

**Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmácia**

**“GLICOLIPÍDIOS EM PLANTAS MEDICINAIS:
PROSPECÇÃO E ISOLAMENTO DE GLICOLIPÍDIOS EM
Cymbopogon citratus (DC.) STAPF – CAPIM-LIMÃO”**

Beatriz Garcia Mendes

**Florianópolis
2004**

...imensa é a graça poderosa que reside nas ervas e em suas raras qualidades, porque na terra nada tão vil que não preste à terra algum benefício especial... dentro do terno cálice da débil flor residem o veneno e o poder medicinal...

William Shakespeare

*Aos meus pais, Carlos e
Graça,
e ao meu vô Lulu*

AGRADECIMENTOS

Seria impossível agradecer aqui a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço, sobretudo a Deus, pelo dom da vida;

À minha orientadora, Professora Miriam, pelo aprendizado, paciência e, principalmente, pela dedicação demonstrada em todos esses anos;

Ao professor Marcos, por acreditar no meu potencial e pela oportunidade de dar continuidade ao trabalho com glicolipídios. Obrigada também por me ensinar um pouco mais sobre os aquarianos;

Aos meus pais, por todos ensinamentos da vida. Espero um dia ensinar tudo o que aprendi aos meus filhos;

Ao Julian, amigo e companheiro de todas as horas, obrigada por estar ao meu lado e fazer-me tão feliz;

Ao meu irmão Alberto, por todo carinho. Obrigada a Lígia. Por gostar tanto dele;

Aos meus avós Ivone, Lulu e Eloísa, pelo amor e dedicação demonstrados à família;

Aos meus queridos tios, Valéria e Nelinho, por me acolherem tão bem em sua casa durante todos esses anos que moro em Florianópolis. Aos meus primos por não se importarem de, freqüentemente, ter uma “irmã mais nova”;

Às minhas grandes amigas Silvânia e Cíntia, por estarem sempre dispostas a ajudar. Ao Luiz Felipe, por tão bem compreender a “badalada” vida de mestrandas;

Aos colegas e amigos Téo, Rodrigo, Aline, Lorena, Marcelo, Gecioni, Pablo, Grazi, Silvana e Danuza por tornarem o mestrado muito mais divertido;

Aos amigos da faculdade Hélen, Elô, Fabi, Carol, Jana, Elyse e Miranda, que apesar de longe, estão sempre querendo estar próximos;

À Lílian, minha grande amiga, por muitas e muitas vezes ouvir com muita atenção e paciência longas histórias sobre glicolipídios, cromatografias... Obrigada à Karina, pelas filosofias essenciais à vida;

À querida Solange, nossa mãezona, obrigada por não medir esforços para ajudar suas “filhas” de laboratório;

Às minhas queridas professoras Berenice e Moema, pelas alegres conversas e pela ajuda nos momentos complicados;

À minha eterna “Tia Terezinha”, por guiar meus primeiros passos na escola. Não esquecerei do “10 de estrelinhas” e do “Continue sempre assim”;

Obrigada a Schirlei e ao Amarildo, por me ajudarem na coleta das plantas.

A todos que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho,

MUITO OBRIGADA!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

Bia

SUMÁRIO

RESUMO	viii
.....ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURA.....	x
LISTA DE TABELA	xii
LISTA DE ABREVIATURA	xiii
1- INTRODUÇÃO	01
2- OBJETIVOS	05
3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	07
3.1- Generalidades sobre glicolipídios	08
3.1.1- Glicosfingolipídios	08
3.1.2- Glicoglicerolipídios	14
3.2- <i>Cymbopogon citratus</i>	18
3.2.1- Aspectos químicos e farmacológicos	20
4- MATERIAIS	27
4.1- Triagem de glicolipídios	28
4.2- Material vegetal	29
4.3- Materiais para extração e cromatografia	30
4.4- Equipamentos	30
5- METODOLOGIA	32
5.1-Triagem de glicolipídios para todas amostras vegetais	33
5.2- Ensaio preliminares para o capim-limão.....	33
5.3.- Análise cromatográfica preliminar	35
5.4- Procedimentos de isolamento	35
5.4.1- Material vegetal	35
5.4.2- Preparação do extrato	35
5.5- Coluna I – Extrato bruto	36
5.5.1- Fracionamento visando à obtenção de G ₁	37
5.5.2- Fracionamento visando à obtenção de G ₂	39
5.5.3- Obtenção de outros compostos	39
5.5.4- Isolamento da substância Cy1	40
5.5.5- Obtenção de Cy2	40

5.5.6- Obtenção de Cy3	41
5.5.7- Obtenção de Cy4	41
5.6- Monitoramento mensal	42
5.6.1- Material vegetal	42
5.6.2- Preparação dos extratos	42
5.6.3- Análise cromatográfica dos extratos do MM	42
5.7- Extração do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i>	43
6- RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
6.1- Triagem de glicolipídios	45
6.2- Ensaio preliminares	50
6.3- Procedimentos de isolamento	53
6.3.1- Fracionamento visando a obtenção de G ₁	56
6.3.2- Fracionamento visando a obtenção de G ₂	60
6.3.3- Obtenção de outros compostos	63
6.3.4- Isolamento das substâncias Cy1, Cy2, Cy3 e Cy4	72
6.4- Monitoramento mensal	76
7- CONCLUSÕES	81
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

RESUMO

Glicolipídios (GLP) são ubiquamente distribuídos nos seres vivos, sendo comumente encontrados na parte externa das membranas celulares, como a membrana citoplasmática, mitocondrial, do retículo endoplasmático e dos cloroplastos. Consistem em moléculas com uma ou mais unidades monossacarídicas, unidas através de ligações do tipo glicosídica a uma porção lipídica. Em vegetais superiores, são componentes da membrana dos cloroplastos e organelas relacionadas, sendo que o monogalactosildiacilglicerol (MGDG) e digalactosildiacilglicerol (DGDG) são os glicolipídios mais abundantes em tecidos fotossintéticos. Nos últimos anos, estes compostos têm sido alvo de vários estudos por apresentarem atividade inibitória da DNA-polimerase (atividade antitumoral), das P-selectinas (antiinflamatório), além da atividade antiviral (anti-HIV entre outros). Apesar do intenso estudo destes compostos, pouco se conhece sobre sua ocorrência em plantas medicinais. O objetivo deste trabalho foi realizar uma triagem de GLP em plantas medicinais e investigar os GLP presentes em *Cymbopogon citratus*. Foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD) os extratos obtidos por maceração em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 2:1 de amostras de plantas *in natura* (8) e amostras comerciais (12). Para CCD, utilizou-se placas de gel de sílica 60 F254, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 65:25:4 (v/v) como eluente, solução de orcinol-sulfúrico como revelador e monohexosilceramida (CMH) e DGDG como padrões. Para investigação fitoquímica de *C. citratus*, foram testados procedimentos de extração com e sem inativação enzimática. O extrato de *C. citratus* foi fracionado por sucessivas cromatografias em coluna monitorando-se as frações por CCD. O monitoramento mensal (MM) das amostras com e sem inativação enzimática foi realizado por CCD. Foram detectados GLP em todas as amostras, porém com diferenças quali- e quantitativas. Com plantas *in natura*, a maior concentração foi encontrada em *Lippia alba* e *Cymbopogon citratus*. Em amostras comerciais, o melhor perfil glicolipídico foi encontrado nos extratos de *C. citratus* e *Baccharis genistelloides*. *C. citratus* foi a espécie que apresentou maior rendimento do extrato bruto (EB), além de ter o maior conteúdo glicolipídico individual. A metodologia de extração com melhor rendimento do EB utilizou a planta seca em temperatura ambiente por 24 horas seguida de maceração em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 2:1 (v/v) por 24 horas. O EB foi filtrado, concentrado (rendimento de 2,45%) e analisado por CCD. Com o fracionamento, foram purificados dois glicolipídios (G_1' e G_2), além de outros componentes do extrato. O G_1' apresenta R_f em 0,80 e G_2 em 0,58, sendo observado que G_2 apresenta um valor de R_f muito próximo daquele observado para o padrão de CMH. O MM demonstrou que o rendimento dos extratos obtidos de plantas sem inativação foi superior aquele observado para plantas que passaram pela inativação enzimática. Porém através da avaliação do conteúdo glicolipídico, observou-se que em ambas plantas houve uma diminuição considerável ao longo do período, sugerindo que a inativação enzimática não evitou a degradação destes componentes. De acordo com os resultados, plantas medicinais, em especial *Cymbopogon citratus*, podem ser fortes candidatos ao isolamento de glicolipídios.

ABSTRACT

Glycolipids (GLP) are ubiquitously distributed in living beings, being commonly found in the external part of the cell membranes. They consist of compounds containing one or more monosaccharide residues bound by a glycosidic linkage to a hydrophobic moiety. In higher plants, they are components of all chloroplastic membranes and related organelles, with monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) and digalactosyldiacylglycerol (DGDG) being the most abundant glycolipids in photosynthetic tissues. In recent years, these composites have been the target of various studies, owing to their extensive biological activities such as inhibition of DNA polymerase, anticancer effects, inhibition of P-selectin receptor (antiflammatory), antiviral activities (HIV and herpes) and so on. Despite the extensive studies with glycolipids, little is known about their occurrence in medicinal plants. The aim of this work was to carry out a GLP screening in medicinal plants, and investigate the GLP present in *Cymbopogon citratus*. The extracts obtained by maceration in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 2:1 of *in natura* plants (8) and commercial medicinal plants - teas (12) were examined by thin-layer chromatography (TLC) on silica gel plates (solvent: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 65:25:4 v/v/v; spray: orcinol/ H_2SO_4) and compared with monohexosylceramide (CMH) and DGDG standards. For the phytochemical investigation of *C. citratus*, extraction procedures were tested, with and without enzymatic inactivation. The *C. citratus* extract was separated by successive column chromatography and the fractions monitored by TLC. The monthly monitoring (MM) of the samples with and without enzymatic inactivation was carried out by TLC. GLP were detected in all the samples, but with qualitative and quantitative differences. For the plants *in natura*, the largest concentrations were found in *Lippia alba* and *Cymbopogon citratus*. For the commercial medicinal plants, the best glycolipidic profile was found in *C. citratus* and *Baccharis genistelloides*. Extracts *C. citratus* was the species that showed the highest yield of crude extract (CE), as well as the highest individual glycolipidic content. The extraction method with the highest CE yield used the dried plant at room temperature, for 24 hours following maceration in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 2:1 (v/v) for 24 hours. The CE were filtered, concentrated (giving a 2.45% yield) and analyzed by TLC. Fractionation yielded two glycolipids (G_1' and G_2), as well as other components of the extract. The G_1' presents R_f of 0.80 and G_2 of 0.58. It was observed that G_2 has a R_f value which is very close to that observed for the standard of CMH. The MM demonstrated that the yield of the extracts obtained from plants without inactivation was higher than that observed for plants which underwent enzymatic inactivation. However, through evaluation of the glycolipidic content, it was observed that in both plants there was a considerable decrease throughout the period, suggesting that the enzymatic inactivation did not prevent the degradation of these components. According to the results, medicinal plants, in particular *Cymbopogon citratus*, may be strong candidates for glycolipidic isolation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura geral da esfingosina	09
Figura 2: Estrutura geral da ceramida	09
Figura 3: Estrutura de algumas esfingosinas	10
Figura 4: Esquema da membrana celular	11
Figura 5: Representação da estrutura de um glicoesfingolípido do tipo CMH	12
Figura 6: Estruturas básicas dos principais tipos de glicoglicerolípídios encontrados em vegetais superiores	15
Figura 7: Aspecto geral de um exemplar de <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	18
Figura 8: Exemplos de compostos terpênicos já isolados do óleo de <i>Cymbopogon citratus</i>	25
Figura 9: Cromatografia em camada delgada dos extratos brutos das espécies de plantas medicinais.....	45
Figura 10: Fluxograma de obtenção dos extratos brutos (EB) de <i>Cymbopogon citratus</i>	52
Figura 11: Fluxograma dos procedimentos iniciais da preparação do extrato e do fracionamento	54
Figura 12: CCD que demonstra o desdobramento de manchas de uma fração da Coluna V ao passar por uma nova coluna cromatográfica	56
Figura 13: Fluxograma de isolamento do glicolípido G ₁ '	58
Figura 14: CCD do G ₁ ' isolado a partir da Coluna XII	59
Figura 15: Fluxograma de isolamento do glicolípido G ₂	61
Figura 16: CCD do glicolípido G ₂	62
Figura 17: CCD da fração C _I F ₁₀ (10) e C _I F _{10R} (10R)	64
Figura 18: CCD das frações obtidas na Coluna X	65
Figura 19: CCD dos componentes purificados C _I F _{10R} , C _{II} F ₄₂ , C _X F ₅ e C _X F ₁₃	65
Figura 20: Fluxograma de isolamento dos componentes purificados	66
Figura 21: CCD utilizando diferentes eluentes para análise dos componentes purificados.....	67
Figura 22: Espectro de massas para a substância C _X F ₅	70
Figura 23: Espectro de massas comparativo para o composto C _X F ₅	71
Figura 24: Fluxograma de isolamento da substância Cy1.....	72
Figura 25: Esquema de isolamento da substância Cy2	73

Figura 26: Fluxograma de isolamento do composto Cy3	73
Figura 27: Esquema de isolamento de Cy4	74
Figura 28: Fluxograma dos procedimentos utilizados no fracionamento do extrato de <i>Cymbopogon citratus</i>	75
Figura 29: CCD da análise MM dos meses 02 e 03	78
Figura 30: CCD do monitoramento mensal da planta com inativação utilizando como eluente CHCl ₃ /MeOH 9:1	80
Figura 31: CCD do monitoramento mensal da planta sem inativação utilizando como eluente CHCl ₃ /MeOH 9:1	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos de glicolipídios e suas principais localizações em células animais	12
Tabela 2: Atividades biológicas relatadas para glicoglicerolipídios	17
Tabela 3: Plantas utilizadas na triagem de glicolipídios e seus locais de coleta.....	28
Tabela 4: Triagem de glicolipídios em amostras comerciais de chás.....	29
Tabela 5: Eluentes utilizados em seqüência na eluição das frações da Coluna I.....	36
Tabela 6: Esquema de eluição utilizado na Coluna II	37
Tabela 7: Rendimento dos extratos brutos das espécies medicinais testadas e glicolipídios detectadas nos mesmos.....	46
Tabela 8: Rendimento dos extratos brutos obtidos a partir de amostras comerciais e glicolipídios detectados nos mesmos	49
Tabela 9: Comparação entre o rendimento e conteúdo lipídico de amostras <i>in natura</i> (IN) e comerciais (C) da mesma espécie	50
Tabela 10: Rendimento dos extratos brutos (EB) de <i>Cymbopogon citratus</i> obtidos por diferentes metodologias	53
Tabela 11: Frações agrupadas da Coluna I contendo compostos glicolipídicos e seus respectivos Rfs	55
Tabela 12: Comparação dos valores de Rf das amostras de G ₂ (fração C ₁ F ₃₇₋₆₀) e G ₂ (precipitado da fração C ₁ F ₆₁₋₇₁) com os valores de Rf dos padrões	63
Tabela 13: Valores de Rf para as substâncias purificadas utilizando dois sistemas de eluentes.....	68
Tabela 14: Rendimentos dos extratos do monitoramento mensal	77

LISTA DE ABREVIATURAS

MGDG: Monogalactosildiácilglicerol

DGDG: Digalactosildiácilglicerol

TGDG: Trigalactosildiácilglicerol

TeGDG: Tetragalactosildiácilglicerol

SQDG: Sulfoquinovosildiácilglicerol

CMH: Monohexosilceramida

EB: Extrato bruto

IE: Inativação enzimática

TA: Temperatura ambiente

F1: Planta macerada por 1 dia

F2: Planta macerada por 2 dias

F5: Planta macerada por 5 dias

MM: Monitoramento Mensal

G₁: Glicolípido 1

G₂: Glicolípido 2

1- INTRODUÇÃO

As membranas celulares são complexos sistemas compostos por várias macromoléculas orgânicas, as quais regulam o metabolismo celular e a comunicação entre o meio intra- e extracelular (BRANDENBURG & SEYDEL, 1998).

Glicolipídios são macromoléculas amplamente distribuídas nos seres vivos, sendo encontrados em representantes de cada um dos cinco reinos conhecidos. Comumente são encontrados na parte externa das membranas celulares, tais como a membrana citoplasmática, mitocondrial, do retículo endotelial e dos cloroplastos (KATES, 1970).

O termo glicolipídio designa compostos que contêm uma ou mais unidades monossacarídicas, unidas através de ligações do tipo glicosídica a uma molécula hidrofóbica, como o acilglicerol, esfingosina, ceramida ou prenilfosfato (IUPAC-IUB, 1999).

A estrutura molecular desses compostos apresenta considerável diversidade e, geralmente, são peculiares às espécies biológicas nas quais são observados (CARTER et al., 1965). Assim, glicoesfingolipídios são comumente encontrados no tecido animal, e glicoglicerolipídios, comuns em plantas e bactérias.

Glicoglicerolipídios são os maiores componentes da membrana tilacóide dos cloroplastos, sendo também encontrados em algas e algumas bactérias. Embora vários glicolipídios desta classe tenham sido isolados e caracterizados, a função biológica destes compostos na membrana celular não está totalmente elucidada. Sabe-se basicamente que eles têm papel fundamental em vários processos baseados nos fenômenos de reconhecimento, adesão e comunicação célula-célula e célula-ambiente (CARTER et al., 1965).

Nos últimos anos, vários trabalhos sobre a atividade biológica de glicolipídios, principalmente da classe dos glicoglicerolipídios, vêm sendo realizados.

Sulfoglicolipídios, como o sulfoquinovosildiácilglicerol (SQDG) e sulfoquinovosilmonoácilglicerol (SQMG), isolados a partir de uma espécie de samambaia (MIZUSHINA et al., 1998) e de uma alga (OHTA et al., 1998), apresentaram potente atividade inibitória da DNA-polimerase (MURAKAMI et al., 2002; 2003a). SQDG/SQMG apresentam efeito anticâncer *in vitro* e *in vivo* (SAHARA et al., 1997). Estudos utilizando monogalactosildiácilglicerol (MGDG), digalatosildiácilglicerol (DGDG) e SQDG isolados a partir de espinafre (*Spinacia oleracea* L.), demonstraram que o MGDG é um potente inibidor do crescimento de uma linhagem de células humanas de câncer gástrico, além de inibir a atividade da DNA-polimerase (MURAKAMI et al., 2003b).

Outro sulfoglicolipídio, o sulfoquinovosildipalmitoilglicerídeo, isolado da alga marinha *Dictyochloris fragrans*, demonstrou atividade como inibidor de receptores de P-selectinas, molécula esta envolvida em processos inflamatórios (GOLIK et al., 1997).

Clinacanthus nutans é uma espécie de planta amplamente utilizada na medicina popular e nas unidades de saúde da Tailândia para o tratamento de lesões causadas pelo Herpes *simplex*, herpes zóster, prurido cutâneo e picadas de mosquito. Recentemente, um estudo demonstrou que trigalactosil- e digalactosildiglicerol, isolados a partir das folhas desta planta, exibiram atividade contra Herpes *simplex* (JANWITAYANUCHIT et al, 2003).

Atividade contra o vírus HIV também foi demonstrada por sulfoglicolipídios isolados a partir de diferentes espécies de cianobactérias. Estes compostos inibiram

eficientemente e seletivamente a função da DNA-polimerase associada com a transcriptase reversa do HIV-1 (LOYA et al., 1998).

Desta forma, os glicolipídios de plantas podem ser fortes candidatos no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, como agentes para terapia do câncer, tratamentos de doenças virais, desenvolvimento de novos agentes antiinflamatórios, etc.

As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, não apenas quando usadas diretamente como agente terapêutico, mas também porque muitos de seus compostos se constituem em modelos para síntese de um grande número de fármacos (WHO, 2001). Está estimado que cerca de 25% de todos os medicamentos provêm direta ou indiretamente de plantas superiores. Cerca de 11% dos medicamentos considerados essenciais pela *WHO* são originários de plantas, além disso, muitos compostos sintéticos são derivados de substâncias naturais (RATES, 2001). Cerca de 60% dos antitumorais e antimicrobianos comercializados e em estudo, derivam de produtos naturais (CALIXTO, 2000).

Fica evidente a importância de pesquisar o conteúdo glicolipídico em diferentes plantas medicinais. A triagem de espécies vegetais é uma ferramenta importante na busca de novos produtos naturais com potencial aplicação terapêutica. Neste trabalho, propusemo-nos a realizar uma triagem de glicolipídios em espécies de plantas medicinais comumente utilizadas na medicina popular da região, com vista a uma melhor caracterização do conteúdo glicolipídico nessas plantas.

2- OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral realizar a triagem de glicolipídios em plantas de uso medicinal, bem como investigar os glicolipídios presentes na espécie medicinal escolhida *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.

Em decorrência desta proposição, os objetivos específicos foram:

- Triar glicolipídios em diferentes plantas medicinais *in natura* e em amostras comerciais;
- Testar o melhor procedimento de extração para glicolipídios de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.;
- Isolar os glicolipídios detectados em maiores concentrações nos extratos de *C. citratus*;
- Monitorar as variações quali- e quantitativas de glicolipídios em função do tempo de armazenamento;

3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1- Generalidades sobre glicolipídios

A divisão dos glicolipídios pode ser feita de acordo com a natureza do álcool presente na porção lipídica, permitindo a divisão em dois grandes grupos: os glicoesfingolipídios e os glicoglicerolipídios. A base de cadeia longa ou aminoálcool de cadeia longa, esfingóide e glicerol, são respectivamente, os álcoois encontrados nos glicoesfingolipídios e glicoglicerolipídios (KOCHEITKOV et al., 1986). Esses dois grandes grupos são ainda subdivididos de acordo com a natureza da sua porção sacarídica, em ácidos ou neutros por apresentarem unidades monossacarídicas ácidas ou neutras respectivamente (SASTRY, 1974).

3.1.1- Glicoesfingolipídios:

O termo glicoesfingolipídio designa lipídios complexos compostos por uma molécula hidrofóbica, como uma esfingosina ou ceramida, ligada a um constituinte polar que, neste caso, é uma molécula de açúcar (MASSERINI & RAVASI, 2001).

Quimicamente, os glicoesfingolipídios são caracterizados por uma base de cadeia longa aminoálcool monoinsaturada (OLSEN & JANTZEN, 2001), chamada de “dihidroesfingosina” ou [(2S, 3R)- 2-amino-octadecano-1,3-diol] (IUPAC-IUB, 1999). A esfingosina possui dois centros estereogênicos (C-2 e C-3) e quatro possíveis isômeros ópticos (OLSEN & JANTZEN, 2001), sendo que sua dupla ligação possui configuração *trans* (Figura 1). O álcool primário do C-1 é o centro nucleofílico, formando ligações covalentes com as moléculas de açúcar. Normalmente, a esfingosina não ocorre como tal. O núcleo estrutural natural dos esfingolipídios é sempre uma ceramida com diferentes substituintes polares na hidroxila do C-1 (OLSEN & JANTZEN, 2001).

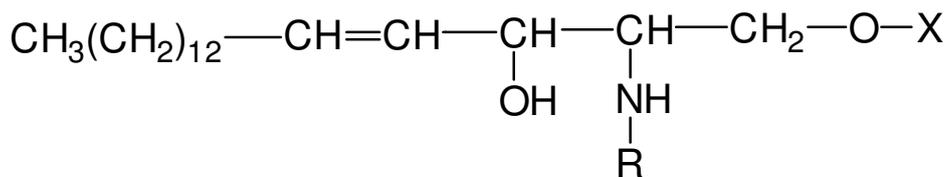


Figura 1: Estrutura geral da esfingosina: longa cadeia aminoálcool

- 1- X= H e R= H → Esfingosina
- 2- X= H e R= ácido graxo → ceramida
- 3- X= fosfocolina e R= ácido graxo → esfingomielina
- 4- X= açúcar e R= ácido graxo → cerebrosídeo, gangliosídeo ou globosídeo

Ao grupamento amino do C-2, liga-se uma cadeia de ácido graxo, formando as ceramidas (Figura 2). Estas consistem em uma base de cadeia longa esfingóide (geralmente esfingosina, esfingenina, ou fitoesfingosina), as quais é ligada via N-acilação por ácidos graxos (BUCCOLIERO & FUTERMAN, 2003). Os ácidos graxos de ocorrência natural têm composição homogênea apresentando cadeias com o comprimento que variam de 16 a 26 carbonos, podendo conter uma ou mais insaturações e/ou hidroxilas no C-2 (IUPAC-IUB, 1999).

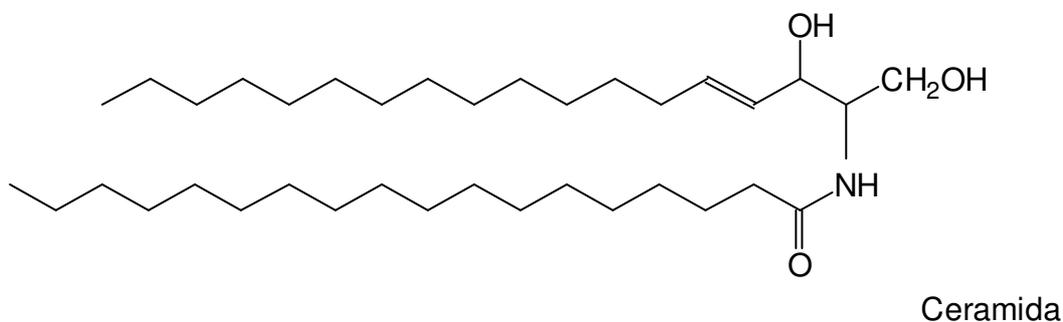
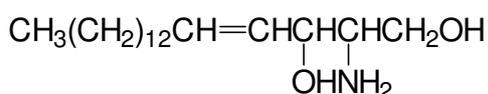
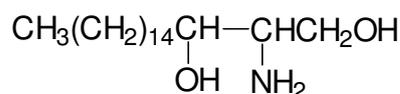


Figura 2: Estrutura geral da ceramida.

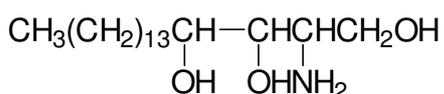
A base de cadeia longa dos glicolipídios encontrados em animais, como os cerebrosídeos, é composta principalmente pela C18-esfingosina, podendo ser em alguns casos uma C18-dihidroesfingosina. Em plantas, a principal ocorrência é na forma de C18-dehidrofitoesfingosina e C18-fitoesfingosina (Figura 3) (CARTER et al., 1965), formando assim os fitoglicolipídios (KATES, 1986).



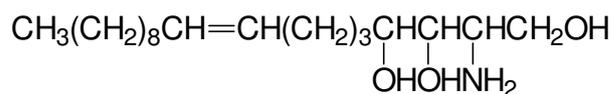
Esfingosina



Dihidroesfingosina



Fitoesfingosina



Dehidrofitoesfingosina

Figura 3: Estrutura de algumas esfingosinas.

Pela diversidade do núcleo estrutural da porção sacarídica, os glicoesfingolipídios podem ser agrupados em classes distintas (SCHWARZMANN, 2001). Assim, são classificados em ácidos ou neutros, baseado na presença ou ausência de grupamentos carregados negativamente na molécula de açúcar (LI & LI, 1999). Em glicoesfingolipídios neutros, a porção hidrofílica contém geralmente glicose, galactose, N-acetilgalactosamina, N-acetilglicosamina ou fucose, sendo formada por uma ou mais moléculas do respectivo açúcar (MASSERINI & RAVASI, 2001). Em glicoesfingolipídios ácidos, o núcleo sacarídico pode estar ligado a um sulfato, formando os sulfatídeos (MASSERINI & RAVASI, 2001) ou ligado a um ou

mais resíduos de ácido siálico, formando assim os gangliosídeos (ALLENDE & PROIA, 2002).

Glicoesfingolipídios são componentes ubíquos nas membranas de células animais. Predominantemente, localizam-se no folheto exoplasmático da membrana plasmática, onde são “ancorados” pela sua porção hidrofóbica (ceramida), enquanto sua porção hidrofílica projeta-se para o espaço extracelular (SCHWARTZMANN, 2001) (Figura 4).

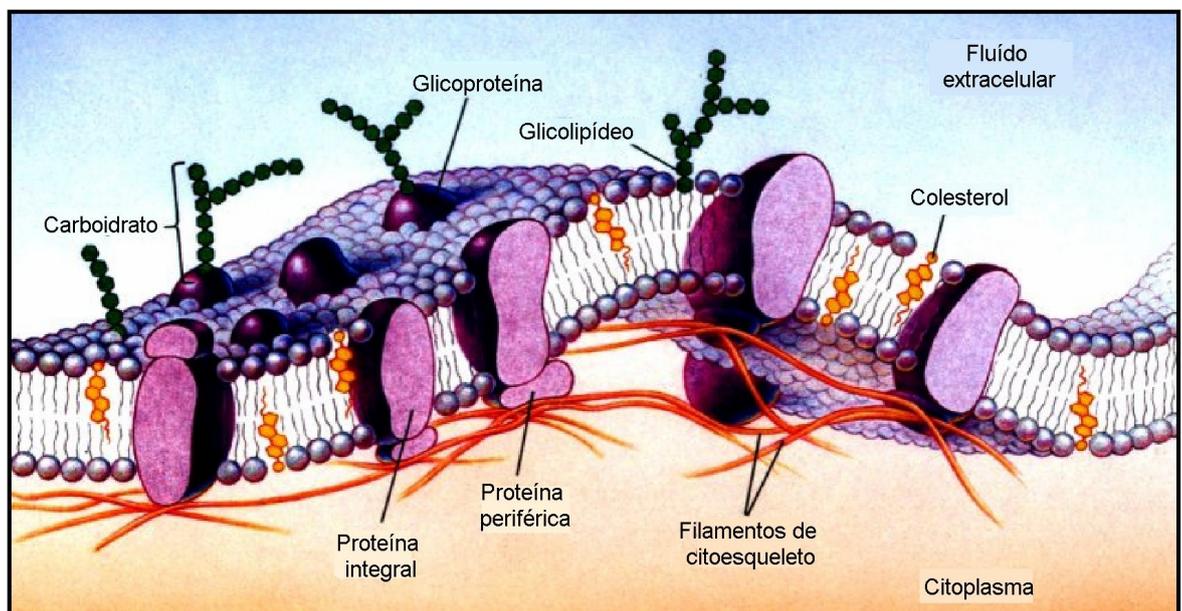


Figura 4: Esquema da membrana celular (Modificado a partir de: omega.dawsoncollege.qc.ca/Ray/cellmemb/401memb.htm).

Embora sejam característicos em células animais, glicoesfingolipídios estão também presentes em bactérias (OLSEN & JANTZEN, 2001), fungos (BATRAKOV et al., 2003), líquens (MACHADO et al., 1997), plantas (KATES, 1986) e em microorganismos marinhos (JENKINS et al., 1999). Geralmente, cada organismo ou tecido tem um tipo dominante de glicoesfingolípídeo (Tabela 1), embora ocorram em concentrações menores em praticamente todos os tecidos (CARTER et al., 1965).

Tabela 1: Exemplos de glicolipídios e suas principais localizações em células animais.

Estrutura básica	Nome trivial	Principal localização
Cer-Glc, Cer-Gal	Cerebrosídeo	Nervos e outros tecidos
Cer-Glc-Gal-Gal-NAcGal	Globosídeo	Membrana celular
Cer-Glc-NeuGal-Gal-NAcGal	Gangliosídeo (GM1)	Células ganglionares
Cer-Glc-GalNeuAc-	Gangliosídeo	Células ganglionares

Fonte: Olsen & Jansen (2001). Abreviaturas: Cer: ceramida; Glc: glicose; Gal: galactose; NAc: N-acetil; NeuAc: N-acetilneuramínico

Os glicosfingolipídios mais simples são aqueles que contêm basicamente uma ou mais unidades de açúcar ligada a ceramida. As monohexosilceramidas (CMH) contêm uma única unidade sacarídica; exemplos deste grupo são a galactosilceramida (Cer-Gal) (Figura 5), encontrada principalmente no cérebro e tecido nervoso, e a glicosilceramida, predominante em tecidos extraneurais (STULTZ et al., 1989). Dihexosilceramidas e trihexosilceramidas são encontradas em menores concentrações.

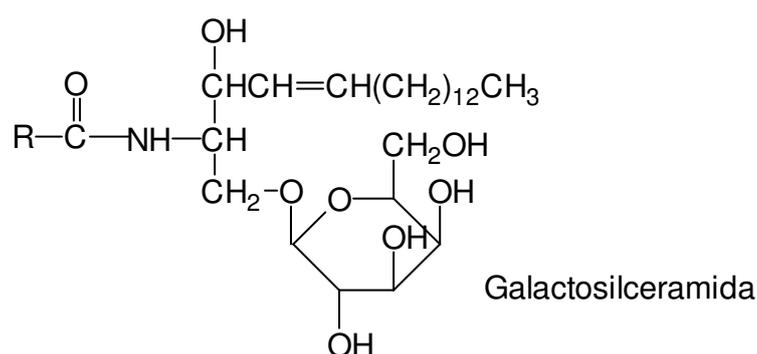


Figura 5: Representação da estrutura de um glicosfingolipídio do tipo CMH.

As moléculas mais complexas, como os gangliosídeos, são encontradas em células do tecido nervoso em alta concentração (STULTZ et al., 1989), embora já tenham sido encontradas em outras células de mamíferos. Eles têm papel

fundamental em processos tais como crescimento, diferenciação, adesão e sinalização celular (ALLENDE & PROIA, 2002).

Os glicosfingolípídios agem de várias maneiras na regulação da interação das células com o seu meio ambiente. Eles atuam como marcadores distintos de um conjunto de célula de determinado órgão animal, mediando assim o reconhecimento e a comunicação célula-célula. Além disso, a composição glicolípídica da membrana muda durante a divisão e diferenciação celular, sugerindo um papel essencial no crescimento sistemático e no desenvolvimento do organismo (HAKOMORI, 1994).

Os glicosfingolípídios têm sido referidos como importantes receptores tanto para bactérias, quanto para vírus e toxinas. Alguns glicolípídios simples têm sido identificados como sítios de ligação de determinados vírus, incluindo o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (LABELL et al., 2002) e da influenza tipo A (NAKATA et al., 2000). Sugere-se que a bactéria *Helicobacter pylori*, causadora de gastrites e úlceras, tenha glicolípídios como receptores (TANG et al., 2001). Em patologias renais, glicolípídios são associados principalmente com aquelas de natureza infecciosa (MACHADO et al., 2001). Assim, *Escherichia coli* uropatogênica tem grande especificidade de ligação por glicolípídios presentes nas células renais e do epitélio vaginal (SCHAEFFER et al., 2001).

Além dessas funções, esses compostos apresentam mudanças nas suas composições durante a divisão, crescimento e diferenciação celular (TAKI et al., 1994). Glicosfingolípídios são marcadores tumorais para várias neoplasias, sendo também marcadores de maturação e diferenciação celular em tecidos adultos e embrionários. Mudanças na composição, metabolismo e organização de glicosfingolípídios na membrana celular são as mudanças biológicas mais comuns associadas com a transformação neoplásica (PAHLSSON et al., 2001).

São conhecidas algumas patologias relacionadas com glicoesfingolipídios, tais como a Doença de Gauche , Tay-Sachs, Fabry e Niemann-Pick A e B, aos quais Glc-Cer, gangliosídeos, glicoesfingolipídios contendo α -galactose terminal e esfingomiéline são, respectivamente, acumulados devido a um defeito na atividade de enzimas lisossomais responsáveis pelas respectivas degradações (BUCCOLIERO & FUTERMAN, 2003).

3.1.2- Glicoglicerolipídios:

Apesar de ubíquos na natureza, os glicoglicerolipídios são verificados em maiores concentrações nos vegetais superiores, algas e bactérias. Nos animais e fungos, suas concentrações são muito inferiores àquelas observadas para os glicoesfingolipídios (KATES, 1986).

Em contraste com a extensa variedade de glicoglicerolipídios presentes em bactérias, os glicolipídios de plantas consistem basicamente em três tipos majoritários: monogalactosildiacilglicerol (MGDG), digalactosildiacilglicerol (DGDG) e sulfoquinovosildiacilglicerol (SQDG) (DIEHL et al., 1995). Homólogos com moléculas maiores como tri- (TGDG) e tetragalactosildiacilglicerol (TeGDG) também são relatados, tanto em tecidos fotossintéticos quanto naqueles não-fotossintéticos, porém em menores concentrações. Outros componentes como 6-acil-MGDG e 6-acil-DGDG, encontrados em menores quantidades, podem ser artefatos formados pela ação enzimática reversível da acil transferase a partir de mono- e digalactosilglicerol (KATES, 1986).

Glicolipídios não derivados de diacilglicerol são também presentes em plantas, como esterilglicosídeos, esterilglicosídeos acilados, esterilcelobiosídeos, esterilcelotriose e cerebrosídeos. Assim, os glicolipídios de plantas podem ser

classificados em três séries: glicosildiacylgliceróis, glicoesteróis e glicosilceramidas (KATES, 1986).

Os glicoglicerolípídios são basicamente constituídos por unidades monossacarídicas unidas glicosidicamente à hidroxila do C₃ do glicerol (IUPAC-IUB, 1999). As outras hidroxilas do glicerol podem estar esterificadas com ácidos graxos, formando assim os glicosildiacylgliceróis (Figura 6), uma delas esterificada e outra esterificada, formando os glicosilalquylgliceróis, ou as duas hidroxilas esterificadas, formando os glicosilalquylgliceróis (KATES, 1986).

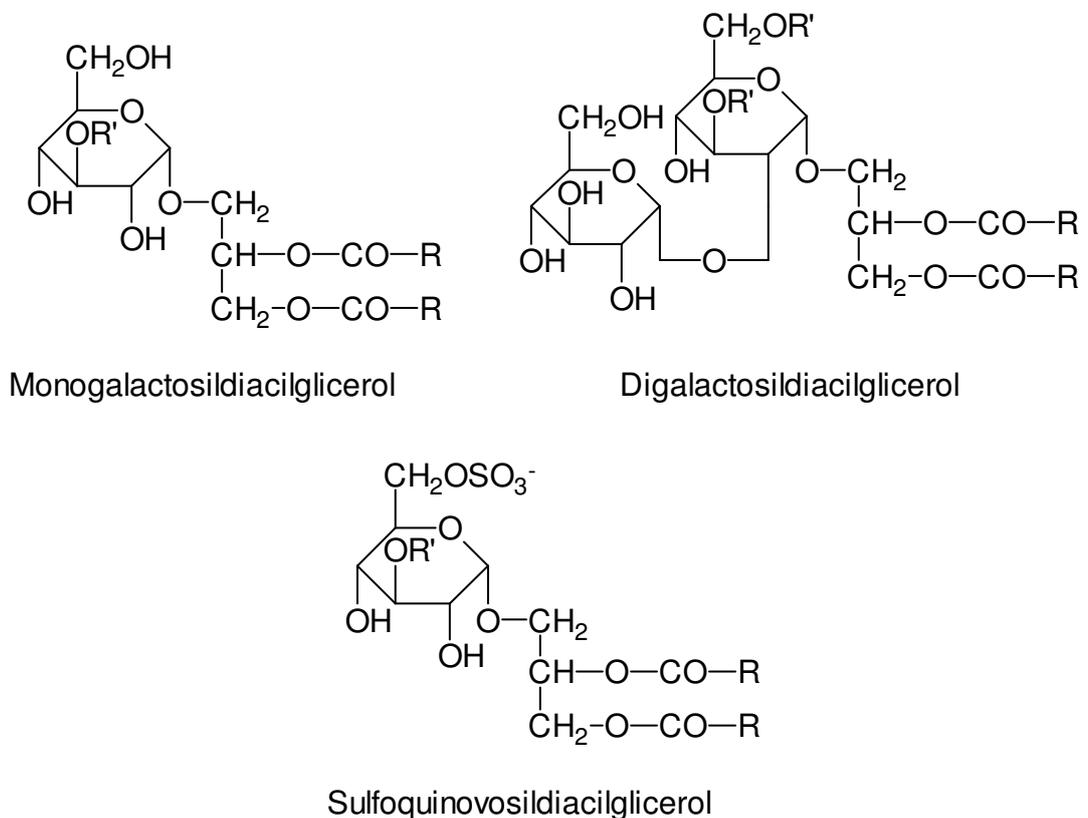


Figura 6: Estruturas básicas dos principais tipos de glicoglicerolípídios encontrados em vegetais superiores. R= Ácido graxo

Uma grande variedade de moléculas de carboidratos ocorre nos glicoglicerolípídios de origem procariótica, no entanto a glicose e galactose são os

principais componentes. Já os glicoglicerolípídios sintetizados por vegetais superiores contêm, geralmente, a galactose ou a sulfoquinovose como açúcares (HAUKSSON et al., 1995). Geralmente são verificados compostos contendo de 1 a 3 unidades monossacarídicas em maiores concentrações, contudo, compostos com 4 ou mais unidades também são observados (MINDEN et al., 2002). Grupos sulfatos podem estar presentes em associação com a galactose e a 6-desoxi-D-glicose, dando origem aos sulfolípídios de plantas (CARTER et al., 1965), como o sulfogalactosildiacylglicerol (MURAKAMI et al., 2003a).

A membrana tilacóide, sítio do aparato fotossintético, é caracterizada por um grande conteúdo de MGDG e DGDG, e menor quantidade de sulfolípídios e fosfatidilgliceróis (CODDINGTON et al., 1982). A concentração de MGDG nesta membrana é geralmente maior que a de DGDG e de SQDG. Do conteúdo lipídico total, 85% equivale a glicolípídios, e apenas 15% a fosfolípídios. Em contraste aos cloroplastos, as mitocôndrias são caracterizadas por ausência completa de glicolípídios e um grande conteúdo de fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina (KATES, 1986).

Em tecidos não fotossintéticos, MGDG e DGDG têm sido identificados em sementes (RAMADAN & MÖRSE, 2003b), frutas, tubérculos, entre outros. Nestes casos, a concentração de DGDAG é maior que a de MGDG, e a concentração de sulfolípídios é geralmente baixa ou indetectável, devido ao baixo conteúdo de cloroplastos (SASTRY, 1974).

A composição dos ácidos graxos de glicosildiacylgliceróis em tecidos fotossintéticos de vegetais superiores e algas verdes é caracterizada por uma grande proporção de ácidos graxos poliinsaturados, principalmente o ácido α -linolênico (ácido octadecatrienóico, 18:3) e, em menor quantidade, seu homólogo

(ácido hexadecatrienóico, 16:3). No entanto, existem diferenças na distribuição desses dois ácidos graxos em glicolipídios de plantas. Assim, existem as chamadas “plantas 18:3”, em que os MGDG e DGDG apresentam grandes conteúdos de ácido 18:3 em ambas *sn-1* e *sn-2* posições, e as “plantas 16:3” que contém ácido hexadecatrienóico (16:3) na posição *sn-2* de MGDG (KATES, 1986; DIEHL et al., 1995, MANNOCK et al, 2001).

A grande concentração de glicolipídios, particularmente na membrana dos cloroplastos dos vegetais superiores, cumpre um papel muito importante na manutenção da integridade estrutural da membrana dos cloroplastos. Esses lipídios também estão relacionados a fenômenos fisiológicos, como aclimação à temperatura e ao estresse salino e hídrico (CHETAL et al., 1982; KATES, 1986).

Nos últimos anos, inúmeros trabalhos têm sido realizados sobre atividade biológica de glicoglicerolipídios (Tabela 2). Dentre as atividades, a antitumoral e antiviral chamam atenção, pois atualmente a busca de novos agentes terapêuticos com estas funções tem sido uma das maiores preocupações da ciência.

Tabela 2: Atividades biológicas relatadas para glicoglicerolipídios.

Atividade	Ação	Tipo de GLP	Referência
Antitumoral	Inibição da DNA polimerase	MGDG e MGMG	MURAKAMI et al., 2003b
Antitumoral	Inibição da DNA polimerase, indutor de apoptose	SQDG, SQMG	MURAKAMI et al., 2003a
Antiviral	Herpes <i>simplex</i>	MGDG	JANWITAYANUCHIT et al., 2003
Antiviral	HIV	SQDG	LOYA et al., 1998
Antiinflamatório	Inibidor de P-selectinas	SQDG	GOLIK et al., 1997

Apesar do estudo de glicoglicerolipídios isolados de plantas ter iniciado já em 1961 com Carter, a ocorrência destes naquelas conhecidas como medicinais é pouco investigada. Os estudos já realizados, em geral, são referentes à ocorrência dessas moléculas em plantas comestíveis, legumes, grãos e sementes, ficando assim a necessidade de uma melhor caracterização do conteúdo desses compostos em plantas (Carter, 1961).

3.2- *Cymbopogon citratus*

Cymbopogon citratus (DC.) Stapf (Figura 7), da família Poaceae (Gramineae), é conhecido popularmente como capim-santo, capim-cidrão, capim-cidreira (MATOS, 1998), capim-limão, erva-cidreira, chá-de-estrada, citronela-de-Java (CASTRO & CHEMALE, 1995), capim-cheiroso, cidró (DI STASI et al., 1989), citronela (SIMÕES et al., 1989), sendo internacionalmente conhecido como *lemongrass* (OLANIYI et al., 1975).



Figura 7: Aspecto geral de um exemplar de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (www.barbadine.com/pages/cymbopogon_lien.htm)

É uma espécie originária da Índia, sendo encontrada em regiões de clima tropical e subtropical (CASTRO et al., 1995), tais como Ásia, América Central e do Sul, África entre outros (MAFFEI et al., 1988). É encontrada em todo Brasil, onde é cultivada em hortas, jardins, beira de estradas de rodagem e ferrovias, e como cerca viva (SIMÕES et al., 1989).

Apresenta-se como uma planta herbácea, perene, formando touceiras compactas e robustas de 1-2 metros de altura (SILVA JÚNIOR, 2003), com rizoma semi-subterrâneo, ramificado, colmo ereto, simples ou ramificado (SIMÕES et al., 1989). Suas folhas se originam da base, sendo alternas, simples, lineares (GUPTA, 1995), eretas, de até 1 m de altura por 1,5 cm de comprimento, ásperas em ambas as faces, com bordos lisos, cortantes e ápice acuminado (CASTRO et al., 1989). As flores estão reunidas em inflorescências do tipo espiguetas com 30-60 cm de comprimento com glumas vermelhas (DI STASI et al., 1989), sendo que no Brasil, onde a espécie foi introduzida, não floresce (MATOS, 1998).

Cymbopogon citratus é uma das espécies mais importantes na medicina popular. No Brasil, seu uso popular varia em cada região. Assim, no Ceará, o chá das folhas é utilizado como calmante e antiespasmódico; no Sul do país, como calmante e contra pressão alta; no Distrito Federal, como diurético, carminativo, calmante e antiespasmódico; no Mato Grosso, como calmante e analgésico; no Pará, contra gripes, dores de cabeça e desintéria (DI STASI et al., 1989). Esta espécie também é utilizada como antifebril, antirreumática, emenagoga (SIMOES et al., 1989) e antiemética (CARLINI et al., 1986). Externamente, é utilizada como antisséptica (CIMANGA et al., 2000). A fumaça oriunda da queima de suas folhas é utilizada como repelente de insetos (OYEDELE et al., 2002).

O uso medicinal do capim-limão não é restrito ao Brasil. Na Guatemala, infusões das folhas são utilizadas para flatulência, febre, gripes e para baixar a pressão sanguínea (GIRÓN et al., 1991). Na Nigéria, *C. citratus* é utilizado como antipirético, antiespasmódico (OLANIYI et al., 1975) e também por seu efeito estimulante. Na Índia é comumente usado como antitussígeno, antirreumático e antisséptico (DERMARDEROSIAN, 2001); na Colômbia é utilizado pela ação carminativa, vermífuga e diaforética, sendo que a infusão do rizoma é usada como tônico para os dentes (GUPTA, 1996). Em Porto Rico, a folha é utilizada como estomáquica, carminativa, antifebril, para flatulência e como expectorante. Os camponeses costumam usar a raiz para limpar suas próteses dentárias (MELÉNDEZ, 1989).

3.2.1- Aspectos químicos e farmacológicos

Apesar do intenso uso desta espécie na medicina popular, estudos relativos as suas atividades farmacológicas iniciaram no Brasil apenas na década de 80. Foi a partir do programa realizado pela CEME (Central de Medicamentos), o chamado “Programa Brasileiro de Plantas Medicinais”, que surgiram trabalhos referentes às atividades biológicas desta planta. Naquela ocasião, foram realizados testes farmacológicos referentes aos principais usos populares, como o uso em distúrbios gastrintestinais, como antipirético e sedativo, bem como investigação da potencial toxicidade (LEITE et al., 1986).

Estudos sobre o uso do capim-limão no tratamento de condições febris mostraram que, tanto o abafado (infuso) via oral, em concentração 40 vezes superior aquelas usualmente utilizadas por humanos (C_{40}), como a administração de 200 mg/kg de citral, foram incapazes de diminuir a temperatura em ratos normais e/ou

ratos com hipertermia por administração prévia de pirogênio. No entanto, ambos os preparados foram ativos quando injetados por via intraperitoneal (ip), sendo capazes de diminuir a temperatura em aproximadamente 2°C (CARLINI et al., 1986).

Os estudos sobre o uso do abafado de capim-limão no tratamento de distúrbios gastrintestinais demonstraram que este não foi capaz de diminuir o trânsito intestinal em ratos que receberam uma dose oral 100 vezes maior que aquela utilizada por humanos (C₁₀₀). A administração oral de 200 mg/kg de citral também foi ineficaz. Novamente, esses preparados demonstraram atividade quando administrados por via ip. Resultados similares foram obtidos com o *score* de defecação em ratos. Doses C₂₀ do abafado por via oral e C₁₀ por via ip. diminuíram fracamente a defecação, mas os resultados mostraram pouca significância estatística. Apenas a administração de 100 mg/kg de citral por via ip diminuiu significativamente a defecação (CARLINI et al., 1986).

O efeito hipnótico foi avaliado em voluntários que ingeriram amostras de capim-limão e placebo, sendo avaliados os seguintes parâmetros: tempo de indução de sono, qualidade do sono e recordação dos sonhos. O capim-limão não demonstrou nenhum efeito quando comparado com o placebo. Além disso, em 18 pacientes com traços de ansiedade foram administrados o abafado do capim-limão ou placebo e, após, submetidos a um teste de ansiedade induzida. Os níveis de ansiedade foram similares, indicando que o abafado da planta não possui propriedade ansiolítica (LEITE et al., 1986).

Em pacientes sadios que receberam uma dose/dia do abafado via oral por duas semanas, não foram demonstradas alterações em testes bioquímicos (glicose, creatinina, uréia, colesterol, triglicerídios, etc.), na análise de urina (proteínas, glicose, cetonas, bilirrubina, urobilinogênio, etc.), no eletroencefalograma (EEG) e

eletrocardiograma (ECG). Alguns pacientes mostraram leves alterações na bilirrubina direta e amilase, mas sem demonstrarem alterações clínicas (LEITE et al., 1986).

Administração oral da infusão de capim-limão produziu analgesia dose-dependente em ratos com hiperalgesia induzida por injeção subplantar de carragenina e prostaglandina E (LORENZETTI et al., 1991). O efeito antinociceptivo do óleo essencial do *C. citratus* foi observado em camundongos, sugerindo que o óleo tem ação tanto periférica quanto ao nível de sistema nervoso central (VIANA et al., 2000).

Em ratos tratados com decocto a 20%, o edema de pata foi inibido em 19%, sendo que a indometacina inibiu o edema em 59%. Assim, concluiu-se que o potencial efeito antiinflamatório do decocto do capim-limão é muito fraco, a ponto de ser considerado sem qualquer utilidade clínica (CARBAJAL et al., 1989).

ONAWUNMI e colaboradores (1984) observaram que componentes do óleo essencial, como o α -citról (gerânial) e β -citról (neral), mostraram ação antibacteriana tanto em organismos gram-negativos quanto em gram-positivos. Já o mircenol não mostrou atividade quando testado isoladamente, mas foi demonstrado que ocorre aumento da atividade quando misturado ao citról (gerânial e neral). HAMMER e colaboradores (1999) observaram que o óleo do capim-limão inibe o crescimento bacteriano em concentração \leq a 2%. Alguns dos principais microorganismos inibidos pelos componentes do óleo essencial incluem *Escherichia coli*, *Citrobacter* sp, *Klebsiella pneumoniae*, *P. vulgaris*, *Staphilococcus aureus* (CIMANGA et al., 2002), *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* (HAMMER et al., 1999), entre outros.

O efeito antimicrobiano de diferentes óleos essenciais e o desenvolvimento de resistência aos mesmos foram avaliados *in vivo* e *in vitro* utilizando 7 cepas de *Helicobacter pylori*. O óleo extraído de *Cymbopogon citratus* e de *Lippia citrodora* (ambos ricos em citral) foram aqueles que apresentaram maior atividade bactericida. Após dez passagens seqüenciais, foi desenvolvida resistência a claritromicina, mas não ao óleo do capim-limão. Em estudos *in vivo*, a densidade de *H. pylori* no estômago de ratos tratados com o óleo do capim-limão foi significativamente menor, comparando-se aos ratos não tratados (OHNO et al., 2003).

Em estudo realizado com 13 óleos essenciais, o óleo extraído do capim-limão mostrou ser um dos mais ativos contra dermatófitos humanos (KISHORE et al., 1992), tais como *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum* e *Microsporum gypseum* (WANNISSOM et al., 1996). Outros estudos relatam a ação contra fungos que surgem durante o armazenamento de certos alimentos (MISHRA et al., 1994; ADEGOKE & ODESOLA, 1996), tais como o fungo aflatoxigênico *Aspergillus flavus* (PARANAGAMA et al., 2003).

O óleo do capim-limão também é efetivo como herbicida (DUDAI et al., 2001) e como inseticida (GILBERT et al., 1999).

Têm sido apresentados muitos trabalhos demonstrando o efeito anticarcinogênico do capim-limão. Compostos ativos incluem o limoneno e o geraniol (WILDMAN, 2000). O óleo essencial e o citral isoladamente mostraram serem tóxicos contra células leucêmicas P388 em ratos (DUBEY et al., 1997). Já com o extrato aquoso liofilizado, observou-se um efeito inibitório na fase inicial da hepatocarcinogênese (PUATANACHOKCHAI et al., 2002). Outros trabalhos demonstraram que os extratos possuem propriedades antimutagênica em *Salmonella typhimurium* TA98 (VINITKETKUMNUEN et al., 1994).

O extrato da planta protege culturas de *Escherichia coli* da ação oxidativa do cloreto estanhoso, substância considerada tóxica e genotóxica. O extrato da planta pode agir quelando e/ou oxidando íons de estanho (MELO et al., 2001).

Muitos trabalhos foram realizados para avaliar a toxicidade do capim-limão. O infuso administrado oralmente em ratos adultos por dois meses, em uma dose 20 vezes superior àquela utilizada normalmente (C_{20}), não induziu qualquer efeito que poderia evidenciar toxicidade. Não se constataram nenhum efeito deletério em machos e fêmeas, antes do acasalamento ou durante a gestação, bem como em sua prole (SOUZA FORMIGONI et al., 1986).

Da espécie *Cymbopogon citratus* já foram isoladas várias substâncias, principalmente aquelas presentes no óleo essencial. O óleo encontrado nas folhas tem como principal componente o citral (65-85%) (SCHANEBERG & KHAN, 2002). Este nome é dado à mistura natural de isômeros monoterpênicos aldeídicos acíclicos: geranial (trans-citral, citral A ou α -citral) e neral (cis-citral, citral B ou β -citral). Naturalmente, um isômero não ocorre sem o outro (LEWINSOHN et al., 1998). Além do citral, o óleo essencial do capim-limão contém pequenas quantidades de geraniol, acetato de geranila, monoterpênicos olefínicos como limoneno e mirceno (LEWINSOHN et al., 1998), citronelol, linalol, farnesol, terpenol (DERMARDEROSIAN, 2001) (Figura 8), α -oxabisaboleno, borneol, ácido cafeico, canfeno, cineol, acetato de citronila, ácido p-cumárico, cimbopogenol, cimbopogona, cimbopogol (HANSON, 1976), himuleno, acetato de nerila, ocimeno, α e β -pineno, terpinoleno, terpinol (GUPTA, 1995). Compostos não voláteis como β -sitosterol, hexaconsanol e triacontanol foram isolados a partir de extratos de éter de petróleo (OLANIYI, 1975; DEMATOUSCHEK, 1991). Flavonóides, como luteolina e luteolina-7-O- β -D-glicosídeo, também foram encontrados no capim-limão (GUPTA, 1995).

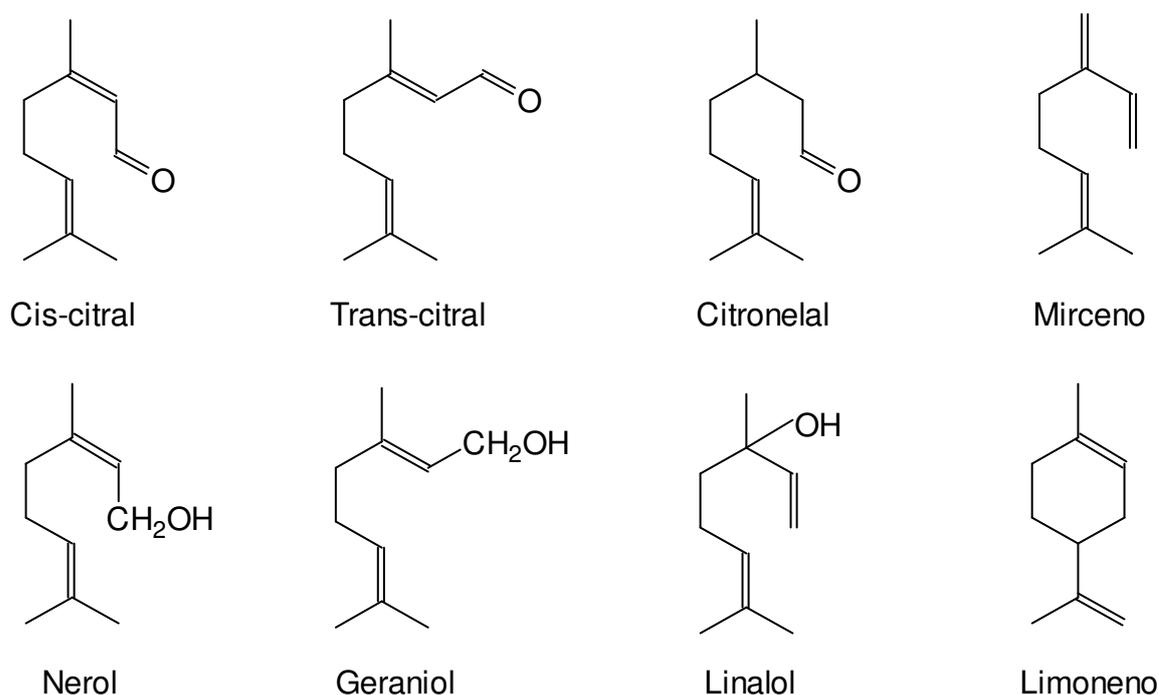


Figura 8: Exemplos de compostos terpênicos já isolados do óleo de *Cymbopogon citratus*.

De acordo com LEWINSOHN e colaboradores (1998) há dois quimiotipos desta espécie na Índia: o tipo “*East Indian*” com alto conteúdo de mirceno ($\cong 38\%$) e citral ($\cong 47\%$), e o tipo “*West Indian*” caracterizado pela reduzida concentração de mirceno (0-12%) e elevada concentração de citral ($> 85\%$).

Devido ao aroma característico de limão, o citral é de considerável importância na indústria alimentícia (DUDAI et al., 2001) e de flavorizantes (ZHENG et al., 1993). É também uma importante matéria prima usada na indústria farmacêutica, de perfumaria e cosmética, especialmente para síntese de vitamina A e iononas (LEWINSOHN et al., 1998).

No âmbito deste trabalho, realizou-se uma triagem de glicolipídios em diversas plantas de uso medicinal: *Maytenus ilicifolia*, *Sorocea bonplandii*, *Zollernia ilicifolia*, *Bauhinia forficata*, *Lippia alba*, *Cymbopogon citratus*, *Baccharis genistelloides*, *Plectranthus barbatus*, *Mentha piperita*, *Peumus boldus*, *Matricaria*

recutita, *Pimpinella anisum*, *Cynara scolymus*, *Achyrocline satureoides* e *Malva sylvestris* tanto em amostras *in natura* quanto em amostras comerciais na forma de chá. Assim, o extrato de *Cymbopogon citratus* - capim-limão foi uma das plantas mais promissoras em relação ao conteúdo glicolípídico. Desta forma, propusemo-nos a realizar o fracionamento com vista ao isolamento de glicolípídios presentes em *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, uma vez que esta é uma espécie de amplo uso popular e que não há qualquer estudo com este tipo de composto.

4- MATERIAIS

4.1- Triagem de glicolipídios

Para a triagem de glicolipídios em plantas medicinais foram coletadas amostras de 8 plantas em março de 2002, em diferentes localidades de Florianópolis, conforme tabela abaixo. Todos os espécimes foram identificados anteriormente por pesquisadores do Departamento de Botânica da UFSC.

Tabela 3: Plantas utilizadas na triagem de glicolipídios e seus locais de coleta.

Nome científico	Nome popular	Parte utilizada	Local de coleta
<i>Maytenus ilicifolia</i> Martius ex Reissek	Espinheira-santa	Folhas	Campus da UFSC
<i>Sorocea bonplandii</i> (Baillon) Burger, Lanjouw & Boer	“Falsa” espinheira- santa	Folhas	Campus da UFSC
<i>Zollernia ilicifolia</i> (Brongn.) Vogel	“Falsa” espinheira- santa	Folhas	Campus da UFSC
<i>Bauhinia forficata</i> Link	Pata-de-vaca	Folhas	Horto do HU
<i>Lippia alba</i> L.	Erva-cidreira	Folhas	Horto do IBAMA
<i>Cymbopogon</i> <i>citratus</i> (DC.) Stapf	Capim-limão	Folhas	Horto do IBAMA
<i>Baccharis</i> <i>genistelloides</i> Person	Carqueja	Folhas	Horto do HU
<i>Plectranthus</i> <i>barbatus</i> Andrews	Boldo	Folhas	Horto do HU

Para a triagem de glicolipídios em drogas vegetais dessecadas foram utilizadas amostras comerciais de diferentes marcas das seguintes plantas (Tabela 4):

Tabela 4: Triagem de glicolipídios em amostras comerciais de chás.

Nome científico (embalagem)	Nome popular (embalagem)	Parte utilizada
<i>Maytenus ilicifolia</i>	Espinheira-santa	Folhas
<i>Mentha piperita</i>	Hortelã	Folhas
<i>Peumus boldus</i>	Boldo do Chile	Folhas
<i>Cymbopogon citratus</i>	Capim-cidreira	Folhas
<i>Matricaria recutita</i>	Camomila	Inflorescências
<i>Baccharis genistelloides</i>	Carqueja	Folhas
<i>Pimpinella anisum</i>	Erva-doce	Frutos
<i>Bauhinia forficata</i>	Pata-de-vaca	Folhas
<i>Cynara scolymus</i>	Alcachofra	Folhas
<i>Achyrocline satureioides</i>	Marcela	Inflorescências
<i>Malva sylvestris</i>	Malva	Folhas

4.2- Material vegetal

A amostra de *Cymbopogon citratus* utilizada nos testes preliminares foi coletada na praia de Morro das Pedras, Florianópolis, em setembro de 2002. O material vegetal utilizado para o fracionamento foi coletado no Horto de Plantas Medicinais do Departamento de Botânica da UFSC, Campus Universitário-Trindade, em outubro de 2002. As amostras foram identificadas pelo Prof. Dr. Daniel de Barcellos Falkenberg, do Departamento de Botânica, UFSC.

4.3- Materiais para extração e cromatografia

Os solventes empregados neste trabalho foram de grau analítico, procedência Nuclear e Vetec.

Para cromatografia em camada delgada (CCD) foram usadas, para os testes de triagem placas de alumínio de tipo HPTLC (CCD de alta eficiência), recobertas de gel de sílica 60 F254, de marca Merck (código 1.05548). Para as análises por CCD durante a investigação fitoquímica foram utilizadas placas comuns de gel de sílica 60 F254, também da marca Merck (código 1.05554).

Os sistemas de eluentes utilizados para análise do conteúdo glicolípídico foram $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 65:25:4 (v/v/v) (KATES, 1986) e $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1 (v/v) para análise do extrato bruto. Para a detecção das substâncias nas placas cromatográficas foram utilizados como reagentes reveladores:

- Solução de anisaldeído-sulfúrico (WAGNER E BLADT, 1995);
- Solução de vanilina-sulfúrica (MERCK, 1971);
- Solução de orcinol-sulfúrico (KATES, 1986).

Utilizaram-se padrões de monohexosilceramida (CMH), fornecido pelo Prof. Dr. Marcos José Machado, Departamento de Análises Clínicas da UFSC, e de digalactosildiácilglicerol (DGDG), ambos da marca Sigma®.

Os adsorventes utilizados na Cromatografia em Coluna (CC) foram gel de sílica 60, com partículas de diâmetro entre 0,05-0,2 μm , procedência Carlo Erba, e gel de sílica 60 com diâmetro de partículas entre 0,04-0,063 μm , procedência Vetec.

4.4- Equipamentos

As amostras vegetais previamente secas foram pulverizadas em moinho de facas. Para concentração dos extratos e das frações, utilizou-se evaporador rotatório

a vácuo Heidolph, modelo Laborota 4000. Para a extração do óleo essencial, utilizou-se o aparelho de Clevenger modificado.

As análises por CG-EM (Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas) foram realizadas em cromatógrafo a gás QP 2000 A, acoplado a um espectrômetro de massas pertencente ao Instituto de Química da UFSC. A coluna capilar era de 50 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno. Como programação de temperatura utilizou-se: temperatura inicial de 40°C, seguido pela elevação em um gradiente de 8°C até 300°C, mantida até o fim da análise. Utilizou-se Hélio como gás de arraste, com fluxo de 1 mL/min.

5- METODOLOGIA

5.1-Triagem de glicolipídios para todas amostras vegetais

As amostras utilizadas na triagem de glicolipídios em plantas medicinais foram coletadas em março/2002. As folhas danificadas foram separadas e as demais submetidas à secagem em temperatura ambiente por 24 horas, sendo então trituradas em moinhos de facas.

Os extratos foram preparados por maceração da planta em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2:1) por 24 horas, na proporção 1:5 (m/v). Após a maceração, os extratos foram filtrados e concentrados em evaporador rotatório sob baixa pressão e temperatura inferior a 50°C .

Para as amostras de chás comerciais, o processo de extração foi realizado tal como descrito para amostras de plantas, apenas sem secagem prévia.

A análise cromatográfica com vista à detecção de glicolipídios foi realizada em placas tipo HPTLC e eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 65:25:4 (v/v), revelando-as com orcinol-sulfúrico.

A caracterização do provável tipo de glicolipídio foi baseada nos seus respectivos fatores de retenção (R_fs), de acordo com a literatura (LEPAGE et al., 1964).

5.2- Ensaio preliminares para o capim-limão

As amostras de *Cymbopogon citratus* utilizadas nos testes preliminares foram coletadas em setembro/2002.

Os extratos foram preparados com a planta moída (fresca e/ou seca previamente por 24 horas), por maceração em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 2:1 (v/v), pelos períodos abaixo especificados. A proporção planta:solvente utilizada foi 1:5 (m/v).

Após a extração, os extratos foram filtrados e concentrados sob baixa pressão em evaporador rotatório com temperatura inferior a 50°C, sendo então seus rendimentos calculados.

Nos testes preliminares, foram avaliadas as seguintes metodologias de extração:

- A- Extração após inativação enzimática;
- B- Extração após secagem em temperatura ambiente por 24 horas;
- C- Extração a fresco por 1, 2 e 5 dias.

A- Extração após inativação enzimática (IE)

Cerca de 10g de folhas foram trituradas e fervidas em água destilada por 3 minutos. Após a filtragem, as folhas foram colocadas na capela de exaustão para total evaporação da água e depois submetidas à extração com CHCl₃/MeOH 2:1 (v/v) por 24 horas (KATES, 1986).

B- Extração após secagem por 24 horas em temperatura ambiente (TA)

Cerca de 10g de planta previamente dessecada (24 horas em temperatura ambiente) foram submetidas a maceração em CHCl₃/MeOH 2:1 (v/v) por 24 horas.

C- Extração da planta fresca por 1, 2 e 5 dias (F1, F2 e F5)

Amostras de cerca de 10 g da planta fresca e triturada foram maceradas em CHCl₃/MeOH 2:1 (v/v) por 1 (F1), 2 (F2) e 5 (F5) dias, respectivamente.

Em todas as metodologias, a maceração foi realizada em temperatura ambiente, ao abrigo da luz e sob freqüente agitação. Foram avaliados os rendimentos obtidos e o perfil cromatográfico de cada extrato bruto.

5.3.- Análise cromatográfica preliminar

Os extratos obtidos foram ressuspensos em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 2:1 (v/v) e analisados por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizando os eluentes: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5 (v/v), $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1 (v/v), $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 85:15 (v/v), $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8:2 (v/v).

Para cada eluente, foram realizadas duas placas. Utilizaram-se em todas as análises padrões de monohexosilceramida (CMH) e digalactosildiacilglicerol (DGDG). As placas foram observadas sob luz visível e sob luz ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm. Após, uma placa foi borrifada com solução de anisaldeído-sulfúrico e outra com orcinol-sulfúrico, sendo então aquecidas a cerca de 100 °C até o aparecimento das manchas características.

5.4- Procedimentos de isolamento

5.4.1- Material vegetal

As amostras de capim-limão utilizadas para a investigação fitoquímica foram coletadas em outubro/2002. As folhas foram submetidas à secagem em temperatura ambiente por 24 horas e trituradas em moinho de facas.

5.4.2- Preparação do extrato

O extrato de *Cymbopogon citratus* foi preparado a partir de 816 g da planta moída. O material foi macerado em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 2:1 (v/v) durante 24 horas, na

proporção de 1 g de planta para 5 mL (m/v) da mistura extratora. A seguir, o macerado foi filtrado e concentrado em evaporador rotatório a vácuo, em temperatura inferior a 50 °C.

5.5- Coluna I – Extrato bruto

O extrato bruto foi fracionado em Coluna Cromatográfica (CC) de gel de sílica, utilizando-se $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 98:2 (v/v) para a preparação da suspensão do adsorvente. A coluna possuía 6 cm de diâmetro interno e a altura da sílica atingiu 24 cm, sendo utilizados aproximadamente 300 g de adsorvente.

Cerca de 11 g do extrato bruto foram dissolvidos em 45 mL de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 98:2 (v/v) e aplicados no topo da coluna. O fluxo de escoamento foi de 2 mL/min, sendo que as frações foram coletadas com 30 mL cada. Seguiu-se a eluição da coluna utilizando eluentes com aumento progressivo de polaridade (Tabela 5). Ao todo foram coletadas 142 frações.

Tabela 5: Eluentes utilizados em seqüência na eluição das frações da Coluna I:

Eluente	Proporção	Número de frações
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	9:1	1-76
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	85:15	77-90
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	8:2	91-100
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	75:25	101-104
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	7:3	105-142

As frações foram analisadas por CCD utilizando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1 (v/v), e como reveladores, soluções de anisaldeído- e orcinol-sulfúrico. As frações foram reunidas em função da semelhança na composição e do seu grau de

pureza baseada na análise cromatográfica, sendo denominadas $C_M F_{x-y}$ (sendo “M” o número da coluna em algarismos romanos e X-Y o intervalo de frações reunidas) conforme o agrupamento realizado. A avaliação do rendimento das frações foi realizada a partir da massa do resíduo correspondente a uma alíquota de 10 mL. A partir desta coluna, foram realizados os fracionamentos com vista ao isolamento das substâncias de interesse.

5.5.1- Fracionamento visando à obtenção de G_1

a)- Coluna II

Amostra aplicada: $C_{12-17}F$ (1,55 g)

Adsorvente: Sílica gel (120 g)

Coluna: 6 cm diâmetro X 18 cm de altura

Fluxo: 1,8 mL/min

Eluentes: conforme tabela 6

Tabela 6: Esquema de eluição utilizado na Coluna II:

Eluente	Proporção	Número de frações
$CHCl_3$	100%	1-26
$CHCl_3/MeOH$	97:3	27-112
$CHCl_3/MeOH$	9:1	113-118
$CHCl_3/MeOH$	8:2	119-130

Foram coletadas 130 frações com 20 mL cada, que foram analisadas por CCD em $CHCl_3/MeOH$ 97:3.

b)- Coluna IV

Amostra aplicada: $C_{11}F_{60-68}$ (0,1103 g)

Adsorvente: Sílica gel (20,8 g)

Coluna: 1,0 cm diâmetro X 38,5 cm altura

Eluente: $CHCl_3/MeOH$ 96:4

Fluxo: 0,4 mL/min.

As 119 frações coletadas continham 1 mL cada. Devido à semelhança do conteúdo, a fração $C_{IV}F_{33-48}$ foi agrupada com uma fração da primeira coluna, a $C_{I}F_{18-20}$, para prosseguir o fracionamento.

c)- Coluna V

Amostra: $C_{IV}F_{33-48} + C_{I}F_{18-20}$ (0,202 g)

Adsorvente: Sílica gel (48,8 g)

Coluna: 2,2 cm diâmetro X 33 cm altura

Eluente: $CHCl_3/EtOH$ 94:6

Fluxo: 0,8 mL/min

Foram recolhidas 108 frações de volume inicial 10 mL (1-13), seguindo-se frações de 1 mL (14-108).

d)- Coluna XII

Amostra: $C_{V}F_{23-73}$ (0,0326 g)

Adsorvente: Sílica gel (6 g)

Coluna: 1,0 cm diâmetro X 37 cm altura

Eluente: $CHCl_3/MeOH/Acetona/\acute{A}cido\ ac\acute{e}tico$ 73:1,5:25:0,5

Fluxo: 0,5 mL/min

Foram recolhidas 18 frações com volume de 1 mL.

5.5.2- Fracionamento visando à obtenção de G₂

Para a obtenção do G₂, a fração C₁F₃₇₋₆₀ foi fracionada conforme descrito:

a)- Coluna VIII

Amostra aplicada: C₁F₃₇₋₆₀ (0,237 g)

Adsorvente: Sílica gel (25 g)

Coluna: 1 cm diâmetro X 50 cm altura

Eluente: CHCl₃/EtOH 86:14

Fluxo: 0,5 mL/min

Desta coluna, coletaram-se 52 frações com 1mL cada, sendo que as frações 19 a 30 (C_{VIII}F₁₉₋₃₀) foram reunidas, concentradas e submetidas a lavagens sucessivas com metanol para retirada de impurezas polares.

b)- Separação do precipitado

Ao se retirar a fração C₁F₆₁₋₇₁ da refrigeração, observou-se um precipitado branco, que foi separado por centrifugação, lavado 4 vezes com metanol e analisado por CCD utilizando-se CHCl₃/MeOH 9:1 e revelador orcinol-sulfúrico.

5.5.3- Obtenção de outros compostos

Na tentativa de ressuspender a fração C₁F₁₀ em CHCl₃/MeOH 2:1, observou-se que parte da fração era insolúvel nesta mistura. Essa alíquota insolúvel foi separada e lavada três vezes com metanol, sendo denominada C₁F₁₀R (Resíduo) O restante da fração foi utilizado para o fracionamento em coluna, como descrito abaixo:

a)- Coluna X

Amostra: C_IF₁₀ (0,109 g)

Adsorvente: Sílica gel (10 g)

Coluna: 1 cm diâmetro X 18 cm altura

Eluente: Tolueno/ acetato de etila 95:5

Fluxo: 0,6 mL/min

Coletaram-se 56 frações (1 mL cada), que foram analisadas por CCD utilizando tolueno/ AcOEt 93:7 e vanilina-sulfúrica como revelador.

b)- Coluna II

Para o isolamento do G₁, realizou-se a coluna II (item 5.5.1.a), cujas frações foram cromatografadas em CHCl₃/MeOH 97:3 e reveladas com solução de anisaldeído-sulfúrico.

5.5.4- Isolamento da substância Cy1:

A fração C_IF₁₂₋₁₇ foi cromatografada inicialmente com CHCl₃ e, posteriormente, com CHCl₃:MeOH 97:3 (item 5.5.1.a). As frações iniciais da coluna foram analisadas por CCD em CHCl₃ e reveladas com anisaldeído-sulfúrico. A fração C_{II}F₂ que continha uma substância purificada foi codificada como Cy1

5.5.5- Obtenção de Cy2

Na coluna VIII (item 5.5.2.a), realizada com vista ao isolamento do G₂, durante a coleta da fração C_{VIII}F₂, observou-se a formação de um precipitado branco. Este foi lavado 4 vezes com metanol, centrifugado para separação do sobrenadante e analisado por CCD com tolueno/AcOEt 93:7 sendo revelado com vanilina-sulfúrica. O precipitado que continha o composto purificado foi denominado Cy2.

5.5.6- Obtenção de Cy3

A fração C_{II}F₄₉₋₅₆ resultante da coluna II foi novamente fracionada em coluna, como descrito na seqüência.

b)- Coluna III

Amostra aplicada: C_{II}F₄₉₋₅₆ (0,477 g)

Adsorvente: Sílica gel (70 g)

Coluna: 2,2 cm diâmetro X 34 cm altura

Eluente: CHCl₃/MeOH 97:3 (frações 1-35), CHCl₃/MeOH 95:5 (frações 36-50)

Fluxo: 0,5 mL/min

As frações 7 a 15 foram reunidas, dando origem a C_{III}F₇₋₁₅ que foi submetida a outro fracionamento cromatográfico (Coluna VI).

c)- Coluna VI

Amostra aplicada: C_{III}F₇₋₁₅ (0,1828 g)

Adsorvente: Sílica gel (21 g)

Coluna: 1 cm diâmetro X 24 cm altura

Eluente: CHCl₃/MeOH 98:2

Fluxo: 0,25 mL/min

Após análise por CCD, as frações 7 a 8, que continham a substância denominada Cy3, foram reunidas.

5.5.7- Obtenção de Cy4

As frações C_{III}F₃₃₋₄₈ e C_IF₁₈₋₂₀ foram reunidas e aplicadas na coluna V conforme descrito no item 5.5.1.c. Após análise por CCD, as frações 17 a 25, contendo a substância codificada Cy4, foram reunidas na fração C_VF₁₇₋₂₅

5.6- Monitoramento mensal (MM) de *Cymbopogon citratus*

5.6.1- Material vegetal

A amostra vegetal foi coletada no Horto do Departamento de Botânica da UFSC, Campus Universitário, em dezembro de 2002. O material foi limpo e, em seguida, processado de duas maneiras:

- a)- A planta foi seca em temperatura ambiente por 24 horas e, em seguida, fracionada em 12 alíquotas para serem armazenadas por até 12 meses. O monitoramento do perfil cromatográfico foi realizado a cada 30 dias;
- b)- A planta foi submetida ao processo de inativação enzimática, mergulhando-a em água destilada a 100°C por 3 minutos. As plantas foram secas em capela de exaustão e armazenadas em 12 alíquotas, para então serem analisadas.

5.6.2- Preparação dos extratos

Os extratos para o monitoramento mensal (MM) foram obtidos através da maceração em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 2:1 (v/v) durante 24 horas, na proporção de 1 g de planta para 5 mL da mistura extratora (m/v).

5.6.3- Análise cromatográfica dos extratos do MM

Os extratos do MM foram concentrados em evaporador rotatório, pesados e ressuspensos em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 2:1 (v/v) de modo a padronizar a concentração de extrato aplicada nas placas de CCD. Foram aplicados 10 μL de cada extrato em placas de gel de sílica 60 F254 e eluídos em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 65:25:4 (v/v/v) (LEPAGE et al., 1964) e $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1 (v/v), utilizando-se como reveladores soluções de anisaldeído- e orcinol-sulfúrico.

5.7- Extração do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*

Foi realizado conforme o método de dosagem de óleos essenciais em drogas vegetais, por arraste de vapor d'água, preconizado pela FARMACOPÉIA Brasileira IV (1988), em aparelho de Clevenger modificado.

Utilizaram-se 30 g de folhas frescas em 400 ml de água destilada e procedeu-se a destilação por 3 horas. Utilizou-se 1,0 ml de xileno. O volume de óleo coletado foi medido e a amostra acondicionada em frasco hermeticamente fechado.

6- RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1- Triagem de glicolipídios

A triagem de espécies vegetais com potencial atividade biológica é uma ferramenta importante na busca de novos produtos naturais com potencial aplicação terapêutica. Neste estudo, foram usadas espécies de plantas medicinais comumente utilizadas na medicina popular.

Os resultados da análise cromatográfica dos extratos brutos das plantas medicinais estão representados na Figura 9.

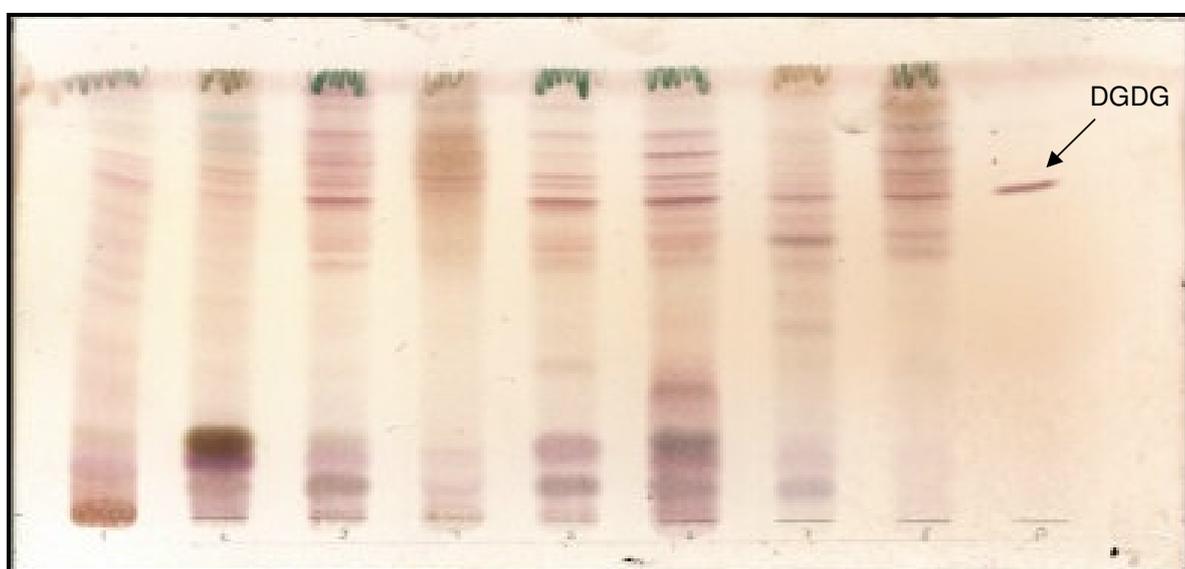


Figura 9: Cromatografia em Camada Delgada dos extratos brutos das espécies de plantas medicinais. Eluente: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:25:4); revelador: orcinol-sulfúrico. Da esquerda para direita: 1- *Maytenus ilicifolia*; 2- *Sorocea bonplandii*; 3- *Zollernia ilicifolia*; 4- *Bauhinia forficata*; 5- *Lippia alba*; 6- *Cymbopogon citratus*; 7- *Baccharis genistelloides*; 8- *Plectranthus barbatus*; P: padrão de digalactosildiacilglicerol.

Na análise cromatográfica, foi possível, a partir do valor de R_f observado para o padrão de DGDG e de dados da literatura (LEPAGE et al., 1964; KATES, 1986), sugerir a presença também de outros tipos de glicolipídios. Os rendimentos do extrato lipídico, bem como a interpretação da análise cromatográfica, estão resumidos na tabela 7.

Pode-se observar que todos os extratos investigados apresentam grande conteúdo glicolípídico, porém com algumas diferenças quali- quantitativas.

Tabela 7: Rendimento dos extratos brutos das espécies medicinais testadas e glicolípídios detectados nos mesmos (+ a ++++ indica a intensidade visual da reação ao orcinol-sulfúrico).

Número	Espécie	Rend.	MGDG	DGDG	TGDG	TeGDG	SQDG
1	<i>Maytenus ilicifolia</i>	6,3	+	+	+	+	+
2	<i>Sorocea bonplandii</i>	5,2	+	+	+	+	+
3	<i>Zollernia ilicifolia</i>	5,6	+	+++	+	+	+
4	<i>Bauhinia forficata</i>	2,7	+	+	+	+	+
5	<i>Lippia alba</i>	11,3	++++	++++	++++	+	+++
6	<i>Cymbopogon citratus</i>	5,6	++++	++++	++++	++	++++
7	<i>Baccharis genistelloides</i>	9,1	+	+	+++	+++	+
8	<i>Plectranthus barbatus</i>	1,1	+	++++	++	+	+

Na avaliação do rendimento dos extratos brutos (EB) obtidos, pode-se observar que houve diferenças de rendimento de até 10 vezes. Assim, o extrato de *Lippia alba* apresentou um rendimento de 11,3 % (g /100 g planta), enquanto para *P. barbatus* o rendimento foi de 1,1 %. Outro ponto observado é que o conteúdo glicolípídico não teve relação com o rendimento: plantas que obtiveram EB com alto rendimento não necessariamente foram aquelas que apresentaram maior concentração de glicolípídios individuais.

Em relação ao conteúdo glicolipídico, pode-se observar que de modo geral os resultados obtidos estão de acordo com o descrito por KATES (1986) para tecidos fotossintéticos, onde MGDG, DGDG são encontrados em maior concentração. Com exceção dos extratos de *Baccharis genistelloides*, *Maytenus ilicifolia* e das espécies adulterantes desta última (*S. bonplandii* e *Z. ilicifolia*), todos os demais apresentaram grandes concentrações de DGDG e TGDG. Destaca-se ainda, a alta concentração de glicolipídios em Rf compatível com TGDG nos extratos de *Bauhinia forficata*, *Lippia alba* e *C. citratus*.

Para análise cromatográfica dos extratos obtidos, o eluente utilizado foi CHCl₃/MeOH/H₂O (LEPAGE et al., 1964), comumente utilizado para análise de glicolipídios neutros. Neste sistema eluente, os valores de Rf de glicolipídios já estão bem documentados na literatura. Além disso, neste sistema há uma boa separação dos compostos e dos pigmentos mais apolares que migram no frente do solvente. Para que pudesse ser feita a comparação do conteúdo glicolipídico presente em cada EB, os extratos foram concentrados e ressolubilizados em volume definido de CHCl₃/MeOH 2:1. Assim, a concentração de todos os extratos foi aproximadamente 5,3 µg/µL, sendo aplicados 20 µL de cada amostra.

Lippia alba e *Cymbopogon citratus* foram as espécies que apresentaram maior rendimento do EB, além de ter o maior conteúdo glicolipídico individual. Assim, os resultados obtidos apontam que estas espécies seriam as mais promissoras para uma investigação mais avançada do ponto de vista químico em relação aos seus conteúdos glicolipídicos.

As amostras comerciais utilizadas na triagem de glicolipídios em chás foram processadas e analisadas da mesma maneira como para as plantas medicinais. Assim, após a maceração, os extratos obtidos foram evaporados e seus rendimentos

calculados. Novamente, observou-se uma grande variação no perfil de glicolipídios e no rendimento dos EB (Tabela 8), tal como foi observado para amostras de plantas.

Cabe também destacar que houveram diferenças significativas no perfil cromatográfico e rendimento de glicolipídios entre as amostras de plantas medicinais *in natura* e amostras comerciais (chás) para a mesma (suposta) espécie (Tabela 9). Mesmo considerando que não se possa garantir a identidade botânica das amostras comerciais aqui testadas, seriam esperadas diferenças na composição química dependendo do local e época de coleta, bem como devido a diferenças no processo de secagem, que para as plantas *in natura* foi à temperatura ambiente por 24 horas. Em princípio, para todas as amostras *in natura*, o rendimento obtido foi menor, o que se poderia explicar, pelo menos em parte, devido ao processo mais drástico de secagem a que amostras comerciais costumam ser submetidas. A diferença no perfil cromatográfico poderia também ser devido à ação enzimática, que poderia estar degradando os glicolipídios nas amostras comerciais.

Tabela 8: Rendimento dos extratos brutos obtidos a partir de amostras comerciais e glicolipídios detectados nos mesmos (+ a ++++ indica a intensidade de reação ao orcinol-sulfúrico).

Espécie (conforme indicação da embalagem)	Rend. g/100 g planta	MGDG	DGDG	TGDG	TeGDG	SQDG
<i>Maytenus ilicifolia</i>	31,07	+	+	+	++++	+
<i>Mentha piperita</i>	8,82	++	+	+	+	+
<i>Peumus boldus</i>	27,31	+	++++	+	+	+
<i>Cymbopogon citratu</i>	16,47	+	++++	+	+	++
<i>Matricaria recutita</i>	30,05	+	+	+	++	+
<i>Baccharis genistelloides</i>	23,14	+++	++++	++++	+++	++
<i>Pimpinella anisum</i>	24,76	+	+	+	+	
<i>Bauhinia forficata</i>	38,78	+	+	+	+++	++
<i>Cynara scolymus</i>	Nd*	+	+	+	+	+
<i>Achyrocline satureioides</i>	20,91	+	+	+	+	+
<i>Malva sylvestris</i>	5,12	+	+	+	+	+

*Nd: Não foi possível calcular o rendimento para essa amostra.

Tabela 9: Comparação entre rendimento e conteúdo lipídico de amostras *in natura* (IN) e comerciais (C) da mesma espécie (+ a ++++ indica a intensidade de reação ao orcinol-sulfúrico).

Amostra	Rend.	MGDG	DGDG	TGDG	TeGDG	SQDG
<i>M. ilicifolia</i> IN	6,3	+	+	+	+	+
<i>M. ilicifolia</i> C	31,07	+	+	+	++++	
<i>Baccharis</i> IN	9,1	+	+	+	+++	+
<i>Baccharis</i> C	23,14	+++	++++	++++	+++	
<i>B. forficata</i> IN	2,7	+	++++	++++	+++	+
<i>B. forficata</i> C	38,78	+	+	+	+++	
<i>C. citratus</i> IN	5,6	++++	++++	++++	+	++++
<i>C. citratus</i> C	16,47	+	++++	+	+	

De acordo com a tabela 9, pode-se observar grande variação no conteúdo glicolipídico individual. As amostras referidas como *Baccharis genistelloides* e *Cymbopogon citratus* foram as espécies que apresentaram maior composição glicolipídica. Espécies como *M. recutita* e *A. satureioides*, onde se utilizaram as inflorescências para o teste, obtiveram um bom rendimento de EB, sendo em alguns casos, superior àqueles observados para plantas onde se utilizaram folhas. O mesmo aconteceu com *Pimpinella anisum*, onde as partes utilizadas foram os frutos. Isso pode ser explicado pelo fato de que os glicolipídios, principal classe de lipídios presentes na membrana tilacóide dos cloroplastos, serem encontrados não apenas em tecidos fotossintéticos como as folhas, mais também naqueles não-fotossintéticos, como sementes, troncos, frutos, vagem (leguminosas), entre outros (KOJIMA et al., 1991).

6.2- Ensaios de extração

Vários procedimentos de extração de glicolipídios têm sido descritos para animais (LÓPEZ-MARÍN et al., 2002), vegetais (RASTRELLI et al., 1997;

MURAKAMI et al., 2003), bactérias (PASCIAK et al., 2002), algas (SON, 1990; RHO et al., 1997), fungos (BATRAKOV et al., 2003) e líquens (SASSAKI et al, 2001). Em geral, as variações entre as metodologias estão relacionadas com o tipo e a proporção de solventes empregados, e as técnicas de preparo dos extratos (KATES, 1986).

Segundo KATES (1970), durante o procedimento de extração, principalmente em se tratando de plantas, um dos fatores que deve ser considerado é a perda do conteúdo lipídico devido à ação de enzimas de degradação. Por isso, deve-se ter um cuidado especial para evitar a ação degradativa de enzimas como as fosfolipases e galactolipases, bem como minimizar a peroxidação dos ácidos graxos poliinsaturados. Em geral, o uso de misturas contendo solventes alcoólicos é suficiente para inativar muitas fosfolipases e lipases, porém, para aquelas enzimas mais estáveis, recomenda-se à imersão da planta em água fervente por 1-2 minutos.

Para a extração do conteúdo glicolipídico do *Cymbopogon citratus*, optou-se pela realização de três métodos (Figura 11): A) inativação enzimática (IE); B) planta seca por 24 horas em temperatura ambiente (TA); C)- planta fresca com diferentes tempos de maceração (F1, F2 e F5 conforme o número de dias).

Nos diferentes procedimentos, manteve-se como mistura extratora $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 2:1 (v/v). Essa mistura de solventes também foi utilizada para extração de glicolipídios de microalgas da espécie *Gymnodinium* (PARRISH et al., 1998); líquens, como *Dictyonema glabratum* (SASSAKI et al, 2001); sementes de *Nigella sativa* L., *Coriandrum sativum* L., *Guizotia absyssinica* Cass (RAMADAN & MÔRSEL, 2003b), bactérias. (KATES, 1986), entre outros.

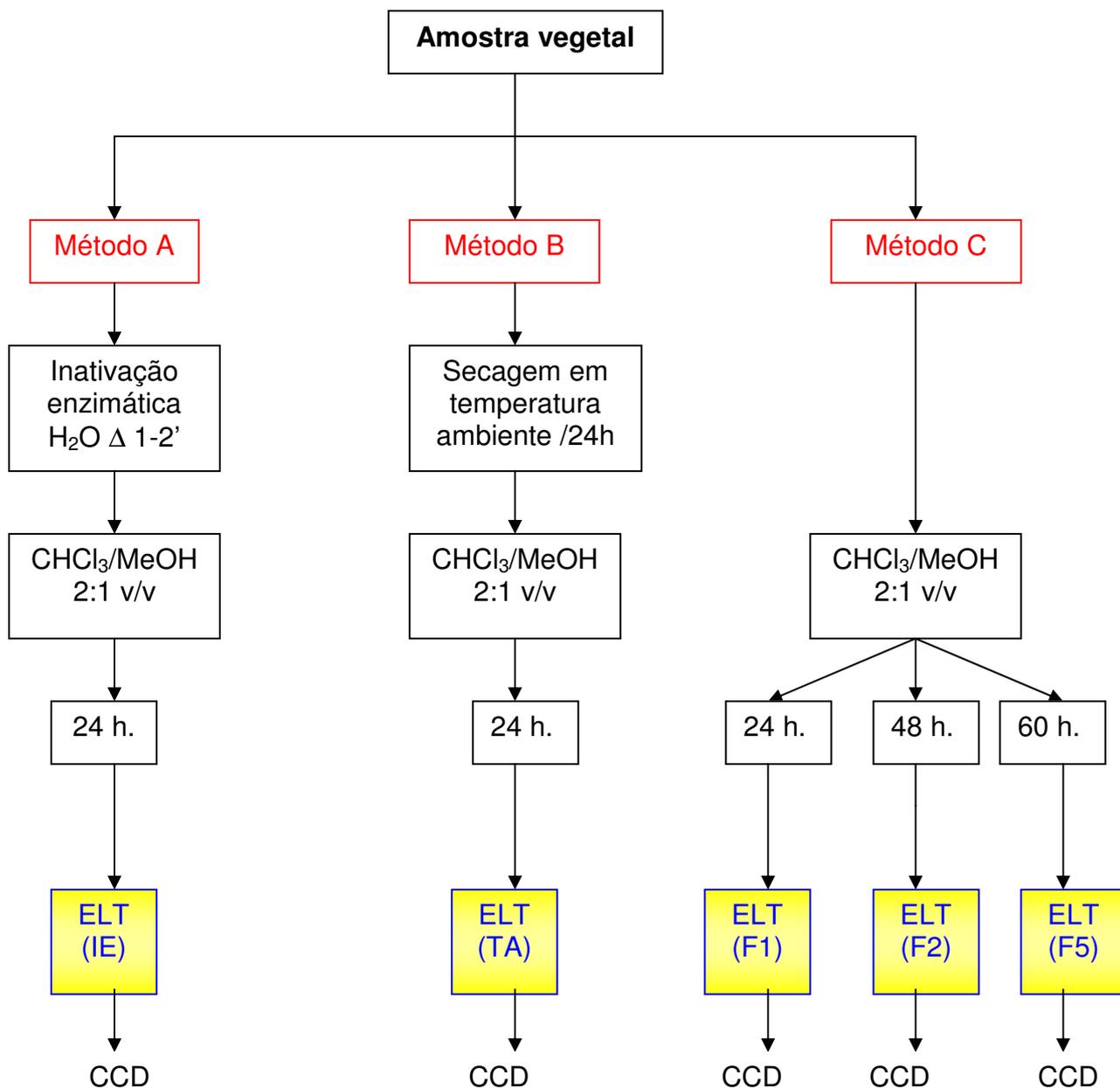


Figura 10: Fluxograma de obtenção dos extratos brutos (EB) de *Cymbopogon citratus*.

Os extratos brutos obtidos foram analisados por CCD, utilizando $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 65:25:4 (v/v/v) como eluente e anisaldeído- e orcinol-sulfúrico como reveladores. Com exceção do extrato obtido através da inativação enzimática, o perfil cromatográfico dos extratos foi muito semelhante. Nestes extratos, cinco substâncias tiveram reação orcinol positivas, com R_f de 0,61, 0,52, 0,44, 0,29 e 0,15.

De acordo com os resultados destes testes, a obtenção do extrato com a planta previamente seca em temperatura ambiente por 24 horas (TA) foi o método que apresentou melhor rendimento (Tabela 10).

Tabela 10: Rendimento dos extratos brutos (EB) de *Cymbopogon citratus* obtidos por diferentes metodologias.

Nome	Peso EB (g)	Rendimento g/100 g planta
IE	0,168	1,67
TA	0,879	8,71
F1	0,685	6,70
F2	0,606	6,02
F5	0,441	4,35

Uma das vantagens de utilizar a planta previamente seca para a preparação do extrato, é que a secagem previne possíveis reações de hidrólise, oxidação e crescimento microbiano (FALKENBERG et al., 1999). No entanto, deve-se evitar o uso de altas temperaturas, devido a possíveis perdas ou alterações no conteúdo químico das substâncias (HARBORNE, 1984).

6.3- Procedimentos de isolamento

Diversos procedimentos têm sido usados para o isolamento de glicolipídios a partir de extratos bruto. De forma geral, esses procedimentos incluem a precipitação e/ou partição em solventes com diferentes polaridades, fracionamento em colunas cromatográficas (ácido silícico, DEAE celulose, fase reversa), cromatografia em camada delgada preparativa (KATES, 1986), cromatografia líquida de alta eficiência-CLAE (DEMANDRE et al., 1985), entre outros.

A extração de folhas de *C. citratus* com vista ao isolamento de glicolipídios forneceu 20,5 g de extrato bruto, um rendimento de aproximadamente de 2,5 %. Uma alíquota do extrato (cerca de 11 g) foi aplicada na coluna I, utilizando misturas de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ em proporções que variaram de 9:1 a 7:3 (Figura 12).

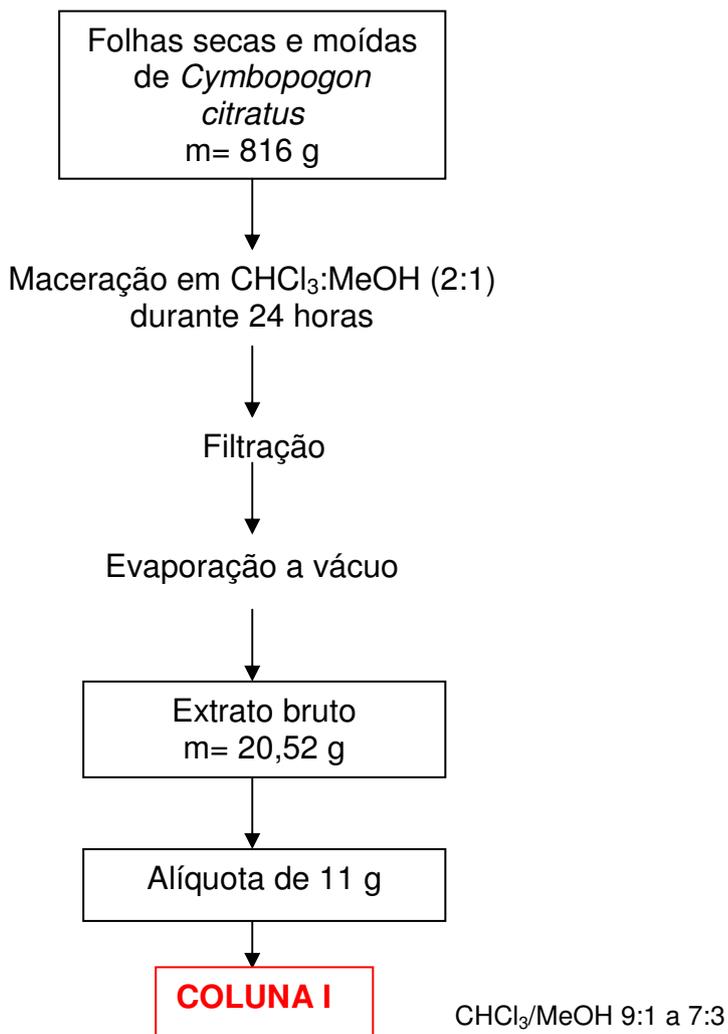


Figura 11: Fluxograma dos procedimentos iniciais da preparação do extrato e do fracionamento.

As frações iniciais da coluna I eram ricas em pigmentos apolares no fronte do solvente, devido à presença de clorofila e carotenóides. A partir da fração doze (F_{12}), manchas orcinol positivas começaram a eluir, indicando a presença de glicolipídios.

As frações eluídas contendo componentes orcinol positivos com mesmo Rf foram reunidas, dando origem a oito grupos de frações (Tabela 11).

Tabela 11: Frações agrupadas da Coluna I contendo compostos glicolipídicos e seus respectivos rendimentos e Rfs.

Número das frações	Rendimento (g)	Rf CHCl₃/MeOH 9:1
F ₁₂₋₁₇	1,55	0,92
F ₁₈₋₂₀	0,268	0,63
F ₂₁₋₂₈	0,220	0,51
F ₃₇₋₆₀	0,254	0,41
F ₆₁₋₇₁	0,034	0,41
F ₈₉₋₁₀₀	0,079	0,29
F ₁₀₈₋₁₁₆	0,075	0,17
F ₁₁₆₋₁₄₂	0,142	0,11

Fracionamento inicial de extratos bruto utilizando cromatografia em coluna de sílica gel e sistemas de eluentes semelhantes a este foram utilizados para o isolamento de glicolipídios do líquen *Ramalina celastri* (MACHADO et al., 1997).

As frações oriundas da Coluna I foram recromatografadas em colunas de sílica gel cujos sistemas de eluentes consistiram basicamente em misturas de CHCl₃/MeOH e CHCl₃/EtOH com diferentes proporções destes solventes.

Muitos desses procedimentos de purificação não obtiveram êxito. Algumas frações, cujas análises preliminares por CCD apresentaram-se como uma única mancha orcinol positivo, após passar por uma ou sucessivas colunas e ao serem cromatografadas em outros sistemas de eluentes revelaram desdobramento das

manchas, muitas vezes dando origem a várias manchas orcinol positivas. Com isso, tornou-se praticamente inviável dar continuidade ao processo de purificação das várias frações contendo glicolipídios (Figura 13).

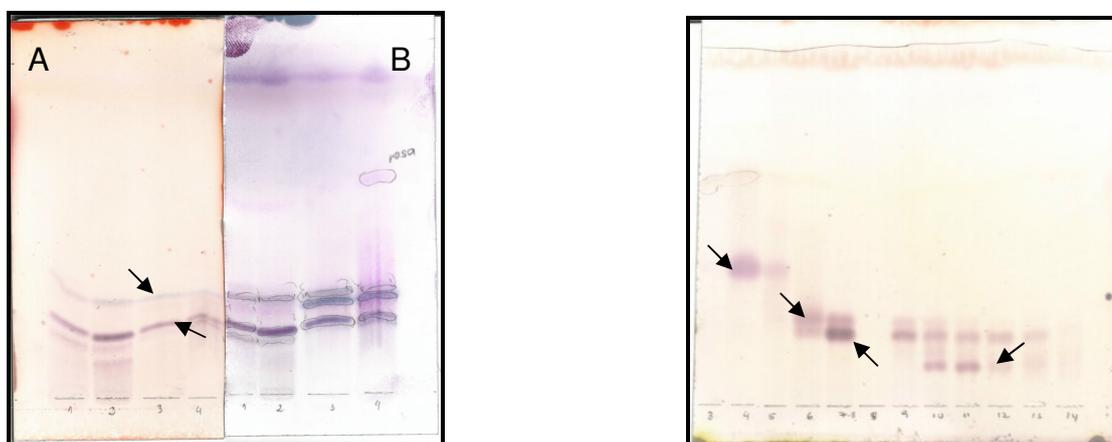


Figura 12: CCD que demonstra o desdobramento de manchas de uma fração da Coluna V ao passar por uma nova coluna cromatográfica. A lâmina da esquerda, as frações são: 1- C_VF_{23-36} ; 2- C_VF_{37-73} , 3- C_VF_{74-85} e 4- C_VF_{86-108} , como eluente utilizou-se $CHCl_3/EtOH$ 94:6 e A- orcinol-sulfúrico e B- anisaldeído-sulfúrico como reveladores. A lâmina da esquerda a fração cromatografada foi a fração C_VF_{74-85} após passar por uma cromatografia em coluna. O eluente utilizado foi $CHCl_3/MeOH/Acetona/\text{Ácido acético}$ 73:1,5:25:0,5 e revelada com orcinol-sulfúrico.

6.3.1- Fracionamento visando a obtenção de G_1

Após a realização e monitoramento cromatográfico da Coluna I, verificou-se que um dos glicolipídios de interesse (denominado G_1) apresentava-se na fração com maior rendimento, a fração $C_I F_{12-17}$ (1,55 g). Para isolamento de G_1 , foi realizado uma cromatografia em coluna de gel de sílica, utilizando a mistura de $CHCl_3/MeOH$ 97:3 como eluente (Coluna II). Na análise cromatográfica das frações, utilizando o mesmo sistema de eluentes da coluna, observou-se que a fração inicial continha dois glicolipídios, e não apenas um, conforme foi observado na CCD com o sistema de eluente da Coluna I, $CHCl_3/MeOH$ (9:1). Um deste apresentava um valor de R_f de 0,34 e outro, R_f de aproximadamente 0,17. Assim, foi possível separar em duas frações distintas, $C_{II} F_{49-56}$ (0,477 g) e $C_{II} F_{60-68}$ (0,110 g), as quais continham G_1 e G_1' ,

respectivamente. A partir daí, o fracionamento desses glicolípídios foi realizado separadamente.

Como a fração contendo G_1 apresentou um rendimento superior, optou-se pela sua purificação. Para tanto, a fração $C_{II}F_{49-56}$ foi cromatografada (Coluna III), obtendo-se uma fração ($C_{III}F_{7-15}$) que além de apresentar uma mancha principal correspondente a G_1 , apresentava também outras substâncias de natureza mais apolar. Assim, realizou-se uma nova coluna contendo $CHCl_3/MeOH$ 98:2 como eluente, na tentativa de uma melhor separação de G_1 e das outras substâncias. Obteve-se uma fração enriquecida em G_1 (16,2 mg) que, no entanto, ainda não se apresentava suficientemente pura para obtenção de espectros. Necessidade de maiores quantidades da substância para continuidade do trabalho de isolamento levaram a opção pelo fracionamento de $C_{II}F_{60-68}$.

A fração $C_{II}F_{60-68}$ foi cromatografada na coluna IV, utilizando como eluente $CHCl_3/MeOH$ 96:4, obtendo-se a fração $C_{IV}F_{33-48}$, que foi reunida a fração $C_I F_{18-20}$ (da Coluna I), já que continham o mesmo glicolípídio (R_f 0,32). A fração reunida ($C_{IV}F_{33-48} + C_I F_{18-20}$) foi novamente cromatografada, utilizando $CHCl_3/EtOH$ 94:6 como eluente. A partir desta (Coluna V), obteve-se a fração $C_V F_{23-73}$ que se apresentava praticamente pura e foi recromatografada (Coluna XII) utilizando o sistema de eluente $CHCl_3/MeOH/Acetona/Ac.Acético$ 73:1,5:25:0,5, conforme descrito por XUE e colaboradores (2002). A partir desta última coluna, obteve-se a fração $C_{XII}F_{6-8}$, que ao ser analisada por CCD no mesmo sistema de eluente utilizado na coluna, apresentava G_1' como única mancha orcinol positiva com valor de R_f igual a 0,28. O esquema de purificação de G_1' é demonstrado resumidamente na Figura 14.

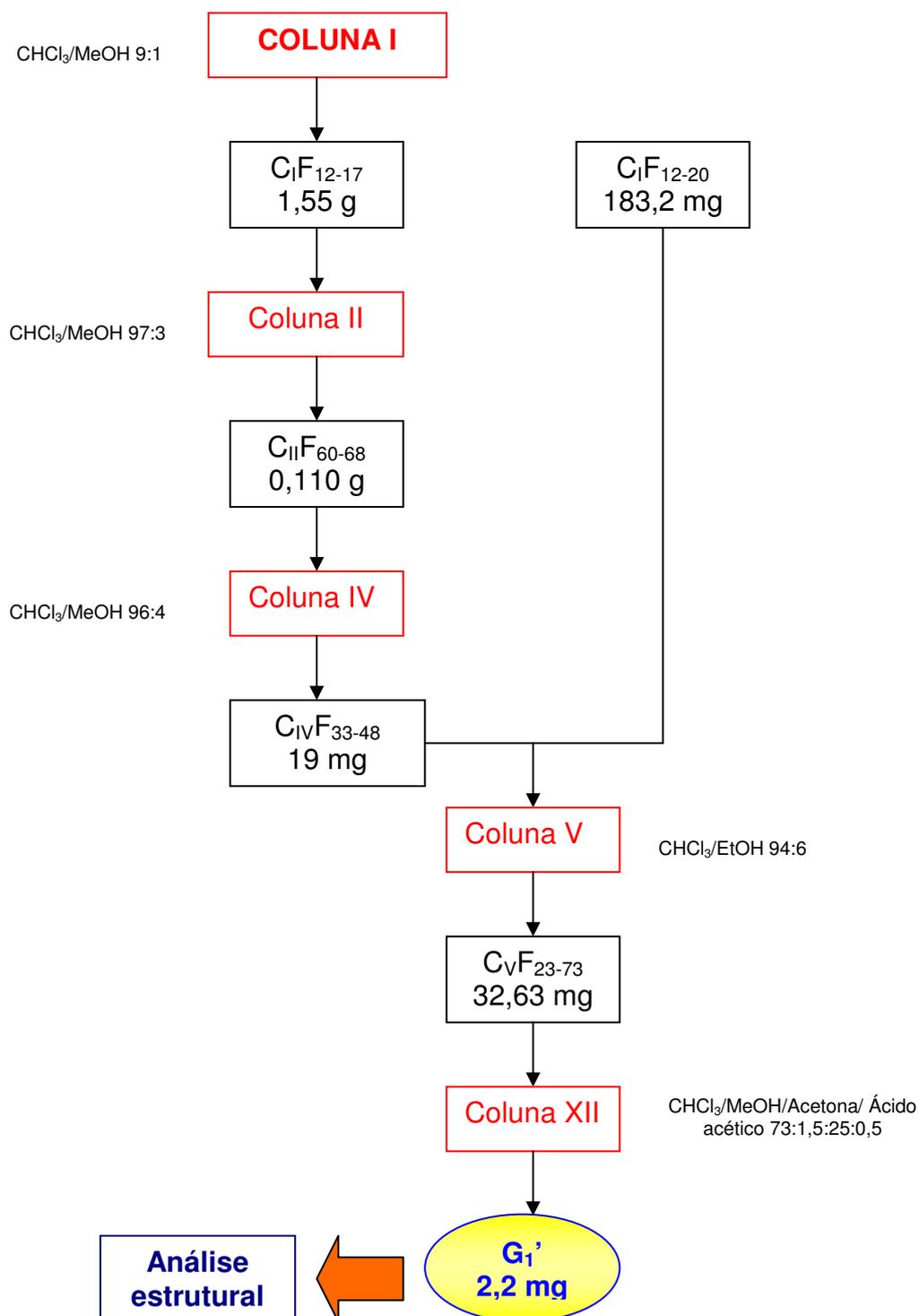


Figura 13: Fluxograma de isolamento do glicolípido 1 (G_1')

Ressalta-se, porém, que pela análise do G_1' utilizando sistema de eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1 (v/v), observou-se impurezas e/ou produtos de degradação e/ou diferenças no conteúdo de ácidos graxos, os quais estariam sendo representados pelos valores de R_f bastante próximos de G_1' (Figura 15). O rendimento obtido nesta

fração foi muito baixo, aproximadamente 2,2 mg, inviabilizando uma nova purificação.

A amostra de G₁' foi encaminhada para análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) no Chengdu Institute of Biology (China) pelo Prof. Dr. Guolin Zhang, sendo que até o momento os espectros ainda não foram recebidos.

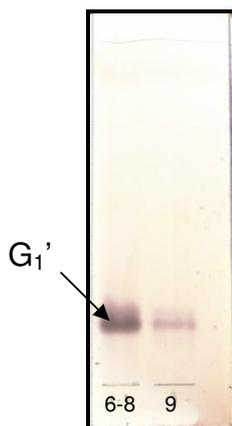


Figura 14: Cromatografia em camada delgada de G₁' isolado a partir da Coluna XII. Eluente: CHCl₃/MeOH 9:1 (v/v); revelador: orcinol-sulfúrico

A dificuldade de se purificar amostras de glicolipídios é relatada por O'BRIEN & BENSON (1964) no isolamento de glicosildiacylgliceróis a partir de folhas de alfafa. MACHADO (1996), na purificação de glicolipídios de extratos de líquens, observou que a fração contendo monogalactosildiacylglicerol apresentava-se freqüentemente como uma mistura de duas substâncias com valores de R_fs bastante próximos, além da existência de pigmentos associados. JENKINS e colaboradores (1999), isolando glicolipídios a partir de um protista marinho, chegaram a uma mistura de difícil separação de dois glicolipídios homólogos, os quais poderiam ser diferenciados através da espectrometria de massas.

Outro fator importante na purificação de glicolipídios é a dificuldade de obtenção a partir de fontes naturais, com uma composição homogênea de ácidos graxos. A composição de ácidos graxos apresenta diferenças no comprimento das

cadeias e no seu grau de insaturação, os quais são dependentes da origem, do ambiente e das condições de crescimento, bem como, do procedimento de extração (MINDEN et al., 2002).

6.3.2- Fracionamento visando à obtenção de G₂

Na análise por CCD com sistema de eluente CHCl₃/MeOH 9:1, a fração C_IF₃₇₋₆₀ (Coluna I) (0,234 g) apresentou uma mancha orcinol positiva de forte intensidade com valor de R_f igual a 0,30. Nesta mesma análise por CCD foram observadas também outras três manchas secundárias orcinol negativas.

Após separação por cromatografia em coluna com o eluente CHCl₃/MeOH 86:14, reuniram-se frações contendo a substância de interesse, resultando na fração C_{VIII}F₁₉₋₃₀. Esta última foi lavada com metanol para a retirada de impurezas mais polares. Através da análise por CCD com CHCl₃/MeOH/H₂O 65:25:4, a fração apresentava-se como mancha única em R_f=0,58, com reação orcinol positiva, sendo codificada como G₂.

A mesma substância também foi obtida a partir de um precipitado formado na fração C_IF₆₁₋₇₁ (Coluna I) mantida sob refrigeração (item 5.5.2.b). Reunidos, estes glicolípídios apresentaram um rendimento de 2,9 mg. O fluxograma de obtenção da substância G₂ é demonstrado na Figura 16.

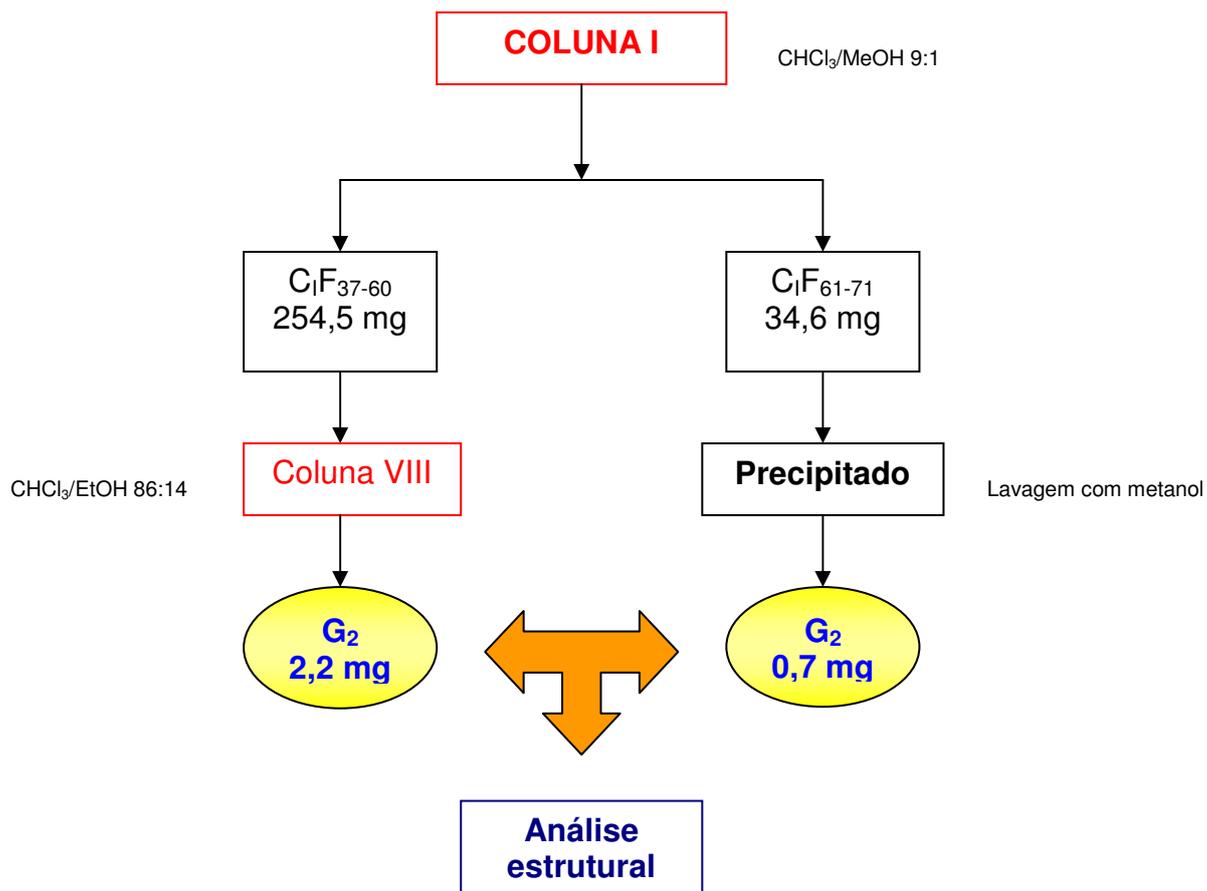


Figura 15: Fluxograma de isolamento do glicolípido 2 (G₂)

Para assegurar que se tratavam dos mesmos glicolípídios isolados, o composto obtido a partir da fração C₁F₃₇₋₆₀ e o precipitado foram novamente cromatografados nos sistemas de eluentes CHCl₃/MeOH 9:1(v/v) e CHCl₃/MeOH/H₂O 65:25:4 (v/v/v), revelando-se com anisaldeído- e orcinol-sulfúrico. Utilizaram-se padrões de CMH e DGDG para comparação dos valores de R_f (Figura 17).

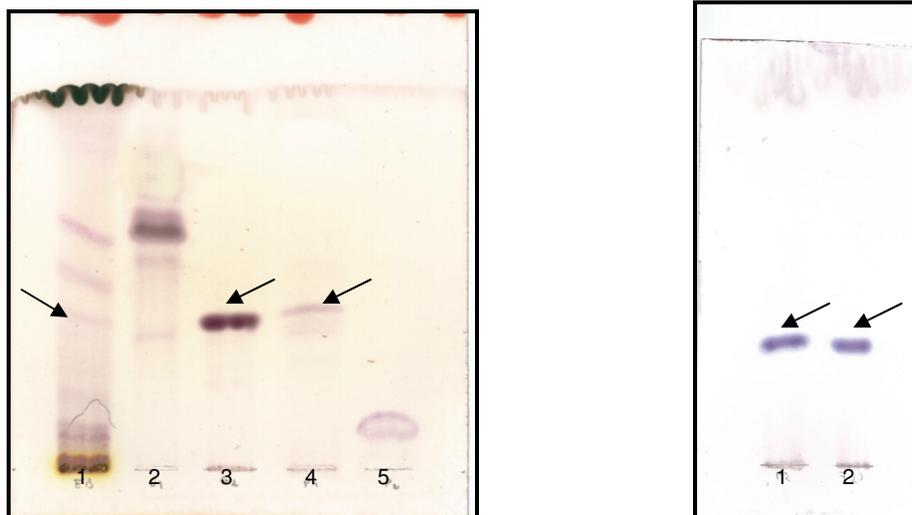


Figura 16: Cromatografia em camada delgada de G_2 . Na cromatografia da esquerda, 1- EB; 2- G_1 ; 3- G_2 ; 4- Padrão de CMH; 5- Padrão de DGDG. Na cromatografia da direita, 1- G_2 (C_6F_{137-60}) e 2- G_2 (precipitado). Em ambas, utilizou-se como eluente $CHCl_3/MeOH$ 9:1(v/v), sendo a lâmina da esquerda revelada com orcinol-sulfúrico e a da direita com anisaldeído-sulfúrico.

Conforme se observa na Figura 17, em $CHCl_3/MeOH$ 9:1 os valores de Rf encontrados para ambos foram iguais a 0,40. No entanto, na análise por CCD com $CHCl_3/MeOH/H_2O$ 65:25:4, o Rf de G_2 foi 0,64 enquanto o Rf do padrão de DGDG foi 0,49. De acordo com a literatura (LEPAGE et al., 1964), o Rf esperado para DGDG em $CHCl_3/MeOH/H_2O$ 65:25:4 seria 0,62 (próximo ao valor de Rf encontrado para G_2).

A diferença do Rf para DGDG em relação ao valor relatado na literatura deve-se provavelmente a diferenças de temperatura e umidade ambientais, que podem interferir significativamente no comportamento cromatográfico das substâncias, levando à não reprodução de valores de Rf.

Porém, o valor de Rf de G_2 foi bem próximo ao do padrão de CMH, respectivamente 0,62 e 0,63 na CCD em $CHCl_3/MeOH/H_2O$ 65:25:4, enquanto na análise em $CHCl_3/MeOH$ 9:1 os Rf foram 0,40 e 0,42. De acordo com FUJINO & OHNISHI (1979), o Rf esperado para CMH em $CHCl_3/MeOH/H_2O$ 65:25:4 seria 0,66, muito próximo daquele encontrado para o G_2 . A reprodução do exato valor de Rf

exato conforme descrito na literatura torna-se bastante difícil de se obter, tendo em consideração muitos fatores como características do adsorvente utilizado, qualidade e quantidade da fase móvel, saturação da cuba, temperatura e umidade, volume e concentração da amostra aplicada (COLLINS & BRAGA, 1988). Assim, deve-se ter precaução ao se comparar valores de Rf, utilizando sempre que possível, padrões adequados e uma análise comparativa nas mesmas condições experimentais (Tabela 12).

Tabela 12: Comparação dos valores de Rf das amostras de G₂ (fração C₁F₃₇₋₆₀) e G₂ (precipitado da fração C₁F₆₁₋₇₁) com os valores de Rf de padrões de CMH e DGDG.

Nome	Valores de Rf		Coloração	
	CHCl ₃ /MeOH 9:1	CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O 65:25:	Anisaldeído- sulfúrico	Orcinol- sulfúrico
G ₂	0,40	0,62	Roxo escuro	Roxo
G ₂ "	0,40	0,62	Roxo escuro	Roxo
CMH	0,42	0,63	Roxo escuro	Roxo
DGDG	0,14	0,49	Roxo escuro	Roxo

Assim, pela proximidade nos valores de Rf entre G₂ e o padrão CMH, presumi-se se tratar de uma estrutura monohexosilceramida, mas possivelmente com diferenças no comprimento da cadeia de ácido graxo em relação ao padrão.

A amostra G₂ foi encaminhada para análises de RMN no Chengdu Institute of Biology pelo Prof. Dr. Guolin Zhang, sendo que até o momento os espectros ainda não foram recebidos.

6.3.3- Obtenção de outros compostos

Ao analisar as frações iniciais coletadas da Coluna I (Item 5.5), observou-se que as mesmas apresentavam um odor de limão, característico da planta. Esse odor

é principalmente associado à presença de citral, componente majoritário do óleo essencial encontrado no capim-limão (MATOS, 1998). Assim, essas frações foram analisadas por CCD com tolueno/AcOEt 93:7 (v/v) e vanilina-sulfúrica conforme descrito por WAGNER e colaboradores (1995) para componentes do óleo essencial.

A partir desta análise cromatográfica, observou-se que a fração $C_{10}F_{10}$ continha 4 substâncias, com valores de R_f de 0,91, 0,77, 0,53 e 0,45 (Figura 18). Ao ressuspender a fração em $CHCl_3/MeOH$ 2:1, observou-se que uma parte da fração era insolúvel nesta mistura de solventes. Essa alíquota insolúvel foi recolhida e lavada três vezes com metanol, sendo denominada $C_{10}F_{10R}$ (Resíduo). Este por sua vez, foi cromatografado no sistema descrito por WAGNER e colaboradores (1995), apresentando-se cromatograficamente puro como uma mancha azul acinzentada e valor de R_f igual a 0,43.

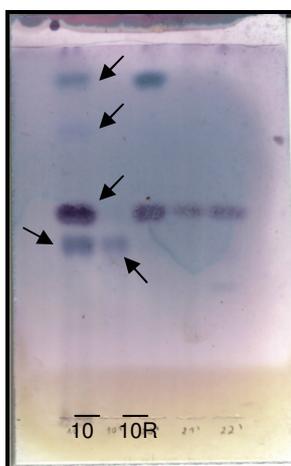


Figura 17: Cromatografia em camada delgada da fração $C_{10}F_{10}$ (10) e $C_{10}F_{10R}$ (10R). Eluente: tolueno/AcOEt 93:7, revelador: anisaldeído-sulfúrico. As setas indicam as substâncias presentes na fração $C_{10}F_{10}$ (esquerda) e no resíduo insolúvel ($C_{10}F_{10R}$).

A parte solúvel da fração $C_{10}F_{10}$ foi cromatografada em coluna (Coluna X), utilizando como eluente uma mistura de tolueno/AcOEt (95:5). As frações coletadas foram analisadas por CCD no mesmo sistema de eluente da coluna e reveladas com vanilina-sulfúrica. Assim, pode-se observar que as frações $C_{10}F_5$, $C_{10}F_8$ e $C_{10}F_{13}$

apresentavam mais concentradas, respectivamente, das substâncias com valores de R_f iguais a 0,60, 0,45 e 0,28 (Figura 19).

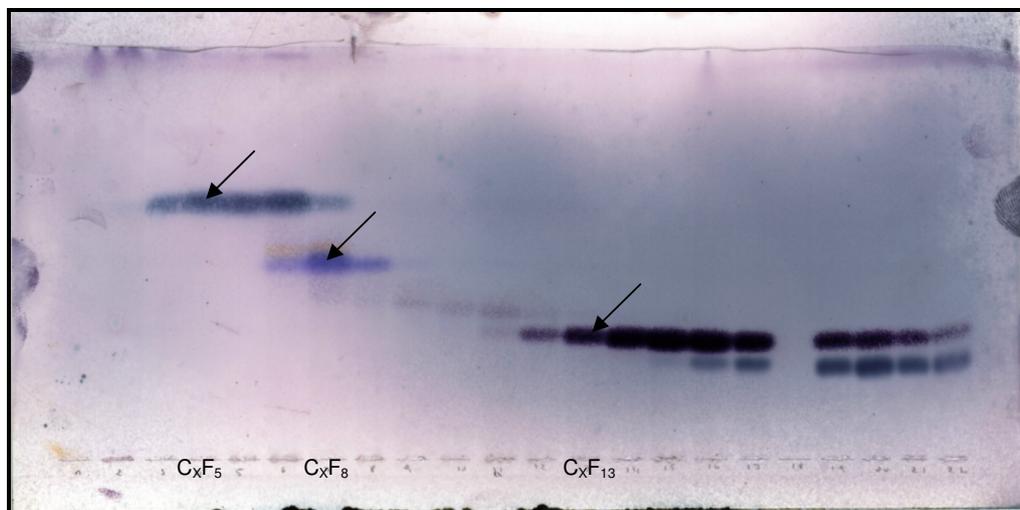


Figura 18: Cromatografia em camada delgada das frações obtidas a partir da Coluna X. As setas indicam as frações onde as substâncias foram obtidas de forma purificada (C_xF_5 , C_xF_8 e C_xF_{13} , respectivamente). Eluente: tolueno/AcOEt (95:5), revelador: anisaldeído-sulfúrico.

Além destes compostos isolados da fração $C_I F_{10}$, obteve-se a partir da Coluna II (isolamento de G_1') a fração $C_{II} F_{42}$ (Figura 20). Ao ser analisada por CCD em tolueno/AcOEt 93:7, essa fração apresentava elevada concentração de uma substância com valor de R_f igual à 0,28. O fluxograma de isolamento dos compostos terpênicos é mostrado na Figura 21.

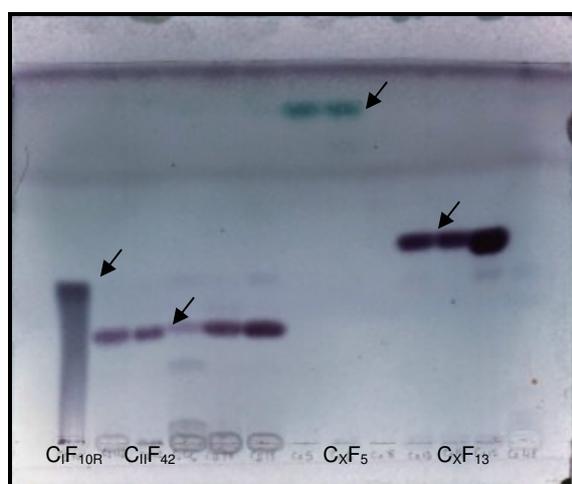


Figura 19: Cromatografia em camada delgada dos componentes purificados, $C_I F_{10R}$, $C_{II} F_{42}$, $C_x F_5$ e $C_x F_{13}$, respectivamente indicados pelas setas. Eluente: tolueno/AcOEt (93:7), revelador: anisaldeído-sulfúrico.

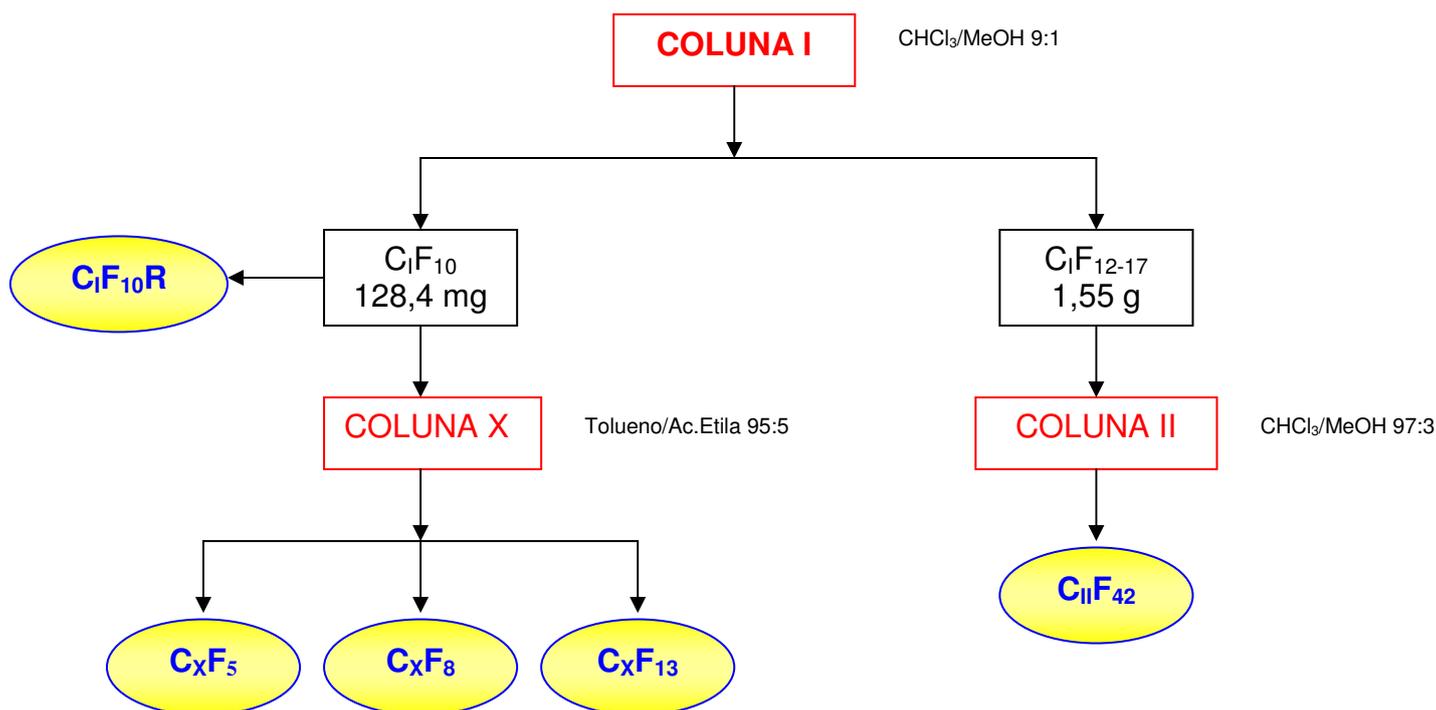


Figura 20: Fluxograma de isolamento dos componentes terpênicos.

Devido ao alto ponto de ebulição do tolueno utilizado na coluna para purificação destas amostras, não foi possível a eliminação total do solvente, o que impossibilitou a determinação do rendimento dos compostos purificados.

As amostras foram cromatografadas em diferentes sistemas de eluentes (dois deles estão sendo representados na Figura 22), na tentativa de melhor caracterizar seus componentes. Diante da hipótese de que estas substâncias poderiam ser componentes do óleo essencial da planta e, como não se dispunha de padrões, optou-se por pela extração do óleo essencial de *C. citratus*, conforme descrito no item 5.7, para ser utilizado como padrão.

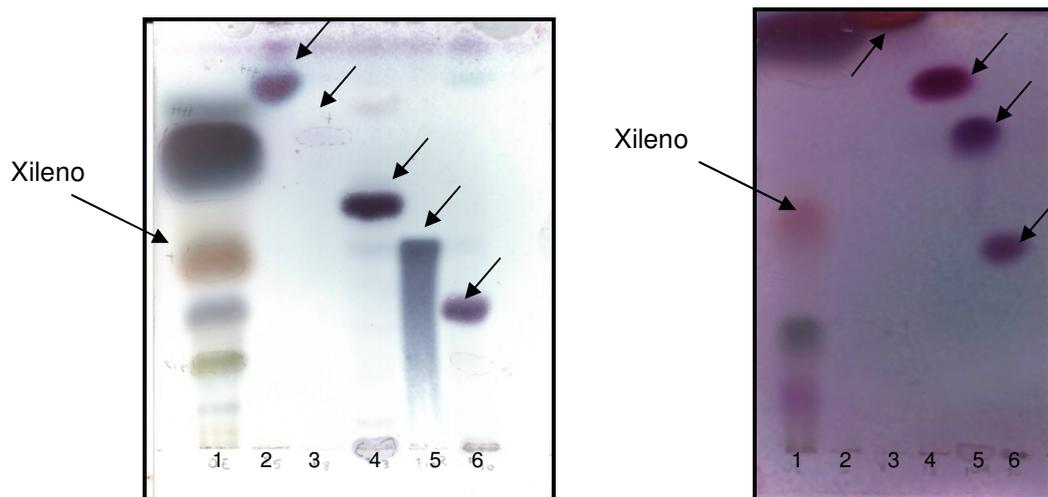


Figura 21: Cromatografia em camada delgada utilizando diferentes eluentes para análise dos componentes purificados. A placa da esquerda foi utilizado tolueno/AcOEt 93:7 revelada com vanilina-sulfúrica; a da direita o eluente utilizado foi CHCl_3 e anisaldeído-sulfúrico como revelador. 1- Óleo extraído da planta; 2- C_xF_5 ; 3- C_xF_8 ; 4- C_xF_{13} ; 5- C_IF_{10R} ; 6- $\text{C}_{II}\text{F}_{42}$, em ambas placas respectivamente.

Na comparação dos dados cromatográficos das amostras isoladas com o óleo extraído da planta, pode-se observar que elas não correspondiam aos componentes majoritários do óleo obtido. Segundo PACHALY (1999), o citral, componente majoritário do óleo, apresenta extinção da luz ultravioleta em 254 nm e, após revelação com anisaldeído-sulfúrico, fluorescência em UV_{365} . Através da análise cromatográfica do óleo essencial extraído da planta, pode-se perceber a presença de um componente majoritário, em $R_f=0,68$ (tolueno/AcOEt 93:7). Esta substância apresenta uma mancha de forte intensidade, apresentando extinção em UV_{254} , mas que após ser revelada com anisaldeído-sulfúrico, adquire coloração azul-acinzentada, mas não apresenta fluorescência em UV_{365} . Segundo STAHL & SCHILD (1981), o citral após revelação com anisaldeído sulfúrico apresenta fluorescência alaranjada em 365 nm. Como a lâmpada UV em 365 nm disponível no laboratório tem apresentado dificuldades em relação à visualização de algumas cores, não se pode descartar a possibilidade de que a mancha majoritária em R_f 0,68 corresponda ao citral.

A substância em $R_f=0,44$ (coloração marrom) corresponde ao xileno utilizado no procedimento de extração do óleo essencial.

O componente majoritário da amostra $C_{10}F_{10}$, a fração que deu origem aos compostos isolados, apresentava-se como uma mancha de cor roxa, em $R_f=0,52$ (tolueno/AcOEt 93:7), não apresentando extinção em UV_{254} . Assim, pode-se considerar que este composto não corresponde ao citral.

As substâncias $C_{10}F_5$ e $C_{10}F_8$ extinguem a fluorescência em UV_{254} , mas não apresentam fluorescência própria em UV_{365} . Os compostos $C_{10}F_{13}$ e $C_{10}F_{10R}$ não apresentaram nem extinção em UV_{254} , tampouco fluorescência em UV_{365} . Já a substância $C_{11}F_{42}$ apresentou extinção em UV_{254} e leve fluorescência alaranjada em UV_{365} . Desta forma, poder-se-ia dizer que a única substância compatível com o “comportamento cromatográfico no UV” do citral é a $C_{11}F_{42}$. Entretanto, na análise por CCD, esta amostra apresentou R_f diferente do R_f da substância majoritária do óleo obtido (Tabela 13).

Tabela 13: Valores de R_f para as substâncias purificadas utilizando dois sistemas de eluentes.

Fração	Valores de R_f		UV_{254}	UV_{365}^*
	Tolueno/AcOEt 93:7	$CHCl_3$ 2 vezes		
$C_{10}F_5$	0,87	0,98	++++	-
$C_{10}F_8$	0,59	**	+	-
$C_{10}F_{13}$	0,52	0,88	-	-
$C_{10}F_{10R}$	0,42	0,69	-	-
$C_{11}F_{42}$	0,30	0,43	-	++

* Após a placa ser revelada com anisaldeído-sulfúrico.

**Devido à baixa concentração na aplicação, não foi possível detectar a $C_{10}F_8$.

As amostras foram encaminhadas para análise por Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) no Instituto de Química da UFSC. Devido a presença do tolueno nas amostras dificultar a sua análise, já que para algumas amostras ocorria a sobreposição, foram obtidos espectros apenas para C_xF_5 e C_xF_8 .

O espectro CG/EM de C_xF_5 demonstrou que esta amostra consistia de uma mistura (Figura 23). Um dos componentes para os quais se obteve o espectro de massas apresentou pico base em m/z 71, sendo que a comparação com espectros disponíveis (Banco de Espectros do Instituto de Farmácia da Universidade de Bonn) (Figura 24) apontou certa semelhança com terpinen-4-ol e *p*-menten-ol, pela presença dos sinais em m/z 86 e 57.

Para a substância C_xF_8 , o espectro de massa apresentou um pico base em m/z 61, porém através da comparação com outros espectros, não foi possível identificar esta substância.

Figura 22: Espectro de massas da substância C_xF_5 .

Figura 23: Espectro de massas comparativo para a substância CXF5.

6.3.4- Isolamento das substâncias Cy1, Cy2, Cy3 e Cy4

Estas substâncias foram obtidas por fracionamento em colunas, conforme representado nas Figuras abaixo.

Cy1 apresenta-se como uma substância sólida, amorfa, de cor branca com um rendimento de 2,9 mg. Na análise por CCD em CHCl_3 aparece em $R_f=0,90$, sem fluorescência própria em 365 nm nem extinção de fluorescência em 254 nm, adquirindo cor roxa após revelação com vanilina-sulfúrica (Figura 25).

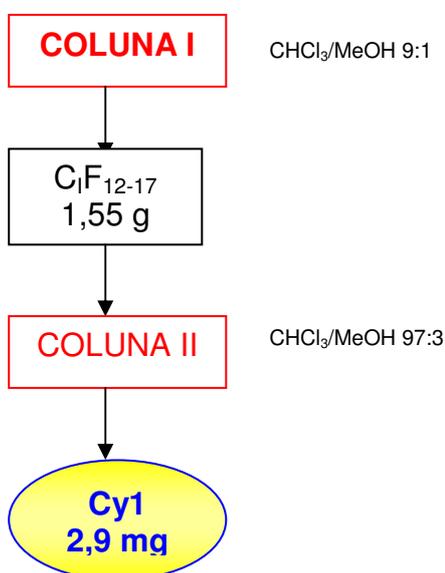


Figura 24: Fluxograma do isolamento da substância Cy1.

Cy2 apresenta-se como uma substância sólida, de cor branca, sem fluorescência própria em 365 nm nem extinção de fluorescência em 254 nm. Na análise por CCD em tolueno/AcOEt 93:7, a substância aparece em $R_f=0,40$, como uma mancha de cor cinza após revelação com vanilina-sulfúrica (Figura 26). O rendimento obtido foi de aproximadamente 3,5 mg.

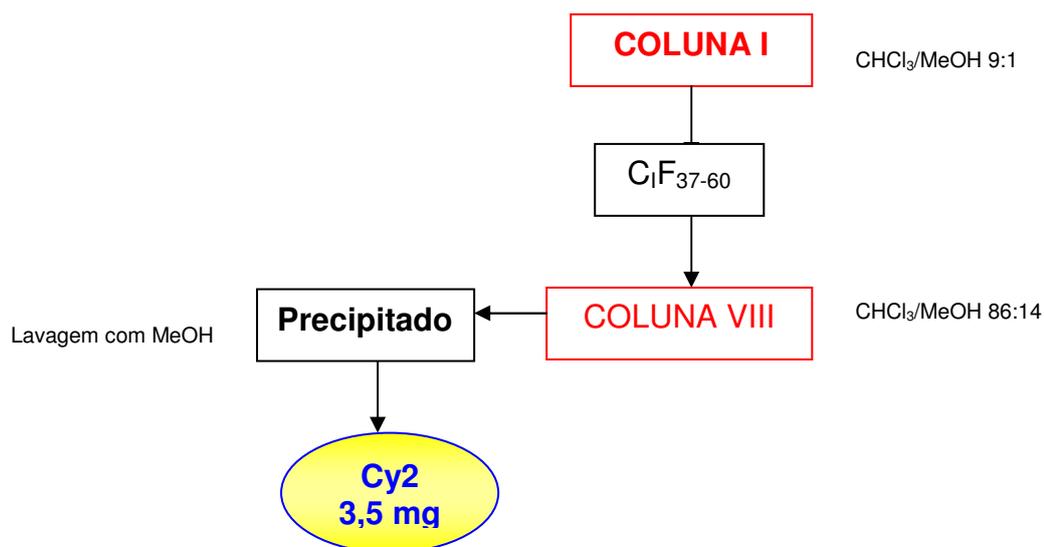


Figura 25: Esquema de isolamento da substância Cy2

Cy3 apresenta-se como uma substância sólida, de cor branca, sem fluorescência própria em 365 nm nem extinção de fluorescência em 254 nm. Na análise por CCD em tolueno/AcOEt 93:7, aparece em $R_f=0,73$, como uma mancha de cor azul após a revelação com vanilina-sulfúrica (Figura 27). O rendimento desta substância foi de 2,8 mg.

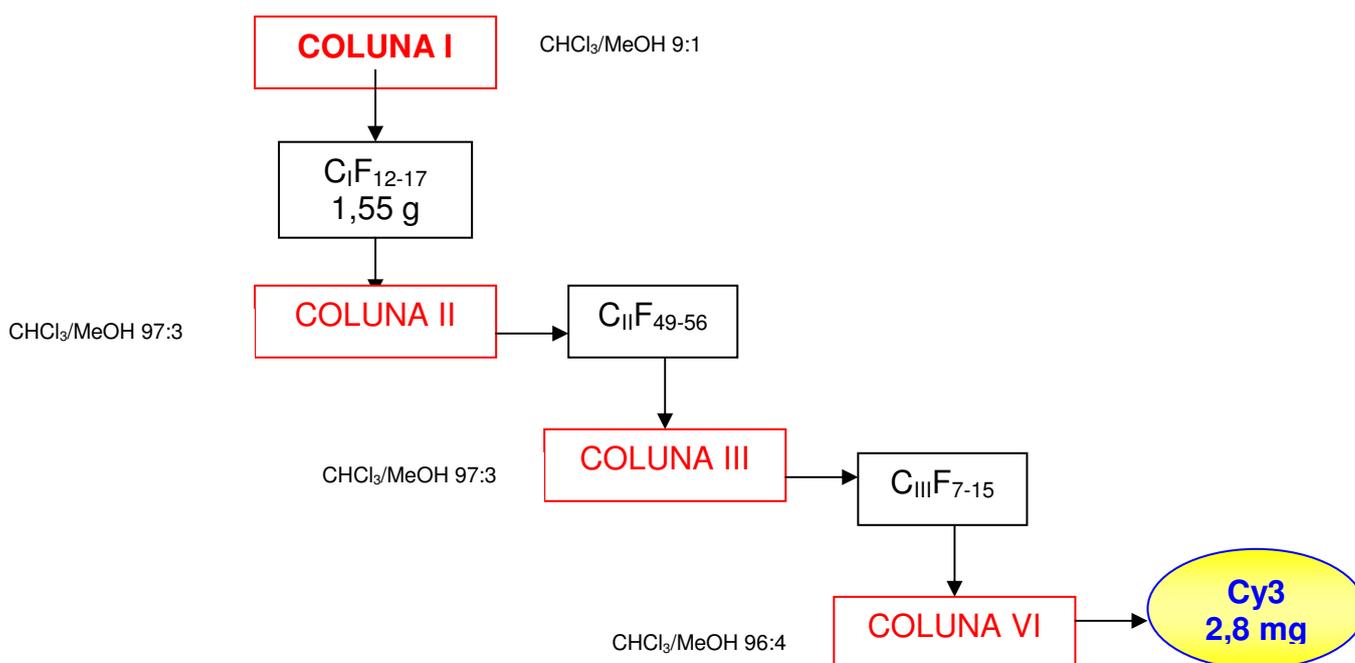


Figura 26: Fluxograma de isolamento do composto Cy3.

Cy4 apresenta-se como uma substância sólida, com coloração branca, sem fluorescência própria em 365 nm nem extinção de fluorescência em 254 nm, com rendimento de aproximadamente 3,2 mg. Na análise por CCD em CHCl_3 , o composto aparece como uma mancha de cor rosa após a revelação com anisaldeído sulfúrico, em $R_f=0,34$ (Figura 28).

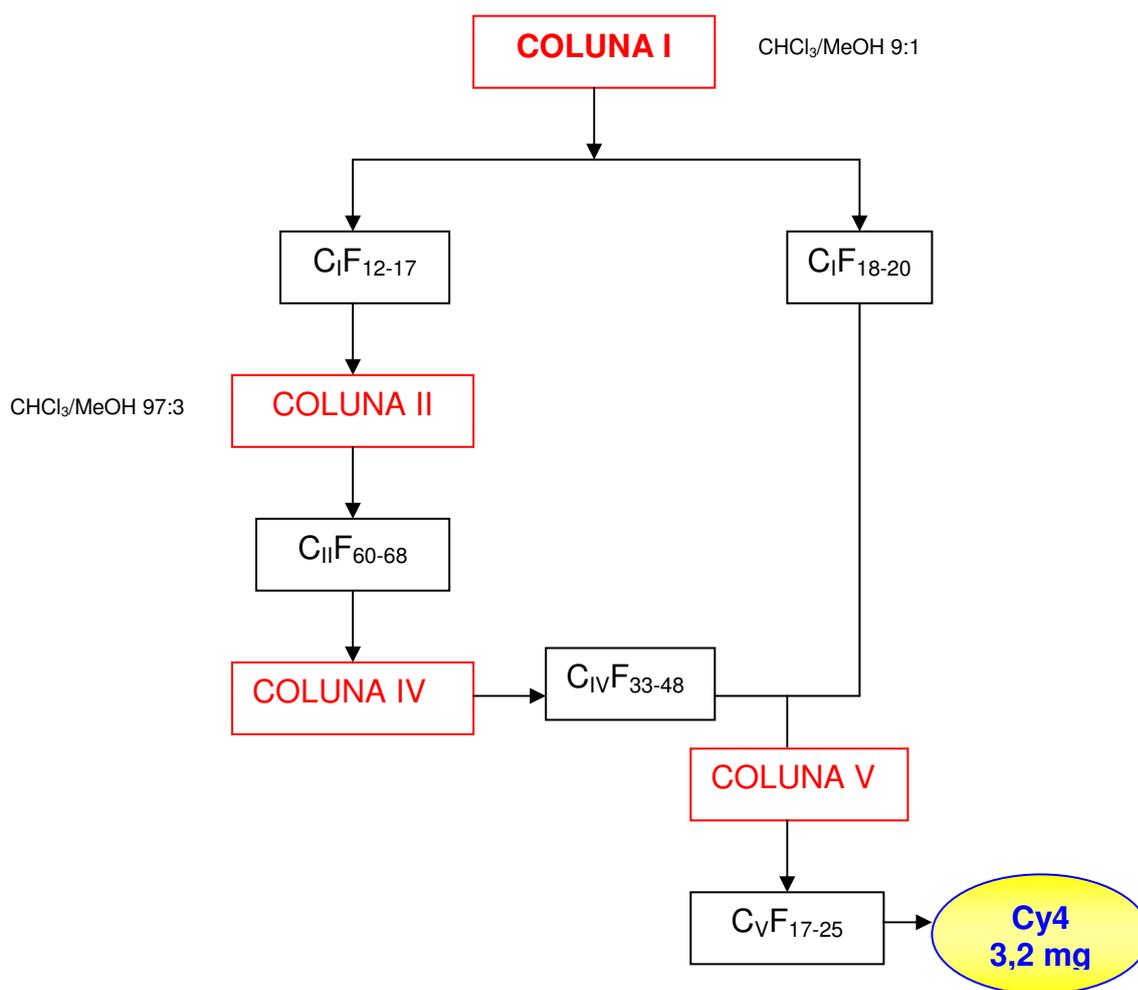


Figura 27: Esquema de isolamento do Cy4

Estas amostras foram encaminhadas para análise no Chengdu Institute of Biology pelo Prof. Dr. Guolin Zhang, sendo que suas análises de RMN não foram realizadas até o momento pela dificuldade de solubilização das amostras.

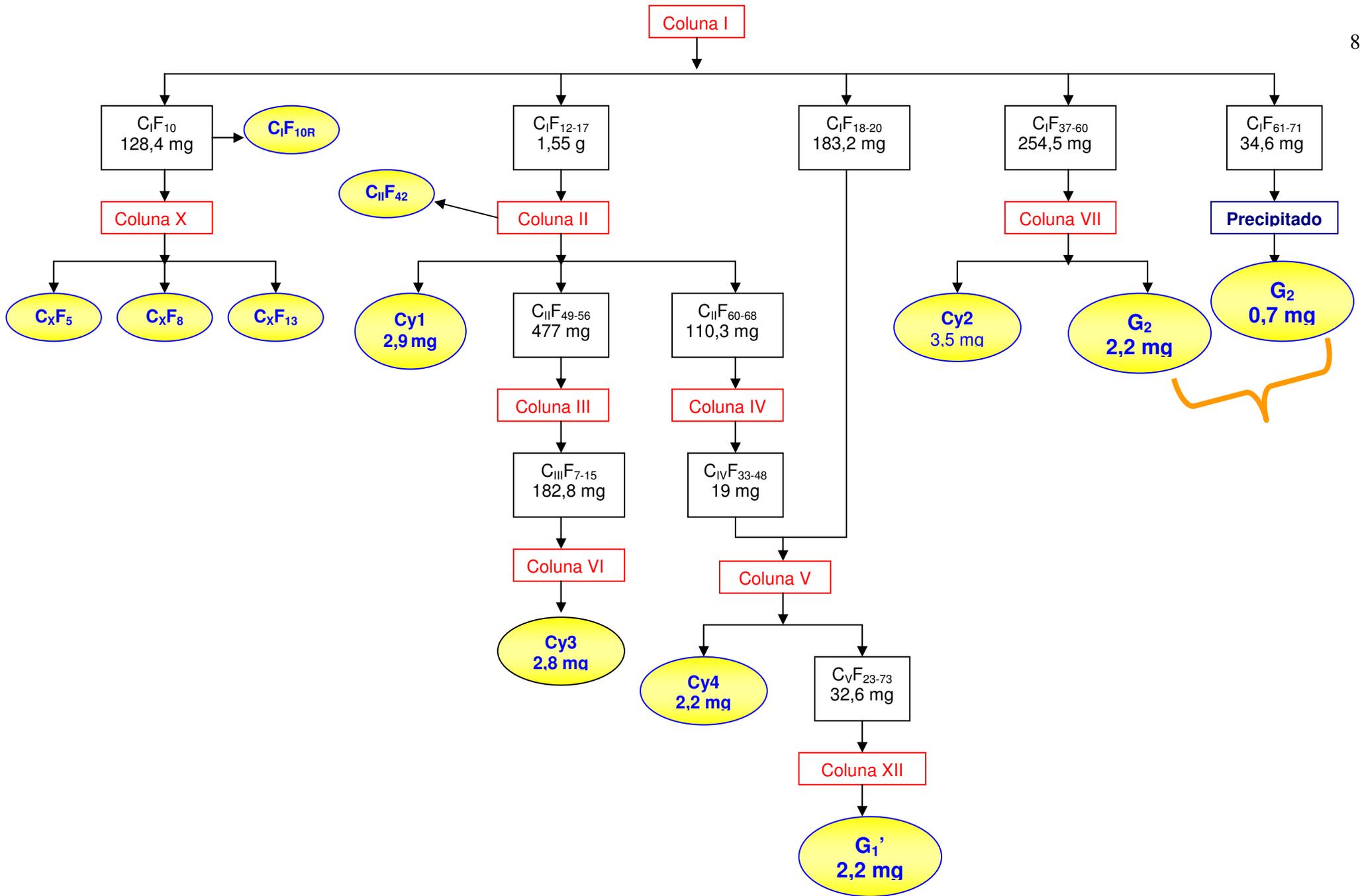


Figura 28: Fluxograma dos procedimentos utilizados no fracionamento do extrato de *Cymbopogon citratus*.

6.4- Monitoramento mensal

O objetivo deste monitoramento foi verificar se o tempo de armazenamento provoca alteração no teor de glicolipídios nas folhas de *Cymbopogon citratus*.

Para verificar se o conteúdo glicolipídico reduzia em decorrência da ação de enzimas, realizou-se o pré-tratamento com água fervente. As amostras submetidas à inativação enzimática serviram como “controle”, pois como as enzimas são inativadas com o processo de fervura, esperar-se-ia nestas amostras menor alteração do perfil cromatográfico.

O monitoramento mensal foi realizado utilizando amostras vegetais que foram processadas de duas maneiras: a) planta seca por 24 horas; b) planta fresca submetida à inativação enzimática. Os materiais foram divididos em doze alíquotas, que a cada mês foram submetidos à extração e, após este período, o extrato era evaporado e ressuspenso em um volume conhecido de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 2:1, para padronizar a concentração.

Através dos rendimentos, pode-se observar que as plantas que não passaram pela inativação enzimática tiveram um rendimento superior em relação àquelas que sofreram o processo. Além disso, o rendimento de extrato bruto para o material sem inativação apresentou tendência a aumentar ao longo dos doze meses, em relação ao rendimento obtido no primeiro mês. Este aumento do rendimento dos extratos poderia ser, pelo menos em parte, devido à dessecação gradual ao longo do tempo de armazenamento.

Para o material vegetal submetido a inativação enzimática, o rendimento apresentou alguma variação ao longo dos 12 meses, porém bem inferior àquela observada para as plantas sem inativação (Tabela 14).

Tabela 14: Rendimentos dos extratos do monitoramento mensal (MM), obtidos a partir da planta seca por 24 horas sem inativação enzimática e da planta com inativação enzimática.

Mês	Sem inativação		Com inativação	
	Rendimento (g/100g planta)	Concentração $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Rendimento (g/100g planta)	Concentração $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
01	5,43	21	4,43	24
02	5,15	20	4,57	24
03	6,49	21	4,20	22
04	5,53	20	3,33	20
05	5,60	20	4,59	21
06	5,84	20	4,67	21
07	5,67	20	4,74	21
08	6,20	21	4,72	22
09	5,86	21	4,12	21
10	6,08	21	4,69	21
11	6,15	20	5,03	26
12	6,65	21	4,63	27

Analisando as cromatografias do MM, pode-se observar que as plantas que sofreram o processo de inativação enzimática tiveram diferenças no perfil lipídico quando comparada às plantas que não passaram por este processo. Nos extratos inativados, houve predominância de uma substância orcinol positiva em $R_f=0,55$, seguida por outra em $R_f=0,74$. As plantas sem inativação mantiveram o perfil glicolipídico, com seis manchas orcinol positivas, em R_f de 0,78, 0,63, 0,58, 0,46, 0,41 e 0,21 (Figura 30). As manchas em R_f de 0,46 e 0,41 foram iguais para os dois tipos de extratos.

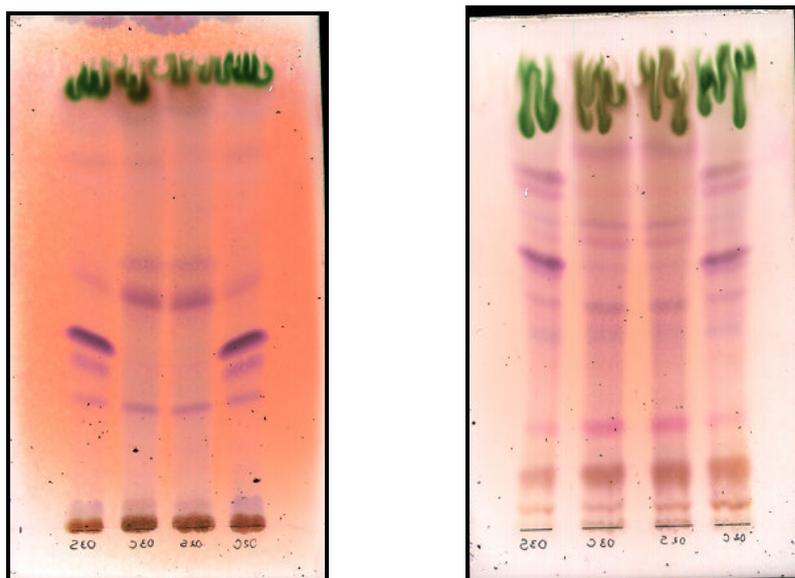


Figura 29: Cromatografia em camada delgada do monitoramento mensal (MM) dos meses 02 e 03. Na cromatografia da esquerda o eluente utilizado foi $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1 (v/v), na cromatografia da direita o eluente foi $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 65:25:4, sendo ambas reveladas com orcinol-sulfúrico. A ordem de aplicação dos extratos é mês 02 com inativação, mês 02 sem inativação, mês 03 sem inativação e mês 03 com inativação em ambas placas.

Quando os extratos sem inativação do MM foram avaliados conjuntamente em CCD utilizando $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1 (Figuras 31 e 32) observou-se que houve uma considerável diminuição da glicolipídio de $R_f = 0,75$ a partir do mês 06. Já para as plantas que passaram pela inativação enzimática, observou-se que houve diminuição da concentração de uma mancha em $R_f = 0,49$. Essa variação do conteúdo glicolipídico da planta previamente inativada, acaba por não justificar o emprego desse pré-tratamento.

A alteração do conteúdo glicolipídico pode estar relacionada a diversos fatores. O aumento da concentração pode ser observado com a maturidade e o crescimento. Já a redução, tem sido relatada ocorrer sob uma variedade de condições como estresse hídrico, estresse térmico, senescência e salinidade. A diminuição de glicolipídios como MGDG e DGDG podem ser devido a uma síntese diminuída ou aumento da atividade das galactolipases (CHETAL et al., 1982).

A degradação de glicolipídios observada quando células de plantas são quebradas é justificada, em parte, pela ação de enzimas envolvidas no catabolismo. Geralmente, glicolipídios sofrem ação enzimática pelas acil hidrolases e acil transferases (KATES, 1986).

A degradação enzimática de lipídios como o MGDG e DGDG devido à ação de acil hidrolases parece estar associada não só com a fração cloroplástica, mas também aquela presente no citoplasma da célula. Através da ação desta enzima, a partir do MGDG, por exemplo, será formado o monogalactosilmonoacilglicerol (MGMG) e seu respectivo ácido graxo (KATES, 1986).

A ação da acil transferase ocorre envolvendo a transferência de acil grupos a partir de DGDG para a posição C6 de MGDG, ou partir de MGDG para a posição C6 de DGDG ou outro MGDG, com a formação de 6-acil-MGDG e 6-acil-DGDG respectivamente. Assim, esses compostos podem ser considerados artefatos formados a partir da ação destas enzimas (KATES, 1986).

Essa degradação também é observada para glicoglicerolipídios que são ingeridos através da alimentação, como o MGDG e DGDG. Esses compostos são hidrolisados em ácidos graxos livres e em monogalactosilmonoacil- e digalactosilmonoacilglicerol (MGMG e DGMG), que resultarão em monogalactosilglicerol (MGG) e digalactosilglicerol (DGG) respectivamente, e finalmente, em galactose e glicerol (SUGAWARA & MIYAZAWA, 2000).

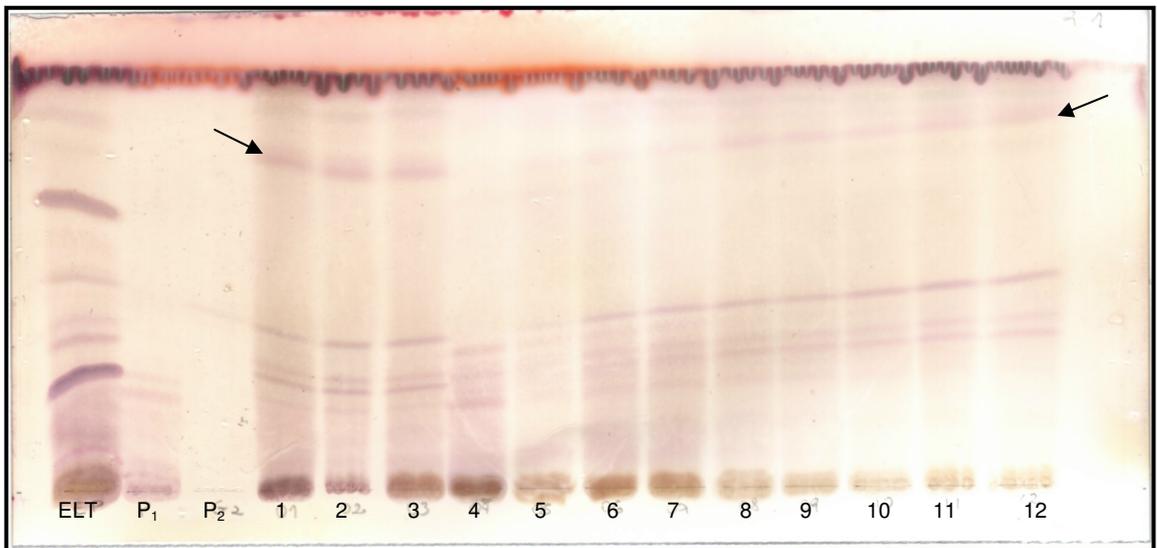


Figura 30: Cromatografia em camada delgada do monitoramento mensal (MM) da planta sem inativação utilizando como eluente $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 9:1 e como revelador orcinol-sulfúrico. Da esquerda para direita: ELT- Extrato Lipídico Total; P_1 - Padrão de DGDG; P_2 - Padrão de CMH; 1- Mês 01; 2- Mês 02; 3- Mês 03*; 4- Mês 04*; 5- Mês 05; 6- Mês 06; 7- Mês 07; 8- Mês 08; 9- Mês 09; 10- Mês 10; 11- Mês 11; 12- Mês 12. A seta mostra o glicolipídios que teve a concentração diminuída.

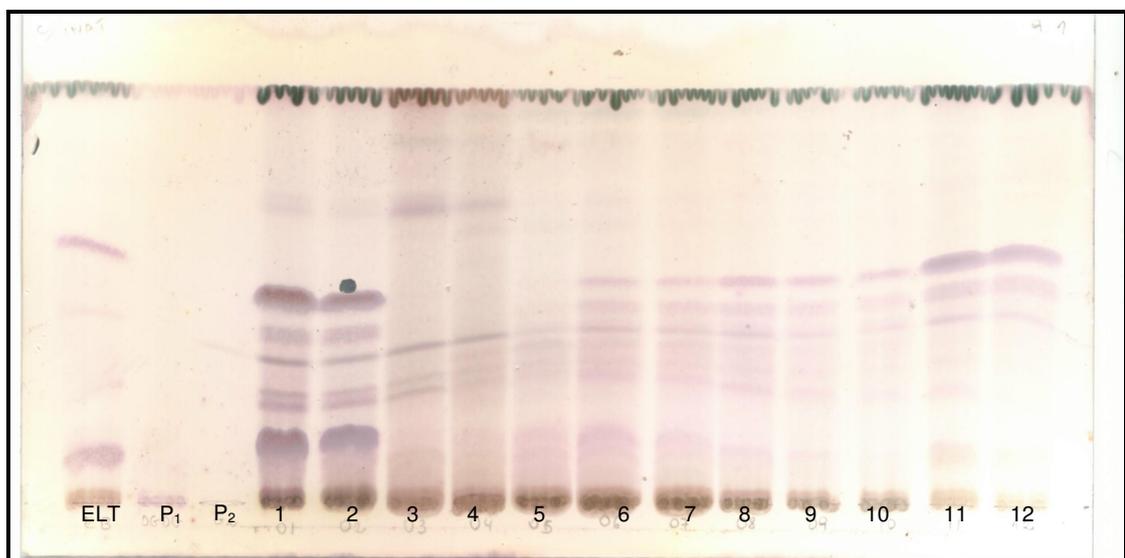


Figura 31: CCD do monitoramento mensal (MM) da planta com inativação utilizando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 65:25:4. Da esquerda para direita: ELT- Extrato Lipídico Total; P_1 - Padrão de DGDG; P_2 - Padrão de CMH; 1- Mês 01; 2- Mês 02; 3- Mês 03*; 4- Mês 04*; 5- Mês 05; 6- Mês 06; 7- Mês 07; 8- Mês 08; 9- Mês 09; 10- Mês 10; 11- Mês 11; 12- Mês 12.

* Os extratos do MM dos meses 03 04 foram trocados nas placas, ou seja, na CCD com inativação o extrato é aquele não inativado e vice-versa.

1

7- CONCLUSÕES

- Detectou-se glicolipídios em todas as amostras pesquisadas, com variação quali-quantitativa considerável entre as espécies e mesmo entre amostras *in natura* e comerciais referentes a mesma espécie;
- Os tipos de glicolipídios detectadas em maior concentração foram monogalactosildiacilglicerol e digalactosildacilglicerol;
- Dentre os procedimentos testados de extração de glicolipídios em *Cymbopogon citratus*, o que proporcionou maior rendimento foi aquele que utilizava a planta seca em temperatura ambiente por 24 horas;
- A partir do extrato de *Cymbopogon citratus*, foram isoladas duas substâncias com reação positiva para orcinol-sulfúrico, sendo G₂ possivelmente relacionada estruturalmente com mono-hexosilceramida;
- Foram isoladas ainda outras substâncias, sendo que para 2 delas foi possível obter espectro de massas sendo que para o composto C_xF₅, o espectro obtido sugere tratar-se de terpinen-4-ol;
- O monitoramento mensal realizado com as amostras de *Cymbopogon citratus* sugere que glicolipídios sofrem degradação ao longo do período de armazenamento.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEGOKE, G.O & ODESOLA, B.A. Storage of maize and cowpea and inhibition of microbial agentes of biodeterioration using the powder and essential oil of lemon grass (*Cymbopogon citratus*). **International Biodeterioration & Biodegradation**, p. 81-84, 1996.

ALLENDE, M.L.; PROIA, R.L. Lubrificating cell signaling pathways with gangliosides. **Carbohydrates and glycoconjugates**, p. 587-592, 2002.

BANTHORPE, D.V. et al. Chemistry of the Sudanesa flora. **Planta Medica**, v.29, p. 10-19, 1976.

BATRAKOV, S.G. et al. Glycolipids of the filamentous fungus *Absidia corymbifera* F-295. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.123, p.157-164, 2003.

BRANDENBURG, K.; SEYDEL, U. Infrared spectroscopy of glycolipids. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.96, p. 23-40, 1998.

BUCCOLIERO, R.; FUTERMAN, A.H. The roles of ceramide and complex sphingolipids in neuronal cell function. **Pharmacological Research**, v.47, p. 409-419, 2003.

CALIXTO, J.B.C. Efficacy, safety, quality, control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, n.2, p. 179-189, 2000.

CARBAJAL, D. et al. Pharmacological study of *Cymbopogon citratus* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v.25, p. 103-107, 1989.

CARLINI, E.A. et al. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v.17, p. 37-64, 1986.

CARTER, H.E.; JOHNSON, P.; WEBER, E.J. Glycolipids. **Ann. Rev. Bioch.**, v.34, p. 109-142, 1965.

CASTRO, L.O.; CHEMALE, V.M. **Plantas medicinais, condimentares e aromáticas: descrição e cultivo**. Guaíba: Agropecuária, 1995.41 p.

CHEVAL, S.; WAGLE, S.D.; NAINAWATEE, H.S. Alterations in glycolipids of wheat and barley leaves under water stress. **Phytochemistry**, v.21, n.1, p. 511-53, 1982.

CIMANGA, K. et al. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, v.79, p. 213-220, 2002.

CODDINGTON, J.M. et al. Preparation and comparison of model bilayer systems from chloroplasts thylakoid membrane lipids for ^{13}C -NMR studies. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.6, p. 351-356, 1982.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L. **Introdução a métodos cromatográficos**. 3.ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1988.

DEMANDRE, C. et al. Analysis of molecular species of plant polar lipids by high performance and gás-liquid chromatography. **Phytochemistry**, v.24, n.3, p. 481-485, 1985.

DEMATOUSCHEK, B.V.; STAHLBISKUP, E. Phytochemical analysis of nonvolatile compounds from *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (Poaceae). **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v.66, p. 242-245, 1991.

DERMARDEROSIAN, A. **The Review of Natural Products**. 1.ed. Saint Louis: Facts and Comparisons, 2001.

DI STASI, L.C. et al. **Plantas medicinais da Amazônia**. São Paulo: Editora UNESP, 1989.

DIEHL, B.W.K. et al. ^{13}C -NMR analysis of the positional distribution of fatty acids in plant glycolipids. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.77, p.147-153, 1995.

DUBEY, N. et al. Citral: a cytotoxic principle isolated from the essential oil of *Cymbopogon citratus* against P388 leukemia cells. **Curr. Sci.**, v.73, n.1, p. 22-24, 1997.

DUDAI, N. et al. Changes in essential oil during enzyme-assisted ensiling of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf) and lemon eucalyptus (*Eucalyptus citriodora* Hook). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.5, p. 2262-2266, 2001.

FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Org.). **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. 1.ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/Editora da UFRGS, 1999.

FARMACOPÉIA Brasileira. IV. ed.,1988.

GILBERT, B. et al. Activities of the Pharmaceutical Technology Institute of the Oswaldo Cruz Foundation with medicinal, insecticidal and insect repellent plants. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v.71, n.2, p. 265-271, 1999.

GIRÓN, L.M. et al. Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. **Journal of Ethnopharmacology**, v.34, p. 173-187, 1991.

GOLIK, J. et al. Isolation and structure determination of sulfonoquinovosyl dipalmitoyl glyceride, a P-selectine receptor inhibitor from the alga *Dictyochloris fragrans*. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 387-389, 1997.

GUPTA, M.P. **270 Plantas Mediciniais Iberoamericanas**. 1.ed. Santafé de Bogotá: CYTED, 1995.

HAKOMORI, S-I. Glycosphingolipids as differentiation-dependent, tumor-associated markers and as regulators of cell proliferation. **TIBS**, p. 453- 459, 1994.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, p. 985-990, 1999.

HANSON, S.W. et al. Cymbopogol, a new triterpenoid from *Cymbopogon citratus*. **Phytochemistry**, v.15, n.6, p. 1074-1075, 1976.

HARBORNE, J.B. **Phytochemical Methods— A guide to modern techniques of plant analysis**. 2.ed. London: Chapman and Hall Ltd, 1984.

HAUKSSON, J.B.; BERGQVIST, H.J.; RILFORS, L. Structure of digalactosyldiacylglycerol from oats. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.78, p. 97-102, 1995.

IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) Nomenclature of Glycolipids. **J. Mol. Biol**, v.286, p. 963-970, 1999.

JANWITAYANUCHIT, W. et al. Synthesis and anti-herpes simplex viral activity of monoglycosyl diglycerides. **Phytochemistry**, v.64, p. 1253-1264, 2003.

JENKINS, K.M.; JENSEN, P.R.; FENICAL, W. Thraustochytriosides A-C: new glycosphingolipids from a unique marine protist, *Thraustochytrium globosum*. **Tetrahedron Letters**, v.40, p. 7637-7640, 1999.

KATES, M. Plant phospholipids and glycolipids. **Adv. Lipid. Research**, v.8, p. 225-265, 1970.

KATES, M. **Techniques of lipidology: isolation, analysis and identification of lipids**. 2.ed. New York : Elsevier, 1986.

KISHORE, N.; MISHRA, A.K.; CHANSOURIA, J.P.N. Fungitoxicity of essential oils against dermatophytes. **Mycoses**, v.36, p.211-215, 1993.

KOCHEITKOV, N.K.; SMIRNOVA, G.P. Glycolipids of marine invertebrates. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, v.44, p. 387-438, 1986.

KOJIMA, M. et al. Distribution and characterization of diglycosyldiacylglycerol isomers with different anomeric configuration in higher plants. **Phytochemistry**, v.30, n.4, p. 1165-1168, 1991.

LABELL, R.Y. et al. Synthesis of novel glycolipids that bind HIV-1 Gp120. **Bioconjugate Chem.**, v.13, p. 143-149, 2002.

LEITE, J.R. et al. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). III. Assessment of eventual toxic, hypnotic and anxiolytic effects on humans. **Journal of Ethnopharmacology**, v.17, p. 75-83, 1986.

LEPAGE, M. The separation and identification of plant phospholipids and glycolipids by two-dimensional thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography**, v.13, p. 99-103, 1964.

LEWINSOHN, E. et al. Histochemical localization of citral accumulation in lemongrass leaves (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, Poaceae). **Annals of Botany**, v.81, p. 35-39, 1998.

LI, Y-T, LI, S-C. Enzymatic hydrolysis of glycosphingolipids. **Analytical Biochemistry**, v.273, p. 1-11, 1999.

LÓPEZ-MARÍN, L.M. et al. Structure and antigenicity of the major glycolipid from *Taenia solium* cysticerc. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v.119, p. 33-42, 2002.

LORENZETTI, B.B. et al. Myrcene mimics the peripheral analgesic activity of lemongrass tea. **Journal of Ethnopharmacology**, v.34, p. 43-48, 1991.

LOYA, S. et al. The inhibitor of the reverse transcriptase of HIV-1 by the natural sulfoglycolipids from cyanobacteria: contribution of the different moieties to their high potency. **Journal of Natural Products**, v.61, p. 891-895, 1998.

MACHADO, M.J. Glicolipídios de *Ramalina celastri*: isolamento e caracterização estrutural. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1996.

MACHADO, M.J. et al. A galactosphingolipid from the lichen, *Ramalina celastri*. **Phytochemistry**, v.45, n. 4, p. 651-653, 1997.

MACHADO, M.J. et al. Determinação de glicolipídios em urinas. **NewsLab**, v.44, p. 98-112, 2001.

MAFFEI, M.; CODIGNOLA, A.; FIESCHI, M. Photosynthetic enzyme activities in lemongrass cultivated in temperate climates. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.16, n.3, p. 263-264, 1988.

MANNOCK, D.A. et al. The physical properties of glycosyl diacylglycerols. Calorimetric, X-ray diffraction and Fourier transform spectroscopic studies of a homologous series of 1,2-di-O-acyl-3-O-(β -D-galactopyranosyl)-*sn*-glycerols. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.111, p. 139-161, 2001.

MASSERINI, M.; RAVASI, D. Role of sphingolipids in the biogenesis of membrane domains. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1532, p.149-161, 2001.

MATOS, F.J.A. **Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades**. 3.ed. Fortaleza: EUFC, 1998.

MELÉNDEZ, E.N. **Plantas Medicinales de Puerto Rico**. Puerto Rico: Editora de la Universidad de Puerto Rico, 1989.

MELO, S.F. et al. Effect of the *Cymbopogon citratus*, *Maytenus ilicifolia* and *Baccharis genistelloides* extracts against the stannous chloride oxidative damage in *Escherichia coli*. **Mutation Research**, v.496, p. 33-38, 2001.

MERCK, E. **Drying reagents for thin layer and paper chromatography**. Germany, 1971.

MINDEN, H.M. von et al. Synthesis and mesogenic properties of glycosil diacylglycerols. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.114, p. 55-80, 2002.

MISHRA, A. et al. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of store food commodities. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.60, n. 4, p. 1105-1105, 1994.

MIZUSHINA, Y. et al. Studies on inhibitors of mammalian DNA polymerase α and β : sulfolipids from pteridophyte, *Athyrium niponicum*. **Biochemical Pharmacology**, v.55, p. 537-541, 1998.

MURAKAMI, C. et al. Structure-function relationship of synthetic sulfoquinovosyl-acylglycerols as mammalian DNA polymerase inhibitors. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.403, p. 229-236, 2002.

MURAKAMI, C. et al. A novel DNA polymerase inhibitor and a potent apoptosis inducer: 2-mono-*O*-acyl-3-*O*-(α -D-sulfoquinovosyl)-glyceride with stearic acid. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1645, p. 72-80, 2003a.

MURAKAMI, C. et al. Effects of glycolipids from spinach on mammalian DNA polymerases. **Biochemical Pharmacology**, v.65, p. 259-267, 2003b.

NAKATA, K. et al. Influenza A virus-binding activity of glycolipids of aquatic bacteria. **Journal of Biochemistry**, v.127, p. 191-198, 2000.

O'BRIEN, J.S.; BENSON, A.A. Isolation and fatty acid composition of the plant sulfolipid and galactolipids. **J. Lipid. Res.**, v.5, p. 432-436, 1964.

OHNO, T. et al. Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. **Helicobacter**, v.8, n.3, p. 207-215, 2003.

OHTA, K. et al. Action of new mammalian DNA polymerase inhibitor, sulfoquinovosylacylglycerol. **Biol. Pharm. Bull**, v.22, p. 111-116, 1999.

OLANIYI, A.A.; SOFOWORA, E.A.; OGUNTIMEHIN, B.O. Phytochemical investigation of some Nigerian plants used against fevers II – *Cymbopogon citratus*. **Planta Medica**, v.28, p. 186-189, 1975.

OLSEN, I.; JANTZEN, E. Sphingolipids in bacteria and fungi. **Anaerobe**, v.07, p.103-112, 2001.

ONAWUNMI, G.O.; YISAK, W.; OGUNLANA, E.O. Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. **Journal of Ethnopharmacology**, v.12, p. 279-286, 1984.

OYEDELE, A.O. et al. Formulation of an effective mosquito-repellent topical product from lemongrass oil. **Phytomedicine**. V.9 (3), p.259-262, 2002.

PAHLSSON, P. et al. Characterization of galactosyl glycerolipids in the HT29 human colon carcinoma cell line. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.396, n.2, p. 187-198, 2001.

PARANAGAMA, P.A. et al. Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice. **Letters in Applied Microbiology**, v.37, p. 86-90, 2003.

PARRISH, C.C.; BODENNEC, G; GENTIEN, P. Haemolytic glyco-glycerolipids from *Gymnodinium* species. **Phytochemistry**, v.47, n.5, p. 783-787, 1998.

PASCIAK. M. et al. Structure of the major glycolipid from *Rothia dentocariosa*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1594, p. 199-205, 2002.

PUATANACHOKCHAI, R. et al. Inhibitory effects of lemon grass (*Cymbopogon citratus*, Stapf) extract on the early phase of hepatocarcinogenesis after initiation with diethylnitrosamine in male Fischer 344 rats. **Cancer Letters**, v.183, p. 9-15, 2002.

RAMADAN, M.F.; MÖRSEL, J.T. Oil cactus pear (*Opuntia ficus-indica* L.). **Food Chemistry**, v.82, p. 339-345, 2003a.

RAMADAN, M.F.; MÖRSEL, J.T. Analysis of glycolipids from black cummin (*Nigella sativa* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.) and niger (*Guizotia absyssinica* Cass.) oilseeds. **Food Chemistry**, v.80, p. 197-204, 2003b.

RASTRELLI, L. et al. Glycolipids from *Byrsonima crassifolia*. **Phytochemistry**, v.45, n.4, p. 647-650, 1997.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v.39, p. 603-613, 2001.

RHO, M.C. et al. A monogalactopyranosyl acylglycerol from *Oltmannsiellopsis unicellularis* (NIES-359). **Phytochemistry**, v.44, n.8, p. 1507-1509, 1997.

SAHARA, H. et al. Anti-tumor effect of chemically synthesized sulfolipids based on sea urchin's natural sulfonoquinovosylmonoacylglycerols. **Br. J. Cancer**, v.7, p. 324-332, 1997.

SASSAKI, G.L.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Characterization of lyso-galactolipids, C-2 and C-3 O-acyl trigalactosylglycerol isomers, obtained from the lichenized fungus *Dictionema glabratum*. **FEMS Microbiology Letters**, v.194, p. 155-158, 2001.

SASTRY, P.S. Glycosil glycerides. **Adv. Lipid Res.**, v.12, p. 251-304, 1974.

SCHAEFFER, A.J. et al. Host pathogenesis in urinary tract infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.17, p. 245-251, 2001.

SCHANEBERG, B.T.; KHAN, I.A. Comparison of extraction methods for marker compounds in the essential oil of lemon grass by GC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p. 1345-1349, 2002.

SCHWARZMANN, G. Uptake and metabolism of exogenous glycosphingolipids by cultured cells. **Cell & Developmental Biology**, v. 12, p. 163-171, 2001.

SILVA JÚNIOR, A.A. **Essentia Herba – Plantas bioativas**. Florianópolis: Epagri, 2003.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 1989.

SON, B.W. Glycolipids from *Gracilaria verrucosa*. **Phytochemistry**, v.29, n.1, p. 307-309, 1990.

SOUZA FORMIGONI, M.L.O. et al. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). II. Effects of daily two month administration in male and female rats and in offspring exposed "in utero". **Journal of Ethnopharmacology**, v.17, p. 65-74, 1986.

STAHL, E.; SCHILD, W. **Pharmazeutische Biologie**. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1981. 461 p.

STULTZ, C.L.; SWEELEY, C.C.; MACHER, B. Glycosphingolipids: structure, biological source, and properties. **Methods in Enzymology**, v.50, n.24, p. 197-214, 1989.

SUGAWARA, T.; MIYAZAWA, T. Digestion of plant monogalactosyldiacylglycerol and digalactosyldiacylglycerol in rat alimentary canal. **J. Nutr. Biochemistry**, n.11, p. 147-152, 2000.

TAKI, T. et al. A simple and quantitative purification of glycosphingolipids and phospholipids by thin-layer chromatography blotting. **Analytical Biochemistry**, v.223, p. 232-238, 1994.

TANG, W. et al. Requirement of ceramide for adhesion of *Helicobacter pylori* to glycosphingolipids. **FEBS Letters**, v.504, p. 31-35, 2001.

VIANA, G.S.B. et al. Antinociceptive effect of the essential oil from *Cymbopogon citratus* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.70, p. 323-327, 2000.

VINITKETKUMNUEN, U. et al. Antimutagenicity of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) to various known mutagens in salmonella mutation assay. **Mutation Research**, v. 341, p. 71-75, 1994.

XUE, C. et al. Molecular species composition of glycolipids from *Spirulina platensis*. **Food Chemistry**, v.77, p. 9-13, 2002.

ZHENG, G.; KENNEY, P.M.; LAM, L.K.T. Potential anticarcinogenic natural products isolated from lemongrass oil and galanga root oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.41, n.2, p. 153-156, 1993.

WANNISSOM, B. et al. Antifungal activity of lemon grass and lemon lemon grass oil cream. **Phytother. Res.**, v.10. n.7, p. 551-554, 1996.

WAGNER, H.; BLADT, S; ZGAINSKI, E.M. **Plant Drug Analyses- A Thin-Layer Chromatography Atlas**. 2.ed. Berlin: Springer-Verlag, 1995.

WHO. Traditional Medicine. Disponível em <http://www.who.ch/>. Consulta em 28/01/2001.

WILDMAN, R.E.C. **Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods**. 1.ed. Boca Raton: CRC Press, 2001.