

***Pterospartum tridentatum* (L.) Willk, *Gomphrena globosa* L. e *Cymbopogon citratus*
(DC) Stapf: fitoquímica e bioatividade das espécies individuais e sinergismos
resultantes do uso combinado**

Custódio Miguel Lobo de Freitas Roriz

*Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança
e à Universidade de Salamanca para obtenção do
Grau de Mestre em Farmácia e Química de Produtos Naturais*

Orientado por

Isabel Cristina F.R. Ferreira

Ana Maria Pinto Carvalho

Bragança

2014

À minha avó e Madrinha

Ana de Jesus Freitas

(16/07/1918 – 12/08/2003)

AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras, Doutora Isabel Ferreira e Doutora Ana Maria Carvalho, por aceitarem orientar o meu trabalho, por tudo o que fizeram para que crescesse enquanto aluno e pessoa; são um exemplo que tentarei seguir. À Doutora Ana Maria Carvalho por toda a paciência, pelo conhecimento transmitido e toda a disponibilidade que apresentou durante este percurso. Um obrigado especial à Doutora Isabel Ferreira; não tenho palavras que expressem a enorme gratidão que lhe guardo; agradeço sobretudo por ser uma inspiração a nível profissional assim como a nível pessoal. Les Brown disse “Ajude os outros a realizarem os sonhos deles, e os seus tornar-se-ão realidade”. Por todos os meus sonhos que tornou realidade, sinto-me um privilegiado por ter a oportunidade de trabalhar consigo; muito obrigado.

A todas as pessoas do Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada (LQBA)-BioChemcore, por todo o companheirismo, paciência e bons momentos que me proporcionaram; agradeço sobretudo o facto de desde o primeiro dia me tratarem como um igual e me fazerem sentir em “casa”. Quero agradecer em particular à Ângela Fernandes, por ter guiado os meus primeiros passos no LQBA, por toda a dedicação e compreensão demonstrada.

À Doutora Lillian Barros por toda a disponibilidade que ainda hoje continua a demonstrar, assim como por todo o conhecimento que me transmitiu de forma despretensiosa e altruísta.

Quero também agradecer à empresa ERVITAL, por ter aceitado colaborar com este trabalho, e tão prontamente ter fornecido as amostras analisadas, muito obrigado

A todos os meus amigos que, longe ou perto, tornaram este percurso tão mais leve; foi com vocês que dividi as alegrias e conquistas, mas também me ajudaram a superar as frustrações e os momentos menos bons.

Quero agradecer às minhas “Companheiras de Batalha” Azucena Marques, Cynthia Malhadas, Marta Pinto e MéliSSa Lopes; sem vocês este percurso não seria igual,

por todas as nossas diferenças que ao invés de nos afastarem nos aproximaram, por sermos capazes de ver o mundo pelos olhos uns dos outros tornando esta aventura em algo que vou recordar para sempre; obrigado.

À Andreia Tomás, por todo o apoio e amizade que me ofereceu de forma despretensiosa.

À Sandrina Alves Heleno, por não ter desistido e ter continuado a acreditar nos meus sonhos, quando eu próprio já não era capaz, já te disse, mas volto a dizer, neste momento estou onde quero, a fazer o que gosto e muito disso devo a ti, obrigado.

À Ana Bourbon, Catarina Canário, Maria João Bravo, Cristina Marques, Rui Bourbon, Mariana Maio, Ricardo Sousa, vocês são o meu porto seguro, são os amigos de sempre e para sempre, aqueles com quem cresci, e definiram muito do que sou como pessoa; obrigado por sempre me transmitirem força e coragem, e aparecerem quando mais preciso, sem nada cobrar.

A toda a minha Família por ser acima de tudo uma fonte inesgotável de motivação e orgulho; somos muitos e bons, contrariando a teoria, pelo companheirismo, carinho e amizade mas acima de tudo porque me dão todos os dias o maior presente que existe, uma Família. Ao Meu primo Custódio Lobo e a esposa Ana Andrez, por me motivarem a perseguir os meus sonhos e serem eles próprios responsáveis pela realização de alguns deles. À Aurora Lobo por ter dividido comigo este caminho da literacia, foi contigo que aprendi a gostar de estudar; que esse desejo de saber sempre mais nunca te abandone, pois é uma inspiração para mim.

Às minhas afilhadas Ana Isabel e Maria Leonor, por olharem para mim como um modelo a seguir, por ver na inocência dos seus olhos todo o amor e orgulho que sentem por mim, obrigado por me deixarem ser vosso.

À minha irmã e amiga, Sílvia Lobo Roriz, por ter tido a difícil tarefa de percorrer novos caminhos que eu tive depois o privilégio de trilhar sem dificuldades, por ser a pessoa que é, pelo muito que me deu e continua a dar; muito do que sou devo-o a ti; um agradecimento muito especial a quem está a caminho, por ser capaz de despertar sentimentos que não sabia existirem.

Aos meus pais, Maria da Ascensão Lobo e José Miguel Roriz, por serem uma fonte de inspiração devido ao seu altruísmo e dedicação aos outros, por apoiarem todas

as decisões que tomo, por sempre me educarem, por de forma subtil sempre me apontarem o melhor caminho e serem uma fonte de amor e compreensão que não cessa nem esgota; o muito que diga nunca vai ser suficiente para descrever e demonstrar o amor que sinto por vocês, espero ser capaz de ser tudo o que merecem.

À minha avó e madrinha Ana de Jesus Freitas, a quem dedico esta tese. Agradeço a sorte que tive por ter sido criado por uma pessoa tão especial e cheia de amor, obrigado por me ter inculcido o respeito pelo próximo, por me fazer acreditar que o futuro guardava grandes coisas para mim; a sua lembrança e amor imenso que tinha por todos nós ficará para sempre comigo, obrigado.

ÍNDICE GERAL

| | |
|--|-----------|
| AGRADECIMENTOS..... | v |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | xi |
| RESUMO..... | xvii |
| ABSTRACT..... | xix |
| I. INTRODUÇÃO..... | 3 |
| 1.1. ETNOBOTÂNICA E ETNOFARMACOLOGIA..... | 3 |
| 1.2. ALGUMAS ESPÉCIES E USOS COM DESTAQUE NA MEDICINA TRADICIONAL..... | 5 |
| 1.2.1. <i>Pterospartum tridentatum</i> (L.) Willk..... | 6 |
| 1.2.2. <i>Gomphrena globosa</i> L..... | 8 |
| 1.2.3. <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf..... | 9 |
| 1.3. FITOQUÍMICOS DAS PLANTAS..... | 11 |
| 1.3.1. Vitaminas..... | 12 |
| 1.3.2. Ácidos orgânicos..... | 14 |
| 1.3.3. Açúcares..... | 15 |
| 1.3.4. Compostos fenólicos..... | 17 |
| 1.4. PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES..... | 18 |
| 1.4.1. Métodos de avaliação da atividade antioxidante..... | 20 |
| 1.5. SINERGIA ENTRE COMPOSTOS..... | 25 |
| 1.6. ENQUADRAMENTO DO ESTUDO E PRINCIPAIS OBJETIVOS..... | 27 |
| II. MATERIAL E MÉTODOS..... | 31 |
| 2.1. AMOSTRAS..... | 31 |
| 2.1.1. Preparação de extratos metanólicos..... | 33 |
| 2.1.2. Infusões..... | 33 |
| 2.1.3. Misturas..... | 33 |
| 2.2. PADRÕES E REAGENTES..... | 34 |
| 2.3. ANÁLISE DE FITOQUÍMICOS..... | 34 |
| 2.3.1. Composição em tocoferóis..... | 34 |
| 2.3.2. Composição em açúcares..... | 35 |
| 2.3.3. Composição em ácidos orgânicos..... | 36 |
| 2.3.4. Composição em compostos fenólicos..... | 37 |
| 2.3.5. Composição em betacianidinas..... | 38 |
| 2.4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE..... | 39 |
| 2.4.1. Atividade captadora de radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH)..... | 39 |
| 2.4.2. Poder redutor..... | 40 |
| 2.4.3. Inibição da descoloração do β -caroteno..... | 40 |
| 2.4.4. Inibição da peroxidação lipídica utilizando substâncias reativas de ácido tiobarbiturico (TBARS)..... | 41 |
| 2.4.5. CLASSIFICAÇÃO DE EFEITO ADITIVO, SINERGISTA OU ANTAGONISTA NAS MISTURAS..... | 42 |
| 2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 42 |
| III. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 45 |
| 3.1. CARACTERIZAÇÃO EM TOCOFERÓIS, AÇÚCARES E ÁCIDOS ORGÂNICOS..... | 45 |
| 3.2. CARACTERIZAÇÃO EM COMPOSTOS FENÓLICOS..... | 49 |
| 3.2.1. Nos extratos metanólicos..... | 49 |

| | | |
|----------------|---|------------|
| 3.2.2. | <i>Nas infusões</i> | 67 |
| 3.3. | PROPIEDADES ANTIOXIDANTES | 75 |
| 3.3.1. | <i>Dos extratos metanólicos</i> | 75 |
| 3.3.2. | <i>Das infusões preparadas com plantas individuais e misturas</i> | 77 |
| IV. | CONCLUSÕES | 83 |
| V. | BIBLIOGRAFIA | 87 |
| VI. | ANEXOS | 101 |
| ANEXO 1 | | 103 |
| ANEXO 2 | | 115 |
| ANEXO 3 | | 123 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. <i>Pterospartum tridentatum</i> (L.) Willk. em floração (A, C e E) e detalhe da flor (B e D) (Grundtvig ^{A,E} , Francisco Erit Vasquez Toro ^B , Teresa Loba ^C , Miguel Angel ^D , https://www.flickr.com 2014)..... | 7 |
| Figura 2. <i>Gomphrena globosa</i> L. em floração (C e E) E detalhe da flor (A, B e D) (Nobuhiro Suhara, https://www.flickr.com 2014)..... | 9 |
| Figura 3. <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf. em arbusto (B), detalhe das folhas (A, C e E) e detalhe da inflorescência (D), (J. Gil ^A , Jan Demman ^B , Missouri Botanical Garden ^C , Tony Rood ^D , Layla Dishman ^E , https://www.flickr.com 2014)..... | 11 |
| Figura 4. Estrutura química dos tocoferóis e dos tocotrienóis (α -tocoferol/tocotrienol: R1=R2=CH ₃ ; β -tocoferol/tocotrienol: R1=H, R2=CH ₃ ; γ -tocoferol/tocotrienol: R1=CH ₃ , R2=H; δ -tocoferol/tocotrienol: R1=R2=H). | 13 |
| Figura 5. Estrutura química do ácido L-ascórbico..... | 13 |
| Figura 6. Estrutura química de açúcares encontrados em plantas. | 16 |
| Figura 7. Estrutura química de diferentes classes de flavonoides. | 18 |
| Figura 8. Redução do DPPH'. | 21 |
| Figura 9. Reação de MDA e TBA na formação de TBARS..... | 24 |
| Figura 10. A- <i>Pterospartum tridentatum</i> (L.) Willk.: aspeto das flores secas, obtidas a partir de exemplares silvestres da Serra de Montemuro, a recolha do material vegetal tem em conta os princípios e técnicas da colheita sustentável de espécies silvestres; B- <i>Gomphrena globosa</i> L.: aspeto das inflorescências secas, obtidas a partir de plantas cultivadas em modo de produção biológico; C- <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf: aspeto das folhas secas, obtidas a partir de plantas cultivadas em modo de produção biológico, todas as espécies são secas e comercializadas pela empresa Ervital, Plantas Aromáticas e Medicinais, Lda de Castro Daire. Fonte: Ervital, http://www.ervital.pt/ | 32 |
| Figura 11. Perfil individual de (A) tocoferóis em <i>Gomphrena globosa</i> : 1- α -tocoferol, 2- BHT, 3- γ -tocoferol, 4- tocol- padrão interno (IS); (B) açúcares em <i>Cymbopogon citratus</i> : 1-frutose, 2- glucose, 3- sacarose, 4 melezitose (IS); (C) ácidos orgânicos em <i>Gomphrena globosa</i> : 1- ácido oxálico, 2- ácido málico, 3- ácido cítrico, 4- ácido fumárico. FM-Fase móvel. | 48 |
| Figura 12. Perfil fenólico de extrato metanólico de <i>P. tridentatum</i> registado a 280 nm; A1- espectros de UV dos picos 1 e 2. | 54 |
| Figura 13 Betacianidina..... | 57 |
| Figura 14. Perfil fenólico de extrato metanólico de <i>G. globosa</i> registado a 370 nm..... | 60 |
| Figura 15. Perfil de betacianinas em <i>G. globosa</i> obtido a 520 nm. | 61 |
| Figura 17. Fragmentação geral de flavonoides O-glucosil-C-glucosilo (baseado em Ferreres et al, 2007); Estrutura química de 2''-O-desoxiosil-6-C-(6-desoxi-pento-hexos-ulosilo) presente em <i>C. citratus</i> | 66 |
| Figura 16. Perfil fenólico de <i>C. citratus</i> registado a 370 nm..... | 66 |
| Figura 18. Perfil fenólico da infusão de <i>P. tridentatum</i> registado a 280 nm. | 68 |

| | |
|--|----|
| Figura 19. A. Perfil fenólico da infusão de <i>G. globosa</i> registado a 370 nm; B. Perfil de betacianidinas em <i>G. globosa</i> registado a 520 nm. | 71 |
| Figura 20. Perfil fenólico da infusão de <i>C. citratus</i> registado a 370 nm. | 73 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Composição em tocoferóis, açúcares e ácidos orgânicos de <i>P. tridentatum</i> , <i>G. globosa</i> e <i>C. citratus</i> (média ± DP). | 45 |
| Tabela 2. Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda da absorção máxima na região do visível (λ_{max}), dados do espectro de massa, identificação e quantificação de compostos fenólicos em <i>P. tridentatum</i> (média ± DP). | 53 |
| Tabela 3. Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda da absorção máxima na região do visível (λ_{max}), dados do espectro de massa, identificação e quantificação de compostos fenólicos em <i>G. globosa</i> (média ± DP). | 59 |
| Tabela 4. Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda da absorção máxima na região do visível (λ_{max}), dados do espectro de massa, identificação e percentagem relativa de betacianidinas em <i>G. globosa</i> (média ± DP). | 61 |
| Tabela 5. Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda da absorção máxima na região do visível (λ_{max}), dados do espectro de massa, identificação e quantificação de compostos fenólicos em <i>C. citratus</i> (média ± DP). | 65 |
| Tabela 6. Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda da absorção máxima na região do visível (λ_{max}), dados do espectro de massa, identificação e quantificação de compostos fenólicos em infusão de <i>P. tridentatum</i> (média ± DP). | 69 |
| Tabela 7. Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda da absorção máxima na região do visível (λ_{max}), dados do espectro de massa, identificação e quantificação de compostos fenólicos, e percentagem relativa de betacianidinas em infusão de <i>G. globosa</i> (média ± DP). | 72 |
| Tabela 8. Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda da absorção máxima na região do visível (λ_{max}), dados do espectro de massa, identificação e quantificação de compostos fenólicos em infusão de <i>C. citratus</i> (média ± DP). | 74 |
| Tabela 9. Atividade antioxidante (valores de EC ₅₀ , mg/mL) de extratos metanólicos obtidos a partir de <i>P. tridentatum</i> , <i>G. globosa</i> e <i>C. citratus</i> (média ± DP). | 77 |

ABREVIATURAS

| | |
|---|--------------------------|
| Absorvância | A |
| Atividade captadora de radicais | ACR |
| Efeito aditivo | AD |
| Análise de Variância | ANOVA |
| Butil-hidroxitolueno (2,6-di- <i>terc</i> -butil-4-metilfenol) | BHT |
| <i>Cymbopogon citratus</i> | Cc |
| Energia de colisão | CE |
| Espalhamento da energia de colisão | CES |
| Deteção de Díodos | DAD |
| Desvio padrão | DP |
| 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo | DPPH |
| Por exemplo | e.g. |
| Concentração de extrato correspondente a 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância no ensaio do poder redutor | EC₅₀ |
| Potencial de entrada | EP |
| Ião produto | EPI |
| Ionização por electrospray | ESI |
| Estados Unidos da América | EUA |
| Cromatografia gasosa | GC |
| <i>Gomphrena globosa</i> | Gg |
| Radical hidroxilo | HO[•] |
| Cromatografia líquida de alta eficiência | HPLC |
| Malondialdeído | MDA |
| Espectrometria de massa | MS |
| Efeito antagonista | NA |
| Não detetado | nd |
| Deteção de fotodíodos | PDA |
| Padrão Interno | PI |
| <i>Pterospartum tridentatum</i> | Pt |
| Ácidos gordos polinsaturados | PUFA |
| Detector de índice de refração | RI |
| Radical peroxilo | ROO[•] |
| Rotações por minuto | Rpm |
| Desvio padrão | SD |
| Efeito sinérgico | SN |
| Ácido tiobarbitúrico | TBA |
| Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico | TBARS |
| Ácido trifluoroacético | TFA |
| Vestígios | Tr |
| Cromatografia líquida ultra rápida | UFLC |
| Radiação ultravioleta | UV |
| Relação volume/volume | v/v |
| Radiação Visível | VIS |
| Radical vitamina C | vit.C[•] |
| Radical vitamina E | Vit.E |
| Organização Mundial de Saúde | WHO |

RESUMO

Pterospartum tridentatum (L.) Willk., *Gomphrena globosa* L. and *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. são plantas medicinais que requerem uma caracterização química mais detalhada, devido à importância do seu consumo em infusões. Assim, o perfil individual em tocoferóis, açúcares livres e ácidos orgânicos foi efetuado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a diferentes detetores (floreescência, índice de refração e detetor de díodos, respetivamente). A composição fenólica (*e.g.*, ácidos fenólicos e flavonoides) foi também analisada por técnicas de cromatografia e espetrometria de massa. A atividade antioxidante dos extratos metanólicos e das infusões foi avaliada através da atividade captadora de radicais livres, poder redutor, inibição da descoloração do β -caroteno e inibição da peroxidação lipídica em homogeneizados cerebrais.

Nos últimos anos, têm surgido estudos de avaliação dos efeitos sinérgicos resultantes da combinação de plantas, destacando o maior potencial das misturas quando comparados com as plantas individuais. As três espécies mencionadas anteriormente são exemplos de plantas medicinais com propriedades antioxidantes próprias, mas que podem mostrar melhorias quando combinadas. Assim, avaliou-se também a atividade antioxidante das infusões preparadas a partir das plantas individuais e de misturas dessas plantas em diferentes proporções.

C. citratus revelou o maior teor em α -tocoferol, tocoferóis totais, glucose sacarose, ácidos succínico e ascórbico, tendo ainda apresentado a mais elevada capacidade de inibição da descoloração do β -caroteno e peroxidação lipídica; a luteolina 2''-*O*-ramnosil-6-*C*-glucósido foi o composto maioritário no extrato metanólico dessa planta. *P. tridentatum* apresentou a maior concentração de frutose e açúcares totais, revelando também a maior atividade captadora de radicais livres e poder redutor; derivados de dihidroflavonol e isoflavona foram os compostos mais significativos no extrato metanólico. Finalmente, *G. globosa* demonstrou a maior concentração em ácidos orgânicos, sendo o canferol 3-*O*-rutínósido o composto fenólico mais abundante no extrato metanólico; foram ainda identificadas betacianidinas nesta amostra.

O perfil fenólico foi muito similar nos extratos metanólicos e nas infusões. Para as infusões, a ordem de eficácia antioxidante foi a seguinte *P. tridentatum* > *C. citratus* > *G.*

globosa, o que pode estar relacionado com a diferente composição em compostos fenólicos, principalmente flavonoides. Quando se combinaram as plantas em estudo, observaram-se maioritariamente efeitos sinérgicos na atividade antioxidante das infusões; os efeitos foram mais significativos nas proporções de 40%:60% (tanto de *P. tridentatum* e *C. citratus*, como *G. globosa* e *C. citratus*). A infusão obtida a partir de 40% de *P. tridentatum* e 60% de *C. citratus* foi a que apresentou propriedades antioxidantes mais elevadas, devido ao aumento da percentagem individual da planta com maior atividade antioxidante, comparativamente à mistura de 25%:75%.

Tanto quanto sabemos, este é o primeiro trabalho que descreve a composição química de *G. globosa* e *C. citratus*. Dada a importância do consumo das três plantas mencionadas, o estudo da sua composição fitoquímica e das suas propriedades antioxidantes é de particular interesse. O presente trabalho valida ainda a comercialização das espécies combinadas em proporções específicas.

ABSTRACT

Pterospartum tridentatum (L.) Willk., *Gomphrena globosa* L. and *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. are medicinal plants that require a more detailed chemical characterization, given the importance of their consumption as infusions. Therefore, the individual profiles in tocopherols, free sugars and organic acids were obtained by high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to different detectors (fluorescence, refraction index and photodiode array, respectively). Phenolic composition (*e.g.*, phenolic acids and flavonoids) was also analysed by chromatographic and mass spectrometry techniques, and the antioxidant activity was also accessed through free radicals scavenging activity, reducing power and inhibition of lipid peroxidation in brain homogenates, for methanol extracts as for infusions.

In recent years, studies focused on the evaluation of synergistic effects of combined plants are emerging and seem to highlight the potential of the mixtures when compared with the individual plants. These three plants are examples of medicinal plants with antioxidant properties by their own, but that can be improved when mixed. In the present work, the antioxidant activity and phenolic compounds were determined in the infusions prepared from the individual plants, as mentioned above, and from mixtures of these plants in different proportions.

C. citratus revealed the highest content of α -tocopherol, total tocopherols, glucose, sucrose, succinic and ascorbic acids, with the highest β -carotene bleaching and lipid peroxidation inhibitions; luteolin 2''-*O*-rhamnosyl-6-*C*-glucoside was the main compound in its methanolic extract. *P. tridentatum* presented the highest fructose and total sugars content, revealing the highest free radicals scavenging activity and reducing power; dihydroflavonol and isoflavone derivatives were mainly detected in the methanolic extract. Finally, *G. globosa* showed the highest organic acids concentration, being kaempferol 3-*O*-rutinoside the most abundant phenolic compound in the methanolic extract; betacyanins were also identified in this sample.

The phenolic profile was very similar in the methanolic extracts and infusions. Regarding infusions, *P. tridentatum* > *C. citratus* > *G. globosa* was the order observed for antioxidant efficacy, which can be related to their different composition in phenolic compounds namely, flavonoids. Synergism was the main effect observed among the

tested mixtures, mainly for the infusions prepared from the plants in proportion 40%:60% (either *P. tridentatum* and *C. citratus*; or *G. globosa* and *C. citratus*). The infusion obtained with 40% of *P. tridentatum* and 60% of *C. citratus* gave the highest antioxidant properties, due to the increasing percentage of the individual plant with the highest antioxidant activity, in comparison with the mixture 25%:75%.

As far as we know, this is the first study reporting chemical composition of *G. globosa* and *C. citratus*. It is very interesting to study the phytochemical composition of these plants, and their properties given the importance of their consumption. The present study also validates the commercialization of the studied species combined in specific proportions.

CAPÍTULO I



I. INTRODUÇÃO

Os sistemas de medicina tradicional foram e continuam a ser um tópico de importância global. A Organização Mundial de Saúde (WHO, 2014) estima que em muitos países desenvolvidos uma grande parte da população recomeça a procurar práticas descritas pela medicina tradicional e a reutilizar plantas para tratamentos de saúde primária. Apesar da medicina convencional estar mais acessível nestes países, os medicamentos à base de plantas mantêm alguma popularidade devido a razões históricas e culturais. Um crescente número de pessoas destes países desenvolvidos são adeptos de terapias alternativas ou complementares, incluindo o recurso a plantas medicinais. Cada vez mais as espécies que possuem interesse medicinal estão sujeitas a avaliação de qualidade e validação científica para garantir a qualidade e segurança e facilitar o seu emprego complementar na medicina (WHO, 2014).

Contudo, a informação relativa à segurança e eficácia dos extratos e princípios ativos de origem vegetal é ainda escassa, tal como são pouco conhecidos os efeitos da sua utilização como um todo e combinada com outros produtos. Em muitos países o mercado de medicamentos à base de plantas está pouco regulado, e estes produtos muitas vezes não são registados nem controlados. Garantir a segurança, qualidade e eficácia dos fitoterápicos e destes produtos naturais tornou-se então uma tarefa chave em todo o mundo e, em particular, nos países desenvolvidos e industrializados. Tanto os consumidores como os profissionais de saúde necessitam de informação fiável para que a utilização destes produtos seja encarada de uma forma segura e eficaz (WHO, 2014).

1.1. ETNOBOTÂNICA E ETNOFARMACOLOGIA

O termo etnobotânica, foi apresentado pela primeira vez pelo cientista norte-americano John Harshberger em 1896 que o utilizou para designar "o estudo do uso das plantas pelos seres humanos". Esta ciência relaciona os seres humanos e plantas em toda a sua complexidade baseando-se numa observação detalhada do uso que uma sociedade

faz das plantas, incluindo todas as crenças e práticas culturais associadas a essa sociedade (Ghorbani et al., 2006).

Etnofarmacologia é definida como "a exploração científica interdisciplinar dos agentes biologicamente ativos, tradicionalmente empregados ou observados pelo homem". As plantas medicinais são importantes elementos de sistemas médicos indígenas em muitas partes do mundo, e esses recursos são normalmente considerados como uma parte do conhecimento tradicional de uma cultura (Ghorbani et al., 2006).

A etnobotânica e etnofarmacologia têm sido encaradas como ferramentas úteis na descoberta de novos fármacos, como forma de determinar e avaliar a importância da conservação dos recursos naturais e dos saberes e práticas tradicionais, como meio para evitar a ameaça à integridade da herança cultural das sociedades humanas, ou ainda como um campo de pesquisa que requer o desenvolvimento de novas formas de parceria entre investigadores, populações indígenas, conhecedores empíricos e consumidores. Estas perspectivas, aparentemente tão diversas, têm um ponto de vista comum: os saberes locais e as práticas relacionadas com a utilização tradicional de plantas medicinais (Heinrich et al., 2006). Contudo, ainda segundo Heinrich et al. (2006), muito pouca atenção tem sido dada à história dos sistemas de transmissão de saberes empíricos, nomeadamente àqueles que nos chegaram por transmissão oral.

As abordagens interdisciplinares que incluem diferentes metodologias de várias ciências como a história, a antropologia, arqueologia, botânica, química, ecologia farmacologia e psicologia facilitam a compreensão das relações entre as plantas e as sociedades humanas ao longo do tempo (Leonti, 2011) e fazem destacar a relevância e o potencial da interligação desses métodos na identificação de temas de pesquisa no contexto da etnobotânica e da etnofarmacologia (Heinrich et al., 2006).

Alguns autores (Heinrich et al., 2009) questionam o que se pretende alcançar com os estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos. No seu entender, documentar e descrever espécies, usos e práticas é interessante, desperta curiosidade, mas não pode ser o único objetivo da investigação. Importa sim perceber de que modo esse conhecimento pode contribuir para a melhoria da saúde humana a nível local e/ou global. As pessoas e as comunidades humanas usam as plantas segundo processos complexos e dinâmicos, no entanto, a nossa compreensão desses processos ainda é bastante rudimentar (Heinrich et

al., 2009). Novas formas integradoras de olhar o uso das plantas e a evolução das farmacopeias, podem levar a uma melhor compreensão da dinâmica e evolução do uso das espécies vegetais pelo Homem. Os resultados dessa percepção e conhecimento são a base da investigação etnofarmacológica, contribuem para o aperfeiçoamento de estratégias de prevenção, diagnóstico, e tratamento de doenças físicas e mentais e proporcionam cuidados de saúde primários ao nível das comunidades rurais e urbanas, tanto nos países desenvolvidos, como nos países em vias de desenvolvimento (WHO, 2013).

1.2. ALGUMAS ESPÉCIES E USOS COM DESTAQUE NA MEDICINA TRADICIONAL

Muitas são as espécies vegetais usadas pela medicina popular Portuguesa desde há longa data. Algumas das mais emblemáticas plantas aromáticas e medicinais da flora Portuguesa são espontâneas. No entanto, a hibridação entre saberes locais, tradicionais e conhecimentos exógenos é algo que sempre aconteceu ao longo dos tempos, dando origem a um corpo de novos saberes importados de várias formas (por exemplo, viagens, migrações, meios de comunicação) que integram múltiplas abordagens e condicionam as escolhas de utilizadores e consumidores de plantas medicinais. Na sequência dessas preferências, surgem novas espécies, algumas exóticas, que são cultivadas e comercializadas para satisfazer a procura dos consumidores. Algumas adaptaram-se de tal forma que surgiram subespontâneas em várias zonas do território português, tornaram-se fundamentais nos hábitos dos consumidores e passaram a constar da própria Farmacopeia Portuguesa (Cunha & Roque, 2008).

Deste modo, neste trabalho selecionaram-se três espécies de consumo frequente em Portugal, para explorar do ponto de vista fitoquímico e etnofarmacológico, e assim contribuir para a caracterização da composição química e avaliação de propriedades bioativas, tanto das matrizes vegetais isoladas, como processadas de acordo com a forma de administração habitual (infusões) ou em misturas segundo novas alternativas de consumo.

As espécies em questão são a carqueija (*Pterospartum tridentatum* (L.) Willk) espécie espontânea da Flora de Portugal e duas espécies exóticas, uma de introdução relativamente recente, a perpétua-roxa, (*Gomphrena globosa* L.) e a erva-príncipe, (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf), planta asiática, cuja utilização em Portugal parece remontar à época dos descobrimentos.

1.2.1. *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk.

Pterospartum tridentatum (L.) Willk. é uma espécie da família das *Fabaceae* que cresce espontaneamente em Portugal em condições térmicas mediterrânicas, onde é conhecida como carqueja ou carqueija (Carvalho, 2010). Existem inúmeros propósitos para os quais esta espécie é utilizada; as flores são usadas na medicina popular para o tratamento de várias afeções, nomeadamente as relativas ao aparelho respiratório, aparelho digestivo, sistema nervoso, sistema urinário e em dermatologia; está também indicada para o controlo da diabetes (Vitor et al., 2004; Carvalho, 2010), sendo por vezes utilizada em misturas com outras plantas para essa finalidade (Vitor et al., 2004).

Alguns autores referem o uso de *P. tridentatum* para tratamento de constipações, dores de estômago, problemas intestinais, doença renal, problemas de fígado e de vesícula e também para o reumatismo (Grosso et al., 2007). É também indicado para a pneumonia, bronquite e traqueíte, dores de cabeça, tosse, para níveis baixos de pressão sanguínea e níveis altos de colesterol, diabetes e até em programas de perda de peso. Esta espécie é conhecida pelos seus efeitos diurético, purgativo, laxativo, hipotensor, hipoglicemiante, e por possuir propriedades digestivas (Neves et al., 2009; Coelho et al., 2011). A infusão das flores secas é considerada um excelente béquico e emoliente (Grosso et al., 2007).

É uma angiospérmica eudicotiledónea incluída na Ordem *Fabales*. Pertence à família *Fabaceae*, à tribo *Genisteeae*, Género *Pterospartum*. Esta espécie tem várias sinonímias, como por exemplo, *Chamaespartium tridentatum* (L.) P. Gibbs.; *Genistella tridentata* (L.) Samp ou *Genista tridentata* L, sendo esta última a mais comum.

A carqueja é um arbusto perene, que pode atingir até um metro de altura, com caules de consistência lenhosa e rígida. As raízes são apumadas e bastante longas e, por vezes,

entrelaçam-se nas raízes de outras espécies companheiras, nomeadamente do género *Pinus*, com o qual se encontra frequentemente associada na natureza.

Os caules são lenhosos, eretos ou prostrados com ramos alados lateralmente, formando falsas folhas de cor verde-escuro, recortadas e de consistência coriácea ou sublenhosa. Os ramos apresentam assim forma achatada com duas ou três expansões em forma de asa, com aspeto articulado, terminando com dois ou três dentes. As folhas, persistentes, alternas, uni folioladas e triangulares, aparentam ser tridentadas, pelos folíolos estarem unidos às estipulas.

As flores (**Figura 1B, C e D**) são de um amarelo intenso e dispõem-se em inflorescências corimbiformes, em grupos de 3 a 10, reunidas em ramalhetes curtos e apertados. Possuem indumento nas sépalas que as revestem. O fruto é uma vagem oblongo-linear com 10 a 12 mm de comprimento (Pimenta, 2012).



Figura 1. *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk. em floração (A, C e E) e detalhe da flor (B e D) (Grundtvig^{A,E}, Francisco Erit Vasquez Toro^B, Teresa Loba^C, Miguel Angel^D, <https://www.flickr.com> 2014).

1.2.2. *Gomphrena globosa* L.

Gomphrena globosa L. é uma espécie da família Amaranthaceae nativa da América Latina e vulgarmente conhecida por perpétua-roxa. Em muitos pontos do globo, as suas propriedades medicinais levaram ao consumo das suas inflorescências indicadas para o tratamento de doenças do sistema respiratório (Cai et al., 2006), de várias condições inflamatórias respiratórias, como asma brônquica, bronquite aguda e crônica ou tosse convulsa (Silva et al., 2012); a infusão das flores é utilizada para tratar a oligúria e a indigestão e também como expetorante (Rahman & Gulshana, 2014). É também utilizada na medicina tradicional para a diabetes, icterícia, hipertensão, incontinência urinária, problemas renais e da próstata (Dinda et al., 2006; Lans, 2007; Ferreres et al., 2011). Tanto quanto se sabe, apesar da ampla utilização em tais condições, a sua atividade anti-inflamatória não foi ainda cientificamente testada, assim como os seus compostos ativos e mecanismos de ação (Silva et al., 2012).

G. globosa é também uma angiospérmica eudicotiledónea que pertence à Ordem *Caryophyllales*, família *Amaranthaceae* e Género *Gomphrena* (Ilyas et al., 2013).

A perpétua-roxa (**Figura 2**) caracteriza-se por ser uma planta herbácea anual, não cespitosa com raiz fibrosa, e pode atingir entre 20-60 centímetros de altura. O caule é robusto, ramificado, com ramos levemente quadrangulares, ligeiramente entumescidos nos nós, com pilosidade rígida acinzentada. O pecíolo possui indumento cinza, o limbo é oblongo ou oval-oblongo, de base estreita, margem ondulada, e ápice agudo ou obtuso.

Inflorescência em capítulo terminal geralmente roxo, às vezes rosado ou branco. Brácteas opostas, verdes, ovaladas ou cordadas, no ápice as brácteas são ovais brancas ou roxas, bractéolas roxas, lanceoladas triangular mais longas que as brácteas. Tépalas recobertas com uma substância lanosa branca e ápice acuminado. Sementes castanhas brilhantes em forma de rim (Zhengyi et al., 2004).



Figura 2. *Gomphrena globosa* L. em floração (C e E) E detalhe da flor (A, B e D) (Nobuhiro Suhara, <https://www.flickr.com> 2014).

1.2.3. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf

Cymbopogon citratus (DC.) Stapf é muito utilizada em países tropicais nomeadamente no Sudeste Asiático (Negrelle & Gomes, 2007), Continente Africano e Países da América do Sul onde é reconhecida como importante fonte de remédios tradicionais. Em Portugal, é conhecida por erva-príncipe ou chá-de-príncipe e é muito apreciada pelo seu aroma e sabor cítrico. A sua aplicação é muito variada: o óleo essencial de folha é utilizado na alimentação, indústrias de perfumaria, sabão, cosméticos, produtos farmacêuticos e como inseticida (Francisco et al., 2011). Por exemplo, em Angola é frequentemente usada na medicina popular, no tratamento de perturbações gastrointestinais e como antiespasmódico, anti-inflamatório, antipirético, e diurético (Machado et al., 2012).

Em muitos países, a infusão e a decocção desta planta são usadas para o tratamento de estados febris e como relaxante e hipnótico. É utilizada também para controlar estados

emocionais e como um agente antidepressivo (Figueirinha et al., 2008). É recomendada para o tratamento de inflamações, distúrbios digestivos, diabetes e distúrbios do sistema nervoso (Cheel et al., 2005; Francisco et al., 2011; Francisco et al., 2013). De acordo com Novais *et al.* (2004.), a infusão é utilizada como analgésico gástrico, anti-inflamatório intestinal, antiespasmódico renal, para doenças da vesícula biliar, enjoo, e para doenças da bexiga. O óleo essencial de erva-príncipe, também tem sido usado para tratar uma grande variedade de outros problemas de saúde, tais como acne, pé de atleta, transpiração excessiva, flatulência, dores musculares, pele oleosa e sarna (Schaneberg & Khan, 2002).

Vários trabalhos investigaram a sua atividade antioxidante, antinociceptiva, entre outras (Shah et al., 2012). Alguns estudos realizados com extratos de folhas de *C. citratus* demonstraram atividade anti-inflamatória, efeito hipotensor, vaso-relaxante e atividade diurética. Demonstraram também eficácia contra o stresse oxidativo e possuem ainda propriedades quimiopreventivas no caso de cancro (Figueirinha et al., 2008). Outros investigadores atribuem-lhe propriedades hipoglicemiantes, hipolipemiantes, ansiolíticas e efeitos sedantes (Adeneye & Agbaje 2007; Blanco et al., 2009; Koh et al., 2012). No entanto, todo o potencial medicinal destas plantas ainda não está exaustivamente estudado (Gbenou et al., 2013).

C. citratus (**Figura 3**) é uma angiospérmica monocotiledónea incluída na Ordem *Cyperales*. Pertence à família *Poaceae*, Género *Cymbopogon*.

É uma espécie de origem tropical. Trata-se de uma planta perene, vivaz e cespitosa (hemicriptófito) ou seja gramínea de touça, os colmos podendo atingir 1-2 metros de altura, as lâminas foliares de revestimento glauco com ambas as superfícies ásperas ou escamosas, diminuindo gradualmente até à base.

A inflorescência é uma panícula composta por vários pares de cachos espiciformes (espiguetas) de eixos finos e caídos. Espiguetas aos pares, uma séssil com uma flor superior hermafrodita, a outra espiguetas pedunculada, com duas flores masculinas ou estéreis. As glumas mais ou menos coriáceas ou membranáceas são mais compridas do que as flores, espiguetas linear séssil e lanceolada, as glumelas exteriores (lemnas) são membranáceas, a superior estreita, inteira, ligeiramente bilobulada frequentemente com uma arista geniculada. O ovário é glabro com dois estiletos e fruto é uma cariopse (Zhengyi et al., 2006).



Figura 3. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. em arbusto (B), detalhe das folhas (A, C e E) e detalhe da inflorescência (D), (J. Gil^A, Jan Demman^B, Missouri Botanical Garden^C, Tony Rood^D, Layla Dishman^E, <https://www.flickr.com> 2014).

1.3. FITOQUÍMICOS DAS PLANTAS

Os fitoquímicos (compostos biologicamente ativos presentes nas plantas) têm vindo a suscitar um interesse crescente devido aos seus reconhecidos benefícios para a saúde nomeadamente, na proteção contra várias doenças. De facto, as propriedades antioxidantes de vários compostos de origem vegetal (polifenóis, vitamina C, vitamina E, entre outros) têm sido amplamente divulgadas, visto serem capazes de proteger as células do organismo em situações de stresse oxidativo, através de uma variedade de mecanismos complementares e sinérgicos reduzindo, assim, o risco de doenças crónicas (Costa et al., 2012).

Os compostos bioativos presentes nos alimentos de origem vegetal, têm sido associados à redução do risco de muitas doenças crónicas. Estima-se que mais de 5000 fitoquímicos tenham sido já identificados, mas uma grande percentagem permanece ainda desconhecida, necessitando de identificação para que os seus benefícios para a saúde

sejam inteiramente compreendidos. Contudo, são cada vez mais convincentes as evidências que sugerem os benefícios dos fitoquímicos presentes em frutas e vegetais nomeadamente, o seu envolvimento no combate ao stress oxidativo induzido por radicais livres e que está envolvido na etiologia de uma grande variedade de doenças crónicas (Liu, 2003).

Dentro da grande variedade de fitoquímicos, os que apresentam maior interesse devido ao seu elevado potencial antioxidante são os tocoferóis, ácidos orgânicos (incluindo o ácido ascórbico), os açúcares redutores e os compostos fenólicos.

1.3.1. Vitaminas

1.3.1.1. Tocoferóis

A vitamina E (constituída por tocoferóis e tocotrienóis) (Figura 4) é reconhecida pela sua eficaz inibição da oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos. Como a vitamina E é sintetizada apenas pelas plantas, é um nutriente dietético muito importante para os seres humanos e animais (Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996). Entre as oito formas de vitamina E, α -tocoferol é a isoforma biologicamente mais ativa. Estes são constituídos por um anel cromanol, que lhes confere atividade antioxidante pela presença do grupo hidroxilo, e uma cauda fitilo que não possui atividade. A vitamina E interrompe a peroxidação lipídica doando o hidrogénio fenólico a radicais peroxilo, dando origem a radicais tocoferoxilo que, apesar de serem também radicais, não possuem capacidade reativa sendo incapazes de dar continuidade à reação oxidativa em cadeia. A vitamina E é o único grande antioxidante lipossolúvel encontrado no plasma, eritrócitos e tecidos, permitindo assim que sejam protegidos e mantenham a sua integridade a nível das estruturas lipídicas, principalmente das membranas (Ferreira et al., 2009; Carochó & Ferreira, 2013).

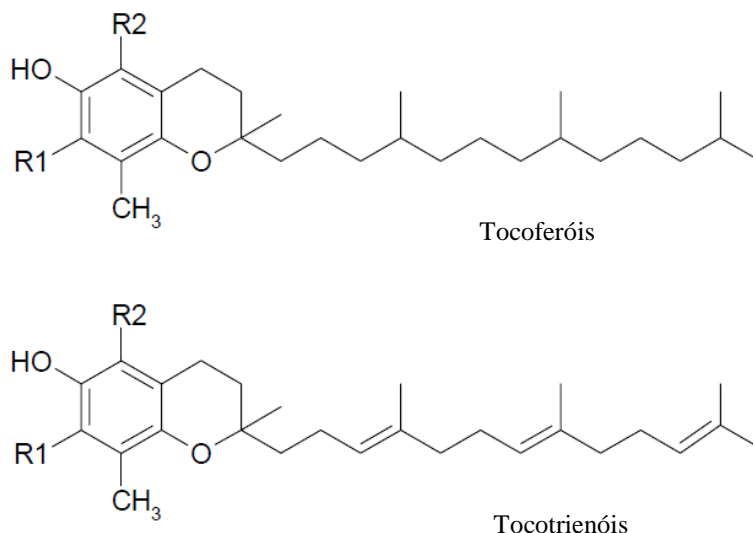


Figura 4. Estrutura química dos tocoferóis e dos tocotrienóis (α -tocoferol/tocotrienol: R1=R2=CH₃; β -tocoferol/tocotrienol: R1=H, R2=CH₃; γ -tocoferol/tocotrienol: R1=CH₃, R2=H; δ -tocoferol/tocotrienol: R1=R2=H).

1.3.1.2. Vitamina C

A vitamina C (**Figura 5**) e a vitamina E são nomes genéricos para designar respetivamente o ácido ascórbico e, como já foi referido, os tocoferóis. A vitamina C inclui dois compostos com atividade antioxidante: ácido L-ascórbico e ácido L-desidroascórbico, que são ambos absorvidos ao longo do trato gastrointestinal e podem alternar enzimaticamente *in vivo*. O ácido ascórbico é um eficiente captador de espécies reativas nomeadamente, anião radical superóxido, peróxido de hidrogénio, radical hidroxilo, singlete de oxigénio e óxido de azoto (Carocho & Ferreira, 2013).

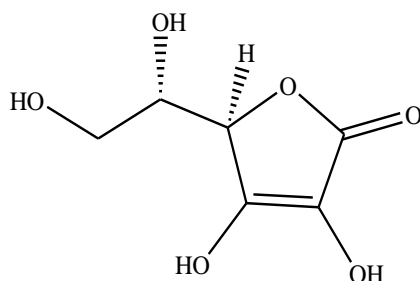


Figura 5. Estrutura química do ácido L-ascórbico.

As espécies reativas de oxigénio (radicais hidroxilo, peróxido, etc.) reagem com a vitamina E, dando origem a um radical fenoxilo fracamente reativo (vit.E[•]). A vitamina C reage depois com este radical vit E[•] produzindo um radical de vitamina C (vit C[•]) e desta reação regenera-se a vitamina E (Ferreira et al., 2009).

1.3.2. Ácidos orgânicos

Outros compostos nutricionalmente importantes são os ácidos orgânicos. Estes compostos são produzidos principalmente nas mitocôndrias através do ciclo de Krebs e, em menor grau, no glioxissoma. Acredita-se que alguns ácidos orgânicos podem ter uma atividade biológica, e assim, possuir um impacto significativo na saúde humana (Morales et al., 2014). Os ácidos orgânicos têm uma reduzida suscetibilidade para sofrer modificações durante o processo de armazenamento, o que não acontece com os pigmentos e compostos aromáticos. Mais importante ainda é o papel que estes ácidos desempenham na proteção contra várias doenças devido à sua capacidade antioxidante (como é o caso dos ácidos tartárico, málico, cítrico ou succínico) nomeadamente, de quelatar metais ou deslocalizar a carga eletrónica de radicais livres (Barros et al., 2013).

O ácido málico está envolvido na respiração e fotossíntese. Este ácido orgânico assim como os ácidos cítrico e oxálico foram propostos como estando envolvidos no transporte de catiões e em processos decorrentes na rizosfera, incluindo a captação de nutrientes, desintoxicação metálica, redução do stresse oxidativo das raízes, desagregação mineral e atração microbiana. Os ácidos orgânicos são também conhecidos pela sua influência nas propriedades organolépticas de alimentos vegetais, e pela sua utilidade na autenticidade e qualidade destas matrizes, incluindo a estabilidade microbiana e consistência do produto. São também largamente utilizados como aditivos alimentares no fabrico de bebidas, sumos de frutas e vegetais. Os principais ácidos utilizados para enriquecer bebidas são os ácidos cítrico, málico e tartárico, utilizados como acidificantes, e o ácido ascórbico usado como antioxidante (Pereira et al., 2013).

1.3.3. Açúcares

Os glúcidos ou hidratos de carbono são compostos orgânicos de grande importância na natureza, resultantes do metabolismo primário das plantas (Wade, 1999). Incluem os açúcares, glúcidos de baixa massa molecular, que são doces e solúveis em água. Alguns possuem capacidade redutora e, por isso, são designados por açúcares redutores (Demiate et al. 2002; Cunha, 2005). São conhecidos por serem um dos principais produtos da fotossíntese, substratos respiratórios, assim como uma forma de transporte e armazenamento de carbono. Estes compostos determinam a tolerância das plantas a baixas temperaturas e outros fatores ambientais adversos (Glyad, 2002). A determinação da composição em açúcares é importante para a caracterização dos processos fisiológicos e bioquímicos das plantas (Cunha et al., 2010).

Os monossacáridos são as unidades básicas mais importantes, que incluem principalmente hexoses redutoras (glucose, glucosamina, galactose, manose, etc.) e pentoses (ribose, arabinose, etc.). A lactose e a maltose são dissacáridos que fazem parte dos açúcares redutores, também responsáveis pela atividade antioxidante (Paulus & Klockow, 1996; Guimarães et al., 2009). As propriedades antioxidantes dos polissacáridos são geralmente influenciadas pelas suas características químicas, tais como a massa molecular, grau de ramificação, tipos de monossacáridos, associações intermoleculares de polissacáridos, ramificação glucosídica, e modificação de polissacáridos (Liu et al., 1997). Todos os monossacáridos são redutores e o mecanismo está relacionado com a formação de um enediol, função fortemente redutora que interconverte aldoses em cetoses (Demiate et al. 2002). Os monossacáridos, devido às propriedades redutoras, fixam com facilidade o oxigénio, o que origina, na maioria dos casos, a passagem do grupo carbonilo a carboxilo. Os dissacáridos também podem ser redutores quando a ligação glucosídica implicar a função redutora de um monossacárido e um hidroxilo alcoólico de outro monossacárido (Cunha, 2005).

Os principais açúcares redutores são a frutose, a glucose, a maltose e a lactose. A glucose, em meio alcalino, é rapidamente transformada em enediol, levando à formação de frutose e de manose. Este composto ao ser oxidado à função aldónica causa a redução dos iões cúpricos. Quanto ao mecanismo de reação, este é semelhante para todos os

monossacáridos. A sacarose, sendo formada por glucose e frutose, pode converter-se em dois monossacáridos redutores se sofrer ação enzimática ou hidrólise ácida (Demiante et al. 2002). A **Figura 6** apresenta alguns dos açúcares mais abundantes nas plantas.

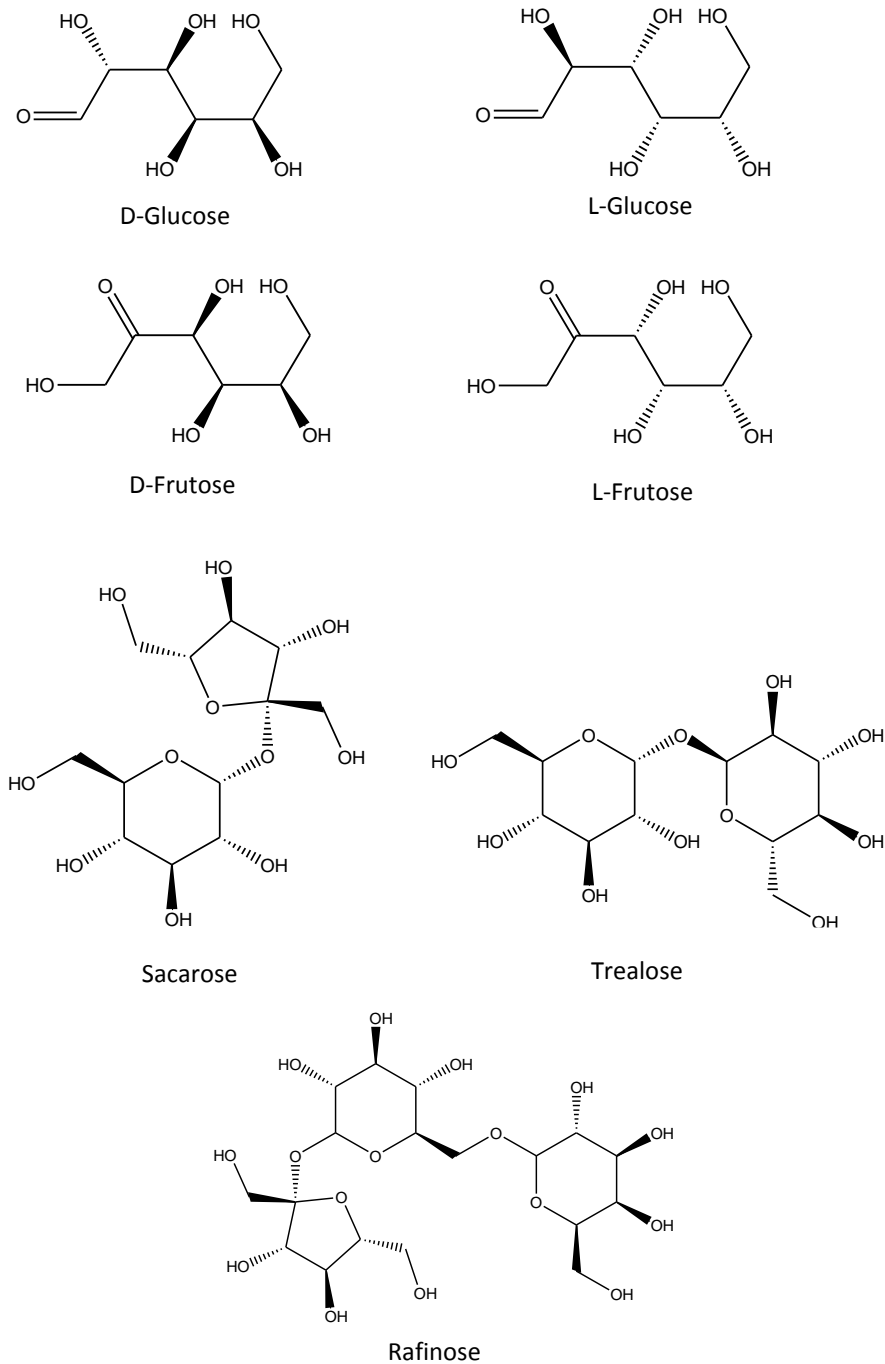


Figura 6. Estrutura química de açúcares encontrados em plantas.

1.3.4. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são comumente encontrados tanto em plantas comestíveis como nas não comestíveis, sendo caracterizados por vários efeitos biológicos, incluindo atividade antioxidante. Extratos de frutas, ervas, legumes, cereais e outros materiais vegetais ricos em compostos fenólicos possuem cada vez maior interesse na indústria alimentar, por serem capazes de retardar a degradação de lípidos por oxidação e, assim, melhorar a qualidade e o valor nutricional dos alimentos (Kähkönen et al., 1999).

Estes compostos são moléculas aromáticas hidroxiladas, possuindo um ou mais anéis aromáticos, com um ou mais grupos hidroxilo, que estão presentes, como já foi referido, em muitos dos alimentos presentes na nossa dieta, mais precisamente em frutas e vegetais, e constituem alguns dos compostos bioativos mais potentes e terapêuticamente úteis. Os compostos fenólicos são acumulados como produtos finais resultantes das vias de síntese do acetato e do shikimato, e podem ir desde pequenas e simples moléculas (ácidos fenólicos, fenilpropanoides, flavonoides) até compostos altamente polimerizados (lenhinas, melaninas, taninos), sendo os flavonoides os compostos mais comuns (Ferreira et al., 2009).

Os flavonoides (**Figura 7**) são antioxidantes que agregam flavonóis, antocianinas, isoflavonoides, flavanonas e flavonas. Todos estes sub-grupos de compostos partilham o mesmo esqueleto de difenilpropano ($C_6C_3C_6$). As flavanonas e as flavonas encontram-se, geralmente, nos mesmos frutos e estão ligadas por enzimas específicas, enquanto os flavonoides e flavonóis não partilham este fenómeno e raramente são encontrados juntos. As antocianinas estão também ausentes nas plantas ricas em flavanonas. As propriedades antioxidantes dos flavonoides são resultado dos grupos hidroxilo fenólicos ligados aos anéis da estrutura, podendo estes atuar como agentes de redução, doadores de hidrogénio, supressores do singleto de oxigénio, captadores de radicais superóxido e até como quelantes de metais. Estes compostos podem ainda ativar enzimas antioxidantes, reduzir radicais α -tocoferoxilo, inibir oxidases, mitigar o stresse nitrosativo e aumentar níveis de ácido úrico e de moléculas de baixa massa molecular (Carocho & Ferreira, 2013).

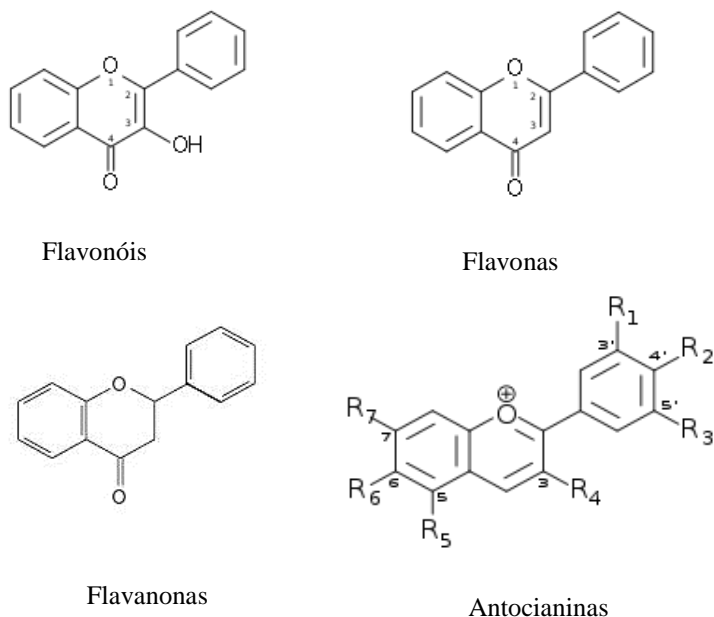


Figura 7. Estrutura química de diferentes classes de flavonoides.

1.4. PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES

Vários estudos demonstram que as espécies reativas de oxigénio estão na etiologia de várias doenças como cancro, aterosclerose, diabetes, asma, etc., pois atacam lípidos, proteínas e ácidos nucleicos (Li et al., 2013).

Espécies reativas de oxigénio é o termo coletivo para designar os radicais de oxigénio (incluindo o hidroxilo e o superóxido) e algumas espécies não radicalares derivadas do oxigénio, como o peróxido de hidrogénio, que podem facilmente gerar radicais livres e/ou causar dano oxidativo, este define-se como um grave desequilíbrio entre a formação de espécies reativas de oxigénio e a proteção antioxidante, que tende para o primeiro causando dano oxidativo excessivo (Halliwell, 2011). Os radicais livres definem-se por qualquer átomo ou molécula que possui eletrões desemparelhados na orbital exterior, são produzidos durante o normal metabolismo de células aeróbias, e são geralmente instáveis e muito reativos. Uma vez produzidos, a maioria dos radicais livres são neutralizados pelas defesas antioxidantes das células. Estas espécies apresentam, de igual modo, benefícios, quando estão presentes em concentrações baixas ou moderadas,

tais como funções fisiológicas de sinalização e regulação celular. Não obstante, o equilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigénio e as defesas antioxidantes pode ser perturbado, quer pela sobreprodução de espécies reativas de oxigénio, ou pela perda das defesas antioxidantes por parte das células. Este desequilíbrio é também conhecido como stresse oxidativo (Ferreira et al., 2009).

Halliwell e Gutteridge (1995) definiram antioxidantes como “qualquer substância, que quando presente a baixas concentrações, comparativamente com a percentagem do substrato oxidável, atrasa significativamente ou inibe a oxidação desse mesmo substrato”; mais tarde, redefiniram-nos como “qualquer substância que atrasa, previne ou remove o dano oxidativo para determinada molécula alvo” (Halliwell, 2007). Uma outra propriedade que um composto deve possuir para ser considerado como antioxidante é a capacidade de após captar o radical, formar um novo radical estável através da ligação do hidrogénio intramolecular em oxidações posteriores (Carocho & Ferreira, 2013).

Apesar do corpo humano possuir um sistema de defesa natural que o protege contra efeitos nocivos dos radicais livres e espécies reativas de oxigénio/azoto/enxofre, a sociedade moderna enfrenta um problema global de doenças crónicas como doenças cardiovasculares e vasculares cerebrais, diabetes e cancro, devido a hábitos de dieta incorretos e stresse do dia-a-dia (Costa et al., 2012). Os seres humanos produzem eles mesmos muitos antioxidantes (como por exemplo, superóxido dismutase, catalases, glutathione reduzida e peroxiredoxinas), como mencionado anteriormente, estas espécies antioxidantes que são produzidas internamente podem combater grandes quantidades de espécies reativas de oxigénio. Não obstante, apesar da sua grande eficiência, os antioxidantes endógenos não são suficientes, sendo necessário obter alguns deles através da dieta (fonte exógena) (Carocho and Ferreira, 2013). Dietas ricas em frutas, grãos e vegetais têm sido apontadas como ricas em antioxidantes, constituindo bons exemplos de alimentos funcionais, isto é, alimentos que promovem benefícios fisiológicos adicionais para além das características nutricionais normais. As plantas aromáticas e medicinais têm também sido descritas como fonte de antioxidantes (Halliwell, 2012; Gonçalves et al., 2013).

Os antioxidantes exógenos, como já referido, são obtidos principalmente pela dieta, e é aí que as plantas medicinais podem constituir boas opções devido ao seu potencial antioxidante. As plantas têm muitos antioxidantes (*e.g.*, tocoferóis, açúcares redutores,

ácidos orgânicos incluindo ácido ascórbico, e compostos fenólicos), uma vez que estão expostas a stresse oxidativo severo por produzirem oxigénio durante a fotossíntese (Halliwell, 2012). *P. tridentatum*, *G. globosa* e *C. citratus* podem ser utilizadas como fontes exógenas de antioxidantes.

1.4.1. Métodos de avaliação da atividade antioxidante

De forma a avaliar a eficácia de diversos antioxidantes, têm vindo a fazer-se vários estudos baseados em métodos realizados em diferentes condições, embora se verifique, muitas vezes, uma falta de correlação entre as atividades determinadas por diferentes ensaios, em diferentes laboratórios, numa mesma matriz, o que pode ser justificado pela multiplicidade de espécies ativas e mecanismos reacionais envolvidos no stresse oxidativo de um organismo. Torna-se, assim, necessária a discussão das vantagens e desvantagens associadas a cada método relacionadas com a instrumentação necessária, os mecanismos, a simplicidade, o método de quantificação e a relevância biológica (Niki, 2010).

Tendo em conta que existem vários tipos de potencial antioxidante, devem ser aplicados os respetivos métodos de forma a incluir os vários modos de ação, não havendo, portanto, nenhum método suficiente por si só (Huang et al., 2005).

Quando se tratam de extratos vegetais, a capacidade antioxidante não depende apenas da composição do extrato, mas também das condições do ensaio. Os métodos de avaliação da capacidade antioxidante total *in vitro* baseiam-se na transferência de átomos de hidrogénio e/ou na transferência de eletrões.

No primeiro, o átomo e o substrato entram em competição por radicais peróxilo (Huang et al., 2005); não dependem do solvente nem do pH (Wright et al., 2001), e são de rápida ação, no entanto, espécies redutoras como os metais podem causar interferências no método (Prior et al., 2005). Os métodos baseados na transferência de eletrões, medem a capacidade de um antioxidante reduzir um oxidante, que ao sofrer redução muda de cor, estando esta variação da cor relacionada com a concentração de antioxidante presente (Huang et al., 2005). Dependem do pH e a avaliação da capacidade

antioxidante é feita com base na percentagem de diminuição da formação do produto, sendo estas reações quase sempre longas (Wright et al., 2001). A diferenciação entre estes dois mecanismos pode tornar-se difícil uma vez que ocorrem quase sempre em conjunto em todas as amostras (Karadag et al., 2009).

1.4.1.1. Ensaio da capacidade de captação de radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH)

Uma vantagem deste método é, o facto de não ser afetado por reações laterais como a quelatação de iões metálicos e a inibição enzimática, ao contrário de certos radicais produzidos em laboratório (Amarowicz et al., 2004).

Imediatamente a seguir à sua preparação, uma solução de DPPH apresenta uma cor violeta forte com um máximo de absorção a 517 nm; quando em contacto com um antioxidante, esta coloração fica menos intensa, logo, as espécies antioxidantes têm a capacidade de captar DPPH convertendo-o a 2,2-difenil-1-picril-hidrazina (**Figura 8**) que, por sua vez, apresenta uma coloração amarela pálida, o que se reflete numa diminuição da absorvância a 517 nm (Ferreira & Abreu, 2007).

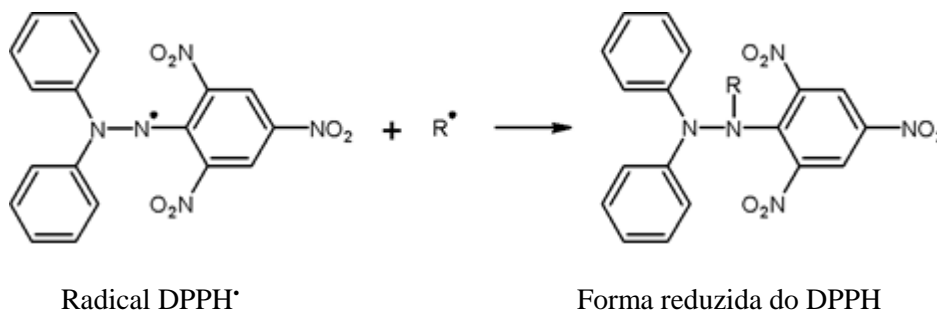


Figura 8. Redução do DPPH[•].

A concentração de antioxidante que causa uma diminuição de 50% da quantidade inicial de DPPH é denominada EC₅₀. Trata-se de uma técnica simples e rápida, sendo portanto frequentemente utilizada; apresenta ainda a vantagem de ser possível recorrer a microplacas no caso de se tratar um grande número de amostras (Karadag et al., 2009).

No entanto, o método apresenta algumas limitações, como o facto de o DPPH só poder ser dissolvido em meio orgânico (especialmente em solventes alcoólicos) e os resultados poderem ser afetados pelas alterações do DPPH por ação da luz, do oxigénio e do tipo de solvente (Karadag et al., 2009). Para além disso, parte do DPPH coagula acima de um certo limite de percentagem de água, impossibilitando a reação com antioxidantes, o que se traduz numa diminuição da capacidade antioxidante; por outro lado, existem outros compostos com absorvância a 517 nm, como os carotenoides, podendo interferir nos resultados (Karadag et al., 2009).

Deve ainda ter-se em consideração que o DPPH é um radical estável, podendo os antioxidantes presentes na amostra interferir na redução de outros radicais envolvidos na peroxidação lipídica como os ROO^{*}, por exemplo, e não ter qualquer efeito ou agir lentamente na captação do DPPH que se torna inacessível aos mesmos (Prior et al., 2005).

1.4.1.2. Ensaio do poder redutor

A solução de ensaio de Fe(III)/ferricianeto [FeCl₃/K₃Fe(CN)₆], que apresenta uma coloração amarela, é reduzida a Fe(II) pelos agentes antioxidantes presentes na amostra, verificando-se, então, uma alteração da cor para diferentes tipos de verde ou azul; a alteração da cor pode ser medida a 700 nm (Amarowicz et al., 2004). A reação ocorre em meio ácido (pH = 3,6) para manter a solubilidade do ferro (Karadag et al., 2009). A reação em pH baixo diminui o potencial de ionização que impulsiona a transferência de eletrões e aumenta o potencial redox, causando uma mudança no mecanismo de reação (Prior et al., 2005).

A química dos ensaios baseados no ferro pode ser resumida pela seguinte equação:



Onde L é o ligando cromogéneo seletivo para o ião ferroso, que produz o complexo corado Fe(II)-L em resultado da reação redox associada.

Trata-se de um ensaio simples, rápido, económico e bastante fiável, que pode ser aplicado de forma manual, automatizada ou semi-automatizada (Prior et al., 2005). Mas,

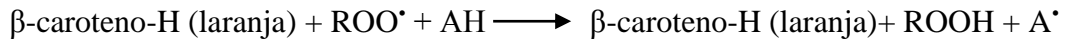
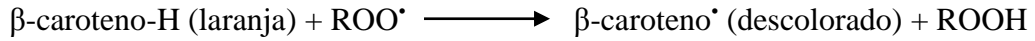
nem todos os redutores capazes de reduzir o Fe(III) podem ser considerados antioxidantes; qualquer substância capaz de doar eletrões com potencial redox inferior ao par Fe(III)/Fe(II) pode influenciar o ensaio. Por outro lado, um antioxidante capaz de reduzir pro-oxidantes, pode não ser capaz de reduzir o Fe(III) não sendo detetados os compostos que captam radicais (Karadag et al., 2009). Outro ponto a ter em consideração é a produção simultânea de Fe(II), que é um conhecido pro-oxidante e pode resultar na produção adicional de radicais, como HO[•] a partir de H₂O₂. Este radical livre é um dos mais nocivos encontrados *in vivo*. Finalmente, compostos que absorvem no mesmo comprimento de onda podem interferir na determinação, causando sobrestimação dos resultados (Magalhães et al., 2008).

1.4.1.3. Ensaio de inibição da descoloração do β-caroteno

Os lípidos constituintes do organismo, como o colesterol, os ácidos gordos polinsaturados (PUFA) ou as correspondentes formas esterificadas podem sofrer ataques por parte de radicais livres, responsáveis pela peroxidação lipídica, sendo assim induzidas alterações nas membranas biológicas, o que origina também compostos potencialmente tóxicos. A função dos antioxidantes é retardar este processo em alimentos e amostras biológicas (Blair, 2008).

Quando auto-oxidados pela luz, calor ou radicais ROO[•], os carotenoides podem sofrer uma rápida descoloração (Karadag et al., 2009). Também o β-caroteno sofre descoloração quando se encontra na presença de um radical linoleato. O ácido linoleico possui um grupo metileno bis-álílico ativo ao qual é removido um átomo H durante a oxidação, formando-se assim um radical pentadieno que ataca o β-caroteno insaturado para readquirir átomos de H. Quando isto acontece, os carotenoides perdem a sua cor laranja, o que pode ser verificado espectrofotometricamente a 470 nm (Amarowicz et al., 2004; Burda & Oleszek, 2001).

Para inibir a descoloração do β-caroteno basta adicionar uma amostra contendo antioxidantes ou extratos vegetais (Laguerre et al., 2007) pois estes podem ceder átomos de H aos radicais, prevenindo assim a descoloração do β-caroteno:



Este método tem como vantagem, o facto de não requerer instrumentação especializada (Amarowicz et al., 2004), tendo também sido sugerida uma versão em microplacas para determinações de rotina (Roginsky & Lissi, 2005). Outra vantagem associada a este método é a sua aplicabilidade em ambientes lipofílicos e hidrofílicos. Além disso, o ensaio de descoloração do β -caroteno pode detetar tanto a ação antioxidante como pro-oxidante de compostos (Ndhlala et al., 2010). As limitações frequentemente apontadas a este método são, o facto de o β -caroteno poder sofrer descoloração a 470 nm por vias múltiplas, por isso interpretação dos resultados pode ser difícil (Ndhlala et al., 2010).

1.4.1.4. Ensaio das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Outro método muito utilizado para detetar a peroxidação lipídica é o ensaio TBARS, que se baseia na medição de malondialdeído (MDA) formado por clivagem de ácidos gordos insaturados após oxidação de um substrato lipídico. Quando a formação deste composto provem de ácidos gordos com um número de ligações duplas inferior a três, dá-se a oxidação secundária de compostos carbonilo primários (Fernández et al., 1998). A posterior reação entre o MDA e o ácido barbitúrico (TBA) origina TBARS (**Figura 9**) que possuem uma coloração rosa que pode ser medida por espectrofotometria a 532 nm (Ng et al., 2000).

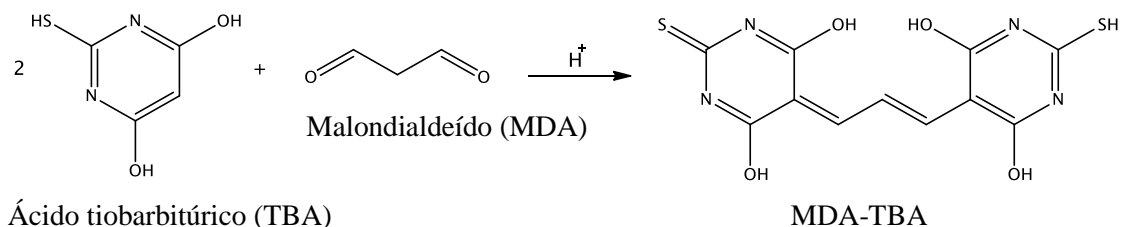


Figura 9. Reação de MDA e TBA na formação de TBARS.

Numa primeira fase deste ensaio, um íão de um metal de transição ou um radical livre oxida o substrato, só então, e após adição de TBA, se verifica a extensão da oxidação que pode ser medida espectrofotometricamente. Verifica-se, normalmente, uma diminuição da absorvância, uma vez que um antioxidante é adicionado. Assim sendo, os resultados são expressos em percentagem de inibição da oxidação (Antolovich et al., 2002).

No ensaio TBARS, a deteção é feita por espectrofotometria e o material requerido não é altamente específico. Recentemente, o MDA-TBA pode também ser medido por HPLC com UV/VIS ou deteção de fluorescência, ou por GC-MS, após derivatização (Niki, 2010). Este ensaio TBARS, é muitas vezes criticado por ser inespecífico, pois mede a formação não só de MDA, mas também de outros oxocompostos (Ndhlala et al., 2010).

1.5. SINERGIA ENTRE COMPOSTOS

Na última década testemunhamos a ascensão e rápida mudança do paradigma da terapia química, envolvendo a gradual transição da terapia mono-substância, que há muito tem sido defendida com grande veemência, para uma terapia multifármaco. Isto deve-se à ineficiência, problemas de resistência e efeitos secundários que aparecem quando se recorre a mono substâncias sintéticas, especialmente em tratamentos de doenças crónicas como cancro, aterosclerose, diabetes e inflamação. Uma vez que muitos investigadores são defensores da utilização de combinações para obter a eficácia terapêutica ótima e para melhorar a saúde do paciente de uma forma geral, o uso de plantas medicinais, que é considerada como “multi-target herb” deve ser otimizado, devido aos seus reduzidos efeitos secundários, elevada eficácia e uma ampla variedade de compostos com atividade farmacêutica (Yang et al., 2014).

Como a medicina à base de plantas continua a aumentar de popularidade, tornou-se vital elucidar a comunidade médica e científica de forma a mostrar que existem algumas características que são únicas na fitoterapia e que contribuem tanto para a eficácia como para a segurança das aplicações de plantas medicinais. Uma delas é o conceito de sinergia resultante dos vários compostos bioativos presentes nas plantas, ao

contrário dos fármacos que contém, na maioria das vezes, um único princípio ativo (Williamson, 2001).

Torna-se importante que investigações farmacológicas sobre efeitos sinérgicos sejam confirmadas por ensaios clínicos e, em particular, sejam comparadas com fármacos sintéticos, utilizando a mesma indicação e dosagens equivalentes. Nos últimos 25 anos, mais de 200 ensaios comparativos, duplo-cego, controlados por placebo foram efetuados utilizando mono ou multi-extratos combinados, em comparação com fármacos convencionais bem conhecidos. Estes fitofármacos demonstraram equivalência terapêutica relativamente aos fármacos convencionais, com a vantagem adicional de possuírem poucos ou mesmo nenhuns dos efeitos adversos observados nos fármacos de síntese (Wagner & Ulrich-Merzenich, 2009).

O efeito sinergista e aditivo dos compostos bioativos presentes nos frutos e vegetais são responsáveis pela sua potente atividade antioxidante e, por isso, o benefício de uma dieta rica nestes alimentos é também atribuída à complexa mistura dos compostos bioativos presentes. Isto explica parcialmente porque é que um antioxidante por si só não pode substituir a combinação de compostos bioativos naturais presentes nas frutas e vegetais para alcançar benefícios para a saúde (Liu, 2003).

A avaliação da sinergia tornou-se recentemente uma área chave na investigação da fitomedicina, de modo a encontrar uma explicação científica racional para a superioridade terapêutica, já antiga, de muitas combinações da medicina tradicional sobre os constituintes singulares (Wagner & Ulrich-Merzenich, 2009). Recentemente, têm aparecido estudos da avaliação dos efeitos sinérgicos de plantas combinadas e parecem evidenciar o potencial das misturas em comparação com as plantas isoladas (Pereira et al., 2014). Os fitofármacos mais eficazes estão disponíveis no mercado como extratos de plantas complexos, acreditando-se sempre que interações sinérgicas entre os compostos individuais ou de misturas de plantas são uma parte importante do seu efeito terapêutico (Williamson, 2001). Acredita-se também que as ações dos suplementos dietéticos por si só não substituem os benefícios para a saúde conseguidos com uma dieta rica em frutas, vegetais e grãos integrais, porque, tomados sozinhos, os antioxidantes individuais estudados em ensaios clínicos, não parecem possuir efeitos preventivos consistentes. O composto puro isolado, ou perde a sua bioatividade ou não se comporta da mesma forma

quando conjugado com os restantes compostos presentes na alimento como um todo (Liu, 2004).

Os extratos de plantas consistem numa mistura complexa de compostos importantes, agentes concomitantes e outras substâncias; a natureza complexa das plantas medicinais pode servir como um valioso recurso de sistemas de base para a descoberta de medicamentos multialvo graças ao seu potencial para tratamento por efeitos sinérgicos. De facto, muitos investigadores defendem a abordagem combinada de modo a atingir a eficácia terapêutica ótima e melhorar o estado de saúde do paciente de um modo geral (Yang et al., 2014).

1.6. ENQUADRAMENTO DO ESTUDO E PRINCIPAIS OBJETIVOS

Historicamente, as espécies vegetais foram e continuam a ser utilizadas para uma imensidão de propósitos, seja como alimento, espécies culinárias, medicinais, em cosméticos, para fins industriais, tecnológicos, espirituais ou ornamentais. Nos tempos modernos apesar desta tendência se manter, as plantas são muito utilizadas como complemento medicinal e como medicina alternativa. Assim sendo, as plantas desempenham um papel importante na manutenção da saúde e são amplamente utilizadas no tratamento de afeções menores assim como no tratamento de doenças crónicas (Afifi et al., 2010).

Muitos dos produtos utilizados na medicina tradicional são consumidos sob a forma de infusões. Hoje em dia, a infusão é utilizada na alimentação como uma bebida, mas também como fonte de compostos benéficos para a saúde. Devido à consciência da presença de compostos benéficos para a saúde, o consumo de infusões tem vindo a tornar-se cada vez mais popular em todo o mundo. Quase todas as infusões à base de plantas são ricas em compostos fenólicos, reconhecidos como importantes antioxidantes a incluir na dieta humana como promotores de saúde (Vidović et al., 2013). Além de metabolitos secundários/não nutrientes como os compostos fenólicos, as plantas medicinais contêm também metabolitos primários e nutrientes (*e.g.*, açúcares, ácidos orgânicos e tocoferóis) que necessitam de ser identificados e quantificados.

Nos últimos anos, alguns investigadores têm estudado diferentes extratos de amostras silvestres de *P. tridentatum*, no que diz respeito às suas propriedades antioxidantes (Pinela et al., 2011; Isailović et al., 2012; Gonçalves et al., 2013), composição em compostos fenólicos (Paulo et al., 2008), ou ambos (Vitor et al., 2004; Luís et al., 2009; Coelho et al., 2011; Coelho et al., 2012), sendo as amostras provenientes de vários países diferentes. Relativamente a *G. globosa*, são conhecidos alguns estudos relativos à composição em betacianinas e compostos fenólicos de amostras comerciais (Ferrerres et al. 2011; Silva et al., 2012), mas também existem estudos com amostras silvestres oriundas de diferentes partes do mundo (Cai et al., 2005; Saikia & Upadhyaya, 2011; Hamiduzzaman & Azam, 2012; Hamiduzzaman et al., 2012). Quanto a *C. citratus*, existem estudos relativos às suas propriedades antioxidantes (Tachakittirungrod et al., 2007; Pereira et al., 2009; Tiwari et al., 2010) e composição fenólica (Cheel et al. 2005; Figueirinha et al. 2008; Koh et al., 2012), tendo sido utilizadas amostras comerciais, cultivadas e silvestres de diferentes zonas do globo, incluindo Portugal. É, no entanto, importante ressaltar que nenhum dos estudos mencionados analisa infusões mas sim, outros tipos de extratos.

Assim, o presente trabalho avalia propriedades antioxidantes (em extratos metanólicos e infusões) e analisa detalhadamente a composição em antioxidantes (*e.g.*, tocoferóis, açúcares redutores, ácidos orgânicos e compostos fenólicos) de amostras comerciais certificadas de *P. tridentatum*, *G. globosa* e *C. citratus*, provenientes de Portugal, obtidas de acordo com os princípios de colheita sustentável e da agricultura biológica. Outro dos objetivos foi o de avaliar os efeitos sinérgicos que se manifestam quando se combinam estas espécies em diferentes proporções, tendo em conta as propriedades antioxidantes e os compostos fenólicos presentes, e validar as combinações que já se encontram disponíveis no mercado.

CAPÍTULO II



II. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. AMOSTRAS

As amostras de *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk., *Gomphrena globosa* L. e *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. foram obtidas na Ervital, uma empresa Portuguesa de Castro Daire (Portugal). Estabelecida numa região montanhosa de flora e vegetação diversificada (Montemuro, Natura 2000), a Ervital comercializa material certificado proveniente de várias espécies vegetais de duas origens: colheita sustentável de plantas silvestres locais de difícil propagação e cultivo de espécies nativas e alóctones em modo de produção biológico.

As inflorescências de *P. tridentatum* foram colhidas na primavera de 2012 (respeitando a sua fenologia e abundância) e as outras espécies estudadas foram também obtidas em 2012, resultado do seu cultivo em modo de produção biológico. Das plantas colhidas, separaram-se as partes usadas (flores na carqueja e perpétua-roxa, e folhas e caules jovens na erva-príncipe) que foram processadas utilizando métodos de secagem a baixas temperaturas (ar aquecido pela luz solar, com uma temperatura diária média de cerca de 30-32 °C, à sombra e com humidade relativa também controlada). Após secagem estes materiais foram acondicionados a granel em sacos, próprios para o efeito, selados e mantidos em condições de temperatura e humidade controladas.

A identificação botânica das amostras foi confirmada por Ana Maria Carvalho, responsável pela coleção de plantas medicinais do Herbário de Escola Superior Agrária (BRESA), do Instituto Politécnico de Bragança (Trás-os-Montes, Portugal).

O material vegetal seco cedido pela empresa foi triturado (~20 mesh) e misturado de forma a obter amostras homogéneas que foram armazenadas num exsiccador, protegidas da luz, até posterior análise.



A



B



C

Figura 10. A- *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk.: aspeto das flores secas, obtidas a partir de exemplares silvestres da Serra de Montemuro, a recolha do material vegetal tem em conta os princípios e técnicas da colheita sustentável de espécies silvestres; B- *Gomphrena globosa* L.: aspeto das inflorescências secas, obtidas a partir de plantas cultivadas em modo de produção biológico; C- *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: aspeto das folhas secas, obtidas a partir de plantas cultivadas em modo de produção biológico, todas as espécies são secas e comercializadas pela empresa Ervital, Plantas Aromáticas e Medicinais, Lda de Castro Daire. Fonte: Ervital, <http://www.ervital.pt/>.

2.1.1. Preparação de extratos metanólicos

Cada amostra (1g) foi extraída com agitação em metanol (25 mL; 25 °C a 150 rpm) durante 1 h, e subsequente filtração através de papel de filtro Whatman No. 4. Os resíduos foram re-extraídos com 25 mL de metanol (25 °C a 150 rpm) por mais 1 h. Os extratos metanólicos combinados foram evaporados a 40 °C (evaporador rotativo Büchi R-210, Flawil, Suíça) até à secura, e redissolvidos em metanol a fim de obter uma concentração final de 10 mg/mL (solução *stock*). Posteriormente, a partir da solução *stock* prepararam-se soluções metanólicas com diferentes concentrações, através de diluições sucessivas, para avaliação da atividade antioxidante e análise de compostos fenólicos.

2.1.2. Infusões

Cada uma das amostras (1 g) foi colocada em 250 mL de água destilada em ebulição, e deixou-se repousar à temperatura ambiente durante 5 min; depois, filtrou-se a pressão reduzida. As infusões obtidas foram congeladas, liofilizadas (Liofilizador Ly-8-FM-ULE) e, posteriormente, redissolvidas em água destilada para obter a solução *stock* de 10 mg/mL. Tal como no caso anterior, a partir da solução *stock* prepararam-se soluções aquosas com diferentes concentrações, através de diluições sucessivas, para avaliação da atividade antioxidante e análise de compostos fenólicos.

2.1.3. Misturas

Foram ainda preparadas infusões das seguintes misturas de amostras: *P. tridentatum* (25%) + *C. citratus* (75%); *P. tridentatum* (40%) + *C. citratus* (60%); *G. globosa* (25%) + *C. citratus* (75%); *G. globosa* (40%) + *C. citratus* (60%).

2.2. PADRÕES E REAGENTES

O acetonitrilo de grau HPLC foi obtido na Merck KgaA (Darmstadt, Alemanha), o acetato de etilo e o *n*-hexano, também grau HPLC foram adquiridos na Fisher Scientific (Lisboa, Portugal). Os ácidos fórmico e acético, de grau analítico, foram obtidos na Prolabo (VWR International, França). O trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) foi comprado na Matreya (PA, EUA). O 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) foi obtido na Alfa Aesar (Ward Hill, MA, EUA). Os padrões de ácido L-ascórbico, tocoferóis, açúcares e ácidos orgânicos foram adquiridos na Sigma (St. Louis, MO, EUA). Os padrões de compostos fenólicos foram obtidos na Extrasynthèse (Genay, France). O tocol racémico (50 mg/mL) foi adquirido na Matreya (Pleasant Gap, PA, EUA). A água foi tratada no sistema de purificação Milli-Q (TGI Pure Systems, Greenville, SC, EUA).

2.3. ANÁLISE DE FITOQUÍMICOS

2.3.1. Composição em tocoferóis

Os tocoferóis foram determinados no material seco. Adicionou-se à amostra (500 mg) uma solução de Butil-hidroxitolueno (BHT, antioxidante) em hexano (10 mg/mL, 0,10 mL) e uma solução de tocol (padrão interno) em hexano (50 µg/mL, 0,4 mL). A amostra foi homogeneizada com metanol (4 mL) no vórtex (1 min). De seguida, adicionou-se hexano (4 mL) homogeneizando-se novamente no vórtex (1 min). Posteriormente, adicionou-se uma solução aquosa concentrada de cloreto de sódio (2 mL), seguida de homogeneização (1 min) e centrifugação (5 min, 4000 g, 10 °C). O sobrenadante foi transferido para um vial previamente envolvido em papel de prata. A amostra foi re-extraída mais duas vezes com hexano. Ao extrato final foi adicionado sulfato de sódio anidro, seco sob corrente de azoto e, posteriormente, redissolvido em hexano (2 mL), filtrado com um filtro descartável LC de 0,22 µm e transferido para um

vial âmbar. Este procedimento foi otimizado e validado pelo grupo de investigação onde se inseriu este trabalho (Barros et al., 2010).

O equipamento de análise consiste num sistema integrado com uma bomba (Knauer, Smartline system 1000, Berlim, Alemanha), sistema de degaseificação (Smartline manager 5000), amostrador automático (Jasco AS-2057, Easton, MD, USA) e detetor de fluorescência (Jasco FP-2020) programada para excitar a 290 nm e emitir a 330 nm. A separação cromatográfica foi conseguida através de uma coluna Polyamide II (250 mm × 4.6 mm i.d.) em fase normal da YMC Waters (Dinslaken, Germany) operando a 30 °C (7971 R Grace oven). A fase móvel utilizada foi uma mistura de n-hexano e acetato de etilo (70:30, v/v) a um fluxo de 1 mL/min, e o volume injetado foi de 20 µL. Os compostos foram identificados por comparação cromatográfica com padrões autênticos. A quantificação foi efetuada com base nas curvas de calibração obtidas a partir de padrões comercializados de cada composto utilizando a metodologia do padrão interno (PI); o tocol racémico foi utilizado como padrão interno. Os resultados foram expressos em µg por g de massa seca.

2.3.2. *Composição em açúcares*

Os açúcares foram determinados no material seco. À amostra (1 g) foi adicionado 1 mL de padrão interno- melezitose (PI, 25 mg/mL), seguindo-se a extração com etanol 80% (40 mL) em banho a 80 °C durante 1h30 min, com agitação a cada 15 min. Após filtração para um balão, levou-se a evaporar para remoção do etanol (evaporador rotativo Büchni-210). Posteriormente, lavou-se a fase aquosa 3 vezes sucessivas com éter etílico (10 mL). Perfez-se a solução do extrato até um volume de 5 mL com água destilada, filtrou-se para um vial e analisou-se por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Este procedimento foi otimizado e validado pelo grupo de investigação onde se inseriu este trabalho (Barros et al., 2011).

Os açúcares livres foram analisados e determinados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC-RI). A análise foi efetuada por HPLC (equipamento descrito acima) utilizando um detetor de índice de

refração (Knauer Smartline 2300, Berlim, Alemanha). Os dados foram analisados utilizando o software Clarity 2.4 (DataApex). A separação cromatográfica foi conseguida numa coluna C₁₈ de fase reversa Eurospher 100-5 NH₂ (5 µm, 250mm × 4.6 mm, Knauer, Berlim, Alemanha) operando a 30 °C. A fase móvel foi de acetonitrilo/ água desionizada 70:30 (v/v) a um fluxo de 1 mL/min. Os compostos foram identificados por comparação cromatográfica com padrões. A quantificação foi efetuada utilizando o método de padrão interno; a melezitose foi o padrão interno utilizado. Os resultados foram expressos em mg por g de massa seca.

2.3.3. *Composição em ácidos orgânicos*

Os ácidos orgânicos foram determinados no material seco. Procedeu-se a uma extração da amostra (1,5 g) com ácido metafosfórico (25 mL, 25 °C, 150 rpm, 4,5%) e filtrou-se em papel Whatman nº 4. Antes da análise por cromatografia líquida ultra rápida (UFLC) acoplada a um detetor de fotodíodos (PDA- Photodiode array detector), a amostra foi novamente filtrada em filtros de nylon de 0,2 µm. Este procedimento foi otimizado e validado pelo grupo de investigação onde se inseriu este trabalho (Pereira et al., 2013).

A análise foi efetuada utilizando Shimadzu 20A series UFLC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). A separação foi atingida numa coluna SphereClone (Phenomenex, Torrance, CA, USA) C₁₈ de fase reversa (5 µm, 250 mm × 4.6 mm i.d.) termostaticada a 35 °C. A eluição foi efetuada com ácido sulfúrico (3.6mM) utilizando um fluxo de 0,8 mL/min. A deteção foi efetuada por um detetor de fotodíodos, utilizando comprimentos de onda preferenciais de 215 e 245 nm (para ácido ascórbico). Os ácidos orgânicos encontrados foram quantificados por comparação da área dos seus picos a 215 nm com curvas de calibração obtidas para padrões comerciais de cada composto. Os resultados foram expressos em mg por g de massa seca.

2.3.4. *Composição em compostos fenólicos*

Os compostos fenólicos foram determinados no material seco. A amostra de material seco (1,5 g) foi extraída com 30 mL de metanol a 150 rpm durante 1h. O extrato foi filtrado e o resíduo re-extraído mais 2 vezes. Os extratos combinados foram evaporados a 35 °C até remoção completa do metanol e filtrados em discos descartáveis LC de 0,22 µm. Este procedimento foi otimizado e validado pelo grupo de investigação de Polifenóis da Universidade de Salamanca que colaborou neste trabalho (Guimarães et al., 2013)

A análise de compostos fenólicos foi efetuada por HPLC (Hewlett-Packard 1100, Agilent Technologies), com uma bomba quaternária, com dupla deteção online levada a cabo por um detetor de díodos (DAD) usando os comprimentos de onda de 280 nm e 370 nm preferenciais e um espectrómetro de massa (MS) (API 3200 Qtrap, Applied Biosystems) ligado ao sistema de HPLC (Guimarães et al., 2013). Utilizou-se uma coluna Waters Spherisorb S3 ODS-2 C18, 3 µm (4,6x150 mm) termostaticada a 35 °C. A fase móvel foi (A) ácido fórmico/água (0,1%) e (B) acetonitrilo. O gradiente de eluição estabelecido foi isocrático 15% B até 5 min, 15-20% B até 5 min, 20-25% B mais 10 min, 25-35% B mais 10 min, 35-50% B mais 10 min e reequilíbrio da coluna; usou-se uma taxa de fluxo de 0.5 mL/min. A deteção MS foi realizada num API 3200 Qtrap (Applied Biosystems) equipado com uma fonte de ionização Electrospray (ESI) num analisador de massa de armadilha de ião-quadrupolo tripla, controlada pelo software Analyst 5.1. Usou-se ar de grau zero (30 psi) como gás de nebulização e gás turbo para secagem do solvente (400 °C, 40 psi). O azoto serviu como cortina (20 psi) e gás de colisão (médio). A tensão de spray dos iões foi definida a -4500V em modo negativo. O detetor MS foi programado para executar, em série, dois modos consecutivos: incrementar a análise do MS (EMS) e do ião produto (EPI). O sistema EMS foi utilizado para mostrar espectros de varrimento completo, para dar uma visão geral a todos os iões na amostra. As configurações usadas foram: potencial de não-cluster (DP) -45V, potencial de entrada (EP) -6V, energia de colisão (CE) -10V. Os espectros foram gravados em modo de ião negativo entre m/z 100 e 1500. O modo EPI foi executado, posteriormente, de modo a obter os padrões de fragmentação dos iões obtidos da experiência anterior, usando os seguintes parâmetros:

DP -50 V, EP -6 V, CE -25V e espalhamento da energia de colisão (CES) 0 V. Os compostos fenólicos foram identificados comparando o seu tempo de retenção, espectros de massa e de UV/VIS com os obtidos a partir de compostos padrão, sempre que disponíveis. De outra forma, a tentativa de identificação foi realizada por comparação dos valores obtidos, com a informação de dados disponíveis na literatura. Para a análise quantitativa, foi realizada uma curva de calibração para cada padrão de compostos fenólicos existente, com base no sinal UV. Para a identificação de compostos fenólicos para os quais não estavam disponíveis padrões comerciais, a quantificação foi feita a partir de uma curva de calibração de outros compostos do mesmo grupo fenólico. Os resultados foram expressos em μg por g de massa seca.

2.3.5. *Composição em betacianidinas*

Cada amostra (1 g) foi extraída com 30 mL de metanol contendo 0,5% de ácido trifluoroacético (TFA), e filtrada através de papel de filtro Whatman No.4. O resíduo foi depois re-extraído duas porções adicionais de 30 mL de metanol contendo 0,5% de TFA. Os extratos combinados foram evaporados a 35°C para remover o metanol, e redissolvidos em água. Para a purificação, a solução extraída foi colocada num cartucho C-18 SepPak® Vac 3 cc (Phenomenex), anteriormente ativado com metanol, seguido de água; os açúcares e as substâncias mais polares foram removidos passando pelo cartucho 10 mL de água; os pigmentos de betalaína/betacianidinas foram posteriormente eluídos com 5 mL de metanol:água (80:20, v/v) contendo 0,1% de TFA. O extrato foi concentrado a vácuo, liofilizado e redissolvido em 1 mL de metanol aquoso a 20%, e depois foi filtrado através de filtros em disco descartáveis LC de 0,22 μm para análise por HPLC. Os solventes usados foram: (A) 0,1% TFA em água e (B) 100% acetonitrilo. O gradiente usado foi: isocrático 10% B até 3 min, 10 a 15% B mais 12 min, isocrático 15% B mais 5 min, 15 a 18% B mais 5 min, 18 a 30% B mais 20 min e 30 a 35% mais 5 min, a uma taxa de 0.5 mL/min. A deteção foi realizada através do DAD, usando 520 nm como comprimento de onda preferencial, e do equipamento de MS já descrito anteriormente. Usou-se ar de grau zero como gás nebulizador (40 psi) e gás turbo (600 °C) para secagem do solvente (50 psi). O azoto serviu como cortina (100 psi) e gás de colisão (alto). A

energia de spray dos iões foi fixada nos 5000V em modo positivo. Os métodos EMS e ESI foram usados para aquisição de espectros de alta resolução e padrões de fragmentação dos iões percursoros, respectivamente. Os parâmetros definidos para o modo EMS foram: DP 41 V, EP 7.5 V, CE 10 V, e os parâmetros para o modo EPI foram: DP 41 V, EP 7.5 V, CE 10 V e espalhamento da energia de colisão (CES) 0 V.

As betacianidinas presentes nas amostras foram determinadas de acordo com o procedimento implementado no laboratório (Guimarães et al., 2013), e foram caracterizadas de acordo com o seu espectro UV e de massa, e tempo de retenção por comparação com padrões, quando disponíveis. Para análise quantitativa, obtiveram-se as curvas de calibração por injeção de soluções-padrão com concentrações conhecidas (0,25-50 µg/mL). Os resultados foram expressos em µg por g de extrato/ infusão.

2.4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

2.4.1. Atividade captadora de radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH)

A atividade captadora de radicais de DPPH foi realizada utilizando o leitor de microplacas ELX800 (Bio-Tek Instruments, Inc; Winooski, VT, EUA). A mistura da reação, em cada um dos 96 poços, consistiu nas diferentes soluções dos extratos (30 µL) às quais se adicionou uma solução metanólica (270 µL) contendo radicais DPPH (6×10^{-5} mol/L). A mistura foi deixada em repouso durante 60 min no escuro. A redução do radical DPPH foi determinada pela medição da absorvância a 515 nm (Pinela et al., 2012). A atividade captadora de radicais (ACR) foi calculada pela percentagem de descoloração da solução de DPPH, usando a equação:

$$\% \text{ ACR} = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{S}})/A_{\text{DPPH}}] \times 100$$

onde A_{S} corresponde à absorvância da solução de DPPH na presença de diferentes concentrações de extrato e A_{DPPH} é a absorvância do branco (solução de DPPH mais o solvente de extração (metanol ou água) em vez da solução de extrato). A concentração de extrato que fornece 50% da atividade captadora de radicais (EC_{50}) foi calculada a partir

da percentagem de ACR contra a concentração de extrato. O Trolox foi utilizado como controlo positivo.

2.4.2. Poder redutor

Esta metodologia foi realizada utilizando o Leitor de Microplacas descrito anteriormente. As diferentes soluções de extrato (0,5 mL) foram misturadas com tampão fosfato de sódio (200 mmol/L, pH 6,6, 0,5 mL) e ferricianeto de potássio (1% w/v, 0,5 mL). A mistura foi incubada a 50 °C durante 20 min. Após esse período adicionou-se ácido tricloroacético (10% w/v, 0,5 mL). A mistura (0,8 mL) foi colocada nos 48 poços juntamente com água desionizada (0,8 mL) e cloreto de ferro (0,1% w/v, 0,16 mL), e a absorvância foi medida a 690 nm (Pinela et al., 2012). Foi preparado um branco com o solvente de extração (metanol ou água) em vez da solução de extrato. A concentração de extrato que forneceu 0,5 da absorvância (EC_{50}) foi calculada a partir da absorvância a 690 nm contra a concentração do extrato. O Trolox foi utilizado como controlo positivo.

2.4.3. Inibição da descoloração do β -caroteno

Preparou-se uma solução de β -caroteno dissolvendo este composto (2 mg) em clorofórmio (10 mL). Transferiram-se 2 mL desta solução para um balão de fundo redondo e removeu-se o clorofórmio a 40 °C, sob vácuo. Posteriormente juntou-se ácido linoleico (40 mg), emulsionante Tween 80 (400 mg) e água destilada (100 mL), e agitou-se vigorosamente. Transferiram-se alíquotas (4,8 mL) desta emulsão para tubos de ensaio contendo diferentes concentrações dos extratos (0,2 mL). Logo após a adição da emulsão a cada tubo, agitou-se e determinou-se o tempo zero de absorvância a 470 nm (espectrofotómetro AnalytikJena). Seguidamente foram incubados num banho a 50 °C durante 2 h. Passado esse tempo determinou-se novamente a absorvância a 470 nm (Pinela et al., 2012). Foi preparado um branco com o solvente de extração (metanol ou

água) em vez da solução de extrato. A inibição da descoloração do β -caroteno foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ Descoloração} = [(A_{470} \text{ após } 2\text{h}/A_{470} \text{ inicial}) \times 100]$$

A concentração de extrato que forneceu 50% de atividade antioxidante (EC_{50}) foi calculada a partir da percentagem de inibição de β -caroteno contra a concentração do extrato. O Trolox foi utilizado como controlo positivo.

2.4.4. *Inibição da peroxidação lipídica utilizando substâncias reativas de ácido tiobarbiturico (TBARS)*

Para realização deste ensaio, utilizou-se tecido cerebral, obtido a partir de porco (*Sus scrofa*), que foi dissecado e homogeneizado em gelo com tampão Tris-HCl (20 mM, pH 7,4) a fim de produzir um homogeneizado de tecido cerebral numa proporção 1:2 (w/v) após centrifugação (centrífuga refrigerada Centorion K24OR) a 3000g durante 10 min. Incubou-se uma alíquota (0,1 mL) do sobrenadante com as diferentes concentrações dos extratos (0,2 mL), na presença de $FeSO_4$ (10 μ M; 0,1 mL) e ácido ascórbico (0,1 mM; 0,1mL) a 37 °C durante 1h. A reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético (28% w/v; 0,5 mL), seguindo-se a adição do ácido tiobarbitúrico (TBA; 2%, w/v; 0,38 mL). A mistura foi aquecida a 80 °C durante 20 min. Após centrifugação, a 3000g durante 10 min, para remoção do precipitado de proteínas, a intensidade da cor do complexo malonaldeído (MDA)-TBA do sobrenadante foi medida através da sua absorvância a 532 nm (Pinela et al., 2012). Foi preparado um branco com o tampão tris-HCl em vez da solução de extrato. A percentagem de inibição da peroxidação lipídica (%) foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = [(A - B)/A] \times 100\%$$

onde A e B correspondem à absorvância do branco e da solução com o extrato, respetivamente. A concentração de extrato que forneceu 50% de inibição da peroxidação lipídica (EC_{50}) foi calculada a partir da percentagem de inibição de TBARS contra concentração do extrato. O Trolox foi utilizado como controlo positivo.

2.4.5. Classificação de efeito aditivo, sinergista ou antagonista nas misturas

Os valores teóricos para a atividade antioxidante das misturas foram calculados como média ponderada dos valores de EC₅₀ experimentais das amostras individuais e considerando contribuições adicionais das espécies individuais em cada percentagem, por exemplo, *P. tridentatum* (25%) + *C. citratus* (75%) EC₅₀ = EC₅₀ *P. tridentatum* × 0,25 + EC₅₀ *C. citratus* × 0,75.

A classificação em efeito aditivo (AD), sinergista (SN) ou antagonista (sinergismo negativo; AN) realizou-se da seguinte forma: AD: valores teórico e experimental com diferenças inferiores a 5%; SN: valores experimentais 5% mais baixos que os valores teóricos; NA: valores experimentais 5% mais elevados que os valores teóricos. Para cada caso, a percentagem foi calculada da seguinte forma:

$$[(\text{valor experimental} - \text{valor teórico})/\text{valor experimental}] * 100.$$

2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As amostras foram obtidas em triplicado e os ensaios relativos a cada uma das amostras foram também feitos em triplicado. Os resultados foram expressos em valores médios ± desvio padrão (DP). Os resultados de cada teste foram analisados através da análise de variância (ANOVA) seguida de um teste de Tukey HSD com $\alpha = 0,05$. Este tratamento foi efetuado utilizando o programa SPSS v. 22.0. As diferenças estatísticas obtidas pela ANOVA foram representadas por letras (letras diferentes indicam diferenças significativas entre resultados). As letras foram ordenadas alfabeticamente de acordo com a diminuição dos valores dos resultados (*e.g.*, a letra “a” representa o melhor resultado para a composição fitoquímica em antioxidantes e o pior resultado para os ensaios das propriedades antioxidantes).

CAPÍTULO III



III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. CARACTERIZAÇÃO EM TOCOFERÓIS, AÇÚCARES E ÁCIDOS ORGÂNICOS

Existem alguns trabalhos acerca da atividade biológica das plantas em estudo, especialmente no que diz respeito à sua atividade antioxidante (Negrelle & Gomes, 2007; Pinela et al., 2011), e que tem sido relacionada com a sua composição em compostos fenólicos (Silva et al., 2012). No entanto, não conseguimos encontrar na literatura estudos relacionados com a composição em metabolitos primários e nutrientes (e.g., açúcares, ácidos orgânicos e tocoferóis).

Os resultados relativos à composição química das três espécies de plantas em tocoferóis, açúcares e ácidos orgânicos são apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Composição em tocoferóis, açúcares e ácidos orgânicos de *P. tridentatum*, *G. globosa* e *C. citratus* (média \pm DP).

| | <i>Pterospartum tridentatum</i> | <i>Gomphrena globosa</i> | <i>Cymbopogon citratus</i> |
|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| α -Tocoferol | 7,21 \pm 0,01 ^b | 0,38 \pm 0,04 ^c | 56,05 \pm 2,47 ^a |
| γ -Tocoferol | 5,81 \pm 0,56 ^a | 3,02 \pm 0,08 ^b | 4,52 \pm 0,76 ^a |
| δ -Tocoferol | 0,50 \pm 0,10 ^b | 5,20 \pm 0,01 ^a | nd |
| Tocoferóis totais (μ g/g) | 13,10 \pm 1,08 ^b | 8,60 \pm 0,10 ^c | 60,57 \pm 3,23 ^a |
| Frutose | 83,23 \pm 7,71 ^a | 18,30 \pm 1,27 ^b | 7,35 \pm 1,06 ^c |
| Glucose | 26,70 \pm 1,13 ^b | 15,65 \pm 2,62 ^c | 29,75 \pm 0,92 ^a |
| Sacarose | 23,75 \pm 1,34 ^b | nd | 41,45 \pm 0,21 ^a |
| Açúcares totais (mg/g) | 133,70 \pm 7,50 ^a | 33,95 \pm 3,89 ^c | 78,55 \pm 2,19 ^b |
| Ácido oxálico | 1,39 \pm 0,02 ^b | 10,64 \pm 0,04 ^a | 1,22 \pm 0,15 ^b |
| Ácido málico | 3,23 \pm 0,90 ^b | 12,33 \pm 0,55 ^a | 2,23 \pm 0,10 ^b |
| Ácido ascórbico | nd | nd | 0,24 \pm 0,01 |
| Ácido xiquímico | 0,71 \pm 0,01 | nd | nd |
| Ácido cítrico | 5,99 \pm 0,35 ^a | 2,40 \pm 0,01 ^b | nd |
| Ácido succínico | nd | nd | 10,29 \pm 0,34 |
| Ácido fumárico | nd | 0,28 \pm 0,01 ^b | 0,49 \pm 0,01 ^a |
| Ácidos orgânicos totais (mg/g) | 11,32 \pm 1,26 ^c | 25,65 \pm 0,51 ^a | 13,98 \pm 0,47 ^b |

Resultados expressos em massa seca; nd- não detetado. Em cada linha letras diferentes correspondem a valores com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

C. citratus demonstrou o maior conteúdo de α -tocoferol e tocoferóis totais, mas não apresentou δ -tocoferol, presente nas outras duas espécies (*e.g.*, **Figura 11A**). Os tocoferóis são antioxidantes solúveis em lípidos, sendo o α -tocoferol a isoforma mais ativa, devido ao seu papel na inibição da peroxidação lipídica (Ouchikh et al., 2011). Estas moléculas são amplamente utilizadas como ingrediente funcionais em preparações alimentares, farmacêuticas e cosméticas (Yang et al., 2013). Tanto quanto sabemos este é o primeiro estudo da composição em tocoferóis nas espécies *C. citratus* e *G. globosa*; por outro lado, os valores obtidos para *P. tridentatum* são similares aos descritos para amostras silvestres secas à sombra (8,8 $\mu\text{g/g}$) (Pinela et al., 2011).

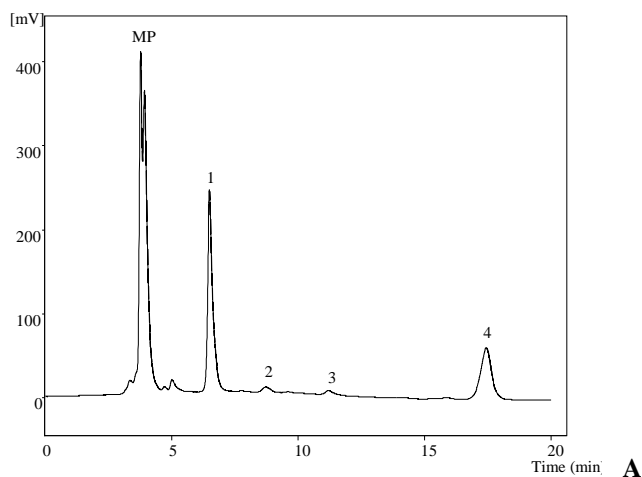
Relativamente aos açúcares livres, *P. tridentatum* demonstrou os níveis mais altos de frutose e açúcares totais, não obstante, os valores obtidos foram muito mais elevados que as concentrações encontradas em amostras silvestres previamente estudadas (0,3 e 49,6 g/100 g para frutose e açúcares totais, respetivamente) (Pinela et al., 2011). Isto pode dever-se à diferença de condições de crescimento das plantas (*e.g.*, variabilidade das condições edafo-climáticas, fatores que afetam o desenvolvimento da planta) e a diferentes métodos de secagem aplicados, que influenciam o conteúdo em humidade e a qualidade do material vegetal. Pinela et al. (2011) simulou as condições tradicionais de processamento (secagem à sombra do material vegetal no escuro em local seco à temperatura ambiente por 30 dias); o material vegetal seco utilizado para análise neste estudo foi processado em 5 dias sob as melhores condições de secagem à sombra, com controlo da temperatura ambiente, humidade relativa, bem como taxa de fluxo de ar.

É necessário destacar que a frutose pode apresentar propriedades antioxidantes devido à sua capacidade redutora. Além disso, os açúcares são praticamente as únicas moléculas presentes em infusões de plantas que contribuem para o seu valor energético (Komes et al., 2014). *C. citratus* demonstrou os valores mais elevados de glucose e sacarose (**Tabela 1, Figura 11B**). Não foram encontrados na literatura quaisquer estudos da composição em açúcares das espécies mencionados.

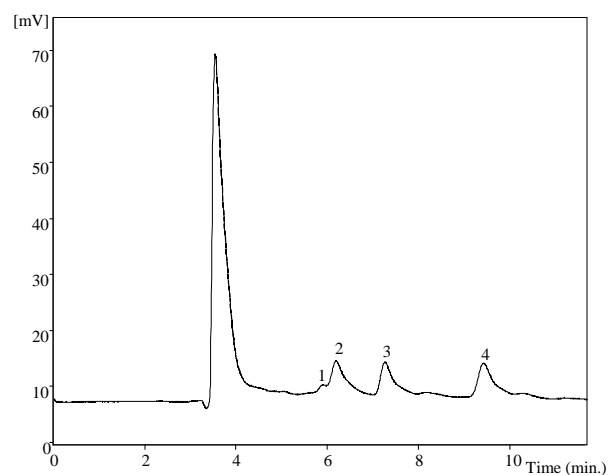
No que diz respeito aos ácidos orgânicos, *G. globosa* foi a amostra com a maior concentração destes compostos, principalmente ácidos málico e oxálico (**Tabela 1, Figura 11C**). Os ácidos cítrico e succínico foram encontrados em maior concentração em *P. tridentatum* e *C. citratus*, respetivamente. O último também apresentou ácido

ascórbico, um potente antioxidante fitoquímico (Ferreira et al., 2009; Halliwell, 2012). Além do seu importante papel no metabolismo humano, os ácidos orgânicos possuem outras aplicações, por exemplo, o ácido cítrico é um cristal de espessamento dos ossos, o ácido succínico é conhecido por auxiliar no tratamento da diabetes, e ao ácido málico são-lhe atribuídas propriedades bactericidas (Carocho et al, 2013).

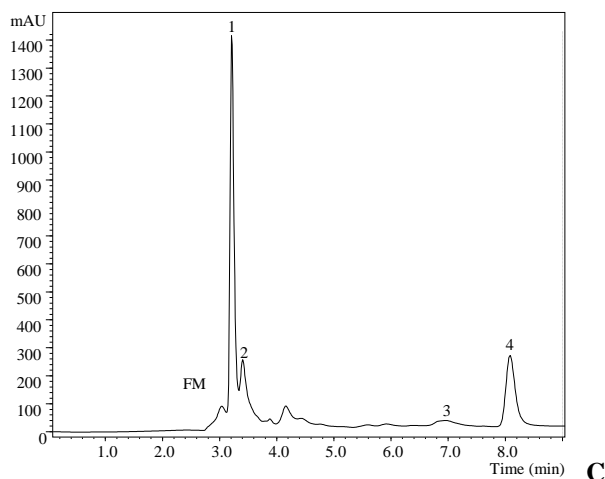
De entre as três espécies analisadas, apenas *P. tridentatum* foi anteriormente estudada quanto à sua composição em ácidos orgânicos (Pereira et al, 2013). Apesar de ter sido encontrada uma quantidade similar (8,1 mg/g), o perfil descrito foi ligeiramente diferente, reportando também a presença dos ácidos quínico, succínico e fumárico. Como mencionado anteriormente, as diferenças podem ser devido às distintas condições ecológicas envolvidas no desenvolvimento das plantas (material vegetal de diferente proveniência) e também às diferentes características do material vegetal utilizado para análise, como consequência do processo de secagem aplicado a cada material. Um processamento de cinco dias, perfeitamente controlado, produz material vegetal de melhor qualidade em termos de cor (confirmado visualmente), textura e conteúdo de humidade, do que as técnicas tradicionais de secagem à sombra.



A



B



C

Figura 11. Perfil individual de (A) tocoferóis em *Gomphrena globosa*: 1- α -tocoferol, 2- BHT, 3- γ -tocoferol, 4- tocol- padrão interno (IS); (B) açúcares em *Cymbopogon citratus*: 1-frutose, 2- glucose, 3- sacarose, 4 melezitose (IS); (C) ácidos orgânicos em *Gomphrena globosa*: 1- ácido oxálico, 2- ácido málico, 3- ácido cítrico, 4- ácido fumárico. FM-Fase móvel.

3.2. CARACTERIZAÇÃO EM COMPOSTOS FENÓLICOS

3.2.1. Nos extratos metanólicos

Os perfis em compostos fenólicos de *G. globosa* (Gg), *C.citratus* (Cc) e *P. tridentatum* (Pt) estão representados nas **Figuras 12, 13 e 15**. Os dados (tempo de retenção, λ_{\max} na região do visível, ião molecular e principais fragmentos iónicos observados em MS²) obtidos a partir da análise HPLC–DAD–ESI/MS no que diz respeito à composição fenólica e betacianidinas, identificação de compostos e quantificação individual estão representados nas **Tabelas 2-5**. Os seguintes compostos foram tentativamente identificados de acordo com os seus tempos de retenção, massa e características UV/VIS por comparação com padrões comerciais: ácido 5-*O*-cafeoilquinico (pico 1^{Cc}), ácido cafeíco (pico 2^{Cc}), ácido *trans-p*-cumárico (pico 9^{Cc}; pico 4^{Gg}), ácido *trans*-ferúlico (pico 7^{Gg}), isoramnetina 3-*O*-rutinosido (pico 13^{Gg}), isoramnetina 3-*O*-glucósido (pico 15^{Gg}), genisteína (pico 12^{Pt}), canferol 3-*O*-rutinosido (pico 12^{Gg}), canferol 3-*O*-glucósido (pico 14^{Gg}), luteolina 6-*C*-glucósido (isoorientin pico 7^{Cc}), luteolina-7-*O*-glucósido (pico 13^{Cc}), luteolina (pico 18^{Cc}), quercetina 3-*O*-rutinosido (pico 8^{Gg} e pico 5^{Pt}) e quercetina 3-*O*-glucósido (pico 10^{Gg} e pico 5^{Pt}).

Vinte e um flavonoides foram detetados em *P. tridentatum* (**Tabela 2**). Os picos 1^{Pt} e 2^{Pt} apresentam o mesmo ião pseudomolecular [M-H]⁻ de m/z 465, e o seu espectro UV (**Figura 12**) e principais fragmentos MS² apontam para que possa ser um derivado de um di-hidroflavonol *C*-glucosilo. Assim, iões com m/z 375 e 345 resultaram, respetivamente, da perda de 90 e 120 u, característica de *C*- ligados a hexoses e devida a uma quebra parcial do resíduo de glucosilo (Cuyckens & Claeys, 2004). Os fragmentos com m/z de 447, 357 e 327 podem-se explicar pela perda de H₂O (-18 u) a partir do composto inicial e dos iões mencionados, respetivamente, provavelmente devido a uma quebra de -OH na posição C-3 do flavonoide. O ião com m/z 317 pode resultar da perda de um CO (-28 u); a maioria dos fragmentos de m/z 345 e o fragmento de m/z 167 podem corresponder ao ião ^{0,2}A₀⁻ da quebra da aglicona. Ferreres et al. (2003) observaram que uma perda de 90 u (ião de m/z 375) não é usual em 8-*C*-hexoses permitindo identificar tentativamente os

picos 1 e 2 como 6-*C*-hexoses. Pode especular-se que se trata de dois estereoisómeros devido à sua natureza assimétrica de C2 e C3 da di-hidroquercetina. Tanto quanto sabemos, di-hidroflavonóis *C*-glucósidos, nomeadamente diferentes isómeros de di-hidroquercetina 6-*C*-glucósido, foram apenas identificados em duas fontes naturais: *Ulmus wallichiana* (família das *Ulmaceae*; Rawat et al., 2009) e *Paepalanthus argenteus* (*Eriocaulaceae*; Dokkedal et al., 2007). Assim sendo, este é o primeiro trabalho a descrever este tipo de compostos menos comuns em *Fabaceas*.

O pico 3^{Pt} apresentou um ião pseudomolecular [M-H]⁻ de *m/z* 479, obtendo-se um produto de ião de *m/z* 359 pela perda de -120 u, característico de flavonas *C*-hexosilo, enquanto os fragmentos de *m/z* 341, 221 e 167 são compatíveis com um anel B *orto*-tri-hidroxiado de um flavonol e um anel A 5,7-di-hidroxi (Fabre et al., 2001; Wu et al, 2004). O composto foi identificado tentativamente como mircetina 6-*C*-glucósido, já descrito em *P. tridentatum* por Paulo et al. (2008). Os picos 4^{Pt} e 7^{Pt} apresentam espectro de UV a λ_{\max} de 352-356 nm e um produto de ião MS² de *m/z* 301, correspondentes a derivados da quercetina. De acordo com o seu ião pseudomolecular, foram designados como quercetina *O*-desoxi-hexosil-hexósido ([M-H]⁻ de *m/z* 609) e quercetina *O*-hexósido ([M-H]⁻ de *m/z* 463).

Os restantes compostos fenólicos foram identificados como derivados de isoflavonas com base nas características o seu espectro de UV e padrões de fragmentação de massas. Os picos 8^{Pt}, 10^{Pt} e 12^{Pt} foram identificados como derivados de genisteína. O pico 8^{Pt}, com um ião pseudomolecular [M-H]⁻ de *m/z* 431 libertou um fragmento de *m/z* 269 ([M-162]⁻, perda de um glucosilo) foi tentativamente identificado com a genisteína 7-*O*-glucósido (genisteína), atendendo também à sua descrição anterior em amostras de *P. tridentatum* (Vitor et al., 2004; Paulo et al., 2008), embora a natureza e posição do grupo glucosilo não possa ser estabelecido no nosso caso. O pico 10^{Pt} ([M-H]⁻ de *m/z* 431) libertou dois fragmentos de iões MS² de *m/z* 311 e 269, correspondendo a perdas de 120 e 42 u, características de flavonas *C*-hexosilo. Este composto foi tentativamente designado como genisteína 8-*C*-glucósido, anteriormente descrito em *Genista tenera* por Rauter et al. (2005), e em outra espécie de *Fabaceae* (Talhi & Silva, 2012). O pico 12^{Pt} ([M-H]⁻ de *m/z* 296) corresponderá a uma aglicona de genisteína.

Um composto com o mesmo ião pseudomolecular e características de fragmentação que o pico 9Pt foi isolado a partir de *P. tridentatum* e totalmente identificado por Vitor et al. (2004) como 5,5'-di-hidroxi-3'-metoxi-isoflavona-7-*O*- β -glucósido; assim, o composto detetado na amostra em estudo foi associado a essa estrutura.

Os picos 14Pt, 15Pt, 16Pt e 17Pt foram identificados como derivados de biochanina A de acordo com os seus espetros de UV e de massa. O pico 15^{Pt}, com um ião pseudomolecular ([M-H]⁻, perda de um glucosilo) foi tentativamente identificado como sissotrina (*i.e.*, biochanina A 7-*O*-glucósido) devido à sua anterior identificação em flores de *P. tridentatum* (Vitor et al., 2004; Paulo et al., 2008). O pico 14^{Pt} com ião pseudomolecular [M-H]⁻ de m/z 607, e fragmentos de iões resultantes de perdas consecutivas de dois resíduos de hexosilo (m/z de 445 e 283) foi identificado como biochanina A *O*-hexósido-*O*-hexósido. Similarmente, o pico 16^{Pt} ([M-H]⁻ de m/z 649), com 42 u maior do que o pico 14^{Pt} poderá ser designado como biochanina A *O*-acetil-hexósido-*O*-hexósido. Tanto quanto sabemos este tipo de compostos ainda não tinha sido descrito em *P. tridentatum*.

Os picos 18^{Pt} e 19^{Pt} apresentam o mesmo ião pseudomolecular [M-H]⁻ de m/z 283, coerente com a metil genisteína. Estes compostos foram tentativamente identificados como prunetina (7-*O*-metilgenisteína) anteriormente descrita em *P. tridentatum* (Paulo et al., 2008), e biochanina A (4'-*O*-metil genisteína), devido à presença de outro derivado de biochanina A na amostra analisada. O pico 20^{Pt} apresenta um ião pseudomolecular [M-H]⁻ de m/z 299 libertando um fragmento de m/z 284 (-15 u, perda de um grupo metilo), podendo corresponder a um tri-hidroxi metoxi-isoflavonoide. Um composto com características similares já foi encontrado em *P. tridentatum* por Paulo et al. (2008) e designado como 7-*O*-metilorobol.

Nenhuma estrutura definitiva foi atribuída aos picos 11^{Pt}, 13^{Pt} e 17^{Pt}. O pico 17^{Pt} apresenta um ião pseudomolecular [M-H]⁻ de m/z 491, 46 u maior que o pico 15^{Pt}, que poderá ser explicado pela ligação de um aduto de ácido fórmico; esta formação já foi descrita na literatura (Rijke et al., 2003, 2004). Assim, pode especular-se que este composto pode corresponder a um artefacto (aduto de ácido fórmico e sissotrin) formado nas condições experimentais utilizadas. Especulações similares poderão ser feitas para o

pico 11^{Pt} (ião [M-H]⁻ de m/z 505) que poderá corresponder a um aduto de ácido fórmico de metilprunetina ou derivado de metilbiochanina A.

Derivados de *C*-di-hidroflavonol (nomeadamente o pico 1^{Pt}, 3873,55 µg/g) foram os compostos maioritários na amostra de *P. tridentatum* (**Tabela 2**). Paulo et al. (2008) e Vitor et al. (2004) estudaram amostras silvestres de *P. tridentatum* provenientes de Portugal, e apresentaram algumas semelhanças na composição fenólica. Contudo, estes autores apenas detetaram até 9 compostos do grupo dos flavonoides e isoflavonas, não descreveram derivados de di-hidroflavonóis e não apresentaram resultados de quantificação. A identificação de derivados de di-hidroflavonóis na nossa amostra é particularmente importante, não apenas por serem os compostos maioritários, mas também pela sua possível atividade biológica. O di-hidroflavonol *C*-hexósido identificado em *Ulmus wallichiana* foi descrito como possuindo atividade osteogénica *in vitro* relevante, sendo capaz de promover a diferenciação osteoblástica de culturas primárias de osteoblastos de ratos, tornando-os bons candidatos para serem usados em terapia para osteoporose (Rawat et al., 2009).

Tabela 2. Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda da absorção máxima na região do visível (λ_{max}), dados do espectro de massa, identificação e quantificação de compostos fenólicos em *P. tridentatum* (média \pm DP).

| Pico | Tr (min) | λ_{max} (nm) | Ião molecular [M-H] ⁻ (m/z) | Principais fragmentos MS ² (m/z) | Tentativa de identificação | Quantificação (μg/g) | |
|------------------|----------|----------------------|--|--|--|--------------------------|---------------------|
| 1 ^{Pt} | 5,03 | 292,sh342 | 465 | 447(25),375(79),357(21),345(100),327(86),317(42),167(63) | Di-hidroquercetina 6-C-hexósido | 3873,55 \pm 34,12 | |
| 2 ^{Pt} | 6,24 | 294,sh348 | 465 | 447(7),375(54),357(13),345(100),327(50),317(23),167(38) | Di-hidroquercetina 6-C-hexósido | 130,77 \pm 3,09 | |
| 3 ^{Pt} | 7,67 | 290,sh340 | 479 | 359(100),341(7),221(5),167(8) | Miricetina-6-C-glucósido | 1316,66 \pm 2,33 | |
| 4 ^{Pt} | 19,22 | 352 | 609 | 463(4),301(46) | Quercetina desoxi-hexosil-hexósido | 100,13 \pm 1,50 | |
| 5 ^{Pt} | 19,45 | 358 | 609 | 301(100) | Quercetina-3-O-rutinosídeo | 125,67 \pm 1,30 | |
| 6 ^{Pt} | 20,36 | 356 | 463 | 301(100) | Quercetina-3-O-glucósido (isoquercitrina) | 963,19 \pm 4,29 | |
| 7 ^{Pt} | 20,77 | 356 | 463 | 301(100) | Quercetina O-hexósido | 474,68 \pm 2,82 | |
| 8 ^{Pt} | 21,71 | 260,sh332 | 431 | 269(100) | Genisteína 7-O-glucósido (genistina) | 162,86 \pm 2,97 | |
| 9 ^{Pt} | 22,88 | 260,sh336 | 461 | 446(35),341(5),299(88),283(29) | 5,5'-Di-hidroxi-3'-metoxi-isoflavona-7-O-β-glucósido | 94,14 \pm 0,93 | |
| 10 ^{Pt} | 25,07 | 260,sh332 | 431 | 311(5),269(30) | Genisteína-8-C-glucósido | 57,73 \pm 1,04 | |
| 11 ^{Pt} | 26,38 | 256,sh322 | 505 | 459(3),297(100),282(22) | Metilbiochanina A/metilprunetina O-hexosido | 89,71 \pm 0,52 | |
| 12 ^{Pt} | 28,29 | 260,sh334 | 269 | 241(4),225(6),201(5),181(2),133(7) | Genisteína | 167,11 \pm 3,43 | |
| 13 ^{Pt} | 29,12 | 262,sh336 | 341 | 298(89),283(35) | Derivado de metilbiochanina A/metilprunetina | 40,29 \pm 1,53 | |
| 14 ^{Pt} | 29,61 | 258,sh330 | 607 | 445(4),283(100) | Biochanina A O-hexósido-O-hexósido | 44,84 \pm 1,04 | |
| 15 ^{Pt} | 32,04 | 260,sh340 | 445 | 283(100) | Biochanina A 7-O-glucósido (sissotrina) | 53,22 \pm 0,19 | |
| 16 ^{Pt} | 33,41 | 260,sh336 | 649 | 607(11),445(3),283(100) | Biochanina A O-acetil-hexósido-O-hexósido | 25,67 \pm 0,26 | |
| 17 ^{Pt} | 34,91 | 260,sh332 | 491 | 445(3),283(100) | Biochanina A O-hexósido | 201,48 \pm 2,82 | |
| 18 ^{Pt} | 37,99 | 262,sh332 | 283 | 268(100),239(7),224(5),195(2),135(2) | 4'-O-metil genisteína (biochanina A) | 433,53 \pm 1,97 | |
| 19 ^{Pt} | 38,19 | 262,sh334 | 283 | 268(100) | 7-O-metil genisteína (prunetina) | 372,62 \pm 2,61 | |
| 20 ^{Pt} | 39,07 | 262,sh338 | 299 | 284(100),281(4),256(4),241(2),228(5),148(2) | 7-O-metilrobol | 167,80 \pm 1,30 | |
| 21 ^{Pt} | 39,97 | 260,sh294 | 297 | 282(100) | Metilbiochanina A/ metilprunetina | 105,37 \pm 1,78 | |
| | | | | | | Flavonóis totais | 2980,33 \pm 9,24 |
| | | | | | | Di-hidroflavonóis totais | 4004,32 \pm 31,03 |
| | | | | | | Isoflavonas totais | 2016,37 \pm 5,52 |
| | | | | | | Flavonoides totais | 9001,01 \pm 16,28 |

Resultados expressos em base de massa seca.

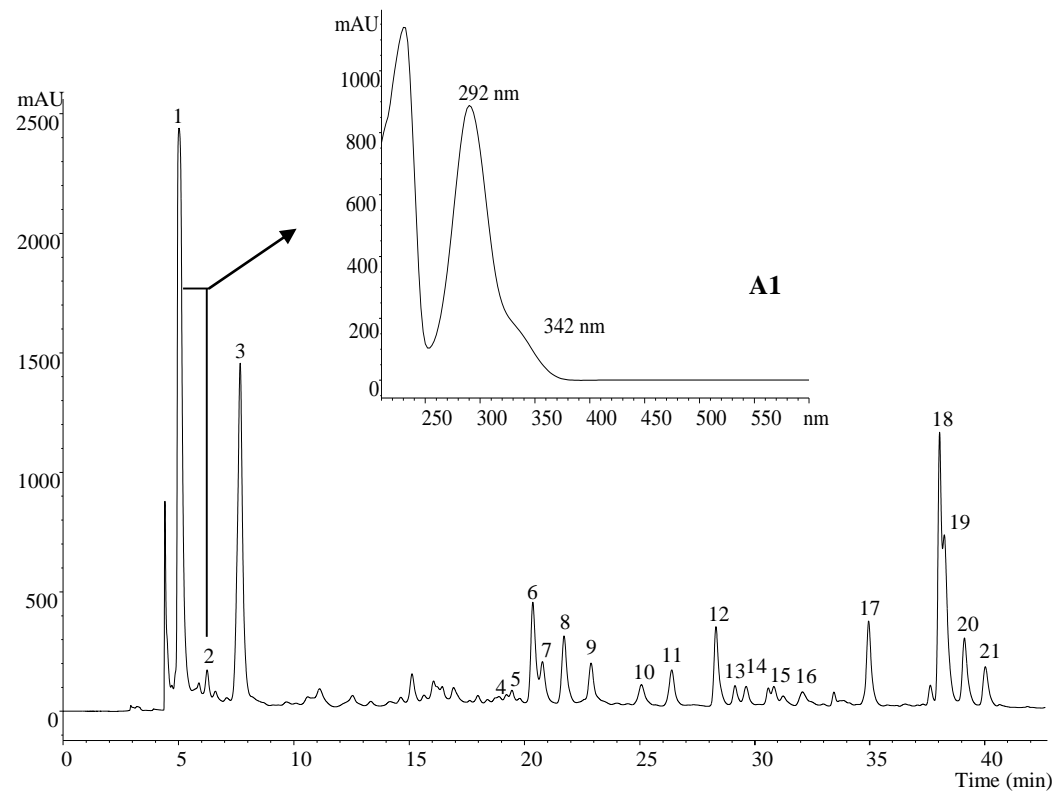


Figura 12. Perfil fenólico de extrato metanólico de *P. tridentatum* registado a 280 nm; A1- espectros de UV dos picos 1 e 2.

Em *G. globosa* foram identificados vinte e sete compostos fenólicos, sendo seis derivados de ácidos fenólicos, 15 flavonoides, maioritariamente derivados de flavonóis (**Tabela 3, Figura 14**), e seis betacianidinas (**Tabela 4, Figura 15**). Os picos 3^{Gg} e 5^{Gg} foram descritos como isómeros *cis* dos ácidos *p*-cumárico e ferúlico, considerando que os isómeros *trans* correspondentes (*i.e.*, picos 4^{Gg} e 7^{Gg}) foram confirmados por comparação com padrões, como descrito anteriormente. Os isómeros *trans* desses ácidos fenólicos foram também encontrados nas inflorescências de *G. globosa* (Silva et al., 2012). Os picos 1^{Gg} e 2^{Gg} com o mesmo ião pseudomolecular [M-H]⁻ de *m/z* 355 e libertando um fragmento MS² de *m/z* 193 ([ácido ferúlico-H]⁻) perda de um grupo hexosilo (-162 mu), estes compostos foram tentativamente identificados como *cis* e *trans* hexósidos de ácido ferúlico, respetivamente. Os picos 9^{Gg}, 11^{Gg}, 16^{Gg}, 20^{Gg} e 21^{Gg} foram identificados como derivados de canferol, com base nos seus espectros de UV e no ião produto de MS² de *m/z* 285. Similarmente, os picos 6^{Gg} e 17^{Gg} (produto de ião MS² de *m/z* 301) foram descritos como derivados de quercetina. Os picos 9^{Gg} e 11^{Gg} apresentam um ião pseudomolecular [M-H]⁻ de *m/z* 725 e 579 e fragmentos MS² de *m/z* 593 e 447 ([M-H-132]⁻, perda de um pentosilo), respetivamente, que posteriormente perde o rutinósido ([M-H-308]⁻; pico 9^{Gg}) ou um hexosilo ([M-H-162]⁻; pico 11^{Gg}) produzindo o fragmento de *m/z* 285 (aglicona). Compostos com os mesmos iões pseudomoleculares foram também descritos em extratos de inflorescências de *G. globosa* por Ferreres et al. (2011) e Silva et al. (2012), e identificados como canferol 3-*O*-(2-pentosilo, 6-*O*-ramnosil)-hexósido e canferol 3-*O*-(2-pentosilo)-hexósido respetivamente; então, estas estruturas foram assumidas para os compostos detetados na nossa amostra. O mesmo raciocínio foi efetuado para o pico 6^{Gg} com um ião pseudomolecular [M-H]⁻ de *m/z* 595 e fragmento MS² de *m/z* 301 ([M-H-132-162]⁻ perda de um pentosilo e hexosilo). Ferreres et al. (2011) identificaram um composto com o mesmo ião pseudomolecular em inflorescências de *G. globosa*, e foi identificado como quercetina 3-*O*-(2-pentosilo)-hexósido. A atribuição da posição de substituição da pentose foi baseada nos iões de fragmentação encontrados por parte destes autores, observando a perda de pentosilo (-132 u) e de pentosilo+água (-150 u) característicos de uma ligação interglucosídica (Cuyckens et al., 2001). No nosso caso, nenhum fragmento de ião resultante da perda de pentosilo foi identificado, o que sugere que estava ligado à posição 6'' do hexósido, de

modo que o pico 6^{Gg} foi tentativamente identificado como quercetina 3-*O*-(6-pentosilo)-hexósido.

Um composto com as mesmas características que o pico 20^{Gg} ([M-H]⁻ e *m/z* 593, fragmento de ião MS² de *m/z* 285, perda de ramnosilo e hexosilo) foi também identificado por Ferreres et al. (2011) e Silva et al. (2012) em inflorescências de *G. globosa* e descrito como canferol 3-*O*-(6-ramnosil)-hexósido. No nosso caso a observação de um fragmento de ião MS² de *m/z* 447, perda de um ramnosilo, pode indicar a substituição do hexósido na posição 2''; deste modo o composto foi tentativamente identificado como canferol 3-*O*-(2-ramnosil)-hexósido. O pico 16^{Gg} foi associado ao canferol *O*-acetil hexósido de acordo com o seu ião pseudomolecular [M-H]⁻ de *m/z* 489 e um fragmento MS² libertado a *m/z* 285 ([M-H-42-162]⁻, perda de um acetilo e hexosilo).

Os picos 17^{Gg} ([M-H]⁻ de *m/z* 639) e 21^{Gg} ([M-H]⁻ de *m/z* 623) devem corresponder a derivados de quercetina e canferol contendo grupos glucuronilo e hexosilo. Em ambos os casos a observação de fragmentos MS² resultantes de perda alternada de cada um dos resíduos (*i.e.*, -176 e -162 u) sugere que cada açúcar está localizado numa posição diferente da aglicona; assim, estes compostos foram tentativamente designados como quercetina *O*-glucuronido-*O*-hexósido (pico 17^{Gg}) e canferol *O*-glucuronido-*O*-hexósido (pico 21^{Gg}).

Os picos 18^{Gg} e 19^{Gg} ([M-H]⁻ de *m/z* 475 e 517, respetivamente) originaram um pico base de *m/z* 313, podendo corresponder a um tri-metilenodioxiflavona, provavelmente gonfrenol (3,5,4'-tri-hidroxi-6,7-metilenedioxiflavona) anteriormente descrito em folhas de *G. globosa* (Bouillant et al., 1978). Picos com os mesmos iões pseudomoleculares foram detetados em inflorescência de *G. globosa* por Ferreres et al. (2011) e Silva et al. (2012), sugerindo uma correspondência a gonfrenol-3-*O*-hexósido e gonfrenol-3-*O*-(6-acetil)-hexósido; assim, essas identificações foram tentativamente atribuídas no nosso caso.

Os compostos correspondentes aos picos 22^{Gg} a 27^{Gg} foram identificados como sendo derivados de betacianidinas (**Tabela 4**) já descritos em *G. globosa* (**Figura 15**); não foram encontradas antocianinas juntamente com as betacianidinas (**Figura 13**), o que está de acordo com estudos anteriores (Cai et al., 2001; Cai et al., 2006; Ferreres et al., 2011; Kugler et al., 2007; Silva et al., 2012). Estes pigmentos pertencem a betacianidinas

tipo (iso)gonfrenina (betanidina/isobetanidina substituída em C6), diferindo das betacianidinas tipo-betanina (betanidina/isobetanidina substituído em C5) (Cai et al., 2001, 2006; Heuer et al., 1992). As diferentes massas de 146 u (m/z 697-551) e 176 u (m/z 727-551) indicam a presença de grupos acilo aromáticos (*i.e.*, cumaroilo e feruloilo) em C-6 da glucose em gonfreninas/isogonfreninas. Assim, os picos 22^{Gg}, 23^{Gg} e 25^{Gg} foram identificados como gonfreninaII/isogonfrenina II, com base na observação de dois fragmentos principais de m/z 551, perda de grupo *p*-cumaroilo (-146 u), e de m/z 389 e uma posterior perda de um hexosilo (-162 u). Para os picos 24^{Gg} e 26^{Gg} foi observado o íon pseudomolecular $[M+H]^+$ de m/z 727; assim, foram identificados como gonfrenina III/isogonfrenina III. Os principais fragmentos de m/z 551 e 389 indicam a perda de um grupo feruloilo (-176 u) e uma posterior perda de hexosilo (-162 u), respetivamente. A eluição posterior dos picos 25^{Gg} e 26^{Gg} permitiu a sua identificação como isogonfreninas II e III, respetivamente. Finalmente, o pico 27^{Gg} foi identificado como amarantina-descarboxilada ($[M+H]^+$ de m/z 683), anteriormente descrito em pétalas vermelhas e em flores de *G. globosa* (Kugler et al., 2007). Estes autores indicaram que o tempo de retenção mais elevado e que a mudança hipsocrómica do máximo do espectro UV (cerca de 33 nm) é comparável com amarantina (betanidin 5-*O*- β -glucuronosil glucósido), sugerindo uma estrutura 17-descarboxilada. Observações similares foram descritas na literatura para 17-descarboxibetanina da beterraba vermelha (Stintzing et al., 2006) e *Boerhavia erecta* (Stintzing et al., 2004)

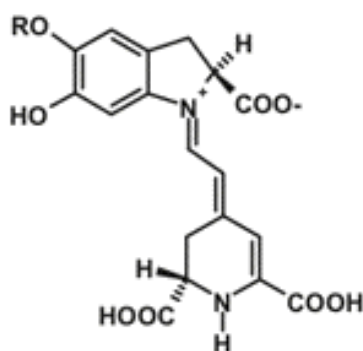


Figura 13 Betacianidina

Os flavonoides foram os principais compostos fenólicos encontrados em *G. globosa* sendo o canferol 3-*O*-rutinosídeo (pico 12^{Gg}, 48,44 $\mu\text{g/g}$) o principal flavonol (**Tabela 3**). Gomphrenin III (pico 24^{Gg}, 4,16 $\mu\text{g/g}$) foi a principal betacianidina encontrada (**Tabela**

4). Silva et al. (2012) e Ferreres et al. (2011) apresentaram um perfil ligeiramente diferente em amostras estudadas por eles, descrevendo flavonóis (quercetina, canferol e derivados de isoramnetina) e derivados de gomphrenol como principais compostos fenólicos. Também descreveram a presença de oito betacianidinas, embora com diferentes perfis dos encontrados na nossa amostra. Além disso, Silva et al. (2012) descreveram maiores valores na quantificação dos compostos identificados. Kugler et al. (2007) e Cai et al. (2001, 2006) apresentaram uma identificação complexa de batacianinas em pétalas de *G. globosa*.

Tabela 3. Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda da absorção máxima na região do visível (λ_{\max}), dados do espectro de massa, identificação e quantificação de compostos fenólicos em *G. globosa* (média \pm DP).

| Pico | Tr (min) | λ_{\max} (nm) | Ião molecular [M-H] ⁻ (m/z) | Principais fragmentos MS ² (m/z) | Tentativa de identificação | Quantificação (µg/g) |
|----------------------------|----------|-----------------------|--|---|--|----------------------|
| 1 ^{Gg} | 11,43 | 326 | 355 | 193(100) | Ácido <i>cis</i> -ferúlico hexóxido | 20,41 \pm 0,76 |
| 2 ^{Gg} | 13,10 | 326 | 355 | 193(100) | Ácido <i>trans</i> -ferúlico hexóxido | 15,13 \pm 0,57 |
| 3 ^{Gg} | 16,07 | 312 | 163 | 119(100) | Ácido <i>cis-p</i> -cumárico | 1,09 \pm 0,16 |
| 4 ^{Gg} | 16,98 | 312 | 163 | 119(100) | Ácido <i>trans-p</i> -cumárico | 5,92 \pm 0,66 |
| 5 ^{Gg} | 18,44 | 322 | 193 | 178(16),134(100),117(3) | Ácido <i>cis</i> -ferúlico | 7,95 \pm 0,27 |
| 6 ^{Gg} | 18,79 | 360 | 595 | 301(100) | Quercetina 3- <i>O</i> -(6-pentosilo)-hexósido | 2,93 \pm 0,25 |
| 7 ^{Gg} | 19,17 | 324 | 193 | 178(35),134(100),117(2) | Ácido <i>trans</i> -ferúlico | 27,73 \pm 0,44 |
| 8 ^{Gg} | 19,48 | 354 | 609 | 301(100) | Quercetina 3- <i>O</i> -rutinósido | 23,76 \pm 0,17 |
| 9 ^{Gg} | 19,71 | 344 | 725 | 593(5),285(30) | Campferol 3- <i>O</i> -(2-pentosilo, 6- <i>O</i> -ramnosil)-hexósido | 16,71 \pm 0,21 |
| 10 ^{Gg} | 20,81 | 358 | 463 | 301(100) | Quercetina 3- <i>O</i> -glucósido | 8,67 \pm 0,70 |
| 11 ^{Gg} | 21,67 | 350 | 579 | 447(5),285(50) | Canferol 3- <i>O</i> -(2-pentosilo)-hexósido | 7,67 \pm 0,18 |
| 12 ^{Gg} | 22,95 | 350 | 593 | 285(100) | Canferol 3- <i>O</i> -rutinósido | 48,44 \pm 0,16 |
| 13 ^{Gg} | 23,93 | 354 | 623 | 315(100) | Isoramnetina 3- <i>O</i> -rutinósido | tr |
| 14 ^{Gg} | 24,46 | 348 | 447 | 285(100) | Canferol 3- <i>O</i> -glucósido | 18,81 \pm 0,43 |
| 15 ^{Gg} | 25,40 | 354 | 477 | 315(100) | Isoramnetina 3- <i>O</i> - glucósido | Tr |
| 16 ^{Gg} | 26,93 | 350 | 489 | 285(100) | Canferol <i>O</i> -acetil-hexósido | 4,89 \pm 0,04 |
| 17 ^{Gg} | 32,27 | 340 | 639 | 463(32),301(34) | Quercetina <i>O</i> -glucuronido- <i>O</i> -hexósido | 1,64 \pm 0,15 |
| 18 ^{Gg} | 32,59 | 274,340 | 475 | 313(100) | Gonfrenol 3- <i>O</i> -hexósido | 3,87 \pm 0,22 |
| 19 ^{Gg} | 34,14 | 274,340 | 517 | 313(100) | Gonfrenol 3- <i>O</i> -(6-acetil)-hexósido | 14,18 \pm 0,37 |
| 20 ^{Gg} | 34,99 | 352 | 593 | 447(9),285(60) | Canferol 3- <i>O</i> -(2-ramnosil)-hexósido | 8,68 \pm 0,23 |
| 21 ^{Gg} | 35,34 | 348 | 623 | 447(4),285(23) | Canferol <i>O</i> -glucuronido- <i>O</i> -hexósido | 11,25 \pm 0,08 |
| Ácidos fenólicos totais | | | | | | 78,23 \pm 2,32 |
| Flavonoides totais | | | | | | 171,50 \pm 2,62 |
| Compostos fenólicos totais | | | | | | 249,73 \pm 4,95 |

Resultados expressos em base de massa seca; tr- vestígios

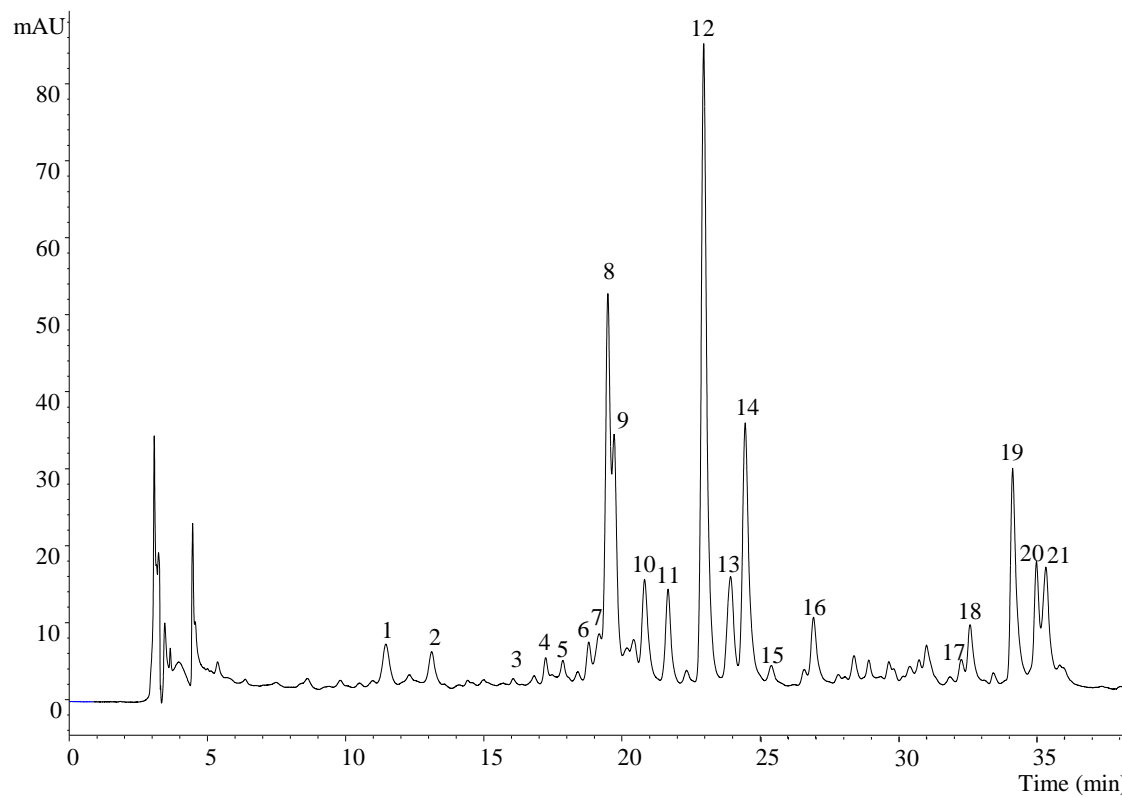


Figura 14. Perfil fenólico de extrato metanólico de *G. globosa* registado a 370 nm.

Tabela 4. Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda da absorção máxima na região do visível (λ_{\max}), dados do espectro de massa, identificação e quantificação de betacianinas em *G. globosa* (média \pm DP).

| Pico | Tr (min) | λ_{\max} (nm) | Ião molecular [M+H] ⁺ (m/z) | Principais fragmentos MS ² (m/z) | Identificação | Quantificação (μg/g) |
|-----------------------|----------|-----------------------|--|---|--------------------------|----------------------|
| 22 ^{Gg} | 28,79 | 550 | 697 | 551(2),389(22) | Gonfrenina II | 0,54 \pm 0,05 |
| 23 ^{Gg} | 31,91 | 550 | 697 | 551(3),389(39) | Gomfrenina II | 1,00 \pm 0,04 |
| 24 ^{Gg} | 32,48 | 550 | 727 | 551(4),389(41) | Gomfrenina III | 4,16 \pm 0,08 |
| 25 ^{Gg} | 34,27 | 550 | 697 | 551(2),389(21) | Isogomfrenina II | 0,41 \pm 0,01 |
| 26 ^{Gg} | 35,40 | 546 | 727 | 551(4),389(38) | Isogomfrenina III | 1,36 \pm 0,02 |
| 27 ^{Gg} | 36,65 | 500 | 683 | 507(2),345(22) | 17-Descarboxi-amarantina | 0,24 \pm 0,01 |
| Betacianidinas totais | | | | | | 7,72 \pm 0,20 |

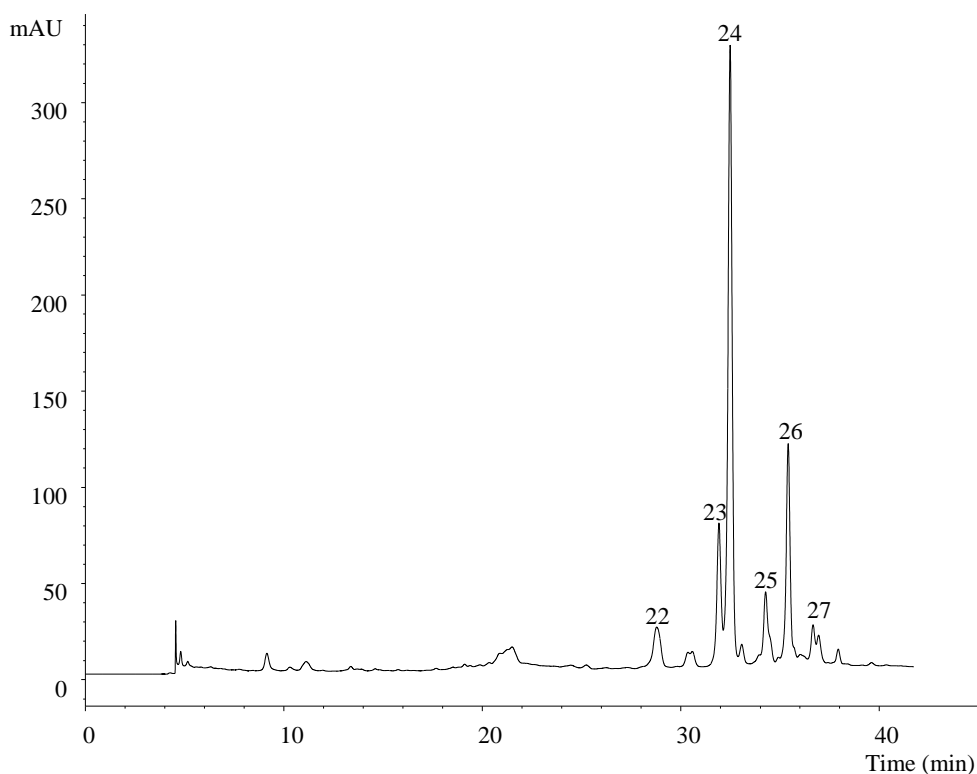


Figura 15. Perfil de betacianinas em *G. globosa* obtido a 520 nm.

Foram identificados dezoito compostos fenólicos em *C. citratus* (**Tabela 5, Figura 16**). Para além dos três derivados de hidroxicinamoilo (picos 1^{Cc}, 2^{Cc} e 9^{Cc}), os restantes picos correspondem a derivados de flavonas, que foram identificados com base no padrão de fragmentação descrito para flavonas *C*- e *O*-glucosilo por Ferreres et al., 2003 e Ferreres et al., 2004; 2007 (**Figura 17**). Deles, apenas dois picos (12^{Cc} e 13^{Cc}) foram considerados como *O*-glucosilados da aglicona. O pico 13^{Cc} foi tentativamente identificado como luteolina-7-*O*-glucósido por comparação com padrão, enquanto o pico 12^{Cc}, com um ião pseudomolecular [M-H]⁻ de *m/z* 593 libertando dois fragmentos iónicos de *m/z* 285 ([M-H-162]⁻, posterior perda de um radical hexosilo), foi descrito como luteolina 7-*O*-neo-hesperósido, com base na identificação anterior deste composto em folhas de *C. citratus* por Figueirinha et al. (2008).

O pico 3^{Cc} ([M-H]⁻ de *m/z* 579) e os picos 4^{Cc} e 5^{Cc} (ambos com [M-H]⁻ a *m/z* 563) apresentam padrões de fragmentação característicos de di-*C*-glucósidos assimétricos (Ferreres et al., 2003). Os fragmentos de *m/z* 489 e 473 ([M-H-90]⁻) e 459 e 443 ([M-H-120]⁻) indicam a presença da unidade de *C*-hexosilo. Para o pico 3^{Cc}, os fragmentos mostram uma perda de 60 u, típico da unidade de pentosilo, e foram observadas a *m/z* 519 ([M-H-60]⁻), 399 ([M-H-120-60]⁻) e 369 ([M-H-120-90]⁻); uma situação similar ocorreu para os picos 4^{Cc} e 5^{Cc} (fragmentos de *m/z* 503; [M-H-60]⁻). Para o pico 3^{Cc}, a observação do pico de base a *m/z* 459 ([M-H-120]⁻, perda parcial do hexosilo) e a sua grande abundância a *m/z* 519 ([M-H-60]⁻, perda parcial do pentosilo), sugerem que a hexose está localizada na posição 6 da aglicona. Reciprocamente, para os picos 4^{Cc} e 5^{Cc}, o pico de base de *m/z* 473 ([M-H-90]⁻) e a grande abundância do fragmento de *m/z* 503 ([M-H-60]⁻) pode indicar uma unidade 6-*C*-pentosilo. Os iões de *m/z* 369 e 353 [aglicona+83]⁻ e 399 e 383 [aglicona+113]⁻, suportam a conclusão de que a luteolina e a apigenina, respetivamente seriam as agliconas, o que permite a identificação como luteolina 6-*C*-hexosilo-8-*C*-pentósido (pico 3^{Cc}) e apigenina 6-*C*-pentosilo-8-*C*-hexósido (picos 4^{Cc} e 5^{Cc}). O pico 15^{Cc} apresenta um ião pseudomolecular [M-H]⁻ de *m/z* 417, 30 u inferior ao pico 7^{Cc} (positivamente identificado como luteolina-6-*C*-glucósido por comparação com padrão), sugerindo uma ligação de uma unidade pentosilo com a aglicona, o que em conjunto com os fragmentos de *m/z* 357 ([M-H-60]⁻; pico de base) e 327 ([M-H-90]⁻) permitiu a sua identificação tentativa como luteolina 6-*C*-pentósido. Os picos 8^{Cc} e 10^{Cc} apresentam o mesmo espectro UV e ião pseudomolecular [M-H]⁻ de

m/z 549. A sua fragmentação MS^2 sugere a presença de duas unidades de pentosilo ligadas nas posições 6 e 8, podendo assim ser identificado como 6-*C*-pentosilo-8-*C*-pentósido. A existência de dois picos pode ser explicada por diferentes pentoses substituintes em cada caso. A presença de todos os picos anteriores em folhas de *C. citratus* foi já descrita por Figueirinha et al. (2008).

O pico 11^{Cc} mostrou um ião pseudomolecular $[M-H]^-$ de m/z 577, libertando cinco fragmentos iónicos MS^2 . A perda de 120 u (ião de m/z 457) é característica de *C*-hexosilo flavona, enquanto que o fragmento de m/z 413 ($[M-H-146-18]^-$) poderá indicar a desosihexose *O*-glucosilada no grupo hidroxilo na posição 2'' da *C*-glucosilação do açúcar (Ferrerres et al., 2007). Os outros três produtos iónicos de m/z 341 ($[aglicona+71]^-$), m/z 311 ($[aglicona+41]^-$) e m/z 293 ($[aglicona+41-18]^-$) são comuns em derivados mono-*C*-glucosilo *O*-glucosilado na posição 2'' (Ferrerres et al., 2007, 2011). Assim, este pico foi tentativamente identificado como apigenina 2''-*O*-desosi-hexosilo-*C*-hexósido. Um raciocínio similar foi aplicado na classificação do pico 6^{Cc} ($[M-H]^-$ de m/z 593). O pico de base de m/z 473 (perda de 120 u) indica uma *C*-hexosilo flavona, e o fragmento de m/z 429 ($[M-H-146-18]^-$) é característico da *O*-glucosilação de posição 2'' de *C* ligado ao açúcar (Ferrerres et al., 2007). Iões de m/z 357 ($[aglicona+71]^-$), m/z 339 ($[aglicona+71-H_2O]^-$) e m/z 309 ($[aglicona+41-H_2O]^-$) confirmam a luteolina como aglicona. Assim, o pico foi tentativamente identificado como luteolina 2''-*O*-desosi-hexosilo-6-*C*-hexósido também descrito em *C. citratus* por Figueirinha et al. (2008). O pico 14^{Cc} demonstrou um ião pseudomolecular $[M-H]^-$ a m/z 563, 30 u inferior ao pico 6^{Cc}. A observação de um ião fraco a m/z 417 ($[(M-H)-146]^-$) e de um fragmento maior a m/z 399 ($[(M-H)-146-18]^-$) indica uma ligação *O*-desosi-hexose, e a observação de iões a m/z 503 ($[(M-H)-60]^-$) e 473 ($[(M-H)-90]^-$) revelaram a pentose diretamente ligada à aglicona. Isto sugere a identificação dos picos como luteolina 2''-*O*-desosi-hexosilo-*C*-pentósido.

O pico 17^{Cc} mostrou um ião pseudomolecular $[M-H]^-$ a m/z 577. Na fragmentação MS^2 , a observação do ião $[M-H-90]^-$ (m/z a 487) e a falta do ião $[M-H-60]^-$ sugerem um *C*-ligado à hexose; assim, o fragmento principal de m/z 413 ($[(M-H)-146-18]^-$) indica o *O*-ligado a desosi-hexose; a perda de -104 u para dar origem ao fragmento de m/z 473 pode ser interpretado como correspondendo a uma fragmentação parcial de desosihexosilo (ião $^{0,2}X_1^-$); assim, os fragmentos de m/z 371 ($[aglicona+71]^-$) e 323

([aglicona+41-H₂O]⁻) apontam para a metil-luteolina como aglicona (Ferrerres et al., 2007). Atendendo a todos os factos mencionados, o composto foi tentativamente classificado como metil-luteolina 2''-*O*-desoxi-hexosil-*C*-hexósido.

Finalmente, o pico 16^{Cc} demonstrou um ião pseudomolecular [M-H]⁻ de *m/z* 575 libertando fragmentos iónicos de *m/z* 411 ([M-H]-146-H₂O]⁻, pico de base) e *m/z* 429 ([M-H]-146]⁻) que sugere a presença de 2''-*O*-ligada ao grupo desoxi-hexosilo (Ferrerres et al., 2007). Os fragmentos de *m/z* 367 e 337, por posterior perda de 44 e 74 u do pico de base, respetivamente, indicam um *C*-ligado 6-desoxi-hexose; a observação de um fragmento não usual de *m/z* 309 pela perda de 102 u (ao invés de 104 u) por parte do pico de base pode ser interpretada como a existência de um carbono cetona no resíduo de açúcar. Assim, o composto foi tentativamente identificado como luteolina 2''-*O*-desoxiosil-6-*C*-(6-desoxi-pento-hexosulosilo) (**Figura 17**), similar ao composto previamente descrito em *C. citratus* por Figueirinha et al. (2008).

Em *C. citratus*, os flavonoides foram o maior grupo de compostos fenólicos encontrado, sendo a luteolina 2''-*O*-desoxiosil-6-*C*-(6-desoxi-pento-hexosulosilo) (pico 6^{Cc}, 2138,07 µg/g) o composto principal (**Tabela 3**). Figueirinha et al. (2008; 2010) descreveram um perfil muito similar ao encontrado na amostra de *C. citratus* em estudo. Pelo contrário, Marques & Farah (2009) descreveram a presença de derivados de ácido cafeoilquínico, feruloilquínico e dicafeoilquínico em extratos metanólicos e infusões de *C. citratus* proveniente do Brasil. Além disso, Port's et al. (2013) estudaram também uma amostra do mesmo país, que foi submetida a um processo de hidrólise, e descreveram um perfil completamente diferente (ácido gálico, catequina, epicatequina, quercetina, rutina e mircetina).

Tabela 5. Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda da absorção máxima na região do visível (λ_{max}), dados do espectro de massa, identificação e quantificação de compostos fenólicos em *C. citratus* (média \pm DP).

| Pico | Tr (min) | λ_{max} (nm) | Ião molecular [M-H] ⁻ (m/z) | Principais fragmentos MS ² (m/z) | Tentativa de identificação | Quantificação (µg/g) | |
|------------------|----------|----------------------|--|--|--|----------------------------|---------------------|
| 1 ^{Cc} | 8.19 | 324 | 353 | 191(100),179(4),161(5),135(3) | Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico | 101,56 \pm 1,56 | |
| 2 ^{Cc} | 11.28 | 326 | 179 | 135(100) | Ácido cafeico | 21,27 \pm 0,79 | |
| 3 ^{Cc} | 12.73 | 350 | 579 | 561(10),519(6),489(56),459(100),399(52),369(47) | Luteolina 6- <i>C</i> -hexosilo-8- <i>C</i> -pentósido | 97,33 \pm 3,75 | |
| 4 ^{Cc} | 14.94 | 336 | 563 | 545(27),503(40),473(100),443(83),383(90),353(85) | Apigenina 6- <i>C</i> -pentosilo-8- <i>C</i> -hexósido | 246,70 \pm 4,82 | |
| 5 ^{Cc} | 15.26 | 336 | 563 | 545(20),503(37),473(100),443(83),383(73),353(83) | Apigenina 6- <i>C</i> -pentosilo-8- <i>C</i> -hexósido | 31,75 \pm 0,50 | |
| 6 ^{Cc} | 15.87 | 350 | 593 | 473(100),429(37),357(26),339(12), 309(20),(35) | Luteolina 2''- <i>O</i> -desoxi-hexosilo-6- <i>C</i> -glucósido | 2138,07 \pm 32,61 | |
| 7 ^{Cc} | 16.24 | 350 | 447 | 429(30),357(100),339(15),327(86),297(22),285(15) | Luteolina-6- <i>C</i> -glucósido | 93,93 \pm 0,47 | |
| 8 ^{Cc} | 16.43 | 350 | 549 | 531(18),489(36),459(100),441(25),429(21),399(55),369(52) | Luteolina 6- <i>C</i> -pentosilo-8- <i>C</i> -pentósido | 270,05 \pm 7,47 | |
| 9 ^{Cc} | 16.96 | 310 | 163 | 119(100) | Ácido <i>trans-p</i> -cumárico | 32,83 \pm 0,88 | |
| 10 ^{Cc} | 17.98 | 350 | 549 | 531(12),489(32),459(100),441(18),429(18),399(76),369(60) | Luteolina 6- <i>C</i> -pentosilo-8- <i>C</i> -pentósido | 20,00 \pm 1,02 | |
| 11 ^{Cc} | 19.04 | 344 | 577 | 457(26),413(100),341(15),311(14),293(77) | Apigenina 2''- <i>O</i> -desosi-hexosilo- <i>C</i> -hexósido | 127,70 \pm 6,59 | |
| 12 ^{Cc} | 20.66 | 350 | 593 | 447(6),285(22) | Luteolina 7- <i>O</i> -neo-hesperósido | 926,42 \pm 15,71 | |
| 13 ^{Cc} | 20.81 | 348 | 447 | 285(100) | Luteolina-7- <i>O</i> -glucósido | 1410,24 \pm 37,12 | |
| 14 ^{Cc} | 22.07 | 352 | 563 | 503(3),473(100),417(17),399(53),357(23),327(25),298(40) | Luteolina 2''- <i>O</i> -desoxi-hexosil- <i>C</i> -pentósido | 1029,80 \pm 41,40 | |
| 15 ^{Cc} | 22.55 | 350 | 417 | 399(42),357(100),339(19),327(90),311(7),297(35) | Luteolina 6- <i>C</i> -pentósido | 38,53 \pm 1,29 | |
| 16 ^{Cc} | 25.22 | 350 | 575 | 531(33),429(38),411(100),367(65),357(15),337(20),309(10) | Luteolina 2''- <i>O</i> -desoxiosil-6- <i>C</i> -(6-desoxi-pento-hexosulosilo) | 1122,62 \pm 7,15 | |
| 17 ^{Cc} | 27.67 | 350 | 577 | 487(10),473(40),413(100),371(15),323(27) | Metil-luteolina 2''- <i>O</i> -desoxi-hexosil-6- <i>C</i> -hexósido. | 58,63 \pm 0,95 | |
| 18 ^{Cc} | 34.37 | 350 | 285 | 175(14),151(18),133(32) | Luteolina | 187,18 \pm 1,35 | |
| | | | | | | Ácidos fenólicos totais | 155,65 \pm 1,47 |
| | | | | | | Flavonoides totais | 7798,96 \pm 70,79 |
| | | | | | | Compostos fenólicos totais | 7954,61 \pm 69,32 |

Resultados expressos em base de massa seca.

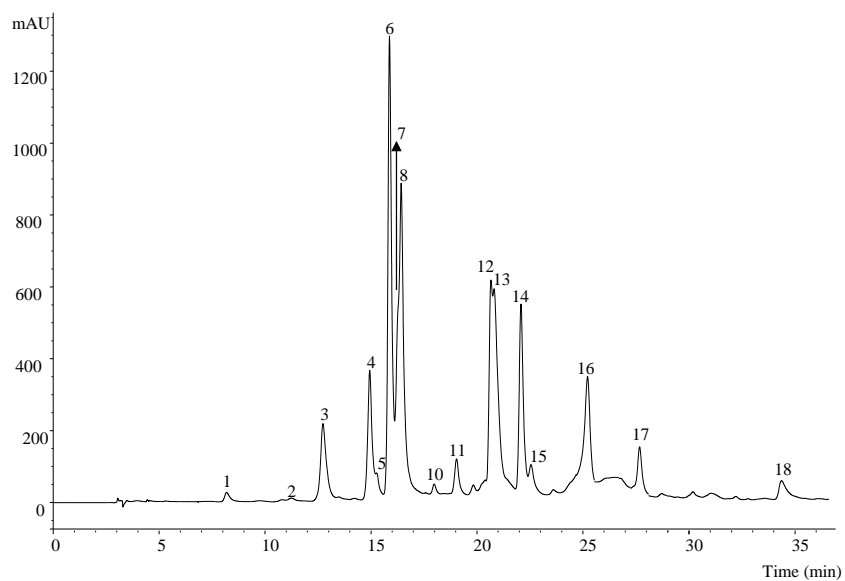


Figura 17. Perfil fenólico de *C. citratus* registrado a 370 nm.

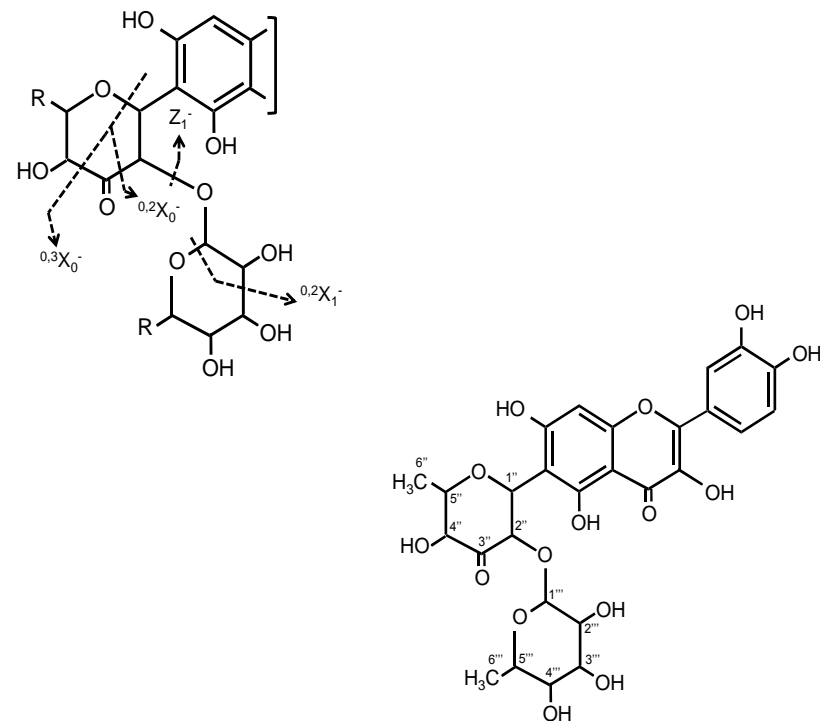


Figura 16. Fragmentação geral de flavonoides *O*-glucosil-*C*-glucosilo (baseado em Ferreres et al, 2007); Estrutura química de 2''-*O*-desoxiosil-6-*C*-(6-desoxi-pento-hexos-ulosilo) presente em *C. citratus*.

3.2.2. Nas infusões

Os perfis em compostos fenólicos das infusões de *P. tridentatum* (Pt), *G. globosa* (Gg) e *C. citratus* (Cc) são apresentados nas **Figuras 18, 19 e 20**. Os dados (tempo de retenção, λ_{\max} na região do visível, ião molecular e principais fragmentos iónicos observados em MS²) obtidos por análise de HPLC-DAD-ESI/MS relativos à identificação de compostos fenólicos e betacianidinas e respetiva quantificação individual são apresentados nas **Tabelas 6-8**.

Todos os compostos encontrados nas infusões foram já descritos na secção anterior. Não obstante, deve ser destacado que alguns dos compostos anteriormente identificados nos extratos metanólicos, não foram encontrados nas infusões aqui estudadas. Sabe-se que o processo de aquecimento inerente à preparação das infusões poderá destruir esses compostos (Samaniego-Sánchez et al., 2011).

Todos os compostos identificados no extrato metanólico de *P. tridentatum*, exceto a 7-*O*-metilgenisteína (prunetina), foram também identificados na infusão (**Tabela 6**), que apresentou vinte flavonoides. Derivados de *C*-di-hidroflavonóis (nomeadamente o pico 1^{Pt}, 43,04 mg/g de infusão) foram também os compostos maioritários encontrados na infusão de *P. tridentatum* (**Tabela 6**). O perfil fenólico da infusão preparada a partir de amostras silvestres de *P. tridentatum* foi também descrito por outros autores (Vitor et al., 2004; Paulo et al., 2008). No entanto, os resultados apresentados no presente trabalho são mais detalhados que os descritos pelos autores referidos.

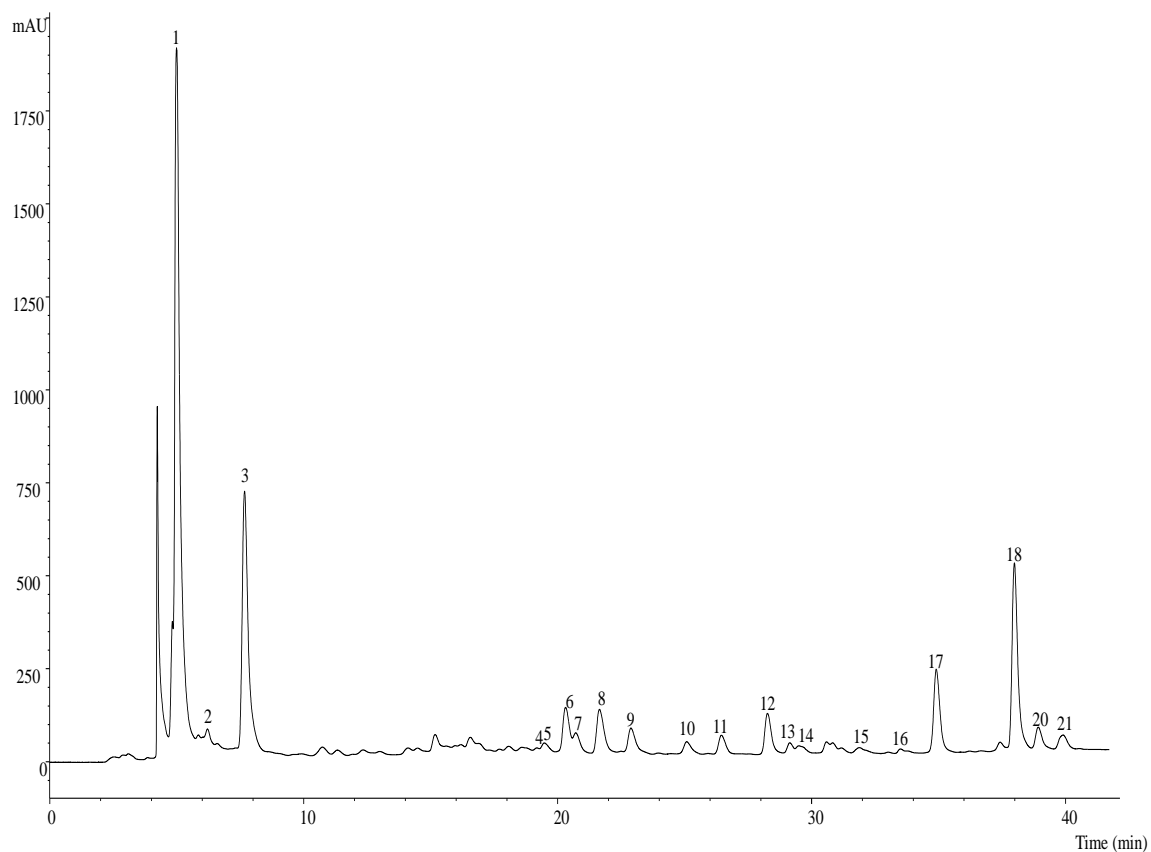


Figura 18. Perfil fenólico da infusão de *P. tridentatum* registado a 280 nm.

Tabela 6. Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda da absorção máxima na região do visível (λ_{max}), dados do espectro de massa, identificação e quantificação de compostos fenólicos em infusão de *P. tridentatum* (média \pm DP).

| Pico | Rt (min) | λ_{max} (nm) | Ião Molecular [M-H] ⁻ (m/z) | Tentativa de Identificação | Quantificação (mg/g inf) |
|--------------------------|----------|-------------------------|---|--|-----------------------------|
| 1 ^{Pt} | 5,0 | 290,sh340 | 465 | Di-hidroquercetina 6-C-hesóxido | 43,04 \pm 0,65 |
| 2 ^{Pt} | 6,1 | 294,sh346 | 465 | Dihidroquercetina 6-C-hesóxido | 2,74 \pm 0,17 |
| 3 ^{Pt} | 7,7 | 290,sh340 | 479 | Miricetina-6-C-glucósido | 12,87 \pm 0,01 |
| 4 ^{Pt} | 18,7 | 356 | 609 | Quercetina desoxi-hexosil-hexósido | 0,77 \pm 0,01 |
| 5 ^{Pt} | 18,9 | 356 | 609 | Quercetina-3-O-rutinosídeo | 2,10 \pm 0,13 |
| 6 ^{Pt} | 19,8 | 354 | 463 | Quercetina-3-O-glucósido (isoquercitrina) | 11,85 \pm 0,05 |
| 7 ^{Pt} | 20,2 | 354 | 463 | Quercetina O-hexósido | 5,81 \pm 0,07 |
| 8 ^{Pt} | 21,2 | 262,sh312 | 431 | Genisteína 7-O-glucósido (genistina) | 3,53 \pm 0,11 |
| 9 ^{Pt} | 22,4 | 262,sh308 | 461 | 5,5'-Di-hidroxi-3'-metoxi-isoflavona-7-O- β -glucósido | 2,25 \pm 0,05 |
| 10 ^{Pt} | 24,6 | 260,sh332 | 431 | Genisteína-8-C-glucósido | 1,28 \pm 0,03 |
| 11 ^{Pt} | 26,0 | 256,sh322 | 505 | Metilbiochanina A/metilprunetina O-hexosido | 1,65 \pm 0,06 |
| 12 ^{Pt} | 27,8 | 262,sh332 | 269 | Genisteína | 3,08 \pm 0,04 |
| 13 ^{Pt} | 28,7 | 262,sh336 | 341 | Derivado de metilbiochanina A/metilprunetina | 0,97 \pm 0,05 |
| 14 ^{Pt} | 29,0 | 252,sh328 | 607 | Biochanina A O-hexósido-O-hexósido | 0,72 \pm 0,07 |
| 15 ^{Pt} | 31,4 | 260,sh340 | 445 | Biochanina A 7-O-glucósido (sissotrina) | 0,60 \pm 0,02 |
| 16 ^{Pt} | 33,1 | 260,sh338 | 649 | Biochanina A O-acetil-hexósido-O-hexósido | 0,31 \pm 0,02 |
| 17 ^{Pt} | 34,5 | 264,sh338 | 491 | Biochanina A O-hexósido | 4,79 \pm 0,03 |
| 18 ^{Pt} | 37,7 | 260,sh332 | 283 | 4'-O-metil genisteína (biochanina A) | 9,52 \pm 0,00 |
| 19 ^{Pt} | 38,6 | 262,sh334 | 283 | 7-O-metil genisteína (prunetina) | nd |
| 20 ^{Pt} | 39,5 | 262,sh338 | 299 | 7-O-metilobol | 1,45 \pm 0,03 |
| 21 ^{Pt} | 41,0 | 264,sh290 | 297 | Metilbiochanina A/ metilprunetina | 0,58 \pm 0,01 |
| Flavonóis totais | | | | | 33,40 \pm 0,28 |
| Di-hidroflavonóis totais | | | | | 45,78 \pm 1,42 |
| Isoflavonas totais | | | | | 30,72 \pm 0,38 |
| Flavonoides totais | | | | | 109,90 \pm 1,32 |

nd- não detetado

No que diz respeito a *G. globosa* (**Tabela 7, Figura 19A e B**), o perfil em compostos fenólicos da infusão foi similar ao já descrito anteriormente para o extrato metanólico e para outras infusões à base da mesma espécie (Ferrerres et al., 2004; Silva et al., 2012). A composição em betacianidinas foi também similar à descrita por Cai et al. (2001), para uma infusão preparada com amostras silvestres. Os flavonoides foram também os principais compostos fenólicos encontrados em *G. globosa*, sendo o canferol 3-*O*-rutinósido (pico 12^{Gg}, 0,89 mg/g de infusão) o principal flavonol. Por outro lado, os isómeros de gomphrenin III foram as betacianidinas maioritariamente encontradas (**Tabela 7, Figura 19B**).

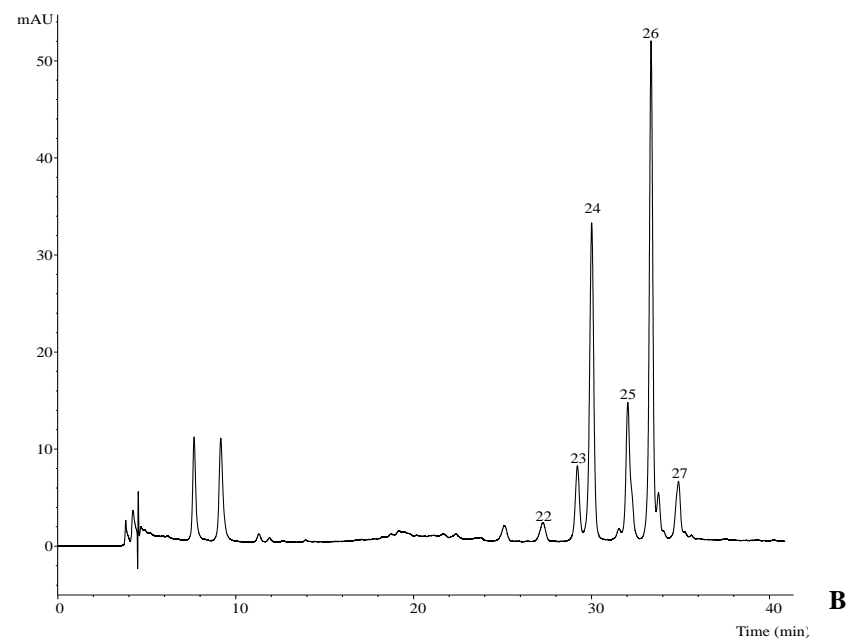
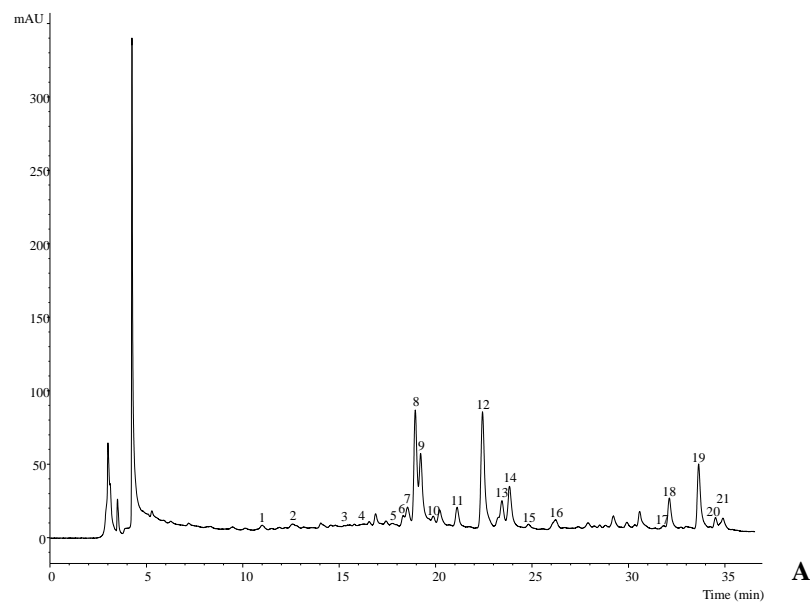


Figura 19. A. Perfil fenólico da infusão de *G. globosa* registado a 370 nm; B. Perfil de betacianidinas em *G. globosa* registado a 520 nm.

Tabela 7. Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda da absorção máxima na região do visível (λ_{max}), dados do espectro de massa, identificação e quantificação de compostos fenólicos, e percentagem relativa de betacianidinas em infusão de *G. globosa* (média \pm DP).

| Pico | Rt (min) | λ_{max} (nm) | Ião Molecular [M-H] ⁻ (m/z) | Tentativa de Identificação | Quantificação (mg/g inf) |
|------------------|----------|----------------------|--|---|--------------------------|
| 1 ^{Gg} | 11,0 | 326 | 355 | Ácido <i>cis</i> -ferúlico hexóxido | 0,37 \pm 0,03 |
| 2 ^{Gg} | 12,6 | 326 | 355 | Ácido <i>trans</i> -ferúlico hexóxido | 0,52 \pm 0,01 |
| 3 ^{Gg} | 15,5 | 309 | 163 | Ácido <i>cis-p</i> -cumárico | 0,09 \pm 0,01 |
| 4 ^{Gg} | 16,4 | 310 | 163 | Ácido <i>trans-p</i> -cumárico | 0,41 \pm 0,01 |
| 5 ^{Gg} | 18,1 | 324 | 193 | Ácido <i>cis</i> -ferúlico | 0,20 \pm 0,02 |
| 6 ^{Gg} | 18,3 | 358 | 595 | Quercetina 3- <i>O</i> -(6-pentosilo)-hexósido | 0,08 \pm 0,02 |
| 7 ^{Gg} | 18,6 | 324 | 193 | Ácido <i>trans</i> -ferúlico | 0,92 \pm 0,01 |
| 8 ^{Gg} | 19,0 | 358 | 609 | Quercetina 3- <i>O</i> -rutinósido | 0,66 \pm 0,01 |
| 9 ^{Gg} | 19,2 | 346 | 725 | Camferol 3- <i>O</i> -(2-pentosilo, 6- <i>O</i> -ramnosil)-hexósido | 0,56 \pm 0,06 |
| 10 ^{Gg} | 19,9 | 358 | 463 | Quercetina 3- <i>O</i> -glucósido | 0,10 \pm 0,01 |
| 11 ^{Gg} | 21,1 | 350 | 579 | Canferol 3- <i>O</i> -(2-pentosilo)-hexósido | 0,19 \pm 0,02 |
| 12 ^{Gg} | 22,4 | 348 | 593 | Canferol 3- <i>O</i> -rutinósido | 0,89 \pm 0,04 |
| 13 ^{Gg} | 23,5 | 352 | 623 | Isoramnetina 3- <i>O</i> -rutinósido | tr |
| 14 ^{Gg} | 23,9 | 350 | 447 | Canferol 3- <i>O</i> -glucósido | 0,31 \pm 0,05 |
| 15 ^{Gg} | 24,9 | 354 | 477 | Isoramnetina 3- <i>O</i> - glucósido | tr |
| 16 ^{Gg} | 26,3 | 350 | 489 | Canferol <i>O</i> -acetil-hexósido | 0,11 \pm 0,03 |
| 17 ^{Gg} | 31,9 | 340 | 639 | Quercetina <i>O</i> -glucuronido- <i>O</i> -hexósido | 0,04 \pm 0,01 |
| 18 ^{Gg} | 32,2 | 276,342 | 475 | Gonfrenol 3- <i>O</i> -hexósido | 0,20 \pm 0,01 |
| 19 ^{Gg} | 33,7 | 278,342 | 517 | Gonfrenol 3- <i>O</i> -(6-acetil)-hexósido | 0,39 \pm 0,04 |
| 20 ^{Gg} | 34,6 | 352 | 593 | Canferol 3- <i>O</i> -(2-ramnosil)-hexósido | 0,10 \pm 0,01 |
| 21 ^{Gg} | 35,0 | 348 | 623 | Canferol <i>O</i> -glucuronido- <i>O</i> -hexósido | 0,12 \pm 0,03 |
| | | | | Ácidos fenólicos totais | 2,51 \pm 0,01 |
| | | | | Flavonoides totais | 3,77 \pm 0,32 |
| | | | | Compostos fenólicos totais | 6,28 \pm 0,31 |

| Pico | Rt (min) | λ_{max} (nm) | Ião Molecular [M+H] ⁺ (m/z) | Tentativa de Identificação | Quantificação (mg/g inf) |
|------------------|----------|----------------------|--|----------------------------|--------------------------|
| 22 ^{Gg} | 27,3 | 550 | 697 | Gonfrenina II | tr |
| 23 ^{Gg} | 29,2 | 550 | 697 | Gomfrenina II | tr |
| 24 ^{Gg} | 30,0 | 550 | 727 | Gomfrenina III | 0,21 \pm 0,01 |
| 25 ^{Gg} | 32,0 | 550 | 697 | Isogomfrenina II | 0,01 \pm 0,00 |
| 26 ^{Gg} | 33,4 | 548 | 727 | Isogomfrenina III | 0,35 \pm 0,01 |
| 27 ^{Gg} | 34,9 | 516 | 683 | 17-Descarboxi-amarantina | tr |

tr- vestígios

O ácido *trans* *p*-cumárico e a luteolina, previamente encontrados em extratos metanólicos de *C. citratus*, não foram observados na infusão (**Tabela 8, Figura 20**). Quanto ao composto 2a^{Cc}, correspondente a um isómero *cis* do ácido cafeico, foi apenas detetado na infusão, provavelmente, devido ao processo de aquecimento aplicado na sua realização. Seria esperado que os derivados *cis* de hidroxicinamoil eluíssem antes dos isómeros *trans* correspondentes, como já observado no nosso laboratório após radiação UV (366 nm, 24 h) de ácidos hidroxicinâmicos (Barros et al., 2012).

Os flavonoides foram também o maior grupo de compostos fenólicos encontrado na infusão de *C. citatus*, sendo a luteolina 2''-*O*-desoxi-hexosil-6-*C*-hexósido (pico 6^{Cc}, 13,12 µg/g de infusão) o composto principal (**Tabela 8**). A caracterização fenólica descrita no presente estudo é mais detalhada que a descrição feita por outros autores (Figueirinha et al., 2008; Marques & Farah, 2009; Figueirinha et al., 2010; Port's et al., 2013).

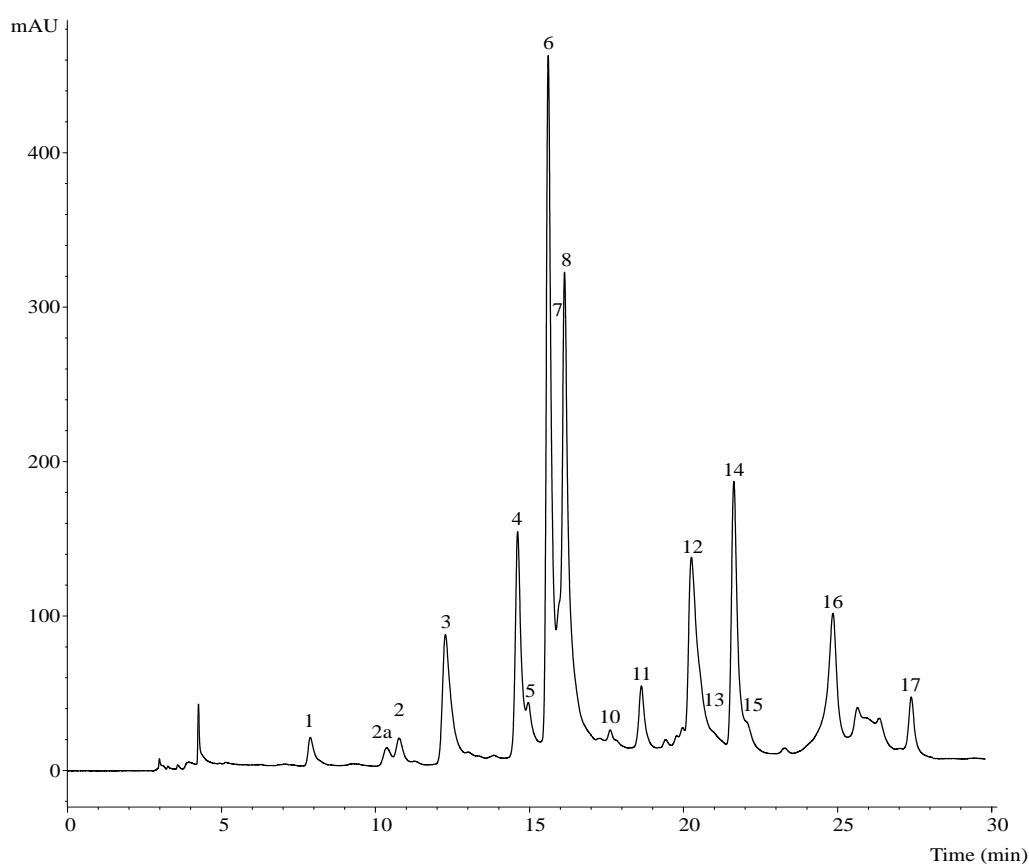


Figura 20. Perfil fenólico da infusão de *C. citratus* registado a 370 nm.

Tabela 8. Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda da absorção máxima na região do visível (λ_{max}), dados do espectro de massa, identificação e quantificação de compostos fenólicos em infusão de *C. citratus* (média \pm DP).

| Pico | Rt (min) | λ_{max} (nm) | Ião Molecular [M-H] ⁻ (m/z) | Tentativa de Identificação | Quantificação (mg/g inf) |
|----------------------------|----------|-------------------------|---|---|-----------------------------|
| 1 ^{Cc} | 7,9 | 326 | 353 | Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico | 1,21 \pm 0,05 |
| 2 ^{Cc} | 10,3 | 326 | 179 | Ácido cafeico | 0,27 \pm 0,01 |
| 2a ^{Cc} | 10,8 | 324 | 179 | Ácido cafeico | 0,77 \pm 0,01 |
| 3 ^{Cc} | 12,3 | 350 | 579 | Luteolina 6- <i>C</i> -hexosilo-8- <i>C</i> -pentósido | 0,70 \pm 0,03 |
| 4 ^{Cc} | 14,6 | 336 | 563 | Apigenina 6- <i>C</i> -pentosilo-8- <i>C</i> -hexósido | 1,76 \pm 0,03 |
| 5 ^{Cc} | 15,0 | 350 | 563 | Apigenina 6- <i>C</i> -pentosilo-8- <i>C</i> -hexósido | 0,53 \pm 0,01 |
| 6 ^{Cc} | 15,6 | 352 | 593 | Luteolina 2''- <i>O</i> -desoxi-hexosilo-6- <i>C</i> -glucósido | 13,12 \pm 0,03 |
| 7 ^{Cc} | 16,0 | 352 | 447 | Luteolina-6- <i>C</i> -glucósido | 0,35 \pm 0,01 |
| 8 ^{Cc} | 16,1 | 350 | 549 | Luteolina 6- <i>C</i> -pentosilo-8- <i>C</i> -pentósido | 1,75 \pm 0,01 |
| 9 ^{Cc} | 17,0 | 310 | 163 | Ácido <i>trans-p</i> -cumárico | nd |
| 10 ^{Cc} | 17,6 | 356 | 549 | Luteolina 6- <i>C</i> -pentosilo-8- <i>C</i> -pentósido | 0,17 \pm 0,03 |
| 11 ^{Cc} | 18,6 | 328 | 577 | Apigenina 2''- <i>O</i> -desoxi-hexosilo- <i>C</i> -hexósido | 0,99 \pm 0,01 |
| 12 ^{Cc} | 20,3 | 348 | 593 | Luteolina 7- <i>O</i> -neo-hesperósido | 5,31 \pm 0,26 |
| 13 ^{Cc} | 20,5 | 350 | 447 | Luteolina-7- <i>O</i> -glucósido | 2,07 \pm 0,15 |
| 14 ^{Cc} | 21,6 | 352 | 563 | Luteolina 2''- <i>O</i> -desoxi-hexosil- <i>C</i> -pentósido | 6,21 \pm 0,36 |
| 15 ^{Cc} | 22,0 | 350 | 417 | Luteolina 6- <i>C</i> -pentósido | 0,24 \pm 0,02 |
| 16 ^{Cc} | 24,9 | 350 | 575 | Luteolina 2''- <i>O</i> -desoxiosil-6- <i>C</i> -(6-desoxi- <i>pento</i> -hexosulosilo) | 4,19 \pm 0,47 |
| 17 ^{Cc} | 27,4 | 352 | 577 | Metil-luteolina 2''- <i>O</i> - desoxi-hexosil-6- <i>C</i> -hexósido, | 0,28 \pm 0,02 |
| 18 ^{Cc} | 34,4 | 350 | 285 | Luteolina | nd |
| Ácidos fenólicos totais | | | | | 2,24 \pm 0,07 |
| Flavonoides totais | | | | | 37,66 \pm 1,07 |
| Compostos fenólicos totais | | | | | 39,90 \pm 1,14 |

nd-não detetado

3.3. PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES

3.3.1. Dos extratos metanólicos

A atividade antioxidante não pode ser medida diretamente. Assim, inúmeros testes têm sido desenvolvidos para avaliar a atividade antioxidante de alimentos e amostras biológicas, não existindo ainda um método universal capaz de medir a atividade antioxidante de todas as amostras (Prior et al., 2005). Além disso, os métodos padronizados para avaliar a atividade antioxidante devem atender a certos requisitos e, por conseguinte, dividem-se em duas categorias com foco na atividade captadora de radicais livres e na inibição da peroxidação lipídica (Magalhães et al., 2008). No presente estudo, a atividade antioxidante foi avaliada pela atividade captadora de radicais de DPPH, poder redutor e inibição da peroxidação lipídica (inibição da descoloração do β -caroteno e ensaio de TBARS).

Os resultados da atividade antioxidantes dos extratos metanólicos das três plantas estudadas são representados na **Tabela 9**. O extrato metanólico de *P. tridentatum* apresentou a maior atividade captadora de radicais de DPPH e poder redutor. Isto pode ser explicado pelo seu perfil peculiar em compostos fenólicos, principalmente derivados de di-hidroflavonóis e isoflavonas. As isoflavonas têm vindo a ser extensivamente estudadas pelos seus efeitos promotores de saúde. Estes compostos fenólicos têm a capacidade de captar radicais livres tais como superóxido e óxido nítrico (Rimbach et al., 2003). A genisteína e daidzeína são conhecidas como as isoflavonas mais eficientes, possuindo capacidade direta para captar radicais livres (Ruiz-Larrea et al., 1997; Arora et al., 1998). Além disso, as isoflavonas são também conhecidas por possuírem a capacidade de diminuir o dano oxidativo via mecanismos indiretos em células, nomeadamente pela indução de enzimas captadoras de antioxidantes (Cai & Wei, 1996). Recentemente, os di-hidroflavonóis têm também recebido especial atenção devido aos seus potenciais benefícios para a saúde, atribuídos à sua atividade antioxidante. Tem sido descrito que as propriedades antioxidantes destes compostos fenólicos são resultado de uma elevada

propensão em transferir eletrões, quelatar iões ferrosos e captar espécies reativas de oxigénio (Montoro et al., 2005; Gong et al., 2009).

Pelo contrário, foi o extrato de *C. citratus* que demonstrou a mais elevada capacidade de inibição da descoloração do β -caroteno e inibição da peroxidação lipídica. Isto pode ser explicado pela sua elevada quantidade de flavonoides, especialmente derivados de apigenina e luteolina. Além disso, estas espécies revelaram também uma grande quantidade de flavonas *C* glicosilo, conhecidas pelas propriedades antioxidantes (Talhi & Silva, 2012). Figueirinha et al. (2008) demonstraram que uma fração de flavonoides de *C. citratus* (principalmente derivados de apigenina e flavonas *C* glicosilo) apresentava boa capacidade captadora de aniões superóxido e radicais hidroxilo, revelando que esses compostos possuem efeitos protetores contra essas espécies reativas envolvidas em doenças inflamatórias e degenerativas.

O extrato metanólico de *G. globosa* apresentou a atividade mais baixa em todos os ensaios, apresentando também a menor concentração de compostos fenólicos, o que pode explicar o menor efeito apresentado por esta amostra.

O extrato de *C. citratus* estudado demonstrou uma atividade captadora de radicais DPPH maior do que os extratos metanólicos obtidos a partir de uma amostra comercial de Taiwan (23,5% a 1 mg/mL; Tsai et al., 2008) e Malásia (valor de EC_{50} 994,77 μ g/mL; Koh et al., 2012), e também poder redutor mais elevado do que um extrato metanólico de uma amostra Coreana (absorvância 0,32 a 0,2 mg/mL; Oh et al., 2013). Não obstante, revelou uma atividade captadora de radicais de DPPH inferior ao do extrato metanólico preparado com amostras do Chile (0,08 μ g/mL; Port's et al., 2013). O extrato de *G. globosa* apresentou menor atividade captadora de radicais de DPPH quando comparado com um extrato aquoso de uma amostra comercial de *G. globosa* também de Portugal, mas de um diferente distribuidor (valor de EC_{50} 421 μ g/mL; Silva et al., 2012). Por fim, a amostra de *P. tridentatum* estudada demonstrou maior atividade captadora de radicais DPPH e poder redutor, e menor inibição da peroxidação lipídica que uma amostra silvestre tradicionalmente seca à sombra descrita por Pinela et al. (2011).

Tabela 9. Atividade antioxidante (valores de EC₅₀, mg/mL) de extratos metanólicos obtidos a partir de *P. tridentatum*, *G. globosa* e *C. citratus* (média ± DP).

| | <i>Pterospartum tridentatum</i> | <i>Gomphrena globosa</i> | <i>Cymbopogon citratus</i> |
|-------------------------------------|---------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| Atividade captadora DPPH | 0,18 ± 0,01 ^c | 4,87 ± 0,13 ^a | 0,31 ± 0,02 ^b |
| Poder redutor | 0,11 ± 0,00 ^c | 1,47 ± 0,03 ^a | 0,21 ± 0,01 ^b |
| Inibição descoloração do β-caroteno | 0,48 ± 0,09 ^b | 0,61 ± 0,03 ^a | 0,32 ± 0,10 ^c |
| Inibição deTBARS | 1,18 ± 0,06 ^b | 3,31 ± 0,18 ^a | 0,53 ± 0,01 ^c |

Os valores de EC₅₀ correspondem à concentração do extrato capaz de atingir 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância no ensaio de poder redutor. Em cada linha, letras diferentes correspondem a diferenças significativas nos resultados ($p < 0.05$).

3.3.2. Das infusões preparadas com plantas individuais e misturas

As empresas de comercialização de plantas têm vindo a preparar misturas de espécies para serem consumidas como infusões, de forma a melhorar os parâmetros organoléticos, em particular o sabor. De facto, para além de algumas propriedades medicinais (mencionadas na secção de introdução), o sabor de *P. tridentatum* e *G. globosa* não é agradável para a maioria dos consumidores. Assim sendo, a estratégia passa por adicionar uma planta de sabor agradável, nomeadamente *C. citratus*, para alcançar uma mistura com propriedades organoléticas adequadas às preferências da maioria dos consumidores. Não obstante, além da melhoria do sabor, a mistura pode providenciar efeitos benéficos, tirando partido dos sinergismos entre plantas. As infusões preparadas a partir das plantas individuais e das misturas das mesmas em diferentes proporções apresentaram elevada atividade antioxidante nomeadamente, atividade captadora de radicais livres, poder redutor e inibição da peroxidação lipídica (**Tabelas 10 e 11**).

A ordem de eficácia antioxidante para as amostras individuais nos quatro ensaios *in vitro* foi *P. tridentatum* > *C. citratus* > *G. globosa*. A elevada atividade observada para *P. tridentatum* pode ser relacionada com a presença de derivados de di-hidroflavonóis e isoflavonas. As propriedades antioxidantes de isoflavonas e o seu papel na proteção contra o desenvolvimento de doenças está descrito na literatura (Ferguson et al., 2014).

A atividade antioxidante da infusão de *C. citratus* pode ser atribuída à elevada concentração de flavonoides, especialmente derivados de apigenina e luteolina. A apigenina e a luteolina, vulgarmente encontradas em diversos frutos, vegetais e plantas, são conhecidas pela alta capacidade antioxidante nomeadamente, de captação de radicais livres (Galati et al., 2001). Finalmente, as infusões de *G. globosa* demonstraram, em geral, maior atividade antioxidante que os extratos metanólicos, ao passo que o oposto se verificou para *C. citratus*.

Nas infusões preparadas a partir de *P. tridentatum* e *C. citratus* em diferentes proporções (25:75% ou 40:60%), só foram observados efeitos sinergistas (**Tabela 10**). Porém, a mistura de 40% de *P. tridentatum* e 60% de *C. citratus* apresentou as propriedades antioxidantes mais elevadas. Isto pode estar relacionado com o aumento da percentagem da planta individual com atividade antioxidante mais elevada.

Para a infusão preparada com 25% de *G. globosa* e 75% de *C. citratus*, o efeito antagonista predominou (poder redutor e inibição de TBARS); verificou-se efeito aditivo para a atividade captadora de radicais livres, sendo o efeito sinergista observado apenas para a inibição da descoloração do β -caroteno (**Tabela 11**). Quanto à infusão preparada com 40% de *G. globosa* e 60% de *C. citratus*, foram observados efeitos sinergistas para a atividade captadora de radicais livres e inibição da peroxidação lipídica, mas um efeito antagonista no caso do poder redutor (**Tabela 11**), o que demonstra que esta mistura é mais adequada do que a anterior no que concerne a propriedades antioxidantes.

Tabela 10. Valores de EC₅₀ teóricos *versus* valores experimentais de atividade antioxidante das infusões de *P. tridentatum* e *C. citratus* combinadas em diferentes proporções.

| Valores de EC ₅₀ (µg/mL) | Amostras individuais | | <i>P. tridentatum</i> (25%) + <i>C. citratus</i> (75%) | | | <i>P. tridentatum</i> (40%) + <i>C. citratus</i> (60%) | | |
|-------------------------------------|-----------------------|--------------------|--|-----------------------|--------|--|-----------------------|--------|
| | <i>P. tridentatum</i> | <i>C. citratus</i> | Valores teóricos | Valores experimentais | Efeito | Valores teóricos | Valores experimentais | Efeito |
| Atividade captadora DPPH | 50±0 | 1231±8 | 936±3 | 663±19 | S | 759±2 | 67±2 | S |
| Poder Redutor | 105±2 | 762±10 | 598±4 | 474±10 | S | 499±3 | 181±3 | S |
| Inibição descoloração β-caroteno | 266±25 | 1510±79 | 1199±33 | 235±9 | S | 1013±29 | 209±18 | S |
| Inibição de TBARS | 93±4 | 428±14 | 345±6 | 261±19 | S | 294±5 | 147±4 | S |

Os valores teóricos foram obtidos considerando a soma das contribuições das espécies individuais. A- Efeito aditivo: valores teóricos e experimentais revelam diferenças inferiores a 5%; SN- Efeito sinérgico: valores experimentais são 5% mais baixos que os valores teóricos; AN- Efeito antagonista: valores experimentais são 5% mais elevados que os valores teóricos.

Tabela 11. Valores de EC₅₀ teóricos *versus* valores experimentais de atividade antioxidante das infusões de *G. globosa* e *C. citratus* combinadas em diferentes proporções.

| Valores de EC ₅₀ (µg/mL) | Amostras individuais | | <i>G. globosa</i> (25%) + <i>C. citratus</i> (75%) | | | <i>G. globosa</i> (40%) + <i>C. citratus</i> (60%) | | |
|-------------------------------------|----------------------|--------------------|--|-----------------------|--------|--|-----------------------|--------|
| | <i>G. globosa</i> | <i>C. citratus</i> | Valores teóricos | Valores experimentais | Efeito | Valores teóricos | Valores experimentais | Efeito |
| Atividade captadora DPPH | 4305±74 | 1231±8 | 1999±24 | 1927±67 | A | 2460±34 | 1651±23 | S |
| Poder Redutor | 916±7 | 762±10 | 968±12 | 1029±20 | AN | 957±11 | 942±13 | AN |
| Inibição descoloração β-caroteno | 4079±31 | 1510±79 | 2152±34 | 797±30 | S | 2538±30 | 505±45 | S |
| Inibição de TBARS | 2496±5 | 428±14 | 989±7 | 1126±16 | AN | 1291±6 | 1005±64 | S |

Os valores teóricos foram obtidos considerando a soma das contribuições das espécies individuais. A- Efeito aditivo: valores teóricos e experimentais revelam diferenças inferiores a 5%; SN- Efeito sinergista: valores experimentais são 5% mais baixos que os valores teóricos; AN- Efeito antagonista: valores experimentais são 5% mais elevados que os valores teóricos.

CAPÍTULO IV



IV. CONCLUSÕES

C. citratus revelou um valor mais elevado de α -tocoferol, tocoferóis totais, glucose, sacarose e ácidos succínico e ascórbico. *P. tridentatum* apresentou os maiores conteúdos em frutose e açúcares totais. Por outro lado, *G. globosa* demonstrou a maior concentração em ácidos orgânicos, devido ao elevado conteúdo em ácidos oxálico e málico. Este estudo reveste-se de grande importância porque preenche um vazio em relação à caracterização química destas espécies, mais precisamente em relação à sua composição em açúcares, ácidos orgânicos e tocoferóis, que podem estar presentes nas formas consumidas (principalmente infusão).

Analisando a atividade antioxidante e o perfil fenólico dos extratos metanólicos, verificámos que, em geral, *C. citratus* demonstrou os valores mais elevados de inibição da descoloração do β -caroteno e inibição da peroxidação lipídica, o que se pode dever à sua elevada quantidade em flavonoides, especialmente derivados de apigenina e luteolina (sendo a luteolina 2"-*O*-ramnosil-6-*C*-glucósido o principal composto). *P. tridentatum* demonstrou a maior atividade captadora de radicais DPPH e poder redutor, o que pode ser explicado pelo seu perfil peculiar em compostos fenólicos, em particular derivados de di-hidroflavonóis e isoflavonas. Já a menor atividade antioxidante obtida no extrato de *G. globosa* pode estar relacionada com a presença de compostos com menor atividade nomeadamente canferol 3-*O*-rutinósido e betacianidinas, estas últimas encontradas apenas nesta amostra.

No que concerne às infusões, de uma forma geral, a infusão de *P. tridentatum* revelou a atividade antioxidante mais elevada, seguida por *C. citratus* e, finalmente, *G. globosa*. A desigualdade no potencial antioxidante está certamente relacionada com a diferente composição em compostos fenólicos. Os efeitos sinérgicos foram os mais observados nas misturas testadas, sendo mais evidentes nas infusões preparadas com as proporções de 40%:60% (*P. tridentatum* e *C. citratus*; ou *G. globosa* e *C. citratus*). O presente estudo valida a combinação das plantas estudadas em proporções específicas para serem comercializadas para a preparação de infusões.

CAPÍTULO V



V. BIBLIOGRAFIA

- Adeneye, A. A., & Agbaje, E.O. (2007). Hypoglycemic and hypolipidemic effects of fresh leaf aqueous extract of *Cymbopogon citratus* Stapf. in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 112, 440-444.
- Afifi, F. U., Wazaify, M., Jabr, M., & Treish, E. (2010). The use of herbal preparations as complementary and alternative medicine (CAM) in a sample of patients with cancer in Jordan. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 16, 208-212.
- Amarowicz, R., Pegg, R., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., & Weil, J. (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 84, 551-562.
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127, 183-198.
- Arora, A., Nair, M. G., & Strasburg, G. M. (1998). Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 356, 133-141.
- Barros, L., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R. (2011). From famine plants to tasty and fragrant spices: Three Lamiaceae of general dietary relevance in traditional cuisine of Trás-os-Montes (Portugal). *LWT - Food Science and Technology* 44, 543-548.
- Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R., & Santos-Buelga, C. (2012). Characterization of phenolic compounds in flowers of wild medicinal plants from Northeastern Portugal. *Food Chemical and Toxicology*, 50, 1576-1582.
- Barros, L., Heleno, S.A., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R. (2010). Lamiaceae often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: vitamins and phenolics. *LWT- Food Science and Technology* 43, 544-550.
- Barros, L., Pereira, C., & Ferreira, I.C.F.R. (2013). Optimized analysis of organic acids in edible mushrooms from Portugal by ultra fast liquid chromatography and photodiode array detection. *Food Analytical Methods*, 6, 309-316.
- Blair, I.A. (2008). DNA adducts with lipid peroxidation products. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 15545-15549.

- Blanco, M., Costa, C., Freire, A., Santos Jr, J., & Costa, M. (2009). Neurobehavioral effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in mice. *Phytomedicine*, 16, 265-270.
- Bouillant, M. L., Redolfi, P., Cantisani, A., & Chopin, J. (1978) Gomphrenol, a new methylenedioxyflavonol from the leaves of *Gomphrena globosa* (Amaranthaceae). *Phytochemistry*, 17, 2138-2140.
- Burda, S., & Oleszek, W. (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2774-2779.
- Cai, Q., & Wei, H. (1996). Effect of dietary genistein on antioxidant enzyme activities in SENCAR mice. *Nutrition and cancer*, 25, 1.
- Cai, Y.-Z., Sun, M., & Corke, H. (2001). Identification and distribution of simple and acylated betacyanins in the amaranthaceae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1971–1978.
- Cai, Y.-Z., Sun, M., & Corke, H. (2005). Characterization and application of betalain pigments from plants of the Amaranthaceae. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 370-376.
- Cai, Y.-Z., Xing, J., Sun M., & Corke, H. (2006). Rapid identification of betacyanins from *Amaranthus tricolor*, *Gomphrena globosa*, and *Hylocereus polyrhizus* by matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole ion trap time-of-flight mass spectrometry (MALDI-QIT-TOF MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6520-6526.
- Carocho M., Barros L., Antonio A.L., Barreira J.C., Bento A., Kaluska I., & Ferreira, I.C.F.R. (2013) Analysis of organic acids in electron beam irradiated chestnuts (*Castanea sativa* Mill.): Effects of radiation dose and storage time. *Food and Chemical Toxicology*, 55, 348-352.
- Carocho, M., & Ferreira, I.C.F.R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25.
- Carvalho, A.M. (2010). Plantas y sabiduría popular del Parque Natural de Montesinho. Un estudio etnobotánico en Portugal. Biblioteca de Ciencias nº 35. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas, pp. 496.

- Cheel, J., Theoduloz, C., Rodríguez, J., & Schmeda-Hirschmann, G. (2005). Free radical scavengers and antioxidants from Lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2511-2517.
- Coelho, M., Pimenta, C., Gonçalves, J., Alves, V., & Martins, M. (2012). Natural extracts from *Pterospartum tridentatum* at different vegetative stages: extraction yields, phenolic content and antioxidant activity. In Central European Congress on Food, 6th, Novi Sad, 23- 26 May - Proceedings. [S.l.: s.n.]. P. 24-28.
- Coelho, M.T., Gonçalves, J.C., Alves, V., & Martins, M.M. (2011). Antioxidant activity and phenolic content of extracts from different *Pterospartum tridentatum* populations growing in Portugal. *Procedia Food Science*, 1, 1454-1458.
- Costa, A., Nunes, M., Almeida, I., Carvalho, M., Barroso, M. F., Alves, R.C., & Oliveira, M. (2012). Teas, dietary supplements and fruit juices: A comparative study regarding antioxidant activity and bioactive compounds. *LWT-Food Science and Technology*, 49, 324-328.
- Cunha, A.P & Roque, O.R. (2008). Plantas Medicinais da Farmacopeia Portuguesa. Lisboa: *Fundação Calouste Gulbenkian*.
- Cunha, A.P. (2005). Farmacognosia e Fitoquímica. Lisboa: *Fundação Calouste Gulbenkian*.
- Cunha, A.P., Teixeira, F., Silva, A.P., & Roque, O.R. (2010). Plantas na Terapêutica, Farmacologia e Ensaio Clínicos, 2.º Ed. Lisboa: *Fundação Calouste Gulbenkian*.
- Cuyckens, F., & Claeys, M. (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, 39, 1-15.
- Cuyckens, F., Rozenberg, R., Hoffmann, E., & Claeys, M. (2001) Structure characterization of flavonoid *O*-diglycosides by positive and negative nano-electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 36, 1203-1210.
- Demiato, I.M., Wosiacki, G., Czelusniak, C., & Nogueira, A. (2002). Determinação de açúcares redutores e totais em alimentos. Comparação entre método colorimétrico e titulimétrico. PUBLICATIO UEPG, *Ciências Exatas e da Terra, C. Agrárias e Engenharias*, 8, 65-78.
- Dinda, B., Ghosh, B., Achari, B., Arima, S., Sato N., & Harigaya, Y. (2006). Chemical Constituents of *Gomphrena globosa*. II. *Natural Product Sciences*, 12, 89-93.

- Dokkedal, A.L., Lavard, F., Santos, C.L., & Vilegas, W. (2007). Xeractinol - A New Flavanonol C-glucoside from *Paepalanthus argenteus* var. *argenteus* (Bongard) Hensold (Eriocaulaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18, 437-439.
- Fabre, N., Rustan, I., Hoffmann, E., & Quetin-Leclercq J. (2001). Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 12, 707-715.
- Ferguson, J. F., Ryan, M. F., Gibney, E. R., Brennan, L., Roche, H. M., & Reilly, M. P. (2014). Dietary isoflavone intake is associated with evoked responses to inflammatory cardiometabolic stimuli and improved glucose homeostasis in healthy volunteers. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 24(9), 996-1003.
- Fernández, E., Reyes, A., Hidalgo, M., & Quilhot, W. (1998). Photoprotector capacity of lichen metabolites assessed through the inhibition of the 8-methoxypsoralen photobinding to protein. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 42, 195-201.
- Ferreira, I.C.F.R., & Abreu, R.M.V. (2007). Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. *Bioanálise*, 2, 32 -39.
- Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., & Abreu, R.M.V. (2009). Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, 16, 1543-1560.
- Ferreres, F., Gil-Izquierdo, A., Andrade, P.B., Valentao, P., & Tomás-Barberán, F.A. (2007). Characterization of C-glycosyl flavones O-glycosylated by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1161, 214-223.
- Ferreres, F., Gil-Izquierdo, A., Valentão, P., & Andrade, P.B. (2011). Structural characterization of phenolics and betacyanins in *Gomphrena globosa* by high-performance liquid chromatography-diode array detection/electrospray ionization multi-stage mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25, 3441-3446.
- Ferreres, F., Llorach, R., & Gil-Izquierdo, A. (2004). Characterization of the interglycosidic linkage in di-, tri-, tetra- and pentaglycosylated flavonoids and

- differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 39, 312-321.
- Ferreres, F., Silva, B.M., Andrade, P. B., Seabra, R. M., & Ferreira, M.A. (2003). Approach to the study of C-glycosyl flavones by ion trap HPLC-PAD-ESI/MS/MS: Application to seeds of quince (*Cydonia oblonga*). *Phytochemical Analysis*, 14, 352-390.
- Figueirinha A., Paranhos, A., Pérez-Alonso, J.J., Santos-Buelga, C., & Batista, M. T. (2008). *Cymbopogon citratus* leaves: Characterisation of flavonoids by HPLC–PDA–ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols. *Food Chemistry*, 110, 718-728.
- Figueirinha, A., Cruz, M.T., Francisco, V., Lopes, M.C., & Batista M.T. (2010). Anti-inflammatory activity of *Cymbopogon citratus* leaf infusion in lipopolysaccharide-stimulated dendritic cells: contribution of the polyphenols. *Journal of Medicinal Food*, 13, 681-690.
- Francisco, V., Costa, G., Figueirinha, A., Marques, C., Pereira, P., Miguel, N.B., Celeste, N.B., García-Rodríguez, C., Teresa, C.M., & Teresa, B.M. (2013). Anti-inflammatory activity of *Cymbopogon citratus* leaves infusion via proteasome and nuclear factor- κ B pathway inhibition: contribution of chlorogenic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, 148, 126.
- Francisco, V., Figueirinha, A., Neves, B.M., García-Rodríguez, C., Lopes, M.C., Cruz, M.T., & Batista, M.T. (2011). *Cymbopogon citratus* as source of new and safe anti-inflammatory drugs: Bio-guided assay using lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 818-827.
- Galati, G., Moridani, M.Y., Chan, T.S., & O'Brien, P.J. (2001). Peroxidative metabolism of apigenin and naringenin versus luteolin and quercetin: glutathione oxidation and conjugation. *Free Radicals Biology and Medicine*, 30, 370-382.
- Gbenou, J., Ahounou, J., Akakpo, H., Laleye, A., Yayi, E., Gbaguidi, F., Baba-Moussa, L., Carbox, R., Dansou, P., Moudachirou, M., & Kotchoni, S. (2013). Phytochemical composition of *Cymbopogon citratus* and *Eucalyptus citriodora* essential oils and their anti-inflammatory and analgesic properties on Wistar rats. *Molecular Biology Reports*, 40, 1127-1134.

- Ghorbani, A., Naghibi, F., & Mosaddegh, M. (2006). Ethnobotany, ethnopharmacology and drug discovery. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2, 109-118.
- Glyad, V. (2002). Determination of monosaccharides, disaccharides, and oligosaccharides in the same plant sample by high-performance liquid chromatography. *Russian Journal of Plant Physiology*, 49, 277-282.
- Gonçalves, S., Gomes, D., Costa, P., & Romano, A. (2013). The phenolic content and antioxidant activity of infusions from Mediterranean medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, 43, 465-471.
- Gong, K., Du, F., Xia, Z., Durstock, M., & Dai, L. (2009). Nitrogen-doped carbon nanotube arrays with high electrocatalytic activity for oxygen reduction. *Science*, 323, 760-764.
- Grosso, A. C., Costa, M.M., Ganço, L., Pereira, A. L., Teixeira, G., Lavado, J.M.G., Cristina Figueireido, A., & Pedro, L.G. (2007). Essential oil composition of *Pterospartum tridentatum* grown in Portugal. *Food Chemistry*, 102, 1083-1088.
- Guimarães, R., Barros, L., Carvalho, A.M., Sousa, M.J., Morais, J.S., & Ferreira, I.C.F.R., (2009). Aromatic plants as a source of important phytochemicals: Vitamins, sugars and fatty acids in *Cistus ladanifer*, *Cupressus lusitanica* and *Eucalyptus gunnii* leaves. *Industrial Crops and Products*, 30, 427-430.
- Guimarães, R., Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A.M., Queiroz M.J.R., & Santo-Buelga, C., Ferreira I.C.F.R. (2013). Characterization of Phenolic Compounds in Wild Fruits from Northeastern Portugal. *Food Chemistry*, 141, 3721-3730.
- Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35, 1147-1150.
- Halliwell, B. (2011). Free radicals and antioxidants – quo vadis? *Trends in Pharmacological Sciences*, 32, 125-130.
- Halliwell, B. (2012). Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition Reviews*, 70, 257-265.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J.M. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radicals Biology and Medicine*, 18, 125–126.
- Hamiduzzaman, M., & Azam, A.Z. (2012). Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of *Gomphrena globosa* (L.). *Bangladesh Pharmaceutical Journal*, 15, 183-185.

- Hamiduzzaman, M., Dey, A., Hossain, M., & Azom, T. (2012). Investigation of biological properties of *Gomphrena globosa* (L.) amily: Amaranthaceae. *Journal of Pharmacy Research*, 5, 4230-4232
- Harshberger, J.W. (1896). The purposes of ethno-botany. *Botanical Gazette*, 146-154.
- Heinrich, M., Edwards, S., Moerman, D.E., & Leonti, M. (2009). Ethnopharmacological field studies: a critical assessment of their conceptual basis and methods. *Journal of Ethnopharmacology*, 124, 1-17.
- Heinrich, M., Kufer, J., Leonti, M., & Pardo-de-Santayana, M. (2006). Ethnobotany and ethnopharmacology- Interdisciplinary links with the historical sciences. *Journal of Ethnopharmacology*, 107, 157-160.
- Heuer, S., Wray, V., Metzger, J. W., & Strack, D. (1992). Betacyanins from flowers of *Gomphrena globosa*. *Phytochemistry*, 31, 1801-1807.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- Ilyas, M., Tarnam, A., & Begum, N. (2013). Biological potential and phytopharmacological screening of *Gomphrena* species. *Global Journal of Pharmacology*, 7, 457-464.
- Isailović, B., Kalušević, A., Žuržul, N., Coelho, M.T., Đorđević, V., Alves, V., Sousa, I., Martins, M.M., Bugarski, B., & Nedović, V. (2012). Microencapsulation of natural antioxidants from *Pterospartum tridentatum* in different alginate and inulin systems. Proceedings of the 6th European Congress on Food, Nedović V., Ilić N., Tumbas V., Kalušević A. (eds), 1075-1081. Novi Sad, Serbia: University of Nov Sad, Institute of Food Technology.
- Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.-P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., & Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3954-3962.
- Kamal-Eldin, A., & Appelqvist, L.-Å. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31, 671-701.
- Karadag, A., Ozcelik, B., & Saner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*, 2, 41-60.

- Koh, P.H., Mokhtar, R.A.M., & Iqbal, M. (2012). Antioxidant potential of *Cymbopogon citratus* extract: alleviation of carbon tetrachloride-induced hepatic oxidative stress and toxicity. *Human & Experimental Toxicology*, 31, 81-91.
- Komes, D., Belščak-Cvitanović, A., Ljubičić, I., Durgo, K., Cindrić, I.J., Bušić, A., Vojvodić, A. (2014). Formulating blackberry leaf mixtures for preparation of infusions with plant derived sources of sweeteners. *Food Chemistry*, 151, 385-393.
- Kugler, F., Stintzing, F.C., & Carle, R. (2007). Characterisation of betalain patterns of differently coloured inflorescences from *Gomphrena globosa* L. and *Bougainvillea* sp. by HPLC–DAD–ESI–MSn. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 637-648.
- Laguerre, M., Lecomte, J., & Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46, 244-282.
- Lans, C. (2007). Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for reproductive problems. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 3, 13.
- Leonti, M. (2011). The future is written: Impact of scripts on the cognition, selection, knowledge and transmission of medicinal plant use and its implications for ethnobotany and ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 134, 542-555.
- Li, S., Li, S.-K., Gan, R.-Y., Song, F.-L., Kuang, L., & Li, H.-B. (2013). Antioxidant capacities and total phenolic contents of infusions from 223 medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, 51, 289-298.
- Liu, F., Ooi, V.E.C., Chang, S.T. (1997). Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sciences*, 60, 763–771.
- Liu, R.H. (2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 517S-520S.
- Liu, R.H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *The Journal of nutrition*, 134, 3479S-3485S.
- Luís, Â., Domingues, F., Gil, C., & Duarte, A. P. (2009). Antioxidant activity of extracts of Portuguese shrubs: *Pterospartum tridentatum*, *Cytisus scoparius* and *Erica* spp. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3, 886-893

- Machado, M., Pires, P., Dinis, A. M., Santos-Rosa, M., Alves, V., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., & Sousa, M.C. (2012). Monoterpenic aldehydes as potential anti-Leishmania agents: Activity of *Cymbopogon citratus* and citral on *L. infantum*, *L. tropica* and *L. major*. *Experimental Parasitology*, 130, 223-231.
- Magalhães, L.M., Segundo, M.A., Reis, S., & Lima, J.L. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613, 1-19.
- Marques, V., & Farah, A. (2009). Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. *Food Chemistry*, 113, 1370-1376.
- Montoro, E., Lemus, D., Echemendia, M., Martin, A., Portaels, F., & Palomino, J. C. (2005). Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test, and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55, 500-505.
- Morales, P., Ferreira, I.C., Carvalho, A.M., Sánchez-Mata, M.C., Cámara, M., Fernández-Ruiz, V., Pardo-de-Santayana, M., & Tardío, J. (2014). Mediterranean non-cultivated vegetables as dietary sources of compounds with antioxidant and biological activity. *LWT-Food Science and Technology*, 55, 389-396.
- Ndhkala, A.R., Moyo, M., & Van Staden, J. (2010). Natural antioxidants: fascinating or mythical biomolecules? *Molecules*, 15, 6905-6930.
- Negrelle, R., Gomes, E. (2007). *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: chemical composition and biological activities. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s 9, 80-92.
- Neves, J.M., Matos, C., Moutinho, C., Queiroz, G., & Gomes, L.R. (2009) Ethnopharmacological notes about ancient uses of medicinal plants in Trás-os-Montes (northern of Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*, 124, 270-283.
- Ng, T., Liu, F., & Wang, Z. (2000). Antioxidative activity of natural products from plants. *Life sciences*, 66, 709-723.
- Niki, E. (2010). Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radicals Biology and Medicine*, 49, 503-515.
- Novais, M., Santos, I., Mendes, S., & Pinto-Gomes, C. (2004) Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida natural park (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*, 93, 183-195.

- Oh, J., Jo, H., Cho, A.R., Kim, S.-J., & Han, J. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. *Food Control*, 31, 403-409.
- Ouchikh, O., Chahed, T., Ksouri, R., Taarit, M.B., Faleh, H., Abdelly, C., Kchouk, M.E., & Marzouk, B. (2011). The effects of extraction method on the measured tocopherol level and antioxidant activity of *L. nobilis* vegetative organs. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 103-110.
- Paulo, A., Martins, S., Branco, P., Dias, T., Borges, C., Rodrigues, A.I., Costa, C.M., Teixeira, A., & Mota-Filipe, H. (2008). The opposing effects of the flavonoids isoquercitrin and sissotrin, isolated from *Pterospartum tridentatum*, on oral glucose tolerance in rats. *Phytotherapy Research*, 22, 539-543.
- Paulus, A., & Klockow, A. (1996). Determination of carbohydrates by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 720, 353-376.
- Pereira, C., Barros, L., Carvalho, A.M., & Ferreira, I.C.F.R. (2013). Use of UFLC-PDA for the analysis of organic acids in thirty five species of food and medicinal plants. *Food Analytical Methods*, 6, 1337-1344.
- Pereira, C., Calhella, R.C., Barros, L., Queiroz, M.J.R.P., Ferreira, I.C.F.R. (2014). Synergisms in antioxidant and anti-hepatocellular carcinoma activities of artichoke, milk thistle and borututu syrups. *Industrial Crops and Products*, 52, 709-713.
- Pereira, R.P., Fachineto, R., de Souza Prestes, A., Puntel, R. L., da Silva, G.N.S., Heinzmann, B.M., Boschetti, T.K., Athayde, M.L., Bürger, M.E., & Morel, A.F. (2009). Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. *Neurochemical Research*, 34, 973-983.
- Pimenta, A.C.M. (2012). Extractos aquosos de *Pterospartum tridentatum* L.- teor de compostos fenólicos totais e actividade antioxidante. Lisboa, 52 p.
- Pinela, J., Barros, L., Carvalho, A.M., & Ferreira, I.C.F.R. (2011). Influence of the drying method in the antioxidant potential and chemical composition of four shrubby flowering plants from the tribe Genisteeae (Fabaceae). *Food and Chemical Toxicology*, 49, 2983-2989.
- Pinela, J., Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. (2012). Antioxidant activity, ascorbic acid, phenolic compounds and sugars of wild

- and commercial *Tuberaria lignosa* samples: effects of drying and oral preparation methods. *Food chemistry*, 135(3), 1028-1035.
- Port's, P.S., Chisté, R.C., Godoy, H.T., & Prado, M.A. (2013). The phenolic compounds and the antioxidant potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian region. *Food Research International*, 53, 875-881.
- Prior, R.L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290-4302.
- Rahman, A.M., & Gulshana, M.I.A. (2014). Taxonomy and medicinal uses on *Amaranthaceae* family of Rajshahi, Bangladesh. *Applied Ecology and Environmental Sciences*, 2, 54-59.
- Rauter, A.P., Martins, A., Borges, C., Ferreira, J., Justino, J., Bronze, M.-R., Coelho, A.V., Choi, Y.H., & Verpoorte, R. (2005). Liquid chromatography diode array detection.electrospray ionization mass spectrometry/nuclear magnetic resonance analyses of the anti-hyperglycemic flavonoid extract of *Genista tenera* Structure elucidation of a flavonoid-C-glycoside. *Journal of Chromatography A*, 1089, 59–64.
- Rawat, P., Manmeet, K., Kunal, S., Naibedy, C., & Rakesh, M. (2009). Ulmosides A and B: Flavonoid 6-C-glycosides from *Ulmus wallichiana*, stimulating osteoblast differentiation assessed by alkaline phosphatase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19, 4684-4687.
- Rijke, E., Zappey, H., Ariese, F., Gooijer, C., & Brinkman, U.A. (2003). Liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization mass spectrometry of flavonoids with triple-quadrupole and ion-trap instruments. *Journal of Chromatography A*, 984, 45-58.
- Rijke, E., Zappey, H., Ariese, F., Gooijer, C., & Brinkman, U.A.T. (2004). Flavonoids in Leguminosae: Analysis of extracts of *T. pratense* L., *T. dubium* L., *T. repens* L., and *L. corniculatus* L. leaves using liquid chromatography with UV, mass spectrometric and fluorescence detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378, 995-1006.
- Roginsky, V., & Lissi, E.A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92, 235-254.

- Ruiz-Larrea, M. B., Mohan, A. R., Paganga, G., Miller, N. J., Bolwell, G. P., & Rice-Evans, C. A. (1997). Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. *Free radical research*, 26, 63-70.
- Saikia, L., & Upadhyaya, S. (2011). Antioxidant activity, phenol and flavonoid content of some less known medicinal plants of Assam. *International Journal of Pharma & Bio Sciences*, 2, 656-663.
- Samaniego-Sánchez, C., Inurreta-Salinas, Y., Quesada-Granados, J.J., Blanca-Herrera, R., Villalón-Mir, M., Serrana, H.L.-G., & López Martínez, M.C. (2011). The influence of domestic culinary processes on the trolox equivalent antioxidant capacity of green tea infusions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 79-86.
- Schaneberg, B.T., & Khan, I.A. (2002). Comparison of extraction methods for marker compounds in the essential oil of lemon grass by GC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1345-1349.
- Shah, G., Kaur, M., Dhabilitya, F., & Shri, R. (2012). Pharmacognostic standardization of *Cymbopogon citratus* (dc.) stapf leaves. *Pharmacognosy Journal*, 4, 19-25.
- Silva, L.R., Valentão, P., Faria, J., Ferreres, F., Sousa, C., Gil-Izquierdo, A., Pinho, B. R., & Andrade, P.B. (2012). Phytochemical investigations and biological potential screening with cellular and non-cellular models of globe amaranth (*Gomphrena globosa* L.) inflorescences. *Food Chemistry*, 135, 756-763.
- Stintzing, F. C., Kammerer, D., Schieber, A., Adama, H., Nacoulma, O.G., & Carle, R. (2004). Betacyanins and phenolic compounds from *Amaranthus spinosus* and *Boerhaavia erecta*. *Zeitschrift für Naturforschung C.*, 59, 1-8.
- Stintzing, F.C., Trichterborn, J., & Carle, R. (2006). Characterisation of anthocyanin-betalain mixtures for food colouring by chromatic and HPLC-DAD-MS analyses. *Food Chemistry*, 94, 296-309
- Tachakittirungrod, S., Okonogi, S., & Chowwanapoonpohn, S. (2007). Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. *Food Chemistry*, 103, 381-388.
- Talhi, O., & Silva, A.M.S. (2012). Advances in C-glycosylflavonoid Research. *Current Organic Chemistry*, 16, 859-896.
- Tiwari, M., Dwivedi, U. N., & Kakkar, P. (2010). Suppression of oxidative stress and pro-inflammatory mediators by *Cymbopogon citratus* D. Stapf extract in

- lipopolysaccharide stimulated murine alveolar macrophages. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2913-2919.
- Tsai, T.-H., Tsai, T.-H., Chien, Y.-C., Lee, C.-W., & Tsai, P.-J. (2008). *In vitro* antimicrobial activities against cariogenic streptococci and their antioxidant capacities: A comparative study of green tea versus different herbs. *Food Chemistry*, 110, 859-864.
- Vidović, S., Cvetkovic, D., Ramić, M., Dunjić, M., Malbaša, R., Tepić, A., & Jokić, S. (2013). Screening of changes in content of health benefit compounds, antioxidant activity and microbiological status of medicinal plants during the production of herbal filter tea. *Industrial Crops and Products*, 50, 338-345.
- Vitor, R.F., Mota-Filipe, H., Teixeira, G., Borges, C., Rodrigues, A.I., Teixeira, A., & Paulo, A. (2004). Flavonoids of an extract of *Pterospartum tridentatum* showing endothelial protection against oxidative injury. *Journal of Ethnopharmacology*, 93, 363-370.
- Wade, L.G. (1999). Organic chemistry. Prentice-Hall.
- Wagner, H., & Ulrich-Merzenich, G. (2009). Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, 16, 97-110.
- WHO (2013). Traditional medicine. http://www.who.int/topics/traditional_medicine/en/ consultado em março, 2013.
- WHO (2014). What does biodiversity mean for human health? <http://www.who.int/globalchange/ecosystems/biodiversity/en/>, consulted in July, 29.
- Williamson, E.M. (2001). Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine*, 8, 401-409.
- Wright, J.S., Johnson, E.R., & DiLabio, G.A. (2001). Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, 123, 1173-1183.
- Wu, W., Yan, C., Li, L., Liu, Z., & Liu, S. (2004). Studies on the flavones using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1047, 213-220.

Yang, Y., & McClements, D.J. (2013) Encapsulation of vitamin E in edible emulsions fabricated using a natural surfactant. *Food Hydrocolloids* 30, 712-720.

Yang, Y., Zhang, Z., Li, S., Ye, X., Li, X., & He, K. (2014). Synergy effects of herb extracts: Pharmacokinetics and pharmacodynamic basis. *Fitoterapia*, 92, 133-147.

Zhengyi, W., Raven, P. H., & Deyuan, H. (2004). Flora of China, Volume 5: Ulmaceae through Basellaceae: Science Press.

Zhengyi, W., Raven, P. H., & Deyuan, H. (2006). Flora of China, Volume 22: Poaceae: Science Press.

VI. ANEXOS

ANEXO 1 Publicação submetida à revista Food Research International.

ANEXO 2 Publicação submetida à revista International Journal of Food Science.

ANEXO 3 Publicação submetida à revista Food Research International.

ANEXO 1

Pterospartum tridentatum, *Gomphrena globosa* and *Cymbopogon citratus*: a phytochemical study focused on antioxidant compounds



Pterospartum tridentatum, *Gomphrena globosa* and *Cymbopogon citratus*: A phytochemical study focused on antioxidant compounds



Custódio Lobo Roriz^a, Lillian Barros^{a,*}, Ana Maria Carvalho^a,
Celestino Santos-Buelga^b, Isabel C.F.R. Ferreira^{a,*}

^a Mountain Research Centre (CIMO), ESA, Polytechnic Institute of Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal

^b GIP-USAL, Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 6 March 2014
Accepted 16 April 2014
Available online 26 April 2014

Keywords:
Pterospartum tridentatum
Gomphrena globosa
Cymbopogon citratus
Phytochemicals
Antioxidants

ABSTRACT

Pterospartum tridentatum (L.) Willk., *Gomphrena globosa* L. and *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. are examples of medicinal plants that demand a more detailed characterization. Therefore, phenolic composition (e.g., phenolic acids and flavonoids) was analyzed by chromatographic and mass spectrometry techniques and the antioxidant activity was also accessed through free radicals scavenging activity, reducing power and inhibition of lipid peroxidation in brain homogenates.

C. citratus revealed the highest β -carotene bleaching and lipid peroxidation inhibitions, being luteolin 2''-O-rhamnosyl-6-C-glucoside the main compound. *P. tridentatum* presented the highest 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity and reducing power and mainly dihydroflavonol and isoflavone derivatives were detected. Otherwise, *G. globosa* presented kaempferol 3-O-rutinoside as the most abundant phenolic compound and betacyanins were only present in this sample. It is very interesting to study the phytochemical composition of these plants, given the importance of their consumption.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Free radicals are produced in natural metabolism of aerobic cells, mostly in the form of oxygen reactive species (ROS) (Ferreira, Barros, & Abreu, 2009). Oxidative stress is a serious imbalance between the generation of ROS and antioxidant protection in favor of the former, causing excessive oxidative damage (Halliwell, 2011). In fact, the non-controlled production of free radicals can be related not only to various chronic diseases such as cancer, cardiovascular and neurodegenerative diseases, but also to the aging process (Ferreira et al., 2009).

Antioxidant species that can be generated internally can counteract the high amounts of ROS. Nevertheless, despite its high efficiency, the endogenous defenses are not enough, being necessary to obtain antioxidants through diet, in order to maintain the values of free radicals at low levels, so that the antioxidant defense systems of the body is not compromised (Carocho & Ferreira, 2013). One of the ways to get antioxidants through the diet is by incorporating a high variety of vegetables and fruits. Plants are full of antioxidants (e.g., phenolic compounds), because they are subject to severe oxidative stress as they produce oxygen during photosynthesis (Halliwell, 2012).

Pterospartum tridentatum (L.) Willk., *Gomphrena globosa* L. and *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. could be explored as sources of

antioxidant phytochemicals. *P. tridentatum*, plant similar to a broom, is a species from the Fabaceae family that grows spontaneously in thermo-Mediterranean conditions of the Iberian Peninsula and North Africa (Carvalho, 2010). There are countless purposes for which this species is used, among them are the treatment of diseases of the respiratory system and of type 2 diabetes (Vitor et al., 2004). *G. globosa*, known as globe amaranth, is a plant native from Brazil, Panama and Guatemala from the Amaranthaceae family usually recommended to treat respiratory system diseases (Cai, Xing, Sun, & Corke, 2006), diabetes, jaundice, hypertension, urinary system conditions, as well as kidney and prostate problems (Dinda et al., 2006; Lans, 2007). *C. citratus* is a tropical plant of the Poaceae family from Southeast Asia, commonly referred as lemongrass. Studies previously conducted reported hypoglycemic, hipolipidemic, anxiolytic and sedative effects (Adeneye & Agbaje, 2007; Blanco, Costa, Freire, Santos, & Costa, 2009), and various other uses for inflammation, diabetes, and nervous disorders.

Some researchers have studied wild samples of *P. tridentatum* regarding antioxidant properties (Coelho, Gonçalves, Alves, & Martins, 2011; Pinela, Barros, Carvalho, & Ferreira, 2011; Vitor et al., 2004) and composition in phenolic compounds (Paulo et al., 2008; Vitor et al., 2004), commercial samples of *G. globosa* concerning betacyanins and phenolic compounds (Ferrerres, Gil-Izquierdo, Valentão, & Andrade, 2011; Silva et al., 2012), and wild and commercial samples of *C. citratus* regarding antioxidant properties and phenolic composition (Cheel, Theoduloz, Rodriguez, & Schmeda-Hirschmann, 2005; Figueirinha, Paranhos, Pérez-Alonso, Santos-Buelga, & Batista, 2008; Koh, Mokhtar,

* Corresponding author. Tel.: +351 273 303219; fax: +351 273 325405.

** Corresponding author. Tel.: +351 273 303200; fax: +351 273 325405.

E-mail addresses: lillian@ipb.pt (L. Barros), iferreira@ipb.pt (I.C.F.R. Ferreira).

& Iqbal, 2012). Nevertheless, as far as we know, this is the first study reporting antioxidant properties and a detailed characterization in phenolic compounds of certified commercial samples from Portugal, obtained according sustainable harvesting and organic farming principles.

Materials and methods

Samples

Plant material of *P. tridentatum* (L.) Willk., *G. globosa* L. and *C. citratus* (DC) Stapf. was purchased from Ervital, a Portuguese company from Castro Daire (Portugal). This company, settled in a high diverse mountain region (Montemuro, a Natura 2000 site), markets several certified plant materials with different origin, such as sustainable wild harvesting of spontaneous local species and organic farming of exogenous species. *P. tridentatum* flowers were wild gathered in spring 2012 (respecting plant phenology and abundance) and the other studied species were grown, also in 2012, with organic farming methods. Harvested plants were processed using in-storage and low temperature drying methods (solar heated air, average daily temperature around 30–32 °C in shade conditions and controlled relative humidity). Samples for analysis were prepared from dried plant materials provided by the company, and botanical identification was confirmed by Ana Maria Carvalho, responsible of the medicinal plant collection of the Herbarium of the Escola Superior Agrária (BRESA), of the Polytechnic Institute of Bragança (Trás-os-Montes, Portugal).

Standards and reagents

HPLC-grade acetonitrile was obtained from Merck KgaA (Darmstadt, Germany) and was purchased from Fisher Scientific (Lisbon, Portugal). Formic and acetic acids were purchased from Prolabo (VWR International, France). Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) was purchased from Matreya (Pleasant Gap, PA, USA). 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) was obtained from Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA). Phenolic standards were from Extrasynthèse (Genay, France). Water was treated in Milli-Q water purification system (TGI Pure Water Systems, Greenville, SC, USA).

Phenolic compounds composition

Phenolic compounds were determined by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC, Hewlett-Packard 1100, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) as previously described by the authors (Barros et al., 2013). Double online detection was carried out in the diode array detector (DAD) using 280 nm and 370 nm as preferred wavelengths and in a mass spectrometer (MS) connected to the HPLC system via the DAD cell outlet. The phenolic compounds were identified by comparing their retention time, UV-vis and mass spectra with those obtained from standard compounds, when available. Otherwise, peaks were tentatively identified comparing the obtained information with available data reported in the literature. For quantitative analysis, a calibration curve for each available phenolic standard was constructed based on the UV signal. For the identified phenolic compounds for which a commercial standard was not available, the quantification was performed through the calibration curve of other compounds from the same phenolic group. The results were expressed in µg per g of dry weight.

Betacyanins

Each sample (1 g) was extracted with 30 mL of methanol containing 0.5% trifluoroacetic acid (TFA), and filtered through a Whatman No. 4 paper. The residue was then re-extracted twice with additional 30 mL

portions of 0.5% TFA in methanol. The combined extracts were evaporated at 35 °C to remove the methanol, and re-dissolved in water. For purification, the extract solution was deposited onto a C-18 SepPak® Vac 3 cc cartridge (Phenomenex), previously activated with methanol followed by water; sugars and more polar substances were removed by passing through 10 mL of water and betalain/betacyanin pigments were further eluted with 5 mL of methanol:water (80:20, v/v) containing 0.1% TFA. The extract was concentrated under a vacuum, was lyophilized, was re-dissolved in 1 mL of 20% aqueous methanol and was filtered through a 0.22-µm disposable LC filter disk for HPLC analysis. Betacyanins were determined by HPLC as previously described by the authors (using anthocyanins analysis methodology; Guimarães et al., 2013). Double detection was carried out by DAD, using 520 nm as the preferred wavelength, and in a MS connected to the HPLC system via the DAD cell outlet. The betacyanins were tentatively identified by comparing their UV-vis and mass spectra with available data information reported in the literature and expressed as relative percentage (%) of their areas recorded at 520 nm.

Evaluation of antioxidant activity

Extracts preparation

The methanolic extracts were obtained from the plant material. Each sample (1 g) was extracted by stirring with 25 mL of methanol (25 °C at 150 rpm) for 1 h and subsequently filtered through Whatman No. 4 paper. The residue was then extracted with 25 mL of methanol (25 °C at 150 rpm) for 1 h. The combined methanolic extracts were evaporated at 40 °C (rotary evaporator Büchi R-210, Flawil, Switzerland) to dryness.

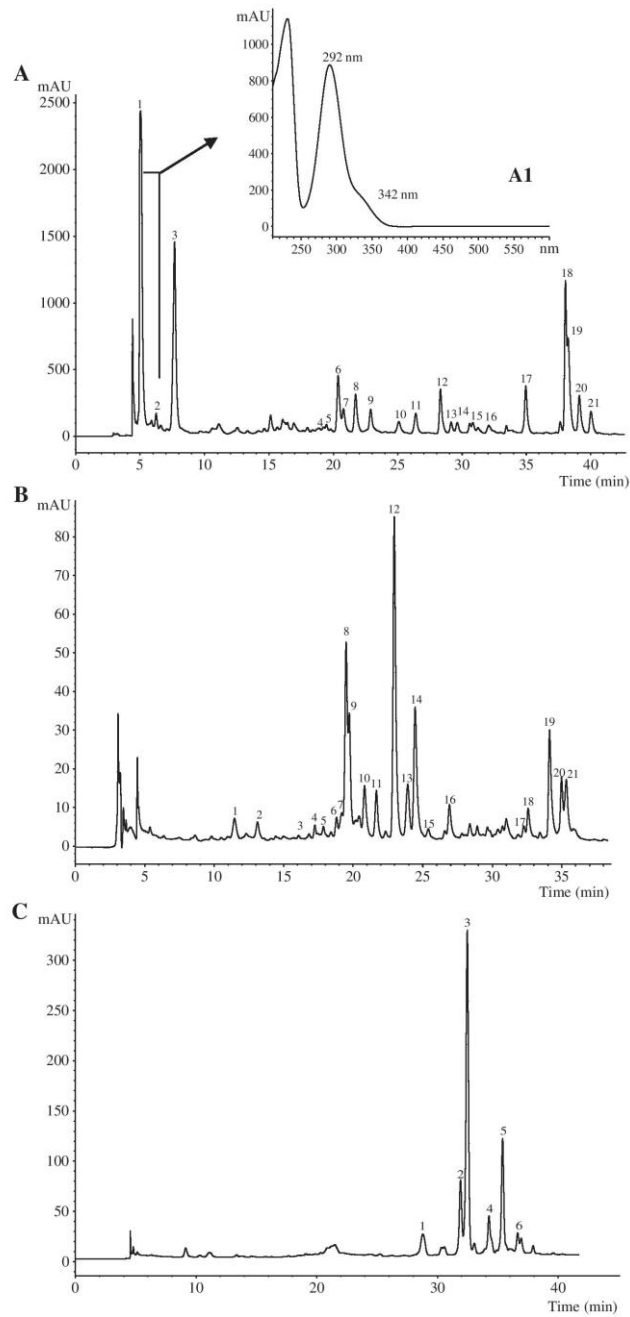
Antioxidant activity assays

DPPH radical-scavenging activity was evaluated by using an ELX800 microplate reader (Bio-Tek Instruments, Inc.; Winooski, VT, USA), and calculated as a percentage of DPPH discoloration using the formula: $[(A_{DPPH} - A_S) / A_{DPPH}] \times 100$, where A_S is the absorbance of the solution containing the sample at 515 nm, and A_{DPPH} is the absorbance of the DPPH solution. Reducing power was evaluated by the capacity to convert Fe^{3+} into Fe^{2+} , measuring the absorbance at 690 nm in the microplate reader mentioned above. Inhibition of β-carotene bleaching was evaluated through the β-carotene/linoleate assay; the neutralization of linoleate free radicals avoids β-carotene bleaching, which is measured by the formula: β -carotene absorbance (after 2 h of assay/initial absorbance) $\times 100$. Lipid peroxidation inhibition in porcine (*Sus scrofa*) brain homogenates was evaluated by the decrease in thiobarbituric acid reactive substances (TBARS); the color intensity of the malondialdehyde-thiobarbituric acid (MDA-TBA) was measured by its absorbance at 532 nm; the inhibition ratio (%) was calculated using the following formula: $[(A - B) / A] \times 100\%$, where A and B were the absorbance of the control and the sample solution, respectively. The results were expressed in EC₅₀ values (sample concentration providing 50% of antioxidant activity or 0.5 of absorbance in the reducing power assay) and trolox was used as the standard (Barros et al., 2013).

Statistical analysis

For each species, three samples were analyzed and all the assays were carried out in triplicate, and the results are expressed as mean values and standard deviation (SD). The results were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's HSD Test with $\alpha = 0.05$. This treatment was carried out using the SPSS v.22.0 program.

Fig. 1. HPLC phenolic profiles of (A)–*P. tridentatum* (recorded at 280 nm); (A1)–UV spectra of peaks 1 and 2; (B)–*G. globosa* (recorded at 370 nm); (C)–*G. globosa* betacyanin profile (recorded at 520 nm).



Results and discussion

Phenolic compounds characterization

The phenolic compound profiles of *G. globosa* (Gg), *C. citratus* (Cc) and *P. tridentatum* (Pt) are shown in Figs. 1 and 2. Data (retention time, λ_{\max} in the visible region, molecular ion and main fragment ions observed in MS²) obtained by HPLC–DAD–ESI/MS analysis regarding phenolic compounds and betacyanins, identification of compounds and individual quantification are presented in Tables 1–3. 5-*O*-Caffeoylquinic acid (peak 1^{Cc}), caffeic acid (peak 2^{Cc}), *trans-p*-coumaric acid (peak 9^{Cc}; peak 4^{Gg}), *trans*-ferulic acid (peak 7^{Gg}), isorhamnetin 3-*O*-rutinoside (peak 13^{Gg}), isorhamnetin 3-*O*-glucoside (peak 15^{Gg}), genistein (peak 12^{Pt}), kaempferol 3-*O*-rutinoside (peak 12^{Gg}), kaempferol 3-*O*-glucoside (peak 14^{Gg}), luteolin 6-*C*-glucoside (isoorientin, peak 7^{Cc}), luteolin 7-*O*-glucoside (peak 13^{Cc}), luteolin (peak 18^{Cc}), quercetin 3-*O*-rutinoside (peak 8^{Gg} and peak 5^{Pt}) and quercetin 3-*O*-glucoside (peak 10^{Gg} and peak 6^{Pt}) were positively identified according to their retention, mass and UV–vis characteristics by comparison with commercial standards.

Twenty-one flavonoids were detected in *P. tridentatum* (Table 1). Peaks 1^{Pt} and 2^{Pt} presented the same pseudomolecular ion [M–H][–] at *m/z* 465, and their UV spectra (Fig. 1A) and main MS² fragments point to they could be dihydroflavonol C-glycosyl derivatives. Thus, ions at *m/z* 375 and 345 would result, respectively, from the losses of 90 mu and 120 mu, characteristics of C-attached hexoses and due to partial cleavage of the glycosyl residue (Cuyckens & Claeys, 2004). Fragments at *m/z* 447, 357 and 327 could be explained by the loss of H₂O (–18 mu) from the original compound and the mentioned ions, respectively, probably by cleavage of the –OH at position C-3 of the flavonoid. The ion at *m/z* 317 may be due to the loss of CO (–28 mu) from the majority fragment at *m/z* 345, and the fragment at *m/z* 167 could correspond to the ^{0,2}A₀[–] ion from the cleavage of the aglycone. The observation of Ferreres, Silva, Andrade, Seabra, and Ferreira (2003) that the loss –90 mu (ion *m/z* at 375) is unusual in 8-*C*-hexosides allowed tentatively assigning peaks 1 and 2 as 6-*C*-hexosides. All in all, the compounds were tentatively identified as dihydroquercetin 6-*C*-hexosides, and they might be speculated to be two stereoisomers due to the asymmetric nature of C2 and C3 of dihydroquercetin. As far as we know, dihydroflavonol C-glycosides, namely different dihydroquercetin 6-*C*-glucoside isomers, have only been reported in two natural sources: *Ulmus wallichiana* (family Ulmaceae; Rawat, Manmeet, Kunal, Naibedya, & Rakesh, 2009) and *Paepalanthus argenteus* (Ericaceae; Dokkedal, Lavard, Santos, & Vilegas, 2007). Therefore, this would be the first report to this type of unusual compounds in Fabaceae.

Peak 3^{Pt} presented a pseudomolecular ion [M–H][–] at *m/z* 479, yielding a product ion at *m/z* 359 by loss of –120 mu, characteristic of C-hexosyl flavones, whereas fragments at *m/z* 341, 221, and 167 are compatible with an ortho-trihydroxylated B ring of a flavonol and a 5,7-dihydroxy A ring (Fabre, Rustan, Hoffmann, & Quetin-Leclercq, 2001; Wu, Yan, Li, Liu, & Liu, 2004). The compound was tentatively identified as myricetin 6-*C*-glucoside, already described in *P. tridentatum* by Paulo et al. (2008). Peaks 4^{Pt} and 7^{Pt} presented UV spectra with λ_{\max} 352–356 nm and an MS² product ion at *m/z* 301, indicating that they correspond to quercetin derivatives. According to their pseudomolecular ions, they were assigned as quercetin *O*-deoxyhexosyl-hexoside ([M–H][–] at *m/z* 609) and quercetin *O*-hexoside ([M–H][–] at *m/z* 463).

The remaining phenolic compounds were identified as isoflavone derivatives based on their characteristic UV spectra and mass fragmentation patterns. Peaks 8^{Pt}, 10^{Pt} and 12^{Pt} were identified as genistein derivatives. Peak 8^{Pt}, with a pseudomolecular ion [M–H][–] at *m/z* 431 releasing a fragment at *m/z* 269 ([M–162][–], (loss of a glycosyl moiety) was tentatively associated with genistein 7-*O*-glucoside (genistin), owing to its previous description in *P. tridentatum* (Paulo et al., 2008; Vitor et al., 2004), although the nature and position of the glycosyl moiety could not be established in our case. Peak 10^{Pt} ([M–H][–] at *m/z* 431)

released two MS² fragment ions at *m/z* 311 and 269, corresponding to the losses of 120 and 42 mu, characteristic of C-hexosyl flavones. This compound was tentatively assigned as genistein 8-*C*-glucoside, previously reported in *Genista tenera* by Rauter et al. (2005) and in other Fabaceae species (Talhi & Silva, 2012). Peak 12^{Pt} ([M–H][–] at *m/z* 269) would correspond to genistein aglycone.

A compound with the same pseudomolecular ion and fragmentation characteristics as peak 9^{Pt} was isolated from *P. tridentatum* and fully identified by Vitor et al. (2004) as 5,5'-dihydroxy-3'-methoxyisoflavone-7-*O*- β -glucoside, so that the compound herein detected was associated with this structure.

Peaks 14^{Pt}, 15^{Pt}, 16^{Pt} and 17^{Pt} were identified as biochanin A derivatives according to their UV and mass spectra characteristics. Peak 15^{Pt}, with a pseudomolecular ion [M–H][–] at *m/z* 431 releasing a fragment at *m/z* 283 ([M–H–162][–], loss of a glycosyl moiety) was tentatively assigned as sissotrin (i.e., biochanin A 7-*O*-glucoside) owing to its previous identification in *P. tridentatum* flowers (Paulo et al., 2008; Vitor et al., 2004). Peak 14^{Pt} with a pseudomolecular ion [M–H][–] at *m/z* 607, and fragment ions resulting from the consecutive losses of two hexosyl residues (*m/z* at 445 and 283) was identified as a biochanin A *O*-hexoside-*O*-hexoside. Similarly, peak 16^{Pt} ([M–H][–] at *m/z* 649), 42 mu greater than 14^{Pt} could be assigned as biochanin A *O*-acetylhexoside-*O*-hexoside. As far as we know, these compounds have not been reported in *P. tridentatum*.

Peaks 18^{Pt} and 19^{Pt} presented the same pseudomolecular ion [M–H][–] at *m/z* 283, coherent with a methylgenistein. They were tentatively identified as prunetin (7-*O*-methylgenistein), previously reported in *P. tridentatum* (Paulo et al., 2008), and biochanin A (4'-*O*-methylgenistein), owing to the presence of other biochanin A derivatives in the analyzed sample. Peak 21^{Pt} ([M–H][–] at *m/z* 297), 14 mu greater than peaks 18^{Pt} and 19^{Pt} could be associated with a methyl derivative of prunetin or biochanin A. Peak 20^{Pt} presented a pseudomolecular ion [M–H][–] at *m/z* 299 releasing a fragment at *m/z* 284 (–15 mu, loss a methyl group), compatible with a trihydroxymethoxy-isoflavonoid. A compound with similar characteristics was reported in *P. tridentatum* by Paulo et al. (2008) and assigned to a 7-*O*-methylrobof.

No definite structures could be matched for peaks 11^{Pt}, 13^{Pt} and 17^{Pt}. This latter presented a pseudomolecular ion [M–H][–] at *m/z* 491, 46 mu greater than peak 15^{Pt}, which might be explained as due to a formic acid adduct, whose formation has been discussed in literature (de Rijke, Zappey, Ariese, Gooijer, & Brinkman, 2003, 2004). Thus, it could be speculated to correspond to an artifact (formic acid adduct of sissotrin) formed under the experimental conditions used. Similar speculation could be made for peak 11^{Pt} (ion [M–H][–] at *m/z* 505) that might correspond to a formic acid adduct of methylprunetin or methylbiochanin A *O*-hexoside. As for peak 13^{Pt} with a pseudomolecular ion [M–H][–] at *m/z* 341 and fragments at *m/z* 298 (–43 mu) and 283 (–43–15 mu), it could be only speculated to be a methylprunetin or methylbiochanin A derivative.

Dihydroflavonol C-derivatives (namely peak 1^{Pt}; 3873.55 μ g/g dw) were the major compounds found in *P. tridentatum* (Table 1). Paulo et al. (2008) and Vitor et al. (2004) studied a wild sample of *P. tridentatum* from Portugal and presented some similarities in the phenolic composition. However, those authors only detected up to nine compounds of the groups of flavanols and isoflavones, but they did not report dihydroflavonol derivatives and did not present quantification results. The identification of dihydroflavonol C-derivatives in our samples is particularly important, not only as they are majority phenolic compounds, but also for their possible biological activity. Indeed, the dihydroflavonol C-hexosides identified in *Ulmus wallichiana* were found to possess relevant in vitro osteogenic activity being able to promote osteoblast differentiation in primary cultures of rat osteoblasts, making them good candidates to be used in osteoporosis therapy (Rawat et al., 2009).

Twenty-seven phytochemicals were detected in *G. globosa*, six of which were phenolic acid derivatives, fifteen flavonoids, mainly flavanol derivatives (Fig. 1B), and six betacyanins (Table 2, Fig. 1C). Peaks

3^{Gg} and 5^{Gg} were assigned as the *cis* isomers of *p*-coumaric acid and ferulic acid, whereas the corresponding *trans* isomers (i.e., peaks 4^{Gg} and 7^{Gg}) were confirmed by comparison with standards, as described

above. The *trans* isomers of these phenolic acids were also found in the inflorescences of *G. globosa* (Silva et al., 2012). Peaks 1^{Gg} and 2^{Gg} with the same pseudomolecular ion $[M-H]^-$ at m/z 355 and releasing

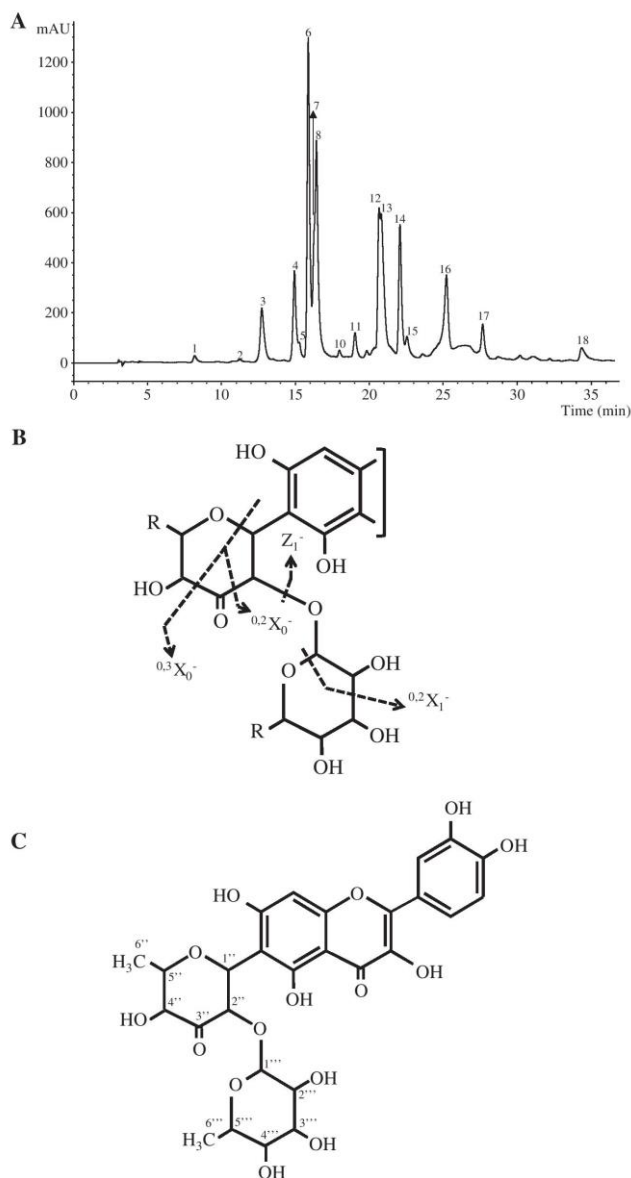


Fig. 2. (A) HPLC phenolic profiles of *C. citratus* (recorded at 370 nm); (B) General fragmentation of *O*-glycosyl-*C*-glycosyl flavonoids (based on Ferreres, Gil-Izquierdo, Andrade, Valentao, & Tomás-Barberán, 2007); (C) Chemical structure of 2''-*O*-deoxyosyl-6-*C*-(6-deoxy-pento-hexos-ulosyl) present in *C. citratus*.

Table 1 Retention time (Rt), wavelengths of maximum absorption in the visible region (λ_{max}), mass spectral data, identification and quantification of phenolic compounds in *P. tridentatum* (mean \pm SD).

| Peak | Rt (min) | λ_{max} (nm) | Molecular ion [M-H] ⁻ (m/z) | Main MS ² fragments (m/z) | Tentative identification | Quantification (μ g/g dw) |
|-----------------|----------|----------------------|--|--|--|--------------------------------|
| 1 ^a | 5.03 | 292, sh342 | 465 | 447(2), 375(79), 357(21), 345(100), 327(86), 317(42), 167(83) | Dihydroquercetin 6-C-hexoside | 3873.55 \pm 34.12 |
| 2 ^a | 6.24 | 294, sh348 | 465 | 447(7), 375(54), 357(131), 345(100), 327(50), 317(23), 167(38) | Dihydroquercetin 6-C-hexoside | 130.77 \pm 3.09 |
| 3 ^a | 7.67 | 290, sh340 | 479 | 359(100), 341(7), 221(51), 167(8) | Myricetin-6-C-glucoside | 1316.66 \pm 2.33 |
| 4 ^a | 19.22 | 352 | 609 | 463(4), 301(46) | Quercetin diethylhexosyl-hexoside | 100.13 \pm 1.50 |
| 5 ^a | 19.45 | 358 | 609 | 301(100) | Quercetin-3-O-rutinoside | 125.67 \pm 1.30 |
| 6 ^a | 20.36 | 356 | 463 | 301(100) | Quercetin-3-O-glucoside (isoquercitrin) | 963.19 \pm 4.29 |
| 7 ^a | 20.77 | 356 | 463 | 301(100) | Quercetin-O-hexoside | 474.68 \pm 2.82 |
| 8 ^a | 21.71 | 260, sh332 | 431 | 269(100) | Genistein 7-O-glucoside (genistin) | 162.86 \pm 2.97 |
| 9 ^a | 22.88 | 260, sh336 | 461 | 446(35), 341(5), 299(88), 283(29) | 5,5'-Dihydroxy-3'-methoxy-isoflavone-7-O- β -glucoside | 94.14 \pm 0.93 |
| 10 ^a | 25.07 | 260, sh336 | 461 | 311(5), 269(30) | Genistein-8-C-glucoside | 57.73 \pm 1.04 |
| 11 ^a | 26.38 | 256, sh322 | 505 | 459(3), 297(100), 283(22) | Genistein | 89.71 \pm 0.52 |
| 12 ^a | 26.48 | 256, sh324 | 505 | 441(4), 287(6), 201(5), 181(2), 133(7) | Genistein | 107.29 \pm 1.43 |
| 13 ^a | 26.72 | 262, sh326 | 341 | 296(28), 167(5) | Biophchanin A | 107.29 \pm 1.43 |
| 14 ^a | 29.61 | 258, sh320 | 607 | 446(4), 283(100) | Biophchanin A 7-O-glucoside (sissotrin) | 44.84 \pm 1.04 |
| 15 ^a | 32.04 | 260, sh340 | 445 | 283(100) | Biophchanin A O-acetylhexoside-O-hexoside | 53.22 \pm 0.19 |
| 16 ^a | 33.41 | 260, sh336 | 649 | 607(11), 445(3), 283(100) | Biophchanin A O-hexoside | 25.67 \pm 0.26 |
| 17 ^a | 34.91 | 260, sh332 | 491 | 445(3), 283(100) | Biochanin A | 201.48 \pm 2.82 |
| 18 ^a | 37.99 | 262, sh332 | 283 | 268(100), 239(7), 224(5), 195(2), 135(2) | 4-O-Methylgenistein (biochanin A) | 433.53 \pm 1.97 |
| 19 ^a | 38.19 | 262, sh334 | 283 | 268(100) | 7-O-Methylgenistein (prunetin) | 372.62 \pm 2.61 |
| 20 ^a | 39.07 | 262, sh338 | 299 | 284(100), 281(4), 256(4), 241(2), 228(5), 148(2) | 7-O-methylorobol | 167.80 \pm 1.30 |
| 21 ^a | 39.97 | 260, sh324 | 297 | 282(100) | Methylbiochanin A methylprunetin | 105.37 \pm 1.78 |
| | | | | | Total flavonols | 2980.33 \pm 9.24 |
| | | | | | Total dihydroflavonols | 4004.32 \pm 31.03 |
| | | | | | Total isoflavone | 2016.37 \pm 5.52 |
| | | | | | Total flavonoids | 9001.01 \pm 16.28 |

Tl—traces; dw—dry weight.

an MS² fragment at *m/z* 193 ([ferulic acid-H]⁻) from the loss of a hexosyl moiety (– 162 mu) were tentatively assigned as *cis* and *trans* ferulic acid hexoside, respectively.

Peaks 9^{CG}, 11^{CG}, 16^{CG}, 20^{CG} and 21^{CG} were identified as kaempferol derivatives, based on their UV spectra and the production of an MS² product ion at *m/z* 285. Similarly, peaks 6^{CG} and 17^{CG} (MS² product ion at *m/z* 301) were assigned as quercetin derivatives. Peaks 9^{CG} and 11^{CG} presented pseudomolecular ions [M-H]⁻ at *m/z* 725 and 579 and MS² fragments at *m/z* 593 and 447 ([M-H-132]⁻, loss of a pentosyl moiety), respectively, which further lost a rutinoyl (– 308 mu; peak 9^{CG}) or a hexosyl moiety ([M-H-162]⁻; peak 11^{CG}) to yield the aglycone fragment at *m/z* 285. Compounds with the same pseudomolecular ions were also found in extracts of *G. globosa* inflorescences by Ferreres et al. (2011) and Silva et al. (2012), and identified as kaempferol 3-O-(2-pentosyl)-hexoside and kaempferol 3-O-(2-pentosyl)-hexoside, respectively, so that these structures were assumed for the compounds detected in our sample. Similarly, peak 6^{CG}, with a pseudomolecular ion [M-H]⁻ at *m/z* 595 and an MS² fragment at *m/z* 301 ([M-H-132-162]⁻ loss of pentosyl and hexosyl moieties). A compound with the same pseudomolecular ion was also found by Ferreres et al. (2011) in *G. globosa* inflorescences, which was identified as quercetin 3-O-(2-pentosyl)-hexoside. In those cases, the assignment of the substitution position of the pentose was based on the observation by the authors of fragment ions from the loss of the pentosyl residue (– 132 mu) and of pentosyl + water (– 150 mu), characteristic of such an interglycosidic linkage (Cuyckens, Rozenberg, Hoffmann, & Claeys, 2001). In our case, no fragment ion resulting from the loss of the pentosyl residue was noticed, which would suggest that it was linked at position 6^o of the hexose, so that peak 6^{CG} was tentatively assigned as quercetin 3-O-(6-pentosyl)-hexoside.

A compound with the same characteristics as peak 20^{CG} ([M-H]⁻ at *m/z* 593, MS² fragment ion at *m/z* 285 from the loss of rhamnosyl and hexosyl moieties) was also identified by Ferreres et al. (2011) and Silva et al. (2012) in *G. globosa* inflorescences and assigned as kaempferol 3-O-(6-rhamnosyl)-hexoside. The observation in our case of an MS² fragment ion at *m/z* 447 from the loss of the rhamnosyl residue might indicate its location at position 2^o of the hexose, so that the compound was tentatively identified as kaempferol 3-O-(2-rhamnosyl)-hexoside. Peak 16^{CG} was associated with a kaempferol O-acetylhexoside according to its pseudomolecular ion [M-H]⁻ at *m/z* 489 and MS² fragment released at *m/z* 285 ([M-H-42-162]⁻, loss of acetyl and hexosyl moieties).

Peaks 17^{CG} ([M-H]⁻ at *m/z* 639) and 21^{CG} ([M-H]⁻ at *m/z* 623) should correspond to quercetin and kaempferol derivatives bearing glucuronoyl and hexosyl moieties. In both cases the observation of MS² fragments resulting from the alternative losses of each residue (i.e., – 176 and – 162 mu) might suggest that each sugar was located on a different position of the aglycone. Therefore, these compounds were tentatively assigned as quercetin O-glucuronide-O-hexoside (peak 17^{CG}) and kaempferol O-glucuronide-O-hexoside (peak 21^{CG}).

Peaks 18^{CG} and 19^{CG} ([M-H]⁻ at *m/z* 475 and 517 mu, respectively) originated a base peak at *m/z* 313 mu, which could correspond to a trihydroxy-methylenedioxyflavone, probably gomphrenol (3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone) early described in *G. globosa* leaves (Bouillant, Redolfi, Cantisani, & Chopin, 1978). Peaks with the same pseudomolecular ions were detected in *G. globosa* inflorescences by Ferreres et al. (2011) and Silva et al. (2012) and suggested to correspond to gomphrenol-3-O-hexoside and gomphrenol-3-O-(6-acetyl)-hexoside, so that those identities were also tentatively assumed in our case.

Compounds 22^{CG} to 27^{CG} were identified as betacyanin derivatives (Table 2) already described in *G. globosa* (Fig. 1C); no anthocyanins were found together with the betacyanins, which is in agreement with the previous reports (Cai, Sun, & Corke, 2001; Cai et al., 2006; Ferreres et al., 2011; Kugler, Stintzing, & Carle, 2007; Silva et al., 2012). These pigments would belong to the (iso)gomphrenin-type betacyanins

Table 2

Retention time (Rt), wavelengths of maximum absorption in the visible region (λ_{max}), mass spectral data, identification, quantification of phenolic compounds and relative percentage of betacyanins in *G. globosa* (mean \pm SD).

| Peak | Rt (min) | λ_{max} (nm) | Molecular ion [M-H] ⁻ (m/z) | Main MS ² fragments (m/z) | Tentative identification | Quantification (μ g/g dw) |
|------------------|----------|----------------------|--|--------------------------------------|---|--------------------------------|
| 1 ^{CG} | 11.43 | 326 | 355 | 193(100) | cis-Ferulic acid hexoside | 20.41 \pm 0.76 |
| 2 ^{CG} | 13.10 | 326 | 355 | 193(100) | trans-Ferulic acid hexoside | 15.13 \pm 0.57 |
| 3 ^{CG} | 16.07 | 312 | 163 | 119(100) | cis-p-Coumaric acid | 1.09 \pm 0.16 |
| 4 ^{CG} | 16.98 | 312 | 163 | 119(100) | trans-p-Coumaric acid | 5.92 \pm 0.66 |
| 5 ^{CG} | 18.44 | 322 | 193 | 178(16), 134(100), 117(3) | cis-Ferulic acid | 7.95 \pm 0.27 |
| 6 ^{CG} | 18.79 | 360 | 595 | 301(100) | Quercetin 3-O-(6-pentosyl)-hexoside | 2.93 \pm 0.25 |
| 7 ^{CG} | 19.17 | 324 | 193 | 178(35), 134(100), 117(2) | trans-Ferulic acid | 23.73 \pm 0.44 |
| 8 ^{CG} | 19.48 | 354 | 609 | 301(100) | Quercetin 3-O-rutinoside | 23.76 \pm 0.17 |
| 9 ^{CG} | 19.71 | 344 | 725 | 593(5), 285(30) | Kaempferol 3-O-(2-pentosyl, 6-O-rhamnosyl)-hexoside | 16.71 \pm 0.21 |
| 10 ^{CG} | 20.81 | 358 | 463 | 301(100) | Quercetin 3-O-glucoside | 8.67 \pm 0.70 |
| 11 ^{CG} | 21.67 | 350 | 579 | 447(5), 285(50) | Kaempferol 3-O-(2-pentosyl)-hexoside | 7.67 \pm 0.18 |
| 12 ^{CG} | 22.95 | 350 | 593 | 285(100) | Kaempferol 3-O-rutinoside | 48.44 \pm 0.16 |
| 13 ^{CG} | 23.93 | 354 | 623 | 315(100) | Isorhamnetin 3-O-rutinoside | tr |
| 14 ^{CG} | 24.46 | 348 | 447 | 285(100) | Kaempferol 3-O-glucoside | 18.81 \pm 0.43 |
| 15 ^{CG} | 25.40 | 354 | 477 | 315(100) | Isorhamnetin 3-O-glucoside | tr |
| 16 ^{CG} | 26.93 | 350 | 489 | 285(100) | Kaempferol O-acetylhexoside | 4.89 \pm 0.04 |
| 17 ^{CG} | 32.27 | 340 | 639 | 463(32), 301(34) | Quercetin O-glucuronide-O-hexoside | 1.64 \pm 0.15 |
| 18 ^{CG} | 32.59 | 274,340 | 475 | 313(100) | Gomphrenol 3-O-hexoside | 3.87 \pm 0.22 |
| 19 ^{CG} | 34.14 | 274,340 | 517 | 313(100) | Gomphrenol 3-O-(6-acetyl)-hexoside | 14.18 \pm 0.37 |
| 20 ^{CG} | 34.99 | 352 | 593 | 447(9), 285(60) | Kaempferol 3-O-(2-rhamnosyl)-hexoside | 8.68 \pm 0.23 |
| 21 ^{CG} | 35.34 | 348 | 623 | 447(4), 285(23) | Kaempferol O-glucuronide-O-hexoside | 11.25 \pm 0.08 |
| | | | | | Total phenolic acids | 78.23 \pm 2.32 |
| | | | | | Total flavonoids | 171.50 \pm 2.62 |
| | | | | | Total phenolic compounds | 249.73 \pm 4.95 |

| Peak | Rt (min) | λ_{max} (nm) | Molecular ion [M + H] ⁺ (m/z) | Main MS ² fragments (m/z) | Identification | Relative percentage (%) |
|------------------|----------|----------------------|--|--------------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| 22 ^{CG} | 28.79 | 550 | 697 | 551(2), 389(22) | Gomphrenin II | 7.66 \pm 0.56 |
| 23 ^{CG} | 31.91 | 550 | 697 | 551(3), 389(39) | Gomphrenin II | 12.99 \pm 0.41 |
| 24 ^{CG} | 32.48 | 550 | 727 | 551(4), 389(41) | Gomphrenin III | 50.21 \pm 0.94 |
| 25 ^{CG} | 34.27 | 550 | 697 | 551(2), 389(21) | Isogomphrenin II | 6.13 \pm 0.11 |
| 26 ^{CG} | 35.40 | 546 | 727 | 551(4), 389(38) | Isogomphrenin III | 17.23 \pm 0.24 |
| 27 ^{CG} | 36.65 | 500 | 683 | 507(2), 345(22) | 17-Descarboxy-amaranthin | 4.10 \pm 0.11 |

tr—traces; dw—dry weight.

(substituted at C-6 of betanidin/isobetanidin), differing from betanin-type betacyanins (substituted at C-5 of betanidin/isobetanidin) (Cai et al., 2001, 2006; Heuer, Wray, Metzger, & Strack, 1992). The mass differences of 146 mu (m/z 697–551) and 176 mu (m/z 727–551) indicated the presence of aromatic acyl groups (i.e., coumaroyl and feruloyl) at the C-6 of glucose in gomphrenins/isogomphrenins. Thus, peaks 22^{CG}, 23^{CG} and 25^{CG} were identified as gomphrenin II/isogomphrenin II, based on the observation of two main fragments at m/z 551, loss of a *p*-coumaroyl group (–146 mu) and at m/z 389, further loss of a hexosyl moiety (–162 mu). For peaks 24^{CG} and 26^{CG} a pseudomolecular ion [M + H]⁺ at m/z 727, was observed, so that they were identified as gomphrenin III/isogomphrenin III. The main fragments at m/z 551 and 389 indicated the loss of a feruloyl group (–176 mu) and the further loss of a hexosyl moiety (–162 mu), respectively. The later elution of peaks 25^{CG} and 26^{CG} allowed their identification as isogomphrenins II and III, respectively. Finally, peak 27^{CG} was identified as descarboxylated amaranthin ([M + H]⁺ at m/z 683), previously reported in red petals and in flowers of *G. globosa* (Kugler et al., 2007). Those authors indicated that the higher retention time and the hypsochromic shift of the maximum UV spectra (around 33 nm) as compared to amaranthin (betanidin 5-O- β -glucuronosylglucoside), suggested a 17-descarboxy structure. Similar observation was described in the literature for 17-descarboxybetanin from red beet (Stintzing, Trichterborn, & Carle, 2006) and erect spiderling (Stintzing et al., 2004).

Flavonoids were the main phenolic compounds found in *G. globosa* being kaempferol 3-O-rutinoside (peak 12^{CG}, 48.44 μ g/g dw) the main flavonol (Table 2). Gomphrenin III (peak 24^{CG}, 50.21%) was the major betacyanidin found (Table 2). Silva et al. (2012) and Ferreres et al. (2011) presented a slightly different profile in the samples studied by them, presenting flavonol (quercetin, kaempferol and isorhamnetin derivatives) and gomphrenol derivatives as the main phenolic

compounds. They also reported the presence of eight betacyanins, although with a different profile of that found in our samples. Furthermore, Silva et al. (2012) showed higher values in their quantification results for all the compounds identified. Kugler et al. (2007) and Cai et al. (2001, 2006) presented a more complex identification of betacyanins in petals of *G. globosa*.

Eighteen phenolic compounds were identified in *C. citratus* (Table 3, Fig. 2A). But for three hydroxycinnamoyl derivatives (peaks 1^{CC}, 2^{CC} and 9^{CC}) the rest of peaks corresponded to flavone derivatives, which were identified based on the fragmentation patterns described for C- and O-glycosyl flavones by Ferreres et al., 2003; Ferreres, Llorach, & Gil-Izquierdo, 2004; Ferreres et al., 2007 (Fig. 2B). From them, only two peaks (12^{CC} and 13^{CC}) were found to be O-glycosylated on the aglycone. Peak 13^{CC} was positively identified as luteolin 7-O-glucoside by comparison with a standard, whereas peak 12^{CC}, with a pseudomolecular ion [M-H]⁻ at m/z 593 releasing two fragment ions at m/z 447 ([M-H-146]⁻, loss of a deoxyhexosyl moiety) and at m/z 285 ([M-H-162]⁻, further loss of an hexosyl moiety), was assigned as luteolin 7-O-neohesperoside, based on the previous identification of this compound in *C. citratus* leaves by Figueirinha et al. (2008).

Peak 3^{CC} ([M-H]⁻ at m/z 579) and peaks 4^{CC} and 5^{CC} (both with [M-H]⁻ at m/z 563) presented a fragmentation pattern characteristic of asymmetric di-C-glycosides (Ferreres et al., 2003). The fragments at m/z 489 and 473 ([M-H-90]⁻) and 459 and 443 ([M-H-120]⁻) indicated the presence of a C-hexosyl unit. For peak 3^{CC}, fragments showing the loss of 60 mu, typical of pentosyl units, were observed at m/z 519 ([M-H-60]⁻), 399 ([M-H-120-60]⁻) and 369 ([M-H-120-90]⁻); and similarly occurred for peaks 4^{CC} and 5^{CC} (fragment at m/z 503; [M-H-60]⁻). For peak 3^{CC}, the observation of a base peak at m/z 459 ([M-H-120]⁻; partial loss of a hexosyl moiety) and its high abundance in relation to that at m/z 519 ([M-H-60]⁻; partial loss of a pentosyl

Table 3
Retention time (Rt), wavelengths of maximum absorption in the visible region (λ_{max}), mass spectral data, identification and quantification of phenolic compounds in *C. citratus* (mean \pm SD).

| Peak | Rt (min) | λ_{max} (nm) | Molecular ion [M-H] ⁻ (m/z) | Main MS ² fragments (m/z) | Tentative identification | Quantification (μ g/g dw) |
|------------------|----------|----------------------|--|--|---|--------------------------------|
| 1 ^{cc} | 8.19 | 324 | 353 | 191(100), 179(4), 161(5), 135(3) | 5-O-Caffeoylquinic acid | 101.56 \pm 1.56 |
| 2 ^{cc} | 11.28 | 326 | 179 | 135(100) | Caffeic acid | 21.27 \pm 0.79 |
| 3 ^{cc} | 12.73 | 350 | 579 | 561(10), 519(6), 489(56), 459(100), 399(52), 369(47) | Luteolin 6-C-hexosyl-8-C-pentoside | 97.33 \pm 3.75 |
| 4 ^{cc} | 14.94 | 336 | 563 | 545(27), 503(40), 473(100), 443(83), 383(90), 353(85) | Apigenin 6-C-pentosyl-8-C-hexoside | 246.70 \pm 4.82 |
| 5 ^{cc} | 15.26 | 336 | 563 | 545(20), 503(37), 473(100), 443(83), 383(73), 353(83) | Apigenin 6-C-pentosyl-8-C-hexoside | 31.75 \pm 0.50 |
| 6 ^{cc} | 15.87 | 350 | 593 | 473(100), 429(37), 357(26), 339(12), 309(20), (35) | Luteolin 2''-O-deoxyhexosyl-6-C-glucoside | 2138.07 \pm 32.61 |
| 7 ^{cc} | 16.24 | 350 | 447 | 429(30), 357(100), 339(15), 327(86), 297(22), 285(15) | Luteolin 6-C-glucoside | 93.93 \pm 0.47 |
| 8 ^{cc} | 16.43 | 350 | 549 | 531(18), 489(36), 459(100), 441(25), 429(21), 399(55), 369(52) | Luteolin 6-C-pentosyl-8-C-pentoside | 270.05 \pm 7.47 |
| 9 ^{cc} | 16.96 | 310 | 163 | 119(100) | trans-p-Coumaric acid | 32.83 \pm 0.88 |
| 10 ^{cc} | 17.98 | 350 | 549 | 531(12), 489(32), 459(100), 441(18), 429(18), 399(76), 369(60) | Luteolin 6-C-pentosyl-8-C-pentoside | 20.00 \pm 1.02 |
| 11 ^{cc} | 19.04 | 344 | 577 | 457(26), 413(100), 341(15), 311(14), 293(77) | Apigenin 2''-O-deoxyhexosyl-C-hexoside | 127.70 \pm 6.59 |
| 12 ^{cc} | 20.66 | 350 | 593 | 447(6), 285(22) | Luteolin 7-O-neohesperoside | 926.42 \pm 15.71 |
| 13 ^{cc} | 20.81 | 348 | 447 | 285(100) | Luteolin 7-O-glucoside | 1410.24 \pm 37.12 |
| 14 ^{cc} | 22.07 | 352 | 563 | 503(3), 473(100), 417(17), 399(53), 357(23), 327(25), 298(40) | Luteolin 2''-O-deoxyhexosyl-C-pentoside | 1029.80 \pm 41.40 |
| 15 ^{cc} | 22.55 | 350 | 417 | 399(42), 357(100), 339(19), 327(90), 311(7), 297(35) | Luteolin 6-C-pentoside | 38.53 \pm 1.29 |
| 16 ^{cc} | 25.22 | 350 | 575 | 531(33), 429(38), 411(100), 367(65), 357(15), 337(20), 309(10) | Luteolin 2''-O-deoxyosyl-6-C-(6-deoxy-pento-hexosuloyl) | 1122.62 \pm 7.15 |
| 17 ^{cc} | 27.67 | 350 | 577 | 487(10), 473(40), 413(100), 371(15), 323(27) | Methyl-luteolin 2''-O-deoxyhexosyl-6-C-hexoside | 58.63 \pm 0.95 |
| 18 ^{cc} | 34.37 | 350 | 285 | 175(14), 151(18), 133(32) | Luteolin | 187.18 \pm 1.35 |
| | | | | | Total phenolic acids | 155.65 \pm 1.47 |
| | | | | | Total flavonoids | 7798.96 \pm 70.79 |
| | | | | | Total phenolic compounds | 7954.61 \pm 69.32 |

dw—dry weight.

moiety), suggested that the hexose was located at position 6 of the aglycone. Conversely, for peaks 4^{cc} and 5^{cc}, the base peak at *m/z* 473 ([M-H-90]⁻) and the high abundance of the fragment at *m/z* 503 ([M-H-60]⁻) would indicate a 6-C-pentosyl unit. The ions at *m/z* 369 and 353 [aglycone + 83]⁻ and 399 and 383 [aglycone + 113]⁻, supported the conclusion that luteolin and apigenin, respectively, were the aglycones, which allowed the identification as a luteolin 6-C-hexoside-8-C-pentoside (peak 3^{cc}) and apigenin 6-C-pentoside-8-C-hexoside (peak 4^{cc} and 5^{cc}). Peak 15^{cc} presented a pseudomolecular ion [M-H]⁻ at *m/z* 417, 30 mu lower than peak 7^{cc} (positively identified as luteolin-6-C-glucoside by comparison with a standard) suggesting a pentosyl unit bound to the aglycone, which together with the fragments at *m/z* 357 ([M-H-60]⁻; base peak) and 327 ([M-H-90]⁻) allowed its tentative identification as a luteolin 6-C-pentoside. Peaks 8^{cc} and 10^{cc} presented the same UV spectra and pseudomolecular ion [M-H]⁻ at *m/z* 549. Their MS² fragmentation suggested the presence of two pentosyl units linked at positions 6 and 8, so that they could be identified as luteolin 6-C-pentoside-8-C-pentoside. The existence of two peaks should be explained by different substituting pentoses in each case. The presence of all the previous peaks in *C. citratus* leaves was also reported by Figueirinha et al. (2008).

Peaks 11^{cc} showed a pseudomolecular ion [M-H]⁻ at *m/z* 577, releasing five MS² fragments ions. The loss of 120 mu (ion at *m/z* 457) is characteristic of a C-hexosyl flavone, whereas the fragment at *m/z* 413 ([M-H-146-18]⁻) would indicate a deoxyhexose O-glycosylated on the hydroxyl group at position 2'' of the C-glycosylating sugar (Ferrerres et al., 2007). The other three product ions at *m/z* 341 ([aglycone + 71]⁻), *m/z* 311 ([aglycone + 41]⁻) and *m/z* 293 ([aglycone + 41-18]⁻) are usual in mono-C-glycosyl derivatives O-glycosylated on 2'' position (Ferrerres et al., 2007, 2011). Thus, this peak could be tentatively identified as apigenin 2''-O-deoxyhexosyl-C-hexoside. Similar reasoning can be applied for the assignment of peak 6^{cc} ([M-H]⁻ at *m/z* 593). The base peak at *m/z* 473 (loss of 120 mu) indicated a C-hexosyl flavone, and the fragment at *m/z* 429 ([M-H-146-18]⁻) would be characteristic of the O-glycosylation at position 2'' of the C-attached sugar (Ferrerres et al., 2007). Ions at *m/z* 357 ([aglycone + 71]⁻), *m/z* 339 ([aglycone + 71-H₂O]⁻) and *m/z* 309 ([aglycone + 41-H₂O]⁻) confirmed luteolin as aglycone. Therefore,

the peak was tentatively identified as luteolin 2''-O-deoxyhexosyl-6-C-hexoside, also reported in *C. citratus* by Figueirinha et al. (2008). Peak 14^{cc} showed a pseudomolecular ion [M-H]⁻ at *m/z* 563, 30 mu lower than peak 6^{cc}. The observation of a weak ion at *m/z* 417 ([M-H-146]⁻) and a major fragment at *m/z* 399 ([M-H-146-18]⁻) indicated an O-linked deoxyhexose, and the observation of ions at *m/z* 503 ([M-H-60]⁻) and 473 ([M-H-90]⁻) revealed a pentose directly linked to the aglycone. This suggested the identification of this peak as a luteolin 2''-O-deoxyhexosyl-C-pentoside.

Peak 17^{cc} showed a pseudomolecular ion [M-H]⁻ at *m/z* 577. In the MS² fragmentation, the observation of a [M-H-90]⁻ ion (*m/z* at 487) and the lack of a [M-H-60]⁻ ion suggested a C-attached hexose, whereas the main fragment at *m/z* 413 ([M-H-146-18]⁻) indicated an O-linked deoxyhexose; the loss of -104 mu to give rise to the fragment at *m/z* 473 could be interpreted as corresponding to the partial fragmentation of the deoxyhexose (⁰, ²X₁⁻ ion), whereas fragments at *m/z* 371 ([aglycone + 71]⁻) and 323 ([aglycone + 41-H₂O]⁻) pointed to a methyl-luteolin as aglycone (Ferrerres et al., 2007). All in all, the compound was tentatively assigned as methyl-luteolin 2''-O-deoxyhexosyl-C-hexoside.

Finally, peak 16^{cc} showed a pseudomolecular ion [M-H]⁻ at *m/z* 575 releasing fragment ions at *m/z* 411 ([M-H-146-H₂O]⁻, base peak) and at *m/z* 429 ([M-H-146]⁻) that suggested the presence of a 2''-O-linked deoxyhexosyl moiety (Ferrerres et al., 2007). The fragments at *m/z* 367 and 337, from further loss of 44 and 74 mu from the base peak, respectively, indicated a C-linked 6-deoxyhexose, and the observation of an unusual fragment at *m/z* 309 from the loss of 102 mu (instead of 104 mu) from the base peak could be interpreted as the existence of a ketone carbon in the sugar residue. All in all, the compound was tentatively identified as luteolin 2''-O-deoxyosyl-6-C-(6-deoxy-pento-hexosuloyl) (Fig. 2C), similar to the compound previously reported in *C. citratus* by Figueirinha et al. (2008).

In *C. citratus*, flavonoids were the major group found being luteolin 2''-O-deoxyhexosyl-6-C-hexoside (peak 6^{cc}, 2138.07 μ g/g dw) the main compound (Table 3). Figueirinha, Cruz, Francisco, Lopes, and Batista (2010); Figueirinha et al. (2008) presented a very similar profile to the one shown for *C. citratus* in this study. Otherwise, Marques and Farah (2009) only detected the presence of caffeoylquinic, feruloylquinic and

dicafeoylquinic acid derivatives in methanolic and infusions of *C. citratus* from Brazil. Furthermore, Port's, Chisté, Godoy, and Prado (2013) also studied a sample from Brazil, but they submitted their samples to a hydrolysis process revealing a completely different profile (gallic acid, catechin, epicatechin, quercetin, rutin and myricetin).

Antioxidant activity

Antioxidant activity cannot be measured directly and numerous tests have been developed for measuring the antioxidant capacity of food and biological samples. However, there is no universal method that can measure the antioxidant capacity of all samples accurately and quantitatively (Prior, Wu, & Schaich, 2005). Furthermore, standardized methods for antioxidant activity should meet certain requirements, and therefore the methods of assessing antioxidant capacity fall into two broad categories reflecting the focus on radicals scavenging activity and lipid peroxidation inhibition (Magalhães, Segundo, Reis, & Lima, 2008). In the present study, the antioxidant activity was assessed by DPPH scavenging activity, reducing power and inhibition of lipid peroxidation (β -carotene bleaching inhibition and TBARS assays).

The results of the antioxidant activity of the three studied plant species are presented in Table 4. *P. tridentatum* methanolic extract gave the highest DPPH scavenging activity and reducing power. This might be explained by its peculiar profile in phenolic compounds, mainly dihydroflavonol and isoflavone derivatives. Isoflavones have been extensively studied for their possible health-promoting effects. These phenolic compounds have the potential to scavenge free radicals such as superoxide and nitric oxide (Rimbach et al., 2003). Genistein and daidzein are known to be the most effective isoflavones, possessing direct free radical quenching ability (Arora, Nair, & Strasburg, 1998; Ruiz-Larrea et al., 1997). Furthermore, isoflavones are also known to have the ability to decrease oxidative damage in cells via indirect mechanisms, such as induction of antioxidant-scavenging enzymes (Cai & Wei, 1996). Recently, dihydroflavonol has also received attention due to its potential health benefits, attributed to the antioxidant activity. It has been described that the antioxidant properties of these phenolic compounds are the results of the high propensity to transfer electrons, to chelate ferrous ions and to scavenge reactive oxygen species (Gong et al., 2009; Montoro, Braca, Pizza, & De Tommasi, 2005).

Nevertheless, it was *C. citratus* that showed the highest β -carotene bleaching and lipid peroxidation inhibitions. This could be explained by its higher amount in flavonoids, especially apigenin and luteolin derivatives. Moreover this species also revealed a high amount of C-glycosylflavones, which have been found to present an antioxidant properties (Talhi & Silva, 2012). Figueirinha et al., 2008 proved that the flavonoid fraction of *C. citratus* (mostly apigenin and luteolin C-glycosylflavones derivatives) demonstrated to have a good scavenger capacity for superoxide anion and hydroxyl radical, revealing that these compounds possess a protective effect against those reactive species which are involved in inflammatory and degenerative diseases.

G. globosa methanolic extract gave the lowest activity in all the assays, presenting also the lowest phenolic concentrations, which might explain the less effect shown by this sample.

The studied *C. citratus* extract gave higher DPPH scavenging activity than methanolic extracts obtained from a commercial sample from Taiwan (23.5% at 1 mg/mL; Tsai, Tsai, Chien, Lee, & Tsai, 2008) and

Malaysia (EC₅₀ value 994.77 μ g/mL; Koh et al., 2012), and also higher reducing power than an ethanolic extract from a Korean sample (absorbance 0.32 at 0.2 mg/mL; Oh, Jo, Cho, Kim, & Han, 2013). Nonetheless, it gave lower DPPH scavenging activity than a methanolic extract prepared with samples from Chile (67.9% at 33 μ g/mL; Cheel et al., 2005) and Brazil (0.08 μ g/mL; Port's et al., 2013).

G. globosa extract presented a lower DPPH scavenging activity (EC₅₀ value 421 μ g/mL) when compared to an aqueous extract of a commercial sample of *G. globosa* also from Portugal, but from a different distributor (Silva et al., 2012). Finally, the studied *P. tridentatum* sample gave higher DPPH scavenging activity and reducing power, but lower lipid peroxidation inhibition when compared to the one described by the authors for a wild sample traditionally shade-dried (Pinela et al., 2011).

Overall, *C. citratus* showed the highest β -carotene bleaching and lipid peroxidation inhibitions, that can be due to its high amount in flavonoids, especially apigenin and luteolin derivatives (luteolin 2''-O-rhamnosyl-6-C-glucoside was the main compound). *P. tridentatum* revealed the highest DPPH radical scavenging activity and reducing power, that may be explained by its peculiar profile in phenolic compounds, mainly dihydroflavonol and isoflavone derivatives. Otherwise, *G. globosa* showed the highest content of kaempferol 3-O-rutinoside and betacyanins were only present in this sample.

Acknowledgments

The authors are grateful to Foundation for Science and Technology (FCT, Portugal) for the financial support to the research center CIMO (strategic project PEst-OE/AGR/UI0690/2011) and L. Barros researcher contract under "Programa Compromisso com Ciência – 2008".

References

- Adeneye, A. A., & Agbaje, E. O. (2007). Hypoglycemic and hypolipidemic effects of fresh leaf aqueous extract of *Cymbopogon citratus* Stapf. in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 112, 440–444.
- Arora, A., Nair, M. G., & Strasburg, G. M. (1998). Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 356, 133–141.
- Barros, L., Pereira, E., Calheta, R. C., Dueñas, M., Carvalha, A. M., Santos-Buelga, C. et al. (2013). Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Functional Foods*, 5, 1732–1740.
- Blanco, M., Costa, C., Freire, A., Santos, J., Jr., & Costa, M. (2009). Neurobehavioral effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in mice. *Phytotherapy*, 16, 265–270.
- Bouillant, M. L., Redolfi, P., Cantisani, A., & Chopin, J. (1978). Gomphrenol, a new methylenedioxyflavonol from the leaves of *Gomphrena globosa* (Amaranthaceae). *Phytochemistry*, 17, 2138–2140.
- Cai, Y.-Z., Sun, M., & Corke, H. (2001). Identification and distribution of simple and acylated betacyanins in the amaranthaceae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1971–1978.
- Cai, Q., & Wei, H. (1996). Effect of dietary genistein on antioxidant enzyme activities in SENCAR mice. *Nutrition and Cancer*, 25, 1–7.
- Cai, Y.-Z., Xing, J., Sun, M., & Corke, H. (2006). Rapid identification of betacyanins from *Amaranthus tricolor*, *Gomphrena globosa*, and *Hylocereus polyrhizus* by matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole ion trap time-of-flight mass spectrometry (MALDI-QIT-TOF MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6520–6526.
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15–25.
- Carvalho, A. M. (2010). *Plantas e sabiduría popular del Parque Natural de Montesinho. Un estudio etnobotánico en Portugal*. Biblioteca de Ciencias, 35. (pp. 496). Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 496.

Table 4

Antioxidant activity (EC₅₀ values, mg/mL) of *P. tridentatum*, *G. globosa* and *C. citratus* methanolic extracts (mean \pm SD).

| | <i>Pterospartum tridentatum</i> | <i>Gomphrena globosa</i> | <i>Cymbopogon citratus</i> |
|--|---------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| DPPH scavenging activity | 0.18 \pm 0.01 ^c | 4.87 \pm 0.13 ^a | 0.31 \pm 0.02 ^b |
| Reducing power | 0.11 \pm 0.00 ^c | 1.47 \pm 0.03 ^a | 0.21 \pm 0.01 ^b |
| β -Carotene bleaching inhibition | 0.48 \pm 0.09 ^b | 0.61 \pm 0.03 ^a | 0.32 \pm 0.10 ^c |
| TBARS inhibition | 1.18 \pm 0.06 ^b | 3.31 \pm 0.18 ^a | 0.53 \pm 0.01 ^c |

EC₅₀ values correspond to the extract concentration achieving 50% of antioxidant activity or 0.5 of absorbance in reducing power assay. In each row different letters mean significant differences ($p < 0.05$).

- Cheel, J., Theoduloz, C., Rodríguez, J., & Schmieda-Hirschmann, G. (2005). Free radical scavengers and antioxidants from Lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2511–2517.
- Coelho, M. T., Gonçalves, J. C., Alves, V., & Martins, M. M. (2011). Antioxidant activity and phenolic content of extracts from different *Pterispartum tridentatum* populations growing in Portugal. *Procedia Food Science*, 1, 1454–1458.
- Cuyckens, F., & Claeys, M. (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, 39, 1–15.
- Cuyckens, F., Rozenberg, R., Hoffmann, E., & Claeys, M. (2001). Structure characterization of flavonoid O-diglycosides by positive and negative nano-electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 36, 1203–1210.
- de Rijke, E., Zappey, H., Ariese, F., Gooijer, C., & Brinkman, U. A. (2003). Liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization mass spectrometry of flavonoids with triple-quadrupole and ion-trap instruments. *Journal of Chromatography A*, 984, 45–58.
- de Rijke, E., Zappey, H., Ariese, F., Gooijer, C., & Brinkman, U. A. T. (2004). Flavonoids in Leguminosae: Analysis of extracts of *T. pratense* L., *T. dubium* L., *T. repens* L., and *L. corniculatus* L. leaves using liquid chromatography with UV, mass spectrometric and fluorescence detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378, 995–1006.
- Dinda, B., Ghosh, B., Achari, B., Arima, S., Sato, N., & Harigaya, Y. (2006). Chemical constituents of *Gomphrena globosa*. II. *Natural Product Sciences*, 12, 89–93.
- Dokkedal, A. L., Lavarid, F., Santos, C. L., & Vilegas, W. (2007). Xeractinol – A new flavanone C-glycoside from *Paepalanthus argenteus* var. *argenteus* (Bongard) Hensold (Ericaulaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18, 437–439.
- Fabre, N., Rustan, I., Hoffmann, E., & Quetin-Leclercq, J. (2001). Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 12, 707–715.
- Ferreira, I. C. F. R., Barros, L., & Abreu, R. (2009). Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, 16, 1543–1560.
- Ferreiras, F., Gil-Izquierdo, A., Andrade, P. B., Valentão, P., & Tomás-Barberán, F. A. (2007). Characterization of C-glycosyl flavones O-glycosylated by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1161, 214–223.
- Ferreiras, F., Gil-Izquierdo, A., Valentão, P., & Andrade, P. B. (2011). Structural characterization of phenolics and betacyanins in *Gomphrena globosa* by high-performance liquid chromatography diode array detection/electrospray ionization multi-stage mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25, 3441–3446.
- Ferreiras, F., Llorach, R., & Gil-Izquierdo, A. (2004). Characterization of the interglycosidic linkage in di-, tri-, tetra- and pentaglycosylated flavonoids and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 39, 312–321.
- Ferreiras, F., Silva, B. M., Andrade, P. B., Seabra, R. M., & Ferreira, M. A. (2003). Approach to the study of C-glycosyl flavones by ion trap HPLC-PAD-ESI/MS/MS: Application to seeds of quince (*Cydonia oblonga*). *Phytochemical Analysis*, 14, 352–390.
- Figueirinha, A., Cruz, M. T., Francisco, V., Lopes, M. C., & Batista, M. T. (2010). Anti-inflammatory activity of *Cymbopogon citratus* leaf infusion in lipopolysaccharide-stimulated dendritic cells: Contribution of the polyphenols. *Journal of Medicinal Food*, 13, 681–690.
- Figueirinha, A., Paranhos, A., Pérez-Alonso, J. J., Santos-Buelga, C., & Batista, M. T. (2008). *Cymbopogon citratus* leaves: Characterisation of flavonoids by HPLC-PDA-ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols. *Food Chemistry*, 110, 718–728.
- Gong, J., Huang, K., Wang, F., Yang, L., Feng, Y., Li, H., et al. (2009). Preparation of two sets of 5,6,7-trioxygenated dihydroflavonol derivatives as free radical scavengers and neuronal cell protectors to oxidative damage. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 3414–3425.
- Guimarães, R., Barros, L., Duénas, M., Carvalho, A. M., Queiroz, M. J. R., Santo-Buelga, C., et al. (2013). Characterization of phenolic compounds in wild fruits from Northeastern Portugal. *Food Chemistry*, 141, 3721–3730.
- Halliwel, B. (2011). Free radicals and antioxidants – quo vadis? *Trends in Pharmacological Sciences*, 32, 125–130.
- Halliwel, B. (2012). Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. *Nutrition Reviews*, 70, 257–265.
- Heuer, S., Wray, V., Metzger, J. W., & Strack, D. (1992). Betacyanins from flowers of *Gomphrena globosa*. *Phytochemistry*, 31, 1801–1807.
- Koh, P. H., Mokhtar, R. A. M., & Iqbal, M. (2012). Antioxidant potential of *Cymbopogon citratus* extract: Alleviation of carbon tetrachloride-induced hepatic oxidative stress and toxicity. *Human & Experimental Toxicology*, 31, 81–91.
- Kugler, F., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2007). Characterisation of betalain patterns of differently coloured inflorescences from *Gomphrena globosa* L. and *Bougainvillea* sp. by HPLC-DAD-ESI-MSn. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 637–648.
- Lans, C. (2007). Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for reproductive problems. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 3, 13.
- Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., & Lima, J. L. F. C. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613, 1–19.
- Marques, V., & Farah, A. (2009). Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. *Food Chemistry*, 113, 1370–1376.
- Montoro, P., Braca, A., Pizzi, C., & De Tommasi, N. (2005). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. *Food Chemistry*, 92, 349–355.
- Oh, J., Jo, H., Cho, A. R., Kim, S.-J., & Han, J. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. *Food Control*, 31, 403–409.
- Paulo, A., Martins, S., Branco, P., Dias, T., Borges, C., Rodrigues, A. L., et al. (2008). The opposing effects of the flavonoids isoquercitrin and sissotrin, isolated from *Pterispartum tridentatum*, on oral glucose tolerance in rats. *Phytotherapy Research*, 22, 539–543.
- Pinela, J., Barros, L., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2011). Influence of the drying method in the antioxidant potential and chemical composition of four shrubby flowering plants from the tribe Genisteae (Fabaceae). *Food and Chemical Toxicology*, 49, 2983–2989.
- Port's, P. S., Chisté, R. C., Godoy, H. T., & Prado, M. A. (2013). The phenolic compounds and the antioxidant potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian region. *Food Research International*, 53, 875–881.
- Prior, R. L., Wu, X. L., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290–4302.
- Rauter, A. P., Martins, A., Borges, C., Ferreira, J., Justino, J., Bronze, M.-R., et al. (2005). Liquid chromatography diode array detection/electrospray ionization mass spectrometry/nuclear magnetic resonance analyses of the anti-hyperglycemic flavonoid extract of *Genista tenera* structure elucidation of a flavonoid-C-glycoside. *Journal of Chromatography A*, 1089, 59–64.
- Rawat, P., Manmeet, K., Kunal, S., Naibedya, C., & Rakesh, M. (2009). Ulmosides A and B: Flavonoid 6-C-glycosides from *Ulmus wallichiana*, stimulating osteoblast differentiation assessed by alkaline phosphatase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19, 4684–4687.
- Rimbach, G., De Pascual-Teresa, S., Ewins, B. A., Matsugo, S., Uchida, Y., Mimihane, A. M., et al. (2003). Antioxidant and free radical scavenging activity of isoflavone metabolites. *Xenobiotica*, 33, 913–925.
- Ruiz-Larrea, M. B., Mohan, A. R., Paganga, G., Miller, N. J., Bolwell, G. P., & Rice-Evans, C. A. (1997). Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. *Free Radical Research*, 26, 63–70.
- Silva, L. R., Valentão, P., Faria, J., Ferreres, F., Sousa, C., Gil-Izquierdo, A., et al. (2012). Phytochemical investigations and biological potential screening with cellular and non-cellular models of globe amaranth (*Gomphrena globosa* L.) inflorescences. *Food Chemistry*, 135, 756–763.
- Stintzing, F. C., Kammerer, D., Schieber, A., Adama, H., Nacolma, O. G., & Carle, R. (2004). Betacyanins and phenolic compounds from *Amaranthus spinosus* and *Boerhaavia erecta*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 59, 1–8.
- Stintzing, F. C., Trichterborn, J., & Carle, R. (2006). Characterisation of anthocyanin-betalain mixtures for food colouring by chromatographic and HPLC-DAD-MS analyses. *Food Chemistry*, 94, 296–309.
- Talhi, O., & Silva, A. M. S. (2012). Advances in C-glycosylflavonoid research. *Current Organic Chemistry*, 16, 859–896.
- Tsai, T.-H., Tsai, T.-H., Chien, Y.-C., Lee, C.-W., & Tsai, P.-J. (2008). In vitro antimicrobial activities against cariogenic streptococci and their antioxidant capacities: A comparative study of green tea versus different herbs. *Food Chemistry*, 110, 859–864.
- Vitor, R. F., Mota-Filipe, H., Teixeira, G., Borges, C., Rodrigues, A. L., Teixeira, A., et al. (2004). Flavonoids of an extract of *Pterispartum tridentatum* showing endothelial protection against oxidative injury. *Journal of Ethnopharmacology*, 93, 363–370.
- Wu, W., Yan, C., Li, L., Liu, Z., & Liu, S. (2004). Studies on the flavones using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1047, 213–220.

ANEXO 2

HPLC-profiles of tocopherols, sugars and organic acids in three medicinal plants consumed as infusions

Research Article

HPLC-Profiles of Tocopherols, Sugars, and Organic Acids in Three Medicinal Plants Consumed as Infusions

Custódio Lobo Roriz, Lillian Barros, Ana Maria Carvalho, and Isabel C. F. R. Ferreira

Mountain Research Centre (CIMO), ESA, Polytechnic Institute of Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal

Correspondence should be addressed to Lillian Barros; lillian@ipb.pt and Isabel C. F. R. Ferreira; iferreira@ipb.pt

Received 11 August 2014; Revised 24 September 2014; Accepted 24 September 2014; Published 7 October 2014

Academic Editor: Jaime Yanez

Copyright © 2014 Custódio Lobo Roriz et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Pterospartum tridentatum (L.) Willk, *Gomphrena globosa* L., and *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf are medicinal plants that require a more detailed chemical characterization, given the importance of their consumption as infusions. Therefore, the individual profiles in tocopherols, free sugars, and organic acids were obtained by high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to different detectors (fluorescence, refraction index, and photodiode array, resp.). *C. citratus* revealed the highest content of α -, and total tocopherols, glucose, sucrose, succinic, and ascorbic acids. *P. tridentatum* presented the highest fructose and total sugars content. Otherwise, *G. globosa* showed the highest organic acids concentration. As far as we know, this is the first study reporting the mentioned chemical compounds in *G. globosa* and *C. citratus*.

1. Introduction

For a long time, plants represented one of the most important therapies for different diseases. Nowadays, the popular use of plants as a way of treatment is still very important for human beings [1]. *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk, *Gomphrena globosa* L., and *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf are examples of those plants that are widely used in folk medicine, mostly as infusions.

P. tridentatum (family: Fabaceae) is a European endemic species and its flowers infusion is used against liver, bladder, kidney, and rheumatism problems; it is also used for high blood pressure, cough, kidney stones, diabetes, and bronchitis [1, 2].

G. globosa (family: Amaranthaceae) is native from Panama and Guatemala and its aqueous extract of its purple inflorescences is good to treat bronchial asthma, acute and chronic bronchitis, and whooping cough; the infusion of the flowers is used to treat oliguria and indigestion, also as expectorant and pertussis [3, 4].

C. citratus (family: Poaceae) is native from the Southwest Asia and its aqueous extract (i.e., in the form of infusion) is used for the treatment of several inflammation-based pathologies, in digestive disorders, diabetes, nervous

disorders, and fever [5–7]. According to Novais et al. [1], the infusion is used as gastric analgesic, intestinal anti-inflammatory, and renal antispasmodic and for gall-bladder ailments, sea-sickness, and bladder ailments.

There are several reports about the biological activity of the mentioned plants, especially concerning antioxidant activity [5, 8], that have been related to their phenolic composition [3, 9], but studies regarding the composition on primary metabolites and nutrients are scarce. Moreover, many of the commercially available samples are wild and require chemical characterization. Besides secondary metabolites/nonnutrients such as phenolic compounds, medicinal plants contain primary metabolites and nutrients (e.g., as sugars, organic acids, and tocopherols) that need to be profiled and quantified.

Mono- and oligosaccharides, with low molecular weight, and their derivatives such as sugar alcohols display a major role in the structure and function of all living cells [10]. Organic acids are involved in several biochemical pathways, including energy production and formation of precursors for amino-acid biosynthesis [11]. Vitamin E (including tocopherols) is known to be an essential micronutrient for maintaining the health and wellbeing of humans and other

animals. Several studies suggest that the use of vitamin E may contribute to help lowering the risks of specific chronic and degenerative diseases such as Alzheimer's disease, some types of cancer, cataracts, and ischemic heart disease [12]. All these molecules can be determined by high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to different detectors according to their chemical properties, namely, fluorescence for tocopherols, refraction for sugars, and UV absorption for organic acids.

Therefore, the objective of the present paper was to characterize tocopherols, sugars, and organic acids in three medicinal plants (*P. tridentatum*, *G. globosa*, and *C. citratus*), widely consumed as infusions.

2. Material and Methods

2.1. Samples. Plant material of *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk, *Gomphrena globosa* L., and *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf was purchased from Ervital, a Portuguese company in Castro Daire (Portugal). This company, settled in a high diverse mountain region (Montemuro, the Natura 2000 site), markets several certified plant materials with different origin, such as sustainable wild harvesting of spontaneous local species and organic farming of exogenous species. *Pterospartum tridentatum* flowers were wildy gathered in spring 2012 (respecting plant phenology and abundance) and the other studied species were grown, also in 2012, with organic farming methods. Harvested plants were processed using in-storage and low temperature drying methods (solar heated air, average daily temperature around 30–32°C in shade conditions, and controlled relative humidity). Samples for analysis were prepared from dried plant materials provided by the company, and botanical identification was confirmed by Ana Maria Carvalho, responsible for the medicinal plant collection of the Herbarium of the Escola Superior Agrária (BRESA), of the Polytechnic Institute of Bragança (Trás-os-Montes, Portugal).

2.2. Standards and Reagents. HPLC-grade acetonitrile, ethyl acetate, and *n*-hexane were purchased from Fisher Scientific (Lisbon, Portugal). L-ascorbic acid, tocopherol, sugar, and organic acid standards were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Racemic tocol (50 mg/mL) was purchased from Matreya (Pleasant Gap, PA, USA). Water was treated in Milli-Q water purification system (TGI Pure Water Systems, Greenville, SC, USA).

2.3. Tocopherols Composition. Tocopherols were determined following a previously described procedure [13]. The equipment consisted of an integrated system with a pump (Knauer, Smartline system 1000, Berlin, Germany), degasser system (Smartline manager 5000), autosampler (Jasco AS-2057, Easton, MD, USA), and a fluorescence detector (Jasco FP-2020) programmed for excitation at 290 nm and emission at 330 nm. The chromatographic separation was achieved with a Polyamide II (250 mm × 4.6 mm i.d.) normal-phase column from YMC Waters (Dinslaken, Germany) operating at 30°C (7971 R Grace oven). The mobile phase used was a

mixture of *n*-hexane and ethyl acetate (70 : 30, v/v) at a flow rate of 1 mL/min, and the injection volume was 20 µL. The compounds were identified by chromatographic comparisons with authentic standards. Quantification was based on calibration curves obtained from commercial standards of each compound using the internal standard (IS) methodology; racemic tocol was used as IS. The results were expressed in µg per g of dry weight.

2.4. Sugars Composition. Free sugars were determined by high performance liquid chromatography coupled to a refraction index detector (HPLC-RI), after an extraction procedure previously described [14]. Analysis was performed by HPLC (equipment described above) using an RI detector (Knauer Smartline 2300, Berlin, Germany). Data were analyzed using Clarity 2.4 Software (DataApex). The chromatographic separation was achieved with a Eurospher 100-5 NH2 column (4.6 × 250 mm, 5 mm, Knauer, Berlin, Germany) operating at 30°C. The mobile phase was acetonitrile/deionized water, 70 : 30 (v/v) at a flow rate of 1 mL/min. The compounds were identified by chromatographic comparisons with authentic standards. Quantification was performed using the internal standard method; melezitose was used as IS. The results were expressed in mg per g of dry weight.

2.5. Organic Acids. Organic acids were determined following a procedure previously described [15]. The analysis was performed using a Shimadzu 20A series UFLC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Separation was achieved on a Sphere-Clone (Phenomenex, Torrance, CA, USA) reverse phase C₁₈ column (5 µm, 250 mm × 4.6 mm i.d.) thermostated at 35°C. The elution was performed with sulfuric acid (3.6 mM) using a flow rate of 0.8 mL/min. Detection was carried out in a PDA (photodiode array detector), using 215 and 245 nm (for ascorbic acid) as preferred wavelengths. The organic acids found were quantified by comparison of the area of their peaks recorded at 215 nm with calibration curves obtained from commercial standards of each compound. The results were expressed in mg per g of dry weight.

2.6. Statistical Analysis. All the assays were carried out in triplicate, and the results are expressed as mean values and standard deviation (SD). The results were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's HSD Test with $\alpha = 0.05$. This treatment was carried out using SPSS v.22.0 program.

3. Results and Discussion

The chemical composition of the three plant species in tocopherols, free sugars, and organic acids is presented in Table 1. *C. citratus* gave the highest α - and total tocopherols content but did not present δ -tocopherol that was found in the other two species (e.g., Figure 1(a)). Tocopherols are lipid-soluble antioxidants, being α -tocopherol the most active isoform, due to its role in lipid peroxidation inhibition [16]. These molecules are widely used as functional ingredients in food, pharmaceutical, and cosmetic preparations [17].

TABLE I: Composition of *P. tridentatum*, *G. globosa*, and *C. citratus* in tocopherols, sugars, and organic acids (mean \pm SD).

| | <i>Pterospartum tridentatum</i> | <i>Gomphrena globosa</i> | <i>Cymbopogon citratus</i> |
|--|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| α -Tocopherol | 7.21 \pm 0.01 ^b | 0.38 \pm 0.04 ^c | 56.05 \pm 2.47 ^a |
| γ -Tocopherol | 5.81 \pm 0.56 ^a | 3.02 \pm 0.08 ^b | 4.52 \pm 0.76 ^a |
| δ -Tocopherol | 0.50 \pm 0.10 ^b | 5.20 \pm 0.01 ^a | nd |
| Total tocopherols ($\mu\text{g/g dw}$) | 13.10 \pm 1.08 ^b | 8.60 \pm 0.10 ^c | 60.57 \pm 3.23 ^a |
| Fructose | 83.23 \pm 7.71 ^a | 18.30 \pm 1.27 ^b | 7.35 \pm 1.06 ^c |
| Glucose | 26.70 \pm 1.13 ^b | 15.65 \pm 2.62 ^c | 29.75 \pm 0.92 ^a |
| Sucrose | 23.75 \pm 1.34 ^b | nd | 41.45 \pm 0.21 ^a |
| Total sugars (mg/g dw) | 133.70 \pm 7.50 ^a | 33.95 \pm 3.89 ^c | 78.55 \pm 2.19 ^b |
| Oxalic acid | 1.39 \pm 0.02 ^b | 10.64 \pm 0.04 ^a | 1.22 \pm 0.15 ^b |
| Malic acid | 3.23 \pm 0.90 ^b | 12.33 \pm 0.55 ^a | 2.23 \pm 0.10 ^b |
| Ascorbic acid | nd | nd | 0.24 \pm 0.01 |
| Shikimic acid | 0.71 \pm 0.01 | nd | nd |
| Citric acid | 5.99 \pm 0.35 ^a | 2.40 \pm 0.01 ^b | nd |
| Succinic acid | nd | nd | 10.29 \pm 0.34 |
| Fumaric acid | nd | 0.28 \pm 0.01 ^b | 0.49 \pm 0.01 ^a |
| Total organic acids (mg/g dw) | 11.32 \pm 1.26 ^c | 25.65 \pm 0.51 ^a | 13.98 \pm 0.47 ^b |

nd: not detected; dw: dry weight. In each row, different letters mean significant differences ($P < 0.05$).

As far as we know this is the first report on tocopherols composition of *C. citratus* and *G. globosa*; otherwise, the values obtained for *P. tridentatum* were similar to the ones described by the authors for a wild traditionally shade-dried sample (8.8 $\mu\text{g/g dw}$) [8]. Furthermore, tocopherols have also been reported in other species of the Fabaceae family, such as *Cicer arietinum*, *Lathyrus sativus* [18], *Cytisus multiflorus*, *Cytisus scoparius*, and *Cytisus striatus* [8]; and the amounts found ranged between 6.3 and 23.1 mg/100 g of dw, which is in the range of the sample studied herein, detecting all the isoforms. All isoforms of tocopherols have also been reported in Poaceae and Amaranthaceae families [19], but the quantities cannot be compared due to the units in which they are expressed.

Regarding free sugars, *P. tridentatum* showed the highest levels of fructose and total sugars; nevertheless, the values obtained were much higher than the concentrations found in a wild sample previously studied (0.3 and 49.6 g/100 g dw for fructose and total sugars, resp.) [8]. This could be due to different growth conditions of the plants (e.g., variability of weather and soil characteristics are major factors affecting plant development) and to different drying processes applied, which influence moisture content and plant material quality. Pinela et al. [8] simulated consumers' traditional conditions of use (shade-drying, plant material being stored in a dark, dry place and at room temperature for 30 days); dried plant material used for analysis in this study was processed in five days under the best conditions of shade, daily temperature, and relative humidity as well as airflow rate. Furthermore, the presence of sugars has also been reported in the Poaceae family, namely, sucrose, glucose, fructose, trehalose, and raffinose, but the amounts obtained cannot be compared to the ones studied herein [20]. Some species belonging to the Fabaceae family (mentioned above) [8, 18] have also shown the presence of sugars, mainly fructose, glucose, sucrose, and

trehalose, although some species revealed the presence of other sugars. The amounts found ranged between 2.56 and 18.67 g/100 g of dw; these results are much lower than the one present in this study.

It should be highlighted that fructose can display antioxidant properties due to its reducing capacity. Furthermore, sugars are one of the molecules present in plant infusions that contribute to their energetic value [21]. *C. citratus* gave the highest levels of glucose and sucrose (Table 1 and Figure 1(b)). No reports were found considering sugars composition in the mentioned species or in *G. globosa*.

Concerning organic acids, *G. globosa* was the sample with the highest concentration of these compounds, mainly malic and oxalic acids (Table 1 and Figure 1(c)). Citric and succinic acids were found in higher levels in *P. tridentatum* and *C. citratus*, respectively. The latter also presented ascorbic acid, a powerful antioxidant phytochemical [22, 23]. Besides their important role in the human metabolism, organic acids have other applications; for example, citric acid is a crystal thickener in bones, succinic acid is known to help in diabetes treatment, and malic acid is reported to have a bactericidal effect [24].

Among the three analyzed species, only *P. tridentatum* was previously studied regarding organic acids composition [15]; despite the fact that similar total amount was found (8.1 mg/g dw), the profile then described was slightly different, reporting also the presence of quinic, succinic, and fumaric acids. As mentioned before, differences may be caused by distinct ecological conditions for plant development (plant material provenance is quite different) and also by different characteristics of the plant material used for analysis, as a consequence of the drying processes applied to each material. A five-day controlled in-storage process may produce a better quality plant material, in terms of color (visually confirmed), texture, and moisture content,

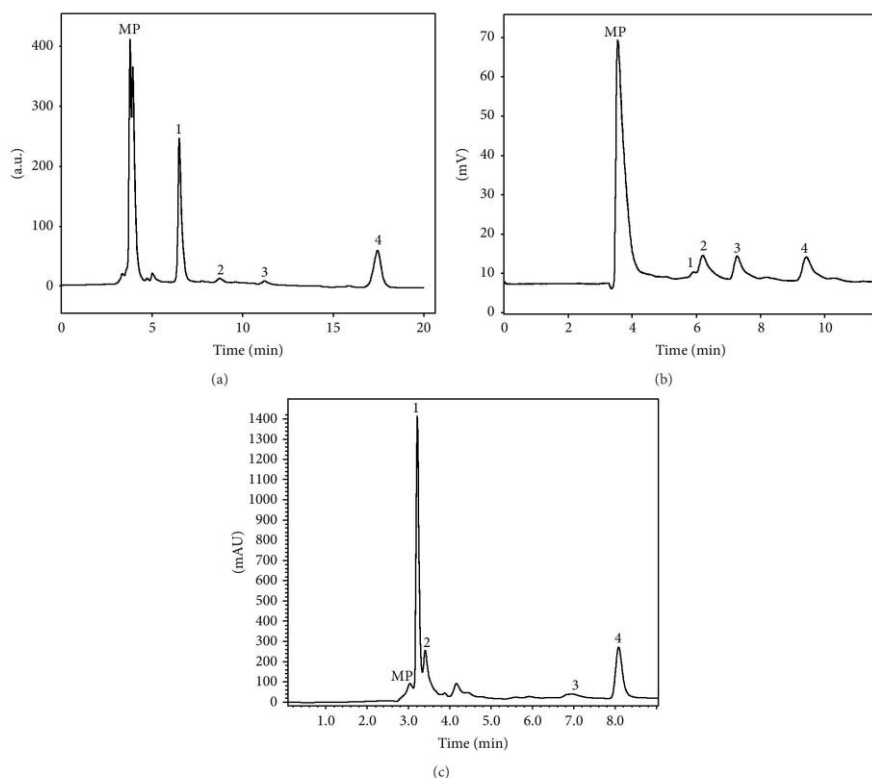


FIGURE 1: Chromatographic profile of (a) tocopherols in *Gomphrena globosa* obtained using HPLC-FD: 1: α -tocopherol, 2: BHT, 3: γ -tocopherol, and 4: tocol (IS); (b) sugars in *Cymbopogon citratus* obtained using HPLC-RI: 1: fructose, 2: glucose, 3: sucrose, and 4: melezitose (IS); (c) organic acids in *Gomphrena globosa* obtained using UFLC-PDA: 1: oxalic acid, 2: malic acid, 3: citric acid, and 4: fumaric acid. MP: mobile phase.

than the traditional shade-drying techniques. All the organic acids, with the exception of quinic acid, have been previously reported in some species (mentioned above) belonging to the Fabaceae family [8, 18], although the quantities present have a large variation depending on the species.

4. Conclusion

Overall, *C. citratus* possessed the highest content of α - and total tocopherols, glucose, sucrose, succinic, and ascorbic acids. *Pterospartum tridentatum* presented the highest fructose and total sugars content. Otherwise, *G. globosa* showed the highest organic acids concentration, due to the highest content of oxalic and malic acids. This study is of great importance because it fills an existing void in relation to

chemical characterization of these plants, more precisely its composition in sugars, organic acids, and tocopherols, that can be present in the consumed forms (mostly infusions).

Conflict of Interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

Acknowledgments

The authors are grateful to Foundation for Science and Technology (FCT, Portugal) for financial support to the research center CIMO (strategic project PEst-OE/AGR/UI0690/2011) and Lillian Barros researcher contract under "Programa Compromisso com Ciência, 2008."

References

- [1] M. H. Novais, I. Santos, S. Mendes, and C. Pinto-Gomes, "Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal)," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 93, no. 2-3, pp. 183-195, 2004.
- [2] J. M. Neves, C. Matos, C. Moutinho, G. Queiroz, and L. R. Gomes, "Ethnopharmacological notes about ancient uses of medicinal plants in Trás-os-Montes (northern of Portugal)," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 124, no. 2, pp. 270-283, 2009.
- [3] L. R. Silva, P. Valentão, J. Faria et al., "Phytochemical investigations and biological potential screening with cellular and non-cellular models of globe amaranth (*Gomphrena globosa* L.) inflorescences," *Food Chemistry*, vol. 135, no. 2, pp. 756-763, 2012.
- [4] A. M. Rahman and M. I. A. Gulshana, "Taxonomy and medicinal uses on amaranthaceae family of Rajshahi, Bangladesh," *Applied Ecology and Environmental Sciences*, vol. 2, no. 2, pp. 54-59, 2014.
- [5] R. R. B. Negrelle and E. C. Gomes, "Cymbopogon citratus (DC.) Stapf: chemical composition and biological activities," *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, vol. 9, no. 1, pp. 80-92, 2007.
- [6] V. Francisco, G. Costa, A. Figueirinha 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*, vol. 148, no. 1, pp. 126-134, 2013.
- [7] V. Francisco, A. Figueirinha, B. M. Neves et al., "Cymbopogon citratus as source of new and safe anti-inflammatory drugs: bio-guided assay using lipopolysaccharide-stimulated macrophages," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 133, no. 2, pp. 818-827, 2011.
- [8] J. Pinela, L. Barros, A. M. Carvalho, and I. C. F. R. Ferreira, "Influence of the drying method in the antioxidant potential and chemical composition of four shrubby flowering plants from the tribe Genisteae (Fabaceae)," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 49, no. 11, pp. 2983-2989, 2011.
- [9] C. L. Roriz, L. Barros, A. M. Carvalho, C. Santos-Buelga, and I. C. F. R. Ferreira, "Pterospartum tridentatum, Gomphrena globosa and Cymbopogon citratus: a phytochemical study focused on antioxidant compounds," *Food Research International*, vol. 62, pp. 684-693, 2014.
- [10] E. Hernandez-Marin and A. Martinez, "Carbohydrates and their free radical scavenging capability: a theoretical study," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 116, no. 32, pp. 9668-9675, 2012.
- [11] J. Lopez-Bucio, M. F. Nieto-Jacobo, V. Ramirez-Rodriguez, and L. Herrera-Estrella, "Organic acid metabolism in plants: From adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils," *Plant Science*, vol. 160, no. 1, pp. 1-13, 2000.
- [12] Q. Jiang, "Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 72, pp. 76-90, 2014.
- [13] M. I. Dias, L. Barros, M. J. Sousa, and I. C. F. R. Ferreira, "Comparative study of lipophilic and hydrophilic antioxidants from in vivo and in vitro grown *Coriandrum sativum*," *Plant Foods for Human Nutrition*, vol. 66, no. 2, pp. 181-186, 2011.
- [14] J. C. M. Barreira, J. A. Pereira, M. B. P. P. Oliveira, and I. C. F. R. Ferreira, "Sugars profiles of different chestnut (*Castanea sativa* Mill.) and almond (*Prunus dulcis*) cultivars by HPLC-RI," *Plant Foods for Human Nutrition*, vol. 65, no. 1, pp. 38-43, 2010.
- [15] C. Pereira, L. Barros, A. M. Carvalho, and I. C. F. R. Ferreira, "Use of UFLC-PDA for the analysis of organic acids in thirty five species of food and medicinal plants," *Food Analytical Methods*, vol. 6, no. 5, pp. 1337-1344, 2013.
- [16] O. Ouchikh, T. Chahed, R. Ksouri et al., "The effects of extraction method on the measured tocopherol level and antioxidant activity of *L. nobilis* vegetative organs," *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 24, no. 1, pp. 103-110, 2011.
- [17] Y. Yang and D. J. McClements, "Encapsulation of vitamin E in edible emulsions fabricated using a natural surfactant," *Food Hydrocolloids*, vol. 30, no. 2, pp. 712-720, 2013.
- [18] A. Sarmento, L. Barros, A. Fernandes, A. M. Carvalho, and I. C. Ferreira, "Valorization of traditional foods: nutritional and bioactive properties of *Cicer arietinum* L. and *Lathyrus sativus* L. pulses," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2014.
- [19] G. Horvath, L. Wessjohann, J. Bigirimana et al., "Differential distribution of tocopherols and tocotrienols in photosynthetic and non-photosynthetic tissues," *Phytochemistry*, vol. 67, no. 12, pp. 1185-1195, 2006.
- [20] H. R. Ghasempour, D. F. Gaff, R. P. W. Williams, and R. D. Gianello, "Contents of sugars in leaves of drying desiccation tolerant flowering plants, particularly grasses," *Plant Growth Regulation*, vol. 24, no. 3, pp. 185-191, 1998.
- [21] D. Komes, A. Belščak-Cvitanović, I. Ljubičić et al., "Formulating blackberry leaf mixtures for preparation of infusions with plant derived sources of sweeteners," *Food Chemistry*, vol. 151, pp. 385-393, 2014.
- [22] I. C. F. R. Ferreira, L. Barros, and R. Abreu, "Antioxidants in wild mushrooms," *Current Medicinal Chemistry*, vol. 16, no. 12, pp. 1543-1560, 2009.
- [23] B. Halliwell, "Free radicals and antioxidants: updating a personal view," *Nutrition Reviews*, vol. 70, no. 5, pp. 257-265, 2012.
- [24] M. Carochi, L. Barros, A. L. Antonio et al., "Analysis of organic acids in electron beam irradiated chestnuts (*Castanea sativa* Mill.): effects of radiation dose and storage time," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 55, pp. 348-352, 2013.

ANEXO 3

Scientific validation of synergistic antioxidant effects in commercialized plant mixtures for infusions preparation

1 **Scientific validation of synergistic antioxidant effects in**
2 **commercialized mixtures of *Cymbopogon citratus* and *Pterospartum***
3 ***tridentatum* or *Gomphrena globosa* for infusions preparation**

4
5 Custódio Lobo Roriz,¹ Lillian Barros,^{1,*} Ana Maria Carvalho¹, Celestino Santos-Buelga,²
6 Isabel C.F.R. Ferreira^{1,*}

7
8 ¹Mountain Research Centre (CIMO), ESA, Polytechnic Institute of Bragança, Campus de
9 Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal.

10 ²GIP-USAL, Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, Campus Miguel de
11 Unamuno, 37007 Salamanca, Spain

12
13
14 * Author to whom correspondence should be addressed (e-mail: iferreira@ipb.pt;
15 telephone +351-273-303219; fax +351-273-325405; email: lillian@ipb.pt; telephone
16 +351-273-303903; fax +351-273-325405).

17
18
19 **Running title:** Synergistic antioxidant effects of commercialized plant mixtures

22 **Abstract**

23 *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk., *Gomphrena globosa* L. and *Cymbopogon citratus*
24 (DC) Stapf. are examples of medicinal plants with antioxidant properties by their own,
25 but that can be improved when mixed. In the present work, the antioxidant activity and
26 phenolic compounds were determined in the infusions prepared from the individual
27 plants, and from mixtures of these plants in different proportions. *P. tridentatum* > *C.*
28 *citratus* > *G. globosa* was the order observed for antioxidant efficacy, which can be
29 related to their different composition in phenolic compounds. Synergism was the main
30 effect observed among the tested mixtures, mainly for the infusions prepared from the
31 plants in proportion 40%:60% (either *P. tridentatum* and *C. citratus*; or *G. globosa* and
32 *C. citratus*). The infusion obtained with 40% of *P. tridentatum* and 60% of *C. citratus*
33 gave the highest antioxidant properties. The present study validates the
34 commercialization of the studied plants combined in specific proportions.

35

36 *Keywords:* *Pterospartum tridentatum*; *Gomphrena globosa*; *Cymbopogon citratus*;
37 Infusions; Synergism; Antioxidants

38

39 **1. Introduction**

40 Nowadays, the therapeutic effects of plants are very important for human health, as the
41 World Health Organization (WHO) estimates that 60% of the total human population still
42 treats primary health care problems with traditional remedies based mainly on
43 phytotherapy (WHO, 2014). Furthermore, contemporary dietary programs generally
44 recommend specific medicinal and aromatic plants as functional foods (foods that provide
45 health benefits beyond normal physiological nutritional requirements) (Gonçalves,
46 Gomes, Costa & Romano, 2013).

47 Tea and herbal infusions are examples of those foods, being prepared with fresh or dried
48 flowers, leaves, seeds, or roots, generally by pouring boiling water over the plant parts
49 and letting them steep for a few minutes. Herbal infusions are considered rich in phenolic
50 compounds recognized for their beneficial effects on human health (Costa et al., 2012).

51 Phenolic compounds comprise flavonoids, phenolic acids, and tannins, among others.
52 Some applications proposed for natural phenolic compounds are based on their
53 antioxidant activity against reactive species involved in aging and in chronic,
54 autoimmune, inflammatory, coronary and degenerative diseases (Ruiz & Romero, 2001).

55 Studies involving the evaluation of synergistic effects of combined plants are emerging
56 and seem to highlight the potential of the mixtures when compared with the isolated plant
57 (Pereira, Calhela, Barros, Queiroz & Ferreira, 2014). Synergy assessment has become a
58 key area in phytomedicine research in recent years, in order to find a scientific rationale
59 for the centuries-old, often-observed therapeutic superiority of many multidrug
60 combinations in traditional medicine over single constituents (Wagner & Ulrich-
61 Merzenich, 2009). As herbal extracts consist of complex mixtures of major compounds,
62 concomitant agents and other substances, the complex multi-component nature of
63 medicinal herbs may serve as a valuable resource due to its potential treatment effects by

64 synergy (Yang et al., 2014). Synergistic interactions between the components of
65 individual or mixtures of herbs are a vital part of their therapeutic efficacy (Williamson,
66 2001). In fact, many leading researchers have advocated using combination approaches
67 to pursue the optimum therapeutic efficacy and to improve the patient's overall health
68 status (Yang et al., 2014).

69 *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk. is traditionally used to treat affections of the
70 nervous, cardiovascular, digestive and urinary systems (Novais, Santos, Mendes & Pinto-
71 Gomes, 2004), and some researchers had already studied its infusion regarding
72 antioxidant capacity (Paulo et al., 2008; Gonçalves et al., 2013). *Gomphrena globosa* L.
73 is commonly consumed for the treatment of several respiratory inflammatory conditions
74 and was previously characterized regarding its phenolic compounds (Silva et al., 2012;
75 Zhu et al., 2013). *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. infusion is used, in Portuguese
76 traditional medicine, to treat mainly digestive system problems (Novais et al., 2004), and
77 the antioxidant capacity of the infusion was also studied (Cheel, Theoduloz, Rodríguez
78 & Schmeda-Hirschmann, 2005; Francisco et al., 2013).

79 In a previous study, our research group described the antioxidant activity and phenolic
80 composition in methanol/water extracts (80:20, v/v) of the mentioned species (Roriz,
81 Barros, Carvalho, Santos-Buelga & Ferreira, 2014), but to our knowledge, there are no
82 studies on mixtures of those plants. This is a very interesting topic as there are available
83 commercial mixtures of *P. tridentatum* and *C. citratus*, as also *G. globosa* and *C. citratus*,
84 in specific proportions (40:60%), for infusions preparation. Therefore, in the present
85 work, we intend to validate those combinations by assessing the synergistic effects
86 regarding antioxidant properties and compounds.

87

88 2. Material and Methods

89 2.1. *Samples and samples preparation*

90 Plant material of *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk., *Gomphrena globosa* L. and
91 *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. was purchased from Ervital, a Portuguese certificated
92 company from Castro Daire (Portugal). *P. tridentatum* flowers were wild gathered in
93 spring 2012 (respecting plant phenology and abundance). The other studied species were
94 grown, also in 2012, with organic farming methods. The parts used were the flowers of
95 *G. globosa* and leaves of *C. citratus*. Harvested plant parts were processed using in-
96 storage and low temperature drying methods (solar heated air, average daily temperature
97 around 30-32 °C in shade conditions and controlled relative humidity). Botanical
98 identification was confirmed by Ana Maria Carvalho, responsible of the medicinal plant
99 collection of the Herbarium of the Escola Superior Agrária (BRESA), of the Polytechnic
100 Institute of Bragança (Trás-os-Montes, Portugal). Samples for analysis were prepared by
101 mixing dried and powdered (20 mesh) plant materials, in the following proportions: *P.*
102 *tridentatum* (25%) + *C. citratus* (75%) and *P. tridentatum* (40%) + *C. citratus* (60%); *G.*
103 *globosa* (25%) + *C. citratus* (75%) and *G. globosa* (40%) + *C. citratus* (60%). Individual
104 samples of each plant species were also analysed.

105 For infusions preparation, each individual sample or mixture (1 g) was added to 250 mL
106 of boiling distilled water, left to stand at room temperature for 5 min, and then filtered
107 under reduced pressure. The obtained infusions were frozen and lyophilized. The
108 lyophilized infusions were re-dissolved in distilled water, to obtain stock solutions of 10
109 mg/mL.

110 For each species, three samples were used and all the assays were carried out in triplicate.

111

112 2.2. *Standards and reagents*

113 HPLC-grade acetonitrile was obtained from Merck KgaA (Darmstadt, Germany). Formic
114 and acetic acids were purchased from Prolabo (VWR International, France). Trolox (6-
115 hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), was purchased from Matreya
116 (PA, USA). 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) was obtained from Alfa Aesar (Ward
117 Hill, MA, USA). Phenolic standards were from Extrasynthèse (Genay, France). Water
118 was treated in Milli-Q water purification system (TGI Pure Water Systems, Greenville,
119 SC, USA).

120

121 *2.3. Analysis of phenolic compounds in the infusions*

122 Phenolic compounds were analysed by High-Performance Liquid Chromatography
123 (HPLC, Hewlett-Packard 1100, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) as
124 previously described by the authors (Roriz et al., 2014). Double online detection was
125 carried out in the diode array detector (DAD) using 280 nm and 370 nm as preferred
126 wavelengths and in a mass spectrometer (MS, API 3200 Qtrap, Applied Biosystems,
127 Darmstadt, Germany) connected to the HPLC system via the DAD cell outlet. The
128 phenolic compounds were identified by comparing their retention time, UV-vis and mass
129 spectra with those obtained from standard compounds, when available. Otherwise, peaks
130 were tentatively identified comparing the obtained information with available data
131 reported in the literature. For quantitative analysis, a calibration curve for each available
132 phenolic standard was constructed based on the UV signal. For the identified phenolic
133 compounds for which a commercial standard was not available, the quantification was
134 performed through the calibration curve of other compound from the same phenolic
135 group. The results were expressed in mg per g of infusion.

136

137 *Betacyanins*. Each sample (1 g) was extracted with 30 mL of methanol containing 0.5%
138 trifluoroacetic acid (TFA), and filtered through a Whatman n° 4 paper. The residue was
139 then re-extracted twice with additional 30 mL portions of 0.5% TFA in methanol. The
140 combined extracts were evaporated at 35 °C to remove the methanol, and re-dissolved in
141 water. For purification, the extract solution was deposited onto a C-18 SepPak® Vac 3 cc
142 cartridge (Phenomenex), previously activated with methanol followed by water; sugars
143 and more polar substances were removed by passing through 10 mL of water and
144 betalain/betacyanin pigments were further eluted with 5 mL of methanol:water (80:20,
145 v/v) containing 0.1% TFA. The extract was concentrated under vacuum, lyophilized, re-
146 dissolved in 1 mL of 20% aqueous methanol and filtered through a 0.22-µm disposable
147 LC filter disk for HPLC analysis. Betacyanins were determined by HPLC as previously
148 described by the authors (Roriz et al., 2014). Double detection was carried out by DAD,
149 using 520 nm as the preferred wavelength, and in a MS connected to the HPLC system
150 via the DAD cell outlet. The betacyanins were tentatively identified by comparing their
151 UV-vis and mass spectra with available data information reported in the literature. The
152 quantification was performed using a calibration curve of gomphrenin (isolated in our
153 laboratory). The results were expressed in mg per g of infusion.

154

155 *2.4. Evaluation of antioxidant activity in the infusions*

156 DPPH radical-scavenging activity was evaluated by using an ELX800 microplate reader
157 (Bio-Tek Instruments, Inc; Winooski, VT, USA), and calculated as a percentage of DPPH
158 discolouration using the formula: $[(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{S}}) / A_{\text{DPPH}}] \times 100$, where A_{S} is the absorbance
159 of the solution containing the sample at 515 nm, and A_{DPPH} is the absorbance of the DPPH
160 solution (Barros et al., 2013). Reducing power was evaluated by the capacity to convert
161 Fe^{3+} into Fe^{2+} , measuring the absorbance at 690 nm in the microplate reader mentioned

162 above (Barros et al., 2013). Inhibition of β -carotene bleaching was evaluated through the
163 β -carotene/linoleate assay; the neutralization of linoleate free radicals avoids β -carotene
164 bleaching, which is measured by the formula: β -carotene absorbance after 2h of
165 assay/initial absorbance) \times 100 (Barros et al., 2013). Lipid peroxidation inhibition in
166 porcine (*Sus scrofa*) brain homogenates was evaluated by the decreasing in thiobarbituric
167 acid reactive substances (TBARS); the color intensity of the malondialdehyde-
168 thiobarbituric acid (MDA-TBA) was measured by its absorbance at 532 nm; the inhibition
169 ratio (%) was calculated using the following formula: $[(A - B)/A] \times 100\%$, where A and
170 B were the absorbance of the control and the sample solution, respectively (Barros et al.,
171 2013). The results were expressed in EC₅₀ values (sample concentration providing 50%
172 of antioxidant activity or 0.5 of absorbance in the reducing power assay). Trolox was used
173 as positive control.

174

175 2.5. Classification of additive, synergistic or antagonistic effects

176 Theoretical values for antioxidant activity of the mixtures were calculated as weighted
177 mean experimental EC₅₀ values of the individual samples and considering additive
178 contributions of individual species in each percentage; for instance, *P. tridentatum* (25%)
179 + *C. citratus* (75%) $EC_{50} = EC_{50} P. tridentatum \times 0.25 + EC_{50} C. citratus \times 0.75$.

180 The classification in additive (AD), synergistic (SN) or antagonistic (negative synergistic;
181 AN) effects was performed as follow: AD: EC₅₀ theoretical and experimental values
182 reveal differences lower than 10%; SN: EC₅₀ experimental values are more than 10%
183 lower than theoretical values; AN: EC₅₀ experimental values are more than 10% higher
184 than theoretical values. The limit of 10% was chosen taking into account the coefficients
185 of variation obtained in the replications of each antioxidant activity assay. It should be
186 noted that lower EC₅₀ values mean greater antioxidant activity.

187

188 **3. Results and Discussion**

189 *3.1. Phenolic profiles*

190 Phenolic compound profiles of the infusion extracts of *P. tridentatum* (Pt), *G. globosa*
191 (*Gg*) and *C. citratus* (*Cc*) are shown in **Figure 1**. Data (retention time, λ_{max} in the visible
192 region, molecular ion and main fragment ions observed in MS²) obtained by HPLC-DAD-
193 ESI/MS analysis regarding phenolic compounds and betacyanins identification and
194 individual quantification in the dry extracts of the infusions are presented in **Tables 1-3**.
195 All the compounds found in the infusions were already described and tentatively
196 identified in a previous study carried out by our research group, but using methanolic
197 extracts of the plants (Roriz et al., 2014). Nevertheless, it should be highlighted that some
198 of the compounds previously identified in the methanolic extracts could not be found in
199 the infusions studied herein, as the heating process inherent to infusion could destroy
200 them (Samaniego-Sánchez et al., 2011). In particular, 7-*O*-methylgenistein (prunetin) that
201 was described for *P. tridentatum* methanolic extract (Roriz et al., 2014), was not observed
202 in its infusion (**Table 1**). Dihydroflavonol *C*-derivatives (namely peak 1^{Pt}, 43.04 mg/g of
203 infusion) were also the major compounds found in *P. tridentatum* infusions (**Table 1**).
204 The phenolic profile of infusions prepared from wild *P. tridentatum* was already
205 described by some authors (Vitor et al., 2004; Paulo et al., 2008); nevertheless, the results
206 described herein for a commercial sample are more detailed.

207 Regarding *G. globosa* (**Table 2, Figure 1B and C**), the qualitative profile in phenolic
208 compounds of the infusion was similar to the one previously described for methanolic
209 extract (Roriz et al., 2014) and for other infusions of the plant (Silva et al., 2012). The
210 composition in betacyanins was also similar to the one described by Cai, Sun and Corke
211 (2001) for an infusion prepared from a wild sample. Flavonoids continued to be the main

212 phenolic compounds found in *G. globosa*, being kaempferol 3-*O*-rutinoside (peak 12^{Gg},
213 0.89 mg/g of infusion) the main flavonol. Otherwise, gomphrenin III isomers were also
214 the major betacyanins found (**Table 2, Figure 1C**).

215 *trans p*-Coumaric acid and luteolin, previously found in *C. citratus* methanolic extract
216 (Roriz et al., 2014), were not observed in the infusion (**Table 3, Figure 1D**). Otherwise,
217 compound 2a^{Cc}, corresponding to the *cis* isomer of caffeic acid, was only detected in the
218 infusion due to the heat treatment applied. The identity of that compound was established
219 based on the observation that hydroxycinnamoyl *cis* derivatives are expected to elute
220 before the corresponding *trans* ones, as previously checked in our laboratory (Barros,
221 Dueñas, Carvalho, Ferreira & Santos-Buelga, 2012). Flavonoids were also the major
222 group found in the infusion of *C. citatus*, being luteolin 2''-*O*-deoxyhexosyl-6-*C*-
223 hexoside (peak 6^{Cc}, 13.12 µg/g dw) the main compound (**Table 3**). The phenolic
224 characterization described in the present study was more detailed than the ones described
225 by other authors (Figueirinha, Paranhos, Pérez-Alonso, Santos-Buelga & Batista, 2008;
226 Figueirinha, Cruz, Francisco, Lopes & Batista, 2010; Marques & Farah, 2009; Port's,
227 Chisté, Godoy, & Prado, 2013).

228

229 3.3. Antioxidant activity of the infusions prepared from individual and mixed samples

230 Herbal companies have been preparing mixtures of plants to consume as infusions with
231 improved organoleptic parameters, in particular flavor. In fact, despite some healthy
232 properties of *P. tridentatum* and *G. globosa* (as mentioned in the Introduction section),
233 their flavor is unpleasant for the majority of consumers. Therefore, the strategy is to add
234 a pleasant flavored plant, such as *C. citratus*, to achieve a mixture with suitable
235 organoleptic properties according to consumers' preferences. Nevertheless, these
236 mixtures can provide beneficial effects taking advantage on the synergism between

237 plants, besides the improvement of flavor. In this perspective, there are available
238 commercial mixtures of *P. tridentatum* + *C. citratus* and *G. globosa* + *C. citratus* in
239 40:60% proportion, that demands scientific studies in order to validate these percentages
240 of combination. We also studied other possibilities increasing the percentage of *C.*
241 *citratus* to 75%, as it would not be recommended to increase the other species (*P.*
242 *tridentatum* and *G. globosa* over 40%) due to the previous mentioned organoleptic and
243 sensorial reasons.

244 The infusions prepared from individual or mixed plants in different proportions gave high
245 antioxidant activity namely, free radicals scavenging activity, reducing power, and lipid
246 peroxidation inhibition (**Table 4**). The order of antioxidant efficacy of the individual
247 samples in the four *in vitro* assays was *P. tridentatum* > *C. citratus* > *G. globosa*.
248 *Pterospartum tridentatum* and *G. globosa* infusions showed, in general, higher
249 antioxidant activity than methanolic extracts, while the opposite was observed for *C.*
250 *citratus* (Roriz et al., 2014). Particularly, *P. tridentatum* showed higher DPPH scavenging
251 activity than the infusions prepared from other commonly consumed herbs such as
252 *Camellia sinensis* (L.) kuntze (EC₅₀=250 µg/mL) (Pereira, Barros, Vilas-Boas, &
253 Ferreira, 2013), *Matricaria recutita* L. (EC₅₀=395 µg/mL) (Guimarães et al., 2013) and
254 *Melissa officinalis* L. (EC₅₀=190 µg/mL) (Dias, Barros, Sousa, & Ferreira, 2012).

255 The highest activity observed for *P. tridentatum* can be related with the presence of
256 dihydroflavonol and isoflavone derivatives. Indeed, the antioxidant properties of
257 isoflavones and their role in the protection against diseases development have been
258 described (Ferguson et al., 2014). The antioxidant activity of *C. citratus* infusion could
259 be attributed to the high concentration of flavonoids, especially apigenin and luteolin
260 derivatives. Apigenin and luteolin, commonly found in different fruits, vegetables and
261 herbs, have demonstrated to possess high antioxidant ability by scavenging free radicals

262 (Galati, Moridani, Chan & O'Brien, 2001). Finally, *G. globosa* infusion that showed the
263 lowest antioxidant potential, gave also the lowest concentration in phenolic compounds.
264 Regarding infusions prepared with *P. tridentatum* and *C. citratus* in different proportions
265 (25:75% or 40:60%), only synergistic effects were observed (**Table 4**), although the
266 mixture with 40% of *P. tridentatum* and 60% of *C. citratus* showed greater antioxidant
267 properties. This could be related with the higher percentage of *P. tridentatum*, the
268 individual plant with the highest antioxidant activity.

269 For the infusion prepared with 25% of *G. globosa* and 75% of *C. citratus*, the antagonistic
270 effects predominated (reducing power and TBARS inhibition); an additive effect was
271 observed for free radicals scavenging activity and synergism was only obtained for β -
272 carotene bleaching inhibition (**Table 4**). Regarding the infusion prepared with 40% of *G.*
273 *globosa* and 60% of *C. citratus*, synergistic effects were observed for free radicals
274 scavenging activity and lipid peroxidation inhibition, but an antagonist effect was
275 obtained for reducing power (**Table 4**).

276 The phenolic compounds were further analysed in the infusions prepared from the two
277 mixtures that showed the highest antioxidant activity: *P. tridentatum* (40%) + *C. citratus*
278 (60%) and *G. globosa* (40%) + *C. citratus* (60%) (**Table 5**). In *P. tridentatum* (40%) + *C.*
279 *citratus* (60%) infusion it can be observed a prevalence of the profile of *P. tridentatum*,
280 even though this species is present in lower proportion (40%). This could be explained
281 by the fact of *P. tridentatum* being the species with the highest concentration of phenolic
282 compounds, mainly dihydroflavonol and isoflavone derivatives, that are also present in
283 high concentration in this mixture. The opposite occurs for the mixture *G. globosa* (40%)
284 + *C. citratus* (60%); in this case, the predominant profile is from *C. citratus* (60%),
285 presenting this species a higher phenolic content in comparison with *G. gombosa*. The

286 phenolic profile obtained in the infusions prepared from those mixtures could also explain
287 their highest antioxidant activity.
288 Overall, *P. tridentatum* infusion displayed the highest antioxidant activity, followed by
289 *C. citratus* and, finally, *G. globosa*. The dissimilarity in antioxidant potential is certainly
290 related with their different composition in phenolic compounds. Synergism was the main
291 effect observed among the tested mixtures, being more evident in the infusions prepared
292 with the plants in proportion 40%:60% (either *P. tridentatum* and *C. citratus*; or *G.*
293 *globosa* and *C. citratus*). The present study validates the combination of the studied plants
294 in specific proportions to be commercialized for infusions preparation.

295

296 **Acknowledgements**

297 The authors are grateful to Foundation for Science and Technology (FCT, Portugal) for
298 financial support to the research center CIMO (strategic project PEst-
299 OE/AGR/UI0690/2011) and L. Barros researcher contract under “Programa
300 Compromisso com Ciência – 2008”.

301

302 **References**

303 Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R., & Santos-Buelga, C. (2012).
304 Characterization of phenolic compounds in flowers of wild medicinal plants from
305 Northeastern Portugal. *Food Chemical and Toxicology*, *50*, 1576-1582.

306 Barros, L., Pereira, E., Calhella, R.C., Dueñas, M., Carvalho, A.M., Santos-Buelga, C.,
307 & Ferreira, I.C.F.R. (2013). Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic
308 and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Functional*
309 *Foods*, *5*, 1732-1740.

- 310 Cai, Y. -Z., Sun, M., & Corke, H. (2001). Identification and distribution of simple and
311 acylated betacyanins in the amaranthaceae. *Journal of Agricultural and Food*
312 *Chemistry*, *49*, 1971–1978.
- 313 Cheel, J., Theoduloz, C., Rodríguez, J., & Schmeda-Hirschmann, G. (2005). Free radical
314 scavengers and antioxidants from Lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.).
315 *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 2511-2517.
- 316 Costa, A., Nunes, M., Almeida, I., Carvalho, M., Barroso, M. F., Alves, R. C., & Oliveira,
317 M. (2012). Teas, dietary supplements and fruit juices: A comparative study regarding
318 antioxidant activity and bioactive compounds. *LWT-Food Science and Technology*,
319 *49*, 324-328.
- 320 Dias, M.I., Barros, L., Sousa, M.J., & Ferreira, I.C.F.R. (2012). Systematic comparison of
321 nutraceuticals and antioxidant potential of cultivated, in vitro cultured and
322 commercial *Melissa officinalis* samples. *Food Chemical and Toxicology*, *50*, 1866-
323 1873.
- 324 Ferguson, J. F., Ryan, M. F., Gibney, E. R., Brennan, L., Roche, H. M., & Reilly, M. P.
325 (2014). Dietary isoflavone intake is associated with evoked responses to inflammatory
326 cardiometabolic stimuli and improved glucose homeostasis in healthy volunteers.
327 *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, in press.
- 328 Figueirinha, A., Paranhos, A., Pérez-Alonso, J. J., Santos-Buelga, C., & Batista, M. T.
329 (2008). *Cymbopogon citratus* leaves: Characterization of flavonoids by HPLC–
330 PDA–ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive
331 polyphenols. *Food Chemistry*, *110*, 718-728.
- 332 Figueirinha, A., Cruz, M. T., Francisco, V., Lopes, M. C., & Batista M. T. (2010). Anti-
333 Inflammatory Activity of *Cymbopogon citratus* Leaf Infusion in Lipopolysaccharide-

334 Stimulated Dendritic Cells: Contribution of the Polyphenols. *Journal of Medicinal*
335 *Food, 13*, 681-690.

336 Francisco, V., Costa, G., Figueirinha, A., Marques, C., Pereira, P., Miguel, N. B., Celeste,
337 N. B., García-Rodríguez, C., Teresa, C. M., & Teresa, B. M. (2013). Anti-
338 inflammatory activity of *Cymbopogon citratus* leaves infusion via proteasome and
339 nuclear factor- κ B pathway inhibition: contribution of chlorogenic acid. *Journal of*
340 *Ethnopharmacology, 148*, 126.

341 Galati, G., Moridani, M. Y., Chan, T. S., & O'Brien, P. J. (2001). Peroxidative metabolism
342 of apigenin and naringenin versus luteolin and quercetin: glutathione oxidation and
343 conjugation. *Free Radical Biology and Medicine, 30*, 370-382.

344 Gonçalves, S., Gomes, D., Costa, P., & Romano, A. (2013). The phenolic content and
345 antioxidant activity of infusions from Mediterranean medicinal plants. *Industrial*
346 *Crops and Products, 43*, 465-471.

347 Guimarães, R., Barros, L., Dueñas, M., Calhella, R.C., Carvalho, A.M., Santos-Buelga,
348 C., Queiroz, M.J.R.P., & Ferreira, I.C.F.R. (2013). Infusion and decoction of wild
349 German chamomile: Bioactivity and characterization of organic acids and phenolic
350 compounds. *Food Chemistry, 136*, 947–954

351 Marques, V., & Farah, A. (2009). Chlorogenic acids and related compounds in medicinal
352 plants and infusions. *Food Chemistry, 113*, 1370–1376.

353 Novais, M., Santos, I., Mendes, S., & Pinto-Gomes, C. (2004). Studies on pharmaceutical
354 ethnobotany in Arrabida natural park (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology, 93*,
355 183-195.

356 Paulo, A., Martins, S., Branco, P., Dias, T., Borges, C., Rodrigues, A. I., do Céu Costa,
357 M., Teixeira, A., & Mota-Filipe, H. (2008). The opposing effects of the flavonoids
358 isoquercitrin and sissotrin, isolated from *Pterospartum tridentatum*, on oral glucose
359 tolerance in rats. *Phytotherapy Research*, 22, 539-543.

360 Pereira, C., Barros, L., Vilas-Boas, M., & Ferreira, I.C.F.R. (2013). Potentiating effects of
361 honey on antioxidant properties of lemon-flavoured black tea. *International Journal*
362 *of Food Science and Nutrition*, 64, 230-234.

363 Pereira, C., Calhelha, R. C., Barros, L., Queiroz, M. J. R., & Ferreira, I. C. (2014).
364 Synergisms in antioxidant and anti-hepatocellular carcinoma activities of artichoke,
365 milk thistle and borututu syrups. *Industrial Crops and Products*, 52, 709-713.

366 Port's, P. S., Chisté, R. C., Godoy, H. T., & Prado, M. A. (2013). The phenolic compounds
367 and the antioxidant potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian
368 region. *Food Research International*, 53, 875-881.

369 Roriz, C. L., Barros, L., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2014).
370 *Pterospartum tridentatum*, *Gomphrena globosa* and *Cymbopogon citratus*: A
371 phytochemical study focused on antioxidant compounds. *Food Research*
372 *International*, 62, 684-693.

373 Ruiz, J. M., & Romero, L. (2001). Bioactivity of the phenolic compounds in higher plants.
374 *Studies in Natural Products Chemistry*, 25, 651-681.

375 Samaniego-Sánchez, C., Inurreta-Salinas, Y., Quesada-Granados, J. J., Blanca-Herrera,
376 R., Villalón-Mir, M., Serrana, H.L.-G., & López Martínez, M. C. (2011). The
377 influence of domestic culinary processes on the Trolox Equivalent Antioxidant
378 Capacity of green tea infusions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 79-
379 86.

380 Silva, L. R., Valentão, P., Faria, J., Ferreres, F., Sousa, C., Gil-Izquierdo, A., Pinho, B. R.,
381 & Andrade, P. B. (2012). Phytochemical investigations and biological potential
382 screening with cellular and non-cellular models of globe amaranth (*Gomphrena*
383 *globosa* L.) inflorescences. *Food Chemistry*, *135*, 756-763.

384 Vitor, R. F., Mota-Filipe, H., Teixeira, G., Borges, C., Rodrigues, A. I., Teixeira, A., &
385 Paulo, A. (2004). Flavonoids of an extract of *Pterospartum tridentatum* showing
386 endothelial protection against oxidative injury. *Journal of Ethnopharmacology*, *93*,
387 363-370.

388 Wagner, H., & Ulrich-Merzenich, G. (2009). Synergy research: approaching a new
389 generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, *16*, 97-110.

390 Williamson, E. M. (2001). Synergy and other interactions in phytomedicines.
391 *Phytomedicine*, *8*, 401-409.

392 WHO (2014). What does biodiversity mean for human health?
393 <http://www.who.int/globalchange/ecosystems/biodiversity/en/>, consulted in July, 29.

394 Yang, Y., Zhang, Z., Li, S., Ye, X., Li, X., & He, K. (2014). Synergy effects of herb
395 extracts: Pharmacokinetics and pharmacodynamic basis. *Fitoterapia*, *92*, 133-147.

396 Zhu, F., Wang, X., Fan, W., Qu, L., Qiao, M., & Yao, S. (2013). Assessment of potential
397 health risk for arsenic and heavy metals in some herbal flowers and their infusions
398 consumed in China. *Environmental Monitoring and Assessment*, *185*, 3909-3916.

399
400
401
402

Table 1. Retention time (Rt), wavelengths of maximum absorption in the visible region (λ_{\max}), mass spectral data, identification and quantification of phenolic compounds in infusion extracts of *P. tridentatum* (Pt) (mean \pm SD).

| Peak | Rt (min) | λ_{\max} (nm) | Molecular ion [M-H] ⁻ (m/z) | Tentative identification | Quantification (mg/g inf) |
|------------------------|----------|-----------------------|--|--|---------------------------|
| 1 ^{Pt} | 5.0 | 290,sh340 | 465 | Dihydroquercetin 6-C-hesoxide | 43.04 \pm 0.65 |
| 2 ^{Pt} | 6.1 | 294,sh346 | 465 | Dihydroquercetin 6-C-hesoxide | 2.74 \pm 0.17 |
| 3 ^{Pt} | 7.7 | 290,sh340 | 479 | Myricetin-6-C-glucoside | 12.87 \pm 0.01 |
| 4 ^{Pt} | 18.7 | 356 | 609 | Quercetin deoxyhexosyl-hexoside | 0.77 \pm 0.01 |
| 5 ^{Pt} | 18.9 | 356 | 609 | Quercetin-3-O-rutinoside | 2.10 \pm 0.13 |
| 6 ^{Pt} | 19.8 | 354 | 463 | Quercetin-3-O-glucoside (isoquercitrin) | 11.85 \pm 0.05 |
| 7 ^{Pt} | 20.2 | 354 | 463 | Quercetin O-hexoside | 5.81 \pm 0.07 |
| 8 ^{Pt} | 21.2 | 262,sh312 | 431 | Genistein 7-O-glucoside (genistin) | 3.53 \pm 0.11 |
| 9 ^{Pt} | 22.4 | 262,sh308 | 461 | 5,5'-Dihydroxy-3'-methoxy-isoflavone-7-O- β -glucoside | 2.25 \pm 0.05 |
| 10 ^{Pt} | 24.6 | 260,sh332 | 431 | Genistein-8-C-glucoside | 1.28 \pm 0.03 |
| 11 ^{Pt} | 26.0 | 256,sh322 | 505 | Methylbiochanin A/methylprunetin O-hexoside | 1.65 \pm 0.06 |
| 12 ^{Pt} | 27.8 | 262,sh332 | 269 | Genistein | 3.08 \pm 0.04 |
| 13 ^{Pt} | 28.7 | 262,sh336 | 341 | Methylbiochanin A/methylprunetin derivative | 0.97 \pm 0.05 |
| 14 ^{Pt} | 29.0 | 252,sh328 | 607 | Biochanin A O-hexoside-O-hexoside | 0.72 \pm 0.07 |
| 15 ^{Pt} | 31.4 | 260,sh340 | 445 | Biochanin A 7-O-glucoside (sissotrin) | 0.60 \pm 0.02 |
| 16 ^{Pt} | 33.1 | 260,sh338 | 649 | Biochanin A O-acetylhexoside-O-hexoside | 0.31 \pm 0.02 |
| 17 ^{Pt} | 34.5 | 264,sh338 | 491 | Biochanin A O-hexoside | 4.79 \pm 0.03 |
| 18 ^{Pt} | 37.7 | 260,sh332 | 283 | 4'-O- Methylgenistein (biochanin A) | 9.52 \pm 0.00 |
| 19 ^{Pt} | 38.6 | 262,sh334 | 283 | 7-O-Methylgenistein (prunetin) | nd |
| 20 ^{Pt} | 39.5 | 262,sh338 | 299 | 7-O-methylorobol | 1.45 \pm 0.03 |
| 21 ^{Pt} | 41.0 | 264,sh290 | 297 | Methylbiochanin A/ methylprunetin | 0.58 \pm 0.01 |
| Total flavonols | | | | | 33.40 \pm 0.28 |
| Total dihydroflavonols | | | | | 45.78 \pm 1.42 |
| Total isoflavone | | | | | 30.72 \pm 0.38 |
| Total flavonoids | | | | | 109.90 \pm 1.32 |

nd- not detected

Table 2. Retention time (Rt), wavelengths of maximum absorption in the visible region (λ_{\max}), mass spectral data, identification and quantification of phenolic compounds and betacyanins in infusion extracts of *G. globosa* (^{Gg}) (mean \pm SD).

| Peak | Rt (min) | λ_{\max} (nm) | Molecular ion [M-H] ⁻ (m/z) | Tentative Identification | Quantification (mg/g inf) |
|--------------------------|----------|--------------------------|---|---|------------------------------|
| 1 ^{Gg} | 11.0 | 326 | 355 | <i>cis</i> -Ferulic acid hexoside | 0.37 ± 0.03 |
| 2 ^{Gg} | 12.6 | 326 | 355 | <i>trans</i> -Ferulic acid hexoside | 0.52 ± 0.01 |
| 3 ^{Gg} | 15.5 | 309 | 163 | <i>cis-p</i> -Coumaric acid | 0.09 ± 0.01 |
| 4 ^{Gg} | 16.4 | 310 | 163 | <i>trans-p</i> -Coumaric acid | 0.41 ± 0.01 |
| 5 ^{Gg} | 18.1 | 324 | 193 | <i>cis</i> -Ferulic acid | 0.20 ± 0.02 |
| 6 ^{Gg} | 18.3 | 358 | 595 | Quercetin 3- <i>O</i> -(6-pentosyl)-hexoside | 0.08 ± 0.02 |
| 7 ^{Gg} | 18.6 | 324 | 193 | <i>trans</i> -Ferulic acid | 0.92 ± 0.01 |
| 8 ^{Gg} | 19.0 | 358 | 609 | Quercetin 3- <i>O</i> -rutinoside | 0.66 ± 0.01 |
| 9 ^{Gg} | 19.2 | 346 | 725 | Kaempferol 3- <i>O</i> -(2-pentosyl, 6- <i>O</i> -rhamnosyl)-hexoside | 0.56 ± 0.06 |
| 10 ^{Gg} | 19.9 | 358 | 463 | Quercetin 3- <i>O</i> -glucoside | 0.10 ± 0.01 |
| 11 ^{Gg} | 21.1 | 350 | 579 | Kaempferol 3- <i>O</i> -(2-pentosyl)-hexoside | 0.19 ± 0.02 |
| 12 ^{Gg} | 22.4 | 348 | 593 | Kaempferol 3- <i>O</i> -rutinoside | 0.89 ± 0.04 |
| 13 ^{Gg} | 23.5 | 352 | 623 | Isorhamnetin 3- <i>O</i> -rutinoside | tr |
| 14 ^{Gg} | 23.9 | 350 | 447 | Kaempferol 3- <i>O</i> -glucoside | 0.31 ± 0.05 |
| 15 ^{Gg} | 24.9 | 354 | 477 | Isorhamnetin 3- <i>O</i> -glucoside | tr |
| 16 ^{Gg} | 26.3 | 350 | 489 | Kaempferol <i>O</i> -acetylhexoside | 0.11 ± 0.03 |
| 17 ^{Gg} | 31.9 | 340 | 639 | Quercetin <i>O</i> -glucuronide- <i>O</i> -hexoside | 0.04 ± 0.01 |
| 18 ^{Gg} | 32.2 | 276,342 | 475 | Gomphrenol 3- <i>O</i> -hexoside | 0.20 ± 0.01 |
| 19 ^{Gg} | 33.7 | 278,342 | 517 | Gomphrenol 3- <i>O</i> -(6-acetyl)-hexoside | 0.39 ± 0.04 |
| 20 ^{Gg} | 34.6 | 352 | 593 | Kaempferol 3- <i>O</i> -(2-rhamnosyl)-hexoside | 0.10 ± 0.01 |
| 21 ^{Gg} | 35.0 | 348 | 623 | Kaempferol <i>O</i> -glucuronide- <i>O</i> -hexoside | 0.12 ± 0.03 |
| Total phenolic acids | | | | | 2.51 ± 0.01 |
| Total flavonoids | | | | | 3.77 ± 0.32 |
| Total phenolic compounds | | | | | 6.28 ± 0.31 |
| Peak | Rt (min) | λ_{\max} (nm) | Molecular ion [M+H] ⁺ (m/z) | Tentative identification | Quantification (mg/g inf) |
| 22 ^{Gg} | 27.3 | 550 | 697 | Gomphrenin II | tr |
| 23 ^{Gg} | 29.2 | 550 | 697 | Gomphrenin II | tr |
| 24 ^{Gg} | 30.0 | 550 | 727 | Gomphrenin III | 0.21±0.01 |

| | | | | | |
|-------------------|------|-----|-----|--------------------------|-----------|
| 25 ^{Gg} | 32.0 | 550 | 697 | Isogomphrenin II | 0.01±0.00 |
| 26 ^{Gg} | 33.4 | 548 | 727 | Isogomphrenin III | 0.35±0.01 |
| 27 ^{Gg} | 34.9 | 516 | 683 | 17-Descarboxy-amaranthin | tr |
| <hr/> | | | | | |
| Total betacyanins | | | | | 0.57±0.02 |

tr- traces

Table 3. Retention time (Rt), wavelengths of maximum absorption in the visible region (λ_{\max}), mass spectral data, identification and quantification of phenolic compounds in infusion extracts of *C. citratus* (^{Cc}) (mean \pm SD).

| Peak | Rt (min) | λ_{\max} (nm) | Molecular ion [M-H] ⁻ (m/z) | Tentative Identification | Quantification (mg/g inf) |
|--------------------------|----------|-----------------------|--|--|---------------------------|
| 1 ^{Cc} | 7.9 | 326 | 353 | 5- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid | 1.21 \pm 0.05 |
| 2 ^{Cc} | 10.3 | 326 | 179 | Caffeic acid | 0.27 \pm 0.01 |
| 2a ^{Cc} | 10.8 | 324 | 179 | Caffeic acid | 0.77 \pm 0.01 |
| 3 ^{Cc} | 12.3 | 350 | 579 | Luteolin 6- <i>C</i> -hexosyl-8- <i>C</i> -pentoside | 0.70 \pm 0.03 |
| 4 ^{Cc} | 14.6 | 336 | 563 | Apigenin 6- <i>C</i> -pentosyl-8- <i>C</i> -hexoside | 1.76 \pm 0.03 |
| 5 ^{Cc} | 15.0 | 350 | 563 | Apigenin 6- <i>C</i> -pentosyl-8- <i>C</i> -hexoside | 0.53 \pm 0.01 |
| 6 ^{Cc} | 15.6 | 352 | 593 | Luteolin 2''- <i>O</i> -deoxyhexosyl-6- <i>C</i> -glucoside | 13.12 \pm 0.03 |
| 7 ^{Cc} | 16.0 | 352 | 447 | Luteolin 6- <i>C</i> -glucoside | 0.35 \pm 0.01 |
| 8 ^{Cc} | 16.1 | 350 | 549 | Luteolin 6- <i>C</i> -pentosyl-8- <i>C</i> -pentoside | 1.75 \pm 0.01 |
| 9 ^{Cc} | 17.0 | 310 | 163 | <i>trans-p</i> -Coumaric acid | nd |
| 10 ^{Cc} | 17.6 | 356 | 549 | Luteolin 6- <i>C</i> -pentosyl-8- <i>C</i> -pentoside | 0.17 \pm 0.03 |
| 11 ^{Cc} | 18.6 | 328 | 577 | Apigenin 2''- <i>O</i> -deoxyhexosyl- <i>C</i> -hexoside | 0.99 \pm 0.01 |
| 12 ^{Cc} | 20.3 | 348 | 593 | Luteolin 7- <i>O</i> -neohesperoside | 5.31 \pm 0.26 |
| 13 ^{Cc} | 20.5 | 350 | 447 | Luteolin 7- <i>O</i> -glucoside | 2.07 \pm 0.15 |
| 14 ^{Cc} | 21.6 | 352 | 563 | Luteolin 2''- <i>O</i> -deoxyhexosyl- <i>C</i> -pentoside | 6.21 \pm 0.36 |
| 15 ^{Cc} | 22.0 | 350 | 417 | Luteolin 6- <i>C</i> -pentoside | 0.24 \pm 0.02 |
| 16 ^{Cc} | 24.9 | 350 | 575 | Luteolin 2''- <i>O</i> -deoxyosyl-6- <i>C</i> -(6-deoxy- <i>pento</i> -hexos-ulosyl) | 4.19 \pm 0.47 |
| 17 ^{Cc} | 27.4 | 352 | 577 | Methyl-luteolin 2''- <i>O</i> - deoxyhexosyl-6- <i>C</i> -hexoside. | 0.28 \pm 0.02 |
| 18 ^{Cc} | 34.4 | 350 | 285 | Luteolin | nd |
| Total phenolic acids | | | | | 2.24 \pm 0.07 |
| Total flavonoids | | | | | 37.66 \pm 1.07 |
| Total phenolic compounds | | | | | 39.90 \pm 1.14 |

nd- not detected

Table 4. Theoretical *versus* experimental EC₅₀ values of antioxidant activity of the infusion extracts prepared from *P. tridentatum* and *C. citratus* or *G. globosa* and *C. citratus* combined in different proportions (mean ± SD).

| EC ₅₀ values (µg/mL) | Individual samples | | <i>P. tridentatum</i> (25%) + <i>C. citratus</i> (75%) | | | <i>P. tridentatum</i> (40%) + <i>C. citratus</i> (60%) | | |
|---------------------------------|-----------------------|--------------------|--|--------------------|----------|--|--------------------|----------|
| | <i>P. tridentatum</i> | <i>C. citratus</i> | Theoretical Value | Experimental Value | Effect | Theoretical value | Experimental value | Effect |
| DPPH scavenging activity | 50±1 | 1231±8 | 936±3 | 663±19 | S (29%) | 759±2 | 67±2 | S (91%) |
| Reducing power | 105±2 | 762±10 | 598±4 | 474±10 | S (21%) | 499±3 | 181±3 | S (64%) |
| β-carotene bleaching inhibition | 266±25 | 1510±79 | 1199±33 | 235±9 | S (80%) | 1013±29 | 209±18 | S (79%) |
| TBARS inhibition | 93±4 | 428±14 | 345±6 | 261±19 | S (24%) | 294±5 | 147±4 | S (50%) |
| EC ₅₀ values (µg/mL) | Individual samples | | <i>G. globosa</i> (25%) + <i>C. citratus</i> (75%) | | | <i>G. globosa</i> (40%) + <i>C. citratus</i> (60%) | | |
| | <i>G. globosa</i> | <i>C. citratus</i> | Theoretical value | Experimental Value | Effect | Theoretical value | Experimental value | Effect |
| DPPH scavenging activity | 4305±74 | 1231±8 | 1999±24 | 1927±67 | A (4%) | 2460±34 | 1651±23 | S (33%) |
| Reducing power | 916±7 | 762±10 | 968±12 | 1029±20 | AN (28%) | 957±11 | 942±13 | AN (14%) |
| β-carotene bleaching inhibition | 4079±31 | 1510±79 | 2152±34 | 797±30 | S (63%) | 2538±30 | 505±45 | S (80%) |
| TBARS inhibition | 2496±5 | 428±14 | 989±7 | 1126±16 | AN (19%) | 1291±6 | 1005±64 | S (20%) |

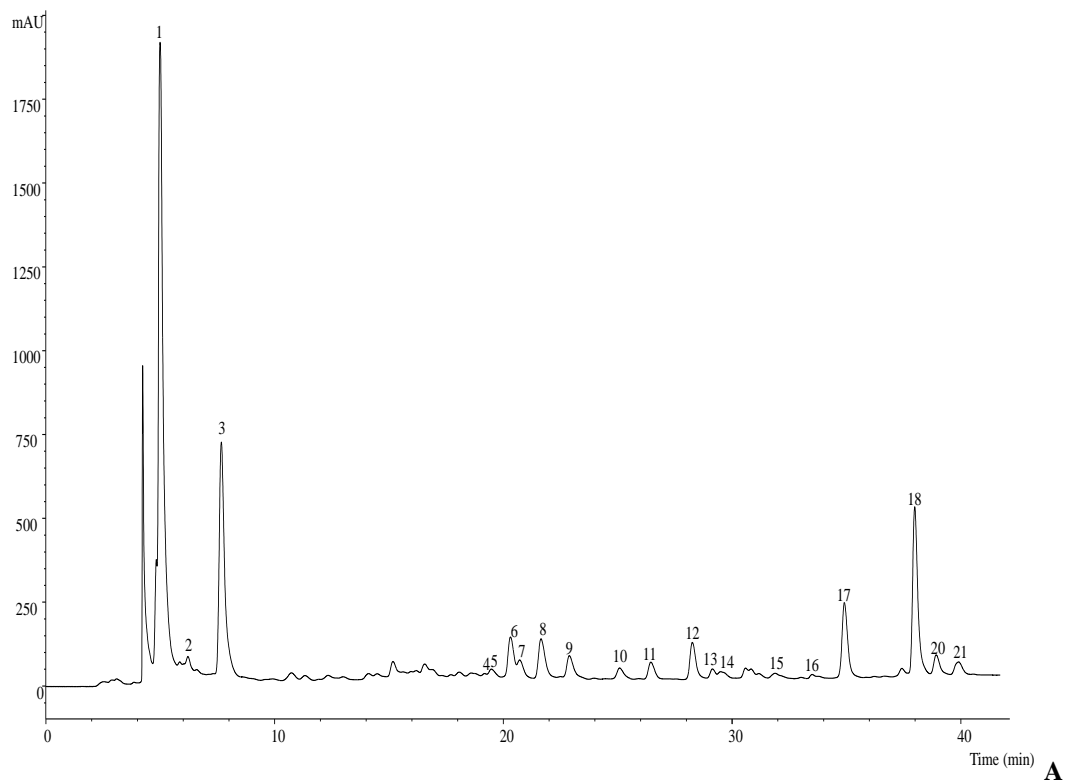
Theoretical values were obtained considering summative contributions of the individual species. A- Additive effect: theoretical and experimental EC₅₀ values reveal differences below 10%. S- Synergistic effect: experimental EC₅₀ values are more than 10% lower than theoretical values. AN - antagonist effect: experimental EC₅₀ values are more than 10% higher than theoretical values.

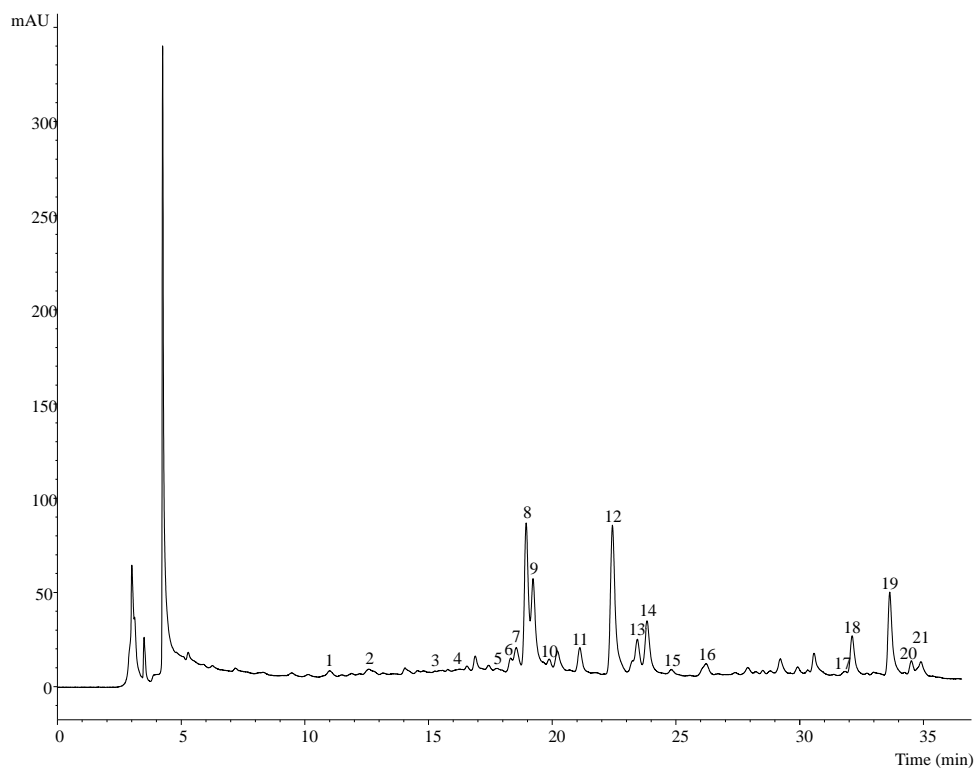
Table 5. Retention time (Rt), wavelengths of maximum absorption in the visible region (λ_{\max}), mass spectral data, identification and quantification of phenolic compounds in combined infusion extracts of *P. tridentatum* (^{Pt}) and *C. citratus* (^{Cc}) or *C. citratus* and *G. globosa* (^{Gg}) (mean \pm SD).

| Peak | Rt (min) | λ_{\max} (nm) | Molecular ion [M-H] ⁻ (m/z) | Tentative Identification | Quantification (mg/g inf) |
|--|----------|-----------------------|--|--|---------------------------|
| <i>P. tridentatum</i> (40%) + <i>C. citratus</i> (60%) | | | | | |
| 1 ^{Pt} | 4.8 | 290,sh340 | 465 | Dihydroquercetin 6-C-hesoxide | 28.73 \pm 0.16 |
| 2 ^{Pt} | 6.0 | 292,sh346 | 465 | Dihydroquercetin 6-C-hesoxide | 2.48 \pm 0.01 |
| 3 ^{Pt} | 7.4 | 290,sh340 | 479 | Myricetin-6-C-glucoside | 16.38 \pm 0.04 |
| 2 ^{Cc} | 10.8 | 326 | 179 | Caffeic acid | 1.14 \pm 0.02 |
| 3 ^{Cc} | 13.2 | 354 | 579 | Luteolin 6-C-hexosyl-8-C-pentoside | 0.53 \pm 0.04 |
| 6 ^{Cc} | 15.3 | 352 | 593 | Luteolin 2''-O-deoxyhexosyl-6-C-glucoside | 1.90 \pm 0.10 |
| 9 ^{Cc} | 16.6 | 310 | 163 | <i>trans-p</i> -Coumaric acid | 3.28 \pm 0.04 |
| 4 ^{Pt} | 18.6 | 356 | 609 | Quercetin deoxyhexosyl-hexoside | 0.74 \pm 0.03 |
| 5 ^{Pt} | 18.8 | 356 | 609 | Quercetin-3-O-rutinoside | 2.60 \pm 0.03 |
| 6 ^{Pt} | 19.8 | 354 | 463 | Quercetin-3-O-glucoside (isoquercitrin) | 8.16 \pm 0.02 |
| 7 ^{Pt} | 20.2 | 352 | 463 | Quercetin O-hexoside | 4.41 \pm 0.12 |
| 8 ^{Pt} | 21.1 | 260,sh312 | 431 | Genistein 7-O-glucoside (genistin) | 3.28 \pm 0.24 |
| 14 ^{Cc} | 21.6 | 352 | 563 | Luteolin 2''-O-deoxyhexosyl-C-pentoside | 0.96 \pm 0.02 |
| 9 ^{Pt} | 22.3 | 262,sh308 | 461 | 5,5'-Dihydroxy-3'-methoxy-isoflavone-7-O- β -glucoside | 2.98 \pm 0.06 |
| 10 ^{Pt} | 24.6 | 260,sh332 | 431 | Genistein-8-C-glucoside | 1.61 \pm 0.13 |
| 16 ^{Cc} | 24.8 | 350 | 575 | Luteolin 2''-O-deoxyosyl-6-C-(6-deoxy-pento-hexos-ulosyl) | 0.97 \pm 0.01 |
| 11 ^{Pt} | 26.0 | 256,sh322 | 505 | Methylbiochanin A/methylprunetin O-hexoside | 2.62 \pm 0.02 |
| 17 ^{Cc} | 27.2 | 356 | 577 | Methyl-luteolin 2''-O- deoxyhexosyl-6-C-hexoside. | 0.30 \pm 0.02 |
| 12 ^{Pt} | 27.8 | 260,sh332 | 269 | Genistein | 2.82 \pm 0.04 |
| 13 ^{Pt} | 28.6 | 262,sh336 | 341 | Methylbiochanin A/methylprunetin derivative | 1.55 \pm 0.10 |
| 14 ^{Pt} | 29.0 | 252,sh328 | 607 | Biochanin A O-hexoside-O-hexoside | 1.08 \pm 0.11 |
| 15 ^{Pt} | 31.7 | 258,sh340 | 445 | Biochanin A 7-O-glucoside (sissotrin) | 0.99 \pm 0.11 |
| 16 ^{Pt} | 33.2 | 260,sh338 | 649 | Biochanin A O-acetylhexoside-O-hexoside | 0.49 \pm 0.02 |
| 17 ^{Pt} | 34.8 | 260,sh338 | 491 | Biochanin A O-hexoside | 3.05 \pm 0.10 |
| 18 ^{Pt} | 37.8 | 260,sh332 | 283 | 4'-O- Methylgenistein (biochanin A) | 8.81 \pm 0.36 |
| 20 ^{Pt} | 38.8 | 262,sh338 | 299 | 7-O-methylorobol | 1.29 \pm 0.02 |
| 21 ^{Pt} | 39.7 | 264,sh290 | 297 | Methylbiochanin A/ methylprunetin | 1.05 \pm 0.09 |
| Total phenolic acids | | | | | 4.41 \pm 0.02 |
| Total flavonoids | | | | | 99.77 \pm 0.92 |
| Total phenolic compounds | | | | | 104.18 \pm 0.94 |
| <i>G. globosa</i> (40%) + <i>C. citratus</i> (60%) | | | | | |
| Peak | Rt (min) | λ_{\max} (nm) | Molecular ion [M-H] ⁻ (m/z) | Tentative identification | Quantification (mg/g inf) |
| 1 ^{Cc} | 7.9 | 324 | 353 | 5-O-Caffeoylquinic acid | 1.32 \pm 0.15 |
| 2 ^{Cc} | 10.3 | 326 | 179 | <i>cis</i> Caffeic acid | 0.94 \pm 0.05 |

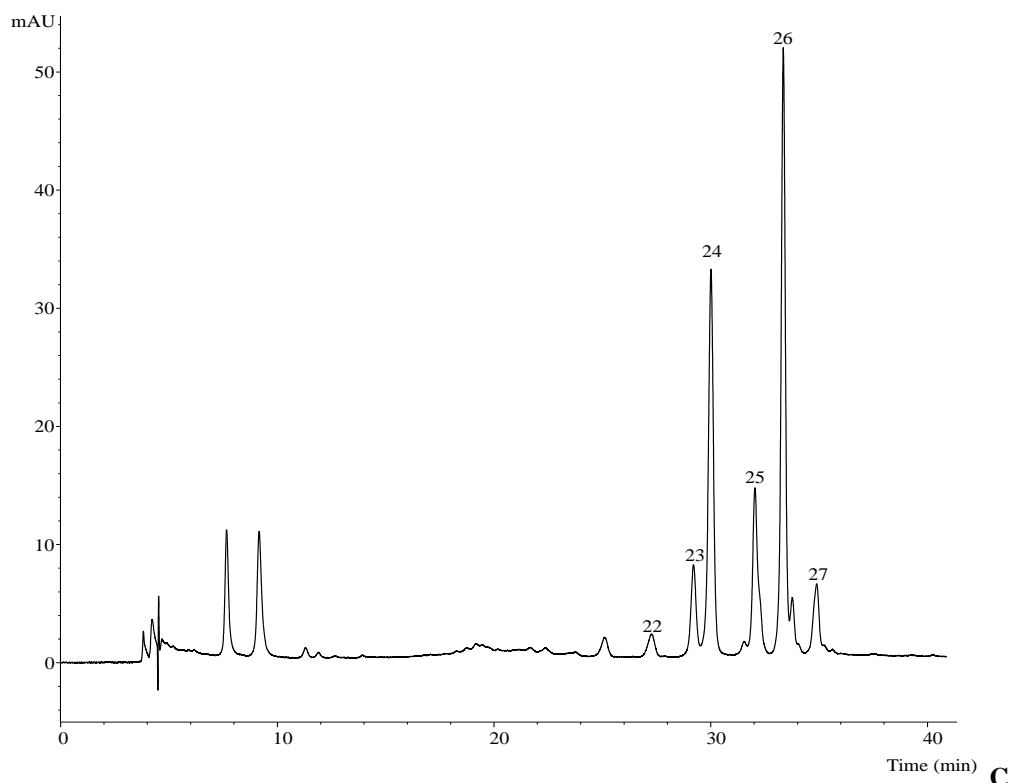
| 2a ^{Cc} | 10.8 | 324 | 179 | <i>trans</i> Caffeic acid | 2.15±0.01 |
|---------------------------------|----------|-----------------------|---|--|---------------------------|
| 2 ^{Gg} | 12.8 | 324 | 355 | <i>trans</i> -Ferulic acid hexoside | 0.60±0.06 |
| 4 ^{Cc} | 14.6 | 332 | 563 | Apigenin 6- <i>C</i> -pentosyl-8- <i>C</i> -hexoside | 0.63±0.04 |
| 5 ^{Cc} | 15.0 | 350 | 563 | Apigenin 6- <i>C</i> -pentosyl-8- <i>C</i> -hexoside | 0.55±0.01 |
| 6 ^{Cc} | 15.6 | 350 | 593 | Luteolin 2''- <i>O</i> -deoxyhexosyl-6- <i>C</i> -glucoside | 3.88±0.02 |
| 7 ^{Cc} | 16.0 | 350 | 447 | Luteolin 6- <i>C</i> -glucoside | 1.12±0.03 |
| 8 ^{Cc} | 16.1 | 350 | 549 | Luteolin 6- <i>C</i> -pentosyl-8- <i>C</i> -pentoside | 2.70±0.19 |
| 4 ^{Gg/9} ^{Cc} | 16.7 | 310 | 163 | <i>trans-p</i> -Coumaric acid | 4.39±0.15 |
| 11 ^{Cc} | 18.6 | 350 | 577 | Apigenin 2''- <i>O</i> -deoxyhexosyl- <i>C</i> -hexoside | 0.37±0.05 |
| 7 ^{Gg} | 19.0 | 326 | 193 | <i>trans</i> -Ferulic acid | 1.73±0.08 |
| 8 ^{Gg} | 19.1 | 358 | 609 | Quercetin 3- <i>O</i> -rutinoside | 0.23±0.03 |
| 10 ^{Gg} | 20.0 | 354 | 463 | Quercetin 3- <i>O</i> -glucoside | 0.24±0.01 |
| 12 ^{Cc} | 20.5 | 348 | 593 | Luteolin 7- <i>O</i> -neohesperoside | 1.79±0.12 |
| 13 ^{Cc} | 20.8 | 350 | 447 | Luteolin 7- <i>O</i> -glucoside | 0.35±0.03 |
| 14 ^{Cc} | 21.7 | 348 | 563 | Luteolin 2''- <i>O</i> -deoxyhexosyl- <i>C</i> -pentoside | 1.77±0.06 |
| 14 ^{Gg} | 22.5 | 348 | 447 | Kaempferol 3- <i>O</i> -glucoside | 0.48±0.01 |
| 16 ^{Cc} | 24.9 | 352 | 575 | Luteolin 2''- <i>O</i> -deoxyosyl-6- <i>C</i> -(6-deoxy- <i>pento</i> -hexos-ulosyl) | 1.07±0.02 |
| 17 ^{Cc} | 27.4 | 350 | 577 | Methyl-luteolin 2''- <i>O</i> - deoxyhexosyl-6- <i>C</i> -hexoside | 0.37±0.01 |
| | | | | Total phenolic acids | 11.13±0.27 |
| | | | | Total flavonoids | 15.56±0.74 |
| | | | | Total phenolic compounds | 26.69±1.00 |
| Peak | Rt (min) | λ_{\max} (nm) | Molecular ion [M+H] ⁺ (<i>m/z</i>) | Tentative identification | Quantification (mg/g inf) |
| 22 ^{Gg} | 27.1 | 550 | 697 | Gomphrenin II | tr |
| 23 ^{Gg} | 28.9 | 550 | 697 | Gomphrenin II | tr |
| 24 ^{Gg} | 29.8 | 550 | 727 | Gomphrenin III | 0.08±0.01 |
| 25 ^{Gg} | 31.9 | 550 | 697 | Isogomphrenin II | tr |
| 26 ^{Gg} | 33.2 | 548 | 727 | Isogomphrenin III | 0.09±0.01 |
| 27 ^{Gg} | 34.7 | 516 | 683 | 17-Descarboxy-amaranthin | tr |
| | | | | Total betacyanins | 0.17±0.02 |

tr- traces





B



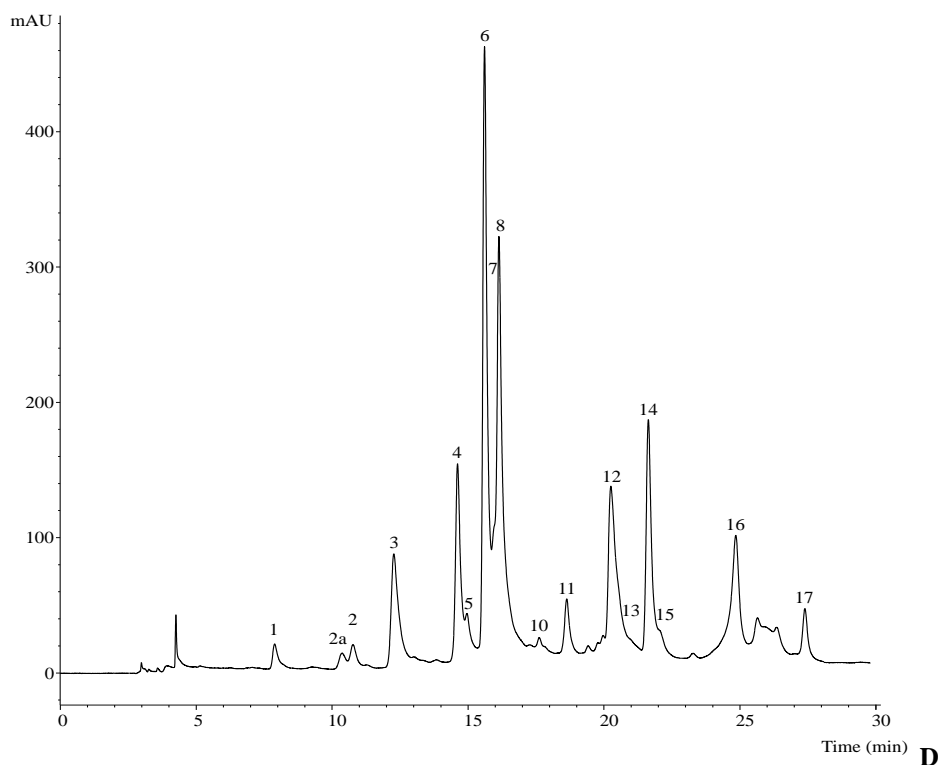


Figure 1. HPLC phenolic profiles of the infusions of (A)- *P. tridentatum* (recorded at 280 nm); (B)- *G. globosa* (recorded at 370 nm); (C)- *G. globosa* betacyanin profile (recorded at 520 nm) and (D)- *C. citratus* (recorded at 370 nm).

