



Patrícia Raquel da Silva Matos

## Avaliação do potencial terapêutico do *Acanthus mollis*

Dissertação de Mestrado em Química Farmacêutica Industrial, orientada pelo Professor Doutor Artur Manuel Bordalo Machado Figueirinha e pela Professora Doutora Maria Teresa Pereira Marques Batista e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Patrícia Raquel da Silva Matos

# Avaliação do potencial terapêutico do *Acanthus mollis*

Dissertação de Mestrado em Química Farmacêutica Industrial, orientada pelo Professor Doutor Artur Manuel Bordalo Machado Figueirinha e pela Professora Doutora Maria Teresa Pereira Marques Batista e apresentada à  
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**“Somos todos cientistas de um gigantesco laboratório, e cada dia é um enorme tubo de ensaio!”**

(Fernando Fraga)



## **Agradecimentos**

Este trabalho não teria sido possível sem a colaboração e a boa vontade daqueles a quem me dirijo, e desde já, a todos os meus sinceros agradecimentos.

Ao Professor Doutor Artur Figueirinha por me ter orientado e dado a oportunidade de concluir mais uma etapa da minha vida académica. Agradecer toda a disponibilidade, paciência e perseverança que foi tendo ao longo destes meses que me orientou. Toda a transmissão de conhecimentos foi para mim uma mais-valia, e por isso mesmo deixo aqui o meu muito obrigado. Sendo o professor um incansável procurador da razão, saiba que: *"Há sempre uma razão, embora não haja nenhuma explicação.* (Adélia Prado)".

À Doutora Teresa Batista pelo rigor e profissionalismo que coloca em cada projeto em que colabora. Também o meu não foi excessão e por isso mesmo gostaria de agradecer a forma cuidadosa como me ensinou a ver e a manusear cada instrumento, o perfeccionismo que "imprimiu" a cada resultado e principalmente a ambição em querer mais e mais resultados. O tempo não chegou para todos os projetos e ambições, porém: *"A ambição é o maior estímulo humano. É com ele que se edifica.* (Carlos Malheiro Dias)".

À Professora Doutora Lígia Salgueiro, diretora do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia de Coimbra, por me ter proporcionado as condições necessárias para o desenvolvimento da maior parte do meu trabalho experimental de fitoquímica.

Ao professor Doutor António Paranhos pela total disponibilidade e auxílio na realização de alguns ensaios de atividade antioxidante.

À Doutora Fátima Nunes do Laboratório de Espectrometria de Massa do Núcleo de Estudos Farmacéuticos da Universidade de Coimbra, integrado na Rede Nacional de Espectrometria de Massa (RNEM) pela obtenção dos espectros de massa do extrato alcoólico.

A todos os elementos da equipa do IBILI que colaboraram na realização dos ensaios com linhas celulares, a Professora Doutora Teresa Cruz e a Isabel Ferreira.

Ao Senhor Arménio Matos do Jardim Botânico da Universidade de Coimbra, por gentilmente me colher o material em estudo, ou seja, as folhas de *Acanthus mollis* para que todo este trabalho fosse possível.

A todos os elementos que constituíram do laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra pela forma como me receberam e ajudaram, tendo como base a simpatia e boa disposição.

Às minhas colegas de casa que sempre me apoiaram e ajudaram em todo este caminho: Ana Leitão, Ana Sequeira, Filipa Teles e Francisca Matos. E porque foi Coimbra que nos uniu: *"Assim sendo, este é o conselho que deixo a quem entra nas tuas portas: vivam como se acabasse amanhã, sintam como se fosse para sempre. (PedRodrigues)"*.

Aos meus pais e avós, obrigada não por dois anos, mas por uma vida! *"A família é como um corrimão quando a subida está difícil sempre temos em quem se apoiar! (Fábio Ribeiro)"*.

# Índice

---

Resumo.....	viii
Abstract.....	xi
Lista de abreviaturas.....	xiv
Índice de figuras.....	xvi
Índice de tabelas.....	xviii
<b>1. Introdução.....</b>	<b>19</b>
<b>1.1. O género <i>Acanthus</i> (espécies, distribuição geográfica e usos medicinais) .....</b>	<b>20</b>
<b>1.1.1. Fenilpropanóides do género <i>Acanthus</i>.....</b>	<b>27</b>
<b>1.1.2. Benzoxazinóides .....</b>	<b>29</b>
<b>1.2. <i>Acanthus mollis</i>.....</b>	<b>32</b>
<b>1.2.1. Caracterização botânica.....</b>	<b>32</b>
1.2.1.1. Classificação taxonómica.....	33
1.2.1.2. Sinónimos.....	33
1.2.1.3. Descrição Botânica.....	34
<b>1.2.2. Condições de cultivo .....</b>	<b>35</b>
<b>1.2.3. Estudos fitoquímicos e atividade biológica.....</b>	<b>35</b>
<b>1.2.4. Etnomedicina.....</b>	<b>37</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>38</b>
<b>3. Material e Métodos.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1. Material de estudo.....</b>	<b>41</b>
<b>3.2. Reagentes .....</b>	<b>41</b>
<b>3.3. Extração.....</b>	<b>41</b>
<b>3.4. Cromatografia analítica.....</b>	<b>42</b>
<b>3.4.1. Cromatografia em camada fina (TLC).....</b>	<b>42</b>
3.4.1.1. Reveladores.....	43
3.4.1.1.1. NP-PEG (Natural products-polythyleneglycol reagent).....	44
3.4.1.1.2. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).....	44
3.4.1.1.3. Reagente vanilina-ácido sulfúrico.....	44
3.4.1.1.4. Reagente anisaldeído-ácido sulfúrico.....	45
3.4.1.1.5. Reagente Dragendorff .....	45
3.4.1.1.6. Reagente Liebermann-Burchard.....	45
3.4.1.1.7. <i>p</i> -Dimetilaminocinamaldeído (DMACA).....	46
3.4.1.1.8. Cloreto de ferro (III) (FeCl <sub>3</sub> ).....	46

3.4.2.	HPLC-PDA .....	46
3.4.3.	HPLC-PDA-ESI/MS <sup>n</sup> .....	48
3.5.	Cromatografia preparativa .....	50
3.5.1.	Cromatografia Flash .....	50
3.5.2.	TLC preparativa .....	51
3.6.	Atividade antioxidante .....	52
3.6.1.	Ensaio do 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).....	52
3.6.2.	Ensaio do anião superóxido.....	52
3.6.3.	Ensaio do radical hidroxilo .....	53
3.7.	Atividade anti-inflamatória e citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	53
3.7.1.	Cultura celular.....	53
3.7.2.	Determinação da produção de nitritos pelo reagente de Griess.....	54
3.7.3.	Determinação da viabilidade celular pelo ensaio da resazurina.....	54
3.7.4.	Análise estatística.....	55
4.	Resultados e Discussão .....	56
4.1.	Estudos preliminares.....	57
4.1.1.	Rendimento extrativo.....	57
4.1.2.	Pesquisa de fitoconstituintes por TLC.....	58
4.1.2.1.	Flavonóides e ácidos fenólicos.....	60
4.1.2.2.	Taninos.....	62
4.1.2.3.	Triterpenóides.....	62
4.1.2.4.	Saponinas.....	64
4.1.2.5.	Alcalóides.....	65
4.1.2.6.	Benzoxazinóides.....	66
4.1.3.	Perfis cromatográficos dos extratos por HPLC-PDA .....	68
4.1.4.	Determinação da atividade antioxidante .....	76
4.1.4.1.	Análise bio-autográfica.....	76
4.1.4.2.	Atividade antioxidante dos extratos EEP-A e EEt100 de <i>Acanthus mollis</i> .....	79
4.1.5.	Avaliação da atividade anti-inflamatória e citotoxicidade.....	80
4.2.	Fracionamento, composição química e atividade biológica do extrato etanólico (EEt100) .....	83
4.2.1.	HPLC-PDA da Fração 1 .....	85
4.2.2.	Atividade antioxidante e anti-inflamatória da Fração 1 .....	85
4.3.	Preparação e avaliação de um extrato para aplicação industrial .....	87

4.3.1.	Caracterização fitoquímica, por HPLC-PDA e HPLC-PDA-MS <sup>n</sup> do extrato EEt95	87
4.3.2.	Fracionamento dos principais grupos químicos por TLC preparativa .....	95
4.3.2.1.	Perfis cromatográficos das manchas, por HPLC-PDA .....	96
4.3.3.	Atividade antioxidante do extrato.....	99
4.3.4.	Atividade anti-inflamatória e citotoxicidade do extrato EEt95 .....	100
5.	Discussão geral .....	102
6.	Conclusões .....	107
7.	Perspetivas futuras .....	109
8.	Bibliografia .....	111



## Resumo

---

O *Acanthus mollis* é uma planta nativa da região mediterrânea pertencente a uma extensa família (Acanthaceae) que compreende 4300 espécies distribuídas principalmente em regiões tropicais (Rezanka, Rezanka e Sigler, 2009), sendo tradicionalmente usada externamente como cicatrizante de feridas e queimaduras, analgésico e anti-inflamatório, e internamente como diurético, anti-inflamatório e calmante das mucosas do trato digestivo e urinário.

Os estudos sobre a composição fitoquímica são escassos, assim como a comprovação científica da eficácia em patologias referidas na medicina popular. Em face do exposto e considerando o atual interesse na procura de novos produtos de origem natural com atividade terapêutica e destituídos de toxicidade, este trabalho aborda a caracterização fitoquímica e a avaliação do potencial terapêutico do *Acanthus mollis*, com base no estudo das propriedades biológicas que suportem algumas das suas utilizações tradicionais.

Através da combinação de diversos processos extrativos foram obtidos diferentes extratos naturais a partir de folhas de *Acanthus mollis*. Assim, após secagem das folhas, por liofilização, efectuou-se uma extração sequencial, com éter petróleo, clorofórmio, etanol, etanol a 50% e água. Adicionalmente, foram preparados dois extratos aquosos, infusão e decocção. Os extratos obtidos foram analisados recorrendo a técnicas de cromatografia em camada fina para pesquisa de flavonóides, saponinas, triterpenos, alcalóides, taninos e benzoxazinóides. Estes mesmos extratos foram posteriormente analisados por cromatografia líquida de alta resolução com detecção de fotódodos, permitindo detetar a existência de ácidos fenólicos, flavonóides e benzoxazinóides, em quase todos os extratos. A pesquisa de compostos com atividade captadora do radical DPPH nos extratos foi realizada pela técnica bio-autográfica. Os extratos de éter petróleo e etanol exibiram a presença de compostos mais reativos ao DPPH, justificando a avaliação da sua atividade antioxidante. De entre estes, o extrato etanólico foi o que apresentou maior atividade anti-radicalar ( $IC_{50} 20,50 \pm 0,47 \mu\text{g/mL}$ ; TEAC de  $6,90 \pm 0,90 \mu\text{g/mL}$ ).

O potencial anti-inflamatório foi determinado para os 3 extratos aquosos, assim como para o extrato alcoólico e hidroalcoólico, usando macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS. O infuso e o extrato etanólico exibiram maior capacidade inibitória do mediador inflamatório NO, sem evidenciar citotoxicidade nas concentrações eficazes.

A maior atividade antioxidante e anti-inflamatória do extrato etanólico, evidenciada nos estudos preliminares, orientou este trabalho para uma posterior identificação de fitoconstituintes eventualmente responsáveis por essas bioatividades. Conseqüentemente, procedeu-se ao fracionamento deste extrato por recurso à cromatografia líquida "Flash", em fase reversa. As frações obtidas foram monitorizadas por HPLC-PDA tendo sido selecionada uma fração contendo benzoxazinóides para a determinação da atividade antioxidante e anti-inflamatória. Esta fração evidenciou uma atividade antioxidante ( $IC_{50}$  de  $163,02 \pm 3,04 \mu\text{g/mL}$ ; TEAC de  $79,33 \pm 0,99$ ) inferior à do extrato etanólico, tendo no entanto exibido uma elevada atividade anti-inflamatória em macrófagos RAW 264.7 estimulados pelo LPS ( $IC_{50}$  de  $32,32 \mu\text{g/mL}$ ), sem citotoxicidade. Estes resultados sugerem que estes fitoconstituintes podem ser em parte responsáveis pela atividade anti-inflamatória que tradicionalmente se atribui a *A. mollis*.

Neste estudo o *Acanthus mollis* revelou ser uma boa fonte de compostos bioativos com potencial antioxidante e anti-inflamatório para a indústria farmacêutica. Nesta perspectiva procurou-se aplicar um processo extrativo que fosse industrialmente mais viável, utilizando-se a extração com etanol a 95%, diretamente da planta seca. Este método demonstrou ser eficiente na extração dos derivados benzoxazinóides (glicósidos do DIBOA) e de fenilpropanóides (verbascósido e seus derivados), identificados por TLC, HPLC-PDA e HPLC-PDA-MS<sup>n</sup>. O extrato evidenciou uma boa atividade captadora do radical DPPH ( $IC_{50}$   $40,00 \pm 1,59 \mu\text{g/mL}$ ; TEAC  $23,54 \pm 1,10$ ) e do anião superóxido ( $IC_{50}$  de  $29,42 \pm 1,99 \mu\text{g/mL}$ ) e baixa atividade captadora para o radical hidroxilo. O extrato apresentou também atividade anti-inflamatória em culturas de macrófagos RAW 264.7 estimuladas pelo LPS, com um  $IC_{50}$  deste extrato de 28,01

$\mu\text{g/mL}$ , superior à atividade do extrato etanólico resultante da extração sequenciada ( $\text{IC}_{50}$  48,31  $\mu\text{g/mL}$ ), sem evidenciar citotoxicidade apreciável.

Dos resultados obtidos infere-se que um extrato alcoólico de *Acanthus mollis* pode constituir uma importante fonte de fitoconstituintes bioativos, com importante potencial na prevenção e/ou tratamento de patologias associadas a processos oxidativos e inflamatórios.

**Palavras-chave:** *Acanthus mollis*, benzoxazinóides, fenilpropanóides, atividade antioxidante, atividade anti-inflamatória.

## Abstract

---

The *Acanthus mollis* is a plant native to the Mediterranean region that belongs to an extended family (Acanthaceae) comprising 4300 species distributed mainly in tropical regions, being traditionally used externally as healing of wounds and burns, analgesic and anti-inflammatory and internally as a diuretic, anti-inflammatory and soothing mucosa of the digestive and urinary tract.

Studies on the phytochemical composition are scarce, and the scientific evidence of efficacy in diseases mentioned in folk medicine. In view of the above and considering the current interest in the search for new natural products with therapeutic activity and devoid of toxicity, the proposed work aims to address the phytochemical characterization and evaluation of the therapeutic potential of *Acanthus mollis*, based on the study of biological properties that support traditional uses.

By combining various extractive processes, different natural extracts were obtained from the leaves of *Acanthus mollis*. Thus, after drying the leaves by lyophilization, a sequential extraction was carried out with petroleum ether, chloroform, ethanol, 50% ethanol and water. Additionally, two aqueous extracts, infusion and decoction were prepared. The extracts were analyzed using thin layer chromatography techniques for searching flavonoids, saponins, triterpenes, alkaloids, tannins and benzoxazinoids. The same extracts were subsequently analyzed using high resolution liquid chromatography with photodiode array detection, allowing to detect the existence of phenolic acids, flavonoids and benzoxazinoids in almost all the extracts. The search for compounds with DPPH scavenging activity in the extracts was performed by bio-autographic technique. The petroleum ether and ethanol extracts showed the presence of more reactive compounds to DPPH, justifying the posterior evaluation of their antioxidant activity. Among these, the ethanol extract showed the highest scavenging activity ( $IC_{50}$  20,50  $\pm$  0,47  $\mu$ g/mL; TEAC of 6,90  $\pm$  0,90  $\mu$ g/mL).

The anti-inflammatory potential was determined for the three aqueous extracts, as well for the alcoholic and hydroalcoholic extracts, using RAW 264.7 macrophages stimulated with LPS. The infusion and ethanol extract exhibited higher inhibitory

capacity of the inflammatory mediator NO, with no evidence of cytotoxicity in effective concentrations.

The highest antioxidant and anti-inflammatory activity of the ethanol extract, shown in preliminary studies, oriented this work for later identification of phytochemicals, possibly responsible for these bioactivities. Consequently, this extract was fractionated using reversed phase liquid "Flash" chromatography. The obtained fractions were monitored by HPLC-PDA having been selected a fraction containing benzoxazinoids to determine the antioxidant and anti-inflammatory activity. This fraction showed an antioxidant activity ( $IC_{50}$  of  $163,02 \pm 3,04 \mu\text{g/mL}$ ; TEAC of  $79,33 \pm 0,99$ ) lower than the ethanol extract, but nevertheless displayed a high anti-inflammatory activity in RAW 264.7 macrophages stimulated by LPS ( $IC_{50}$   $32,32 \mu\text{g/mL}$ ) without cytotoxicity. These results suggest that these phytochemicals may be partly responsible for the anti-inflammatory activity that traditionally attributed to *A. mollis*.

In this study the *Acanthus mollis* proved to be a good source of bioactive compounds with antioxidant and anti-inflammatory potential for the pharmaceutical industry. In this perspective we tried to apply an extraction process that would be more industrially feasible, using extraction with 95% ethanol, directly from the dried plant. This method proved to be efficient extracting benzoxazinoid derivatives (DIBOA glycosides) and phenylpropanoids (verbascosid and its derivatives), identified by TLC, HPLC-PDA and HPLC-PDA-MS<sup>n</sup>. The extract showed a good scavenging activity for DPPH ( $IC_{50}$   $40,00 \pm 1,59 \mu\text{g/mL}$ ; TEAC  $23,54 \pm 1,10$ ) and superoxide anion ( $IC_{50}$  of  $29,42 \pm 1,99 \mu\text{g/mL}$ ) and low activity for scavenging hydroxyl radical. The extract also showed anti-inflammatory activity in RAW 264.7 macrophage cultures stimulated by LPS, with an  $IC_{50}$  of  $28,01 \mu\text{g/mL}$ , greater than the activity of the ethanolic extract resulting from sequential extraction ( $IC_{50}$   $48,31 \mu\text{g/mL}$ ) without evidencing significant cytotoxicity.

From the results obtained it appears that an alcoholic extract of *Acanthus mollis* could be an important source of bioactive phytochemicals, with significant potential in the prevention and/or treatment of diseases associated with oxidative and inflammatory processes.

**Keywords:** *Acanthus mollis*, benzoxazinoids, phenylpropanoids, antioxidant activity, anti-inflammatory activity.

## Lista de abreviaturas

---

ADN	Ácido desoxirribonucléico
AP-1	Proteína ativadora 1
AS	Reagente anisaldeído-ácido sulfúrico
BOA	2-benzoxazolinona
CF	Cloreto de ferro (III)
D	Reagente de Dragendorff
DIBOA	2,4-dihidroxi-(2 <i>H</i> )-1,4-benzoxazin-3(4 <i>H</i> )-ona
DIBOA-Glc	2- $\beta$ -D-glucopiranosiloxi-4-hidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona
DIMBOA	2,4-dihidroxi-7-metoxi-(2 <i>H</i> )-1,4-benzoxazin-3(4 <i>H</i> )-ona
DIMBOA-Glc	2- $\beta$ -D-glucopiranosiloxi-4- hidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona
DMACA	<i>p</i> -dimetilaminocinamaldeído
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EC	Extrato de clorofórmio
ED	Extrato obtido por decocção
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EEP	Extrato de éter de petróleo
EEP-A	1ª extração com éter de petróleo
EEt100	Extrato de etanol absoluto
EEt50	Extrato de etanol a 50%
EEt95	Extrato de etanol a 95%
EH <sub>2</sub> O	Extrato de água
EI	Extrato obtido por infusão
ESI	Ionização por electrospray
HBOA	2-hidroxi-(2 <i>H</i> )-1,4-benzoxazin-3(4 <i>H</i> )-ona
HBOA-Glc	2- $\beta$ -D-glucopiranosil-(2 <i>H</i> )-1,4-benzoxazin-3(4 <i>H</i> )-ona
HMBOA	2-hidroxi-7-metoxi-(2 <i>H</i> )-1,4-benzoxazin-3(4 <i>H</i> )-ona
HMBOA-Glc	2- $\beta$ -D-glucopiranosiloxi-7-metoxi-1,4- benzoxazin-3-ona
HPLC	Cromatografia líquida de alta resolução
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória a 50%
LB	Reagente de Liebermann-Burchard



LPS	Lipopolissacarídeo
LTB4	Leucotrieno B4
<i>m/z</i>	Razão entre a massa e a carga do ião
MBOA	6-metoxi-2-benzoxazolinona
NBT	Azul de nitrotetrazólio
NO	Monóxido de azoto
NOS	Enzima óxido nítrico síntase
NP-PEG	Natural products-polythyleneglycol reagent
PAL	Enzima fenilalaninaamoniase
PM	Peso molecular
PTLC	Cromatografia em camada fina preparativa
Rf	Fator de retenção
<i>sh</i>	do inglês, <i>shoulder</i>
TEAC	Ensaio da atividade antioxidante equivalente ao Trolox
TLC	Cromatografia em camada fina
tR	Tempo de retenção
Trolox	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2
TXB2	Tromboxano B2
ua	Unidades arbitrárias
u.m.a.	Unidades de massa atômica
UV/Vis	Ultravioleta/Visível
VS	Reagente vanilina-ácido sulfúrico

## Índice de figuras

---

Figura 1 – Via do ácido chiquímico para biossíntese dos fenilpropanóides .....	28
Figura 2 – Biossíntese dos benzoxazinóides .....	31
Figura 3 – Fotografia de <i>Acanthus mollis</i> (L.) .....	34
Figura 4 – Esquema ilustrativo da redução da resazurina a resofurina por células vivas .....	54
Figura 5 – Coloração das extrações com éter de petróleo. ....	57
Figura 6 – Detecção da presença de ácidos fenólicos e flavonóides nos extratos, por TLC. ....	61
Figura 7 – Detecção da presença de triterpenos nos extratos, por TLC.....	63
Figura 8 – Detecção de saponinas nos extratos, por TLC.....	64
Figura 9 – Detecção da presença de alcalóides nos extratos EEP-A e EEt100, por TLC.. ....	66
Figura 10 – Pesquisa de benzoxazinóides nos extratos, por TLC. ....	67
Figura 11 – Extrato EEP-A antes e após revelação com CF (sistema 6). ....	68
Figura 12 – Exemplos de espectros de UV-Vis dos compostos presentes nos extratos de <i>Acanthus mollis</i> , obtidos por HPLC-PDA (sistema 7 e sistema 8).....	69
Figura 13 – Cromatogramas dos extratos EEP-A, EC e EEt100 das folhas de <i>Acanthus mollis</i> obtidos por HPLC-PDA (sistema7).....	70
Figura 14 – Cromatogramas dos extratos EEP-A, EC, EEt100, ED e EI de <i>Acanthus mollis</i> obtidos por HPLC-PDA (sistema 8).....	73
Figura 15 – Detecção da presença de compostos antioxidantes, por TLC.....	78
Figura 16 – Efeito dos extratos EI, ED, EEt100, EEt50 e EH <sub>2</sub> O de <i>Acanthus mollis</i> na inibição da produção de nitritos em células de macrófagos RAW 264.7.....	81
Figura 17 – Cromatogramas das frações obtidas por Cromatografia Flash do extrato EEt100, analisadas por HPLC-PDA (sistema 7).....	84
Figura 18 – Cromatogramas da F1 do extrato EEt100 das folhas de <i>Acanthus mollis</i> obtidos por HPLC-PDA (sistema 8).....	85
Figura 19 – Efeito da Fração 1 do extrato EEt100 de <i>Acanthus mollis</i> na inibição da produção de nitritos em células de macrófagos RAW 264.7.....	86
Figura 20 – Cromatograma do extrato EEt95 das folhas de <i>Acanthus mollis</i> obtido por HPLC-PDA (sistema 7). ....	88
Figura 21 – Cromatograma do extrato EEt95 das folhas de <i>Acanthus mollis</i> obtido por HPLC-PDA (sistema 8). ....	89
Figura 22 – Perfil cromatográfico do extrato EEt95 obtido no HPLC-PDA Surveyor e registrado a 280 nm (sistema 9).....	91

Figura 23 – Perfil cromatográfico do extrato ET95 obtido por HPLC-PDA e registado a 280 nm (sistema 10).....	92
Figura 24 – Estruturas químicas do verbascósido e do seu isómero isoverbascósido	94
Figura 25 – Possível fragmentação do acteósido.....	94
Figura 26 – TLC preparativa do extrato EEt95 (sistema 6).....	96
Figura 27 – Cromatograma da mancha M1 do extrato EEt95 das folhas de <i>Acanthus mollis</i> obtido por HPLC-PDA (sistema 8).....	97
Figura 28 – Cromatograma da mancha M2 do extrato EEt95 das folhas de <i>Acanthus mollis</i> obtido por HPLC-PDA (sistema 8).....	99
Figura 29 – Efeito do extrato EEt95 de <i>Acanthus mollis</i> na inibição da produção de nitritos em células de macrófagos RAW 264.7.....	100

## Índice de tabelas

---

Tabela 1 – Atividades e fitoconstituintes presentes em espécies do género <i>Acanthus</i> . .....	22
Tabela 2 – Estrutura química de alguns glicósidos fenilpropanóides presentes em plantas do género <i>Acanthus</i> . .....	29
Tabela 3 – Estruturas químicas dos benzoxazinóides conhecidos. ....	30
Tabela 4 – Propriedades farmacológicas de benzoxazinóides.....	32
Tabela 5 – Classificação Botânica .....	33
Tabela 6 – Compostos fixos identificados em <i>Acanthus mollis</i> .....	36
Tabela 7 – Condições utilizadas no Sistema 7.....	47
Tabela 8 – Condições utilizadas no Sistema 8.....	48
Tabela 9 – Condições utilizadas na análise por HPLC-PDA-ESI/MS <sup>n</sup> (Sistema 9). .....	49
Tabela 10 – Condições utilizadas na análise por HPLC-PDA-ESI/MS <sup>n</sup> (Sistema 10). ....	50
Tabela 11 – Condições de fracionamento e frações obtidas da Cromatografia Flash. 51	
Tabela 12 – Matéria seca das folhas de <i>Acanthus mollis</i> e rendimento dos extratos.. 58	
Tabela 13 – Comportamento dos fitoconstituintes dos diversos extratos para os diferentes reveladores.....	59
Tabela 14 – Tentativa de identificação da classe de compostos presentes nos extratos EEP-A, EC e EEt100, no sistema 7. ....	71
Tabela 15 – Tentativa de identificação da classe de compostos presentes nos extratos EEt100, EEt50, EH <sub>2</sub> O, ED e EI.....	74
Tabela 16 – Atividade antioxidante de extratos EEP-A e EEt100 de <i>Acanthus mollis</i> ... 79	
Tabela 17 – Efeito dos diferentes extratos na viabilidade de macrófagos (ensaio da resazurina).....	82
Tabela 18 – Tentativa de identificação das classes de compostos presentes no extrato de etanol 95% de <i>Acanthus mollis</i> (sistema 7). ....	88
Tabela 19 – Tentativa de identificação das classes de compostos presentes no extrato de etanol 95% de <i>Acanthus mollis</i> (sistema 8). ....	90
Tabela 20 – Compostos fenólicos identificados em EEt95 por HPLC-PDA-ESI/MS <sup>n</sup> (sistema 10). ....	93
Tabela 21 – Tentativa de identificação da classe de compostos presentes na mancha M1 do extrato de etanol 95% de <i>Acanthus mollis</i> (sistema 8). ....	98
Tabela 22 – Tentativa de identificação da classe de compostos presentes na mancha M2 do extrato de etanol 95% de <i>Acanthus mollis</i> (sistema 8). ....	99

# **1. Introdução**

---

### 1.1. O género *Acanthus* (espécies, distribuição geográfica e usos medicinais)

*Acanthaceae* é uma família numerosa com cerca de 4000 espécies pertencentes a aproximadamente 300 géneros (Sharma *et al.*, 2015). Um destes géneros é o *Acanthus*, que inclui mais de 50 espécies, distribuídas pela Ásia, África e Mediterrâneo, sendo que a maioria dessas espécies é terrestre e cresce de forma selvagem. Muitas destas espécies, entre as quais a africana e chinesa, têm sido utilizadas na medicina tradicional, em várias afeções ou patologias como inflamações, hepatites, gastralgias, tumores, linfomas, hepatopatias ou asma, entre outras (Asongalem *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2014; Huo *et al.*, 2008; Kiem, Van *et al.*, 2008; Nana *et al.*, 2008; Okoli *et al.*, 2008; Phisalaphong, NTT e Siripong, 2006).

O género *Acanthus* é particular, por incluir simultaneamente espécies terrestres e espécies de mangal (Yang *et al.*, 2015). De entre as espécies de mangal, o *Acanthus ilicifolius* é aquela sobre a qual existem mais estudos etnomédicos, etnofarmacológicos e fitoquímicos (Tabela 1).

O *Acanthus ilicifolius* apresenta vários usos medicinais em diversos locais do mundo, dos quais se destacam a asma, reumatismo, tosse, mordeduras de ofídios, gastralgias, psoríase, esplenomegalia e linfedema (Babu, Shylesh e Padikkala, 2001; Bose e Bose, 2008; Wai *et al.*, 2015; Wei *et al.*, 2015). Muitos foram os compostos já descritos nesta planta, entre os quais, flavonóides, terpenos, alcalóides, glicósidos de ligninas, glicósidos benzoxazonóides, glicósidos feniletanóides, triterpenóides, terpenóides, esteróides, ácidos alifáticos, fitosteróis, derivados glicosilados do megastigmano, benzoxazinonas, saponinas, derivados do ácido cumárico, entre outros.

Vários extratos de *A. ilicifolius* de diferentes partes da planta apresentam atividade anti inflamatória (Senthil Kumar *et al.*, 2008, 2012; Wai *et al.*, 2015), analgésica (Babu, Shylesh e Padikkala, 2001; Senthil Kumar *et al.*, 2008; Wai *et al.*, 2015), antioxidante (Firdaus, Prihanto e Nurdiani, 2013), anticarcinogénica (Babu, Shylesh e Padikkala, 2002; Chakraborty *et al.*, 2007), antimicrobiana (Bose e Bose, 2008; Ganesh e Vennila, 2010; Ravikumar, Raja e Gnanadesigan, 2012) e anti-ulcerosa (Senthil Kumar *et al.*, 2012). Os fitoquímicos presentes nas suas folhas têm exibido várias atividades

em diversos estudos, nomeadamente osteoblástica (Kiem, Van *et al.*, 2008), antioxidante (Babu, Shylesh e Padikkala, 2001; Thirunavuk *et al.*, 2011), hepatoprotetora (Babu, Shylesh e Padikkala, 2001; Wei *et al.*, 2015) e antitumoral (Babu, Shylesh e Padikkala, 2002).

As atividades anticonvulsiva, hipnótica e relaxante muscular, têm sido atribuídas à presença de benzoxazolinonas (Sam e Plampin, 1964; Sam e Valentine, 1969). Segundo Kapil e colaboradores (1994), o composto 2-benzoxazolinona, isolado a partir das folhas de *Acanthus ilicifolius*, demonstrou atividade leishmanicida contra *Leishmania donovani* (Babu, Shylesh e Padikkala, 2001).

A espécie *A. ebracteatus* é igualmente uma espécie de mangal, distribuída no Sudeste Asiático e utilizada no tratamento de diversas doenças (Hokputsa *et al.*, 2004). "*Sea Holly*", o seu nome em inglês, também conhecida como azevinho do mar, é uma planta medicinal utilizada na Malásia, Tailândia e China, para tratamento de febre, doenças respiratórias, asma, tosse, hepatites, linfomas, doenças de pele, artrites, paralisias e hepatoesplenomegalia (Boonsaner e Hawker, 2012; Hokputsa *et al.*, 2004; Koschella *et al.*, 2008; Sittiwet, Niamsa e Puangpronp, 2009). As suas raízes são muitas vezes utilizadas sob a forma de cataplasmas em feridas, mordeduras de ofídios e tratamento de infeções por *Herpes zoster* (Somchaichana, Bunaprasert e Patumraj, 2012).

A sua composição química inclui polissacarídeos, linhanos, alcalóides, glicósidos fenólicos, triterpenóides, esteróis, glicósidos alifáticos, aminoácidos (Kanchanapoom *et al.*, 2001c; Mahasiripanth *et al.*, 2012).

Os diversos estudos realizados sobre esta planta evidenciaram várias atividades farmacológicas, tais como, antimicrobiana, antimutagénica, anticancerígena, anti-inflamatória, antioxidante, hepatoprotetora, imunoestimulante (Babu, Shylesh e Padikkala, 2001, 2002; Koschella *et al.*, 2008; Laupattarakasem *et al.*, 2003; Sittiwet, Niamsa e Puangpronp, 2009). Os efeitos anti-inflamatórios foram verificados no extrato aquoso, pela redução do tromboxano B2 (TXB2) e leucotrieno B4 (LTB4) (Laupattarakasem *et al.*, 2003). O extrato aquoso demonstrou atividade antibacteriana e antioxidante (Somchaichana, Bunaprasert e Patumraj, 2012). Um dos seus compostos



bioativos, o  $\beta$ -sitosterol, possui atividade angiogénica semelhante ao *Aloe vera* (Moon *et al.*, 1999). Este mesmo composto, assim como estigmasterol, lupeol e benzoxazolin-2-ona, podem ser responsáveis pelos efeitos citotóxicos do *A. ebracteatus* em diferentes tipos de cancro (Mahasiripanth *et al.*, 2012). Foi também relatado que extratos orgânicos possuem propriedades antimutagénicas e antitumorais, enquanto os extratos aquosos inibem a síntese dos eicosanóides (Hokputsa *et al.*, 2004). Os extractos de etanol a 80%, obtidos dos caules do *Acanthus ebracteatus*, apresentaram efeitos imunoestimulantes, devido à presença de polissacarídeos neutros ou acídicos (Hokputsa *et al.*, 2004).

Alguns destes compostos estão presentes em outras espécies do género *Acanthus*, apresentando propriedades semelhantes.

A *Acanthus mollis* é outra espécie pertencente ao género *Acanthus*, que tem sido usada tradicionalmente, por via externa, como cicatrizante de feridas e queimaduras, analgésico e anti-inflamatório, e internamente como diurético, anti-inflamatório e calmante das mucosas do trato digestivo e urinário (Rivera e Obón, 1995). Neste caso verifica-se, uma escassez de estudos fitoquímicos e farmacológicos, não estando por isso devidamente validada a sua utilização tradicional, nem identificados os compostos responsáveis pelos usos etnomédicos. Por este facto, e em virtude da sua frequente utilização na medicina tradicional, justifica-se o estudo da sua composição química e do seu potencial farmacológico de modo a fundamentar devidamente o seu uso tradicional.

**Tabela 1** – Atividades e fitoconstituintes presentes em espécies do género *Acanthus*.

	<b>Atividades</b>	<b>Extrato e parte da planta</b>	<b>Compostos identificados</b>	<b>Referência</b>
	Antioxidante e hepatoprotetora	Extrato alcoólico das folhas	Flavonóides; terpenos	Babu <i>et al.</i> , 2001
<b>A. ilicifolius</b>	Anticarcinogénica	Extrato alcoólico das folhas		Babu, Shylesh e Padikkala, 2002
	Citotóxica e antioxidante	Extrato metanólico das flores	Terpenóides; compostos fenólicos; alcalóides	Firdaus, Prihanto e Nurdiani, 2013

**Tabela 1** – Atividades e fitoconstituintes presentes em espécies do género *Acanthus* (continuação).

Atividades	Extrato e parte da planta	Compostos identificados	Referência
Anti-inflamatória	Extrato de éter de petróleo das folhas		Senthil Kumar <i>et al.</i> , 2008
	Extrato alcoólico das partes aéreas	HBOA-Glc; DIBOA-Glc	Yin <i>et al.</i> , 2008
	Extrato alcoólico das raízes	Benzoxazinonas	Huo <i>et al.</i> , 2005
	Extrato alcoólico das raízes	5,11-Epoximegastigmano glucósido; (6S,9S)-Roseósido	Huo <i>et al.</i> , 2008
Antibacteriana	Frações de <i>n</i> -hexano, benzeno, clorofórmio, acetona, etanol e água, das folhas	6-hidroxi-benzoxazolinona; ácido (Z)-4-cumárico 4- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopiranosídeo; 3,5-dimetil-4-hidroxi benzoato	Ravikumar, Raja e Gnanadesigan, 2012
<b>A.</b> <b><i>ilicifolius</i></b>	Tratamento da fibrose hepática	4-hidroxi-2-benzoxazolona (HBOA); 4-acetoxi-2-benzoxazolona; 3-acetil-4-acetoxi-2-benzoxazolona	Wai <i>et al.</i> , 2015
Anticancerígena	Extrato aquoso das folhas		Chakraborty <i>et al.</i> , 2007
	Extrato metanólico das partes aéreas	Glucósidos de linhanos	Kanchanapoom <i>et al.</i> , 2001a
Anti-ulcerosa e anti-inflamatória	Extrato de éter de petróleo das folhas		Senthil Kumar <i>et al.</i> , 2012
	Extrato alcoólico das partes aéreas	Glucósidos do megastigmano; flavona glicosilada	Wu <i>et al.</i> , 2003b
Cancro colo-retal	Extrato alcoólico das folhas		Almagrami <i>et al.</i> , 2014

**Tabela 1** – Atividades e fitoconstituintes presentes em espécies do género *Acanthus* (continuação).

Atividades	Extrato e parte da planta	Compostos identificados	Referência	
<b>A.</b> <b><i>ilicifolius</i></b>	Extrato alcoólico das partes aéreas	Ácido siríngico; vomifoliol; ácido vanílico; 6-hidroxi-2-benzoxazolinona; 2-benzoxazolinona	Wang <i>et al.</i> , 2015	
	Extrato metanólico das partes aéreas	Benzoxazinóides glucolisados (HBOA-Glc; DIBOA-Glc; DHBOA-Glc); ácido siríngico $\beta$ -glucopiranosil; 2,6-dimetoxi- <i>p</i> -hidroquinona 1- <i>O</i> - $\beta$ -glucopiranosido	Kanchanapoom <i>et al.</i> , 2001b	
	Osteoporose	Extrato metanólico das folhas	Acancifoliósido; acteósido; isoacteósido; acantaminósido; (+)-lioniresinol 3a- <i>O</i> - $\beta$ -glucopiranosido; (-)-lioniresinol; $\alpha$ -amirina	Kiem, Van <i>et al.</i> , 2008
		Extrato alcoólico das partes aéreas	Álcoois alifáticos; glicósidos do ácido cumárico	Wu <i>et al.</i> , 2003a
		Extrato metanólico das raízes	2-benzoxazolinona; 2-hidroxi-2H-1,4-benzoxazina-3(4H)-ona; (2R)-2- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopiranosil-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona; (2R)-2- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopiranosil-4-hidroxi-2H-1,4-benzoxazina-3(4H)-one; (2R)-2- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopiranosil-7-hidroxi-2H-1,4-benzoxazina-3(4H)-ona; lionósido; 3'-metoxi-luteolina-7- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopiranosido; $\beta$ -sitosterol-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopiranosido; estigmasterol octadecanoate; $\beta$ -sitosterol octadecanoate; estigmasterol-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopiranosido	Huang <i>et al.</i> , 2014

**Tabela 1** – Atividades e fitoconstituintes presentes em espécies do género *Acanthus* (continuação).

	<b>Atividades</b>	<b>Extrato e parte da planta</b>	<b>Compostos identificados</b>	<b>Referência</b>
<b>A. ilicifolius</b>	Hepatoprotector	Extrato alcoólico das folhas		Wei <i>et al.</i> , 2015
	Antioxidante e anti-radicalar	Extrato de éter de petróleo das folhas		Thirunavuk <i>et al.</i> , 2011
<b>A. ebracteatus</b>	Efeitos imuno-estimulantes	Extrato aquoso dos caules	Polissacarídeos contendo galactose; 3-O-metilgalactose; arabinose; ácido galacturónico; ramnose; arabinose	Hokputsa <i>et al.</i> , 2004
	Antitumoral	Extrato metanólico das folhas		Murakami <i>et al.</i> , 1993
	Anti-inflamatória, por inibição da síntese dos eicosanóides	Extrato aquoso das folhas		Laupattarakase <i>m et al.</i> , 2003
		Extrato metanólico das partes aéreas	Ebracteatósido A; ebracteatósidos B–D; benzoxazinóides; fenilpropanóides; benzoxazinóides glucosilados; plucheósido B; alangionósido C; prenaionósido; zizibeósido I; leucosceptósido A; martinósido; $\beta$ -hidroxiacteósido; vicenina-2; schaftósido; luteolina-7-O- $\beta$ -D-glucurónido; apigenin-7-O- $\beta$ -D-glucurónido; (+)-Lioniresinol 3 $\alpha$ -O- $\beta$ -D-glucopiranósido; (-)-Lioniresinol 3 $\alpha$ -O- $\beta$ -D-glucopiranósido; (8R, 7'S, 8'R)-5,5'-dimetoxilariciresinol 4'-O- $\beta$ -D-glucopiranósido; magnolenina C; (+)-Siringaresinol-4-O- $\beta$ -D-apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-glucopiranósido	Kanchanapoom <i>et al.</i> , 2001c

**Tabela 1** – Atividades e fitoconstituintes presentes em espécies do género *Acanthus* (continuação).

	<b>Atividades</b>	<b>Extrato e parte da planta</b>	<b>Compostos identificados</b>	<b>Referência</b>
<b>A. ebracteatus</b>	Antimicrobiana	Extrato aquoso das partes aéreas		Sittiwet, Niamsa e Puangpronp, 2009
	Cicatrizante	Extrato alcoólico do caule		Somchaichana, Bunaprasert e Patumraj, 2012
	Antimutagénica			Rojanapo W, Tepsuwan A e Siripong P., 1990
<b>A. hirsutus</b>	Citotóxico Antiradicalar	Extrato Aquoso	Glucósidos linhano; benzoxazinóides; glicósidos feniletanóides; glucósidos fenilpropanóides	Harput <i>et al.</i> , 2011
			Glicósido hirsutusóide; glicósidos	Capanlar <i>et al.</i> , 2010
<b>A. montanus</b>	Analgésica	Extrato metanólico das folhas		Adeyemi, Okpo e Okpaka, 2004
	Relaxante muscular	Extrato metanólico das folhas		Adeyemi, Okpo e Young-Nwafor, 1999
	Anti-inflamatório, analgésico e antipirético	Extrato aquoso das folhas	Alcalóides; saponinas; taninos; fenóis	Asongalem <i>et al.</i> , 2004
		Extrato metanol / diclorometano (1: 1) das folhas	$\beta$ -Sitosterol	Nana <i>et al.</i> , 2008
	Antimicrobiana e anti-inflamatória	Extrato aquoso das raízes	Alcalóides; carboidratos	Okoli <i>et al.</i> , 2008
	Relaxante muscular	Extrato metanólico das folhas		Adeyemi, Mgbeokwere e Okpo, 2012
	Hipoglicemiante	Extrato metanólico	Alcalóides; terpenóides; glicósidos; flavonóides	Ukwe e Ubaka, 2011
	Inseticida	Extrato alcoólico das partes aéreas	$\beta$ -sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glicósido; linarósido; acetósido	Amin <i>et al.</i> , 2012

**Tabela 1** – Atividades e fitoconstituintes presentes em espécies do género *Acanthus* (continuação).

	<b>Atividades</b>	<b>Extrato e parte da planta</b>	<b>Compostos identificados</b>	<b>Referência</b>
			Triterpenóides pentacíclicos	Anam, 1997
			Acantusol; acantusol-3 $\beta$ -glucósido	Anam, 1997
<b>A. montanus</b>		Extrato metanólico das partes aéreas	Acanmontanósido; feniletanóides glicósidos; benzoxazinóides glucósidos; álcoois alifáticos glicósidos	Noiarsa, Ruchirawat e Kanchanapoom, 2010
	Anti-helmíntico <i>in vitro</i>	Extrato aquoso das folhas		Adamu, Oshadu e Ogbaje, 2010
<b>A. arboreus</b>		Extrato alcoólico	Alcalóides; apigenina; 7-O- $\beta$ -D(6"-trans-p-Cumaroil)3"-O-glicopiranósido apigenina; ácido vanílico; lupeol; estigmasterol; 3- $\beta$ -glicopiranósido sitosterol	Amer <i>et al.</i> , 2004
<b>A. spinosus</b>		Extrato Aquoso da raiz ou da folha	DIBOA	Pratt, Kumar e Chilton, 1995

### 1.1.1. Fenilpropanóides do género *Acanthus*

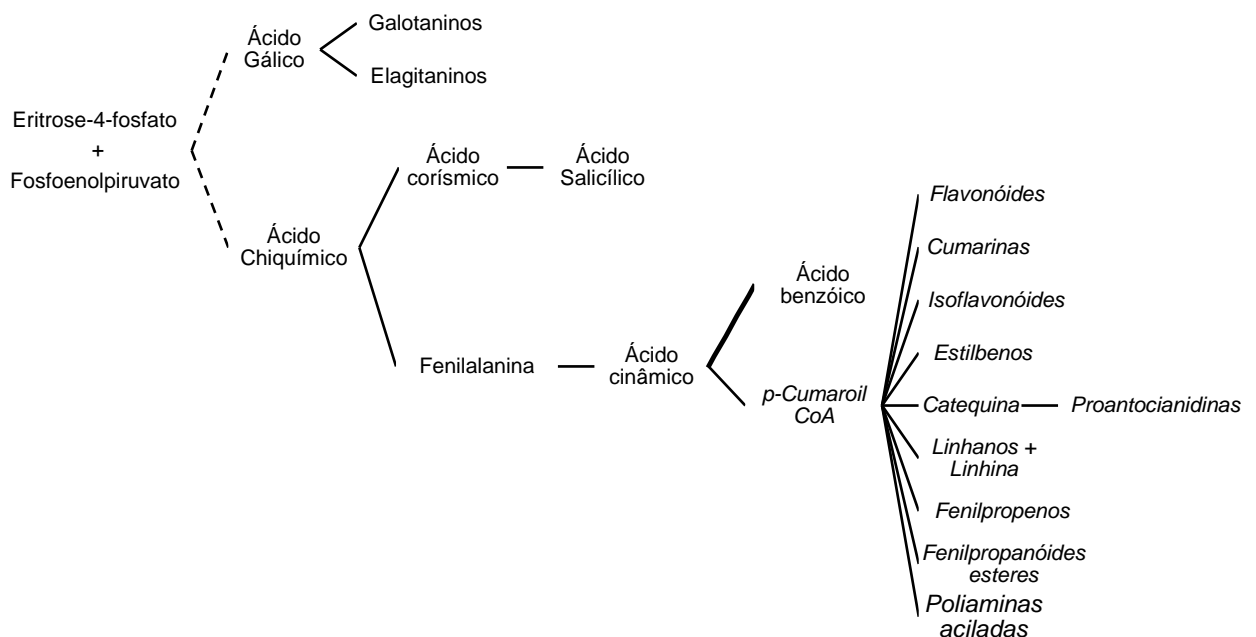
Tal como descrito na tabela, diversas espécies do género *Acanthus* possuem fenilpropanóides. No extrato metanólico das folhas do *A. ilicifolius*, foram descobertos, por exemplo, acteósido e isoacteósido, tendo sido relacionados com a prevenção da osteoporose (Kiem, Van *et al.*, 2008). Estes fenilpropanóides foram também descobertos na espécie *A. ebracteatus*, juntamente com o leucosceptósido A e martinósido (Kanchanapoom *et al.*, 2001). Em 2011, Harput e colaboradores verificaram que o acteósido apresentava atividade antiradicalar, possuindo no entanto toxicidade seletiva para células tumorais.

Os fenilpropanóides e os seus derivados são compostos fenólicos muito representativos, estando presentes em quase todas as plantas. Este grupo apresenta

várias estruturas com diferentes graus de hidroxilação e/ou metilação, e cujas funções biológicas são dependentes do número e da orientação dos grupos substituintes (Korkina, 2007).

A biossíntese dos fenilpropanóides inicia-se com a desaminação da fenilalanina, em presença da PAL (fenilalanina amónio liase), formando-se o ácido cinâmico (Korkina, 2007), como podemos observar na figura 1. Subsequentemente, e por hidroxilação do ácido cinâmico, obtém-se, os ácidos hidroxicinâmicos que são normalmente esterificados com açúcares, ácidos orgânicos e lípidos. O ácido cafeico é o principal ácido fenólico, derivado biossinteticamente da via do ácido chiquímico (Vogt, 2010).

**Figura 1** – Via do ácido chiquímico para biossíntese dos fenilpropanóides (adaptado de Vogt, 2010).

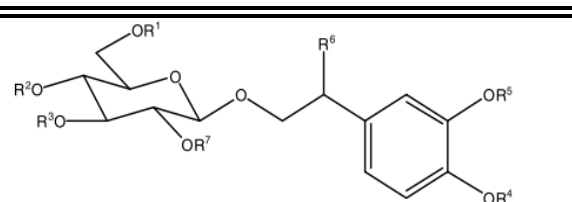


Diferentes fenilpropanóides têm sido identificados em diversas plantas (Tabela 2). A atividade antitumoral tem sido explicada por vários mecanismos, desde a inibição da telomerase e encurtamento do comprimento de telómeros nestas células, efeito sobre diversas enzimas e citocinas, bem como pela sua ação antioxidante /anti-radicalar e reparação rápida de ADN danificado. Outras atividades incluem a anti-viral, antibacteriana, anti-inflamatória, anti-agregante plaquetar, anti-hipertensora,



hepatoprotetora, imunossupressora, anti-aterosclerose, neuroprotetora e analgésica (Pan *et al.*, 2003).

**Tabela 2** – Estrutura química de alguns glicósidos fenilpropanóides presentes em plantas do género *Acanthus* (adaptado de Pan *et al.*, 2003).



	<b>R<sup>1</sup></b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>R<sup>3</sup></b>	<b>R<sup>4</sup></b>	<b>R<sup>5</sup></b>	<b>R<sup>6</sup></b>	<b>R<sup>7</sup></b>
<b>Acteósido (Verbascosido)</b>	H	caf	$\alpha$ -L-rma	H	H	H	H
<b>Isoacteósido (Isoverbascosido)</b>	caf	H	$\alpha$ -L-rma	H	H	H	H
<b>2'-Acetilacteósido</b>	H	caf	$\alpha$ -L-rma	H	H	H	Ac
<b>Leucosceptósido A</b>	H	fer	$\alpha$ -L-rma	H	H	H	H
<b>Martinósido</b>	H	fer	$\alpha$ -L-rma	CH <sub>3</sub>	H	H	H

**caf = cafeoil; fer = feruloil; ram = ramnosil; glu = glucosil**

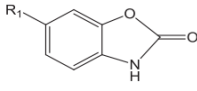
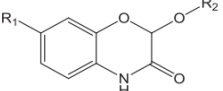
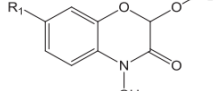
### 1.1.2. Benzoxazinóides

Assim como os fenilpropanóides, também os benzoxazinóides têm sido descritos em diferentes espécies do género *Acanthus*, nomeadamente a espécie em estudo, *A. mollis* (Frey *et al.*, 2009). Nesta planta foram descritos vários benzoxazinóides, tais como BOA, DIBOA e DIBOA-Glc (Pratt, Kumar e Chilton, 1995; Wolf, Spencer e Plattner, 1985). Outros derivados dos benzoxazinóides foram descritos quer na sua forma glicosilada, metoxilada ou hidroxilada, em outras espécies de *Acanthus*, tais como *A. ilicifolius*, *A. ebracteatus*, *A. hirsutus*, *A. montanus* e *A. spinosus* (Wai *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015; Kanchanapoom, Kamel *et al.* 2001a; Kanchanapoom, Kasai, *et al.* 2001b; Harput *et al.*, 2011; Noiarsa *et al.*, 2010; Pratt *et al.*, 1995).

Os benzoxazinóides são pesticidas naturais presentes em várias famílias de plantas, quer monocotiledóneas quer dicotiledóneas. Estes compostos fazem parte do sistema de defesa das plantas contra fungos, bactérias e insetos, e têm sido estudados

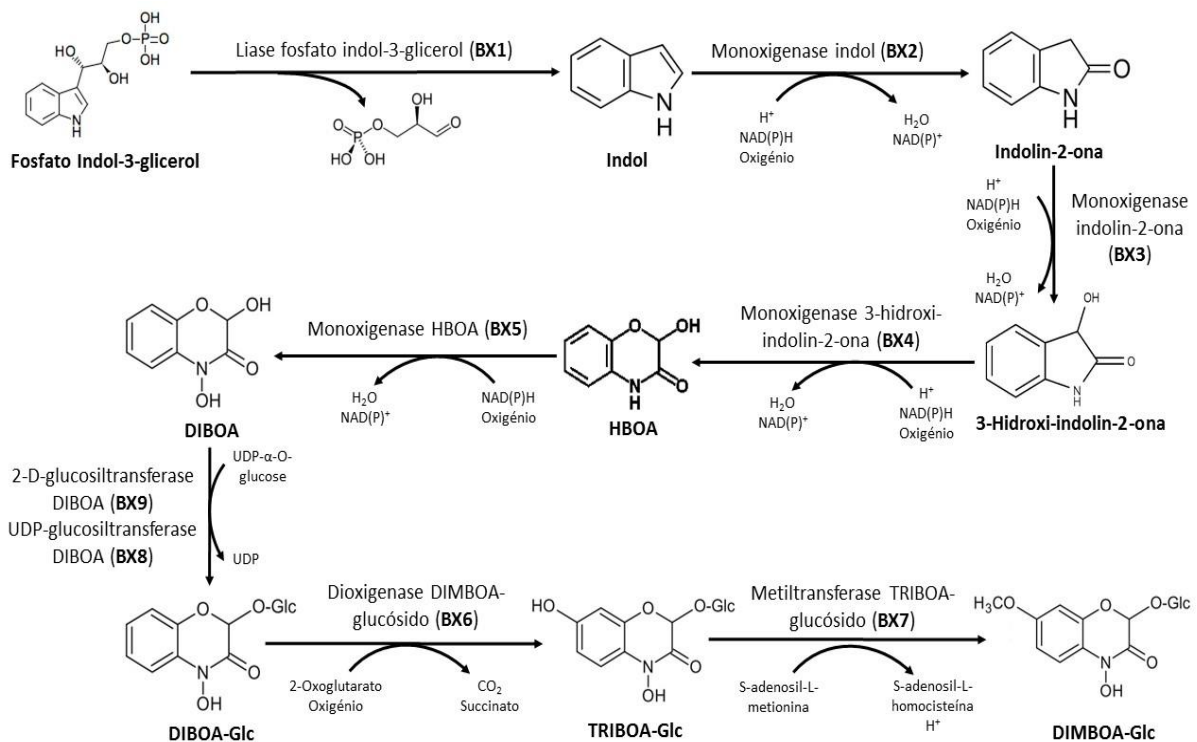
durante várias décadas (Buchmann *et al.*, 2007). Os benzoxazinóides são muitas vezes encontrados em cereais e acredita-se na sua ampla aplicação farmacológica e nos seus efeitos protetores (Adhikari *et al.*, 2013). Este grande grupo pode ser dividido em três categorias, tendo em conta a sua estrutura química, como podemos observar na tabela 3. As benzoxazolinonas mais comuns são 2-benzoxazolinona (BOA) e 6-metoxi-2-benzoxazolinona (MBOA). Dentro das benzoxazinonas, ocorre a 2-hidroxi-(2*H*)-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona (HBOA) e o seu glucósido 2- $\beta$ -D-glucopiranosil-(2*H*)-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona (HBOA-Glc), 2-hidroxi-7-metoxi-(2*H*)-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona (HMBOA) e o seu glucósido (HMBOA-Glc), e um derivado di-hexósido de HBOA (HBOA-Glc-Hex). A outra categoria dos benzoxazinóides são os derivados de ácidos hidroxâmicos, nomeadamente o 2,4-dihidroxi-(2*H*)-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona (DIBOA), 2,4-dihidroxi-7-metoxi-(2*H*)-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona (DIMBOA), 2- $\beta$ -D-glucopiranosiloxi-4-hidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona (DIBOA-Glc), o glucósido de DIMBOA (DIMBOA-Glc) e o derivado di-hexósido de DIBOA (DIBOA-Glc-Hex) (Adhikari *et al.*, 2015).

**Tabela 3** – Estruturas químicas dos benzoxazinóides conhecidos (adaptado de Adhikari *et al.*, 2013).

						
<b>Benzoxazolinonas</b>		<b>Benzoxazinonas</b>		<b>Ácidos hidroxâmicos cíclicos</b>		
<b>R<sub>1</sub></b>		<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	
H	BOA	H	H	H	H	DIBOA
OCH <sub>3</sub>	HBOA	H	Glc	H	Glc	DIBOA-Glc
		OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	H	DIMBOA
		OCH <sub>3</sub>	Glc	OCH <sub>3</sub>	Glc	DIMBOA-Glc
		H	Glc-Hex	H	Glc-Hex	DIBOA-Glc-Hex

Na biossíntese dos ácidos hidroxâmicos cíclicos, DIBOA e DIMBOA, estão envolvidas enzimas do citocromo P450, sendo estas as responsáveis pela formação destes compostos de defesa e de toxinas nas plantas através do metabolismo secundário (Dutartre, Hilliou e Feyereisen, 2012). Esta via envolve nove enzimas de forma sequencial que transformam fosfato de indol-3-glicerol em DIMBOA-glucósido

(Figura 2). As enzimas do citocromo P450 são quatro, BX2 a BX5 e uma dioxigenase dependente de 2-oxoglutarato (BX6), que tem como função introduzir átomos de oxigénio (Schullehner *et al.*, 2008). O fosfato indol-3-glicerol é convertido a indol através da enzima BX1, que é uma enzima liase que catalisa a formação deste composto e pode servir como o primeiro intermediário na biossíntese dos benzoxazinóides (Macías *et al.*, 2009). As reações que ocorrem a seguir à formação do indol ocorrem através das enzimas do citocromo P450, que o convertem em DIBOA (Dick *et al.*, 2012). O indol é convertido, pela enzima BX2, a indolin-2-ona, que é depois transformado em 3-hidroxi-indolin-2-ona através de BX3. A enzima BX4 catalisa este composto formando-se o HBOA. Este composto é convertido em DIBOA através de uma N-hidroxilação que é catalisada pelo BX5. BX8 e BX9 são responsáveis pela glicosilação dos benzoxazinóides, transformando assim DIBOA em DIBOA-glicósido. Após esta glicosilação ocorre uma hidroxilação pela enzima BX6 e seguidamente uma O-metilação por BX7. A glicosilação de DIBOA reduz a sua toxicidade e origina um metabolito estável para as modificações efetuadas pelas enzimas BX6 e BX7 (Frey *et al.*, 2009).



**Figura 2** – Biossíntese dos benzoxazinóides (adaptado de Frey *et al.*, 2009).

Para além das suas atividades alelopáticas também podem atuar como protetores da planta à ação de herbicidas (Bravo e Copaja, 2002). Estes compostos possuem também interesse nutricional e farmacológico (Adhikari *et al.*, 2013). Vários estudos dos benzoxazinóides referem diversas atividades ou propriedades farmacológicas, incluindo a anti-alérgica, anti-inflamatória, anticancerígena, antimicrobiana, antidepressiva e estimuladora do sistema reprodutor (Adhikari *et al.*, 2013), tal como se transcreve na tabela 4.

**Tabela 4** – Propriedades farmacológicas de benzoxazinóides (adaptado de Adhikari *et al.* 2015)

<b>Propriedades</b>	<b>Benzoxazinóides</b>
Estimulação do sistema nervoso central (SNC)	MBOA e os seus derivados
Imunorreguladoras	MBOA, HMBOA, HBOA, DIMBOA
Estimulação do sistema reprodutor	MBOA
Antimicrobianas	MBOA, BOA, HBOA, DIBOA, DIMBOA
Anticancerígena	DIBOA, HBOA, MBOA

A 4-hidroxi-2-benzoxazolona (HBOA) é um bioisosterismo de Cloroxazona, e muito possivelmente será uma alternativa como medicamento anti-inflamatório não esteróide, pois foi demonstrado que o HBOA é uma das benzoxazolonas com maior bioatividade (Zheng *et al.*, 2015). Em 2015, Wai e colaboradores demonstraram que HBOA e os seus derivados poderão ser os compostos ativos dos futuros medicamentos para o tratamento da fibrose hepática.

## 1.2. *Acanthus mollis*

### 1.2.1. Caracterização botânica

*Acanthus mollis* (L.), *Acanthaceae*, é uma planta tipicamente mediterrânica, de Portugal e noroeste de África até à Península Balcânica (Rezanka, Rezanka e Sigler, 2009). Muitos são os nomes populares a ela atribuídos, entre os quais, erva-gigante, branca-ursina, gigante, acanto ou até pé-de-urso, do termo em inglês "*Bear's Breeches*" e ainda "*Alas de ángel*" em espanhol (Rivera e Obón, 1995).

Apesar de espontânea, esta planta foi uma das primeiras a ser cultivada em jardins, para embelezar os espaços, devido às suas grandes folhas e flores brancas. No entanto pode ser encontrada em outros locais como paredes, pastagens, bosques ou até matos (Sharma *et al.*, 2015). Devido à beleza das suas folhas, crê-se que foi motivo de inspiração para os frisos decorativos das colunas dos capitais Coríntios (Fiorini-Puybaret, 2011; Melo, 2007; Sharma *et al.*, 2015).

#### 1.2.1.1. Classificação taxonómica

*Acanthus mollis* é uma angiospérmica pertencente à família Acanthaceae, que contém 4300 espécies em 346 géneros (Rezanka, Rezanka e Sigler, 2009). O género *Acanthus* possui mais de 50 espécies (Huang *et al.*, 2014), e o seu nome genérico deriva do termo, ἄκανθος, *Akanthos*, o nome da planta em grego. A palavra está relacionada com ἄκανθα, *akantha* que significa "espinho" em grego, enquanto o nome latino da espécie, *mollis* significa "soft", "suave", referindo-se à textura das folhas (Mifsud, 2006).

A classificação botânica varia de autor para autor, como se pode verificar pela tabela 5 (Melo, 2007).

**Tabela 5** – Classificação Botânica (Melo, 2007).

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Sub-reino</b>	Tracheobionta
<b>Divisão</b>	Magnoliophyta
<b>Classe</b>	Magnoliopsida
<b>Subclasse</b>	Asteridadae
<b>Ordem</b>	Lamiales
<b>Família</b>	Acanthaceae
<b>Subfamília</b>	Acanthioideae
<b>Tribo</b>	Acantheae
<b>Género</b>	<i>Acanthus</i>
<b>Espécie</b>	<i>Acanthus mollis</i>

#### 1.2.1.2. Sinónimos

Os nomes comuns atribuídos à planta podem corresponder a outras espécies como é o caso da designação "branca-ursina" que é igualmente atribuída à *Heracleum*

*sphondylium* L. (*Apiaceae*), planta também existente em Portugal continental (Melo, 2007).

*Acanthus mollis* pode também apresentar denominações científicas variadas, como é o caso de: *Acanthus latifolius* Hort. Ex Goeze, *Acanthus lusitanicus* Hort., *Acanthus nigra* Mill., *Acanthus mollis* subsp. *platyphyllus* Murb., *Acanthus mollis* var. *nigra* (Mill.) Willd., *Acanthus mollis* var. *viciosoi* Pau., *Acanthus vulgaris* (Melo, 2007).

### 1.2.1.3. Descrição Botânica

O *Acanthus mollis* é uma planta herbácea perene, vivaz e robusta, com folhas moles dispostas em roseta basal, e com flores dispostas em espiga, podendo atingir uma altura superior a 1,5 m (Simpson, 2006).

Os seus rizomas subterrâneos de cor esbranquiçada formam brotos e raízes de diâmetro cerca de 3 cm, servindo para a reprodução da planta e armazenamento de amido. Possui caules simples, roliços e eretos bem acima da folhagem, mas sem um verdadeiro caule aéreo, sendo que as folhas e flores crescem diretamente dos seus rizomas (Mifsud, 2006).



**Figura 3** – Fotografia de *Acanthus mollis* (L.).

As folhas são simples, muito grandes, profundamente lobadas, dentadas, oblongas, na maioria basílares, irregularmente penatipartidas ou penatifendidas. Apresentam uma cor verde escura, sendo brilhantes e lustrosas na página superior, um pouco suaves, dispostas em hastes carnudas e com um pecíolo longo, que ao ser pressionado faz a folha libertar um suco viscoso (Fiorini-Puybaret, 2011).

As flores são hermafroditas, de cor branca tingidas de rosa ou lilás, e estão dispostas numa densa espiga vertical, com brácteas grandes até 4 cm, oblongas, ovadas e espinhosas, dentadas, com 4 sépalas e uma pétala branca labiada com 4 estames no interior. Cálice 4-partido com lóbulo superior esverdeado e o inferior bífido e alongado, com corola branca e nervuras violáceas. Os seus frutos são cápsulas brilhantes e longas, que libertam cerca de quatro sementes (Simpson, 2006).

### **1.2.2. Condições de cultivo**

Devido à escassez de estudos feitos nesta espécie, não podemos afirmar com grandes certezas quais as melhores condições de cultivo, mas sabe-se que prefere clima Continental e Mediterrânico. São plantas de difícil erradicação e que vivem muito tempo sem necessidade de atenção podendo assim sobreviver durante várias décadas. A sua floração, abundante e duradoura, ocorre nos finais da Primavera ou inícios de Verão, crescendo melhor em ambientes húmidos porém adapta-se à seca e à sombra, produzindo no entanto menos flores em sombra profunda. Podem sobreviver a temperaturas baixas (-10°C ou -15°C), sendo tolerantes ao tipo de solo e pH, preferindo profundidade, boa drenagem e fertilidade (Chevallier, 1998; Tenenbaum, 2003).

### **1.2.3. Estudos fitoquímicos e atividade biológica**

Todos os estudos de *Acanthus mollis* estão direcionados para os seus constituintes fixos, não sendo relatados até à data a presença de óleos essenciais.

Nesta planta não tem sido referida uma variedade muito significativa de fitoconstituintes, talvez pela existência de poucos estudos sobre a mesma. No entanto, foram encontrados nesta espécie ácidos orgânicos, glúcidos, mucilagens, princípios amargos, resinas, sais minerais e taninos (Melo, 2007). Em 1985, Wolf et al. demonstrou que as sementes de *A. mollis* continham benzoxazolinona (BOA) e glucósidos de 2,4-dihidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona (DIBOA). O DIBOA mostrou ser letal para os pulgões, sendo por isso utilizado em estudos antifedantes; já o BOA demonstrou atividade anticonvulsiva. Os dois compostos, segundo o estudo de Wolf e colaboradores (1985),



inibem o crescimento das plantas. Dez anos mais tarde Pratt e colaboradores (1995) descobriram que extratos aquosos de folhas ou raízes também continham DIBOA (Pratt, Kumar e Chilton, 1995). A presença de DIBOA em várias partes de *Acanthus mollis*, tem sido explicada como exercendo funções de controlo integrado de pragas por parte da planta, tendo-se verificado o aumento da atividade antifedante com a concentração de DIBOA (Bravo, Copaja e Argandoña, 2004). Rezanka e colaboradores (2009) ampliou o conhecimento dos fitoconstituintes desta espécie, descrevendo a presença de linhanos e de citotoxicidade em alguns modelos de células tumorais. Estes e outros extratos da planta evidenciaram a presença de terpenóides, proteínas e flavonóides, revelando bioatividade em diversos ensaios tais como o verde de metilo-DNA (Attard e Pacioni, 2011). Recentemente, verificou-se que o extrato metanólico das folhas de *A. mollis*, aumentava a biossíntese de 15(S)-HETE, um eicosanóide anti-inflamatório (Bader *et al.*, 2015). Foi também descrita a presença de  $\beta$ -sitosterol, e atribuída a propriedades de reduzir o colesterol no plasma (Chikezie *et al.*, 2015).

**Tabela 6** – Compostos fixos identificados em *Acanthus mollis*.

Atividade	Extrato	Compostos	Referência
	Água – Raiz ou folha	Ácidos hidroxâmicos cíclicos: DIBOA	(Pratt, Kumar e Chilton, 1995)
	Aquoso, Hidro-alcoólico, Clorofórmico, Etanólico, Éter petróleo	Terpenóides; proteínas; flavonóides	(Attard e Pacioni, 2011)
<b><i>Acanthus mollis</i></b>	Aumento da biossíntese de 15 (S) – HETE – um eicosanóide anti-inflamatório	Metanol - Folhas	(Bader <i>et al.</i> , 2015)
		Ácidos orgânicos; glúcidos; mucilagens; princípio amargo; resinas; sais minerais; taninos	(Melo, 2007)
Citotóxica Antiproliferativa	Etanol - Partes aéreas floridas	Glicósidos de arilnaftaleno; linhanos; 2',4-dihidroxi-retrohelioxantina	(Rezanka, Rezanka e Sigler, 2009)

**Tabela 6** – Compostos fixos identificados em *Acanthus mollis* (continuação).

Atividade	Extrato	Compostos	Referência
<b><i>Acanthus mollis</i></b>	Extrato de acetona das sementes	BOA; DIBOA-Glc	(Wolf, Spencer e Plattner, 1985)
	Atividade antifedante	Aquoso – Diferentes tecidos	2,4-dihidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona (Bravo, Copaja e Argandoña, 2004)

#### 1.2.4. Etnomedicina

Desde há muito tempo que o Homem usa as plantas para aliviar as suas dores ou para curar as suas doenças. Também *Acanthus mollis* tem sido usado na medicina tradicional de várias partes do mundo. No Sul da Europa usa-se em cataplasmas (problemas intestinais), gargarejos (para aliviar a dor de dentes e a inflamação da boca), banhos e compressas (Ferrão e Liberato, 2015; Rivera e Obón, 1995). As suas folhas são muitas vezes utilizadas para fazer chás, ou para aplicar diretamente sobre a pele a fim de tratar chagas e pernas inchadas, assim como dores de cabeça, aplicando folhas aquecidas na testa (Freitas e Mateus, 2013). As folhas esmagadas são usadas externamente para luxações, fraturas, contusões, queimaduras, cicatrização de feridas, problemas bocais, devido às suas propriedades calmantes e emolientes (Attard e Pacioni, 2011; Fiorini-Puybaret, 2011; Rivera e Obón, 1995; Sequeira *et al.*, 2006). A sua seiva é usada também para hemorroidas, diarreias, febre, anginas, picadas de insetos, inflamação das vias inferiores, devido às mucilagens abundantes que esta planta possui (Melo, 2007). Sob a forma de infusão utiliza-se para tratar a irritação das mucosas digestivas e urinárias, tumores, úlceras (Rivera e Obón, 1995). É também empregue no tratamento da tosse, e indicado como diurético (Fiorini-Puybaret, 2011).

## **2. Objetivos**

---

## 2. Objetivos

O *Acanthus mollis* é uma planta usada na medicina tradicional de alguns países das regiões tropicais, principalmente. Tem algumas propriedades como cicatrizante de feridas e queimaduras, analgésico e anti-inflamatório, diurético e calmante das mucosas do trato digestivo e urinário.

O trabalho proposto tem como objetivo principal a caracterização fitoquímica e a avaliação do potencial terapêutico do *Acanthus mollis*, com base em propriedades biológicas que suportam as utilizações tradicionais.

O plano de trabalho a desenvolver envolverá:

- Obtenção de diversos extratos;
- Fracionamento de fitoconstituintes ativos, com recurso a técnicas cromatográficas;
- Caracterização fitoquímica com base em metodologias de análise físico-químicas, cromatográficas e espectroscópicas;
- Avaliação da atividade biológica com especial ênfase nas atividades antioxidante e anti-inflamatória;
- Determinação da citotoxicidade *in vitro*.

## **3. Material e Métodos**

---

### 3.1. Material de estudo

As folhas de *Acanthus mollis* foram colhidas no mês de novembro de 2015, na zona de Coimbra (geolocalização: 40°12'28.9"N, 8°25'20.2"W). Até à sua utilização todas as folhas foram conservadas ao abrigo da luz e da humidade, no frio, a -20°C. Posteriormente, as folhas foram liofilizadas (liofilizador FTSSYSTEMS tipo EZ-DRY, modelo EL 1501-1 com manifold modelo EZT18, de 8 portas e válvula de borracha, Stone Ridge, NY USA), e trituradas num moíno (BRAUN KSM 2) seguido de tamisação (Tamis ENDECOTT'S de 2500 malhas/cm<sup>2</sup>). Ao longo deste trabalho, o material em estudo irá ser referido como folhas liofilizadas.

### 3.2. Reagentes

O éter de petróleo, etanol, acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético glacial, *n*-butanol, tolueno, hexano, anidrido acético, anisaldeído, nitrato de bismuto (III), iodeto de potássio, *p*-dimetilaminocinamaldeído (DMACA), ácido tiobarbitúrico, ácido tricloroacético e os solventes usados para o HPLC-PDA foram Merck (Darmstadt, Germany). O ácido ascórbico e colesterol foram da Aldrich, vanilina da Fluka e o cloreto de ferro (III) foi obtido da AcrosOrganics. O ácido sulfúrico foi obtido da Panreac, o clorofórmio e o metanol foram obtidos da VWR. Acetona foi da Fisher Chemical, etanol comercial (95%). A catequina, EDTA, 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), ácido difenilbórico 2-aminoetil éster (NP), polietilenoglicol-4000 (PEG-400) da Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO).

### 3.3. Extração

Para este trabalho realizou-se uma extração sequenciada com solventes de polaridades diferentes, e preparou-se um infuso, um decocto e um extrato com etanol a 95%.

Na extração sequenciada partiu-se de 10,00 g de folhas liofilizadas e extraiu-se com duas porções de 100 mL de cada solvente: éter petróleo, clorofórmio, etanol, solução aquosa de etanol a 50% e finalmente água, durante uma hora em agitador eletromagnético. Os extratos de éter de petróleo (EEP), clorofórmio (EC) e etanol absoluto (EEt100) foram filtrados sob vácuo em papel de filtro Watmann N°1 e

armazenados a 5°C ao abrigo da luz, para posterior utilização. Os extratos de etanol a 50% (EEt50) e água (EH<sub>2</sub>O) foram centrifugados (centrífuga SIGMA, Laborzentrifuga, 3K10, a 4000 g, durante 30 minutos) e concentrados num evaporador rotativo (BUCHI, Rotavapor R-114 com controlador V-850 e bomba de vácuo V-700 da BUCHI acoplado a um circuito de refrigeração do condensador, Minichiller Huber, Germany), sendo posteriormente liofilizados.

Para a infusão (EI), colocaram-se, numa caneca de infuso, 1,3 g de planta à qual se adicionaram 100 mL de água a ferver, deixando-se em repouso durante 10 minutos. Seguidamente procedeu-se à centrifugação e posterior concentração em evaporador rotativo, seguida de liofilização. Com a mesma massa de planta (1,3 g) e o mesmo volume de água (100 mL) foi preparado o decocto (ED), adicionando a planta na água a ferver e mantendo a fervura durante 15 minutos. Posteriormente, usou-se o mesmo procedimento que para a infusão.

Para o extrato de etanol a 95% (EEt95), adicionaram-se 100 mL do solvente a 2,00 g de planta, mantendo-se a extração durante uma hora em agitador eletromagnético. Posteriormente foram adicionados 2 mL de água ao extrato e este foi colocado no frio durante uma noite e centrifugado, para eliminar a clorofila.

O rendimento extrativo foi determinado gravimetricamente, retirando-se três alíquotas de 1 mL e submetendo-as a aquecimento a 40°C, numa estufa de vácuo (memmert) até peso constante.

#### **3.4. Cromatografia analítica**

##### **3.4.1. Cromatografia em camada fina (TLC)**

A cromatografia em camada fina (TLC) é um método rápido que permite pesquisar a presença de várias classes de fitoquímicos num elevado número de amostras, auxiliando na seleção das amostras mais promissoras a serem caracterizadas mais detalhadamente utilizando outros métodos analíticos (Bolliger *et al.*, 1965). Nessa perspectiva utilizaram-se seis sistemas de TLC para monitorização de extratos e frações. Em todos os sistemas foram utilizadas placas pré-revestidas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck), eluídas com diferentes desenvolvedores (S1 a S6), em câmaras previamente

saturadas com os respectivos solventes. A revelação foi feita à luz visível e ultravioleta (254 e 366 nm), antes e após a atuação dos diversos reveladores.

O **sistema 1**, descrito por Wagner e Bladt (2001), é apropriado para separação de flavonóides glicosilados. A fase móvel deste sistema foi uma solução de acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-água (100:11:11:26).

Para a detecção das saponinas, eluíram-se as placas no **sistema 2**, utilizando-se *n*-butanol-ácido acético-água (40:50:10) (Oleszek, Kapusta e Stochmal, 2007).

No **sistema 3**, para a pesquisa de alcalóides, as placas foram desenvolvidas com a fase superior de uma mistura de acetato de etilo-metanol-água (100:13,5:10) de acordo com Wagner e Bladt (2001), usando a quinina como composto de referência.

A pesquisa de triterpenos foi realizada com o **sistema 4** recorrendo a uma solução de tolueno-clorofórmio-etanol (40:40:10) (Wagner e Bladt, 2001) e ao colesterol como referência.

O **sistema 5** foi utilizado para avaliar o grau de polimerização dos taninos usando-se o sistema cromatográfico descrito para as procianidinas (Escribano-Bailon *et al.*, 1992). A fase móvel consistiu de uma solução de tolueno-acetona-ácido acético (3:7,5:1). Recorreu-se à catequina como composto de referência.

O **sistema 6** foi descrito por Pratt e colaboradores (1995), para a determinação de alguns compostos benzoxazinóides. Neste caso o eluente utilizado foi uma solução de hexano-acetona (1:1).

#### 3.4.1.1. Reveladores

Os reagentes reveladores são muitas vezes aplicados para localizar qual ou quais as manchas que contêm o mesmo tipo de compostos. Por vezes são utilizados reagentes universais, podendo localizar quase todas as classes de compostos orgânicos. No entanto, podem aplicar-se reagentes mais seletivos para a identificação individual ou de um grupo de compostos. Assim sendo, após a eliminação da fase móvel e das placas serem observadas quer ao visível, quer ao UV, aplicaram-se diferentes reveladores: NP-PEG (NP), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), vanilina-



ácido sulfúrico (VS), anisaldeído-ácido sulfúrico (AS), Dragendorff (D), Liebermann-Burchard (LB), *p*-dimetilaminocinamaldeído (DMACA) e FeCl<sub>3</sub> (CF).

#### 3.4.1.1.1. NP-PEG (Natural products-polythyleneglycol reagent)

O NP-PEG é um revelador utilizado para detecção de polifenóis, mais concretamente flavonóides e ácidos fenólicos (Wagner e Bladt, 2001; Waksmundzka-Hajnos, Sherma e Kowalska, 2008). Este revelador é constituído pelo reagente NP, uma solução metanólica do éster aminoetílico do ácido difenilbórico a 1%, e o reagente PEG, uma solução etanólica de polietilenoglicol 4000 a 5%, aplicados sequencialmente sobre as placas, após secagem do primeiro. Após evaporação, as placas foram observadas ao visível e à luz ultravioleta (366 nm).

#### 3.4.1.1.2. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

A técnica de análise bioautográfica da atividade antioxidante pelo 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) usada neste trabalho foi a descrita por Joshi (Joshi, 2012). Num bioensaio de TLC, o cromatograma desenvolvido é pulverizado com a solução de DPPH, e a placa é observada após 30 minutos à luz visível (Dewanjee *et al.*, 2015). O DPPH é um radical muitas vezes utilizado para avaliar a capacidade captadora de radicais livres / atividade antioxidante (Choma e Jesionek, 2015; Joshi, 2012). Na preparação da solução do reagente DPPH pesou-se 2 mg de DPPH para um balão de 20 mL que se aferiu com metanol. O DPPH em solução metanólica e o uso de placas de sílica gel dão resultados mais intensos do que o DPPH em solução etanólica (Choma e Jesionek, 2015). As placas de TLC foram pulverizadas com esta solução, e após evaporação do solvente foram observadas ao visível.

#### 3.4.1.1.3. Reagente vanilina-ácido sulfúrico

Este reagente é muitas vezes aplicado para detecção de terpenos, saponinas, álcoois de cadeia longa, fenóis, esteróides, cetonas e até óleos essenciais (Bolliger *et al.*, 1965; Cannell, 1998; Merck, 1980; Oleszek, Kapusta e Stochmal, 2007; Senguttuvan, Paulsamy e Arts, 2014). É constituído por duas soluções que são aplicadas

imediatamente seguidas uma da outra. A primeira solução a ser aplicada, após a evaporação do desenvolvedor, é uma solução de vanilina em etanol a 1%. A segunda solução contém ácido sulfúrico em etanol a 10%. Após aquecimento a 110 ° C durante 5-10 min, as placas são avaliadas no visível.

#### 3.4.1.1.4. Reagente anisaldeído-ácido sulfúrico

Este reagente deteta vários compostos especialmente terpenos, açúcares, fenóis, esteroides e saponinas (Cannell, 1998; Merck, 1980; Waksmundzka-Hajnos, Sherma e Kowalska, 2008). Utiliza-se uma mistura extemporânea constituída por 0,5 mL de anisaldeído, 10 mL de ácido acético glacial, 85 mL de metanol e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após a atuação deste revelador e aquecimento a 100°C durante 5-10 min, as placas são observadas ao visível e à luz ultravioleta (366 nm).

#### 3.4.1.1.5. Reagente Dragendorff

O reagente de Dragendorff é o método mais tradicional para a detecção de alcalóides, apesar deste teste dar positivo para alguns não alcalóides ou até flavonóides, sendo também utilizado para outras bases heterocíclicas e para compostos azotados (Bolliger *et al.*, 1965; Senguttuvan, Paulsamy e Arts, 2014; Waksmundzka-Hajnos, Sherma e Kowalska, 2008). Consiste de duas soluções; a solução A e a solução B. A solução A resulta da dissolução de 0,85 g de nitrato de bismuto (III) em 10 mL de ácido acético glacial e 40 mL de água sob aquecimento. Na solução B, 8 g de iodeto de potássio são dissolvidos em 30 mL de água. Estas duas soluções são misturadas na proporção de 1:1. Daqui é retirado 1 mL e misturado com 2 mL de ácido acético glacial e 10 mL de água antes da pulverização nas placas. A observação é feita à luz visível.

#### 3.4.1.1.6. Reagente Liebermann-Burchard

Este reagente é utilizado maioritariamente para detetar esteróides e terpenóides (Oleszek, Kapusta e Stochmal, 2007). Antes de aplicar, adiciona-se cuidadosamente 5 mL de anidrido acético e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado a 50 mL de etanol

absoluto, arrefecendo no gelo devido à reação exotérmica resultante desta mistura. Após pulverização, as placas são aquecidas a 100°C durante 5-10 min, sendo posteriormente observadas à luz ultravioleta (366 nm).

#### 3.4.1.1.7. *p*-Dimetilaminocinamaldeído (DMACA)

Este reagente é utilizado numa solução ácida para detetar taninos condensados (Merck, 1980), consistindo numa solução de *p*-dimetilaminocinamaldeído a 1% em metanol contendo ácido sulfúrico 1,5 M. No momento de utilizar misturam-se 1 g de dimetilaminocinamaldeído a 100 mL de metanol contendo 8 mL de ácido sulfúrico. Após pulverização aquece-se a 100 °C durante 5-10 min, sendo as placas posteriormente avaliadas no visível.

#### 3.4.1.1.8. Cloreto de ferro (III) (FeCl<sub>3</sub>)

O cloreto de ferro é usado para a deteção de alcalóides, compostos fenólicos, ácidos hidroxâmicos, taninos e hipericinas (Bolliger *et al.*, 1965; Merck, 1980; Senguttuvan, Paulsamy e Arts, 2014; Waksmundzka-Hajnos, Sherma e Kowalska, 2008). Este reagente consiste se uma solução metanólica de cloreto férrico a 5%. As placas são observadas à luz visível após aplicação.

### 3.4.2. HPLC-PDA

A análise por HPLC-PDA foi realizada num cromatógrafo líquido de alta resolução (HPLC) Gilson, equipado com duas bombas (modelo 305 e 306); misturador (modelo 811 B); módulo manométrico (modelo 805) e um injetor automático (Gilson 234 Autoinjeter), acoplado a um detetor de fotodíodos (PDA) (Gilson, modelo 170) e a uma estação de controlo e tratamento de dados Unipoint System (Unipoint® 2.10).

A fase estacionária da coluna foi uma RP18 Spherisorb Waters® ODS-2, partículas de 5 µm (4,6x250 mm), mantida 23-24°C protegida por uma pré-coluna KS 30/4 Nucleosil 120-5, C-18, Macherey-Nagel (Düren, Germany). A fase móvel consistiu

de uma solução aquosa de ácido fórmico a 5% (A) e metanol (B), usada em gradiente descontínuo, a um fluxo de 1 mL/min.

Os solventes utilizados nesta análise foram microfiltrados e desgaseificados, utilizando-se filtros NL16 (0,2 µm; 50 mm) (Schleicher & Schuell, Germany), e a sua desgaseificação foi realizada num aparelho de ultrassons (Bransonic, modelo B-2200 E1).

Foram injetados 100 µL das amostras, previamente microfiltradas, sendo a aquisição dos espectros realizada entre 200 e 600 nm, registando-se os perfis cromatográficos a 280 e a 320 nm, para os diferentes sistemas utilizados.

Neste trabalho utilizaram-se dois gradientes diferentes: **Sistema 7** e **Sistema 8** tendo em conta a polaridade dos diversos solventes utilizados na preparação dos extratos.

### Sistema 7

Recorreu-se a uma separação em gradiente, nas condições descritas na tabela 7.

**Tabela 7** – Condições utilizadas no **Sistema 7**.

<b>Fase móvel</b>	<b>Eluente A</b> – Ácido fórmico 5% em água (v/v)		
	<b>Eluente B</b> – Metanol		
<b>Pré-coluna</b>	KS 30/4 Nucleosil 120-5, C-18, Macherey-Nagel		
<b>Coluna</b>	Coluna analítica de Waters Spherisorb, ODS2, partículas de 5 µm (4,6 x 250 mm)		
<b>Temperatura da Coluna</b>	23-24°C		
<b>Fluxo</b>	1 mL/min		
	<b>Tempo (min)</b>	<b>%A</b>	<b>%B</b>
	0	70	30
	10	70	30
<b>Gradiente</b>	20	65	35
	60	50	50
	70	20	80
	85	0	100
	95	0	100

**Sistema 8**

Procedeu-se a uma separação em gradiente nas condições transcritas pela tabela 8.

**Tabela 8** – Condições utilizadas no **Sistema 8**.

<b>Fase móvel</b>	<b>Eluente A</b> – Ácido Fórmico 5% em água (v/v) <b>Eluente B</b> – Metanol		
<b>Pré-coluna</b>	KS 30/4 Nucleosil 120-5, C-18, Macherey-Nagel		
<b>Coluna</b>	Coluna analítica de Waters Spherisorb, ODS2, partículas de 5 µm (4,6 x 250 mm)		
<b>Temperatura da Coluna</b>	23-24°C		
<b>Fluxo</b>	1 mL/min		
	<b>Tempo (min)</b>	<b>%A</b>	<b>%B</b>
	0	95	5
	10	85	15
	15	75	25
<b>Gradiente</b>	40	50	50
	50	20	80
	60	20	80
	70	0	100
	85	0	100

**3.4.3. HPLC-PDA-ESI/MS<sup>n</sup>**

A identificação dos compostos presentes no extrato de etanol a 95% foi realizada por análise dos espectros de UV e de massa adquiridos *online*.

A análise realizou-se num cromatógrafo líquido Surveyor equipado com um detector PDA (Thermo Fisher Scientific, USA) e um espectrómetro de massa Finnigan LCQ (San Jose, CA, USA) com uma câmara de ionização ESI. A separação cromatográfica foi realizada numa coluna de fase reversa C18 Spherisorb® ODS-2 (150x2,1 mm; 3 µm) (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA) e protegida por uma pré-coluna Spherisorb® ODS-2 C18 (10x4,6 mm; 5 µm), Waters Corporation [Milford, Massachusetts, USA] a 25°C, usando como fase móvel uma solução aquosa de ácido fórmico a 2% (A) e metanol (B). As condições utilizadas na realização da análise podem ser observadas na tabela 9 e tabela 10.

Neste trabalho utilizaram-se dois gradientes diferentes Sistema 9 e Sistema 10 tendo em conta a melhor separação dos compostos presentes no extrato.

**Tabela 9** – Condições utilizadas na análise por HPLC-PDA-ESI/MS<sup>n</sup> (**Sistema 9**).

	<b>Tempo</b>	<b>A%</b>	<b>B%</b>
<b>Gradiente</b>	0.00-20.00	70.0	30.0
	20.00-60.00	65.0	35.0
	60.00-70.00	50.0	50.0
	70.00-85.00	20.0	80.0
	85.00-95.00	0.0	100.0
<b>Fluxo</b>	200.0 $\mu$ L/min		
<b>Deteção no PDA (nm)</b>	200-500		
<b>Modo análise no MS</b>	<b>Segmento 1 (0-9 Minutos):</b>	<b>Segmento 2 (9-95 Minutos):</b>	
	Modo ão positivo. Varrimentos: modo SIM ( <i>m/z</i> 163.5-164.5; 181.5- 182.5; 324.5-325.5; 343.5-344.5; 505.5- 506.5)	Modo ão negativo. Varrimentos: "full mass" ( <i>m/z</i> 200-1000), MS <sup>2</sup> do fragmento mais abundante do primeiro espectro, MS <sup>3</sup> do fragmento mais abundante do espectro MS <sup>2</sup> .	
<b>Voltagem da fonte</b>	4 kV	4,7 kV	
<b>Voltagem do capilar</b>	10 V	-7 V	
<b>Temperatura</b>	300°C	275°C	
<b>Gás nebulizante (ua)*</b>	Azoto (30)	Azoto (20)	
<b>Gás auxiliar (ua)*</b>	Azoto (5)	Azoto (7)	
<b>Gás de colisão (energia de colisão)</b>	Hélio (40)	Hélio (45)	

\*ua – Unidades arbitrárias

**Tabela 10** – Condições utilizadas na análise por HPLC-PDA-ESI/MS<sup>n</sup> (**Sistema 10**).

	<b>Tempo</b>	<b>A%</b>	<b>B%</b>
<b>Gradiente</b>	0.00-10.00	95.0	5.0
	10.00-15.00	85.0	15.0
	15.00-40.00	75.0	25.0
	40.00-50.00	50.0	50.0
	50.00-70.00	20.0	80.0
	70.00-85.00	0.0	100.0
<b>Fluxo</b>	200.0 $\mu$ L/min		
<b>Deteção no PDA (nm)</b>	200-500		
<b>Modo análise no MS</b>	<b>Segmento 1</b>	<b>Segmento 2</b>	
	<b>0-16 Minutos:</b>	<b>16-95 Minutos:</b>	
	Modo ião positivo. Varrimentos: modo SIM ( <i>m/z</i> 163.5-164.5; 181.5-182.5; 324.5-325.5; 343.5-344.5; 505.5-506.5)	Modo ião negativo. Varrimentos: "full mass" ( <i>m/z</i> 200-1000), MS <sup>2</sup> do fragmento mais abundante do primeiro espectro, MS <sup>3</sup> do fragmento mais abundante do espectro MS <sup>2</sup> .	
<b>Voltagem da fonte</b>	4 kV	4,7 kV	
<b>Voltagem do capilar</b>	10 V	-7 V	
<b>Temperatura</b>	300°C	275°C	
<b>Gás nebulizante (ua)*</b>	Azoto (30)	Azoto (20)	
<b>Gás auxiliar (ua)*</b>	Azoto (5)	Azoto (7)	
<b>Gás de colisão (energia de colisão)</b>	Hélio (40)	Hélio (45)	

\*ua – Unidades arbitrárias

### 3.5. Cromatografia preparativa

#### 3.5.1. Cromatografia Flash

O extrato etanólico resultante da extração sequenciada (EEt100) foi fracionado por Cromatografia Flash, segundo as condições descritas na tabela 11. Injetaram-se 25 mL do extrato EEt100 numa coluna de fase reversa C18 Buchi® (40x150 mm, com diâmetro das partículas entre 40-63  $\mu$ m) (Flawil, Suíça). A fase móvel foi propulsionada por duas bombas Buchi® Pump Module C-605 (Flawil, Suíça), tendo-se utilizado a água e metanol, em gradiente descontínuo, a um fluxo variável. O registo do perfil cromatográfico foi efetuado a 280 e a 320 nm pelo detetor ultravioleta C-640 Buchi® (Flawil, Suíça), com o *software* para tratamento de dados ECOMAC® 0.238 (Praga, República Checa). Deste fracionamento obtiveram-se quinze frações que foram

concentradas em evaporador rotativo e posteriormente monitorizadas quanto à sua composição por HPLC-PDA.

**Tabela 11** – Condições de fracionamento e frações obtidas da Cromatografia Flash.

<b>Fração</b>	<b>Gradiente</b>	<b>Fluxo (mL/min)</b>	<b>Tempo (min)</b>	<b>Volume (mL)</b>
<b>F<sub>0</sub></b>	5% B	10	0-5	54
<b>F<sub>1</sub></b>	5% B	10	5-8	26
<b>F<sub>2</sub></b>	5% B	10	8-10	23
<b>F<sub>3</sub></b>	5% B 10% B (14 min)	10	10-18	72
<b>F<sub>4</sub></b>	10% B	10	18-21	32
<b>F<sub>5</sub></b>	15% B	10	21-24	28
<b>F<sub>6</sub></b>	15% B	10	24-28	45
<b>F<sub>7</sub></b>	15% B	10	28-35	70
<b>F<sub>8</sub></b>	30% B 50% B (40 min)	10	35-43	77
<b>F<sub>9</sub></b>	50% B	10	43-47	46
<b>F<sub>10</sub></b>	50% B 60% B (60 min) 80% B (70 min)	10 15 (63 min) 20 (65 min)	47-76	397
<b>F<sub>11</sub></b>	80% B	20	76-80	90
<b>F<sub>12</sub></b>	100% B	20	80-85	100
<b>F<sub>13</sub></b>	100% B	20	85-96	220
<b>F<sub>14</sub></b>	100% B	20 15 (98 min)	96- —	---

### 3.5.2. TLC preparativa

Na cromatografia em camada fina preparativa (PTLC) as amostras a cromatografar são geralmente aplicadas em banda. Após a separação cromatográfica, localizam-se os compostos pretendidos, por revelação não destrutiva, os quais são posteriormente recuperados por remoção da mancha pretendida e eluição do composto (Fried e Sherma, 1996).

A TLC preparativa, realizou-se em placas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (20x20 cm) (Merck), eluídas com uma mistura de *n*-hexano-acetona (1:1) (Sistema 6), após aplicação, em



banda, de aproximadamente 0,5 mL do extrato de etanol a 95% (EEt95). Posteriormente detetaram-se os fitoconstituintes, por observação do cromatograma à luz visível e, de seguida, à luz ultravioleta (254 e 366 nm), tendo estes sido removidos da fase estacionária, por agitação com etanol a 95% seguida de centrifugação numa centrífuga Sigma 3K10. A natureza química dos fitoconstituintes fracionados foi monitorizada por HPLC-PDA.

#### **3.6. Atividade antioxidante**

##### **3.6.1. Ensaio do 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)**

As atividades antioxidantes dos extratos mais promissores, EEP-A, EEt100, EEt95 e da fração F<sub>1</sub> obtida por cromatografia flash foram avaliadas segundo o método descrito por Blois (1958). A 100 µL das amostras, a diferentes concentrações, foram adicionados 1 mL de tampão acetato 100 mM, a pH 6,0 e 1,4 mL de metanol. Seguiu-se a adição de 500 µL de solução metanólica de DPPH a 500 µM agitando-se a mistura por 30 segundos.

A mistura reacional (3 mL) foi mantida à temperatura ambiente e ao abrigo da luz durante 30 minutos. O decréscimo do valor da absorvância da solução de DPPH foi medido a 517 nm num espectrofotómetro de duplo feixe, Cintra 101 (GBC, Austrália), contra um branco. O mesmo processo foi repetido para o Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), para que por extrapolação os resultados fossem expressos em valor TEAC (capacidade antioxidante equivalente ao trolox numa solução de 1 mM).

##### **3.6.2. Ensaio do anião superóxido**

O ensaio baseia-se na redução do azul de nitrotetrazólio (NBT) pela riboflavina (Kostyuk *et al.*, 2000), catalisada pelo anião superóxido.

As misturas reacionais (3 mL) foram obtidas com tampão fosfato 16 mM a pH 7,8, solução de EDTA 0,1 mM, TEMED 0,8 mM, NBT 85 µM, riboflavina 6 mM e um volume apropriado das amostras. O ensaio foi conduzido à temperatura ambiente (22°C) sob luz fluorescente (20W, 20 cm). A reação foi interrompida removendo da luz

e adicionando 50 mL de SOD (1 mg/mL). A absorvância foi medida a 560 nm num Espectrofotómetro de UV/vis – Jasco V-530.

#### **3.6.3. Ensaio do radical hidroxilo**

A capacidade antiradicalar para o radical hidroxilo foi avaliada usando o ensaio de degradação da desoxirribose (Payá, Halliwell e Hoult, 1992). Num volume final de 1 mL, preparou-se a mistura reacional com tampão fosfato 20 mM a pH 7,4, 2-desoxi-D-ribose 2,8 mM, EDTA 104 mM, FeCl<sub>3</sub> 20 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM, ácido ascórbico 0,1 mM e alíquotas das amostras. A mistura foi mantida a 37°C durante 1 h, após o que se mediu a extensão da degradação da desoxirribose por adição de 1 mL de solução de ácido tiobarbitúrico (m/v) e 1 mL de ácido tricloroacético 2,8% (m/v) seguido de aquecimento a 100°C durante 20 minutos.

Após arrefecimento, mediu-se a absorvância a 532 nm num espectrofotómetro de UV/Vis – Jasco V-530.

#### **3.7. Atividade anti-inflamatória e citotoxicidade *in vitro***

##### **3.7.1. Cultura celular**

Para este estudo, foi utilizada uma linha celular de macrófagos de ratinho, Raw 264.7 (American Type Culture Collection - TIB-71), gentilmente cedida pela Doutora Otilia Vieira (Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra). As células foram cultivadas em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen) suplementado com 10 % (v/v) de soro fetal bovino não inativado (Invitrogen), 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma) e mantidas a 37 °C em atmosfera húmida com 5% CO<sub>2</sub>/95% ar.

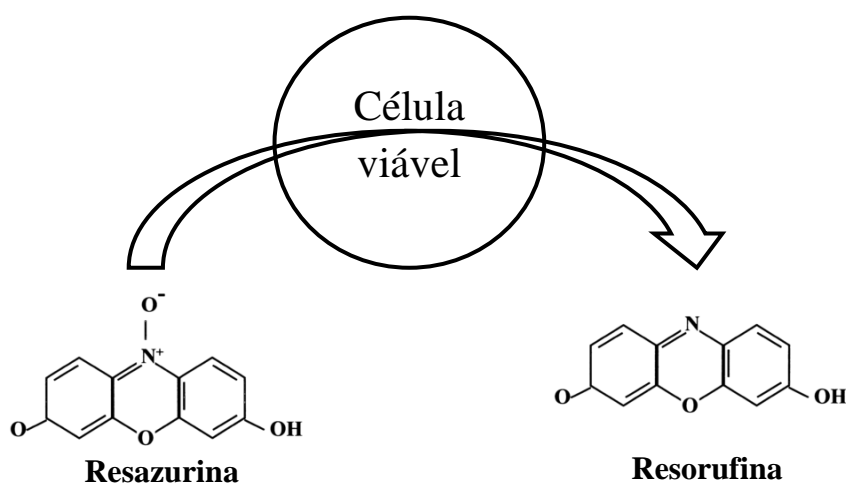
Para a realização dos ensaios as células foram plaqueadas em placas de cultura de 96 poços (0,1x10<sup>6</sup> células/poço), e deixadas estabilizar *overnight*. Após este período as células foram mantidas em meio (controlo) e incubadas com diferentes concentrações (15 µg/mL, 30 µg/mL, 60 µg/mL, 120 µg/mL e 240 µg/mL) de extratos e frações, e /ou 1 µg/mL de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) (Sigma) durante 24 horas.

### 3.7.2. Determinação da produção de nitritos pelo reagente de Griess

A produção de monóxido de azoto foi medida pela acumulação de nitritos no sobrenadante da cultura celular, através da reação colorimétrica com o reagente de Griess [0,1% (m/v) de dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina e 1% (m/v) de sulfanilamida contendo 5% (m/v) de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>] (Green *et al.*, 1982). Em suma, 170 µL de sobrenadante da cultura celular foram diluídos com igual volume de reagente de Griess e mantidos durante 30 min no escuro. A absorvância a 550 nm foi lida num leitor de placas (Biotek Synergy HT) e a concentração de nitritos determinada por extrapolação a partir de uma curva padrão com diluições seriadas de nitrito de sódio.

### 3.7.3. Determinação da viabilidade celular pelo ensaio da resazurina

A determinação das células metabolicamente ativas foi realizada por recurso ao ensaio com resazurina. Este ensaio baseia-se na capacidade das células vivas converterem a resazurina (azul, não fluorescente) em resorufina (rosa, fluorescente) (Figura 4) e é aplicado em ensaios de citotoxicidade, proliferação e viabilidade celular (Rampersad, 2012). A quantidade de resofurina produzida é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Após os tratamentos, as células foram incubadas com uma solução de resazurina (50 µM em meio de cultura) durante 2 horas a 37 °C em atmosfera húmida com 5% CO<sub>2</sub>/95% ar. A quantificação da resofurina foi determinada num leitor de placas (Biotek Synergy HT) a 570 nm com filtro de referência a 620 nm.



**Figura 4** – Esquema ilustrativo da redução da resazurina a resofurina por células vivas. Adaptado de O'Brien *et al.* (2000)

#### **3.7.4. Análise estatística**

Para a análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism, versão 5.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), aplicando-se One-way ANOVA seguida dos diferentes testes estatísticos.

A determinação do valor de  $IC_{50}$  para a atividade antioxidante foi calculado a partir da equação da reta obtida por linearização pelo método dos mínimos quadrados do gráfico percentagem de inibição *versus* concentrações dos extratos.

Os valores de  $IC_{50}$  correspondentes à atividade anti inflamatória foram calculados a partir da reta de calibração (*median effect plot*) obtida após linearização da curva dose-resposta, segundo método descrito por Chou (2006).

## **4. Resultados e Discussão**

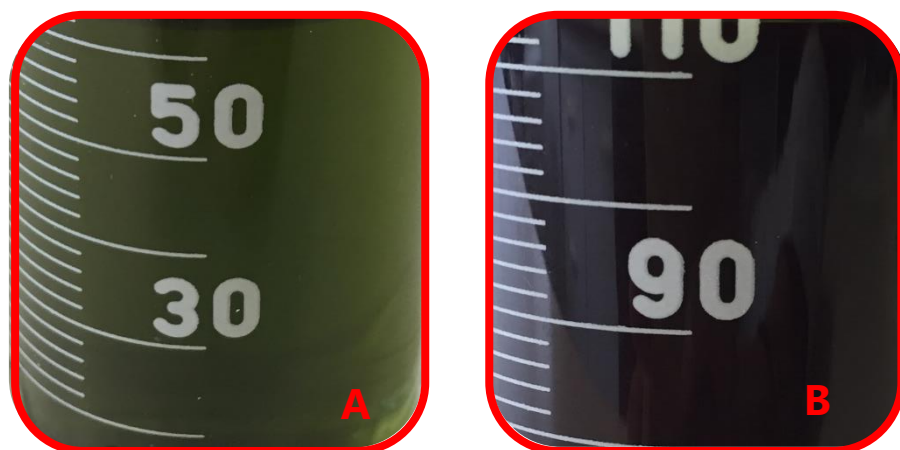
---

#### 4.1. Estudos preliminares

A escassez de estudos existentes sobre o *Acanthus mollis* tornou necessária a realização de estudos prévios de *screening* com o objetivo de identificar as classes de constituintes presentes na planta e a sua contribuição para a atividade antioxidante. Neste contexto procedeu-se à realização de vários processos extrativos: extração sequenciada (EEP, EC, EEt100, EEt50, EH<sub>2</sub>O), decocção (ED) e infusão (EI).

##### 4.1.1. Rendimento extrativo

Esta etapa de *screening* iniciou-se com uma extração sequenciada, que resultou na obtenção de cinco extratos com rendimentos distintos. Todos os extratos foram obtidos juntando a primeira extração (100 mL) e a segunda extração (100 mL) do respetivo solvente, exceto o extrato EEP que é só representativo da primeira extração (100 mL) \_ EEP-A, havendo uma clara diferença de coloração entre as duas extrações (Figura 5), optando assim por não proceder à sua mistura. Após o *screening* por TLC verificou-se que apenas a primeira extração continha compostos objeto de estudo, por essa razão a segunda extração foi descartada.

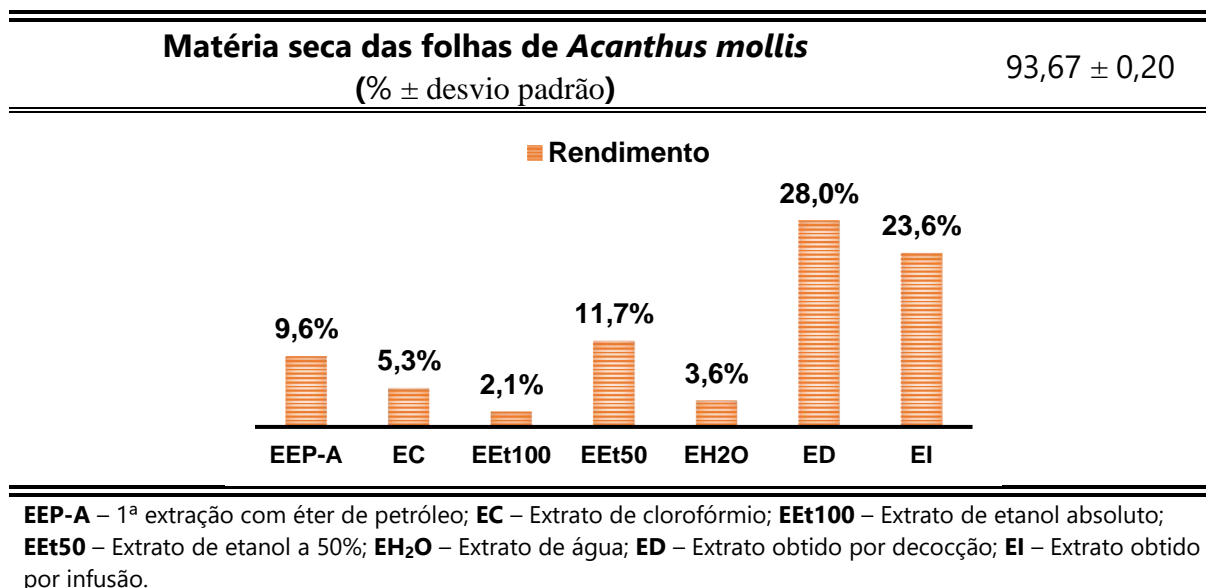


**Figura 5** – Coloração das extrações com éter de petróleo. **A** – Primeira extração com 100 mL do solvente. **B** – Segunda extração com 100 mL do solvente.

A decocção foi o processo extrativo que apresentou um maior rendimento em peso. Na extração sequenciada o extrato de etanol absoluto (EEt100) foi o o que demonstrou menor rendimento enquanto o etanol 50% (EEt50) foi o que apresentou

uma maior eficiência extrativa, seguido pelo extrato de éter de petróleo (EEP-A) (Tabela 12).

**Tabela 12** – Matéria seca das folhas de *Acanthus mollis* e rendimento dos extratos.



#### 4.1.2. Pesquisa de fitoconstituintes por TLC

A TLC é uma técnica cromatográfica simples e rápida, que permite rastrear fitoconstituintes bioativos presentes nos extratos de plantas (Srivastava, 2011), recorrendo para isso a eluentes diversos e reveladores mais ou menos específicos de determinados grupos químicos (Bolliger *et al.*, 1965). Para uma mesma fase estacionária, cada composto tem a sua afinidade para a fase móvel, podendo, por esta razão ser identificado através do seu fator de retenção (Rf). A cromatografia em camada fina permite assim a obtenção de um cromatograma característico da amostra em análise (Kulkarni *et al.*, 2014).

Para a realização desta técnica utilizaram-se várias fases móveis, e diferentes reveladores para a deteção de diversos grupos de fitoconstituintes. Para a deteção de flavonóides e ácidos fenólicos, utilizou-se o reagente NP-PEG (NP); para as saponinas, os reagentes vanilina-ácido sulfúrico (VS) e anisalaldeído-ácido sulfúrico (AS); a presença de alcalóides foi determinada com reagente de Dragendorff (D); os triterpenóides foram detetados com o reagente Liebermann-Burchard (LB) e os taninos condensados

através do reagente DMACA. Os ácidos hidroxâmicos foram detetados com cloreto de ferro (III) (CF), de acordo com Pratt e colaboradores (1995).

Na tabela 13 encontra-se um resumo dos resultados obtidos para os extratos após a revelação.

**Tabela 13** – Comportamento dos fitoconstituintes dos diversos extratos para os diferentes reveladores. NP para flavonóides e ácidos fenólicos; VS e AS para saponinas; D para alcalóides; LB para triterpenóides; DMACA para taninos; FC para benzoxazinóides.

Extrato	NP	VS	AS	D	LB	DMACA	CF
<b>EEP-A</b>	+++	++	+	++	++	-	+++
<b>EC</b>	-	++	-	-	+++	-	++
<b>EEt100</b>	++	-	-	+	+	-	+
<b>EEt50</b>	++	+	+	-	+	-	-
<b>EH<sub>2</sub>O</b>	+	+	++	-	+	-	-
<b>ED</b>	++	+	++	-	+	-	-
<b>EI</b>	++	+	++	-	+	-	-

**Extratos:** **EEP-A** – 1ª extração com éter de petróleo; **EC** – Extrato de clorofórmio; **EEt100** – Extrato de etanol absoluto; **EEt50** – Extrato de etanol 50%; **EH<sub>2</sub>O** – Extrato de água; **ED** – Extrato obtido por decocção; **EI** – Extrato obtido por infusão. **Reveladores:** **NP** – Reagente NP-PEG; **VS** – Reagente vanilina-ácido sulfúrico; **AS** – Reagente anisaldeído-ácido sulfúrico; **D** – Reagente de Dragendorff; **LB** – Reagente Liebermann-Burchard; **DMACA** – Reagente DMACA; **CF** – Cloreto de ferro (III).

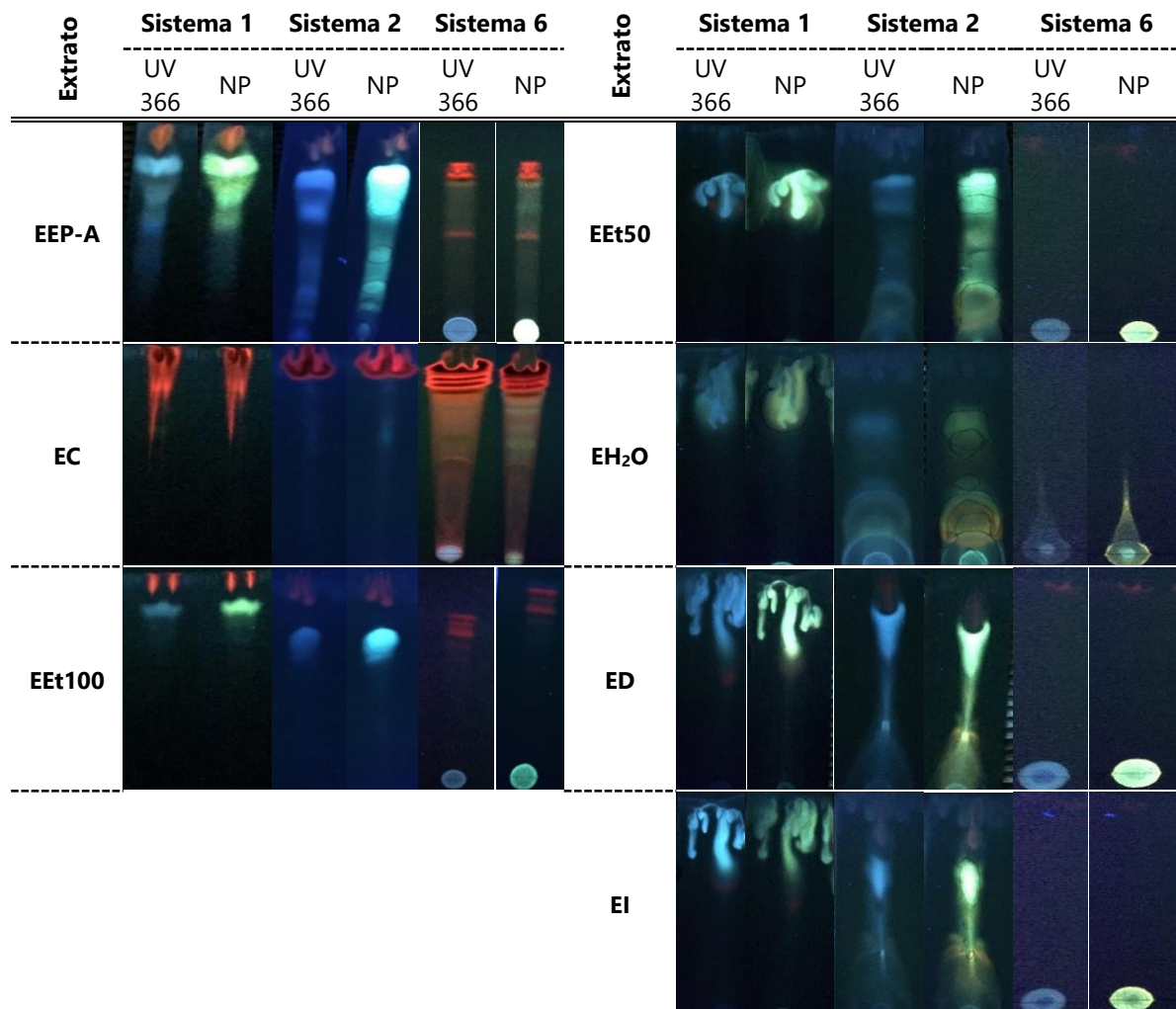
Os flavonóides e ácidos fenólicos estão presentes na maioria dos extratos, exceto em EC. A presença de saponinas foi mais evidente nos extratos EEP-A e EC, quando pulverizadas com VS, enquanto com AS esta presença mostrou-se mais significativa nos extratos aquosos, ou seja, EI, ED, EH<sub>2</sub>O. Reação comum aos alcalóides foi detetada em EEP-A e EEt100, no entanto, com maior intensidade no primeiro. Todos os extratos apresentaram manchas típicas de triterpenóides, no entanto, EEP-A e EC foram os que mostraram maior quantidade destes compostos. Em nenhum dos extratos foram encontrados taninos do tipo condensado. Benzoxazinóides evidenciaram a sua presença em EEP-A, EC e EEt100, com maior abundância em EEP-A.



### 4.1.2.1. Flavonóides e ácidos fenólicos

Todos os flavonóides dependendo do tipo de estrutura, quando observados a 366 nm, podem apresentar fluorescência ou ausência desta (Wagner e Bladt, 2001). Na presença de reveladores apropriados, estas fluorescências sob luz ultravioleta (366 nm), podem intensificar ou mesmo modificar a cor. Os flavonóides, mais concretamente as flavonas e os flavonóis, podem ser distinguidos pela cor, aquando da revelação das placas com NP-PEG (NP). Apresentam uma coloração alaranjada quando há uma di-hidroxilação no anel B em 3'e 4', mas quando são mono-hidroxilados em 4', a fluorescência é amarela esverdeada (Wagner e Bladt, 2001). Sob luz ultravioleta, a 366 nm, os ácidos fenólicos apresentam uma fluorescência azul, enquanto os derivados da apigenina emitem uma fluorescência amarela esverdeada e os derivados da luteolina aparecem alaranjados (Quideau, 2006).

Para a pesquisar a presença de flavonóides ou ácidos fenólicos nos extratos, usou-se o revelador NP-PEG após separação cromatográfica em vários sistemas (Figura 6).



**Figura 6** – Detecção da presença de ácidos fenólicos e flavonóides nos extratos, por TLC. **Sistema 1** – acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-água (100:11:11:26); **Sistema 2** – *n*-butanol-ácido acético-água (40:50:10); **Sistema 6** – *n*-hexano-acetona (1:1). **Extratos:** **EEP-A** – 1ª extração com éter de petróleo; **EC** – Extrato de clorofórmio; **EEt100** – Extrato de etanol absoluto; **EEt50** – Extrato de etanol 50%; **EH<sub>2</sub>O** – Extrato de água; **ED** – Extrato obtido por decocção; **EI** – Extrato obtido por infusão. **Revelador:** **NP** – Reagente NP-PEG/UV 366 nm.

Foi aplicado o sistema para glicósidos (S1), não se tendo verificado uma boa separação, Este comportamento dever-se-á provavelmente ao carácter muito polar dos compostos fenólicos presentes. Por esta razão foram usados outros sistemas, como podemos observar pela figura 6, onde foi possível extrair mais informações relativamente aos compostos presentes nos extratos. Os extratos dos solventes mais polares, ou seja, EEt50, EH<sub>2</sub>O, ED e EI apresentaram algumas semelhanças no perfil cromatográfico, enquanto os extratos EEP-A, EC e EEt100 contêm compostos com menor polaridade, apresentando mais clorofila (manchas vermelhas). Na análise por TLC, a maioria dos extratos apresentaram manchas de coloração azul fluorescente a

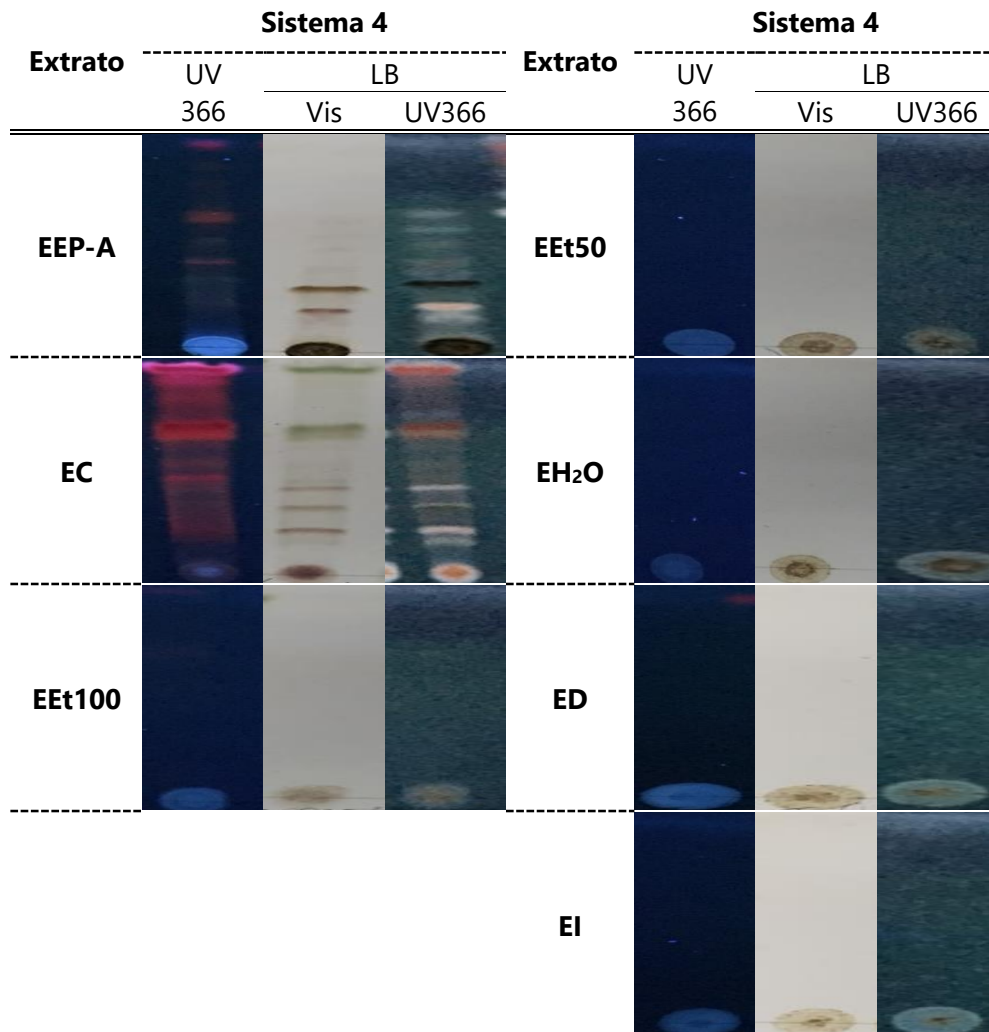
366 nm que poderá ser indicador de ácidos fenólicos. Porém, após aplicação do revelador NP, estes adquirem coloração amarela esverdeada que pode ser indicadora de alguns tipos de flavonóides. De realçar que o extrato EC não ilustrou nem a presença de ácidos fenólicos nem flavonóides, tendo na sua constituição maioritariamente clorofila.

##### 4.1.2.2. Taninos

Os taninos podem ser hidrolisáveis ou condensados, também denominados de proantocianidinas, que são de estrutura variável e complexa (Monteiro *et al.*, 2005), normalmente constituídos por unidades de flavanóis. O revelador utilizado para a determinação da presença de taninos condensados, foi o reagente DMACA. Este reagente ao ligar-se aos anéis benzénicos com dois ou três hidroxilos no anel A e com uma ligação simples na posição 2,3 do anel C, apresenta uma coloração verde, à luz visível (Preedy, 2014). Neste ensaio, não foram detetados taninos condensados em nenhum dos extratos uma vez que não foram observadas quaisquer manchas de cor verde.

##### 4.1.2.3. Triterpenóides

Tal como as saponinas, os triterpenos também pertencem ao grupo dos triterpenóides, sendo constituídos por 30 átomos de carbono, ou seja, 6 unidades isopropénicas (Neves e Cunha, 2012). São muitas vezes associados à proteção da planta contra insetos e pragas, e detetam-se por TLC (Oleszek, Kapusta e Stochmal, 2007) nomeadamente com o revelador Liebermann-Burchard (LB). Na presença de triterpenos, ocorrem manchas de cor azul, verde, rosa, castanha ou amarelada quando observada ao visível ou à luz ultravioleta (366 nm) após a aplicação do revelador (Oleszek, Kapusta e Stochmal, 2007). Na figura 7 apresentam-se as placas de TLC desenvolvidas no sistema 4, com a aplicação do revelador LB.



**Figura 7** – Detecção da presença de triterpenos nos extratos, por TLC. **Sistema 4** – tolueno-clorofórmio-etanol (40:40:10). **Extratos:** **EEP-A** – 1ª extração com éter de petróleo; **EC** – Extrato de clorofórmio; **EEt100** – Extrato de etanol absoluto; **EEt50** – Extrato de etanol 50%; **EH<sub>2</sub>O** – Extrato de água; **ED** – Extrato da decocção; **EI** – Extrato da infusão. **Revelador:** **LB** – Reagente de Liebermann-Burchard/UV 366 nm.

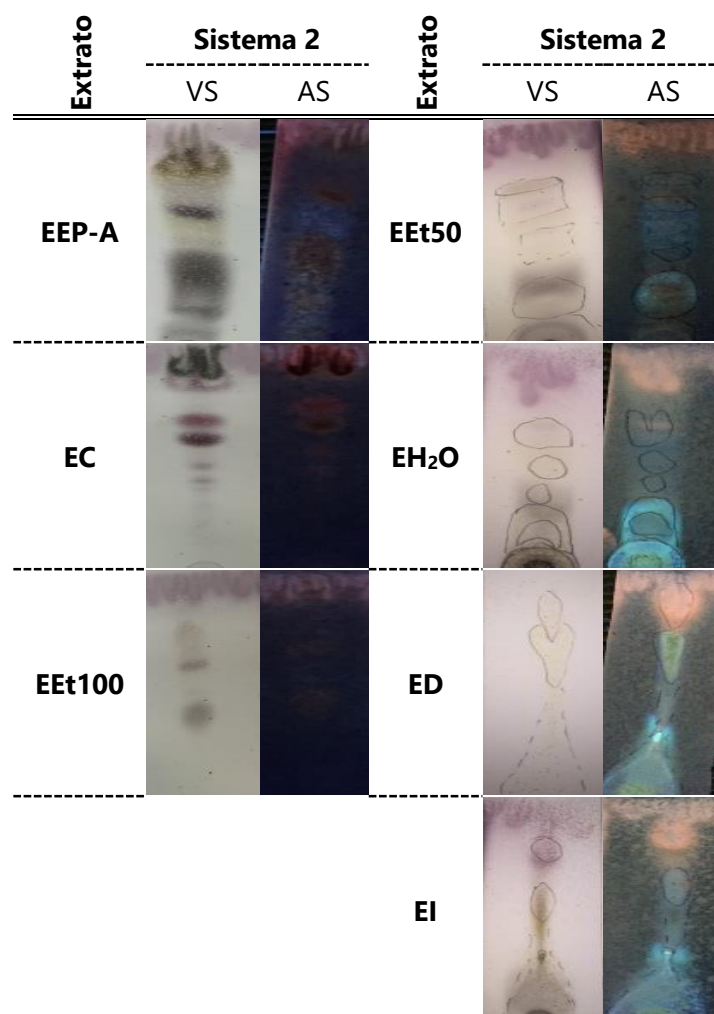
Nos extratos EEP-A e EC observaram-se manchas com comportamento comum a triterpenos, enquanto nos extratos mais polares ocorreram manchas difusas, esverdeadas, que podem corresponder a outro tipo de compostos.

A presença de terpenóides detetada neste trabalho, no *Acanthus mollis*, corrobora os resultados de Attard e Pacioni (2011), para além de ter permitido detetar a presença de flavonoides, ácidos fenólicos e de alcalóides.

## 4.1.2.4. Saponinas

As saponinas fazem parte do grande grupo dos triterpenóides, juntamente com os triterpenos, os esteróides e os glicósidos cardíacos (Oleszek, Kapusta e Stochmal, 2007). Estas encontram-se nas plantas, geralmente na forma glicosilada, ou seja, a aglicona ligada a açúcares, e podem ser classificadas como esteroidais ou triterpénicas, de acordo com a natureza da genina (Gangwal A, 2013).

A presença de saponinas nos extratos foi pesquisada em vários sistemas cromatográficos, e as placas reveladas com VS e AS (Figura 8).



**Figura 8** – Detecção de saponinas nos extratos, por TLC. **Sistema 2** – *n*-butanol-ácido acético-água (40:50:10). **Extratos:** **EEP-A** – 1ª extração com éter de petróleo; **EC** – Extrato de clorofórmio; **EEt100** – Extrato de etanol absoluto; **EEt50** – Extrato de etanol 50%; **EH<sub>2</sub>O** – Extrato de água; **ED** – Extrato obtido por decocção; **EI** – Extrato obtido por infusão. **Reveladores:** **VS** – Reagente vanilina-ácido sulfúrico/Visível; **AS** – Reagente anisaldeído-ácido sulfúrico/UV 366 nm.

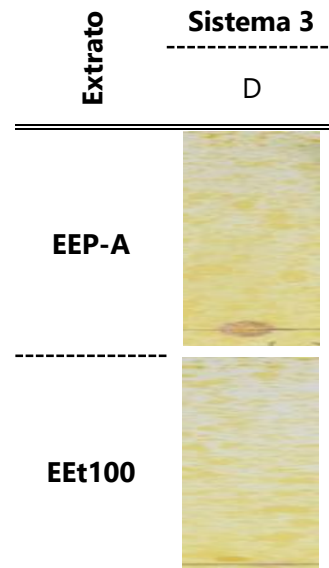
Na ausência de reveladores, as saponinas não são detetáveis e por isso a necessidade da utilização de um revelador (Wagner e Bladt, 2001). Com o reagente vanilina-ácido sulfúrico (VS) as saponinas apresentam-se, ao visível, com coloração azul, azul-violeta, vermelho ou amarelo-acastanhado, sendo que à luz ultravioleta não foram observadas quaisquer manchas fluorescentes. O mesmo acontece com o reagente anisaldeído-ácido sulfúrico (AS), no entanto, sob luz ultravioleta (366 nm), as manchas aparecem com fluorescência violeta, verde e azul (Wagner e Bladt, 2001).

Quando observadas ao visível, as placas reveladas com VS, apresentaram manchas amarelas-acastanhadas, para os extratos EI, ED, EEP-A, EEt50 e EH<sub>2</sub>O.

Com o revelador AS, a 366 nm, as manchas eram preferencialmente azuis e verdes, apresentando-se em maior quantidade nos extratos EI, ED e EH<sub>2</sub>O, ou seja, todos os extratos aquosos, o que sugere que estes compostos se encontram maioritariamente na forma glicosilada.

##### 4.1.2.5. Alcalóides

Os alcalóides são aminas predominantemente cíclicas com anéis heterocíclicos que têm na sua constituição um ou mais átomos de azoto. Alguns tipos de alcalóides exibem *quenching* quando observados à luz ultravioleta (254 nm), podendo a 366 nm apresentar manchas de cor azul, violeta, azul esverdeada ou amarela, dependendo do tipo de alcalóide (Wagner e Bladt, 2001). No entanto este comportamento é comum a outros fitoconstituintes, sendo por isso utilizado o reagente de Dragendorff (D), como demonstra a figura 9. Este reagente foi sofrendo modificações ao longo dos tempos, e apesar de detetar compostos não alcalóides, continua a ser bastante utilizado para este fim (Svendsen e Verpoorte, 1983). Com este revelador, os alcalóides indólicos apresentam uma coloração, à luz visível, castanha ou laranja acastanhada, sob fundo amarelo (Waksmundzka-Hajnos, Sherma e Kowalska, 2008). A sensibilidade do reagente para estes compostos não é muito estável, podendo as manchas desaparecer rapidamente (Fried e Sherma, 1996).

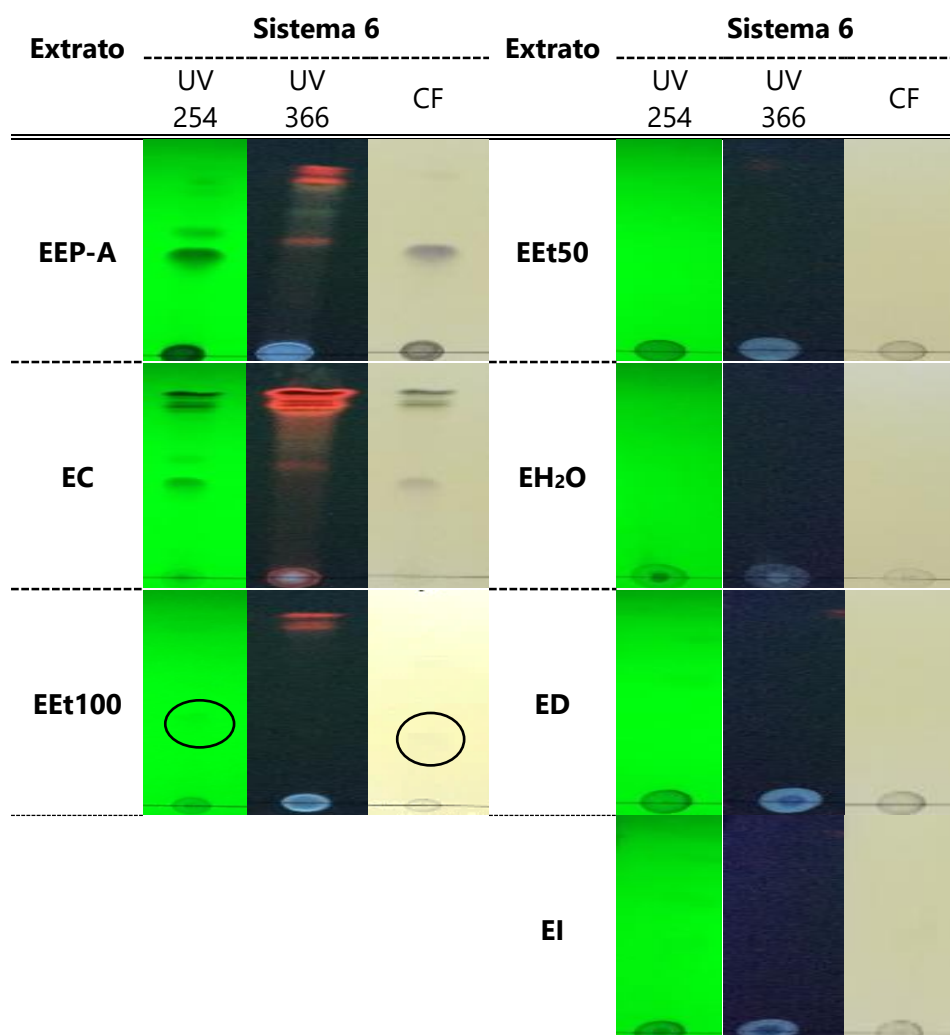


**Figura 9** – Detecção da presença de alcalóides nos extratos EEP-A e EEt100, por TLC. **Sistema 3** – acetato de etilo-metanol-água (100:13,5:10). **Extratos: EEP-A** – 1<sup>a</sup> extração com éter de petróleo; **EEt100** – Extrato de etanol absoluto. **Revelador: D** – Reagente de Dragendorff/Visível.

A presença de alcalóides foi detetada nos extratos EEP-A e EEt100, embora em maior quantidade no primeiro e a coloração obtida sugere a sua natureza indólica.

#### 4.1.2.6. Benzoxazinóides

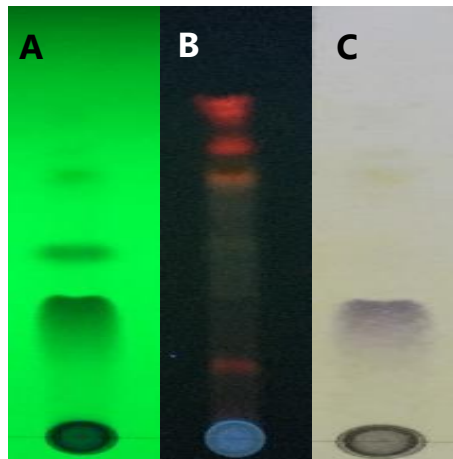
Pratt e colaboradores (1995) identificaram alguns compostos do grupo dos benzoxazinóides, mais concretamente, ácidos hidroxâmicos cíclicos. Estes metabolitos são detetados quando a placa é observada à luz ultravioleta a 254 nm, pois apresentam *quenching*, não exibindo fluorescência a 366 nm. Ao pulverizar a placa com cloreto de ferro (III) (CF), alguns dos ácidos hidroxâmicos, aparecem com cor azul, passando a castanho ao longo do tempo, ou apresentam-se de cor violeta-acastanhada quando a placa é deixada *overnight*. O composto DIMBOA, em contrapartida apresenta uma cor vermelha-acastanhada e o DIBOA dá origem a manchas de cor amarelada, *overnight*. Esta técnica tem algumas limitações, visto que nem todos os benzoxazinóides reagem com CF, nomeadamente as benzoxazolinonas (BOA e MBOA) (Rice *et al.*, 2005). Na figura 10, encontram-se ilustrados cromatogramas obtidos no sistema 6 e observados aos UV e ao visível após revelação com CF.



**Figura 10** – Pesquisa de benzoxazinóides nos extratos, por TLC. **Sistema 6** – *n*-hexano-acetona (1:1). **Extratos:** **EEP-A** – 1ª extração com éter de petróleo; **EC** – Extrato de clorofórmio; **EEt100** – Extrato de etanol absoluto; **EEt50** – Extrato de etanol 50%; **EH<sub>2</sub>O** – Extrato de água; **ED** – Extrato obtido por decocção; **EI** – Extrato obtido por infusão. **Revelador:** **CF** – Cloreto de ferro (III)/Visível.

Após análise da figura, podemos concluir que os extratos EEP, EC e o EEt100 ( $R_f = 0,43$ ) continham benzoxazinóides. É possível verificar que grande parte destes compostos foi extraída na primeira extração (EEP-A). O sistema 6 revelou-se eficiente na separação cromatográfica e tal como referido anteriormente, estes compostos exibem *quenching* da fluorescência da fase estacionária, a 254 nm, e uma coloração violeta, no visível, após revelação com CF (Figura 11).





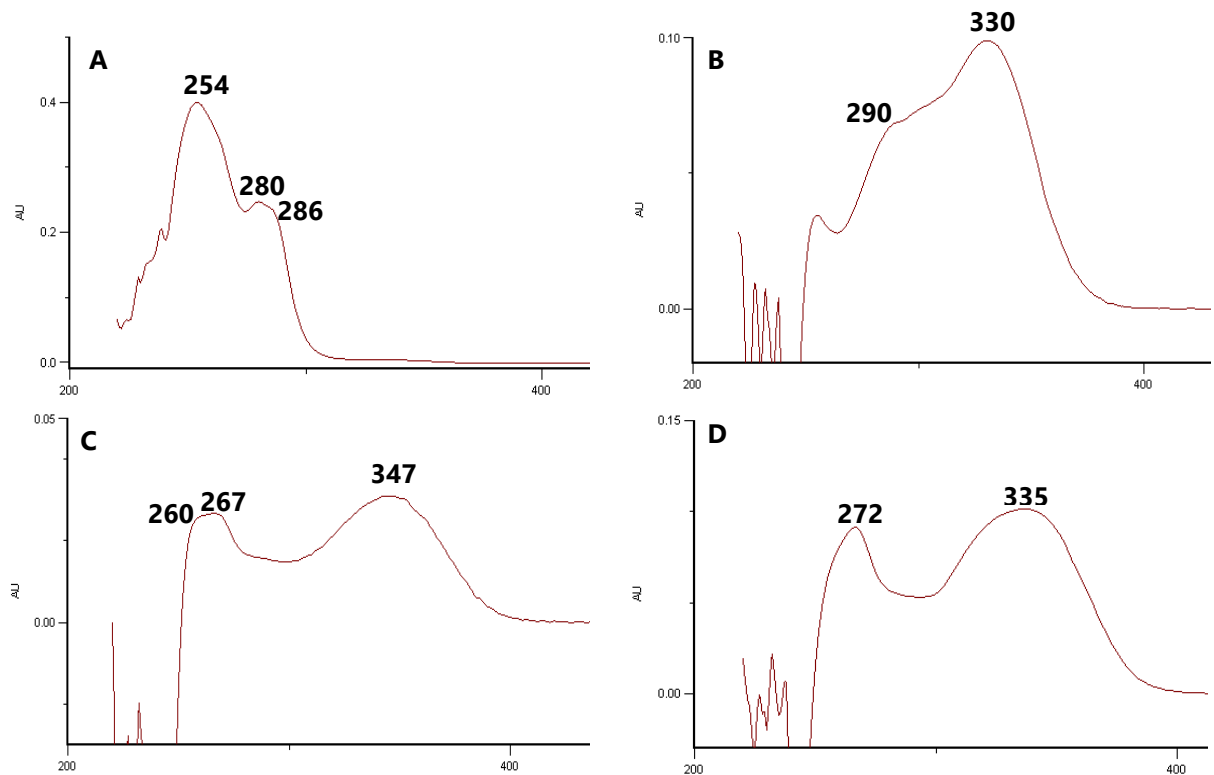
**Figura 11** – Extrato EEP-A antes e após revelação com CF (sistema 6). **A** – Observação a 254 nm, sem pulverização de CF; **B** – Observação a 366 nm, sem pulverização de CF; **C** – Observação à luz visível, após pulverização com CF. **Sistema 6** – *n*-hexano-acetona (1:1). **Extrato: EEP-A** – 1ª extração com éter de petróleo. **Revelador: CF** – Cloreto de ferro (III)/Visível.

#### 4.1.3. Perfis cromatográficos dos extratos por HPLC-PDA

Para obter mais informação estrutural, todos os extratos acima referidos foram analisados por HPLC-PDA; extratos EEP-A, EC e EEt100 no sistema 7, e EEt100,EEt50, EH<sub>2</sub>O, ED e EI no sistema 8.

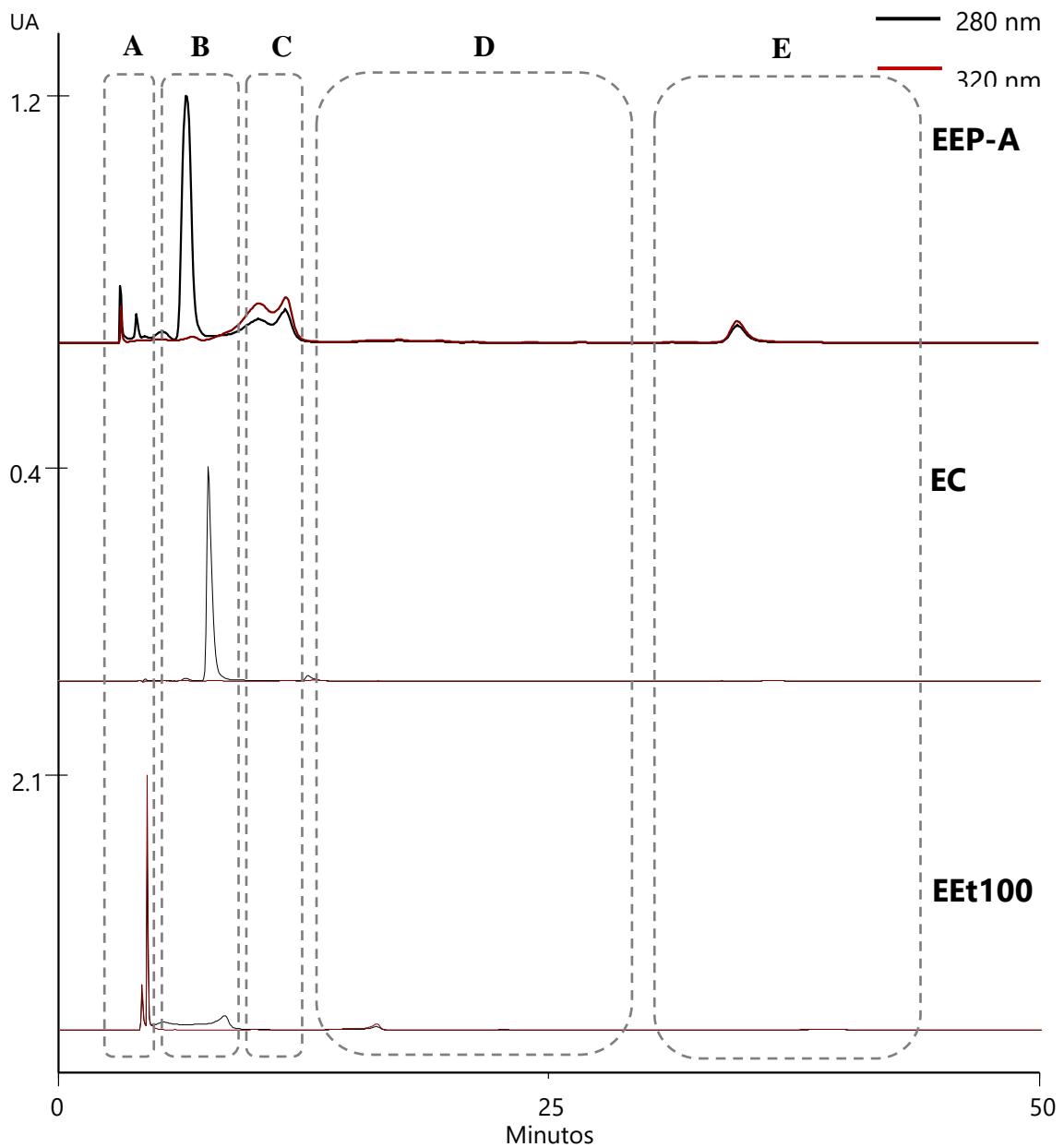
A análise espectral UV-Vis evidenciou a presença de dois tipos de compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonóides) e de ácidos hidroxâmicos cíclicos, derivados do DIBOA (Figura 12). Dos espectros dos ácidos fenólicos destacaram-se os derivados do ácido cafeico (ou ácido ferúlico) (Figura 12B), pelo seu perfil e máximos de absorção, de acordo com Plazonić e colaboradores (2009). Os flavonóides apresentaram espectros de flavonas, com as suas duas bandas de absorção características (banda I entre os 331-347 nm e a banda II entre 253-272 nm) (Figura 12C e 12D). Os espectros observados correspondem a dois tipos de flavonas: com anel B dihidroxilado, com um máximo e uma inflexão na banda II (Figura 12C), e com anel B monohidroxilado, apresentando apenas um máximo na banda II a 272 nm (Figura 12C e 12D) (Waksmundzka-Hajnos *et al.*, 2010).

Os benzoxazinóides, derivados do DIBOA, mostram espectros UV-Vis característicos deste tipo de compostos, com  $\lambda_{\text{máx}}$  a 254 e 280 nm e inflexão a 286 nm (Bailey e Larson, 1989).



**Figura 12** – Exemplos de espectros de UV-Vis dos compostos presentes nos extratos de *Acanthus mollis*, obtidos por HPLC-PDA (**sistema 7** e **sistema 8**).

O perfil cromatográfico dos extratos menos polares (EEP, EC e EEt100) no sistema 7, assim como a classe de compostos presentes nestes extratos encontra-se ilustrado na figura 13 e na tabela 14, respetivamente.



**Figura 13** – Cromatogramas dos extratos EEP-A, EC e EEt100 das folhas de *Acanthus mollis* obtidos por HPLC-PDA (**sistema7**).

O extrato de éter de petróleo (EEP-A) foi o primeiro a ser obtido durante a extração sequencial, seguido do extrato de clorofórmio (EC) e do extrato de etanol absoluto (EEt100). Nos cromatogramas é possível delimitar cinco zonas ou áreas nas quais se detetaram diferentes tipos de compostos. Na zona A ocorrem ácidos fenólicos, que só foram extraídos com o etanol, não aparecendo nos outros extratos. Os compostos benzoxazinóides foram detetados na zona B. Os tempos de retenção dos compostos extraídos pelos diferentes solventes, sugerem que estes solventes extraem

compostos distintos. No entanto EEP-A e EC apresentam um perfil cromatográfico semelhante nesta zona, o mesmo não se verificando para o EEt100, para o qual, o sistema 7 não foi eficaz na separação destes compostos. O éter de petróleo (EEP-A) extraiu ácidos fenólicos que eluíram na zona C do cromatograma e que não foram extraídos pelos outros solventes da extração sequenciada. Na zona D eluíram pequenas quantidades de ácidos fenólicos. Já na zona E é possível detetar flavonóides, embora a sua quantidade tenha sido mais expressiva no extrato de éter de petróleo do que nos restantes.

No cromatograma do extrato EEP-A observa-se um pico maioritário cujo espectro UV-Vis sugere a presença de um derivado de DIBOA ( $t_R = 6,53$ ) (Figura 12A). Adicionalmente, ocorrem picos menos representativos, com espectros UV-Vis típicos dos derivados do ácido cafeico/ferúlico (Figura 12B) e de flavonas com anel B monohidroxilado, do tipo apigenina (Figura 12C). O extrato EC também apresenta um pico ao qual corresponde um espectro relacionado com a presença de derivados de DIBOA ( $t_R = 7,66$ ), mas em menor quantidade e com tempo de retenção diferente do EEP-A, sugerindo poder eventualmente corresponder a compostos diferentes.

O extrato EEt100 apresenta também o mesmo tipo de compostos detetados no extrato EEP-A; compostos benzoxazinóides, derivados do ácido cafeico/ferúlico e uma flavona do tipo apigenina. Trata-se muito provavelmente de compostos diferentes dos detetados nos extratos anteriores.

**Tabela 14** – Tentativa de identificação da classe de compostos presentes nos extratos EEP-A, EC e EEt100, no sistema 7.

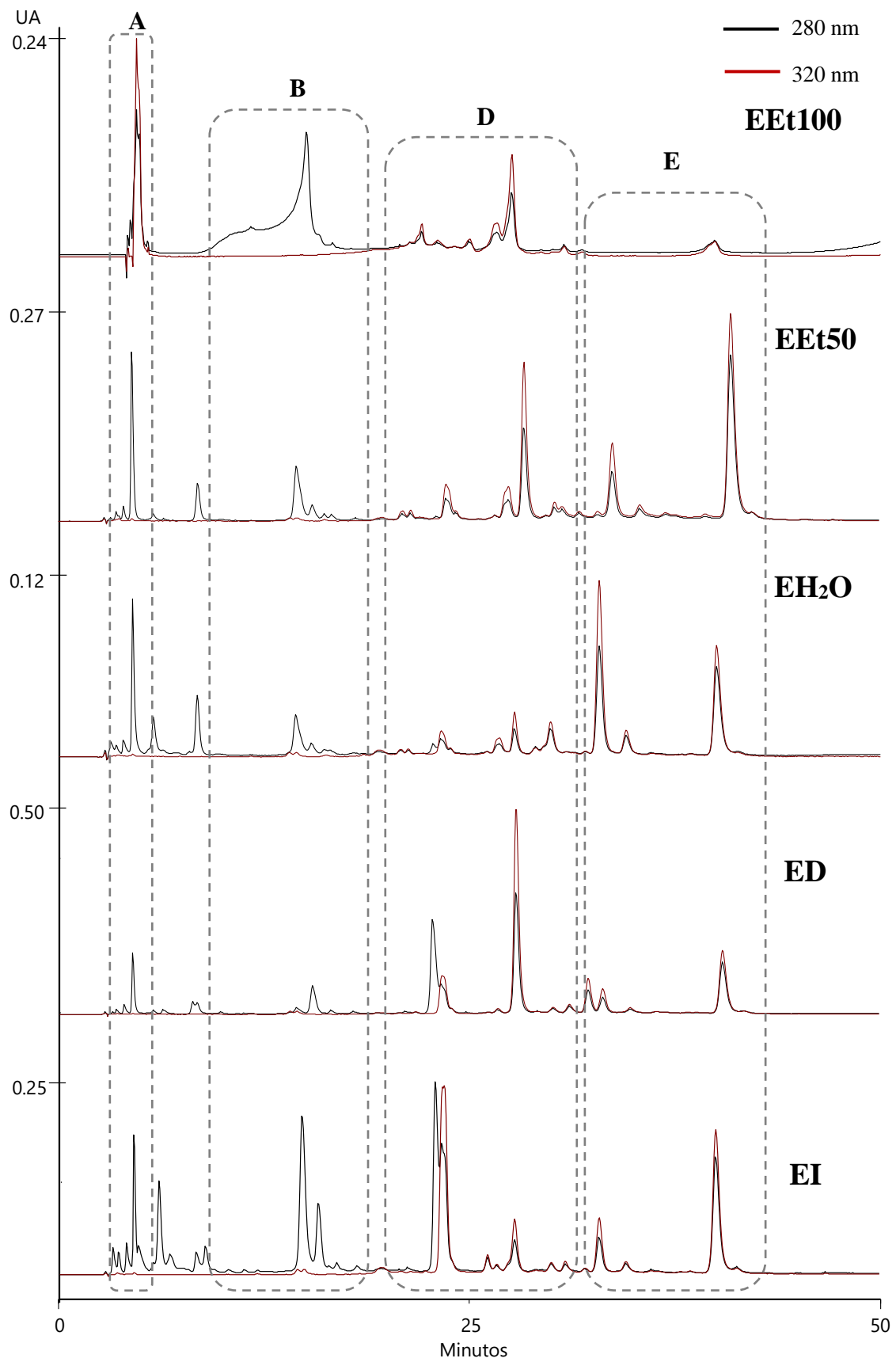
Zona	$t_R$ (min)	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)	Identificação da classe do composto	Extrato
<b>A</b>	4,45	249, 289sh, 303sh, 329sh, 334	Ácido Fenólico	<b>EEt100</b>
	4,55	256, 288sh, 303sh, 331	Ácido Fenólico	<b>EEt100</b>
<b>B</b>	5,24	253, 264sh, 280, 286sh	Benzoxazinóide	<b>EEt100</b>
	6,53	253, 263sh, 280, 286sh	Benzoxazinóide	<b>EEP-A</b>
	7,66	253, 263sh, 280, 287sh	Benzoxazinóide	<b>EC</b>
	8,39	254, 264sh, 280, 286sh	Benzoxazinóide	<b>EEt100</b>

**Tabela 14** – Tentativa de identificação da classe de compostos presentes nos extratos EEP-A, EC e EEt100, no sistema 7 (continuação).

Zona	$t_R$ (min)	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)	Identificação da classe do composto	Extrato
<b>C</b>	10,24	245, 289sh, 300sh, 331	Ácido Fenólico	<b>EEP-A</b>
	11,55	246, 271sh, 279sh, 289sh, 303sh, 331	Ácido Fenólico	<b>EEP-A</b>
<b>D</b>	16,11	248, 288sh, 300sh, 311sh, 331	Ácido Fenólico	<b>EEt100</b>
	17,41	251, 289sh, 329	Ácido Fenólico	<b>EEP-A</b>
<b>E</b>	34,61	272, 334	Flavona (derivada da apigenina)	<b>EEP-A</b>
	39,24	273, 333	Flavona (derivada da apigenina)	<b>EEt100</b>

Para os extratos mais polares, EEt100, EEt50 e EH<sub>2</sub>O da extração sequenciada e os extratos EI e ED os perfis cromatográficos, no sistema 8, e a identificação das classes de compostos presentes, encontram-se ilustrados na tabela 15 e na figura 14. Tal como referido anteriormente na zona A do cromatograma eluem ácidos fenólicos que são extraídos pelo etanol absoluto, não aparecendo nos outros solventes de extração (EEt50 e EH<sub>2</sub>O) nem no decocto e infuso. Na zona B estão presentes os benzoxazinóides. Neste gradiente é possível verificar a existência de mais do que um tipo destes compostos, devido à boa separação cromatográfica, observada nos extratos EEt50 e EH<sub>2</sub>O, assim como no EI e no ED. Este sistema permite também uma boa separação dos ácidos fenólicos e os flavonóides que eluem na zona D, e que foram sendo extraídos com os diversos solventes, embora em concentrações diferentes. Na zona E do perfil cromatográfico é visível a presença de mais compostos do tipo flavonóide, sendo estes maioritariamente extraídos com o etanol absoluto (EEt100), o etanol a 50% (EEt50) e a água (EH<sub>2</sub>O) na extração sequenciada, assim como pela decocção (ED) e infusão (EI.) Também neste sistema os perfis cromatográficos são semelhantes, embora os tempos de retenção não sejam totalmente coincidentes.

Tal como anteriormente foi referido, o sistema 7 revelou-se inadequado para separar os ácidos fenólicos presentes no extrato EEt100. No entanto, o sistema 8 permitiu separar os ácidos fenólicos e simultaneamente confirmar a presença de vários compostos com espectro típico de DIBOA, bem como o de uma flavona com espectro típico de apigenina.



**Figura 14** – Cromatogramas dos extratos EEP-A, EC, EEt100, ED e EI de *Acanthus mollis* obtidos por HPLC-PDA (**sistema 8**).

#### 4. Resultados e Discussão

Os extratos de etanol 50% (EEt50) e aquoso (EH<sub>2</sub>O) apresentam uma composição química semelhante. No extrato de etanol a 50%, um solvente mais polar que o etanol absoluto, a separação e identificação dos compostos, permitiu observar a presença maioritária de compostos fenólicos, como ilustrado na figura 14. Os compostos com tempos de retenção 14,49 e 15,46 min (zona B) apresentam um espectro de UV típico do ácido hidroxâmico cíclico, DIBOA. Todos os restantes compostos exibem espectros característicos de compostos fenólicos, ácidos fenólicos ou flavonóides. Os fitoconstituintes correspondentes aos picos cujo tempo de retenção varia entre os 20,92 e os 32,82 min (zona D) apresentam um espectro característico do derivado do ácido cafeico/ferúlico, enquanto os compostos com tempos de retenção de 33,72; 40,92 e 42,28 min e também 35,39 min, na zona E têm espectros UV de flavonas, comuns ao dos derivados da apigenina e da luteolina, respetivamente.

Os extratos da decocção (ED) e da infusão (EI) apresentaram bastantes fitoconstituintes com comportamento cromatográfico e espectral comuns. Em ambos extratos ocorre DIBOA, ácidos fenólicos e flavonoides, nomeadamente derivados da apigenina e da luteolina. No entanto, enquanto no decocto predominam ácidos fenólicos, o infuso é particularmente abundante em ácidos hidroxâmicos cíclicos (Tabela 15).

**Tabela 15** – Tentativa de identificação da classe de compostos presentes nos extratos EEt100, EEt50, EH<sub>2</sub>O, ED e EI.

Zona	t <sub>R</sub> (min)	λ <sub>máx</sub> (nm)	Identificação da classe do composto	Extrato
A	4,68	255, 287sh, 303sh, 331	Ácido Fenólico	EEt100
	4,90	256, 288sh, 330	Ácido Fenólico	EEt100
	11,65	255, 280, 286sh	Benzoxazinóide	EEt100
B	14,39	255, 264sh, 280, 287sh, 331	Benzoxazinóide	EH <sub>2</sub> O
	14,49	254, 280, 286sh, 336	Benzoxazinóide	EEt50
	14,79	254, 280, 286sh	Benzoxazinóide	EI
	15,04	254, 280, 286sh	Benzoxazinóide	EEt100
	15,36	256, 264sh, 278, 285sh	Benzoxazinóide	EH <sub>2</sub> O
	15,44	253, 278, 285sh	Benzoxazinóide	ED
	15,46	256, 280, 286sh	Benzoxazinóide	EEt50

**Tabela 15** – Tentativa de identificação da classe de compostos presentes nos extratos EEt100, EEt50, EH<sub>2</sub>O, ED e EI (continuação).

Zona	t <sub>R</sub> (min)	λ <sub>máx</sub> (nm)	Identificação da classe do composto	Extrato
<b>B</b>	15,78	253, 278, 285sh	Benzoxazinóide	<b>EI</b>
	16,58	257, 279, 284sh	Benzoxazinóide	<b>ED</b>
	20,92	258, 287sh, 330	Ácido Fenólico	<b>EEt50</b>
	21,45	258, 287sh, 330	Ácido Fenólico	<b>EEt50</b>
	22,06	257, 289sh, 304sh, 331	Ácido Fenólico	<b>EEt100</b>
	22,90	260, 290sh, 331	Ácido Fenólico	<b>EI</b>
	23,03	258, 288sh, 331	Ácido Fenólico	<b>EEt100</b>
	23,25	260, 280sh, 303sh, 331	Ácido Fenólico	<b>EH<sub>2</sub>O</b>
	23,26	255, 290sh, 330	Ácido Fenólico	<b>ED</b>
	23,31	252, 279sh, 287sh, 301sh, 331	Ácido Fenólico	<b>EI</b>
	23,59	256, 286sh, 331	Ácido Fenólico	<b>EEt50</b>
	24,97	259, 286sh, 331	Ácido Fenólico	<b>EEt100</b>
	26,48	257, 288sh, 331	Ácido Fenólico	<b>EEt100</b>
	26,73	259, 286sh, 328	Ácido Fenólico	<b>ED</b>
	26,74	260, 286sh, 331	Ácido Fenólico	<b>EH<sub>2</sub>O</b>
	27,38	256, 287sh, 303sh, 331	Ácido Fenólico	<b>EEt50</b>
	<b>D</b>	27,53	254, 289sh, 303sh, 331	Ácido Fenólico
27,70		258, 289sh, 331	Ácido Fenólico	<b>EH<sub>2</sub>O</b>
27,73		255, 289sh, 330	Ácido Fenólico	<b>EI</b>
27,84		251, 289sh, 301sh, 331	Ácido Fenólico	<b>ED</b>
28,34		253, 286sh, 303sh, 331	Ácido Fenólico	<b>EEt50</b>
29,90		263, 347	Flavona (derivada da Luteolina)	<b>EH<sub>2</sub>O</b>
29,96		264, 286sh, 345	Flavona (derivada da Luteolina)	<b>EI</b>
30,09		260sh, 267, 290sh, 346	Flavona (derivada da Luteolina)	<b>ED</b>
30,20		258, 287sh, 303sh, 333	Ácido Fenólico	<b>EEt50</b>
30,66		259sh, 267, 344	Flavona (derivada da Luteolina)	<b>EEt50</b>
31,09		259, 287sh, 330	Ácido Fenólico	<b>ED</b>
31,69		260, 287sh, 330	Ácido Fenólico	<b>EEt50</b>
32,23		256, 288sh, 328	Ácido Fenólico	<b>ED</b>
32,82		260, 290sh, 330	Ácido Fenólico	<b>EEt50</b>
<b>E</b>	32,85	258sh, 267, 335	Flavona (derivada da Apigenina)	<b>EH<sub>2</sub>O</b>
	32,88	267, 337	Flavona (derivada da Apigenina)	<b>EI</b>



**Tabela 15** – Tentativa de identificação da classe de compostos presentes nos extratos EEt100, EEt50, EH<sub>2</sub>O, ED e EI (continuação).

Zona	t <sub>R</sub> (min)	λ <sub>máx</sub> (nm)	Identificação da classe do composto	Extrato
E	33,12	267, 336	Flavona (derivada da Apigenina)	ED
	33,72	267, 335	Flavona (derivada da Apigenina)	EEt50
	34,49	260sh, 268, 347	Flavona (derivada da Luteolina)	EH <sub>2</sub> O
	34,51	260sh, 268, 289sh, 345	Flavona (derivada da Luteolina)	EI
	35,39	260sh, 268, 288sh, 343	Flavona (derivada da Luteolina)	EEt50
	39,87	272, 335	Flavona (derivada da Apigenina)	EEt100
	39,99	272, 335	Flavona (derivada da Apigenina)	EI
	39,99	260sh, 272, 334	Flavona (derivada da Apigenina)	EH <sub>2</sub> O
	40,42	272, 335	Flavona (derivada da Apigenina)	ED
	40,92	271, 334	Flavona (derivada da Apigenina)	EEt50
	42,28	273, 338	Flavona (derivada da Apigenina)	EEt50

Os resultados obtidos por HPLC corroboram a presença de ácidos fenólicos, flavonóides e derivados de ácidos hidroxâmicos cíclicos, sugeridos pelas TLC realizadas, corroborando desta forma os estudos de Rezanka et al. (2009) e Attard e Pacioni (2011) em folhas de *Acanthus mollis*. Foi igualmente patente a influência da natureza do solvente na composição qualitativa e particularmente, quantitativa dos extratos.

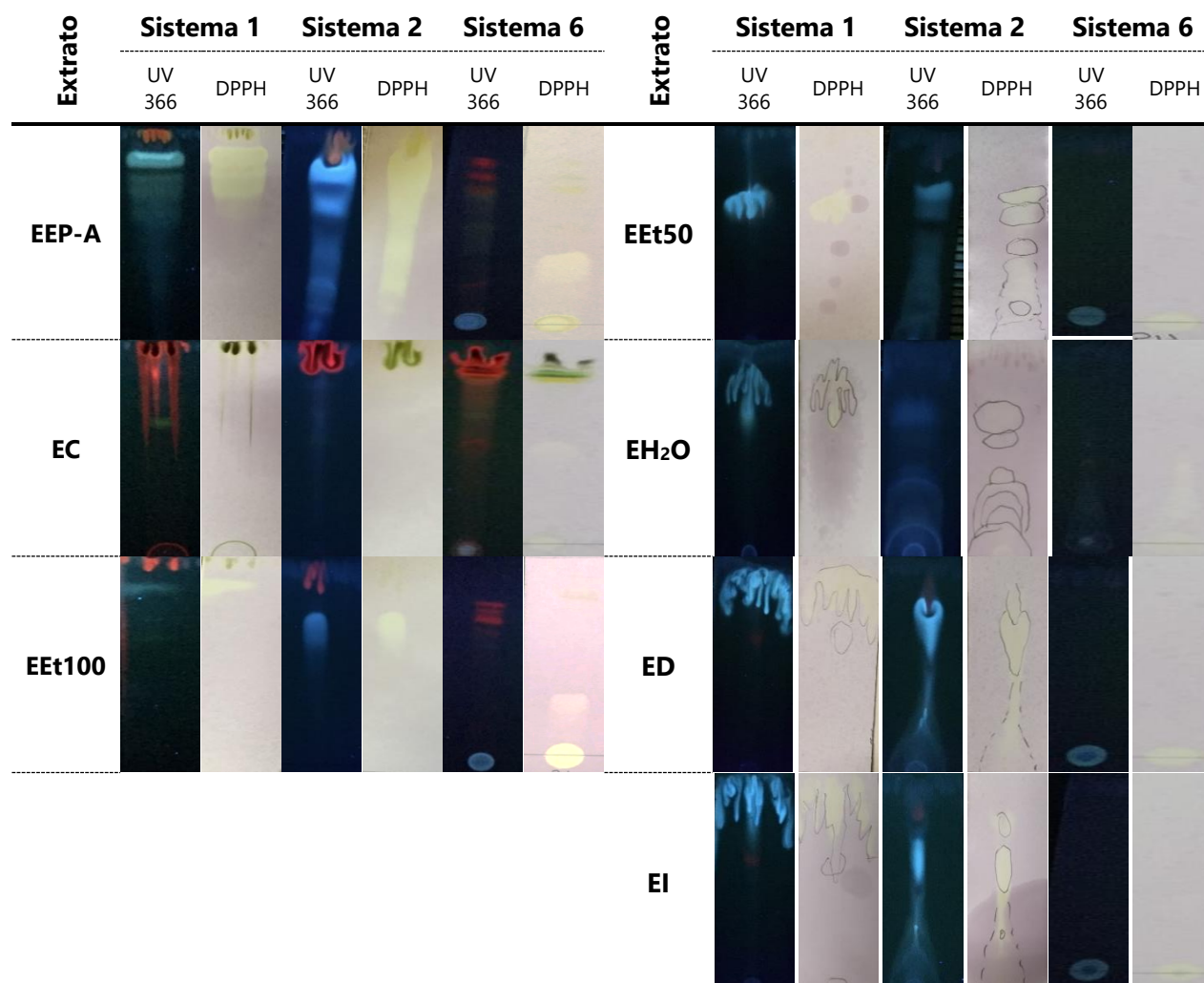
#### 4.1.4. Determinação da atividade antioxidante

##### 4.1.4.1. Análise bio-autográfica

A descoberta de novos antioxidantes em extratos de plantas é cada vez mais importante. Atualmente tem aumentado a utilização de técnicas de cromatografia planar associada à pesquisa de diversas atividades biológicas, tais como antibacteriana, antifúngica, antioxidante, de inibição enzimática, entre outras (Dewanjee *et al.*, 2015), com vantagens evidentes. Sendo esta técnica barata rápida e eficaz na análise

fitoquímica, a fim de identificar novos compostos bioativos, pode ser realizada em pequenos laboratórios, permitindo um rastreio rápido da bioatividade dos fitoconstituintes dos extratos, após a sua separação cromatográfica. Este método foi realizado, pela primeira vez, em 1967, e desde então tem sido utilizado para a realização do *screening* em extratos, a partir de produtos naturais complexos, ou mesmo de compostos isolados (Choma e Jesionek, 2015). Métodos bioautográficos de TLC combinam a separação cromatográfica com a determinação da atividade *in situ* facilitando o isolamento e a localização dos compostos ativos numa mistura (Sasidharan *et al.*, 2011).

Para pesquisar a presença de antioxidantes nos extratos em estudo, pulverizaram-se as placas com DPPH, após eluição em vários sistemas, como podemos observar pela figura 15. A presença de manchas amarelas em fundo violeta, correspondente à redução do DPPH indicando a presença de fitoconstituintes com capacidade de captar o radical, ou seja, com propriedades antioxidantes (Waksmundzka-Hajnos, Sherma e Kowalska, 2008).



**Figura 15** – Detecção da presença de compostos antioxidantes, por TLC. **Sistema 1** – acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-água (100:11:11:26); **Sistema 2** - *n*-butanol-ácido acético-água (40:50:10); **Sistema 6** – *n*-hexano-acetona (1:1). **Extratos:** **EEP-A** – 1ª extração com éter de petróleo; **EC** – Extrato de clorofórmio; **EEt100** – Extrato de etanol absoluto; **EEt50** – Extrato de etanol 50%; **EH<sub>2</sub>O** – Extrato de água; **ED** – Extrato obtido por decocção; **EI** – Extrato obtido por infusão. **Revelador:** **DPPH** – Reagente DPPH/Visível.

Todos os extratos evidenciaram a presença de compostos antioxidantes, destacando-se o EEP-A seguido do EEt100, pela quantidade de manchas resultantes da redução de cor do DPPH. O extrato EEP-A evidenciou-se pela intensidade da coloração amarela apresentada pelas manchas. No sistema 6, uma das manchas apresentou um comportamento idêntico ao descrito para o composto DIBOA, ou seja  $R_f=0,43$  e coloração violeta após revelação com uma solução metanólica de cloreto férrico a 5% (Pratt, Kumar e Chilton, 1995). De facto, a presença de benzoxazinóides nos extratos EEP-A, e EEt100, para além do EC foi igualmente sugerida pelos perfis

cromatográficos de HPLC-PDA. No entanto, em todos os extratos a os dois métodos cromatográficos utilizados evidenciaram a presença de ácidos fenólicos, e tal como a mancha de benzoxazinóide, também os estes compostos apresentam atividade antioxidante. O sistema 6, em TLC, foi o que nos permitiu separar melhor os compostos fenólicos dos benzoxazinóides, ficando os fenólicos no ponto de aplicação. Este sistema ainda nos permitiu verificar que os extratos aquosos apresentam maioritariamente compostos fenólicos na sua constituição, ao invés dos extratos EEP-A, EC e EEt100 (Figura 15).

#### 4.1.4.2. Atividade antioxidante dos extratos EEP-A e EEt100 de *Acanthus mollis*

Nos ensaios de *screening*, por recurso ao ensaio bio-autográfico, os extratos EEP-A e o EEt100 foram os que evidenciaram maior atividade antioxidante. Assim sendo, avaliou-se a concentração de cada extrato com capacidade para captar 50% do radical DPPH. Os valores de IC<sub>50</sub> obtidos foram de 22,47 ± 1,52 µg/mL para o extrato EEP-A e de 20,50 ± 0,47 µg/mL para o extrato EEt100 (Tabela 16). O extrato EEP-A apresentou valores TEAC 10,98 ± 0,99 µg/mL, enquanto o extrato EEt100 obteve valores TEAC de 6,90 ± 0,90 µg/mL.

**Tabela 16** – Atividade antioxidante de extratos EEP-A e EEt100 de *Acanthus mollis*.

<b>Extrato</b>	<b>IC<sub>50</sub> (Média ± Desvio Padrão)*</b>	<b>TEAC (Desvio Padrão)*</b>
<b>EEP-A</b>	22,47 ± 1,52	10,98 ± 0,99
<b>EEt100</b>	20,50 ± 0,47	6,90 ± 0,90

\*µg de extrato seco/ mL de mistura reacional (N=3)

Outros estudos realizados em *Acanthus mollis*, em extratos metanólicos, demonstraram valores de IC<sub>50</sub> superiores a 100 µg/mL para o método de DPPH (Bader *et al.*, 2015).

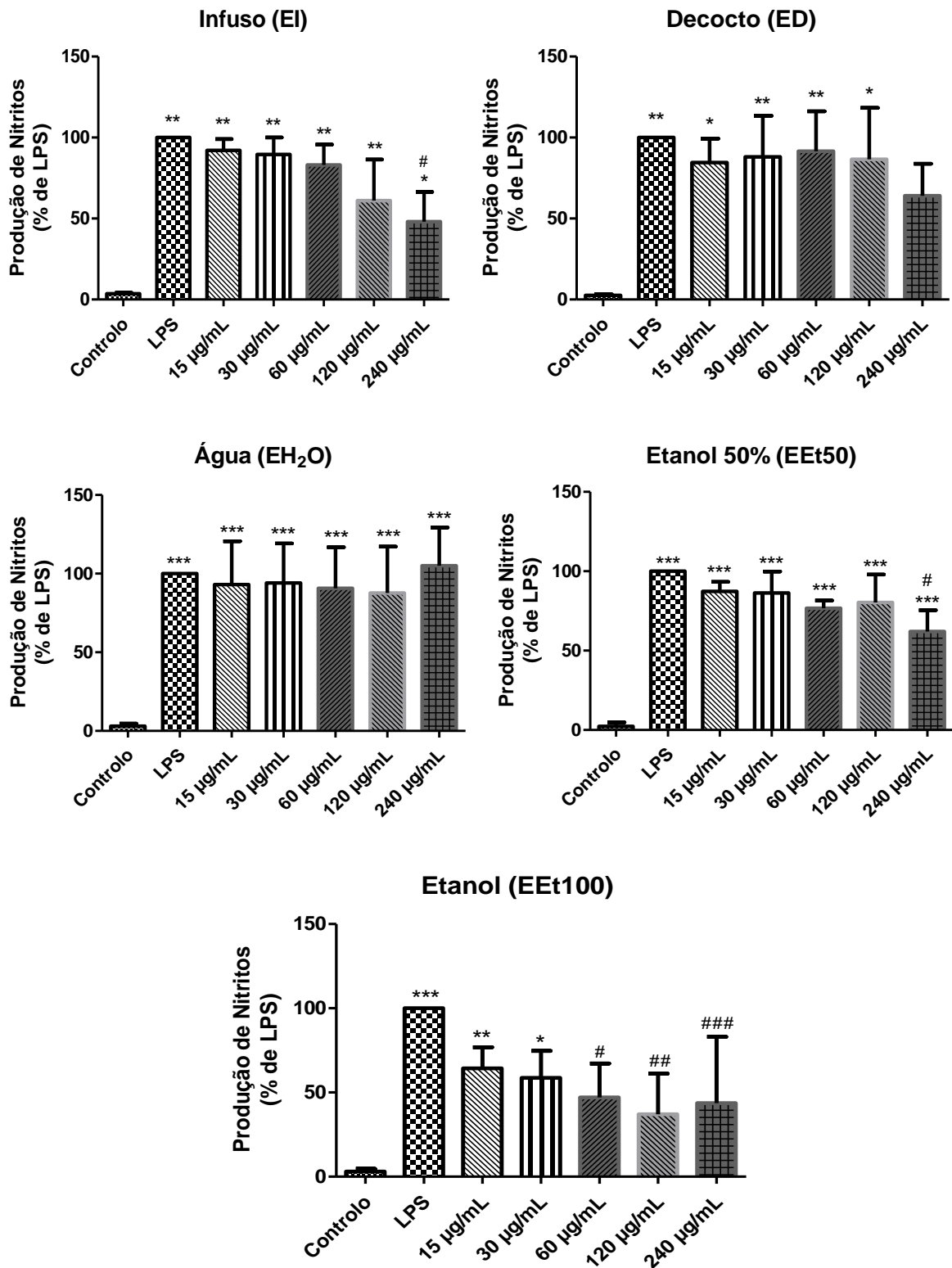
#### 4.1.5. Avaliação da atividade anti-inflamatória e citotoxicidade

A inflamação define-se como uma resposta do organismo contra agressões ou danos celulares. O monóxido de azoto (NO) é um dos mediadores inflamatórios, responsável pela vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular, produzido pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (Calixto, Otuki e Santos, 2003).

Para avaliar a potencial atividade anti-inflamatória dos extratos, determinou-se o seu efeito na produção de NO por macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS, quantificando, pelo método de *Griess*, os nitritos presentes no sobrenadante das culturas celulares. As células Raw 264.7 não estimuladas produzem um teor de nitritos muito baixo. Quando estimuladas pelo LPS, a produção deste mediador pró-inflamatório sofre um aumento exponencial. Neste trabalho não foi determinada a atividade dos extratos EEP-A e EC devido à toxicidade dos solventes, éter de petróleo e clorofórmio, optando-se pelo estudo dos extratos aquosos e etanólicos por serem mais usados em medicina tradicional como anti-inflamatórios.

Após estimular as células com LPS, na presença de várias concentrações dos extratos de *Acanthus mollis* (15, 30, 60, 120 e 240  $\mu\text{g/mL}$ ), avaliou-se a produção de nitritos, relativamente às células cultivadas apenas na presença de LPS (Figura 16).

Apenas os extratos EI e EEt100 provocaram diminuições significativas na produção de nitritos pelos macrófagos, em comparação com os macrófagos estimulados somente com LPS (controlo). O extrato EEt100 provocou uma diminuição da produção de nitritos dependente da dose em concentrações entre 15 a 120  $\mu\text{g/mL}$ , verificando-se uma diminuição significativa, para  $47 \pm 11,68 \%$ , na concentração de 60  $\mu\text{g/mL}$ , o que corresponde a um valor de  $\text{IC}_{50}$  de aproximadamente 48,31  $\mu\text{g/mL}$ . O extrato EI foi cerca de quatro vezes menos ativo, conseguindo atingir os 50% de inibição para a concentração de 214,36  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 16** – Efeito dos extratos EI, ED, EEt100, EEt50 e EH<sub>2</sub>O de *Acanthus mollis* na inibição da produção de nitritos em células de macrófagos RAW 264.7. As células de macrófagos ( $0,1 \times 10^6$  células/poço) foram mantidas em meio de cultura (controlo), ou estimuladas com  $1 \mu\text{g/mL}$  de LPS, com diferentes concentrações dos extratos (15-240  $\mu\text{g/mL}$ ), durante 24h. Os resultados estão expressos em percentagem de produção de nitritos pelas células na presença de LPS. Cada valor corresponde à média  $\pm$  erro padrão de três experiências independentes. Foi realizado o teste ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni's. Valores significativos: (\*\*\*)  $P < 0,001$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$ , versus controlo) (###  $P < 0,001$ ; ##  $P < 0,01$ ; #  $P < 0,05$ , versus LPS).

#### 4. Resultados e Discussão

Para além da sua atividade anti-inflamatória, os extratos foram também avaliados quanto à sua citotoxicidade, de forma a determinar a segurança das concentrações bioativas.

A viabilidade celular foi determinada utilizando a resazurina (Alamar Blue), que muda de cor aquando da sua redução por células vivas, sendo por isso um indicador de oxidação-redução (Hamid *et al.*, 2004). Através do ensaio da resazurina, verificámos igualmente que esta diminuição da produção de nitritos nas células em contacto com as concentrações anteriormente referidas não eram citotóxicas para a maioria dos extratos (Tabela 17). Apenas para o extrato EEt100, a partir da concentração de 120  $\mu\text{g/mL}$ , se observou redução de viabilidade celular. No entanto, o extrato EEt100 não apresentou citotoxicidade numa concentração eficaz (60  $\mu\text{g/mL}$ ).

**Tabela 17** – Efeito dos diferentes extratos na viabilidade de macrófagos (ensaio da resazurina).

	<b>EI</b>	<b>ED</b>	<b>EH<sub>2</sub>O</b>	<b>EEt50</b>	<b>EEt100</b>
<b>Controlo</b>	100	100	100	100	100
<b>LPS</b>	101,5 $\pm$ 1,5	99,5 $\pm$ 0,5	102,3 $\pm$ 2,8	100 $\pm$ 0,6	103,7 $\pm$ 2,3
<b>15 <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	90,5 $\pm$ 0,5	81 $\pm$ 11	90,3 $\pm$ 7,5	87,3 $\pm$ 2,7	97,3 $\pm$ 3
<b>30 <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	96,5 $\pm$ 4,5	83,5 $\pm$ 8,5	100,7 $\pm$ 2,3	85 $\pm$ 1,5	87 $\pm$ 4
<b>60 <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	91 $\pm$ 4,5	85 $\pm$ 12	100,3 $\pm$ 4,8	81,3 $\pm$ 6,4	81,7 $\pm$ 5,7
<b>120 <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	95,5 $\pm$ 5,5	89 $\pm$ 9	107 $\pm$ 4,5	92,3 $\pm$ 5,8	73,3 $\pm$ 8,6
<b>240 <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	98	93,5 $\pm$ 0,5	110,7 $\pm$ 1,3	104 $\pm$ 3,1	59,3 $\pm$ 6,1

Células RAW 264,7 foram expostas a diferentes concentrações dos extratos (15-240  $\mu\text{g/mL}$ ), por 24 horas. Os resultados estão expressos em percentagem da redução da resazurina por células cultivadas na presença de meio de cultura (controlo). Cada valor corresponde à percentagem média  $\pm$  erro padrão de três experiências independentes realizadas em duplicado.

Os compostos fenólicos têm atraído especial atenção por serem metabolitos secundários profusamente difundidos em plantas medicinais e por vezes responsáveis pela capacidade anti-inflamatória que lhes é atribuída, a qual frequentemente se associa à sua capacidade anti-radical/antioxidante. No entanto, outros fitoconstituintes podem igualmente contribuir para as propriedades anti-inflamatórias de plantas

medicinais. Atendendo aos objetivos deste trabalho foram tentativamente elucidadas as estruturas de compostos presentes no extrato mais ativo e que eventualmente mais contribuem para a atividade anti-inflamatória.

O comportamento cromatográfico por TLC, assim como o perfil espectral no UV sugerem que o extrato mais ativo (EEt100) contém na sua composição compostos benzoxazinóides derivados do DIBOA. Diversos benzoxazinóides têm sido associados à atividade anti-inflamatória, embora não exista até à data qualquer estudo sobre esta atividade para os derivados de DIBOA (Adhikari *et al.*, 2015).

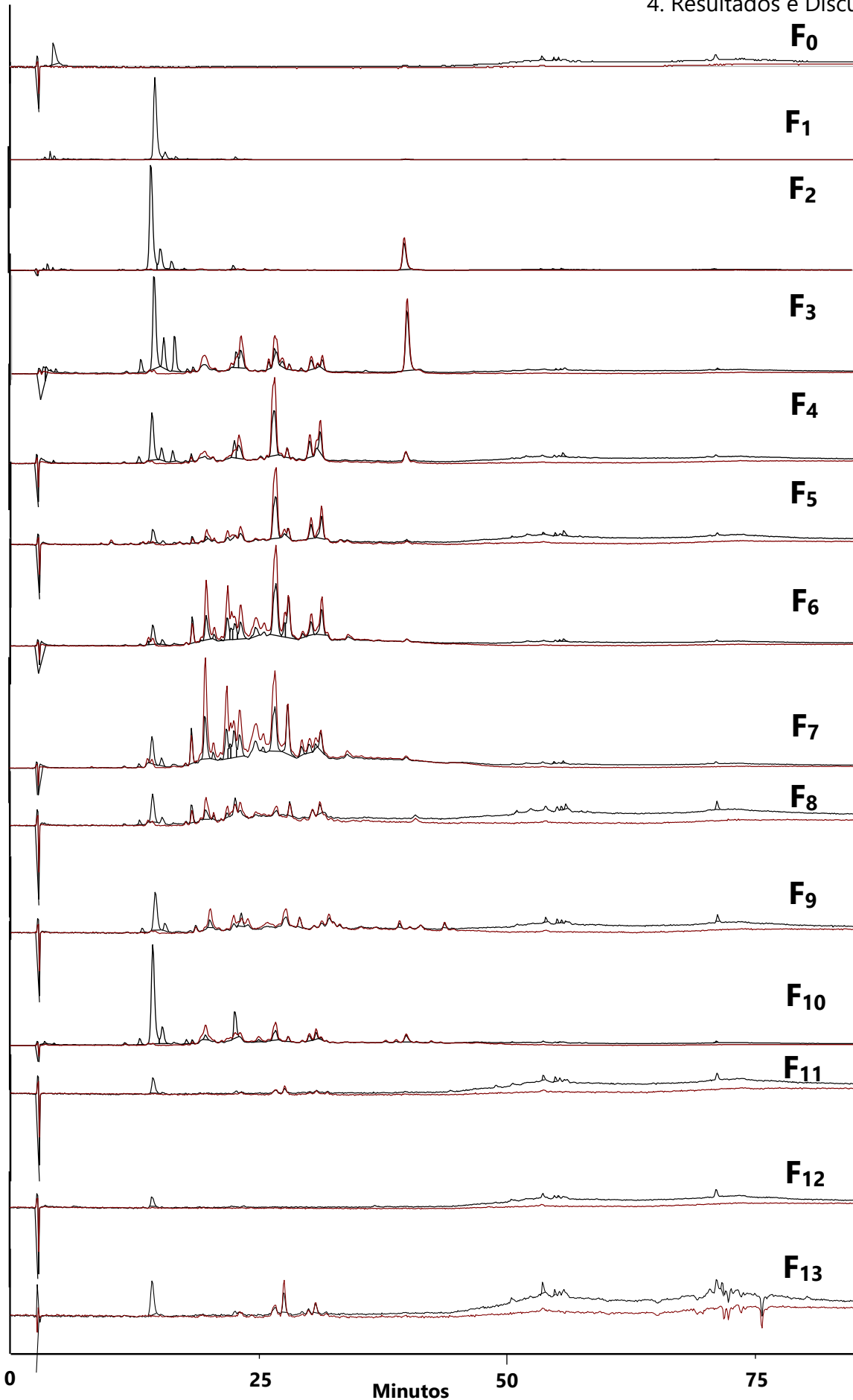
Outros compostos presentes no extrato EEt100, e que podem ser responsáveis pelo potencial anti-inflamatório de *Acanthus mollis*, são os compostos fenólicos, embora a sua presença predominante nos extratos menos ativos (EEt50, EH<sub>2</sub>O e ED), possa sugerir a sua menor contribuição para a atividade anti-inflamatória desta planta.

#### **4.2. Fracionamento, composição química e atividade biológica do extrato etanólico (EEt100)**

O extrato de etanol absoluto resultante da extração sequenciada foi fracionado por Cromatografia Flash. Obtiveram-se 14 frações que foram monitorizadas por HPLC-PDA (Figura 17).

Na fração **F<sub>0</sub>** não foi possível identificar nenhum composto, e como podemos observar pelo cromatograma, esta fração não apresenta picos relevantes. A fração **F<sub>1</sub>** é maioritariamente constituída por ácidos hidroxâmicos cíclicos, derivados de DIBOA. O pico maioritário que se observa no cromatograma tem uma concentração elevada, e, pelo seu perfil espectral no UV, corresponde a um derivado de DIBOA. À medida que as frações foram recolhidas, o teor de compostos fenólicos foi aumentando, detetando-se, na fração **F<sub>2</sub>** um pico com espectro UV típico de uma flavona derivada da apigenina. Na fração **F<sub>3</sub>** este pico aumenta, e os sinais correspondentes aos ácidos fenólicos são detetáveis, juntamente com derivados de DIBOA. Nas frações **F<sub>4</sub>**, **F<sub>5</sub>**, **F<sub>6</sub>** e **F<sub>7</sub>** predominam os ácidos fenólicos.

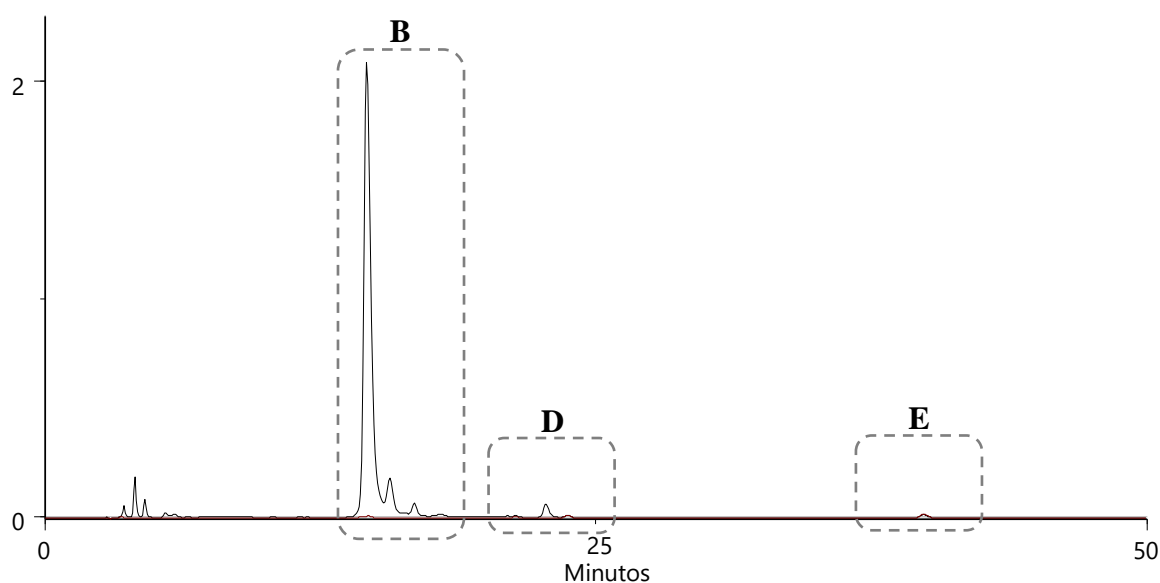




**Figura 17** – Cromatogramas das frações obtidas por Cromatografia Flash do extrato EEt100, analisadas por HPLC-PDA (**sistema 7**).

#### 4.2.1. HPLC-PDA da Fração 1

Após obtenção das 14 frações e sua monitorização por HPLC, foi selecionada a fração F1 para o estudo da atividade antioxidante e anti-inflamatória, por ser constituída por derivados de DIBOA (zona B), que, de acordo com os resultados anteriormente descritos parecem contribuir significativamente para a atividade anti-inflamatória, embora também sejam detentores de atividade antioxidante (Figura 18).



**Figura 18** – Cromatogramas da F1 do extrato EEt100 das folhas de *Acanthus mollis* obtidos por HPLC-PDA (**sistema 8**).

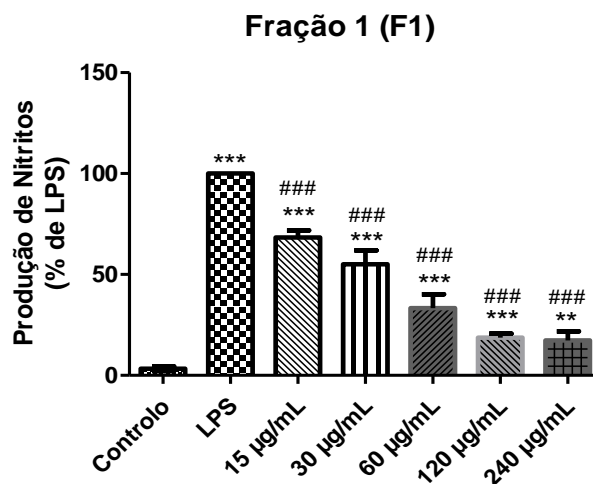
Nesta fração podemos observar a existência de mais do que um composto benzoxazinóide, no mínimo quatro compostos diferentes (zona B) e apenas quantidades residuais de compostos fenólicos.

#### 4.2.2. Atividade antioxidante e anti-inflamatória da Fração 1

A atividade antioxidante da fração F1 determinada pelo método do DPPH apresentou um valor de  $IC_{50}$  de  $163,02 \pm 3,04 \mu\text{g/mL}$  e valores TEAC  $79,33 \pm 0,99$ . Na literatura consultada, não foram encontrados estudos de capacidade de captação de radicais livres para o composto DIBOA. Este composto foi descoberto na espécie *Acanthus mollis*, na sua forma glicosilada, juntamente com BOA, um outro benzoxazinóide, não lhes tendo sido associada nenhuma propriedade farmacológica (Pratt, Kumar e Chilton, 1995; Wolf, Spencer e Plattner, 1985). Já relativamente a outros

compostos do grupo dos benzoxazinóides, encontram-se alguns estudos. Assim, Gleńsk e colaboradores (Gleńsk *et al.*, 2015) identificaram DIMBOA, em tecidos do milho (*Zea mays* L.), demonstrando que este composto exibia uma atividade captadora de radicais livres muito boa. A uma concentração de 34,04  $\mu\text{g/mL}$  este composto eliminou 98,75% do radical DPPH, apresentando conseqüentemente um  $\text{IC}_{50}$  de 11,31  $\mu\text{g/mL}$ . Também anteriormente, em 2011, Harput e colaboradores tinham demonstrado que HBOA isolado do extrato aquoso de *Acanthus hirsutus* exibia um  $\text{IC}_{50}$  de 39,29  $\mu\text{g/mL}$  utilizando o método de DPPH (Harput *et al.*, 2011).

Relativamente à atividade anti-inflamatória pode-se observar pela figura 19, que a incubação das células com 30  $\mu\text{g/mL}$  da fração F1, na presença da estimulação com LPS, reduziu significativamente a produção de NO, para  $55,00 \pm 4,00$  ( $p \leq 0,001$ ), o que corresponde a um  $\text{IC}_{50}$  de 32,32  $\mu\text{g/mL}$ . Também para a menor concentração testada - 15  $\mu\text{g/mL}$  foi verificada uma redução significativa de NO, para  $68,3 \pm 2,03$  ( $p \leq 0,001$ ). Com estas duas concentrações, ou seja, 15 e 30  $\mu\text{g/mL}$ , obteve-se atividade sem citotoxicidade no teste da resazurina, o mesmo não se tendo registado para as concentrações iguais e superiores a 60  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 19** – Efeito da Fração 1 do extrato EEt100 de *Acanthus mollis* na inibição da produção de nitritos em células de macrófagos RAW 264.7. As células de macrófagos ( $0,1 \times 10^6$  células/poço) foram mantidas em meio de cultura (controlo), ou estimuladas com 1  $\mu\text{g/mL}$  de LPS, com diferentes concentrações dos extratos (15-240  $\mu\text{g/mL}$ ) durante 24h. Os resultados estão expressos em percentagem de produção de nitritos pelas células na presença de LPS. Cada valor corresponde à média  $\pm$  desvio padrão de três experiências independentes. Foi realizado o teste ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni's. Valores significativos: (\*\*\*)  $P < 0,001$ , versus controlo) (###  $P < 0,001$ , versus LPS).

O estudo realizado permite inferir que apesar do extrato EEt100 ter uma boa atividade antioxidante, esta dever-se-à essencialmente a outros constituintes da amostra ausentes na F1. Curiosamente, e suportando a hipótese anteriormente sugerida, o composto representativo deste extrato e existente maioritariamente nesta fração, um benzoxazinóide, tem uma significativa atividade anti-inflamatória, apresentando um IC<sub>50</sub> inferior ao do extrato EEt100, a partir do qual foi fracionado. Estes resultados sugerem que o mecanismo de ação destes compostos não é por captação de radicais livres e sim por outras vias de atuação.

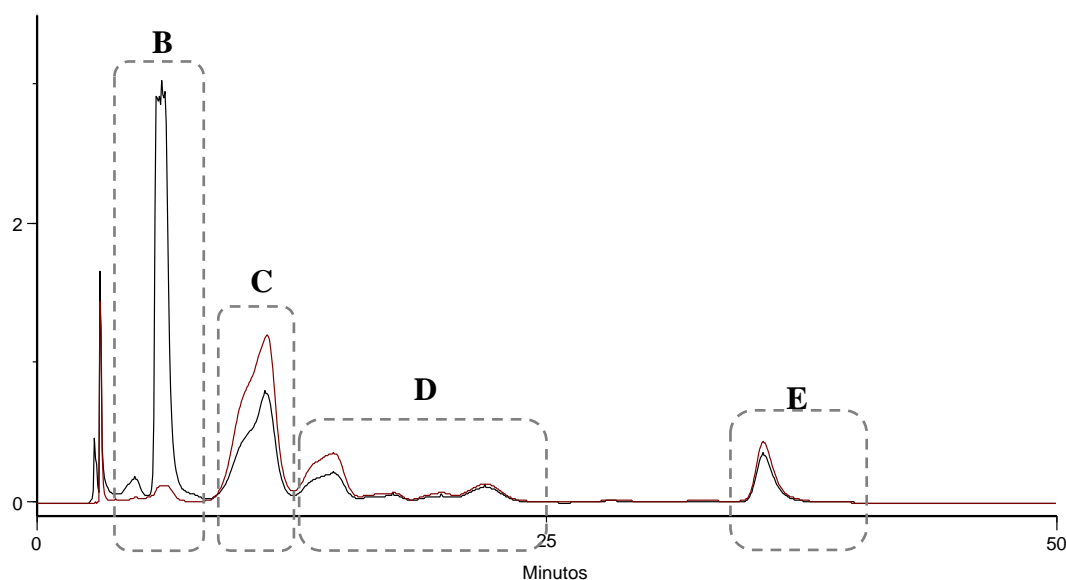
### **4.3. Preparação e avaliação de um extrato para aplicação industrial**

A fim de encontrar uma alternativa viável para a indústria, procurou-se selecionar um processo de extração rápido e de simples execução, utilizando um solvente fácil de obter e de baixo custo, mas com garantia de eficácia extrativa e a atividade biológica. Com este objetivo, realizou-se uma extração de *Acanthus mollis* com etanol 95% monitorizando a sua composição química e a atividade antioxidante e anti-inflamatória.

#### **4.3.1. Caracterização fitoquímica, por HPLC-PDA e HPLC-PDA-MS<sup>n</sup> do extrato EEt95**

Após a extração, os fitoconstituintes presentes em EEt95 foram analisados por HPLC-PDA, cujo cromatograma e a tentativa de identificação se encontra ilustrada na figura 20 e na tabela 18.

Pode-se observar que este extrato é constituído por benzoxazinóides, ácidos fenólicos e flavonóides. Neste extrato não conseguimos observar a presença de compostos na zona A, ou seja, dos ácidos fenólicos que durante a extração sequenciada foram extraídos pelo solvente de etanol. Isto pode ter acontecido pois há outros compostos que co eluem com estes não deixando assim visualizar-se espectros UV-Vis característicos dos derivados do cafeico.



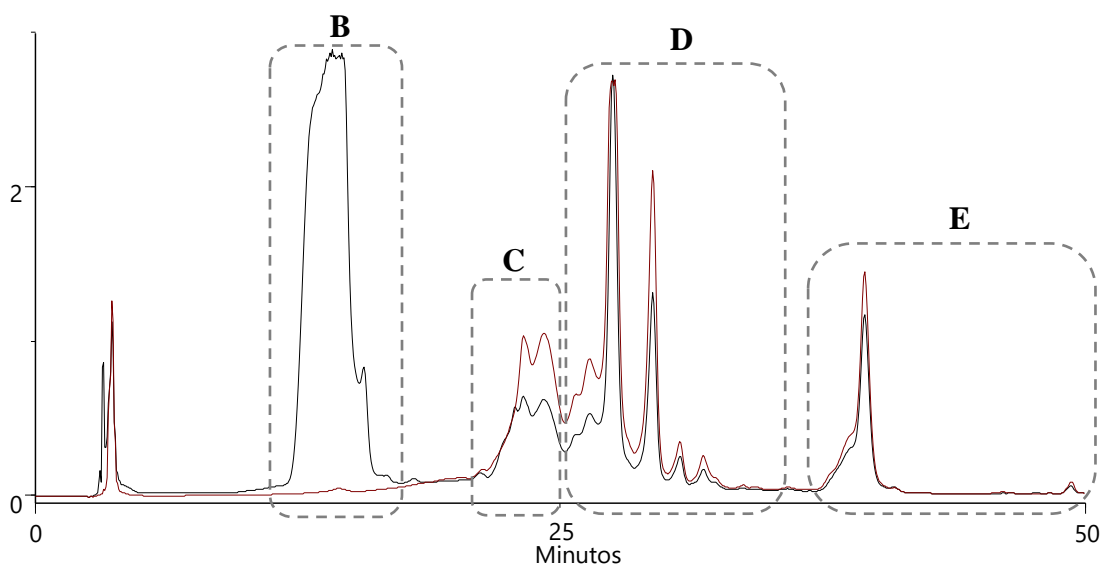
**Figura 20** – Cromatograma do extrato EEt95 das folhas de *Acanthus mollis* obtido por HPLC-PDA (**sistema 7**).

O pico que eluíu na zona B apresenta um espectro UV-Vis característico do composto DIBOA, e embora só ocorra um pico, é notória a quantidade elevada presente neste extrato. Os ácidos fenólicos que só tinham sido extraídos com o solvente de éter de petróleo, aparecem também nesta extração, estando assinalados pelo grupo C. Os ácidos fenólicos que eluíram na zona D, apresentaram um espectro UV-Vis típico de derivados do ácido cafeico ou ferúlico. Verificou-se ainda a presença de uma flavona com espectro típico de um derivado da apigenina (zona E).

**Tabela 18** – Tentativa de identificação das classes de compostos presentes no extrato de etanol 95% de *Acanthus mollis* (**sistema 7**).

Zona	$t_R$ (min)	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)	Identificação da classe do composto
<b>B</b>	5,65	252, 262sh, 280, 287sh, 330	Benzoxazinóide
<b>C</b>	11,20	245, 280sh, 289sh, 302sh, 330	Ácido fenólico
<b>D</b>	14,47	244, 288sh, 303sh, 330	Ácidos fenólicos
	17,51	245, 288, 328	
	19,84	247, 289sh, 328	
	22,00	247, 288, 331	
<b>E</b>	35,62	272, 334	Flavona (derivada da apigenina)

Este mesmo extrato foi cromatografado no sistema 8, onde foi conseguida a separação dos compostos fenólicos. Assim, os compostos presentes em EEt95 foram analisados por HPLC-PDA, cujo cromatograma e a tentativa de identificação dos compostos se encontra ilustrada na figura 21 e na tabela 19. Tal como no sistema anterior podemos observar a presença de benzoxazinóides, ácidos fenólicos e flavonóides.



**Figura 21** – Cromatograma do extrato EEt95 das folhas de *Acanthus mollis* obtido por HPLC-PDA (sistema 8).

Tal como podemos observar pela tabela, e apesar do pico maioritário da zona B se encontrar bastante concentrado, é notória a presença de mais do que um tipo de benzoxazinóide. Também neste sistema a separação dos ácidos fenólicos presentes na zona C foi mais eficiente, assim como na zona D, onde se encontraram picos com espetros UV-Vis típicos dos derivados do ácido cafeico. A flavona derivada da apigenina, que no sistema 7 ocorreu como um pico único, neste sistema originou três picos com o mesmo espetro UV-Vis, característico deste tipo de flavona. Aparece ainda uma outra flavona derivada da apigenina ao tempo de retenção de 49,28 minutos, que não tinha sido detetada nos outros extratos.

**Tabela 19** – Tentativa de identificação das classes de compostos presentes no extratos de etanol 95% de *Acanthus mollis* (**sistema 8**).

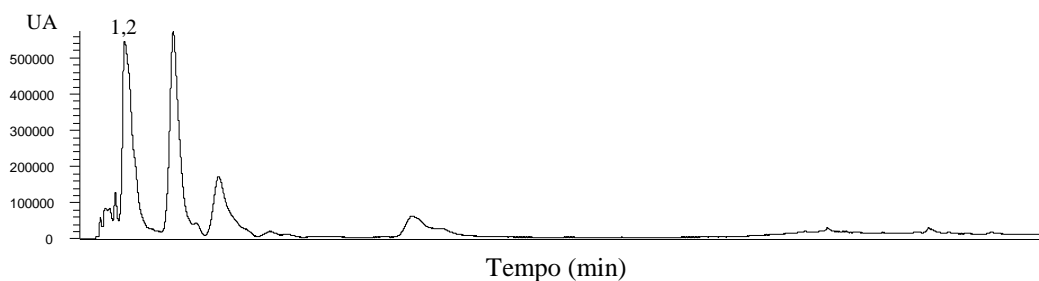
Zona	t <sub>R</sub> (min)	λ <sub>máx</sub> (nm)	Identificação da classe do composto
<b>B</b>	11,33	256, 265sh, 272sh, 286sh, 332	Benzoxazinóides
	12,84	255, 264sh, 280, 287sh	
	15,64	252, 278, 285sh	
	16,76	254, 280, 284sh, 330	
<b>C</b>	21,33	253, 289, 303sh, 328	Ácidos Fenólicos
	23,29	249, 289sh, 302sh, 330	
	24,18	249, 289sh, 302sh, 331	
<b>D</b>	25,69	250, 289sh, 303sh, 331	Ácidos Fenólicos
	26,42	250, 289sh, 302sh, 331	
	27,26	248, 289sh, 303sh, 331	
	29,38	248, 289sh, 303sh, 331	
	30,67	252, 289, 328	
	31,84	253, 289sh, 328	
	32,34	255, 288, 328	
	33,74	257, 289, 328	
	34,30	258, 289, 300sh, 305sh, 328	
	35,81	259, 288, 304, 328	
36,89	259, 288, 327		
<b>E</b>	38,79	273, 333	Flavonas (derivadas da apigenina)
	39,47	272, 334	
	40,92	274, 338	
	49,28	274, 334	

A confirmação ou a complementaridade dos resultados obtidos pelas metodologias anteriormente referidas foi feita utilizando HPLC acoplada à espectrometria de massa, que forneceu informação adicional acerca dos compostos presentes no extrato de etanol a 95%.

Na análise por HPLC-PDA/ESI-MS<sup>n</sup>, usaram-se condições separativas diferentes (sistemas 9 e 10), Pelos espectros de massa confirma-se a presença dos benzoxazinóides derivados do DIBOA, e de glicósidos fenilpropanóides, mais especificamente, acteósido (verbascósido) e os seus derivados.

O sistema 9 mostrou-se mais adequado para a identificação dos compostos benzoxazinóides, e o sistema 10 foi usado na identificação dos compostos fenólicos. Não tendo sido possível obter as condições ideais de fragmentação dos compostos benzoxazinóides, os seus espectros de massa foram obtidos no modo SIM, enquanto os espectros dos compostos fenólicos foram obtidos por "full mass".

O perfil cromatográfico e a identificação dos compostos benzoxazinóides encontram-se ilustrados na figura 22. A análise dos espectros UV-Vis sugeriu que os compostos identificados como 1 e 2 se referem a benzoxazinóides, com espectro típico de derivados do DIBOA.



**Figura 22** – Perfil cromatográfico do extrato EEt95 obtido no HPLC-PDA Surveyor e registado a 280 nm (**sistema 9**).

Os espectros de massa, obtidos neste trabalho confirmam a presença de benzoxazinóides, mais especificamente, de dois DIBOA (1 e 2). Os espectros UV-Vis destes picos exibem  $\lambda_{\text{máx}}$  a 254 e 280 nm aproximadamente, correspondente a espectros típicos dos compostos DIBOA.

O **composto 1** ( $t_R$  5.55 minutos) apresenta um ião molecular com  $m/z$  506 e o **composto 2** ( $t_R$  7,27 minutos) um ião molecular com  $m/z$  344, no modo de ionização positivo.

Outros fragmentos são igualmente observados no espectro de massa do **composto 1** nomeadamente o fragmento com  $m/z$  344 correspondente à perda de 162 uma, ou seja, à perda de uma hexose. A perda da segunda hexose é sugerida pelo aparecimento do fragmento a  $m/z$  182, ou seja, resultante de uma perda de 162 uma a partir do fragmento com  $m/z$  344. Este último ião corresponde à molécula não glicosilada, ou seja à aglicona que, por fragmentação origina principalmente os iões

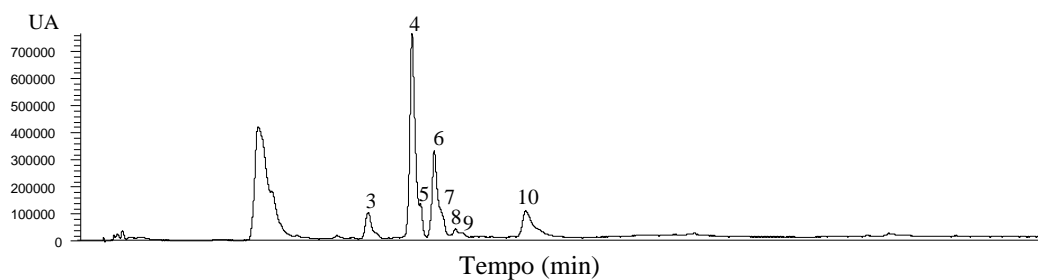


com  $m/z$  164 e 136, que correspondem à perda de uma água (-18 uma) e de um carbonilo (-28 uma), respetivamente.

O **composto 2**, com tempo de retenção 7,27 min, apresentou um ião molecular com  $m/z$  344 e um padrão de fragmentação idêntico ao observado para o composto 1 após a perda de uma hexose.

Assim sendo, estes dois compostos foram tentativamente identificados como sendo DIBOA dihexose (PM 505 Da) e DIBOA hexose (PM 343 Da) de acordo com o padrão de fragmentação referido por Pihlava e Kurtelius (2016).

No sistema 10 a separação dos compostos fenólicos foi notoriamente melhor. O perfil cromatográfico e a identificação dos compostos fenólicos encontram-se ilustrados na figura 23 e na tabela 20, respetivamente. A análise dos espectros UV-Vis sugeriu que os compostos de 3 a 9 se referem a ácidos fenólicos com espectro típico de derivados do ácido cafeico ou ferúlico.



**Figura 23** – Perfil cromatográfico do extrato ET95 obtido por HPLC-PDA e registado a 280 nm (sistema 10).

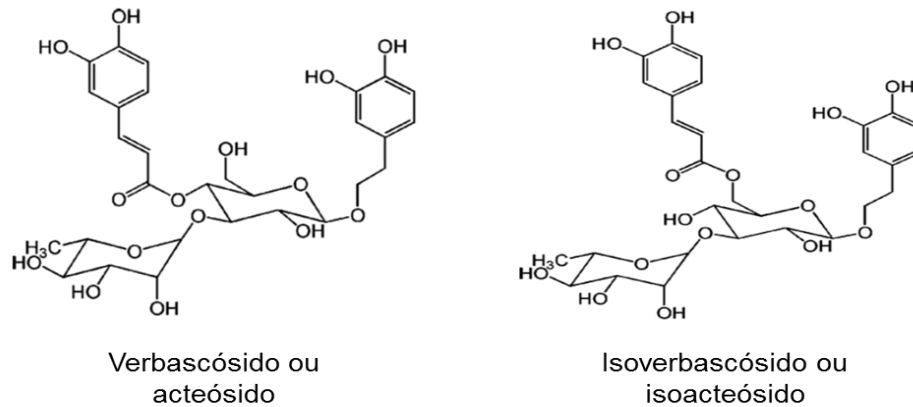
O **composto 3** com tempo de retenção de 25,39 min foi identificado como sendo  $\beta$ -OH-verbascósido (PM 640 Da). Este composto é um derivado do verbascósido, diferindo estruturalmente pela presença de um grupo hidroxilo na posição  $\beta$  do 3,4-dihidroxifeniletanol. No modo ião negativo, este composto apresenta o ião molecular com  $m/z$  639 referente à molécula desprotonada, seguidamente o ião com  $m/z$  621 ocorre devido à perda de uma molécula de água (-18 uma). O fragmento com  $m/z$  459 representa a perda do grupo cafeóilo, a partir do fragmento de  $m/z$  621 (Cardinali *et al.*, 2012; Sanz *et al.*, 2012).

**Tabela 20** – Compostos fenólicos identificados em EEt95 por HPLC-PDA-ESI/MS<sup>n</sup> (**sistema 10**).

Pico	t <sub>R</sub> (min)	λ <sub>máx</sub> (nm)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> [m/z (abundância relativa, %)]	MS <sup>3</sup>	Tentativa de identificação
3	25,39	247; 286sh; 300sh; 331	639	459 (14); 529 (12); 621 (100)	459 (100)	β-OH- verbascósido*
4	29,20	249; 286sh; 299sh; 330	623	461 (100)	315 (100)	Isômero de Acteósido**
5	29,96	248; 286sh; 300sh; 331	623	461 (100)	279 (22); 297 (32); 315 (100)	Isômero de Acteósido**
6	31,16	248; 288sh; 300sh; 331	667	621 (100)	179 (7); 459 (100)	Isômero de β-EtOH- acteósido***
7	31,88	247; 289sh; 300sh; 330	667	621 (100)	179 (7); 459 (100); 469 (10)	Isômero de β-EtOH- acteósido***
8	33,03	246; 290sh; 328	623	461 (100)	315 (100)	Isômero de Acteósido**
9	33,71	287sh; 327	667	621 (100)	251 (18); 441 (10); 459 (100)	Isômero de β-EtOH- acteósido***
10	39,21	273; 334	497	299 (7); 451 (100)	225 (75); 333 (7); 433 (100)	Não identificado

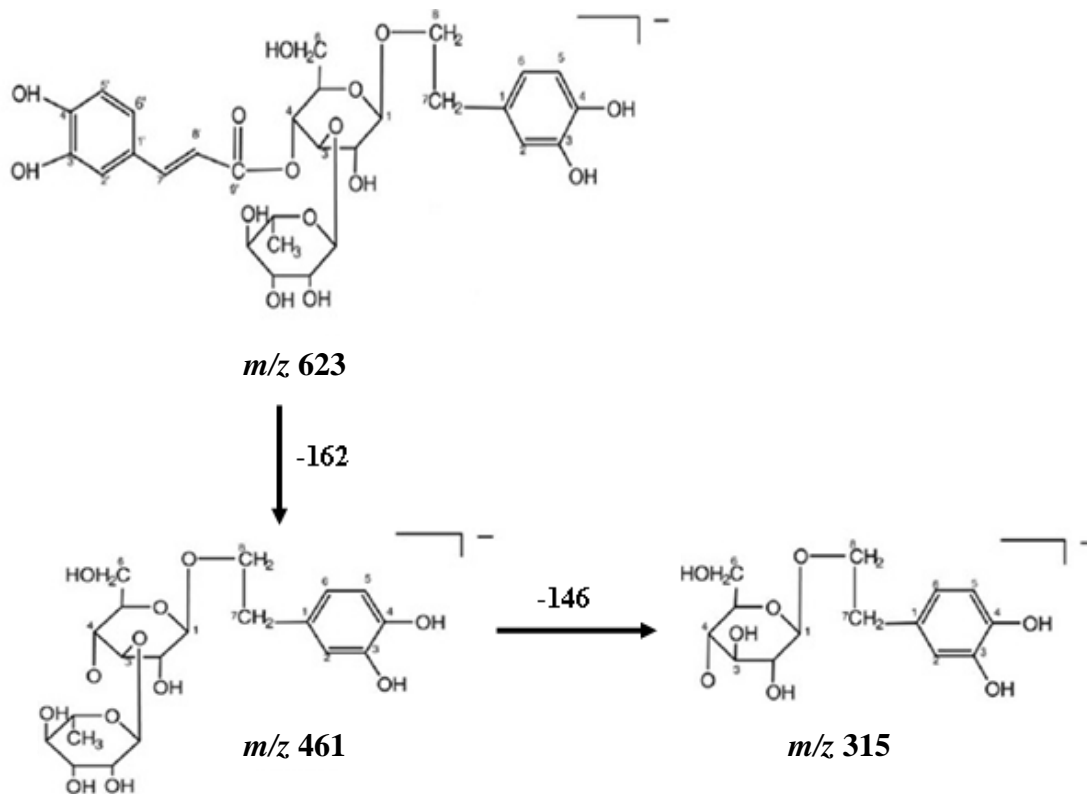
Identificação realizada com base nos espectros de UV-Vis, na massa molecular e nos padrões de fragmentação, que estão de acordo com autores como: (\*) Sanz et al. 2012; Cardinali et al. 2012; (\*\*) Ying et al. 2004; Cardinali et al. 2012; Sanz et al. 2012; Blazics et al. 2011; Nenadis et al. 2007; Savarese et al. 2007; Owen et al. 2003; (\*\*\*) Innocenti et al. 2006

Os **compostos 4, 5 e 8** mostraram espectros UV-Vis comuns ao ácido cafeico e ferúlico, e, no modo ião negativo, os mesmos iões moleculares, com  $m/z$  623, e espectros de massas MS<sup>2</sup> e MS<sup>3</sup> apresentando iguais fragmentos majoritários com  $m/z$  461 e 315, respetivamente. O peso molecular e a informação estrutural obtida pelos espectros de massa destes compostos está de acordo com o composto acteósido (ou verbascósido), derivado do ácido cafeico, com peso molecular de 624 Da e a fórmula C<sub>29</sub>H<sub>36</sub>O<sub>15</sub> (Cardinali *et al.*, 2012; Owen *et al.*, 2003; Sanz *et al.*, 2012). Estes compostos foram identificados como verbascósido (acteósido) com ião molecular de  $m/z$  623, fragmentos com  $m/z$  461, que corresponde à perda de um grupo cafeóilo, e outro fragmento majoritário com  $m/z$  315, indicativo da subsequente perda de um resíduo ramnosilo (Figura 24).



**Figura 24** – Estruturas químicas do verbascósido e do seu isômero isoverbascósido (adaptado de Cardinali et al. 2012).

No espectro de MS<sup>3</sup>, os fragmentos com  $m/z$  315 e 297 resultantes da fragmentação do ião  $m/z$  461 correspondem, respectivamente, à perda de um resíduo ramnosilo (Figura 25) seguida da perda de uma molécula de água. A identificação dos isômeros de verbascósido resultam das diferentes configurações da dupla ligação C=C do grupo do ácido cafeico (Nenadis *et al.*, 2007).

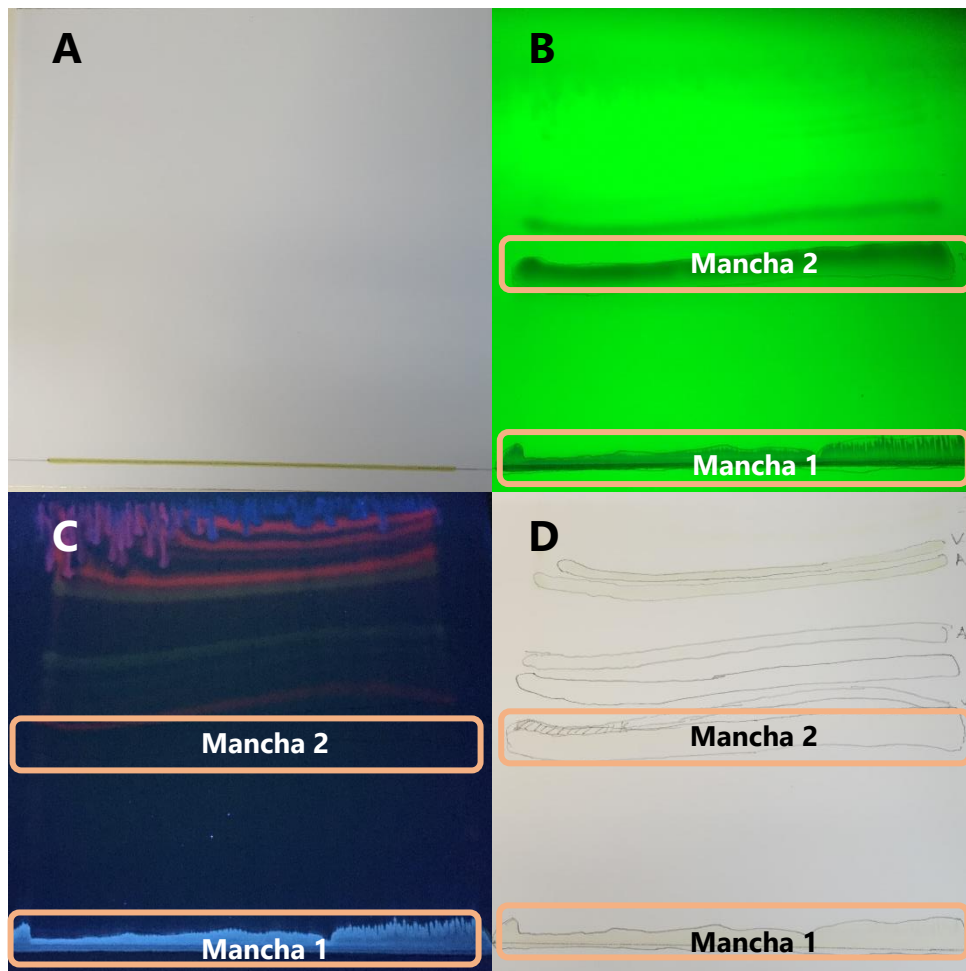


**Figura 25** – Possível fragmentação do acteósido (adaptado de Li et al. 2005).

Os **compostos 6, 7 e 9** foram identificados como isómeros de  $\beta$ -EtOH-acteósido com peso molecular de 668 Da. Tal como o acteósido, também este composto apresentou um espectro UV-Vis característico do ácido cafeico. Foram obtidas três fragmentações essenciais para a identificação destes compostos, ou seja, os fragmentos com  $m/z$  621, 459 e 179. O ião a 621 resulta da perda do etanol, formando uma dupla ligação entre os carbonos  $\alpha$  e  $\beta$ . O ião com  $m/z$  459 corresponde à subsequente perda do grupo cafeóilo da molécula. O último ião encontrado nesta fragmentação é relativo ao ácido cafeico.

#### 4.3.2. Fracionamento dos principais grupos químicos por TLC preparativa

Para confirmar a presença dos compostos quer fenólicos quer benzoxazinóides, foi realizada uma TLC preparativa que nos permitiu confirmar quais manchas eram referentes aos compostos, utilizando para isso a sua monitorização por HPLC-PDA. Após desenvolver a placa no sistema 6, esta foi observada à luz ultravioleta (254 e 366 nm), pois segundo a literatura e os espectros de UV obtidos *on line*, após separação cromatográfica, os compostos benzoxazinóides não são detetáveis a 366 nm, facto pelo qual a observação foi realizada a 254 nm. No entanto os compostos fenólicos apresentam fluorescência a 366 nm e *quenching* quando observados a 254 nm (Figura 26). Após aplicação de 0,5 mL do extrato EEt95 (Figura 26A), e após eluição da placa, podemos observar que no ponto de aplicação se apresentava uma mancha com *quenching* a 254 nm e azul fluorescente quando observada a 366 nm, possivelmente representativa dos compostos fenólicos (Figura 26B e C). Ainda a 254 nm podemos observar algumas manchas com efeito *quenching*, de entre as quais ocorreu uma, com  $R_f$  0,43 que não foi observada a 366 nm, comportamento característico dos benzoxazinóides (Figura 26B e C). Estas duas manchas foram delimitadas, como podemos observar na figura 26D, e recortadas para que os compostos fossem solubilizados novamente em etanol 95%, obtendo assim uma amostra com os compostos do ponto de aplicação (M1), e outra com os compostos presentes na mancha 2 (M2), cuja composição química foi monitorizada por HPLC-PDA, a fim de confirmar o estudo realizado até ao momento.



**Figura 26** – TLC preparativa do extrato EEt95 (sistema 6). A – Aplicação de 0,5 mL de extrato na TLC, em forma de banda. B – Observação da placa a UV254 nm após evaporação do solvente. C – Observação da placa a UV366 nm. D – Delimitação das manchas presentes para posterior análise.

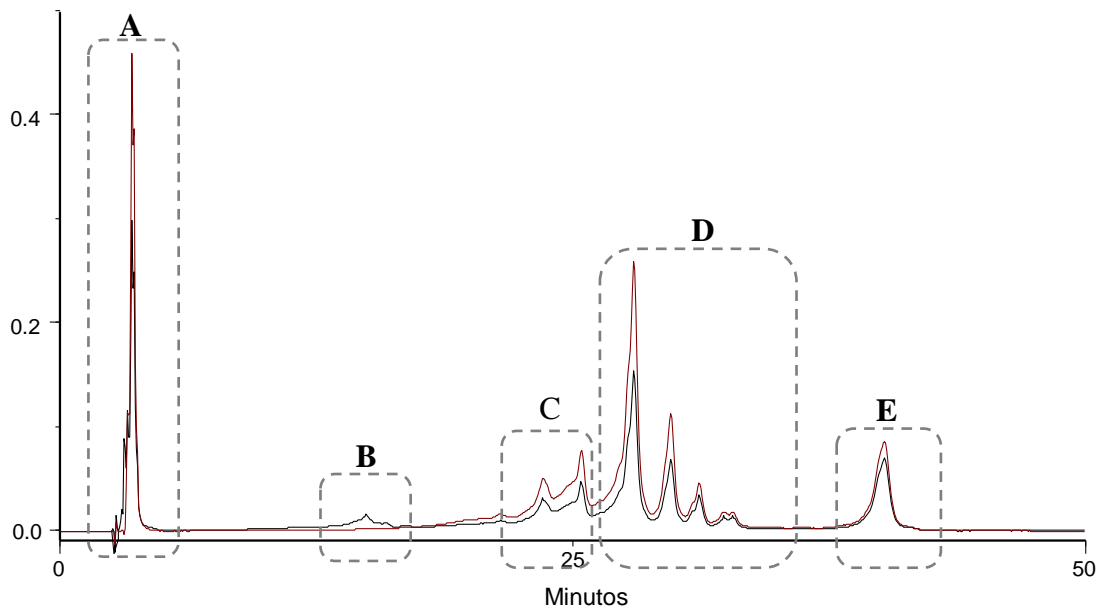
#### 4.3.2.1. Perfis cromatográficos das manchas, por HPLC-PDA

Um volume de 100  $\mu$ L das soluções etanólicas resultantes da extração das manchas M1 e M2 foi injetado no HPLC-PDA, encontrando-se os seus cromatogramas apresentados a seguir.

##### **Mancha1 (M1)**

Os fitoconstituintes da mancha M1, referente aos compostos que permaneceram no ponto de aplicação da TLC preparativa com o sistema 6, encontram-se representados no cromatograma de HPLC (Figura 27), e foram tentativamente identificados (Tabela 21). Tal como suposto, esta mancha é representativa dos

compostos fenólicos, apresentando na sua maioria ácidos fenólicos (grupo A, C e D), tendo também presente uma flavona derivada da apigenina (zona E), e, muito pequena concentração, um benzoxazinóide derivado do DIBOA (zona B).



**Figura 27** – Cromatograma da mancha M1 do extrato EEt95 das folhas de *Acanthus mollis* obtido por HPLC-PDA (**sistema 8**).

Dos onze picos identificados no cromatograma, só dois é que não apresentam espectros UV-Vis típicos dos ácidos fenólicos. Estes picos encontram-se aos tempos de retenção de 14,92 min que apresenta um espectro característico de um derivado de DIBOA, e aos 40,17 minutos que é característico de uma flavona, derivada da apigenina. Todos os outros picos se referem a ácidos fenólicos, com espectros de UV-Vis típicos do derivado do ácido cafeico. Estes compostos são os mais representativos nesta mancha, podendo afirmar, que no sistema 6 da TLC os compostos fenólicos ficam maioritariamente no ponto de aplicação.

A separação dos fitoconstituintes por TLC permitiu verificar que o EEt95 apresenta na sua constituição os compostos fenólicos que até então só apareceram na extração sequenciada com etanol (EEt100), ou seja, os picos com tempos de retenção de 3,31 e 3,52 min e espectros de UV característicos dos derivados do ácido cafeico. Neste cromatograma podemos também observar a presença dos ácidos fenólicos comuns aos do extrato de éter de petróleo (zona C) da extração sequenciada. Porém, alguns dos ácidos fenólicos presentes no extrato não ficaram retidos no ponto de

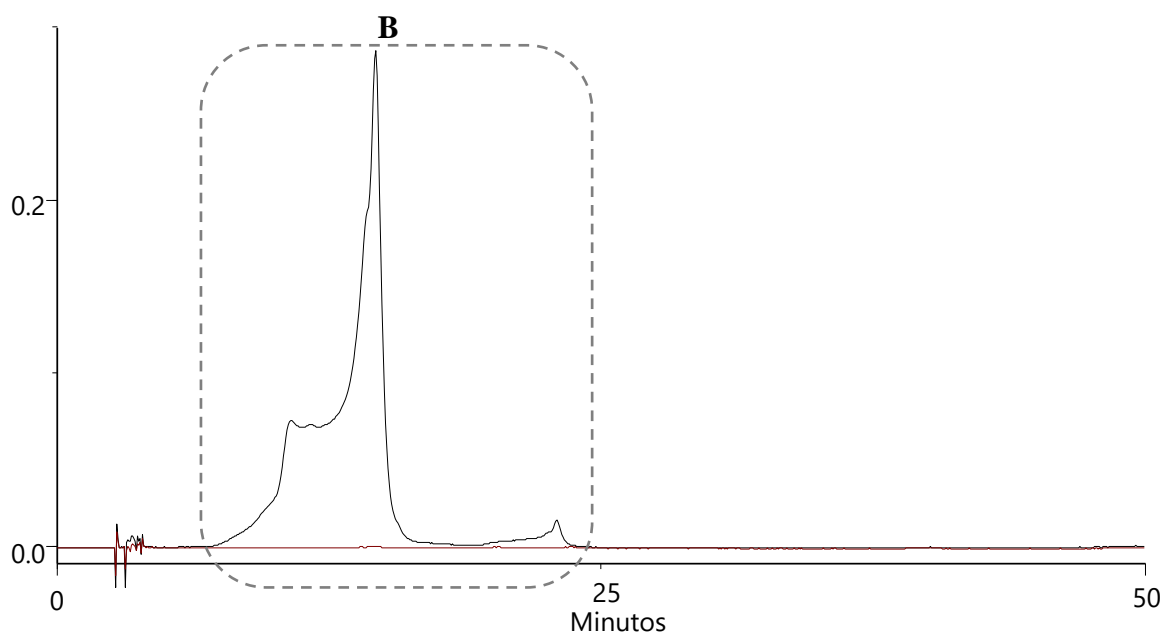
aplicação da TLC preparativa e por isso no grupo D não aparecem todos os ácidos fenólicos presentes no extrato EEt95.

**Tabela 21** – Tentativa de identificação da classe de compostos presentes na mancha M1 do extrato de etanol 95% de *Acanthus mollis* (**sistema 8**).

Zona	t <sub>R</sub> (min)	λ <sub>máx</sub> (nm)	Identificação da classe do composto
<b>A</b>	3,31	255, 286sh, 302sh, 330	Ácidos fenólicos
	3,52	252, 287sh, 303sh, 330	
<b>B</b>	14,92	255, 263sh, 280, 288sh, 333	Benzoxazinóide
<b>C</b>	23,55	255, 285sh, 330	Ácidos fenólicos
	25,42	255, 288sh, 331	
<b>D</b>	27,97	252, 288sh, 304sh, 331	Ácidos fenólicos
	29,77	254, 287sh, 304sh, 331	
	31,18	256, 285sh, 328	
	32,41	259, 287sh, 328	
	32,80	259, 286sh, 329	
<b>E</b>	40,17	256sh, 272, 334	Flavona (derivada da apigenina)

### Mancha 2 (M2)

A mancha M2 aparece a um R<sub>f</sub> = 0,43, que no sistema 6 corresponde aos compostos benzoxazinóides detetados no estudo preliminar deste trabalho, e confirmado pelo seu comportamento aquando da revelação com o cloreto férrico. Após análise por HPLC, o perfil cromatográfico e a tentativa de identificação dos fitoconstituintes apresentam-se ilustrados na figura 28 e tabela 22. Tal como suposto, esta mancha é representativa dos compostos benzoxazinóides, apresentando na sua composição ácidos hidroxâmicos cíclicos com espectros de UV correspondentes aos dos derivados do DIBOA, confirmando assim a sua presença também neste extrato.



**Figura 28** – Cromatograma da mancha M2 do extrato EEt95 das folhas de *Acanthus mollis* obtido por HPLC-PDA (**sistema 8**).

**Tabela 22** – Tentativa de identificação da classe de compostos presentes na mancha M2 do extrato de etanol 95% de *Acanthus mollis* (**sistema 8**).

Zona	$t_R$ (min)	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)	Identificação da classe do composto
	10,64	254, 264sh, 280, 288sh	
<b>B</b>	11,66	254, 264sh, 280, 287sh	Benzoxazinóides
	14,62	254, 264sh, 280, 287sh	

#### 4.3.3. Atividade antioxidante do extrato

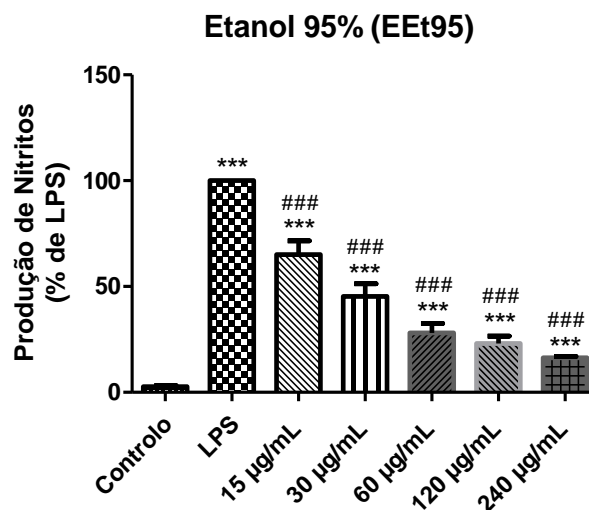
O extrato de etanol 95% foi testado quanto à atividade antioxidante/anti-radicalar contra DPPH, anião superóxido e radical hidroxilo. Os resultados mostram que o extrato de etanol 95% das folhas de *Acanthus mollis* evidenciaram capacidade antioxidante, tendo o valor de  $IC_{50}$  ( $40,00 \pm 1,59 \mu\text{g/mL}$ ), sido maior que nos extratos obtidos durante a extração sequenciada (EEP-A e EEt100). Este extrato apresentou também valores TEAC superiores ao dos outros extratos, ou seja,  $23,54 \pm 1,10$ . Assim, embora apresentando menor atividade, o extrato contém na sua composição, compostos que atuam por captação de radicais livres. Nesse sentido foi testada a



atividade antioxidante do extrato EEt95 sobre duas espécies reativas de oxigênio envolvidas em processos de oxidação celular; o anião superóxido e o radical hidroxilo, complementando desta forma os resultados obtidos para o DPPH. A capacidade anti-radicalar do anião superóxido evidenciou uma atividade com valores de IC<sub>50</sub> de 29,42 ± 1,99 µg/mL, e uma atividade muito inferior para o radical hidroxilo, tendo-se obtido apenas uma inibição de 31,15 ± 2,36% para uma concentração de 250 µg/mL do extrato EEt. Este resultado mostrou que este extrato possui potencialidades para atuar como agente anti-inflamatório, eventualmente como captador de radicais livres formados durante o processo, não se podendo excluir a possibilidade de outros mecanismos de ação.

#### 4.3.4. Atividade anti-inflamatória e citotoxicidade do extrato EEt95

A fim de avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato EEt95 determinou-se a capacidade do extrato para inibir a produção de NO por macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS. Paralelamente a este ensaio, foi determinada a citotoxicidade pelo método da resazurina. Na figura 29 encontra-se o efeito de diversas concentrações do extrato EEt95 na inibição da produção de nitritos em células de macrófagos estimuladas com LPS.



**Figura 29** – Efeito do extrato EEt95 de *Acanthus mollis* na inibição da produção de nitritos em células de macrófagos RAW 264.7. As células de macrófagos ( $0,1 \times 10^6$  células/poço) foram mantidas em meio de cultura (controlo), ou estimuladas com 1 µg/mL de LPS, com diferentes concentrações dos extratos (15-240 µg/mL), durante 24h. Os resultados estão expressos em percentagem de produção de nitritos pelas células na presença de LPS. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão de três experiências independentes. Foi realizado o teste ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni's. Valores significativos: (\*\*\*) P<0,001, versus controlo) (### P<0,001, versus LPS).

#### 4. Resultados e Discussão

As percentagens de produção de nitritos foram de  $65 \pm 3,79$ ,  $45,3 \pm 3,48$ ,  $28 \pm 2,65$ ,  $23 \pm 2,08$  e  $16,3 \pm 0,33$  ( $p \leq 0,001$ ), para as concentrações de 15, 30, 60, 120 e 240  $\mu\text{g/mL}$ , respetivamente. À concentração de 30  $\mu\text{g/mL}$  o extrato EEt95 inibiu a produção de nitritos em mais de 50%, sendo  $\text{IC}_{50}$  deste extrato de 28,01  $\mu\text{g/mL}$ , denotando uma atividade quase dupla daquela verificada para o extrato etanólico resultante da extração sequenciada (EEt100), sem que se registasse citotoxicidade. No entanto, para concentrações superiores verificou-se uma diminuição da viabilidade celular (inferior a 80%), pelo que as concentrações eficazes e isentas de toxicidade se situam, para as concentrações testadas, entre 15 e 30  $\mu\text{g/mL}$ .

Este desenho experimental não fornece informação acerca dos mecanismos de ação responsáveis pela atividade anti-inflamatória observada. No entanto existem fortes probabilidades de se tratar de uma ação *scavenging* do NO e/ou inibição da sua produção.

## **5. Discussão geral**

---

Muitos fitoconstituintes resultantes do metabolismo secundário das plantas têm propriedades farmacológicas interessantes, para além de fazerem parte integrante do sistema de defesa da planta. São vários os métodos utilizados para a elucidação estrutural destes compostos, nomeadamente os métodos cromatográficos e espetrais, alguns dos quais foram usados neste trabalho.

A TLC demonstrou, em *Acanthus mollis* a existência de compostos como terpenóides e flavonóides, corroborando os resultados de Attard e Pacioni (2011) e de ácidos hidroxâmicos cíclicos tal como referido por Pratt, Kumar e Chilton (1995). A presença de ácidos hidroxâmicos cíclicos, ou seja, dos derivados de DIBOA e de flavonóides foi reforçada pelo estudo por HPLC hifenada com detetor de PDA e espetrometria de massa, permitindo, adicionalmente identificar derivados do ácido cafeico, nomeadamente verbascósido e os seus derivados, que são referidos pela primeira vez nesta planta.

As plantas com propriedades anti-inflamatórias e/ou antioxidantes são potenciais fontes de constituintes bioativos de relevante interesse para a prevenção e tratamento de diferentes doenças. Existem várias patologias que se encontram associadas a processos inflamatórios, como é o caso da diabetes, do cancro, de algumas doenças cardiovasculares, neurológicas ou até mesmo pulmonares (Reuter *et al.*, 2010). Quando a produção de radicais livres é superior à eliminação pelos diversos mecanismos antioxidantes endógenos, ocorre o chamado stresse oxidativo, como resultado desse desequilíbrio (Khansari, Shakiba e Mahmoudi, 2009). Por sua vez, um constante stresse oxidativo pode levar a inflamações crónicas, que originam doenças crónicas. A inflamação crónica e o cancro podem estar interligados. Entre muitos exemplos, temos o cancro gástrico que é muitas vezes associado a uma infeção pela bactéria *Helicobacter pylori* (Grivennikov, Greten e Karin, 2010). O cancro da próstata é causado por uma lesão ou inflamação da próstata (Marzo *et al.*, 2007; Nelson *et al.*, 2004; Platz e Marzo, 2004). Recentemente, Heppner, Ransohoff e Becher (2015), afirmam que tal como se tem vindo a pensar nas últimas décadas, a inflamação contribui e agrava a doença de Alzheimer (Heppner, Ransohoff e Becher, 2015).

Para a prevenção ou até mesmo a cura de algumas destas doenças, é essencial a descoberta e identificação de compostos com propriedades anti-inflamatórias, visando um benefício para os doentes. Muitos são os estudos realizados quer com benzoxazinóides, quer com fenilpropanóides com vista à avaliação das suas propriedades farmacológicas.

Os benzoxazinóides foram durante décadas considerados como responsáveis pela defesa natural das plantas contra insetos, pestes e agentes patogénicos. Atualmente, há vários estudos *in vitro* que os referem como anti-inflamatórios, anticancerígenos, antimicrobianos, anti-alérgicos, com ação sobre o sistema nervoso central e no sistema reprodutivo, e também na diminuição de apetite e de peso (Adhikari *et al.*, 2013, 2015). Estes autores referem que DIBOA apresenta propriedades antimicrobianas, quer antifúngicas quer antibacterianas, e propriedades anticancerígenas. No género *Acanthus*, foram já atribuídas, a estes compostos, algumas propriedades como anticonvulsiva, hipnótica, analgésica, antipirética, antibacteriana, antihelmíntica, relaxante muscular e eventualmente no tratamento de fibroses hepáticas (Sam e Plampin, 1964; Sam e Valentine, 1969; Wai *et al.*, 2015).

Por sua vez, os fenilpropanóides são referidos como potentes antioxidantes, eficazes na prevenção de tumores, nos processos inflamatórios, como analgésicos, imunossuppressores, antibacterianos e antivirais, cicatrizantes, antitrombóticos e protetor cardiovascular e neurológico e hipotensores (Korkina, 2007; Pan *et al.*, 2003; Radev, 2010). Segundo Radev (2010), estes compostos apresentam uma baixa toxicidade e um amplo espectro farmacológico, o que leva a crer serem uns excelentes compostos para a obtenção de novos fármacos de origem natural. Fenilpropanóides já foram descritos para as diversas espécies do género *Acanthus*, mas, que seja do nosso conhecimento, nunca foram referenciados na espécie estudada neste trabalho, *Acanthus mollis*.

A maioria dos compostos presentes nos extratos resultantes da extração sequenciada foram igualmente extraídos pelo etanol a 95%, o qual contém maioritariamente glicósidos de DIBOA, e derivados do ácido cafeico, nomeadamente verbascósido e seus derivados. Este solvente tem sido utilizado na extração de

compostos fenólicos e benzoxazinóides de várias partes de plantas pertencentes a outras espécies do género *Acanthus*, aos quais têm sido atribuídas atividades farmacológicas tais como, antioxidante, hepatoprotetora, anticarcinogénica, inseticida e anti-inflamatória (Amer *et al.*, 2004; Amin *et al.*, 2012; Babu, Shylesh e Padikkala, 2001, 2002; Hokputsa *et al.*, 2004; Huo *et al.*, 2005, 2008; Somchaichana, Bunaprasert e Patumraj, 2012; Wang *et al.*, 2015; Wei *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2003a, 2003c; Yin *et al.*, 2008).

O DIBOA é um composto armazenado na forma glucosilada inativa, sendo ativado enzimaticamente após um ataque à planta. Por degradação do DIBOA libertam-se produtos químicos tóxicos que têm a capacidade de inibir um tipo particular de enzimas, as histonas desacetilases, que ajudam a fazer a compactação do ADN (Andrews, 2015). Em 2015, Venturelli e colaboradores descobriram que as toxinas resultantes da degradação dos benzoxazinóides inibem eficientemente o crescimento de células cancerosas humanas (Venturelli *et al.*, 2015).

O verbascósido, assim como o seu isómero, o isoverbascósido foi anteriormente descrito num extrato metanólico de folhas de *A. ilicifolius*, (Kiem, Van *et al.*, 2008). Segundo estes autores, estes dois compostos aumentaram significativamente o crescimento e a diferenciação dos osteoblastos, podendo assim contribuir para a prevenção da osteoporose. Outras propriedades biológicas têm sido atribuídas ao verbascósido, entre as quais a atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana (antibacteriana e antiviral), hepatoprotetora, antitumoral e fotoprotetora (Cardinali *et al.*, 2012; Funes *et al.*, 2009; Koo *et al.*, 2006; Tripoli *et al.*, 2005; Vertuani *et al.*, 2011). No entanto, a este composto tem sido principalmente atribuída a atividade antioxidante, *in vivo* e *ex vivo* (Cardinali *et al.*, 2012). Alguns investigadores defendem que o seu potente efeito antioxidante se deve ao grande número de grupos hidroxilo que existem na sua estrutura (Georgiev *et al.*, 2011), o que evidencia a importante contribuição do  $\beta$ -OH-verbascósido, detetado no nosso extrato, para esta atividade. A atividade anti-inflamatória do verbascósido foi também demonstrada, num ensaio *in vitro* utilizando queratinócitos humanos primários, tendo-se verificado uma redução de quimiocinas pró-inflamatórias libertadas, e a reparação da pele com decréscimo do

processo inflamatório (Esposito *et al.*, 2010). Já *in vivo*, foi testada a capacidade do verbascósido inibir a ativação de proteínas pró- inflamatórias na mucosa intestinal, tendo sido demonstrando que a sua administração pode ser benéfica no tratamento de doenças inflamatórias intestinais (Vertuani *et al.*, 2011). Ainda numa linha celular de macrófagos RAW 264.7, o verbascósido bloqueou eficientemente o ativador da proteína 1 (AP-1), aquando da sua ativação, induzida por LPS (Koo *et al.*, 2006).

Neste trabalho foi possível concluir que os extratos menos polares eram mais ricos em DIBOA e que apresentavam maior atividade anti-inflamatória, ao invés dos extratos mais polares que apresentaram maior concentração em compostos fenólicos (verbascósido e seus derivados) e maior atividade antioxidante. Assim sendo, e demonstrada a presença do verbascósido e seus derivados no extrato alcoólico das folhas de *Acanthus mollis*, pode ser sugerido que estes fenilpropanóides são os principais responsáveis pela atividade antioxidante deste extrato, apesar de também poderem contribuir para a atividade anti-inflamatória, que está particularmente relacionada com os glicósidos do DIBOA igualmente presentes neste extrato. Em nenhuma da literatura consultada, se atribui a atividade anti-inflamatória ao DIBOA, revelando-se através deste estudo pela primeira vez esta atividade. Esta planta torna-se de especial interesse, visto que contém constituintes capazes de atuar como antioxidantes ou como anti-inflamatórios.

## **6. Conclusões**

---



*Acanthus mollis* é uma planta nativa da região do Mediterrâneo com diversos usos tradicionais que não foram até ao momento devidamente confirmados por nenhum estudo científico. Com este trabalho podemos chegar a várias conclusões.

Esta planta contém vários fitoquímicos potencialmente bioativos, tais como, derivados dos ácidos fenólicos, flavonóides, alcalóides, saponinas, triterpenos e benzoxazinóides. Alguns destes fitoquímicos, mais concretamente, compostos fenólicos, principalmente derivados do ácido cafeico, e benzoxazinóides possuem atividade antioxidante e anti-inflamatória.

O extrato de etanol resultante da extração sequenciada possui um benzoxazinóide, DIBOA-hex-hex, que mostrou uma atividade antioxidante cerca de oito vezes inferior à do extrato, mas inibiu significativamente a produção de NO induzida por LPS em macrófagos RAW 264.7. Estes resultados parecem confirmar a atividade anti-inflamatória que tradicionalmente se atribui a esta planta.

O extrato de etanol a 95% obtido diretamente da planta seca por liofilização parece ser uma alternativa para a preparação industrial de um extrato bioativo, pois extrai fitoconstituintes com potencial terapêutico. De facto, este extrato demonstrou, em macrófagos RAW 264.7, estimulados com LPS a maior atividade anti-inflamatória de todos os extratos testados, assim como uma importante capacidade antioxidante, particularmente para o anião superóxido, radical biologicamente nocivo por promover a oxidação ao nível dos constituintes celulares.

## **7. Perspetivas futuras**

---

Este trabalho confirmou o potencial da *A. mollis* como fonte de compostos com atividade antioxidante e anti-inflamatória. No entanto vários aspetos carecem ainda de serem explorados em futuros trabalhos nomeadamente na análise fitoquímica, confirmação da atividade antioxidante e anti-inflamatória e estudo dos seus mecanismos de acção, estabelecimento da relação estrutura-atividade, pesquisa de outras atividades biológicas e avaliação da segurança. A obtenção destas informações permitirão não só validar a sua utilização tradicional como confirmar a planta como fonte para isolamento ou para síntese de novos fármacos com interesse farmacológico.

Neste contexto propõe-se como continuação do trabalho:

Reforçar os resultados obtidos neste trabalho e determinar os mecanismos responsáveis pela atividade anti-inflamatória, utilizando também outros modelos *in vitro*.

Visto ser conhecida, a contribuição dos fitoconstituintes maioritários, para as duas atividades estudadas, otimizar as condições extrativas a fim de se obterem produtos diferenciados de acordo com a natureza dos seus fitoconstituintes e das potenciais aplicações.

Identificar os fitoconstituintes de outras classes igualmente detetadas nos estudos preliminares, mas que não foram objeto de estudo neste trabalho, e avaliar a sua contribuição não só para as atividades antioxidante e anti-inflamatória mas também para outras atividades, bem como a sua toxicidade.

## **8. Bibliografia**

---

- ADAMU, M.; OSHADU, O. D.; OGBAJE, C. I. - **Anthelmintic efficacy of aqueous extract of *Acanthus montanus* leaf against strongylid nematodes of small ruminants**. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines. 7 (2010) 279–285.
- ADEYEMI, Olufunmilayo O.; OKPO, Steve O.; OKPAKA, Orowo - **The analgesic effect of the methanolic extract of *Acanthus montanus***. Journal of Ethnopharmacology. 90 (2004) 45–48.
- ADEYEMI, Olufunmilayo O.; OKPO, Steve O.; YOUNG-NWAFOR, Chizaram C. - **The relaxant activity of the methanolic extract of *Acanthus montanus* on intestinal smooth muscles**. Journal of Ethnopharmacology. 68 (1999) 169–173.
- ADEYEMI, OO; MGBEOKWERE, UO; OKPO, SO - **Relaxant Activity of the Methanol Extract of *Acanthus Montanus* (Nees) T Anderson (Acanthaceae) on Isolated Guinea Pig Trachea**. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 11 (2012) 777–782.
- ADHIKARI, Khem B. *et al.* - **Absorption and metabolic fate of bioactive dietary benzoxazinoids in humans**. Molecular Nutrition and Food Research. 57 (2013) 1847–1858.
- ADHIKARI, Khem B. *et al.* - **Benzoxazinoids: Cereal phytochemicals with putative therapeutic and health-protecting properties**. Molecular Nutrition and Food Research. 59 (2015) 1324–1338.
- ALMAGRAMI, Amel A. *et al.* - **Evaluation of Chemopreventive Effects of *Acanthus ilicifolius* against Azoxymethane-Induced Aberrant Crypt Foci in the Rat Colon**. PLoS ONE. 9 (2014) e96004.
- AMER, Masouda E. *et al.* - **Alkaloids and flavone acyl glycosides from *Acanthus arboreus***. Journal of the Brazilian Chemical Society. 15 (2004) 262–266.
- AMIN, Elham *et al.* - **Potent Insecticidal Secondary Metabolites from the Medicinal Plant *Acanthus montanus***. Records of Natural Products. 6 (2012) 301–305.
- ANAM, EM - **Novel triterpenoid glycosides and triterpenoid acid from the root extract of *Acanthus montanus* (Acanthaceae)**. Indian Journal of Chemistry Section B-Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry. 36 (1997) 901–904.
- ANAM, EM - **Pentacyclic triterpenoids from *Acanthus montanus* (Acanthaceae)**. Indian Journal of Chemistry Section B-Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry. 36 (1997) 110–113.
- ANDREWS, Robin - **Plants' Chemical Warfare Mechanism Revealed For First Time**. 2015. [Acedido a 12 jul. 2016]. Disponível na Internet: <http://www.iflscience.com/plants-and-animals/plants-chemical-warfare-mechanism-revealed-first-time/>.
- ASONGALEM, E. A. *et al.* - **Antiinflammatory, lack of central analgesia and antipyretic properties of *Acanthus montanus* (Ness) T. Anderson**. Journal of Ethnopharmacology. 95 (2004) 63–68.
- ATTARD, Everaldo; PACIONI, Pierpaolo - **The phytochemical and in vitro**

**pharmacological testing of maltese medicinal plants.** Section Title: Pharmacology. 2011. 93–112.

BABU, B. H.; SHYLES, B. S.; PADIKKALA, J. - **Antioxidant and hepatoprotective effect of *Acanthus ilicifolius*.** Fitoterapia. 72 (2001) 272–277.

BABU, B. H.; SHYLES, B. S.; PADIKKALA, J. - **Tumour reducing and anticarcinogenic activity of *Acanthus ilicifolius* in mice.** Journal of ethnopharmacology. 79 (2002) 27–33.

BADER, Ammar *et al.* - **Modulation of Cox-1, 5-, 12- and 15-Lox by popular herbal remedies used in southern Italy against psoriasis and other skin diseases.** Phytotherapy research: PTR. 29 (2015) 108–13.

BAILEY, B. A; LARSON, R. L. - **Hydroxamic Acid glucosyltransferases from maize seedlings.** Plant physiology. 90 (1989) 1071–6.

BLAZICS, Balázs *et al.* - **Identification and LC–MS –MS Determination of Acteoside , the Main Antioxidant Compound of *Euphrasia Rostkoviana*, Using the Isolated Target Analyte as External Standard.** Journal of Chromatographic Science. 49 (2011) 203–208.

BLOIS, M. S. - **Antioxidant determinations by the use of a stable free radical.** Nature. 181 (1958) 1999–1200.

BOLLIGER, H. R. *et al.* - **Thin-Layer Chromatography A Laboratory Handbook.** ISBN 978-3-662-01033-4.

BOONSANER, Maliwan; HAWKER, Darryl W. - **Remediation of saline soil from shrimp farms by three different plants including soybean (*Glycine max* (L.) Merr.).** Journal of environmental science and health, Part A. 47 (2012) 558–64.

BOSE, S.; BOSE, Arti - **Antimicrobial activity of *Acanthus ilicifolius* (L.).** Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. 70 (2008) 821–3.

BRAVO, H. R.; COPAJA, S. V - **Contents and morphological distribution of 2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one and 2-benzoxazolinone in *Acanthus mollis* in relation to protection from larvae of *Pseudaletia impuncta*.** Annals of Applied Biology. 140 (2002) 129–132.

BRAVO, Héctor R.; COPAJA, Sylvia V.; ARGANDOÑA, Víctor H. - **Chemical Basis for the Antifeedant Activity of Natural Hydroxamic Acids and Related Compounds.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52 (2004) 2598–2601.

BUCHMANN, Christoph A. *et al.* - **Dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA) and 2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIBOA), two naturally occurring benzoxazinones contained in sprouts of Gramineae are potent aneugens in human-derived liver cells (HepG2).** Cancer Letters. 246 (2007) 290–299.

CALIXTO, João B.; OTUKI, Michel F.; SANTOS, Adair R. S. - **Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kappa B (NF-kappaB).** Planta medica. 69 (2003) 973–983.

- CANNELL, Richard - **Natural Products Isolation Methods in Biotechnology**. Totowa, NJ : Humana Press, 1998. ISBN 978-0-89603-362-7.
- CAPANLAR, S. *et al.* - **A novel glycoside from *Acanthus hirsutus* (Acanthaceae)**. Natural Product Communications. 5 (2010) 563–6.
- CARDINALI, Angela *et al.* - **Verbascoside, isoverbascoside, and their derivatives recovered from olive mill wastewater as possible food antioxidants**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 60 (2012) 1822–1829.
- CHAKRABORTY, Tridib *et al.* - ***Acanthus ilicifolius* plant extract prevents DNA alterations in a transplantable Ehrlich ascites carcinoma-bearing murine model**. World journal of gastroenterology. 13 (2007) 6538–6548.
- CHEVALLIER, Andrew - **Enciclopédia de Plantas Medicinais**. Selecções ed. Verona. ISBN 972-609-243-4.
- CHIKEZIE, Paul C.; IBEGBULEM, Chiedozi O.; MBAGWU, Ferdinand N. - **Bioactive Principles from Medicinal Plants**. Research Journal of Phytochemistry. 9 (2015) 88–115.
- CHOMA, Irena; JESIONEK, Wioleta - **Effects-Directed Biological Detection. Em Instrumental Thin-Layer Chromatography**. Elsevier, 2015
- CHOU, T. C. - **Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies**. Pharmacological Reviews. 58 (2006) 621–681.
- DEWANJEE, Saikat *et al.* - **Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry**. Journal of Pharmaceutical Analysis. 5 (2015) 75–84.
- DICK, Regina *et al.* - **Comparative Analysis of Benzoxazinoid Biosynthesis in Monocots and Dicots: Independent Recruitment of Stabilization and Activation Functions**. The Plant cell. 24 (2012) 915–928.
- DUTARTRE, Leslie; HILLIOU, Frédérique; FEYEREISEN, René - **Phylogenomics of the benzoxazinoid biosynthetic pathway of Poaceae: gene duplications and origin of the *Bx* cluster**. BMC Evolutionary Biology. 12 (2012) 64.
- ESCRIBANO-BAILON, Teresa. *et al.* - **Characterization of procyanidins of *Vitis vinifera* variety Tinta del Pais grape seeds**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 40 (1992) 1794–1799.
- ESPOSITO, Emanuela *et al.* - **PPAR-alpha Contributes to the Anti-Inflammatory Activity of Verbascoside in a Model of Inflammatory Bowel Disease in Mice**. PPAR research. 2010 (2010) 10.
- FERRÃO, José; LIBERATO, Maria - **Dicionário de plantas medicinais**. Em Dicionário de plantas medicinais. p. 1–13.
- Cosmetic Composition Including an *Acanthus* Extract, and Use of *Acanthus* in a Cosmetic Hair-Care Composition**. FIORINI-PUYBARET, Christel. United States patente US 2011/0268686 A12011.

- FIRDAUS, Muhamad; PRIHANTO, Asep Awaludin; NURDIANI, Rahmi - **Antioxidant and cytotoxic activity of *Acanthus ilicifolius* flower**. Asian Pacific journal of tropical biomedicine. 3 (2013) 17–21.
- FREITAS, F.; MATEUS, M. .. G. - **Plantas e seus usos tradicionais**. Serviço do Parque Natural da Madeira ed. Funchal. ISBN 978-989-95497-9-1.
- FREY, Monika *et al.* - **Benzoxazinoid biosynthesis, a model for evolution of secondary metabolic pathways in plants**. Phytochemistry. 70 (2009) 1645–1651.
- FRIED, Bernard; SHERMA, Joseph - **Practical Thin-layer Chromatography: A Multidisciplinary Approach**. Bosa Roca, United States : Taylor & Francis Inc, 1996. ISBN 9780849326608.
- FUNES, L. *et al.* - **Correlation between plasma antioxidant capacity and verbascoside levels in rats after oral administration of lemon verbena extract**. Food Chemistry. 117 (2009) 589–598.
- GANESH, S.; VENNILA, J. J. - **Screening for antimicrobial activity in *Acanthus ilicifolius***. Archives of Applied Science Research. 2 (2010) 311–315.
- GANGWAL A - **Extraction , Estimation and Thin Layer Chromatography of Saponins: A Review**. International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences. 2 (2013) 1366–1368.
- GEORGIEV, Milen *et al.* - **Antioxidant and cholinesterases inhibitory activities of *Verbascum xanthophoeniceum* Griseb. and its phenylethanoid glycosides**. Food Chemistry. 128 (2011) 100–105.
- GLEŃSK, Michał *et al.* - ***In vitro* evaluation of the antioxidant and antimicrobial activity of DIMBOA [2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one]**. Natural Product Research. 6419 (2015) 1–4.
- GREEN, Laura C. *et al.* - **Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids**. Analytical Biochemistry. 126 (1982) 131–138.
- GRIVENNIKOV, Sergei I.; GRETEN, Florian R.; KARIN, Michael - **Immunity, Inflammation, and Cancer**. Cell. 140 (2010) 883–899.
- HAMID, R. *et al.* - **Comparison of alamar blue and MTT assays for high throughput screening**. Toxicology in Vitro. 18 (2004) 703–710.
- HARPUT, Ummuhan Sebnem *et al.* - **Antinociceptive, Free Radical–Scavenging, and Cytotoxic Activities of *Acanthus hirsutus* Boiss**. Journal of Medicinal Food. 14 (2011) 767–774.
- HEPPNER, Frank L.; RANSOHOFF, Richard M.; BECHER, Burkhard - **Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease**. Nature Reviews Neuroscience. 16 (2015) 358–372
- HOKPUTSA, Sanya *et al.* - **Bioactive polysaccharides from the stems of the Thai medicinal plant *Acanthus ebracteatus*: their chemical and physical features**. Carbohydrate research. 339 (2004) 753–62.



- HUANG, Ming-Yu *et al.* - **Chemical constituents from the roots of *Acanthus ilicifolius* var. *xiamenensis***. *Biochemical Systematics and Ecology*. 55 (2014) 145–147.
- HUO, Chang-Hong *et al.* - **Benzoxazinones from *Acanthus ilicifolius***. *Biochemical Systematics and Ecology*. 33 (2005) 643–645.
- HUO, Chang-Hong *et al.* - **A new 5,11-epoxymegastigmane glucoside from *Acanthus ilicifolius***. *Natural Product Research*. 22 (2008) 896–900.
- INNOCENTI, Marzia *et al.* - **Electrospray ionisation tandem mass spectrometric investigation of phenylpropanoids and secoiridoids from solid olive residue**. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 20 (2006) 2013–2022.
- JOSHI, Devi Datt - **Herbal Drugs and Fingerprints**. India : Springer India, 2012. ISBN 978-81-322-0803-7.
- KANCHANAPOOM, Tripetch *et al.* - **Lignan glucosides from *Acanthus ilicifolius***. *Phytochemistry*. 56 (2001a) 369–72.
- KANCHANAPOOM, Tripetch *et al.* - **Benzoxazinoid glucosides from *Acanthus ilicifolius***. *Phytochemistry*. 58 (2001b) 637–40.
- KANCHANAPOOM, Tripetch *et al.* - **Megastigmane, aliphatic alcohol and benzoxazinoid glycosides from *Acanthus ebracteatus***. *Phytochemistry*. 58 (2001c) 811–7.
- KAPIL, Aruna; SHARMA, Shalini; WAHIDULLA, Solimabi - **Leishmanicidal Activity of 2-Benzoxazolinone from *Acanthus ilicifolius* in vitro**. *Planta Medica*. 60 (1994) 187–188.
- KHANSARI, Nemat; SHAKIBA, Yadollah; MAHMOUDI, Mahdi - **Chronic Inflammation and Oxidative Stress as a Major Cause of Age- Related Diseases and Cancer**. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*. 3 (2009) 73–80.
- KIEM, Phan VAN *et al.* - **Chemical constituents of *Acanthus ilicifolius* L. and effect on osteoblastic MC3T3E1 cells**. *Archives of pharmacal research*. 31 (2008) 823–9.
- KOO, Kyung Ah *et al.* - **Acteoside and its aglycones protect primary cultures of rat cortical cells from glutamate-induced excitotoxicity**. *Life Sciences*. 79 (2006) 709–716.
- KORKINA, L. G. - **Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: From plant defense to human health**. *Cellular and Molecular Biology*. 53 (2007) 15–25.
- KOSCHELLA, Andreas *et al.* - **Unconventional methyl galactan synthesized via the thexyldimethylsilyl intermediate: preparation, characterization, and properties**. *Macromolecular bioscience*. 8 (2008) 96–105.
- KOSTYUK, Vladimir A. *et al.* - **Protective Effects of Green Tea Catechins against Asbestos-Induced Cell Injury**. *Planta Medica*. 66 (2000) 762–764.
- KULKARNI, Kirti M. *et al.* - **Fingerprinting Techniques in Herbal Standardization**. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*. 4 (2014) 1049-1062.

- LAUPATTARAKASEM, P. *et al.* - **An evaluation of the activity related to inflammation of four plants used in Thailand to treat arthritis.** *Journal of Ethnopharmacology*. 85 (2003) 207–215.
- LI, Li *et al.* - **Isolation and purification of acteoside and isoacteoside from *Plantago psyllium* L. by high-speed counter-current chromatography.** *Journal of Chromatography A*. 1063 (2005) 161–169.
- MACÍAS, Francisco A *et al.* - **Rediscovering the bioactivity and ecological role of 1,4-benzoxazinones.** *Natural product reports*. 26 (2009) 478–489.
- MAHASIRIPANTH, Taksanee *et al.* - **Effects of *Acanthus ebracteatus* Vahl on tumor angiogenesis and on tumor growth in nude mice implanted with cervical cancer.** *Cancer management and research*. 4 (2012) 269–79.
- MARZO, Angelo M. *et al.* - **Inflammation in prostate carcinogenesis.** *Nature Reviews Cancer*. 7 (2007) 256–269.
- MELO, Dr. Carlos Lima - ***Acanthus mollis* L ou *Acanthis mollis* L.** Em CESAHO (Ed.) - *Matéria Médica Lógica e Prática de Homeopatia* [Acedido a 8 dez. 2015]. Disponível em [http://www.cesaho.com.br/biblioteca\\_virtual/arquivos/arquivo\\_212\\_cesaho.pdf](http://www.cesaho.com.br/biblioteca_virtual/arquivos/arquivo_212_cesaho.pdf)>. p. 1–20.
- MERCK - **Handbook - Dyeing Reagents for Thin Layer and Paper Chromatography.** ISBN 352728205X.
- MIFSUD, Stephen - *MaltaWildPlants.com*, atual. 2006. [Acedido a 8 dez. 2015]. Disponível em [http://www.maltawildplants.com/ACNT/Acanthus\\_mollis.php](http://www.maltawildplants.com/ACNT/Acanthus_mollis.php)>.
- MONTEIRO, Julio Marcelino *et al.* - **Taninos: Uma abordagem da química à ecologia.** *Química Nova*. 28 (2005) 892–896.
- MOON, E. J. *et al.* - **A novel angiogenic factor derived from *Aloe vera* gel: beta-sitosterol, a plant sterol.** *Angiogenesis*. 3 (1999) 117–23.
- MURAKAMI, Akira *et al.* - **Possible Anti-tumor Promoting Properties of Edible Plants from Thailand, and Identification of an Active Constituent, Cardamonin, of *Boesenbergia pandurata*.** *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 57 (1993) 1971–1973.
- NANA, P. *et al.* - **Maternal and developmental toxicity evaluation of *Acanthus montanus* leaves extract administered orally to Wistar pregnant rats during organogenesis.** *Journal of Ethnopharmacology*. 116 (2008) 228–233.
- NELSON, William G. *et al.* - **The role of inflammation in the pathogenesis of prostate cancer.** *The Journal of urology*. 172 Pt 2 (2004) S6–S12
- NENADIS, Nikolaos *et al.* - ***Syringa oblata* Lindl var. *alba* as a source of oleuropein and related compounds.** *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 87 (2007) 160–166.
- NEVES, J. M.; CUNHA, Silvia - **Plantas Medicinais.** *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde*. 3 (2012) 50–57.

- NOIARSA, Pawadee; RUCHIRAWAT, Somsak; KANCHANAPOOM, Tripetch - **Acanmontanoside, a new phenylethanoid diglycoside from *Acanthus montanus***. *Molecules*. 15 (2010) 8967–8972.
- O'BRIEN, John *et al.* - **Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity**. *European Journal of Biochemistry*. 267 (2000) 5421–5426.
- OKOLI, Charles O. *et al.* - ***Acanthus montanus*: an experimental evaluation of the antimicrobial, anti-inflammatory and immunological properties of a traditional remedy for furuncles**. *BMC complementary and alternative medicine*. 8 (2008) 27.
- OLESZEK, Wieslaw; KAPUSTA, Ireneusz; STOCHMAL, Anna - **TLC of Triterpenes (Including Saponins)**. Em WAKSMUNDZKA-HAJNOS, MONIKA; SHERMA, JOSEPH; KOWALSKA, TERESA (Eds.) - *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*. CRC Press ed. London. ISBN 978-1-4200-4677-9. p. 519–542.
- OWEN, R. W. *et al.* - **Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes**. *Food and Chemical Toxicology*. 41 (2003) 703–717.
- PAN, Jing *et al.* - **Pharmacological activities and mechanisms of natural phenylpropanoid glycosides**. *Pharmazie*. 58 (2003) 767–775.
- PAYÁ, Miguel; HALLIWELL, Barry; HOULT, J. R. S. - **Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species**. *Biochemical Pharmacology*. 44 (1992) 205–214.
- PHISALAPHONG, M.; NTT, Ha; SIRIPONG, P. - **Desalting of aqueous extract of *Acanthus ebracteatus* Vahl. by nanofiltration**. *Separation Science and Technology*. 41 (2006) 455–470.
- PIHLAVA, Juha-Matti; KURTELIUS, Tuula - **Determination of benzoxazinoids in wheat and rye beers by HPLC-DAD and UPLC-QTOF MS**. *Food chemistry*. 204 (2016) 400–8.
- PLATZ, Elizabeth A.; MARZO, Angelo M. - **Epidemiology of Inflammation and Prostate Cancer**. *The Journal of Urology*. 171 (2004) S36–S40.
- PLAZONIC, Ana *et al.* - **Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in burr parsley (*caucalis platycarpus* L.), using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry**. *Molecules*. 14 (2009) 2466–2490.
- PRATT, K.; KUMAR, P.; CHILTON, W. S. - **Cyclic hydroxamic acids in dicotyledonous plants**. *Biochemical Systematics and Ecology*. 23 (1995) 781–785.
- PREEDY, Victor R. - **Processing and Impact on Antioxidants in Beverages**. Elsevier, 2014 [Acedido a 21 mai. 2016]. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124047389050017>>. ISBN 9780124047389.
- QUIDEAU, Stéphane - **Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications**.

Edited by Øyvind M. Andersen and Kenneth R. Markham. 2016 Disponível em <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.200685399>. ISBN 0-8493-2021-6.

RADEV, R. - **Pharmacological Effects of Phenylethanoid Glycosides.** J Clin Med. 3 (2010) 20–23.

RAMPERSAD, Sephra N. - **Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays.** Sensors. 12 (2012) 12347–12360.

RAVIKUMAR, S.; RAJA, M.; GNANADESIGAN, M. - **Antibacterial potential of benzoate and phenylethanoid derivatives isolated from *Acanthus ilicifolius* L. leaf extracts.** Natural product research. 26 (2012) 2270–2273.

REUTER, Simone *et al.* - **Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?** Free Radical Biology and Medicine. 49 (2010) 1603–1616.

REZANKA, Tomás; REZANKA, Pavel; SIGLER, Karel - **Glycosides of aryl-naphthalene lignans from *Acanthus mollis* having axial chirality.** Phytochemistry. 70 (2009) 1049–54.

RICE, Clifford P. *et al.* - **Hydroxamic acid content and toxicity of rye at selected growth stages.** Journal of Chemical Ecology. 31 (2005) 1887–1905.

RIVERA, D.; OBÓN, C. - **The ethnopharmacology of Madeira and Porto Santo Islands, a review.** Journal of ethnopharmacology. 46 (1995) 73–93.

ROJANAPO W; TEPSUWAN A; SIRIPONG P. - **Mutagenicity and antimutagenicity of Thai medicinal plants.** Basic Life Sci. 52 (1990) 447–52.

SAM, J.; PLAMPIN, J. N. - **Benzoxazoles: Potent Skeletal Muscle Relaxants.** Journal of pharmaceutical sciences. 53 (1964) 538–44.

SAM, Joseph; VALENTINE, J. L. - **Preparation and properties of 2-benzoxazolinones.** Journal of Pharmaceutical Sciences. 58 (1969) 1043–1054.

SANZ, Miriam *et al.* - **LC-DAD/ESI-MS/MS study of phenolic compounds in ash (*Fraxinus excelsior* L. and *F. americana* L.) heartwood. Effect of toasting intensity at cooperage.** Journal of Mass Spectrometry. 47 (2012) 905–918.

SASIDHARAN, S. *et al.* - **Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts.** African journal of traditional, complementary, and alternative medicines: AJTCAM/African Networks on Ethnomedicines. 8 (2011) 1–10.

SAVARESE, M.; MARCO, E. DE; SACCHI, R. - **Characterization of phenolic extracts from olives (*Olea europaea* cv. *Pisciottana*) by electrospray ionization mass spectrometry.** Food Chemistry. 105 (2007) 761–770.

SCHULLEHNER, Katrin *et al.* - **Benzoxazinoid biosynthesis in dicot plants.** Phytochemistry. 69 (2008) 2668–2677.

SENGUTTUVAN, Jamuna; PAULSAMY, Subramaniam; ARTS, Kongunadu - **Thin layer chromatographic analysis for various secondary metabolites in the methanolic leaf and root extracts of *Hypochaeris*.** American Journal PharmTech Research. 4

(2014) 145–156.

SENTHIL KUMAR, K. T.Mani *et al.* - **Anti-inflammatory activity of *Acanthus ilicifolius***. Journal of Ethnopharmacology. 120 (2008) 7–12.

SENTHIL KUMAR, K. T.Mani *et al.* - **The Gastroprotective Role of *Acanthus ilicifolius* – A Study to Unravel the Underlying Mechanism of Anti-Ulcer Activity**. Scientia Pharmaceutica. 80 (2012) 701–717.

SEQUEIRA, M.Meneses *et al.* - **Plantas e Usos Tradicionais nas Memórias de Hoje**. Casa do Povo da Ilha / Parque Natural da Madeira ed. Funchal.

SHARMA, Archana *et al.* - **Selected Medicinal Plants of Order Lamiales Used in Traditional Medicine**. American Journal of Pharmacy & Health Research. 3 (2015) 2321–3647.

SIMPSON, Michael G. - **Plant systematics**. Elsevier/Academic Press, 2006. ISBN 0080514049.

SITTIWET, C.; NIAMSA, N.; PUANGPRONP, D. - **Antimicrobial Activity of *Acanthus ebracteatus* Vahl. Aqueous Extract: The Potential for Skin Infection Treatment**. International Journal of Biological Chemistry. 3 (2009) 95–98.

SOMCHAICHANA, Jutamas; BUNAPRASERT, Tanom; PATUMRAJ, Suthiluk - ***Acanthus ebracteatus* Vahl. Ethanol Extract Enhancement of the Efficacy of the Collagen Scaffold in Wound Closure: A Study in a Full-Thickness-Wound Mouse Model**. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2012 (2012) 754527.

SRIVASTAVA, ManMohan - **High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC)**. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2011. ISBN 978-3-642-14024-2.

SVENDSEN, A.Baerheim; VERPOORTE, R. - **Chromatography of alkaloids - Part A: thin-layer chromatography**Journal of Chromatography Library. Elsevier, 1983. ISBN 9780444421456.

TENENBAUM, Frances (ED.) - **Taylor's Encyclopedia of Garden Plants**. Houghton M ed. New York.

THIRUNAVUK, P. *et al.* - **Antioxidant and Free Radical Scavenging Effect of *Acanthus ilicifolius***. Research Journal of Applied Sciences. 6 (2011) 218–222.

TRIPOLI, Elisa *et al.* - **The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health**. Nutrition research reviews. 18 (2005) 98–112.

UKWE, Chinwe Victoria; UBAKA, Chukwuemeka Michael - **Hypoglycemic activity of leaves of *Acanthus montanus* T.Anderson (Acanthaceae) in rats**. International Journal of Diabetes in Developing Countries. 31 (2011) 32–36.

VENTURELLI, S. *et al.* - **Plants Release Precursors of Histone Deacetylase Inhibitors to Suppress Growth of Competitors**. Plant Cell. 27 (2015) 3175–3189.

VERTUANI, Silvia *et al.* - **Activity and stability studies of verbascoside, a novel**

- antioxidant, in dermo-cosmetic and pharmaceutical topical formulations.** *Molecules*. 16 (2011) 7068–7080.
- VOGT, Thomas - **Phenylpropanoid biosynthesis.** *Molecular Plant*. 3 (2010) 2–20.
- WAGNER, H.; BLADT, S. - **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas.** Springer ed. ISBN 3540586768.
- WAI, Kyi Kyi *et al.* - **The protective effects of *Acanthus ilicifolius* alkaloid A and its derivatives on pro- and anti-inflammatory cytokines in rats with hepatic fibrosis.** *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 62 (2015) 537–546
- WAKSMUNDZKA-HAJNOS, Monika *et al.* - **HPLC of Flavonoids. Em High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis.** CRC Press ed. London. ISBN 978-1-4200-9260-8. p. 535–561.
- WAKSMUNDZKA-HAJNOS, Monika; SHERMA, Joseph; KOWALSKA, Teresa (EDS.) - **Thin layer chromatography in phytochemistry.** CRC Press ed. London. ISBN 9781420046779.
- WANG, Fazuo *et al.* - **A Three-Phase Solvent System in High-Speed Counter-Current Chromatographic for the Separation and Purification of Bioactive Constituents from *Acanthus ilicifolius*.** *Chromatographia*. 78 (2015) 1401–1407.
- WEI, Peng-hai *et al.* - **Effect of alcohol extract of *Acanthus ilicifolius* L. on anti-duck hepatitis B virus and protection of liver.** *Journal of Ethnopharmacology*. 160 (2015) 1–5.
- WOLF, Rebecca B.; SPENCER, Gayland F.; PLATTNER, Ronald D. - **Benzoxazinone, 2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one, and its glucoside from *Acanthus mollis* seeds inhibit velvetleaf germination and growth.** *Journal of Natural Products*. 48 (1985) 59–63.
- WU, Jun *et al.* - **New Aliphatic Alcohol and (Z)-4-Coumaric Acid Glycosides from *Acanthus ilicifolius*.** *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 51:10 (2003a) 1201–1203.
- WU, Jun *et al.* - **Megastigmane and flavone glycosides from *Acanthus ilicifolius*.** *Die Pharmazie*. 58 (2003b) 363–4.
- WU, Jun *et al.* - **Phenylethanoid and aliphatic alcohol glycosides from *Acanthus ilicifolius*.** *Phytochemistry*. 63 (2003c) 491–495.
- YANG, Yuchen *et al.* - **Transcriptome analysis of the Holly mangrove *Acanthus ilicifolius* and its terrestrial relative, *Acanthus leucostachyus*, provides insights into adaptation to intertidal zones.** *BMC Genomics*. 16 (2015) 605.
- YIN, Hao *et al.* - **Preparative isolation and purification of two benzoxazinoid glucosides from *Acanthus ilicifolius* L. by high-speed counter-current chromatography.** *Journal of chromatography. A*. 1205 (2008) 177–81.
- YING, T. *et al.* - **Separation and identification of 20 chemical constituents in the traditional Chinese medicinal preparation Shenbao tablet by LC-ESI-MS3.** *Journal of Chromatographic Science*. 42 (2004) 177–183.

ZHENG, Guangjin *et al.* - **Synthesis, Anti-Inflammatory, and Analgesic Activities of Derivatives of 4-Hydroxy-2-benzoxazolone.** *Journal of Chemistry* 2015 (2015) 1–5.