



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

**Estudos das Potencialidades farmacológicas de
plantas endémicas /medicinais de Cabo Verde:
Campylanthus glaber Benth ssp glaber e da
*Globularia amygdalifolia Webb***

Versão final após defesa

Nadir Alves Cardoso

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Química Medicinal

(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Jesús Miguel López Rodilla

Covilhã, março de 2018

Dedicatória

Ao meu pai João e à minha mãe Rosa

*“Os nossos pais amam-nos porque somos seus filhos,
é um fato inalterável.
Nos momentos de sucesso, isso pode parecer irrelevante,
mas nas ocasiões de fracasso,
oferecem um consolo e
uma segurança que não se encontram em qualquer outro lugar.”*

Bertrand Russell

Agradecimentos

Ao Pai celestial Senhor Jeová pela vida e pelas bênçãos derramadas nessa caminhada, graças a Ele consegui suportar e ser bem sucedida em todas as dificuldades.

Ao meu orientador, Prof. Doutor Jesús Miguel López Rodilla pelo apoio direto e incentivo desde o primeiro momento da minha chegada à Universidade, pelo tempo disponibilizado, e os conhecimentos transmitidos na orientação deste trabalho. Aqui exprimo a minha gratidão.

À Faculdade de Ciências da Universidade da Beira Interior, particularmente o departamento de Química e todos os Professores e técnicos de laboratório pelo apoio na realização deste trabalho e a todos os professores que lecionaram unidades curriculares no Mestrado de Química Medicinal, obrigado pelos conhecimentos transmitido.

À Universidade de Cabo Verde pela oportunidade e financiamento desse mestrado. Agradeço profundamente à Magnífica Reitora Judite Nascimento!

À amiga e Professora Cláudia Beato, pelo incentivo, apoio emocional, pelo ombro emprestado nos momentos de desespero vividos aqui na Covilhã.

Aos meus progenitores e aos meus irmãos que mesmo distantes estavam sempre presentes, mostrando-me que tudo na vida vale a pena vencer para a satisfação pessoal.

Ao meu irmão Adilson pelo apoio e incentivo nos momentos mais difíceis dessa etapa, graças ao teu auxílio consegui ultrapassar todas as fases desse mestrado e atingir a meta. Amo-te, mano!

Aos meus colegas Dr. Osvaldo Ortet, Elyane Dias, Arlindo Monteiro, António Gomes e todos aqueles que me apoiaram nessa etapa e que torceram pela minha vitória. Aos meus colegas do curso de química medicinal pelos momentos de confraternização porque se não fosse pelo apoio e dedicação de todos não estaria a atingir esta etapa, obrigada meus “Kambas”.

Ao meu mais que amigo especial e companheiro Edgar Faria Mutunda pela força nos momentos tristes e de desespero, obrigada pelos bons momentos vividos na Covilhã.

À Dijinira Ramos, Kleidy Delgado e Salvador Tito por serem a minha força motivadora ao longo do trajeto percorrido.

Por último e não menos importante, obrigada à Covilhã que nos acolheu!
A todos o meu Muito Obrigado.

Resumo

Em Cabo Verde há uma forte prática da medicina tradicional, mas verifica-se pouca informação sobre a composição química de algumas espécies endêmicas usadas nesse tipo de terapia. Esse facto motivou o desenvolvimento deste tema dissertativo. Os objetivos principais são (i) analisar a composição química de duas plantas de uso tradicional da medicina popular selecionadas da flora Cabo-verdiana, nomeadamente o *Campylanthus glaber Benth ssp glaber* e a *Globularia amygdalifolia Webb*; (ii) realizar extratos em solventes de diferentes polaridades; (iii) proceder ao fracionamento, purificação e isolamento dos seus princípios bioativos. Para a identificação e caracterização dos compostos presentes nas plantas procedeu-se à extração sólido - líquido, usando-se três solventes a frio, por ordem crescente de polaridade: n-hexano, acetona e etanol. Na caracterização dos componentes isolados, as suas estruturas foram completamente elucidadas por técnicas comumente utilizadas no campo da fitoquímica, tais como: a Espectrometria de Massa (MS), a Ressonância Magnética Nuclear (RMN), o Infravermelho (IV), o fracionamento em cromatográfico em coluna (CC), a cromatografia em camada fina (CCF) e a cromatografia gasosa com espectrómetro de massa (GC-MS).

No estudo efetuado sobre as folhas de *Campylanthus glaber Benth ssp glaber* verificou-se que para além dos compostos principais e maioritários como o Esqualeno (55,17 %), Hentriacontano (37,82%; 31,20%) e o octadecanal (27,51%), misturas de triacilgliceróis, cetona artemisa (79,79 %) e de α -tecoferol (Vitamina E) (75,41 %), estas apresentam uma serie de compostos como esteres metílicos, hidrocarbonetos, triterpenoides, fitoesteróis, ácidos fenólicos, ácidos gordos e álcoois gordos de cadeia linear de interesse químico e biológico. Relativamente ao estudo fitoquímico da espécie *Globularia amygdalifolia Webb*, foram identificados nos extratos de hexano os compostos maioritários β -sitosterol (87,46%), handianol (cicloartenol), dihidrocalisterol, β -dihidrofucosterol e ácido z,z-9,12-octadecadienóico, 9, 12, 15 octadecatrienoato de metilo e 9, 12 octadecadienoato de metilo. No estudo efetuado ao extrato de acetona solúvel em clorofórmio e da análise efetuada nas frações obtidas por RMN de ^{13}C e de ^1H , verifica-se a existência de um único composto em toda a fração, a globularina, um derivado do catalpol, formado por um iridoide e uma unidade de glucose.

Portanto, este é o primeiro estudo sobre a caracterização dos compostos dos extratos de hexano e de acetona para estes géneros. Deste modo, espera-se que os resultados desta pesquisa representem um passo para a realização de mais estudos sobre a atividade biológica dos constituintes químicos presentes nas espécies em apreço.

Palavras-chave: Produtos naturais, medicina tradicional, plantas endêmicas, *Campylanthus glaber Benth ssp glaber*, *Globularia amygdalifolia Webb*, compostos bioativos.

Abstract

In Cape Verde there is a strong practice of traditional medicine, but there is little information on the chemical composition of some endemic species used in this type of therapy. This fact motivated the development of this dissertation theme. The main objectives are to (i) analyze the chemical composition of two traditional folk medicine plants selected from Cape Verdean flora, namely *Campylanthus glaber* Benth ssp *glaber* and *Globularia amygdalifolia* Webb; (ii) perform extracts in solvents of different polarities; (iii) to fractionate, purify and isolate its bioactive principles.

For the identification and characterization of the compounds present in the plants, solid-liquid extraction was carried out using three cold solvents, in increasing order of polarity: n-hexane, acetone and ethanol. In the characterization of the isolated components, their structures were completely elucidated by techniques commonly used in the field of phytochemistry, such as Mass Spectrometry (MS), Nuclear Magnetic Resonance (NMR), Infrared (IR), Column chromatography (CC), Thin Layer Chromatography (TLC), and Mass Spectrometry Gas Chromatography (MS-GC).

In the study carried out on the leaves of *Campylanthus glaber* Benth ssp *glaber*, it was verified that in addition to the main and major compounds such as Squalene (55.17%), Hentriacontane (37.82%, 31.20%) and octadecanal (79.79%) and α -tocoferol (Vitamin E) (75.41%), these present a series of compounds such as methyl esters, hydrocarbons, triterpenoids, phytosterols, phenolic acids, fatty acids and linear chain fatty alcohols of chemical and biological interest. In the hexane extracts, the major compounds were identified as β -sitosterol (87.46%), handianol (75.84%), dihydrochalisterol (49.73%), β -sitosterol dihydrofucosterol (50.85%) and *z, z*-9,12-octadecadienoic acid (33.32%), methyl 9,12,15-octadecatrienoate (17.25%) and methyl 9,12-octadecadienoate (16.39% %). In the study carried out on acetone extract soluble in chloroform and the analysis performed on the fractions obtained by ¹³C and ¹H NMR, there is a single compound in the whole fraction, globularin, a derivative of catalpol, formed by a iridoid and a glucose unit.

Therefore, this is the first study on the characterization of hexane and acetone extract compounds for these genera. Thus, it is expected that the results of this research represent a step towards further studies on the biological activity of the chemical constituents present in the species under consideration.

Key words: Natural products, traditional medicine, endemic plants, *Campylanthus glaber* Benth ssp *glaber*, *Globularia amygdalifolia* Webb, bioactive compounds.

Índice

Dedicatória	ii
Agradecimentos	iii
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
Índice.....	vi
Lista de figuras.....	viii
Lista de tabelas	ix
Lista de acrónimos.....	x
Introdução.....	1
1.1. Objetivos.....	3
1.1.2. Objetivos específicos.....	3
1.2. Cabo Verde: Caracterização Geográfica.....	3
1.3. Plantas usadas na Medicina Tradicional em Cabo Verde	4
1.4. Espécies /Famílias de plantas Seleccionadas	6
1.5. Família das <i>Scrophulariaceae</i>	6
1.5.1. <i>Campylanthus glaber Benth. ssp glaber</i>	9
1.6. Família <i>Globulariaceae</i>	13
1.6.1. <i>Globularia amygdalifolia weeb</i>	19
1.7. Produtos naturais como fonte de novos fármacos	20
1.8. Métodos de extração/separação e Identificação de compostos naturais	22
1.9. Métodos de Extração em estudos fitoquímicos	22
1.9.1. Identificação	23
2. Parte experimental - Materiais e métodos.....	25
2.1. Material vegetal / amostragem	25
2.2. Preparação dos extratos	25
2.3. Técnicas cromatográficas.....	25
2.3.1. Cromatográfica em coluna.....	25
2.3.2. Cromatografia em camada fina	26
2.3.3. Cromatografia Gasosa e espetrometria de Massa (GC-MS).....	26
2.4. Caracterização dos produtos	26
2.4.1. Infravermelho (IV).....	27
2.4.2. Espetrometria de Ressonância magnética de ¹ H e ¹³ C.....	27
2.4.3. Reação de saponificação	27
2.5. Extratos de <i>Campylanthus glaber Benth</i>	28
2.5.1. Extrato de hexano	28
2.5.2. Extrato de acetona	28
2.5.3. Extrato de etanol.....	29
2.6. Extratos de <i>Globularia amygdalifolia Weeb</i>	30

2.6.1. Extrato de hexano	30
2.6.2. Extrato de acetona	31
2.6.3. Extrato de etanol.....	31
2.7. Fracionamento dos diferentes extratos	32
2.7.1. <i>Campylanthus glaber</i> Benth	32
2.7.2. <i>Globulária amygdafolia</i>	33
3. Resultados e discussão	34
3.1. Análise dos extratos	34
3.2. Análise e identificação dos compostos encontrados nas frações do <i>Campylanthus glaber Benth ssp glaber</i>	35
3.2.1. Estudos preliminares.....	35
3.2.2. Extrato de hexano	36
3.2.3. Extrato de Acetona.....	43
3.3. Análise e identificação dos compostos encontrados nas frações da <i>Globularia amygdalifobia Weeb</i>	51
3.3.1. Extrato de hexano	51
3.3.1.1. Extrato de hexano (Parte Neutra)	51
3.3.1.2. Extrato de hexano (Parte ácida esterificada).....	52
3.3.2. Extrato de acetona	56
4. Conclusão	62
4.1. Recomendações.....	64
5. Bibliografia	65
6. Anexos	73

Lista de figuras

FIGURA 1: LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DE CABO VERDE; A-ARQUIPÉLAGO DE CABO VERDE; B- ILHA DE SANTIAGO. _____	4
FIGURA 2: MAPA DE DISTRIBUIÇÃO DA FAMÍLIA SCROPHULARIACEAE. _____	7
FIGURA 3: ESTRUTURA DOS COMPOSTOS DE 1 A 6 EXTRAÍDAS DAS PARTES AÉREAS DE LINARIA REFLEXA ^[18] . ____	8
FIGURA 4: MAPA DO NORTE DA ÁFRICA E DA ARÁBIA MOSTRANDO A DISTRIBUIÇÃO TOTAL DO CAMPYLANTHUS ^[29] . _____	10
FIGURA 5: CAMPYLANTHUS GLABER BENTH. IN DC. SSP. GLABER ^[26] . _____	10
FIGURA 6: ESTRUTURA DA AUCUBINA ^[31] . _____	12
FIGURA 7: COMPOSTOS ISOLADOS EM ALGUMAS ESPÉCIES DA GLOBULÁRIA- ^[36] _____	15
FIGURA 8: IMAGEM DA ESPÉCIE GLOBULARIA AMYGDALIFOLIA WEBB DE CABO VERDE. _____	19
FIGURA 9: SEPARAÇÃO DA FASE ORGÂNICA E FASE AQUOSA DEPOIS DA REAÇÃO DE SAPONIFICAÇÃO. _____	28
FIGURA 10: FILTRADO E EVAPORAÇÃO DOS SOLVENTES NO EVAPORADOR ROTATIVO. _____	29
FIGURA 11: EXTRATO BRUTO DA CAMPYLANTHUS G. EXTRAÍDO COM HEXANO _____	29
FIGURA 12: ESQUEMA RESUMIDO DAS EXTRAÇÕES EFETUADAS PARA A ESPÉCIE CAMPYLANTHUS GLABER. ____	30
FIGURA 13: EXTRATO BRUTO DE HEXANO DA GLOBULÁRIA A.W. _____	30
FIGURA 14: ESQUEMA RESUMIDO DAS EXTRAÇÕES EFETUADAS PARA A ESPÉCIE G. AMYGDALIFOLIA _____	32
FIGURA 15: MONTAGEM DA COLUNA CROMATOGRÁFICA (CC) (A) E AS FRAÇÕES REUNIDAS DE ACORDO COM PERFIL CROMATOGRÁFICO (B). _____	33
FIGURA 16: EXEMPLOS DE PLACAS DE CCF: A-EXTRATO DE HEXANO CAMP1:1_19; B-EXTRATO DE PARTE NEUTRA GLOB1:1_23 _____	33
FIGURA 17: CCF PARA O EXTRATO DE ACETONA DAS DUAS ESPÉCIES: A- EXTRATO DE ACETONA SOLÚVEL EM CLOROFORMIO (C. GLABER); B-PRODUTO SOLÚVEL EM HEXANO (C. GLABER); C-PRODUTO INSOLÚVEL (C. GLABER); D-PRODUTO SOLÚVEL EM CLOROFORMIO (G. AMYGDALIFOLIA); E-PRODUTO INSOLÚVEL (G. AMYGDALIFOLIA). _____	35
FIGURA 18: ESPETRO IV DO EXTRATO HEXANO DO CAMPYLANTHUS GLABER. _____	38
FIGURA 19: ESPETROS DE RMN DO ¹ H DA FRAÇÃO CAMP1: 18. _____	39
FIGURA 20: ESPETROS DE RMN DO ¹³ C DA FRAÇÃO CAMP1: 18. _____	39
FIGURA 21: ESPETRO IV DA FRAÇÃO CAMP1:12 (CAMPYLANTHUS GLABER) _____	40
FIGURA 22: NEOFITADIENO. FONTE: PUBCHEM CID: 10446). _____	44
FIGURA 23: ESTRUTURA DO B-SITOSTEROL E COLESTEROL. _____	52
FIGURA 24: CROMATOGRAMA PARTE ÁCIDA DO EXTRATO DE HEXANO. _____	53
FIGURA 25: GLOBULARINA, O COMPOSTO IDENTIFICADO EM TODA A FRAÇÃO GLOB2:1_21 _____	56
FIGURA 26: ESPETRO DE MASSA DO EXTRATO DE ACETONA SOLÚVEL EM CLOROFORMIO: GLOB2:20. ____	58
FIGURA 27: IV DA FRAÇÃO GLOB 2:20, GLOBULARINA. _____	58
FIGURA 28: ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DA FRAÇÃO GLOB2:20, GLOBULARINA. _____	59
FIGURA 29: ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C (AMPLIADA) DA FRAÇÃO GLOB2:20, GLOBULARINA. _____	60

Lista de tabelas

TABELA 1: ESTUDOS DE AÇÃO FARMACOLÓGICO RELACIONADOS À ALGUMAS ESPÉCIES DA FAMÍLIA GLOBULARIACEAE.	16
TABELA 2: RESUMO DOS PESOS DOS EXTRATOS OBTIDOS	34
TABELA 3: COMPOSTOS IDENTIFICADOS NO EXTRATO DE HEXANO DA ESPÉCIE <i>CAMPYLANTHUS GLABER</i> (CAMP1:1_19).	41
TABELA 4: COMPOSTOS DETERMINADOS PELO GC-MS DA FRAÇÃO CAMP 1: 12, PARTE ÁCIDA ESTERIFICADA. . 42	
TABELA 5: COMPOSTOS DETERMINADOS PELO GC-MS DA FRAÇÃO CAMP 1: 19, PARTE ÁCIDA ESTERIFICADA COM DIAZOMETANO.	43
TABELA 6: IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ENCONTRADOS NAS FRAÇÕES DO EXTRATO DE ACETONA SOLÚVEL EM HEXANO (CAMP2:1_29).	45
TABELA 7: COMPOSTOS ENCONTRADOS NAS FRAÇÕES DO EXTRATO DE ACETONA SOLÚVEL EM HEXANO (CAMP2:1_29).	48
TABELA 8: COMPOSTOS IDENTIFICADOS NO CAMP3:1_38.	50
TABELA 9: COMPOSTOS IDENTIFICADOS NO EXTRATO DE HEXANO DA PARTE NEUTRA, GLOB1:1_23.	54
TABELA 10: COMPOSTOS ENCONTRADOS PARA O EXTRATO DE HEXANO ESTERIFICADA: PARTE ÁCIDA DA GLOBULÁRIA AMYGDIFOLIA.	55
TABELA 11: SINAIS DE RMN DE ¹H DA FRAÇÃO GLOB2:20, GLOBULARINA.	59
TABELA 12: SINAIS DE RMN DE ¹³C (AMPLIADA) DA FRAÇÃO GLOB2:20, GLOBULARINA.	61
TABELA 13: TODOS OS COMPOSTOS IDENTIFICADOS NOS EXTRATOS DE HEXANO E ACETONA NAS FOLHAS DE <i>CAMPYLANTHUS GLABER</i>.	73
TABELA 14: TODOS OS COMPOSTOS IDENTIFICADOS NOS EXTRATOS DE HEXANO E ACETONA NAS FOLHAS DE <i>GLOBULARIA A.W.</i>	75

Lista de acrónimos

“S”-sintético

AcOEt - Acetato de etilo

APG IV - Angiosperm Phylogeny Group

C. - *Campylanthus*

CC- cromatografia em coluna

CCF-Cromatografia de camada fina

COX-1 - ciclooxigenase-1

d- duplete

dd- duplo duplete

DiCYT- Agencia Ibero-americana para la difusión de la ciência y la tecnologia

EGF- Fator de crescimento Epidérmico

FDA - Food and Drug Administration

G.-*Globulária*

GCMS-Cromatografia gasosa com espectrómetro de massa

Hex/AcOEt-hexano /acetato de etilo

HSP-70- Proteína de choque térmico 70

Hz- Hertz

INIDA-Instituto Nacional de InvestigaçãO Desenvolvimento Agrário

IV- Infravermelho

L-Lamiales

m- multipleto

m/z- relação massa carga

MS - Espectrometria de Massa

NE - Nordeste

NEMs- novas entidades moleculares

OMS - Organização Mundial da saúde

ppm- partes por milhão

RMN ¹³C - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

RMN ¹H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogénio

RMN- Ressonância Magnética Nuclear

VEGF- Fator de crescimento endotelial vascular

Introdução

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana. As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma significativa para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos. Dessa forma, usuários de plantas medicinais de todo o mundo mantêm em voga a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos. [1]

A descoberta racional de drogas à base das plantas começou no início do século XIX, quando o assistente alemão de apicultor Friedrich Sertürner conseguiu isolar o analgésico e o agente indutor do sono do ópio, que ele chamou de *morfíno* (morfina) em alusão ao deus grego dos sonhos Morpheus. Ele publicou um documento abrangente sobre seu isolamento, cristalização, estrutura de cristal e propriedades farmacológicas, que ele estudou primeiro em cães vadios e depois em experiências próprias. [2]

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a definição de medicina tradicional tem uma longa história. É a soma total de conhecimentos, habilidades e práticas baseadas em teorias, crenças e experiências de diferentes culturas, explicáveis ou não, usadas para manter a saúde e prevenir, diagnosticar, melhorar ou tratar doenças físicas e mentais. [3]

A medicina tradicional é geralmente disponível, acessível e comumente usada em grande parte da África, Ásia e América Latina. O que estima que cerca de 80% da população nos países em desenvolvimento ainda dependem da medicina tradicional para suas necessidades de cuidados de saúde primários. No entanto, essa percentagem pode variar de país para país. [4]

Como um primeiro passo crítico a OMS realizou uma análise situacional em 2007 para avaliar o nível de desenvolvimento da medicina tradicional nos estados membros Africanos. Onze dos 15 países da sub-região Africana tinham uma política nacional de medicina tradicional, enquanto que 9 países tinham uma lei e regulamentação da medicina tradicional. Com apenas 7 países com um quadro regulamentar para a prática da medicina tradicional. Até mesmo países como a Guiné, que foi o primeiro a desenvolver uma política nacional em 1994, bem antes da declaração da década da medicina tradicional africana em julho de 2001 e a adoção da resolução da OMS sobre medicina tradicional em agosto de 2000 não tem um

quadro legal ou dados, mas tem um plano estratégico que foi desenvolvido em 2005. Cabo Verde, Guiné Bissau e Libéria precisam se juntar aos outros países para desenvolver seu setor de medicina tradicional. [4]

Cabo Verde foi um dos muitos países comprometidos em preservar a diversidade biológica e aderiu à Convenção sobre Diversidade Biológica em 1995, concordando assim em usar seus componentes sustentáveis e compartilhar os benefícios do uso de recursos genéticos e seu acesso. Ao contrário de outros países, este juntou-se às preocupações ambientais com seus planos de desenvolvimento, a fim de fazer algumas mudanças substanciais. Desde a independência em 1975, vários esforços foram feitos para uma maior compreensão, conscientização e proteção do meio ambiente. Para esse efeito, Cabo Verde confiou em vários programas de cooperação internacional para auxiliar no projeto e a execução dos importantes instrumentos de gestão ambiental. [5]

Um estudo bibliográfico realizado em 2006 identificou 157 taxa aromáticos com interesse medicinal em Cabo Verde, sendo plantas maioritariamente alóctones, introduzida, subespontâneas, naturalizadas ou cultivadas. Estão distribuídas em 68 famílias, com destaque para *Lamiaceae*, *Asteraceae* e *Solanaceae*, com 21,6 %. As plantas cultivadas representam 32%, seguida das endémicas com 17%. Em relação aos endemismos, cerca de 35 taxa de angiospérmicas endémicas de Cabo Verde estão a ser utilizadas na medicina tradicional, equivalentes a 41% da lista de taxas endémicas de Cabo Verde. [6]

As poucas espécies de plantas que crescem no arquipélago desempenham um papel importante para os cuidados de saúde dos habitantes locais, atendendo suas alegações medicinais. Algumas dessas espécies são aromáticas, com os metabolitos voláteis e permitindo isolar óleos essenciais. [5]

São os casos de mais de uma centena de espécies existentes nas diferentes ilhas, já com reconhecida importância na medicina tradicional noutras regiões, nomeadamente no Arquipélago das Canárias, mas que ainda não são utilizadas pelas populações em Cabo Verde. [6]

Muitas outras plantas da flora cabo-verdiana, sobretudo endémicas, são utilizadas na medicina tradicional, sem que tenham sido realizados estudos comprovativos dos seus princípios ativos. Este trabalho será focado na caracterização química de duas das plantas usadas na medicina popular, nomeadamente o *Campylanthus glaber benth ssp glaber*, e a *Globularia amygdalifolia Webb*.

1.1. Objetivos

Com base em inventários florísticos, famílias/espécies bem classificadas, assim como no uso popular e efeitos dentro da medicina tradicional, consideramos a importância de se estudar a composição química para a justificação científica desses efeitos, através de uma pesquisa das plantas endémicas/plantas medicinais para saber quais são, como são usadas (partes das plantas usadas, extratos, em seco, etc.) e determinar os produtos responsáveis pelas suas atividades biológicas e para que finalidade em termos de função terapêutica que são utilizadas.

O “screening” químico das plantas endémicas de Cabo Verde, tendo como base a sua utilização terapêutica, e o conseqüente isolamento do respetivo princípio ativo constitui um contributo importantíssimo para o entendimento da ação que leva sua utilização. Numa etapa mais avançada a descoberta do princípio ativo, pode ser a primeira etapa do desenvolvimento de um novo medicamento. É sobre estes pressupostos que se assenta este trabalho.

1.1.2. Objetivos específicos

Este trabalho teve como objetivos específicos:

- Isolar os metabolitos Secundários existentes na planta *Campylanthus glaber* Benth ssp *glaber* e na *Globularia amygdalifolia* Webb;

- Utilizar técnicas de separação e purificação de metabolitos, tais como a Cromatografia em coluna e Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de Massa (GC-MS).

- Efetuar a elucidação estrutural, usando técnicas comumente utilizadas em fitoquímica, tais como: a Espectrometria de Massa (MS), Ressonância Magnética Nuclear, (RMN), infravermelho (IV), etc., com o objetivo de caracterizar os componentes isolados.

1.2. Cabo Verde: Caracterização Geográfica

O arquipélago de Cabo Verde está localizado no Oceano Atlântico Norte, próximo da costa da África Ocidental, 600 km a oeste do Senegal.^[7] Localizado na zona sub-saheliana, o arquipélago é caracterizado por condições climáticas de aridez e semi-aridez. Conta com duas estações: a das chuvas ou «das águas» (muito irregulares) - de agosto a outubro - e a estação seca, ou o «tempo das brisas», que vai de dezembro a junho. Os meses de julho e novembro são considerados meses de transição. A penúria em água é uma constante. As secas são frequentes e no passado (até os finais dos anos 40), acarretavam frequentemente a fome que dizimava, por vezes, 10 a 30% dos seus habitantes.^[8]

parte das plantas introduzidas tem valor medicinal e muitas delas têm grande importância para a pecuária (pastagem), alimentação e como ornamentais.^[11]

O arquipélago apresenta uma grande variedade de endemismos, na flora, avifauna e herpetofauna. [9] Considera-se que a flora do arquipélago de Cabo Verde no Atlântico norte compreende aproximadamente 740 espécies de plantas vasculares, sendo 92 delas endêmicas.^[12] Algumas dessas espécies são aromáticas, com os metabolitos voláteis e permitindo isolar óleos essenciais. Devido ao seu perfume intenso, estas são facilmente reconhecidas e lembradas e, provavelmente por essas razões, são as espécies preferidas e as mais conhecidas.^[5]

Como reflexo da situação geográfica do arquipélago, a flora de Cabo Verde engloba na sua composição elementos de floras de diversas regiões, das quais as mais representadas são a região florística Macaronésica (Canárias, Madeira e Açores) e os países africanos (Senegal, Gâmbia, Mauritânia e Marrocos)³.

Cabo Verde é um país com elevado endemismo e encontra-se inserido num dos centros mais importantes do mundo para a diversidade vegetal que é a Bacia do Mediterrâneo. Esta bacia é considerada pela Conservação Internacional como um dos maiores Hotspot do mundo. Devido ao desmatamento para a prática de agricultura, obtenção de combustíveis e uso na medicina tradicional, muitas espécies de plantas encontram-se em perigo de extinção. Atualmente essas espécies são encontradas, na maioria das vezes, apenas em áreas protegidas, criadas para fins de preservação das espécies, denominadas Parques Naturais^[10].

As plantas nativas cabo-verdianas ainda não têm estudos que permitam a elaboração de monografias completas e modernas. As espécies são usadas empiricamente, sem respaldo científico quanto à eficácia e segurança. A utilização dessas espécies deve-se aos conhecimentos estritamente herdados e alguns posteriormente adquiridos, o que demonstra que num país como Cabo Verde, com uma biodiversidade razoável, existe uma enorme lacuna entre a oferta de plantas e a existência de pesquisas.^[10] A diversidade vascular endêmica de Cabo Verde é mais alta do que se pensava anteriormente e é necessário trabalhar ainda mais para a caracterizar a flora.^[12] Apesar do valor reconhecido da flora cabo-verdiana, o estudo de plantas medicinais ainda é incipiente^[7].

Artemisia gorgonum (Asteraceae), *Satureja forbesii* (Lamiaceae) e *Tornabenea annua* e *Tornabenea insularis* (Apiaceae), são plantas aromáticas endêmicas, juntamente com as

³ <http://www.sia.cv/index.php/sia-mainmenu/perfil-ambiental?id=66> (consultada em 18/10/2017)

espécies alóctonas, *Cymbopogon citrates* (*Poaceae*), *Hyptis pectinata* (*Lamiaceae*), *Tornabenea bischoffi* e *Tornabenea tenuissima* (*Apiaceae*) representam a biodiversidade aromática do arquipélago de Cabo Verde ^[5].

1.4. Espécies /Famílias de plantas Selecionadas

Criado pelo Decreto-Lei nº 3/2003, de 24 de fevereiro, o Parque Natural de Serra Malagueta situa-se na parte norte da Ilha de Santiago da República de Cabo Verde, entre os paralelos 15° 10' 12'' e 15° 12' 12'' Norte e os meridianos 23° 39' 26'' e 23° 42' 17'' Oeste, é alongado na direção Este-Oeste, com a maioria no Norte-Nordeste, na parte norte da ilha, mantendo uma parcela pequena no Noroeste, sendo a altitude máxima de 1064 metros. O Parque possui uma área de 774 hectares e situa-se na confluência de três municípios, o de Santa Catarina (302 hectares), o São Miguel (436 hectares) e o de Tarrafal (36 hectares)⁴.

As espécies selecionadas localizam-se no Parque Natural de Serra Malagueta. Foram objetos de estudo para a identificação química dos seus componentes, assim como a sua utilização na medicina popular são descritas a seguir.

1.5. Família das *Scrophulariaceae*

As *Scrophulariaceae* são uma família de plantas angiospérmicas dicotiledóneas. As plantas são ervas anuais ou perenes com flores de simetria zigomórfica ou raramente radial (actinomórfica). Os membros das *Scrophulariaceae* têm uma distribuição cosmopolita, com a maioria encontradas em zonas temperadas, incluindo montanhas tropicais. O nome da família baseia-se no nome do género *Scrophularia* L. No passado, foi tratada como incluindo cerca de 275 géneros e mais de 5.000 espécies, mas a sua circunscrição foi radicalmente alterada desde que numerosos estudos moleculares conduziram a uma nova arrumação genérica ^{[13][14]}.

Atualmente, o *Scrophulariaceae*, na ordem de Lamiales, tem cerca de 62 géneros com aproximadamente 1830 espécies, cosmopolitas, distribuídas principalmente em regiões temperadas.^[15] Deste modo, muitos géneros foram recentemente transferidos para outras famílias dentro da Ordem Lamiales, nomeadamente Plantaginaceae e Orobanchaceae, mas também para várias famílias novas. ^[16] Várias famílias das Lamiales tiveram as suas

⁴ Cfr. Decreto-Regulamentar no 19/2007 de 31 de Dezembro, que aprova a delimitação do Parque Natural de Serra Malagueta da Ilha de Santiago, pertencente à Rede Nacional das Áreas Protegidas, declarada no anexo ao Decreto-Lei 3/2003 de 24 de Fevereiro, de acordo com as coordenadas, referências e croqui cartográfico em, de que faz parte integrante do presente diploma

circunscrições ampliadas para acomodar géneros transferidos das *Scrophulariaceae sensu lato*. A família inclui algumas plantas medicinais, entre elas: *Leptandra*, *Scrophularia* e *Verbascum*.⁵

Conforme se pode observar na figura 2, a maior parte do resto desta família está no hemisfério sul, em particular a África do Sul, onde quatro tribos são endêmicas. A Austrália tem uma representação substancial das *Scrophulariaceae* na forma das *Myoporaceae*, um grupo tradicionalmente considerado de uma família distinta, mas agora é visto como pertencente a *Scrophulariaceae*. A *Buddlejaceae* também está incluída neste grupo e é distribuída na África, Ásia e no continente americano. Excluindo *Myoporaceae* e *Buddlejaceae* de *Scrophulariaceae* tornaria o grupo restante parafilético^{[13][14][16]}.



Figura 2: Mapa de distribuição da família *Scrophulariaceae*⁶.

Os membros da família *scrophulariaceae* têm uma importância económica limitada. Como exceção podem-se mencionar os géneros *Digitalis*, cujos membros se extrai a digitalina e digoxina, medicamentos importantes para infeções cardíacas. Espécies de alguns géneros como *antirrhinum*, *calceolária*, *mimulus*, *penstemon*, *verbascum* e *veronica* são conhecidas como plantas ornamentais. Algumas espécies hemiparasitas causam sérios problemas na agricultura, afetando os cultivos: por exemplo, as do género *triga*, que se distribuem no este e norte de África, parasitam os cultivos do milho e sorgo provocando anualmente perdas que variam entre 30% e 75% da produção total.^[17]

Outros estudos relacionados com os membros da família *Scrophulariaceae* são relatados. Segundo os estudos de Seghiri *et al.* (2014).^[18] do género *Linaria*, um dos 220 géneros da família *Scrophulariaceae*, distribuídas na bacia mediterrânea e no leste da Ásia, usadas na medicina popular em muitas áreas para o tratamento de várias doenças, por exemplo, flores

⁵ <https://en.wikipedia.org/wiki/Scrophulariaceae#fischer2004scrophulariaceae> (consultada em 20-11-2017).

⁶ Fonte: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/welcome.html> (Consultada em 16-11-2017).

frescas ou secas de *Linaria (L)* vulgar são usadas internamente para ajudar os problemas digestivos e distúrbios urinários. Externamente, a planta é aplicada no tratamento de hemorroidas, úlcera da perna, para ablação de feridas e erupções cutâneas.

Também é relatado que tem efeito anti-inflamatório e para tratar tosse e asma. *Linaria japonica* conhecido sob o nome "unran" é usado como diurético, purgativo e laxante. *Linaria cymbalaria* é usado por seus efeitos diuréticos, tônicos e antiescorbútics. [18] O estudo anterior relatou a presença de sete constituintes, como flavonóides, iridoídes e esteróides nas flores e hastes de *L. reflexa* Desf. Nesta investigação, seis compostos (Figura 3) principalmente, pectolarina (1); linariin (2); linoleato de metilo (3); apigenina(4); o manitol(5) e a pectolarigenina (6) foram obtidos a partir das partes aéreas de *L. reflexa*.

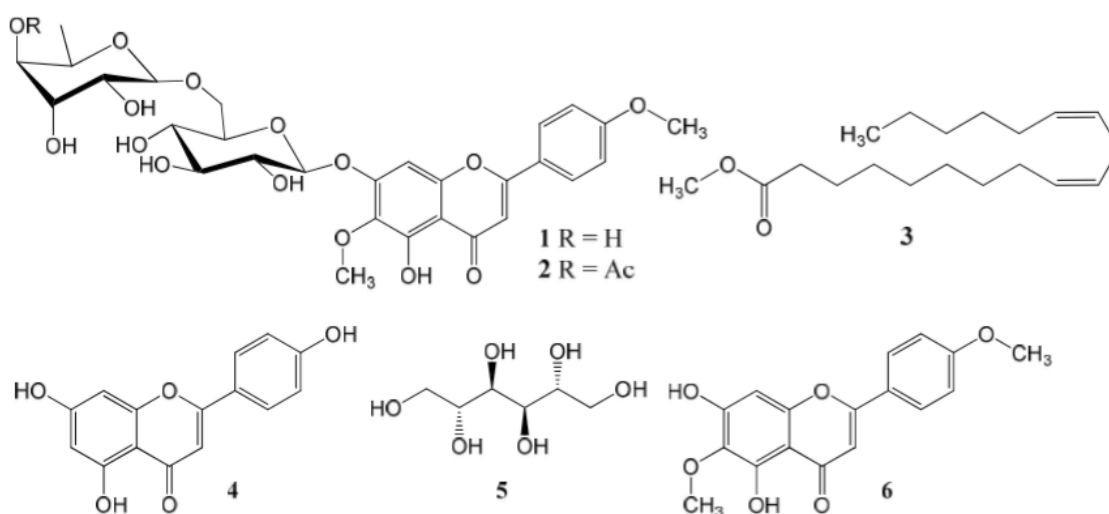


Figura 3: estrutura dos compostos de 1 a 6 extraídas das partes aéreas de *Linaria reflexa* [18].

Outro estudo fitoquímico da *Cymbaria daturica L. (Scrophulariaceae)* proporcionou 16 compostos, incluindo 12 flavonóides e 4 iridoídes. [19]

Scrophularia saharae Batt. & Trab. (*Scrophulariaceae*) é uma planta perene, comum em toda a região desértica da Argélia. O isolamento e a caracterização de um novo iridoide glicosilado, juntamente com quatro iridoídes conhecidos: harpagoside, 8-O-acetilharpagide, scropolioside B e scropolioside D. sendo que os iridoídes e os seus derivados de glicosídeos são marcadores quimioterápicos da família *Scrophulariaceae*, a que pertence o género da *Scrophularia*. [20]

Scrophulariaceae é considerada uma família problemática. É uma grande família de angiospermas para a qual um tratamento e subdivisão sistemática baseados em motivos morfológicos tem sido difícil e levou a diferenças de opinião e instabilidade taxonómica.

Muitas pesquisas contribuíram para os esforços em andamento para criar uma classificação filogenética de Scrophulariaceae usando microcaracteres morfológicos, bem como caracteres químicos, incluindo os iridoides, flavonoides ou distribuição de betaína.^{[21][16][22]} Sendo as espécies *Verbascum capitis-viridis* Hub.-Mor (nome vulgar “sabão-de-feiticeira”), usada na medicina tradicional no Tratamento de febre (suco das folhas em solução aquosa, (utilizada no banho); *Verbascum cystolithicum* (Pett.) Hub.- Mor (“mato-branco”) e *Campylanthus glaber* Benth. ssp. *glaber* (“alecrim-brabo”).

1.5.1. *Campylanthus glaber* Benth. ssp. *glaber*

Campylanthus tem sido incluído nas *Scrophulariaceae*, mas as relações dentro da família são incertas.^[24] *Campylanthus* tem um tipo de inclusão lamelar comum na subfamília *Scrophularioideae*, mas não na tribo de *Rhinanthoidea* e *Veroniceae*. Sugeriu-se que *Campylanthus* não deveria permanecer na *Veroniceae*, caracterizada por um tipo de inclusões amorfos, mas pode estar mais relacionada a grupos com inclusões lamelar.^[24] As plantas *Campylanthus glaber* Benth ssp. *glaber*, Família *Scrophulariaceae*, utilizada na medicina tradicional Cabo-verdiana e popularmente conhecidas como Alecrim Brabo é usada no tratamento para dores de cabeça e perturbações menstruais.^{[23][25][26]}

Campylanthus glaber Benth ssp. *glaber* (Figura 5) é caracterizado, por ser um pequeno arbusto rasteiro, perene, de folhas muito estreitas (0,05-0,2 cm de largura), frouxos, ligeiramente suculentas. Flores pequenas (6-9 mm de comprimento), corola com um tubo cilíndrico, arqueado e amarela. Limbo estrelado com 5 lobos ovados, apiculados, de um lilás rosado, com a fauce amarela.^{[26][23]}

Geograficamente estão distribuídas nas ilhas cabo-verdianas Santo Antão, S. Vicente, S. Nicolau, Santiago, Fogo e Brava.^{[24][27][23][25][12]} Na ilha de Santiago pode ser encontrado no Concelho de Santa Catarina, no coroamento montanhoso e nas escarpas, no Parque Natural de Serra da Malagueta. Nos barrancos e escarpas nas proximidades de Rui Vaz, no Concelho de São Domingos.^[26] *Campylanthus* inclui 18 espécies de arbustos e sub-arbustos, sendo duas restritas à Macaronésia (Ilhas Canárias e Cabo Verde) e 16 ocorrendo do leste da África, da Arábia, do Paquistão (figura 4).^{[28][29][24]} A linhagem ocidental é atualmente representada por *Campylanthus salsoloides* nas ilhas Canárias e *Campylanthus glaber* nas ilhas de Cabo Verde.^[29]

Tem um centro de diversidade na Arabia Saudita (nordeste africano). Estas regiões abrigam juntos 12 das 15 espécies conhecidas de *Campylanthus*, a maioria descrita botanicamente nos últimos 22 anos. Uma espécie é confinada ao Sul do Paquistão, e duas espécies

estritamente relacionadas são distribuídas nas Ilhas Canárias e Cabo Verde, uma área extraordinariamente desigual da distribuição principal do gênero ^[30].



Figura 4: Mapa do norte da África e da Arábia mostrando a distribuição total do *Campylanthus* ^[29].



Figura 5: *Campylanthus glaber* Benth. in DC. ssp. *Glaber* ^[26].

Apesar do grande potencial terapêutico usado na medicina tradicional de Cabo Verde, as espécies do gênero *Campylanthus glaber* Benth, ainda não foram alvo de muitos estudos para o conhecimento de suas propriedades químicas e biológicas, e algumas espécies do gênero *Cmpylanthus* foram analisadas^[30].

Quanto ao estudo químico da espécie *C. glaber*, o único trabalho encontrado na literatura foi os de Ronsted e Jensen (2002) ^[24], que utiliza a extração solido-liquido com etanol para obter os extratos e identificar os compostos por RMN e por comparação com dados conhecidos. Nos estudos de Ronsted e Jensen (2002) ^[24], a composição química de *Campylanthus* é escassamente investigada. Os iridoídeos glucosilados são comuns nos asterídeos, onde são marcadores taxonômicos úteis. ^[24] As *Lamiales* (exceto *Oleaceae*)

contém muitas vezes iridoides descarboxilados em C-11, como aucubina e seus derivados. No referido estudo, as partes aéreas frescas de *Campylanthus glaber* foram extraídas com etanol e foram isolados os seguintes compostos: erigerosídeo (1,6 g, 1,3%), aucubina (400 mg, 0,3%), uma mistura de 55 mg (na proporção: 2: 2: 1) de gardoside (0,02%), monomelittósido (0,02%) e melittósido (0,01%); ácido geniposídico (34 mg, 0,03%); uma mistura de 40 mg (na proporção: 2: 1) de ácido 8-epiloganico (0,02%) e salidroside (0,01%); e finalmente avandulifoliosido (172 mg, 0,14%).

No mesmo estudo, o *Campylanthus salsaloides* foi extraído com etanol sendo isolado os seguintes compostos: uma mistura (na proporção: 2: 1) de manitol (2,7% de peso seco) e sorbitol (1,4%); erigerosídeo (6,5%); aucubina (0,15%); uma mistura (na proporção de 2: 2: 1) de gardósido (0,03%), monomelittósido (0,03%) e aucubina (0,01%); gardosido (0,09%); ácido geniposídico (0,7%); ácido mussaenosídico (0,9%) e lavandulifoliosídeo (0,8%).

Os perfis químicos de *Campylanthus glaber Benth* (endêmico de Cabo Verde) e de *Campylanthus salsaloides* (Canárias) são semelhantes, com exceção da presença de 8-epiloganin e salidroside em *C. glaber*. Dos compostos encontrados no presente estudo, o erigerosídeo não apresenta significância taxonômica, apenas a presença do sorbitol pode ter significado taxonômico, uma vez que este açúcar é de distribuição limitada, sendo comum apenas em partes de Rosaceae e *Plantago*

Kooiman (1970) citado por Ronsted e Jensen (2002), num estudo de triagem de TLC sobre a ocorrência de iridoides glucosilados em *Scrophulariaceae*, encontrou aucubina (Figura 6) em *Campylanthus* e manchas indicando a presença de outros dois iridoides não identificados em *Campylanthus salsaloides*. No entanto, sendo generalizado na família, a aucubina não é um bom marcador taxonômico na *Scrophulariaceae*, e uma investigação mais aprofundada dos iridoides de *Campylanthus*, usando técnicas modernas, pareceu útil na exploração das possíveis relações do gênero. Nos estudos de Diaz et al. (1967) também citado por Ronsted e Jensen (2002) ^[24], obteve-se a sapogenina esteroide, samsaspapenina, após hidrólise de um extracto foliar de *Campylanthus Salsaloides*. Foi determinado um perfil químico para *Campylanthus*, que é muito semelhante ao encontrado no *Plantago*. Contudo, nos estudos de Ronsted e Jensen (2002) ^[24] sobre *Campylanthus*, nenhum dos iridoides encontrados foi do tipo 8,9-insaturado.

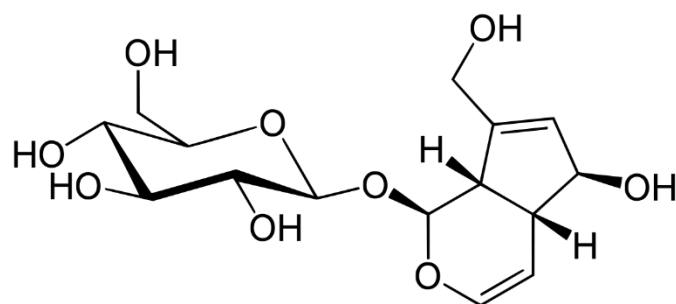


Figura 6: Estrutura da Aucubina ^[31].

Estudos biológicos comprovam que a aucubina extraída de sementes de *Eucommia ulmoides*, mostrou efeito protetor contra a lesão gástrica aguda da mucosa causada pelo etanol devido aos efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, em ratos. verificou-se também que a aucubina melhorou a proteção da mucosa gástrica por regulação ascendente do nível HSP-70 e normalização dos níveis EGF, VEGF e COX-1. A administração oral profilática da aucubina diminuiu os índices de úlcera gástrica e as características histológicas. ^[31]

O *Campylanthus* por ser da família *Scrophulariaceae* que é por sua vez caracterizada principalmente pela presença das iridoides glucosilados: aucubina, catalpol e derivados destes, e os seus congêneres biossintéticos ^[32] são alvos de estudos químicos e farmacológicos, que incluem o isolamento e identificação dos seus compostos com interesse medicinal.

Nos estudos de Navarrete *et al.*, (2016) ^[33] os compostos bioativos extraídos da planta *Plantago lanceolata L*, aucubina e acteosídeos, *a priori* considerados que tinham efeitos antimicrobianos e antifúngicos, foram avaliados os seus efeitos sobre a fermentação do rúmen *in vitro*. A aucubina mostrou ter o potencial de reduzir a produção de NH₃ na fermentação do rúmen.

Contudo os estudos sobre isolamento dos compostos químicos e farmacológicos do género *Campylanthus* ainda são escassos. Os restantes estudos encontrados sobre *Campylanthus* referem-se à sua variabilidade, taxonomia e características morfológicas.^[30] Nos estudos de Thiv *et al.*, (2010) ^[29] foram testados a hipótese de variabilidade usando um exemplo proeminente de disjunções macaronesianas-Eritreo/árabe, e o género *Campylanthus* (*Plantaginaceae*, anteriormente *Scrophulariaceae*), utilizando uma análise filogenética molecular.

Tendo em conta a grande dimensão do género *Campylanthus* e a sua dispersão de estudos, não existem conclusões definitivas sobre a relação química do género *C. glaber* (Cabo Verde) e sua atividade biológica. Segundo o Hjertson (2015)^[28], o género *Campylanthus* (*Scrophulariaceae*) foi revisto e 15 espécies foram reconhecidas. Os aspetos morfológicos do género são discutidos e uma análise cladística incluindo todas as espécies é apresentada. A análise indica uma divisão entre espécies ocidentais e orientais no género.

1.6. Família *Globulariaceae*

A *Globulariaceae* é uma família de plantas dicotiledóneas da ordem *Scrophulariales*. São pequenas plantas herbáceas, de folha simples, alternas, das regiões temperadas a subtropicais. Podem ser encontradas na Europa e Norte de África. O sistema APG inclui estas plantas na família *Plantaginaceae*, situando-as na ordem *Lamiales*. Composta por 30 espécies distribuídas em dois géneros: *Globularia* L. e *Poskea*^[7]. A Sua distribuição ocorre principalmente no mediterrâneo, na parte sul e norte da Europa, com um número considerável de espécies endémicas em Cabo Verde e Ilhas Canárias, Atlas, Baleares, Itália, Grécia e Turquia ^{[34][35][36][37]}. As espécies do género *Globularia* (*Plantaginaceae*) são conhecidas como fontes de diferentes compostos fenólicos e iridoides. *Globularia alypum* L. é uma planta medicinal usada como agente de cura em muitos países do mediterrâneo. As semelhanças na composição fitoquímica são muitas vezes observadas para espécies relacionadas e os flavonoides (principalmente sob a forma de glicósidos) forma reconhecidos como principais metabólitos secundários destas ^[38].

Alguns membros deste género são bem conhecidos pelas suas propriedades biológicas que estão apresentadas na tabela 1. A *Globularia alypum* L. é utilizada para diversos fins, tais como agentes hipoglicemiantes, laxantes, colagogos, estomacais, purgativos, sudoríferos e também no tratamento de doenças cardiovasculares e renais. A *Globularia arábica* Jaub. & Spach é usada na medicina tradicional na Jordânia.^[37] Ambas as espécies *Globulária* também são conhecidas pelas suas atividades antimicrobianas e antitumorais.^[35] *Globularia trichosantha* Fisch. & CA Mey. é utilizada para o tratamento de hemorroidas ^[37].

Taskova *et al.*, (2006)^[36] faz referência a estudos anteriores de varias espécies de *Globulária* e alguns dos principais compostos presentes possuem estruturas elucidadas na figura 7:

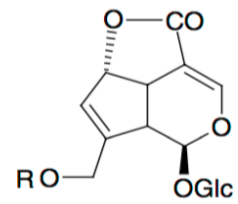
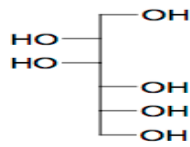
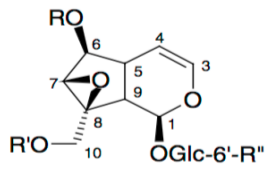
- ✓ Globularina (a) foi descrito pela primeira vez de *G. Alypum* (1966);
- ✓ Manitol (b) e (a) foram relatados de *G. salicina* (1969);

- ✓ Asperulosido (c), aucubina (d) e catalpol (e) juntamente com uma série de compostos relacionados a (a) foram descritos de *G. cordifolia* e *G. alypum* (1980-1981);
- ✓ Os mais recentes (1999-2004), várias espécies turcas foram relatadas e muitos dos iridoides anteriormente conhecidos, juntamente com novos, dos quais alguns estavam relacionados com o ácido arborescosídico (f).

Na mesma publicação de Taskova *et al.* (2006) [36], foi investigada a espécie *Globularia vulgaris*, que não tinha sido estudada anteriormente, e esta espécie continha como esperado manitol (b) como principal derivado glucídico. Foram isolados os ácidos iridoides do gardoside (g), o ácido mussaenosídico (h) e o ácido geniposídico (i), dos quais g e h são novos para o gênero. A aucubina (d), catalpol (e) e os ésteres de iridoides conhecidos como asperulosido (c), 10-benzoilcatalpol (j) e globularina (a) também estavam presentes nesta espécie e adicionalmente o novo éster de benzoílo k.

Sobre os estudos de iridoides glicosilados e bisiridoid da *Globularia meridionalis*, Tundis *et al.* (2012) [37] cita-se que em alguns casos, a presença de iridoides tem sido usada para suportar uma classificação botânica definida. [37] Os bisiridoides em *Globularia* parecem estar confinados ao complexo de espécies de *G. cordifolia*. De acordo com caracterizações anteriores de espécies de *Globularia*, o estudo de *G. meridionalis* confirma completamente os compostos encontrados no gênero, demonstrando a ocorrência de iridoides como marcadores. Assim, os resultados sugerem potencialidades taxonômicas desses compostos em espécies, família e nível de ordem em *Lamiales*.

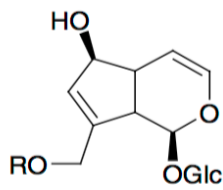
A globularina (Figura 7 a;) é um glicósido purgativo presente em quantidades elevadas em *G. alypum* e *G. punctata*. [38] Os estudos in vivo deste composto isolado mostrou que desempenha um papel importante na anti-hipercolesterolemia e anti-hipertrigliceridemia propriedades de *Globularia alypum* e base científica para o uso desta planta em medicina tradicional, a Globularina tem esta potência farmacológica que pode ser usada no futuro [39].



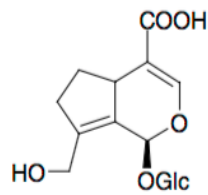
a; R=R''=H; R'=cinnamoyl;

Globularina

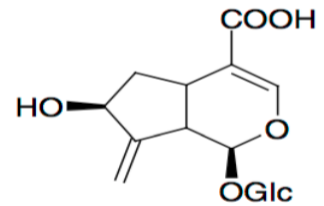
e: R=R'=R''=H; Catalpol



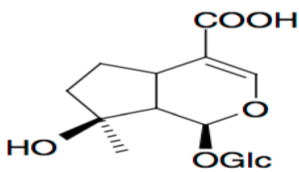
d; R=H; Aucubina



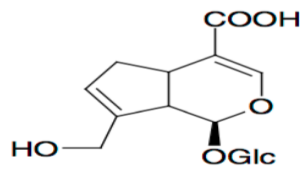
f; ácido arborescosídico



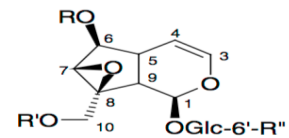
g; Gardosido



h; ácido Mussaenosídico

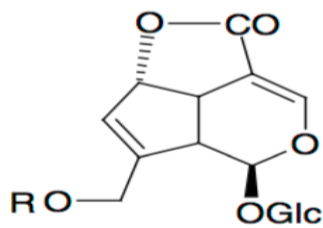


i; ácido Geniposídico



j; R=R''=H; R'=benzoyl;

Benzoylcatalpol



k; R=benzoyl; Besperuloside

Figura 7: Compostos Isolados em algumas espécies da *globulária*.^[36]

Tabela 1: Estudos de ação farmacológico relacionados à algumas espécies da família *Globulariaceae*.

N	Espécie	Uso popular	Parte /preparo	Tipo de teste	Ação /Efeito Farmacológico	Compostos presentes	Autor
1	<i>Globularia arábica</i> Jordânia (Tafila)	Antimicrobianas	Folhas/Ext. etanólico	Efeito da toxicidade reprodutiva em ratos	A toxicidade materna invariavelmente provoca aumento das reabsorções precoce e morte fetal tardia	ácidos aromáticos, compostos fenólicos, manitol hetrosídeos, globularina	[35]
2	<i>Globulária alypum</i> Jordânia (Tafila) Tunísia (Korbos)	Agente laxante e diurético ,tratamento de furúnculos , febre intermitente , atrite, afrodisíaco.	Folhas /Ext. etanólicos	Efeito da toxicidade reprodutiva em ratos		ácidos aromáticos, compostos fenólicos, manitol hetrosídeos, globularina	[35]
3	<i>Globulária alypum L.</i> Taounate (Marrocos)	Agente hipoglicêmico, laxante, purgativo e sudorífico.	Folhas /Ext. aquoso	Níveis de glicose no sangue em ratos diabéticos normais e induzida por estreptozotocina (STZ)	Efeito hipoglicemiante significativo.	Plantas livres de compostos tóxicos nas doses testadas.	[40]
4	<i>Globularia alypum L.</i> Taza, Marrocos	Laxante, purgativo, sudorífero, tratamento de doenças cardiovasculares e renais	Parte aéreas /Ext. hidro-metanólico	Atividade antioxidante contra radical livre de 2,2-difenil-1-picrilidrazilo. Ensaio in vitro do extrato hidroalcoólico.	significativa atividade antioxidante.	flavonóides , iridóides , phenylethanoids e siringina	[41]
5	<i>Globularia meridionalis</i> Italia	agente hipoglicémico, , colagogo, estomacal, purgante, sudorífico e tratamento de Doenças cardio-vasculares e renais.				foram identificados: geniposídeo ; melampyroside ; globularifolin; speruloside; globuloside A; globuloside B	[37]

(Continuação da Tabela 1)

N	Espécie	Uso popular	Parte /preparo	Tipo de teste	Ação /Efeito Farmacológico	Compostos presentes	Autor
6	<i>Globularia alypum</i> Argélia	Tratamento de diabetes, doenças cardiovasculares, lesões cancerosas do estômago, cólon, reto, fígado e esôfago.	folhas/ext. aquoso liofilizado	Redução do distúrbios metabólicos e estresse oxidativo induzido em ratos	O extrato aquoso de GA parece útil como um adjuvante para a prevenção e / ou tratamento de hipertrigliceridemia e estresse oxidativo.	OBS: são necessárias investigações adicionais para identificar os ingredientes biologicamente ativos.	[42]
7	<i>Globulária alypum L.</i> Colinas de testour (noroeste da Tunísia)	Contra reumatismo, gota, febre tifoide, febre intermitente e diabetes	Folhas /extt.aq. em agua	Toxicidade agudas e crônicas em camundongos	Toxicidade aguda muito baixa. A toxicidade crônica mostrou impacto no peso de crescimento de alguns órgãos. Indução de espermatogénese ativa.	Conclui que que G. <i>Alypum L.</i> contém substâncias ativas andogénicas.	[43]
8	<i>Globularia alypum L</i> Beja no Norte da Tunísia	Usado contra doenças de pele e abscessos e na Cura de úlceras.	Folhas / ext. MeOH	Avaliar o efeito da cicatrização de feridas in vivo e efeito anti-inflamatórias, atividades antimicrobianas e antioxidantes in vitro; bem como as composições químicas do extrato metanólico GA.	Provou-se que os vários compostos químicos são a fonte dessas diferentes atividades biológicas (antioxidante, antiinflamatório e antimicrobiana e efeito cicatrizante).	Foram identificados 17 compostos: 3 Polifenóis ; 6 fenóis, incluindo 4 ácidos fenólicos ; 2 açúcares ; 4 ácidos gordos ,1 glicerol e um fitol.	[44]
9	<i>Globulária alypum</i>	Usado como agente hipoglicémico, laxante, e purgativo e, além disso, usada no tratamento da doença renal	Folhas	investigar os efeitos protetores do extrato de folhas GA contra a nefrotoxicidade provocada por uma exposição crônica à deltametrina (DLM) em ratos.	O tratamento com GA restaurou o aumento dos níveis plasmáticos de creatinina, ureia e ácido úrico, reduziu os níveis elevados de MDA e PC, e normalizou significativamente as atividades da enzima antioxidante. -GA apresentou efeitos protetores contra a nefrotoxicidade induzida por deltametrina através da ação de seus compostos bioativos.	Revelou a presença de 39 compostos entre eles, a globularina foi o principal composto (9444 mg / 100 g de matéria seca).	[45]

1.6.1. *Globularia amygdalifolia webb*

Todas as espécies de *Globularia* têm hastes lenhosas ou bases de tronco (a estrutura da madeira não é "pedomorfa"), todas são de folhas verdes ou semi-verdes. Algumas podem produzir botões no hipocótilo (*G. salicina*) ou nas raízes (*G. punctata*). A raiz principal domina o sistema radicular na maioria das espécies durante toda a vida da planta (exceção: o grupo *G. cordifolia*).^[46] A *Globularia amygdalifolia Webb* (Figura 8), conhecida vulgarmente por "mato-botão", pertence à família *Globulariaceae*. Esta espécie é endêmica de Cabo verde.^{[23] [25]}

Única espécie representante do género no país, ocorre normalmente em zonas húmidas e sub-húmidas, mas foi encontrada em Santiago, em zona árida. Ocorre normalmente em zonas de altitude média superior a 400 metros, e excepcionalmente em algumas localidades de altitude inferior a 100 metros.^[25] Na ilha de Santiago, é uma espécie rara, no entanto existe uma comunidade silvestre no sub-bosque do perímetro florestal de Rui Vaz nas proximidades do Pico de Antónia. Arbusto lenhoso, até 1,5 m de altura, caule com muitos ramos, folhas em forma de lança, de cor verde quando jovens, tornando-se, depois, acinzentados. Inflorescência com um pedúnculo axilar delgado de 3-4 cm e flores azuladas ou arroxeadas. Planta medicinal usada como remédio para dores de dente e alívio de dores de barriga.^{[26] [25] [23]}

A espécie mais estreitamente relacionada a *Globularia amygdalifolia Webb* é a *Globularia salicina* das ilhas canárias, ambas as espécies diferem de outras espécies *globulárias* de forma encaracolada, em vez de terminal⁷. Apesar do uso das espécies do género *Globularia* na medicina popular em Cabo Verde a escassez de estudos químicos e biológicos, os motivos principais para a escolha da espécie como objeto de estudo e o desenvolvimento do presente trabalho.



Figura 8: Imagem da espécie *Globularia amygdalifolia Webb* de Cabo verde.
Fonte: <http://botany.cz/cs/globularia-amygdalifolia/> (consultada em 21-11-2017).

⁷ <http://botany.cz/cs/globularia-amygdalifolia/> (consultada em 21-11-2017).

1.7. Produtos naturais como fonte de novos fármacos

As plantas podem ser classificadas de acordo com sua ordem de importância, iniciando-se pelas plantas utilizadas diretamente na terapêutica, seguidas daquelas que constituem matéria-prima para manipulação e, por último, as utilizadas na indústria para obtenção de princípios ativos ou como precursores em semi-síntese [47].

A maior dificuldade encontra-se na busca da planta correta no meio de um grupo muito vasto e variado. [54] Segundo Relatório “*State of the World’s Plants*” 2016 publicado pelo Jardim Botânico Real de Kew, o número de espécies de plantas conhecidas na Terra é estimado em 391.000, das quais 300 mil espécies possuem propriedades medicinais sendo mais de destas 200 mil existentes em regiões tropicais de África. [48]

Outro problema comum que enfrenta a pesquisa botânica é o da qualidade das ervas usadas no estudo. Há relatos na literatura onde os investigadores usaram produtos de qualidade inferior, dando lugar aos resultados confusos e tendenciosos. Em certos estudos, os pacientes apresentaram melhorias para um tratamento com plantas particular, no entanto, quando o produto foi testado quanto ao seu conteúdo, não foi encontrado nenhum material herbário dentro dele! Assim sendo, é importante que as formulações testadas experimentalmente tenham o seu conteúdo exato conhecido com antecedência, a fim de evitar quaisquer conclusões falsas da experiência. [49]

A pesquisa de novos fármacos teve sempre inspiração em produtos naturais bioativos isolados de plantas [50]. Os produtos naturais contribuem grandemente para a história e panorama de Novas Entidades Moleculares (NEMs). Uma avaliação de todos os NEMs aprovados pela FDA (Food and Drug Administration) revela que os produtos naturais e seus derivados representam mais de um terço de todos os NEMs. Quase metade deles é derivado de mamíferos, um quarto de micróbios e um quarto de plantas. Desde a década de 1930, a fração total de produtos naturais diminuiu, enquanto os derivados de produtos naturais semissintéticos e sintéticos aumentaram. [51]

A dependência de produtos naturais não é obrigatória e muitos medicamentos são moléculas pequenas puramente sintéticas ou produtos biológicos fabricados, como vacinas, anticorpos e proteínas recomendadas. Dadas essas alternativas, é necessário que haja um raciocínio para a contínua exploração de produtos naturais, e dois principais argumentos podem ser apresentados. [52]

1: Os produtos naturais integram uma área diferente do espaço químico de compostos sintéticos. Se isso fosse falso, seria mais rentável concentrar-se em compostos sintéticos

mais facilmente acessíveis. No entanto, existem diferenças significativas na estrutura molecular produzida pela natureza quando comparada às moléculas sintéticas da química medicinal. Embora ambos visem produzir matéria biologicamente ativa, a biossíntese tem por base um conjunto diferente de restrições e princípios orientadores do que o químico orgânico sintético.

2: Os produtos naturais são suscetíveis de melhorar ainda mais. Se isso não fosse verdadeiro, os extratos de produtos naturais seriam suficientes, ou o produto natural purificado se tornaria o medicamento final sem modificação. Embora isso geralmente seja o caso, este é contrário ao paradigma de descoberta de medicamentos, onde os compostos iniciais são submetidos a extensas campanhas de química medicinal antes que um candidato seja selecionado. A priori, os produtos naturais devem sofrer o mesmo ciclo iterativo de melhoria, pois sua razão evolutiva para a existência não é para uso como agente terapêutico.

Nas últimas décadas do século XX os produtos naturais foram estudados para a sua utilização como medicamentos naturais não modificados. [51]

A utilização de produtos naturais e/ou suas estruturas principais, para descobrir e desenvolver a entidade final de medicamentos, atualmente ainda é muito estudado. Por exemplo, na área do cancro, ao longo do período de cerca de 1940 até o final de 2014, das 175 pequenas moléculas aprovadas, 131 ou 75%, são diferentes de "S" (sintético), com 85 ou 49%, na verdade, são produtos naturais ou derivados diretamente destes. [53]

Alguns fármacos utilizados atualmente para o tratamento de cancro se originaram de produtos naturais ou resultam de suas modificações. [54] 6 em cada 10 pessoas com cancro (60%) usam medicamentos de origem natural juntamente com tratamentos convencionais. Nos últimos anos, as plantas medicinais demonstraram ser uma fonte natural importante para a terapia do cancro com menos efeitos colaterais [55] com o surgir de novos sistemas de rastreamento relacionados com a explosão da informação genética acelerando a necessidade de identificar rapidamente estruturas *LEADS* efetivas e inovadoras é uma necessidade vital. Uma parcela muito significativa dessas derivações continuará sendo derivada do produto natural [56].

Embora a complexidade intrínseca da descoberta de medicamentos baseada em produtos naturais necessite de abordagens interdisciplinares altamente integradas, os desenvolvimentos científicos, avanços tecnológicos recentes e tendências de pesquisa indicam claramente que os produtos naturais serão uma das fontes mais importantes de novos medicamentos também no futuro [2]. Nas últimas décadas, na maioria dos países,

terapias alternativas, particularmente fitoterapia e suplementos dietéticos, foram cada vez mais investigadas para o tratamento de doenças [57].

1.8. Métodos de extração/separação e Identificação de compostos naturais

O uso de compostos bioativos em diferentes setores comerciais, como indústrias farmacêuticas, alimentares e químicas, significa a necessidade do método mais apropriado e padrão para extrair esses componentes ativos de materiais vegetais. Juntamente com os métodos convencionais, vários novos métodos foram estabelecidos, mas até agora nenhum método único é considerado padrão para a extração de compostos bioativos de plantas. A eficiência dos métodos de extração convencionais e não convencionais depende principalmente dos parâmetros críticos de entrada, compreendendo a natureza da matriz da planta; química de compostos bioativos e conhecimentos científicos [58].

É uma prática comum no isolamento destes compostos bioativos que sejam usadas uma série de diferentes técnicas de separação, tais como ccf, cromatografia em coluna (flash, Sephadex e outras), podem ser usadas para obter compostos puros. Os compostos puros são caracterizados por, espectroscopia de infravermelho de transformação de Fourier (FTIR) e por espectroscopia de ressonância Magnética Nuclear (RMN) de próton (¹H) e de carbono 13 (¹³C)[59].

Os estudos qualitativos e quantitativos de compostos bioativos de materiais vegetais dependem principalmente da seleção do método de extração apropriado [58] [59] [60].

1.9. Métodos de Extração em estudos fitoquímicos

A extração é o primeiro passo crucial na análise de plantas medicinais, porque é necessário extrair os componentes químicos desejados dos materiais vegetais para maior separação e caracterização. A operação básica incluiu etapas, Como pré-lavagem, secagem de materiais vegetais ou liofilização, moagem para obter uma amostra homogênea e, muitas vezes, melhorar a cinética de extração analítica e também aumentando o contato da superfície da amostra com o solvente. As ações adequadas devem ser tomadas para assegurar que potenciais componentes ativos não sejam perdidos, distorcidos ou destruídos durante a preparação do extrato de amostras de plantas [59].

Os compostos bioativos podem ser extraídos de plantas por técnicas de extração convencional, as quais se baseiam na capacidade de extração dos diferentes solventes

utilizados e na aplicação de calor e/ou agitação. As técnicas de extração convencional mais utilizadas são: extração com extrator de Soxhlet, maceração, decocção e hidrodestilação. [58] Apesar destas técnicas continuarem a ser as mais empregues na extração de compostos bioativos, apresentam algumas desvantagens, nomeadamente, longos tempos de extração, necessidade de evaporação de grandes quantidades de solventes, baixa seletividade de extração e, em alguns casos, a decomposição térmica de compostos termolábeis [58].

Para superar estas dificuldades, têm sido introduzidas novas técnicas de extração, referidas como não-convencionais, por exemplo, extração assistida por ultrassons, enzimas, micro-ondas e campos elétricos, extração por fluidos supercríticos e extração por líquidos pressurizados [58]. Os métodos de extração para óleos voláteis evoluíram muito nos últimos anos, tendo surgido técnicas e métodos híbridos que associam as técnicas convencionais às modernas [61].

Na extração com solventes, o caráter lipofílico e pouco polar dos óleos voláteis permite sua extração com solventes orgânicos, em especial éter de petróleo, hexano, éter etílico, etanol e diclorometano, ou misturas deles. O uso deste tipo de extração tem como uma das principais desvantagens a presença de resíduos de solvente no óleo, com subsequente risco toxicológico. Esses resíduos precisam de ser completamente eliminados antes da caracterização olfatória do óleo volátil ou o estudo de suas atividades biológicas /farmacológicas [61].

Outras desvantagens são o longo tempo de extração requerido e a baixa seletividade dos solventes. Assim, além das substâncias voláteis desejadas, constituintes não voláteis de alta massa molecular, como óleos fixos, resinas, ceras epicuticulares e pigmentos, também são extraídos. A extração de óleos voláteis com solventes orgânicos pode ocorrer utilizando-se técnicas convencionais como percolação a frio, mas também pode ser associada a técnicas mais atuais, como ocorre na extração assistida por micro-ondas ou ultrassom. O emprego de técnica híbridas fornece várias vantagens, como aumento de rendimento, redução do tempo e consumo de solvente, o que leva à diminuição dos custos [61].

1.9.1. Identificação

Existem diversos métodos para a análise e identificação de metabólitos secundários conhecidos produzidos em culturas de plantas. A análise de misturas complexas é usualmente feita por cromatografia em camada fina (ccf), por comparação com os valores de fator de retenção (Rf) de substâncias conhecidas em diferentes sistemas eluentes e pela sua reatividade frente a diferentes cromogénios. A ccf ainda permanece como um dos

métodos preferidos para análise qualitativa de compostos conhecidos, pois não requer equipamentos sofisticados ou uma preparação laboriosa de amostra. ^[62]

2. Parte experimental - Materiais e métodos

2.1. Material vegetal / amostragem

As amostras foram colhidas em Cabo Verde, ilha de Santiago em agosto de 2016. Sendo que a espécie *Campylanthus glaber* recolhida no jardim Botânico da INIDA, e a espécie *Globularia a.* recolhida nas montanhas de serra Malagueta interior de Santiago, com a orientação do Botânico Dr. Samuel Gomes. As amostras foram recolhidas com ajuda de um jardineiro da mesma instituição. Para amostragem foram colhidas as partes superiores das plantas, caules, folhas e flores. Retiradas no período de manhã, foram secas durante dez dias ao ar livre e expostas ao sol das 10:00 h e às 12:00 h, o restante do dia foram colocadas à sombra na temperatura ambiente que rondava entre 26 a 28 graus Celcius. Para este trabalho foram usadas 799,67 g de folhas secas de *Globularia a. W.* e 1116,54 g de folhas e caules de *Campylanthus glaber Benth ssp glaber*.

As amostras foram trazidas para Portugal, Covilhã, para o laboratório de Investigação de Química Orgânica dos Produtos Naturais, Faculdade de Ciências, Departamento de química, UBI. Onde foram realizadas as investigações fitoquímicas.

2.2. Preparação dos extratos

Para a identificação e caracterização dos compostos presentes nas plantas procedeu-se à extração sólido -líquido usando solventes a frio. Foram usados três solventes, por ordem crescente de polaridade, cujas extrações sucessivas foram feitas com: *n*-hexano, acetona e etanol. Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram purificados por destilação.

2.3. Técnicas cromatográficas

2.3.1. Cromatográfica em coluna

A cromatografia em coluna (cc) efetuou-se utilizando sílica gel de espessura de 0,04 - 0,06 mesh como sólido absorvente, realizada numa coluna de vidro de 50 cm de comprimento e 2,5 cm de diâmetro. A coluna foi acoplada a uma bomba de cromatografia de baixa pressão (bomba FHI LAB. PUMP-Model QD, Fluid Metering INC.). Para a fase móvel utilizaram-se misturas de solventes de *n*-hexano e acetato de etilo (AcOEt) em proporções de polaridades crescentes (Hex/AcOEt (98:2); Hex/AcOEt (95:5); Hex/AcOEt (80:20); Hex/AcOEt (70:30); Hex/AcOEt (60:40); Hex/AcOEt (50:50); AcOEt)). Noutra coluna foram utilizados clorofórmio e metanol em proporções de polaridades crescentes, terminando com metanol. As frações

foram recolhidas (aprox. 50ml) em balão de fundo redondo (100ml) e enumeradas as frações com o mesmo perfil cromatográfico analisadas pela cromatografia em camada fina (ccf). As frações foram concentradas no evaporador rotativo.

2.3.2. Cromatografia em camada fina

A cromatografia em camada fina (ccf) foi executada sobre placas de sílica gel de 0,2 mm. Usando como solvente uma solução de n-hexano: acetato de etilo por ordem crescente de polaridade. Os cromatogramas revelaram-se por imersão das placas numa solução de ácido fosfomolibdico 5% (p/v) em etanol ou em uma solução aquosa de permanganato de potássio, as placas foram relevadas numa estufa a aproximadamente 104 °C durante alguns minutos e as de permanganato foram reveladas apenas por deixar passar a água corrente durante uns minutos.

2.3.3. Cromatografia Gasosa e espectrometria de Massa (GC-MS)

Esta análise foi realizada num aparelho de Cromatografia de Gases (GC) da Agilent® Technologies 7890A GC-System equipado com uma coluna capilar DB5-MS, 30m x 0,25mm i.d., com filme de Polidimetilsiloxano (j.&.w LTM coluna module) de espessura 0,25µm. A temperatura inicial da coluna é 60°C durante 5 minutos, aumentando até aos 200°C numa rampa de crescimento de 4°C/min; numa seguinte rampa de temperatura aumenta de 200°C até 280°C, numa rampa de crescimento de 10°C/min; A temperatura final mantém-se constante durante algum tempo. A temperatura do injetor é de 250°C, o detetor tem uma temperatura de 180°C. O gás de arraste é Hélio, com um caudal de 1mL/min e com volume de injeção de amostra de 1µL. O GC está acoplado a um detetor de massas da Agilent® Technologies 5975C, Inert XL MSD com detetor triple-Axis (quadrupolo), com uma voltagem de ionização de 70 eV e com a fonte iónica a uma temperatura de 230°C. A análise dos espetros é feita no software Chemstation para análise das áreas obtidas e dos vários constituintes, realizando-se a identificação dos componentes com a ajuda das bases de dados NIST mass spectral software.

2.4. Caracterização dos produtos

A elucidação estrutural das substâncias identificadas foi efetuada através da utilização de um conjunto de diferentes técnicas de espectroscopia de infravermelho (IV), por cromatografia de gases-massas (CG-MS), espectrometria de RMN de ¹H e de ¹³C e de correlações bidimensionais.

2.4.1. Infravermelho (IV)

As leituras dos espectros de infravermelho foram realizadas num espectrofotómetro Genesis[®] II ATR. As amostras foram colocadas em direto sobre o analisador, previamente limpo com isopropanol. O espectro foi realizado utilizando o software OMNIC.

2.4.2. Espetrometria de Ressonância magnética de ¹H e ¹³C

Espectrómetro Bruker[®] Avance 400, a 400 MHz e 100 MHz, respetivamente para ¹H e ¹³C. Os desvios químicos são expressos em parte por milhão δ (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Os solventes usados foram clorofórmio deuterado (CDCl₃), (CD₃)₂CO, metanol (CD₃OD) e água deuterada (D₂O).

2.4.3. Reação de saponificação

Pela análise do IV, algumas amostras apresentaram ter muitos esteres. A amostra foi submetida a uma reação de saponificação de forma a hidrolisar esteres. Da hidrólise foram obtidas duas frações: os produtos ácidos e os produtos neutros. Num balão dissolveu-se o produto a saponificar em aproximadamente 200ml de uma solução de NaOH/MeOH a 5% e deixou-se reagir por 12 horas à temperatura ambiente.

De seguida evaporou-se o metanol e dissolveu-se o produto em água destilada, obtendo uma solução aquosa em meio básico. Extraíu-se com éter obtendo-se a primeira fase orgânica (parte neutra) e uma solução aquosa básica. Depois de extrair os produtos neutros adicionou-se HCl concentrado (1-2 ml) à solução básica para chegar a um pH à volta de 1-2. Volta-se a extrair com éter, obtendo a segunda fase orgânica a parte ácida e uma solução aquosa (Figura 9).



Figura 9: Separação da fase orgânica e fase aquosa depois da reação de saponificação.

2.5. Extratos de *Campylanthus glaber Benth*

2.5.1. Extrato de hexano

As folhas e caules do *C. glaber* (1116,54 g) foram colocadas em balão de fundo redondo de 10,0 L e adicionou-se quantidades suficientes de *n*-hexano para cobrir toda a planta, ficando em solução por aproximadamente 30 dias. A solução foi filtrada em papel de filtro e o filtrado evaporado em evaporador rotativo (figura 10). Foi obtido o extrato bruto de *n*-hexano de 7,632g com um rendimento de 0,7 %. Ao final da extração, o extrato bruto de hexano foi rotulado (Figura 11) e acondicionado para posterior realização da análise química de Infravermelho e Cromatografia.

2.5.2. Extrato de acetona

O extrato vegetal foi seco à temperatura ambiente. No mesmo balão de fundo redondo (10,0 L), adicionou-se quantidades suficiente de acetona para cobrir toda a planta. Depois de aproximadamente 30 dias, a solução foi filtrada e evaporada em evaporador rotativo a vácuo, obtendo-se o extrato bruto de acetona seco (15,245 g). Ao extrato bruto de acetona, foi submetido a uma separação por solubilidade.

2.5.2.1. Separação por solubilidade do extrato de acetona do *C. glaber*

Ao extrato bruto de acetona (15,245 g) extraído com *n*-hexano e agitado. O processo foi repetido 3 a 4 vezes, permitindo que todo o produto solúvel em *n*-hexano seja obtido. O produto solúvel em *n*-hexano foi transferido para um balão tarado e evaporado todo o

solvente. O produto solúvel em hexano obtido foi de 2,967g. O restante do produto que não se dissolveu em *n*-hexano foi adicionado clorofórmio, fazendo o mesmo processo de lavagem do extrato de acetona, obtendo-se o produto solúvel em clorofórmio. O produto solúvel em clorofórmio foi transferido para um balão previamente tarado e evaporado todo o clorofórmio. O produto solúvel em clorofórmio foi de 4,767g. O restante do produto insolúvel que não se dissolveu em *n*-hexano e em clorofórmio foi de 7,511 g. A estas três amostras do produto foram feitas análises de Infravermelhos, GCMS e cromatografias em coluna. A figura 12 resume o processo de preparação dos extratos de da espécie *C. Glaber*.

2.5.3. Extrato de etanol

As folhas e caules do *Campylanthus* depois de estarem secos de toda acetona foram adicionados quantidade suficiente de etanol para cobrir toda a planta, e deixada durante aproximadamente 25 dias em solução. A solução foi filtrada em papel de filtro e o filtrado evaporado em evaporador rotativo, obtendo-se o extrato bruto de etanol (53,889g). Ao final da extração, o extrato bruto foi rotulado e acondicionado para posterior realização da análise química.

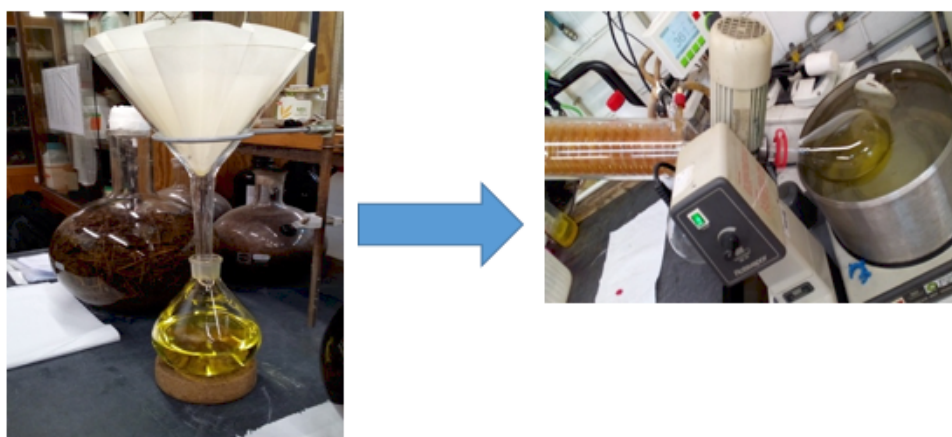


Figura 10: Filtrado e evaporação dos solventes no evaporador rotativo.



Figura 11: Extrato bruto da *Campylanthus g.* extraído com hexano

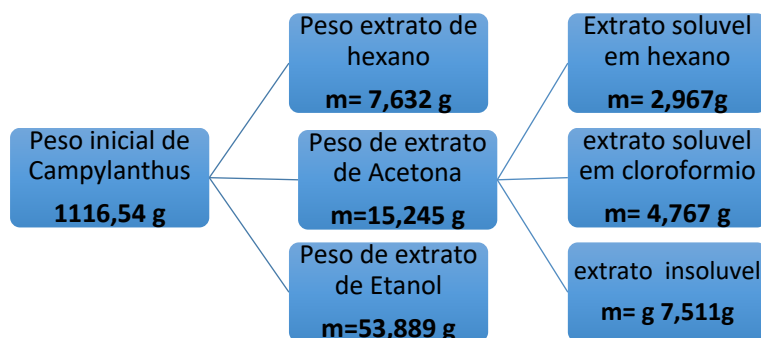


Figura 12: Esquema resumido das extrações efetuadas para a espécie *Campylanthus glaber*.

2.6. Extratos de *Globularia amygdalifolia* Weeb

2.6.1. Extrato de hexano

As folhas secas de *G. amygdalifolia* (799,67 g) foram colocadas num balão de fundo redondo de 10,0 L, adicionando quantidade suficiente de hexano para cobrir toda a planta, durante aproximadamente 30 dias. A solução foi filtrada em papel de filtro e o filtrado evaporado em evaporador rotativo, obtendo-se o extrato bruto (4,695g) com um rendimento de 0,6 %. Ao final da extração, o extrato bruto de hexano (Figura 13) foi rotulado e acondicionado para posterior realização da análise química de Infravermelho (IV). Pela análise de IV (Figura 18), a amostra aparentou ter muitos esteréis. A amostra foi submetida a uma reação de saponificação de forma a hidrolisar e separar os álcoois e os ácidos gordos. Do extrato bruto de *Globulária* extraído com hexano a frio (4,695g). Foram usadas 2,684g para a saponificação e foram recuperadas 1,0216g da parte Neutra e 0,5487g da parte acida.



Figura 13: Extrato bruto de hexano da *Globulária a.w.*

2.6.2. Extrato de acetona

Depois de secar o material vegetal à temperatura ambiente, num balão de fundo redondo (10,0 L), adicionou-se quantidades suficiente de acetona para cobrir toda a planta. Depois de aproximadamente 30 dias, a solução foi filtrada e evaporada em evaporador rotativo a vácuo, obtendo-se o extrato bruto de acetona seco (41,36 g). De seguida ao extrato bruto de acetona foi realizada uma separação por solubilidade.

2.6.2.1. Separação por solubilidade do extrato de acetona *Globularia amygdalifolia Weeb*

Ao extrato bruto de acetona (4,695 g) foi adicionado n-hexano e agitado. O processo foi repetido 3 a 4 vezes, permitindo que todo o produto solúvel em n-hexano seja transferido. O produto solúvel em n-hexano foi transferido para um balão tarado e evaporado todo o solvente. O produto solúvel em hexano obtido foi de 0,171 g, e foi perdido o extrato, pelo que não se analisou essa fração. O restante do produto que não se dissolveu em n-hexano foi adicionado clorofórmio, fazendo o mesmo processo de lavagem do extrato de acetona, obtendo-se o produto solúvel em clorofórmio. O produto solúvel em clorofórmio foi transferido para um balão previamente tarado e evaporado todo o clorofórmio. O produto solúvel em clorofórmio foi de 1,927 g.

O restante do produto insolúvel que não se dissolveu em n-hexano e em clorofórmio foi de 2,597g. A estas duas amostras do produto foram feitas análises de Infravermelhos, GC-MS e cromatografias em coluna (cc).

2.6.3. Extrato de etanol

Depois de estarem secos de toda acetona foram adicionados quantidade suficiente de etanol para cobrir toda a planta, e deixada durante aproximadamente 30 dias em solução. A solução foi filtrada em papel de filtro e o filtrado evaporado em evaporador rotativo, obtendo-se o extrato bruto (153,756 g). Ao final da extração, o extrato bruto foi rotulado e acondicionado para posterior realização da análise química. O esquema da figura 14 resume o processo de preparação dos extratos da espécie *G. amygdalifolia*.

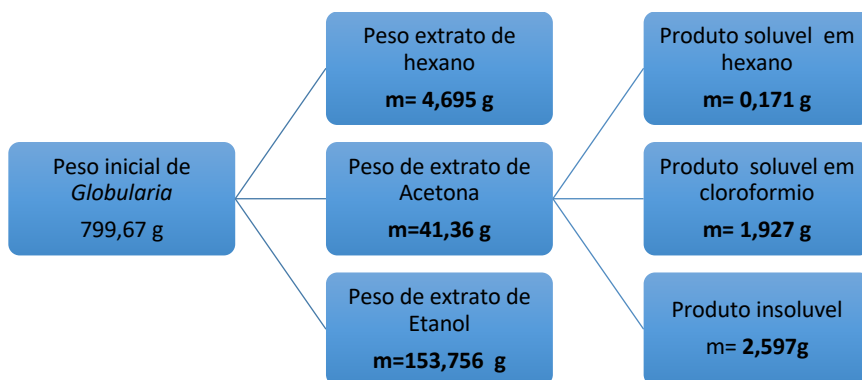


Figura 14: Esquema resumido das extrações efetuadas para a espécie *G. amygdalifolia*

2.7. Fracionamento dos diferentes extratos

Para fracionar as amostras, preparou-se a cc (Figura 15, A) para a separação dos compostos. A cromatografia em coluna efetuou-se com a utilização de sílica gel flash de espessura de 0,04 - 0,06 mm, como sólido absorvente. Como fase móvel utilizaram-se misturas de solventes de n-hexano e acetato de etilo em proporções de polaridades crescentes (mencionadas no ponto 2.1.3). Foram recolhidas em balões enumeradas as frações. A composição destas frações (figura 15,B) foi avaliada por cromatografia em camada fina (Figura 16), de modo a reunir as frações de acordo com semelhanças de seu perfil cromatográfico em balões enumerado e tarado. No final foi usado metanol para a lavagem e remoção de qualquer composto que tenha ficado retido na coluna.

2.7.1. *Campylanthus glaber* Benth

Foram realizadas três cromatografias em coluna para o *C. glaber* e todas foram efetuadas de acordo com os procedimentos descritos no ponto 2.3.1:

- 2,005g do extrato bruto de hexano, chamado Camp1:1_19;
- 2,9848 g do produto solúvel em hexano do extrato de acetona, chamado de Camp2: 1_29;
- 2,901 g do produto solúvel em clorofórmio do extrato de acetona, chamado de Camp3: 1_38.
- As amostras do Camp1:12 e Camp1:19 foram hidrolisadas, recuperando apenas as partes ácidas e seguidas analisadas por GC-MS.

2.7.2. *Globulária amygdafolia*

Foram realizadas duas cromatografias em coluna para a *G. amygdafolia* de acordo com os procedimentos descritos no ponto 2.3.1:

- 1,0216g de parte Neutra extraído com hexano, chamada de amostra Glob1:1_23;
- 1,927g do produto solúvel em clorofórmio do extrato de acetona, chamada de amostra Glob2: 1_21.

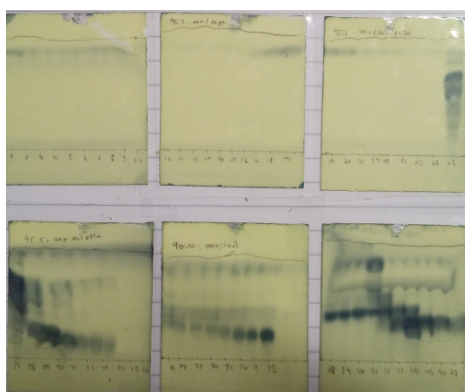


A

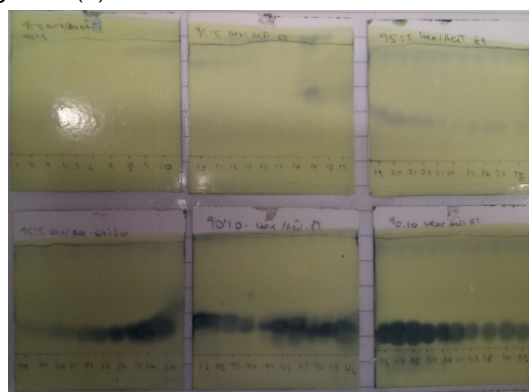


B

Figura 15: Montagem da Coluna Cromatográfica (CC) (A) e as frações reunidas de acordo com perfil cromatográfico (B).



A



B

Figura 16: Exemplos de Placas de CCF: A-Extrato de hexano Camp1:1_19; B-extrato de parte neutra Glob1:1_23

3. Resultados e discussão

3.1. Análise dos extratos

Para a análise fitoquímica em *C. glaber* e *G. amygdofolia* foram realizadas 3 extrações sólido-líquido para cada uma das espécies, extração a frio em n-hexano, acetona e etanol. O método de extração escolhido foi usado por não se conhecer a natureza dos compostos químicos ativos presentes nas plantas em estudo.

As partes aéreas do material vegetal seco do *C. glaber* (1116,54 g) constituído por folhas e caules originou 7,632g (0,7%) de extrato bruto de hexano, 15,245 g de extrato bruto de acetona e 53,889g de extrato bruto de etanol. As partes aéreas de *G. amygdofolia* (799,67g) renderam 4,695g (0,6%) de extrato bruto em hexano, 41,36 g de extrato de acetona e 153,756 g extrato de etanol (Tabela 2).

Tabela 2: Resumo dos pesos dos extratos obtidos

Espécies	Partes da planta	Peso T. (g)	Extrações (solventes)	Peso dos extratos (g)	Rendimentos das extrações (%)
<i>Campylanthus G.</i>	Folhas e caule	1116,54	n-hexano	7,632	0,7
			Acetona	15,245	1,4
			Etanol	53,889	4,8
<i>Globulária A.W.</i>	Folhas e caule	799,67	n-hexano	4,695	0,6
			Acetona	41,36	5,2
			Etanol	153,756	19,2

Pelos resultados da tabela 2, nas extrações com hexano, os rendimentos das duas espécies são equivalentes. Nos casos dos extratos de acetona variam para as duas espécies, sendo que o extrato para *G. amygdofolia* é maior do que o extrato do *C. glaber*. Para a espécie *G. amygdofolia*, a eficiência de extração com etanol é maior (19,2 %) em comparação ao do *C. glaber* (4,8 %), quase 3 vezes o total de peso do extrato bruto de etanol do *C. glaber*.

Alem de o método de extração influenciar o rendimento dos extratos, a polaridade do solvente demonstrou influencia no rendimento da extração, quanto maior a polaridade, maior o rendimento. Esta relação pode ser determinada pela natureza dos metabolitos presentes nas espécies em estudo. O etanol pode extrair tanto substancias com carater apolar quanto polares é o solvente que mostrou maior eficiência de extração para as duas espécies. Conclui-se que o etanol será o solvente menos seletivo para a extração dos metabolitos presente nas duas espécies, pelo que apresenta o maior peso de extração extraíndo o resto dos componentes. Para este método de extração obtém-se melhores

rendimentos com a utilização de maior tempo em solventes polares.

Quanto ao extrato bruto de acetona e os produtos solúveis em hexano e clorofórmio das duas espécies foram analisados pela cromatografia de camada fina (Figura 17) utilizando como fase móvel hexano/acetato de etilo (7:30); hexano/acetato (1:1) e clorofórmio e como revelador permanganato de potássio em solução.

Todas a frações de ambas as espécies foram analisadas cromatograficamente. Os extratos de etanol serão analisados em trabalhos futuros.

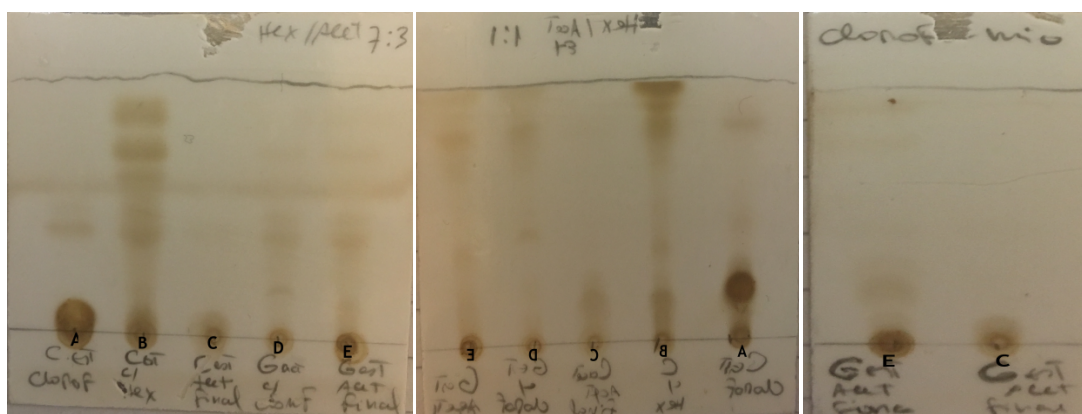


Figura 17: CCF para o extrato de acetona das duas espécies: A- extrato de acetona solúvel em clorofórmio (*C. glaber*); B- Produto solúvel em hexano (*C. glaber*); C- Produto insolúvel (*C. glaber*); D- Produto solúvel em clorofórmio (*G. amygdalifolia*); E- Produto insolúvel (*G. amygdalifolia*).

Os fracionamentos efetuados aos extratos mostraram ser eficientes uma vez que todas as massas depositadas na coluna foram recuperadas e nenhuma amostra ficou retida na sílica. A polaridade dos solventes foi adequada para a separação dos compostos na coluna. Todas as frações foram analisadas e caracterizados por técnicas de espectroscopia, de infravermelho (IV), por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) e RMN de ^1H e de ^{13}C .

3.2. Análise e identificação dos compostos encontrados nas frações do *Campylanthus glaber Benth ssp glaber*

3.2.1. Estudos preliminares

A família das *Scrophulariaceae* que quimicamente é caracterizada principalmente pela presença dos iridoídeos glucosilados: como aucubina, catalpol e derivados destes, assim como os seus congêneres biossintéticos. [32] Nos estudos de Ronsted e Jensen (2002) [24] foram realizadas análises preliminares do extrato de etanol das partes aéreas de *Campylanthus glaber* por RMN ^1H (300 MHz), e em ^{13}C RMN (75 MHz) e concluiu-se que a espécie apresenta

entre outros compostos citados, os iridoides glucosilados como a aucubina. É o único estudo encontrado na literatura sobre a espécie específica e endêmica de Cabo Verde. Indicando que um dos objetivos deste trabalho é realizar a análise, a separação e caracterização dos componentes dos extratos de hexano e acetona, este é o primeiro estudo sobre a caracterização dos compostos dos extratos de hexano e de acetona para este gênero de *Campylanthus*, assim como foi mencionado no presente estudo, apenas existem estudos de caracterização dos extratos etanoicos. Às amostras dos extratos do *Campylanthus glaber* foram analisadas por cromatografia em coluna e os estudos das frações obtidas de cada um deles foram analisados para determinar os seus compostos químicos (Tabela 13 em anexo) que seguidamente são descritos.

3.2.2. Extrato de hexano

Pela análise espectro IV (Figura 18), observou-se que o extrato de hexano apresentava uma banda referente à vibração da ligação carbono-Hidrogenio dos grupos metilenos, e dos grupos metilos ($2916,18\text{ cm}^{-1}$ - $2954,95\text{ cm}^{-1}$); uma banda referente à vibração da ligação CH dos alcanos ($2848,50\text{ cm}^{-1}$) e uma banda de absorção das ligações duplas carbono-carbono nos alcenos *cis* ($729,28\text{ cm}^{-1}$ - $719,47\text{ cm}^{-1}$). Foram submetidos ao fracionamento cromatográfico em coluna (Camp1:1_19) e as respectivas frações foram analisadas por RMN ^1H e ^{13}C , IV e GC-MS.

Estas frações são caracterizadas na sua maioria por misturas de compostos: Hidrocarbonetos saturados e insaturados de cadeia longa (17 a 40 átomos de carbono), triterpenos, compostos fenólicos, esteroides, compostos orgânicos como ésteres metílicos e ácidos gordos livres.

Foram identificados no total 33 compostos (Tabela 3). De acordo com os resultados encontrados no GC-MS, os principais constituintes maioritários foram: Esqualeno (55,17 %), Hentriacontano (37,82%; 31,20%) e octadecanal (27,51%).

Entre os constituintes, destacam-se:

- ✓ Os terpenoides como Esqualeno um potencial antioxidante, precursor da biossíntese do colesterol e por causa de seus benefícios dietéticos significativos, biocompatibilidade, inércia e outras propriedades vantajosas, o esqualeno é amplamente utilizado como excipiente em formulações farmacêuticas. [63]
- ✓ Fitoesteróis como ergost-5-en-3 β -ol, análogo de colesterol, utilizado no tratamento de doenças cardiovasculares [64].
- ✓ Os esteroides: como o (3 β , 22E)-estigmasta-5,22-dien-3-ol com ação biológica de: Anti-hepatotóxico, antiviral, antioxidante, prevenção ao cancro, hipocolesterolémico [65][66].

As amostras do Camp1: 11, Camp1:13, Camp1:14, Camp1:15, Camp1:16, Camp1:17 e Camp1:18 e pela análise dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C (Figura 19 e 20), estes compostos são na maioria misturas de triacilgliceróis ou misturas de ácidos gordos insaturados. Não podiam ser analisados por GC-MS, pois são produtos neutros ou ésteres naturais que fazem parte das gorduras das plantas. Pelo espectro do RMN ^1H , o sinal que aparece a 5,33 ppm são os hidrogénios da ligação dupla (-CH=CH-), o outro sinal ligeiramente abaixo 5,24 ppm corresponde ao hidrogénio do grupo metino do glicerol. O sinal que está 4,11 ppm a 4,29 ppm são os hidrogénios do grupo CH_2 do glicerol. Os sinais (0,7 ppm a 2,2 ppm) correspondem a parte saturada da cadeia carbonada dos ácidos gordos. Através do espectro de ^{13}C , podemos identificar os átomos de carbono dos grupos carbonilos dos ácidos que aparecem a 172-173 ppm. Os carbonos terciários e quaternários das ligações duplas estão entre 127 a 130 ppm. Os dois carbonos dos metilenos saem no mesmo sinal a aproximadamente 67,1 ppm. Outro carbono (CH) aparece a 68,9 ppm.

A parte insaturada correspondente ao ácido carboxílico linear pode ser observada no espectro de RMN de ^{13}C (em anexo) de 125 ate 135 ppm e uma cadeia comprida saturada cujos sinais aparecem de 10 ppm a 46 ppm e normalmente são ácidos gordos com cadeias de C_{14} a C_{22}

Os triglicéridos (TG) também são conhecidos como triacilgliceróis ou triacilglicéridos, o que significa que são glicéridos nos quais o glicerol é esterificado com três grupos de ácidos gordos (isto é, tri-ésteres de ácidos gordos com o glicerol) e desempenham um papel importante no metabolismo como fontes de energia e transportadores de gorduras alimentares.

Os TGs podem ser divididos em três tipos gerais em relação aos seus substituintes acilos. Eles são simples ou monoácidos se contiverem apenas um tipo de ácido gordo, diácido se contiverem dois tipos de ácidos gordos e triácidos se forem três grupos de acilo diferentes. Os comprimentos das cadeias dos ácidos gordos nos triglicéridos de ocorrência natural podem ter diferentes comprimentos e saturações, mas os de 16, 18 e 20 átomos de carbonos são os mais comuns⁸.

Conclui-se que das várias substâncias que compõem a cera das plantas, surgem os indicadores tais como ácidos gordos de cadeia longa, e especialmente os hidrocarbonetos alifáticos saturados [67]. Contudo ainda falta informação sobre o comprimento da cadeia, a proporção e a percentagem de componentes em cada classe química das ceras. Além disso,

⁸ <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11146#section=Top>.

a composição química em cada cera pode variar de acordo com a sua origem e do processo metabólico da planta [68]. Pela análise do espectro do IV (Figura 21) da fração do Camp1:12 observou-se bandas de absorção em $2915,89\text{ cm}^{-1}$ a $2848,16\text{ cm}^{-1}$ característico das cadeias carbonadas e bandas a $1739,93\text{ cm}^{-1}$ característicos da presença de esteres de ácidos gordos. Por este motivo foi hidrolisada para separar os álcoois, os ácidos e para a preparação dos esteres metílicos dos ácidos gordos para a sua análise. Dessa hidrolise obteve-se o Camp1:12 (parte ácida esterificada).

Os compostos identificados no Camp1:12 (Tabela 4) caracterizam-se todos os ácidos dos triacilgliceróis. Pela análise GC-MS da fração camp1:12 permitiu-se a identificação de 30 picos e na elucidação estrutural de 21 compostos: ésteres, hidrocarbonetos e triterpenos. Como aspeto importante, observou-se que esta fração é composta na sua maioria por ésteres metílicos de ácidos gordos de cadeia longa. A parte neutra não foi analisada porque praticamente são os gliceróis. Sendo o composto 9-octadecenoato de metilo o maioritário (37,9%) na fração, é o ácido maioritário dos triacilgliceróis.

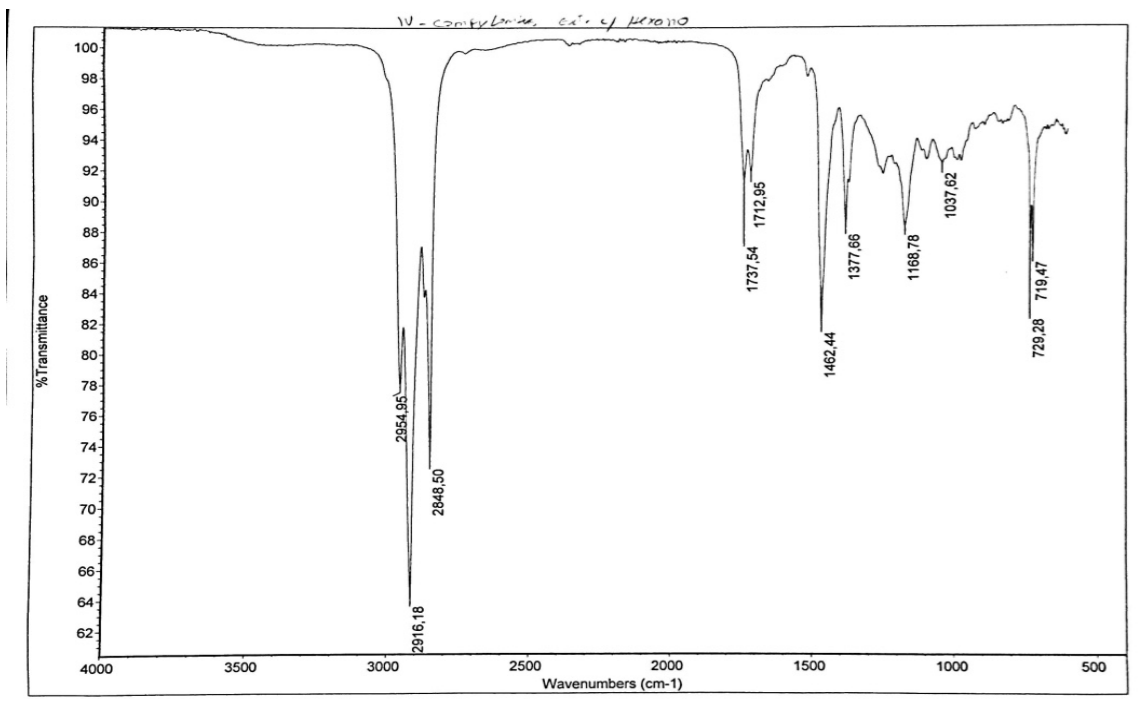


Figura 18: Espectro IV do extrato hexano do *Campylanthus glaber*.

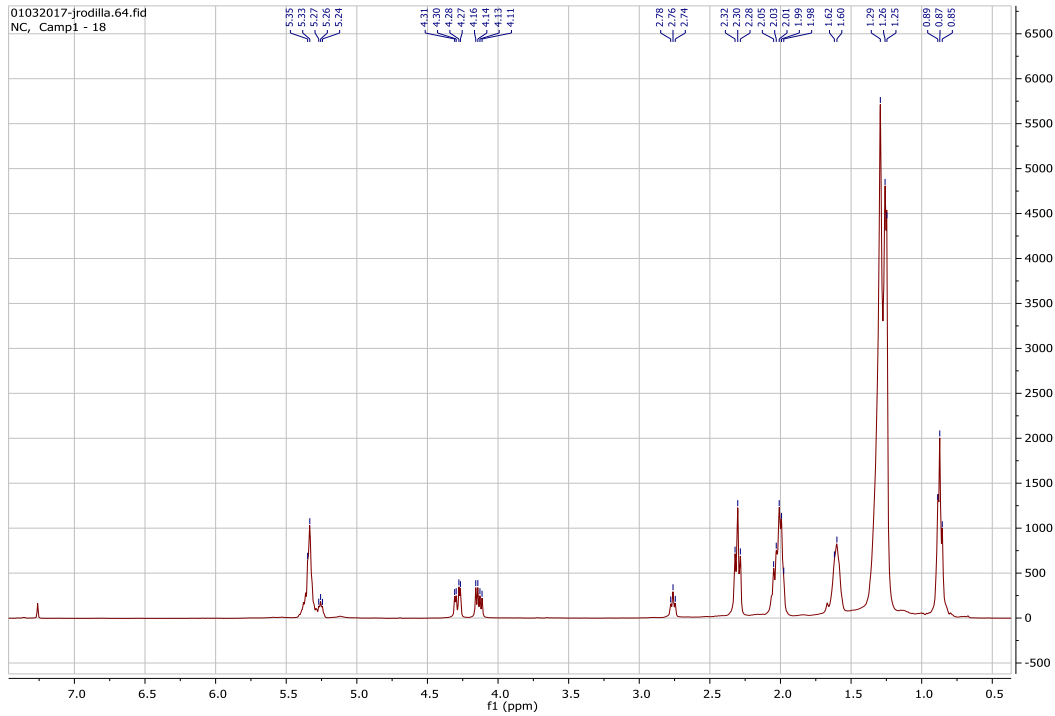


Figura 19: Espectros de RMN do ^1H da fração Camp1: 18.

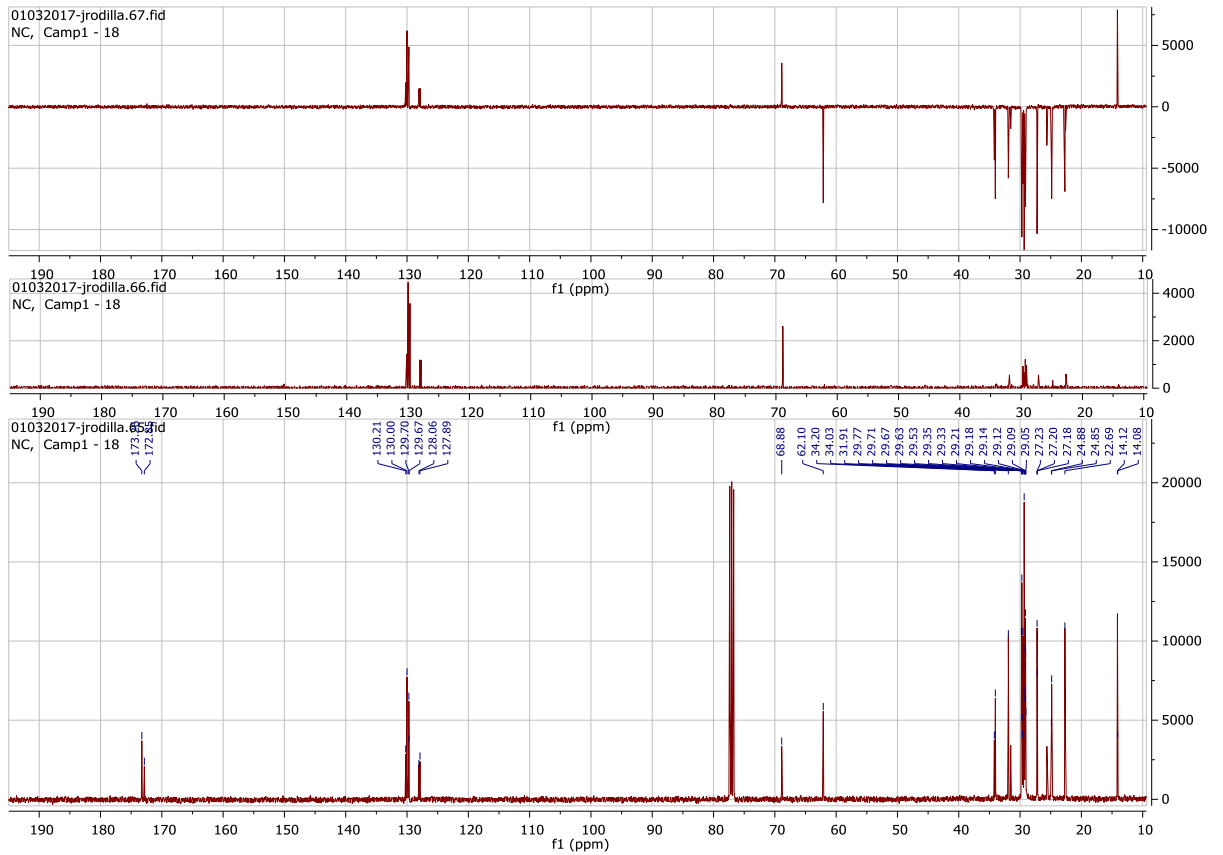


Figura 20: Espectros de RMN do ^{13}C da fração Camp1: 18.

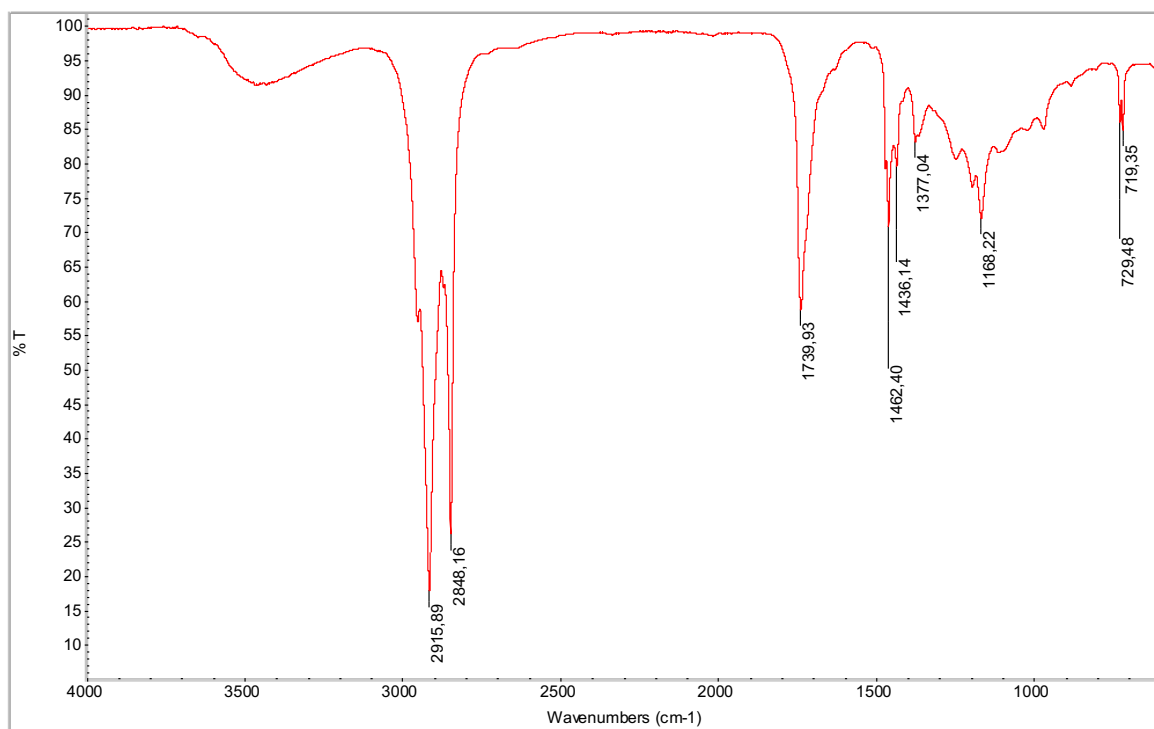


Figura 21: Espectro IV da fração Camp1:12 (*Campylanthus glaber*)

Tabela 3: Compostos identificados no extrato de hexano da espécie *Campylanthus Glaber* (Camp1:1_19).

Amostras	Peso (mg)	%	Espectros	Compostos encontrados
Camp 1: 1	83,8	4,18%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	Hidrocarbonetos: Heneicosano; tricosano; 9-octadecenoil glicerol; 1-heptacosanol; Hentriacontano.
Camp 1: 2	41,2	2,05%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	hidrocarbonetos insaturados: Esqualeno; triacontano; Hentriacontano; tritriacontano.
Camp 1: 3	306	15,26%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	Mistura: 14-metilpentadecanoato de metilo; octadecanal; docosanoato de metilo; nonadecanal; esqualeno; hexadecanoato de metilo; tetratriacontano.
Camp 1: 4	357,3	17,82%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	Mistura: eicosanal; Esqualeno; tetracosano; vitamina E (α -tocoferol);
Camp 1: 5	77,2	3,85%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	mistura: hexadecanoato de metilo; icosanal; Esqualeno ; triacontano ; Vitamina E (α -tocoferol).
Camp 1: 6	72,3	3,61%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	Mistura: esqualeno; tetracosano; cetona do olean-12-eno; α -amirina; estigmast-4-en-3-ona;
Camp 1: 7	69,2	3,45%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	mistura: hexadecanoato de metilo; um aldeído ; um aldeído; esqualeno; Hentriacontano ; β -amirina; α -amirina; estigmast-4-en-3-ona ;
Camp 1: 8	124	6,18%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	Mistura: cetona artemisia ; 3-metilundeca-1,4-olida; icosanal; ác. 9-octadecenóico; hentriacontano; Vitamina E (α -tocoferol); isómero vitamina E; ergost-5-en-3 β -ol ; trans-estigmasta-5,22-dien-3 β -ol; 24 β -etilcolesterol; β -amirina; α -amirina; Estigmast-4-en-3-ona.
Camp 1: 9	95,5	4,76%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	mistura: ác. (Z,Z)-9,12-octadecadienóico; hentriacontano; 24 β -metilcolesterol; (3 β ,22E)-estigmasta-5,22-dien-3-ol; β -sitosterol.
Camp 1: 10	50,2	2,50%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	Mistura: Hexadecanoato de metilo; 9-octadecenoato de metilo; nonadecanal; docosanoato de metilo; tetracosanoato de metilo; hentriacontano; Vitamina E; trans-estigmasta-5,22- dien-3 β -ol.
Camp 1: 11	73,5	3,66%	RMN ¹ H e ¹³ C	Mistura de triacilgliceróis
Camp 1: 12	310,7	15,49%	RMN ¹ H e ¹³ C	Mistura de triacilgliceróis
Camp 1: 13	78	3,89%	RMN ¹ H e ¹³ C	Mistura de triacilgliceróis
Camp 1: 14	29,9	1,49%	RMN ¹ H e ¹³ C	Mistura de triacilgliceróis
Camp 1: 15	86,9	4,33%	RMN ¹ H e ¹³ C	Mistura de triacilgliceróis
Camp 1: 16	181,1	9,03%	RMN ¹ H e ¹³ C	Mistura de triacilgliceróis
Camp 1: 17	161,3	8,04%	RMN ¹ H e ¹³ C	Mistura de triacilgliceróis
Camp 1: 18	79,6	3,97%	RMN ¹ H e ¹³ C	Mistura de triacilgliceróis
Camp 1: 19	334,3	16,67%	RMN ¹ H e ¹³ C	Mistura de triacilgliceróis

Tabela 4: Compostos determinados pelo GC-MS da fração Camp 1: 12, parte ácida esterificada.

Pico nº.	Compostos encontrados	%
Pico no 1	octanoato de metilo	< 0,5
Pico n. 2	E-2-decenal	< 0,5
Pico n. 3	2,6-diterbutil-4-hidroxi-4-metil-2,5-ciclohexadien-1-ona	0,6
Pico n. 4	nonanodioato de dimetilo	< 0,5
Pico n. 5	tetradecanoato de metilo	2,6
Pico n. 6	pentadecanoato de metilo	< 0,5
Pico n. 7	hexahidrofarnesilacetona	< 0,5
Pico n. 8	hexadecanoato de metilo	9,9
Pico n. 9	14-metilhexadecanoato de metilo	< 0,5
Pico n. 10	9,12-octadecadienoato de metilo	10,3
Pico n. 11	9-octadecenoato de metilo	37,9
Pico n. 12	10-octadecenoato de metilo	0,9
Pico n. 13	octadecanoato de metilo	4,1
Pico n. 14	7,10-octadecadienoato de metilo	< 0,5
Pico n. 15	NI*	4,1
Pico n. 16	NI	4,5
Pico n. 17	eicosanoato de metilo	1,1
Pico n. 18	NI	1,5
Pico n. 19	NI	2,6
Pico n. 20	docosanoato de metilo	2,0
Pico n. 21	tricosanoato de metilo	0,4
Pico n. 22	tetracosanoato de metilo	1,4
Pico n. 23	hexacosanoato de metilo	1,0
Pico n. 24	(triterpeno) NI	0,9
Pico n. 25	hentriacontano	5,6
Pico n. 26		1,3
Pico n. 27	octacosanoato de metilo	1,3
Pico n. 28	hexatriacontano	1,8
Pico n. 29	mistura (esteróis)	1,1
Pico n. 30	viminalol	2,8

*NI -Não identificado

A fração 19 (Camp1: 19) (Tabela 5) que foi hidrolisada para recuperar a parte ácida e esterificar com diazomentano e poder realizar a análise por GC-MS e para ver os ácidos que se encontram nessa planta, tais como ácidos livres, ácidos dos triacilglicerois e de outros ésteres. Os ésteres que foram aqui preparados e não são naturais das plantas, são os ácidos que formam os triaglicerois e esteris. Os compostos determinados nesta fração são todos esteris metílicos e permitiu identificar 15 componentes que há nessa fração. Sendo que o ácido 8-octadecenoato de metilo é um dos maioritário da planta (60,3 %).

Os ácidos 9-octadecenoato de metilo e docosanoato de metilo encontram-se em todas as frações analisadas (Camp1:1_19; Camp1:12 e camp1:19) do extrato de hexano da *Campylanthus*. Os esteris metílicos de ácidos gordos são membros de um grupo de esteris que são substitutos promissores de hidrocarbonetos clorados em processos industriais, para combustível diesel e lubrificantes. [69]. Os compostos identificados até o momento nos extratos de hexano (Tabela 3, 4 e 5) são comuns nestas espécies.

Tabela 5: Compostos determinados pelo GC-MS da fração Camp 1: 19, parte ácida esterificada com diazometano.

Amostras	Compostos encontrados	%
Pico n. 1	4-metil-2,6-diterbutilfenol	< 0,5
Pico n. 2	tetradecanoato de metilo	< 0,5
Pico n. 3	9-hexadecenoato de metilo	< 0,5
Pico n. 4	hexadecanoato de metilo	7,3
Pico n. 5	(Z,Z)-9,12-octgadecadienoato de metilo	25,1
Pico n. 6	8-octadecenoato de metilo	60,3
Pico n. 7	9-octadecenoato de metilo	1,2
Pico n. 8	octadecanoato de metilo	4,1
Pico n. 9	9,10-epoxioctadecanoato de metilo	< 0,5
Pico n. 10	11-eicosenoato de metilo	< 0,5
Pico n. 11	eicosanoato de metilo	0,4
Pico n. 12	13-docosenoato de metilo	< 0,5
Pico n. 13	docosanoato de metilo	1,2
Pico n. 14	tricosanoato de metilo	< 0,5
Pico n. 15	tetracosanoato de metilo	0,5

3.2.3. Extrato de Acetona

Ao extrato de acetona foram feitas separações por solubilidade em hexano e clorofórmio, obtendo a parte solúvel em hexano, parte solúvel em clorofórmio e a parte insolúvel. Destas partes foram estudadas por cromatografia em coluna a parte solúvel em hexano (Camp2:1_29) e a parte solúvel em clorofórmio (Camp 3:1_38).

3.2.3.1. Fração do extrato de acetona solúvel em hexano (Camp2:1_29)

Os compostos identificados no Camp2:1_29 (Tabela 6) observam-se como principais características dos compostos a presença de alguns esteres metílicos de ácidos gordos, hidrocarbonetos, triterpenoides, fitoesteróis e a presença dos componentes maioritários e principais desta fração tais como cetona artemisia (79,79 % em camp2: 25; 57,95 % em camp2: 20; 35,90 % em camp2:22; 33,47% em camp2:17; 31,27% em camp2:19) e de α -tecoferol (Vitamina E) (75,41 % em camp2:7). A vitamina E é reconhecida como antioxidante

e pode ser responsável pela atividade desta planta relacionada com alguns usos tradicionais relatados da espécie.

Nesta Fração foram identificados no total 105 componentes (tabela 7). Sendo a presença maioritária dos triterpenos como a α -amirina (49,36 %) em toda fração camp2:1_29, o esqualeno (32,15 %) presente na fração camp2:4 e estigmasta-5,22-dien-3 β -ol (31,69%) em camp2:2. O hidrocarboneto insaturado tal como o neofitadieno (30,44 % em camp2:15) aparece distribuído em quase toda a fração do Camp2:1_29, sendo presente nas frações Camp2:1 e do Camp2:11 a Camp2:26. O neofitadieno (Figura 22) é um hidrocarboneto que pertence ao grupo dos diterpenos, é muito abundante nas ceras epicuticulares de plantas [70].

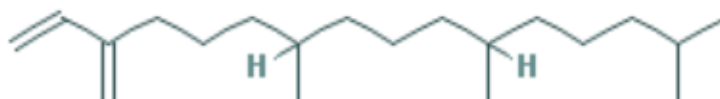


Figura 22: Neofitadieno. Fonte: PubChem CID: 10446).

Observam-se ainda nesta fração a presença das moléculas de 9-octadecenoato de metilo, docosanoato de metilo, hexadecanoato de metilo presente também em todas as frações cromatográficas do extrato de hexano analisada anteriormente (Camp1-12, Camp1-19, camp1-1-19).

A fração camp2:11 é a fração que apresenta maior peso (426,5 mg -14,29%), foram detetados cerca de 24 compostos e misturas de compostos não identificados (9,28%). Essa fração é caracterizada por ser uma mistura esteroides, álcoois alifáticos e diterpenos acíclico, e ácidos gordos e esteres de ácidos gordos. Sendo os compostos majoritários: ácido hexadecanóico (16,50 %); fitol (16,50 %); 1-docosanol (15,20%); B-dihidrofucosterol (9,74%); estigmasta-5,22-dien-3 β -ol (7,01%).

Outra fração considerável em peso (423 mg-14,17 %) é a fração camp 2:10. Nesta fração os compostos maioritários são os triterpenos α -amirina (49,36 %) e B-amirina (15,15 %). Os triterpenos são de grande interesse devido às diversas atividades biológicas apresentadas, servindo como candidatos ou protótipos de novos fármacos [71].

A fração camp2:12 apresenta como compostos maioritários os fitoesteróis, trans-estigmast-5,22-dien-3 β -ol (37,75 %), B-dihidrofucosterol (36,80 %) e Δ^5 -ergostenol (17,36%). Os ésteres de fitoesteróis, assim como os fitoesteróis, são substâncias conhecidas pela sua atividade hipocolesterolêmica e têm recebido grande atenção em virtude da sua utilização em alimentos funcionais [72].

Tabela 6: Identificação dos compostos encontrados nas frações do extrato de acetona solúvel em hexano (Camp2:1_29).

Amostras	Peso (mg)		Espectros	Compostos encontrados
Camp 2: 1	460,2	15,42%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	Neofitadieno; 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona; neofitadieno isómero; hexadecanoato de metilo; 9,12-octadecadienoato de metilo; 9-octadecenoato de metilo; octadecanoato de metilo; esqualeno; 3β-acetatoestigmasta-5,22-dieno; acetato de aplysterilo; vitamina E, α-tocoferol.
Camp 2: 2	87,5	2,93%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	hexanoato de metilo; octadecanal; 5-octadecenoato de metilo; eicosanal; 3-acetato de estigmasta-5,22-dieno; esqualeno; estigmagsta-5-en-3β-ol; mistura; Vitamina E (α-tocoferol); tocoferol isómero; esqualeno.
Camp 2: 4	366,5	12,28%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	1-tetradeceno ; 1-hexadeceno ; 1-octadeceno; tricosano ; 9-eicoseno; octacosano; nonacosano; dodecoseno; triacontano; 5-octadeceno; dotriacontano?; tetratriacontano; pentatriacontano; esqualeno; hexatriacontano; hentriacontano.
Camp 2: 7	328,1	10,99%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	Aldeído; linoleato de butilo; Vitamina E (α-tocoferol)
Camp 2: 8	32,8	1,10%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	alceno; ,10,14-trimetil-2-pentadecanona; di-isobutil ftalato; ftalato de di-butilo ; 10,11-dihidro-2-cis-6trans-farnesol; um éster do glicerol ; 1,3-dipalmitoilglicerol; outro diacilglicerol; ácido hexadecanóico ; linoleína (2-monoβ); é um aldeído ; mistura de acilglicerois; outros acilglicerois ; farnesilfarnesilgeraniol; ácido; esqualeno ; vitamina E (α-tocoferol).
Camp 2: 9	103,7	3,47%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	1,4-naftilquinona ; 10,11-dihidro-2cis-6trans-farneol; mistura; dipalmitina; ác. 9-octadecenóico ; β-monolinoleína ; linoleato de butilo ; di-(9-octadecenoil)-glicerol; solanesol; mistura ; Vitamina E (α-tocoferol) ; viminalol ; estigmas-4-en-3-ona.
Camp 2: 10	423	14,17%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	cetona artemisia; 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona; fitol ; ácido hexadecanóico; mistura; mistura ; β-monolinoleína; glicerol 1-monooleato; 1-docosanol; hidrocarboneto ; acetato de estigmasta-5,22-dien-3β-ilo; acetato de aplysterilo; vitamina E(α-tocoferol); β-amirina; α-amirina; estigmast-4-en-3-ona.
Camp 2: 11	426,5	14,29%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	cetona artemisia ; neofitadieno; 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona; ác. Hexadecanóico; Fitol; ác. 9-octadecenóico; 1-octadecanol; ác. 9-octadecenóico; 1-docosanol ; docosanoato de metilo; 1-heptacosanol ; acetato de docosanol; ciclotetracosano; nonacosano; tetracosanoato de metilo ; um álcool; dotriacontano; γ-tocoferol ; Vitamina E(α-tocoferol) ; mistura ; ergosta-5-en-3β-ol; estigmasta-5,22-dien-3β-ol ; β-dihidrofucoesterol; β-amirina ; α-amirina ; 3',6-ciclopropa[5,6]estigmas-22-en-3-ona.
Camp 2: 12	150,4	5,04%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	Neofitadieno; 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona; neofitadieno isómer; dipalmitina; 1-monolinolenina ; pentatriacontano; colesterol; Δ ⁵ -ergostenol; trans-estigmast-5,22-dien-3β-ol; β-dihidrofucoesterol.

(Continuação Tabela 6)

Amostras	Peso (mg)	%	Espectros	Compostos encontrados
Camp 2: 13	119,6	4,01%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	Dihidroactinidiolida; 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadeceno; neofitadieno; 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadeceno isómer; neofitadieno isomero ; neofitadieno isomer ; mistura ; fitol ; dipalmitina; linoleato de butilo; 1-tricosanol ; octacosano; acetato de estigmasta-5,22-dien-3β-ol ; acetato de aplysterilo vitamina E(α-tocoferol) ; ergost-5-en-3β-ol; trans-estigmasta-5,22-dien-3β-ol; β-dihidrofucoesterol.
Camp 2: 14	36,8	1,23%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	5-etil-2,4-dimetil-2-hepteno; 2-feniletanol; neofitadieno; 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadeceno; neofitadieno isómer; isomer 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadeceno; isómero de neofitadieno; neofitadieno isomer ; 1-docosanol ; docosano; 1-hexacoseno um alceno ; docosanoato de metilo; docosano; tetracosanoato de metilo; heptacosano; acetato de estigmasta-5,22-dien-3β-ol; acetato de aplysterilo; vitamina E (α-tocoferol).
Camp 2: 15	21,4	0,72%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	cetona artemisia propiovanillona; 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadeceno; neofitadieno; isómer 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadeceno; neofitadieno isómer; neofitadieno isómer; 5-heptilpentan-5-olida; 1-eicosanol; acetato de epiaplysterilo; vitamina E (α-tocoferol).
Camp 2: 16	55,6	1,86%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	cetona artemisia; 3,7,11-trimetil-1-dodecanol; 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadeceno; neofitadieno; 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadeceno isómero; neofitadieno isómer; neofitadieno isómer; β-metil-γ-undecalactona; 1-docosanol ; 1-docosanol; mistura; vitamina E (α-tocoferol).
Camp 2: 17	68,9	2,31%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	cetona artemisia ; 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadeceno; neofitadieno; 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadeceno isomer ; neofitadieno isómer; neofitadieno isomer ; 1-docosanol ; vitamina E (α-tocoferol).
Camp 2: 18	79,9	2,68%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	cetona artemisia; geranilacetona; 4-hidroxiacetofenona ; 4-hidroxi-3-metoxiacetofenona ; 2-metoxi-4-etil-6-metilfenol; ac. tetradecanóico ; 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadeceno; neofitadieno; ; 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadeceno isómer; neofitadieno isomer ; ác. Hexadecanóico; fitol; 1-octadecanol; 1-heptacosanol; γ-tocoferol; mistura ; vitamina E ; estigmasta-4,22-dien-3-ona ; estigmast-4-en-3-ona; mistura; 3',6-ciclopropa[5,6]estigmast-22-en-3-ona ; miatura.
Camp 2: 19	80,2	2,69%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	cetona artemisia; neofitadieno; 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona; ciclotetracosano; 11-butildocosano ; mistura; vitamina E; estigmastano-3,6-diona.

(Continuação Tabela 6)

Amostras	Peso (mg)	%	Espectros	Compostos encontrados
Camp 2: 20	45,3	1,52%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	cetona artemisia; neofitadieno; 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona; neofitadieno isomer ; 17-nonadecenal ; α-tocoferol (vitamina E); estigmastano-3,6-dion.
Camp 2: 21	24,7	0,83%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	cetona artemisia ; 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona ; hexadecanoato de metilo; 10-octadecenoato de metilo; 9-tricoseno ; ftalato de bis(2-etilhexilo); acetato de estigmasta-5,22-dien-3-ol; acetato de aplysterilo; vitamina E (α-tocoferol).
Camp 2: 22	69,5	2,33%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	cetona artemisia; 3,7,11-trimetil-1-dodecanol; neofitadieno; 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona; neofitadieno isomer ; mistura; 1-eicosanol ; ác. 9-octadecenóico ; 8,8-difenil-heptadecano; acetato de estigmasta-5,22-dien-3β-ol; γ-tocoferol; acetato de aplysterilo; Vitamina E (α-tocoferol); estigmasta-3,5-dien-7-ona.
Camp 2: 25	62,5	2,09%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	cetona artemisia; neofitadieno; 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona; neofitadieno; 1-tetracosanol; vitamina E (α-tocoferol).
Camp 2: 26	97,4	3,26%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	2-pentadecanona; 3,7,11-trimetil-1-dodecanol ; (-)-loliolida; neofitadieno; 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona; neofitadieno isomer ; diacetato de glicerol-1-oleato; acetato de estigmasta-5,22-dien-3-ol; estigmasta-5-en-3β-ol; vitamina E (α-tocoferol).

Tabela 7: Compostos encontrados nas frações do extrato de acetona solúvel em hexano (Camp2:1_29).

<p>1,3-dipalmitoilglicerol; 1,4-naftilquinona; 10,11-dihidro-2cis-6trans-farneol; 10,14-trimetil-2-pentadecanona; 10-octadecenoato de metilo; 11-butildocosano; 17-nonadecenal; 1-docosanol 1-eicosanol; 1-heptacosanol; 1-hexacoseno; 1-hexadeceno; 1-monolinolenina; 1-octadecanol; 1-tetracosanol; 1-tetradeceno; 1-tricosanol; 2-feniletanol; 2-metoxi-4-etil-6-metilfenol; 2-pentadecanona; 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadeceno 3,7,11-trimetil-1-dodecanol; 3',6-ciclopropal[5,6]estigmas-22-en-3-ona. 3-acetato de estigmasta-5,22-dieno; 3β-acetatoestigmasta-5,22-dieno; 4-hidroxi-3-metoxiacetofenona; 4-hidroxiacetofenona; 5-etil-2,4-dimetil-2-hepteno; 5-heptilpentan-5-olida; 5-octadeceno; 5-octadecenoato de metilo; 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona 8,8-difenil-heptadecano;</p>	<p>9,12-octadecadienoato de metilo; 9-eicoseno; 9-octadecenoato de metilo; 9-tricoseno; ácido 9-octadecenoico; ácido Hexadecanóico; ácido tetradecanóico ; acetato de aplysterilo acetato de docosanol; acetato de epiaplysterilo; acetato de estigmasta-5,22-dien-3-ol; acetato de estigmasta-5,22-dien-3β-ilo; cetona artemisia; ciclotetracosano; colesterol; di-(9-octadecenoil)-glicerol; diacetato de glicerol-1-oleato; Dihidroactinidiolida; di-isobutil ftalato; dipalmitina; docosano; docosanoato de metilo; dodecoseno; dotriacontano; eicosanal; ergost-5-en-3β-ol; esqualeno ; estigmagsta-5-en-3β-ol; estigmas-4-en-3-ona. estigmasta-3,5-dien-7-ona. estigmasta-4,22-dien-3-ona; estigmasta-5,22-dien-3β-ol; estigmastano-3,6-dion. farnesilfarnesilgeraniol; fitol;</p>	<p>ftalato de bis(2-etilhexilo); ftalato de di-butilo; geranilacetona glicerol 1-monooleato; hentriacontano. heptacosano; hexadecanoato de metilo; hexanoato de metilo; hexatriacontano; hidrocarboneto; isómero de neofitadieno; linoleato de butilo; linoleina (2-monoβ); neofitadieno; nonacosano; octacosano; octadecanal; octadecanoato de metilo; pentatriacontano; propiovanillona; solanesol; tetracosanoato de metilo; tetratriacontano; tocoferol isómero; trans-estigmast-5,22-dien-3β-ol; triacontano; tricosano; viminalol; vitamina E (α-tocoferol). α-amirina; β-amirina; β-dihidrofucosterol; β-metil-γ-undecalactona; β-monolinoleina; γ-tocoferol; Δ^5-ergostenol</p>
--	--	--

3.2.3.2. Fração do extrato de acetona solúvel em clorofórmio (Camp3:1_38)

Quanto á fração do extrato de acetona solúvel em clorofórmio, a fração camp3:1_38 (Tabela 8) foi fracionada em 38 frações, e um total de 41 compostos foram detetados e caraterizados. Nesta fração nota-se que todos os compostos tiverem uma composição percentual inferior a 5% em GC-MS, não havendo compostos maioritários nessa fração.

Esta fração é constituída na sua maioria por ácidos orgânicos, ácidos fenólicos, álcoois gordos de cadeia linear, esteres metílicos. Mesmo sendo menores os rendimentos dos componentes determinados, pode-se identificar a presença de alguns compostos que está relacionada com as propriedades químicas e biológicas atuando como antioxidantes, anti-inflamatória, antiproliferativa contra carcinoma da bexiga célula humana TCA ^[71].

Tabela 8: Compostos identificados no Camp3:1_38.

Amostras	Peso (mg)	%	Espectros	Compostos encontrados
Camp 3: 9	19,5	0,67%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	25-epiaplysteril acetato;
Camp 3: 12	7,3	0,25%	RMN ¹ H e GC-MS	Hexatriacontano; mistura; tritetracontano;
Camp 3: 14	12,9	0,44%	RMN ¹ H e GC-MS	neofitadieno; 5-eicoseno; estigmas-5-en-3B-ol
Camp 3: 15	10,1	0,35%	RMN ¹ H e GC-MS	? ác. o-metilbenzoato ftálico; vanilina; mistura; 2,4-dihidroxiacetofenona; propiovanillona; neofitadieno; mistura; neofitadieno isómer;
Camp 3: 16	26,8	0,92%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	vanillina ; hidroxibenzoato de fenilo; acetovanillona;
Camp 3: 17	38,8	1,34%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	1,4-naftalenediona; acetovanillona;
Camp 3: 18	52,7	1,82%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	1-naftalenol; 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldeído;
Camp 3: 19	497	17,13%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	Ac. 4-hidroxifenillactico; ácido vanílico; mistura;
Camp 3: 21	53,6	1,85%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	4-vinil-2-metoxifenol; mistura; vinilbenzil álcool;
Camp 3: 22	136,6	4,71%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	naftaleno, azuleno;
Camp 3: 23	158,3	5,46%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	1,3-isobenzofurandiona;
Camp 3: 24	48,7	1,68%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	2,4-hidroxibenzoato de metilo; 2-nonadeceno; 1-dodecanol; 1-eicosanol; ftalatos de alquilos;
Camp 3: 26	36	1,24%	RMN ¹ H e GC-MS	5-eicoseno; 1-eicosanol; ftalatos
Camp 3: 28	57,8	1,99%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	ácido p-metilbenzoilformico; 1,3-isobenzofurandiona;
Camp 3: 32	255,9	8,82%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	5-eicoseno; 1-eicosanol; 3-(3,5-diterbutil-4-hidroxifenil)propanoato de metilo; 9-tricoseno; alceno; ftalato;
Camp 3: 37	168,3	5,80%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	Difenilmetanona; nonacosano; 9-octadecenoato de metilo; jaceosidin; 5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-6-methoxychromen-4-one
Camp 3: 38	224,9	7,75%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	hexadecanoato de metilo; 3-(3,5-diterbutil-4-hidroxifenil)propanoato de metilo; 9,12-octadecadienoato de metilo; 9-octadecenoato de metilo; octadecanoato de metilo;

3.3. Análise e identificação dos compostos encontrados nas frações da *Globularia amygdalifolia* Weeb

3.3.1. Extrato de hexano

Ao extrato de hexano inicialmente foi realizada uma saponificação obtendo-se a parte ácida (esterificada) e a parte neutra.

3.3.1.1. Extrato de hexano (Parte Neutra)

Ao extrato de hexano da parte neutra foram analisadas por CC e GC-MS e a fração denominada de Glob1:1_23. Foram determinadas num total de 51 compostos (tabela 9) e na sua maioria constituídas por ácidos fenólicos e fitoesteróis.

A presença de ácidos fenólicos foi e têm sido muito estudados devido a sua influência na qualidade dos alimentos. Englobam uma gama enorme de substâncias, entre elas os ácidos fenólicos, os quais, pela sua constituição química, possuem propriedades antioxidantes (Soares, 2002). Os extratos de plantas ricas em compostos fenólicos podem reduzir ou prevenir doenças humanas dependendo das moléculas ativas e do tecido ou órgão alvo e sem efeitos colaterais.^[47]

Conforme previamente descrito nas diferentes literatura para os géneros de *Globulária* descritos na Tabela 1, os resultados encontrados nesta investigação estão de acordo com os dados encontrados para espécies desse género (Tabela 14 em anexo). Constata-se na sua maioria a presença de ácidos fenólicos e de compostos fenólicos. Este é o primeiro estudo para a espécie globulária das ilhas de Cabo Verde.

Entre os compostos maioritários na fração Glo1:1_23 destacam-se o β -sitosterol (87,46%) na fração 12 e (83,88%) na fração 11, handianol (cicloartenol) (75,84%) na fração 7 e (32,29%) na fração 8, dihidrocalisterol (49,73%) na fração 15, β -dihidrofucosterol(50,85%) na fração 10, isoftol (38,31%) e ác. z,z-9,12-octadecadienóico (33,32%) na fração 13, entre outros compostos em percentagem considerável.

O β -sitosterol (Figura 23) é um fitoesterol estruturalmente relacionado com o colesterol, demonstrou melhoria significativa na sinalização defeituosa do recetor de colecistoquinina de tipo 1 (CCK1R) presente no colesterol alto, sem afetar a afinidade de ligação colecistoquinina.^[73] É usado como suplemento para tratar a hipercolesterolemia, possui

Estudos das Potencialidades farmacológicas de plantas endêmicas / medicinais de Cabo Verde:
Campylanthus glaber benth ssp glaber e da *Globularia amygdalifolia webb*

gLOBULARIA PARTE ACIDA HEXANAO *
MaxE3 SumE5
RI 21749 34089

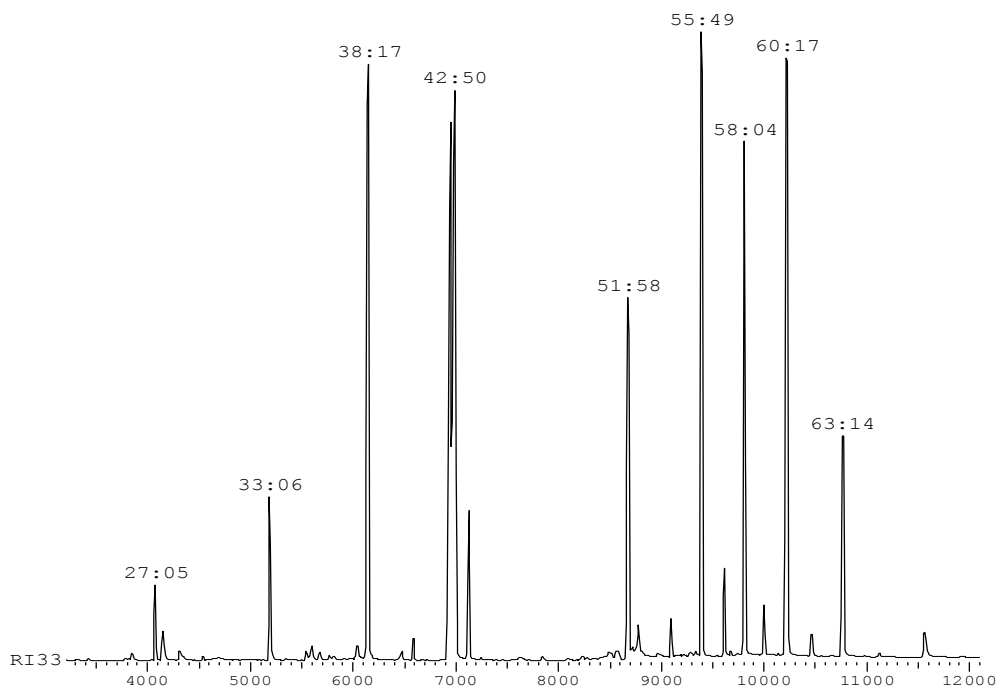


Figura 24: Cromatograma parte ácida do extrato de hexano.

Tabela 9: Compostos identificados no extrato de hexano da parte neutra, Glob1:1_23.

Amostras	Peso (mg)	%	Espectros	Compostos encontrados
4	30,1	2,95%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	6,10,14-trimetilpentadecan-2-ona (16,57%); 7-acil-6-etil-1,1,4,4-trametiltetralin; farnesilacetona; hexadecanoato de metilo; totarol ; farnesilacetona isomero ; docosanoato de metilo ; 1-DOCOSANOICO; esqualeno ; vitamina E: alfa-tocoferol;
5	10,3	1,01%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	isofitol (38,31%)
7	20,5	2,01%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	cetona artemisia; um hidrocarboneto; derivado de esqualeno; cicloartenol handianol (75,84%); 24-metilencicloartenol;
8	110,9	10,86%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	1-octadecanol; fitol; 9E-eicoseno; um álcool; ciclotetracosano; um álcool; um álcool; lanosta-8-en-3β-ol; β-amirina; um triterpeno; handianol (32,29%); handianol (cicloartenol); 24-metilenecicloartenol;
9	134,3	13,15%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	1-octadecanol (25,28%); Outro álcool; fitol; álcool ou hidrocarboneto (25,91%); um álcool; 1-octadecanol; 1-docosanol; ciclotetracosano ; isómero ; obtusifoliol; β-amirina ; handianol; 24-metilencicloartenol ; citrostadienol ;
10	149	14,58%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	cetona artemisia; 1-octadecanol; ácido (Z,Z)9,12-octadecadienoico ; um ácido; hidrocarboneto ; vitamina E, α-tocoferol ; tocoferol isómero ; ergost-5-en-3β-ol ; obtusifoliol ; β-dihidrofucosterol (50,85%); fucosterin ; 24-metilenelophenol; handianol ; citrostadienol ;
11	152,1	14,89%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	24β-metilcolesterol; trans-estigmasta-5,22-dien-3β-ol ; β-sitosterol(83,88%) ; fucosterin; estigmat-4-en-3-ona ;
12	39,9	3,91%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	dihidroactinidiolida; 24β-metilcolesterol ; β-sitosterol (87,46%) ; isomero ;
13	59,5	5,82%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	6,10,14-trimetilpentadecan-2-ona; ácido hexadecanóico; ác z,z-9,12-octadecadienóico(33,32%); vitamina E; delta-5-ergostenol; β-dihidrofucosterol ; isómero ; Handianol ; 33-norgorgosta-5,24(28)-dien-3β-ol ; 9,19-ciclolanost-23-en-3,25-diol ;
14	29	2,84%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	um alceno; exahidrofarnesilacetona; acetato de farnesilo ; um lipideo ; um tocoferol ; β-dihidrofucosterol(22,98%)
15	51,5	5,04%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	3,7,11,15-tetrametilhexadecanol; hexahidrofarnesilacetona ; um ácido ; um ácido ; mistura ; β-dihidrofucosterol ; pode ser dihidrocalisterol (49,73%);
16	27	2,64%	RMN ¹ H e ¹³ C e GC-MS	um álcool ; hexahidrofarnesilacetona ; um ácido ; α-tocoferol (vitamina E) ; β-dihidrofucosterol ; tremulona;

Tabela 10: Compostos encontrados para o extrato de Hexano esterificada: parte ácida da *Globulária amygdofolia*

Amostras	Compostos encontrados	%
Pico no 1	2,6-di(terbutil)-4-hidroxi-4-metil- 2,5-ciclohexadien-1-ona ;	0,1
Pico no 2	2,6-di(terbutil)-4-metilfenol	1,1
Pico no 3	decanoato de metilo	0,7
Pico no 4	nonadioato de dimetilo	0,2
Pico no 5	tetradecanoato de metilo	3,0
Pico no 6		0,3
Pico no 7		
Pico no 8		
Pico no 9	pentadecanoato de metilo	0,1
Pico no 10	9-hexadecenoato de metilo	0,2
Pico no 11	hexadecanoato de metilo	12,7
Pico no 12	9Z-9-octadecenoato de emtilo	0,2
Pico no 13	15-metilhexadecanoato de metilo	0,4
Pico no 14	9,12-octadecadienoato de metilo	16,4
Pico no 15	9,12,15-octadecatrienoato de metilo	17,2
Pico no 16	10-octadecenoato de metilo	0,6
Pico no 17	octadecanoato de metilo	3,3
Pico no 18	11-eicosanoato de emtilo	0,1
Pico no 19		
Pico no 20	eicosanoato de metilo	8,7
Pico no 21		
Pico no 22		
Pico no 23		
Pico no 24	Heneicosanoato de metilo	0,6
Pico no 25	docosanoato de metilo	8,5
Pico no 26	tricosanoato de metilo	1,1
Pico no 27	tetracosanoato de emtilo	5,3
Pico no 28	pentacosanoato de emtilo	0,6
Pico no 29	hexacosanoato de metilo	10,6
Pico no 30	heptacosanoato de emtilo	0,4
Pico no 31	octacosanoato de metilo	4,7
Pico no 32	triacontanoato de metilo	1,0

3.3.2. Extrato de acetona

Ao extrato de acetona foram feitas separações por solubilidade em hexano e clorofórmio, obtendo-se a parte solúvel em hexano, parte solúvel em clorofórmio e parte insolúvel. Destas partes foram estudadas por cromatografia em coluna a parte solúvel em clorofórmio.

O extrato de acetona solúvel em clorofórmio foi chamado de amostra Glob2: 1_21 fracionada pela CC em 21 frações. Da análise efetuada às frações obtidos por RMN de ^{13}C e de ^1H verifica-se a existência de semelhanças em todas as frações, e do estudo conclui-se que todas as frações correspondem ao mesmo composto. Pelo espectro de massa de alta resolução determina a fórmula molecular para esse composto como $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_{11}$ e peso molecular de 492 (Figura 26).

O composto identificado é a Globularina um derivado do catalpol, estaria formado por um iridoide e uma unidade de glucose (Figura 25). A globularina é o principal composto das folhas de *Globularia alypum* (3,4%), e os resultados demonstraram que o composto isolado desempenha um papel importante na anti-hipercolesterolemia e anti-hipertrigliceridemia propriedades de *Globularia alypum* e base científica para o uso desta planta em medicina tradicional [40].

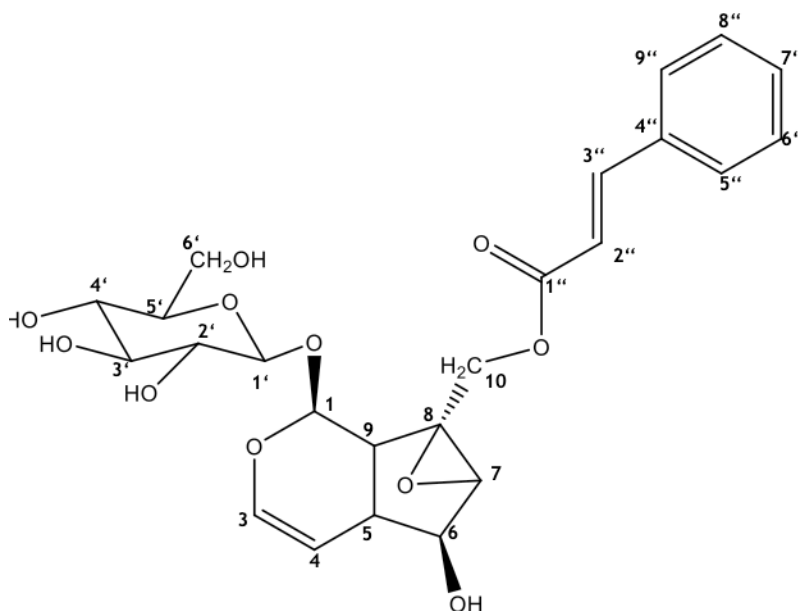


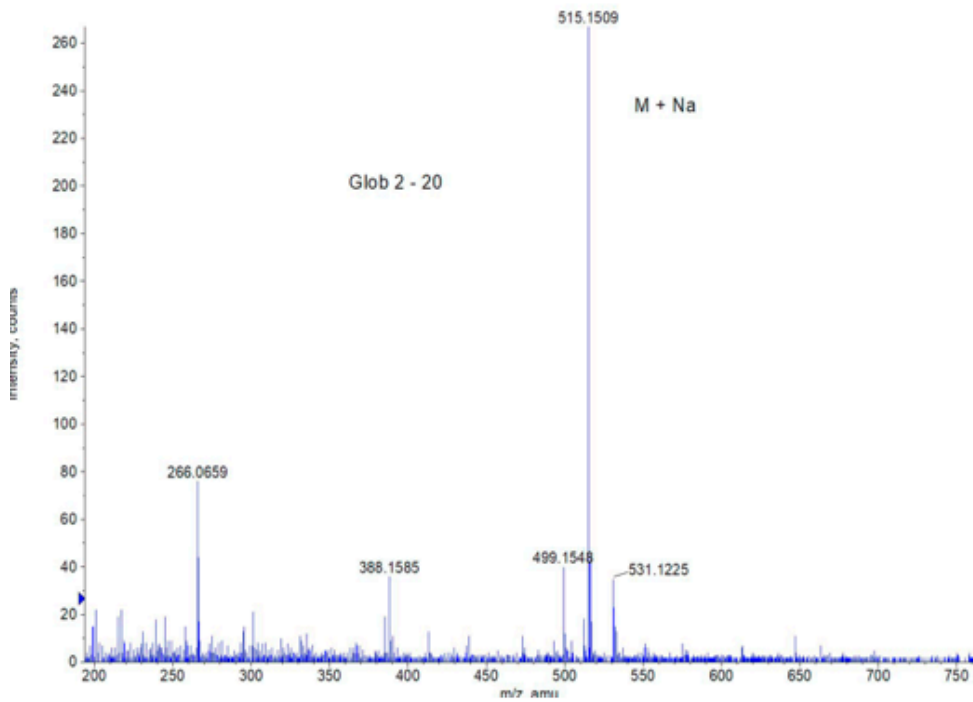
Figura 25: Globularina, o composto identificado em toda a fração Glob2:1_21

Nas figuras 28 e 29 estão representados os espectros de RMN ^1H e ^{13}C para a globularina e nas tabelas 11 e 12 estão descritas os seus carbonos e hidrogénios. Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C foram comparados com os dados da literatura, porem existe pouca discussão envolvendo as atribuições dos deslocamentos químicos dos hidrogénios das unidades de glicose e o *trans*-cinamoilo.

No espectro de Infravermelho (Figura 27 efetuada a uma das frações da Glob2:20), a banda de absorção em $3347,00\text{ cm}^{-1}$ está relacionada com os grupos hidroxilo, com deformação axial, larga e característica de ligações de hidrogénios intermolecular. A volta de $3080 - 3100\text{ cm}^{-1}$ pode ser observada as ligações C-H de algum anel de benzeno. O sinal que aparece a $2919,61\text{ cm}^{-1}$, característico da deformação axial das ligações C-H dos metilenos em compostos alifáticos. Às absorções em $1698,33\text{ cm}^{-1}$ corresponde a ligação C=O de um grupo éster e a absorção em $1634,24\text{ cm}^{-1}$ é correspondente às ligações duplas do anel de benzeno. O sinal que aparece de 1050 cm^{-1} a 1010 cm^{-1} é o sinal característico da deformação axial simétrica C-O-C e o sinal a $1280,80\text{ cm}^{-1}$ corresponde a sinal assimétrica de C-O-C.

Os dados de RMN ^1H (400 MHz, Metanol- d_4) e correlação com os dados RMN-2D HSQC e HMBC, indicam sinais típicos de anel aromático do grupo *trans*-cinamoilo em δ_{H} 7,60 ppm (H5"), δ_{H} 7,40 ppm (H8"), além dos sinais dos hidrogénios da posição α e β em δ_{H} 6,55 (H2") e 7,70 ppm (H3"). A unidade de glicose com sinais característicos nas posições entre 3,19 ppm e 4,75 ppm. Entretanto os sinais característicos para os iridoides aparecem em 5,01 ppm e 6,31 ppm. Verifica-se que o composto apresenta 24 átomos de carbono, dos quais 4 átomos de carbono terciário, 14 átomos de carbono secundário e 6 átomos de carbono de primário.

Comparando esses dados com os da literatura, a determinação da estrutura é consistente com a globularina um glicósido purgativo também comum aos congêneres *Globularia alypum*, *Globularia vulgaris*, *Globularia arábica* e *Globulária puntata*.^{[45][36][38]} De acordo com outros estudos anteriores sobre a composição química das espécies de globulária, a *Globulária a. w.* de Cabo Verde é caracterizada por iridoides, e o presente estudo relata pela primeira vez o isolamento e a identificação da Globularina nesta espécie. Este estudo demonstra a ocorrência de iridoides como potenciais marcadores taxonómicos desses compostos em espécies, família e nível de ordem Lamiales.



Formula	CalculatedMass	mDaError	ppmError	RDB
<u>C24 H28 O11 Na</u>	515,152383	-1,48328	-2,879309	10,5
C33 H23 O6	515,148915	1,98482	3,852886	22,5
C26 H27 O11	515,154789	-3,88854	-7,548343	13,5
C31 H24 O6 Na	515,14651	4,39008	8,521921	19,5

Figura 26: Espectro de Massa do extrato de acetona solúvel em clorofórmio: Glob2:20.

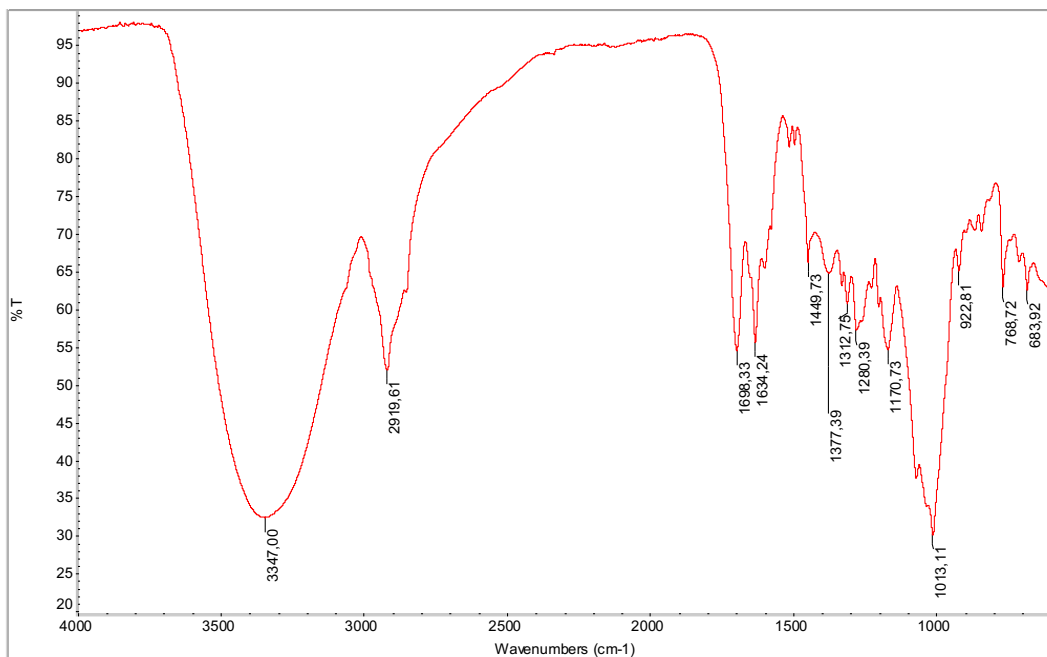


Figura 27: IV da fração Glob 2:20, Globularina.

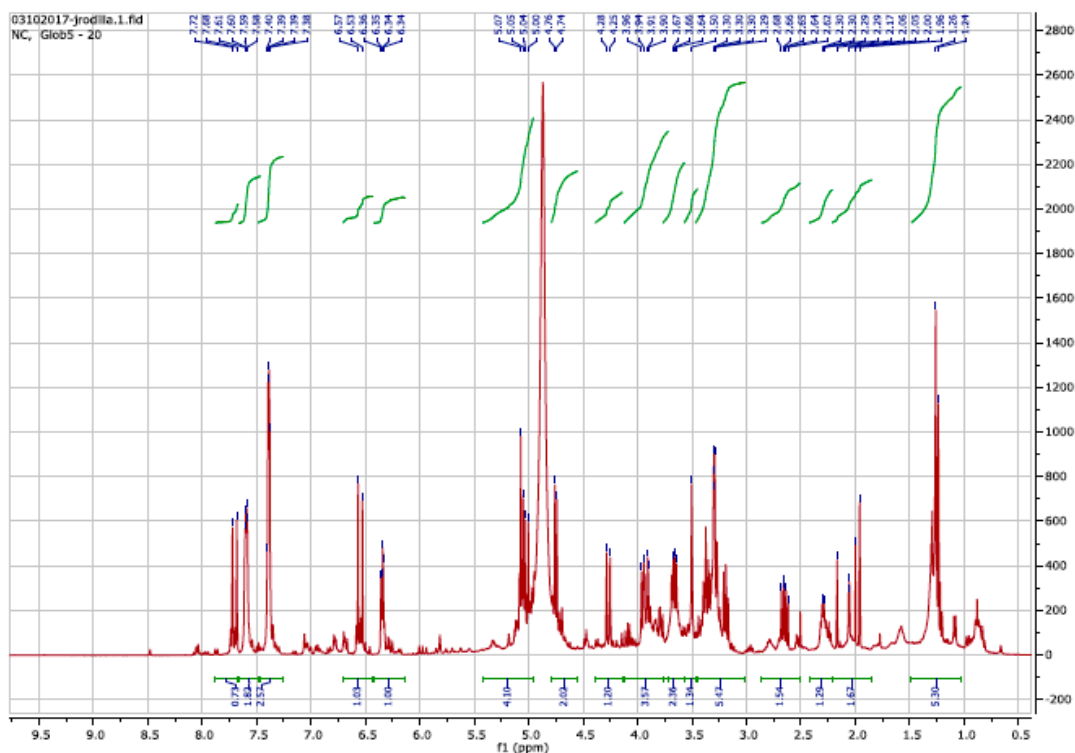


Figura 28: Espectro de RMN de ^1H da fração Glob2:20, Globularina.

Tabela 11: Sinais de RMN de ^1H da fração Glob2:20, Globularina.

H	δ (ppm)	Multiplicidade: J (Hz)
Iridoide		
1	5,06	Dupleto
3	6,35	Duplo dupleto
4	5,07	dupleto
5	2,30	Duplo dupleto
6	3,93	Dupleto
7	3,36	dupleto
9	2,65	Multipleto
10	4,27 e 5,02	Dupleto
Glucose		
1'	4,75	Dupleto
2'	3,19	Duplo dupleto
3'	3,29	Multipleto
4'	3,28	Duplo dupleto
5'	3,29	Dupleto
6'	3,67 - 3,90	Multipleto
Trans-cinamoilo		
2''	6,55	dupleto
3''	7,70	dupleto
5''	7,60	Duplo dupleto
6''	7,40	dupleto
7''	7,40	Multipleto
8''	7,40	Multipleto
9''	7,60	Dupleto

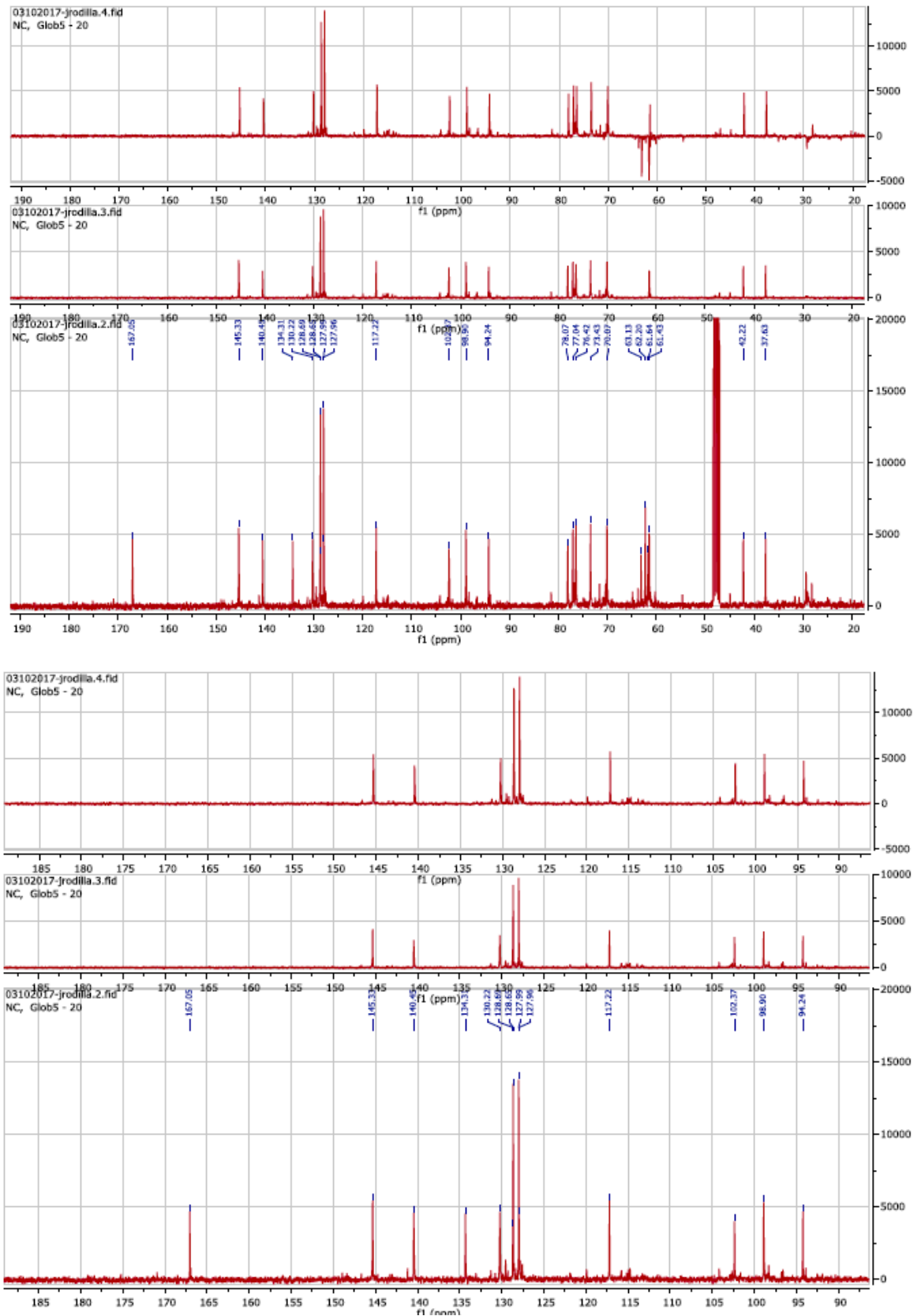


Figura 29: Espectro de RMN de ^{13}C (ampliada) da fração Glob2:20, Globularina.

Tabela 12: sinais de RMN de ^{13}C (ampliada) da fração Glob2:20, Globularina.

Posição C	δ (ppm)	Tipo de carbono
Iridoide		
1	94,24	CH
3	140,45	CH
4	102,17	CH
5	37,63	CH
6	77,04	CH
7	61,64	CH
8	62,20	C
9	42,22	CH
10	63,13	CH ₂
Glucose		
1'	98,90	CH
2'	73,43	CH
3'	76,42	CH
4'	70,07	CH
5'	77,04	CH
6'	61,43	CH ₂
Trans-cinamoilo		
1"	134,31	C
2"	128,69	CH
3"	127,96	CH
4"	130,22	CH
5"	127,99	CH
6"	128,65	CH
7"	167,05	C
8"	117,,22	CH
9"	145,33	CH

4. Conclusão

O conhecimento etnofarmacológico que várias culturas adquiriram desde a antiguidade sobre o uso de plantas como medicamentos baseado em experiências e observações foram cruciais para a pesquisa de produtos biomédicos e naturais. As plantas sempre desempenharam um papel importante, por um lado, por serem aplicadas de forma direta à medicina tradicional, nos cuidados de saúde das populações, por outro, por servirem como matéria-prima para a obtenção de compostos bioativos utilizados na indústria farmacêutica. Os produtos naturais proporcionam uma variedade de compostos bioativos de uma diversidade química incomparável responsáveis pelas ações terapêuticas, embora muitas vezes isso não se prove cabalmente por causa de poucos estudos.

No caso deste estudo de investigação fitoquímica, e a partir das informações obtidas das duas espécies de plantas endêmicas de Cabo Verde, nomeadamente o *Campylanthus glaber Benth ssp glaber* e a *Globularia amygdalifolia Webb*, podemos concluir que:

Os métodos usados na extração, fracionamento e purificação dos extratos bioativos bem como as técnicas cromatográficas e espectroscópicas utilizadas permitiram a identificação de várias classes de compostos de interesse químico e farmacológico. O método de extração e a polaridade do solvente demonstraram influências no rendimento da extração, quanto maior a polaridade, maior o rendimento. Esta relação pode ser determinada pela natureza dos metabolitos essenciais presentes nas espécies em estudo. O etanol, por ser uma molécula anfipática e extrair tanto substâncias com caráter apolar como polares, é o solvente que mostrou maior eficiência de extração para as duas espécies, pois extraiu todos os componentes. Quanto aos extratos, observou-se que são misturas complexas e merecem estudos para avaliar de uma forma mais detalhada, a composição química.

A partir das frações obtidas de cada cromatografia foi possível identificar a maior parte dos constituintes dos extratos através das técnicas espectroscópicas de IV, RMN de ^1H e ^{13}C e análise por GC-MS (bases de dados NIST *mass spectral software*) e também por comparação com os dados da literatura. Foram identificados nas folhas de *Campylanthus glaber Benth ssp glaber* o Esqualeno, Hentriacontano, octadecanal, misturas de triacilglicerois, cetona Artemisa, α -tecoferol (Vitamina E), esterres metílicos, hidrocarbonetos, triterpenoides, fitoesteróis, ácidos fenólicos, ácidos gordos e álcoois gordos de cadeia linear, além de vários compostos com interesse químico e biológico, sendo os compostos maioritários, o esqualeno no extrato de hexano e a cetona artemisa e o α -tecoferol (Vitamina E) nos extratos de acetona.

Para a espécie *Globularia amygdalifolia Webb*, foram identificados nos extratos de hexano os compostos maioritários: β -sitosterol, handianol (cicloartenol), dihidrocalisterol, β -dihidrofucosterol, e ácido z,z-9,12-octadecadienóico, 9, 12, 15 octadecatrienoato de metilo, e 9, 12 octadecadienoato de metilo. No extrato de acetona solúvel em clorofórmio verificou-se a existência de um único composto em toda a fração, a globularina, um derivado do catalpol formado por um iridoide e uma unidade de glucose, sendo o composto marcador quimiotaxonómico nos principais géneros da *globulária*.

Alguns dos constituintes presentes nas folhas de *Campylanthus glaber* e *globulária amygdofolia* podem justificar os efeitos terapêuticos na medicina popular, embora nesse estudo não tenham sido provadas as suas atividades biológicas e farmacológicas. São exemplos alguns dos principais triterpenos e compostos fenólicos identificados nesse estudo, que de modo geral sugerem potencialidades para atividades microbianas, antioxidantes, antiviral e de prevenção do cancro.

Esses dados contribuirão para a documentação de informações relativas a dados fitoquímicos de plantas de uso tradicional da medicina popular selecionadas da flora Cabo-verdiana, uma vez que são poucas ou raras as informações encontradas.

Este é a primeira contribuição sobre os constituintes químicos das duas espécies a partir de estudos sobre os extratos de hexano e acetona para as duas espécies endêmicas de Cabo Verde. Sendo que para o *Campylanthus glaber* de origem Cabo-verdiana já exista estudos sobre os extratos de metanol e caracterização dos seus constituintes. Enquanto para a *Globulária amygdofolia* é o primeiro estudo aos extratos de hexano e acetona e sua caracterização química.

Um dos objetivos alcançados foi a documentação de informações fitoquímicas destas plantas medicinais Cabo-verdianas, usando abordagens quantitativas, que foi desde o início uma das principais motivações pelo qual se desenvolveu esta investigação.

4.1. Recomendações

O presente trabalho dissertativo das potencialidades farmacológicas de plantas endémicas /medicinais de Cabo Verde que não se dá por terminado, visto ser um tema abrangente e atual, recomenda-se para um posterior estudo, uma vez que são escassos os estudos fitoquímicos. Com a perspetiva de desenvolver novas técnicas, unir diferentes centros de pesquisa, os dados poderão auxiliar em projetos ligados ao meio ambiente e ao meio académico, pois ainda há muito que se conhecer sobre a taxonomia e marcadores biológicos das espécies endémicas de Cabo Verde.

Para essas duas espécies serão necessários realizar estudos aos extratos de etanol e alargar este estudo de caracterização química a outras partes das plantas, nomeadamente o tronco e as raízes, de modo a caracterizar e comparar os seus principais constituintes químicos e estudos de relações estrutura-atividade para identificar as características estruturais biologicamente importantes que expliquem seus efeitos terapêuticos na medicina tradicional, bem como a realização de ensaios *in vitro* e *in vivo* em diversas linhas celulares de cancro e de outras patologias, para determinar o seu potencial de utilização em novos medicamentos.

5. Bibliografia

[1] Maciel, M., Pinto, A., Veiga, V., “Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares”, *Química Nova* 25 (2002) 429-438.

[2] Atanasov A.G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E-M., Thomas Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S., Heiss E., Rollinger, J.M., Schuster D., Breuss J.M., Bochkov, V., Mihovilovic, M.D., Kopp, B., Bauer, R., Dirsch V.M., Stuppner, H., “Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review”, *Biotechnology Advances* 33 (2015) 1582-1614.

[3] OMS, “Estratégia da OMS sobre medicina tradicional 2014-2023”, ISBN 978 92 4 350609 8, Genebra, 2013.

[4] OMS (2010). “Special Issue: African Traditional Medicine Day”, 31 August 2010.

[5] Lima, I., Tese de doutoramento publicada, “Medicinal and aromatic plants of Cape Verde: characterization of volatile metabolites of endemic and native species”, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Portugal, 2013.

[6] Medina, A., Gomes, I., “relatório nacional sobre o estado da biodiversidade em Cabo Verde”, Direção Nacional do Ambiente, Praia, Cabo Verde, 2015.

[7] Romeiras, M.M., Catarino, L., Torrao, M.M., Duarte, M.C., “Diversity and origin of medicinal exotic ora in Cape Verde Islands”, *Plant Ecology and Evolution* 142 (2011) 214-225.

[8] Bäckström, B., Tese de Doutoramento, “Saúde e imigrantes: as representações e as práticas sobre a saúde e a doença na comunidade cabo-verdiana em Lisboa”, Universidade Nova de Lisboa, Biblioteca Nacional de Portugal, 2009.

[9] Semedo, J.M., “A Ilha de Santiago (Cabo Verde): Génese de um ecossistema e identidade cultural numa ilha de escala marítima entre a África, a Europa e as Américas”, *Palaver*, 1 (2012) 153-168.

[10] Carvalho, J.C., Dissertação de Mestrado, “Estudo químico e biológico das espécies vegetais Caboverdianas: *Echium hypertropicum Webb* e *Echium stenosphon Webb subsp. Stenosphon*, Universidade federal fluminense, Brasil, 2013.

[11] Fernandes, C.M., Tese de Mestrado, “Flora exótica de cabo verde: avaliação e impactos nos ecossistemas naturais, utilizando sistemas de informação geográfica”, Universidade de Lisboa, Portugal, 2008.

[12] Romeiras, M.M., Monteiro, F., Duarte, M.C., Schaefer, H., Carine, M., “Patterns of genetic diversity in three plant lineages endemic to the Cape Verde Islands”, *AoB PLANTS* 7 (2015)

[13] Olmstead, R.G., “O que aconteceu com as Scrophulariaceae?”, *Fremontia* 30 (2013) 13-22.

[14] APG IV, “Uma atualização da classificação do grupo de *Angiosperm phylogeny* para as ordens e famílias de plantas com flores”, *Botanical Journal of the Linnean Society* 161 (2016) 105-20.

[15] Xu, Z., Chang, L., “Scrophulariaceae. Em: Identificação e controle de ervas daninhas comuns”, Springer 3, 2017.

[16] Naskar, S., “Characterization of Scrophulariaceae based on gross morphology and petiole anatomy”, *Indian Journal of Plant Sciences* 4 (2015) 121-126.

[17] Larios, I.M., Rios, J.L.V., “La familia Scrophulariaceae en Mexico: Diversidade y Distribución” *Bol.Soc.Bot. Mexico*, 69 (2001) 101-121.

[18] Seghiri, R., Cheriet, T., Aouabdia, S., Mancini, I., Defant, A., Boumaza, O., Mekkiou, R., Sarri, D., León, F., Brouard, I., Benayache, F., Benayache, S., (2014). “Chemical constituents of *Linaria reflexa* Desf. (Scrophulariaceae)”, *Der Pharmacia Lettre* 6 (2014) 54-57.

[19] Li, Z-H., Long, P., Bai, S., Yang, D-W., Zhu, H., Cui, Z-H., Zhang, C-H., Li, M-H., “Chemical constituents from *Cymbaria dahurica* L. (Scrophulariaceae)”, *Biochemical Systematics and Ecology* 57 (2014) 11-14.

[20] Chebaki, R., Haba, H., Long, C., Marcourt, L., Benkhaled, M., “Acylated iridoid glycosides from *Scrophularia saharae* Batt. & Trab.”, *Biochemical Systematics and Ecology* 39 (2011) 902-905.

[21] Blunden, G., Patel, A.V., Armstrong, N., “Betaine distribution in the Scrophulariaceae and some previously included families”, *Biochemical Systematics and Ecology* 31 (2003). 359-365.

[22] Oxelman, B., Kornhall, P., Olmstead, R.G., Bremer, B., “Further disintegration of Scrophulariaceae”, *Taxon* 54 (2005) 411-425.

[23] Gomes, S., “Plantas Endémicas Medicinais de Cabo Verde”, INIDA -DCA, Cabo Verde, 2015.

[24] Ronsted, N., Jensen, S., “Iridoid glucosides and caffeoyl phenylethanoid glycosides from *Campylanthus salsaloides* and *Campylanthus glaber*”, *Biochemical Systematics and Ecology* 30 (2002) 1091-1095.

[25] Soares, M.J., “Monitorização da vegetação endémica da ilha de Santiago” Instituto Superior de Educação, Santiago, Cabo Verde, 2004.

[26] Monteverde-MAC/3/C172, Cooperação euro-africana para a melhoria florestal da região atlântica a partir do conhecimento e luta contra a desertificação. Cartografia de espécies vegetais ameaçadas na ilha de Santiago, Cabo Verde, 2013.

[27] Gomes, A.R., Vasconcelos, T., M. Helena Guimarães de Almeida, M.H., “Plantas na medicina tradicional de Cabo Verde”, Workshop Plantas Medicinais e Fitoterapêuticas nos Trópicos, IICT /CCCM, 29, 30 e 31 de outubro de 2008.

[28] Hjertson, M., “Revision of the disjunct genus *Campylanthus* (Scrophulariaceae)”, *Edinburgh Journal of Botany* 60 (2003) 131-174.

[29] Thiv, M., Thulin, M., Hjertson, M., Kropf, M., Linder, H.P., “Evidence for a vicariant origin of Macaronesian-Eritreo/Arabian disjunctions in *Campylanthus* Roth (Plantaginaceae)” *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54 (2003) 607-616.

[30] Kilian, N., Hein, P., Bahah, S.O., “A new species of *Campylanthus* (Scrophulariaceae) from Ras Fartak, Al-Mahra, and notes on other species of the genus in Yemen”, *Botanic Garden and Botanical Museum Berlin* 32 (2002) 271-279.

[31] Yang, Y., Yina, B., Lva, L., Wang, Z., Hea, J., Chen, Z., Wen, X., Zhanga, Y., Suna, W., Lia, Y., Zhaoa, Y., “Gastroprotective effect of aucubin against ethanol-induced gastric mucosal injury in mice”, *Life Sciences*, 189 (2017) 44-51.

- [32] Gousiadou, C., Kokubun, T., Gotfredsen, C.H., Jensen, S.R., “Further iridoid glucosides in the genus *Manulea* (Scrophulariaceae)”, *Phytochemistry*, 109 (2015) 43-48.
- [33] Navarrete, S., Kempa, P.D., Painb, S.J., Back, P.J., “Bioactive compounds, aucubin and acteoside, in plantain (*Plantago lanceolata* L.) and their effect on in vitro rumen fermentation” *Animal Feed Science and Technology* 222 (2016) 158-167.
- [34] Punt, W., Marks, A., “GLOBULARIACEAE”, *Review of Palaeobotany and Palynology*, 69 (1991) 109-112.
- [35] Elbetieha, A., Oran, S.A., Alkofahi, A., Darmani, H., Raies, A.M., “Fetotoxic potentials of *Globularia arabica* and *Globularia alypum* (Globulariaceae) in rats”, *Journal of Ethnopharmacology* 72 (2000) 215-219.
- [36] Taskova, R.M., Gotfredsen c.h., Jensen, S.R., “Chemotaxonomy of Veroniceae and its allies in the Plantaginaceae”, *Phytochemistry* 67 (2006) 286-301.
- [37] Tundis, R., Peruzzi, L., Colica, C., Menichini, F., “Iridoid and bisiridoid glycosides from *Globularia meridionalis* (Podp.) O. Schwarz aerial and underground parts”, *Biochemical Systematics and Ecology* 40 (2012) 71-74.
- [38] Friščić, M., Bucar, F., Pilepić, K.H., “LC-PDA-ESI-MS” analysis of phenolic and iridoid compounds from *Globularia* spp.”, *Journal of Mass Spectrom*, 51 (2016) 1211-1236.
- [39] Merghache, S., Zerriouh, M., Merghache, D., Tabti, B., Djaziri, R., Ghalem, S., “Evaluation of hypoglycaemic and hypolipidemic activities of Globularin isolated from *Globularia alypum* L. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats”, *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 3 (2013) 001-007.
- [40] Jouad, H., Maghrani, M., Eddouks, M., “Hypoglycaemic effect of *Rubus fruticosus* L. and *Globularia alypum* L. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats”, *Journal of Ethnopharmacology* 81 (2002) 351-356.
- [41] Es-Safia, N-E., Kollmanna, A., Khlfic, S., Ducrota, P-H., “Antioxidative effect of compounds isolated from *Globularia alypum* L. structure-activity relationship” *LWT-Food Science and Technology* 40 (2007) 1246-1252.

[42] Taleb-Dida, N., Krouf, D., Bouchenak, M., “Globularia alypum aqueous extract decreases hypertriglyceridemia and ameliorates oxidative status of the muscle, kidney, and heart in rats fed a high-fructose diet.”, *Nutrition Research* 31 (2011) 488-495.

[43] Fehri, B., Aiache, J-M., Ahmed, K.K.M., “Active spermatogenesis induced by a reiterated administration of *Globularia alypum* L. aqueous leaf extract” *Pharmacognosy Research* 4 (2012) 138-147.

[44] Ghilissi, Z., Kalleb, R., Silac, A., Harrabia, B., Atheymena, R., Zeghala, K., Bougatefc, A., Sahnouna, Z., “*Globularia alypum* methanolic extract improves burn wound healing process and inflammation in rats and possesses antibacterial and antioxidant activities” *Biomedicine & Pharmacotherapy* 84 (2016) 1488-1495.

[45] Feriani, A., Contreras, M., Talhaoui, N., Gómez-Caravaca, A.M., Taamalli, A., Segura-Carretero, A., Ghazouani, L., Feki, A., Allagui, M.S., “Protective effect of *Globularia alypum* leaves against deltamethrin-induced nephrotoxicity in rats and determination of its bioactive compounds using high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem quadrupole-time-of-flight mass spectrometry”, *Journal of Functional Foods* 32 (2017) 139-148.

[46] Hollander, K. & Jage, E.J., “*Globularia*: Morphology, biology and ecogeographical differentiation. I. Progressions in the growth form, leaf structure, inflorescences, and distribution of the specie”, *Flora* 189 (1994) 223-254.

[47] Foglio, M.A., Queiroga, C.L., Sousa, I.M., Rodrigues, A.F., “Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar”, Divisão de Fitoquímica, CPQBA/UNICAMP, Brasil, 2006.

[48] Mangambu, M.J.D., Mushagalusa, K.F., Kadima, N.J., “Contribution à l'étude photochimique de quelques plantes médicinales antidiabétiques de la ville de bukavu et ses environs (sud-kivu, r.d.congo)”, *journal of applied biosciences* 75 (2014) 6211- 6220.

[49] Antonie, A-A., “An Introduction to Botanical Medicines: History, Science, Uses, and Dangers”, 87-95, 2008.

[50] Sangi, D.P.,” Estratégias de síntese na descoberta de fármacos: o emprego da síntese orientada pela diversidade estrutural”, *Quim. Nova* 39 (2016) 995-1006.

- [51] Patridge, E., Gareiss, P., Kinch, M., Hoyer, D., “An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives”, *Drug Discovery Today*, 21 (2016) 2.
- [52] Ganesan, A., “The impact of natural products upon modern drug Discovery”, *Current Opinion in Chemical Biology* 12 (2008) 306-317.
- [53] Newman, D.J., Cragg, G.M., (2016). “Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014”, *J. Nat. Prod.* 79 (2016) 629–661.
- [54] Kuroshima, K.N., Tese doutoramento, “Estudos químicos e farmacológicos das plantas virola oleifera e hyeronima alchorneoides”, Universidade Federal De Santa Catarina, Brasil, 2002.
- [55] Jaikumar, B., & Jasmine, R., “A Review on a few medicinal plants possessing anticancer activity against human breast cancer”, *International Journal of PharmTech Research* 93 (2016) 333-365.
- [56] Cragg, G.M. & Newman, D.J.,” Natural products: A continuing source of novel drug leads”, *Biochimica et Biophysica Acta*,1830 (2013) 3670-3695.
- [57] Sedighi, M., Bahmani, M., Asgarv, S., Beyranvand, F., Kopael, M.R., “A review of plant-based compounds and medicinal plants effective on atherosclerosis”, *J Res Med Sci.*, 22 (2017) 30.
- [58] Azmir, J., Zaidul,I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M., “Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review”, *Journal of Food Engineering*, 117 (2013) 426-436.
- [59] Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram K.M., Yoga, L., “Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants extracts”, *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8, (2011) 1-10.
- [60] Smith, R., “Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques”, *Journal of Chromatography A* 1000 (2003) 3-27.
- [61] Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Mello, J.P., Mentz, L.A., Perovick, P., “Farmacognosia: Do produto natural ao medicamento”, Porto Alegre: Artmed. ISBN 978-85-8271-359-4,2017.

[62] Fumagali, E., Gonçalves, R.A., Machado, M.F., Vidoti, G.J, Oliveira A.J., “Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*”, *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 18 (2008) 627-641.

[63] Reddy, H., Crouveur, P., “A natural triterpene for use in disease management and therapy”, *Advanced Drug Delivery Reviews* 61 (2009) 1412-1426.

[64] Srigley, C.T. & Haile, E.A., “Quantification of plant sterols/stanols in foods and dietary supplements containing added phytosterols”, *Journal of food composition and analysis*, 40 (2015) 163-176.

[65] Shukla, R.S. & Bhaskar, V.V., “Steroidal composition of the root extract of *Orthosiphon tomentosus*, Benth (Lamiaceae) used in Tribal medicine”, *Journal of Pharmacy Research*, 2 (2009) 1137-1138.

[66] Patil, B. & Rajput, A. (2012). “GC-MS analysis of biologically active compounds of chloroform extract of leaves of *Butea monosperma*”, *Journal of Pharmacy Research*, 5 (2012) 1228-1230.

[67] Oliveira, D.E. & Prates, E.R., “Utilização dos componentes da cera das plantas, em especial os n-alcanos, em estudos de nutrição de ruminantes”, *Ciência Rural* 30 (2000) 549-557.

[68] Doan, C.D., Ming, T. C., Vrieze, M., Lynen.F., Danthine, S., Brown, A., Dewettinck, K., Patel, A.R., “Chemical profiling of the major components in natural waxes to elucidate their role in liquid oil structuring”, *Food Chemistry* 214 (2017) 717-725.

[69] Lipkind, D., Kapustin, Y., Umnanant, P., Chickos, J.S. “The vaporization enthalpies and vapor pressures of a series of unsaturated fatty acid methyl esters by correlation gas chromatography”, *Thermochimica Acta* 456 (2007) 94-101.

[70] Tejada, J.F., Antequera, T., Martín, L., Ventanas, J., Garcia, C., “Study of the branched hydrocarbon fraction of intramuscular lipids from Iberian fresh ham”, *Meat Science* 58 (2001) 175-179.

[71] Silva, F.C., Duarte, L.P., Filho, A.S., “Celastraceae Family: Source of Pentacyclic Triterpenes with Potential Biological Activity”, *Revista Virtual Química* 6 (2014) 1205-1220.

[72] Martins, P.F., Tese de Doutorado, “Estudos e experimentos para a concentração de Tocoferóis e fitoesteróis por meio da destilação molecular”, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil, 2006.

[73] Desai, A.J., Dong, M., Miller, L.J., “Beneficial effects of b-sitosterol on type 1 cholecystokinin receptor dysfunction induced by elevated membrane cholesterol”, *Clinical Nutrition*, 35 (2016) 1374 -1379.

[74] Hamed, A., Ghanbari, A., Saeidi, V., Razavipour, R., Azari, H., “Effects of β -sitosterol oral administration on the proliferation and differentiation of neural stem cells”, *Journal of Functional foods* 8 (2014) 252-258.

[75] Lomenick, B., Shi, H., Huang, J., Chen, C., “Identification and characterization of b-sitosterol target proteins”, *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters* 25 (2015) 4976-4979.

6. Anexos

Tabela 13: Todos os compostos identificados nos extratos de Hexano e Acetona nas folhas de *Campylanthus glaber*

(3 β ,22E)-estigmasta-5,22- dien-3-ol; Δ^5 ergosterol ; (Z,Z)-9,12-octadecadienoato de metilo 1-monolinolenina ; 1-tetradeceno ; 1,3-isobenzofurandiona; 1,4-naftalenediona; 1,4-naftilquinona ; 10,11-dihidro-2-cis-6trans-farnesol; 10,14-trimetil-2-pentadecanona; 11-butildocosano ; 11-eicosenoato de metilo 13-docosenoato de metilo 14-metilhexadecanoato de metilo; 14-metilpentadecanoato de metilo; 17-nonadecenal ; 2-nonadeceno; 2-pentadecanona; 2,4-dihidroxiacetofenona ; 2,4-hidroxibenzoato de metilo; 2,6-diterbutil-4-hidroxi-4-metil- 2,5- ciclohexadien-1-ona; 24beta-etilcolesterol; 24beta-metilcolesterol	25-epiaplysteril acetato; 5-octadeceno; 5-octadecenoato de metilo; 5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxy-3- 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona ; 7,10-octadecadienoato de metilo; 8-octadecenoato de metilo 8,8-difenil-heptadecano; 9-eicoseno; 9-hexadecenoato de metilo 9-octadecenoato de metilo 9-octadecenoil glicerol 9-tricoseno ; 9,10-epoxioctadecanoato de metilo 9,12-octadecadienoato de metilo; 9,12-octadecadienoato; Ac. (Z,Z)-9,12-octadecadienónico; Ac. 4-hidroxifenillactico; Ac. o-metilbenzoato ftálico ; ácido 9-octadecenónico; ácido Hexadecanónico; ácido tetradecanónico ; acetato de aplysterilo acetato de docosanol; acetato de epiaplysterilo; acetato de estigmasta-5,22-dien-3 β -ol;	acetovanillona áci p-metilbenzoilformico; ácido vanílico; azuleno; cetona artemisia ciclotetracosano; colesterol; derivado do colesterol; derivado do olean-12-eno di-(9-octadecenoil)-glicerol; di-isobutil ftalato; diacetato de glicerol-1-oleato; Difenilmetanona; Dihidroactinidiolida; dipalmitina; docosano; docosanoato de metilo dodecoseno; dotriacontano; E-2-decenal ; eicosanal; eicosanoato de metilo ergost-5-en-3 β -ol; esqualeno ; estigmas-5-en-3 β -ol ftalato de bis(2-etilhexilo); ftalato de di-butilo ; ftalatos de alquilos; geranilacetona;
---	--	---

(Continuação Tabela 13)

hexacosanoato de metilo;
hexadecanoato de metilo
hexahidrofarnesilacetona;
hexanoato de metilo;
Hexatriacontano;
hidroxibenzoato de fenilo;
lactona; um aldeído;
linoleato de butilo ;
linoleína (2-mono β);
naftaleno,
neofitadieno ;
neofitadieno isómer;
nonacosano;
nonacosano;
nonanodioato de dimetilo

octacosano;
octacosanoato de metilo;
octadecanal
octadecanoato de metilo
octanoato de metilo;
pentadecanoato de metilo;
pentatriacontano;
propiovanillona;
solanesol;
tetracosanoato de metilo
tetradecanoato de metilo
tetratriacontano;
tocoferol isómero;
trans-estigmast-5,22-dien-3 β -ol;
triacontano ;
tricosano

glicerol 1-monooleato;
Heneicosano;
Hentriacontano;
heptacosano;
tricosanoato de metilo
tritetracontano;
vanilina;
viminalol
vinilbenzil álcool ;
vitamina E (α -tocoferol).
 α -amirina ;
 β -amirina ;
 β -dihidrofucosterol;
 β -metil- γ -undecalactona;
 β -monolinoleína ;
 γ -tocoferol ;

Tabela 14: Todos os compostos identificados nos extratos de Hexano e Acetona nas folhas de *Globularia a.w.*

1-docosanol ;	9Z-9-octadecenoato de emtilo	fucosterin ;
1-octadecanol ;	acetato de farnesilo;	handianol (cicloartenol) ;
10-octadecenoato de metilo	ácido (Z,Z)9,12-octadecadienoico ;	Heneicosanoato de metilo
11-eicosanoato de emtilo	ácido hexadecanóico;	heptacosanoato de emtilo
15-metilhexadecanoato de metilo	álcool ou hidrocarboneto ;	hexacosanoato de metilo
2,6-di(terbutil)-4-hidroxi-4-metil- 2,5- ciclohexadien-1-ona ;	cetona artemisia;	hexadecanoato de metilo
2,6-di(terbutil)-4-metilfenol	cicloartenol handianol ;	hexahidrofarnesilacetona ;
24-metilencicloartanol ;	ciclotetracosano ;	isofitol
24-metilnelophenol;	citrostadienol ;	lanosta-8-en-3 β -ol ;
24 β -metilcolesterol ;	decanoato de metilo	nonadioato de dimetilo
3,7,11,15-tetrametilhexadecanol ;	delta-5-ergostenol;	obtusifoliol ;
33-norgorgosta-5,24(28)-dien-3 β -ol ;	derivado de esqualeno ;	octacosanoato de metilo
6,10,14-trimetilpentadecan-2-ona ;	dihidroactinidiolida ;	octadecanoato de metilo
7-acil-6-etil-1,1,4,4- trametiltetralin;	dihidrocálistero	pentacosanoato de emtilo
9-hexadecenoato de metilo	docosanoato de metilo ;	pentadecanoato de metilo
9,12-octadecadienoato de metilo	eicosanoato de metilo	tetracosanoato de emtilo
9,12,15-octadecatrienoato de metilo	ergost-5-en-3 β -ol ;	tetradecanoato de metilo
9,19-ciclolanost-23-en-3,25-diol ;	esqualeno ;	totalol ;
9E-eicoseno ;	estigmat-4-en-3-ona ;	trans-estigmasta-5,22-dien-3 β -ol ;
	exahidrofarnesilacetona;	tremulona;
	farnesilacetona ;	triacontanoato de metilo
	farnesilacetona isomero ;	tricosanoato de metilo
	fitol ;	ucosterin;
		vitamina E (α -tocoferol) ;
		β -amirina ;
		β -dihidrofucosterol ;
		β -sitosterol ;