



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências

**Avaliação Química de Uma Planta Medicinal
Angolana**

Claudia Andrade Vieira Gonçalves

**Tese para a obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica
(2º ciclo de estudos)**

**Orientadora: Prof^a. Doutora Dina Mendonça
Co-orientador: Prof. Doutor António Mendonça**

Covilhã, outubro de 2016

Agradecimentos

Aos meus pais por todo o sacrifício que fizeram ao longo de todo o meu percurso académico, sem eles nada disso seria possível.

À minha Orientadora Prof. Doutora Dina Mendonça pela sua incansável ajuda ao longo de todo esse trabalho, pela paciência, disponibilidade e principalmente por me ter aceite como sua orientanda.

Ao Prof. Doutor António Mendonça, meu co-orientador, pela disponibilidade e ajuda prestada.

Agradeço também a Prof. Doutora Luiza Granadeiro por compartilhar a sua experiência, pela paciência e pela bondade de ter aceite que parte do trabalho seja feita sob a sua orientação.

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a concretização desse trabalho, em especial ao João Marques, Mariana Marques e Inês Martins, meus colegas de laboratório, pela ajuda e particularmente pela paciência.

À minha família, namorado e amigos que sempre se fizeram presentes e me prestaram um apoio incondicional ao longo de todo esse processo.

Resumo

Neste trabalho foi estudada a *Paropsia brazzeana* Bail, uma planta medicinal angolana recolhida na Huila.

O material vegetal foi macerado e extraído a frio com metanol. De seguida procedeu-se ao processo de fracionamento do extrato bruto em fração de hexano/acetato de etilo 95:5, hexano/acetato de etilo 8:2, hexano/acetato de etilo 1:1, acetato de etilo, acetato de etilo/metanol 9:1, acetato de etilo/metanol 7:3, acetato de etilo/metanol 1:1, metanol e metanol/ácido clorídrico. Das frações obtidas com as misturas de vários solventes com polaridades crescentes, foram isolados quatro compostos.

O geraniol foi isolado a partir da fração hexano/acetato de etilo 95:5, o β -sitosterol e o ácido octanóico foram isolados a partir da fração hexano/acetato de etilo 1:1 e o ácido 14-nor-7,8-seco-10-oxocadinano-1(6),3-dienóico, que isolado a partir da fração acetato etilo, foi isolado pela primeira vez no género *Paropsia* e foi considerado um novo produto natural. Nas restantes frações não foi isolado nenhum composto.

As frações hexano/acetato de etilo 95:5, hexano/acetato de etilo 8:2, hexano/acetato de etilo 1:1 e acetato de etilo foram utilizadas para testes de citotoxicidade nas células MCF-7 e NHDF.

Para efetuar os ensaios de citotoxicidade fez-se o ensaio para determinar a viabilidade celular (MTT) e o ensaio de doseamento de proteínas (BCA).

Os resultados dos ensaios de viabilidade celular e de doseamento de proteínas feitos nas MCF-7 mostraram que todas as frações testadas aparentemente são tóxicas para essas células.

Os resultados dos ensaios feitos nas NHDF são semelhantes aos resultados obtidos nas MCF-7, tanto os ensaios da viabilidade celular como os resultados do doseamento de proteínas apontaram para uma possível toxicidade das frações para com as células.

Palavras-chave: Plantas medicinais, *Paropsia brazzeana* Bail, Passifloraceae, Cancro de mama, MCF-7, NHDF

Abstract

This master thesis reports the study of *Paropsia brazzeana* Bail, an Angolan medicinal plant collected in Huila.

The plant material was macerated and extracted with cold methanol giving the crude extract. Then proceeded to the crude extract fractionation process obtaining the following fractions: hexane/ethyl acetate 95:5, 8:2, 1:1 hexane/ethyl acetate fraction; ethyl acetate fraction; ethyl acetate/methanol fraction 9:1, 7:3; 1:1, 7:3 ethyl acetate/methanol fraction; ethyl acetate/methanol 1:1; methanol and methanol/hydrochloric acid. Different fractions eluted with various mixtures of solvents with increasing polarity afforded four compounds.

Geraniol was isolated from the fraction of hexane/ethyl acetate 95:5. β -sitosterol and octanoic acid were isolated from the fraction hexane/ethyl acetate 1:1. 14-Nor-7,8-seco-1(6), oxocadinanedienoic acid was first isolated in *Paropsia* genus and was considered a new natural product, this compound was isolated from the ethyl acetate fraction. In the remaining fractions wasn't isolated any compound.

The fractions hexane/ethyl acetate 95:5, hexane/ethyl acetate 8:2, hexane/ethyl acetate 1:1 and ethyl acetate were used in cytotoxicity assays in MCF-7 and NHDF cells.

To perform the cytotoxicity assays the assay was made the cell viability test (MTT) and the protein assay (BCA).

The results of cell viability assays and protein determination made in MCF-7 showed that all extracts tested are apparently toxic to these cells.

The results of the tests made in NHDF are similar to the results obtained in MCF-7, both the tests of cell viability such as protein assay results pointed to a possible toxicity of the extract towards the cells.

Keywords: Medicinal plants, *Paropsia brazzeana* Bail, Passifloraceae, breast cancer, MCF-7, NHDF

Índice

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Agradecimentos | iii |
| Resumo | v |
| Abstract | vii |
| Capítulo 1 - Introdução | 1 |
| 1.1. Plantas medicinais | 1 |
| 1.2. A família Passifloraceae | 2 |
| 1.2.1. <i>Passiflora</i> , o género mais abrangente da família | 3 |
| 1.2.2. Exemplos de estruturas dos compostos isolados em algumas espécies do género <i>Passiflora</i> | 8 |
| 1.2.3. Exemplos de estruturas dos compostos isolados no género <i>Turnera</i> | 13 |
| 1.2.4. <i>Paropsia brazzeana</i> Bail | 15 |
| 1.3. Cancro da mama | 16 |
| 1.4. Linha celular | 17 |
| 1.4.1. Linha celular hormônio-dependente | 18 |
| 1.5. Fibroblastos | 18 |
| 1.6. Objetivos | 20 |
| 1.6.1. Objetivos gerais | 20 |
| 1.6.2. Objetivos específicos | 20 |
| Capítulo 2 - Materiais e métodos | 21 |
| 2.1. Materiais e métodos da avaliação química | 21 |
| 2.1.1. Material Vegetal | 21 |
| 2.1.2. Preparação do extrato bruto | 21 |
| 2.1.3. Materiais e reagentes | 22 |
| 2.1.3.1. Técnicas cromatográficas | 22 |
| 2.1.3.2. Revelador utilizado | 22 |
| 2.1.3.3. Técnicas espectrométricas | 22 |
| 2.1.3.4. Fracionamento das diversas frações | 23 |
| 2.1.3.5. Caracterização espectroscópica dos compostos | 40 |

| | | |
|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.2. | Materiais e métodos da determinação citotóxica | 42 |
| 2.2.1. | Frações estudadas nas linhas celulares..... | 42 |
| 2.2.2. | Diluição das frações para os estudos de citotoxicidade | 42 |
| 2.2.3. | Cultura celulares | 42 |
| 2.2.4. | NHDF..... | 42 |
| 2.2.5. | MCF-7..... | 43 |
| 2.2.6. | Tripsinização | 43 |
| 2.2.7. | Contagem das células | 43 |
| 2.2.8. | Procedimentos seguidos para a execução dos ensaios..... | 43 |
| 2.2.9. | Ensaio da viabilidade celular - MTT | 44 |
| 2.2.10. | Ensaio da proliferação celular - BCA | 44 |
| Capítulo 3 - Resultados e discussões | | 45 |
| 3.1. | Resultados e discussão da avaliação química..... | 45 |
| 3.1.1. | Geraniol (N1)..... | 45 |
| 3.1.2. | β -sitosterol (N2) | 46 |
| 3.1.3. | Ácido octanóico (N3)..... | 48 |
| 3.1.4. | Ácido 14-nor-7,8-seco-10-oxocadinano-1(6),3-dienóico (N4)... | 49 |
| 3.2. | Resultados e discussão da determinação citotóxica | 50 |
| 3.2.1. | Curva de crescimento celular com o ensaio BCA | 51 |
| 3.2.2. | Resultados dos ensaios da fração Hex/AcOEt 95:5 nas MCF-7.. | 52 |
| 3.2.3. | Resultados dos ensaios da fração Hex/AcOEt 8:2 nas MCF-7 ... | 53 |
| 3.2.4. | Resultados dos ensaios da fração Hex/AcOEt 1:1 nas MCF-7 ... | 54 |
| 3.2.5. | Resultados dos ensaios da fração AcOEt nas MCF-7 | 55 |
| 3.2.6. | Resultados dos ensaios de MTT nas NHDF | 56 |
| Capítulo 4 - Conclusões e perspectivas futuras | | 58 |
| Bibliografia | | 59 |
| Anexo | | 65 |

Lista de figuras

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: Mapa dos países onde encontram-se distribuídas a <i>Passiflora</i> | 3 |
| Figura 2: Exemplos de Espécies da <i>Passiflora</i> | 4 |
| Figura 3: Histograma mostrando as percentagens dos subgéneros da <i>Passiflora</i> | 5 |
| Figura 4: Estrutura de uma isotientina glicerada identificada na <i>P. edulis</i> | 8 |
| Figura 5: Estruturas de derivados de estilbeno isolados de uma <i>P. edulis</i> | 8 |
| Figura 6: Triterpenos cicloartanos isolados na <i>P. edulis</i> | 9 |
| Figura 7: Passifloricinas isoladas da <i>P. foetida</i> | 9 |
| Figura 8: Estrutura dos flavonoides isolados na <i>P. Bogotensis</i> | 10 |
| Figura 9: Monoterpenos isolados da <i>P. quadrangularis</i> L | 11 |
| Figura 10: Proposta de estrutura de luteolina isolada da <i>P. tripartita</i> | 12 |
| Figura 11: Proposta de estrutura da apigenina isolada da <i>P. tripartita</i> | 13 |
| Figura 12: Componentes isolados da <i>T. subulata</i> | 14 |
| Figura 13: Esquema de obtenção do extrato bruto | 21 |
| Figura 14: Hexagrama das frações utilizados no ensaio. | 42 |
| Figura 15: Estrutura do geraniol..... | 45 |
| Figura 16: Estrutura do β -sitosterol. | 47 |
| Figura 17: Estrutura do ácido octanóico | 48 |
| Figura 18: Estrutura do ácido 14-nor-7,8-seco-10-oxocadinano-1(6),3-dienóico. | 50 |
| Figura 19: Gráfico de crescimento das células MCF-7 de 48h para 96h | 51 |
| Figura 20: Viabilidade celular e Doseamento de Proteínas das células MCF-7 incubadas com a fração Hex/AcOEt 95:5 | 52 |
| Figura 21: Viabilidade celular e Doseamento de Proteínas das células MCF-7 incubadas com a fração Hex/AcOEt 8:2 | 53 |
| Figura 22: Viabilidade celular e Doseamento de Proteínas das células MCF-7 incubadas com a fração Hex/AcOEt 1:1 | 54 |
| Figura 23: Viabilidade celular e Doseamento de Proteínas das células MCF-7 incubadas com a fração AcOEt..... | 55 |
| Figura 24: Viabilidade celular das células NHDF | 56 |
| Figura 25: Viabilidade celular das células NHDF e MCF-7 | 56 |

Lista de tabelas

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1: Compostos identificados no género <i>Passiflora</i> | 6 |
| Tabela 2 Cont.: Compostos identificados no género <i>Passiflora</i> | 7 |
| Tabela 3: Identificação de compostos fenólicos nas frutas da <i>P. tripartita</i> | 11 |
| Tabela 4. Cont.) Identificação de compostos fenólicos nas frutas da <i>P. tripartita</i> | 12 |
| Tabela 5: Cromatografia 1 da <i>P. brazzeana</i> | 23 |
| Tabela 6: Cromatografia 2 da <i>P. brazzeana</i> | 24 |
| Tabela 7: Cromatografia 3 da <i>P. brazzeana</i> | 25 |
| Tabela 8: Cromatografia 4 da <i>P. brazzeana</i> | 25 |
| Tabela 9: Cromatografia 5 da <i>P. brazzeana</i> | 26 |
| Tabela 10: Cromatografia 6 da <i>P. brazzeana</i> | 26 |
| Tabela 11: Cromatografia 7 da <i>P. brazzeana</i> | 27 |
| Tabela 12: Cromatografia 8 da <i>P. brazzeana</i> | 27 |
| Tabela 13: Cromatografia 9 da <i>P. brazzeana</i> | 28 |
| Tabela 14: Cromatografia 10 da <i>P. brazzeana</i> | 29 |
| Tabela 15: Cromatografia 11 da <i>P. brazzeana</i> | 29 |
| Tabela 16: Cromatografia 12 da <i>P. brazzeana</i> | 30 |
| Tabela 17: Cromatografia 13 da <i>P. brazzeana</i> | 30 |
| Tabela 18: Cromatografia 14 da <i>P. brazzeana</i> | 31 |
| Tabela 19: Cromatografia 15 da <i>P. brazzeana</i> | 32 |
| Tabela 20: Cromatografia 16 da <i>P. brazzeana</i> | 32 |
| Tabela 21: Cromatografia 17 da <i>P. brazzeana</i> | 33 |
| Tabela 22: Cromatografia 18 da <i>P. brazzeana</i> | 34 |
| Tabela 23: Cromatografia 19 da <i>P. brazzeana</i> | 34 |
| Tabela 24: Cromatografia 20 da <i>P. brazzeana</i> | 35 |
| Tabela 25: Cromatografia 21 da <i>P. brazzeana</i> | 36 |
| Tabela 26: Cromatografia 22 da <i>P. brazzeana</i> | 37 |
| Tabela 27: Cromatografia 23 da <i>P. brazzeana</i> | 38 |
| Tabela 28: Cromatografia 24 da <i>P. brazzeana</i> | 38 |
| Tabela 29: Cromatografia 25 da <i>P. brazzeana</i> | 39 |
| Tabela 30: Dados de RMN ^1H , ^{13}C e correlações de HMBC do composto N1. | 46 |
| Tabela 31: RMN de ^{13}C do composto N2. | 47 |
| Tabela 32: RMN de ^1H e ^{13}C do composto N3. | 48 |
| Tabela 33: Dados de RMN ^1H , ^{13}C e correlações de HMBC do composto N4. | 49 |

Lista de acrónimos

| | |
|-------------------|-------------------------------------------------------------|
| AcOEt | Acetato de etilo |
| AEM | Autoexame de mamas |
| BCA | Bicinchoninic Acid |
| °C | Grau celsius |
| c.c.f. | Cromatografia em camada fina |
| CDCL ₃ | Clorofórmio deuterado |
| c.d.o | Comprimento de onda |
| CHCL ₃ | Clorofórmio |
| CO ₂ | Dióxido de carbono |
| COSY | Correlation Spectroscopy |
| DEPT | Distortionless Enhancement by Polarization Transfer |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| E ₂ | Estrogénio |
| ECM | Exame clínico de mamas |
| ER | Estrogen receptor |
| ER+ | Estrogen receptor positive |
| EUA | Estados Unidos da América |
| FBS | Soro fetal bovino |
| G | Gramma |
| HCl | Ácido clorídrico |
| Hex | Hexano |
| HMBC | Heteronuclear Multiple Bond Correlation |
| HSQC | Heteronuclear Single Quantum Correlation |
| Hz | Hertz |
| <i>J</i> | Constante de acoplamento |
| MCF-7 | Human breast adenocarcinoma cell line |
| MeOH | Metanol |
| mL | Mililitros |
| mm | Milímetros |
| MTT | Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| NHDF | Normal Human Dermal Fibroblasts |
| nm | Nanómetro |
| O ₂ | Oxigénio |

| | |
|------------------------|---------------------------------------------|
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| ONU | Organização das Nações Unidas |
| PBS | Tampão fosfato salino |
| pH | Potência de hidrogénio |
| ppm | Partes por milhão |
| RMN de ¹³ C | Ressonância magnética nuclear de carbono 13 |
| RMN de ¹ H | Ressonância magnética nuclear de protão |
| TNM | Classification of Malignant Tumours |
| Tol | Tolueno |
| U.V | Radiação ultravioleta |
| α | Alfa |
| β | Beta |
| δ | Desvio químico |
| % | Porcentagem |

Capítulo 1 - Introdução

1.1. Plantas medicinais

As plantas têm sido utilizadas na medicina tradicional desde a antiguidade. Segundo o registro fóssil, presume-se que o uso de plantas medicinais começou no Paleolítico médio a cerca de 60 000 anos atrás. (Lam, Ling et al. 2016)

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 80% da população mundial depende da medicina tradicional para os seus cuidados de saúde primários. O continente africano tem uma longa história de uso de plantas e em alguns países africanos, até 90% da população dependem de plantas medicinais. (Simbo 2010)

Uma planta medicinal é qualquer planta, que por um ou mais dos seus órgãos contém substâncias ativas que podem ser utilizadas para fins terapêuticos ou que contêm compostos que podem ser utilizados na síntese de fármacos. Estima-se que 25% dos medicamentos prescritos e 11% dos medicamentos considerados essenciais pela OMS são derivados de plantas. (Simbo 2010)

Apesar do aumento significativo no progresso feito na investigação de droga sintética, as plantas e os seus produtos ainda são considerados as principais fontes de medicamentos. Mais de 50% dos fármacos advêm de produtos naturais, por isso os medicamentos tradicionais desempenham um papel vital nas industriais farmacêuticas. De acordo com um relatório apresentado pela ONU, o mercado mundial de medicamentos à base de plantas baseadas em conhecimento tradicional ronda os 60.000 milhões de dólares por ano. (Adnan, Tariq et al. 2015, Swamy and Sinniah 2015, Teschke and Eickhoff 2015)

Infelizmente, segundo um relatório recente, quase um terço das espécies de plantas medicinais podem se tornar extintas por excesso de uso, com perdas significativas relatadas na China, Índia, Quênia, Nepal, Tanzânia e Uganda. (Kumar, Sheikh et al. 2011)

Paralelamente, o conhecimento tradicional medicinal e as práticas associadas à mesma, também estão sujeitos a desaparecer, visto terem sido armazenados especialmente nas memórias de pessoas idosas e transmitida de boca em boca ao longo das gerações. (Tsobou, Mapongmetsem et al. 2016)

As plantas medicinais parecem ter compostos bioativos com capacidade de eliminar os radicais livres. Elas possuem na sua composição grandes quantidades de antioxidantes tais como compostos fenólicos, nitrogénio, vitaminas, terpenos e outros metabolitos endógenos. (Ozkan, Kamiloglu et al. 2016). A vasta procura das plantas medicinais para fins terapêuticos deve-se principalmente ao alto custo dos medicamentos disponibilizados e a facilidade de acesso as plantas. (Bacha, Tariq et al. 2016)

O maior número de espécies vegetais encontra-se na região equatorial da América do Sul, da África e da Ásia. Na América do Sul, concentra-se a maior diversidade de plantas, 40000

espécies vegetais, sendo considerado um local de alta biodiversidade. (Simões, Schenkel et al. 2007)

1.2. A família Passifloraceae

A família Passifloraceae Juss. Ex DC. compreende cerca de 18 géneros com mais de 525 espécies distribuídas pelas regiões tropicais e subtropicais, sendo a *Passiflora* o género mais abrangente da família com cerca de 500 espécies. (Sousa, Souza et al. 2015). A Passifloraceae pertence à ordem Malpighiales, uma das maiores ordens de plantas com flor, e é composta essencialmente por herbáceas ou trepadeiras, arbustos e árvores. As folhas de várias espécies desta família são utilizadas na medicina tradicional ou em fitoterapia como anti-inflamatório, substâncias ansiolíticas e substâncias sedativas. (Judd, Campbell et al. 2007, Simirgiotis, Schmeda-Hirschmann et al. 2013)

As estimativas do número de espécies na família variam entre 520 e 700, tais variações são o resultado das incertezas taxonómicas, o uso de sinónimos e descrições de novas espécies. Também não há consistência no número de géneros, que varia entre 18 e 23. (Muschner et al., 2015; Cerqueira-Silva et al, 2014).

A característica morfológica mais relevante da família, que sustenta a monofilia do grupo, são pétalas com filamentos em círculos formando uma coroa, esta característica é mais desenvolvida nas espécies polinizadas por insetos. Também é característico desta família as sépalas petaloides e androceu, e gineceu dispostas num pedúnculo formando um androginóforo. (Judd, Campbell et al. 2007, Mondin, Cervi et al. 2011)

Segundo Escobar (1988), a família Passifloraceae está dividida em duas tribos, Paropsieae e Passiflorieae. A tribo Paropsieae compreende 6 géneros: *Androsiphonia*, *Viridivia*, *Smeathmannia*, *Barteria*, *Paropsiopsis* e *Paropsia*. Já a tribo Passiflorieae compreende 14 géneros: *Tetrastylis*, *Ancistrotryrsus*, *Mitostemma*, *Dilkea*, *Passiflora*, *Crossotemma*, *Schlechterina*, *Tetrapathea*, *Hollrungia*, *Efulensia*, *Deidamia*, *Thyphostemma*, *Basananthe* e *Ademia*. (Cervi 1997)

As obras mais relevantes sobre a Passifloraceae datam desde o século XVIII, quando Linnaeus (1753), no *Species Plantarum*, reconhece 24 espécies para o género *Passiflora*. Posteriormente, Masters (1871, 1872) publica duas obras consecutivas ressaltando os aspetos históricos e a morfologia detalhada da família. Candolle em 1891 reconheceu 126 espécies para o género *Passiflora*. Outras importantes contribuições para a taxonomia da família Passifloraceae foram oferecidas por Killip em 1938, considerada uma das obras mais completas dentre as já publicadas sobre a família, seguida por Escobar (1988) e Cervi (1997), todas de suma importância para o entendimento sobre a taxonomia da família. (Costa, Nunes et al. 2015)

1.2.1. *Passiflora*, o género mais abrangente da família

O género *Passiflora* popularmente conhecido por maracujá é altamente diversificada. Cerca de 96% das suas espécies estão distribuídas pela América, embora haja registros de algumas espécies na Índia, China, Sudeste Asiático, Austrália e nas ilhas do Pacífico. A diversidade do género na América do Sul em termos de espécies explica a razão desta região ser o principal produtor de maracujá. (Tapp, Cummins et al. 2008, Simirgiotis, Schmeda-Hirschmann et al. 2013, Cerqueira-Silva, Jesus et al. 2014)

A Colômbia é um dos principais centros de diversidade do género *Passiflora*, acomoda mais de 100 espécies e é rica em quase todas as secções do género. O Brasil também é outro país rico nas espécies *Passiflora*, aproximadamente 30% das espécies são encontrados nesses países (cerca de 150 no Brasil e 170 na Colômbia). No entanto algumas espécies viram-se ameaçadas por atividades antropológicas que têm diminuído os seus habitats naturais. (Ramaiya, Bujang et al. 2014)

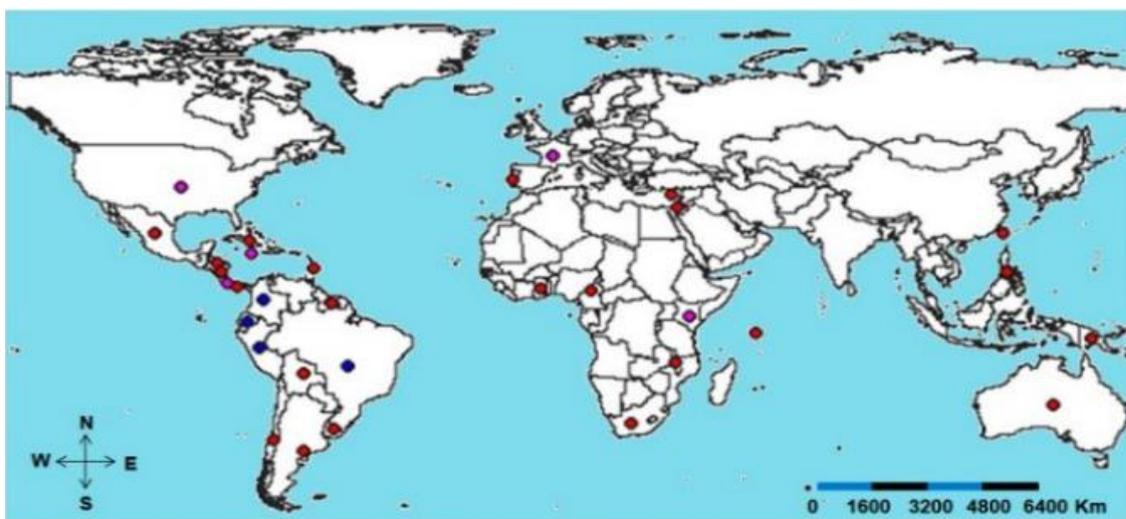


Figura 1: Mapa dos países onde encontram-se distribuídas a *Passiflora*. Os países com mais espécies são identificados com os círculos azuis. (Cerqueira-Silva, Jesus et al. 2014)

As espécies desse género têm uma importância fulcral na economia devido a utilização dos seus frutos na alimentação, a sua adaptabilidade ao cultivo como planta ornamental e ainda devido as suas propriedades medicinais. (Echeverri, Arango et al. 2001). Os frutos comestíveis mais conhecidos do género são a *Passiflora edulis Sims* e a *Passiflora edulis F. flavicarpa*, popularmente conhecidos por maracujás roxos e maracujás amarelos respetivamente. (Simirgiotis, Schmeda-Hirschmann et al. 2013)

As folhas, os caules, as raízes e os frutos das espécies da *Passiflora* têm sido muito utilizados na medicina popular e têm conquistado cada vez mais um lugar importante na medicina moderna. Para além de possuírem capacidade ansiolítica e sedativo, também demonstraram ter efeitos terapêuticos no tratamento da diabetes e da hipertensão. (Ramaiya,

Bujang et al. 2014, Silva, Souza et al. 2014). Ainda demonstraram ter capacidades anti-inflamatório, citotóxica, antioxidante, antibacteriana, e propriedades antifúngicas. As suas flores também demonstraram possuir capacidades sedativa e ansiolítica, para além da capacidade antiespasmódica e de apresentar atividade hipotensora e efeitos de indução do sono. (Ramaiya, Bujang et al. 2014, Silva, Souza et al. 2014)

As espécies selvagens da *Passiflora* apresentam resistência as pragas e a doenças, autocompatibilidade, melhor adaptação às condições adversas do tempo, período de floração prolongado, androginóforo mais curto e maior concentração de componentes químicos de interesse económico. Na sua maioria as espécies selvagens disponíveis são a *Passiflora edulis*, a *Passiflora leschenaultia*, a *Passiflora mollissima* e a *Passiflora subpeltata*. Fundamentalmente são usados para tratar de doenças como a diarreia, doenças do trato intestinal, doenças da garganta, infeções nos ouvidos, febres e doenças da pele. (Sasikala, Saravanan et al. 2011, Cerqueira-Silva, Santos et al. 2012)

O uso da *Passiflora* como planta ornamental é justificado pela diversidade e pela beleza das suas folhas, flores e frutos. A *Passiflora caerulea*, a *Passiflora incarnata*, e vários híbridos interespecíficos cultivados principalmente na Europa e nos EUA destacam-se no mercado ornamental. (Cerqueira-Silva, Jesus et al. 2014, Silva, Souza et al. 2014)

O potencial das plantas ornamentais é determinado por variáveis como o tamanho, a cor e a beleza, isso é válido tanto para as peças florais como para as partes vegetativas. (Silva, Souza et al. 2014)

Diversas são as espécies do género *Passiflora* que apresentam flores com formas exóticas, cores fortes ou suaves e folhagens exuberantes. (Judd, Campbell et al. 2007)



Figura 2: Exemplos de Espécies da *Passiflora*: (a) *P. edulis*; (b) *P. atata*; (c) *P. cincinnata*; (d) *P. coccinea*; (e) *P. quadrangularis*. (Montero, Marques et al. 2016)

As espécies do género *Passiflora* têm uma ampla gama de características morfológicas, diferenças anatómicas e variabilidade filogenética. Contudo, essas características dificultam a classificação das espécies do género pois algumas espécies variam muito em termos de morfologia, enquanto outras espécies são bastantes semelhantes entre si. (Ramaiya, Bujang et al. 2014)

As classificações taxonómicas da *Passiflora* são normalmente baseadas em variações morfológicas, ecológicas e agronómicas. Por exemplo, a *Passiflora edulis* é geralmente caracterizado de acordo com a sua produção, o peso e o tamanho do seu fruto, e a suculência e a acidez do suco do seu fruto. No entanto, estas variáveis não representam caracteres quantitativos precisos ao nível taxonómico. Todavia, apesar dessas dificuldades, a taxonomia do género foi baseada durante muito tempo na proposta de Killip (1938). (Echeverri, Arango et al. 2001, Cerqueira-Silva, Jesus et al. 2014)

Atualmente, o género está subdividido em quatro subgéneros: *Astrophea* (DC.) Mast., *Decaloba* (DC.) Rchb., *Passiflora* L. e *Deidamioides* Harms. Dentro do género *Passiflora*, *Decaloba* é o segundo maior subgénero, incluindo aproximadamente 235 espécies de trepadeiras com porte pequeno, folhas variegadas ou bilobadas e flores pequenas. (Farias, Maranhão et al. 2016)

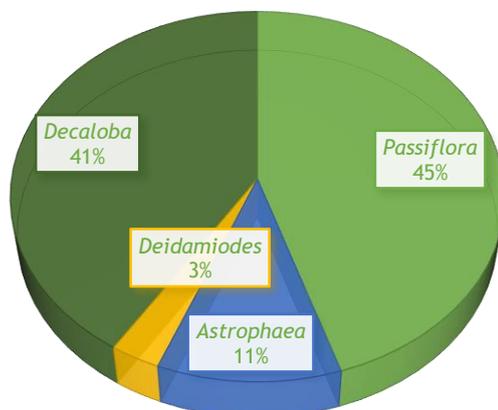


Figura 3: Histograma mostrando as percentagens dos subgéneros da *Passiflora*. *Passiflora* (45%): distribuídas pela América do Sul e do Norte. *Astrophea* (11%): distribuídas pela América do Sul e Central. *Deidamioides* (3%): distribuídas pela América do Sul e Central. *Decaloba*: distribuídas pela América do Sul e do Norte, pela Ásia e pela Austrália. (Cerqueira-Silva, Jesus et al. 2014)

Os cientistas têm mostrado um interesse crescente nesse género, devido ao facto de esses apresentarem propriedades fitoterápicas, dos seus usos etnobotânicos, das suas informações quimiotaxonómica e a interação da planta com o seu ambiente. Esses fatores têm sido sugeridos como critérios de seleção para potenciais fontes de moléculas naturais de relevância farmacêutica. (Ramaiya, Bujang et al. 2014)

Nos países europeus e americanos essas espécies são muito populares também porque o chá das suas folhas tem sido largamente utilizado na medicina popular como sedativo, diurético, tónico e também no tratamento da hipertensão. (Zhang, Koike et al. 2013)

A literatura etnobotânica indicou que a planta *Passiflora* contém uma variedade de compostos, incluindo compostos fenólicos, alcaloides, flavonoides e constituintes cianogénicos. Ainda é encontrada na planta taninos, saponinas, vitaminas e aminoácidos livres. (Ramaiya, Bujang et al. 2014, Shekhawat, Manokari et al. 2015). A planta pode ser encontrada em zonas como leitos dos rios, pisos de floresta seca, e matas de beira de estrada. A maioria das *Passifloras* são herbáceas, mas há também arbustos e árvores. (Muschner, Lorenz et al. 2003, Sasikala, Saravanan et al. 2011)

Tabela 1: Compostos identificados no género *Passiflora*. (Montero, Marques et al. 2016)

| Composto | <i>P. alata</i> | <i>P. cincinnata</i> | <i>P. coccinea</i> | <i>P. edulis</i> | <i>P. quadrangularis</i> |
|-----------------------|-----------------|----------------------|--------------------|------------------|--------------------------|
| 2-metil-3-pentanona | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Heptano | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Metil-isobutil-cetona | | | | ✓ | |
| 2,5-dimetil-hex-2-eno | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | |
| Acetato de isobutilo | | ✓ | | ✓ | |
| Acetato de alilo | ✓ | | | ✓ | ✓ |
| 2-Hexanona | | ✓ | ✓ | | |
| Octano | | ✓ | | | |
| 2-Hexanol | ✓ | | ✓ | | ✓ |
| 3-hexil-hidroperóxido | | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Pent-3-en-2-ol | | ✓ | | ✓ | |
| Acetato de butilo | | | | ✓ | |
| 4-metil-octano | | ✓ | | | |
| Decano | | | | ✓ | |
| 2,4-dimetil-decano | | ✓ | | ✓ | |
| Undecano | | ✓ | ✓ | ✓ | |
| Dodecano | | | ✓ | ✓ | |
| Tridecano | | ✓ | | ✓ | |
| Tetradecano | | | ✓ | ✓ | |
| Hexadecano | | | ✓ | ✓ | |
| Benzaldeído | | ✓ | | | |
| Álcool benzílico | ✓ | | | ✓ | ✓ |
| Álcool feniletílico | | ✓ | | | ✓ |
| 4-etil-benzaldeído | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |

Tabela 2 Cont.: Compostos identificados no género *Passiflora*. (Montero, Marques et al. 2016)

| Composto | <i>P. alata</i> | <i>P. cincinnata</i> | <i>P. coccinea</i> | <i>P. edulis</i> | <i>P. quadrangularis</i> |
|------------------------------------|---------------------|--------------------------|------------------------|----------------------|------------------------------|
| 1,4-Dimetoxibenzeno | | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| 3,4-Dimetil fenona aceto | | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Trans-metil-cinamato | | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| 1,3,5-trimetoxi-Benzeno | | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Benzoato de prenilo | | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Tiglato de benzilo | | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| 4-metil-2,6-di-terc- butilfenol | | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Tiglato de 2-feniletil-o | | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Mirceno | | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Limoneno | | ✓ | | ✓ | |
| Eucaliptol | | | | ✓ | |
| Cis-ocimeno | | ✓ | | | |
| Trans-ocimeno | | | | ✓ | |
| Linalol | | ✓ | | ✓ | |
| Citronelal | | ✓ | ✓ | ✓ | |
| Nerol | | | ✓ | ✓ | |
| Citronelol | | ✓ | | ✓ | |
| Neral | | | ✓ | ✓ | |
| Iso-geraniol | | | ✓ | ✓ | |
| Geraniol | | ✓ | | | |
| Geranial | ✓ | | | ✓ | ✓ |
| Geranato de metil | | ✓ | | | ✓ |

1.2.2. Exemplos de estruturas dos compostos isolados em algumas espécies do género *Passiflora*

Passiflora edulis Sims

Estudos revelam que já foram isolados na espécie *Passiflora edulis* Sims compostos como triterpenos cicloartanos, flavonoides, compostos fenólicos e alcaloides. A planta é utilizada na indústria alimentícia e apresenta ainda capacidades sedativas. (Wang, Xu et al. 2013). Cultivada geralmente em regiões de temperaturas quentes, as suas folhas e caules são utilizadas na medicina popular para o tratamento da ansiedade e do nervosismo. Demonstraram ainda ter capacidades anti-inflamatória e antimicrobiana. (Devaki, Beulah et al. 2012). As folhas ainda são utilizadas como sedativo, no tratamento da asma, insónia, epilepsia, úlceras e hemorroidas. (Sunitha and Devaki 2019). A *P. edulis* também produz óleos que são utilizados em perfumes e na indústria do sabão. Os seus frutos apresentam propriedades antioxidantes que inibem o crescimento das células cancerígenas. (Shekhawat, Manokari et al. 2015)

Os compostos fenólicos são conhecidos pela sua atividade antioxidante que inibe os danos oxidativos e consequentemente previne as condições inflamatórias. O teor de flavonoides totais encontradas nesta espécie é bastante significativo, e a isoorientina, uma flavona-C-glicósido, foi isolada da *P. edulis*. (Zeraik, Serateyn et al. 2011)

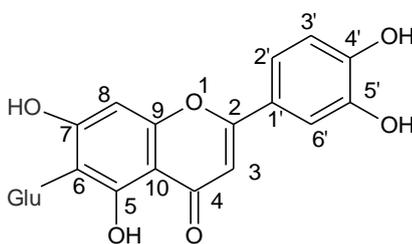


Figura 4: Estrutura de uma isoorientina glicerada identificada na *P. edulis*. (Zeraik, Serateyn et al. 2011)

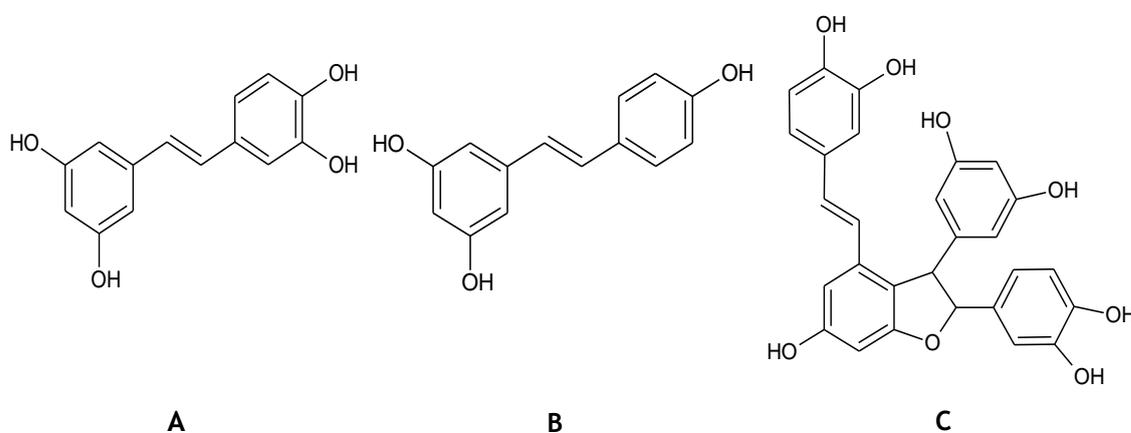


Figura 5: Estruturas de derivados de estilbeno isolados de uma *P. edulis*: A) piceatannol; B) casticin; C) resveratrol. (Sano, Sugiyama et al. 2011)

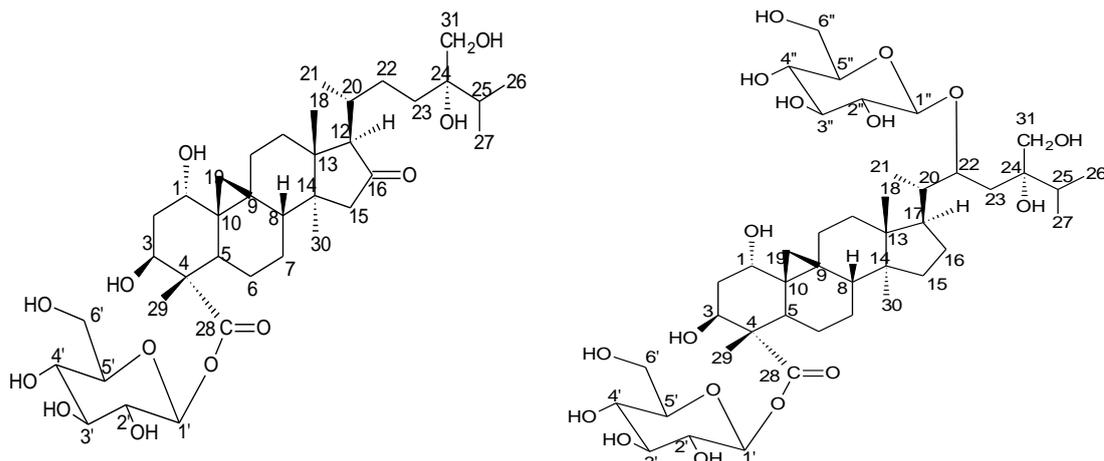


Figura 6: Triterpenos cicloartanos isolados na *P. edulis*. (Wang, Xu et al. 2013)

Passiflora foetida L

A *Passiflora foetida* L contém grandes quantidades de metabolitos secundários, tais como fenóis, alcaloides, polifenóis e polissacarídeos. (Lade, Patil et al. 2014). Outros estudos relatam a presença de flavonoides, glicosídeos, compostos cianogénicos, passiflorinas, polipeptídeos e α -pironas. A planta é utilizada para tratar doenças como diarreias, infeções de ouvidos, febres, doenças de pele, asma, doenças relacionadas com a garganta e o trato intestinal, curas de comichões, tonturas e dores de cabeça. (Sasikala, Saravanan et al. 2011). A *P. foetida* ainda é utilizada para tratamentos de doenças neurológicas, vertigens e histeria. (Krishnaveni and Thaakur 2008)

Echeverri *et al* em 2000 isolaram três α -pironas da *P. foetida*, a qual deram o nome de passifloricinas. Num estudo anterior esses autores tinham encontrado, nesta espécie, flavonoides com capacidades de resistência às pragas. (Echeverri, Arango et al. 2001)

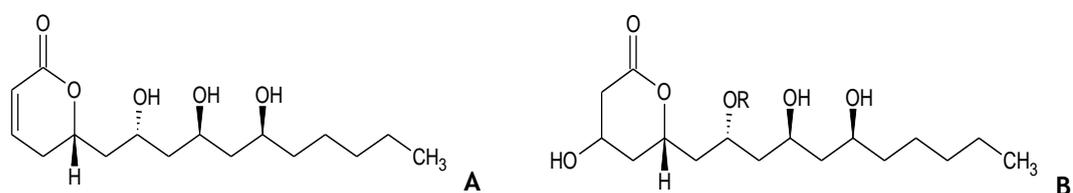


Figura 7: Passifloricinas isoladas da *P. foetida*. A) passifloricina A; B) passifloricina B (R= H), passifloricina C (R= Ac). (Echeverri, Arango et al. 2001)

Passiflora bogotensis Benth

Embora algumas espécies sejam cultivadas para consumo das suas frutas ou para produção de sumos, outras espécies não servem a este propósito, como é o caso da *P. bogotensis*. É uma espécie nativa da região de Bogotá que é usada essencialmente para fins ornamentais. Escassos são os dados literários sobre essa espécie. (Costa, Cardenas et al. 2015)

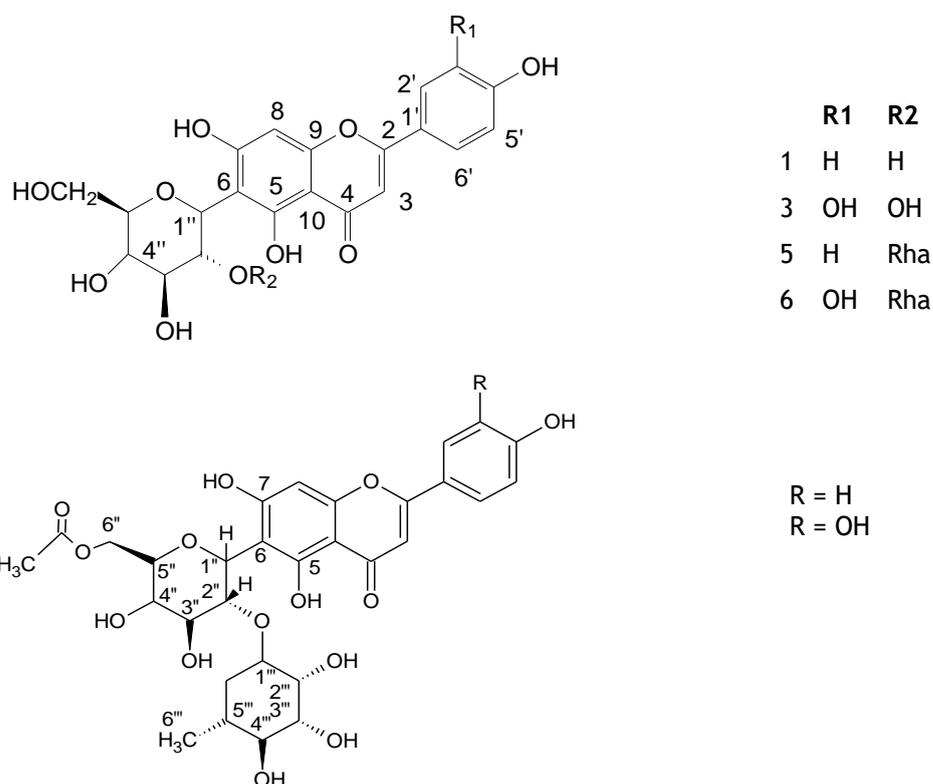


Figura 8: Estrutura dos flavonoides isolados na *P. Bogotensis*. (Costa, Cardenas et al. 2015)

Passiflora quadrangularis L.

A *P. quadrangularis* L. é uma videira relativamente abundante em algumas regiões da América tropical. O seu fruto tem uma polpa ligeiramente ácida com um aroma agradável e refrescante que é utilizada para a produção de refrigerantes. Apesar da sua popularidade entre os consumidores, não há na literatura estudos publicados sobre a composição química da fruta, à exceção de um triterpeno glicosilado isolado a partir das folhas da planta. (Osorio, Duque et al. 2000, Yuldasheva, Carvalho et al. 2005)

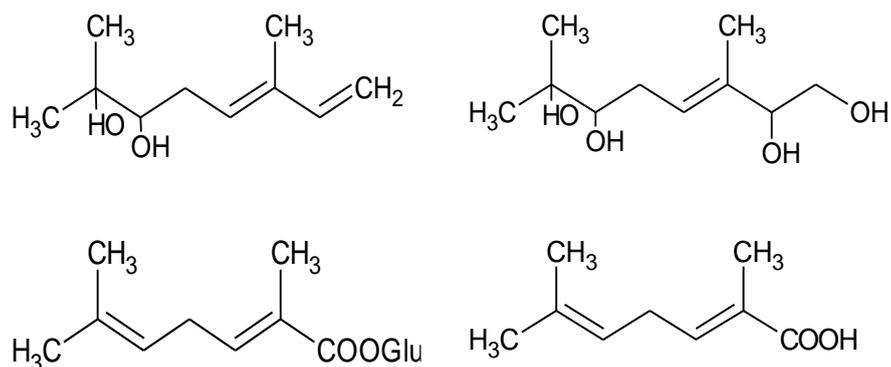


Figura 9: Monoterpenos isolados da *P. quadrangularis* L. (Osorio, Duque et al. 2000)

Passiflora tripartida

A *P. tripartida* é uma espécie nativa de Andes que cresce entre os 1800 e 3600 metros acima do nível do mar em florestas tropicais. Conhecido no norte do Chile como “tumbo”, os seus frutos aromatizados são apreciados pelo sabor agradável e pelo sumo de frutas ácidas. A planta demonstrou ter atividades hipoglicémica e antibacteriana para além da capacidade antioxidante. Estudos mostram que nesta espécie já foram isolados nas suas frutas compostos como a prunasina, eugenilo α -D-glicosídeo, hidrocarbonetos voláteis, cetonas, aldeídos e ésteres. (Simirgiotis, Schmeda-Hirschmann et al. 2013)

Tabela 3: Identificação de compostos fenólicos nas frutas da *P. tripartita*. Parte do fruto: C- casca; S - polpa e sumo; *Diferentes iões moleculares. (Simirgiotis, Schmeda-Hirschmann et al. 2013)

| Compostos identificados | Parte do fruto |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| (6-C- α -L- arabinofuranosil) -7-O-glucosil-8-C- β -D-glucopiranosido | C, S |
| Oligossacarídeos feruloilatados | C, S |
| Luteolina-(7-O-glucopiranosido) -8-C-glucopiranosido | C |
| Derivado de luteolina-di-glicósido | C |
| Luteolina-6,8-di-C- β -D-glucopiranosido (Leucina II) * | C |
| Derivado da vicenina II | C |
| 5'-Metoxi-dimetil-piperitol-4-O-glucósido | C, S |
| Luteolina-(6-C-pentosilo) -8-C- β -D-glucopiranosido isómero | C, S |
| (6-C- α -L-arabinofuranosil) -8-C- β -D-glucopiranosido (ISO schaftosídeo) * | C |
| (Leucina II, éter 4'-metil) | C |
| Apigenina (6-C- β -D-glucopiranosil) 8-C- α -L-arabinosido (schaftosídeo) * | C, S |
| Derivado da luteolina-5-O-glucosil-8-C (6 "acetil) - β -D-glucopiranosido | C |

Tabela 4. Cont.) Identificação de compostos fenólicos nas frutas da *P. tripartita*. Parte do fruto: C- casca; S - polpa e sumo; *Diferentes iões moleculares. (Simirgiotis, Schmeda-Hirschmann et al. 2013)

| Compostos identificados | Parte do fruto |
|------------------------------------------------------------------------|----------------|
| Apigenina-6,8-di-C-β-D-glucopiranósido (vicenina II) * | C, S |
| Isómero da vicenina II | C, S |
| Flavonoide di-glicosílico desconhecido | C, S |
| Apigenina-8-C-β-D-glucopiranósido (vitexina) * | C |
| Eriodictiol 6,8-di-C-glicósido | C |
| Luteolina-7-O-glucopiranosil 8-C-(6 "acetil)-glucopiranósido | C, S |
| Luteolina-8-C-β-D-glucopiranósido (orientina) * | C, S |
| Apigenina-5-O-β-D-glucopiranosilo, 8-C- (6 "acetil)-β-D-glucopiranosil | C, S |
| 4'-metoxi luteolina-8-C-β-D-glucopiranósido | C, S |
| Miricetina * | C |
| Miricetina-3-O-(6 "galoil) glicósido | C |
| Luteolina-8-C (6 "acetil) -β-D-glucopiranósido | C, S |
| Derivado da Miricetina-3-O-(6 "galoil) glicósido | C |
| Éter miricetina 3' metil | C |
| Apigenina-8-C (6 "acetil) -β-D-glucopiranósido | C |
| Derivado C-glicosilo desconhecido | C |
| Derivado C-glicosilo desconhecido | C, S |
| Derivado C-glicosilo desconhecido | C |
| 4'-metoxi luteolina-8-C-(6 "acetil)-β-D-glucopiranósido * | C, S |

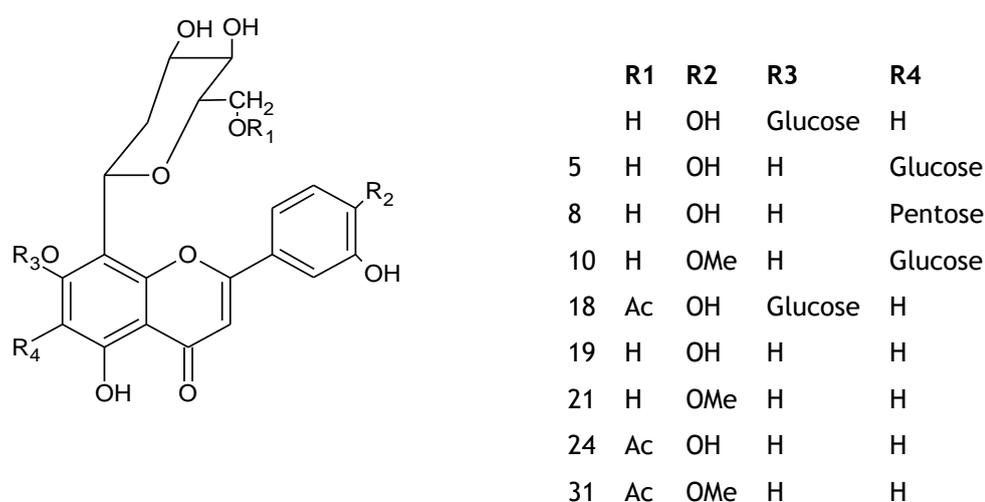
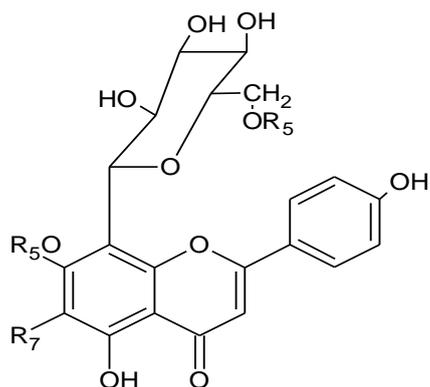


Figura 10: Proposta de estrutura de luteolina isolada da *P. tripartita*. (Simirgiotis, Schmeda-Hirschmann et al. 2013)



| | R5 | R6 | R7 |
|----|----|---------|-----------|
| 1 | H | Glucose | Arabinose |
| 9 | H | H | Arabinose |
| 13 | H | H | Glucose |
| 16 | H | H | H |
| 20 | Ac | Glucose | H |
| 27 | Ac | H | H |

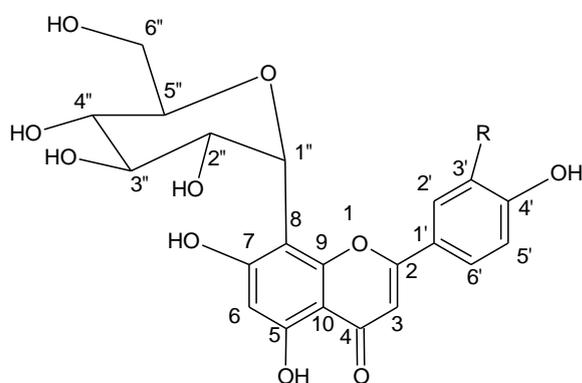
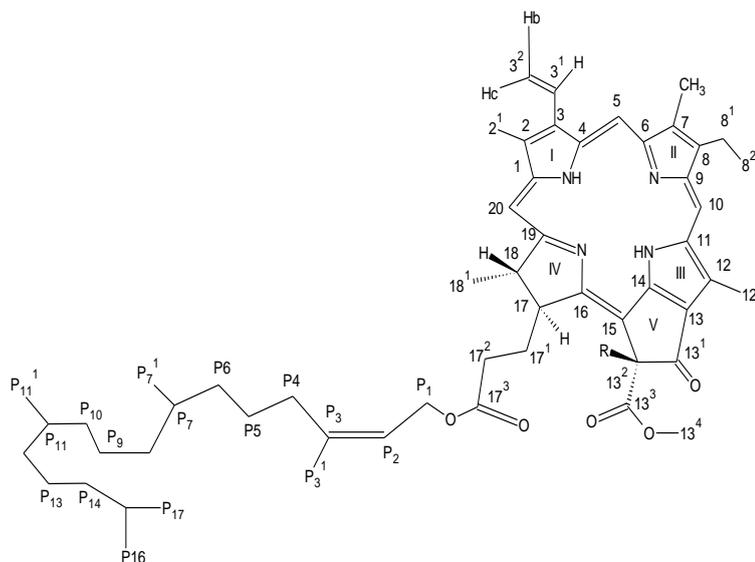
Figura 11: Proposta de estrutura da apigenina isolada da *P. tripartita*. (Simirgiotis, Schmeda-Hirschmann et al. 2013)

1.2.3. Exemplos de estruturas dos compostos isolados no género *Turnera*

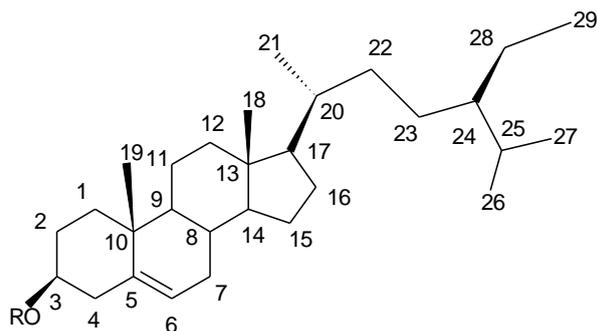
Turnera subulata Sm

A família Turneroideae compreende 10 géneros, aproximadamente 200 espécies e segundo Thulin *et al*, passaram a integrar a família Passifloraceae. O género *Tunera* é um dos géneros mais abrangentes e são caracterizados pela presença de terpenoides, flavonoides, esteroides, alcaloides, benzenoides e lípidos. A espécie *T. subulata* Sm, conhecida como "chanana" ou "flor-do-Guarujá" é uma herbácea com folhas simples e flores brancas com pétalas amarelas ou laranjas. A *T. subulata*. é uma espécie Sul americana cujo as raízes têm sido utilizadas na medicina popular para o tratamento de amenorreia. (Brito Filho, Fernandes et al. 2014)

- 4 R = H R₁ = CH₃
- 5 R = OH R₁ = CH₃
- 7 R = H R₁ = CHO



- 3A → R = H
- 3B → R = OH



- 1A → R = H
- 1B → R = OH, Δ^{22,23}
- 6A → R = C₆H₁₂O₆
- 6B → R = C₆H₁₂O₆, Δ^{22,23}

Figura 12: Componentes isolados da *T. subulata*. (Brito Filho, Fernandes et al. 2014)

1.2.4. *Paropsia brazzeana* Bail

A *Paropsia* é um género pertencente à família Passifloraceae que compreende onze espécies, uma na Ásia e dez na África. Das onze espécies, quatro encontram-se no continente africano, três na África central e uma no Leste-Africano, e seis no Madagasca. (Breteler 2003)

A *Paropsia brazzeana*, também conhecida por *Paropsia argutidens* Sleumer e *Paropsia reticulata* Engl. é uma planta medicinal pertencente ao género *Paropsia*. O nome *brazzeana* foi atribuído como homenagem a Jacques de Brazza (1859-1888), um explorador e coletor de plantas francês, que viajou acompanhado do seu irmão Pierre Savorgnan de Brazza para o Gabão e o Congo.

A *P. brazzeana* pode ser um pequeno arbusto de até um metro de altura proveniente de um rizoma grosso, ou pode ser um arbusto de até quatro metros de altura com aproximadamente cinco centímetros de diâmetros. Os seus ramos apresentam pelos oxidados quando jovens e ausência de pelos quando maduros. As suas folhas alternam entre formas elíptico lanceoladas e ovaladas. As flores apresentam-se em cachos axilares floridos de um a três com cores entre branco e branco esverdeada. As sementes são ovoides e de cor castanho com um arilo laranja. (Drummond 1975, Fernandes 1978, Timberlake 2004, Setshogo 2005)

Esta planta encontra-se distribuída em diferentes regiões de África como Angola, Camarões, República do Congo, República Democrática do Congo, Botswana, Namíbia, Zâmbia e Zimbabwe. Habitualmente floresce entre janeiro e abril. (Drummond 1975, Fernandes 1978, Timberlake 2004, Setshogo 2005)

Para efeitos medicinais ela é usada para tratar o reumatismo, a disenteria amebiana, a gonorreia e a dor de dentes. A polpa da sua folha é usada como analgésico para dores musculares. O sumo do seu fruto é usado para tratar dores de cabeça e infeções no nariz. No entanto, estudos têm indicado que as folhas da planta apresentam propriedades benéficas para indivíduos com diabetes do tipo 2. A planta possui uma atividade hipoglicémica, ela impede o aumento excessivo da glicémia após a refeição. (Shedd, Vanuchi et al.)

Geralmente a *P. brazzeana* contém compostos como flavonas, taninos, saponinas e ácido cianídrico. Ela apresenta atividades antibacteriana significativa, atividade anti-amebiana e atividades antiespasmódica. (Ruijter 1886)

Infelizmente os estudos sobre esse género da família Passifloraceae ainda é bastante escasso sendo, portanto, difícil obter mais informações acerca da *P. brazzeana*.

1.3. Cancro da mama

O cancro da mama é uma doença heterogênea com diversas alterações moleculares. É o cancro mais comum e a principal causa de morte por neoplasia entre as mulheres de todo o mundo, com aproximadamente 1.7 milhões de casos em 2012. Apesar de apresentar uma maior incidência nos países desenvolvidos, as taxas de mortalidade são maiores nos países em desenvolvimento. (Bing, XinPing et al. 2016, Nieto-Jiménez, Alcaraz-Sanabria et al. 2016) Os sinais e sintomas primordiais desta patologia são os nódulos na mama e/ou axila, dores mamárias e alterações na pele que envolve a mama. (Silva and Riul 2011)

As principais estratégias de tratamento para os pacientes que sofrem desta doença são as intervenções cirúrgicas, as quimioterapias e eventualmente as radioterapias, dependendo do caso. Contudo as respostas destes pacientes às quimioterapias costumam ser insuficientes, devido a resistência que estes desenvolvem aos fármacos. As sequelas ao longo prazo também têm sido uma preocupação pois 10 em cada 30 % dos pacientes com tumores malignos primários têm uma forte probabilidade de virem a desenvolver metástases espinhais epidurais. (Man, Lingling et al. 2016, Sciubba, Goodwin et al. 2016)

Os protocolos de quimioterapias utilizados no tratamento dependem do estágio da doença, da análise dos exames clínicos realizados, da idade do paciente, e da sua preferência, após ser informada dos efeitos secundários e da duração do tratamento. É importante também mencionar que a forma como o médico comunica a informação clínica ao paciente e o modo como este o interpreta são fundamentais no seu processo de adaptação à doença e em futuras decisões terapêuticas que venha a tomar. (Rebelo, Rolim et al. 2007)

Cirurgicamente, pode ser efetuada uma tumorectomia ou uma mastectomia. A tumorectomia consiste na remoção do tumor e de uma pequena porção de tecido saudável circundante e, se necessário, dos gânglios linfáticos da axila do lado afetado. A mastectomia radical modificada consiste na remoção da glândula mamária, do mamilo e da auréola, assim como da pele necessária, de acordo com a localização do tumor, e por fim dos gânglios linfáticos da axila do lado afetado. (Rebelo, Rolim et al. 2007)

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento do cancro da mama estão relacionados com o género (é mais frequente no sexo feminino do que no sexo masculino), com a idade (é raro antes dos 35 anos, a incidência aumenta com a idade, sendo descoberto, principalmente, entre os 40 e os 60 anos; aos 50 anos as mulheres têm cerca de 2 % de chances de desenvolverem o cancro da mama nos 10 anos seguintes. Aos 60 anos esse risco aumenta para 2,5 %), com as características reprodutivas (as características reprodutivas de risco se dão porque a doença é estrogênio-dependente, e compreendem a menarca precoce, a menopausa tardia, a primeira gestação após os 30 anos e a nuliparidade), o histórico familiar e pessoal (se há um ou mais parentes de primeiro grau com cancro da mama antes dos 50 anos, um ou mais parentes de primeiro grau com cancro da mama bilateral ou cancro de ovário em qualquer idade, parente com cancro da mama masculina, cancro da mama e/ou doença mamária benigna prévios), os hábitos de vida (os hábitos de vida relacionados são a obesidade, pelo aumento do

nível de estrogênio produzido no tecido adiposo, o uso regular do álcool, acima de 60 gramas por dia, pois o acetaldeído, primeiro metabólito do álcool, é carcinogénico, mutagénico, estimulador da produção de estrogênio e imunodepressor) e as influências ambientais. A obesidade nas mulheres que estejam na pós-menopausa é um fator de risco para o desenvolvimento do cancro da mama daí a menopausa também ser um fator de risco. E ainda o uso da terapia hormonal contendo estrogénio e progestina sintética na menopausa também foi associada a um aumento do risco do cancro da mama. (Green and Taplin 2002, Coelho 2008, Silva and Riul 2011, Asi, Mohammed et al. 2016, Perez-Perez, Sanchez-Jimenez et al. 2016)

O estágio do cancro da mama é classificado segundo o sistema de classificação TNM da AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER (2002), que avalia o tamanho do tumor (T), o envolvimento dos nódulos linfáticos regionais (N) e a expansão da doença à distância ou metástase (M). (Coelho 2008)

As estratégias de diagnóstico e a evolução nos tratamentos diminuíram a mortalidade do cancro da mama em 25 %. O controlo dessa doença é feito através da deteção precoce, na qual a lesão se restringe ao parênquima mamário, com um tamanho de no máximo três centímetros, permitindo o uso de recursos terapêuticos menos mutiladores e maior possibilidade de cura. Os meios mais eficazes para a deteção precoce do cancro da mama são o exame clínico de mamas (ECM) e a mamografia, pois o autoexame de mamas (AEM) deteta a doença geralmente em estágio avançado, sendo responsável por cerca de 80% das descobertas de cancros da mama. (Yue, Wang et al. 2010, Silva and Riul 2011)

Infelizmente há referências de que a doença vem atingindo um maior número de mulheres jovens. (Silva and Riul 2011)

1.4. Linha celular

Uma linha celular define uma população de células que são mantidas em cultura por um determinado período de tempo. A cultura de células tem sido bastante utilizada na investigação, pois provou ser uma ferramenta útil para estudar o material genético e a sua caracterização mostra que são um modelo excelente para o estudo dos mecanismos biológicos envolvidos no cancro. O uso apropriado do modelo *in vitro* em pesquisas do cancro é crucial para o estudo da desregulação da proliferação e da apoptose. (Gstraunthaler 2003, Ferreira, Adegas et al. 2013)

A utilização da cultura de células é muito vantajosa por ser fácil a sua execução nos laboratórios, por permitir estudo de fenómenos inacessíveis em tecidos intactos, por possibilitar o controlo das condições ambientais (pH, temperatura, concentração de O₂ e CO₂), por permitir a obtenção de células com boa homogeneidade e bem caracterizadas, por ser um modelo ideal nas fases iniciais pré-clínicas dos ensaios e por permitir a diminuição nos gastos de reagentes e de tempo. (Markowitz, Von Moltke et al. 2008)

1.4.1. Linha celular hormônio-dependente

A linha celular MCF-7 é uma linha de célula epitelial luminal ER+ e representa 50 a 60% de todos os tumores da mama. Essas linhas são úteis para o estudo em vitro do cancro da mama porque retêm as características ideais para o epitélio mamário. No entanto Marc Lippman mostrou que o tamoxifeno inibe o crescimento das MCF-7, embora esse efeito possa ser revertido com o estrogénio. (Levenson and Jordan 1997, Van Dijk, Floore et al. 1997, Perou, Sørli et al. 2000)

O cancro da mama pode ser classificado, em hormônio dependente ou hormônio-independente, dependendo se há presença de recetores de estrogénio ou não. (Huang, Newman et al. 2000)

Por sua vez o estrogénio desempenha um papel importante na mediação da maturação, proliferação, diferenciação, apoptose, inflamação, metabolismo, homeostasia celular, função cerebral e no desenvolvimento do cancro da mama. Sendo que os cancros da mama positivos para o recetor de estrógeno (ER+) são mais comuns e antagonistas do ER são usados no tratamento do cancro da mama hormônio-dependente. Estudos mostram que o bloqueio do estrogénio (E2) por anti-estrogénios reduz de 50-75% a incidência do cancro em mulheres com elevado risco. (Enmark and Gustafsson 1999, Ravdin, Cronin et al. 2007, Yue, Wang et al. 2010, Baran-Gale, Purvis et al. 2016)

1.5. Fibroblastos

Os fibroblastos são os principais componentes do tecido conjuntivo e são encontrados em quase todo o corpo. Apresentam morfologia e função diversificada de acordo com os seus ambientes. Têm um efeito reparador muito importante na degeneração celular, necrose e defeito de diferentes graus nos tecidos. (Golpour, Niaki et al. 2014, Lu, Guo et al. 2016)

Na pele jovem e saudável os fibroblastos da derme humana apresentam uma ligação intacta com as fibras do colagénio, isso permite a normal propagação das células e confere a sua forma habitual. Contudo na pele envelhecida esta ligação encontra-se reduzida, o que prejudica a propagação e a função dos fibroblastos, levando desta forma a uma alteração na morfologia das células. (Quan, Cho et al. 2015)

Os NHDF (células da derme humana) são um tipo de fibroblastos encontradas na derme humana e acredita-se que estão ligados à rede do colagénio para auxiliar a epiderme e dar origem a propriedades elásticas de um tecido. Essas células em cultura tem uma elevada capacidade de proliferação, no entanto in vivo raramente prolifera-se, mantém a homeostasia da derme através da produção do colagénio. (Dulinska-Molak, Pasikowska et al. 2014, Ejiri, Nomura et al. 2015)

Os fibroblastos da derme são células que expressam genes que regulam a síntese da matriz extracelular, vias de sinalização celular, proliferação celular e migração das células. Elas também expressam enzimas de metabolização de estrogénio e recetores de estrogénio. (Stevenson, Sharpe et al. 2009)

1.6. Objetivos

1.6.1. Objetivos gerais

O trabalho realizado nesta Tese de Mestrado em Bioquímica consiste numa Avaliação química de uma planta medicinal angolana, identificando desta forma os seus respetivos compostos e a capacidade citotóxica de diferentes frações.

1.6.2. Objetivos específicos

- Preparação de um extrato de metanol da planta selecionada;
- Fracionamento do extrato;
- Isolamento de compostos naturais;
- Identificação e caracterização espectroscópica dos compostos isolados;
- Determinação da citotoxicidade das frações resultantes da avaliação química nas células MCF-7 e NHDF.

Capítulo 2 - Materiais e métodos

2.1. Materiais e métodos da avaliação química

2.1.1. Material Vegetal

A *Paropsia brazzaeana* Baill foi recolhida no ano de 2013 em Angola pelo botânico Francisco Maiato na Huila e foi depositado no Herbário da Província da Huila com o número 1684.

2.1.2. Preparação do extrato bruto

Inicialmente as folhas (395,07 g) foram trituradas num moinho RetschMühle SM1 com um molde de 2,0 mm. De seguida foram colocadas em 1580 mL de metanol (MeOH) numa proporção de 15 g de material seco para 100 mL de metanol. Colocou-se a macerar durante uma semana e o processo repetiu-se por mais três vezes. Ao fim de cada uma das semanas, filtrou-se e evaporou-se o metanol do macerado até à sua total evaporação. Obteve-se 101,3 g de extrato bruto.

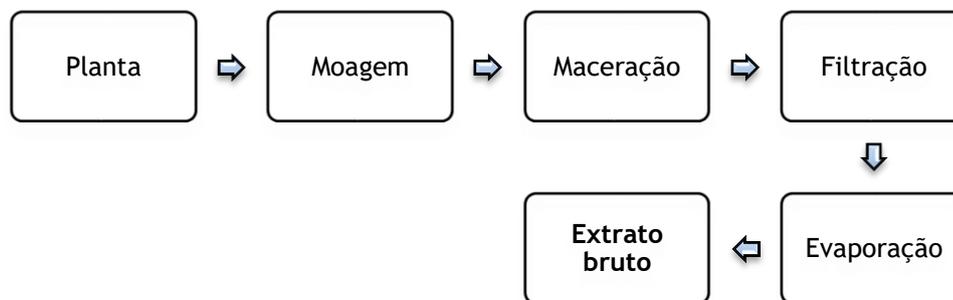


Figura 13: Esquema de obtenção do extrato bruto

2.1.3. Materiais e reagentes

2.1.3.1. Técnicas cromatográficas

Cromatografia em coluna húmida

Na cromatografia em coluna usou-se como adsorvente a sílica gel Schalau G-60, 70-230 mesh (ref. 1.07734). A razão entre a amostra e o adsorvente foi de 1:100. Usou-se diversas colunas de vidro, que variavam conforme o peso da amostra a ser extraído. A sílica é misturada com o solvente e colocado lentamente na coluna de vidro, desta forma evita-se a formação de bolhas de ar na mesma. De seguida adiciona-se lentamente a amostra. A eluição foi feita com misturas de solventes de polaridade crescente. A polaridade foi aumentada à medida que se observava um decréscimo significativa da massa das frações extraídas. A composição das frações foi estimada por cromatografia em camada fina (c.c.f.).

Cromatografia em camada fina

As cromatografias em camada fina foram executadas em placas de sílica gel DC - Fertigfolien Alugram® Xtra Sil G/UV pré-preparadas em suporte de alumínio (Ref. 818.333). A separação dos compostos deu-se através de eluição de diferentes solventes e misturas de solventes. As placas foram previamente analisadas por irradiação com luz U.V. de c.d.o. $\lambda = 366$ nm, para visualizar as substâncias fluorescentes. A sua revelação deu-se, na maioria dos casos, através da pulverização da placa com uma solução de ácido fosfomolibdico em etanol a 5%, seguida de aquecimento a 120°C durante alguns minutos.

2.1.3.2. Revelador utilizado

O revelador utilizado foi feito dissolvendo 5 g de ácido fosfomolibdico em 100 mL de etanol e a solução colocada num pulverizador.

2.1.3.3. Técnicas espectrométricas

Espectrometria no infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram adquiridos num Termo Scientific Nicolet iS10 FTIR com filme capilar em células de NaCl.

Ressonância magnética nuclear ^1H e de ^{13}C

Os espectros de RMN foram adquiridos num Bruker Avance III de 400 MHz (400 MHz ^1H e 100,6 MHz ^{13}C). Os deslocamentos químicos foram registrados em δ (ppm), tendo como padrão de referência interna o CHCl_3 residual (δ 7,25 ppm para o ^1H e 77,00 ppm para o ^{13}C). O solvente deuterado usado nas análises foi o clorofórmio deuterado (CDCl_3). As constantes de acoplamento (J) foram referidas em Hertz (Hz).

2.1.3.4. Fracionamento das diversas frações

Fracionamento da coluna mãe**Cromatografia 1**

O processo foi realizado numa coluna de cromatografia com 200 g de sílica gel misturada previamente com hexano, foi colocado ≈ 21 g do extrato de metanol, obtendo-se compostos de acordo com o aumento da polaridade (dos mais apolares aos mais polares). Cada balão retirado foi posteriormente evaporado até a evaporação total do solvente. Na figura seguinte é apresentada uma tabela do fracionamento efetuado.

Tabela 5: Cromatografia 1 da *P. brazzeana*.

| Frações | Eluentes | Pesos (mg) | Percentagens (%) | Observações |
|---------|------------------|------------|------------------|-------------|
| 1 | Hex/AcOEt (95:5) | 1444 | 6,757 | N1+Mist |
| 2 | Hex/AcOEt (8:2) | 1839 | 8,605 | |
| 3 | Hex/AcOEt (1:1) | 918 | 4,295 | N2+N3+Mist. |
| 4 | AcOEt | 856 | 4,005 | N4+Mist. |
| 5 | AcOEt/MeOH (9:1) | 442 | 2,068 | |
| 6 | AcOEt/MeOH (7:3) | 4013 | 18,777 | |
| 7 | AcOEt/MeOH (1:1) | 2091 | 9,784 | |
| 8 | MeOH | 6391 | 29,904 | |
| 9 | MeOH/HCl | 3251 | 15,211 | |

Fracionamento da fração Hex/AcOEt (95:5)**Cromatografia 2**

A fração de Hex/AcOEt (95:5) (1444 mg) foi cromatografada numa coluna com sílica gel e eluída em hexano (Hex), uma mistura de hexano/tolueno (Tol) de polaridades crescentes, tolueno, uma mistura de tolueno e acetato etilo (AcOEt) de polaridades crescentes, acetato etilo e metanol (MeOH). Obteve-se os resultados apresentados na tabela seguinte.

Tabela 6: Cromatografia 2 da *P. brazzeana*.

| Frações | Eluentes | Pesos (mg) | Percentagens (%) | Observações |
|---------|------------------|------------|------------------|-------------|
| 1-10 | Hex | 108,5 | 7,514 | |
| 11-15 | Hex/Tol (98:2) | 83,3 | 5,769 | |
| 16-20 | Hex/Tol (95:5) | 0,7 | 0,048 | |
| 21-28 | Hex/Tol (9:1) | 25,9 | 1,794 | |
| 29-32 | Hex/Tol (8:2) | 3,5 | 0,242 | |
| 33-37 | Hex/Tol (7:3) | 7,3 | 0,506 | |
| 38-43 | Hex/Tol (6:4) | 23,2 | 1,607 | |
| 44-51 | Tol | 62,6 | 4,335 | |
| 52-57 | Tol/AcOEt (95:5) | 24,7 | 1,711 | |
| 58-59 | Tol/AcOEt (9:1) | 17,9 | 1,240 | |
| 60-61 | “ | 208,5 | 14,439 | N1+Mist |
| 61-66 | “ | 56,2 | 3,892 | |
| 67-71 | Tol/AcOEt (8:2) | 34,8 | 2,410 | |
| 72-76 | Tol/AcOEt (7:3) | 20,5 | 1,420 | |
| 77-81 | Tol/AcOEt (1:1) | 15,3 | 1,060 | |
| 82-87 | AcOEt | 190,2 | 13,172 | |
| 88-99 | MeOH | 554,4 | 38,407 | |

Cromatografia 3

A fração 60-61 (208,5 mg) proveniente da fração Hex/AcOEt (95:5) (tabela 6) foi cromatografada numa coluna com sílica gel e eluída em hexano, uma mistura de Hex/AcOEt de polaridades crescentes e AcOEt. Obteve-se os resultados apresentados na tabela seguinte.

Tabela 7: Cromatografia 3 da *P. brazzeana*.

| Frações | Eluentes | Pesos (mg) | Percentagens (%) | Observações |
|---------|------------------|------------|------------------|-------------|
| 1-5 | Hex | 7 | 3,357 | |
| 6-10 | Hex/AcOEt (99:2) | 76,2 | 36,547 | |
| 11-13 | Hex/AcOEt (98:1) | 71,5 | 34,293 | |
| 14 | “ | 27,3 | 13,094 | N1 |
| 15 | “ | 10,2 | 4,892 | |
| 16-20 | Hex/AcOE (95:5) | 15,5 | 7,434 | |
| 21 | AcOEt | 0,0 | 0,0 | |

Fracionamento da fração Hex/AcOEt (8:2)

Cromatografia 4

A fração de Hex/AcOEt (8:2) (1839 mg) foi cromatografada numa coluna com sílica gel e eluída em uma mistura de Hex/AcOEt de polaridades crescentes, AcOEt e MeOH. Obteve-se os resultados apresentados na tabela seguinte.

Tabela 8: Cromatografia 4 da *P. brazzeana*.

| Frações | Eluentes | Pesos (mg) | Percentagens (%) | Observações |
|---------|------------------|------------|------------------|-------------|
| 1-6 | Hex/AcOEt (95:5) | 73,2 | 3,980 | |
| 7 | Hex/AcOEt (9:1) | 7,5 | 0,408 | |
| 8-11 | “ | 164,3 | 8,934 | |
| 12-15 | “ | 118,8 | 6,460 | |
| 16-18 | “ | 88,2 | 4,796 | |
| 19-22 | Hex/AcOEt (8:2) | 68,6 | 3,730 | |
| 23-26 | “ | 64,6 | 3,513 | |
| 27-28 | “ | 121,3 | 6,596 | |
| 29-33 | Hex/AcOEt (7:3) | 51,5 | 2,800 | |
| 34-38 | Hex/AcOEt (1:1) | 150,7 | 8,195 | |
| 39-44 | AcOEt | 468,3 | 25,465 | |
| 45-48 | MeOH | 370,5 | 20,147 | |

Cromatografia 5

A fração 8-11 (164,3 mg) proveniente da fração Hex/AcOEt (8:2) (tabela 8) foi cromatografada numa coluna com sílica gel e eluída em uma mistura de Hex/AcOEt de polaridades crescentes e AcOEt. Obteve-se os resultados apresentados na tabela seguinte.

Tabela 9: Cromatografia 5 da *P. brazzeana*.

| Frações | Eluentes | Pesos (mg) | Percentagens (%) | Observações |
|---------|------------------|------------|------------------|-------------|
| 1-4 | Hex/AcOEt (98:2) | 2,4 | 1,461 | |
| 5-8 | Hex/AcOEt (95:5) | 64,9 | 39,501 | |
| 9-12 | Hex/AcOEt (99:1) | 56,6 | 34,449 | |
| 13-15 | AcOEt | 25,8 | 15,703 | |

Cromatografia 6

A fração 12-15 (118,8 mg) proveniente da fração Hex/AcOEt (8:2) (tabela 8) foi cromatografada numa coluna com sílica gel e eluída em uma mistura de Hex/AcOEt de polaridades crescentes e AcOEt. Obteve-se os resultados apresentados na tabela seguinte.

Tabela 10: Cromatografia 6 da *P. brazzeana*.

| Frações | Eluentes | Pesos (mg) | Percentagens (%) | Observações |
|---------|------------------|------------|------------------|-------------|
| 1-4 | Hex/AcOEt (98:2) | 4,7 | 3,956 | |
| 5-8 | Hex/AcOEt (95:5) | 19,9 | 16,751 | |
| 9-14 | Hex/AcOEt (9:1) | 70,7 | 59,512 | |
| 15-16 | Hex/AcOEt (6:4) | 22,6 | 19,024 | |
| 17 | AcOEt | 0,0 | 0,0 | |

Cromatografia 7

As frações 16-18 (88,2 mg) e 19-22 (68,6 mg) provenientes da fração Hex/AcOEt (8:2) (tabela 8) foram cromatografadas numa coluna com sílica gel e eluídas em uma mistura de Hex/AcOEt de polaridades crescentes, AcOEt e MeOH. Obteve-se os resultados apresentados na tabela seguinte.

Tabela 11: Cromatografia 7 da *P. brazzeana*.

| Frações | Eluentes | Pesos (mg) | Percentagens (%) | Observações |
|---------|------------------|------------|------------------|-------------|
| 1-4 | Hex/AcOEt (98:2) | 1,6 | 1,020 | |
| 5-9 | Hex/AcOEt (95:5) | 0,4 | 0,255 | |
| 10-18 | Hex/AcOEt (9:1) | 27,6 | 17,602 | |
| 19-23 | Hex/AcOEt (8:2) | 19,4 | 12,372 | |
| 24-28 | Hex/AcOEt (7:3) | 30,7 | 19,579 | |
| 29-31 | Hex/AcOEt (6:4) | 51 | 32,526 | |
| 32-35 | AcOEt | 13,5 | 8,610 | |
| 36-37 | MeOH | 0,9 | 0,574 | |

Cromatografia 8

A fração 23-26 (64.6 mg) proveniente da fração Hex/AcOEt (8:2) (tabela 8) foi cromatografada numa coluna com sílica gel e eluída em uma mistura de Hex/AcOEt de polaridades crescentes e AcOEt. Obteve-se os resultados apresentados na tabela seguinte.

Tabela 12: Cromatografia 8 da *P. brazzeana*.

| Frações | Eluentes | Pesos (mg) | Percentagens (%) | Observações |
|---------|------------------|------------|------------------|-------------|
| 1-4 | Hex/AcOEt (95:5) | 0,7 | 1,084 | |
| 5-9 | Hex/AcOEt (9:1) | 0,5 | 0,774 | |
| 10-16 | Hex/AcOEt (8:2) | 5,6 | 8,669 | |
| 17-22 | Hex/AcOEt (7:3) | 18,7 | 28,947 | |
| 23-27 | Hex/AcOEt (6:24) | 15,2 | 23,529 | |
| 28-29 | AcOEt | 21,5 | 33,282 | |

Fracionamento da fração Hex/AcOEt (1:1)

Cromatografia 9

A fração de Hex/AcOEt (1:1) (918 mg) foi cromatografada numa coluna com sílica gel e eluída em uma mistura de Hex/AcOEt de polaridades crescentes, AcOEt, AcOEt/MeOH de polaridades crescentes e MeOH. Obteve-se os resultados apresentados na tabela seguinte.

Tabela 13: Cromatografia 9 da *P. brazzeana*.

| Frações | Eluentes | Pesos (mg) | Percentagens (%) | Observações |
|---------|------------------|------------|------------------|-------------|
| 1-6 | Hex/AcOEt (95:5) | 4 | 0,436 | |
| 7-10 | Hex/AcOEt (9:1) | 13,8 | 1,503 | |
| 11-18 | “ | 87,5 | 9,532 | |
| 19-27 | “ | 56,5 | 6,155 | N2+mist. |
| 28-29 | Hex/AcOEt (8:2) | 22,3 | 2,429 | N2+mist. |
| 30-36 | “ | 78,1 | 8,508 | N3+mist. |
| 36-39 | “ | 15,2 | 1,656 | |
| 40-46 | Hex/AcOEt (7:3) | 89,5 | 9,749 | |
| 47-49 | Hex/AcOEt (6:4) | 78,6 | 8,562 | |
| 50-54 | “ | 102,8 | 11,198 | |
| 55-60 | Hex/AcOEt (5:5) | 110,2 | 12,004 | |
| 61-66 | Hex/AcOEt (4:6) | 57,5 | 6,264 | |
| 67 | Hex/AcOEt (3:7) | 6,1 | 0,664 | |
| 68-73 | “ | 54,9 | 5,980 | |
| 74 | Hex/AcOEt (2:8) | 3,8 | 0,414 | |
| 75-79 | “ | 34,9 | 3,802 | |
| 80-84 | Hex/AcOEt (1:9) | 26,4 | 2,876 | |
| 85-90 | AcOEt | 18,7 | 2,037 | |
| 91-93 | AcOEt/MeOH (9:1) | 24 | 2,614 | |
| 93-98 | “ | 8,4 | 0,915 | |
| 99-105 | AcOEt/MeOH (7:3) | 13,2 | 1,438 | |
| 106-113 | MeOH | 9,6 | 1,264 | |

Cromatografia 10

A fração 11-18 (87,5 mg) proveniente da fração Hex/AcOEt (1:1) (tabela 13) foi cromatografada numa coluna com sílica gel e eluída em uma mistura de Hex/AcOEt de polaridades crescentes e AcOEt. Obteve-se os resultados apresentados na tabela seguinte.

Tabela 14: Cromatografia 10 da *P. brazzeana*.

| Frações | Eluentes | Pesos (mg) | Percentagens (%) | Observações |
|---------|------------------|------------|------------------|-------------|
| 1-5 | Hex/AcOEt (95:5) | 32,4 | 37,029 | |
| 6-12 | Hex/AcOEt (9:1) | 25 | 28,571 | |
| 13-16 | Hex/AcOEt (8:2) | 4,5 | 5,143 | |
| 17-22 | Hex/AcOEt (7:3) | 2,6 | 2,971 | |
| 23-25 | AcOEt | 21,6 | 24,686 | |

Cromatografia 11

As frações 19-27 (56,5 mg) e 28-29 (22,3 mg) provenientes da fração Hex/AcOEt (1:1) (tabela 13) foram cromatografadas numa coluna com sílica gel e eluídas em hexano, uma mistura de Hex/AcOEt de polaridades crescentes e AcOEt. Obteve-se os resultados apresentados na tabela seguinte.

Tabela 15: Cromatografia 11 da *P. brazzeana*.

| Frações | Eluentes | Pesos (mg) | Percentagens (%) | Observações |
|---------|------------------|------------|------------------|-------------|
| 1-3 | Hex | 1,5 | 1,904 | |
| 4-7 | Hex/AcOEt (95:5) | 38,3 | 48,604 | |
| 8-10 | Hex/AcOEt (9:1) | 6,1 | 7,741 | |
| 11-12 | “ | 3,6 | 4,569 | N2 |
| 13-16 | Hex/AcOEt (8:2) | 6,3 | 7,995 | |
| 17-20 | Hex/AcOEt (7:3) | 9 | 11,421 | |
| 21-25 | AcOEt | 1,5 | 1,904 | |

Cromatografia 12

A fração 30-36 (78.1 mg) proveniente da fração Hex/AcOEt (1:1) (tabela 13) foi cromatografada numa coluna com sílica gel e eluída em uma mistura de Hex/AcOEt de polaridades crescentes e AcOEt. Obteve-se os resultados apresentados na tabela seguinte.

Tabela 16: Cromatografia 12 da *P. brazzeana*.

| Frações | Eluentes | Pesos (mg) | Percentagens (%) | Observações |
|---------|------------------|------------|------------------|-------------|
| 1-4 | Hex/AcOEt (95:5) | 23,1 | 29,577 | |
| 5-7 | Hex/AcOEt (9:1) | 6,1 | 7,810 | |
| 8-9 | “ | 6,6 | 8,451 | N3 |
| 10-12 | “ | 3,3 | 4,225 | |
| 13-19 | Hex/AcOEt (8:2) | 15,6 | 19,974 | |
| 20-23 | Hex/AcOEt (7:3) | 12,5 | 16,005 | |
| 24-26 | AcOEt | 10,2 | 13,060 | |

Cromatografia 13

As frações 40-46 (89,5 mg) e 47-49 (78,6 mg) provenientes da fração Hex/AcOEt (1:1) (tabela 13) foram cromatografadas numa coluna com sílica gel e eluídas em uma mistura de Hex/AcOEt de polaridades crescentes e AcOEt. Obteve-se os resultados apresentados na tabela seguinte.

Tabela 17: Cromatografia 13 da *P. brazzeana*.

| Frações | Eluentes | Pesos (mg) | Percentagens (%) | Observações |
|---------|-----------------|------------|------------------|-------------|
| 1-5 | Hex/AcOEt (9:1) | 19,6 | 11,660 | |
| 6-12 | Hex/AcOEt (8:2) | 8,2 | 4,878 | |
| 13-16 | “ | 13,9 | 8,269 | |
| 17-25 | “ | 5 | 2,974 | |
| 26-34 | Hex/AcOEt (7:3) | 37,5 | 22,308 | |
| 35-37 | Hex/AcOEt (6:4) | 10,4 | 6,187 | |
| 38-42 | Hex/AcOEt (1:9) | 68,8 | 40,928 | |
| 43 | AcOEt | 3,4 | 2,023 | |

Cromatografia 14

As frações 50-54 (102,8 mg), 55-60 (110,2 mg), 61-66 (57,5 mg) e 67 (6,1 mg) provenientes da fração Hex/AcOEt (1:1) (tabela 13) foram cromatografadas numa coluna com sílica gel e eluídas em uma mistura de Hex/AcOEt de polaridades crescentes, AcOEt, uma mistura de AcOEt/MeOH de polaridades crescentes e MeOH. Obteve-se os resultados apresentados na tabela seguinte.

Tabela 18: Cromatografia 14 da *P. brazzeana*.

| Frações | Eluentes | Pesos (mg) | Percentagens (%) | Observações |
|---------|------------------|------------|------------------|-------------|
| 1-4 | Hex/AcOEt (9:1) | 32,9 | 11,894 | |
| 5-9 | Hex/AcOEt (8:2) | 5,4 | 1,952 | |
| 10-28 | Hex/AcOEt (7:3) | 46,4 | 16,775 | |
| 29-37 | Hex/AcOEt (6:4) | 45,4 | 16,414 | |
| 38-48 | Hex/AcOEt (5:5) | 36,5 | 13,196 | |
| 49-58 | Hex/AcOEt (4:6) | 23,4 | 8,460 | |
| 59-63 | Hex/AcOEt (3:7) | 17,4 | 6,291 | |
| 64-68 | Hex/AcOEt (2:8) | 15,1 | 5,459 | |
| 69-72 | Hex/AcOEt (1:9) | 7,9 | 2,856 | |
| 73-76 | AcOEt | 12 | 4,338 | |
| 77-80 | AcOEt/MeOH (9:1) | 15,2 | 5,495 | |
| 81-83 | AcOEt/MeOH (7:3) | 4,9 | 1,772 | |
| 84-85 | MeOH | 10,1 | 3,651 | |

Cromatografia 15

As frações 68-73 (54,9 mg), 74 (3,8 mg) e 75-79 (34,9 mg) provenientes da fração Hex/AcOEt (1:1) (tabela 13) foram cromatografadas numa coluna com sílica gel e eluída em uma mistura de Hex/AcOEt de polaridades crescentes, AcOEt, uma mistura de AcOEt/MeOH de polaridades crescente e MeOH. Obteve-se os resultados apresentados na tabela seguinte.

Tabela 19: Cromatografia 15 da *P. brazzeana*.

| Frações | Eluentes | Pesos (mg) | Percentagens (%) | Observações |
|---------|------------------|------------|------------------|-------------|
| 1-5 | Hex/AcOEt (7:3) | 17 | 18,162 | |
| 6-11 | Hex/AcOEt (6:4) | 2,4 | 2,564 | |
| 12-17 | Hex/AcOEt (3:7) | 25,6 | 27,350 | |
| 18-23 | Hex/AcOEt (2:8) | 16,3 | 17,415 | |
| 24-28 | AcOEt | 10,8 | 11,538 | |
| 29-34 | AcOEt/MeOH (9:1) | 9,6 | 10,256 | |
| 35-36 | MeOH | 11,3 | 12,073 | |

Cromatografia 16

As frações 80-84 (26,4 mg), 85-90 (18,7 mg) e 91-93 (24 mg) provenientes da fração Hex/AcOEt (1:1) (tabela 13) foi cromatografada numa coluna com sílica gel e eluída em uma mistura de Hex/AcOEt de polaridades crescentes, AcOEt, uma mistura de AcOEt/MeOH de polaridades crescente e MeOH. Obteve-se os resultados apresentados na tabela seguinte.

Tabela 20: Cromatografia 16 da *P. brazzeana*.

| Frações | Eluentes | Pesos (mg) | Percentagens (%) | Observações |
|---------|------------------|------------|------------------|-------------|
| 1-4 | Hex/AcOEt (7:3) | 7,5 | 10,854 | |
| 5-11 | Hex/AcOEt (6:4) | 2,2 | 3,184 | |
| 12-18 | Hex/AcOEt (5:5) | 4,2 | 6,078 | |
| 19-25 | Hex/AcOEt (4:6) | 1,8 | 2,605 | |
| 26-32 | Hex/AcOEt (3:7) | 5,7 | 8,249 | |
| 33-40 | Hex/AcOEt (2:8) | 18,6 | 26,918 | |
| 41-46 | Hex/AcOEt (1:9) | 5,9 | 8,538 | |
| 47-50 | AcOEt | 2,3 | 3,329 | |
| 51-54 | AcOEt/MeOH (9:1) | 13,9 | 20,116 | |
| 55-57 | AcOEt/MeOH (8:2) | 4,4 | 6,368 | |
| 58-59 | AcOEt/MeOH (7:3) | 1,4 | 2,026 | |

Fracionamento da fração AcOEt**Cromatografia 17**

A fração de AcOEt (856 mg) foi cromatografada numa coluna com sílica gel e eluída em uma mistura de Hex/AcOEt de polaridades crescentes, AcOEt, AcOEt /MeOH de polaridades crescentes e MeOH. Obteve-se os resultados apresentados na tabela seguinte.

Tabela 21: Cromatografia 17 da *P. brazzeana*.

| Frações | Eluentes | Pesos (mg) | Percentagens (%) | Observações |
|---------|------------------|------------|------------------|-------------|
| 1 | Hex/AcOEt (7:3) | 0,1 | 0,012 | |
| 2 | “ | 178,7 | 20,876 | N4+Mist. |
| 3 | “ | 61,4 | 7,173 | |
| 4-12 | “ | 99,3 | 11,600 | |
| 13 | Hex/AcOEt (6:4) | 6 | 0,701 | |
| 14-17 | “ | 40,7 | 4,755 | |
| 18-19 | “ | 23,7 | 2,769 | |
| 20-24 | Hex/AcOEt (5:5) | 73,5 | 8,586 | |
| 25-28 | Hex/AcOEt (4:6) | 44,5 | 5,199 | |
| 29-34 | Hex/AcOEt (3:7) | 68,6 | 8,014 | |
| 35-38 | Hex/AcOEt (2:8) | 38,9 | 4,544 | |
| 39-44 | AcOEt | 61,2 | 7,150 | |
| 45-48 | AcOEt/MeOH (9:1) | 83,3 | 9,731 | |
| 49-52 | AcOEt/MeOH (7:3) | 42,6 | 4,977 | |
| 53-56 | MeOH | 33,5 | 3,914 | |

Cromatografia 18

A fração 2 (178.7 mg) proveniente da fração AcOET (tabela 21) foi cromatografada numa coluna com sílica gel e eluída em uma mistura de Hex/AcOEt de polaridades crescentes e AcOET. Obteve-se os resultados apresentados na tabela seguinte.

Tabela 22: Cromatografia 18 da *P. brazzeana*.

| Frações | Eluentes | Pesos (mg) | Percentagens (%) | Observações |
|---------|------------------|------------|------------------|-------------|
| 1-3 | Hex/AcOEt (95:5) | 70,2 | 39,284 | |
| 4 | “ | 7,9 | 4,421 | N4 |
| 5-7 | Hex/AcOEt (9:1) | 18,8 | 10,520 | |
| 8-11 | Hex/AcOEt (8:2) | 41,3 | 23,111 | |
| 12-14 | Hex/AcOEt (7:3) | 24,9 | 13,934 | |
| 15-16 | Hex/AcOEt (5:5) | 7,3 | 4,085 | |
| 17-19 | AcOEt | 5,9 | 3,302 | |

Cromatografia 19

A fração 3 (61.4 mg) proveniente da fração AcOET (tabela 21) foi cromatografada numa coluna com sílica gel e eluída em uma mistura de Hex/AcOEt de polaridades crescentes e AcOET. Obteve-se os resultados apresentados na tabela seguinte.

Tabela 23: Cromatografia 19 da *P. brazzeana*.

| Frações | Eluentes | Pesos (mg) | Percentagens (%) | Observações |
|---------|------------------|------------|------------------|-------------|
| 1-2 | Hex/AcOEt (95:5) | 2,1 | 3,420 | |
| 3-4 | Hex/AcOEt (9:1) | 4,4 | 7,166 | |
| 5-10 | Hex/AcOEt (8:2) | 11,1 | 18,078 | |
| 11-13 | Hex/AcOEt (7:3) | 7,9 | 12,866 | |
| 14-15 | Hex/AcOEt (6:4) | 6,5 | 10,586 | |
| 16-17 | Hex/AcOEt (5:5) | 7,3 | 24,919 | |
| 18-19 | AcOEt | 8,6 | 18,893 | |

Cromatografia 20

As frações 14-17 (40,7 mg) e 18-19 (23,7 mg) provenientes da fração AcOEt (tabela 21) foi cromatografada numa coluna com sílica gel e eluída em uma mistura de Hex/AcOEt de polaridades crescentes e AcOEt. Obteve-se os resultados apresentados na tabela seguinte.

Tabela 24: Cromatografia 20 da *P. brazzeana*.

| Frações | Eluentes | Pesos (mg) | Percentagens (%) | Observações |
|---------|-----------------|------------|------------------|-------------|
| 1-3 | Hex/AcOEt (8:2) | 10,3 | 15,994 | |
| 4-7 | Hex/AcOEt (7:3) | 1,7 | 2,640 | |
| 8-12 | Hex/AcOEt (6:4) | 15,4 | 23,913 | |
| 13-17 | Hex/AcOEt (5:5) | 8,1 | 12,578 | |
| 18-21 | Hex/AcOEt (4:6) | 11,4 | 17,702 | |
| 22-25 | Hex/AcOEt (3:7) | 5,5 | 8,540 | |
| 26-29 | Hex/AcOEt (2:8) | 3,8 | 5,901 | |
| 30-32 | AcOEt | 5,5 | 8,540 | |
| 33-36 | Hex/MeOH (9:1) | 2,2 | 3,416 | |
| 37-39 | MeOH | 0,3 | 0,466 | |

Fracionamento da fração AcOEt/MeOH (9:1)

Cromatografia 21

A fração de AcOEt /MeOH (442 mg) foi cromatografada numa coluna com sílica gel e eluída em uma mistura de Hex/AcOEt de polaridades crescentes, AcOEt, AcOEt/MeOH de polaridades crescente, MeOH e MeOH/HCl. Obteve-se os resultados apresentados na tabela seguinte.

Tabela 25: Cromatografia 21 da *P. brazzeana*.

| Frações | Eluentes | Pesos (mg) | Percentagens (%) | Observações |
|---------|------------------|------------|------------------|-------------|
| 1-2 | Hex/AcOEt (7:3) | 31 | 7,014 | |
| 3-5 | Hex/AcOEt (6:4) | 28,2 | 6,380 | |
| 6-8 | Hex/AcOEt (4:6) | 17,5 | 3,959 | |
| 9-11 | Hex/AcOEt (2:8) | 20,6 | 4,661 | |
| 12-15 | AcOEt | 39 | 8,824 | |
| 16-20 | AcOEt/MeOH (9:1) | 176,9 | 40,023 | |
| 21-24 | AcOEt/MeOH (8:2) | 43,8 | 9,910 | |
| 25-28 | AcOEt/MeOH (7:3) | 26,3 | 5,950 | |
| 29-32 | Hex/AcOEt (6:4) | 16,4 | 3,710 | |
| 33-35 | AcOEt/MeOH (5:5) | 18,3 | 4,140 | |
| 36-39 | Hex/AcOEt (4:6) | 9,9 | 2,240 | |
| 40-42 | Hex/AcOEt (3:7) | 3,3 | 0,747 | |
| 43-46 | Hex/AcOEt (2:8) | 5,2 | 1,176 | |
| 47-51 | MeOH | 1,5 | 0,339 | |
| 51-39 | MeOH/HCl | 3,5 | 0,792 | |

Fracionamento da fração AcOEt/MeOH (7:3)**Cromatografia 22**

A fração de AcOEt/MeOH (4013 mg) foi cromatografada numa coluna com sílica gel e eluída em clorofórmio (CHCl_3), uma mistura de AcOEt/ CHCl_3 de polaridades crescentes, AcOEt, AcOEt/MeOH de polaridades crescentes, MeOH e MeOH/HCl. Obteve-se os resultados apresentados na tabela seguinte.

Tabela 26: Cromatografia 22 da *P. brazzeana*.

| Frações | Eluentes | Pesos (mg) | Percentagens (%) | Observações |
|---------|--------------------------------|------------|------------------|-------------|
| 1-7 | CHCl ₃ | 68,1 | 1,697 | |
| 8-9 | AcOEt/CHCl ₃ (98:2) | 3,6 | 0,090 | |
| 10-11 | “ | 91,5 | 2,280 | |
| 12-14 | “ | 106,7 | 2,659 | |
| 15-18 | “ | 16,4 | 0,409 | |
| 19-24 | AcOEt/CHCl ₃ (95:5) | 10,4 | 0,259 | |
| 25-30 | AcOEt/CHCl ₃ (9:1) | 8,1 | 0,202 | |
| 31-35 | AcOEt/CHCl ₃ (8:2) | 7,9 | 0,197 | |
| 36-40 | AcOEt/CHCl ₃ (7:3) | 9 | 0,224 | |
| 41-45 | AcOEt/CHCl ₃ (6:4) | 12,1 | 0,302 | |
| 46-50 | AcOEt/CHCl ₃ (5:5) | 13,1 | 0,326 | |
| 51-54 | AcOEt/CHCl ₃ (4:6) | 12,5 | 0,311 | |
| 55-57 | AcOEt/CHCl ₃ (3:7) | 11,4 | 0,284 | |
| 58-63 | AcOEt | 47,7 | 1,189 | |
| 64-71 | AcOEt/MeOH (9:1) | 504,9 | 12,582 | |
| 72-76 | AcOEt/MeOH (8:2) | 53,2 | 1,326 | |
| 77-81 | AcOEt/MeOH (7:3) | 176,6 | 4,401 | |
| 82-86 | AcOEt/MeOH (6:4) | 73,1 | 1,822 | |
| 87-91 | AcOEt/MeOH (5:5) | 334,9 | 8,345 | |
| 92-94 | AcOEt/MeOH (4:6) | 160,7 | 4,004 | |
| 95-97 | AcOEt/MeOH (3:7) | 644,1 | 16,050 | |
| 98-102 | AcOEt/MeOH (2:8) | 300,3 | 7,483 | |
| 103-106 | AcOEt/MeOH (1:9) | 526 | 13,107 | |
| 107-109 | MeOH | 400,8 | 9,988 | |
| 110-118 | MeOH/HCl | 224,9 | 5,604 | |

Cromatografia 23

A fração 10-11 (91,5 mg) proveniente da fração AcOEt/MeOH (7:3) (tabela 26) foi cromatografada numa coluna com sílica gel e eluída em CHCl₃, uma mistura de CHCl₃/MeOH (9:1) e MeOH. Obteve-se os resultados apresentados na tabela seguinte.

Tabela 27: Cromatografia 23 da *P. brazzeana*.

| Frações | Eluentes | Pesos (mg) | Percentagens (%) | Observações |
|---------|-------------------|------------|------------------|-------------|
| 1-36 | CHCl ₃ | 83,3 | 91,038 | |
| 37-39 | CHCl/MeOH (9:1) | 5,5 | 6,011 | |

Cromatografia 24

A fração 12-14 (106.7 mg) proveniente da fração AcOEt/MeOH (7:3) (tabela 26) foi cromatografada numa coluna com sílica gel e eluída em CHCl₃, uma mistura de CHCl₃/MeOH (9:1) e MeOH. Obteve-se os resultados apresentados na tabela seguinte.

Tabela 28: Cromatografia 24 da *P. brazzeana*.

| Frações | Eluentes | Pesos (mg) | Percentagens (%) | Observações |
|---------|-------------------|------------|------------------|-------------|
| 1-20 | CHCl ₃ | 69,3 | 64,948 | |
| 21-23 | CHCl/MeOH (9:1) | 30,8 | 28,866 | |
| 24-26 | MeOH | 4,1 | 3,843 | |

Fracionamento da fração AcOEt/MeOH (1:1)

Cromatografia 25

A fração de AcOEt/MeOH (2091 mg) foi cromatografada numa coluna com sílica gel e eluída em clorofórmio (CHCl₃), uma mistura de CHCl₃/MeOH de polaridades crescentes, MeOH e MeOH/HCl. Obteve-se os resultados apresentados na tabela seguinte.

Tabela 29: Cromatografia 25 da *P. brazzeana*.

| Frações | Eluentes | Pesos (mg) | Percentagens (%) | Observações |
|---------|--------------------------------|------------|------------------|-------------|
| 1-6 | CHCl ₃ | 18,8 | 0,899 | |
| 7-13 | CHCl ₃ /MeOH (98:2) | 126,6 | 6,055 | |
| 14-19 | CHCl ₃ /MeOH (95:5) | 34,6 | 1,655 | |
| 20-23 | CHCl ₃ /MeOH (9:1) | 28,5 | 1,363 | |
| 24-28 | CHCl ₃ /MeOH (8:2) | 7,7 | 0,368 | |
| 29-32 | CHCl ₃ /MeOH (7:3) | 138,4 | 6,619 | |
| 33-47 | CHCl ₃ /MeOH (6:4) | 225,8 | 10,799 | |
| 48-56 | CHCl ₃ /MeOH (5:5) | 515,9 | 24,672 | |
| 57-66 | CHCl ₃ /MeOH (4:6) | 326,5 | 15,615 | |
| 67-74 | CHCl ₃ /MeOH (3:7) | 169,5 | 8,106 | |
| 75-78 | CHCl ₃ /MeOH (2:8) | 24,8 | 1,186 | |
| 79-87 | MeOH | 80,7 | 3,859 | |
| 88-97 | MeOH/HCl | 336 | 16,069 | |

2.1.3.5. Caracterização espectroscópica dos compostos

Caracterização dos compostos da fração Hex/AcOEt (95:5)

Geraniol (N1)

Espetro de IV, $\nu_{\text{máx}}^{\text{filme}}$ cm^{-1} : 3428, 3031, 2926, 2855, 1714, 1449, 1376.

Espetro RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3), δ ppm: Tabela 30

Espetro RMN ^{13}C (100,6 MHz, CDCl_3), δ ppm: Tabela 30.

Caracterização dos compostos da fração Hex/AcOEt (1:1)

β -Sitosterol (N2)

Da fração 11-12 da cromatografia 11 foi isolado o β -sitosterol com as seguintes propriedades:

Espetro de IV, $\nu_{\text{máx}}^{\text{filme}}$ cm^{-1} : 3418, 3029, 2929, 2854, 1709, 1514, 1464, 1382, 1333, 1216, 1108, 1047, 1022, 959, 929, 757, 668.

Espetro RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3), δ ppm: 5,34 (1H, d, $J = 5,3$ Hz; H-6), 3,51 (1H, tdd, $J = 11,2$ Hz; $J = 5,3$; $J = 3,9$ Hz, H-3), 0,94 (3H, s, Me-19), 0,82 (1H, d, $J = 7,2$ Hz, Me-26), 0,80 (1H, d, $J = 7,0$ Hz, Me-27), 0,67 (3H, s, Me-18).

Espetro RMN ^{13}C (100,6 MHz, CDCl_3), δ ppm: Tabela 31.

Ácido octanóico (N3)

Espetro de IV, $\nu_{\text{máx}}^{\text{filme}}$ cm^{-1} : 3600-2400, 1694, 1463, 1411, 1297.

Espetro RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3), δ ppm: Tabela 32.

Espetro RMN ^{13}C (100,6 MHz, CDCl_3), δ ppm: Tabela 32.

Caracterização dos compostos da fração AcOEt

Ácido 14-nor-7,8-seco-10-oxocadinano-1(6),3-dienóico (N4)

Espetro de IV, $\nu_{\text{máx}}^{\text{filme}}$ cm^{-1} : 3429, 3029, 2924, 2853, 1715, 1651 1456, 1377.

Espetro RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3), δ ppm: Tabela 33.

Espetro RMN ^{13}C (100,6 MHz, CDCl_3), δ ppm: Tabela 33.

2.2. Materiais e métodos da determinação citotóxica

2.2.1. Frações estudadas nas linhas celulares

As frações utilizadas para determinar a sua toxicidade nas linhas celulares são provenientes da coluna mãe (tal como descrito na figura 13; tabela 5).

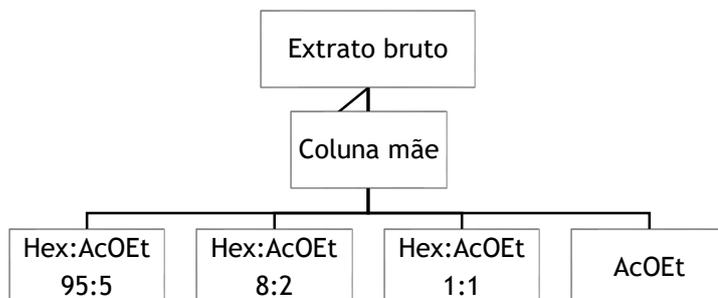


Figura 14. Hexagrama das frações utilizados no ensaio.

2.2.2. Diluição das frações para os estudos de citotoxicidade

A preparação das soluções das frações para o teste consistiu na dissolução de 4 mg da fração em 1 mL de DMSO. A dissolução foi igual para todas as frações. As concentrações usadas em todos os ensaios foram de 0,8 µg/mL, 8 µg/mL, 20 µg/mL e 40 µg/mL.

2.2.3. Cultura celulares

Para a realização deste trabalho utilizou-se duas linhas celulares: fibroblastos da derme humana não cancerígenos, as NHDF e as células epiteliais humanas do cancro da mama, as MCF-7.

2.2.4. NHDF

No estudo efetuado, estas células foram mantidas em meio de cultura RPMI suplementado com 10 % de Soro Fetal Bovino (FBS), 20 mM de L-glutamina, 10 mM de HEPES, 1mM de piruvato de sódio e 1 % de antibiótico/antimicótico a 37 °C em atmosfera humidificada contendo 5 % de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias e as células eram divididas para frascos de cultura novos quando a confluência era atingida. As células usadas no ensaio encontravam-se entre a passagem 9 e 10.

2.2.5. MCF-7

As células MCF-7 usadas no ensaio foram conservadas em meio DMEM complementado com 10 % de FBS e 1 % de antibiótico/antimicótico a 37 °C em atmosfera humidificada contendo 5 % de CO₂. O meio de cultura foi substituído a cada 2 dias e as células foram expandidas para novos frascos de cultura quando a confluência foi alcançada. As células usadas no ensaio encontravam-se entre a passagem 12 e 13.

2.2.6. Tripsinização

Com o passar do tempo as células foram ficando em confluência. A apreciação da confluência das células foi observada no microscópio. Quando as células atingiam uma confluência acima dos 70 % eram expandidas para mais frascos de cultura. Para esta expansão foi feita a tripsinização. A tripsinização fez-se efetuando uma mistura de tripsina e PBS (1 mL de tripsina mais 9 mL de PBS). Posteriormente retirou-se o meio do frasco e adicionou-se a mistura de tripsina. Essa mistura foi colocada num falcon com 20 mL de meio e centrifugou-se a: Speed 240 RCF; Time 10 minutos; Temperatura 25 °C. Retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet. A suspensão celular consequente foi colocada em novos frascos.

2.2.7. Contagem das células

Para os ensaios foram precisos determinar os números de células a serem colocadas em cada poço. Para isso foi utilizada uma câmara de Neubauer e contabilizou-se o número de células em cada quadrante.

2.2.8. Procedimentos seguidos para a execução dos ensaios

Para os ensaios foram preparadas placas multiwells de 96 poços, com uma concentração de 2×10^4 células/mL mantidas em meio de cultura apropriada durante 48 horas. Após esse período adicionou-se as frações. As frações permaneceram em contacto com as células durante 48 horas. Passado esse tempo as placas foram sujeitas ao ensaio de BCA ou ao ensaio de MTT consoante o pretendido (para a determinação da viabilidade MTT, para a determinação da proliferação BCA). Os ensaios foram executados a triplicar. Em cada placa multiwell foi testado um controlo também a triplicar, este apenas conteve meio de cultura, sem frações. Considerou-se que a média da absorvância obtida nos três poços do controlo corresponde a 100 % de viabilidade celular. Os demais valores adquiridos após a incubação com

as frações foram calculados a partir dos valores do controlo. Desta forma é possível comparar os valores na presença das frações com os valores na ausência das mesmas.

2.2.9. Ensaio da viabilidade celular - MTT

Para a execução do MTT, após o contato das linhas celulares com as frações, aspirou-se o meio de cada poço. De seguida foi colocado em cada poço 200µL de uma solução de MTT (com uma concentração de 0,5 mg de MTT para 1 mL de PBS). Posteriormente as placas foram incubadas na estufa a 5 % de CO₂, 37 °C e 95 % de humidade, durante 3 horas. Passado esse tempo retirou-se a placa da incubadora, descartou-se o MTT de todos os poços e adicionou-se 200 µL de DMSO aos poços. Por fim transferiu-se 200 µL para uma microplaca de leitura e adicionou-se 20 µL de tampão de glicina a todos os poços. A absorvância foi lido a 570 nm no leitor espectrofotométrico de microplacas. Os resultados são calculados em percentagem considerando 100 % os poços com controlo. (Riss, Moravec et al. 2013, Pan, Weng et al. 2016)

2.2.10. Ensaio da proliferação celular - BCA

Para o ensaio BCA, após o contato das linhas celulares com as frações, foi aspirado o meio de todos os poços. Depois colocou-se 200 µL de PBS a 1 % em todos os poços. De seguida o PBS é aspirado dos poços e é colocado 200 µL de BCA. Passa-se as células para uma microplaca de leitura e adiciona-se 4 µL de sulfato de cobre em todos os poços. Coloca-se a placa a temperatura ambiente durante 2 horas ou meia hora a 37 °C. Os resultados são calculados em percentagem considerando 100 % os poços com controlo. (Huang, Mian et al. 2010, Shah and Eikmanns 2016)

Capítulo 3 - Resultados e discussões

3.1. Resultados e discussão da avaliação química

3.1.1. Geraniol (N1)

Este composto foi obtido da fração 14 da cromatografia 3, sendo um óleo incolor. No espectro de IV observam-se bandas de absorções características de um grupo hidroxilo a 3428 cm^{-1} , da ligação CH em alcenos a 3030 cm^{-1} , da ligação C=C a 1732 cm^{-1} e de metilos a 1376 cm^{-1} .

No espectro de RMN de ^1H visualizam-se dois multipletos a δ 5,11 e 5,10 ppm característicos de dois prótons olefínicos, um duplo duplete a δ 4,08 ppm ($J=7,2\text{ Hz}$; $J=1,1\text{ Hz}$) atribuível a dois prótons geminais a um grupo hidroxilo, dois metilos singuleto a δ 1,60 e 1,59 ppm que se encontram ligados a uma ligação dupla.

O espectro de RMN ^{13}C (tabela 30) apresenta dez átomos de carbono dos quais três metilos (todos ligados a carbonos sp^2), três metilenos (um ligado a um hidroxilo; 59,0 ppm), dois metinos olefínicos (δ 124,9 e 124,5 ppm) e dois carbonos quaternários sp^2 (δ 139,9 e 135,2 ppm). O metileno a δ 59,0 ppm apresenta-se bastante desblindado o que será devido à presença de um grupo hidroxilo sobre este carbono.

Os espectros de RMN-2D HSQC (figura E5) e HMBC (figura E6) do composto permitiram concluir que este composto apresentava três metilos (δ 1,70; 1,60 e 1,59 ppm; s cada) ligados a carbonos sp^2 (s, δ 26,4; 17,6 e 16,0 ppm, respetivamente), os dois primeiros apresentam correlações com o carbono quaternário a δ 135,2 ppm e com o metino a δ 124,5 ppm estabelecendo um grupo isopropenilo; o último metilo encontra-se ligado aos carbonos sp^2 a δ 139,9 e 124,9 ppm. O metileno desblindado [δ 4,08 ppm ($J=7,2\text{ Hz}$; $J=1,1\text{ Hz}$); δ 59,9 ppm] apresenta correlações com a outra ligação dupla (δ 139,9 e 124,9 ppm). A fórmula molecular obtida dos espectros de ^{13}C e DEPT, $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$, apresenta dois graus de insaturação, que se justificam com a presença de duas ligações duplas, isto implica que a estrutura da molécula é de um monoterpene de cadeia aberta.

Consultada a bibliografia (Rahman and Ahmad 1992, Guerrini, Rossi et al. 2011) concluiu-se que o mesmo se tratava do geraniol.

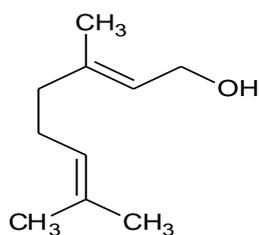


Figura 15: Estrutura do geraniol.

Tabela 30: Dados de RMN ^1H , ^{13}C e correlações de HMBC do composto N1.

| Numeração | δ C (ppm) | Tipo de C | δ H (ppm) (J_{HH} in Hz) | HMBC |
|-----------|------------------|---------------|-------------------------------------------|-------------|
| 1 | 59,0 | CH_2 | 4,08; d; 7,2 | 2, 4 |
| 2 | 124,9 | CH | 5, 10; m | 4, 10 |
| 3 | 139,9 | C | | |
| 4 | 39,7 | CH_2 | 1,97; dd; 8,9; 4,7 | 5, 6, 7, 10 |
| 5 | 26,4 | CH_2 | 2,07; m | 4, 6, 7 |
| 6 | 124,5 | CH | 5,11; m | 5, 7 |
| 7 | 135,2 | C | | |
| 8 | 26,4 | CH_3 | 1,70; m | 6, 7, 9 |
| 9 | 17,6 | CH_3 | 1,60; S | 6, 7, 8 |
| 10 | 16,0 | CH_3 | 1,59; S | 2, 4 |

3.1.2. β -sitosterol (N2)

Este composto foi obtido da fração 11-12 da cromatografia 11, sendo um óleo incolor. No espectro de IV observam-se bandas de absorções características de um grupo hidroxilo a 3420 cm^{-1} , da ligação CH em alcenos a 3031 cm^{-1} , da ligação C=C a 1715 cm^{-1} e de metilos a 1385 cm^{-1} .

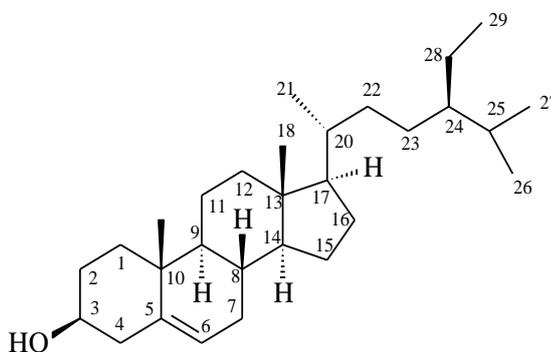
O espectro de RMN de ^1H demonstra um duplete a δ 5,34 ppm ($J=5,3\text{ Hz}$; H-6) característico de um próton olefínico e um triplo duplo duplete a δ 3,51 ppm ($J=11,2\text{ Hz}$; $J=5,3$; $J=3,9\text{ Hz}$) atribuível a um próton geminal a um grupo hidroxilo que é característico de um núcleo esteroide (Marinho, Marinho et al. 2009). Admitindo que este composto é um esteroide então os dois singuletos a δ 0,94 e 0,67 ppm correspondem aos metilos 19 e 18, respetivamente. Os restantes grupos metilo 21, 26, 27 e 29 encontram-se na cadeia lateral, sendo dois pertencentes ao grupo isopropilo (dupletos a δ 0,82 e 0,80 ppm; $J=7,2\text{ Hz}$; $J=7,0\text{ Hz}$, respetivamente, dos Me-26 e 27).

Tabela 31: RMN de ^{13}C do composto N2.

| CH_3 (ppm) | CH_2 (ppm) | CH (ppm) | C (ppm) |
|---------------------|---------------------|-------------------|------------------|
| 11,9 | 21,1 | 29,1 | 36,5 |
| 12,0 | 23,1 | 31,9 | 42,3 |
| 18,8 | 24,3 | 36,1 | 140,7 |
| 19,0 | 26,1 | 45,8 | |
| 19,4 | 28,2 | 50,1 | |
| 19,8 | 29,7 | 56,0 | |
| | 31,7 | 56,8 | |
| | 31,9 | 71,8 | |
| | 33,9 | 121,7 | |
| | 37,3 | | |
| | 39,8 | | |
| | 42,3 | | |

O espectro de RMN ^{13}C (tabela 31) apresenta vinte e nove átomos de carbono dos quais seis metilos, onze metilenos, nove metinos (um olefínico, δ 121,7 ppm e outro ligado a um hidroxilo, δ 71,8 ppm) e três carbonos quaternários (um olefínico, δ 140,7 ppm; C-5) e os outros com desvios químicos a δ 42,3 e 36,5 ppm dos, C-13 e C-10. O metino a δ 71,8 ppm apresenta-se bastante desblindado que será devido à presença de um grupo hidroxilo sobre este carbono. O espectro de correlação direta C-H (HSQC) apresenta uma correlação entre o sinal do próton a 3,51 ppm e o sinal de ^{13}C a 71,8 ppm referente ao C-3 e entre 5,35 ppm e o sinal a 121,7 ppm em relação ao carbono C-6.

Por comparação dos dados dos espectros de RMN 1D e 2D com a literatura (Komboj and Saluja 2011, Rajput and Rajput 2012), o composto foi identificado como β -sitosterol (figura 16).

Figura 16: Estrutura do β -sitosterol.

3.1.3. Ácido octanóico (N3)

Este composto foi obtido da fração 8-9 da cromatografia 12, sendo um óleo incolor. No espectro de IV observam-se bandas de absorções características de um grupo hidroxilo a 3600-2400 cm^{-1} e da ligação C=O a 1710 cm^{-1} .

O espectro de RMN de ^1H apresenta um tripleto a δ 2,34 ppm ($J=7,5$ Hz; H-2) que integra para dois prótons, característico de prótons ligados a um grupo eletronegativo, um quinteto a δ 1,62 ppm ($J=7,4$ Hz), um sinal a δ 1,4 ppm que integra para oito prótons e um metilo a δ 0,87 ppm ($J=6,8$ Hz) característico de um metilo ligado a uma cadeia carbonada linear.

O espectro de RMN ^{13}C (tabela 32) apresenta oito átomos de carbono dos quais um metilo, seis metilenos e um carbono quaternário (C=O, δ 179,9 ppm; C-5), três metilenos na zona δ 24-30 ppm e um metilo a δ 14,1 ppm indicam que o composto será um composto com uma cadeia carbonada linear ligada a um grupo ácido carboxílico. Analisando os espectros 2D (HSQC e HMBC) confirmou-se que o composto era um ácido carboxílico com oito átomos de carbono.

Tabela 32: RMN de ^1H e ^{13}C do composto N3.

| Numeração | δ ^{13}C (ppm) | Tipo de C | δ ^1H (ppm) (J_{HH} in Hz) |
|-----------|--------------------------------|-----------------|------------------------------------------------------|
| 1 | 179,9 | C | |
| 2 | 33,9 | CH ₂ | 2,34; t; 7,5 |
| 3 | 24,7 | CH ₂ | 1,62; quint; 7,4 |
| 4 | 29,1 | CH ₂ | 1,24; en |
| 5 | 29,2 | CH ₂ | 1,23; en |
| 6 | 31,9 | CH ₂ | 1,24; en |
| 7 | 22,7 | CH ₂ | 0,87; t; 6,8 |
| 8 | 14,1 | CH ₃ | 2,34; t; 7,5 |

Por comparação dos dados dos espectros de RMN 1D e 2D com a literatura (Osako, Torii et al. 2015), o composto foi identificado como sendo o ácido octanóico (figura 17).

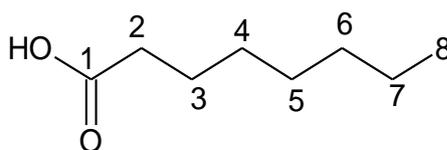


Figura 17: Estrutura do ácido octanóico

3.1.4. Ácido 14-nor-7,8-seco-10-oxocadinano-1(6),3-dienólico (N4)

Este composto foi obtido da fração 4 da cromatografia 18, sendo um óleo incolor. No espectro de IV observam-se absorções características de um grupo ácido carboxílico a 3429 cm^{-1} , de um alceno a 3029 cm^{-1} , da ligação C=O a 1715 cm^{-1} e da ligação C=C a 1651 cm^{-1} .

O espectro de RMN de ^1H (tabela 33; figura E20) sugere a existência de um alceno devido à presença de um sinal a δ 5,11 ppm (1H), o metilo a δ 1,67 ppm (dd; $J = 2,7\text{ Hz}$; $J = 1,3\text{ Hz}$; 3H) devido à sua desblindagem deve estar ligado a um alceno, os dois metilos a δ 0,85 (d, $J = 6,6\text{ Hz}$; cada) são consistentes com a presença de um isopropilo na molécula.

Tabela 33: Dados de RMN ^1H , ^{13}C e correlações de HMBC do composto N4.

| Numeração | C | ^{13}C | HSQC | HMBC |
|-----------|-------|-----------------|-----------------------|---------|
| 1 | 142,0 | C | | |
| 2 | 32,2 | CH ₂ | | |
| 3 | 125,0 | CH | 5,11; m | 2,5,15 |
| 4 | 135,4 | C | | |
| 5 | 26,4 | CH ₂ | 2,05; m | 1,3,6,7 |
| 6 | 146,9 | C | | |
| 7 | 39,4 | CH ₂ | 1,12; m | |
| 8 | 201,7 | C | | |
| 9 | 41,5 | CH ₂ | 1,63; m | 10 |
| 10 | 198,8 | C | | |
| 11 | 28,0 | CH | 0,85; m | |
| 12 | 22,6 | CH ₃ | 0,85; d; 6,6 | 7,11,13 |
| 13 | 22,7 | CH ₃ | 0,85; d; 6,6 | 7,11,13 |
| 15 | 23,4 | CH ₃ | 0,85; dd; 2,7; 1,7 | 2,3,4 |

O espectro de RMN de ^{13}C (tabela 33; figura E21) associado ao espectro DEPT (figura E22) aferiu catorze átomos de carbono sendo três metilos (um sobre ligação dupla, dois formando um isopropilo), quatro metilenos, dois metinos (um olefínico) e cinco quaternários (três olefínicos um de uma cetona e outro de um ácido carboxílico). Assim a fórmula molecular será $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_3$, de onde se obtêm 5 graus de insaturação, quatro deles justificam-se pelos dois C=O e pelas duas ligações duplas, o grau de insaturação sobranter será, provavelmente, de um anel. Uma molécula com catorze átomos de carbono, e sem evidências da presença de um substituinte adicional, será um sesquiterpeno que perdeu um grupo metilo, e como apresenta um só anel, provavelmente o segundo anel sofreu uma clivagem, assim podemos considerar que se trata de um *nor*-seco sesquiterpeno.

Os espectros de RMN-2D HSQC (figura E24) e HMBC (figura E25) do composto permitiram concluir que este composto apresentava um metilo [δ 1,67 (dd; $J = 2,7\text{ Hz}$; $J = 1,3\text{ Hz}$;

23,4 ppm) que apresenta correlação com a ligação trissubstituída (δ 125,0 e 135,4 ppm), os metilos 0,85 e 0,85 ppm (d, $J = 6,6$ Hz cada: H-12 e H-13); δ 22,6 e 22,7 ppm, respetivamente] apresentam correlação com um metino (δ 0,86 ppm; m; δ 28,0 ppm) formando um grupo isopropilo (Kwon, Choi et al. 2001, Brown, Liang et al. 2003). Um metino (δ 5,11; m; H-3; δ 125,0; C-3) ligado a um carbono sp^2 completamente substituído (δ 135,4 ppm; C-4), uma ligação dupla tetrasubstituída (δ 142,0 e 146,9 ppm; C-1 e C-6) e dois grupos C=O (δ 198, e 201,7 ppm; C-8 e C-10). A partir de outras correlações encontradas no espectro de HMBC foi possível chegar à estrutura um sesquiterpeno cadinano com uma quebra no anel B, entre C-7 e C-8, e que evidencia a ausência do metilo 14. Confirma-se, então, a suposição anterior de que se estava na presença de um *nor*-seco sesquiterpeno.

Consultada a bibliografia foi possível verificar a existência de outros 7,8-seco-cadinanos (Ahmed, Ali et al. 2006) no entanto não foi possível encontrar descrito este composto pelo que se propõem que o ácido 14-nor-7,8-seco-10-oxocadinano-1(6),3-dienóico (N4) seja considerado um novo composto natural.

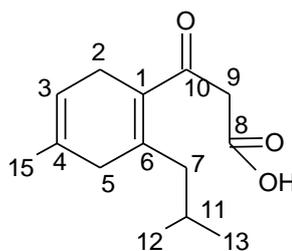


Figura 18: Estrutura do ácido 14-nor-7,8-seco-10-oxocadinano-1(6),3-dienóico.

3.2. Resultados e discussão da determinação citotóxica

Com o objetivo de avaliar o efeito das frações na viabilidade celular e na proliferação das células foram efetuados ensaios de MTT e ensaios de Doseamento de Proteínas. As condições de ensaio foram iguais para todas as frações. As células estiveram em contato com as frações durante 48 horas e as concentrações usadas foram de 0,8 $\mu\text{g/mL}$, 8 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$ e 40 $\mu\text{g/mL}$.

3.2.1. Curva de crescimento celular com o ensaio BCA

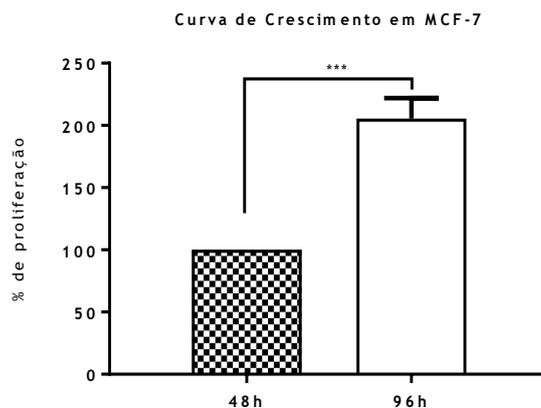


Figura 19: Gráfico de crescimento das células MCF-7 de 48h para 96h, obtido através do doseamento de proteínas. Os dados estão expressos em percentagem; as barras representam as médias e as linhas o desvio padrão da média associado. *** $p < 0.001$ (teste t)

O ensaio para o estudo do crescimento celular nas MCF-7 de 48h para 96h foi feito sem a adição de qualquer fração. O ensaio mostra que através do doseamento de proteínas é possível estudar a proliferação celular, visto que segundo os resultados obtidos no ensaio, houve um aumento de quase 100 % no número de células entre os 48h e os 96h. Esse aumento mostra que a toxicidade vista nos ensaios é devido a adição das frações estudadas, ou seja, as células não morrem por si só no período de tempo utilizado nos ensaios.

3.2.2. Resultados dos ensaios da fração Hex/AcOEt 95:5 nas MCF-7

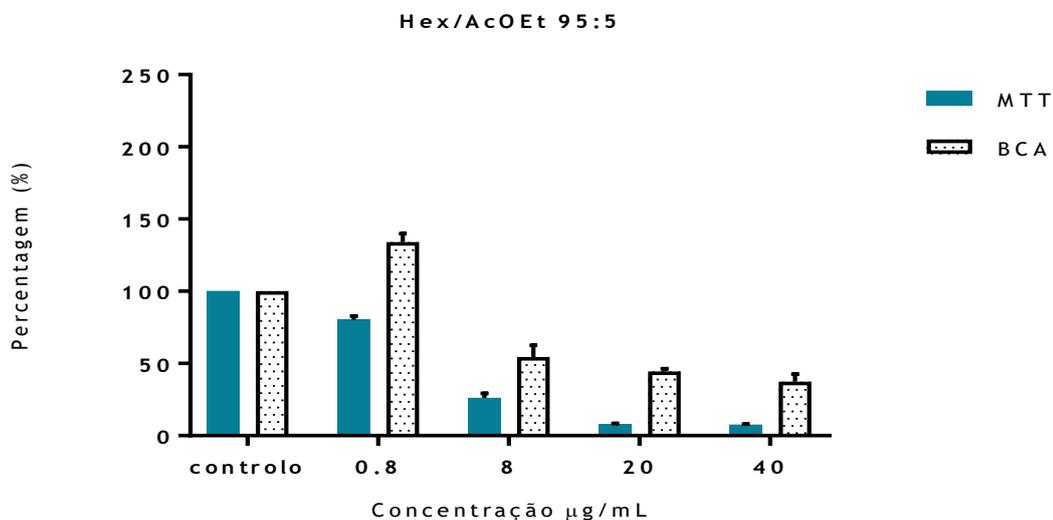


Figura 20: Viabilidade celular e Doseamento de Proteínas das células MCF-7 incubadas com a fração Hex/AcOEt 95:5 em concentrações de 0,8 µg/mL, 8 µg/mL, 20 µg/mL e 40 µg/mL durante 48h. Os dados estão expressos em percentagem e são comparados com o controlo; as barras representam as médias e as linhas o desvio padrão da média associado.

Examinando os resultados obtidos relativamente aos ensaios de MTT e ao ensaio de BCA efetuados nas MCF-7, na concentração de 0,8 µg/mL o ensaio de BCA mostra que há um aumento no número de células relativamente ao controlo, no entanto estas mesmas estão a perder a sua viabilidade. O ensaio de MTT, nesta concentração, mostra uma diminuição na viabilidade celular relativamente ao controlo. Desta forma conclui-se que na concentração de 0,8 µg/mL, apesar do aumento das células, estas parecem estar a perder a sua qualidade. Na concentração de 8 µg/mL o ensaio de BCA mostra que há uma diminuição de ≈50 % no número de proteínas e uma diminuição bastante significativa na viabilidade celular. Ou seja, além de haver uma diminuição significativa no número de células, estas estão pouco viáveis. Relativamente às concentrações de 20 µg/mL e 40 µg/mL, os resultados são parecidos. A diminuição na percentagem das células nas duas concentrações é mais de 50 % em relação ao controlo, segundo o ensaio de BCA. Apresentam também uma diminuição drástica na viabilidade celular de acordo com o ensaio de MTT. As células que conseguiram sobreviver, em ambas as concentrações, não são viáveis, estão praticamente mortas.

Em suma conclui-se que a baixas concentrações, mais precisamente na concentração de 0,8 µg/mL, a fração de Hex/AcOEt 95:5 nas MCF-7 serve como estímulo para o crescimento das células (segundo o resultado da viabilidade). Nas concentrações de 8 µg/mL, 20 µg/mL e 40 µg/mL a toxicidade é bastante evidente nos resultados obtidos, apresenta morte celular acompanhada da diminuição da viabilidade celular.

3.2.3. Resultados dos ensaios da fração Hex/AcOEt 8:2 nas MCF-7

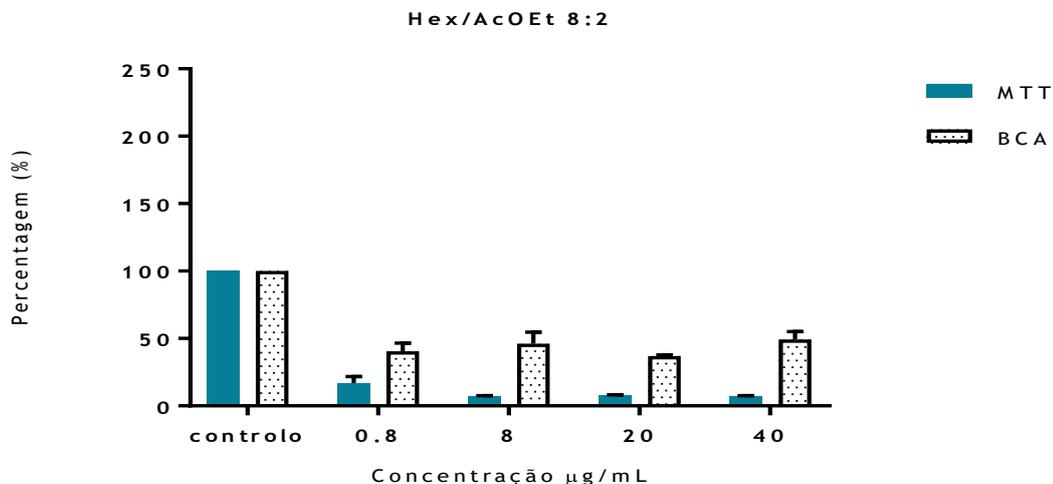


Figura 21: Viabilidade celular e Doseamento de Proteínas das células MCF-7 incubadas com a fração Hex/AcOEt 8:2 em concentrações de 0,8 µg/mL, 8 µg/mL, 20 µg/mL e 40 µg/mL durante 48h. Os dados estão expressos em percentagem e são comparados com o controlo; as barras representam as médias e as linhas o desvio padrão da média associado.

Ao contrário do que acontece na fração anterior (Hex/AcOEt 95:5), aqui na concentração de 0,8 µg/mL o ensaio de BCA mostra uma diminuição no número de células em relação ao controlo. No ensaio de MTT também há uma diminuição de aproximadamente 80 % na viabilidade celular relativamente ao controlo. Assim, verificou-se que as células que resistiram ao ensaio são pouco viáveis. Nas restantes concentrações, 8 µg/mL, 20 µg/mL e 40 µg/mL os resultados são parecidos tanto no ensaio de BCA como no ensaio de MTT. À exceção da concentração de 20 µg/mL, que apresenta uma percentagem relativamente menor no ensaio de BCA. De qualquer modo, é visível que em todas as concentrações a fração Hex/AcOEt 8:2 é tóxica para as MCF-7, pois os resultados apresentam uma diminuição significativa no número de células e uma diminuição drástica na viabilidade celular, em todas as concentrações.

3.2.4. Resultados dos ensaios da fração Hex/AcOEt 1:1 nas MCF-7

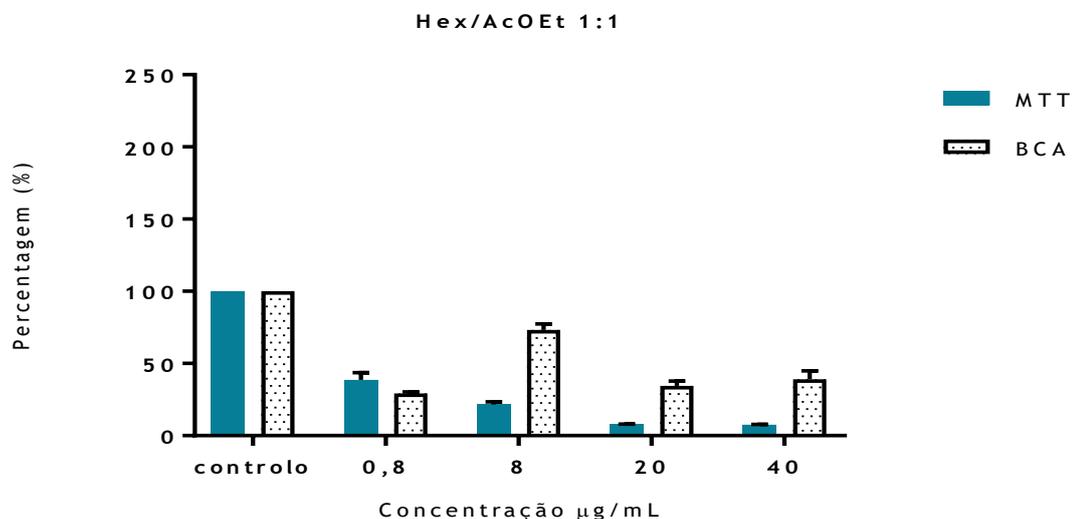


Figura 22: Viabilidade celular e Doseamento de Proteínas das células MCF-7 incubadas com a fração Hex/AcOEt 1:1 em concentrações de 0,8 µg/mL, 8 µg/mL, 20 µg/mL e 40 µg/mL durante 48h. Os dados estão expressos em percentagem e são comparados com o controlo; as barras representam as médias e as linhas o desvio padrão da média associado.

Analisando os resultados obtidos no ensaio com a fração Hex/AcOEt 1:1, verifica-se toxicidade em todas as concentrações. Na concentração de 0,8 µg/mL, houve uma diminuição de ~60 % no número das células e a viabilidade das células que resistiram ao ensaio são reduzidas. Na concentração de 8 µg/mL cerca de 60 % das células apresentam uma viabilidade baixa. Os resultados relativamente às concentrações de 20 µg/ml e 40 µg/mL são semelhantes, apresentam uma percentagem de sobrevivência das células baixa com uma viabilidade celular quase nula.

3.2.5. Resultados dos ensaios da fração AcOEt nas MCF-7

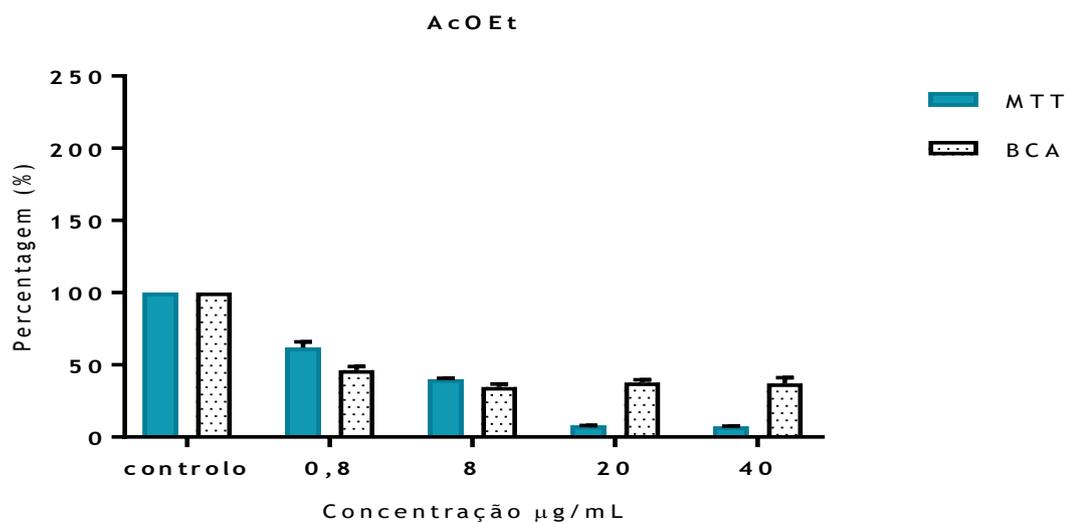


Figura 23: Viabilidade celular e Doseamento de Proteínas das células MCF-7 incubadas com a fração AcOEt em concentrações de 0,8 µg/mL, 8 µg/mL, 20 µg/mL e 40 µg/mL durante 48h. Os dados estão expressos em percentagem e são comparados com o controlo; as barras representam as médias e as linhas o desvio padrão da média associado.

Os resultados dos ensaios com a fração AcOEt mostram que esta fração também é tóxica para as MCF-7, visto que há uma diminuição nos valores nos ensaios de MTT e BCA relativamente ao controlo. Na concentração de 0,8 µg/mL, resistiram ao ensaio ≈60 % das células, estas apresentam uma viabilidade acima dos 50 %. Na concentração de 8 µg/mL, o valor do ensaio de MTT e o valor do ensaio de BCA, por serem próximos um do outro, apontam para uma possível situação citostática. Nas concentrações de 20 µg/ml e 40 µg/mL, estamos claramente perante uma situação citotóxica pois as células que sobreviveram em ambas as concentrações tem uma viabilidade celular bastante reduzida. Em ambas as concentrações há uma diminuição no número das células abaixo de 50 % e uma viabilidade quase nula.

3.2.6. Resultados dos ensaios de MTT nas NHDF

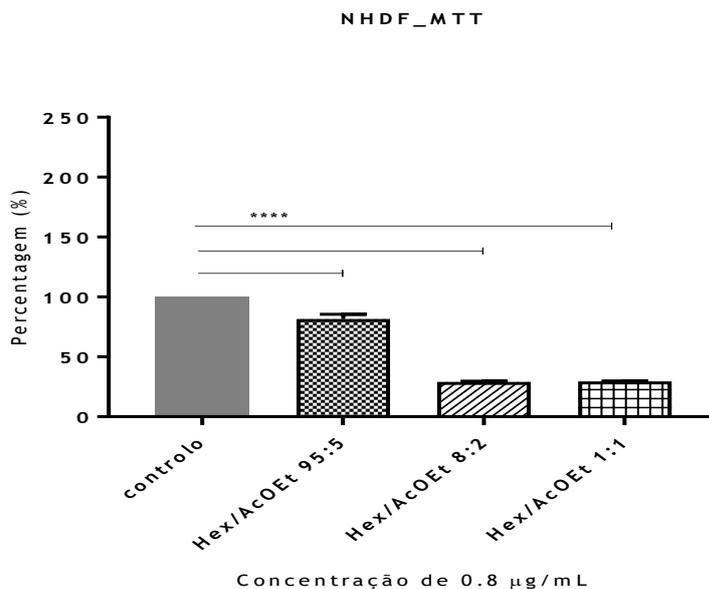


Figura 24: Viabilidade celular das células NHDF incubadas com as frações Hex/AcOEt 95:5, Hex/AcOEt 8:2 e Hex/AcOEt 1:1 na concentração de 0,8 µg/mL durante 48h. Os dados estão expressos em percentagem e são comparados com o controlo; as barras representam as médias e as linhas o desvio padrão da média associado. **** $p < 0.0001$ versus controlo (teste ANOVA)

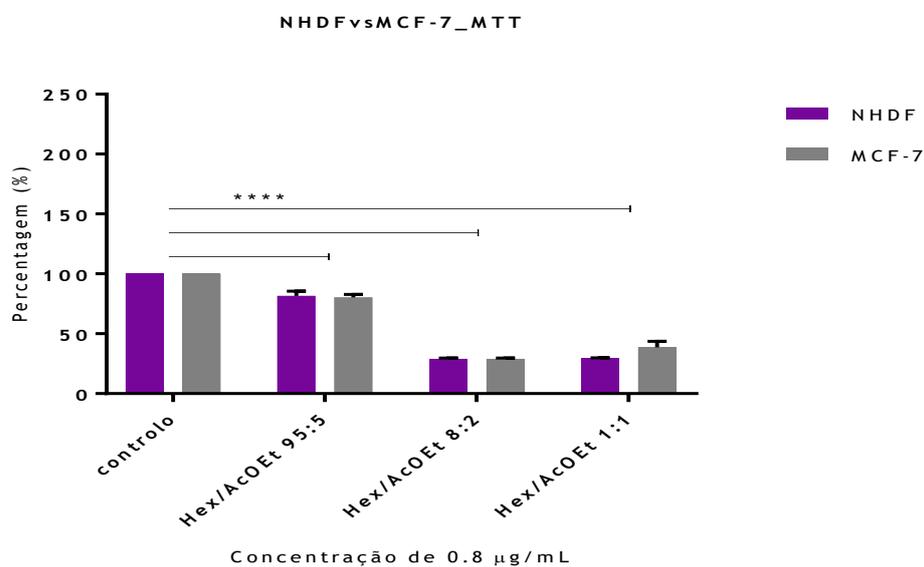


Figura 25: Viabilidade celular das células NHDF e MCF-7 incubadas com as frações Hex/AcOEt 95:5, Hex/AcOEt 8:2 e Hex/AcOEt 1:1 na concentração de 0,8 µg/mL durante 48h. Os dados estão expressos em percentagem e são comparados com o controlo; as barras representam as médias e as linhas o desvio padrão da média associado. **** $p < 0.0001$ versus respetivos controlos (teste ANOVA).

De um modo geral os resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular das NHDF praticamente não diferem dos resultados obtidos nas MCF-7. Os resultados dos ensaios feitos com a fração Hex/AcOEt 95:5 nas NHDF e nas MCF-7 são bastante próximos, ambos com valores de $\approx 80\%$. Estes valores mostram que houve uma diminuição de $\approx 20\%$ na viabilidade das células.

Os resultados dos ensaios feitos com a fração Hex/AcOEt 8:2 nas NHDF e nas MCF-7 também são semelhantes, com valores de $\approx 30\%$. A viabilidade celular diminuiu em $\approx 70\%$ tanto nas NHDF como nas MCF-7.

Já nos ensaios realizados com a fração Hex/AcOEt 1:1 a diferença entre os ensaios de viabilidade celular feito nas NHDF e nas MCF-7 apresentam uma ligeira diferença. Nas NHDF o valor da viabilidade celular é $\approx 30\%$ o que indica uma perda na viabilidade de $\approx 70\%$, enquanto que nas MCF-7 o valor da viabilidade celular é próximo dos 40% , o que indica uma perda na viabilidade celular de $\approx 60\%$.

Capítulo 4 - Conclusões e perspectivas futuras

Este trabalho teve como alvo de estudo a *Paropsia brazzeana* Bail. As folhas desta planta foram extraídas com metanol obtendo-se o extrato bruto de metanol. Uma parte do extrato de metanol foi separado em frações por um processo de cromatografia em coluna húmida com eluentes de diferentes polaridades, do qual foram obtidas nove frações com diferentes polaridades. Destas nove frações, sete foram submetidas a uma avaliação química de modo a identificar os compostos presentes na planta.

Apenas em três das sete frações obtidas (Hex/AcOEt 95:5; Hex/AcOEt 1:1; AcOEt) conseguiu-se identificar quatro compostos, concretamente o geraniol, β -sitosterol, ácido octanóico e o ácido 14-nor-7,8-seco-10-oxocadinano-1(6),3-dienóico. Em relação ao último composto propõe-se que o mesmo seja considerado como um novo produto natural.

Sugere-se, para o futuro, se realize um estudo das frações nas quais não se conseguiu isolar nenhum composto, além do estudo das frações que não foram analisadas.

Das frações obtidas, quatro (Hex/AcOEt 95:5; Hex/AcOEt 8:2; Hex/AcOEt 1:1; AcOEt) foram utilizados para testar a sua toxicidade nas NHDF e nas MCF-7. Desta forma também é pertinente a realização de estudos citotóxicos com as frações não testadas nas células utilizadas nos estudos.

Os resultados obtidos nos ensaios para determinar a citotoxicidade nas MCF-7 e NHDF mostram que, de um modo geral, que os valores da viabilidade celular são sempre menores que os valores da proliferação nas células estudadas, o que pode indicar uma provável indução de morte por apoptose.

Outra conclusão retirada dos resultados obtidos nos ensaios feitos nas células utilizadas é a inexistência da toxicidade seletiva, pelo menos nas concentrações e nos períodos de tempos utilizados. Por fim, os resultados obtidos indicam que os compostos existentes nas frações Hex/AcOEt 8:2 e Hex/AcOEt 1:1 parecem ser mais tóxicos que os compostos existentes na fração Hex/AcOEt 95:5.

Desta forma sugere-se futuramente um estudo completo dos compostos presentes em cada uma das frações. Também é importante estudar a toxicidade e a proliferação em cada fração nas concentrações entre 0 e 0,8 $\mu\text{g/mL}$ e durante um período de tempo mais longo.

Bibliografia

- Adnan, M., A. Tariq, S. Mussarat, S. Begum, E. N. M. Abd and R. Ullah (2015). "Ethnogaecological assessment of medicinal plants in Pashtun's tribal society." BioMed Research International **2015**: 196475.
- Ahmed, F., M. Ali and O. Singh (2006). "New compounds from Commiphora myrrha (Nees) Engl." Pharmazie **61**: 728-731.
- Asi, N., K. Mohammed, Q. Haydour, M. R. Gionfriddo, O. L. M. Vargas, L. J. Prokop, S. S. Faubion and M. H. Murad (2016). "Progesterone vs. synthetic progestins and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis." Systematic Reviews **5**: 121.
- Bacha, K., Y. Tariq, F. Gebreyesus, S. Zerihun, A. Mohammed, N. Weiland-Bräuer, R. A. Schmit and M. Mulat (2016). "Antimicrobial and anti-Quorum Sensing activities of selected medicinal plants of Ethiopia: Implication for development of potent antimicrobial agents." BMC Microbiology **16**: 139-148.
- Baran-Gale, J., J. E. Purvis and P. Sethupathy (2016). "An integrative transcriptomics approach identifies miR-503 as a candidate master regulator of the estrogen response in MCF-7 breast cancer cells." RNA Society **22**: 1592-1603.
- Bing, L., H. XinPing, H. YunLong, C. TingTing, P. BoYa, G. NingNing, J. ZhenChao, J. TieLiu, Z. Na, W. ZhuLin and J. GuangYi (2016). "Ethacrynic acid improves the antitumor effects of irreversible epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in breast cancer." Oncotarget.
- Breteler, F. J. (2003). "Novitates gabonenses. A new species of Paropsia (Passifloraceae) from Gabon." Adansonia **25**: 247-249.
- Brito Filho, S. G., M. G. Fernandes, O. S. Chaves, M. C. O. Chaves, F. B. Araruna, C. Eiras, J. R. S. A. Leite, M. F. Agra, R. Braz-Filho and M. F. V. Souza (2014). "Chemical constituents isolated from Turnera Subulata Sm. and electrochemical characterization of Phaeophytin B." Química Nova **37**.
- Brown, G. D., G. Y. Liang and L. K. Sy (2003). "Terpenoids from the seeds of Artemisia annua." Phytochemistry **64**: 303-323.
- Cerqueira-Silva, C. B., O. N. Jesus, E. S. Santos, R. X. Correa and A. P. Souza (2014). "Genetic breeding and diversity of the genus Passiflora: progress and perspectives in molecular and genetic studies." International Journal of Molecular Sciences **15**(8): 14122-14152.
- Cerqueira-Silva, C. B., E. S. Santos, A. M. Souza, G. M. Mori, E. J. Oliveira, R. X. Correa and A. P. Souza (2012). "Development and characterization of microsatellite markers for the wild South American Passiflora cincinnata (Passifloraceae)." American Journal of Botany **99**: 170-172.
- Cervi, A. C. (1997). "Passifloraceae do Brasil. Estudo do Gênero Passiflora L., Subgênero Passiflora." Fontqueria **45**: 1-92.
- Coelho, C. M. C. (2008). Mulheres com cancro da mama em tratamento com quimioterapia: Contributos para a compreensão da sua qualidade de vida Mestrado, Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar Universidade do Porto.
- Costa, E. C. S., T. S. Nunes and J. I. M. Melo (2015). "Flora da Paraíba, Brasil: Passifloraceae sensu stricto." Rodriguésia **66**: 271-284.

- Costa, G. M., P. A. Cardenas, A. C. Gazola, D. M. Aragon, L. Castellanos, F. H. Reginatto, F. A. Ramos and E. P. Schenkel (2015). "Isolation of C-glycosylflavonoids with alpha-glucosidase inhibitory activity from *Passiflora bogotensis* Benth by gradient high-speed counter-current chromatography." Journal of Chromatography B **990**: 104-110.
- Devaki, K., U. Beulah and V. K. Gopalakrishnan (2012). "Effect of aqueous extract of *Passiflora edulis* on Biochemical and Hematological Parameters of Wistar Albino Rats." Toxicology International **19**: 63-67.
- Drummond, R. B. (1975). "A list of trees, shrubs and woody climbers indigenous or naturalised in Rhodesia." Kirkia **10**: 262.
- Dulinska-Molak, I., M. Pasikowska, K. Pogoda, M. Lewandowska, I. Eris and M. Lekka (2014). "Age-Related Changes in the Mechanical Properties of Human Fibroblasts and Its Prospective Reversal After Anti-Wrinkle Tripeptide Treatment." International Journal of Peptide Research **20**: 77-85.
- Echeverri, F., V. Arango, W. Quiñones, F. Torres, G. Escobar, Y. Rosero and R. Archbold (2001). "Passifloricins, polyketides α -pyrones from *Passiflora foetida* resin." Phytochemistry **56**: 881-885.
- Ejiri, H., T. Nomura, M. Hasegawa, C. Tatsumi, M. Imai, S. Sakakibara and H. Terashi (2015). "Use of synthetic serum-free medium for culture of human dermal fibroblasts to establish an experimental system similar to living dermis." Cytotechnology **67**: 507-514.
- Enmark, E. and J.-Å. Gustafsson (1999). "Oestrogen receptors - an overview." Journal of Internal Medicine **246**: 133-138.
- Farias, V. d., L. T. Maranhão, V. C. Mushner and P. Soffiatti (2016). "Anatomia foliar de *Passiflora* subgênero *Decaloba* (Passifloraceae): implicações taxonômicas." Rodriguésia **67**: 29-44.
- Fernandes, R. A. (1978). "Passifloraceae Flora Zambesiaca." **4**: 372 - 374.
- Ferreira, D., F. Adegas and R. Chaves (2013). The Importance of Cancer Cell Lines as in vitro Models in Cancer Methylation Analysis and Anticancer Drugs Testing.
- Golpour, M., H. A. Niaki, H. R. Khorasani, A. Hajian, R. Mehrasa and A. Mostafazadeh (2014). "Human Fibroblast Switches to Anaerobic Metabolic Pathway in Response to Serum Starvation: A Mimic of Warburg Effect." Spring **3**: 2.
- Green, B. H. and S. H. Taplin (2002). "Breast Cancer Screening Controversies." Gstraunthaler, G. (2003). "Alternatives to the Use of Fetal Bovine Serum: Serum-free Cell Culture." ALTEX **20**.
- Guerrini, A., D. Rossi, G. Paganetto, M. Tognolini, M. Muzzoli, C. Romagnoli, F. Antognoni, S. Vertuani, A. Medici, A. Bruni, C. Useli, E. Tamburini, R. Bruni and G. Sacchetti (2011). "Chemical characterization (GC/MS and NMR Fingerprinting) and bioactivities of South-African *Pelargonium capitatum* (L.) L'Her. (Geraniaceae) essential oil." Chemistry & Biodiversity **8**: 624-642.
- Huang, T., L. Mian and B. Huo (2010). "Competitive Binding to Cuprous Ions of Protein and BCA in the Bicinchoninic Acid Protein Assay" The Open Biomedical Engineering Journal **4**: 271-278.
- Huang, W., B. Newman, R. C. Millikan, M. J. Schell, B. S. Hulka and P. G. Moorman (2000). "Hormone-related Factors and Risk of Breast Cancer in Relation to Estrogen Receptor and Progesterone Receptor Status." American Journal of Epidemiology **151**: 7.
- Judd, W. S., C. S. Campbell, E. A. Kellogg, P. F. Stevens and M. J. Donoghue (2007). *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*, Sinauer Associates.

- Komboj, A. and A. K. Saluja (2011). "Isolation of Stigmasterol and β -sitosterol from Petroleum Ether Extract of Aerial Part Of *Ageratum Conyzoides* (Asteraceae)." International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences **3**: 94-96.
- Krishnaveni, A. and S. R. Thaakur (2008). "Pharmacognostical and preliminary phytochemical studies of *Passiflora foetida* ." **17**.
- Kumar, M., M. A. Sheikh and R. W. Bussmann (2011). "Ethnomedicinal and ecological status of plants in Garhwal Himalaya, India." Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine **7**: 32.
- Kwon, H. C., S. U. Choi and K. R. Lee (2001). "Phytochemical Constituents of *Artemisia stolonifera*." Archives of Pharmacal Research **24**: 312-315.
- Lade, B. D., A. S. Patil and H. M. Paikrao (2014). "Efficient genomic DNA extraction protocol from medicinal rich *Passiflora foetida* containing high level of polysaccharide and polyphenol." SpringerPlus **3**: 457.
- Lam, K. Y., A. P. Ling, R. Y. Koh, Y. P. Wong and Y. H. Say (2016). "A Review on Medicinal Properties of Orientin." Adv Pharmacol Sci **2016**: 4104595.
- Levenson, A. S. and V. C. Jordan (1997). "MCF-7: The First Hormone-responsive Breast Cancer Cell Line." CANCER RESEARCH **57**: 3071-3078.
- Lu, J., J. H. Guo, X. L. Tu, C. Zhang, M. Zhao, Q. W. Zhang and F. H. Gao (2016). "Tiron Inhibits UVB-Induced AP-1 Binding Sites Transcriptional Activation on MMP-1 and MMP-3 Promoters by MAPK Signaling Pathway in Human Dermal Fibroblasts." PLoS One **11**: e0159998.
- Man, G., M. Lingling, L. Mingxia, L. Chenggang, Y. Cunzhi, Y. Hong, Y. Yongxiang, W. Yizheng, Q. Xinming and R. Jin (2016). "miR-145 sensitizes breast cancer to doxorubicin by targeting multidrug resistance-associated protein-1." Oncotarget.
- Marinho, A. M. R., P. S. B. Marinho and E. Rodrigues Filho (2009). "Esteroides produzidos por *Penicillium herquei*, um fungo endofítico isolado dos frutos de *Melia azedarach* (MELIACEAE)." Química Nova **32**: 1710-1712.
- Markowitz, J. S., L. L. Von Moltke and J. L. Donovan (2008). "Predicting interactions between conventional medications and botanical products on the basis of in vitro investigations." Molecular Nutrition & Food Research **52**: 747-754.
- Mondin, C. A., A. C. Cervi and G. R. P. Moreira (2011). "Sinopse das espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) do Rio Grande do Sul, Brasil." Brazilian Journal of Biosciences **9**: 3-27.
- Montero, D. A., M. O. Marques, L. M. Meletti, M. H. Kampen and S. C. Polozzi (2016). "Floral scent of Brazilian *Passiflora*: five species analysed by dynamic headspace." Anais da Academia Brasileira de Ciências **88**: 1191-1200.
- Muschner, V. C., A. P. Lorenz, A. C. Cervi, S. L. Bonatto, T. T. Souza-Chies, F. M. Salzano and L. B. Treitas (2003). "A FIRST MOLECULAR PHYLOGENETIC ANALYSIS OF PASSIFLORA (PASSIFLORACEAE)." American Journal of Botany **90**: 1229-1238.
- Nieto-Jiménez, C., A. Alcaraz-Sanabria, R. Páez, J. Pérez-Peña, V. Corrales-Sánchez, A. Pandiella and A. Ocaña (2016). "DNA-damage related genes and clinical outcome in hormone receptor positive breast cancer." Oncotarget.
- Osako, T., K. Torii and Y. Uozumi (2015). "Aerobic flow oxidation of alcohols in water catalyzed by platinum nanoparticles dispersed in an amphiphilic polymer." RSC Advances **5**: 2647-2654.
- Osorio, C., C. Duque and Y. Fujimoto (2000). "Oxygenated monoterpenoids from *Badea quadrangularis* fruit pulp." Phytochemistry **53**: 97-101.

- Ozkan, G., S. Kamiloglu, T. Ozdal, D. Boyacioglu and E. Capanoglu (2016). "Potential Use of Turkish Medicinal Plants in the Treatment of Various Diseases." Molecules **21**: 257.
- Pan, C., S. Weng, Y. Duan, L. Ding, S. Zhang and J. Huang (2016). "Interferon-alpha reduces the gefitinib sensitivity of human non-small cell lung cancer." Contemporary Oncology **20**: 320-326.
- Perez-Perez, A., F. Sanchez-Jimenez, T. Vilarino-Garcia, L. de la Cruz, J. A. Virizuela and V. Sanchez-Margalet (2016). "Sam68 Mediates the Activation of Insulin and Leptin Signalling in Breast Cancer Cells." PLoS One **11**.
- Perou, C. M., T. Sørlie, M. B. Eisen, M. Van de Rijn, S. S. Jeffrey, C. A. Rees, J. R. Pollack, D. T. Ross, H. Johnsen, L. A. Akslen, Ø. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S. X. Zhu, P. E. Lønning, A. Børresen-Dale, P. O. Brown and D. Botstein (2000). "Molecular portraits of human breast tumours." Nature **406**.
- Quan, C., M. K. Cho, D. Perry and T. Quan (2015). "Age-associated reduction of cell spreading induces mitochondrial DNA common deletion by oxidative stress in human skin dermal fibroblasts: implication for human skin connective tissue aging." Journal of Biomedical Science **22**: 62.
- Rahman, A. and V. U. Ahmad (1992). ¹³C-NMR of Natural Products. P. Press. New York.
- Rajput, A. P. and T. A. Rajput (2012). "Isolation of Stigmasterol and β -sitosterol from Chloroform Extract of Leaves of *Corchorus fascicularis* Lam." International Journal of Biological Chemistry **6**: 130-135.
- Ramaiya, S. D., J. S. Bujang and M. H. Zakaria (2014). "Assessment of total phenolic, antioxidant, and antibacterial activities of *Passiflora* species." Scientific World Journal **2014**: 167309.
- Ramaiya, S. D., J. S. Bujang and M. H. Zakaria (2014). "Genetic diversity in *Passiflora* species assessed by morphological and its sequence analysis." Scientific World Journal **2014**: 598313.
- Ravdin, P. M., K. A. Cronin, N. Howlader, C. D. Berg, R. T. Chlebowski, E. J. Feuer, B. K. Edwards and D. A. Berry (2007). "The Decrease in Breast-Cancer Incidence in 2003 in the United States." The new England Journal of Medicine **356**: 16.
- Rebelo, V., L. Rolim, E. Carqueja and S. Ferreira (2007). "Avaliação da qualidade de vida em mulheres com cancro da mama: um estudo exploratório com 60 mulheres portuguesas." Avaliação, Saúde & doenças **8**: 13-32.
- Riss, T. L., R. A. Moravec, A. L. Niles, S. Duellman, H. A. Benink, T. J. Worzella and L. Minor (2013). Assay Guidance Manual
Cell Viability Assays.
- Ruijter, A. (1886). "Paropsia brazzeana Baill." Bulletin mensuel de la Société linnéenne **1**: 611.
- Sano, S., K. Sugiyama, T. Ito, Y. Katano and A. Ishihata (2011). "Identification of the strong vasorelaxing substance scirpusin B, a dimer of piceatannol, from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds." Journal of Agricultural and Food Chemistry **59**: 6209-6213.
- Sasikala, V., S. Saravanan and T. Parimelazhagan (2011). "Analgesic and anti-inflammatory activities of *Passiflora foetida* L." Asian Pacific Journal of Tropical Medicine: 600-603.
- Sciubba, D. M., C. R. Goodwin, A. Yurter, D. Ju, Z. L. Gokaslan, C. Fisher, L. D. Rhines, M. G. Fehlings, D. R. Fourny, E. Mendel, I. Laufer, C. Bettgowda, S. R. Patel, Y. R. Rampersaud, A. Sahgal, J. Reynolds, D. Chou, M. H. Weber and M. J. Clarke (2016). "A Systematic Review of Clinical Outcomes and Prognostic Factors for Patients Undergoing Surgery for Spinal Metastases Secondary to Breast Cancer." Global Spine Journal **6**: 482-496.

- Setshogo, M. P. (2005). "Preliminary checklist of the plants of Botswana." Sabonet, Pretoria and Gaborone **37**: 91.
- Shah, A. and B. J. Eikmanns (2016). "Transcriptional Regulation of the beta-Type Carbonic Anhydrase Gene *bca* by RamA in *Corynebacterium glutamicum*." PLoS One **11**: e0154382.
- Shedd, A., J. Vanuchi, Y. Dorce, J. Kiernan and W. Kadima "Clinical studies of the effect(s) of *Paropsia brazzeana* on patients with type 2 diabetes."
- Shekhawat, M. S., M. Manokari and C. P. Ravindran (2015). "An Improved Micropropagation Protocol by Ex Vitro Rooting of *Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg. through Nodal Segment Culture." Scientifica **2015**: 578676.
- Silva, M. A., M. M. Souza, G. S. Silva, C. A. Melo, R. X. Correa, I. S. Araujo and L. D. Conceicao (2014). "Analysis of transferability of microsatellite primers (SSR) in wild *Passiflora* species and intraspecific genetic diversity in *Passiflora alata*." Genetics and Molecular Research **13**: 5908-5918.
- Silva, P. A. and S. S. Riul (2011). "Cancro de mama: fatores de risco e detecção precoce." Revista Brasileira de Enfermagem **64**: 1016-1021.
- Simbo, D. J. (2010). "An ethnobotanical survey of medicinal plants in Babungo, Northwest Region, Cameroon." Simbo Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine **2010** **6**: 8.
- Simirgiotis, M. J., G. Schmeda-Hirschmann, J. Borquez and E. J. Kennelly (2013). "The *Passiflora tripartita* (Banana Passion) fruit: a source of bioactive flavonoid C-glycosides isolated by HSCCC and characterized by HPLC-DAD-ESI/MS/MS." Molecules **18**: 1672-1692.
- Simões, C. M. O., E. P. Schenkel, G. Gosman, J. C. P. Mello, L. A. Mentz and P. R. Petrovick (2007). Farmacognosia: da planta ao medicamento. P. A. E. d. UFSCURGS.
- Sousa, A. G., M. M. Souza, C. A. Melo and G. A. Sodre (2015). "ISSR markers in wild species of *Passiflora* L. (Passifloraceae) as a tool for taxon selection in ornamental breeding." Genetics and Molecular Research **14**: 18534-18545.
- Stevenson, S., D. T. Sharpe and M. J. Thornton (2009). "Effects of oestrogen agonists on human dermal fibroblasts in an in vitro wounding assay." Experimental Dermatology **18**: 988-990.
- Sunitha, M. and K. Devaki (2019). "Antioxidant Activity of *Passiflora edulis* Sims Leaves." Indian Journal of Pharmaceutical Sciences **71**: 310-311.
- Swamy, M. K. and U. R. Sinniah (2015). "A Comprehensive Review on the Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of *Pogostemon cablin* Benth.: An Aromatic Medicinal Plant of Industrial Importance." Molecules **20**: 8521-8547.
- Tapp, E. J., I. Cummins, D. Brassington and R. Edwards (2008). "Determination and Isolation of a Thioesterase from Passion Fruit (*Passiflora edulis* Sims) That Hydrolyzes Volatile Thioesters." Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**: 6623-6630.
- Teschke, R. and A. Eickhoff (2015). "Herbal hepatotoxicity in traditional and modern medicine: actual key issues and new encouraging steps." Front Pharmacol **6**: 72.
- Timberlake, J. R. C., S.L. (2004). Biodiversity of the Four Corners Area: Technical Reviews Volume Two. **15**: 221.
- Tsobou, R., P. M. Mapongmetsem and P. Van Damme (2016). "Medicinal Plants Used for Treating Reproductive Health Care Problems in Cameroon, Central Africa." Economic Botany **70**: 145-159

Van Dijk, M. A. J., A. N. Floore, K. I. M. Kloppenborg and L. J. Van't Veer (1997). "A Functional Assay in Yeast for the Human Estrogen Receptor Displays Wild-Type and Variant Estrogen Receptor Messenger RNAs Present in Breast Carcinoma." Cancer Research **57**: 3478-3485.

Wang, C., F. Q. Xu, J. H. Shang, H. Xiao, W. W. Fan, F. W. Dong, J. M. Hu and J. Zhou (2013). "Cycloartane triterpenoid saponins from water soluble of *Passiflora edulis* Sims and their antidepressant-like effects." Journal of Ethnopharmacology **148**: 812-817.

Yue, W., J. P. Wang, Y. Li, P. Fan, G. Liu, N. Zhang, M. Conaway, H. Wang, K. S. Korach, W. Bocchinfuso and R. Santen (2010). "Effects of estrogen on breast cancer development: Role of estrogen receptor independent mechanisms." International Journal of Cancer **127**: 1748-1757.

Yuldasheva, L. N., E. B. Carvalho, M.-T. J. A. Catanho and O. V. Krasilnikov (2005). "Cholesterol-dependent hemolytic activity of *Passiflora quadrangularis* leaves." Brazilian Journal of Medical and Biological Research **38**: 1061-1070.

Zeraik, M. L., D. Serteyn, G. Deby-Dupont, J. N. Wauters, M. Tits, J. H. Yariwake, L. Angenot and T. Franck (2011). "Evaluation of the antioxidant activity of passion fruit (*Passiflora edulis* and *Passiflora alata*) extracts on stimulated neutrophils and myeloperoxidase activity assays." Food Chem **128**: 259-265.

Zhang, J., R. Koike, A. Yamamoto, M. Ukiya, M. Fukatsu, N. Banno, M. Miura, S. Motohashi, H. Tokuda and T. Akihisa (2013). "Glycosidic Inhibitors of Melanogenesis from Leaves of *Passiflora edulis*." Chemistry & Biodiversity **10**.

Anexo

Geraniol (N1)

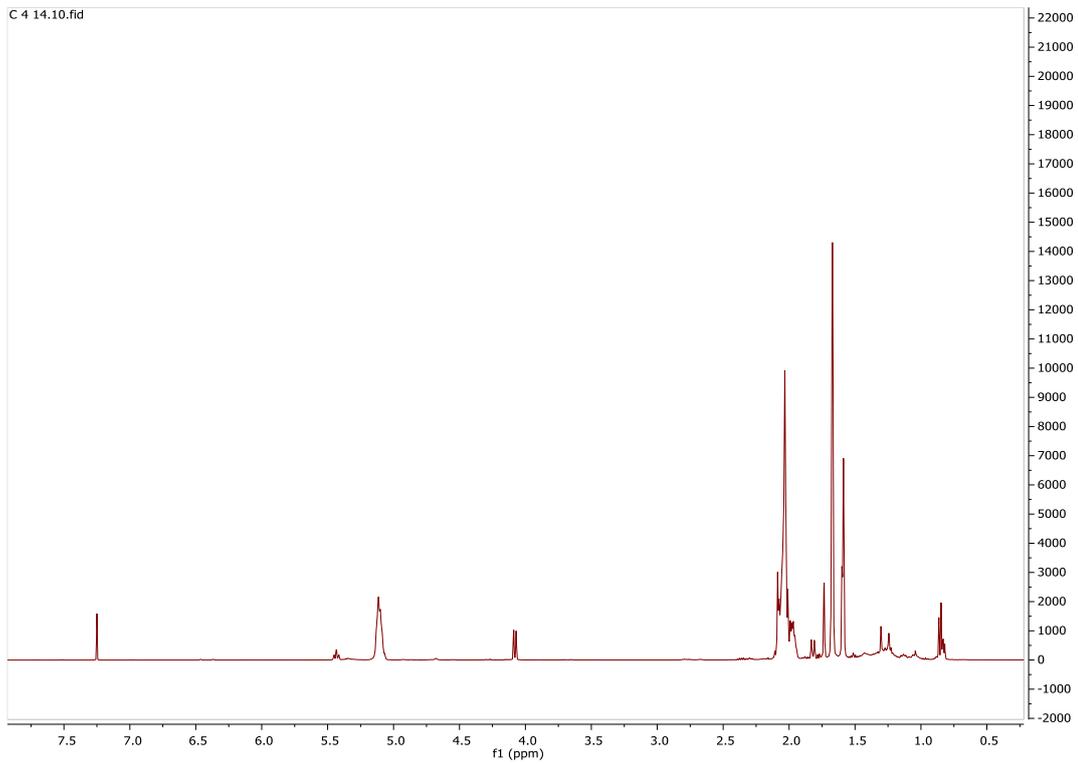


Figura E1: Espectro RMN ¹H do N1.

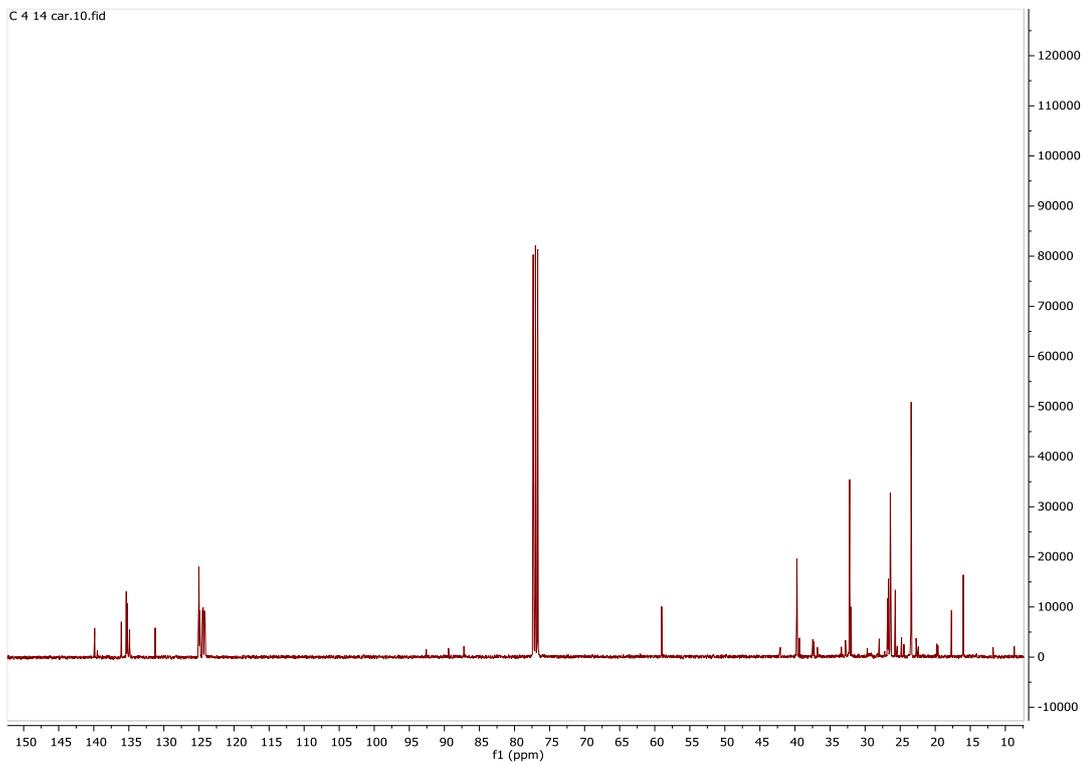


Figura E2: Espectro RMN ¹³C do N1.

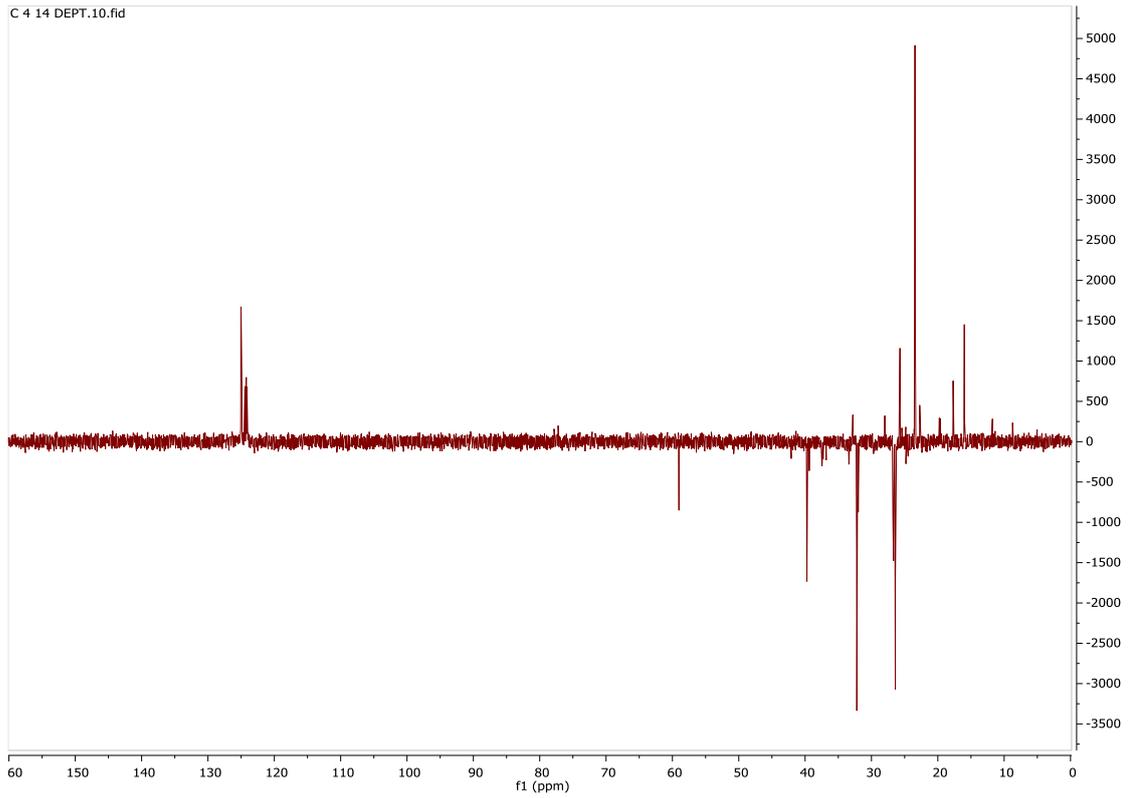


Figura E3: Espectro do DEPT do N1.

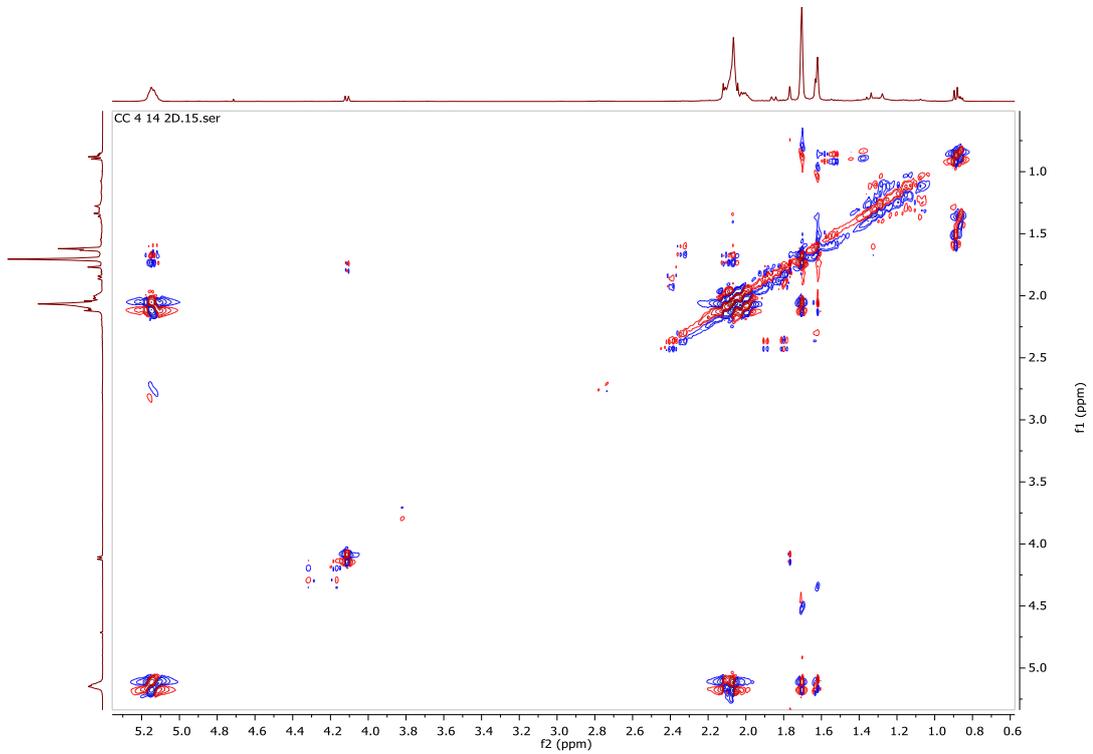


Figura E4: Espectro 1H-1H COSY do N1.

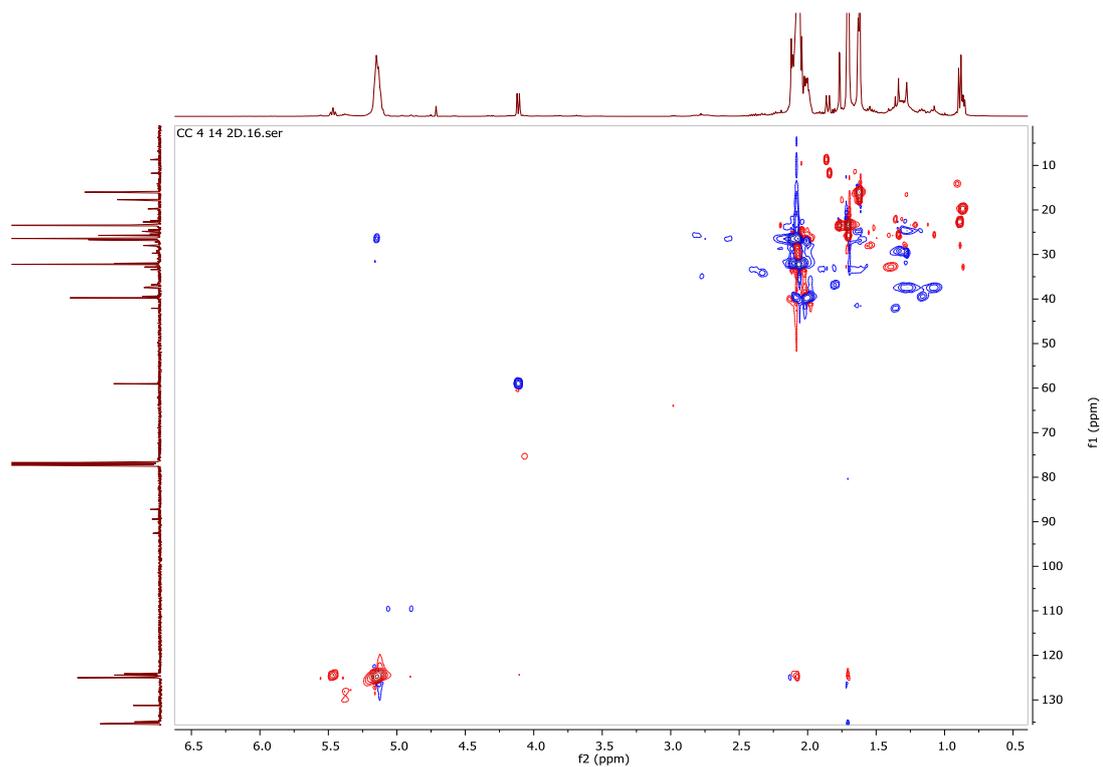


Figura E5: Espectro HSQC do N1.

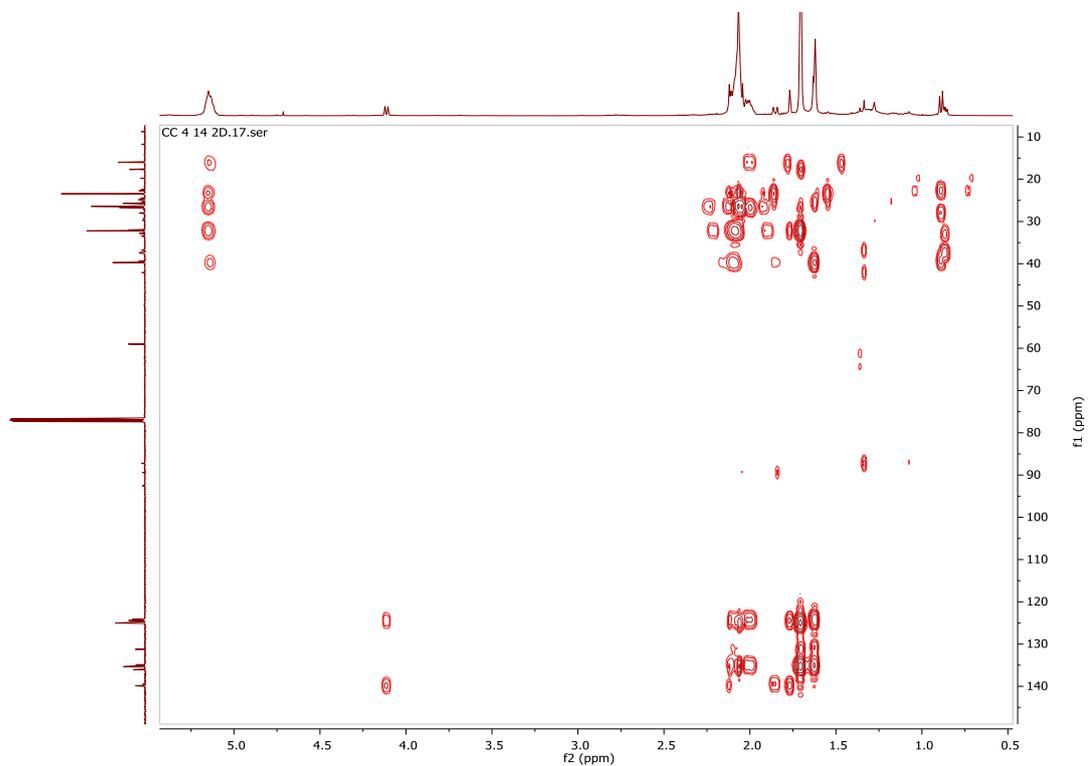


Figura E6: Espectro HMBC do N1.

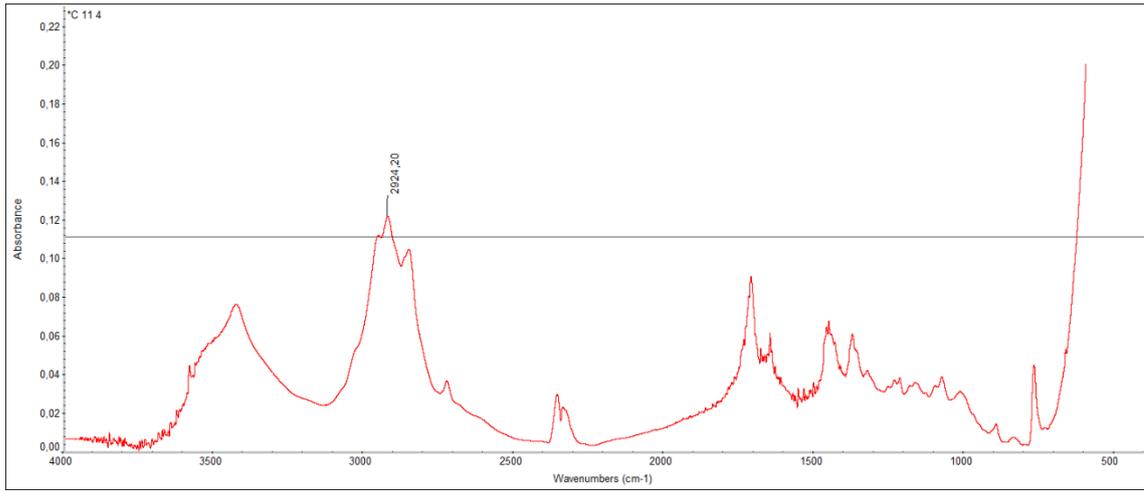


Figura E7: Espectro Infravermelho do N1.

β -sitosterol (N2)

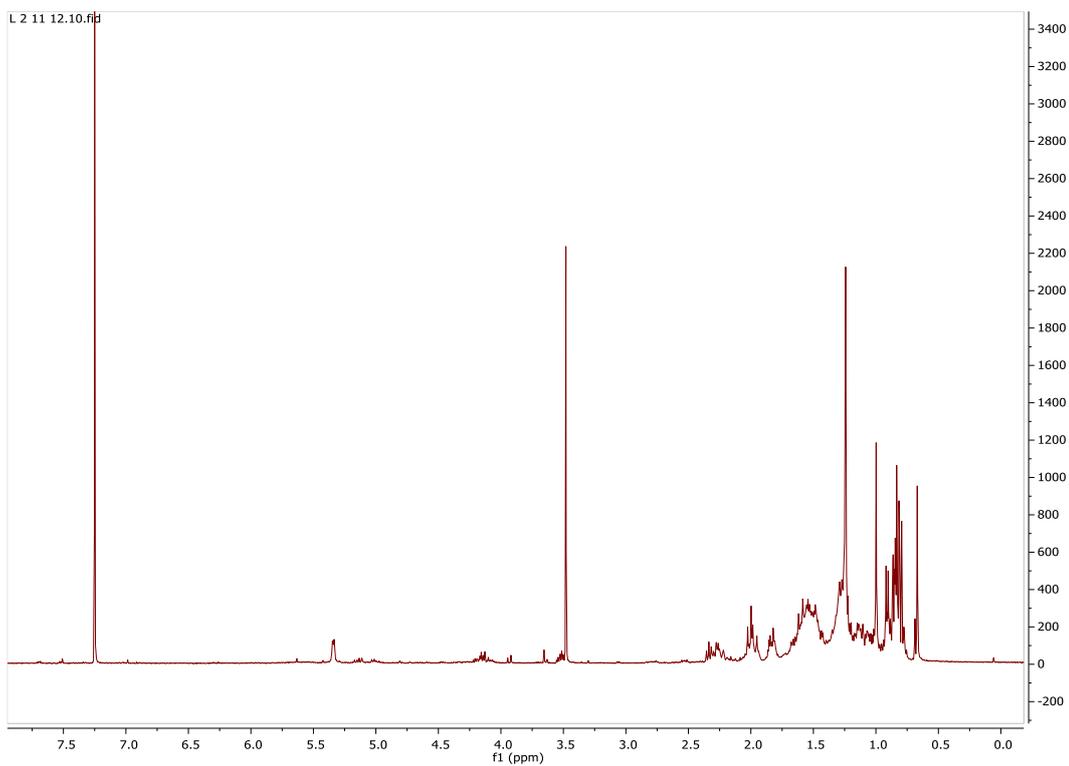


Figura E8: Espectro RMN ^1H do N2.

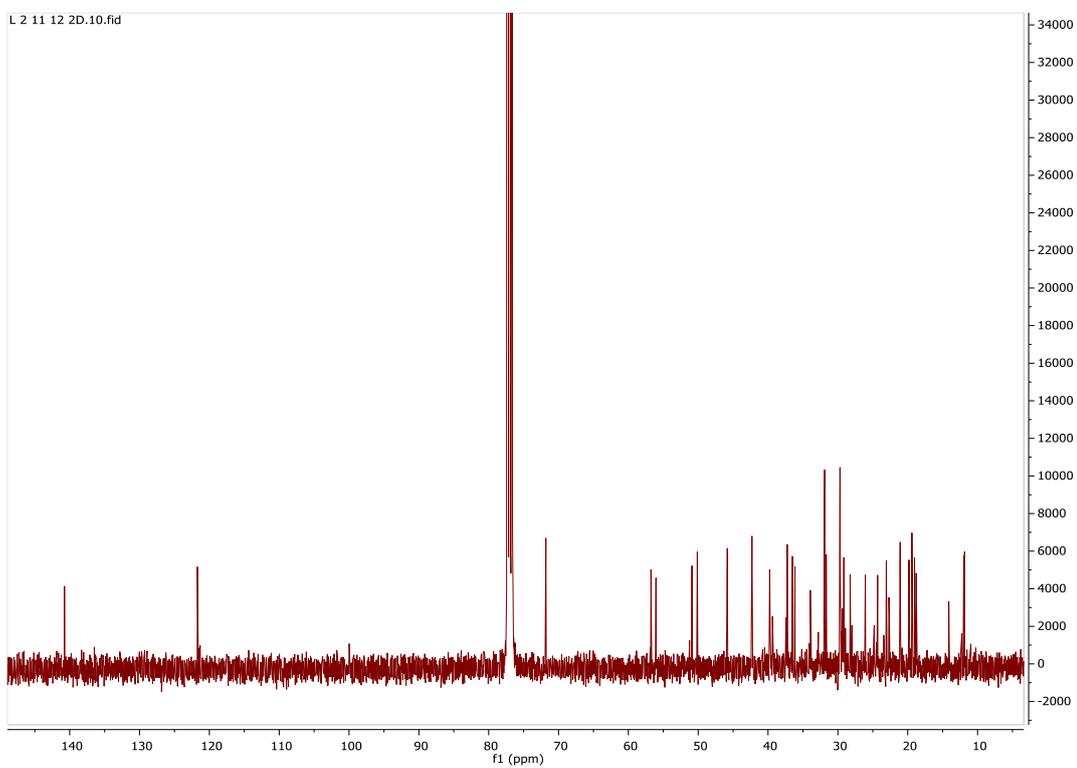


Figura E9: Espectro RMN ^{13}C do N2.

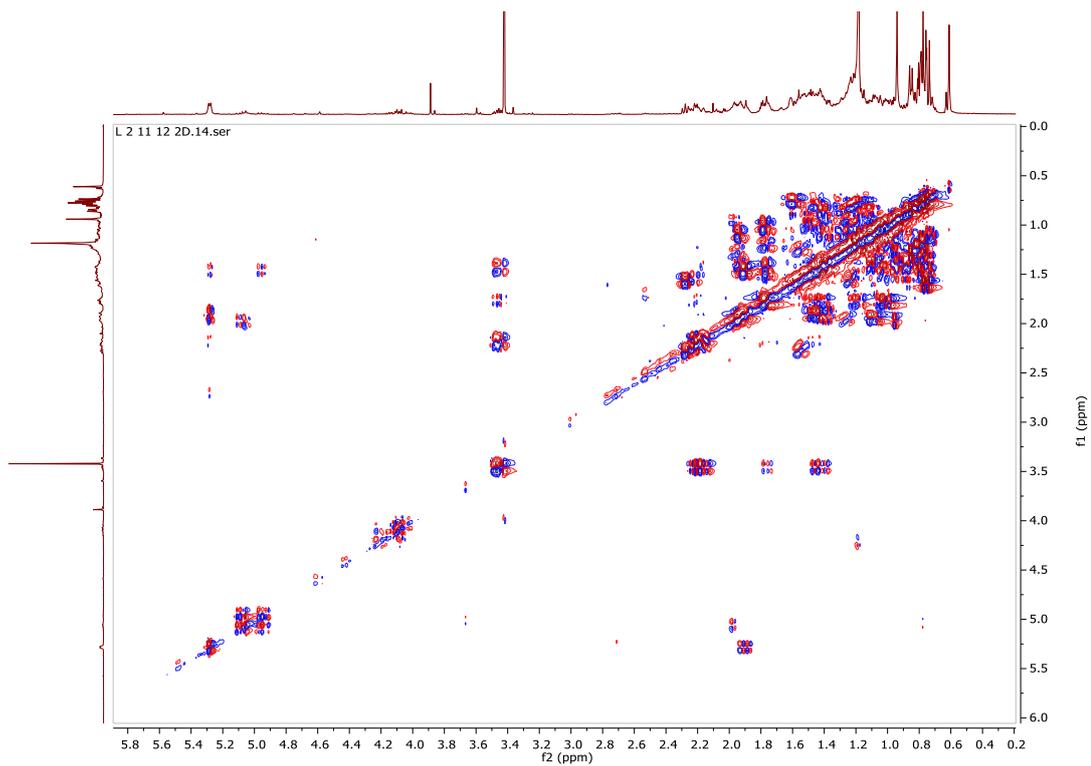


Figura E10: Espectro 1H-1H COSY do N2.

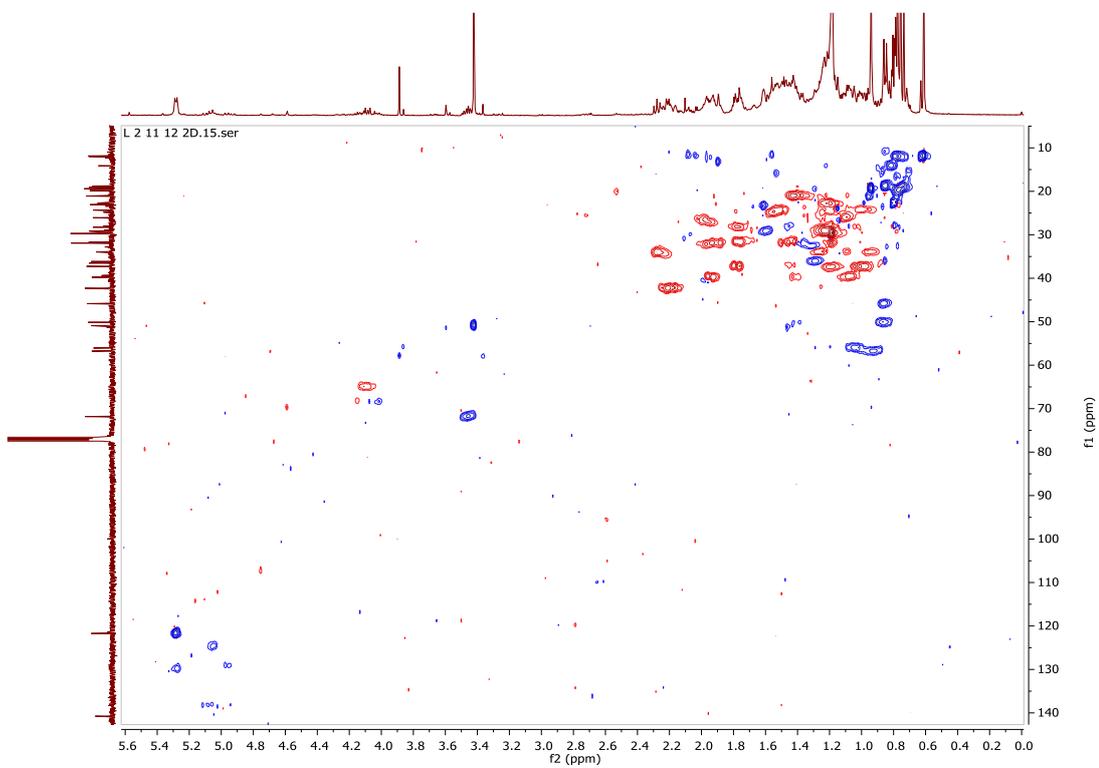


Figura E11: Espectro HSQC do N2.

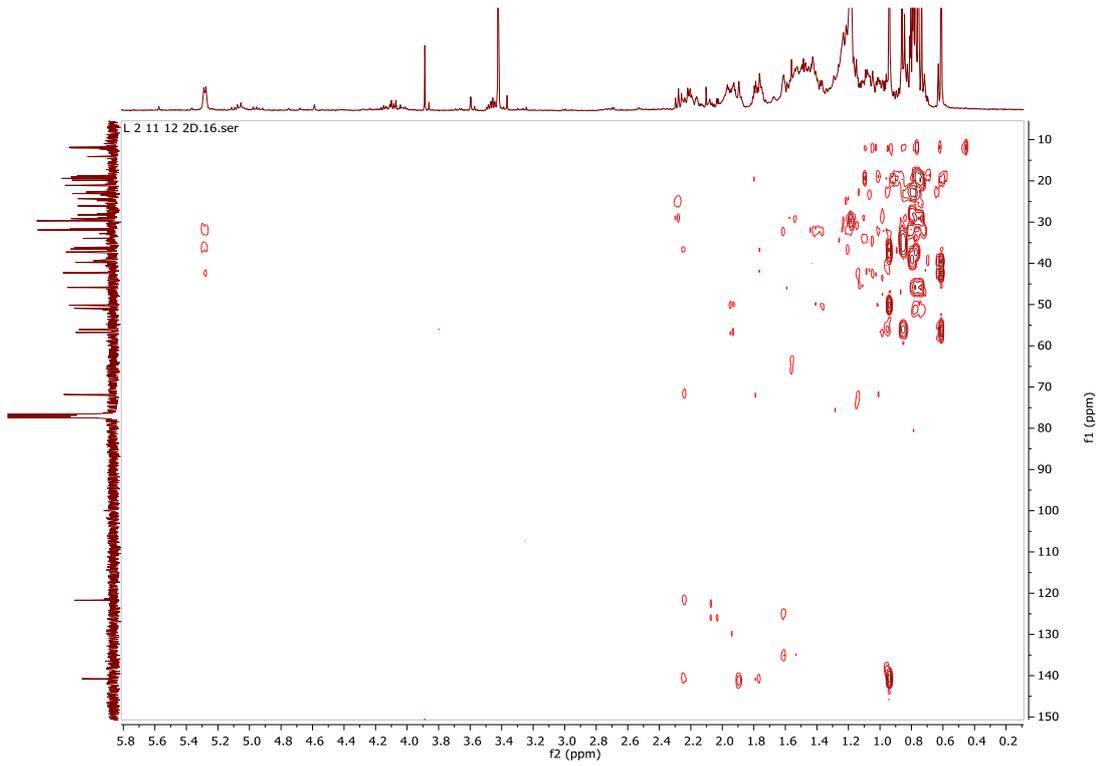


Figura E12: Espectro HMBC do N2.

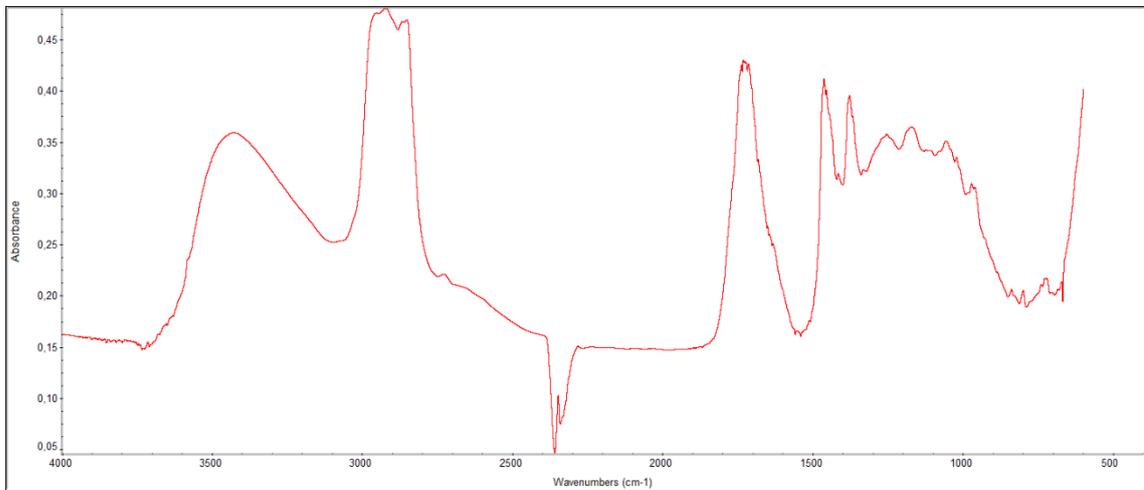


Figura E13: Espectro Infravermelho do N2.

Ácido octanóico (N3)

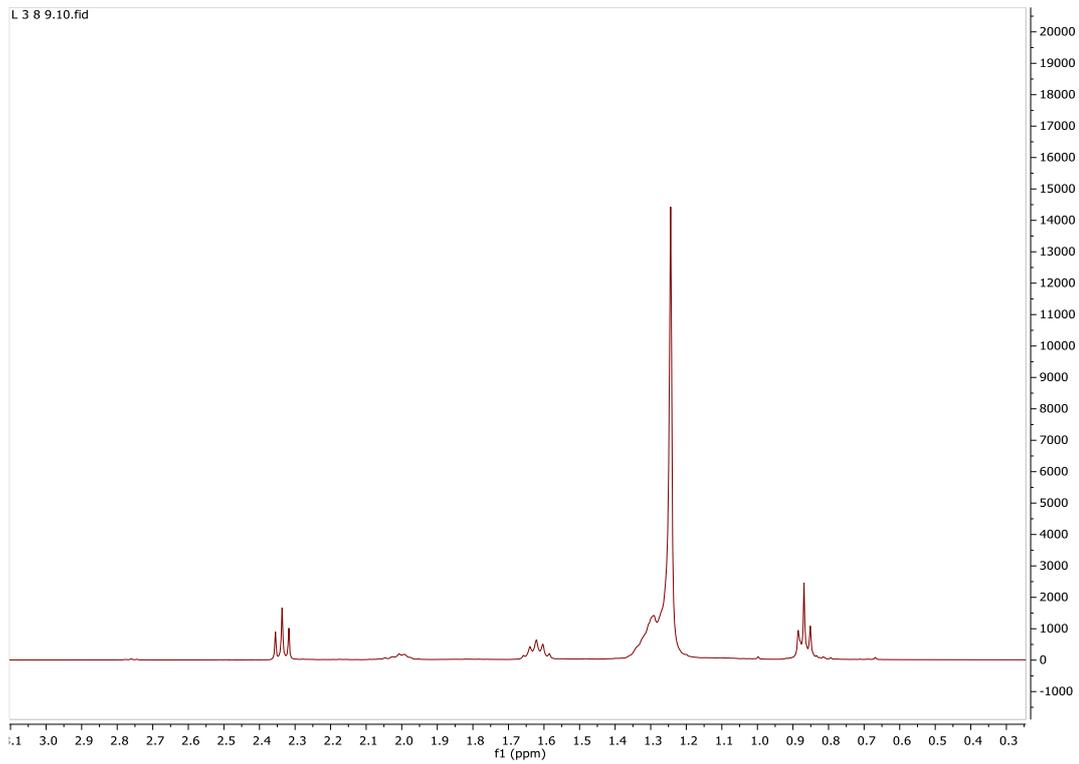


Figura E14: Espectro RMN ¹H do N3.

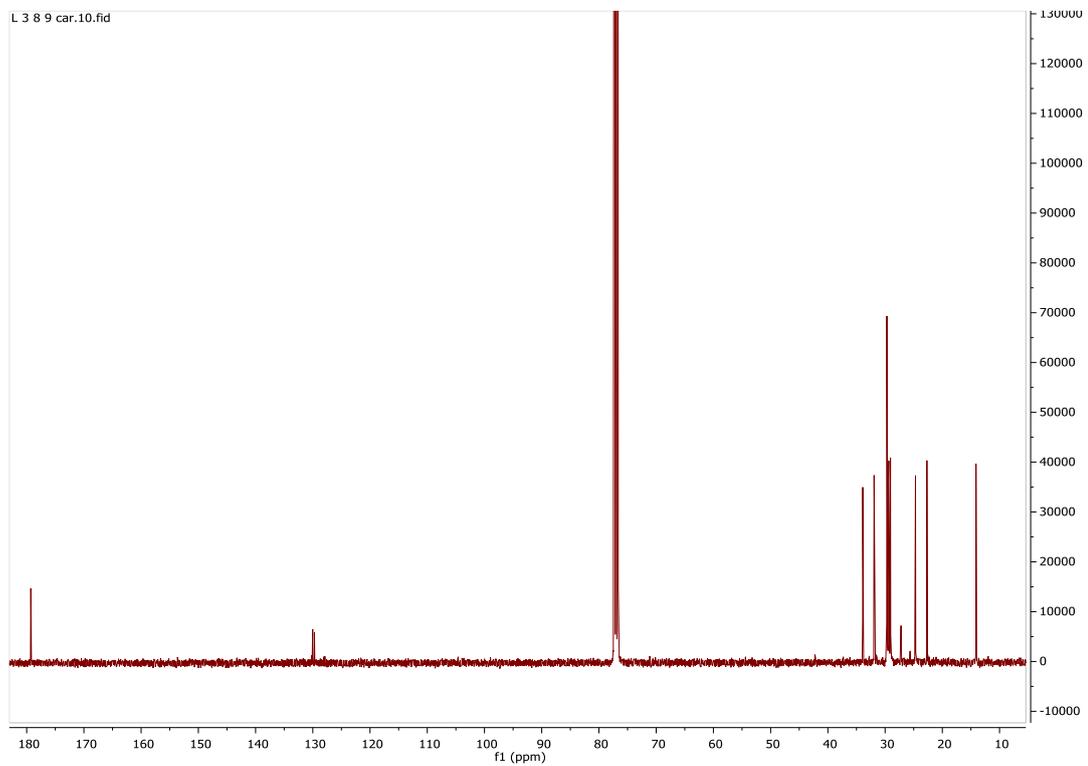


Figura E15: Espectro RMN ¹³C do N3.

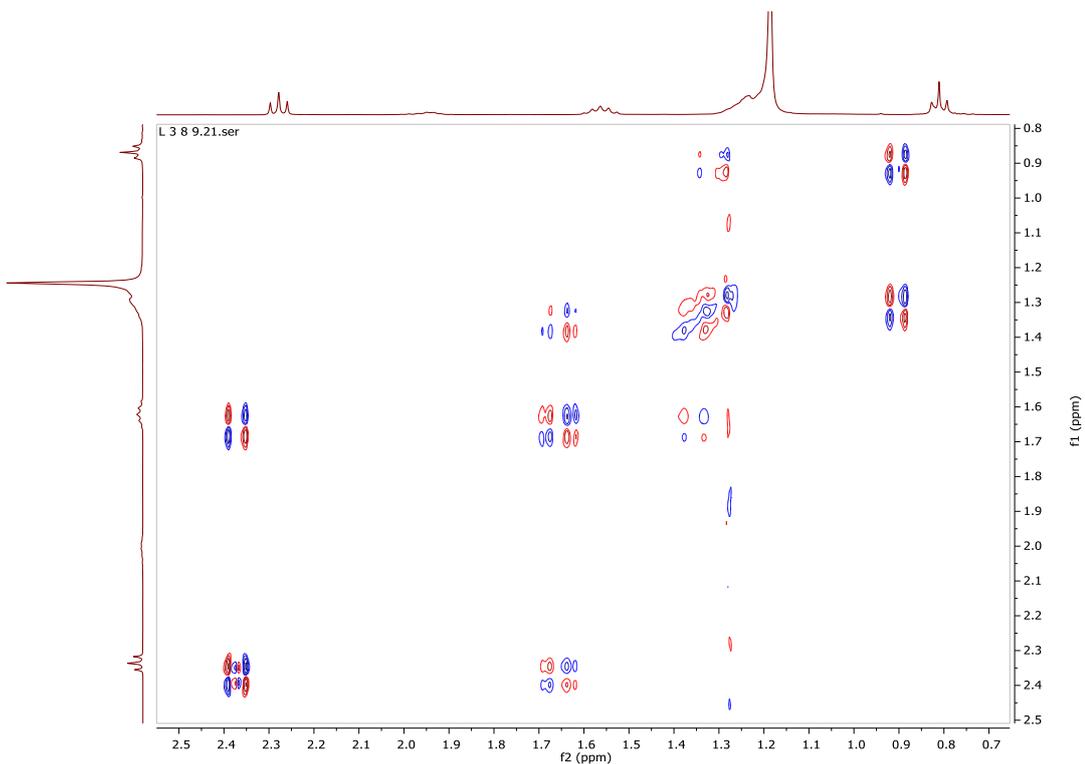


Figura E16: Espectro 1H-1H COSY do N3.

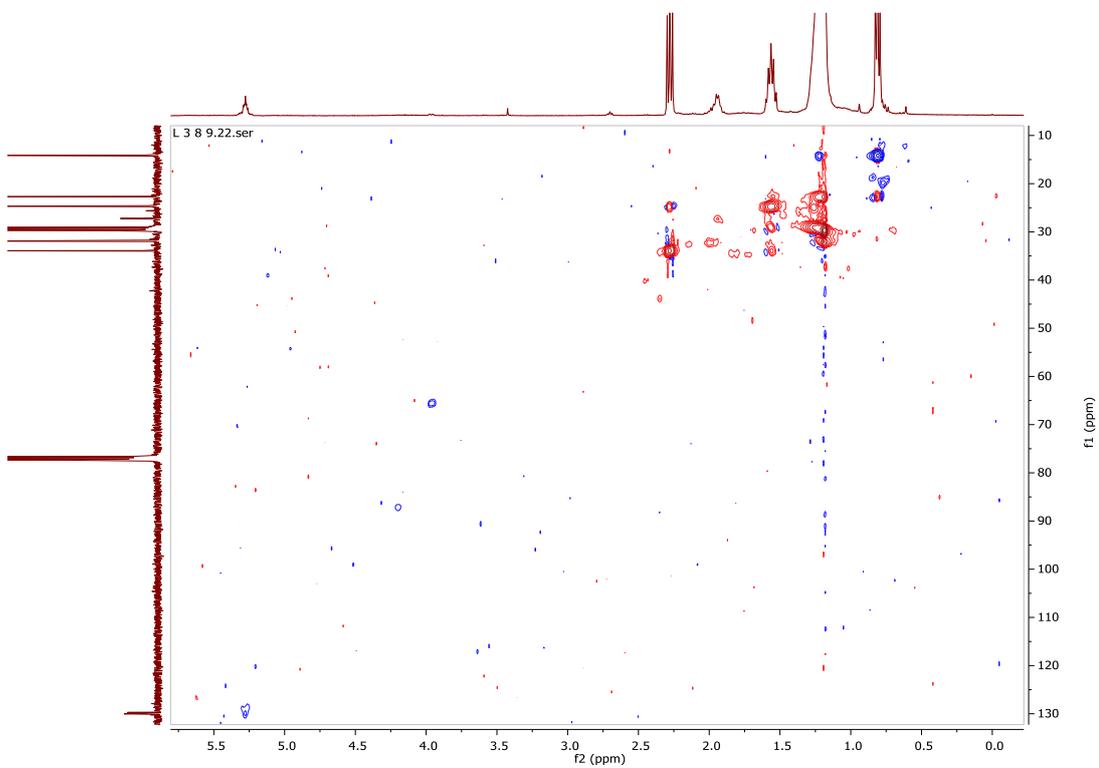


Figura E17: Espectro HSQC do N3.

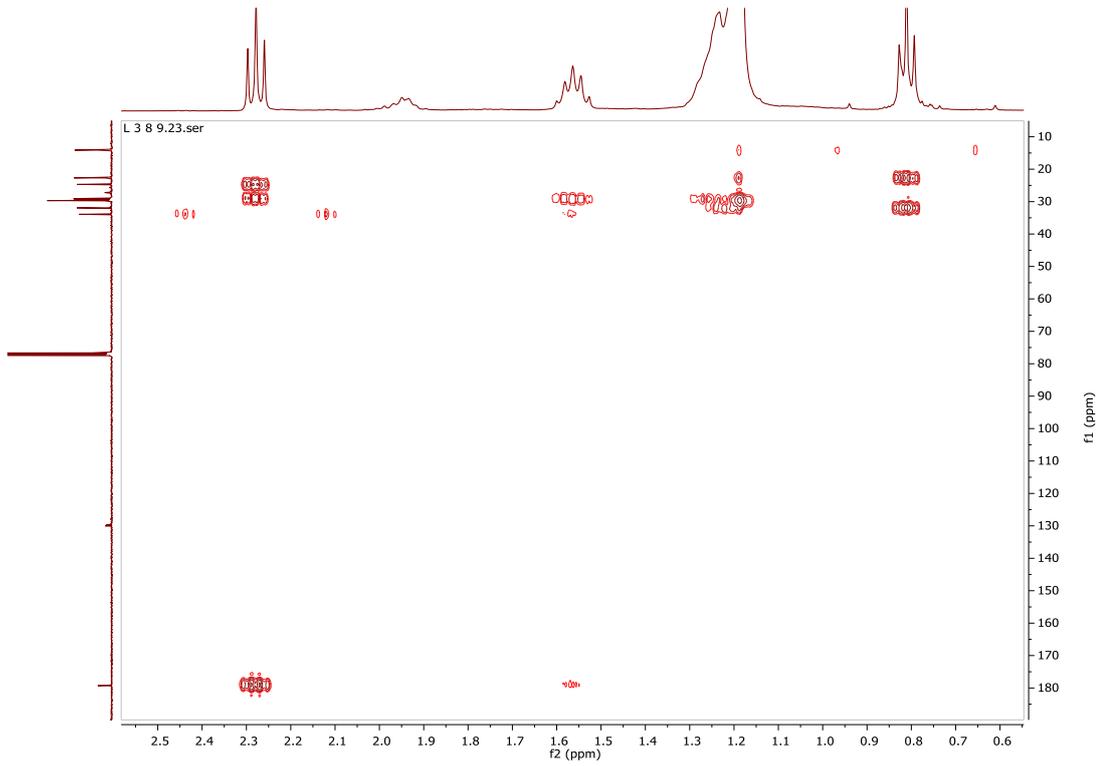


Figura E18: Espectro HMBC do N3.

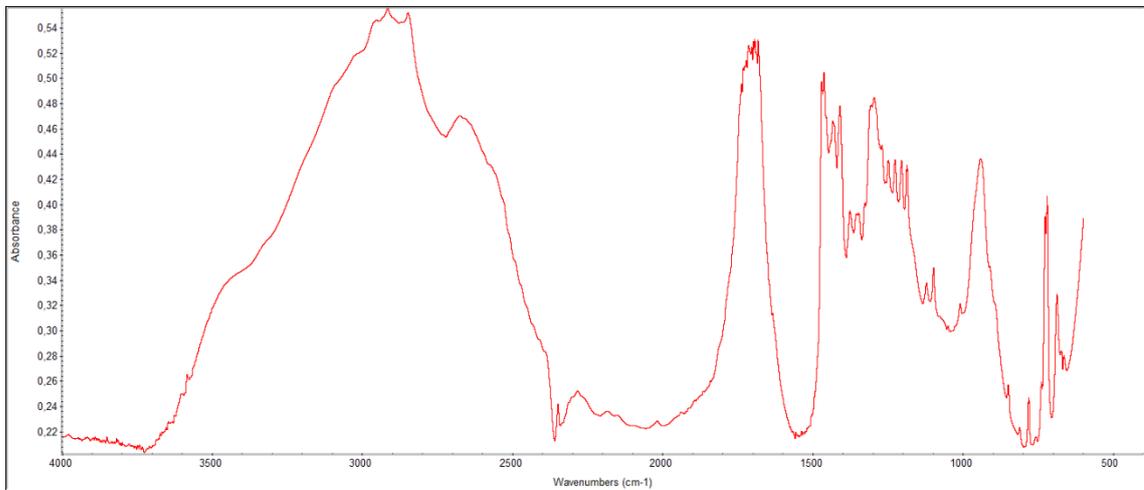


Figura E19: Espectro Infravermelho do N3.

Ácido 14-nor-7,8-seco-10-oxocadinano-1(6),3-dienóico (N4)

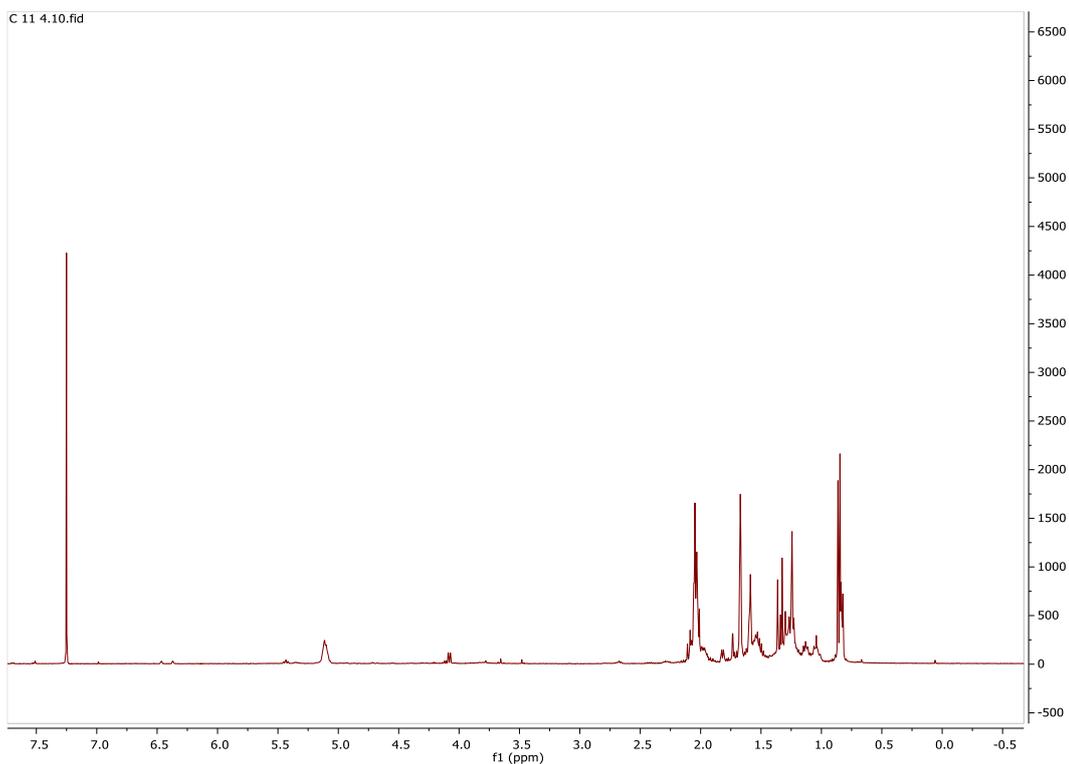


Figura E20: Espectro RMN ¹H do N4.

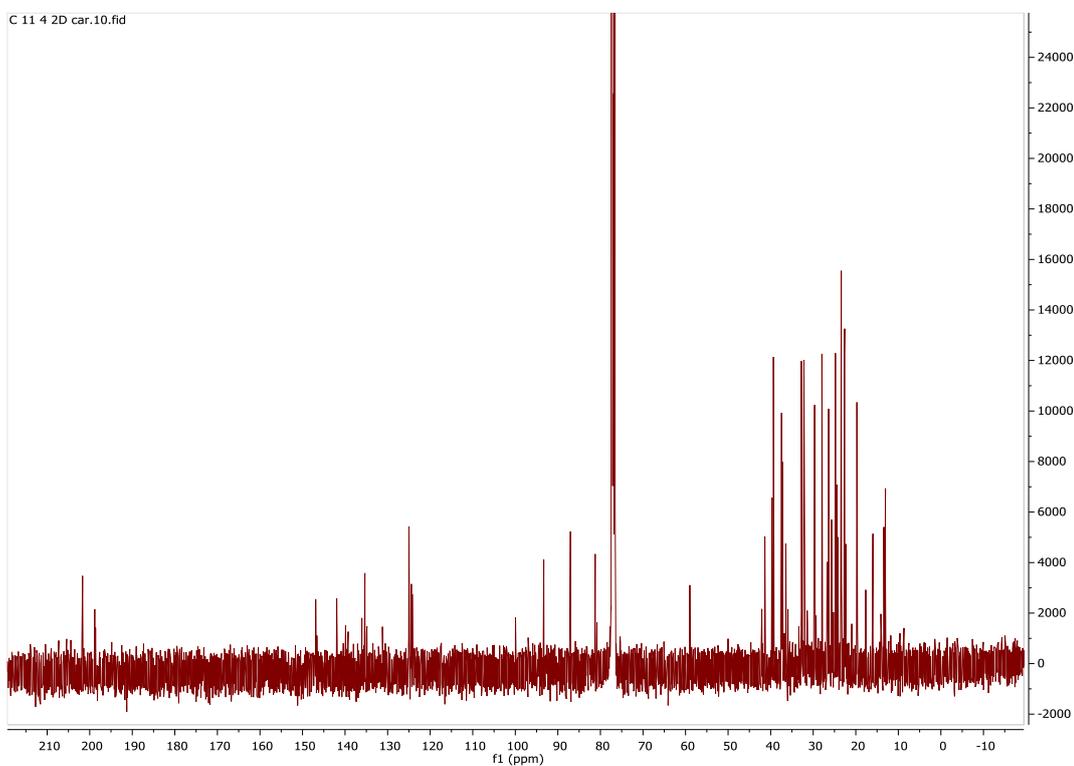


Figura E21: Espectro RMN ¹³C do N4.

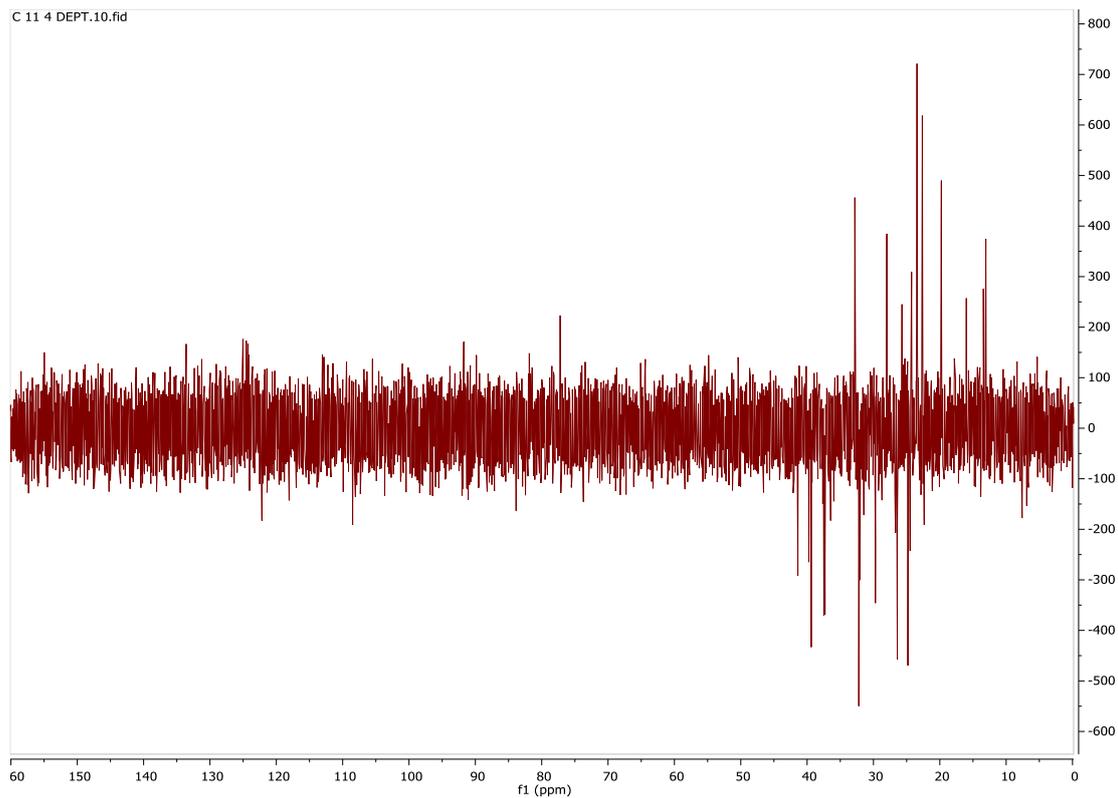


Figura 22: Espectro do DEPT do N4.

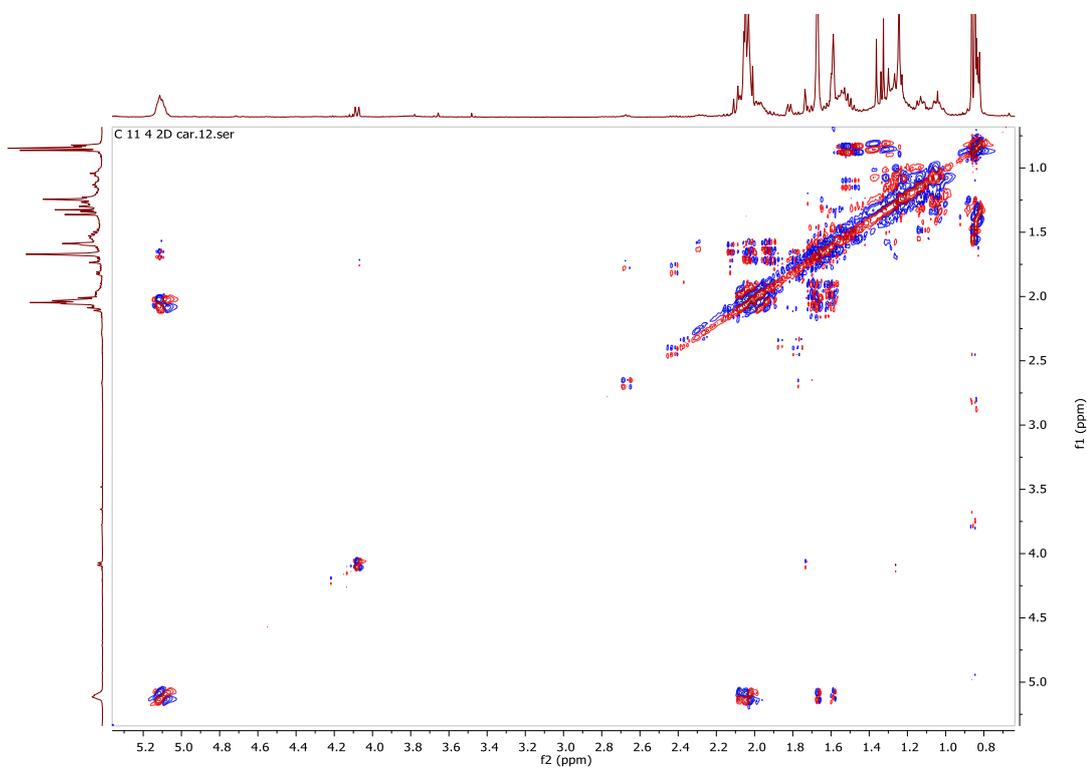


Figura E23: Espectro 1H-1H COSY de N4.

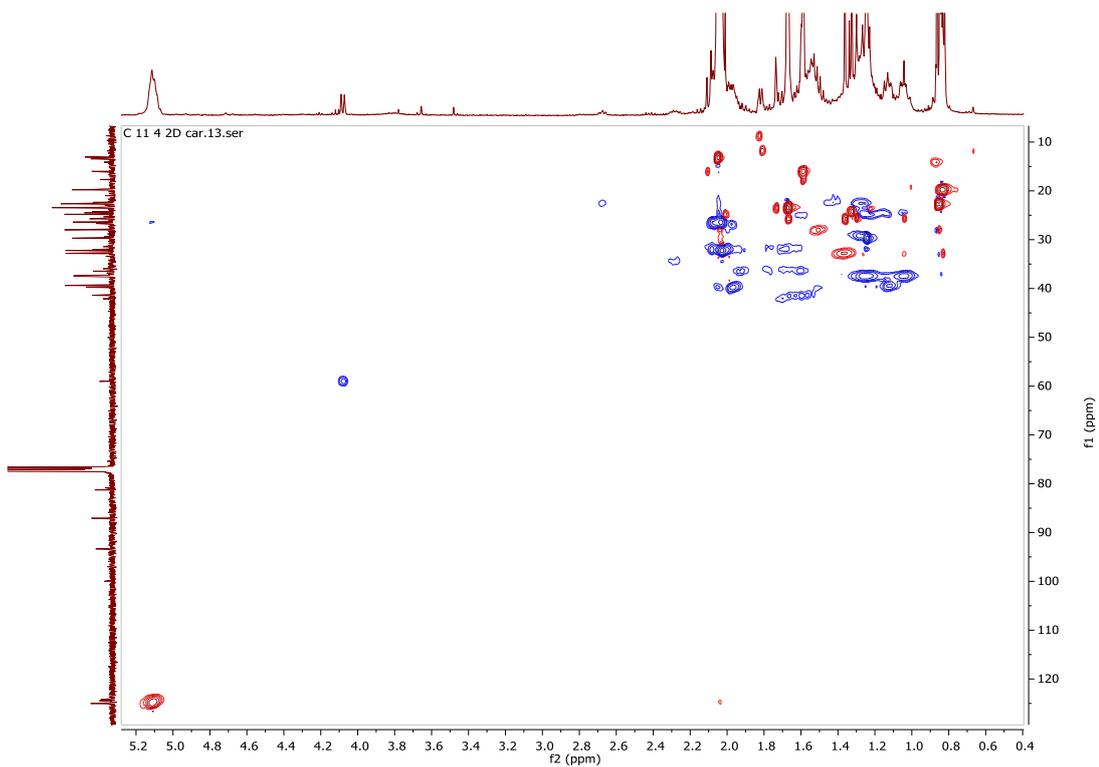


Figura E24: Espectro HSQC de N4.

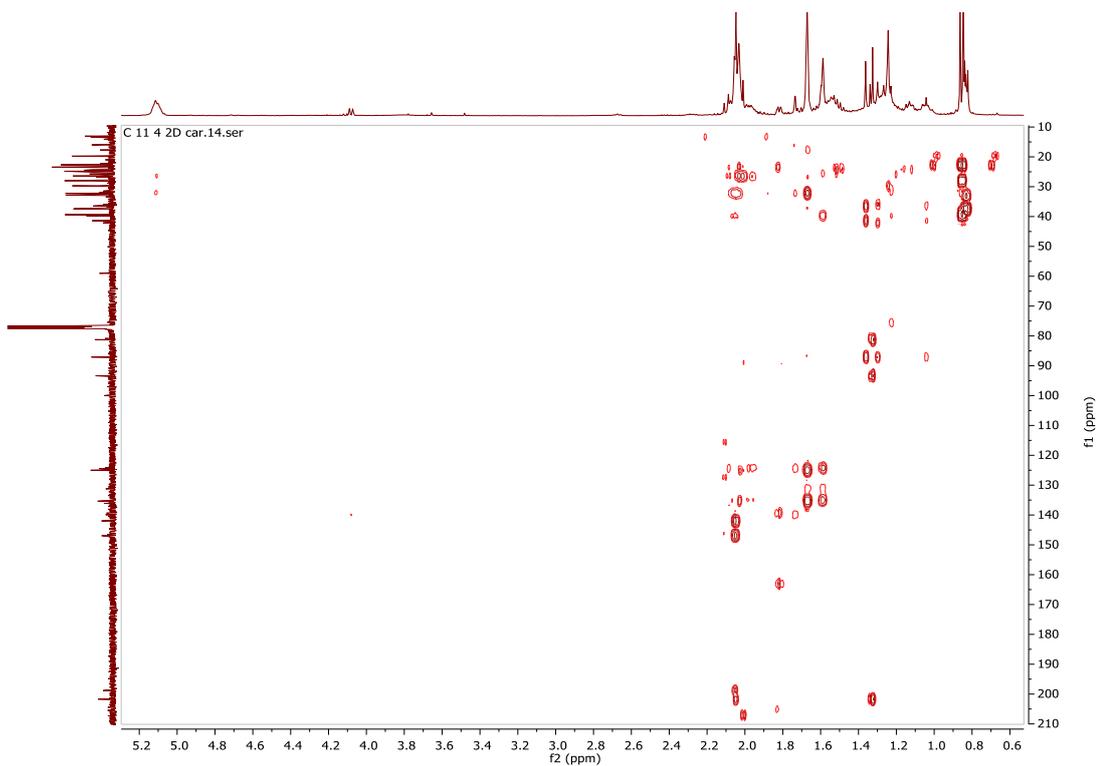


Figura E25: Espectro HMBC de N4.

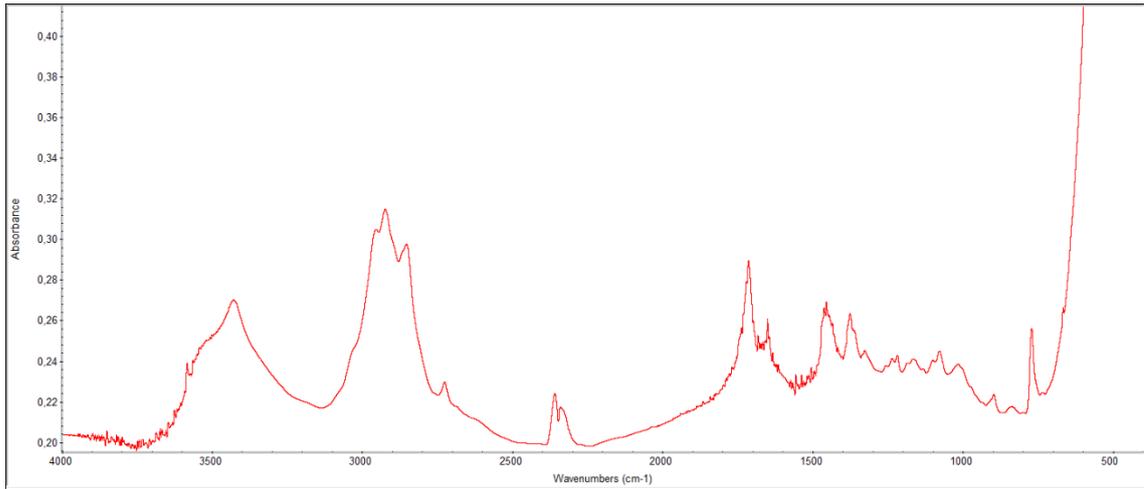


Figura E26: Espectro Infravermelho de N4.