



UNIVERSIDADE D
COIMBRA



Sónia Raquel Jorge Pedreiro

AVALIAÇÃO DE EFEITOS SINÉRGICOS ENTRE
COMPOSTOS FENÓLICOS DE *CYMBOPOGON CITRATUS*

Dissertação de Mestrado na área científica de Química Medicinal
orientada pelo Professor Doutor Artur Manuel Bordalo Machado
Figueirinha e pela Professora Doutora Maria Teresa Batista e
apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade de Coimbra da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2018

Sónia Raquel Jorge Pedreiro

**Avaliação de efeitos sinérgicos entre compostos fenólicos
do *Cymbopogon citratus***

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química Medicinal

Professor Doutor Artur Manuel Bordalo Machado Figueirinha

Professora Doutora Maria Teresa Pereira Marques Batista

Setembro 2018

Universidade de Coimbra

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Artur Figueirinha, por todo o conhecimento transmitido, paciência, perseverança e compreensão. Fico muito grata pela sua dedicação, desde o início até ao fim da minha dissertação de mestrado. À Professora Doutora Teresa Batista, pela partilha do seu conhecimento inesgotável, compreensão e paciência durante todo o tempo que me acompanhou. Obrigada pela possibilidade de trabalhar convosco. Obrigada pela vossa amizade. Tentando demonstrar a minha gratidão, deixo uma frase de William Arthur Ward: “O professor medíocre conta. O bom professor explica. O professor superior demonstra. O grande professor inspira.”

À Professora Doutora Lígia Salgueiro, diretora do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, pelas condições necessárias à execução prática da minha dissertação.

À Professora Doutora Teresa Cruz, por ter fornecido as linhas celulares e todo o material necessário para a realização dos testes *in vitro*, no AIBILI. À Isabel e à Cátia pelo apoio prestado.

À Fátima Colaço pela disponibilidade, ajuda e simpatia.

Aos meus colegas e amigos do laboratório, Patrícia Matos e Pedro Borges, por todo o vosso apoio, amizade e paciência. Porque sem vocês, este último ano não seria tão animador porque “As crises não afastam os amigos, apenas os selecionam.” (Augusto Cury)

À Andreia Cunha, à Diana Ferreira, à Sónia Branco, ao Ricardo Azevedo, à Julie Reis, à Filipa e à Carla por toda a vossa amizade e apoio. À Dora Cardoso, à Gilda Soares e ao Nuno Monteiro pela vossa disponibilidade quando precisei.

E, por último mas não menos importante, aos meus pais e irmãos que, apesar de tudo, me apoiaram e acreditaram em mim.

Índice

Agradecimentos	iii
Lista de figuras	vii
Lista de tabelas	xi
Abreviaturas	xiii
Resumo	xv
Abstract.....	xvii
Capítulo 1 – Introdução	1
1.1 <i>Cymbopogon citratus</i>	3
1.1.1 Caracterização botânica	3
1.1.2 Usos tradicionais e Etnomedicina.....	4
1.1.3 Composição fitoquímica e atividades biológicas atribuídas a <i>Cymbopogon citratus</i>	7
1.2 Classificação e estrutura de compostos fenólicos	11
1.2.1 Ácidos fenólicos	11
1.2.2 Flavonóides.....	14
1.2.3 Taninos	18
1.3 Atividade anti-inflamatória e antioxidante	20
1.4 Interação entre fármacos	24
1.4.1 Conceitos gerais de farmacodinâmica.....	27
1.4.2 Avaliação do sinergismo	29
Capítulo 2 – Materiais e Métodos	41
2.1 Material de estudo	43
2.2 Reagentes.....	43
2.3 Preparação do extrato.....	43
2.4 Fracionamento do extrato	44
2.4.1 Fracionamento em fase reversa	44
2.5 Monitorização das frações obtidas no decurso do fracionamento	46
2.5.1 Cromatografia em camada fina (TLC).....	46

2.5.2	Cromatografia líquida de alta resolução acoplada a um detetor de fotodíodos (HPLC-PDA).....	47
2.6	Atividade anti-inflamatória e Citotoxicidade.....	48
2.6.1	Cultura celular.....	48
2.6.2	Avaliação da atividade anti-inflamatória.....	48
2.6.3	Avaliação da viabilidade celular.....	49
2.6.4	Análise Estatística.....	50
Capítulo 3 – Resultados e Discussão.....		51
3.1	Caracterização físico-química do extrato por HPLC-PDA.....	53
3.2	Fracionamento do extrato.....	56
3.3	Caracterização físico-química das frações AF, FF, TI e TII por HPLC-PDA.....	65
3.4	Atividade anti-inflamatória e citotoxicidade do extrato e das frações.....	68
3.4.1	Atividade anti-inflamatória do extrato e das frações.....	68
3.5	Avaliação das interações sinérgicas de algumas frações do <i>Cymbopogon citratus</i>	74
3.5.1	Avaliação do sinergismo na combinação 1: Flavonóides e Ácidos fenólicos.....	74
3.5.2	Avaliação do sinergismo na combinação 2: Flavonóides e Taninos TI.....	78
3.5.3	Avaliação do sinergismo na combinação 3: Flavonóides e Taninos.....	80
3.5.4	Discussão dos resultados obtidos na avaliação do sinergismo pelos métodos do isoblograma e de Chou-Talalay.....	83
3.6	Citotoxicidade do extrato e das frações.....	84
Capítulo 4 – Conclusões.....		87
Capítulo 5 – Bibliografia.....		91

Lista de figuras

Figura 1. <i>Cymbopogon citratus</i> Stapf.....	3
Figura 2. Principais estruturas do tipo C6-C3-C6 em flavonóides.....	15
Figura 3. Estruturas da catequina e da galhocatequina.	18
Figura 4. Estruturas de algumas proantocianidinas do tipo B e do tipo A.	19
Figura 5. Estrutura representativa dos taninos hidrolisáveis.....	20
Figura 6. Curvas dose-resposta: a) conceito de potência; b) conceito de eficácia.....	28
Figura 7. Curvas dose-resposta em que a razão de potências é constante	30
Figura 8. Modelo da aditividade de Loewe. a) Curvas dose-resposta com razão de potências constante; b) Representação gráfica de um isoblograma.	35
Figura 9. a) Curvas dose-resposta resultantes da aplicação da equação do efeito médio. b) Linearização das curvas dose-resposta representadas em a).....	38
Figura 10. Gráfico Fa-CI para quantificar as interações sinérgicas.	39
Figura 11. Redução da resazurina a resorufina.	49
Figura 12. Cromatograma HPLC-PDA do extrato do <i>Cymbopogon citratus</i>	53
Figura 13. Espectros de absorção representativos da análise por HPLC-PDA do extrato do <i>Cymbopogon citratus</i> . a) e b) Espectros de absorção característicos dos ácidos fenólicos; c) e d) Espectros de absorção característicos dos flavonóides.	55
Figura 14. Esquematização do processo de fracionamento dos compostos fenólicos, presentes no infuso das folhas do <i>Cymbopogon citratus</i> . CF – compostos fenólicos	56
Figura 15. Cromatograma do fracionamento do <i>Cymbopogon citratus</i> , obtido por Cromatografia Flash.	57
Figura 16. Cromatogramas HPLC-PDA das frações F0-F4 obtidas por Cromatografia Flash: a) infuso do <i>Cymbopogon citratus</i> ; b) - fração F0; c) - F1; d) - F2; e) - F3; f) - F4	58
Figura 17. Coluna cromatográfica de Sephadex LH-20 (fase estacionária).....	59
Figura 18. TLC das frações F1 a F27 obtidas no fracionamento do <i>Cymbopogon citratus</i> por Cromatografia de exclusão molecular (sistema S1 e revelador NP-PEG).....	60

Figura 19. Exemplo ilustrativo para o controlo de algumas frações recolhidas no fracionamento por SEC quanto à presença e ao grau de polimerização dos taninos (fase móvel: tolueno: acetona: ácido acético 3:7.5:1; revelador - :DMACA).	60
Figura 20. Cromatogramas HPLC-PDA das frações resultantes do fracionamento do infuso do <i>Cymbopogon citratus</i> por SEC.....	63
Figura 21. Frações finais resultantes do fracionamento do extrato de <i>Cymbopogon citratus</i>	65
Figura 22. Cromatogramas HPLC-PDA das frações finais obtidas no processo do fracionamento: A - fração enriquecida em flavonóides; B - fração enriquecida em ácidos fenólicos; C - fração enriquecida em taninos TII; D - fração enriquecida em taninos TI; E – fração enriquecida (na mistura das duas frações dos taninos (TI)).	66
Figura 23. Espectro correspondente ao cromatograma da fração TI.....	67
Figura 24. Perfil espectral do cromatograma correspondente à fração TII, obtido por HPLC-PDA. Os espectros A e B são característicos de luteolinflavanos e o espectro C de apigeninflavanos.....	68
Figura 25. Efeito do infuso das folhas do <i>Cymbopogon citratus</i> em células RAW 264.7 estimuladas com LPS ($EC_{50} = 90,56 \pm 1,069 \mu\text{g/mL}$; $r^2 = 0,9969$).	69
Figura 26. Efeito da fração dos ácidos fenólicos em células RAW 264.7 estimuladas com LPS ($EC_{50} = 215,1 \pm 1,037 \mu\text{g/mL}$; $r^2 = 0,9924$).	69
Figura 27. Efeito da fração dos flavonóides em células RAW 264.7 estimuladas com LPS ($EC_{50} = 64,14 \pm 1,072 \mu\text{g/mL}$; $r^2 = 0,9911$).	70
Figura 28. Efeito da fração dos Taninos I em células RAW 264.7 estimuladas com LPS ($EC_{50} = 43,41 \pm 1,074 \mu\text{g/mL}$; $r^2 = 0,9945$).	70
Figura 29. Efeito da fração dos Taninos em células RAW 264.7 estimuladas com LPS ($EC_{50} = 166,2 \pm 1,268 \mu\text{g/mL}$; $r^2 = 0,9912$).	71
Figura 30. Curvas dose-resposta de todas as frações testadas individualmente em células RAW 264.7 estimuladas com LPS.	71
Figura 31. Gráfico Fa-CI correspondente à combinação 1, obtido pelo método de Chou-Talalay para quatro concentrações correspondentes às misturas AFF1, AFF2, AFF3 e AFF5. (Os resultados experimentais correspondem à média de 4 ensaios independentes, feitos em duplicado).	75

Figura 32. Isoblograma curvo do EC ₅₀ correspondente ao ensaio da combinação de flavonóides e ácidos fenólicos. (Os ensaios foram feitos em macrófagos estimulados com LPS. O resultado experimental corresponde à média de 4 ensaios independentes feitos em duplicado)...	76
Figura 33. Isoblograma curvo do EC _{7,68} correspondente ao ensaio da combinação de flavonóides e ácidos fenólicos. O ponto experimental corresponde às doses de cada uma das frações na mistura AFF3. (Os ensaios foram feitos em macrófagos estimulados com LPS. O resultado experimental corresponde à média de 4 ensaios independentes feitos em duplicado)...	77
Figura 34. Gráfico Fa-CI correspondente à combinação 2, obtido pelo método de Chou-Talalay (Os resultados experimentais correspondem à média de 5 ensaios independentes, feitos em duplicado).....	79
Figura 35. Isoblograma do EC ₅₀ correspondente ao ensaio da combinação de flavonóides e taninos TI (doses concentrações em µg/mL). O EC ₅₀ da combinação foi de 219,9 ± 1,090 e r ² =0,9999. (Os ensaios foram feitos em macrófagos estimulados com LPS. O resultado experimental corresponde à média de 5 ensaios independentes feitos em duplicado).....	79
Figura 36. Isoblograma do EC ₁₄ correspondente ao ensaio da combinação de flavonóides e taninos TI (concentrações/doses em µg/mL). (Os ensaios foram feitos em macrófagos estimulados com LPS. O resultado experimental corresponde à média de 5 ensaios independente feitos em duplicado).....	80
Figura 37. Gráfico Fa-CI correspondente à combinação 3, obtido pelo método de Chou-Talalay (Os resultados experimentais correspondem à média de 3 ensaios independentes, feitos em duplicado).....	81
Figura 38. Isoblograma do EC ₅₀ correspondente ao ensaio da combinação de flavonóides e taninos T (doses concentrações em µg/mL). O EC ₅₀ da combinação foi de 219,9 ± 1,090 e r ² =0,9999. (Os ensaios foram feitos em macrófagos estimulados com LPS. O resultado experimental corresponde à média de 5 ensaios independentes feitos em duplicado).....	82
Figura 39. Isoblograma do EC ₉ correspondente ao ensaio da combinação de flavonóides e taninos T (doses concentrações em µg/mL). (Os ensaios foram feitos em macrófagos estimulados com LPS. O resultado experimental corresponde à média de 3 ensaios independentes feitos em duplicado).....	83
Figura 40. Ensaio para avaliar a viabilidade celular dos macrófagos quando submetidos ao extrato e às várias frações, assim como os ensaios da associaçõas combinações das frações. As concentrações de cada uma das amostras testadas estão dentro do intervalo dos valores de EC ₅₀ da atividade anti-inflamatória. Os resultados estão em redução da resazurina pelos macrófagos	

relativamente ao controlo. Cada valor corresponde à média \pm desvio-padrão de ensaios independentes (extrato: n=4; flavonóides: n=8; ácidos fenólicos: n=6; taninos TI: n=9; taninos T II: n=4; taninos n=9; F + AF: n=9; F + T: n=4; F + TI: n=7). Foi aplicado o teste ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni's.....86

Lista de tabelas

Tabela 1. Classificação botânica do <i>Cymbopogon citratus</i> (retirado de Natural Resources Conservation Service – PLANTS Database, 2018).....	4
Tabela 2. Utilizações do <i>Cymbopogon citratus</i> na Medicina Tradicional (N.d.: não definido; RS: Rio Grande do Sul).....	5
Tabela 3. Levantamento bibliográfico dos fitoconstituintes e atividades farmacológicas de <i>C. citratus</i> (N.d.: não definido).....	8
Tabela 4. Estruturas, nomes comuns e IUPAC dos ácidos fenólicos e seus derivados mais comumente encontrados em plantas. Adaptado de Anantharaju <i>et al.</i> , 2016.	12
Tabela 5. Estruturas das principais classes dos Flavonóides. Adaptado de Kumar e Pandey, 2013 e Reis Giada, 2013.....	16
Tabela 6. Características do equipamento de cromatografia Flash.	45
Tabela 7. Condições do fracionamento e frações recolhidas por Cromatografia de fase reversa. .	45
Tabela 8. Identificação dos picos do cromatograma do infuso de <i>Cymbopogon citratus</i> , obtido por HPLC-PDA.....	54
Tabela 9. Frações recolhidas e respectivas condições do fracionamento do <i>Cymbopogon citratus</i> , utilizadas na Cromatografia Flash.	57
Tabela 10. Volumes das frações recolhidas no fracionamento do infuso do <i>Cymbopogon citratus</i> por cromatografia de exclusão molecular e identificação das classes de compostos presentes nas respectivas frações recolhidas, por TLC (sinal +: positivo para a classe identificada).....	61
Tabela 11. Registo das condições utilizadas e dos volumes das frações recolhidas no fracionamento da fração 7E por SPE.	64
Tabela 12. Apresentação dos valores do EC ₅₀ do extrato e de cada uma das frações resultantes do processo do fracionamento do <i>Cymbopogon citratus</i> . As curvas dose-resposta foram calculadas no programa GraphPad Prism, versão 5.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), recorrendo à regressão não linear e usando o log [inibidor] em função da resposta (parâmetro utilizado: desvio variável- variable slope).....	72
Tabela 13. Parâmetros utilizados no método de Chou-Talalay para determinar o CI experimental e o respetivo gráfico Fa-CI, para a combinação 1 (Ácidos fenólicos e Flavonóides).	75
Tabela 14. Parâmetros utilizados para construir o isoblograma curvo da combinação 1, relativo ao EC ₅₀	75
Tabela 15. Parâmetros utilizados para construir o isoblograma curvo relativo ao EC _{7,68}	77

Tabela 16. Parâmetros utilizados no método de Chou-Talalay para determinar o CI experimental e o respectivo gráfico Fa-CI, para a combinação 1 (Flavonóides e taninos TI).	78
Tabela 17. Parâmetros utilizados para construir o isoblograma curvo da combinação 2, relativo ao EC ₅₀	78
Tabela 18. Parâmetros utilizados para construir o isoblograma curvo da combinação 2, relativo ao EC ₁₄	80
Tabela 19. Parâmetros utilizados no método de Chou-Talalay para determinar o CI experimental e o respectivo gráfico Fa-CI, para a combinação 3 (flavonóides e taninos).	81
Tabela 20. Parâmetros utilizados para construir o isoblograma curvo da combinação 3, relativo ao EC ₅₀	81
Tabela 21. Parâmetros utilizados para construir o isoblograma curvo da mistura FT2 na combinação 3, relativo ao EC ₉	82
Tabela 22. Resumo das concentrações testadas em cada uma das combinações e os respectivos índices de combinação (concentrações expressas em µg/mL).	83

Abreviaturas

AP1 – Proteína Activa 1

C. citratus – *Cymbopogon Citratus*

CCL5 – Quimiocina (motivo C-C) do ligando 5

CF – Compostos Fenólicos

CI – Índice de Combinação

COX – Ciclo-oxigenase

CT – Chou-Talalay

DAMPs – Padrões moleculares associados a Dano

DMACA – *p*-dimetilamino-cinamaldeído

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DPPH – 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo

EEM – Equação do efeito Médio

F – Fração

FDA – *Food and Drug Administration*

HPLC-DAD – Cromatografia Líquida de Alta Resolução acoplada a um Detetor

IKB α – inibitor of nuclear factor kappa β kinase

IKK γ ou NEMO – Inibidor da subunidade quinase γ do fator nuclear kB ou modulador essencial do NF- κ β

iNOS – Sintase de Óxido Nítrico Indutível

LOX – Lipoxigenase

LPS – Lipopossacarídeo

ND – Não definido

NF- κ β – Fator Nuclear κ β

NO – Óxido Nítrico

NOD – Domínios de oligomerização de ligação a nucleótidos

NP-PEG – Producto Natural – polietilenoglicol

OXPHOS – Fosforilação Oxidativa

PAMPS – Padrões Moleculares associados a Patogéneos

PEG4000 – Polietilenoglicol 4000

PRRs – Recetores de Reconhecimento de Padrões

RNS – Espécies Reativas de Nitrogénio

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio
RS – Rio Grande do Sul
SAR – Relações Estrutura-Actividade
SEC – Cromatografia de Exclusão Molecular
SOD1 – Cu/Zn-superóxido dismutase
SOD2 – Mn-superóxido dismutase
SPE – Extração de Fase Sólida
TI – Taninos do Tipo I
TLC – Cromatografia de Camada Fina
TLR – *Toll-like receptors*
TNF – fator de Necrose Tumoral
VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

Resumo

O *Cymbopogon citratus* é uma planta do Sudoeste asiático, existindo principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Esta planta é usada na medicina tradicional como infusão e decocção das folhas, para tratar várias patologias entre as quais, síndromes gripais, febre, dor e infecções microbianas. Deste modo, os compostos responsáveis pelas atividades verificadas, têm sido estudados e caracterizados, sendo que os compostos fenólicos têm sido associados a muitas das atividades atribuídas a esta planta. Os compostos fenólicos presentes no infuso evidenciaram atividades antioxidante e anti-inflamatória. Assim, com vista à seleção da melhor forma de utilização da planta (extrato, frações ou compostos fenólicos isolados) nas atividades mencionadas, torna-se necessário conhecer a contribuição de cada classe de fenóis, bem como a existência de interações sinérgicas entre estes para a atividade total do extrato.

Neste sentido, o presente trabalho pretende estudar as interações sinérgicas entre as classes de fenóis presentes no infuso de *Cymbopogon citratus*, recorrendo a dois dos métodos mais usados (método do isoblograma e método de Chou-Talalay).

Após a preparação do infuso, este foi fracionado por várias técnicas separativas, nomeadamente: cromatografia de fase reversa, cromatografia de exclusão molecular e extração em fase sólida. As frações obtidas foram monitorizadas por TLC e HPLC-PDA. Do fracionamento resultaram cinco frações: flavonóides, ácidos fenólicos, taninos de baixo peso molecular, com 1 a 4 unidades monoméricas (II), oligómeros e polímeros de taninos (III) e uma mistura de taninos resultante das frações II e III. A atividade anti-inflamatória e a citotoxicidade do extrato e das frações foram avaliadas em macrófagos estimulados pelo LPS. A amostra mais ativa foi a fração dos taninos II com um EC_{50} de $43,41 \pm 1,074 \mu\text{g/ml}$ seguido dos flavonóides ($EC_{50} = 64,14 \pm 1,072 \mu\text{g/ml}$), extrato ($EC_{50} = 90,56 \pm 1,069 \mu\text{g/ml}$), taninos ($EC_{50} = 166,2 \pm 1,268 \mu\text{g/ml}$) sendo os ácidos fenólicos os menos ativos ($EC_{50} = 215,1 \pm 1,037 \mu\text{g/ml}$). Não foi possível determinar o EC_{50} dos taninos III por terem apresentado atividade pro-inflamatória.

Com base nos valores de EC_{50} obtidos e da proporção de cada classe de fenóis no extrato prepararam-se misturas das amostras acima mencionadas e realizaram-se ensaios com vista a verificar a existência de interações sinérgicas para a atividade anti-inflamatória e a citotoxicidade em macrófagos estimulados com LPS. As misturas testadas foram: flavonóides e ácidos fenólicos (proporção 6,5:1); flavonóides e taninos II (proporção 1,5:1); e flavonóides e taninos (proporção 1,57:1). Os resultados experimentais permitiram concluir a existência de sinergismo em todas as misturas testadas, mas em baixas concentrações. A mistura de flavonóides e ácidos fenólicos

apresentou sinergismo entre 14,42 e 57,69 µg/ml, a de flavonóides e taninos TI na concentração de 20,83 µg/ml e a de flavonóides e taninos entre 20,45 e 40,90 µg/ml. Acima destas concentrações, as misturas foram aditivas ou antagônicas.

Os resultados obtidos permitem concluir que os constituintes são mais ativos em mistura do que isoladamente, tendo-se verificado sinergismos para baixas concentrações.

Palavras – chave: *Cymbopogon citratus*; compostos fenólicos; sinergismo; método de Chou-Talalay; método do isoblograma

Abstract

Cymbopogon citratus is a plant in Southwest Asia, existing mainly in tropical and subtropical regions. This plant is used in traditional medicine as infusion and decoction of the leaves, to treat several pathologies among which, flu syndromes, fever, pain and microbial infections. In this way, the compounds responsible for the verified activities have been studied and characterized, and the phenolic compounds have been associated to many of the activities attributed to this plant. The phenolic compounds present in the infusion evidenced antioxidant and anti-inflammatory activities. Thus, in order to select the best way of using the plant (extracts, fractions or isolated phenolic compounds) in the mentioned activities, it is necessary to know the contribution of each class of phenols, as well as the existence of synergistic interactions between them for the activity of the extract.

In this sense, the present work intends to study the synergic interactions between the classes of phenols present in the infusion of *Cymbopogon citratus*, using two of the most used methods (isobologram method and Chou-Talalay method).

After preparation of the infusion, it was fractionated by several separative techniques, namely reverse phase chromatography, molecular exclusion chromatography and solid phase extraction. Fractions obtained were monitored by TLC and HPLC-PDA. Fractionation resulted in five fractions: flavonoids, phenolic acids, low molecular weight tannins, with 1 to 4 monomeric units (TI), oligomers and polymers of tannins (TII) and a mixture of tannins resulting from the TI and TII fractions. The anti-inflammatory activity and the cytotoxicity of the extract and fractions were evaluated in LPS-stimulated macrophages. The most active sample was the fraction of TI tannins with an EC_{50} of $43.41 \pm 1.074 \mu\text{g/ml}$ followed by flavonoids ($EC_{50} = 64.14 \pm 1.072 \mu\text{g/ml}$), extract ($EC_{50} = 90.56 \pm 1.069 \mu\text{g/ml}$), tannins ($EC_{50} = 166.2 \pm 1.268 \mu\text{g/ml}$) and phenolic acids were the least active ($EC_{50} = 215.1 \pm 1.037 \mu\text{g/ml}$). It was not possible to determine the EC_{50} of the TII tannins because they presented pro-inflammatory activity.

Based on the EC_{50} values obtained and the proportion of each class of phenols in the extract, mixtures of the above-mentioned samples were prepared and assays were performed to verify the existence of synergistic interactions for anti-inflammatory activity and cytotoxicity in macrophages stimulated with LPS. The mixtures tested were: flavonoids and phenolic acids (6.5:1 ratio); flavonoids and TI tannins (1.5:1 ratio); and flavonoids and tannins (1.57:1 ratio). The experimental results allowed to conclude the existence of synergism in all the mixtures tested, but in low concentrations. The blend of flavonoids and phenolic acids showed synergism between

14.42 and 57.69 $\mu\text{g/ml}$, that of flavonoids and TI tannins at a concentration of 20.83 $\mu\text{g/ml}$ and that of flavonoids and tannins between 20.45 and 40.90 $\mu\text{g/ml}$. Above these concentrations, the mixtures were additive or antagonistic.

The results obtained allow us to conclude that the constituents are more active in mixture than in isolation, with synergisms occurring at low concentrations.

Keywords: *Cymbopogon citratus*; phenolic compounds; synergism; Chou-Talalay method; isobologram method.

Capítulo 1 – Introdução

1.1 *Cymbopogon citratus*

1.1.1 Caracterização botânica

O *Cymbopogon citratus* (*C. citratus*) é uma planta endémica nas zonas tropicais e sub-tropicais do Sudoeste Asiático, sendo também cultivado nos continentes Americano e Africano e em países europeus de clima temperado (Shah *et al.*, 2011). A espécie *Cymbopogon citratus* Stapf. (figura 1), conhecida em Portugal como Erva-Príncipe ou Chá-Príncipe, pertence à família Poaceae (ou Graminaceae) (Novais *et al.*, 2004). Esta família compreende cerca de 770 géneros e 12074 espécies (Soreng *et al.*, 2015), sendo que do género *Cymbopogon* fazem parte cerca de 144 espécies (Avoseh *et al.*, 2015).



Figura 1. *Cymbopogon citratus* Stapf. (retirado de CABI, 2018).

Inicialmente conhecida por *Andropogon citratus*, classificação atribuída por De Candolle, esta planta foi reclassificada como *Cymbopogon citratus* por Otto Stapf. O nome “citratus” de origem latina, deve-se ao aroma a limão característico da planta (Shah *et al.*, 2011; Uraku, 2015). O *Cymbopogon citratus* pertence à superdiversão das Espermatófitas, à classe das Liliopsidas (anteriormente denominada por Monocotiledóneas) e, como já foi referido, à família Poaceae. A classificação taxonómica do *Cymbopogon citratus* está descrita na tabela 1.

Tabela 1. Classificação botânica do *Cymbopogon citratus* (retirado de Natural Resources Conservation Service – PLANTS Database, 2018).

Reino	Plantae
Sub-reino	Tracheobionta
Super-divisão	Spermatophyta
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Liliopsida
Sub-classe	Commelinidae
Ordem	Cyperales
Família	Poaceae
Género	<i>Cymbopogon</i> Spreng.
Espécie	<i>Cymbopogon citratus</i> (DC ex Nees) Stapf.

Na literatura, existem outras designações para o *C. citratus*. De acordo com a Ecocrop (Peter Schmitz – **Ecocrop**, 2018) esta planta também pode ser denominada de *Andropogon citratus*, *Andropogon ceriferus*, *Andropogon nardus subsp. ceriferius* e *Cymbopogon Nardus*.

1.1.2 Usos tradicionais e Etnomedicina

O uso tradicional de plantas do género *Cymbopogon* é amplo, as quais são utilizadas sob a forma de infusões e decocções, suplemento alimentar, repelente de insetos, inseticida, antigripal, bem como analgésico e anti-inflamatório. A planta *Cymbopogon citratus* é a mais distribuída e utilizada (Avoseh *et al.*, 2015), nomeadamente para tratar várias patologias, referidas na tabela 2, ou aliviar os seus sintomas, na indústria alimentar como conservante e aromatizante, em aromaterapia, na indústria cosmética, entre outros. Estudos recentes mostram que esta planta também poderá ser aplicada em processos de tratamento de efluentes, já que é um bom bioadsorvente de Pb (III), Cd (II) e Zn (II), removendo estes metais das soluções aquosas em que se encontrem (Adesola Babarinde, Kemi Ogundipe, Kikelomo Tobi Sangosanya, 2016).

C. citratus é utilizada por todo o mundo pelas suas vastas aplicações medicinais, relacionadas com as suas propriedades antimicrobianas (anti-fúngico, anti-bacteriano e anti-parasitário), anti-inflamatórias, antioxidantes, anti-carcinogénicas, cardioprotectoras, anti-tússicas, anti-reumáticas, anti-sépticas, entre outras (Ekpenyong, Akpan e Nyoh, 2015). No entanto, as

aplicações desta planta centram-se maioritariamente no alívio de constipações, síndromes gripais, dor, febre e ansiedade. *C. citratus* é frequentemente consumida sob a forma de infusão ou decoção das folhas da planta, podendo ser utilizadas outras partes da planta como, por exemplo, os rizomas. A tabela 2 descreve as várias aplicações da planta *C. citratus* na medicina tradicional, o nome comum na zona geográfica respetiva e a parte da planta utilizada.

Tabela 2. Utilizações do *Cymbopogon citratus* na Medicina Tradicional (N.d.: não definido; RS: Rio Grande do Sul).

Nome comum	Zona geográfica	Parte da planta	Indicação terapêutica	Referência bibliográfica
Agusl/ Korikoba/ Lemon grass	Noroeste da Nigéria (Igbo, Hausa Yoruba)	Folhas	Cancro, Febre, Indigestão,	(Dike, Obembe e Adebisi, 2012)
Cana-cidreira /Capim-cidreira	Brasil (Porto Alegre-RS)	Folhas	Controlo de peso	(Cercato <i>et al.</i> , 2015)
Capim-santo	Brasil	Folhas	Ansiedade, Hipertensão	(Avoseh <i>et al.</i> , 2015)
Capim-santo	Brasil do Nordeste (Margojipe),	N.d.	Febre, Gripe, Hipercolesterolémia, Inflamação, Stress	(De Santana, Voeks e Funch, 2016)
Citronelle/ Lemon grass	África (Ilha de Mauritius)	Folhas e Rizoma	Asma, Bronquite, Constipação	(Suroowan e Mahomoodally, 2016)
Citronelle/ Lemon grass	Madagáscar (Ilha Rodrigues)	Folhas	Constipação	(Samoisy e Mahomoodally, 2016)
Ewe-tea, Koko-oba, Lemon grass	Nigéria do Sul	Folhas	Malária	(Iyamah e Idu, 2015)
Fever grass	América Central (Trinidad e Tobago)	Folhas e Rizoma	Constipação, Diabetes, Febre, Gripe	(Avoseh <i>et al.</i> , 2015)

Tabela 2. Utilizações do *Cymbopogon citratus* na Medicina Tradicional (N.d.: não definido; RS: Rio Grande do Sul) (continuação).

Nome comum	Zona geográfica	Parte da planta	Indicação terapêutica	Referência bibliográfica
Grass tea	Costa Rica	Folhas	Alívio Constipação, Carminativo, Depurativo, Expetorante	(Avoseh et al., 2015)
Koko-oba, Lemon grass	Nigéria (Ogbomoso)	Folhas	Malária	(Olorunnisola et al., 2013),
Lemon grass	Ásia e África	Folhas	Anti-inflamatório, Antimicrobiano, Sedativo	(Boukhatem et al., 2014)
Lemon grass	Egipto	Folhas	Antiespasmódico renal, Diurético	(Shah et al., 2011),
Lemon grass	Nigéria	Folhas	Diabetes, Desordens do sistema nervoso, Inflamação	(Avoseh et al., 2015)
Limonaria	Argentina	Folhas	Constipações, Decocção com outras plantas para o tratamento da Malária, Desordens digestivas e gástricas, Gripes	(Avoseh et al., 2015)
Limonaria	Colômbia	Rizomas	Controlo de pragas, Pasta dentrífica,	(Avoseh et al., 2015)
Mlaing	Ásia (Nordeste do Cambodja)	Folhas	Cãimbras, Constipação, Dor de cabeça, Dor lombar, Febre	(Chassagne et al., 2016)
Mlaing	Ásia (Nordeste do Cambodja)	Planta	Entorses	(Chassagne et al., 2016)

Tabela 2. Utilizações do *Cymbopogon citratus* na Medicina Tradicional (N.d.: não definido; RS: Rio Grande do Sul) (continuação).

Nome comum	Zona geográfica	Parte da planta	Indicação terapêutica	Referência bibliográfica
N.d.	Norte das Filipinas (Província de Benguet)	N.d.	Ansiedade, Artrite, Constipações, Desordens gástricas, Febre Dor,	(Ekpenyong, Akpan e Nyoh, 2015)
Sera, Verveine	Índia	Parte aérea	Dor de cabeça, Febre, Sedativo	(Shah et al., 2011)
Ta-Khrai	Tailândia	Planta	Digestivo	(Shah et al., 2011)
Ta-Khrai	Tailândia	Raiz	Diabetes	(Shah et al., 2011)
Té-limon, Zacate limón	México	N.d.	Ansiolítico e Depressão	(López-Rubalcava e Estrada-Camarena, 2016)

1.1.3 Composição fitoquímica e atividades biológicas atribuídas a *Cymbopogon citratus*

As plantas sintetizam uma série de compostos que podem ser classificados em dois tipos: metabolitos primários e metabolitos secundários. Os metabolitos primários permitem a sobrevivência da planta. Macromoléculas como proteínas, lípidos, açúcares, entre outros, constituem os metabolitos primários e são produzidos geralmente em maior quantidade relativamente aos metabolitos secundários. Os metabolitos primários são normalmente necessários para a fotossíntese, respiração e armazenamento de nutrientes. Por outro lado, os metabolitos secundários são produzidos em menor quantidade e têm como funções a perpetuação da espécie, sintetizando compostos que são responsáveis pela reprodução (polinização) e outros que funcionam como mecanismos de defesa da planta, no que diz respeito a animais, bactérias, fungos, vírus e à luz ultravioleta. Os metabolitos secundários podem ser voláteis ou não-voláteis (fixos) (Geetha e Geetha, [s.d.]), hidrofílicos ou lipofílicos, relacionando-se, os usos tradicionais, anteriormente referidos, com a natureza química desses metabolitos presentes na planta e nos extratos a partir dela obtida.

C. citratus contém vários tipos de metabolitos secundários, fixos e voláteis. Alguns investigadores realizaram extrações das folhas com um solvente polar e outro apolar, etanol e

clorofórmio, respetivamente, e procederam à caracterização fitoquímica dos respetivos extratos, tendo sido detetados flavonóides, hidratos de carbono, esteróides, taninos, alcalóides, glicósidos, fenóis e fitoesteróis (Umar *et al.*, 2016). No que se refere aos compostos fenólicos, derivados do ácido cafeico, ferúlico, clorogénico e *p*-cumárico, assim como derivados *O*- ou *C*-glicosilados da apigenina e da luteolina, taninos do tipo heteroflavanos e proantocianidinas foram também identificados (Costa *et al.*, 2016; Figueirinha *et al.*, 2008).

Por outro lado, estudos efetuados sobre o óleo essencial das folhas mostraram a presença de compostos voláteis tais como β -mirceno, α -pineno, geraniol, geranial, acetato de geranilo, D-limoneno, óxido de limoneno, citral, citronelol, linalol, neral entre outros (Mohamed Ali *et al.*, 2017; Olayemi, 2017).

Na tabela 3 referem-se alguns fitoconstituintes extraídos de *C. citratus* e as atividades biológicas que lhe têm sido atribuídas.

Tabela 3. Levantamento bibliográfico dos fitoconstituintes e atividades farmacológicas de *C. citratus* (N.d.: não definido).

Extrato e parte da planta	Tipos de compostos/Compostos identificados	Atividades biológicas	Referência bibliográfica
Extrato aquoso das folhas secas (Soxhlet)	N.d.	Antioxidante	(Rahim <i>et al.</i> , 2013)
Decocção de folhas frescas	Fenólicos e alcalóides	Hipoglicémico e hipolipidémico	e (Adeneye e Agbaje, 2007)
Decocção de folhas secas	Polissacarídeos	Anti-tumoral	(Thangam, Suresh e Kannan, 2014)
	N.d.	Anti-larvicida (Malária e Dengue)	(Murugan <i>et al.</i> , 2015)

Tabela 3. Levantamento bibliográfico dos fitoconstituintes e atividades farmacológicas de *C. citratus* (N.d.: não definido) (continuação).

Extrato e parte da planta	Tipos de compostos/Compostos identificados	Atividades biológicas	Referência bibliográfica
Infusão das folhas secas	Derivados do ácido cafeico e do ácido <i>p</i> -cumárico, 6-C-hexosil-8-C-pentosil luteolina, 6-C-pentosil-8-C-hexosil apigenina, 6-C-glucosil luteolina (isoorientina), 2''-O-ramnosil isoorientina, 6-C-pentosil-8-C-pentosil luteolina, 7-O-glucosil luteolina, 7-O-neohesperosil luteolina, flavanóis e proantocianidinas	Antioxidante	Figueirinha <i>et al.</i> , 2008
	Compostos fenólicos		(Francisco <i>et al.</i> , 2011)
	Compostos fenólicos		(Francisco <i>et al.</i> , 2011)
	Ácido clorogénico		(Francisco <i>et al.</i> , 2013)
Extrato etanólico (50%) das folhas	Ácidos feruloilquínico, neoclorogénico, clorogénico e <i>p</i> -cumárico, carnilósido, isoorientina, isoorientina 2''-O-ramnósido, luteolina 7-O-neohesperidósido, luteolina 6-C-pentósido, cassiaocidentalina B, kurilensina A e isochaftósido	Anti-inflamatória	(Costa <i>et al.</i> , 2015)
	Luteolina 7-O-neohesperidósido, cassiaocidentalina B, carlinósido, cinarósido		(Costa <i>et al.</i> , 2016)
Extrato etanólico (50%) das folhas	Ácidos fenólicos, flavonóides e taninos	Gastroprotector	(Sagradas <i>et al.</i> , 2015)
	Fenólicos	Antioxidante e Anti-inflamatória	(Tiwari, Dwivedi e Kakkar, 2010)

Tabela 3. Levantamento bibliográfico dos fitoconstituintes e atividades farmacológicas de *C. citratus* (N.d.: não definido) (continuação).

Extrato e parte da planta	Tipos de compostos/Compostos identificados	Atividades biológicas	Referência bibliográfica
Extrato etanólico (80%) do caule	Fenólicos	Hepatoprotectora	(Koh, Mokhtar e Iqbal, 2012)
Extrato e parte da planta	Tipos de compostos/Compostos identificados	Atividades biológicas	Referência bibliográfica
Extratos etanólicos (50 e 90%)	Monoterpenos, sesquiterpenos e ácidos fenólicos	Anti-proliferativo	(Halabi e Sheikh, 2014)
Extrato metanólico (70%) das folhas	Citral	Anti-inflamatório	(Bachiega e Sforcin, 2011)
	Fenóis, flavonóides e alcalóides	Anti-larvicida (Malária)	(Karunamoorthi e Ilango, 2010)
Extrato metanólico (70%) das folhas	Apigenina e derivados da luteolina, maioritariamente luteolina 2''-O-ramnosil-6-C-glucósido	N.d.	(Roriz <i>et al.</i> , 2014)
Extrato metanólico	Fenóis, flavonóides e alcalóides	Antimicrobiana	(Zulfa, Chia e Rukayadi, 2016)
	Citral	Antinociceptivo	(Viana <i>et al.</i> , 2000)
	Geranial e neral	Anti-bacteriana	(Naik <i>et al.</i> , 2010)
Óleo essencial	Citral	Anticonvulsante, Hipnótico/Sedativo (tratamento da epilepsia)	(Silva <i>et al.</i> , 2010)
	Geranial e neral	Ansiolítica (efeito mediado pelo receptor GABA _A)	(Costa <i>et al.</i> , 2011)
	Citral, geraniol e β -mirceno	Redução dos níveis de colesterol	(Costa <i>et al.</i> , 2011)

É frequente a utilização de *C. citratus* sob a forma de infusões ou decocções na Medicina Tradicional e estudos fitoquímicos destas preparações mostraram a presença de uma grande variedade de compostos fenólicos, com os quais se relacionam algumas das atividades biológicas atribuídas a esta planta. No entanto, a caracterização fitoquímica é fundamental, pois o perfil químico dos extratos depende não só do solvente de extração utilizado, da parte da planta de onde são extraídos os fitoconstituintes, mas também de outros fatores nomeadamente fisiológicos, edafo-climáticos e genéticos. Neste sentido, a caracterização fitoquímica e a elucidação estrutural dos compostos presentes nos extratos sujeitos à avaliação da atividade biológica é fundamental, o que por vezes permite a descoberta de novos fármacos, quer por utilização de compostos puros isolados a partir da planta, quer por recurso à hemi-síntese ou mesmo como “inspiração” para o desenho e síntese de novas moléculas biologicamente ativas.

O presente trabalho focar-se-á nos compostos fenólicos nomeadamente nos ácidos fenólicos, flavonóides e taninos, pelo que estas três classes serão abordadas mais detalhadamente quanto à sua classificação e estrutura.

1.2 Classificação e estrutura de compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários das plantas, sintetizados pela via do ácido chiquímico e cujos precursores são os aminoácidos fenilalanina e/ou tirosina. Da classe dos compostos fenólicos fazem parte, por exemplo, os fenóis simples, flavonóides, taninos, xantonas, cumarinas e linhanos. Estruturalmente, os compostos fenólicos são compostos não azotados contendo, no mínimo, um anel benzénico hidroxilado. No entanto, ao invés de ter um grupo hidroxilo ligado ao anel benzénico este pode estar associado a outras funções tal como um éster, éter ou a sacarídeos (Anantharaju *et al.*, 2016).

1.2.1 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos podem ser classificados consoante a sua estrutura em derivados do ácido cinâmico (têm um núcleo estrutural C₃-C₆) e derivados do ácido benzóico (núcleo estrutural C₁-C₆). Alguns dos derivados do ácido cinâmico mais comuns são o ácido *p*-cumárico, o ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido criptoclorogénico, ácido neoclorogénico, ácido ferúlico e ácido sinápico. Os ácidos protocatéquico, vanílico, gálhico e siríngico são derivados do ácido benzóico (Anantharaju *et al.*, 2016, Tsao, 2010). A tabela 4 refere algumas das estruturas de ácidos fenólicos e seus derivados.

Tabela 4. Estruturas, nomes comuns e IUPAC dos ácidos fenólicos e seus derivados mais comumente encontrados em plantas. Adaptado de Anantharaju *et al.*, 2016.

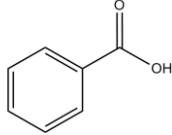
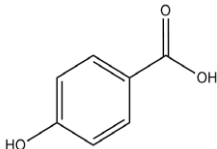
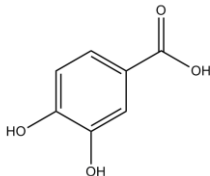
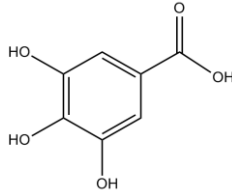
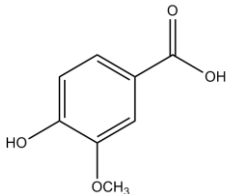
Nome IUPAC	Nome comum	Estrutura
Ácidos do tipo benzoico		
Ácido benzóico	Ácido benzóico	
Ácido 4-hidroxibenzoico	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	Ácido protocatéquico	
Ácido 3,4,5-trihidroxil benzóico	Ácido gálgico	
Ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico	Ácido vanílico	

Tabela 4. Estruturas, nomes comuns e IUPAC dos ácidos fenólicos e seus derivados mais comumente encontrados em plantas. Adaptado de Anantharaju *et al.*, 2016 (continuação)

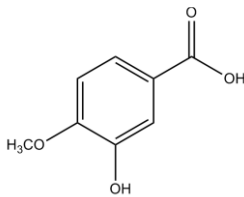
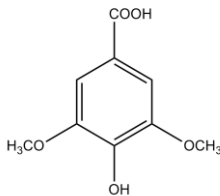
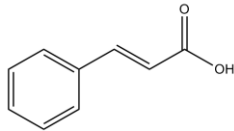
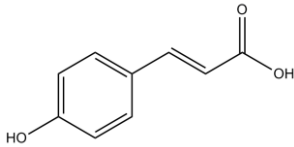
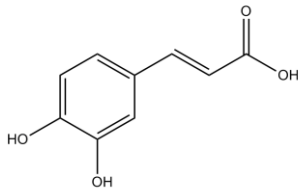
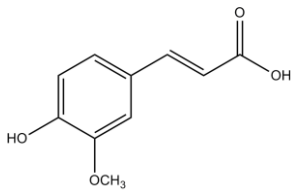
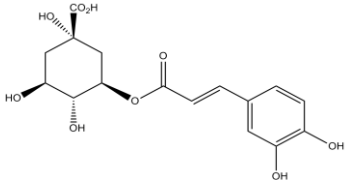
Nome IUPAC	Nome comum	Estrutura
Ácido 3-hidroxi-4-metoxibenzóico	Ácido isovanílico	
Ácido dimetoxibenzóico	Ácido siríngico	
Ácidos do tipo cinâmico		
Ácido 3-fenilprop-2-enóico	Ácido cinâmico	
Ácido 3-(4-hidroxifenil)-2-propenóico	Ácido <i>p</i> -cumárico	
Ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propenóico	Ácido cafeico	
Ácido 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) prop-2-enóico	Ácido ferúlico	

Tabela 4. Estruturas, nomes comuns e IUPAC dos ácidos fenólicos e seus derivados mais comumente encontrados em plantas. Adaptado de Anantharaju *et al.*, 2016 (continuação).

Nome IUPAC	Nome comum	Estrutura
Ácido 3-{[(2E)-3-(3,4-dihydroxifenil)enoil]oxi}-1,4,5-trihidroxiciclohexano carboxílico	Ácido clorogénico (Ácido 3-cafeoilquínico)	

1.2.2 Flavonóides

Os flavonóides são moléculas constituídas por dois anéis aromáticos unidos por 3 carbonos. Esta cadeia de ligação pode eventualmente ciclizar formando um anel pirano ou furano. Considera-se que os flavonóides têm como estrutura geral $C_6-C_3-C_6$ como se ilustra na figura 2 (Kachlicki *et al.*, 2016).

Geralmente, na Natureza os flavonóides estão glicosilados podendo ser *O*-glicósidos ou *C*-glicósidos. A maioria dos flavonóides têm o anel B ligado ao anel C pelo carbono na posição 2 exceto as isoflavonas (3-fenilbenzopirano) e os neoflavonóides (4-fenilbenzopirano) em que o anel B está ligado ao anel C pelas posições 3 e 4, respetivamente. Já as chalconas não têm o anel C e as auronas possuem um anel do tipo furano (Figura 2).

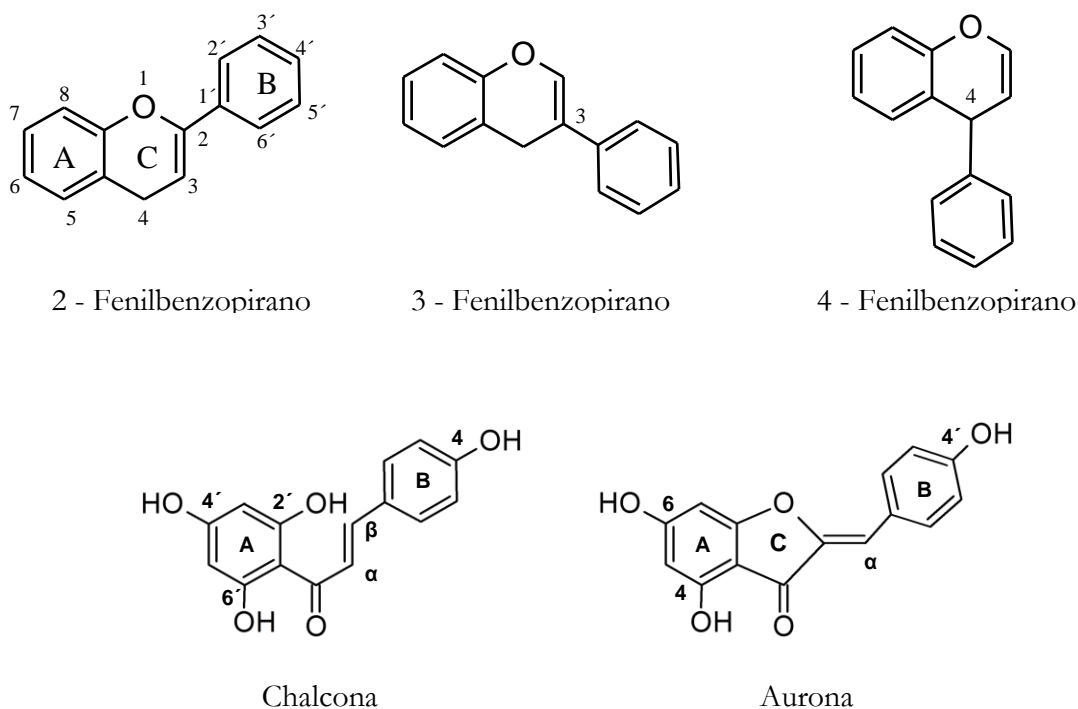


Figura 2. Principais estruturas do tipo C6-C3-C6 em flavonóides.

O padrão de hidroxilação e substituições no anel C são responsáveis pela subdivisão dos flavonóides em flavonas (A), flavonóis (B), flavanonas (C), flavanonóis (D), flavanóis (E), antocianidinas (F) e isoflavonas (G) (Tabela 5).

As flavonas têm uma ligação dupla nos carbonos C_2 - C_3 e uma função cetona na posição C_4 do anel C.

Os flavonóis têm uma estrutura semelhante à das flavonas tendo um grupo hidroxilo ligado ao carbono C_3 do anel C, podendo estar glicosilado.

As flavanonas, também designadas por dihidroflavonas, têm o anel C saturado relativamente às flavonas (ausência da ligação dupla nos carbonos C_2 - C_3) (Panche, Diwan e Chandra, 2016).

Os flavanonóis são caracterizados pela ausência da ligação dupla nas posições 2 - 3 e pela presença de um grupo hidroxilo na posição 3 no anel C, mantendo a função cetona na posição 4.

Os flavanóis, dos quais as catequinas são os mais frequentes, seguido das galhocatequinas, caracterizam-se pela ausência da ligação dupla entre os carbonos C_2 e C_3 e pela ausência do grupo carbonilo no carbono quatro do anel C. Além desta particularidade estrutural, a maioria dos flavanóis estão hidroxilados no carbono três e, por isso, estes compostos têm dois centros quirais no C_2 e no C_3 (quatro diastereoisómeros possíveis).

As antocianidinas comumente existem na forma glicosilada sendo referidas como antocianinas. Estes compostos são caracterizados pela presença de uma carga positiva no oxigênio do anel C (Smeriglio *et al.*, 2016), conferindo a estrutura base das antocianidinas, denominada por catião flavílio (estrutura F, Tabela 5). A estabilidade das antocianinas é dependente do pH, da luz, da estrutura e da temperatura. Estas propriedades observadas nas antocianinas devem-se à estrutura de ressonância do catião flavílio (Khoo *et al.*, 2017). A coloração destes compostos relaciona-se principalmente com o pH e grau de hidroxilação e padrão de metilação ou acilação dos grupos hidroxilo nos anéis A e B, assim como com o grau de glicosilação (açúcar ou o açúcar acilado). As antocianinas são quimicamente estáveis em condições ácidas (Panche, Diwan e Chandra, 2016, Reis Giada, 2013, Tsao, 2010). Na tabela 5 estão ilustradas as estruturas gerais de algumas classes de flavonóides.

Tabela 5. Estruturas das principais classes dos Flavonóides. Adaptado de Kumar e Pandey, 2013 e Reis Giada, 2013.

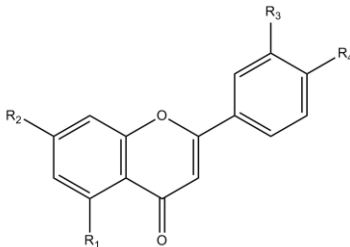
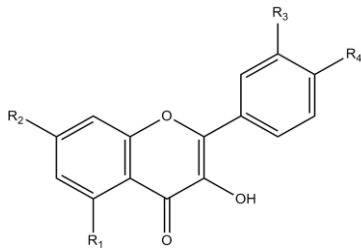
Classes de Flavonóides	Estrutura geral	Exemplos
A) Flavonas		<p>Crisina $R_1=R_2=OH$ $R_3=R_4=H$</p> <p>Apigenina $R_1=R_2= R_4=OH$ $R_3=H$</p> <p>Luteolina $R_1=R_2= R_3= R_4=OH$</p>
B) Flavonóis		<p>Quercetina $R_1=R_2= R_3= R_4=OH$</p> <p>Camferol $R_1=R_2= R_4= OH$ $R_3=H$</p> <p>Galangina $R_1=R_2=OH$ $R_3=R_4=H$</p>

Tabela 5. Estruturas das principais classes dos Flavonóides. Adaptado de Kumar e Pandey, 2013 e Reis Giada, 2013. (continuação)

C) Flavanonas		<p>Hesperetina $R_1=R_2= R_3=OH$ $R_4=OCH_3$ Naringenina $R_1=R_2= R_4= OH$ $R_3=H$</p>
D) Flavanonóis		<p>Taxifolina $R_1=R_2= R_3= R_4=OH$</p>
E) Flavanóis		<p>Catequina $R_1=R_2= R_3= R_4=OH$ $R_5=H$ Galthocatequina$R_1=R_2=R_3=$ $R_4=R_5=OH$</p>
F) Antocianidinas		<p>Delfinidina¹ $R_1=R_2= R_3= R_4=R_5=R_6=OH$ Cianidina¹ $R_1=R_2= R_4=R_5=R_6=OH$ $R_3=H$</p>
G) Isoflavonas		<p>Daidzeína $R_2= R_3=OH$ $R_1=H$</p>

¹ Panche, Diwan e Chandra, 2016

1.2.3 Taninos

Os taninos são compostos fenólicos de elevado peso molecular (500-3000 Da) sendo encontrados no reino vegetal. Estes compostos podem ser classificados em duas classes principais: taninos condensados e taninos hidrolisáveis (Naumann *et al.*, 2017).

Os taninos condensados, também designados por proantocianidinas são flavonóides poliméricos, constituídos geralmente por subunidades de 3-flavanóis. As procianidinas possuem unidades monoméricas contendo o anel B di-hidroxilado (catequina e/ou epicatequina) enquanto as prodelphinidinas são constituídas por unidades com o anel B tri-hidroxilado (galhocatequina e/ou epigalhocatequina) (Figura 3), e as unidades monohidroxiladas no anel B designadas por afzelequina (Naumann *et al.*, 2017)(Crestini, Lange e Bianchetti, 2016, Ropiak *et al.*, 2016) (figura 3). Estas designações devem-se ao facto de formarem antocianidinas quando são submetidos a um tratamento ácido (por exemplo, ácido clorídrico em butanol) que quebra algumas ligações interflavânicas existentes nas cadeias poliméricas. O rendimento desta reação vai depender da regioseletividade das ligações intermoleculares e do padrão de oxigenação das proantocianidinas (Crestini, Lange e Bianchetti, 2016).

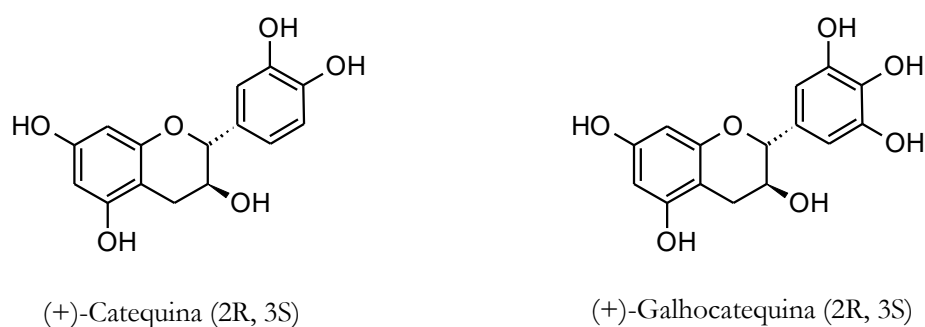
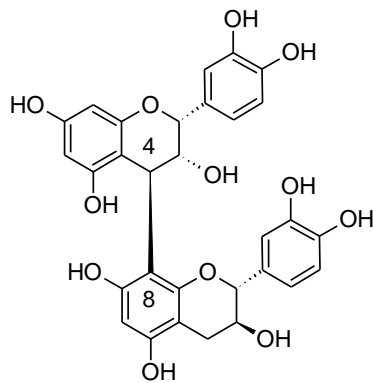
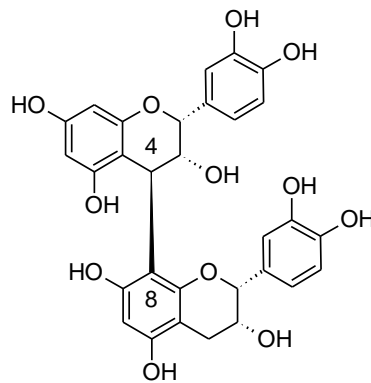


Figura 3. Estruturas da catequina e da galhocatequina.

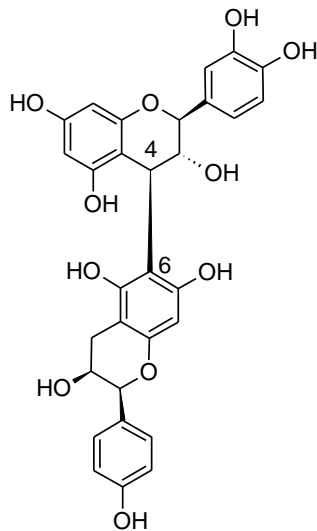
As proantocianidinas do tipo B caracterizam-se pela presença de ligações C-C, principalmente $C4 \rightarrow C8$ e mais raramente $C4 \rightarrow C6$, enquanto as do tipo A contêm, para além desta, uma ligação adicional C-O-C, $2 \rightarrow O \rightarrow 7$ (Figura 4) (Duval e Aveous, 2016).



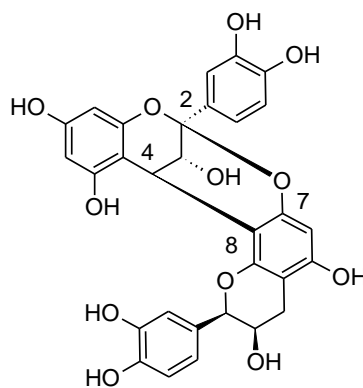
Procianidina B1:
Epicatequina-(4 β →8)-catequina



Procianidina B2:
Epicatequina-(4 β →8)-epicatequina



Procianidina B5:
Ent-catequina-(4 β →6)-ent-epicafzelequina



Procianidina A2:
Epicatequina-(2 β →7,4→8)-epicatequina

Figura 4. Estruturas de algumas proantocianidinas do tipo B e do tipo A.

Os taninos hidrolisáveis (Figura 5), tal como o nome sugere, sofrem hidrólise com ácidos, bases e esterases. Estes compostos são constituídos por um núcleo poliál (comumente a D-glicose) esterificado com ácidos fenólicos (Huang *et al.*, 2017). Este tipo de taninos pode ser subdividido em galhotaninos e elagitaninos. Os galhotaninos são constituídos por monómeros de ácido gálico esterificado com uma ou mais oses (geralmente, a ose é a D-glicose). A hidrólise dos galhotaninos e dos elagitaninos origina oses e ácido gálico. No entanto, na hidrólise dos elagitaninos também se forma o ácido elágico. Os elagitaninos são formados por galhotaninos que, por acoplamento Carbono-Carbono intermolecular, estão ligados a, pelo menos, duas

unidades galhoil. A hidrólise dos elagitaninos leva à formação do ácido hexa-hidroxi-difenóico que, em solução aquosa, lactoniza formando o ácido elágico (Smeriglio *et al.*, 2017).

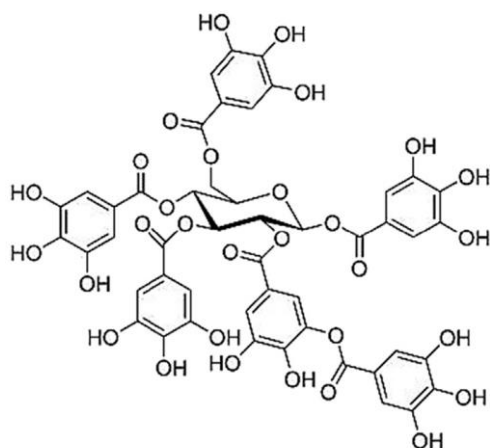


Figura 5. Estrutura representativa dos taninos hidrolisáveis (adaptado de Huang *et al.*, 2017).

De uma forma geral, todos os taninos têm muitos grupos hidroxilo podendo estabelecer, deste modo, ligações de hidrogénio inter- e intramoleculares. Dada esta característica, os taninos têm a capacidade de reagir com macromoléculas como os hidratos de carbono e as proteínas e, no caso destas precipitando-as (Smeriglio *et al.*, 2017, Adamczyk *et al.*, 2017). A formação de complexos proteína-taninos está dependente de vários fatores nomeadamente: o ponto isoelétrico da proteína, pH, força iónica da solução, presença de outros compostos na solução, concentração, entre outros. O estabelecimento de ligações de hidrogénio favorece a precipitação das proteínas pelos taninos (Adamczyk *et al.*, 2017). Relativamente aos hidratos de carbono, estudos *in vitro* demonstraram que há potenciação da absorção das proantocianidinas. No entanto, quando na presença de dímeros e trímeros de proantocianidinas, os hidratos de carbono diminuíram a sua absorção (Jakobek, 2015).

1.3 Atividade anti-inflamatória e antioxidante

Como demonstrado na tabela 3, o *C. citratus* apresenta várias atividades biológicas. Os fitoconstituintes desta planta atuam em vários órgãos tendo atividades muito diversas, nomeadamente: atividade hepatoprotetora, ação sobre o sistema nervoso central como ansiolítico, antidepressivo e sedativo, hipoglicemiante e hipolipidémico tendo, por isso, atividade em desordens metabólicas como a diabetes e doenças cardiovasculares. Ao diminuir os níveis de colesterol pode ser utilizado como coadjuvante na aterosclerose, apresentando também um efeito

vasodilatador, atividade antimicrobiana, nomeadamente em infeções causadas por bactérias, parasitas, fungos. Atua também ao nível da mucosa gástrica tendo um efeito protetor, como analgésico e tem atividades anti-inflamatórias e antioxidantes.

A inflamação é um processo que faz parte da resposta inata do sistema imunitário, exercendo uma ação local após uma lesão celular. Além da inflamação, a resposta a uma lesão celular é caracterizada pelo aumento do fluxo sanguíneo, dilatação capilar, infiltração de leucócitos, produção local de mediadores químicos responsáveis pela eliminação de agentes tóxicos e por último, a reparação do tecido celular danificado. O processo inflamatório conduz à formação de citocinas e outros mediadores anti-inflamatórios (Minihane *et al.*, 2015). A resposta inflamatória pode ser dividida em dois tipos: aguda e crónica. A inflamação aguda ocorre em situações infecciosas, em tecidos danificados e, nestes casos, exerce um efeito benéfico auxiliando o sistema imunitário e, assim, restaurar a homeostase. A ativação da resposta inflamatória aguda envolve recetores do sistema imunitário inato como os recetores *toll-like* (TLR) e os *nucleotide-binding oligomerization-domain protein-like* (NOD).

O reconhecimento inicial de infeção é mediado por macrófagos e mastócitos que levam à produção de uma variedade de mediadores inflamatórios entre os quais, quimiocinas, citocinas, aminas vasoativas, eicosanóides e produtos de cascatas proteolíticas. Uma das vias de sinalização envolvidas na inflamação é a via do fator de transcrição *nuclear factor kappa B* ($NF-\kappa\beta$) que responde a uma variedade de estímulos, nomeadamente a: ligandos de vários recetores de citocinas, recetores de reconhecimento de padrões (PRRs) dos quais os *damage associated molecular patterns* (DAMPs) e os *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs), membros da superfamília dos recetores *tumor necrosis factor* (TNF), recetores das células T, recetores das células B. O fator de transcrição $NF-\kappa\beta$ está presente no citoplasma e encontra-se no seu estado inativo devido à sua associação com o complexo *inhibitor of nuclear factor kappa B kinase* (IKK). Este complexo é constituído por três subunidades: duas catalíticas, $IKK\alpha$ e $IKK\beta$, e uma reguladora- $IKK\gamma$ ou NEMO. O complexo IKK é ativado por citocinas, fatores de crescimento, mitogénios, componentes microbianos e agentes causados pelo stress. Uma vez ativado, os dois resíduos N-terminais de serina presente no $IKK\beta$ são fosforilados havendo, posteriormente, a poliubiquitinação e destruição pelo proteossoma. O $NF-\kappa\beta$ é libertado e entra no núcleo ativando a transcrição de uma variedade de genes que participam nas respostas inflamatória e imune, controlo do crescimento e proteção contra a apoptose. Relativamente à inflamação, o $NF-\kappa\beta$ regula a ativação, diferenciação e função efetora das células T inflamatórias. Estudos recentes sugerem também que este fator de transcrição tem um papel relevante na ativação dos inflamassomas. Dado o envolvimento do $NF-\kappa\beta$ na resposta inflamatória é claro que a

desregulação deste fator contribui para o aparecimento de doenças inflamatórias crônicas (Israel, 2010, Liu *et al.*, 2017). Os mediadores pró-inflamatórios lipídicos como as prostaglandinas e os leucotrienos são obtidos através da modificação enzimática do ácido araquidônico pelas ciclo-oxigenases (COX) e pelas lipoxigenases (LOX). No local da lesão ou da infecção forma-se um exsudato inflamatório, essencial para a passagem de proteínas plasmáticas e leucócitos (principalmente neutrófilos) para os vasos sanguíneos através das vénulas pós-capilares até aos tecidos extravasculares do local da infecção ou do dano celular. O endotélio ativado dos vasos sanguíneos permite, assim, o extravasamento dos neutrófilos prevenindo, por outro lado, a saída de eritrócitos. Quando chegam ao local lesado, os neutrófilos podem ser ativados pelo contacto com os agentes patogénicos ou por citocinas produzidas pelo tecido lesado, libertando o conteúdo dos seus grânulos para eliminarem os agentes patogénicos. Deste conteúdo fazem parte as espécies reativas de oxigénio (ROS), as espécies reativas de nitrogénio (RNS), a proteinase 3, catepsina G e a elastase. De notar que estas moléculas não apresentam especificidade contra o agente invasor e, por isso, são tóxicas para este como para as células saudáveis do hospedeiro. As ROS são produzidas durante o metabolismo normal em quantidades fisiológicas, estando envolvidas em vários processos fundamentais na homeostase celular. Estas ajudam no controlo dos níveis hormonais, mantêm o balanço químico, fortalecem a plasticidade sináptica, intervêm na resposta imunitária a influências patogénicas, estão envolvidas na transdução de sinal e na expressão genética, entre outros. Estas moléculas muito reativas são produzidas maioritariamente na cadeia transportadora de eletrões da mitocôndria e, também são produzidas por reações fotoquímicas e enzimáticas, radiação ionizante ou reações com iões de metais pesados. Os radicais livres produzidos pelo organismo são o anião superóxido, o radical hidroxilo e radicais lipídicos. Outras espécies que não são radicais, mas que também têm um efeito oxidante são o peróxido de hidrogénio, o peroxinitrito e o ácido hipocloroso. Os radicais superóxidos são produzidos pela fosforilação oxidativa (OXPHOS) na cadeia respiratória da mitocôndria e são posteriormente convertidos em peróxido de hidrogénio. No entanto, este pode ter uma ação oxidante na presença de iões metálicos como é o caso do Fe^{2+} onde ocorre a reação de Fenton que resulta na produção de radicais hidroxilo (mais reativos que os restantes radicais mencionados). Apesar de, em condições normais, estes radicais terem uma ação benéfica, perante a sua natureza reativa eles têm de ser neutralizados. O organismo possui um sistema antioxidante intracelular constituído por várias enzimas nomeadamente: Cu/Zn-superóxido dismutase (SOD1) presente no citosol da mitocôndria, Mn-superóxido dismutase (SOD2) na matriz mitocondrial, catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase. De uma forma geral, as superóxido-dismutases são responsáveis pela redução do superóxido a peróxido de hidrogénio e

as catalases e glutathionas pela conversão deste em água e oxigênio. Além do sistema antioxidante intracelular, a alimentação também contribui para o fornecimento de compostos antioxidantes para neutralizar as ROS. No entanto, pode haver situações em que a dieta alimentar e o sistema antioxidante intracelular não sejam suficientes para neutralizar as ROS resultando no stress oxidativo, que em tempo prolongado poderá estar na base de muitas patologias. (Fischer e Maier, 2015, Nita e Grzybowski, 2016, Panth, Paudel e Parajuli, 2016). O stress oxidativo pode ser resultante de: produção excessiva de ROS, disfunção mitocondrial, alteração do sistema antioxidante ou a combinação dos fatores supracitados. As ROS estimulam os processos inflamatórios havendo a secreção de citocinas pró-inflamatórias, ativação do fator nuclear $\kappa\beta$ /proteína activa-1 (*NF- $\kappa\beta$ /AP-1*) e produção do *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- α). O stress oxidativo e a inflamação estão relacionados com algumas doenças nomeadamente doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, metabólicas (diabetes *mellitus*, por exemplo), renais, hepáticas, cancro, artrite reumatoide, esclerose múltipla, hipertensão e envelhecimento (Bellumkonda *et al.*, 2017, Biswas, 2016, Hunter e Plaen, De, 2014, Hussain *et al.*, 2016, Nita e Grzybowski, 2016, Oishi e Manabe, 2016, Panth, Paudel e Parajuli, 2016, Salzano *et al.*, 2014).

Após a eliminação dos agentes patogénicos, inicia-se a fase de reparação celular e finalização do processo inflamatório (resolução). Uma das vias pela qual ocorre a resolução envolve a ativação de mediadores lipídicos anti-inflamatórios e a diminuição de mediadores pró-inflamatórios. Os mediadores lipídicos anti-inflamatórios, dos quais as lipoxinas, as resolvinas e as protectinas, inibem o recrutamento de neutrófilos e promovem a mobilização de monócitos que são responsáveis pela remoção de células mortas e pela iniciação do processo de reparação celular (Medzhitov, 2008, Sugimoto *et al.*, 2016).

A inflamação crónica, ao contrário da inflamação aguda, não tem origem em infeções ou tecidos danificados, mas está associada ao desequilíbrio homeostático de um sistema fisiológico que não está diretamente relacionado com a reparação dos tecidos ou com a defesa imunitária num processo infeccioso. No caso em que o processo de resolução (finalização da inflamação) é insuficiente, continua a haver inflamação e, se esta não for terminada, pode levar a estados de inflamação crónica, tecidos lesados e desregulação do processo de reparação celular. Por conseguinte, irão surgir doenças inflamatórias crónicas como é o caso das doenças metabólicas e autoimunes. Outras doenças crónicas que não têm por base a inflamação, mas em que é um sintoma podem levar também à inflamação crónica. Exemplos destas doenças são as doenças cardiovasculares, neurodegenerativas (como a doença de Alzheimer), aterosclerose e cancro.

A maioria dos anti-inflamatórios atuam ao nível da ciclo-oxigenase 1 e/ou 2 (COX-1 ou COX-2), impedindo a formação de mediadores pró-inflamatórios por esta via e, por conseguinte,

a inflamação. Contudo, os efeitos adversos dos anti-inflamatórios não esteróides, maioritariamente usados, apresentam alguns efeitos secundários graves associados à toxicidade hepática que, em pessoas mais suscetíveis a patologias hepáticas poderá levar tanto à falência do fígado como outras doenças associadas, nomeadamente disfunções pulmonares, renais, cardíacas, desordens metabólicas, hemorragias gastrointestinais, entre outros (Soleimanpour *et al.*, 2016). Assim, é fundamental a investigação em novos fármacos anti-inflamatórios que sejam mais seletivos e que apresentem menor toxicidade principalmente a nível hepático.

1.4 Interação entre fármacos

Como já referido anteriormente, ainda antes de existirem medicamentos as plantas já constituíam uma fonte de tratamento ou alívio dos sintomas para as mais diversas patologias. Estudos nesta área mostraram que a variedade de patologias em que o extrato de uma planta pode ser usado se deve à presença de vários compostos, sejam eles voláteis ou não. A diversidade de metabolitos secundários que uma única planta produz e os respetivos efeitos biológicos que apresentam denotam que esses se devem, provavelmente, a vários compostos e não somente a um. No Sudão, país onde os cuidados de saúde primários se baseiam na medicina tradicional, os povos recorrem a uma variedade de plantas que tratam/aliviam as mais diversas afeções (infecções, mordidas de animais venenosos, inflamação, distúrbios gastrointestinais, cancro, dor de cabeça, entre outras) (Karar e Kuhnert, 2017). Além de preparações mono-herbárias, na medicina tradicional também são utilizadas misturas poli-herbárias para tratar doenças ou aliviar alguns sintomas. Na África do Sul, na zona de Maputaland são usadas misturas de várias plantas para tratar doenças da pele nomeadamente acne, erupções cutâneas, queimaduras, entre outros (Wet, De, Nciki e Vuuren, van, 2013). Na mesma região também são utilizadas várias plantas para tratar infeções microbianas (Naidoo *et al.*, 2013). Na medicina tradicional asiática (Japão, China e Coreia), utilizam-se misturas poli-herbárias e, cujas formulações vão desde pós, comprimidos, entre outros. Por exemplo, existe uma formulação de dez plantas diferentes cujo objetivo se centra na estimulação da função imunitária das placas de Peyer (Kiyohara, Matsumoto e Yamada, 2004). Na Nigéria e na Índia, *C. citratus* é misturado com outras plantas para tratar a malária (Avoseh *et al.*, 2015). Dada a enorme diversidade de fitoconstituintes presentes numa formulação tradicional de uma ou mais plantas, e variabilidade química, qualitativa e/ou quantitativa, numa mesma planta, devido aos fatores intrínsecos e extrínsecos anteriormente referidos, é essencial identificar os compostos responsáveis de uma determinada atividade biológica. Além disso, quando se usam extratos, é importante saber se a interação entre os fitoconstituintes desse

extrato é ou não benéfica, ou seja, se atuam sinergicamente ou antagonicamente. Existem vários estudos que avaliam a atividade de misturas de extratos de diversas plantas e outros estudos *in vitro* com extratos de plantas associados com fármacos para tratamento de várias patologias, tais como doenças antimicrobianas (Ibrahim *et al.*, 2017, Komape *et al.*, 2017, Moussaoui e Alaoui, 2016, Nguefack *et al.*, 2012, Padalia *et al.*, 2015, Salih, 2016, Sanhueza *et al.*, 2017, Shiriki *et al.*, 2017), cancro (Ammar e Ulrich-Merzenich, 2017, Chen *et al.*, 2015, Esfíni-Farahani *et al.*, 2017, Mansour *et al.*, 2016, Motiwala e Rangari, 2015), stress oxidativo e inflamação (Padalia, Poptani e Chanda, 2018, Ramachandran *et al.*, 2017, Vissienon *et al.*, 2016, 2017), doenças metabólicas como por exemplo a diabetes (Dhanalaxmi, Raj e Reddy, 2016, Esculenta *et al.*, 2016, Gupta *et al.*, 2017, Musabayane, Tufts e Mapanga, 2010, Poonam, Prem Prakash e Vijay Kumar, 2013, Sharma e Gupta, 2017, Singh, Singh e Jeyabalan, 2015).

Desde sempre que as plantas assumem um papel importante na descoberta de novos fármacos. Alguns fármacos no mercado integram compostos isolados de plantas. A galantamina é um alcalóide natural isolado da planta *Galanthus nivalis*, usado na doença de Alzheimer. A capsaicina é uma molécula isolada do *Capsicum annum*, sendo usada para o alívio das dores (Veeresham, 2012). A vincristina, molécula isolada da planta *Catharanthus roseus* (L.) e o paclitaxel (*Taxus brevifolia*) são agentes anti-tumorais, atualmente utilizados na prática clínica (Seca e Pinto, 2018). No entanto, nem sempre é possível utilizar os compostos isolados, seja pela quantidade necessária de planta para obter rendimentos aceitáveis de composto isolado ativo ou, pela dificuldade de sintetizar em laboratório estes compostos (recorrendo à retrossíntese) dada a sua complexidade estrutural. Assim, é essencial procurar outras estratégias que permitam usar os recursos naturais. As bibliotecas de produtos naturais ou derivados, com estruturas simplificadas e possíveis de sintetizar, tornam o processo de design e descoberta de novos fármacos mais acessível. O conhecimento destas estruturas, assim como as suas respetivas atividades é essencial para a identificação dos respetivos farmacóforos. Estes podem ser utilizados posteriormente em estudos computacionais de modo a otimizar a sua afinidade e seletividade para com o alvo. Os processos químicos de derivatização e otimização também irão servir, posteriormente, para a modulação das propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas da molécula. Estudos de SAR (*Structure-Activity Relationship*) comparando o composto natural e o respetivo análogo poderão fornecer informação para otimizar as propriedades farmacocinéticas. Assim, as principais estratégias para obter novas entidades químicas são nomeadamente: isolamento do composto bioativo, quando possível, a criação de bibliotecas de estruturas químicas de produtos naturais e derivados e a identificação dos respetivos farmacóforos, síntese de novas moléculas tendo por base os farmacóforos ou as estruturas globais das moléculas naturais. Atualmente, um

terço das novas entidades moleculares aprovadas pela FDA (*Food and Drug Administration*) são compostos ou derivados de origem natural (Li e Lou, 2017).

O estudo do sinergismo assume um papel cada vez mais relevante na área da saúde. Algumas das vantagens de combinar vários fármacos residem no facto de as doses administradas serem menores permitindo geralmente diminuir o risco de efeitos secundários associado aos fármacos (doses menores têm uma toxicidade menor) e podendo também haver um aumento da eficácia, o que em situações patológicas que não sejam crónicas, ou seja, de natureza aguda, poderá levar a que a terapia seja a curto prazo (já que o risco de resistência ou habituação aos fármacos é reduzido). Em várias patologias como é o caso do cancro e das doenças infecciosas, é comum que o tratamento seja ineficaz ao fim de um determinado tempo devido à resistência das células cancerígenas ou dos agentes infecciosos aos fármacos administrados. Os estudos da combinação de dois ou mais fármacos (e, por isso, de possíveis interações sinérgicas) constituem uma alternativa às resistências evitando que estas ocorram. O desenvolvimento de resistência numa terapia combinada pode dever-se a dois acontecimentos: a ocorrência de várias mutações nas células, num curto espaço de tempo que permita o desenvolvimento de novos mecanismos de resistência aos fármacos administrados, uma mutação individual capaz de resistir a ambos os fármacos. Tais eventos têm uma probabilidade mínima de acontecer e, é por isso que a terapia de combinação poderá reduzir o desenvolvimento de resistências (Gayvert *et al.*, 2017). As interações entre fármacos podem atuar de um modo negativo, ou seja, pode haver antagonismo. Neste caso, a combinação de fármacos é prejudicial, podendo haver um risco de toxicidade maior do que em condições normais, diminuição do efeito terapêutico e aumento de efeitos adversos. Os mecanismos que podem levar a esta interação negativa são: interações farmacodinâmicas e farmacocinéticas. As primeiras ocorrem quando os dois fármacos estão presentes no mesmo local de ação. As interações farmacodinâmicas que podem levar a antagonismo são: a presença simultânea de um agonista e antagonista de um recetor, competição por mecanismos de transporte dos fármacos no local de ação, impedindo por exemplo, que haja a absorção de um deles, alterações do balanço eletrolítico. As propriedades farmacocinéticas também podem ser afetadas pela interação negativa entre fármacos. Tais propriedades são: diminuição da absorção dos fármacos e, conseqüentemente, menor efeito terapêutico, competição entre os fármacos na ligação às proteínas plasmáticas e às proteínas presentes nas células, indução da atividade enzimática, aumentando a metabolização dos fármacos, o que pode levar à diminuição do efeito terapêutico (verifica-se o contrário perante um pró-fármaco), inibição das enzimas de metabolização (como o CYP450) levando ao aumento das concentrações plasmáticas dos fármacos, o que pode conduzir a quadros de toxicidade, afetação da excreção renal por alterações

de pH da urina, alteração do fluxo sanguíneo no rim, a inibição da secreção tubular, mudanças nos sistemas enzimáticos, entre outros (Pleuvry, 2005).

1.4.1 Conceitos gerais de farmacodinâmica

Sabe-se que os extratos de plantas, devido à presença de grande variedade em fitoconstituintes, podem apresentar várias atividades biológicas. Quais serão os compostos responsáveis por uma determinada atividade biológica? Uma vez isolados e administrados individualmente será que a sua atividade é maior ou se mantém? Ou serão mais ativos quando administrados em conjunto? A medicina tradicional utiliza, como já foi referido, extratos de plantas para tratar/aliviar algumas patologias, e não compostos isolados. De facto, muitas das utilizações tradicionais de plantas já foram cientificamente comprovadas. Além disso, se um extrato apresentar uma atividade biológica significativamente razoável, cujo efeito poderá ser o resultado de interações sinérgicas então, a nível de viabilização industrial, a obtenção destes extratos será economicamente mais rentável, relativamente ao isolamento de compostos bioativos. De modo a ponderar estas questões, é fundamental verificar se num extrato de uma determinada planta ocorrem interações sinérgicas ou antagónicas relativamente a uma determinada patologia.

Atualmente, o tratamento de várias patologias como é o caso do cancro, HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), doenças cardiovasculares, metabólicas, infecciosas consiste na administração de dois ou mais fármacos atuando, assim, em vários alvos farmacológicos (Foucquier e Guedj, 2015). O efeito obtido pela administração conjunta de dois ou mais fármacos pode ser o resultado de diferentes tipos de interações, nomeadamente: aditividade, sinergismo, antagonismo e potenciação.

Quando a atividade individual de dois fármacos A e B permanece a mesma após mistura, considera-se que o efeito é aditivo. Por outro lado, designa-se por sinergismo quando a mistura de dois fármacos é significativamente mais ativa do que a atividade de cada um dos fármacos quando testados individualmente. Se a mistura dos fármacos for significativamente menos ativa ou mesmo sem efeito então estamos perante antagonismo. Em suma, o sinergismo e antagonismo são observados quando a atividade da mistura de dois ou mais fármacos é maior ou menor do que o efeito aditivo, respetivamente. No caso da potenciação, um dos fármacos é pouco ativo ou não tem atividade quando administrado individualmente, tornando-se ativo ou registando um aumento da sua atividade em presença de outro fármaco ativo (Breitinger, 2012, Foucquier e Guedj, 2015, Newman, [s.d.], Tallarida, 2011). Apesar dos conceitos de interação

estarem bem estabelecidos, existe, todavia, alguma divergência na forma como se determinam esses efeitos, o que se traduz na existência de diferentes métodos de avaliação.

1.4.1.1 Curvas dose-resposta

É frequente a utilização de curvas dose-resposta na interpretação de resultados farmacológicos experimentais. Estas curvas frequentemente adotam uma forma sigmóide devido ao facto de adotar uma escala semi-logarítmica. As curvas dose-resposta derivam da lei da ação das massas (explicada no capítulo a seguir). A partir deste tipo de curvas pode-se inferir alguns aspetos do fármaco testado, como a sua potência, a dose máxima de fármaco em que é verificado o efeito máximo, bem como a dose responsável por metade do efeito observado.

O gráfico a) da figura 6 ilustra quatro curvas dose-resposta resultantes da ação de quatro fármacos que atingem 50% do efeito com doses diferentes. O fármaco A é, pois, o mais potente. A potência é definida como a menor dose de fármaco necessária para atingir metade do efeito pretendido e, por isso, quanto maior a potência do fármaco, menor será o seu EC_{50} .

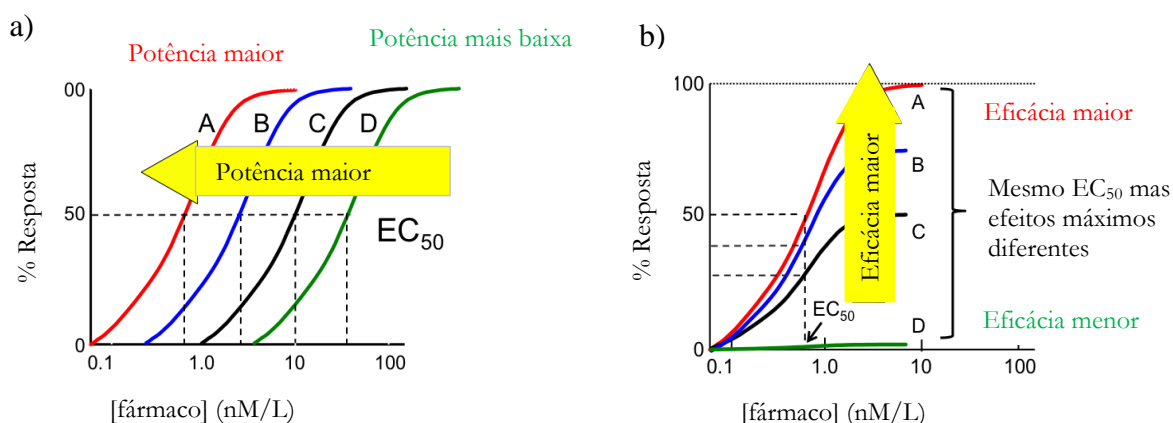


Figura 6. Curvas dose-resposta: a) conceito de potência; b) conceito de eficácia (adaptado de http://tmedweb.tulane.edu/pharmwiki/lib/exe/detail.php/potency.png?id=basic_principles_of_pharm).

Outro parâmetro avaliado através deste tipo de curvas é a eficácia, que se encontra ilustrado no gráfico b) da figura 6. De acordo com este exemplo, o fármaco A é o mais eficaz, por ser o que apresenta maior resposta. Assim, a eficácia é definida pela resposta do fármaco num dado sistema biológico.

A eficácia de um fármaco pode revelar se este é um agonista parcial ou total, este último caracterizado por apresentar a resposta máxima como no caso do fármaco A. Os fármacos B e C

do gráfico b) serão classificados como agonistas parciais já que as suas respostas são inferiores ao máximo do efeito.

1.4.2 Avaliação do sinergismo

1.4.2.1 Modelos de referência

Para desenvolver métodos de avaliação de interações entre fármacos é necessário estabelecer modelos matemáticos que definam o que constitui uma não interação (ausência de antagonismo ou de sinergismo) e a base para quantificar o nível de interação entre dois fármacos, tendo em conta os seus efeitos individuais. Apesar de já terem sido propostos vários modelos, existem dois que são mais aceites pela comunidade científica: o modelo de Bliss (baseado no efeito) e o modelo da independência de Loewe (baseado na relação dose-efeito) (Roell, Reif e Motsinger-Reif, 2017).

1.4.2.1.1 Aditividade de Loewe

O modelo da aditividade de Loewe assenta no princípio da combinação simulada (*sham mixture*), onde um fármaco é combinado com ele mesmo. Este princípio assume que não haverá qualquer interação pois fármacos similares, relativamente à sua estrutura ou alvo farmacológico, não interagem entre si. O resultado desta combinação é denominado por aditividade de Loewe. Neste método só podem ser utilizados fármacos que atuem em alvos farmacológicos semelhantes. Para avaliar o sinergismo usando este modelo, é necessário determinar as curvas dose-resposta para o efeito estudado. A razão de potências das curvas dose-resposta de cada um dos fármacos deve ser constante, ou seja, as curvas dose-resposta deverão ser paralelas.

Deste modo, qualquer dose na curva α (curva a azul na Figura 7) é transponível para a curva β (curva a vermelho na Figura 7) dada a razão de potências ser constante. De acordo com a figura 7, as doses **a** e **b** dos fármacos **A** e **B** produzem o efeito E_A e E_B , respetivamente, e que corresponde à dose **a** na curva α e à dose **b** na curva β (Figura 7).

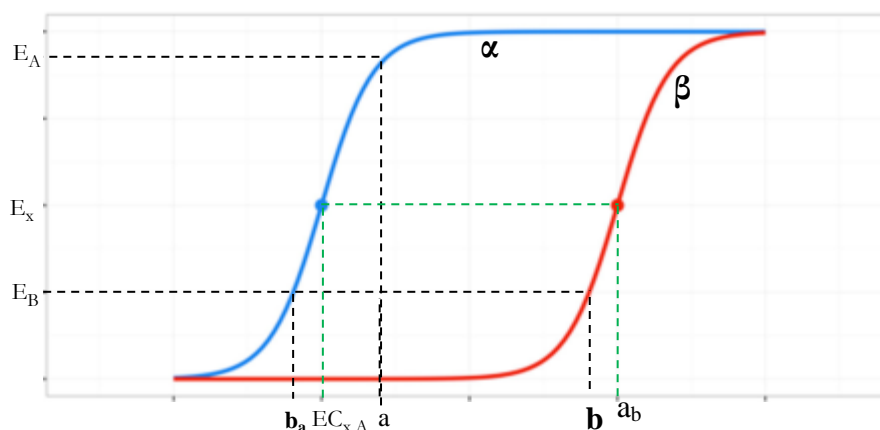


Figura 7. Curvas dose-resposta em que a razão de potências é constante (retirado de Roell, Reif e Motsinger-Reif, 2017).

Para chegar a estes resultados, devem-se determinar primeiro as doses do fármaco A ($EC_{x,A}$) e B ($EC_{x,B}$) com o mesmo efeito por exemplo o EC_{50} . A razão destas doses ($EC_{x,A} / EC_{x,B}$ ou $EC_{x,B} / EC_{x,A}$) permite a conversão de valores de uma curva na outra, de acordo com as equações indicadas (equação 1 e 2):

$$b_a = a \times \frac{EC_{x,B}}{EC_{x,A}} \quad (\text{equação 1}) \qquad a_b = b \times \frac{EC_{x,A}}{EC_{x,B}} \quad (\text{equação 2})$$

onde b_a é a dose de composto B que tem o mesmo efeito que a dose a do composto A, e a_b é a dose de composto A que tem o mesmo efeito que a dose b do composto B. Partindo destas equações o efeito (F) da mistura dos fármacos A e B pode ser determinado a partir da equação 3:

$$F = \underbrace{(b + b_a)}_B = \underbrace{(a + a_b)}_A \quad (\text{equação 3})$$

Considerando que $b+b_a=B$, rearranjando temos que,

$$b + a \times \frac{EC_{x,B}}{EC_{x,A}} = EC_{x,B} \quad (\text{equação 4})$$

A partir da equação 4 obtém-se a equação do modelo da aditividade de Loewe (equação 5):

$$\frac{a}{EC_{50,A}} + \frac{b}{EC_{50,B}} = 1 \quad (\text{equação 5})$$

Esta equação está na base de vários métodos para quantificar as interações entre fármacos e determinar o sinergismo (Roell, Reif e Motsinger-Reif, 2017).

1.4.2.1.2 Independência de Bliss

O modelo da independência de Bliss baseia-se no princípio da não interação, isto é, pressupõe que os fármacos não interagem entre si e atuam por mecanismos diferentes contribuindo, no entanto, para um efeito comum num dado sistema biológico.

Este modelo baseia-se na teoria da independência probabilística em que a probabilidade de dois compostos A e B serem responsáveis por um determinado efeito é obtida usando a equação da independência probabilística (equação 6):

$$P(A + B) = P(A) + P(B) - P(AB) \quad (\text{equação 6})$$

De acordo com os pressupostos da independência de Bliss, a probabilidade de um determinado efeito produzido pela combinação, $P(AB)$, é dada por:

$$P(AB) = P(A) \times P(B) \quad (\text{equação 7})$$

A combinação das equações 6 e 7 permitem deduzir a equação da independência de Bliss:

$$E_c = E_a + E_b - E_a \times E_b \quad (\text{equação 8})$$

Onde E_c é o efeito da combinação dos dois fármacos, A e B, e E_a e E_b são os efeitos das doses **a** e **b**, respetivamente.

1.4.2.2 Métodos de determinação do sinergismo

Vários métodos de determinação do sinergismo têm sido propostos, os quais podem ser enquadrados em dois tipos de abordagens, nomeadamente: métodos que se baseiam no efeito biológico testado e métodos baseados na relação dose-efeito dos fármacos administrados.

1.4.2.2.1 Métodos baseados no efeito

Vejamos o caso mais simples: interação entre dois fármacos A e B. Os métodos baseados no efeito, comparam o efeito resultante da combinação dos fármacos ($E_{A,B}$) usados, com o efeito dos fármacos isolados (E_A e E_B) e utilizam o valor P do teste estatístico aplicado para a avaliação do sinergismo. Os principais métodos orientados pelo efeito são: combinação sub-limiar

(*combination subthresholding*), componente maioritário único (*single highest agent*), aditividade da resposta e a independência de Bliss (Foucquier e Guedj, 2015).

1.4.2.2.1.1 Combinação sub-limiar (*combination subthresholding*)

O método da combinação sub-limiar baseia-se no efeito farmacológico apresentado por uma mistura de dois fármacos em doses não efetivas. A atividade é calculada mediante o valor P . Este valor resulta do teste estatístico e é comparada a um grupo controlo não tratado, com um intervalo de confiança de 95%. Deste modo, é estabelecido um limiar que define a ausência, ou não, de atividade (Foucquier e Guedj, 2015).

1.4.2.2.1.2 Componente maioritário único (*single highest agent*)

Este método, também designado por não-interação de Gaddum, assenta no princípio do efeito da combinação dos dois fármacos ser maior que os seus respetivos efeitos individuais. Para avaliar o sinergismo, é calculado o índice de combinação EC_{SHA} (equação 9), em que E_A e E_B são os efeitos dos fármacos A e B, respetivamente e $\max(E_A, E_B)$ corresponde ao valor máximo do efeito obtido pela combinação dos fármacos A e B.

$$EC_{SHA} = \frac{\max(E_A, E_B)}{E_B} \quad (\text{equação 9})$$

A avaliação do sinergismo é dada pela significância do índice de combinação, recorrendo ao valor P resultante do método estatístico, comparando a combinação dos fármacos ao componente maioritário único (fármaco que tem maior atividade) (Foucquier e Guedj, 2015).

1.4.2.2.1.3 Aditividade da resposta

O modelo da aditividade da resposta afirma que existe sinergismo quando o efeito da combinação $E_{A,B}$ é maior que o efeito aditivo esperado. O efeito aditivo é dado pela soma dos efeitos individuais dos fármacos A e B (E_A e E_B , respetivamente). Neste modelo, também é determinado o índice de combinação EC_{AR} (equação 10):

$$EC_{AR} = \frac{E_A + E_B}{E_{A,B}} \quad (\text{equação 10})$$

Recorrendo a um teste estatístico adequado, é comparado o efeito da mistura ao efeito aditivo esperado (Foucquier e Guedj, 2015).

1.4.2.2.1.4 Método baseado no modelo da independência de Bliss

O modelo da independência de Bliss pode ser usado para calcular a relação dose-resposta esperada quando combinamos dois ou mais fármacos, fazendo posteriormente a comparação com os resultados experimentais das suas atividades independentes. Na aplicação deste método utiliza-se o efeito obtido (expresso em fração afetada) como medida de probabilidade. Esta abordagem é mais adequada em estudos de toxicidade, por exemplo, onde o que está a ser avaliado são frações afetadas pelos compostos que resultaram em morte celular. Este método faz referência à fração afetada (F_a) e não afetada (F_u). A fração afetada corresponde à porção do resultado do ensaio em que houve o efeito estudado, sendo que a fração não afetada corresponde à outra porção onde esse efeito não se verificou. Neste caso, a equação que traduz a independência de Bliss é dada pelo produto ($F_{uA,B}$) da fração não afetada (componente do resultado do ensaio que corresponde à ausência de efeito) do fármaco A, (F_{uA}), e do fármaco B, (F_{uB}) (equação 11):

$$F_{uA,B} = F_{uA} \times F_{uB} \quad (\text{equação 11})$$

A equação 11 pode ser reescrita relativamente à fração afetada (F_a) e não afetada (F_u). Deste modo, sabendo que,

$$F_a = 1 - F_u \quad (\text{equação 12})$$

e substituindo na equação 11, a fração afetada pela combinação dos fármacos A e B ($F_{aA,B}$), é dada por:

$$F_{aA,B} = F_{aA} + F_{aB} - F_{aA} \times F_{aB} \quad (\text{equação 13})$$

onde, F_{aA} é a fração afetada pelo fármaco A e F_{aB} é a fração afetada pelo fármaco B.

A fórmula da aditividade de Bliss constitui uma referência para determinar o efeito da mistura na ausência de sinergismo ou antagonismo. Assim, se o efeito combinado experimental é maior que o efeito combinado teórico ($F_{aA,B}$) então existe sinergismo. Caso o efeito

experimental da combinação seja menor existe antagonismo (Foucquier e Guedj, 2015, Roell, Reif e Motsinger-Reif, 2017).

Uma das limitações do método de Bliss é a sua aplicabilidade para combinações contendo um número reduzido de fármacos (Yan *et al.*, 2010). Além disso, como não considera a variabilidade da resposta medida, pode originar falsos positivos (Zhao *et al.*, 2014). Este modelo pode ser aplicado quando não há interação entre os fármacos e as respectivas atividades são diferentes, isto é, quando atuam em alvos farmacológicos ou vias de sinalização diferentes (Tang, Wennerberg e Aittokallio, 2015, Zhou *et al.*, 2016), não podendo ser aplicado para fármacos que tenham mecanismos de ação idênticos. No entanto, é um dos métodos mais antigos para determinar a existência de interações sinérgicas, tendo sido usado no caso de várias doenças nomeadamente, microbianas (Baeder *et al.*, 2016, Guo *et al.*, 2008, Petraitis *et al.*, 2009, Zhitnitsky, Rose e Lewinson, 2017), inflamatórias (Yan *et al.*, 2010), cancro (Tagliaferri *et al.*, 2010) e também na área toxicológica (Goldoni e Johansson, 2007).

1.4.2.2.2 Métodos baseados na relação dose-efeito

Os métodos baseados apenas no efeito são contestados por alguns autores por não incluírem fatores importantes como por exemplo a dose. Os gráficos típicos destes estudos assumem uma forma sigmoideal (não-linear). Baseado neste conceito, a melhor abordagem para comparar a atividade de fármacos consiste na determinação das doses de cada um, responsáveis pelo mesmo efeito. Assim, estes métodos dependem de curvas dose-resposta dos fármacos testados de *per si* para, posteriormente, avaliar a atividade da sua mistura. Os métodos de aditividade de Loewe e de Chou-Talalay constituem dois dos mais usados, tendo por base a relação dose-resposta/efeito (Foucquier e Guedj, 2015).

1.4.2.2.2.1 Método do isoblograma

A existência de interações sinérgicas entre fármacos pode ser avaliada pelo método do isoblograma descrito por Loewe (Damaraju *et al.*, 2007). A equação da aditividade de Loewe (equação 5 deduzida no ponto 1.4.2.1.1.) permite determinar as doses teóricas **a** e **b** dos fármacos A e B, respetivamente, que em combinação, tenham efeito aditivo. A partir desta equação podemos obter uma representação gráfica denominada por isoblograma (figura 8b)). Para construir o isoblograma é necessário avaliar as concentrações (doses, expressas, por exemplo em EC₅₀) responsáveis por um determinado efeito, para cada um dos fármacos (por exemplo A e B).

Estes valores de EC_{50} irão corresponder aos extremos da linha da aditividade do isoblograma. Assim, num dos eixos teremos o valor do EC_{50} do fármaco A e no outro eixo o valor do EC_{50} do fármaco B. Os eixos deste gráfico serão as doses **a** e **b** que, em combinação terão um efeito aditivo (representado pela linha de aditividade) (gráfico b da figura 8). Os valores teóricos são calculados a partir da equação 14 (equação da linha de aditividade).

$$b = EC_{50,B} - \frac{EC_{50,B}}{EC_{50,A}} \times a \quad (\text{equação 14})$$

Graficamente, a interação será sinérgica se o EC_{50} da mistura estiver abaixo da linha da aditividade, aditiva caso o valor obtido coincida com a linha da aditividade e antagónica se estiver acima da linha da aditividade (Chen *et al.*, 2016, Tallarida, 2011, Zhao, Au e Wientjes, 2010), (Fouquier e Guedj, 2015).

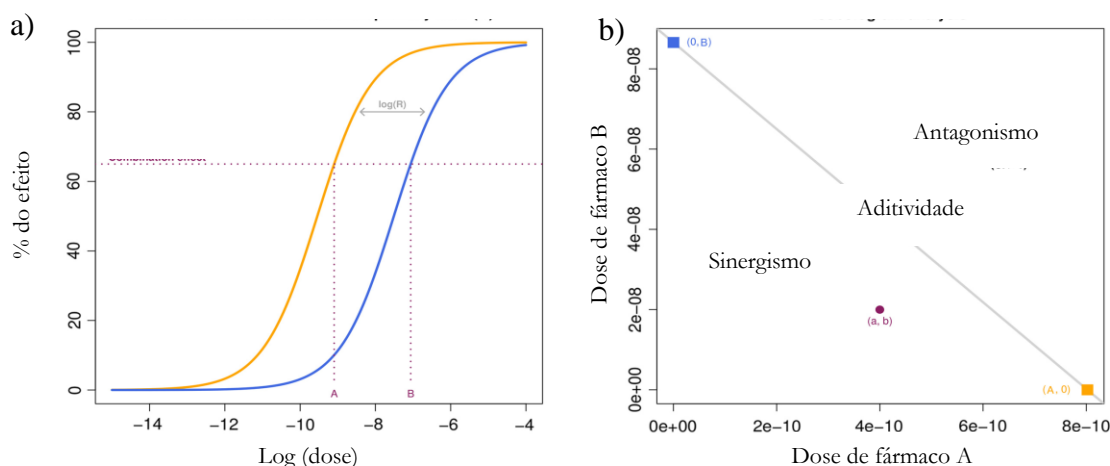


Figura 8. Modelo da aditividade de Loewe. a) Curvas dose-resposta com razão de potências constante; b) Representação gráfica de um isoblograma (adaptado de Fouquier e Guedj, 2015).

A potência, como já foi referido, constitui um parâmetro muito importante na determinação do EC_{50} . Este facto terá implicações na construção do isoblograma. O isoblograma representado no gráfico b) da figura 8, assume que a razão das potências é constante relativamente aos EC_{50} de cada um dos fármacos. Loewe estabeleceu dois conceitos considerando a razão das potências de dois fármacos quando são combinados. Uma combinação homodinâmica implica que a razão das potências dos dois fármacos é constante. Esta situação corresponde, por isso, ao gráfico a) da figura 8. Por outro lado, quando a razão das potências não é constante então diz-se que a combinação é heterodinâmica. Neste caso, o isoblograma não

tem uma forma linear (Tallarida, 2006) e, por conseguinte, não se pode usar a equação 14 para construir o isoblograma.

Quando temos dois fármacos com eficácias diferentes (os máximos das respetivas curvas dose-resposta são diferentes), a razão de potências, como já foi referido anteriormente, é variável. Por convenção, assumindo que o fármaco A é o de maior eficácia, ou seja, o que tem o máximo maior e, o fármaco B de menor eficácia, as curvas dose-resposta de A e B, testadas individualmente, irão ter máximos diferentes. Sabendo que o efeito máximo de A ($E_{A, \max}$) é maior que o efeito máximo de B, ($E_{B, \max}$), a equação correspondente ao isoblograma curvo (aditividade não linear) (equação 15) (adaptada de Tallarida, 2006), é dada por:

$$a = A_i - \frac{EC_{50,A}}{\frac{E_A}{E_B} \left(1 + \frac{EC_{50,B}}{b}\right) - 1} \quad (\text{equação 15})$$

onde A_i é a dose de fármaco A necessária para ter o efeito pretendido. Se os dois fármacos tiverem máximos iguais, a partir da equação 15 obtém-se a equação 14 tendo-se assim um isoblograma linear (gráfico b da figura 8).

O método do isoblograma é um dos mais antigos e bem estabelecido para estudar as interações sinérgicas. Além disso, o desenho experimental é relativamente fácil de executar e de interpretar (Zhou *et al.*, 2016). No entanto, este método só pode ser aplicado em misturas de fármacos cujos mecanismos de ação sejam semelhantes e que atuem nos mesmos recetores ou nas mesmas vias de sinalização. A sua aplicabilidade está limitada à combinação de dois fármacos já que combinações com mais de dois fármacos seriam difíceis de interpretar devido à possibilidade de sobreposição dos resultados ou um desvio significativo (Chou, 2006, Zhou *et al.*, 2016). O método baseia-se nas curvas dose-resposta, permitindo o cálculo da dose para um determinado efeito, que tem de estar entre o efeito máximo - E_{\max} e o efeito mínimo - E_{\min} , o que nem sempre se verifica. A impossibilidade de obter uma curva dose-resposta aceitável condiciona a aplicabilidade do método (Zhao *et al.*, 2014).

Este método tem sido utilizado por vários autores para testar a presença de interações sinérgicas entre extratos de plantas. Vissiennon e colaboradores (2017) estudaram as interações sinérgicas de extratos de mirra (*Commiphora molmol* Engler, Burseraceae), flores de camomila (*Matricaria chamomilla* L., Asteraceae) e borra de café (*Coffea arabica* L., Rubiaceae) relativamente à atividade anti-inflamatória *in vitro* (Vissiennon *et al.*, 2017). O método do isoblograma foi também utilizado no estudo do sinergismo de fármacos ou extratos para outras doenças como cancro (Ooko *et al.*, 2017, Zhao, Kelnar e Bader, 2014), inflamação (Lev-Ari *et al.*, 2006), e

doenças neurodegenerativas (Chumakov *et al.*, 2015, Hajj *et al.*, 2015), microbianas e parasitárias (Adrar, Oukil e Bedjou, 2016, Forkuo *et al.*, 2016), entre outras.

1.4.2.2.2 Método de Chou-Talalay

A lei da ação das massas é uma das leis mais importantes em reações químicas e foi enunciada por Guldberg e Waage em 1864. A lei afirma que a velocidade da reação é diretamente proporcional à concentração dos reagentes. A descoberta desta lei permitiu obter uma melhor compreensão sobre vários processos químicos incluindo os processos fisiológicos. Em farmacologia, a lei da ação das massas é importante na interpretação das curvas dose-resposta (Ferner e Aronson, 2016). Ting-Chao Chou desenvolveu uma teoria baseada na lei da ação das massas, a teoria unificada (*The Unified theory*), em que é usada a equação do efeito médio (EEM) de modo a determinar um nível de efeito, por exemplo o EC₅₀. A equação do efeito médio (equação 16) foi deduzida a partir da lei da ação das massas e de outros parâmetros, como a cinética enzimática (Chou, 2011).

$$\frac{f_a}{f_u} = \left(\frac{D}{D_m}\right)^m \quad (\text{equação 16})$$

Na equação 16, f_a representa a fração do efeito obtido pela dose D (num exemplo de inibição, $f_a = \% \text{ inibição}/100$), f_u é a fração de não efeito. D_m representa o efeito que se pretende determinar (por exemplo 50% inibição, ou seja o EC₅₀) e m é o coeficiente de ordem dinâmica que indica a forma da curva. A curva é hiperbólica para $m=1$, sigmóide se $m > 1$ e se $m < 1$ a curva dose-resposta apresenta uma forma sigmoidal achatada (Chou, 2011).

A equação 16 pode ser logaritimizada (equação 17) para obter gráficos lineares das curvas dose-resposta, como ilustrado na Figura 9 (Chou, 2006) e determinar o EC₅₀.

O ajuste dos valores experimentais ao modelo de Chou e, por isso, à lei da ação das massas pode ser avaliada de acordo com o coeficiente de correlação linear r do gráfico da EEM (Gráfico b da Figura 9), indicando que, se $r=1$ os valores estão em consonância perfeita com a lei da ação das massas. De acordo com o mesmo autor, o coeficiente de correlação linear em ensaios *in vitro* tem de ser superior a 0,95 para ter uma concordância razoável. A partir desta equação, os valores de EC₅₀ são calculados pela equação 17.

$$\log \frac{f_a}{f_u} = m \log(D) - m \log(D_m) \quad (\text{equação 17})$$

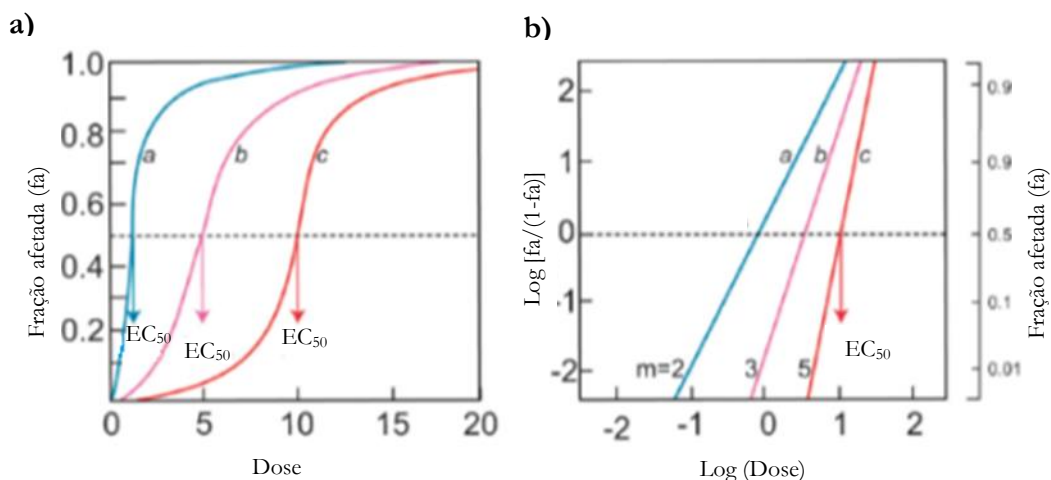


Figura 9. a) Curvas dose-resposta resultantes da aplicação da equação do efeito médio. b) Linearização das curvas dose-resposta representadas em a).

Rearranjando a equação 17, a dose D pode ser calculada da seguinte forma:

$$D = D_m \left[\frac{f_a}{(1-f_a)} \right]^{1/m} \quad (\text{equação 18})$$

Por outro lado, a fração afetada, isto é, o efeito f_a também pode ser calculada, e é dada pela equação 19:

$$f_a = \frac{1}{\left[1 + \left(\frac{D_m}{D} \right)^m \right]} \quad (\text{equação 19})$$

Atentando às equações 18 e 19, observa-se que, conhecendo os valores de D_m e m , podem calcular-se a dose D e o respetivo efeito f_a .

Uma vez determinados os EC₅₀ dos fármacos envolvidos, a próxima fase será avaliar o sinergismo. A teoria unificada pode ser aplicada a sistemas mais complexos como é o caso de ensaios com mais que um fármaco e, assim, determinar efeitos sinérgicos. Chou e Talalay formularam em 1983 o teorema do índice da combinação para quantificar o tipo de interações entre os fármacos no que diz respeito ao seu efeito aditivo, antagonista ou sinérgico. Assim, são calculados ambos os EC₅₀ onde são conhecidos os respetivos coeficientes de Hill, m_A e m_B , dos fármacos A e B respetivamente. A partir destes são calculadas as doses responsáveis pelos efeitos ($D_{x,A}$) e ($D_{x,B}$) dos fármacos A e B quando combinados, de acordo com a equação 20 e 21:

$$D_{xA} = EC_{50,A} \left[\frac{f_a}{(1-f_a)} \right]^{1/m_A} \quad (\text{equação 20})$$

$$D_{xB} = EC_{50,B} \left[\frac{f_a}{(1-f_a)} \right]^{1/m_B} \quad (\text{equação 21})$$

Posteriormente, conhecendo as doses dos fármacos A e B, D_A e D_B , podemos determinar o índice de combinação CI (equação 22).

$$CI = \frac{D_A}{D_{xA}} + \frac{D_B}{D_{xB}} \quad (\text{equação 22})$$

A partir dos valores do CI calculados e fazendo a análise do gráfico fa-CI podem tirar-se conclusões relativamente à existência de sinergismo. Assim, o efeito será aditivo se $CI=1$, sinérgico se $CI < 1$ e antagónico se $CI > 1$ (Figura 10).

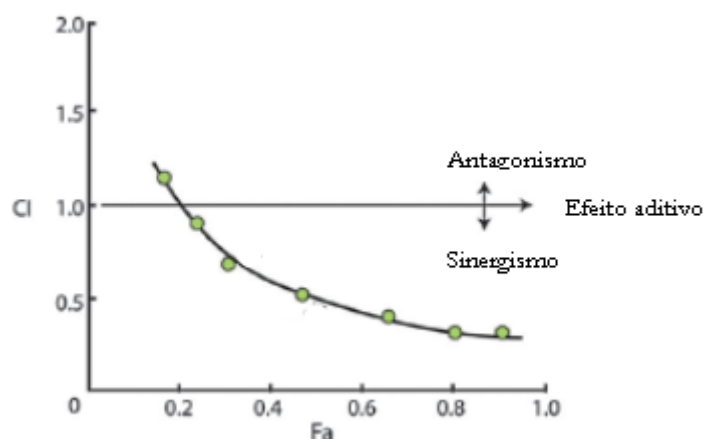


Figura 10. Gráfico Fa-CI para quantificar as interações sinérgicas. Adaptada de Chou (2011).

O método de Chou-Talalay é aplicável a combinações com mais de dois fármacos. É um dos métodos mais demonstrativos para quantificar o sinergismo e é fácil de executar experimentalmente. Este método, tal como no método do isoblograma, requer as curvas dose-resposta de cada um dos compostos testados individualmente e quando combinados (Zhou *et al.*, 2016). É um dos métodos mais utilizados para quantificar as interações sinérgicas entre dois ou mais fármacos, tendo sido usado para estudar a administração de vários fármacos usados no tratamento de: vários tipos de cancro (Chen *et al.*, 2016, Damaraju *et al.*, 2007, Desai *et al.*, 2015, Engel *et al.*, 2017, Jin, Yang e Zhang, 2017, Kaur *et al.*, 2013, Kaushik *et al.*, 2016, Levine, Cagan Correspondence e Cagan, 2016, Montgomery *et al.*, 2016, Pasquier *et al.*, 2016, Peng *et al.*, 2011, Wu *et al.*, 2017, Yu *et al.*, 2017, Yuan *et al.*, 2016), da inflamação (Liu e Talalay, 2013, Ramachandran *et al.*, 2017, Zhou *et al.*, 2016), da dor (Oh *et al.*, 2016), da Leishmania (Tiwari *et al.*,

2017), doenças infecciosas (Kraszewska *et al.*, 2016, Lomonosova, Zlotnick e Tavis, [s.d.], Zhitnitsky, Rose e Lewinson, 2017), doenças cardiovasculares (Huang *et al.*, 2016), entre outras.

Capítulo 2 – Materiais e Métodos

2.1 Material de estudo

Folhas secas de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. cedidas pela Ervital[®]. A planta foi cultivada em estufa na região de Mezio (Castro Daire, Portugal) tendo sido colhido um exemplar para ser catalogada e armazenada no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. A identificação da planta foi confirmada pelo Professor Doutor J. Paiva do Departamento de Ciências da Vida da mesma Universidade.

2.2 Reagentes

No decorrer deste trabalho experimental foram utilizados vários reagentes/solventes de acordo com os objetivos pretendidos. Para fins analíticos, foram utilizados os reagentes: *n*-hexano e *p*-dimetilamino-cinamaldeído (DMACA) da Merck (Darmstadt, Germany), polietilenoglicol-4000 (PEG-4000) e o ácido difenilbórico 2-aminoetil éster, ambos da Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO).

Para a análise das amostras por HPLC-PDA, foram utilizados os reagentes metanol Lichrosolv (VWR), o ácido fórmico da Merck (Darmstadt, Germany) e água desionizada MilliQ da MILLIPORE SYMPLECITY (Molsheim, France).

Os reagentes utilizados nos fracionamentos foram o metanol Hipersolv (VWR), o etanol absoluto e a acetona pura, ambos da Merck (Darmstadt, Germany) e, para o fracionamento por SEC foi utilizado como fase estacionária o Sephadex LH-20 da Sigma Aldrich (Amersham, Sweden).

Para a monitorização das amostras por TLC, os reagentes utilizados foram o ácido acético glacial, o acetato de etilo, o ácido fórmico (98-100%), a acetona e o tolueno da Merck (Darmstadt, Germany) e água desionizada MilliQ da MILLIPORE SYMPLECITY (Molsheim, France).

2.3 Preparação do extrato

As folhas secas das plantas foram pulverizadas (moinho BRAUN KSM 2) e posteriormente tamizadas (Tamiz ENDECOTT'S de 60 Mesh). Após o processamento da planta, foi preparada uma infusão (forma utilizada na medicina tradicional) por contacto de 5 g das folhas pulverizadas com 150 mL de água a ferver durante 15 minutos. Seguidamente procedeu-se à deslipidificação do infuso agitando, três vezes com *n*-hexano, na porção infuso: *n*-hexano de 1:1. Uma vez eliminados os compostos apolares, o extrato foi filtrado por papel de filtro

Watmann nº1, sob vácuo (bomba de vácuo e compressor KNF NEUBERGER, modelo N035AN.18). O extrato filtrado foi concentrado num evaporador rotativo BUCHI, Rotavapor R-200 com controlador V-850 e bomba de vácuo V-700 da BUCHI acoplado a um circuito de refrigeração do condensador, Minichiller Huber, Germany. Por fim, o concentrado resultante foi liofilizado num liofilizador FTSSYSTEMS tipo EZ-DRY, modelo EL I50I-I com manifold modelo EZT 18, de 8 portas e válvula de borracha, Stone Ridge, NY USA. O liofilizado obtido foi armazenado ao abrigo da luz e da humidade, à temperatura de -22 °C.

2.4 Fracionamento do extrato

De acordo com os objetivos estabelecidos neste trabalho experimental, foi necessária a separação de diferentes classes de compostos fenólicos, nomeadamente ácidos fenólicos, flavonóides e taninos. Para tal, o extrato liofilizado foi submetido à cromatografia preparativa, em coluna, usando duas distintas fases estacionárias: i) fase reversa C18, por recurso à Cromatografia Flash, e a cartuchos de extração em fase sólida – SPE, ii) gel de dextrano, Sephadex LH-20, por cromatografia de exclusão molecular. As frações obtidas em cada um dos processos separativos foram monitorizadas por cromatografia em camada fina (TLC) e cromatografia líquida de alta resolução acoplada a um detetor de fotodíodos (HPLC-PDA).

2.4.1 Fracionamento em fase reversa

2.4.1.1 Cromatografia Flash

O extrato foi inicialmente submetido a um fracionamento por cromatografia Flash. Pesou-se 1 g de extrato que foi solubilizada em 20 mL de metanol a 5%. Desta solução foram injetados aproximadamente 7 ml na coluna cromatográfica. Como fase móvel utilizou-se um gradiente de metanol (solvente B) e água MiliQ (solvente A) (descrito na tabela 7), previamente filtrados por vácuo e desgaseificados com o ultrassons Branson, modelo B-2200 EI. O fracionamento foi monitorizado com um detetor ultra-violeta e o registo efetuado a 260 e 300 nm. O procedimento foi repetido oito vezes. A tabela 6 descreve as características do equipamento utilizado.

Tabela 6. Características do equipamento de cromatografia Flash.

Coluna	Coluna fase reversa C18 Buchi® (40x150 mm, diâmetro entre 40-63 µm, Flawil, Suíça)
Propulsão da fase móvel	Duas bombas Buchi® Pump Module C-605 (Flawil, Suíça)
Detetor	Detetor ultravioleta C-640 Buchi® (Flawil, Suíça)
Software	ECOMAC® 0.238 (Praga, República Checa)

Tabela 7. Condições do fracionamento e frações recolhidas por Cromatografia de fase reversa.

Fração	Eluente (% MeOH)	Tempo (minutos)	Fluxo (mL/min.)
0	5-6	0-6,5	7,3
1	6	6,5-8,9	7,3
2	6-7	8,9-14,2	7,3
3	10	14,2-18,6	10
	30	18,6-25	10
4	30	25-29,4	10
	40	29,4-31,2	10
5	40	31,2-33	15
	50	33-41,9	15
	60	41,9-45,6	15
	80	45,6-50,5	15
	100	50,5-64,3	15

Os ácidos fenólicos são compostos com maior polaridade relativamente aos flavonóides e aos taninos que têm polaridades mais próximas sendo, neste tipo de cromatografia com baixa resolução, mais difícil separar estas 2 classes de compostos. Tratando-se, de uma fase estacionária apolar, os ácidos fenólicos foram os primeiros compostos a eluir (F0 e F1). Subsequentemente, numa tentativa de separar os flavonóides e os taninos, foram recolhidas as frações F2 a F5, posteriormente controladas por Cromatografia em camada fina (TLC) e por HPLC-PDA. O processo de fracionamento transcrito na tabela 7 foi repetido nove vezes de modo a obter frações em quantidade necessária para os ensaios subsequentes.

2.4.1.2 Fracionamento por Cromatografia de Exclusão Molecular

Do fracionamento por Cromatografia Flash (2.4.1.1.), resultaram frações com mistura das três classes de fitoconstituintes fenólicos, com diferentes pesos moleculares. Assim, estas frações

foram purificadas por Cromatografia de Exclusão Molecular (CEM), separação cromatográfica que se baseia no peso molecular das moléculas. Neste trabalho experimental foi utilizada uma coluna de volume igual a 923 cm³ (5 cm de diâmetro e 47 cm de altura). A fase estacionária utilizada foi Sephadex LH-20 (235.65 g) equilibrada com etanol absoluto e as fases móveis foram o etanol absoluto (volume gasto foi de 1036 mL) seguido da acetona a 70% (volume gasto foi de 252 mL). O fracionamento foi monitorizado por observação do decurso separativo, com o auxílio de uma lâmpada UV CAMAG n° 022.9120 (Switzerland) a 366 nm.

2.4.1.3 Extração em Fase Sólida (SPE)

Do fracionamento por Cromatografia de Exclusão Molecular (SEC) (2.4.2.) resultaram 30 frações com mistura de ácidos fenólicos e flavonóides, pelo que foi necessário purificá-las. Para isso, utilizou-se uma Chromabond C18 (10 g/ 70 mL) da Machery - Nagel (Düren, Germany). A fase estacionária foi ativada com 35 ml de metanol e 35 ml de água miliQ. Aplicaram-se 8 mL da mistura das frações etanólicas e procedeu-se à putificação usando como fase móvel água miliQ (71 ml), metanol a 5% (63 ml) e metanol absoluto (36 mL). Desta purificação resultaram 17 frações que foram controladas por TLC e HPLC-PDA. Este procedimento foi repetido duas vezes.

2.5 Monitorização das frações obtidas no decurso do fracionamento

2.5.1 Cromatografia em camada fina (TLC)

A cromatografia em camada fina é uma técnica simples, rápida e relativamente económica que permite fazer um “screening” rápido do tipo de compostos presentes numa amostra. De acordo com a natureza das fases estacionária e móvel, compostos diferentes podem migrar diferentemente, segundo a sua maior ou menor afinidade para uma das fases, fornecendo informação sobre a sua polaridade ou sobre o seu peso molecular, por exemplo. O valor de R_f, dado pela razão entre a distância percorrida pelo soluto e a distância percorrida pela frente do solvente, é um parâmetro que permite inferir esse comportamento.

As frações recolhidas durante o fracionamento foram controladas por Cromatografia em camada fina – TLC. De acordo com a classe de fitoconstituintes que se pretendeu identificar foram usados diferentes sistemas e reveladores. Para haver valores de R_f reproduzíveis, as eluições cromatográficas foram realizadas em câmaras previamente saturadas pela fase móvel.

Depois de secar a placa e evaporada a fase móvel, a placa de TLC foi pulverizada com reveladores específicos e observada sob uma lâmpada de ultravioleta aos comprimentos de onda 254 e 366 nm.

2.5.1.1 Sistema cromatográfico para flavonóides: sistema S1

Para monitorizar a presença de flavonóides recorreu-se a placas pré-revestidas de gel de sílica, com indicador de fluorescência 60F254 da Merck (Darmstadt, Germany) e à fase móvel constituída por uma mistura de acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: água na proporção 100:11:11:26, respetivamente (sistema S1) descrito por WAGNER e BLADT (2001). Após ter terminado o processo cromatográfico, evaporou-se a fase móvel, e as placas foram pulverizadas sequencialmente com os reveladores NP-PEG (Natural Products – polythyleneglycol) e visualizadas ao ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm. O revelador NP é constituído por uma solução metanólica do éster aminoetílico de ácido difenilbórico a 1% e o revelador PEG é formado por uma solução etanólica de polietilenoglicol 4000 a 5%. Estes reveladores permitem detetar, também, os ácidos fenólicos.

2.5.1.2 Sistema cromatográfico para taninos: sistema S2

Para monitorizar a presença de taninos recorreu-se a placas pré-revestidas de gel de sílica, com indicador de fluorescência 60F254 da Merck e à mistura tolueno: acetona: ácido acético na proporção 3:7,5:1 (sistema S2), de acordo com ESCRIBANO-BAILÓN (1992), que permite separar os taninos de acordo com o seu grau de polimerização. Após a separação cromatográfica, a fase móvel foi eliminada e a deteção dos taninos efetuada com o revelador DMACA (p-dimetilamino-cinamaldeído) a 1% em metanol com ácido sulfúrico 1.5 M. Posteriormente, a placa de TLC foi aquecida a 100 °C durante 5 minutos e, findo este tempo, observada ao visível.

2.5.2 Cromatografia líquida de alta resolução acoplada a um detetor de fotodíodos (HPLC-PDA)

As frações previamente controladas por TLC foram igualmente monitorizadas por HPLC-PDA. Os solventes utilizados foram previamente microfiltrados e desgaseificados. Para a filtração foram utilizados filtros NL16 (0.2 µm, 50 mm) (Schleicher Schuell, Germany) e a desgaseificação foi realizada num aparelho de ultrassons da Branson, modelo B-2200 EI.

Para a análise das amostras, utilizou-se um cromatógrafo da GILSON, equipado com duas bombas (modelo 305 e 306), misturador modelo 811 B, módulo manométrico modelo 805, injetor automático GILSON 234 Autoinjetor e detector de fotodíodos (PDA) da GILSON, modelo 170. O programa de controlo e tratamento de dados utilizado foi o Unipoint System (Unipoint® 2.10).

Como fase estacionária utilizou-se uma coluna analítica RP18 Spherisorb Waters® ODS-2 (250 x 4,6 mm, 5 µm), à temperatura de 24 °C, protegida por uma pré-coluna KS 30/4 Nucleosil 120-5, C-18 (30 x 4 mm, 5 µm), Mackerey-Nagel (Düren, Germany).

Para fase móvel recorreu-se a um gradiente de solução aquosa de ácido fórmico a 5% (eluyente A) e metanol 100% (eluyente B), a um fluxo de 1 mL/minuto. O gradiente usado foi: 5-15 % de metanol (0-10 minutos), 15-30% mtanol (10-15 minutos), 30-35% metanol (15-25 minutos), 35-50% metanol (25-35 minutos), 50-80% metanol (35-40 minutos) seguida por uma eluição isocrática de 100 % de metanol, durante 20 minutos. O volume de amostra injetado foi de 100 µL. A aquisição dos espectros de UV-V foi realizada entre 200 e 600 nm e os perfis cromatográficos registados nos comprimentos de onda de 280 e 320 nm.

2.6 Atividade anti-inflamatória e Citotoxicidade

2.6.1 Cultura celular

Para o estudo da atividade anti-inflamatória das amostras foi utilizada a linha celular de macrófagos Raw 264.7 (American Type Culture Collection – TIB-71). A linha celular foi amavelmente cedida pela Doutora Otilia Vieira do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra. O meio de cultura usado foi o DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen) suplementado com 10 % (v/v) de soro fetal bovino não inativado (Invitrogen), 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma) e mantidas a 37 °C em atmosfera húmida com 5% CO₂/95% ar. Para a realização dos ensaios de atividade anti-inflamatória e de citotoxicidade, as amostras foram preparadas no meio de cultura supracitado.

2.6.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória

Para a realização dos ensaios, as células foram plaqueadas em placas de cultura de 96 poços (0,6 x 10⁵ células/poço), e deixadas a estabilizar durante a noite. Após este período as células foram mantidas com meio de cultura (controlo) e incubadas com diferentes concentrações

do extrato e das frações e /ou 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) (Sigma) durante 24 horas.

A atividade anti-inflamatória foi determinada através da produção de óxido nítrico (NO), medida pela acumulação de nitritos no sobrenadante da cultura celular, recorrendo a uma reação colorimétrica com o reagente de Griess [0,1% (m/v) de dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina e 1% (m/v) de sulfanilamida contendo 5% (m/v) de H_3PO_4] (Green *et al.*, 1982). Foram utilizados 170 μL de sobrenadante da cultura celular e 170 μL de reagente de Griess tendo sido colocados ao abrigo da luz durante 30 minutos. Decorrido este tempo, a absorvância a 550 nm foi lida num leitor de placas (Biotek Synergy HT) e a concentração de nitritos determinada por extrapolação a partir de uma curva padrão obtida com diluições seriadas de nitrito de sódio.

2.6.3 Avaliação da viabilidade celular

A determinação das células metabolicamente ativas foi realizada por recurso ao ensaio com resazurina. Este ensaio baseia-se na capacidade das células vivas converterem a resazurina (azul, não fluorescente) em resorufina (rosa, fluorescente) (Figura 4) e é aplicado em ensaios de citotoxicidade, proliferação e viabilidade celular (Rampersad, 2012). A quantidade de resorufina produzida é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Após a incubação com amostras, o meio sobrenadante foi retirado e as células foram incubadas com 100 μL de solução de resazurina (10 μM em meio de cultura) durante 2 horas a 37 °C em atmosfera húmida com 5% $\text{CO}_2/95\%$ ar. A quantificação da resorufina foi determinada num leitor de placas (Biotek Synergy HT) a 570 nm com filtro de referência a 620 nm.

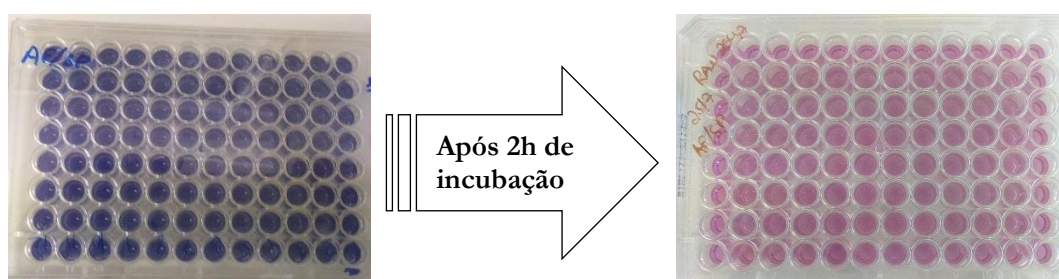


Figura 11. Redução da resazurina a resorufina.

2.6.4 Análise Estatística

Para a análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism, versão 5.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), tendo sido aplicado o One-way ANOVA seguida dos diferentes testes estatísticos.

Os valores de EC_{50} correspondentes à atividade anti-inflamatória foram calculados a partir da reta de calibração (median effect plot) obtida após linearização da curva dose-resposta, segundo método descrito por Chou (2006).

As combinações das frações testadas neste trabalho foram analisadas de acordo com o método do isoblograma e com o método de Chou (Chou, 2006).

Capítulo 3 – Resultados e Discussão

3.1 Caracterização físico-química do extrato por HPLC-PDA

Procedeu-se à preparação do infuso do *C. citratus* na concentração de 5 mg/mL em MeOH a 5%. Foram injetados 100 µL desta solução no HPLC-PDA. O gradiente utilizado encontra-se descrito no capítulo 2 (Material e métodos). O perfil espectral foi registrado a 280 e 320 nm (figura 12).

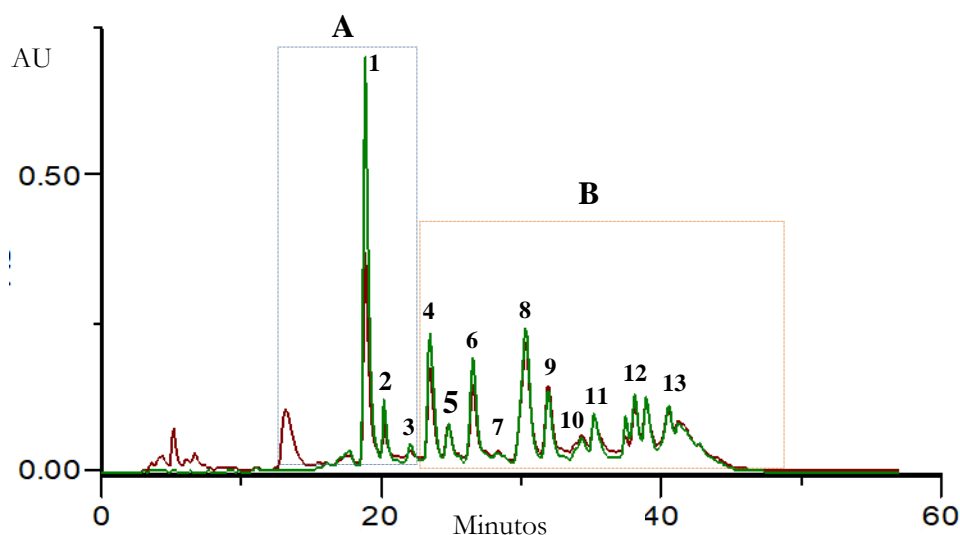


Figura 12. Cromatograma HPLC-PDA do extrato do *Cymbopogon citratus*.

A análise dos espectros UV, obtidos por PDA, permitiu detetar ácidos fenólicos (A) e flavonóides (B) (Figura 12). Os tempos de retenção e máximos de absorção dos picos 1 a 13 do cromatograma da figura 12 e a respetiva identificação estão transcritos na tabela 8.

Na figura 13 estão ilustrados exemplos de espectros de ultra-violeta característico de ácidos fenólicos e flavonóides que foram detetados no infuso do *C. citratus*, assim como os respetivos máximos de absorção. Os espectro de absorção a) e b) são característicos dos ácidos fenólicos encontrados nesta planta. Os espectros cujo máximo de absorção é de 310 nm, são característicos do ácido *p*-cumárico (pico 3, espectro b) da figura 13. Os espectros que apresentam uma inflexão a aproximadamente 295 nm e um máximo de absorção a 326 nm são característicos do ácido cafeico ou ferúlico (pico 1 do cromatograma e espectros a) da Figura 13). Os ácidos fenólicos presentes são derivados do ácido cafeico ou ferúlico e *p*-cumárico.

Tabela 8. Identificação dos picos do cromatograma do infuso de *Cymbopogon citratus*, obtido por HPLC-PDA.

Pico	Tr (minutos)	$\lambda_{\text{máximo}}$ (nm)	Tipo de compostos fenólicos
1	18,9	248; 296(i); 326	Derivados do ácido cafeico ou ferúlico
2	20,2	253; 294(i); 326	
3	23,3	310	Derivado do ácido <i>p</i> -cumárico
4	24,9	270; 350	Derivados da luteolina
5	26,6	272; 329	Derivado da apigenina
6	30,5	257(i); 269; 351	Derivados da luteolina
7	31,9	270; 351	
8	34,4	258(i); 345	
9	35,2	266; 349	
10	37,4	287; 330	Derivado da apigenina
11	38,1	270; 350	Derivados da luteolina
12	38,9	270; 350	
13	40,5	270; 347	

(i) – inflexão dos máximos de absorção no UV; Tr – tempo de retenção; $\lambda_{\text{máximo}}$ – comprimento de onda máximo

Relativamente aos espectros c) e d), estes são característicos de flavonas. Os seus espectros distinguem-se pelos máximos de absorção na banda I (os comprimentos de onda típicos são 320-385 nm) e pela forma da banda II, podendo ter apenas um máximo de absorção ou haver o seu desdobramento. A forma da banda II deve-se essencialmente ao padrão de substituição do anel B nas flavonas. A banda II do espectro de absorção apresentará um máximo se o anel B for mono-hidroxilado. Por outro lado, se o anel B apresentar mais que um grupo hidroxilo, esta substituição adicional produzirá um desdobramento da banda II. Os espectros correspondentes aos picos 5 e 10 do cromatograma sugerem ser derivados da apigenina, já que esta é uma flavona mono-hidroxilada no anel B, pelo que a banda II só apresentará um máximo de absorção aos 272 nm, e a banda I absorve aos 330 nm (espectro d) da figura 13). Por outro lado, a luteolina é uma flavona di-hidroxilada no anel B e, por isso, irá haver desdobramento da banda II absorvendo aos comprimentos de onda de 257 e 268 nm. A banda I irá absorver aos 350 nm e, por isso, o espectro típico da luteolina e seus derivados será o espectro de absorção c).

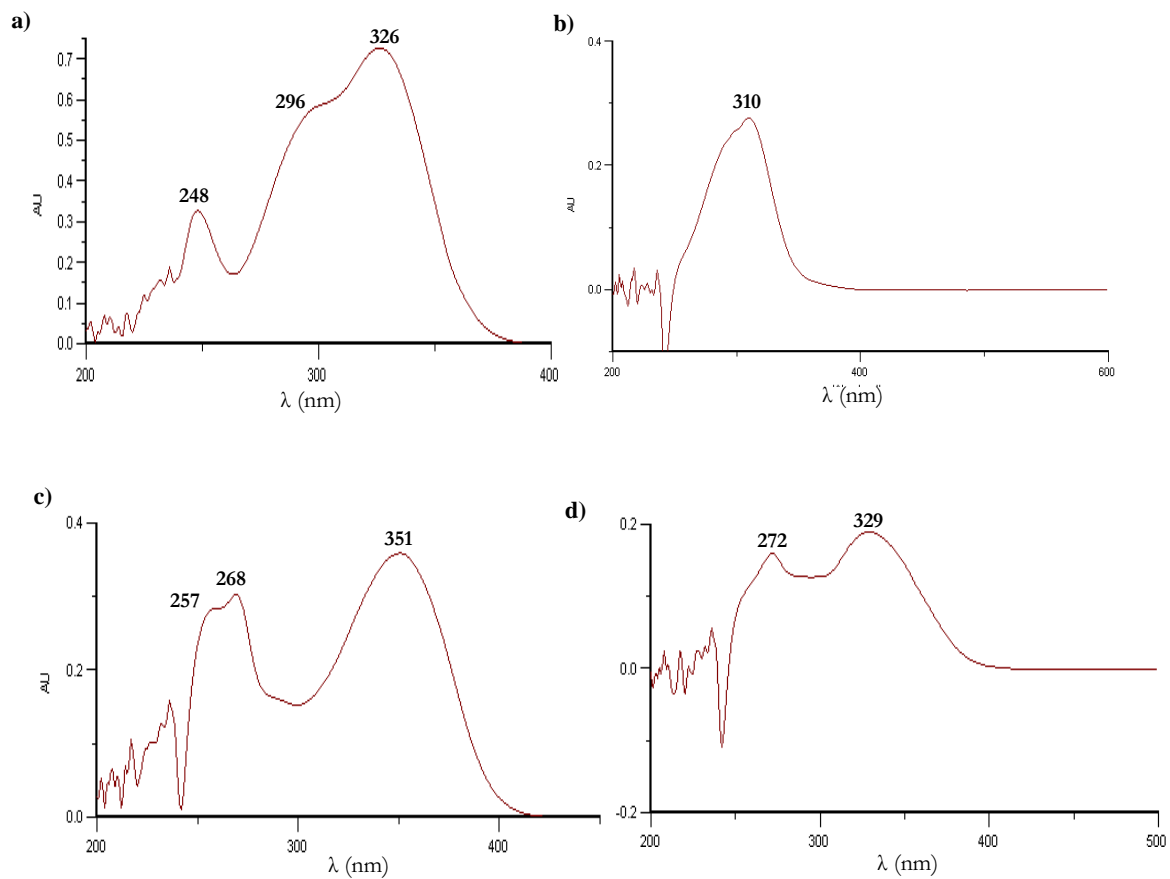


Figura 13. Espectros de absorção representativos da análise por HPLC-PDA do extrato do *Cymbopogon citratus*. a) e b) Espectros de absorção característicos dos ácidos fenólicos; c) e d) Espectros de absorção característicos dos flavonóides.

3.2 Fracionamento do extrato

O infuso do *Cymbopogon citratus* foi fracionado em três etapas. A figura 14 resume o processo de fracionamento.

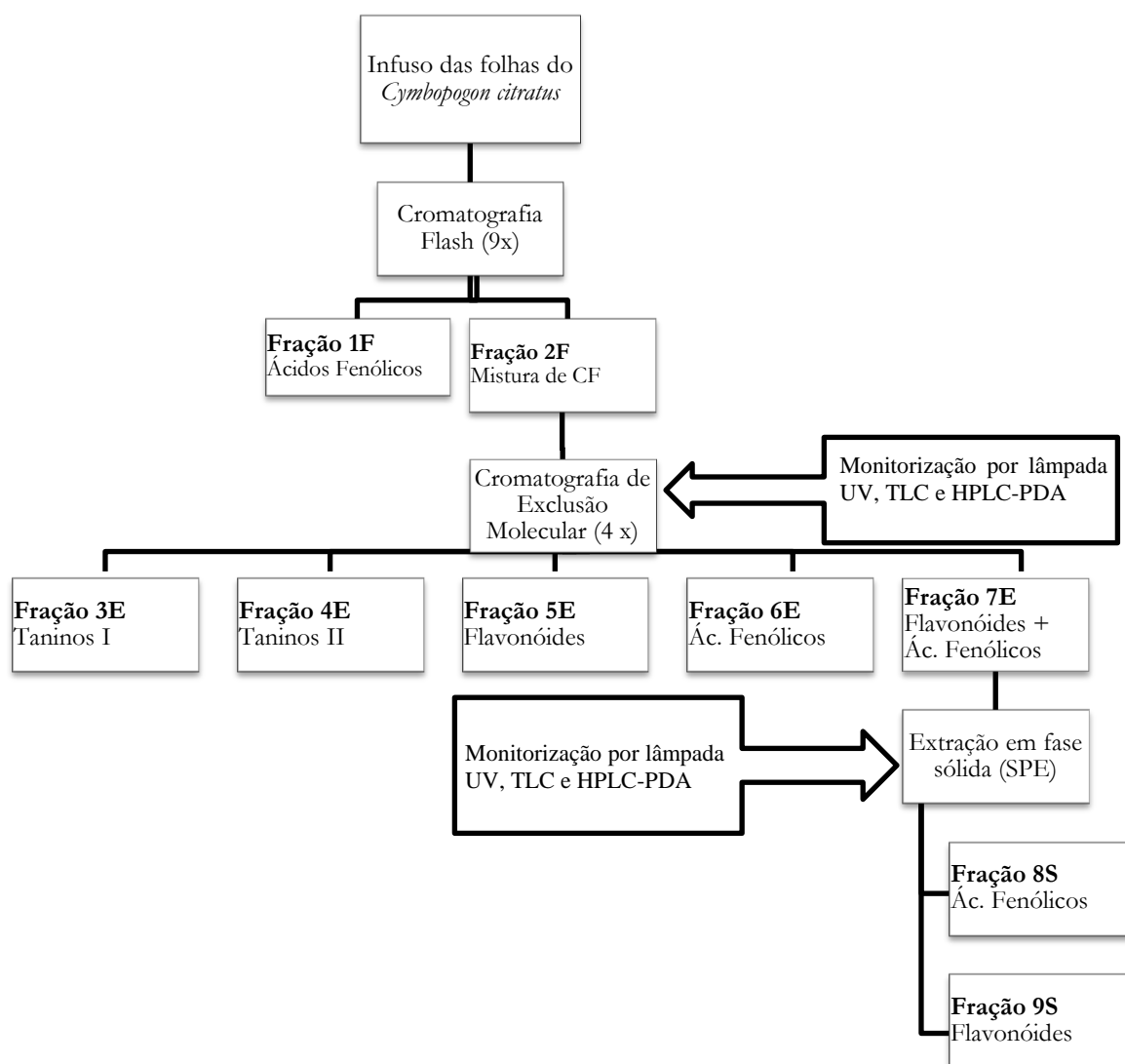


Figura 14. Esquematização do processo de fracionamento dos compostos fenólicos, presentes no infuso das folhas do *Cymbopogon citratus*. CF – compostos fenólicos

A primeira fase do fracionamento consistiu em separar a maioria dos ácidos fenólicos dos restantes compostos por cromatografia Flash. Na tabela 9, estão indicadas as condições do fracionamento do infuso.

Tabela 9. Frações recolhidas e respetivas condições do fracionamento do *Cymbopogon citratus*, utilizadas na Cromatografia Flash.

Fração	Eluente (% MeOH)	Tempo (minutos)	Fluxo (mL/min.)
0	5-6	0-6,5	7,3
1	6	6,5-8,9	7,3
2	6-7	8,9-14,2	7,3
3	10	14,2-18,6	10
	30	18,6-25	10
4	30	25-29,4	10
	40	29,4-31,2	10
5	40	31,2-33	15
	50	33-41,9	15
	60	41,9-45,6	15
	80	45,6-50,5	15
	100	50,5-64,3	15

Este procedimento foi repetido nove vezes. O cromatograma resultante deste fracionamento está representado na figura 15.

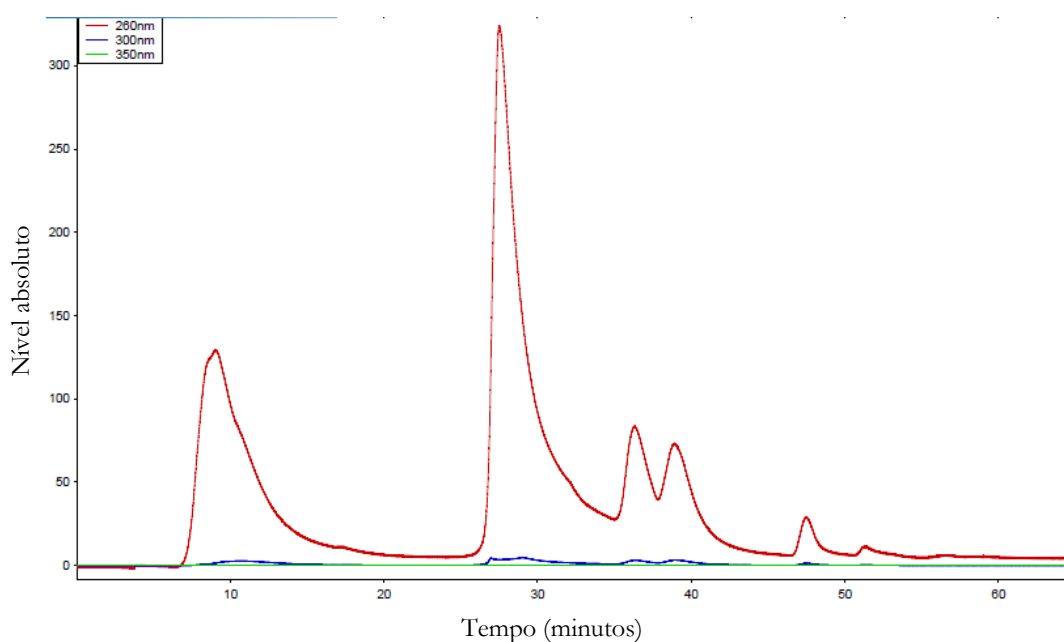


Figura 15. Cromatograma do fracionamento do *Cymbopogon citratus*, obtido por Cromatografia Flash.

As frações (0 – 5) foram monitorizadas por HPLC-PDA (Figura 16) tendo sido avaliada a sua composição química no sentido de reunir as frações com composição semelhante. De acordo com o perfil espectral dos cromatogramas correspondentes, verificou-se que: as frações F0 e F1

continham ácidos fenólicos e as frações F2, F3, F4 e F5 continham mistura de compostos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonóides e taninos). Deste procedimento obtiveram-se duas frações: a fração 1F (F0 + F1) contendo ácidos fenólicos e a fração 2F (F2 a F5) constituída pela mistura ácidos fenólicos e flavonóides.

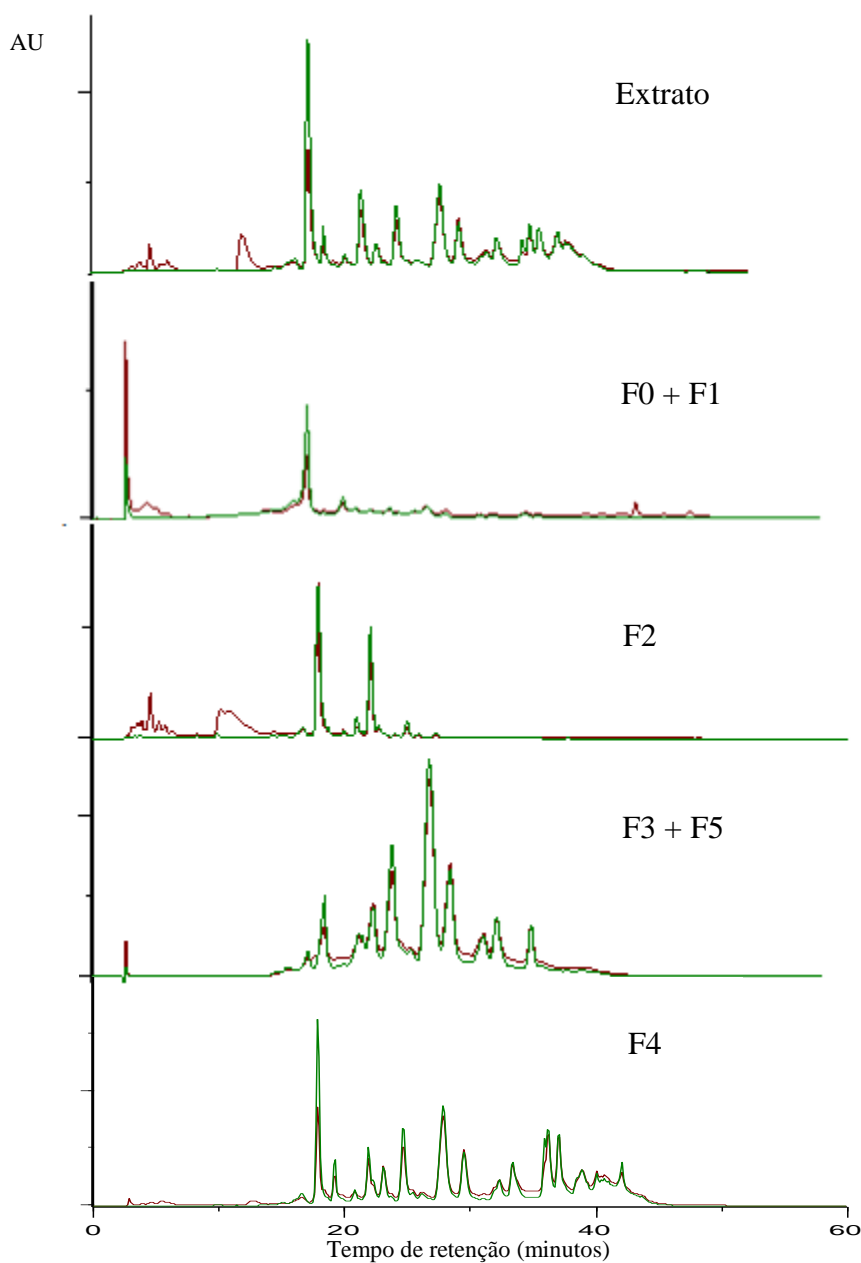


Figura 16. Cromatogramas HPLC/-PDA das frações F0-F5 obtidas por Cromatografia Flash: a) infuso do *Cymbopogon citratus*; b) - fração F0; c) - F1; d) - F2; e) - F3 + F5; f) - F4

Dada a pouca resolução da cromatografia Flash (diâmetro da coluna é relativamente grande quando comparada com a coluna do HPLC-PDA) e devido à complexidade da amostra, apenas foi possível separar alguns ácidos fenólicos já que, grande parte destes, são compostos mais polares que os flavonóides, facilitando a sua separação. No entanto, existem ácidos fenólicos

cuja polaridade é semelhante à dos flavonóides e, por isso, não foi possível separá-los por cromatografia Flash. Além de diferirem na polaridade, os compostos fenólicos podem ser separados de acordo com o seu peso molecular. Com base neste pressuposto, a fração 2F foi submetida a cromatografia de exclusão molecular (SEC). Com este objetivo utilizou-se uma coluna cromatográfica de volume igual a 923 cm³ (Figura 17).



Figura 17. Coluna cromatográfica de Sephadex LH-20 (fase estacionária).

O fracionamento foi monitorizado com uma lâmpada UV, ao comprimento de onda de 366 nm. Algumas frações apresentavam bandas de coloração acastanhada pelo que não foi necessário recorrer ao uso de lâmpada UV durante o fracionamento. Foram recolhidas 30 frações no total (Tabela 10).

O controlo das frações foi realizado por TLC, recorrendo ao sistema S1 e à utilização dos reveladores NP-PEG para identificação dos ácidos fenólicos e dos flavonóides (Figura 18) e, DMACA para deteção dos taninos (sistema S2), obtendo também informação quanto ao grau de polimerização destes (Figura 19).

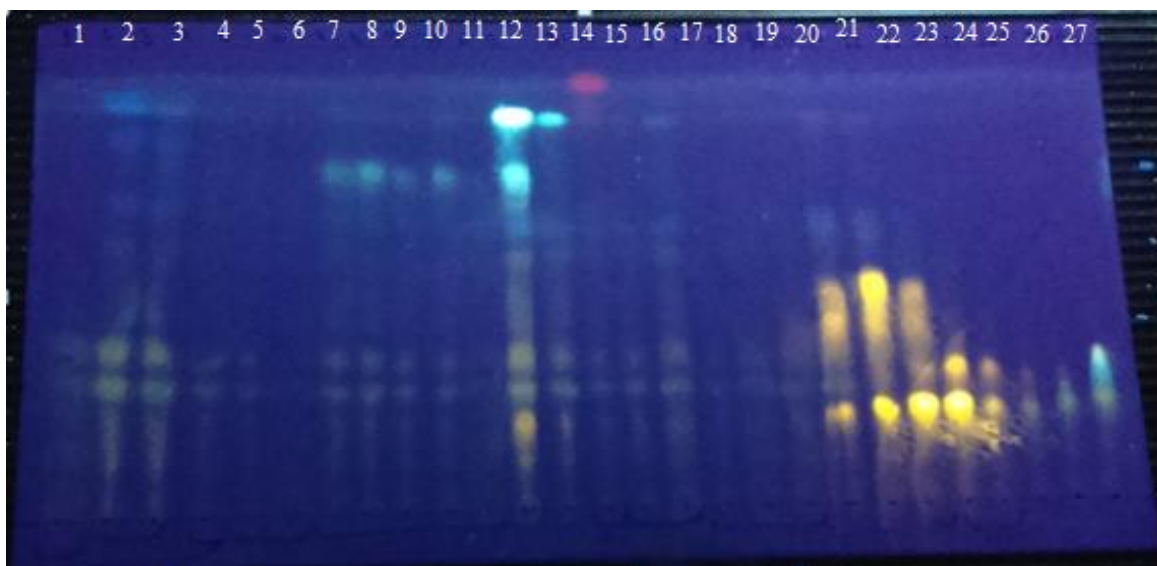


Figura 18. TLC das frações F1 a F27 obtidas no fracionamento do *Cymbopogon citratus* por Cromatografia de exclusão molecular (sistema S1 e revelador NP-PEG).

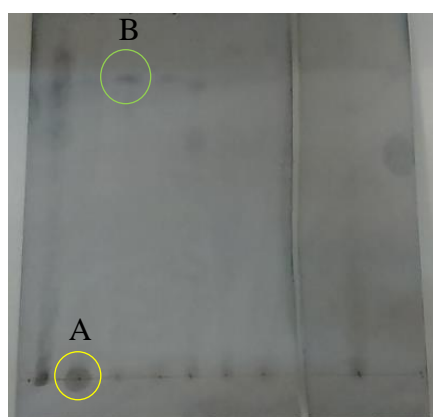


Figura 19. Exemplo ilustrativo para o controlo de algumas frações recolhidas no fracionamento por SEC quanto à presença e ao grau de polimerização dos taninos (fase móvel: tolueno: acetona: ácido acético 3:7.5:1; revelador - DMACA). A letra A indica os taninos de elevado peso molecular (círculo a amarelo) e a letra B os de baixo peso molecular (círculo a verde).

Tabela 10. Volumes das frações recolhidas no fracionamento do infuso do *Cymbopogon citratus* por cromatografia de exclusão molecular e identificação das classes de compostos presentes nas respectivas frações recolhidas, por TLC (sinal +: positivo para a classe identificada).

Fração n°	Volume recolhido (mL)	Fase móvel	Classe de compostos fenólicos		
			Ácidos fenólicos	Flavonóides	Taninos
1	15,5	Etanol absoluto	-	-	+
2	77		+	+	+
3	8,5		+	+	+
4	8,5		+	-	+
5	8,5		+	-	+
6	9,5		+	-	+
7	10		+	+	+
8	9,5		+	+	+
9	11		+	+	-
10	12,5		+	+	-
11	100		+	+	-
12	10,5		+	+	-
13	10		+	+	-
14	15		-	-	-
15	14		+	+	-
16	14		+	+	-
17	13		+	+	-
18	112		+	+	-
19	60		+	+	-
20	80		-	+	-
21	87		-	+	-
22	100		-	+	-
23	89		-	+	-
24	32,5		-	+	-
25	106		+	+	-
26	138		+	+	-
27	115,5		+	+	-
28	126		+	-	-
29	126	Acetona 70%	-	-	+
30	126		-	-	+

Os ácidos fenólicos e os flavonóides foram detetados pela sua fluorescência a 366 nm, sendo que os primeiros apresentam uma coloração azul e os segundos uma coloração amarela esverdeado ou alaranjado. Os flavonóides que, na TLC, ocorrem com uma cor amarelo esverdeada são derivados da apigenina e os que têm cor alaranjada são derivados da luteolina (Wagner e Bladt, 1996).

Para controlar a presença de taninos nas frações foi utilizado o sistema de TLC descrito no capítulo 2 e DMACA como revelador. Assim, foi possível determinar quais as frações que continham taninos e, dentro destas, as que detetar a presença de taninos de baixo peso molecular e de alto peso molecular. Nestas condições os taninos absorvem no visível apresentando cor lilás.

Relativamente ao seu grau de polimerização, os taninos de baixo peso molecular com grau de polimerização inferior a quatro (**A**, Figura 19) migrarão mais tendo, por isso, um Rf (factor de retenção) maior que os taninos com peso molecular maior que terão um Rf menor (**B**, Figura 19) (Cheynier *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 2014). Observando a figura 19 conclui-se que: a fração 1 apresenta taninos de baixo e elevado peso molecular; a fração 2 taninos de elevado peso molecular já que não houve migração dos compostos e as frações 3-8 apresentam ambos os tipos de taninos, já que se observa que houve alguma migração, apresentando, no entanto, uma mancha residual no ponto de aplicação. As frações 29 e 30, que eluíram com acetona a 70%, contêm taninos de elevado peso molecular tal como é sugerido pela TLC ilustrada na figura 19. Como já dito anteriormente, os taninos absorvem no visível apresentando cor castanha pelo que foi relativamente fácil fracionar estes compostos dos ácidos fenólicos e dos flavonóides.

A análise por TLC (Tabela 10) permitiu detetar o tipo de compostos fenólicos presentes nas 30 frações resultantes do fracionamento por SEC. Assim, reuniram-se frações com composição semelhante para posterior confirmação por HPLC-PDA. Assim, as frações 2 e 3 continham ácidos fenólicos e flavonóides; 4 a 6 (ácidos fenólicos); 7 a 11 (ácidos fenólicos e flavonóides); 12 e 13 (ácidos fenólicos e flavonóides); 15 a 19 (ácidos fenólicos e flavonóides); 20 a 24 (flavonóides); 21 a 27 (ácidos fenólicos e flavonóides) e 28 (ácidos fenólicos) (Figura 14). As frações 1, 29 e 30 (contendo apenas taninos) e a fração 14 (sem compostos fenólicos) não foram injetadas.

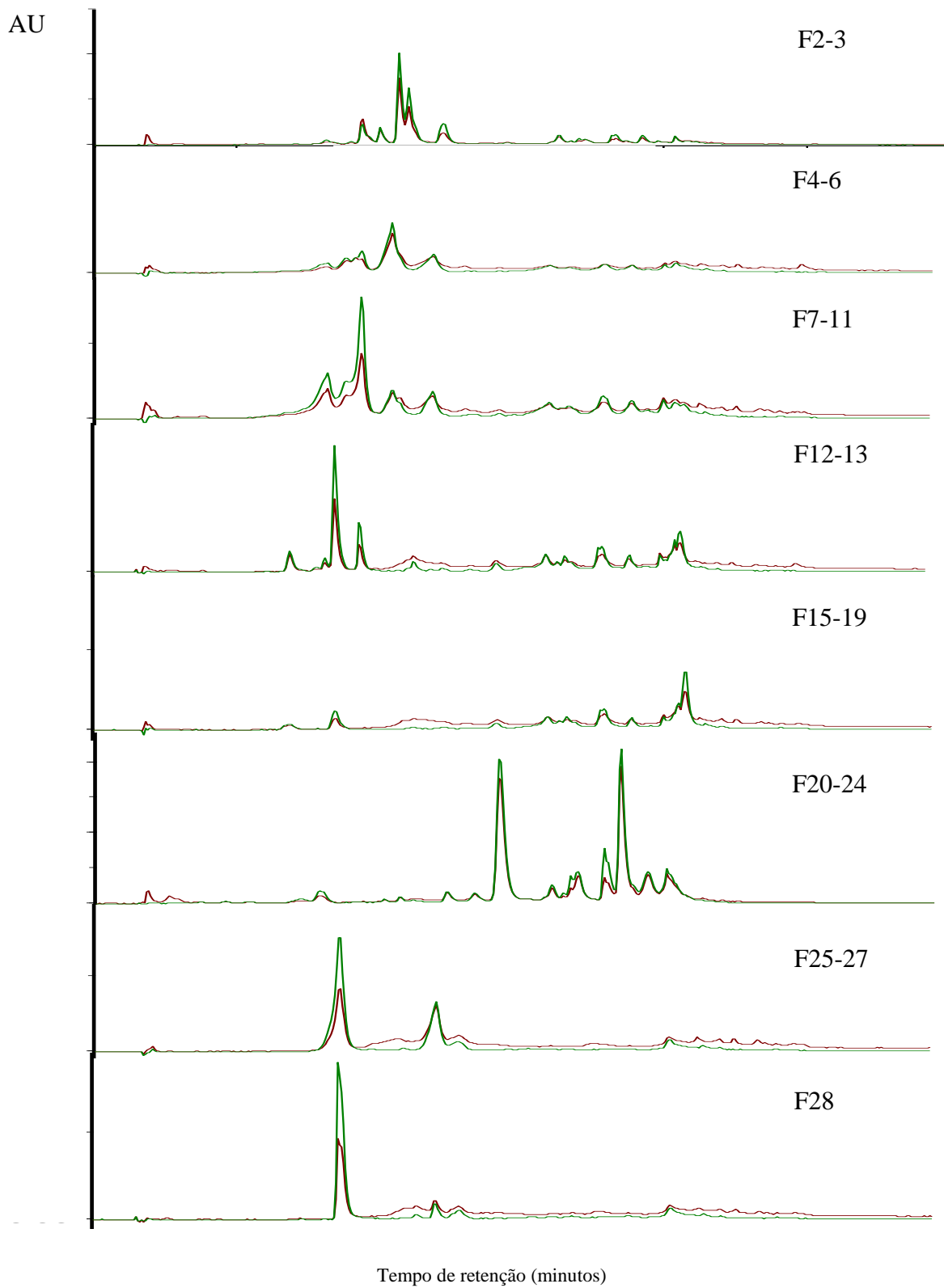


Figura 20. Cromatogramas HPLC-PDA das frações resultantes do fracionamento do infuso do *Cymbopogon citratus* por SEC.

A análise por HPLC-PDA confirmou a composição observada por TLC e de acordo com estes resultados, as frações foram reunidas tendo em conta a sua composição, obtendo-se: uma fração contendo apenas ácidos fenólicos (4 a 6) que foi reunida à fração previamente obtida por cromatografia Flash (1F); uma fração contendo apenas flavonóides (20 a 24); duas frações de taninos T I (1) e TIII (31). As frações com mistura de ácidos fenólicos e flavonóides (2 e 3; 7 a 13; 15 a 19; 25 a 27) foram reunidas numa única fração (F7E) para posterior fracionamento numa coluna C18 extração em fase sólida (SPE).

A fração F7E foi concentrada (volume final = 16 mL) e, posteriormente, submetida duas vezes (volume de aplicação igual a 8 mL) à extração em fase sólida (SPE), numa tentativa de separar os ácidos fenólicos dos flavonóides. Deste fracionamento foram obtidas 18 frações (Tabela 11). A presença de compostos fenólicos foi monitorizada por TLC e com o hidróxido de sódio, através da coloração amarela conferida aos eluatos, na presença de fenóis. A composição da fase móvel encontra-se descrita na tabela 11, bem como os volumes das respetivas frações.

Tabela 11. Registo das condições utilizadas e dos volumes das frações recolhidas no fracionamento da fração 7E por SPE.

Fração	Volume (mL)	Fase móvel	NaOH	Classe de compostos fenólicos
1	40	Água	-	
2	4,3		+	AF
3	11		+	AF
4	10		+	AF
5	10		-	
6	11	Metanol 5%	-	
7	10		-	
8	10		-	
9	10		-	
10	10		-	
11	10		-	
12	10		-	
13	4,5		-	
14	10	Metanol 100%	-	
15	2,4		+	FLAV
16	10		+	FF
17	12		+	FF
18	4,1		-	

Os ácidos fenólicos eluíram com a água nas frações 2 a 4 (Tabela 11). Na fração 5, o teste do NaOH não revelou a presença de compostos fenólicos. Assim, o gradiente foi alterado para metanol a 5% de modo a confirmar a eluição de todos os ácidos fenólicos. Uma vez confirmada a ausência de fenólicos nas frações 6 a 13, o gradiente foi alterado para metanol a 100%. Os flavonóides começaram a eluir a partir da fração 15 até à 17. A fração 18 não continha fenólicos

pelo que se concluiu o fracionamento. Reuniram-se as frações resultantes de forma a obter uma fração de ácidos fenólicos 8S (2 a 4) e uma de flavonóides 9S (15 a 17) que, posteriormente, foram misturadas às frações obtidas no final do fracionamento por SEC (Figura 20).

No final da sequência do fracionamento do infuso (cromatografias Flash, SEC e SPE), foram obtidas quatro frações: a fração AF (resultante das frações 1F, 6E e 8S) enriquecida em ácidos fenólicos; a fração FF (resultante das frações 5E e 9S) enriquecida em flavonóides; a fração TI (correspondente à fração 3E) enriquecida em taninos e, por último, a fração TII (correspondente à fração 4E) enriquecida em taninos (Figura 21). Estas quatro frações finais foram liofilizadas para posteriormente, serem utilizadas nos ensaios *in vitro* da atividade anti-inflamatória.

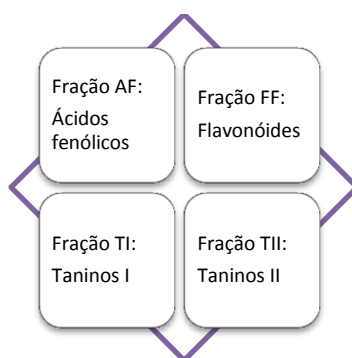


Figura 21. Frações finais resultantes do fracionamento do extrato de *Cymbopogon citratus*.

No total foram fracionadas nove gramas de extrato tendo-se obtido um rendimento de 1,9% para os flavonóides (FF); 12,09% para os ácidos fenólicos (AF); 1,74% para os taninos TI e 1,24% para os taninos TII. Como se pode verificar pelos rendimentos obtidos, os ácidos fenólicos são, dos compostos em estudo, os mais representativos do extrato.

3.3 Caracterização físico-química das frações AF, FF, TI e TII por HPLC-PDA

No fim de todo o processo de fracionamento do infuso do *Cymbopogon citratus* foram obtidas quatro frações: a fração AF enriquecida em ácidos fenólicos; a fração FF enriquecida em flavonóides; as frações TI e TII enriquecidas em taninos. Estas frações foram liofilizadas e caracterizadas por HPLC-PDA (Figura 15). De acordo com os espectros de absorção, a fração FF terá maioritariamente derivados da luteolina e da apigenina; a fração AF terá derivados do ácido cafeico ou ferúlico e *p*-cumárico (identificados pelos espectros obtidos que eram idênticos aos observados após a caracterização do extrato – Figura 22).

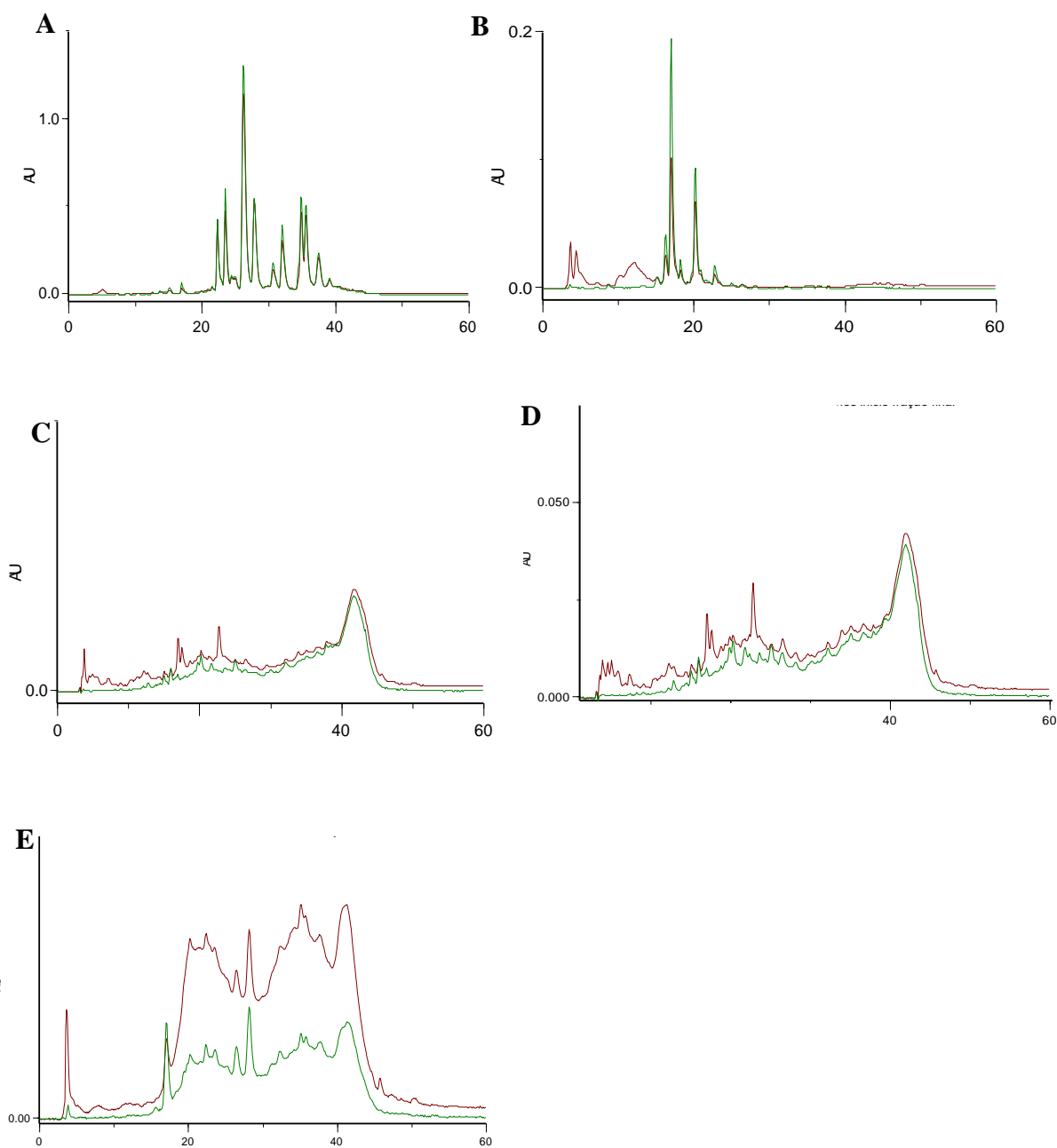


Figura 22. Cromatogramas HPLC-PDA das frações finais obtidas no processo do fracionamento: A - fração enriquecida em flavonóides; B - fração enriquecida em ácidos fenólicos; C - fração enriquecida em taninos TII; D - fração enriquecida em taninos TI; E – fração enriquecida (na mistura das duas frações dos taninos (TI).

A fração TI é constituída por taninos de baixo e elevado peso molecular e a fração TII por taninos de alto peso molecular (como mostrado na Figura 19). A análise dos espectros obtidos dos cromatogramas das frações de taninos (cromatogramas **C**, **D** e **E**, Figura 22), sugere a presença de taninos condensados porque possuem um máximo de absorção a 278 nm, característico de flavonóides em que há ausência da conjugação entre o anéis B e C (Figura 13).

Os espectros dos compostos presentes na fração TII são característicos de proantocianidinas cujas unidades monoméricas são flavanóis e 3-desoxi-flavanóis monohidroxiladas no anel B, uma vez que apresenta um máximo de absorção ao comprimento de onda de 330 nm (Figura 13, espectro D). Relativamente à fração TIII esta apresenta maior diversidade de compostos uma vez que os seus espectros têm máximos de absorção característicos de unidades monoméricas mono e di-hidroxiladas (comprimentos de onda variam de 330 a 350 nm) (Figura 13, espectros C e D). Este tipo de compostos foram previamente identificados em estudos anteriores (Costa *et al.*, 2015).

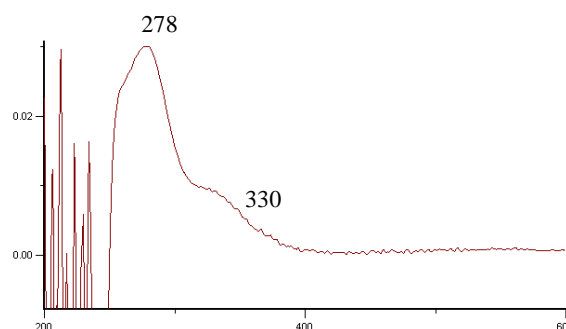


Figura 23. Espectro correspondente ao cromatograma da fração TII.

A figura 23 ilustra o perfil espectral encontrado no cromatograma correspondente à fração TII. Foram efetuados estudos envolvendo o fracionamento dos compostos fenólicos do *C. citratus* e caracterização da fração de taninos por HPLC-PDA-tandem MS. Os máximos de absorção apresentados (banda I: 330 nm e banda II: 278 nm) indicam que os compostos presentes na fração correspondem a apigeninflavanos (Ferreira Da Costa, 2015). O perfil espectral do cromatograma da fração TIII (Figura 24) indica maior diversidade de compostos, cujos máximos de absorção da banda II variam de 330 e 350 nm. Assim, a fração TIII é constituída por apigeninflavanos e luteolinflavanos (máximo de absorção de 350 nm (Ferreira Da Costa, 2015). A banda I indica o padrão de hidroxilação do anel B, como já referido anteriormente. Atendendo à figura 24, verifica-se que o padrão de hidroxilação tende a aumentar dos espectros C para A, uma vez que o desdobramento da banda II do espectro A é mais evidente.

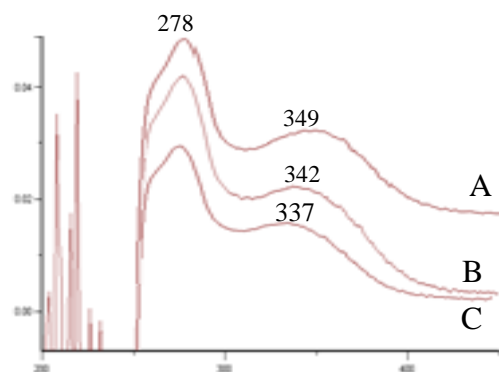


Figura 24. Perfil espectral do cromatograma correspondente à fração TII, obtido por HPLC-PDA. Os espectros A e B são característicos de luteolinflavanos e o espectro C de apigeninflavanos.

3.4 Atividade anti-inflamatória e citotoxicidade do extrato e das frações

Como já referido no capítulo 2, as amostras foram dissolvidas em meio de cultura. A atividade anti-inflamatória foi avaliada *in vitro* em macrófagos. Estes, quando estimulados com LPS (lipopolissacarídeo) produzem óxido nítrico (NO). A incubação com várias concentrações das amostras permite verificar a redução dos níveis do NO (através do método de Griess, descrito no capítulo 2) permitindo avaliar a capacidade do extrato inibir o NO e, dessa forma, inferir sobre o seu potencial anti-inflamatório. O EC_{50} foi calculado e corresponde à concentração necessária de extrato/frações que inibe 50% do NO.

A citotoxicidade foi avaliada pela redução da resazurina. A resazurina é um composto de cor roxa que em células viáveis é metabolizada a resofurina, mudando para rosa. Assim, quanto mais tóxicas forem as amostras menor é a metabolização da resazurina e, conseqüentemente, não haverá uma mudança de cor significativa.

3.4.1 Atividade anti-inflamatória do extrato e das frações

Foram testadas algumas concentrações para avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato e determinar o EC_{50} deste. De acordo com o EC_{50} do extrato, as concentrações testadas foram de: 15, 50, 83, 125, 251 e 503 $\mu\text{g/ml}$. A curva dose-resposta é dada em função da inibição da produção de NO (em percentagem) pelas concentrações testadas. Observando a figura 25 verifica-se que, à medida que as concentrações de extrato vão aumentando, a produção de NO vai reduzindo até um determinado limiar existindo, por isso, uma dependência da dose testada. O

EC₅₀ do extrato, determinado a partir da curva dose-resposta (Figura 25) é de $90,56 \pm 1,069$ µg/mL.

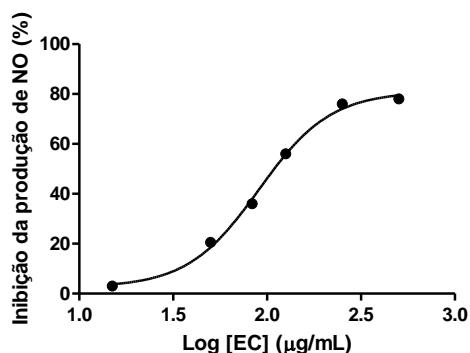


Figura 25. Efeito do infuso das folhas do *Cymbopogon citratus* em células RAW 264.7 estimuladas com LPS (EC₅₀ = $90,56 \pm 1,069$ µg/mL; $r^2 = 0,9969$).

As frações também foram testadas em células RAW 264.7 estimuladas com LPS, obtendo-se curvas dose-resposta da qual se calcularam os EC₅₀ respectivos.

Para os ácidos fenólicos as concentrações testadas foram de 50, 100, 172, 200, 277, 800 e 1000 µg/mL. O EC₅₀ determinado foi de $215,1 \pm 1,037$ µg/ml, o que sugere que os ácidos fenólicos têm baixa atividade anti-inflamatória.

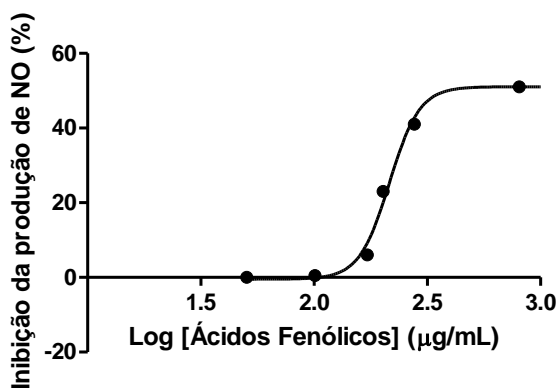


Figura 26. Efeito da fração dos ácidos fenólicos em células RAW 264.7 estimuladas com LPS (EC₅₀ = $215,1 \pm 1,037$ µg/mL; $r^2 = 0,9924$).

A fração de flavonóides também foi testada em várias concentrações nomeadamente: 13, 26, 52, 104 e 208 µg/mL sendo que o EC₅₀ foi de $64,14 \pm 1,072$ µg/mL. No gráfico 4 está representada a curva dose-resposta obtida.

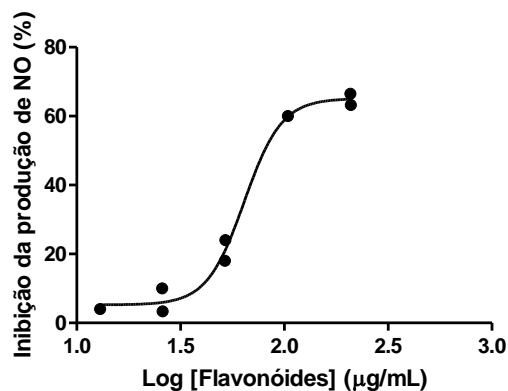


Figura 27. Efeito da fração dos flavonóides em células RAW 264.7 estimuladas com LPS (EC₅₀ = 64,14 ± 1,072 µg/mL; r² = 0,9911).

A fração dos taninos TI foi testada nas concentrações de 12,59; 24,5; 25,0; 50,0; 100 e 203 µg/mL, sendo que o EC₅₀ foi de 43,41 ± 1,074 µg/mL (Gráfico 5).

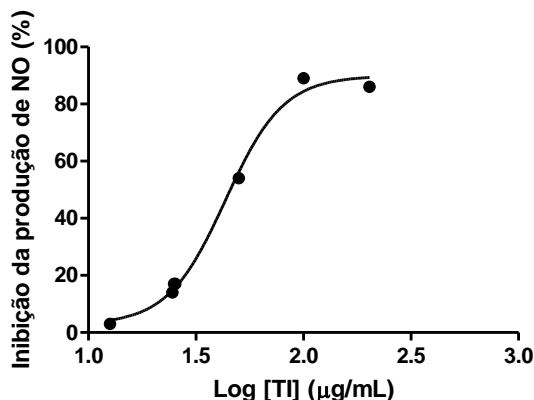


Figura 28. Efeito da fração dos Taninos I em células RAW 264.7 estimuladas com LPS (EC₅₀ = 43,41 ± 1,074 µg/mL; r² = 0,9945).

Os taninos da fração TII foram testados nas concentrações de 10, 20, 40, 102, 201 e 205 µg/mL. Esta fração revelou ter um efeito pró-inflamatório pelo que não foi possível determinar o EC₅₀. Este efeito pode estar relacionado com o grau de polimerização do tipo de taninos existentes na fração. Apesar de serem do mesmo tipo de monómeros, diferem no peso molecular como verificado pela TLC. Taninos com grau de polimerização inferior a quatro não migram. Por outro lado, se o grau de polimerização for superior, haverá migração. Sabe-se também que a fração TII foi a que teve um tempo de retenção maior na cromatografia por exclusão molecular, sendo os últimos compostos a eluir. Assim, esta fração poderá ter um grau de polimerização muito superior a quatro, o que sugere que serão polímeros e não oligómeros (Zhou *et al.*, 2014).

Por último, atendendo à proporção de TI e TII que poderá existir na planta (determinada de acordo com o rendimento dos taninos obtido no processo do fracionamento), estas duas frações foram misturadas de modo a determinar o efeito anti-inflamatório dos taninos totais,

mistura essa que passará a ser designada apenas por taninos. (Assim, as concentrações usadas foram de 33,5; 50,0; 66,0; 100; 133; 196; 265 e 400 $\mu\text{g/mL}$. Partindo da curva dose-resposta obtida (Gráfico 7) o EC_{50} determinado foi de $166,2 \pm 1,268 \mu\text{g/mL}$.

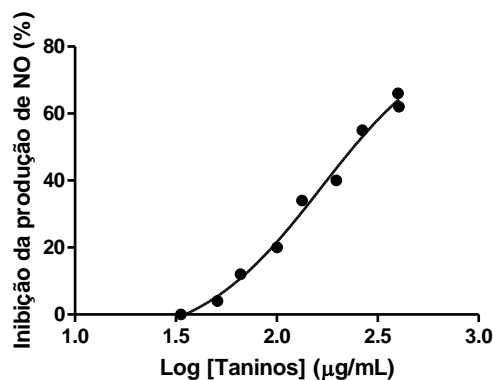


Figura 29. Efeito da fração dos taninos em células RAW 264.7 estimuladas com LPS ($\text{EC}_{50} = 166,2 \pm 1,8 \mu\text{g/mL}$; $r^2 = 0,9912$).

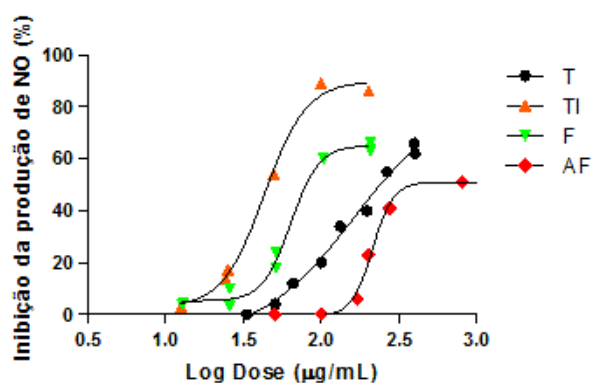


Figura 30. Curvas dose-resposta de todas as frações testadas individualmente em células RAW 264.7 estimuladas com LPS.

Na figura 30 estão representadas as curvas dose-resposta individuais de todas as frações testadas em macrófagos estimulados com LPS. De acordo com as definições de potência e eficácia descritas anteriormente, observa-se que os taninos do tipo I são os mais potentes (a curva dose-resposta é a que mais se aproxima do eixo de inibição do NO, o que dará um EC_{50} menor e, por isso, maior atividade) e os mais eficazes (atingem uma inibição da produção de NO mais elevada) relativamente às restantes classes de compostos fenólicos. A curva dose-resposta dos ácidos fenólicos é a que está mais desviada do eixo de inibição do NO e a que apresenta uma menor percentagem da inibição da produção do NO, significando que estes não são só os menos potentes como os que apresentam menor eficácia de entre as frações testadas. No entanto, em todas as curvas dose-resposta verifica-se que existe uma dependência da dose.

Tabela 12. Apresentação dos valores do EC₅₀ do extrato e de cada uma das frações resultantes do processo do fracionamento do *Cymbopogon citratus*. As curvas dose-resposta foram calculadas no programa GraphPad Prism, versão 5.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), recorrendo à regressão não linear e usando o log [inibidor] em função da resposta (parâmetro utilizado: desvio variável- variable slope).

Classe	de	EC ₅₀ (µg/mL)	Emáx (%)	r ²
compostos fenólicos				
Extrato (ECc)		90,56 ±1,069	81,00	0,9969
Ácidos	fenólicos	215,1±1,037	51,06	0,9924
(AF)				
Flavonóides (F)		64,14±1,072	65,14	0,9911
Taninos I (TI)		43,41±1,074	89,92	0,9945
Taninos II (TII)		-	-	-
Taninos (TI+TII)		166,2±1,268	85,38	0,9912

EC₅₀ – concentração de amostra que inibe 50% do NO; Emáx – efeito máximo apresentado pela amostra;
r² – correlação da curva dose-resposta

Na tabela 12 estão resumidos os EC₅₀ da atividade anti-inflamatória para cada uma das frações finais obtidas no processo de fracionamento. Neste trabalho foi estudada a atividade anti-inflamatória mas, como referido no capítulo 1, a atividade antioxidante pode estar relacionada com esta, pelos mecanismos já explicados anteriormente. Alguns investigadores (Figueirinha *et al.*, 2008) avaliaram a capacidade antioxidante do infuso, do decocto, extrato etanólico e metanólico do *C. citratus*, concluindo que a infusão era a que apresentava maior percentagem de redução do radical DPPH. Assim, Figueirinha *et al.* (2008) fracionou o infuso, obtendo três frações contendo taninos, ácidos fenólicos e flavonóides, que foram testadas quanto à sua capacidade antioxidante, por recurso a três métodos: DPPH; captação do anião superóxido e do radical hidroxilo. Os flavonóides foram os fitoconstituintes mais ativos nos ensaios de captação do radical hidroxilo e do anião superóxido. No ensaio da captação do radical do DPPH, os taninos apresentaram maior atividade relativamente aos flavonóides e aos ácidos fenólicos, sendo estes últimos os menos ativos em todos os ensaios realizados. Estes resultados sugerem um paralelismo comportamental com os resultados obtidos na avaliação do potencial inibitório do NO para as diferentes frações testadas neste trabalho. Além disso, infere-se uma relação da estrutura fenólica com as atividades antioxidante e anti-inflamatória verificadas para as diferentes frações.

Wang, Li e Bi, (2018) sugeriram que, os mecanismos responsáveis pela atividade antioxidante resultante dos flavonóides devem-se à captação de radicais livres e à capacidade quelante para iões de metais de transição. A presença de grupos fenólicos na estrutura dos flavonóides permite que haja a deslocalização eletrónica e, conseqüentemente, a facilidade em doar hidrogénios. Os flavonóides também podem quelar iões de metais de transição envolvidos na formação de radicais hidroxilo nas suas formas reduzidas (via reação de Fenton, em condições

anormais). Estudos de SAR (structure-activity relationship) para a atividade antioxidante de flavonóides revelaram que as principais particularidades estruturais que contribuem para uma elevada atividade antioxidante são, nomeadamente: a dupla ligação $C_2=C_3$ conjugada com o grupo carbonilo C_4 , que permite uma maior deslocalização eletrónica no anel B; o padrão de hidroxilação principalmente um núcleo de catecol no anel B (pelo menos dois hidroxilos); grupos metoxilo e menos açúcares ligados à genina, apesar de haver exceções, segundo os quais os C-glicósidos demonstraram maior atividade antioxidante que os O-glicósidos.

A produção de radicais livres está associada ao processo inflamatório, como já referido. Sabe-se que quando os macrófagos são estimulados com LPS, a ativação da via da sinalização do $NF-\kappa\beta$ ativa a expressão da iNOS, a produção de NO e de citocinas. Assim, a capacidade de captação de ROS por parte dos compostos fenólicos leva à inibição da via de sinalização do $NF-\kappa\beta$ (Francisco *et al.*, 2013).

A atividade anti-inflamatória do infuso de *C. citratus* e das suas frações (ácidos fenólicos, flavonóides e taninos) já foi estudada. Os resultados sugeriram que o infuso apresenta atividade anti-inflamatória, atuando nas vias de sinalização do $NF-\kappa\beta$ e inibindo o sistema ubiquitina-proteossoma. O extrato inibe também a produção de NO através da inibição das citocinas TNF- α e CCL5 envolvidas na via do $NF-\kappa\beta$. A fração de ácidos fenólicos apresentou atividade anti-inflamatória atuando principalmente ao nível do proteossoma, inibindo este e, também, a ativação do NF-Kb, já que mantém os níveis de fosforilação do I κ B α . Estes mecanismos foram atribuídos à ação do ácido clorogénico, já que este foi identificado como principal ácido fenólico juntamente com derivados do ácido *p*-cumárico (Francisco *et al.*, 2013). Estes derivados revelaram ter a capacidade de inibir o $NF-\kappa\beta$ dependente da iNOS e da expressão da COX-2 (Yen *et al.*, 2008). Em estudos anteriores, o potencial anti-inflamatório das frações de ácidos fenólicos, flavonóides e taninos já tinha sido verificado. A fração de taninos atua no sistema ubiquitina-proteossoma através da modulação de proteínas envolvidas neste. Apesar do potencial anti-inflamatório apresentado pelos ácidos fenólicos (principalmente o ácido clorogénico e os derivados do ácido *p*-cumárico) ser relevante, as frações de flavonóides e taninos apresentaram uma atividade maior (Francisco *et al.*, 2013).

3.5 Avaliação das interações sinérgicas de algumas frações do *Cymbopogon citratus*

Na medicina tradicional o *C. citratus* é consumido majoritariamente sob a forma de infusão. Assim, será importante avaliar o sinergismo entre as frações de compostos fenólicos na proporção em que estes se encontram no extrato obtido a partir da planta. Foram testadas três combinações, nomeadamente:

Combinação 1: Flavonóides e ácidos fenólicos;

Combinação 2: Flavonóides e taninos II;

Combinação 3: Flavonóides e taninos (II + III).

Com base nos rendimentos dos processos de fracionamento do *C. citratus*, observou-se que o extrato tem uma maior percentagem de ácidos fenólicos do que flavonóides. A proporção calculada foi de 6,5:1. A partir desta proporção e atendendo ao teor de flavonóides no extrato e ao seu EC₅₀ foi escolhida uma concentração de ácidos fenólicos de 50 µg/mL e de 7.69 µg/mL para os flavonóides, na mistura. Com base nestas concentrações (concentração A) foram preparadas várias soluções nomeadamente: ¼ A; ½ A; A; 2A e 4A. Estas concentrações foram testadas nos macrófagos RAW estimulados com LPS (procedimento descrito no capítulo 2), de modo a determinar a sua atividade inibitória do NO. As percentagens de inibição do NO foram usadas para a avaliação do sinergismo.

Para aquilatar o tipo de interação entre as frações testadas, foram usados dois métodos, nomeadamente o método do isoblograma e o método de Chou (já descritos no capítulo 1). Relativamente ao método do isoblograma, todas as frações têm potência e eficácia diferentes, pelo que o efeito máximo de cada uma das frações é diferente. Assim, os isobogramas construídos para cada uma das combinações são isobogramas curvos, e não lineares, pelas razões já supracitadas.

Quanto ao método de Chou-Talalay, permite verificar quais as concentrações das frações que são sinérgicas quando misturadas e, por isso, os resultados foram analisados por recurso a este método tendo-se posteriormente aplicado o método do isoblograma.

3.5.1 Avaliação do sinergismo na combinação 1: Flavonóides e Ácidos fenólicos

Como já foi referido, em ambos os métodos as concentrações utilizadas foram baseadas nos EC₅₀ de cada uma das frações previamente determinados. A aplicação do método de Chou-Talalay, além dos EC₅₀, necessita também dos respetivos declives de Hill. Para a fração dos

flavonóides o EC_{50} é de 64,14 $\mu\text{g/mL}$ e o declive de Hill da curva dose-resposta é de 4,827. A fração dos ácidos fenólicos apresenta um EC_{50} de 215,1 $\mu\text{g/mL}$ e declive de Hill de 6,527. Na tabela 13 estão mencionados os parâmetros utilizados para a construção do gráfico Fa-CI (fração afetada em função do índice de combinação) da combinação 1.

Tabela 13. Parâmetros utilizados no método de Chou-Talalay para determinar o CI experimental e o respetivo gráfico Fa-CI, para a combinação 1 (Ácidos fenólicos e Flavonóides).

Nº mistura	AF ($\mu\text{g/mL}$)	F ($\mu\text{g/mL}$)	Fa	Dx (F)	Dx (AF)	CI experimental
AFF1	12,50	1,92	0,016	27,50	114,98	0,18
AFF2	25,00	3,85	0,035	32,31	129,55	0,31
AFF3	50,00	7,69	0,072	37,82	145,54	0,55
AFF4	100,00	15,38	0,112	41,74	156,55	1,01
AFF5	200,00	30,08	0,114	41,98	157,22	1,99

AFF – mistura de ácidos fenólicos e flavonóides; AF – ácidos fenólicos; F – flavonóides; Fa – fração afetada; Dx(F) – efeito dos flavonóides na mistura; Dx (AF) – efeito dos ácidos fenólicos na mistura; CI – índice de combinação calculado pelo método de Chou-Talalay.

Tabela 14. Parâmetros utilizados para construir o isoblograma curvo da combinação 1, relativo ao EC_{50} .

EC_{50} AF ($\mu\text{g/mL}$)	$E_{\text{máx}}$ AF (% inibição)	EC_{50} F ($\mu\text{g/mL}$)	$E_{\text{máx}}$ F (% inibição)
215.1	51.06	64.14	65.14

EC_{50} – concentração de amostra que inibe 50% do NO; $E_{\text{máx}}$ – efeito máximo apresentado pela amostra; F- Flavonóides; AF – ácidos fenólicos

A tabela 14 indica os parâmetros necessários para calcular os valores teóricos das doses de cada uma das frações que, em mistura, terão 50% do efeito pretendido. Desta forma, o isoblograma curvo do EC_{50} foi construído (Figura 32). A figura 31 indica o gráfico Fa-CI de onde poderão ser tiradas conclusões quanto à presença de interações sinérgicas.

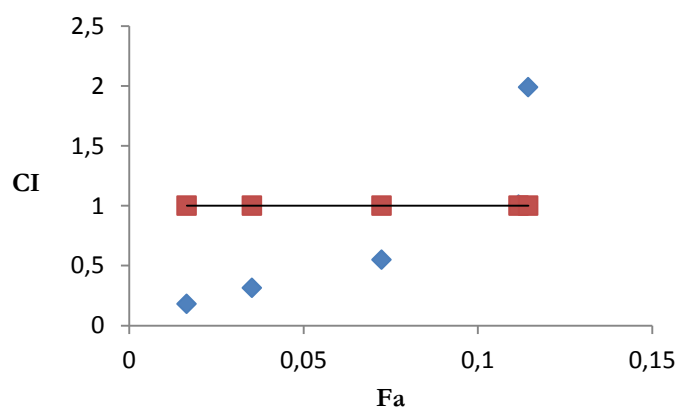


Figura 31. Gráfico Fa-CI correspondente à combinação 1, obtido pelo método de Chou-Talalay para quatro concentrações correspondentes às misturas AFF1, AFF2, AFF3 e AFF5. (Os resultados experimentais correspondem à média de 4 ensaios independentes, feitos em duplicado).

De acordo com os valores de CI obtidos e observando a figura 18, verifica-se que a concentrações baixas de cada uma das frações existe sinergismo, nomeadamente às concentrações de 12,50 (AFF1), 25 (AFF2) e 50 (AFF3) $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácidos fenólicos. À concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a combinação é aditiva e acima desta, antagónica.

A partir dos valores da inibição da produção de NO da mistura obtidos, foi possível obter uma curva dose-resposta com um coeficiente de correlação (r^2) de 0,9989. O EC_{50} da combinação 1 foi de $39,07 \pm 1,291 \mu\text{g}/\text{mL}$. Foram determinadas as concentrações de cada uma das frações correspondentes a este EC_{50} , e posteriormente inseridas no isoblograma (Figura 32). Os valores utilizados para construir o isoblograma curvo estão descritos na tabela 14. Nesta mistura, a concentração de flavonóides é de $5,209 \mu\text{g}/\text{mL}$ e a de ácidos fenólicos, $33,86 \mu\text{g}/\text{mL}$.

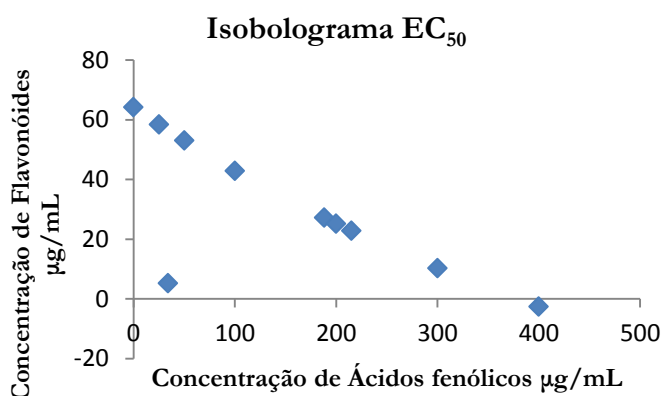


Figura 32. Isoblograma curvo do EC_{50} correspondente ao ensaio da combinação de flavonóides e ácidos fenólicos. (Os ensaios foram feitos em macrófagos estimulados com LPS. O resultado experimental corresponde à média de 4 ensaios independentes feitos em duplicado).

De acordo com o isoblograma, a combinação é sinérgica já que o ponto experimental ($33,86 \mu\text{g}/\text{mL}$ ácidos fenólicos e está abaixo da linha da aditividade. Analisando os resultados obtidos no método de Chou-Talalay, verifica-se que as concentrações obtidas no método do isoblograma de cada uma das frações correspondem à zona sinérgica no gráfico da figura 18. Assim, ambos os métodos aplicados estão em consonância. Posto isto, o valor total da concentração da mistura AFF3 (Tabela 15) foi substituído na equação da curva dose-resposta (equação de Hill), de forma a calcular o valor do EC correspondente a esta mistura, sendo este de $7,68 \mu\text{g}/\text{mL}$. Com base nestes valores, foi construído o isoblograma de modo a confirmar os resultados obtidos no método CT.

Tabela 15. Parâmetros utilizados para construir o isoblograma curvo relativo ao EC_{7,68}.

EC _{7,68} AF (µg/mL)	E _{máx} AF (% inibição)	EC _{7,68} F (µg/mL)	E _{máx} F (% inibição)
166,64	51,06	33,35	65,14

EC_{7,68} – concentração de amostra que inibe 7,68% do NO; E_{máx} – efeito máximo apresentado pela amostra; F- Flavonóides; AF – ácidos fenólicos

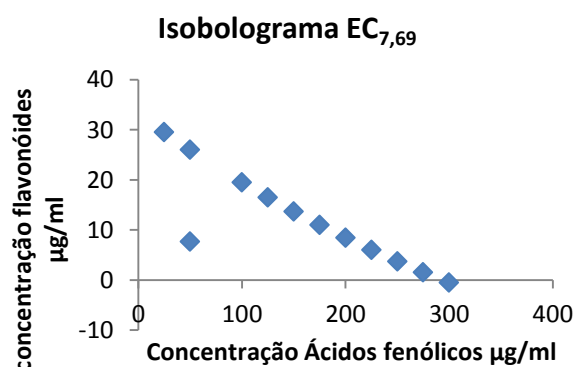


Figura 33. Isoblograma curvo do EC_{7,68} correspondente ao ensaio da combinação de flavonóides e ácidos fenólicos. O ponto experimental corresponde às doses de cada uma das frações na mistura AFF3. (Os ensaios foram feitos em macrófagos estimulados com LPS. O resultado experimental corresponde à média de 4 ensaios independentes feitos em duplicados).

Dado que o método do isoblograma é aplicado quando dois fármacos têm o mesmo mecanismo de ação, pode-se inferir que o sinergismo observado poderá advir do facto dos compostos terem mecanismos de ação semelhantes, atuando em recetores ou mediadores pró-inflamatórios idênticos, por exemplo (Chou, 2010).

Comparando os resultados do método do isoblograma com os do método de Chou-Talalay, pode-se concluir que, provavelmente, os mecanismos de ação de cada uma das frações serão semelhantes. Verifica-se também que existe uma dependência da dose com a presença do sinergismo, já que a doses baixas, tanto de flavonóides como de ácidos fenólicos, existe sinergismo. Com o aumento das doses de cada uma das frações, a combinação deixa de ser tão eficaz, observando-se a ocorrência de antagonismo. Este facto poderá dever-se à competição por recetores ou saturação destes.

3.5.2 Avaliação do sinergismo na combinação 2: Flavonóides e Taninos TI

De acordo com os rendimentos obtidos, o extrato possui maior percentagem de flavonóides relativamente aos taninos TI, correspondendo a uma proporção de 1,5:1. Foram testadas cinco concentrações nos macrófagos estimulados com LPS.

A partir dos resultados da combinação, foi construída a respetiva curva dose-resposta e calculadas as concentrações de cada uma das frações na combinação responsável pelo EC₅₀. A figura 35 indica a linha da aditividade correspondente ao EC₅₀ e o respetivo valor experimental. Na tabela 16 estão descritas as doses de cada uma das frações usadas na combinação os respetivos parâmetros para a determinação do CI experimental e do respetivo gráfico Fa-CI. A tabela 17 refere os valores necessários para a construção do isoblograma curvo referente ao EC₅₀.

Tabela 16. Parâmetros utilizados no método de Chou-Talalay para determinar o CI experimental e o respetivo gráfico Fa-CI, para a combinação 1 (Flavonóides e taninos TI).

Nº mistura	F (µg/mL)	TI (µg/mL)	Fa	Dx (F)	Dx (TI)	CI experimental
FTI1	12,50	8,33	0,140	44,02	24,75	0,62
FTI2	25,00	16,65	0,155	45,17	25,72	1,20
FTI3	50,00	33,30	0,226	49,68	29,64	2,13
FTI4	100,00	66,60	0,380	57,96	37,61	3,51
FTI5	200,00	133,20	0,591	69,20	48,62	5,63

FTI – mistura de flavonóides e taninos TI; TI – taninos TI; F – flavonóides; Fa – fração afetada; Dx(F) – efeito dos flavonóides na mistura; Dx (TI) – efeito dos taninos TI na mistura; CI – índice de combinação calculado pelo método de Chou-Talalay.

Tabela 17. Parâmetros utilizados para construir o isoblograma curvo da combinação 2, relativo ao EC50.

EC ₅₀ TI (µg/mL)	E _{máx} TI (% inibição)	EC ₅₀ F (µg/mL)	E _{máx} F (% inibição)
43,41	89,92	64,14	65,14

EC₅₀ – concentração de amostra que inibe 50% do NO; E_{máx} – efeito máximo apresentado pela amostra; F- Flavonóides; TI – taninos TI

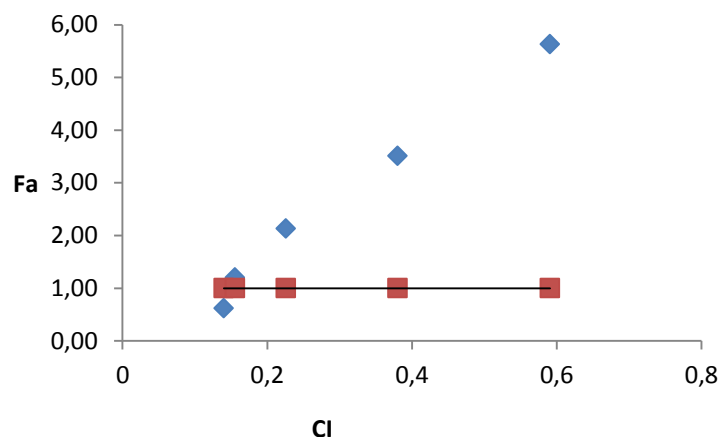


Figura 34. Gráfico Fa-CI correspondente à combinação 2, obtido pelo método de Chou-Talalay (Os resultados experimentais correspondem à média de 5 ensaios independentes, feitos em duplicados).

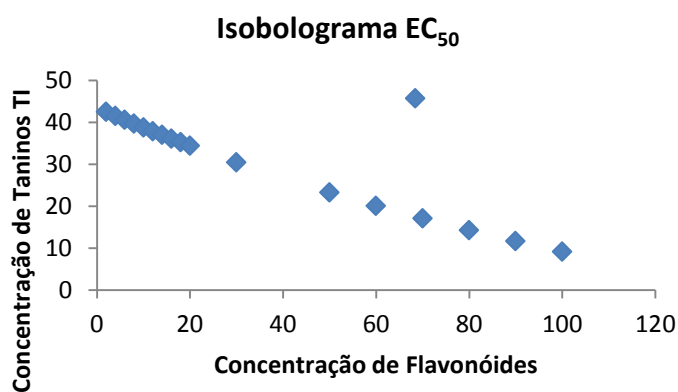


Figura 35. Isoblograma do EC_{50} correspondente ao ensaio da combinação de flavonóides e taninos TI (doses concentrações em $\mu\text{g}/\text{mL}$). O EC_{50} da combinação foi de $219,9 \pm 1,090$ e $r^2=0,9999$. (Os ensaios foram feitos em macrófagos estimulados com LPS. O resultado experimental corresponde à média de 5 ensaios independentes feitos em duplicados).

O r^2 da curva dose-resposta da combinação foi de 0,9999. Os resultados experimentais indicam que a combinação é antagônica, estando até fora da linha da aditividade. Analisando os resultados de ambos os métodos, verifica-se que as doses responsáveis pelo EC_{50} levam a uma interação antagônica. Contudo, no método de Chou-Talalay, constata-se que a combinação correspondente às concentrações de 12,50 e 8,33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de flavonóides e taninos (mistura FTI1), respectivamente, é a única que apresenta sinergismo. As restantes concentrações são antagônicas, o que significa que as interações sinérgicas têm uma dependência da dose, já que com doses maiores existe antagonismo.

Perante a existência de sinergismo na mistura FTI1, foi calculado o EC correspondente e o isoblograma curvo deste EC, de modo a verificar o resultado obtido pelo método de Chou-Talalay. Recorrendo à equação de Hill, o EC calculado para a mistura FTI1 foi aproximadamente

de 14 µg/mL. Perante este valor, os EC₁₄ das frações de flavonóides e taninos TI foram calculados para construir o respetivo isoblograma curvo (Figura 36).

Tabela 18. Parâmetros utilizados para construir o isoblograma curvo da combinação 2, relativo ao EC₁₄.

EC ₁₄ TI (µg/mL)	E _{máx} TI (% inibição)	EC ₁₄ F (µg/mL)	E _{máx} F (% inibição)
23,97	89,92	44,35	65,14

EC₁₄ – concentração de amostra que inibe 14% do NO; Emáx – efeito máximo apresentado pela amostra; F- Flavonóides; TI – taninos TI

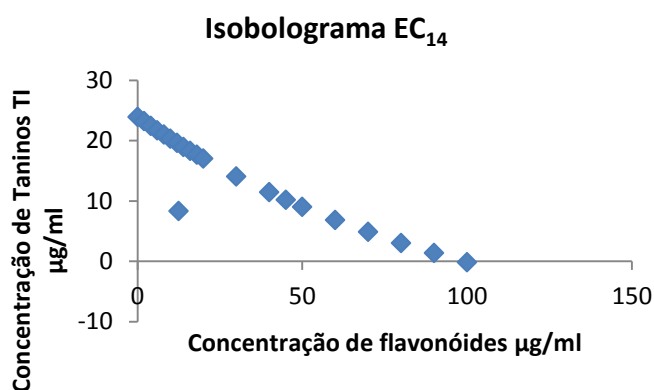


Figura 36. Isoblograma do EC₁₄ correspondente ao ensaio da combinação de flavonóides e taninos TI (concentrações doses em µg/mL). (Os ensaios foram feitos em macrófagos estimulados com LPS. O resultado experimental corresponde à média de 5 ensaios independente feitos em duplicado).

Neste caso, além de, os compostos das duas frações atuarem em alvos farmacológicos diferentes, tem de se ter em conta que os taninos têm a capacidade de precipitar proteínas o que pode condicionar a atividade pretendida (Adamczyk *et al.*, 2012).

3.5.3 Avaliação do sinergismo na combinação 3: Flavonóides e Taninos

No rendimento do fracionamento, este foi maior nos flavonóides do que nos taninos (este rendimento foi calculado a partir dos rendimentos individuais dos taninos TI e TII). A proporção calculada foi de 1,57:1. A partir desta proporção foram calculadas cinco concentrações de cada uma das frações usadas na combinação 3. Na tabela 19 estão descritas as doses de cada uma das frações usadas na combinação os respetivos parâmetros para a determinação do CI experimental e do respetivo gráfico Fa-CI. Na tabela 20 estão inscritos os valores necessários para a construção do isoblograma curvo referente ao EC₅₀.

Tabela 19. Parâmetros utilizados no método de Chou-Talalay para determinar o CI experimental e o respectivo gráfico Fa-CI, para a combinação 3 (flavonóides e taninos).

Nº mistura	F (µg/mL)	T (µg/mL)	Fa	Dx (F)	Dx (T)	CI experimental
FT1	12,50	7,95	0,06	38,94	19,89	0,72
FT2	25,00	15,90	0,20	61,06	57,26	0,69
FT3	50,00	31,80	0,25	67,45	72,34	1,18
FT4	100,00	63,6	0,44	87,96	135,00	1,61
FT5	200,00	127,20	0,71	125,30	310,13	2,01

FT – mistura de ácidos fenólicos e flavonóides; T – Taninos; F – flavonóides; Fa – fração afetada; Dx(F) – efeito dos flavonóides na mistura; Dx (T) – efeito dos taninos na mistura; CI – índice de combinação calculado pelo método de Chou-Talalay.

Tabela 20. Parâmetros utilizados para construir o isoblograma curvo da combinação 3, relativo ao EC₅₀.

EC ₅₀ T (µg/mL)	E _{máx} T (% inibição)	EC ₅₀ F (µg/mL)	E _{máx} F (% inibição)
166,2	85,38	64,14	65,14

EC₅₀ – concentração de amostra que inibe 50% do NO; Emáx – efeito máximo apresentado pela amostra; F – Flavonóides; T – taninos

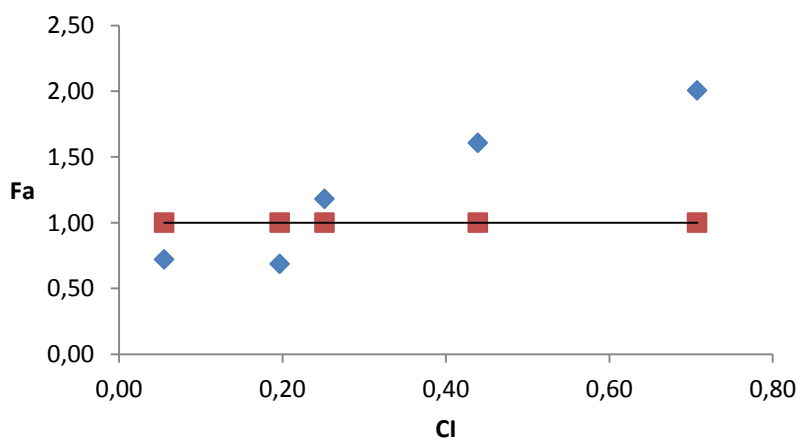


Figura 37. Gráfico Fa-CI correspondente à combinação 3, obtido pelo método de Chou-Talalay (Os resultados experimentais correspondem à média de 3 ensaios independentes, feitos em duplicados).

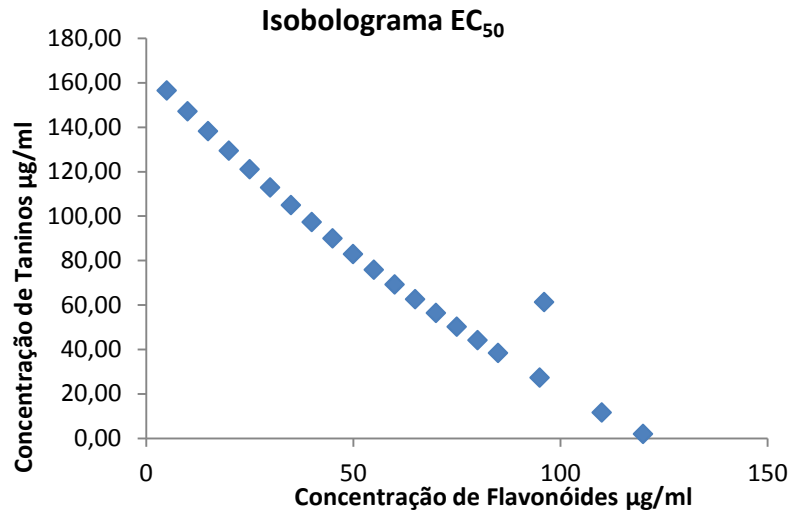


Figura 38. Isobolograma do EC₅₀ correspondente ao ensaio da combinação de flavonóides e taninos T (doses concentrações em µg/mL). O EC₅₀ da combinação foi de $219,9 \pm 1,090$ e $r^2=0,9999$. (Os ensaios foram feitos em macrófagos estimulados com LPS. O resultado experimental corresponde à média de 5 ensaios independentes feitos em duplicados).

De acordo com o método de Chou-Talalay, os resultados experimentais permitem concluir que as misturas FT1 e FT2 (Tabela 19) são sinérgicas. As restantes concentrações, de acordo com os índices de combinação calculados, são antagónicas.

O EC₅₀ da combinação foi de $175,6 \pm 1,131$ µg/mL. As concentrações de flavonóides e taninos na combinação foram calculadas sendo, aproximadamente, 107 e 68 µg/mL, respetivamente. Foi construído o isobolograma curvo referente ao EC₅₀ desta combinação e os valores experimentais foram inseridos. De acordo com a figura 34, verifica-se que a combinação 3 é antagónica.

Relativamente às concentrações de flavonóides e taninos na mistura FT2, foi calculado o EC correspondente, assim como o respetivo isobolograma curvo (Figura 39). A tabela 21 refere os valores necessários para a construção do isobolograma curvo.

Tabela 21. Parâmetros utilizados para construir o isobolograma curvo da mistura FT2 na combinação 3, relativo ao EC₉.

EC ₉ T (µg/mL)	E _{máx} T (% inibição)	EC ₉ F (µg/mL)	E _{máx} F (% inibição)
60,95	85,38	36,65	65,14

EC₉ – concentração de amostra que inibe 9% do NO; E_{máx} – efeito máximo apresentado pela amostra; F – Flavonóides; T – taninos

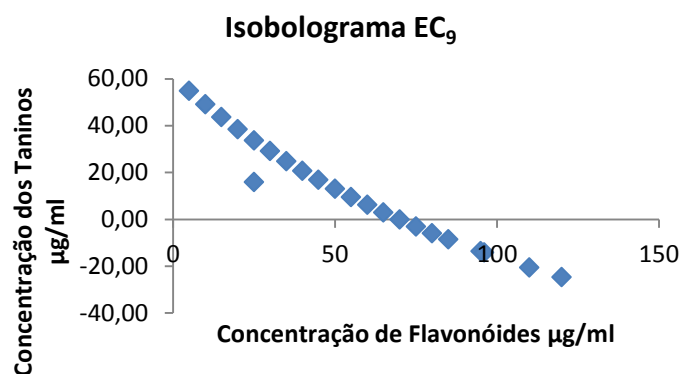


Figura 39. Isoblograma do EC₉ correspondente ao ensaio da combinação de flavonóides e taninos T (doses concentrações em µg/mL). (Os ensaios foram feitos em macrófagos estimulados com LPS. O resultado experimental corresponde à média de 3 ensaios independentes feitos em duplicado).

3.5.4 Discussão dos resultados obtidos na avaliação do sinergismo pelos métodos do isoblograma e de Chou-Talalay

A tabela 22 resume os valores do índice de combinação calculados pelo método de Chou-Talalay.

Tabela 22. Resumo das concentrações testadas em cada uma das combinações e os respectivos índices de combinação (concentrações expressas em µg/mL).

Combinação 3			Combinação 2			Combinação 1		
F	Taninos	CI	F	TI	CI	AF	F	CI
12,50	7,95	0,72	12,50	8,33	0,62	12,50	1,92	0,30
25,00	15,90	0,68	25,00	16,65	1,20	25,00	3,85	0,55
50,00	31,80	1,18	50,00	33,30	2,13	50,00	7,69	0,94
100,00	63,60	1,61	100,00	66,60	3,51	100,00	15,38	1,67
200,00	127,20	2,01	200,00	133,20	5,63	200,00	30,08	2,67

F – flavonóides; AF – ácidos fenólicos; CI – índice de combinação calculado pelo método de Chou

Todas as combinações apresentam concentrações em que se verifica sinergismo, aditividade e antagonismo. Por recurso ao método de Chou-Talalay, os resultados sugerem que as interações sinérgicas são dependentes das concentrações testadas. Verificou-se a existência de sinergismo para concentrações mais baixas e antagonismo para concentrações mais elevadas.

Como já foi referido acima, todas as frações atuam ao nível da via de sinalização do *NF-κβ*, o que significa que todos eles têm, pelo menos, um alvo farmacológico em comum. A fração de ácidos fenólicos e taninos também atuam por outros mecanismos, nomeadamente pela

inibição do sistema ubiquitina-proteossoma, embora por mecanismos diferentes (Francisco *et al.*, 2013). Como já referido, a fração de taninos é responsável pela modulação de proteínas envolvidas no sistema do proteossoma. Os flavonóides, por outro lado, atuam, também, ao nível da captação do NO. Apesar de, uma maneira geral, todas as frações atuarem na mesma via de sinalização ($NF-\kappa\beta$), estudos realizados mostram que todas as frações atuam em mais que um alvo. Este facto, pode explicar os resultados observados no método do isoblograma, já que existe mais do que um alvo farmacológico e, como já foi referido, os compostos atuam em vários alvos farmacológicos, podendo estes serem diferentes ou não (Figueirinha *et al.*, 2010; Francisco *et al.*, 2013).

Relativamente aos resultados obtidos no método de CT, a combinação 1 (flavonóides e ácidos fenólicos) foi a que apresentou maior sinergismo (CI mais baixo que as restantes combinações). A combinação 3 (flavonóides e taninos) foi a segunda que apresentou resultados sinérgicos mais satisfatórios relativamente à combinação 2. Sabe-se que os flavonóides atuam ao nível da captação do NO e os taninos atuam no sistema do proteossoma (Figueirinha *et al.*, 2008; Francisco *et al.*, 2013; S, 2016). O sinergismo verificado nas duas primeiras concentrações poderá dever-se à atuação em alvos farmacológicos diferentes. No entanto, nas concentrações mais elevadas, as interações passam a ser antagónicas. Tal facto poderá ser explicado pela precipitação de proteínas por parte dos taninos. Na combinação 2 (flavonóides e taninos II), apenas a concentração mais baixa é sinérgica. O núcleo estrutural das proantocianidinas (unidades de 3-flavanóis) é muito semelhante ao dos flavonóides. Esta semelhança estrutural poderá levar a que atuem nos mesmos alvos farmacológicos, saturando os recetores ou competindo pelos mesmos locais ativos. Assim, concentrações maiores levarão a interações antagónicas.

3.6 Citotoxicidade do extrato e das frações

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio da resazurina. Os resultados obtidos para extrato e as frações, bem como para as combinações estudadas nos ensaios do sinergismo (e os respetivos testes estatísticos) estão ilustrados na figura 16. Como observado nos gráficos apresentados, verifica-se que nenhuma das amostras testadas apresenta citotoxicidade, pois demonstram uma viabilidade celular de 90 a 100%.

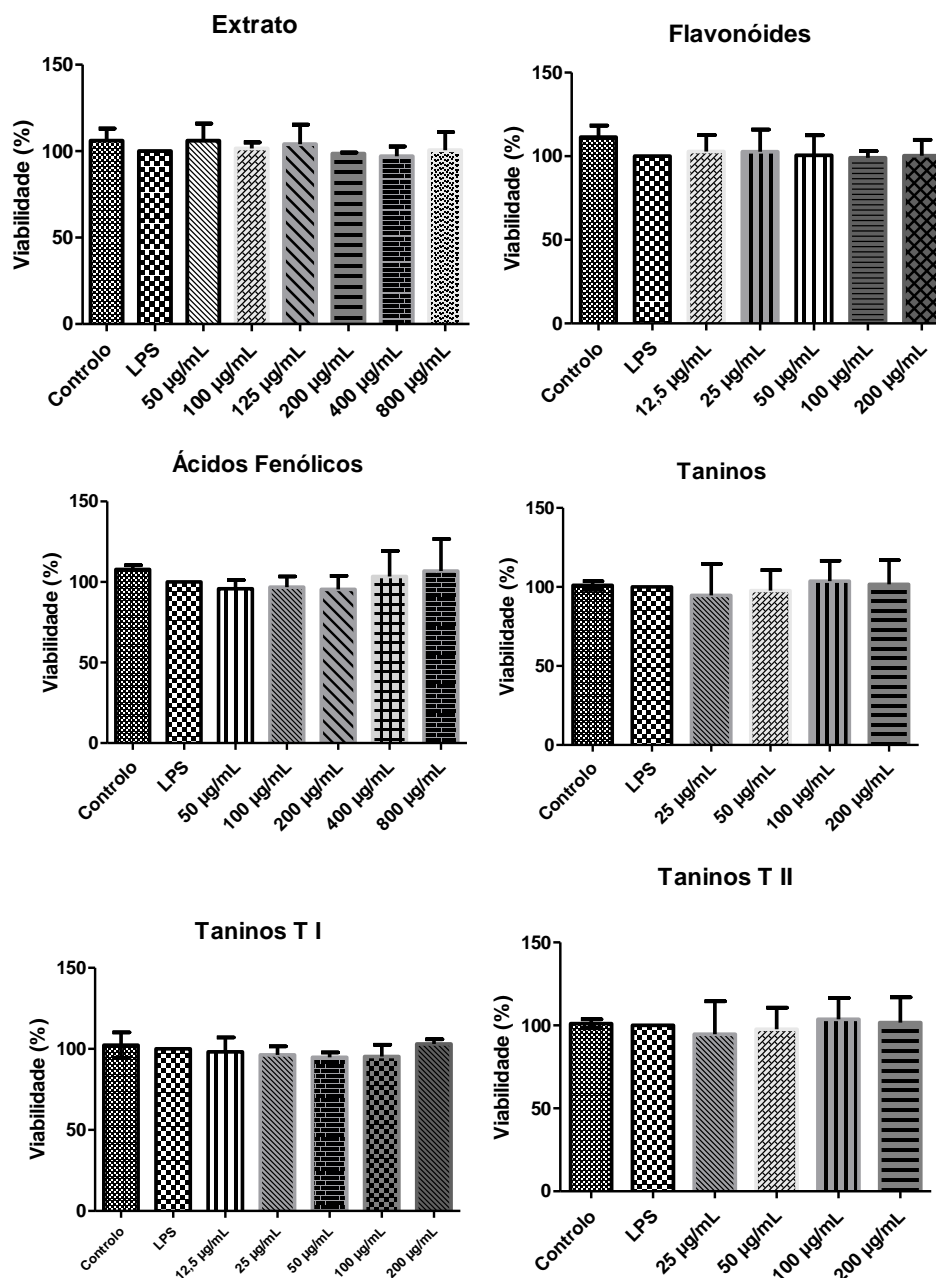


Figura 40. Ensaio para avaliar a viabilidade celular dos macrófagos quando submetidos ao extrato e às várias frações, assim como os ensaios da associação às combinações das frações. As concentrações de cada uma das amostras testadas estão dentro do intervalo dos valores de EC_{50} da atividade anti-inflamatória. Os resultados estão em redução da resazurina pelos macrófagos relativamente ao controlo. Cada valor corresponde à média \pm desvio-padrão de ensaios independentes (extrato: $n=4$; Flavonóides: $n=8$; ácidos fenólicos: $n=6$; taninos T I: $n=9$; taninos T II: $n=4$; taninos $n=9$; F + AF: $n=9$; F + T: $n=4$; F + T I: $n=7$). Foi aplicado o teste ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni's.

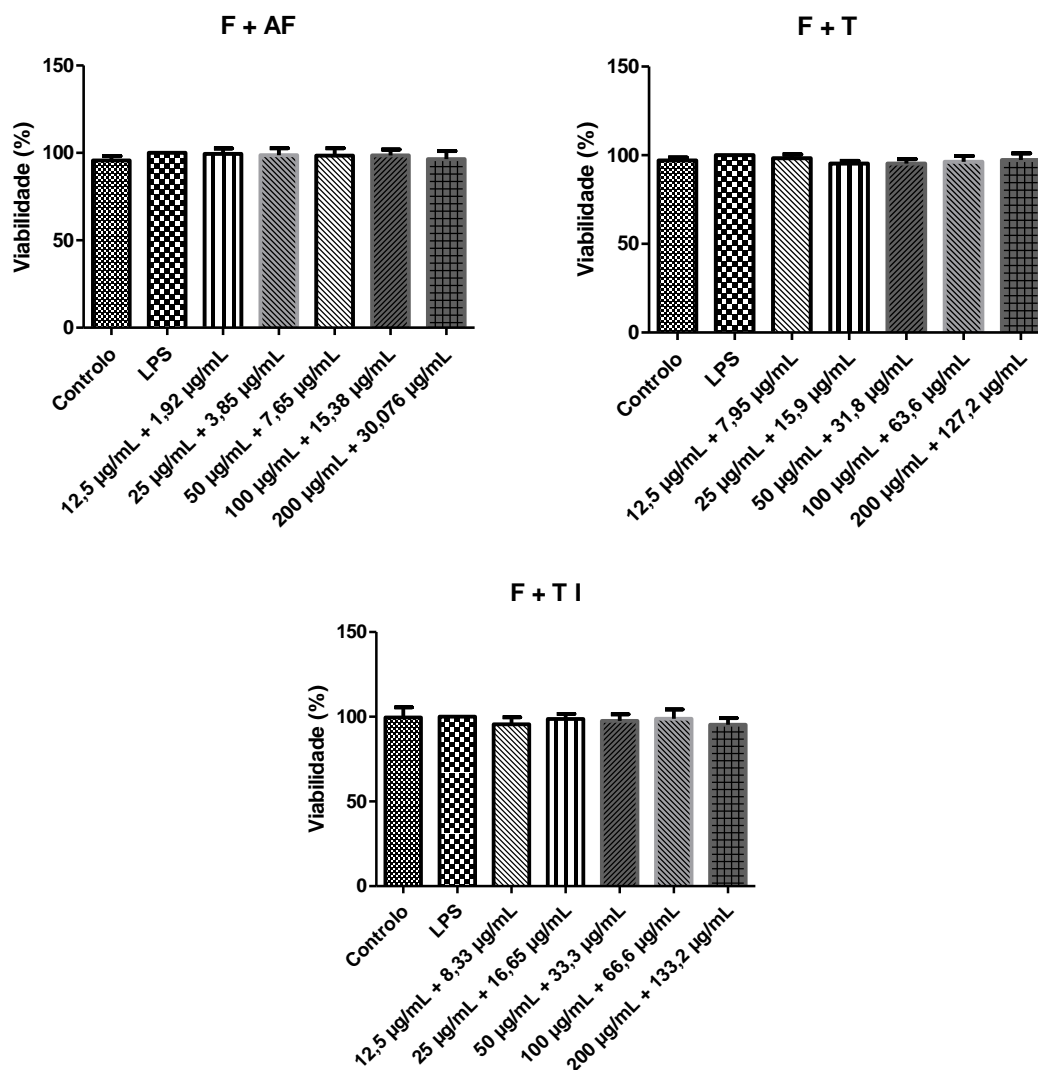


Figura 41. Ensaio para avaliar a viabilidade celular dos macrófagos quando submetidos ao extrato e às várias frações, assim como os ensaios da associação às combinações das frações. As concentrações de cada uma das amostras testadas estão dentro do intervalo dos valores de EC_{50} da atividade anti-inflamatória. Os resultados estão em redução da resazurina pelos macrófagos relativamente ao controlo. Cada valor corresponde à média \pm desvio-padrão de ensaios independentes (extrato: n=4; Flavonóides: n=8; ácidos fenólicos: n=6; taninos T I: n=9; taninos T II: n=4; taninos n=9; F + AF: n=9; F + T: n=4; F + T I: n=7). Foi aplicado o teste ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni's (continuação).

Capítulo 4 – Conclusões

No trabalho desenvolvido utilizaram-se dois métodos, o de Chou-Talalay e do isoblograma, para avaliar a ocorrência de sinergismo entre compostos fenólicos, nomeadamente, ácidos fenólicos, flavonóides e taninos, presentes num infuso do *Cymbopogon citratus*, a fim de aquilatar a forma mais vantajosa para a inclusão numa futura formulação com atividade anti-inflamatória; se sob a forma de extrato - infuso, ou frações enriquecidas em compostos fenólicos

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que, à exceção da combinação dos taninos TI e dos flavonóides, as restantes frações possuíam menor atividade anti-inflamatória que o extrato. Daqui se poderá concluir que a melhor forma para conseguir ter um efeito anti-inflamatório pronunciado será o consumo do extrato sob a forma de infusão (tal como é usado na medicina tradicional). Além disso, o processo de fracionamento é dispendioso para a indústria farmacêutica pelo gasto elevado de solvente além de que os impactos ambientais também são maiores. Assim, tanto a nível de atividade como económico e ambiental, é mais vantajoso o uso do extrato.

Relativamente à avaliação de interações sinérgicas entre as frações, verificou-se a existência destas, a baixas concentrações. Acima de uma determinada concentração de cada uma das frações, as misturas mostraram ser antagónicas. De facto, numa infusão os compostos extraídos da planta estão em concentrações mais baixas do que em algumas das misturas testadas para as combinações efetuadas.

Os métodos usados, nomeadamente o método do isoblograma e o método de Chou-Talalay mostraram ser eficazes na determinação do sinergismo, além de que os resultados obtidos no método de Chou-Talalay foram comprovados pelo método do isoblograma, como mostrado no capítulo 3. No entanto, conclui-se que o método de Chou-Talalay é um método mais preciso que o método do isoblograma, já que permite avaliar cada mistura individual relativamente à presença de sinergismo (dado pelo índice de combinação). Além disso, o método de Chou-Talalay é aplicável a misturas de compostos, não se verificando o mesmo para o método do isoblograma uma vez que este só permite avaliar o sinergismo entre dois fármacos/frações.

Capítulo 5 – Bibliografía

- [1] ADAMCZYK, Bartosz *et al.* - Tannins and Their Complex Interaction with Different Organic Nitrogen Compounds and Enzymes : Old Paradigms versus Recent Advances. [s.d.]
- [2] ADENEYE, Adejuwon Adewale; AGBAJE, Esther Oluwatoyin - Hypoglycemic and hypolipidemic effects of fresh leaf aqueous extract of *Cymbopogon citratus* Stapf. in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. . ISSN 03788741. 112:3 (2007) 440–444.
- [3] ADESOLA BABARINDE, KEMI OGUNDIPE, KIKELOMO TOBI SANGOSANYA, Babatunde Damilare Akintola And Aanu-Oluwa Elizabeth Hassan - Comparative study on the biosorption of Pb(II), Cd(II) and Zn(II) using Lemon grass (*Cymbopogon citratus*): Kinetics, isotherms and thermodynamics. **Chemistry International** . 2:2 (2016) 89–102.
- [4] ADRAR, Nabil; OUKIL, Naima; BEDJOU, Fatiha - Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus numidicus* and *Salvia officinalis* essential oils alone or in combination. **Industrial Crops and Products**. . ISSN 0926-6690. 88:2016) 112–119.
- [5] AMMAR, R. M.; ULRECH-MERZENECH, G. - Curcumin synergizes with the endocannabinoid reuptake inhibitor OMDM-2 in human MCF-7 breast cancer and U-87 glioblastoma cells. **Synergy**. . ISSN 2213-7130. 5:2017) 7–14.
- [6] ANANTHARAJU, Preethi G. *et al.* - An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. **Nutrition Journal**. . ISSN 1475-2891. 15:1 (2016) 99.
- [7] AVOSEH, Opeyemi *et al.* - *Cymbopogon* Species; Ethnopharmacology, Phytochemistry and the Pharmacological Importance. **Molecules**. . ISSN 1420-3049. 20:2015) 7438–7453.
- [8] BACHIEGA, Tatiana Fernanda; SFORCIN, José Maurício - Lemongrass and citral effect on cytokines production by murine macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**. . ISSN 03788741. 137:1 (2011) 909–913.
- [9] BAEDER, Desiree Y. *et al.* - Antimicrobial combinations: Bliss independence and Loewe additivity derived from mechanistic multi-hit models. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**. . ISSN 1471-2970. 371:1695 (2016) 20150294.
- [10] BELLUMKONDA, Lavanya *et al.* - Pathophysiology of heart failure and frailty: a common inflammatory origin? **Aging Cell**. . ISSN 14749726. 16:3 (2017) 444–450.
- [11] BISWAS, Subrata Kumar - Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox ? 2016:2016) 17–19.
- [12] BOUKHATEM, Mohamed Nadjib *et al.* - Lemon grass (*cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. **Libyan Journal of Medicine**. . ISSN 18196357. 9:2014) 1–10.
- [13] BREITINGER, Hans-Georg - Drug synergy – mechanisms and methods of analysis. **Toxicity and Drug Testing**. . ISSN 9789533070865. 2012) 143–166.
- [14] CAMPOS, J. *et al.* - Lemon grass (*Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf) polyphenols protect human umbilical vein endothelial cell (HUVECs) from oxidative damage induced by high glucose,

- hydrogen peroxide and oxidised low-density lipoprotein. **Food Chemistry**. . ISSN 18737072. 151:2014) 175–181.
- [15] CERCATO, Luana M. *et al.* - A systematic review of medicinal plants used for weight loss in Brazil: Is there potential for obesity treatment? **Journal of Ethnopharmacology**. . ISSN 18727573. 176:2015) 286–296.
- [16] CHASSAGNE, François *et al.* - Natural remedies used by Bunong people in Monduliri province (Northeast Cambodia) with special reference to the treatment of 11 most common ailments. **Journal of Ethnopharmacology**. . ISSN 18727573. 191:2016) 41–70.
- [17] CHEN, Di *et al.* - Systematic synergy modeling: understanding drug synergy from a systems biology perspective. **BMC Systems Biology**. . ISSN 1752-0509. 9:1 (2015) 1–10.
- [18] CHEN, Mei-Chuan *et al.* - Novel histone deacetylase inhibitor MPT0G009 induces cell apoptosis and synergistic anticancer activity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand against human hepatocellular carcinoma. **Oncotarget**. . ISSN 1949-2553. 7:1 (2016) 402–417.
- [19] CHEN, Xing *et al.* - NLLSS: Predicting Synergistic Drug Combinations Based on Semi-supervised Learning. **PLoS Computational Biology**. . ISSN 15537358. 12:7 (2016) 1–23.
- [20] CHEYNIER, Véronique *et al.* - The Structures of Tannins in Grapes and Wines and Their Interactions with Proteins. p. 81–93.
- [21] CHOU, T. C. - Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. **Pharmacological Reviews**. . ISSN 0031-6997. 58:3 (2006) 621–681.
- [22] CHOU, Ting-Chao - The mass-action law based algorithms for quantitative econo-green bio-researchw. **Integr. Biol. Integr. Biol.** 3:3 (2011) 548–559.
- [23] CHOU, Ting-Chao - The mass-action law based algorithm for cost-effective approach for cancer drug discovery and development. **American journal of cancer research**. . ISSN 2156-6976. 1:7 (2011) 925–54.
- [24] CHUMAKOV, Ilya *et al.* - Combining two repurposed drugs as a promising approach for Alzheimer’s disease therapy. **Scientific Reports**. . ISSN 2045-2322. 5:1 (2015) 7608.
- [25] COSTA, Celso A. R. A. *et al.* - Cholesterol reduction and lack of genotoxic or toxic effects in mice after repeated 21-day oral intake of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil. **Food and Chemical Toxicology**. . ISSN 02786915. 49:9 (2011) 2268–2272.
- [26] COSTA, Celso A. Rodrigues De Almeida *et al.* - The GABAergic system contributes to the anxiolytic-like effect of essential oil from *Cymbopogon citratus* (lemongrass). **Journal of Ethnopharmacology**. . ISSN 03788741. 137:1 (2011) 828–836.
- [27] COSTA, Gustavo *et al.* - Flavan hetero-dimers in the *Cymbopogon citratus* infusion tannin fraction and their contribution to the antioxidant activity. **Food & Function**. . ISSN 2042-6496. 6:3 (2015) 932–937.

- [28] COSTA, Gustavo *et al.* - Validation of a RP-HPLC Method for Quantitation of Phenolic Compounds in three Different Extracts from *Cymbopogon citratus*. **Research Journal of Medicinal Plant**. . ISSN 18193455. 9:7 (2015) 331–339.
- [29] COSTA, Gustavo *et al.* - Polyphenols from *Cymbopogon citratus* leaves as topical anti-inflammatory agents. **Journal of Ethnopharmacology**. . ISSN 18727573. 178:2016) 222–228.
- [30] CRESTINI, Claudia; LANGE, Heiko; BIANCHETTI, Giulia - Detailed Chemical Composition of Condensed Tannins via Quantitative. [s.d.].
- [31] DAMARAJU, Vijaya L. *et al.* - Synergistic activity of troxactabine (Troxyatyl™) and gemcitabine in pancreatic cancer. **BMC Cancer**. . ISSN 1471-2407. 7:1 (2007) 121.
- [32] DESAI, Urja N. *et al.* - Enhancement of the cytotoxic effects of Cytarabine in synergism with Hesperidine and Silibinin in Acute Myeloid Leukemia: An in-vitro approach. **Journal of cancer research and therapeutics**. . ISSN 1998-4138. 11:2 (2015) 352–7.
- [33] DHANALAXMI, Mrs; RAJ, Mohan; REDDY, K.Bhaskar - Synergistic effect of camellia sinensis and macrotyloma uniflorum as antihyperlipidaemic and antidiabetic activity. **Int. J. Pharmacol. Pharm. Sci. International Journal of Pharmacology and Pharmaceutical Sciences**. 35:5 (2016) 18–24.
- [34] DIKE, I.Precious; OBEMBE, O.Olawole; ADEBIYI, F.Ezekiel - Ethnobotanical survey for potential anti-malarial plants in south-western Nigeria. **Journal of Ethnopharmacology**. . ISSN 03788741. 144:3 (2012) 618–626.
- [35] DUVAL, Antoine; AVEOUS, Luc - Characterization and Physicochemical Properties of Condensed Tannins from Acacia catechu. [s.d.].
- [36] EKPENYONG, Christopher E.; AKPAN, Ernest; NYOH, Azah - Ethnopharmacology, phytochemistry, and biological activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf extracts. **Chinese Journal of Natural Medicines**. . ISSN 18755364. 13:5 (2015) 321–337. doi: 10.1016/S1875-5364(15).
- [37] ENGEL, Nadja *et al.* - Synergistic Action of Genistein and Calcitriol in Immature Osteosarcoma MG-63 Cells by SGLP1 Up-Regulation. **PLOS ONE**. . ISSN 1932-6203. 12:1 (2017).
- [38] ESCULENTA, Colocasia *et al.* - Synergistic Action in Oral Glucose Tolerance Tests between Spilanthes Calva Aerial Parts and Tubers of Colocasia Esculenta. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Developmental Research DOI CC By Int J Pharm Sci Dev Res**. 23:21 (2016) 23–26.
- [39] ESFINI-FARAHANI, Mohammad *et al.* - Analysis of Cytotoxic Activity and Synergistic Effect of Curcuma Longa Extract in Combination with Prednisolone on Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Lines. **International Journal of Cancer Management**. . ISSN 2538-4422. In Press:In Press (2017).
- [40] FERNER, Robin E.; ARONSON, Jeffrey K. - Cato Guldberg and Peter Waage, the history of the Law of Mass Action, and its relevance to clinical pharmacology. **British journal of**

- clinical pharmacology**. . ISSN 1365-2125. 81:1 (2016) 52–5.
- [41] FIGUEIRINHA, Artur *et al.* - *Cymbopogon citratus* leaves: Characterization of flavonoids by HPLC-PDA-ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols. **Food Chemistry**. . ISSN 03088146. 110:3 (2008) 718–728.
- [42] MAIER, Olaf - Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: role of TNF. **Oxidative medicine and cellular longevity**. . ISSN 1942-0994. 2015:2015) 610813.
- [43] FORKUO, Arnold D. *et al.* - Synergistic anti-malarial action of cryptolepine and artemisinins. **Malaria Journal**. . ISSN 1475-2875. 15:1 (2016) 89.
- [44] FOUCQUIER, Julie; GUEDJ, Mickael - Analysis of drug combinations: current methodological landscape. **Pharmacology research & perspectives**. . ISSN 2052-1707. 3:3 (2015) e00149.
- [45] 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**. . ISSN 03788741. 133:2 (2011) 818–827.
- [46] FRANCISCO, Vera *et al.* - Anti-inflammatory activity of *Cymbopogon citratus* leaves infusion via proteasome and nuclear factor- κ B pathway inhibition: Contribution of chlorogenic acid. **Journal of Ethnopharmacology**. . ISSN 03788741. 148:1 (2013) 126–134.
- [47] FRANCISCO, Vera *et al.* - Anti-inflammatory activity of *Cymbopogon citratus* leaves infusion via proteasome and nuclear factor- κ B pathway inhibition: Contribution of chlorogenic acid. **Journal of Ethnopharmacology**. . ISSN 03788741. 148:1 (2013) 126–134.
- [48] GAYVERT, Kaitlyn M. *et al.* - A Computational Approach for Identifying Synergistic Drug Combinations. **PLOS Computational Biology**. . ISSN 1553-7358. 13:1 (2017) e1005308.
- [49] GEETHA, T. S.; GEETHA, N. - Phytochemical Screening, Quantitative Analysis of Primary and Secondary Metabolites of *Cymbopogon citratus* (DC) stapf. leaves from Kodaikanal hills, Tamilnadu. **International Journal of PharmTech Research**. 6:2 ([s.d.]) 521–529.
- [50] GOLDONI, Matteo; JOHANSSON, Carolina - A mathematical approach to study combined effects of toxicants in vitro: Evaluation of the Bliss independence criterion and the Loewe additivity model. **Toxicology in Vitro**. . ISSN 0887-2333. 21:5 (2007) 759–769.
- [51] GUO, Q. *et al.* - Synergistic activity of azoles with amiodarone against clinically resistant *Candida albicans* tested by checkerboard and time-kill methods. **Journal of Medical Microbiology**. . ISSN 0022-2615. 57:4 (2008) 457–462.
- [52] GUPTA, Ramesh C. *et al.* - Interactions between antidiabetic drugs and herbs: an overview of mechanisms of action and clinical implications. **Diabetology & Metabolic Syndrome**. . ISSN 1758-5996. 9:1 (2017) 59.
- [53] HAJJ, Rodolphe *et al.* - Combination of acamprosate and baclofen as a promising therapeutic approach for Parkinson's disease. **Scientific Reports**. . ISSN 2045-2322. 5:1 (2015) 16084.

- [54] HALABI, Mohammed F.; SHEIKH, Bassem Y. - Anti-proliferative effect and phytochemical analysis of *Cymbopogon citratus* extract. **BioMed research international**. . ISSN 2314-6141. 2014:2014) 906239.
- [55] HUANG, Qianqian *et al.* - Potential and challenges of tannins as an alternative to in-feed antibiotics for farm animal production. **Animal Nutrition**. . ISSN 2405-6545. 2017).
- [56] HUANG, Wei *et al.* - Combination of microRNA-21 and microRNA-146a Attenuates Cardiac Dysfunction and Apoptosis During Acute Myocardial Infarction in Mice. **Molecular therapy. Nucleic acids**. . ISSN 2162-2531. 5:3 (2016).
- [57] HUNTER, Catherine J.; PLAEN, Isabelle G. DE - Inflammatory signaling in NEC: Role of NF- κ B, cytokines and other inflammatory mediators. **Pathophysiology**. . ISSN 1873149X. 21:1 (2014) 55–65.
- [58] HUSSAIN, Tarique *et al.* - Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? **Oxidative medicine and cellular longevity**. . ISSN 1942-0994. 2016:2016).
- [59] IBRAHIM, Mohammed Auwal *et al.* - Combination therapy of vitamin C and phenolics-rich fraction of *Khaya senegalensis* stem bark extract against *Trypanosoma brucei brucei* infection. **Synergy**. . ISSN 2213-7130. 4:2017) 19–22.
- [60] ISRAËL, Alain - The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**. . ISSN 1943-0264. 2:3 (2010).
- [61] IYAMAH, P. C.; IDU, M. - Ethnomedicinal survey of plants used in the treatment of malaria in Southern Nigeria. **Journal of Ethnopharmacology**. . ISSN 18727573. 173:2015) 287–302.
- [62] JAKOBEK, Lidija - Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. **Food Chemistry**. . ISSN 03088146. 175:2015) 556–567.
- [63] JIN, Xin; YANG, Qing; ZHANG, Youwen - Synergistic apoptotic effects of apigenin TPGS liposomes and tyroservatide: implications for effective treatment of lung cancer. **International Journal of Nanomedicine**. . ISSN 1178-2013. Volume 12:2017) 5109–5118.
- [64] KARAR, Mohamed Gamaleldin Elsadig; KUHNERT, Nikolai - Herbal Drugs from Sudan: Traditional Uses and Phytoconstituents. **Pharmacognosy reviews**. . ISSN 0973-7847. 11:22 (2017) 83–103.
- [65] KARUNAMOORTHY, Kaliyaperumal; ILANGO, K. - Larvicidal activity of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. and *Croton macrostachyus* Del. against *Anopheles arabiensis* Patton, a potent malaria vector. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**. . ISSN 11283602. 14:1 (2010) 57–62.
- [66] KAUR, Gurmeet *et al.* - **International journal of oncology**. University of Crete, Faculty of Medicine, Laboratory of Clinical Virology, 2013.
- [67] KAUSHIK, Shweta *et al.* - Genistein synergizes centchroman action in human breast cancer cells. **Indian journal of pharmacology**. . ISSN 1998-3751. 48:6 (2016) 637–642.

- [68] KHAN, Mohd Sajjad Ahmad; AHMAD, Iqbal - Biofilm inhibition by *Cymbopogon citratus* and *Syzygium aromaticum* essential oils in the strains of *Candida albicans*. **Journal of Ethnopharmacology**. . ISSN 03788741. 140:2 (2012) 416–423.
- [69] KHOO, Hock Eng *et al.* - Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. **Food & nutrition research**. . ISSN 1654-661X. 61:1 (2017) 1361779.
- [70] KIYOHARA, Hiroaki; MATSUMOTO, Tsukasa; YAMADA, Haruki - Combination Effects of Herbs in a Multi-herbal Formula: Expression of Juzen-taiho-to's Immuno-modulatory Activity on the Intestinal Immune System. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**. . ISSN 1741-427X. 1:1 (2004) 83–91.
- [71] KOH, P. H.; MOKHTAR, R. A. M.; IQBAL, M. - Antioxidant potential of *Cymbopogon citratus* extract: alleviation of carbon tetrachloride-induced hepatic oxidative stress and toxicity. **Human & Experimental Toxicology**. . ISSN 0960-3271. 31:2012) 81–91.
- [72] KOMAPE, Nancy Patience Motlalepula *et al.* - Anti-mycobacteria potential and synergistic effects of combined crude extracts of selected medicinal plants used by Bapedi traditional healers to treat tuberculosis related symptoms in Limpopo Province, South Africa. **BMC complementary and alternative medicine**. . ISSN 1472-6882. 17:1 (2017) 128.
- [73] KPOVIESSI, Salomé *et al.* - Chemical composition, cytotoxicity and in vitro antitrypanosomal and antiplasmodial activity of the essential oils of four *Cymbopogon* species from Benin. **Journal of Ethnopharmacology**. . ISSN 03788741. 151:1 (2014) 652–659.
- [74] KRASZEWSKA, Joanna *et al.* - Comparative Analysis of the Antimicrobial Activities of Plant Defensin-Like and Ultrashort Peptides against Food-Spoiling Bacteria. **Applied and environmental microbiology**. . ISSN 1098-5336. 82:14 (2016) 4288–98.
- [75] KUMAR, Shashank; PANDEY, Abhay K. - Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **TheScientificWorldJournal**. . ISSN 1537-744X. 2013:2013) 162750.
- [76] LEV-ARI, S. *et al.* - Curcumin synergistically potentiates the growth-inhibitory and pro-apoptotic effects of celecoxib in osteoarthritis synovial adherent cells. **Rheumatology**. 45:2006) 171–177.
- [77] LEVINE, Benjamin D.; CAGAN CORRESPONDENCE, Ross L.; CAGAN, Ross L. - *Drosophila* Lung Cancer Models Identify Trametinib plus Statin as Candidate Therapeutic. **Cell Reports**. 14:2016) 1477–1487.
- [78] LI, Gang; LOU, Hong-Xiang - Strategies to diversify natural products for drug discovery. **Medicinal Research Reviews**. . ISSN 01986325. 2017).
- [79] LIU, Hua; TALALAY, Paul - Relevance of anti-inflammatory and antioxidant activities of exemestane and synergism with sulforaphane for disease prevention. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. . ISSN 1091-6490. 110:47 (2013) 19065–70.

- [80] LIU, Ting *et al.* - NF- κ B signaling in inflammation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**. . ISSN 2059-3635. 2:2017) 17023.
- [81] LOMONOSOVA, Elena; ZLOTNECK, Adam; TAVIS, John E. - Synergistic Interactions between Hepatitis B Virus RNase H Antagonists and Other Inhibitors. [s.d.).
- [82] LÓPEZ-RUBALCAVA, Carolina; ESTRADA-CAMARENA, Erika - Mexican medicinal plants with anxiolytic or antidepressant activity: Focus on preclinical research. **Journal of Ethnopharmacology**. . ISSN 18727573. 186:2016) 377–391.
- [83] MACHADO, M. *et al.* - Monoterpenic aldehydes as potential anti-Leishmania agents: Activity of *Cymbopogon citratus* and citral on *L. infantum*, *L. tropica* and *L. major*. **Experimental Parasitology**. . ISSN 00144894. 130:3 (2012) 223–231.
- [84] MANSOUR, Amr F. *et al.* - Evaluation of Synergistic Interactions on Antioxidant and Anticancer Efficacy of Methanol Extracts of some Egyptian Spices in Combination. **International Journal of Biological Chemistry**. . ISSN 1819155X. 11:1 (2016) 9–16.
- [85] MEDZHITOV, Ruslan - Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**. . ISSN 14764687. 2008).
- [86] MINIHANE, Anne M. *et al.* - Low-grade inflammation, diet composition and health: current research evidence and its translation. **The British journal of nutrition**. . ISSN 1475-2662. 114:7 (2015) 999–1012.
- [87] MOHAMED ALI, Mahmoud *et al.* - GC-MS Analysis and Antimicrobial Screening of Essential Oil from Lemongrass (*Cymbopogon citratus*). **International Journal of Pharmacy and Chemistry**. 3:6 (2017) 72–76.
- [88] MONTGOMERY, Amanda *et al.* - Curcumin Sensitizes Silymarin to Exert Synergistic Anticancer Activity in Colon Cancer Cells. **Journal of Cancer**. . ISSN 1837-9664. 7:10 (2016) 1250–7.
- [89] MOTIWALA, M. N.; RANGARI, V. D. - Combined effect of paclitaxel and piperine on a MCF-7 breast cancer cell line in vitro: Evidence of a synergistic interaction. **Synergy**. . ISSN 2213-7130. 2:1 (2015) 1–6.
- [90] MOUSSAOUI, Fadila; ALAOUI, Tajelmolk - Evaluation of antibacterial activity and synergistic effect between antibiotic and the essential oils of some medicinal plants. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. . ISSN 2221-1691. 6:1 (2016) 32–37.
- [91] MURUGAN, Kadarkarai *et al.* - *Cymbopogon citratus*-synthesized gold nanoparticles boost the predation efficiency of copepod *Mesocyclops aspericornis* against malaria and dengue mosquitoes. **Experimental Parasitology**. . ISSN 10902449. 153:2015) 129–138.
- [92] MUSABAYANE, C. T.; TUFTS, M. A.; MAPANGA, R. F. - Synergistic antihyperglycemic effects between plant-derived oleanolic acid and insulin in streptozotocin-induced diabetic rats. **Renal Failure**. . ISSN 0886-022X. 32:7 (2010) 832–839.
- [93] NAIDOO, D. *et al.* - Plants traditionally used individually and in combination to treat sexually transmitted infections in northern Maputaland, South Africa: Antimicrobial activity

- and cytotoxicity. **Journal of Ethnopharmacology**. . ISSN 0378-8741. 149:3 (2013) 656–667.
- [94] NAIK, Mohd Irfan *et al.* - Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacterias. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. . ISSN 19957645. 3:7 (2010) 535–538.
- [95] NAUMANN, Harley D. *et al.* - The role of condensed tannins in ruminant animal production: advances, limitations and future directions. **Revista Brasileira de Zootecnia**. . ISSN 1806-9290. 46:12 (2017) 929–949.
- [96] NEWMAN, C.Michael - **Fundamentals of Ecotoxicology, Third Edition - Michael C. Newman - Google Livros**
- [97] NGUEFACK, J. *et al.* - Synergistic action between fractions of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against *Penicillium expansum*. **Food Control**. . ISSN 09567135. 23:2 (2012) 377–383
- [98] NITA, Malgorzata; GRZYBOWSKI, Andrzej - The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults. **Oxidative medicine and cellular longevity**. . ISSN 1942-0994. 2016:2016).
- [99] NOVAIS, M. H. *et al.* - Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal). **Journal of Ethnopharmacology**. . ISSN 03788741. 93:2–3 (2004) 183–195.
- [100] OH, Eunjung *et al.* - Synergistic Effect of Intravenous Ibuprofen and Hydromorphone for Postoperative Pain: Prospective Randomized Controlled Trial. **Pain physician**. . ISSN 2150-1149. 19:6 (2016) 341–8.
- [101] OISHI, Yumiko; MANABE, Ichiro - Macrophages in age-related chronic inflammatory diseases. **Nature Publishing Group**. May (2016) 1–8.
- [102] OLORUNNISOLA, O. S. *et al.* - Ethnobotanical survey of medicinal plants used in the treatment of malarial in Ogbomoso, Southwest Nigeria. **Journal of Ethnopharmacology**. . ISSN 03788741. 150:1 (2013) 71–78.
- [103] OOKO, Edna *et al.* - Pharmacogenomic Characterization and Isobologram Analysis of the Combination of Ascorbic Acid and Curcumin-Two Main Metabolites of *Curcuma longa*-in Cancer Cells. **Frontiers in pharmacology**. . ISSN 1663-9812. 8:2017).
- [104] PADALIA, H. *et al.* - Antimicrobial and synergistic effects of some essential oils to fight against microbial pathogens-a review. 2015) 34–45.
- [105] PADALIA, Hemali; POPTANI, Rakesh; CHANDA, Sumitra - Evaluation of *in Vitro* Antioxidant Properties of Solvent Extracts of Selected Medicinal Plants and Their Synergistic Efficacy. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**. . ISSN 1049-6475. 24:1 (2018) 15–27
- [106] PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. - Flavonoids: an overview. **Journal of nutritional science**. . ISSN 2048-6790. 5:2016).

- [107] PANTH, Nisha; PAUDEL, Keshav Raj; PARAJULI, Kalpana - Reactive Oxygen Species: A Key Hallmark of Cardiovascular Disease. **Advances in medicine**. . ISSN 2356-6752. 2016:2016).
- [108] PASQUIER, Eddy *et al.* - Effective Management of Advanced Angiosarcoma by the Synergistic Combination of Propranolol and Vinblastine-based Metronomic Chemotherapy: A Bench to Bedside Study. **EBIOM**. 6:2016) 87–95.
- [109] PENG, Huiming *et al.* - Drug Inhibition Profile Prediction for NFκB Pathway in Multiple Myeloma. **PLoS ONE**. 6:3 (2011).
- [110] PETRAITIS, Vidmantas *et al.* - Combination therapy in treatment of experimental pulmonary aspergillosis: in vitro and in vivo correlations of the concentration- and dose-dependent interactions between anidulafungin and voriconazole by Bliss independence drug interaction analysis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. . ISSN 1098-6596. 53:6 (2009) 2382–91.
- [111] PLEUVRY, Barbara J. - Pharmacodynamic and pharmacokinetic drug interactions. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**. . ISSN 1472-0299. 6:4 (2005) 129–133.
- [112] POONAM, Tripathi; PREM PRAKASH, Gupta; VIJAY KUMAR, Lal - Interaction of *Momordica charantia* with Metformin in Diabetic Rats. **American Journal of Pharmacology and Toxicology**. . ISSN 1557-4962. 8102106:83 (2013) 102–106.
- [113] RAHIM, Saleh M. *et al.* - Protective effect of *Cymbopogon citratus* on hydrogen peroxide-induced oxidative stress in the reproductive system of male rats. **Systems biology in reproductive medicine**. . ISSN 1939-6376. 59:6 (2013) 329–336.
- [114] RAMACHANDRAN, Cheppail *et al.* - Synergistic Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects between Modified Citrus Pectin and Honokiol. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**. . ISSN 1741-427X. 2017:2017).
- [115] REIS GIADA, Maria De Lourdes - Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power. Em **Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants**. InTech, 2013.
- [116] ROELL, Kyle R.; REIF, David M.; MOTSINGER-REIF, Alison A. - An Introduction to Terminology and Methodology of Chemical Synergy-Perspectives from Across Disciplines. **Frontiers in pharmacology**. . ISSN 1663-9812. 8:2017) 158.
- [117] ROPIAK, Honorata M. *et al.* - Structure–Activity Relationship of Condensed Tannins and Synergism with trans-Cinnamaldehyde against *Caenorhabditis elegans*. [s.d.]
- [118] RORIZ, Custódio Lobo *et al.* - *Pterospartum tridentatum*, *Gomphrena globosa* and *Cymbopogon citratus*: A phytochemical study focused on antioxidant compounds. **Food Research International**. . ISSN 09639969. 62:2014) 684–693.
- [119] SAGRADAS, Joana *et al.* - Gastroprotective effect of *Cymbopogon citratus* infusion on acute ethanol-induced gastric lesions in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. . ISSN 18727573. 173:2015) 134–138.

- [120] SALIH, Kamal A. - Synergistic Effects of Plant Extracts and Antifungal Drugs on *C. albicans*. **Journal of Developing Drugs**. . ISSN 23296631. 5:3 (2016) 1–4.
- [121] SALZANO, Sonia *et al.* - Linkage of inflammation and oxidative stress via release of glutathionylated peroxiredoxin-2 , which acts as a danger signal. 12 (2014).
- [122] SAMOISY, Anne Kathie; MAHOMOODALLY, Fawzi - Ethnopharmacological appraisal of culturally important medicinal plants and polyherbal formulas used against communicable diseases in Rodrigues Island. **Journal of Ethnopharmacology**. . ISSN 18727573. 194:November (2016) 803–818.
- [123] SANHUEZA, Loreto *et al.* - Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **PloS one**. . ISSN 1932-6203. 12:2 (2017).
- [124] SANTANA, Bruna Farias DE; VOEKS, Robert A.; FUNCH, Ligia Silveira - Ethnomedicinal survey of a maroon community in Brazil's Atlantic tropical forest. **Journal of Ethnopharmacology**. . ISSN 18727573. 181:2016) 37–49.
- [125] SECA, Ana; PINTO, Diana - Plant Secondary Metabolites as Anticancer Agents: Successes in Clinical Trials and Therapeutic Application. **International Journal of Molecular Sciences**. . ISSN 1422-0067. 19:1 (2018) 263.
- [126] SHAH, Gagan *et al.* - Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (Lemon grass). **Journal of advanced pharmaceutical technology & research**. . ISSN 0976-2094. 2:1 (2011) 3–8.
- [127] SHARMA, Ajay Kumar; GUPTA, Ritika - Anti-Hyperglycemic Activity of Aqueous Extracts of Some Medicinal Plants on Wistar Rats. **Journal of Diabetes & Metabolism**. . ISSN 21556156. 8:7 (2017).
- [128] SHIRIKI, Dooshima *et al.* - Postharvest Loss Control: Synergistic Plants Extract Inhibition of Ten Microbial Yam Rot Organisms. **Food and Nutrition Sciences**. . ISSN 2157-944X. 8:7 (2017) 725–732.
- [129] SILVA, Monalisa Ribeiro *et al.* - Comparative anticonvulsant activities of the essential oils (EOs) from *Cymbopogon winterianus* Jowitt and *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**. . ISSN 00281298. 381:5 (2010) 415–426.
- [130] SINGH, Jeyabalan; SINGH, Yogendra; JEYABALAN, G. - Synergistic antihyperglycemic potential of plant drugs -a review. **Asian Pac. J. Health Sci. ASIAN PACIFEC JOURNAL OF HEALTH SCIENCES**. . ISSN 2350-0964. 2:24 (2015).
- [131] SMERIGLIO, Antonella *et al.* - Chemistry, Pharmacology and Health Benefits of Anthocyanins. **Phytotherapy Research**. . ISSN 0951418X. 30:8 (2016) 1265–1286.
- [132] SMERIGLIO, Antonella *et al.* - Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. **British Journal of Pharmacology**. . ISSN 00071188. 174:11 (2017) 1244–1262.

- [133] SOLEIMANPOUR, Maryam *et al.* - The Role of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) in the Treatment of Patients With Hepatic Disease: A Review Article. **Anesthesiology and pain medicine**. . ISSN 2228-7523. 6:4 (2016).
- [134] SORENG, Robert J. *et al.* - A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae). **Journal of Systematics and Evolution**. . ISSN 16744918. 53:2 (2015) 117–137.
- [135] SUGIMOTO, Michelle A. *et al.* - Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset? **Frontiers in immunology**. . ISSN 1664-3224. 7:2016) 160.
- [136] SUROOWAN, Shanoo; MAHOMOODALLY, M.Fawzi - A comparative ethnopharmacological analysis of traditional medicine used against respiratory tract diseases in Mauritius. **Journal of Ethnopharmacology**. . ISSN 18727573. 177:2016) 61–80.
- [137] TAGLIAFERRI, Sara *et al.* - Low concentrations of the brominated flame retardants BDE-47 and BDE-99 induce synergistic oxidative stress-mediated neurotoxicity in human neuroblastoma cells. **Toxicology in Vitro**. . ISSN 0887-2333. 24:1 (2010) 116–122.
- [138] TALLARIDA, R. J. - An Overview of Drug Combination Analysis with Isobolograms. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. . ISSN 0022-3565. 319:1 (2006) 1–7.
- [139] TALLARIDA, Ronald J. - Quantitative methods for assessing drug synergism. **Genes & cancer**. . ISSN 1947-6027. 2:11 (2011) 1003–8.
- [140] TANG, Jing; WENNERBERG, Krister; AITTOKALLIO, Tero - What is synergy? The Saariselkä agreement revisited. **Frontiers in Pharmacology**. . ISSN 1663-9812. 6:2015) 181.
- [141] THANGAM, Ramar; SURESH, Veeraperumal; KANNAN, Soundarapandian - Optimized extraction of polysaccharides from *Cymbopogon citratus* and its biological activities. **International Journal of Biological Macromolecules**. . ISSN 01418130. 65:2014) 415–423.
- [142] TIWARI, Brajendra *et al.* - Nanotized Curcumin and Miltefosine, a Potential Combination for Treatment of Experimental Visceral Leishmaniasis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. . ISSN 1098-6596. 61:3 (2017).
- [143] TIWARI, M.; DWIVEDI, U. N.; KAKKAR, P. - Suppression of oxidative stress and pro-inflammatory mediators by *Cymbopogon citratus* D. Stapf extract in lipopolysaccharide stimulated murine alveolar macrophages. **Food and Chemical Toxicology**. . ISSN 02786915. 48:10 (2010) 2913–2919.
- [144] TOFIÑO-RIVERA, A. *et al.* - Effect of *Lippia alba* and *Cymbopogon citratus* essential oils on biofilms of *Streptococcus mutans* and cytotoxicity in CHO cells. **Journal of Ethnopharmacology**. . ISSN 18727573. 194:December 2015 (2016) 749–754.
- [145] TSAO, Rong - Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients**. . ISSN 2072-6643. 2:12 (2010) 1231–46.

- [146] UMAR, M. *et al.* - Phytochemical Analysis and Antimicrobial Effect of Lemon Grass (*Cymbopogon citratus*) Obtained From Zaria, Kaduna State, Nigeria. **Journal of Complementary and Alternative Medical ResearchJOCAMR**. 126783:22 (2016) 1–8.
- [147] URAKU, A. J. - Determination of chemical compositions of *Cymbopogon citratus* leaves by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method. **Research Journal of Phytochemistry**. . ISSN 21516081. 9:4 (2015) 175–187.
- [148] VEERESHAM, Ciddi - Natural products derived from plants as a source of drugs. **Journal of advanced pharmaceutical technology & research**. . ISSN 2231-4040. 3:4 (2012) 200–1.
- [149] VIANA, G. S. .. *et al.* - Antinociceptive effect of the essential oil from *Cymbopogon citratus* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. . ISSN 03788741. 70:3 (2000) 323–327.
- [150] VISSIENNON, C. *et al.* - Synergy Research: Investigating the combined action of chamomile, myrrh and coffee charcoal on chemokine release of activated human macrophages. **Zeitschrift für Phytotherapie**. . ISSN 0722-348X. 37:S 01 (2016) P27.
- [151] VISSIENNON, Cica *et al.* - Synergistic interactions of chamomile flower, myrrh and coffee charcoal in inhibiting pro-inflammatory chemokine release from activated human macrophages. **Synergy**. . ISSN 22137130. 4:4 (2017) 13–18.
- [153] WAGNER, Hildebert; BLADT, Sabine - **Plant Drug Analysis** [Em linha]. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 1996 [Consult. 4 set. 2018]
- [152] WANG, Tian-yang; LI, Qing; BI, Kai-shun - Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**. . ISSN 1818-0876. 13:1 (2018) 12–23.
- [153] WET, Helene DE; NCIKI, Sibongile; VUUREN, Sandy F. VAN - Medicinal plants used for the treatment of various skin disorders by a rural community in northern Maputaland, South Africa. **Journal of ethnobiology and ethnomedicine**. . ISSN 1746-4269. 9:2013) 51.
- [154] WU, Yu Shan *et al.* - Synergistic Inhibition of Breast Cancer Cell Growth by an Epigenome-Targeting Drug and a Tyrosine Kinase Inhibitor. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. . ISSN 0918-6158. 40:10 (2017) 1747–1753.
- [155] YAN, Han *et al.* - A formal model for analyzing drug combination effects and its application in TNF- α -induced NF κ B pathway. **BMC Systems Biology**. . ISSN 1752-0509. 4:1 (2010) 50.
- [156] YEN, Gow-Chin *et al.* - Protective effect of pine (*Pinus morrissonicola* Hay.) needle on LDL oxidation and its anti-inflammatory action by modulation of iNOS and COX-2 expression in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. **Food and Chemical Toxicology**. . ISSN 02786915. 46:1 (2008) 175–185.
- [157] YU, Yi *et al.* - In-vitro and in-vivo combined effect of ARQ 092, an AKT inhibitor, with ARQ 087, a FGFR inhibitor. **Anti-Cancer Drugs**. . ISSN 0959-4973. 28:5 (2017) 503–513.

- [158] YUAN, Huihui *et al.* - Synergistic anticancer effects of andrographolide and paclitaxel against A549 NSCLC cells. **Pharmaceutical Biology**. . ISSN 1388-0209. 54:11 (2016) 2629–2635.
- [159] ZHAO, Jane; KELNAR, Kevin; BADER, Andreas G. - In-Depth Analysis Shows Synergy between Erlotinib and miR-34a. **PLoS ONE**. . ISSN 1932-6203. 9:2 (2014) e89105.
- [160] ZHAO, Liang; AU, Jessie L. S.; WIENTJES, M.Guillaume - Comparison of methods for evaluating drug-drug interaction. **Frontiers in bioscience (Elite edition)**. . ISSN 1945-0508. 2:2010) 241–9.
- [161] ZHAO, Wei *et al.* - A New Bliss Independence Model to Analyze Drug Combination Data. **Journal of Biomolecular Screening**. . ISSN 1087-0571. 19:5 (2014) 817–821.
- [162] ZHITNITSKY, Daniel; ROSE, Jessica; LEWINSON, Oded - The highly synergistic, broad spectrum, antibacterial activity of organic acids and transition metals. **Scientific reports**. . ISSN 2045-2322. 7:2017).
- [163] ZHOU, Xian *et al.* - Synergistic Effects of Chinese Herbal Medicine: A Comprehensive Review of Methodology and Current Research. **Frontiers in pharmacology**. . ISSN 1663-9812. 7:2016) 201.
- [164] ZHOU, Xian *et al.* - Synergistic Effects of Danshen (*Salvia Miltiorrhiza Radix et Rhizoma*) and Sanqi (*Notoginseng Radix et Rhizoma*) Combination in Inhibiting Inflammation Mediators in RAW264.7 Cells. **BioMed research international**. . ISSN 2314-6141. 2016:2016).
- [165] ZHOU, Hai-Chao *et al.* - Relationships between degree of polymerization and antioxidant activities: a study on proanthocyanidins from the leaves of a medicinal mangrove plant *Cerriops tagal*. **PloS one**. . ISSN 1932-6203. 9:10 (2014).
- [166] ZULFA, Z.; CHIA, C. T.; RUKAYADI, Y. - In vitro antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) extracts against selected foodborne pathogens. **International Food Research Journal**. . ISSN 22317546. 2016).
- [167] CABI, current year. *Cymbopogon citratus* [original text by AN Author]. In: Invasive Species Compendium. Wallingford, UK: CAB International. www.cabi.org/isc