

Filipa Raquel Grilo Tavares

# Prospecção e obtenção de compostos com potencial terapêutico, a partir de subprodutos industriais

Dissertação de Mestrado em Química Farmacêutica Industrial, orientada pela Professora Doutora Maria Teresa Pereira Batista e pelo Professor Doutor Jorge António Ribeiro Salvador e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2014





Por decisão pessoal da autora, a dissertação não segue o novo acordo ortográfico.

Este trabalho foi suportado financeiramente pela Fundação da Ciência e Tecnologia através dos projectos PTDC/SAU-FCF/105429/2008 e PEst-OE/SAU/UI0177/2014.



“Na natureza, nada se cria, nada se perde, tudo se transforma.”

(Antoine Lavoisier)



## **Agradecimentos**

Ao finalizar esta etapa da minha vida, não posso deixar de agradecer a todas as pessoas que a tornaram possível e me acompanharam no seu decorrer.

Em primeiro lugar quero agradecer especialmente à Professora Doutora Teresa Batista por me aceitar como orientanda e me receber de braços abertos no seu grupo de trabalho. Gostaria de agradecer pelo carinho, paciência e apoio incondicional, pela constante disponibilidade em acompanhar o meu trabalho e esclarecer qualquer dúvida dele resultante e, principalmente por me permitir aprofundar um pouco mais os meus conhecimentos no mundo das plantas medicinais.

Ao Professor Doutor Jorge Salvador quero deixar um obrigado sincero pela orientação dada e pela ajuda e apoio que me deu no decorrer deste percurso.

Ao Gustavo Costa quero agradecer por toda a paciência, disponibilidade e amizade com que me acolheu e ensinou.

À Professora Doutora Teresa Cruz, à Joana Liberal e à Isabel Ferreira quero deixar também um agradecimento especial por toda a ajuda, disponibilidade e amizade com que me receberam na realização dos ensaios anti-inflamatórios.

À Dra. Fátima Nunes quero agradecer pelo seu apoio na aquisição e análise dos espectros de massa.

À FCT pelo financiamento dos projectos PEst-OE/SAU/UI0177/2014 e do LEM do Núcleo CEF-UC integrado na Rede Nacional de Espectrometria de Massa.

À Fátima quero agradecer pelo carinho e por ajudar a animar os meus dias.

Aos meus amigos e família por todo o apoio e compreensão e por estarem sempre presentes.

Ao meu namorado quero agradecer pela paciência, compreensão, apoio, amor e por estar sempre ao meu lado, nos bons e maus momentos.

Ao meu irmão por ser a pessoa que é, por desde sempre estar ao meu lado e querer virar o mundo para me ajudar.

Aos meus pais, porque sem eles nada disto seria possível! Obrigado por estarem sempre do meu lado, fazendo tudo o que podiam (e não podiam), por toda a força e dedicação, por todas as palavras e valores e, sobretudo por sempre me encorajarem a seguir os meus sonhos e me tornarem na pessoa que sou.





## Índice

<b>Índice de Figuras</b> .....	<b>x</b>
<b>Índice de Tabelas</b> .....	<b>xii</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>xiii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>xv</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>xvii</b>
<b>Capítulo I - Introdução</b> .....	<b>I</b>
<b>A. Compostos Fenólicos</b> .....	<b>2</b>
1. Biossíntese .....	3
2. Classificação, fontes e actividades biológicas .....	7
2.1. Ácidos fenólicos .....	8
2.1.1. Ácidos hidroxibenzóicos .....	8
2.1.2. Ácidos hidroxicinâmicos .....	9
2.2. Flavonóides .....	10
2.2.1. Antocianidinas .....	10
2.2.2. Flavonóis .....	11
2.2.3. Flavonas.....	11
2.2.4. Flavanonas .....	12
2.2.5. Isoflavonas .....	13
2.2.6. Flavanos.....	13
2.3. Taninos.....	15
2.3.1. Taninos Condensados .....	15
2.3.2. Taninos Hidrolisáveis.....	19
2.3.3. Taninos Complexos .....	19
3. Biodisponibilidade .....	20
<b>B. Fisiopatologia</b> .....	<b>21</b>
1. Stress oxidativo .....	21
2. Inflamação .....	23
<b>C. <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf</b> .....	<b>26</b>
1. Caracterização botânica .....	26
2. Usos terapêuticos .....	27
2.1. Etnofarmacologia .....	27

2.2. Bioactividades .....	29
2.3. Toxicidade.....	33
2.3.1. Extracto aquoso.....	33
2.3.2. Extracto hidroalcolico.....	34
2.3.3. Óleo essencial .....	34
3. Fitoquímica .....	36
3.1. Óleo essencial .....	36
3.2. Compostos não-voláteis .....	39
<b>D. Processos Extractivos e Analíticos .....</b>	<b>41</b>
1. Processos extractivos .....	41
2. Métodos Cromatográficos .....	42
2.1. Cromatografia em camada fina (TLC).....	42
2.2. Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) .....	43
3. Métodos Espectrofotométricos.....	44
<b>E. Objectivos .....</b>	<b>47</b>
<b>Capítulo II - Materiais e Métodos.....</b>	<b>48</b>
1. Materiais .....	49
2. Métodos .....	49
2.1. Extracção.....	49
2.2. Fraccionamento do extracto .....	50
2.3. Análise Fitoquímica.....	54
2.3.1. Cromatografia em camada fina (TLC).....	54
2.3.2. HPLC-PDA.....	55
2.3.3. HPLC-PDA-ESI/MS <sup>n</sup> .....	56
2.3.4. Quantificação de fenóis totais.....	58
2.3.5. Quantificação de ácidos hidroxicinâmicos totais .....	58
2.3.6. Quantificação de flavonóides totais .....	58
2.3.7. Quantificação de taninos totais .....	59
2.4. Ensaio de actividade antioxidante .....	59
2.4.1. 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).....	59
2.4.2. “Ferric Reducing Antioxidant Power” (FRAP) .....	60
2.4.3. ABTS (ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico) a pH neutro .....	60
2.4.4. ABTS (ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico) a pH ácido	60

2.5. Actividade anti-inflamatória e citotoxicidade .....	61
2.5.1. Cultura celular .....	61
2.5.2. Determinação da produção de nitritos pelo reagente de Griess .....	61
2.5.3. Determinação da viabilidade celular pelo ensaio MTT .....	62
2.6. Análise estatística.....	62
<b>Capítulo III - Resultados e Discussão.....</b>	<b>63</b>
1. Análise Fitoquímica .....	64
1.1. Identificação dos compostos fenólicos presentes em CcHD .....	64
1.2. Identificação dos compostos fenólicos presentes em $F_{III}+F_{IV}$ .....	68
1.3. Identificação dos compostos fenólicos presentes em $F_A$ .....	75
1.4. Identificação dos compostos fenólicos presentes em $F_B$ .....	81
2. Actividade anti-radicalar .....	90
3. Actividade anti-inflamatória e viabilidade celular .....	93
<b>Capítulo IV - Conclusão.....</b>	<b>100</b>
<b>Capítulo V - Perspectivas Futuras .....</b>	<b>102</b>
<b>Capítulo VI - Bibliografia.....</b>	<b>104</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> – Esquema representativo da biossíntese dos compostos fenólicos. Abreviaturas das enzimas: PAL, fenilalanina amónia liase, 4CL, ácido 4-cumarato coenzima A ligase, PD, piruvato desidrogenase, ACoAC, acetil CoA carboxilase, CHS, chalcona sintase, CHI, chalcona isomerase, FNSII, flavona sintase II, IFS, isoflavona sintase, F3H, 3-flavanona hidroxilase, FLS, flavonol sintase, DFR, 4-dihidroflavonol redutase, ANS, antocianidina sintase, ANR, antocianidina redutase, LDOX, leucoantocianidina desoxigenase, LAR, leucoantocianidina redutase. Ver o texto para identificação dos compostos..	5
<b>Figura 2</b> – Esquema representativo da biossíntese das proantocianidinas. Abreviaturas das enzimas: DFR, 4-dihidroflavonol redutase, ANS, antocianidina sintase, ANR, antocianidina redutase, LAR, leucoantocianidina redutase, PPO, polifenol oxidase. Ver o texto para identificação dos compostos..	6
<b>Figura 3</b> – Possível reacção da leucoantocianidina redutase (LAR) tendo como substrato a 3-desoxi-leucoantocianidina, luteoforol. Ver o texto para identificação dos compostos..	7
<b>Figura 4</b> – Estrutura das antocianidinas. Para $R_1 = H$ , cianidina e para $R_1 = OH$ , delphinidina.	10
<b>Figura 5</b> – Estrutura dos vários flavanos: (A) – flavano, (B) – 3-flavanol, (C) – 4-flavanol, (D) – 3,4-flavanodiol..	14
<b>Figura 6</b> – Estrutura de proantocianidinas diméricas para elucidar os diferentes tipos de ligação interflavânica. (A) – Proantocianidina do tipo A. (B) – Proantocianidina do tipo B com ligação $C_4 - C_8$ . (C) - Proantocianidina do tipo B com ligação $C_4 - C_6$ ..	16
<b>Figura 7</b> – Heteropoliflavanos glicosilados encontrados no Sorgo. $R_1 = OH$ , proluteolinidina; $R_1 = H$ , proapigeninidina; $R_2 = H$ , eriodictiol e $R_2 = glc$ , eriodictiol 5-O- $\beta$ -glucósido..	17
<b>Figura 8</b> – Estrutura dos taninos hidrolisáveis. (A) Galhotaninos e (B) Elagitaninos..	19
<b>Figura 9</b> – <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf.	27
<b>Figura 10</b> – Estrutura dos compostos maioritários presentes no <i>Cymbopogon citratus</i> , sendo (A) Neral, (B) Geranial e (C) Mirceno..	36
<b>Figura 11</b> – Estrutura dos flavonóides maioritários presentes no <i>Cymbopogon citratus</i> .	40
<b>Figura 12</b> – Ciclo catalítico da peroxidase..	46
<b>Figura 13</b> – Esquema ilustrativo do fraccionamento do extracto.	51
<b>Figura 14</b> – Perfil cromatográfico do CcHD obtido no HPLC-PDA Gilson e registado a 320 nm.	65
<b>Figura 15</b> – Espectro UV dos Picos 1-3 (A); Pico 4 (B); Picos 5, 7-II (C); Pico 6 (D)..	65

<b>Figura 16</b> – Padrão de fragmentação dos ésteres hidroxicinâmicos do ácido quínico..	67
<b>Figura 17</b> – Perfil de fragmentação das unidades de açúcar em di-C-glicosilflavonas (A) e O,C-diglicosilflavonas.....	68
<b>Figura 18</b> – Perfil cromatográfico de F <sub>III</sub> +F <sub>IV</sub> obtido no HPLC-PDA Surveyor e registado a 280 nm (A) e 320 nm (B). .....	68
<b>Figura 19</b> – Espectro UV-Vis dos picos 2 e 8. ....	71
<b>Figura 20</b> – Perfil de fragmentação dos dímeros de proantocianidinas tipo A, em modo ião positivo. ....	72
<b>Figura 21</b> – Padrão de fragmentação típico dos dímeros de proantocianidinas do tipo B, em modo ião negativo. RDA = Fissão de Retro-Diels-Alder, QM = Clivagem por mecanismo quinona metide e HRF = Fissão do anel heterociclo, sendo R = H a afzelequina e R = OH a catequina.....	73
<b>Figura 22</b> – Perfil cromatográfico de F <sub>A</sub> obtido no HPLC-PDA Surveyor e registado a 280 nm (A) e 320 nm (B).....	75
<b>Figura 23</b> – Espectro UV-Vis dos picos 8, 11 - 15.....	79
<b>Figura 24</b> – Perfil cromatográfico de F <sub>B</sub> obtido no HPLC-PDA Surveyor e registado a 280 nm (A) e 320 nm (B). ....	81
<b>Figura 25</b> – Exemplo de fragmentação da (Ep)Catequina.....	83
<b>Figura 26</b> – Possível estrutura da aglicona para o heterodímero do pico 8.....	85
<b>Figura 27</b> – Mecanismo proposto para transformação de proantocianidinas do tipo B nas do tipo A.....	89
<b>Figura 28</b> – Possíveis mecanismos de oxidação das proantocianidinas do tipo B. CQA – ácido cafeoilquínico; CQAoq – ácido cafeoilquínico o-quinona; PA – proantocianidina.....	89
<b>Figura 29</b> – Actividade anti-radicalar de CcHD, F <sub>III</sub> +F <sub>IV</sub> , F <sub>A</sub> e F <sub>B</sub> contra os radicais DPPH, FRAP e ABTS (pH neutro e ácido). Os resultados estão expressos em valores TEAC. Cada valor representa a média ± erro padrão de 3 experiências. ....	91
<b>Figura 30</b> – Efeito inibitório de CcHD e fracções F <sub>III</sub> +F <sub>IV</sub> , F <sub>A</sub> e F <sub>B</sub> em macrófagos estimulados pelo LPS. Os resultados mostram a produção de NO, expressa em % de estímulo LPS. Cada valor representa a média ± erro padrão de pelo menos 3 experiências independentes.....	93

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> – Ácidos hidroxibenzóicos mais comuns. ....	8
<b>Tabela 2</b> – Ácidos hidroxicinâmicos mais comuns. ....	9
<b>Tabela 3</b> – Estrutura dos flavonóis, flavonas, flavanonas e isoflavonas. ....	13
<b>Tabela 4</b> – Classificação das proantocianidinas relativamente ao padrão de hidroxilação. ..	16
<b>Tabela 5</b> – Classificação taxonómica do <i>Cymbopogon citratus</i> . ....	26
<b>Tabela 6</b> – Estudos etnofarmacológicos em <i>Cymbopogon citratus</i> . ....	28
<b>Tabela 7</b> – Bioactividades dos diversos extractos de <i>Cymbopogon citratus</i> . ....	31
<b>Tabela 8</b> – Compostos terpénicos presentes no óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> . ....	37
<b>Tabela 9</b> – Compostos não voláteis identificados no <i>Cymbopogon citratus</i> . ....	40
<b>Tabela 10</b> – Condições do fraccionamento em Sephadex®. ....	52
<b>Tabela 11</b> – Condições do fraccionamento em Chromabond® C18. ....	53
<b>Tabela 12</b> – Condições de obtenção das fracções F <sub>A</sub> e F <sub>B</sub> . ....	54
<b>Tabela 13</b> – Condições utilizadas na análise por HPLC-PDA-ESI/MS <sup>n</sup> . ....	57
<b>Tabela 14</b> – Análise fitoquímica de CcHD e Ccl. ....	64
<b>Tabela 15</b> – Compostos fenólicos identificados em CcHD por HPLC-PDA-ESI/MS <sup>n</sup> . ....	66
<b>Tabela 16</b> – Compostos fenólicos identificados em F <sub>III</sub> +F <sub>IV</sub> por HPLC-PDA-ESI/MS <sup>n</sup> . ....	69
<b>Tabela 17</b> – Compostos fenólicos identificados em F <sub>A</sub> por HPLC-PDA-ESI/MS <sup>n</sup> . ....	75
<b>Tabela 18</b> – Compostos fenólicos identificados em F <sub>B</sub> por HPLC-PDA-ESI/MS <sup>n</sup> . ....	81
<b>Tabela 19</b> – Efeito do CcHD e fracções F <sub>III</sub> +F <sub>IV</sub> , F <sub>A</sub> e F <sub>B</sub> na viabilidade celular de macrófagos. ....	94

## Resumo

*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (Cc), mundialmente conhecido como *lemongrass* é usado na medicina tradicional como infusão, no tratamento de patologias inflamatórias, designadamente em gastrites e úlceras pépticas. Mais ainda, o óleo essencial do Cc é usado na agricultura e nas indústrias de cosmética e farmacêutica. No entanto, a solução aquosa resultante da extracção do óleo essencial, por hidrodestilação, é descartada. Assim, o objectivo deste estudo foi fraccionar e caracterizar quimicamente este desperdício, bem como avaliar o seu potencial antioxidante e terapêutico em condições inflamatórias induzidas por um lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) em macrófagos de rato, assim como a ausência de citotoxicidade para concentrações eficazes.

As folhas do Cc foram extraídas por infusão e hidrodestilação. Os extractos obtidos (Ccl e CcHD, respectivamente) foram deslipidificados com *n*-hexano e liofilizados. O CcHD foi fraccionado, do que resultaram três fracções: F<sub>III</sub>+F<sub>IV</sub>, F<sub>A</sub> e F<sub>B</sub>. Um ensaio quantitativo foi realizado em Ccl e CcHD, avaliando-se o teor de fenóis, ácidos hidroxicinâmicos, flavonóides e taninos totais. Registou-se maior concentração de fenóis e taninos totais para o CcHD e de ácidos hidroxicinâmicos e flavonóides para o Ccl.

A caracterização do perfil fenólico do CcHD e das fracções obtidas foi realizada usando HPLC-PDA e HPLC-PDA-ESI/MS<sup>n</sup>, ilustrando perfis distintos. O CcHD evidenciou um perfil rico em ácidos fenólicos e flavonóides, sem que fosse muito perceptível a presença de taninos. A F<sub>III</sub>+F<sub>IV</sub> revelou, na sua maioria, flavonóides, essencialmente glicósidos da luteolina e muito poucos taninos, concretamente, proantocianidinas. As fracções F<sub>A</sub> e F<sub>B</sub> apresentaram um perfil rico em taninos, embora com naturezas químicas diversas. Na F<sub>A</sub> foram predominantemente detectadas proantocianidinas do tipo A, algumas das quais, glicosiladas e poucos heteropoliflavanos glicosilados constituídos por pro-3-desoxi-antocianidinas e uma unidade flavanona. A outra fracção, F<sub>B</sub> evidenciou a presença maioritária de heteropoliflavanos.

A actividade antioxidante de todas as fracções foi superior à do CcHD, sendo a F<sub>B</sub> a mais activa e a F<sub>A</sub> a menos activa. Adicionalmente, todas as fracções demonstraram melhores propriedades anti-inflamatórias, ao inibir a produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos estimulados por um lipopolissacárido. A fracção F<sub>III</sub>+F<sub>IV</sub> foi a mais activa, seguida pela F<sub>A</sub> e pela F<sub>B</sub>. A fracção F<sub>A</sub> também demonstrou propriedades imuno-estimulantes. Mais ainda, nenhuma citotoxicidade foi observada, para as concentrações eficazes testadas, sugerindo a segurança da administração *in vivo* do CcHD e das fracções dele obtidas.

Em conclusão, o presente trabalho revelou, pela primeira vez, a composição fenólica do CcHD, bem como o seu potencial biológico, nomeadamente, propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Assim, estes resultados encorajam o reaproveitamento, da solução aquosa resultante da extracção do óleo essencial por hidrodestilação das folhas de *Cymbopogon citratus*, como fonte de compostos seguros e bioactivos, que podem conferir um valor adicional a esta planta. Além disso, o processo conducente a este extracto permite obter maiores concentrações de taninos e, eventualmente induzir transformações químicas que constituem um desafio para estudos futuros.

**Palavras-chave:** erva-príncipe; *Cymbopogon citratus*; desperdício industrial; polifenóis; antioxidante; anti-inflamatório.



## Abstract

*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (Cc, also known as lemongrass) is used in traditional medicine, as infusion of its leaves, to treat inflammatory, mainly gastritis and peptic ulcers. Additionally, Cc essential oil is used by cosmetics, agriculture and pharmaceutical industry, but the waste aqueous solution resulting from the essential oil extraction by hydrodistillation is discarded. Therefore, the aim of this study was to fractionate and characterize the chemical profile of this waste, and to establish its therapeutic potential in inflammatory conditions induced by bacterial lipopolysaccharide (LPS), as well as its safety profile in murine macrophages, at effective concentrations.

Dry aerial parts of Cc were extracted by infusion and by hydrodistillation. The two aqueous extracts (Ccl and CcHD, respectively) were washed with *n*-hexane and freeze-dried. CcHD was then fractionated and three fractions were obtained:  $F_{III}+F_{IV}$ ,  $F_A$  and  $F_B$ . Quantitative assays were performed in Ccl and CcHD to evaluate the total phenols, total hydroxycinnamic acids, total flavonoids and total tannins. It was observed a higher concentration of total phenols and tannins to the CcHD and hydroxycinnamic acids and flavonoids for the Ccl.

The chemical characterization of CcHD and its fractions was achieved using both HPLC-PDA and HPLC/PDA/ESI-MS<sup>n</sup>, presenting distinct profiles. CcHD exhibited the presence of phenolic acids, flavonoids, without being highly perceptible the presence of tannins.  $F_{III}+F_{IV}$  presented mostly flavonoids, mainly glycosides of luteolin and very few tannins, in particular, proanthocyanidins.  $F_A$  and  $F_B$  showed a tannin-rich profile, although with different chemical characteristics.  $F_A$  showed predominantly A-type proanthocyanidins, some of which are glycosylated and a few glycosylated heteropolyflavan consisting of pro-anthocyanidins 3-deoxy-unit and a flavanone. The other fraction,  $F_B$  revealed the presence of heteropolyflavan as majority compounds.

The antioxidant activity of all fractions was higher than CcHD, being  $F_B$  the most active and  $F_A$  the less active. Additionally, all fractions showed greater anti-inflammatory properties than CcHD by reducing nitric oxide (NO) production in lipopolysaccharide-stimulated macrophages.  $F_{III}+F_{IV}$  was the most active fraction, followed by  $F_A$  and  $F_B$ .  $F_A$  also showed immunostimulatory properties. Furthermore, no cytotoxicity was observed, suggesting the *in vivo* safety of CcHD and its fractions.

In conclusion, the present work disclosure, for the first time, the CcHD chemical composition and its biological activities, namely antioxidant and anti-inflammatory properties. Thus, these results encourage the recovering of the aqueous solution resulting from the extraction of the essential oil by hydrodistillation of *Cymbopogon citratus* leaves, as a source of safe and bioactive compounds which may give additional value to this plant. Furthermore, the process leading to this statement allows to obtain higher concentrations of tannins and eventually induce chemical transformations that are a challenge for future studies.

**Keywords:** lemongrass; *Cymbopogon citratus*; industrial waste; polyphenols; antioxidant; anti-inflammatory.

## Abreviaturas

- 4CL – ácido 4-cumarato coenzima A ligase
- ABTS – ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico
- ABTS<sup>•+</sup> – radical ABTS
- Acetil CoA – acetil Coenzima A
- ACoAC – acetil CoA carboxilase
- ANR – antocianidina reductase
- ANS – antocianidina sintase
- AP-I – factor de transcrição proteína activadora I
- ATP – trifosfato de adenosina
- BFF – fissão de formação benzofurano.
- Cc – *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf
- CcHD – extracto aquoso resultante da hidrodestilação de *Cymbopogon citratus*
- Ccl – infuso do *Cymbopogon citratus*
- CHI – chalcona isomerase
- CHS – chalcona sintetase
- COX – ciclooxigenase
- DFR – 4-dihidroflavonol reductase
- DMACA – 4-dimetilaminocinamaldeído
- DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium
- DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
- eNOS – óxido nítrico-sintase endotelial
- E-selectina – selectina celular endotelial
- ESI – ionização por electrospray
- F<sub>III</sub>+F<sub>IV</sub> – fracção F<sub>III</sub>+F<sub>IV</sub> resultante do fraccionamento por cromatografia flash, numa coluna de fase reversa (C18)
- F3H – 3-flavanona hidroxilase
- F<sub>A</sub> – fracção F<sub>A</sub> resultante do fraccionamento por cromatografia flash e sub-fraccionamento em coluna de Sephadex LH20 e fase reversa (C18)
- F<sub>B</sub> – fracção F<sub>B</sub> resultante do fraccionamento por cromatografia flash e sub-fraccionamento em coluna de Sephadex LH20 e fase reversa (C18)
- FBS – soro fetal bovino
- FeCl<sub>3</sub>•6H<sub>2</sub>O – tricloreto de ferro hexa-hidratado
- Fe<sup>III</sup>-TPTZ – complexo tripiridil-triazina férrico

Fe<sup>II</sup>-TPTZ – complexo tripiridil-triazina ferroso  
FLS – flavonol sintase  
FNSII – flavona sintase II  
FRAP – ferric reducing antioxidant power  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogénio  
HPLC – cromatografia líquida de alta resolução  
HRF – fissão do anel heterociclo  
IC<sub>50</sub> – concentração inibitória a 50 %  
ICAM – molécula de adesão intercelular  
IFN- $\gamma$  – interferão gama  
IFS – isoflavona sintase  
IL – interleucina  
iNOS – óxido nítrico-sintase induzível  
I $\kappa$ B – inibidor  $\kappa$ B  
LAR – leucoantocianidina redutase  
LC<sub>50</sub> – concentração letal a 50%  
LD<sub>50</sub> – dose letal a 50%  
LDH – lactato desidrogenase  
LDL – lipoproteína de baixa densidade  
LDOX – leucoantocianidina desoxigenase  
m – massa  
MAPKs – quinases de proteínas activadas por mitogénios  
MS – espectrometria de massa  
MSn – espectrometria de massa sequencial  
Neu/Peg – 1% de ácido difenilbórico 2-aminoetil ester em metanol / 5% de polietilenoglicol-4000 em etanol  
NF- $\kappa$ B – factor nuclear  $\kappa$ B  
nNOS – óxido nítrico-sintase neuronal  
NO – óxido nítrico  
NOAEL – nenhum efeito adverso observado  
O<sup>2-</sup> – anião superóxido  
OH<sup>\*</sup> – radical hidroxilo  
PA – proantocianidina  
PAL – fenilalanina amónia liase

PBS – tampão fosfato-salino  
PD – piruvato desidrogenase  
PGE<sub>2</sub> – prostaglandinas E<sub>2</sub>  
PI3K/Akt – fosfatidilinositol-3-quinase/serina-treonina quinase  
PPO – polifenol oxidase  
QM – clivagem via quinona-metídio  
RDA – Retro-Diels-Alder  
Reagente de Griess – dicloridrato de N-(1-naftil)etilenodiamina e sulfanilamida  
Rf – factor de retenção  
ROS – espécies reactivas de oxigénio  
Sh – do inglês *shoulder*  
TEAC – capacidade antioxidante equivalente ao trolox numa solução de 1 mM  
TLC – cromatografia em camada fina  
TNF- $\alpha$  – factor de necrose tumoral  $\alpha$   
TPTZ – 2,4,6-tripiridil-S-triazino  
t<sub>r</sub> – tempo de retenção  
TROLOX – 6-hidroxi-2-5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico  
u.m.a – unidade de massa atómica  
Uv-Vis – Ultravioleta-Visível  
VCAM – molécula de adesão celular vascular  
z – carga



## Capítulo I

---

### Introdução

## A. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são um dos grupos mais numerosos e mais disseminados no reino *Plantae*, estando distribuídos em alimentos tais como frutas, vegetais, frutos secos, sementes, flores e também em cascas de árvores (Crozier, Jaganath & Clifford, 2009; Nichols & Katiyar, 2010). Quimicamente podem ser definidos como substâncias que possuem um anel aromático, com um ou mais grupos hidroxilo directamente ligados, incluindo também os seus derivados funcionais (Shahidi & Naczki, 2004; Vermerris & Nicholson, 2006). Os polifenóis possuem mais de 8000 variantes estruturais e podem variar de uma simples molécula, como os ácidos fenólicos, a compostos com alto grau de polimerização, como os taninos condensados (Rahman, Biswas & Kirkham, 2006).

Como metabolitos secundários das plantas, os compostos fenólicos têm um papel importante na protecção desta contra agentes patogénicos, predadores e radiações ultravioleta (Manach *et al.*, 2004; Ross & Kasum, 2002). Possuem ainda um lugar de destaque na reprodução uma vez que atraem insectos polinizadores e animais dispersores de sementes e, actuam também como moléculas de sinalização nas interações entre plantas (Fraga, 2010).

Ao contrário do que é referido para as vitaminas, os compostos fenólicos não são essenciais para um bem-estar a curto prazo. No entanto, surgem cada vez mais evidências de que o seu consumo é benéfico na prevenção de doenças (Fraga, 2010). Estudos epidemiológicos demonstraram que a dieta mediterrânea (rica em azeite extra virgem) contribui para uma taxa mais baixa de doenças coronárias do que a dieta consumida no Norte da Europa e da América (Santangelo *et al.*, 2007). Também o “French paradox” é alusivo a esta situação. Neste caso, a população francesa demonstrou uma taxa de mortalidade coronária muito semelhante à da população chinesa e japonesa. Contudo, se se analisar a dieta de ambas as populações, verifica-se que, na França a alimentação é rica em gorduras saturadas e colesterol, o que não se observa na população asiática. A diferença parece dever-se ao consumo de vinho tinto, que é muito superior em França, sugerindo-se assim que a prevenção das doenças cardiovasculares é resultado do consumo desta bebida rica em polifenóis (Vermerris & Nicholson, 2006).

Para além da prevenção das doenças cardiovasculares, existem evidências que associam o consumo de polifenóis com a fotoprotecção da pele e prevenção de patologias como o cancro, a diabetes, bem como doenças inflamatórias e neurodegenerativas (Afaq & Katiyar, 2011; Heim *et al.*, 2012; Nichols & Katiyar, 2010; Owuor & Kong, 2002; Scapagnini *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2008; Yoon & Baek, 2005).



## I. Biossíntese

A biossíntese dos compostos fenólicos é um processo complexo que envolve várias vias, tais como as vias do ácido chiquímico, dos fenilpropanóides e do ácido malónico (Crozier, Jaganath & Clifford, 2009), e está representada na Figura I.

A biossíntese destes fitoquímicos inicia-se na fotossíntese com o metabolismo dos hidratos de carbono. É deste processo que se obtêm os precursores iniciais fosfoenolpiruvato (1) e eritrose 4-fosfato (2), oriundos da glicólise e da via das pentoses fosfato, respectivamente. Os dois precursores entram na via do ácido chiquímico e sofrem uma série de reacções por forma a dar origem ao ácido chiquímico (3). A partir de um dos intermediários desta via de síntese é obtido o ácido gálgico (4), precursor dos galhotaninos e dos elagitaninos. A via do ácido chiquímico resulta então na síntese do corismato (5), precursor de aminoácidos aromáticos como a fenilalanina (6), a tirosina e o triptofano (Vermeris & Nicholson, 2006).

Com a fenilalanina inicia-se a via dos fenilpropanóides. A desaminação deste aminoácido pela fenilalanina amónia liase (PAL) dá origem ao ácido cinâmico (7), que por sua vez é hidroxilado, obtendo-se o ácido *p*-cumárico (8). Este pode sofrer uma série de reacções sequenciais formando-se assim diversos ácidos fenólicos, tais como o ácido cafeico (9). Por outro lado, o ácido *p*-cumárico (8) pode também ser sujeito à acção da enzima ácido 4-cumarato coenzima A ligase (4CL), obtendo-se como produto final a *p*-cumaroil CoA (10) (Fraga, 2010).

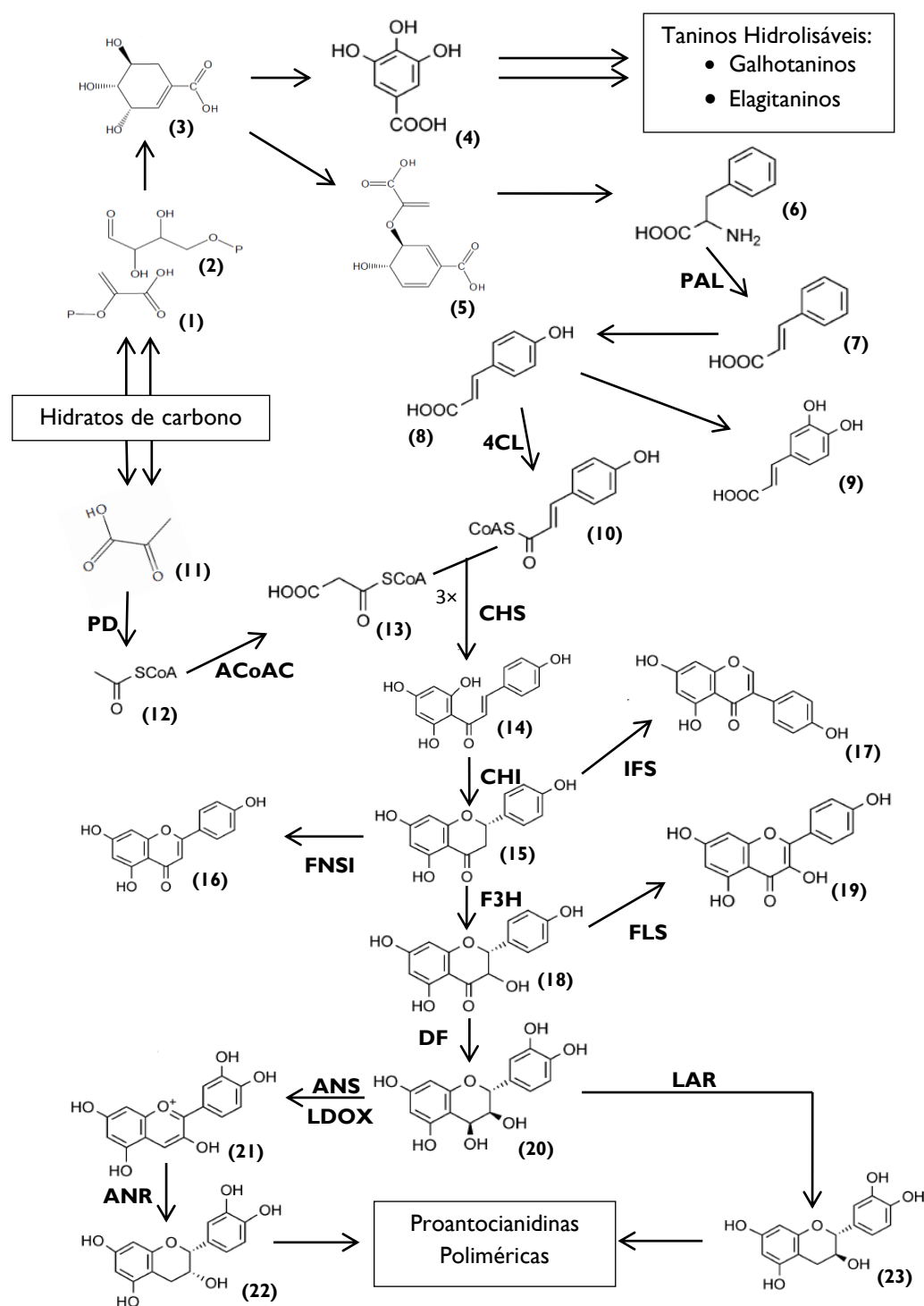
Também a via do ácido malónico é iniciada com o metabolismo dos hidratos de carbono. Assim, através da glicólise obtém-se como produto final o piruvato (11). Este, por acção da piruvato desidrogenase (PD) dá origem à acetil coenzima A (acetil CoA) (12), que por sua vez sofre uma carboxilação pela acção da acetil CoA carboxilase (ACoAC) dando origem à malonil-CoA (13), um importante precursor na biossíntese dos flavonóides (Heldt & Heldt, 2005).

A estrutura base dos flavonóides é formada através da interacção de duas vias biossintéticas separadas. Enquanto o anel aromático A é obtido a partir de três moléculas de malonil-CoA (13) (via do ácido malónico), a estrutura intermédia e o anel aromático B são sintetizados a partir da *p*-cumaroil CoA (10) (via dos fenilpropanóides) (Crozier, Jaganath & Clifford, 2009). A biossíntese dos flavonóides inicia-se então com a condensação destas estruturas, catalisada pela enzima chalcona sintetase (CHS), originando-se o produto 4,2',4',6' tetrahidroxichalcona (14). A chalcona obtida dá origem à flavanona naringenina (15) (estrutura C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), desta vez através da acção da enzima chalcona isomerase (CHI). É de

salientar que a enzima CHS pode biossintetizar outros derivados da chalcona, formando-se assim diferentes flavanonas. Devido à sua estrutura química, as flavanonas são importantes intermediários na biossíntese de outros compostos fenólicos, de entre os quais, flavonas, flavonóis e antocianidinas (Vermerris & Nicholson, 2006).

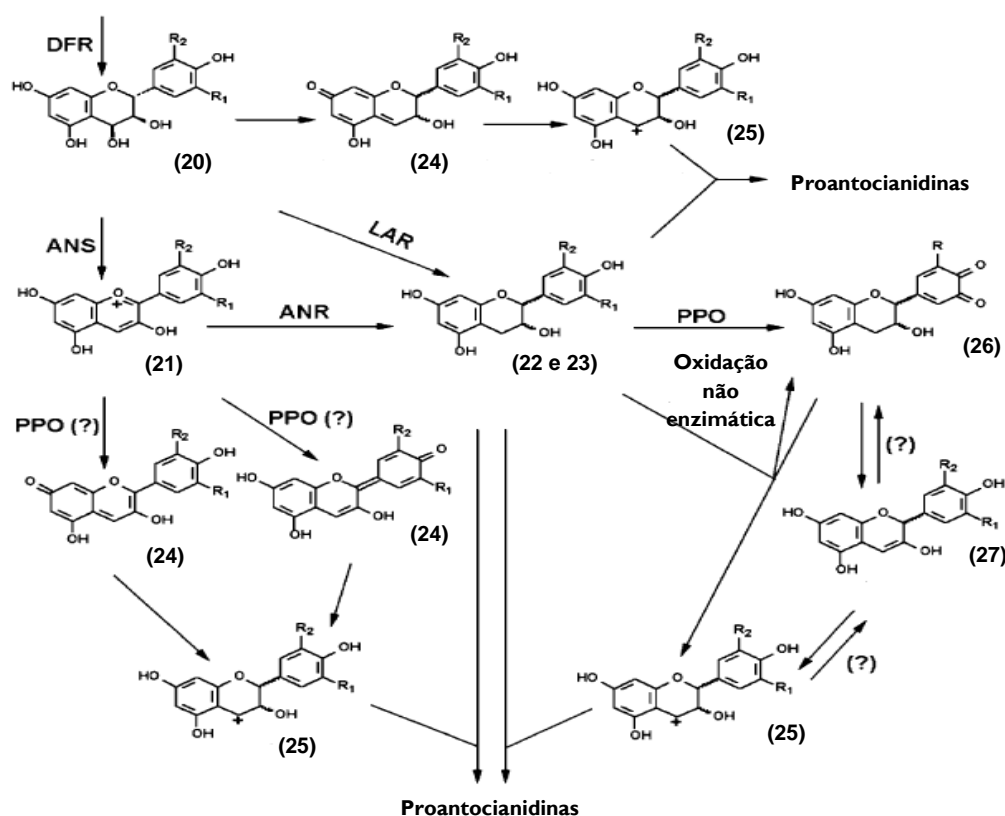
As flavanonas podem ser convertidas em flavonas (**16**) e isoflavonas (**17**), através da acção das enzimas flavona sintase II (FNSII) e isoflavona sintase (IFS), respectivamente. Podem ainda ser transformadas em dihidroflavonóis (**18**) na presença da enzima 3-flavanona hidroxilase (F3H). Por sua vez, os dihidroflavonóis (**18**) podem ser convertidos em flavonóis (**19**) pela enzima flavonol sintase (FLS). Para além de darem origem aos flavonóis (**19**), os dihidroflavonóis (**18**) podem ser reduzidos pela acção da enzima 4-dihidroflavonol redutase (DFR), dando origem às leucoantocianidinas (**20**), sendo estas importantes precursores na síntese de antocianidinas e proantocianidinas. As leucoantocianidinas (**20**) podem então ser oxidadas a antocianidinas (**21**), pela acção das enzimas antocianidina sintase (ANS) ou leucoantocianidina desoxigenase (LDOX).

No que diz respeito à biossíntese das proantocianidinas, estudos revelaram que tanto antocianidinas (**21**) como leucoantocianidinas (**20**) podem ser consideradas precursores para a síntese dos monómeros das proantocianidinas, sendo estes geralmente 3-flavanóis. As antocianidinas (**21**) são convertidas em 2,3-*cis*-3-flavanol (**22**), pela enzima antocianidina redutase (ANR), enquanto as leucoantocianidinas (**20**) são transformadas em 2,3-*trans*-3-flavanol (**23**) através da acção da enzima leucoantocianidina redutase (LAR). Ambos os produtos podem funcionar como iniciadores ou extensores dos taninos condensados.



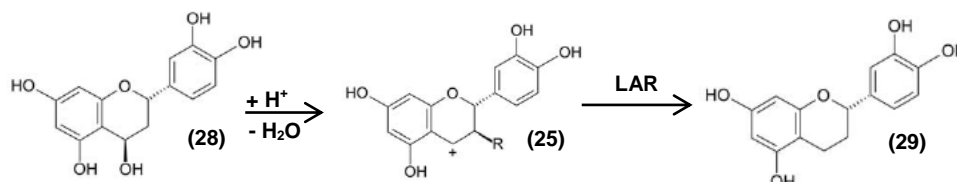
**Figura I** – Esquema representativo da biossíntese dos compostos fenólicos. Abreviaturas das enzimas: PAL, fenilalanina amônia liase, 4CL, ácido 4-cumarato coenzima A ligase, PD, piruvato desidrogenase, ACoAC, acetil CoA carboxilase, CHS, chalcona sintase, CHI, chalcona isomerase, FNSII, flavona sintase II, IFS, isoflavona sintase, F3H, 3-flavanona hidroxilase, FLS, flavonol sintase, DFR, 4-dihidroflavonol redutase, ANS, antocianidina sintase, ANR, antocianidina redutase, LDOX, leucoantocianidina desoxigenase, LAR, leucoantocianidina redutase. Ver o texto para identificação dos compostos. Adaptado de Crozier, Jagannath & Clifford (2009) e Vermerris & Nicholson (2006).

Assim, as quinonas metide (**24**) ou carbocatiões (**25**) derivados de leucoantocianidinas (**20**) têm sido consideradas como precursores das unidades de extensão das proantocianidinas. Também as antocianidinas (**21**), que sob condições ácidas estão presentes maioritariamente sob a forma de íão flavílio, podem sob acção da enzima polifenol oxidase (PPO), ser convertidas a quinona metide (**24**) e de seguida a carbocatiões (**25**). Já os 3-favanóis (**22** e **23**) podem ser convertidos a *o*-quinonas (**26**) pela acção da mesma enzima. As *o*-quinonas (**26**) são então transformadas em carbocatiões (**25**), via 3-flaveno-3-óis (**27**), ou reduzidas a carbocatiões através de oxidação não enzimática. Assim, as unidades de extensão surgem da condensação de um eletrófilo, o carbocátion derivado de leucoantocianidinas (**20**), antocianidinas (**21**) ou 3-flavanóis (**22** e **23**), com a posição nucleofílica 8 ou 6 da unidade inicial (Dixon, Xie & Sharma, 2005; Xie & Dixon, 2005). A Figura 2 ilustra os possíveis mecanismos da biossíntese das proantocianidinas.



**Figura 2** – Esquema representativo da biossíntese das proantocianidinas. Abreviaturas das enzimas: DFR, 4-dihidroflavonol redutase, ANS, antocianidina sintase, ANR, antocianidina redutase, LAR, leucoantocianidina redutase, PPO, polifenol oxidase. Ver o texto para identificação dos compostos. Adaptado de Dixon, Xie & Sharma (2005).

Contudo, apesar de a maioria dos taninos condensados serem constituídos por monómeros de 3-flavanol, existem exceções como as pro-3-desoxi-antocianidinas, cujos monómeros não possuem o grupo hidroxilo na posição 3. Pfeiffer *et al.* (2006) demonstrou que, apesar de não existir o grupo hidroxilo na posição 3, a enzima LAR reconhece a 3-desoxi-leucoantocianidina, luteoforol (**28**), como substrato e tem a capacidade de reduzir a carbocação (**25**), sendo posteriormente convertida em 3-desoxi-catequina, proluteolinidina (**29**), como é possível observar na Figura 3.



**Figura 3** – Possível reacção da leucoantocianidina redutase (LAR) tendo como substrato a 3-desoxi-leucoantocianidina, luteoforol. Ver o texto para identificação dos compostos. Adaptado de Pfeiffer *et al.* (2006).

Na natureza, existe uma grande variedade de compostos fenólicos que se encontram sob a forma de heterósidos. A glicosilação melhora a solubilidade e pode mesmo ser essencial no transporte transmembranar e no armazenamento vacuolar, pelas plantas (Fraga, 2010). As enzimas responsáveis por estas modificações pertencem à classe das glicosiltransferases e transferem o nucleótido-difosfato de açúcares activados para o oxigénio do grupo hidroxilo, formando os *O*-heterósidos, ou para átomos de carbono, formando os *C*-heterósidos. As enzimas mais comuns na glicosilação dos compostos fenólicos são a UDP-glucose, UDP-galactose e a UDP-ramnose (Vogt & Jones, 2000).

## 2. Classificação, fontes e actividades biológicas

Os compostos fenólicos encontram-se distribuídos um pouco por todo o reino *Plantae* e podem ser encontrados em cereais, legumes, frutos secos, plantas oleaginosas, frutos e vegetais. Podem ainda ser encontrados em bebidas diariamente consumidas como o chá, a cerveja, o vinho e o chocolate. Na natureza apresentam uma infinidade de estruturas diferentes organizadas em várias classes, sendo das mais importantes os ácidos fenólicos, os flavonóides e os taninos (Shahidi & Naczk, 2004).

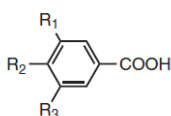
## 2.1. Ácidos fenólicos

Podem distinguir-se duas classes de ácidos fenólicos: derivados do ácido benzóico e derivados do ácido cinâmico.

### 2.1.1. Ácidos hidroxibenzóicos

Os ácidos hidroxibenzóicos caracterizam-se pela presença de um grupo carboxilo ligado a um fenol (Vermerris & Nicholson, 2006). Na Tabela I estão representados os compostos mais frequentemente encontrados desta subclasse de compostos fenólicos. É de salientar que o teor destes compostos nas plantas consumidas pelos humanos é normalmente bastante baixo. No entanto estes podem ser encontrados numa concentração considerável em amoras, framboesas, rabanetes pretos e cebolas. Também o chá é uma boa fonte destes compostos (D'Archivio *et al.*, 2007; Manach *et al.*, 2004).

**Tabela I** – Ácidos hidroxibenzóicos mais comuns. Adaptado de Shahidi & Naczk (2004).



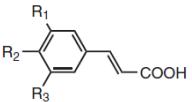
Ácido	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<i>p</i> -Hidroxibenzóico	H	OH	H
Protocatéquico	OH	OH	H
Vanílico	OCH <sub>3</sub>	OH	H
Siríngico	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
Gálhico	OH	OH	OH

Uma vez que os ácidos hidroxibenzóicos se encontram em poucas plantas comestíveis, estes não têm sido alvo de grande interesse. No entanto, estudos referem que o ácido gálhico possui actividade antioxidante e anticancerígena, enquanto o ácido protocatéquico possui propriedades anti-inflamatórias. Já o ácido vanílico é anti-helmíntico e o ácido siríngico exibe um carácter antibacteriano e hepatoprotector (Khadem & Marles, 2010). É ainda necessário referir o ácido salicílico. Embora tenha sido isolado da casca do salgueiro e não de uma planta comestível, possui propriedades anti-inflamatórias, antipiréticas e analgésicas, sendo o seu éster acético o princípio activo da Aspirina<sup>®</sup> (Shahidi & Naczk, 2004).

### 2.1.2. Ácidos hidroxicinâmicos

Os ácidos hidroxicinâmicos diferem dos anteriores na substituição do anel fenólico. Neste caso, a função carboxilo está inserida numa cadeia tricarbonada que por sua vez está ligada ao fenol, formando-se assim uma estrutura base C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> (Vermerris & Nicholson, 2006). Os derivados do ácido cinâmico são bastante comuns na natureza embora surjam maioritariamente ligados a glicósidos ou ésteres dos ácidos quínico, chiquímico ou tartárico. Por exemplo, o ácido cafeico e o ácido quínico conjugam-se e formam o ácido clorogénico que está presente em grande concentração na natureza. Os ácidos hidroxicinâmicos estão difundidos por quase todas as plantas, dando-se especial atenção aos frutos e ao café (Fraga, 2010). Na Tabela 2 estão representados os compostos mais frequentemente encontrados nesta subclasse de compostos fenólicos.

**Tabela 2** – Ácidos hidroxicinâmicos mais comuns. Adaptado de Shahidi & Naczk (2004).



Ácido	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
p-Cumárico	H	OH	H
Cafeico	OH	OH	H
Ferúlico	OCH <sub>3</sub>	OH	H
Sinápico	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>

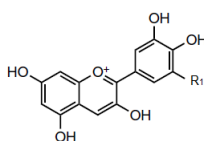
No que diz respeito às actividades biológicas, o ácido cafeico e os ácidos clorogénicos tomam um lugar de destaque. Vários estudos revelam que estes compostos possuem actividade antioxidante e inibem a mutagénese e carcinogénese produzida por compostos N-nitrosados. Estudos epidemiológicos sugerem ainda uma relação entre o consumo de café e a diminuição dos casos de cancro do colón, talvez devido à alta concentração do ácido clorogénico (Tapiero *et al.*, 2002). Estes compostos estão também associados à diminuição da acumulação de óxido nítrico (NO), muito provavelmente por impedirem a degradação do factor nuclear IκBα e, conseqüentemente, a activação do proteossoma e do factor nuclear NF-κB (Búfalo *et al.*, 2013; Francisco *et al.*, 2013; Natarajan *et al.*, 1996). Adicionalmente é referido o potencial do ácido cafeico na prevenção da aterosclerose. Este, através da inibição da activação do NF-κB, bloqueia a adesão dos monócitos ao endotélio e a consequente expressão das células de adesão celular (VCAM, ICAM e E-selectina) (Moon *et al.*, 2009).

## 2.2. Flavonóides

Os flavonóides são uma classe de compostos fenólicos muito disseminada na natureza, estando identificadas em plantas cerca de 8000 estruturas (Lago *et al.*, 2014). Estes possuem uma estrutura comum,  $C_6-C_3-C_6$ , constituída por dois anéis aromáticos (A e B) que estão ligados por uma cadeia de três carbonos, que ao ciclizar forma um heterociclo oxigenado (anel C). O estado de oxidação e de insaturação/saturação do anel pirano (anel C) divide os flavonóides em diferentes subclasses: antocianidinas, flavonóis, flavanonas, flavonas e flavanóis (Manach *et al.*, 2004; Middleton, Kandaswami & Theoharides, 2000).

### 2.2.1. Antocianidinas

Ao contrário dos outros flavonóides, o heterociclo das antocianidinas é um catião pirílio (Vermerris & Nicholson, 2006). Na dieta humana, as antocianidinas podem ser encontradas no vinho tinto, em certas variedades de cereais, em algumas folhas e raízes de vegetais e sobretudo em frutos. Estes são os compostos responsáveis pela maioria das cores rosa, vermelho, azul ou roxo, dependendo do pH a que se encontram. Em geral, estes pigmentos estão sob a forma de heterósido uma vez que a glicosilação os torna mais estáveis (D'Archivio *et al.*, 2007; Manach *et al.*, 2004). Os compostos mais frequentemente encontrados possuem um grupo hidroxilo em  $C_3$  e estão representados na Figura 4. No entanto, existem outros menos comuns que não possuem esse grupo, e são por isso denominados por 3-desoxi-antocianidinas. Por serem mais hidrofóbicas, estão sujeitas a menos ataques e por isso não necessitam de glicosilação para se tornarem mais estáveis. Têm também menos tendência a perder cor em condições menos acídicas (Awika, 2011).



**Figura 4** – Estrutura das antocianidinas. Para  $R_1 = H$ , cianidina e para  $R_1 = OH$ , delphinidina. Adaptado de Fraga (2010).

No que diz respeito às bioatividades das antocianidinas, o consumo destes compostos tem sido inversamente relacionado com o risco de enfarte do miocárdio. Estudos em modelos de asma e células do epitélio dos pulmões revelaram ainda que estes compostos possuem propriedades antialérgicas (Stevenson & Hurst, 2007). Por sua vez, a cianidina e a delphinidina inibem a proliferação de células cancerígenas. Esta classe de compostos possui ainda um papel de destaque ao nível da inflamação uma vez que diminuem a expressão do



factor de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), da interleucina 8 (IL-8), da ICAM-1 (Youdim *et al.*, 2002) e impedem a activação do NF- $\kappa$ B (Prasad *et al.*, 2010; Santangelo *et al.*, 2007). Por outro lado, as 3-desoxi-antocianidinas luteolinidina e apigeninidina, apresentam significativas capacidades anti-proliferativas, exibindo um potencial superior ao dos seus análogos cianidina e pelargonidina (Awika, 2011; Devi, Saravanakumar & Mohandas, 2011; Yang, Browning & Awika, 2009).

### 2.2.2. Flavonóis

Os flavonóis possuem uma ligação dupla no anel pirano, entre C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub>, a função cetona na posição C<sub>4</sub> e um grupo hidroxilo na posição C<sub>3</sub>. São os flavonóides mais abundantes na natureza podendo ser encontrados em grande quantidade em cebolas, couves, bróculos, cerejas, bagas e também no chá (Ross & Kasum, 2002; Shahidi & Naczki, 2004). Os compostos mais frequentemente encontrados podem ser observados na Tabela 3.

A actividade anti-inflamatória destes compostos, em particular da quercetina e do canferol foi extensamente estudada. Estes flavonóis demonstraram inibir a expressão do NF- $\kappa$ B, do factor de transcrição AP-1, de quinases de proteínas activadas por mitogénios (MAPKs) e da via de sinalização fosfatidilinositol-3-quinase/serina-treonina quinase (PI3K/Akt). Estes dois compostos afectam também a expressão das enzimas óxido nítrico-sintase indutível (iNOS) e ciclooxigenase 2 (COX-2) bem como a produção de VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina. Na presença destes flavonóis observou-se ainda uma diminuição na produção de NO, prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>), TNF- $\alpha$ , interleucinas IL-1 $\beta$  e IL6 e também do interferão gama (IFN- $\gamma$ ) (Comalada *et al.*, 2006; González-Gallego *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2004; Prasad *et al.*, 2010; Santangelo *et al.*, 2007). No que diz respeito ao seu potencial anticancerígeno, a quercetina e o canferol apresentaram a capacidade de induzir apoptose e diminuir a proliferação das células cancerígenas e a angiogénese (Benavente-García & Castillo, 2008; Prasad *et al.*, 2010). Para além destas actividades, os flavonóis demonstraram ainda diminuir os danos no ADN, causado pelo stress oxidativo e também um forte potencial como inibidores da agregação plaquetária (Nijveldt *et al.*, 2001; Stevenson & Hurst, 2007).

### 2.2.3. Flavonas

As flavonas, tal como os flavonóis, possuem uma ligação dupla no anel pirano, entre C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub> e a função cetona na posição C<sub>4</sub>, não possuindo, porém, o hidroxilo em C<sub>3</sub>. São menos frequentes que os flavonóis, podendo ser encontrados em frutas e vegetais (D'Archivio *et al.*,

2007; Manach *et al.*, 2004). Os compostos mais frequentemente encontrados podem ser observados na Tabela 3.

Também nas flavonas a actividade anti-inflamatória foi bastante estudada. Estudos demonstram que a luteolina e a apigenina inibem a expressão do NF- $\kappa$ B, AP-1, MAPKs, iNOS, COX-2, ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina. Foi também observado uma diminuição na produção de TNF- $\alpha$ , NO, PGE<sub>2</sub> e das IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 (Chen *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2004; Gerritsen *et al.*, 1995; González-Gallego, Sánchez-Campos & Tuñón, 2007; Hu, 2004; Kim *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2006; Kotanidou *et al.*, 2002; Liang *et al.*, 1999; Shimoi *et al.*, 2000; Xagorari, Roussos & Papapetropoulos, 2002; Yano *et al.*, 2007). Tal como o observado para os flavonóis, as flavonas também induziram a apoptose e diminuíram a angiogénese e a proliferação celular, em células cancerígenas (Chen *et al.*, 2005; Nijveldt *et al.*, 2001; Yao *et al.*, 2011). Como antioxidantes, estes compostos diminuem a oxidação do colesterol LDL e aumentam a expressão das enzimas catalase e superóxido dismutase (Orrego, Leiva & Cheel, 2009; Stevenson & Hurst, 2007). Podem ainda ser considerados antialérgicos já que diminuem a produção da imunoglobulina E (IgE) (Yano *et al.*, 2007). Para além do referido, a apigenina e luteolina diminuem a pressão sanguínea e os níveis de glucose no sangue, demonstrando ainda propriedades anti-trombóticas e neuroprotectivas (Benavente-García & Castillo, 2008; López-Lázaro, 2009).

#### 2.2.4. Flavanonas

O heterociclo das flavanonas também possui o grupo cetona na posição C<sub>4</sub> contudo, ao contrário das flavonas e dos flavonóis não possui a ligação dupla entre C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub> (Vermerris & Nicholson, 2006). Esta subclasse de compostos é maioritariamente encontrada em citrinos, embora possa também estar presente em tomates e algumas plantas aromáticas, como é o caso da menta (Manach *et al.*, 2004). Os compostos mais usualmente encontrados podem ser observados na Tabela 3.

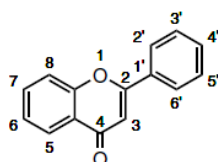
A actividade anti-inflamatória das flavanonas não foi tão abordada como das classes anteriormente referidas. No entanto, há estudos que referem que a naringenina e a hesperidina diminuem a produção de NO, bem como a expressão da iNOS, NF- $\kappa$ B e MAPKs (Prasad *et al.*, 2010; Santangelo *et al.*, 2007). Como anticancerígenos estes compostos induzem a apoptose e possuem actividade anti-proliferativa e anti-angiogénica (Benavente-García & Castillo, 2008; Galati & O'Brien, 2004; Ross & Kasum, 2002). Para além destas actividades, as flavanonas estão também associadas à manutenção da homeostase do colesterol (Benavente-García & Castillo, 2008).

### 2.2.5. Isoflavonas

As isoflavonas possuem as mesmas características estruturais que as flavonas, contudo, ao contrário dos outros flavonóides, as isoflavonas caracterizam-se por possuírem o anel aromático B ligado na posição C<sub>3</sub> e não em C<sub>2</sub> (Fraga, 2010). Estes compostos são encontrados sobretudo em legumes e na soja. Os compostos mais conhecidos podem ser observados na Tabela 3.

Em termos inflamatórios, a genisteína inibe a expressão da iNOS e da COX-2, bem como a produção de NO, PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  (González-Gallego *et al.*, 2010; Valles *et al.*, 2010). Além da actividade anti-inflamatória, as isoflavonas possuem também uma acção benéfica na prevenção de doenças cardiovasculares, e são reconhecidas principalmente como fitoestrogénios (Fraga, 2010).

**Tabela 3** – Estrutura dos flavonóis, flavonas, flavanonas e isoflavonas. Adaptado de Shahidi & Naczki (2004)



Classe	Nome	Substituição
Flavonóis	Canferol	3, 5, 7, 4' - OH
	Quercetina	3, 5, 7, 3', 4' - OH
Flavonas	Apigenina	5, 7, 4' - OH
	Luteolina	5, 7, 3', 4' - OH
Flavanonas <sup>(a)</sup>	Naringenina	5, 7, 4' - OH
	Eriodictiol	5, 7, 3', 4' - OH
	Hesperetina	5, 7, 3' - OH, 4' OCH <sub>3</sub>
Isoflavonas <sup>(b)</sup>	Daidzeína	7, 4' - OH
	Genisteína	5, 7, 4' - OH

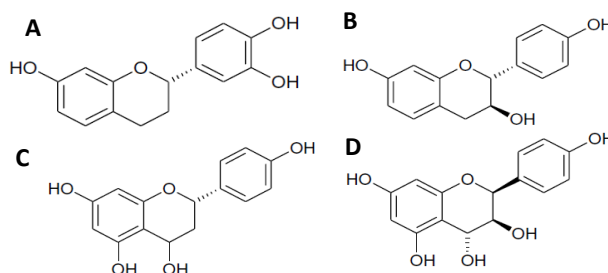
<sup>(a)</sup> Nas flavanonas a ligação dupla entre C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub> é inexistente.

<sup>(b)</sup> Nas isoflavonas a ligação do anel B ao heterociclo dá-se em C<sub>3</sub> e não em C<sub>2</sub>.

### 2.2.6. Flavanos

Os flavanos possuem um destaque especial uma vez que estão intimamente ligados com os taninos condensados (ver secção 2.3.1). Podem ser classificados como flavanos, 3-flavanóis, 4-flavanóis e 3,4-flavanodióis, sendo os últimos dois também denominados por leucoantocianidinas. São moléculas não planares uma vez que possuem o heterociclo saturado e diferem no padrão de hidroxilação (Figura 5). Os flavanos não apresentam qualquer substituição no anel C, ao contrário dos 3-flavanóis, 4-flavanóis e 3,4-flavanodióis

que possuem o heterociclo substituído em C<sub>3</sub> e/ou C<sub>4</sub>, sendo por isso menos frequentemente encontrados, podendo co-ocorrer com flavanonas, flavonóis e leucoantocianidinas (Bohm, 1998; Hagerman, 2002; Vermerris & Nicholson, 2006).



**Figura 5** – Estrutura dos vários flavanos: (A) – flavano, (B) – 3-flavanol, (C) – 4-flavanol, (D) – 3,4-flavanodiol. Adaptado de Anderson & Markham (2006).

Os flavanos possuem características químicas únicas que possibilitam a formação dos taninos condensados. Flavanos e 3-flavanóis funcionam como unidades nucleofílicas terminais da cadeia, enquanto as leucoantocianidinas actuam como unidades eletrofílicas na extensão das cadeias. As características mais importantes das unidades terminais relativamente à química das proantocianidinas são a nucleofilicidade dos seus anéis A, a aptidão do anel heterocíclico sofrer clivagem e consequentes rearranjos, bem como a mobilidade conformacional que lhe é atribuída e a susceptibilidade para acoplamento oxidativo com análogos que possuem o anel B do tipo pirocatecol ou pirogallol. Quanto às características das leucoantocianidinas no mesmo contexto, estas actuam como precursores de carbocátions, como já foi referido em I. (Anderson & Markham, 2006).

Os 3-flavanóis são os mais comuns na natureza e por isso os mais estudados. Estes estão presentes em muitos tipos de frutos e também no vinho tinto, embora o chá verde e o chocolate sejam as maiores fontes dos 3-flavanóis (Manach *et al.*, 2004). Os compostos maioritários desta classe de flavonóides são as catequinas, às quais foram atribuídas propriedades antioxidantes e neuroprotectoras (Scapagnini *et al.*, 2011; Stevenson & Hurst, 2007). Em termos inflamatórios, as catequinas inibem a expressão do NF- $\kappa$ B, MAPKs, AP-1, iNOS e COX-2. Possuem também o potencial de diminuir a produção de NO, PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$  e as IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e IL-12 (González-Gallego *et al.*, 2010; Nichols & Katiyar, 2010; Rahman, Biswas & Kirkham, 2006; Santangelo *et al.*, 2007). No que diz respeito à actividade anti-cancerígena, diminuem a angiogénese e a proliferação celular e induzem a apoptose (Kazi *et al.*, 2004; Yao *et al.*, 2011).

## 2.3. Taninos

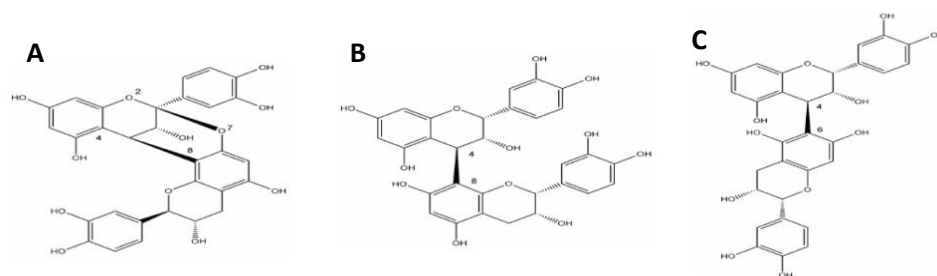
Taninos são uma família de compostos solúveis em água, com uma estrutura muito diversificada e de elevado peso molecular. O termo tanino deriva do francês “tanin” já que estas substâncias eram utilizadas no curtimento das peles. São usados na indústria alimentar para clarificar bebidas (vinho, cerveja e sumos) e como corantes na indústria têxtil. Estes compostos dividem-se em três classes consoante os monómeros que os constituem: condensados, hidrolisáveis e complexos (Khanbabaee & Ree, 2001).

### 2.3.1. Taninos Condensados

Taninos condensados, também denominados por proantocianidinas, estão amplamente distribuídos na natureza. Há referência da sua presença em frutas, cereais, chocolate, vinho e chá e são estes os compostos responsáveis pelo carácter adstringente dos frutos e pelo amargo do chocolate (D'Archivio *et al.*, 2007; Prior & Gu, 2005).

Os taninos condensados não são mais do que oligómeros ou polímeros de flavanos, podendo ser denominados por homopoliflavanos ou heteropoliflavanos se as unidades de extensão e terminação são iguais ou diferentes, respectivamente (Dicko *et al.*, 2006). Apesar de existirem outros tipos de proantocianidinas, as mais comuns e, conseqüentemente as mais estudadas, são constituídas por monómeros de 3-flavanóis (Serrano *et al.*, 2009).

As proantocianidinas podem ser classificadas consoante o local de ligação entre os monómeros (Figura 6). As mais comuns, do tipo B, possuem uma ligação interflavânica entre C<sub>4</sub> (unidade superior) e C<sub>8</sub> (unidade inferior). A unidade superior pode também ligar-se a C<sub>6</sub> da unidade inferior, embora seja menos frequente. Nas proantocianidinas do tipo A, além da ligação referida para as do tipo B, existe também uma ligação adicional entre C<sub>2</sub> (unidade superior) e C<sub>7</sub> ou C<sub>5</sub> (unidade inferior) (Rasmussen *et al.*, 2005). Para além do local de ligação, as proantocianidinas diferem estruturalmente pelo padrão de hidroxilação e pela estereoquímica dos carbonos assimétricos do heterociclo (Santos-Buelga & Scalbert, 2000). Na Tabela 4 estão referenciadas as várias proantocianidinas, tendo em conta o padrão de hidroxilação dos monómeros. Os monómeros de flavanóis podem ainda possuir substituintes como o ácido gálgico ou glúcidos. Na sua maioria, o ácido gálgico forma uma ligação éster em C<sub>3</sub>, enquanto as proantocianidinas glicosiladas apresentam o açúcar ligado em C<sub>3</sub> ou em C<sub>5</sub> (Rasmussen *et al.*, 2005).



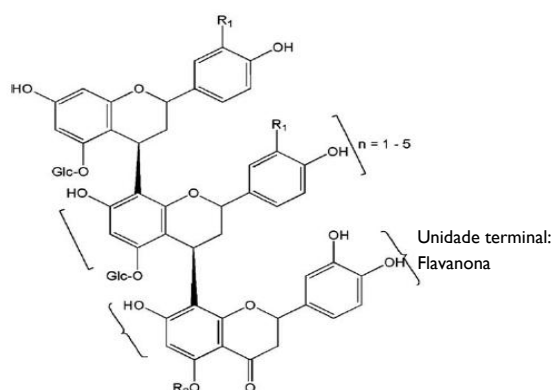
**Figura 6** – Estrutura de proantocianidinas diméricas para elucidar os diferentes tipos de ligação interflavânica. (A) – Proantocianidina do tipo A. (B) – Proantocianidina do tipo B com ligação C<sub>4</sub> – C<sub>8</sub>. (C) – Proantocianidina do tipo B com ligação C<sub>4</sub> – C<sub>6</sub>. Adaptado de Serrano *et al.* (2009).

**Tabela 4** – Classificação das proantocianidinas relativamente ao padrão de hidroxilação. Adaptado de Anderson & Markham (2006) e Serrano *et al.*, (2009).

Proantocianidina	Padrão de hidroxilação						
	3	5	7	8	3'	4'	5'
Procassinidina	H	H	OH	H	H	OH	H
Probutinidina	H	H	OH	H	OH	OH	H
Proapigenidina	H	OH	OH	H	H	OH	H
Proluteolinidina	H	OH	OH	H	OH	OH	H
Protrictetinidina	H	OH	OH	H	OH	OH	OH
Prodistenidina	OH	OH	OH	H	H	H	H
Propelargonidina	OH	OH	OH	H	H	OH	H
Procianidina	OH	OH	OH	H	OH	OH	H
Prodelfinidina	OH	OH	OH	H	OH	OH	OH
Proguibourtinidina	OH	H	OH	H	H	OH	H
Profisetinidina	OH	H	OH	H	OH	OH	H
Prorobinetinidina	OH	H	OH	H	OH	OH	OH
Proteracacnidina	OH	H	OH	OH	H	OH	H
Promelacacnidina	OH	H	OH	OH	OH	OH	H
Propeltoginidina	OCH <sub>2</sub> -	H	OH	H	H	OH	OH
Promopanidina	OCH <sub>2</sub> -	H	OH	H	OH	OH	H

Embora a maioria dos taninos condensados identificados e estudados sejam oligómeros ou polímeros de 3-flavanóis, existem outros mais raros. Nas espécies do género *Sorghum* (Sorgo), mais especificamente na *Sorghum bicolor* (L.) Moench, têm vindo a ser identificados os heteropoliflavanos. Estes compostos são constituídos por glicósidos de pro-3-desoxi-antocianidinas, tais como proluteolinidina ou proapigeninidina (Tabela 4) na cadeia extensora, e uma flavanona, sendo a mais comum o eriodictiol (Tabela 3) ou glicósidos deste, na cadeia

terminal (Awika & Rooney, 2004; Dicko *et al.*, 2006; Krueger, Vestling & Reed, 2003; Madrigal-Carballo *et al.*, 2013; Reed, Krueger & Vestling, 2005). A estrutura destes compostos pode ser observada na Figura 7.



**Figura 7** – Heteropoliflavanos glicosilados encontrados no Sorgo. R<sub>1</sub>= OH, proluteolinidina; R<sub>1</sub>= H, proapigeninidina; R<sub>2</sub>= H, eriodictiol e R<sub>2</sub>= glc, eriodictiol 5-O-β-glucósido. Adaptado de Awika & Rooney (2004).

Assim, enquanto a hidrólise das proantocianidinas liberta as antocianidinas, a hidrólise das pro-3-desoxi-antocianidinas liberta as 3-desoxi-antocianidinas (Awika, 2011).

Os estudos acerca das bioactividades das proantocianidinas dizem respeito principalmente a extractos ricos nestes compostos. Estes compostos são associados a vários mecanismos anti-inflamatórios. Possuem a capacidade de inibir o NF-κB, AP-1, MAPKs, PI3k/Akt, iNOS, COX-2, ICAM-1 e VCAM-1. Foi também observada uma diminuição na produção de TNF-α, NO, PGE<sub>2</sub>, IFN-γ e das interleucinas 1, 2, 4, 6, 8, 12, 13, 17 e 23, enquanto se verificou um aumento da IL-10 (Afaq & Katiyar, 2011; Ahmad *et al.*, 2013; Andre *et al.*, 2012; Ho *et al.*, 2007; Huang, Cai, & Zhang, 2010; Hurst *et al.*, 2010; Johnson *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2001; Martinez-Micaelo *et al.*, 2012; Nandakumar, Singh & Katiyar, 2008; Nichols & Katiyar, 2010; Pallarès *et al.*, 2013; Rasmussen *et al.*, 2005). Relativamente à actividade anti-cancerígena, as proantocianidinas demonstram uma diminuição da proliferação celular e da angiogénese e um aumento da apoptose. Estudos demonstraram ainda que estes compostos diminuem o endurecimento da mama após radioterapia (de la Iglesia *et al.*, 2010; Nandakumar, Singh & Katiyar, 2008; Yao *et al.*, 2011). São também cardioprotectores uma vez que diminuem a oxidação da LDL, aumentam a produção de NO, pela eNOS causando o relaxamento dos vasos sanguíneos, inibem a agregação plaquetária e são hipotensores (Cui *et al.*, 2012; Dixon, Xie & Sharma, 2005; Rasmussen *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2008). Demonstram também efeitos benéficos na diabetes dado que diminuem a

hiperglicémia, hiperlipidémia e hipertrigliceridémia. Possuem ainda a capacidade de diminuir a produção endógena de lípidos, bem como a inflamação local e sistémica relacionada com a obesidade (Arola-Arnal & Bladé, 2011; de la Iglesia *et al.*, 2010; Terra *et al.*, 2011a). São compostos fotoprotectores e suprimem a inflamação alérgica em modelos agudos e crónicos de asma (Afaq & Katiyar, 2011; Lee *et al.*, 2012; Nichols & Katiyar, 2010; Sharma & Katiyar, 2010). Previnem ainda os depósitos de  $\beta$ -amilóide, atrasando assim o desenvolvimento de *Alzheimer* (Wang *et al.*, 2009). Como antibacterianos complexam metais essenciais ao crescimento destes microorganismos e possuem propriedades anti-adesivas (de la Iglesia *et al.*, 2010; Serrano *et al.*, 2009). Diversos estudos revelam ainda que as proantocianidinas são antioxidantes, possuem propriedades “scavenging” (Gonçalves, Dinis & Batista, 2005; Huang, Chi & Liu, 2010; Pallarès *et al.*, 2013), aumentam os antioxidantes naturais (glutathiona) e diminuem a destruição do osso, aumentando a sua formação (Park *et al.*, 2012). Pensa-se que algumas destas propriedades estejam relacionadas com a capacidade das proantocianidinas interagirem com proteínas como enzimas, toxinas e hormonas, sendo que esta ligação é estabelecida entre grupos fenólicos (dadores de protão) e o grupo carbonilo dos péptidos (aceitadores de protão). Com base nesta propriedade, estes compostos são coadjuvantes no tratamento de problemas gastrointestinais, formando na mucosa intestinal uma camada protectora (Santos-Buelga & Scalbert, 2000).

Estudos mais específicos demonstram a actividade anti-inflamatória de dímeros e trímeros de procianidinas. Estas proantocianidinas inibem NF- $\kappa$ B, MAPKs, COX-2 e diminuem a produção de NO, PGE<sub>2</sub> e das interleucinas 6 e 8 (Byun *et al.*, 2013; Jung *et al.*, 2009; Mackenzie *et al.*, 2004; Mackenzie *et al.*, 2009; Martinez-Micaelo *et al.*, 2012; Pallarès *et al.*, 2012; Sung *et al.*, 2013; Terra *et al.*, 2011b). Por outro lado, para as proantocianidinas poliméricas são referidas as mesmas actividades (excepto para a IL-6 e IL-8) e ainda uma diminuição da expressão de AP-1, PI3k/Akt, iNOS e da produção de TNF- $\alpha$  (Da Silva *et al.*, 2012; Gentile *et al.*, 2012). O grau de polimerização parece intervir na actividade das proantocianidinas. As mais poliméricas parecem interferir com interacções entre células, mascarar os receptores das células ou ligar-se directamente ao ligando, enquanto as oligoméricas de mais baixo peso molecular modulam sinais intra-celulares (Hurst *et al.*, 2010). No que diz respeito à actividade antioxidante, Huang, Chi & Liu (2010) demonstraram que esta aumenta com o aumento da polimerização das proantocianidinas.

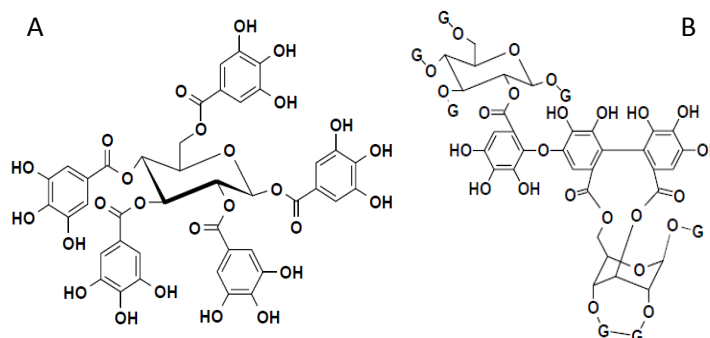


### 2.3.2. Taninos Hidrolisáveis

Os taninos hidrolisáveis (Figura 8) são derivados glicosilados do ácido gálgico, encontrados na natureza em frutos, vegetais e frutos secos. O ácido gálgico esterifica hidroxilos alcoólicos de um poliol (carboidrato) e os grupos galhoil podem ser então esterificados ou oxidados de modo a formarem taninos mais complexos. Com base nos seus produtos de hidrólise os taninos hidrolisáveis podem ser classificados como galhotaninos ou elagitaninos (Serrano *et al.*, 2009; Shahidi & Naczki, 2004; Vermerris & Nicholson, 2006).

Os galhotaninos são os taninos hidrolisáveis mais simples e são ésteres poligaloílicos de uma ose, geralmente a glucose. Quando há oxidação de grupos galhoil complementares estabelece-se uma ligação entre carbonos dos dois grupos, formando-se o ácido hexahidroxi-difénico. Os elagitaninos mais simples são ésteres deste composto que lactoniza espontaneamente em ácido elágico, quando presente em solução aquosa (Hagerman, 2002).

Em termos de actividade anti-inflamatória, Erd *et al.* (2005) verificaram que galhotaninos diminuem a actividade de NF- $\kappa$ B e AP-1.



**Figura 8** – Estrutura dos taninos hidrolisáveis. (A) Galhotaninos e (B) Elagitaninos. Adaptado de Hagerman (2002).

### 2.3.3. Taninos complexos

Taninos complexos são uma mistura das duas classes anteriores. Por outras palavras, estes compostos possuem uma unidade 3-flavanol ligada a uma unidade glicosilada de um galhotanino ou elagitanino (Vermerris & Nicholson, 2006).

### 3. Biodisponibilidade

Biodisponibilidade pode ser definida como concentração de um dado composto ou do(s) seu(s) metabolito(s), num órgão alvo. Assim, é importante saber não só a concentração dos compostos fenólicos nas plantas mas também a biodisponibilidade destes (Holst & Williamson, 2008).

É importante avaliar a biodisponibilidade dos compostos fenólicos pois estes demonstram resultados promissores no tratamento de diversas patologias e são muito comuns na dieta humana. Estudos epidemiológicos associam o consumo de compostos fenólicos, com a diminuição do risco de incidência de certas formas de cancro bem como de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (Arts & Hollman, 2005; Scapagnini *et al.*, 2011; Vauzour *et al.*, 2010). Embora as agliconas possam ser absorvidas directamente no intestino delgado, o mesmo não se verifica para polifenóis esterificados, glicosilados ou polimerizados, que por sinal são também os mais abundantes na natureza. A estrutura química dos compostos fenólicos condiciona a sua absorção intestinal e os metabolitos formados. A maioria dos compostos fenólicos é demasiado hidrofílico para atravessar a barreira intestinal por difusão passiva e, por esta razão, têm de sofrer hidrólise no intestino tanto por enzimas nele presente, como pela microflora intestinal. É o caso dos ácidos fenólicos que na sua forma livre são absorvidos directamente no intestino delgado, enquanto na forma esterificada, tal como no caso dos ácidos clorogénicos, sofrem hidrólise pela microflora intestinal, uma vez que os tecidos humanos não possuem esterases. Também os flavonóides são exemplo disto, já que na sua maioria se encontram glicosilados e, por esta razão, sofrem hidrólise do açúcar.

Durante a fase de absorção, as agliconas dos polifenóis sofrem metabolização, inicialmente no intestino e mais tarde no fígado, formando-se metabolitos derivados dos processos de metilação, sulfatação e glucuronidação. São estes metabolitos e, raramente as agliconas, que circulam na corrente sanguínea ligados a proteínas como a albumina, que são capazes de penetrar tecidos. Ao nível celular, os polifenóis exercem as suas bioactividades após sofrerem desconjugação. Finalmente, os compostos fenólicos e os seus metabolitos são eliminados na urina e na biliar, sendo os metabolitos mais conjugados eliminados preferencialmente na biliar, enquanto os menos conjugados são excretados na urina (D'Archivio *et al.*, 2007; Hollman, 2004; Manach *et al.*, 2004; Perez-Vizcaino, Duarte, & Santos-Buelga, 2012; Scalbert & Williamson, 2000; Shimo *et al.*, 1998).

Devido ao seu alto grau de polimerização, as proantocianidinas merecem um destaque especial. Seria de esperar que estes compostos fossem hidrolisados durante a digestão no

estômago, devido ao ambiente ácido do suco gástrico. No entanto, estes compostos passam inalterados, talvez devido ao efeito tampão criado pelo bolo alimentar (Manach *et al.*, 2005). Já no intestino delgado, apenas monómeros, dímeros e trímeros podem penetrar a barreira intestinal. As de maior peso molecular não sofrem alteração nesta etapa do sistema gastrointestinal e apenas são alteradas no cólon, pela microflora intestinal. Aqui, a microflora degrada as proantocianidinas a ácidos aromáticos e estes penetram a barreira intestinal, sendo metabolizados mais tarde no fígado e excretados na urina. A extensão da degradação diminui com o aumento do grau de polimerização destes compostos. Não são conhecidos os motivos desta relação, mas pensa-se que esteja relacionado com as propriedades antibacterianas e de ligação a proteínas, características destes compostos. Observou-se também que o contacto com uma elevada concentração de proantocianidinas pode alterar a flora intestinal, aumentando o número de bactérias resistentes ao efeito dos taninos. No entanto, quando a dieta retorna ao teor normal de proantocianidinas, a flora intestinal normaliza (de la Iglesia *et al.*, 2010; Nandakumar *et al.*, 2008; Prior & Gu, 2005; Rasmussen *et al.*, 2005; Serrano *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2008).

Assim, as proantocianidinas possuem dois mecanismos de acção distintos. Por um lado os dímeros e trímeros, bem como os metabolitos obtidos pela microflora, conseguem penetrar a barreira intestinal e actuar a nível sistémico, e por outro lado, as proantocianidinas poliméricas actuam no tracto gastrointestinal. Como o intestino é um dos órgãos mais envolvidos na resposta imune, efeitos locais no tracto gastrointestinal podem afectar os parâmetros de saúde sistémica e saúde em geral indirecta, mas significativamente (Holst & Williamson, 2008).

## **B. Fisiopatologia**

### **I. Stress oxidativo**

Os polifenóis têm vindo a merecer um interesse científico especial devido às suas propriedades antioxidantes. Define-se por antioxidante o composto capaz de reagir com oxidantes, diminuindo o seu poder de reacção química. Os radicais livres não são mais do que moléculas altamente reactivas devido à existência de um electrão livre. Estes são formados durante reacções de oxidação, na sequência do metabolismo dos organismos vivos. As células usam o oxigénio para obter energia através de um processo de fosforilação oxidativo. Neste processo, a criação de ATP está associada a uma reacção em que quatro electrões e quatro protões são fornecidos ao  $O_2$  para a formação de duas moléculas de água. Todavia, quando o  $O_2$  ganha apenas um electrão, forma-se o anião superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), uma

espécie reactiva do oxigénio (ROS) que tende a ganhar mais três electrões e quatro prótons para formar água. Este processo envolve diversas reacções que resultam na produção de ROS como o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), o radical hidroxilo (OH) e radicais do NO. Para além dos mecanismos endógenos, também factores externos como o stress ambiental, ferimentos e ataques de organismos patogénicos podem elevar a concentração de radicais livres para limites insustentáveis ao bom funcionamento do organismo (Imlay, 2003; López-Lázaro, 2009; Rao *et al.*, 2009; Vermerris & Nicholson, 2006). As ROS vão reagir com biomoléculas como o DNA, lípidos e proteínas. Nestes casos, surgem reacções em cadeia nas quais um radical reage com uma molécula, criando outro radical que por sua vez reagirá com uma nova molécula, causando um distúrbio do balanço oxidante/antioxidante que leva ao stresse oxidativo. O stresse oxidativo está associado a diversas patologias incluindo doenças cardiovasculares, cancerígenas e neurodegenerativas (Fraga, 2010; Kawai, 2011; Koh, Mokhtar & Iqbal, 2012; Ojo *et al.*, 2006; Sabir *et al.*, 2012; Serrano *et al.*, 2009).

Os organismos vivos desenvolveram vários mecanismos no combate às ROS, como os mecanismos enzimáticos de inactivação. Por um lado, a enzima superóxido dismutase transforma o  $O_2^{\cdot-}$  e o  $H_2O_2$  em  $O_2$ , via oxidação e redução, respectivamente. Por outro lado, a catalase converte  $H_2O_2$  em  $O_2$  ou água, enquanto a glutathiona peroxidase forma a glutathiona oxidada, a partir da glutathiona reduzida, usando o  $H_2O_2$  (Middleton, Kandaswami & Theoharides, 2000; Vermerris & Nicholson, 2006).

Antioxidantes podem ainda ser encontrados na dieta diária. Para além de captarem os radicais evitando algumas patologias, estes são ainda importantes na prevenção da deterioração de produtos alimentares e na manutenção do seu teor nutricional (Shahidi & Naczk, 2004). Estas moléculas possuem a capacidade de eliminar espécies reactivas de oxigénio, azoto e de cloro, impedindo também a sua produção. São igualmente eficazes na reacção com iões metálicos, diminuindo a sua actividade pro-oxidante (Fraga, 2010). Existem dois tipos de antioxidantes. São considerados antioxidantes preventivos, moléculas que funcionalmente atrasam a iniciação da reacção em cadeia e antioxidantes terminadores de radicais livres, os compostos que reagem com radicais de alta energia tornando-os termodinamicamente mais estáveis. Os polifenóis enquadram-se nesta última classe, uma vez que são excelentes doadores de hidrogénio ou electrões. Os compostos fenólicos são oxidados pelos radicais, resultando em radicais mais estáveis e menos reactivos, devido à sua ressonância de deslocalização e ausência de locais de ataque pelas ROS (Nijveldt *et al.*, 2001; Shahidi & Naczk, 2004). Para além dos mecanismos antioxidantes convencionais, os polifenóis podem ainda induzir a expressão de antioxidantes endógenos, causando assim um efeito

antioxidante indirecto (Gonçalves *et al.*, 2013; Stevenson & Hurst, 2007). Por vezes, quando este tipo de compostos se encontra numa concentração elevada, pode verificar-se perda da capacidade antioxidante e o surgimento de efeitos pró-oxidantes (Campos *et al.*, 2014; Shahidi & Naczki, 2004). Apesar disto, verificou-se que alguns fitoquímicos com propriedades anti-cancerígenas aumentam a concentração de ROS apenas em células tumorais, induzindo apoptose, sem afectar as células normais (Yao *et al.*, 2011).

A actividade antioxidante dos polifenóis é determinada pela sua estrutura química. Os ácidos fenólicos são mais antioxidantes quanto maior for o número de grupos hidroxilo, enquanto nos flavonóides, a *orto*-di-hidroxilação do anel B, bem como a ligação dupla C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> e o grupo cetona em C<sub>4</sub> do anel C, são particularidades estruturais essenciais no que diz respeito à capacidade antioxidante. No entanto, é necessário referir que os compostos glicosilados, os mais frequentes na natureza, são menos eficazes do que as agliconas, neste tipo de actividade. Já nas proantocianidinas, a estrutura essencial é a *orto*-di-hidroxilação do anel B, e estas são mais antioxidantes quanto maior for o seu grau de polimerização (Huang, Chi & Liu, 2010; López-Lázaro, 2009; Middleton, Kandaswami & Theoharides, 2000; Rasmussen *et al.*, 2005; Ross & Kasum, 2002; Shahidi & Naczki, 2004).

Apesar dos polifenóis demonstrarem ser promissores antioxidantes, é necessário realizar estudos que confirmem a actividade dos produtos da metabolização *in vivo*, bem como a segurança dos radicais intermediários formados (Fraga, 2010).

## 2. Inflamação

A inflamação é a resposta do organismo à presença de agentes patogénicos ou a lesões tecidulares e manifesta-se através de rubor, calor, inchaço e dor. Pode ser considerada aguda ou crónica, sendo que a primeira surge de forma abrupta e é de curta duração. Esta pode evoluir para a inflamação crónica se a lesão permanecer por um longo período de tempo. A inflamação e as lesões a ela associadas estão relacionadas com o desenvolvimento de diversas patologias como aterosclerose, *Alzheimer* e cancro (Santangelo *et al.*, 2007; Yoon & Baek, 2005; Zamora, Vodovotz & Billiar, 2000).

O primeiro passo na inflamação passa pela activação e migração de leucócitos para o tecido lesado, nomeadamente neutrófilos, monócitos e eosinófilos. Na etapa seguinte, os macrófagos tomam o papel principal no processo inflamatório (Fraga, 2010; Murray & Wynn, 2011). Estas células podem sofrer estímulo por parte de citoquinas ou de produtos bacterianos, tais como os lipopolissacarídeos (LPS), importantes componentes estruturais das membranas celulares das bactérias Gram negativas. Face a estes estímulos, a resposta

dos macrófagos dá-se através da síntese de mediadores pró-inflamatórios (Francisco *et al.*, 2011; Lu, Yeh & Ohashi, 2008; Sforzin *et al.*, 2009).

A resposta imune é um processo complexo que envolve muitos mediadores pró-inflamatórios. A expressão destas moléculas pró-inflamatórias é intensamente regulada por vários factores de transcrição e vias de sinalização (Kim *et al.*, 2004; Koelink *et al.*, 2012). Um dos factores de transcrição mais importantes na regulação das moléculas pró-inflamatórias é o factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). A activação deste factor de transcrição regula a expressão de moléculas de adesão e citocinas, bem como o recrutamento de células efectoras, como os neutrófilos. Na ausência de estímulo, o NF- $\kappa$ B encontra-se no citoplasma, ligado a proteínas inibidoras I $\kappa$ B que o tornam incapaz de se ligar ao ADN. Contudo, quando sofre acção de estímulos como radicais livres, estímulos inflamatórios, endotoxinas, entre outros, as proteínas I $\kappa$ B são fosforiladas. O NF- $\kappa$ B é então translocado para o núcleo e é capaz de induzir a expressão de mais de 200 genes relacionados com a inflamação (Karin, 2009; Santangelo *et al.*, 2007; Yoon & Baek, 2005). Outro factor de transcrição importante é a proteína activadora 1 (AP-1). Esta liga-se ao ADN e regula a expressão de genes associados à apoptose, e respostas celulares associadas ao stress oxidativo e à inflamação (Karin, Liu & Zandi, 1997). Ambos factores são regulados por vias de sinalização.

Durante a resposta inflamatória, o envolvimento de uma grande variedade de estímulos, leva à activação das vias de sinalização, tais como as MAPKs e as PI3/Akt. MAPKs são proteínas quinases activadas por mitogénios e são importantes componentes de sinalização. Estas possuem a capacidade de converter sinais extracelulares em respostas intracelulares, através de uma série de cascatas de fosforilações, desempenhando por isso um papel crucial na inflamação. Estão associadas à regulação dos factores de transcrição, bem como das enzimas iNOS e COX-2. PI3/Akt, fosfatidilinositol-3-quinases, é uma serina-treonina activada em resposta a certos estímulos tais como, factores de crescimento e citocinas, que regulam moléculas envolvidas no crescimento celular e proliferação, homeostase metabólica e moléculas pró-inflamatórias (Costa *et al.*, 2012; Francisco *et al.*, 2011; Owuor & Kong, 2002).

A activação de factores de transcrição e vias de sinalização levam à produção de mediadores inflamatórios, tais como o NO, PGE<sub>2</sub>, citocinas e moléculas de adesão celular. O NO é uma importante molécula de sinalização intracelular e intercelular produzida pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), a partir do aminoácido L-arginina. Existem três isoformas da NOS, nomeadamente a NOS endotelial (eNOS), a NOS neuronal (nNOS) e a NOS indutível (iNOS). Enquanto as duas primeiras são expressas constitutivamente e a sua

activação requer um aumento do teor de cálcio intracelular, a última é induzida por estímulos inflamatórios, tais como LPS ou citocinas. A iNOS produz NO em concentrações micromolares que são imuno-estimulantes, mas que podem resultar em citotoxicidade e danos nos tecidos. Em contraste, a eNOS e a nNOS produzem NO em concentrações nanomolares que são benéficas ao organismo, regulando a vasodilatação e agindo como neurotransmissor, respectivamente (Aktan, 2004; Geller & Billiar, 1998; Guzik & Korbust, 2003; Kim et al., 1999; Kröncke, Fehsel, & Kolb-Bachofen, 1998; Mori & Gotoh, 2000). Tal como o NO, também as prostaglandinas (PGE) são eficazes mediadores inflamatórios. Estas são produzidas pela enzima ciclooxigenase (COX) e a sua produção pode ser constitutiva (COX-1) ou induzida (COX-2) pelo LPS ou citocinas (Kim et al., 2004). As citocinas, por outro lado, são proteínas com um papel crucial na inflamação. Estas moléculas são os principais mediadores locais de comunicação intercelular, essenciais na resposta imunitária a estímulos inflamatórios. O desequilíbrio entre as citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , entre outras) e as anti-inflamatórias (IL-10) está associado ao surgimento de quadros clínicos inflamatórios (Costa et al., 2012; Koelink et al., 2012). Já as moléculas de adesão celular são proteínas de superfície celular que estão relacionadas com a ligação de células, como os leucócitos, à matriz extracelular ou às células endoteliais. As mais comuns são as moléculas de adesão celular vasculares (V-CAM), moléculas de adesão intercelular (I-CAM), e a selectina celular endotelial (E-selectina) e pensa-se que estas estão envolvidas na aterosclerose (Costa et al., 2012; Pak, Grandner & Pack, 2014).

Por fim, vários estudos associam a actividade anti-inflamatória ao potencial antioxidante dos compostos bioactivos (Muanda, Dicko & Soulimani, 2010; Scapagnini et al., 2011). No entanto, é de salientar que o facto de um composto possuir actividade antioxidante não quer dizer necessariamente que esta actividade esteja intimamente relacionada com a actividade anti-inflamatória (Fraga, 2010).

## C. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf

### I. Caracterização botânica

*Cymbopogon citratus* é uma planta originária das zonas tropicais e subtropicais da Ásia, sendo neste momento cultivada em alguns países do continente Africano e Americano (Tayeboon *et al.*, 2013). É geralmente conhecida como erva-príncipe no contexto nacional e “lemongrass” no âmbito internacional. Pode ainda ser denominada por capim-limão, capim-cidreira ou capim-santo, no Brasil. A sua classificação botânica é descrita na Tabela 5. A planta pertence à família *Poaceae* que abrange cerca de 500 géneros, compreendendo um total de 8000 espécies herbáceas, sendo que o género *Cymbopogon* inclui perto de 30 espécies. O nome *Cymbopogon* deriva do grego *kymbe* (barco) e *pogon* (barba), referindo-se ao arranjo da espiga de flores (Barbosa *et al.*, 2008; Negrelle & Gomes, 2007). É uma erva aromática, monocotiledónea, perene, que atinge cerca de 1,5 metros de altura. Possui rizomas e raízes fibrosas, densamente tufados, tipicamente semi-subterrâneos. Os caules são do tipo colmo, em que os nós e os entrenós formam uma touceira robusta. No que se refere às folhas estas são alternas, compridas, erectas e ásperas em ambas as faces. São normalmente verdes e com um odor a limão. A lâmina possui a base estreita e o ápice agudo, medindo até 100 cm de comprimento e 2 cm de largura. As bainhas são fechadas na base, mais curtas que os entrenós, e possuem um tom vermelho-acastanhado. A lígula é normalmente membranácea e mede 4-5 mm de comprimento. Em termos de nervação, quer a central como a paralela, encontram-se salientes na face dorsal, sendo a nervação central a mais proeminente. As flores reúnem-se em inflorescências do tipo espiguetas com glumas vermelhas, embora não sejam frequentemente observadas (Adeneye & Agbaje, 2007; Agbafor & Akubugwo, 2007; Asaolu, Oyeyemi & Olanlokun, 2009; Di Stasi & Hiruma-Lima, 2002; Martins *et al.*, 2004; Negrelle & Gomes, 2007; Oloyede, 2009). O *Cymbopogon citratus* está representado na Figura 9.

**Tabela 5** – Classificação taxonómica do *Cymbopogon citratus*. (Adaptado de Negrelle & Gomes, 2007).

Classificação Taxonómica	
Reino	Plantae
Sub-reino	Tracheobionta (plantas vasculares)
Superdivisão	Spermatophyta (plantas com sementes)
Divisão	Magnoliophyta (plantas com flores)
Classe	Liliopsida (Monocotiledónea)
Subclasse	Commelinidae
Ordem	Cyperales
Família	Poaceae (R.BR) Barnhart, 1895 (família grass)
Género	<i>Cymbopogon</i> Sprengel, 1815
Espécie	<i>Cymbopogon citratus</i> (D.C. ex Nees) Stapf, 1906





**Figura 9** – *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. Adaptado de Katzer (2007), Stender (n.d.) e Tang (2008).

## 2. Usos terapêuticos

### 2.1. Etnofarmacologia

A natureza tem sido uma fonte quase inesgotável de compostos biologicamente activos. Com o decorrer dos tempos as plantas têm vindo a tomar parte importante no desenvolvimento de novos fármacos, tanto pela aplicação directa dos seus extractos como pela criação de modelos para a síntese de um grande número de compostos. Apesar do crescente interesse nas plantas medicinais, apenas 15 a 17 % foram analisadas quanto aos seus benefícios para a saúde humana (Akin-Osanaiye, Agbaji & Dakare, 2007; Martins *et al.*, 2004). Destas, cerca de 400 000 espécies de plantas tropicais possuem propriedades medicinais, sendo a única fonte de cuidados primários de saúde para 65 a 80% da população mundial, aos quais a medicina moderna é inacessível (Cragg & Newman, 2013; Fagbemi *et al.*, 2009; Hindumathy, 2011; Kumari & Agrawal, 2010).

*Cymbopogon citratus* é uma planta com alguma relevância económica já que é muito utilizada na indústria da perfumaria e da cosmética (Koba *et al.*, 2009; Pedroso *et al.*, 2006). A um nível mais tradicional é usada na cozinha quer em sopas, quer como bebida aromática, devido à sua fragrância a limão (Asaolu, Oyeyemi & Olanlokun, 2009; Hindumathy, 2011). Para além destas aplicações, é também consumida um pouco por todo o mundo devido às suas propriedades medicinais no tratamento de problemas associados ao sistema gastrointestinal, distúrbios nervosos e sintomas gripais.

Na Tabela 6 estão reunidos alguns dos estudos etnofarmacológicos mais recentes acerca do *Cymbopogon citratus*.

**Tabela 6** – Estudos etnofarmacológicos em *Cymbopogon citratus*.

<b>País/ Nome tradicional da planta</b>	<b>Tipo de extracto</b>	<b>Usos</b>	<b>Referências</b>
<b>África</b>			
<b>Etiópia</b> Tej sar	Folhas	Tratamento da dor de estômago.	Teklehaymanot <i>et al.</i> , 2007
	Fumegar (folhas)	Repelente de mosquitos, moscas e pulgas.	Karunamoorthi & Husen, 2012
<b>Gana</b> Tea ba	Cataplasma (folhas)	Tratamento de furúnculos e inchaços.	Agyare <i>et al.</i> , 2009
	Infuso (folhas)	Actividade anti-malária.	Asase, Akwetey & Achel, 2010
<b>Nigéria</b> Koko oyinbo, Agusi, Ebana, Nyayaha	Infuso (folhas)	Tratamento da febre-amarela, tifoide e comum, bem como problemas associados a indigestão e cancro.	Ajaiyeoba <i>et al.</i> , 2003; Dike, Obembe & Adebiji, 2012
	Decocto (folhas)	Actividade anti-malária.	Ajibesin <i>et al.</i> , 2008
	Óleo essencial	Acção diurética e tónica.	De Smet, 1998
<b>Répubblica Democrática do Congo</b> Sinda	Decocto (folhas)	Alívio sintomático de problemas estomacais, diarreia, febre, malária e edema.	Mesia <i>et al.</i> , 2008
	Óleo essencial	Actividade antibacteriana.	Cimanga <i>et al.</i> , 2002
<b>Uganda</b> Chai subi	Vapores (folhas)	Tratamento de sintomas gripais.	Tabuti, Lye & Dhillion, 2003
	Infuso (folhas)	Actividade anti-malária.	Tabuti, 2008
<b>América Central</b>			
<b>Cuba</b> Yerba de calentura	Decocto (folhas)	Acção sedativa e hipotensiva.	Cano & Volpato, 2004
<b>Guadeloupe</b> Citronelle, sitwannel	Decocto e infuso (folhas)	Acção antigripal.	Boulogne <i>et al.</i> , 2011
<b>Honduras</b>	Decocto (folhas)	Incentivo do aleitamento.	Ticktin & Dalle, 2005
<b>América do Sul</b>			
<b>Argentina</b> Cedrón paja	Infuso (folhas)	Tratamento de constipações, tosse, gastrites e diarreia.	Hilgert, 2001
	Decocto (folhas)	Actividade estomacal, hipotensiva e cardiotónica.	Scarpa, 2004
	Óleo essencial	Repelente.	Moore <i>et al.</i> , 2007
<b>Bolívia</b> Hierba luisa	Decocto (folhas)	Efeito tranquilizante e auxílio na dor de estômago e inchaços devido ao frio.	Macía, García & Vidaurre, 2005

<b>Brasil</b> Capim-santo	Infuso (folhas e/ou planta)	Tratamento de problemas associados à pressão e circulação sanguíneas, dor de cabeça, diarreia e dor pré-parto. Possui acção tranquilizante, antioxidante e pode ser usado em veterinária no tratamento de cólicas, diarreia, vômitos e parasitas.	Coelho-Ferreira, 2009; Port's et al., 2013; Ritter et al., 2012; de Albuquerque et al., 2007
	Banho	Auxílio em sintomas gripais.	Coelho-Ferreira, 2009
<b>Equador</b> Hierba luisa	Infuso (folhas)	Efeito relaxante e alívio sintomático de gastrites, dor estomacal e diarreia.	Tene et al., 2007
<b>Guiana</b>	Folhas	Actividade anti-malária.	Vigneron et al., 2005
<b>Peru</b> Yerba luisa, Maria luisa	Decocto (folhas)	Efeito carmitivo e tratamento de cólicas digestivas.	Rehecho et al., 2011
	Infuso (folhas)	Acção sedativa e descongestionante. Tratamento de fraqueza, nervosismo e malária.	
	Mastigar (folhas)	Analgésico para a dor de dentes.	
	Mastigar (rizomas)	Tratamento para a tosse seca, distúrbios de garganta e respiratórios.	
<b>Asia</b>			
<b>Bangladesh</b>	Infuso	Tratamento estomacal.	Kadir, Sayeed & Mia, 2013
<b>China</b> Hiongmao	Banho	Alívio da dor.	Au et al., 2008
<b>Índia</b> Sugandha, Rohisha	Óleo essencial	Efeito carmitivo.	Poonam & Singh, 2009
	Sumo	Tratamento de cólera, febre e dor de cabeça.	
	Infuso (folhas)	Estimulante para a fraqueza.	
<b>Nepal</b> Kagati ghans	Infuso (folhas)	Alívio sintomático em casos de constipação.	Shrestha & Dhillion, 2003
<b>Tailândia</b> Sa kan	Decocto (folhas)	Acção refrescante, bem como alívio das dores nos ossos e articulações.	Panyaphu et al., 2011
<b>Europa</b>			
<b>Portugal</b> Erva-príncipe,	Infuso (folhas)	Alívio em problemas associados ao sistema digestivo, enjoo, doenças da vesícula biliar e bexiga. É também analgésico gástrico, anti-inflamatório intestinal e antiespasmódico renal.	Novais et al., 2004

## 2.2. Bioactividades

*Cymbopogon citratus* é uma planta medicinal de elevado interesse na medicina tradicional, sendo consumida um pouco por todo o mundo. Este forte impacto etnofarmacológico despertou na comunidade científica uma grande curiosidade. Por esta razão, existem centenas de estudos publicados com o intuito de se perceberem os mecanismos inerentes aos benefícios farmacológicos desta planta (Tabela 7).

A planta é maioritariamente consumida sob a forma de infusão. Apesar do seu uso tradicional estar associado à protecção gástrica, grande parte dos estudos encontrados focam-se na sua actividade antibacteriana, antifúngica, antioxidante e anti-inflamatória (Oloyede, 2009; Watanabe *et al.*, 2010; Wright, Maree & Sibanyoni, 2009; Zielinski *et al.*, 2013). No que diz respeito à actividade anti-inflamatória, estudos sugerem que a infusão de *Cymbopogon citratus* inibe a produção de NO e PGE<sub>2</sub>, através da inibição da expressão da iNOS e COX-2, bem como várias cascatas de sinais inerentes à activação das enzimas. Polifenóis, tais como flavonóides e taninos foram estudados nesta planta (Figueirinha *et al.*, 2008), os quais contribuem largamente para o efeito observado em células dendríticas e macrófagos (Figueirinha *et al.*, 2010; Francisco *et al.*, 2011). Em termos antioxidantes, Soares *et al.* (2013) avaliou a capacidade antioxidante do extracto aquoso, enquanto Ojo *et al.* (2006) determinou a sua influência na diminuição da peroxidação dos lípidos, e, por conseguinte, na protecção das membranas celulares contra o ataque de radicais livres. Há também alusões aos seus efeitos hipoglicémicos e hipolipidémicos (Adeneye & Agbaje, 2007), bem como sugestões de efeitos protectores na exposição a raios gama (Fuentes *et al.*, 2006). Por fim, estudos em animais demonstraram que o extracto aquoso de *Cymbopogon citratus* diminui o ritmo cardíaco (Gazola *et al.*, 2004) e possui efeitos analgésicos e anti-inflamatórios (Nambiar & Matela, 2012).

Apesar do reconhecimento medicinal de *Cymbopogon citratus*, é pelo seu óleo essencial que a planta possui valor económico. Este é muito utilizado como matéria-prima nas indústrias da perfumaria, cosmética, alimentar, farmacêutica e como insecticida (Asaolu, Oyeyemi & Olanlokun, 2009; Negrelle & Gomes, 2007; Saddiq & Khayyat, 2010). A extracção do óleo essencial é geralmente realizada através de hidrodestilação, sendo que a água da destilação é normalmente rejeitada, contribuindo assim como uma fonte de poluição (Jayasinha, Warnasuriya & Dissanayake, 1999). Por ser um produto de alto valor económico, o óleo essencial foi alvo do maior número de estudos, demonstrando ter actividade antibacteriana, antifúngica (Nguefack *et al.*, 2009; Saddiq & Khayyat, 2010), antiparasitária (protozoários e nematóides) (Faria *et al.*, 2013; Machado *et al.*, 2012) e insecticida (Phasomkusolsil & Soonwera, 2011). Foram-lhe também atribuídas propriedades antioxidantes (Viuda-Martos *et al.*, 2010), anti-inflamatórias (Gbenou *et al.*, 2013) e anticancerígenas (Bidinotto *et al.*, 2011), bem como acções sobre o sistema nervoso central (Koga *et al.*, 2014) e o tracto gastrointestinal (Fernandes *et al.*, 2012).

**Tabela 7** – Bioactividades dos diversos extractos de *Cymbopogon citratus*.

<b>Actividade</b>	<b>Referências</b>
<b>Extracto aquoso</b>	
<b>Antibacteriano</b>	
<i>Bacillus spp.</i>	Oloyede, 2009
<i>Escherichia coli</i>	Oloyede, 2009
<i>Pseudomonas spp.</i>	Hindumathy, 2011
<i>Salmonella spp.</i>	Oloyede, 2009
<i>Staphylococcus aureus</i>	Oloyede, 2009
<b>Antifúngico</b>	
<i>Candida albican</i>	Wright, Marre & Sibanyoni, 2009
<b>Anti-inflamatório</b>	Figueirinha et al., 2010; Francisco et al., 2011, 2013; Watanabe et al., 2010
<b>Antioxidante</b>	Ojo et al., 2006; Soares et al., 2013; Zielinski et al., 2013
<b>Hipoglicémico e Hipolipídico</b>	Adeneye & Agbaje, 2007
<b>Radioprotector</b>	Fuentes et al., 2006
<b>Redução do ritmo cardíaco</b>	Gazola et al., 2004
<b>Extracto etanólico</b>	
<b>Antibacteriano</b>	
<i>Bacillus spp.</i>	Fagbemi et al., 2009; Oloyede., 2009
<i>Escherichia coli</i>	Asaolu, Oyeyemi, & Olanlokun, 2009; Oloyede., 2009
<i>Salmonella spp.</i>	Asaolu, Oyeyemi, & Olanlokun, 2009; Fagbemi et al., 2009; Oloyede., 2009
<i>Staphylococcus aureus</i>	Asaolu, Oyeyemi, & Olanlokun, 2009; Oloyede., 2009
<i>Listeria spp</i>	Asaolu, Oyeyemi, & Olanlokun, 2009
<b>Anti-cancerígeno</b>	Puatanachokchai et al., 2002
<b>Anti-inflamatório</b>	Tiwari, Dwivedi & Kakkar, 2010
<b>Antioxidante</b>	Soares et al., 2013; Tiwari, Dwivedi & Kakkar, 2010
<b>Cardioprotetivo</b>	Gayathri et al., 2011
<b>Hepatoprotetivo</b>	Koh, Mokhtar & Iqbal, 2012
<b>Hipocolesterómico</b>	Agbafor & Akubugwo, 2007
<b>Extracto metanólico</b>	
<b>Ansiolítico</b>	Shah et al., 2010
<b>Antibacteriano</b>	
<i>Bacillus spp.</i>	Hindumathy, 2011
<i>Escherichia coli</i>	Hindumathy, 2011
<i>Pseudomonas spp.</i>	Hindumathy, 2011
<i>Staphylococcus aureus</i>	Hindumathy, 2011
<b>Antigenotóxico</b>	Rao et al., 2009
<b>Anti-inflamatório</b>	Bachiega & Sforcin, 2011
<b>Antioxidante</b>	Campos et al., 2014; Cheel et al., 2005; Mongkolsilp et al., 2004; Soares et al., 2013
<b>Radioprotector</b>	Rao et al., 2009
<b>Vasorelaxante</b>	Runnie et al., 2004
<b>Óleo essencial</b>	
<b>Analgésico</b>	Gbenou et al., 2013
<b>Ansiolítico</b>	Blanco et al., 2009; Costa et al., 2011b; Koga et al., 2014

<b>Antibacteriano</b>	
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Baratta et al., 1998
<i>Bacillus subtilis</i>	Baratta et al., 1998
<i>Citrobacter freundii</i>	Baratta et al., 1998
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Baratta et al., 1998; Pereira et al., 2004
<i>Escherichia coli</i>	Akin-Osanaiye, Agbaji & Dakare, 2007; Baratta et al., 1998; Pereira et al., 2004; Wannissorn et al., 2005
<i>Helicobacter pylori</i>	Ohno et al., 2003
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Baratta et al., 1998; Pereira et al., 2004
<i>Listeria spp.</i>	Bassolé et al., 2011; Nguefack et al., 2004; Viuda-Martos et al., 2010
<i>Proteus vulgaris</i>	Baratta et al., 1998
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Baratta et al., 1998
<i>Salmonella spp.</i>	Akin-Osanaiye, Agbaji & Dakare, 2007; Baratta et al., 1998; Bassolé et al., 2011; Wannissorn et al., 2005
<i>Shigella dysenteriae</i>	Bassolé et al., 2011
<i>Staphylococcus aureus</i>	Akin-Osanaiye, Agbaji & Dakare, 2007; Baratta et al., 1998; Nguefack et al., 2004; Saddiq & Khayyat, 2010
<i>Streptococcus faecalis</i>	Baratta et al., 1998
<b>Anticancerígeno</b>	Bidinotto et al., 2011; Dudai et al., 2005
<b>Anticonvulsivante</b>	Blanco et al., 2009; Silva et al., 2010
<b>Antifúngico</b>	
<i>Aspergillus spp.</i>	Bankole, Joda & Ashidi, 2005; Baratta et al., 1998; Helal et al., 2007; Mishra, Dubey & Hindu, 1994; Nguefack, Budde & Jakobsen, 2004; Nguefack et al., 2009; Paranagama et al., 2003; Pawar & Thaker, 2006
<i>Candida albican</i>	Dutta et al., 2006; Rauber, Guterres & Schapoval, 2005; Tyagi & Malik, 2010
<i>Fusarium spp.</i>	Fandohan et al., 2004; Nguefack et al., 2004
<i>Penicillium spp.</i>	Saddiq & Khayyat, 2010
<i>Pityriasis versicolor</i>	Carmo, Cavalcante & Lima, 2013
<i>Rhizopus stolonifer</i>	Saddiq & Khayyat, 2010
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Helal et al., 2006
<b>Anti-inflamatório</b>	Gbenou et al., 2013; Sforcin et al., 2009
<b>Antioxidante</b>	Viuda-Martos et al., 2010
<b>Antiparasitário</b>	
<b>Antiprotozoário</b>	
<i>Leishmania spp.</i>	Machado et al., 2012; Oliveira et al., 2009; Santin et al., 2009
<i>Crithidia deanei</i>	Pedroso et al., 2006
<b>Inseticida</b>	
<i>Aedes aegypti</i> L.	Oyedele et al., 2002; Phasomkusolsil & Soonwera, 2011; Sritabutra, et al., 2011
<i>Anopheles dirus</i>	Oyedele et al., 2002; Phasomkusolsil & Soonwera, 2011; Sritabutra, et al., 2011
<i>Culex quinquefasciatus</i>	Oyedele et al., 2002; Phasomkusolsil & Soonwera, 2011; Pushpanathan, Jebanesan & Govindarajan, 2006
<i>Musca domestica</i> L.	Kumar et al., 2013
<i>Tribolium castaneum</i>	Olivero-Verbel, Nerio & Stashenko, 2010; Olivero-Verbel et al., 2013; Stefanazzi, Stadler & Ferrero, 2011
<i>Sitophilus oryzae</i>	Stefanazzi, Stadler & Ferrero, 2011
<i>Stomoxys calcitrans</i>	Baldacchino et al., 2013

<b>Nematicida</b> <i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	Arbosa et al., 2010; Faria et al., 2013
<b>Antipirético</b>	Gbenou et al., 2013
<b>Anti-proliferativo</b>	Manosroi, Dhumtanom & Manosroi, 2006
<b>Anti-ulceroso</b>	Fernandes et al., 2012
<b>Hipotensivo</b>	Moreira et al., 2010
<b>Neuroprotector</b>	Tayeboon et al., 2013

### 2.3. Toxicidade

Dado o crescente interesse farmacológico e económico no *Cymbopogon citratus* torna-se inevitável abordar o tema da sua possível toxicidade para o ser humano, uma vez que, para além da infusão que é tomada mundialmente, também o óleo essencial desta planta integra produtos como perfumes e cosméticos. Existe ainda o facto do óleo essencial poder ser integrado na alimentação animal, já que melhora a absorção e a utilização de nutrientes por parte destes (Omer et al., 2010). Sabe-se também que esta planta pode ser uma mais-valia no controlo de pragas, tanto como pesticida (Fandohan et al., 2004; Poonpaiboonpipat et al., 2013), como pelo facto de tornar o armazenamento de alimentos mais seguro (Bankole & Joda, 2004).

#### 2.3.1. Extracto aquoso

A toxicidade do extracto aquoso foi avaliada em ratos. Ao ser fornecida uma dose diária de 500 mg/kg/ dia, durante 42 dias, observou-se uma progressiva perda de peso. No entanto, em termos de toxicidade aguda, pode considerar-se que o decocto do *Cymbopogon citratus* é relativamente seguro, já que, uma toma de 5000 mg/kg não causou qualquer mortalidade (Adeneye & Agbaje, 2007).

Por sua vez, Akinboro & Bakare (2007) avaliaram a citotoxicidade do decocto do *Cymbopogon citratus* (4 g planta/L), em células de *Allium cepa* L.. Observou-se que a viabilidade celular foi reduzida para 50 % (IC<sub>50</sub>) com uma concentração de extracto de 3 %, e que o aumento da concentração de extracto originava uma diminuição do crescimento da raiz, do número de células a dividir-se e também do índice mitótico. Assim, o decocto demonstrou possuir um efeito mitodepressivo, afectando a divisão celular.

Outro estudo avaliou a toxicidade do extracto aquoso de *Cymbopogon citratus*, neste caso, em células da raiz de *Lactuca sativa*. Foram avaliadas concentrações de 5 a 30 mg/mL de extracto aquoso. Nas concentrações mais altas verificou-se toxicidade e genotoxicidade, através da redução do índice mitótico, do tempo de germinação das sementes, do

desenvolvimento da raiz e da ocorrência de aberrações cromossômicas. Contudo, a concentração mais baixa, 5 mg/mL, não demonstrou qualquer diferença relativamente ao controlo, não sendo considerada como tóxica (Sousa, Silva & Viccini, 2010).

### 2.3.2. Extracto hidroalcolico

A toxicidade do extracto hidroalcolico foi avaliada na *Artemia salina L.*, uma espécie de camarão, que é usado laboratorialmente para determinar a toxicidade *in vivo*, estimando-se a concentração média letal ( $LC_{50}$ ). O ensaio postula que o aumento da mortalidade é proporcional ao aumento da concentração, o que fornece uma relação linear de dose-efeito, determinando-se assim  $LC_{50}$ . Através do  $LC_{50}$ , estima-se o valor da dose média letal ( $LD_{50}$ ), reportada para ratos, tendo apresentado o ensaio uma boa correlação ( $r = 0,85$ ). O valor de  $LD_{50}$  para o extracto hidroalcolico do *Cymbopogon citratus* foi de 460 mg/kg (Parra *et al.*, 2001).

Também Tiwari, Dwivedi & Kakkar (2010) avaliaram a toxicidade de um extracto hidroalcolico de *Cymbopogon citratus*, desta vez numa linha celular de macrófagos alveolares. A viabilidade celular foi testada através do ensaio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenilbrometo de tetrazolina). Testaram-se concentrações desde 2,5 a 15  $\mu$ g e nenhuma destas apresentou citotoxicidade, demonstrando que o extracto, nestas concentrações, não exerce toxicidade nesta linha celular.

### 2.3.3. Óleo essencial

A toxicidade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* foi avaliada por Fandohan *et al.* (2008) que demonstraram não haver qualquer alteração do peso corporal, bem como alterações morfológicas em estruturas como estômago e fígado, quando fornecida ao rato uma concentração de óleo essencial entre 5 e 1500 mg/kg de peso corporal, durante 14 dias. Observaram também que a dose média letal ( $LD_{50}$ ) é 3250 mg/kg de peso corporal. Como não foi observado nenhum efeito adverso (NOAEL), em ratos, com 71,4 mg/kg/dia de óleo essencial, extrapolou-se que o nível seguro para humanos é 1/100 do NOAEL, sendo portanto 0,7 mg/kg/dia.

Também Blanco *et al.* (2009) observaram não haver qualquer toxicidade quando administrado aos ratos óleo essencial numa concentração de até 1 g/kg de peso corporal. Nesta concentração, durante 15 dias, não foram observadas variações de peso nem alterações comportamentais (redução de actividade, resposta ao toque, distúrbios motores ou do equilíbrio).



Um outro estudo foi realizado em ratos para avaliar a segurança da administração do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*. Costa et al. (2011a) determinaram que a dose média letal (LD<sub>50</sub>) de uma aplicação única de óleo essencial a ratos é de 3500 mg/kg de peso corporal. Já quando a administração se realizou num período alargado (21 dias), as concentrações de 1, 10 e 100 mg/kg de peso corporal não demonstraram qualquer alteração nos órgãos internos do animal, bem como nas análises bioquímicas e à urina. Mais ainda, a concentração de 100 mg/kg de peso corporal demonstrou uma diminuição dos níveis de colesterol. Assim, este estudo comprova a segurança do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, já que não apresenta toxicidade nem genotoxicidade.

Outros estudos foram realizados, desta vez *in vitro*. Kpoviessi et al. (2014) avaliaram a citotoxicidade do óleo essencial através do ensaio MTT. Este demonstrou alguma toxicidade, sendo que as concentrações tóxicas observadas foram 10,63 µg/mL, em células do ovário de hamster, e 39,77 µg/mL, para a linha celular de fibroblastos não cancerígenos.

Koba et al. (2009) avaliaram também a citotoxicidade do óleo essencial com o ensaio MTT, mas desta vez em células da epiderme humana. Contrariamente ao que foi observado por Kpoviessi et al. (2014), foi verificado que o óleo essencial não apresenta qualquer toxicidade nas concentrações testadas até 100 µL/mL, sendo que a viabilidade celular foi reduzida para 50% (IC<sub>50</sub>) com a concentração de 150 µL/mL.

O IC<sub>50</sub> do óleo essencial foi também determinado por Santin et al. (2009) que estimaram que a concentração capaz de reduzir a viabilidade celular para 50%, em macrófagos, é 25 µg/mL.

Outro estudo foi realizado no seguimento dos já descritos, em duas linhas celulares diferentes: macrófagos e células do endotélio aórtico de bovinos. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio MTT e, as concentrações testadas (25, 38 e 52 µg/mL) não apresentaram qualquer citotoxicidade (Machado et al., 2012).

Por fim, Silva et al. (2010) avaliaram a toxicidade do óleo essencial em neutrófilos humanos, com recurso ao teste lactato desidrogenase (LDH), um indicador de citotoxicidade. Mais uma vez, nenhuma toxicidade foi observada nas células quando usadas concentrações até 100 µg/mL.

Assim, os estudos acima descritos demonstram que o óleo essencial e os extractos de *Cymbopogon citratus* são seguros para o consumo humano, dependendo da dose em que são administrados, já que se observa uma clara tendência dose-efeito. Para além da ausência de toxicidade demonstrou-se também a segurança da aplicação de uma toma única bem como de um tratamento alargado.

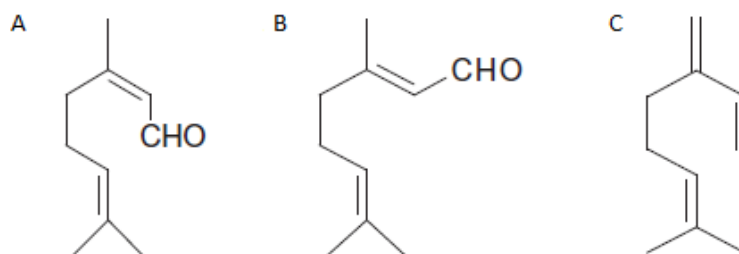
### 3. Fitoquímica

Devido ao elevado valor etnofarmacológico e económico de *Cymbopogon citratus*, tornou-se essencial aprofundar o conhecimento no que diz respeito ao perfil químico desta planta medicinal e perceber as variações a que pode estar sujeito.

#### 3.1. Óleo essencial

Óleos essenciais não são mais do que misturas complexas e naturais com imensos constituintes químicos na sua composição (Edris, 2007). Devido ao seu potencial económico, vários estudos têm sido realizados na tentativa de se perceber um pouco mais sobre a sua composição química e as influências a que esta pode estar sujeita.

No caso específico do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, sabe-se que estas alterações podem verificar-se com a variação da época e zona geográfica de cultivo. Contudo, independente da zona de origem, o constituinte predominante é normalmente o citral, com uma abundância de 30 a 94% (Negrelle & Gomes, 2007). Este composto não é mais do que uma mistura dos aldeídos monoterpénicos acíclicos neral (*cis*-citral ou citral B) e geranial (*trans*-citral ou citral A), sendo o último o mais abundante (Baratta *et al.*, 1998; Bassolé *et al.*, 2011; Cimanga *et al.*, 2002; Fandohan *et al.*, 2008; Fandohan *et al.*, 2004; Fernandes *et al.*, 2012; Gbenou *et al.*, 2013; Kasali, Oyedeji & Ashilokun, 2001; Koba *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2013; Machado *et al.*, 2012; Masamba *et al.*, 2003; Moreira *et al.*, 2010; Ohno *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2009; Olivero-Verbel, Nerio & Stashenko, 2010; Poonpaiboonpipat *et al.*, 2013; Rao *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2010; Stefanazzi, Stadler & Ferrero, 2011; Viuda-Martos *et al.*, 2010). Ambos os estereoisómeros estão representados na Figura 10.



**Figura 10** – Estrutura dos compostos maioritários presentes no *Cymbopogon citratus*, sendo (A) Neral, (B) Geranial e (C) Mirceno. Adaptado de Machado *et al.* (2012).

O composto maioritário é o responsável pelo cheiro característico de *Cymbopogon citratus*, bem como pelo seu cultivo em larga escala a nível mundial, sendo a planta geralmente colhida entre Março e Junho, uma vez que nesta época há um maior rendimento de citral no óleo essencial (Negrelle & Gomes, 2007).

É também frequentemente referida a presença de nerol e geraniol, os álcoois correspondentes aos aldeídos neral e geranial, respectivamente (Bassolé *et al.*, 2011; Cimanga *et al.*, 2002; Fandohan *et al.*, 2004; Fernandes *et al.*, 2012; Gbenou *et al.*, 2013; Kasali, Oyedeji & Ashilokun, 2001; Koba *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2013; Machado *et al.*, 2012; Masamba *et al.*, 2003; Moreira *et al.*, 2010; Negrelle & Gomes, 2007; Olivero-Verbel, Nerio & Stashenko, 2010; Poonpaiboonpipat *et al.*, 2013; Rao *et al.*, 2009).

Outro composto característico desta planta é o mirceno, um hidrocarboneto monoterpénico acíclico, que se encontra com uma abundância de 0,3 a 28% e está representado na Figura 10 (Baratta *et al.*, 1998; Bassolé *et al.*, 2011; Cimanga *et al.*, 2002; Fandohan *et al.*, 2008; Fandohan *et al.*, 2004; Fernandes *et al.*, 2012; Gbenou *et al.*, 2013; Kasali, Oyedeji & Ashilokun, 2001; Koba *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2013; Machado *et al.*, 2012; Masamba *et al.*, 2003; Moreira *et al.*, 2010; Ohno *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2009; Poonpaiboonpipat *et al.*, 2013; Rao *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2010; Viuda-Martos *et al.*, 2010).

Para além dos compostos mencionados, muitos outros têm sido descobertos no óleo essencial, numa abundância muito menor. São principalmente terpenos embora existam outros.

Na Tabela 8 estão reunidos os compostos terpénicos mais referenciados, organizados de acordo com a sua classificação.

**Tabela 8** – Compostos terpénicos presentes no óleo essencial de *Cymbopogon citratus*.

Função/ Composto (Abundância)	Referências
<b>Monoterpenos acíclicos</b>	
(E)- e (Z)- $\alpha$ -Ocimeno, (E)- e (Z)- $\beta$ -Ocimeno (0,2 – 1,8%)	Baratta <i>et al.</i> , 1998; Fernandes <i>et al.</i> , 2012; Gbenou <i>et al.</i> , 2013; Kasali, Oyedeji & Ashilokun, 2001; Kumar <i>et al.</i> , 2013; Machado <i>et al.</i> , 2012; Olivero-Verbel, Nerio & Stashenko, 2010; Poonpaiboonpipat <i>et al.</i> , 2013; Silva <i>et al.</i> , 2010
<b>Monoterpenos acíclicos oxigenados</b>	
<b>Álcoois</b>	
Citroneol (0,1 - 0,6%)	Cimanga <i>et al.</i> , 2002; Gayathri <i>et al.</i> , 2011; Koba <i>et al.</i> , 2009

Linalol (0,2 - 3,4%)	Baratta <i>et al.</i> , 1998; Bassolé <i>et al.</i> , 2011; Cimanga <i>et al.</i> , 2002; Fernandes <i>et al.</i> , 2012; Gayathri <i>et al.</i> , 2011; Gbenou <i>et al.</i> , 2013; Kasali, Oyedeji & Ashilokun, 2001; Kumar <i>et al.</i> , 2013; Machado <i>et al.</i> , 2012; Masamba <i>et al.</i> , 2003; Moreira <i>et al.</i> , 2010; Negrelle & Gomes, 2007; Ohno <i>et al.</i> , 2003; Olivero-Verbel, Nerio & Stashenko, 2010; Rao <i>et al.</i> , 2009; Sforcin <i>et al.</i> , 2009; Silva <i>et al.</i> , 2010; Viuda-Martos <i>et al.</i> , 2010
<b>Aldeídos</b>	
Citronela (0,1 - 1,7%)	Baratta <i>et al.</i> , 1998; Cimanga <i>et al.</i> , 2002; Gbenou <i>et al.</i> , 2013; Kasali, Oyedeji & Ashilokun, 2001; Koba <i>et al.</i> , 2009; Kumar <i>et al.</i> , 2013; Machado <i>et al.</i> , 2012; Ohno <i>et al.</i> , 2003; Rao <i>et al.</i> , 2009; Silva <i>et al.</i> , 2010
<b>Cetonas</b>	
6-Metil-hept-5-en-2-ona (0,4-2,7%)	Baratta <i>et al.</i> , 1998; Gbenou <i>et al.</i> , 2013; Koba <i>et al.</i> , 2009; Kumar <i>et al.</i> , 2013; Machado <i>et al.</i> , 2012; Moreira <i>et al.</i> , 2010; Olivero-Verbel, Nerio & Stashenko, 2010
<b>Ésteres</b>	
Acetato de citronelilo (<0,1%)	Baratta <i>et al.</i> , 1998; Machado <i>et al.</i> , 2012; Negrelle & Gomes, 2007
Acetato geranilo (0,1 - 4,2%)	Baratta <i>et al.</i> , 1998; Cimanga <i>et al.</i> , 2002; Gbenou <i>et al.</i> , 2013; Koba <i>et al.</i> , 2009; Kumar <i>et al.</i> , 2013; Machado <i>et al.</i> , 2012; Masamba <i>et al.</i> , 2003; Moreira <i>et al.</i> , 2010; Ohno <i>et al.</i> , 2003; Olivero-Verbel, Nerio & Stashenko, 2010
Acetato nerilo (6,3 - 13,6%)	Cimanga <i>et al.</i> , 2002; Sforcin <i>et al.</i> , 2009; Stefanazzi, Stadler & Ferrero, 2011
<b>Monoterpeno cíclico</b>	
Limoneno (0,1 - 6,7%)	Baratta <i>et al.</i> , 1998; Cimanga <i>et al.</i> , 2002; Koba <i>et al.</i> , 2009; Kumar <i>et al.</i> , 2013; Machado <i>et al.</i> , 2012; Ohno <i>et al.</i> , 2003; Rao <i>et al.</i> , 2009
<b>Monoterpeno cíclico oxigenado</b>	
<b>Alcoois</b>	
$\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -Terpineol e 4-Terpinol (0,4 - 3,0%)	Cimanga <i>et al.</i> , 2002; Fandohan <i>et al.</i> , 2008; Fernandes <i>et al.</i> , 2012; Gbenou <i>et al.</i> , 2013; Koba <i>et al.</i> , 2009; Kumar <i>et al.</i> , 2013; Silva <i>et al.</i> , 2010
<b>Monoterpeno bicíclico</b>	
Canfeno (0,7 - 1,2%)	Cimanga <i>et al.</i> , 2002; Gbenou <i>et al.</i> , 2013; Kumar <i>et al.</i> , 2013

$\alpha$ - e $\beta$ -Pino	Cimanga <i>et al.</i> , 2002; Gbenou <i>et al.</i> , 2013; Kumar <i>et al.</i> , 2013; Olivero-Verbel, Nerio & Stashenko, 2010
(0,5 – 8,1%)	
<b>Monoterpeno bicíclico oxigenado</b>	
<b>Álcoois</b>	
Borneol	Cimanga <i>et al.</i> , 2002; Fernandes <i>et al.</i> , 2012; Kumar <i>et al.</i> , 2013;
(0,7 - 3,7%)	Masamba <i>et al.</i> , 2003
<b>Éteres</b>	
1,8-Cineol	Baratta <i>et al.</i> , 1998; Cimanga <i>et al.</i> , 2002; Gbenou <i>et al.</i> , 2013; Kumar <i>et al.</i> , 2013
(0,1- 7,52%)	
<b>Sesquiterpeno bicíclico</b>	
$\alpha$ -Cariofileno	Kasali, Oyedeji & Ashilokun, 2001; Machado <i>et al.</i> , 2012; Negrelle & Gomes, 2007
$\beta$ -Cariofileno	
(0,1 – 0,3%)	

### 3.2. Compostos não-voláteis

Como já se verificou anteriormente, muitos compostos voláteis foram identificados no óleo essencial do *Cymbopogon citratus*, uma vez que este é um produto com valor económico acrescido. Todavia, para além destes, existem também muitos outros constituintes não voláteis que, só agora começam a tomar um papel relevante na investigação desta planta medicinal. De entre estes, tem sido dada especial atenção aos compostos fenólicos, principalmente ácidos fenólicos e flavonóides (Figueirinha *et al.*, 2008; Negrelle & Gomes, 2007). A Tabela 9 reúne os compostos não voláteis mais referenciados no *Cymbopogon citratus*.

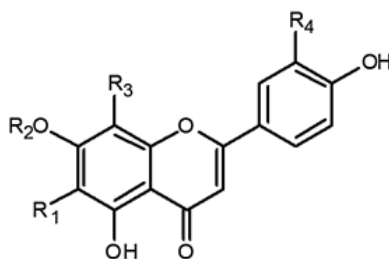
Os ácidos fenólicos identificados nas folhas do *Cymbopogon citratus* são na sua maioria o ácido cafeico, *p*-cumárico e clorogénico, bem como derivados dos mesmos (Cheel *et al.*, 2005; Figueirinha *et al.*, 2008; Gayathri *et al.*, 2011; Marques & Farah, 2009; Negrelle & Gomes, 2007; Tapia *et al.*, 2007).

No que diz respeito aos flavonóides, estes são maioritariamente derivados (C- e O-heterósidos) da luteolina e da apigenina (Figura 11), embora também possam ser detectadas as agliconas. Em geral, a glicolisação dá-se em C<sub>6</sub> e C<sub>8</sub>, no caso dos C-heterósidos, e em C<sub>7</sub> para os O-heterósidos. As oses preferenciais na ligação à aglicona são a glucose e a ramnose, embora possam existir outros (Cheel *et al.*, 2005; Figueirinha *et al.*, 2008; Gayathri *et al.*, 2011; Negrelle & Gomes, 2007; Orrego, Leiva & Cheel, 2009).

Para além dos ácidos fenólicos e dos flavonóides, também os taninos são frequentemente detectados nas folhas do *Cymbopogon citratus* (Asaolu, Oyeyemi &

Olanlokun, 2009; Hindumathy, 2011; Ewansiha *et al.*, 2012; Negrelle & Gomes, 2007; Soares *et al.*, 2013). Ao contrário dos primeiros, não existem muitos estudos focados na identificação de taninos ainda que, Figueirinha e os seus colaboradores (2008) os identificassem como proantocianidinas.

Para além dos compostos fenólicos, outros foram identificados tais como ácido glutâmico, alcalóides, elemicina, esteróides, hidroquinona e saponinas (Asaolu, Oyeyemi & Olanlokun, 2009; Hindumathy, 2011; Negrelle & Gomes, 2007; Shah *et al.*, 2012; Tapia *et al.*, 2007).



R<sub>4</sub> = H – Apigenina; OH – Luteolina  
 R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub> = Açúcar ou H

**Figura 11** – Estrutura dos flavonóides maioritários presentes no *Cymbopogon citratus*. Adaptado de Figueirinha *et al.* (2010).

**Tabela 9** – Compostos não voláteis identificados no *Cymbopogon citratus*.

Classe/Composto	Referências
<b>Ácidos Fenólicos</b>	
Ácido cafeico	
Ácido clorogénico	
Ácido criptoclorogénico	Cheel <i>et al.</i> , 2005; Francisco <i>et al.</i> , 2013; Gayathri <i>et al.</i> , 2011;
Ácido neoclorogénico	Marques & Farah, 2009;
Ácido <i>p</i> -cumárico	Negrelle & Gomes, 2007;
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	Tapia <i>et al.</i> , 2007
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico 3- <i>O</i> -β-D-glucósido	
Ácidos 3-, 4- e 5-feruloilquínico	
Ácidos 3,4-, 3,5- e 4,5-dicafeoilquínico	
<b>Flavonóides</b>	
2- <i>O</i> -Ramnosil-limborientino	
2''- <i>O</i> -Ramnosil-isoorientina	
6- <i>C</i> -Glucosil-luteolina (isoorientina ou homoorientina)	Cheel <i>et al.</i> , 2005; Figueirinha <i>et al.</i> , 2008; Gayathri <i>et al.</i> ,
8- <i>C</i> -Glucosil-luteolina (orientina)	2011; Negrelle & Gomes,
6- <i>C</i> -Hexosil-8- <i>C</i> -pentosil-luteolina	2007; Orrego, Leiva & Cheel,
6- <i>C</i> -Pentosil-luteolina	2009
6- <i>C</i> -Pentosil-8- <i>C</i> -desoxi-hexosil-luteolina	
6- <i>C</i> -Pentosil-8- <i>C</i> -hexosil-apigenina	
6- <i>C</i> -Pentosil-8- <i>C</i> -pentosil luteolina	

7-O-Glucosil-luteolina	
7-O-Neohesperosil-luteolina	
Apigenina	
Canferol	
Isoscoparina	
Luteolina	
Quercetina	
Swertiajaponina	
X''-O-Ramnosil-C-pentosil-luteolina	
X''-O-Ramnosil-C-(6-desoxi-hexosil)-luteolina	
<b>Taninos</b>	
Proantocianidinas	Figueirinha <i>et al.</i> , 2008)
<b>Outros</b>	Orrego, Leiva & Cheel, 2009; Hindumathy, 2011; Negrelle & Gomes, 2007; Shah <i>et al.</i> , 2012; Tapia <i>et al.</i> , 2007
Ácido glutâmico, alcalóides, elemicina, esteróides, hidroquinona e saponinas	

## D. Métodos Extractivos e Analíticos

### I. Processos extractivos

A extracção envolve a separação de constituintes a partir de matrizes diversas, nomeadamente, vegetais. Na extração sólido-líquido é fundamental a escolha do solvente adequado à natureza química dos fitoconstituintes que se pretendem extrair. O solvente, ao contactar com a matriz, extrai os compostos que para ele tenham mais afinidade, ocorrendo uma transferência de massa desses compostos para o solvente, até que se atinja o equilíbrio. O solvente escolhido deve ser o mais selectivo possível já que é devido a este factor que se pode extrair essencialmente os compostos pretendidos ou aumentar a quantidade extraída. Para um mesmo solvente, a solubilidade dos diversos compostos é altamente variável, dependendo da sua natureza química e do ambiente químico em que decorre a extracção (Handa *et al.*, 2008; Oloyede, 2009).

O processo extractivo não depende apenas do solvente utilizado mas também se há ou não agitação que facilite o contacto entre a matriz e o solvente extractivo. Também a divisão do material vegetal é um factor importante. A necessidade de fragmentar e/ou pulverizar a planta relaciona-se com a rigidez da estrutura histológica que queremos submeter à extracção. A dimensão da partícula deve ter uma granulometria adequada ao processo extrativo utilizado. É ainda necessário referir que o aumento da temperatura provoca um aumento da solubilidade de qualquer substância, e, por essa mesma razão, as extracções a quente são sempre mais rápidas do que aquelas realizadas à temperatura ambiente. Contudo, temperaturas elevadas nem sempre podem ser utilizadas devido à possível degradação de compostos termolábeis. O tempo de extracção varia em função da rigidez dos tecidos vegetais, da fragmentação da amostra, da natureza das substâncias a

extrair, do solvente utilizado e, da utilização ou não de temperaturas elevadas e agitação (Handa *et al.*, 2008).

A forma mais comum de se obter o óleo essencial de uma planta, a nível laboratorial, é através da hidrodestilação. Desta forma, os constituintes voláteis da planta são arrastados pelo vapor de água durante um longo período de tempo, que pode atingir 3 horas (Kürkçüoğlu, Koşar & Başer, 2007). A mistura de vapor de água e óleo essencial é condensada por arrefecimento e, desta forma, o óleo separa-se automaticamente da água da destilação. Caso se pretenda dosear o teor em óleo essencial, pode-se recorrer ao aparelho de Clevenger. O destilado é recolhido num tubo graduado, que permite avaliar o rendimento extractivo, ao passo que a água retorna ao balão onde se encontra a planta, a fim de iniciar um novo ciclo. Este processo, em que a planta está sujeita a um aquecimento juntamente com a água em ebulição, é similar à decocção, diferindo por ocorrer em circuito fechado e durante um maior período de tempo (Costa, 2000; Handa *et al.*, 2008).

## **2. Métodos cromatográficos**

### **2.1. Cromatografia em camada fina (TLC)**

A TLC é um processo de separação cromatográfico no qual a fase estacionária é aplicada na forma de uma fina camada colocada sobre um suporte sólido (Hahn-Deinstrop, 2007). A eluição da fase móvel ocorre devido à acção da capilaridade, arrastando consigo os compostos para os quais tem mais afinidade. Cada composto interage de forma particular com a fase estacionária e a fase móvel, adquirindo assim uma identidade única (Vermerris & Nicholson, 2006). Os compostos são então identificados através do factor de retenção ( $R_f$ ), definido como a quociente entre a distância percorrida por um dado composto e a distância percorrida pelo solvente (Hahn-Deinstrop, 2007).

Um dos sistemas mais eficazes na identificação de ácidos fenólicos e flavonóides é a utilização de placas de celulose, tendo como eluente uma solução de ácido acético a 15%. Estes polifenóis emitem uma fluorescência diferente ao serem revelados com o reagente Neu/PEG (1% de ácido difenilbórico 2-aminoetil ester em metanol/ 5% de polietilenoglicol-4000 em etanol) e submetidos a radiação ultravioleta, a 366 nm (Wagner & Bladt, 2001). Assim, os ácidos fenólicos emitem uma fluorescência azul (Hajnos, 2008), enquanto os flavonóides apresentam uma tonalidade alaranjada, se forem derivados de luteolina ou amarelo esverdeado caso derivem da apigenina (Anderson & Markham, 2006). Os taninos, por sua vez, apresentam uma tonalidade castanha, e arrastamento no sistema cromatográfico utilizado, contrariamente ao que ocorre para os ácidos fenólicos e flavonóides. Este facto



ocorre já que o método separativo não é o mais indicado para a separação de proantocianidinas (Figueirinha *et al.*, 2008). Para estes compostos em especial, as placas são de sílica e a fase móvel, uma mistura constituída por acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético e água (30:1,2:0,8:8) (Anderson & Markham, 2006). Para a detecção de taninos condensados utiliza-se o reagente DMACA (4-dimetilaminocinamaldeído) que reage com os 3-flavanóis adquirindo estes compostos uma cor azulada, à luz visível (Abeynayake *et al.*, 2011).

## 2.2. Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)

A cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) é utilizada normalmente para separar, identificar e quantificar compostos. Não é mais do que uma cromatografia em coluna em que a fase estacionária consiste de pequenas partículas (3-50  $\mu\text{m}$ ) contidas numa coluna com um diâmetro pequeno (2-5 mm). É essencial uma ou duas bombas que propulsionem a fase móvel através da coluna. A escolha dos solventes e seu gradiente varia consoante a natureza da fase estacionária e os compostos a analisar, pelo que é de extrema importância para uma boa análise. Para a detecção dos compostos usam-se diversos detectores acoplados ao HPLC, de entre os quais o detector de fotodíodos e/ou um espectrómetro de massa. Cada composto é único dado que possui um espectro de radiação e uma massa específica (Kamboj, 2012; Malviya *et al.*, 2009).

O detector de fotodíodos fornece o perfil espectral UV-Visível dos compostos eluídos, assim como os seus máximos de absorção, fornecendo assim uma valiosa informação para a elucidação estrutural (Anderson & Markham, 2006).

Também a espectrometria de massa (MS) é uma ferramenta importante na identificação de compostos, tendo em conta a massa molecular do composto. No fundo, MS envolve a medição da massa ( $m$ ) de um composto em função da sua carga ( $z$ ), ( $m/z$ ). Na maioria das análises, a carga é um e, por essa razão, o peso molecular do ião é igual à relação  $m/z$ . Para que a identificação do composto seja possível, são necessários três passos: ionização, análise de massa e detecção (Vermerris & Nicholson, 2006). Após introdução da amostra no espectrómetro de massa, esta tem de sofrer ionização. Como os compostos fenólicos não são voláteis, a técnica mais utilizada é a ionização por electrospray (ESI). Esta é uma técnica de ionização suave que realiza a transferência de iões em solução para a fase gasosa. A solução é constituída por um solvente volátil na presença do analito. A solução da amostra introduz-se no espectrómetro de massa através de um tubo capilar mantido a um elevado potencial eléctrico, relativamente ao eléctrodo de encontro. À saída do capilar, uma

corrente de azoto quente evapora o solvente das gotas ionizadas, e os iões dirigem-se então ao analisador (Gross, 2004).

Após a ionização, o ião resultante é analisado em função de  $m/z$  e dirige-se para o detector do espectrómetro de massa. A maioria dos detectores tem como base o facto dos iões embaterem na superfície do detector. Consoante a geometria do detector, a velocidade de impacto e as características químicas do ião, são formados vários electrões secundários. A informação obtida do detector é então usada para gerar o espectro de massa. Normalmente, o ião mais intenso, com uma abundância de 100% é denominado o pico de base, e os outros iões no espectro de massa são normalizados para a intensidade deste pico (Vermerris & Nicholson, 2006).

A espectrometria de massa tandem ( $MS^n$ ) faculta informações importantes sobre a estrutura de compostos, para além dos seus pesos moleculares. Nesta técnica analítica, é dado ao ião de interesse um excesso de energia que resulta numa nova fragmentação, da qual resultam informações adicionais sobre a estrutura dos iões precursores (Gross, 2004; Vermerris & Nicholson, 2006).

### 3. Métodos Espectrofotométricos

O teor de polifenóis pode constituir um bom indiciador de actividades biológicas de uma determinada planta medicinal.

A dosagem dos fenóis totais pode ser realizada por uma reacção colorimétrica com o reagente Folin-Ciocalteu. O reagente em causa não é mais do que uma mistura de óxidos de tungsténio e de molibdénio. Na presença de polifenóis o reagente Folin-Ciocalteu é reduzido, possuindo, os produtos resultantes desta redução, uma cor azulada. A intensidade da cor da solução é proporcional à concentração dos fenóis totais (Waterhouse, 2002). A concentração dos fenóis é expressa em equivalentes de ácido gálgico.

O teor de ácidos hidroxicinâmicos totais é conseguido através da reacção destes com o reagente de Arnow (reagente nitrito-molibdénio). O catecol, quando combinado com o reagente de Arnow, em meio ácido, revela uma coloração amarela. O amarelo dá lugar a um vermelho-alaranjado na presença de um excesso de hidróxido de sódio. A intensidade da cor da solução é proporcional à concentração dos ácidos hidroxicinâmicos totais, expressa em equivalentes de ácido cafeico (Clark, 2004).

Quanto ao teor de flavonóides totais, este é normalmente avaliado com o tricloreto de alumínio, que, na presença de flavonóides confere à solução uma coloração amarelada. A concentração dos flavonóides é expressa em equivalentes de rutina (Laloo & Sahu, 2011).

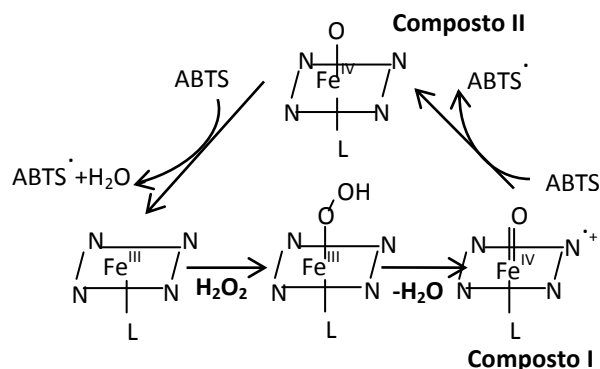
A dosagem de taninos pode ser realizada por diversos métodos, um dos quais se baseia no princípio de que os taninos se ligam às proteínas, precipitando-as (Vermerris & Nicholson, 2006). Assim, sendo conhecido o teor de fenóis totais pela reacção com o reagente fosfomolibdotungesténio, antes e depois da reacção com o pó de pele, consegue determinar-se o teor de taninos, expressos em equivalentes de pirogalhol (Amat, Upur & Blazeković, 2010; Žugić *et al.*, 2014).

A concentração dos polifenóis tem vindo a ser relacionada com a actividade antioxidante e anti-inflamatória (Figueirinha *et al.*, 2010). Uma das formas mais comuns de se determinar a actividade antioxidante passa pela utilização do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) que, em solução alcoólica, possui uma cor violeta, absorvendo a 517 nm. Esta coloração deve-se à presença de um electrão desemparelhado, mas que, em presença de compostos dadores de electrões (antioxidantes) passa à forma não radicalar, perdendo a sua cor violeta (Molyneux, 2004).

Também o FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) é um ensaio frequentemente utilizado para avaliar o potencial antioxidante. Na presença de compostos antioxidantes o complexo tripiridil-triazina férrico ( $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TPTZ) é reduzido à forma ferroso ( $\text{Fe}^{\text{II}}$ -TPTZ) que, sob condições acídicas, apresenta uma coloração azulada com um máximo de absorção a 593 nm (Benzie & Strain, 1996; Kaushik *et al.*, 2012).

Para avaliação da actividade antioxidante existe também o método ABTS. O radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  é produzido a partir de um precursor: o ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico. Este radical possui uma coloração azul esverdeada, com máximos de absorvância variáveis entre 414 e 734 nm e pode ser formado tanto por reacções enzimáticas como químicas. No caso da reacção enzimática a formação do radical dá-se na presença de peroxidase, peróxido de hidrogénio e ABTS. A reacção ocorre por oxidação do grupo prostético heme da peroxidase, na presença do peróxido de hidrogénio (Figura 12). Há formação de um composto intermediário com um estado de oxidação  $\text{Fe}^{5+}$  (composto I), constituído pelo ferro oxiferril ( $\text{O}=\text{Fe}^{5+}$ ) e pelo catião radical porfírico. Este reage com o ABTS, retirando-lhe um electrão, o que leva à formação do segundo composto intermediário com um estado de oxidação  $\text{Fe}^{4+}$  (composto II). Uma nova molécula de ABTS é oxidada e, desta forma a enzima retorna ao seu estado de oxidação natural ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Resulta assim o radical  $\text{ABTS}^+$  (Kadnikova & Kostić, 2002; Uliana, Riccardi & Yamanaka, 2008). No caso dos métodos químicos, o radical forma-se a partir da oxidação do sal pelo persulfato de potássio. Este método baseia-se na capacidade dos antioxidantes reduzirem o catião  $\text{ABTS}^{\bullet+}$

a ABTS, o que provoca um decréscimo na absorvância (Kadnikova & Kostić, 2002; Re *et al.*, 1999; Sucupira *et al.*, 2012).



**Figura 12** – Ciclo catalítico da peroxidase. Adaptado de Ceni (2005).

O rastreio da actividade anti-inflamatória faz-se normalmente pela dosagem dos nitritos formados, recorrendo ao reagente de Griess, que consta de uma mistura extemporânea, em partes iguais, de N-(1-naftil)etilenodiamina (Composto A) e ácido sulfanílico (Composto B). Se na solução a testar estiverem presentes nitritos, estes reagem com o ácido sulfanílico, em meio ácido, formando um sal diazónico. Este sal reage então com o Composto A formando uma molécula com coloração rosa. A intensidade da cor é directamente proporcional à concentração de nitritos em solução (Srihari, Beeregowda & Vishnu, 2012; Sun *et al.*, 2003).

No entanto, para além da eficácia, também é imprescindível avaliar a segurança na utilização dos produtos naturais. Por essa razão é essencial verificar a ausência de toxicidade celular. Com esse objectivo, procede-se frequentemente à realização do teste MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenilbrometo de tetrazolina), dado que os organismos vivos possuem enzimas capazes de reagir com esta molécula. A redução do anel tetrazólio dá origem a cristais de formazano de coloração roxa, demonstrando assim o estado funcional da cadeia respiratória celular, e conseqüentemente a viabilidade da célula (Peres *et al.*, 2008).

## E. Objectivos

*Cymbopogon citratus* é uma planta reconhecida em todo o mundo pelas suas propriedades etnofarmacológicas, sendo estas, em parte, atribuídas ao teor em compostos fenólicos. Industrialmente, esta planta é muito utilizada pelo seu óleo essencial, matéria-prima integrante de produtos da indústria cosmética, perfumeira e farmacêutica.

Uma das formas mais comuns de se extrair óleo essencial de uma planta é através de hidrodestilação. Do processo extrativo resulta um extracto aquoso rico em polifenóis; desperdício que, se não for devidamente tratado poderá acarretar problemas ambientais.

Com base no descrito, os objectivos deste estudo foram:

- Avaliar o perfil fitoquímico do extracto aquoso resultante da hidrodestilação das folhas do *Cymbopogon citratus* (CcHD) e, compará-lo com o infuso (Ccl) utilizado na medicina tradicional;
- Aquilatar a influência do processo extractivo na composição química do extracto;
- Fraccionar o CcHD de forma a serem obtidas fracções mais puras, nomeadamente ricas em taninos;
- Identificar os compostos presentes em CcHD e nas fracções a partir dele obtidas;
- Determinar o potencial antioxidante e anti-inflamatório do CcHD e das fracções;
- Verificar a segurança das amostras eficazes, pela ausência de toxicidade;
- Estabelecer a relação entre o tipo de compostos identificados e a bioactividade demonstrada pelo CcHD e suas fracções;
- Contribuir para viabilizar a reutilização de um desperdício da indústria com potencial farmacológico.

## Capítulo II

---

### Materiais e Métodos

## I. Materiais

As folhas de *Cymbopogon citratus* foram gentilmente cedidas por uma empresa portuguesa, Ervital<sup>®</sup>. A planta foi cultivada na região de Mezio, Castro D’Aire numa estufa a 1000 m acima do nível do mar. A identificação da planta foi confirmada pelo Dr. J. Paiva, do departamento de Botânica da Universidade de Coimbra. As folhas secas do *Cymbopogon citratus* foram então congeladas a fim de preservar os seus constituintes. Na altura da sua utilização o material foi colocado no exsiccador até atingir a temperatura ambiente, para não se hidratar. Posteriormente, fragmentou-se e/ou pulverizou-se o material com o intuito de aumentar o rendimento extractivo.

O ácido acético, ácido acético glacial, *n*-hexano, carbonato de sódio decahidratado, carbonato de sódio anidro, reagente Folin-Ciocalteu, cloreto de alumínio, etanol e os solventes usados para HPLC foram obtidos da Merck (Darmstadt, Germany). O 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), ácido 2,2-azino-*bis*(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS), ácido 6-hidroxi-2-5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (TROLOX), rutina, ácido gálgico, piragalhol, ácido cafeico, reagente fosfomolibdotungstíco, o corante tryptan blue, isopropanol, 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenilbrometo de tetrazolina (MTT) e o LPS da *Escherichia coli* (serotipo 026:B6) foram da Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). O meio de cultura DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle Medium) com baixo teor de glucose foi obtido da Invitrogen (Paisley, UK), enquanto o soro fetal bovino (FBS) foi obtido da Gibco (Paisley, UK). O tampão fosfato-salino (PBS) e o reagente Griess (dicloridrato de N-(1-naftil)etilenodiamina e sulfanilamida) foram da Merck (Darmstadt, Germany). Todos os outros reagentes, acetona, acetato de sódio anidro e tri-hidratado, nitrito de sódio, molibdato de sódio, acetato de etilo, ácido fórmico, ácido clorídrico, cloreto de ferro hexahidratado, persulfato de potássio, peroxidase, peróxido de hidrogénio, glicina, ácido difenilbórico 2-aminoetil éster (Neu), polietilenoglicol-4000 (PEG-400) e 4-dimetilamino-cinamaldeído (DMACA) foram da Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO) ou Merck (Darmstadt, Germany). A água Ultra-pura Milli-Q da Millipore (Molsheim, France) foi sempre usada.

## 2. Métodos

### 2.1. Extracção

A extracção foi realizada por hidrodestilação. As folhas fragmentadas foram extraídas com água à temperatura de ebulição (1:15, m/v), durante 180 minutos, em aparelho de Clevenger, de acordo com o que está descrito na Farmacopeia Europeia (2011) para a extracção de óleo essencial. É de salientar que, a fase aquosa resultante da extracção do

óleo essencial, industrialmente é rejeitada. Para este trabalho o extracto aquoso foi objecto de estudo. Para isso, a solução aquosa foi filtrada, sob vácuo, e deslipidificada com *n*-hexano, sendo posteriormente concentrada em evaporador rotativo e liofilizada. O extracto resultante da liofilização (CcHD) apresentou um rendimento de 10,94g/100g de planta seca.

Em paralelo, foi preparada uma infusão da mesma planta. Colocou-se água a ferver sobre a planta pulverizada (1:30, m/v) durante 15 minutos. Filtrou-se o infuso, sob vácuo e deslipidificou-se com *n*-hexano, sendo posteriormente concentrado em evaporador rotativo e liofilizado. O extracto resultante da liofilização (Ccl) revelou um rendimento de 16,52g/100g de planta seca.

## 2.2. Fraccionamento do extracto

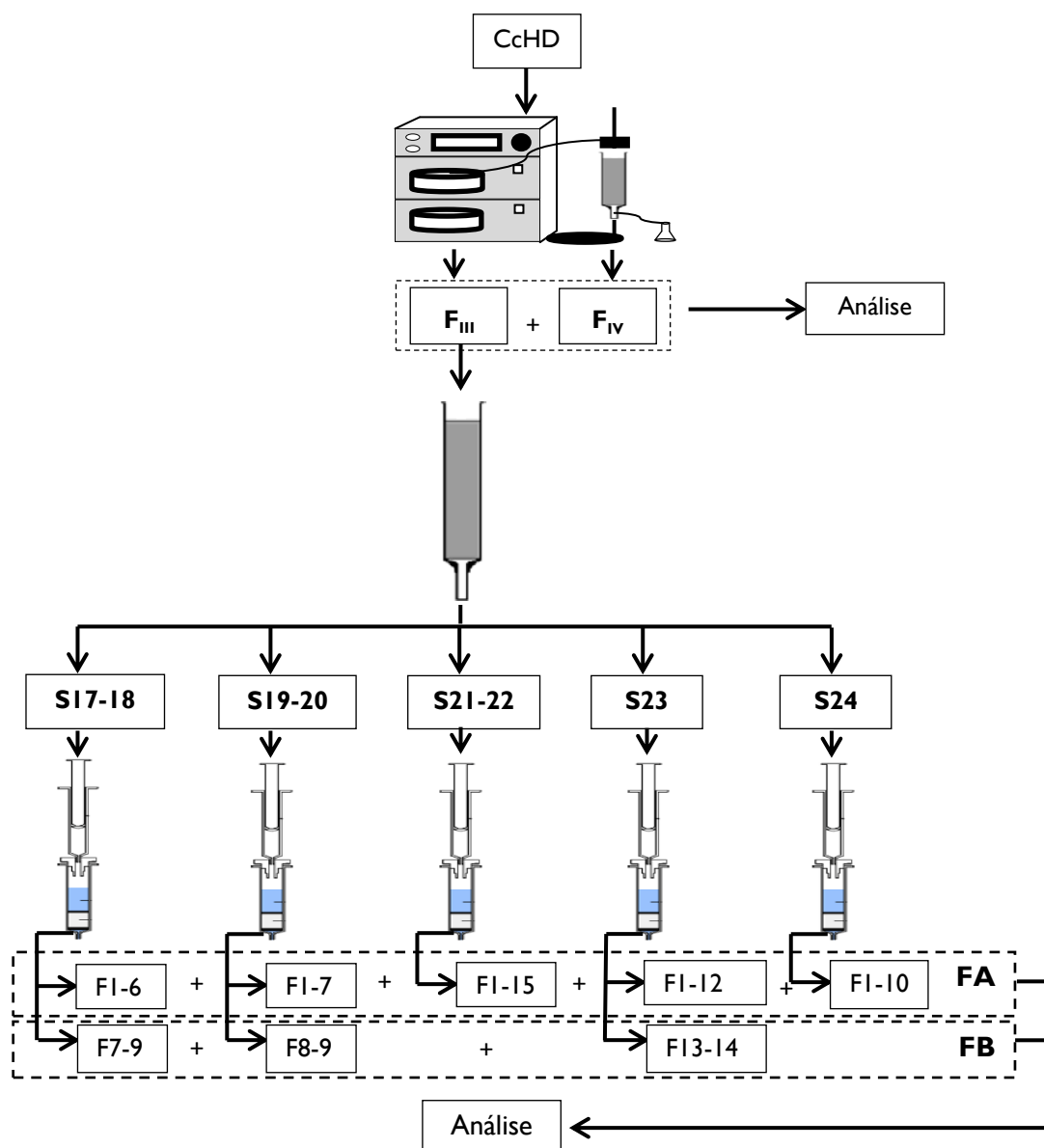
Um esquema do fraccionamento do CcHD pode ser observado na Figura 13. O CcHD (800 mg) foi solubilizado em metanol a 5% (10 mL) e filtrado. Após filtração o extracto foi fraccionado numa coluna de fase reversa, por Cromatografia Flash. A fase estacionária utilizada foi uma C18 Buchi® (40 × 150 mm; com diâmetro das partículas entre 40 - 63 µm) (Flawil, Suíça). A fase móvel foi propulsionada por duas bombas Buchi® Pump Module C-605 (Flawil, Suíça), tendo-se utilizado a água e metanol, em gradiente descontínuo, a um fluxo de 3 mL/min. No gradiente, o metanol foi usado nas seguintes concentrações: 5% nos primeiros 40 minutos, 5-10 % dos 40 aos 55 minutos, 10 % dos 55 aos 85 minutos, 10-15 % dos 85 aos 90 minutos, 15-25 % dos 90 aos 110 minutos, 25-50 % dos 110 aos 140 minutos, 50% dos 140 aos 160 minutos, 50-80 % dos 160 aos 180 minutos, 80-100 % dos 180 aos 200 minutos e 100% dos 200 aos 220 minutos. O registo do perfil cromatográfico foi efectuado a 280 e a 320 nm pelo detector de ultravioleta C-640 Buchi® (Flawil, Suíça), com o software para tratamento de dados ECOMAC® 0.238 (Praga, República Checa). Deste fraccionamento obtiveram-se três fracções: F<sub>I</sub>+F<sub>II</sub> (gradiente: 5-37% metanol), F<sub>III</sub> (gradiente: 37-87% metanol) e F<sub>IV</sub> (gradiente: 87-100% metanol).

Repetiu-se o fraccionamento por quatro vezes, perfazendo um total de CcHD fraccionado, de 3,2 g. A constituição fenólica das fracções foi monitorizada por TLC, tendo-se posteriormente reunido as fracções de modo a ficar com duas fracções; a primeira (F<sub>I</sub>+F<sub>II</sub>), constituída maioritariamente por ácidos fenólicos, foi descartada, enquanto a segunda (F<sub>III</sub>+F<sub>IV</sub>), contendo flavonóides e taninos, foi guardada para análise.

O processo foi repetido novamente por mais seis vezes, perfazendo um total de CcHD fraccionado, de 4,8 g. A constituição fenólica das fracções foi monitorizada mais uma vez por TLC, tendo-se posteriormente reunido as fracções de modo a ficar com três



fracções; a primeira ( $F_I + F_{II}$ ), constituída maioritariamente por ácidos fenólicos e a terceira ( $F_{IV}$ ), formada na sua maioria por flavonóides, foi descartada, enquanto a segunda ( $F_{III}$ ), contendo flavonóides e taninos, foi guardada para análise.



**Figura 13** – Esquema ilustrativo do fraccionamento do extracto.

De seguida, a fracção  $F_{III}$  foi sujeita a um sub-fraccionamento, por cromatografia de exclusão molecular, em Sephadex<sup>®</sup> LH-20 (430 mm × 60 mm) (Sigma-Aldrich- Amersham, Sweden), eluída com uma solução aquosa de metanol. As fracções obtidas e as condições utilizadas estão transcritas na Tabela 10.

**Tabela 10** – Condições do fraccionamento em Sephadex®.

<b>Fracção</b>	<b>Compostos</b>	<b>Volume (mL)</b>	<b>Solvente</b>
S0-F2	-	400	MeOH 30%
S3-F6	Ácidos fenólicos e taninos	350	MeOH 30%
S7-F8	Ácidos fenólicos e taninos	850	MeOH 30%
S9-F12	Flavonóides e taninos	1080	MeOH 50%
S13-16	Ácidos fenólicos, flavonóides e taninos	500	MeOH 80%
S17-F18	Flavonóides e taninos	200	MeOH Absoluto
S19-F20	Flavonóides e taninos	225	MeOH Absoluto
S21-F22	Flavonóides e taninos	280	MeOH Absoluto
S23	Flavonóides e taninos	110	MeOH Absoluto
S24	Flavonóides e taninos	350	MeOH Absoluto

As fracções S17-18, S19-20, S21-22, S23 e S24 foram sujeitas, separadamente, a outro fraccionamento, novamente em fase reversa, numa coluna Chromabond® C18 10 g / 70 mL (Macherey-Nagel, Düren, Germany). A eluição realizou-se inicialmente com água seguida de soluções aquosas com diferentes concentrações de metanol e, finalmente, com metanol acidificado com 5% de ácido fórmico. As fracções obtidas e as condições utilizadas estão inscritas Tabela 11.

No final, após monitorização da constituição química, por processos cromatográficos (TLC e HPLC-PDA), de todas as sub-fracções obtidas, procedeu-se à junção de algumas, de constituição química idêntica, resultando duas fracções constituídas por taninos, que foram seleccionadas para análise: F<sub>A</sub> e F<sub>B</sub> (Tabela 12).

**Tabela II** – Condições do fracionamento em Chromabond® C18

<b>Fracção do Sephadex</b>	<b>Fracção C18</b>	<b>Compostos</b>	<b>Volume (mL)</b>	<b>Solvente (volume, mL)</b>
<b>S17-18</b>	<b>F1-6</b>	Taninos	180	Água (20), MeOH 5% (20), MeOH 10% (10), MeOH 15% (40), MeOH 20% (20), MeOH 25% (40), MeOH 30% (30)
	<b>F7-9</b>	Taninos	90	MeOH 30% (90)
	<b>F10-19</b>	Taninos e Flavonóides	270	MeOH 35% (40), MeOH 40% (20), MeOH 45% (20), MeOH 50% (40), MeOH 70% (30), MeOH 80% (30), MeOH absoluto (50), MeOH acidificado (40)
<b>S19-20</b>	<b>F1-7</b>	Taninos	105	Água (10), MeOH 5% (10), MeOH 10% (10), MeOH 15% (20), MeOH 20% (10), MeOH 25% (20), MeOH 30% (25)
	<b>F8-9</b>	Taninos	30	MeOH 30% (15), MeOH 35% (15)
	<b>F10</b>	Taninos	15	MeOH 40% (15)
	<b>F11-13</b>	Flavonóides	45	MeOH 45% (30), MeOH 50% (15)
	<b>F14-17</b>	Taninos e Flavonóides	60	MeOH 50% (15), MeOH 60% (15), MeOH 70% (30)
	<b>F18-28</b>	Taninos	150	MeOH 70% (20), MeOH 80% (30), MeOH absoluto (60), MeOH acidificado (40)
<b>S21-22</b>	<b>F1-15</b>	Taninos	1125	Água (50), MeOH 5% (100), MeOH 15% (200), MeOH 20% (125), MeOH 25% (175), MeOH 30% (175), MeOH 35% (175), MeOH 40% (125)
	<b>F16-19</b>	Taninos e Flavonóides	300	MeOH 45% (150), MeOH 50% (75), MeOH 60% (75)
	<b>F20-25</b>	Taninos	450	MeOH 70% (75), MeOH 80% (50), MeOH Absoluto (250), MeOH acidificado (75)
	<b>F26</b>	Taninos e Flavonóides	75	MeOH acidificado (75)
<b>S23</b>	<b>F1-12</b>	Taninos	180	Água (15), MeOH 5% (10), MeOH 10% (5), MeOH 15% (30), MeOH 20% (15), MeOH 25% (15), MeOH 30% (30), MeOH 35% (30), MeOH 40% (30)
	<b>F13-14</b>	Taninos	30	MeOH 45% (30)
	<b>F15-17</b>	Taninos	45	MeOH 50% (30), MeOH 60% (15)
	<b>F18-23</b>	Taninos e Flavonóides	90	MeOH 70% (30), MeOH 80% (20), MeOH Absoluto (40)
	<b>F24-28</b>	Taninos	75	MeOH absoluto (20), MeOH acidificado (55)
<b>S24</b>	<b>F1-10</b>	Taninos	150	Água (10), MeOH 5% (10), MeOH 10% (5), MeOH 15% (20), MeOH 20% (15), MeOH 25% (10), MeOH 30% (20), MeOH 35% (20), MeOH 40% (20), MeOH 45% (20)
	<b>F11-13</b>	Taninos	45	MeOH 50% (20), MeOH 60% (10), MeOH 70% (15)
	<b>F14-19</b>	Taninos e Flavonóides	90	MeOH 80% (20), MeOH Absoluto (40), MeOH acidificado (30)

**Tabela 12** – Condições de obtenção das fracções F<sub>A</sub> e F<sub>B</sub>.

Fracção Sephadex	Fracção C18	Denominação da Fracção
S17-18	F1-6	F <sub>A</sub>
S19-20	F1-7	
S21-22	F1-15	
S23	F1-12	
S24	F1-10	
S17-18	F7-9	F <sub>B</sub>
S19-20	F8-9	
S23	F13-14	

## 2.3. Análise Fitoquímica

### 2.3.1. Cromatografia em camada fina (TLC)

Foram utilizados dois sistemas cromatográficos distintos: o sistema 1 (S1) para detecção de flavonóides e ácidos fenólicos e o sistema 2 (S2) para detecção de taninos. No S1, a fase estacionária utilizada foi a celulose (Polygram CEL 300), e o eluente, ácido acético 15%. No S2, foram utilizadas placas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck), eluídas com uma solução de acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético-água (100:11:11:27). Optou-se por estas fases estacionárias devido às suas características polares, ideais para a separação de polifenóis, uma vez que estes apresentam características similares. Também as fases móveis foram constituídas por solventes igualmente polares, de modo a ser evitada a fixação dos compostos às fases estacionárias. Como ambas as fases são hidrofílicas, todos os compostos sofrem um arrastamento pela fase móvel, deslocando-se mais os compostos mais polares (Hajnos, 2008).

Foram aplicados 10 µL de cada amostra, a 1 cm da base da placa. Deixou-se correr o eluente numa câmara saturada do mesmo. Retirou-se a placa da câmara e deixou-se evaporar o eluente. Observou-se a placa à luz visível e, de seguida, com o auxílio de luz ultravioleta a 366 nm. Seguidamente, submeteu-se a placa aos reveladores, observando-se os resultados à luz visível e ultra violeta. Enquanto para o S1, a detecção foi realizada com o reagente de Neu (solução do éster difenilbórico-ácido β-etilamino a 1% em metanol) e, após evaporação deste, com o reagente PEG-400 (solução de polietilenoglicol-400 a 5% em etanol), no caso do S2 a detecção foi efectuada com o reagente DMACA (4-dimetilaminocinamaldeído) seguida de aquecimento numa placa de aquecimento.

Os reagentes de revelação permitiram detectar os diferentes tipos de compostos fenólicos de acordo com as suas particularidades estruturais. Especificamente, o complexo entre o reagente Neu e o PEG actua sobre os grupos hidroxilo (Hajnos, 2008), permitindo evidenciar os ácidos fenólicos e flavonóides, enquanto o reagente DMACA reage com os

anéis benzénicos *meta*-orientados di- ou tri-hidroxilados (Abeynayake *et al.*, 2011), detectando a presença de taninos.

### 2.3.2. HPLC-PDA

A análise por HPLC, realizou-se num cromatógrafo líquido de alta resolução (HPLC) GILSON, equipado com duas bombas modelo 305 e 306; misturador modelo 811B; módulo manométrico modelo 805 e um injetor automático GILSON 234, acoplado a um detector de fotodíodos (PDA) GILSON, modelo 170 e a uma estação de controlo e tratamento de dados Unipoint System (Unipoint® 2.10). A fase estacionária da coluna utilizada foi uma RP18 Spherisorb Waters® ODS-2 (4,6×250 mm; 5 µm). Optou-se por uma coluna de fase reversa dado que esta separa os componentes da solução com base nas suas características hidrofóbicas. Trata-se de uma fase estacionária com características apolares, que, com as fases móveis habitualmente usadas – misturas acidificadas de água com metanol ou acetonitrilo, permite que os compostos mais polares eluam mais rapidamente (Wagaw *et al.*, 2011). Segundo Escribano-bailo & Santos-Buelga (2003), esta é também a fase estacionária mais indicada na análise qualitativa de compostos fenólicos. A fase móvel utilizada neste trabalho consistiu de uma solução aquosa de ácido fórmico a 5% e metanol, em gradiente descontínuo, a um fluxo de 1 mL/min. O metanol foi usado num gradiente de concentração de 5-15 % nos primeiros 10 minutos, 15-30 % dos 10 aos 15 minutos, 30-35 % dos 15 aos 25 minutos, 35-50 % dos 25 aos 35 minutos e 50-80 % dos 35 aos 40 minutos, seguindo-se uma eluição isocrática, durante 20 minutos.

O metanol é considerado um bom solvente para os polifenóis já que ambos apresentam características polares (Anderson & Markham, 2006). O ácido fórmico, por sua vez, é incorporado na fase móvel com o intuito de acidificar, minimizando assim o desdobramento e/ou arrastamento dos picos apresentados no perfil cromatográfico (Dai & Mumper, 2010). Optou-se pela eluição em gradiente, em detrimento da eluição isocrática, por forma a diminuir o tempo de análise e aumentar a eficácia da separação cromatográfica, uma vez que os picos mais tardios da eluição não aparecem tão largos no cromatograma (Masqué *et al.*, 1998). Foram injectados 100 µL das amostras. O registo dos perfis cromatográficos, foi efectuado a 280 e a 320 nm.

### 2.3.3. HPLC-PDA-ESI/MS<sup>n</sup>

A identificação dos compostos presentes no CcHD, e nas fracções  $F_{III}+F_{IV}$ ,  $F_A$  e  $F_B$  foi realizada por análise dos espectros de UV e de massa adquiridos *online*.

A análise realizou-se num cromatógrafo líquido Surveyor equipado com um detector PDA (Surveyor) e um espectrómetro de massa Finnigan LCQ (San Jose, CA, USA) com uma câmara de ionização API-ES. A separação cromatográfica foi realizada numa coluna de fase reversa C18 Spherisorb<sup>®</sup> ODS-2 (150x2,1 mm; 3  $\mu$ m) (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA) e protegida por uma pré-coluna Spherisorb<sup>®</sup> ODS-2 C18 (10x4,6 mm; 5  $\mu$ m), Waters Corporation [Milford, Massachusetts, USA] a 25°C, usando como fase móvel uma solução aquosa de ácido fórmico a 2% (A) e metanol (B). As condições utilizadas na realização da análise podem ser observadas na Tabela 13.

**Tabela 13** – Condições utilizadas na análise por HPLC-PDA-ESI/MS<sup>n</sup>.

Amostra	Tempo (min)	Gradiente de MeOH (fluxo)	Deteção (nm)	Modo: Análise	Voltagem da fonte	Voltagem do capilar	Temperatura	Gás nebulizante (fluxo de unidades arbitrárias)	Gás de colisão (energia de colisão)
CcHD	0-10 10-15 15-25 25-35 35-40 40-60	5-15% 15-30% 30-35% 35-50% 50-80% 80% isocraticamente (0,2 mL/min)	200 - 450	Negativo: MS <sup>1</sup> ( <i>m/z</i> 150-2000), MS <sup>2</sup> do ião mais abundante em MS <sup>1</sup> , e MS <sup>3</sup> do mais abundante em MS <sup>2</sup>	4,5 kV	-10V	250°C	Azoto (20)	Hélio (35%)
F <sub>A</sub>	0-10 10-20 20-40 40-50 50-60	5-15% 15-25% 25-35% 35-50% 50-80% (0,2 mL/min)	200 - 450	Positivo: MS <sup>1</sup> ( <i>m/z</i> 200-2000), MS <sup>2</sup> do ião mais abundante em MS <sup>1</sup> , e MS <sup>3</sup> do mais abundante em MS <sup>2</sup>	5 kV	45V	225°C	Azoto (20)	Hélio (40%)
F <sub>III</sub> +F <sub>IV</sub> F <sub>B</sub>	0-10 10-20 20-40 40-50 50-60	5-15% 15-25% 25-35% 35-50% 50-80% (0,2 mL/min)	200 - 450	Negativo: MS <sup>1</sup> ( <i>m/z</i> 160-1300), MS <sup>2</sup> do ião mais abundante em MS <sup>1</sup> , e MS <sup>3</sup> do mais abundante em MS <sup>2</sup>	4,5 kV	-10V	250°C	Azoto (20)	Hélio (40%)

#### **2.3.4. Quantificação de fenóis totais**

Os fenóis totais foram avaliados pelo método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu, descrito por (Julkunen-Titto, 1985; Wang, Lee & Peng, 1997). Alíquotas das amostras (100  $\mu$ L numa solução aquosa de acetona a 70%) foram avaliadas pela sua reactividade com o reagente Folin-Ciocalteu (1 mL) e carbonato de sódio decahidratado a 20% (m/v) (5 mL), sendo o volume final de 10 mL, ajustado com água. A mistura reaccional (10 mL) foi mantida durante 20 min, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Os valores de absorvância foram medidos a 700 e 735 nm, num espectrofotómetro Cintra 101, GBC<sup>®</sup> (Victoria, Australia). A quantificação dos fenóis totais foi expressa em equivalentes de ácido gálico.

#### **2.3.5. Quantificação de ácidos hidroxicinâmicos totais**

Os ácidos hidroxicinâmicos totais foram avaliados pelo método espectrofotométrico descrito por Lamaison, Petitjean-Freytet & Carnat (1991). Alíquotas das amostras (1 mL numa solução aquosa de etanol a 50%) foram avaliadas pela sua reactividade com o reagente de Arnou (1 mL), ácido clorídrico a 0,5 N (1 mL), hidróxido de sódio 1 N (1 mL), perfazendo-se o volume de 10 mL, com água. Para a preparação do branco procedeu-se da mesma forma substituindo o reagente de Arnou por etanol a 50% (1 mL). Os valores de absorvância foram medidos a 505 nm, num espectrofotómetro Cintra 101, GBC<sup>®</sup> (Victoria, Australia). Repetiu-se o processo com o padrão ácido cafeico 10 mg/100 mL ( $A_0$ ) com o mesmo solvente, etanol a 50%. A quantificação dos derivados hidroxicinâmicos foi obtida dividindo a absorvância do extracto pela absorvância do padrão e multiplicando por 100 ou através da fórmula  $A \times C_0 \times 100 / A_0 \times C$ , sendo C a concentração na amostra e  $C_0$  a concentração do padrão. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido cafeico.

#### **2.3.6. Quantificação de flavonóides totais**

Os flavonóides totais foram avaliados pelo método espectrofotométrico descrito por Lamaison & Carnat (1990). Alíquotas das amostras (5 mL em metanol) foram avaliadas pela sua reactividade com o cloreto de alumínio anidro (5 mL) a 2% (m/v em metanol). A mistura reaccional (10 mL) foi mantida durante 10 min, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Os valores de absorvância foram medidos a 430 nm, num espectrofotómetro Cintra 101, GBC<sup>®</sup> (Victoria, Australia), usando como branco alíquotas da amostra (5 mL em metanol) e metanol (5 mL). A quantificação dos flavonóides totais foi expressa em equivalentes de rutina.



### 2.3.7. Quantificação de taninos totais

O teor de taninos totais foi calculado de acordo com o ensaio espectrofotométrico descrito na Farmacopéia Europeia (2011). Alíquotas de soluções aquosas das amostras (5 mL) foram diluídas com água, em balões volumétricos de 25 mL. Estas soluções diluídas (2 mL) foram misturadas com o reagente fosfomolibdotúngstico (1 mL), água (10 mL) e diluída para 25 mL com uma solução aquosa de carbonato de sódio anidro (290 g/L). Após 30 minutos, a absorvância foi medida a 760 nm (A1), usando água como branco. Em paralelo, alíquotas das mesmas soluções aquosas das amostras (10 mL) foram tratadas com 0,10 g de pó de pele e agitadas vigorosamente durante 60 minutos. As soluções foram filtradas e alíquotas (5 mL) destes filtrados foram diluídas para 25 mL com água. Estas diluições (2 mL) foram misturadas com o reagente fosfomolibdotúngstico (1 mL), água (10 mL) e diluídas para 25 mL com uma solução aquosa de carbonato de sódio anidro (290 g/L). Após 30 minutos, a absorvância foi medida a 760 nm (A2), usando água como branco. O pirogalhol foi usado como padrão. Para tal, preparou-se uma solução aquosa de pirogalhol (50 mg %, m/v) e 5 mL desta solução foi diluída para 100 mL, com água. Esta solução (2 mL) foi misturada com o reagente fosfomolibdotúngstico (1 mL), água (10 mL) e diluída para 25 mL com uma solução aquosa de carbonato de sódio anidro (290 g/L). Após 30 minutos, a absorvância foi medida a 760 nm (A3), num espectrofotómetro Cintra 101, GBC® (Victoria, Australia), usando água como branco. O teor de taninos (mg/g de amostra) foi calculado usando a expressão:  $31,25 (A1-A2) \times A3 / m$ , onde m é a quantidade de amostra (g) pesada.

## 2.4. Ensaio de actividade antioxidante

### 2.4.1. 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

A actividade antioxidante do CcHD e das fracções  $F_{III}+F_{IV}$ ,  $F_A$  e  $F_B$  foi avaliada segundo o método descrito por Blois (1958). Alíquotas das amostras (100  $\mu$ L) foram testadas pela sua reactividade com uma solução metanólica de DPPH a 500  $\mu$ M (500  $\mu$ L) na presença de tampão acetato a 100 mM, pH 6.0 (1 mL). A mistura reaccional (3 mL) foi mantida ao abrigo da luz, durante 30 min à temperatura ambiente. O decréscimo do valor da absorvância foi medido a 517 nm, num espectrofotómetro Cintra 101, GBC® (Victoria, Australia). O mesmo processo foi repetido para o trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), para que por extrapolação os resultados fossem expressos em valor TEAC (capacidade antioxidante equivalente ao trolox numa solução de 1 mM).

### 2.4.2. “Ferric Reducing Antioxidant Power” (FRAP)

A actividade antioxidante do CcHD e das fracções  $F_{III}+F_{IV}$ ,  $F_A$  e  $F_B$  foi avaliada segundo o método descrito por Benzie & Strain (1996). O reagente FRAP foi preparado através da mistura de tampão acetato 300 mM a pH baixo (pH=3.6) (1,55 g de acetato de sódio tri-hidratado e 16 mL de ácido acético glacial por 500 mL de tampão) com uma solução de TPTZ (2,4,6-tripiridil-S-triazino) a 10 mM (0,078 g TPTZ em 25 mL de HCl a 40 mM) e uma solução de tricloreto de ferro hexa-hidratado ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ) a 20 mM (0.135 g  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  por 25 mL de água Milli-Q), na proporção 250:25:25. Alíquotas das amostras (100  $\mu$ L) foram testadas pela sua reactividade com o reagente FRAP (3 mL). Ao fim de 6 minutos, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, a absorvância foi medida a 593 nm, num espectrofotómetro Cintra 101, GBC<sup>®</sup> (Victoria, Australia). O mesmo processo foi repetido para o trolox para posterior extrapolação dos resultados e consequente expressão em valor TEAC.

### 2.4.3. ABTS (ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico) a pH neutro

A actividade antioxidante do CcHD e das fracções  $F_{III}+F_{IV}$ ,  $F_A$  e  $F_B$  foi avaliada segundo o método descrito por Re *et al.* (1999). ABTS foi dissolvido em água numa concentração de 7 mM. O catião radicalar ABTS foi produzido pela reacção da solução de ABTS 7 mM com 2,45 mM de persulfato de potássio (concentração final), dando-se a reacção ao abrigo da luz, durante 16 horas. Alíquotas das amostras (50  $\mu$ L) foram testadas pela sua reactividade com o ABTS (2 mL). Ao fim de 4 minutos, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, o decréscimo do valor da absorvância foi medido a 734 nm, num espectrofotómetro Cintra 101, GBC<sup>®</sup> (Victoria, Australia). O mesmo processo foi repetido para o trolox, para que, por extrapolação dos dados, os resultados fossem expressos em valor TEAC.

### 2.4.4. ABTS (ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico) a pH ácido

A actividade antioxidante do CcHD e das fracções  $F_{III}+F_{IV}$ ,  $F_A$  e  $F_B$  foi avaliada segundo o método descrito por Re *et al.* (1999). ABTS foi dissolvido em água numa concentração de 1,5 mM. O catião radicalar ABTS foi produzido pela reacção da solução de ABTS 1,5 mM com 15  $\mu$ M de peróxido de hidrogénio e 0,25  $\mu$ M de peroxidase, em 50 mM de tampão glicina-HCl (pH=4,5). Alíquotas das amostras (100  $\mu$ L) foram testadas pela sua reactividade

com o ABTS (2 mL). Ao fim de 2 minutos, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, o decréscimo do valor da absorvância foi medido a 414 nm, num espectrofotómetro Cintra 101, GBC® (Victoria, Australia). O mesmo processo foi repetido para o trolox, para que por extrapolação dos dados os resultados fossem expressos em valor TEAC.

## **2.5. Actividade anti-inflamatória e citotoxicidade**

### **2.5.1. Cultura celular**

A linha celular de macrófagos de murino Raw 264.7 (ATCC number: TIB-71) foi gentilmente fornecida pela Dra. Otília Vieira (Centro de Neurociências e Biologia Celular Universidade de Coimbra, Portugal). A cultura celular foi realizada com meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado com 25 mM glucose, 10% (v/v) de FBS não inactivado, 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomomicina. As células foram incubadas a 37°C, em atmosfera de 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>. Qualquer alteração morfológica durante os ensaios foi monitorizada através de observação ao microscópio óptico.

Para a realização dos ensaios, as células foram plaqueadas, numa concentração de  $0,3 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup> para um volume de meio de cultura de 600 µL, e deixadas a estabilizar durante 12 horas. Após este período, as células Raw 264.7 foram mantidas em meio de cultura (controlo) ou pré-incubadas com o extracto ou com as fracções (30 µL) nas seguintes concentrações: CcHD<sub>1</sub> (300 µg/mL), CcHD<sub>2</sub> (400 µg/mL), CcHD<sub>3</sub> (600 µg/mL), FIII+FIV<sub>1</sub> (300 µg/mL), FIII+FIV<sub>2</sub> (400 µg/mL), FA<sub>1</sub> (300 µg/mL), FA<sub>2</sub> (400 µg/mL), FB<sub>1</sub> (300 µg/mL), FB<sub>2</sub> (400 µg/mL). Depois de uma hora de incubação, as células foram estimuladas com LPS a 1 µg/mL (0,6 µL), sendo novamente incubadas por um período de 24 horas.

### **2.5.2. Determinação da produção de nitritos pelo reagent de Griess**

A produção de óxido nítrico (NO) foi avaliada pela acumulação de nitritos no sobrenadante da cultura, usando uma reacção colorimétrica com o reagente de Griess [0,1% (m/v) dicloridrato de N-(1-naftil)etilenodiamina e 1% (m/v) sulfanilamida contendo 5% (m/v) de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>] (Green *et al.*, 1982). Assim, foram misturados 170 µL do sobrenadante da cultura com igual volume do reagente de Griess. A reacção decorreu durante 30 minutos ao abrigo da luz. A absorvância foi medida a 550 nm num leitor de placas ELISA (SLT, Austria). Usou-se o meio de cultura como branco e a concentração de nitritos foi determinada através de uma análise de regressão usando várias diluições de um padrão de nitrito de sódio.

### 2.5.3. Determinação da viabilidade celular pelo ensaio MTT

A avaliação das células metabolicamente activas foi realizada utilizando 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenilbrometo de tetrazolina (MTT), num ensaio colorimétrico descrito por Mosmann (1983). Após a remoção do sobrenadante das células no ensaio anteriormente referido, foi adicionado às células aderentes 43 $\mu$ L de uma solução de MTT a 5 mg/mL solubilizado em PBS. As células foram novamente incubadas a 37°C durante 15 minutos. Após este período, solubilizaram-se os cristais roxos de formazano em 300  $\mu$ L de isopropanol ácido (HCl 0,04 N em isopropanol) e avaliou-se a absorvância usando um leitor de placas ELISA (SLT, Austria), a 570 nm, com um filtro de referência a 620 nm.

### 2.6. Análise estatística

One-way ANOVA seguido pelo teste Turkey foi usado para cada resultado da análise fitoquímica e da actividade antioxidante. Os testes estatísticos foram aplicados usando o programa GraphPad Prism, versão 5.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). O nível de significância foi \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , quando comparado o efeito que cada radical sofreu pelas diferentes amostras.

One-way ANOVA seguido pelo teste Dunnett foi usado para comparar o efeito de diferentes tratamentos nas células estimuladas por LPS. Aplicaram-se os testes estatísticos usando o programa GraphPad Prism, versão 5.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). O nível de significância foi \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , quando comparado com o LPS.

## Capítulo III

---

### Resultados e Discussão

## I. Análise fitoquímica

Vários estudos têm sido realizados com o infuso do *Cymbopogon citratus* (Ccl) na tentativa de avaliar o seu potencial farmacológico. Para este extracto em particular foram já confirmadas propriedades antioxidantes (Figueirinha *et al.*, 2008) e anti-inflamatórias (Figueirinha *et al.*, 2010; Francisco *et al.*, 2011). Uma vez que estas actividades biológicas estão relacionadas com o teor de polifenóis, procedeu-se à análise fitoquímica comparativa entre este extracto (Ccl) e CcHD. Os teores de fenóis totais, ácidos hidroxicinâmicos totais, flavonóides totais e taninos totais encontram-se na Tabela 14, apresentando todos os resultados diferenças estatisticamente significativas.

**Tabela 14 – Dosagem de compostos fenólicos em CcHD e Ccl.**

Extracto	Fenóis Totais <sup>(a)</sup>	Hidroxicinâmicos Totais <sup>(b)</sup>	Flavonóides Totais <sup>(c)</sup>	Taninos Totais <sup>(d)</sup>
CcHD	57,7 ± 0,000202	35,9 ± 0,00292	36,0 ± 0,00121	31,7 ± 0,02887
Ccl	41,6 ± 0,000208	49,6 ± 0,00209	60,6 ± 0,00114	18,2 ± 0,02309

<sup>(a)</sup>mg ácido gálico/g extracto liofilizado, <sup>(b)</sup>mg ácido cafeico/g extracto liofilizado, <sup>(c)</sup>mg rutina/g extracto liofilizado, <sup>(d)</sup>mg piragalhol/g extracto liofilizado

Cada resultado representa a média ± erro padrão de 3 experiências.

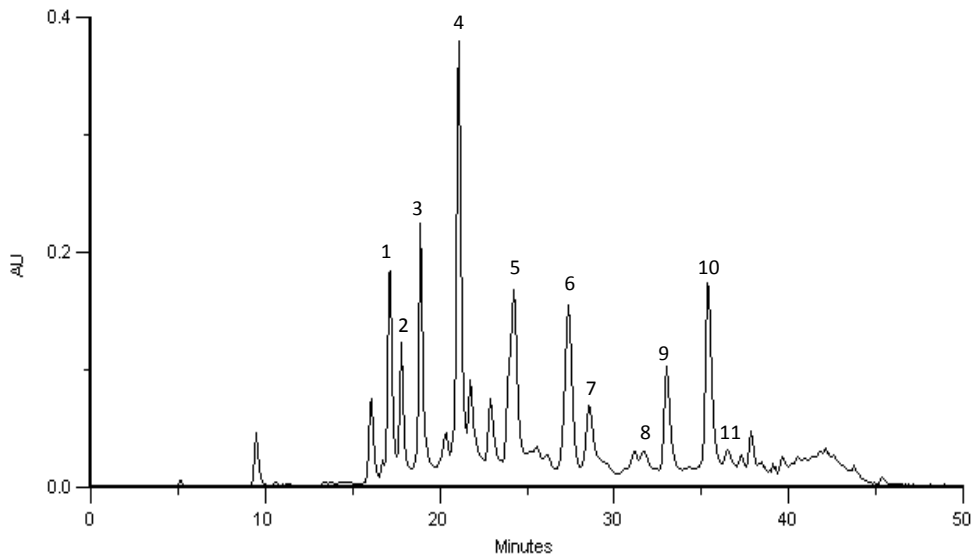
A análise fitoquímica revelou que o CcHD possui um maior teor de fenóis totais, quando comparado com Ccl. Por esta razão, foi avaliado o teor dos constituintes fenólicos mais significativos nestes extractos. O CcHD demonstrou um teor superior de taninos totais, enquanto o Ccl apresentou uma maior concentração de ácidos hidroxicinâmicos totais e flavonóides totais, o que evidencia a influência do processo extractivo na composição quantitativa dos compostos fenólicos.

### I.1. Identificação dos compostos fenólicos presentes em CcHD

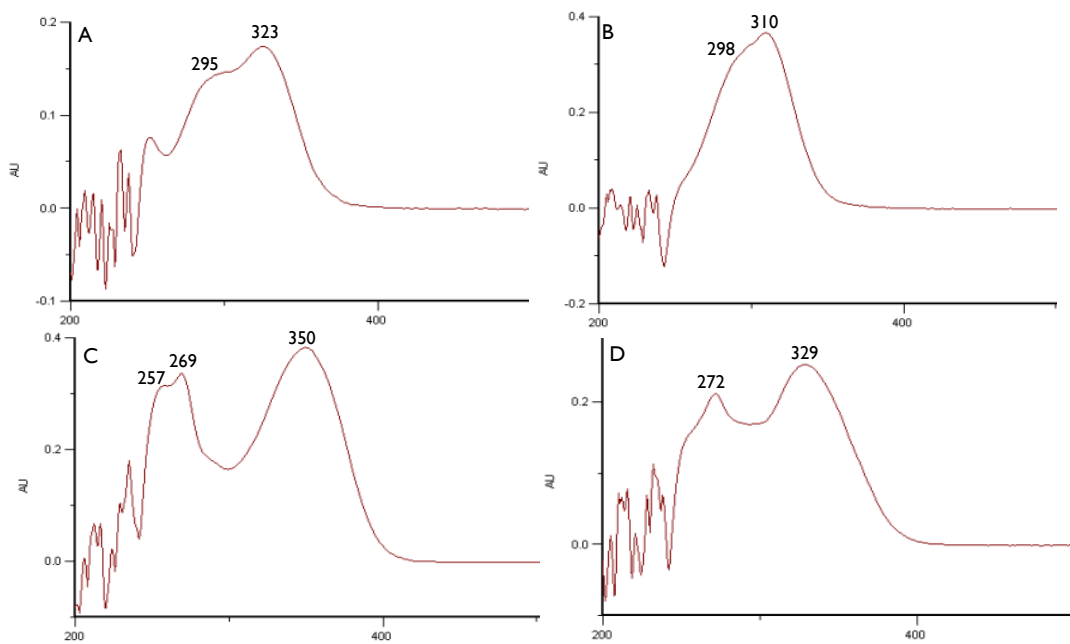
Após a avaliação dos teores totais de compostos fenólicos presentes em Ccl e CcHD procedeu-se à identificação dos mesmos por HPLC/PDA/ESI-MS<sup>n</sup>.

O perfil cromatográfico e a identificação de compostos fenólicos presentes em CcHD encontram-se ilustrados na Figura 14 e Tabela 15, respectivamente.

A análise dos espectros UV-Vis sugeriu a presença de ácidos fenólicos e flavonóides. De entre os ácidos fenólicos, destacaram-se os espectros típicos dos derivados do ácido cafeico e do ácido *p*-cumárico, com um máximo de absorção a 325 e 310 nm, respectivamente (Plazonić *et al.*, 2009), como pode ser observado nas Figuras 15A e B.



**Figura 14** – Perfil cromatográfico do CcHD obtido no HPLC-PDA Gilson e registrado a 320 nm.



**Figura 15** – Espectro UV dos Picos 1-3 (A); Pico 4 (B); Picos 5, 7-11 (C); Pico 6 (D).

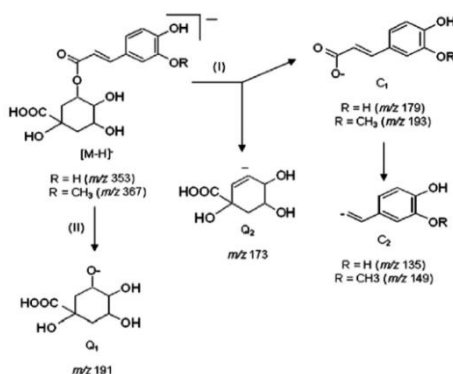
**Tabela 15** – Compostos fenólicos identificados em CcHD por HPLC–PDA–ESI/MS<sup>n</sup>.

<b>P*</b>	<b>Identificação do composto</b>	<b>t<sub>R</sub> (min)<sup>a</sup></b>	<b>λ<sub>máx</sub> (nm)<sup>a</sup></b>	<b>[M-H]<sup>-</sup> (m/z)<sup>b</sup></b>	<b>MS<sup>2</sup> [m/z (abundância relativa, %)]<sup>b</sup></b>	<b>MS<sup>3</sup> [m/z (abundância relativa, %)]<sup>b</sup></b>
1	Ácido Feruloilquínico <sup>**</sup>	18,1	290, 325	367	193(100)	149(100)
2	Ácido Cafeoilquínico <sup>**</sup>	19,0	290, 326	353	191(100), 179(10), 109(2)	191(60), 173(100), 93(68)
3	Ácido Clorogénico <sup>**</sup>	19,7	290, 326	353	191(100), 179(60), 109(10)	191(60), 173(100), 93(70)
4	Ácido <i>p</i> -Cumárico <sup>***</sup>	21,6	295, 310	163	-	-
5	Luteolina-6- <i>C</i> -hexosil-8- <i>C</i> -pentósido <sup>****</sup>	24,9	258sh, 272, 329	579	519(2), 489(32), 459(100), 399(25)	441(26), 399(100), 369(80)
6	Apigenina-6- <i>C</i> -pentosil-8- <i>C</i> -hexósido <sup>****</sup>	27,4	272, 331	563	545(30), 503(79), 473(100), 443(76), 383(43), 353(40)	383(15), 353(100)
7	Luteolina-6- <i>C</i> -hexósido (isorientina) <sup>****</sup>	28,6	258sh, 269, 348	447	429(35), 387(2), 357(100), 327(75), 285(1)	357(100), 339(60), 297(28), 285(10)
8	Isorientina-2''- <i>O</i> -ramnósido <sup>****</sup>	31,9	258sh, 269, 350	593	575(2), 473(100), 429(60), 357(24), 339(10)	399(2), 327(100), 298(20), 285(2)
9	Luteolina-7- <i>O</i> -neo-hesperidósido <sup>****</sup>	32,6	258sh, 268, 347	593	447(100), 327(18), 285(74), 199(1)	327(2), 285(100)
10	Luteolina-6- <i>C</i> -pentosil-8- <i>C</i> -desoxi-hexósido <sup>****</sup>	35,4	258sh, 270, 350	563	545(19), 503(13), 473(100), 459(16), 399(34), 369(16)	399(100), 369(73)
11	Luteolina-6- <i>C</i> -pentósido <sup>****</sup>	37,7	258sh, 272, 348	417	399(22), 357(100), 327(35)	339(100), 327(16), 311(20), 297(87), 285(17)

\*Picos do perfil cromatográfico apresentado na Figura 14; <sup>a</sup>tempo de retenção e máximos de absorção obtidos com o detector PDA; <sup>b</sup>informação obtida com o espectrómetro de massa; Identificação realizada com base nos espectros de UV, na massa molecular e nos padrões de fragmentação, que corroboram a presença de compostos citados em: <sup>(\*\*)</sup>Francisco *et al.*, 2013; <sup>(\*\*\*)</sup>Plazonić *et al.*, 2009; <sup>(\*\*\*\*)</sup>Figueirinha *et al.*, 2008.

Os espectros de massa, obtidos neste trabalho confirmam a presença do ácido feruloilquínico (**1**) e de derivados do ácido cafeico, mais especificamente, dois ácidos cafeoilquínicos (**2** e **3**), de entre os quais o ácido clorogénico (**3**). O perfil de fragmentação dos ésteres do ácido quínico é originado com base em duas vias competitivas que, em modo ião negativo, originam os fragmentos observados na Figura 16 (Francisco *et al.*, 2013).

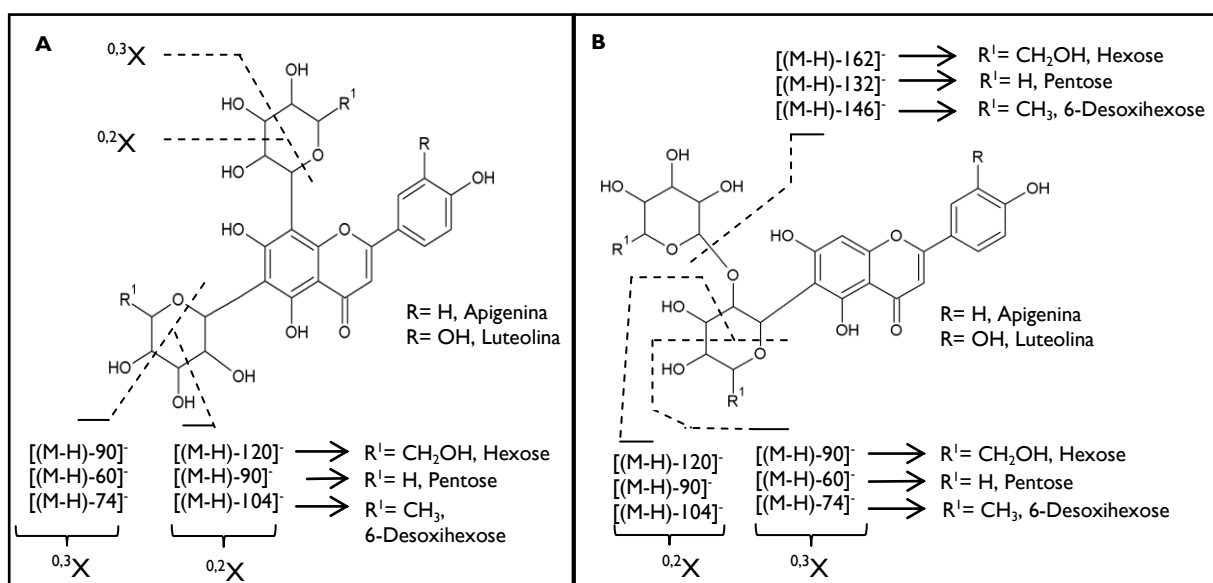




**Figura 16** – Padrão de fragmentação dos ésteres hidroxicinâmicos do ácido quínico. Adaptado de Francisco *et al.* (2013).

Os flavonóides, por outro lado apresentam um espectro UV-Vis completamente distinto. Todos os flavonóides presentes em CcHD apresentaram um espectro UV-Vis típico das flavonas já que as bandas I e II, correspondentes ao grupo cinamoílo (anel B e C) e benzoílo (anel A) respectivamente, ocorrem no intervalo de 310-350 e 250-280 nm. Mais ainda, dois grupos distintos de flavonas foram observados. A banda II dos compostos **5** e **7-11**, apresentou dois máximos de absorção ou, um máximo e um *shoulder*, consistente com os derivados da luteolina que possuem um anel B di-hidroxilado (Figura 15C). Pelo contrário, o composto **6** apresentou um espectro típico dos derivados da apigenina (Figura 15D), dado que a banda II ocorre apenas com um máximo de absorção, o que está em concordância com o anel B mono-hidroxilado da apigenina (Bohm, 1998; Figueirinha *et al.*, 2008).

Contudo, foi a análise dos espectros de massa que tornou possível a identificação dos flavonóides, com base nos padrões de fragmentação descritos por Figueirinha *et al.* (2008). Os flavonóides, na sua maioria, são encontrados na natureza sob a forma glicosilada. A massa molecular, o perfil de fragmentação e a abundância relativa dos fragmentos formados, contribuem significativamente para a identificação dos compostos. No caso de os flavonóides serem di-C-glicosilflavonas (picos **5**, **6**, **10**), os fragmentos com maior intensidade relativa observados no  $MS^2$  correspondem à ose ligada ao  $C_6$ , enquanto os fragmentos maioritários do  $MS^3$  se relacionam com a ose em  $C_8$  (Figura 17A). No caso das mono-C-glicosilflavonas (picos **7**, **11**), se o fragmento maioritário no  $MS^2$  resultar da perda de 90 ou de 60 u.m.a.  $[(M-H) - 90]^-$  ou  $[(M-H) - 60]^-$  ( $^{0,3}X$ ) é indiciador da presença de uma hexose ou pentose em  $C_6$ , respectivamente. Caso a fragmentação da ose seja outra que não esta, sugere-se que a ose está presente em  $C_8$ . No caso de estarmos perante O-heterósidos (pico **9**), a fragmentação ocorre como é representado na Figura 17B, levando à perda total da ose, e à consequente ocorrência de um fragmento maioritário correspondente ao ião molecular da aglicona.

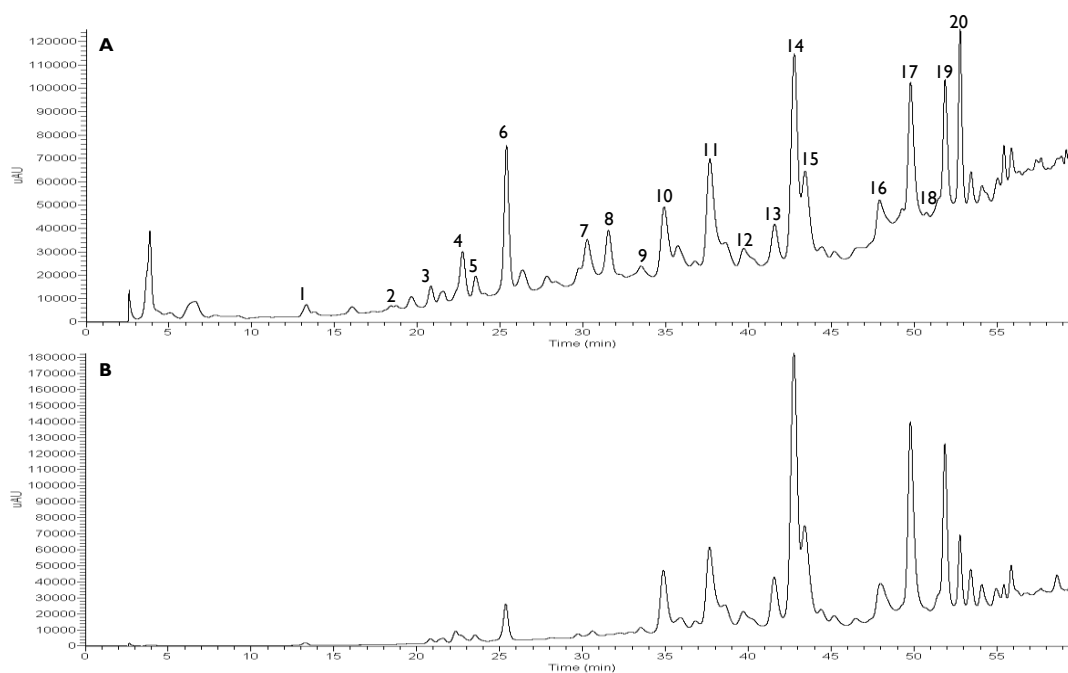


**Figura 17** – Perfil de fragmentação das unidades de açúcar em di-C-glicosilflavonas (A) e O,C-diglicosilflavonas. Adaptado de Figueirinha *et al.* (2008).

## 1.2. Identificação dos compostos fenólicos presentes em F<sub>III</sub>+F<sub>IV</sub>

A separação cromatográfica e a tentativa de identificação dos compostos presentes em F<sub>III</sub>+F<sub>IV</sub> estão ilustradas na Figura 18 e Tabela 16, respectivamente.

A análise dos espectros UV-Vis evidencia a presença de compostos fenólicos de diversos tipos.



**Figura 18** – Perfil cromatográfico de F<sub>III</sub>+F<sub>IV</sub> obtido no HPLC-PDA Surveyor e registado a 280 nm (A) e 320 nm (B).

**Tabela 16** – Compostos fenólicos identificados em F<sub>III</sub>+F<sub>IV</sub> por HPLC–PDA–ESI/MS<sup>n</sup>.

P*	Hipótese estrutural	t <sub>R</sub> (min)	λ <sub>máx</sub> (nm)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> [m/z (abundância relativa, %)]	MS <sup>3</sup>
1	Ácido 3-cafeoilquínico <sup>a</sup>	13,4	295sh, 324	353	191(100), 179(76), 135(7)	127(69), 86(100)
2	(Epi)afzelequina-(epi)catequina- A** - hexósido	18,6	278	721	585(30), 567(9), 559(100), 541(8), 423(9), 405(13), 271(9), 243(7)	433(100), 257(84)
3	2-O-Cafeoilglicerol <sup>b</sup>	20,9	294sh, 324	253	179(32), 162(9), 161(100), 135(44)	133(100)
4	Éster do ácido cafeico e ácido sinápico (aducto com ácido fórmico)	22,9	297sh, 322	431	385(100), 223(18), 153(6)	223(88), 222(5), 205(55), 161(17), 153(100)
5	Ácido 5-cafeoilquínico <sup>a</sup>	23,4	294sh, 325	353	191(100), 179(3)	111(100)
6	1-O-Cafeoilglicerol <sup>b</sup>	25,4	294sh, 325	253	179(46), 161(58), 135(100)	-
7	Luteolina-6-C-hexosil-8-C-pentósido <sup>c</sup>	30,6	269, 340	579	519(7), 489(35), 460(23), 459(100), 441(8), 429(7), 399(31), 369(13)	441(22), 399(100), 381(6), 369(79)
8	(Epi)catequina-(epi)-catequina-(epi)-catequina-hexósido	31,7	280, 307sh	1027	901(11), 865(20), 847(28), 739(100), 485(9)	593(36), 575(100), 503(25)
9	Apigenina-6-C-hexosil-8-C-pentósido	33,6	275, 333	563	546(5), 545(13), 504(20), 503(82), 485(6), 474(25), 473(86), 444(35), 443(100), 425(20), 413(10), 395(6), 384(10), 383(84), 354(11), 353(63)	425(13), 383(70), 365(6), 353(100)
10	Luteolina-6-C-hexosil-8-C-pentósido <sup>c</sup>	34,9	269, 340	579	561(5), 519(5), 489(39), 460(17), 459(100), 441(12), 429(9), 401(5), 399(30), 369(16)	441(27), 399(100), 369(83)
11	Apigenina-6-C-pentosil-8-C-hexósido <sup>c</sup>	37,5	250sh, 272, 337	563	545(24), 504(16), 503(73), 485(7), 474(25), 473(100), 444(16), 443(73), 425(17), 413(7), 384(13), 383(61), 354(9), 353(53)	383(11), 353(100)
12	Apigenina-6-C-hexosil-8-C-pentósido	39,7	250sh, 272, 338	563	545(13), 503(31), 474(18), 473(73), 444(21), 443(100), 425(6), 413(7), 384(6), 383(41), 354(8), 353(46)	383(37), 353(100)

13	Luteolina-6-C-hexósido (isoorientina) <sup>c</sup>	41,5	269, 345	447	429(28), 357(100), 327(61)	357(23), 339(100), 327(6), 311(6), 299(6), 297(49)
14	Isoorientina-2''-O-ramnósido <sup>c</sup>	42,1	257sh, 270, 346	593	473(100), 429(61), 357(23), 327(12), 309(8)	327(100), 326(12), 298(21)
15	Luteolina-6-C-pentosil-8-C-pentósido <sup>c</sup>	43,4	257sh, 271, 348	549	531(9), 490(6), 489(29), 460(17), 459(100), 441(17), 429(11), 399(40), 369(17)	441(27), 399(94), 381(5), 369(100)
16	Apigenina-O-ramnosil-C-hexósido	47,9	252sh, 273, 338	577	457(7), 414(18), 413(100), 341(8), 323(8), 293(26)	335(5), 323(8), 294(9), 293(100)
17	Luteolina-O-hexosil-ramnósido <sup>c</sup>	49,5	258sh, 269, 345	593	473(5), 448(7), 447(100), 429(9), 327(14), 286(6), 285(99), 284(25)	327(2), 285(100)
18	Luteolina-C-pentósido <sup>c</sup>	51,5	252sh, 274, 342	417	399(21), 357(100), 327(32)	357(11), 339(85), 299(5), 297(100), 285(43)
19	Luteolina-6-C-pentosil-O-ramnósido <sup>c</sup>	51,7	252sh, 274, 342	563	545(5), 474(25), 473(100), 417(8), 400(17), 399(69), 357(26), 339(6), 327(10)	328(5), 327(100), 326(10), 298(17)
20	Luteolina-2''-O-ramnosil-(6-desoxi-ribo-hexos-3-ulosilo) <sup>c</sup>	53,4	255sh, 273, 339	575	531(17), 513(7), 429(24), 412(12), 411(100), 385(5), 367(60), 357(16), 337(11), 325(6)	393(24), 367(96), 351(5), 337(100)

<sup>a</sup>Picos do perfil cromatográfico apresentado na Figura 18; <sup>\*\*</sup>Ligação tipo A; <sup>(a)</sup> (Barros et al., 2012); <sup>(b)</sup> (Ma et al., 2007); <sup>(c)</sup> (Figueirinha et al., 2008).

Os compostos **1**, **3**, **4**, **5** e **6** apresentam um espectro UV-Vis típico dos derivados do ácido cafeico, como já foi referido para o CcHD (Figura 15A).

Os compostos correspondentes aos picos **1** e **5** apresentam um espectro UV-Vis característico do ácido cafeico e o ião molecular com  $m/z$  de 353. Considerando que a aquisição dos espectros de massa foi realizada no modo ião negativo, pode-se inferir que a massa destes compostos é 354 Da. Estes resultados e a ocorrência, no espectro de segunda ordem ( $MS^2$ ) do fragmento com  $m/z$  de 191 resultante da perda de 162 u.m.a.  $[(M - H) - 162]$  sugere a presença de ácidos cafeoilquínicos. Com base nos padrões de fragmentação referenciados por Clifford, Knight & Kuhnert et al. (2005) e Barros et al. (2012), o composto **1** foi identificado como ácido 3-cafeoilquínico, devido à presença no  $MS^2$  de um intenso sinal (79%) com  $m/z$  179, enquanto a ausência deste fragmento, correspondente ao cinamato, no composto **5** permitiu identificá-lo como ácido 5-cafeoilquínico. A sequência de eluição, evidenciada pelos respectivos tempos de retenção ( $t_R$ ), corrobora a identificação destes compostos.

Os compostos **3** e **6** apresentam um ião molecular com  $m/z$  253 e a fragmentação típica do ácido cafeico: fragmentos com  $m/z$  179  $[(M - H) - 74]^-$ , 162  $[(M - H) - 92]^-$  e 135  $[(M - H) - 118]^-$ . A perda de 74 e 92 u.m.a. são consistentes com a presença de glicerol ( $C_3H_8O_3$ ). Com base nos tempos de retenção dos compostos **3** e **6** e no que foi referido por Ma *et al.* (2007), sugere-se a identificação destes compostos como 1- e 2-O-cafeoilglicerol, respectivamente.

O composto **4**, por outro lado, apresenta um pseudo ião molecular com  $m/z$  431. No  $MS^2$  surgem fragmentos de  $m/z$  385  $[(M - H) - 46]^-$  e 223  $[(M - H) - 208]^-$ . O fragmento maioritário de  $m/z$  385  $[(M - H) - 46]^-$  é consistente com a presença de aductos do ácido fórmico. Este facto já foi referido por outros autores, já que o ácido fórmico, tal como neste trabalho, incorpora muitas vezes a fase móvel utilizada para a eluição dos compostos (Moco *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2006). Assim, o fragmento de  $m/z$  223 sugere a presença do ácido sinápico que possui um peso molecular de 224 Da. O  $MS^3$  apresenta fragmentos de  $m/z$  223  $[(M - H) - 46 - 162]^-$  e 205  $[(M - H) - 46 - 180]^-$  consistente com a presença de uma hexose ou do ácido cafeico, ambos com um peso molecular de 180 Da. No entanto, o espectro UV-Vis é típico do ácido cafeico, levando a sugerir, que o composto **4** seja um aducto do ácido fórmico de um éster entre o ácido cafeico e o ácido sinápico. É de salientar que, até à data, os compostos **3**, **4** e **6** ainda não foram identificados no *Cymbopogon citratus*.

Os compostos **2** e **8** apresentam um espectro UV-Vis típico de 3-flavanóis, monoméricos ou oligo- e poliméricos, os quais apresentam apenas um máximo de absorção entre 270 e 290 nm (Figura 19), consoante o grau de hidroxilação do anel B (Anderson & Markham, 2006).

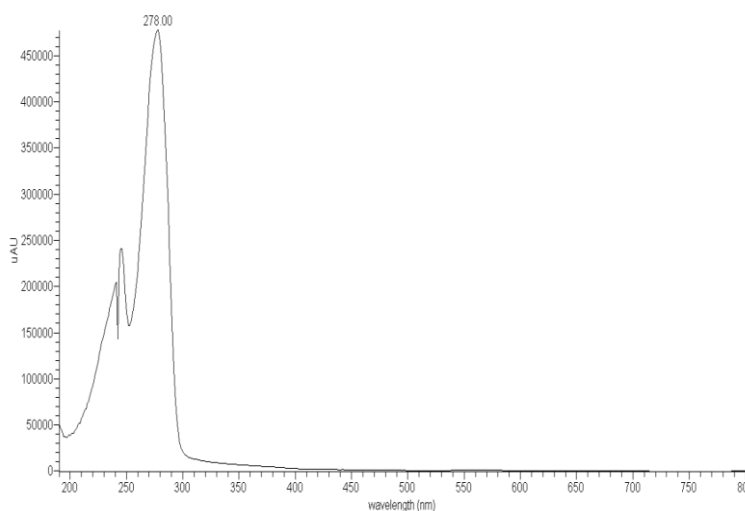
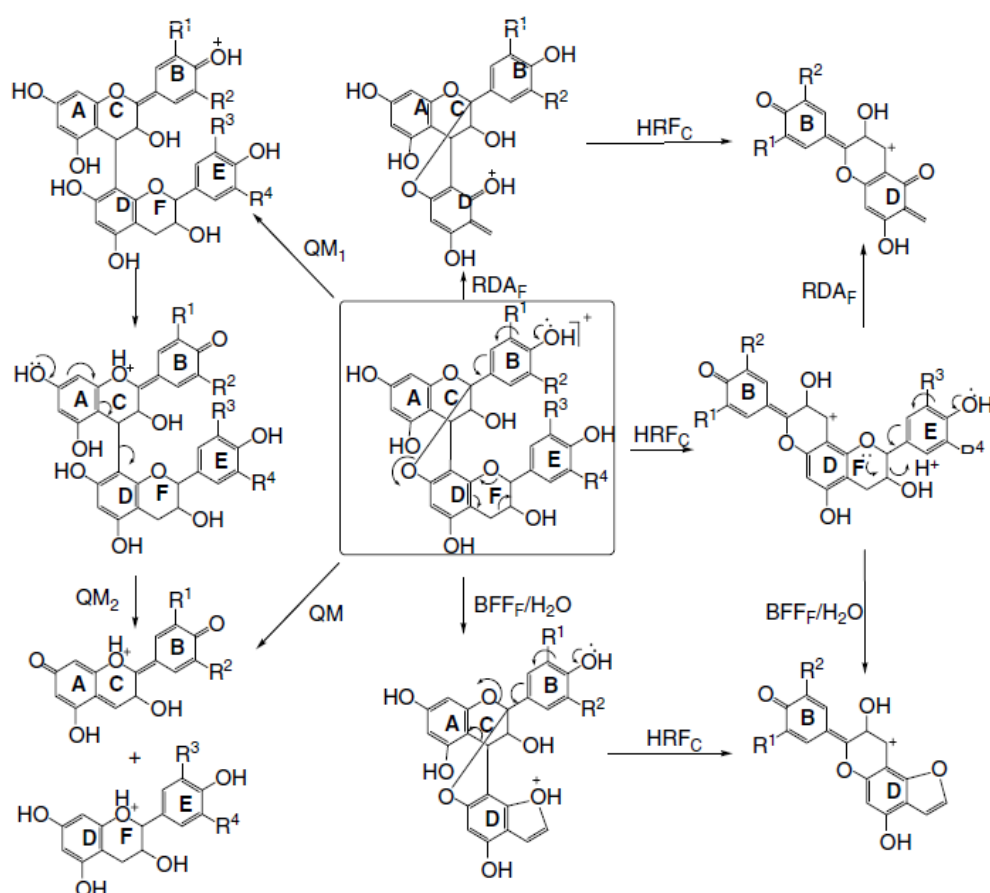
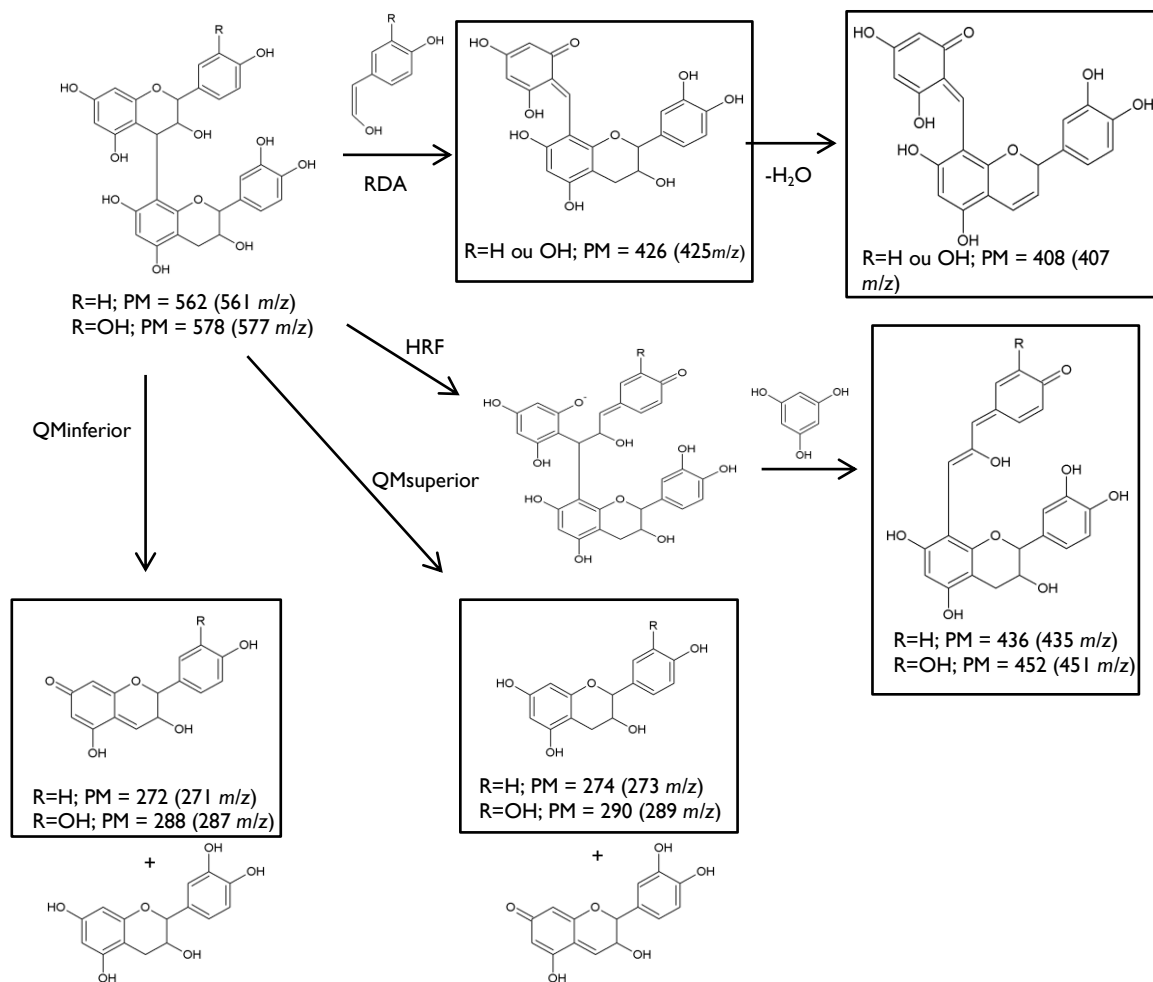


Figura 19 – Espectro UV-Vis dos picos 2 e 8.

O perfil de fragmentação típico destes compostos baseia-se nos princípios de fissão por retro-Diels-Alder (RDA), fissão do anel heterociclo (HRF), fissão com formação de benzofurano (BFF) e clivagem via quinona-metide (QM), ilustrado nas Figuras 20 e 21 (Li & Deinzer, 2008; Callemien & Collin, 2008). Tal como os flavonóides, estes compostos podem ser encontrados sob a forma glicosilada (Ojwang *et al.*, 2013), tendo o perfil de fragmentação das oses já sido descrito na Figura 17, com base no que foi referido por Figueirinha *et al.* (2008).



**Figura 20** – Perfil de fragmentação dos dímeros de proantocianidinas tipo A, em modo ião positivo. Adaptado de Li & Deinzer (2008).



**Figura 21** – Padrão de fragmentação típico dos dímeros de proantocianidinas do tipo B, em modo ião negativo. RDA = Fissão de Retro-Diels-Alder, QM = Clivagem por mecanismo quinona metide e HRF = Fissão do anel heterocíclico, sendo R = H a afzelequina e R = OH a catequina. Adaptado de Callemien & Collin (2008).

O composto **2** apresentou um ião molecular de *m/z* 721. O ião maioritário, *m/z* 559 [(M – H) – 162]<sup>-</sup>, pode corresponder ao dímero formado por (epi)afzelequina e (epi)catequina, unidas por uma ligação do tipo A (proantocianidina do tipo A) resultante da perda de um resíduo hexosilo, o que é corroborado pela presença do ião com *m/z* 541 [(M – H) – 162 – H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>. O perfil de fragmentação revelou um ião de *m/z* 271 [(M – H) – 162 – 288]<sup>-</sup>, que resulta da eliminação do resíduo hexosilo e da clivagem via quinona-metide (QM), com a consequente perda da unidade inferior, a (epi)catequina. No MS<sup>3</sup> o ião de *m/z* 433 [(M – H) – 162 – 126]<sup>-</sup> corresponde à perda do resíduo hexosilo, que ocorreu com a fragmentação do ião molecular (MS<sup>2</sup>), e à fissão do anel heterocíclico (HRF), com saída do anel A da unidade superior (Li & Deinzer, 2008). A ausência, no MS<sup>2</sup>, do ião correspondente à HRF, sugere que a hexose possa estar ligada ao anel A da unidade superior, a (epi)afzelequina (Ojwang *et al.*, 2013). Assim, propõe-se, para o composto **2** a estrutura correspondente a um hexósido do dímero (epi)afzelequina–(epi)catequina, do tipo A. É de salientar que, até à data, o composto **2** ainda não foi identificado no *Cymbopogon citratus*.

O composto **8** apresenta um íão molecular de  $m/z$  1027. Como íão maioritário do  $MS^2$ , o fragmento com  $m/z$  739  $[(M - H) - 288]^-$  indica a clivagem via QM revelando a presença da (epi)catequina. Por sua vez, os íões de  $m/z$  865  $[(M - H) - 162]^-$ , resultante da perda de um resíduo hexosilo e 847  $[(M - H) - 162 - H_2O]^-$  proveniente da perda de uma hexose, sugerem a presença de um trímero de (epi)catequina. Já o íão de  $m/z$  901  $[(M - H) - 126]^-$  mostra a perda do anel A da unidade superior (HRF), revelando ainda que o açúcar não está ligado ao anel A da unidade superior. Baseados neste padrão de fragmentação sobreponível ao descrito por Callemien & Collin (2008) e Ojwang *et al.* (2013), sugere-se a identificação do composto **8** como um hexósido do trímero (epi)catequina-(epi)catequina-(epi)catequina, do tipo B. Tal como o composto **2**, este composto não foi ainda identificado no *Cymbopogon citratus*.

Os compostos **7**, **9** – **20** apresentam um espectro UV característico das flavonas, como já foi referido na identificação dos compostos do CcHD (Figura 15C e D). Os flavonóides **7**, **10**, **11**, **13** – **15**, **17** – **20** foram já identificados por Figueirinha *et al.* (2008). Os compostos **9**, **12** e **16** possuem um espectro UV com apenas um máximo de absorção, na região dos 270 nm (banda II), correspondente aos derivados da apigenina (Anderson & Markham, 2006).

Os espectros de massa dos compostos **9** e **12** ilustram um íão molecular de  $m/z$  563. Os fragmentos presentes no  $MS^2$ , de  $m/z$  443  $[(M - H) - 120]^-$  e 473  $[(M - H) - 90]^-$ , elucidam a presença de um resíduo hexosilo na posição  $C_6$ . Já os fragmentos no  $MS^3$ , de  $m/z$  353  $[(M - H) - 120 - 90]^-$  e 383  $[(M - H) - 120 - 60]^-$ , correspondem à presença de um resíduo pentosilo na posição  $C_8$  (ver Figura 17A). Assim, para os compostos **9** e **12** sugere-se a estrutura da apigenina-6-C-hexosil-8-C-pentósido.

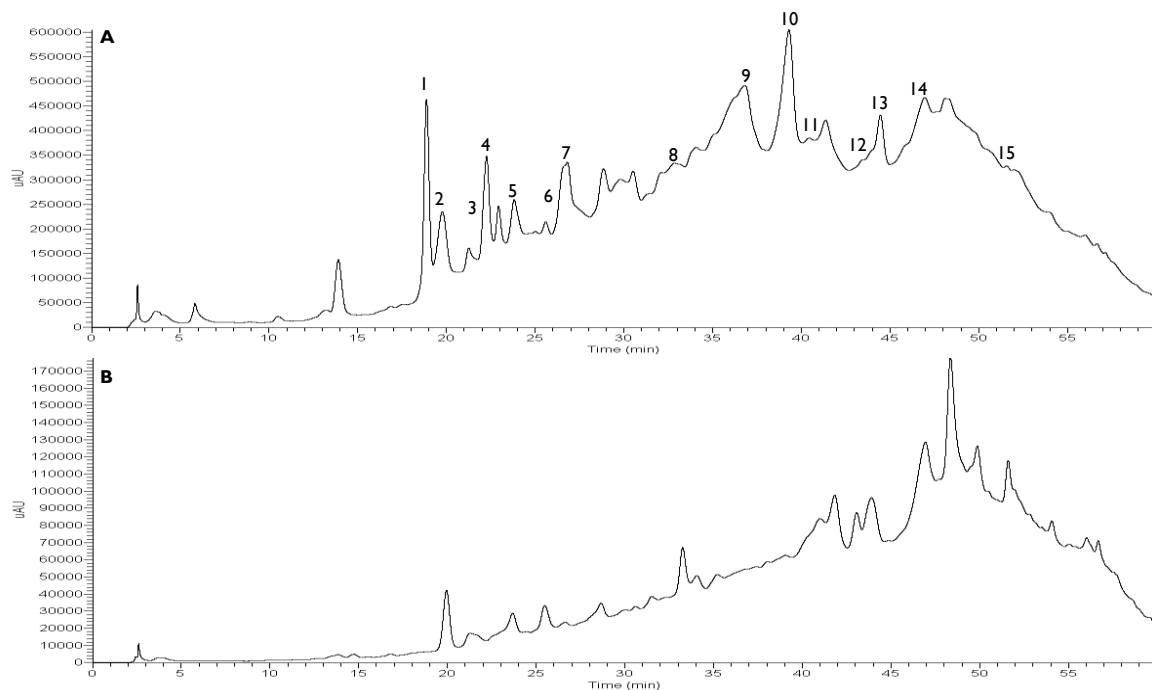
O composto **16** demonstra um íão molecular de  $m/z$  577. O fragmento com  $m/z$  413  $[(M - H) - 164]^-$  revela a perda de uma ramnose. Por outro lado, os íões de  $m/z$  293  $[(M - H) - 164 - 120]^-$  e 323  $[(M - H) - 164 - 90]^-$  são indicadores da presença de uma C-hexose. O facto de não ser detectada a massa da aglicona (apigenina) é consistente com os heterósidos do tipo O, C (Figueirinha *et al.*, 2008). Assim, sugere-se a identificação do composto **16** como apigenina-O-ramnosil-C-hexósido.

É de realçar que os compostos **9**, **12** e **16** não foram, até à data, identificados no *Cymbopogon citratus*.



### 1.3. Identificação dos compostos fenólicos presentes em F<sub>A</sub>

A separação e identificação dos compostos presentes em F<sub>A</sub> pode ser observada na Figura 22 e Tabela 17.



**Figura 22** – Perfil cromatográfico de F<sub>A</sub> obtido no HPLC-PDA Surveyor e registrado a 280 nm (A) e 320 nm (B).

**Tabela 17** – Compostos fenólicos identificados em F<sub>A</sub> por HPLC-PDA-ESI/MS<sup>n</sup>.

P*	Hipótese estrutural	t <sub>R</sub> (min)	λ <sub>máx</sub> (nm)	[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup>	MS <sup>3</sup>
						[m/z (abundância relativa, %)]
1	(Epi)afzelequina-A <sup>**</sup> - (epi)catequina - hexósido	18,9	278	723	678(59), 562(100), 435(25), 383(39), 271(20)	-
2	(Epi)catequina-A <sup>**</sup> - (epi)afzelequina - hexósido	19,5	278	723	668(29), 596(100), 570(21), 561(80), 553(43), 544(38), 501(73), 436(60), 417(27), 382(26), 340(31), 316(14), 274(76)	-
3	(Epi)catequina-A <sup>**</sup> - (epi)afzelequina	21,98	279	561	435(37), 425(6), 409(12), 399(35), 274(100)	255(56), 245(12), 227(12), 217(10), 189(100)
4	(Epi)catequina-A <sup>**</sup> - (epi)afzelequina - hexósido	22,3	279	723	571(58), 561(42), 464(70), 435(100), 339(31), 314(26), 273(25)	339(85), 193(100)
5	(Epi)catequina-A <sup>**</sup> - (epi)afzelequina	24,00	279	561	435(79), 425(6), 417(8), 409(24), 399(80), 299(6), 274(100), 248(9)	255(87), 189(100)

6	(Epi)catequina-A** - (epi)afzelequina -hexosil-ramnósido	26,4	279	869	837(7), 715(10), 705(90), 651(8), 580(25), 564(12), 554(18), 544(27), 420(100), 416(6), 402(7), 398(6), 394(11), 351(10), 280(7)	420(28), 391(27), 273(27), 257(100), 247(59)
7	(Epi)afzelequina-A** - (epi)catequina -hexosil-ramnósido	26,9	280	869	707(100), 705(26), 581(13), 570(34), 563(9), 555(30), 545(37), 520(10), 434(22), 417(8), 409(7), 395(43), 391(9), 299(6), 275(9)	419(54), 418(32), 417(100), 408(28), 257(88)
8	Proapigeninidina- proluteolinidina- eriodictiol -tri- hexósido	33,0	280, 355	1303	1266(35), 1140(66), 1068(42), 978(100)	816(100)
9	(Epi)catequina-A** - (epi)afzelequina -hexosil-ramnósido	36,8	280	869	795(6), 720(5), 716(25), 707(66), 648(5), 595(7), 580(25), 570(5), 561(6), 555(9), 545(56), 484(6), 434(23), 420(100), 415(9), 399(5), 394(31), 273(16)	401(38), 383(25), 377(25), 273(100), 257(19)
10	(Epi)afzelequina-A** - (epi)afzelequina -di-hexósido	39,1	281	869	721(5), 717(6), 707(100), 704(13), 581(12), 571(5), 563(14), 555(27), 545(45), 462(5), 434(22), 421(65), 418(23), 409(17), 394(25), 391(5), 359(8), 286(4), 273(15)	581(100), 545(70), 435(54), 419(99), 418(34), 409(62), 408(66), 282(78)
11	Proapigeninidina- A** -eriodictiol di-hexósido	40,8	280, 344	867	720(6), 704(100), 601(6), 568(5), 551(5), 543(34), 419(5), 272(2)	543(100), 417(41), 271(7)
12	Proluteolinidina- A** -eriodictiol di-hexósido	43,9	279, 348	883	787(91), 763(52), 734(19), 729(100), 703(83), 692(28), 685(57), 666(33), 654(91), 625(28), 601(46), 572(32), 568(29), 551(96), 533(23), 502(33), 475(15), 431(20), 381(14), 354(24)	799(30), 787(93), 733(53), 729(59), 695(17), 667(45), 655(94), 623(22), 577(63), 571(21), 551(27), 513(27), 503(18), 499(43), 457(30), 431(100), 419(17), 409(55), 383(37), 247(19)
13	Proapigeninidina- eriodictiol-di- hexósido	44,5	280, 343	869	706(100), 679(8), 595(17), 574(5), 544(27), 435(33), 430(5), 419(23), 410(16), 402(7), 393(7), 321(6), 274(23)	544(100), 543(17), 449(20), 417(10)
14	Proluteolinidina- A** -eriodictiol di-hexósido	47,00	279, 347	883	787(100), 763(69), 733(25), 729(12), 703(42), 685(37), 667(13), 655(35), 601(21), 567(10), 551(34), 544(6), 534(12), 504(8), 500(9), 473(13), 457(24), 431(8), 420(7), 274(7)	732(100), 697(6), 655(57), 597(5), 571(65), 559(7), 529(9), 503(17), 501(16), 435(8), 419(16), 383(11), 325(14)

15	Proapigeninidina- A <sup>**</sup> -eriodictiol di-hexósido	51,6	279, 349	867	705(100), 578(2), 543(5), 418(12),	544(5), 543(44), 418(7), 417(100), 407(15), 281(9), 271(8)
----	--	------	----------	-----	---------------------------------------	---

\*Picos do perfil cromatográfico apresentado na Figura 22; \*\*Ligação do tipo A

Os compostos **1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, **7**, **9** e **10** apresentam um espectro UV-Vis típico das proantocianidinas (Figura 19).

O composto **1** apresenta um íão molecular de  $m/z$  723. O fragmento maioritário com  $m/z$  562  $[(M + H) - 161]^+$  é consistente com a perda de um resíduo hexosilo. Por sua vez, o íão de  $m/z$  435  $[(M - H) - 288]^+$  revela a presença de uma (epi)catequina, clivada via QM. Já o fragmento com  $m/z$  271 (560 – 290 Da) demonstra a presença de uma (epi)afzelequina, como unidade superior, de acordo com o padrão de fragmentação proposto por Li & Deinzer (2008) e Ojwang *et al.* (2013). Assim, sugere-se a identificação do composto **1** como um hexósido do dímero (epi)afzelequina-(epi)catequina, do tipo A.

Os compostos **2** e **4** apresentam também o mesmo íão molecular. Os íões com  $m/z$  561  $[(M + H) - 162]^+$  demonstram a presença de um resíduo hexosilo. No MS<sup>2</sup> do composto **2**, o fragmento maioritário de  $m/z$  596  $[(M + H) - 127]^+$  é indicativo da HRF da unidade superior, com a perda do anel A, o que demonstra que a hexose não pode estar presente nesta unidade. Por sua vez, os íões com  $m/z$  436  $[(M + H) - 287]^+$  e 274  $[(M + H) - 162 - 287]^+$ , resultantes da clivagem via QM, sugerem a (epi)catequina e (epi)afzelequina como unidades superior e inferior, respectivamente e a hexose provavelmente ligada à unidade inferior. Para o composto **4**, o fragmento principal com  $m/z$  435  $[(M + H) - 162 - 126]^+$  pode resultar da perda do resíduo hexosilo e da HRF da unidade superior. Quanto ao íão com  $m/z$  273  $[(M + H) - 162 - 288]^+$  provém da clivagem via QM e subsequente perda da unidade inferior, tratando-se igualmente da (epi)afzelequina, indo de encontro ao que foi referido por Li & Deinzer (2008) e Ojwang *et al.* (2013). Assim, os compostos **2** e **4** são hexósidos do dímero (epi)catequina-(epi)afzelequina, do tipo A, diferindo, provavelmente na localização da hexose.

Os compostos **3** e **5** demonstram um íão molecular de  $m/z$  561. Os fragmentos 435  $[(M + H) - 126]^+$  revelam a HRF da unidade superior com eliminação do anel A. Quanto aos íões maioritários de  $m/z$  274  $[(M + H) - 287]^+$  sugerem a presença da (epi)afzelequina na unidade inferior destes compostos e a (epi)catequina também resultante de clivagem QM, como unidade superior, tal como é sugerido por Li & Deinzer (2008). Assim, os compostos **3** e **5** podem corresponder a dímeros de (epi)catequina-(epi)afzelequina, do tipo A.

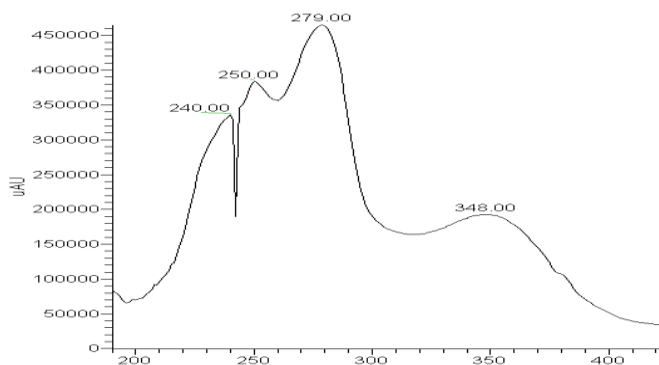
Os compostos **6** e **9** apresentam um íão molecular de  $m/z$  869. O fragmento com  $m/z$  715  $[(M + H) - 136 - H_2O]^+$  revela a fissão de RDA com perda de água da (epi)afzelequina.

A presença desta molécula é confirmada pelo fragmento maioritário do MS<sup>3</sup> do composto **9**, de  $m/z$  273 [(M + H) – 420 – 147]<sup>+</sup>, obtido por clivagem via QM, com perda do resíduo ramnosilo. A presença da ramnose é visível também pelo fragmento maioritário do MS<sup>3</sup> do composto **6**, de  $m/z$  257 [(M + H) – 420 – 146 – H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>. Por sua vez, o ião com  $m/z$  580 [(M + H) – 289]<sup>+</sup> revela a existência de uma (epi)catequina, libertada por clivagem via QM. O ião maioritário dos dois compostos, de  $m/z$  420 [(M + H) – 449]<sup>+</sup> é consistente com um ramnósido da (epi)afzelequina (146 + 274 Da) resultante de uma clivagem QM, com perda de 449 u.m.a., correspondente ligada à (epi)catequina a uma hexose (287 Da + 162 Da), como unidade superior, como sugerido por Li & Deinzer (2008) e Ojwang *et al.* (2013). No entanto, a ocorrência de iões muito representativos com  $m/z$  705 (90%) [(M + H) – 164]<sup>+</sup> e 707 (66%) [(M + H) – 162]<sup>+</sup>, nos compostos **6** e **9** respectivamente, indica uma eventual diferença na localização das oses. Assim, sugere-se a identificação dos compostos **6** e **9** como hexosil-ramnósido do dímero (epi)catequina-(epi)afzelequina, do tipo A.

Relativamente ao composto **7**, tem um ião molecular de  $m/z$  869, mas o ião maioritário do MS<sup>2</sup> apresenta um ião com  $m/z$  707 [(M + H) – 162]<sup>+</sup>, que corresponde à saída de um resíduo hexosilo. No MS<sup>3</sup>, o fragmento com  $m/z$  417 (100%) [(M + H) – 290]<sup>+</sup> resulta da perda de (epi)catequina, da unidade inferior e está associado à (epi)afzelequina e um resíduo ramnosilo (274 Da + 146 – 3H), da unidade superior, semelhante ao aludido por Li & Deinzer (2008) e Ojwang *et al.* (2013). Do exposto, sugere-se para o composto **7** a estrutura de um ramnosil-hexósido do dímero (epi)afzelequina-(epi)catequina, do tipo A.

O composto **10** apresenta um ião molecular com a mesma massa dos compostos atrás referidos (**6**, **7** e **9**),  $m/z$  869. No entanto, o perfil de fragmentação é diferente. O fragmento maioritário do MS<sup>2</sup>, com  $m/z$  707 [(M + H) – 162]<sup>+</sup>, revela a perda de um resíduo hexosilo, enquanto no MS<sup>2</sup> e MS<sup>3</sup>, o ião de  $m/z$  545 [(M + H) – 162 – 162]<sup>+</sup> demonstra a perda de dois resíduos hexosilo, podendo, este fragmento, corresponder a um ião protonado de um dímero da (epi)afzelequina com uma ligação interflavânica adicional, ou seja uma proantocianidina do tipo A (544 Da). Por sua vez, o fragmento com  $m/z$  273 [(M + H) – 596]<sup>+</sup> revela a presença de uma (epi)afzelequina (Li & Deinzer, 2008). Mais ainda, os fragmentos maioritários do MS<sup>3</sup>, com  $m/z$  581 [(M + H) – 162 – 126]<sup>+</sup> e 419 [(M + H) – 162 – 126 – 162]<sup>+</sup>, evidenciam a HRF do anel A da unidade superior e a saída das duas hexoses, provando que provavelmente o composto **10** se encontra glicosilado no anel A das duas unidades de (epi)afzelequina, similarmente ao que sugere Ojwang *et al.* (2013), para um composto semelhante na semente da uva. Assim, para a identificação do composto **10** sugere-se um di-hexósido do dímero (epi)afzelequina-(epi)afzelequina, do tipo A.

Os compostos **8**, **11** – **15** apresentam um espectro UV-Vis típico dos heteropoliflavanos (Figura 23), estruturas constituídas por flavanos - pro-3-desoxi-antocianidinas, tendo como unidade terminal uma flavanona (Awika & Rooney, 2004; Krueger, Vestling & Reed, 2003; Madrigal-Carballo *et al.*, 2013; Reed, Krueger & Vestling, 2005).



**Figura 23** – Espectro UV-Vis dos picos **8**, **11** – **15**.

O composto **8** apresenta um íon molecular de  $m/z$  1303. O fragmento maioritário do  $MS^2$  com  $m/z$  978  $[(M + H) - 325]^+$  revela a perda de dois resíduos hexosilo. No  $MS^3$  o íon de  $m/z$  816  $[(M + H) - 324 - 162]^+$  demonstra a perda de outro resíduo hexosilo. Através da análise do espectro UV-Vis ( $\lambda = 280, 355$  nm) infere-se que está presente uma unidade de eriodictiol. Assim, para o fragmento com  $m/z$  816 procede-se a uma tentativa de identificação como um trímero de proapigeninidina, proluteolinidina e eriodictiol  $[816 = 258 + 274 - 2H + 288 - 2H]$ , similar ao descrito por Krueger, Vestling & Reed (2003) no sorgo. Tendo como base estes aspectos, sugere-se a identificação do composto **8** como um trihexósido do trímero proapigeninidina-proluteolinidina-eriodictiol.

O composto **11** apresenta um íon molecular de  $m/z$  867. O fragmento maioritário do  $MS^2$ ,  $m/z$  704  $[(M + H) - 163]^+$ , revela a perda de um resíduo de hexose. O mesmo se verifica para o íon maioritário do  $MS^3$   $m/z$  543  $[(M + H) - 163 - 161]^+$ , revelando a presença de dois resíduos hexosilo. O fragmento  $m/z$  417  $[(M + H) - 163 - 287]^+$  sugere a presença de uma unidade superior constituída por proapigeninidina ligada a uma hexose  $[416 \text{ Da} = 162 + 258 - 4H]$ , resultante da perda de 450 u.m.a. eventualmente correspondente a uma molécula de eriodictiol, ligada a outra hexose. Com base nesta fragmentação e no que foi descrito por Krueger, Vestling & Reed (2003) o composto **11** foi tentativamente identificado como um di-hexósido do dímero proapigeninidina-eriodictiol, do tipo A.

Os compostos **12** e **14** demonstram um íon molecular de  $m/z$  883, diferindo do composto **11**, em 16 u.m.a. adicionais. Os fragmentos com  $m/z$  763  $[(M + H) - 120]^+$  e 703  $[(M + H) - 180]^+$  sugerem a presença de duas hexoses, uma vez que apresentam o perfil

típico de fragmentação deste tipo de ose, já descrito por Figueirinha *et al.* (2008). Este facto é confirmado pelo ião com  $m/z$  601  $[(M + H) - 162 - 120]^+$ . No composto **12**, o fragmento maioritário de  $m/z$  729  $[(M + H) - 136 - H_2O]^+$  é consistente com a fissão de RDA da proluteolinidina com perda de água do eriodictiol, como sugerido por Tsimogiannis *et al.* (2007). O ião com  $m/z$  431  $[(M + H) - 272]^+$ , fragmento maioritário no MS<sup>3</sup> do composto **12**, corrobora a presença de uma proluteolinidina, similar ao que é sugerido por Krueger, Vestling & Reed (2003). Por sua vez, no composto **14**, a proluteolinidina é confirmada através do fragmento com  $m/z$  274  $[(M + H) - 609]^+$ . Tendo como base a identificação da proluteolinidina e de duas hexoses infere-se a presença do eriodictiol na unidade terminal:  $882 \text{ Da} = 274 + 162 + 162 + 288 - 4H$ , sendo o dímero unido por uma ligação do tipo A. Assim, identificam-se os compostos **12** e **14** como di-hexósidos do dímero proluteolinidina-eriodictiol, do tipo A.

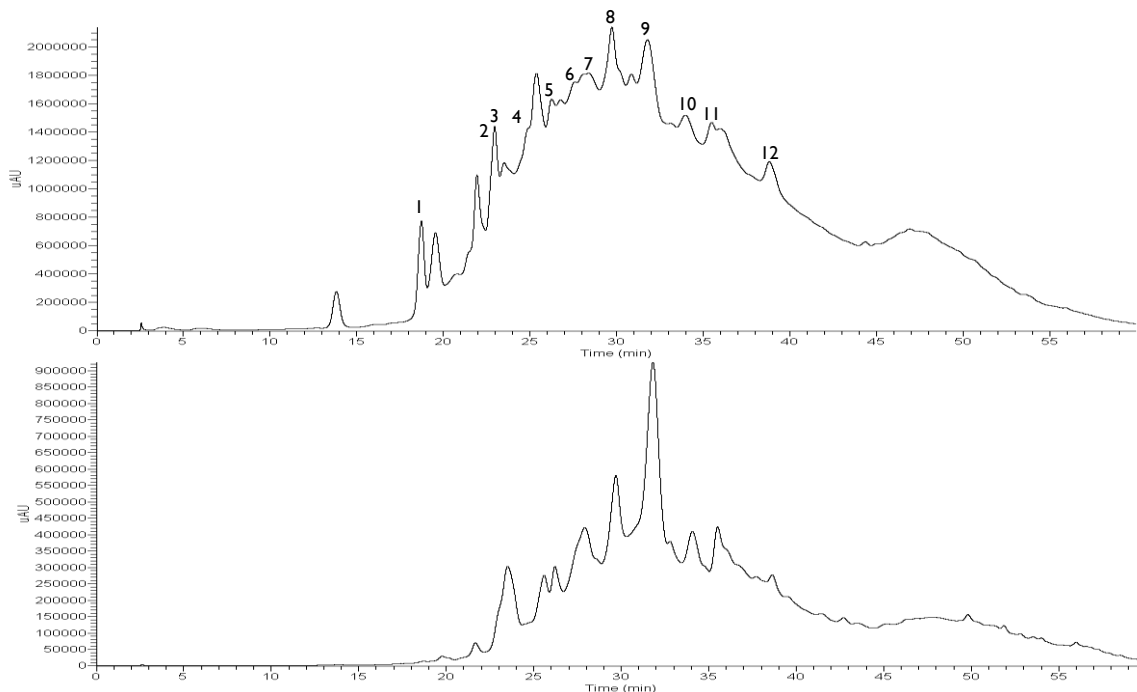
O composto **13** apresenta um ião molecular de  $m/z$  869. O fragmento maioritário do MS<sup>2</sup>, com  $m/z$  706  $[(M + H) - 163]^+$  revela a perda de um resíduo hexosilo. O mesmo se verifica relativamente ao ião mais abundante do MS<sup>3</sup>, com  $m/z$  544  $[(M + H) - 163 - 162]^+$ . Por outro lado, o fragmento de  $m/z$  449  $[(M + H) - 163 - 257]^+$  demonstra a presença de uma unidade proapigeninidina, enquanto o ião de  $m/z$  417  $[(M + H) - 163 - 289]^+$  mostra a perda de uma molécula protonada de eriodictiol, semelhante ao descrito por Krueger, Vestling & Reed (2003). Assim, sugere-se que o composto **13** seja um di-hexósido do dímero proapigeninidina-eriodictiol, do tipo B.

O ião molecular do composto **15**, com  $m/z$  867 apresenta uma diferença de 2 u.m.a. relativamente ao composto **13**. O perfil de fragmentação é semelhante observando-se a perda de dois resíduos hexosilo, visível pelos fragmentos de  $m/z$  705  $[(M + H) - 162]^+$  e 543  $[(M + H) - 162 - 162]^+$ . Por sua vez, o fragmento maioritário do MS<sup>3</sup>, com  $m/z$  417  $[(M + H) - 162 - 288]^+$  revela a presença de uma molécula de eriodictiol. Tendo como base a identificação do eriodictiol e de duas hexoses infere-se a presença de uma molécula de proapigeninidina  $[866 \text{ Da} = 288 + 162 + 162 + 258 - 4H]$ , sendo o dímero unido por uma ligação do tipo A. Assim, sugere-se a identificação do composto **15** como um di-hexósido do dímero proapigeninidina-eriodictiol, do tipo A.

É necessário evidenciar que nenhum dos compostos que constituem a F<sub>A</sub> foram até à data, identificados no *Cymbopogon citratus*, dando-se um destaque especial para os heteropoliflavanos.

### I.4. Identificação dos compostos fenólicos presentes em F<sub>B</sub>

A separação e identificação dos compostos presentes em F<sub>B</sub> pode ser observada na Figura 24 e Tabela 18. Através da análise do espectro UV infere-se que estão presentes dois tipos de compostos.



**Figura 24** – Perfil cromatográfico de F<sub>B</sub> obtido no HPLC-PDA Surveyor e registrado a 280 nm (A) e 320 nm (B).

Os compostos **1** e **3** apresentam um espectro típico das proantocianidinas (Figura 19). Os restantes compostos exibem um espectro semelhante aos dos heteropoliflavanos (Figura 23).

**Tabela 18** – Compostos fenólicos identificados em F<sub>B</sub> por HPLC-PDA-ESI/MS<sup>n</sup>.

P*	Hipótese estrutural	Rt (min)	λ <sub>máx</sub> (nm)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup>	MS <sup>3</sup> [m/z (abundância relativa, %)]
1	(Epi)afzelequina-(epi)catequina-A* <sup>-</sup> hexósido	18,7	277	721	585(52), 567(16), 559(100), 541(8), 447(11), 433(14), 423(13), 405(36), 379(6), 271(2), 267(5)	437(5), 433(26), 423(100), 419(5), 405(5), 397(7), 379(29), 271(13), 231(12)
2	Proluteolinidina-proluteolinidina-eriodictiol di-hexósido	22,7	278, 345	1155	993(100), 975(16), 867(32), 839(23), 813(16), 705(33), 551(8), 537(12), 523(11)	-
3	(Epi)catequina hexósido	23,00	278, 315sh	451	289(100), 245(8)	245(100)

4	Proluteolinidina-proluteolinidina-proluteolinidina-eriodictiol tri-hexósido	24,00	279,347	1589	1427(23), 1409(5), 1301(38), 1273(61), 1155(31), 1111(22), 1013(6), 993(14), 985(5), 957(6), 867(100), 839(6), 705(34), 579(12), 551(6)	705(100), 687(5), 593(7), 579(16), 565(8), 551(60), 389(13)
5	Proluteolinidina-proapigeninidina-eriodictiol tri-hexósido	26,1	276,345	1301	1147(26), 1139(55), 1013(34), 985(100), 984(39), 958(11), 904(10), 877(13), 867(64), 839(10), 823(27), 739(12), 705(23), 703(11), 579(70), 551(11), 535(13), 433(12), 417(10)	-
6	Proluteolinidina-proluteolinidina-eriodictiol di-hexósido	27,3	276,346	1155	993(100), 957(20), 867(25), 839(31), 821(51), 705(45), 523(61)	-
7	Proluteolinidina-proluteolinidina-proluteolinidina-eriodictiol tri-hexósido	27,9	275,347	1589	1427(11), 1409(5), 1301(29), 1273(20), 1272(12), 1155(49), 1111(9), 985(13), 957(6), 867(100), 839(12), 705(30), 551(24)	730(11), 705(100), 687(9), 575(23), 551(41), 271(12)
8	Heterodímero do ramnosil-(epi)catequina-(epi)catequina-hexosil-proluteolinidina-eriodictiol	29,5	276,334	1443	1289(7), 1281(11), 1155(21), 1128(7), 1127(39), 1009(9), 993(8), 965(8), 722(17), 721(100), 558(5), 557(66), 483(13)	557(100), 513(4), 501(3), 483(2), 459(4), 411(2), 405(1)
9	Proluteolinidina-A <sup>**</sup> -eriodictiol-di-hexósido-ramnósido	31,8	275,349	1027	865(36), 847(23), 739(100), 725(9), 575(2)	619(45), 593(15), 575(100), 503(24), 485(8), 473(8), 455(12)
10	Proapigeninidina-A <sup>**</sup> -Eriodictiol – di-hexósido-ramnósido	34,1	278,344	1011	849(36), 831(21), 723(100), 709(54), 695(15), 559(5)	603(35), 577(21), 559(99), 558(8), 523(10), 517(5), 487(16), 469(11), 457(16), 439(100), 345(5)
11	Proapigeninidina-eriodictiol di-hexósido	35,5	278,345	867	786(6), 731(5), 723(9), 709(12), 705(80), 704(7), 687(8), 579(79), 569(19), 559(7), 551(100), 525(8), 433(11), 417(18), 389(21)	389(100), 242(8)
12	Proapigeninidina-eriodictiol di-hexósido	38,8	279,346	867	777(5), 705(83), 689(5), 687(6), 579(73), 569(14), 551(100), 433(11), 417(13), 389(38)	413(18), 389(100)

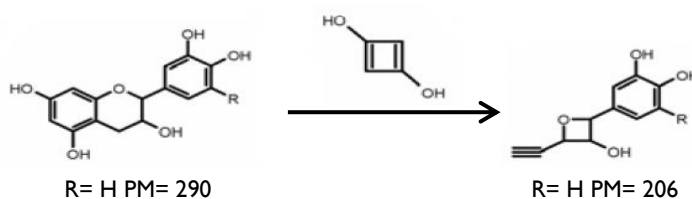
\*Picos do perfil cromatográfico apresentado na Figura 24; \*\*Ligação do tipo A

Pela massa molecular e padrão de fragmentação, assim como pelas características do espectro de UV-Vis, o composto **1** parece tratar-se do mesmo composto da fracção F<sub>III</sub>+F<sub>IV</sub>, ou seja um hexósido do dímero (epi)afzelequina-(epi)catequina, do tipo A.

O composto **3** apresenta um ião molecular de  $m/z$  451. O fragmento maioritário do MS<sup>2</sup> com  $m/z$  289 [(M – H) – 162]<sup>-</sup>, é consistente com a perda de um resíduo hexosilo. Já o ião do MS<sup>3</sup> com  $m/z$  245 [(M – H) – 206]<sup>-</sup> (100%) é indicativo de que a hexose se encontra



no anel A (Figura 25), de acordo com o referido por Callemien & Collin (2008). Assim, identifica-se tentativamente o composto **3** como um hexósido da (epi)catequina.



**Figura 25** – Exemplo de fragmentação da (Ep)Catequina. Adaptado de Callemien & Collin, (2008).

Os compostos **2** e **6** apresentam um íão molecular de  $m/z$  1155. Os íões 993  $[(M - H) - 162]^-$  e 975  $[(M - H) - 162 - H_2O]^-$  comprovam a presença de uma hexose. O fragmento de  $m/z$  867  $[(M - H) - 288]^-$  revela a perda do eriodictiol. Por sua vez, o fragmento  $m/z$  813  $[(M - H) - 162 - 162 - H_2O]^-$ , do composto **2** é consistente com a perda de um segundo resíduo hexosilo. Ao ser analisado de forma mais detalhada, este fragmento pode corresponder à presença de duas unidades de proluteolinidina e uma de eriodictiol, com perda de água  $[814 \text{ Da} = 272 + 272 + 288 - 18]$ , similar ao referido por Krueger, Vestling & Reed (2003), para o sorgo. A presença da proluteolinidina pode ser confirmada pelo fragmento com  $m/z$  839  $[(M - H) - 136 - 162 - H_2O]^-$ , consistente com a fissão de RDA e a perda da hexose, tendo como base o que foi descrito por Ojwang *et al.* (2013) para a (epi)catequina, o 3-flavanol análogo à pro-3-desoxi-antocianidina, proluteolinidina. O segundo resíduo hexosilo pode estar ligado ao eriodictiol, tal como é indicado pelo fragmento com  $m/z$  705  $[(M - H) - 450]^-$ . Assim, os compostos **2** e **6** foram tentativamente identificados como di-hexósidos do trímero proluteolinidina-proluteolinidina-eriodictiol.

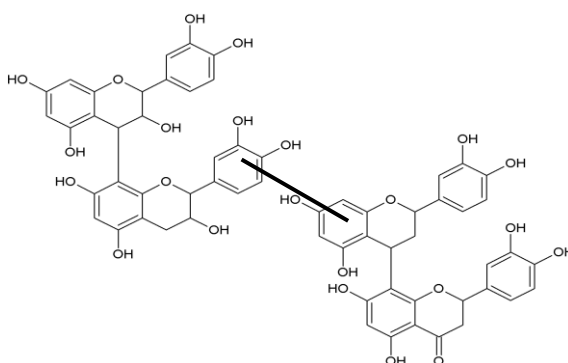
Os compostos **4** e **7** demonstram um íão molecular de  $m/z$  1589. Os fragmentos com  $m/z$  1427  $[(M - H) - 162]^-$  e 1409  $[(M - H) - 162 - H_2O]^-$  revelam a presença de uma hexose. Por sua vez o íão de  $m/z$  1301  $[(M - H) - 288]^-$  é consistente com a perda de uma molécula de eriodictiol, enquanto o íão maioritário do  $MS^2$  com  $m/z$  867  $[(M - H) - 722]^-$  é consistente com a clivagem QM entre um dímero constituído por 2 unidades de proluteolinidina com duas hexoses  $[868 \text{ Da} = 274 + 272 + 324 - 2H]$ , e um outro dímero de proluteolinidina e eriodictiol contendo uma hexose  $[722 \text{ Da} = 274 + 288 + 162 - 2H]$ , tal como foi mencionado por Krueger, Vestling & Reed (2003). No  $MS^3$  o fragmento maioritário de  $m/z$  705  $[(M - H) - 722 - 162]^-$  e o íão 687  $[(M - H) - 722 - 162 - H_2O]^-$  revelam a perda de uma hexose. Por sua vez, o íão 551  $[(M - H) - 722 - 316]^-$  é consistente com a fissão de RDA da proluteolinidina com perda de água e de um resíduo hexosilo. Da fissão de RDA da proluteolinidina obtém-se um resíduo de 120 u.m.a. unido a uma molécula

de proluteolinidina com menos 2 u.m.a. devido à clivagem via QM, e um resíduo hexosilo: [552 Da = 274 + 120 – 2H + 162 – 2H]. Assim, sugere-se a identificação para os compostos **4** e **7** como tri-hexósido do tetrâmero proluteolinidina-proluteolinidina-proluteolinidina-eriodictiol.

O composto **5** apresenta o ião molecular de  $m/z$  1301. O fragmento de  $m/z$  1147 [(M – H) – 136 – H<sub>2</sub>O]<sup>–</sup> revela a fissão de RDA da proluteolinidina tendo como base o que foi descrito por Callemien & Collin (2008) para a (epi)catequina, o 3-flavanol análogo à pro-3-desoxi-antocianidina, proluteolinidina. Por sua vez, o ião com  $m/z$  1013 [(M – H) – 288]<sup>–</sup> mostra a perda de eriodictiol. Já os fragmentos com  $m/z$  1139 [(M – H) – 162]<sup>–</sup> e 958 [(M – H) – 162 – 162 – H<sub>2</sub>O]<sup>–</sup> revelam a perda de uma e de duas hexoses, respectivamente. O fragmento maioritário, de  $m/z$  985 [(M – H) – 162 – 136 – H<sub>2</sub>O]<sup>–</sup> indica a fissão de RDA da proluteolinidina, com perda de água e um resíduo hexosilo, semelhante ao descrito por Ojwang *et al.* (2013) para a (epi)catequina. O ião com  $m/z$  823 [(M – H) – 162 – 162 – 136 – H<sub>2</sub>O]<sup>–</sup> indica o mesmo tipo de fragmentação com a perda de outro resíduo hexosilo, enquanto o fragmento de  $m/z$  703 [(M – H) – 120 – 162 – 162 – 136 – H<sub>2</sub>O]<sup>–</sup> não é mais do que o fragmento anterior com a fissão de RDA de uma unidade de proapigeninidina. Assim, sugere-se a identificação do composto **5** como tri-hexósido do trimero proluteolinidina-proapigeninidina-eriodictiol.

O composto **8** apresenta um ião molecular de  $m/z$  1443. O fragmento maioritário de  $m/z$  721 [(M – H) – 722]<sup>–</sup> divide a molécula ao meio. O ião  $m/z$  1289 [(M – H) – 136 – H<sub>2</sub>O]<sup>–</sup> revela a fissão de RDA da proluteolinidina, com perda de água, enquanto o fragmento  $m/z$  1155 [(M – H) – 288]<sup>–</sup> revela a presença de uma molécula de eriodictiol. Já o ião  $m/z$  1281 [(M – H) – 162]<sup>–</sup> é consistente com a perda de um resíduo hexosilo. Assim, a massa que se perde na fragmentação principal é consistente com um hexósido do dímero proluteolinidina-eriodictiol [722 Da = 272 + 288 + 162]. O facto de a outra metade da molécula ter a mesma massa sugere a presença de um fragmento idêntico, com mais duas unidades de massa. No MS<sup>3</sup> surge o ião  $m/z$  557 [(M – H) – 722 – 146 – H<sub>2</sub>O]<sup>–</sup>, consistente com a perda de uma ramnose (164 Da), restando o dímero de (epi)catequina [290 + 290 – 2 = 578 Da] que, perdendo uma molécula de água (18 Da) e 2 u.m.a. aquando do acoplamento intermolecular, origina o fragmento  $m/z$  557 [578 – 18 – 2 = 558 Da]. Com base nesta análise sugere-se que o fragmento maioritário do MS<sup>2</sup>  $m/z$  721 [(M – H) – 722]<sup>–</sup> possa corresponder a um ramnósido do dímero (epi)catequina-(epi)catequina, originado via clivagem QM. Com base nesta fragmentação e no que foi descrito por Poupard *et al.* (2011), para compostos identificados no sumo da maçã, o composto **8** foi tentativamente

identificado como um heterodímero do ramnosil-(epi)catequina-(epi)catequina-hexosil-proluteolinidina-eriodictiol (Figura 26).



**Figura 26** – Possível estrutura da aglicona para o heterodímero do pico 8. Adaptado de Poupard et al. (2011).

O composto **9** apresenta um íon molecular de  $m/z$  1027. Os fragmentos com  $m/z$  865  $[(M - H) - 162]^-$  e 847  $[(M - H) - 162 - H_2O]^-$  mostram a perda de uma hexose. O fragmento maioritário de  $m/z$  739  $[(M - H) - 288]^-$  revela a presença do eriodictiol. Já no  $MS^3$  o fragmento com  $m/z$  593  $[(M - H) - 146]^-$  e o íon maioritário de  $m/z$  575  $[(M - H) - 146 - H_2O]^-$  elucidam a presença de uma ramnose. Por sua vez, os íões de  $m/z$  503  $[(M - H) - 288 - 146 - 90]^-$ , 473  $[(M - H) - 288 - 146 - 120]^-$  e 619  $[(M - H) - 288 - - 120]^-$  (45%) são coincidentes com a presença de uma hexose, dado que apresentam o perfil de fragmentação típico deste tipo de oses, como já foi referido por Figueirinha et al. (2008). Com base na análise do fragmento maioritário de  $m/z$  739  $[(M - H) - 288]^-$  pode-se inferir sobre a presença de uma unidade de proluteolinidina clivada através de QM  $[740 \text{ Da} = 162 + 162 + 146 + (274 - 4H)]$ , por analogia com o que foi referido por Li & Deinzer (2008) para os 3-flavanóis. Assim, sugere-se a identificação do composto **9** como di-hexosil-ramnósido do dímero proluteolinidina-eriodictiol, do tipo A.

O composto **10** apresenta um íon molecular de  $m/z$  1011, diferindo do composto **9**, em menos 16 u.m.a., mas apresentando igual padrão de fragmentação. Assim, os fragmentos com  $m/z$  849  $[(M - H) - 162]^-$  e 831  $[(M - H) - 162 - H_2O]^-$  mostram a perda de uma hexose. O fragmento maioritário do  $MS^2$ , de  $m/z$  723  $[(M - H) - 288]^-$ , revela a presença do eriodictiol. Já no  $MS^3$  o fragmento com  $m/z$  577  $[(M - H) - 146]^-$  e o íon principal de  $m/z$  559  $[(M - H) - 146 - H_2O]^-$  elucidam a presença de uma ramnose. Por sua vez, os íões de  $m/z$  487  $[(M - H) - 288 - 146 - 90]^-$  e 457  $[(M - H) - 288 - 146 - 120]^-$  são coincidentes com a presença de um resíduo hexosilo, já que revelam o perfil de fragmentação típico deste tipo de oses, como já foi referido por Figueirinha et al. (2008). Já o fragmento  $m/z$  469  $[(M - H) - 288 - (258 - 4H)]^-$  revela a presença de uma unidade de proapigeninidina, já referida por Krueger, Vestling & Reed (2003) no sorgo, clivada através de QM. O fragmento

maioritário do MS<sup>3</sup> de  $m/z$  439 [(M – H) – 288 – 284]<sup>–</sup> sugere ser originado através da HRF da unidade de proapigeninidina, com perda do anel A desta unidade e de um resíduo hexosilo, indiciando-se que este se encontra ligado no anel A da unidade superior: [284 Da = 126 + 162 – 4H]. A presença desta unidade é confirmada pelo ião  $m/z$  603 [(M – H) – 288 – 120]<sup>–</sup>, consistente com a fissão de RDA da proapigeninidina, tendo como base o que foi descrito por Li & Deinzer (2008) para as proantocianidinas do tipo A, constituídas por 3-flavanóis. Assim, sugere-se a identificação do composto **10** como dihexosil-ramnósido do dímero proapigeninidina-eriodictiol, do tipo A.

Os compostos **11** e **12** apresentam um ião molecular de  $m/z$  867. Os fragmentos com  $m/z$  705 [(M – H) – 162]<sup>–</sup> e 687 [(M – H) – 162 – H<sub>2</sub>O]<sup>–</sup> revelam a presença de uma hexose. O fragmento maioritário do MS<sup>2</sup> de  $m/z$  687 [(M – H) – 316]<sup>–</sup> é consistente com a fissão de RDA de uma unidade de eriodictiol, com perda de água e de um resíduo hexosilo, como sugerido por Tsimogiannis *et al.* (2007). Já no MS<sup>3</sup>, o fragmento principal de  $m/z$  389 [(M – H) – 316 – 162]<sup>–</sup> sugere a presença de outro resíduo hexosilo. O ião com  $m/z$  579 [(M – H) – 288]<sup>–</sup> indica a perda de uma molécula de eriodictiol. Este fragmento pode resultar da clivagem QM e corresponder a uma unidade de proapigeninidina e dois resíduos hexosilo [580 Da = 162 + 162 + 258 – 2H], semelhante ao referido por Krueger, Vestling & Reed (2003), no sorgo. Assim, sugere-se a identificação dos compostos **11** e **12** como dihexósidos do dímero proapigeninidina-eriodictiol.

É necessário ainda salientar que, à excepção do composto **3** nenhum dos compostos que constituem a F<sub>B</sub> foram até à data, identificados no *Cymbopogon citratus*, dando-se ênfase para as pro-3-desoxi-antocianidinas.

O perfil de ácidos fenólicos e flavonóides do CcHD, por HPLC-PDA demonstrou ser, em termos qualitativos, surpreendentemente similar ao do Ccl (Tavares *et al.*, 2011). No entanto, o teor de fenóis totais revelou ser superior no CcHD quando comparado ao Ccl. Este resultado sugeriu que a diferença no teor de fenóis totais se devia a um grupo de compostos diferente dos ácidos fenólicos e dos flavonóides. Por esta razão, foi avaliado o teor dos compostos fenólicos mais representativos dos extractos. Ao contrário do que seria de esperar, o teor de ácidos hidroxicinâmicos e de flavonóides foi inferior no CcHD, comparativamente ao do Ccl. Esta diminuição no teor de ácidos hidroxicinâmicos e, principalmente, de flavonóides, está intimamente relacionada com o processo extractivo utilizado uma vez que, para a extracção do óleo essencial são necessárias condições mais exaustivas, nomeadamente uma temperatura e tempo de extracção superiores (Costa,

2000). Segundo Pinelo *et al.* (2005), o aumento da temperatura de extracção tem um efeito directamente proporcional no teor de fenóis totais extraídos, ao melhorar a sua solubilidade e o coeficiente de difusão. No entanto, é necessário ter em conta que altas temperaturas podem degradar os compostos fenólicos. Os flavonóides são susceptíveis de sofrer degradação térmica, sendo a luteolina bastante afectada (Hostetler, Riedl & Schwartz, 2013). Todavia, a presença de substituintes nestas moléculas, especialmente oses, ajuda a prevenir a degradação pela temperatura, não se verificando a transformação dos glicósidos em agliconas (Biesaga, 2011). Também os ácidos hidroxicinâmicos, nomeadamente o ácido cumárico, ácido cafeico e ácido clorogénico, são sensíveis à temperatura, formando-se moléculas altamente reactivas (Guillot, Malnoe & Stadler, 1996; Kulik *et al.*, 2011; Stadler *et al.*, 1996). Contudo, estas condições de extracção mais exaustivas exercem um efeito oposto na extracção de taninos. No que diz respeito às proantocianidinas, estudos efectuados em sementes de uva comprovam que o teor destes compostos aumenta com o aumento da temperatura de extracção (Bucić-Kojić *et al.*, 2009). Ao contrário do que ocorre com ácidos fenólicos e flavonóides, as catequinas apresentam uma grande estabilidade térmica, não se verificando redução significativa, mesmo para aquecimento com água à temperatura de ebulição durante sete horas (Zhu *et al.*, 1997).

Durante a última década, esta classe de polifenóis tem vindo a adquirir um papel de destaque pelo seu potencial anti-radicalar e anti-inflamatório (Francisco & Costa *et al.*, 2014). Apesar do crescente interesse nestes compostos, não estão ainda identificadas as proantocianidinas no *Cymbopogon citratus*.

As proantocianidinas estão amplamente distribuídas na natureza, especialmente em frutos e sementes, sendo as mais comuns e, conseqüentemente as mais estudadas, as proantocianidinas do tipo B (de la Iglesia *et al.*, 2010). Contrariamente ao que seria de esperar, as proantocianidinas que foram identificadas com o decorrer deste trabalho foram, maioritariamente do tipo A. Embora não sejam tão referidas na literatura, esta subclasse dos taninos condensados está bem caracterizada na espécie *Vaccinium macrocarpon* (Tarascou *et al.*, 2011) existindo ainda referências de pro-3-desoxi-antocianidinas do tipo A na resina, mais conhecida por sangue de dragão (Arnone *et al.*, 1997).

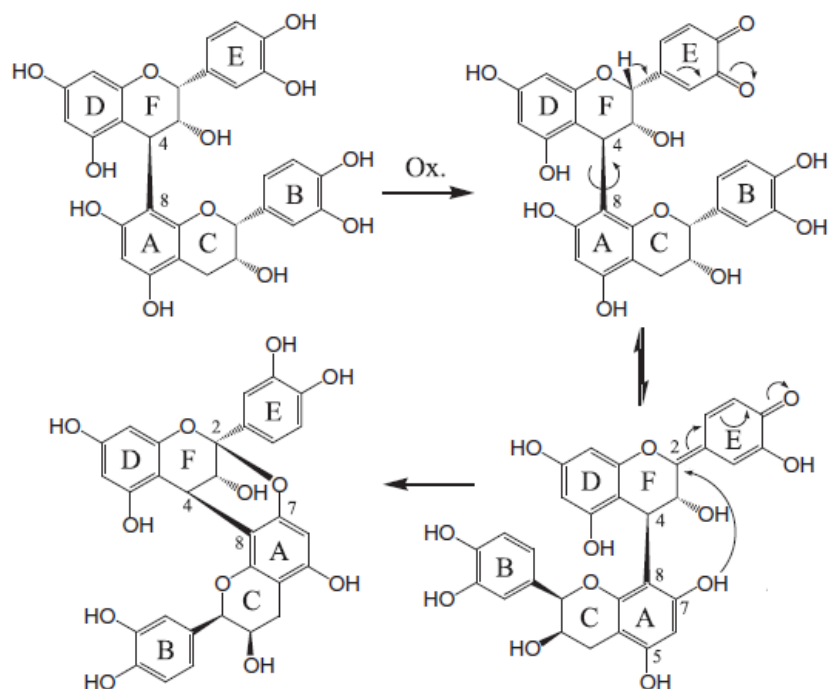
O facto de, até à data, não terem sido ainda identificadas proantocianidinas do tipo A no *Cymbopogon citratus*, sugeriu que as condições exaustivas do processo extractivo poderiam, de alguma forma, estar relacionadas com estes resultados. De facto, segundo Poupard *et al.* (2011) as proantocianidinas do tipo B podem ser oxidadas a proantocianidinas do tipo A, por intermédio de *o*-quinonas de ácidos hidroxicinâmicos, como o ácido

clorogénico, sendo que, a elevada temperatura do processo extractivo pode contribuir para a formação destas estruturas (Li, Guo & Wang, 2008). *Orto*-quinonas de proantocianidinas são formadas através de reacções de oxidação-redução com *o*-quinonas do ácido clorogénico. O facto de as *o*-quinonas serem estruturas que, em meio aquoso, são pouco estáveis e muito reactivas leva à formação de outros produtos de oxidação. De entre estes, tem-se como exemplos a adição intramolecular de proantocianidinas *o*-quinonas e a adição intermolecular entre grupos de flavanóis.

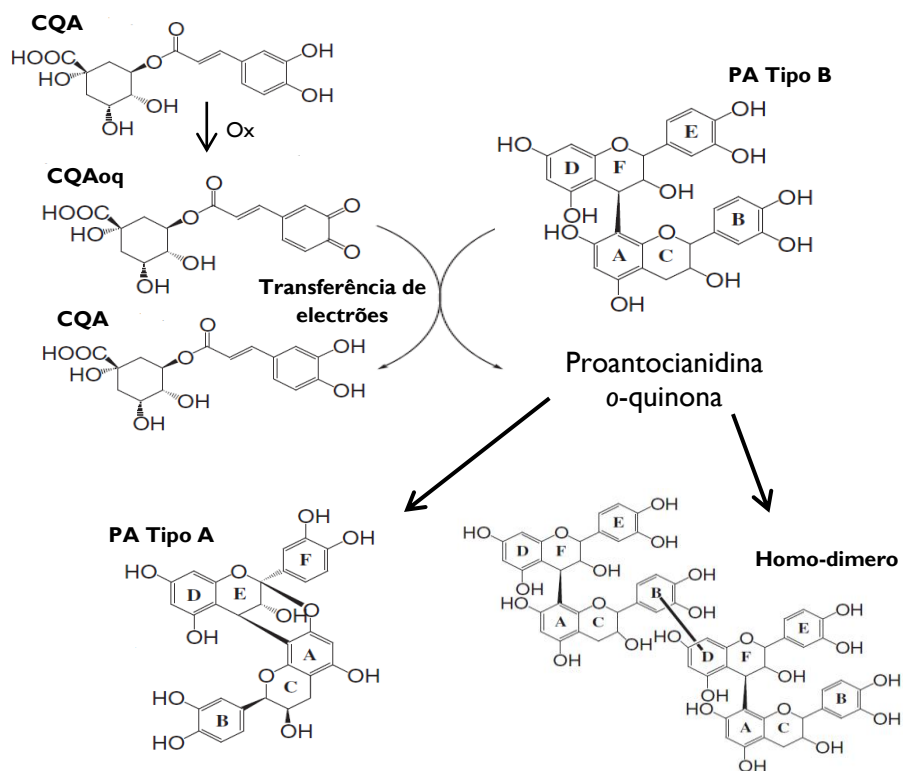
No primeiro caso, a *o*-quinona é formada na unidade superior da proantocianidina e convertida em quinona metide através de rearranjo tautomérico. Esta reacção é seguida de uma adição nucleofílica do grupo hidroxilo da posição C<sub>7</sub> (unidade inferior) ao carbono C<sub>2</sub> (unidade superior), formando-se uma ligação éter que leva ao produto final: uma proantocianidina do tipo A (Figura 27). É de salientar que a transformação de proantocianidinas do tipo B em proantocianidinas do tipo A não ocorre apenas em dímeros, mas também em trímeros, sendo a temperatura um factor importante para esta conversão (Chen *et al.*, 2014; Poupard *et al.*, 2011).

No que diz respeito aos heteropoliflavanos, não há até à data alusões a compostos com ligações do tipo A, ou seja, com duas ligações interflavânicas. Contudo, em termos mecanísticos (Figura 27), também estes compostos sugerem sofrer oxidação por intermédio de *o*-quinonas de ácidos hidroxicinâmicos, uma vez que apenas o anel B da unidade superior (representado na Figura 27 como anel E) e o anel A da unidade inferior aparentam sofrer influência directa na transformação da ligação do tipo B para a ligação do tipo A.

O mecanismo inerente à adição intermolecular entre grupos de flavanóis, não é ainda bem conhecido, embora se saiba o papel importante das *o*-quinonas das proantocianidinas para a formação de homo- e hetero-dímeros, sendo que estruturas com o grupo pirogalhol ou catecol são capazes de dimerizar (Figura 28) (Lavelli *et al.*, 2011; Poupard *et al.*, 2011).



**Figura 27** – Mecanismo proposto para transformação de proantocianidinas do tipo B nas do tipo A. Adaptado de Poupard *et al.*, (2011).



**Figura 28** – Possíveis mecanismos de oxidação das proantocianidinas do tipo B. CQA – ácido cafeoilquínico; CQAoq – ácido cafeoilquínico *o*-quinona; PA – proantocianidina. Adaptado de Poupard *et al.* (2011).

Analisados os resultados obtidos, infere-se a importância do processo extractivo na obtenção de compostos fenólicos, tanto a nível qualitativo como quantitativo. De facto, as condições exaustivas aumentam o teor de fenóis totais extraídos, especialmente taninos, embora degradem outros compostos, como os flavonóides. Estas mesmas condições, nomeadamente a temperatura, sugerem ainda estar envolvidas na diminuição do teor de ácidos hidroxicinâmicos, reunindo as condições necessárias para a formação de moléculas altamente reactivas. Assim, a diminuição do teor de ácidos hidroxicinâmicos sugere estar relacionada com o seu consumo na oxidação de proantocianidinidas e heteropoliflavanos do tipo B a compostos similares do tipo A. É ainda de salientar que esta transformação pode ser bastante benéfica uma vez que, proantocianidinas do tipo A têm sido alvo de grande interesse devido ao seu potencial anti-proliferativo, como descrito por Neto (2007) na espécie *Vaccinium macrocarpon*. Mais ainda, o facto de estes compostos serem oriundos de um desperdício da indústria da extracção do óleo essencial, potencialmente poluente, confere-lhes um valor económico adicional.

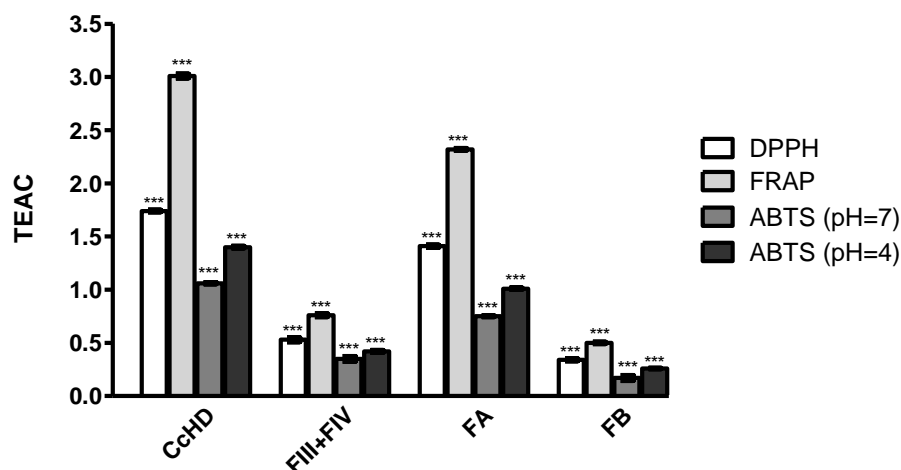
## 2. Actividade Anti-radicalar

O extracto CcHD e as três fracções dele obtidas ( $F_{III}+F_{IV}$ ,  $F_A$  e  $F_B$ ) foram testadas quanto à actividade anti-radicalar contra DPPH, FRAP e ABTS em pH neutro e ácido, sendo os resultados expressos em valor TEAC (capacidade antioxidante equivalente ao trolox, numa solução de 1 mM).

CcHD apresentou valores TEAC de  $1,74 \pm 0,0059$  (DPPH),  $3,01 \pm 0,0151$  (FRAP),  $1,06 \pm 0,0035$  (ABTS pH=7) e  $1,40 \pm 0,0053$  (ABTS pH=4).

Quanto às fracções, a  $F_{III}+F_{IV}$  demonstrou valores TEAC de  $0,53 \pm 0,0166$  (DPPH),  $0,76 \pm 0,01022$  (FRAP),  $0,35 \pm 0,0193$  (ABTS pH=7) e  $0,42 \pm 0,00584$  (ABTS pH=4), enquanto a  $F_A$  exibiu valores TEAC de  $1,41 \pm 0,00788$  (DPPH),  $2,32 \pm 0,00570$  (FRAP),  $0,75 \pm 0,00088$  (ABTS pH=7) e  $1,01 \pm 0,00363$  (ABTS pH=4) e a  $F_B$  ostentou valores TEAC de  $0,34 \pm 0,00663$  (DPPH),  $0,50 \pm 0,00495$  (FRAP),  $0,17 \pm 0,0206$  (ABTS pH=7) e  $0,26 \pm 0,00669$  (ABTS pH=4). Para melhor interpretação dos dados, estes foram organizados na Figura 29.





**Figura 29** – Actividade anti-radicalar de CcHD, F<sub>III</sub>+F<sub>IV</sub>, F<sub>A</sub> e F<sub>B</sub> contra os radicais DPPH, FRAP e ABTS (pH neutro e ácido). Os resultados estão expressos em valores TEAC. Cada valor representa a média ± erro padrão de 3 experiências.

Todos os resultados apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Cada amostra apresentou um TEAC diferente consoante o radical analisado e, para cada radical testado, as amostras demonstraram possuir actividades diferentes. Todas as fracções obtidas por fraccionamento do CcHD demonstraram maior actividade que o extracto, para todos os radicais. A fracção que mais se destacou foi a F<sub>B</sub>, seguida da F<sub>III</sub>+F<sub>IV</sub>, enquanto a F<sub>A</sub> não apresentou uma actividade antioxidante tão marcante.

Sabe-se que a actividade antioxidante dos polifenóis está intimamente relacionada com a estrutura química destes compostos. Vários estudos têm sido realizados na tentativa de se perceber qual a melhor relação estrutura-actividade. Um dos factores que mais contribui para a actividade anti-radicalar dos flavonóides e seus polímeros é o padrão de hidroxilação do anel B. A *o*-di-hidroxilação do anel B (catecol) permite a oxidação dos compostos fenólicos, produzindo-se um radical *orto*-semiquinona bastante estável que facilita a deslocalização de electrões. A presença de grupos hidroxilo no anel A não parece ser tão relevante na actividade antioxidante deste tipo de compostos, enquanto a hidroxilação da posição C<sub>3</sub> do heterociclo parece contribuir bastante para esta actividade. O ângulo de torção do anel B em relação ao resto da molécula influencia a capacidade sequestrante de radicais livres. Compostos hidroxilados em C<sub>3</sub> são planares, enquanto outros sem este grupo funcional são ligeiramente torcidos. O facto de serem planares permite a conjugação e o deslocamento de electrões e, conseqüentemente, um aumento na estabilidade do radical. A remoção deste grupo funcional anula a co-planaridade e conjugação, comprometendo, assim o potencial anti-radicalar. Também a presença de uma ligação dupla C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> e de um grupo cetona na posição C<sub>4</sub> determina a co-planaridade do heterociclo e estabiliza o radical através

da deslocalização de electrões sobre os três sistemas de anéis. Apesar das duas estruturas serem importantes, a ligação dupla C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> parece não influenciar tanto como a presença do grupo cetona em C<sub>4</sub>. Por último, o grau de polimerização, que parece estar relacionado com a actividade antioxidante, sugere que compostos com um grau superior de polimerização apresentam um potencial anti-radicalar superior (Amić *et al.*, 2007; Heim, Tagliaferro & Bobilya, 2002; Pietta, 2000).

Assim, os resultados obtidos estão em concordância com o que foi acima referido. A fracção F<sub>B</sub>, a mais activa, é uma mistura de proantocianidinas e heteropoliflavanos, estando os últimos em maior concentração e apresentando maior grau de polimerização, com unidades essencialmente *o*-hidroxiladas no anel B. De facto, os heteropoliflavanos são constituídos, na sua maioria, por proluteolinidinas e eriodictiol, ambos di-hidroxilados no anel B, sendo que o eriodictiol possui também o grupo cetona na posição C<sub>4</sub> do heterociclo.

A F<sub>A</sub>, por sua vez, possui proantocianidinas do tipo A como compostos mais abundantes, sendo que na sua maioria possuem uma unidade de (epi)afzelequina, flavanol mono-hidroxilado no anel B. Também o facto de possuírem uma ligação interflavânica, adicional entre o C<sub>2</sub> da unidade superior e o hidroxilo do C<sub>7</sub> da unidade inferior contribui para o decréscimo da actividade, uma vez que o grupo hidroxilo em C<sub>3</sub> das unidades estruturais 3-flavanóis, não está acessível à reacção.

A fracção F<sub>III</sub>+F<sub>IV</sub>, por outro lado, é rica em flavonas e proantocianidinas, sendo que as flavonas possuem a ligação insaturada C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> conjugada com o grupo cetona em C<sub>4</sub> e são essencialmente derivadas da luteolina, flavona *o*-di-hidroxilada no anel B. Embora não seja reportada uma actividade antioxidante tão proeminente para as flavonas como o referido para as proantocianidinas (Pietta, 2000), nesta fracção parecem surgir efeitos sinérgicos entre os dois tipos de compostos, como já foi observado anteriormente entre 3-flavanóis e flavonóis (Hidalgo, Sánchez-Moreno & de Pascual, 2010).

Apesar das amostras possuírem actividades diferentes, todas possuem uma actividade superior sobre o radical ABTS a pH neutro. Este radical não reproduz o que ocorre com as espécies reactivas do oxigénio (ROS) e, por isso considera-se que este não é um teste com grande relevância biológica (Badarinath *et al.*, 2010). No entanto, tal como com o DPPH, a reacção entre o radical ABTS e o composto antioxidante reproduz as reacções que ocorrem num sistema de oxidação, como por exemplo, a auto-oxidação dos lípidos ou outra biomolécula. Assim, este radical é orientador do que pode ocorrer *in vivo*, pois mimetiza os radicais formados nas cadeias oxidativas, cuja actividade é suprimida na presença de uma substância antioxidante (Molyneux, 2004).

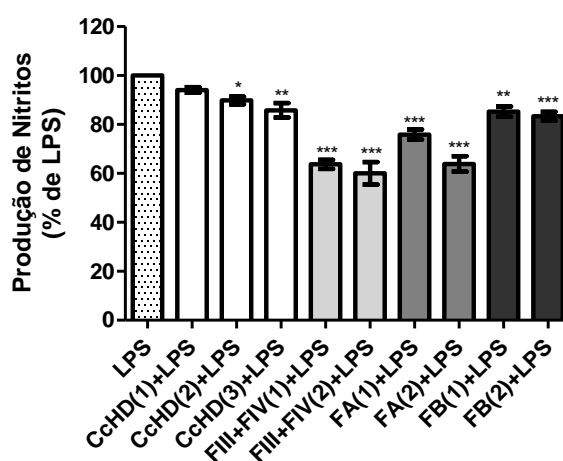
### 3. Actividade anti-inflamatória e viabilidade celular

O potencial anti-inflamatório do extracto (CcHD) e das três fracções dele obtidas ( $F_{III}+F_{IV}$ ,  $F_A$  e  $F_B$ ) foi avaliado através da sua capacidade inibidora para o mediador pro-inflamatório, NO, em macrófagos RAW 264.7, estimulados por LPS. Para além do potencial anti-inflamatório, foi também avaliado o perfil de citotoxicidade do extracto e das fracções, não se verificando qualquer citotoxicidade para as concentrações eficazes testadas (Figura 30 e Tabela 19).

As células Raw 264.7 não estimuladas produzem um teor de nitritos muito baixo. Quando estimuladas pelo LPS, a produção deste mediador pro-inflamatório sofre um aumento exponencial. Contudo, a produção de nitritos diminui quando as células estimuladas são sujeitas à acção do CcHD e das fracções ( $F_{III}+F_{IV}$ ,  $F_A$  e  $F_B$ ), de uma forma dependente da dose.

Todas as fracções se mostraram mais activas do que o extracto, sendo a  $F_{III}+F_{IV}$  a mais activa, seguida da  $F_A$  e da  $F_B$ . As percentagens de inibição do CcHD foram de  $5,90 \pm 1,18$  (CcHD<sub>1</sub>),  $10,17 \pm 1,56$  (CcHD<sub>2</sub>) e  $14,22 \pm 2,96$  (CcHD<sub>3</sub>).

No caso das fracções, para  $F_{III}+F_{IV}$  as percentagens de inibição foram  $36,29 \pm 1,82$  e  $39,92 \pm 4,59$  para  $F_{III}+F_{IV}_1$  e  $F_{III}+F_{IV}_2$ , respectivamente.  $F_A$  revelou uma percentagem de inibição de  $24,11 \pm 2,08$  para  $F_{A1}$  e  $36,12 \pm 3,14$  para  $F_{A2}$ . Já  $F_B$  apresentou uma percentagem de inibição de  $14,75 \pm 2,10$  e  $16,67 \pm 1,78$  para  $F_{B1}$  e  $F_{B2}$ , respectivamente.



**Figura 30** – Efeito inibitório de CcHD e fracções  $F_{III}+F_{IV}$ ,  $F_A$  e  $F_B$  em macrófagos estimulados pelo LPS. Os resultados mostram a produção de NO, expressa em % de estímulo LPS. Cada valor representa a média  $\pm$  erro padrão de pelo menos 3 experiências independentes.

**Tabela 19** – Efeito do CcHD e frações F<sub>III</sub>+F<sub>IV</sub>, F<sub>A</sub> e F<sub>B</sub> na viabilidade celular de macrófagos.

Amostra	Viabilidade celular (% LPS) <sup>a</sup>
CcHD <sub>1</sub> +LPS	126,2 ± 22,18
CcHD <sub>2</sub> +LPS	113,7 ± 20,10
CcHD <sub>3</sub> +LPS	95,61 ± 12,04
F <sub>III</sub> +F <sub>IV</sub> <sub>1</sub> +LPS	125,7 ± 31,23
F <sub>III</sub> +F <sub>IV</sub> <sub>2</sub> +LPS	140,9 ± 39,26
F <sub>A</sub> <sub>1</sub> +LPS	108,6 ± 12,99
F <sub>A</sub> <sub>2</sub> +LPS	104,0 ± 16,78
F <sub>B</sub> <sub>1</sub> +LPS	130,4 ± 34,95
F <sub>B</sub> <sub>2</sub> +LPS	133,4 ± 31,07

<sup>a</sup>Cada valor representa a média ± erro padrão de pelo menos 3 experiências independentes.

Tal como a actividade antioxidante, também a actividade anti-inflamatória dos polifenóis está intimamente relacionada com a sua estrutura química. A hidroxilação dos flavonóides é um factor de extrema importância, tanto no anel A (C<sub>5</sub> e C<sub>7</sub>), como no anel B (C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub>), sendo que o ideal será os compostos possuírem no mínimo três grupos hidroxilo. Mais ainda, a ausência de hidroxilação do anel B suprime a actividade anti-inflamatória, enquanto o grupo hidroxilo em C<sub>3</sub> não parece ser de grande relevância para a inibição da produção de NO. Também a ligação dupla C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> em conjugação com o grupo cetona em C<sub>4</sub> supõe-se contribuir para a actividade anti-inflamatória dos compostos. No que diz respeito às proantocianidas, o seu potencial anti-inflamatório aumenta proporcionalmente com o acréscimo do grau de polimerização. (Chen *et al.*, 2007; Comalada *et al.*, 2006; Gerritsen *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2004; Terra *et al.*, 2007).

Com base no conhecimento da relação estrutura-actividade, os resultados obtidos estão concordantes com o descrito na literatura, sugerindo que a diferença no potencial anti-inflamatório está relacionada com o tipo de compostos presentes em cada fracção. A fracção mais activa, a F<sub>III</sub>+F<sub>IV</sub>, é rica em flavonas, principalmente derivados da luteolina. Estes compostos possuem as estruturas mais importantes para a actividade anti-inflamatória, sendo di-hidroxiladas tanto no anel B (C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub>), como no anel A (C<sub>5</sub> e C<sub>7</sub>) e possuindo ainda a ligação dupla C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> conjugada com o grupo cetona em C<sub>4</sub> (Comalada *et al.*, 2006).

A F<sub>A</sub>, por sua vez, é constituída maioritariamente por dímeros de (epi)catequina e (epi)afzelequina. Ambas as unidades são di-hidroxiladas no anel A (C<sub>5</sub> e C<sub>7</sub>), embora apenas a (epi)catequina o seja também no anel B (C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub>). Todavia, as duas unidades perfazem um mínimo de três grupos hidroxilos, número reportado para boa ocorrência de actividade anti-inflamatória.

Quanto à F<sub>B</sub>, fracção menos activa, é constituída maioritariamente por heteropoliflavanos, dímeros, trímeros e tetrameros. Também as unidades que constituem estes compostos (proluteolinidina, proapigeninidina e eriodictiol) possuem estruturas de

destaque para a actividade anti-inflamatória. Todas as unidades são di-hidroxiladas no anel A ( $C_5$  e  $C_7$ ). No que diz respeito ao anel B, apenas a proluteolinidina e o eriodictiol são dihidroxilados ( $C_3$  e  $C_4$ ), sendo as outras unidades mono-hidroxiladas. As unidades terminais (eriodictiol) possuem ainda o grupo cetona em  $C_4$ , embora este não esteja conjugado com uma ligação dupla  $C_2$ - $C_3$ , factor ideal para este tipo de actividade. Mais ainda, seria de esperar que esta fracção, por possuir compostos com um maior grau de polimerização, possuísse uma maior actividade do que  $F_A$ . No entanto, o facto de os compostos serem quimicamente distintos leva a crer que as regras sugeridas para as proantocianidinas não se aplicam a este tipo de estruturas, sendo necessário mais estudos neste âmbito.

Apesar da  $F_A$  apresentar uma actividade semelhante à da  $F_{III}+F_{IV}$ , esta fracção demonstrou possuir propriedades pro-inflamatórias, uma vez que, por si só, a fracção causa um aumento de NO. Existem estudos que relacionam o aumento da produção de NO com um bom potencial anti-proliferativo, uma das propriedades farmacológicas mais procurados nos fármacos anti-cancerígenos, já que o NO é um modulador patofisiológico capaz de interferir com a proliferação celular, perturbar o ciclo celular e induzir apoptose. (Napoli *et al.*, 2013; Quintana-Lopez *et al.*, 2013). Mais uma vez, esta diferença nos resultados sugere estar relacionada com a composição química da fracção.

A  $F_A$  possui maioritariamente proantocianidinas do tipo A, que indiciam um potencial imunoestimulante. Segundo Neto (2007), a ligação do tipo A nas proantocianidinas revela um papel de destaque, uma vez que uma proantocianidina com ligações do tipo A é mais citotóxica que o seu análogo estrutural de ligações do tipo B. Neto, Amoroso & Liberty (2008) sugerem ainda que o mecanismo predominante neste tipo de compostos é a apoptose, provavelmente induzida pelo seu potencial imunoestimulante.

Para além das proantocianidinas do tipo A, na  $F_A$  observou-se ainda a possível presença de 3-desoxi-antocianidinas, uma vez que a fracção apresentava uma tonalidade rosa e alguns compostos ostentaram um espectro UV-Vis, típico destes compostos (dados não apresentados). As antocianidinas apresentam um espectro UV-Vis com uma absorção na região dos 450-560 nm, correspondente à Banda I e uma absorção na região dos 240-280 nm, referente à Banda II. Através da análise do espectro UV-Vis dos compostos presentes em  $F_A$  infere-se a presença de uma classe de antocianidinas particulares: as 3-desoxi-antocianidinas. Estes compostos caracterizam-se por absorverem à luz visível a um comprimento de onda inferior a 500 nm (a pH=7), enquanto as antocianidinas mais comuns absorvem geralmente a um comprimento de onda acima dos 510 nm (Awika, 2011; Yao *et*

al., 2004). Estudos revelam que antocianidinas e proantocianidinas possuem um mecanismo anticancerígeno semelhante, interferindo com o ciclo celular das células. Ren *et al.* (2003) refere que sinais mitóticos induzem a célula a entrar em divisão celular através de várias etapas bem reguladas. A síntese de ADN (fase S) e a separação em duas células “filhas” (fase M) são os aspectos principais na progressão do ciclo celular. O tempo entre as fases S e M é denominado por fase  $G_2$ , e é neste período que os mecanismos celulares reparam os erros que possam ter ocorrido aquando da duplicação do ADN, prevenindo assim a passagem de erros para as células “filhas”. A fase  $G_1$  separa as fases M e S e é nela que a célula se prepara para a duplicação do ADN. Segundo Chen *et al.* (2005) e Gossé *et al.* (2005), antocianidinas e proantocianidinas levam à acumulação de células nas fases  $G_2/M$ . Em simultâneo, estes compostos causam a diminuição do número de células na fase  $G_0/G_1$ , aumentando consequentemente o número de células hipodiplóides, um indicador da apoptose.

Segundo Devi, Saravanakumar & Mohandas (2011) o mesmo mecanismo é observado nas 3-desoxi-antocianidinas, sendo ainda reportado por Awika (2011) que as 3-desoxi-antocianidinas possuem uma actividade antiproliferativa superior à dos seus análogos estruturais, as antocianidinas. Assim, se o mecanismo entre antocianidinas e proantocianidinas é semelhante, pode inferir-se que o mesmo poderá ocorrer com as 3-desoxi-antocianidinas e as pro-3-desoxi-antocianidas. Mais ainda, estudos realizados com as unidades terminais dos heteropoliflavanos, eriodictiol (Liu *et al.*, 2010) e naringenina (Arul & Subramanian, 2013), revelam que estes compostos também exercem uma actividade antiproliferativa através de interferência no ciclo celular. Assim, com base no que foi descrito na literatura e por analogia à relação entre antocianidinas e proantocianidinas, infere-se que a  $F_B$ , rica em heteropoliflavanos, possa exibir um potencial antiproliferativo. Adicionalmente, como referido por Ren *et al.* (2003), o potencial antioxidante da  $F_B$  pode contribuir para o seu carácter anti-cancerígeno, limitando os danos causados por reacções oxidativas, que podem pré-dispor as células a tornarem-se tumurais.

Através do fraccionamento do CcHD obtivemos então três fracções com potencial de aplicações distintas.

A  $F_{III}+F_{IV}$  apresentou uma actividade anti-inflamatória bastante satisfatória, não demonstrando para as condições testadas qualquer tipo de citotoxicidade.

A  $F_B$  revelou um potencial antioxidante excelente, demonstrando que a actividade antioxidante não está directamente relacionada com o potencial anti-inflamatório. A natureza química dos compostos identificados e os dados bibliográficos disponíveis sobre

este tipo de compostos sugerem ainda a possibilidade desta fracção apresentar um carácter anti-cancerígeno. É ainda de salientar que, por ser obtida a partir de um desperdício da indústria e ser de origem natural, esta fracção e os compostos nelapresentes, seriam bons candidatos a integrar produtos alimentares. No entanto, um estudo mais aprofundado é necessário, uma vez que os heteropoliflavanos foram descobertos recentemente, e para além dos compostos identificados pelo nosso grupo no *Cymbopogon citratus*, estes apenas foram identificados no Sorgo (Krueger, Vestling & Reed, 2003; Reed, Krueger & Vestling, 2005).

Por fim, a  $F_A$  sugeriu possuir um potencial anti-proliferativo devido à sua composição química, particularmente rica em proantocianidinas do tipo A. É de referir que, as proantocianidinas do tipo A parecem ser formadas durante o processo extractivo, inferido de trabalhos realizados com o sumo de maçã (Poupard *et al.*, 2011), incentivando-se assim o reaproveitamento do desperdício industrial, que estudámos.

No que diz respeito às 3-desoxi-antocianidinas, constituintes presentes na  $F_A$ , revelam-se potencialmente interessantes para a indústria alimentar, por serem consideradas corantes com boa estabilidade e de origem natural. Tanto antocianidinas como 3-desoxi-antocianidinas tendem a perder cor com o aumento do pH. No entanto, as 3-desoxi-antocianidinas demonstraram ser mais resistentes à degradação da cor. Esta particularidade está associada à natureza mais hidrofóbica do seu anel heterociclo, quando comparado com o dos seus análogos estruturais, as antocianidinas. Assim, em meio aquoso, as 3-desoxi-antocianidinas não são tão sujeitas à hidratação como as antocianidinas, evoluindo para uma base quinoidal, que possui uma coloração vermelha, enquanto as antocianidinas, por possuírem um anel heterociclo mais hidrofílico, evoluem para uma chalcona, incolor (Awika, 2011).

Capítulo IV

---

Conclusão



## Conclusão

*Cymbopogon citratus* é uma planta medicinal reconhecida mundialmente tanto em termos etnofarmacológicos como pelo interesse comercial do seu óleo essencial. A água da destilação resultante da extracção do óleo essencial (CcHD) é um conhecido desperdício que acarreta problemas ambientais. Na tentativa de tornar este subproduto, numa matéria-prima rentável, o CcHD foi fraccionado e avaliado tanto em termos de composição química como no seu potencial antioxidante e anti-inflamatório.

Em termos fitoquímicos, CcHD é rico em ácidos fenólicos, flavonóides e taninos, sendo o teor destes últimos cerca do dobro relativamente ao registado para o infuso. Do fraccionamento realizado, obteve-se uma primeira fracção,  $F_{III}+F_{IV}$ , constituída maioritariamente por flavonóides, do tipo flavona, principalmente derivados da luteolina, e por taninos condensados (proantocianidinas). As fracções obtidas, constituídas exclusivamente por taninos condensados, demonstraram um perfil fenólico bastante distinto. A fracção  $F_A$  revelou a presença de proantocianidinas do tipo A e alguns derivados de 3-desoxi-antocianidinas, como compostos minoritários. Por outro lado a  $F_B$  apresentou como compostos maioritários heteropoliflavanos constituídos por pro-3-desoxi-antocianidinas e uma flavanona.

No que diz respeito às bioactividades, os polifenóis presentes nas fracções obtidas a partir de CcHD demonstraram potenciais de aplicação bastante distintos. A  $F_{III}+F_{IV}$  apresentou uma boa actividade anti-inflamatória, não demonstrando qualquer tipo de citotoxicidade. A  $F_B$  revelou um potencial antioxidante excelente, sugerindo que a actividade antioxidante não está directamente relacionada com o potencial anti-inflamatório. Por serem oriundos de um desperdício da indústria e de origem natural, os heteropoliflavanos presentes nesta fracção, seriam bons candidatos a integrar produtos alimentares. Já a  $F_A$  demonstrou um potencial imuno-estimulante, sugerindo possuir propriedades anti-proliferativas. As 3-desoxi-antocianidinas nela presentes conferem ainda um potencial de aplicação na indústria alimentar, como corantes.

Conclui-se ainda que o processo extractivo, apesar de exaustivo, leva à formação de compostos com possíveis propriedades terapêuticas, incentivando-se assim o reaproveitamento deste desperdício da indústria.

Em suma, os resultados obtidos sugerem que, o desperdício da indústria de extracção de óleos essenciais do *Cymbopogon citratus* por hidrodestilação pode vir a proporcionar potenciais fármacos anti-inflamatórios e anti-cancerígenos, bem como antioxidantes e corantes de aplicação industrial, seguros e de origem natural.

## Capítulo V

---

### Perspectivas Futuras

## Perspectivas futuras

Com o decorrer deste trabalho percebeu-se que o desperdício resultante da hidrodestilação do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* possui propriedades farmacológicas, especificamente actividade antioxidante e anti-inflamatória. Mais ainda, alguns compostos presentes nas fracções sugeriram um potencial antiproliferativo/anti-cancerígeno. Por outro lado, os compostos identificados através do fraccionamento deste extracto aquoso, na sua maioria, não foram ainda identificados em *Cymbopogon citratus*.

Assim, com base nestes aspectos considera-se que o presente trabalho apresenta ainda uma linha de investigação a ser desenvolvida:

- Isolar e identificar/confirmar a estrutura dos compostos tentativamente identificados, por recurso à Ressonância Magnética Nuclear;
- Confirmar se as proantocianidinas e heteropoliflavanos do tipo A se originaram no decorrer do processo extractivo ou se, pelo contrário, já existem na planta;
- Alargar o estudo do potencial antioxidante com testes considerados orientados para o estudo de espécies reactivas de oxigénio biológicas;
- Estudar mecanismos da acção anti-inflamatória dos flavonóides;
- Avaliar os sinergismos entre flavonóides e taninos;
- Explorar/confirmar o potencial antiproliferativo/anti-cancerígeno das proantocianidinas do tipo A e dos heteropoliflavanos, bem como entender as vias pelo qual actuam;
- Realizar testes *in vivo* para comprovação das actividades;
- Determinar os metabolitos originados durante o processo digestivo e aquilatar a sua bioactividade.

## Capítulo VI

---

### Bibliografía

- ABEYNAYAKE, S. W. *et al.* - **A high-resolution method for the localization of proanthocyanidins in plant tissues.** *Plant Methods*. Vol. 7, n°.1 (2011), p. 1–6.
- ADENEYE, A. A.; AGBAJE, E. O. - **Hypoglycemic and hypolipidemic effects of fresh leaf aqueous extract of *Cymbopogon citratus* Stapf. in rats.** *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 112, n°. 3 (2007), p. 440–444.
- AFAQ, F.; KATIYAR, S. - **Polyphenols: Skin photoprotection and inhibition of photocarcinogenesis.** *Mini Rev Med Chem*. Vol. 11, n°.14 (2011), p. 1200–1215.
- AGBAFOR, K.; AKUBUGWO, E. - **Hypocholesterolaemic effect of ethanolic extract of fresh leaves of *Cymbopogon citratus* (lemongrass),** *African Journal of Biotechnology*. Vol. 6, n°.5 (2007), p. 596–598.
- AGYARE, C. *et al.* - **An ethnopharmacological survey and in vitro confirmation of ethnopharmacological use of medicinal plants used for wound healing in Bosomtwi-Atwima-Kwanwoma area, Ghana.** *Journal of ethnopharmacology*. Vol. 125, n°.3 (2009), p. 393–403.
- AHMAD, S. F. *et al.* - **Grape Seed Proanthocyanidin Extract Protects Against Carrageenan-Induced Lung Inflammation in Mice Through Reduction of Pro-inflammatory Markers and Chemokine Expressions.** *Inflammation*. Vol. 37, n°. 2 (2013), p. 500–511.
- AJAIYEGBA, E. *et al.* - **Cultural categorization of febrile illnesses in correlation with herbal remedies used for treatment in Southwestern Nigeria.** *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 85, n°.2-3 (2003), p.179–185.
- AJIBESIN, K. K. *et al.* - **Ethnobotanical survey of Akwa Ibom State of Nigeria.** *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 115, n°.3 (2008), p. 387–408.
- AKINBORO, A.; BAKARE, A. A. - **Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn.** *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 112, n°.3 (2007), p. 470–475.
- AKIN-OSANAIYE, B. C., AGBAJI, A. S.; DAKARE, M. A. - **Antimicrobial Activity of oils and extracts of *Cymbopogon citratus* (Lemon Grass), *Eucalyptus citriodora* and *Eucalyptus camaldulensis*.** *J. Med. Sci.*. Vol. 7, n°.4 (2007), p. 694–697.
- AKTAN, F. - **iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation.** *Life Sciences*. Vol. 75, n°.6 (2004), p. 639–653.
- AMAT, N.; UPUR, H.; BLAZEKOVIĆ, B. - **In vivo hepatoprotective activity of the aqueous extract of *Artemisia absinthium* L. against chemically and immunologically induced liver injuries in mice.** *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 131, n°.2 (2010), p. 478–84.
- AMIĆ, D. *et al.* - **SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids.** *Current Medicinal Chemistry*. Vol. 14, n°.7 (2007), p. 827–845.

ANDERSON, Ø. M.; MARKHAM, K. R. - **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. EUA: CRC Press, 2006. ISBN 0-8493-2021-6.

ANDRE, C. M. *et al.* - **Anti-Inflammatory Procyanidins and Triterpenes in 109 Apple Varieties**. Journal of Agriculture and Food Chemistry. Vol. 60 (2012), p. 10546–10554.

ARBOSA, P. *et al.* - **Nematicidal activity of essential oils and volatiles derived from Portuguese aromatic flora against the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus***. Journal of Nematology. Vol. 42, n.º.1 (2010), p. 8–16.

ARNONE, A. *et al.* - (1997) **Constituents of Dragon ' s Blood .5.1 Dracoflavans B1, B2, C1, C2, D1, and D2, New A-type deoxyproanthocyanidins**. J. Nat. Pod.. Vol. 60, n.º.10 (1997), p. 971–975.

AROLA-ARNAL, A.; BLADÉ, C. - **Proanthocyanidins Modulate MicroRNA Expression in Human HepG2 Cells**. Plos One. Vol. 6, n.º10 (2011), p. 1–7.

ARUL, D.; SUBRAMANIAN, P. - **Naringenin (citrus flavonone) induces growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells**. Pathology oncology research. Vol. 19, n.º.4 (2013), p. 763–770.

ASAOLU, M. F.; OYEYEMI, O. A.; OLANLOKUN, J. O. - **Chemical compositions, phytochemical constituents and in vitro biological activity of various extracts of *Cymbopogon citratus***. Pakistan Journal of Nutrition. Vol. 8, n.º.12 (2009), p. 1920–1922.

ASASE, A.; AKWETEY, G. A.; ACHEL, D. G. - **Ethnopharmacological use of herbal remedies for the treatment of malaria in the Dangme West District of Ghana**. Journal of Ethnopharmacology. Vol. 129, n.º.3 (2010), p. 367–376.

ARTS, I.C.W.; HOLLMAN, P. C. H. - **Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies**. The American journal of clinical nutrition. Vol. 81, n.º.1 (2005), p. 317S–325S.

AU, D. T. *et al.* - **Ethnobotanical study of medicinal plants used by Hakka in Guangdong, China**. Journal of Ethnopharmacology. Vol. 117, n.º.1(2008), p. 41–50.

AWIKA, J. - (2011) **Sorghum Flavonoids: Unusual Compounds with Promising Implications for Health**. In: AWIKA, J.; PIIRONEN, V.; BEAN, S.. Advances in Cereal Science: Implications to Food Processing and Health Promotion. EUA: Oxford Univ Pr, 2012. ISBN 978-0-8412-2636-4, p. 1–47.

AWIKA, J. M.; ROONEY, L. W. - **Sorghum phytochemicals and their potential impact on human health**. Phytochemistry. Vol. 65, n.º.9 (2004), p. 1199–1221.

BACHIEGA, T. F.; SFORCIN, J. M. - **Lemongrass and citral effect on cytokines production by murine macrophages**. Journal of Ethnopharmacology. Vol. 137, n.º.1(2011), p. 909–913.

- BADARINATH, A. V. *et al.* - **A Review on In-vitro Antioxidant Methods: Comparisons , Correlations and Considerations.** International Journal of PharmTech Research. Vol. 2, n°.2 (2010), p. 1276–1285.
- BALDACCHINO, F. *et al.* - **The repellency of lemongrass oil against stable flies, tested using video tracking.** Parasite.Vol. 20, n°.21 (2013), p. 1–7.
- BANKOLE, S. A.; JODA, A. O.; ASHIDI, J. S. - **The use of powder and essential oil of *Cymbopogon citratus* against mould deterioration and aflatoxin contamination of “egusi” melon seeds.** Journal of Basic Microbiology. Vol. 45, n°.1 (2005), p. 20–30.
- BANKOLE, S. A.; JODA, A. O. - **Effect of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) powder and essential oil on mould deterioration and aflatoxin contamination of melon seeds (*Colocynthis citrullus* L.).** African Journal of Biotechnology. Vol. 3, n°.1 (2004), p. 52–59.
- BARATTA, M. T. *et al.* - **Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils.** Flavour and Fragrance Journal. Vol. 13, n°.4 (1998), p. 235–244.
- BARBOSA, L. C. A. *et al.* - **Evaluation of the Chemical Composition of Brazilian Commercial *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf Samples.** Molecules. Vol. 13, n°.8 (2008), p. 1864–1874.
- BARROS, L. *et al.* - **Characterization of phenolic compounds in flowers of wild medicinal plants from Northeastern Portugal.** Food and Chemical Toxicology. Vol. 50, n°.5 (2012), p. 1576–1582.
- BASSOLÉ, I. H. N. *et al.* - **Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination.** Phytomedicine. Vol. 18, n°.12 (2011), p. 1070–1074.
- BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILLO, J. - **Update on Uses and Properties of Citrus Flavonoids: New Findings in Anticancer, Cardiovascular, and Anti-inflammatory Activity.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 56 (2008), p. 6185–6205.
- BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. - **The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay.** Analytical Biochemistry. Vol. 239, n°.1 (1996), p. 70–76.
- BIDINOTTO, L. T. *et al.* - **Protective effects of lemongrass (*Cymbopogon citratus* STAPF) essential oil on DNA damage and carcinogenesis in female Balb/C mice.** Journal of Applied Toxicology. Vol. 31, n°.6 (2011), p. 536–544.
- BIESAGA, M. - **Influence of extraction methods on stability of flavonoids.** Journal of Chromatography A. Vol. 1218, n°.18 (2011), p. 2505–2512.
- BLANCO, M. M. *et al.* - **Neurobehavioral effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in mice.** Phytomedicine. Vol. 16, n°.2-3 (2009), p. 265–270.

BLOIS, M. S. - **Antioxidant determinations by the use of a stable free radical.** Nature. Vol. 181, n°.4617 (1958), p. 1999–1200.

BOHM, B. - **Introduction to Flavonoids.** Amestardão: Harwood Academic Publishers, 1998. ISBN 90-5702-353-9.

BOULOGNE, I. *et al.* - **TRAMIL ethnopharmacological survey in Les Saintes (Guadeloupe, French West Indies): a comparative study.** Journal of Ethnopharmacology. Vol. 133, n°.3 (2011), p. 1039–1050.

BUCIĆ-KOJIĆ, A. *et al.* - **Influence of solvent and temperature on extraction of phenolic compounds from grape seed, antioxidant activity and colour of extract.** International Journal of Food Science & Technology. Vol. 44, n°.12 (2009), p. 2394–2401.

BÚFALO, M. C. *et al.* - **Propolis and its constituent caffeic acid suppress LPS-stimulated pro-inflammatory response by blocking NF- $\kappa$ B and MAPK activation in macrophages.** Journal of Ethnopharmacology. Vol. 149, n°.1 (2013), p. 84–92.

BYUN, E.-B. *et al.* - **The procyanidin trimer CI inhibits LPS-induced MAPK and NF- $\kappa$ B signaling through TLR4 in macrophages.** International Immunopharmacology. Vol. 15, n°.2 (2013), p. 450–456.

CALLEMIEN, D. & COLLIN, S. - **Use of RP-HPLC-ESI (-) -MS / MS to Differentiate Various Proanthocyanidin Isomers in Lager Beer Extracts.** American Society of Brewing Chemists. Vol. 2 (2008), 109–115 .

CAMPOS, J. *et al.* - **Lemon grass (*Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf) polyphenols protect human umbilical vein endothelial cell (HUVECs) from oxidative damage induced by high glucose, hydrogen peroxide and oxidised low-density lipoprotein.** Food Chemistry. Vol. 151 (2014) , p. 175–181.

CANO, J. H.; VOLPATO, G. - **Herbal mixtures in the traditional medicine of eastern Cuba.** Journal of Ethnopharmacology. Vol. 90, n°.2-3 (2004), p. 293–316.

CARMO, E. S.; CAVALCANTE, N. M., LIMA, E. D. O. - **Treatment of pityriasis versicolor with topical application of essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.** Anais Brasileiros de Dermatologia. Vol. 88 (2013), p. 381–385.

CENI, G. C. - (2005). **Oxidases de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis* ST . HILL): Extração, estabilidade térmica e influência da exposição ao microondas.** Brasil: 2005. Tese de Mestrado.

CHEEL, J. *et al.* - **Free radical scavengers and antioxidants from Lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.).** Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 53, n°.7 (2005), p. 2511–2517.

CHEN, C. *et al.* - **Flavonoids Inhibit Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -Induced Up-Regulation of Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) in Respiratory Epithelial Cells through Activator Protein-1 and Nuclear Factor- $\kappa$ B: Structure-Activity Relationships.** Molecular Pharmacology. Vol. 66, n°.3 (2004), p. 683–693.



CHEN, C.-Y. *et al.* - **Luteolin suppresses inflammation-associated gene expression by blocking NF-kappaB and AP-I activation pathway in mouse alveolar macrophages.** *Life Sciences*. Vol. 81, n°.23-24 (2007), p. 1602–1614.

CHEN, D. *et al.* - **Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human leukemia cells.** *Biochemical Pharmacology*. Vol. 69, n°.10 (2005), p. 1421–1432.

CHEN, L. *et al.* - **Oxidative conversion of B- to A-type procyanidin trimer: evidence for quinone methide mechanism.** *Food Chemistry*. Vol. 154 (2014), p. 315–322.

CHEN, P. *et al.* - **Cyanidin 3-glucoside and peonidin 3-glucoside inhibit tumor cell growth and induce apoptosis in vitro and suppress tumor growth in vivo.** *Nutrition and cancer*. Vol. 53, n°.2 (2005), p. 232–243.

CHOI, J. *et al.* - **Biochemical and Molecular Actions of Nutrients Flavones Mitigate Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -Induced Adhesion Molecule Upregulation in Cultured Human Endothelial Cells: Role of Nuclear Factor  $\kappa$ B.** *The Journal of Nutrition*. Vol. 134, n°.5 (2004), p. 1013–1019.

CIMANGA, K. *et al.* - **Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo.** *Journal of ethnopharmacology*. Vol. 79 (2002), p. 213–220.

CLARK, B. L. - **Characterization of a Catechol-Type Siderophore and the Detection of a Possible Outer Membrane Receptor Protein from *Rhizobium leguminosarum*.** EUA: 2004. Tese de Mestrado.

CLIFFORD, M. N.; KNIGHT, S.; KUHNERT, S. - **Discriminating between the Six Isomers of Dicafeoylquinic Acid by LC-MS<sup>n</sup>.** *J. Agric. Food Chem.* Vol. 53 (2005), p. 3821–3832.

COELHO-FERREIRA, M. - **Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil).** *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 126, n°.1 (2009), p. 159–75.

COMALADA, M. *et al.* - **Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure-activity relationship.** *Biochemical Pharmacology*. Vol. 72, n°.8 (2006), p. 1010–1021.

COSTA, A. F. - **Farmacognosia: Farmacognosia Experimental.** 3ª ed.. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2000. ISBN 972-31-0913-1.

COSTA, C. A. R. A. *et al.* - **Cholesterol reduction and lack of genotoxic or toxic effects in mice after repeated 21-day oral intake of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil.** *Food and Chemical Toxicology*. Vol. 49, n°.9 (2011a), p. 2268–2272.

COSTA, C. A. R. D. A., *et al.* - **The GABAergic system contributes to the anxiolytic-like effect of essential oil from *Cymbopogon citratus* (lemongrass).** Journal of Ethnopharmacology. Vol. 137, n°.1(2011b), p. 828–836.

COSTA, G. *et al.* - **Intracellular Signaling Pathways Modulated by Phenolic Compounds: Application for New Anti-Inflammatory Drugs Discovery.** Current Medicinal Chemistry. Vol. 19 (2012), p. 2876–2900.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. - **Natural products: a continuing source of novel drug leads.** Biochimica et Biophysica Acta. Vol. 1830, n°.6 (2013), p. 3670–3695.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; & CLIFFORD, M. N. - **Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health.** Natural Product Reports. Vol. 26, n°.8 (2009), p. 1001–1043.

CUI, X. *et al.* - **Grape Seed Proanthocyanidin Extracts Enhance Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression through 5' -AMP Activated Protein Kinase / Surtoin 1 – Krüppel Like Factor 2 Pathway and Modulate Blood Pressure in Ouabain Induced Hypertensive Rats.** Biol. Pharm. Bull. Vol. 35, n°.12 (2012), p. 2192–2197.

D'ARCHIVIO, M. *et al.* - **Polyphenols, dietary sources and bioavailability.** Annali dell'Istituto Superiore Di Sanità. Vol. 43, n°.4 (2007), p. 348–61.

DA SILVA, M. *et al.* -. **Large procyanidins prevent bile-acid-induced oxidant production and membrane-initiated ERK1/2, p38, and Akt activation in Caco-2 cells.** Free Radical Biology & Medicine. Vol. 52, n°.1 (2012), p. 151–159.

DAI, J.; MUMPER, R. J. -. **Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties.** Molecules. Vol. 15, n°.10 (2010), p. 7313–7352. doi:10.3390/molecules15107313

DE ALBUQUERQUE, U. P. *et al.* - **Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil.** Journal of Ethnopharmacology. Vol. 110, n°.1 (2007), p. 76–91.

DE LA IGLESIA, R. *et al.* - **Healthy properties of proanthocyanidins.** International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Vol. 36, n°.3 (2010), p. 159–168.

DE SMET, P. A. - **Traditional pharmacology and medicine in Africa. Ethnopharmacological themes in sub-Saharan art objects and utensils.** Journal of Ethnopharmacology. Vol. 63, n°.1-2 (1998), p. 1–175.

DEVI, P. S.; SARAVANAKUMAR, M.; MOHANDAS, S. - **Identification of 3-deoxyanthocyanins from red sorghum (*Sorghum bicolor*) bran and its biological properties.** African Journal of Pure Applied Chemistry. Vol. 5, n°.7 (2011), p. 181–193.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. - (2002). **Plantas Mediciniais na Amazônia e na Mata Atlântica.** 2ª Ed. São Paulo: UNESP. 2002. ISBN 85-7139-411-3.

DICKO, M. H. *et al.* - **Phenolic compounds and related enzymes as determinants of sorghum for food use.** *Biotchenology and Molecular Biology Review.* Vol. 1, n°.1(2006), p. 21–38.

DIKE, I. P.; OBEMBE, O. O.; ADEBIYI, F. E. - **Ethnobotanical survey for potential anti-malarial plants in south-western Nigeria.** *Journal of Ethnopharmacology.* Vol. 144, n°.3 (2012), p. 618–626.

DIXON, R.; XIE, D.-Y.; SHARMA, S. B. - **Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research?** *New Phytologist.* Vol. 165 (2005), p. 9–28.

DUDAI, N. *et al.* -. **Citral is a new inducer of caspase-3 in tumor cell lines.** *Planta Medica,* Vol. 71, n°.5 (2005), p. 484–488.

DUTTA, B. K. *et al.* -. **Anticandidial activity of some essential oils of a mega biodiversity hotspot in India.** *Journal Compilation.* (2006), p. 121–124.

EDRIS, A. E. - **Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents : A Review.** *Phytotherapy Research.* (2007). p. 1–16.

ERD, K. *et al.* - **Gallotannin Inhibits the Expression of Chemokines and Inflammatory Cytokines in A549 Cells.** *Molecular Pharmacology.* Vol. 68 (2005), p. 895–904.

ESCRIBANO-BAILO, M. T.; SANTOS-BUELGA, C. - **Polyphenol Extraction from Foods.** In SALTMARSH, M.; SANTOS-BUELGA, C.; WILLIAMSON, G.. *Methods in Polyphenol Analysis.* Reino Unido: Royal Society of Chemistry, 2003. ISBN 08-540-4580-5, p. 1–16.

EWANSIHA, J. U. *et al.* - **Antimicrobial Activity of *Cymbopogon Citratus* (Lemon Grass) and It's Phytochemical Properties.** *Frontiers in Science.* Vol. 2, n°.6 (2012), p. 214–220.

**FARMACOPÉIA EUROPEIA.** 7ª. Ed., 2011. Concílio da Europa.

FAGBEMI, F. J. *et al.* - **Evaluation of the antimicrobial properties of unripe banana (*Musa sapientum* L.), lemon grass (*Cymbopogon citratus* S.) and turmeric (*Curcuma longa* L.) on pathogens.** *African Journal of Biotechnology.* Vol. 8, n°.7 (2009), p. 1176–1182.

FANDOHAN, P. *et al.* - **Effect of essential oils on the growth of *Fusarium verticillioides* and fumonisin contamination in corn.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* Vol. 52, n°.22 (2004), p. 6824–6829.

FANDOHAN, P. *et al.* - **Toxicity and gastric tolerance of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Ocimum basilicum* in Wistar rats.** *Food and Chemical Toxicology.* Vol. 46, n°.7 (2008), p. 2493–2497.

- FARIA, J. M. S. *et al.* - **Bioactivity against *Bursaphelenchus xylophilus*: Nematotoxics from essential oils, essential oils fractions and decoction waters.** *Phytochemistry*. Vol. 94 (2013), p. 220–228.
- FERNANDES, C. *et al.* - **Investigation of the mechanisms underlying the gastroprotective effect of *Cymbopogon citratus* essential oil.** *Journal of Young Pharmacists*. Vol. 4, n°.1 (2012), p. 28–32.
- FIGUEIRINHA, A. *et al.* - **Anti-inflammatory activity of *Cymbopogon citratus* leaf infusion in lipopolysaccharide-stimulated dendritic cells: contribution of the polyphenols.** *Journal of Medicinal Food*. Vol. 13, n°.3 (2010), p. 681–90.
- FIGUEIRINHA, A. *et al.* - ***Cymbopogon citratus* leaves: Characterization of flavonoids by HPLC–PDA–ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols.** *Food Chemistry*. Vol. 110, n°.3 (2008), p. 718–728.
- FRAGA, C. G. - **Plant Phenolics and Human Health: biochemistry, nutrition and pharmacology.** New Jersey: I. John Wiley & Sons, Ed.: John Wiley & Sons, Inc., 2010. ISBN 978-0-470-28721-7.
- FRANCISCO, V. *et al.* - **Anti-inflammatory activity of *Cymbopogon citratus* leaves infusion via proteasome and nuclear factor- $\kappa$ B pathway inhibition: contribution of chlorogenic acid.** *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 148, n°.1 (2013), p. 126–134.
- FRANCISCO, V. *et al.* - ***Cymbopogon citratus* as source of new and safe anti-inflammatory drugs: bio-guided assay using lipopolysaccharide-stimulated macrophages.** *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 133, n°.2 (2011), p. 818–827.
- FRANCISCO, V. & COSTA, G., *et al.* - **Anti-inflammatory Activity of Polyphenols on Dendritic Cells.** In: Watson, R.R.; Preedy, V.R.; Zibadi, S.. *Polyphenols in Human Health and Disease*: Elsevier Inc., 2014. ISBN 978-0-12398-467-8 pp. 373–394.
- FUENTES, J. L. *et al.* - **Usefulness of the SOS Chromotest in the study of medicinal plants as radioprotectors.** *International Journal of Radiation Biology*. Vol. 82, n°.5 (2006), p. 323–329.
- GALATI, G.; O'BRIEN, P. J. - **Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties.** *Free Radical Biology & Medicine*. Vol. 37, n°.3 (2004), p. 287–303.
- GAYATHRI, K. *et al.* - **Cardioprotective effect of lemon grass as evidenced by biochemical and histopathological changes in experimentally induced cardiotoxicity.** *Human & Experimental Toxicology*. Vol. 30, n°.8 (2011), p. 1073–82.
- GAZOLA, R. *et al.* - ***Lippia alba*, *Melissa officinalis* and *Cymbopogon citratus*: effects of the aqueous extracts on the isolated hearts of rats.** *Pharmacological Research*. Vol. 50, n°.5 (2004), p. 477–480.
- GBENOU, J. D. *et al.* - **Phytochemical composition of *Cymbopogon citratus* and *Eucalyptus citriodora* essential oils and their anti-inflammatory and analgesic**

**properties on Wistar rats.** *Molecular Biology Reports*. Vol. 40, n°.2 (2013), p. 1127–1134.

GELLER, D. A; BILLIAR, T. R. - **Molecular biology of nitric oxide synthases.** *Cancer Metastasis Reviews*. Vol. 17, n°.1 (1998), p. 7–23.

GENTILE, C. *et al.* - **Polymeric proanthocyanidins from Sicilian pistachio (*Pistacia vera* L.) nut extract inhibit lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW 264.7 cells.** *European Journal of Nutrition*. Vol. 51, n°.3 (2012), p. 353–363.

GERRITSEN, M. E. *et al.* - **Flavonoids inhibit cytokine-induced endothelial cell adhesion protein gene expression.** *The American Journal of Pathology*. Vol. 147, n°.2 (1995), p. 278–292.

GONÇALVES, C.; DINIS, T.; BATISTA, M. T. - **Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity.** *Phytochemistry*. Vol. 66, n°.1 (2005), p. 89–98.

GONÇALVES, S. *et al.* - **The phenolic content and antioxidant activity of infusions from Mediterranean medicinal plants.** *Industrial Crops and Products*. Vol. 43 (2013), p. 465–471.

GONZÁLEZ-GALLEGO, J. *et al.* - **Fruit polyphenols, immunity and inflammation.** *The British Journal of Nutrition*. Vol. 104 (2010), p. 15–27.

GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; TUÑÓN, M. J. - **Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids.** *Nutrición Hospitalaria*. Vol. 22, n°.3 (2007), p. 287–293.

GOSSÉ *et al.* - **Chemopreventive properties of apple procyanidins on human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of colon carcinogenesis.** *Carcinogenesis*. Vol. 26, n°.7 (2005), p. 1291–1295.

GREEN, L. *et al.* - **Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids.** *Analytical Biochemistry*. Vol. 126 (1982), p. 131–138.

GROSS, J. H. - **Mass Spectrometry.** 1ª Ed. Alemanha: Springer, 2004. ISBN 3-540-40739-1.

GUILLOT, L.; MALNOE, A.; STADLER, R. H. - **Antioxidant Properties of Novel Tetraoxygenated Phenylindan Isomers Formed during Thermal Decomposition of Caffeic Acid.** *J. Agric. Food Chem.* Vol. 44 (1996), p. 2503–2510

GUZIK, T. J.; KORBUT, R. - **Review article nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation.** *Journal of Physiology and Pharmacology*. Vol. 4, n°.4 (2003), p. 469–487.

HAGERMAN, A. E. - **Tannin Chemistry.** Miami: 2002.

HAHN-DEINSTROP, E. - **Applied Thin-Layer Chromatography: Best Practice and avoidance of mistakes.** 2ª Ed. Alemanha: Wiley-VCH, 2007. ISBN 978-3-527-31553-6.

HAJNOS, M. W. - **Thin Layer Chromatography in Phytochemistry**. EUA: CRC Press, 2008. ISBN 978-1-4200-4677-9.

HANDA, S. S. *et al.* - **Extraction technologies for medicinal and aromatic plants**. Trieste: United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology, 2008.

HEIM, K. C. *et al.* - **Anti-inflammatory and neuroactive properties of selected fruit extracts**. *Journal of Medicinal Food*. Vol. 15, n°.9 (2012), p. 851–854.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. - **Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships**. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. Vol. 13, n°.10 (2002), p. 572–584.

HELAL, G. A. *et al.* - **Effect of *Cymbopogon citratus* L. essential oil on growth and morphogenesis of *Saccharomyces cerevisiae* ML2-strain**. *Journal of Basic Microbiology*. Vol. 46, n°.5 (2006), p. 375–386.

HELAL, G. *et al.* - **Effects of *Cymbopogon citratus* L. essential oil on the growth, morphogenesis and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* ML2-strain**. *Journal of Basic Microbiology*. Vol. 47, n°.1 (2007), p. 5–15.

HELDT, H.; HELDT, F. - **Plant Biochemistry**. California: Elsevier, 2005. ISBN 0-12-088391-033.

HIDALGO, M.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; DE PASCUAL, T. - **Flavonoid–flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity**. *Food Chemistry*. Vol. 121, n°.3 (2010), p. 691–696.

HILGERT, N. I. - **Plants used in home medicine in the Zenta River basin, Northwest Argentina**. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 76, n.1 (2001), p. 11–34.

HINDUMATHY, C. K. - **Invitro Study of Antibacterial Activity of *Cymbopogon citratus***. *World Academy of Science, Engineering and Technology*. Vol. 74 (2011), p. 193–197.

HO, S.-C. *et al.* - **Suppressive effect of a proanthocyanidin-rich extract from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) flowers on nitric oxide production in LPS-stimulated macrophage cells**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 55, n°.26 (2007), p. 10664–10670.

HOLLMAN, P. C. H. - **Absorption, Bioavailability, and Metabolism of Flavonoids**. *Pharmaceutical Biology*. Vol. 42 (2004), p. 74–83.

HOLST, B.; WILLIAMSON, G. - **Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants**. *Current Opinion in Biotechnology*. Vol. 19, n°.2 (2008), p. 73–82.

HOSTETLER, G. L.; RIEDL, K. M.; SCHWARTZ, S. J. - **Effects of food formulation and thermal processing on flavones in celery and chamomile**. *Food Chemistry*. Vol. 141, n°.2 (2013), p. 1406–1411.

HU, C. - **Luteolin and luteolin-7-O-glucoside from dandelion flower suppress iNOS and COX-2 in RAW264.7 cells.** *Molecular and Cellular Biochemistry*. Vol. 265, n°.1/2 (2004), p. 107–113.

HUANG, P.-L.; CHI, C.-W.; LIU, T.-Y. - **Effects of *Areca catechu* L. containing procyanidins on cyclooxygenase-2 expression in vitro and in vivo.** *Food and Chemical Toxicology*. Vol. 48, n°.1 (2010), p. 306–313.

HUANG, W.-Y.; CAI, Y.-Z.; ZHANG, Y. - **Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention.** *Nutrition and Cancer*. Vol. 62, n°.1 (2010), p. 1–20.

HURST, S. M. *et al.* - **Blackcurrant proanthocyanidins augment IFN-gamma-induced suppression of IL-4 stimulated CCL26 secretion in alveolar epithelial cells.** *Molecular Nutrition & Food Research*. Vol. 54, n°.2 (2010), p. 159–170.

IMLAY, J. A - **Pathways of oxidative damage.** *Annual Review of Microbiology*. Vol. 57 (2003), p. 395–418.

JAYASINHA, P.; WARNASURIYA, D.; DISSANAYAKE, H. - **Lemongrass (*Cymbopogon citratus*).** In: JAYASINHA, P.; WARNASURIYA, D.; DISSANAYAKE, H.. *Medicinal and Aromatic Plants series*, Sri Lanka: Information Services Centre, Industrial Technology Institute, 1999. ISBN 955-8394-09-2. p. 1–51.

JOHNSON, M. H. *et al.* - **Anthocyanins and proanthocyanidins from blueberry-blackberry fermented beverages inhibit markers of inflammation in macrophages and carbohydrate-utilizing enzymes in vitro.** *Molecular Nutrition & Food Research*. Vol. 57, n°.7 (2013), p. 1182–1197.

JULKUNEN-TITTO, R. - **Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics.** *J. Agric. Food Chem.* Vol. 33 (1985), p. 213–217.

JUNG, M. *et al.* - **Influence of apple polyphenols on inflammatory gene expression.** *Molecular Nutrition & Food Research*. Vol. 53, n°.10 (2009), p. 1263–1280.

KADIR, M. F.; SAYEED, M. S. B.; MIA, M. M. K. - **Ethnopharmacological survey of medicinal plants used by traditional healers in Bangladesh for gastrointestinal disorders.** *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 147, n°.1 (2013), p.148–156.

KADNIKOVA, E. N.; KOSTIĆ, N. M. - **Oxidation of ABTS by hydrogen peroxide catalyzed by horseradish peroxidase encapsulated into sol – gel glass. Effects of glass matrix on reactivity.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. Vol. 18 (2002), p. 39–48.

KAMBOJ, A. - **Analytical Evaluation of Herbal Drugs.** In: VALLISUTA, O.; OLIMAT, S.. *Drug discovery research in pharmacognosy*. Rijeka: InTech, 2012. ISBN 978-953-51-0213-7, p. 23–60.

KARIN, M. - **NF- $\kappa$ B as a Critical Link Between Inflammation and Cancer**. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. Vol. 1 (2009), p. 1–14.

KARIN, M.; LIU, Z. G.; & ZANDI, E. - **AP-1 function and regulation**. Current Opinion in Cell Biology. Vol. 9, n°.2 (1997), p. 240–6.

KARUNAMOORTHY, K.; HUSEN, E. - **Knowledge and self-reported practice of the local inhabitants on traditional insect repellent plants in Western Hararghe zone, Ethiopia**. Journal of Ethnopharmacology. Vol. 141, n°.1 (2012), p. 212–219.

KASALI, A. A.; OYEDEJI, A. O.; ASHILOKUN, A. O. - **Volatile leaf oil constituents of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf**. Flavour and Fragrance Journal. Vol. 16, n°.5 (2001), p. 377–378.

KATZER, G. - **Lemon Grass (*Cymbopogon citratus* [DC] Stapf)**. 2007. Disponível em: [http://gernot-katzers-spice-pages.com/engl/Cymb\\_cit.html](http://gernot-katzers-spice-pages.com/engl/Cymb_cit.html)

KAUSHIK, A. *et al.* - **FRAP (Ferric reducing ability of plasma) assay and effect of *Diplazium esculentum* (Retz) Sw. (a green vegetable of North India) on central nervous system**. Indian Journal of Natural Products and Resources. Vol. 3, n°.6 (2012), p. 228–231.

KAWAI, Y - **Immunochemical Detection of Food-Derived Polyphenols in the Aorta: Macrophages as a Major Target Underlying the Anti-Atherosclerotic Activity of Polyphenols**. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. Vol. 75, n°.4 (2011), p. 609–617.

KAZI, A. *et al.* - **Structure-activity relationships of synthetic analogs of (-)-epigallocatechin-3-gallate as proteasome inhibitors**. Anticancer Research. Vol. 24, n°.2B (2004), p. 943–54.

KHADEM, S.; MARLES, R. J. - **Monocyclic phenolic acids; hydroxy- and polyhydroxybenzoic acids: occurrence and recent bioactivity studies**. Molecules. Vol. 15, n°.11 (2010), p. 7985–8005.

KHANBABAEE, K.; REE, T. V. - **Tannins : Classification and Definition**. Nat. Prod. Rep.. Vol. 18 (2001), p. 641–649.

KIM, H. K. *et al.* - **Effects of Naturally Occurring Flavonoids on Nitric Oxide Production in the Macrophage Cell Line RAW 264 . 7 and Their Structure – Activity Relationships**. Biochemical Pharmacology. Vol. 58, n°.99 (1999), p. 759–765.

KIM, H. P. *et al.* - **Critical Review Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms**. J. Pharmacol. Sci.. Vol.96 (2004), p. 229–245.

KIM, J. S. *et al.* - **Luteolin inhibits LPS-stimulated inducible nitric oxide synthase expression in BV-2 microglial cells**. Planta Medica. Vol. 72, n°.1 (2006), p. 65–68. doi:10.1055/s-2005-873145



- KOBA, K. *et al.* - **In vitro cytotoxic activity of *Cymbopogon citratus* L . and *Cymbopogon nardus* L . essential oils from Togo.** Bangladesh J. Pharmacol.. Vol. 4 (2009), p. 29–34.
- KOELINK, P. J. *et al.* - **Targeting chemokine receptors in chronic inflammatory diseases: An extensive review.** Pharmacology & Therapeutics. Vol. 133, n°.1 (2012), p. 1–18.
- KOGA, N. *et al.* - **Kososan, a standardized traditional Japanese herbal medicine, reverses sleep disturbance in socially isolated mice via GABAA-benzodiazepine receptor complex activation.** Phytomedicine. Vol. 21, n°.5 (2014), p. 697–703.
- KOH, P. H.; MOKHTAR, R. A. M.; IQBAL, M. - **Antioxidant potential of *Cymbopogon citratus* extract: alleviation of carbon tetrachloride-induced hepatic oxidative stress and toxicity.** Human & Experimental Toxicology. Vol. 31, n°.1 (2012), p. 81–91.
- KOTANIDOU, A. *et al.* - **Luteolin Reduces Lipopolysaccharide-induced Lethal Toxicity and Expression of Proinflammatory.** Am. J. Respir. Crit. Care Med. Vol. 165 (2002), p. 818–823.
- KPOVIESSI, S. *et al.* - **Chemical composition, cytotoxicity and in vitro antitrypanosomal and antiplasmodial activity of the essential oils of four *Cymbopogon* species from Benin.** Journal of Ethnopharmacology. Vol. 151, n°.1 (2014), p. 652–659.
- KRÖNCKE, K. D.; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN, V. - **Inducible nitric oxide synthase in human diseases.** Clinical and Experimental Immunology. Vol. 113, n°.2 (1998), p. 147–56.
- KRUEGER, C. G.; VESTLING, M. M.; REED, J. D. - **Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of heteropolyflavan-3-ols and glucosylated heteropolyflavans in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench].** Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 51, n°.3 (2003), p. 538–543.
- KULIK, T. V. *et al.* - **Thermal transformations of biologically active derivatives of cinnamic acid by TPD MS investigation.** Journal of Analytical and Applied Pyrolysis. Vol. 90, n°.2 (2011), p. 219–223.
- KUMAR, P. *et al.* - **Housefly (*Musca domestica* L.) control potential of *Cymbopogon citratus* Stapf. (Poales: Poaceae) essential oil and monoterpenes (citral and 1,8-cineole).** Parasitology Research. Vol. 112, n°.1 (2013), p. 69–76.
- KUMARI, R.; AGRAWAL, S. B. - **Supplemental UV-B induced changes in leaf morphology, physiology and secondary metabolites of an Indian aromatic plant *Cymbopogon citratus* (D.C.) Staph under natural field conditions.** International Journal of Environmental Studies. Vol. 67, n°.5 (2010), p. 655–675.
- KÜRKÇÜGLU, M.; KOSAR, M.; BASER, K. H. C. - **Comparison of Microwave-Assisted Hydrodistillation and Hydrodistillation Methods for *Pimpinella anisum* L.** Journal of Essential Oil Research. Vol. 19, n°.5 (2007), p. 1–8.

- LAGO, J. H. G. *et al.* - **Structure-activity association of flavonoids in lung diseases.** *Molecules*. Vol. 19, n° 3 (2014), p. 3570–3595.
- LALOO, D.; SAHU, A. N. - **Antioxidant activities of three Indian commercially available Nagakesar: An in vitro study.** *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. Vol. 3, n° 1 (2011), p. 277–283.
- LAMAISON J.; CARNAT A. - **Teneur en principaux flavonoids des fleurs et des feuilles de *Crataegus monogyna* Jacq. et de *Crataegus laevigata* (Poiret) DC. (*Rosacea*).** *Pharm. Acta Helv.* Vol. 65, n° 11 (1990), p. 315–320.
- LAMAISON J. L.; PETITJEAN-FREYTET, C.; CARNAT A. - **Lamiacées médicinales à propriétés antioxydantes, sources potentielles d'acide rosmarinique.** *Pharm. Acta Helv.* Vol. 66, n° 7 (1991), p. 185–188.
- LAVELLI, V. *et al.* - **Stability and anti-glycation properties of intermediate moisture apple products fortified with green tea.** *Food Chemistry*. Vol. 127, n° 2 (2011), p. 589–595.
- LEE, T. *et al.* - **Grape seed proanthocyanidin extract attenuates allergic inflammation in murine models of asthma.** *Journal of Clinical Immunology*. Vol. 32, n° 6 (2012), p. 1292–304.
- LI, H.; DEINZER, M. L. - **The mass spectral analysis of isolated hops A-type proanthocyanidins by electrospray ionization tandem mass spectrometry.** *Journal of Mass Spectrometry*. Vol. 43, n° 4 (2008), p. 1353–1363.
- LI, H.; GUO, A.; WANG, H. - **Mechanisms of oxidative browning of wine.** *Food Chemistry*. Vol. 108, n° 1 (2008), p. 1–13.
- LI, W. *et al.* - **Anti-inflammatory effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds.** *Acta Pharmacol Sin.* Vol. 22, n° 12 (2001), p. 1117–1120.
- LIANG, Y. C. *et al.* - **Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages.** *Carcinogenesis*. Vol. 20, n° 10 (1999), p. 1945–52.
- LIU, K. *et al.* - **Eriodictyol inhibits RSK2-ATF1 signaling and suppresses EGF-induced neoplastic cell transformation.** *The Journal of biological chemistry*. Vol. 286, n° 3 (2011), p. 2057–2066.
- LÓPEZ-LÁZARO, M. - **Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin.** *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. Vol. 9, n° 1 (2009), p. 31–59.
- LU, Y.-C.; YEH, W.-C.; OHASHI, P. S. - **LPS/TLR4 signal transduction pathway.** *Cytokine*. Vol. 42, n° 2 (2008), p. 145–151.
- MA, C. *et al.* - **Characterization of active phenolic components in the ethanolic extract of *Ananas comosus* L. leaves using high-performance liquid**

**chromatography with diode array detection and tandem mass spectrometry.** Journal of Chromatography A. Vol. 1165, n°.1-2 (2007), p. 39–44.

MACHADO, M. *et al.* - **Monoterpenic aldehydes as potential anti-*Leishmania* agents: activity of *Cymbopogon citratus* and citral on *L. infantum*, *L. tropica* and *L. major*.** Experimental Parasitology. Vol. 130, n°.3 (2012), p. 223–31.

MACÍA, M. J.; GARCÍA, E.; VIDAURRE, P. J. - **An ethnobotanical survey of medicinal plants commercialized in the markets of La Paz and El Alto, Bolivia.** Journal of Ethnopharmacology. Vol. 97, n°.2 (2005), p. 337–50.

MACKENZIE, G. G. *et al.* - **Epicatechin, catechin, and dimeric procyanidins inhibit PMA-induced NF-kappaB activation at multiple steps in Jurkat T cells.** FASEB Journal. Vol. 18, n°.1 (2004), p. 167–169.

MACKENZIE, G. G. *et al.* - **Dimeric procyanidins are inhibitors of NF-kappaB-DNA binding.** Biochemical Pharmacology. Vol. 78, n°.9 (2009), p. 1252–62.

MADRIGAL-CARBALLO, S. *et al.* - **MALDI-TOF mass spectrometry of oligomeric food polyphenols.** International Food Research Journal. Vol. 20, n°.5 (2013), p. 2023–2034.

MALVIYA, R. *et al.* - **High Performace Liquid Chromatography: a short review.** Journal of Global Pharma Technology. Vol. 2, n°. (5) (2009), p. 22–26.

MANACH, C *et al.* - **Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans . I . Review of 97 bioavailability studies.** The American journal of clinical nutrition. Vol. 81(2005), p. 230–242.

MANACH, C *et al.* - **Polyphenols: food sources and bioavailability.** The American journal of clinical nutrition. Vol. 79, n°.5 (2004), p. 727–747.

MANOSROI, J.; DHUMTANOM, P.; MANOSROI, A. - **Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines.** Cancer Letters. Vol. 235, n°.1 (2006), p. 114–20.

MARQUES, V.; FARAH, A. - **Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions.** Food Chemistry. Vol. 113, n°.4 (2009), p. 1370–1376.

MARTINEZ-MICAELO, N. *et al.* - **Omega-3 docosahexaenoic acid and procyanidins inhibit cyclo-oxygenase activity and attenuate NF-kB activation through a p105/p50 regulatory mechanism in macrophage inflammation.** The Biochemical Journal. Vol. 441, n°.2 (2012), p. 653–63.

MARTINS, M. B. G. *et al.* - **Caracterização anatômica da folha de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (*Poaceae*) e perfil químico do óleo essencial.** Rev. Bras. Plmed., Botucatu. Vol. 6, n°.3 (2004), p. 20–29.

MASAMBA, W. R. L. *et al.* - **Extraction and analysis of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil: An essential oil with potential to control the Larger Grain Borer**

**(Prostephanus truncatus) in stored products in Malawi.** Malawi Journal of Agriculture Sciences. Vol. 2, n°.1 (2003), p. 56–64.

MASQUÉ, N. *et al.* - **Determination of eleven priority EPA phenolics AT ng L<sup>-1</sup> levels by on-line solid-phase extraction and liquid chromatography with uv and electrochemical detection.** Chromatographia. Vol. 47, n°.3-4 (1998), p. 176–182.

MESIA, G. K. *et al.* - **Antiprotozoal and cytotoxic screening of 45 plant extracts from Democratic Republic of Congo.** Journal of Ethnopharmacology. Vol. 115, n°.3 (2008), p. 409–15.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. - **The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer.** Pharmacological Reviews. Vol. 52, n°.4 (2000), p. 673–751.

MISHRA, A. K.; DUBEY, N. K.; HINDU, B. - **Evaluation of Some Essential Oils for Their Toxicity against Fungi Causing Deterioration of Stored Food Commodities.** Applied and Environmental Microbiology. Vol. 60, n°.4 (1994), p. 1101–1105.

MOCO, S. *et al.* - **A Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-Based Metabolome Database for Tomato I.** Plant Physiology. Vol. 141, n°.8 (2006), p. 1205–1218.

MOLYNEUX, P. - **The use of the stable free radical diphenylpicryl- hydrazyl ( DPPH ) for estimating antioxidant activity.** J. Sci. Technol.. Vol. 26, n°.2 (2004), p. 211–219.

MONGKOLSILP, S. *et al.* - **Radical Scavenging Activity and Total Phenolic Content of Medicinal Plants Used in Primary Health Care.** SWU L Pharm Sci. Vol. 9, n°.1 (2004), p. 32–35.

MOON, M. K. *et al.* - **Effect of caffeic acid on tumor necrosis factor-alpha-induced vascular inflammation in human umbilical vein endothelial cells.** Biological & Pharmaceutical Bulletin. Vol. 32, n°.8 (2009), p. 1371–1377.

MOORE, S. J. *et al.* - **Are mosquitoes diverted from repellent-using individuals to non-users? Results of a field study in Bolivia.** Tropical Medicine & International Health: TM & IH. Vol. 12, n°.4 (2007), p. 532–539.

MOREIRA, F. V. *et al.* - **Chemical composition and cardiovascular effects induced by the essential oil of *Cymbopogon citratus* DC. Stapf, Poaceae, in rats.** Revista Brasileira de Farmacognosia. Vol. 20, n°.6 (2010), p. 904–909.

MORI, M.; GOTOH, T. - **Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes.** Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol. 275, n°.3 (2000), p. 715–719.

- MOSMANN, T. - **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** Journal of Immunological Methods. Vol. 65 (1983), p. 55–63.
- MUANDA, F. N.; DICKO, A.; SOULIMANI, R. - **Assessment of polyphenolic compounds, in vitro antioxidant and anti-inflammation properties of *Securidaca longepedunculata* root barks.** Comptes Rendus Biologies. Vol. 333, n°.9 (2010), p. 663–669.
- MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. - **Protective and pathogenic functions of macrophage subsets.** Nature Reviews. Immunology. Vol. 11, n°.11 (2011), p. 723–737.
- NAMBIAR, V. S.; MATELA, H. - **Potential Functions of Lemon Grass (*Cymbopogon citratus*) in Health and Disease.** International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives. Vol. 3, n°.5 (2012), p. 1035–1043.
- NANDAKUMAR, V.; SINGH, T.; KATIYAR, S. K. - **Multi-targeted prevention and therapy of cancer by proanthocyanidins.** Cancer Letters. Vol. 269, n°.2 (2008), p. 378–387.
- NAPOLI, C. *et al.* - **Effects of nitric oxide on cell proliferation: novel insights.** Journal of the American College of Cardiology. Vol. 62, n°.2 (2013), p. 89–95.
- NATARAJAN, K. *et al.* - **Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-KB.** Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 93 (1996), p. 9090–9095.
- NEGRELLE, R.; GOMES, E. - ***Cymbopogon citratus* ( DC .) Stapf: chemical composition and biological activities.** Revista Brasileira de Plantas Medicinai. Vol. 9 (2007), p. 80–92.
- NETO, C. C. - **Cranberry and its phytochemicals: a review of in vitro anticancer studies.** The Journal of Nutrition. Vol. 137, n°.1 (2007), p. 186S–193S.
- NETO, C. C.; AMOROSO, J. W.; LIBERTY, A. M. - **Anticancer activities of cranberry phytochemicals: an update.** Molecular nutrition & food research. Vol. 52, n°.1 (2008), p. S18–S27.
- NGUEFACK, J.; BUDDE, B. B.; JAKOBSEN, M. - **Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmic membrane of *Listeria innocua* examined by flow cytometry.** Letters in Applied Microbiology. Vol. 39, n°.5 (2004), p. 395–400.
- NGUEFACK, J. *et al.* - **Food preservative potential of essential oils and fractions from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against mycotoxigenic fungi.** International Journal of Food Microbiology. Vol. 131, n°.2-3 (2009), p. 151–156.

- NGUEFACK, J. *et al.* - **Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi.** International Journal of Food Microbiology. Vol. 94, n°.3 (2004), p. 329–334.
- NICHOLS, J. A & KATIYAR, S. K. - **Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms.** Archives of Dermatological Research. Vol. 302, n°.2 (2010), p. 71–83.
- NIJVELDT, R. *et al.* - **Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications.** Am J Clin Nutr. Vol. 74 (2001), p. 418–425.
- NOVAIS, M. H. *et al.* - **Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal).** Journal of Ethnopharmacology. Vol. 93, n°.2-3 (2004), p. 183–95.
- OHNO, T. *et al.* - **Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*.** Helicobacter. Vol. 8, n°.3 (2003), p. 207–215.
- OJO, O. O. *et al.* - **Inhibition of paracetamol-induced oxidative stress in rats by extracts of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and green tea (*Camellia sinensis*) in rats.** African Journal of Biotechnology. Vol. 5, n°.12 (2006), p. 1227–1232.
- OJWANG, L. O. *et al.* - **Proanthocyanidin profile of cowpea (*Vigna unguiculata*) reveals catechin-O-glucoside as the dominant compound.** Food Chemistry. Vol. 139, n°.1-4 (2013), p. 35–43.
- OLIVEIRA, V. C. S. *et al.* - **Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes.** Parasitology Research. Vol. 104, n°.5 (2009), p. 1053–1059.
- OLIVERO-VERBEL, J.; NERIO, L. S.; STASHENKO, E. E. - **Bioactivity against *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae) of *Cymbopogon citratus* and *Eucalyptus citriodora* essential oils grown in Colombia.** Pest Management Science. Vol. 66, n°.6 (2010), p. 664–668.
- OLIVERO-VERBEL, J. *et al.* - **Essential oils applied to the food act as repellents toward *Tribolium castaneum*.** Journal of Stored Products Research. Vol. 55 (2013), p. 145–147.
- OMER, H. A. A. *et al.* - **Productive performance of rabbits fed diets containig lemongrass or active dried yeast.** American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.. Vol. 7, n°.2 (2010), p. 179–187.
- OLOYEDE, O. I. - **Chemical profile and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* leaves.** Journal of Natural Products. Vol. 2 (2009), p. 98–103.
- ORREGO, R.; LEIVA, E.; CHEEL, J. - **Inhibitory effect of three C-glycosylflavonoids from *Cymbopogon citratus* (Lemongrass) on human low density lipoprotein oxidation.** Molecules. Vol. 14, n°.10 (2009), p. 3906–3913.

OWUOR, E. D.; KONG, A.-N. T. - **Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways**. *Biochemical Pharmacology*. Vol. 64, n°.5-6 (2002), p. 765–770.

OYEDELE, A. O. *et al.* - **Formulation of an effective mosquito-repellent topical product from lemongrass oil**. *Phytomedicine*. Vol. 9, n°.3 (2002), p.259–262.

PAK, V. M.; GRANDNER, M. A.; PACK, A. I. - **Circulating adhesion molecules in obstructive sleep apnea and cardiovascular disease**. *Sleep Medicine Reviews*. Vol. 18, n°.1 (2014), p. 25–34.

PALLARÈS, V. *et al.* - **Additive, antagonistic, and synergistic effects of procyanidins and polyunsaturated fatty acids over inflammation in RAW 264.7 macrophages activated by lipopolysaccharide**. *Nutrition*. Vol. 28, n°.4 (2012), 447–457.

PALLARÈS, V. *et al.* - **Grape seed procyanidin extract reduces the endotoxic effects induced by lipopolysaccharide in rats**. *Free Radical Biology & Medicine*. Vol. 60 (2013), p. 107–114.

PANYAPHU, K. *et al.* - **Medicinal plants of the Mien (Yao) in Northern Thailand and their potential value in the primary healthcare of postpartum women**. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 135, n°.2 (2011), p. 226–237.

PARANAGAMA, P. A. *et al.* - **Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice**. *Letters in Applied Microbiology*. Vol. 37, n°.1 (2003), p. 86–90.

PARK, J.-S. *et al.* - **Grape-seed proanthocyanidin extract as suppressors of bone destruction in inflammatory autoimmune arthritis**. *PloS One*. Vol. 7, n°.12 (2012), p. 1–10.

PARRA, A. L. *et al.* - **Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts**. *Phytomedicine*. Vol. 8, n°.5 (2001), p. 395–400.

PAWAR, V. C.; THAKER, V. S. - **In vitro efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger***. *Mycoses*. Vol. 49, n°.4 (2006), p. 316–23.

PEDROSO, R. B. *et al.* - **Biological Activities of Essential Oil Obtained from *Cymbopogon citratus* on *Crithidia deanei***. *Acta Protozool.* Vol. 45 (2006), p. 231–240.

PEREIRA, R. S. *et al.* - **Antibacterial activity of essential oils on microorganisms isolated from urinary tract infection**. *Revista de Saúde Pública*. Vol. 38, n°.2 (2004), p. 326–328.

PERES, L. A. B. *et al.* - **Padronização do Teste do MTT em Modelo de Preservação a Frio como Instrumento de Avaliação da Viabilidade Celular Renal**. *J. Bras. Nefrol.* Vol. 30, n°.1 (2008), p. 48–53.

- PEREZ-VIZCAINO, F.; DUARTE, J.; SANTOS-BUELGA, C. - **The flavonoid paradox: conjugation and deconjugation as key steps for the biological activity of flavonoids.** *Journal of the Science of Food and Agriculture.* Vol. 92, n°.9 (2012), p. 1822–1825.
- PFEIFFER, J. *et al.* - **Biosynthesis of flavan 3-ols by leucoanthocyanidin 4-reductases and anthocyanidin reductases in leaves of grape (*Vitis vinifera* L.), apple (*Malus x domestica* Borkh.) and other crops.** *Plant Physiology and Biochemistry.* Vol. 44, n°.5-6 (2006), p. 323–334.
- PHASOMKUSOLSIL, S.; SOONWERA, M. - **Efficacy of herbal essential oils as insecticide against *Aedes aegypti* (Linn.), *Culex quinquefasciatus* (Say) and *Anopheles dirus* (Peyton and Harrison).** *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health.* Vol. 42, n°.5 (2011). p. 1083–1092.
- PIETTA, P. G. - **Flavonoids as antioxidants.** *Journal of Natural Products.* Vol. 63, n°.7 (2000), p. 1035–1042.
- PINELO, M. *et al.* - **Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* Vol. 53, n°.6 (2005), p. 2111–2117.
- PLAZONIĆ, A. *et al.* - **Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in burr parsley (*Caucalis platycarpos* L.), using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry.** *Molecules.* Vol. 14, n°.7 (2009). p. 2466–2490.
- POONAM, K.; SINGH, G. S. - **Ethnobotanical study of medicinal plants used by the Taungya community in Terai Arc Landscape, India.** *Journal of Ethnopharmacology.* Vol. 123, n°.1 (2009), p. 167–176.
- POONPAIBOONPIPAT, T. *et al.* - **Phytotoxic effects of essential oil from *Cymbopogon citratus* and its physiological mechanisms on barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*).** *Industrial Crops and Products.* Vol. 41 (2013), p. 403–407.
- PORT'S, D.P. *et al.* - **The phenolic compounds and the antioxidant potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian region.** *Food Research International.* Vol. 53, n°.2 (2013), p. 875–881.
- POUPARD, P. *et al.* - **Characterization of procyanidin B2 oxidation products in an apple juice model solution and confirmation of their presence in apple juice by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ion trap mass spectrometry.** *Journal of Mass Spectrometry.* Vol. 46, n°.11 (2011), p. 1186–1197.
- PRASAD, S. *et al.* - **Targeting inflammatory pathways by flavonoids for prevention and treatment of cancer.** *Planta Medica.* Vol. 76, n°.11 (2010), p. 1044–1063.
- PRIOR, R. L.; GU, L. - **Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet.** *Phytochemistry.* Vol. 66, n°.18 (2005), p. 2264–2280.



PUATANACHOKCHAI, R. *et al.* - **Inhibitory effects of lemon grass (*Cymbopogon citratus*, Stapf) extract on the early phase of hepatocarcinogenesis after initiation with diethylnitrosamine in male Fischer 344 rats.** *Cancer Letters*. Vol. 183, n.º.1 (2002), p. 9–15.

PUSHPANATHAN, T.; JEBANESAN, A.; GOVINDARAJAN, M. - **Larvicidal, ovicidal and repellent activities of *Cymbopogon citratus* Stapf (*Graminae*) essential oil against the filarial mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say) (*Diptera: Culicidae*).** *Tropical Biomedicine*. Vol. 23, n.º.2 (2006), p. 208–212.

QUINTANA-LOPEZ, L. *et al.* - **Nitric oxide is a mediator of antiproliferative effects induced by proinflammatory cytokines on pancreatic beta cells.** *Mediators of Inflammation*. Vol. 2013 (2013), p. 1–10.

RAHMAN, I.; BISWAS, S. K.; KIRKHAM, P. A. - **Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols.** *Biochemical Pharmacology*. Vol. 72, n.º.11 (2006), p. 1439–52.

RAO, B. S. S. *et al.* - **Preventive efficacy of hydroalcoholic extract of *Cymbopogon citratus* against radiation-induced DNA damage on V79 cells and free radical scavenging ability against radicals generated in vitro.** *Human & Experimental Toxicology*. Vol. 28, n.º.4 (2009), p. 195–202.

RASMUSSEN, S. E. *et al.* - **Dietary proanthocyanidins: occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease.** *Molecular Nutrition & Food Research*. Vol. 49, n.º.2 (2005), p. 159–174.

RAUBER, C.; GUTERRES, S.; SCHAPOVAL, E. - **LC determination of citral in *Cymbopogon citratus* volatile oil.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Vol. 37, n.º.3 (2005), p. 597–601.

RE, R. *et al.* - **Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.** *Free Radical Biology & Medicine*. Vol. 26, n.º.9/10 (1999), p. 1231–1237.

REED, J. D.; KRUEGER, C. G.; VESTLING, M. M. - **MALDI-TOF mass spectrometry of oligomeric food polyphenols.** *Phytochemistry*. Vol. 66, n.º.18 (2005), p. 2248–2263.

REHECHO, S. *et al.* - **Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Nor-Yauyos, a part of the Landscape Reserve Nor-Yauyos-Cochas, Peru.** *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 133, n.º.1 (2011), p. 75–85.

REN, W. *et al.* - **Flavonoids: Promising Anticancer Agents.** *Medicinal Research Reviews*. Vol. 23, n.º.4 (2003), p. 519–534.

RITTER, R. A. *et al.* - **Ethnoveterinary knowledge and practices at Colares Island, Pará state, eastern Amazon, Brazil.** *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 144, n.º.2 (2012), p. 346–352.

- ROSS, J. A; KASUM, C. M. - **Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety.** Annual Review of Nutrition. Vol. 22, (2002), p.19–34.
- RUNNIE, I. *et al.* - **Vasorelaxation induced by common edible tropical plant extracts in isolated rat aorta and mesenteric vascular bed.** Journal of Ethnopharmacology. Vol. 92, n°.2-3 (2004), p. 311–316.
- SABIR, S. M. *et al.* - **Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic extract of leaves of *Solidago microglossa* containing polyphenolic compounds.** Food Chemistry. Vol. 131, n°.3 (2012), p. 741–747.
- SADDIQ, A. A.; KHAYYAT, S. A. - **Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: Citral.** Pesticide Biochemistry and Physiology. Vol. 98, n°.1 (2010), p. 89–93.
- SANTANGELO, C. *et al.* - **Polyphenols , intracellular signalling and inflammation.** Ann Ist Super Sanita. Vol. 43, n°.4 (2007), p. 394–405.
- SANTIN, M. R. *et al.* - **In vitro activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major component (citral) on *Leishmania amazonensis*.** Parasitology Research. Vol. 105, n°.6 (2009), p. 1489–1496.
- SANTOS-BUELGA, C.; SCALBERT, A. - **Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature , occurrence , dietary intake and effects on nutrition and health.** Journal of the Science of Food and Agriculture. Vol. 80 (2000), p. 1094–1117.
- SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. - **Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols.** The Journal of Nutrition (2000), p. 2073–2085.
- SCAPAGNINI, G. *et al.* - **Modulation of Nrf2/ARE pathway by food polyphenols: a nutritional neuroprotective strategy for cognitive and neurodegenerative disorders.** Molecular Neurobiology. Vol. 44, n°.2 (2011), p. 192–201.
- SCARPA, G. F. - **Medicinal plants used by the Criollos of Northwestern Argentine Chaco.** Journal of Ethnopharmacology. Vol. 91, n°.1 (2004), p. 115–135.
- SERRANO, J. *et al.* - **Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects.** Molecular Nutrition & Food Research. Vol. 53, n°.2 (2009), p. S310–329.
- SFORCIN, J. M. *et al.* - **Lemongrass effects on IL-1beta and IL-6 production by macrophages.** Natural Product Research. Vol. 23, n°.12 (2009), p. 1151–1159.
- SHAH, G. *et al.* - **Pharmacognostic Standardization of *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf leaves.** Pharmacognosy Journal. Vol. 4, n°.29 (2012), p. 19–25.
- SHAH, G. *et al.* - **Anti-anxiety Activity of *Cymbopogon citratus* (dc.) stapf Leaves Extracts on the Elevated Plus-Maze Model of Anxiety in Mice.** Pharmacognosy Journal. Vol. 2, n°.15 (2010), p. 45–50.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. - **Phenolics in food and nutraceuticals**. EUA: CRC Press LLC, 2004. ISBN 1-58716-138-9.

SHARMA, S. D.; KATIYAR, S. K. - **Dietary grape seed proanthocyanidins inhibit UVB-induced cyclooxygenase-2 expression and other inflammatory mediators in UVB-exposed skin and skin tumors of SKH-I hairless mice**. *Pharmaceutical Research*. Vol. 27, n.º.6 (2010), p. 1092–1102.

SHIMOI, K. *et al.* - **Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O-beta-glucoside in rats and humans**. *FEBS Letters*. Vol. 438, n.º.3 (1998), p. 220–224.

SHIMOI, K. *et al.* - **Metabolic fate of luteolin and its functional activity at focal site**. *Biofactors*. Vol. 12 (2000), p. 181–186.

SHRESTHA, P. M.; DHILLON, S. S. - **Medicinal plant diversity and use in the highlands of Dolakha district, Nepal**. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 86, n.º.1 (2003), p. 81–96.

SILVA, M. R. *et al.* - **Comparative anticonvulsant activities of the essential oils (EOs) from *Cymbopogon winterianus* Jowitt and *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf in mice**. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. Vol. 381, n.º.5 (2010), p. 415–426.

SILVA, S., *et al.* - **Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of *Olea europaea* L. Fruits and Leaves**. *Food Science and Technology International*. Vol. 12, n.º.5 (2006), p. 385–395.

SOARES, M. O. *et al.* - **Angolan *Cymbopogon citratus* used for therapeutic benefits: nutritional composition and influence of solvents in phytochemicals content and antioxidant activity of leaf extracts**. *Food and Chemical Toxicology*. Vol. 60 (2013), p. 413–418.

SOUSA, S. M.; SILVA, P. S.; VICCINI, L. F. - **Cytogenotoxicity of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemon grass) aqueous extracts in vegetal test systems**. *Anuais Da Academia Brasileira de Ciências*. Vol. 82, n.º.2 (2010), p. 305–311.

SRIHARI, A.; BEEREGOWDA, Y. C.; VISHNU, V. R.T. - **A comparative study of griess nitrate test and urinary culture in detection of asymptomatic bacteriuria in children**. *Int. J. Biol. Med. Res.* Vol. 3, n.º.1 (2012), p. 1439–1441.

SRITABUTRA, D. *et al.* - **Evaluation of herbal essential oil as repellents against *Aedes aegypti* (L.) and *Anopheles dirus* Peyton & Harrion**. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. Vol. 1, n.º.1 (2011), p. S124–S128.

STADLER, R. H. *et al.* - **Thermal Decomposition of Caffeic Acid in Model Systems: Identification of Novel Tetraoxygenated Phenylindan Isomers and Their Stability in Aqueous Solution**. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 44 (1996), p. 898–905.

STEFANAZZI, N.; STADLER, T.; FERRERO, A. - **Composition and toxic, repellent and feeding deterrent activity of essential oils against the stored-grain pests *Tribolium***

*castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). Pest Management Science. Vol. 67, n.º.6 (2011), p. 639–646.

STENDER, K. - **MarinelifePhotography.com.** (n.d.). Disponível em: <http://www.marinelifephotography.com/default.htm>

STEVENSON, D. E.; HURST, R. D. - **Polyphenolic phytochemicals--just antioxidants or much more?**. Cellular and Molecular Life Sciences. Vol. 64, n.º.22 (2007), p. 2900–2916.

SUCUPIRA, N. R. *et al.* - **Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos Methods for Measuring Antioxidant Activity of Fruits.** UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde. Vol. 14, n.º.4 (2012), p. 263–269.

SUN, J. *et al.* - **Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay.** Sensors. Vol. 3 (2003), p. 276–284.

SUNG, N.-Y. *et al.* - **Procyanidin dimer B2-mediated IRAK-M induction negatively regulates TLR4 signaling in macrophages.** Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol. 438, n.º.1 (2013), p. 122–128.

TABUTI, J. R.; LYE, K.; DHILLION, S. - **Traditional herbal drugs of Bulamogi, Uganda: plants, use and administration.** Journal of Ethnopharmacology. Vol. 88, n.º.1 (2003), p. 19–44.

TABUTI, J. R. S. - **Herbal medicines used in the treatment of malaria in Budiope county, Uganda.** Journal of Ethnopharmacology. Vol. 116, n.º.1 (2008), p. 33–42.

TANG, E. - **tourismthailand blog** (2008). Disponível em: <http://www.eugenegoesthailand.com/?p=614>

TAPIA, A. *et al.* - **Free radical scavengers from *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf plants cultivated in bioreactors by the temporary immersion (TIS) principle.** Zeitschrift Für Naturforschung. C, Journal of Biosciences. Vol. 62, n.º.5-6 (2007), p. 447–457.

TAPIERO, H. *et al.* - **Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies?**. Biomedicine & Pharmacotherapy. Vol. 56, n.º.4 (2002), p. 200–207.

TARASCOU, I. *et al.* - **Characterisation of genuine and derived cranberry proanthocyanidins by LC–ESI–MS.** Food Chemistry. Vol. 128, n.º.3 (2011), p. 802–810.

TAVARES, F. *et al.* - **Antioxidant activity of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: influence of the extraction method.** In: CEF Meeting 2011, n.º.2, Coimbra.

TAYEBOON, G. S. *et al.* - **Effects of *Cymbopogon citratus* and *Ferula assa-foetida* extracts on glutamate-induced neurotoxicity.** In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal. Vol. 49, n.º.9 (2013), p. 706–715.

TEKLEHAYMANOT, T. *et al.* - **Knowledge and use of medicinal plants by people around Debre Libanos monastery in Ethiopia.** Journal of Ethnopharmacology. Vol. 111, n.º.2 (2007), p. 271–83.

- TENE, V. *et al.* - **An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipe, Ecuador.** Journal of Ethnopharmacology. Vol. 111, n°.1 (2007), p. 63–81.
- TERRA, X. *et al.* - **Modulatory effect of grape-seed procyanidins on local and systemic inflammation in diet-induced obesity rats.** The Journal of Nutritional Biochemistry. Vol. 22, n°.4 (2011a), p. 380–387.
- TERRA, X. *et al.* - **Procyanidin dimer BI and trimer CI impair inflammatory response signalling in human monocytes.** Free Radical Research. Vol. 45, n°.5 (2011b), p. 611–619.
- TERRA, X. *et al.* - **Grape-seed procyanidins act as antiinflammatory agents in endotoxin-stimulated RAW 264.7 macrophages by inhibiting NFkB signaling pathway.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 55, n°.11 (2007), p. 4357–4365.
- TICKTIN, T.; DALLE, S. P. - **Medicinal plant use in the practice of midwifery in rural Honduras.** Journal of Ethnopharmacology. Vol. 96, n°.1-2 (2005), p. 233–248.
- TIWARI, M.; DWIVEDI, U. N.; KAKKAR, P. - **Suppression of oxidative stress and pro-inflammatory mediators by *Cymbopogon citratus* D. Stapf extract in lipopolysaccharide stimulated murine alveolar macrophages.** Food and Chemical Toxicology. Vol. 48, n°.10 (2010), p. 2913–2919.
- TSIMOGIANNIS, D. *et al.* - **Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS.** Molecules. Vol. 12, n°.3 (2007), p. 593–606.
- TYAGI, A. K.; MALIK, A. - **Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against *Candida albicans*: microscopic observations and chemical characterization of *Cymbopogon citratus*.** BMC Complementary and Alternative Medicine. Vol. 10, n°.1 (2010), p. 10–65.
- ULIANA, C. V.; RICCARDI, C. S.; YAMANAKA, H. - **Estudo do comportamento eletroquímico da enzima peroxidase na presença de peróxido de hidrogênio e ácido 5- aminossalicílico.** Eclética Química. Vol. 33, n°.1 (2008), p. 2–7.
- VALLES, S. L. *et al.* - **Estradiol or genistein prevent Alzheimer's disease-associated inflammation correlating with an increase PPAR gamma expression in cultured astrocytes.** Brain Research. Vol. 1312 (2010), p. 138–144.
- VAUZOUR, D. *et al.* - **Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action.** Nutrients. Vol. 2, n°.11 (2010), p. 1106–1131.
- VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. - **Phenolic compound biochemistry** Holanda: Springer, 2006. ISBN 1-4020-5163-8.
- VIGNERON, M. *et al.* - **Antimalarial remedies in French Guiana: a knowledge attitudes and practices study.** Journal of Ethnopharmacology. Vol. 98, n°.3 (2005), p. 351–360.

- VIUDA-MARTOS, M. *et al.* - **Chemical composition and antioxidant and anti-*Listeria* activities of essential oils obtained from some Egyptian plants.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 58, n°.16 (2010), p. 9063–9070.
- VOGT, T.; JONES, P. - **Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family.** Trends in Plant Science. Vol. 5, n°.9 (2000), p. 380–386.
- WAGAW, S. *et al.* - HPLC Guide Departments R450, R452, R45R (2011).
- WAGNER, H.; BLADT, S. - **Plant Drug Analysis - A Thin Layer Chromatography Atlas.** 2ª Ed. Nova Iorque: Springer, 2001. ISBN 3-540-58676-8.
- WANG, Y.-J. *et al.* - **Consumption of grape seed extract prevents amyloid-beta deposition and attenuates inflammation in brain of an *Alzheimer's* disease mouse.** Neurotoxicity Research. Vol. 15, n°.1 (2009), p. 3–14.
- WANG, C.; LEE, W.; PENG, C. - **Contents of phenolics and alkaloids in *Areca catechu* Linn. during maturation.** J. Agric. Food Chem.. Vol. 45 (1997), p. 1185–1188.
- WANNISSORN, B. *et al.* - **Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants.** Fitoterapia. Vol. 76, n°.2 (2005), p. 233–236.
- WATANABE, C. *et al.* - **Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) ameliorates murine spontaneous ileitis by decreasing lymphocyte recruitment to the inflamed intestine.** Microcirculation. Vol. 17, n°.5 (2010), p. 321–32.
- WATERHOUSE, A. L. - **Determination of total phenolics: Current protocols in food.** Analytical Chemistry (2002), p. 11.1.1–11.1.8.
- WRIGHT, S. C.; MAREE, J. E.; SIBANYONI, M. - **Treatment of oral thrush in HIV/AIDS patients with lemon juice and lemon grass (*Cymbopogon citratus*) and gentian violet.** Phytomedicine. Vol.16, n°.2-3 (2009), p. 118–124.
- XAGORARI, A.; ROUSSOS, C.; PAPAPETROPOULOS, A. - **Inhibition of LPS-stimulated pathways in macrophages by the flavonoid luteolin.** British Journal of Pharmacology. Vol. 136 (2002), p. 1058–1064.
- XIE, D.-Y.; DIXON, R. A. - **Proanthocyanidin biosynthesis--still more questions than answers?.** Phytochemistry. Vol. 66, n°.18 (2005), p. 2127–2144.
- YANG, C. S. *et al.* - **Bioavailability issues in studying the health effects of plant polyphenolic compounds.** Molecular Nutrition & Food Research. Vol. 52, n°.1(2008), p. S139–S151.
- YANG, L.; BROWNING, J. D.; AWIKA, J. M. - **Sorghum 3-deoxyanthocyanins possess strong phase II enzyme inducer activity and cancer cell growth inhibition properties.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 57, n°.5 (2009), p. 1797–1804.

- YANO, S. *et al.* - **Dietary flavones suppresses IgE and Th2 cytokines in OVA-immunized BALB/c mice.** *European Journal of Nutrition.* Vol. 46, n°.5 (2007), p. 257–263.
- YAO, H. *et al.* - **Dietary flavonoids as cancer prevention agents.** *Journal of Environmental Science and Health. Part C, Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews.* Vol. 29, n°.1 (2011), p. 1–31.
- YAO, L. H. *et al.* - **Flavonoids in Food and Their Health Benefits.** *Plant Foods for Human Nutrition.* Vol. 59, n°.3 (2004), p. 113–122.
- YOON, J.-H.; BAEK, S. J. - **Molecular Targets of Dietary Polyphenols with Anti-inflammatory Properties.** *Yonsei Medical Journal.* Vol. 46, n°.5 (2005), p. 585–596.
- YOU DIM, K. A. *et al.* - **Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults.** *The Journal of Nutritional Biochemistry.* Vol. 13, n°.5 (2002), p. 282–288.
- ZAMORA, R.; VODOVOTZ, Y.; BILLIAR, T. R. - **Inducible Nitric Oxide Synthase and Inflammatory Diseases.** *Molecular Medicine.* Vol. 6, n°.5 (2000), p. 347–373.
- ZHU, Q. Y. *et al.* - **Stability of Green Tea Catechins.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* Vol. 45, n°.12 (1997), p. 4624–4628.
- ZIELINSKI, A. A. F. *et al.* - **A comparative study of the phenolic compounds and the in vitro antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques.** *Food Research International* (2013), p. 1–9.
- ŽUGIĆ, A. *et al.* - **Antioxidant activity and phenolic compounds in 10 selected herbs from Vrujci Spa, Serbia.** *Industrial Crops and Products,* Vol. 52 (2014), p. 519–527.