



Caracterização química e avaliação das propriedades bioativas de folhas de *Psyrax locuples* (K. Schum.)

Bridson

Amândio David Zimba

Trabalho de Projeto apresentado à Escola Superior Agrária de Bragança e à Faculdade de Farmácia da Universidade de Salamanca, no âmbito do mestrado em Farmácia e Química de Produtos Naturais

Orientado por

Isabel C.F.R. Ferreira

Pablo Anselmo García García

M^a Ángeles Castro González

Bragança

2014

À Wuyane Zimba;
Ao Winly Zimba;
E a todos meus sobrinhos
Dedico.

Que sirva de fonte de inspiração para os desafios do futuro.

AGRADECIMENTOS

São devidos agradecimentos a todos aqueles que contribuíram diretamente e indiretamente para a efetivação deste trabalho.

Aos meus orientadores, à Professora Doutora Isabel Ferreira, do Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada do Instituto Politécnico de Bragança (IPB)-Portugal, e ao Professor Doutor Pablo A. García, do Departamento de Química Farmacêutica da Universidade de Salamanca (USAL)-Espanha, pelo apoio incondicional, simpatia, simplicidade, disponibilidade, e prontidão na orientação científica deste trabalho e sem os quais teria sido impossível concluir o presente trabalho.

À Professora Doutora María Ángeles Castro e ao Professor Doutor José María Miguel del Corral, ambos do Departamento de Química Farmacêutica da Universidade de Salamanca (USAL)-Espanha, pela simpatia e amizade que sempre demonstraram durante a realização do estágio no Laboratório de Química Farmacêutica da Universidade de Salamanca e que muito contribuíram para tornar a minha estadia mais agradável.

Ao Professor Doutor François Munyemana, do Departamento de Química da Universidade Eduardo Mondlane (UEM)-Moçambique, pela amizade, confiança e pela escolha e fornecimento da amostra (material vegetal) para o estudo.

À Doutora Lillian Barros e à MSc Carla Pereira, ambas do Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada-IPB, pela preciosa ajuda na avaliação da atividade antioxidante dos extratos da amostra em estudo.

Ao Doutor Ricardo C. Calhela, do Laboratório Química e Bioquímica Aplicada-IPB por toda a colaboração na avaliação da atividade antitumoral dos extratos e compostos da amostra em estudo.

Ao Professor Doutor Carlos Aguiar, da Escola Superior Agrária (IPB), pela ajuda na classificação botânica da amostra em estudo.

Ao corpo docente da Escola Superior Agrária de Bragança (IPB) e da Faculdade de Farmácia (USAL) pelas teorias e modelos prestados que facilitaram grandemente na investigação do presente trabalho.

Ao Ministério de Ciência e Tecnologia de Moçambique (MCT), pela concessão da bolsa de estudo.

À Escola Superior de Desenvolvimento Rural (ESUDER)-UEM, pela licença concedida para a continuação dos estudos. Ao professor Doutor Simião Balane, pelo encorajamento na escolha do mestrado.

Ao Professor Doutor Albino Bento, pela simpatia e esforço para garantir o transporte para o deslocamento de Bragança a Salamanca e vice-versa e à Professora Doutora Conceição Fernandes, pela amizade, apoio moral e material durante as aulas.

Um "Kanimambo¹" muito especial a toda minha família em particular aos meus pais, irmãos e sobrinhos, pela força e encorajamento concedido durante os dois anos de formação. À minha esposa Odete Domingos Guambe, pela compreensão, companheirismo, paciência e incentivo permanente que muito contribuiu para a conclusão do mestrado, e aos meus filhos Wuyane Zimba e Winly Zimba, pelo sorriso que sempre proporcionaram ao comunicar-me com eles telefonicamente.

Ao Eng. Paulo Júlio Dimande, Luís Forquilha, Ananias Pascoal e a todos os Angolanos da Domus Universitária, pela amizade, simpatia e momentos de lazer proporcionados durante os dois anos de formação.

Por fim, agradeço a todos os colegas dos diversos laboratórios onde trabalhei, pela simpatia e a colaboração dispensadas em especial à Elena V. Martín, Ángela H. García, Ellahioui Younes, Sobinson Arsene, Tiago José e a todos os colegas do mestrado, pelo apoio dado sempre que necessitei e pelos momentos de lazer proporcionados em Salamanca.

A todos,
Muito obrigado!

¹ Obrigadoo

ÍNDICE DE CONTEÚDOS

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	iv
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii

INTRODUÇÃO	1
1. ESTADO DA ARTE	3
1.1. Família Rubiaceae.....	3
1.2. Género <i>Psydrax</i>	3
1.3. <i>Psydrax locuples</i> (K. Schum.) Bridson.....	4
1.3.1. Classificação científica.....	4
1.3.2. Sinónímias	5
1.3.3. Nomes vernaculares em Moçambique.....	5
1.3.4. Descrição	5
1.3.5. Distribuição geográfica e <i>habitat</i>	6
1.3.6. Usos em Moçambique	6
1.4. Composição química e propriedades bioativas de <i>P. locuples</i>	6
1.4.1. Composição química	7
1.4.2. Propriedades bioativas	12
1.4.2.1. Propriedades antiparasitárias	13
1.4.2.1.1. Atividade antiplasmódica.....	13
1.4.2.1.2. Atividade antitripanossomial e antileishmanial.....	14
1.4.2.1.3. Atividade nematocidal	15

1.4.2.2.	Propriedades antibacterianas.....	15
1.4.2.3.	Atividade antioxidante e citotóxica	16
2.	OBJETIVOS	17
3.	MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1.	Material Vegetal	18
3.2.	Equipamentos e reagentes.....	19
3.3.	Obtenção de extratos de <i>P. locuples</i>	21
3.3.1.	Partição do extrato metanólico	24
3.3.2.	Extração ácido-base da fração metanólica solúvel em acetato de etilo (F.MeOHsol.AcOEt).....	25
3.3.3.	Fracionamento e isolamento.....	26
3.4.	Obtenção de geninas do Ext.AcOEt	36
3.6.	Ensaio de bioatividade	39
3.6.1.	Avaliação da atividade antioxidante.....	39
3.6.1.1.	Atividade captadora de radicais livres DPPH.....	40
3.6.1.2.	Poder redutor.....	40
3.6.1.3.	Inibição da descoloração do β -caroteno.....	40
3.6.2.	Avaliação do potencial antitumoral e citotoxicidade	41
3.6.2.1.	Atividade antiproliferativa em linhas celulares tumorais humanas	42
3.6.2.2.	Hepatotoxicidade em células não tumorais.....	43
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1.	Extratos obtidos de folhas <i>P. locuples</i> e seus rendimentos.....	44
4.2.	Compostos isolados das folhas de <i>P. locuples</i>	44
4.2.1.	Triterpenos Pentacíclicos.....	46
4.2.1.1.	Elucidação estrutural.....	47
4.2.2.	Dissacáridos.....	52

4.2.2.1.	Elucidação estrutural.....	53
4.2.3.	Composto 10.....	65
4.2.3.1.	Elucidação estrutural.....	65
4.2.3.2.	Análise por GC/MS	66
4.2.4.	Análise de geninas por GC/MS	68
4.3.	Bioatividade	70
4.3.1.	Atividade antioxidante.....	70
4.3.2.	Atividade antitumoral e citotoxicidade.....	72
5.	CONCLUSÕES	76
	BIBLIOGRAFIA	78

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

[α]	Rotação ótica específica
1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
Ac	Acetato
AcOEt	Acetato de etilo
Api	Apiosa
CC	Cromatografia em coluna
DCM	Diclorometano
DEPT	Espectro de carbono 13 com seleção de carbonos (<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>)
DMEM	Meio de cultura para células animais (<i>Dulbecco Modified Eagle Medium</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
EC ₅₀	Concentração de amostra correspondente a 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância no ensaio do poder redutor
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EL.	Eluição
EtOH	Etanol
Ext.MeOH	Extrato metanólico
Ext.MeOHsol.AcOEt	Extrato metanólico solúvel em acetato de etilo
Ext.MeOHsol.But	Extrato metanólico solúvel <i>n</i> -butanol
Ext.MeOHsol.H ₂ O	Extrato metanólico solúvel em água
F.A.F.MeOHsol.AcOEt	Fração ácida da fração metanólica solúvel em acetato de etilo
F.N.F.MeOHsol.AcOEt	Fração neutra da fração metanólica solúvel em acetato de etilo
GC/MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
GI ₅₀	Concentração da amostra responsável por 50% de inibição do crescimento celular
Glc	Glucose

COSY	<i>CO</i> rrrelation <i>S</i> pectroscop <i>Y</i>
HBSS	Solução salina de Hank's
HeLa	Linha celular humana de carcinoma cervical
HepG2	Linha celular humana de carcinoma hepatocelular
Hex.	Hexano
HMBC	Hetero-correlação ^1H - ^{13}C a duas e três ligações (<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>)
HMQC	Hetero-correlação com detecção de próton (<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i>)
HRMS	Espectrometria de massa de alta resolução
IV	Espectroscopia na região do infravermelho
<i>m/z</i>	Razão carga, massa
MCF-7	Linha celular humana de carcinoma de adenocarcinoma mamário
Me	Metil
Me ₂ CO	Acetona
Mis.	Mistura
Mn	Mandelonitrilo
NCI-H460	Linha celular humana de carcinoma de pulmão
PLP2	<i>Porcine liver primary cell culture</i>
PR	Poder redutor
PTLC	Cromatografia preparativa em camada fina
R _f	Índice de retenção
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN ^1H	Ressonância magnética nuclear de próton
ROESY	<i>Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy</i>
RPMI	Meio de cultura para células animais
SFB	Soro fetal bovino
SRB	Sulforadamina B
TCA	Ácido tricloroacético

TLC	Cromatografia em camada fina
Tris	2-amino-2- (hidroximetil) propano-1,3-diol
UV/VIS	Ultravioleta visível

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Psydrax locuples</i> (K. Schum.) Bridson.....	5
Figura 2. Compostos isolados de folhas e cascas do caule <i>C. dicoccum</i>	8
Figura 3. Glucósidos cianogénicos isolados das folhas e frutos de <i>C. huillense</i> e <i>C. shimperiam</i>	8
Figura 4. Glucósidos e irdoídes isolados da partes aéres de <i>C. berberidifolium</i>	9
Figura 5. Compostos extraídos das folhas de <i>C. parviflorum</i> Lam.	10
Figura 6. Compostos extraídos das folhas de <i>C. multiflorum</i> (Thonn.) Hier	10
Figura 7. Compostos extraídos da casca do caule de <i>C. multiflorum</i> (Thonn.) Hier.....	11
Figura 8. Compostos extraídos da casca do caule de <i>C. horridum</i> Bl.....	12
Figura 9. Processo de secagem das folhas de <i>P. locuples</i> , ao abrigo do sol.....	18
Figura 10. Processo de secagem rápida das folhas de <i>P. locuples</i> utilizando estufa.....	18
Figura 11. Moinho elétrico de facas utilizado para triturar as folhas de <i>P. locuples</i>	19
Figura 12. Folhas de <i>P. locuples</i> na forma fina.	19
Figura 13. Extração por maceração dos extratos de folhas de <i>P. locuples</i>	22
Figura 14. Filtração a vácuo dos extratos de folhas de <i>P. locuples</i>	22
Figura 15. Remoção dos solventes nos extratos de folhas de <i>P. locuples</i>	22
Figura 16. Sequência I de obtenção de extratos das folhas de <i>P. locuples</i>	23
Figura 17. Sequencia II de obtenção de extratos das folhas de <i>P. locuples</i>	23
Figura 18. Processo de partição do extrato metanólico.....	24
Figura 19. Frações produzidas na partição do extrato MeOH.....	24
Figura 20. Remoção de água no extrato aquoso de <i>P. locuples</i>	25
Figura 21. Frações produzidas na extração ácido-base de F.MeOHsol.AcOEt.	25
Figura 22. Realização da cromatografia em coluna de F.N.F.MeOHsol.AcOEt.	27
Figura 23. Esquema da reação de acetilação das frações 13-30.....	28
Figura 24. Esquema de obtenção de compostos 1 a 7 a partir da F.MeOHsol.AcOEt.....	29
Figura 25. Esquema de reação de esterificação dos compostos 8 e 9.	31
Figura 26. Esquema de obtenção dos compostos 4,8-17 no Ext.AcOEt.	36
Figura 27. Reação de hidrólise do Ext.AcOEt.	37
Figura 28. Obtenção de geninas a partir do Ext.AcOEt.	38

Figura 29. Papel de filtro previamente preparado, antes e depois da reação de hidrólise do Ext.AcOEt.	39
Figura 30. Estrutura do ácido benzóico.....	45
Figura 31. Triterpenos isolados das folhas de <i>P.locuples</i>	46
Figura 32. Estrura do composto 8.	47
Figura 33. Esquema de obenção do composto 8a.....	48
Figura 34. Estrutura do composto 9.	49
Figura 35. Esquema de obtenção do composto 9a.	50
Figura 36. Mistura de compostos 2 e 3.	50
Figura 37. Dissacáridos isolados de folhas de <i>P. locuples</i>	52
Figura 38. Estrutura de composto 4.....	54
Figura 39. Estrutura e configurações do composto 4 e seu epímero (composto 5).....	55
Figura 40. Estrutura do composto 6.	56
Figura 41. Estrutura e configuração do composto 6 e seu epímero (composto 7).	57
Figura 42. Estrutura do composto 11.	57
Figura 43. Estrutura do composto 12.	58
Figura 44. Estrutura do composto 13.	58
Figura 45. Estrutura do composto 14.	59
Figura 46. Estrutura do composto 15.	59
Figura 47. Estrutura do composto 16.	60
Figura 48. Estrura do composto 17.	60
Figura 49. Estrura do D-glucitol isolado das folhas de <i>P. locuples</i>	65
Figura 50. Cromatograma do composto 10 analisado por GC/MS.	67
Figura 51. Espetro de massa de penta-O-acetil-1-O-metil-Dglucitol.....	68
Figura 52. Cromatograma das geninas analisadas por GC/MS.....	69
Figura 53. Espetro de massa de benzaldeido.....	69
Figura 54. Espetro de massa do ácido benzóico.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécie do género <i>Psydrax</i> existentes em Moçambique	4
Tabela 2. Espécie do género <i>Psydrax</i> inexistentes na preliminary checklist of vascular plants of Mozambique.	4
Tabela 3. Historial da pesquisa de informação referente a <i>psydrax</i>	7
Tabela 4. Algumas espécies do género <i>canthium</i> popularmente utilizadas na medicina tradicional.	13
Tabela 5. Frações obtidas do fracionamento de Ext.AcOEt.	30
Tabela 6. Rendimento de extratos obtidos por maceração	44
Tabela 7. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H dos compostos 8 (CDCl_3) e 9 ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$)..	51
Tabela 8. Experimento HMBC do composto 4.	54
Tabela 9. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H dos compostos 4 e 14 (CDCl_3).....	61
Tabela 10. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H dos compostos 6 e 13 em CDCl_3	62
Tabela 11. Dados de RMN ^{13}C e ^1H dos compostos 11 e 15 em CDCl_3	63
Tabela 12. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H dos compostos 12 e 16 em CDCl_3	64
Tabela 13. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H do composto 10 em CDCl_3	66
Tabela 14. Atividade antioxidante de extratos/frações de <i>p. locuples</i> (média \pm SD).	71
Tabela 15. Atividade antitumoral de extratos/frações de folhas de <i>P. locuples</i> (média \pm SD).	72
Tabela 16. Atividade antitumoral de compostos isolados (média \pm SD).	74

RESUMO

A humanidade sempre utilizou plantas medicinais como fonte primária no tratamento de algumas doenças. Em África, as plantas do género *Psydrax* são popularmente usadas na medicina tradicional para o tratamento de várias doenças e sintomas, incluindo malária, febre, dores de cabeça, edema, reumatismo, diarreia, conjuntivites, micoses e outras doenças inoficiosas. Existem estudos sobre os compostos presentes em algumas das plantas do género mencionado e responsáveis pela sua bioatividade, mas pouco se sabe sobre o perfil químico de *Psydrax locuples* (K. Schum.) Bridson. Assim, com o objetivo de contribuir para a descoberta de novos constituintes e avaliação de propriedades bioativas dessa espécie, foram realizados estudos com as folhas, muito utilizadas na medicina tradicional no sul de Moçambique.

Os extratos foram preparados por maceração das folhas secas e moídas, sequencialmente, com solventes de polaridade progressiva. Os compostos solúveis em acetato de etilo, na maioria dos casos após acetilação, foram purificados por cromatografia em coluna e preparativa em camada fina. A elucidação estrutural destes compostos foi feita através da espectroscopia de RMN e espectrometria de massa (HRMS).

Foram isolados derivados acetilados de dois triterpenos (ácido ursólico e 11 β -hidroxiursólico) que, posteriormente, foram esterificados com trimetilsilildiazometano de forma a converter o grupo carboxílico em éster metílico. Quer o composto 11 β -hidroxiursólico, quer os seus derivados eram desconhecidos. Também foram identificados nove dissacáridos acetilados dos quais cinco são cianogénicos. Previamente, já haviam sido descobertos numa planta de outra espécie, dois dissacáridos cianogénicos relacionados com os isolados.

O potencial antioxidante dos extratos/frações foi determinado pela atividade captadora de radicais 2,2-difenil-picril-hidrazilo (DPPH), poder redutor (PR) e inibição da descoloração do β -caroteno. Todos os extratos/frações, apresentaram resultados satisfatórios, principalmente os extratos de metanol e água ($EC_{50}DPPH = 0,29$ e $0,32$ mg/mL, respetivamente; $EC_{50}PR = 0,31$ e $0,30$ mg/mL, respetivamente; $EC_{50}\beta$ -caroteno = $0,52$ e $0,31$ mg/mL, respetivamente).

O potencial antitumoral foi avaliado *in vitro*, em quatro linhas celulares tumorais humanas (HeLa, HepG2, MCF7 e NCI-H460), pelo método da sulforodamina B. Todos os extratos e compostos isolados (sobretudo triperpenos e dissacáridos) revelaram atividade inibitória do crescimento celular. O extrato de acetato de etilo acetilado foi o que apresentou maior atividade em todas as linhas celulares testadas ($80 \mu\text{g/mL} < \text{GI}_{50} < 219 \mu\text{g/mL}$). A ausência de toxicidade dos extratos foi confirmada e ensaiada em culturas primárias de células de fígado de porco (PLP2). Os resultados dos ensaios de bioatividade vêm realçar o potencial medicinal das folhas de *P. locuples* tão utilizadas na medicina tradicional em Moçambique.

ABSTRACT

Since ancient times, mankind has used medicinal plants as primary source to treat some diseases. In Africa, plants belonging to the genus of *Psyrax* are popularly used in the traditional medicine to treat several symptoms and diseases, such as fevers, malaria, edema, headache, rheumatic pains, diarrhea, conjunctivitis, mycoses and other infectious diseases. There are available studies on the compounds present in some of the plants of the mentioned genus and responsible for their bioactivity, but the chemical profile of *Psyrax locuples* (K. Schum.) Bridson is still unknown. Therefore, in order to contribute to the discovery of new compounds and evaluation of bioactive properties of this species, studies with its leaves, highly used in the traditional medicine in south of Mozambique, were carried out.

The extracts were obtained by sequential maceration of the powder of the dried leaves of *P. locuples* using different solvents and increasing polarity.

The soluble compounds in ethyl acetate, most of the cases after their acetylation, were purified by column and thin-layer preparative chromatographies. Their structural elucidation was done by NMR spectroscopy and mass spectrometry (HRMS).

We have isolated acetylated derivative of two triterpenes (ursolic and 11 β -hydroxyursolic acids) that were subsequently esterified with trimethylsilyldiazomethane to convert the carboxylic to an ester group. 11 β -Hydroxyursolic acid and its derivatives were unknown compounds. Furthermore, nine diglycoside compounds, which five are cyanogenic compounds, were also identified. Two cyanogenic diglycosides related with the ones isolated in the present work were previously identified in other species.

Bioassays were conducted in order to know the biological potential of extracts and isolated compounds. The antioxidant activity of all the extracts/fractions was evaluated through DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical scavenging activity, reducing power (RP) and β -carotene bleaching inhibition. All the extracts/fractions showed satisfactory results, especially the methanolic and water extracts ($EC_{50}DPPH = 0.29$ and 0.32 mg/mL, respectively; $EC_{50}RP = 0.31$ and 0.30 mg/mL, respectively; $EC_{50}\beta$ -carotene = 0.52 and 0.31 mg/mL, respectively).

The *in vitro* antitumor potential of all the extracts and isolated compounds was evaluated in four human tumor cell lines (HeLa, HepG2, MCF7 and NCI-H460) by Sulforhodamine B assay. All the extracts and isolated compounds (especially triterpenes and diglycosides) showed results against tumor cell lines. The acetylated ethyl acetate extract expressed better inhibition of the cell growth in all the lines tested ($80 \mu\text{g/mL} < \text{GI}_{50} < 219 \mu\text{g/mL}$). The absence of toxicity of the extracts was confirmed in a primary culture of porcine liver cells (PLP2). The results obtained in the bioassays validate the medicinal potential of *P. locuples* leaves, commonly used in the traditional medicine of Mozambique.

INTRODUÇÃO

A utilização de matrizes vegetais para fins terapêuticos é tão antiga quanto a civilização humana e, por muito tempo, produtos minerais, vegetais e animais foram fundamentais para a área da saúde. Historicamente, as plantas medicinais são importantes como fitoterápicos e na descoberta de novos fármacos, estando no reino vegetal a maior contribuição para a formulação de medicamentos (Rodrigues & Amaral, 2012).

As plantas superiores são fontes de milhares de produtos naturais, com uma variedade quase infinita de estruturas diferentes. As suas moléculas têm, frequentemente, funções específicas e muitas delas apresentam atividades biológicas que podem ser úteis para os seres humanos (Hostettmann *et al.*, 2008). Rodrigues & Amaral (2012) estimam que 5 mil espécies foram já estudadas com fins medicinais. De facto, as plantas superiores formam um pequeno grupo de cerca de 250 000 espécies, das quais apenas 6 % foram investigadas farmacologicamente e 15 % fitoquimicamente (Heinrich *et al.*, 2004; Rodrigues & Amaral, 2012).

As plantas dos trópicos e subtropicais são bastante abundantes mas têm sido pouco estudadas; inclusivamente, muitas delas ainda nunca foram estudadas e outras estão a desaparecer antes de terem sido catalogadas botanicamente (del Fresno *et al.*, 1999; Hostettmann *et al.*, 2008). Estas representam um enorme reservatório de novas moléculas com potenciais atividades terapêuticas à espera de serem descobertas (Hostettmann *et al.*, 2008).

A Organização Mundial de Saúde (OMS), considerando as plantas medicinais como importantes instrumentos de assistência farmacêutica, tem expressado, por meio de vários comunicados e resoluções, a sua posição a respeito da necessidade de valorizar a sua utilização no âmbito sanitário, sobretudo, ao observar que 70 % a 90 % da população nos países em vias de desenvolvimento depende delas no que se refere aos cuidados primários de Saúde (Rodrigues & Amaral, 2012). Segundo informações da OMS, descritas pelos mesmos autores, 60 % da população mundial utiliza medicamentos tradicionais, baseados numa história de utilização prolongada, com frequência milenar.

Segundo Lobo & Lourenco (2007), os princípios ativos são geralmente metabolitos secundários cuja função ainda não é bem conhecida; alguns parecem não ser essenciais à vida do organismo que os biossintetiza, outros são essenciais na comunicação da espécie, outros ainda podem constituir defesas em caso de ataque. Heinrich *et al.* (2004) estimam que cerca de 139 000 metabolitos secundários foram já isolados, sendo 16 833 alcaloides e 30 000 terpenos. Exemplos clássicos de drogas de origem vegetal, incluem o agente antimalárico quinina, extraído a partir da casca de *Cinchona officinales* L. (Rubiaceae), o analgésico morfina e o bem conhecido antitússico codeína, ambos extraídos de *Papaver somniferum* L. [(opium) poppy] (Papaveraceae), a atropina extraída de *Atropa belladonna* L. (atropa) com propriedades anticolinérgicas e outras espécies das Solanaceae, e a digoxina extraída de *Digitalis spp.* (Scrophulariaceae), utilizada para o tratamento de insuficiência cardíaca (Heinrich *et al.*, 2004; Hostettmann *et al.*, 2008).

Moçambique é um repositório importante de diversidade biológica. Esta diversidade é usada por cerca de 90 % da população do país, maioritariamente das zonas rurais, para satisfazer as suas necessidades habitacionais, energéticas, alimentares e de saúde. Em Moçambique, cerca de 15 % do total dos recursos genéticos vegetais (estimado em cerca de 5500 espécies de plantas) é utilizado pelas comunidades rurais para fins medicinais e desempenham um papel fundamental nos cuidados básicos de saúde (Senkoro *et al.*, 2012). Na região sul de Moçambique (províncias de Inhambane, Gaza e Maputo), usam-se as folhas de *Psydrax locuples* (K. Schum.) Bridson para tratar e prevenir a "doença da lua", doença caracterizada por febre, vômitos, diarreia, dor de cabeça, cólicas abdominais, e por produzir sintomas e sinais idênticos aos da epilepsia, em recém-nascidos e crianças.

É neste âmbito, que o presente trabalho pretende caracterizar quimicamente e avaliar as propriedades bioativas de folhas de *Psydrax locuples* (K. Schum.) Bridson. Alguns dos compostos identificados serão isolados de forma a confirmar as moléculas bioativas e responsáveis pelas propriedades observadas. Até então, desconhece-se a composição química das folhas e ainda não foram confirmadas as propriedades bioativas que suportam a sua utilização pelas populações do sul de Moçambique.

1. ESTADO DA ARTE

1.1. Família Rubiaceae

Segundo Coelho *et al.* (2006), a família Rubiaceae é a maior da ordem Gentianales, com cerca de 650 géneros e 13 000 espécies, que corresponde a 66 % do total das Gentianales. Entretanto, a subdivisão da família tem variado de acordo com o autor. Estudos filogenéticos mais recentes propõem a divisão de Rubiaceae em três subfamílias: Rubioideae, Cinchonoideae e Ixoroideae. Esta família está distribuída por todo o mundo essencialmente nos trópicos e em regiões quentes (Heinrich *et al.*, 2004). Coelho *et al.* (2006), referem ainda que esta família possui espécies de grande importância económica, que são exploradas como alimentares (*Coffea arabica* L. e *Genipa americana* L.), ornamentais (*Ixora spp.*, *Mussaenda spp.*, *Gardenia spp.*, etc.), e também na indústria farmacêutica, como por exemplo *Cinchona pubescens* Vahl, produtora de quinina, utilizada no tratamento da malária.

1.2. Género Psydrax

A *Plant List* (2010), um projeto internacional que visa montar um sólido banco de dados de plantas, contando com a participação de institutos como *Royal Botanic Gardens* e o *Missouri Botanical Garden*, incluem 80 espécies do género *Psydrax*. Segundo Hyde *et al.* (2007), a Flora de Moçambique comporta 9 espécies de *Psydrax*, uma delas representada com duas subespécies (**Tabela 1**).

Tabela 1. Espécie do género *Psydrax* existentes em Moçambique.

Psydrax

fragrantissima (K.Schum.) Bridson;
kaessneri (S. Moore) Bridson;
kraussiioides (Hiern) Bridson;
livida (Hiern) Bridson;
locuples (K. Schum.) Bridson;
micans (Bullock) Bridson;
moggii Bridson;
obovata (Eckl. &Zeyh.) Bridson subsp.elliptica Bridson;
obovata (Klotzsch ex Eckl. &Zeyh.) Bridson subsp.obovata;
parviflora (Afzel.) Bridson subsp.chapmanii Bridson.

Adaptado de Hyde *et al.*, (2013)

A *Preliminary Checklist of the Vascular Plants of Mozambique*, descrita por Da Silva *et al.* (2004), refere a existência de apenas 7 espécies, não validando a presença em Moçambique das seguintes espécies de *Psydrax* (**Tabela 2**).

Tabela 2. Espécie do género *Psydrax* inexistentes na preliminary checklist of vascular plants of Mozambique.

Psydrax

kaessneri (S. Moore) Bridson;
parviflora (Afzel.) Bridson subsp.chapmanii Bridson;
obovata (Eckl. &Zeyh.) Bridson subsp. Elliptica Bridson.

1.3. *Psydrax locuples* (K. Schum.) Bridson

1.3.1. Classificação científica

Seguindo o sistema de classificação das plantas com flor (angiospérmicas) proposto por Chase & Reveal (2009), a espécie em estudo (**Figura 1**) classifica-se do seguinte modo:

Classe: Equisetopsida

Subclasse: Magnoliidae

Ordem: Gentianales
Superordem: Asteranae
Família: Rubiaceae
Género: Psydrax
P. locuples (K. Schum.) Bridson



Figura 1. *Psydrax locuples* (K. Schum.) Bridson.

1.3.2. Sinonímias

Canthium locuples (K.Schum.) Codd;

Plectronia locuples K.Schum (Germishuizen & Meyer, 2003).

1.3.3. Nomes vernaculares em Moçambique

Bandissa-lhoko, Shihlobongo (Da Silva *et al.*, 2004).

1.3.4. Descrição

É uma árvore/arbusto perene com uma altura que varia entre 2-6 m, com um padrão impressionante de ramificação; os ramos crescem em pares opostos exatamente em ângulo reto com o ramo principal. As folhas são pequenas e brilhantes, com margens onduladas. As flores são muito pequenas e brancas. Os frutos são bagas assimétricas,

brilhantes e negros. A sua propagação é feita através da semente (David & Nichols, 2002; Germishuizen & Meyer, 2003).

1.3.5. Distribuição geográfica e *habitat*

Encontra-se em regiões quentes. Desenvolve-se em planícies costeiras ou dunas, florestas, geralmente em solo arenoso ou sobre afloramentos de arenito e em declives de montanhas rochosas. A taxa de crescimento é de cerca de 40 cm por ano. Tolerante ao frio, mas cresce melhor em ambiente acolhedor, com chuvas moderadas (GBIF, 2000; David & Nichols, 2002).

Em África, a espécie encontra-se distribuída em Moçambique, África do Sul, Suazilândia e Zimbábue (GBIF, s.d). Em Moçambique, a espécie encontra-se nas províncias de Inhambane, Gaza e Maputo (Da Silva *et al.*, 2004).

1.3.6. Usos em Moçambique

As folhas frescas de *P. locuples* são utilizadas no alívio de dores de cabeça. As folhas são esmagadas, e posteriormente, colocadas sobre a testa, amarradas com um lenço de cabeça (Turner, 2002). Além deste uso, as folhas são também utilizadas para tratar e prevenir a "doença da lua". Usam-se normalmente folhas dissecadas, maceradas em água numa concha de caracol durante horas. A tisana resultante é administrada fria por via oral nas primeiras horas da manhã e à noite a recém-nascidos e crianças até aos 5 anos de idade.

1.4. Composição química e propriedades bioativas de *P. locuples*

Após extensa pesquisa bibliográfica, não foram encontrados estudos sobre a composição química e atividade farmacológica/propriedades bioativas desta espécie. Para a revisão bibliográfica partiu-se, então, do seguinte pressuposto de Hostettmann *et al.* (2008):

"os componentes são muitas vezes específicos para uma família, género ou espécie. Se um produto natural possui atualmente propriedades curativas interessantes, pode ser possível encontrar espécies análogas num mesmo género ou na mesma família". Assim, optou-se por fazer uma revisão bibliográfica sobre outras espécies já estudadas e pertencentes a família Rubiaceae.

Para a recolha da informação referente à composição química e atividades farmacológicas/propriedades bioativas de *Psydrax*, procedeu-se em outubro de 2013, a uma pesquisa na *ISI Web of knowledge [v5.13]*, onde se usou a seguinte estratégia (**Tabela 3**).

Tabela 3. Historial da pesquisa de informação referente a *Psydrax*.

Conjunto	Estratégia de pesquisa	Resultados
1	Tópico: (<i>Psydrax</i>)	18
2	Tópico: (<i>Whipstickquar</i>)	0
3	Tópico: (<i>Canthium</i>)	68
4	Tópico: (<i>Plectronia</i> ou <i>Afrocanthium</i> ou <i>Cyclophyllum</i> ou <i>Keetia</i>)	35
Total		102

Foram encontrados 102 artigos, que por sua vez, foram refinados através da leitura dos títulos e resumos, tendo sido incluídos nesta secção do documento 45 artigos.

1.4.1. Composição química

Segundo Kouam *et al.*(2013), a família Rubiaceae é reconhecida como uma fonte rica em compostos bioativos, incluindo iridoides, alcaloides e triterpenos. Os mesmos autores referem ainda, que a maioria dos iridoides isolados nesta família foram descritos como tendo um esqueleto ciclopentapirano, com o grupo funcional de éster metílico ou de ácido carboxílico.

Estudos de investigação nas espécies do género *Canthium*, mostram que estas contêm caracteristicamente compostos como iridoides, terpenoides, glucósidos cianogénicos, glucósidos fenólicos e alcaloides (Kouam *et al.*, 2013).

De acordo com os estudos iniciados por Herath *et al.* (1979) e complementados por Gunasegaran *et al.* (2001), nas folhas e cascas do caule de *C. dicoccum*, foram isolados diferentes compostos bioativos nomeadamente, β -sitosterol (1), ácidos quinováico (2) e acetil quinováico, rutina (3) e escopolatina (4) (**Figura 2**).

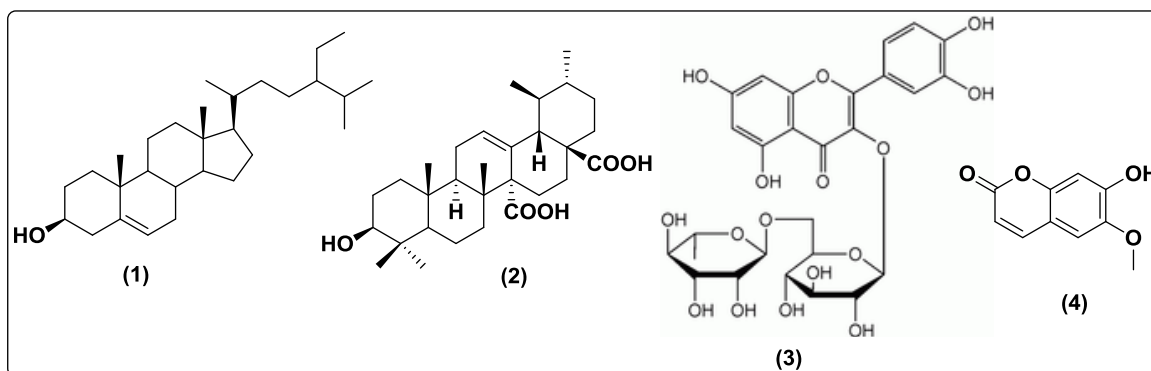


Figura 2. Compostos isolados das folhas e cascas do caule *C. dicoccum*.

Segundo Rockenbach *et al.* (1992) e Schwarz *et al.* (1996), o estudo das folhas e frutos de *C. huillense* e *C. shimperianum*, culminou com o isolamento da prunasina (5), seus derivados e outro novo glucósido cianogénico (6) (**Figura 3**).

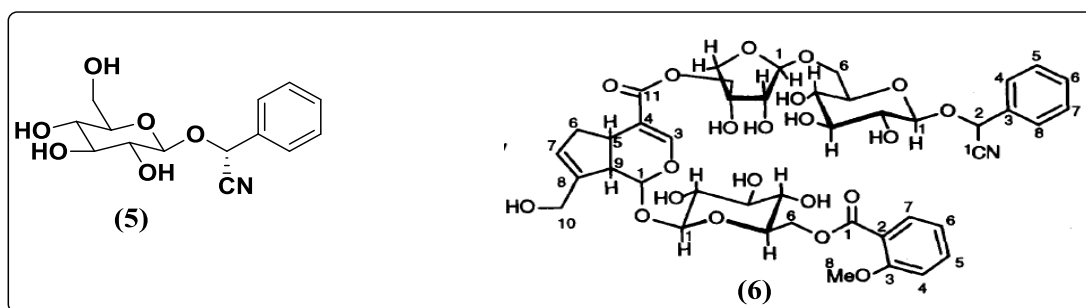


Figura 3. Glucósidos cianogénicos isolados das folhas e frutos de *C. huillense* e *C. shimperiam*.

Outro estudo das partes aéreas de *C. berberidifolium*, realizados por Kanchanapoom *et al.* (2002), também permitiu o isolamento do ácido genipósido (7), outro derivado iridoico (10), piceína (8), e de vários glucósidos fenólicos (9, 11, 12, 13 e 14) (**Figura 4**).

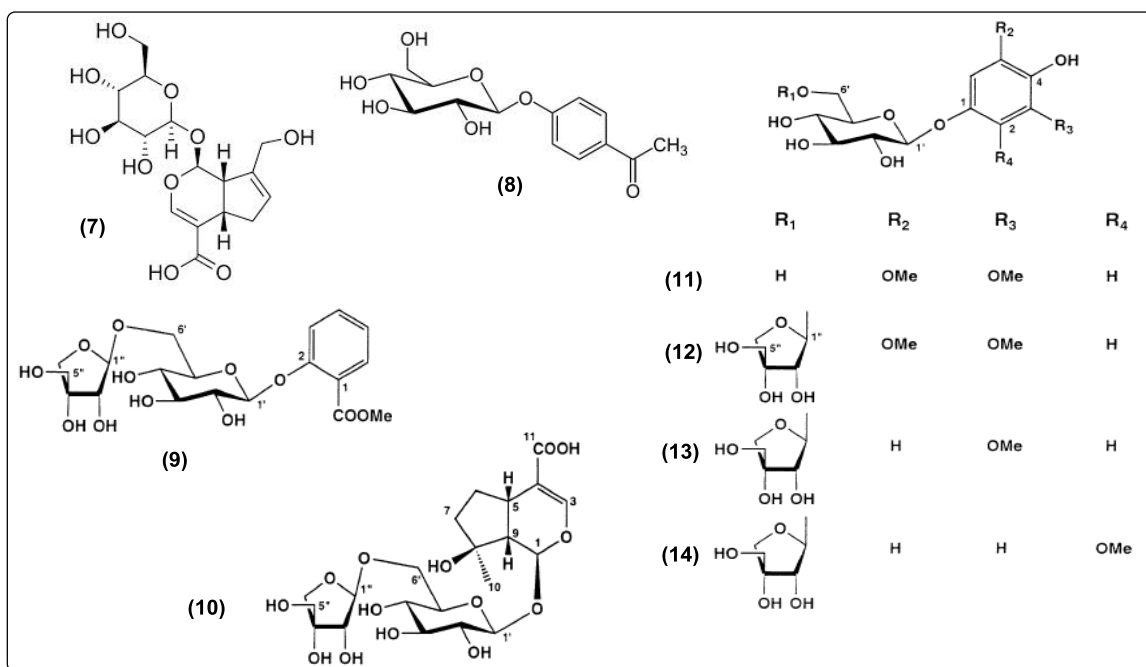


Figura 4. Glucósidos e iridoídes isolados da partes aéreas de *C. berberidifolium*.

O estudo da composição fitoquímica das folhas *C. parviflorum* Lam., efetuado por Jose *et al.* (2008) e por Pasumarthi *et al.* (2011), permitiu isolar compostos bioativos como β -sitosterol (1), taraxerol (15), D-manitol (16), petunidina (17) e glucósidos cardíacos (18), incluindo ésteres, ácidos e álcoois de cadeia longa (**Figura 5**).

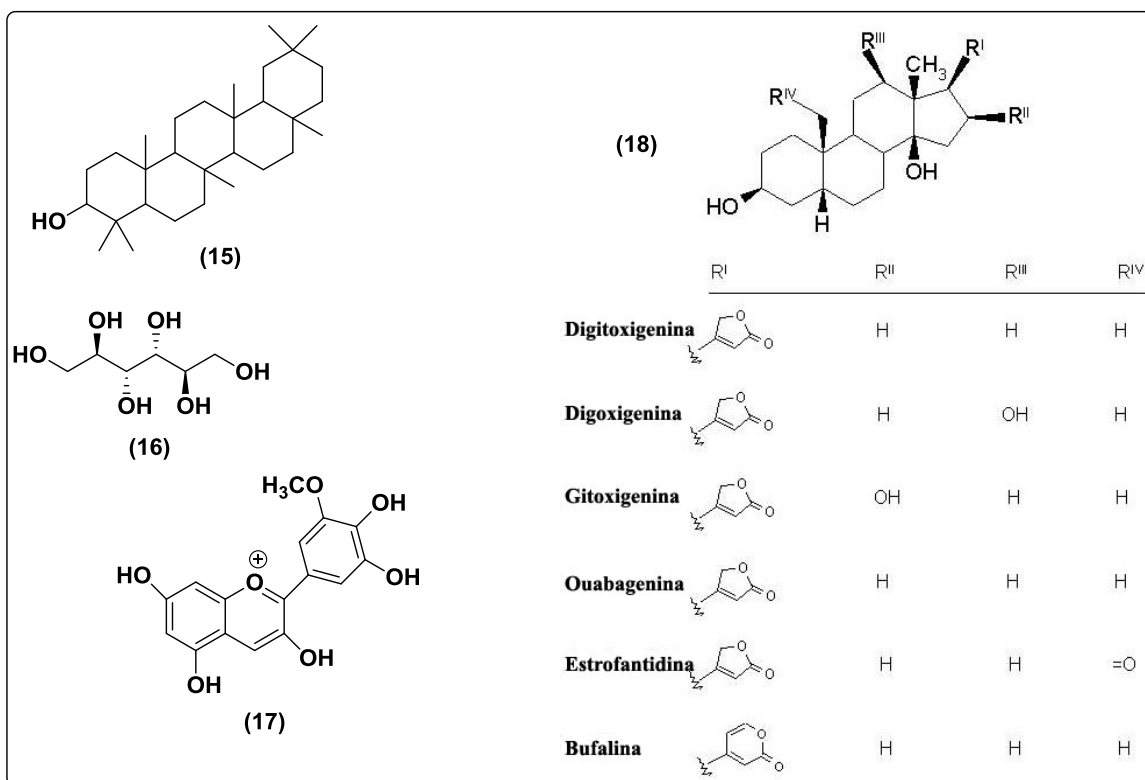


Figura 5. Compostos extraídos das folhas de *C. parviflorum* Lam.

Os estudos das raízes e folhas de *C. multiflorum* (Thonn.) Hier, indicaram presença de derivados do ácido-28-ursólico hidroxilado (18), cumarinas metoxiladas (19): escopolatina (4), escoparona e outros e derivado iridóico (20) (Traoré *et al.*, 2008; Coulibaly *et al.*, 2009; Akomo *et al.*, 2009) (Figura 6).

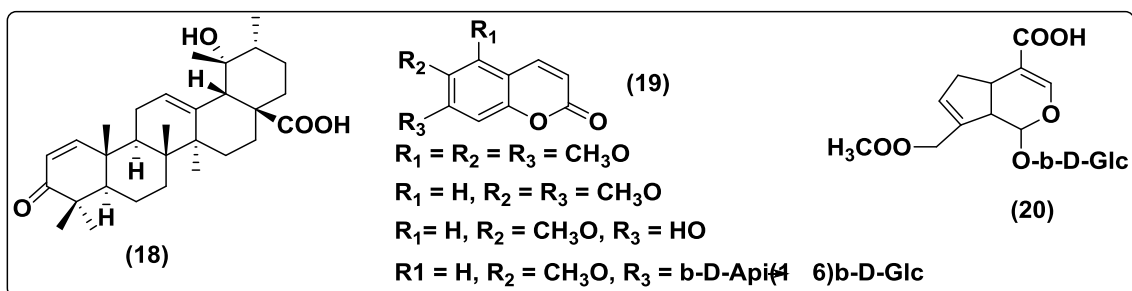


Figura 6. Compostos extraídos das folhas de *C. multiflorum* (Thonn.) Hier

Kouam *et al.* (2013), vieram complementar o estudo da planta *C. multiflorum* (Thonn.) Hier, com o isolamento a partir da casca do caule, de vários metabolitos secundários, incluindo ácido quinováico (2), manitol (15), 6-oxoginipina (21),

macrofilósido (22), garjasmine (23), gardenine (24), gardenamida (25), galiósido (26), aitchisónido B (27), 6 α -hidroxigenipósido (28), ácido diacetilasperulósido (29), ácido vanílico 4-*O*- β -D-(6-*O*-benzoilglucopiranósido (30), ácido oleanólico (31) e um ácido vanílico (32) (**Figura 7**).

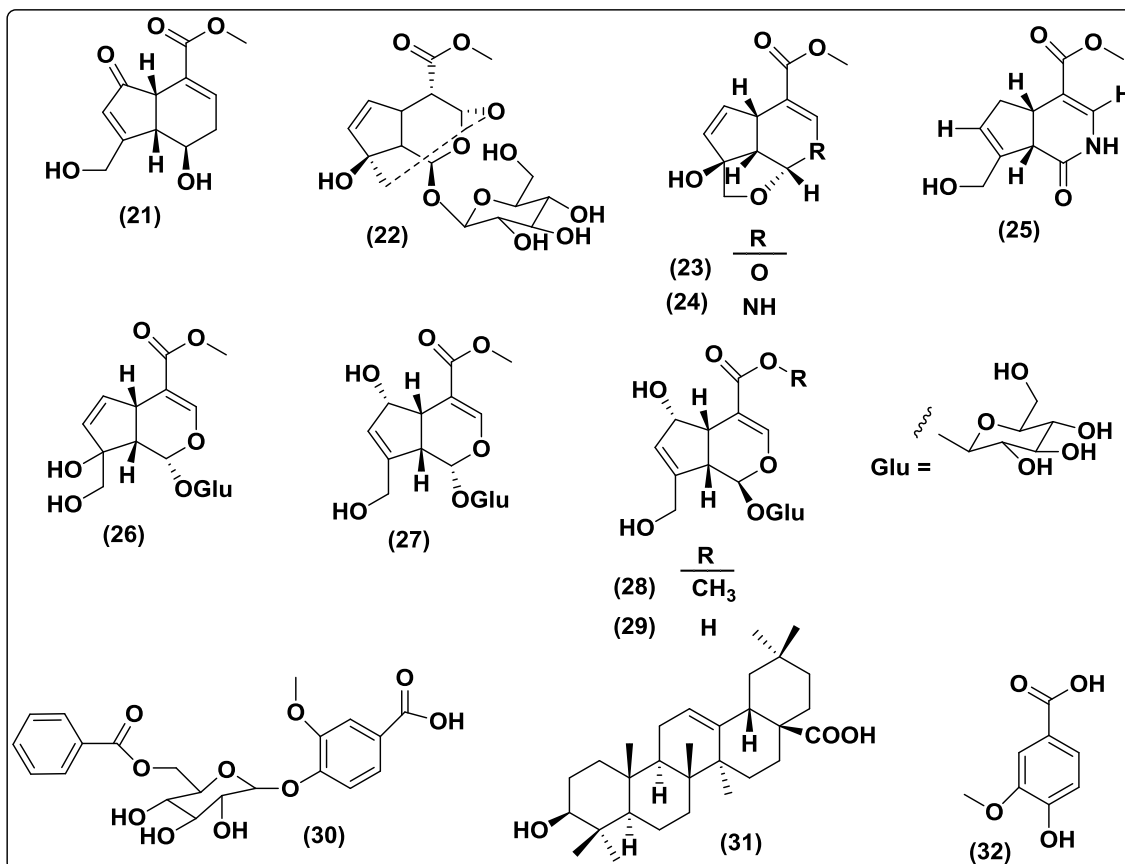


Figura 7. Compostos extraídos da casca do caule de *C. multiflorum* (Thonn.) Hier.

Numa outra espécie de *C. glaucum* Hiern., Musila *et al.* (2013), para além dos alcaloides e flavonoides, puderam também isolar lactonas sesquiterpénicas. Num outro estudo com folhas e galhos de *C. henriquesianum*, efetuado por Ilboudo *et al.* (2013), foram identificadas nos extratos aquosos, misturas de flavonoides, taninos hidrolisáveis e saponinas.

Estudos biomonitorados com extratos da casca do caule *C. horridum* Bl., conduziram ao isolamento de dez compostos: β -sitosterol (1), manitol (16), cumarina metoxilada (19), escopoletina (4) e escoparona, ácido vanílico 4-*O*- β -D-

glucopiranosídeo(30), (+)-siringaresinol (33), 3'-metoxi-4'-hidroxi-trans-cinamaldeído (34), aldeído sinápico (35), ácido sirínico (36), e β -daucosterol (37) (Yang *et al.*, 2010) (Figura 8).

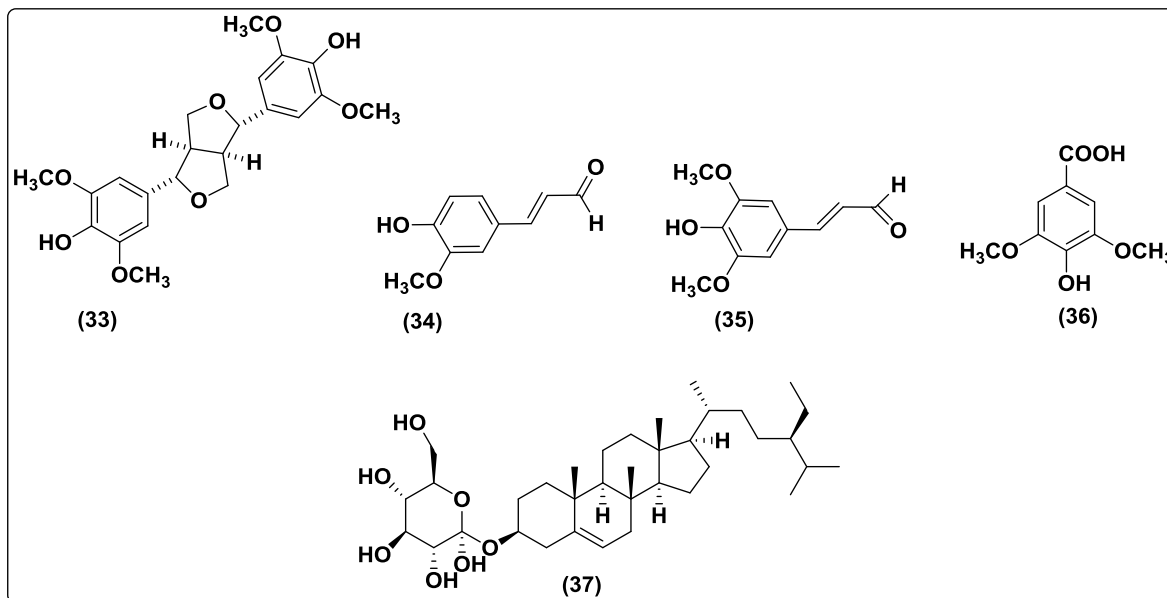


Figura 8. Compostos extraídos da casca do caule de *C. horridum* Bl.

1.4.2. Propriedades bioativas

Foram realizados vários estudos fitoquímicos em espécies do género *Canthium*, que comprovaram a presença de vários metabolitos secundários. Segundo Musila *et al.* (2013), estes metabolitos secundários, são responsáveis pelas atividades biológicas destas espécies. De acordo com Bero *et al.* (2009) e Ilboudo *et al.* (2013), estas espécies são popularmente usadas na medicina tradicional para o tratamento de várias doenças (Tabela 4).

Tabela 4. Algumas espécies do género *canthium* popularmente utilizadas na medicina tradicional.

Nome botânico	Parte usada	Indicações	Referência
<i>Keetia leucantha</i> (K. Kruse) Bridson (syn. <i>Plectronia leucantha</i> Krause)	Folhas	Malária e doenças respiratórias	Koné <i>et al.</i> (2004) e Bero <i>et al.</i> (2009)
<i>Canthium multiflorum</i> (Thonn.) Hier	Folhas	Várias doenças, incluído febre, malária, dores de cabeça, edema, reumatismo, diarreia, conjuntivites, micoses e outras doenças inoficiosas	Akomo <i>et al.</i> (2009)
	Raízes	Hipertensão	Traoré <i>et al.</i> (2008)
<i>Canthium mannii</i> Hier	Cascas do caule	Helmintíase	Pone <i>et al.</i> (2009)
<i>Canthium parviflorum</i> Lam.	Folhas	Anti-veneno e cicatrizante de feridas	Pasumarthi <i>et al.</i> (2011)
<i>Canthium sucordatum</i> (D.C.)	Raiz	Malária, febre, inflamação, doenças cardiovasculares	Awah <i>et al.</i> (2012)
<i>Canthium henriquesianum</i> (K. Schum)	Parte aérea	Malária, tosse, diabetes e hipertensão	Ilboudo <i>et al.</i> (2013)

Kouam *et al.* (2013), atribuem aos iridoides várias actividades biológicas, incluindo actividades citotóxica, antiplasmódica, antifúngica e antibacteriana.

1.4.2.1. Propriedades antiparasitárias

1.4.2.1.1. Actividade antiplasmódica

Segundo Bero *et al.* (2009), estudos *in vitro* de extratos de diclorometano, metanólicos e aquosos de folhas e galhos de *Keetia leucantha* (K. Krause) Bridson (syn. *Plectronia eucantha* Krause), mostraram que os extratos de diclorometano foram mais ativos frente aos parasitas *Plasmodium falciparum*; resultados similares foram verificados

nos extratos de diclorometano obtidos a partir de raízes de *C. multiflorum* (Iboudo *et al.*, 2013).

Estudos *in vivo* com extratos orgânicos de *C. glaucum*, realizados por Musila *et al.* (2013), mostraram que estes conseguiram inibir o crescimento de parasitas de *Plasmodium berghei*, comprovando deste modo que esta espécie era possuidora de atividade antiplasmódica. Um outro estudo envolvendo o mesmo tipo de parasitas realizado por Bero *et al.* (2013), comprovou que extratos orgânicos e aquosos de galhos de *Keetia leucantha* eram significativamente ativos na inibição do crescimento desses parasitas. Os mesmos autores ainda referem que os extratos eram constituídos por uma mistura de ésteres de triterpenos que são possuidoras de atividade antiplasmódica. A presença de maior quantidade destes ésteres triterpênicos, ácidos ursólico e oleanólico nos extratos de diclorometano de *Keetia leucantha* pode justificar, em parte, a atividade antiplasmódica dos extratos brutos. Estudos efetuados por outros autores revelaram que a atividade antiplasmódica dos dois ácidos foi observada em duas experiências, uma vez que inibiram o parasita *Plasmodium falciparum* com $EC_{50} = 9,3$ e $4,9 \mu\text{g/mL}$ e $EC_{50} = 15,2$ e $3,1 \mu\text{g/mL}$ para o ácido ursólico e oleanólico, respetivamente (Bero *et al.*, 2011).

1.4.2.1.2. Atividade antitripanossomial e antileishmanial

Bero *et al.* (2011), realizaram testes *in vitro* para a avaliação da atividade antitripanossomial e antileishmanial. Segundo os autores, foram preparados extratos de diclorometano, metanólicos e aquosos de galhos de *Keetia leucantha*, as actividades foram observadas nos extratos de diclorometano, pela inibição do crescimento do parasita *Trypanosoma brucei*. Os mesmos autores referem que o extrato de diclorometano foi, posteriormente fracionado, o que permitiu a identificação dos ácidos ursólico e oleanólico como componentes maioritários. Estes ácidos também foram testados relativamente às suas actividades antitripanossomial e os resultados foram: $EC_{50} = 1,0 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$ e $EC_{50} = 2,8 \pm 0,5 \mu\text{g/mL}$ para os ácidos ursólico e oleanólico, respetivamente. Um outro estudo *in vitro* de avaliação da atividade antitripanossomial envolvendo extratos de diclorometano de folhas de *Keetia leucantha* e óleo essencial extraído de folhas da mesma planta, provou

mais uma vez que os ácidos betulínico, ursólico e oleanólico eram os maiores constituintes no extrato e possuíam elevada atividade antitripanossomial; os compostos que tiveram maior atividade no óleo essencial foram: geranilacetona, fitol, α -ionona e β -ionona (Bero *et al.*, 2013).

1.4.2.1.3. Atividade nematicidal

A atividade nematicidal de extratos etanólicos de cascas do caule de *Canthium mannii* foram avaliadas *in vivo* usando parasitas *Heligmosomoides polygyrus*, obtidos a partir de fezes e duodeno de ratos adultos, tendo o extrato reduzido significativamente os parasitas das fezes e do duodeno (75,0 % e 83,6 %, respectivamente), 7 dias após o tratamento. A atividade do extrato pode ser atribuída à concentração de álcool e princípios ativos anti-helmínticos solúveis que influenciam a vida do parasita. A atividade nematicidal observada pode ser devida ao facto da casca do caule de *C. mannii* conter metabolitos secundários tais como alcaloides, flavonoides, polifenóis e saponinas (Pone *et al.*, 2009).

1.4.2.2. Propriedades antibacterianas

Foram realizados estudos *in vitro* para avaliar as propriedades antimicrobianas de extratos de espécies do género *Canthium*, utilizando o método de difusão de disco em agar. De acordo com Akomo *et al.* (2009), foram preparados extratos metanólicos e aquosos de folhas de *C. multiflorum* e submetidos a um teste *in vitro* usando vários microrganismos. Após cerca de 11 horas de exposição, os resultados mostraram que todas as bactérias eram suscetíveis a todos os extratos. No entanto, a suscetibilidade foi maior para o extrato metanólico. O extrato revelou-se bactericida para *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphulococcus camorum*, *Staphulococcus aureus* e *Staphulococcus entérica*, e bacteriostático para *Bacillus cereus*.

Num outro estudo efetuado por Lagnika *et al.* (2011) com extratos metanólicos obtidos a partir de partes aéreas de *C. setosum* (*Keetia leucantha*), demonstrou-se a sua

atividade antibacteriana pela inibição do crescimento de *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. faecalis* e *E. coli* após 18 horas de incubação. Akomo *et al.* (2009) referem que outros autores demonstraram nos seus estudos que a atividade antibacteriana é devida à presença de compostos fenólicos nomeadamente, flavonoides, cumarinas e taninos.

1.4.2.3. Atividade antioxidante e citotóxica

Foi avaliada *in vivo* a atividade antioxidante de extratos metanólicos obtidos a partir de partes aéreas de *C. setosum*, utilizando o ensaio de captação de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo). Os resultados provaram que estes extratos eram possuidoras de propriedades antioxidantes, cujo valor de EC₅₀ foi de 3,47 µg/mL (Lagnika *et al.*, 2011). Segundo os mesmos autores, os extratos metanólicos eram maioritariamente constituídos por flavonoides. He *et al.* (2008), referem que a atividade antioxidante de vegetais está principalmente relacionada com a presença de flavonoides.

Para o ensaio da atividade citotóxica, foram preparados extratos aquosos e metanólicos de folhas de *C. parviflorum* e testados quanto ao seu efeito citotóxico na linha celular de adenocarcinoma de cólon (Caco-2). O extrato metanólico mostrou ser um agente citotóxico potente com uma EC₅₀ de 52 µg/mL; o extrato aquoso revelou uma EC₅₀ de 71 µg/mL. Nestes extratos, foram identificados vários metabolitos nomeadamente, saponinas, taninos, flavonoides e glucósidos cardiotónicos (Pasumarthi *et al.*, 2011). As saponinas com um núcleo triterpénico, geralmente possuem atividade antitumoral, como é o caso do α-fitol e do ácido betulínico (De Araujo *et al.*, 2009).

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho foi caracterizar quimicamente as folhas de *Psudras locuples* (k. Schum.) Bridson, e avaliar a sua bioatividade.

Como objetivos específicos foram considerados a:

- Preparação de extratos de hexano, diclorometano, acetato de etilo, metanol e água e correspondentes frações obtidos a partir de folhas de *P. locuples*;
- Conhecimento da composição, isolamento e purificação dos compostos solúveis em acetato de etilo utilizando métodos cromatográficos (CC e PTLC) e GC/MS;
- Elucidação das estruturas dos compostos presentes utilizando técnicas espectroscópicas: 1D e 2D RMN, HRMS e IV.
- Avaliação da bioatividade dos diferentes extratos/frações/compostos obtidos nomeadamente, atividade antioxidante e citotoxicidade em quatro linhas celulares tumorais humanas e hepatotoxicidade usando uma cultura celular obtida a partir de fígado de porco.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

As folhas de *Psydrax locuples* (K. Schum.) Bridson foram colhidas em agosto de 2013, em Moçambique, na província de Maputo, no distrito de Marracuene pelo Prof. Doutor François Munyemana. Após a sua colheita, procedeu-se à secagem, ao abrigo da luz (**Figura 9**), durante 30 dias, no Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Química, Faculdade de Ciências, Universidade Eduardo Mondlane (UEM) /Maputo. Este local possui condições adequadas para a secagem e armazenamento de órgãos de plantas medicinais: condições de higiene, ventilação e proteção contra ataques de insetos e outros animais. Para completar o processo de secagem as folhas foram colocadas na estufa a uma temperatura entre 35 a 40 °C (**Figura 10**), durante duas horas.



Figura 9. Processo de secagem das folhas de *P. locuples*, ao abrigo do sol.



Figura 10. Processo de secagem rápida das folhas de *P. locuples* utilizando estufa.

Após a secagem, estas folhas foram trituradas em moinho elétrico de facas (figura 11) até à forma fina (figura 12), fornecendo cerca de 1,137 kg de material. Este material foi identificado e devidamente guardado. Posteriormente foi enviado para a Universidade de Salamanca (USAL), onde foi conservada até ao mês de fevereiro de 2014, período em que se iniciaram os estudos num dos laboratórios do Departamento de Química Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, Salamanca (Espanha).

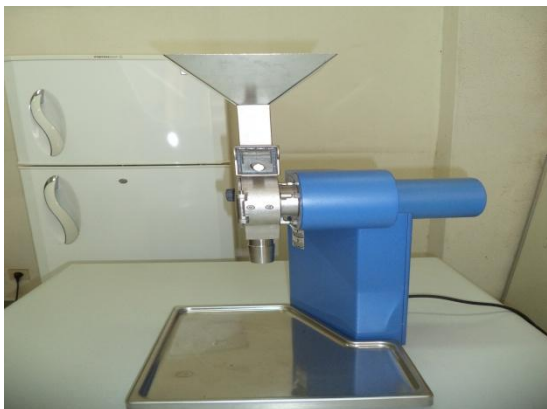


Figura 11. Moinho elétrico de facas utilizado para triturar as folhas de *P. locuples*.



Figura 12. Folhas de *P. locuples* na forma fina.

3.2. Equipamentos e reagentes

➤ **Extração, fracionamento, isolamento e identificação de compostos**

Todos os reagentes utilizados no processo de extração foram de grau analítico P.A, com a exceção do hexano que foi purificado no laboratório. Para obtenção dos extratos, assim como no processo de fracionamento, utilizou-se hexano, acetato de etilo, acetona, metanol e n-butanol (*Carlo Erba Reagents Group*). A água destilada foi tratada num sistema de purificação de água Millipore Direct-Q do Departamento de Química Analítica, Nutrição e Bromatologia da USAL

Os extratos e frações foram concentrados sob pressão reduzida a temperatura de 40 °C, em evaporador rotativo (*Buchi R-210*) acoplado a um banho de aquecimento (modelo B-491) da mesma marca. No extrato aquoso, a água foi removida usando-se um liofilizador (modelo Lyoquest) de marca Telstar.

A sílica gel 60 de granulação 0,063-0,200 mm (70-230 mesh ASTM) e sílica gel P60 de granulação 40-63 µm (230-400 mesh) foram utilizadas para o empacotamento das colunas (ambas da Merck).

Para a cromatografia em camada fina (TLC), foram utilizadas placas DC-*Fotigfolien ALUGRAM*[®]Sil G/UV₂₅₄, com 0,20 mm de espessura da *Macherey-Nagel*.

As revelações das placas foram realizadas sob luz ultravioleta no Duo-UV-Source for *thin-layer and column chromatography* de marca *Desaga*, a 254, 366 nm e ou por meio

de reação com uma mistura de ácido sulfúrico/etanol 96% (1:3), seguido de aquecimento da placa na estufa a 100 °C.

As cromatografias preparativas em camada fina (PTLC) foram desenvolvidas em placas de vidro de sílica gel 60 F₂₅₄ (20x 20 cm, 1 mm de espessura) de procedência *Merck*.

Para a elucidação estrutural das substâncias isoladas foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Espectrômetro de infravermelho: *Nicolect Impact 410*, utilizando pastilhas de KBr a 1% (m/m) ou em filme. Os valores de número de onda de máxima vibração (ν_{Max}) expressam-se em cm^{-1} .
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear *Varian* modelo *Mercury Vx 400* MHz (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C), usado para a obtenção dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT. Os espectros de COSY, HMQC, HMBC e ROESY, foram obtidos em um espectrômetro *Brucker* (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C). As amostras foram solubilizadas em clorofórmio (CDCl_3) e metanol(CD_3OD) deuterados, *CAMBRIDGE (Cambridge Isotope Laboratories)*. Nestas análises, foi utilizado como referencial interno, o sinal do tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J), em Hertz (Hz).
- Cromatógrafo de Gases *Hewlett Packard 5890 Series II* acoplado a um espectrômetro de massas *MSD Hewlett Packard 5972*. A coluna cromatográfica é uma *HP-5MS* (5 % de fenil) metilsilicona de 30 m, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 micrómetros de espessura de película. Utiliza o He como gás inerte.
- Os espectros de massas de alta resolução (HRMS): quadrupolo-tempo, modelo *Applied Biosystems QSTR XL*, utilizando o *elestrospray* como modo de ionização a 5500 V e um detetor *ESI-Q-TOF*; os iões observados expressam-se em m/z.
- A determinação do valor da atividade ótica $[\alpha]$ foi realizada num polarímetro *Perkin Elmer*, modelo 241.

Os pontos de fusão dos compostos foram obtidos em graus Celsius em aparelho *Gallankamp* de marca *Sanyo*.

➤ **Ensaio de bioatividade**

Para a avaliação da atividade antioxidante foram usados os seguintes padrões: O 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) foi obtido na Alfa Aesar (*Ward Hill, MA*) e o trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromato-2-carboxílico) foi adquirido à Sigma (*St. Louis, MO*). O ácido tricloroacético (TCA) foi também adquirido à Sigma (*St. Louis, MO*).

Para a avaliação da atividade antitumoral e citotóxica foram usados as seguintes soluções: o soro fetal bovino (SFB), a L-glutamina, a solução salina de Hank's (HBSS), a tripsina-EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), os aminoácidos não essenciais (2 mM), a penicilina/estreptomicina (100 U/mL e 100 mg/mL, respetivamente), e os meios de cultura RPMI-1640 e DMEM, que foram adquiridos à Hyclone (*Logan*).

O ácido acético, a elipticina, a sulforadamina B (SRB), o azul tripano e o Tris [2-amino-2- (hidroximetil) propano-1,3-diol], foram adquiridos à Sigma (*St. Louis, MO*).

A água destilada foi tratada num sistema de purificação de água Milli-Q (*TGI Pure water Systems*) do Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada do Instituto Politécnico de Bragança- IPB.

3.3. Obtenção de extratos de *P. locuples*

Os extratos foram obtidos por maceração (**Figura 13**) das folhas trituradas (secção **3.1.**) utilizando diferentes solventes, tendo sido feitas duas extrações:

- I. Cerca de 100 g da amostra foram sucessivamente extraídas com hexano, diclorometano, metanol e água (300 mL de cada solvente), à temperatura ambiente e sob agitação constante. Os extratos foram filtrados a vácuo em funil de *Buchner* (**Figura 14**) e posteriormente concentrados no evaporador rotativo (**Figura 15**) a 40 °C, fornecendo cerca de 2,457 g de extrato de hexano, 3,500 g de extrato de diclorometano, 32,536 g de extrato metanólico e 15,011 g de extrato aquoso (**Figura 16**). A água do extrato aquoso foi removida no liofilizador.

- II. Cerca de 200 g da amostra foram extraídas com hexano, duas vezes com diclorometano e finalmente, com acetato de etilo (600 mL de cada solvente). Esta extração forneceu cerca de 3,950 g de extrato de hexano, 5,571 g de extrato de diclorometano I, 2,199 g de extrato de diclorometano II e 17,521 g de extrato de acetato de etilo (**Figura 17**).



Figura 13. Extração por maceração dos extratos de folhas de *P. locuples*.



Figura 14. Filtração a vácuo dos extratos de folhas de *P. locuples*.



Figura 15. Remoção dos solventes nos extratos de folhas de *P. locuples*.

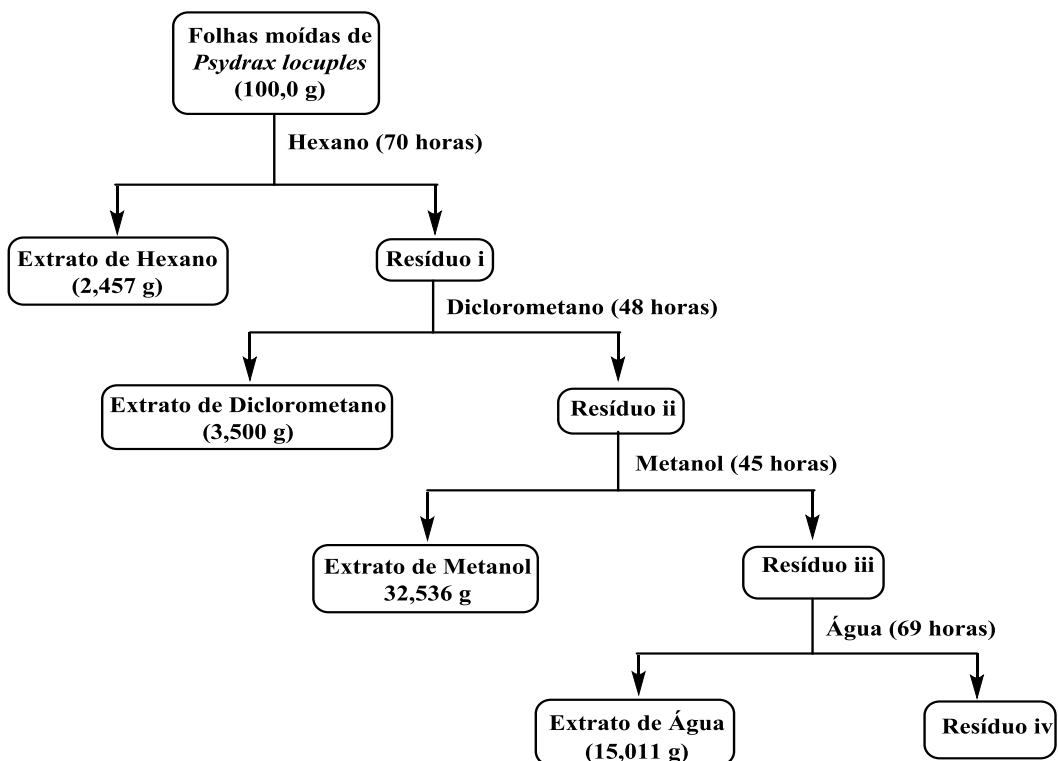


Figura 16. Sequência I de obtenção de extratos das folhas de *P. locuples*.

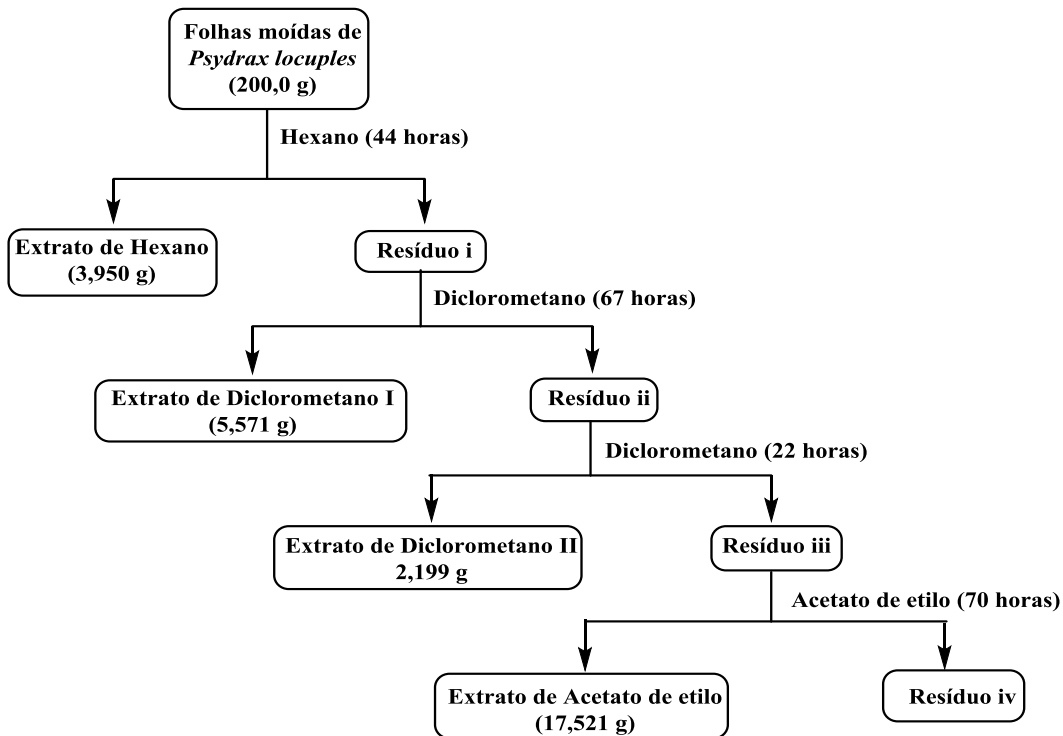


Figura 17. Sequencia II de obtenção de extratos das folhas de *P. locuples*.

3.3.1. Partição do extrato metanólico

Cerca de 5,1 g do extrato metanólico (**Figura 16**), foi particionada com água destilada e acetato de etilo num funil de separação (**Figura 18**). Posteriormente, procedeu-se à partição da fase aquosa remanescente com *n*-butanol.



Figura 18. Processo de partição do extrato metanólico.

As fases de acetato de etilo e *n*-butanol foram lavadas até pH neutro com solução aquosa saturada de NaCl, secos com Na₂SO₄ anidro, filtrados e concentrados no evaporador rotativo a 40 °C, obtendo-se assim o extrato metanólico solúvel em acetato de etilo (Ext.MeOHsol.AcOEt), extrato metanólico solúvel *n*-butanol (Ext.MeOHsol.But) e extrato metanólico solúvel em água (Ext.MeOHsol.H₂O) (**Figura 19**), a água desta fase foi removida no liofilizador (**Figura 20**)

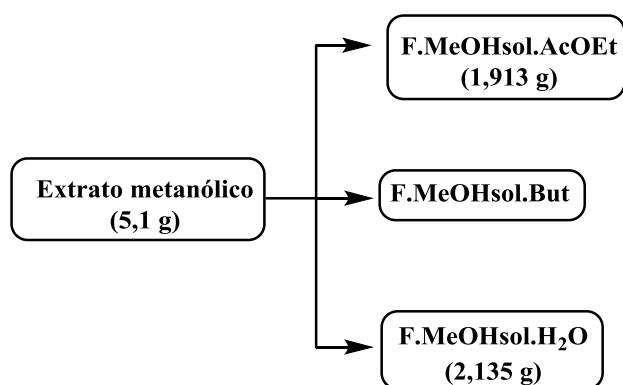


Figura 19. Frações produzidas na partição do extrato MeOH.



Figura 20. Remoção de água no extrato aquoso de *P. locuples*.

3.3.2. Extração ácido-base da fração metanólica solúvel em acetato de etilo (F.MeOHsol.AcOEt)

Cerca de 1,017 g da F.MeOHsol.AcOEt foi colocado num funil de separação e foi particionado com AcOEt e NaOH_(aq) 4% e (80:20, v/v). A fase aquosa remanescente foi adicionada HCl_(aq) 2 N (30 mL) até ao pH ácido e depois particionada três vezes com e AcOEt (70 mL). Finalmente, as duas fases foram lavadas com a solução aquosa saturada de NaCl até ao pH neutro e secos (fase neutra com Na₂CO₃ anidro e fase ácida com Na₂SO₄ anidro), filtrados e concentrados no evaporador rotativo a 40 °C, resultando desta forma, a fração neutra da fração metanólica solúvel em acetato de etilo (F.N.F.MeOHsol.AcOEt) e a fração ácida da fração metanólica solúvel em acetato de etilo (F.A.F.MeOHsol.AcOEt) (**Figura 21**).

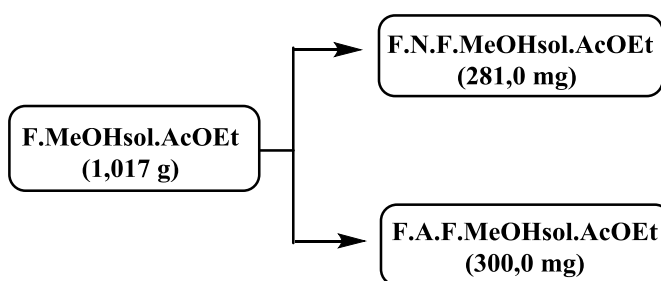


Ilustração 21. Frações produzidas na extração ácido-base de F.MeOHsol.AcOEt.

Durante a remoção do solvente para se obter o F.A.F.MeOHsol.AcOEt, observou-se a formação duma substância incolor em forma de agulhas nas paredes do balão. Após a remoção total do solvente e posterior pesagem, notou-se a perda demasiada do peso da fração.

A substância formada nas paredes foi recolhida num outro balão e dissolvida em DCM. Após concentração no evaporador rotativo, obteve-se 5 mg desta substância (**composto 1**). Ao analisar-se por RMN ^1H , comprovou tratar-se de uma substância pura.

3.3.3. Fracionamento e isolamento

3.3.3.1. Fração neutra do extrato metanólico solúvel em acetato de etilo (F.N.F.MeOHsol.AcOEt)

A F.N.F.MeOHsol.AcOEt (281,0 mg) foi eluída numa coluna empacotada com sílica gel 60. A coluna cromatográfica (**Figura 22**) foi preparada utilizando-se uma proporção entre sílica e amostra de 1:50 (m/m) (Hostettmann *et al.*, 2008). Num balão de fundo redondo de 100 mL, colocou-se o extrato que foi dissolvido a quente numa mistura de AcOEt e Me_2CO , em seguida, adicionou-se 200 mg de sílica e levou-se ao evaporador rotativo, ficando o extrato impregnado na sílica. O empacotamento da coluna com sílica gel foi feito com hexano e, de seguida, aplicou-se a amostra que foi eluída primeiramente com AcOEt e depois com a mistura de Me_2CO e AcOEt, numa proporção de (2:8) e finalmente com acetona, resultando 30 frações de 20 mL cada.



Figura 22. Realização da cromatografia em coluna de F.N.F.MeOHsol.AcOEt.

Após verificação sob luz ultravioleta e posterior revelação com a mistura $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{EtOH}$, foram reunidas de acordo com a semelhança de seus perfis cromatográficos, somente as frações **7-8** (48,0 mg) e **13-30** (182,0 mg); entretanto, as outras frações não foram estudadas porque apresentavam massas desprezáveis.

Nas frações **7-8**, estava presente uma substância sólida amorfa. Analisada por TLC, esta só foi visível a 366 nm e ao ser revelada com a mistura de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{EtOH}$ e posterior aquecimento, desenvolveu-se uma mancha cor rosa. Analisada por RMN de ^1H e HRMS, provou tratar-se duma mistura de compostos **2 e 3**.

Dados espectroscópicos da mistura de compostos 2 e 3.

Mistura de compostos 2 e 3: P.f. 219-240 °C; IR (v, cm^{-1}): 2927, 1735, 1701, 1458, 1369, 1246, 1028. HRMS (ESI-TOF): calculado para $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_4 \text{ Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 521,3601; encontrado: 521,3613 m/z .

i) Acetilação das frações 13-30

Num balão de fundo redondo de 100 mL, colocou-se 182,0 mg das frações **13-30** (**a**) e dissolvidas em 1 mL de piridina, seguida de adição de 1 mL anidrido acético (**b**). Esta reação ocorreu durante 12 h, ao abrigo da luz e sob agitação a temperatura ambiente e monitorada através da TLC (Bhan *et al.*, 1988). Após este período, adicionando-se gelo picado para hidrolisar o excesso do anidrido acético. Após 1h, procedeu-se à partição da

mistura reacional com AcOEt e lavou-se sucessivamente a fase orgânica com uma solução aquosa de HCl 2 N e soluções aquosas saturadas de NaHCO₃ e NaCl resultante até pH neutro. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro, evaporou-se o solvente, obtendo-se deste modo 183,0 mg da fração **13-30** acetilada (**c**) (**Figura 23**), que foi confirmada através de RMN ¹H.

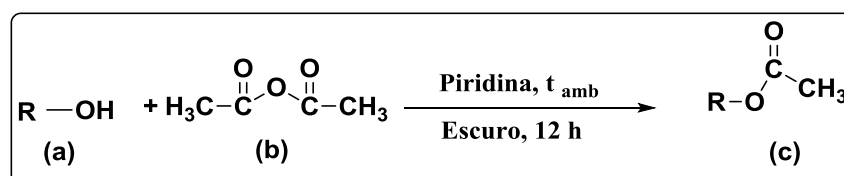


Figura 23. Esquema da reação de acetilação das frações 13-30.

As frações acetiladas (183,0 mg) foram submetidas a uma segunda cromatografia em coluna e eluídas numa coluna empacotada com sílica gel flash P60. Para este caso, dissolveram-se as frações em DCM e colocaram-se na coluna de separação. Foram utilizadas os seguintes eluentes: DCM, DCM:AcOEt (9:1), (7:3), (1:1) e (2:8) e finalmente AcOEt, resultando em 45 subfrações (recolhidas em tubos de ensaio 20 mL). A análise sob luz ultravioleta e posterior revelação com a mistura H₂SO₄/EtOH, permitiu que se juntassem, de acordo com os seus perfis cromatográficos, as frações **21-24** (67,0 mg) e **41-49** (23,0 mg). As subfrações **21-24** eram compostas de composto **4** e seu epímero (composto **5**). Nas subfrações **41-49**, estava presente o compostos **6** e seu epímero (composto **7**).

Dados espectroscópicos das misturas de estereoisómeros isolados

Mistura de compostos 4 e 5: HRMS (ESI-TOF): calculado para C₃₆H₄₃N₂O₁₆ [M+NH₄]⁺: 759,2607; encontrado: 759,2618 *m/z*. RMN para **4** (*R*): H-7 Mn (5,55; *s*); C-8 Mn (117,1) e RMN para **5** (*S*): H-7 Mn (5,74; *s*); C-8 Mn (116,7).

Mistura de compostos 6 e 7: HRMS (ESI-TOF): calculado para C₃₇H₅₁N₂O₁₆ [M+NH₄]⁺: 779,3233; encontrado: 779,3230 *m/z*. RMN para **6** (*R*): H-7 Mn (5,48; *s*); C-8 Mn (117,1) e RMN para **7** (*S*): H-7 Mn (5,70; *s*); C-8 Mn (116,6).

A **Figura 24** ilustra o procedimento utilizado para a obtenção das frações e isolamento dos compostos na F.N.F.MeOHsol.AcOEt, mencionados previamente.

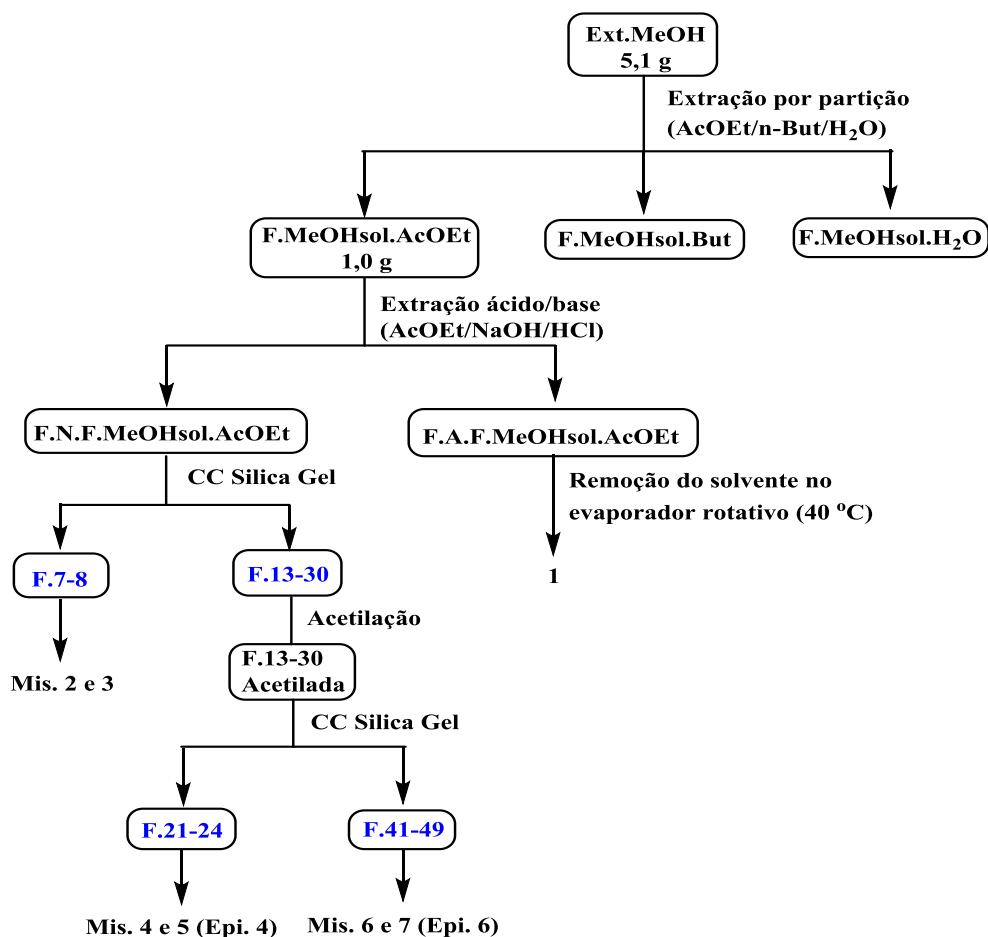


Figura 24. Esquema de obtenção de compostos 1 a 7 a partir da F.MeOHsol.AcOEt.

3.3.3.2. Extrato de acetato de etilo (Ext.AcOEt)

Começou por se proceder à acetilação de 2,0 g do Ext.AcOEt do mesmo modo descrito na secção **3.3.3.1.i**; para a sua dissolução, foram necessários 8 mL de piridina e 8 mL do anidrido acético. Após a partição obteve-se 2,282 g de Ext.AcOEt acetilado.

Cerca de 2,242 g de Ext.AcOEt acetilado, foi eluído numa coluna empacotada com sílica gel 60 (98,0 g). A proporção entre sílica e amostra utilizada foi de 1:44 (m/m). Num

balão de fundo redondo de 100 mL colocou-se o extrato e foi dissolvido com hexano; de seguida, adicionou-se 2 g de sílica e levou-se ao evaporador rotativo, permitindo deste modo a impregnação do extrato na sílica. Eluiu-se utilizando-se hexano e AcOEt (9:1), (8:2), (1:1) e (2:8), depois com o AcOEt e finalmente com a mistura de AcOEt e Me₂CO (8:2). Recolheram-se, portanto, 61 balões de fundo redondo de 100 mL, cada com 25 mL. As frações foram reunidas em treze grupos de acordo com a semelhança do perfil cromatográfico observado através de TLC (**Tabela 5**).

Tabela 5. Frações obtidas do fracionamento de Ext.AcOEt.

Grupos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Frações	26-27	28-34	35-39	40	41	42	43	44	45	46	47	48-50	51-54
Massa (mg)	65	144	86	91	129	302	344	381	237	121	60	142	146

Destes, foram estudados somente:

a) Grupo 1 (26-27) e 2 (28-34)

Estas frações destes grupos apresentaram-se como um sólido branco amorfo. Pela análise por TLC, após revelação com a mistura de H₂SO₄/EtOH e posterior aquecimento, observaram-se duas manchas rosas na placa. As duas frações foram misturadas e dissolvidas em DCM. Foram submetidas a uma segunda CC e eluídas numa coluna empacotada com sílica gel flash P60 (8,0 g). Procedeu-se à eluição com uma mistura de Hex/AcOEt (9:1), (8,5:1,5), (8,3:1,7) e (7:3), resultando 16 subfrações de balões de fundo redondo de 100 mL, cada com 25 mL. De acordo com o perfil observado na placa de TLC, foram agrupados as subfrações: **1,2-3** (56,0 mg), **5-10** (34,0 mg) e **11-14** (17,0 mg).

As subfrações **1** e **2-3**, após revelação com a mistura de H₂SO₄/EtOH e posterior aquecimento, desenvolveu-se uma mancha rosa (**composto 8**). No entanto, o composto **8** da subfracção **1** estava mais purificado em relação ao das subfrações **2-3**.

As subfrações **5-10** e **11-14**, após revelação com a mistura de H₂SO₄/EtOH e posterior aquecimento, desenvolveu-se uma outra mancha rosa (**composto 9**). O composto

9 das subfrações **5-10**, também se apresentou mais purificado em relação ao das subfrações **11-14**.

Dados espectroscópicos e propriedades físicas dos compostos isolados:

Composto 8 (ácido acetilursólico): $[\alpha]_D^{25} +0,450$ (c 0,9; CHCl_3). IR (ν , cm^{-1}): 2927, 1735, 1701, 1458, 1369, 1246, 1028. HRMS (ESI-TOF): calculado para $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_4 \text{ Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 521,3601; encontrado: 521,3613 m/z . RMN ^1H e RMN ^{13}C (**Tabela 7**).

Composto 9 (ácido 11β -hidroxiacetilursólico): P.f. 225-235 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{25} +0,050$ (c 0,5; CHCl_3). IR (ν , cm^{-1}): 2927, 1734, 1690, 1458, 1375, 1249 (Anexo 1). HRMS (ESI-TOF): calculado para $\text{C}_{32}\text{H}_{49}\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 497,3625; encontrado: 497,3624 m/z . RMN ^1H e RMN ^{13}C (**Tabela 7**).

i) Esterificação dos compostos **8** e **9**

Em dois balões de fundo redondo de 100 mL foram colocados, num 22,0 mg do composto **8** e noutro 20,0 mg do composto **9**. Ambos foram dissolvidos numa mistura de tolueno/MeOH (10 mL, 3:2), seguida de adição de 2 mL de trimetilsilildiazometano (TMSCHN_2) 2 M como agente alquilante (Hashimoto *et al.*, 1981). Esta reação ocorreu durante 12 h à temperatura ambiente e monitorada por TLC ($t = 0$ e $t = 12$ h) (**Figura 25**).

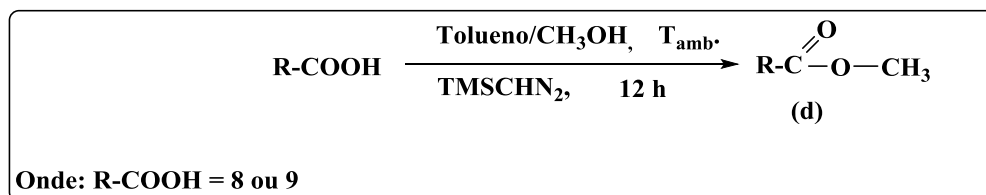


Figura 25. Esquema de reação de esterificação dos compostos **8** e **9**.

Passados 12 h, evaporou-se o solvente, obtendo-se deste modo 26,0 mg do composto **8a** (**d**) e 22,0 mg do composto **9a** (**d**).

Dados espectroscópicos dos compostos esterificados:

Composto 8a (éster metílico do ácido acetilursólico): IR (ν , cm^{-1}): HRMS (ESI-TOF): calculado para $\text{C}_{33}\text{H}_{53}\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 513,3938; encontrado: 513,3943 m/z . RMN ^1H : 5,17 (H, *t*); 4,42 (H, *dd*); 3,53 (3H, *s*); 1,98 (3H, *s*) ppm. RMN ^{13}C : 178,1; 171,0, 138,2; 125,4; 81,0 e 51,6 ppm.

Composto 9a (éster metílico do ácido 11 β -hidroxiacetilursólico): IR (ν , cm^{-1}): HRMS (ESI-TOF): calculado para $\text{C}_{33}\text{H}_{51}\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 511,3782; encontrado: 511,3788 m/z . RMN ^1H : 5,42 (H; *d*; 3,2 Hz); 4,44 (2H, *m*); 3,54 (3H, *s*); 1,98 (3H, *s*) ppm. RMN ^{13}C : 177,8; 170,9; 144,8; 125,4; 81,6; 80,6 e 51,5 ppm.

b) Grupo 3 (frações 35-39)

Este grupo de frações foi submetido a cromatografia preparativa em capa fina (PTLC), utilizando como sistema eluente a mistura Hex/AcOEt/Me₂CO (8:1:1). Foram efetuadas quatro eluições sucessivas que permitiram o isolamento de quatro compostos nomeadamente: composto **10** (11,0 mg), **11** (11,0 mg), **4** (6,0 mg) e **8** (8,0 mg). Entretanto os compostos **8**, **4** e **11** estavam impuros. O composto **10** foi caracterizado por RMN e confirmado por CG/MS.

Composto 10 (penta-*O*-acetil-1-*O*-metil-D-glucitol): HRMS (ESI-TOF): calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{30}\text{NO}_{11}$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 424,1813; encontrado: 424,1822 m/z . RMN ^1H e RMN ^{13}C (Tabela 13).

c) Grupos 4 (fração 40) e 5 (fração 42)

Estes grupos (91,0 mg da fração **40** e 85,0 mg da fração **42**) foram submetidos a PTLC utilizando como sistema de eluente a mistura Hex/AcOEt/Me₂O (6,5:1:2,5).

Efetuararam-se seis eluições sucessivas tendo, na terceira eluição, começado a formar-se um precipitado branco (composto **4**) na placa, que se ia concentrando em cada eluição.

Da PTLC da fração **40** foi possível isolar quantidade adicional do composto **10** (6,0 mg), perfazendo, portanto 17,0 mg desse composto. Além deste composto, foram isolados destes grupos, outras quantidades adicionais dos compostos **4** (37,0 mg) e **11** (34,0 mg) e uma mistura dos compostos **4** e **11** (64,0 mg). Nesta mistura, foi possível purificar o composto **4**, por meio de sua precipitação (gotas do eluente em uso e adição 2,0 mL de hexano); assim, obteve-se 50,0 mg de precipitado branco (composto **4**).

Dados espectroscópicos dos compostos isolados:

Composto 4 ((2*R*)-2,2',3,3',4-Penta-*O*-acetil-5'-*O*-benzoil-β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosilmandelonitrilo): IR (ν, cm⁻¹): 2937, 1754, 1602, 1452, 1372, 1220, 1112, 1066, 906, 714, 600. HRMS (ESI-TOF): calculado para C₃₆H₄₃N₂O₁₆ [M+NH₄]⁺: 759,2607; encontrado: 759,2618 *m/z*. RMN ¹H e RMN ¹³C (**Tabela 9**).

Composto 11 (2,2',3,3',4-Penta-*O*-acetil-1,5'-di-*O*-benzoil-β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil): IR (ν, cm⁻¹): 2926, 1752, 1636, 1452, 1373, 1241, 1064, 713. HRMS (ESI-TOF): calculado para C₃₅H₄₂NO₁₇ [M+NH₄]⁺: 748,2447; encontrado: 748,2456 *m/z*. RMN ¹H e RMN ¹³C (**Tabela 11**).

d) Grupos 10 (fração 46) e 11 (fração 47)

Estas duas frações foram reunidas (181,0 mg) e foram submetidas a uma PTLC utilizando como sistema de eluente a mistura de Hex/AcOEt/Me₂CO (6:2:2), onde foram feitas quatro eluições sucessivas. Desta cromatografia foi possível isolar o composto **12** (31,0 mg), duas subfrações do composto **13** (30,0 e 13,0 mg) e duas subfrações do composto **14** (11,0 e 12 mg). Entretanto, as subfrações do composto **13** assim como as do composto **14** não foram reunidas porque havia diferenças de pureza entre elas.

Dados espectroscópicos dos compostos isolados:

Composto 12 (2,2',3,3',4-Penta-*O*-acetil-1-*O*-benzoil-5-*O*-[(*E*)-6-hidroxi-2,6-dimetilocta-2,7-dienoil]-β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glucopiranososa): IR (ν , cm^{-1}): 3519, 2930, 2110, 1747, 1647, 1452, 1371, 1241, 1065, 926, 714. HRMS (ESI-TOF): calculado para $\text{C}_{38}\text{H}_{52}\text{NO}_{18}$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 810,3179; encontrado: 810,3172 m/z . RMN ^1H e RMN ^{13}C (**Tabela 12**).

Composto 13 ((2*R*)-2,2',3,3',4-Penta-*O*-acetil-5-*O*-[(*E*)-6-hidroxi-2,6-dimetilocta-2,7-dienoil]-β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosilmandelonitrilo): IR (ν , cm^{-1}): 3488, 2929, 1754, 1455, 1371, 1220, 1065, 925, 700. HRMS (ESI-TOF): calculado para $\text{C}_{39}\text{H}_{53}\text{N}_2\text{O}_{17}$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 821,3339; encontrado: 821,3342 m/z . RMN ^1H e RMN ^{13}C (**Tabela 10**).

Composto 14 ((2*R*)-2,2',3,4-Tetra-*O*-acetil-5'-*O*-benzoil-β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosilmandelonitrilo): IR (ν , cm^{-1}): 3488, 2926, 1754, 1700, 1380, 1223, 1064, 1036, 717, 601. HRMS (ESI-TOF): calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_{15}$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 717,2501, encontrado: 717,2500 m/z . RMN ^1H e RMN ^{13}C (**Tabela 9**).

e) Grupos 12 (frações 48-50) e 13 (frações 51-54)

As frações (48-50) do grupo 12 foram submetidas a uma PTLC utilizando como sistema de eluente a mistura de Hex/AcOEt/Me₂O (6:1,75:2.25), onde foram feitas seis eluições sucessivas. Desta cromatografia foi possível isolar uma quantidade adicional de composto 12 (4,0 mg) e composto 14 (4,0 mg) que estavam mais puros em relação aos obtidos nas frações anteriores. Além destes compostos, foram isoladas outras subfrações de impuras de compostos 6 (18 mg), que foram adicionadas às frações 51-54 para serem purificadas.

O eluente utilizado para eluir as frações **48-50**, foi utilizado na mesma proporção para eluir dez vezes a PTLC das frações (**51-54**) do grupo **13**, tendo-se isolado o composto **6** (32,0 mg), e outros novos: composto **15** (30,0 mg), composto **16** (14,0 mg) e uma mistura (14,0 mg) de compostos **16** e **17** (derivado de **15**), **6**, **15** e dois compostos com P.M de 782 e 793 u.m.a, respectivamente, que não foi possível o seu isolamento.

Dados espectroscópicos dos compostos isolados:

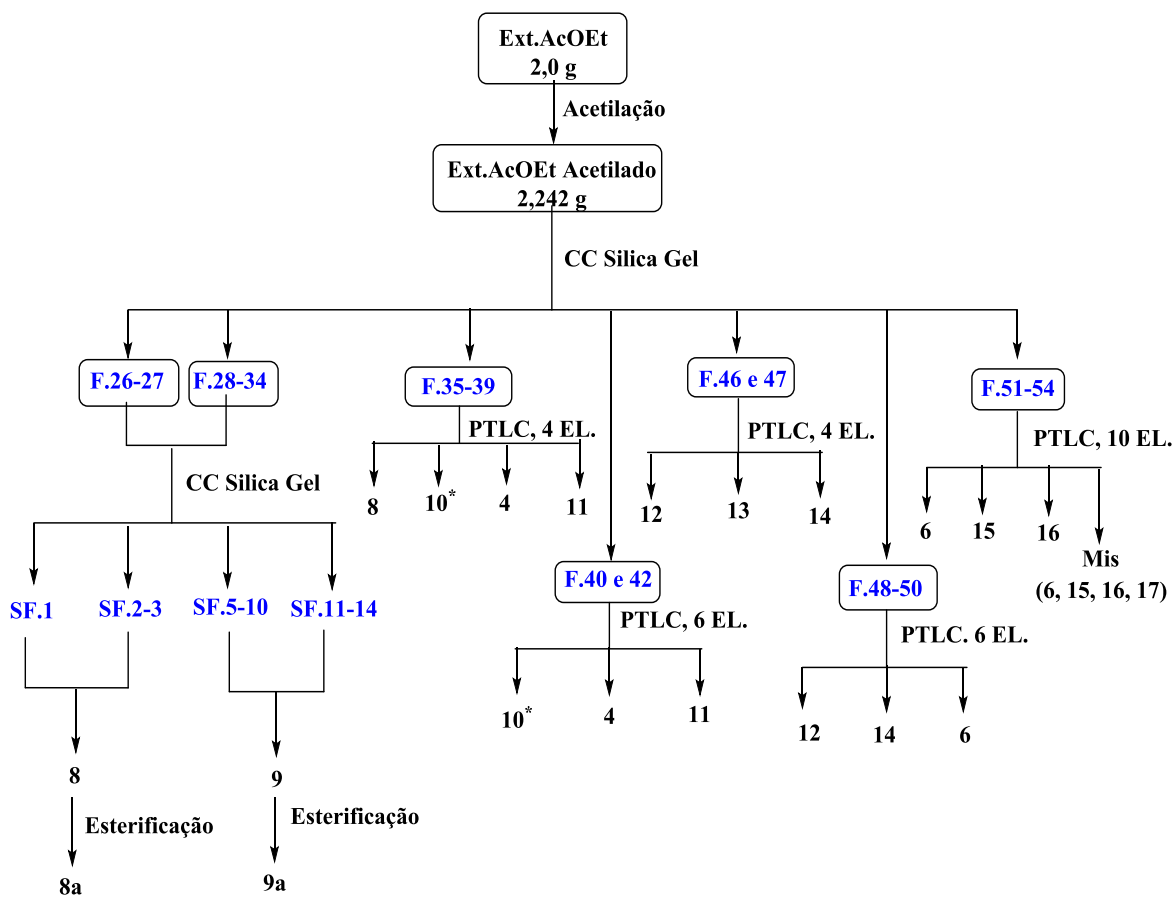
Composto 6 ((2*R*)-2,2',4-Tetra-*O*-acetil-5-*O*-[(*E*)-6-hidroxi-2,6-dimetilocta-2,7-dienoil]-β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosilmandelonitrilo): HRMS (ESI-TOF): calculado para C₃₇H₅₁N₂O₁₆ [M+NH₄]⁺: 779,3233; encontrado: 779,3230 *m/z*. RMN ¹H e RMN ¹³C (**Tabela 10**).

Composto 15 (2,2',3,4,5'-Penta-*O*-acetil-1-*O*-benzoil-β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil): HRMS (ESI-TOF): calculado para C₂₈H₃₈NO₁₆ [M+NH₄]⁺: 644,2185; encontrado: 644,2176 *m/z*. RMN ¹H e RMN ¹³C (**Tabela 13**).

Composto 16 (2,2',4-Tetra-*O*-acetil-1-*O*-benzoil-5-*O*-[(*E*)-6-hidroxi-2,6-dimetilocta-2,7-dienoil]-β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil): HRMS (ESI-TOF): calculado para C₃₆H₅₀NO₁₇ [M+NH₄]⁺: 768,30732; encontrado: 768,3067 *m/z*. RMN ¹H e RMN ¹³C (**Tabela 12**).

Composto 17 ((2*R*)-2,2',3,4,5'-Penta-*O*-acetil-β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosilmandelonitrilo): HRMS (ESI-TOF): calculado para C₂₉H₃₉N₂O₁₅ [M+NH₄]⁺: 655,2354; encontrado: 655,2345 *m/z*.

A **Figura 26** ilustra o procedimento utilizado para a obtenção das frações e isolamento dos compostos no Ext.AcOEt acetilado, mencionados previamente.



* Composto caracterizado por RMN ^{13}C e ^1H e confirmado por GC/MS

Figura 26. Esquema de Obtenção dos compostos 4,8-17 no Ext.AcOEt.

3.4. Obtenção de geninas do Ext.AcOEt

i) Reação 1

Num balão esmerilado de fundo redondo de 100 mL foi colocado 1,0 g do extrato de acetato de etilo, dissolvido numa mistura de dioxano e água (14 mL, 1:1), seguida de

adição de 14,0 mL de ácido acético. A reação ocorreu sob refluxo num banho de silicone sob agitação e a uma temperatura de 82 °C.



Figura 27. Reação de hidrólise do Ext.AcOEt.

A reação foi monitorizada por TLC nos tempos $t = 0, 6, 20, 30$ e 45 h da reação. Passados 45 h, interrompeu-se a reação e deixou-se arrefecer, tendo a solução adquirido cor alaranjada. Os produtos de hidrólise (geninas e os açúcares) foram obtidos por partição com AcOEt/H₂O, resultando duas fases, a orgânica e aquosa. A fase orgânica foi novamente extraída com água. A fase orgânica foi lavada sucessivamente com solução saturada de NaCl até ao pH neutro, seca em Na₂SO₄ anidro, filtrada e levada ao evaporador rotativo, obtendo-se deste modo as geninas (479 mg). Evaporou-se a água da fase aquosa no evaporador rotativo a 70 °C, obtendo-se deste modo os açúcares (491 mg). Após análise por RMN ¹H, notou-se que a reação de hidrólise foi incompleta.

ii) Reação 2

Para a hidrólise completa destes, seguiu-se o procedimento realizado por Iwagawa & Hase (1983), estes produtos foram novamente reunidos e colocados num balão do mesmo tipo, dissolvidos em $7,0$ mL de MeOH e seguiu-se com adição de $28,0$ mL de HCl 2 N. A reação de refluxo ocorreu em $2,5$ h a 137 °C, tendo-se novamente monitorizado esta reação por TLC nos $t = 0$ e $2,5$ h. Passado esse tempo, interrompeu-se a reação. Após o arrefecimento, a solução permaneceu com a cor laranja e com um precipitado de cor creme no fundo do balão. Depois, evaporou-se o MeOH e procedeu-se à partição de produtos de

hidrólise da mesma forma que se extraiu os produtos de hidrólise da **reação 1**, tendo se obtido 329,0 mg de geninas (**Figura 28**).

As geninas foram caracterizadas por apenas CG/MS, para tal, 1 mg destas foram dissolvidas em 1 mL de DCM e de seguida pipetou-se 1 µL da solução stock e injetou-se no CG/MS, tendo se identificado dois compostos, o composto **1** e o composto **18**.

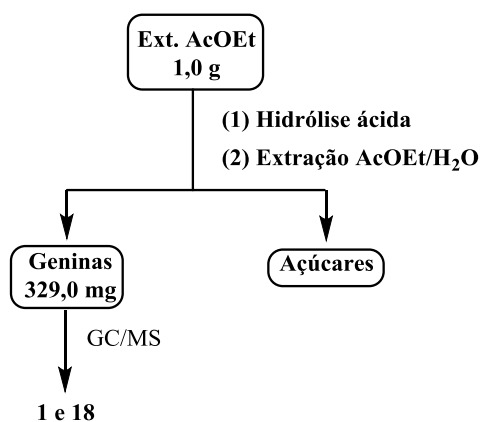


Figura 28 . Obtenção das geninas a partir do Ext.AcOEt.

3.5. Reação de identificação do grupo ciano (CN) no extrato de acetato de etilo (Ext.AcOEt)

Seguindo o procedimento efetuado por Brimer *et al.* (1983), na reação de hidrólise (secção 3.4.), sob a boca do condensador, colocou-se um papel de filtro, previamente preparado com duas soluções distintas, primeiramente mergulhado numa solução aquosa saturada de ácido pícrico, tendo este tomado a cor da solução (amarela) e após secagem rápida no secador, este foi mergulhado novamente numa outra solução aquosa de Na_2CO_3 2 M. Terminada a reação de hidrólise, notou-se no papel de filtro, a existência de uma cor vermelho-tijolo (**Figura 29**).

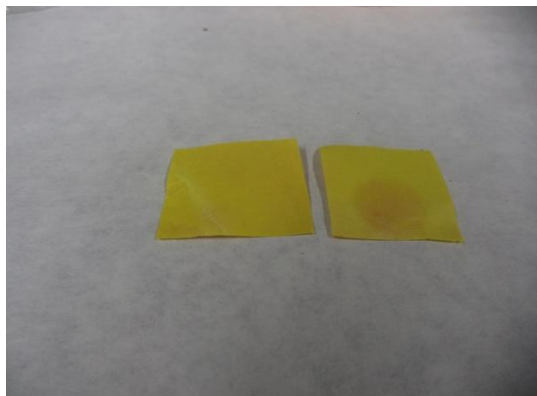


Figura 29. Papel de filtro previamente preparado, antes e depois da reação de hidrólise do Ext.AcOEt.

3.6. Ensaio de bioatividade

Os extratos (secção 3.3.), frações (secção 3.3.1.) assim como as geninas (secção 3.4.) obtidos, foram avaliados quanto à sua bioatividade (atividades antioxidante e antitumoral) no Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada do Centro de Investigação de Montanha (CIMO) do Instituto Politécnico de Bragança (IPB), Portugal.

3.6.1. Avaliação da atividade antioxidante

Para este ensaio utilizou-se 10,0 mg de cada extrato/fração que foram dissolvidas em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Posteriormente, realizaram-se diluições sucessivas da solução mãe (10,0 mg/mL), utilizando-se o mesmo solvente para as seguintes concentrações: 5,0; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,15625; 0,078; 0,039 e 0,019 mg/mL. Neste ensaio, o Trolox (antioxidante comercial) foi utilizado como controlo positivo. Foram avaliadas todas as amostras em triplicado com a exceção do poder redutor que foi em duplicado. Os resultados foram expressos em valores de EC_{50} (concentração da amostra responsável por 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância no ensaio do poder redutor, expressos em $\mu\text{g/mL}$).

3.6.1.1. Atividade captadora de radicais livres DPPH

Misturaram-se as soluções das amostras nas várias concentrações (0,30 mL) com uma solução de metanol (0,27 mL) contendo radicais de DPPH (6×10^{-5} mol/L). Após um intervalo de 60 min de incubação à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, mediu-se a redução do radical livre DPPH através da leitura da absorvância a 515 nm no leitor de microplacas ELX800 (equipamento Bio-Tek, Inc.) (Guimarães *et al.*, 2013).

A atividade captadora de radicais (RSA) foi calculada em função da percentagem da descoloração da solução de DPPH, conforme a seguinte equação: $\%RSA = [(ADPPH - AS)/ADPPH] \times 100$, sendo AS a absorvância da solução na presença das várias concentrações de amostra e ADPPH a absorvância da solução de DPPH. A concentração de extração/fração capaz de inibir 50% de radicais DPPH (EC_{50}) foi calculada a partir do gráfico de percentagem RSA em função da concentração de amostra.

3.6.1.2. Poder redutor

As soluções das amostras nas várias concentrações (0,5 mL) foram misturadas com tampão fosfato de sódio (200 mmol/L, pH 6,6, 0,5mL) e ferricianeto de potássio (1%, 0,5 mL). As amostras foram incubadas a 50° C durante 20 min e adicionou-se posteriormente ácido tricloroacético (10%, 0,5 mL). O sobrenadante (0,8 mL) foi colocado numa microplaca de 48 poços juntamente com água destilada e cloreto de ferro (0,1%, 0,16 mL) (Guimarães *et al.*, 2013). A absorvância foi medida a 690 nm, no leitor de microplacas, referido anteriormente. A concentração de amostra que fornece 0,5 de absorvância foi calculada a partir do gráfico de absorvância 690 nm em função da concentração da amostra.

3.6.1.3. Inibição da descoloração do β -caroteno

Preparou se uma solução de β -caroteno (2 mg) em clorofórmio, transferindo se 2 mL desta solução para um balão de fundo redondo para remoção do clorofórmio a 40° C,

sob vácuo. Adicionaram-se o ácido linoleico (40 mg), o emulsionante Tween 80 (400 mg) e água destilada, agitando-se vigorosamente. Transferiram-se 4,8 mL desta solução para cada tubo de ensaio contendo as soluções das amostras nas várias concentrações (0,2 mL) (Guimarães *et al.*, 2013). Agitaram-se os tubos homogeneizando a mistura e mediu-se, imediatamente, a absorvância a 470 nm (equipamento Analytik jena, modelo SPECORD 200) no tempo zero. Para a medição do tempo 1 colocaram-se os tubos em banho (50° C, 2h) com agitação (50 rpm). A inibição da descoloração do β -caroteno foi calculada em função da equação: β -caroteno (tempo 1)/ β -caroteno (tempo 0)x100. A concentração de amostra capaz de inibir 50% da oxidação do β -caroteno (EC_{50}) foi calculada a partir do gráfico de percentagem de inibição da descoloração do β -caroteno em função da concentração da amostra.

3.6.2. Avaliação do potencial antitumoral e citotoxicidade

Para o screening de atividade antiproliferativa *in vitro* foram selecionadas quatro linhas celulares tumorais humanas, assim designadas: MCF-7 (adenocarcinoma de mama), NCI-H460 (cancro de pulmão), HeLa (carcinoma cervical) e HepG2 (carcinoma hepatocelular) e uma cultura primária de células de fígado de porco: PLP2 (porcine liver primary cell culture estabelecida no laboratório onde decorreram os estudos).

As amostras preparadas na secção **3.6.1.** foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO)/água (1:1) de forma a obter a concentração final de 5,0 mg/mL. Após diluições sucessivas da solução stock (5,0 mg/mL), preparam-se 5 novas concentrações. Estas soluções foram adicionadas na placa de 96 poços de forma a obter as seguintes concentrações: 250; 62,5; 15,625; 3,906; 0,977 μ g/mL. De forma análoga, foram também preparadas amostras de compostos e misturas isolados da F.MeOHsol.AcOEt (secção **3.3.3.1.**) e do Ext.AcOEt acetilado (secção **3.3.3.2.**). Foram feitos pelo menos três ensaios em duplicado para cada amostra. Os resultados foram expressos em valores de GI50 (concentração da amostra responsável por 50% de inibição do crescimento celular; expressos em μ g/mL. Neste ensaio, a elipticina foi usada como controlo positivo.

3.6.2.1. Atividade antiproliferativa em linhas celulares tumorais humanas

As células foram mantidas em cultura de células aderentes em meio RPMI-1640 contendo 10% de Soro Fetal de Bovino (SFB) inativado pelo calor e 2 mM de glutamina (MCF-7, NCI-H460, HeLa e HepG2, a 37 °C, em incubadora com temperatura humidificada contendo 5% de CO₂ (HF 151, Heal Force) (Guimarães *et al.*, 2013). Todas as experiências foram realizadas em ambiente asséptico numa câmara de fluxo laminar vertical (TLStar, AV-30/70). Retirou-se o meio de cultura de cada caixa de cultura com as respectivas linhas celulares. Adicionou-se o meio de lavagem (HBSS, 2mL) e após a sua remoção adicionou-se tripsina (1,0mL). A caixa de cultura foi colocada na incubadora durante 3 min para desagregação das células. Adicionou-se rapidamente meio de cultura (3 mL) para inativar a tripsina. A suspensão celular foi transferida para um tubo de falcon estéril e posteriormente centrifugada (1200 rpm, 5 min.). O sobrenadante foi rejeitado e as células foram ressuspensas em meio de cultura. Retiraram-se 50 µL de suspensão e adicionaram-se 50 µL de solução de azul tripano para contagem do número de células numa câmara de Neubauer.

Cada linha celular foi plaqueada numa densidade apropriada ($7,5 \times 10^3$ células/poço para MCF-7, NCI-H460 e HCT-15 ou $1,0 \times 10^4$ células/poço for HeLa e HepG2) numa placa de 96 poços. Adicionaram 10 µL de cada concentração das amostras em cada poço e 190 µL da suspensão celular anteriormente preparada. As microplacas foram incubadas durante 48h até ao teste da sulforodamina B (SRB). Neste teste, adicionou-se a cada poço ácido tricloroacético frio (TCA, 10%; 100 µL), incubando-se de seguida durante 60 min a 4° C. As microplacas foram lavadas com água destilada e secas. A solução de SRB (0,1% em 1% ácido acético; 100 µL) foi adicionada a cada poço. A placa foi incubada durante 30 min à temperatura ambiente. Posteriormente, lavou-se a placa com ácido acético (1%) para remover o excesso de SRB e secou-se. A SRB foi solubilizada com 10 mM de Tris (200 µL, pH 7,4) num agitador de microplacas (Stat Fax-2100). A absorvância foi medida a 540 nm num leitor de microplacas (referido anteriormente).

3.6.2.2. Hepatotoxicidade em células não tumorais

Preparou-se uma cultura de células primárias a partir de fígado fresco de porco, obtido num matadouro local, designada por PLP2. O procedimento foi descrito anteriormente pelo grupo de investigação em que se insere este trabalho (Abreu *et al.*, 2011). Os tecidos foram lavados em solução salina de Hank contendo 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina e dividido em explantes de 1x1 mm³. Os explantes foram colocados em caixas de cultura com meio DMEM suplementado com SFB (10%), 2 mM de aminoácidos não essenciais, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, e colocou-se na incubadora. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias, monitorizando-se utilizando um microscópio de invertido (Nikon Eclipse Ts 100). As células foram transferidas para uma placa de 96 poços com uma densidade de 1x10⁴ células/poço, e cultivadas em meio DMEM com 10% de SFB, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. As células foram tratadas com diferentes concentrações de amostra e efetuou-se o teste SRB anteriormente descrito.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Extratos obtidos de folhas *P. locuples* e seus rendimentos

O processo de extração de folhas trituradas de *P. locuples* apresentou os rendimentos conforme a **Tabela 6**.

Tabela 6. Rendimento de extratos obtidos por maceração

Extratos	Extração I (100 g)		Extração II (200 g)	
	Tempo (h)	Rendimento*	Tempo (h)	Rendimento**
Hexano	70	2,457 g (2,56%)	44	3,950 g (1,98%)
Diclorometano (i)	48	3,500 g (3,50%)	67	5,571 g (2,79%)
Diclorometano (ii)	-	-	22	2,199 g (1,01%)
Acetato de etilo	-	-	70	17,521 g (8,76%)
Metanólico	45	32,536 g (32,54%)	-	-
Aquoso	69	15,011 g (15,01%)	-	-

* Extração em 300 mL de cada solvente

** Extração em 600 mL de cada solvente

O elevado rendimento do extrato metanólico (32,54%) condicionou a existência duma etapa intermediária de extração entre os solventes diclorometano e metanol, para tal, utilizou-se o acetato de etilo, permitindo deste modo a obtenção do extrato de acetato de etilo (8,76%) que foi o nosso objeto de estudo.

4.2. Compostos isolados das folhas de *P. locuples*

Os procedimentos descritos na metodologia possibilitaram o fracionamento e isolamento de dois triterpenos, nove dissacáridos e um glicitol.

Na extração ácido-base da fração metanólica solúvel em acetato de etilo (F.MeOHsol.AcOEt), foram produzidas duas frações:

a) Fração neutra da fração metanólica solúvel em acetato de etilo (F.N.F.MeOHsol.AcOEt), donde foram isoladas:

➤ Uma mistura de triterpenos e;

- Duas misturas de dissacáridos.

Presume-se que a extração ácido-base efetuada na fração metanólica solúvel em acetato de etilo, tenha criado as seguintes inconveniências:

1. A não obtenção de compostos puros;
 2. A obtenção de mistura dos triterpenos na fração neutra;
 3. A perda demasiada do peso na fração ácida da fração metanólica solúvel em acetato de etilo (F.A.F.MeOHsol.AcOEt) durante a sua concentração no rotavapor, devido a utilização do $\text{HCl}_{(\text{aq})}$, que provavelmente pode ter hidrolisado os dissacáridos cianogénicos, desprendendo o HCN (detetado por reação com o ácido pícrico descrita na secção 3.5.), e o benzaldeído (composto 18).
 4. A epimerização dos dissacáridos cianogénicos 4 e 6 produzindo seus respetivos epímeros (artefactos). A utilização do $\text{NaOH}_{(\text{aq})}$, para além de ter epimerizado os dissacáridos cianogénicos também hidrolisou as funções ésteres, desprendendo o ácido benzóico (composto 1) e o monoterpeno (não detetado nas geninas hidrolisadas por GC/MS).
- b) A fração ácida da fração metanólica solúvel em acetato de etilo (F.A.F.MeOHsol.AcOEt), donde foi obtido o composto 1 (Figura 30). Este composto foi obtido durante a concentração desta fração no evaporador rotativo a 40 °C e foi obtido como um cristal sólido branco e solúvel em diclorometano. Foi analisada por RMN ^1H e, de acordo com as características do seu espetro comprovou-se tratar-se de uma substância pura e portanto, foi comparada com uma amostra autêntica em TLC, tendo-se constatado se tratar do ácido benzóico.

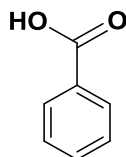


Figura 30. Estrutura do ácido benzóico.

Com a acetilação do extrato de acetato de etilo (Ext.AcOEt acetilado) permitiu o isolamento dos triterpenos e dissacáridos na forma pura.

As estruturas de todos os compostos/misturas foram elucidadas com base nas análises dos dados espectroscópicos IV, HRMS, RMN ^1H e ^{13}C (DEPT 90° e 135°), COSY, HMQC, HMBC, ROESY e GC/MS e por comparação com os dados disponíveis na literatura. Com base nos espectros de RMN dos compostos isolados, fez-se as Tabelas 9 a 15 (dados espetrais de RMN) que permitiram a melhor visualização dos deslocamentos químicos dos sinais de cada composto.

4.2.1. Triterpenos pentacíclicos

Os triterpenos foram isolados da fração neutra da fração metanólica solúvel em acetato de etilo (F.N.F.MeOHsol.AcOEt) e do extrato de acetato de etilo acetilado (Ext.AcOEt acetilado) (**Figura 31**).

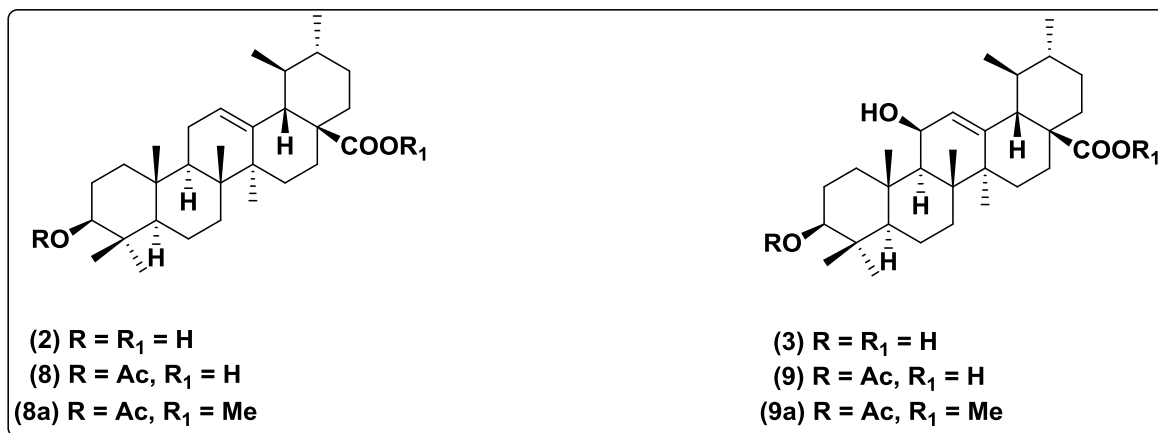


Figura 31. Triterpenos isolados de folhas de *P. locuples*.

A mistura de compostos 2 e 3 foi isolada duma das frações proveniente da CC de sílica gel da F.N.F.MeOHsol.AcOEt. Uma das particularidades destes triterpenos é de serem visíveis (cor rosa) na placa de TLC, quando revelados com a mistura de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{EtOH}$ seguido de aquecimento na placa.

Os compostos **8** e **9** foram isolados duma das frações proveniente CC de sílica gel do Ext.AcOEt acetilado, estas frações sofreram uma segunda CC de sílica gel dando origem a estes compostos.

Os compostos **8a** e **9a** foram obtidos da esterificação dos compostos **8** e **9**, respetivamente.

4.2.1.1. Elucidação estrutural

Composto **8** (**Figura 32**), sólido branco amorfo, solúvel em acetato de etilo. A sua fórmula molecular $C_{32}H_{50}O_4$ foi deduzida a partir do pico de ião $[M+Na]^+$ a $m/z = 521,3601$ no seu espectro de HRMS. Este composto exibiu duas bandas (1735 e 1701 cm^{-1}) no espectro de IV na região de grupos carbonilos, correspondentes a um grupo éster e um grupo ácido carboxílico, respetivamente. O seu espectro DEPT revelou presença de oito carbonos metílicos, nove carbonos metilénicos e seis carbonos monoprotonados. Pelo espectro de RMN ^{13}C (**Tabela 7**) observam-se sinais a $184,3$ e a $171,1$ ppm onde o primeiro é referente ao grupo carboxílico e o segundo a éster. A existência de um sinal de C-3 a $80,9$ ppm, sugere que C-3 está ligado a um acetato, sinais a $125,7$ e $137,9$ ppm relativos à ligação dupla entre C-12 e C-13. Estes últimos sinais, relacionando-os com o sinal de hidrogénio olefínico presente no espectro de RMN 1H a $5,16$ (t ; 3,4; H-12), permitem definir um triterpeno do tipo ursano. Estes dados foram comparados com dados de RMN de um triterpeno caracterizado por Taketa, *et al.* (2004) e são totalmente iguais, portanto chegou-se a conclusão de que o composto em análise é um ácido acetilursólico.

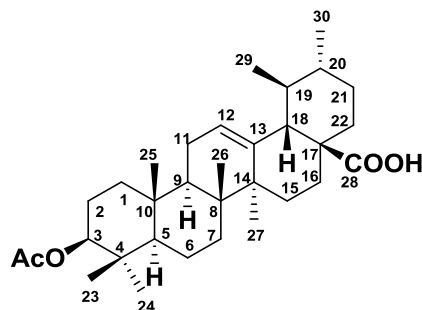


Figura 32. Estrutura do composto **8**.

Os espectros de RMN 2 D (HMQC, HMBC, COSY e ROESY) concordaram com a estrutura deste composto.

Composto **8a** sólido branco amorfo, solúvel em acetato de etilo. Este composto é produto da reação do composto **8** com o trimetilsilildiazometano (**Figura 33**). Seu espectro de HRMS exibiu um pico de íão $[M+H]^+$ a $m/z = 513,3938$, o qual deduzido, corresponde a fórmula molecular $C_{33}H_{53}O_4$. Os espectros de RMN deste composto, se diferenciam com os do composto **8** (**Tabela 7**) pela presença neste em análise de deslocamento do sinal correspondente ao carbonilo do ácido carboxílico de 184,3 a 178,1 ppm e pela presença de um novo grupo metoxilo (3,53 s, 51,6 ppm), confirmando a estrutura de éster metílico do ácido acetilursólico.

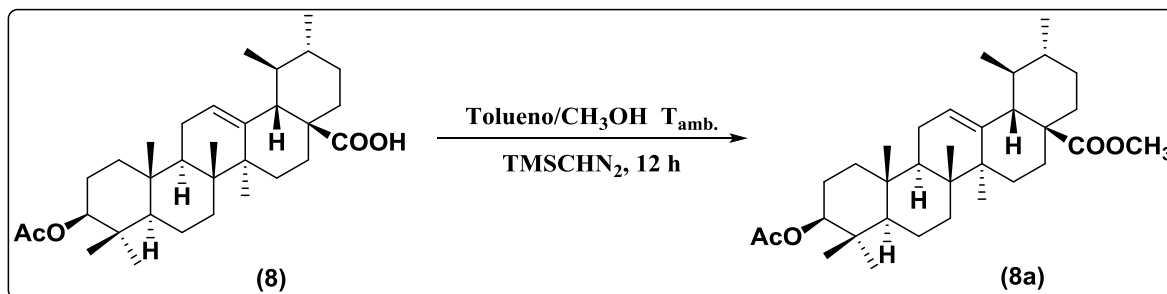


Figura 33. Esquema de obtenção do composto **8a**.

Composto **9** (**Figura 34**) sólido incolor, solúvel em acetato de etilo. O espectro de HRMS exibiu o pico de íão $[M+H]^+$ a $m/z = 497,3624$ correspondente a fórmula molecular $C_{32}H_{49}O_4$, que corresponderia com um composto semelhante a **8** mas com uma insaturação a mais. Da mesma forma que o composto **8**, o seu espectro de IV exibiu também duas bandas (1734 e 1690 cm^{-1}) na região de grupos carbonilos, correspondentes a um grupo éster e um grupo ácido carboxílico, respetivamente. Os seus espectros de RMN 1D e 2 D são muito parecidos ao do composto **8** (ácido acetilursólico), no entanto, há algumas diferenças. No Espectro de RMN ^1H (**Tabela 7**) o sinal de hidrogénio olefínico H-12 em

lugar de ser um tripleto, no composto **9** é um doblete, o qual indicaria a presença de um substituinte sobre o C-11. Além disso o valor do integral do sinal que aparece a 4,38 ppm corresponderia a dois hidrogénios o qual sugeriria a existência de um segundo hidrogénio geminal a átomo de oxigénio adicional a H-3. Espectro de RMN de ^{13}C deste composto exibiu dois sinais de carbono metílico (CH) unido a oxigénio (80,7 e 81,1 ppm) que corresponderiam com C-3 e C-11, respetivamente. Segundo o que se descreve na bibliografia, o sinal do C-11 de 11-hidroxitriterpenos insaturados na posição 12 aparecem aproximadamente a 81 ppm se tratar-se uma configuração 11 β -hidroxi, e a aproximadamente 68 ppm se for uma configuração 11 α -hidroxi (Lima, *et al.*, 2005). Desta forma o ião observado no experimento HRMS não corresponderia ao ião $[\text{M}+\text{H}]^+$ mas sim seu produto de desidratação $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$. Sendo assim, a fórmula molecular deste triterpeno seria $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_5$ (ácido 11 β -hidroxiacetilursólico). O grupo OH da posição 11 β se encontraria estericamente impedido para a sua acetilação. Este composto e o composto sem acetilar **3** (ácido 11 β -hidroxiursólico) são dois triterpenos não descritos até ao momento.

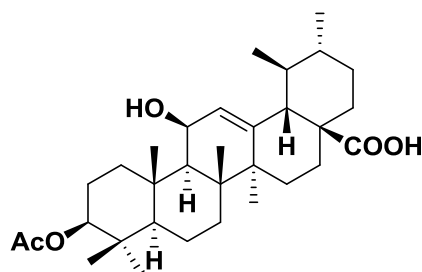


Figura 34. Estrutura do composto 9.

Composto **9a** sólido incolor, solúvel em acetato de etilo. Este composto é produto da reação do composto **9** com o trimetilsilildiazometano (**Figura 35**). Seu espectro de HRMS exibiu um pico de ião $[\text{M}+\text{H}]^+$ a $m/z = 511,3782$, o qual deduzido, corresponde a fórmula molecular $\text{C}_{33}\text{H}_{51}\text{O}_4$. Este fórmula não corresponderia com a estrutura de **9a** mas sim, com o seu produto de desidratação. Os espectros de RMN deste composto se diferenciam as do composto **9** (**Tabela 7**) pela presença no composto em análise do sinal do grupo carbonilo do ácido carboxílico deslocado de 180,1 à 177,8 ppm e pela presença de

um novo grupo metoxilo (3,54 s, 51,5 ppm), confirmando a estrutura de éster metílico do ácido 11 β -hidroxiacetilursólico.

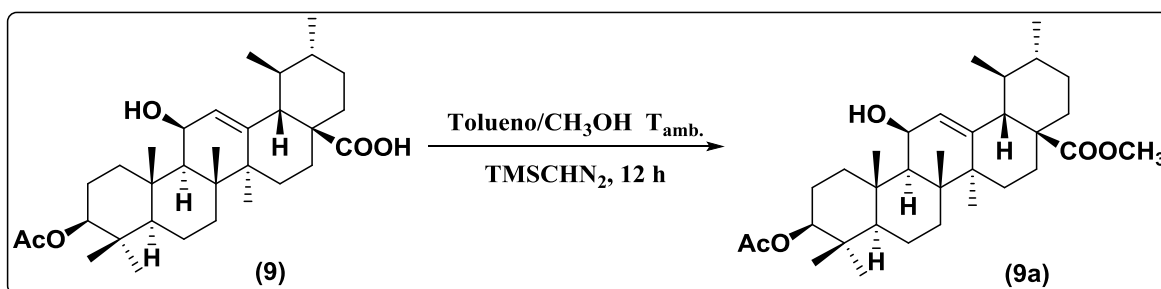


Figura 35. Esquema de obtenção do composto 9a.

Mistura de compostos **2** e **3** (Figura 36) sólido branco amorfo, solúvel em acetato de etilo em proporção 2:1. Segundo a discussão realizada para os compostos **8** e **9** e os dados espectroscópicos que aparecem na bibliografia se pode concluir que o composto **2** é ácido ursólico, um triterpeno muito abundante no reino vegetal e o composto **3**, é o ácido 11 β -hidroxiursólico, um triterpeno que ainda era desconhecido até ao momento.

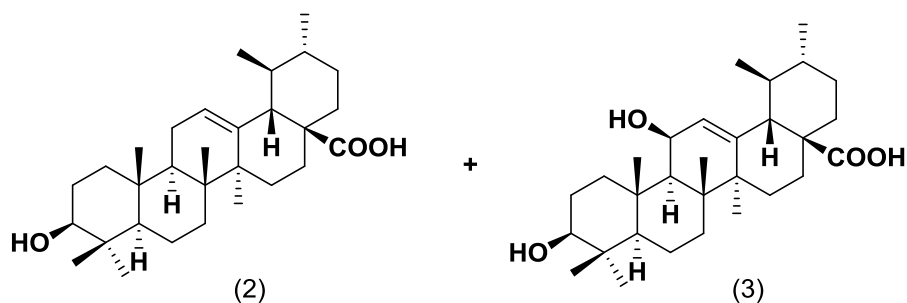


Figura 36. Mistura de compostos 2 e 3.

Tabela 7. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H dos compostos 8 (CDCl_3) e 9 ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$)

Carbono	Composto 8		Composto 9	
	$^{13}\text{C}^{\text{a}}$	$^1\text{H}^{\text{a,b}}$	$^{13}\text{C}^{\text{a}}$	$^1\text{H}^{\text{a,b}}$
1	38,2		38,5	
2	23,6		23,3	
3	80,9	4,43 (H; <i>dd</i> ; 8,4; 7,6)	80,7	4,38 (H, <i>m</i>)
4	37,9	-	37,5	-
5	55,2		54,9	
6	18,1		18,0	
7	32,8		33,0	
8	39,4	-	41,7	-
9	47,4	1,46 (2H; <i>t</i>)	49,4	1,69 (H; <i>d</i> ; 10,1)
10	36,7		36,3	
11	23,3	1,83 (2H; <i>m</i>)	81,1	4,38 (H, <i>m</i>)
12	125,7	5,16 (H; <i>t</i> , 3,4)	125,5	5,41 (H; <i>d</i> ; 3,6)
13	137,9	-	143,1	-
14	41,8	-	42,6	-
15	28,1		29,3	
16	24,0		23,7	
17	47,9	-	47,0	-
18	52,4	2,16 (H, <i>d</i> ; 11,6)	51,7	2,18 (H; <i>d</i> ; 10,9)
19	38,8		38,6	
20	39,0		38,7	
21	30,6		30,2	
22	37,7		37,4	
23	27,9		27,8	
24	16,7		16,2	
25	15,5		16,2	
26	17,0		16,5	
27	23,5		22,0	
28	184,3	-	180,1	-
29	17,1		17,8	
30	21,3		20,6	
OCOCH ₃	21,2	2,03 (3H, <i>s</i>)	20,8	1,98 (3H, <i>s</i>)
OCOCH ₃	171,1	-	171,6	

^a Deslocamento químico, δ , em ppm. ^b (Número de H, multiplicidade, constante de acoplamento J , em Hz).

Valores de ^1H mais significativos.

4.2.2. Dissacáridos

Os dissacáridos foram isolados da fração neutra da fração metanólica solúvel em acetato de etilo (F.N.F.MeOHsol.AcOEt) e do extrato de acetato de etilo acetilado (Ext.AcOEt acetilado) (**Figura 37**)

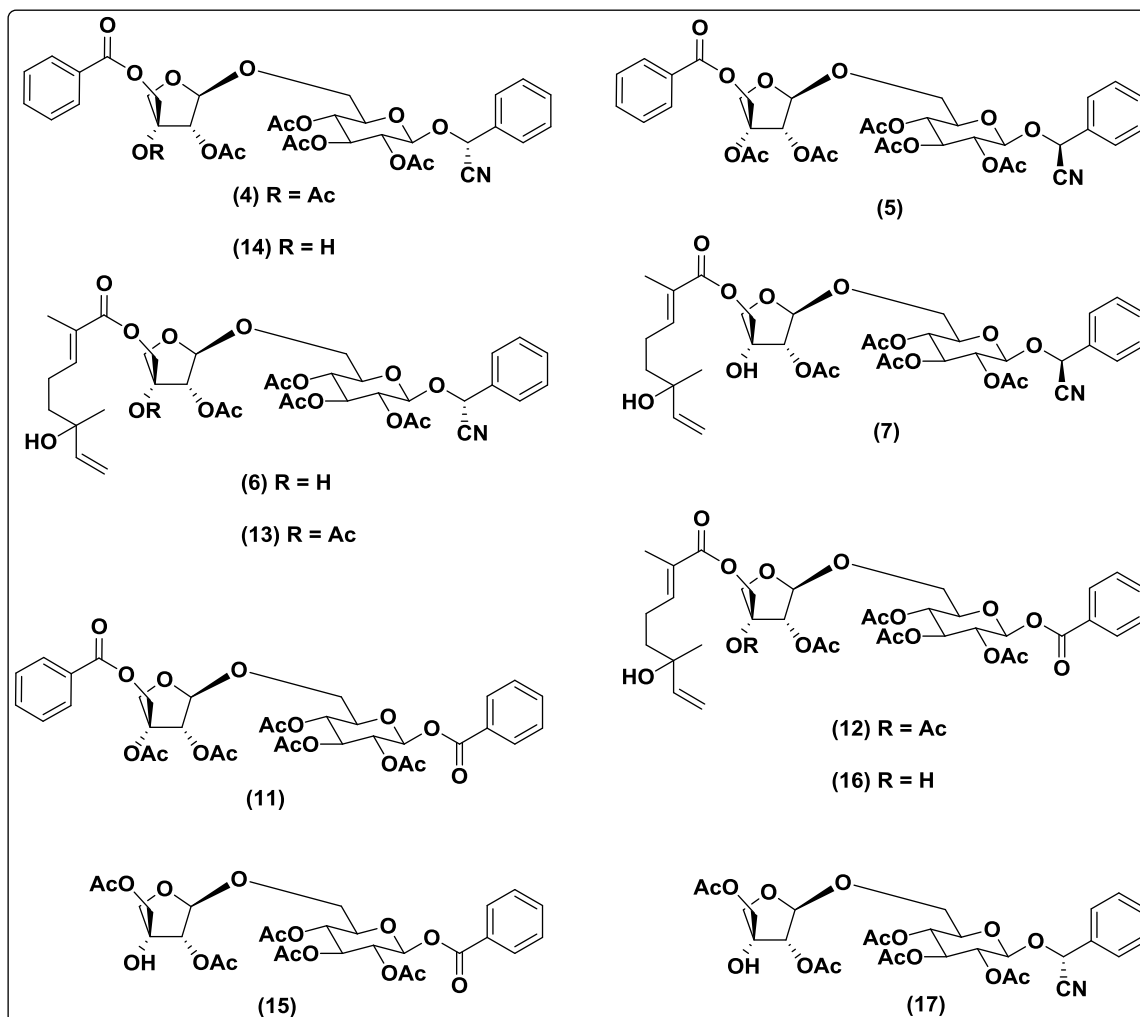


Figura 37. Dissacáridos isolados de folhas de *P. locuples*.

As duas misturas contendo os compostos **4** e **6** com seus epímeros **6** e **7** foram isoladas duma das frações proveniente da fração acetilada que foi submetida a uma segunda CC. Esta fração acetilada é proveniente da CC de sílica gel da F.N.F.MeOHsol.AcOEt.

Os compostos **4**, **6**, **11**, **12**, **13**, **14**, **15** e mistura de compostos **16** e **17** foram isolados de frações provenientes da cromatografia em coluna de sílica gel de Ext.AcOEt

acetilado, para o seu isolamento, as frações foram submetidas a sucessivas cromatografias preparativas em camada fina (PTLC).

4.2.2.1. Elucidação estrutural

Composto **4** (**Figura 38**) é sólido branco em forma de precipitado, solúvel em diclorometano. Seu espectro de HRMS exibiu um pico de íão $[M+NH_4]^+$ a $m/z = 759,2618$, o qual deduzido, corresponde a fórmula molecular $C_{36}H_{39}NO_{16}$. Esta fórmula molecular sugere a existência de dezoito insaturações. Pelo espectro de ^{13}C verificam-se sinais repetidos de deslocamento químico nas regiões entre 127,4-133,3 ppm que determinam presença de dois benzenos monosubstituído, pelo espectro de HMBC são observados correlações entre o grupo carbonilo (166,0 ppm) e hidrogénios de um dos benzenos (8,08 ppm), sugerindo portanto a presença de um benzoilo (cinco insaturações). A existência de sinais de δ de ^{13}C entre 166,0 - 169,8 ppm e 1H entre 20,4 - 21,1 ppm, determinam presença de 5 grupos acetatos (cinco insaturações). São também observados sinais de deslocamento químico de ^{13}C a 117,1 ppm de um carbono quaternário, muito característico a carbono de nitrilos (CN) e um outro sinal em torno de 70 ppm de carbono alfa (CH oxigenado). Pelo experimento HMBC (duas ou três ligações) nota-se correlações entre CN (117,1)/ H-alfa (5,55) e pelo outro experimento HMQC nota-se correlações entre C-alfa (68,2)/ H-alfa (5,55) confirmando a ligação -CH-CN, finalmente, pelo experimento HMBC visualiza-se correlações entre o C-alfa (68,2) com hidrogénios do outro benzeno (7,45) em sobra, confirmando então a presença do resíduo mandelonitrilo (seis insaturações).

Entre 106,5 e 98,7 ppm temos dois sinais de carbonos anoméricos (CH hemiacetálicos) que indicam presença de duas unidades monosacáridas cíclicas (duas insaturações em falta), e pelo experimento HMQC são visíveis correlações entre C-1 (106,5) Api /H-1(5,19) Api, e C-1 (98,7) Glc/ H-1(4,52) Glc. O sinal de deslocamento de C-3 (83,7) Api é um valor característico de um carbono quaternário de uma apiosa. Entretanto os sinais de C-3 (83,7) Api e C-1 (106,5) Api confirmam a presença da estrutura de uma apiosa. O sinal de C-1 (98,7) justifica a presença da glucosa na estrutura.

Estes resíduos (**Tabela 9**) foram encontrados num composto (oxyanthin 5"-benzoate), sem acetilar, descrito por Rockenbach *et al.* (1992), os seus espectros de RMN ^1H e de ^{13}C foram obtidos utilizando-se CD_3OD como solvente.

Os valores de deslocamento químico de RMN ^1H e de ^{13}C da glucose, apiosa e acetatos do composto em análise, foram comparados com valores do resíduo 6-*O*-D-apiofuranosil- β -(1 \rightarrow 6)-D-glucopiranosil peracetilada obtidos num composto isoflavónico por Mathias *et al.* (1998), e estes valores são concordantes por se utilizar o mesmo solvente (CDCl_3).

A ordem de união dos quatro fragmentos do composto, as posições e as estruturas de piranosa em glucose (glucopiranosil) e de furanosa em apiosa (apiofuranosil) foram confirmadas através do experimento HMBC (**Tabela 8**).

Tabela 8. Experimento HMBC do composto 4

Fragmento	^{13}C	^1H
Glucose	C-1 (98,7)	H-7 (5,55) Mn
Glucose	C-1 (98,7)	H-5 (3,65) Glc
Apiosa	C-1 (106,5)	H-6 (3,65) Glc
Apiosa	C-1 (106,5)	H-4 (4,22; 4,36) Api
Benzoilo	C-7 (166,0)	H-5 (4,92) Api

A constante de acoplamento $J= 7,6$ de H-1Glc indica que é um dobrele trans-diaxial com H-2 Glc o que supõe uma configuração axial e a ligação glicosídica com o mandenotriilo é β .

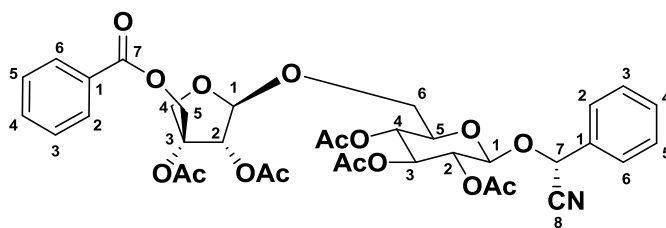


Figura 38. Estrutura do composto 4.

O composto **4** (desacetilado) já foi descritos por Rockenbach *et al.* (1992) e foi isolado de diferentes órgãos (flores, frutos e caule) de *P. livida*.

Mistura de compostos **4** e **5** (**Figura 39**), sólido branco em forma de precipitado, solúvel em diclorometano. Compostos **4** e **5** são estereoisômeros (**5** epímero de **4**) e foram confirmados a partir do seu espectro de RMN ^{13}C . Neste espectro verifica-se duplicação de sinais de deslocamento químico, com maior evidência para C-8 do mandelonitrilo. Presume-se que o composto **4** possui uma configuração *R* em C-7 por estar deslocada para frequências mais baixas (5,55 ppm), em meio básico se produz a epimerização desta posição, passando para a configuração *S*, fenómeno este observado no seu epímero **5**, tendo o sinal de H-7 Mn, se deslocado para 5,74 ppm. Segundo Rockenbach *et al.* (1992), Nakamura *et al.* (2009) e Yang *et al.* (2012), este seria o método mais adequado para a identificação da configuração de H-7 dos glicosil-(*R*)-mandelonitrilos.

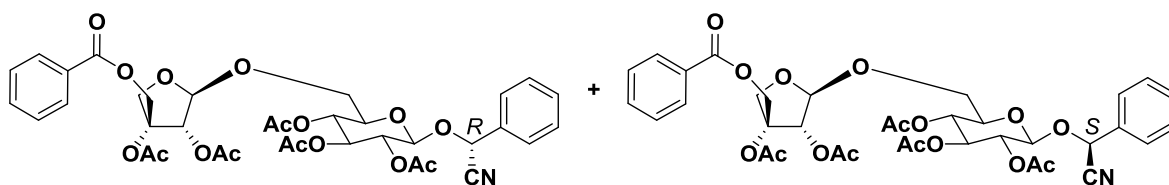


Figura 39. Estrutura e configurações do composto 4 e seu epímero (composto 5).

O composto **6** (**Figura 40**) foi obtido como um sólido incolor, solúvel em diclorometano. A sua fórmula molecular $\text{C}_{37}\text{H}_{47}\text{NO}_{16}$ foi deduzida a partir do pico de íão $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ a $m/z = 779,3230$ no seu espectro de HRMS. Esta fórmula molecular sugere a presença de quinze insaturações na sua estrutura. Os dados espectrais de RMN ^{13}C e ^1H deste composto (**Tabela 10**) são muito parecidos aos do composto **4** (**Tabela 9**) nos resíduos de Mandelonitrilo, glucose e apiosa (com insaturações de quatro acetatos, perfazem doze insaturações). O acetato em falta, deve-se ao facto do C-3 de apiosa aparecer a 78,7 ppm, valor este que sugere que C-3 de apiosa está ligado ao grupo OH (Mathias *et al.*, 1998).

Portanto, fazendo o somatório de todos oxigénios dos acetatos e das unidades monosacáridas e do grupo OH unido a C-3 da apiosa, perfazem catorze oxigénios, faltando portanto dois oxigénios e três insaturações. Este composto carece do segundo resíduo de

benzoilo e em seu lugar aparecem 10 novos sinais em espectro de RMN ^{13}C : 168,1; 144,5; 144,0; 127,0; 112,2; 73,0; 40,4; 28,1; 23,6 e 12,3 ppm. Aparecem também novos sinais de RMN de ^1H a 6,81 *t*; 5,81 *dd*; 5,18 *dd*; 5,14 *dd*; 2,19 *m*; 1,79 *s*; 1,57 *m* e 1,24 *s*. Pelo espectro DEPT nota-se que a 12,3 e 28,1 ppm localizam-se dois carbonos metílicos ($-\text{CH}_3$), a 112,2, 40,4 e 23,6 ppm localizam-se três carbonos metilénicos ($-\text{CH}_2-$), a 144,5 e 144,0 ppm localizam-se dois carbonos monoprotonados oleofínicos ($=\text{CH}-$) e a 168,1; 127,0 e 73,0 ppm localizam-se três carbonos quaternários: carbonilo, oleofínico e ligado ao grupo OH respectivamente (álcool terciário). Portanto as três insaturações deste resíduo correspondem a um grupo carbonilo e duas ligações duplas. Analisados estes sinais (HMQC, HMBC e NOESY), permitiram a construção do resíduo (*E*)-6-hidroxi-2,6-dimetil-2,7-octadienoilo (Monoterpeno) (Tabela 10). Pelo experimento HMBC observam-se correlações entre o C-1 (168,1) do monoterpeno com H-5 (4,38; 4,25) da apiosa, confirmando então que o composto em estudo está ligado a apiosa. Os sinais deste resíduo monoterpeno foram comparados com sinais dum resíduo presente num composto (5"-*O*-menthiafolate de seguicide), descrito por Zhong *et al.* (1999), sendo o único composto descrito na bibliografia onde este monoterpeno está unido a apiosa.

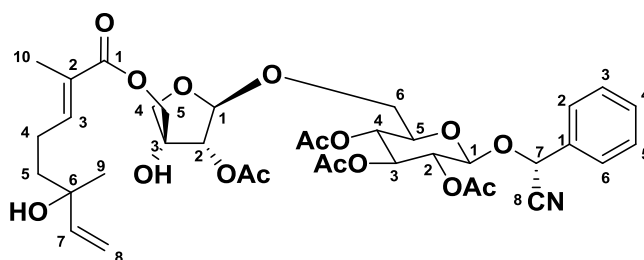


Figura 40. Estrutura do composto 6.

Mistura de compostos **6** e **7** (Figura 41) sólido incolor, solúvel em diclorometano. Compostos **6** e **7** são estereoisómeros (**7** epímero de **6**) e foram confirmados a partir do seu espectro de RMN ^{13}C . A configuração destes compostos é o mesmo descrito para os estereoisómeros **4** e **5** (Figura 39). O composto **6** possui a configuração *R* (H-7 Mn; 5,48 ppm) e composto **7** com a configuração *S* (H-7 Mn: 5,70 ppm).

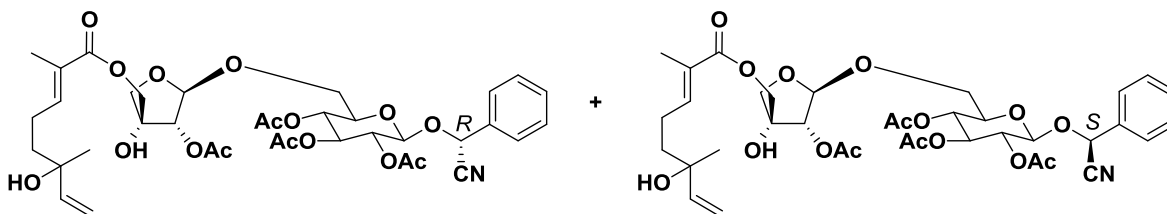


Figura 41. Estrutura e configuração do composto 6 e seu epímero (composto 7).

Composto **11** (**Figura 42**) sólido incolor, solúvel em diclorometano. O seu espectro de HRMS exibiu um pico de ião $[M+NH_4]^+$ a $m/z = 748,2456$, o qual foi deduzido para a fórmula molecular $C_{35}H_{38}O_{17}$. Comparando os dados de RMN ^{13}C e de 1H deste composto (**Tabela 11**) com os do composto **4** (**Tabela 9**), foram observadas várias semelhanças, destacando-se portanto a ausência de sinais deslocamento químico do resíduo mandelonitrilo. Aparecem sinais duplicados do sinal de carbonilo (CO) nas regiões entre 164-165 ppm, sendo assim sugere-se a presença de dois resíduos de benzoilo, um ligado a glucose e outro ligado a apiosa.

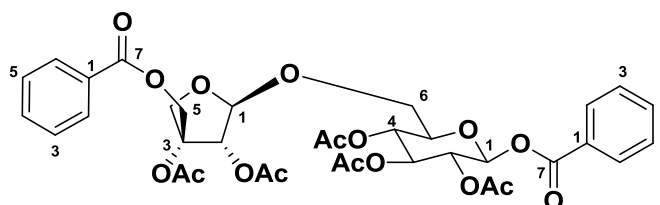


Figura 42. Estrutura do composto 11.

Composto **12** (**Figura 43**) sólido incolor, solúvel em diclorometano. A fórmula molecular $C_{38}H_{48}O_{18}$ foi deduzida do pico de ião $[M+NH_4]^+$ a $m/z = 810,3172$ no seu espectro de HRMS. Os dados espectrais de RMN ^{13}C e 1H deste composto (**Tabela 11**) são totalmente iguais aos do composto **6** (**Tabela 10**) nos resíduos de (*E*)-6-hidroxi-2,6-dimetil-2,7-octadienoilo (monoterpeno), glucose e apiosa, tendo em falta o mandelonitrilo e em sua substituição aparecem sinais de benzoilo. A outra diferença está no C-3 da apiosa que aparece a 84,0 ppm, sugerindo que C-3 está unido a um acetato.

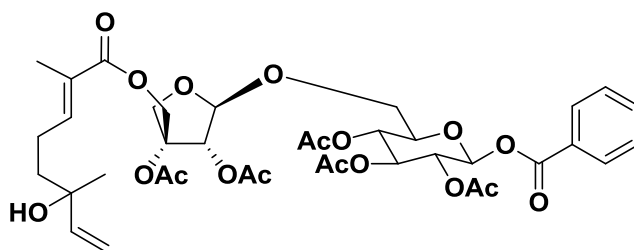


Figura 43. Estrutura do composto 12.

Composto **13** (Figura 44), obtido como um sólido incolor, solúvel em diclorometano. O seu espectro de HRMS exibiu um pico de ião $[M+NH_4]^+$ a $m/z = 821,3342$, o qual deduzido, corresponde a fórmula molecular $C_{39}H_{49}NO_{17}$. Os dados espectrais de RMN ^{13}C e 1H deste composto (Tabela 10) são totalmente iguais aos do composto **6** (Tabela 10), com exceção no valor de deslocamento químico de ^{13}C do C-3 de apiosa que observou-se a 83,8 ppm, sugerindo que este está unido a um acetato.

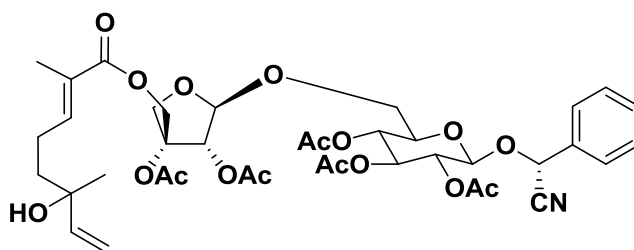


Figura 44. Estrutura do composto 13.

Composto **14** (Figura 45) é um sólido branco, solúvel em diclorometano. O seu espectro de HRMS exibiu um pico de ião $[M+NH_4]^+$ a $m/z = 717,2501$, o qual deduzido, corresponde a fórmula molecular $C_{34}H_{41}N_2O_{15}$. Os dados espectrais de RMN ^{13}C e 1H deste composto (Tabela 9) são totalmente iguais aos do composto **4** (Tabela 9), com exceção no valor C-3 de apiosa que observou-se a 78,7 ppm, sugerindo que este está unido a um grupo OH.

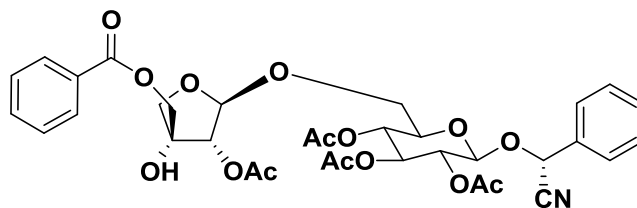


Figura 45. Estrutura do composto 14.

Composto **15** (Figura 46) sólido incolor, solúvel em diclorometano. A sua fórmula molecular $C_{28}H_{34}O_{16}$ foi deduzida do pico de ião $[M+NH_4]^+$ a $m/z = 644,21768$ no seu espectro de HRMS. Seus dados de RMN ^{13}C e 1H (Tabela 11) apresentam similaridade com os do composto **11** (Tabela 11), destacando-se nos espectros de composto em estudo, ausência de um resíduo benzoilo. Outra diferença no C-3 de apiosa que aparece a 78,7 ppm, indicando que o C-3 de apiosa está ligado ao grupo OH.

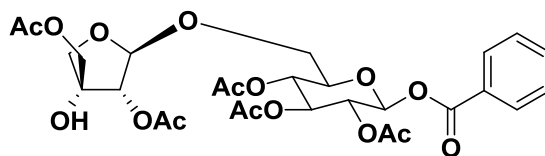


Figura 46. Estrutura do composto 15.

O composto **16** (Figura 47), sólido incolor, solúvel em diclorometano. A sua fórmula molecular $C_{36}H_{46}O_{17}$ foi deduzida à partir do pico de ião $[M+NH_4]^+$ a $m/z = 768,3067$ no seu espectro de HRMS. Os dados espectrais de RMN de ^{13}C e de 1H deste composto (Tabela 12) são praticamente iguais aos do composto **12** (Tabela 12). A única diferença entre estes dois compostos está no C-3 da apiosa do composto em análise, que está ligado ao grupo OH.

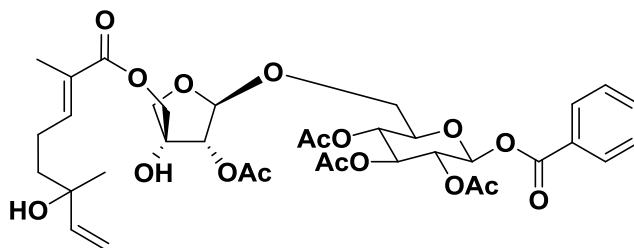


Figura 47. Estrutura do composto 16.

O composto **17** (Figura 48), possuindo a fórmula molecular C₂₉H₃₉O₁₅, deduzida à partir do pico de ião [M+NH₄]⁺ a $m/z = 655,2354$ num espectro de HRMS numa mistura contendo os compostos **6**, **15**, **16**, **17** e outros dois desconhecidos. A partir da sua massa exata (637 u.m.a) foi comparada com a massa exata do composto **15** (626 u.m.a), tendo se feito uma relação entre estas massas e notou-se que há diferença de 11 unidades, esta relação também existe entre os compostos **4** e **11**, **12** e **13** e entre **6** e **16**, e deve-se pela substituição dos resíduo benzoilo pelo mandelonitrilo ou vice-versa. Portanto o composto **15** (Figura 46) tem na sua estrutura o resíduo benzoilo e logo, o composto **17** deve possuir na sua estrutura o resíduo mandelonitrilo. Assim nos dados de RMN ¹³C e ¹H do composto **15** (Tabela 11) ao substituir o resíduo benzoilo pelo mandelonitrilo, chegamos a estrutura do composto **17**.

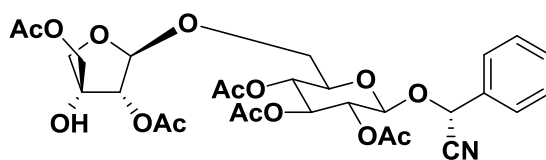


Figura 48. Estrutura do composto 17.

A oxyanthina (composto **17** sem acetilar), já foi descrita por Rockenbach *et al.* (1992) e foi isolado de diferentes órgãos (flores, frutos e caule) de *P. livida*.

Tabela 9. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H dos compostos 4 e 14 (CDCl_3)

Fragmento	Posição do carbono	Composto 4		Composto 14	
		$^{13}\text{C}^a$	$^1\text{H}^{a,b}$	$^{13}\text{C}^a$	$^1\text{H}^{a,b}$
Mandelonitrilo	1	132,6	-	*	-
	2,6	127,4	7,45 (2H; <i>m</i>)	127,5	7,37 (2H; <i>m</i>)
	3,5	128,5	7,45 (2H; <i>m</i>)	128,5	7,37 (2H; <i>m</i>)
	4	130,1	7,45 (H; <i>m</i>)	130,2	7,37 (H; <i>m</i>)
	7	68,2	5,55 (H; <i>s</i>)	68,4	5,46 (H; <i>s</i>)
	8	117,1	-	*	-
Glucose	1	98,7	4,52 (H; <i>d</i> ; 7,6)	98,7	4,56 (H; <i>m</i>)
	2	71,0	5,08 (H; <i>m</i>)	71,0	4,91 (H; <i>m</i>)
	3	72,5	5,08 (H; <i>m</i>)	72,5	5,05 (H; <i>m</i>)
	4	68,6	4,92 (H; <i>m</i>)	68,6	5,05 (H; <i>m</i>)
	5	74,1	3,65 (H; <i>m</i>)	73,7	3,59 (H; <i>m</i>)
	6	66,3	A 3,65 (H; <i>m</i>) B 3,65 (H; <i>m</i>)	66,5	A 3,69 (H; <i>m</i>) B 3,59 (H; <i>m</i>)
Apiosa	1	106,5	5,19 (H; <i>d</i>)	107,3	5,13 (H; <i>m</i>)
	2	76,1	5,48 (H; <i>d</i>)	78,5	5,14 (H; <i>d</i>)
	3	83,7	-	78,7	-
	4	72,8	A 4,36 (H; <i>d</i> ; 10,8) B 4,22 (H; <i>d</i> ; 10,4)	74,3	A 4,02 (H; <i>d</i> ; 9,6) B 3,93 (H; <i>d</i> ; 9,6)
	5	63,9	A 4,92 (H; <i>m</i>) B 4,92 (H; <i>m</i>)	68,0	A 4,57 (H; <i>d</i> ; 12,0) B 3,59 (H; <i>m</i>)
Benzoilo	1	129,5	-	*	-
	2,6	129,8	8,08 (2H; <i>d</i> ; 7,2)	129,8	8,04 (2H; <i>d</i> ; 6,4)
	3,5	129,1	7,45 (2H; <i>m</i>)	129,1	7,45 (2H; <i>m</i>)
	4	133,3	7,55 (H; <i>m</i>)	133,4	7,53 (H; <i>m</i>)
	7	166,0	-	*	-
OCOCH_3		170,1	-	170,1	-
		169,8	-	*	-
		169,5	-	*	-
		169,3	-	-	-
		168,9	-	168,9	-
OCOCH_3		21,1	2,11 (3H; <i>s</i>)	20,7	2,11 (3H; <i>s</i>)
		20,7	2,05 (3H; <i>s</i>)	20,6	1,96 (3H; <i>s</i>)
		20,6	2,02 (3H; <i>s</i>)	20,5	1,91 (3H; <i>s</i>)
		20,6	1,97 (3H; <i>s</i>)	20,4	1,90 (3H; <i>s</i>)
		20,5	1,95 (3H; <i>s</i>)	-	-

^a Deslocamento químico, δ , em ppm. ^b (Número de H, multiplicidade, constante de acoplamento, *J*, em Hz).

* Valor de sinal não registado (existência de menor quantidade de mostra).

Tabela 10. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H dos compostos 6 e 13 em CDCl_3

Fragmento	Posição do carbono	Composto 6		Composto 13	
		$^{13}\text{C}^a$	$^1\text{H}^{a,b}$	$^{13}\text{C}^a$	$^1\text{H}^{a,b}$
Mandelonitrilo	1	132,5	-	132,6	-
	2,6	127,5	7,40 (2H; <i>m</i>)	127,0	7,44 (2H; <i>m</i>)
	3,5	129,2	7,40 (2H; <i>m</i>)	129,2	7,44 (2H; <i>m</i>)
	4	130,3	7,40 (H; <i>m</i>)	130,2	7,44 (H; <i>m</i>)
	7	68,4	5,48 (H; <i>s</i>)	68,2	5,58 (H; <i>s</i>)
	8	117,1	-	117,2	-
Glucose	1	98,7	4,60 (H; <i>d</i> ; 8,0)	98,6	4,51 (H; <i>d</i> ; 8,0)
	2	71,0	4,92 (H; <i>m</i>)	70,9	4,94 (H; <i>m</i>)
	3	73,7	4,92 (H; <i>m</i>)	72,8	4,94 (H; <i>m</i>)
	4	68,6	4,92 (H; <i>m</i>)	68,6	4,59 (H; <i>m</i>)
	5	74,2	3,58 (H; <i>m</i>)	74,1	3,64 (H; <i>m</i>)
	6	67,3	A 3,67 (H; <i>d</i> ; 9,6) B 3,58 (H; <i>m</i>)	66,3	A 3,64 (H; <i>m</i>) B 3,64 (H; <i>m</i>)
Apiosa	1	107,3	5,04 (H; <i>m</i>)	106,4	5,15 (H; <i>d</i>)
	2	76,7	5,09 (H; <i>m</i>)	76,2	5,39 (H; <i>d</i>)
	3	78,7	-	83,8	-
	4	72,5	A 3,86 (H; <i>d</i>) B 3,67 (H; <i>d</i> ; 9,6)	68,6	A 4,25 (H; <i>d</i>) B 4,16 (H; <i>d</i> ; 10,0)
	5	66,4	A 4,38 (H; <i>d</i> ; 11,6) B 4,25 (H; <i>d</i> ; 12,0)	63,4	A 4,73 (H; <i>m</i>) B 4,73 (H; <i>m</i>)
Monoterpeno	1	168,1	-	169,4	-
	2	127,0	-	127,6	-
	3	144,5	6,81 (1H; <i>t</i>)	145,4	6,82 (1H; <i>t</i>)
	4	23,6	2,19 (2H; <i>m</i>)	25,1	2,21 (2H; <i>m</i>)
	5	40,4	1,57 (2H; <i>m</i>)	40,4	1,65 (2H; <i>m</i>)
	6	73,0	-	73,0	-
	7	144,0	5,81 (H; <i>dd</i> ; 17,2; 10,8)	144,5	5,85 (H; <i>dd</i> ; 17,2; 10,8)
	8	112,2	A 5,18 (H; <i>dd</i> ; 17,2; 1,4) B 5,14 (H; <i>dd</i> ; 10,8; 1,4)	112,2	A 5,22 (H; <i>dd</i> ; 17,2; 1,4) B 5,04 (H; <i>dd</i> ; 10,8; 1,4)
	9	12,3	1,79 (3H; <i>s</i>)	12,3	1,84 (3H; <i>s</i>)
	10	28,1	1,24 (3H; <i>s</i>)	28,1	1,30 (3H; <i>s</i>)
OCOCH_3		170,4	-	170,3	-
		170,2	-	170,2	-
		169,4	-	169,8	-
		169,0	-	169,8	-
		-	-	169,6	-
OCOCH_3		20,8	2,11 (3H; <i>s</i>)	21,1	2,10 (3H; <i>s</i>)
		20,6	1,97 (3H; <i>s</i>)	20,7	2,04 (3H; <i>s</i>)
		20,6	1,92 (3H; <i>s</i>)	20,6	2,02 (3H; <i>s</i>)
		20,5	1,90 (3H; <i>s</i>)	20,6	2,00 (3H; <i>s</i>)
		-	-	20,5	1,98 (3H; <i>s</i>)

^a Deslocamento químico, δ , em ppm. ^b (Número de H, multiplicidade, constante de acoplamento, *J*, em Hz).

Tabela 11. Dados de RMN ^{13}C e ^1H dos compostos 11 e 15 em CDCl_3

Fragmento	Posição do Carbono	Composto 11		Composto 15	
		$^{13}\text{C}^a$	$^1\text{H}^{a,b}$	$^{13}\text{C}^a$	$^1\text{H}^{a,b}$
Benzoilo I	1	133,0	-	130,1	-
	2,6	129,9	7,91 (2H; <i>dd</i> ; 8,0;1,0)	128,6	7,97 (2H; <i>d</i> ; 6,8)
	3,5	129,7	7,35 (2H; <i>m</i>)	128,5	7,42 (2H; <i>m</i>)
	4	133,0	7,47 (H; <i>m</i>)	133,9	7,56 (H; <i>m</i>)
	7	164,4	-	164,5	-
Glucose	1	92,3	5,82 (H; <i>d</i> ; 8,1)	92,3	5,82 (H; <i>d</i> ; 8,0)
	2	70,2	5,26 (H; <i>d</i> ; 3,2)	70,2	5,25 (H; <i>d</i> ; 3,6)
	3	72,7	5,26 (H; <i>d</i> ; 3,2)	74,1	5,25 (H; <i>d</i> ; 3,6)
	4	68,7	5,02 (H; <i>m</i>)	68,6	5,02 (H; <i>m</i>)
	5	74,1	3,84 (H; <i>m</i>)	74,3	3,85 (H; <i>m</i>)
	6	66,3	A 3,69 (H; <i>d</i>) B 3,60 (H; <i>m</i>)	66,2	A 3,72 (H; <i>d</i> ; 2,4) B 3,50-3,59 (H; <i>m</i>)
Apiosa	1	106,1	5,00 (H; <i>d</i>)	107,2	5,00 (H; <i>d</i>)
	2	76,3	5,40 (H; <i>d</i>)	76,7	4,91 (H; <i>d</i>)
	3	83,9	-	78,7	-
	4	72,6	A 4,30 (H; <i>d</i> ; 10,4) B 4,14 (H; <i>d</i> ; 10,4)	72,7	A 3,92 (H; <i>d</i>) B 3,79 (H; <i>d</i> ; 10,0)
	5	63,6	A 4,95 (H; <i>d</i> ; 12,0) B 4,73 (H; <i>d</i> ; 12,0)	66,5	A 4,30 (H; <i>d</i> ; 11,6) B 4,15 (H; <i>d</i> ; 12,0)
Benzoilo II	1	130,1	-	-	-
	2,6	129,8	8,02 (2H; <i>dd</i> ; 8,0; 1,3)	-	-
	3,5	128,5	7,31-7,40 (2H; <i>m</i>)	-	-
	4	133,7	7,47 (H; <i>m</i>)	-	-
	7	165,9	-	-	-
OCOCH_3		170,1	-	171,2	-
		169,7	-	170,1	-
		169,4	-	169,9	-
		169,3	-	169,4	-
		169,0	-	169,3	-
OCOCH_3		21,1	1,99 (3H; <i>s</i>)		2,06 (3H; <i>s</i>)
		20,6	1,99 (3H; <i>s</i>)	20,7	2,02 (3H; <i>s</i>)
		20,6	1,96 (3H; <i>s</i>)	20,6	2,00 (3H; <i>s</i>)
		20,5	1,93 (3H; <i>s</i>)	20,6	1,97 (3H; <i>s</i>)
		20,4	1,91 (3H; <i>s</i>)	20,6	1,93 (3H; <i>s</i>)

^a Deslocamento químico, δ , em ppm. ^b (Número de H, multiplicidade, constante de acoplamento, *J*, em Hz).

Tabela 12. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H dos compostos 12 e 16 em CDCl_3

Fragmento	Posição do carbono	Composto 12		Composto 16	
		$^{13}\text{C}^a$	$^1\text{H}^{a,b}$	$^{13}\text{C}^a$	$^1\text{H}^{a,b}$
Benzoilo	1	130,2	-	130,1	-
	2,6	129,2	7,94 (2H; <i>dd</i> ; 7,2; 1,2)	128,6	7,96 (2H; <i>dd</i> ; 7,2; 1,2)
	3,5	128,6	7,40 (2H; <i>m</i>)	128,5	7,41 (2H; <i>m</i>)
	4	133,8	7,52 (1H; <i>m</i>)	133,8	7,53 (1H; <i>m</i>)
	7	164,4	-	-	-
Glucose	1	92,3	5,81 (H; <i>d</i>)	92,3	5,81 (H; <i>m</i>)
	2	70,2	5,26 (H; <i>d</i> ; 4,0)	70,2	5,26 (H; <i>m</i>)
	3	72,7	5,26 (H; <i>d</i> ; 4,0)	72,7	5,26 (H; <i>m</i>)
	4	68,7	5,04 (H; <i>m</i>)	68,7	5,00 (H; <i>m</i>)
	5	74,1	3,83 (H; <i>m</i>)	74,1	3,92 (H; <i>m</i>)
	6	66,2	A 3,64 (H; <i>d</i>) B 3,58 (H; <i>m</i>)	67,2	A 3,71 (H; <i>m</i>) B 3,54 (H; <i>m</i>)
Apiosa	1	106,0	4,88 (H; <i>d</i>)	107,3	5,26 (H; <i>m</i>)
	2	76,3	5,27 (H; <i>d</i>)	76,4	5,04 (H; <i>m</i>)
	3	84,0	-	78,8	-
	4	72,5	A 4,21 (H; <i>d</i> ; 10,8) B 4,08 (H; <i>d</i> ; 10,8)	72,7	A 3,93 (H; <i>d</i> ; 9,6) B 3,83 (H; <i>d</i> ; 10,0)
	5	63,0	A 4,75 (H; <i>d</i> ; 12,4) B 4,49 (H; <i>d</i> ; 12,8)	66,3	A 4,32 (H; <i>d</i> ; 12,0) B 4,22 (H; <i>d</i> ; 12,0)
Monoterpeno	1	169,1	-	169,3	-
	2	127,0	-	-	-
	3	144,6	6,79 (H; <i>t</i>)	144,5	6,79 (H; <i>t</i>)
	4	23,5	2,08 (2H; <i>m</i>)	23,5	2,17 (2H; <i>m</i>)
	5	40,5	1,60 (2H; <i>m</i>)	40,5	1,63 (2H; <i>m</i>)
	6	73,0	-	73,5	-
	7	143,4	5,88 (H; <i>dd</i> ; 17,2; 10,8)	143,8	5,86 (H; <i>dd</i> ; 17,2; 10,8)
	8	112,1	A 5,17 (H; <i>dd</i> ; 17,2; 1,4) B 5,02 (H; <i>dd</i> ; 10,8; 1,4)	112,1	A 5,16 (H; <i>dd</i> ; 17,2; 1,4) B 5,02 (H; <i>dd</i> ; 10,8; 1,4)
	9	12,3	1,75 (3H; <i>s</i>)	12,2	1,90 (3H; <i>s</i>)
	10	28,1	1,25 (3H; <i>s</i>)	28,0	1,58 (3H; <i>s</i>)
OCOCH_3		170,2	-	170,1	-
		169,6	-	168,1	-
		169,5	-	-	-
		169,4	-	-	-
		169,4	-	-	-
OCOCH_3		21,1	2,00 (3H; <i>s</i>)		2,05 (3H; <i>s</i>)
		20,7	1,98 (3H; <i>s</i>)	20,8	2,00 (3H; <i>s</i>)
		20,6	1,98 (3H; <i>s</i>)	20,6	1,99 (3H; <i>s</i>)
		20,6	1,97 (3H; <i>s</i>)	20,5	1,92 (3H; <i>s</i>)
			1,94 (3H; <i>s</i>)	-	-

^a Deslocamento químico, δ , em ppm. ^b (Número de H, multiplicidade, constante de acoplamento, *J*, em Hz).

4.2.3. Composto 10

O composto **10** (**Figura 49**) é proveniente de frações donde foram isolados os dissacáridos. Como os dissacáridos, o seu isolamento foi por meio de cromatografia preparativa em TLC (PTLC). Este composto foi caracterizado por duas técnicas: RMN e cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa (GC/MS).

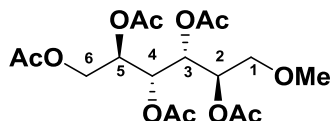


Figura 49. Estrutura de D-glucitol isolado das folhas de *P. locuples*.

4.2.3.1. Elucidação estrutural

O composto **10** foi isolado como um sólido branco, solúvel em diclorometano. O seu espectro de HRMS exibiu um pico de ião $[M+NH_4]^+$ a $m/z = 424,1822$, o qual deduzido, corresponde a fórmula molecular $C_{17}H_{30}NO_{11}$. Pelo espectro de RMN 1H deste composto são observados dois sinais de deslocamento químico (δ) a 3,48 (*dd*; 3,6; H-6) e a 4,05 (*dd*; 1,6; 5,2; H-2) correspondentes a hidrogénios metilénicos e quatro sinais de δ a 3,33 (*m*; H-1), 4,21 (*d*; 2,8; H-3), 5,06 (*m*; H-4) e a 5,45 (*m*; H-5) referentes a hidrogénios monoprotonados, também observa-se um sinal a 3,30 ppm, correspondente ao grupo metoxi (O-CH₃). No espectro de RMN ^{13}C são observados cinco sinais de δ entre 170,5-171,4 ppm correspondentes a carbonos carbonilos (CO), sugerindo portanto a presença de acetatos. A presença de cinco sinais de carbonos metílicos (-CH₃) em 21,7-21,4 ppm, também fundamentam a existência destes acetatos e pelo experimento HMBC observam-se correlações entre CO (170,5 ppm) com os hidrogénios metílicos (2,04; *s*). Este composto foi confirmado pela técnica de GC/MS como sendo o penta-*O*-acetil-1-*O*-metil-D-glucitol.

Tabela 13. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H do composto 10 em CDCl_3

Número de carbono	$^{13}\text{C}^{\text{a}}$	$^1\text{H}^{\text{a, b}}$
1	71,5	4,05 (2H; <i>dd</i> ; 1,6; 5,2)
2	60,0	3,33 (H; <i>m</i>)
3	68,1	4,21 (H; <i>d</i> ; 2,8)
4	68,4	5,06 (H; <i>m</i>)
5	68,6	5,45 (H; <i>m</i>)
6	62,7	3,48 (2H; <i>dd</i> ; 3,6)
OCH_3	60,2	3,30 (3H; <i>s</i>)
OCOCH_3	171,4	-
	170,8	-
	170,7	-
	170,5	-
	170,5	-
OCOCH_3	21,7	2,07 (3H; <i>s</i>)
	21,6	2,06 (3H; <i>s</i>)
	21,5	2,04 (3H; <i>s</i>)
	21,4	2,03 (3H; <i>s</i>)
	21,4	2,02 (3H; <i>s</i>)

^a Deslocamento químico, δ , em ppm. ^b (Número de H, multiplicidade, constante de acoplamento, *J*, em Hz).

4.2.3.2. Análise por GC/MS

Na análise do composto **10** por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, foi possível obter um cromatograma contendo um pico com o respectivo tempo de retenção. Este composto foi identificado por comparação do espectro de massas obtido com o espectro de massas existente na base de dados do equipamento utilizado. Portanto, foi possível observar no cromatograma um pico com o tempo de retenção de 12,646 minutos (**Figura 50**).

File : C:\HPCHEM\1\DATA\A2B47.D
Operator : Amadio
Acquired : 26 May 114 1:58 am using AcqMethod DEFAULT
Instrument : 5972 - In
Sample Name: B47: R1 de CPCC 40 de ext AE acetilad
Misc Info : 70(3)-20-320(9,5); 50-700 uma
Vial Number: 1

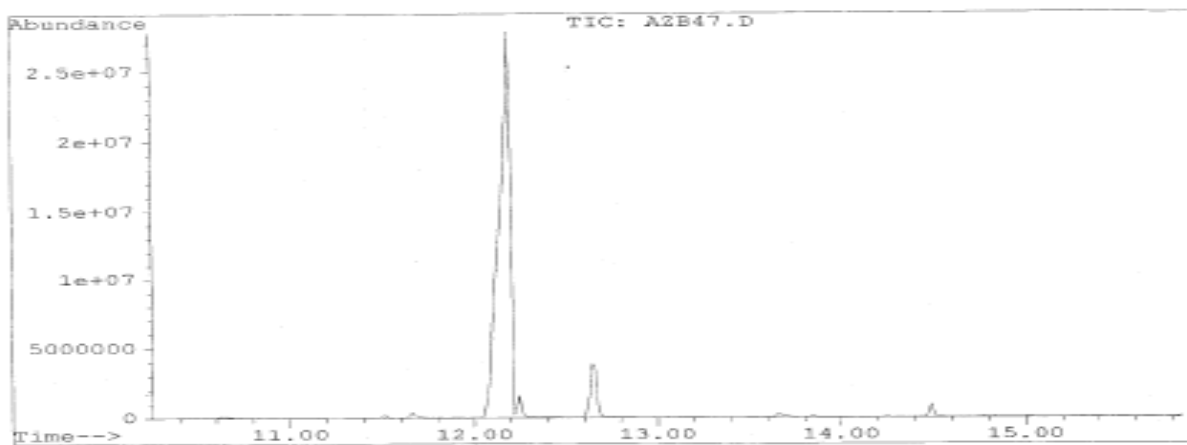


Figura 50. Cromatograma do composto 10 analisado por GC/MS.

O espectro de massas por impacto de eletrão (**Figura 51**) do composto **10** mostrou uma razão em m/z 406, que corresponde ao pico do ião molecular do penta-*O*-acetil-1-*O*-metil-D-glucitol.

Library Searched : C:\DATABASE\W99N08.L
Quality : 87
ID : d-Glucitol, penta-O-acetyl-1-O-methyl-

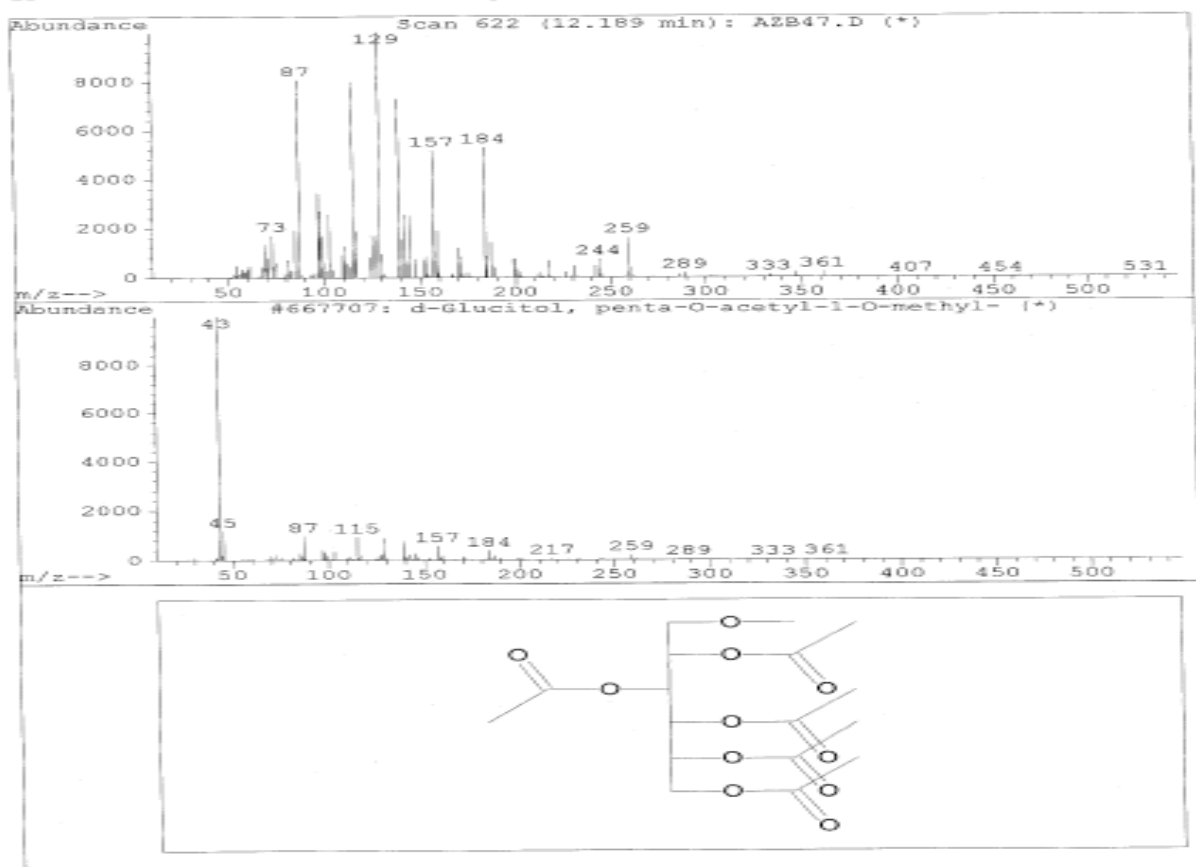


Figura 51. Espectro de massa de penta-O-acetil-1-O-metil-Dglucitol.

4.2.4. Análise de geninas por GC/MS

Na análise das geninas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, foi possível obter cromatogramas contendo picos com diferentes tempos de retenção. Os compostos presentes foram identificados por comparação entre os espectros de massas obtidos com os espectros de massas existentes na base de dados do equipamento utilizado. No entanto, foi possível observar no cromatograma (**Figura 52**) três picos com os seguintes tempos de retenção: 4,662; 7,450 e 11,720 min, entretanto só foram identificados os compostos dos primeiros dois picos.

File : C:\HPCHEM\1\DATA\AZB8B.D
 Operator : Amandio
 Acquired : 4 Jun 114 8:29 am using AcqMethod DEFAULT
 Instrument : 5972 - In
 Sample Name: B8: Geninas hidrolisaveis
 Misc Info : 70(3) - 20 - 325 (9.25) SD 3 min
 Vial Number: 1

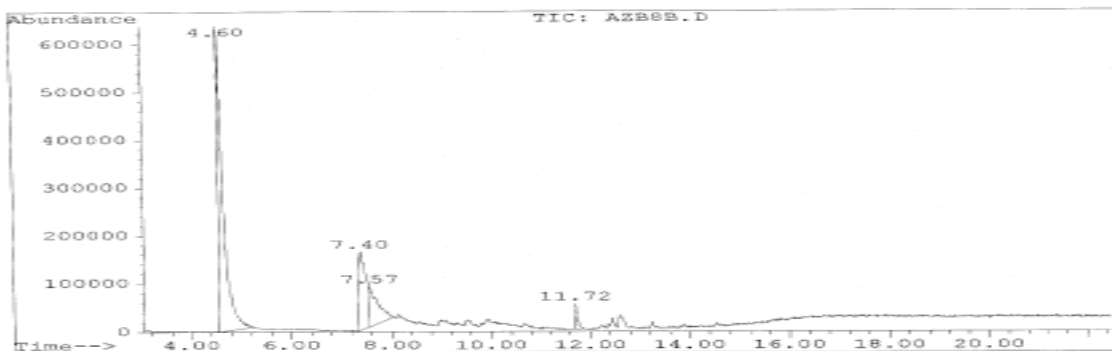


Figura 52. Cromatograma das geninas analisadas por GC/MS.

O espectro de massas por impacto de elétron (**Figura 53**) do composto **18**, mostrou uma razão em m/z 106, que corresponde ao pico do ião molecular do benzaldeído.

Library Searched : C:\DATABASE\W9N08.L
 Quality : 95
 ID : Benzaldehyde (CAS) \$\$ Phenylmethanal \$\$ Benzenecarbonyl \$
 \$ Benzaldehyde FFC

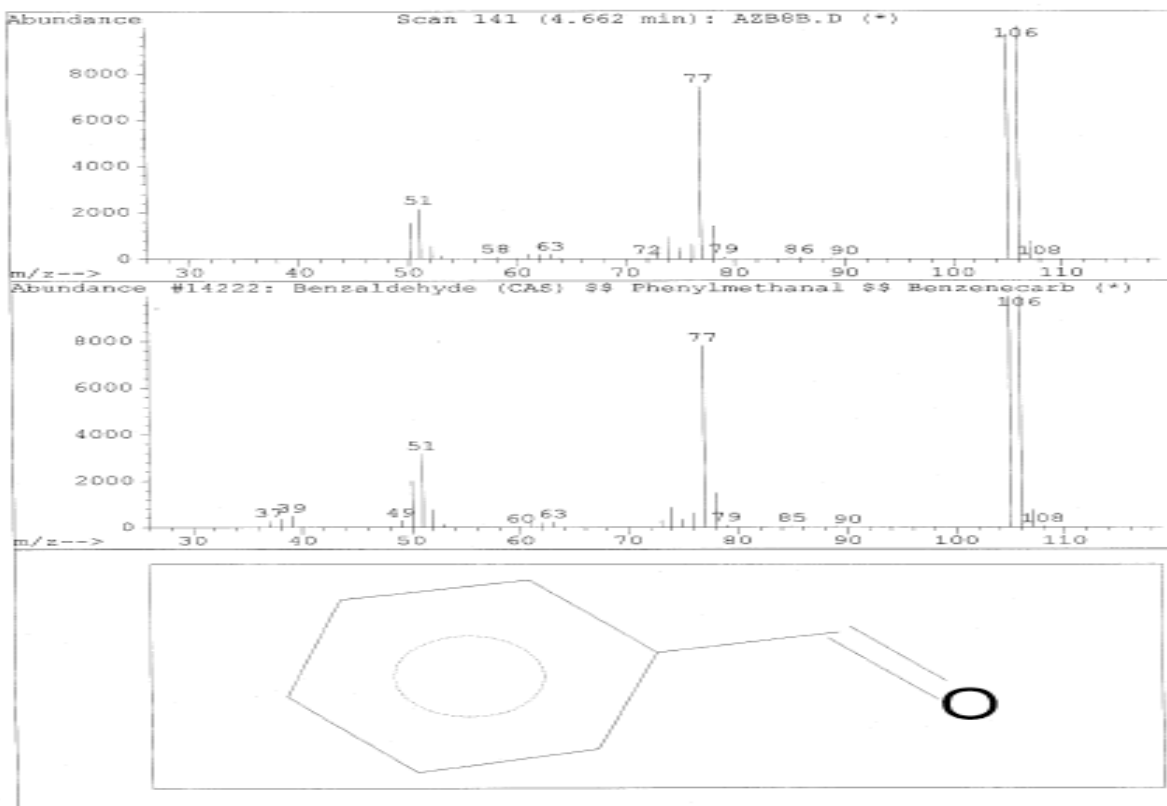


Figura 53. Espectro de massa do benzaldeído.

O espectro de massas por impacto de elétron (**Figura 54**) do composto **1**, mostrou uma razão em m/z 122, que corresponde ao pico do ião molecular do ácido benzóico (composto **1**).

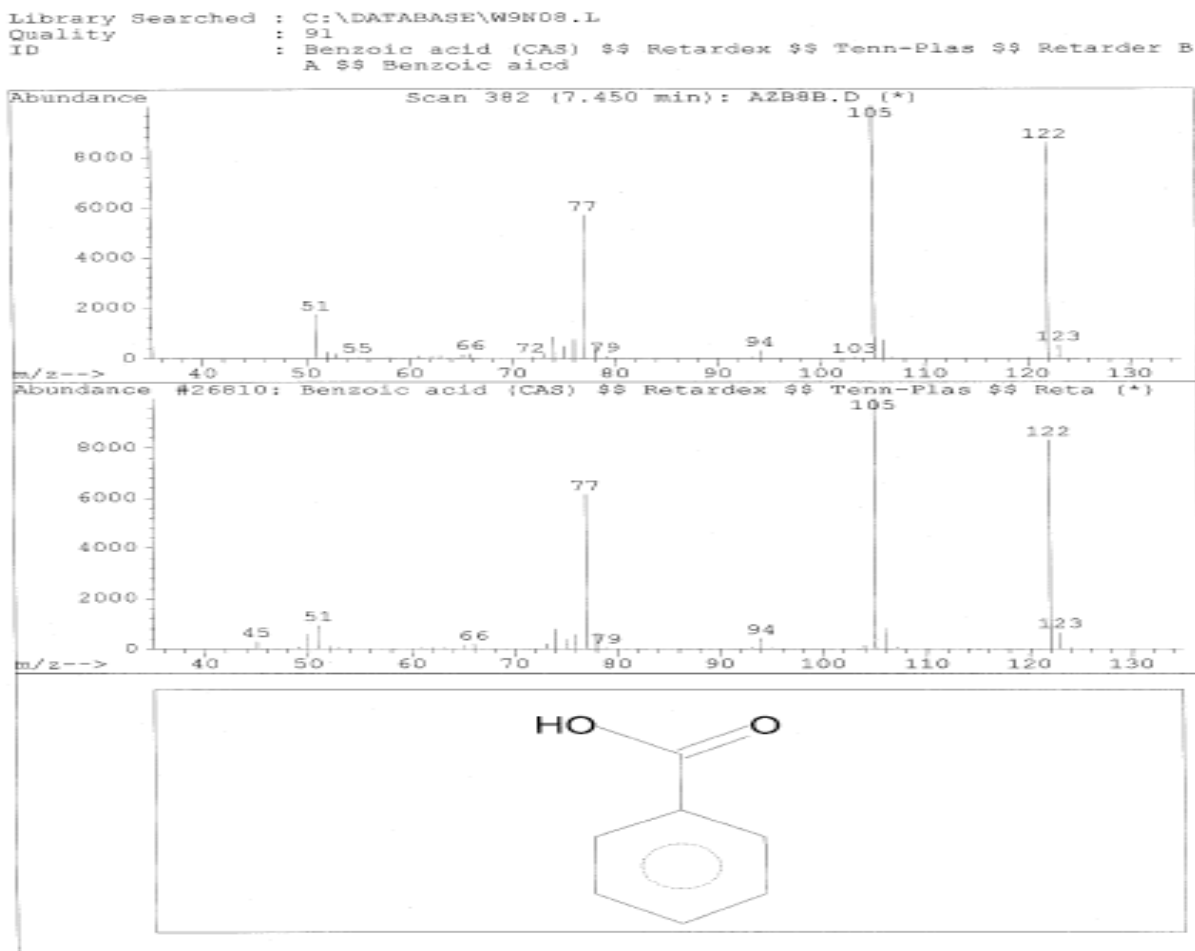


Figura 54. Espectro de massa do ácido benzóico.

4.3. Bioatividade

4.3.1. Atividade antioxidante

Os resultados da atividade antioxidante dos extratos e frações preparados a partir de folhas trituradas de *P. locuples* são apresentados na **Tabela 14**.

Tabela 14. Atividade antioxidante de extratos/frações de *P. locuples* (média± SD)

Amostras	Valores de EC ₅₀ (mg/mL)		
	Atividade captadora de DPPH	Poder Redutor (PR)	Inibição da descoloração do β-Caroteno
Ext.Hex	7,69 ± 0,23	1,17 ± 0,01	3,40 ± 0,06
Ext.DCM	4,28 ± 0,13	1,55 ± 0,00	2,21 ± 0,08
Ext.MeOH	0,29 ± 0,01	0,31 ± 0,00	0,52 ± 0,01
Ext.H ₂ O	0,32 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,31 ± 0,00
F.MeOHsol.AcOEt	0,48 ± 0,01	0,48 ± 0,02	0,88 ± 0,02
F.MeOHsol.But	> 10	> 10	10,66 ± 0,41
F.MeOHsol.H ₂ O	0,59 ± 0,01	0,50 ± 0,01	1,01 ± 0,02
Ext.AcOEt	2,79 ± 0,07	2,17 ± 0,00	7,57 ± 0,34
Ext.AcOEt acetilado	> 20	1,81 ± 0,03	10,72 ± 0,12
Geninas Ext.AcOEt	3,37 ± 0,06	1,59 ± 0,01	2,21 ± 0,06
Controlo Positivo (Trolox)	42,0 µg/mL	41,0 µg/mL	18,0µg/mL

De uma forma geral, os extratos obtidos com solventes de maior polaridade (metanol e água) revelaram maior atividade antioxidante (EC₅₀DPPH = 0,29 e 0,32 mg/mL, respetivamente; EC₅₀PR = 0,31 e 0,30 mg/mL, respetivamente; EC₅₀β-caroteno = 0,52 e 0,31 mg/mL, respetivamente). Os extratos obtidos a partir da partição do extrato metanólico com acetato de etilo e água apresentaram valores intermédios de atividade antioxidante, com exceção do ensaio de inibição da descoloração do β-caroteno que originou EC₅₀ = 0,88 e 1,01 mg/mL, respetivamente, enquanto que os extratos obtidos com hexano, diclorometano e acetato de etilo (normal e acetilado), bem como as geninas, apresentaram menor potencial antioxidante. Até à concentração máxima testada (10 mg/mL), o extrato metanólico particionado com *n*-butanol não apresentou nem atividade captadora de DPPH, nem PR; o EC₅₀ obtido no ensaio de descoloração do β-caroteno foi superior a 10 mg/mL (EC₅₀β-caroteno = 10,66 mg/mL).

4.3.2. Atividade antitumoral e citotoxicidade

4.3.2.1. Extratos/frações de folhas de *P. locuples*

Relativamente aos ensaios de citotoxicidade em linhas celulares tumorais, todos os extratos revelaram atividade inibitória do seu crescimento, exceto os extratos metanólicos particionados em n-butanol e água ($GI_{50} > 400 \mu\text{g/mL}$) na linha NCI-H460. O extrato de acetato de etilo acetilado (Ext.AcOEtacetilado) foi o que apresentou maior atividade em todas as linhas celulares testadas ($79,61 \mu\text{g/mL} < GI_{50} < 218,61 \mu\text{g/mL}$). Somente a fração metanólica solúvel em acetato de etilo (F.MeOHsol.AcOEt) revelou toxicidade nas células não-tumorais PLP2 ($GI_{50} = 325,58 \mu\text{g/mL}$), mas a uma concentração superior à que revelou atividade para linhas tumorais (**Tabela 15**).

Tabela 15. Atividade antitumoral de extratos/frações de folhas de *P. locuples* (média \pm SD)

Amostras	GI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)				
	HeLa	HepG2	MCF-7	NCI-H460	PLP2
Ext.Hex	223,52 \pm 19,08	357,09 \pm 5,53	273,70 \pm 5,80	331,09 \pm 20,65	>400
Ext.DCM	185,76 \pm 13,63	306,94 \pm 7,41	200,48 \pm 14,73	269,69 \pm 8,47	>400
Ext.MeOH	265,79 \pm 0,63	332,72 \pm 17,67	245,10 \pm 22,94	269,26 \pm 11,92	>400
Ext.H ₂ O	274,71 \pm 0,30	349,22 \pm 10,85	251,38 \pm 18,72	268,23 \pm 8,97	>400
F.MeOHsol.AcOEt	100,27 \pm 6,90	290,96 \pm 4,04	196,76 \pm 9,99	210,93 \pm 14,58	>325,58 \pm 12,36
F.MeOHsol.But	283,56 \pm 22,38	377,95 \pm 8,17	368,70 \pm 3,27	>400	>400
F.MeOHsol.H ₂ O	304,48 \pm 4,59	372,02 \pm 5,39	269,11 \pm 8,66	>400	>400
Ext.AcOEt	203,92 \pm 11,98	245,38 \pm 15,75	186,76 \pm 4,42	276,51 \pm 10,46	>400
Ext.AcOEt acetilado	80,64 \pm 5,69	129,13 \pm 3,36	79,61 \pm 0,14	218,61 \pm 19,46	>400
GeninasExt.AcOEt	170,56 \pm 3,84	275,94 \pm 17,42	219,71 \pm 11,35	256,05 \pm 10,41	>400
Controlo Positivo (Elipticina)	0,91 \pm 0,11	1,10 \pm 0,09	1,21 \pm 0,02	1,03 \pm 0,09	2,29 \pm 0,18

4.3.2.2. Compostos isolados

No geral, todos os compostos isolados da fração metanólica solúvel em acetato de etilo (F.MeOHsol.AcOEt) e do extrato de acetato de etilo acetilado (Ext.AcOEtacetilado) revelaram atividade inibitória do crescimento de todas as linhas celulares tumorais testadas, mas também revelaram toxicidade nas PLP2 (**Tabela 16**). Todos os compostos apresentaram bons resultados inibitórios do crescimento celular da linha de carcinoma cervical (HeLa, $9,68\mu\text{g/mL} < \text{GI}_{50} < 67,00\mu\text{g/mL}$) com a exceção do composto **8** que teve um $\text{GI}_{50} = 177,74\mu\text{g/mL}$. A mistura dos triterpenos **2, 3** e o triterpeno **9** foram os mais potentes contra todas as linhas celulares ($4,51\mu\text{g/mL} < \text{GI}_{50} < 32,50\mu\text{g/mL}$), e em contrapartida foram os mais tóxicos (para células não-tumorais, PLP2) de todos os compostos com $\text{GI}_{50} = 27,77$ e $13,02\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Entre os dissacáridos, o **15** apresentou bons resultados inibitórios do crescimento de todas as linhas celulares testadas ($9,68\mu\text{g/mL} < \text{GI}_{50} < 34,52\mu\text{g/mL}$, com a exceção da linha de carcinoma do pulmão (NCI-H460, $\text{GI}_{50} = 102,28\mu\text{g/mL}$). Para além da linha celular de carcinoma cervical (HeLa), os dissacáridos **12, 13 e 14**, também apresentaram bons resultados inibitórios do crescimento da linha celular de carcinoma hepatocelular (HepG2, $\text{GI}_{50} = 68,60; 9,95$ e $28,20\mu\text{g/mL}$, respectivamente); os mesmos compostos **12 e 13**, voltaram a apresentar bons resultados inibitórios do crescimento da linha celular de carcinoma de pulmão (NCI-H460, $\text{GI}_{50} = 81,30$ e $61,40\mu\text{g/mL}$, respectivamente). Os menos potentes contra todas as linhas celulares testadas foram os compostos **8 e 11** ($66,37\mu\text{g/mL} < \text{GI}_{50} < 324,4\mu\text{g/mL}$). O dissacárido **4** foi apenas menos potente contra as linhas celulares de carcinoma de mama e pulmão (MCF-7, $\text{GI}_{50} = 200,39\mu\text{g/mL}$ e NCI-H460, $\text{GI}_{50} = 244,09\mu\text{g/mL}$).

Tabela 16. Atividade antitumoral de compostos isolados (média±SD)

Amostras	GI ₅₀ (µg/mL)				
	HeLa	HepG2	MCF-7	NCI-H460	PLP2
2, 3*	11,33±1,22	22,92±0,11	23,04±0,04	10,58±1,49	27,77±2,05
4	67,00±5,71	85,24±7,23	200,39±4,34	244,09±9,58	233,79±17,99
4, 5**	63,84±3,49	167,23±4,49	97,42±7,19	199,69±8,29	237,06±8,65
6	42,21±1,05	119,35±6,97	99,60±3,15	233,43±12,34	267,65±2,52
6, 7**	24,43±0,78	287,60±2,37	94,56±5,81	82,62±1,65	214,00±10,20
8	177,74±11,33	196,26±15,61	219,30±20,30	228,16±11,89	200,67±0,81
9	31,50±3,04	15,12±1,26	32,50±0,31	4,51±0,49	13,02±0,53
10	44,03±1,14	120,01±10,85	147,55±11,97	52,24±3,25	>225
11	66,37±5,71	322,65±1,66	274,46±1,47	324,41±12,26	343,89±5,20
12	58,22±3,94	68,60±3,98	242,64±15,13	81,30±7,62	247,63±22,10
13	34,09±1,66	91,87±7,45	110,70±9,33	61,40±6,23	126,11±3,62
14	39,50±0,24	9,95±0,04	98,00±6,47	135,53±3,63	155,48±4,09
15	9,68±0,80	28,20±0,57	34,52±3,39	102,28±5,20	131,28±2,32
Controlo Positivo (Elipticina)	0,91±0,11	1,10±0,09	1,21±0,02	1,03±0,09	2,29±0,18

* Mistura

** Mistura de estereoisómeros

Os melhores resultados observados para a mistura dos triterpenos **2,3** e triterpeno **9** na inibição do crescimento de todas as linhas celulares testadas, podem estar relacionados com a presença do grupo OH na estrutura desses compostos. Os compostos **8** e **9** foram acetilados nos grupos OH do C-3, mas o composto **9** possui um grupo OH no C-11 que não sofreu acetilação. Estes resultados não são surpreendentes, já que existem vários estudos sobre propriedades antitumorais comprovadas de triterpenos pentacíclicos (Mazumder *et al.*, 2013).

Para os dissacáridos **4** e **11**, nota-se que a presença do mandelonitrilo no composto **4**, potencia a atividade antitumoral deste composto, com exceção na linha celular HeLa, onde o composto **11** apresenta melhor resultado. O mesmo se verifica para os dissacáridos **12** e **13**.

Entre a mistura dos dissacáridos **4,5** e o dissacárido **4**, observa-se que a mistura apresenta melhores resultados antitumorais, com a exceção da linha celular HepG2, em que

o composto **4** apresentou bom resultado. Estes dados podem estar relacionados com a presença do seu epímero (composto **5**) na mistura que pode estar a potenciar a atividade antitumoral do composto **4**. A mesma observação pode ser feita para a mistura dos dissacáridos **6** e **7**, em comparação com o dissacárido **7**.

Segundo os resultados do dissacárido **15**, pode afirmar-se que a não acetilação do C-3 da apiosa, torna os compostos mais potentes na inibição do crescimento celular das linhas celulares tumorais. O mesmo fenómeno se observa nos compostos **4** e **14**, onde o composto **14** foi mais potente em relação ao **4**. Este fenómeno não se observa entre os compostos **6** e **13**; o composto **6** não está acetilado no C-3 da apiosa, e entretanto apresenta maus resultados quando comparado com o **13** que está acetilado no C-3 da apiosa.

5. CONCLUSÕES

Foram preparados diferentes extratos e frações de folhas moídas de *Psyrax locuples* nomeadamente, extratos de hexano, diclorometano, acetato de etilo, metanol e água, e frações metanólicas solúveis em acetato de etilo, *n*-butanol e água.

Por extração ácido-base da fração metanólica solúvel em acetato de etilo foi obtida a fração neutra e, numa das suas frações acetiladas, foram isoladas uma mistura de dois triterpenos e duas misturas de dissacáridos cianogénicos com seus respetivos epímeros (artefactos).

No extrato de acetato de etilo acetilado foram isolados dois triterpenos acetilados que foram posteriormente esterificados com trimetilsilildiazometano produzindo, portanto, os seus respetivos ésteres. Para além dos triterpenos, foram também isolados nove dissacáridos dos quais cinco são cianogénicos.

Até então, o ácido 11 β -hidroxiursólico e os seus dois derivados eram compostos triterpénicos desconhecidos. Em relação aos dissacáridos, apenas dois compostos relacionados com os identificados, tinham sido descritos anteriormente.

Os extratos, frações e compostos isolados foram submetidos aos ensaios de bioatividade. Todos os extratos revelaram atividade antioxidante, no entanto, os extratos metanólico e aquoso apresentaram melhores atividades. O extrato de acetato de etilo acetilado apresentou melhor atividade antitumoral e não apresentou toxicidade nas PLP2 (células não-tumorais).

Os compostos isolados apresentaram bons resultados de atividade antitumoral, mas apresentaram também toxicidade para as PLP2. Os melhores resultados foram obtidos com os triterpenos pentacíclicos **2,3** (mistura) e **9**. Os dissacáridos **12**, **13**, **14** e **15** mostraram também serem possuidores de boa atividade em inibir algumas linhas celulares.

Os resultados dos ensaios de bioatividade dos extratos e de compostos isolados vêm realçar o potencial medicinal das folhas de *P. locuples* tão utilizadas na medicina tradicional em Moçambique. Para além dos triterpenos que possuem atividade antitumoral

comprovada, pode afirmar-se que os dissacáridos isolados podem ser potenciais candidatos para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento do cancro.

BIBLIOGRAFIA

- Abreu, R. M., Ferreira, I. C., Calhella, R. C., Lima, R. T., Vasconcelos, M. H., Adegá, F., et al. (2011). Anti-hepatocellular Carcinoma Activity Using Human HepG2 Cells and Hepatotoxicity of 6- Substituted Methyl 3-Aminothiemo [3,2-b]pyridine-2-carboxylate derivatives: In Vitro Evaluation, Cell Cyclo Analysis and QSAR Studies. *European Journal of Medicinal Chemistry* 46, 5800-5806.
- Akomo, E. F., Zongo, C., Karou, S. D., Obame, L. C., Savadogo, A., Atteke, C., et al. (2009). In vitro Antiplasmodial and Antibacterial Activities of *Canthium multiflorum* Schum and Thonn (Rubiacea) Extracts. *Pakistan Journal of Biological* 12, 919-923.
- Awah, F. M., Uzoegwu, P. N., Ifeonu, P., Oyugi, J. O., Rutherford, J., Yao, X., et al. (2012). Free Radical Scavenging Activity, Phenolic Contents and Cytotoxicity of Selected Nigerian Medicinal Plants. *Food Chemistry* 131, 1279-1286.
- Bero, J., Beaufay, C., Hanaert, V., Herent, M. -F., Michels, P. A., & Quetin-Leclercq, J. (2013). Antitrypanosomal Compounds from the Essential Oil and Extracts of *Keetia leucantha*. *Phytomedicine* 20, 270-274.
- Bero, J., Ganfon, H., Jonville, M.-C., Frederich, M., Gbaguidi, F., DeMol, P., et al. (2009). In Vitro Antiplasmodial Activity of Plantas Used in Benin in Tradicional Medicine to Treat Malaria. *Journal of Ethnopharmacology* 122, 439-444.
- Bero, J., Hannaert, V., Chataigne, G., Herent, M.-F., & Quetin-Leclercq, J. (2011). In Vitro Antitrypanosomal and Antileishmanial Activity of Plants Used in Benin in Tradicional Medicine and Bio-guided Fractionation of the Most Active Extract. *Journal of Ethnopharmacology* 137, 998-1002.
- Bhan, S., Kumar, R., Kalla, A. K., & Dhar, K. L. (1988). Triterpenoides from *Swetia Petiolata*. *Phytochemistry* 27, 539-542.

- Brimer, L., Christensen, B. S., Molgaard, P., & Narthey, F. (1983). Determination of Cyanogenic Compounds by Thin-Layer Chromatography.1. A Densitometric Method for Quantification of Cyanogenic Glycosides, Employing Enzyme Preparations (B-Glucuronidase) from *Helix pomatia* and Picrate Impregnated Ion-Exchange Sheets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 31, 789-793.
- Chase, M. W., & Reveal, J. L. (2009). A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG IIIboj_1002 1. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161, 122-127.
- Coelho, V. P., Agra, M. d., & Barbosa, M. R. (2006). Estudo Farmacobotânico das Folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K.Schum. (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16, 170-177.
- Coulibaly, M. T., Zieglera, H. L., Olsen, C. E., Hassanata, M. k., Pierre, G. I., Nacoulma, O. G., et al. (2009). 19a-Hydroxy-3-oxo-ursa-1,12-dien-28-oic acid, an Antiplasmodial. *Natural Product Research* 23, 1108-1111.
- Da Silva, M. C., Izidine, S., & Amude, A. B. (2004). *A preliminary checklist of the vascular plants of Mozambique*. Pretoria: Southern African Botanical Diversity Network Report No. 30. SABONET.
- David, & Nichols, S. J. (2002). *Gardening with Indigenous Shrubs* (1st ed.). (M. whiterkor, Ed.) Cape Town: Struik Publishers.
- De Araujo, F. C., Marques, F. G., da Silva, C. C., Santin, S. M., Nakamura, C. V., & Zamuner, M. L. (2009). Terpenos isolados de *Coussarea platyphylla* Müll. Arg. (Rubiaceae). *Quim. Nova* 32, 1760-1763.
- Del Fresno, A. M., Benito, P. B., & Accame, M. E. (1999). Farmacognosia, conceptos Generales. In A. M. del Fresno, & F. A. M Villar del (Ed.), *Farmacognosia General*.Madrid: Editorial Sinteses.
- GBIF. (2000). *JSTOR | Global Plants: Psydrax locuples*. (ITHAKA, Editor) Obtido em 06 de Janeiro de 2014, de plants.jstor.org/taxon/psydrax.locuples.

- GBIF. (s.d). *Psydrax locuples* - *Gwannon.com*. Obtido em 11 de January de 2014, de www.gwannon.com/species/Psydrax-locuples.
- Germishuizen, G., & Meyer, N. L. (Edits.). (2003). *Plants of southern Africa: an annotated checklist* (Vol. Strelitzia 14). Pretoria: National Botanical Institute,.
- Guimaraes, R., Barros, L., Duenas, M., Calhelha, R. C., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., et al. (2013). Infusion and Decoction of Wild German Chamimile: Bioactive and Characterization of Organic Acids and Phenolic Compounds. *Food. Chemistry* 136, 947-954.
- Gunasegaran, R., Subramani, K., Parimala, P. A., Nair, A. G., Rodriguez, B., & Madhusudanan, K. P. (2001). 7-O-(6-O-Benzoyl-D-glucopyranosyl) -Rutin from Leaves of *Canthium dicoccum*. *Fitoterapia* 72, 201-205.
- Hashimoto, N., Aoyawa, T., & Shioiri, T. (1981). New Methods and Reagents in Organic Synthesis. A Simple Efficient Preparation of Methyl Esters with Trimethylsilyldiazomethane and its Application to Gas Chromatographic Analysis of Fatty Acids . *Chemical Pharmaceutical Buletin* 29, 1475-8.
- He, X., Liu, D., & Liu, R. H. (2008). Sodium Borohydride/Chloranil-Based Assay for Quantifying Total Flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 9337–9344.
- Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., & Williamson, E. M. (2004). *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*. (C. Livingstone, Ed.) Toronto: Elsevier.
- Herath, W. H., Sultanbawa, M. U., Wannigama, G. P., & Cave, A. (1979). Alkaloidal and Other Constituents of *Uncaria elliptica* and *Canthium Dicoccum*. *Phytochemistry* 18, 1385-1387.
- Hostettmann, K., Gupta, M. P., Marston, A., & Queiroz, E. F. (2008). *Handbook of Strategies for the Isolation of Bioactive Natural Products* (1st Edition ed.). Bogota: SECAB and CYTED.

- Hyde, M., Wursten, B., Ballings, P., Dondeyne, S., & Palgrave, M. C. (2007). *Flora of Mozambique: Genus page: Psydrax*. Obtido em 05 de janeiro de 2014, de http://www.mozambiqueflora.com/speciesdata/genus.php?genus_id=1401.
- Ilboudo, D. P., Basilico, N., Parapini, S., & Corbett, Y. (2013). Antiplasmodial and Anti-inflammatory activities of *Canthium Henriquesianum* (K. Schum), a Plant Used in Traditional Medicine in Burkina Faso. *Journal of Ethnopharmacology* 148, 763-769.
- Jose, B., Jirovetz, L., & Shafi, P. M. (2008). Phytochemical Studies on the Thorns and Leaves of *Canthium parviflorum* Lam. *Asian Journal of Chemistry* 20, 5372-5376.
- Kanchanapoom, T., Kasai, R., & Yamasaki, K. (2002). Iridoides and Phenolic Glycosides from *Canthium berberidifolium*. *Phytochemistry* 61, 461-464.
- Kone, W. M., Atindehou, K. K., Terreux, C., Hostettmann, K., Traore, D., & Dosso, M. (2004). Traditional Medicine in North Cote-d' Ivoire: Screening of 50 Medicinal Plantas for Antibacterial Activity. *Journal of Ethnopharmacology* 93, 43-49.
- Kouam, S. F., Ngouonpe, A. W., Bullach, A., Lamshöft, M., Kuigoua, G. M., & Spiteller, M. (2013). Monoterpenes with antibacterial activities from a Cameroonian medicinal plant *Canthium multiflorum* (Rubiaceae). *Fitoterapia* 91, 199-204.
- Lagnika, L., Anago, E., & Sanni, A. (2011). Screening for Antibacterial, Antioxidant Activity and Toxicity of Some Medicinal Plants in Benin Folkloric Medicine. *Journal of Medicinal Plants Reseach* 5, 773-777.
- Lima, F. V., Malheiros, A., Otuki, M. F., Calixto, J. B., Yunes, R. A., Filho, V. C., et al. (2005). Three New Triterpenes from the Resinous Bark of *Protium kleinii* and their Antinociceptive Activity. *Journal of Brazilian Chemical Society* 16, 578-582.
- Lobo, A. M., & Lourenco, A. M. (2007). Metodos de Estudo Biossintético. In A. M. Lobo, & I. Press (Ed.), *Biossíntese de Produtos Naturais*. Lisboa.
- Mathias, L., Vieira, I. J., Braz-Filho, R., & Rodrigues-Filho, E. (1998). A New Isoflavone Glycoside from *Dalbergia nigra*. *Journal of Natural Products* 61, 1158-1161.

- Mazumder, K., Tanaka, K., & Fukase, K. (2013). Cytotoxic Activity of Ursolic Acid Derivatives Obtained by Isolation and Oxidative Derivatization. *Molecules* 18, 8929-8944.
- Musila, M. F., Dossaji, S. F., Nguta, J. M., Lukhoba, C. W., & Munyao, J. M. (2013). In vivo Antimalarial Activity, toxicity and Phytochemical Screening of Selected Antimalarial plants. *Journal of Ethnopharmacology* 146, 557-561.
- Nakamura, S., Wanga, Z., Xu, F., Matsuda, H., Wub, L., & Yoshikawa, M. (2009). The Absolute Stereostructures of Cyanogenic Glycosides, Hydracyanosides A, B, and C, from the leaves and stems of *Hydrangea macrophylla*. *Tetrahedron Letters* 50, 4639–4642.
- Pasumarthi, S., Chimata, M. K., Chetty, C. S., & Challa, S. (2011). Screening of Phytochemical Compounds in Selected Medicinal plants of *Deccan Plateau* and their Viability Effects on Caco-2 Cells. *Journal of Medicinal Plants Reseach* 5, 6955-6962.
- Pone, J. W., Mbida, M., & Bilong, C. F. (2009). In Vivo Evaluation of Potential nematicidal Properties of Ethanol Extract of *Canthium manni* (Rubiaceae) on *Heligmossomoides polygyrus* Parasite of Rodentes. *Veterinary Parasitology* 166, 103-107.
- Psydrax locuples* (K.Schum.) Bridson — *The Plant List*. (2010). Obtido em 29 de November de 2013, de www.theplantlist.org/tpl/record/kew-170255.
- Rockenbach, J., Nahrstedt, A., & Wray, V. (1992). Cyanogenic Glycosides from *Psydrax* and *Oxyanthus* Species. *Phytochemistry* 31, 567-570.
- Rodrigues, A. G., & Amaral, A. C. (2012). Plantas Medicinais e Fitoterapia na Saúde da Família. In *Práticas Integrativas e Complementares* (1ª edição ed., pp. 13-21). Brasília: Ministerio de Saude.
- Schwarz, B., Wray, V., & Proksch, P. (1996). A Cyanogenic Glycoside from *Canthium schimperianum*. *Phytochemistry* 3, 633-636.

- Senkoro, A., Barbosa, F., DA Silva, A. F., Manjate, A., Samuel, V. M., Maquias, I., et al. (2012). Estudo e Conservação de Plantas Medicinais em Moçambique. *Atas do Congresso Internacional Saber Tropical em Moçambique: História, Memória e Ciência* (pp. 1-5). Lisboa: Instituto de Investigação Científica Tropical.
- Taketa, A. T., Breitmaier, E., & Schenkel, E. P. (2004). Triterpenes and Triterpenoidal Glycosides from the Fruits of *Ilex paraguariensis* (Mate). *Journal of Brazilian Chemical Society* 2, 205-211.
- Traoré, M., Jaroszewski, J. W., Olsen, C. E., Ouédraogo, J. B., Pierre, G. I., Nacoulma, O. G., et al. (2008). A New Oxygenated Ursane Derivative from *Canthium multiflorum*. *Planta Medica* 74, 560–562.
- Turner, Q. (2002). Medicinal Plants of Maputaland. In N. o. Network, & S. S. MÖSSMER (Ed.), *Computerisation of Southern African Herbaria* (Vol. 7, pp. 114-115). Pretoria: Sabonet News.
- Yang, B., Chen, G., Chen, Z., Song, X., & Wang, J. (2010). Chemical Constituents and Antimicrobial Activities of *Canthium horridum*. *Natural Product Communications* 5, 913-4.
- Yang, C.-J., Wang, Z.-B., Zhu, D.-L., Yu, Y., Lei, Y.-T., & Liu, Y. (2012). Two New Cyanogenic Glucosides from the Leaves of *Hydrangea macrophylla*. *Molecules* 17, 5396-5403.
- Zhong, X.-N., Otsuka, H., Ide, T., Hirata, E., & Takeda, Y. (1999). Hydroquinone Diglycoside Acyl Esters from Leaves of *Myrsine seguinii*. *Phytochemistry* 52, 923-927.