLC permitiu observar que os diferentes métodos de extração possibilitam a obtenção de diferentes compostos. O método de decocção permite a extração de compostos fenólicos, identificados com fluorescência azul e o método de maceração hidroetanólica possibilita a extração de compostos fenólicos e clorofilas, identificadas pela sua fluorescência vermelha/laranja. No entanto a extração exaustiva não demonstrou extrair outros tipos de compostos face à extração simples, exceto no caso de ER_EHA onde a extração exaustiva permitiu a extração de alcaloides que se revelaram de natureza bastante polar, cuja presença foi avaliada nos extratos devido ao seu potencial citotóxico (Zhou *et al.*, 2016; Kwak *et al.*, 2013). Assim, concluiu-se que a melhor relação custo-benefício era obtida pela extração simples uma vez que o rendimento de biomassa obtido pela extração exaustiva não era significativo, à exceção da extração de UD por decocção.

A análise por LC-DAD-ESI/MSⁿ identificou compostos fenólicos presentes nos extratos. Os extratos da espécie ER demonstraram maior teor de flavonóides do que

ácidos fenólicos onde se identificaram principalmente, camferol e quercetina, como descrito na literatura (Boeing *et al.*, 2021; Shah *et al.*, 2021). Os extratos da espécie UD apresentam maior teor de ácidos fenólicos do que flavonóides. Foram identificados ácido clorogénico e derivados deste, ácido cafeico e a forma esterificada de ácido elenólico e como flavonóides, apigenina, rutina e quercetina. Na espécie UU, os extratos apenas revelaram a presença de ácidos fenólicos como ácido ferúlico, clorogénico e derivados deste. O ácido clorogénico é reportado na literatura como um bom antioxidante e também como agente de inibição da osteoclastogénese (Lu *et al.*, 2020). Com foco no teor de compostos fenólicos e na sua atividade antioxidante inerente foi realizada a sua quantificação nos extratos, que se revelou baixa. A avaliação foi realizada por LC-DAD-ESI/MSn para o extratos obtidos por extração simples e espectrofotometricamente por FC para esses e os obtidos por extração exaustiva. A quantificação por LC-MS revelou que o extratos obtidos por D apresentam menor teor de compostos fenólicos do que EHA. O ensaio com o reagente FC revelou o contrário. Em concordância, ambos os métodos verificaram que UD apresenta maior teor de compostos fenólicos entre as três plantas. Estas diferenças podem se verificar pela diferença de sensibilidade e rigor dos ensaios, onde a técnica por LC-MS é muito mais sensível e realiza a quantificação com os padrões mais semelhantes aos compostos das amostras. O ensaio colorimétrico baseia-se na reação redox com grupos hidroxilo, o que pode levar à sua reação com compostos de outras classes. Nesta linha de raciocínio foi também avaliada a atividade antioxidante que se apresentou baixa, em concordância com o teor determinado. No entanto, a proporção entre o teor e a atividade antioxidante não se demonstra linear uma vez que os extratos obtidos por extração exaustiva demonstraram maior teor de compostos fenólicos, em comparação com os extratos obtidos por extração simples, mas a atividade antioxidante revela-se superior em extratos obtidos por extração simples vs. exaustiva. Tal pode indicar que a atividade antioxidante não é inteiramente resultante da presença de compostos fenólicos ou que a presença de outros compostos pode mascarar e comprometer a ação antioxidante dos compostos fenólicos. De forma a isolar os grupos de compostos fenólicos nos extratos de outros compostos neles presentes, foi realizado o fracionamento dos mesmos de acordo com a hipótese colocada, reavaliado o teor de compostos fenólicos e a consequente atividade antioxidante de cada fração obtida. Denotou-se que o teor se mantinha baixo, sendo que a fração 1 da espécie ER apresentou a melhor correlação entre o teor fenólico e a respetiva atividade antioxidante. Já a espécie UD apresentou essa

correlação linear no extrato obtido por EHA, mas não por D. O mesmo ocorreu para a espécie UU onde o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante não se demonstram diretamente relacionados. Tal pode dever-se à presença de outras classes de compostos como mencionada, que possam apresentar atividade antioxidante como é o caso de clorofilas, o que se encontra reportado na literatura (Ebrahimi *et al.*, 2023; Lanfer-Marquez *et al.*, 2005; Pérez-Gálvez *et al.*, 2020), ou que possam mascarar a sua atividade.

Prosseguiu-se à avaliação *in vitro* dos extratos obtidos por extração simples, pelos dois métodos. Esta decorreu em células precursoras de osteoclastos, os macrófagos RAW 264.7 (Kong *et al.*, 2019), onde ao fim de 5 dias (tempo médio necessário à formação de osteoclastos maduros nesta linha celular) se observou que os extratos hidroetanólicos de ER e UD não apresentaram toxicidade na concentração máxima testada (1 mg/mL) e UU não apresentou toxicidade até à concentração de 0,125 mg/mL. Os extratos aquosos provocaram a inibição da atividade metabólica das células ao fim de 5 dias, mas não a morte celular neste período. Tal disparidade pode ser explicada pela composição dos extratos criar condições de *stress* das células e a resposta ao estímulo pode ser minimizar o consumo energético, incluindo a diminuição dos processos metabólicos, sem levar necessariamente à morte celular. No entanto, há necessidade de mais estudos para entender os mecanismos subjacentes a este comportamento. Seria aqui necessário a avaliação de enzimas desidrogenases para clarificar esta hipótese. Com base nestes resultados, os ensaios de diferenciação prosseguiram com a concentração máxima não tóxica dos extratos hidroetanólicos. A avaliação da capacidade de ação dos extratos na osteoclastogénese e no desenvolvimento de osteoclastos maduros foram avaliadas por marcação de uma enzima específica destas células e observadas por microscopia. Observou-se a total inibição por parte do extrato UD e quando expostos a ER e UU houve formação de osteoclastos, mas não a sua total maturação. Esta ação pode ser relacionada com a presença de ácido clorogénico, como reportado na literatura (Lu *et al.*, 2020) que foi identificado nos extratos UD e UU, no entanto são necessários estudos mais aprofundados para tal se poder concluir.

Como está reportada a correlação entre a atividade mitocondrial e a osteoclastogénese, uma vez que o processo de diferenciação celular requer a alteração do seu metabolismo (Da *et al.*, 2021; Yan *et al.*, 2023), para que as células tenham energia suficiente para se proliferarem e diferenciarem, foi avaliada a respiração mitocondrial das células expostas às condições de ensaio ao fim de 24h. Não se notaram alterações no

consumo de oxigénio mitocondrial, parâmetro que se correlaciona com a atividade das NOXs. A respiração basal sofreu alterações na presença dos extratos em relação ao controlo e na presença de UD e UU em simultâneo com RANKL o que pode indicar que a atividade da CTE diminui na presença dos mesmos, como forma de resposta ao *stress* provocado pela alteração de ambiente. O extrato ER demonstrou influência sobre a capacidade de resposta da CTE em condições de stress, diminuindo-a. O mesmo se observou para o extrato UD em conjunto com RANKL, onde há uma diminuição da atividade da CTE, o que se pode dever à composição de UD. A presença dos extratos também demonstrou alterar o consumo de O₂ associado à manutenção do gradiente ao diminuir os níveis de H⁺ no espaço intermembranar, que resultam da atividade da CTE, mas são independentes da atividade da ATPsintase. Isto pode menor atividade da CTE. Na presença de extratos e RANKL observa-se o mesmo comportamento o que permite colocar como hipótese que os extratos inibem a atividade da CTE por inibir o estímulo provocado por exposição a RANKL para os extratos, mas tal inibição também pode significar uma disfunção da respiração celular. Para isto, são necessários mais estudos de forma a tirar elações sobre este comportamento, que também foi observado na atividade da ATPsintase. A capacidade das células de responder a situações de *stress* não revelou alterações significativas. Após 24h de incubação também se avaliou a produção de ATP nas células onde se observou, como esperado um aumento aquando estimuladas por exposição a RANKL e uma diminuição quando expostas a RANKL em conjunto com E2. A exposição aos extratos quando estimuladas por RANKL provoca uma diminuição da produção de fonte de energia, que mais uma vez pode dever-se à indução de *stress* ou à influência na atividade da CTE, nomeadamente sobre o complexo I. De notar que quando as células se encontram expostas a RANKL e E2, a adição do extrato UD provoca uma diminuição dos níveis de ATP produzidos. Isto pode indicar um mecanismo de ação do extrato independente de E2, no entanto mais estudos são necessários para se comprovar tal efeito.

A mesma avaliação da respiração mitocondrial foi realizada ao fim de 72h onde se observaram diferenças significativas. Tal como esperado, a respiração basal e o consumo de oxigénio não mitocondrial, aquando a exposição a RANKL é muito superior, o que se pode associar à atividade das NOXs, presentes na matriz citosólica e responsáveis pela formação de ROS (Marques-Carvalho *et al.*, 2023). Também se observa que há influência na atividade relativa à formação de ROS quando as células se

encontra expostas a RANKL e E2, mas ainda não é conhecido de que forma E2 afeta os níveis destas espécies nas células. Foi observado que a adição de extratos a células estimuladas por RANKL também diminui este consumo não mitocondrial de oxigênio. Tal pode ser indicativo que os compostos presentes nos extratos podem atuar como agentes de captação de radicais ou como inibidores da atividade enzimática de NOXs, mas não é possível retirar conclusões sem mais estudos concretos. Mais uma vez, na presença de RANKL e E2 as espécies da família Urticaceae provocaram alterações neste caso pelo aumento do consumo de oxigênio. Na capacidade de respiração basal, confirma-se a robustez mitocondrial em células estimuladas por RANKL. Denotou-se o extrato UU diminui esta resposta o que pode mais uma vez ser indicativo de um efeito de *stress* ou inibição da atividade da CTE. A presença dos extratos com RANKL provoca uma diminuição da respiração, o que pode ser devido a *stress* celular ou à ação de inibição do efeito de RANKL. A capacidade de resposta celular a condições de alta demanda energética demonstra-se aumentada na presença de RANKL inibida na presença de E2 e RANKL em simultâneo, como expectável. A presença dos extratos UD e UU em comparação com o controlo e de todos os extratos em simultâneo com RANKL diminui a atividade da CTE. Já a disrupção do potencial de membrana (*proton leak*) apresenta diferenças para a exposição das células ao extrato UU. Na exposição de RANKL e extratos, a diminuição é observada no caso do extrato ER. Na presença de RANKL e E2, a adição dos extratos UD e UU provoca um aumento, o que coloca como hipótese que os mesmos não comprometem a atividade da CTE. Como esperado observou-se ainda que a adição de E2 e RANKL simultaneamente, provoca a diminuição deste parâmetro (*vs.* RANKL). A produção de ATP associado à atividade da ATPsintase demonstra-se concordante. Em relação ao controlo, UU diminui a atividade da CTE, o que pode resultar de uma possível inibição da atividade do complexo I. Aquando expostas a RANKL e extratos, todos eles culminam na diminuição da atividade da ATPsintase (*vs.* RANKL), o que pode revelar uma inibição sobre a atividade da CTE, como E2. Na presença de RANKL e E2, UD e UU provocam um aumento da sua atividade. Por fim a capacidade de resposta das células em situações de *stress* revela uma diminuição na presença dos extratos UD e UU, o que pode estar de acordo com a ideia de que estes têm um papel inibitório da atividade da CTE. A adição de extratos a células expostas a RANKL também demonstra diminuir este parâmetro – que é estimulado pela adição do fator - tal como ocorre após a adição de E2 a RANKL (por comparação apenas a RANKL) (Kim *et al.*,

2020; Marques-Carvalho *et al.*, 2023). Tudo isto carece de mais estudos de modo a avaliar o tipo de comportamento que os extratos exercem sobre as células e quais as consequências exatas da sua influência.

Tendo em conta a relevância das ROS na formação e atividade osteoclástica (Marques-Carvalho *et al.*, 2023), a avaliação da atividade antioxidante *in vitro* foi realizada ao fim de 24h, 48h e 72h e incluiu a produção de ROS mitocondrial e no citosol, este definido como *stress oxidativo*; a deteção da expressão de proteínas das enzimas catalase e SOD2, a expressão génica da enzima SOD1 e a atividade da enzima catalase.

Após 24 horas, notou-se um aumento da produção de $O_2^- \cdot$ mitocondrial, que resulta da atividade dos complexos I e III, que é estimulada na presença de RANKL. A presença dos extratos ER e UD também provocaram aumento dessa espécie. No entanto, quando as células foram expostas a RANKL, a presença dos extratos ER e UU provocou uma diminuição do seu teor, o que pode estar ligado à diminuição da atividade do complexo I por parte dos extratos, mas não é possível retirar conclusões sem mais estudos. No citosol, o estímulo induzido por RANKL aumentou a produção de ROS, associadas à maior atividade das NOXs. A exposição a RANKL e aos extratos resultou numa diminuição das ROS, possivelmente devido à ação antioxidante dos compostos dos extratos ou à inibição das enzimas citosólicas. Quando expostas a RANKL e E2, a adição dos extratos UD e UU diminuiu a produção de espécies reativas, possivelmente devido à presença de ácido clorogénico e dos seus derivados, descritos pela sua atividade antioxidante, o que pode reforçar uma forma de ação independente de E2 (Lu *et al.*, 2020).

Na avaliação após 48 horas, os níveis de $O_2^- \cdot$ aumentaram com a exposição a RANKL e diminuíram na presença de E2, como esperado. Observou-se que ER provoca um aumento desta espécie e que os extratos provocam uma diminuição destes níveis aquando a exposição das células a RANKL em simultâneo. Tal pode indicar a influência dos extratos numa menor atividade dos complexos I e III.

O nível de ROS citosólico não demonstrou alterações com a presença dos extratos, apenas no parâmetro de exposição a RANKL que aumenta e a RANKL+E2 que diminui em relação a RANKL, como esperado. Também se avaliou o *stress oxidativo* intracelular após 72h de incubação onde não se observou diferenças significativas. Seria esperado que a exposição a RANKL provoca-se um aumento neste parâmetro, o que não se observou. Acredita-se que as alterações do meio de cultura possam ter influenciado a

resposta celular aos fatores de diferenciação, para tal se confirmar será necessário repetir este ensaio.

A detecção de proteínas constituintes das enzimas SOD2 e catalase foi avaliada ao fim de 24h onde se notou menor intensidade da banda de SOD2 na presença de extratos, o que pode indicar um efeito negativo dos extratos sobre a mesma, em particular na presença de ER, que se manteve baixa na presença e ausência dos fatores de diferenciação. As bandas na presença dos extratos UD e UU e dos fatores de diferenciação apresentam mais intensidade em comparação às restantes condições com os extratos, o que pode reforçar a ideia de atuarem por uma via independente de E2. Encontra-se descrita na literatura, a correlação da presença de RANKL e na diminuição da catalase, o que foi observado (Marques-Carvalho *et al.*, 2023). No entanto, a adição de extratos, na presença de RANKL, demonstra um aumento da expressão de catalase, o que pode indicar que os extratos podem regular positivamente a expressão da enzima. A expressão génica da SOD1 não registou alterações na presença de extratos nem dos mesmos em conjunto com RANKL, mas notou-se que houve um aumento da expressão na presença de RANKL e a diminuição da mesma na presença de RANKL e E2. Também na presença dos dois fatores, a adição de ER e UU alterou a expressão génica da enzima. Ainda não é conhecido a forma como RANKL possa atuar na expressão da enzima SOD1 mas sabe-se que esta se encontra no citosol, tem como função a redução de $O_2^{\cdot -}$ a H_2O_2 , espécie muito relevante para o funcionamento dos osteoclastos (Austermann *et al.*, 2019; Marques-Carvalho *et al.*, 2023). A mesma avaliação foi realizada ao fim de 72h. Relativamente à CAT, há um aumento da intensidade das bandas na exposição a extratos e a RANKL o que pode indicar um efeito positivo destes da sua expressão. O mesmo ocorre quando expostas aos extratos, RANKL e E2 em simultâneo. Tal como ao fim de 24h, observa-se uma diminuição da intensidade da banda relativa à proteína da SOD2 na presença de extratos e que a adição dos mesmos em conjunto com RANKL provoca um aumento de intensidade da banda, que se pode relacionar com o aumento da expressão da SOD2. De notar o aumento da intensidade da expressão de SOD2 exposta a RANKL e E2, na presença de UU. No entanto, a atividade da SOD2 relaciona-se com a SOD1 uma vez que ambas reduzem a espécie $O_2^{\cdot -}$ a H_2O_2 , apesar de se encontrarem em locais diferentes. Na avaliação da expressão génica da enzima SOD1 observou-se que a presença de extratos aumenta a sua expressão génica, o que pode indicar uma regulação positiva por parte destes sobre a expressão da enzima. Já na presença de RANKL e E2, a

adição de ER aumenta e UU diminui a expressão génica da SOD1. Apesar disto, mais estudos são necessários para avaliar as suas consequências na atividade da mesma. A avaliação do rácio SOD/GPx (superóxido dismutase/ glutathione peroxidase também seria uma abordagem interessante, uma vez que as GPx tem atividade antioxidante ao reduzir H_2O_2 a água, enquanto contribuem para a manutenção da camada lipídica (Austermann *et al.*, 2019). Ao fim de 72h foi ainda avaliada a atividade da enzima catalase. É expectável, de acordo com a literatura (Marques-Carvalho *et al.*, 2023) que a sua atividade seja inibida pela presença de RANKL, mas tal não se observou. Será necessário reavaliar este estudo e também compreender de que forma a atividade das enzimas SOD1 e SOD2 são influenciadas nas mesmas condições.

VI. Conclusão

Em conclusão, grande parte dos objetivos definidos foram atingidos. O objetivo deste estudo foi investigar o potencial dos extratos de plantas de espécies do Vale do Côa como abordagem terapêutica para a osteoporose, com foco na inibição da reabsorção óssea. Foram avaliados dois métodos de extração, decocção e maceração hidroetanólica e duas metodologias: simples e exaustiva, para obter extratos ricos em compostos bioativos, com foco em compostos fenólicos. Os resultados indicam que a decocção produz extratos com maior rendimento. A maceração hidroetanólica a 80% mostrou-se eficaz na extração de compostos fenólicos e clorofilas. Os diferentes métodos revelaram extrair compostos diferentes, onde EHA mostra extrair maior diversidade de compostos. Mais se conclui que em geral, a extração exaustiva não demonstrou uma relação custo-benefício favorável, exceto em duas condições. No entanto, o esclarecimento da composição total dos extratos ainda carece de mais estudo para avaliar todos os compostos extraídos, além dos fenólicos. As análises por LC-DAD-ESI/MSⁿ revelaram a presença de compostos fenólicos, como ácido clorogénico, ácido ferúlico, quercetina e camferol, nos extratos das diferentes espécies. Em geral, os extratos apresentam um teor de compostos fenólicos baixo e atividade antioxidante concordante. A avaliação *in vitro* demonstrou o efeito inibitório na diferenciação de osteoclastos, onde o extrato UD demonstrou total inibição da sua formação. Além disso, os extratos mostraram influência na respiração mitocondrial e na produção de ROS, o que pode sugerir a sua influência na modulação do metabolismo e na produção energética. O mesmo comportamento também se verificou em relação ao *stress* oxidativo. Apesar de a sua composição revelar baixo teor de compostos fenólicos, os mesmos parecem demonstrar atividade *in vitro*, um modelo muito mais sensível e complexo, o que pode revelar um papel promissor na regulação da homeostase óssea. Com isto, é necessário ressaltar que são necessários mais estudos para compreender completamente os mecanismos subjacentes aos efeitos inibitórios observados, uma vez que a avaliação de marcadores celulares e da atividade antioxidante se encontra pouco conclusiva. Os mecanismos de ação dos extratos bem como os compostos com maior relevância na inibição, necessitam de estudos mais imersivos de modo a poder-se retirar conclusões sobre os extratos enquanto possível abordagem terapêutica no tratamento da osteoporose.

VII. Perspetivas Futuras

Todos os ensaios realizados são bastante preliminares, exigindo este estudo uma avaliação muito mais extensa, quer a nível fitoquímico, quer a nível biológico. Assim, é necessário avaliar outras classes de metabolitos presentes na composição dos extratos, de forma a perceber-se a sua composição completa e com isto as possíveis atividades biológicas que podem exercer. Tal clarificação deve ser realizada por métodos analíticos muito mais sensíveis. Da mesma forma, com base na literatura, seria interessante avaliar o teor de sílica presente nos extratos, avaliação que pode ser feita por ICP-OES. Desta forma, também é possível realizar, em maior escala, um fracionamento seletivo com técnicas como cromatografia em coluna, que permite a eluição por gradiente.

A nível biológico é necessário realizar mais ensaios independentes para conferir maior robustez aos resultados. Também seria interessante avaliar por *Western Blot* e *qt-PCR* a expressão e quantificação de todos os complexos da CTE. Seria ainda relevante avaliar a expressão de marcadores celulares de osteoclastos como a catepsina K e TRAP por *qt-PCR* e também a expressão de recetores de estrogénio. Era interessante avaliar a atividade do complexo I na presença dos diversos extratos de modo a comparar com o efeito exercido pelo estrogénio. Também é necessário, para completar a avaliação antioxidante, realizar a avaliação do anião superóxido ao fim de 72h e avaliar a atividade de mais enzimas antioxidantes como a SOD2 e SOD1, em complemento à análise já realizada da atividade da catalase.

Não descurando os resultados obtidos nos ensaios de toxicidade, será necessário reavaliar e prosseguir os estudos com os extratos obtidos por decocção para tentar compreender exatamente os compostos químicos dos mesmos que tenham provocado comportamentos tão distintos na atividade metabólica das células, em comparação aos extratos hidroetanólicos. Por fim, após a avaliação dos extratos, seria interessante avaliar o comportamento das células na presença de frações destes extratos de forma a avaliar a influência do teor de compostos fenólicos e a atividade terapêutica bem como os sinergismos existentes entre os compostos presentes nos extratos.

VIII. Referências

- Abubakar, AbdullahiR, e Mainul Haque. 2020. "Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes". *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences* 12, no.1: 1. https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_175_19.
- AlQranei, Mohammed S., Hanan Aljohani, Sunipa Majumdar, Linda T. Senbanjo, e Meenakshi A. Chellaiah. 2020. "C-phycocyanin attenuates RANKL-induced osteoclastogenesis and bone resorption in vitro through inhibiting ROS levels, NFATc1 and NF- κ B activation". *Scientific Reports* 10, no.1: 2513. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59363-y>.
- Amorim, Ricardo, Inês Simões, Caroline Veloso, Adriana Carvalho, Rui Simões, Francisco Pereira, Theresa Thiel, *et al.* 2021. "Exploratory Data Analysis of Cell and Mitochondrial High-Fat, High-Sugar Toxicity on Human HepG2 Cells". *Nutrients* 13, no.5: 1723. <https://doi.org/10.3390/nu13051723>.
- Anjaneyulu, K., Kumar Mr Bhat, S. R. Srinivasa, R. A. Devkar, e T. Henry. 2018. "Beneficial Role of Hydro-alcoholic Seed Extract of *Trigonella foenum graecum* on Bone Structure and Strength in Menopause Induced Osteopenia". *Ethiopian journal of health sciences* 28, no.6: 787–94. <https://doi.org/10.4314/ejhs.v28i6.14>.
- Austermann, Katharina, Natalie Baecker, Peter Stehle, e Martina Heer. 2019. "Putative Effects of Nutritive Polyphenols on Bone Metabolism In Vivo—Evidence from Human Studies". *Nutrients* 11, no.4: 871. <https://doi.org/10.3390/nu11040871>.
- Bădilă, Adrian Emilian, Dragos Mihai Rădulescu, Andrei Ilie, Adelina Gabriela Niculescu, Alexandru Mihai Grumezescu, e Adrian Radu Rădulescu. 2022. "Bone Regeneration and Oxidative Stress: An Updated Overview". *Antioxidants*. MDPI. <https://doi.org/10.3390/antiox11020318>.
- Bates, Darcy, e Alan Eastman. 2017. "Microtubule destabilising agents: far more than just antimitotic anticancer drugs.". *British journal of clinical pharmacology* 83, no.2: 255–68. <https://doi.org/10.1111/bcp.13126>.
- Bessa Pereira, C., P. S. Gomes, J. Costa-Rodrigues, R. Almeida Palmas, L. Vieira, M. P. Ferraz, M. A. Lopes, e M. H. Fernandes. 2012. "Equisetum arvense hydromethanolic extracts in bone tissue regeneration: In vitro osteoblastic modulation and antibacterial activity". *Cell Proliferation* 45, no.4: 386–96. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2012.00826.x>.
- Bessada, Sílvia M.F., João C.M. Barreira, Lillian Barros, Isabel C.F.R. Ferreira, e M. Beatriz P.P. Oliveira. 2016. "Phenolic profile and antioxidant activity of *Coleostephus myconis* (L.) Rchb.f.: An underexploited and highly disseminated species". *Industrial Crops and Products* 89, outubro: 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.065>.
- Bethesda. 2012. *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Acedido a 31 de agosto de 2023. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31643176/>.
- Bilgiç, Elif, Özge Boyacıoğlu, Merve Gizer, Petek Korkusuz, e Feza Korkusuz. 2020. "Architecture of bone tissue and its adaptation to pathological conditions". Comunicação apresentada em *Comparative Kinesiology of the Human Body*:

- Normal and Pathological Conditions*, 71–90. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812162-7.00006-0>.
- Boeing, Thaise, Karyne Garcia Tafarelo Moreno, Arquimedes Gasparotto Junior, Luisa Mota Da Silva, e Priscila De Souza. 2021. "Phytochemistry and Pharmacology of the Genus *Equisetum* (Equisetaceae): A Narrative Review of the Species with Therapeutic Potential for Kidney Diseases". *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2021/6658434>.
- Bu, Jie, Juan Du, Lina Shi, Wei Feng, Wei Wang, Jie Guo, Tomoka Hasegawa, Hongrui Liu, Xuxia Wang, e Minqi Li. 2019. "Eldecacitol effects on osteoblastic differentiation and function in the presence or absence of osteoclastic bone resorption". *Experimental and Therapeutic Medicine*, julho. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7784>.
- Caines, Jenna K., David A. Barnes, e Mark D. Berry. 2022. "The Use of Seahorse XF Assays to Interrogate Real-Time Energy Metabolism in Cancer Cell Lines". Comunicação apresentada em , 225–34. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2376-3_17.
- Carvalho, Ana Rita, Gustavo Costa, Artur Figueirinha, Joana Liberal, João A.V. Prior, Maria Celeste Lopes, Maria Teresa Cruz, e Maria Teresa Batista. 2017. "Urtica spp.: Phenolic composition, safety, antioxidant and anti-inflammatory activities". *Food Research International* 99, setembro: 485–94. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.008>.
- Chaachouay, Noureddine, Ouafae Benkhniue, Mohamed Fadli, Rachida El Ayadi, e Lahcen Zidane. 2019. "Ethnobotanical study of medicinal plants used to treat osteoarticular diseases in the Moroccan Rif, Morocco Chaachouay *et al.* Medicinal plants and osteoarticular diseases in the Moroccan Rif". *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research* 7, no.6: 454–70. <http://jppres.com/jppreshttp://jppres.com/>.
- Chakuleska, Lidija, Aleksandar Shokondrov, Georgi Popov, Nadya Zlateva-Panayotova, Reneta Petrova, Mariyana Atanasova, Ilina Krateva, Irini Doytchinova, e Rumyana Simeonova. 2022. "Beneficial effects of the fructus *Sophorae* extract on experimentally induced osteoporosis in New Zealand white rabbits". *Acta Pharmaceutica* 72, no.2: 289–302. <https://doi.org/10.2478/acph-2022-0012>.
- Chen, Xiao, Zhongqiu Wang, Na Duan, Guoying Zhu, Edward M. Schwarz, e Chao Xie. 2018. "Osteoblast–osteoclast interactions". *Connective Tissue Research*. Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/03008207.2017.1290085>.
- Chen, Yu Pin, Yo Lun Chu, Yang Hwei Tsuang, Yueh Wu, Cheng Yi Kuo, e Yi Jie Kuo. 2020. "Anti-inflammatory effects of adenine enhance osteogenesis in the osteoblast-like mg-63 cells". *Life* 10, no.7: 1–10. <https://doi.org/10.3390/life10070116>.
- Clynes, Michael A., Nicholas C. Harvey, Elizabeth M. Curtis, Nicholas R. Fuggle, Elaine M. Dennison, e Cyrus Cooper. 2020. "The epidemiology of osteoporosis". *British Medical Bulletin*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldaa005>.
- Costa, Pedro, Ana T. P. C. Gomes, Márcia Braz, Carla Pereira, e Adelaide Almeida. 2021. "Application of the Resazurin Cell Viability Assay to Monitor *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium* Inactivation Mediated by Phages". *Antibiotics* 10, no.8: 974. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10080974>.

- Costa-Rodrigues, J., S. C. Carmo, J. C. Silva, e M. H.R. Fernandes. 2012. "Inhibition of human in vitro osteoclastogenesis by *Equisetum arvense*". *Cell Proliferation* 45, no.6: 566–76. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2012.00848.x>.
- Curtis, Elizabeth M., Elaine M. Dennison, Cyrus Cooper, e Nicholas C. Harvey. 2022. "Osteoporosis in 2022: Care gaps to screening and personalised medicine". *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology*. Bailliere Tindall Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2022.101754>.
- cytiva, life sciences. 2022. "Western Blotting Principles & Methods". Handbooks. 2022. Acedido a 26 de agosto de 2023. <https://www.cytivalifesciences.com/en/us/support/handbooks>.
- Da, Wacili, Lin Tao, e Yue Zhu. 2021. "The Role of Osteoclast Energy Metabolism in the Occurrence and Development of Osteoporosis". *Frontiers in Endocrinology* 12, maio. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.675385>.
- Das, Atanu Kumar, Md. Nazrul Islam, Md. Omar Faruk, Md. Ashaduzzaman, e Rudi Dungani. 2020. "Review on tannins: Extraction processes, applications and possibilities". *South African Journal of Botany* 135, dezembro: 58–70. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.08.008>.
- Divakaruni, Ajit S., Alexander Paradyse, David A. Ferrick, Anne N. Murphy, e Martin Jastroch. 2014. "Analysis and Interpretation of Microplate-Based Oxygen Consumption and pH Data". Comunicação apresentada em , 309–54. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801415-8.00016-3>.
- Durdan, Margaret M., Ruth D. Azaria, e Megan M. Weivoda. 2022. "Novel insights into the coupling of osteoclasts and resorption to bone formation". *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.10.008>.
- Ebrahimi, Peyman, Zahra Shokramraji, Setareh Tavakkoli, Dasha Mihaylova, e Anna Lante. 2023. "Chlorophylls as Natural Bioactive Compounds Existing in Food By-Products: A Critical Review.". *Plants (Basel, Switzerland)* 12, no.7. <https://doi.org/10.3390/plants12071533>.
- Elson, Ari, Anuj Anuj, Maayan Barnea-Zohar, e Nina Reuven. 2022. "The origins and formation of bone-resorbing osteoclasts". *Bone* 164, novembro. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2022.116538>.
- Epsley, S, S Tadros, A Farid, D Kargilis, S Mehta, e C S Rajapakse. 2021. "The Effect of Inflammation on Bone". *Frontiers in Physiology* / www.frontiersin.org 11: 511799. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.511799>.
- Farag, Mohamed A., Maximilian Weigend, Federico Luebert, Grischa Brokamp, e Ludger A. Wessjohann. 2013. "Phytochemical, phylogenetic, and anti-inflammatory evaluation of 43 *Urtica* accessions (stinging nettle) based on UPLC-Q-TOF-MS metabolomic profiles". *Phytochemistry* 96: 170–83. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.09.016>.
- Feng, Yi, Pei Yan He, Wei Dong Kong, Wan Jing Cen, Peng Lin Wang, Chang Liu, Wu Zhang, Shu Shu Li, e Jian Wei Jiang. 2021. "Apoptosis-promoting properties of miR-3074-5p in MC3T3-E1 cells under iron overload conditions". *Cellular and Molecular Biology Letters*. BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s11658-021-00281-w>.

- Fernandes, Carlos, Afonso J. C. Videira, Caroline D. Veloso, Sofia Benfeito, Pedro Soares, João D. Martins, Beatriz Gonçalves, *et al.* 2021. "Cytotoxicity and Mitochondrial Effects of Phenolic and Quinone-Based Mitochondria-Targeted and Untargeted Antioxidants on Human Neuronal and Hepatic Cell Lines: A Comparative Analysis". *Biomolecules* 11, no.11: 1605. <https://doi.org/10.3390/biom11111605>.
- Gao, Zhonghua, Zhuoying Chen, Zhifan Xiong, e Xiangjie Liu. 2022. "Ferroptosis - A new target of osteoporosis". *Experimental Gerontology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2022.111836>.
- Grilo, Luís F., João D. Martins, Chiara H. Cavallaro, Peter W. Nathanielsz, Paulo J. Oliveira, e Susana P. Pereira. 2020. "Development of a 96-well based assay for kinetic determination of catalase enzymatic-activity in biological samples". *Toxicology in Vitro* 69, dezembro: 104996. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104996>.
- Gutiérrez, L., G. Stepien, L. Gutiérrez, M. Pérez-Hernández, J. Pardo, J. Pardo, V. Grazú, e J.M. de la Fuente. 2017. "Nanotechnology in Drug Discovery and Development". Comunicação apresentada em *Comprehensive Medicinal Chemistry III*, 264–95. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12292-9>.
- Hidayat, Rachmat, e Patricia Wulandari. 2021. "Methods of Extraction: Maceration, Percolation and Decoction". *Eureka Herba Indonesia* 2, no.1: 73–79. <https://doi.org/10.37275/ehi.v2i1.15>.
- Hussen, Endris Muhie, e Sisay Awoke Endalew. 2023. "In vitro antioxidant and free-radical scavenging activities of polar leaf extracts of Vernonia amygdalina". *BMC Complementary Medicine and Therapies* 23, no.1: 146. <https://doi.org/10.1186/s12906-023-03923-y>.
- Irgin, Celal, Bayram Çörekçi, Fatih Ozan, Koray Halicioğlu, Orçun Toptaş, Arzu Birinci Yildirim, Arzu Türker, e Fahri Yilmaz. 2016. "Does stinging nettle (*Urtica dioica*) have an effect on bone formation in the expanded inter-premaxillary suture?". *Archives of Oral Biology* 69, setembro: 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.05.003>.
- Ismail, Abbas, T Ouaid, Maythem AL-Amery, Bahram Maulood, e William Serson. 2020. "A PRELIMINARY STUDY OF PHYTOCHEMICALS IN EQUISETUM ARVENSE & E. RAMOSISSIMUM (EQUISETACEAE) EXTRACTS FROM NORTHERN IRAQ", agosto.
- Jaiswal, Varun, e Hae Jeung Lee. 2022. "Antioxidant Activity of *Urtica dioica*: An Important Property Contributing to Multiple Biological Activities". *Antioxidants*. MDPI. <https://doi.org/10.3390/antiox11122494>.
- Kalia, AjudhiaNath, BhuwanChandra Joshi, e Minky Mukhija. 2014. "Pharmacognostical review of *Urtica dioica* L.". *International Journal of Green Pharmacy* 8, no.4: 201. <https://doi.org/10.4103/0973-8258.142669>.
- Kanis, John A., Nicholas Norton, Nicholas C. Harvey, Trolle Jacobson, Helena Johansson, Mattias Lorentzon, Eugene V. McCloskey, Carl Willers, e Fredrik Borgström. 2021. "SCOPE 2021: a new scorecard for osteoporosis in Europe". *Archives of Osteoporosis* 16, no.1: 82. <https://doi.org/10.1007/s11657-020-00871-9>.

- Kauffman, Megan, Melinda Kauffman, Kassim Traore, Hong Zhu, Michael Trush, Zhenquan Jia, e Y. Li. 2016. "MitoSOX-Based Flow Cytometry for Detecting Mitochondrial ROS". *Reactive Oxygen Species*. <https://doi.org/10.20455/ros.2016.865>.
- Khare, Vertika, Pradeep Kushwaha, Shikhar Verma, Abhishek Gupta, Sharad Srivastava, e AKS Rawat. 2012. "Pharmacognostic Evaluation and Antioxidant Activity of <i>Urtica dioica</i> L.". *Chinese Medicine* 03, no.03: 128–35. <https://doi.org/10.4236/cm.2012.33021>.
- Kim, Bongju, Sung Ho Lee, Su Jin Song, Won Hyeon Kim, Eun Sung Song, Jae Chang Lee, Sung Jae Lee, Dong Wook Han, e Jong Ho Lee. 2019. "Protective effects of melon extracts on bone strength, mineralization, and metabolism in rats with ovariectomy-induced osteoporosis". *Antioxidants* 8, no.8. <https://doi.org/10.3390/antiox8080306>.
- Kim, Eun Nam, Jaeyoung Kwon, Hyun Su Lee, Sooyeon Lee, Dongho Lee, e Gil Saeng Jeong. 2020. "Inhibitory Effect of Cudratrixanthone U on RANKL-Induced Osteoclast Differentiation and Function in Macrophages and BMM Cells". *Frontiers in Pharmacology* 11, agosto. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01048>.
- Kim, Ha-Neui, Filipa Ponte, Intawat Nookaew, Serra Ucer Ozgurel, Adriana Marques-Carvalho, Srividhya Iyer, Aaron Warren, *et al.* 2020. "Estrogens decrease osteoclast number by attenuating mitochondria oxidative phosphorylation and ATP production in early osteoclast precursors". *Scientific Reports* 10, no.1: 11933. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68890-7>.
- Kim, Kyeong-Min, Do-Young Kim, Dong-Seok Lee, Jung-Woo Kim, Jeong-Tae Koh, Eun-Jung Kim, e Won-Gu Jang. 2019. "Peroxiredoxin II negatively regulates BMP2-induced osteoblast differentiation and bone formation via PP2A α -mediated Smad1/5/9 dephosphorylation". *Experimental & Molecular Medicine* 51, no.6: 1–11. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0263-x>.
- Kong, Lingbo, Wanli Smith, e Dingjun Hao. 2019. "Overview of RAW264.7 for osteoclastogenesis study: Phenotype and stimuli". *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 23, no.5: 3077–87. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14277>.
- Kregiel, Dorota, Ewelina Pawlikowska, e Hubert Antolak. 2018. "Urtica spp.: Ordinary plants with extraordinary properties". *Molecules* 23, no.7. <https://doi.org/10.3390/molecules23071664>.
- Kupina, Steve, Chris Fields, Mark C Roman, e Sharon L Brunelle. 2018. "Determination of Total Phenolic Content Using the Folin-C Assay: Single-Laboratory Validation, First Action 2017.13". *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 101, no.5: 1466–72. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.18-0031>.
- Kurimoto, Michitaka, Tsung-che Chang, Yoshitake Nishiyama, Takehiro Suzuki, Naoshi Dohmae, Katsunori Tanaka, e Satoshi Yokoshima. 2022. "Anticancer Approach Inspired by the Hepatotoxic Mechanism of Pyrrolizidine Alkaloids with Glycosylated Artificial Metalloenzymes". *Angewandte Chemie International Edition* 61, no.43. <https://doi.org/10.1002/anie.202205541>.
- Kwak, Sung Chul, Cheol Lee, Ju-Young Kim, Hyun Mee Oh, Hong-Seob So, Myeung Su Lee, Mun Chual Rho, e Jaemin Oh. 2013. "Chlorogenic Acid Inhibits Osteoclast Differentiation and Bone Resorption by Down-Regulation of Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand-Induced Nuclear Factor of Activated T Cells c1

- Expression". *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 36, no.11: 1779–86. <https://doi.org/10.1248/bpb.b13-00430>.
- Lanfer-Marquez, Ursula M., Rosa M.C. Barros, e Patricia Sinnecker. 2005. "Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives". *Food Research International* 38, no.8–9: 885–91. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.02.012>.
- Li, Feng, Yongli Wang, Dapeng Li, Yilun Chen, e Q Ping Dou. 2019. "Are we seeing a resurgence in the use of natural products for new drug discovery?". *Expert Opinion on Drug Discovery* 14, no.5: 417–20. <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1582639>.
- Liu, Jiaqi, Qing Xiao, Jiani Xiao, Chenxi Niu, Yuanyuan Li, Xiaojun Zhang, Zhengwei Zhou, Guang Shu, e Gang Yin. 2022. "Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities". *Signal Transduction and Targeted Therapy* 7, no.1: 3. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00762-6>.
- Lu, Huijie, Zhimei Tian, Yiyan Cui, Zhichang Liu, e Xianyong Ma. 2020. "Chlorogenic acid: A comprehensive review of the dietary sources, processing effects, bioavailability, beneficial properties, mechanisms of action, and future directions". *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 19, no.6: 3130–58. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12620>.
- Maaroufi, Lobna, Md Sazzad Hossain, Wiem Tahri, e Ahmed Landoulsi. 2017. "New insights of Nettle (*Urtica urens*): Antioxidant and antimicrobial activities" Vol. 11(4), junho: 73–86. <https://doi.org/10.5897/JMPR2016.6278>.
- Maksimović, Zoran, e Stevan Samardžić. 2019. "Herbal Medicinal Products in the Treatment of Osteoarthritis". Comunicação apresentada em *Osteoarthritis Biomarkers and Treatments*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.80593>.
- Marques-Carvalho, Adriana, Ha Neui Kim, e Maria Almeida. 2023. "The role of reactive oxygen species in bone cell physiology and pathophysiology". *Bone Reports*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2023.101664>.
- Marques-Carvalho, Adriana, Vilma A. Sardão, Ha-Neui Kim, e Maria Almeida. 2023. "ECSIT is essential for RANKL-induced stimulation of mitochondria in osteoclasts and a target for the anti-osteoclastogenic effects of estrogens". *Frontiers in Endocrinology* 14, abril. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1110369>.
- Marques-Carvalho, Adriana, Beatriz Silva, Francisco B Pereira, Ha-Neui Kim, Maria Almeida, e Vilma A Sardão. 2023. "The effect of estradiol during the early stages of osteoclast differentiation is associated with the accumulation of phosphorylated p53 in mitochondria and the inhibition of mitochondrial metabolism". *bioRxiv*, janeiro, 2023.03.30.534893. <https://doi.org/10.1101/2023.03.30.534893>.
- Martins-Gomes, Carlos, Meriem Taghouti, Judith Schäfer, Mirko Bunzel, Amélia M. Silva, e Fernando M. Nunes. 2018. "Chemical characterization and bioactive properties of decoctions and hydroethanolic extracts of *Thymus carnosus* Boiss.". *Journal of Functional Foods* 43, abril: 154–64. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.02.012>.
- May, Aileen, G Ang, Nonita P Peteros, e Mylene M Uy. 2018. "Cytotoxicity and Antioxidant Activity of *Equisetum debile* Roxb. (Equisetaceae) from Bukidnon, Philippines". *Pharmacology and Life Sciences Bull. Env. Pharmacol. Life Sci.* Vol. 7.

- Meftahi, Gholam Hossein, Zahra Bahari, Ali Zarei Mahmoudabadi, Maryam Iman, e Zohreh Jangravi. 2021. "Applications of western blot technique: From bench to bedside". *Biochemistry and Molecular Biology Education* 49, no.4: 509–17. <https://doi.org/10.1002/bmb.21516>.
- Mikołajczak, Natalia, Małgorzata Tańska, e Dorota Ogrodowska. 2021. "Phenolic compounds in plant oils: A review of composition, analytical methods, and effect on oxidative stability". *Trends in Food Science & Technology* 113, julho: 110–38. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.046>.
- Mira-Pascual, Laia, Christina Patlaka, Suchita Desai, Staffan Paulie, Tuomas Näreoja, Pernilla Lång, e Göran Andersson. 2020. "A Novel Sandwich ELISA for Tartrate-Resistant Acid Phosphatase 5a and 5b Protein Reveals that Both Isoforms are Secreted by Differentiating Osteoclasts and Correlate to the Type I Collagen Degradation Marker CTX-I In Vivo and In Vitro". *Calcified Tissue International* 106, no.2: 194–207. <https://doi.org/10.1007/s00223-019-00618-w>.
- Moreira CA, Dempster DW, e Baron R. 2019. *Anatomy and Ultrastructure of Bone – Histogenesis, Growth and Remodeling*. Editado por Feingold KR, Anawalt B, e Blackman MR. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279149/>.
- Mzid, Massara, Riadh Badraoui, Sameh Ben Khedir, Zouheir Sahnoun, e Tarek Rebai. 2017. "Protective effect of ethanolic extract of *Urtica urens* L. against the toxicity of imidacloprid on bone remodeling in rats and antioxidant activities". *Biomedicine & Pharmacotherapy* 91, julho: 1022–41. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2017.05.023>.
- Mzid, Massara, Sameh Ben Khedir, Sana Bardaa, Zouheir Sahnoun, e Tarek Rebai. 2017. "Chemical composition, phytochemical constituents, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Urtica urens* L. leaves". *Archives of Physiology and Biochemistry* 123, no.2: 93–104. <https://doi.org/10.1080/13813455.2016.1255899>.
- Niedermair, Tanja, Stephan Schirner, Mar Guaza Lasheras, Rainer H Straub, e Susanne Grässel. 2020. "Absence of α -calcitonin gene-related peptide modulates bone remodeling properties of murine osteoblasts and osteoclasts in an age-dependent way". *Mechanisms of Ageing and Development* 189: 111265. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111265>.
- Nova, Zuzana, Henrieta Skovierova, Jan Strnadel, Erika Halasova, e Andrea Calkovska. 2020. "Short-Term versus Long-Term Culture of A549 Cells for Evaluating the Effects of Lipopolysaccharide on Oxidative Stress, Surfactant Proteins and Cathelicidin LL-37". *International Journal of Molecular Sciences* 21, no.3: 1148. <https://doi.org/10.3390/ijms21031148>.
- Ntungwe, Epole, Eva María Domínguez-Martín, Catarina Teodósio, Silvia Teixidó-Trujillo, Natalia Armas Capote, Lucilia Saraiva, Ana María Díaz-Lanza, Noélia Duarte, e Patrícia Rijo. 2021. "Preliminary Biological Activity Screening of *Plectranthus* spp. Extracts for the Search of Anticancer Lead Molecules". *Pharmaceuticals* 14, no.5: 402. <https://doi.org/10.3390/ph14050402>.
- Ojha, Rijan, e Hari Prasad Devkota. 2021. "Edible and medicinal pteridophytes of nepal: A review". *Ethnobotany Research and Applications*. Ilia State University, Institute of Botany, Department of Ethnobotany. <https://doi.org/10.32859/ERA.22.16.1-16>.
- Palacios, Carmen E., Alice Nagai, Priscila Torres, José Avelino Rodrigues, e Antonio Salatino. 2021. "Contents of tannins of cultivars of sorghum cultivated in Brazil, as

- determined by four quantification methods". *Food Chemistry* 337, fevereiro: 127970. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127970>.
- Pérez-Gálvez, Antonio, Isabel Viera, e María Roca. 2020. "Carotenoids and Chlorophylls as Antioxidants". *Antioxidants* 9, no.6: 505. <https://doi.org/10.3390/antiox9060505>.
- Pouresmaeili, Farkhondeh, Behnam Kamalidehghan, Maryam Kamarehei, e Yong Meng Goh. 2018. "A comprehensive overview on osteoporosis and its risk factors.". *Therapeutics and clinical risk management* 14: 2029–49. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S138000>.
- Qiu, Zhi Ye, Yun Cui, e Xiu Mei Wang. 2019. "Natural Bone Tissue and Its Biomimetic". *Mineralized Collagen Bone Graft Substitutes*, janeiro, 1–22. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102717-2.00001-1>.
- Raal, A, A Meos, T Hinrikus, J Heinämäki, E Romāne, V Gudienė, V Jak Tas, *et al.* 2020. "Dragendorff's reagent: Historical perspectives and current status of a versatile reagent introduced over 150 years ago at the University of Dorpat, Tartu, Estonia.". *Die Pharmazie* 75, no.7: 299–306. <https://doi.org/10.1691/ph.2020.0438>.
- Reithmeier, Anja, Maria Norgård, Barbro Ek-Rylander, Tuomas Näreoja, e Göran Andersson. 2020. "Cathepsin K regulates localization and secretion of Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP) in TRAP-overexpressing MDA-MB-231 breast cancer cells". *BMC Molecular and Cell Biology* 21, no.1: 15. <https://doi.org/10.1186/s12860-020-00253-6>.
- Sadowska, Anna, e Franciszek Świdorski. 2020. "Sources, bioavailability, and safety of silicon derived from foods and other sources added for nutritional purposes in food supplements and functional foods". *Applied Sciences (Switzerland)*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/APP10186255>.
- Salabei, Joshua K, Andrew A Gibb, e Bradford G Hill. 2014. "Comprehensive measurement of respiratory activity in permeabilized cells using extracellular flux analysis". *Nature Protocols* 9, no.2: 421–38. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.018>.
- Satpathy, S., A. Patra, M. D. Hussain, e B. Ahirwar. 2018. "Amelioration of postmenopausal osteoporosis and anticancer properties of an antioxidant enriched fraction from *Hygrophila spinosa* T. Anders". *South African Journal of Botany* 117, julho: 247–55. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.05.033>.
- Satpathy, Swaha, Arjun Patra, Muhammad Delwar Hussain, Mohsin Kazi, Mohammed S. Aldughaim, e Bharti Ahirwar. 2021. "A fraction of *Pueraria tuberosa* extract, rich in antioxidant compounds, alleviates ovariectomized-induced osteoporosis in rats and inhibits growth of breast and ovarian cancer cells". *PLoS ONE* 16, no.1 January. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240068>.
- Seadawy, Hosam M El, Kamilia A Abo El Seoud, Amal M Kabbash, Mona El Aasr, e Ghada I Attia. 2018. "PHYTOCHEMICAL AND BIOLOGICAL INVESTIGATION OF *URTICA URENS* L. GROWING IN EGYPT". *International Research Journal of Pharmacy* 9, no.1: 25–35. <https://doi.org/10.7897/2230-8407.0915>.
- Shah, Ghulam Mujtaba, Nasir Shad, Muhammad Sajid, Asma, Abid Naeem, Fahim Ullah Khan, Nadia Jabeen, Mazna Urooj, Said Muhammad, e Muhammad Hasnain. 2021. "Herbal remedies used for the management of urolithiasis in Abbottabad, Northern

- Pakistan". *Plant Science Today*. Horizon e-Publishing Group. <https://doi.org/10.14719/PST.2021.8.4.1244>.
- Shen, Chang-Hui. 2019. "Detection and Analysis of Nucleic Acids". Comunicação apresentada em *Diagnostic Molecular Biology*, 167–85. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802823-0.00007-9>.
- Słupski, Wojciech, Paulina Jawień, e Beata Nowak. 2021. "Botanicals in postmenopausal osteoporosis". *Nutrients*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu13051609>.
- Stel, Wanda van der, Giada Carta, Julie Eakins, Salihanur Darici, Johannes Delp, Anna Forsby, Susanne Hougaard Bennekou, *et al.* 2020. "Multiparametric assessment of mitochondrial respiratory inhibition in HepG2 and RPTEC/TERT1 cells using a panel of mitochondrial targeting agrochemicals". *Archives of Toxicology* 94, no.8: 2707–29. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02792-5>.
- Subba, Sonu, e Kajal Pradhan. 2022. "A comprehensive review on common plants with remarkable medicinal properties: *Urtica dioica*". *Journal of Medicinal Plants Studies* 10, no.6: 87–91. <https://doi.org/10.22271/plants.2022.v10.i6b.1492>.
- Szuman, Karina, e Namrita Lall. 2020. "Equisetum ramosissimum". Comunicação apresentada em *Underexplored Medicinal Plants from Sub-Saharan Africa*, 93–98. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816814-1.00013-2>.
- Taheri, Yasaman, Cristina Quispe, Jesús Herrera-Bravo, Javad Sharifi-Rad, Shahira M. Ezzat, Rana M. Merghany, Shabnum Shaheen, *et al.* 2022. "Urtica dioica -Derived Phytochemicals for Pharmacological and Therapeutic Applications". *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2022/4024331>.
- Tiago, Francisco J., Alexandre Paiva, Ana A. Matias, e Ana Rita C. Duarte. 2022. "Extraction of Bioactive Compounds From *Cannabis sativa* L. Flowers and/or Leaves Using Deep Eutectic Solvents". *Frontiers in Nutrition* 9, maio. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.892314>.
- Tilvi, Supriya, Mahesh S. Majik, e Keisham S. Singh. 2014. "Mass Spectrometry for Determination of Bioactive Compounds". Comunicação apresentada em , 193–218. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63359-0.00008-2>.
- Tresguerres, F. G.F., J. Torres, J. López-Quiles, G. Hernández, J. A. Vega, e I. F. Tresguerres. 2020. "The osteocyte: A multifunctional cell within the bone". *Annals of Anatomy* 227, janeiro: 151422. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2019.151422>.
- Villaverde, Ana Izabel Silva Balbin, Jacob Netherton, e Mark A. Baker. 2019. "From Past to Present: The Link Between Reactive Oxygen Species in Sperm and Male Infertility". *Antioxidants* 8, no.12: 616. <https://doi.org/10.3390/antiox8120616>.
- Wattanathorn, Jintanaporn, Cholathip Thipkaew, Wipawee Thukham-mee, Supaporn Muchimapura, Panakaporn Wannanon, e Terdthai Tong-Un. 2018. "Morinda citrifolia L. leaf extract protects against cerebral ischemia and osteoporosis in an in vivo experimental model of menopause". *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1039364>.
- Yan, Chunlu, Yao Shi, Lingqing Yuan, Donghui Lv, Bai Sun, Jiayu Wang, Xiyan Liu, e Fangyu An. 2023a. "Mitochondrial quality control and its role in osteoporosis". *Frontiers in Endocrinology* 14, janeiro. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1077058>.

- Yusuf, Mohd, Alankar Shrivastav, Mayur Porwal, e Najam Ali Khan. 2020. "A Review on Equisetum ramosissimum". *Journal of Drug Delivery and Therapeutics* 10, no.5: 311–15. <https://doi.org/10.22270/jddt.v10i5.4413>.
- Zhao, Dongfeng, Bing Shu, Chenglong Wang, Yongjian Zhao, Weidong Cheng, Nannan Sha, Chenguang Li, Qiang Wang, Sheng Lu, e Yongjun Wang. 2020. "Oleanolic acid exerts inhibitory effects on the late stage of osteoclastogenesis and prevents bone loss in osteoprotegerin knockout mice". *Journal of Cellular Biochemistry* 121, no.1: 152–64. <https://doi.org/10.1002/jcb.28994>.
- Zhou, Rong Ping, Si Jian Lin, Wen Bing Wan, Hui Ling Zuo, Fen Fen Yao, Hui Bing Ruan, Jin Xu, *et al.* 2016. "Chlorogenic Acid Prevents Osteoporosis by Shp2/PI3K/Akt Pathway in Ovariectomized Rats". *PLOS ONE* 11, no.12: e0166751. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166751>.
- Zhou, Tongxi, Zhuo Gai, Xing Gao, e Li Li. 2021. "The Potential Mechanism of Exercise Combined with Natural Extracts to Prevent and Treat Postmenopausal Osteoporosis". *Journal of Healthcare Engineering*. Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2021/2852661>.
- Ziani, Borhane E.C., Sandrina A. Heleno, Khaldoun Bachari, Maria Inês Dias, Maria José Alves, Lillian Barros, e Isabel C.F.R. Ferreira. 2019. "Phenolic compounds characterization by LC-DAD-ESI/MSn and bioactive properties of Thymus algeriensis Boiss. & Reut. and Ephedra alata Decne". *Food Research International* 116, fevereiro: 312–19. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.041>.

Anexos

Anexo 1 – Análise do perfil fenólico dos extratos por LC-DAD-ESI/MSn

O perfil fenólico dos extratos aquosos e hidroetanólicos foi obtido pela dissolução numa solução de metanol: água (80:20, v/v). A análise cromatográfica foi realizada por LC-DAD-ESI/MSn (Dionex Ultimate 3000 UPLC, Thermo Scientific, CA, EUA), sendo realizadas as condições descritas em Bessada *et al.*, 2016.

A detecção online dupla foi realizada num espectrómetro de massa com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI) acoplado ao sistema de cromatografia líquida de alta desempenho (HPLC) através da saída de detecção da matriz de díodos (DAD) para a qual foram usados os comprimentos de onda de 280 nm e 370 nm. A detecção do espectrómetro de massa foi realizada num espectrómetro de massa Linear Ion Trap LTQ XL (ThermoFinnigan, San Jose, CA, EUA) em modo negativo. A identificação dos compostos fenólicos foi realizada com o uso de compostos padrão, sempre que possível, por comparação de parâmetros como tempo de retenção, UV-vis, espectros de massa, bem como por comparação dos dados obtidos com os descritos na literatura, numa tentativa de identificação (Ziani *et al.*, 2019).

A análise quantitativa foi realizada através da construção da curva de calibração de cada padrão fenólico disponível, com base no sinal detetado por UV. No caso de compostos identificados sem padrão descrito na literatura, a quantificação foi feita por meio da curva de calibração do padrão mais semelhante disponível na literatura. Os resultados foram expressos em mg/g de extrato (Ziani *et al.*, 2019).

Tabela A 1 - Composição fenólica dos extratos obtidos por extração simples da espécie *Equisetum ramosissimum* Desf. (ER) obtidos por decocção (D) e maceração hidroetanólica (EHA) por LC-DAD-ESI/MSn. nd – não detetado

ER_EHA		ER_D					ER_EHA	ER_D
Pico	Rt (min)	λ_{max} (nm)	Composto ID	$[M-H]^-$ (m/z)	MS ² (m/z)	Concentração mg/g		
1	5,08	5,13	246,271sh,352	771,00	MS2:609(100). MS3:429(100),285(53)	6,59	4,61	
			Camferol- <i>O</i> -dihexosil- <i>O</i> -dihexosido					
2	5,93	5,75	246,271sh,352	771,00	MS2:609(100). MS3:429(100),285(35)	0,99	0,60	
3	6,36	6,31	264,301,328	787,00	MS2:625(100). MS3:463(100),301(79)	0,35	0,36	
			Quercetina- <i>O</i> -dihexosil- <i>O</i> -dihexosido					
4	6,70	6,73	284,00	355,00	MS2:193(100),178(18)	0,13	0,06	
			Hexósido de ácido ferúlico					
5	7,83	7,87	266,248	813,00	MS2:651(100),285(34)	0,24	0,16	
			Camferol- <i>O</i> -hexosil- <i>O</i> -acetil-dihexosido					
6	8,25	8,27	284,00	355,00	MS2:193(100),178(23)	0,33	0,20	
			Hexósido de ácido ferúlico					
7	10,68	10,64	266,307,327	537,00	MS2:375(100),195(34)	0,73	0,66	
			Cupressuflavona					
8	15,11	15,12	246,271sh,352	771,00	MS2:609(100). MS3:429(100),285(98)	0,64	0,37	
			Camferol- <i>O</i> -dihexosil- <i>O</i> -dihexosido					
9	16,57	16,57	347,00	609,00	MS2:285(100)	1,59	1,59	
			Camferol- <i>O</i> -dihexosido					
10	17,29	17,27	324,00	193,00	MS2:178(34),134(100)	0,00	0,02	
			Ácido ferúlico					
11	20,99		345,00	651,00	MS2:609(65),285(100)	0,08	nd	
			Camferol- <i>O</i> -acetil-dihexosido					
TPA (Total ácidos fenólicos)						0,47	0,28	
TF (Total flavonóides)						11,23	8,34	
TPC (Total compostos fenólicos)						11,69	8,62	

Tabela A 2 - Composição fenólica dos extratos obtidos por extração simples da espécie *Urtica dioica* L. (UD) obtidos por decocção (D) e maceração hidroetanólica (EHA) por LC-DAD-ESI/MSn. nq – não quantificado

UD_EHA		UD_D				UD_EHA		UD_D	
Pico	Rt (min)	λ_{max} (nm)	Composto ID	[M-H] ⁻ (m/z)	MS ² (m/z)	Concentração mg/g			
1	6,93	318	Ácido 4-Caffeoil-5-p-coumaroilquinico	499	MS2:353(100),163(2)	0,73			
4	6,84					1,46			
2	7,82	321	Ácido 5-O-Caffeoilquinico	353	MS2:191(100), 179(82),135(12)	9,21			
5	10,32					4,87			
3	10,17	334	Apigenina-C-dihexosido	593	503(35),473(100),353(22),297(5)	0,39			
6	9,98					0,82			
4	10,74	328	Ácido cafeico	179	135(100)	1,70			
7	10,32					1,03			
5	16,84	270	Glicósido de ácido elenólico (metil ester oleosido)	403	MS2:241(5),223(100),179(28),135(5)	nq			
10	16,85								
6	17,90	353	Quercetina-3-O-rutinosido	609	MS2:301(100)	0,69			
11	17,77					0,63			
7	20,53	328	Quercetina-O-acetil-hexosido	505	MS2:301(100)	0,50			
13	20,27					0,66			
8	21,20	337	Luteolina-O-deoxihexosil-hexosido	593	MS2:285(100)	0,49			
14	21,01					0,65			
9	26,23	353	Isorhamnetina-O-acetil-hexosido	519	MS2:315(100)	0,60			
15	26,04					0,60			
TPA (Total ácidos fenólicos)						11,64	7,36		
TF (Total flavonóides)						2,67	3,36		

TPC (Total compostos fenólicos)	14,31	10,72
--	-------	-------

Tabela A 3 - Composição fenólica dos extratos obtidos por extração simples da espécie *Urtica urens* L. (UU) obtidos por decocção (D) e maceração hidroetanólica (EHA) por LC-DAD-ESI/MSn

UU_EHA		UU_D					UU_EHA	UU_D
Pico	Rt (min)		λ_{max} (nm)	Composto ID	[M-H] ⁻ (m/z)	MS ² (m/z)	Concentração mg/g	
1	6,93	7,52	318	Ácido 4-Caffeoil-5-p-coumaroilquinico	499	MS2:353(100),163(2)	0,56	0,36
2	7,82	7,8	321	Ácido 5-O-Caffeoilquinico	353	MS2:191(100), 179(82),135(12)	3,28	0,36
3	10,74	10,01	328	Ácido cafeico	179	135(100)		tr
4	13,88	13,87	326	Ácido 5-O-Feruloilquinico	367	MS2:193(10),191(100),173(14),149(25)	0,04	0,05
5	18,99	18,97		Ácido hidroxidihidrocaffeoil glucosil)quinico	533	MS2:515(5),371(100),353(98),191(10)	0,59	0,55
					TPC (TPA) /Total compostos fenólicos(Total ácidos fenólicos)		4,50	1,32

Anexo 2 – Análise do perfil metabólicos celular por *Seahorse XF*

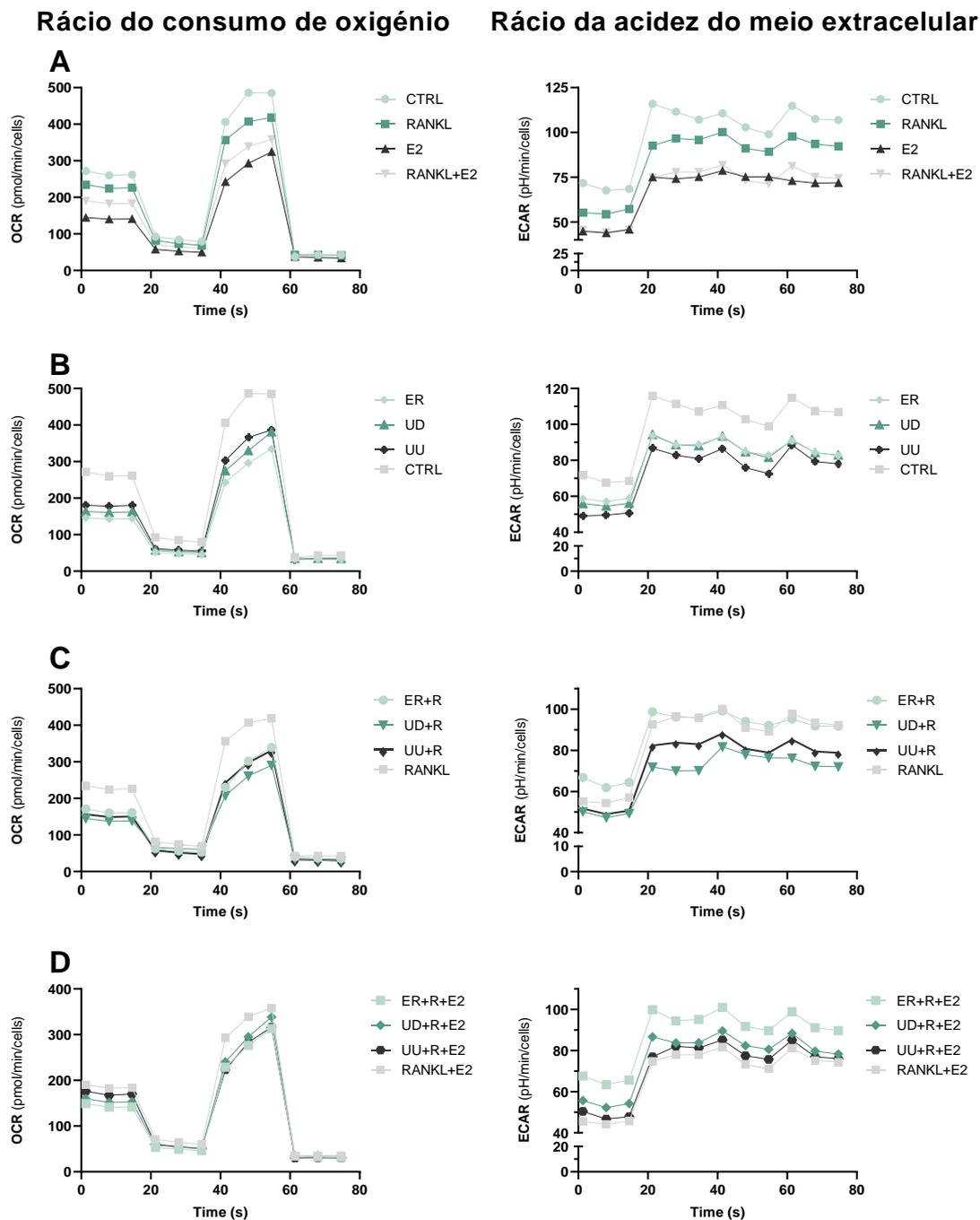


Figura A 1 - Perfis metabólicos celulares obtidos por *Seahorse XF* em células submetidas a condições de ensaio por 24h. Análise do rácio do consumo de oxigénio (esquerda) e do rácio de acidez do meio extracelular (direita) na presença e/ou ausência de fatores de diferenciação sem extratos (A); na presença de extratos sem fatores de diferenciação (B); na presença de extratos e do fator RANKL (C); na presença de extratos e ambos os fatores de diferenciação (D).

Rácio do consumo de oxigênio

Rácio da acidez do meio extracelular

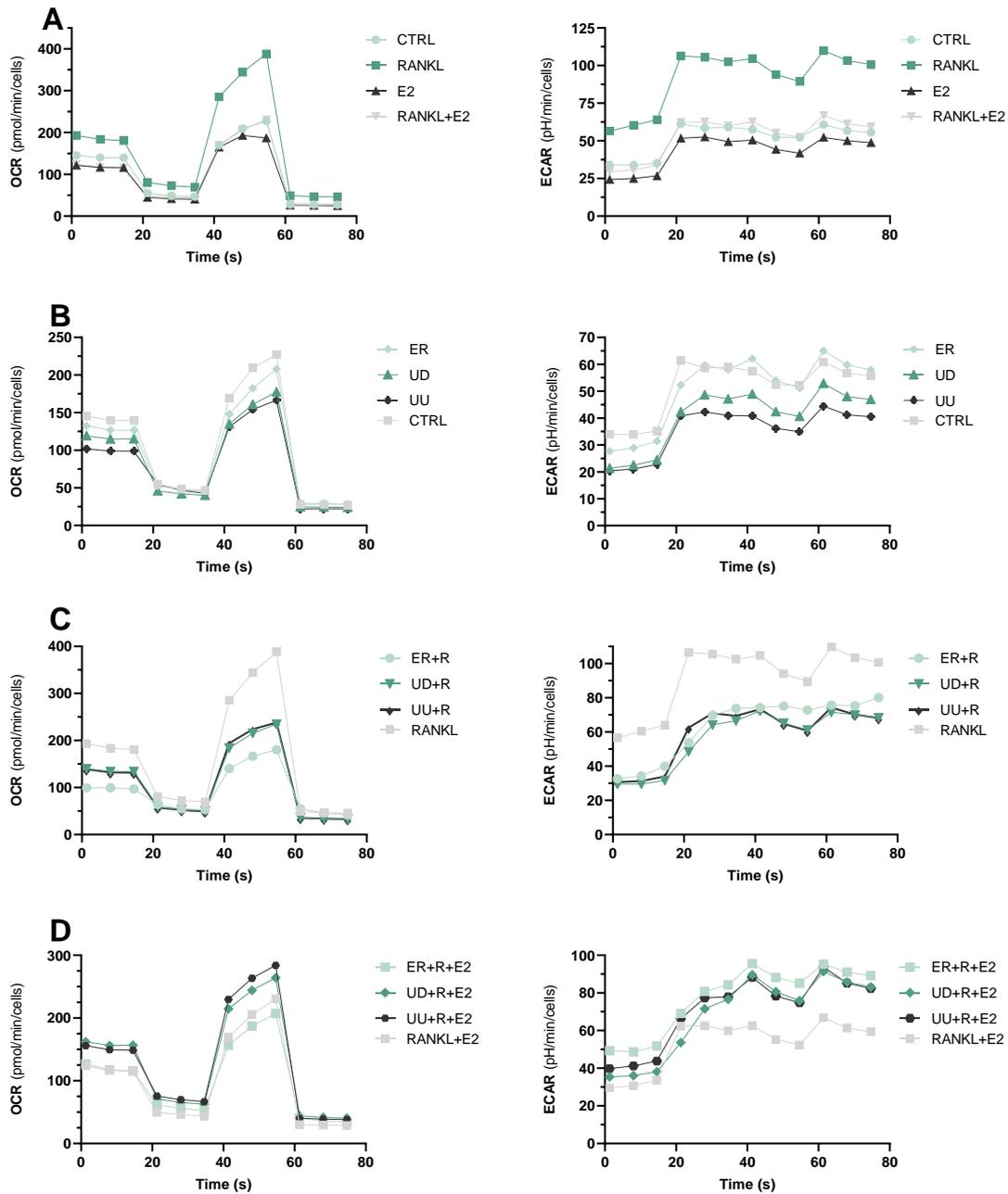


Figura A 2 - Perfis metabólicos celulares obtidos por *Seahorse XF* em células submetidas a condições de ensaio por 72h. Análise do rácio do consumo de oxigênio (esquerda) e do rácio de acidez do meio extracelular (direita) na presença e/ou ausência de fatores de diferenciação sem extratos (A); na presença de extratos sem fatores de diferenciação (B); na presença de extratos e do fator RANKL (C); na presença de extratos e ambos os fatores de diferenciação (D).