



UNIVERSIDADE D
COIMBRA



Pedro Henrique Oliveira Borges

*INIBIÇÃO DA ALFA-GLUCOSIDASE
POR FLAVONÓIDES DO CYMBOPOGON
CITRATUS*

ESTUDOS IN SILICO E IN VITRO

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Medicinal
orientada pelo Professor Doutor Artur Manuel Bordalo Machado
Figueirinha e pela Professora Doutora Maria Manuel Cruz Silva e
apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2018

Faculdade de Ciências e Tecnologia

INIBIÇÃO DA ALFA-GLUCOSIDASE
POR FLAVONÓIDES DO
CYMBOPOGON CITRATUS
Estudos *in silico* e *in vitro*

Pedro Henrique Oliveira Borges

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Medicinal orientada pelo Professor Doutor Artur Manuel Bordalo Machado Figueirinha e pela Professora Doutora Maria Manuel Cruz Silva e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2018

Resumo

As plantas são importantes fontes de compostos naturais com atividades terapêuticas. Desde a antiguidade, as comunidades têm feito uso desses metabolitos secundários como meios de tratamento de doenças e como curativos de ferimentos. Após a modernização da indústria farmacêutica, os compostos de origem natural têm perdido seu lugar para os fármacos sintéticos, com a justificativa de que estes seriam mais seletivos e eficazes. Devido ao frequente insucesso destes compostos sintéticos atingirem o mercado como produto final, a comunidade científica tem voltado a sua atenção para a investigação de fármacos a partir de fontes de origem natural.

Compostos de origem natural, como flavonóides, são mais seguros quando comparados aos compostos sintéticos, porém colocam um grande desafio quanto à sua extração e transposição para um produto final. Extratos de plantas podem conter dezenas de compostos bioativos, com diferentes propriedades físico-químicas, o que torna sua identificação e isolamento tarefas difíceis que podem custar tempo e dinheiro durante o processo de pesquisa de um novo possível fármaco.

Atualmente existem ferramentas computacionais disponíveis gratuitamente, como bancos de dados de compostos e ferramentas de previsão de atividades e de características de ADME que podem auxiliar neste processo, prevendo quais compostos ativos em determinados alvos moleculares e quais as suas características físico-químicas previstas. Somando-se isso às ferramentas de *docking* molecular, é possível prever quais os compostos bioativos presentes num extrato possuem maior atividade, de modo a isolá-los de maneira guiada, poupando esforços e acelerando o processo de pesquisa.

O *Cymbopogon citratus* é uma planta largamente utilizada no mundo e conhecida principalmente pelo seu óleo essencial. O seu extrato possui uma variedade de compostos bioativos, com atividades antioxidante, anti-inflamatória e antidiabética. Entre estes, os flavonóides C- e O-glicosilados são os menos estudados e possuem atividades terapêuticas ainda não exploradas.

Este trabalho visa utilizar as ferramentas de previsão de atividades e *docking* molecular para identificar compostos bioativos no *C. citratus* capazes de inibir a α -glucosidase, importante alvo molecular para o tratamento da diabetes.

Abstract

Plants are the most important sources of natural compounds with biological activities. Until the modern age, humans have been using these secondary metabolites as means of treating diseases and as curatives for wounds. After the modernization of the pharmaceutical industry, natural compounds have been losing its place to synthetical drugs, the reason being that synthetical drugs are more selective and efficient. Due to the frequent failure of these synthetical compounds reaching the market as a final product, the scientific community have been turning its attention back to the research of drugs based on natural compounds.

Natural compounds, like flavonoids, are safer when compared to synthetical compounds, but they still pose a huge challenge because of its extraction and translation to a final product. Plants extracts can contain several bioactive compounds, with different physical-chemical properties, which makes its identification and isolation a hard task that could take time and resources during the research process of a new drug.

Nowadays, several computational tools are freely available online, like compound databases, biological activities and ADME properties prediction tools that could aid in this process, predicting which compounds are actives in which molecular targets and what are their predicted physical-chemical properties. Alongside these tools, molecular docking allows to predict which bioactive compounds present in a plant extract is more active, so it's possible to isolate it in a guided manner, saving resources and speeding up the research process.

Cymbopogon citratus is a widely used plant around the world and known mainly because of its essential oil. Its extract has several bioactive compounds, with antioxidant, anti-inflammatory and antidiabetic activities. Along those, C- and O-glicosilated flavonoids are less investigated and possesses unknown and unexplored therapeutical activities.

This work aims to use activity predicting tools and molecular docking to identify bioactive compounds in *C. citratus* able to inhibit α -glucosidase, an important molecular target for the treatment of diabetes.

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, à oportunidade que me foi dada de realizar o sonho de estudar fora. Nada disso seria possível sem o apoio daqueles que me amam e que me suportam. Meus pais, irmão, amigos, amigas e todos aqueles que passaram por mim e dividiram suas vidas comigo. Foram dois anos de uma experiência que jamais esquecerei e carregarei no coração.

Ao Professor Doutor Artur Figueirinha, por ter me recebido no Laboratório de Farmacognosia, por ter me orientado e me ensinado e por aceitar o desafio de tentarmos algo novo e transformá-lo em uma dissertação. Agradeço também pelo tempo disponibilizado e por sempre me fazer buscar por mais, além das preocupações nos meus momentos mais baixos.

À Professora Doutora Maria Manuel, por também aceitar este desafio e por me proporcionar as condições necessárias para que eu pudesse seguir com meus estudos. Agradeço também pelas apresentações que me eram solicitadas, pois era sempre uma forma de estar a par dos meus estudos.

À Professora Doutora Olga Borges por disponibilizar o equipamento necessário para que eu pudesse realizar meus ensaios enzimáticos.

À Professora Doutora Teresa Batista por sempre se preocupar com meu percurso acadêmico e sempre me desafiar a buscar fazer o melhor.

À Doutora Salete Baptista por toda a orientação em *docking* e pelas explicações.

Às minhas queridas colegas de laboratório e colegas de mestrado, que me receberam em Portugal com muita alegria e sorriso no rosto, nunca me deixando na mão.

Aos meus colegas de trabalho e residência, que me proporcionaram bons momentos e alegrias nos momentos de estresse e descanso.

À minha parceira de vida, Júlia de Almeida, que me deu todo o suporte emocional para sobreviver a este período e que em nenhum momento me abandonou neste processo. Que sempre me deu forças para continuar e sempre procurou trazer o melhor de mim.

E, finalmente, à Coimbra por ser recetiva e pelo espírito académico aqui presente que me fará, para sempre, ansiar por um retorno.

Dedico esta dissertação a todos aqueles que sonham alto, que não desistem de seus sonhos e que lutam por um mundo melhor.

Índice de Figuras

Figura 1. <i>Cymbopogon citratus</i> (D.C.) Stapf (Gomes e Negrelle, 2007).	6
Figura 2. Esquema da estrutura das diferentes classes de flavonóides.	10
Figura 3. Estrutura dos flavonóides presentes na constituição da <i>Cymbopogon citratus</i>	12
Figura 4. Projeção (escala multidimensional, MDS) de NPs aleatórios (n = 1000, azul) e compostos disponíveis (n = 1000, vermelho) nos bancos de dados TCM@Taiwan e ZINC15 (Rodrigues, 2017)	19
Figura 5. Cromatogramas obtidos para o extrato de <i>Cymbopogon citratus</i> (esquerda) e da fração de flavonóides (direita).....	29
Figura 6. Página de submissão do SwissADME.	31
Figura 7. Gráfico BOILED-egg (WLOGP -versus- TPSA) para a luteolina.	32
Figura 8. Radar de biodisponibilidade para a luteolina.	33
Figura 9. Página de submissão do PASS Online.....	34
Figura 10. Arquivo gerado pelo PASS Online para a luteolina.	35
Figura 11. Esquema de reação do cromóforo <i>Fast Blue Salt B</i> com o produto da reação enzimática.....	39
Figura 12. Gráfico BOILED-egg para os flavonóides da <i>Cymbopogon citratus</i>	45
Figura 13. (A) Sobreposição das estruturas da acarbose co-cristalizada, em azul, e da obtida em docking. (B) Sobreposição da unidade acarvosina das duas estruturas.....	51
Figura 14. Interações entre o ligando de referência (amarelo) e os resíduos da α -glucosidase lisossomal.....	52
Figura 15. Interações entre a isomaltose e os resíduos da proteína obtida por modelo de homologia.....	52
Figura 16. Alteração do resíduo Glu411 para Asp408 impede a interação entre o ligando e o resíduo do modelo obtido por homologia.....	53
Figura 17. Interações entre o ligando 2"-O-ramnosil isoorientina e os resíduos da α -glucosidase lisossomal.....	54
Figura 18. Interações entre os ligandos cassiaocidentalina B (esquerda) e kurilesina A (direita) e a enzima.	54
Figura 19. Posições previstas para os ligando C-O-diglicosilados, 2"-O-ramnosil isoorientina (azul), cassiaocidentalina B (amarelo) e kurilesina A (vermelho).	55
Figura 20. Orientações previstas para o carlinósido (azul) e o isoshaftósido (vermelho).	56

Figura 21. Orientações previstas para isoorientina (verde), orientina (roxo) e swertiajaponina (amarelo).....	56
Figura 22. Interações entre os ligandos e os resíduos da enzima. (A) carlinósido, (B) isoorientina, (C) isoshaftósido, (D) orientina e (E) swertiajaponina.	57
Figura 23. Poses previstas para os compostos O-glicosilados cinarósido (vermelho), isoscoparina (roxo), L7OG (amarelo) e luteolina 7-O-neohesperidósido (azul).....	58
Figura 24. Interações entre a luteolina 7-O-glucósido (L7OG), em amarelo, e os resíduos da proteína.	58
Figura 25. Interações entre os ligandos e os resíduos da enzima. (A) cinarósido, (B) isoscoparina, (C) luteolina-7-O-neohesperidósido.....	59
Figura 26. Orientação previstas para as agliconas apigenina (azul), canferol (vermelho), luteolina (verde) e quercertina (amarelo).	60
Figura 27. Interações entre canferol (vermelho) e quercertina (amarelo) e os resíduos próximos.	60
Figura 28. Interações entre a enzima e os ligandos apigenina (esquerda) e luteolina (direita).	61
Figura 29. Esquema 2D da interação da acarbose com resíduos do sítio ativo da α -glucosidase de levedura.....	61
Figura 30. Interação da cassiaocidentalina B com resíduos do sítio ativo da α -glucosidase de levedura.....	62
Figura 31. Interações entre os resíduos da enzima e os ligandos kurilesina A (esquerda) e 2"-O-ramnosil isoorientina (direita).....	62
Figura 32. Orientação dos grupos glicosil da 2"-O-ramnosil isoorientina (vermelho) e kurilesina A (amarelo) no interior da cavidade da proteína.	63
Figura 33. Orientação prevista para os compostos 6,8-C-diglicosilados, carlinósido (vermelho) e isoshaftósido (verde) e as interações com os resíduos próximos.	64
Figura 34. Interações dos grupos glicosil dos compostos isoorientina (azul) e swertiajaponina (roxo) com os resíduos internos.....	65
Figura 35. Orientação da orientina (amarelo) prevista no interior do sítio ativo da proteína.	65
Figura 36. Orientações previstas para apigenina (vermelho) e canferol (verde) e suas interações com resíduos do sítio ativo da enzima.	66
Figura 37. Orientações previstas para luteolina (azul) e quercertina (amarelo) e suas interações com resíduos do sítio ativo da enzima.	67
Figura 38. Placa TLC visualizada sob luz visível e sob os comprimentos de onda 254nm (centro) e 366nm (direita).....	69

Figura 39. Placa multiwell após incubação e adição do <i>Fast Blue Salt B</i>	70
Figura 40. Atividade inibitória das amostras em diferentes concentrações. Os valores correspondem à média \pm desvio padrão de três ensaios independentes. (** $P < 0,001$ e ns = não significativo)	71
Figura 41. Curvas de dose resposta para as diferentes amostras e seus valores de IC_{50}	72

Índice de Tabelas

Tabela 1. Caracterização botânica da <i>Cymbopogon citratus</i> (Gomes e Negrelle, 2007).	6
Tabela 2. Nomes comuns e usos terapêuticos das partes da <i>Cymbopogon citratus</i>	7
Tabela 3. Classe dos flavonóides presentes na <i>Cymbopogon citratus</i>	11
Tabela 4. Identificação dos compostos presentes no extrato e fração do <i>Cymbopogon citratus</i> . Atribuição feita de acordo com Figueirinha, Santos-buelga e Batista (2008). 30	
Tabela 5. Concentração (em µg/mL) e log da concentração (logC) das amostras utilizadas nos ensaios enzimáticos.	39
Tabela 6. Possíveis atividades biológicas dos flavonóides da <i>Cymbopogon citratus</i> . .	43
Tabela 7. Propriedades físico-químicas dos flavonóides da <i>Cymbopogon citratus</i>	46
Tabela 8. Parâmetros de lipofilicidade calculados para os flavonóides da <i>C. citratus</i> . 46	
Tabela 9. Propriedades farmacocinéticas dos flavonóides da <i>C. citratus</i>	47
Tabela 10. Propriedades <i>druglikeness</i> dos flavonóides da <i>C. citratus</i>	47
Tabela 11. Características químicas medicinais e acessibilidade sintética dos flavonóides da <i>C. citratus</i>	48
Tabela 12. Docking molecular dos flavonóides da <i>Cymbopogon citratus</i> para a α -glucosidase lisossomal (PDB ID: 5NN8) e de levedura (AGS)	50
Tabela 13. Resultados do ensaio enzimático obtidos para acarbose, extrato e fração de flavonóides.	70

Índice de Abreviações

5-LO	Lipo-oxigenase 5
AChE	Acetilcolinesterase
AD	Doença de Alzheimer
AGS	α -glucosidase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
BACE1 local β	Enzima 1 responsável pela clivagem da proteína precursora amilóide no local β
BChE	Butirilcolinesterase
C.A.D.D.	<i>Computer Assisted Drug Design</i>
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
DII	Doença Inflamatória Intestinal
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
GAA	α -glucosidase lisossomal ácida de <i>Homo sapiens</i>
GSK3 β	Glicogénio sintase cinase-3 β
HIF-1A	Fator de hipóxia induzido-1A
HRAR	Aldose redutase recombinante humana
HTS	<i>High Throughput Screening</i>
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
L7OG	Luteolina-7-O-glucopiranósido
LPS	Lipopolissacárido
LTB ₄	Leucotrieno B4
NCE	Novas entidades químicas
NF-kB	Fator nuclear <i>kappa</i> B
PASS	<i>Prediction of Activity Spectra of Substances</i>
PPAR γ	Proliferador de peroxissoma γ
PPHG	Hiperglicemia de período pós-prandial
RLAR	Aldose redutase recombinante de ratos
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TXB ₂	Tromboxano B2
VEGF-A	Fator de crescimento vascular endotelial A
WHO	<i>World Health Organization</i>

ÍNDICE GERAL

1. Introdução	1
1.1. Plantas medicinais e o seu papel no desenvolvimento de novos fármacos	3
1.2. O género <i>Cymbopogon</i>	5
1.3. <i>Cymbopogon citratus</i>	5
1.3.1. Caracterização botânica	5
1.4. Composição fitoquímica	8
1.4.1. Óleo essencial	8
1.4.2. Compostos fenólicos	9
1.5. Flavonóides C-glicosilados e suas atividades terapêuticas	13
1.6. Diabetes	15
1.7. <i>Computer Assisted Drug Design (C.A.D.D.)</i>	18
2. Objetivos	23
3. Métodos Experimentais	27
3.1. Materiais e reagentes	29
3.2. Preparação e caracterização química do extrato e fração de flavonóides	29
3.3. Caracterização físico-química dos flavonóides do <i>Cymbopogon citratus</i>	31
3.4. Seleção dos alvos farmacológicos dos flavonóides do <i>Cymbopogon citratus</i>	34
3.5. Ensaio <i>in silico</i>	35
3.5.1. Modelo de homologia para a α -glucosidase	35
3.6. Análise qualitativa dos fitoconstituintes por cromatografia de camada fina	37
4. Resultados e Discussão	41
4.1. Seleção dos alvos farmacológicos dos flavonóides do <i>Cymbopogon citratus</i>	43
4.2. Ensaio <i>in silico</i>	45
4.2.1. Previsão das propriedades físico-químicas	45
4.2.2. Docking molecular	50
4.2.2.1. Docking sobre α -glucosidase lisossomal	53
4.2.2.2. Docking sobre α -glucosidase de levedura	61
5. Discussão Geral	73
6. Conclusão	77
7. Perspetivas Futuras	81
8. Referências Bibliográficas	85

1. Introdução

1.1. Plantas medicinais e o seu papel no desenvolvimento de novos fármacos

Desde a antiguidade o ser humano tem utilizado fontes naturais de origem animal, vegetal e mineral para o tratamento de doenças. Apesar de não possuir o conhecimento sobre os mecanismos das doenças, as comunidades adquiriram e acumularam dados sobre usos terapêuticos de fontes naturais, que perduram até hoje e ainda são utilizados para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. Historicamente, os tratamentos disponíveis eram maioritariamente de origem natural e eram os únicos disponíveis até o século XX, quando se verificou um grande avanço tecnológico que permitiu mudanças na forma como desenvolvemos novos fármacos (Lahlou, 2013). Após este período, o surgimento de técnicas como química combinatorial, *High Throughput Screening* (HTS) e técnicas mais avançadas de química orgânica resultou em uma forte mudança no panorama da Investigação e Desenvolvimento de medicamentos. A abordagem antes empírica e baseada na observação de fenótipos produzidos pelos extratos de produtos naturais, também chamada de abordagem *phenotype-based*, passou a ser uma abordagem baseada na hipótese de que um único composto presente nos extratos interage com proteínas chaves responsáveis pelo desenvolvimento de uma determinada doença. Esta abordagem, conhecida como *target-based*, é a abordagem preferencial ainda utilizada pela indústria farmacêutica. Com isso, esperava-se que a síntese de compostos cujas estruturas eram previstas computacionalmente tornasse a pesquisa e desenvolvimento de medicamentos mais eficiente e barata (Swinney, 2013).

Apesar do sucesso da nova abordagem, a indústria começou a presenciar uma queda no número de pequenas moléculas aprovadas como medicamentos. Por exemplo, no período entre 1940 e 2014, das 175 pequenas moléculas aprovadas na área do cancro, 75% eram consideradas “não-sintéticas”, sendo 85 destas moléculas provenientes de produtos naturais ou derivadas dos mesmos, e apenas 36% das 1073 novas moléculas aprovadas entre 1981 e 2010 foram puramente sintéticas, sendo mais de metade destas inspiradas ou derivadas de compostos naturais (Atanasov *et al.*, 2016; Newman e Cragg, 2016). Esta redução pode ser explicada pelo facto de os compostos sintéticos raramente resultam em medicamentos aprovados, muitas vezes por serem ineficazes ou por serem muito tóxicos (Hughes *et al.*, 2011). Estes números mostram um panorama preocupante, visto que o custo de desenvolvimento de um novo medicamento pode chegar a mais de US\$ 2 bilhões, sendo que apenas cerca de 10% dos compostos considerados *hits/leads* conseguem avançar da fase II até o seu lançamento no mercado, sobretudo por causa de problemas relacionados com eficácia e segurança, correspondendo a 52% e 24%, respetivamente, das falhas no período

entre 2013-2015 (DiMasi, Grabowski e Hansen, 2016; Harrison, 2016; Smietana, Siatkowski e Møller, 2016). Devido a estas adversidades, os investigadores voltaram as suas atenções para os produtos naturais, em contrassenso com a tendência atual de pesquisa e desenvolvimento. Esta mudança de estratégia confere muitas vantagens, inerentes às características dos produtos naturais e seus fitoconstituintes.

Os compostos presentes nos produtos naturais possuem elevado grau de complexidade, dificilmente podendo ser reproduzidos sinteticamente, com *scaffolds* semi-rígidos, presença de muitos centros quirais, mais de 5 dadores de ligação de hidrogênio, mais de 10 aceitadores de ligação de hidrogênio, mais de 5 ligações C-C rotativas, uma área de superfície polar grande e peso molecular acima de 500. Também é importante lembrar que a quinta regra de Lipinski diz que as primeiras quatro regras não se aplicam aos produtos naturais, nem a nenhuma outra molécula que é reconhecida por um sistema de transporte ativo. Além disso, técnicas muito utilizadas hoje como HTS baseiam-se em bibliotecas de compostos contendo muitas informações estruturais de compostos naturais, o que ainda demonstra uma grande dependência de conhecimento sobre estas estruturas por parte da indústria farmacêutica (Lahlou, 2013; Newman e Cragg, 2016).

Das fontes naturais disponíveis, as plantas estão fortemente presentes na história da medicina, contribuindo com um número significativo de compostos, nomeadamente a morfina, ingrediente ativo do ópio extraído da papoila, e a digoxina, um estimulante cardíaco extraído da planta *Digitalis lanata* (Lahlou, 2013). Medicamentos como o ácido acetilsalicílico, largamente utilizado hoje para o tratamento de dores leves a moderadas e febre, e a galantamina, utilizada para o tratamento da doença de Alzheimer, surgiram das plantas ou foram derivadas dos seus princípios ativos a partir de semi-síntese.

Porém, a principal desvantagem da investigação de novos medicamentos a partir de compostos derivados de fontes naturais é a dificuldade de transpor os resultados das pesquisas para um item comercial, sobretudo devido às dificuldades inerentes das etapas de extração, isolamento e identificação, que são complexas e morosas. Além disso, certos compostos naturais possuem estruturas muito complexas que não podem ser sintetizadas facilmente, levando a um grande impacto ambiental devido à exploração da fonte principal. Mesmo assim, o panorama não é desanimador. Das 250000 espécies de plantas, estima-se que apenas entre 5 e 15% já tenham sido investigadas, o que nos dá um grande espaço para investigação e desenvolvimento de novos fármacos a partir de plantas medicinais (Lahlou, 2013; Newman e Cragg, 2016). Com a tecnologia disponível hoje, como ferramentas de previsão de atividades farmacológicas e bancos de dados disponíveis gratuitamente pela internet, é possível reduzir o custo e facilitar o processo de isolamento de um determinado princípio ativo, além de possibilitar a

descoberta de atividades ainda não investigadas para os fitoconstituintes presentes numa planta medicinal.

1.2. O género *Cymbopogon*

O género *Cymbopogon* é largamente distribuído nas regiões tropicais e sub-tropicais da África, Ásia e América e compreende 144 espécies. Este género é notório pelo seu alto conteúdo de óleos essenciais, que são largamente comercializados e utilizados com aplicações na cosmética, perfumaria e indústria farmacêutica. O grande valor comercial atribuído às plantas deste género pode ainda ser explicado devido às suas capacidades de crescerem em condições climáticas moderadas ou extremas. Dentre os usos mais comuns para estas plantas, incluem-se o uso como chá comum, controlo da gripe, analgésico e anti-inflamatório, inseticida e repelente de insetos e também como suplemento alimentício (Avoseh *et al.*, 2015).

O nome *Cymbopogon* foi primeiramente introduzido por Sprengel em 1815 e possui grande semelhança com o género *Andropogon*, com alguns autores concordando que plantas pertencentes ao primeiro género são subespécies do segundo. As plantas deste género costumam ser altas, com até 1 metro de altura, perenes e com folhas longas e estreitas, principalmente caracterizadas por pequenos espinhos alinhadas com as extremidades das folhas. Dentre as plantas deste género, as mais conhecidas são a *C. citratus*, *C. martinii*, *C. flexuosus*, *C. nardus*, e *C. winterianus* (Berteau e Maffei, 2010).

1.3. *Cymbopogon citratus*

1.3.1. Caracterização botânica

O *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf, anteriormente classificado como *Andropogon citratus*, pertence à família Poaceae, que engloba cerca de 500 géneros e aproximadamente 8000 espécies, classificado botanicamente conforme descrito na Tabela 1. É uma planta nativa das Américas, Ásia e África, sendo também cultivada em outras regiões temperadas e tropicais. Com mais de 28 designações em todo o mundo, é popularmente conhecida como capim-limão ou erva cidreira (Brasil), erva-príncipe (Portugal), *hierba limon* ou *zacate de limón* (Espanha), *lemon grass* (Estados- Unidos/Inglaterra), *citronelle* ou *verveine des indes* (França) e *xiang mao* (China), entre outros. Pertence ao género *Cymbopogon*, o qual possui cerca de 180 espécies, sub-espécies, variedades e sub-variedades e, dentre as diferentes espécies do genus, é uma das mais conhecidas no mundo, juntamente com a *C. martinii*, devido ao seu óleo essencial de grande valor comercial (Berteau e Maffei, 2010; Lawal *et al.*, 2017).

Tabela 1. Caracterização botânica da *Cymbopogon citratus* (Gomes e Negrelle, 2007).

Reino	Plantae
Sub-reino	Tracheobionta
Super divisão	Spermatophyta
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Liliopsida
Subclasse	Cammelinidae
Ordem	Cyperales
Família	Poaceae (R.BR) Barnhart, 1895
Gênero	<i>Cymbopogon</i> Spreng., 1815
Espécie	<i>Cymbopogon Citratus</i>

**Figura 1.** *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf (Gomes e Negrelle, 2007).

Devido à facilidade da sua plantação, o consumo de infusões e outros preparados a partir de diversas partes tornou-se prática comum em muitos países, tanto pelo seu valor medicinal, como pelas suas características físico-químicas. Possui uma coloração levemente esverdeada e um aroma agradável, característico do limão, que faz com que seja muito utilizado em alimentos e na indústria de aromas. Devido ao seu sabor levemente cítrico, é frequentemente utilizada na culinária asiática, sendo muito comum encontrá-la na preparação de chás e como condimento (Figueirinha, 2011). Quanto ao seu valor medicinal, muitos países utilizam diferentes partes da planta para o tratamento ou alívio de diversas doenças como febre, doenças inflamatórias intestinais (DII) e diabetes, sendo ainda utilizada como repelente de insetos e para usos ornamentais. Em

alguns locais, como Nigéria, Argentina, Cuba e Costa Rica, as folhas de *Cymbopogon* são utilizadas para tratamento de diabetes, gripe, constipação, alívio da tosse, expetorante e como uma alternativa à escova de dentes ao mastigar. Nas Filipinas também acreditam que a *C. citratus* possui propriedades curativas e ajuda no alívio da indigestão, problemas estomacais, stress, resfriados, febres, dores e artrite. Outros usos já reportados incluem atividades antibacteriana, antifúngicas, anticarcinogênica, antioxidante, cardioprotetora e antirreumática (Avoseh *et al.*, 2015; Ekpenyong, Akpan e Nyoh, 2015; Shah *et al.*, 2011).

O óleo essencial da *C. citratus* é muito utilizado pela indústria de cosméticos, farmacêutica e de perfumaria, atribuindo um elevado valor económico à planta e rendendo diversos estudos acerca de sua composição e propriedades (Avoseh *et al.*, 2015).

Tabela 2. Nomes comuns e usos terapêuticos das partes da *Cymbopogon citratus*.

Região	Nome comum	Partes	Usos terapêuticos	Ref.
Argentina	Limonaria	Folhas	Resfriado, gripes, distúrbios digestivos, malária	Avoseh <i>et al.</i> , 2015
Brasil	Capim-limão Erva-cidreira Capim-santo	Folhas	Ansiolítico, anti-hipertensivo	Avoseh <i>et al.</i> , 2015; Shah <i>et al.</i> , 2011
China	Xiang mao	Planta	Alívio de dores	Figueirinha, 2011
Colômbia	Limonaria	Rizoma	Mastigado como pasta dentária, controle de pestes	Avoseh <i>et al.</i> , 2015
Costa Rica	Grass tea	Folhas	Tosse, expetorante, carminativo, depurativo	Avoseh <i>et al.</i> , 2015
Cuba	Cana Santa	Folhas	Resfriado, gripes, distúrbios digestivos, malária	Avoseh <i>et al.</i> , 2015
Estados- Unidos	Lemon grass Citronella	Planta	Feridas e fratura óssea	Shah <i>et al.</i> , 2011
Índia	Lemon grass	Áereas	Febre, problemas digestivos	Avoseh <i>et al.</i> , 2015
Nigéria	Lemon grass	Folhas	Diabetes, inflamação, doença nos nervos	Avoseh <i>et al.</i> , 2015
Portugal	Erva-príncipe	Folhas	Analgésico gástrico, problemas digestivos, anti-inflamatório intestinal, enjoo, antiespasmódico renal	Figueirinha, 2011
Trinidad & Tobago	Fever grass	Grama e rizoma	Gripes, resfriados, febres e diabetes	Avoseh <i>et al.</i> , 2015

O *Cymbopogon citratus* é uma planta perene, frondosa e robusta, que pode chegar a um metro ou mais de altura formando touceiras, com rizomas curtos. Caracteriza-se pelos colmos simples ou ramificados, eretos, lisos e glabros, as folhas moles, basais, glabras; bainhas fechadas na base, mais curtas que os entrenós, estriadas; lígula membranácea ou árida, com 4-5 mm de comprimento; lâminas eretas, planas, longo-atenuadas na base da lâmina estreita, para cima atenuada, na ponta setácea, cerca de 1 m de comprimento, 5-15 mm de largura, margens escabrosas e perto do ápice costa forte em baixo e alvacentas na face superior. As inflorescências normalmente são em pares de racimos espiciformes, sendo um ou outro solitário, e terminais no colmo ou nos ramos de colmo, 30-60 cm de comprimento, eretas, entrenós da ráquis semelhantes aos pedicelos da espiguetas pedicelada; os racimos são desiguais, com 3-6 cm de comprimento; os pedicelos são lineares, planos na face ventral, dorsalmente convexos, normalmente com cavidade no ápice, vilosos, arroxeados. Espiguetas sésseis desarmadas, canaliculadas no lado ventral, 4,5-5,0 mm de comprimento, 0,8-1,0 mm de largura, margens crescentes, ciliadas. Glumas iguais ou subiguais, a inferior lanceolada, bilobulada no ápice, bicarinada, com margens agudamente curvadas do meio para cima, a superior lanceolada, 4,3-4,5 mm de comprimento, normalmente 1-nervada. Lema estéril lanceolado, 3,5 mm de comprimento, 2-nervado ciliado. Lema fértil linear, 2,5 mm de comprimento, bifido, 1-nervado, ciliado. As suas folhas são longas, medindo até 1,5 m de comprimento, lanceoladas, de coloração verde-pálida, cortante ao tato quando dilacerada manualmente. As epidermes em secção paradérmica, apresentam células de paredes espessas e onduladas com formatos alongados, os estômatos possuem células oclusivas em “halteres” e os tricomas tectores são unicelulares, curtos (50 µm) e curvos, constituindo aspeto de “serra” (Gomes e Negrelle, 2007).

1.4. Composição fitoquímica

1.4.1. Óleo essencial

O óleo essencial (O.E.) da *C. citratus* é muito comum e um dos mais baratos disponíveis no mercado. É obtido através da destilação a vapor a partir das folhas secas ou frescas, resultando em uma mistura de hidrocarbonetos, como terpenos e sesquiterpenos, e compostos oxigenados, como éteres, ésteres, cetonas, fenóis e aldeídos, que conferem o aroma característico do óleo essencial (Koul *et al.*, 2004), sendo alguns destes fitoconstituintes invariáveis à origem da planta. Os terpenóides que constituem o óleo essencial possuem algumas variações dependendo do local de cultivo, estado de maturação e diferenças genéticas, além das diferenças dos métodos

de extração e partes das plantas utilizados (Lawal *et al.*, 2017). O óleo contém alto teor de citral, uma mistura dos aldeídos neral e geranial (em maior predominância), que pode chegar a concentrações de 70 a 80% (Gomes e Negrelle, 2007), e é usado principalmente na confecção de sabonetes, produtos de perfumaria e outros de caráter não-medicinal. Além destes, há uma variedade de monoterpenos que constituem o óleo, sendo o mirceno o que aparece em maior quantidade, com concentrações entre 2 e 25%, seguido do limoneno, que pode chegar a 5% (Figueirinha, 2011; Figueirinha, Santos-buelga e Batista, 2008).

Apesar de o seu uso ser maioritariamente não-medicinal, muitos estudos evidenciaram o caráter terapêutico do óleo essencial, principalmente atividades anti-inflamatória, anti-fúngica, ansiolítica, efeitos no sistema cardiovascular e atividade anti-tumoral (Boukhatem *et al.*, 2014; Gomes e Negrelle, 2007; Moreira *et al.*, 2010). Em regiões como Ásia e África, o óleo é ainda utilizado como antisséptico, antitússico e antirreumático, através do uso das infusões das folhas (Boukhatem *et al.*, 2014). No Brasil, o chá com folhas secas ou frescas é utilizado para tratamento de problemas digestivos, como antitússico, analgésico, antitérmico, anti-inflamatório, tratamento de doenças do trato urinário, anti-hermético, antiespasmódico, anticardíopático e antialérgico (Gomes e Negrelle, 2007; Sousa, Silva e Viccini, 2010). Devido ao seu alto valor comercial, grande parte da investigação é voltada para a composição do óleo essencial, sendo poucos os estudos que procuram caracterizar os compostos fenólicos presentes e relacioná-los com as atividades terapêuticas da planta.

1.4.2. Compostos fenólicos

Os compostos polifenólicos são partes importantes na constituição das plantas e estão presentes como metabolitos secundários, não tendo nenhuma função vital para o funcionamento do seu metabolismo principal. Estes compostos agem principalmente como mecanismos de defesa nas plantas, ou outras formas de comunicação e interação com o ambiente externo, mas possuem grande valor medicinal. Entre os compostos fenólicos, os flavonóides desempenham diversas funções, como proteção UV, quimioatrativos para bactérias e fungos ou como defesa contra vírus, bactérias, fungos e herbívoros (Marín *et al.*, 2015). Os flavonóides compõem um conjunto de diferentes classes de compostos, como antocianidinas, flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas, isoflavonas, isoflavanos e isoflavanonas, cada uma com suas respectivas subclasses e estão largamente distribuídas nas plantas (Figura 2). Estes compostos podem ser encontrados em diferentes fontes naturais, geralmente sob as formas C- ou O-glicosiladas, estando relacionados com diversas atividades terapêuticas.

Introdução

Até hoje, foram caracterizados na *C. citratus* diferentes compostos fenólicos com atividades terapêuticas, principalmente o ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico (Negrelle e Gomes, 2007). Compostos como elemicina, catecol e hidroquinona também já foram isolados do óleo essencial da *Cymbopogon citratus* no Bangladesh, assim como outros ácidos fenólicos como nerólico e gerânico (Figueirinha, 2011).

Entre os flavonóides presentes nesta planta, diferentes derivados glicosilados da apigenina e luteolina foram identificados, principalmente flavonas como a luteolina 6-*C*- β -glucopiranosídeo (isoorientina), luteolina 7-*O*- β -glucopiranosídeo (L7OG), luteolina 2''-*O*-ramnosil-(6-desoxi-ribo-hexos-3-ulosilo (cassiaocidentalina B), isoorientina 2''-*O*-ramnósido, apigenina 6-*C*- α -arabinopiranosil-8-*C*- β -glucopiranosídeo (isoshaftósido), luteolina 6-*C*- β -glucopiranosil-8-*C*- α -arabinopiranosídeo (carlinósido), luteolina 7-*O*-neohesperidósido (Lonicerina) e 6-*C*- α -arabinofuranosil-(1 \rightarrow 2)- α -*L*-ramnopiranosídeo (kurilesina A) (Figueirinha, 2011). Outros autores também já reportaram a presença de quercetina, canferol, luteolina 7-*O*-glucósido (cinarósido) (Sousa, Silva e Viccini, 2010), crisoeriol 6-*C*-glucósido (isoscoparina), luteolina 8-*C*- β -glucopiranosídeo (orientina) e swertiajaponina (Cheel *et al.*, 2005) na *C. citratus* (Figura 3). Estes compostos podem ser separados em grupos de acordo com o número de glicósidos ligados e a posição de ligação do mesmo (Tabela 3).

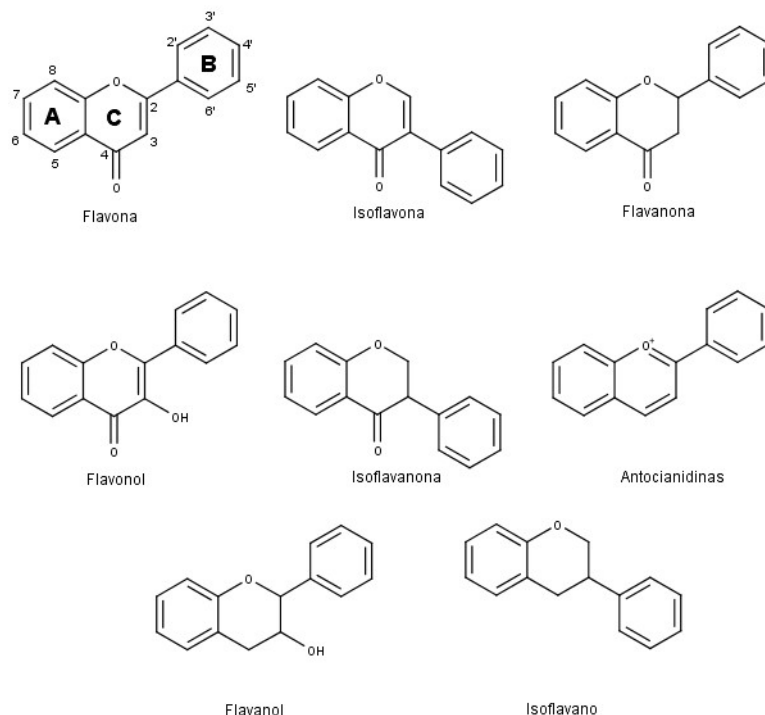


Figura 2. Esquema da estrutura das diferentes classes de flavonóides.

Tabela 3. Classe dos flavonóides presentes na *Cymbopogon citratus*.

Classe	Nome	Estrutura
C-O-diglicosilados	2"-O-Ramnosil Isoorientina	1
	Cassiaocidentalina B	2
	Kurilesina A	3
C-glicosilados	Carlinósido	4
	Isoorientina	5
	Isoshaftósido	6
	Orientina	7
	Swertiajaponina	8
O-glicosilado	Cinarósido	9
	Isoscoparina	10
	L7OG	11
	Luteolina 7-O-neohesperidósido	12
Genina	Apigenina	13
	Canferol	14
	Luteolina	15
	Quercetina	16

Introdução

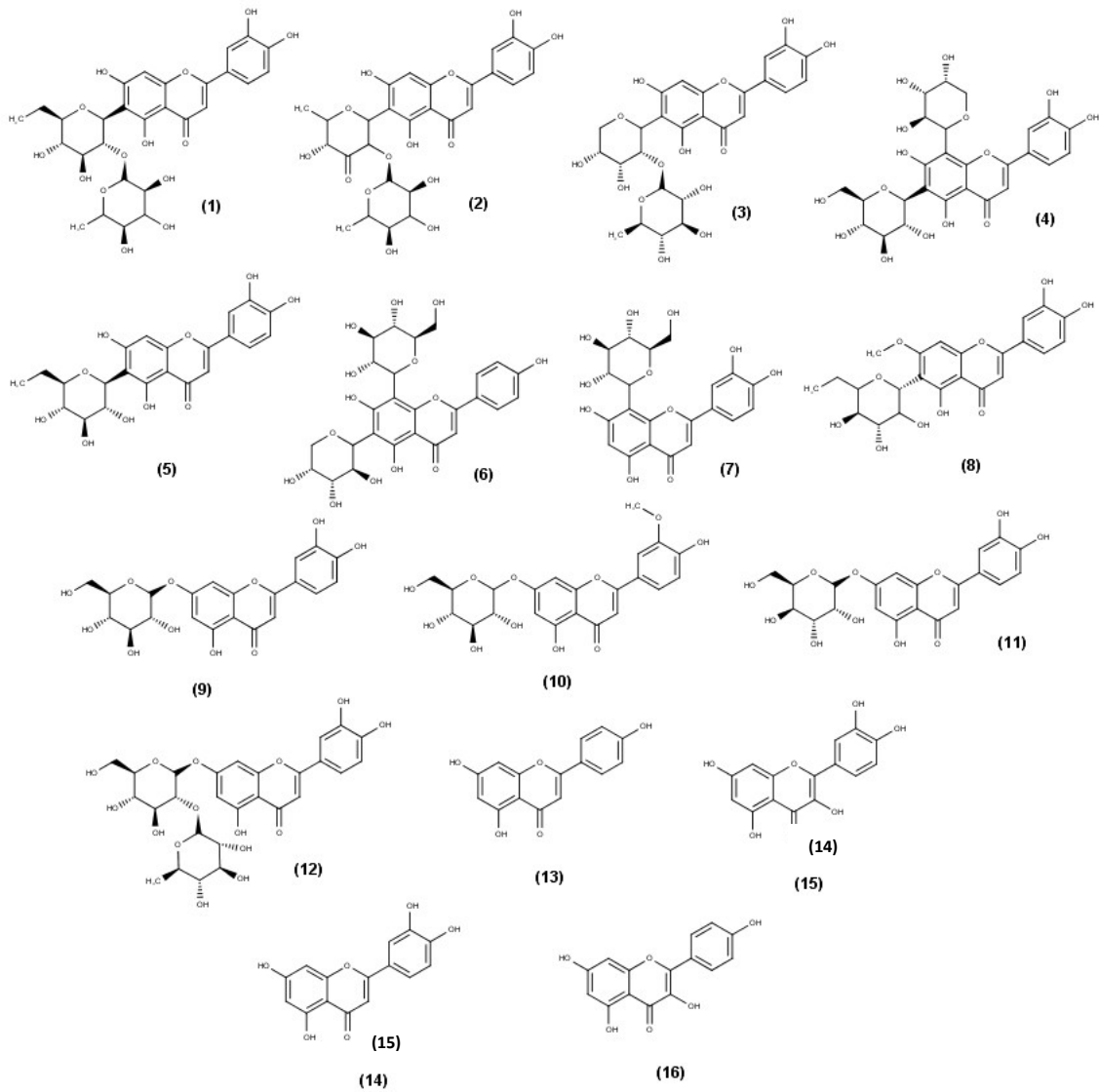


Figura 3. Estrutura dos flavonóides presentes na constituição da *Cymbopogon citratus*.

Muitos estudos comprovam os seus diferentes benefícios para a saúde, principalmente devido às suas capacidades de captação e estabilização de radicais livres de oxigénio ou azoto, atividades anti-inflamatórias, anti-mutagênica e anti-carcinogênica, além de serem capazes de modular enzimas importantes. Estas propriedades conferem a esta classe de compostos um vasto potencial terapêutico, desde o possível tratamento da doença de Alzheimer (AD), diabetes e cancro (Panche, Diwan e Chandra, 2016). Dentre os flavonoides presentes na *C. Citratus*, a orientina, isoorientina, luteolina e apigenina já foram largamente reportados como possuindo atividades anti-inflamatórias, através da redução a expressão de enzimas e citocinas pro-inflamatórias, como a ciclo-oxigenase 2 (COX-2), a óxido nítrico sintase induzida

(iNOS), 5-lipo-oxigenase (5-LO ou 5-ALOX), fator nuclear kappa B (NF- κ B), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e modulação da expressão de isoleucinas pró e anti-inflamatórias (Francisco *et al.*, 2011; Jiang, Doseff e Grotewold, 2016; Lee e Kim, 2010; Mello *et al.*, 2011; Park e Song, 2013). Francisco e colaboradores (2011) também já evidenciaram a ação anti-inflamatória da fração de flavonóides do extrato aquoso das folhas da *C. citratus*. Neste, mostram que a fração foi capaz de reduzir a expressão da iNOS em macrófagos estimulados com LPS, apesar de não reduzir a expressão de COX-2. Sagradas e colaboradores (2015) também mostraram que a infusão das folhas da *Cymbopogon* é capaz de reduzir os danos no estômago dos ratos em modelo de úlcera péptica causada por etanol.

1.5. Flavonóides C-glicosilados e suas atividades terapêuticas

Apesar de existirem muitos estudos sobre as atividades dos flavonóides, em geral o foco é voltado para as atividades das agliconas ou dos flavonóides O-glicosilados, principalmente devido à dificuldade existente em isolar e caracterizar os flavonóides C-glicosilados. Adicionalmente, devido à maior solubilidade e capacidade de absorção e maior facilidade de metabolização das agliconas e dos O-glucósidos, estes tornam-se objetos de maior interesse. Em perspectiva, enquanto o número de flavonas e flavonóis O-glicosilados conhecidos durante o período de 2004-2006 aumentou em cerca de 31 e 60%, respectivamente, o número de flavonas e flavonóis C-glicosilados diminuiu em 22%. Os C-glicosilflavonóides possuem um glucósido geralmente ligado nas posições 6 ou 8 do anel C, ou até mesmo em ambas, onde o tipo de glucósido pode ser variável. Os flavonóides C e O-glicosilados mais comuns encontrados nas plantas geralmente são flavonas e flavonóis, dentre os mais pesquisados a vitexina, a isovitexina, a orientina, isoorientina e seus derivados multiglicosilados (Veitch e Grayer, 2011; Xiao *et al.*, 2016).

Ainda assim, existem estudos que comprovam as suas atividades como potenciais agentes terapêuticos. Por exemplo, Odontuya e colaboradores (2005) foram capazes de isolar a isoorientina das partes aéreas da *Gentiana tenella* e *G. azurea* e estudaram a sua capacidade de inibir a síntese de tromboxano B2 (TXB₂) e leucotrieno B4 (LTB₄) em leucócitos de ratos, ambos derivados do ácido araquidônico da via da ciclo-oxigenase (COX) e 5-lipo-oxigenase (5-LOX) com propriedades pró-inflamatórias. A atividade anti-inflamatória foi atribuída à estrutura da isoorientina. Kwon e colaboradores (2004) estudaram a capacidade de diferentes flavonoides C-glucósidos, entre eles a orientina, em inibir a produção de NO induzida por lipopolisacárido (LPS), cujos

resultados mostraram que, à exceção de alguns flavonoides, muitos mostraram inibir a produção de NO de forma dose-dependente. Estes resultados foram atribuídos à presença de um grupo glicosilo nas posições 6 e 8 do anel (Xiao *et al.*, 2016).

Ninfali e colaboradores (2017) realçaram a atividade antioxidante, anti-inflamatória e antiproliferativa da vitexina-2-O-xilósido e vitexina-2-O-ramnósido isoladas da acelga (*Beta vulgaris* var. *cicla* L.) e da beterraba (*Beta vulgaris* var. *rubra* L.). Estes compostos, em conjunto com as betaxantinas e betacianinas isoladas da *B. vulgaris*, são capazes de exercer atividades antiproliferativas nas linhas celulares de cânceros de mama, bexiga, cólon e fígado, através da indução de vias apoptóticas intrínsecas e extrínsecas, além de exercerem um papel importante na *downregulation* de genes pró-sobrevivência e que controlam a angiogênese, como o fator hipóxia induzido-1A (HIF-1A) e o fator de crescimento vascular endotelial A (VEGF-A).

Liang e colaboradores (2016) verificaram a capacidade do extrato de seda de milho (*Zea mays* L.) de inibir a glicogênio sintase cinase-3 β (GSK3 β), enzima chave responsável pela hiperfosforilação da proteína Tau e que desempenha um papel crítico no desenvolvimento de doenças degenerativas, como a doença de Alzheimer. Os pesquisadores isolaram dois C-glicosídeos do extrato, isorientina e 3'-metoximaysina, e realizaram o *docking* molecular, mostrando que a inibição da GSK3 β ocorre através de um mecanismo não-competitivo com o ATP, em um sítio alostérico da enzima onde a C-glicona realiza uma interação polar com resíduos próximos à cavidade de ligação da molécula de ATP.

Modesti e colaboradores (2015) isolaram seis flavonóides C-glicosilados, dentre eles isovitexina, isorientina, isovitexina-2"-O-ramnósido e isorientina-2"-O-ramnósido, do extrato aquoso das folhas de *Passiflora bogotensis* e analisaram os seus potenciais de inibição da α -glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae*. Os seus estudos mostraram que os flavonóides C-glicosilados isolados foram capazes de inibir a enzima, concordando com outros estudos similares. Além disso, notaram que as atividades dos compostos monoglicosilados são maiores quando comparados àqueles diglicosilados e ainda maiores quando há um grupo acetilo na posição C(6") do açúcar.

Derivados mono e di-glicosilados da apigenina e da luteolina, isolados do extrato das folhas de *Passiflora edulis*, também mostraram capacidades antioxidantes contra 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) e inibição da xantina oxidase (Ferrerres *et al.*, 2007).

Além disso, por não sofrerem hidrólise ácida no estômago, as C-glicosilflavonas são mais estáveis e chegam praticamente intactas à região do cólon, onde então podem ser metabolizadas pelas bactérias existentes da flora intestinal, sendo uma característica

muito interessante para se considerar em relação às doenças inflamatórias intestinais (DII), como a doença de Chron e colite ulcerativa, além de doenças como diabetes, através da competição com a glicose com certos mecanismos de absorção no intestino (Cazarolli *et al.*, 2008; Francisco, Figueirinha e Costa, 2014; Sagradas *et al.*, 2015).

Porém, ainda há uma extensa falta de dados sobre a relação estrutura-atividade dos C-glicósidos em ensaios *in vivo* que permitam fazer uma generalização sobre o assunto. O que se observa até o momento é que a O-glicosilação reduz a atividade, quando comparado com as respectivas agliconas, podendo promover muitas outras atividades, como anti-HIV, antialérgica, antiobesidade, anticolinesterase, inibição da tirosinase, entre outros (Xiao, 2015; Xiao *et al.*, 2016). Nos derivados da luteolina e apigenina, a C-glicosilação confere diferentes resultados sobre a atividade antioxidante, antidiabética, anti-inflamatória e anti-Alzheimer. Entre a luteolina e seus dois derivados C-glicosilados, a orientina e isorientina, a última mostrou maior atividade antioxidante contra DPPH, apesar da aglicona mostrar maior inibição da geração de espécies reativas de oxigênio. A atividade anti-Alzheimer destes compostos foi maior para a aglicona, sobre alvos como a acetilcolinesterase (AChE), a butirilcolinesterase (BChE) e a enzima 1 responsável pela clivagem da proteína precursora amilóide no local β (BACE1). A isovitexina, um derivado da apigenina, mostrou maior potencial inibitório para estes alvos. Apesar da apigenina e seus derivados se mostrarem potentes inibidores da aldose redutase recombinante humana (HRAR) e aldose redutase de ratos (RLAR), ambos alvos para diabetes, o derivado glicosilado isovitexina mostrou maior atividade (Choi *et al.*, 2014a, 2014b). Portanto, estudos detalhados sobre estes compostos são necessários para avaliar seus potenciais terapêuticos.

1.6. Diabetes

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO), a diabetes é uma doença crônica que ocorre quando o pâncreas não produz insulina suficiente ou quando o corpo é incapaz de usar a insulina de maneira eficiente, sendo esta hormona a responsável pela regulação dos níveis de glicose no sangue. Em pacientes com diabetes o quadro comum é de hiperglicemia, isto é, quando os níveis de glicose no sangue estão elevados, e cuja permanência do quadro pode levar a sérios danos aos sistemas do corpo, principalmente os nervos e vasos sanguíneos. A diabetes é dividida em duas classificações:

- Diabetes tipo 1, também conhecida como diabete insulina independente, que é caracterizada pela deficiência da produção de insulina pelo corpo. A causa da

diabetes do tipo 1 ainda é desconhecida e o tratamento é dado através da injeção diária de insulina;

- Diabetes tipo 2, também conhecida como insulina-não-dependente, é caracterizada pela ineficácia do organismo para utilizar a insulina. É a forma de diabetes mais comum e é frequentemente resultado do excesso de peso e falta de atividade física. Os sintomas, como poliúria, mudança da visão, fadiga e entre outros, presentes na diabetes tipo 1, são menos marcantes na diabetes tipo 2, o que leva a um diagnóstico tardio.

Apesar de ser uma doença com maior prevalência em adultos, tem sido identificada também em crianças, de forma cada vez mais frequente. De 1980 a 2014, o número de pessoas com diabetes cresceu de 108 milhões para 422 milhões, onde a prevalência da doença em adultos com mais de 18 anos subiu de 4,7% para 8,5% no mesmo período. Em 2015, cerca de 1,6 milhões de mortes foram diretamente ligadas à diabetes. Até 2030, estima-se que a doença será a sétima maior causa de morte no mundo. A diabetes está relacionada como causadora de cegueira, falha renal, ataques cardíacos, doenças cardio-vasculares e amputação dos membros inferiores. Ainda assim, a diabetes pode ser prevenida por meio de exercício físico, alimentação saudável, manutenção do peso e redução do uso tabaco. Atualmente, a diabetes é tratável por meio de medicamentos e pode ser prevenida com dieta adequada, atividade física e diagnóstico precoce.

Os flavonóides têm demonstrado de grande potencial para o tratamento da diabetes *mellitus*. Dentre os mecanismos propostos, encontram-se a inibição da absorção de glicose, por meio da inibição competitiva do transportador de glicose sódio-dependente 1 (SGTL-1), ou através do aumento da tolerância à glicose, regulação da atividade ou expressão de enzimas limitantes no metabolismo de hidratos de carbono, estimulação da captação de glicose nos tecidos periféricos, estimulação da secreção de insulina e também a capacidade de mimetizar enzimas importantes da via metabólica através de complexos metálicos (Cazarolli *et al.*, 2008).

A α -glucosidase é uma das principais enzimas estudadas como potencial alvo contra a diabetes *mellitus* tipo 2. Esta enzima, também conhecida por α -glucosidase ácida (GAA) ou α -glucosidase lisossomal em seres humanos, é responsável pela degradação de glicogénio e hidratos de carbono em glicose. Assim, os inibidores da α -glucosidase são de grande interesse na medicina devido à sua capacidade de reduzir a hiperglicemia do período pós-prandial (PPHG). Diversos inibidores da α -glucosidase já foram utilizados para o tratamento da diabetes *mellitus* tipo 2, como a acarbose, miglitol e voglibose, porém muitos efeitos adversos foram observados, como inchaço, diarreia e

flatulência, fazendo com que novos inibidores sejam pesquisados (Leong *et al.*, 2017). Muitos flavonóides, principalmente agliconas, já foram estudados como potenciais inibidores desta enzima, geralmente separados em grupos de acordo com sua estrutura. Proença e colaboradores (2017) avaliaram a capacidade de inibição de 44 flavonóides sobre a enzima através de estudos *in vitro* e técnicas de *docking* e concluíram que diversos flavonóides possuem atividade inibitória. Também concluíram que um flavonóide contendo dois grupos catecóis nos anéis A e B, além de um grupo hidroxilo na posição 3 do anel C foi o mais ativo, com atividade superior à da acarbose, um inibidor da α -glucosidase atualmente usado na clínica para diabetes.

A α -amilase pancreática é outro alvo molecular muito estudado para o desenvolvimento de fármacos contra a diabetes. Esta enzima age sobre o amido, o glicogênio e polissacáridos, quebrando as ligações (1 \rightarrow 4) - α -D-glicosídicas e libertando monómeros de hidratos de carbono na corrente sanguínea. Tadera e colaboradores (2006) testaram seis grupos de flavonóides em α -glucosidases de leveduras e de intestino de ratos e na α -amilase pancreática de suínos e avaliaram as estruturas e atividades dos flavonóides testados. Todos os flavonóides testados, com exceção da apigenina, se mostraram fortes inibidores destas enzimas, cuja atividade foi atribuída à insaturação do anel C, à presença do grupo hidroxilo na posição 3, à presença do grupo carbonilo na posição 4, à ligação ao anel B na posição 3 e à substituição do hidroxilo no anel B, sendo as antocianidinas o grupo com maior atividade inibitória. Jumepaeng e colaboradores (2013) analisaram a capacidade antioxidante e de inibir a α -amilase do óleo essencial da *Cymbopogon citratus* e mostraram que a inibição desta enzima foi cerca de quinze vezes maior que a da acarbose. Este resultado, porém, foi atribuído à presença de terpenos e sesquiterpenos presentes no óleo essencial, ao invés dos compostos fenólicos.

Porém, apesar de conhecermos suas atividades, os seus mecanismos de ação ainda não foram completamente esclarecidos e pouca informação acerca desta classe de compostos existe na literatura. Além disso, em muitos artigos as enzimas utilizadas não são de procedência humana, sendo principalmente utilizadas enzimas de ratos ou leveduras. Wang, Li e Bi (2017), em seu trabalho, realizam uma extensa revisão sobre estudos de relação estrutura-atividade de diferentes flavonóides bioativos em plantas medicinais. Apesar de haver muitos estudos sobre os efeitos dos flavonóides sobre a α -glucosidase, pouco é mencionado sobre esta classe de compostos, especificamente e informações acerca dos seus derivados glicosilados ainda é escassa.

1.7. Computer Assisted Drug Design (C.A.D.D.)

Um dos conceitos mais conhecidos da quimio-informática é o do espaço químico; um espaço finito contendo um número determinado de moléculas farmacologicamente ativas. Estima-se que este espaço contém cerca de 10^{60} moléculas, cada uma com sua respectiva atividade e capazes de se ligarem a qualquer sítio de ligação em um determinado alvo na biologia (Reymond e Awale, 2012). Numa primeira abordagem, pode-se imaginar que percorrer este espaço na busca de uma molécula específica com uma determinada atividade pode ser praticamente impossível. Não obstante, técnicas mais recentes como HTS e química combinatorial surgem com a proposta de percorrer este vasto espaço de forma eficiente, direcionada e barata, através de uma biblioteca de pequenas estruturas conhecidas. Além disso, o design *de novo* de moléculas promete gerar novos ligandos direcionados a uma determinada atividade terapêutica desejada (Schneider, 2012).

Apesar dos avanços tecnológicos nesta área, o número de novos fármacos aprovados nos últimos anos tem sido cada vez menor. Mesmo com a capacidade do HTS de explorar cerca de 1 a 2 milhões de compostos, ainda não é possível explorar o espaço químico na sua totalidade (Schneider, 2012). Diversas ferramentas existem atualmente para auxiliar na busca local de compostos que podem se desenvolver em novos fármacos, desde ferramentas de previsão de atividades até a existência de bancos de dados com informações físico-químicas e atividades biológicas. Ainda assim, os compostos completamente sintéticos descobertos através da síntese *de novo* correspondem a uma taxa de sucesso de aprovação muito baixa.

Frente ao espaço químico que os químicos têm de explorar, os compostos de produtos naturais mostram-se vantajosos devido à sua grande diversidade. Rodrigues (2017) mostrou que entre 1000 produtos naturais (NP) e outros compostos aleatórios coletados dos bancos de dados TCM@Taiwan e ZINC15, os primeiros mostraram grande diversidade e diferenças estruturais em comparação ao segundo grupo (Figura 4). Além disso, devido a esta diversidade, cobriam uma área maior da projeção multidimensional (MDS), o que em termos de varredura *in vitro*, cobriria uma área maior do espaço químico.

Introdução

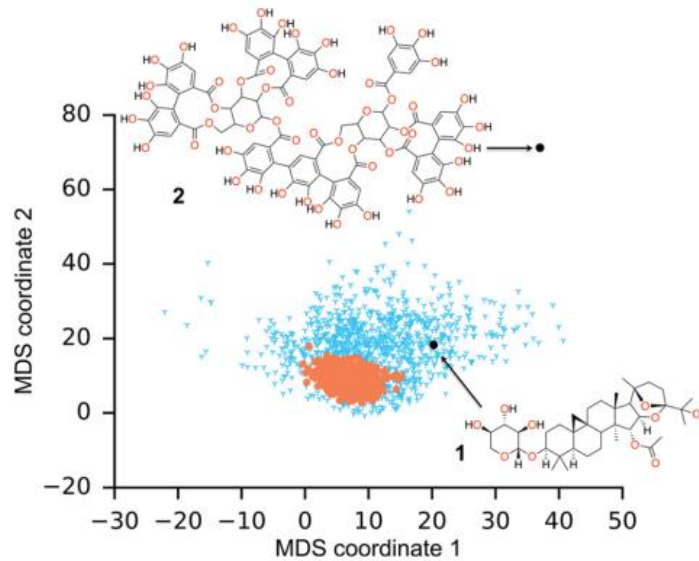


Figura 4. Projeção (escala multidimensional, MDS) de NPs aleatórios (n = 1000, azul) e compostos disponíveis (n = 1000, vermelho) nos bancos de dados TCM@Taiwan e ZINC15 (Rodrigues, 2017).

Ao contrário dos compostos puramente sintéticos os compostos ativos de produtos naturais são isolados baseados nos fenótipos produzidos pelos extratos através de usos terapêuticos documentados destas plantas na medicina popular, do conhecimento Ayurvédico, pesquisa exaustiva da literatura e uso tribal não documentado. Isto traz uma grande vantagem à indústria farmacêutica, visto que a aprovação de novas entidades químicas (NCEs) somada aos elevados custos da investigação configuram um enorme desafio para o desenvolvimento de novos fármacos (Katiyar *et al.*, 2012). Devido a estas dificuldades, a busca por NCEs através de plantas medicinais tem encontrado novamente o seu espaço nas últimas décadas. Apenas no período entre 1981 e 2006, mais de 70% dos NCEs introduzidos foram de origem natural (Lagunin, Filimonov e Poroikov, 2010). Muitas ferramentas modernas nas áreas da química e biologia, como as diversas tecnologias “-ômicas”, permitem detalhar a natureza exata dos efeitos biológicos dos compostos naturais no organismo humano, assim como evidenciar novas sinergias que podem ser promissoras para o tratamento de doenças como cancro e demência (Ji, Li e Zhang, 2009).

Entretanto, os extratos de plantas contêm muitos compostos diferentes e é difícil poder esclarecer qual o composto responsável por determinada atividade ou se tem atividade terapêutica. Como estes compostos diferem em polaridades e características químicas, a separação destes permanece como um grande desafio para a identificação e caracterização de compostos bioativos. Entre os métodos mais comuns de separação,

utilizam-se a cromatografia em camada fina (TLC), cromatografia em coluna, Sephadex, HPLC e cromatografia FLASH para a obtenção de compostos isolados (Sasidharan *et al.*, 2011). Porém, muitas vezes estes processos são demorados, havendo a necessidade de se identificar qual o composto mais promissor para que se faça um isolamento orientado. Adicionalmente, a mudança de fenótipos devido à aplicação de compostos naturais pode estar associada às diferentes vias ou alvos moleculares, tornando menos óbvias as interações entre o fármaco e o alvo. A falta de conhecimento sobre os alvos modulados por parte dos produtos naturais é o que torna difícil o desenvolvimento racional destes compostos em novos fármacos (Rodrigues, 2017). De um mesmo modo, projetos de investigação cujo alvo molecular era conhecido levavam diretamente à derivação de um composto natural. Com o advento de novas tecnologias de previsão, potenciais novos alvos moleculares poderiam ser descobertos e auxiliariam na descoberta de novas bioatividades de produtos naturais. Em conjunto com estas ferramentas de previsão, o *docking* inverso, isto é, o *docking* de um único ligando sobre um conjunto de alvos, também se mostrou uma importante ferramenta de descoberta de novas bioatividades de compostos naturais, identificando a COX-2 e os recetores ativados por proliferador de peroxissoma γ (PPAR γ) como alvos da meranzina, um composto natural encontrado em frutas cítricas (Rodrigues *et al.*, 2016).

Atualmente existem diversas ferramentas computacionais que auxiliam a descoberta de NCEs e o desenvolvimento de novos fármacos. O programa PASS (*Prediction of Activity Spectra of Substances*), por exemplo, permite prever o perfil de atividades biológicas de compostos orgânicos que possuam características *drug-like* (cuja massa molecular esteja entre 50 e 1250 Da) a partir de uma biblioteca de mais de 4000 tipos de atividades biológicas, com uma precisão de mais de 95%. Esta previsão é feita através de uma análise da relação estrutura-atividade contida em um conjunto de informações (*training set*) de mais de 300000 compostos orgânicos, envolvendo fármacos, candidatos a fármacos em diversos estágios de desenvolvimento, agentes farmacêuticos e compostos cujas atividades farmacológicas e toxicidade são conhecidas. O utilizador do programa recebe como resultado um relatório contendo as probabilidades do composto ser ativo (P_a) e inativo (P_i), que variam de zero a um. Porém, apesar do programa prever algumas atividades, é preciso ainda realizar experimentos que comprovem tal atividade, sendo maiores as probabilidades de encontrá-la quando o valor de P_a for alto e menor quando o valor de P_i for baixo. Porém, o usuário também deve ter em atenção que baixos valores de P_a não descartam as probabilidades do composto ter uma determinada atividade, cabendo sempre ao

utilizador discernir quais as atividades que devem ser investigadas (Filimonov *et al.*, 2014).

Sabendo-se da diversidade de atividades biológicas que os fitocompostos possuem, devido às suas diferenças estruturais, como a C- ou O-glicosilação dos anéis dos flavonóides, além da capacidade de se ligarem à diversos alvos moleculares e atuarem por diferentes vias (Choi *et al.*, 2014; Khan *et al.*, 2009; Vezza *et al.*, 2016), o PASS (disponível em http://www.way2drug.com/Total_plus/index.php) é de grande utilidade para a descoberta de atividades antes não investigadas para esta classe de compostos. Lagunin, Filimonov e Poroikov (2010) mostraram que os compostos naturais são submetidos a métodos de *screening* virtual de modo a identificar substâncias *lead*, mas estas estratégias apenas resultam em atividades já descritas pela etnofarmacologia e estima-se que apenas uma pequena porção da diversidade estrutural dos compostos naturais foram exploradas quanto ao seu potencial terapêutico. Goel e colaboradores (2011) também corroboram esta ideia, afirmando que o potencial de previsão de atividades “ocultas” dos compostos naturais pelo PASS é subestimado. Para chegar a esta conclusão, realizaram um estudo sobre a capacidade do PASS de prever as atividades já reportadas de compostos naturais presentes nas plantas *Withania somnifera*, *Curcuma longa*, *Boerhaavia diffusa*, *Piper longum*, e *Alium sativum* e confirmaram que o PASS foi capaz de prever a maior parte das atividades já reportadas para o principal composto de cada planta, sendo o restante das atividades atribuídas aos outros fitocompostos. Foi ressaltado também o modo como o PASS prevê as atividades, pois o mesmo é feito a partir de estruturas conhecidas. Compostos que tenham Pa baixo pode não significar que não possuam determinada atividade, mas que a sua estrutura é nova ou suficientemente diferente dos compostos existentes. Apesar de que quanto menor for o Pa, menor é a probabilidade de se encontrar a atividade experimentalmente, a probabilidade de se encontrar um NCE é maior.

Em conjunto com o PASS, o uso de bancos de dados também permite filtrar alvos moleculares, procurar fármacos já desenvolvidos ou ainda em desenvolvimento e permite verificar artigos que reportam um determinado composto. O site Open Targets (disponível em <https://www.targetvalidation.org>) é um banco de dados contendo e cruzando informações sobre doenças, seus alvos moleculares, estudos publicados e fármacos desenvolvidos. Nesta plataforma cada fármaco está ligado a uma doença através de uma ampla fonte de dados, sendo possível fazer pesquisas centradas nos alvos moleculares e quais doenças estão associadas, ou centradas em uma determinada doença e quais alvos moleculares estão associados (Koscielny *et al.*, 2017).

O banco de dados de enzimas, BRENDA (disponível em <https://www.brenda-enzymes.org>), contém uma extensa biblioteca de informações sobre 83000 enzimas, com aproximadamente 3 milhões de dados e 137000 referências da literatura. Estas informações são recolhidas manualmente e posteriormente estendidas a partir de procedimentos de *text mining*, integração de dados externos e algoritmos de previsão. É possível recolher informações sobre a função de uma determinada enzima, seu papel metabólico, envolvimento em doenças, a sequência e estrutura da proteína e genómica de todos os grupos taxonómicos, desde eucariotas, archaea, bactérias e vírus (Placzek *et al.*, 2017).

A ferramenta online SwissADME (disponível em <http://www.swissadme.ch/>) permite prever as características físico-químicas, farmacocinéticas, *drug-likeness* e informações sobre a absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) de um determinado composto a partir de sua estrutura. Esta ferramenta permite uma avaliação inicial sobre a ADME de um determinado composto de maneira rápida e barata, permitindo maior eficiência na pesquisa de novos medicamentos sem recorrer a ensaios *in vivo* e descartando possíveis falhas nos ensaios clínicos (Daina, Michielin e Zoete, 2017).

Por último, o banco de dados de compostos bioativos, ChEMBL (disponível em <https://www.ebi.ac.uk/chembl/>), é um banco de dados aberto contendo informações sobre compostos com características *drug-like*. De forma semelhante ao BRENDA, as informações presentes são manualmente inseridas a partir da literatura e posteriormente refinadas de modo a melhorar sua qualidade e permitir uma busca menos trabalhosa. Em 2012, este banco de dados contava com a presença de cerca de 1 milhão de compostos, 5200 alvos moleculares e 5,4 milhões de ensaios biológicos. Devido ao seu carácter coeso, a busca de compostos já identificados e possíveis ensaios realizados torna-se mais fácil, tornando a pesquisa por novos compostos bioativos mais eficiente e económico (Gaulton *et al.*, 2012).

2. Objetivos

Objetivos

Os objetivos do presente trabalho são:

- a) avaliar a capacidade de previsão de atividades terapêuticas a partir das propriedades físico-químicas de flavonóides da planta *Cymbopogon citratus* por meio de métodos *in silico*;
- b) confirmar estas atividades por meio de ensaios enzimáticos *in vitro*;
- c) desenvolver uma metodologia que permita encontrar princípios ativos presentes em extratos de produtos naturais de modo fácil, rápido e barato, encurtando o tempo necessário para o isolamento do mesmo;
- d) Estabelecer uma correlação entre as actividades previstas e as actividades determinadas; e
- e) Contribuir para um melhor conhecimento das atividades terapêuticas da planta *Cymbopogon citratus*, descobrindo novas moléculas com atividade antidiabética.

3. Métodos Experimentais

3.1. Materiais e reagentes

O programa para *docking* foi o GOLD versão 5.6 (CCDC – Cambridge Crystallographic Data Centre, Cambridge, Reino Unido). Os programas para visualização e análise das interações proteína-ligando foram o *Visual Molecular Dynamics* (VMD) versão 1.9.3 (*Theoretical and Computational Biophysics Group e National Institution of Health*, Universidade de Illinois, EUA) e *Discovery Studio Visualizer 2017* (*Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment, Release 2017*, San Diego: *Dassault Systèmes*, 2016). O leitor de placas foi do modelo Multiskan EX (Thermo electron corporation), com estação de controlo e tratamento de dados Ascent Software Thermo LabSystems versão 2.6, contendo filtro de 620 nm.

O etanol, metanol, ácido acético, acetato de sódio e placa de TLC de sílica gel 60 F₂₅₄ foram Merck (Darmstadt, Alemanha). A α -glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae* (LOT# SLBV6748), o cromóforo *Fast Blue Salt B* e o padrão acarbose são todos da Sigma-Aldrich. Os padrões isoorientina e luteolina-7-O-glucósido foram Extrasynthèse (França). O substrato α -naftil-D-glucopiranosídeo foi Chem-INPEX International (EUA, LOT# EN066011001).

3.2. Preparação e caracterização química do extrato e fração de flavonóides

De modo a avaliar a atividade inibitória do *Cymbopogon citratus* sobre a α -glucosidase, optou-se por utilizar o infuso das folhas secas da planta e uma fração de flavonóides deste extrato, ambos liofilizados. O extrato e a fração de flavonóides foram obtidos e caracterizados por parte do grupo de trabalho do Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Coimbra, através de método previamente descrito por Figueirinha, Santos-buelga e Batista (2008).

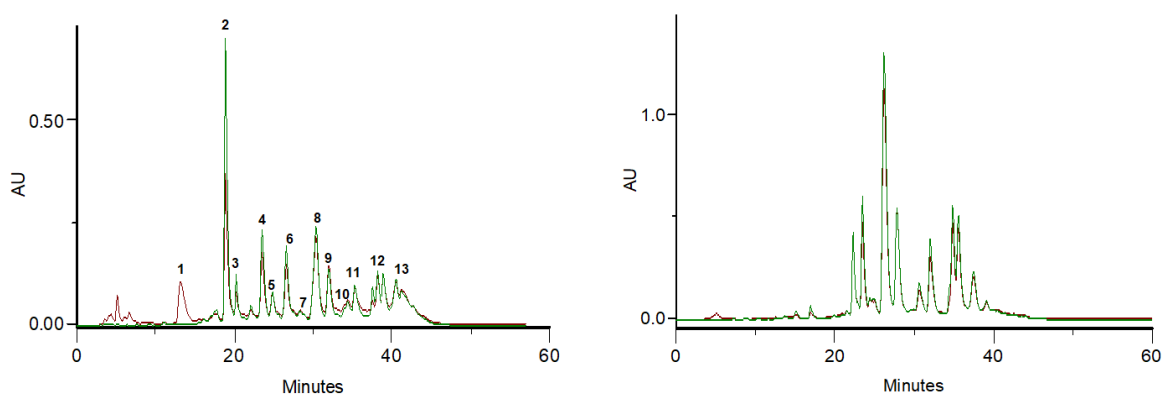


Figura 5. Cromatogramas obtidos para o extrato de *Cymbopogon citratus* (esquerda) e da fração de flavonóides (direita).

Na Figura 5 estão representados os cromatogramas obtidos por HPLC-PDA/ESI/MSn do extrato e da fração, evidenciando a presença de taninos (1), ácidos fenólicos (2-4) e flavonóides (5-13). Os flavonóides presentes são principalmente flavonas, mais especificamente derivados da luteolina e da apigenina e estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Identificação dos compostos presentes no extrato e fração do *Cymbopogon citratus*. Atribuição feita de acordo com Figueirinha, Santos-buelga e Batista (2008).

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	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

A composição química da fração enriquecida em flavonóides foi determinada por RMN-H após o isolamento dos compostos presentes por Figueirinha (2011), tendo se identificado os seguintes flavonóides: luteolina 6-C- β -glucopiranosídeo (isoorientina), luteolina 7-O- β -glucopiranosídeo (L7OG), luteolina 2''-O-ramnosil-(6-desoxi-ribo-hexos-3-ulosilo) (cassiaocidentalina B), isoorientina 2''-O-ramnósido, apigenina 6-C- α -arabinopiranosil-8-C- β -glucopiranosídeo (isoshaftósido), luteolina 6-C- β -glucopiranosil-8-

C- α -arabinopiranosídeo (carlinósido), luteolina 7-O-neohesperidósido (Lonicerina) e 6-C- α -arabinofuranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosídeo (kurilesina A).

3.3. Caracterização físico-química dos flavonóides do *Cymbopogon citratus*

As características físico-químicas e farmacocinéticas dos flavonóides da *Cymbopogon citratus* foram analisados pelo servidor SwissADME. A utilização do servidor é feita através da inserção dos códigos SMILES das estruturas, uma para cada linha, com a possibilidade de adicionar um nome à molécula através de um espaço após o código para cada estrutura (Figura 6).

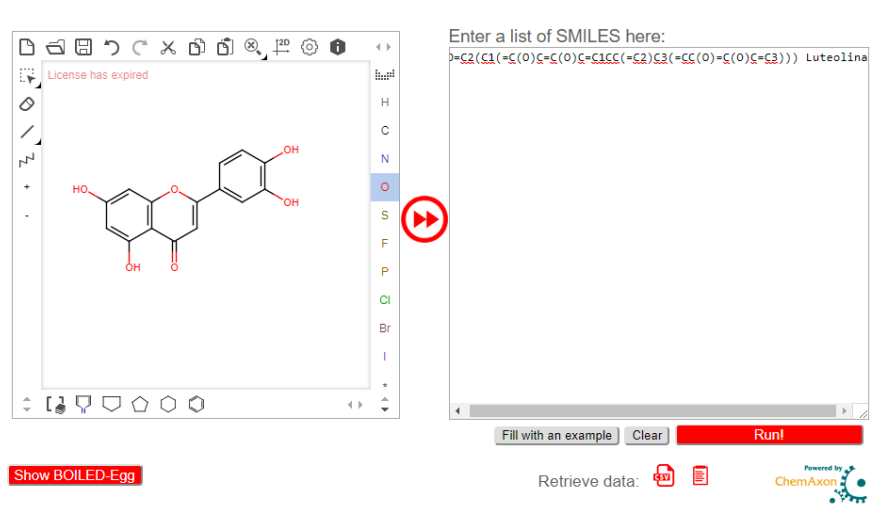


Figura 6. Página de submissão do SwissADME.

O servidor analisa seis propriedades físico-químicas, como: lipofilicidade, tamanho, polaridade, solubilidade, flexibilidade e saturação. Dentre estas propriedades, diversos descritores moleculares são calculados, como peso molecular (MW), área de superfície polar (PSA), coeficiente de partição n-octanol/água ($\log P_{o/w}$), permeabilidade da barreira hemato-encefálica, *drug likeness*, entre outros. Além disso, o servidor também gera um gráfico intuitivo (Figura 7) estilo “ovo cozido” (*BOILED-egg*), que prevê a absorção gastrointestinal passiva humana (HIA) e a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BBB) com base em dois parâmetros: WLOGP, um método atomístico para o cálculo do $\log P$ desenvolvido por Wildman e Crippen (Wildman e Crippen, 1999), e a área de superfície polar topológica (TPSA), que considera a contribuição de grupos funcionais de uma ampla biblioteca de estruturas (Prasanna e Doerksen, 2009). Neste gráfico, a secção amarela (gema) engloba o espaço físico-químico com alta probabilidade de permeação da BBB, enquanto a secção branca (clara) engloba o espaço físico-químico com alta probabilidade de permeação da HIA. Estes espaços não são mutualmente

exclusivos e moléculas pertencentes à área cinza do gráfico possuem características que implicam baixa permeabilidade à BBB e HIA. Neste mesmo gráfico, é dada a probabilidade de uma determinada molécula ser substrato da glicoproteína-P (P-gp), um importante mecanismo de efluxo ativo encontrados nestas barreiras biológicas; visualmente demonstrado por pontos azuis, para substratos da P-gp (PGP+), ou pontos vermelhos para não-substratos (PGP-), informando de maneira simplificada a capacidade de absorção e de eliminação da molécula por estas barreiras (Daina, Michielin e Zoete, 2017).

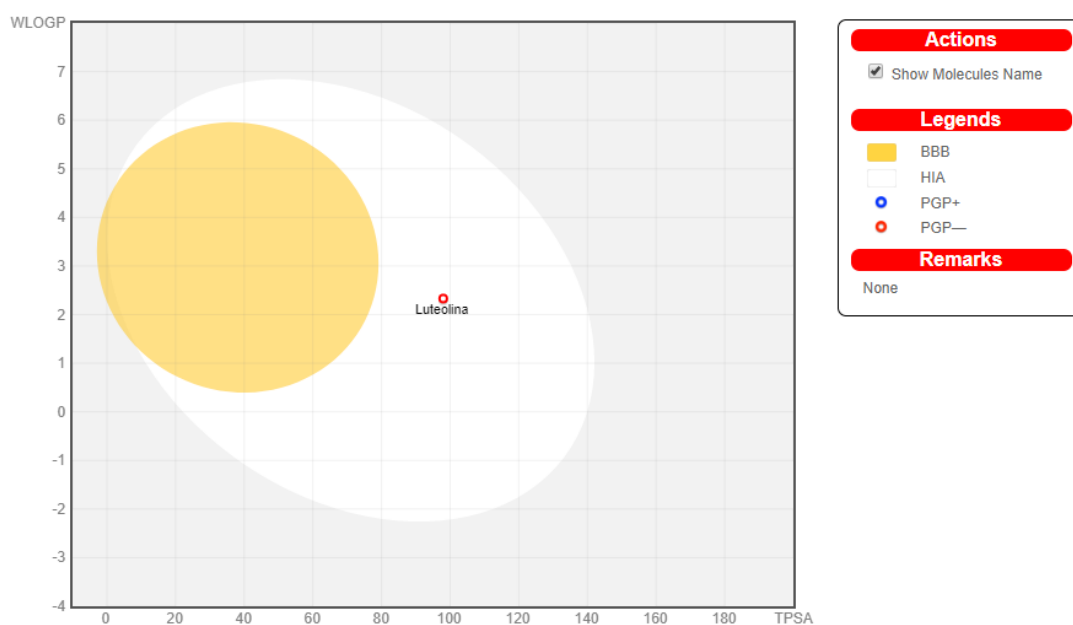


Figura 7. Gráfico BOILED-egg (WLOGP -versus- TPSA) para a luteolina.

Para cada molécula é gerado um radar de biodisponibilidade contendo as seis propriedades físico-químicas calculadas (Figura 8).

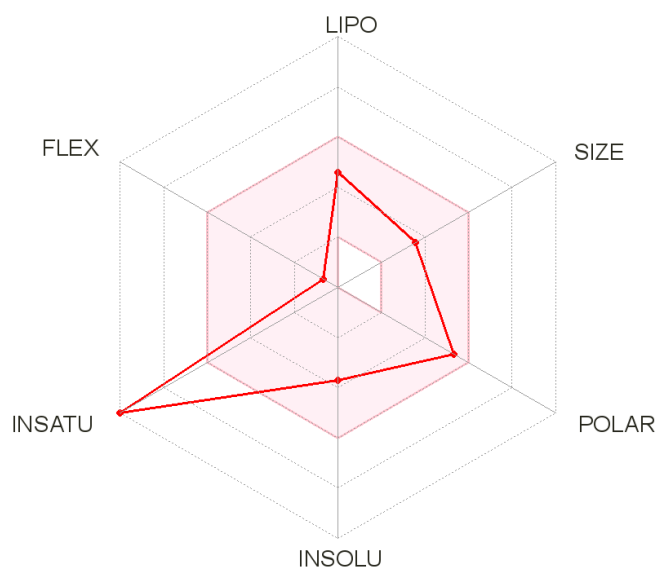


Figura 8. Radar de biodisponibilidade para a luteolina.

Este radar contém uma faixa ideal de valores para cada propriedade. Para a lipofilicidade (LIPO), o valor de XLOGP3 calculado deve estar na faixa de -0,7 até +5,0. Para o tamanho (SIZE), a molécula deve ter entre 150 e 500 g/mol. Para a polaridade (POLAR), o valor calculado de TPSA deverá estar entre 20 e 130 Å². Para a solubilidade (INSOLU), o valor calculado de log S, calculado pelo método de ESOL, deve estar entre 0 e 6. Para a insaturação (INSATU), o valor da Fração Csp³, a razão entre o número de átomos de carbono sp³ hibridizados e o número total de átomos de carbono da molécula, deve estar entre 0,25 e 1. Finalmente, para a flexibilidade (FLEX), o número de ligações rotacionáveis deve ser entre 0 e 9. A área rosa representa a faixa ótima das seis propriedades para que uma molécula seja considerada *drug like*. Qualquer desvio desta área representa condições de baixa biodisponibilidade oral (Daina, Michielin e Zoete, 2017).

A previsão das características de ADME é bastante útil e já foi demonstrada como essencial para diminuir as probabilidades de falha nos ensaios clínicos durante o desenvolvimento de um fármaco (Hay *et al.*, 2014). Portanto, a previsão destas propriedades foi considerada para avaliar se os possíveis compostos ativos possuem características *drug like* e se podem atuar no local de ação da α -glucosidase.

3.4. Seleção dos alvos farmacológicos dos flavonóides do *Cymbopogon citratus*

A previsão das atividades terapêuticas dos flavonóides foi realizada através da ferramenta *PASS Online*. As estruturas dos compostos, previamente preparadas no MarvinSketch, foram inseridas e seguiu-se com a previsão das atividades, mecanismos, transporte e toxicidade (Figura 9). O procedimento computacional para a previsão das atividades está extensamente descrito na literatura (Poroikov *et al.*, 2007).

Também se buscaram referências nos bancos de dados sobre os flavonóides presentes no extrato da *Cymbopogon citratus*, principalmente os compostos glicosilados, no ChEMBL e PubChem.

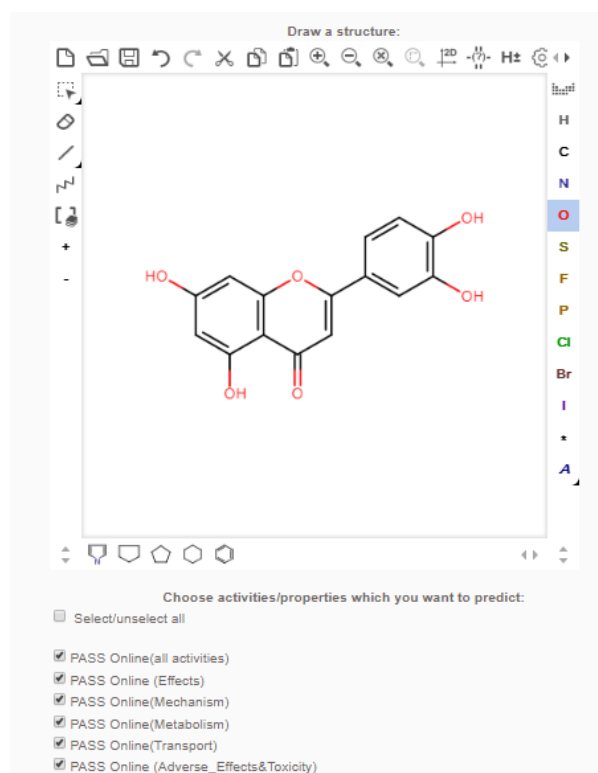
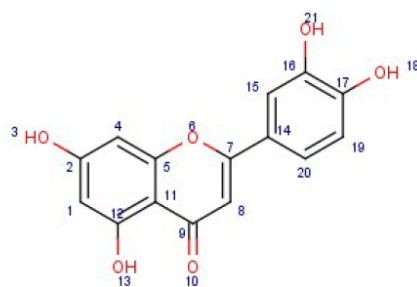


Figura 9. Página de submissão do PASS Online.

Após a submissão de cada estrutura, um arquivo no formato PDF é gerado contendo diversas possíveis atividades biológicas para aquele composto e suas devidas probabilidades de acordo com a razão Pa/Pi (Figura 10).



Pa	Pi	Activity
0,978	0,001	Chlordecone reductase inhibitor
0,965	0,003	Membrane integrity agonist
0,964	0,003	HIF1A expression inhibitor
0,953	0,002	Membrane permeability inhibitor
0,952	0,002	2-Dehydropantoate 2-reductase inhibitor
0,947	0,001	Aryl-alcohol dehydrogenase (NADP+) inhibitor

Figura 10. Arquivo gerado pelo PASS Online para a luteolina.

3.5. Ensaios *in silico*

Os compostos utilizados para o ensaio em *docking* foram escolhidos de acordo com a literatura publicada dos compostos já identificados e isolados para a *Cymbopogon citratus*. No total, 16 compostos da classe flavonóides foram escolhidos para testes *in silico* nas enzimas α -glucosidase lisossomal (GAA) e α -glucosidase de levedura e ferramentas *online* de previsão de atividades e de características físico-químicas. Dentre eles, apigenina, luteolina, Isoorientina, luteolina 7-O- β -glucopiranosídeo, cassiaocidentalina B, isoorientina 2''-O-ramnósido, isoshaftósido, carlinósido, luteolina-7-O-neohesperidósido (lonicerina), kurilesina A, quercetina, canferol, cinarósido, isoscoparina, orientina e swertiajaponina. As respectivas estruturas foram desenhadas e otimizadas através da minimização de energia a pH 7,4 no programa MarvinSketch.

3.5.1. Modelo de homologia para a α -glucosidase

Devido à indisponibilidade da estrutura 3D da α -glucosidase da *Saccharomyces cerevisiae*, criou-se um modelo de homologia através do Swiss-MODEL, de acordo com o descrito na literatura (Leong *et al.*, 2017; Proença *et al.*, 2017; Xu, 2010). A construção do modelo de homologia da α -glucosidase de levedura *Saccharomyces cerevisiae* iniciou-se com a busca da sequência de aminoácidos da α -glucosidase (maltase, MAL32) da levedura (UniProt P38158), contendo 584 resíduos. A busca do *template* foi realizada através do BLAST e HHBlits contra a biblioteca estrutural do SWISS-MODEL, resultando em um total de 174 *templates*. Para cada *template* identificado, a sua

qualidade foi prevista através do alinhamento alvo-*template*. Aqueles com maior qualidade foram selecionados para a construção do modelo. A proteína isomaltase/ α -metilglucosidase (PDB ID: 3AJ7) possui 72,51% de similaridade com a sequência inserida e uma resolução da estrutura de raio-X de 1,30 Å, sendo então utilizada como *template*. O modelo foi construído através do ProMod3. A estrutura resultante, nomeada AGS, possui uma Estimativa Global da Qualidade do Modelo (GMQE) de 0,92 e um RMSD de 9,57, calculado pelo *RMSD Calculator* do VMD.

A estrutura foi posteriormente validada pelo servidor RAMPAGE através do gráfico de Ramachandran, contendo apenas um resíduo fora da região permitida, o que foi considerado aceitável e reforça a qualidade do modelo.

Devido à ausência de ligandos no *template* o modelo de homologia foi sobreposto com a isomaltase complexada com a isomaltose (PDB ID: 3AXH). Sabendo-se que a acarbose inibe a α -glucosidase a partir da sua ligação no mesmo sítio do substrato, a sobreposição das cavidades foi considerada válida.

3.5.2. Docking molecular

Os estudos em *docking* molecular foram realizados usando-se o GOLD (*Genetic Optimization Ligand Docking*), que permite uma flexibilização parcial da proteína e uma flexibilidade total do ligando (Azam *et al.*, 2012). Durante a configuração da proteína, adicionaram-se todos os hidrogénios à estrutura cristalina. As configurações do algoritmo genético (GA) foram mantidas no Automático, com eficiência de busca de 100%, contando com até 100,000 operações. Os ligandos foram inseridos na cavidade ativa dos alvos moleculares selecionados a partir de uma esfera de 6 Å de diâmetro centrada no ligando cocrystalizado.

Devido à sua praticidade e velocidade nos cálculos, a função de pontuação escolhida foi a ChemPLP. Esta função usa o termo de ligação de hidrogénio presente na função ChemScore e inclui múltiplos potenciais lineares para modelar termos de van der Waals e termos repulsivos. Apesar da sua rapidez, diversos testes de validação mostraram que esta função é geralmente mais eficaz que outras funções existentes.

As proteínas utilizadas para os ensaios foram retiradas do *Protein Data Bank* (PDB, disponível em <https://www.rcsb.org/>) de acordo com a sua resolução cristalográfica e referências na literatura. De modo a avaliar os efeitos dos compostos sobre os principais alvos relacionados com a diabetes, foram selecionadas as proteínas α -glucosidase lisossomal ácida (GAA) de *Homo sapiens* (PDB ID: 5NN8) e a α -glucosidase MAL32

construída por modelo de homologia (nomeada aqui de AGS) da *Saccharomyces cerevisiae*.

A presença de moléculas de água durante o cálculo de *docking* podem ser ou não consideradas e tem grande importância na precisão na previsão da ligação entre a enzima e um determinado ligando. Isto deve-se, principalmente, à capacidade destas moléculas mediarem e criarem uma rede de ligações de hidrogênio que podem estabilizar o complexo proteína-ligando (Roberts e Mancera, 2008). A decisão de considerar estas moléculas varia, dependendo da contribuição comprovada de determinadas moléculas presentes na cavidade para a estabilidade da ligação entre o ligando e a enzima e, conseqüentemente, para a atividade de um determinado fármaco. Porém, como o *docking* também procura a melhor interação ligando-enzima, a presença destas moléculas pode intervir nesta previsão, pois podem ocupar espaços que antes seriam ocupados pelo ligando de interesse. Ainda assim, devido à presença destas moléculas próximas à cavidade de ligação, com ligações mais fortes que aquelas que estão ao redor da enzima e por poderem participar ativamente da ligação, estas moléculas foram consideradas sempre que possível para avaliar a sua contribuição para a estabilidade da ligação.

Para a GAA, foram visualizadas pelo *Protein Data Bank* as moléculas de água próximas à cavidade de ligação e estas moléculas foram extraídas e utilizadas para o cálculo do *docking*. As moléculas de água foram colocadas em modo *toggle*, permitindo que o GOLD avalie a importância da presença de cada molécula de água dependendo da sua contribuição para a estabilidade da ligação entre o ligando e a enzima.

Devido à ausência de moléculas de água próximas ao sítio de ligação da proteína utilizada para o modelo de homologia da α -glucosidase de levedura e devido à exclusão das moléculas de água presentes no *template* pelo Swiss-MODEL, nenhuma molécula de água foi considerada para o *docking* da proteína AGS.

3.6. Análise qualitativa dos fitoconstituintes por cromatografia de camada fina

De modo a avaliar a presença de compostos fenólicos no extrato e na fração de flavonóides, prosseguiu-se com a análise por cromatografia de camada fina (TLC).

Numa placa de TLC de sílica gel 60 F₂₅₄ foram aplicados dois pontos contendo 10 e 5 μ L de soluções aquosas de extrato deslipidificado da *C. citratus* e da fração contendo flavonóides. A placa foi desenvolvida em uma solução contendo acetato de etilo, metanol e água em uma razão de 15:2:1. Após o desenvolvimento da placa, a mesma

foi seca com ar frio até remoção completa do solvente. As placas foram visualizadas sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm.

3.7. Ensaio colorimétrico para avaliação da inibição da α -glucosidase

A atividade inibitória dos fitoconstituintes da *C. citratus* foi determinada através da ação do extrato e da fração de flavonóides sobre a α -glucosidase da *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados foram comparados com a atividade do inibidor padrão, acarbose. De modo a comparar o potencial inibitório da fração de flavonóides com os flavonóides puros, o ensaio também foi realizado com dois padrões, luteolina-7-O- β -glucopiranosídeo (L7OG) e isoorientina, ambos dissolvidos em metanol.

O ensaio de atividade foi baseado nos procedimentos da literatura para o ensaio bioautográfico (Simões-Pires *et al.*, 2009) e no ensaio descrito por Saleem Ali-Shtayeh e colaboradores (2014) para a avaliação da inibição da acetilcolinesterase (AChE) por extratos de plantas, com algumas alterações.

Uma solução estoque de α -glucosidase foi preparada dissolvendo-se 11,4 mg da enzima em 25,00 mL de tampão (17,003 g de acetato de sódio tri-hidratado em 250,00 mL de ácido acético 0,2 M até pH 7,0), dividida em frações de 1,0 mL e refrigeradas a 0°C. Uma solução 1,0 mg/mL de α -naftil-D-glucopiranosídeo foi preparada dissolvendo-se 1,0 mg do substrato em 1,00 mL de uma mistura etanol/água (1:1) levemente aquecida até dissolução completa. Em uma placa multiwell de 96 poços foram aplicados 10,0 μ L de amostra, 10,0 μ L de substrato, 50,0 μ L de enzima e 190,0 μ L de tampão pH 7,1. A placa foi então incubada a 37°C por 30 min em ambiente húmido. Após este intervalo, 10,0 μ L de uma solução 2,5 mg/mL de cromóforo *Fast Blue Salt B* foram aplicados a cada poço, observando-se em poucos segundos a alteração da coloração. A mudança de coloração ocorre devido à reação do cromóforo com o produto da reação do substrato com a enzima, formando um sal de diazônio, conforme ilustrado na Figura 11. Para cada ensaio, foram realizados dois controlos, contendo água no lugar da amostra, e um branco, contendo água no lugar da amostra e do *Fast Blue Salt B*. Um branco da amostra também foi medido, com os mesmos reagentes, à exceção do cromóforo. Após a adição do cromóforo, a placa foi imediatamente analisada por um leitor de placas com um filtro de comprimento de onda à 620 nm. Os ensaios foram realizados de maneira independente. As concentrações das amostras (em μ g/mL) estão descritas na Tabela 5, onde logC representa o logaritmo da concentração de cada amostra presente no meio reacional. A gama de concentrações escolhida foi baseada levando-se em consideração a absorvância medida, de forma que seus valores fossem

abaixo de 1,0, e os valores estimados de IC₅₀, de modo a ser possível calcular o mesmo a partir dos gráficos obtidos.

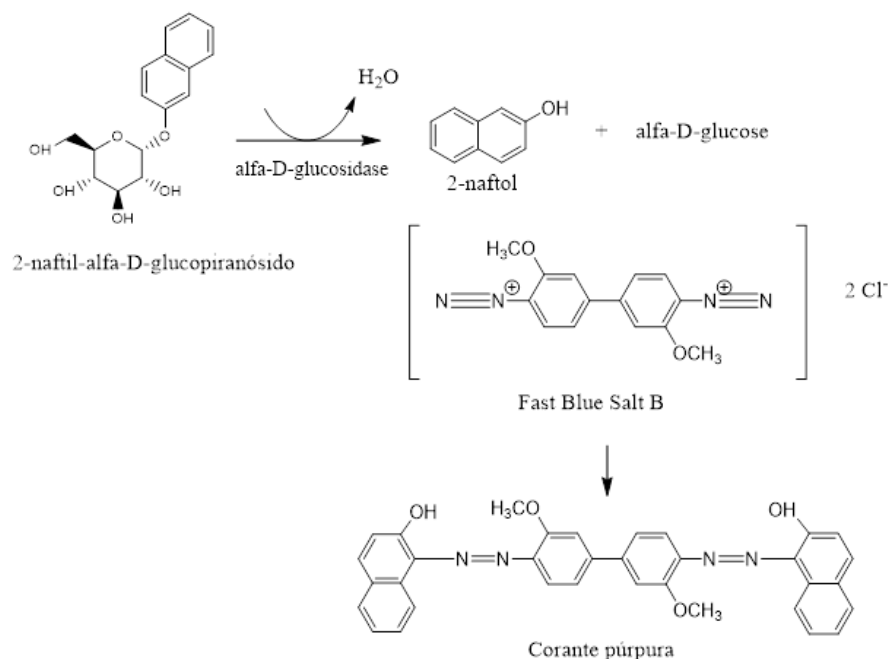


Figura 11. Esquema de reação do cromóforo Fast Blue Salt B com o produto da reação enzimática.

Tabela 5. Concentração (em $\mu\text{g/mL}$) e log da concentração (logC) das amostras utilizadas nos ensaios enzimáticos.

Acarbose		Extrato		Fração		L7OG e isoorientina	
Conc.	logC	Conc.	logC	Conc.	logC	Conc.	logC
15360	2,7714	1280	1,6922	250	0,9830	112,5	0,6362
30720	3,0724	2560	1,9933	500	1,2840	225	0,9372
38400	3,1694	3200	2,0902	800	1,4881	450	1,2382
48000	3,2663	6400	2,3912	1000	1,5850	600	1,3632
60000	3,3632	8000	2,4881	2000	1,8861	800	1,4881
80000	3,4881	10000	2,5850	4000	2,1871	1000	1,5850

3.8. Tratamento estatístico de dados

A análise estatística dos dados foi realizada pelo programa GraphPad Prism, versão 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA), utilizando-se *One-way* ANOVA e teste de Bonferroni's para comparação entre amostras.

Os ensaios enzimáticos foram realizados de maneira independente, em três dias diferentes. A determinação do IC₅₀ das amostras foi realizada a partir dos cálculos realizados sobre a sigmoide obtida através da curva dose resposta (log da concentração

Métodos Experimentais

versus porcentagem de inibição) com regressão não linear de curva variável. Os *outliers* identificados foram automaticamente descartados pelo programa no tratamento de dados.

4. Resultados e Discussão

4.1. Seleção dos alvos farmacológicos dos flavonóides do *Cymbopogon citratus*

A ferramenta PASS *online* fornece um ficheiro com diversas atividades e respetivos valores de Pa/Pi. Os alvos foram selecionados levando-se em consideração dois critérios principais: facilidade e possibilidade da validação por meio de teste *in vitro* e maior relação Pa/Pi. Dos resultados obtidos, escolheram-se os alvos com maior relação Pa/Pi e cuja validação experimental fosse possível de maneira rápida e eficiente. Para cada composto testado, os valores de Pa/Pi para cada respetiva doença estão listados na Tabela 6.

Tabela 6. Possíveis atividades biológicas dos flavonóides da *Cymbopogon citratus*.

Classe	Nome	Pa	Pi	Alvo/Ação farmacológica	
C-O-diglicosilados	2"-O-ramnosil isoorientina	0,854	0,001	Inibidor da α -glucosidase	
		0,687	0,002	Inibidor da HIF1A	
		0,783	0,005	Antidiabético	
	Cassiaoccidentalina B	0,823	0,010	Inibidor da expressão da HIF1A	
		0,607	0,002	Inibidor da α -glucosidase	
		0,257	0,039	Inibidor da α -amilase	
	Kurilesina A	0,839	0,001	Inibidor da α -glucosidase	
		0,776	0,013	Inibidor da expressão da HIF1A	
		0,241	0,043	Inibidor da α -amilase	
	Carlinósido		0,891	0,006	Inibidor da expressão da HIF1A
			0,794	0,001	Inibidor da α -glucosidase
			0,225	0,048	Inibidor da α -amilase
Isoorientina		0,922	0,004	Inibidor da expressão da HIF1A	
		0,767	0,001	Inibidor da α -glucosidase	
		0,407	0,015	Inibidor da α -amilase	
C-glicosilados	Isoshaftósido	0,887	0,006	Inibidor da expressão da HIF1A	
		0,790	0,001	Inibidor da α -glucosidase	
		0,259	0,039	Inibidor da α -amilase	
	Orientina	0,940	0,004	Inibidor da expressão da HIF1A	
		0,772	0,001	Inibidor da α -glucosidase	
		0,374	0,019	Inibidor da α -amilase	
Swertiajaponina	0,900	0,005	Inibidor da expressão da HIF1A		
	0,575	0,002	Inibidor da α -glucosidase		
	0,319	0,027	Inibidor da α -amilase		

Tabela 6. Possíveis atividades biológicas dos flavonóides do *Cymbopogon citratus* (cont.).

Classe	Nome	Pa	Pi	Alvo/Ação farmacológica
O-glicosilados	Cinarósido	0,904	0,005	Inibidor da expressão da HIF1A
		0,852	0,001	Inibidor da α -glucosidase
		0,514	0,005	Inibidor da α -amilase
	Isoscoparina	0,897	0,006	Inibidor da expressão da HIF1A
		0,810	0,001	Inibidor da α -glucosidase
		0,454	0,009	Inibidor da α -amilase
	L7OG	0,904	0,005	Inibidor da expressão da HIF1A
		0,852	0,001	Inibidor da α -glucosidase
		0,514	0,005	Inibidor da α -amilase
	Luteolina 7-O-neohesperidósido	0,891	0,001	Inibidor da α -glucosidase
		0,868	0,008	Inibidor da expressão da HIF1A
		0,488	0,006	Inibidor da α -amilase
Genina	Apigenina	0,249	0,004	Inibidor da α -glucosidase
		0,963	0,003	Inibidor da expressão da HIF1A
		0,176	0,070	Inibidor da α -amilase
	Canferol	0,969	0,002	Inibidor da expressão da HIF1A
		0,248	0,004	Inibidor da α -glucosidase
		0,136	0,103	Inibidor da α -amilase
	Luteolina	0,964	0,003	Inibidor da expressão da HIF1A
		0,275	0,004	Inibidor da α -glucosidase
		0,136	0,103	Inibidor da α -amilase
	Quercetina	0,969	0,002	Inibidor da expressão da HIF1A
		0,273	0,004	Inibidor da α -glucosidase
		N/D	N/D	N/D

De todas as atividades previstas no programa *PASS*, três atividades aparecem com maior frequência, sendo estas a inibição da expressão da HIF1A, a inibição da enzima α -glucosidase e inibição da enzima α -amilase. As duas últimas são consideradas os principais alvos farmacológicos para o tratamento da diabetes e contam com medicamentos já na clínica, como a acarbose.

A partir destes resultados, pôde-se prever que todos os compostos glicosilados possuem um valor previsto de atividade para a inibição da α -glucosidase muito maior em relação àqueles não-glicosilados. Estes resultados são interessantes, tendo em vista os poucos estudos acerca dos flavonóides glicosilados, sendo em sua maior parte sobre as suas geninas. Além disso, muitos dos fitoconstituintes da *C. citratus* pertencentes a esta classe de compostos não tiveram a sua atividade comprovada nestes alvos moleculares, como carlinósido, kurilesina A, cassiaocidentalina B, swertiajaponina e

isoshaftósido. Tal comprovação permite o isolamento guiado destes compostos e uma busca mais rápida e eficiente para novos compostos com atividade terapêutica.

De modo a validar as atividades previstas, prosseguiu-se com os ensaios em *docking* molecular para a previsão da ligação entre os fitoconstituintes da *C. citratus* e ensaios *in vitro* para a enzima α -glucosidase da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

4.2. Ensaio *in silico*

4.2.1. Previsão das propriedades físico-químicas

As propriedades físico-químicas (Tabela 7), lipofilicidade (Tabela 8), propriedades farmacocinéticas (Tabela 9), características de *druglikeness* (Tabela 10) e facilidade sintética dos fitoconstituintes da *Cymbopogon citratus* previstas pelo SwissADME estão descritos a seguir. O gráfico BOILED-egg para todos os compostos estudados está descrito na Figura 12.

Numa primeira abordagem, é possível notar que os compostos com melhores propriedades farmacocinéticas são as geninas, com melhores capacidades de absorção gastrointestinal quando comparadas aos compostos glicosilados. Isto é esperado devido ao aumento da massa e do volume molecular ocorrido pela presença dos glicósidos, além da perda da configuração planar dos flavonóides. Os flavonóides glicosilados são, na sua maioria, substratos da glicoproteína-P, o que diminui ainda mais sua biodisponibilidade no interior das células. Dos 16 flavonóides estudados, 8 se encontram fora da faixa do gráfico, podendo indicar baixa absorção.

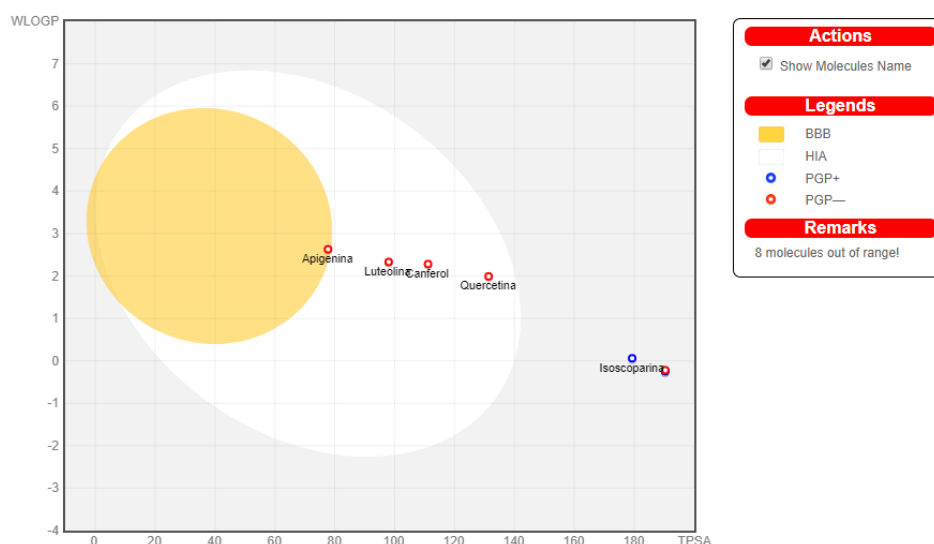


Figura 12. Gráfico BOILED-egg para os flavonóides da *Cymbopogon citratus*.

Tabela 7. Propriedades físico-químicas dos flavonóides da *Cymbopogon citratus*.

Molécula	MM	Fr. Csp3	#L. Rot.	#Ace.	#Doad.	TPSA
2"-O-ramnosil isoorientina	594,52	0,44	5	15	10	260,20
Cassiaocidentalina B	576,5	0,41	4	14	8	236,81
Kurilesina A	564,49	0,42	4	14	9	239,97
Carlinósido	580,49	0,42	4	15	11	271,20
Isoorientina	448,38	0,29	3	11	8	201,28
Isoshaftósido	564,49	0,42	4	14	10	250,97
Orientina	448,38	0,29	3	11	8	201,28
Swertiajaponina	462,4	0,32	4	11	7	190,28
Cinarósido	448,38	0,29	4	11	7	190,28
Isoscoparina	462,4	0,32	5	11	6	179,28
L7OG	448,38	0,29	4	11	7	190,28
Luteolina-7-O-neohesperidósido	594,52	0,44	6	15	9	249,20
Apigenina	268,26	0,06	1	4	3	77,76
Canferol	286,24	0	1	6	4	111,13
Luteolina	284,26	0,06	1	5	4	97,99
Quercetina	302,24	0	1	7	5	131,36
Acarbose	645,6	0,92	9	19	14	321,17

MM = Massa molecular, **Fr. Csp3** = fração Csp3, **#L. Rot.** = nº de ligações rotacionáveis, **#Ace.** = nº de átomos aceitadores de ligação-H, **#Doad.** = nº de átomos doadores de ligação-H, **TPSA** = área de superfície topológica polar

Tabela 8. Parâmetros de lipofilicidade calculados para os flavonóides da *C. citratus*.

Molécula	iLOGP	XLOGP3	WLOGP	MLOGP	Silicos-IT Log P	Consensus Log P
2"-O-Ramnosil-Isoorientina	1,93	-1,24	-1,68	-3,83	-1,66	-1,3
Cassiaocidentalina B	1,76	-0,32	-0,44	-3,17	-0,47	-0,53
Kurilesina A	1,6	-1,18	-1,04	-3,29	-1,18	-1,02
Carlinósido	1,42	-2,54	-2,7	-4,44	-1,79	-2,01
Isoorientina	2,12	-0,15	-0,53	-2,51	-0,14	-0,24
Isoshaftósido	1,41	-2,19	-2,4	-3,97	-1,32	-1,7
Orientina	1,27	-0,15	-0,53	-2,51	-0,14	-0,41
Swertiajaponina	1,81	0,18	-0,22	-2,29	0,4	-0,02
Cinarósido	1,83	1,46	-0,24	-2,1	-0,12	0,16
Isoscoparina	2,66	1,79	0,06	-1,89	0,42	0,61
L7OG	1,83	1,46	-0,24	-2,1	-0,12	0,16
Luteolina-7-O-neohesperidósido	0,96	0,36	-1,39	-3,43	-1,64	-1,03

Tabela 8. Parâmetros de lipofilicidade calculados para os flavonóides da *C. citratus* (cont.).

Molécula	iLOGP	XLOGP3	WLOGP	MLOGP	Silicos-IT Log P	Consensus Log P
Apigenina	1,89	2,89	2,63	1,44	2,67	2,3
Canferol	1,7	1,9	2,28	-0,03	2,03	1,58
Luteolina	1,72	2,54	2,33	0,88	2,17	1,93
Quercetina	1,63	1,54	1,99	-0,56	1,54	1,23
Acarbose	-0,35	-8,53	-8,56	-6,94	-7,69	-6,41

Tabela 9. Propriedades farmacocinéticas dos flavonóides da *C. citratus*.

Molécula	Absorção GI	BBB permeável	Substrato da P-gp
2"-O-Ramnosil-Isoorientina	Baixo	Não	Sim
Cassiaocidentalina B	Baixo	Não	Sim
Kurilesina A	Baixo	Não	Sim
Carlinósido	Baixo	Não	Não
Isoorientina	Baixo	Não	Não
Isoshaftósido	Baixo	Não	Sim
Orientina	Baixo	Não	Não
Swertiajaponina	Baixo	Não	Não
Cinarósido	Baixo	Não	Sim
Isoscoparina	Baixo	Não	Sim
L7OG	Baixo	Não	Sim
Luteolina-7-O-neohesperidósido	Baixo	Não	Sim
Apigenina	Alto	Sim	Não
Canferol	Alto	Não	Não
Luteolina	Alto	Não	Não
Quercetina	Alto	Não	Não
Acarbose	Baixo	Não	Sim

Tabela 10. Propriedades *druglikeness* dos flavonóides da *C. citratus*.

Molécula	#Violações					Biodisp.
	Lipinski	Ghose	Veber	Egan	Muegge	
2"-O-Ramnosil-Isoorientina	3	4	1	1	3	0,17
Cassiaocidentalina B	3	3	1	1	3	0,17
Kurilesina A	3	3	1	1	3	0,17
Carlinósido	3	3	1	1	4	0,17

Tabela 10. Propriedades *druglikeness* dos flavonóides da *C. citratus* (cont.).

Molécula	#Violações					Biodisp.
	Lipinski	Ghose	Veber	Egan	Muegge	
Isoorientina	2	1	1	1	3	0,17
Isoshaftósido	3	3	1	1	4	0,17
Orientina	2	1	1	1	3	0,17
Swertiajaponina	2	0	1	1	3	0,17
Cinarósido	2	0	1	1	3	0,17
Isoscoparina	2	0	1	1	3	0,17
L7OG	2	0	1	1	3	0,17
Luteolina-7-O-neohesperidósido	3	4	1	1	3	0,17
Apigenina	0	0	0	0	0	0,55
Canferol	0	0	0	0	0	0,55
Luteolina	0	0	0	0	0	0,55
Quercetina	0	0	0	0	0	0,55
Acarbose	3	4	1	1	5	0,17

Tabela 11. Características químicas medicinais e acessibilidade sintética dos flavonóides da *C. citratus*.

Molécula	PAINS #alertas	Brenk #alertas	Leadlikeness #violações	Acessibilidade Sintética
2"-O-Ramnosil-Isoorientina	1	1	1	6,39
Cassiaocidentalina B	1	1	1	6,18
Kurilesina A	1	1	1	6,16
Carlinósido	1	1	1	6,22
Isoorientina	1	1	1	5,04
Isoshaftósido	0	0	1	6,18
Orientina	1	1	1	5,17
Swertiajaponina	1	1	1	5,12
Cinarósido	1	1	1	5,17
Isoscoparina	0	0	1	5,28
L7OG	1	1	1	5,17
Luteolina-7-O-neohesperidósido	1	1	1	6,37
Apigenina	1	0	0	2,92
Canferol	0	0	0	3,14
Luteolina	2	1	0	3,00
Quercetina	1	1	0	3,23
Acarbose	0	1	2	7,34

Os resultados previstos para ADME dos fitoconstituintes da *C. citratus* demonstram com clareza as diferenças das propriedades físico-químicas entre as geninas e seus respectivos derivados glicosilados. Sabe-se que a glicosilação destes compostos conferem diferentes propriedades quanto ao seu metabolismo, estabilidade e atividades biológicas, dependendo do número e tipo de açúcar ligados.

Os flavonóides existem, maioritariamente, na forma glicosilada. Após ingeridos, passam por diversas etapas metabólicas que hidrolisam a ligação glicosídica e produzem a respetiva aglicona, que irá finalmente ser absorvida no intestino delgado. Entretanto, estas etapas metabólicas e seus respetivos produtos dependem da ligação glicosídica existente. Para os O-monoglicosilados, a metabolização envolve a hidrólise por enzimas ou degradação por bactérias existentes no intestino, redução e então a conjugação da fase II para formar flavonóides O-glucoronídeo e O-sulfato no fígado. Para esta classe de compostos, especificamente, os efeitos biológicos observados podem estar associados aos metabolitos produzidos na fase de conjugação, ao invés dos compostos O-glicosilados em si (Murota, Nakamura e Uehara, 2018).

No caso dos C-glicósidos, a ligação C-C entre o flavonóide e o grupo açúcar é mais estável, o que impossibilita a hidrólise pela β -glucosidase presente no intestino, fazendo com que a metabolização desta classe de compostos seja dada principalmente pela microbiota intestinal. De modo geral, os flavonóides C-monoglicosilados são mal absorvidos no trato gastrointestinal. Estima-se que apenas cerca de 10% dos glicósidos de flavonóides ingeridos são absorvidos no trato gastrointestinal superior. Alguns estudos reportam que C-monoglicósidos de flavonas, como orientina, isovitexina, homoorientina e isovitexina foram mal absorvidos no trato gastrointestinal de ratos, chegando ao colon e excretados nas fezes após 24 h (Murota, Nakamura e Uehara, 2018; Xiao *et al.*, 2016).

Porém, alguns artigos demonstram que os flavonóides C-multiglicosilados são absorvidos de forma inalterada e passam pela circulação entero-hepática, sendo distribuídos para outros tecidos. Flavonóides desta classe, como vitexina 4-O-glucósido e vitexina 2"-O-ramnósido, mostraram ser absorvidos rapidamente no plasma com picos de concentração após 0,75 h de administração, sendo rapidamente distribuídos nos rins e fígado, e eliminados após 12 h (Ma *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010).

Quanto ao fármaco de referência, sabe-se que a biodisponibilidade da acarbose é baixa, devido à sua degradação ao longo do trato gastrointestinal pelas bactérias do intestino e a pequena quantidade do fármaco que alcança a circulação sistémica é depurada pelos rins (Goodman e Gilman, 2013). Além disso, de acordo com os dados

experimentais obtidos no *DrugBank*, o valor de log P para este fármaco é de -6,8, o que está de acordo com a média dos valores de log P calculados (*consensus log P*) de -6,41.

Todavia, apesar da baixa biodisponibilidade prevista para este fármaco e para os flavonóides em estudo, não há necessidade de os mesmos serem absorvidos ou de ultrapassarem membranas, pois a α -glucosidase encontra-se nas paredes do lúmen do intestino.

Portanto, a partir do tipo de perfil de metabolização existente para estas classes de compostos e, em conjunto com os dados obtidos, sugere-se que os compostos C-diglicosilados sejam mais estáveis à metabolização e terão maior biodisponibilidade em relação às agliconas, e aos C- e O-monoglicósidos. Além disso, todos os glicósidos avaliados possuem perfil de propriedades físico-químicas semelhantes ao fármaco de referência acarbose, o que pode sugerir um perfil de absorção e biodisponibilidade semelhante.

4.2.2. Docking molecular

Os resultados do docking molecular para a α -glucosidase lisossomal humana (PDB ID: 5NN8) e para a α -glucosidase da levedura (AGS) estão descritos na Tabela 12.

Tabela 12. Docking molecular dos flavonóides da *Cymbopogon citratus* para a α -glucosidase lisossomal (PDB ID: 5NN8) e de levedura (AGS)

Classe	Nome	Score	
		5NN8	AGS
C-O-diglicosilados	2"-O-Ramnosil Isoorientina	87,16	50,59
	Cassiaocidentalina B	79,67	64,17
	Kurilesina A	85,97	75,04
C-glicosilados	Carlinósido	80,98	59,58
	Isoorientina	77,73	58,53
	Isoshaftósido	93,39	72,89
	Orientina	81,99	67,72
	Swertiajaponina	72,45	57,17
O-glicosilado	Cinarósido	90,34	56,26
	Isoscoparina	84,75	84,95
	L7OG	101,83	64,67
	Luteolina 7-O-neohesperidósido	99,68	71,83
Genina	Apigenina	70,15	47,27
	Canferol	68,55	49,40
	Luteolina	73,91	51,79
	Quercetina	72,27	53,56

Tabela 13. Docking molecular dos flavonóides da *Cymbopogon citratus* para a α -glucosidase lisossomal (PDB ID: 5NN8) e de levedura (AGS) (cont.).

Classe	Nome	Score	
		5NN8	AGS
Referência	Acarbose	113,83	85,15

A qualidade do *docking* foi avaliada através do cálculo do desvio quadrático médio (RMSD) entre a posição da estrutura do ligando co-cristalizado e da posição do ligando obtido no *docking*. O cálculo foi realizado através do programa *Discovery Studio Visualizer* 2017.

Para a α -glucosidase lisossomal (PDB ID: 5NN8), o valor de RMSD entre o ligando co-cristalizado (acarbose) e o obtido no *docking* é de 2,6428 Å (Figura 13 - A). A análise da estrutura cristalizada permite visualizar que a acarbose se liga ao sítio ativo da enzima através da sua unidade acarvosina, que compreende os dois primeiros anéis do terminal não redutor da molécula, interagindo com resíduos próximos como His674, Asp404, Asp282, Asp616 e Arg600, enquanto as unidades de glicose quase não interagem com resíduos próximos (Figura 14). Se considerarmos apenas a unidade acarvosina, verificamos que o RMSD é de 0,8323 Å, sendo a maior parte do desvio, portanto, dos dois anéis de glicósido, que não são essenciais para a ligação e, conseqüentemente, para a sua atividade (Figura 13 - B).

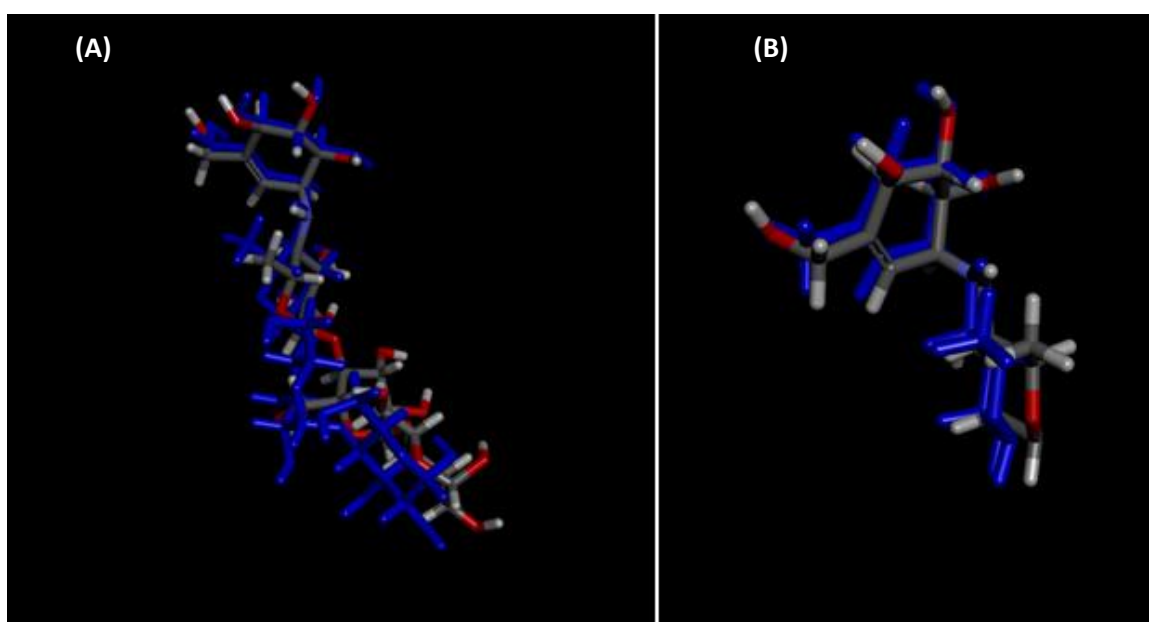


Figura 13. (A) Sobreposição das estruturas da acarbose co-cristalizada, em azul, e da obtida em docking. (B) Sobreposição da unidade acarvosina das duas estruturas.

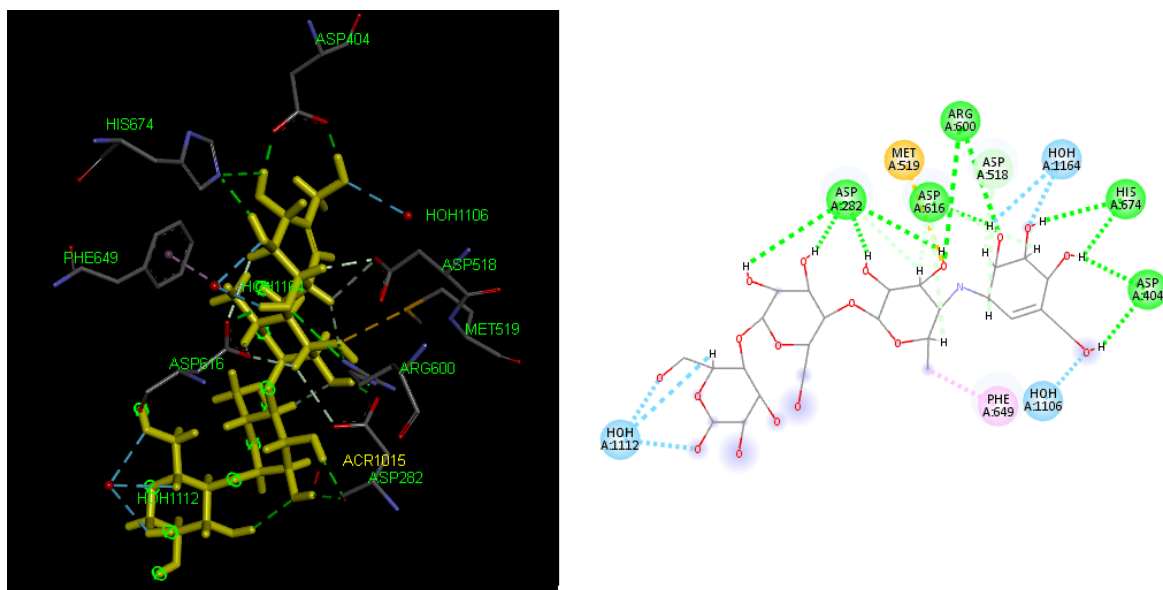


Figura 14. Interações entre o ligando de referência (amarelo) e os resíduos da α -glucosidase lisossomal

Para a α -glucosidase de levedura, o ligando de referência utilizado foi o mesmo do *template* (PDB ID: 3AJ7), isomaltose, e o valor de RMSD entre as duas estruturas foi de 6,5257 Å. Apesar do alto valor de RMSD, a pose obtida para o ligando ainda permite a ligação do mesmo com os principais resíduos da cavidade ativa da enzima, como Asp68, His111, Arg212, Asp214, His348, Asp349 e Arg439 (Figura 15).

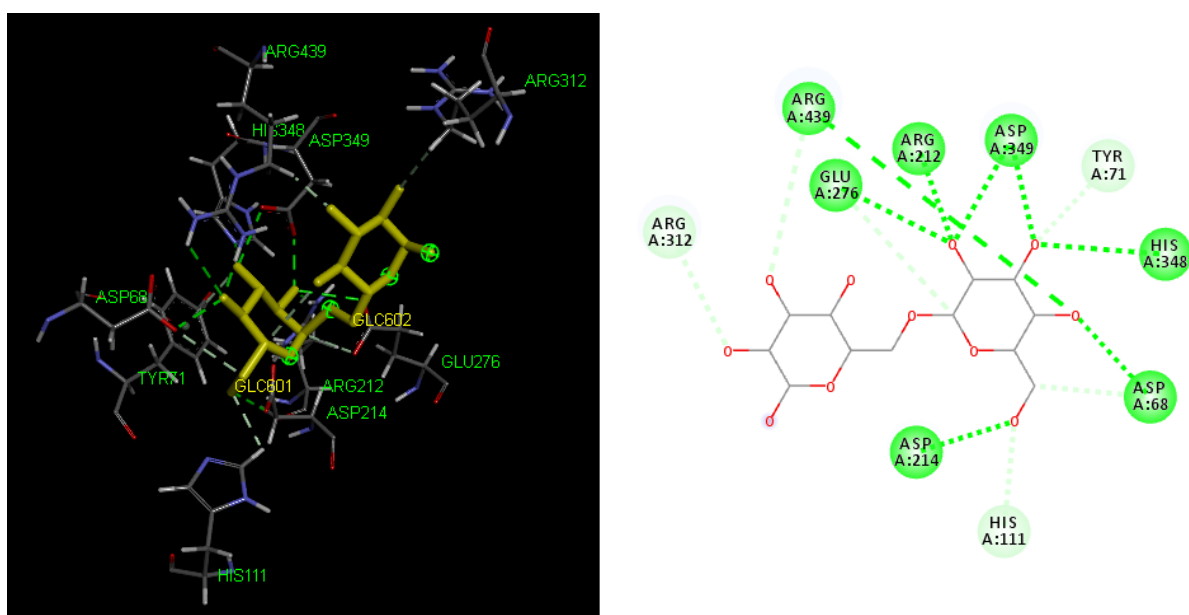


Figura 15. Interações entre a isomaltose e os resíduos da proteína obtida por modelo de homologia.

Devido à alteração do resíduo Glu411 presente no *template* para o resíduo Asp408 no modelo, o ligando fica impossibilitado de interagir com o grupo carboxilato do ácido glutâmico, resultando em menor estabilidade na interação com a enzima e influenciando a pose obtida. Como as ligações com os principais resíduos não foram diferentes entre as duas estruturas, o *docking* foi considerado válido (Figura 16).

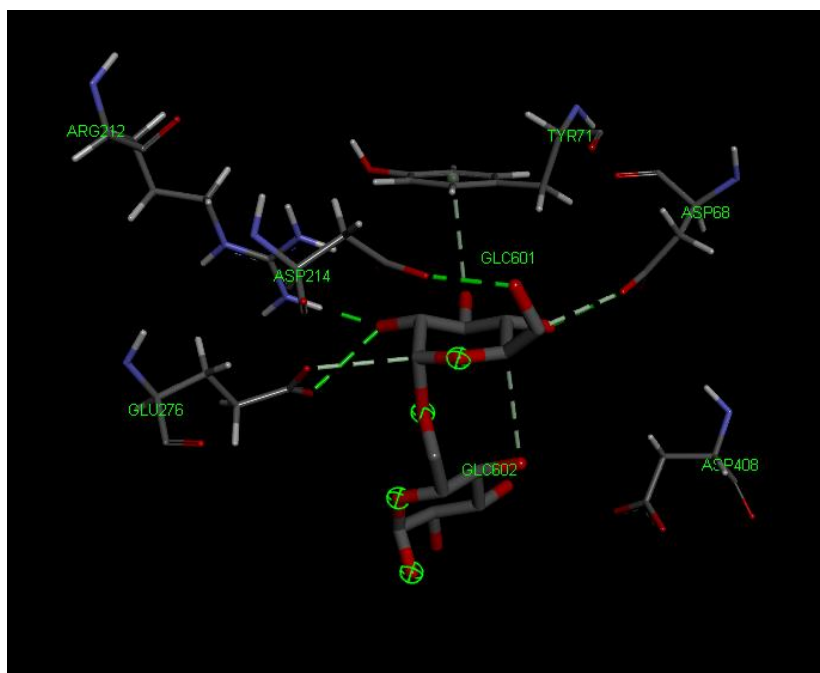


Figura 16. Alteração do resíduo Glu411 para Asp408 impede a interação entre o ligando e o resíduo do modelo obtido por homologia.

4.2.2.1. *Docking sobre α -glucosidase lisossomal*

Entre os compostos C-O-diglicosilados, os diferentes grupos açúcar ligados à aglicona conferem conformações que podem ser mais ou menos favoráveis à estabilidade da interação enzima-ligando. No caso da 2''-O-ramnosil isoorientina, a conformação dos glicósidos permite a interação com resíduos mais internos como a Arg600 e Asp616, os mesmos que interagem com a acarbose, além de outros resíduos como Asp518 (Figura 17).

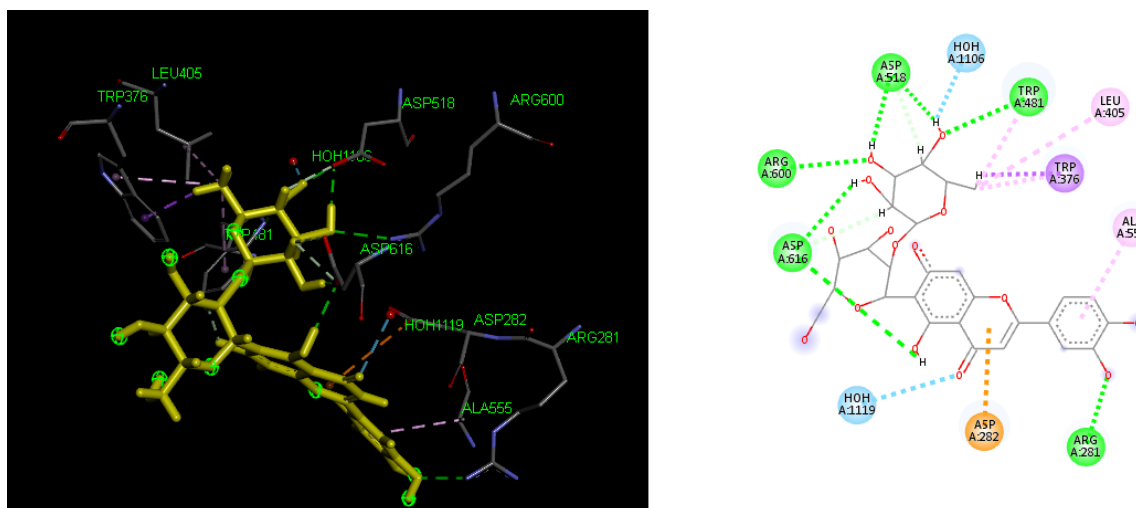


Figura 17. Interações entre o ligando 2''-O-ramnosil isoorientina e os resíduos da α -glucosidase lisossomal.

Outros compostos do mesmo grupo, cassiaocidentalina B e kurilesina A, apresentam posições que impedem as interações com os resíduos internos da proteína, deixando os grupos açúcar voltados para fora da cavidade. Estas posições conferem menor estabilidade de ligação, quando comparados com a 2''-O-ramnosil isoorientina e, conseqüentemente, menor pontuação no *docking*. O ligando kurilesina A é capaz de interagir com outros resíduos como Arg281, Asp282 e Trp481, o que conferem maior estabilidade quando comparada com a cassiaocidentalina B (Figura 18).

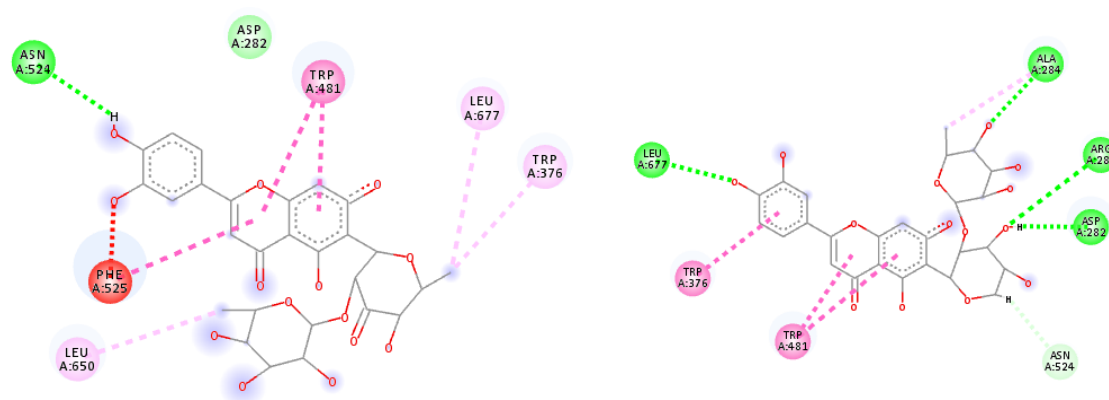


Figura 18. Interações entre os ligandos cassiaocidentalina B (esquerda) e kurilesina A (direita) e a enzima.

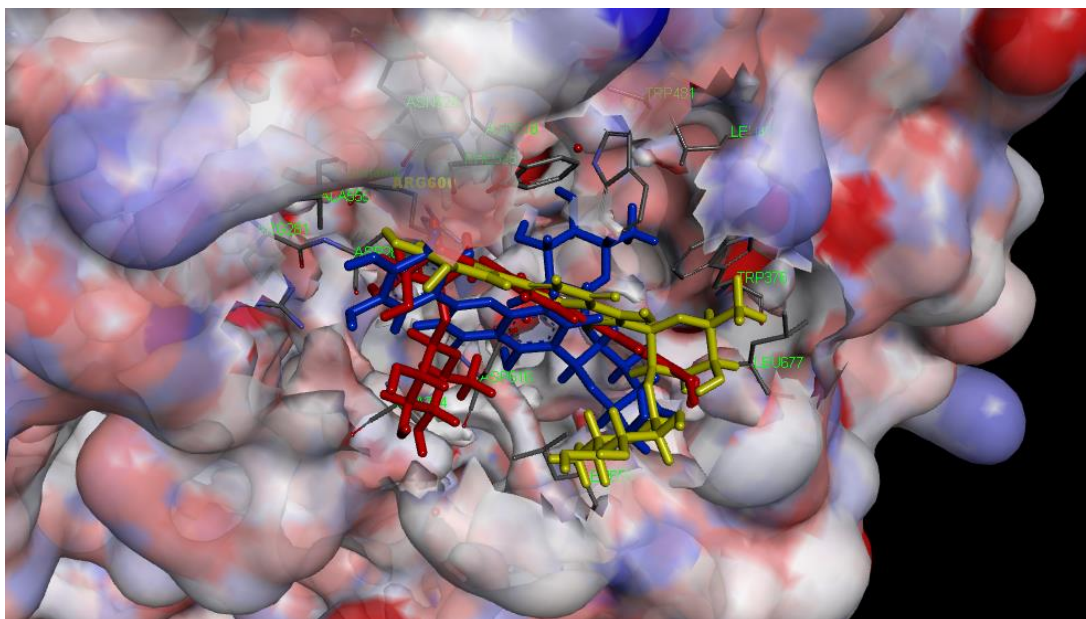


Figura 19. Posições previstas para os ligando C-O-diglicosilados, 2''-O-ramnosil isoorientina (azul), cassiaocidentalina B (amarelo) e kurilesina A (vermelho).

Os compostos do grupo dos C-glicosilados apresentam pontuações diferentes de acordo com a posição da glicosilação na estrutura. As flavonas isoshaftósido e carlinósido apresentam dois grupos glicosilo ligados, cada um, nas posições C-6 e C-8 do anel A que favorecem as interações com diversos resíduos ao redor da cavidade catalítica. Enquanto o carlinósido é capaz de interagir apenas com His674, Asp518 e 616, o isoshaftósido é capaz de interagir com todos os resíduos que fazem ligação com a acarbose, além de interagir também com Asp518 e Trp481 (Figura 20). Este efeito deve-se, provavelmente, à estrutura do grupo glicosilo ligado nas diferentes posições. Entre as flavonas C-monoglicosiladas, a isoorientina e swertiajaponina apresentam menor pontuação em relação à orientina, sendo a principal diferença a posição da ligação do grupo glicosilo. A orientina possui um grupo glicosilo na posição C-8 que permite a interação com o resíduo Leu677, enquanto os grupos hidroxilos do anel B interagem com os resíduos internos His674 e Asp404. Os compostos restantes, glicosilados na posição C-6, estão orientados de forma que o grupo glicosilo esteja direcionado para dentro da cavidade catalítica, fazendo com que os grupos hidroxilo responsáveis pela interação com os resíduos internos sejam provenientes do açúcar, o que torna a ligação de hidrogênio mais fraca devido à ausência da ressonância que existe no anel B (Figura 21).

Resultados e Discussão

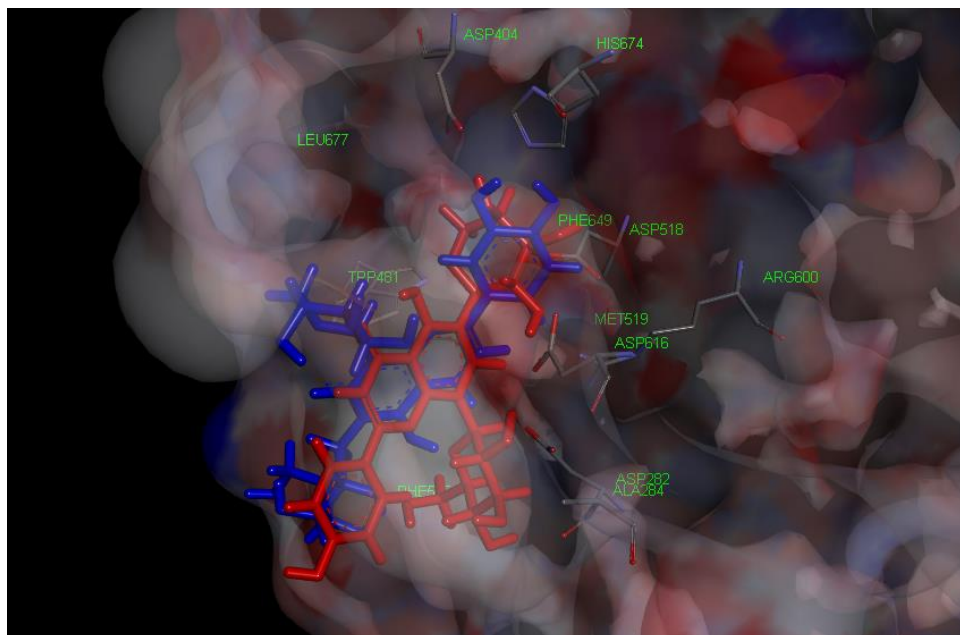


Figura 20. Orientações previstas para o carlinósido (azul) e o isoshaftósido (vermelho).

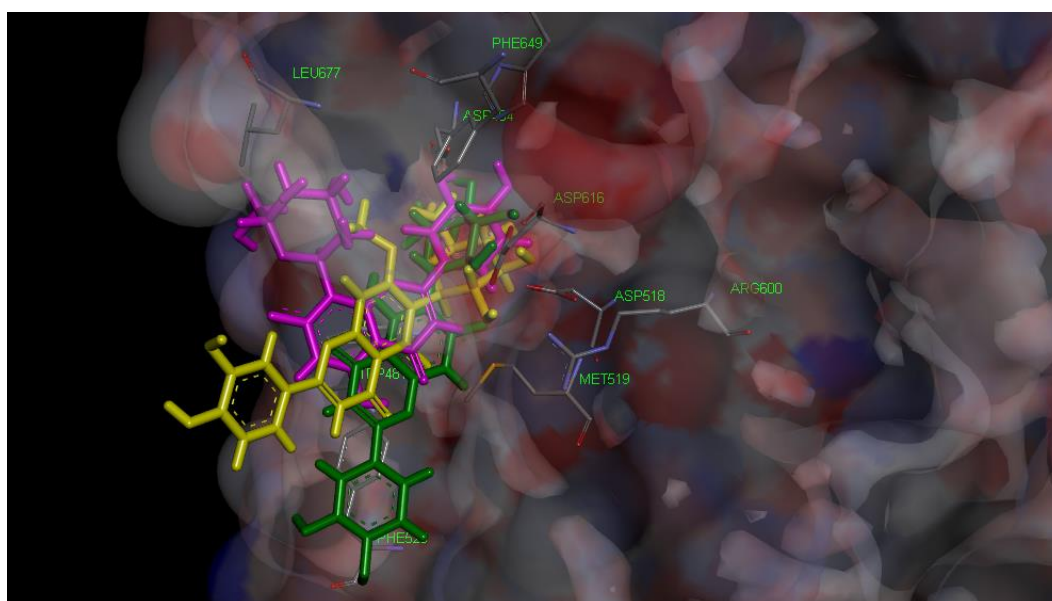


Figura 21. Orientações previstas para isoorientina (verde), orientina (roxo) e swertiajaponina (amarelo).

Resultados e Discussão

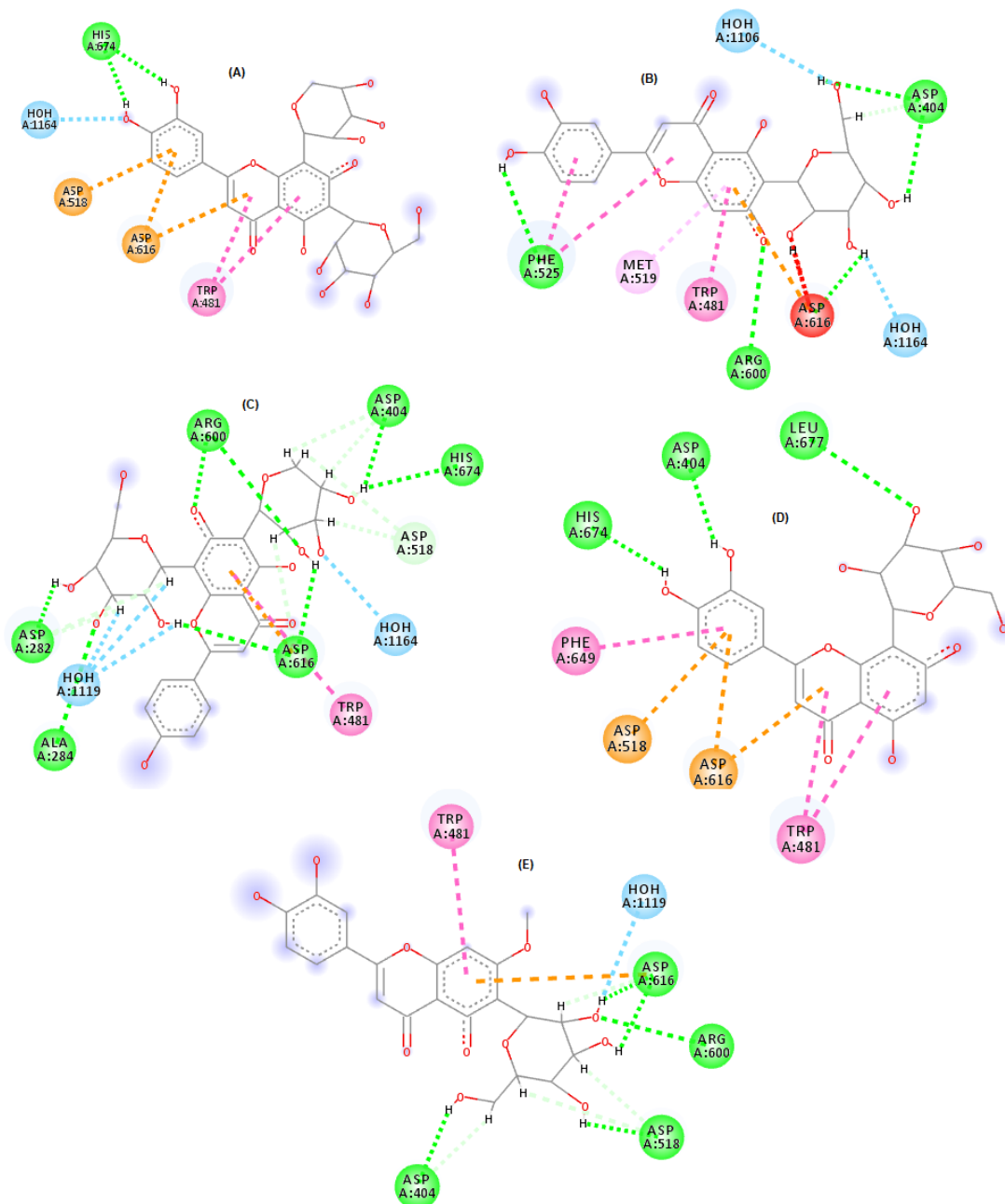


Figura 22. Interações entre os ligandos e os resíduos da enzima. (A) carlinósido, (B) isoorientina, (C) isoshaftósido, (D) orientina e (E) swertiajaponina.

Os flavonóides que contêm glicósidos ligados ao oxigênio presente na posição C-7, os O-glicósidos, são os que possuem a maior estabilidade prevista em *docking*. Nas posições previstas para esta classe de compostos, todos possuem os seus grupos glicósidos voltados para dentro da cavidade catalítica da enzima, com as principais interações ocorrendo entre os grupos hidroxilo dos açúcares. A conformação destes compostos devido à glicosilação na posição O-7 permite que os mesmos interajam com os principais resíduos da cavidade enquanto mantém a estrutura planar e rígida do

flavonóide para fora do sítio catalítico. Este tipo de conformação favorece as ligações de hidrogénio e evita impedimentos estéricos impostos pela estrutura rígida dos anéis A e C (Figura 23). Além disso, o oxigênio presente entre o açúcar e o anel A participa como um ponto de interação adicional, que não está presente nos compostos C-glicosilados, como evidenciado no caso da L7OG (Figura 24).

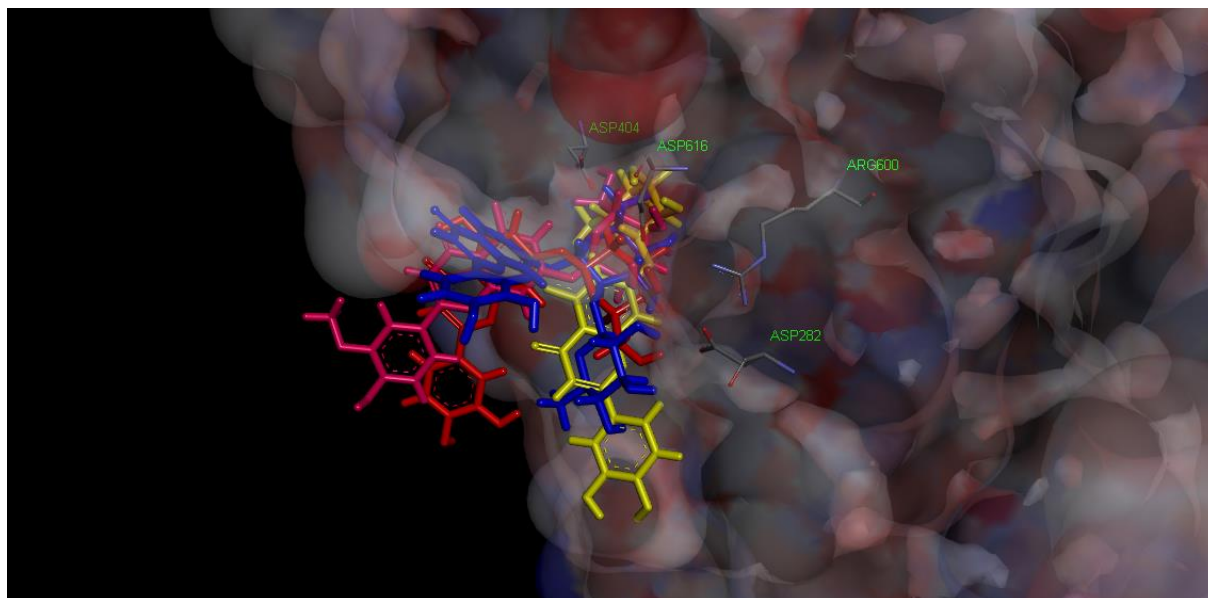


Figura 23. Poses previstas para os compostos O-glicosilados cinarósido (vermelho), isoscaparina (roxo), L7OG (amarelo) e luteolina 7-O-neohesperidósido (azul).

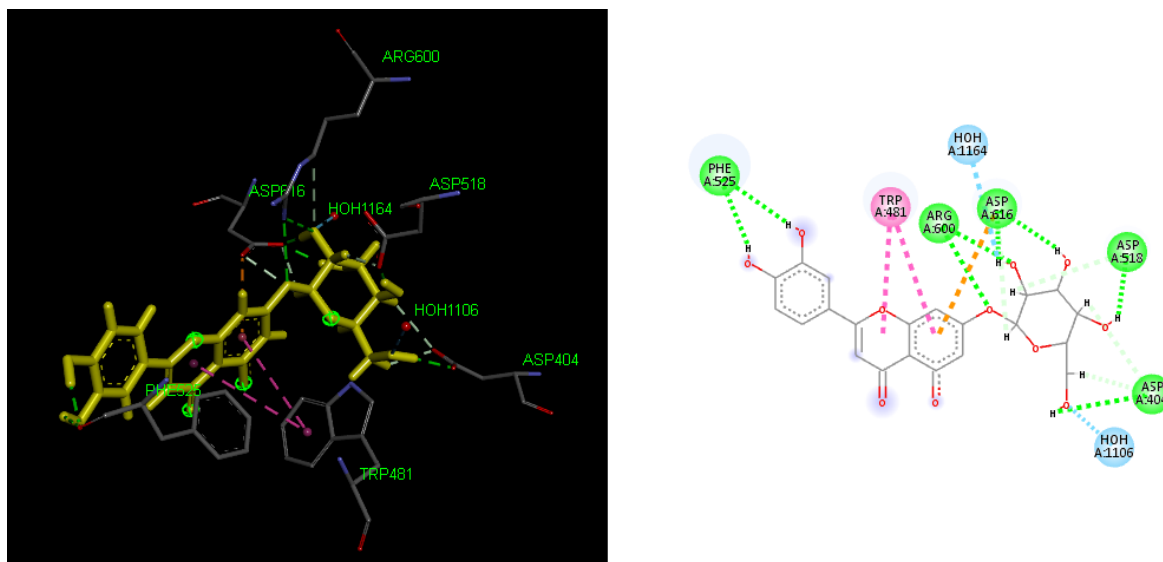


Figura 24. Interações entre a luteolina 7-O-glucósido (L7OG), em amarelo, e os resíduos da proteína.

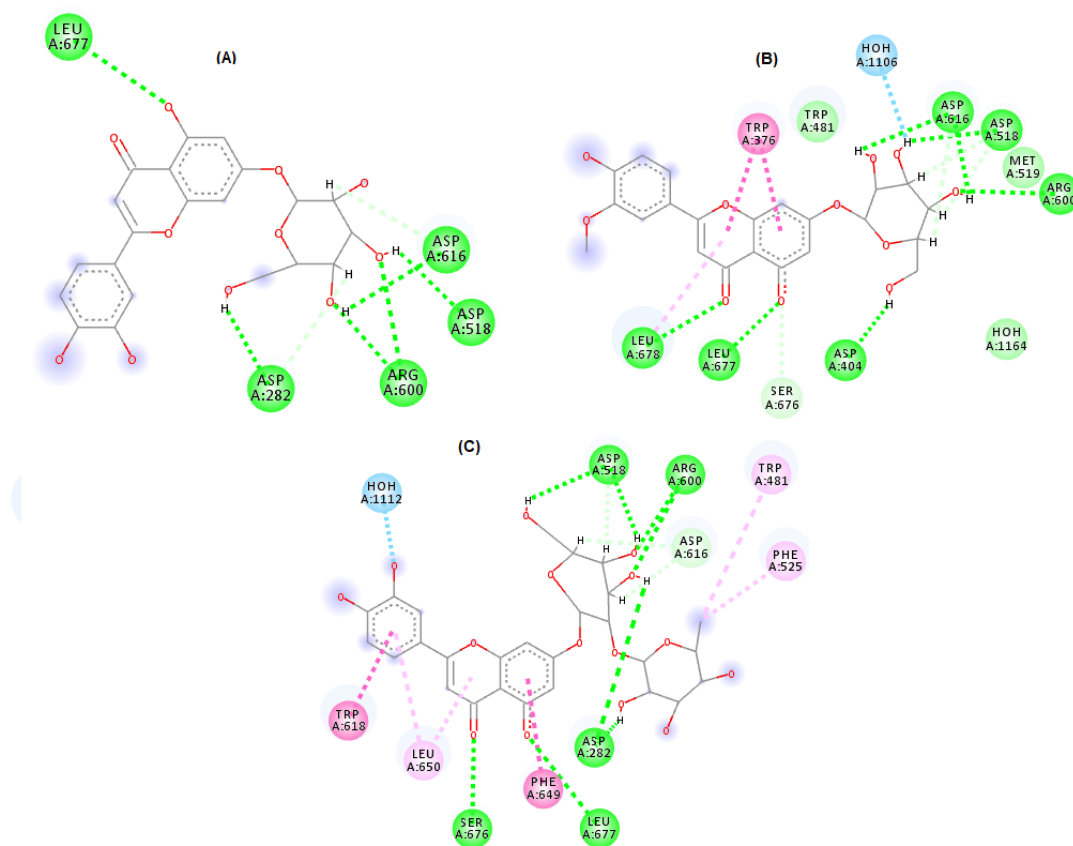


Figura 25. Interações entre os ligandos e os resíduos da enzima. (A) cinarósido, (B) isoscoparina, (C) luteolina-7-O-neohesperidósido.

Finalmente, para as agliconas, devido às suas estruturas rígidas e planares, além do número reduzido de pontos de coordenação devido à ausência dos grupos hidroxilos presentes nos glicósidos, este grupo de flavonóides apresenta a menor pontuação entre os compostos estudados. Devido às suas características supracitadas, estes compostos são incapazes de interagir com alguns resíduos importantes como a Arg600, à exceção da apigenina. Este, por sua vez, interage apenas com os resíduos Arg600 e Asp616, enquanto canferol e luteolina interagem com outros resíduos vizinhos (Figuras 27 e 28). Devido à presença de dois grupos hidroxilo no anel B e pela possibilidade da rotação da ligação C-C entre os anéis B e C, a luteolina mostra maior flexibilidade em relação à apigenina e as principais interações ocorrem neste anel, enquanto a região planar da estrutura encontra-se fora da cavidade. Quercertina e canferol apresentam orientações semelhantes, devido à presença do grupo hidroxilo na posição 3 do anel C que interage com o resíduo Asp616 e do grupo hidroxilo presente na posição 4' do anel B que favorece a interação com o resíduo Asp404 (Figura 26). A diferença de pontuação entre estes dois compostos deve-se principalmente à estabilização da ligação de hidrogênio

pela presença da molécula de água entre os hidroxilos nas posições 3' e 4' do anel B da quercertina.

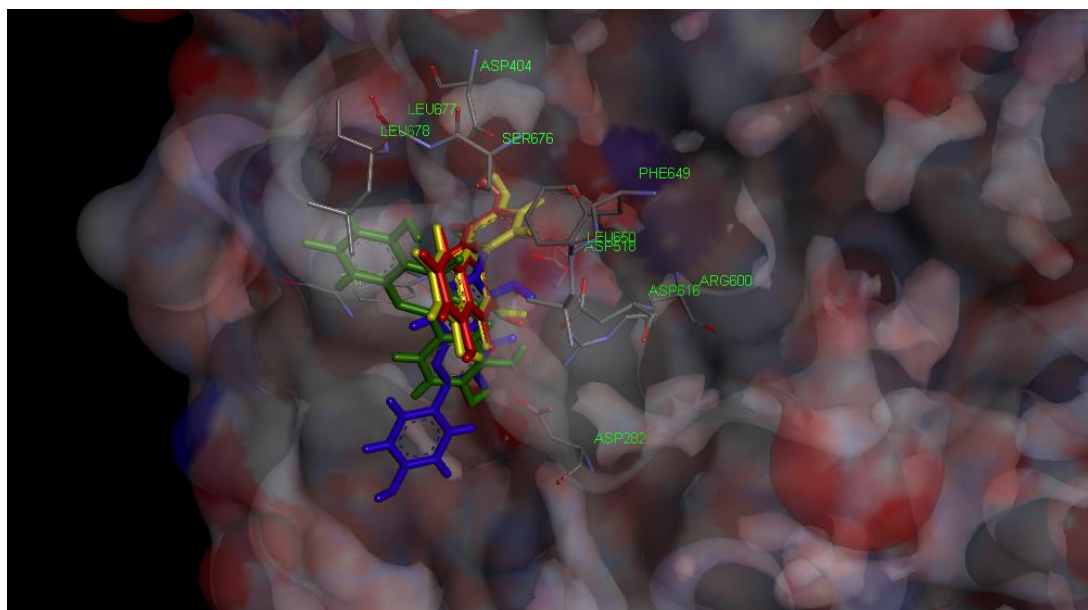


Figura 26. Orientação previstas para as agliconas apigenina (azul), canferol (vermelho), luteolina (verde) e quercertina (amarelo).

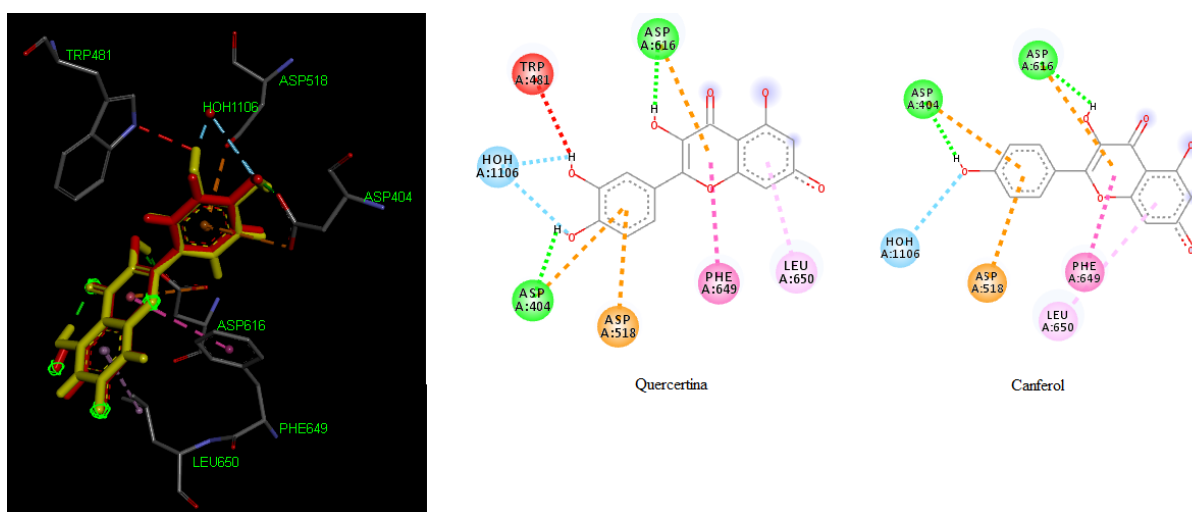


Figura 27. Interações entre canferol (vermelho) e quercertina (amarelo) e os resíduos próximos.

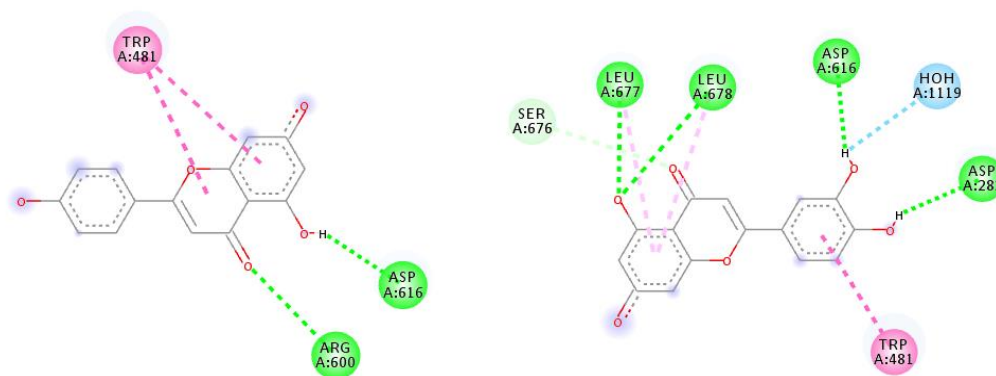


Figura 28. Interações entre a enzima e os ligandos apigenina (esquerda) e luteolina (direita).

4.2.2.2. Docking sobre α -glucosidase de levedura

A α -glucosidase da levedura é o principal alvo para o ensaio de compostos com atividade inibitória de modo a avaliar os seus potenciais terapêuticos na diabetes e, portanto, foi também testado em *docking* para verificar se as atividades dos compostos estudados traduzem para a enzima de origem humana.

A acarbose possui a maior pontuação entre os compostos estudados, principalmente devido ao grande número de grupos hidroxilo ao redor da estrutura, capazes de interagir com muitos resíduos do sítio ativo, principalmente Asp68, His111, Asp349 e Asp439. Além disso, o modelo obtido por homologia substitui o resíduo Glu411 por Asp408, mas a acarbose também interage com este último. A unidade acarvosina do fármaco é a principal região da estrutura em termos de interação, realizando ligações de hidrogénio com 6 dos 10 resíduos avaliados.

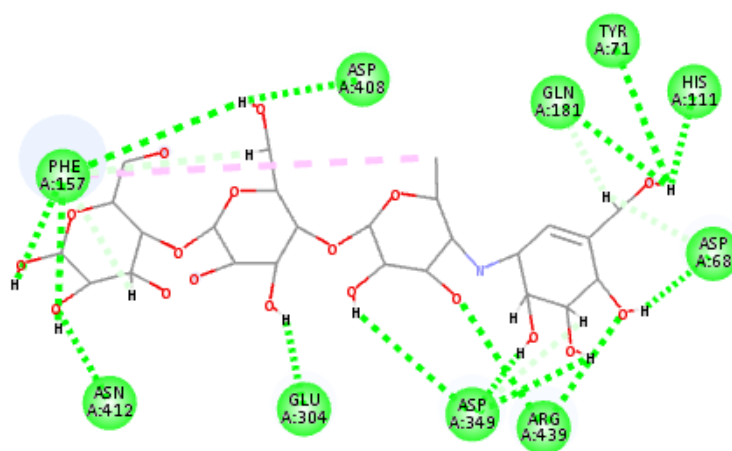


Figura 29. Esquema 2D da interação da acarbose com resíduos do sítio ativo da α -glucosidase de levedura.

Os compostos C-O-diglicosilados apresentam uma orientação de ligação semelhante à observada para a α -glucosidase lisossomal, com os grupos glicósidos voltados para dentro da cavidade ativa da proteína, à exceção da cassiaocidentalina B, que apresenta o anel B interagindo com os resíduos internos (Figura 30). Essa inversão pode estar relacionada com a flexibilidade que cada grupo glicosilo fornece à estrutura, especialmente no caso da cassiaocidentalina B que possui um grupo carbonilo na primeira unidade de açúcar ligada ao anel A. Esta flexibilidade também pode ser a razão da diferença de estabilidade entre a kurilesina A e 2"-O-ramnosil isoorientina, que possuem orientações semelhantes no interior da cavidade (Figura 31).

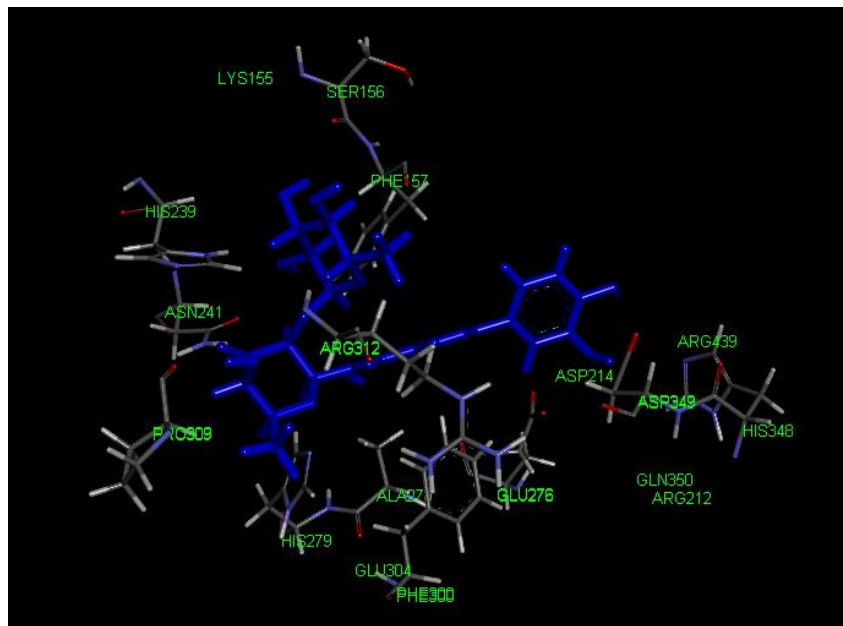


Figura 30. Interação da cassiaocidentalina B com resíduos do sítio ativo da α -glucosidase de levedura.

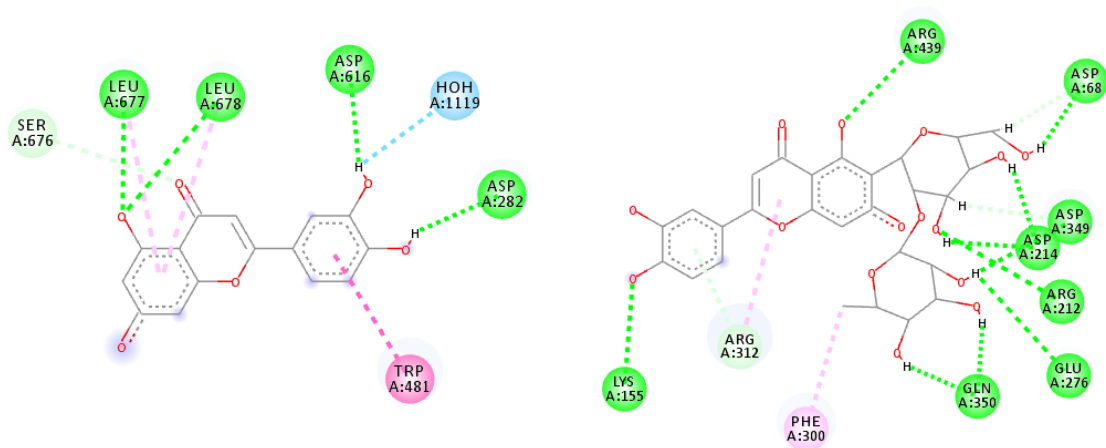


Figura 31. Interações entre os resíduos da enzima e os ligandos kurilesina A (esquerda) e 2"-O-ramnosil isoorientina (direita).

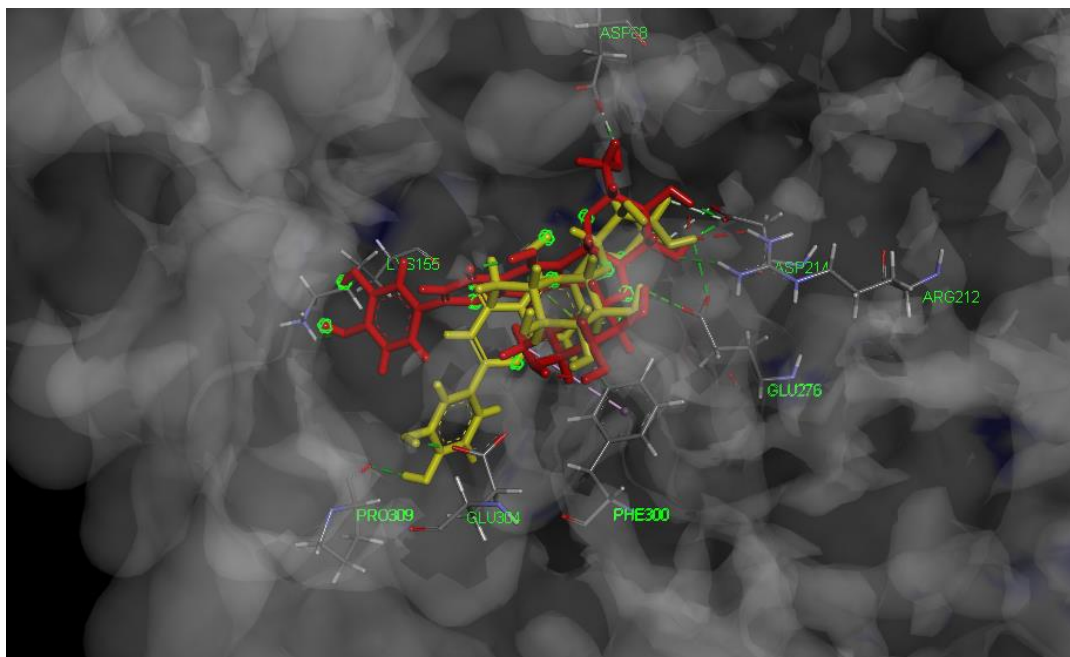


Figura 32. Orientação dos grupos glicosil da 2"-O-ramnosil isoorientina (vermelho) e kurilesina A (amarelo) no interior da cavidade da proteína.

O mesmo pode ser observado para os compostos C-glicosilados, onde a importância da posição da glicosilação do anel A fica mais evidente. Nesta classe de compostos, aqueles que estão glicosilados nas posições C-6 e C-8, como carlinósido e isoshaftósido, orientam seus os grupos glicosilo para o interior da cavidade e o anel B para a parte externa da mesma. Esta orientação permite que estes compostos façam ligações de hidrogénio com Asp68, Arg212, Asp214, His348, Asp349 e Asp408 a partir do C-6-glucósido, além de orientar favoravelmente a interação do C-8-glucósido com os resíduos Leu437, Tyr313 e Arg312, que podem favorecer a estabilidade de ligação (Figura 33).

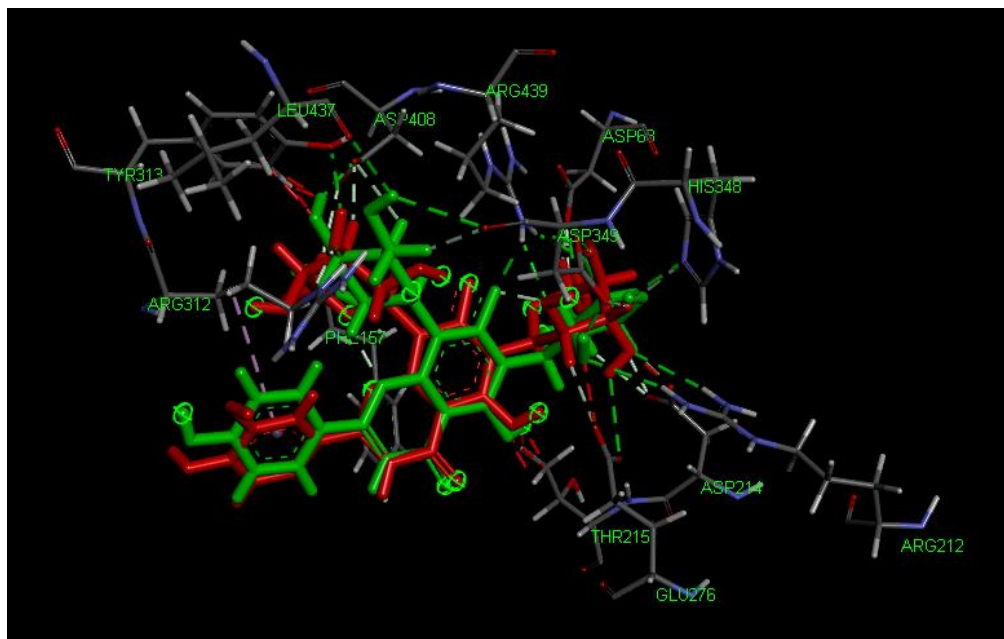


Figura 33. Orientação prevista para os compostos 6,8-*C*-diglicosilados, carlinósido (vermelho) e isoshaftósido (verde) e as interações com os resíduos próximos.

Na ausência de um dos grupos glicosilo, a orientação será favorecida de acordo com os grupos dadores de ligações hidrogênio disponíveis. Isto é melhor observado entre os flavonóides *C*-6-monoglicosilados, isorientina e swertiajaponina, e o flavonóide *C*-8-monoglicosilado, orientina. Os primeiros estão orientados de modo que o glucósido esteja voltado para o interior da cavidade e possa interagir com Asp68, Arg212, Asp214, Asp349 e Arg439, enquanto o anel B está orientado para fora da proteína, realizando pouca ou nenhuma interação com resíduos próximos. Devida a esta orientação, entretanto, o grupo carbonilo do anel C pode formar uma interação desfavorável com o resíduo Asp408, diminuindo a estabilidade da ligação (Figura 34). No caso da orientina, a orientação é invertida de modo a favorecer a interação dos hidroxilos nas posições 3' e 4' do anel B com os resíduos Asp349, Arg212 e Asp214, diminuindo o possível efeito estérico que o glucósido causaria nesta região. Paralelamente, o grupo glicosilo é capaz de interagir com Asp408 e também com Asp349, favorecendo a estabilidade desta conformação (Figura 35).

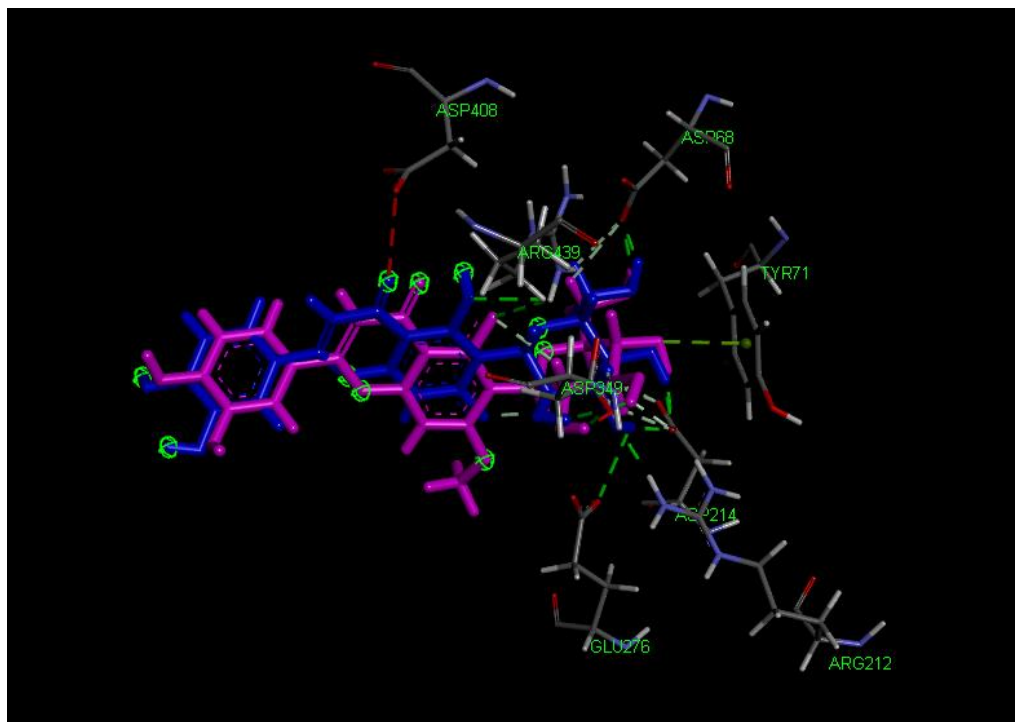


Figura 34. Interações dos grupos glicosil dos compostos isoorientina (azul) e swertiajaponina (roxo) com os resíduos internos.

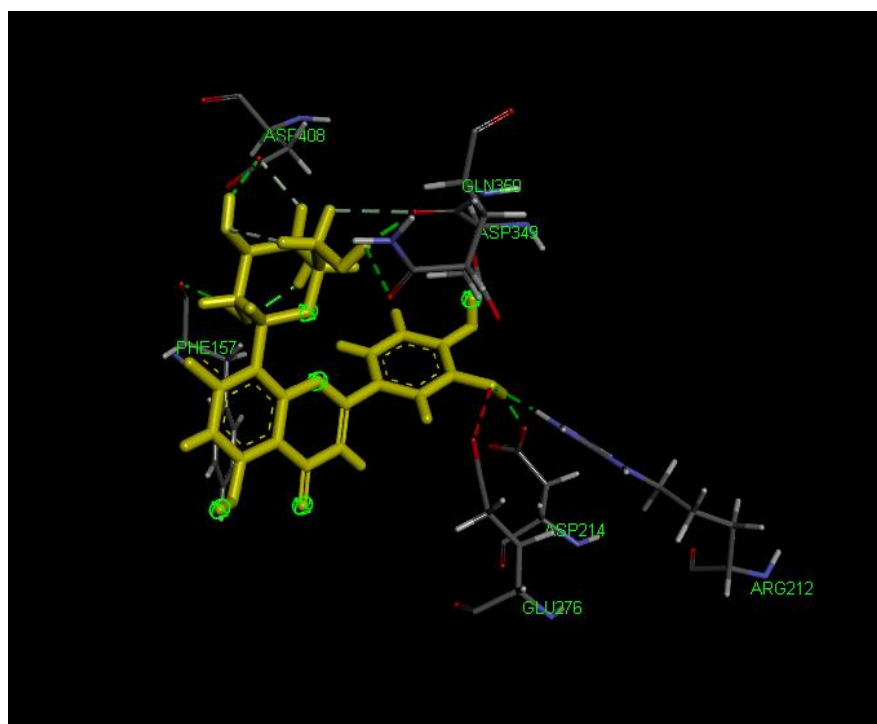


Figura 35. Orientação da orientina (amarelo) prevista no interior do sítio ativo da proteína.

Por fim, as geninas apresentam um padrão de interação entre si muito semelhante, com os hidroxilos do anel B orientados para o interior do sítio ativo da α -glucosidase, realizando ligações de hidrogénio, principalmente, com Asp68, Arg212 e Asp214. A presença do grupo hidroxilo na posição 3 do anel C parece não ter influência na inibição da enzima, conforme pode ser visto entre apigenina e canferol, onde nenhuma interação pôde ser visualizada. Entretanto, a presença de um segundo grupo hidroxilo no anel B na posição 3' aumenta a estabilidade da ligação entre os compostos luteolina e quercertina e a enzima.

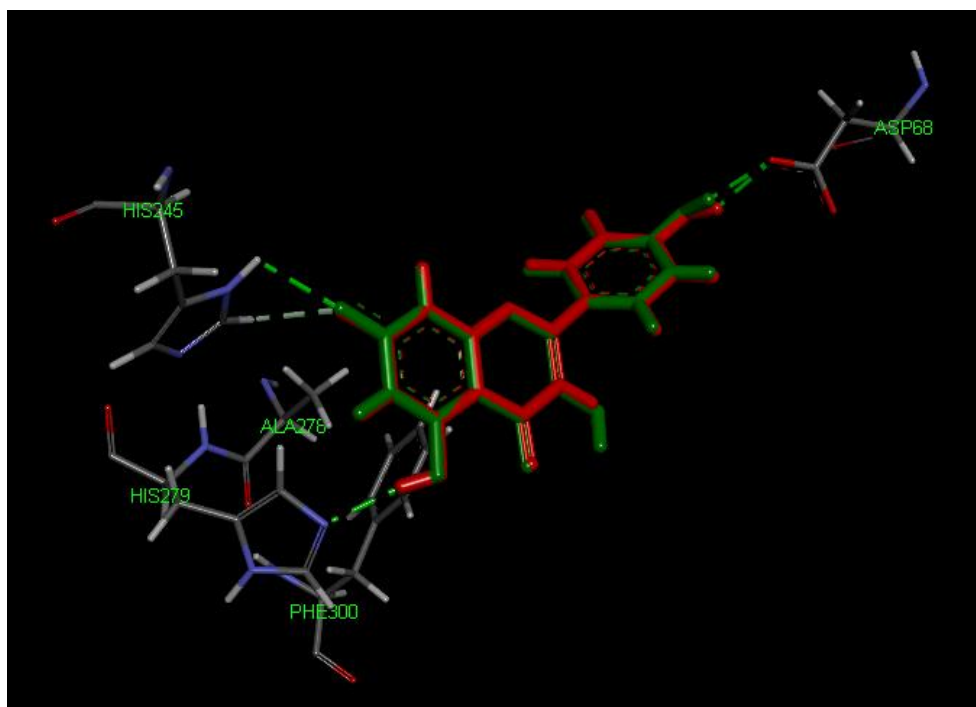


Figura 36. Orientações previstas para apigenina (vermelho) e canferol (verde) e suas interações com resíduos do sítio ativo da enzima.

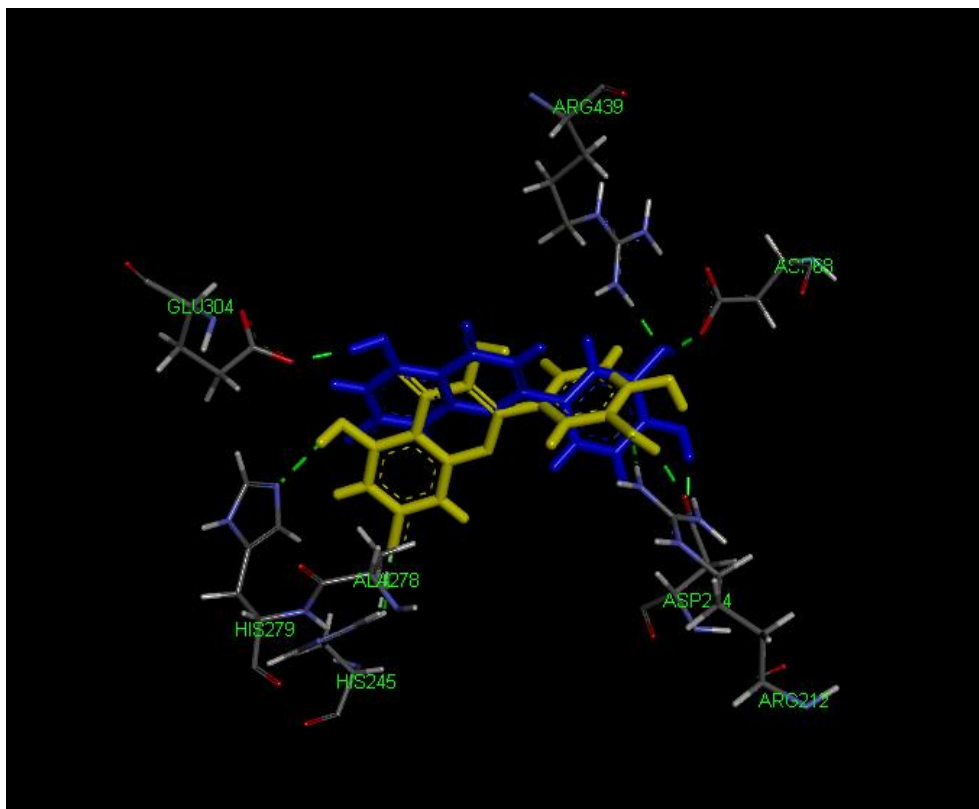


Figura 37. Orientações previstas para luteolina (azul) e quercertina (amarelo) e suas interações com resíduos do sítio ativo da enzima.

De um modo geral, a presença dos grupos glicósidos em diferentes posições do anel A confere maior flexibilidade à estrutura rígida do flavonóide, permitindo que o mesmo interaja com diferentes resíduos ao redor da cavidade ativa da proteína. Para as enzimas α -glucosidase humana e de levedura, o padrão de atividade inibitória observada foi O-glicósidos > C-glicósidos > C-O-diglicósidos > agliconas. As diferenças de estabilidade entre os compostos do mesmo ou de diferentes grupos pode ser explicada pelo tipo de glicósido ligado e pela posição da ligação do mesmo.

A presença dos grupos hidroxilo no anel B também mostraram ter sua influência na atividade inibitória. Este fenômeno já foi observado em diversos estudos de relação estrutura-atividade (SAR). Proença e colaboradores (2017) realizaram estudos *in silico* e *in vitro* de uma série de flavonóides, em grande parte geninas, sobre a inibição da α -glucosidase de modo a construir a SAR destes compostos. Na ausência de grupos hidroxilo no anel B, nenhuma inibição é observada, enquanto outros compostos com uma ou mais substituições apresentam pouca ou nenhuma inibição. Somando-se a isso, a presença de grupos catecol nos anéis A e B aumentam consideravelmente a capacidade de inibir a α -glucosidase e a substituição destes grupos por outros mais hidrofóbicos, como -OMe, diminui a atividade. Isto está evidente nos resultados, onde os grupos catecol se mostram importantes dadores de ligação de hidrogênio com os

resíduos do sítio ativo e a presença do radical metilo impede esta interação. Também observaram que a presença do grupo hidroxilo na posição 3 do anel C aumenta o potencial de inibição do flavonóide. Em contrapartida, o efeito da glicosilação observado para a rutina é de diminuição da atividade inibitória, o que não é observado neste trabalho para compostos glicosilados.

Os efeitos da glicosilação dos flavonóides têm se mostrado controverso em diversos estudos publicados. Kim, Kwon e Son (2000) avaliaram o potencial inibitório de alguns flavonóides sobre a α -glucosidase de levedura e observaram que a luteolina e luteolina-7-O-glucósido inibem a enzima, porém a genina apresenta maior efeito inibitório do que seu derivado glicosilado. Verificaram também que o derivado poliglicosilado Ionicerina apresentou menor atividade comparado com o monoglicósido L7OG, o que não foi observado no *docking*. Xiao (2015) também publicou uma extensa revisão sobre os potenciais terapêuticos dos flavonóides e seus glicósidos e mostrou que a glicosilação diminui a atividade inibitória destes compostos, evidenciando ainda que a glicosilação na posição C-6 teve menor impacto em relação à glicosilação em C-8. Porém, o mesmo não pôde ser observado entre os compostos orientina, isoorientina e Swertiajaponina, onde o efeito da glicosilação 6-C na diminuição da atividade inibitória foi maior do que para a glicosilação em 8-C, além de destes compostos apresentarem maior pontuação em relação às suas agliconas. Apesar de não ter sido mostrado neste trabalho, Xiao também comenta sobre o efeito negativo da glicosilação em C-3 e mostra que a glicosilação no oxigênio em C-7 diminui a atividade, o que não é observado para os compostos estudados.

Apesar da flexibilidade e do maior número de doadores de ligação de hidrogênio adquirida pela glicosilação, a massa molar e a possibilidade de impedimento estérico aumentam, o que pode justificar muitos dos resultados observados *in vitro*. Entretanto, a diversidade estrutural inerente dos fitoconstituintes, além da diversidade adicional promovida pelos diferentes grupos glicósidos que podem estar ligados, conferem inúmeras possibilidades de modos de ligação, levando a variados resultados observados. De um modo geral, o que se observou foi o aumento da estabilidade de ligação promovida pela presença dos grupos glicósidos em diferentes posições dos anéis A e B dos flavonóides, principalmente sobre os compostos diglicosilados. É importante ressaltar, entretanto, que estes compostos são absorvidos e metabolizados de maneiras diferentes entre si, e que muitos resultados reportados sobre estes compostos são *in vitro*, onde o fator de ADME é pouco considerado.

4.3. Análise qualitativa dos fitoconstituintes do *Cymbopogon citratus*

A placa de TLC foi visualizada nos comprimentos de onda 254 e 366 nm, onde foi possível visualizar a separação dos compostos presentes no extrato e na fração de flavonóides, conforme mostra a Figura 38. Dentre os compostos separados, é possível identificar a presença de flavonóides (manchas escuras a 366 nm) e ácidos fenólicos (manchas de fluorescência azuis, a 366 nm).

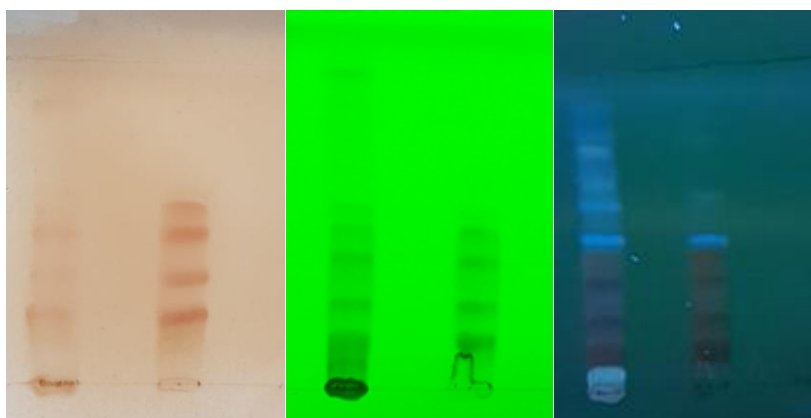


Figura 38. Placa TLC visualizada sob luz visível e sob os comprimentos de onda 254nm (centro) e 366nm (direita).

4.4. Ensaio colorimétrico da atividade inibitória dos fitocompostos

Após a adição do cromóforo foi possível observar a rápida mudança de coloração dos poços. A leitura dos valores de absorbância foi realizada de maneira imediata, devido à precipitação do sal de diazônio dentro de poucos minutos após a adição do *Fast Blue Salt B*.

Os valores de porcentagem de inibição (%_{inib}) obtidos para cada concentração das amostras estão descritos na Tabela 14. A porcentagem de inibição foi calculada a partir da fórmula descrita abaixo:

$$\%_{inib} = \frac{(Abs_{controle} - Abs_{amostra})}{Abs_{controle}} \times 100 \quad (1)$$

Os valores de absorbância para o controle e a amostra foram corrigidos através da subtração do valor obtido para o branco do controle e o branco da amostra.

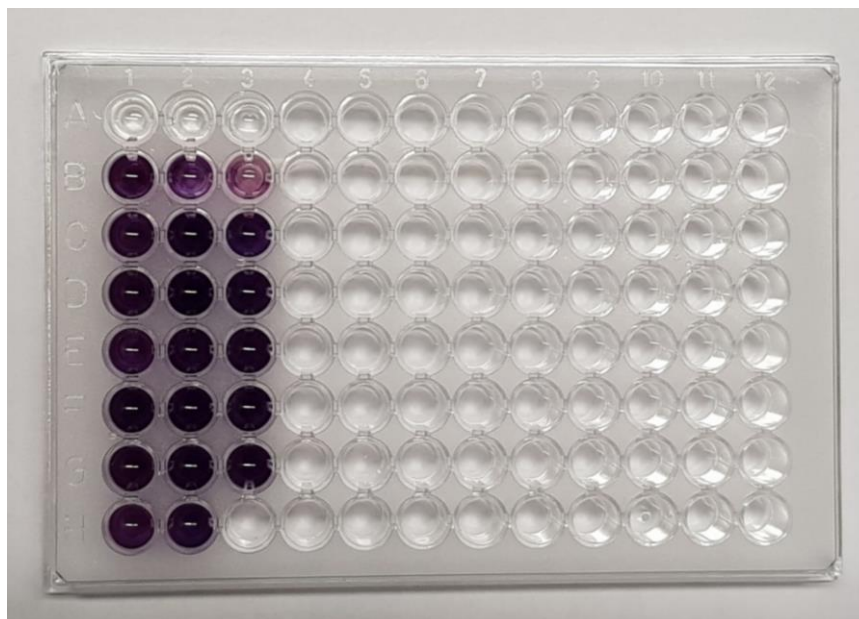


Figura 39. Placa multiwell após incubação e adição do *Fast Blue Salt B*.

Tabela 14. Resultados do ensaio enzimático obtidos para acarbose, extrato e fração de flavonóides.

Acarbose		Extrato		Fração	
logC	% inibição	logC	% inibição	logC	% inibição
2,7714	16,19 ± 5,35	1,9933	18,40 ± 1,49	0,9830	20,07 ± 4,97
3,1694	41,58 ± 2,82	2,0902	17,18 ± 5,56	1,2840	41,59 ± 4,18
3,2663	52,88 ± 6,53	2,3912	36,41 ± 1,89	1,4881	56,77 ± 5,16
3,3632	57,58 ± 1,22	2,4881	40,67 ± 1,37	1,8861	67,34 ± 4,28
3,4881	67,30 ± 2,82	2,5850	43,07 ± 2,62	2,1871	73,06 ± 4,63

A atividade inibitória das amostras estudadas foi comparada de acordo com o percentual de inibição da enzima α -glucosidase. A partir dos resultados é possível observar que tanto o extrato quanto a fração contendo apenas flavonóides mostraram-se mais ativas que o fármaco de referência, com a fração sendo particularmente mais ativa, com valor de IC_{50} de $14,87 \pm 1,87 \mu\text{g/mL}$, cerca de 100 vezes mais ativa que a acarbose ($IC_{50} = 1535 \pm 1,14 \mu\text{g/mL}$) e cerca de 14 vezes mais ativa que o extrato ($IC_{50} = 214,9 \pm 1,14 \mu\text{g/mL}$) (Figura 40).

Entre os dois flavonóides testados, isoorientina e luteolina-7-O- β -glucopiranosídeo (L7OG), observou-se que ambos apresentaram atividades similares com valores de IC_{50} de $17,83 \pm 1,17 \mu\text{g/mL}$ e $17,97 \pm 1,06 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Utilizando-se o *One-way* ANOVA, seguido do teste de Bonferroni, concluiu-se que não há diferença estatística

entre si ($P > 0,001$). Comparando-se aos resultados obtidos para o *docking*, ambos os flavonóides isolados apresentam pontuações próximas, justificando os valores semelhantes de IC_{50} . Entretanto, a fração ainda se mostra mais ativa que os compostos isolados, não sendo possível concluir se a atividade observada é devida à presença de outros compostos ativos na fração ou de interações sinérgicas.

É possível observar que o extrato se mostrou menos ativo que a fração (Figura 41). Devido à presença de outros compostos em sua composição, principalmente polifenóis como ácido cafeico, ácido hidroxicinâmico e ácido clorogênico, é possível que estes influenciem negativamente na inibição da enzima pelo extrato, através da competição pela ligação à mesma. Estes polifenóis já foram reportados como péssimos inibidores da α -glucosidase (Xiao *et al.*, 2013), ser uma das razões pela baixa atividade observada no extrato, além da concentração dos principais inibidores serem menores do que na fração.

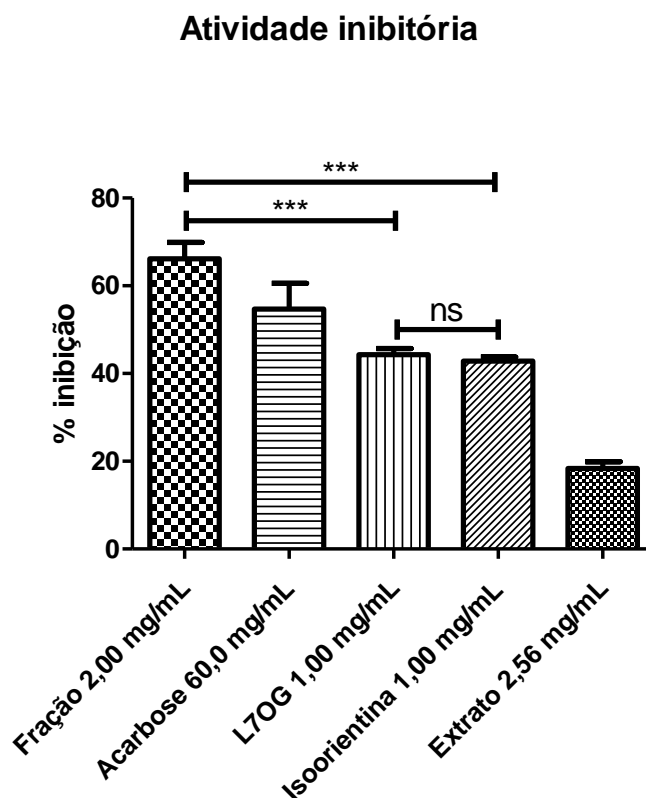


Figura 40. Atividade inibitória das amostras em diferentes concentrações. Os valores correspondem à média \pm desvio padrão de três ensaios independentes. (***) $P < 0,001$ e ns = não significativo)

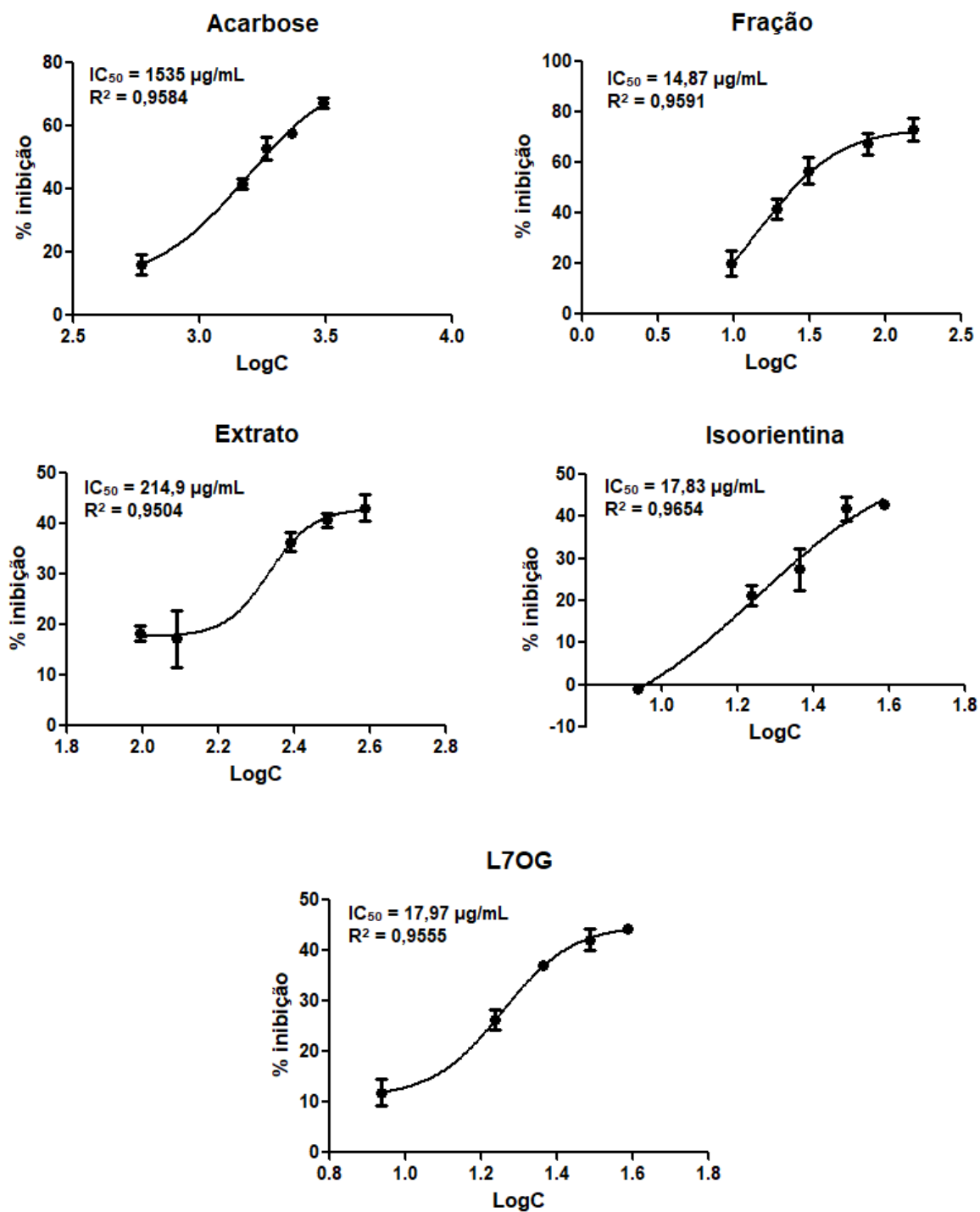


Figura 41. Curvas de dose resposta para as diferentes amostras e seus valores de IC_{50} .

5. Discussão Geral

As plantas medicinais são importantes fontes de novos fármacos, devido à sua diversidade estrutural e de atividades terapêuticas. Por contribuírem com uma gama de compostos biologicamente ativos e de baixa toxicidade, a comunidade científica têm voltado sua atenção para a descoberta de novos fármacos a partir de plantas, porém muitos desafios ainda persistem. A diversidade estrutural que concede estas diversas atividades terapêuticas torna-se um dos principais desafios a serem enfrentados na etapa de descoberta de fármacos, visto que torna a síntese destes compostos mais complexa. Somado a isso, a quantidade de planta necessária para a extração de uma pequena quantidade do fitoconstituente ativo é muito grande, o que pode gerar um grande impacto ambiental. Ainda assim, com o desenvolvimento de novas tecnologias computacionais, é possível rastrear quais desses compostos contribui melhor para a atividade terapêutica de um extrato ou fração e é possível prever se tal composto é fácil de se sintetizar.

As ferramentas disponíveis online para a previsão de atividades terapêuticas, como o *PASS Online*, permite em primeiro momento verificar se um composto ou conjunto de compostos possui determinada atividade de interesse, ou até mesmo possíveis atividades ainda não estudadas. Outras ferramentas, como SwissADME, permitem verificar se uma molécula de interesse terá as propriedades farmacocinéticas necessárias para atuar num determinado alvo farmacológico e se é um composto fácil de ser sintetizado, contornando as dificuldades inerentes aos fitoconstituintes. Somado com o uso dos bancos de dados, é possível também verificar se o composto a ser estudado já possui atividade comprovada no alvo de interesse. Isto verificou-se facilmente através da busca dos compostos em estudo no PubChem e no ChEMBL, apesar deste último apresentar bem menos referências comparado ao primeiro. Também foi possível verificar que compostos como orientina e isoorientina e suas agliconas já estão bastante estudadas, enquanto outros flavonóides apenas foram estudados em poucos alvos terapêuticos. Nestes bancos de dados também é possível perceber um padrão de atividades estudadas para esta classe de compostos, principalmente àquelas ligadas às atividades anti-inflamatórias ou processos antioxidantes, para possível uso em doenças como o cancro. Isto sugere que os estudos ainda estão muito limitados a apenas um seletor grupo de doenças e atividades comuns aos flavonóides e as ferramentas de previsão podem ajudar a descobrir novas atividades terapêuticas.

Os flavonóides constituem um grupo de compostos presentes nas plantas como metabolitos secundários e possuem diversas atividades terapêuticas comprovadas e são de grande interesse para a procura de novos fármacos. Apesar da maior parte dos

estudos existentes para este grupo de compostos estarem voltados para as geninas, os flavonóides estão maioritariamente presentes nas plantas sob formas glicosiladas, nomeadamente C- ou O-glicosiladas. Estes compostos, principalmente os O-glicosilados, ao serem ingeridos, são prontamente metabolizados e perdem a ose associada e o efeito terapêutico observado é atribuído, portanto, à genina derivada. Os flavonóides C-glicosilados são mais estáveis e são capazes de alcançar o trato gastrointestinal inalterados, possuindo, portanto, atividades que não podem ser atribuídos às geninas ou aos O-glicósidos. Isto é especialmente importante no que concerne à biodisponibilidade destas moléculas, pois apesar do potencial inibitório dos C-glicósidos sobre a α -glucosidase ser menor do que os O-glicósidos, estes últimos podem ter baixa biodisponibilidade e influenciar na sua atividade terapêutica.

A presença das oses na estrutura dos flavonóides altera de maneira significativa as suas propriedades físico-químicas e farmacocinéticas. A massa molar aumenta, assim como a área de superfície polar e volume. A molécula torna-se mais flexível, devido ao aumento de ligações rotacionáveis e aumenta-se também o número de doadores e aceitadores de ligações de hidrogênio. Estas alterações permitem melhores interações com o sítio ativo da α -glucosidase, aumentando o potencial inibidor destes compostos, tornando-os potenciais novos fármacos para o tratamento da diabetes.

Apesar de bastante estudada, o *Cymbopogon citratus* ainda apresenta flavonóides que não tiveram suas capacidades terapêuticas totalmente avaliadas como carlinósido, kurilesina A, swertiajaponina e isoshaftósido, cujos resultados aqui apresentados não estão presentes em nenhum outro estudo. Adicionalmente, devido ao potencial antioxidante e de captação de radicais livres conhecido dos flavonóides, grande parte das pesquisas são orientadas para este fim. Isto fica evidente quando, ao pesquisar os flavonóides aqui estudados nos bancos de dados, a maioria das atividades encontradas são aquelas que estão ligadas ao tratamento do cancro ou de doenças ligadas ao estresse oxidativo ou inflamação. Além disso, mesmo aqueles que já foram estudados na inibição da α -glucosidase, como no caso da luteolina-7-O-neohesperidósido, são poucos os estudos adicionais que possam corroborar estes resultados. Estes aspetos demonstram que ainda há muito a explorar nesta planta, além de mostrar a importância dos glicósidos de flavonóides na área farmacêutica e como ferramentas de previsão de atividades podem orientar melhor a busca por novos princípios ativos.

6. Conclusão

Conclusão

A atividade antidiabética prevista para os compostos estudados foi determinada através de métodos *in silico* e suplementada através de ensaios enzimáticos *in vitro*. A utilização das ferramentas aqui mencionadas pode auxiliar na busca de novos fármacos a partir de fontes naturais, tornando-a mais fácil, barata e eficaz. Os compostos de origem natural são comprovadamente mais seguros que os fármacos puramente sintetizados, com menor toxicidade e maior taxa de sucesso nos ensaios clínicos e têm se tornado novamente o foco de atenção dos pesquisadores. O desafio corrente, que envolve a identificação do composto isolado, além da sua caracterização estrutural é o primeiro obstáculo a ultrapassar. Os compostos polifenólicos e os componentes do óleo essencial estão bastante estudados, mas ainda há poucos estudos acerca dos flavonóides e seus derivados glicosilados. Estes últimos já mostraram atividades terapêuticas em diversas doenças e algumas provavelmente ainda não exploradas. Ferramentas como estas permitem explorar ainda mais um conjunto de compostos que podem trazer grandes benefícios para a saúde.

Os flavonóides do *Cymbopogon citratus* são capazes de inibir a enzima α -glucosidase, um importante alvo para o controle da diabetes, em menores concentrações do que a acarbose, o fármaco de referência. Resultados obtidos para kurilesina A, isoshaftósido, cassiaocidentalina B e carlinósido não foram obtidos em outros estudos até o momento, e tampouco apresentam resultados nos bancos de dados como o ChEMBL ou PubChem. Portanto, estes resultados inovadores podem sugerir e alavancar novas pesquisas de fármacos de origem naturais a partir da planta *Cymbopogon citratus*.

7. Perspetivas Futuras

De modo a avaliar melhor o potencial terapêutico dos compostos aqui estudados, serão necessários estudos de relação estrutura-atividade, com avaliação das atividades antidiabéticas dos compostos isolados. Além disso, também será necessário realizar estudos de ADME *in vivo* para os compostos isolados de modo a definir suas capacidades de absorção e estabilidade, principalmente entre os diferentes graus e posições de glicosilação. Estes estudos podem contribuir para a descoberta de novos fármacos para o controle da diabetes.

O uso das ferramentas de previsão, em conjunto com métodos de *docking* e dinâmica molecular, também poderão ser implementadas no laboratório de farmacognosia de modo a isolar compostos ativos de modo guiado, facilitando e diminuindo os custos e tempo necessários para extração e isolamento de princípios ativos das plantas.

8. Referências Bibliográficas

- ATANASOV, Atanas G. *et al.* - **Discovery and resupply of pharmacologically active plant- derived natural products: A review.** *Biotechnology Advances.* 33, 8 (2016), 1582–1614.
- AVOSEH, Opeyemi *et al.* - ***Cymbopogon* species; ethnopharmacology, phytochemistry and the pharmacological importance.** *Molecules.* 20, 5 (2015), 7438–7453.
- AZAM, Syed Sikander *et al.* - **Molecular docking studies of potent inhibitors of tyrosinase and α -glucosidase.** *Medicinal Chemistry Research.* 21, 8 (2012), 1677–1683.
- BERTEA, Cinzia M.; MAFFEI, Massimo E. - **The genus *Cymbopogon*: Botany, including anatomy, physiology, biochemistry and molecular biology.** In: AKHILA, ANAND (Ed.) - *Essential oil - Bearing Grasses. The Genus *Cymbopogon*.* New York: CRC Press, 2010. ISBN 9780849378577
- BOUKHATEM, Mohamed Nadjib *et al.* - **Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs.** *Libyan Journal of Medicine.* 9 (2014).
- CAZAROLLI, Luisa Helena *et al.* - **Flavonoids: cellular and molecular mechanism of action in glucose homeostasis.** *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry.* 8, 10 (2008), 1032–1038.
- CHEEL, José *et al.* - **Free radical scavengers and antioxidants from lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.).** *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 53, 7 (2005), 2511–2517.
- CHOI, Jae Sue *et al.* - **The effects of C-glycosylation of luteolin on its antioxidant, anti-Alzheimer's disease, anti-diabetic, and anti-inflammatory activities.** *Archives of Pharmacal Research.* 37, 10 (2014a), 1354–1363.
- CHOI, Jae Sue *et al.* - **Effects of C-glycosylation on anti-diabetic, anti-Alzheimer's disease and anti-inflammatory potential of apigenin.** *Food and Chemical Toxicology.* 64 (2014b), 27–33.
- DAINA, Antoine; MICHIELIN, Olivier; ZOETE, Vincent - **SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules.** *Scientific Reports.* 7 (2017), 1–13.
- DIMASI, Joseph A.; GRABOWSKI, Henry G.; HANSEN, Ronald W. - **Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs.** *Journal of Health Economics.* 47 (2016), 20–33.

- EKPENYONG, Christopher E.; AKPAN, Ernest; NYOH, Azah - **Ethnopharmacology, phytochemistry, and biological activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf extracts**. Chinese Journal of Natural Medicines. 13, 5 (2015), 321–337.
- FERRERES, Federico *et al.* - **New C-deoxyhexosyl flavones and antioxidant properties of *Passiflora edulis* leaf extract**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 55 (2007), 10187–10193.
- FIGUEIRINHA, Artur - **Composição Química e Actividade Anti-Inflamatória Do Infuso de *Cymbopogon citratus***. Coimbra: Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, 2011. Tese de Doutoramento
- FIGUEIRINHA, Artur; SANTOS-BUELGA, Celestino; BATISTA, Maria T. - ***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.
- FILIMONOV, D. A. *et al.* - **Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the pass online web resource**. Chemistry of Heterocyclic Compounds. 50, 3 (2014), 444–457.
- FRANCISCO, Vera *et al.* - ***Cymbopogon citratus* as source of new and safe anti-inflammatory drugs: Bio-guided assay using lipopolysaccharide-stimulated macrophages**. Journal of Ethnopharmacology. 133, 2 (2011), 818–827.
- FRANCISCO, Vera; FIGUEIRINHA, Artur; COSTA, Gustavo - **Chemical characterization and anti-inflammatory activity of luteolin glycosides isolated from lemongrass**. Journal of Functional Foods. 10 (2014), 436–443.
- GAULTON, Anna *et al.* - **ChEMBL: A large-scale bioactivity database for drug discovery**. Nucleic Acids Research. 40, D1 (2012), 1100–1107.
- GOEL, Rajesh Kumar *et al.* - **PASS-assisted exploration of new therapeutic potential of natural products**. Medicinal Chemistry Research. 20, 9 (2011), 1509–1514.
- GOMES, Eliane Carneiro; NEGRELLE, Raquel Rejane Bonato - ***Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf: Aspectos botânicos e ecológicos**. Visão Acadêmica. 4, 2 (2007), 137–144.
- GOODMAN; GILMAN – **Hormones and hormones antagonists**. In: BRUNTON, LAURENCE; CHABNER, BRUCE; KNOLLMAN, BJORN (Eds.) – The Pharmacological Basis of Therapeutics. Cambridge: Cambridge University Press, 2013. ISBN: 9780071769396, p.1264-1265.

- HARRISON, Richard K. - **Phase II and phase III failures: 2013-2015**. Nature Reviews Drug Discovery. 15, 12 (2016), 817–818.
- HAY, Michael *et al.* - **Clinical development success rates for investigational drugs**. Nat Biotech. 32, 1 (2014), 40–51.
- HUGHES, J. P. *et al.* - **Principles of early drug discovery**. British Journal of Pharmacology. 162 (2011), 1239–1249.
- JI, Hong Fang; LI, Xue Juan; ZHANG, Hong Yu - **Natural products and drug discovery: Can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia?** EMBO Reports. 10, 3 (2009), 194–200.
- JIANG, Nan; DOSEFF, Andrea; GROTEWOLD, Erich - **Flavones: From biosynthesis to health benefits**. Plants. 5, 2 (2016), 27.
- JUMPAENG, T. *et al.* - **Determination of antioxidant capacity and α -amylase inhibitory activity of the essential oils from citronella grass and lemongrass**. International Food Research Journal. 20, 1 (2013), 481–485.
- KATIYAR, Chandrakant *et al.* - **Drug discovery from plant sources: An integrated approach**. AYU (An International Quarterly Journal of Research in Ayurveda). 33, 1 (2012), 10.
- KHAN, Mahmud Tareq Hassan *et al.* - **Cholinesterase inhibitory activities of some flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies**. Chemico-Biological Interactions. 181, 3 (2009), 383–389.
- KIM, Jong-Sang; KWON, Chong-Suk; SON, Kun Ho - **Inhibition of alpha-glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid**. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 64, 11 (2000), 2458–2461.
- KOSCIELNY, Gautier *et al.* - **Open Targets: A platform for therapeutic target identification and validation**. Nucleic Acids Research. 45, D1 (2017), D985–D994.
- KOUL, V. K. *et al.* - **Steam distillation of lemon grass (*Cymbopogon* spp.)**. Indian Journal of Chemical Technology. 11, 1 (2004), 135–139.
- LAWAL, O. A. *et al.* - ***Cymbopogon citratus***. In KUETE, VICTOR (Ed.) - Medicinal Spices and Vegetables from Africa: Therapeutic Potential against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases. London: Academic Press, 2017. ISBN 9780128092866, p. 692.

- LAGUNIN, Alexey; FILIMONOV, Dmitry; POROIKOV, Vladimir - **Multi-targeted natural products evaluation based on biological activity prediction with PASS**. *Current Pharmaceutical Design*. 16 (2010), 1703–1717.
- LAHLOU, Mouhssen - **The success of natural products in drug discovery**. *Pharmacology & Pharmacy*. 4 (2013), 17–31.
- LEE, Je Hyuk; KIM, Gun Hee - **Evaluation of antioxidant and inhibitory activities for different subclasses flavonoids on enzymes for rheumatoid arthritis**. *Journal of Food Science*. 75, 7 (2010), H212-H217.
- LEONG, Sze Wei *et al.* - ***In vitro* and *in silico* evaluations of diarylpentanoid series as α -glucosidase inhibitor**. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 28 (2017), 302–309.
- LIANG, Zhibin *et al.* - **C-Glycosylflavones alleviate tau phosphorylation and amyloid neurotoxicity through GSK3 β inhibition**. *ACS Chemical Neuroscience*. 7, 7 (2016), 912–923.
- MA, L. Y. *et al.* - **The pharmacokinetics of C-glycosyl flavones of Hawthorn leaf flavonoids in rat after single dose oral administration**. *Phytomedicine*. 17, 8–9 (2010), 640–645.
- MARÍN, Laura *et al.* - **Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: Antimicrobial properties**. *BioMed Research International*. 2015 (2015), 1-18.
- MELLO, Priscilla D' *et al.* - **Modeling of COX-2 inhibitory activity of flavonoids**. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 3, 4 (2011), 33–40.
- MODESTI, Geison *et al.* - **Isolation of C-glycosylflavonoids with alpha-glucosidase inhibitory activity from *Passiflora bogotensis* Benth by gradient high-speed counter-current chromatography**. 990 (2015), 104–110.
- MOREIRA, F. V *et al.* - **Chemical composition and cardiovascular effects induced by the essential oil of *Cymbopogon citratus* DC. Stapf, Poaceae, in rats**. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 20, 6 (2010), 904–909.
- MUROTA, Kaeko; NAKAMURA, Yoshimasa; UEHARA, Mariko - **Flavonoid metabolism: The interaction of metabolites and gut microbiota**. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 82, 4 (2018), 600–610.
- NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. - **Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014**. *Journal of Natural Products*. 79, 3 (2016), 629–661.

- NINFALI, Paolino *et al.* - **C-Glycosyl flavonoids from *Beta vulgaris Cicla* and betalains from *Beta vulgaris rubra*: Antioxidant, anticancer and antiinflammatory activities—A review.** *Phytotherapy Research*. 31, 6 (2017), 871–884.
- PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. - **Flavonoids: an overview.** *Journal of Nutritional Science*. 5, e47 (2016), 1-15.
- PARK, Chung Mu; SONG, Young Sun - **Luteolin and luteolin-7-O-glucoside inhibit lipopolysaccharide-induced inflammatory responses through modulation of NF- κ B/Ap-1/PI3K-Akt signaling cascades in RAW 264.7 cells.** *Nutrition Research and Practice*. 7, 6 (2013), 423–429.
- PLACZEK, Sandra *et al.* - **BRENDA in 2017: New perspectives and new tools in BRENDA.** *Nucleic Acids Research*. 45, D1 (2017), D380–D388.
- POROIKOV, V. *et al.* - **PASS: Identification of probable targets and mechanisms of toxicity.** *SAR and QSAR in Environmental Research*. 18, 1–2 (2007), 101–110.
- PRASANNA, S.; DOERKSEN, R. J. - **Topological polar surface area: a useful descriptor in 2D-QSAR.** *Current medicinal chemistry*. 16, 1 (2009), 21–41.
- PROENÇA, Carina *et al.* - **α -Glucosidase inhibition by flavonoids: an *in vitro* and *in silico* structure–activity relationship study.** *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 32, 1 (2017), 1216–1228.
- REYMOND, Jean Louis; AWALE, Mahendra - **Exploring chemical space for drug discovery using the chemical universe database.** *ACS Chemical Neuroscience*. 3,9 (2012), 649–657.
- ROBERTS, Benjamin C.; MANCERA, Ricardo L. - **Ligand-protein docking with water molecules.** *Journal of Chemical Information and Modeling*. 48, 2 (2008), 397–408.
- RODRIGUES, Tiago *et al.* - **Counting on natural products for drug design.** *Nature Chemistry*. 8 (2016), 531-541.
- RODRIGUES, Tiago - **Harnessing the potential of natural products in drug discovery from a cheminformatics vantage point.** *Organic & Biomolecular Chemistry*. 15, 44 (2017), 9275–9282.
- SAGRADAS, Joana *et al.* - **Gastroprotective effect of *Cymbopogon citratus* infusion on acute ethanol-induced gastric lesions in rats.** *Journal of Ethnopharmacology*. 173 (2015), 134–138.
- SALEEM ALI-SHTAYEH, Mohammed *et al.* - ***In-vitro* screening of acetylcholinesterase inhibitory activity of extracts from Palestinian indigenous flora in relation to the**

- treatment of Alzheimer's disease.** *Functional Foods in Health and Disease.* 4, 9 (2014), 381–400.
- SASIDHARAN, S. *et al.* - **Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts.** *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines.* 8, 1 (2011), 1–10.
- SCHNEIDER, Gisbert - **From theory to bench experiment by computer-assisted drug design.** *CHIMIA International Journal for Chemistry.* 66, 3 (2012), 120–124.
- SHAH, Gagan *et al.* - **Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (Lemon grass).** *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research.* 2, 1 (2011), 3.
- SIMÕES-PIRES, Claudia A. *et al.* - **A TLC bioautographic method for the detection of α - and β -glucosidase inhibitors in plant extracts.** *Phytochemical Analysis.* 20, 6 (2009), 511–515.
- SMIETANA, Katarzyna; SIATKOWSKI, Marcin; MØLLER, Martin - **Trends in clinical success rates.** *Nature Reviews Drug Discovery.* 15, 6 (2016), 379–380.
- SOUSA, Saulo M.; SILVA, Pâmela S.; VICCINI, Lyderson F. - **Cytogenotoxicity of *Cymbopogon citratus* (DC) stapf (lemon grass) aqueous extracts in vegetal test systems.** *Anais da Academia Brasileira de Ciências.* 82, 2 (2010), 305–311.
- SWINNEY, D. C. - **Phenotypic vs. target-based drug discovery for first-in-class medicines.** *Clinical Pharmacology and Therapeutics.* 93, 4 (2013), 299–301.
- TADERA, Kenjiro *et al.* - **Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoids.** *Journal of Nutritional Science and Vitaminology.* 52, 2 (2006), 149–153.
- VEITCH, Nigel C.; GRAYER, Renée J. - **Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins.** *Natural Product Reports.* 28, 10 (2011), 1626.
- VEZZA, Teresa *et al.* - **Flavonoids in inflammatory bowel disease: A review.** *Nutrients.* 8, 211 (2016), 1-22.
- WANG, Tian Yang; LI, Qing; BI, Kai Shun - **Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate.** *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 13, 1 (2017), 12–23.
- WILDMAN, Scott A.; CRIPPEN, Gordon M. - **Prediction of physicochemical parameters by atomic contributions.** *Journal of Chemical Information and Computer Sciences.* 39, 5 (1999), 868–873.

- XIAO, Jianbo *et al.* - **Advance in dietary polyphenols as α -glucosidases inhibitors: A review on structure-activity relationship aspect.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 53, 8 (2013), 818–836.
- XIAO, Jianbo - **Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: Which show better biological significance?** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 57, 9 (2015), 1874–1905.
- XIAO, Jianbo *et al.* - **Advance on the flavonoid C-glycosides and health benefits.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 56 (2016), S29–S45.
- XU, Heng - **Inhibition kinetics of flavonoids on yeast α -glucosidase merged with docking simulations.** *Protein and peptide letters.* 17, 10 (2010), 1270–9.
- ZHANG, Wenjun *et al.* - **Simultaneous determination of vitexin-4''-O-glucoside, vitexin-2''-O-rhamnoside, rutin and vitexin from hawthorn leaves flavonoids in rat plasma by UPLC-ESI-MS/MS.** *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences.* 878, 21 (2010), 1837–1844.