

Raquel Sofia Gomes de Sousa

Desenvolvimento e otimização de formas farmacêuticas orais contendo *Cymbopogon citratus*

Dissertação de Mestrado em Tecnologias do Medicamento, orientada pela Professora Doutora Maria Eugénia Pina e pelo Professor Doutor Artur Figueirinha e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Raquel Sofia Gomes de Sousa

**Desenvolvimento e otimização de formas farmacêuticas orais
contendo *Cymbopogon citratus***

Dissertação de Mestrado em Tecnologias do Medicamento, orientada pela Professora Doutora Maria Eugénia Pina e pelo Professor Doutor Artur Figueirinha e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho de 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Imagem da capa

Pormenor/adaptação da ilustração **Lemongrass II Art Print by Jarman Fagalde** at Art.com [Acedido a 29 de junho de 2016]. Disponível na internet: <https://pt.pinterest.com/pin/536069161876041723/>.

Agradecimentos

À Professora Doutora Maria Eugénia Pina e ao Professor Doutor Artur Figueirinha por toda a orientação, dedicação, paciência e pela constante disponibilidade que demonstraram em acompanhar o meu trabalho, esclarecer dúvidas e ainda pela revisão do presente trabalho.

À Professora Doutora Teresa Batista pela disponibilidade e ajuda no decorrer deste trabalho.

Ao Diretor da Unidade de Controlo de Qualidade de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia (UCQFarma), pela possibilidade da realização de alguns ensaios, ao Dr. Rui Manadas e ao Doutor Ricardo Ferreira, pela ajuda na execução dos ensaios de dissolução, de espectroscopia de infravermelho e de calorimetria diferencial de varrimento.

Ao Doutor Gustavo Costa pelo auxílio e pelo conhecimento transmitido na caracterização inicial da planta.

À D. Regina Vieira do Laboratório de Galénica e Tecnologia Farmacêutica e à D. Fátima Colaço do Laboratório de Farmacognosia por toda a disponibilidade com que me receberam e pela ajuda que me deram.

À minha família, em especial aos meus pais, à minha irmã e à minha madrinha, por toda a ajuda, compreensão e incentivo.

Às minhas amigas, por estarem sempre presentes.

Índice

Agradecimentos	iii
Índice.....	iv
Índice de figuras	vii
Índice de tabelas	ix
Resumo.....	x
Abstract	xii
Abreviaturas	xiv
Capítulo I - Introdução	1
1. Fitoterapia - passado, presente e futuro	2
1.1 Aspectos históricos	2
1.2 Legislação	4
2. <i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf.	5
2.1 Caracterização botânica e etnomedicina.....	5
2.2 Composição química	9
2.2.1 Óleos essenciais.....	9
2.2.2 Compostos fenólicos	11
2.2.3. Outros compostos	12
2.3 Atividade biológica	12
2.4 Farmacocinética e biodisponibilidade.....	16
2.5 Toxicidade	17
3. Formas Farmacêuticas.....	18
4. Referências bibliográficas	22
Capítulo II - Objetivos e Apresentação do trabalho	29
Capítulo III - Materiais e Métodos.....	31
A. Matérias-primas.....	32
B. Material botânico.....	33
C. Métodos	33
1. Obtenção e caracterização do liofilizado de <i>Cymbopogon citratus</i>	33

1.1	Preparação do extrato de <i>Cymbopogon Citratus</i>	33
1.2	Determinação do teor de humidade.....	33
1.3	Cromatografia líquida de alta resolução.....	33
1.4	Ensaio de atividade antioxidante.....	35
1.5	Doseamento dos fenóis totais.....	36
1.6	Cromatografia gasosa.....	37
2.	Desenvolvimento da forma farmacêutica.....	37
2.1	Estudos de pré-formulação.....	37
2.1.1	Calorimetria diferencial de varrimento.....	38
2.1.2	Espectroscopia de infravermelho.....	39
2.2	Preparação das cápsulas.....	39
2.3	Ensaio de controlo de qualidade.....	40
2.3.1	Uniformidade de massa.....	41
2.3.2	Uniformidade de teor.....	41
2.3.3	Ensaio de dissolução.....	41
2.3.4	Validação do ensaio de dissolução.....	42
2.3.4.1	Especificidade.....	42
2.3.4.2	Linearidade.....	43
2.3.4.3	Exatidão.....	44
2.3.4.4	Repetibilidade.....	44
3.	Caracterização da formulação após contacto com o suco gástrico artificial.....	44
3.1	Avaliação da estabilidade química do extrato e formulação em suco gástrico artificial.....	44
3.2	Avaliação da atividade antioxidante do extrato e formulação após contacto com o suco gástrico artificial.....	45
4.	Referências bibliográficas.....	46
	Capítulo IV - Resultados e Discussão.....	49
1.	Obtenção e caracterização do liofilizado de <i>Cymbopogon citratus</i>	50
1.1	Teor de humidade.....	50
1.2	Rendimento extrativo.....	50
1.3	Análise qualitativa do extrato de <i>Cymbopogon citratus</i> por HPLC-PDA.....	51
1.4	Avaliação da atividade antioxidante pelo método de DPPH.....	53
1.5	Doseamento dos fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu.....	54
1.6	Avaliação da presença de <i>n</i> -hexano.....	55
2.	Desenvolvimento de formas farmacêuticas.....	56
2.1	Seleção dos excipientes.....	56

2.1.1. Avaliação da compatibilidade do extrato com os excipientes através de DSC.....	56
2.1.2. Avaliação da compatibilidade do extrato com os excipientes através de IV	58
2.2 Determinação da massa volúmica aparente do extrato	61
2.3 Composição das formulações	61
2.4 Ensaio de dissolução	62
2.4.1 Validação do método de dissolução	62
2.4.2 Ensaio de dissolução	65
2.5 Uniformidade de massa	66
2.6 Uniformidade de teor.....	67
2.7 Seleção da forma farmacêutica.....	67
3. Caracterização da formulação após ação do suco gástrico	68
3.1 Avaliação da estabilidade química dos compostos fenólicos em suco gástrico por HPLC-PDA .	68
3.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo ensaio de DPPH, após ação do suco gástrico.....	74
4. Referências bibliográficas	76
Capítulo V - Conclusões.....	79
Capítulo VI - Perspetivas futuras	81

Índice de figuras

Figura 1 - Acompanhamento da evolução dos indicadores de progresso dos países, definidos pela WHO Traditional Medicine Strategy.....	5
Figura 2 - <i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf.....	6
Figura 3 - Estrutura dos principais compostos do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i>	10
Figura 4 - Estrutura de alguns dos compostos fenólicos e triterpenos de <i>Cymbopogon citratus</i>	12
Figura 5 - Constituição do trato gastrointestinal.....	20
Figura 6 - Esquema das soluções preparadas para avaliação da linearidade.	43
Figura 7 - Perfil cromatográfico obtido por HPLC-PDA de <i>Cymbopogon citratus</i> (280 nm e 320 nm).	51
Figura 8 - Espectros UV, obtidos por HPLC-PDA, característico dos taninos.....	51
Figura 9 - Espectros UV, obtidos por HPLC-PDA característicos dos ácidos fenólicos. (a) ácido cafeico e (b) ácido p-cumárico.....	52
Figura 10 - Espectros UV, obtidos por HPLC-PDA, característicos dos flavonoides. (a) derivados da apigenina e (b) derivados da luteolina.....	52
Figura 11 - Reta de calibração no ensaio de DPPH.....	54
Figura 12 - Curva de calibração do ácido gálico para o doseamento dos fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu.....	55
Figura 13 - Termograma de DSC do extrato (vermelho), do amido de milho (azul) e da mistura de extrato:amido de milho (1:1) (verde).	56
Figura 14 - Termograma de DSC do extrato (vermelho), da lactose mono hidratada (azul) e da mistura de extrato:lactose mono hidratada (1:1) (verde).	57
Figura 15 - Termograma de DSC do extrato (vermelho), da celulose microcristalina (azul) e da mistura de extrato:celulose microcristalina (1:1) (verde).	57
Figura 16 - Termograma de DSC do extrato (vermelho), do estearato de magnésio (azul) e da mistura de extrato:estearato de magnésio (1:1) (verde).....	58
Figura 17 - Espectro FTIR-ATR do extrato (azul), do amido de milho (vermelho) e da mistura de extrato:amido de milho (1:1) (verde).	59
Figura 18 - Espectro FTIR-ATR do extrato (azul), da lactose mono hidratada (vermelho) e da mistura de extrato:lactose mono hidratada (1:1) (verde).....	59

Figura 19 - Espectro FTIR-ATR do extrato (azul), da celulose microcristalina (vermelho) e da mistura de extrato:celulose microcristalina (1:1) (verde).....	60
Figura 20 - Espectro FTIR-ATR do extrato (azul), do estearato de magnésio (vermelho) e da mistura de extrato:estearato de magnésio (1:1) (verde).....	60
Figura 21 - Curva de calibração da rutina em suco gástrico.....	63
Figura 22 - Perfis de dissolução das diferentes formulações desenvolvidas.	66
Figura 23 - Sobreposição dos perfis obtidos por HPLC-PDA para o extrato em metanol a 50%, formulação F1 após 2h (cinza) e 3h (azul) de contacto com o meio gástrico.....	68
Figura 24 - Representação da variação das áreas (a 320 nm), em percentagem, dos picos obtidos em HPLC-PDA para a formulação F1, em relação ao extrato em metanol a 50%.	69
Figura 25 - Espectros UV, obtidos por HPLC-PDA observados nos tempos de retenção 17,49 minutos e 17,58 minutos, respetivamente para a formulação F1 após 2 horas (a) e 3 horas (b) de contacto com suco gástrico.	71
Figura 26 - Espectros UV, obtidos por HPLC-PDA dos picos observados para a formulação F1 após 2 e 3 horas de contacto com o suco gástrico. (a) espectro UV após 2 horas (tempo de retenção de 20,33 minutos) e (b) espectro UV após 3 horas (tempo de retenção de 20,42 minutos).....	71
Figura 27 - Sobreposição dos perfis obtidos por HPLC-PDA para o extrato em metanol a 50%, F5 após 2h (verde) e 3h (azul) de ensaio de dissolução.	72
Figura 28 - Representação da variação das áreas (a 320 nm), em percentagem, dos picos obtidos em HPLC-PDA para a formulação F5, em relação ao extrato em metanol a 50%.	73
Figura 29 - Espectros UV, obtidos por HPLC-PDA, dos picos observados para F5 em suco gástrico após 3 horas de dissolução com tempo de retenção: (a) 15,41 minutos e (b) 17,31 minutos.....	73
Figura 30 - Espectros UV, obtidos por HPLC-PDA, para a formulação F5: (a) após 2 horas (tempo de retenção de 20,34 minutos) e (b) após 3 horas (tempo de retenção de 20,06 minutos) de contacto com o suco gástrico.	74

Índice de tabelas

Tabela 1 - Classificação científica de <i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf.	6
Tabela 2 - Lista das utilizações medicinais de <i>Cymbopogon citratus</i> consoante o país.....	7
Tabela 3 - Fito constituintes de <i>Cymbopogon citratus</i> e suas atividades biológicas.	15
Tabela 4 - Matérias-primas utilizadas.	32
Tabela 5 - Gradiente de eluição da fase móvel.....	35
Tabela 6 - Tamanho das cápsulas duras e sua capacidade.	40
Tabela 7 - Excipientes contidos nas formulações utilizadas na validação do ensaio de dissolução.....	43
Tabela 8 - Teor de humidade contido na amostra e no extrato liofilizado de <i>Cymbopogon citratus</i>	50
Tabela 9 - Rendimento extrativo para a <i>Cymbopogon citratus</i> obtido por outros autores.....	50
Tabela 10 - Identificação dos compostos presentes no liofilizado de <i>Cymbopogon citratus</i> (report a 280 nm).	53
Tabela 11 - Composição das formulações desenvolvidas.....	62
Tabela 12 - Interferência dos excipientes no ensaio de dissolução.....	62
Tabela 13 - Dados da curva de calibração de cada formulação para o parâmetro da linearidade.....	63
Tabela 14 - Percentagem de recuperação para as formulações em estudo, nas diferentes concentrações de extrato.	64
Tabela 15 - Coeficiente de variação, em percentagem, para a dissolução das diferentes formulações.....	65
Tabela 16 - Resultados da uniformidade de massa das formulações desenvolvidas.....	67
Tabela 17 - Resultados da uniformidade de teor das formulações desenvolvidas.	67
Tabela 18 - Correspondência entre os picos e os compostos identificados anteriormente por HPLC-PDA.	69
Tabela 19 - Percentagem de redução, determinada pelo ensaio de DPPH, para a formulação F1.....	75
Tabela 20 - Percentagem de redução, determinada pelo ensaio de DPPH, para a formulação F5.....	75

Resumo

Cymbopogon citratus DC (Stapf.) é uma gramínea perene nativa do sudeste asiático, distribuída um pouco por todo o mundo, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. As infusões e as decocções das suas folhas secas têm sido utilizadas numa vasta gama de utilizações na Medicina Tradicional. Na composição fitoquímica esta espécie inclui óleos essenciais, ácidos fenólicos (ácidos hidroxicinâmicos, C- e O-glicósidos de flavonas e taninos do tipo condensado), vitaminas, minerais e macronutrientes. Os extratos de *Cymbopogon citratus*, em particular as frações de compostos fenólicos têm mostrado atividade antioxidante, antirradicalar e anti-inflamatória, podendo desempenhar um papel importante na prevenção de doenças tais como: cancro, aterosclerose e distúrbios do trato gastrointestinal.

Os factos apresentados associados ao crescente interesse pelo uso de plantas medicinais no tratamento e prevenção de situações patológicas, implicam a necessidade de fornecer à população produtos com qualidade, segurança e eficácia.

O objetivo deste trabalho é desenvolver uma formulação a partir do extrato de *Cymbopogon citratus*. Inicialmente foi preparada e liofilizada uma infusão livre de óleos essenciais. De seguida, o produto anterior foi caracterizado por HPLC-PDA; tendo sido detetados principalmente compostos fenólicos que foram quantificados pelo método de Folin-Ciocalteu e cuja atividade antioxidante foi determinada pelo ensaio de DPPH. Foram preparadas cápsulas de gelatina contendo o extrato e diferentes excipientes, selecionados após ensaios de DSC e de IV, e caracterizadas através dos testes descritos na Farmacopeia Portuguesa (ensaio de dissolução, uniformidade de massa e de teor). As formulações cumpriram os limites de uniformidade de massa e de teor e apresentaram percentagens de dissolução acima dos 100%, que poderão ser devidas à instabilidade dos compostos em suco gástrico e/ou incompatibilidade com os excipientes.

De seguida foi selecionada a formulação que apresentou melhores resultados nos ensaios descritos anteriormente tendo sido avaliada a sua estabilidade química e atividade antioxidante após o contacto com suco gástrico artificial a 37°C, reproduzindo as condições *in vivo*. Este processo foi também realizado com uma formulação contendo apenas extrato. Os resultados mostraram que parte dos compostos fenólicos identificados são degradados no suco gástrico, fenómeno que é menos evidente na presença de amido de milho, mantendo, no entanto, a sua atividade antioxidante.

Em conclusão, no presente trabalho foi possível desenvolver uma formulação que, aparentemente, protege o extrato das condições gástricas mantendo a sua atividade antioxidante. No futuro será interessante estudar de forma pormenorizada qual o mecanismo ativado na presença do amido de milho que proporciona a estabilidade do extrato em suco gástrico, quais as alterações que ocorrem nos compostos fenólicos a nível gástrico e quais as suas implicações na segurança do extrato para uso humano.

Palavras-chave: *Cymbopogon citratus*, infusão, cápsulas de gelatina, atividade biológica, estabilidade química

Abstract

Cymbopogon citratus DC (Stapf.) is a perennial grass native from the southwest Asia and it is distributed around the world, mainly, in tropical and subtropical regions. The infusions and decoctions of its dried leaves have been used in a wide range of applications in Traditional Medicine. In phytochemical composition the species include essential oils, phenolic compounds (hydroxycinnamic acids, C- and O-glycosides of flavones and condensed tannins type), vitamins, minerals and macronutrients. The *Cymbopogon citratus* extracts, in particular the fractions of phenolic compounds have showed antioxidant, anti-radical and anti-inflammatory activity, and may play an important role in the prevention of diseases such as: cancer, atherosclerosis, and gastrointestinal tract disorders.

The presented facts associated with growing interest in the use of medicinal plants for treatment and prevention of pathological conditions, imply the need to provide products for population with quality, safety and efficacy.

The aim of the present work is the development of a formulation from *Cymbopogon citratus* extract. Initially, an essential oil-free infusion was prepared and lyophilized. Then, the previous product was characterized by HPLC-PDA; it has been detected mainly phenolic compounds which were quantified by Folin-Ciocalteu method, and their antioxidant activity was assessed by the DPPH assay. Gelatin capsules containing the extract with different excipients, selected after DSC and IV trials, were prepared and characterized by the described test in the Portuguese Pharmacopeia (dissolution test, content uniformity and mass uniformity). The formulations fulfilled the limits of mass and content uniformity and have presented dissolution percentages above 100%, probably due to instability of the compounds in gastric juice and/or incompatibility of the excipients.

Following, the formulation that have showed the best results in the tests described above, was selected and its chemical stability and biological activity were evaluated after contact with gastric juice at 37°C, reproducing *in vivo* conditions; this process was also performed with a formulation containing only extract. The results showed that some of the identified phenolic compounds are degraded in the gastric juice, and this phenomenon is less apparent in the presence of corn starch, while the extract maintain its antioxidant activity.

In conclusion, in this study it was possible to develop a formulation that, apparently, protect the extract of gastric conditions and maintains its antioxidant activity. In the future, it will be interesting to study in detail which mechanism is activated in the presence of corn starch that protects the extract from gastric juice, which changes occur in phenolic

compounds at gastric level and what are their implications in the safety of the extract for human use.

Keywords: *Cymbopogon citratus*, infusion, gelatin capsules, biological activity, chemical stability

Abreviaturas

AIM - autorização de introdução no mercado

ATR - reflexão total atenuada

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

DSC - calorimetria diferencial de varrimento

EC50 - concentração eficaz a 50% (concentração que reduz 50% do DPPH)

FTIR - espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier

GC - cromatografia gasosa

HDL - lipoproteína de alta densidade

HMPC - *Committee on Herbal Medicine Products*

HPLC - cromatografia líquida de alta resolução

HSV-1 - vírus herpes simplex 1

HUVEC - células endoteliais da veia umbilical

ICH - *International Conference on Harmonization*

INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde

i-NOS - óxido nítrico sintase induzível

IL-1 β - interleucina-1 β

IL-10 - interleucina-10

IL-12 - interleucina-12

IL-2 - interleucina-2

IL-4 - interleucina-4

IL-6 - interleucina-6

IV - infravermelho

LDL - lipoproteína de baixa densidade

LPS - lipopolissacarídeos

min - minutos

NF- κ B - fator nuclear κ B

NO - óxido nítrico

OMS - Organização Mundial de Saúde

PDA - detetor de matriz de diodos

ROS - espécies reativas de oxigénio

SNC - sistema nervoso central

SPE - extração em fase sólida

TNF- α - fator de necrose tumoral

UV - ultravioleta

Capítulo I - Introdução

I. Fitoterapia - passado, presente e futuro

A Fitoterapia é a prática clínica baseada no uso de produtos de origem vegetal (medicamentos à base de plantas) na prevenção ou tratamento de situações patológicas; estes produtos são alvo de ensaios clínicos e farmacológicos que avaliam a sua eficácia e segurança (Encyclopaedia Britannica, 2016).

I.1 Aspetos históricos

O Homem desde sempre utilizou as plantas medicinais para seu benefício, tendo sido no passado o seu principal meio terapêutico. As antigas civilizações aprenderam a diferenciar as plantas saudáveis das tóxicas, e esse conhecimento foi transmitido oralmente de geração em geração. Só mais tarde as informações adquiridas sobre o uso tradicional das plantas foram registadas em documentos escritos (Firmo *et al.*, 2011; Cunha, Roque e Nogueira, 2012).

Uma das mais antigas fontes escritas referentes ao uso tradicional de plantas medicinais data de 1700 a.C., na civilização da Mesopotâmia e contém 15 receitas medicinais (Oliveira, 2013). O manuscrito Egípcio *Papiro de Ebers* (1500 a.C.), decifrado em 1873 é também uma importante fonte de informação, onde se encontram descritas centenas de substâncias ativas e prescrições para o tratamento de doenças internas e indicações sobre a composição dos produtos a aplicar; algumas das plantas descritas neste documento, como o Ginseng (*Panax spp.*) e a *Ephedra spp.*, ainda hoje são utilizadas na medicina tradicional (Firmo *et al.*, 2011; Cunha, Roque e Nogueira, 2012).

Na civilização chinesa destaca-se a obra *Pen T'Sao* que descreve 365 plantas medicinais, algumas das quais ainda são empregues atualmente (Petrovska, 2012). Nas culturas mais recentes destacaram-se as figuras de Hipócrates, Galeno e Teofrasto. Este último autor apresenta descrições botânicas precisas, acompanhadas de indicações terapêuticas e efeitos tóxicos na sua obra "*Historia Plantarum*". É de destacar também o trabalho de Dioscórides, que durante as viagens que fez com o exército romano, estudou plantas medicinais que descreve na "*De Materia Medica*", que constituiu uma obra de referência até ao final da Idade Média (Cunha, Roque e Nogueira, 2012; Petrovska, 2012).

Durante o Renascimento, verifica-se na Europa, a introdução de novos fármacos na terapêutica resultante da chegada dos portugueses a África, à Índia e ao Brasil e dos espanhóis a outros locais da América do Sul (Cunha, Roque e Nogueira, 2012). Nesta época Garcia de Orta destacou-se com a sua obra "*Coloquios dos simples, e drogas he cousas medicinais da Índia, e assi dalguas frutas achadas nella onde se tratam alguas cousas tocantes*

amedicina, pratica, e outras cousas boas, p̃era saber" onde impõe a sua opinião, esclarece aspectos já publicados e ainda fornece indicação de fármacos nunca descritos (Cunha, Roque e Nogueira, 2012; Oliveira, 2013).

Em finais do século XVIII e início do século XIX deu-se uma viragem no conhecimento das plantas medicinais devido ao isolamento dos respetivos compostos ativos e determinação da sua estrutura. O isolamento dos compostos com ação farmacológica permitiu a substituição das plantas e dos seus extratos por aqueles (século XIX). O desenvolvimento da química analítica tem possibilitado, nas últimas décadas, um melhor conhecimento da composição química e da estrutura dos componentes das plantas medicinais, o que permite também um maior controlo da qualidade (Cunha, Roque e Nogueira, 2012; Petrovska, 2012; Oliveira, 2013). Durante milhares de anos o recurso a fármacos de origem vegetal correspondeu a cerca de 90% dos medicamentos utilizados para o tratamento de doenças (Marques, 2008).

Por volta de 1930, houve um grande desenvolvimento da química de síntese com o aparecimento das primeiras sulfamidas seguido dos antibióticos; este desenvolvimento juntamente com a boa aceitação e eficácia destes produtos levou à generalização do seu uso e conseqüentemente a uma diminuição da aplicação de plantas medicinais (Martins, 2008; Marques, 2008). No entanto, a utilização destes produtos trouxe alguns problemas como é o caso das reações adversas, o que fez com que para além da eficácia fossem tidas em conta a qualidade e a segurança (Martins, 2008). Este fator, juntamente com a preferência por produtos naturais, a validação científica das propriedades farmacológicas de várias espécies de plantas, os novos métodos analíticos para controlo da qualidade, desenvolvimento de novas formas de preparação e de administração dos fitoterápicos e o preço reduzidos destes quando comparados com os produtos de síntese levaram à expansão atual da Fitoterapia (Melo *et al.*, 2007; Marques, 2008).

O interesse pelas plantas medicinais não ocorre só nos países com tradição em Fitoterapia mas um pouco por todo o mundo (Oliveira, 2013) e países como a Alemanha, a França e a Inglaterra têm vindo a incluir nas suas farmacopeias várias plantas medicinais e elaboradas monografias importantes, como as da Comissão E (Comité de peritos em plantas medicinais, criado pela Agência Federal de Saúde Alemã que avalia a segurança das fitomedicinas) (Martins, 2008).

Apesar de toda a atenção direcionada para as plantas medicinais, estima-se que das muitas espécies com propriedades medicinais descritas tradicionalmente apenas para uma

reduzida percentagem foram realizados estudos sobre as suas atividades farmacológicas e composição química (Pereira, 2013).

1.2 Legislação

O crescente interesse pela utilização de plantas medicinais (dos seus extratos ou componentes isolados), conduz à necessidade de obter um conhecimento mais aprofundado de cada espécie de planta a nível da composição química e das atividades biológicas, desenvolver formulações que garantam a eficácia terapêutica da substância ativa e permitam assegurar a proteção da saúde pública, através do estabelecimento de requisitos de qualidade, segurança e eficácia (demonstrada através de ensaios pré-clínicos e clínicos). É ainda imprescindível a existência de legislação e regulamentação que possibilitem o cumprimento destas exigências (Marques, 2008; Cunha, Roque e Nogueira, 2012; Observatório de Interações Planta - Medicamento, 2013).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) e a União Europeia têm vindo a trabalhar com o intuito de assegurar os objetivos referidos anteriormente. A nível europeu, a Diretiva 2004/24/CE harmoniza as normas dos medicamentos com grande tradição de utilização de forma a cumprirem os requisitos necessários para a concessão da autorização de introdução no mercado (AIM). Com esta Diretiva foi também instituído o *Committee on Herbal Medicine Products* (HMPC) da Agência Europeia do Medicamento, que tem por responsabilidade a elaboração de monografias relativas ao uso medicinal bem estabelecido e de listas de substâncias derivadas de plantas, preparações e associações das mesmas bem como das condições de utilização (Martins, 2008).

Em Portugal, as diretivas europeias estão transpostas no Estatuto do Medicamento aprovado pelo Decreto-Lei nº 176/2006, de 30 de Agosto, onde o medicamento à base de plantas é definido como "qualquer medicamento que contenha exclusivamente como substância ativa uma ou mais substâncias derivadas de plantas, uma ou mais preparações à base de plantas ou uma ou mais substâncias derivadas de plantas em associação com uma ou mais preparações à base de plantas". O trabalho de regulamentação e fiscalização dos medicamentos à base de plantas é da responsabilidade da Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde (INFARMED) (Oliveira, 2013).

Para submissão de um pedido de AIM de medicamentos à base de plantas deve ser elaborado um documento com informações de ensaios pré-clínicos e clínicos que pode ser

submetido por um procedimento nacional e/ou por reconhecimento mútuo e descentralizado (INFARMED ("Medicamentos à base de plantas"); Oliveira,2013).

O trabalho desenvolvido com o objetivo de regulamentar a utilização de plantas medicinais tem mostrado resultados positivos; segundo dados da OMS (2013) tem-se verificado um aumento do número de Estados-membros com regulamentação de plantas medicinais e de criação de políticas de utilização da medicina tradicional.

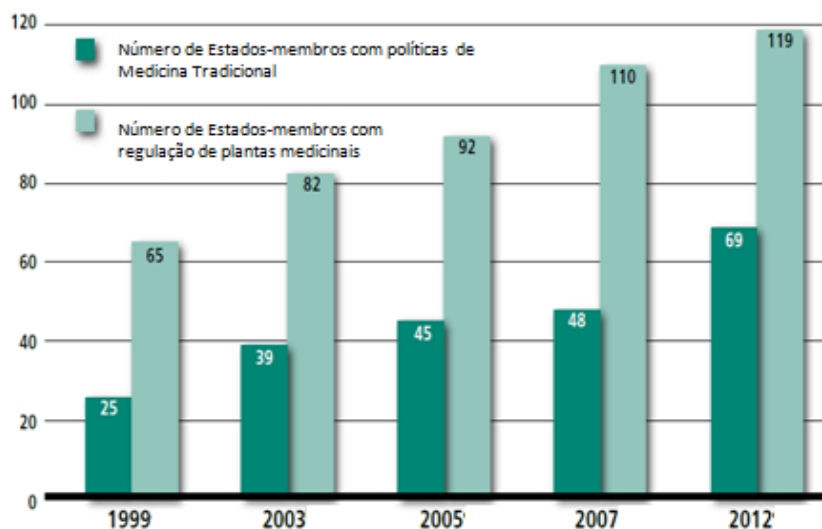


Figura I - Acompanhamento da evolução dos indicadores de progresso dos países, definidos pela WHO Traditional Medicine Strategy. Adaptado de WHO Traditional Medicine Strategy 2014-2023 (OMS, 2013).

No futuro espera-se que continue a haver investimento/incentivo para o estudo de plantas com vantagens terapêuticas, que haja o seu reconhecimento nos diferentes países, bem como a implementação de medicinas complementares, como a Fitoterapia, nos sistemas de saúde para que o doente tenha opção de escolha na terapêutica que lhe é aplicada.

2. *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.

Devido ao crescente interesse pelo uso de plantas medicinais, já anteriormente referido, surge a necessidade de adquirir um maior conhecimento científico sobre as diferentes espécies. A espécie *Cymbopogon citratus* é uma das que tem despertado a atenção dos investigadores, não só devido à panóplia de utilizações tradicionais em diferentes patologias, mas também pelas suas aplicações industriais, tais como: perfumaria, cosmética e indústria alimentar (Pereira, 2013; Tavares *et al.*, 2014).

2.1 Caracterização botânica e etnomedicina

O *Cymbopogon citratus*, já descrito como *Andropogon citratus* por De Candolle, pertence à família Poaceae (conhecida genericamente por gramíneas); o género *Cymbopogon*

é composto por 30 espécies (Negrelle e Gomes, 2007) e é amplamente distribuído nas regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia e América (Avoseh *et al.*, 2015), sendo originário do sudoeste asiático (Melo *et al.*, 2007; Figueirinha, 2011). Desenvolve-se bem em ambientes quentes e húmidos (climas tropicais) (Ewenighi *et al.*, 2013), sendo também encontrado em climas temperados (Figueirinha, 2011). O nome *Cymbopogon* deriva do grego *kymbe* e *pogon* que significa "arranjo de flores em espiga" e *citratus* deriva do latim e refere-se ao característico aroma a limão desta espécie. Em cada região do globo a espécie é conhecida por um nome específico, sendo conhecida em Portugal por Erva-príncipe (Negrelle e Gomes, 2007; Shah *et al.*, 2011; Pereira, 2013). *Cymbopogon citratus* pode ser apresentado através dos sinónimos seguintes: *Andropogon ceriferus* Hack, *Andropogon citratus* DC, *Andropogon citratus* DC ex Nees, *Andropogon citriodorum* Hort x Desf., *Andropogon nardus* subsp. *ceriferus* (Hack) Hack, *Andropogon roxburghii* Nees ex Steud., *Andropogon schoenathus* L., *Cymbopogon nardus* subvar. *citratus* (DC.) Roberty (Negrelle e Gomes, 2007).



Figura 2 - *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.

(http://zipcodezoo.com/index.php/File:Cymbopogon_citratus_7.jpg).

Tabela 1 - Classificação científica de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. Adaptado de Negrelle e Gomes, 2007 e Shah *et al.*, 2011.

Reino	Plantae
Sub-reino	Tracheobionta
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Liliopsida
Subclasse	Cammelinidae
Ordem	Poales
Família	Poaceae
Género	<i>Cymbopogon</i>
Espécie	<i>citratus</i>

A Erva-príncipe desenvolve-se em grupos densos que podem atingir até um metro de altura, com rizomas curtos e folhas que crescem a partir da base, formando um tufo, longas (em média de um metro de comprimento e 1,5-2 cm de largura), lanceoladas, lineares, textura cortante, coloração verde e com agradável odor a limão (Gupta,1995; Duarte e Zaneti, 2004; Negrelle e Gomes, 2007; Figueirinha, 2011).

Na medicina tradicional o *Cymbopogon citratus* é muito usado na forma de infusões preparadas a partir das suas folhas frescas ou secas (Negrelle e Gomes, 2007); as raízes são a parte da planta menos utilizada, e quando usada é sob a forma de decocto (Figueirinha, 2011). Tradicionalmente, a infusão é preparada pela adição de 2g de folhas secas a 150 ml de água (Formulário de Fitoterápicos Farmacopeia Brasileira, 2011; Pereira, 2013). As infusões de *Cymbopogon citratus* são utilizadas para uma vasta gama de indicações terapêuticas que vão variando de acordo com o país onde são empregadas (Negrelle e Gomes, 2007). A tabela 2 resume alguns dos usos do *Cymbopogon citratus*.

Tabela 2 - Lista das utilizações medicinais de *Cymbopogon citratus* consoante o país.
Adaptado de Gupta,1995; Negrelle e Gomes, 2007; Figueirinha,2011; Shah et al., 2011; Avoseh et al., 2015.

País	Uso tradicional
Argentina	Decocção das folhas é tomada oralmente como chá - "mate" para dores de garganta, como emético, para queixas digestivas e transtornos de estômago e para a malária em conjunto com outras plantas.
Brasil	O chá feito a partir das suas folhas é normalmente utilizado como antiespasmódico, analgésico, anti-inflamatório, antipirético, diurético, ansiolítico, anti-hipertensivo e sedativo. É também usado como antitússico, antialérgico e contra constipações.
China	Chá ou infusão usado como ansiolítico.
Colômbia	O rizoma é mastigado e usado como escova de dentes (também a infusão preparada a partir do rizoma é utilizada para limpar os dentes) e no controlo de pragas.
Costa Rica	A infusão preparada com as folhas é tomada para aliviar a tosse, como carminativo, diaforético, expetorante e depurativo.
Cuba	O extrato de água quente das folhas secas é tomado oralmente como hipertensor, para o catarro e reumatismo; as folhas são também utilizadas para constipações e problemas gástricos.
Egipto	Extrato de água quente das folhas é tomado oralmente como

	antiespasmódico e diurético.
Guatemala	As folhas secas são utilizadas para feridas, úlceras, contusões e infecções do trato urinário.
Ilhas Maurícias	O chá é utilizado para gripes, febre, pneumonia e para problemas gástricos e sudoríferos.
Índia	Toda a planta fresca serve para repelir serpentes; 2 ou 3 gotas do óleo essencial em água quente são tomadas para problemas gástricos; uma gota de óleo com sumo de limão é tomada oralmente para a cólera. O extrato aquoso quente das folhas é usado para o banho em caso de dor de cabeça e febre; o chá é usado como sedativo.
Indonésia	Extrato de água quente da planta inteira é tomado oralmente como emenagogo. A planta é indicada para ajudar na digestão, promover a diurese e sudorese.
Malásia	Extrato de água quente da planta inteira é tomado oralmente como emenagogo.
Nicarágua	Usado como diaforético em febres, tratamento de tosse, gripe e pneumonia; infusões com as folhas e decoctos com a raiz são recomendados como sedativo, para dores de estômago e hipertensão.
Nigéria	As folhas são utilizadas para distúrbios da diabetes, inflamatórios e nervosos. É também usado como antipirético e antiespasmódico.
Panamá	A infusão é usada como depurativo, para a indigestão e dores de estômago (umas folhas em quatro copos de água).
Península Malaia	O chá é utilizado para gripes, febre, pneumonia e para problemas gástricos e sudoríferos.
Peru	Antiespasmódico, estomáquico e analgésico.
Portugal	O infuso das folhas é usado para problemas gastrointestinais.
Suriname	Utilizado para a tosse, cortes, asma, distúrbios de bexiga, diaforético e alívio das dores de cabeça.
Tailândia	Toda a planta fresca é inalada como uma fragrância e comida como um condimento; extrato de água quente de toda a planta seca é tomada oralmente para problemas estomacais e o da raiz é

	usado na diabetes.
Trinidad e Tobago	Usado no tratamento da diabetes.
USA	Extrato de água quente da planta inteira é usado no Minnesota para cicatrização e fraturas ósseas.

Além das aplicações na medicina tradicional é também utilizado na aromoterapia, em bebidas, como condimento na cozinha tradicional pelo seu sabor a limão, na perfumaria e cosmética e ainda como conservante e inseticida (Figueirinha *et al.*, 2008; Asaolu, Oyeyemi e Olanlokun, 2009).

2.2 Composição química

Na medicina tradicional são vulgarmente usadas infusões das folhas de *Cymbopogon citratus* mas a espécie é constituída por fitoquímicos que têm grande utilidade (Negrelle e Gomes, 2007; Pereira, 2013).

A composição química dos extratos de *Cymbopogon citratus* apresenta diferenças consoante a origem geográfica, as diferenças genéticas, parte da planta utilizada, método de extracção, idade, forma de secagem, armazenamento e época da colheita (Ekpenyong, Akpan e Daniel, 2014; Costa *et al.*, 2016a). Têm sido identificados como constituintes de *Cymbopogon citratus* os óleos essenciais, polifenóis como os ácidos fenólicos, flavonoides e taninos, alcalóides, terpenos, álcoois, saponinas, cetonas, antraquinonas, aldeídos, minerais, vitaminas e macronutrientes (Negrelle e Gomes, 2007; Pereira, 2013; Ekpenyong, Akpan e Nyoh, 2015).

2.2.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são líquidos perfumados extraídos de plantas aromáticas (El Asbahani *et al.*, 2015). Trata-se de misturas complexas formadas por metabolitos secundários bio sintetizados em diferentes órgãos de plantas (Costa, 2011; El Asbahani *et al.*, 2015). A composição qualitativa e quantitativa dos óleos essenciais varia consoante a origem geográfica, a idade da planta e as características ambientais, mas de modo geral, os principais constituintes permanecem na planta (Pinto *et al.*, 2015).

Devido às vantagens económicas dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, uma vez que são uma fonte de compostos empregues na indústria alimentar, na indústria de sabão e na perfumaria, como aromatizante, há uma grande incidência de investigação e consequentemente um maior conhecimento sobre estes compostos (Negrelle e Gomes,

2007; Figueirinha *et al.*, 2008); os constituintes do óleo essencial são principalmente terpenos de hidrocarbonetos, álcoois, cetonas, ésteres e aldeídos (Negrelle e Gomes, 2007).

O composto principal é o citral (30 - 93,74%), uma mistura isomérica de aldeídos: o geranial (isômero *trans*) com uma predominância de 40 - 62% e o neral (isômero *cis*) com predominância de 25 - 38% (Negrelle e Gomes, 2007; Shah *et al.*, 2011). O citral é responsável pelo aroma a limão característico da espécie. O *Cymbopogon citratus* da Etiópia apresenta como constituinte maioritário do óleo essencial o geraniol e não o citral (Negrelle e Gomes, 2007).

Além do citral são ainda encontrados outro tipo de aldeídos como o isocitral, decinal, aldeído valérico, anisaldeído, cinamaldeído, citronelal e outros aldeídos C-9 e C-10 (Negrelle e Gomes, 2007; Figueirinha, 2011; Shah *et al.*, 2011).

Outros compostos característicos do óleo essencial são os terpenos, em especial o mirceno (monoterpeno maioritário 2-25%), o limoneno, α -pineno (0,07%) e alguns sesquiterpenos (Negrelle e Gomes, 2007; Figueirinha, 2011; Shah *et al.*, 2011). Os ésteres presentes no óleo essencial de *Cymbopogon citratus* são: formato de geranilo, acetato de citronelilo, acetato de terpinilo, formato de linalilo, acetato de linalilo (0,1%) e acetato de geranilo (0,83%) (Negrelle e Gomes, 2007; Shah *et al.*, 2011).

De entre os álcoois o mais frequente é o geraniol (3,04%) mas estão também presentes outros como o linalol, citronelol, meta-heptanol, nerol, neomentol, fumesol, furforol, α -tirpeneol entre outros (Negrelle e Gomes, 2007; Shah *et al.*, 2011; Ekpenyong, Akpan e Daniel, 2014). É ainda constituído por cetonas, onde se destaca a ionona e a metil-heptanona (Negrelle e Gomes, 2007). A Figura 3 apresenta a estrutura química de alguns dos principais compostos do óleo essencial.

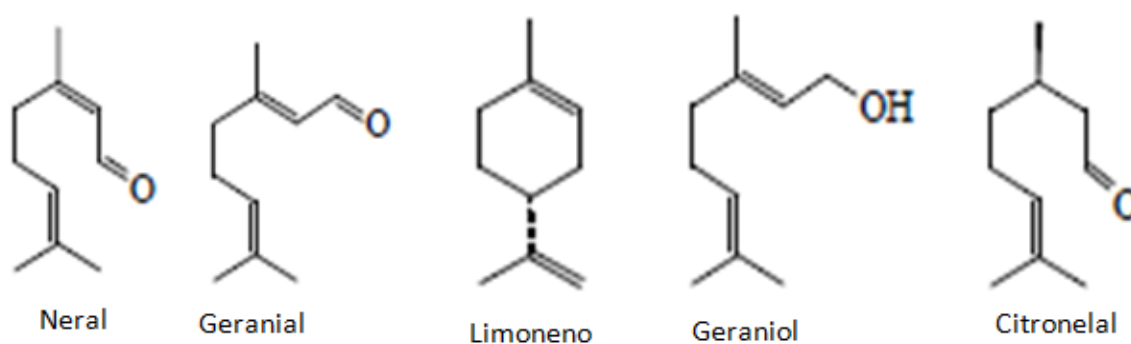


Figura 3 - Estrutura dos principais compostos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*. Adaptado de Avoseh *et al.*, 2015.

2.2.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários de plantas produzidos em resposta a estímulos externos e que exercem várias funções na planta como a proteção contra organismos patogênicos e predadores entre outras (Vázquez *et al.*, 2015). Estruturalmente derivam do fenol, podendo o grupo hidroxilo encontrar-se livre ou substituído (glicosilado ou esterificado) (Figueirinha, 2011).

Foram vários os compostos fenólicos identificados no *Cymbopogon citratus* sendo a maioria: ácidos fenólicos, flavonoides e taninos.

Os ácidos fenólicos são uma categoria dos compostos fenólicos e estão divididos em ácido hidroxibenzóico (C6-C1) e ácido hidroxicinâmico (C6-C3) (Tsao, 2010). No *Cymbopogon citratus* são mais comuns os ácidos hidroxicinâmicos (Figueirinha, 2011). Alguns dos ácidos hidroxicinâmicos presentes são o ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúilquínico, ácido cafeoilquínico e seus derivados (Negrelle e Gomes, 2007; Figueirinha *et al.*, 2008; Tavares *et al.*, 2014).

Os flavonoides são constituídos por dois anéis aromáticos ligados por três carbonos que podem ou não formar um terceiro anel (classificados como C6-C3-C6); consoante a hidroxilação e a existência do anel de três carbonos estes são classificados em diversos sub-grupos tais como: flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas e flavonóis (Tsao, 2010).

No *Cymbopogon citratus* os flavonoides característicos são do tipo flavonas, em particular a luteolina e seus derivados *C*- e *O*- glicósidos, de que são exemplo: luteolina 6-*C*-hexosil-8-*C*-pentosilo, isoorientina, luteolina 2''-*O*-ramnosil-(6-desoxi-ribo-hexos-3-ulosilo), isoorientina 2''-*O*-ramnósido, luteolina 7-*O*-glicosilo, entre outros, e os derivados glicosilados da apigenina (Negrelle e Gomes, 2007; Figueirinha *et al.*, 2008; Figueirinha *et al.*, 2010; Tavares *et al.*, 2014).

Os taninos que se encontram em maior quantidade no *Cymbopogon citratus* são do tipo condensado (também designados por proantocianidinas) que consistem em polímeros de flavonoides de elevado peso molecular e portanto apresentam um elevado número de grupos hidroxilo (Avoseh *et al.*, 2015; Figueirinha *et al.*, 2008).

As estruturas químicas de alguns dos compostos fenólicos presentes em *Cymbopogon citratus* encontram-se na Figura 4.

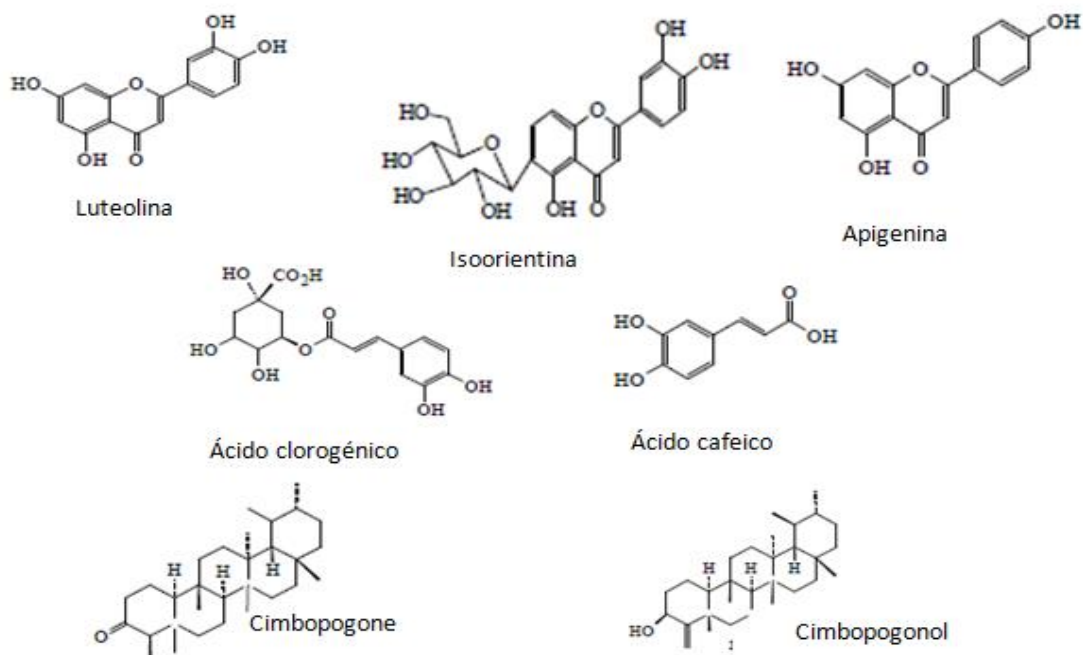


Figura 4 - Estrutura de alguns dos compostos fenólicos e triterpenos de *Cymbopogon citratus*. Adaptado de Avoseh *et al.*, 2015.

2.2.3. Outros compostos

Foram ainda encontrados terpenos não voláteis (mais especificamente dois triterpenos): o cimbopogone (cetona) e o cimbopogonol (aldeído) (Pereira, 2013; Avoseh *et al.*, 2015). Relativamente à constituição em electrólitos e minerais têm sido detetados, por exemplo: sódio, zinco, potássio, selénio, cálcio e as vitaminas A, C e E, riboflavina e tiamina. Também têm sido identificados macronutrientes como proteínas, hidratos de carbono e gorduras (Ekpenyong, Akpan e Daniel, 2014; Ekpenyong, Akpan e Nyoh, 2015).

2.3 Atividade biológica

Os extratos de *Cymbopogon citratus* apresentam uma vasta gama de atividades biológicas evidenciadas em diversos estudos, nomeadamente: ansiolítico, sedativo / relaxante, analgésico, anti-inflamatório, anti-oxidante, antifúngica, antimicrobiano, antitumoral, no tratamento da diabetes, colesterol e asma e atividade hemodinâmica (Figueirinha *et al.*, 2008; Negrelle e Gomes, 2007; Ekpenyong, Akpan e Nyoh, 2015).

Ao nível do Sistema Nervoso Central (SNC), foi verificado que o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* apresentam marcada depressão do SNC em ratos (Shah *et al.*, 2011; Avoseh *et al.*, 2015; Ekpenyong, Akpan e Nyoh, 2015); outros ensaios mostram que o chá preparas com folhas fresca ou secas de *Cymbopogon citratus* não apresentam efeito ansiolítico em animais de experimentação (Negrelle e Gomes, 2007; Ekpenyong, Akpan e Nyoh, 2015). Blanco e seus colaboradores (2009) indicaram nos seus estudos em camundongos que o

óleo essencial administrado oralmente mostrou resultados positivos nos testes de avaliação da ansiedade e efeito anti convulsionante. A atividade ansiolítica por parte dos óleos essenciais poderá estar relacionada com o complexo recetor GABA_A de benzodiazepinas, já que esta pode ser revertida pelo Flumazenilo (antagonistas dos efeitos provocados pelas benzodiazepinas) (Costa *et al.*, 2011). A ação antinociceptiva do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* foi verificada em ratos por Viana *et al.* (2000), bem como o efeito analgésico que pode ocorrer tanto a nível central como periférico.

A atividade antimicrobiana do *Cymbopogon citratus* tem sido atribuída principalmente ao seu óleo essencial, este que também evidenciou atividade antibacteriana contra diferentes agentes patogénicos como por exemplo: *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*; sendo eficaz contra bactérias gram-negativas e gram-positivas, principalmente devido ao geranial, neral e mirceno (Negrelle e Gomes, 2007; Naik *et al.*, 2010; Bassolé *et al.*, 2011; Shah *et al.*, 2011; Ekpenyong, Akpan e Nyoh, 2015). Extratos em clorofórmio, metanol e água também têm sido eficazes contra *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus vulgaris* (Balakrishnan, Paramasivam e Arulkumar, 2014). O óleo essencial também exibiu atividade antifúngica contra *Candida albicans* (o que pode justificar o seu uso tradicional em infeções do trato urinário), contra fungos comuns no armazenamento de alimentos e dermatófitos (Negrelle e Gomes, 2007; Khan e Ahmad, 2012; Ekpenyong, Akpan e Nyoh, 2015). Um ensaio para avaliar a eficácia clínica de um fitoterápico à base do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* em candidíase vaginal, mostrou que este é tão eficaz e seguro como o Miconazol (Dias, 2014). O óleo essencial demonstrou igualmente ser um antivírico eficaz contra o vírus herpes simplex I (HSV-I) *in vitro* (Ekpenyong, Akpan e Nyoh, 2015) e anti malárico, uma vez que suprimiu o crescimento de *Plasmodium berghei* (Shah *et al.*, 2011).

Em vários ensaios de atividade antioxidante, os extratos em metanol e metanol/água, infusões e decocções de *Cymbopogon citratus*, e em particular as frações de compostos fenólicos têm apresentado capacidade de eliminar espécies reativas de oxigénio (ROS) (Cheel *et al.*, 2005; Balakrishnan, Paramasivam e Arulkumar, 2014). Tem sido proposto que a atividade antioxidante das frações polifenólicas da planta possa ter um papel fundamental na disfunção endotelial associada a stress oxidativo, já que diminui a produção de ROS em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) e diminui a vasoconstrição induzida por Tromboxano A2 (Campos *et al.*, 2014); outra aplicação terapêutica poderá ser na aterosclerose já que os C-glicosiflavonoides diminuem a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (Orrega, Leiva e Cheel, 2009). Estudos realizados por Tiwari *et al.* (2010)

mostram um aumento da atividade do superóxido dismutase e do conteúdo de glutatona, diminuição da produção de ROS e de marcadores da peroxidação lipídica em macrófagos alveolares murinos. A atividade antioxidante tem sido atribuída aos flavonoides, taninos (Figueirinha *et al.*, 2008) e às vitaminas presentes (Ekpenyong, Akpan e Nyoh, 2015).

Os compostos fenólicos presentes em infusões da planta parecem ter atividade anti-inflamatória uma vez que exibiram capacidade de reduzir os níveis de expressão da proteína i-NOS (óxido nítrico sintase induzível), a produção de NO (óxido nítrico) induzida por lipopolissacarídeos (LPS), inibir o proteossoma e conseqüentemente impedirem a activação do fator nuclear kB (NF-kB) em diversas linhas celulares (Figueirinha *et al.*, 2010; Francisco *et al.*, 2011; Francisco *et al.*, 2013; Tavares *et al.*, 2014). Também a suportar esta hipótese, vários estudos têm demonstrado a capacidade de extratos etanol/água reduzirem mediadores pró-inflamatórios como o fator de necrose tumoral (TNF- α) (Tiwari, Dwivedi e Kakkar, 2010) e a interleucina-1 β (IL-1 β), propriedades que têm sido atribuídas à luteolina e seus glicósidos (Francisco *et al.*, 2014). Também o citral mostrou ser capaz de diminuir a libertação de citocinas pró-inflamatórias, em particular a IL-1 β , interleucina-6 (IL-6) e interleucina-10 (IL-10) em macrófagos murinos (Bachiega e Sforcin, 2011). Recentemente, os estudos *in vivo* desenvolvidos por Costa *et al.* (2016b), demonstram a capacidade da infusão de *Cymbopogon citratus*, após administração tópica, atuar como anti-inflamatória o que sugere a sua aplicação no tratamento de patologias da pele associadas a inflamação.

O extrato aquoso administrado oralmente, na dose de 125-500 mg/Kg, em ratos diabéticos demonstra a redução dos níveis de glucose no plasma, diminuição dos níveis de colesterol total e LDL e aumento dos níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL) (Adeneye e Agbaje, 2007). Resultados semelhantes foram obtidos por Ewenighi *et al.* (2013) onde também foi verificada a diminuição do peso corporal e dos níveis de triglicerídeos em ratos tratados com extratos da planta. Estudos de Costa *et al.* (2011) mostraram que a administração oral dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* permitiu diminuir o nível de colesterol no sangue; estes efeitos também foram observados em humanos, e podem estar relacionados com a inibição da HMG-CoA e diminuição da absorção intestinal de colesterol por acção daqueles, saponina, taninos ou flavonoides (Ekpenyong, Akpan e Nyoh, 2015).

Os extratos de hexano revelam potencial para modular a asma alérgica, podendo vir a ser no futuro uma abordagem alternativa para tratamento desta patologia. Em modelos *in vivo* de alergia respiratória, o extrato demonstrou reduzir: o número de leucócitos/eosinófilos na solução de lavagem bronco-alveolar, a atividade da peroxidase de

eosinófilos, a produção de leucócitos no tecido pulmonar, a produção de muco nas vias respiratórias, o nível de IL-4 e a expressão nuclear de NF-kB (Machado *et al.*, 2015).

A atividade hemodinâmica foi demonstrada através da capacidade das decocções de *Cymbopogon citratus* exercerem ação diurética que permite diminuir a pressão arterial; outro mecanismo proposto para a redução da pressão arterial pelos componentes de *Cymbopogon citratus* é a inibição do sistema renina-angiotensina-aldosterona (Ekpenyong, Akpan e Nyoh, 2015).

O óleo essencial de *Cymbopogon citratus* tem demonstrado atividade anticancerígena e anti tumoral através da supressão da proliferação de células do carcinoma da epiderme da boca em ratos e humanos (Ekpenyong, Akpan e Nyoh, 2015), inibição do cancro do fígado e da membrana da mucosa intestinal, em ratinhos (Negrelle e Gomes, 2007). Os polissacarídeos têm demonstrado, nos estudos realizados por Bao *et al.* (2015), impacto na atividade anti tumoral já que diminui o crescimento do Sarcoma 180 e ainda melhora a imunidade dos ratos portadores do tumor, com secreção de interleucina 2, 6 e 12 (IL-2, IL-6 e IL-12) e do TNF- α .

Para algumas destas ações terapêuticas já existe evidência de quais os componentes fitoquímicos responsáveis pela atividade biológica, informação que se encontra na tabela 3 (Ekpenyong, Akpan e Nyoh, 2015).

Tabela 3 - Fito constituintes de *Cymbopogon citratus* e suas atividades biológicas. Adaptado de Ekpenyong, Akpan e Nyoh, 2015.

Óleo essencial	Aromaterapia, conservação de alimentos, antimicrobiano, hipoglicémico, anti carcinogénico, neuro farmacológico, cardiovascular e hematológica
Taninos	Ação anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante, hipoglicémica e adstringente
Saponinas	Ação anti-inflamatória, adstringente suave e hipocolesterolémica
Flavonoides	Ação antioxidante, antipirética e antimicrobiano
Alcaloides	Ação neurofarmacológica e adstringente
Vitaminas	Ação cardioprotectora e antioxidante
Minerais	Ação neuro farmacológica e hemodinâmica

Além das aplicações já anteriormente referidas, *Cymbopogon citratus* (em particular o óleo essencial) é utilizado como inseticida. Estudos realizados por Pinto *et al.* (2015) revelam

que os óleos essenciais e em particular o citral causam alterações morfológicas nas espécies adultas de *Musca Domestica* e mortalidade no período larval, neo-larval a adulto de acordo com a dose aplicada. Costa *et al.* (2013) mostrou que o óleo essencial apresenta atividade contra *Myzus persicae*, o que sugere a sua possível aplicação como pesticida. Têm ainda sido obtidos resultados positivos como herbicida, já que os óleos essenciais inibiram a germinação de *Digitaria horizontalis*, *Sorghum halepense*, *Bidens pilosa*, *Euphorbia heterophylla* e *Raphanus raphanistrum* (Negrelle e Gomes, 2007).

2.4 Farmacocinética e biodisponibilidade

Após a administração de uma substância activa é necessário conhecer a sua farmacocinética, isto é, estudar o modo como se dá a absorção, distribuição, metabolismo e excreção. Estas informações sobre extratos à base de *Cymbopogon citratus* ainda são escassas, em estudos em humanos e animais, mas já são conhecidas algumas propriedades farmacocinéticas e de biodisponibilidade de alguns dos constituintes presentes na planta (Ekpenyong, Akpan e Nyoh, 2015).

Os componentes dos óleos essenciais apresentam perfis semelhantes em termos de absorção, metabolismo e excreção; sendo rapidamente absorvidos após administração pulmonar, oral e dérmica. Na sua maioria são metabolizados e eliminados pelo rim e a sua acumulação no organismo é improvável devido à rápida depuração e semivida biológica curta. Por exemplo, estudos em animais demonstraram que a absorção do citral é quase completa e o seu metabolismo é rápido e extenso, sendo o sistema urinário a principal via de eliminação (Ekpenyong, Akpan e Nyoh, 2015). Já os compostos fenólicos são metabolizados no trato gastrointestinal (Gullon *et al.*, 2015), sendo observada a diminuição dos compostos fenólicos na fração duodenal (Rodríguez-Roque *et al.*, 2013). Os polifenóis na forma de ésteres ou glicosilados podem sofrer hidrólise, através das enzimas intestinais e da microflora colónica, antes de serem absorvidos. Em geral, os polifenóis glicosilados ou com algum grau de polimerização têm uma biodisponibilidade mais baixa. Após absorção os compostos fenólicos sofrem conjugação (metilação, sulfatação e glucoronidação) que facilita a sua eliminação (Pandareesh, Mythri e Srinivas Bharath, 2015).

Examinando mais detalhadamente algumas das classes dos compostos fenólicos presentes em *Cymbopogon citratus* verificou-se que: os flavonoides têm fraca biodisponibilidade e em grande parte são decompostos na flora intestinal (Ekpenyong, Akpan e Nyoh, 2015); quando são glicosilados sofrem, no intestino delgado, desglicosilação e são absorvidos em pequena quantidade na forma de agliconas, apresentando tendência a

acumular no organismo, após doses repetidas (Pandareesh, Mythri e Srinivas Bharath, 2015). A luteolina demonstra ser convertida em glucoronidos aquando de sua passagem através da membrana intestinal e os derivados glicosilados também são absorvidos após a hidrólise do açúcar (Shimoi *et al.*, 1998). Estudos de Ahmad-Qasem *et al.* (2014) mostram a relativa estabilidade da luteolina 7-O-glucósido, que sofre ligeira degradação durante a digestão. Os ácidos hidroxicinâmicos são pouco absorvidos no estômago sendo, em geral, assimilados no intestino delgado (Oliveira e Bastos, 2011). Podem ser absorvidos de forma intacta ou após hidrólise, na forma de ácido cafeico e quínico (Ekpenyong, Akpan e Nyoh, 2015). O ácido clorogénico, por exemplo, aparece em baixas concentrações ou mesmo nulas na urina e plasma, sugerindo uma extensa metabolização (Oliveira e Bastos, 2011). Os taninos têm biodisponibilidade negligenciável devido às suas dimensões, afinidade para ligarem a proteínas e fraca solubilidade lipídica; as proantocianidinas são hidrolisadas em monómeros de flavanol nas condições gástricas e no intestino delgado tendem a ligar -se a proteínas, formando complexos mais difíceis de digerir pelas enzimas digestivas (Serrano *et al.*, 2009; Ekpenyong, Akpan e Nyoh, 2015).

2.5 Toxicidade

A avaliação da toxicidade de *Cymbopogon citratus* torna-se indispensável a partir do momento em que cresce o interesse pelo seu uso. O óleo essencial tem sido considerado inócuo em mamíferos mas em outros estudos o citral tem demonstrado algumas reacções dérmicas e indução da atividade do citocromo P450, o que pode ter influência na toxicidade e interações medicamentosas. Ratos tratados com o óleo essencial não mostraram resultados de toxicidade aguda em doses únicas de 5-1500mg/Kg de massa corporal e no tratamento prolongado (21 dias) não foram observadas alterações histológicas indicadoras de toxicidade (Negrelle e Gomes, 2007; Costa *et al.*, 2011; Ekpenyong, Akpan e Daniel, 2014).

As infusões preparadas a partir das folhas da planta também não apresentaram toxicidade observando-se total ausência de efeitos neurotóxicos em voluntários saudáveis nem teratogénicos em ratos quando administrada em doses elevadas durante dois meses; na administração de extratos em ratos também não foram observadas alterações nos órgãos vitais nem alterações bioquímicas no sangue e urina; o extrato hidroalcoólico na dose de 5 e 10 µg não mostrou cito toxicidade em macrófagos alveolares (Negrelle e Gomes, 2007; Tiwari, Dwivedi e Kakkar, 2010; Ekpenyong, Akpan e Daniel, 2014).

3. Formas Farmacêuticas

Após os estudos *in vitro* e *in vivo*, em animais de experimentação, que comprovam a eficácia e segurança dos extratos de *Cymbopogon citratus* o desenvolvimento de formas farmacêuticas que sejam tanto ou mais eficazes e melhor aceites pelos doentes é perfeitamente justificado.

Segundo o Decreto-Lei nº 128/2013, de 5 de Setembro, uma forma farmacêutica é o estado final que as substâncias ativas ou excipientes apresentam depois de submetidas às operações farmacêuticas necessárias, a fim de facilitar a sua administração e obter o maior efeito terapêutico desejado.

A substância ativa é o componente que se destina a exercer uma ação farmacológica ou outro efeito diretamente relacionado com o diagnóstico, tratamento ou prevenção de uma doença, ou a atuar na estrutura ou nas funções do organismo humano ou animal por meios farmacológicos (Farmacopeia Portuguesa IX, 2008).

O excipiente é qualquer componente de um medicamento que não seja a substância ativa ou o material da embalagem (Decreto-Lei nº 128/2013, de 5 de Setembro) e é classificado consoante a função que tem na forma farmacêutica. Pode ser então qualificado como: diluente (produto inerte que tem por finalidade obter uma formulação com a massa adequada como são exemplos a lactose, a sacarose e os amidos); absorvente (tem por objetivo absorver a água, fixar ou estabilizar princípios ativos voláteis ou higroscópicos, respetivamente); desagregante (acelera a dissolução ou a desagregação sendo o mais utilizado o amido); lubrificante (evita a aderência dos pós e são exemplo o estearato de magnésio, talco e parafina); aglutinante (permite a aglomeração da substância activa e serve de exemplo a goma arábica e a celulose); molhante (opõe-se à libertação do pó na compressão como é o caso do Tween 80); tampão (mantem estável o pH da fórmula como são exemplo os fosfatos alcalinos); corante (dar cor para tornar a forma farmacêutica mais atrativa); aromatizante e edulcorante (têm a função de modificar o aroma e o paladar da formulação, respetivamente, de modo a que seja melhor aceite pelo doente) (Prista, Alves e Morgado, 1995). Em suma, os excipientes são utilizados para ajudar no fabrico da forma farmacêutica, proteger, apoiar ou melhorar a estabilidade e a biodisponibilidade da substância ativa bem como a sua aceitação pelo doente e melhorar a segurança e a eficácia do medicamento (Sam *et al.*, 2012).

As formas farmacêuticas sólidas orais são as mais utilizadas, uma vez que permitem a administração de doses exatas de fármacos (Pezzini, Silva e Ferraz, 2007), sendo os

comprimidos e as cápsulas que apresentam maior destaque. Segundo a Farmacopeia Portuguesa IX (2008) os comprimidos são preparações sólidas que contêm uma ou mais substâncias ativas, sendo geralmente obtidos por compressão de um volume constante de partículas, ou por um processo adequado. Podem ser deglutidos ou mastigados bem como dissolvidos ou desagregados em água, antes da administração, ou permanecerem na boca e aí libertarem a substância ativa. Geralmente a substância ativa é acompanhada de excipientes como por exemplo, diluentes, desagregantes e lubrificantes que facilitam a obtenção da forma farmacêutica. Estes possibilitam a administração de uma dose precisa, apresentam conservação superior à das soluções, são rápidos de preparar e apresentam deglutição fácil (Marques, 2008).

A Farmacopeia Portuguesa IX (2008) define as cápsulas como preparações sólidas constituídas por invólucro duro ou mole de forma e capacidades variáveis, contendo uma dose de substância ativa. O invólucro é de gelatina ou outras substâncias cuja consistência pode ser ajustada por exemplo com glicerina ou sorbitol. Podem ainda ser adicionados à substância ativa excipientes como agentes tensioativos, opacificantes, conservantes, antimicrobianos, edulcorantes, corantes autorizados pelas entidades competentes e aromatizantes. As cápsulas podem ser de vários tipos: duras, moles, gastroresistentes e de libertação modificada. Esta forma farmacêutica é de mais fácil deglutição que os comprimidos, permite a associação de substâncias incompatíveis, a administração de uma dose precisa e é fácil de preparar (Marques, 2008).

As cápsulas duras são produzidas através do enchimento manual ou automático, geralmente com uma substância sólida, do invólucro adquirido na indústria. Este é constituído por duas partes cilíndricas, abertas numa das extremidades e de fundo hemisférico; a substância ativa juntamente com os excipientes são colocados numa das partes (geralmente a mais comprida), servindo depois a outra como tampa. A escolha do tamanho da cápsula, dos excipientes e do método de enchimento é realizada de acordo com as propriedades da substância activa, dose, volume aparente das substâncias a introduzir e do número de unidades que se pretende produzir (Prista, Alves e Morgado, 1995; Farmacopeia Portuguesa IX, 2008).

As formas farmacêuticas sólidas orais podem ser classificadas pela Farmacopeia Portuguesa IX (2008) segundo o modo de libertação da substância ativa em formas farmacêuticas de libertação convencional e formas farmacêuticas de libertação modificada. As formas farmacêuticas de libertação convencional são preparações em que a libertação da

substância ativa não foi sujeita a uma modificação deliberada resultante de um processo específico de formulação e ou método de fabrico especial. A libertação da substância ativa pode ser muito rápida, onde 80% do fármaco é libertado em apenas 15 minutos ou então pode ser uma libertação imediata, em que o sistema farmacêutico apenas serve de suporte à substância ativa não interferindo na sua libertação. Neste último caso, o fármaco deve libertar-se na quantidade de 85% em 15-60 minutos. Nas formas farmacêuticas de libertação convencional são adicionados diluentes solúveis, desagregantes ou outros excipientes que favoreçam a libertação e dissolução do fármaco (Manadas, Pina e Veiga, 2002; Pezzini, Silva e Ferraz, 2007; Farmacopeia Portuguesa IX, 2008;).

A via oral é via de eleição para a administração de fármacos, já que apresenta maior adesão pelo doente e é a mais económica (Souza, Freitas e Storpirtis, 2007; Sam *et al.*, 2012); contudo, esta via apresenta algumas limitações como a variabilidade inter e intraindividual, as diferenças genéticas e metabólicas, situações patológicas e a idade, que afetam a absorção do fármaco (e conseqüentemente a sua acção terapêutica); outras limitações são representadas pelo efeito de primeira passagem hepática, a elevada atividade metabólica, variações do pH ao longo do trato gastrointestinal e a interação com os alimentos.

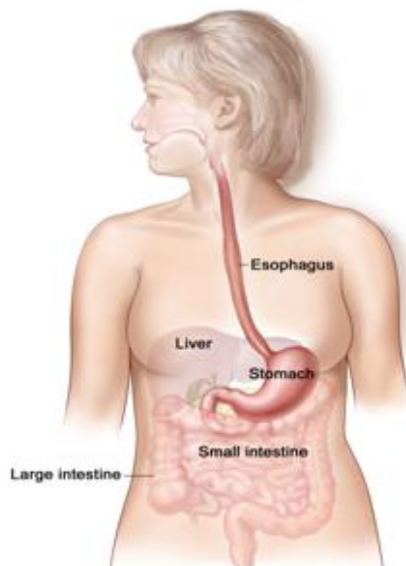


Figura 5 - Constituição do trato gastrointestinal.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0022855/>

Depois de administrado, o fármaco segue ao longo do trato gastrointestinal onde sofre metabolização e onde posteriormente é absorvido no intestino delgado, ou eliminado pelo intestino grosso (fração não absorvida). A metabolização ocorre principalmente através das enzimas presentes nas diferentes porções do trato gastrointestinal superior, em particular na saliva (ptialina e pectinase), suco gástrico (pepsina) e suco pancreático (tripsina, amilase e lipase). Aquando do esvaziamento gástrico o quimo é libertado no duodeno onde continua a sofrer metabolização e onde ocorre grande parte da absorção (e ainda no jejuno) devido à presença de um elevado número de vilosidades e microvilosidades que aumentam a área de absorção, a maior permeabilidade do tecido intestinal, a elevada vascularização que leva ao transporte do fármaco absorvido para o fígado e ainda a produção de muco e água pela parede intestinal que facilita a dissolução do fármaco. A dissolução e conseqüentemente a absorção é condicionada pelas características

físico-químicas do fármaco (solubilidade, dimensão das partículas e estado de cristalinização), pelas propriedades da forma farmacêutica e seus excipientes (velocidade e extensão da desagregação e dissolução) e por fatores intrínsecos ao doente (por exemplo a velocidade de esvaziamento gástrico). Pode também ocorrer absorção do fármaco ao nível do estômago, como é o caso de fármacos ácidos (Prista, Alves e Morgado, 1995; Manadas, Pina e Veiga, 2002; Souza, Freitas e Storpirtis, 2007; Marques, 2008). Para que sejam absorvidos é necessário que os compostos apresentem solubilidade aquosa (para que sejam dissolvidos) e permeabilidade intestinal (Souza, Freitas e Storpirtis, 2007).

Após entrar na corrente sanguínea o fármaco é distribuído por todo o organismo de forma não uniforme, sendo depois eliminado principalmente pela urina, podendo também ser excretado pelo fígado através da biliar e posteriormente pelas fezes (Prista, Alves e Morgado, 1995).

Os extratos secos de plantas apresentam-se geralmente como pós muito finos, pouco compressíveis e muito higroscópicos, o que dificulta a sua manipulação para a formulação de comprimidos e compromete as propriedades de desagregação da forma farmacêutica. A granulação tem sido o método mais utilizado para tentar superar este tipo de problemas (Soares *et al.*, 2005). No caso do extrato de *Cymbopogon citratus* já foram elaborados comprimidos recorrendo à granulação por via húmida. Os grânulos formados apresentaram propriedades de fluidez e de compressão satisfatórios para a formulação de comprimidos, apresentando características que não comprometem as suas propriedades aquando do seu manuseamento (Salome *et al.*, 2012).

Como o conhecimento da absorção e metabolismo deste extrato é ainda pequeno e apenas se sabe, como já referido na secção 2.4, que as proantocianidinas parecem sofrer hidrólise em condições gástricas, o que pode facilitar a sua absorção intestinal e que a luteolina apresenta alguma estabilidade em meio gástrico e absorção a nível intestinal (Shimoi *et al.*, 1998; Serrano *et al.*, 2009; Ahmad-Qasem *et al.*, 2014); como os flavonoides e taninos são os principais responsáveis pela atividade antioxidante (Figueirinha *et al.*, 2008), não será necessário recorrer, numa primeira abordagem de formulação e do estudo da estabilidade dos compostos em meio gástrico, a uma forma farmacêutica de libertação modificada.

Tendo em conta os dados anteriormente expostos, neste trabalho optou-se por seleccionar as cápsulas para o desenvolvimento de uma formulação com o extrato de *Cymbopogon citratus*.

4. Referências bibliográficas

- ADENEYE, A. A.; AGBAJE, E. O. - "Hypoglycemic and hypolipidemic effects of fresh leaf aqueous extract of *Cymbopogon citratus* Stapf. in rats". *Journal of Ethnopharmacology*, 112 (2007) 440-444.
- AHMAD-QASEM, M. H., et al. - "Influence of Olive Leaf Processing on the Bioaccessibility of Bioactive Polyphenols". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (2014) 6190–6198.
- ASAOLU, M. F.; OYEYEMI, O. A.; OLANLOKUN, J. O. - "Chemical Composition, Phytochemical Constituents and *in vitro* Biological Activity of Various Extracts of *Cymbopogon citratus*". *Pakistan Journal of Nutrition*, 8:12 (2009) 1920-1922.
- AVOSEH, O. et al. - "*Cymbopogon* Species; Ethnopharmacology, Phytochemistry and the Pharmacological Importance". *Molecules*, 20 (2015) 7438-7453.
- BACHIEGA, T. F.; SFORCIN, J. M. - "Lemongrass and citral effect on cytokines production by murine macrophages". *Journal of Ethnopharmacology*, 137 (2011) 909-913.
- BALAKRISHNAN, B.; PARAMASIVAM, S.; ARULKUMAR, A. - "Evaluation of the lemongrass plant (*Cymbopogon citratus*) extracted in different solvents for antioxidant and antibacterial activity against human pathogens". *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(Suppl 1) (2014) S134-S139.
- BAO, X. et al. - "Polysaccharide from *Cymbopogon citratus* with antitumor and immunomodulatory activity". *Pharmaceutical Biology*, 53:1 (2015) 117-124.
- BASSOLÉ, I. H. N. et al. - "Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oil alone and in combination". *Phytomedicine*, 18 (2011) 1070-1074.
- BLANCO, M. M. et al. - "Neurobehavioral effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in mice". *Phytomedicine*, 16 (2009) 265-270.
- CAMPOS, J. et al. - "Lemon grass (*Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf) polyphenols protect human umbilical vein endothelial cell (HUVECs) from oxidative damage induced by high glucose, hydrogen peroxide and oxidised low-density lipoprotein". *Food Chemistry*, 151 (2014) 175-181.
- CHEEL, J. et al. - "Free Radical Scavengers and Antioxidants from lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.)". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (2005) 2511-2517.

COSTA, A. V. et al. - "*Cymbopogon citratus* (Poaceae) Essential Oil on *Frankliniella schultzei* (Thysanoptera: Thripidae) and *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae)". *Bioscience Journal* 29:6 (2013) 1840-1847.

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

COSTA, C. A. R. A. et al. - "The GABAergic system contributes to the anxiolytic-like effect of essential oil from *Cymbopogon citratus* (lemongrass)". *Journal of Ethnopharmacology*, 137 (2011) 828-836.

COSTA, G. et al. - "Influence of harvest date and material quality on polyphenolic content and antioxidant activity of *Cymbopogon citratus* infusion". *Industrial Crops and Products*, 83 (2016a) 738–745.

COSTA, G. et al. - "Polyphenols from *Cymbopogon citratus* leaves as topical anti-inflammatory agents". *Journal of Ethnopharmacology*, 178 (2016b) 222-228.

CUNHA, A. P.; ROQUE O. R.; NOGUEIRA M. T. - "Plantas aromáticas e óleos essenciais: composição e aplicação". Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2012. ISBN: 9789723114508.

Decreto-Lei nº 176/2006, de 30 de Agosto. Legislação Farmacêutica Compilada. INFARMED - Gabinete Jurídico e Contencioso. [Acedido a 6 de junho de 2016]. Disponível na Internet: https://placotrans.infarmed.pt/documentacao/Circulares/035-E_DL_176_2006_9ALT.pdf.

Decreto-Lei nº 128/2013, de 5 de Setembro. Legislação Farmacêutica Compilada. INFARMED - Gabinete Jurídico e Contencioso. [Acedido a 3 de junho de 2015]. Disponível na Internet: http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/PESQUISA/RESULTADOS_DA_PESQUISA

DIAS, O. J. Q. - "Avaliação da eficácia do fitoterápico a base de *Cymbopogon citratus* Stapf em candidíase vaginal: estudo controlado, cego e randomizado". Fortaleza: Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2014. Tese de Mestrado.

[Acedido a 17 de setembro de 2015]. Disponível na internet: http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/12359/1/2014_dis_ojqdias.pdf

Directiva 2004/24/CE do Parlamento Europeu e do Conselho. *Jornal Oficial da União Europeia*, 31 de Março de 2004, L136/85 - L136/90. [Acedido a 20 de junho de 2016]. Disponível na internet: http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-1/dir_2004_24/dir_2004_24_pt.pdf

DUARTE, M. R.; ZANETI, C. C. - "Estudo farmacobotânico de folhas de capim-limão: *Cymbopogon citratus* (DC.) STAPF, POACEAE ". *Visão Académica*, Curitiba, 5:2 (2004) 117-124.

EKPENYONG, C. E.; AKPAN, E. E.; DANIEL, N. E. - "Phytochemical Constituents, Therapeutic Applications and Toxicological Profile of *Cymbopogon citratus* Stapf (DC) Leaf Extract". *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3:1 (2014) 133-141.

EKPENYONG, C. E.; AKPAN, E.; NYOH, A. - "Ethnopharmacology, phytochemistry, and biological activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf extracts". *Chinese Journal of Natural Medicines*, 13:5 (2015) 0321-0337.

EL ASBAHANI, A. *et al.* - "Essential Oils: From Extraction to Encapsulation". *International Journal of Pharmaceutics*, 83 (2015) 220-243.

Encyclopaedia Britannica, Michael Heinrich, 2016. [Acedido a 28 de junho de 2016]. Disponível na internet: <http://www.britannica.com/topic/phytotherapy>.

EWENIGHI, C. O. *et al.* - "Estimation of lipid profile and glucose level in alloxan-induced diabetic rats treated with *Cymbopogon citratus* (lemongrass)". *Journal of Experimental Integrative Medicine*, 3:3 (2013) 249-253.

Farmacopeia Portuguesa IX, 2008. Edição Oficial, Ministério da Saúde, Infarmed, Lisboa, Volume I.

FIGUEIRINHA, A. M. B. R. - "Composição química e atividade anti-inflamatória do infuso de *Cymbopogon citratus*". Coimbra: Faculdade de Farmácia de Universidade de Coimbra, 2011. Tese de Doutoramento.

FIGUEIRINHA, A. *et al.* - "*Cymbopogon citratus* leaves: Characterisation of flavonoids by HPLC-PDA-ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols". *Food Chemistry*, 110 (2008) 718-728.

FIGUEIRINHA, A. *et al.* - "Anti-Inflammatory Activity of *Cymbopogon citratus* Leaf Infusion in Lipopolysaccharide-Stimulated Dendritic Cells: Contribution of the Polyphenols". *Journal of Medicinal Food*, 13:3 (2010) 1-10.

FIRMO, W. C. A. et al. - "Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais". *Cadernos de Pesquisa*, 18 (2011) 90-95.

Formulário de Fitoterápicos Farmacopeia Brasileira, 1ª edição, 2011.

[Acedido a 26 de setembro de 2015]. Disponível na Internet: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/Formulario_de_Fitoterapicos_da_Farmacopeia_Brasileira.pdf

FRANCISCO, V. et al. - "Anti-inflammatory activity of *Cymbopogon citratus* leaves infusion via proteasome and nuclear factor - κ B pathway inhibition: contribution of chlorogenic acid". *Journal of Ethnopharmacology*, 148 (2013) 126-134.

FRANCISCO, V. et al. - "Chemical characterization and anti-inflammatory activity of luteolin glycosides isolated from lemongrass". *Journal of Functional Foods*, 10 (2014) 436-443.

FRANCISCO, V. et al. - "*Cymbopogon citratus* as source of new and safe anti-inflammatory drugs: Bio-guided assay using lipopolysaccharide-stimulated macrophages". *Journal of Ethnopharmacology*, 133 (2011) 818-827.

GULLON, B. et al. - "*In vitro* gastrointestinal digestion of pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co-products: Changes in the antioxidant potential and bioactive compounds stability". *Journal of Functional Foods*, 19 (2015) 617-628.

GUPTA, M. P. - "270 Plantas Medicinales Iberoamericanas". Ed. Lit. Colômbia: Programa Iberoamericano da Ciencia y Tecnologia para el Desarrollo, CYTED, 1995. ISBN: 958-9206-50-6.

INFARMED (Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde) - "Medicamentos à base de plantas". [Acedido a 1 de junho de 2015]. Disponível na Internet: http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MEDICAMENTOS_USO_HUMANO/AUTORIZACAO_DE_INTRODUCAO_NO_MERCADO/MEDICAMENTOS_A_BASE_DE_PLANTAS

KHAN, M. S. A.; AHMAD, I. - "Biofilm inhibition by *Cymbopogon citratus* and *Syzygium aromaticum* essential oils in the strains of *Candida albicans*". *Journal of Ethnopharmacology*, 140 (2012) 416-423.

MACHADO, M. S. S. *et al.* - "The anti-allergic activity of *Cymbopogon citratus* is mediated via inhibition of nuclear factor kappa B (Nf- κ B) activation". *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15:158 (2015).

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. - "A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada". *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 38:4 (2002) 375-399.

MARQUES, O. C. P. - "Desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas orais de *Uncaria tomentosa* com atividade antioxidante". Coimbra: Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, 2008. Tese de Mestrado. [Acedido a 11 de maio de 2015]. Disponível na Internet: <https://estudogeral.sib.uc.pt/jspui/handle/10316/7425>

MARTINS, A. P. - "O uso tradicional como evidência na regulamentação dos medicamentos à base de plantas". In "INFARMED 15 anos: olhar o passado, projectar o futuro". Lisboa: INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P. Ministério da Saúde, 2008. [Acedido a 1 de junho de 2015]. Disponível na Internet: http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/PESQUISA/RESULTADOS_DA_PESQUISA

MELO, J.G. *et al.* - "Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializadas no Brasil: castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) e centela (*Centella asiatica* (L.) Urban)". *Acta botanica Brasilica*, 21:1 (2007) 27-36.

NAIK, M. I., *et al.* - "Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacteria". *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3 (2010) 535-538.

NEGRELLE, R.R.B; GOMES, E.C. - "*Cymbopogon citratus* (DC.) Stap: chemical composition and biological activities". *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 9:1 (2007) 80-92.

Observatório de Interações Planta - Medicamento - "Utilização de produtos à base de plantas", 2013 [Acedido a 1 de junho de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.oipm.uc.pt/home/index.php?target=read-news&id=13>

OLIVEIRA, C. M. C. - "Fitoterapia na prevenção do cancro". Porto: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, 2013. Tese de Mestrado. [Acedido a 11 de maio de 2015]. Disponível na Internet: <http://bdigital.ufp.pt/handle/10284/4182>

OLIVEIRA, M. D.; BASTOS, D. H. M. - "Biodisponibilidade de ácidos fenólicos". *Química Nova*, 34:6 (2011) 1051-1056.

Organização Mundial de Saúde (OMS) - "WHO Traditional Medicine Strategy 2014-2023", 2013 [Acedido a 4 de junho de 2015]. Disponível na Internet: http://www.who.int/medicines/publications/med_strategy/en/

ORREGA, R.; LEIVA, E.; CHEEL, J. - "Inhibitory Effect of Three C-glycosylflavonoids from *Cymbopogon citratus* (Lemongrass) on Human Low Density Lipoprotein Oxidation". *Molecules*, 14 (2009) 3906-3913.

PANDAREESH, M. D.; MYTHRI, R. B.; SRINIVAS BHARATH, M. M. - "Bioavailability of dietary polyphenols: Factors contributing to their clinical application in CNS diseases". *Neurochemistry International*, 89 (2015) 198-208.

PEREIRA, R. F.V. R. - "Avaliação da atividade anti-inflamatória de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. em modelos *in vivo* de inflamação crónica". Coimbra: Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, 2013. Tese de Mestrado. [Acedido a 31 de maio de 2015]. Disponível na Internet: <https://estudogeral.sib.uc.pt/handle/10316/26082>

PETROVSKA, B. B. - "Historical review of medicinal plants' usage". *Pharmacognosy Review*, 6: 11 (2012) 1-5.

PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A. S.; FERRAZ, H. G. - "Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados". *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43:4 (2007) 491-502.

PINTO, Z. T. *et al.* - "Chemical composition and insecticidal activity of *Cymbopogon citratus* essential oil from Cuba and Brazil against housefly". *Brazilian Journal Veterinary Parasitology*, 24:1 (2015) 36-44.

PRISTA; L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R.M.R. - "Técnica Farmacêutica e Farmácia Galénica", I Volume, 5ª edição. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1995. ISBN: 9723106787.

RODRÍGUEZ-ROQUE, M. J. *et al.* - "Soy milk phenolic compounds, isoflavones and antioxidant activity as affected by *in vitro* gastrointestinal digestion". *Food Chemistry*, 136 (2013) 206-212.

- SALOME, A. C. *et al.* - "Formulation and evaluation of *Cymbopogon citratus* dried leaf-powder tablets". *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6:48 (2012) 3274-3279.
- SAM, T. *et al.* - "A benefit/risk approach towards selecting appropriate pharmaceutical dosage forms - An application for paediatric dosage form selection". *International Journal of Pharmaceutics*, 435 (2012) 115-123.
- SERRANO, J. *et al.* - "Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects". *Molecular Nutrition & Food Research*, 53 (2009) S310-S329.
- SHAH, G. *et al.* - "Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (Lemon grass)". *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 2:1 (2011) 3–8.
- SHIMOI, K. *et al.* - "Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O-L-glucoside in rats and humans". *FEBS Letters* 438 (1998) 220-224.
- SOARES, L. A. L. *et al.* - "Optimization of Tablets Containing a High Dose of Spray-Dried Plant Extract: A Technical Note". *AAPS PharmSciTech*, 6:3 (2005) E367-E371.
- SOUZA, J.; FREITAS, Z. M. F.; STORPIRTIS, S. - "Modelos *in vitro* para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção". *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43:4 (2007) 515-527.
- TAVARES, F. *et al.* - "*Cymbopogon citratus* industrial waste as a potential source of bioactive compounds". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2014.
- TIWARI, M.; DWIVEDI, U. N.; KAKKAR, P. - "Suppression of oxidative stress and pro-inflammatory mediators by *Cymbopogon citratus* D. Stapf extract in lipopolysaccharide stimulated murine alveolar macrophages". *Food and Chemical Toxicology*, 48 (2010) 2913-2919.
- TSAO, R. - "Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols". *Nutrients*, 2 (2010) 1231-1246.
- VÁZQUEZ, C. V. *et al.* - "Total phenolic compounds in milk from different species. Design of an extraction technique for quantification using the Folin-Ciocalteu method". *Food Chemistry*, 176 (2015) 480-486.
- VIANA, G. S. B. *et al.* - "Antinociceptive effect of the essential oil from *Cymbopogon citratus* in mice". *Journal of Ethnopharmacology*, 70 (2000) 323-327.

Capítulo II - Objetivos e Apresentação do trabalho

Atualmente tem vindo a notar-se um crescente interesse pelo uso de terapias alternativas, em particular das plantas medicinais ou seus derivados. Contudo, o uso destes produtos está condicionado pela grande variedade na composição química relacionada com as condições de cultivo, época de recolha, armazenamento, parte da planta utilizada, entre outros. Devido ao interesse do uso de plantas medicinais surge a necessidade de conseguir um conhecimento científico mais aprofundado sobre a grande variedade de espécies que são usadas na medicina tradicional e a forma como são usadas com o objetivo de assegurar a proteção da saúde pública.

Perante o extenso conhecimento existente sobre a composição química e atividade biológica bem como estudos sobre a segurança e eficácia da espécie *Cymbopogon citratus* um dos passos que se revela importante é o desenvolvimento de formulações contendo o extrato, onde através do conhecimento do modo de preparação e das doses utilizados na medicina tradicional, se possa ter junto da população uma forma farmacêutica que obedeça a todos os requisitos de qualidade, segurança e eficácia necessários, associados a uma boa aceitação.

Assim, os objetivos deste trabalho de investigação são:

1. Preparação de extratos liofilizados de *Cymbopogon citratus* (isento de óleo essencial), seguido da caracterização da sua composição química e da sua atividade antioxidante;
2. Desenvolvimento de cápsulas a partir do extrato caracterizado no ponto 1, realizando ensaios de compatibilidade com excipientes, otimização de formulação e ensaios de controlo de qualidade;
3. Estudo da estabilidade química e da atividade biológica do extrato formulado sob a forma de cápsulas em suco gástrico, simulando as condições in vivo do trato gastrointestinal.

Capítulo III - Materiais e Métodos

A. Matérias-primas

As matérias-primas utilizadas no desenvolvimento do trabalho laboratorial encontram-se descritas na tabela seguinte.

Tabela 4 - Matérias-primas utilizadas.

Matéria-prima	Utilização	Fabricante
2,2 - Difetil-1-picrilhidrazilo (DPPH)	Ensaio DPPH	Sigma Aldrich
Acido acético glacial	Tampão acetato para o ensaio de DPPH	Merck
Acido clorídrico 37%	Suco gástrico	Scharlau
Ácido fórmico 98-100%	Preparação da fase móvel de HPLC e das soluções para ativação da coluna SPE	Merck
Acido gálico	Padrão para o doseamento de fenóis	Fluka
Acetato de sódio anidro	Tampão acetato para o ensaio de DPPH	Merck
Acetona	Doseamento de fenóis	Merck
Água MilliQ	Preparação de diversas soluções	Produzida no laboratório
Amido de milho	Excipiente	Labor Spirit Lda.
Carbonato de sódio	Doseamento de fenóis totais	Merck
Celulose microcristalina	Excipiente	Labor Spirit Lda.
Cloreto de sódio	Suco gástrico	Panreac
Estearato de magnésio	Excipiente	Panreac
Etanol absoluto	Ensaio DPPH	Merck
Lactose mono hidratada	Excipiente	Scharlau
Metanol (Gradient grade)	Fase móvel de HPLC e preparação da solução para ativação da coluna SPE	Merck
<i>n</i> -hexano	Remoção dos componentes lipídicos do extrato	Merck
Pepsina	Suco gástrico	Merck
Reagente de Folin-Ciocalteu	Doseamento de fenóis totais	Merck
Rutina	Curva de calibração do ensaio de dissolução	Sigma Aldrich

B. Material botânico

As folhas secas de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. foram adquiridas na ERVITAL (Mezio, Castro Daire, Portugal). Uma amostra da planta foi depositada no Herbário de Plantas Aromáticas e Medicinais da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (A. Figueirinha 0109). A identidade da planta foi confirmada por J. Paiva (Departamento das Ciências da Vida, Universidade de Coimbra, Portugal). Para o estudo foi utilizado o lote de planta colhida em Julho de 2011.

C. Métodos

I. Obtenção e caracterização do liofilizado de *Cymbopogon citratus*

I.1 Preparação do extrato de *Cymbopogon Citratus*

O método utilizado para a preparação da infusão de *Cymbopogon citratus* foi o descrito por Figueirinha *et al.*, 2008.

Em vaso de infusão de porcelana, adicionam-se 150 ml de água fervente a 5g de folhas da planta anteriormente pulverizadas e tamisada (60 Mesh) para que a sua área de contacto com o solvente de extração seja maior e uniforme. A infusão repousou durante 15 minutos e de seguida foi filtrada sob vácuo (em funil de Buchner) e a quente. De seguida o infuso foi extraído com *n*-hexano (três vezes na razão de 1:1), com o objetivo de remover os componentes lipídicos presentes. A fração aquosa foi depois concentrada num evaporador rotativo (Büchi) e posteriormente liofilizada e armazenada a -20°C até à sua utilização.

I.2 Determinação do teor de humidade

O teor de humidade da planta seca adquirida ao fabricante e do extrato liofilizado (designado no restante trabalho como extrato) foi determinado, em triplicado, através da perda de água por secagem de 0,5g de amostra em estufa a 100°C durante no mínimo 24 horas até peso constante.

O teor de humidade foi determinado através da seguinte expressão:

$$\% \text{ humidade} = \frac{(\text{massa após secagem} - \text{massa inicial})}{\text{massa inicial}} \times 100$$

I.3 Cromatografia líquida de alta resolução

A cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) é uma técnica que permite separar uma grande variedade de espécies orgânicas presentes em diversos tipos de amostras e que

se caracteriza pelo facto de a fase móvel ser líquida. Pode ser classificada em vários tipos, sendo cada um deles caracterizado pelo mecanismo de separação, como por exemplo a cromatografia de partição, iónica, de adsorção, de exclusão molecular. A seleção do tipo de cromatografia, fase móvel, fase estacionária e condições de separação depende das características do analito e da mistura. As colunas analíticas de HPLC apresentam uma elevada eficiência de separação pelo facto de a fase estacionária se apresentar na forma de partículas de dimensões muito reduzidas e muito compactas e que pode ser melhorada através de uma eluição por gradiente da fase móvel, isto é, ao longo da separação a proporção dos solventes que a constituem vai variando. Para a separação de compostos fenólicos recorre-se geralmente a colunas de fase reversa onde a fase estacionária é apolar (geralmente sílica funcionalizada com hidrocarbonetos) e a fase móvel é polar (água, metanol, acetonitrilo, entre outros). Os detetores usados permitem-nos além da separação, fazer a identificação e a quantificação dos compostos, e os que usualmente estão acoplados ao HPLC, são os de matriz de díodos, de ultravioleta (UV) e de espectrometria de massa (Tsao, 2010; Figueirinha, 2011; Skoog *et al.*, 2014).

A análise por HPLC-PDA quantitativa do extrato foi realizada num cromatógrafo líquido de alta resolução (HPLC) Gilson, equipado com duas bombas (modelo 305 e 306); misturador (modelo 811 B); módulo manométrico (modelo 805) e um injetor automático (Gilson 234 Autoinjeter), acoplado a um detetor de fotodíodos (PDA) (Gilson, modelo 107) e uma estação de controlo e tratamento de dados Unipoint System (Unipoint® 2.10).

A fase estacionária da coluna foi uma RPI8 Spherisorb Waters® ODS-2, partículas de 5 µm (4,6x250 mm) e uma pré-coluna KS 30/4 Nucleosil 120-5, C-18, Macherey-Nagel (Düren, Germany). A fase móvel foi efetuada à temperatura de 21°C usando uma solução aquosa de ácido fórmico 5% (A) e metanol (B), em gradiente descontínuo, a um fluxo de 1 mL/min.

Os solventes utilizados nesta análise foram microfiltrados e desgaseificados, utilizando-se filtros NL16 (0,2 µm; 50 mm) (Schleicher & Schuell, Germany), e a sua desgaseificação foi realizada num aparelho de ultrassons (Bransonic, modelo B-2200 E1).

Foram injetados 100 µL de amostra (1,8 mg de extrato solubilizadas em 1 mL de metanol a 50%), sendo a aquisição dos espetros realizada entre 200-600 nm, registando-se os perfis cromatográficos a 280 nm e a 320 nm, para os diferentes sistemas utilizados.

Recorreu-se a uma separação por gradiente nas condições descritas na tabela 5.

Tabela 5 - Gradiente de eluição da fase móvel.

Fase móvel	Eluente A - Ácido fórmico 5% em água (v/v)		
	Eluente B - Metanol		
Pré-coluna	KS 30/4 Nucleosil 120-5, C-18, Macherey-Nagel		
Coluna	Coluna analítica da Waters Spherisorb, ODS-2, partículas de 5 µm (4,6x250 mm)		
Temperatura da coluna	23-24°C		
Fluxo	1 mL/min		
Gradiente	Tempo (min)	% A	% B
	0	95	5
	10	85	15
	15	70	30
	25	65	35
	35	50	50
	40	20	80
	60	20	80

1.4 Ensaio de atividade antioxidante

Um dos métodos muito utilizado para avaliação da atividade antioxidante é o ensaio de DPPH pelo facto de ser fácil e reprodutível. A molécula 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) é um radical livre estável devido à deslocação do eletrão livre que origina a sua cor violeta. Na presença de um agente redutor, o radical DPPH vai ser reduzido e a sua cor alterada de violeta para amarelo; esta modificação pode ser quantificada pela diminuição da absorvência da solução a 517 nm. Os resultados podem ser expressos pelo valor EC50, ou seja a concentração de amostra que reduz 50% da absorvência do DPPH. Assim quanto menor for este valor maior será a atividade antioxidante da amostra (Molyneux, 2004; Alves *et al.*, 2010; Pereira, 2010)

O ensaio de DPPH foi realizado como descrito por Blois (1958); inicialmente foi preparada uma solução-mãe de extrato em etanol (2 mg/mL) a partir da qual foram preparadas diluições; de cada solução diluída foram retirados 100 µL de amostra (concentração no meio reacional de 3,33 µg/mL, 16,67 µg/mL, 33,33 µg/mL, 50 µg/mL e 66,67 µg/mL) e adicionado 1 mL de tampão acetato a pH 6,0, 1,4 mL de etanol e 500 µL de

DPPH (500µM em etanol). Esta solução foi agitada no vortex durante 30 segundos e após 30 minutos de reação ao abrigo da luz mediu-se a absorvência a 517 nm contra um branco. Foi também preparada uma solução controlo, onde a 500 µL de DPPH (500µM em etanol) se adicionou 1 mL de tampão acetato a pH 6,0 e 1,5 mL de etanol, sendo também medida a absorvência a 517 nm contra um branco, após 30 segundos de agitação e 30 minutos de reação ao abrigo da luz. A atividade antioxidante é expressa pelo valor de EC50 e pela % de redução do DPPH, calculado através da expressão:

$$\% \text{ redução} = \frac{\text{Abs controlo} - \text{Abs ensaio}}{\text{Abs controlo}} \times 100$$

As medições de absorvência foram realizadas num espectrofotómetro UV-visível (Cintra 101).

1.5 Doseamento dos fenóis totais

A quantificação dos fenóis presentes no extrato de *Cymbopogon citratus* é importante pois permite-nos avaliar a sua estabilidade e a qualidade da formulação.

O método utilizado para a quantificação dos fenóis foi o método de Folin-Ciocalteu (Wang, Lee e Peng, 1997). Este é um método colorimétrico, que permite a avaliação de compostos com anéis aromáticos hidroxilados (Vázquez *et al.*, 2015) e apresenta uma boa reprodutibilidade. O método baseia-se no número de grupos fenólicos ou outros grupos que sejam oxidáveis e estejam presentes no extrato; estes grupos a pH básico, ou seja, na presença de carbonato de sódio, vão ser capazes de reduzir o reagente de Folin-Ciocalteu (redução do molibdénio (VI) a molibdénio (V)), produzindo cor azul. Os resultados da quantificação são expressos em função de um padrão que pode ser o ácido gálgico, catequina, ácido clorogénico, entre outros (Chen, Cheng e Liang, 2015).

Na técnica usada, alíquotas de 100 µL de amostra em acetona a 70% (5 mg/mL) foram misturadas com 1,9 mL de água e 1 mL de reagente de Folin-Ciocalteu e após 1 minuto de agitação no vortex adicionaram-se 5 mL de carbonato de sódio a 20% e água perfazendo o volume de 10 mL. Após 1 minuto de agitação no vortex e 20 minutos de reação ao abrigo da luz foi medida a absorvência a 700 e 735 nm contra o branco. Para traçar a curva de calibração realizou-se o ensaio, nas mesmas condições, com o padrão de ácido gálgico, numa gama de concentração entre 0,24-0,60 µg/mL. A equação da reta da curva de calibração foi utilizada para determinar os fenóis totais, expressos em mg de ácido gálgico/mL de amostra ou mg de ácido gálgico/g de liofilizado.

1.6 Cromatografia gasosa

A cromatografia gasosa (GC) é uma técnica de separação analítica que permite fazer a análise qualitativa e quantitativa de diversos analitos e que se caracteriza pela separação dos componentes presentes numa amostra vaporizada através da sua distribuição entre a fase móvel e a fase estacionária. Neste tipo de cromatografia a fase móvel é gasosa e apenas tem a função de transportar a amostra, sem interagir com ela. Consoante a natureza da fase estacionária podemos classificar a GC em dois tipos: cromatografia gás-líquido e cromatografia gás-sólido. Na cromatografia gás-líquido a fase estacionária é líquida e é retida à superfície através de um sólido inerte, por adsorção ou ligação química; é aplicada a espécies voláteis e estáveis a temperaturas elevada (a rondar as centenas de graus Celsius). A cromatografia gás-sólido caracteriza-se pela fase estacionária ser sólida e a retenção do analito ocorre por adsorção física entre este e a fase estacionária. Este tipo de cromatografia não permite uma separação tão eficiente dos analitos e como tal só é usada quando estes não são isolados pela cromatografia gás-líquido (Skoog *et al.*, 2014).

Após a injeção da amostra, esta irá passar através da coluna cromatográfica que pode estar a uma temperatura fixa ou então é sujeita a um programa de temperatura variável que permite melhorar a separação dos constituintes da mistura. Os detetores usados em cromatografia gasosa podem ser, por exemplo, detetor de ionização em chama, de condutividade térmica, de captura de eletrões, espectroscopia de massa (Skoog *et al.*, 2014).

Neste trabalho recorreu-se à cromatografia gasosa para avaliar a presença de vestígios de hexano utilizado para retirar os constituintes menos polares do extrato utilizado. Para este efeito utilizou-se um cromatógrafo gasoso acoplado aos detetores FID e MS QP2010 Plus (Shimadzu), constituído por: detetor massas, SPL 2010, detetor FID 2010 e um Autosampler e Headspace AOC-5000.

A análise foi feita por *headspace* usando 300mg de extrato a 80°C durante 10 minutos; 2,5 mL da amostra obtida foram injetados na coluna de GC com o seguinte programa de temperatura: 8 minutos a 50°C, aumentando depois de temperatura, a uma taxa de 6°C/min até aos 240°C, permanecendo depois durante 20 minutos.

2. Desenvolvimento da forma farmacêutica

2.1 Estudos de pré-formulação

Os estudos de compatibilidade entre fármaco e excipientes são um passo fundamental no desenvolvimento de qualquer forma farmacêutica uma vez, que a existência

de interações entre eles pode colocar em causa a eficácia, segurança e estabilidade do fármaco. As interações (físicas ou químicas) são consideradas incompatibilidades quando as propriedades físicas, químicas e terapêuticas da forma farmacêutica são alteradas (Tiça *et al.*, 2011; Chadha e Bhandari, 2014).

De entre os vários métodos possíveis de utilizar para avaliar a compatibilidade fármaco-excipiente, foram selecionados a calorimetria diferencial de varrimento e a espectroscopia de infravermelho.

2.1.1 Calorimetria diferencial de varrimento

A calorimetria diferencial de varrimento (DSC) é um método térmico que permite registar/medir o fluxo de calor (ΔT) emitido ou absorvido por uma amostra quando submetida a um programa controlado de temperatura. Quando nenhuma transformação ocorre na amostra aquando do aquecimento/arrefecimento, a diferença de temperatura entre esta e a referência é nula ($\Delta T=0$) (Marques, 2008; Feiteira, 2010).

Ao serem detetada diferenças de temperatura entre a amostra e referência, o sistema vai atuar de modo a que haja um aumento da temperatura do elemento que se encontra com temperatura mais baixa (amostra ou referência), para que se estabeleça de novo o equilíbrio ($\Delta T=0$). Esta potência é registada dando origem a um termograma onde a área do pico fornece a variação da entalpia (ΔH) referente à transformação ocorrida na amostra (Gill, Moghadam e Ranjbar, 2010).

O DSC tem um papel fundamental na indústria farmacêutica, no estudo da compatibilidade de fármacos com outros fármacos e/ou excipientes, estudo de polimorfos, determinação da pureza química, estabilidade térmica, análise de formas farmacêuticas sólidas, controlo de qualidade, estudo da solubilidade (Canotilho, Sousa e Pinto, 1992; Forte, 2010).

Contudo, nem sempre a análise dos termogramas é simples e pode ser facilitada através do acoplamento de outras técnicas como raios-X, infravermelho, e espectroscopia de varrimento eletrónico (Tiça *et al.*, 2011).

A análise foi realizada num sistema DSC de fluxo de calor modelo Pyris 6 (Perkin Elmer), em cápsulas de alumínio hermeticamente fechadas, onde foram colocados 2 mg dos componentes na forma isolada ou em mistura extrato:excipiente (1:1), usando o índio e a cápsula vazia com padrão e referência, respetivamente. A gama de temperatura utilizada

variou entre 25-300°C com uma velocidade de aquecimento de 10°C/min, sob atmosfera de azoto.

2.1.2 Espectroscopia de infravermelho

O infravermelho (IV) é uma radiação de menor energia que a radiação visível e que quando absorvida pelas moléculas é capaz de causar a transição entre os seus estados vibracionais. As moléculas consoante o número de átomos, a forma como estes estão ligados e o ambiente que os rodeia vão apresentar diferentes modos de vibração e consequentemente a transição entre os níveis vibracionais irá ocorrer em diferentes comprimentos de onda, sendo assim possível obter as diferentes bandas do espectro (Morrison e Boyd, 2011; Skoog *et al.*, 2014).

Uma das formas de obter o espectro IV de uma substância é através da reflexão total atenuada (ATR), cuja grande vantagem em relação a outros tipos de IV, é a simplicidade de preparação da amostra. A ATR ocorre quando um feixe de radiação passa de um meio com um índice de refração elevado para outro com índice de refração inferior; quando o ângulo de incidência atinge o valor crítico, toda a radiação incidente é refletida na interface dos meios. Na zona do espectro onde o meio com menor índice de refração absorve, a intensidade do feixe é atenuada e, quando o meio é a amostra a diminuição observada é característica da absorção desta e obtém-se o espectro de IV. Adicionalmente, para garantir um espectro de qualidade é necessário um bom contacto entre a amostra e o cristal, aquela é comprimida (Eerdenbrugh e Taylor, 2011).

A análise do extrato e excipientes na forma isolada bem como em mistura na razão 1:1 foi realizada num espectrofotómetro de infravermelho médio e próximo com transformadas de Fourier (FTIR) - Perkin Elmer Spectrum 400 (Perkin Elmer) por ATR. Uma pequena quantidade de amostra é colocada sobre o cristal de diamante e sujeita a uma força de compressão de 100 N. O espectro é obtido entre os 650-4000 cm^{-1} , num total de 16 scans, com uma velocidade de varrimento de 0,5 cm/s e uma resolução de 2 cm^{-1} .

2.2 Preparação das cápsulas

As cápsulas duras têm forma cilíndrica, arredondada nos extremos e são formadas por duas partes abertas numa extremidade, com diâmetros e comprimento diferentes. A parte mais longa (corpo) serve para acondicionar a formulação e a outra (cabeça) atua como uma espécie de tampa na qual se encaixa a primeira.

Os invólucros estão disponíveis em diferentes tamanhos que diferem no volume que podem conter, como se resume na tabela 6.

Tabela 6 - Tamanho das cápsulas duras e sua capacidade. Adaptado de (Prista, Alves e Morgado, 1995)

	Número da cápsula							
	000	00	0	1	2	3	4	5
Capacidade (mL)	1,37	0,95	0,68	0,50	0,37	0,30	0,21	0,13

A escolha do tamanho depende do volume aparente de determinada massa que se pretende colocar. Para tal, em primeiro lugar é necessário realizar o ensaio do volume aparente, que tem por objetivo determinar o volume aparente antes e após compactação, a capacidade de compactação e a massa volúmica aparente dos sólidos divididos (Farmacopeia Portuguesa IX, 2008).

O volume aparente foi determinado através do procedimento descrito na Farmacopeia Portuguesa IX (2008). Na proveta do aparelho de batimentos colocou-se uma massa de amostra (sem compactar) e leu-se o volume aparente; de seguida esta foi submetida a 10, 500 e 1250 batimentos e os volumes registados. Caso a diferença entre as 500 e 1250 batimentos seja superior a 2 mL deve ser feito novo ciclo de 1250 batimentos.

A massa volúmica aparente foi determinada através do quociente entre a massa e o volume aparente por ela ocupada e expressa em g/mL, o que permitiu selecionar o número de cápsula a utilizar.

Após a escolha dos excipientes e das quantidades a utilizar, foi pesada a quantidade exata de extrato e de excipientes respetivamente, sendo estas misturadas num almofariz de vidro depois de terem sido tamisadas (tamis de 250 µm) e se necessário pulverizadas num almofariz de porcelana. As cápsulas (Capsugel/Labialpharma) foram preparadas através do método de enchimento manual, lançando o pó (na quantidade calculada ao preenchimento) em cada cápsula com a ajuda de um funil e de um suporte.

2.3 Ensaio de controlo de qualidade

A Farmacopeia Portuguesa IX (2008) define para as cápsulas duras para administração oral, de forma a manter os requisitos de qualidade, os seguintes ensaios: uniformidade de massa, uniformidade de teor, desagregação e dissolução.

2.3.1 Uniformidade de massa

Escolheu-se ao acaso 20 unidades e para cada uma pesou-se a cápsula cheia e de seguida, sem perder fragmentos do invólucro, abriu-se a cápsula, extraiu-se todo o seu conteúdo, e pesou-se o invólucro vazio. A massa do conteúdo foi determinada através da diferença entre os dois valores.

2.3.2 Uniformidade de teor

O ensaio de uniformidade de teor baseia-se na determinação do teor individual de substância ativa de cada unidade (cápsula), permitindo verificar se este se encontra ou não dentro dos limites estabelecidos em relação ao teor médio (Farmacopeia Portuguesa IX, 2008).

Foram tomadas ao acaso 10 cápsulas e doseada a substância ativa, através do método de Folin-Ciocalteu, tal como descrito na secção 1.5.

2.3.3 Ensaio de dissolução

Para que um fármaco exerça a sua ação terapêutica é necessário que seja absorvido no trato gastrointestinal. Como tal, é necessário que se liberte da forma farmacêutica, que se solubilize no meio fisiológico e que seja permeável no trato gastrointestinal. Os estudos de dissolução são uma forma de prever o comportamento da forma farmacêutica *in vivo*, uma vez que permitem determinar a quantidade de substância activa que se dissolve num determinado intervalo de tempo. As formas farmacêuticas sólidas orais de libertação convencional devem libertar pelo menos 85% do seu conteúdo entre 15-60 minutos (Manadas, Pina e Veiga, 2002).

Um dos aparelhos descritos na Farmacopeia Portuguesa IX (2008) para a realização dos ensaios de dissolução é o da pá agitadora. Este aparelho é constituído por seis recipientes cilíndricos de fundo hemisférico (onde em cada um é colocada uma cápsula) e com uma tampa (que evita a evaporação do meio de dissolução) onde passa o agitador que tem uma pá na extremidade inferior e um banho termoestabilizado que permite manter a temperatura do líquido de dissolução a 37°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$) durante o ensaio. A análise das amostras num determinado intervalo de tempo pode ser realizada em contínuo ou não. Caso não seja realizada em contínuo deve ser feita a reposição da mesma quantidade do meio de dissolução (Farmacopeia Portuguesa IX, 2008).

Os ensaios de dissolução foram realizados num aparelho de dissolução Sotax constituído por: aparelho de teste de dissolução com pás e cestos AT7 Smart, coletor de

frações Sotax C613, bomba de pistão modelo CY7-50, aparelho de testes de dissolução de fluxo contínuo e computador com programa "Winsotax software off-line". No recipiente de dissolução foram colocados 900 mL de suco gástrico artificial, preparado como descrito na Farmacopeia Portuguesa IX (2008) (para 1 L de suco gástrico são pesados 2 g de cloreto de sódio, 3,2 g de pepsina e dissolvidos em água; de seguida adicionam-se 80 mL de ácido clorídrico 1 M e perfaz-se o volume com água). A velocidade de agitação foi de 100 rpm, à temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e a leitura realizada em contínuo durante 180 minutos. A absorvência foi medida a 333 nm (comprimento de onda determinado através da análise do espectro UV do extrato em suco gástrico entre os 200 e os 600 nm) num espectrofotómetro UV-visível (Espectrofotómetro Perkin Elmer - Lambda 25, Perkin Elmer). Os valores de absorvência foram reportados a concentração recorrendo a uma curva de calibração de rotina.

2.3.4 Validação do ensaio de dissolução

A validação de um método analítico tem por objetivo demonstrar que este é adequado para o que se pretende que analise/avalie. No caso dos ensaios de dissolução, os parâmetros normalmente avaliados são: especificidade, exatidão, linearidade, amplitude e precisão (repetibilidade e precisão intermédia) (ICH, 2005).

No presente trabalho, para a validação do ensaio de dissolução foram avaliados os seguintes parâmetros:

2.3.4.1 Especificidade

A especificidade é a capacidade do método avaliar inequivocamente a substância pretendida na presença de outros componentes que seja expectável que estejam presentes (por exemplo: impurezas, produtos de degradação, entre outros) (ICH, 2005).

Foram preparadas soluções dos excipientes em suco gástrico e lida a sua absorvência a 333 nm contra um branco de suco gástrico. Estas soluções foram preparadas para as formulações desenvolvidas e na concentração que os excipientes se apresentam no meio de dissolução aquando do ensaio de dissolução. A tabela 7 resume os excipientes contidos nas formulações desenvolvidas e utilizadas na validação do ensaio de dissolução.

Tabela 7 - Excipientes contidos nas formulações utilizadas na validação do ensaio de dissolução.

Formulação	Excipiente
F1	Amido de milho
F2	Lactose mono hidratada
F3	Amido de milho, lactose mono hidratada, celulose microcristalina e estearato de magnésio

2.3.4.2 Linearidade

A linearidade de um procedimento analítico é a capacidade de o método obter resultados que são diretamente proporcionais à concentração de analito na amostra. Esta é avaliada numa amplitude que vai desde o valor mais baixo de concentração até ao mais alto esperado (ICH, 2005).

Inicialmente foi preparada uma solução - mãe de extrato em suco gástrico, e a partir desta foram preparadas soluções em diferentes concentrações e os excipientes em suco gástrico. A Figura 6 esquematiza as soluções preparadas, onde 100% corresponde à concentração de extrato no meio de dissolução quando uma cápsula é sujeita ao ensaio. A absorvência das soluções foi medida a 333 nm contra um branco de suco gástrico. Os valores de concentração do extrato são expressos através de uma curva de calibração da rotina em suco gástrico, nas seguintes concentrações: 0,015; 0,03; 0,05; 0,06; 0,08; 0,09; 0,12; 0,16; 0,19; 0,22 e 0,25 mg/mL.

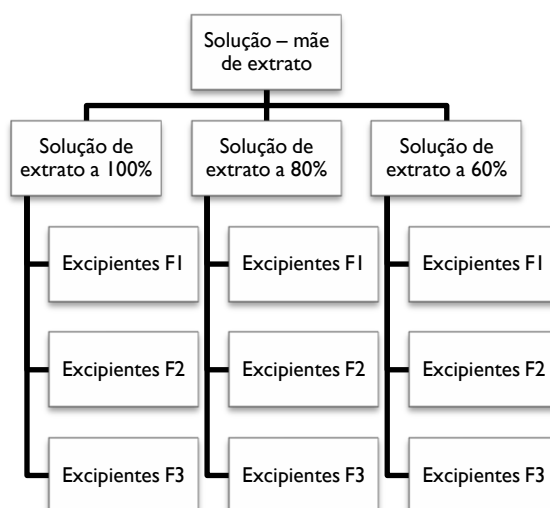


Figura 6 - Esquema das soluções preparadas para avaliação da linearidade.

2.3.4.3 Exatidão

A exatidão expressa o grau de concordância entre o valor que é aceite como verdadeiro ou de referência e o valor encontrado experimentalmente. Para a determinação da exatidão devem ser realizadas 9 determinações num mínimo de 3 níveis de concentração (ICH, 2005).

Soluções contendo os excipientes e o extrato (100, 80 e 60%) foram preparadas para as diferentes formulações e foi medida a sua absorvência a 333 nm usando o suco gástrico para fazer a correção da linha de base.

A percentagem de recuperação foi calculada através de relação entre o valor de concentração obtido experimentalmente e o tido como verdadeiro (teórico) através da seguinte expressão:

$$\%recuperação = \frac{[experimental]}{[teórica]} \times 100$$

2.3.4.4 Repetibilidade

A repetibilidade expressa a precisão de um ensaio quando realizado sob as mesmas condições de operação durante um curto intervalo de tempo, isto é, a dispersão dos resultados obtidos entre as réplicas do ensaio (ICH, 2005).

A repetibilidade foi avaliada através do coeficiente de variação, em percentagem, do ensaio de dissolução de 6 cápsulas (para cada formulação) nas condições descritas para o ensaio de dissolução.

3. Caracterização da formulação após contacto com o suco gástrico artificial

3.1 Avaliação da estabilidade química do extrato e formulação em suco gástrico artificial

Com o objetivo de avaliar a ação do suco gástrico artificial na composição química do extrato de *Cymbopogon citratus* e da formulação selecionada, recolheram-se alíquotas de 1 mL após 2 e 3 horas de contacto de 330 mg de extrato (a mesma quantidade presente na formulação) com 900 mL do meio gástrico simulado (37°C). As amostras foram depois sujeitas a um processo de purificação para remoção do ácido, pepsina e sais (Costa, 2015). Para isso as alíquotas recolhidas foram aplicadas numa coluna SPE (SPE-PAK® - Cartridge), previamente ativada com metanol acidificado com ácido fórmico 0,5% (v/v) e ácido fórmico 0,5% (v/v); de seguida foi feita a eluição com 2 mL de ácido fórmico 0,5% (v/v) (para um tubo

1) e com 1,5 mL de metanol acidificado com ácido fórmico 0,5% (v/v) (para um tubo 2), sendo esta segunda fração levada a resíduo seco num evaporador rotativo. O resíduo é retomado em 200 µL de metanol a 50% e injetado no HPLC-PDA, sob as condições utilizadas na secção 1.3 deste capítulo, para avaliação dos respetivos perfis cromatográficos.

3.2 Avaliação da atividade antioxidante do extrato e formulação após contacto com o suco gástrico artificial

A atividade antioxidante do extrato e da formulação em meio gástrico simulado (37°C) foi avaliada pelo ensaio de DPPH de forma semelhante à descrita anteriormente. As amostras do meio de dissolução foram recolhidas ao tempo 0 e em intervalos de 20 minutos durante um período de 3 horas. Para o ensaio utilizaram-se 200 µL de amostra e ao controlo de DPPH foram adicionados 200 µL de suco gástrico a 37°C (de forma a poder eliminar a interferência do suco gástrico e da temperatura na reação), sendo o volume de etanol ajustado para que o volume final fosse de 3 mL. A atividade antioxidante é expressa através da % de redução do DPPH.

4. Referências bibliográficas

ALVES, C. Q. *et al.* - "Métodos para determinação da atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos". *Química Nova*, 33:10 (2010) 2202-2210.

BLOIS, M.S. - "Antioxidant determinations by the use of a stable free radical". *Nature*, 181(1958) 1199–1200.

CANOTILHO, J.; SOUSA, A. T. B.; PINTO, J. A. M. C. - "Análise térmica. Interesse em tecnologia farmacêutica". *Revista Portuguesa de Farmácia*, XLII:4 (1992) 5-12.

CHADHA, R.; BHANDARI, S. - "Drug–excipient compatibility screening - Role of thermoanalytical and spectroscopic techniques". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87 (2014) 82– 97.

CHEN, L.; CHENG, C.; LIANG, J. - "Effect of esterification condensation on the Folin–Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols". *Food Chemistry*, 170 (2015) 10–15.

COSTA, G. - "*Cymbopogon citratus* and its polyphenols as potential phytotherapeutic products: an *in vivo* approach". Coimbra: Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, 2015. Tese de Doutoramento. [Acedido a 7 de junho de 2016]. Disponível na internet: <https://estudogeral.sib.uc.pt/jspui/bitstream/10316/29994/1/Cymbopogon%20citratus%20and%20its%20polyphenols%20as%20potential%20phytotherapeutic%20products.pdf>

EERDENBRUGH, B. V.; TAYLOR, L. S. - "Application of mid-IR spectroscopy for the characterization of pharmaceutical systems". *International Journal of Pharmaceutics*, 417 (2011) 3– 16.

Farmacopeia Portuguesa IX, 2008. Edição Oficial, Ministério da Saúde, Infarmed, Lisboa, Volume I.

FEITEIRA, J. C. - "Estudo sobre polimorfos de compostos orgânicos: Ibuprofeno e Carboxamidas". Coimbra: Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Departamento de Química, 2010. Tese de Mestrado [Acedido a 24 de outubro de 2015]. Disponível na internet: <https://estudogeral.sib.uc.pt/handle/10316/14359>

FIGUEIRINHA, A. *et al.* - "*Cymbopogon citratus* leaves: Characterisation of flavonoids by HPLC–PDA–ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols". *Food Chemistry*, 110 (2008) 718–728.

FIGUEIRINHA, A. M. B. R - "Composição química e atividade anti-inflamatória do infuso de *Cymbopogon citratus*". Coimbra: Faculdade de Farmácia de Universidade de Coimbra, 2011. Tese de Doutoramento.

FORTE, C. A. D. - "Estudos de formação de co-cristais com o diflunisal e isómeros de piridina-carboxamida". Coimbra: Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Departamento de Química, 2010. Tese de Mestrado. [Acedido a 24 de outubro de 2015]. Disponível na internet: <https://estudogeral.sib.uc.pt/handle/10316/15391>

GILL, P.; MOGHADAM, T. T.; RANJBAR, B. - "Differential Scanning Calorimetry Techniques: Applications in Biology and Nanoscience". *Journal of Biomolecular Techniques*, 21 (2010) 167–193.

International Conference on Harmonisation (ICH) - "Validation of Analytical Procedures: text and methodology Q2 (R1)", 2005.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. - "A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada". *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 38:4 (2002) 375-399.

MARQUES, O. C. P. - "Desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas orais de *Uncaria tomentosa* com atividade antioxidante". Coimbra: Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, 2008. Tese de Mestrado. [Acedido a 11 de maio de 2015]. Disponível na Internet: <https://estudogeral.sib.uc.pt/jspui/handle/10316/7425>

MOLYNEUX, P. - "The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity". *Songklanakarin Journal of Science Technology*, 26:2 (2004) 211-219.

MORRISON, R.; BOYD, R. - "Química Orgânica", 16ª edição. Fundação Calouste Gulbenkian, 2011. ISBN: 978-972-31-0513-1.

PEREIRA, M. O. S. - "Estudo Comparativo de Métodos de Avaliação da Capacidade Antioxidante de Compostos Bioativos". Lisboa: Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, 2010. Tese de Mestrado.

[Acedido a 7 de outubro de 2015]. Disponível na internet: <https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/3146/3/TESEMESTRADO3x.pdf>

PRISTA; L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R.M.R. - "Técnica Farmacêutica e Farmácia Galénica", I Volume, 5ª edição. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1995. ISBN: 9723106787.

SKOOG, D. A. *et al.* - "Fundamentals of Analytical Chemistry", 9ª edição. Brooks/Cole, Cengage Learning, 2014. ISBN: 978-0-495-55828-6.

TIȚA, B. *et al.* - "Compatibility study between ketoprofen and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56 (2011) 221–227.

TSAO, R. - "Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols". *Nutrients*, 2 (2010) 1231-1246.

VÁZQUEZ, C. V. *et al.* - "Total phenolic compounds in milk from different species. Design of an extraction technique for quantification using the Folin–Ciocalteu method". *Food Chemistry*, 176 (2015) 480–486.

WANG, C.; LEE, W.; PENG, C. - "Contents of phenolics and alkaloids in *Areca catechu* Linn. during maturation". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (1997) 1185–1188.

Capítulo IV - Resultados e Discussão

I. Obtenção e caracterização do liofilizado de *Cymbopogon citratus*

I.1 Teor de humidade

O teor de humidade foi determinado através da perda de massa por secagem na estufa, até valor constante. Os resultados obtidos encontram-se descritos na Tabela 8.

Tabela 8 - Teor de humidade contido na planta e no extrato de *Cymbopogon citratus*.

	Peso seco (%)	Teor de humidade (%)
Planta	89,9	10,1
Extrato	99,8	0,2

O valor obtido para o extrato encontra-se dentro do limite estipulado na Farmacopeia Portuguesa IX (2008) para os extratos secos, cujo teor máximo de água admissível é de 5% (m/m).

I.2 Rendimento extrativo

O rendimento extrativo, do infuso de *Cymbopogon citratus* foi de 18,4%. Os resultados do rendimento extrativo da planta obtidos em outros trabalhos parecem demonstrar que este valor não é reprodutível, uma vez que apresenta variações consoante o solvente de extração e mesmo quando a infusão é preparada da mesma forma que a utilizada neste trabalho os valores de rendimento apresentam diferenças. A Tabela 9 resume alguns dos resultados encontrados, que evidenciam o descrito anteriormente.

Tabela 9 - Rendimento extrativo para a *Cymbopogon citratus* obtido por outros autores.

Solvente de extração	Rendimento extrativo (%)	Referências bibliográficas
Água *	16,52	Tavares et al., 2014
Água	10,94	
Etanol 50%	6,32	Tiwari, Dwivedi e Kakkar, 2010
Metanol / água (7:3)	21,5±1,4	Cheel et al., 2005
Metanol / água (1:1)	22,6±2,2	
Metanol	18,2±1,2	
Água (decoção / infusão)	17,6±0,9 / 21,2±1,3	

* mesmo método que o utilizado para obter o extrato neste trabalho

1.3 Análise qualitativa do extrato de *Cymbopogon citratus* por HPLC-PDA

A Figura 7 representa o perfil cromatográfico, obtido por HPLC-PDA a 280 e 320 nm, do extrato na concentração de 1,8 mg/mL em metanol a 50%. O cromatograma evidencia a presença de taninos (1), ácidos fenólicos (2-4) e flavonoides (5-13).

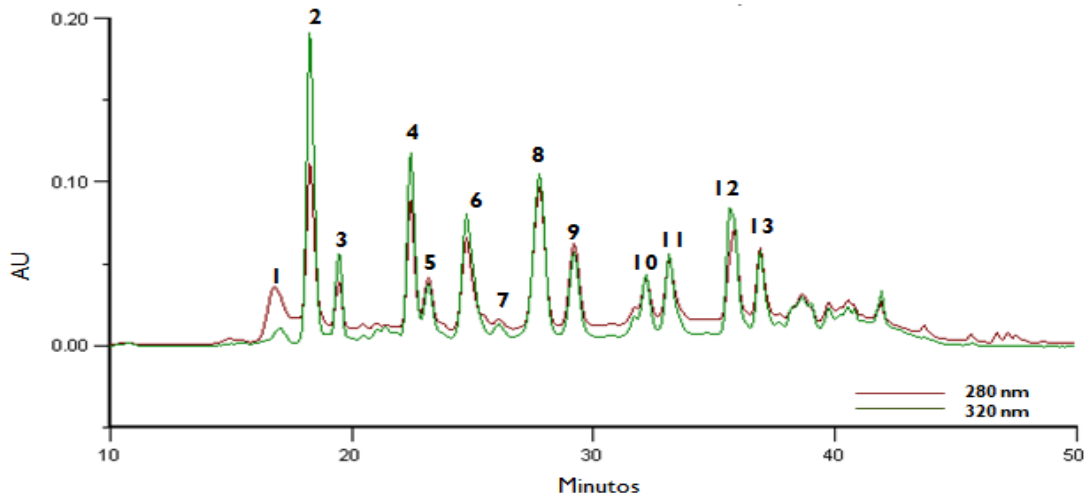


Figura 7 - Perfil cromatográfico obtido por HPLC-PDA de *Cymbopogon citratus* (280 nm e 320 nm).

Através dos espectros UV foi possível verificar que os ácidos fenólicos presentes são principalmente derivados do ácido cafeico ou do ácido ferúlico e do ácido *p*-cumárico, já os flavonoides são preferencialmente flavonas, mais especificamente derivados da luteolina e da apigenina. As Figuras 8 a 10 representam os espectros UV característicos dos compostos identificados no extrato.

Os taninos apresentam um espectro UV com máximo de absorção por volta dos 274 nm (a ligeira elevação que se observa por volta dos 320 nm poderá estar relacionada com a co-eluição de outros compostos), o ácido cafeico e seus derivados apresentam dois máximos (292 nm e 325 nm), e por sua vez o ácido *p*-cumárico apresenta um máximo de absorção a 310 nm.

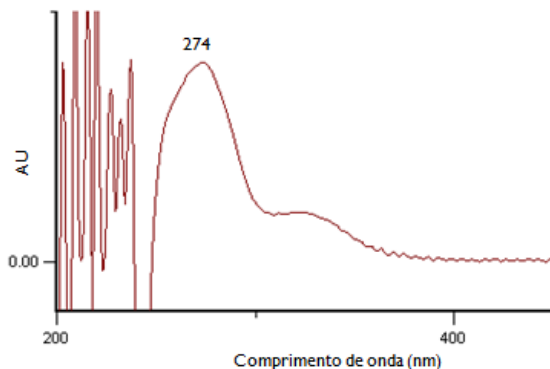


Figura 8 - Espectros UV, obtidos por HPLC-PDA, característico dos taninos.

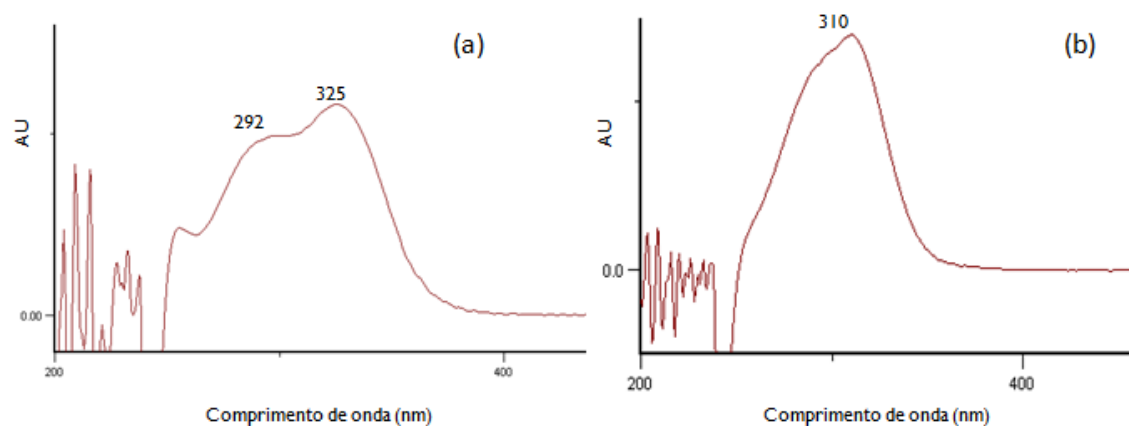


Figura 9 - Espectros UV, obtidos por HPLC-PDA característicos dos ácidos fenólicos. (a) ácido cafeico e (b) ácido *p*-cumárico.

Relativamente aos flavonoides é visível a existência de duas bandas de absorção: uma a 330-350 nm que corresponde à banda I e outra a 258-270 nm correspondente à banda II. Os derivados da luteolina apresentam a banda I próxima dos 350nm e a banda II apresenta um desdobramento em dois máximos ou um máximo com uma inflexão, devido à presença de dois hidroxilos no anel B. Por sua vez, os derivados da apigenina apresentam a banda I aos 330 nm e a banda II mostra apenas um máximo de absorção próximo dos 270 nm. A banda II não apresenta desdobramento, comportamento que é característico de flavonas com anel B monohidroxilado (Figueirinha, 2011).

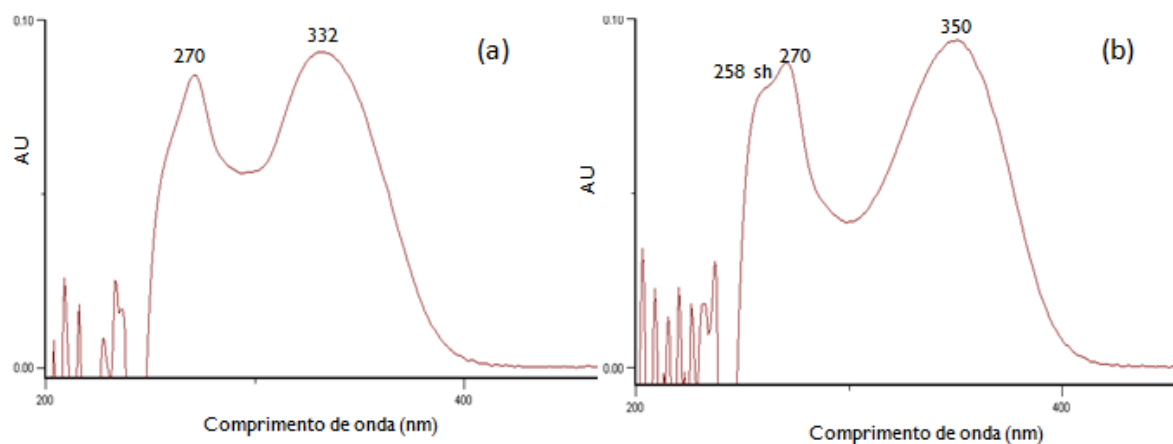


Figura 10 - Espectros UV, obtidos por HPLC-PDA, característicos dos flavonoides. (a) derivados da apigenina e (b) derivados da luteolina.

A Tabela 10 resume os compostos fenólicos identificados no extrato; a identificação foi feita comparando os espectros UV e os tempos de retenção obtidos neste trabalho com os que foram identificados anteriormente, por parte do grupo de trabalho do Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Coimbra, por HPLA-PDA-ES/MS (Figueirinha, 2011).

Tabela 10 - Identificação dos compostos presentes no extrato de *Cymbopogon citratus* (registrado a 280 nm). * Atribuição feita de acordo com Figueirinha, 2011.

Composto	Identificação *	Tempo de retenção (min)	λ máx HPLC-PDA (nm)
1	Tanino condensado	16,78	273,7
2	Ácido neoclorogénico	18,26	298,8sh;326,5
3	Derivado do ácido cafeico	19,48	297,9;325,6
4	Derivado do ácido <i>p</i> -cumárico	22,42	309,9
5	Luteolina 6-C- β -glucopiranosil- 8-C- α - arabinopiranosídeo	23,17	259,9sh;270,6; 347,9
6	Apigenina 6-C- α -arabinopiranosil-8-C- β -glucopiranosídeo	24,74	270;332,3
7	Apigenina 6-C-pentosil-8-C-hexosilo	26,10	272;338,1
8	Luteolina 6-C- β -glucopiranosídeo (isoorientina) Isoorientina 2''-O- β -ramnósido	27,76	258,1sh;269,7; 350,6
9	Luteolina 6-C-pentosil-8-C-pentosilo	29,19	259,4sh;271,1; 350,6
10	Luteolina 7-O- β - glucopiranosídeo	32,16	258,1sh;267,5; 345,7
11	Luteolina 7-O-neohesperidósido Luteolina 6-C-pentosil-8-C-desoxihexosilo	33,13	258,1sh;265,7; 348
12	Luteolina 6-C-pentosilo Luteolina 2''-O- α -L-ramnosil-6-C- α -arabinofuranósido	35,82	258,1sh;270,2; 347
13	Luteolina 2''-O-ramnosil-(6-desoxi-ribo-hexos-3-ulosilo)	36,89	258,5sh;269,7; 351,1

1.4 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de DPPH

Nos organismos que realizam a respiração por via aeróbia, em situações de *stress*, produzem naturalmente ROS; estas podem ocorrer na forma de radicais livres ou não, e quando se apresentam em concentrações elevadas, quer por serem produzidas em elevada quantidade ou porque os mecanismos antioxidantes endógenos não são eficazes para impedir a sua produção ou eliminação, deixam o organismo numa situação de *stress* oxidativo causando danos celulares que se refletem em várias disfunções tais como: doenças coronárias, inflamação, cancro, envelhecimento, doenças neuro degenerativas, entre outras. A presença no organismo de agentes antioxidantes exógenos (ingeridos na dieta, por exemplo) vai ajudar no processo de defesa contra os referidos danos. Os compostos

fenólicos presentes em muitos produtos como é o caso das plantas medicinais, e em particular do *Cymbopogon citratus*, em estudos *in vitro*, têm mostrado contribuir para a ação antioxidante e antiradicalar, devido à sua capacidade de oxidação-redução diminuir as espécies oxidantes e contribuir para a neutralização de ROS (Degáspari e Waszczyński, 2004; Pimpão, 2009).

A atividade antioxidante foi avaliada pelo ensaio de DPPH, através da percentagem de redução calculada em relação a uma solução controlo de DPPH, nas mesmas condições experimentais do *Cymbopogon citratus*. Na Figura 11 encontra-se representada a reta obtida com os valores da percentagem de redução do DPPH em função da concentração do extrato no meio reacional ($\mu\text{g/mL}$), a partir da qual se determina o valor de EC50, isto é, a concentração de extrato que reduz em 50% a absorvência da solução de DPPH.

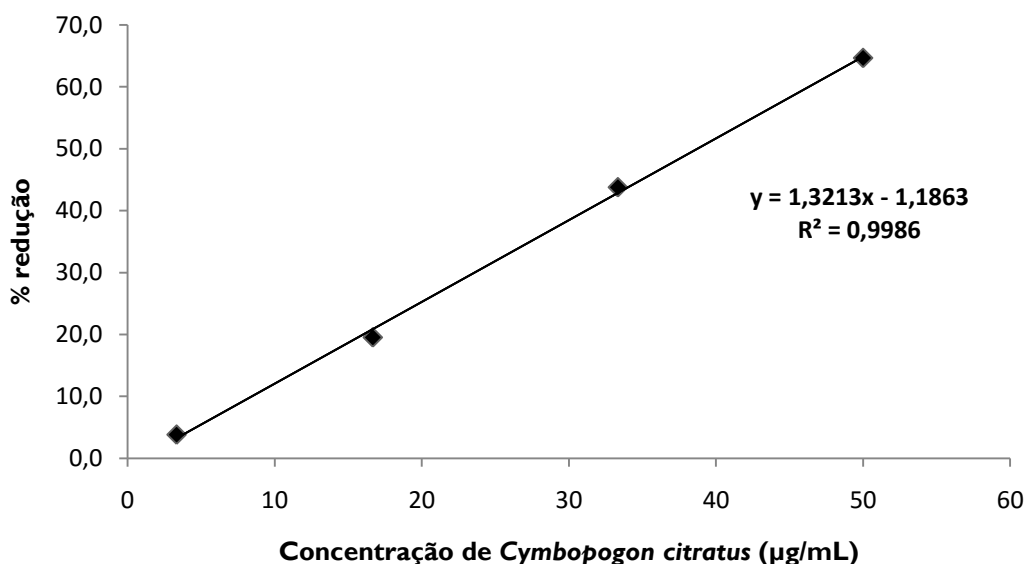


Figura 11 - Reta de calibração no ensaio de DPPH.

A equação da reta obtida foi: $y=1,3212x-1,1863$, com um coeficiente de correlação de 0,9986 e o valor do EC50 de $38,75 \pm 1,09 \mu\text{g/mL}$; que corresponde a uma atividade ligeiramente superior à obtida por Tavares *et al.*, 2014 usando o mesmo processo extractivo ($41,72 \pm 0,05$).

1.5 Doseamento dos fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu

A análise quantitativa da composição química do extrato foi feita através do teor de fenóis totais recorrendo ao método de Folin-Ciocalteu. Começou-se por traçar uma curva de calibração usando como padrão o ácido gálico, cuja equação da reta é: $y=0,1081x+0,0109$, com um coeficiente de correlação de 0,9904, onde y é a absorvência e x a concentração, em mg/ml , de fenóis totais reportada a ácido gálico.

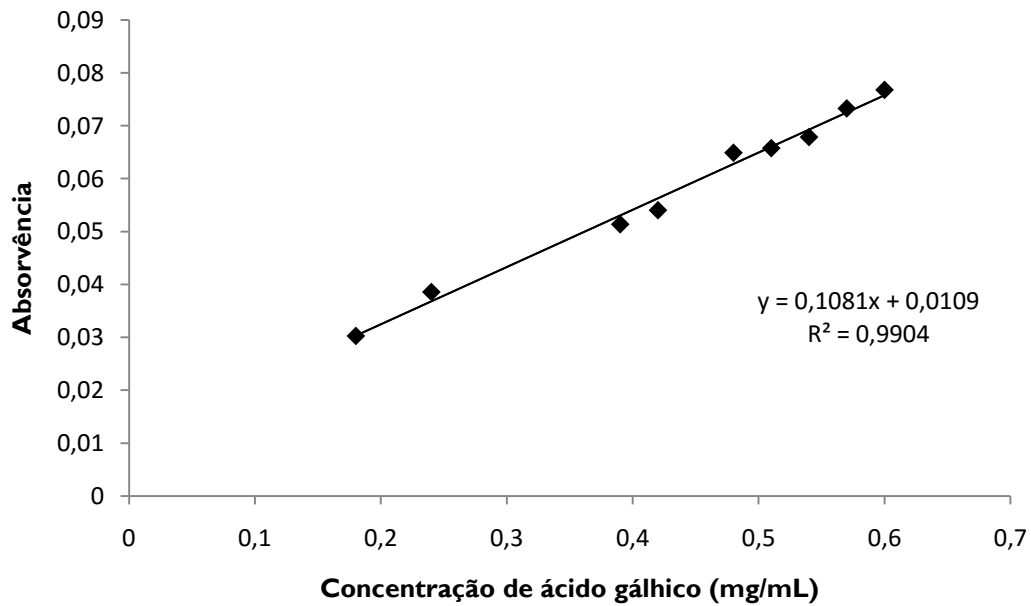


Figura 12 - Curva de calibração do ácido gálico para o doseamento dos fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu.

O teor de fenóis totais no extrato foi de $70,20 \pm 0,02$ miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de extrato. Neste caso o valor obtido é superior ao observado por Tavares *et al.*, 2014 ($41,6 \pm 0,05$). Este facto pode justificar a atividade antioxidante ligeiramente superior deste extrato comparada com a obtida pelo mesmo autor.

As diferenças observadas podem ser o resultado de fatores ambientais como por exemplo: a composição química do solo, época de recolha, qualidade da planta na altura em que é colhida, entre outros (Costa *et al.*, 2016a).

O propósito destes ensaios iniciais é estabelecer as características do extrato, servindo como uma padronização do extrato para o restante trabalho.

1.6 Avaliação da presença de *n*-hexano

Durante o processo extrativo utilizou-se *n*-hexano para remover os componentes lipídicos presentes no extrato, em particular os óleos essenciais. Como o objetivo é desenvolver uma formulação para uso humano, é necessário verificar se o *n*-hexano está ausente no extrato. A pesquisa da presença de solventes, feita por cromatografia gasosa com *headspace*, não detetou quaisquer vestígios deste solvente confirmando assim a segurança para uso humano.

2. Desenvolvimento de formas farmacêuticas

2.1 Seleção dos excipientes

No desenvolvimento das formas farmacêuticas contendo o extrato de *Cymbopogon citratus* optou-se por selecionar excipientes que são frequentemente utilizados em formulações sólidas para uso oral, concretamente o amido de milho, lactose mono hidratada, celulose microcristalina e estearato de magnésio. Também o facto de existir na literatura o desenvolvimento de comprimidos com alguns destes excipientes incentivou esta preferência (Salome *et al.*, 2012).

2.1.1. Avaliação da compatibilidade do extrato com os excipientes através de DSC

Para avaliar a existência de possíveis interações/incompatibilidades foram realizados, numa primeira fase, termogramas por DSC do extrato, excipientes e misturas binárias destes (Figuras 13 a 16).

A curva de DSC do extrato apresentou um pico endotérmico largo com um máximo aos 67,93 °C, provavelmente relacionado com a perda de água, já que dados gravimétricos do *Cymbopogon citratus* descritos na literatura mostram perda de massa entre os 25-150°C associada à perda de água (Lee *et al.*, 2014). A temperatura superior a 155°C verifica-se a sua decomposição.

No caso do amido de milho a curva DSC (Figura 13) é semelhante ao descrito na literatura, apresentando um pico largo, aproximadamente, entre os 50-140°C que é atribuído à perda de água (Mura *et al.*, 1995). Na mistura binária do extrato com o amido de milho não foram verificadas alterações que revelem algum tipo de incompatibilidade.

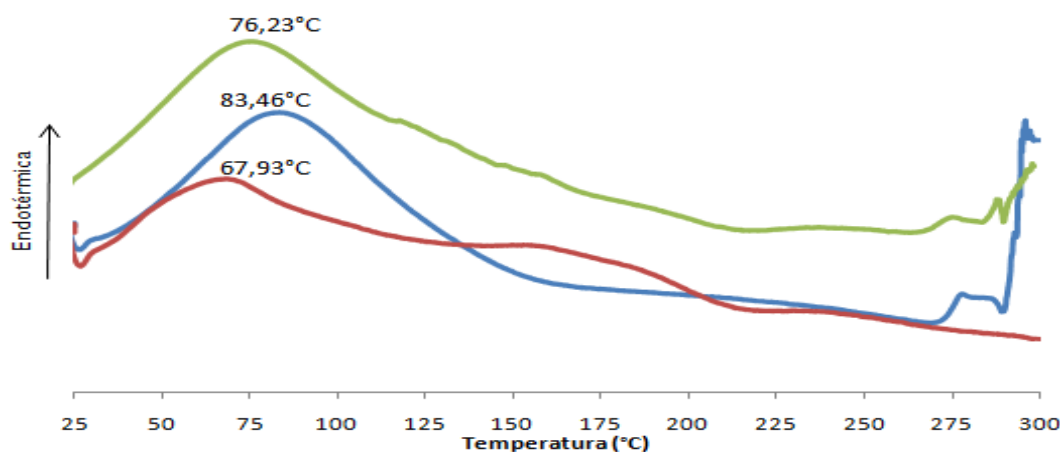


Figura 13 - Termograma de DSC do extrato (vermelho), do amido de milho (azul) e da mistura de extrato:amido de milho (1:1) (verde).

A lactose mono hidratada apresenta dois principais eventos endotérmicos (Figura 14). O primeiro ocorre aos 146,82°C e corresponde à perda da molécula de água, e o segundo verifica-se aos 218,99°C e corresponde ao ponto de fusão da lactose. Estes valores vão de encontro ao que já se encontra descrito na literatura (Verma e Garg, 2005). A curva de DSC da mistura do extrato com a lactose mono hidratada demonstra a existência de interação entre eles, já que se verifica um ligeiro deslocamento do pico de fusão da lactose para temperaturas inferiores bem como uma diminuição acentuada da sua área.

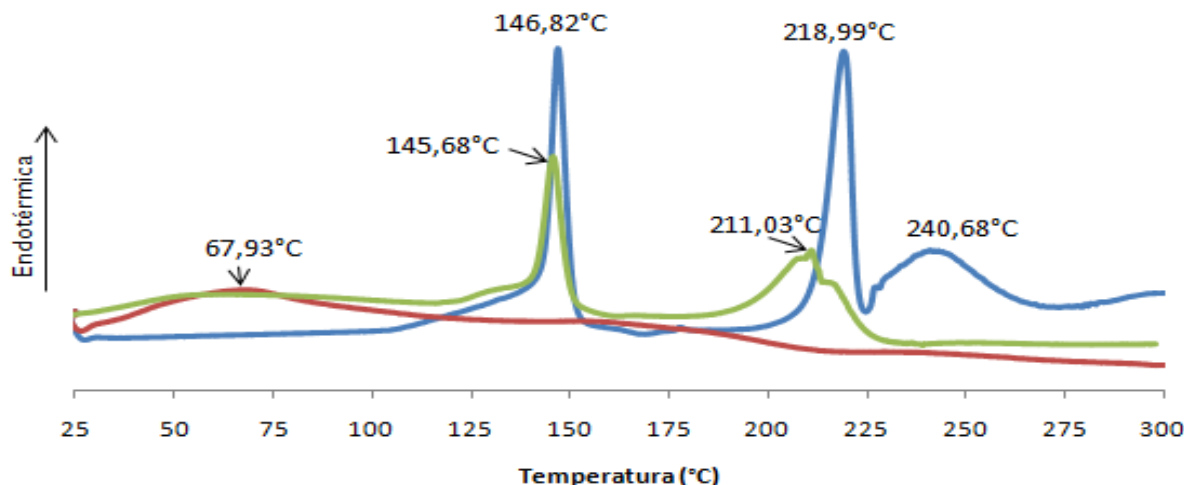


Figura 14 - Termograma de DSC do extrato (vermelho), da lactose mono hidratada (azul) e da mistura de extrato:lactose mono hidratada (1:1) (verde).

No caso da celulose microcristalina (Figura 15), o termograma obtido apresentou um pico endotérmico largo entre os 41- 87°C sendo o seu máximo a 66,73°C, estando de acordo com o descrito na literatura (Mura *et al.*, 1995 e Verma e Garg, 2005). A curva da mistura binária do extrato com o excipiente, não revelou qualquer incompatibilidade.

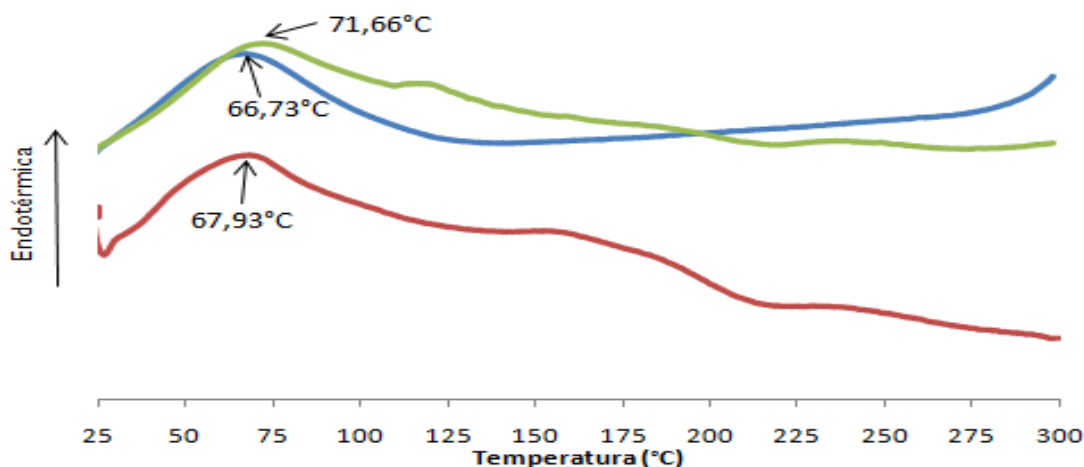


Figura 15 - Termograma de DSC do extrato (vermelho), da celulose microcristalina (azul) e da mistura de extrato:celulose microcristalina (1:1) (verde).

A análise da curva de DSC do estearato de magnésio (Figura 16), revelou a presença de três picos endotérmicos, com máximos aos 92,65°C, 114,80°C e 121,05°C, que correspondem à perda de água (os dois primeiros) e à fusão, respetivamente, e são concordantes com os descritos por Javadzadeh *et al.* (2012). A curva DSC da mistura não revela a existência de interação entre o extrato e o excipiente.

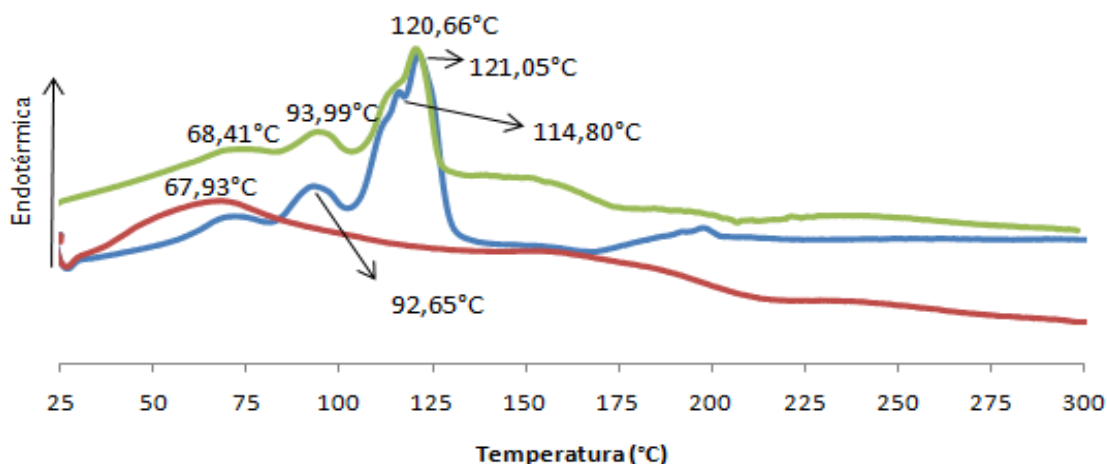


Figura 16 - Termograma de DSC do extrato (vermelho), do estearato de magnésio (azul) e da mistura de extrato:estearato de magnésio (1:1) (verde).

2.1.2. Avaliação da compatibilidade do extrato com os excipientes através de IV

Numa segunda fase e como forma de complementar/confirmar a informação obtida por DSC, e com o objetivo de retirar mais conclusões sobre incompatibilidades do extrato com os excipientes selecionados, recorreu-se à espectroscopia de infravermelho, onde se analisou os componentes isolados e a mistura do extrato com o excipiente (1:1) (Figuras 17 a 20).

No espectro FTIR-ATR do extrato (Figura 17) a região entre os 3600 e 2700 cm^{-1} normalmente relacionada com as vibrações de deformação axial no átomo de hidrogénio ligados a carbono, oxigénio e azoto (C-H, O-H e N-H), apresenta duas bandas: uma banda larga 3264 cm^{-1} , associada ao alongamento da ligação O-H em álcoois e uma banda fraca a 2930 cm^{-1} correspondente ao alongamento da ligação no grupo C-H alifático. Na região correspondente às vibrações por deformação axial de ligações duplas e triplas (2300 a 1500 cm^{-1}) observa-se apenas uma banda forte aos 1575 cm^{-1} , que pode ser interpretada como o resultado do alongamento do grupo C=C em anéis aromáticos (a elevada intensidade é característica de insaturações ou presença de átomos contendo pares de electrões livres ligados ao grupo fenilo). A zona entre os 1500 e os 600 cm^{-1} apresenta maior complexidade devido à sobreposição de bandas de absorção. Destacam-se nesta zona uma banda de

intensidade média (1386 cm^{-1}) que provavelmente corresponderá à absorção devida à deformação simétrica do grupo CH_3 alifático, e uma banda forte (1031 cm^{-1}) que corresponde muito provavelmente aos anéis saturados das oses (Lambert *et al.*, 1987; Brajdes *et al.*, 2013). Estes resultados coincidem com os descritos na literatura (Lee *et al.*, 2014).

Pela observação do espectro da mistura de extrato com amido de milho (Figura 17), confirma-se a ausência de incompatibilidades entre os dois componentes, já que este parece ser a soma dos espectros dos componentes isolados.

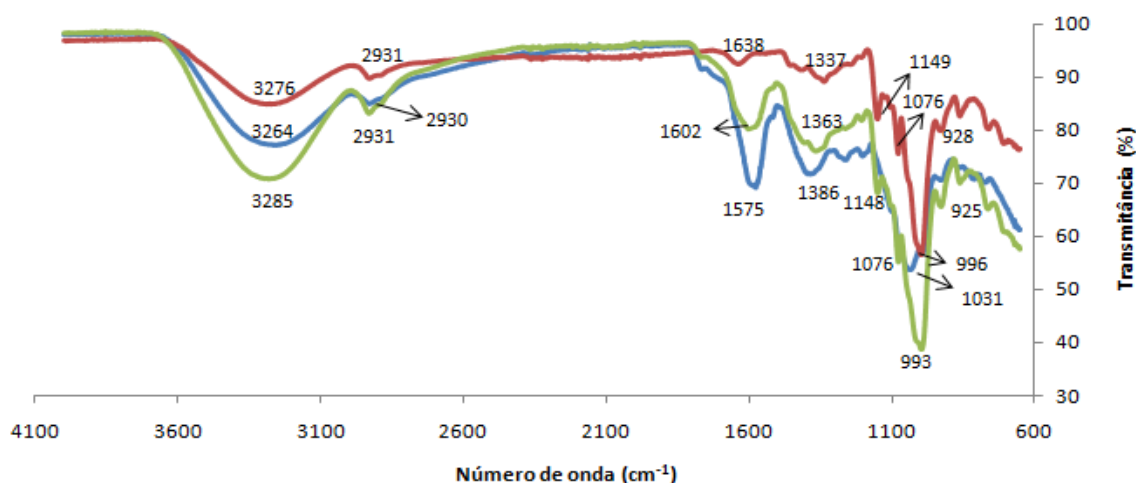


Figura 17 - Espectro FTIR-ATR do extrato (azul), do amido de milho (vermelho) e da mistura de extrato:amido de milho (1:1) (verde).

A análise da mistura do extrato com a lactose mono hidratada por FTIR-ATR (Figura 18) mostra um espectro que parece corresponder à soma dos espectros dos compostos isolados, com exceção da banda a 1575 cm^{-1} que parece estar muito diminuída na mistura em relação ao que seria esperado. Esta alteração parece confirmar a existência de interação deste excipiente com o extrato, já observada no estudo realizado por DSC.

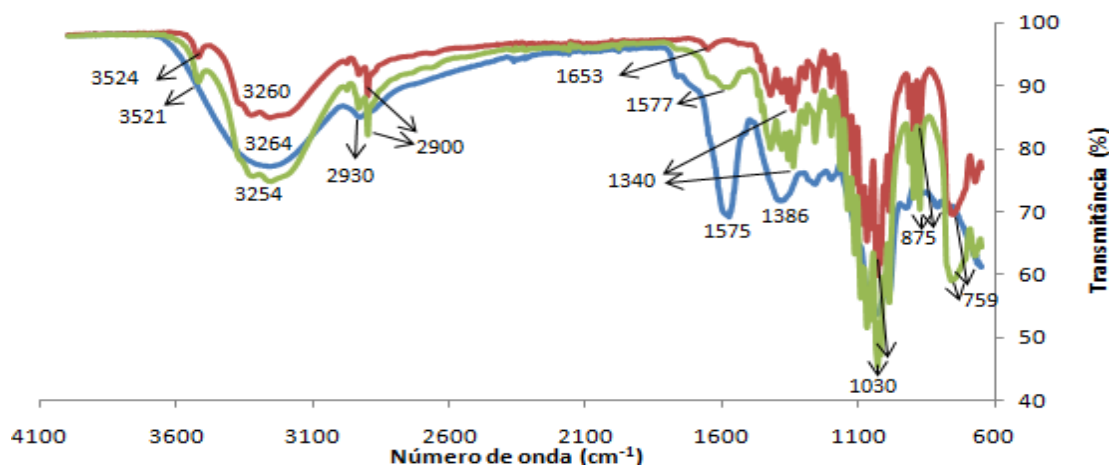


Figura 18 - Espectro FTIR-ATR do extrato (azul), da lactose mono hidratada (vermelho) e da mistura de extrato:lactose mono hidratada (1:1) (verde).

No caso da celulose microcristalina em mistura com o extrato (Figura 19) não se observam bandas adicionais ou o seu desaparecimento; o espectro parece resultante da soma dos espectros dos componentes isolados sugerindo assim a inexistência de interação entre eles.

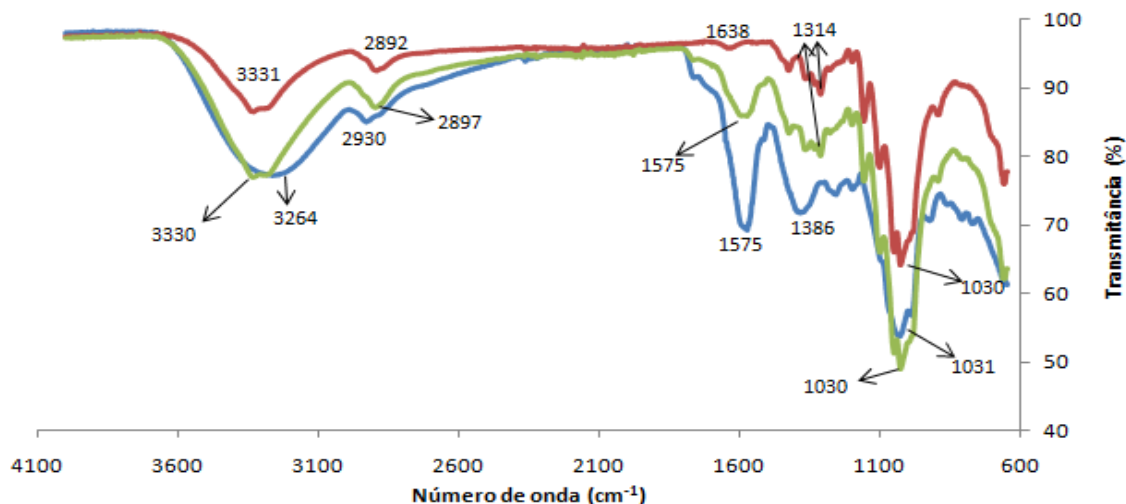


Figura 19 - Espectro FTIR-ATR do extrato (azul), da celulose microcristalina (vermelho) e da mistura de extrato:celulose microcristalina (1:1) (verde).

O espectro da mistura do extrato com o estearato de magnésio (Figura 20) é similar ao estearato, não tendo sido observadas quaisquer bandas correspondentes ao extrato, o que pode indicar a existência de interação entre estes, mas que não foi detetada por DSC.

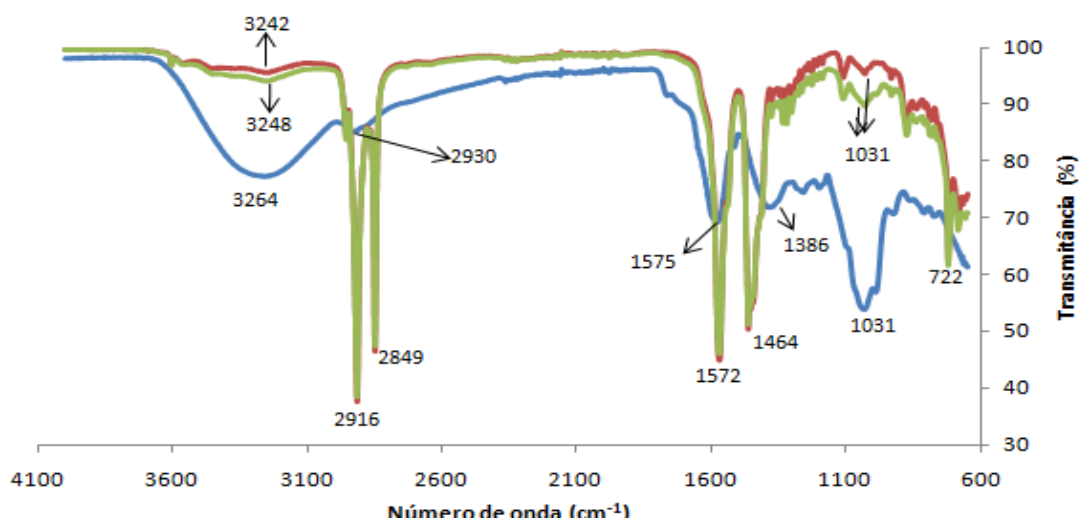


Figura 20 - Espectro FTIR-ATR do extrato (azul), do estearato de magnésio (vermelho) e da mistura de extrato:estearato de magnésio (1:1) (verde).

2.2 Determinação da massa volúmica aparente do extrato

O ensaio de volume aparente descrito na Farmacopeia Portuguesa IX (2008) tem como objetivos a determinação dos volumes aparentes antes e após compactação, capacidade de compactação e as massas volúmicas aparentes dos sólidos. A determinação destes valores é essencial na escolha do tamanho de cápsula a utilizar.

Este método foi utilizado para a determinação da massa volúmica dos excipientes contudo não foi possível utilizá-lo para a determinação do volume aparente do extrato porque a quantidade obtida não foi suficiente para usar no equipamento do ensaio. Assim fez-se a medição do volume usando uma proveta onde foi colocada uma determinada massa de amostra e de seguida foram aplicadas pancadas verticais constantes até não ser observada alteração do volume. A massa volúmica obtida, após compactação, do extrato foi de 0,879 g/mL.

2.3 Composição das formulações

A partir do valor do rendimento extrativo obtido é calculada a quantidade de extrato a colocar na forma farmacêutica para ter a dose descrita na medicina tradicional de 2 g de folhas secas. Como no uso tradicional a planta utilizada não é totalmente seca, foi então utilizado para o cálculo da dose o rendimento extrativo de 16,50%, determinado a partir da massa da planta. Assim a massa de extrato a colocar por cápsula foi de 330 mg.

Tendo em conta este valor e a massa volúmica, é possível obter o volume ocupado pelo extrato (0,375 mL); tendo em atenção os invólucros gelatinosos e os suportes disponíveis no laboratório para o enchimento das cápsulas optou-se por utilizar a cápsula número 0.

Apesar dos estudos de pré-formulação terem indicado a possibilidade de interação do extrato com a lactose mono hidratada e com o estearato de magnésio, optou-se por utilizar estes excipientes na formulação, dado que no primeiro caso a existência de interação pode não causar instabilidade e no segundo caso, o estearato de magnésio está presente na formulação numa quantidade muito inferior à ensaiada, aquando dos estudos por DSC e IV.

A quantidade de excipiente a colocar por cápsula foi feita de acordo com a massa volúmica de cada um; no caso da formulação F3 que contém vários excipientes a proporção utilizada foi a seguinte: 14% de amido de milho, 15% de lactose mono hidratada, 15% de celulose microcristalina e 1% de estearato de magnésio. A composição das formulações ensaiadas está resumida na Tabela II.

Tabela 11 - Composição das formulações desenvolvidas.

Excipiente	Formulação (mg)				
	F1	F 2	F 3	F 4	F 5
Extrato	330	330	330	597,70	330
Amido de milho	158	-	49,30	-	-
D (+)-Lactose mono hidratada	-	199	66,50	-	-
Estearato de magnésio	-	-	2,43	-	-
Celulose microcristalina	-	-	42,50	-	-

2.4 Ensaio de dissolução

2.4.1 Validação do método de dissolução

A validação do ensaio de dissolução foi realizada tendo por base a guideline Q2 (R1) da *International Conference on Harmonisation* (ICH, 2005) onde os parâmetros avaliados foram a especificidade, linearidade, exatidão e repetibilidade.

- **Especificidade**

A especificidade foi avaliada pela determinação da absorvência de cada excipiente em suco gástrico, reproduzindo as condições do ensaio de dissolução. Em todas as formulações desenvolvidas os excipientes apresentaram valores de absorvência muito próximos de 0 (Tabela 12) e portanto a sua interferência é inferior a 2%, estando de acordo com o critério de aceitação para este parâmetro. Estes resultados permitem concluir que, no comprimento de onda a que se faz a leitura da absorvência no ensaio de dissolução, esta corresponde unicamente ao extrato dissolvido no meio.

Tabela 12 - Interferência dos excipientes no ensaio de dissolução.

Formulação	Excipientes das formulações	Absorvência excipiente	Interferência (%)
F1	Amido de milho	0	0
F2	Lactose mono hidratada	0,0002	0,14
F3	Amido de milho, lactose mono hidratada, celulose microcristalina e estearato de magnésio	0	0

- **Linearidade**

Para avaliação da linearidade foi lida a absorvência das soluções contendo os excipientes presentes em cada formulação e diferentes concentrações de extrato; os valores medidos foram reportados a rotina através da curva de calibração da Figura 21.

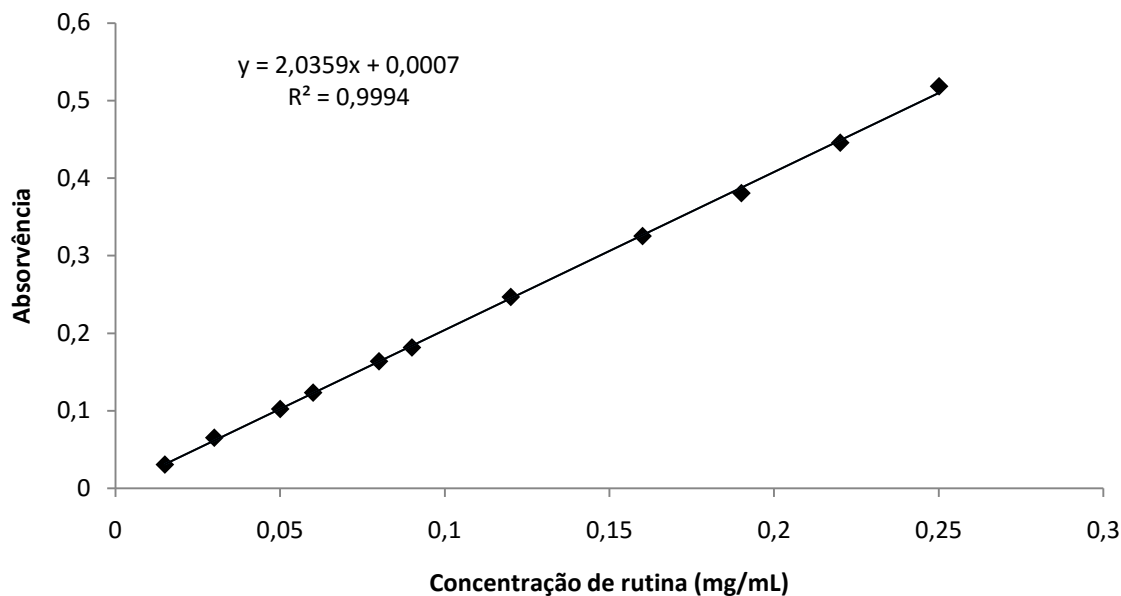


Figura 21 - Curva de calibração da rutina em suco gástrico.

Os resultados da linearidade, obtidos para as diferentes formulações, estão expressos na Tabela 13 através da equação da reta e do coeficiente de correlação (r^2).

Tabela 13 - Dados da curva de calibração de cada formulação para o parâmetro da linearidade.

Formulação	Equação da reta	r^2
F1	$Y=2,0359x+0,0007$	1
F2	$Y=2,0359x+0,0007$	1
F3	$Y=2,0359x+0,0007$	1

Os critérios de aceitação definidos para a linearidade são: coeficiente de correlação $\geq 0,98$ e ordenada na origem não significativamente diferente de zero. Como é possível observar pela Tabela 13 as formulações cumprem os requisitos de aceitação.

- **Exatidão**

A exatidão foi avaliada através da percentagem de recuperação de amostras contendo extrato e excipiente (ambos em quantidade conhecida). De acordo com o intervalo de percentagem de extrato utilizado e com o que se encontra descrito na tabela de Ludwig Huber (Nash e Wachter, 2003) conclui-se que os valores de percentagem de recuperação devem estar compreendidos entre 98-102%. A Tabela 14 resume os valores obtidos na avaliação deste parâmetro e a partir dela é possível verificar que em todas as formulações a percentagem de recuperação se encontra dentro do intervalo especificado.

Tabela 14 - Percentagem de recuperação para as formulações em estudo, nas diferentes concentrações de extrato.

Formulação	Extrato (%)	Recuperação (%)
F1	100	98,45
	80	100,04
	60	98,00
F2	100	99,13
	80	100,77
	60	101,26
F3	100	98,73
	80	100,43
	60	98,75

- **Repetibilidade**

Para o estudo da repetibilidade analisou-se o coeficiente de variação, obtido a partir das réplicas do ensaio de dissolução para cada formulação. Como a libertação é rápida apenas se consideram os valores acima de 85% dissolvido cujo critério de aceitação exige um coeficiente de variação inferior a 5%.

Tabela 15 - Coeficiente de variação, em percentagem, para a dissolução das diferentes formulações.

Formulação	Tempo (minutos)	CV (%)
F1	15	1,48
	45	1,90
	75	1,48
	105	1,36
	135	1,59
	165	1,16
F2	15	3,86
	45	3,86
	75	3,81
	105	3,77
	135	4,49
	165	3,65
F3	15	2,48
	45	4,23
	75	2,30
	105	1,53
	135	4,37
	165	4,39

(n=6)

Como é possível observar pelos resultados obtidos (Tabela 15), para este parâmetro de validação, os requisitos de qualidade são cumpridos, sendo possível concluir que o ensaio de dissolução se encontra validado para o presente estudo.

2.4.2 Ensaio de dissolução

O ensaio de dissolução foi realizado de acordo com o definido na Farmacopeia Portuguesa, utilizando o método da pá agitadora e segundo as condições definidas na seção material e métodos. A concentração dissolvida foi expressa em rotina através da curva de calibração apresentada anteriormente (Figura 21).

Como se pode verificar pelos perfis de dissolução (Figura 22) as formulações testadas não apresentam problemas na dissolução, estando totalmente dissolvidas ao fim de 15 minutos. Estes valores de dissolução estão de acordo com o definido para as formas

farmacêuticas de libertação convencional, mais especificamente formas farmacêuticas de libertação muito rápida (80% em 15 minutos) (Manadas, Pina e Veiga, 2002).

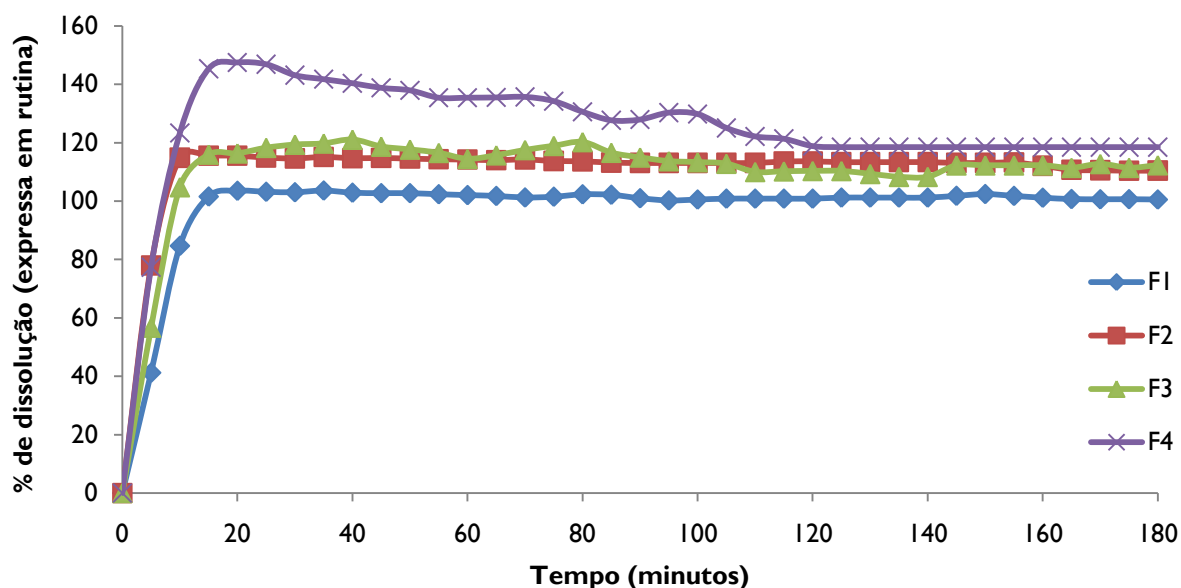


Figura 22 - Perfis de dissolução das diferentes formulações desenvolvidas.

Através dos perfis de dissolução também é possível observar que 3 das formulações apresentam valores de dissolução superiores a 100%. No caso das formulações F2 e F3 este facto pode estar relacionado com a interação com a lactose mono hidratada já detetada nos estudos de pré-formulação e com a instabilidade dos compostos fenólicos em suco gástrico, cujos produtos de degradação também absorvam no comprimento de onda do ensaio. Esta última razão pode também ser a justificação dos valores da percentagem de dissolução muito elevada observados no caso da formulação F4.

Também é possível verificar pelos perfis obtidos que existe uma ligeira diminuição da percentagem de extrato dissolvido com o decorrer do ensaio de dissolução. Esta diminuição pode ser devida a uma degradação dos compostos fenólicos, situação que será avaliada e discutida mais tarde quando se estudar a estabilidade química do extrato em suco gástrico por HPLC-PDA.

2.5 Uniformidade de massa

Os resultados obtidos, para as diferentes formulações, no que diz respeito à uniformidade de massa encontram-se na Tabela 16.

Na Farmacopeia Portuguesa IX (2008), é considerado que existe uniformidade de massa se não mais que duas unidades das 20 ensaiadas diferir de 7,5% da massa média e nenhuma diferir do dobro dessa percentagem.

Tabela 16 - Resultados da uniformidade de massa das formulações desenvolvidas.

Formulação	Massa média (mg)	Desvio padrão	CV (%)	Máximo (mg)	Mínimo (mg)
F1	483,30	0,005	0,94	477,71	487,55
F2	529,95	0,001	0,25	528,36	531,96
F3	483,20	0,003	0,67	477,30	486,50

(n=20)

Todas as 20 cápsulas analisadas de cada formulação apresentam massa dentro do intervalo definido, podendo concluir-se que as formulações satisfazem o ensaio.

2.6 Uniformidade de teor

O teor das formulações foi determinado através da quantificação dos fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu; a escolha deste procedimento justifica-se pelo facto de esta técnica já ter sido usada para a caracterização do extrato.

Para eliminar possíveis interferências foi realizada a reação com os excipientes na quantidade em que estão presentes na cápsula. Os valores de absorvência obtidos foram muito próximos de zero mas para garantir que não intervinham na determinação do teor, foram subtraídos à absorvência obtida para a formulação.

A Tabela 17 apresenta os valores obtidos expressos em mg de ácido gálgico por 330 mg de extrato, a partir dos quais é possível verificar que estes respeitam os limites fixados na Farmacopeia Portuguesa (o teor de uma só unidade se afastar dos limites de 85-115% do teor médio mas não se afastar do limites de 75-125% do mesmo valor) e portanto as formulações satisfazem o requisito exigido.

Tabela 17 - Resultados da uniformidade de teor das formulações desenvolvidas.

Formulação	Teor teórico (mg de ácido gálgico)*	Teor experimental (mg de ácido gálgico)**	Máximo (mg de ácido gálgico)	Mínimo (mg de ácido gálgico)
F1	23,17 ± 0,02	24,78 ± 0,24	24,93	24,44
F2	23,17 ± 0,02	25,65 ± 0,24	25,88	25,31
F3	23,17 ± 0,02	24,33 ± 0,20	24,55	24,09

* média ± desvio padrão; ** média ± desvio padrão (n=10)

2.7 Seleção da forma farmacêutica

Com base nos ensaios de pré-formulação e de controlo de qualidade desenvolvidos, foi selecionada a formulação avaliada quanto à estabilidade em suco gástrico e atividade

antioxidante. Como as formulações apresentam uniformidade de massa e de teor, a decisão foi baseada nos resultados obtidos nos ensaios de dissolução; assim, a formulação escolhida é a F1 porque apresenta um perfil de dissolução mais estável com valores próximos de 100% e adicionalmente o excipiente presente não apresentou sinais de incompatibilidade com o extrato nos estudos de pré-formulação.

3. Caracterização da formulação após ação do suco gástrico

3.1 Avaliação da estabilidade química dos compostos fenólicos em suco gástrico por HPLC-PDA

A avaliação da estabilidade química da formulação F1 e do extrato (formulação F5) foi feita por HPLC-PDA após 2 e 3 horas de contacto com o suco gástrico. Os cromatogramas obtidos encontram-se representados nas Figuras 23 e 27.

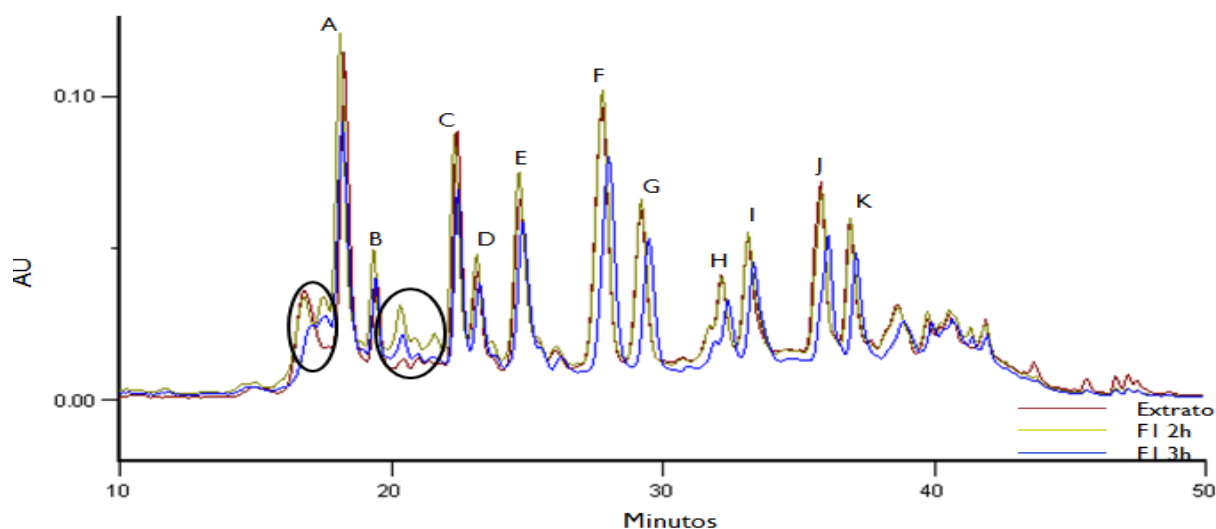


Figura 23 - Sobreposição dos perfis obtidos por HPLC-PDA para o extrato (vermelho), formulação F1 após 2h (amarelo) e 3h (azul) de contacto com o suco gástrico.

Através da sobreposição dos cromatogramas obtidos por HPLC da formulação F1 após 2 e 3h de contacto com o suco gástrico e do extrato (Figura 23) é possível observar uma diminuição dos picos dos compostos fenólicos, principalmente nas 3 horas de ensaio, no qual também se verifica uma ligeira diminuição da linha de base. Apenas nas zonas assinaladas no gráfico se observa, em ambas as horas estudadas, um comportamento diferente, isto é, entre os 17 e 18 minutos e logo após os 20 minutos verifica-se um aumento dos compostos ou o aparecimento de novos picos.

Tabela 18 - Correspondência entre os picos e os compostos identificados anteriormente por HPLC-PDA.

Pico	Composto	Identificação
A	2	Ácido neoclorogénico
B	3	Derivado do ácido cafeico
C	4	Derivado do ácido <i>p</i> -cumárico
D	5	Luteolina 6- <i>C</i> - β -glucopiranosil- 8- <i>C</i> - α - arabinopiranosido
E	6	Apigenina 6- <i>C</i> - α -arabinopiranosil-8- <i>C</i> - β -glucopiranosido
F	8	Luteolina 6- <i>C</i> - β -glucopiranosido (isoorientina) Isoorientina 2''- <i>O</i> - β -ramnósido
G	9	Luteolina 6- <i>C</i> -pentosil-8- <i>C</i> -pentosilo
H	10	Luteolina 7- <i>O</i> - β - glucopiranosido
I	11	Luteolina 7- <i>O</i> -neohesperidósido Luteolina 6- <i>C</i> -pentosil-8- <i>C</i> -desoxihexosilo
J	12	Luteolina 6- <i>C</i> -pentosilo Luteolina 2''- <i>O</i> - α -L-ramnosil-6- <i>C</i> - α -arabinofuranósido
K	13	Luteolina 2''- <i>O</i> -ramnosil-(6-desoxi-ribo-hexos-3-ulosilo)

Ao final de 2 horas de ensaio os picos maioritários (identificados na Figura 23 de A a K e cuja correspondência com a identificação dos compostos fenólicos feita na secção 1.3 deste capítulo se encontra na Tabela 18) na formulação FI não sofrem grandes variações da área quando esta é comparada com a área dos picos correspondentes no extrato em metanol, como se conclui pela Figura 24. Apenas no pico J se observa uma diminuição mais clara da área enquanto nos picos D, H e I se verifica um aumento mais evidente.

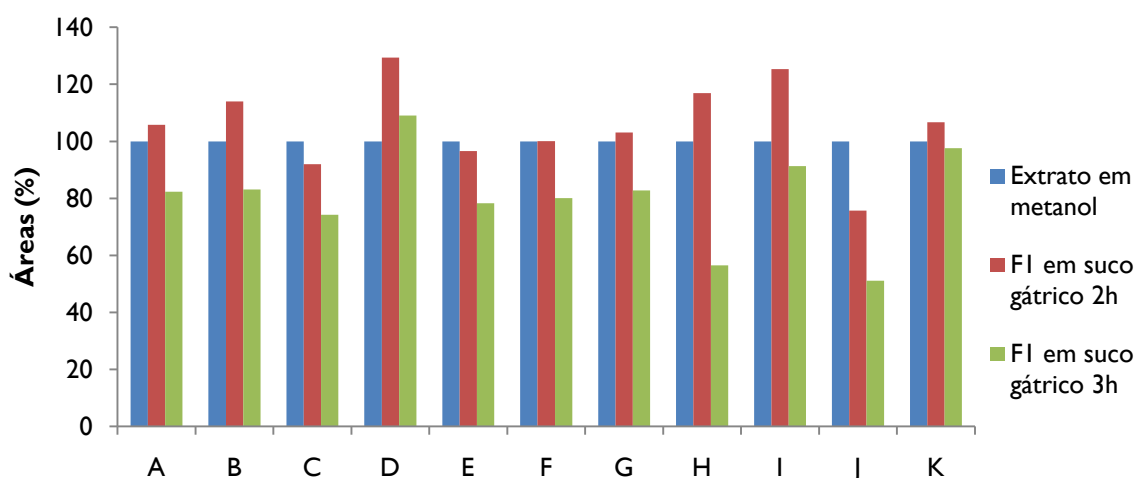


Figura 24 - Representação da variação das áreas (a 320 nm), em percentagem, dos picos obtidos em HPLC-PDA para a formulação FI, em relação ao extrato em metanol.

Após 3 horas de contacto com suco gástrico a diminuição das áreas é notória na maioria dos picos, havendo alguns casos com redução de cerca de 50% (Figura 24). Esta diminuição da área está provavelmente relacionada com a diminuição da quantidade de compostos presentes, o que sugere a sua degradação em suco gástrico.

No caso dos ácidos fenólicos, a diminuição observada em meio gástrico já foi relatada por Mosele e seus colaboradores (2015), que verificaram uma diminuição da concentração dos ácidos fenólicos em produtos da romã após digestão gástrica *in vitro*.

A diminuição observada tanto nas 2 como nas 3 horas é mais pronunciada nos O-glicósidos o que pode ser justificado pelo facto destes serem suscetíveis de hidrólise ácida; no entanto, a diminuição observada nos C-glicósidos não deve ser devida ao rearranjo de Wessely-Moser (que consiste na abertura do heterociclo de γ -pirona, seguido da desidratação da β -dicetona formada e por fim a reciclagem da cetona nos hidroxilos fenólicos que ocorre na posição *orto* relativamente ao carbonilo) (Figueirinha 2011), uma vez que não surgiram novos picos no cromatograma. O mais provável é que os C-glicósidos tenham permanecido quase intactos ao longo do tempo de contacto com o meio gástrico e que a diminuição observada na área do pico seja devida à degradação dos O-glicósidos, já que existem picos que contêm os dois tipos de compostos. A degradação observada nos compostos fenólicos vai de encontro aos estudos realizados por Ahmad-Qasem *et al.* (2014), em folhas de oliveira (contêm derivados de luteolina e apigenina) que mostraram que evidenciaram a diminuição de fenóis na fase gástrica da digestão devido ao pH e atividade enzimática, mostrando contudo que a luteolina 7-O-glucósido era o componente mais estável ao longo da digestão.

Nos cromatogramas representados na Figura 23, estão assinaladas zonas onde se verifica um aumento dos picos após contacto com suco gástrico. Estas alterações foram analisadas através dos espectros UV obtidos por HPLC-PDA, que se encontram nas Figuras 25 e 26.

Ao fim de 2 horas de contacto é observado o aparecimento de um pico, com tempo de retenção de 17,49 minutos, em relação ao extrato; o espectro UV (Figura 25 (a)) observado para este pico é típico de taninos do tipo condensado. A mesma alteração é observada após as 3 horas de contacto, aos 17,58 minutos de eluição, sendo o espectro UV também representativo de um tanino (Figura 25 (b)).

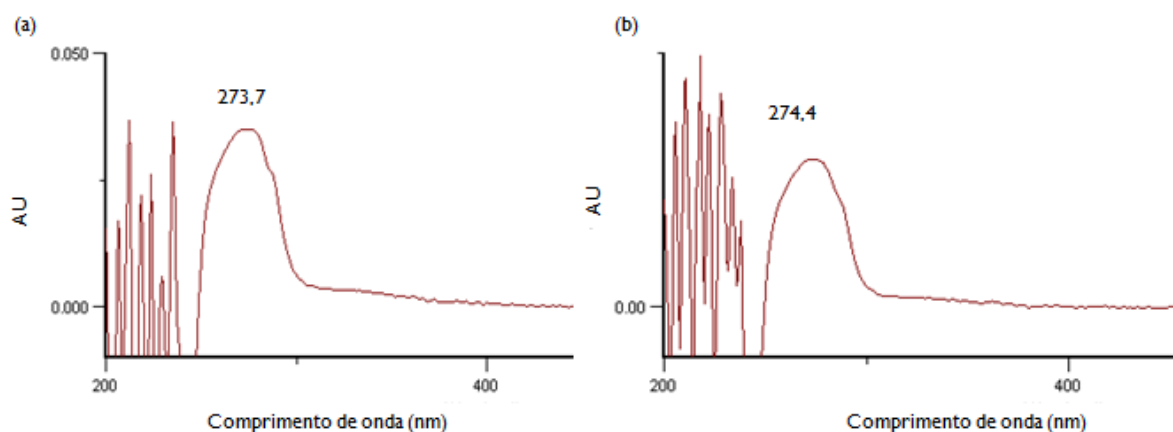


Figura 25 - Espectros UV, obtidos por HPLC-PDA observados nos tempos de retenção 17,49 minutos e 17,58 minutos, respetivamente para a formulação FI após 2 horas (a) e 3 horas (b) de contacto com suco gástrico.

Outras das zonas assinaladas nos perfis cromatográficos da Figura 23 e onde se observa um aumento dos compostos após contacto com suco gástrico é a região entre os 20 e os 22 minutos de eluição. Os espectros UV obtidos para as 2 horas (Figura 26 (a)) e para as 3h (Figura 26 (b)) de ensaio mostram ser também típicos de taninos. Contudo esta informação só poderá ser confirmada recorrendo a outras técnicas.

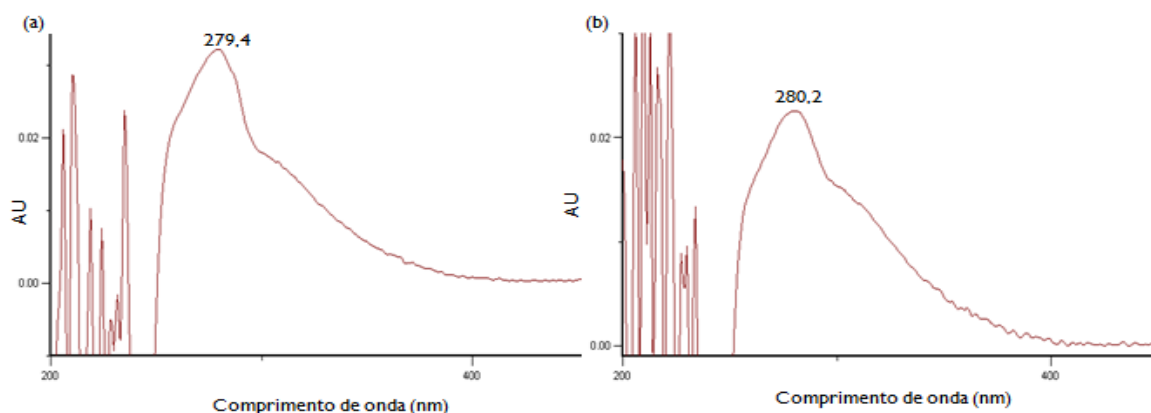


Figura 26 - Espectros UV, obtidos por HPLC-PDA dos picos observados para a formulação FI após 2 e 3 horas de contacto com o suco gástrico. (a) espectro UV após 2 horas (tempo de retenção de 20,33 minutos) e (b) espectro UV após 3 horas (tempo de retenção de 20,42 minutos).

O aumento destes picos bem como a diminuição da linha de base (cujas elevações estão relacionadas com os taninos) parecem indicar a hidrólise dos taninos já existentes no extrato, já que *Cymbopogon citratus* apresenta na sua constituição proantocianidinas de elevado peso molecular que podem sofrer fragmentação total ou parcial originando oligómeros ou monómeros (Figueirinha et al., 2010). Em particular, estão presentes procianidinas do tipo B, catequina e derivados de luteoliflavano e apigeninano (Costa et al. 2015); as procianidinas podem hidrolisar-se em monómeros e dímeros de epicatequina

(Spencer et al., 2000). Os taninos presentes, tendo em conta os máximos observados nos espectros UV, parecem tratar-se de cianidina, luteolinidina e apigenidina, ainda assim não são observados máximos a comprimentos de onda superiores que também são característicos destes compostos, o que poderá estar relacionado com o pH (Halbwirth, 2010; Quin et al., 2010; Sharma et al., 2012).

Os cromatogramas da formulação F5 sujeita à ação do suco gástrico durante 2 e 3 horas encontram-se sobrepostos com o perfil cromatográfico do extrato em na Figura 27.

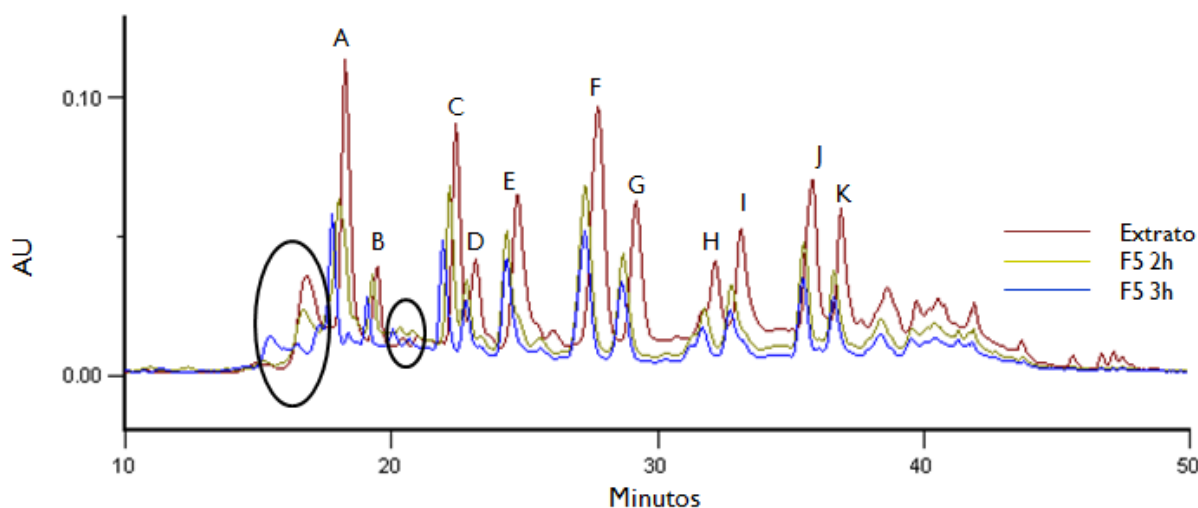


Figura 27 - Sobreposição dos perfis obtidos por HPLC-PDA para o extrato (vermelho), formulação F5 após 2h (amarelo) e 3h (azul) de contacto com o suco gástrico.

No caso da formulação F5 é possível observar uma acentuada diminuição de todos os picos maioritários após 2 horas de contacto com o suco gástrico e que se mantém nas 3 horas, com exceção dos compostos D e E (como é possível verificar na Figura 28). Como analisado e justificado anteriormente os compostos fenólicos aparentam ser instáveis em contacto com o suco gástrico. No caso da formulação F5 verifica-se uma diminuição dos compostos fenólicos mais acentuada do que a que ocorre na presença de excipientes, o que pode indicar que o amido de milho atua como um protetor dos compostos presentes no extrato impedindo a sua degradação. Diversos estudos têm relatado a capacidade de o amido formar complexos com ligandos, como por exemplo o iodo, álcoois lineares, lípidos ou o ibuprofeno, através de uma mudança conformacional na dupla hélice da amilose, o que permite a criação de uma cavidade hidrofóbica onde estes ligandos se podem alojar; no caso do ibuprofeno foi verificado que o complexo formado com o amido é estável em suco gástrico, havendo depois a sua degradação no intestino delgado por ação da amilase (Putseys, Lamberts e Delcour, 2010; Yang et al., 2013). Esta capacidade de o amido ser capaz de formar complexos que são estáveis em condições gástricas pode ser uma possível

justificação para a menor degradação dos compostos fenólicos na presença deste excipiente, podendo não ocorrer da mesma forma em todos os compostos presentes no extrato.

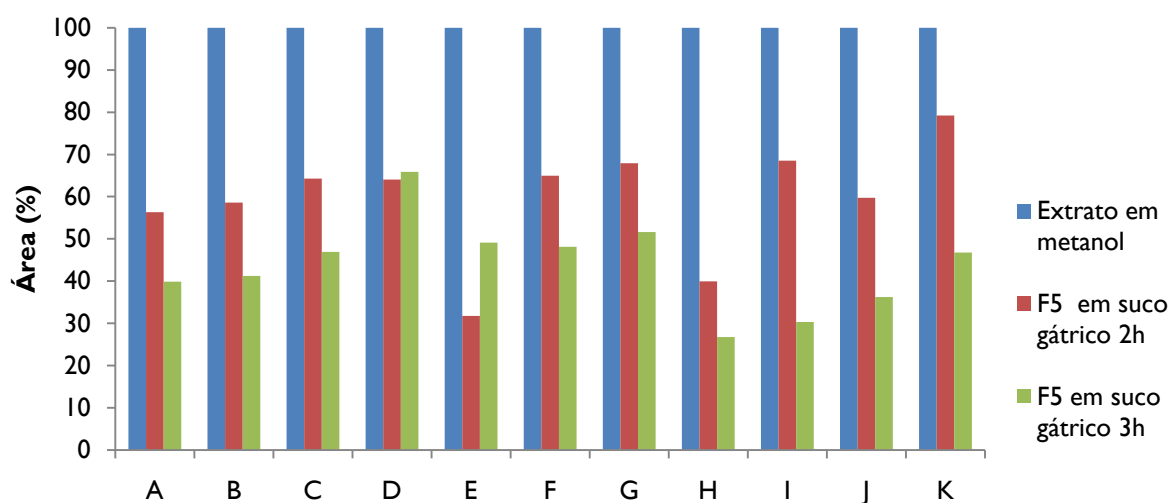


Figura 28 - Representação da variação das áreas (a 320 nm), em percentagem, dos picos obtidos em HPLC-PDA para a formulação F5, em relação ao extrato em metanol.

Após as 3 horas de contacto com o suco gástrico foi observado o aparecimento de dois novos picos, o primeiro ao tempo de retenção 15,41 minutos e o outro aos 17,31 minutos, e a diminuição do pico com tempo de retenção 16,78 minutos. Os espectros UV observados para os dois picos que surgem (Figura 29) também são indicativos de taninos, todavia para identificação completa teria de se recorrer a outros métodos analíticos, nomeadamente espectroscopia de massa.

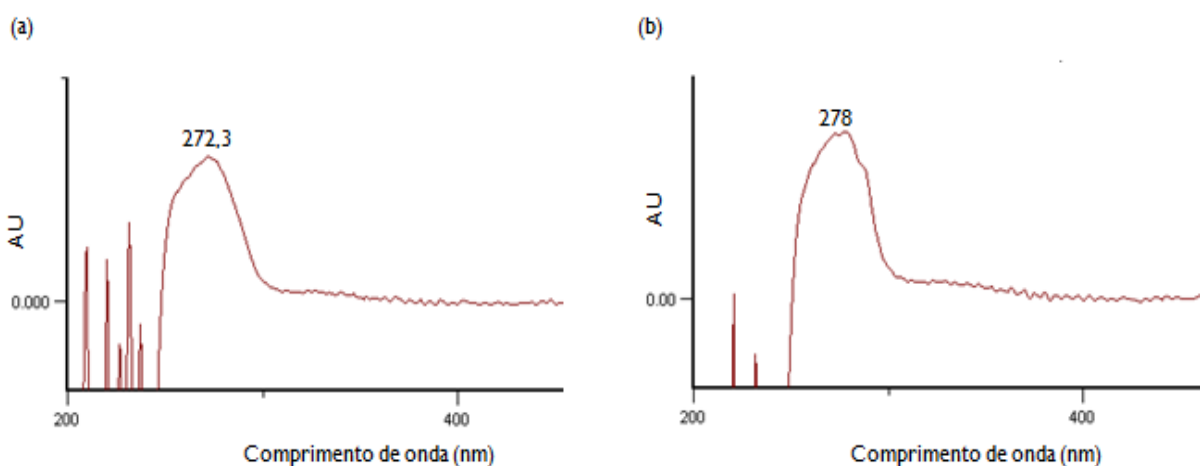


Figura 29 - Espectros UV, obtidos por HPLC-PDA, dos picos observados para F5 em suco gástrico após 3 horas de dissolução com tempo de retenção: (a) 15,41 minutos e (b) 17,31 minutos.

Entre os 20 e 22 minutos de eluição é observado, nos perfis cromatográficos correspondentes às 2 e 3 horas de contacto com o suco gástrico, o aumento dos picos cujos espectros UV são característicos de taninos, como se pode verificar na Figura 30.

Na formulação F5 foi observado também o aumento dos picos no HPLC que parecem representar taninos e a diminuição da linha de base; estes factos podem estar relacionados com a hidrólise dos compostos pelo suco gástrico como já foi discutido anteriormente.

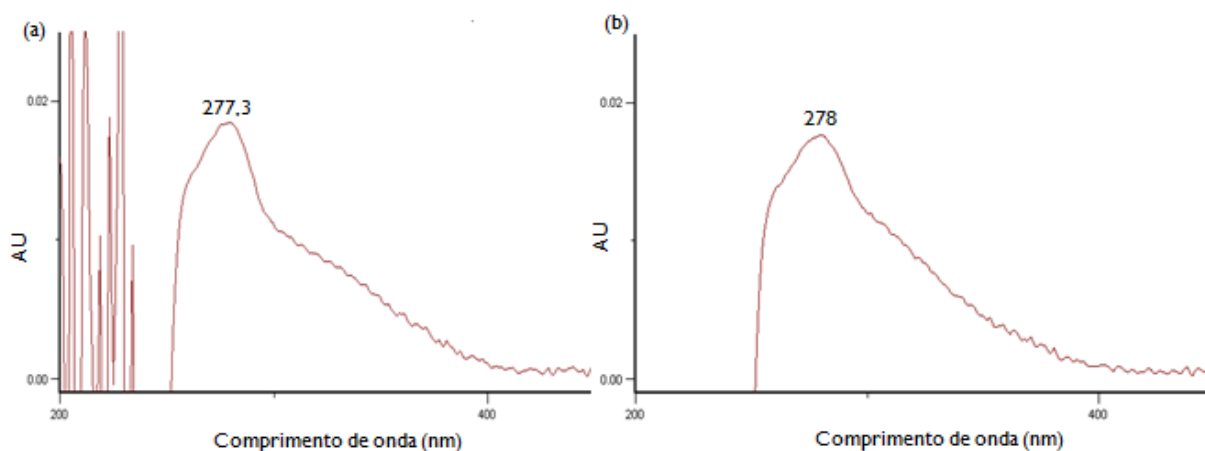


Figura 30 - Espectros UV, obtidos por HPLC-PDA, para a formulação F5: (a) após 2 horas (tempo de retenção de 20,34 minutos) e (b) após 3 horas (tempo de retenção de 20,06 minutos) de contacto com o suco gástrico.

3.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo ensaio de DPPH, após ação do suco gástrico

Com o objetivo de avaliar se a formulação do extrato permite que este mantenha a sua atividade antioxidante foi realizado o ensaio de DPPH com alíquotas do meio de dissolução, recolhidas de 20 em 20 minutos durante 3 horas.

Os resultados obtidos ao longo das 3 horas do ensaio para a formulação F1 (Tabela 19) apontam para a diminuição, não muito acentuada nem significativa, da capacidade de redução do DPPH com o decorrer do tempo. A percentagem de redução mostra-se muito semelhante até cerca dos 80 minutos, ocorrendo depois ligeiras diminuições até aos 180 minutos.

No caso da análise do meio de dissolução da cápsula contendo apenas extrato (formulação F5) quanto à sua atividade antioxidante são verificadas algumas oscilações na percentagem de redução ao longo do tempo (Tabela 20); contudo, olhando para os valores de desvio padrão associado é possível observar que a capacidade de redução se mantém mais ou menos constante durante o intervalo estudado, já que os desvios associado são significativos.

Tabela 19 - Percentagem de redução, determinada pelo ensaio de DPPH, para a formulação F1.

Tempo (min)	Absorvência do controle a 517 nm	Absorvência do ensaio a 517 nm	% Redução
0	1,03 ± 0,032	1,04 ± 0,16	-0,77 ± 1,502
20		0,62 ± 0,011	40,05 ± 1,083
40		0,63 ± 0,009	39,12 ± 0,911
60	1,08 ± 0,013	0,65 ± 0,005	39,38 ± 0,479
80		0,65 ± 0,003	39,73 ± 0,256
100		0,67 ± 0,007	37,92 ± 0,624
120	1,08 ± 0,008	0,68 ± 0,007	36,67 ± 0,635
140		0,71 ± 0,016	34,12 ± 1,471
160		0,74 ± 0,017	31,70 ± 1,601
180	1,07 ± 0,009	0,74 ± 0,021	33,26 ± 2,002

Tabela 20 - Percentagem de redução, determinada pelo ensaio de DPPH, para a formulação F5.

Tempo (min)	Absorvência do controle a 517 nm	Absorvência do ensaio a 517 nm	% Redução
0	1,01 ± 0,014	0,99 ± 0,024	1,79 ± 2,356
20		0,60 ± 0,018	40,57 ± 1,75
40		0,56 ± 0,015	44,54 ± 1,47
60	0,97 ± 0,082	0,58 ± 0,027	39,82 ± 2,846
80		0,58 ± 0,003	39,70 ± 0,295
100		0,55 ± 0,046	42,75 ± 4,749
120	0,94 ± 0,073	0,59 ± 0,024	37,58 ± 2,518
140		0,59 ± 0,027	36,978 ± 2,880
160		0,57 ± 0,039	39,52 ± 4,099
180	0,97 ± 0,561	0,57 ± 0,023	40,73 ± 2,397

Comparando estes resultados com a percentagem de redução que seria esperada, para esta concentração, pelo valor do EC50% (31,87%), a atividade está aumentada após ação do suco gástrico, no entanto, não é um aumento significativo.

4. Referências bibliográficas

AHMAD-QASEM, M. H., et al. - "Influence of Olive Leaf Processing on the Bioaccessibility of Bioactive Polyphenols". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (2014) 6190–6198.

BRAJDES, C et al. - "Phenolics composition and their biochemical stability confirmation by *IN VITRO* gastrointestinal conditions simulation, for a new functional fermented beverage based on sprouted buckwheat". *Romanian Biotechnological Letters*, 18:6 (2013) 8832-8842.

CHEEL, J. et al. - "Free Radical Scavengers and Antioxidants from lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.)". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (2005) 2511-2517.

COSTA, G. et al. - "Flavan hetero-dimers in the *Cymbopogon citratus* infusion tannin fraction and their contribution to the antioxidant activity". *Food & Function*, 6 (2015) 932-937.

COSTA, G. et al. - "Influence of harvest date and material quality on polyphenolic content and antioxidant activity of *Cymbopogon citratus* infusion". *Industrial Crops and Products*, 83 (2016a) 738–745.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. - "Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos". *Visão Acadêmica*, 5:1 (2004) 33-40.

Farmacopeia Portuguesa IX, 2008. Edição Oficial, Ministério da Saúde, Infarmed, Lisboa, Volume I.

FIGUEIRINHA, A. M. B. R - "Composição química e atividade anti-inflamatória do infuso de *Cymbopogon citratus*". Coimbra: Faculdade de Farmácia de Universidade de Coimbra, 2011. Tese de Doutoramento.

FIGUEIRINHA, A. et al. "Anti-Inflammatory Activity of *Cymbopogon citratus* Leaf Infusion in Lipopolysaccharide-Stimulated Dendritic Cells: Contribution of the Polyphenols". *Journal of Medicinal Food*, 13:3 (2010) 1–10.

HALBWIRTH, H. - "The Creation and Physiological Relevance of Divergent Hydroxylation Patterns in the Flavonoid Pathway". *International Journal of Molecular Sciences*, 11 (2010) 595-621.

International Conference on Harmonisation (ICH) - "Validation of Analytical Procedures: text and methodology Q2 (R1)", 2005.

JAVADZADEH, Y. *et al.* - "Evaluating retardation and physicochemical properties of co-ground mixture of Na-diclofenac with magnesium stearate". *Powder Technology*, 218 (2012) 51–56.

LAMBERT, J. B. *et al.* - "Introduction to organic spectroscopy", Macmillan, 1987.

LEE, L.Y. *et al.* - "Utilisation of *Cymbopogon citratus* (lemon grass) as biosorbent for the sequestration of nickel ions from aqueous solution: Equilibrium, kinetic, thermodynamics and mechanism studies". *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 45 (2014) 1764–1772.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. - "A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada". *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 38:4 (2002) 375-399.

MOSELE, J. I. *et al.* - "Application of *in vitro* gastrointestinal digestion and colonic fermentation models to pomegranate products (juice, pulp and peel extract) to study the stability and catabolism of phenolic compounds". *Journal of functional foods*, 14 (2015) 529–540.

MURA, P. *et al.* - "Utilization of differential screening scanning calorimetry as a screening technique to determine the compatibility of ketoprofen with excipients". *International Journal of Pharmaceutics*, 119 (1995) 71-79.

NASH, R. A.; WACHTER, A. H. - "Pharmaceutical Process Validation: An International Third Edition, Revised and Expanded". *Drug and the Pharmaceutical Sciences*, Volume 129. Marcel Dekker, Inc., 2003.

PIMPÃO, R. C. S. - "Compostos fenólicos e sua atividade antioxidante em espécies de *Juniperus*: análise da produção sazonal e sob condições de stresse". Lisboa: Faculdade de Ciências, Departamento de Biologia Vegetal, Universidade de Lisboa, 2009. Tese de Mestrado. [Acedido a 14 de outubro de 2015]. Disponível na internet: <http://repositorio.ul.pt/handle/10451/1793>

PUTSEYS, J. A.; LAMBERTS, L.; DELCOUR, J. A. - "Amylose-inclusion complexes: Formation, identity and physico-chemical properties". *Journal of Cereal Science*, 51 (2010) 238-247.

QIN, C. *et al.* - "Analysis and Characterization of Anthocyanins in Mulberry Fruit". *Czech Journal of Food Sciences*, 28:2 (2010) 117–126.

- SALOME, A. C. *et al.* - "Formulation and evaluation of *Cymbopogon citratus* dried leaf-powder tablets". *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6:48 (2012) 3274-3279.
- SHARMA, M. *et al.* - "Expression of flavonoid 3'-hydroxylase is controlled by PI, the regulator of 3-deoxyflavonoid biosynthesis in maize". *BMC Plant Biology*, 12:196 (2012).
- SPENCER, J. P. E., *et al.* - "Decomposition of Cocoa Procyanidins in the Gastric Milieu". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 272 (2000) 236–241.
- TAVARES, F. *et al.* - "*Cymbopogon citratus* industrial waste as a potential source of bioactive compounds". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2014.
- TIWARI, M.; DWIVEDI, U. N.; KAKKAR, P. - "Suppression of oxidative stress and pro-inflammatory mediators by *Cymbopogon citratus* D. Stapf extract in lipopolysaccharide stimulated murine alveolar macrophages". *Food and Chemical Toxicology*, 48 (2010) 2913-2919.
- VERMA, R.K.; GARG, S. - "Selection of excipients for extended release formulations of glipizide through drug excipient compatibility testing". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 38 (2005) 633–644.
- YANG *et al.* - "Preparation, characterization, and properties of amylose-ibuprofen inclusion complexes". *Starch/Stärke*, 65 (2013) 593–602.

Capítulo V - Conclusões

Muitos são os estudos que têm demonstrado que, tanto os óleos essenciais, como extratos, infusões e até frações dos compostos presentes em *Cymbopogon citratus* apresentam uma pluralidade de aplicações terapêuticas, entre elas a atividade antioxidante. Mais uma vez foi possível verificar que o extrato livre de óleos essenciais contém uma grande quantidade de compostos fenólicos, em particular os ácidos fenólicos, flavonas e taninos condensados; este apresenta capacidade de reduzir o radical de DPPH, o que indica a sua capacidade para atuar como agente antioxidante.

Como, nos últimos anos, tem vindo a crescer o interesse pelo uso de plantas medicinais surge a necessidade de fazer chegar à população produtos que garantam a eficácia terapêutica e assegurem a protecção da saúde pública; assim, o desenvolvimento de formulações que cumpram os requisitos de qualidade, segurança e eficácia são uma das maneiras de atingir estes objetivos.

As cápsulas gelatinosas desenvolvidas neste trabalho contendo extrato numa dose semelhante à usada na medicina tradicional, e excipientes (selecionados através dos ensaios de pré-formulação) apresentam uma libertação de todo o seu conteúdo ao fim de 15 a 20 minutos em suco gástrico e obedecem aos parâmetros de controlo de qualidade especificados na Farmacopeia Portuguesa IX para este tipo de formulação. Os perfis obtidos no ensaio de dissolução mostraram percentagens de dissolução acima dos 100%, o que provavelmente estará relacionado com a existência de interação com os excipientes e com a instabilidade que os compostos fenólicos apresentaram em meio gástrico.

As formulações selecionadas para a avaliação da estabilidade química após ação do suco gástrico demonstraram que os compostos presentes no extrato sofrem degradação quando estão em contacto com o suco gástrico embora, na presença do amido de milho a degradação dos compostos maioritários mostra-se diminuída o que nos indica que este excipiente poderá proteger o extrato. Quanto à atividade antioxidante foi possível verificar que esta não sofre alterações significativas com o desenvolvimento da formulação e no contacto com o suco gástrico.

Deste modo, pode-se afirmar que foi possível desenvolver cápsulas duras para administração oral contendo o extrato de *Cymbopogon citratus*, que apresentam atividade antioxidante e ainda parecem ser uma mais-valia para o comportamento dos compostos fenólicos em condições gástricas, cumprindo assim os objetivos iniciais.

Capítulo VI - Perspectivas futuras

Com o desenvolvimento e avaliação das formulações foi possível observar a existência de interação entre o extrato e alguns dos excipientes utilizados bem como a degradação dos compostos fenólicos em condições gástricas, sendo esta atenuada na presença de amido de milho. Estes resultados sugerem alguns pontos de trabalho que poderão dar continuidade a este trabalho no futuro, como é o caso dos a seguir mencionados:

1. Estudar com maior profundidade as interações que ocorrem entre o extrato e a lactose mono hidratada e o estearato de magnésio, e como podem afetar a segurança do extrato;

2. Explorar/confirmar qual o mecanismo que faz com que o amido de milho atue como protetor do extrato e que vantagens poderá trazer para a aplicação do extrato noutras ações terapêuticas;

3. Identificar quais os compostos que se formam com a degradação dos flavonóides e das proantocianidinas, recorrendo a outras técnicas como a espectroscopia de massa e através da comparação com padrões comerciais;

4. Avaliar a utilização da formulação otimizada em outras ações terapêuticas para as quais o extrato esteja indicado.