UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências

Caracterização Fitoquímica da *Phyllanthus welwitschianus* Mull. Arg.

(Versão Final Após Defesa)

Cidália António Faila Watxitomba Dala

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Biotecnologia

(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Profª. Doutora Dina Mendonça

Covilhã, maio de 2019

Dedicatória

Aos meus pais António Wanguiva e Júlia José, por serem o meu suporte

Agradecimentos

Honra e glória seja dada ao criador, pelo dom da vida e inúmeras bênçãos que me tem proporcionado;

Aos meus pais António Wanguiva e Júlia José, aos meus irmãos Isaac, Joana, Leonardo, Jovete, Filomena, Emilizíana, Abraão, Irene, Leonor, Beatriz pelo apoio, motivação e suporte dado durante toda a minha existência e no momento da minha formação

Ao meu esposo Domingos Dala e aos meus tesouros Elias Justino Wanguiva Sachilombo e Diana Cristina Wanguiva Dala pela compreensão nas horas cruéis durante a minha ausência, obrigada por estarem ao meu lado nos momentos difíceis;

À Professora Dra. Dina Mendonça por ter aceite o desafio de orientar esse trabalho, pela amizade, dedicação e todo encorajamento nos momentos difíceis. Grata eternamente serei e jamais cansarei de agradecer por todos os conhecimentos transmitido e que tentarei ao máximo colocar em prática.

Ao Dr. Fortunato Pedro Talani Diambo. Minha admiração por sua contribuição na realização deste trabalho e por dialogar comigo e me apontar o caminho certo a seguir. Obrigada;

À Universidade da Beira Interior a todos os docentes que muito fizeram para a minha integração no curso, incentivo dado a cada momento da formação e pelos conhecimentos transmitidos. Aos colegas de Biotecnologia 2016/2017; 2017/2018, acredito que sem o vosso apoio não teria conseguido terminar o curso.

Os meus agradecimentos são extensivos à Faculdades de Medicina Veterinária, por apostar nas minhas capacidades e pela seleção para beneficiar da bolsa no Processo de Formação de Quadros do País INAGBE-Angola.

Resumo

As plantas medicinais são o recurso de saúde mais acessível e disponível para grande parte das comunidades no mundo, principalmente em África onde a rede de saúde é bastante deficiente. A presente investigação centra-se na identificação de compostos químicos da planta *Phyllanthus welwitschianus*. As folhas da planta com que se fez o estudo, foram recolhidas na localidade da Umpata, província da Huila em Angola, onde a população utilizam-nas para tratamento de feridas.

O material vegetal foi macerado e exaustivamente extraído à temperatura ambiente com metanol, posteriormente procedeu-se ao fracionamento de uma amostra do extrato de metanol. Essa amostra foi fracionada com mistura de vários solventes de polaridades crescentes, resultando em dez frações, das quais, em três delas isolaram-se três compostos: tetracos-1-eno, ß-sitosterol e sacarose.

O tetracos-1-eno foi isolado a partir da fração hexano/acetato de etilo 9:1, o ß-sitosterol foi isolado a partir da fração hexano/acetato de etilo 1:1, e a sacarose isolada a partir da fração de acetato etilo/metanol 1:1, os compostos foram caracterizados por métodos espectroscópicos de IV, RMN 1D e 2D. Estes resultados foram comparados com os referenciados na bibliografia, confirmando que os compostos ß-sitosterol e sacarose, já tinham sido identificados no mesmo género.

Palavras-chave: Plantas medicinais, *Phyllanthus welwitschianus*, Avaliação da composição química

Abstract

Medicinal plants are the most accessible and available health resource for most communities in the world, especially in Africa where the health care network is quite deficient. The present research focuses on the identification of chemical compounds of the plant *Phyllanthus welwitschianus*. The leaves of the study plant were collected in Umpata, Huila province in Angola, where the population used them to treat wounds.

The plant material was macerated and exhaustively extracted with methanol at room temperature. A sample of the methanol extract was f fractionated with a mixture of several solvents of increasing polarities, resulting in ten fractions, of which three compounds were isolated: tetracos-1-ene, ß-sitosterol, and sucrose.

Tetracos-1-ene was isolated from the 9:1 hexane/ethyl acetate fraction, ß-sitosterol was isolated from the 1:1 hexane/ethyl acetate fraction, and sucrose was isolated from the 1:1 ethyl acetate/methanol fraction, the compounds were characterized by spectroscopic methods namely IR, 1D and 2D NMR. These results were compared with those referenced in the literature, confirming that ß-sitosterol and sucrose had already been identified in the same genera.

Key words: Medicinal plants, *Phyllanthus welwitschianus*, Evaluation of the chemical composition

Índice

Dedicatória iii
Agradecimentos iv
Abstract vi
Lista de Figuras viii
Lista de Tabelas ix
Lista de acrónimos e símbolos x
Capítulo I - Introdução 1
1.1 - Plantas Medicinais 1
1.1.1 - Plantas Medicinais em África 2
1.1.2 - Família, género e espécies da *Phyllanthus* 3
1.1.2.1 - Género *Phyllanthus* 3
1.1.2.1.1 - *Phyllanthus emblica* L. 5
1.1.2.1.2 - *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn 6
1.1.2.1.3 - *Phyllanthus niruri* L. 7
1.1.2.1.4 - *Phyllanthus fraternus* G. L. Webster 8
1.1.2.1.5 - *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels 9
1.1.2.1.6 - *Phyllanthus urinaria* L. 11
1.1.2.1.7 - *Phyllanthus welwitschianus* Mull. Arg. 12
1.2.1 - Objetivo geral 12
1.2.2 - Objetivos Específicos 12
Capítulo II - Materiais e métodos 30
2.1 - Materiais e métodos da avaliação química 30
2.1.1 - Colheita do material vegetal 30
2.1.3 - Materiais e reagentes 31
2.1.3.1. Cromatografia em coluna 31
2.1.3.2 - Cromatografia em camada fina 31
2.1.3.3 - Técnicas espectrométricas 31
2.1.3.4 - Fracionamento das diversas frações 31
2.2 - Caracterização espectroscópica dos compostos 38
Capítulo III – Resultados e discussão 40
3.1- Tetracos-1-eno 40
3.2- ß-sitosterol 41
3.3 - Sacarose 44
Capítulo IV – Conclusão e perspetivas futuras 46
Referências 47
Anexos 52

Lista de Figuras

Figura 1- Mapa da utilização tradicional da *Phyllanthus* em diferentes países.....4
Figura 2 - Estrutura da 1-*O*-galoil-ß-D-glucose isolada da *P. emblica*. 5
Figura 3 - Estrutura do ácido gálico isolado da *P. emblica*.....5
Figura 4 - Estrutura da nirantina isolada da *P.amarus* 7
Figura 5 - Estrutura da filantina isolada da *P. amarus* 7
Figura 6 - Estrutura da filtetralina isolado da *P. niruri* 8
Figura 7 - Estutura da hipofilantina isolada da *P. niruri* e *P. fraternus* 8
Figura 8 - Estrutura da nirtetralina isolada da *P. fraternus*.....9
Figura 9 - Estrutura do 1,7,8-tri-hidroxi-2-naftaldeido isolado da *P.acidus* 10
Figura 10 - Estrutura do filantosol B isolado da *P. acidus* 10
Figura 11 - Estrutura do 28-norlup-20(29)-eno-3,17ß-diol isolado da *P. urinaria* 11
Figura 12 - Estrutura da betulina isolada da *P. urinaria*..... 11
Figura 13 - *Phyllanthus welwitschianus* Mull. Arg 30
Figura 14 - Esquema da extração da planta..... 30
Figura 15 - Estrutura do tetracos-1-eno 41
Figura 16 - Estrutura do ß - sitosterol..... 42
Figura 17 - Estrutura da sacarose 45

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Cromatografia 1. 32
Tabela 2 - Cromatografia 2. 32
Tabela 3 - Cromatografia 3. 33
Tabela 4 - Cromatografia 4. 33
Tabela 5 - Cromatografia 5. 34
Tabela 6 - Cromatografia 6. 35
Tabela 7 - Cromatografia 7. 36
Tabela 8 - Cromatografia 8. 37
Tabela 9 - Cromatografia 9. 37
Tabela 10 - Cromatografia 10..... 38
Tabela 11 – Dados de RMN ^{1}H e ^{13}C do composto N_1 (tetracos–1-eno). 41
Tabela 12 - Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C do composto N_2 (β-sitosterol). 43
Tabela 13 – Dados de RMN ^{1}H e ^{13}C do composto N_3 (Sacarose) 44

Lista de acrónimos e símbolos

AcOEt	acetato de etilo
c.c. f	cromatografia de camada fina
d	Dupleto
dl	dupleto largo
dt	duplo tripleto
dq	duplo quarteto
ddt	duplo duplo tripleto
FTIR-ATR	Infravermelho com transformada de Fourier com refletância total atenuada
Hex	Hexano
J	constante de acoplamento
m	Multipleto
Me	Metilo
MeOH	Methanol
m/z	massa/carga
OMS	Organização Mundial de Saúde
s	Singuleto
s. d.	sem data
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13
RMN de ^{1}H	Ressonância Magnética Nuclear de protão
t	Tripleto
UV	Radiação ultravioleta
α	alfa

β	Beta
δ	desvio químico
λ	comprimento de onda

Capítulo I - Introdução

1.1 - Plantas Medicinais

As plantas medicinais são, e sempre foram importantes para a vida do homem, pois, serviram desde a existência do homem primitivo para a prevenção e cura de certas doenças. Estudos mostram que, para além de servirem para a prevenção e cura de doenças, eram utilizadas para uso em tradições e nas diferentes culturas dos povos (Lee *et al.*, 2013). Estudos feitos por Siddiqui *et al.* (2017), dão conta que grande parte da população mundial está cada vez mais dependente da medicina alternativa.

Outrossim, os autores afirmam que, são utilizadas para fins medicinais mais de 30% de espécies de plantas. É do conhecimento comum, que a utilização dos vegetais como componente medicinal, antecede o surgimento da ciência, todavia, não se tem com precisão o período do início e da descoberta da sua utilização para fins terapêuticos, nem tão pouco a distinção das propriedades das plantas que curavam ou preveniam algumas doenças. Talvez seja por tentativas ou experimentação dos homens antigos na tentativa de curar certas doenças que foram adquirindo conhecimentos, e, que este legado passou a ser transmitido de geração em geração. O ser humano sempre buscou na Natureza a cura para as suas diversas enfermidades. Através do conhecimento e uso popular das plantas medicinais, em comparação com os seus efeitos (positivos),e com o desenvolvimento da ciência e da medicina, os investigadores procuram o conhecimento profundo das propriedades de plantas medicinais utilizadas inicialmente pelos homens primitivos (Awasthi *et al.*, 2015; Duong *et al.*, 2017; e Siddiqui *et al.*, 2017). A este respeito, um estudo feito por Duong e seus colaboradores (2017) na Tailândia mostra que cerca de 500 medicamentos têm como base plantas medicinais, as mesmas são utilizadas no tratamento de doenças sobre insuficiência cardiovascular, diabetes, cancro, entre outras.

Hoje, apesar da evolução da medicina moderna, existem ainda indivíduos que recorrem à medicina tradicional, o que justifica a sua importância, dando lugar à continuidade no descobrimento de mais plantas medicinais (Yuandani *et al.*, 2016; Siddiqui *et al.*, 2017). Devido aos seus constituintes bioativos e rica fonte de fármacos, as plantas medicinais têm sido uma fonte preponderante na cura de várias doenças podendo ser a origem de novos medicamentos (Lee *et al.*, 2013 e Yuandani *et al.*, 2016). De acordo com Awasthi *et al.* (2015), as plantas medicinais, estão cada vez mais a ganhar espaço, tendo em conta os seus inúmeros benefícios para a saúde humana, assim como na conceção de fármacos.

As plantas medicinais sempre foram objeto de estudo na tentativa de descobrir novas fontes de obtenção de princípios ativos, que são os responsáveis por uma ação farmacológica ou terapêutica. Portanto, é importante que se dê a continuidade da exploração e uso das plantas medicinais como fonte de vários fármacos, pois que elas contêm um conjunto

de ingredientes ativos suscetíveis de contribuir na produção de peptídeos e proteínas (Accorsi, 2000; Fan *et al.*, 2014; Pereira *et al*, 2016 e Siddiqui *et al.*, 2017).

Tendo em conta o rápido crescimento populacional, e a coexistência de várias doenças, a Organização Mundial da Saúde (OMS) tem trabalhado bastante na identificação de quase todas as plantas medicinais existentes, de modo a responder à demanda da saúde mundial. Um dos avanços incide na criação do Regulamento de Produtos de Saúde Natural do Canadá, que autoriza a promoção e uso de produtos naturais, para o combate da diversidade de doenças, uma vez que vários estudos comprovaram a eficiência das plantas medicinais na cura de doenças quer infeciosas ou não (Mukhtar *et al.*, 2008). Dados fornecidos pela Organização para a Alimentação e Agricultura (FAO) dão conta que 52 885 de um total de 422 000 espécies de plantas foram identificadas e utilizadas para combate de várias doenças (Schippmann *et al.*, 2002). Por outro lado, a OMS refere que cerca de 80% destas plantas, servem para atender a grande parte das necessidades de cuidados médicos da população mundial (Mukhtar *et al.*, 2008).

1.1.1 - Plantas Medicinais em África

As plantas medicinais no continente africano têm uma longa história tanto de uso, bem como na transmissão de conhecimentos tipicamente tradicionais, no seio dos membros da família de geração em geração (Rukangira, 1998; Da Silva *et al.*, 2011 e Mahomoodally, 2013). Cerca de 90% da população africana depende da medicina tradicional, motivada também, pela insuficiência de recursos para pagar um tratamento médico moderno e eficaz (Mahomoodally, 2013).

De acordo com Rukangira (1998), os governos devem apoiar as instituições de maneira a promover e potencializar as indústrias de plantas medicinais disponibilizando verbas. Para tal deve-se ter em contas as seguintes medidas:

- inventário e documentação das diversas plantas medicinais, que são usadas para tratar doenças comuns em cada país;
- criação de uma rede de laboratórios e fabricas piloto com instalações adequadas para a avaliação da eficácia das plantas medicinais;
- estabelecimento de normas de dosagem e produção dos extratos de plantas medicinais mais eficazes em qualquer formulação farmacêutica;
- a conservação e produção de plantas medicinais, em jardins comunitários, deve ser priorizada, juntamente com outras opções de conservação e incentivos de mercado para a preservação de plantas medicinais essenciais.

Para que seja possível a concretização destas medidas, em países africanos, teria que haver um registo oficial de medicamentos à base de plantas reconhecido e regulamentado, algo que ainda não está bem estabelecido (Da Silva *et al.*, 2011). Mesmo em países onde a medicina tradicional é utilizada por cerca de 80% das pessoas não existe um orçamento adequado que

possibilite o funcionamento do Comité de Medicina Tradicional que normalmente é inadequado ou inexistente. Existe, portanto a necessidade de formular e desenvolver políticas e legislação nacionais e regionais em termos de comércio e acesso a esses recursos (Da Silva *et al.*, 2011).

Em Angola podemos encontrar cerca de 235 espécies de plantas medicinais classificadas, dentre estas 40 são frequentemente utilizadas para medicina tradicional para acudir às necessidades da população em doenças como malária, diarreia, gripe entre outras. Mesmo sendo os terapeutas tradicionais os principais prestadores de cuidados para população, não estão integrados no programa nacional de cuidados intensivos e nem existe nenhuma legislação ou programa que regimente a prática da medicina tradicional (Vasish*t et al.*, 2004).

1.1.2 - Família, género e espécies da *Phyllanthus*

Tradicionalmente a família Euphorbiaceae é composta por 334 géneros, 11 subgéneros e mais de 8 000 espécies, podendo ser encontrada principalmente em regiões cujo clima é tropical, integra árvores, arbustos, ervas e trepadeiras, às vezes suculentas (Stefanowicz-Hajduk *et al.*, 2016; Mao *et al.*, 2016; Kumar *et al.*,2017; Komlaga *et al.*, 2017 e Duong *et al.*, 2017).

Cientificamente de acordo com os estudos feitos pelo Grupo de Filogenia de Angiospermas (APG II 2003), foi dividida em quatro novas famílias e suas respetivas subfamílias, conforme a descrição a seguir: Euphorbiaceae sensu stricto, compreende as subfamílias Euphorbioideae, Crotonoideae e Acalyphoideae; Phyllanthaceae, incluindo os Phyllanthoideae; Picrodendraceae, incluindo Oldfieldioideae e Putranjivaceae compreendendo Drypetes Vahl e Putranjiva Wall. Os diversos resultados mencionados atrás sobre a classificação da família Euphorbiaceae, mostram evidências que a complexidade e elevado número de géneros desta família, são necessários mais estudos morfológicos e anatómicos (Secco *et al.*, 2012).

1.1.2.1 - Género *Phyllanthus*

Phyllanthus é um género da família Euphorbiaceae constituído aproximadamente por cerca de 750 espécies e 11 subgéneros, podendo ser encontrado em regiões tropicais e subtropicais do mundo. Este género é composto por árvores, arbustos, semi-suculentas, e ervas anuais (Duong *et al.*, 2017).

Pelo seu elevado valor medicinal e tradicional, e pelas suas inúmeras propriedades curativas para diversas enfermidades que afetam as populações, o género *Phyllanthus* têm sido usado há vários anos, existindo relatos de estudos botânicos, fitoquímicos e farmacológicos para tratamento do cancro, obesidade e doenças cardiovasculares (Kumar *et al.*, 2017; *Chongsa et al.*, 2014). Por exemplo: as sementes são usadas como laxantes, para alívio da dor de ouvidos, bronquite, tónico para o fígado (Hossen *et al.*, 2015); as folhas são utilizadas como diaforético, expetorante (Khatoon *et al.*, 2006); as raízes são usadas como antídoto para o

veneno de víbora, e para combater febres altas; as cascas do caule são usadas para tratamento das febres menstruais, bem como, alívio da dor de cabeça causada pela hipertensão (Leeya *et al.*, 2010 e Chongsa *et al.*, 2014).

O género P*hyllanthus* é uma excelente fonte de compostos fenólicos, alcaloides (Kumar *et al.*, 2017); terpenóides (Fan *et al.*, 2014 e Kumar *et al.*, 2017), lignanos, flavonoides (Shen *et al.*, 2008), e taninos que funcionam como agentes de proteção, toxinas naturais de animais e pesticidas contra organismos invasores (Shen *et al.*, 2008). Este género contém espécies com propriedades antivirais (Tan *et al.*, 2013), antibacterianas, antiamnésicas, antiúlcerantes, anti-hepatotóxicas (Kumar *et al.*, 2017), anticarcinogénicas, anti-HIV (Lee *et al.*, 2013), antioxidantes (Shen *et al.*, 2008), anti-inflamatórios, anti-alodinâmicas, bem como antiproliferativas (Sousa *et al.*, 2007 e Mao *et al.*, 2016).

Em África muitas tribos utilizam plantas do género *Phyllanthus* para tratar a malária, febre e feridas. Sendo a *Phyllanthus muellerianus* o género mais utilizado em África. No Gana e Camarões, a casca do caule é utilizada para o tratamento de feridas e tétano. Na Zâmbia, na Nigéria e na Costa do Marfim, as folhas e a raiz são aplicadas como remédio para combater a febre. No Quénia, a planta é usada para curar doenças sexualmente transmissíveis (Mao *et al.*, 2016). Entretanto as plantas inteiras de *P. muellerianus* e P. *reticulatus* são frequentemente utilizadas para o tratamento da malária. No mapa da Figura 1, podemos constatar os países em que se encontra o género *Phyllanthus* e os principais órgãos em que a planta pode tratar (Mao *et al.*, 2016).

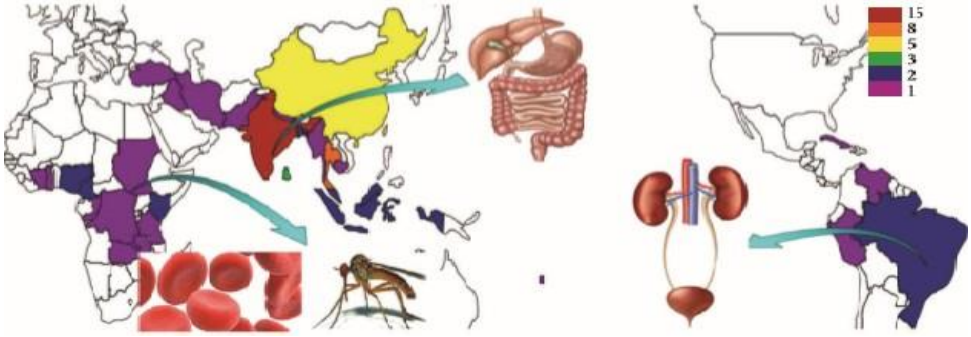

Figura 1- Mapa da utilização tradicional da *Phyllanthus* em diferentes países. As várias cores apresentadas no mapa representam o número de plantas usadas, tradicionalmente, em diferentes países: o vermelho, laranja, amarelo, verde, azul e purpura representam quinze, oito, cinco, três, dois e um tipo de plantas usadas, respetivamente. Apresenta-se, também, os órgãos do corpo humano, onde incide a ação terapêutica do género *Phyllanthus (Mao* et al., *2016)*.

Na Ásia, plantas do género *Phyllanthus* são utilizadas para tratar doenças do sistema digestivo, na América do Sul, são usadas para tratar doenças do sistema urinário, e na África, servem para tratar a malária e feridas (Mao *et al.*, 2016).

Como já foi referido anteriormente, o género *Phyllanthus* é constituído por cerca de 750 espécies, porém, para o presente estudo foram escolhidas as espécies mais estudadas: *Phyllanthus emblica*, *Phyllanthus fraternus*, *Phyllanthus amarus*, *Phyllanthus acidus*, *Phyllanthus niruri*, *Phyllanthus urinaria* e *Phyllanthus welwitschianus*.

1.1.2.1.1 - *Phyllanthus emblica* L.

A espécie *Phyllanthus embilica* L. é uma árvore caducifólia que tem origem nas zonas tropical e subtropical da China, Índia, Indonésia e Malásia, podendo alcançar 3 a 8 metros de altura, no início da fase do florescimento, a planta apresenta-se com folhas pouco desenvolvidas e densamente florida, mais adiante, apresenta menos flores e folhas mais desenvolvidas (Liu *et al.*, 2008). Os seus frutos são muito consumidos pela população nativa, pelo seu excelente sabor (Liu *et al.*, 2008).

Estudos realizados concluíram que a planta possui as seguintes atividades biológicas: anticancerígena, anti-inflamatória, hipoglicémica, hepatoprotetora, antimicrobiana, hipolipemiante, (Liu *et al.*, 2008) e antioxidante (Kumaran *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008).

Segundo Kumaran *et al* (2006), a *P. embilica*, tem sido utilizada há muitos anos na medicina tradicional para tratamento de doenças como hemorragia, icterícia, dispepsia e diarreia. Os seguintes compostos foram isolados do fruto desta planta: 1-0-galoil-ß-D-glucose e ácido gálico (Fig. 2 e 3).

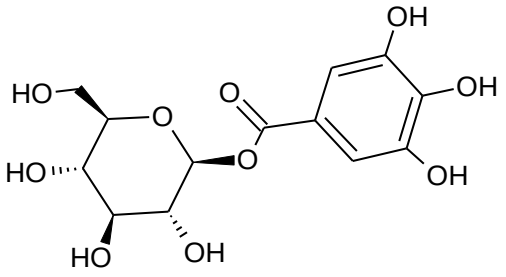

Figura 2 - Estrutura da 1-*O*-galoil-ß-D-glucose isolada da *P. emblica* (Variya *et al.*, 2016).

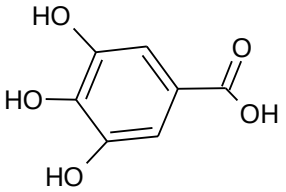

Figura 3 - Estrutura do ácido gálico isolado da *P. emblica* (Variya *et al.*, 2016).

1.1.2.1.2 - *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn

A *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn. é uma planta herbácea distribuída na maior parte dos países de clima tropical ou subtropical da África, Ásia e América do Sul (Roengrit *et al.*, 2015 e Yuandani *et al.*, 2016). É um arbusto capaz de alcançar uma altura entre 10-60 cm, possui um caule cilíndrico e folhas de forma elíptica. É tradicionalmente conhecido por "Bhuiamlki" na Índia "quebra pedra" no Brasil e nos Estados Unidos da América (Pereira *et al.*, 2016).

Estudos feitos por vários cientistas dão conta que a *P. amarus* é rica em compostos como: alcaloides, lignanos, flavonoides, polifenóis, taninos hidrolisáveis (Roengrit *et al.*, 2015 e Yuandani *et al.*, 2016), filanina (Sundaram *et al.*, 2016; Yuandani *et al.*, 2016 e Pereira *et al.*, 2016), hipofilantina (Pereira *et al.*, 2016), lintetralina (Sundaram *et al.*, 2016), nirtetralina, nirantina e filtetralina (Yuandani *et al.*, 2016 e Pereira *et al.*, 2016), saponinas, terpenóides (Awasthi *et al.*, 2015), triterpenos, esteróis, óleos voláteis, ácido protocatecúico, kaempferol e quercetina (Kumar *et al.*, 2015), hipofilina, corilagina e ácido gálico (Yuandani *et al.*, 2016)

A *P. amarus* apresenta propriedades antibacterianas (Srivastava *et al.*, 2013 e Sundaram *et al.*, 2016), antidiabéticas (Pereira *et al.*, 2016 e Srivastava *et al.*, 2013), antivirais (Pereira et al., 2016), anti-inflamatórias e anticoncetivas (Roengrit *et al.*, 2015; Yuandani *et al.*, 2016 e Pereira *et al.*, 2016), anticolesterolémicas, anticrustáceos (Srivastava *et al.*, 2013), hepatoprotetoras (Pereira *et al.*, 2016), antimaláricas (Yuandani *et al.*, 2016), anticancerígenas (Srivastava *et al.*, 2013 e Pereira *et al.*, 2016); diuréticas (Srivastava *et al.*, 2013), antioxidantes (Roengrit *et al.*, 2015 e Pereira *et al.*, 2016), anti-hiperglicémicas e anti-hipercolesterolémicas (Kumar *et al.*, 2015), anti-hepatotóxicas (Srivastava *et al.*, 2013 e Sundaram *et al.*, 2016), antimutagénicas, antilíticas e hipoglicémicas (Sundaram *et al.*, 2016), analgésicas (Roengrit *et al.*, 2015).

Tendo em conta as propriedades da *P. amarus* ela é bastante utilizada na medicina tradicional para o tratamento de hepatites, diabetes, diarreia, icterícia, infeções brônquicas, feridas, inchaços, prurido, problemas gástricos e problemas cardiovasculares (Yuandani *et al.*, 2016), problemas do fígado, problemas genito-urinários (Sundaram *et al.*, 2016), pedra nos rins, gripe, problemas inflamatórios, problemas de infertilidade e problemas do ciclo menstrual (Awasthi *et al.*, 2015). Estudos efetuados por Kassuya *et al.* (2005) demonstraram que a nirantina é o composto com maior ação anti-inflamatória na *P. amarus*, estudos desenvolvidos por Chowdhury *et al* (2012) verificaram que a mesma substância tem uma grande atividade antilesmanial. Verificou-se que a filantina tem um poder antioxidante e é um melhor hepatoprotetor que o extrato de *P. amarus* a baixas concentrações (Krithika *et al*, 2009).

Apresentam-se de seguida as estruturas de dois compostos isolados da *P. amarus*: nirantina e filantina (Figura 4 e 5).

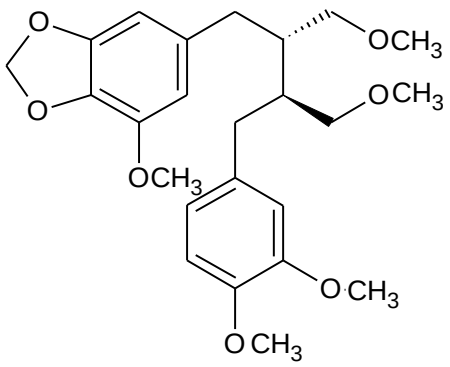

Figura 4 - Estrutura da nirantina isolada da *P. amarus* (Pereira *et al.*, 2016)

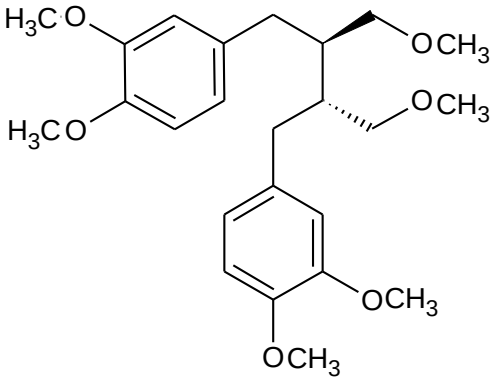

Figura 5 - Estrutura da filantina isolada da *P. amarus* (Pereira *et al.*, 2016).

1.1.2.1.3 - *Phyllanthus niruri* L.

A *Phyllanthus niruri* L. é uma planta herbácea anual, que se encontra fundamentalmente em regiões ou florestas tropicais e subtropicais do mundo (Ifeoma *et al.*, 2013 e Liu *et al.*, 2014). Em estudos realizados a esta planta verificou-se que ela contém: filantina (Ooi *et al.*, 2015),tirosina, octacosano, tetratetracontano (Giribabu *et al.*, 2017), nirantina (Liu et al., 2014), limoneno, p-cimeno (Ifeoma *et al.*, 2013), lupeol (Shanbhag *et al.*, 2010 e Ifeoma *et al.*, 2013), apresentando propriedades anti-inflamatórias (Giribabu *et al.*, 2017), antivirais, anti-hepatite B (Liu *et al.*, 2014), antibacterianas, antioxidantes (Giribabu *et al.*, 2017), hepatoprotetoras, hipoglicémicas, hipotensoras (Liu *et al.*, 2014), bem como propriedades antidiabéticas (Liu *et al.*, 2014 e Giribabu *et al.*, 2017).

Fruto da diversidade de propriedades, esta planta, leva muitos povos a utilizarem-na no combate de várias doenças. No Sul e sudeste da Ásia por exemplo, a planta tem sido utilizada no tratamento de bronquite, anemia, lepra e asma (Karuna *et al.*, 2009). Na medicina chinesa a *P. niruri* serve para curar lesões do fígado (Wang, 2000). No Brasil ela é tradicionalmente conhecida como "Chanca Pietra" ou "quebra pedras" e usada para tratamentos

de cálculos renais ou ureterais (Calixto *et al.*, 1998). A planta é um forte protetor do rins contra a formação de cálculos, com capacidade de modificar a composição da pedra nos rins, podendo assim tornar mais fácil a sua dissolução, serve ainda de inibidor do crescimento de cristais de urato (Calixto *et al.*, 1998). As suas partes aéreas secas são utilizadas na Tailândia para estimular apetite e combater a malária (Ifeoma *et al.*, 2013 e Giribabu *et al.*, 2017). Estudos realizados por Ooi *et al.* (2015) comprovaram científica e clinicamente que a *P. niruri* é elemento fundamental para a proteção, limpeza, desintoxicação e tratamento de doenças do fígado, por exemplo a hepatite e hepatocarcinoma. Verificou-se também que, a sua atividade hepaprotetora é consequência da sua composição maioritária em filantina, suscetível de atuar sinergicamente com os outros compostos na decocção. Apresentam-se a seguir as estruturas de dois compostos isolados da *P. niruri*: filtetralina e hipofilantina (Figura 6 e 7).

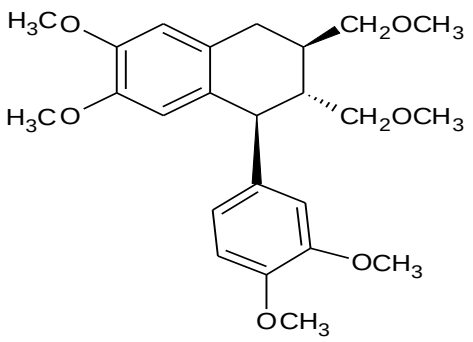

Figura 6 - Estrutura da filtetralina isolado da *P. niruri* (Murugaiyah *et al.*, 2009).

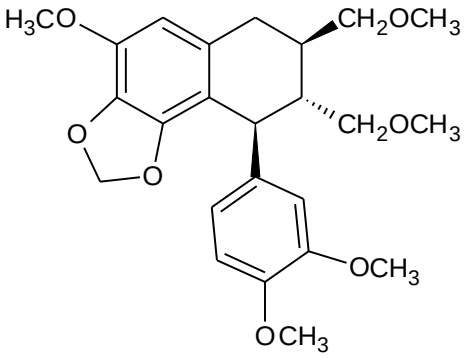

Figura 7 - Estutura da hipofilantina isolada da *P. niruri* e *P. fraternus (*Murugaiyah *et al,* 2009 e Khatoon *et al*, 2006).

1.1.2.1.4 - *Phyllanthus fraternus* G. L. Webster

A *Phyllanthus fraternus* G. L. Webster, é uma erva anual podendo ser encontrada em regiões quentes. Estudos mostram que ela é originária do Paquistão e do Oeste da Índia, porém pode ser encontrada também em algumas regiões da África, cujo clima é tropical exceto em

zonas húmidas. É uma erva monóica, podendo atingir até 45 cm de altura. (Oudhia, 2008; Sebastian *et al.*, 1999)

A *P. fraternus* apresenta na sua composição nirantina (Fig. 5), nirtetralina, hipofilina (Fig. 7) e filtetralina (Fig. 6) (Sebastian *et al.*, 1999), filantina (Fig. 4) (Secco *et al.*, 2012), alorescurinina, ent-norsecurinina, nirurina e bubibialina (Komlaga *et al.*, 2017). Esta composição, faz com que a *P. fraternus* tenha propriedades antiplasmodiais (Komlaga *et al.*, 2017) e hipoglicémicas (Sebastian *et al.*, 1999).

De forma geral as folhas frescas e raízes são bastante usadas na medicina tradicional, para vários fins tendo em conta as suas propriedades (Komlaga *et al.*, 2017). Em África especificamente na Costa do Marfim é usada para facilitar o parto e combate de edemas em mulheres grávidas, bem como para tratamento de dores da coluna vertebral. No Sudão serve para tratar disenteria, gonorreia e hidropisia. No Gana, a *P. fraternus* é utilizada em tratamento da malária, alívio dos espasmos, infeções da pele e febre. Na Índia a *P. fraternus* é misturada com outras espécies de *Phyllanthus* obtendo-se um preparado tradicionalmente conhecido por "Bhumyamlaki", que serve para o tratamento da icterícia, bronquite, asma, lepra, anemia, doenças venéreas, problemas do trato genito-urinário, anúria, biliosidade e doenças venéreas (Oudhia, 2008). De forma isolada, os frutos, folhas, raízes e seiva são usados no tratamento de úlceras, feridas, sarna, micoses, problemas de pele, malária (Oudhia, 2008 e Komlaga *et al.*, 2017), icterícia, contusões e conjuntivite (Oudhia, 2008; Sebastian *et al.*, 1999 e Patel *et al.*, 2014).

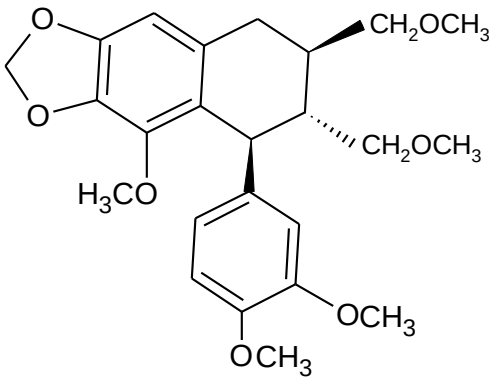

Figura 8 - Estrutura da nirtetralina isolada da *P. fraternus* (Huang *et al.*, 2003).

1.1.2.1.5 - *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels

A *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels é uma pequena árvore, que se encontra nas regiões de clima tropical, podendo estar distribuída em quase toda parte do mundo, naquelas zonas cujo clima seja favorável. Os estudos sobre a planta verificaram que é muito frequente na Tailândia onde tradicionalmente é conhecida como Otaheiti Gooseberry, Star Gooseberry ou "Mayom".

Encontra-se também em Porto Rico, conhecida como groselha do Taiti ou donzela; na Jamaica como "jimbilin", no norte das Filipinas é designada como "Karamay" ou simplesmente groselha (Sousa *et al.*, 2007; Leeya *et al.*, 2010; Chongsa *et al.*, 2014; Hossen *et al.*, 2015 e Duong *et al.*, 2017).

A *P. acidus* na sua composição química contém: adenosina, kaempferol (Leeya *et al.*, 2010 e Chongsa *et al.*, 2014), ácido hipogálico (Chongsa *et al.*, 2014; Hossen *et al.*, 2015 e Duong *et al.*, 2017), quercetina (Sousa *et al.*, 2007), ácido cafeico, ácido 5-hidroxibenzóico e filantóides A e B (Chongsa *et al.*, 2014). Fruto desta composição, tem propriedades anti-hipertensiva atividade vasodilatadora (Leeya *et al.*, 2010), anti-inflamatórias (Sousa *et al.*, 2007), anticancerígena (Duong *et al.*, 2017). Devido a estas propriedades a *P. acidus* é utilizada, na medicina tradicional, para o tratamento de distúrbios inflamatórios (Sousa *et al.*, 2007), obesidade, doenças cardiovasculares, diabetes (Chongsa *et al.*, 2014) e hipertensão (Leeya *et al.*, 2010). De seguida, apresentam-se duas estruturas de compostos isolados da *P. acidus*: 1,7,8-tri-hidroxi-2-naftaldeído e filantosol B (Figura 10 e 11).

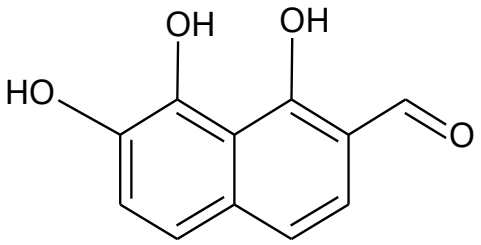

Figura 9 - Estrutura do 1,7,8-tri-hidroxi-2-naftaldeido isolado da *P.acidus* (Yuandani *et al.*, 2016).

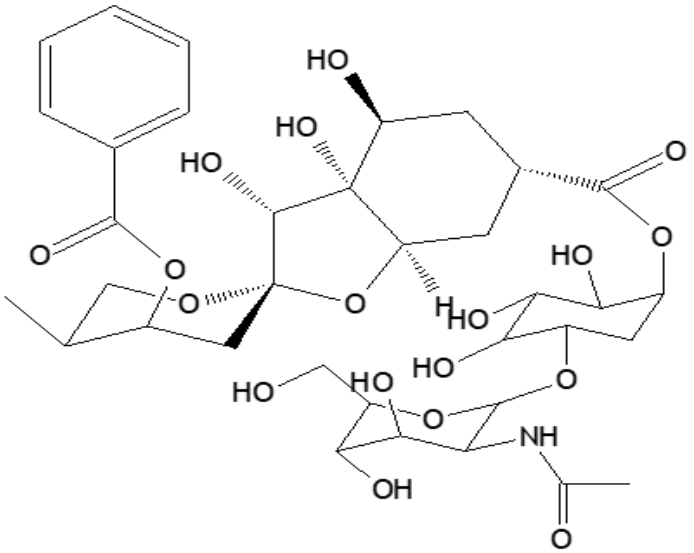

Figura 10 - Estrutura do filantosol B isolado da *P. acidus* (Vongvanich *et al.*, 2000).

1.1.2.1.6 - *Phyllanthus urinaria* L.

A *Phyllanthus urinaria* L. é uma erva tropical distribuída na América do Sul, na Ásia, fundamentalmente Índia, China e Tailândia (Chudapongse *et al.*, 2010). Estudos demostram que a *P.urinaria* tem semelhanças, até nalgumas propriedades, com a *P. amarus*, chegando a ser comercializada e utilizada no tratamento de diversas enfermidades (Chudapongse *et al.*, 2010 e Jantan *et al.*, 2014).

Na *P. urinaria* foram isolados os seguintes compostos: geranina, corilagina, filantina (Fig. 4) e hipofilantina (Fig. 7) (Jantan *et al.*, 2014); 28-norlup-20-eno-3,17ß-diol, betulina, ácido ß-betulínico, ácido 3-oxofriedelan-28-oico, ácido oleanólico, 3*R*-*E*-coumaroiltaraxerol e 3-*R*-*Z*-coumaroiltaraxerol (Wu *et al.*, 2017). Levando a que a mesma tenha propriedades imunomoduladoras (Jantan *et al.*, 2014), anti-inflamatórias, antidiarreicas e hepatoprotetoras, citotóxicas (Chudapongse *et al.*, 2010) antioxidantes, anti-inflamatórias (Shen *et al.*, 2008) e anti-viral (Wu *et al.*, 2017).

Tendo em conta as suas propriedades a *P.urinaria* tem sido utilizada no tratamento de várias doenças tais como: cancro do fígado (Chudapongse *et al.*, 2010), Esteato-hepatite não alcoólica (NASH) (Shen *et al.*, 2008) e hepatite (Mao *et al.*, 2016). Apresentam-se a seguir duas estruturas de compostos isolados da *P. urinaria*: 28-norlup-20(29)-ene-3,17ß-diol e betulina (Figura 11 e 12).

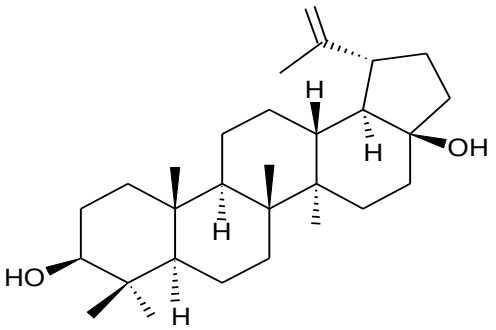

Figura 11 - Estrutura do 28-norlup-20(29)-eno-3,17ß-diol isolado da *P. urinaria* (Wu *et al.*, 2017).

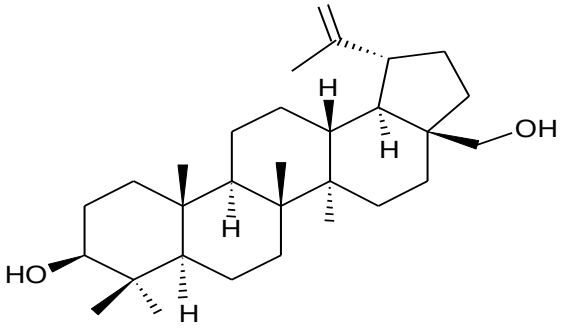

Figura 12 - Estrutura da betulina isolada da *P. urinaria* (Wu *et al.*, 2017).

1.1.2.1.7 - *Phyllanthus welwitschianus* Mull. Arg.

A *Phyllanthus welwitschianus* Mull. Arg. é uma erva perene com 90 cm de altura, dióico ou frequentemente monóico, de cor castanho-avermelhada. Pode ser encontrada em regiões arenosas, planícies, bosques, bem como em altitudes mais elevadas, da Zâmbia, Malawi, Angola, Tanzânia, Quénia e República Democrática do Congo (Punt, 1972 e Radcliffe-Smith, 1996).

Estudo fitoquímico realizado por Ren *et a*l., (s. d.), com a finalidade de analisar a citotoxidade da *Phyllanthus welwitschianus* Mull. Arg. (folhas, flores, frutos, galhos, caules e raízes), resultou no isolamento de compostos tais como: lignanos de arilnaftaleno, lignanos tetra-hidrofurano, diterpenos aromáticos e um derivado do benzaldeído, podendo suprimir, seletivamente, o crescimento das células cancerosas do cólon humano.

1.2 - Objetivos

1.2.1 - Objetivo geral

A realização da presente dissertação em Biotecnologia tem como objetivo determinar a composição química das folhas da *Phyllanthus welwitschianus* Mull. Arg.

1.2.2 - Objetivos Específicos

1. Preparar o extrato de metanol da planta selecionada
2. Fracionamento do extrato
3. Isolamento de compostos naturais
4. Identificação e caracterização espectroscópica dos compostos isolados

Capítulo II - Materiais e métodos

2.1 - Materiais e métodos da avaliação química

2.1.1 - Colheita do material vegetal

As folhas da *Phyllanthus welwitschianus* Mull. Arg., foram colhidas na Província da Huíla, Angola, em 2016, numa localidade com as seguintes coordenadas geográficas: a Sul 14.32271° e a Este 014.36145°. A identificação taxonómica da planta foi feita pelo Botânico Francisco Maiato e um voucher foi depositado no Herbário da Huíla.

Figura 13 - *Phyllanthus welwitschianus* Mull. Arg colhida em Angola (cedida por Paulo Cassavela).

2.1.2 - Preparação do extrato bruto

As folhas secas (272 g) foram trituradas e de imediato colocadas em 2176 mL de metanol (MeOH), numa proporção aproximadamente de 12,5 g de material vegetal para 100 mL de metanol. O material vegetal foi macerado por uma semana, o processo foi repetido por mais 5 semanas, no final de cada semana o metanol foi filtrado e evaporado para obter o extrato bruto, obteve-se uma massa de extrato bruto de 113,61g.

Figura 14 - Esquema da extração da planta.

2.1.3 - Materiais e reagentes

2.1.3.1. Cromatografia em coluna

A sílica gel Merck G-60, 70-230 mesh (ref. 1.07734) foi utilizada como absorvente para a realização das cromatografias de coluna húmida. A razão entre a mistura a ser cromatografada e o absorvente foi numa proporção de 1:100. Diversas colunas de vidro foram usadas de acordo com o peso da amostra por purificar. Para a realização da cromatografia foi preparada uma mistura de solvente e sílica que posteriormente foi adicionada lentamente na coluna evitando desse modo a formação de bolhas durante o processo. A eluição foi efetuada com misturas de solventes de polaridades crescentes. Na medida em que era confirmada a diminuição da massa das frações obtidas, a polaridade da mesma era aumentada. As composições de todas as frações foram comprovadas por cromatografia em camada fina (c.c.f.).

2.1.3.2 - Cromatografia em camada fina

A cromatografia em camada fina foi executada em placas de Silica gel 60 F_{254} pré-preparadas em suporte de alumínio (Ref. 818.333). A separação dos compostos deu-se através de eluição de diferentes solventes e misturas de solventes. Antes as placas foram examinadas com irradiação de luz ultravioleta de comprimento de onda (c.d.o.) λ = 366 nm, para visualizar as substâncias florescentes. A sua revelação deu-se, na maioria dos casos, através da pulverização da placa com uma solução de ácido fosfomolíbidico em etanol a 5%, seguida de aquecimento a 120ºC durante alguns minutos.

2.1.3.3 - Técnicas espectrométricas

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram adquiridos num Termo Scientific Nicolet iS10 FTIR-ATR. Os espectros de RMN foram adquiridos num Bruker Avance III de 400 MHz (400 MHz ^{1}H e 100,6 MHz ^{13}C). Os deslocamentos químicos foram registados em δ (ppm), tendo como padrão de referência interna o $CHCl_3$ residual (δ 7,25 ppm para o ^{1}H e 77,00 ppm para o ^{13}C) ou o CH_3OH residual (δ 3,31 ppm para o ^{1}H e 49,00 ppm para o ^{13}C). O solvente deuterado usado nas análises foi o clorofórmio deuterado ($CDCl_3$) ou o metanol deuterado CD_3OD. As constantes de acoplamento (*J*) foram referidas em Hertz (Hz).

2.1.3.4 - Fracionamento das diversas frações

Cromatografia 1

Uma amostra do extrato de metanol (≈20 g) foi cromatografada (tabela 1) numa coluna de sílica gel e eluído com hexano (Hex) e misturas de Hex/acetato de etilo (AcOEt) de polaridades crescentes, AcOEt, AcOEt/metanol (MeOH) (95:5), MeOH e MeOH/HCl [1L de MeOH a que se adicionam 3 mL de ácido clorídrico concentrado (HCl)] tendo-se obtido os seguintes resultados:

Tabela 1 - Cromatografia 1.

Frações	Eluentes	Peso (mg)	Percentagens (%)	Observações
1 - 8	Hex	0	0	
9 - 20	Hex/AcOEt (95:5)	3600	18,5	
21 - 32	Hex/AcOEt (9:1)	650	3,3	N_1
33 - 43	Hex/AcOEt (7:3)	110	5,6	
44 - 51	Hex/AcOEt (1:1)	390	2,0	N_2
52 - 59	AcOEt	320	1,6	
60 - 73	AcOEt/MeOH (9:1)	2680	13,7	
74 - 83	AcOEt/MeOH (1:1)	3115	16,0	N_3
84 - 100	AcOEt/MeOH (1:9)	6401	32,8	
101 - 107	MeOH	188	1,0	
108 - 116	MeOH/HCl	1060	5,4	

Cromatografia 2

A fração de Hex/AcOEt 95:5 da coluna 1 (3,6 g) foi cromatografada (tabela 2) numa coluna de sílica gel e eluída com Hex e misturas de Hex/AcOEt de polaridades crescentes, AcOEt /MeOH (95:5) e MeOH, tendo-se obtido os seguintes resultados:

Tabela 2 - Cromatografia 2.

Frações	Eluentes	Peso (mg)	Percentagens (%)
1-33	Hex	2008	55,8
34-42	Hex/AcOEt (99:1)	261	7,2
43-54	Hex/AcOEt (98:2)	1100	30,6
55-57	Hex/AcOEt (95:5)	239	6,6

Cromatografia 3

A fração de Hex/AcOEt 9:1 da coluna 1 (650 mg) foi cromatografada (tabela 3) numa coluna de sílica gel e eluída com Hex e misturas de Hex/AcOEt de polaridade crescentes, AcOEt (9:1), tendo-se obtido os seguintes resultados:

Tabela 3 - Cromatografia 3.

Frações	Eluentes	Peso (mg)	Percentagens (%)	Observações
1 - 3	Hex	36,1	6,1	Tetracos-1-eno(N_1)
4 - 14	Hex/AcOEt (98:2)	221,9	37,6	
15 -19	Hex/AcOEt (95:5)	52,4	8,9	
20 - 24	Hex/AcOEt (9:1)	190,8	32,4	
25 -29	Hex/AcOEt (8:2)	70,1	11,9	
30 - 32	AcOEt	18,1	3,1	

Cromatografia 4

A fração de Hex/AcOEt 7:3 da coluna 1 (1,1 g) foi cromatografada (tabela 4) numa coluna de sílica gel e eluída com Hex e misturas de Hex/AcOEt de polaridade crescentes (7:3), tendo-se obtido os seguintes resultados:

Tabela 4 - Cromatografia 4.

Frações	Eluentes	Peso (mg)	Percentagens (%)
1 - 7	Hex	106,6	10,2
8 - 21	Hex/AcOEt (98:2)	433,6	41,3
22 - 28	Hex/AcOEt (95:5)	0	0,0
29 - 46	Hex/AcOEt (8:2)	379	36,1
47 - 51	Hex/AcOEt (7:3)	52,6	5,0
52 - 56	Hex/AcOEt (1:1)	34,7	3,3
57 - 64	AcOEt	43,6	4,2

Cromatografia 5

A fração de Hex/AcOEt 1:1 da coluna 1 (390 mg) foi cromatografada (tabela 5) numa coluna de sílica gel e eluída com misturas de Hex/AcOEt de polaridade crescentes, AcOEt e MeOH, tendo- se obtido os seguintes resultados:

Tabela 5 - Cromatografia 5.

Frações	Eluentes	Peso (mg)	Percentagens (%)	Observações
1 - 6	Hex/AcOEt (9:1)	109,8	27,9	
7 - 8	Hex/AcOEt (9:1)	28,5	7,2	ß – sitosterol (N_2)
9 - 14	Hex/AcOEt (8:2)	70,3	17,9	
15 - 23	Hex/AcOEt (7:3)	85,9	21,8	
24 - 30	Hex/AcOEt (6:4)	32,7	8,3	
31 - 35	AcOEt	47	12,0	
36 - 39	MeOH	19	4,8	

Cromatografia 6

A fração de AcOEt da coluna 1 (320 mg) foi cromatografada (tabela 6) numa coluna de sílica gel e eluída com misturas de Hex/AcOEt de polaridade crescentes, AcOEt, AcOEt/MeOH e MeOH, tendo-se obtido os seguintes resultados:

Tabela 6 - Cromatografia 6.

Frações	Eluentes	Peso (mg)	Percentagens (%)
1 - 11	Hex/AcOEt (7:3)	145,6	45,6
12 - 21	Hex/AcOEt (6:4)	94,3	29,6
22 - 26	Hex/AcOEt (1:1)	7,9	2,5
27 - 32	AcOEt	34,8	10,9
33 - 37	AcOEt/MeOH (95:5)	6,1	1,9
38 - 41	AcOEt/MeOH (9:1)	6,5	2,0
42 - 45	AcOEt/MeOH (1:1)	13,9	4,4
46 - 49	MeOH	9,9	3,1

Cromatografia 7

Uma vez que os resultados anteriores das diferentes frações se tinham mostrado pouco promissores em termos de isolamento de compostos as frações seguintes foram avaliadas por TLC e RMN de ^{1}H, tendo-se concluído que a fração AcOEt/MeOH 9:1 da coluna 1 não parecia apresentar compostos isoláveis. Assim, só uma pequena parte da fração (500 mg) foi cromatografada (tabela 7) numa coluna de sílica gel e eluída com misturas de Hex/AcOEt de polaridade crescentes, AcOEt, AcOEt/MeOH e MeOH tendo-se obtido os seguintes resultados:

Tabela 7 - Cromatografia 7.

Frações	Eluentes	Peso (mg)	Percentagens (%)
1 – 6	Hex/AcOEt (7:3)	64,7	12,9
7 - 12	Hex/AcOEt (6:4)	14,6	2,9
13 - 18	Hex/AcOEt (1:1)	9,5	1,9
19 - 23	AcOEt	11,7	2,3
24 - 32	AcOEt/MeOH (9:1)	174,9	34,8
33 - 36	AcOEt/MeOH (8:2)	19,3	3,8
37 - 41	AcOEt/MeOH (7:3)	19,8	3,9
42 - 46	AcOEt/MeOH (1:1)	22,3	4,4
47 - 57	MeOH	166,2	33,0

Cromatografia 8

A fração de AcOEt/MeOH 1:1 da coluna 1 (3115 mg) foi cromatografada (tabela 8) numa coluna de sílica gel e eluída com AcOEt e misturas de AcOEt/MeOH de polaridade crescentes, MeOH, tendo-se obtido os seguintes resultados:

Tabela 8 - Cromatografia 8.

Frações	Eluentes	Peso (mg)	Percentagens (%)	Observações
1 - 2	AcOEt/MeOH (8:2)	6	0,2	
3 - 10	AcOEt/MeOH (7:3)	768,4	24,7	
11- 13	AcOEt/MeOH (7:3)	297	9,5	sacarose (N_3)
14 - 31	AcOEt/MeOH (7:3)	515	16,5	
32 - 38	AcOEt/MeOH (6:4)	76,5	2,5	
39 - 46	AcOEt/MeOH (1:1)	128,4	4,1	
47 - 58	AcOEt/MeOH (3:7)	198,6	6,4	
59 - 69	MeOH	108,4	3,5	
70 - 82	MeOH/HCl	1014,6	32,6	

Cromatografia 9

A fração de AcOEt /MeOH 1:9 da coluna 1 (6,401 g) foi cromatografada (tabela 9) numa coluna de sílica gel e eluída com AcOEt e misturas de AcOEt/MeOH de polaridade crescentes e MeOH, tendo-se obtido os seguintes resultados:

Tabela 9 - Cromatografia 9.

Frações	Eluentes	Peso (mg)	Percentagens (%)
1 - 6	AcOET	80,2	1,3
7 - 13	AcOEt/MeOH (1:1)	64,8	1,0
14 - 33	AcOET/MeOH (4:6)	4569	71,4
34 - 45	AcOEt/MeOH (3:7)	499,4	7,8
46 - 50	AcOEt/MeOH (2:8)	79,4	1,2
51 - 59	MeOH	185,7	2,9
60 - 73	MeOH/HCl	920,3	14,4

Cromatografia 10

A fração de MeOH da coluna 1 (188 mg) foi cromatografada (tabela 10) numa coluna de sílica gel e eluída com misturas de AcOEt/MeOH de polaridade crescente e MeOH, tendo-se obtido os seguintes resultados:

Tabela 10 - Cromatografia 10.

Frações	Eluentes	Peso (mg)	Percentagens (%)	Observações
1 - 3	Hex/AcOEt (6:4)	4,1	2,4	
4 - 8	Hex/AcOEt (1:1)	6,9	4,1	
9 - 12	Hex/AcOEt (4:6)	2,9	1,7	
13 - 16	Hex/AcOEt (3:7)	10,9	6,4	
17 - 21	AcOEt	8,2	4,8	
22 - 26	AcOEt/MeOH (7:3)	19,9	11,7	
27 - 30	MeOH	27,5	16,2	
31 - 34	MeOH/HCl	89	52,5	

2.2 - Caracterização espectroscópica dos compostos

N_1 - Tetracos-1- eno

Da fração 1 - 3 da cromatografia 3, foram separados 6,1 mg de um hidrocarboneto (N_1) com as seguintes características:

Espetro de IV $v_{máx}$ cm^{-1}: 3082; 2959; 2921; 2851; 1641; 1462; 1375; 992; 907; 720

Espetro RMN de ^1H (400 MHz $CDCl_3$), δ ppm: Tabela 11

Espetro RMN de ^{13}C (100,6 MHz $CDCl_3$), δ ppm: Tabela 11

N_2 - B- Sitosterol

Da fração 7 - 8 da cromatografia 5, foram separados 7,2 mg de um óleo incolor (N_2) com as seguintes características:

Espetro de IV $v_{máx}$ cm^{-1}: 3371; 2957; 2925; 2853; 1720; 1648; 1458; 1377; 1184; 1080; 1038; 969.

Espetro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$), δ ppm: Tabela 12

Espetro RMN de ^{13}C (100,6 MHz, $CDCl_3$), δ ppm: Tabela 12

N_3 - Sacarose

Da fração 11 - 13 da cromatografia 8, foram separados 9,5 mg de um sólido amorfo (N_3) com as seguintes características:

Espetro de IV $v_{máx}^{filme}$ cm^{-1}: 3299; 2933; 1638; 1426; 1346; 1251; 1044; 990

Espetro RMN de ^{1}H (400 MHz, CD_3OD), δ ppm: Tabela 13

Espetro RMN de ^{13}C (100,6 MHz, CD_3OD), δ ppm: Tabela 13

Capítulo III – Resultados e discussão

O fracionamento de uma amostra do extrato de metanol levou à obtenção de onze frações. Dessas frações duas não foram submetidas a novas cromatografias: a primeira não foi estudada por não ter massa suficiente e a última devido à sua polaridade não é possível ser novamente fracionada. As restantes frações foram novamente cromatografadas. As sub-frações foram todas avaliadas por TLC e as que apresentavam manchas isoladas foram submetidas a análise por RMN de ^{1}H. São apresentados nesta secção os resultados da avaliação da composição química do extrato de MeOH das folhas de *Phyllanthus welwitschianus* Mull. Arg..

3.1- **Tetracos-1-eno**

O composto foi isolado, como um óleo incolor, na fração 1 a 3 da coluna 3. No espectro de IV observam-se bandas de absorções da ligação C-H em alcenos a 3082 cm^{-1}, da ligação CH de alcanos a 2959, 2921 e 2851 cm^{-1} e da ligação C=C a 1641 cm^{-1}.

No seu espetro de RMN de protão (Tabela 11), pode observar-se um tripleto a δ 0,87 ppm (*J* = 8,0) de um metilo terminal de uma cadeia linear. A presença desta cadeia linear é justificada pelo multipleto a δ 1,25 ppm. O composto apresenta ainda um duplo tripleto a δ 4,92 ppm (*J* = 10,3 Hz; *J* = 1,7 Hz) e um duplo quarteto δ 4,98 ppm (*J* = 17,1 Hz; *J* = 1,8 Hz) possivelmente de dois hidrogénios geminais de uma ligação dupla terminal e, ainda, um duplo duplo tripleto a δ 8,81 ppm (*J* = 17,0 Hz; *J* = 10,2 Hz; *J* = 6,7 Hz) de um hidrogénio vicinal aos dois hidrogénios geminais o que foi comprovado pela correlação que se observa entre os três sinais no espetro de ^{1}H-^{1}H COSY.

O espetro de RMN de ^{13}C (Tabela 11), mostra a identificação de onze sinais dos átomos de carbono em que no sinal a δ 29,7 ppm absorvem múltiplos átomos de carbono, o que reforça a ideia que o composto apresenta uma longa cadeia linear. Por análise dos espetros DEPT 135º e 90º conclui-se que o composto apresenta um grupo metilo, nove sinais de grupos metileno (um olefínico) e um metino olefínico. O metileno olefínico a δ 114,1 ppm em conjunto com o metilo olefínico a δ 139,3 ppm constituem uma ligação dupla terminal. Conclui-se, assim, que o composto é um alceno linear.

A fórmula molecular do alceno, $C_{24}H_{48}$, foi estabelecida por Espetrometria de Massas de Alta Resolução EI-TOF, o composto apresentou um ião molecular a m/z 336,3751 (calculado para 336,3756)

O estudo detalhado dos espectros de RMN-2D ^{1}H-^{1}H COSY, HSQC, HMBC (figuras 16) e a informação derivada da literatura (Afonso, 1993 e Kenig, *et al.*, 2005) permitiram fazer a elucidação da estrutura e concluir que o composto é o tetracos-1-eno.

Tabela 11 – Dados de RMN ^{1}H e ^{13}C do composto N_1 (tetracos–1-eno).

Posição (C)	δ C (ppm)	Tipos de carbonos	δ H (ppm)(J_{HH} em Hz)	HMBC
1	114,1	CH_2	4,92 dt; 10,3; 1,7	2,3
			4,98; dq; 17,1; 1,8	2,3
2	139,3	CH	5,81; ddt; 17,0; 10,2; 6,7	3,4
3	33,8	CH_2	2,03; m	1,2,5
4	29,0	CH_2	1,37; m	5
5	29,2	CH_2		
6	29,6	CH_2		
7-20	29,7	CH_2	1,25; m	
21	29,5	CH_2		
22	32,0	CH_2	1,21; m	
23	22,7	CH_2	0,87; m	
			1,28; m	
24	14,1	CH_3	0,87; t; 8,0	22, 23

De acordo com Afonso (1993), o tetracos-1-eno pode ser utilizado como feromona em abelha solitária *Megachile rotundata* (F), que serve como estimulante sexual, para o acasalamento dos animais da mesma ou de diferentes espécies.

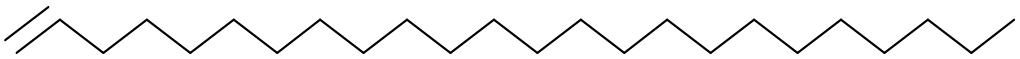

Figura 15 - Estrutura do tetracos-1-eno

3.2- β–sitosterol

Este composto foi obtido da fração 7-8 da cromatografia 5, encontrar-se um óleo incolor. No espectro de IV observam-se bandas de absorções marcantes do grupo OH a 3418 cm^{-1}, da ligação CH em alcenos a 3029 cm-1, da ligação C=C a 1648 cm^{-1} e de grupos metilos a 1382 cm^{-1}.

O espetro de RMN de ^{1}H revela um dupleto largo δ 5,34 ppm (J = 5,3 Hz; H-6) que se pode atribuir a um protão olefínico e um multipleto a δ 3,50 ppm provavelmente de um protão

geminal a um grupo hidroxilo. A presença destes sinais no espetro parece apontar para a presença de um esqueleto esteroide (Rajput *et al.*, 2012). Admitindo que composto é um esteroide então, os dois singuletos a δ 0,67 e 1,00 ppm correspondem aos metilos 19 e 18, respetivamente. Os restantes grupos metilo 21, 26, 27 e 29 fazem parte da cadeia lateral, dois deles pertencem ao grupo isopropilo (dupletos a δ 0,82 e 0,80 ppm; *J* = 7,2 Hz; *J* = 6,9 Hz, respetivamente, dos Me 26 e 27).

O espetro de RMN de ^{13}C, mostra a identificação de vinte e nove sinais dos átomos de carbono, dos quais seis corresponde a grupos metilo, onze a grupos metileno, nove a grupos metino (um olefínico e outro ligado ao grupo hidroxilo) e três carbonos quaternários (um dos quais olefínico) com desvios químicos a δ 140,8 ppm; 42,3 ppm e 36,5 ppm atribuídos aos C-5, C-13 e C-10 e ainda um metino olefínico a δ 121,7 ppm (C-6). A um desvio químico de δ 71,8 ppm encontra-se um sinal de um metino bastante desblindado devido à presença de um grupo hidroxilo sobre este carbono (C-3).

O ß-sitosterol (Figura 17) é um fitoesterol pertencente ao grupo de esteróides, existindo semelhança estrutural com o colesterol, encontrado abundamente em plantas, animais e fungos. É um dos principais componentes de vários medicamentos tradicionais, usado para tratamento de doenças cardíacas, hipercolesterolemia, prevenção do cancro e modulação do sistema imunológico (Saeidnia *et al.*, 2014). Pode também tratar a artrite reumatoide, tuberculose, cancro do colo do útero, queda de cabelo e hiperplasia prostática benigna (Rajput *et al.*, 2012).

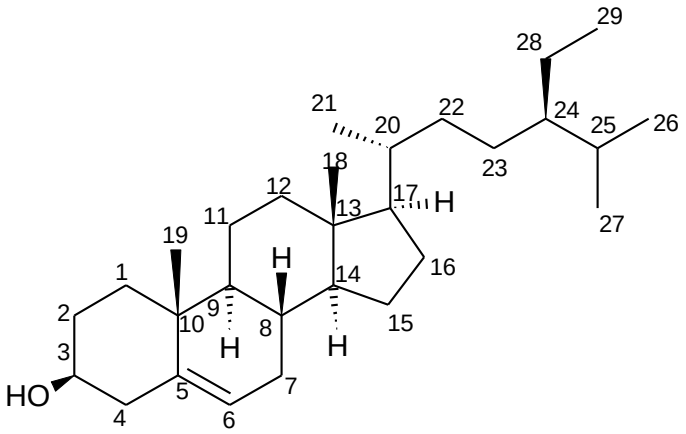

Figura 16 - Estrutura do ß - sitosterol.

Tabela 12 - Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C do composto N_2 (β-sitosterol).

Posição (C)	δ C (ppm)	Tipos de carbonos	δ H (ppm)(J_{HH} em Hz)
1	37,3	CH_2	
2	31,4	CH_2	
3	71,8	CH	3,50; m
4	42,3	CH_2	
5	140,8	C	
6	121,7	CH	5,34; dl; 5,3
7	31,7	CH_2	
8	31,9	CH	
9	50,1	CH	
10	36,5	C	
11	21,1	CH_2	
12	39,8	CH_2	
13	42,3	C	
14	56,7	CH	
15	24,3	CH_2	
16	28,3	CH_2	
17	56,1	CH	
18	18,8	CH_3	0,67; s
19	11,9	CH_3	1,00; s
20	36,2	CH	
21	19,0	CH_3	0,91; d; 6,5
22	39,9	CH_2	
23	26,1	CH_2	
24	45,8	CH	
25	29,6	CH	
26	19,8	CH_3	0,82; d; 7,2
27	19,4	CH_3	0,80; d; 6,9
28	23,1	CH_2	
29	12,0	CH_3	0,83; m

3.3 - Sacarose

O composto foi obtido da fração 11 a 13 da cromatografia 8, no espectro de IV nota-se particularmente as absorções de grupos hidroxilo a 3299 cm^{-1}.

O espetro de RMN de ^{1}H (Tabela 12) mostra a presença de sinais entre δ 4,05 a 3,36 ppm, na região dos hidrogénios geminais a hidroxilos e que é caraterística dos açúcares pelo que é uma indicação que a molécula deverá ser um açúcar (Moccelini et al., 2009). Verifica-se a presença de um protão anomérico dupleto a δ 5,34 ppm (*J* = 3,8 Hz) correspondente ao H-1 e um duplo dupleto a δ 3,39 ppm (*J* = 9,9 Hz; 3,7 Hz) correspondente a H-2. Nota-se ainda, sinais de um tripleto a 3,36 ppm (*J* = 9,6 Hz), multipleto a 3,63 ppm e um dupleto a 4,05 ppm (*J* = 8,3 Hz).

Tabela 13 – Dados de RMN ^{1}H e ^{13}C do composto N_3 (Sacarose)

Posição(C)	δ C (ppm)	Tipo de Carbono	δ H (ppm)(J_{HH} em Hz)
1	93,5	CH	5,34 (d = 3,8)
2	73,0	CH	3,39 (dd = 9,9;3,7)
3	74,2	CH	3,78 (m)
4	71,2	CH	3,36 (t = 9,6)
5	74,4	CH	3,63 (m)
6	62,1	CH_2	3,63 (m)
			3,78(m)
1'	63,8	CH_2	3,59 (d = 10,5)
			3,66 (m)
2'	105,1	C	-
3'	79,3	CH	4,05 (d = 8,3)
4'	75,6	CH	3,97 (m)
5'	83,5	CH	3,71 (m)
6'	63,3	CH_2	3,71 (m)

O espetro de RMN ^{13}C (tabela) associado ao espetro DEPT 135º verificou-se a existência de doze átomos de carbono, distribuídos da seguinte maneira: três oximetilenos, oito oximetinos e um carbono quaternário. Neste espectro foi possível observar os sinais a δ 93,65 ppm (C-1) de um carbono anomérico que é distintivo de um açúcar terminal (redutor), o que se justifica devido à constante de acoplamento de *J* = 3,8 Hz, esta característica aponta para a presença na molécula de um resíduo α-D-glucose (Agrawal, 1992). O sinal a δ 105,1 ppm (C-2') do carbono quaternário é próprio de um resíduo ß-D-frutose (Agrawal,1992 e Moccelini *et al.*, 2009) Estas evidências apontam para que o dissacarídeo é a sacarose na forma de α-D-glucopiranosil-ß-D-frutofuranosído. Os valores dos espetros de RMN de ^{1}H e ^{13}C e em conjunto com a informação

derivada da literatura (Ferreira *et al.*, 2001) asseguram que o composto isolado é o α-D-glucopiranosil-β-D-frutofuranósido ou dissacárido sacarose (figura 18).

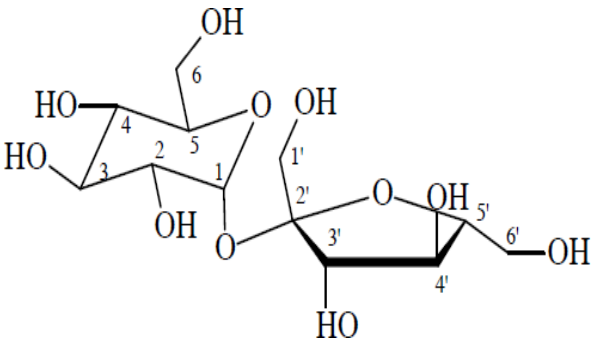

Figura 17 - Estrutura da sacarose

Capítulo IV – Conclusão e perspetivas futuras

As plantas medicinais desde os tempos remotos são utilizadas pela população para o tratamento das principais enfermidades e na descoberta de novos fármacos para poder dar suporte aos novos desafios da sociedade.

A presente investigação teve como foco, a identificação dos compostos químicos da planta *Phyllanthus welwitschianus* Mull. Arg., as suas folhas foram extraídas com metanol obtendo-se o extrato bruto de metanol. Uma parte do extrato de metanol foi separado em frações por um processo de cromatografia em coluna com eluentes de diferentes polaridades, do qual se obtiveram dez frações com diferentes polaridades.

Os métodos usados na extração, fracionamento e purificação dos extratos e com a utilização de técnicas cromatográficas e espectroscópicas permitiu na identificação de três compostos químicos, nomeadamente: tetracos-1-eno isolado na fração Hex/AcOEt 9:1, ß-sitosterol, obtido da fração Hex/AcOEt 1:1 e sacarose, isolado na fração AcOEt/MeOH 1:1.

Apesar de diversos estudos realizados em outras espécies do género *Phyllanthus* em outros países, até ao momento não foram encontrados dados publicados da avaliação dos compostos químicos, e de algumas atividades biológicas em extratos de *Phyllanthus welwitschianus* Mull. Arg..

Tendo em conta a importância medicinal desta planta, sugere-se um estudo mais completo incluindo o estudo das atividades antimicrobiana, antiviral, antibacteriana, entre outras.

Referências

Accorsi, W. R. (2000). Medicina natural, um novo conceito. *A fórmula: guia de negócios*, *2*(4), 5.

Afonso, C. M. M. (1993). Comunicação química: feromonas sexuais em *Megachile rotundata* (F.). Tese de doutoramento, Universidade do Porto

Agrawal, P. K. (1992). NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry*, *31*(10), 3307-3330.

Anupama, K. K., Ramya, K., Joseph, A. (2016). Electrochemical and computational aspects of surface interaction and corrosion inhibition of mild steel in hydrochloric acid by *Phyllanthus amarus* leaf extract (PAE). *Journal of Molecular Liquids*, *216*, 146-155.

Awasthi, A., Singh, R., Agrawal, M. K. (2015). Qualitative and quantitative phytochemical screening of different plant parts of *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. collected from central India with respect to the traditional claims for their medicinal uses. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, *6*(1), 393-398.

Calixto, J. B., Santos, A. R., Filho, V. C., Yunes, R. A. (1998). A review of the plants of the genus *Phyllanthus:* their chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. *Medicinal Research Reviews*, *18*(4), 225-258.

Chongsa, W., Radenahmad, N., Jansakul, C. (2014). Six weeks oral gavage of a *Phyllanthus acidus* leaf water extract decreased visceral fat, the serum lipid profile and liver lipid accumulation in middle-aged male rats. *Journal of Ethnopharmacology*, *155*(1), 396-404.

Chowdhury, S., Mukherjee, T., Mukhopadhyay, R., Mukherjee, B., Sengupta, S., Chattopadhyay, S., Majumder, H. K. (2012). The lignan niranthin poisons Leishmania donovani topoisomerase IB and favors a Th1 immune response in mice. *EMBO Molecular Medicine*, *4*(10), 1126-1143.

Chudapongse, N., Kamkhunthod, M., Poompachee, K. (2010). Effects of *Phyllanthus urinaria* extract on HepG2 cell viability and oxidative phosphorylation by isolated rat liver mitochondria. *Journal of Ethnopharmacology*, *130*(2), 315-319.

Da Silva, G., Serrano, R., Silva, O. (2011). *Maytenus* heterophylla and *Maytenus senegalensis,* two traditional herbal medicines. *Journal of Natural Science, Biology, and Medicine*, *2*(1), 59.

Duong, T. H., Bui, X. H., Le Pogam, P., Nguyen, H. H., Tran, T. T., Chavasiri, W., Boustie, J. (2017). Two novel diterpenes from the roots of *Phyllanthus acidus* (L.) Skeel. *Tetrahedron*, *73*(38), 5634-5638.

Fan, Y. Y., Zhang, H., Zhou, Y., Liu, H. B., Tang, W., Zhou, B., Zuo, J. P., Yue, J. M. (2014). Phainanoids A–F, A new class of potent immunosuppressive triterpenoids with an unprecedented carbon skeleton from *Phyllanthus hainanensis*. *Journal of the American Chemical Society*, *137*(1), 138-141.

Ferreira, V. F., Silva, F. C., Perrone, C. C. (2001). Sacarose no laboratório de química orgânica de graduação. *Química Nova*, *24*(6), 905-907.

Giribabu, N., Karim, K., Kilari, E. K., Salleh, N. (2017*). Phyllanthus niruri* leaves aqueous extract improves kidney functions, ameliorates kidney oxidative stress, inflammation, fibrosis

and apoptosis and enhances kidney cell proliferation in adult male rats with diabetes mellitus. *Journal of Ethnopharmacology*, *205*, 123-137.

Hossen, M. J., Jeon, S. H., Kim, S. C., Kim, J. H., Jeong, D., Sung, N. Y., Yang, S., Baek K. S., Kim, J. H., Yoon, D. H., Song, W. O., Yoon, K. D., Cho, S. H., Lee, S., Kim, J. H., Cho, J. Y. (2015). In vitro and in vivo anti-inflammatory activity of *Phyllanthus acidus* methanolic extract. *Journal of Ethnopharmacology*, *168*, 217-228.

Huang, R. L., Huang, Y. L., Ou, J. C., Chen, C. C., Hsu, F. L., Chang, C. (2003). Screeing of 25 compounds isolated from *Phyllanthus* species for anti-human hepatitis B virus *in vitro*. *Phytoterapy Research*, *17*(5), 449-453.

Ifeoma, O., Samuel, O., Itohan, A. M., Adeola, S. O. (2013). Isolation, fractionation and evaluation of the antiplasmodial properties of *Phyllanthus niruri* resident in its chloroform fraction. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, *6*(3), 169-175.

Jantan, I., Ilangkovan, M., Mohamad, H. F. (2014). Correlation between the major components of *Phyllanthus amarus* and *Phyllanthus urinaria* and their inhibitory effects on phagocytic activity of human neutrophils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *14*(1), 429.

Karuna, R., Reddy, S. S., Baskar, R., Saralakumari, D. (2009). Antioxidant potential of aqueous extract of *Phyllanthus amarus* in rats. *Indian Journal of Pharmacology*, *41*(2), 64.

Kassuya, C. A., Leite, D. F., de Melo, L. V., Rehder, V. L. G., Calixto, J. B. (2005). Anti-inflammatory properties of extracts, fractions and lignans isolated from *Phyllanthus amarus*. *Planta Medica*, *71*(08), 721-726.

Kenig, F., Simons, D. J. H., Crich, D., Cowen, J. P., Ventura, G. T., Rehbein-Khalily, T. (2005). Structure and distribution of branched aliphatic alkanes with quaternary carbon atoms in Cenomanian and Turonian black shales of Pasquia Hills (Saskatchewan, Canada). *Organic Geochemistry*, *36*(1), 117-138.

Khatoon, S., Rai, V., Rawat, A. K. S., Mehrotra, S. (2006). Comparative pharmacognostic studies of three *Phyllanthus* species. *Journal of Ethnopharmacology*, *104*(1-2), 79-86.

Krithika, R., Mohankumar, R., Verma, R. J., Shrivastav, P. S., Mohamad, I. L., Gunasekaran, P., Narasimhan, S. (2009). Isolation, characterization and antioxidative effect of phyllanthin against CCl4-induced toxicity in HepG2 cell line. *Chemico-biological interactions*, *181*(3), 351-358.

Komlaga, G., Genta-Jouve, G., Cojean, S., Dickson, R. A., Mensah, M. L., Loiseau, P. M., Mensah, M. L. K., Beniddir, M. A. (2017). Antiplasmodial Securinega alkaloids from *Phyllanthus fraternus*: Discovery of natural (+)-allonorsecurinine. *Tetrahedron Letters*, *58*(38), 3754-3756.

Kumar, S., Singh, A., Kumar, B. (2017). Identification and characterization of phenolics and terpenoids from ethanolic extracts of *Phyllanthus* species by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, *7*(4), 214-222.

Kumaran, A., Karunakaran, R. J. (2006). Nitric oxide radical scavenging active components from *Phyllanthus emblica* L. *Plant Foods for Human Nutrition*, *61*(1), 1.

Lee, S. H., Tang, Y. Q., Rathkrishnan, A., Wang, S. M., Ong, K. C., Manikam, R., Payne, B. J., Jaganath, H., Sekaran, S. D. (2013). Effects of cocktail of four local Malaysian medicinal plants

(*Phyllanthus* spp.) against dengue virus 2. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *13*(1), 192.

Leeya, Y., Mulvany, M. J., Queiroz, E. F., Marston, A., Hostettmann, K., Jansakul, C. (2010). Hypotensive activity of an n-butanol extract and their purified compounds from leaves of *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels in rats. *European Journal of Pharmacology*, *649*(1-3), 301-313.

Liu, S., Wei, W., Shi, K., Cao, X., Zhou, M., Liu, Z. (2014). In vitro and in vivo anti-hepatitis B virus activities of the lignan niranthin isolated from *Phyllanthus niruri* L. *Journal of Ethnopharmacology*, *155*(2), 1061-1067.

Liu, X., Zhao, M., Wang, J., Yang, B., Jiang, Y. (2008). Antioxidant activity of methanolic extract of emblica fruit (*Phyllanthus emblica* L.) from six regions in China. *Journal of Food Composition and Analysis*, *21*(3), 219-228.

Mahomoodally, M. F. (2013). Traditional medicines in Africa: an appraisal of ten potent African medicinal plants. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2013*.

Mao, X., Wu, L. F., Guo, H. L., Chen, W. J., Cui, Y. P., Qi, Q., Li, S., Liang, W. Y., Yang, G. H., Shao, Y. Y., Zhu, D., She, G. M., You, Y., Zhang, L. Z. (2016). The genus *Phyllanthus*: an ethnopharmacological, phytochemical, and pharmacological review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2016*.

Moccelini, S. K., Silva, V. C. D., Ndiaye, E. A., Sousa Jr, P. T. D., Vieira, P. C. (2009). Phytochemical study from root barks of Zanthoxylum rigidum Humb. & Bonpl. ex Willd (Rutaceae). *Quimica Nova*, *32*(1), 131-133.

Mukhtar, M., Arshad, M., Ahmad, M., Pomerantz, R. J., Wigdahl, B., Parveen, Z. (2008). Antiviral potentials of medicinal plants. *Virus Research*, *131*(2), 111-120.

Murugaiyah, V., Chan, K. L. (2009). Mechanisms of antihyperuricemic effect of *Phyllanthus niruri* and its lignan constituents. *Journal of Ethnopharmacology*, *124*(2), 233-239.

Ooi, K. L., Loh, S. I., Sattar, M. A., Muhammad, T. S. T., Sulaiman, S. F. (2015). Cytotoxic, caspase-3 induction and in vivo hepatoprotective effects of phyllanthin, a major constituent of *Phyllanthus niruri*. *Journal of Functional Foods*, *14*, 236-243.

Oudhia, P. (2008). *Phyllanthus fraternus* GL Webster. *Prota*, *11*(1).

Patel, N. S., Hrdlicka, J., Beranek, P., Přibyl, M., Šnita, D., Hammouti, B., Al-Deyab, S. S., Salghi, R. (2014). Extract of *Phyllanthus fraternus* leaves as corrosion inhibitor for mild steel in H2SO4 solutions. *International Journal of Electrochemical Science*, *9*(6), 2805-2815.

Pereira, R. G., Garcia, V. L., Rodrigues, M. V. N., Martínez, J. (2016). Extraction of lignans from *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn using pressurized liquids and low-pressure methods. *Separation and Purification Technology*, *158*, 204-211.

Punt, W. (1972). Pollen morphology and taxonomy of section Ceramanthus Baillon sl of the genus *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). *Review of Palaeobotany and Palynology*, *13*(3-4), 213-228.

Radcliffe-Smith, A., 1996. *Phyllanthus welwitschianus* Mull. Arg. [família Euphorbiaceae]. *Flora Zambesiaca,* vol. 9, parte 4. Disponível em https://plants.jstor.org/stable/10.5555/al.ap.flora.fz6905 acedido em 22 de fevereiro de 2019.

Rajput, A. P., Rajput, T. A. (2012). Isolation of stigmasterol and ß-sitosterol from chloroform extract of leaves of *Corchorus fascicularis* Lam. *International Journal of Biolological Chemistry*, *6*(4), 130-135.

Ren, Y., Lantvit, D.D., Ninh, T.N., Chai, H., Soejento, D.D., De Blanco, E.J.C., Swanson, S.M., Kinghorn, A.D (n.d.) Cytotoxic constituents of different plant parts of *Phyllanthus welwitschianus*. Disponível em https://apps.pharmacy.uic.edu/depts/pcrps/anticancer_agents_natural/10.pdf Acedido em 23 de fevereiro de 2019.

Roengrit, T., Wannanon, P., Prasertsri, P., Kanpetta, Y., Sripanidkulchai, B. O., Wattanathorn, J., Leelayuwat, N. (2015). Antioxidant effect of *Phyllanthus amarus* after moderate-intensity exercise in sedentary males: a randomized crossover (double-blind) study. *Journal of Physical Therapy Science*, *27*(4), 1181-1186.

Rukangira, E. (1998). Regional Workshop on Medicinal Plants and Traditional Medicines in Africa, Cape Town, South Africa, 14-18 Apr. 1998: proceedings.

Saeidnia, S., Manayi, A., Gohari, A. R., Abdollahi, M. (2014). The story of ß-sitosterol-a review. *European Journal of Medicinal Plants*, *4*(5), 590.

Schippmann, U., Leaman, D. J., Cunningham, A. B. (2002). Impact of cultivation and gathering of medicinal plants on biodiversity: global trends and issues. *Biodiversity and the Ecosystem Approach in Agriculture, Forestry and Fisheries*.

Sebastian, T., Setty, O. H. (1999). Protective effect of *P. fraternus* against ethanol-induced mitochondrial dysfunction. *Alcohol*, *17*(1), 29-34.

Secco, R. D. S., Cordeiro, I., Senna-Vale, L. D., Sales, M. F. D., Lima, L. R. D., Medeiros, D., Haiad, B. S., Oliveira, A. S., Caruzo, M. B. R., Carneiro-Torres, D., Bigio, N. C. (2012). An overview of recent taxonomic studies on Euphorbiaceae sl in Brazil. *Rodriguésia*, *63*(1), 227-242.

Shanbhag, T., Amuthan, A., Shenoy, S. (2010). Effect of *Phyllanthus niruri*. Linn on burn wound in rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, *3*(2), 105-108.

Shen, B., Yu, J., Wang, S., Chu, E. S., Wong, V. W. S., Zhou, X., Lin, G., Sung, J. J. Y., Chan, H. L. (2008). *Phyllanthus urinaria* ameliorates the severity of nutritional steatohepatitis both in vitro and in vivo. *Hepatology*, *47*(2), 473-483.

Siddiqui, M. H., Alamri, S. A., Al-Whaibi, M. H., Hussain, Z., Ali, H. M., El-Zaidy, M. E. (2017). A mini-review of anti-hepatitis B virus activity of medicinal plants. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, *31*(1), 9-15.

Sousa, M., Ousingsawat, J., Seitz, R., Puntheeranurak, S., Regalado, A., Schmidt, A., Grego, T., Jansakul, C., Amaral, M. D., Schreiber, R., Kunzelmann, K. (2007). An extract from the medicinal plant *Phyllanthus acidus* and its isolated compounds induce airway chloride secretion: a potential treatment for cystic fibrosis. *Molecular Pharmacology*, *71*(1), 366-376.

Srivastava, P., Raut, H., Puntambekar, H., Desai, A. (2013). HPLC analysis of *Phyllanthus amarus* samples stored in stability chambers under different conditions and study of the effect

on quantification of the phytomarkers phyllanthin and hypophyllanthin. *Acta Chromatographica*, *27*(1), 147-156.

Stefanowicz-Hajduk, J., Sparzak-Stefanowska, B., Krauze-Baranowska, M., Ochocka, J. R. (2016). Securinine from *Phyllanthus glaucus* induces cell cycle arrest and apoptosis in human cervical cancer HeLa cells. *PloS One*, *11*(10), e0165372.

Sundaram, D., Kesavan, K., Kumaravel, H., Mohammed, R. F., Tohru, M., Toshiaki, I., Raja, S. (2016). Protective efficacy of active compounds from *Phyllanthus amarus* against white spot syndrome virus in freshwater crab (*Paratelphusa hydrodomous*). *Aquaculture Research*, *47*(7), 2061-2067.

Tan, W. C., Jaganath, I. B., Manikam, R., Sekaran, S. D. (2013). Evaluation of antiviral activities of four local Malaysian *Phyllanthus* species against herpes simplex viruses and possible antiviral target. *International Journal of Medical Sciences*, *10*(13), 1817.

Variya, B. C., Bakrania, A. K., Patel, S. S. (2016). *Emblica officinalis* (Amla): A review for its phytochemistry, ethnomedicinal uses and medicinal potentials with respect to molecular mechanisms. *Pharmacological Research*, *111*, 180-200.

Vasisht, K., Kumar, V., 2004. Compendium of medicinal and aromatic plants Africa. *Earth, environmental and marine sciences and technologies. Area Science Park, Trieste, Italy: ICS-UNIDO*, 2004.

Vongvanich, N., Kittakoop, P., Kramyu, J., Tanticharoen, M., Thebtaranonth, Y. (2000). Phyllanthusols A and B, Cytotoxic Norbisabolane Glycosides from *Phyllanthus acidus* Skeels. *The Journal of Organic Chemistry*, *65*(17), 5420-5423.

Wang, B. E. (2000). Treatment of chronic liver diseases with traditional Chinese medicine. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *15*, E67-E70.

Wu, Y., Xie, S. S., Hu, Z. X., Wu, Z. D., Guo, Y., Zhang, J. W., Wang, J. P., Xue, Y. B., Zhang, Y. H. (2017). Triterpenoids from whole plants of *Phyllanthus urinaria*. *Chinese Herbal Medicines*, *9*(2), 193-196.

Yuandani, I. J., Ilangkovan, M., Husain, K., Chan, K. M. (2016). Inhibitory effects of compounds from *Phyllanthus amarus* on nitric oxide production, lymphocyte proliferation, and cytokine release from phagocytes. *Drug Design, Development and Therapy*, *10*, 1935.

Anexos

N_1 – Tetracos-1-eno

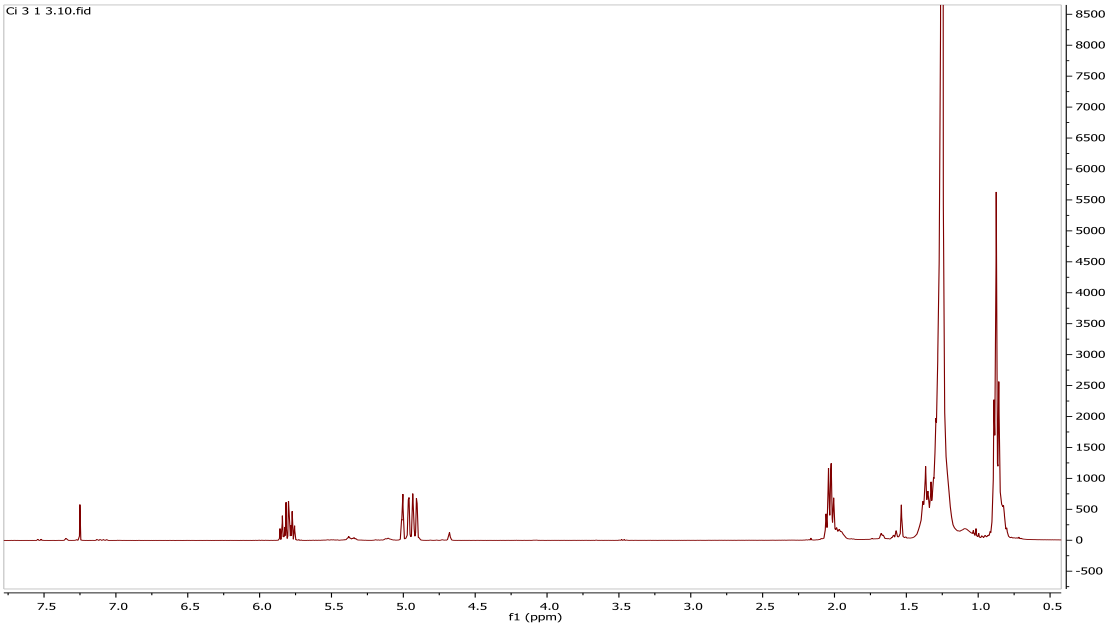

Figura E1: Espetro de RMN de ^{1}H do N_1.

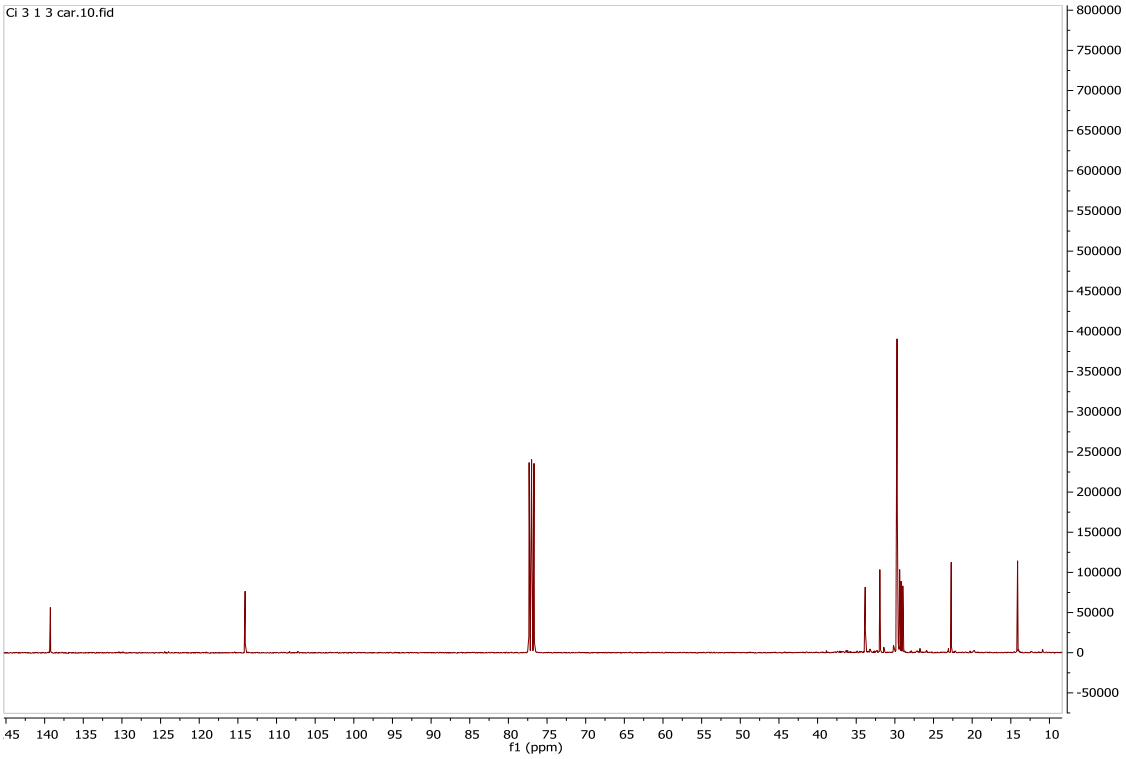

Figura E2: Espetro de RMN de ^{13}C do N_1.

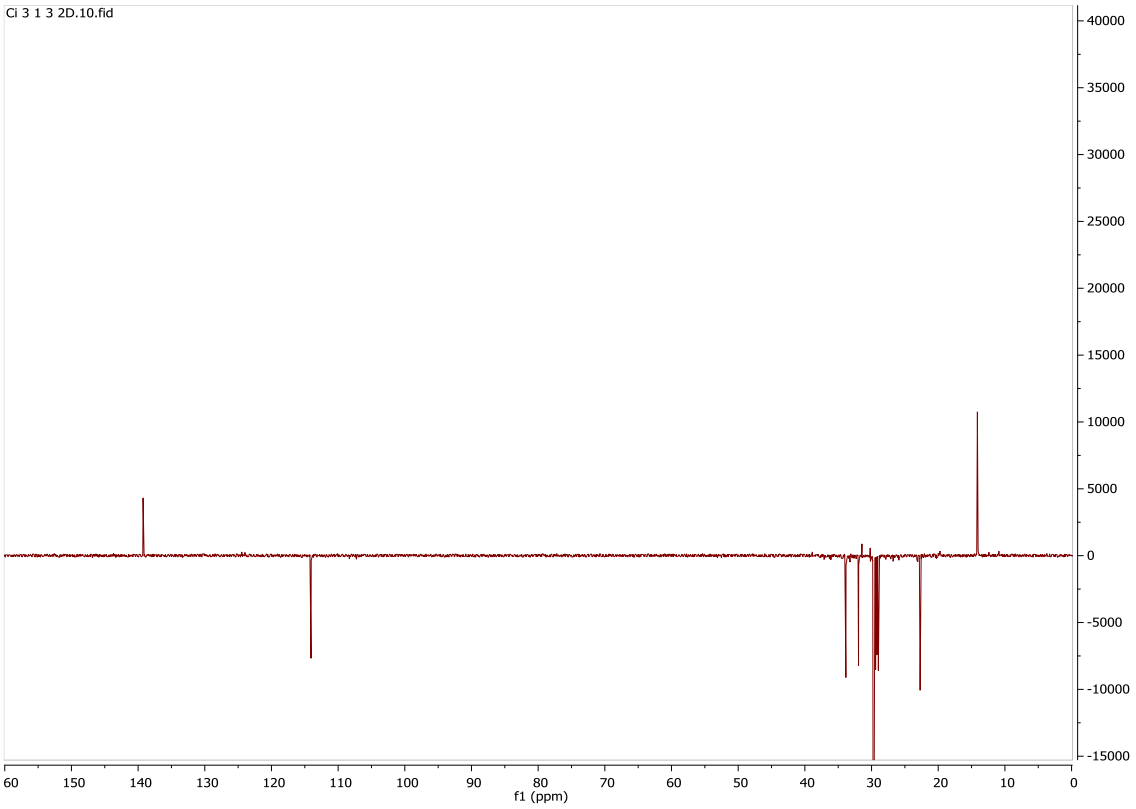

Figura E3: Espetro DEPT 135 de N_1.

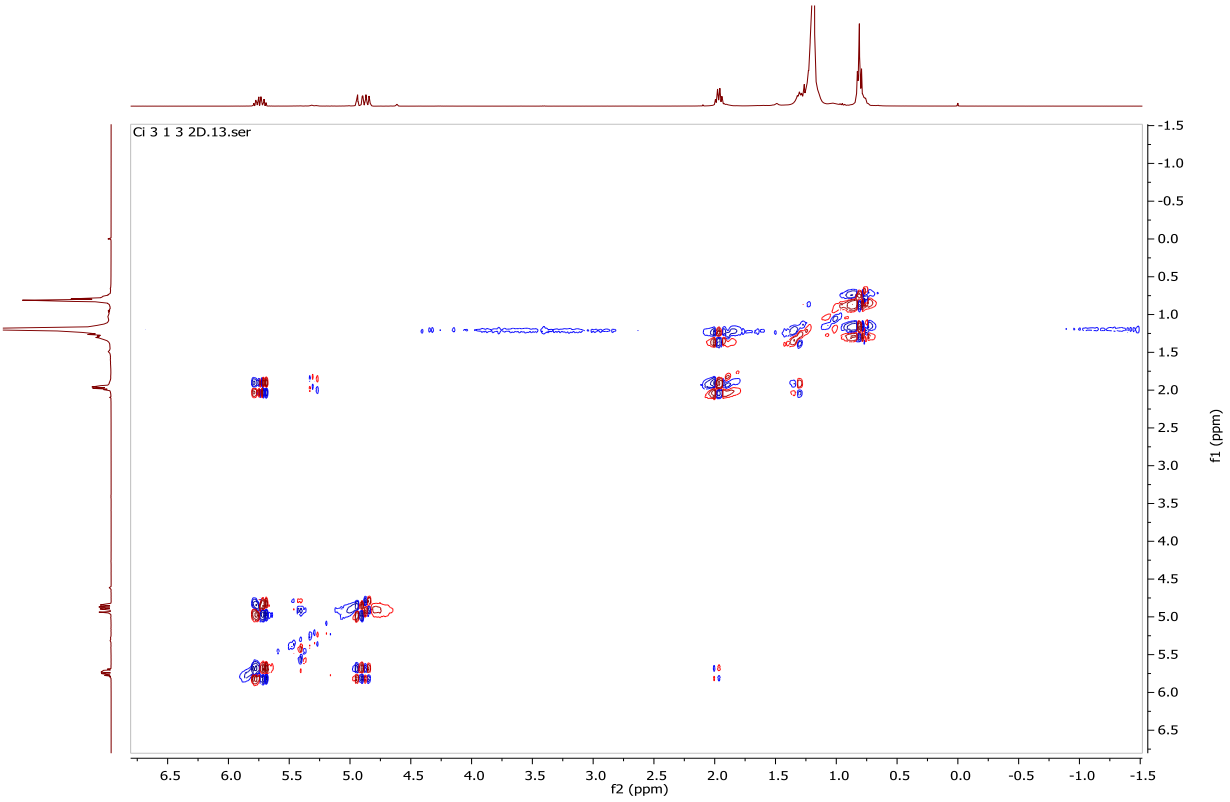

Figura E4: Espetro ^{1}H-^{1}H-COSY de N_1.

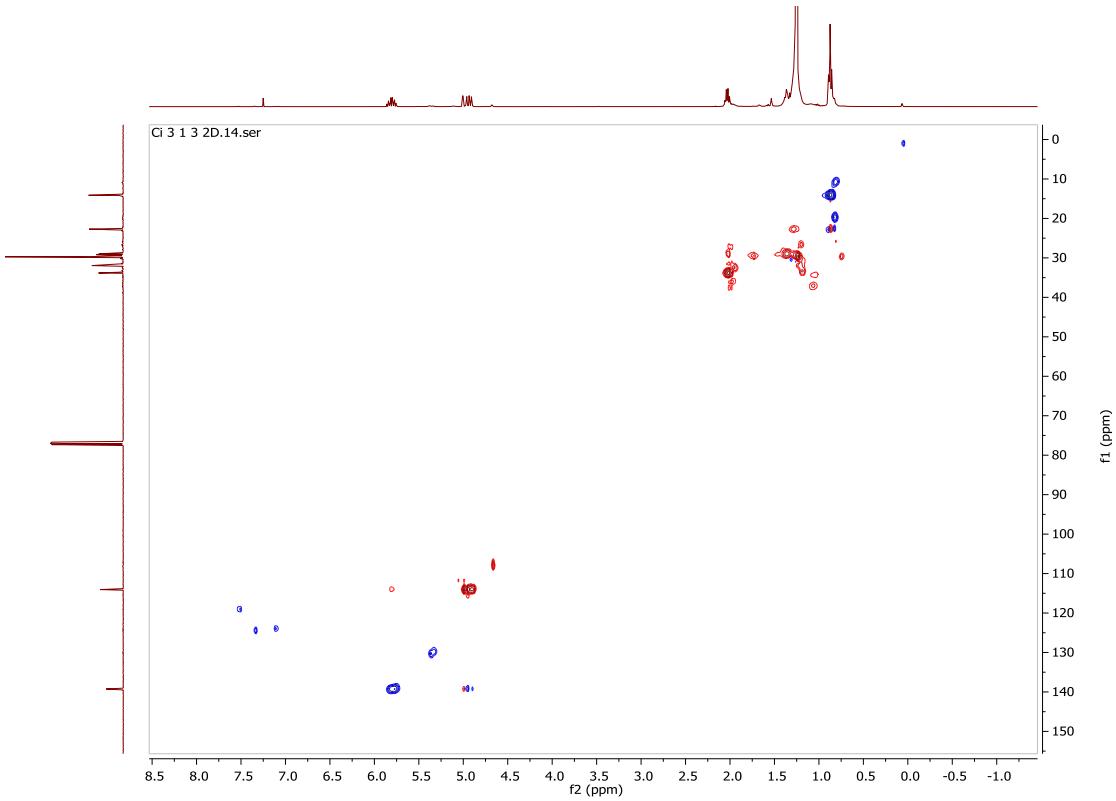

Figura E5: Espetro HSQC de N_1.

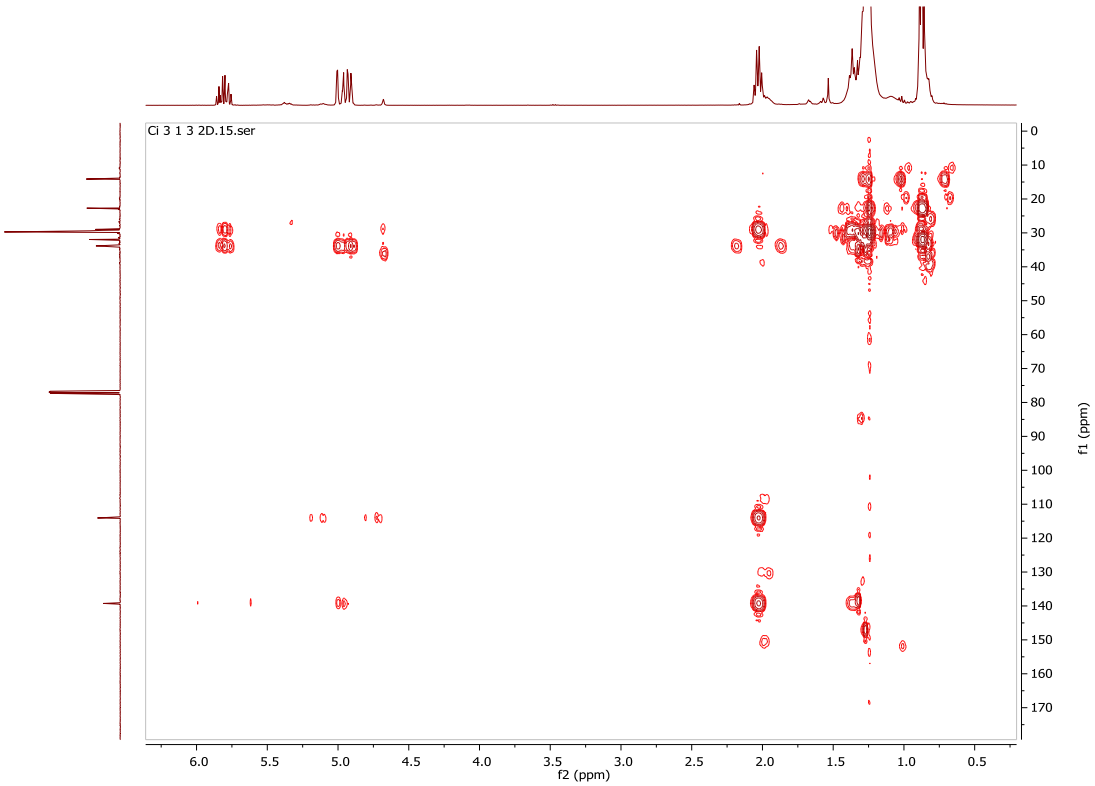

Figura E6: Espetro HMBC de N_1.

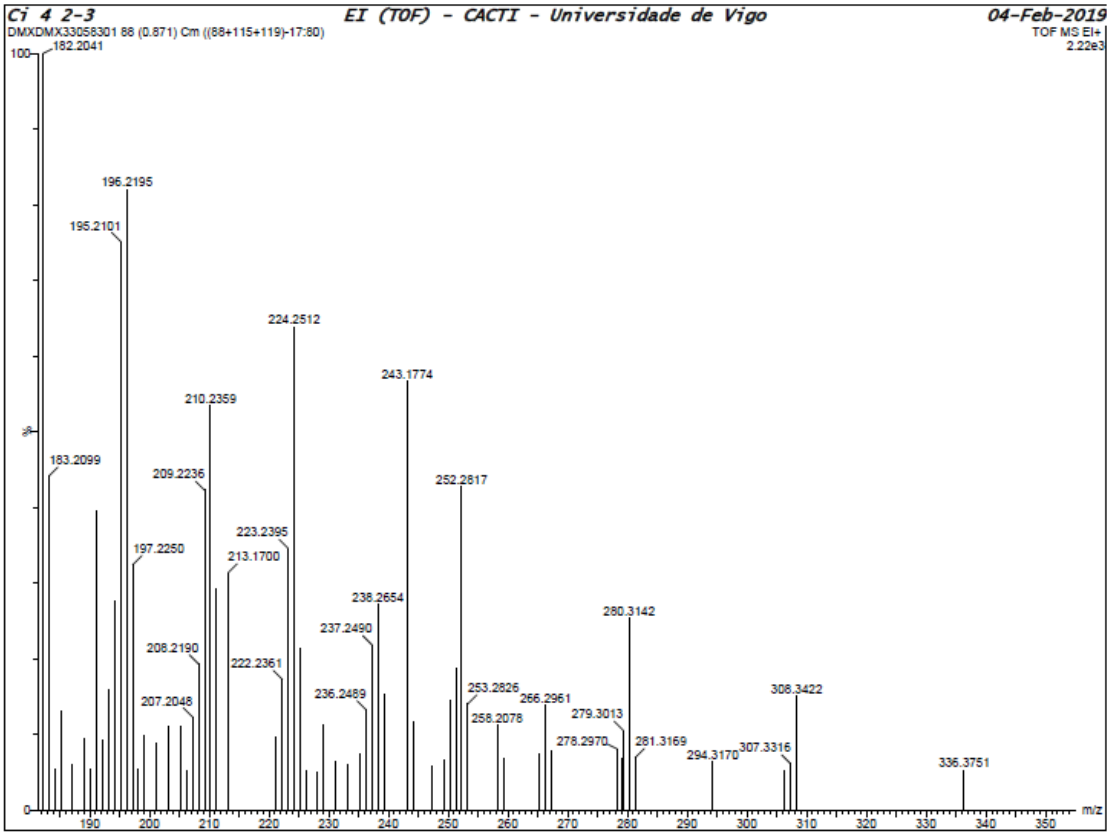

Figura E7: Espetro de massa de alta resolução de N_1.

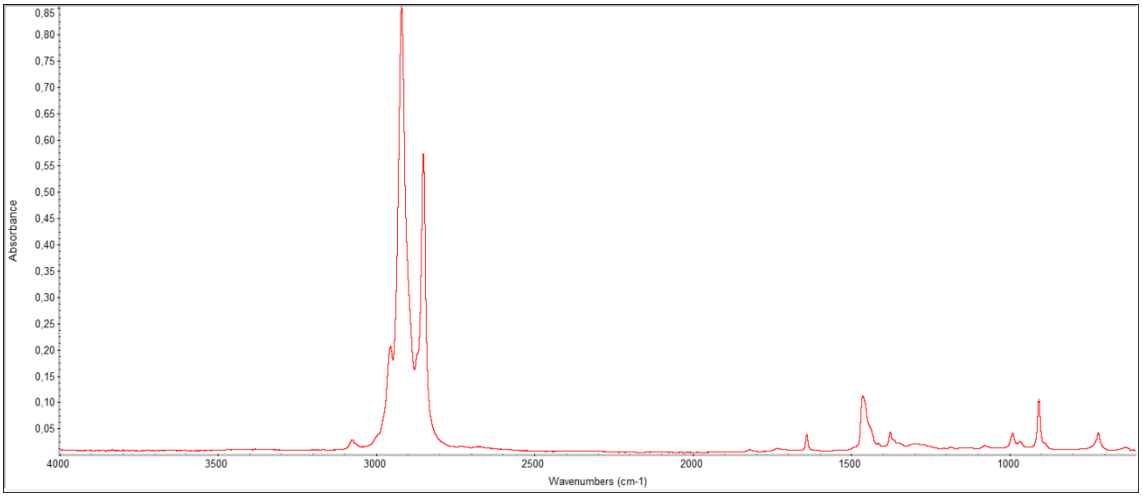

Figura E8: Espetro de IV de N_1.

N_2 - β-sitosterol

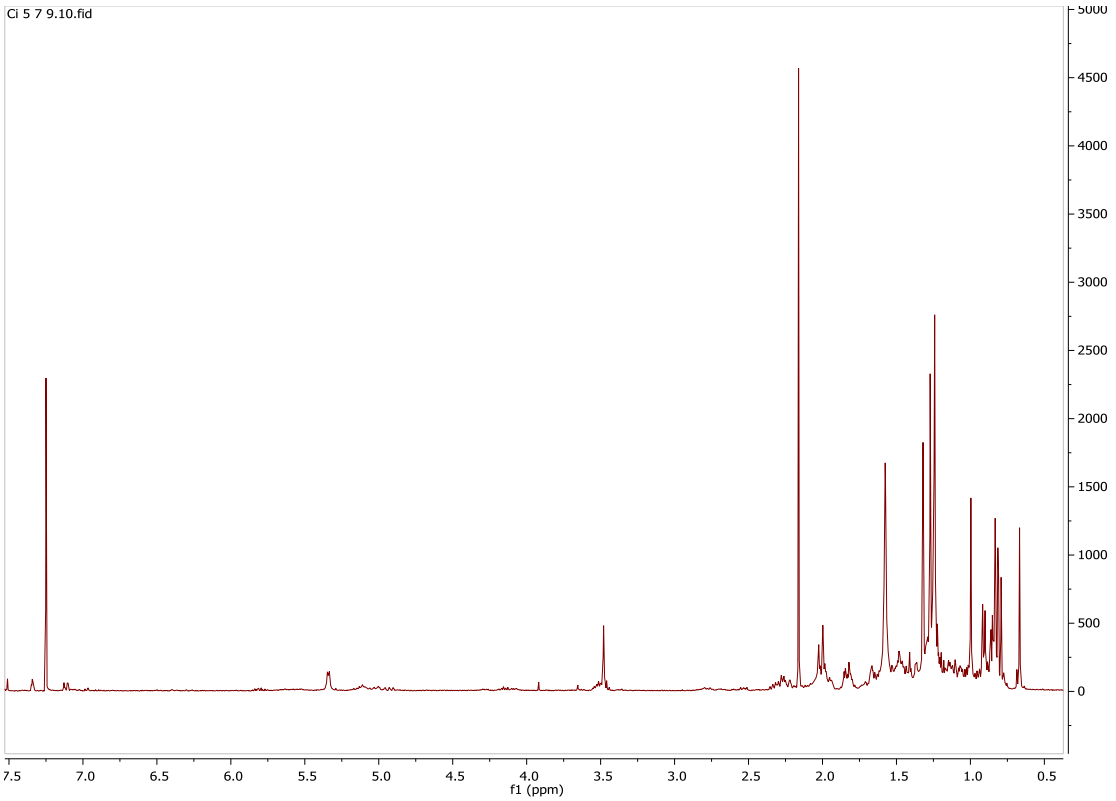

Figura E9: Espetro de RMN de ^{1}H de N_2.

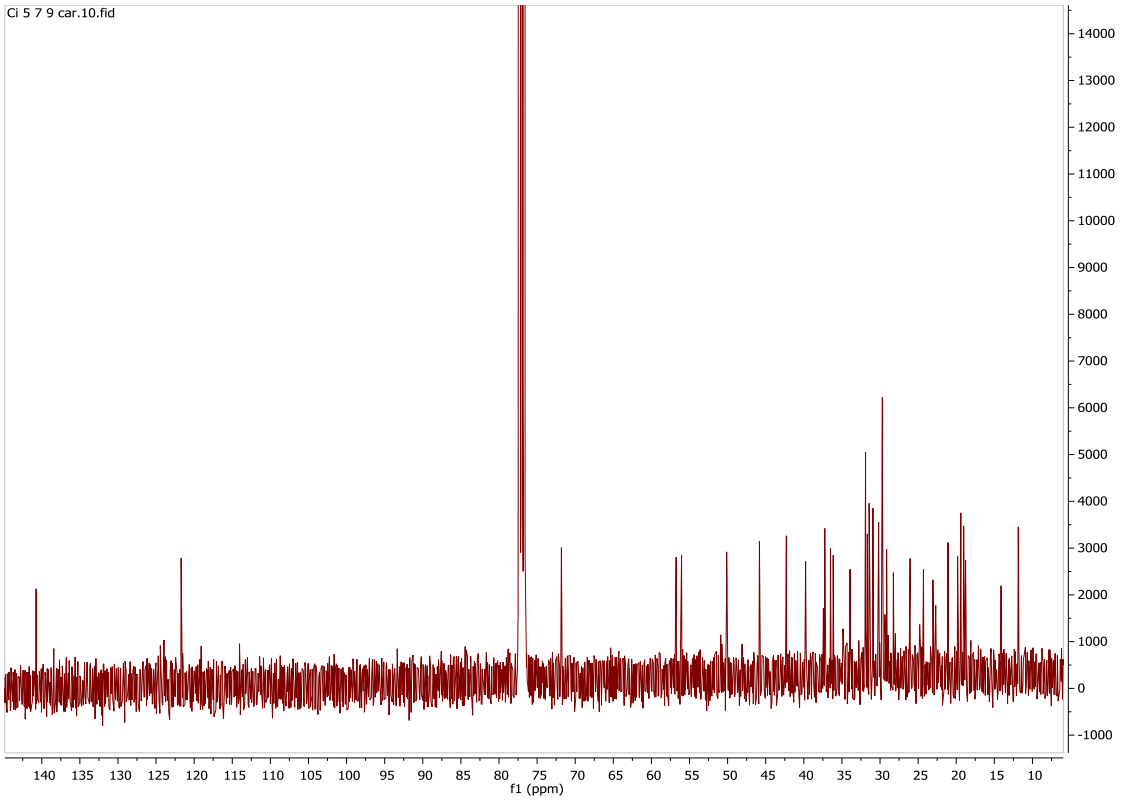

Figura E10: Espetro de RMN de ^{13}C de N_2.

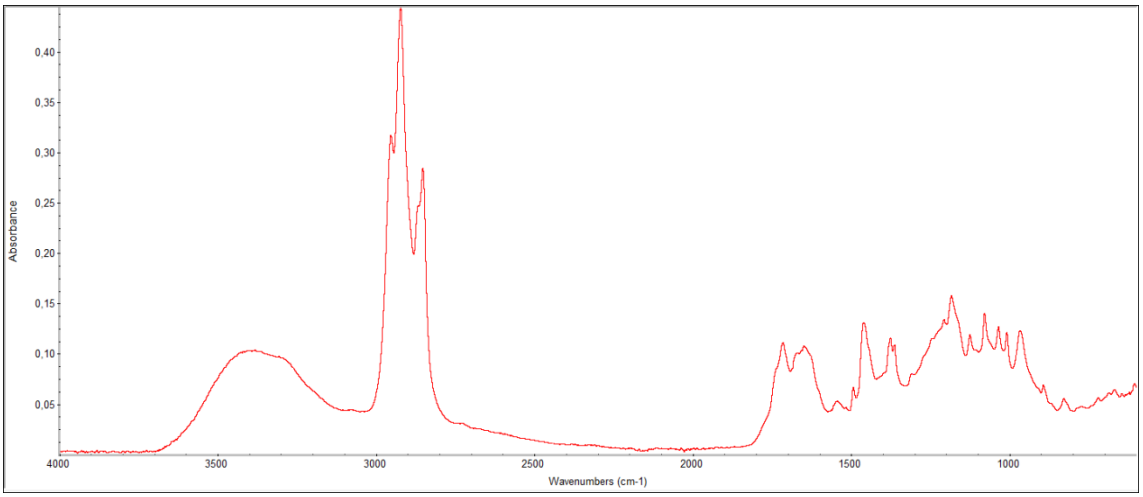

Figura E10: Espetro de IV de N_2.

N_3 - Sacarose

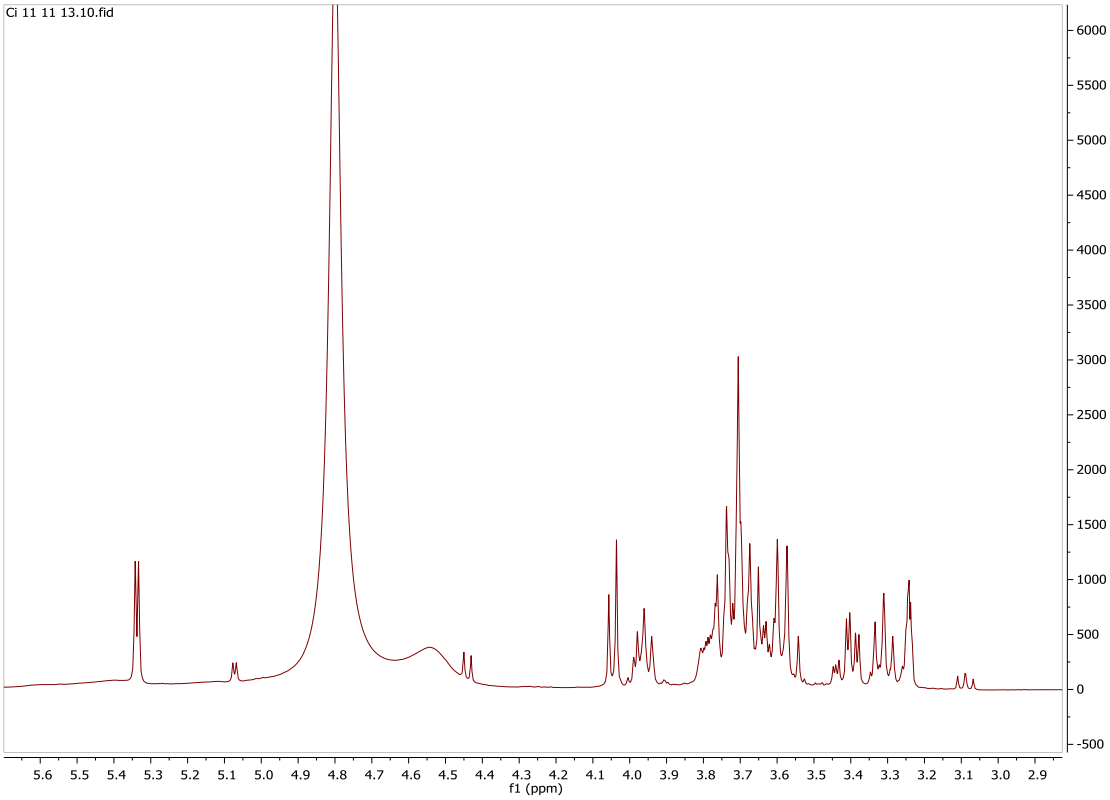

Figura E11: Espetro de RMN de ^1H de N_3.

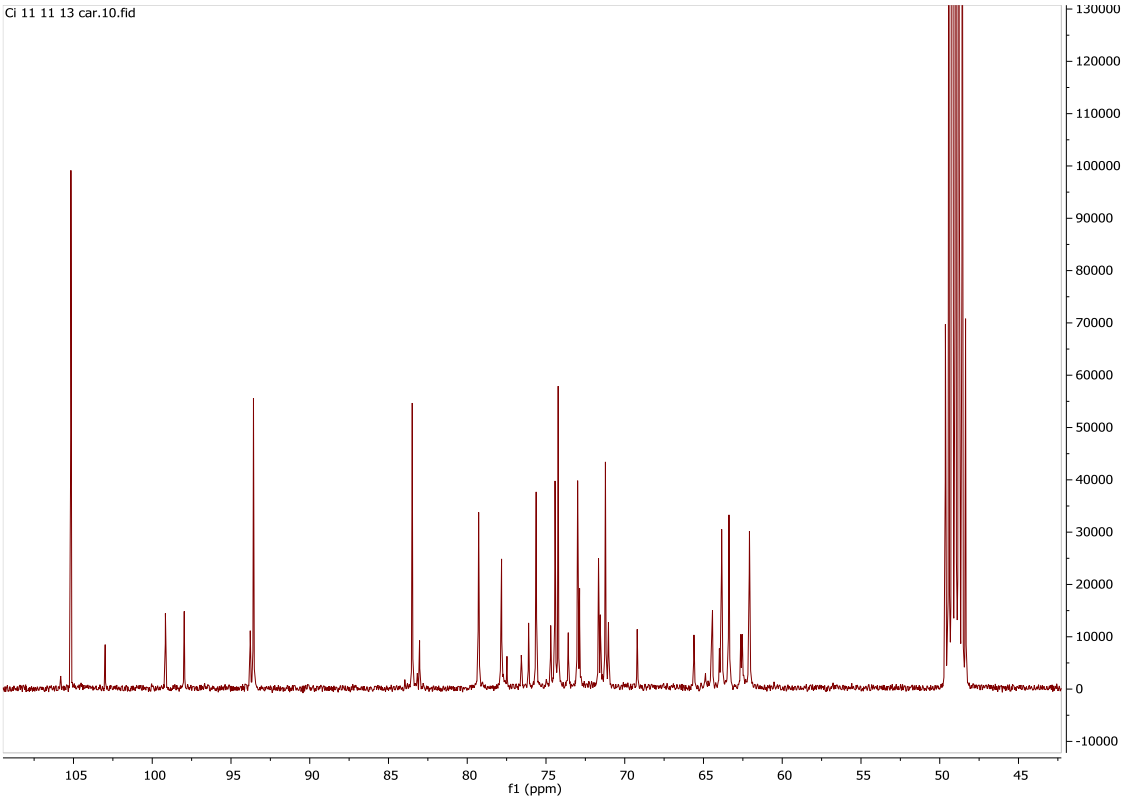

Figura E12: Espetro de RMN de ^{13}C de N_3.

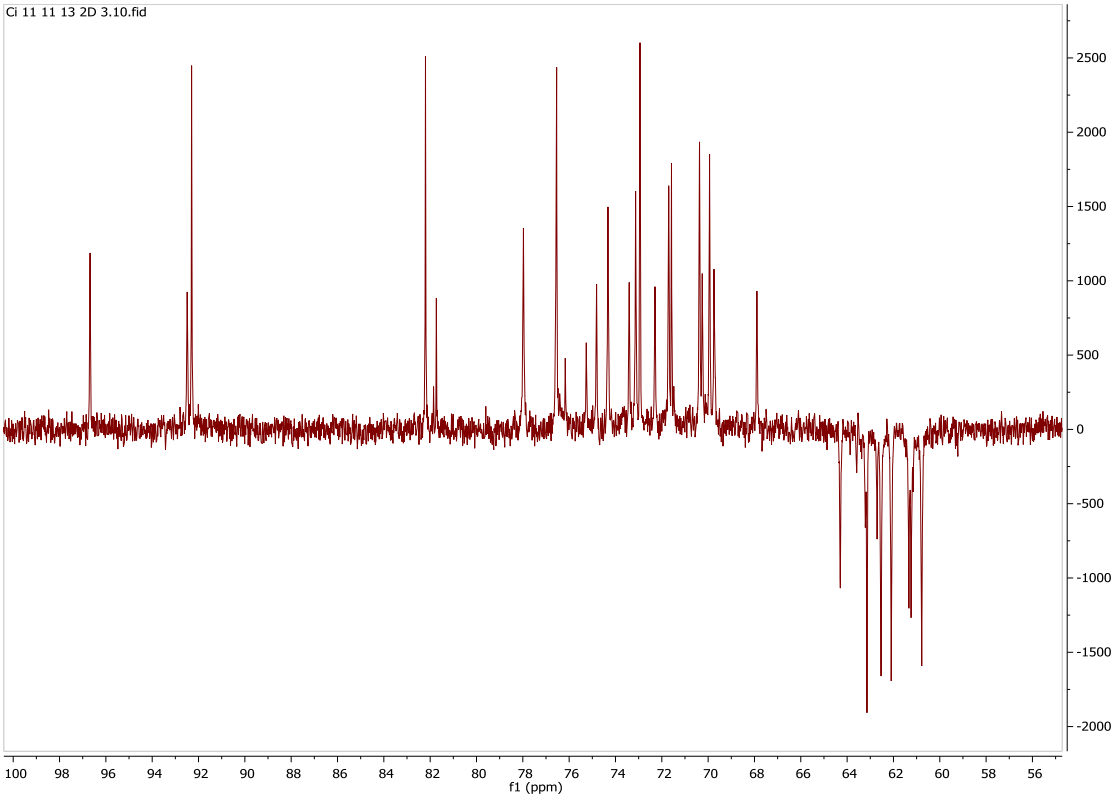

Figura E13: Espetro DEPT 135 de N_3.

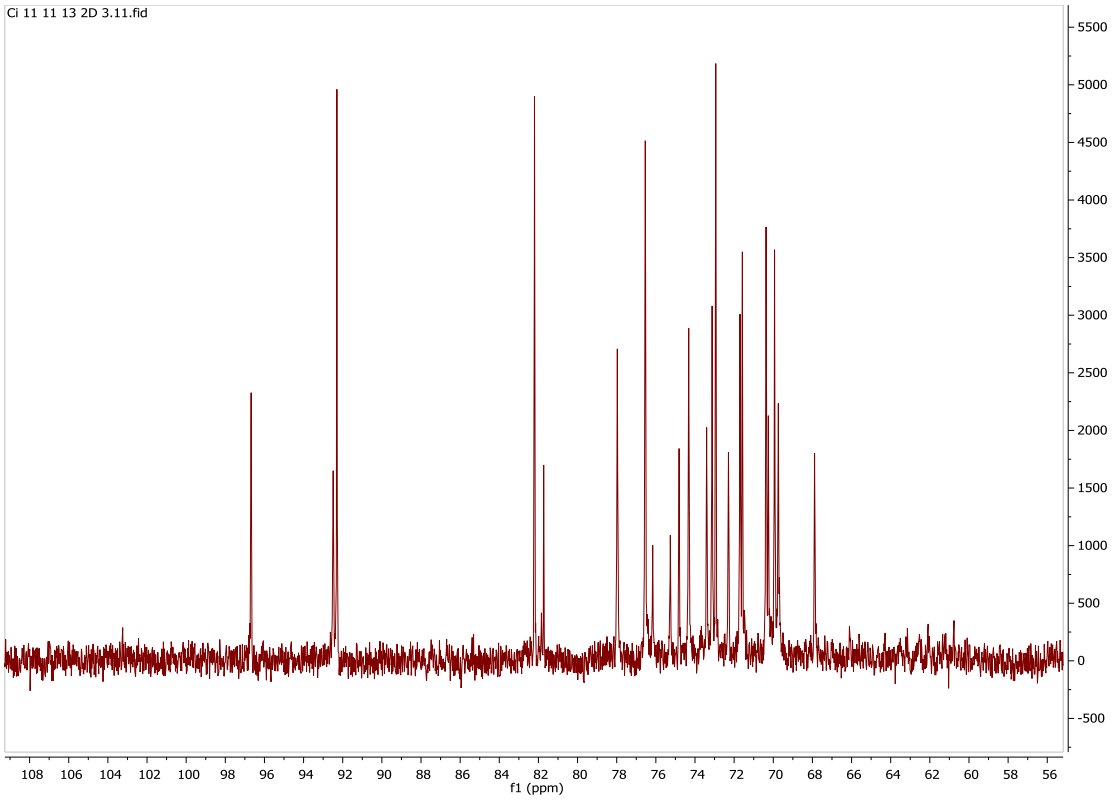

Figura E14: Espetro DEPT 90 de N_3.

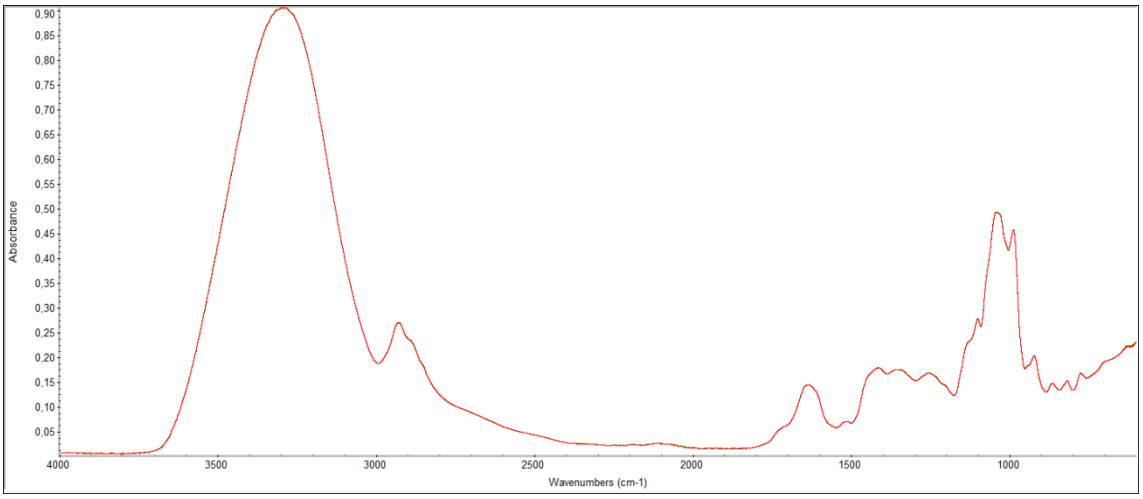

Figura E15: Espetro de IV de N_3.