



Micaela Isabel da Silva Jordão

ANÁLISE DE FITOQUÍMICOS EM *GERANIUM ROBERTIANUM* L.

Dissertação de mestrado em Química Farmacêutica Industrial, orientada pela Doutora Susana Maria de Almeida Cardoso (Universidade de Aveiro) e pelo Prof. Doutor Jorge António Ribeiro Salvador (Universidade de Coimbra) e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Análise de fitoquímicos em *Geranium robertianum* L.

Micaela Isabel da Silva Jordão

Dissertação de mestrado em Química Farmacêutica Industrial, orientada pela Doutora Susana Maria de Almeida Cardoso (Universidade de Aveiro) e pelo Prof. Doutor Jorge António Ribeiro Salvador (Universidade de Coimbra) e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

2016

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

(Charles Chaplin)

Agradecimentos

O espaço limitado desta secção de agradecimentos, seguramente, não me permite agradecer como devia, a todas as pessoas que, ao longo do Mestrado me ajudaram, direta ou indiretamente, a cumprir os meus objetivos e a realizar mais esta etapa da minha formação académica. Desta forma deixo apenas algumas palavras, poucas, mas com um sentimento de reconhecido agradecimento.

Ao Coordenador do Mestrado de Química Farmacêutica Industrial, *Professor Doutor Jorge António Ribeiro Salvador*, agradeço a oportunidade que tive em frequentar este Mestrado que muito contribuiu para o enriquecimento da minha formação académica e científica.

À *Doutora Susana Maria de Almeida Cardoso*, expresse o meu profundo agradecimento pela orientação e apoio que elevaram os meus conhecimentos científicos e, sem dúvida me estimularam o desejo de querer fazer melhor. Agradeço também a oportunidade que me deu de integrar no seu Grupo de Investigação e reconheço, com gratidão, não só a confiança que em mim depositou, desde o início, mas também, o sentido de responsabilidade que me incutiu ao longo do Projeto.

À *Unidade de Investigação de Química Orgânica, Produtos Naturais e Agroalimentares*, do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, por me ter proporcionado as condições necessárias para a elaboração da minha Tese e por permitir a minha integração numa unidade de investigação de qualidade.

Ao *Professor Doutor Artur Manuel Soares Silva*, o meu sincero agradecimento por todo o apoio neste projeto. Muito obrigada pelo profissionalismo e pela total disponibilidade que sempre revelou para comigo.

À *Doutora Mónica Valega*, técnica da unidade de investigação, pela disponibilidade e colaboração na realização das técnicas cromatográficas, bem como pelo seu incentivo e boa disposição durante este trabalho de investigação.

Aos meus *Colegas do Laboratório, Ana Sofia, Sónia, Rita, Marcelo, Pedro, Rodrigo e colegas da UA*, um Muito Obrigada pela vossa amizade, companheirismo e ajuda, fatores importantes na realização desta Tese e que me permitiram que cada dia fosse encarado com particular motivação. Também uma referência especial à *Ana Sofia*, pela enorme amizade que criámos. Agradeço-lhe a partilha de bons momentos, a ajuda e os estímulos nas alturas de desânimo.

À minha amiga e colega, *Daniela Loureiro*, pela enorme amizade que criámos desde o primeiro ano de mestrado, até aos dias de hoje. Pelas maratonas de estudo, horas infindáveis de desabafos e pela valiosa amizade, quero-te agradecer especialmente.

Aos meus amigos, *José, Andreia e Noémi* pela partilha de bons momentos, durante os míticos jantares ao fim de semana.

Às minha amigas de secundário, *Karen, Daniela e Andreia*, pela partilha de bons (e menos bons) momentos.

Ao *Tiago*, um agradecimento especial pelo amor, apoio e carinho diários, pelas palavras doces e pela transmissão de confiança e de força, em todos os momentos. Por tudo a minha enorme gratidão.

À minha família, em especial aos meus *Pais*, um enorme obrigada por todos os esforços que fizeram neste ano que passou, para que esta etapa da minha vida se pudesse concluir. Um enorme obrigada por acreditarem em mim e naquilo que faço e por todos os ensinamentos de vida. À minha *Avó*, aos meus *Tios* e ao meu *Primo*, por todo o apoio nas horas de saudade, ao chegar a casa e não ter os meus pais. Espero que esta etapa, que agora termino, possa, de alguma forma, retribuir e compensar todo o carinho, apoio e dedicação que, constantemente, me oferecem. A eles, dedico todo este trabalho.

Resumo

Introdução: As plantas medicinais têm vindo a ser reconhecidas e utilizadas ao longo da história da humanidade pelos seus efeitos terapêuticos e curativos. Estas plantas conseguem sintetizar uma grande variedade de fitoquímicos biologicamente ativos, dos quais se podem destacar os compostos fenólicos. O interesse no estudo destes metabolitos tem aumentado exponencialmente nestes últimos anos, uma vez que se pensa que estejam intimamente associados a diversas propriedades benéficas para a saúde, entre as quais a capacidade antioxidante e anti-inflamatória.

Geranium robertianum é uma espécie de planta que tem sido muito utilizada na medicina tradicional devido as suas propriedades benéficas. Esta planta é vulgarmente utilizada na forma de infusões ou pastas, atuando como agente anti-inflamatório, antioxidante, anti-hepatotóxico, diurético e antidiabético. Com base nestes alegados benefícios, existem atualmente no mercado diversos suplementos alimentares à base de extratos de *G. robertianum* L.

Neste trabalho pretendeu-se caracterizar os extratos etanólicos de *G. robertianum*, tendo-se para tal recorrido ao seu fracionamento sequencial com diferentes solventes orgânicos. Este fracionamento tem como objetivo a obtenção de frações enriquecidas em diversos compostos, por forma a isolar e caracterizar compostos através da espectroscopia de ressonância magnética nuclear. Por outro lado, o conhecimento dos extratos etanólicos permite também conhecer melhor a composição fitoquímica da planta, percebendo se existe potencial para que esta possa vir a ser explorada com fins terapêuticos ou como formulações para nutracêuticos.

Métodos: A composição fitoquímica dos extratos etanólicos foi conseguida pela análise destas e/ou de frações obtidas por solubilização sequencial a quente com *n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona e metanol (frações EtOH1_Hex e EtOH2_Hex, EtOH1_Dic e EtOH2_Dic, respetivamente). A caracterização dos componentes voláteis e fenólicos dos extratos e frações foi efetuada com recurso à análise de GC-MS e/ou UHPLC-DAD-ESI/MSⁿ, tendo-se ainda procedido ao isolamento por HPLC de dois compostos e efetuado análise de ¹H RMN, com a finalidade de elucidar a sua estrutura. Adicionalmente, as atividades antioxidante e anti-inflamatória dos extratos etanólicos e respetivas frações foram avaliadas pelo método de Folin-Ciocalteu e de captação de NO[•], respetivamente.

Resultados: Os extratos etanólicos de *G. robertianum* analisados em GC-MS, mostraram na sua composição, álcoois, monossacarídeos, ácidos carboxílicos e ácidos

gordos, sendo os ácidos gordos palmítico e linoleico os elementos predominantes nas análises efetuadas. Por sua vez, a análise dos extratos etanólicos e respectivas frações efetuada por UHPLC-DAD-ESI/MSⁿ permitiu concluir que os compostos fenólicos predominantes correspondem à hidroxidifenilenogaloil-hexosídeo (corilagina), brevifolina, ácido elágico e ao composto desconhecido [M-H]⁻ = m/z 319. O ácido galoil-quinico, ácido dicafeoil-quinico e a flavona luteolina também foram identificados, embora com menor intensidade. Adicionalmente, a análise de ¹H RMN dos compostos, hidroxidifenilenogaloil-hexosídeo e o composto com [M-H]⁻ = m/z 319 permitiu identificar alguns dos seus sinais característicos, muito embora não tenha permitido elucidar toda a estrutura destes compostos. No que diz respeito ao composto [M-H]⁻ = m/z 319, foi possível observar a presença de sinais na zona dos aromáticos assim como na zona alifática do espetro.

Relativamente à atividade antioxidante dos extratos etanólicos e frações, EtOH2 mostrou melhor resultado (190 µg±3 GAE/mg extrato), seguindo-se das frações de acetato de etilo e acetona (EtOH2_Acett, EtOH1_Acett e EtOH2_Acett, com 148±6 µg GAE/mg extrato, 178±1 µg GAE/mg extrato e 170±0,7 µg GAE/mg extrato, respetivamente). Relativamente à capacidade de captação de NO[•], a amostra que mostrou um menor IC₅₀ foi EtOH2_Acett com 0,09±0,02 mg/mL, seguindo-se as amostras de EtOH1 e EtOH2 com um IC₅₀ de 0,14±0,01 mg/mL e 0,14±0,03 mg/mL, respetivamente.

Conclusões: Este estudo contribuiu para o conhecimento fitoquímico dos extratos etanólicos de *G. robertianum*. Relativamente às atividades biológicas, os extratos etanólicos mostraram resultados promissores para atividades antioxidantes, além disso também revelaram ser eficazes na captação de NO[•].

A vasta gama de compostos identificados em cada extrato analisado, assim como as proeminentes atividades biológicas, são claramente um contributo para a valorização de *G. robertianum*.

Palavras-chave: Plantas medicinais, *Geranium robertianum*, compostos bioativos, caracterização fitoquímica, UHPLC-DAD-ESI/MSⁿ, GC-MS

Abstract

Introduction: Medicinal plants are recognized and widely used through history for their therapeutic and healing benefits. Those plants have the capability of synthesizing a great variety of biologically active phytochemicals, among them the phenolic compounds. The study of these metabolites has increased exponentially in recent years, since they are claimed to be intimately associated with several beneficial properties to health, highlighting the antioxidant and anti-inflammatory capability.

Geranium robertianum is a plant widely used in traditional medicine due to its beneficial properties. This plant is commonly used as infusion or paste, acting as anti-inflammatory agent, antioxidant, anti-hepatotoxic, diuretic and antidiabetic. Based on these alleged benefits, there are currently several dietary supplements on the market based on *G. robertianum* L extracts .

This study aimed to characterize the ethanolic extracts of *G. robertianum*. For that, sequential fractionation of ethanolic extracts were performed with different organic solvents. This approach intended to allow the obtaining of fractions enriched in distinct compounds, enabling the isolation and their further structural characterization by nuclear magnetic resonance spectroscopy.

On the other hand, the knowledge of the ethanolic extracts of a plant leads to the understanding of its phytochemical composition, thus facilitating the understanding of their potential exploitation for usage in therapeutics or nutraceuticals formulations.

Methods: The phytochemical composition of ethanol extracts was achieved by their analysis and/or of their respective fractions obtained by hot solubilization with *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate and methanol (fractions EtOH1_Hex and EtOH2_Hex, EtOH1_Dic and EtOH2_Dic, EtOH1 respectively). The characterization of volatile and phenolic components of the extracts and fractions was performed using the GC-MS and/or UHPLC-DAD-ESI/MSⁿ analysis. In addition, two phenolic compound were isolated by HPLC and their ¹H RMN analysis was performed in order to achieve structural details. Moreover, the antioxidant and anti-inflammatory potential of ethanolic extracts and fractions were evaluated respectively by the Folin-Ciocalteu and NO[•] scavenging assays.

Results: *G. robertianum* ethanol extracts analyzed by GC-MS presented in its composition alcohols, monosaccharides, carboxylic and fatty acids, being the fatty acids palmitic and linoleic the prevalent elements on the analysis performed. On the hand, the the UHPLC-DAD-ESI/MSⁿ analysis of ethanolic extracts and their fractions allowed to conclude that the main phenolic compounds correspond to galloyl-HHDP-hexoside (corilagin)

brevifolin, ellagic acid and an unknown compound $[MH]^-$ at m/z 319. Galloyl-quinic acid, dicaffeoyl-quinic acid and flavone luteolin were also identified, though they showed less intensity. In addition, the 1H NMR analysis of galloyl-HHDP-hexoside and $[M-H]^- = m/z$ 319 allowed to identify some of their typical 1H signals, although the complete structural elucidation of these compounds was not possible to achieve. Relatively to compound $[M-H]^-$ at m/z 319 it was possible observed the presence of signals in aromatic and aliphatic region.

Regarding the antioxidant activity of ethanol extracts and fractions, EtOH2 ($190 \pm 3 \mu\text{g}$ GAE/mg extract) showed the best results, followed the ethyl acetate and acetone fractions (EtOH2_Acett, EtOH1_Acetn and EtOH2_Acetn at $148 \pm 6 \mu\text{g}$ GAE/mg extract, $178 \pm 1 \mu\text{g}$ GAE/mg extract and $170 \pm 0.7 \mu\text{g}$ GAE/mg extract, respectively). For the NO^\bullet scavenging assay, the sample EtOH2_Acett showed the lowest IC_{50} ($0.09 \pm 0.02 \text{ mg/mL}$), followed by EtOH1 and EtOH2 samples, with IC_{50} respectively $0.14 \pm 0.01 \text{ mg/mL}$ and $0.14 \pm 0.03 \text{ mg/mL}$.

Conclusions: This study contributed to the phytochemical knowledge of the ethanol extracts of *G. robertianum*. Concerning the biological activity, the ethanol extracts showed promising results for antioxidant activity and proved to be effective in NO^\bullet scavenging. Hence, overall, the wide range of compounds identified with each extract, as well as the prominent biological activities, are clearly a contribution to the valorization of *G. robertianum*.

Keywords: Medicinal plants, *Geranium robertianum*, bioactive compounds, phytochemical characterization, HPLC-DAD-ESI/MSⁿ, GC-MS

Sumário

Resumo	I
Abstract	III
Lista de Figuras	VII
Lista de tabelas	IX
Lista de abreviaturas	X
1. Introdução	I
1.1 Plantas Medicinais	I
1.2 Compostos Fenólicos	I
1.2.1 A Química dos Compostos Fenólicos.....	4
1.2.2 Flavonóides	4
1.2.3 Isoflavonóides, Neoflavonóides, Calconóides e Auronóides	7
1.2.4 Não-Flavonóides.....	7
1.2.5 Biodisponibilidade de Compostos Fenólicos	8
1.2.6 Condições de Stress Oxidativo e Inflamatório	10
1.2.7 Envolvimento dos Compostos Fenólicos no Stress Oxidativo e Inflamatório	12
1.3 Análise de Compostos Fenólicos	14
1.3.1 Teor de Compostos Fenólicos Totais.....	14
1.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)	15
1.3.2 Cromatografia Gasosa (GC).....	16
1.3.3 Cromatografia em Camada Fina (TLC)	17
1.3.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	18
1.4 <i>Geranium robertianum</i> L.	18
1.3.1 Caracterização Química	19
2. Objetivos	21
3. Procedimentos Experimentais	22
3.1 Reagentes	22
3.2 Material Vegetal	22
3.3 Extração	22
3.4 Análise fitoquímica através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS)	25
3.5 Análise fitoquímica através de cromatografia líquida de ultra eficiência com um detetor de díodos, acoplada à espectrometria de massa com ionização por electrospray (UHPLC-DAD-ESI-MSⁿ)	25

3.6 Purificação de Compostos Fenólicos	26
3.7 Análise estrutural por espectroscopia de RMN (Ressonância Magnética Nuclear).....	27
3.7.1 RMN ¹ H.....	27
3.8 Atividades Biológicas	27
3.8.1 Ensaio de Folin-Ciocalteu.....	27
3.8.2 Determinação da capacidade de captação de NO [•]	28
3.10 Análise Estatística.....	29
4. Resultados e Discussão.....	30
4.1 Rendimentos de extração.....	30
4.2 Análise dos extratos etanólicos e frações apolares de <i>G. robertianum</i> por GC-MS	31
4.3 Análise dos extratos etanólicos e frações polares de <i>G. robertianum</i> por LC-MS.....	39
4.4 Purificação de compostos fenólicos da fração acetato de etilo de <i>G. robertianum</i> (EtOH₂_Acett).....	54
4.5 Análise estrutural da hidroxidifenilenogaloil-hexose e do composto [M-H]⁻ = m/z 319, por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹H.....	56
4.6 Ensaios Biológicos	57
4.6.1. Análise da atividade antioxidante	57
4.6.2. Análise da atividade anti-inflamatória	59
5. Conclusões e Perspetivas Futuras.....	61
6. Referências Bibliográficas	63

Lista de Figuras

Figura 1 - Classificação geral dos compostos fenólicos.	4
Figura 2 - Estrutura química base dos flavonóides.	5
Figura 3 - Representação das principais classes de flavonóides.	5
Figura 4 - Representação das diferentes estruturas químicas das subclasses de flavonóides. .	6
Figura 5 – Representação das diferentes estruturas químicas das subclasses dos não-flavonóides.	8
Figura 6 - Resumo dos passos envolvidos na biodisponibilidade de substâncias fenólicas em seres humanos. Adaptado de (Souza, Casanova e Costa, (2015)).	10
Figura 7 - Vias inflamatórias que induzem o stress oxidativo. Os níveis de citocinas aumentam, indiretamente causando a formação de ROS através de várias vias de sinalização intracelular e deficiência do recetor de insulina. Infiltração de leucócitos provoca a formação enzimática de ROS. Ambas as vias geram ROS e danos oxidativos. Adaptado de (Vincent e Taylor, 2006).	11
Figura 8 - <i>Geranium robertianum</i> (esquerda) e abordagem da distribuição geográfica de <i>G. robertianum</i> no mundo (direita).	18
Figura 9 - Estruturas químicas de alguns dos compostos isolados do <i>G. robertianum</i>	20
Figura 10 - Ilustração do procedimento de extração e fracionamento.	24
Figura 11 - Perfil de GC-MS dos extratos etanólicos EtOH1 (A) e EtOH2 (B).	32
Figura 12 – Perfil de GC-MS das frações de hexano, EtOH1_Hex (A) e EtOH2_Hex (B). ...	35
Figura 13 – Perfil de GC-MS das frações de diclorometano, EtOH1_Dic (A) e EtOH2_Dic (B).	37
Figura 14 – Perfil cromatográfico a 280 nm do extrato EtOH1 (A) e das frações EtOH1_Acett (B), EtOH1_Acetn (C) e EtOH1_MEOH (D).	40
Figura 15 – Perfil cromatográfico a 280 nm do extrato EtOH2 (A) e das frações EtOH2_Acett (B), EtOH2_Acetn (C) e EtOH2_MEOH (D).	41
Figura 16 - Padrão de fragmentação do ácido cafeoilquínico ($[M-H]^- = m/z 353 \rightarrow 191$ e $[M-H]^- = m/z 353 \rightarrow 173$), para o isómero ácido <i>trans</i> 3-O-cafeoilquínico e para o isómero ácido 4-O-cafeoilquínico, respetivamente. Nota: a figura não tem em consideração as orientações dos grupos funcionais das moléculas identificadas.	48
Figura 17 - TIC obtido por UHPLC-DAD-ESI-MS ⁿ do kaempferol hexose-deoxihexose ($[M-H]^- = m/z 593$).	48
Figura 18 - TIC obtido por UHPLC-DAD-ESI-MS ⁿ da digaloiil-hexose ($[M-H]^- = m/z 483$).	49

Figura 19- Padrão de fragmentação $[M-H]^- = m/z 635 \rightarrow 465$.	50
Figura 20 - Padrões de fragmentação dos derivados de hidroxidifenilenogaloil-hexose. (A) – $[M-H]^- = m/z 633$, (B)- $[M-H]^- = m/z 907$, (C)- $[M-H]^- = m/z 979$, (D)- $[M-H]^- = m/z 997$ e (E)- $[M-H]^- = m/z 1025$.	51
Figura 21 - TIC obtido por UHPLC-DAD-ESI-MS ⁿ dos compostos derivados da corilagina, $[M-H]^- = m/z 997$ (A) e $[M-H]^- = m/z 1025$ (B).	52
Figura 22 – Espectros de UV da brevifolina (A) e do composto $[M-H]^- = m/z 319$ (B).	53
Figura 23 - Perfil cromatográfico (280nm) obtido através de HPLC, da fração EtOH ₂ _Acett.	55
Figura 24 - Perfil cromatográfico obtido por UHPLC-DAD-ESI-MS ⁿ , do composto $[M-H]^- = m/z 633$.	55
Figura 25 - Perfil cromatográfico obtido por UHPLC-DAD-ESI-MS ⁿ , do composto $[M-H]^- = m/z 319$.	55
Figura 26 - Estrutura química da hidroxidifenilenogaloil-hexose (corilagina).	56
Figura 27- Espectro de RMN de ¹ H do composto $[M-H]^- = m/z 319$.	57
Figura 28 - Capacidade antioxidante dos extratos etanólicos e respectivas frações. Resultados expressos em μg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por mg extrato. Os dados apresentam média \pm desvio padrão.	58
Figura 29- Representação dos valores de IC ₅₀ , determinado para as várias amostras. O ácido ascórbico foi o padrão usado. Os dados apresentam média \pm desvio padrão.	59

Lista de tabelas

Tabela 1 - Conteúdo em compostos fenólicos de alguns alimentos e o seu consumo estimado por dia.*.....	2
Tabela 2 - Rendimentos dos extratos etanólicos (EtOH1 e EtOH2) e das respectivas frações obtidas por extração com n-hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona, e metanol. .	30
Tabela 3 – Compostos identificados nos extratos EtOH1 e EtOH2, através da análise de GC-MS.....	33
Tabela 4- Compostos identificados nas frações EtOH1_Hex e EtOH2_Hex, através da análise de GC-MS.....	36
Tabela 5 – Compostos identificados nas frações EtOH1_Dic e EtOH2_Dic, através da análise de GC-MS.....	38
Tabela 6 - Identificação dos compostos através de UHPLC-DAD-ESI-MS ⁿ	43

Lista de abreviaturas

APCI	Ionização química à pressão atmosférica
BAR	Bombardeamento atômico rápido
BSTFA	N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
DAD	Detetor de díodos
DMSO	Dimetilsulfóxido
ESI	Ionização por <i>electrospray</i>
EtOHI	Extrato etanólico da 1ª extração
EtOHI_Acetn	Fração de acetona da 1ª extração
EtOHI_Acett	Fração de acetato de etilo da 1ª extração
EtOHI_Dic	Fração de diclorometano da 1ª extração
EtOHI_Hex	Fração de hexano da 1ª extração
EtOHI_MeOH	Fração de metanol da 1ª extração
EtOH2	Extrato etanólico da 2ª extração
EtOH2_Acetn	Fração de acetona da 2ª extração
EtOH2_Acett	Fração de acetato de etilo da 2ª extração
EtOH2_Dic	Fração de diclorometano da 2ª extração
EtOH2_Hex	Fração de hexano da 2ª extração
EtOH2_MeOH	Fração de metanol da 2ª extração
FID	Deteção por ionização de chama
FLD	Detetores de UV-fluorescência
GAE	Equivalentes de ácido gálico
GC	Cromatografia gasosa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
HAT	Transferência do átomo de hidrogénio

HNO ₂	Ácido nítrico
HO [•]	Radical hidroxilo
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HRGC-HT	Cromatografia gasosa de alta resolução
IE	Troca iónica
IkB	Inibidor de kB
iNOS	Sintetase do óxido nítrico induzível
LOX	Lipoxigenase
MS	Espectrometria de massa
N ₂ O ₃	Óxido nitroso
NF-kB	Fator nuclear kB
NO [•]	Radical óxido nítrico
NO ₂ ⁻	ião nitrito
NO ₃ ⁻	ião nitrato
NP	Fase normal
O ₂ ^{-•}	Radical superóxido
PDA	Detetor de varrimento de fotodíodos
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RO [•]	Radical alcoxilo
ROO [•]	Radical peroxilo
RP	Fase reversa
SE	Exclusão por tamanho
SET	Transferência de um electrão
TLC	Cromatografia em camada fina
TMSi	Trimetilclorosilano
TSP	Termopulverização
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência
UV-VIS	Ultravioleta visível

Introdução

I. Introdução

I.1 Plantas Medicinais

As plantas medicinais têm sido utilizadas durante séculos na medicina tradicional para fins terapêuticos, sendo igualmente um recurso para a produção de medicamentos modernos, suplementos alimentares e nutracêuticos, bem como intermediários químicos para fármacos sintéticos (Hammer, Carson e Riley, 1999).

De facto, as plantas medicinais são uma fonte de compostos fitoquímicos com atividades biológicas muito diversas, na sua maioria metabolitos secundários. Estima-se que cerca de 66% das moléculas introduzidas no mundo entre 1981-2010, como fármacos, tenham sido obtidas a partir de produtos naturais. Além disso, mais de 23 novos medicamentos derivados de fontes naturais foram aprovados e colocados no mercado depois de 2000, para o tratamento de doenças como o cancro e doenças neurológicas, infecciosas, cardiovasculares, metabólicas, imunológicas e inflamatórias (Cragg e Newman, 2013).

I.2 Compostos Fenólicos

Entre os inúmeros fitoquímicos existentes, os compostos fenólicos, também designados comumente de polifenóis, representam a maior percentagem em todo o reino vegetal, tendo sido identificados mais de 8000 até ao momento (Rio, Del *et al.*, 2013). Estes compostos são sintetizados na via do ácido xiquímico, a partir de carboidratos ou alternativamente, pela via do acetato-polimalato (acetil-CoA e malonil-CoA). Estas vias metabólicas utilizam precursores provenientes do metabolismo primário, ou seja, de um conjunto de reações ligadas aos processos vitais, como a respiração, fotossíntese e formação de novos tecidos nas plantas. Os precursores mais importantes para a biossíntese dos metabolitos secundários são o ácido xiquímico e a acetil coenzima A. Nas plantas, cerca de 40% dos compostos fenólicos provêm da via do acetato-malonato e 60% provêm da via do ácido xiquímico, estando esta ausente nos animais (Dewick, 2009).

Inevitavelmente, uma vez que os compostos fenólicos estão presentes numa grande variedade de legumes, frutas e sementes, ou seja, alimentos de origem vegetal, estes encontram-se presentes diariamente na dieta humana. Estima-se que na dieta humana sejam

ingeridos diariamente 1 g/dia de compostos fenólicos, sendo um terço correspondente a ácidos fenólicos e dois terços a flavonóides (Scalbert e Williamson, 2000). A Tabela I apresenta a concentração de compostos fenólicos de alguns alimentos presentes na dieta humana.

Tabela I - Conteúdo em compostos fenólicos de alguns alimentos e o seu consumo estimado por dia.*

	Fonte	[Polifenóis] mg/kg ou mg/mL	Consumo Estimado Por Dose (mg/dia)	
Flavonóides:	Cebola (100 g)	350–1200	35–120	
	Repolho (200 g)	300–600	60–120	
	Alho Francês (200 g)	30–225	6–45	
	Tomate cereja (200 g)	15–200	3–40	
	Brócolos (200 g)	40–100	8–20	
	Mirtilo (100 g)	30–160	3–16	
	Groselha (100 g)	30–70	3–7	
	Quercetina	Alperce (200 g)	25–50	5–10
	Kaempferol	Maçã (200 g)	20–40	4–8
		Feijão verde ou branco (200 g)	10–50	2–10
		Uva preta (200 g)	15–40	3–8
		Tomate (200 g)	2–15	0.4–3.0
		Infusão de chá preto (200 mL)	30–45	6–9
		Infusão de chá verde (200 mL)	20–35	4–7
		Vinho tinto (100 mL)	2–30	0.2–3
Flavonas:	Salsa (5 g)	240–1850	1.2–9.2	
	Apigenina	Aipo (200 g)	20–140	4–28
	Luteolina	Pimenta Capsicum (100 g)	5–10	0.5–1
Flavanonas:	Sumo de laranja (200 mL)	215–685	40–140	
	Hesperetina	Sumo de toranja (200 mL)	100–650	20–130
	Naringenina	Sumo de limão (200 mL)	50–300	10–60
Isoflavonas:	Farinha de soja (75 g)	800–1800	60–135	
	Soja cozida (200 g)	200–900	40–180	
	Daidzeína	Miso (100 g)	250–900	25–90
	Genisteína	Tofu (100 g)	80–700	8–70
	Gliciteína	Tempeh (100 g)	430–530	43–53
		Leite de soja (200 mL)	30–175	6–35

	Beringela (200 g)	7500	1500
	Amora Preta (100 g)	1000–4000	100–400
Antocianinas:	Groselha preta (100 g)	1300–4000	130–400
Cianidina	Mirtilo (100 g)	250–5000	25–500
Delfinidina	Uva preta (200 g)	300–7500	60–1500
Malvidina	Tomate (200 g)	350–4500	70–900
Peonidina	Ruibarbo (100 g)	2000	200
	Morango (200 g)	150–750	30–150
	Vinho Tinto (100 mL)	200–350	20–35
	Ameixa (200 g)	20–250	4–50
	Repolho vermelho (200 g)	250	50

	Amora (100 g)	80–270	8–27
	Framboesa (100 g)	60–100	6–10
	Groselha (100 g)	40–130	4–13
Ácidos fenólicos:	Morango (200 g)	20–90	4–18
Ácido	Mirtilo (100 g)	2000–2200	200–220
protocatecuico	Kiwi (100 g)	600–1000	60–100
Ácido gálico	Tomate (200 g)	180–1150	36–230
Ácido p-	Ameixa (200 g)	140–1150	28–230
hidroxibenzóico	Beringela (200 g)	600–660	120–132
Ácido cafeico	Maça (200 g)	50–600	10–120
Ácido clorogénico	Pêra (200 g)	15–600	3–120
Ácido cumárico	Chicória (200 g)	200–500	40–100
Ácido ferúlico	Alcachofra (100 g)	450	45
Ácido sinápico	Batata (200 g)	100–190	20–38
	Farinha de milho (75 g)	310	23
	Farinha de trigo, arroz, aveia (75 g)	70–90	5–7
	Cidra (200 mL)	10–500	2–100
	Café (200 mL)	350–1750	70–350

*(Adaptado de Manach *et al.*, (2004)).

Nos últimos anos, tem havido um acréscimo exponencial do número de produtos disponíveis no mercado, enriquecidos com extratos de origem vegetal ou com fitoquímicos. Estes podem encontrar-se na forma de comprimidos, cápsulas, xaropes entre outros, com o intuito de beneficiar algumas funções fisiológicas. Note-se que estes produtos não podem ser classificados como alimentos ou como fármacos, e por essa razão são normalmente designados pelo termo de “nutracêutico”, embora exista ainda uma certa indefinição em torno desta designação. A *Health Canada*, define nutracêutico como um “Produto purificado ou isolado a partir de alimentos, que é geralmente vendido sob formas farmacêuticas, não associadas a alimentos. Um nutracêutico demonstra ter benefícios fisiológicos ou oferecer protecção contra doenças crónicas. Disponível em: <http://www.agr.gc.ca/eng/industry->

1.2.1 A Química dos Compostos Fenólicos

Compostos fenólicos são metabolitos secundários amplamente distribuídos pelo reino vegetal. Estes são normalmente divididos em duas classes, tendo em conta a sua estrutura molecular, i.e. não flavonóides (ex. ácidos fenólicos) e flavonóides (ex. flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis, isoflavonas e flavanonóis), como é possível observar na Figura 1 (Manach *et al.*, 2004). No tópico seguinte serão discutidas as várias subclasses de flavonóides.

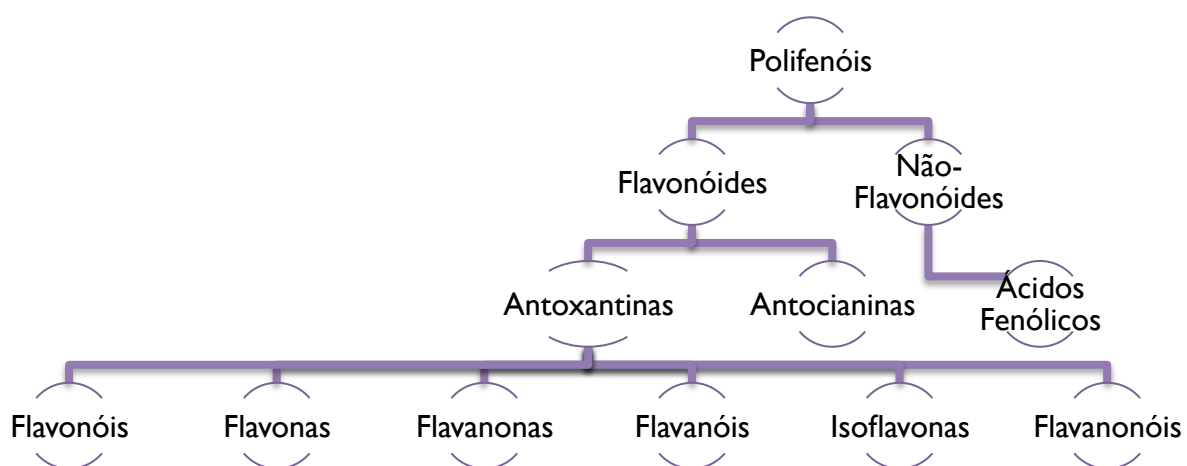


Figura 1 - Classificação geral dos compostos fenólicos.

1.2.2 Flavonóides

Flavonóides são o maior grupo de compostos fenólicos presentes nas plantas. Estes compostos são metabolitos secundários importantes, sintetizados pela via fenilpropanóide (Ferreyra, Rius e Casati, 2012) e estão envolvidos em papéis vitais na fisiologia das plantas, como a regulação das funções celulares e reprodução. Além disso, podem atuar como atratores ou repelentes e agentes citotóxicos (Dixon e Pasinetti, 2010). Quimicamente são compostos tricíclicos, contendo dois anéis aromáticos (A e B) e um anel de pirano (C) (Figura 2). Substituições nos anéis A e B podem dar origem a compostos diferentes dentro de cada classe de flavonóides (Pietta, 2000). Essas substituições podem incluir a oxigenação, a alquilação, glicosilação, acilação e sulfatação (Hollman e Katan, 1999).

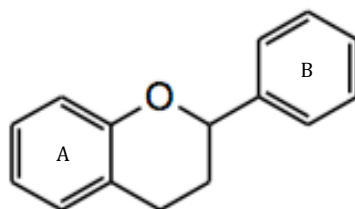


Figura 2 - Estrutura química base dos flavonóides.

A posição do grupo substituinte divide o grupo dos flavonóides em diferentes classes, nomeadamente flavonóides, isoflavonas e neoflavonóides (Figura 3). Além disso, os flavonóides ocorrem frequentemente como compostos de cadeia aberta calconóides ou auronóides (Iwashina, 2000).

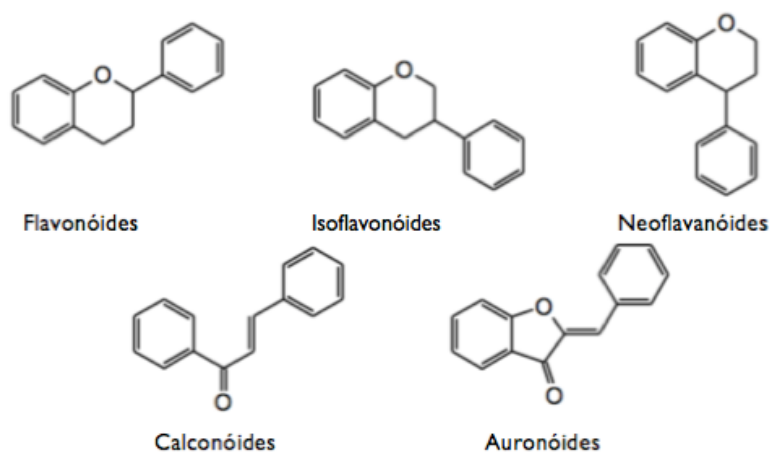


Figura 3 - Representação das principais classes de flavonóides.

De acordo com o grau de oxidação e padrão de substituição do anel, ou seja, a presença ou ausência do grupo de cetona e/ou o grupo 3-hidroxilo no anel C, podem ser designadas seis subclasses diferentes de flavonóides: flavonas, flavonóis, flavanóis (ou catequinas), flavanonas, flavanonóis e as antocianinas, como se pode observar na Figura 4 (Marais *et al.*, 2006).

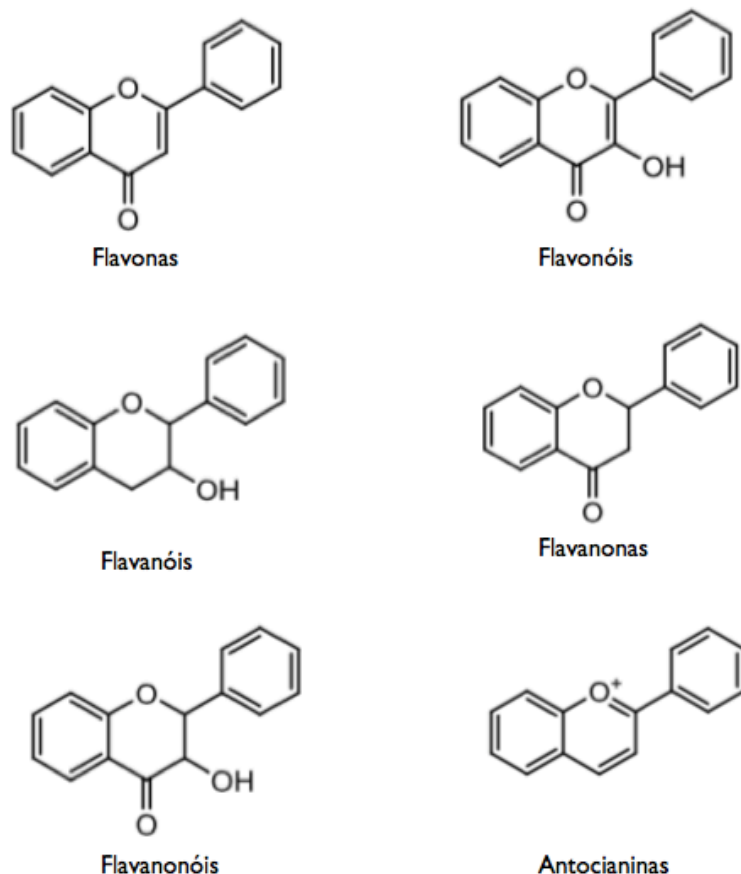


Figura 4 - Representação das diferentes estruturas químicas das subclasses de flavonóides.

Os compostos de cada subclasse, são por vezes resultantes de substituições de grupos hidroxilo e/ou grupos metoxilo nos anéis A e B (Kumar e Pandey, 2013). Naturalmente, os flavonóides podem ocorrer na forma de agliconas livres, ou modificadas por glicosilação ou alquilação (Tanwar e Modgil, 2012).

As flavonas e os flavonóis diferem entre si, na ausência/presença de um grupo hidroxilo na posição 3 do anel pirona, sendo estas as categorias mais abundantes na natureza (Comalada *et al.*, 2006). Os flavonóis mais encontrados são a quercetina, a luteolina e a apigenina, enquanto as flavonas estão maioritariamente distribuídas nas suas formas glicosiladas (Gharras, 2009).

As flavanonas têm a particularidade de apresentarem uma saturação na ligação C2-C3, isto é, estes compostos não apresentam dupla ligação entre os dois átomos de carbono no anel de pirona. As flavanonas mais comumente encontradas na natureza são a hesperetina, a naringenina e o erioditol, sendo frequentes em cítricos (Tomás-Barberán e Clifford, 2000).

Por outro lado, os flavanóis apresentam um esqueleto semelhante ao dos flavanonóis, sendo que nos flavanóis há ausência de uma cetona no carbono 4 do anel pirano (Comalada

et al., 2006). Estes compostos podem existir na forma de monómero (catequinas) e de polímero (proantocianidinas) e estão entre os flavonóides mais frequentes na dieta Humana. As catequinas podem ser encontradas em muitas frutas, mas é, sem dúvida, no chá verde, onde são predominantes. As proantocianidinas, também conhecidas como taninos condensados, são catequinas complexas ligadas entre C4-C8 (ou C6), que formam dímeros, oligómeros e polímeros e que são responsáveis pela adstringência de frutos e bebidas (incluindo uvas, bagas, vinho, chá, etc.) (Gu et al., 2004; Hooper et al., 2008).

A subclasse restante, as antocianinas, podem ser distinguidas pela sua carga positiva (ião) presente no anel pirano, ião que é responsável pela pigmentação vermelha, azul ou roxa nos tecidos de frutas e flores. Visto que a forma livre de aglicona é altamente instável, estas aparecem na natureza sempre na forma glicosilada (Veberic et al., 2015).

1.2.3 Isoflavonóides, Neoflavonóides, Calconóides e Auronóides

Os isoflavonóides, neoflavonóides, calconóides e auronóides são compostos menos comuns que os flavonóides anteriormente abordados. Os isoflavonóides ganharam um crescente interesse, uma vez que sendo fitoestrogénios, acredita-se que estes tenham vários efeitos biológicos em seres humanos através dos recetores de estrogénio. Por esta razão estes compostos são frequentemente encontrados em suplementos dietéticos, principalmente relacionados com a menopausa (North American Menopause Society, 2011).

Os neoflavonóides, calconóides e auronóides são classes de compostos que não se encontram frequentemente na natureza, embora tenham sido previamente documentados devido aos seus benefícios para a saúde (Garazd, Garazd e Khilya, 2003).

1.2.4 Não-Flavonóides

Os principais não-flavonóides (Figura 5) são os ácidos fenólicos C6-C1, como por exemplo o ácido gálico, que é o precursor biossintético de taninos hidrolizáveis, os ácidos hidroxicinâmicos C6-C3 e seus derivados conjugados e os estilbenos C6-C2-C6. Os ácidos hidroxicinâmicos mais comuns são o ácido p-cumárico, o ácido cafeico, o ácido ferúlico e o ácido sinápico. Estes compostos encontram-se na natureza normalmente conjugados ou na forma de ésteres, conjugados por exemplo, com o ácido tartárico ou ácido quínico, sendo usualmente designados como ácidos clorogénicos. Nos últimos anos o interesse nestes compostos tem aumentado dado que foi demonstrado a sua capacidade de inibir a oxidação

da lipoproteína de baixa densidade (LDL), entre outras propriedades biológicas (McCune *et al.*, 2010). Curiosamente, os hábitos do consumo de café têm um sério impacto na ingestão de ácidos hidroxicinâmicos. A ingestão de três cafés/dia pode corresponder à ingestão de 800 mg de ácidos hidroxicinâmicos. Por outro lado, indivíduos que não bebam café e consumam pouca quantidade de fruta, é provável que ingiram menos do que 25 mg/dia destes compostos (Freitas, 2012).

Por fim, os estilbenos possuem uma estrutura C6-C2-C6, e são uma classe de compostos fenólicos que se encontra pouco difundida nas plantas. No entanto, estudos intensivos foram realizados com resveratrol, e verificou-se que este apresenta um elevado potencial antioxidante, anti-inflamatório, anti-cancerígeno e mais recentemente tem sido demonstrado possuir capacidade de ativar serotoninas, justificando assim o seu uso em diversos nutracêuticos (Gertz *et al.*, 2012; Silk e Smoliga, 2014).

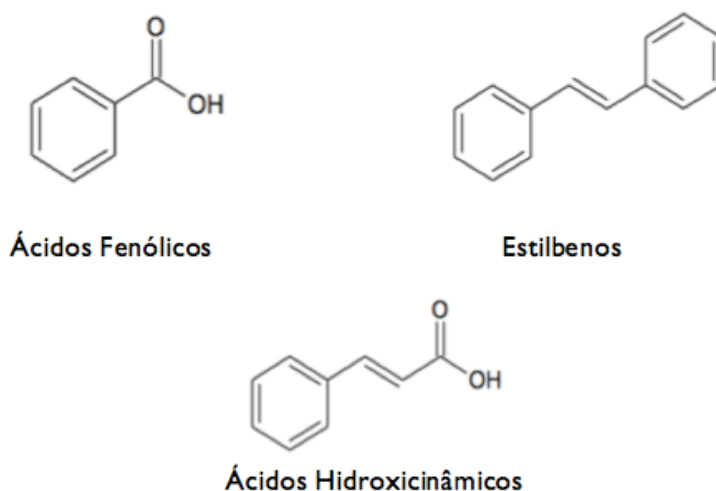


Figura 5 – Representação das diferentes estruturas químicas das subclasses dos não-flavonóides.

1.2.5 Biodisponibilidade de Compostos Fenólicos

A biodisponibilidade dos compostos fenólicos e a acumulação dos mesmos nos tecidos é um tema bastante complexo e que tem suscitado muitos debates dentro da comunidade científica, estando longe de ser um assunto totalmente compreendido. É importante realçar que a biodisponibilidade difere muito de um composto fenólico para o outro, e os compostos fenólicos mais abundantes na dieta Humana não são necessariamente os que conduzem a maiores concentrações de metabolitos ativos, visto que estes possuem uma atividade intrínseca inferior e são altamente metabolizados (Manach *et al.*, 2004).

A absorção de compostos fenólicos a partir da ingestão de alimentos é determinada principalmente pela sua estrutura química, que depende de fatores tais como o grau de glicosilação, acilação, a sua estrutura de base (isto é, benzeno ou derivados de flavona), tamanho molecular, o grau de polimerização e a solubilidade (Karakaya, 2004).

A biodisponibilidade pode ainda ser mais baixa quando os compostos fenólicos possuem um peso molecular elevado, como é o caso de taninos hidrolisáveis e condensados, i.e. conjugados de flavonóides complexos com vários açúcares e acilados com ácidos hidroxicinâmicos, respetivamente. Os metabolitos destes compostos fenólicos complexos são moléculas mais pequenas, em que alguns dos grupos hidroxilo originais foram removidos, sendo normalmente mais absorvidos no intestino (Landete, 2012).

Salienta-se ainda o facto de que a hidrólise dos compostos fenólicos pode resultar em metabolitos que são biologicamente mais ativos do que os compostos parentais (Selma, Espín e Tomás-Barberán, 2009). Por exemplo, as isoflavonas glicosídicas são pouco absorvidas no intestino delgado, em comparação com as suas agliconas, devido ao seu maior peso molecular e maior hidrofiliçidade (Chang e Nair, 1995). Além disso, glicosídeos são conhecidos por serem menos bioativos do que as suas respetivas agliconas (Piskula, Jun e Yukihiko, 1999). Os flavonóides em geral, são absorvidos como agliconas após uma hidrólise prévia dos glicosídeos.

Adicionalmente, durante o percurso de absorção, os compostos fenólicos podem sofrer vários processos de modificação, nomeadamente metilações, e sulfatações, que ocorrem ao nível do fígado. Estas modificações na estrutura dos compostos fenólicos servem como elementos de sinalização para a sua excreção. Parte destes compostos são assim excretados do organismo (e.g. pela bÍlis), como representado na Figura 6. Como consequência de todos estes processos, a forma estrutural de um composto fenólico que chega à corrente sanguínea é bastante distinta daquela quando ingerido, o que dificulta a completa elucidação da sua atividade biológica.

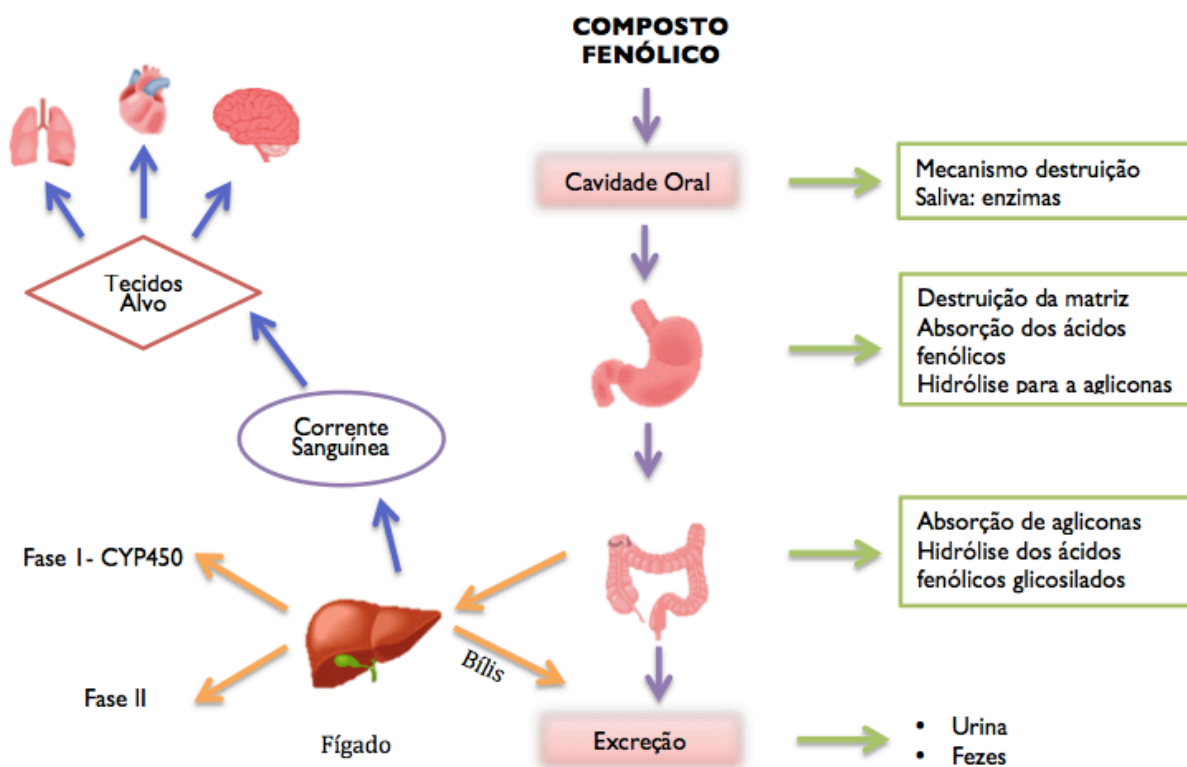


Figura 6 - Resumo dos passos envolvidos na biodisponibilidade de substâncias fenólicas em seres humanos. Adaptado de (Souza, Casanova e Costa, 2015).

1.2.6 Condições de Stress Oxidativo e Inflamatório

A oxidação é um processo fundamental da vida aeróbica e metabolismo Humano, onde se originam espécies reativas de oxigénio (ROS) e de azoto (RNS) i.e., compostos altamente reativos como por exemplo radicais livres que possuem eletrões desemparelhados no átomo de oxigénio e azoto, respetivamente. As principais espécies de ROS distribuem-se em dois grupos, i.e., os radicais e os não-radicais, estando os radicais hidroxilo (HO^\bullet), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroxilo (ROO^\bullet) e alcoxilo (RO^\bullet) englobados dentro do primeiro e o oxigénio e o peróxido de hidrogénio dentro do segundo grupo. Por outro lado, as principais espécies de RNS englobam o óxido nítrico (NO^\bullet), óxido nítrico (N_2O_3), ácido nítrico (HNO_2), nitritos (NO_2^-) e nitratos (NO_3^-).

Processos como a fagocitose, a regulação do crescimento celular, a produção de energia, a sinalização intracelular e a síntese de substâncias importantes envolvem a formação de ROS e/ou RNS (Figura 7), sendo o excesso destas substâncias no organismo normalmente contrabalançado por sistemas antioxidantes. Contudo, situações de excesso

de ROS e/ou RNS (e.g. produção excessiva de radicais livres ou deficiência de sistemas antioxidantes) estão normalmente associadas a efeitos prejudiciais e várias patologias, como por exemplo, doenças cardíacas, disfunções cognitivas, cancro entre outras (Barreiros, David e David, 2006).

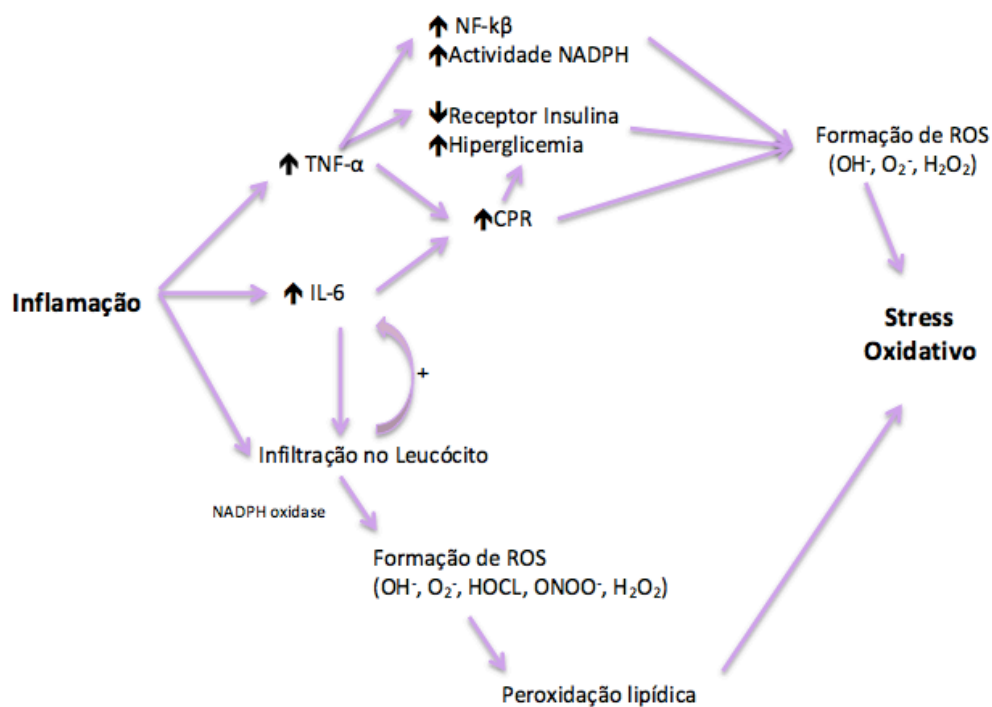


Figura 7 - Vias inflamatórias que induzem o stress oxidativo. Os níveis de citocinas aumentam, indiretamente causando a formação de ROS através de várias vias de sinalização intracelular e deficiência do recetor de insulina. Infiltração de leucócitos provoca a formação enzimática de ROS. Ambas as vias geram ROS e danos oxidativos. Adaptado de (Vincent e Taylor, 2006).

A inflamação ocorre inicialmente numa área localizada, podendo ser induzida por diversos fatores, entre eles danos físicos, percursoros químicos entre outros. De um modo geral, a inflamação controlada é uma resposta imune que pode ser benéfica no sentido em que pode proteger o corpo contra “invasores”. Contudo, se esta inflamação for disfuncional poderá ter um efeito adverso sobre o organismo, assim como o aparecimento de inflamações crónicas e uma série de reações em cadeia.

O processo inflamatório compreende dois mecanismos de defesa interligados, uma resposta não específica (imunidade inata) e uma resposta altamente específica (imunidade adaptativa). As células do sistema de imunidade inata residem em tecidos (por exemplo, macrófagos, fibroblastos, mastócitos e células dendríticas), bem como células em circulação (por exemplo, monócitos e neutrófilos) sendo recetores de reconhecimento específicos, i.e., proteínas capazes de reconhecer direta ou indiretamente agentes patogénicos ou antigénios

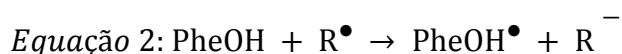
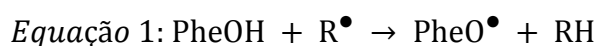
libertados por células lesadas (Rahman, Biswas e Kirkham, 2006). Numa condição de dano, as células fagocíticas iniciam a libertação de vários mediadores químicos (e.g. citocinas) que permitem recrutar células circundantes como neutrófilos e macrófagos (Federico *et al.*, 2007). Quando estes mediadores são reconhecidos, eles irão provocar uma série de cascatas intracelulares que promovem a ativação do fator de transcrição NF- κ B (fator nuclear- κ B) que, por sua vez, induzirá uma série de eventos que culminam no aumento da expressão de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, enzimas pró-inflamatórias (e.g. ciclo-oxigenase-2 (COX-2), sintetase do óxido nítrico induzível (iNOS) e lipoxigenase (LOX)) e de ROS e RNS (Cardoso *et al.*, 2014). Note-se que a COX-2 e LOX são importantes na via do ácido araquidónico e controlam, respetivamente, a biossíntese dos eicosanóides e de leucotrienos pró-inflamatórios (considerados como fortes mediadores libertados no local da inflamação por leucócitos e outras células) (Vardeny e Solomon, 2008). Por outro lado, o aumento da expressão de iNOS acarreta consigo o incremento dos níveis de NO[•] em células, nomeadamente em macrófagos e células endoteliais. Conjuntamente com outros mediadores, o NO[•] atua sobre os capilares provocando uma dilatação, resultando num aumento de fluxo e tornando-os mais permeáveis de forma a que os agentes recrutados possam atuar nos espaços intersticiais. Todos estes processos resultam num ciclo auto-sustentável, onde ROS e RNS estimulam os mediadores químicos pró-inflamatórios que, por sua vez estimulam a produção de mais espécies reativas, criando um ambiente ideal para o desenvolvimento de uma inflamação crónica e várias condições patológicas associadas (Catarino *et al.*, 2015).

1.2.7 Envolvimento dos Compostos Fenólicos no Stress Oxidativo e Inflamatório

Nos últimos anos têm existido um elevado interesse ao nível científico, relativamente ao papel benéfico dos compostos fenólicos em condições de stress oxidativo e inflamação. Este facto em parte deve-se à identificação de flavonóides e outros antioxidantes polifenólicos em plantas medicinais. Efetivamente, dados científicos apoiam a ideia de que os benefícios na saúde relacionados com o consumo de frutas, legumes e vinho tinto, estão associados aos compostos fenólicos antioxidantes que os mesmos contêm (Rahman, Biswas e Kirkham, 2006).

De forma global, consideram-se três mecanismos moleculares principais envolvidos nas propriedades biológicas dos polifenóis: I) neutralização de espécies reativas através da eliminação de radicais livres; II) a inibição de mediadores pró-oxidantes, pró-inflamatórios, como por exemplo, NF- κ B, iNOS, COX-2 e LOX; e III) a melhoria das defesas celulares,

através da regulação da fase II) (González *et al.*, 2011). O primeiro mecanismo pode ocorrer de duas formas, i.e., através de reações de transferência do átomo de hidrogênio (HAT) ou de transferência de um elétron (SET). Como resultado de uma reação HAT, o átomo de hidrogênio é transferido do composto fenólico para o radical (Equação 1), podendo este último reagir com outros radicais. Por outro lado, numa reação SET, o elétron do composto fenólico é transferido para reduzir os radicais, ou metais carbonílicos (Equação. 2).



De salientar que as reações de HAT e SET podem ocorrer em simultâneo, sendo a reação principal determinada pelas propriedades do antioxidante, a solubilidade e o coeficiente do solvente. De momento acredita-se que a reação HAT é a mais relevante em termos de organismos vivos (Catarino *et al.*, 2015).

Para além das propriedades antioxidantes diretas, os compostos fenólicos também são conhecidos por apresentar propriedade indiretas, ou seja, a inibição dos mediadores pró-antioxidantes e pró-inflamatórios (Higdon e Frei, 2003).

Embora menos estudada, existem algumas conclusões sobre a relação estrutura-atividade de flavonóides e outras enzimas. Segundo a literatura descrita, os flavonóis são inibidores da LOX, enquanto as flavonas agem preferencialmente contra a COX (Kim *et al.*, 2004). No entanto, no geral as evidências sugerem que a presença da ligação dupla C2-C3, a presença do grupo catecol no anel B, grupos carbonilo e hidroxilo C5 e C7, são relevantes para um bom efeito inibitório sobre estas duas enzimas, bem como para a inibição de iNOS, e cinases de I κ B que são responsáveis pela ativação do fator de transcrição NF- κ B (Comalada *et al.*, 2006).

A informação que existe relativamente à estrutura-atividade entre ácidos hidroxicinâmicos e pró-oxidantes e/ou enzimas pró-inflamatórias ainda é muito limitada. No entanto, algumas evidências já demonstraram que a função 3,4-catecol e grupos α,β -insaturados são importantes para uma inibição eficaz da atividade de NF- κ B (Chang *et al.*, 2007; Chiang *et al.*, 2005).

1.3 Análise de Compostos Fenólicos

A análise de extratos ricos em compostos fenólicos é bastante complexa, embora ao longo do tempo tenha vindo a ser facilitada com a evolução de muitas técnicas espectroscópicas. No entanto, a caracterização de um material complexo como este, exige o uso de várias técnicas: métodos espectrofotométricos, passando por técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massa, e finalmente, pelo fracionamento dos extratos, como técnica preparativa a fim de se obter os compostos puros, para a caracterização por técnicas espectroscópicas, como a de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

1.3.1 Teor de Compostos Fenólicos Totais

O método mais utilizado para determinação dos compostos fenólicos totais é o método Folin-Denis, modificado por Folin Ciocalteu. Este ensaio baseia-se em reações de oxidação-redução, em que os íons de fenolato são oxidados e o fosfotúngstico-fosfomolibdico são reduzidos, formando produtos coloridos. No entanto, esta técnica apenas permite obter uma estimativa das concentrações dos compostos fenólicos, não sendo possível caracterizar individualmente estes compostos. Além disso, os reagentes de Folin-Ciocalteu não reagem especificamente com fenóis e, portanto, os dados gerados podem não ser fiáveis (Khoddami, Wilkes e Roberts, 2013).

Considerando as limitações do método anteriormente referido, torna-se necessário a utilização de técnicas separativas mais eficientes e precisas. Neste campo, os métodos cromatográficos são irrefutavelmente os mais aplicados devido à sua excelente capacidade de separação e capacidade na análise de vários compostos em simultâneo (Sun *et al.*, 2014). Estas técnicas são caracterizadas por terem duas fases distintas, isto é, uma fase móvel que consiste numa amostra a ser analisada e um fluido/eluente que a transporta para fora através de uma estrutura imobilizada, que é conhecida como a fase estacionária.

Uma discussão mais detalhada de técnicas de cromatografia, nomeadamente cromatografia líquida de alta performance (HPLC), cromatografia gasosa (GC) e cromatografia em camada fina (TLC) será levada a cabo nesta secção, a par com os sistemas de deteção, uma vez que também são importantes contribuintes para a caracterização dos compostos fenólicos.

1.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)

Cromatografia líquida (LC) é uma técnica de separação que começou no início do Século XIX. Esta técnica foi inicialmente levada a cabo num cilindro de vidro empacotado com um pó fino e carregado com a mistura de amostra na parte superior. Um eluente foi então vertido para a coluna, de forma a fluir sobre a ação da gravidade, arrastando os compostos da amostra através da coluna, a diferentes velocidades (Snyder, Kirkland e Dolan, 2010).

HPLC é uma técnica atualizada a partir do tradicional LC de baixa pressão, utiliza pressões de funcionamento elevadas (até 400 bar) (Jing *et al.*, 2013). Neste caso, pequenas quantidades de amostras e solventes são necessárias e, portanto, as dimensões de uma coluna convencional de HPLC são de 250 mm comprimento x 4,6 mm de diâmetro, empacotada com partículas de 5 μM , resultando em separações mais rápidas (Buckenmaier *et al.*, 2015). Todas essas características dão a esta técnica um poder de resolução superior, aquando a separação é de misturas.

Vários modos de separação diferentes de HPLC são conhecidos. Entre eles, a fase normal (NP), a fase reversa (RP), a troca iónica (IE) e a exclusão por tamanho (SE), são as principais técnicas de cromatografia aplicadas (Dong, 2006). A técnica NP-HPLC, também conhecida como cromatografia líquido-sólido ou de adsorção, é o método de separação tradicional baseado na adsorção/dessorção da amostra numa fase estacionária polar (normalmente sílica ou alumina). Por outro lado, o funcionamento de RP-HPLC é o oposto da NP-HPLC, isto é, a separação baseia-se em coeficientes de partição entre uma fase móvel polar e uma fase estacionária hidrofóbica (Fanali *et al.*, 2012). No que diz respeito à cromatografia por IE e a SE, como os nomes indicam, a primeira é baseada na troca de analitos iónicos com os contra-íões dos grupos iónicos ligados ao suporte sólido (Lang *et al.*, 2015), enquanto a última é baseada na separação de moléculas de acordo com seus tamanhos, ou seja, moléculas menores migram mais lentamente através dos poros e os maiores são excluídos mais rapidamente na coluna (Yang *et al.*, 2015).

Apesar da técnica de HPLC ser muito bem estabelecida, poderá sofrer algumas melhorias, especialmente em relação aos tempos de separação. Em geral, são obtidas altas eficiências a partir de colunas com diâmetro entre os 10-150 μM , bem como com partículas de pequenas dimensões (1,5-2 μm) (Wren e Tchelitcheff, 2006). No entanto, apesar das melhorias na sensibilidade, resolução e velocidade de análise, existem também alguns aspetos desvantajosos, sendo o principal a necessidade de pressões mais elevadas. Portanto, a criação de novos instrumentos capazes de gerar e suportar pressões até 1000 bar deu

origem ao que é hoje conhecido por ultra-desempenho LC (UPLC), um termo que foi primeiramente usado pela Waters Corporation. Com este novo equipamento, a mesma separação que levaria mais de 20 min em RP-HPLC, pode ser realizada em menos de 3 min (Pyrzynska e Biesaga, 2009).

Juntamente com as técnicas separativas, os sistemas de detecção também desempenham um papel muito importante. Em particular, os sistemas de detecção mais comuns para compostos fenólicos, o ultravioleta-visível (UV-Vis), o detetor de varrimento de fotodíodos (PDA), e os detetores de UV-fluorescência (FLD) (Khoddami, Wilkes e Roberts, 2013). A existência de ligações duplas e aromáticos conjugados faz com que cada fenol absorva na região UV-Vis, que vai desde 200-290 nm para os ácidos benzóicos e para os ácidos cinâmicos, 190-380 nm, enquanto o espectro típico UV-Vis para flavonóides compreende duas bandas: o primeiro com uma gama máxima de 240-285 nm, que surge a partir do anel A e a segunda na gama de 300-550 nm, associada ao anel B. Portanto, o comprimento de onda mais utilizado para a identificação de compostos fenólicos é de 280 nm (Stalikas, 2007).

A técnica de HPLC acoplada à espectrometria de massa foi melhorando a análise de espécies não-voláteis, incluindo de compostos fenólicos. Esta técnica analítica envolve a criação de moléculas com carga na fonte de iões, que irão ser ordenados por campos electromagnéticos (Stobiecki, 2000). Várias fontes de ionização de MS podem ser aplicadas, por exemplo, ionização por *electrospray* (ESI), ionização química à pressão atmosférica (APCI), bombardeamento atómico rápido (BAR) e termopulverização (TSP), no entanto, ESI tem provado ser a mais adequada (Wang e Morris, 2005).

1.3.2 Cromatografia Gasosa (GC)

A técnica de GC também é utilizada em alguns casos para a determinação de compostos fenólicos, tanto qualitativamente como quantitativamente. A principal desvantagem da técnica de GC na análise dos compostos fenólicos é a necessidade de volatilizar a amostra, o que limita a gama de compostos que podem ser analisados. Para ultrapassar esta lacuna, os compostos normalmente devem passar por um processo de derivatização, isto é, uma modificação química dos compostos para produzir derivados com propriedades que são mais adequadas para a análise de GC (Capriotti *et al.*, 2014). Ainda assim, a derivatização pode ser um desafio para os compostos de interesse, dado que a presença de glicosídeos pode interferir com a sua modificação química (Robbins, 2003). Outra alternativa é a cromatografia gasosa de alta resolução (HRGC-HT), é uma técnica

estabelecida para a separação de misturas complexas e identificação de compostos de alto peso molecular, que não eluem quando analisados em colunas de GC comuns (Khoddami, Wilkes e Roberts, 2013).

No início o GC era realizado com detecção por ionização de chama (FID), que se baseia na detecção de íões formados durante a combustão de compostos orgânicos numa chama de hidrogénio (Castele, Pooter e Sumere, 1976; Schulz e Herrmann, 1980), no entanto, a combinação de GC-MS permitiu a aquisição de dados de massa molecular e informação estrutural, juntamente com a identificação de compostos.

1.3.3 Cromatografia em Camada Fina (TLC)

A cromatografia em camada fina é uma outra técnica cromatográfica que é amplamente utilizada para a análise qualitativa de compostos orgânicos, para isolamento dos compostos individuais a partir de misturas, análise quantitativa, e isolamento em escala preparativa (Sherma, 2007). Esta técnica é rápida, barata e permite a análise de várias amostras em simultâneo, fornecendo uma impressão digital cromatográfica da amostra, que é muito útil para fins de identificação (Khoddami, Wilkes e Roberts, 2013; Stalikas, 2007).

Entre as muitas placas de TLC pré-revestidas disponíveis (isto é, com camadas inorgânicas adsorventes, como sílica ou gel de sílica e alumina; e camadas orgânicas, como poliamida e celulose, entre outros), é possível escolher uma fase estacionária adequada de acordo com as características da amostra (Sherma, 2007). Por exemplo, uma fase estacionária de gel de sílica clássica é amplamente utilizada para separar os flavonóides mais apolares tais como flavonóis e isoflavonas (Gómez-Caravaca *et al.*, 2006).

Neste método de cromatografia, é usado normalmente um comprimento de onda comum, UV de curto comprimento de onda e um de longo comprimento de onda (Medic-Saric *et al.*, 2004). No entanto, a técnica de TLC tem algumas limitações, incluindo longos tempos de desenvolvimento, baixa reprodutibilidade e sensibilidade moderada (Cserhádi e Mária, 2012). Além disso, a fase móvel volátil entra em contacto com a atmosfera ao redor da câmara, de modo a que fatores como a humidade e a temperatura afetam os resultados (Berezkin e Chausov, 2012).

1.3.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma outra alternativa que tem recebido cada vez mais atenção. Esta tecnologia foi inicialmente utilizada no final de 1940 para elucidar a estrutura de moléculas em química orgânica (Marcone *et al.*, 2013), e consiste na exposição de certos núcleos atômicos a um campo magnético, permitindo explorar as suas propriedades magnéticas (Gunther, 2015). O seu principal inconveniente é a sua baixa sensibilidade, quando comparado com MS, visto que nesta última técnica não há necessidade de obtenção de grandes quantidades de amostra para análise (Maul, Schebb e Kulling, 2008). Uma alternativa é o acoplamento de HPLC com técnicas de RMN (LC-RMN) que, na verdade, aparece como o método mais poderoso para a separação e a determinação estrutural de compostos. Independentemente da sua eficácia para a identificação de compostos fenólicos, o método não é muito utilizado devido aos elevados custos decorrentes (Stalikas, 2007).

1.4 *Geranium robertianum* L.

G. robertianum, comumente conhecido como “Erva de São Roberto”, é uma planta herbácea nativa da Europa e Ásia, tendo sido introduzida na América do Norte (Figura 8) (Svendsen *et al.*, 2015). Esta planta cresce em locais húmidos, atingindo uma altura de 5 cm, os seus caules são avermelhados com folhas verdes que, após o período de floração, passam a vermelhas. Esta planta é também caracterizada pelas suas pequenas flores rosa com cinco pétalas (Tofts, 2004).

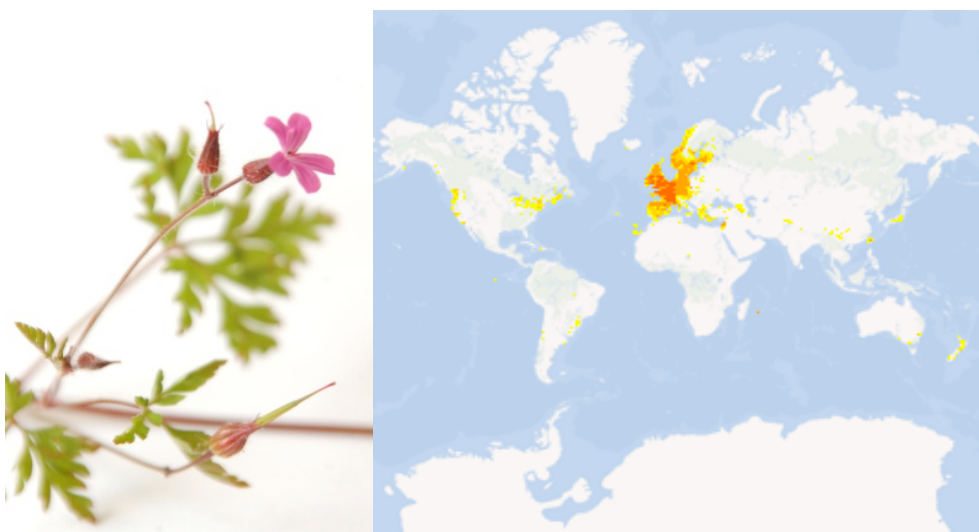


Figura 8 - *Geranium robertianum* (esquerda) e abordagem da distribuição geográfica de *G. robertianum* no mundo (direita).

A utilização de *Geranium robertianum* está muito associada à medicina tradicional. Na realidade, esta planta é amplamente utilizada no tratamento de conjuntivites, febre, dores de estômago, intestino e rins entre outras, presumindo-se que poderá atuar como anti-inflamatório, antiasmático, antialérgico, hemostático, antidiabético, antibacteriano, antioxidante e diurético (Paun *et al.*, 2012).

1.3.1 Caracterização Química

Os componentes ativos no *G. robertianum* incluem óleo essencial, flavonóides, taninos e outros polifenóis (Zhao, 2014). Um estudo efetuado por Pedro *et al.* (1992) em óleo essencial, recolhido das partes aéreas e raízes desta planta permitiu identificar o linalol (22,9%), γ -terpineno (13,9%), germacreno-D (7,8%), limoneno (5,3%), geraniol (4,4%), α -terpineol (3,8%) e fitol (3,8%) (Pedro, Pais e Scheffer, 1992). No entanto, estudos de outros autores (Radulović, Dekić e Stojanović-Radić, 2012) mostraram uma composição distinta, apontando o ácido hexadecanóico (45,5%), pentacosano (28,5% em óleo de raízes), hexahidrofarnesil acetona (6,5% em óleo de partes aérea) e óxido de cariofileno (5,4% em óleo de partes aéreas) como os compostos mais abundantes do óleo.

Investigações adicionais nas partes aéreas desta planta permitiram isolar vários compostos fenólicos das partes aéreas, nomeadamente o ácido elágico, ácido cafeico, ácido gálico, quercetina-3-galactosídeo, quercetina e kaempferol (Figura 9) (Kobakhidze e Alaniya, 2004). Dados adicionais foram ainda descritos por Fodorea *et al.* (2005), que identificaram os seguintes compostos através das partes aéreas secas, hiperosídeo (3,64 μg / 100 mg), ácido elágico (7599,76 ηg / 100 mg), isoquercetina (49.49 μg /100 mg), quercetina (83.92 μg /100 mg), kaempferol (143,43 mg/100 mg), ácido caftárico (166,92 mg/100 mg), e rutina (72.23 μg /100 mg).

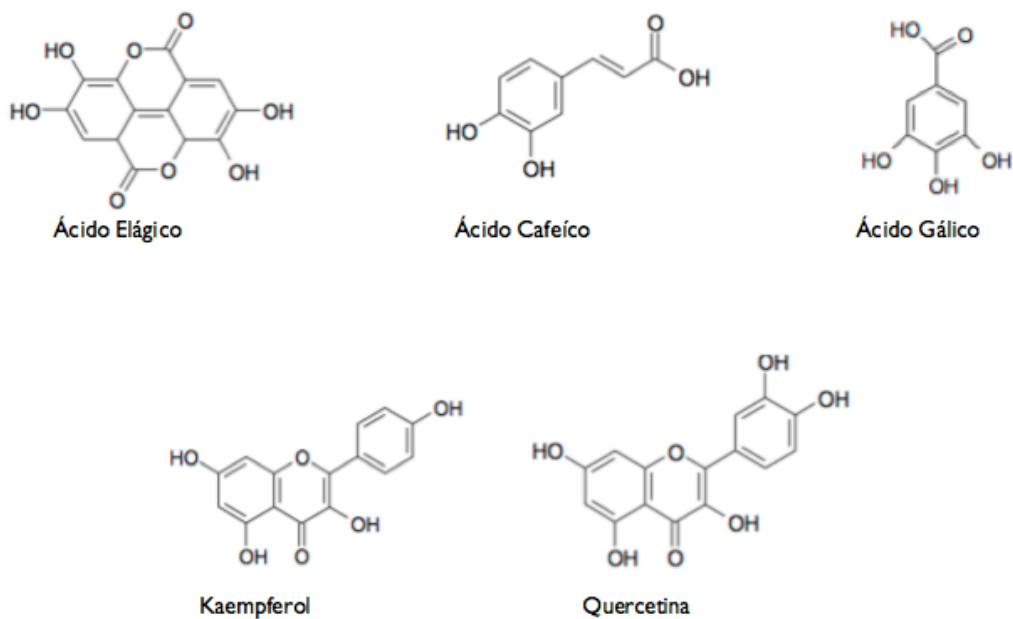


Figura 9 - Estruturas químicas de alguns dos compostos isolados do *G. robertianum*.

Estes dados sugerem, que a composição de fenólicos dentro da mesma espécie podem diferir, pois os metabolitos secundários das plantas, extratos e óleos essenciais, são influenciados por diversos fatores, entre eles, métodos e solventes de extração, estação de recolha, clima, solo, entre outros.

Objetivos

2. Objetivos

A “Erva de São Roberto”, ou *Geranium robertianum* L., é uma planta aclamada como sendo benéfica no tratamento de várias condições de doença e por isso frequentemente utilizada na medicina popular portuguesa. No entanto, a sua composição química e as suas propriedades bioativas não se encontram totalmente elucidadas.

Neste contexto, o presente trabalho teve como principal objetivo a caracterização de compostos fitoquímicos dos extratos etanólicos de *G. robertianum*, por forma a aumentar o conhecimento sobre os seus constituintes. Pretende-se ainda avaliar a potencialidade de extratos ricos em compostos fenólicos e/ou compostos isolados com a capacidade antioxidante e/ou anti-inflamatória da planta.

Para atingir estes objetivos, foram propostas as seguintes tarefas:

- Obtenção de extratos etanólicos de *G. robertianum* em soxhlet e extração sequencial destes com solventes de diferentes polaridades (*n*-Hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona e metanol);
- Análise fitoquímica dos extratos etanólicos de *G. robertianum* e as suas frações apolares, através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS);
- Análise fitoquímica dos extratos etanólicos de *G. robertianum* e as suas frações polares, através de cromatografia líquida de ultra eficiência com um detetor de díodos, acoplada à espectrometria de massa com ionização por *electrospray* (UHPLC-DAD-ESI-MSⁿ);
- Isolamento e purificação de compostos através de uma Coluna Semi-Preparativa Spherisorb (RP-18);
- Determinação da atividade antioxidante dos extratos polares e apolares de *G. robertianum* através do método Folin-Ciocalteu e determinação da capacidade de captação de NO[•].

Procedimentos Experimentais

3. Procedimentos Experimentais

3.1 Reagentes

Os solventes orgânicos *n*-Hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona, metanol e etanol foram adquiridos à empresa Panreac (Barcelona, Espanha) assim como o ácido ascórbico, o reagente de Folin-Ciocalteu, fosfato de potássio di-hidrogenado, ácido fosfórico 85%. O metanol, acetonitrilo, ácido fórmico de pureza HPLC, peróxido de hidrogénio, hidróxido de sódio e o dimetilsulfóxido foram adquiridos Fisher Scientific (Hampton, EUA). Os reagentes cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato de sódio di-hidrogenado, carbonato de sódio 10·H₂O, ácido gálico, foram obtidos pela Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). O sal nitroprussiato de sódio di-hidratado foi adquirido a empresa Acros Organic (Geel, Bélgica) e o ácido bórico foi comprado na ChemLab (Zedelgem, Bélgica).

3.2 Material Vegetal

O material vegetal usado (*G. robertianum* L.) foi comprado à empresa Ervital - Plantas Aromáticas e Medicinais, Lda. (Castro Daire, Portugal) na forma seca. Este material era constituído pelas partes áreas da planta.

3.3 Extração

Após moagem do material vegetal num moinho industrial (Retsch SKI) com martelos cruzados e equipado com um peneiro de 1 mm, a amostra (aprox. 125 g) foi extraída a quente, em soxhlet com aproximadamente 2 L de etanol durante 8 h. Após esta extração, a solução resultante foi evaporada até à secura em evaporador rotativo e o resíduo resultante foi submetido a um tratamento com acetato de chumbo de acordo com a técnica descrita por Kijjoa *et al.* (2002), tendo como finalidade a eliminação da clorofila. Em maior detalhe, foram usados os seguintes reagentes e solventes para cada 35 g de resíduo: 28 mg de acetato de chumbo, 750 mL de água, 700 mL etanol e 8 mL de ácido acético. O balão foi mantido durante 48 horas no escuro sob agitação magnética. Após o tratamento, a solução resultante foi filtrada com o auxílio de algodão e posteriormente o filtrado foi evaporado até à secura em evaporador rotativo, tendo o resíduo resultante sido designado de EtOH1. Este extrato foi em seguida extraído sequencialmente com solventes de polaridade crescente (*n*-

hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona e metanol). A extração com cada solvente foi efetuada por um período de 3 h, tendo a solução resultante sido filtrada em papel de filtro 125 mm (Whatman) e o resíduo extraído novamente em condições semelhantes por mais quatro vezes. As soluções resultantes das 5 extrações foram evaporadas até à secura tendo-se desta forma obtido os extratos EtOHI_Hex, EtOHI_Dic, EtOHI_Acett, EtOHI_Acetn e EtOHI_MeOH, relativos às extrações efetuadas com *n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona e metanol, respetivamente (Figura 10).

Adicionalmente, o resíduo da extração com etanol foi submetido a nova extração com etanol em soxhlet (8 h), e a solução resultante (não submetida ao processo para remoção de clorofilas) foi evaporada à secura (EtOH₂) e tratada com os vários solventes como anteriormente descrito, dando origem à obtenção dos extratos EtOH₂_hex, EtOH₂_Dic, EtOH₂_Acett, EtOH₂_Acetn e EtOH₂_MeOH, relativos às extrações efetuadas (Figura 10).

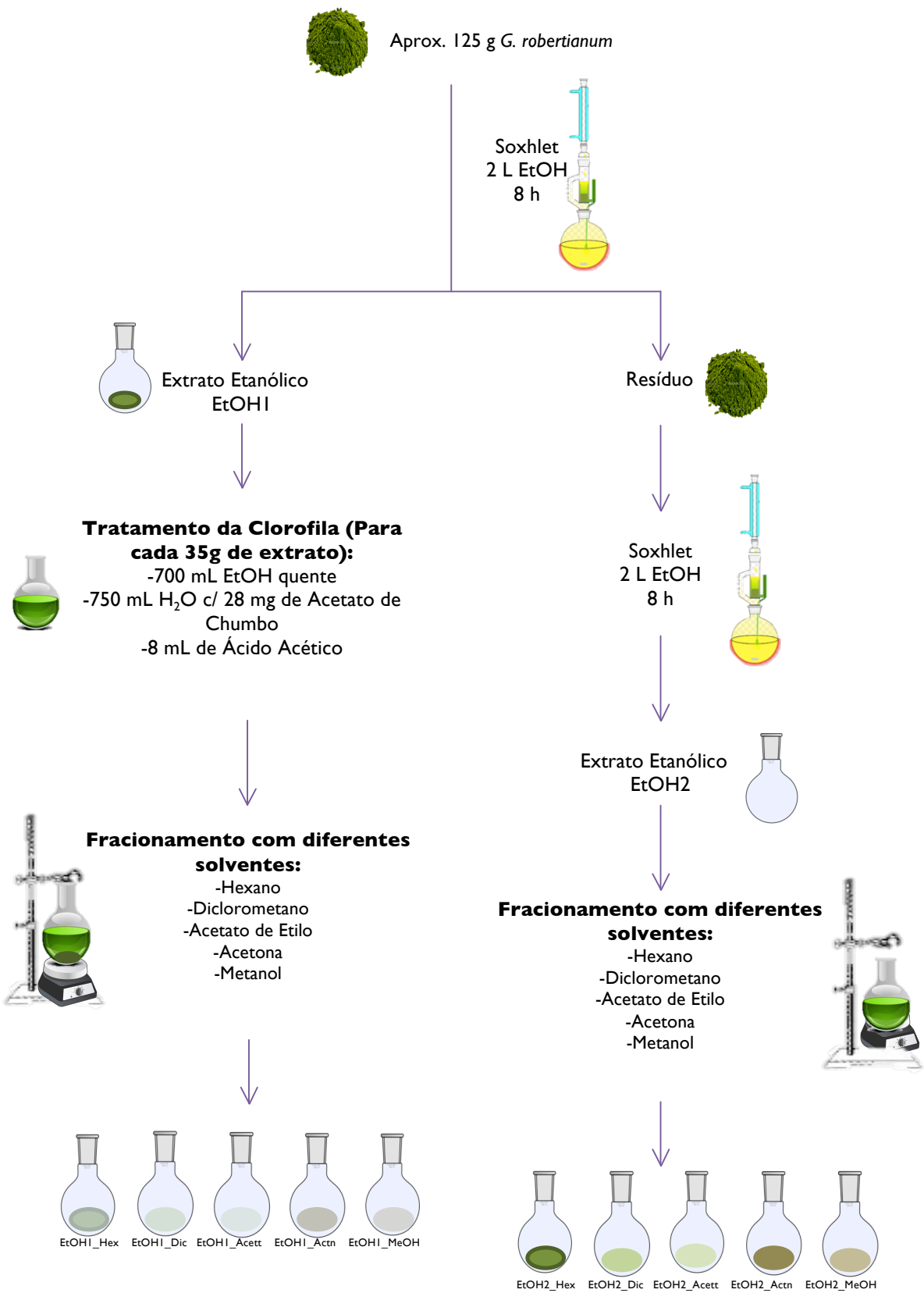


Figura 10 - Ilustração do procedimento de extração e fracionamento.

3.4 Análise fitoquímica através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS)

A análise por GC-MS foi efetuada num aparelho CGMS-QP2010 Ultra (Shimadzu) equipado com um *autosampler* AOC-20i, utilizando hélio como gás de arraste ($1,19 \times 10^{-3} \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$). A coluna usada foi uma DB-5 com $30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm}$ de diâmetro e $0,25 \mu\text{m}$ de espessura de filme. As condições cromatográficas foram as seguintes: temperatura do injetor 320°C , temperatura inicial da coluna 70°C durante 5 min, aquecendo a uma razão de $4^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até 250°C e a uma razão de $2^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até 300°C , permanecendo durante 5 min a 300°C , sendo o tempo total do programa de 55 min.

O espectrofotómetro de massa utilizado foi um Finnigan Trace MS (Thermo Scientific), com funcionamento através de modo de impacto eletrónico a uma temperatura de 200°C e a interface a 300°C . A análise em modo de varrimento foi efetuada num intervalo de massas de 50-1000 *m/z*.

As amostras analisadas em GC (20 mg extrato ou fração) foram previamente derivatizadas, dissolvendo a amostra em 250 μL de piridina. Os compostos da amostra contendo grupos hidroxilo e carboxilo foram convertidos nos seus éteres e ésteres, respetivamente, pela adição de 250 μL de N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) e de 50 μL de trimetilclorosilano (TMSi), tendo a reação sido efetuada a 70°C durante 30 minutos. Por fim, as amostras derivatizadas foram filtradas num filtro de nylon com um poro de $0,2 \mu\text{m}$ (Ge Healthcare Life Sciences, Reino Unido), tendo-se procedido à injeção de 1 μL de amostra no GC-MS (Oliveira *et al.*, 2005).

Os compostos foram identificados com base nos seus derivados TMSi comparando o espetro de massa com dados da biblioteca NIST.

3.5 Análise fitoquímica através de cromatografia líquida de ultra eficiência com um detetor de díodos, acoplada à espectrometria de massa com ionização por *electrospray* (UHPLC-DAD-ESI-MSⁿ)

A análise por UHPLC-DAD-ESI-MSⁿ foi utilizada para deteção de compostos fenólicos presentes nos vários extratos e frações. Para tal utilizou-se um aparelho Ultimate 3000 (Thermo SCIENTIFIC) equipado com um detetor de fotodíodos (3000RS-DAD), acoplado a um espectrómetro de massa LTQ XL Linear Ion Trap 2D.

O sistema cromatográfico consistia numa bomba quaternária, um amostrador automático, um detetor de fotodíodo e um compartimento de coluna termostaticada. A

análise foi efetuada com uma coluna Hypersil GOLD (100 mm de comprimento; 2,1 milímetros I.D. e 1,9 μm de diâmetro de partículas) mantida a 30°C, tendo o volume de injeção sido de 2 μL . A fase móvel para a separação dos extratos de *G. robertianum* foi 0,1% ácido fórmico (v/v) (A) e acetronitrilo (B). O gradiente de solvente iniciou com 5% de B alcançando os 40% de B em 14 min, aumentando até aos 100% de B em 2 min e mantendo essas condições até aos 18 min, seguido do restabelecimento das condições iniciais com um tempo total de programa de 20 min.

Antes da análise por UHPLC, cada extrato ou fração (5 mg) foi dissolvido em 1 mL de MeOH e a solução filtrada através de um filtro de nylon com um poro de 0,2 μm (Ge Healthcare Life Sciences, Reino Unido). A taxa de fluxo da corrida foi de 200 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Os dados espectrais de UV-Vis para todos os picos foram recolhidos numa gama de 219-450 nm, tendo os perfis cromatográficos sido registados a 280 nm.

O espectrofotómetro de massa usado foi um LTQ XL Linear Ion Trap 2D (Thermo Scientific) equipado com uma fonte de ionização ortogonal de *electrospray* (ESI). As análises foram efetuadas em modo negativo com uma voltagem de 5,00 kV e temperatura do capilar de ESI a 275°C, aplicando-se uma energia de colisão de 20- 25 eV nas fragmentações.

3.6 Purificação de Compostos Fenólicos

A purificação de compostos foi efetuada com a amostra EtOH2_Acett (m=0,4335 g), tendo esta sido dissolvida em 0,867 mL de MeOH e filtrada através de um filtro de nylon com um poro de 0,2 μm (Ge Healthcare Life Sciences, Reino Unido).

Este procedimento foi efetuado num cromatógrafo HPLC Detector (Gilson) equipado com as seguintes componentes: detetor UV-Vis 118, Bomba 306, Bomba 307, Módulo Manométrico 805 e 811 C Dinamic Mixer. Para a separação foi usada uma Coluna Semi-Preparativa Spherisorb (United Kingdom) com as seguintes dimensões: 25,0 cm de comprimento e 10,0 mm I.D com uma partícula de tamanho 5 μm . O volume de injeção foi de 40 μL , sendo a fase móvel usada 0,1% ácido fórmico (v/v) (A) e acetronitrilo (B). O programa iniciou com 15% de B, atingindo 20% de B aos 20 min, 24% de B aos 60 min, chegando aos 100% aos 80 min, mantendo-se nestas condições por mais 20 min, seguido do restabelecimento das condições iniciais. A taxa de fluxo foi de 2,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Os dados espectrais de UV-Vis para todos os picos foram registados a 280 nm. Após a recolha dos compostos de interesse, foi efetuada uma análise por UHPLC-DAD-ESI-MSⁿ, com o objetivo de verificar o nível de pureza dos compostos recolhidos. As condições utilizadas foram as

anteriormente descritas para detecção de compostos fenólicos em UHPLC-DAD-ESI-MSⁿ.

3.7 Análise estrutural por espectroscopia de RMN (Ressonância Magnética Nuclear)

3.7.1 RMN ¹H

Os compostos isolados foram dissolvidos em aproximadamente 600 µL de DMSO deuterado. As amostras dissolvidas foram colocadas, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, em tubos de RMN. Os compostos dissolvidos em DMSO-d₆ foram analisados por RMN de ¹H a 295.1K num espectrómetro de RMN Bruker ASCEND 500 a operar a 500,16 MHz. Os parâmetros de aquisição foram: comprimento de pulso 11,5 µs com 3 s de atraso e 840 scans.

3.8 Atividades Biológicas

Neste estudo avaliou-se ainda a atividade biológica dos extratos e frações obtidas quanto às suas potenciais atividades antioxidantes e anti-inflamatórias, usando os métodos Folin-Ciocalteu e captação de NO[•], respetivamente.

Para este estudo, efetuou-se a preparação de soluções stock de cada amostra, por dissolução de aproximadamente 20 mg em 4 mL de DMSO, com concentrações finais de: [EtOH1]=5,075 mg/mL; [EtOH1_Hex]=5,025 mg/mL; [EtOH1_Dic]=5,000 mg/mL; [EtOH1_Acett]=5,000 mg/mL; [EtOH1_Acetrn]=5,000 mg/mL; [EtOH1_MeOH]=5,050 mg/mL; [EtOH2]=5,000 mg/mL; [EtOH2_Hex]=5,150 mg/mL; [EtOH2_Dic]=5,150 mg/mL; [EtOH2_Acett]=6,200 mg/mL; [EtOH2_Acetrn]=5,400 mg/mL; [EtOH2_MeOH]=6,150 mg/mL.

3.8.1 Ensaio de Folin-Ciocalteu

A presença de compostos fenólicos totais, foi determinada através da reação de Folin-Ciocalteu, que sendo uma reação específica para compostos com uma determinada característica estrutural (derivados fenólicos), é também uma avaliação da atividade antioxidante, pois os compostos fenólicos são geralmente redutores e sequestradores de radicais livres. O meio reacional foi preparado num tubo de ensaio, onde se adicionou 1500 µl de água destilada, 100 µl de amostra e 100 µl de reagente de Folin-Ciocalteu. Após 2

minutos adicionou-se 300 µl de solução carbonato de sódio, Na₂CO₃ a 20% (m/v). A reação foi incubada à temperatura de 40°C durante 30 minutos, após a qual se mediu a absorvância a um comprimento de onda de 675 nm. Para a realização da reta de calibração, seguiu-se o mesmo procedimento, apenas substituindo a amostra por diferentes concentrações de ácido gálico, variando de 0,4 µg/mL até 3,2 µg/mL. Desta forma, os compostos fenólicos totais das amostras foram expressos em equivalente de ácido gálico (GAE mg) / g de extrato.

3.8.2 Determinação da capacidade de captação de NO[•]

O método de captação de NO[•] pode ser considerado um método útil como primeiro “screening” do potencial anti-inflamatório das amostras em estudo, uma vez que este radical é um importante mediador no processo da inflamação.

As amostras utilizadas neste teste foram as que se encontram acima descritas. Partindo dessas amostras preparou-se diluições das mesmas, com os fatores de diluição 2, 5, 10, 20, 30, 50 e 80.

Numa placa *Multiwell* de 96 poços preparou-se o meio reacional, contendo 100 µl do padrão ou de amostra, adicionando-se em seguida 100 µL de nitroprussiato de sódio 3,33 mM (SNP) em tampão fosfato (pH= 7,4) e colocando a mistura sob luz fluorescente durante 10 min. Após este tempo, foram adicionados 100 µl de reagente de Griess e manteve-se a placa por 10 min no escuro. O NO[•] assim formado interage com o oxigênio molecular, produzindo NO²⁻ que, na presença de reagente de Griess (1% de sulfanilamida e 0,1% de cloreto de hidro-naftiletilenodiamina em 2,5% de ácido fosfórico) forma uma cor púrpura. As absorvâncias foram determinadas a 562 nm num leitor de placas (EON, Biotek) e o valor da concentração mínima necessária para inibir 50% (IC₅₀) da produção de NO[•] foi determinado, representando graficamente a percentagem de inibição da produção de nitritos vs. as concentrações testadas, sendo a percentagem de inibição calculada usando a equação de Yen e Duh (1994):

$$\text{Equação 3: \% Inibição} = \frac{\text{Abs controle} - \text{Abs extracto}}{\text{Abs controle}} \times 100$$

onde Abs controle é a absorvância da solução sem a adição de amostra, e Abs extrato é a absorvância das soluções com adição de extrato, lidas no final da reação. Os resultados apresentados representam a média ± desvio padrão de pelo menos 3 experiências efetuadas em duplicado. Para realização da reta de calibração, seguiu-se o mesmo

procedimento apenas substituindo a amostra por diferentes concentrações de ácido ascórbico, variando de 5 µg/mL até 350 µg/mL.

3.10 Análise Estatística

Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média de três ensaios independentes, realizados em duplicado e analisados através da ANOVA combinado com o teste de Tukey (GraphPad Prism 6). O nível de significância foi de $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

4.1 Rendimentos de extração

Com o objetivo de estudar os compostos fenólicos presentes no material vegetal, procedeu-se à realização de extrações em soxhlet (como apresentado na secção 3.3 dos Procedimentos Experimentais). O solvente escolhido foi o etanol pela sua elevada eficácia na extração destes compostos, quando utilizado a quente (Peschel *et al.*, 2006).

Como é possível observar na Tabela 2, o extrato EtOH1 apresentou um rendimento que, apesar de ser inferior a 50%, pode ser considerado favorável, tendo em conta que o respetivo cálculo foi realizado após a eliminação da clorofila, cujo processo inevitavelmente causa algumas perdas. Relativamente ao extrato etanólico EtOH2, o seu rendimento foi mais baixo que o do extrato anterior, tal como esperado. Neste caso, a amostra utilizada tinha sido previamente sujeita a uma extração de 8 horas, pelo que a maioria dos compostos terá sido extraída durante esse tempo e apenas uma pequena parte terá sido recuperada na segunda extração.

Tabela 2 - Rendimentos dos extratos etanólicos (EtOH1 e EtOH2) e das respetivas frações obtidas por extração com *n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona, e metanol.

Amostra	Massa extrato obtido (g)	Rendimento* (%)
EtOH1	54,706	44
EtOH1_Hex	1,119	2
EtOH1_Dic	2,745	5
EtOH1_Acett	2,833	5
EtOH1_Acetn	8,299	15
EtOH1_MeOH	37,475	69
EtOH2	7,988	6
EtOH2_Hex	1,09	14
EtOH2_Dic	0,130	2
EtOH2_Acett	1,397	17
EtOH2_Acetn	1,124	14
EtOH2_MeOH	1,09	14

*Os rendimentos de EtOH1 e EtOH2 foram calculados em relação à massa da amostra de planta (125,678 g), enquanto os rendimentos das frações foram calculados em relação à massa do extrato EtOH1 ou EtOH2.

Os dois extratos etanólicos foram ainda sujeitos a um fracionamento sequencial a quente com solventes de diferentes polaridades (*n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona e metanol), com o intuito de se obterem frações enriquecidas em diferentes

compostos. De entre as diversas frações, é possível verificar que EtOH1_MeOH foi a que mostrou melhor rendimento (69%). Por oposição, as frações EtOH1_Hex e EtOH2_Dic foram as que apresentaram rendimentos mais baixos, ambas com 2.

4.2 Análise dos extratos etanólicos e frações apolares de *G. robertianum* por GC-MS

Posteriormente, a análise de GC-MS foi efetuada nos extratos etanólicos (EtOH1 e EtOH2) e às suas respetivas frações apolares (EtOH1_Hex/EtOH1_Dic e EtOH2_Hex/EtOH2_Dic), com o objetivo de identificar os seus compostos voláteis. Esta análise não foi efetuada às frações obtidas com acetato de etilo, acetona e metanol, uma vez que presumivelmente, essas frações deverão ser preferencialmente ricas em compostos mais polares, cuja análise é passível de ser efetuada pela técnica de UHPLC-DAD-ESI-MSⁿ. Em geral, a análise de GC-MS permitiu concluir que os extratos etanólicos EtOH1 e EtOH2 possuíam na sua composição álcoois, monossacarídeos, ácidos carboxílicos e ácidos gordos. Os perfis cromatográficos dos extratos brutos podem ser consultados na Figura 11 e os compostos identificados encontram-se resumidos na Tabela 3.

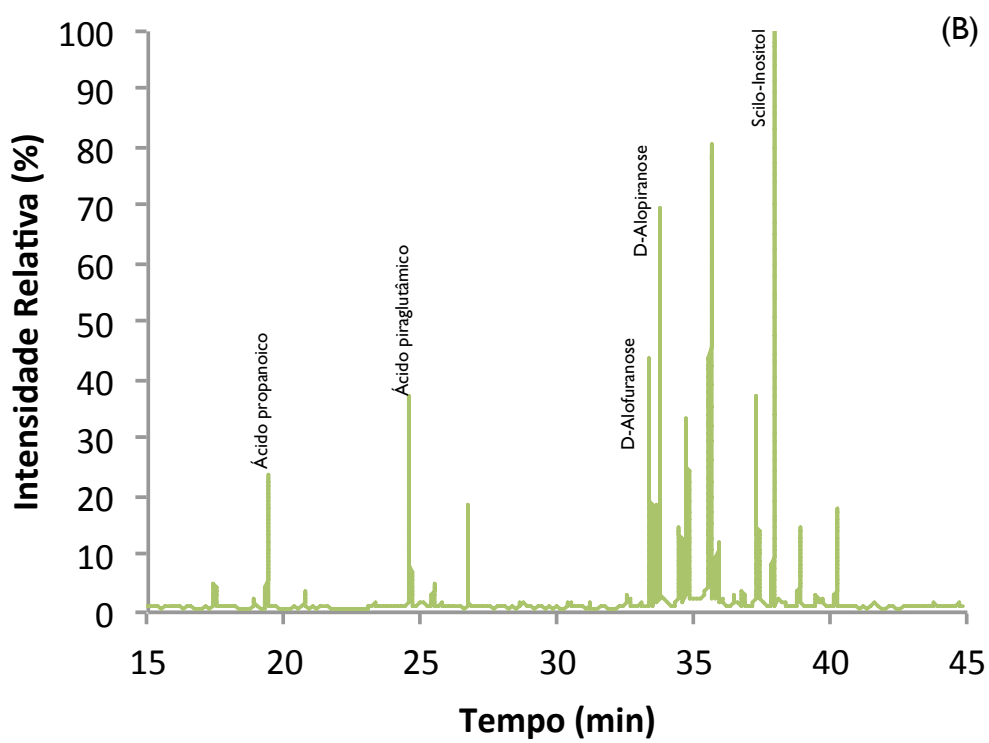
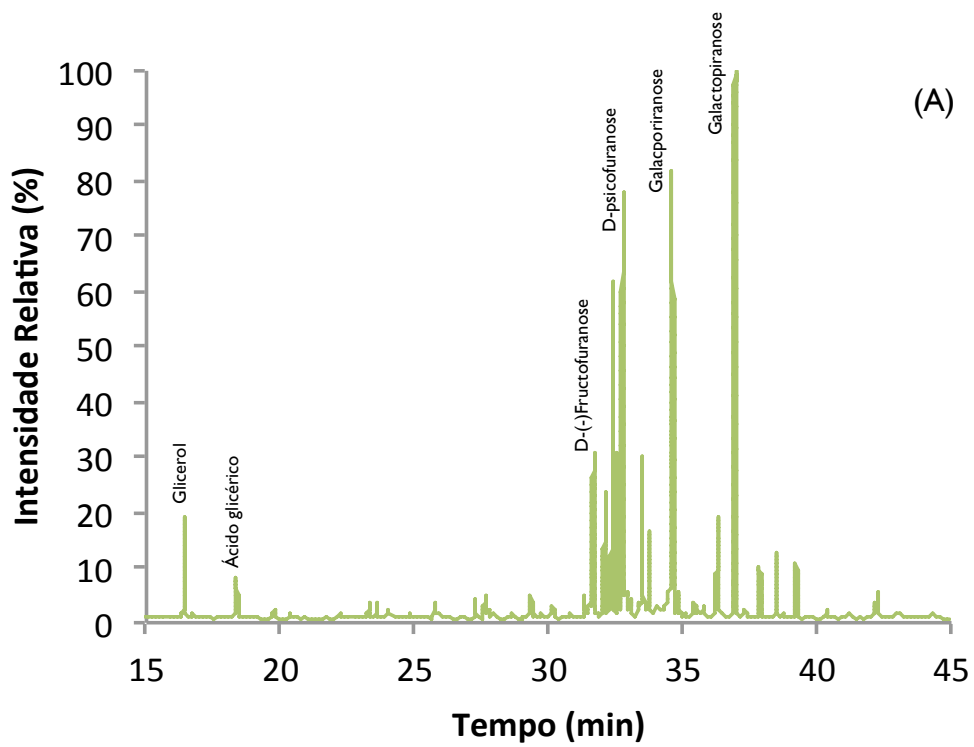


Figura 11 - Perfil de GC-MS dos extratos etanólicos EtOH1 (A) e EtOH2 (B).

Relativamente à composição dos extratos EtOH I e EtOH2 (ver Tabela 3), verificou-se que, para ambos os casos, os monossacarídeos são os compostos predominantes.

Tabela 3 – Compostos identificados nos extratos EtOH1 e EtOH2, através da análise de GC-MS.

Tempo de Retenção (min)	Identificação	EtOH1	EtOH2
ÁLCOOIS			
16,40	Glicerol	✓	✓
37,80	Scilo-Inositol	✗	✓
39,20	Mio-Inositol	✓	✓
MONOSSACARÍDEOS			
27,60	β-L-Monopirano	✓	✗
29,35	β-L-Monopirano	✓	✗
32,30	D-Psicofuranose	✓	✓
32,55	D-(-)-Fructofuranose	✓	✗
32,55	D-(-)-Tagatofuranose	✗	✓
33,45	D-Alofuranose	✗	✓
33,45	β-D-Galactofuranose	✓	✗
34,60	α-D-Manopirano	✗	✓
34,60	Galactopirano	✓	✗
34,85	α-D-Alopirano	✓	✓
36,90	Galactopirano	✓	✗
ÁCIDOS CARBOXÍLICOS			
18,30	Ácido glicérico	✓	✗
19,35	Ácido propanóico	✗	✓
23,55	Ácido málico	✗	✓
24,45	Ácido piroglutâmico	✗	✓
32,75	Ácido xiquímico	✓	✓
ÁCIDOS GORDOS			
38,45	Ácido palmítico	✓	✗
42,30	α-Ácido linoleico	✓	✗

No extrato EtOH1 os monossacarídeos mais abundantes são a galactopirano (36,90 min), a D-(-)-fructofuranose (32,55 min) e a D-psicofuranose, enquanto no extrato EtOH2 os principais monossacarídeos são a D-alofuranose e a α-D-alopirano. Contudo, é de referir que no extrato EtOH2 o pico de maior intensidade corresponde ao álcool scilo-inositol, que não foi detetado no extrato EtOH1. Os inositóis são poliálcoois constituídos por seis carbonos em forma de anel, com um grupo hidroxilo em cada posição de carbono

(Ma, Thomason e McLaurin, 2012). Existem 9 estereoisômeros de inositol, classificados de acordo com as diferentes orientações dos grupos hidroxilo, sendo o mio-inositol (presente em ambos os extratos) o estereoisômero mais abundante na natureza.

Relativamente à composição em ácidos carboxílicos, observou-se uma quase ausência destes compostos no extrato EtOH1, tendo sido apenas identificado o ácido glicérico (18,30 min). Contudo, na extração EtOH2 verificou-se com alguma intensidade o ácido propanóico e o ácido piroglutâmico. Relativamente aos ácidos gordos, foi possível verificar que a extração EtOH2 não continha este tipo de compostos, ao contrário do extrato EtOH1 que apresentou dois ácidos gordos na sua composição, o ácido palmítico e o α -ácido linoléico.

Tal como descrito anteriormente, a composição das frações EtOH1_Hex e EtOH2_Hex foi também investigada. Os cromatogramas obtidos na análise destas duas frações encontram-se representados na Figura 12. Os resultados obtidos indicam a presença de poucos compostos, observando-se maioritariamente ácidos gordos.

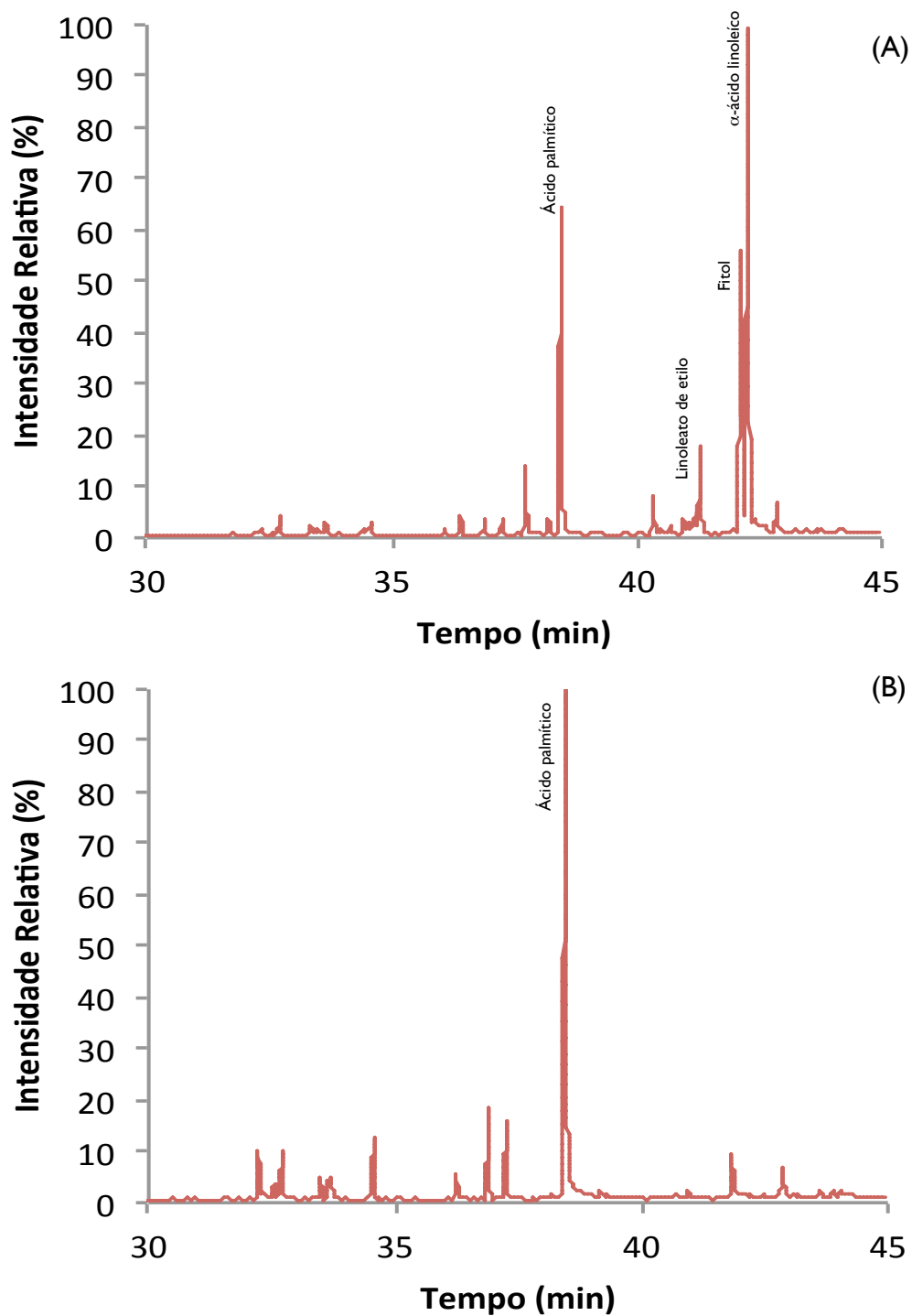


Figura 12 – Perfil de GC-MS das frações de hexano, EtOH1_Hex (A) e EtOH2_Hex (B).

As frações de hexano eram na sua maioria ricas em ácidos gordos, como se pode observar na Tabela 4, sendo um dos compostos com maior intensidade e presente em ambas as frações, o ácido palmítico (38,40 min).

Tabela 4- Compostos identificados nas frações EtOH1_Hex e EtOH2_Hex, através da análise de GC-MS.

Tempo de Retenção (min)	Identificação	EtOH1_Hex	EtOH2_Hex
ÁLCOOIS			
32,35	1-Hexadecanol	x	✓
40,40	9-octadecen-1-ol	✓	x
42,00	Fitol	✓	x
MONOSSACARÍDEOS			
33,60	α -D-Manopiranoose	✓	x
36,85	D-Lixose	x	✓
36,90	β -D-Glucopiranoose	✓	x
ÁCIDOS CARBOXÍLICOS			
32,70	Ácido xiquímico	✓	x
ÁCIDOS GORDOS			
36,10	Ácido pentadecanóico	✓	x
38,40	Ácido palmítico	✓	✓
41,10	Linoleato de etilo	✓	x
42,20	α -Ácido linoleico	✓	x
42,90	Ácido esteárico	✓	x

Porém a fração EtOH1_Hex apresentou ainda um ácido gordo como maioritário, α -ácido linoleico. É de salientar que a fração de EtOH1_Hex possui na sua composição bastantes ácidos gordos, pois este fracionamento foi efetuado com *n*-hexano, um solvente extremamente apolar, assim como os ácidos gordos. Em relação à fração EtOH2_Hex, esta possuía uma menor diversidade de ácidos gordos, provavelmente por estes terem sido, na sua maioria, solubilizados no primeiro extrato de etanol. Relativamente aos álcoois, na fração EtOH1, foi possível observar o 9-octadecen-1-ol e o fitol, anteriormente já identificados em amostras de *G. robertianum* (Pedro, Pais e Scheffer, 1992). No grupo dos ácidos carboxílicos apenas foi possível detetar um na fração EtOH1_Hex, sendo ele o ácido xiquímico.

As frações EtOH1_Dic e EtOH2_Dic também foram analisadas quanto à sua composição volátil. Os cromatogramas encontram-se representados na Figura 13. À semelhança do que se tem vindo a verificar, a amostra proveniente da segunda extração exibiu menos compostos voláteis e com menor intensidade.

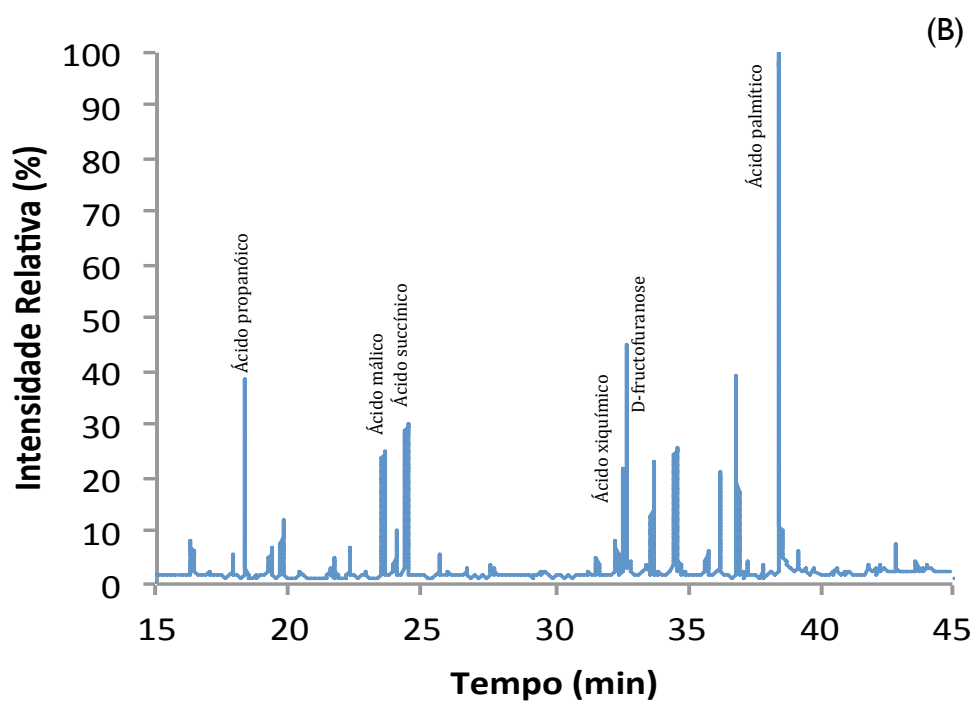
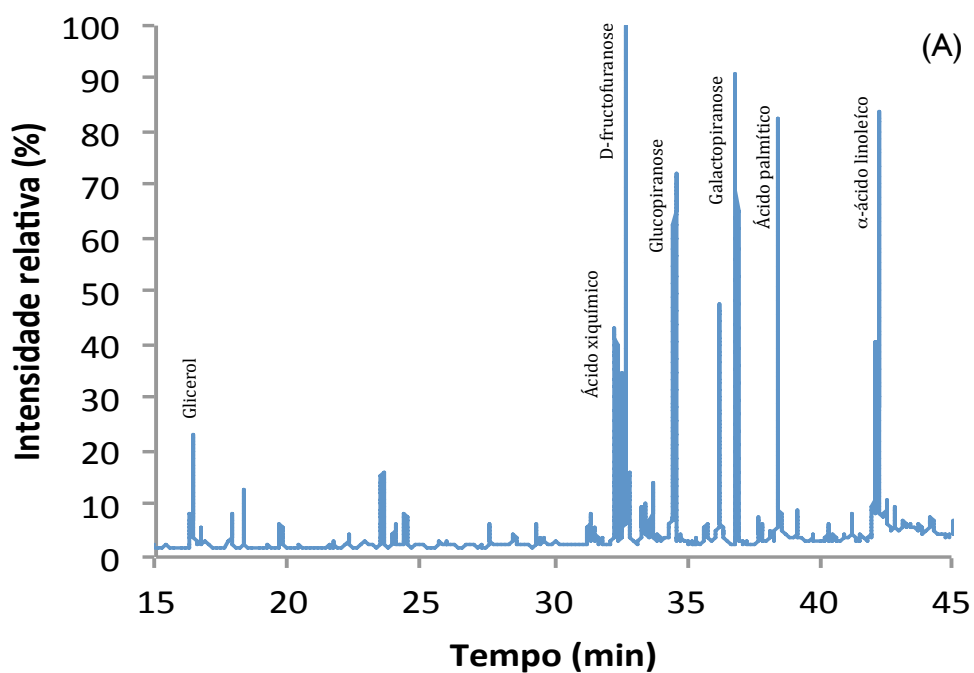


Figura 13 – Perfil de GC-MS das frações de diclorometano, EtOH1H_Dic (A) e EtOH2_Dic (B).

Os compostos identificados nas frações de diclorometano encontram-se resumidos na Tabela 5. Mais uma vez foi possível observar que a fração proveniente de EtOH2 possuía menor diversidade de compostos.

Tabela 5 – Compostos identificados nas frações EtOH1_Dic e EtOH2_Dic, através da análise de GC-MS.

Tempo de Retenção (min)	Identificação	EtOH1_Dic	EtOH2_Dic
ÁLCOOIS			
16,40	Glicerol	✓	✗
MONOSSACARÍDEOS			
32,70	D-fructofuranose	✓	✓
34,55	Glucopirranose	✓	✗
34,60	α -D-Talopirranose	✓	✗
36,90	Galactopirranose	✓	✓
ÁCIDOS CARBOXÍLICOS			
18,30	Ácido propanóico	✗	✓
23,50	Ácido málico	✓	✓
24,50	Ácido succínico	✗	✓
32,60	Ácido xiquímico	✓	✓
ÁCIDOS GORDOS			
38,45	Ácido palmítico	✓	✓
42,20	α -Ácido linoleico	✓	✗

Relativamente à composição das frações de diclorometano, foi possível observar que o composto correspondente ao principal sinal do cromatograma da fração EtOH2_Dic correspondia ao ácido palmítico (38,45 min), estando este composto também presente na fração EtOH1_Dic, embora com uma intensidade relativa inferior. Por sua vez, nesta fração, o sinal mais intenso correspondia à D-frutofuranose. Na realidade, a fração EtOH1_Dic era bastante rica em monossacarídeos, entre os quais a glucopirranose e a galactopirranose. Em EtOH2_Dic os ácidos carboxílicos foram os compostos que se encontraram com maiores intensidades, como foi o caso do ácido propanóico, o ácido málico, o ácido succínico e o ácido xiquímico.

Os estudos de *G. robertianum* através de GC-MS têm recebido menos atenção por parte de investigadores, do que os estudos por cromatografia líquida. Este facto deve-se à natureza volátil dos seus constituintes, que acarreta consigo uma análise mais complexa e extensa. O primeiro estudo que descreveu a composição de *G. robertianum*, através de uma extração com *n*-pentano, identificou como compostos maioritários o limoneno, geraniol e

fitol (Pedro, Pais e Scheffer, 1992). Desses três, foi possível verificar a existência de fitol em uma das amostras (EtOH1_Hex). Mais tarde, num estudo descrito por (Radulović, Dekić e Stojanović-Radić, 2012), com recurso a uma extração com éter dietílico, os autores identificaram ácidos gordos, apontando o ácido palmítico como composto mais abundante. De acordo com isso, esse ácido foi identificado neste trabalho nos extratos e na grande maioria das frações. Mais recentemente foi efetuado um outro estudo, com recurso a uma extração metanólica, tendo os autores também considerando o ácido palmítico como composto lipídico maioritário, a par do ácido dodecanóico e ácido linoleico (Zhao, 2014). Note-se que este último composto foi também detetado nos extratos e frações analisadas neste estudo.

Em suma, foram observadas diferenças entre todos os estudos efetuados. Tal facto pode-se dever-se não só à influência de fatores ambientais, variabilidade genética, mas também às condições de extração e tratamento das amostras efetuadas.

4.3 Análise dos extratos etanólicos e frações polares de *G. robertianum* por LC-MS

A técnica de UHPLC-DAD-ESI-MSⁿ foi utilizada com o objetivo principal de identificar os componentes fenólicos presentes nos extratos etanólicos (EtOH1 e EtOH2) e nas frações obtidas pela solubilização sequencial destes extratos com acetato de etilo, acetona e metanol (EtOH1_Acett, EtOH1_Acetn, EtOH1_MeOH, EtOH2_Acett, EtOH2_Acetn e EtOH2_MeOH), uma vez que se sabe que solventes são eficazes na solubilização de compostos fenólicos. Os perfis cromatográficos das amostras podem ser consultados na Figura 14 e Figura 15. Note-se que na sua maioria, apesar das variações de intensidades relativas dos picos eluídos, os cromatogramas dos extratos não apresentaram divergências significativas em relação aos compostos fenólicos aí presentes, indicando que no geral, os solventes utilizados não foram seletivos.

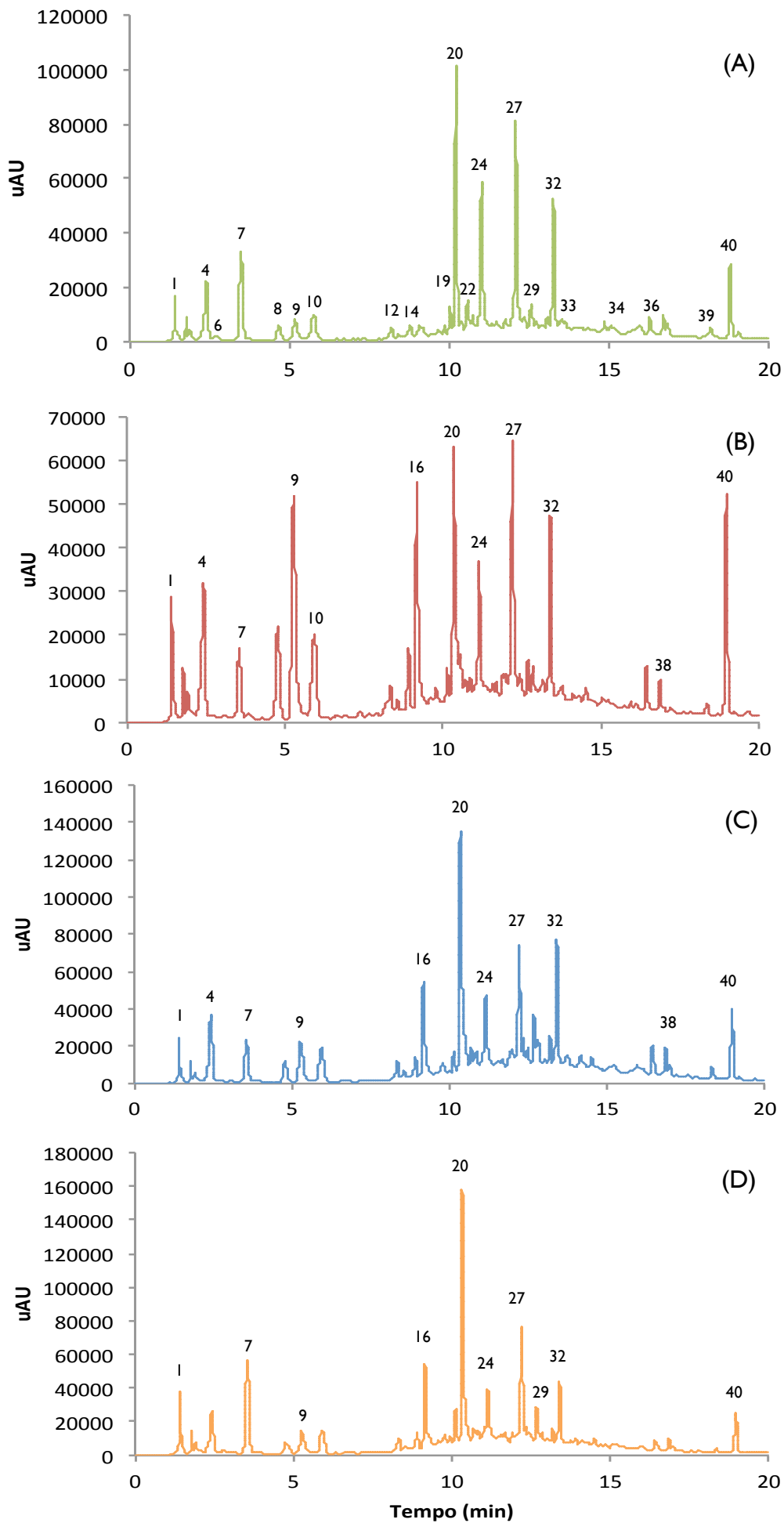


Figura 14 – Perfil cromatográfico a 280nm do extrato EtOHI (A) e das frações EtOHI_Acett (B), EtOHI_Acett (C) e EtOHI_MEHO (D).

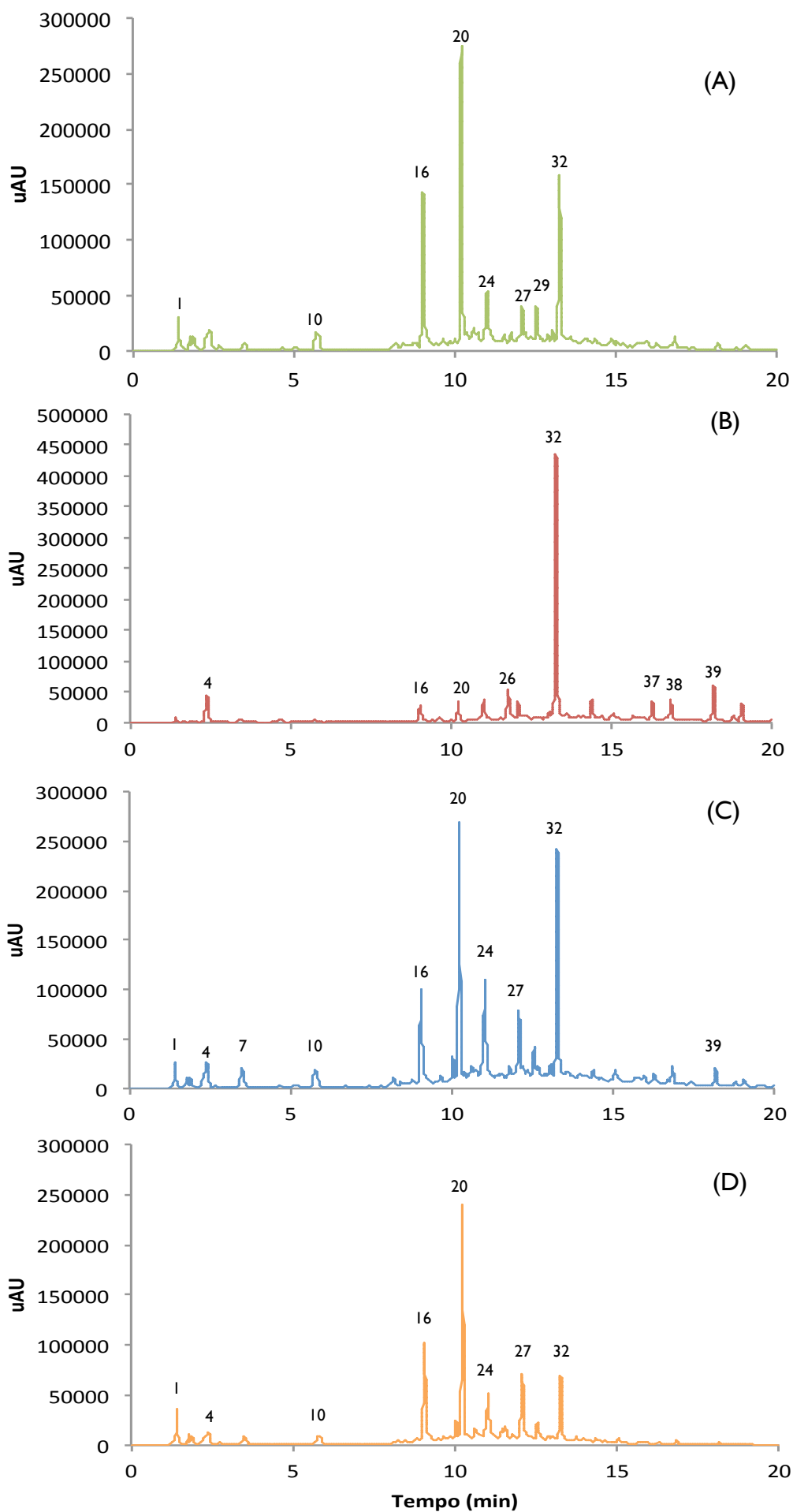


Figura 15 – Perfil cromatográfico a 280 nm do extrato EtOH2 (A) e das frações EtOH2_Acett (B), EtOH2_Acetrn (C) e EtOH2_MEOH (D).

Realça-se, no entanto, o facto de que, em comparação com o extrato EtOH1 (e respetivas frações), o extrato EtOH2 (e respetivas frações) possuía uma maior intensidade no sinal cromatográfico. Ainda, a intensidade dos picos principais no extrato EtOH2 (16, 20, 24 e 32) destacavam-se bastante da dos outros compostos presentes nessa amostra. Ainda, a fração solubilizada com acetato de etilo era claramente enriquecida no composto eluído aos 13,25 min (32).

A tabela 6 resume os compostos fenólicos dos extratos etanólicos e das frações de acetato de etilo, acetona e metanol, identificados tendo em consideração o seu tempo de eluição, o seu espectro de UV-Vis e o perfil de fragmentação na análise de UHPLC-DAD-ESI-MSⁿ. Deve no entanto salientar-se que, embora estes compostos tenham sido detetados na globalidade das amostras, a sua concentração é variável (como é notório pelas diferentes intensidades dos sinais cromatográficos das Figuras 14 e 15).

Em geral, a análise das amostras permitiu identificar na sua maioria taninos hidrolisáveis e ácidos fenólicos. Em seguida, será efetuada uma descrição da composição química detalhada destes compostos, tendo em foco a amostra EtOH1, uma vez que esta era uma das mais representativas em termos de rendimento (44% /g planta seca).

Tabela 6 - Identificação dos compostos através de UHPLC-DAD-ESI-MSⁿ

Pico	Tempo de Retenção (min)	$\lambda_{\text{máx}}$	[M-H] ⁻	ESI-MS ²	ESI-MS ³	Composto
			133	115	71	Ácido málico
1	1,41	209	173	155 , 111, 93, 143	Sem sinal	Ácido Quínico di-hidratado
			191	127 , 173, 85, 111	85, 109	Ácido quínico
2	1,76	205, 271	290	200 , 272, 128, 170	127, 153	Desconhecido
3	1,88	206, 276	331*	169 , 271, 193, 211	125, 169	Monogaloil-hexose
4	2,3	214, 273	343	191 , 169	125, 173, 85	Ácido galoil-quínico (isómero)
5	2,39	214, 271	169	125	81, 97	Ácido gálico
6	2,75	293	343	191 , 169	125	Ácido galoil-quínico (isómero)
7	3,48	214, 284	487	469 , 331, 325	451, 331	Derivado de ácido gálico hexose
8	4,67	204, 259, 293	153*	109	Sem sinal	Ácido protocatecuíco
9	5,17	211, 273	483	271 , 193, 465	211, 169	Digaloil-hexose
			318	182 , 210, 240, 300, 153	126, 112, 154	Desconhecido
10	5,75	214, 324	353*	191 , 179, 135	127, 173, 85	Ácido <i>trans</i> 3-O-Cafeoilquínico
11	8,07	277, 312	337	163 , 191	119	Ácido p-coumaroil-quínico

12	8,18	221, 276	483*	271 , 193, 465, 313	Sem sinal	Digaloil-hexose (isómero)
13	8,4	226, 276	483	271 , 193, 465, 313	Sem sinal	Digaloil-hexose (isómero)
14	8,76	231, 282	483	271 , 331, 313, 439	211, 169	Digaloil-hexose (isómero)
15	9,07	282, 324	367	193	134, 149	Ácido feruloil-quínico
16	9,17	236, 290, 325	353	173 , 179, 191	93, 111, 155	Ácido 4-O- Cafeloilquínico
17	9,67	276	635	465 , 423, 483, 617	271, 211, 193	Trigaloil-hexose
18	9,83	240, 273	1078	890 494 , 530	Sem sinal	Derivado do ácido gálico
19	10,01	262	444*	354 , 299, 426	310, 354	Desconhecido
20	10,19	220, 267	633*	301 , 463, 275	257	Hidroxidifenilenogaloil- hexose (corilagina)
21	10,38	276	951	933	301, 299, 273	Geranina
22	10,57	230, 276	935	301 , 765, 463	257, 229	Galoil-bis-HHDP- hexose
23	10,74	274	635	465 , 483	313, 169, 295	Trigaloil-hexose
			605	453 , 291	291, 393, 247	Derivado do ácido da brevifolina
24	11,00	276, 351	247*	219	191, 173, 147	Brevifolina
25	11,46	253	433*	301	257	Ácido elágico hexose

26	11,74	273	197	169	125	Ácido Siríngico
27	12,07	253, 367	301*	257	257, 229, 185	Ácido Elágico
28	12,34	265, 324, 345	609	301, 343	179, 151, 257, 273	Rutina
			393*	317, 169	Sem sinal	Derivado do ácido benzóico
29	12,55	270, 342	907	633, 435, 605, 587, 737	301, 463, 275	Derivado da Hidroxidifenilenogaloil-hexose
			593	285, 429	257, 151, 241	Kaempferol hexose-deoxihexose
30	12,70	262, 301	463	301	179, 151, 257	Quercetina hexose
			593	285, 429, 257	151, 257	Kaempferol hexose-desoxihexose
31	13,05	277	363	319	273, 229, 291	Desconhecido
			939	769	Sem Sinal	Pentagaloil-hexosídeo
32	13,25	276, 353	997	633, 953	301, 463, 275	Derivado da Hidroxidifenilenogaloil-hexose
			319*	273	245, 229	Desconhecido
33	13,49	244, 276	997	301, 633, 907	Sem sinal	Derivado da Hidroxidifenilenogaloil-hexose

34	15,04	246, 273	979	301, 507, 809	257	Derivado da Hidroxidifenilenogaloil- hexose
35	15,94	277, 335	1025	633, 979, 301	301, 463, 275	Derivado da Hidroxidifenilenogaloil- hexose
			391	345, 303, 317	317, 299	Desconhecido
36	16,25	248, 288	1025	633, 979	301, 463, 275	Derivado da Hidroxidifenilenogaloil- hexose
37	16,69	255, 368	301	179, 151	151	Quercetina
38	16,81	277	1025	979, 855	951, 809, 615, 507, 301	Derivado da Hidroxidifenilenogaloil- hexose
39	18,15	247, 285	391*	345, 319	317, 301	Desconhecido
40	18,77	265, 367	285*	151	Sem sinal	Luteolina

*Indica a presença de adutos 2[M-H] no espectro de ESI-MS

Tal como se pode observar na Tabela 6, os ácidos orgânicos foram co-eluídos no início da corrida (1,41 min), devido à sua grande afinidade com solventes aquosos. Dentro deste grupo de compostos foram identificados o ácido málico, considerando o perfil de fragmentação característico $[M-H]^- = m/z 133 \rightarrow 115$, onde o fragmento principal do espectro de ESI-MS² corresponde à perda de uma molécula de água (Mendonça *et al.*, 2008). Adicionalmente foram ainda detetados o ácido quínico di-hidratado ($[M-H]^- = m/z 173$) e o ácido quínico ($[M-H]^- = m/z 191$), cujas fragmentações corresponderam igualmente às anteriormente descritas na literatura ($[M-H]^- = m/z 173 \rightarrow 155$ e $[M-H]^- = m/z 91 \rightarrow 127$ para o ácido quínico-di-hidratado e ácido quínico, respetivamente) (Ng, Lafontaine e Vanier, 2004).

Na amostra EtOH1 (e restantes) foram também detetados ácidos benzóicos, nomeadamente o ácido gálico ($t_R = 2,39$ min), que foi identificado de acordo com o seu $UV_{máx}$ a 271 nm e um ião molecular a $m/z 169$, com um fragmento base no espectro de ESI-MS² a $m/z 125$ (Romani, Campo e Pinelli, 2012). Em adição, foi ainda identificado o ácido protocatecuico, que apresentou um ião molecular a $m/z 153$ e um padrão de fragmentação $[M-H]^- = m/z 153 \rightarrow 109$, correspondente à perda de -44 Da, i.e., um grupo carboxílico (Sánchez-Rabaneda *et al.*, 2003), bem como o ácido siríngico ($[M-H]^- = m/z 197$ com um fragmento base no espectro de ESI-MS² a $m/z 169$ (-28 Da)) (Torre, La *et al.*, 2006).

Dentro dos ácidos hidroxicinâmicos foram identificados compostos derivados do ácido quínico com o ácido cafeico, o ácido ferúlico e o ácido cumárico. Em maior detalhe, os derivados de ácido cafeico, que apresentaram um $UV_{máx}$ de 290 e 320 nm, foram identificados como *trans* 3-O-cafeoilquínico (t_R aos 5,17 min), e o seu isómero ácido 4-O-cafeoilquínico (t_R aos 9,17min). A identificação dos dois isómeros foi efetuada com base na diferente fragmentação destes compostos, tal como descrito na literatura (Bastos *et al.*, 2007). De facto, o ácido *trans* 3-O-cafeoilquínico ($[M-H]^- = m/z 353$) apresenta como padrão de fragmentação $[M-H]^- = m/z 353 \rightarrow 191$, correspondente à perda de um ácido cinâmico (-162 Da), enquanto o ácido 4-O-cafeoilquínico, apresenta como principal ião fragmento no seu espectro de ESI-MS² o ião a $m/z 173$, que é originado a partir de uma molécula de ácido cinâmico e de água (-180 Da), como se pode verificar na Figura 16.

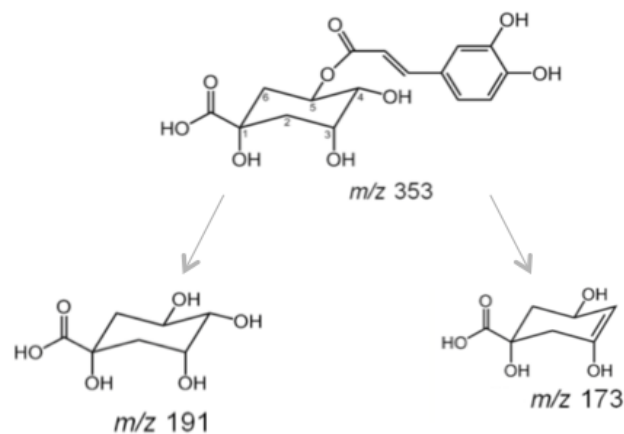


Figura 16 - Padrão de fragmentação do ácido cafeoilquínico ($[M-H]^- = m/z 353 \rightarrow 191$ e $[M-H]^- = m/z 353 \rightarrow 173$), para o isômero ácido *trans* 3-*O*-cafeoilquínico e para o isômero ácido 4-*O*-cafeoilquínico, respectivamente. Nota: a figura não tem em consideração as orientações dos grupos funcionais das moléculas identificadas.

Tal como foi referido acima, a amostra de EtOHI (e outras) continham também o ácido feruloil-quínico, com $UV_{\text{máx}}$ 282 e 324 nm e um padrão de fragmentação $[M-H]^- = m/z 367 \rightarrow 193$, e ainda o ácido *p*-cumaroil-quínico com um ião molecular a $m/z 337$ ($UV_{\text{máx}}$ 277 e 312 nm e um fragmento base no espectro de ESI- MS^2 a $m/z 193$).

O extrato EtOHI (e as outras amostras) possuía também vários flavonóides, em particular flavonóis e flavonas. Dentro dos primeiros, foi detetado na amostra um derivado do kaempferol, cujo pico cromatográfico apresentou absorvância máxima a 270 e 342 nm. Este composto ($[M-H]^- = m/z 593$) foi identificado como kaempferol hexose-desoxihexose uma vez que o seu padrão de fragmentação mostrou como fragmento principal no espectro de ESI- MS^2 o ião a $m/z 285$, originado pela perda neutra de 308 Da (correspondente à perda simultânea de hexose e desoxihexose) e a $m/z 429$ (-164 Da, correspondente à quebra tipo Z de uma desoxihexose) (Zhu, Dong e Guo, 2015). A análise de ESI-MS permitiu ainda verificar a existência de vários isómeros deste composto no extrato (Figura 17), tendo a análise de ESI- MS^2 sido efetuada aos isómeros eluídos aos t_R de 12,55 e 12,77 min e discriminada na Tabela 6.

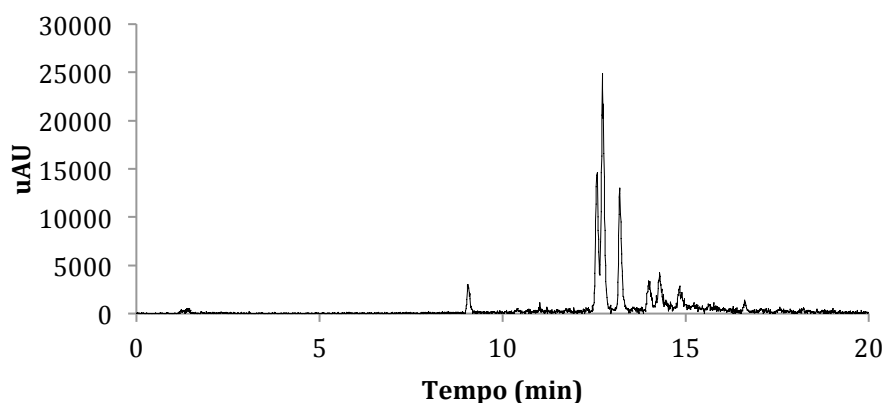


Figura 17 - TIC obtido por UHPLC-DAD-ESI- MS^n do kaempferol hexose-deoxihexose ($[M-H]^- = m/z 593$).

Para além dos derivados de kaempferol, os flavonóides identificados englobaram a quercetina ($t_R = 16,60$ min, $UV_{\text{máx}}$ de 255 e 368 nm e perfil fragmentação $[M-H]^- = m/z 301 \rightarrow 179$), a quercetina hexose ($t_R = 12,70$ min, $[M-H]^- = m/z 463 \rightarrow 301$) e a rutina ($t_R = 12,34$ min, $[M-H]^- = m/z 609 \rightarrow 301$). Por outro lado, a luteolina ($t_R = 18,77$ min, $UV_{\text{máx}}$ de 265 e 367 nm, e $[M-H]^- = m/z 285$) foi a única flavona detetada na amostra através da análise ESI-MSⁿ.

No entanto, como anteriormente referido, os principais compostos presentes no extrato etanólico EtOHl eram taninos hidrolisáveis, incluindo galotaninos e elagitaninos. Dentro do primeiro grupo foram detetados a monogaloil-hexose ($t_R = 1,88$ min, $[M-H]^- = m/z 331$) e várias formas isoméricas da digaloil-hexose, $[M-H]^- = m/z 483$, nomeadamente aos $t_R = 5,17, 8,18, 8,40$ e $8,76$ min ($[M-H]^- = m/z 483 \rightarrow 271$) (Figura 18) (Mammela *et al.*, 2000; Tuominen *et al.*, 2013).

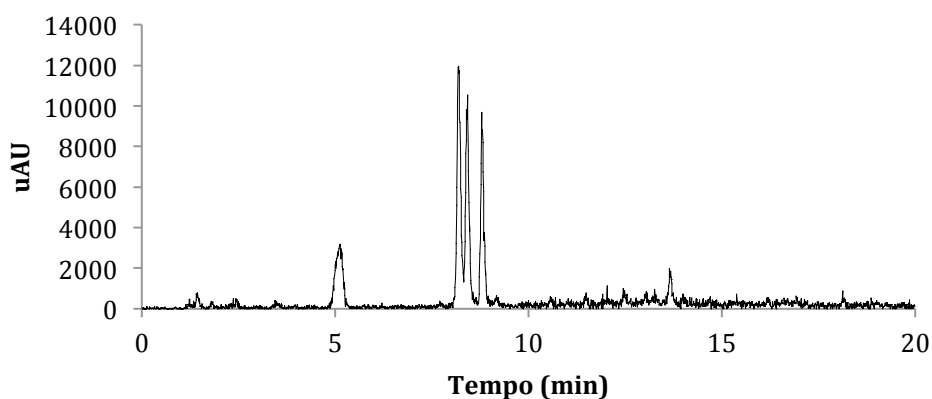


Figura 18 - TIC obtido por UHPLC-DAD-ESI-MSⁿ da digaloil-hexose ($[M-H]^- = m/z 483$).

A análise de ESI-MS permitiu ainda identificar outros galotaninos na amostra, designadamente o trigaloil-hexose ($[M-H]^- = m/z 635$) eluído aos 9,67 min e o pentagaloil-hexose ($t_R = 13,05$ min, $UV_{\text{máx}}$ 277 nm e um padrão de fragmentação $[M-H]^- = m/z 939 \rightarrow 769$ (-170 Da)). O composto $[M-H]^- = m/z 635$ foi identificado como trigaloil-hexose, uma vez que para além do seu espectro de UV compatível com este composto, o seu padrão de fragmentação mostrou como fragmento principal no espectro de ESI-MS² o ião a $m/z 456$, correspondente à perda de um ácido gálico (-170 Da) (Figura 19) (Salminen *et al.*, 1999).

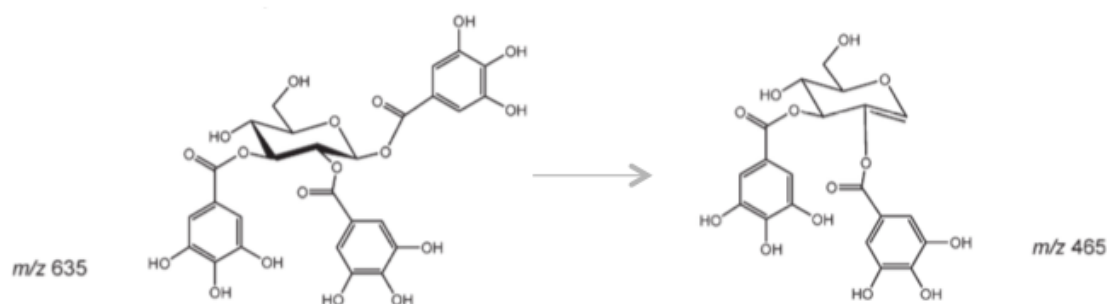


Figura 19- Padrão de fragmentação $[M-H]^- = m/z\ 635 \rightarrow 465$.

Dentro dos taninos hidrolisáveis, foram detetados elagitaninos como o ácido elágico ($t_R = 12,07$ min e $UV_{máx} = 253$ e 367 nm) e ácido elágico hexose ($t_R = 11,46$ min), $[M-H]^- = m/z\ 301$ e $[M-H]^- = m/z\ 433$ respetivamente (Zhu, Dong e Guo, 2015). Identificou-se ainda a hidroxidifenileno-galoil-hexose ($[M-H]^- = m/z\ 633$) e alguns derivados. De facto, o composto $[M-H]^- = m/z\ 633$ ($t_R = 10,19$ min), apresentou um padrão de fragmentação de $[M-H]^- = m/z\ 633 \rightarrow 301$ (ácido elágico) e um espetro de $UV_{máx} = 220$ e 267 nm, que é consistente com dados bibliográficos anteriores (Graça, Ferreira e Santos, 2016). Durante a análise foi possível verificar diversos derivados deste elagitanino, como por exemplo galoil-bis-HHDP-hexose ($[M-H]^- = m/z\ 935$), e outros derivados, ainda que a sua estrutura não tenha sido possível esclarecer i.e. $[M-H]^- = m/z\ 907$, $[M-H]^- = m/z\ 997$, $[M-H]^- = m/z\ 979$ e $[M-H]^- = m/z\ 1025$ (Figura 20).

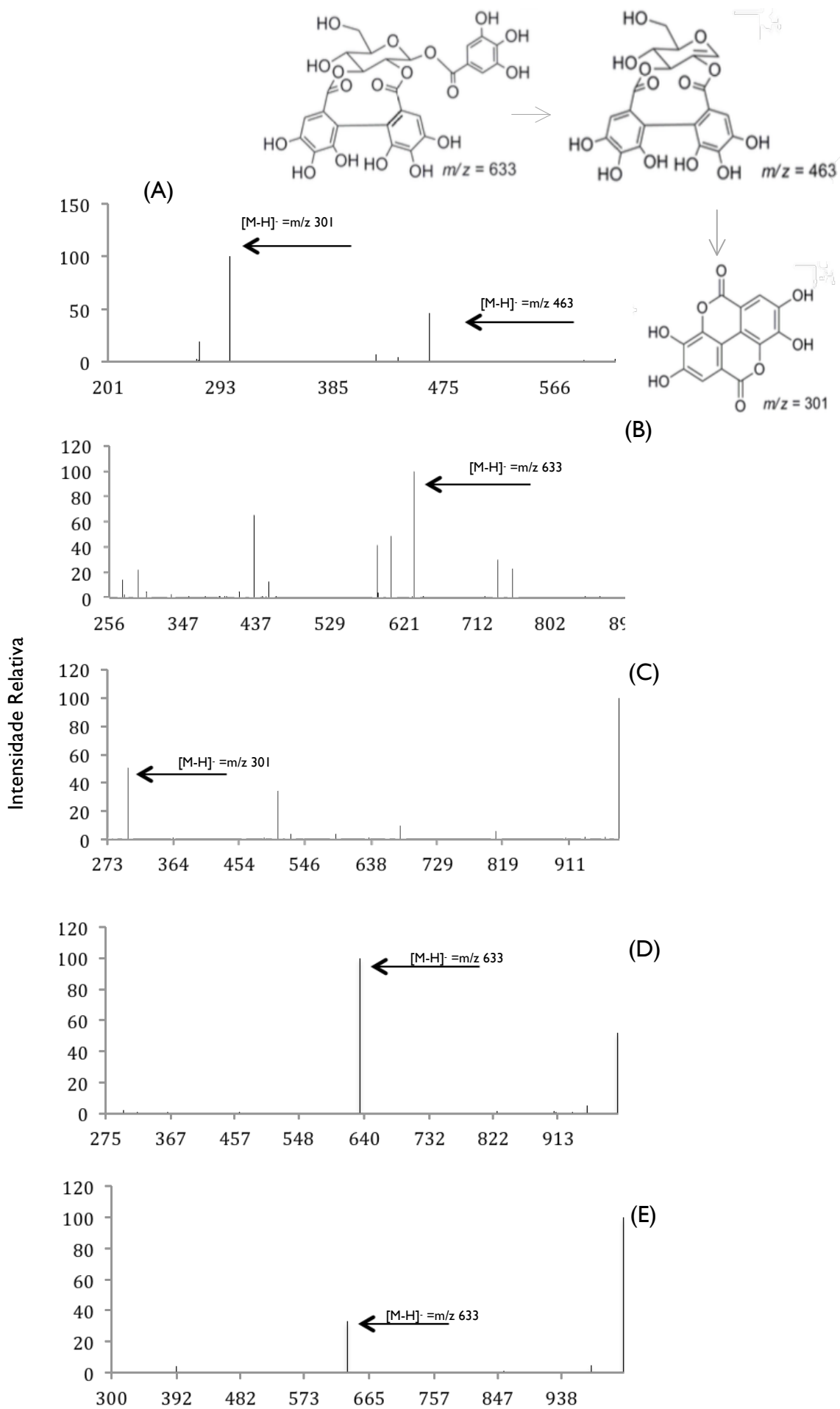


Figura 20 - Padrões de fragmentação dos derivados de hidroxidifenilnagalol-hexose. (A) - $[M-H]^- = m/z 633$, (B)- $[M-H]^- = m/z 907$, (C)- $[M-H]^- = m/z 979$, (D)- $[M-H]^- = m/z 997$ e (E)- $[M-H]^- = m/z 1025$.

Como se pode averiguar na Figura 20, o composto $[M-H]^- = m/z 907$, detetado ao $t_R=12,55$ min, apresentou como principal ião fragmento no espectro de ESI-MS² o ião a $m/z 633$, bem como os derivados $[M-H]^- = m/z 997$ e $[M-H]^- = m/z 1025$. Apenas o derivado $[M-H]^- = m/z 979$ apresentou como fragmento maioritário no espectro de ESI-MS² o ião a $m/z 301$. Estes resultados, em conjunto com o espectros de UV dos respetivos picos cromatográficos ($UV_{m\acute{a}x} \cong 270$ nm) permitem sugerir que todos estes compostos são derivados da hidroxidifenilenogaloil-hexose (corilagina). É ainda de referir que a análise de LC-MS permitiu ainda verificar a existência de vários isómeros de alguns dos compostos derivados da corilagina, nomeadamente dos compostos $[M-H]^- = m/z 997$ e $[M-H]^- = m/z 1025$, como é possível verificar na Figura 21.

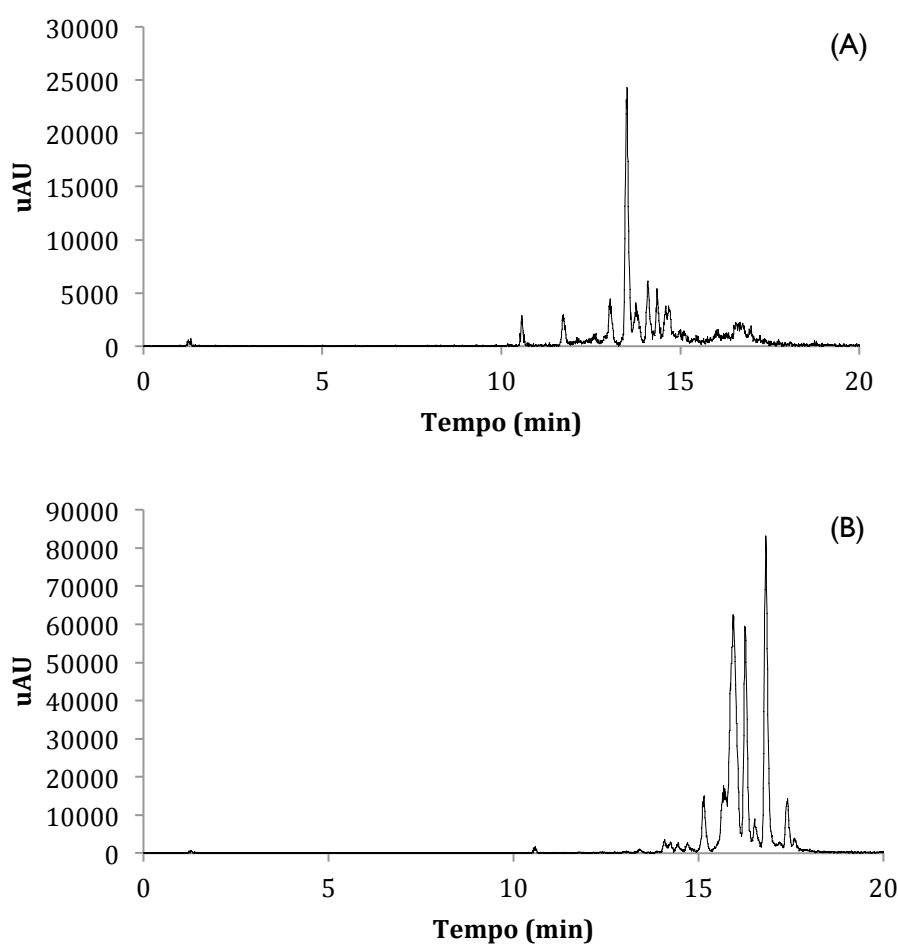


Figura 21 - TIC obtido por UHPLC-DAD-ESI-MSⁿ dos compostos derivados da corilagina, $[M-H]^- = m/z 997$ (A) e $[M-H]^- = m/z 1025$ (B).

O composto $[M-H]^- = m/z 997$ apresentou mais de dois isómeros, no entanto na Tabela 6 estão apresentados os maioritários ($t_R= 13,05$ min e $t_R= 13,49$ min). O composto $[M-H]^- = m/z 1025$ apresentou os isómeros maioritários aos $t_R=15,94$ min, $t_R=16,25$ min e

$t_R=16,81$ min, como se encontra descrito na Tabela 6. Por fim, identificou-se ainda a geranina, um elagitanino ($[M-H]^- = m/z 951$, $UV_{m\acute{a}x}= 276$ nm) eluído ao $t_R= 10,38$ min. Este composto $[M-H]^- = m/z 951$ apresentou como fragmento principal no espectro de ESI-MS² o ião a $m/z 933$, originado pela perda de uma molécula de água (-18 Da) (Tuominen *et al.*, 2013).

Curiosamente, em adição aos compostos anteriormente descritos, o extrato EtOH1 (e outras amostras) demonstraram possuir compostos fenólicos menos comumente descritos nas plantas, incluindo a isocumarina brevifolina ($t_R = 11,00$ min, $UV_{m\acute{a}x}$ a 276 e 351 nm, o seu perfil de fragmentação foi $[M-H]^- = m/z 247 \rightarrow 219$) e um derivado do ácido carboxílico da brevifolina, co-eluído no $t_R = 10,74$ min e $[M-H]^- = m/z 605$. O espectro de ESI-MS² deste composto demonstrou um ião base a $m/z 453$, que sugere a perda de um grupo galoil (-152 Da), o espectro ESI-MS³ por sua vez apresentou o ião base a $m/z 291$ o que indica a perda de uma hexose (-162 Da).

Ainda, é importante realçar que o pico cromatográfico (32) eluído aos 13,25 minutos apresentou um espectro de UV-Vis muito semelhante ao da brevifolina, sugerindo que o composto aí eluído pertence à mesma família de compostos (Figura 22).

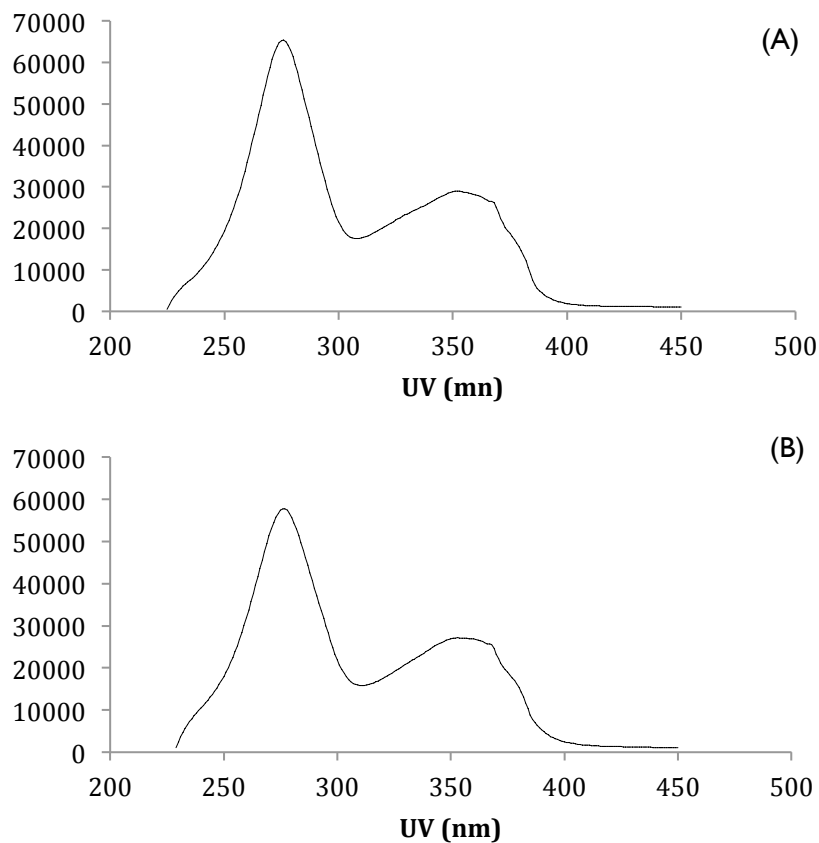


Figura 22 – Espectros de UV da brevifolina (A) e do composto $[M-H]^- = m/z 319$ (B).

Como é possível observar nas Figuras 14 e 15, este pico é dos mais abundantes no extrato EtOH1 (e em diversas frações), sugerindo assim que ele seja um dos compostos fenólicos maioritários na planta *G. robertianum* e nos seus extratos etanólicos. A análise de ESI-MSⁿ deste composto indicou a presença do ião molecular a m/z 319, juntamente com o aduto $2[M-H]^-$ a m/z 639. O composto $[M-H]^- = m/z$ 319 apresentou um padrão de fragmentação $[M-H]^- = m/z$ 319 \rightarrow 273, que por sua vez possuía o ião a m/z 247 (-28 Da) no espectro ESI-MS³, podendo esta perda corresponder à libertação de uma molécula de monóxido de carbono (CO).

Após uma breve análise a todos os compostos fenólicos identificados no estudo, foi possível verificar que alguns já se encontram descritos por outros autores no género *Geranium*, nomeadamente os compostos ácido galoil-quínico, ácido elágico e a isocumarina brevifolina, anteriormente descritos por Okuda, Yoshida e Mori, (1975). Os taninos hidroxidifenilengaloil-hexose e geranina foram relatados por Okuda, Yoshida e Nayeshiro, (1976). Quanto aos flavonóides kampferol e quercetina, estes foram descritos mais tarde por Markham, Mitchell e Boase, (1997). Relativamente aos galoil-hexosídeos, digaloil-hexose e o trigaloil-hexose, estes foram já identificados na espécie de *Geranium thunbergii* por Ishimaru e Shimomura, (1991). Contudo, que seja do conhecimento do autor, compostos como $[M-H]^- = m/z$ 290, $[M-H]^- = m/z$ 318, $[M-H]^- = m/z$ 444, $[M-H]^- = m/z$ 363, $[M-H]^- = m/z$ 319 e $[M-H]^- = m/z$ 391 não se encontram descritos neste género botânico.

4.4 Purificação de compostos fenólicos da fração acetato de etilo de *G. robertianum* (EtOH2_Acett)

Na análise de HPLC selecionou-se a coluna Spherisorb na tentativa de isolar compostos para posterior análise de RMN, com particular interesse no composto $[M-H]^- = m/z$ 319. De modo a obter informações relativas à estrutura do composto e possibilitar a sua identificação. A fim de obter maiores quantidades de composto $[M-H]^- = m/z$ 319, escolheu-se a fração de EtOH2_Acett. Esta escolha foi efetuada tendo em consideração a intensidade do composto de interesse nesta amostra, em relação aos restantes compostos (Figura 15). Verificou-se que o perfil obtido para a fração referida é diferente dos anteriores. Estas observações podem estar relacionadas com o facto da amostra ter sido preparada através de saturação em metanol ($c = 0,5$ g/ mL MeOH). No decorrer da análise, observou-se ainda que a hidroxidifenilengaloil-hexose (corilagina) também se encontrava saturada, sendo isolada da mesma forma que o composto $[M-H]^- = m/z$ 319. O cromatograma obtido durante o isolamento encontra-se representado na Figura 23.

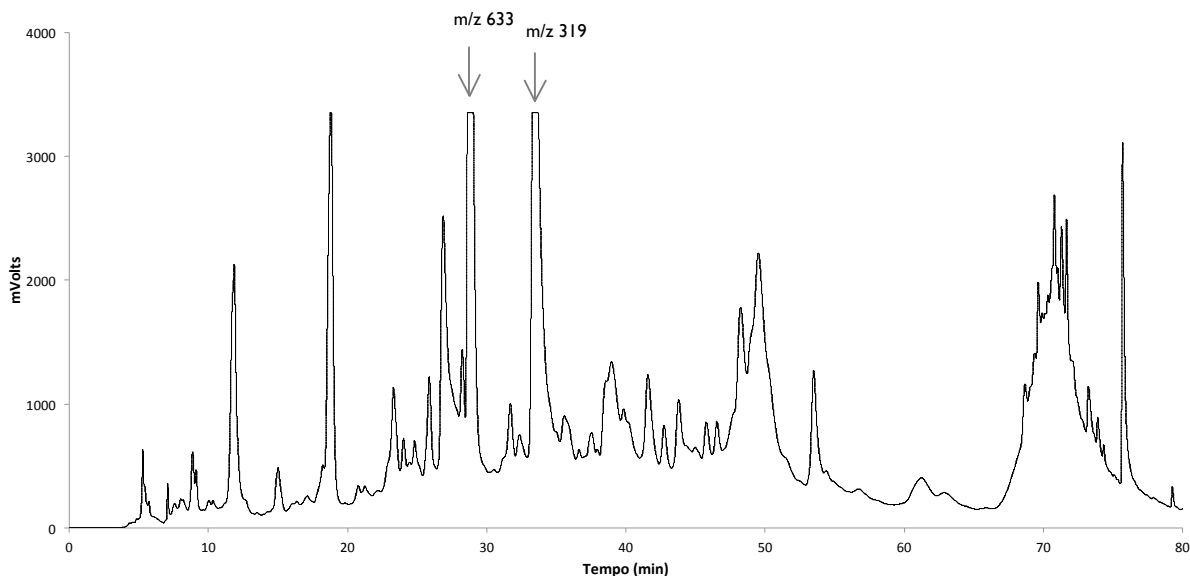


Figura 23 - Perfil cromatográfico (280nm) obtido através de HPLC, da fração EtOH₂_Acett.

Após a recolha dos picos acima assinalados, estas foram analisadas por UHPLC-DAD-ESI-MSⁿ, de forma a perceber qual o grau da sua pureza. Tal como é possível observar nos cromatogramas da Figura 24 e Figura 25, as duas frações cromatográficas recolhidas não se encontravam puras.

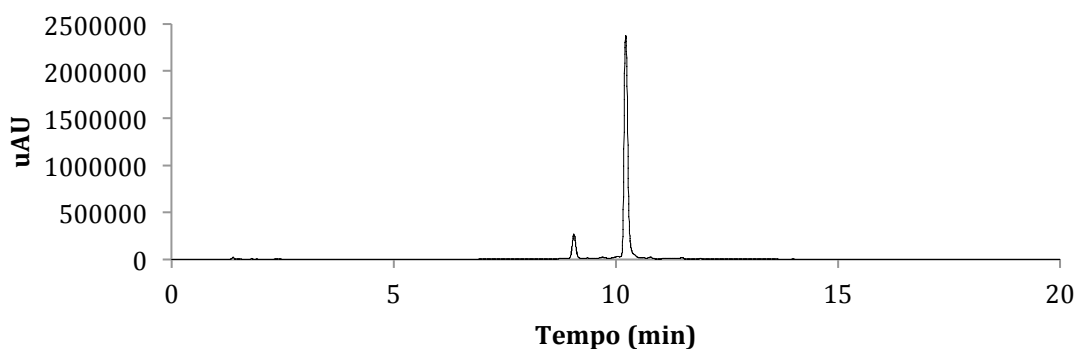


Figura 24 - Perfil cromatográfico obtido por UHPLC-DAD-ESI-MSⁿ, do composto [M-H]⁻ = m/z 633.

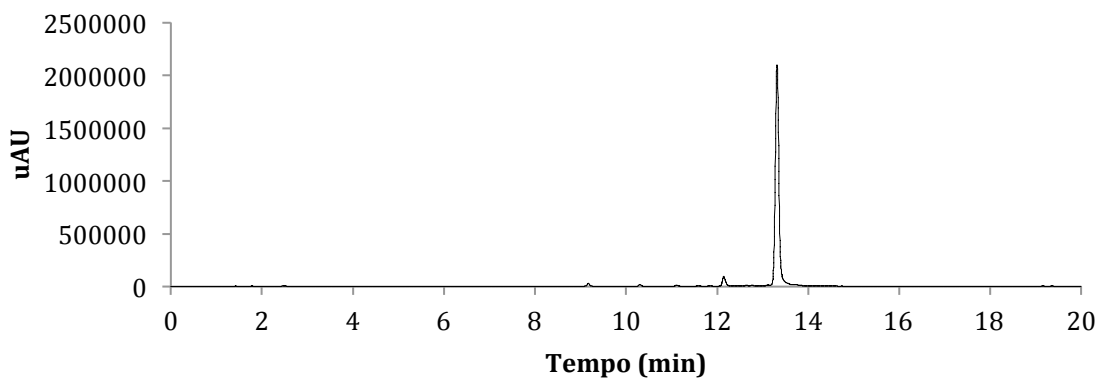


Figura 25 - Perfil cromatográfico obtido por UHPLC-DAD-ESI-MSⁿ, do composto [M-H]⁻ = m/z 319.

A hidroxifenilenogaloil-hexose ($[M-H]^- = m/z 633$) encontrava-se contaminada com a brevifolina ($[M-H]^- = m/z 247$). O composto $[M-H]^- = m/z 319$ também apresentou uma contaminação, mas neste caso com o ácido elágico ($[M-H]^- = m/z 301$). Mesmo contendo estas pequenas contaminações estes dois compostos foram analisados por RMN .

4.5 Análise estrutural da hidroxidifenilenogaloil-hexose e do composto $[M-H]^- = m/z 319$, por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de 1H

Como auxílio da estrutura química da corilagina ($[M-H]^- = m/z 633$) (Figura 26), analisou-se o espectro de RMN de 1H .

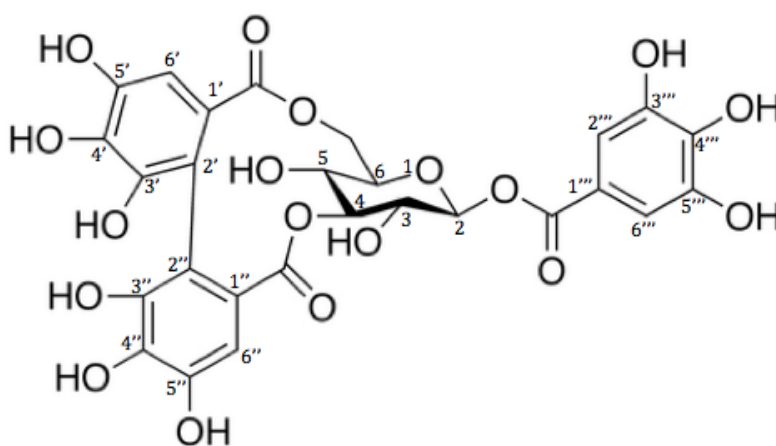


Figura 26 - Estrutura química da hidroxidifenilenogaloil-hexose (corilagina).

Tendo presente a informação estrutural já obtida anteriormente, verificou-se que o espectro de RMN de 1H (500 MHz, DMSO- d_6) deste composto confirma os dados obtidos: δ 7,00 (s, 2H, H-2''',6'''); 6,60 (s, 1H, H-6'); 6,50 (s, 1H, H-6''); 6,20 (d, 1H, 2-H) ppm.

A análise realizada está de acordo com a literatura já anteriormente descrita (Fecka e Cisowski, 2005). Contudo, devido à contaminação apresentada (Figura 24), não foi possível reunir mais informações acerca da estrutura completa. Também não foi possível obter outros espectros de RMN uma vez que a quantidade de composto era limitada. Este espectro de RMN de 1H só foi possível obter no espectrómetro de RMN 500 equipado com uma criosonda e com saturação dos picos abundantes de solvente.

Relativamente ao composto de massa $[M-H]^- = m/z 319$, efetuou-se a mesma análise no mesmo aparelho, devido às mesmas limitações. Obtendo então o espectro de RMN de 1H (Figura 27).

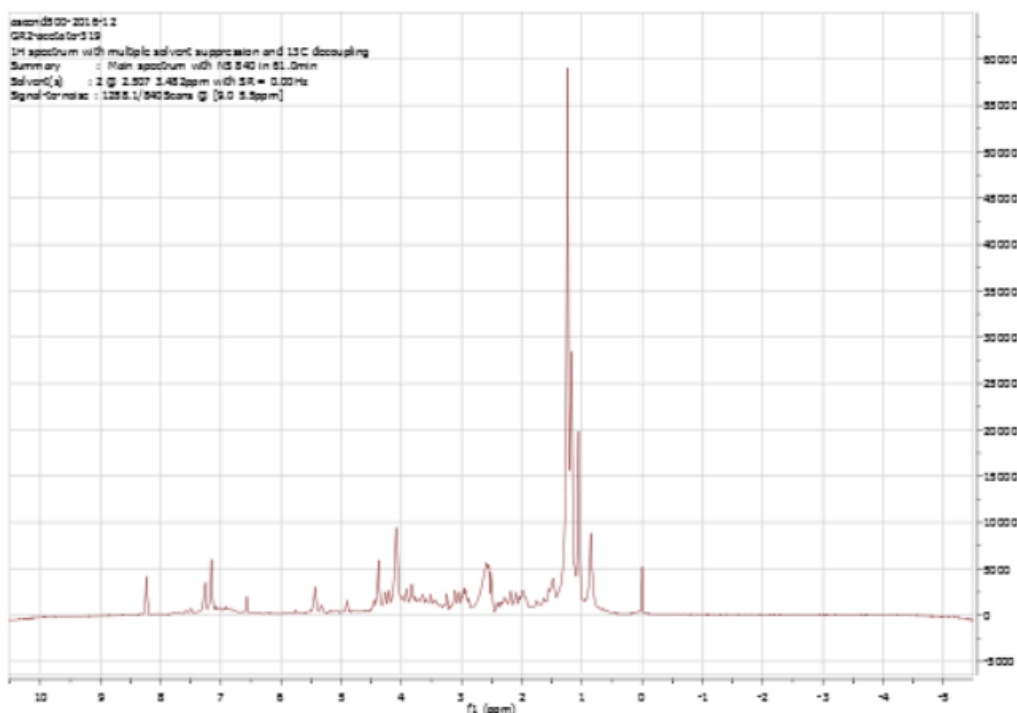


Figura 27- Espetro de RMN de ^1H do composto $[\text{M-H}]^- = m/z$ 319.

Apesar de não ser possível obter uma estrutura do composto, pode verificar-se a presença de sinais na zona aromática [δ 8,25 ppm em forma singuleto, 7,25 ppm um duplete e a 7,15 ppm um singuleto]. A estrutura poderá ainda ter resíduos de ácidos gordos, pois existem sinais na zona 3,0-4,0 ppm, na zona alifática (0-3,0 ppm) do espetro é ainda possível observar sinais, que podem corresponder à cadeia alquílica do ácido.

4.6 Ensaio Biológicos

Com o intuito de avaliar o potencial antioxidante e a capacidade anti-inflamatória dos extratos etanólicos e das frações obtidas através dos solventes *n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona e metanol, testaram-se as amostras recorrendo aos métodos de Folin-Ciocalteu e da inibição do radical NO, respetivamente.

4.6.1. Análise da atividade antioxidante

O potencial antioxidante das amostras foi determinado com base no teste de Folin-Ciocalteu, note-se que este teste baseia-se numa reação específica para compostos com uma determinada característica estrutural (derivados fenólicos), sendo também uma avaliação da atividade antioxidante, pois os compostos fenólicos são geralmente redutores e

sequestradores de radicais livres. Os resultados indicam que as amostras EtOH2, de uma forma geral apresentaram maior capacidade antioxidante, comparativamente às amostras EtOH1 (ver Figura 28).

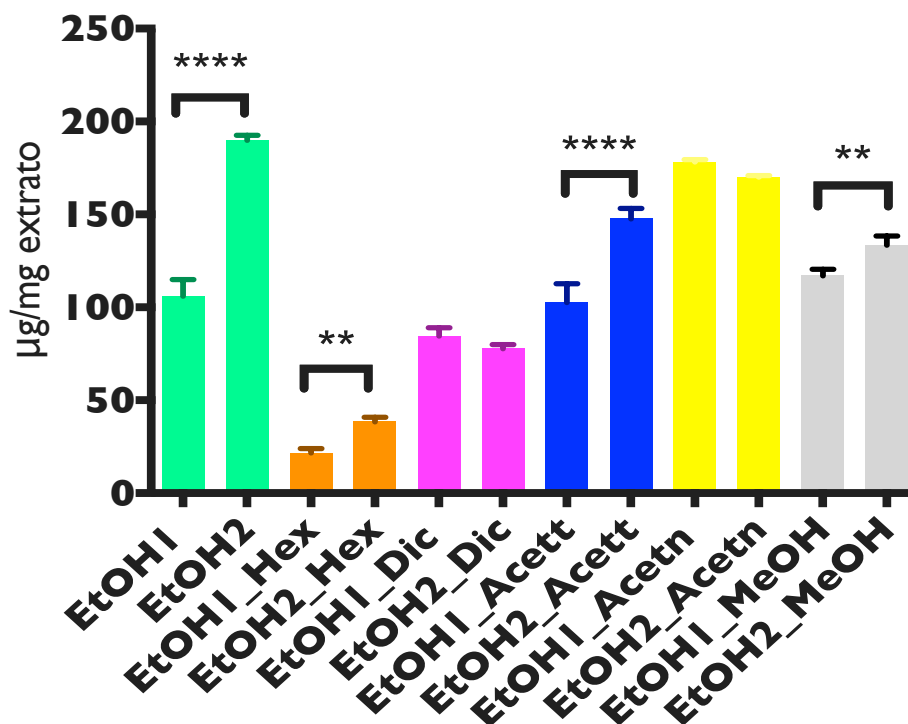


Figura 28 – Capacidade antioxidante dos extratos etanólicos e respectivas frações. Resultados expressos em µg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por mg extrato. Os dados apresentam média ± desvio padrão.

Como se pode verificar, EtOH2 tem aproximadamente o dobro da capacidade antioxidante de EtOH1, apresentando 190 ± 3 µg GAE/mg extrato e 106 ± 9 µg GAE/mg extrato, respetivamente. Relativamente ao fracionamento com *n*-hexano, verifica-se que ambos os extratos EtOH1_Hex e EtOH2_Hex apresentam baixa capacidade antioxidante, apresentando 21 ± 2 µg GAE/mg extrato e 38 ± 3 µg GAE/mg extrato, respetivamente. Assim como as frações de diclorometano, também não mostraram ter potencial antioxidante, apresentando valores entre 78 ± 2 e 84 ± 5 µg GAE/mg de extrato.

Relativamente às frações de EtOH1_Acett e EtOH2_Acett, obtiveram-se resultados elevados (103 ± 10 µg GAE/mg extrato e 148 ± 6 µg GAE/mg extrato, respetivamente). Desta forma é possível concluir que as frações de acetato de etilo apresentam algum potencial antioxidante. Por outro lado, as frações obtidas com acetona e metanol mostraram-se promissoras relativamente ao seu potencial antioxidante, sendo as frações EtOH1_Acetrn e EtOH2_Acetrn, as que apresentaram maior potencial antioxidante, i.e. 178 ± 1 µg GAE/mg extrato e $170 \pm 0,7$ µg GAE/mg extrato, respetivamente. As frações EtOH1_MeOH e

EtOH2_MeOH, também apresentaram valores elevados ($117 \pm 4 \mu\text{g GAE/mg extrato}$ e $133 \pm 5 \mu\text{g GAE/mg extrato}$, respectivamente).

Os resultados obtidos vão de acordo com o que já foi descrito na literatura, à exceção das frações metanólicas, que no presente estudo mostraram melhores resultados antioxidantes. No estudo efetuado por Graça *et al*, (2016), as frações de *n*-hexano mostraram ser menos eficazes na atividade antioxidante; enquanto que as frações de acetato de etilo e a acetona ($216 \pm 2 \mu\text{g GAE/mg extrato}$ e $497 \pm 8 \mu\text{g GAE/mg extrato}$, respectivamente) permitem a extração de maior compostos antioxidantes, pelo que se pode concluir serem frações com potencial antioxidante. No entanto, a utilização do metanol como solvente orgânico mostrou ser menos eficaz ($76 \pm 5 \mu\text{g GAE/mg extrato}$) na extração de compostos fenólicos.

4.6.2. Análise da atividade anti-inflamatória

Através da realização do teste da capacidade de captação do radical NO^{\bullet} , foi possível efetuar um “screening” do potencial anti-inflamatório dos extratos etanólicos e das respetivas frações, que têm vindo a ser alvo de estudo ao longo deste trabalho. Desta forma, através da geração de NO^{\bullet} , calculou-se o IC_{50} (capacidade de inibir 50% da produção do radical NO^{\bullet}) (Figura 29).

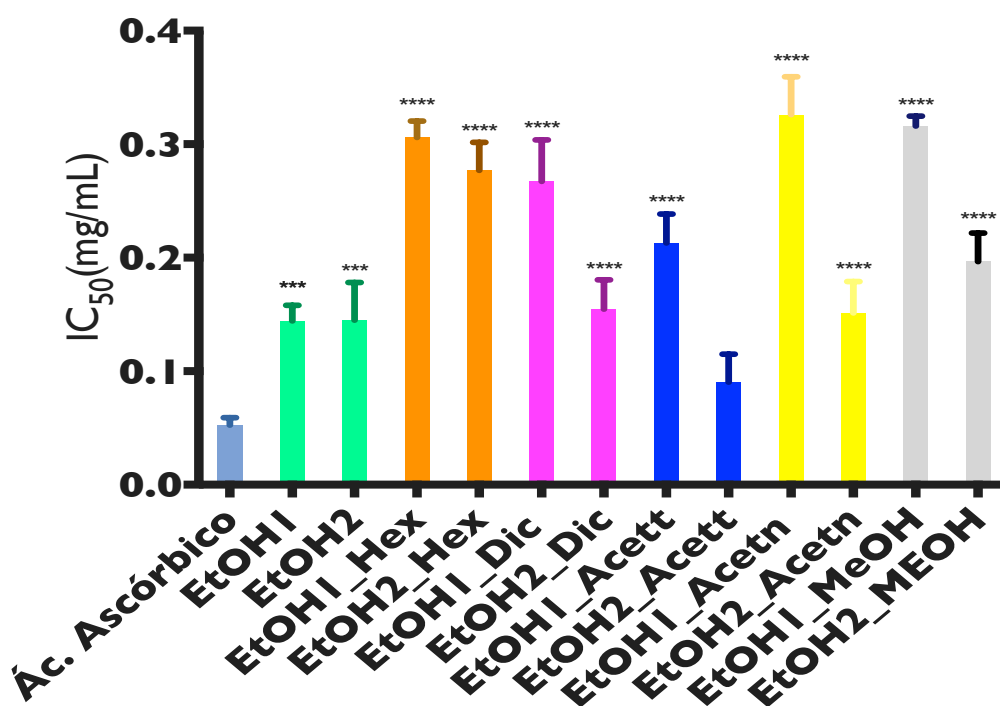


Figura 29- Representação dos valores de IC_{50} , determinado para as várias amostras. O ácido ascórbico foi o padrão usado. Os dados apresentam média \pm desvio padrão.

Como é possível verificar na Figura 30, as frações de EtOH2 apresentam valores de IC_{50} pouco mais elevados que o ácido ascórbico ($0,05 \pm 0,007$ mg/mL), como é o caso de EtOH2, EtOH2_Dic, EtOH2_Acett e EtOH2_Acetn, com $0,14 \pm 0,03$ mg/mL, $0,15 \pm 0,02$ mg/mL, $0,09 \pm 0,02$ mg/mL e $0,16 \pm 0,003$ mg/mL, respetivamente. Relativamente às frações EtOHI_Hex, EtOHI_Dic, EtOHI_Acett, EtOHI_Acetn e EtOHI_MeOH estas mostraram todas um IC_{50} acima dos $0,20$ mg/mL, à excepção do extrato etanólico EtOHI que apresentou um IC_{50} de $0,14 \pm 0,01$ mg/mL. De acordo com os resultados, pode-se afirmar que a amostra com maior poder anti-inflamatório foi EtOH2_Acett ($0,09 \pm 0,02$ mg/mL), e ainda EtOHI e EtOH2 com um IC_{50} de $0,14 \pm 0,01$ mg/mL e $0,14 \pm 0,03$ mg/mL, respetivamente.

Conclusões e Perspetivas Futuras

5. Conclusões e Perspetivas Futuras

Este estudo permitiu compreender melhor a composição fitoquímica de *G. robertianum*. Assim como permitiu confirmar que os extratos etanólicos desta planta podem ser, claramente, explorados para fins terapêuticos ou para formulações de nutracêuticos.

Relativamente aos rendimentos de extração verificou-se que o extrato etanólico EtOH1 (8 horas de extração, seguidas da remoção da clorofila) obteve uma percentagem de recuperação de 44%, permitindo concluir que esta foi influenciada pelo processo de eliminação das clorofilas. Por outro lado, o extrato etanólico EtOH2 apresentou um rendimento menor, 6%, por ter resultado de uma segunda extração do material vegetal resultante da extração EtOH1. De acordo com as análises de GC-MS aos extratos e frações, pode-se concluir que apesar dos baixos rendimentos dos extratos mais apolares, quando analisados por GC-MS, estes apresentaram uma variedade de compostos, identificando álcoois, monossacarídeos, ácidos carboxílicos e ácidos gordos. Em quase todos os extratos etanólicos foi possível identificar o ácido palmítico e o ácido linoleico, ácidos gordos bastante comuns em *G. robertianum*.

A análise por UHPLC-DAD-ESI/MSⁿ, permitiu concluir que os fracionamentos com diferentes solventes não mostraram a devida eficácia, visto que a composição fitoquímica não apresentou divergências significativas em relação aos compostos fenólicos. Os compostos maioritários identificados nos extratos etanólicos foram, a hidroxidifenilenogaloil-hexose ($[M-H]^- = m/z$ 633), a brevifolina ($[M-H]^- = m/z$ 247), o ácido elágico ($[M-H]^- = m/z$ 301) e o composto $[M-H]^- = m/z$ 319. Este estudo permitiu isolar a hidroxifenilenogalil-hexose e o composto $[M-H]^- = m/z$ 319. Apesar de não ter sido possível obter a estrutura completa do composto desconhecido ($[M-H]^- = m/z$ 319), foi possível observar sinais que nos indicam a presença de aromáticos, resíduos de ácidos gordos e ainda sinais que podem corresponder à cadeia alquílica do ácido.

Relativamente aos ensaios biológicos, o extrato etanólico EtOH2 apresentou maior potencial antioxidante (190 ± 3 μ g GAE/mg extrato), enquanto que os extratos apolares, EtOH1_Hex e EtOH2_Hex mostraram menor atividade antioxidante (21 ± 2 μ g GAE/mg extrato e 38 ± 3 μ g GAE/mg extrato, respetivamente). Quando testadas quanto a sua capacidade de captar o radical NO[•], o extrato EtOH2_Acett foi o que apresentou um IC₅₀ mais promissor ($0,09 \pm 0,02$ mg/mL), seguindo-se os extratos etanólicos EtOH1 e EtOH2, com um IC₅₀ de $0,14 \pm 0,01$ mg/mL e $0,14 \pm 0,03$ mg/mL, respetivamente. Indicando

que, numa primeira abordagem, estes três extratos podem possuir fortes capacidades anti-inflamatórias.

Apesar do número de compostos identificados até agora em *G. robertinaum*, a sua composição fitoquímica ainda pode ser explorada. Em paralelo, é necessário fazer muita investigação, de modo a entender a relação entre a composição química e as propriedades biológicas, e identificar as moléculas eventualmente responsáveis pelas propriedades terapêuticas atribuídas a esta planta. Posto isto, é de extrema importância isolar compostos bioativos e avaliar as suas propriedades em modelos biológicos, a fim de compreender melhor o seu comportamento em ambientes mais fisiológicos.

Referências Bibliográficas

6. Referências Bibliográficas

BARREIROS, André; DAVID, Jorge M.; DAVID, Juceni P. - Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**. . ISSN 01004042. 29:1 (2006) 113–123. doi: 10.1590/S0100-40422006000100021.

BASTOS, Deborah H. Markowicz *et al.* - Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from yerba maté (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. **Molecules**. . ISSN 14203049. 12:3 (2007) 423–432. doi: 10.3390/12030423.

BEREZKIN, Victor G.; CHAUSOV, Aleksey V. - The Simple Chromatographic Chamber and Its Application in Circular and Linear Tlc. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. . ISSN 1082-6076. 35:2 (2012) 294–307. doi: 10.1080/10826076.2011.597077.

BUCKENMAIER, Stephan *et al.* - Instrument contributions to resolution and sensitivity in ultra high performance liquid chromatography using small bore columns: Comparison of diode array and triple quadrupole mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**. . ISSN 18733778. 1377:2015) 64–74. doi: 10.1016/j.chroma.2014.11.086.

CAPRIOTTI, Anna Laura *et al.* - Chromatographic Methods Coupled to Mass Spectrometry Detection for the Determination of Phenolic Acids in Plants and Fruits. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. . ISSN 1082-6076. 38:December (2014) 353–370. doi: 10.1080/10826076.2014.941263.

CARDOSO, Susana M. *et al.* - Virgin Olive Oil As a Source of Anti-Inflammatory Agents. Em **Virgin Olive Oil: Production, composition, uses and benefits for man**. ISBN 6312317269. p. 301–334.

CASTEELE, K. Vande; POOTER, H. De; SUMERE, C. F. Van - Gas chromatographic separation and analysis of trimethylsilyl derivatives of some naturally occurring non-volatile phenolic compounds and related substances. **Journal of Chromatography A**. . ISSN 00219673. 121:1 (1976) 49–63. doi: 10.1016/S0021-9673(00)82297-9.

CATARINO, Marcelo D. *et al.* - Antioxidant Capacities of Flavones and Benefits in Oxidative-Stress Related Diseases. **Current Topics in Medicinal Chemistry**. . ISSN 15680266. 15:2 (2015) 105–119. doi: 10.2174/1568026615666141209144506.

CHANG, Y. C.; NAIR, M. G. - Metabolism of daidzein and genistein by intestinal bacteria. **Journal of natural products**. . ISSN 0163-3864. 58:12 (1995) 1892–6.

CHANG, Yuan-Ching *et al.* - Structure-activity relationship of C6-C3 phenylpropanoids on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities. **Free Radical Biology & Medicine**. . ISSN 00062952. 43:6 (2007) 1541–1551. doi: 10.1016/j.bcp.2007.11.023.

CHIANG, Yi-Ming *et al.* - Ethyl caffeate suppresses NF-kB activation and its downstream inflammatory mediators, iNOS, COX-2, and PGE2 in vitro or in mouse skin. **British journal of pharmacology**. . ISSN 0007-1188. 146:3 (2005) 352–363. doi: 10.1038/sj.bjp.0706343.

COMALADA, Mònica *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**. . ISSN 00062952. 72:8 (2006) 1010–1021. doi: 10.1016/j.bcp.2006.07.016.

CRAGG, Gordon M.; NEWMAN, David J. - Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**. . ISSN 03044165. 1830:6 (2013) 3670–3695. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.02.008.

CSERHÁTI, Tibor; MÁRIA, Szógyi - Evaluation of Chromatographic Retention Data By Cluster Analysis. New Achievements. **European Chemical Bulletin**. 1:3-4 (2012) 69–74. doi: 10.17628/ECB.2012.1.69.

DEWICK, Paul M. - **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach** [Em linha]. 3rd editio ed. [S.l.] : Chichester, UK (2009), 2009 Disponível em WWW:<URL:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874109003134>\nhttp://www.sciencedirect.com/science?_ob=MiamImageURL&_cid=271283&_user=213585&_pii=S0378874109003134&_check=y&_origin=article&_zone=toolbar&_coverDate=30-Jul-2009&view=c&originContentFa>. ISBN 9780470741689.

DIXON, R. A.; PASINETTI, G. M. - Flavonoids and Isoflavonoids: From Plant Biology to Agriculture and Neuroscience. **Plant Physiology**. . ISSN 0032-0889. 154:2 (2010) 453–457. doi: 10.1104/pp.110.161430.

DONG, Michael W. - **Modern HPLC for Practicing Scientists**. ISBN 9780471727897.

FANALI, Chiara *et al.* - Recent Developments in High-Performance Liquid Chromatography. **Food Analysis by HPLC, Third Edition**. Lc (2012) 1–32. doi: 10.1201/b13024-2.

FECKA, Izabela; CISOWSKI, Wojciech - Tannins and flavonoids from the *Erodium cicutarium* herb. **Zeitschrift fur Naturforschung - Journal of Chemical Sciences**. . ISSN 09320776. 60:5 (2005) 555–560.

FEDERICO, Alessandro *et al.* - Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. **International Journal of Cancer**. . ISSN 00207136. 121:11 (2007) 2381–2386. doi: 10.1002/ijc.23192.

FERREYRA, María L. Falcone; RIUS, Sebastián P.; CASATI, Paula - Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. **Frontiers in Plant Science**. . ISSN 1664-462X. 3:2012) 1–15. doi: 10.3389/fpls.2012.00222.

FODOREA, Cristina-Stefania *et al.* - Preliminary HPLC study on some polyphenols of *Geranium robertianum* L. (Geraniaceae). **Revista medico-chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi**. . ISSN 0048-7848. 109:1 (2005) 174–178.

FREITAS, Pedro Maniel Marques De - **Polyphenols and neurodegenerative diseases**. [S.l.] : Universidade do Porto, 2012

GARAZD, M. M.; GARAZD, Ya. L.; KHILYA, V. P. - Neoflavones. I. Natural distribution and spectral and biological properties. **Chemistry of Natural Compounds**. . ISSN 16130073. 39:1 (2003) 54–121. doi: 10.1023/A.

GERTZ, Melanie *et al.* - A Molecular Mechanism for Direct Sirtuin Activation by Resveratrol. **PLoS ONE**. . ISSN 19326203. 7:11 (2012) 1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0049761.

GHARRAS, Hasna El - Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review. **International Journal of Food Science and Technology**. . ISSN 09505423. 44:12 (2009) 2512–2518. doi: 10.1111/j.1365-2621.2009.02077.x.

GÓMEZ-CARAVACA, A. M. *et al.* - Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**. . ISSN 0731-7085. 41:4 (2006) 1220–1234. doi: 10.1016/j.jpba.2006.03.002.

GONZÁLEZ, R. *et al.* - Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. **Critical reviews in food science and nutrition**. . ISSN 1040-8398. 51:4 (2011) 331–362. doi: 10.1080/10408390903584094.

GRAÇA, V. C. *et al.* - Chemical characterization and bioactive properties of *Geranium molle* L.: from the plant to the most active extract and its phytochemicals. **Food & Function**. . ISSN 2042-6496. 7:5 (2016) 2204–2212. doi: 10.1039/C5FO01479D.

GRAÇA, Vânia C.; FERREIRA, Isabel C. F. R.; SANTOS, Paulo F. - Phytochemical composition and biological activities of *Geranium robertianum* L.: A review. **Industrial Crops and Products**. . ISSN 09266690. 87:2016) 363–378. doi: 10.1016/j.indcrop.2016.04.058.

GU, Liwei *et al.* - Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. **The Journal of nutrition**. . ISSN 0022-3166. 134:3 (2004) 613–617. doi: 10.1016.

GUNTHER, Harald - **NMR Spectroscopy: Basic Principles, Concepts and Applications in Chemistry**. 3ª Edição ed. [S.l.] : WILEY-VCH Verlag, 2015. ISBN 9788578110796.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. - Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**. . ISSN 13645072. 86:6 (1999) 985–990. doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00780.x.

HIGDON, Jane V; FREI, Balz - Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. **Critical reviews in food science and nutrition**. . ISSN 1040-8398. 43:1 (2003) 89–143. doi: 10.1080/10408690390826464.

HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. - Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**. . ISSN 02786915. 37:1999) 937–942. doi: 10.1016/S0278-6915(99)00079-4.

HOOPER, Lee *et al.* - Flavonoids , flavonoid-rich foods , and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials 1 , 2. **The American Journal of Clinical Nutrition**. 88:2008) 38–50.

ISHIMARU, Kanji; SHIMOMURA, Koichiro - Tannin Production in Hairy Root Culture of *Geranium Thunbergii*. **Phytochemistry**. 30:3 (1991) 825–828.

IWASHINA, Tsukasa - The Structure and Distribution of the Flavonoids in Plants. **Journal of Plant Research**. . ISSN 0918-9440. 113:3 (2000) 287–299. doi: 10.1007/PL00013940.

JING, Jing *et al.* - Advances in analytical technologies to evaluate the quality of traditional Chinese medicines. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**. . ISSN 01659936. 44:2013) 39–45. doi: 10.1016/j.trac.2012.11.006.

KARAKAYA, S. - Bioavailability of phenolic compounds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. . ISSN 1040-8398. 44:6 (2004) 453–464. doi: 10.1080/10408690490886683.

KHODDAMI, Ali; WILKES, Meredith A.; ROBERTS, Thomas H. - Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**. . ISSN 14203049. 18:2 (2013) 2328–2375. doi: 10.3390/molecules18022328.

KIJJOA, Anake *et al.* - Polyoxygenated cyclohexene derivatives from *Ellipeiopsis cherrevensis*. **Phytochemistry**. . ISSN 00319422. 59:5 (2002) 543–549. doi: 10.1016/S0031-9422(01)00465-4.

KIM, Hyun Pyo *et al.* - Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms. **Journal of Pharmacological Sciences**. . ISSN 1347-8613. 96:2004) 229 – 245. doi: 10.1254/jphs.CRJ04003X.

KOBAKHIDZE, K. B.; ALANIYA, M. D. - Flavonoids from *Geranium robertianum*. **Chemistry of Natural Compounds**. . ISSN 00093130. 40:1 (2004) 89–90. doi: 10.1023/B:CONC.0000025477.18086.8b.

KUMAR, Shashank; PANDEY, Abhay K. - Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. **The Scientific World Journal**. . ISSN 1537744X. 2013) 1–16. doi: 10.1155/2013/162750.

LANDETE, J. M. - Updated Knowledge about Polyphenols: Functions, Bioavailability, Metabolism, and Health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. . ISSN 1040-8398. 52:10 (2012) 936–948. doi: 10.1080/10408398.2010.513779.

LANG, Katharina M. H. *et al.* - A comprehensive molecular dynamics approach to protein retention modeling in ion exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**. . ISSN 18733778. 1381:2015) 184–193. doi: 10.1016/j.chroma.2015.01.018.

MA, Keran; THOMASON, Lysie A. M.; MCLAURIN, JoAnne - Scyllo-Inositol, Preclinical, and Clinical Data for Alzheimer's Disease. **Advances in Pharmacology**. . ISSN 10543589. 64:2012) 177–212. doi: 10.1016/B978-0-12-394816-8.00006-4.

MAMMELA, Pirjo *et al.* - Analysis of oak tannins by liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. . ISSN 00219673. 891:1 (2000) 75–83. doi: 10.1016/S0021-9673(00)00624-5.

MANACH, Claudine *et al.* - Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**. 79:2004) 727 – 747.

MARAIS, J. P. J. *et al.* - The Science of Flavonoids. Em ERICH, GROTEWOLD (Ed.) - **The science of flavonoids**. Columbus, Ohio, USA : Springer, 2006. ISBN 9780387288215

MARCONE, Massimo F. *et al.* - Diverse food-based applications of nuclear magnetic resonance (NMR) technology. **Food Research International**. . ISSN 09639969. 51:2 (2013) 729–747. doi: 10.1016/j.foodres.2012.12.046.

MARKHAM, Kenneth R.; MITCHELL, Kevin A.; BOASE, Murray R. - Malvidin-3-O-Glucoside-5-O- (6-Acetylglucoside) and its colour manifestation in «Johnson's Blue» and other '«Blue» Geraniums. **Phytochemistry**. 45:2 (1997) 417–423.

MAUL, Ronald; SCHEBB, Nils Helge; KULLING, Sabine E. - Application of LC and GC hyphenated with mass spectrometry as tool for characterization of unknown derivatives of isoflavonoids. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. . ISSN 16182642. 391:1 (2008) 239–250. doi: 10.1007/s00216-008-1884-4.

MCCUNE, Letitia M. *et al.* - Cherries and Health: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. . ISSN 1040-8398. 51:1 (2010) 1–12. doi: 10.1080/10408390903001719.

MEDIC-SARIC, Marica *et al.* - Optimization of Chromatographic Conditions in Thin Layer Chromatography of Flavonoids and Phenolic Acids. **Croatia Chemica Acta**. . ISSN 00111643. 77:2004) 361–366.

MENDONÇA, Juliana C. F. *et al.* - Chemical characterisation of non-defective and defective green arabica and robusta coffees by electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS). **Food Chemistry**. . ISSN 03088146. 111:2 (2008) 490–497. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.03.080.

NG, Lay Keow; LAFONTAINE, Pierre; VANIER, Micheline - Characterization of cigarette tobacco by direct electrospray ionization-ion trap mass spectrometry (ESI-ITMS) analysis of the aqueous extract - A novel and simple approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. . ISSN 00218561. 52:24 (2004) 7251–7257. doi: 10.1021/jf040203x.

OKUDA, Takuo; YOSHIDA, Takashi; MORI, Kazuro - Brevifolin, corilagin and other phenols from *Geranium thunbergii*. **Phytochemistry**. 14:1975) 1877–1878.

OKUDA, Takuo; YOSHIDA, Takashi; NAYESHIRO, Hidekazu - Geraniin, a new ellagitannin from *geranium thunbergii*. **Tetrahedron Letters**. . ISSN 00404039. 17:41 (1976) 3721–3722. doi: 10.1016/S0040-4039(00)93091-0.

OLIVEIRA, L. *et al.* - Steryl glucosides from banana plant *Musa acuminata* Colla var cavendish. **Industrial Crops and Products**. . ISSN 09266690. 22:3 (2005) 187–192. doi: 10.1016/j.indcrop.2004.10.001.

PAUN, Gabriela *et al.* - Membrane processes application on the *Symphytum officinale* and *Geranium robertianum* extracts concentration to obtain high antioxidative activity compounds. **Journal of the Serbian Chemical Society**. . ISSN 0352-5139. 77:9 (2012) 1191–1203. doi: 10.2298/JSC120106021P.

PEDRO, Luis G.; PAIS, M. Salomé; SCHEFFER, Johannes J. C. - Composition of the Essential Oil of. **Flavour and Fragrance Journal**. . ISSN 15738388. 7:2 (1992) 635–637. doi: 10.1007/s10600-016-1697-1.

PEDRO, Luis G.; PAIS, M. Salomé; SCHEFFER, Johannes J. C. - Composition of the Essential Oil of. 637:2 (1992) 635–637.

PESCHEL, Wieland *et al.* - An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. **Food Chemistry**. . ISSN 03088146. 97:1 (2006) 137–150. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.03.033.

PIETTA, Pier Giorgio - Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**. . ISSN 01633864. 63:7 (2000) 1035–1042. doi: 10.1021/np9904509.

PISKULA, Mariusz K.; JUN, Yamakoshi; YUKIHIKO, Iwai - Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach. **FEBS Letters**. . ISSN 00145793. 447:1999) 287–291. doi: 10.1016/S0014-5793(99)00307-5.

PYRZYNSKA, Krystyna; BIESAGA, Magdalena - Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**. 28:7 (2009) 893–902. doi: 10.1016/j.trac.2009.03.015.

RADULOVIĆ, Niko; DEKIĆ, Milan; STOJANOVIĆ-RADIĆ, Zorica - Chemical composition and antimicrobial activity of the volatile oils of *Geranium sanguineum* L. and *G. robertianum* L. (Geraniaceae). **Medicinal Chemistry Research**. . ISSN 10542523. 21:5 (2012) 601–615. doi: 10.1007/s00044-011-9565-9.

RAHMAN, Irfan; BISWAS, Saibal K.; KIRKHAM, Paul A. - Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. **Biochemical Pharmacology**. . ISSN 00062952. 72:11 (2006) 1439–1452. doi: 10.1016/j.bcp.2006.07.004.

RIO, Daniele DEL *et al.* - Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. **Antioxidants & redox signaling**. . ISSN 1557-7716. 18:14 (2013) 1818–92. doi: 10.1089/ars.2012.4581.

ROBBINS, Rebecca J. - Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. November (2003) 2866–2887. doi: 10.1021/jf026182t.

ROMANI, Annalisa; CAMPO, Margherita; PINELLI, Patrizia - HPLC/DAD/ESI-MS analyses and anti-radical activity of hydrolyzable tannins from different vegetal species. **Food Chemistry**. . ISSN 03088146. 130:1 (2012) 214–221. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.07.009.

SALMINEN, J. P. *et al.* - Characterisation of hydrolysable tannins from leaves of *Betula pubescens* by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. . ISSN 00219673. 864:2 (1999) 283–291. doi: 10.1016/S0021-9673(99)01036-5.

SÁNCHEZ-RABANEDA, Ferran *et al.* - Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). **Journal of Mass Spectrometry**. . ISSN 10765174. 38:1 (2003) 35–42. doi: 10.1002/jms.395.

SCALBERT, Augustin; WILLIAMSON, Gary - Chocolate: Modern Science Investigates an Ancient Medicine. **The Journal of Nutrition**. . ISSN 1096-620X. 2000) 121–125. doi: 10.1089/109662000416311.

SCHULZ, Jurgen M.; HERRMANN, Karl - Analysis of methyl and ethyl esters of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids in plant material. **Journal of Chromatography A**. . ISSN 00219673. 240:2 (1980) 387–396. doi: 10.1016/S0021-9673(00)99618-3.

SELMA, María V.; ESPÍN, Juan C.; TOMÁS-BARBERÁN, Francisco A. - Interaction between phenolics and gut microbiota: Role in human health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. . ISSN 00218561. 57:15 (2009) 6485–6501. doi: 10.1021/jf902107d.

SHERMA, Joseph - Joseph Sherma. Em **Analytical chemistry**v. 61. p. 153R–165R.

SILK, Jennifer J.; SMOLIGA, James M. - Resveratrol: Nutraceutical believed to counteract the detrimental effects of high-fat diet. **Lipid Technology**. . ISSN 18635377. 26:1 (2014) 15–17. doi: 10.1002/lite.201300315.

SNYDER, Lloyd R.; KIRKLAND, Joseph J.; DOLAN, John W. - **Introduction to modern liquid chromatography**. 3ª Edição ed. ISBN 9780470167540.

SOCIETY, The North American Menopause - The role of soy isoflavones in menopausal health. **Menopause: the Journal of The North American Menopause Society**. [Em linha]. ISSN 1072-3714 (2011). 18:7 732–753. Disponível em WWW:<URL:http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=0042192-201107000-00005>.

SOUZA, Jacqueline E. De; CASANOVA, Livia M.; COSTA, Sônia S. - Biodisponibilidade de compostos fenólicos: um importante desafio para o desenvolvimento de fármacos? **Revista Fitos**. . ISSN 2446-4775. 9:1 (2015) 55–67. doi: 10.5935/2446-4775.20150006.

STALIKAS, Constantine D. - Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**. . ISSN 16159306. 30:18 (2007) 3268–3295. doi: 10.1002/jssc.200700261.

STOBIECKI, Maciej - Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. **Phytochemistry**. . ISSN 00319422. 54:3 (2000) 237–256. doi: 10.1016/S0031-9422(00)00091-1.

SUN, Yan-Mei *et al.* - Simultaneous determination of eight flavonoids in propolis using chemometrics-assisted high performance liquid chromatography-diode array detection. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**. 962:2014) 59–67. doi: 10.1016/j.jchromb.2014.05.027.

SVENDSEN, Mathias T. *et al.* - Contact sensitization to *Geranium robertianum* L. in an amateur gardener. **Contact Dermatitis**. . ISSN 16000536. 72:6 (2015) 420–421. doi: 10.1111/cod.12378.

TANWAR, Beenu; MODGIL, Rajni - Flavonoids: Dietary Occurrence and Health Benefits. **Spatula DD - Peer Reviewed Journal on Complementary Medicine and Drug Discovery**. . ISSN 1309-9914. 2:1 (2012) 59–68. doi: 10.5455/spatula.20120328100506.

TOFTS, Richard J. - *Geranium robertianum* L. **Journal of Ecology**. . ISSN 00220477. 92:3 (2004) 537–555. doi: 10.1111/j.0022-0477.2004.00892.x.

TOMÁS-BARBERÁN; CLIFFORD - Review: Flavanones, chalcones and dihydrochalcones – nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. . ISSN 1097-0010. 80:2000) 1073–1080. doi: 10.1002/(SICI)1097-0010(20000515).

TORRE, Giovanna Loredana LA *et al.* - Direct determination of phenolic compounds in Sicilian wines by liquid chromatography with PDA and MS detection. **Food Chemistry**. . ISSN 03088146. 94:4 (2006) 640–650. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.02.007.

TUOMINEN, Anu *et al.* - Defensive strategies in *Geranium sylvaticum*. Part I: Organ-specific distribution of water-soluble tannins, flavonoids and phenolic acids. **Phytochemistry**. . ISSN 00319422. 95:2013) 394–407. doi: 10.1016/j.phytochem.2013.05.013.

VARDENY, Orly; SOLOMON, Scott D. - Cyclooxygenase-2 Inhibitors, Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs, and Cardiovascular Risk. **Cardiology Clinics**. . ISSN 07338651. 26:4 (2008) 589–601. doi: 10.1016/j.ccl.2008.06.004.

VEBERIC, Robert *et al.* - Anthocyanin composition of different wild and cultivated berry species. **LWT - Food Science and Technology**. . ISSN 00236438. 60:1 (2015) 509–517. doi: 10.1016/j.lwt.2014.08.033.

VINCENT, H. K.; TAYLOR, A. G. - Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. **International journal of obesity**. . ISSN 0307-0565. 30:3 (2006) 400–418. doi: 10.1038/sj.ijo.0803177.

WANG, Liang; MORRIS, Marilyn E. - Liquid chromatography-tandem mass spectroscopy assay for quercetin and conjugated quercetin metabolites in human plasma and urine. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**. . ISSN 15700232. 821:2 (2005) 194–201. doi: 10.1016/j.jchromb.2005.05.009.

WREN, Stephen A. C.; TCHELITCHEFF, Pierre - Use of ultra-performance liquid chromatography in pharmaceutical development. **Journal of Chromatography A**. . ISSN 00219673. 1119:1-2 (2006) 140–146. doi: 10.1016/j.chroma.2006.02.052.

YANG, Yanli *et al.* - Size-exclusion HPLC provides a simple, rapid, and versatile alternative method for quality control of vaccines by characterizing the assembly of antigens. **Vaccine**. . ISSN 18732518. 33:9 (2015) 1143–1150. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.01.031.

ZHAO, M. Tianming - **CARACTERISATIONS CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES D'EXTRAITS DE PLANTES AROMATIQUES ET MEDICINALES OUBLIEES OU SOUS- UTILISEES DE MIDI-PYRENEES (FRANCE) ET CHONGQING (CHINE)**. [S.l.] : Sciences de la Matière (SDM), 2014

ZHU, Mingzhi; DONG, Xia; GUO, Mingquan - Phenolic Profiling of *Duchesnea indica* Combining Macroporous Resin Chromatography (MRC) with HPLC-ESI-MS/MS and ESI-IT-MS. **Molecules**. . ISSN 1420-3049. 20:12 (2015) 22463–22475. doi: 10.3390/molecules201219859.