

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACOLÓGICAS



**CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO FARMACOGNÓSTICO DE
GYMNOSPORIA ARENICOLA, FOLHA**

Gustavo Adolfo Lopes Ferreira da Silva

MESTRADO EM MEDICAMENTOS À BASE DE PLANTAS

2014

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACOLÓGICAS



**CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO FARMACOGNÓSTICO DE
GYMNOSPORIA ARENICOLA, FOLHA**

Gustavo Adolfo Lopes Ferreira da Silva

MESTRADO EM MEDICAMENTOS À BASE DE PLANTAS

Dissertação orientada pelas Professoras Doutoradas Olga Maria Duarte Silva
e Elsa Teixeira Gomes

2014

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Medicamentos à Base de Plantas, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Olga Maria Duarte Silva, Professora Associada do Departamento de Ciências Farmacológicas da Universidade de Lisboa e da Professora Doutora Elsa Teixeira Gomes, Professora Associada Aposentada da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

Sou um pouco de todos que conheci, um pouco dos lugares que fui, um pouco das saudades que deixei e muito das coisas que gostei.

Saint-Exupéry

Resumo

Gymnosporia arenicola Jordaan (Celastraceae) é um arbusto ou pequena árvore (raramente subarbusto), endêmico ou quase-endêmico das zonas costeiras de Moçambique e África do Sul. As folhas de *G. arenicola* são amplamente usadas nos sistemas de medicina tradicional para o tratamento de doenças de natureza infecciosa e/ou inflamatória.

Com o objetivo de criar critérios de qualidade e eficácia, e na ausência de uma monografia de qualidade para esta planta medicinal, torna-se indispensável o estabelecimento de parâmetros de controlo de qualidade botânicos e químicos para assegurar a correta identificação desta planta medicinal, assim como a validação de alguns dos seus usos tradicionais e exploração do interesse biológico de alguns dos seus constituintes maioritários.

No âmbito deste estudo, são apresentados os resultados da caracterização botânica das folhas de *Gymnosporia arenicola*, onde são incluídas as análises macro- e microscópica do material vegetal, com inclusão de elementos histoquímicos relevantes. São também reveladas as características anatomo-morfológicas consideradas úteis para fins de diagnose botânica das folhas de *Gymnosporia arenicola* observadas macroscopicamente (a olho nú e à lupa) e microscopicamente em microscopia ótica e eletrónica de varrimento. A deteção microscópica de alcalóides, amido, di-hidroxi-orto-fenóis, lípidos totais e terpenóides carbonilados é observada com recurso a técnicas histoquímicas. Os resultados visando os estudos químicos são também apresentados, abrangendo o isolamento e identificação de um dos constituintes maioritários do extrato alcaloídico das folhas de *G. arenicola*. São reportados também os estudos de atividade biológica do extrato etanólico e de um dos constituintes maioritários do extrato alcaloídico.

Este trabalho permitiu a caracterização botânica das folhas de *G. arenicola*, com identificação e quantificação de elementos úteis para a sua diagnose morfológica. O estudo químico desenvolvido neste trabalho, acrescenta novos dados aos estudos anteriormente reportados e permitiu a identificação de um novo macrociclo bioativo de interesse quimiotaxonómico. O conjunto dos resultados deste estudo constituem uma contribuição relevante para o estudo farmacognóstico desta planta medicinal.

Palavras-chave

Gymnosporia arenicola; identificação botânica; análise histoquímica; marcadores químicos; elucidação estrutural; atividade citotóxica.

Abstract

Gymnosporia arenicola Jordaan (Celastraceae) is a shrub or small tree (rarely suffrutex), endemic or nearly-endemic of the coastal areas of Mozambique and South Africa. Leaves of *G. arenicola* are widely used in traditional medicine systems for the treatment of infectious and/or inflammatory diseases.

Aiming at the creation of quality and efficacy criteria and in the absence of a quality monograph for this medicinal plant, the establishment of botanical and chemical quality control parameters is necessary to ensure the correct botanical identification of this herbal drug, as well as to validate some of their traditional uses and to explore the biological interest of some its major constituents. In this study, the results of the botanical characterization of the leaves of *Gymnosporia arenicola* are presented, including the macro- and microscopic analysis of the plant material and relevant histochemical elements. The morphoanatomical features considered to be useful for the botanical diagnosis of *Gymnosporia arenicola* leaves are reported, including both macroscopic (naked eye and stereomicroscope) and microscopic observations, using light and scanning electron microscopy. The microscopical detection of alkaloids, dihydroxy-*ortho*-phenols starch, terpenoids containing a carbonyl group and total lipids is observed with histochemical techniques. The results from the chemical studies are also presented, including the isolation and structural identification of one of the major constituents from the alkaloid extract of *G. arenicola* leaves. Hereby the results from the biological activity from the ethanolic extract and one of the major constituents from the alkaloid extract are also reported.

This work allowed the botanical characterization of *G. arenicola* leaves, comprising the identification and quantification of useful elements for their morphological diagnosis. The chemical study developed in this work adds new data to previously reported studies and allowed the identification of a novel bioactive macrocycle with chemotaxonomical interest. All the results consist of relevant contributions towards the pharmacognostical study of this medicinal plant.

Keywords

Gymnosporia arenicola; botanical identification; chemical markers; histochemical analysis; structural elucidation; cytotoxic activity.

Agradecimentos

À Prof.a Doutora Olga Maria Duarte Silva, do Departamento de Ciências Farmacológicas, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa e minha orientadora científica, gostaria de agradecer pelos ensinamentos transmitidos ao longo deste trabalho experimental, pela disponibilidade demonstrada e pelo incentivo necessário à conclusão desta dissertação.

À Prof.a Doutora Elsa Teixeira Gomes, colaboradora Departamento de Ciências Farmacológicas, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa e minha orientadora científica, gostaria de expressar a minha gratidão pela transmissão de conhecimentos constantemente concedidos durante este período, pela receptividade revelada ao me acolher inicialmente no seu laboratório e pela motivação revelada no sentido da conclusão deste trabalho. Também agradeço a cedência de material fotográfico incluído nesta dissertação.

À Prof.a Doutora Rita Maria Olivença Trindade dos Santos Serrano, do Departamento de Ciências Farmacológicas, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, gostaria de agradecer pelos conhecimentos constantemente transmitidos ao longo de todo o trabalho experimental, pela disponibilidade demonstrada e pelo incentivo necessário à concretização desta dissertação.

À Doutora Raquel Maria González Soengas, investigadora do grupo de Química Orgânica, Produtos Naturais e Agroalimentares do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, agradeço a disponibilidade concedida na discussão dos dados relativos à elucidação estrutural, assim como a amizade que sempre me demonstrou.

À Doutora Vera Lúcia Marques da Silva, investigadora do grupo de Química Orgânica, Produtos Naturais e Agroalimentares do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, gostaria de agradecer os ensinamentos pacientemente transmitidos noutras circunstâncias, que de forma involuntária também possibilitaram a interpretação dos espectros de ressonância magnética nuclear.

Ao Prof. Artur Manuel Soares da Silva, do grupo de Química Orgânica, Produtos Naturais e Agroalimentares do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, agradeço toda a aprendizagem que me possibilitou, durante o período em que recebeu no seu laboratório, nomeadamente na análise rotineira de espectros de ressonância magnética nuclear.

À Dra. Maria Adélia Diniz, do Instituto de Investigação Científica e Tropical, agradeço a identificação do material vegetal, que foi estudado no âmbito desta dissertação, assim como a cedência de literatura.

Ao Dr. Telmo Nunes, do Laboratório do Centro de Biologia Ambiental da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, agradeço a assistência técnica na utilização do Microscópio Eletrónico de Varrimento.

À Dra. Maria do Rosário Caras Altas, do Laboratório de Análises do REQUIMTE, do Departamento de Química/Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa agradeço a assistência técnica na obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear.

À Dra. Luz Catarina Neves Fernandes, técnica superior do Laboratório de Análises do REQUIMTE, do Departamento de Química/Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa, agradeço a execução de MALDI-TOF-MS.

Trabalhos científicos publicados

Os resultados constantes desta dissertação foram já objeto de divulgação sob a forma de artigos científicos ou apresentados sob a forma de painel, com as seguintes referências:

- da Silva G, Taniça M, Gomes ET, Serrano R, Silva O (2008) Estudos fitoquímico e de actividade biológica de espécies moçambicanas do género *Maytenus*. *Actas do Workshop Plantas Medicinais e Fitoterapêuticas nos Trópicos*. Outubro, Lisboa (Portugal).
- da Silva G, Taniça M, Gomes ET, Serrano R, Silva OD (2009) Microscopic identification of *Maytenus heterophylla* leaf, and herbal drug. Joint Meeting of the Spanish and Portuguese Microscopy Societies - XXIV Congress of the Spanish Society and XLIV Annual Meeting of the Portuguese Society for Microscopy. Julho, Segóvia (Espanha).
- da Silva G, Taniça M, Gomes ET, Serrano R, Silva O (2009) Morphoanatomy and histochemistry of *Maytenus heterophylla* leaf, an African medicine. *Planta Medica* **75**(9): 994.
- da Silva G, Taniça M, Gomes ET, Serrano R, Silva O (2010) Use of microscopy in botanical authentication of *Maytenus heterophylla* leaf, an herbal medicine. VIII International Ethnobotany Symposium. Outubro, Lisboa (Portugal).
- Serrano R, da Silva G, Silva O (2010) Application of Light and Scanning Electron Microscopy in the Identification of Herbal Medicines. In: Méndez-Vilas A, Díaz J (Eds) *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*. Badajoz: Formatex. pp 182-190
- da Silva G, Serrano R, Rocha J, Sepodes B, Gomes ET, Silva O (2011) *Gymnosporia heterophylla* Leaves – Botanical, Chemical and Biological Studies. 3rd iMed.UL Post-Graduate Students Meeting. Dezembro, Lisboa (Portugal).
- da Silva G, Serrano R, Silva O (2011) *Maytenus heterophylla* and *Maytenus senegalensis*, two traditional herbal medicines. *Journal of Natural science, Biology and Medicine* **2**(1): 59-65.

Outros resultados estão em vias de serem publicados, em fase de avaliação ou preparação:

- da Silva G, Macedo R, Famba I, Serrano R, Taniça M, Maluleque M, Agostinho AB, Gomes ET, Pereira E, Silva O (2014) *In vitro* antimycobacterial activity of some selected medicinal plants from Mozambique. Submetido ao *Journal of Ethnopharmacology*.
- da Silva G, Serrano R, Gomes ET, Silva O (2014) Leaf anatomy as a contribution to the identification of *Gymnosporia arenicola*. Em preparação para o *Journal of Microscopy*.
- da Silva G, Soengas R, Martinho A, Duarte AP, Gomes ET, Silva O (2014) A novel cytotoxic spermidine macrocyclic alkaloid isolated from *Gymnosporia arenicola* leaf. Em preparação para o *Journal of Natural Products*.

Índice

RESUMO	V
PALAVRAS-CHAVE	V
ABSTRACT	VII
KEYWORDS	VII
AGRADECIMENTOS	IX
TRABALHOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS	XI
ÍNDICE	XIII
ABREVIATURAS	XIX
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos	1
1.2 Distribuição ecológica e geográfica	2
1.2.1 Ecologia e biótopo	2
1.2.2 Distribuição geográfica	2
1.3 Aspectos botânicos	3
1.3.1 Nomenclatura e etimologia binomial	3
1.3.2 Descrição anatomo-morfológica	3
1.3.3 Sinonímias homotípicas	7
1.3.4 Enquadramento taxonómico	7
1.3.5 Nomes comuns	8
1.3.6 Estudos botânicos anteriores	9
1.4 Aspectos etnomédicos e estudos anteriores químicos e biológicos	9
1.4.1 Utilização na medicina tradicional	10
1.4.2 Outros usos	10
1.4.3 Estudos biológicos	11
1.5 Aspectos químicos	11
1.5.1 Metabolitos identificados	12
1.5.2 Atividade biológica atribuída aos metabolitos	16
2 METODOLOGIA	19

2.1 Reagentes	19
2.2 Material vegetal.....	19
2.2 Métodos de análise botânica	19
2.2.1 Análise macroscópica.....	19
2.2.2 Análise microscópica em microscópio ótico.....	20
2.2.3 Análise microscópica em microscópio eletrônico de varrimento	20
2.2.4 Obtenção de cortes histológicos transversais	20
2.2.5 Obtenção de cortes histológicos paradérmicos	21
2.2.6 Obtenção do material vegetal pulverizado	22
2.2.7 Procedimentos histoquímicos.....	22
2.3 Métodos extrativos	24
2.3.1 Extração com etanol a 70%	24
2.3.2 Extração alcaloídica	25
2.4 Métodos cromatográficos preparativos	25
2.4.1 LPLC	25
2.4.2 CC.....	25
2.5 Métodos biológicos	26
2.5.1 Avaliação da atividade antimicrobiana	26
2.5.2 Avaliação da atividade antitumoral.....	28
2.6 Métodos físico-químicos	29
3 RESULTADOS	31
3.1 Estudo botânico.....	31
3.2 Estudo químico.....	42
3.2.1 Métodos extrativos e isolamento de um dos constituintes	42
3.2.2 Identificação estrutural de um dos constituintes	42
3.3 Estudos biológicos	48
3.3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana	48
3.3.2 Avaliação da atividade antitumoral.....	49
4 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	53
4.1 Estudo botânico.....	53
4.2 Estudo químico.....	55

4.3 Estudos biológicos	59
4.3.1 Atividade antimicrobiana	59
4.3.2 Atividade antitumoral.....	59
5 CONCLUSÕES	61
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPETIVAS FUTURAS	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

Índice de Figuras

Figura 1. Distribuição geográfica descrita para <i>Gymnosporia arenicola</i> , em Moçambique	3
Figura 2. <i>Gymnosporia arenicola</i> no habitat natural, na praia da Macaneta (Moçambique).....	5
Figura 3. Gravura com detalhes da parte aérea de <i>Gymnosporia arenicola</i>	6
Figura 4. Estruturas dos alcalóides identificados em <i>Maytenus heterophylla</i>	12
Figura 5. Estruturas dos triterpenóides identificados em <i>Maytenus heterophylla</i>	14
Figura 6. Estruturas dos flavonóides identificados em <i>Maytenus heterophylla</i>	15
Figura 7. Estruturas dos glucósidos identificados em <i>Maytenus heterophylla</i>	16
Figura 8. Folhas de <i>Gymnosporia arenicola</i> , observadas a olho nú e à lupa.....	31
Figura 9. Principais características dos cortes transversais da folha de <i>G. arenicola</i>	33
Figura 10. Principais características dos cortes transversais da folha de <i>G. arenicola</i> observados em microscopia ótica (A) e em microscopia eletrónica de varrimento (B), revelando detalhes ao nível da estrutura da nervura central (C)	34
Figura 11 Vista superior da folha de <i>G. arenicola</i> , em microscopia eletrónica de varrimento (A,C,E) e microscopia ótica (B, D, F).....	36
Figura 12. Principais características microscópicas do pó das folhas de <i>G. arenicola</i>	38
Figura 13. Ilustração esquemática das características microscópicas da folha de <i>G. arenicola</i>	39
Figura 14. Localização histoquímica das principais classes de constituintes em cortes transversais da folha de <i>G. arenicola</i>	41
Figura 15. Espetro de massa do composto 16.....	42
Figura 16. Espetro de RMN de ¹ H do composto 16.....	43
Figura 17. Espetro de RMN de ¹³ C do composto 16.....	44
Figura 18. Espetro de RMN de DEPT-135 do composto 16.....	45
Figura 19. Projeção interna de HSQC do composto 16	46
Figura 20. Projeção interna de HMBC do composto 16	47
Figura 21. Citotoxicidade produzida pela (2 <i>S</i>)-9-benzoil-2-fenil-1-metil-1,5,9-triazaciclotridecan-4-ona 1 nas células PNT1A e PC3	50
Figura 22. Citotoxicidade produzida pelo composto 16 nas células MCF10 e MCF7	51
Figura 23. Estrutura e numeração da (2 <i>S</i>)-9-benzoil-2-fenil-1-metil-1,5,9-triazaciclotridecan-4-ona 16 ..	55
Figura 24. Efeito de ressonância na unidade benzoilo	56
Figura 25. Principais conectividades observadas nos espectros de HMBC de (2 <i>S</i>)-9-benzoil-2-fenil-1-metil-1,5,9-triazaciclotridecan-4-ona 16.....	58

Abreviaturas

Nesta dissertação foi utilizada a terminologia anglo-saxónica e acrónimos correspondentes para designação de alguns reagentes, técnicas cromatográficas, métodos de elucidação estrutural, culturas de células, ensaios e parâmetros biológicos. As restantes designações correspondem apenas a abreviaturas amplamente empregues dos termos utilizados.

Δ	Desvio químico, em ppm
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
br s	Singuleto largo
C	Concentração
CC	<i>Column Chromatography</i>
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CPTLC	<i>Centrifugal Preparative Thin Layer Chromatography</i>
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DNPH	<i>2,4-Dinitrophenylhydrazine</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple-Bond Correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation</i>
HR-MS	<i>High Resolution-Mass Spectrometry</i>
IC ₅₀	<i>Inhibitory Concentration, for 50% of the population</i>
IE	Índice estomático
<i>J</i>	Constante de acoplamento, em Hz
LPLC	<i>Low Pressure Liquid Chromatography</i>
M	Multipleto
MIC	<i>Minimal Inhibitory Concentration</i>
MTT	<i>Microculture Tetrazolium Test</i>
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de protão
s	Singuleto
t	Tripleto
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i>

1.1 Objetivos

A presente dissertação de mestrado contribui para o estudo farmacognóstico de uma planta da flora de Mozambique, amplamente usada na medicina tradicional africana no tratamento de doenças infecciosas e/ou de natureza inflamatória e tem como um dos objetivos específicos o estabelecimento de critérios de identificação botânica e química, necessários para a correta diagnose da folha de *Gymnosporia arenicola* Jordaan enquanto planta medicinal.

Neste âmbito são apresentados os resultados da observação macroscópica (a olho nú e à lupa) e microscópica (microscopia ótica e microscopia eletrónica de varrimento) do material vegetal inteiro, em corte histológico e/ou pulverizado. Os resultados da análise microscópica do material vegetal são complementados com a localização *in situ* de algumas das classes de constituintes químicos em cortes histológicos da folha de *G. arenicola*, com recurso a reações histoquímicas para deteção de alcalóides, amido, *o*-di-hidroxifenóis, lípidos totais e terpenóides carbonilados.

Outro dos objetivos específicos do presente trabalho também foi a extração, isolamento e identificação estrutural de um marcador químico bioativo desta planta medicinal. Os resultados obtidos são apresentados e discutidos com base nos seus dados estruturais, observados em estudos de ressonância magnética nuclear monodimensional (^1H e ^{13}C) e dimensional (homo- e heteronuclear), espectrofotometria de massa de alta resolução e polarimetria, para determinação da configuração absoluta de compostos quirais. Neste âmbito é proposta uma rota biossintética plausível para este composto isolado e também são apresentados os resultados inerentes à avaliação da sua atividade citotóxica, através do estudo da viabilidade celular (ensaio MTT) em quatro linhas celulares, em células cancerígenas e não-cancerígenas.

1.2 Distribuição ecológica e geográfica

1.2.1 Ecologia e biótopo

Gymnosporia arenicola Jordaan (Celastraceae) é uma espécie vegetal comum em zonas costeiras e dunas de areia, ocorrendo ao longo da costa oriental da África Austral. Esta espécie está associada à floresta tropical de duna, estando integrada nas comunidades vegetais dos ecossistemas de praia e de duna. Cresce preferencialmente nas zonas limítrofes da mata dunal e orlas de floresta, em solos arenosos preferencialmente ácidos, ocorrendo frequentemente em zonas húmidas.¹

1.2.2 Distribuição geográfica

Gymnosporia arenicola tem uma distribuição muito restrita, ocorrendo no Sudoeste africano (África tropical). Espécie endémica ou quase endémica das zonas costeiras localizadas desde o sul da Tanzânia (distrito de Korogwe), até à costa de África do Sul (distrito de Natal), passando pela costa de Moçambique (todo o país).

Esta região atravessa um centro de endemismo, o centro de endemismo de Maputaland, amplamente reconhecido como uma zona de grande biodiversidade de flora e de fauna. Este centro de endemismo, partilhado com África do Sul, é caracterizado por elevada temperatura e humidade (precipitação média anual cerca de 1100 cm³ nas zonas costeiras).^{1,2} *G. arenicola* é considerada uma espécie protegida, incluída na lista vermelha de plantas sul-africanas.³

Na Figura 1 é apresentado um mapa, ilustrando a distribuição geográfica conhecida de *G. arenicola* na costa de Moçambique.

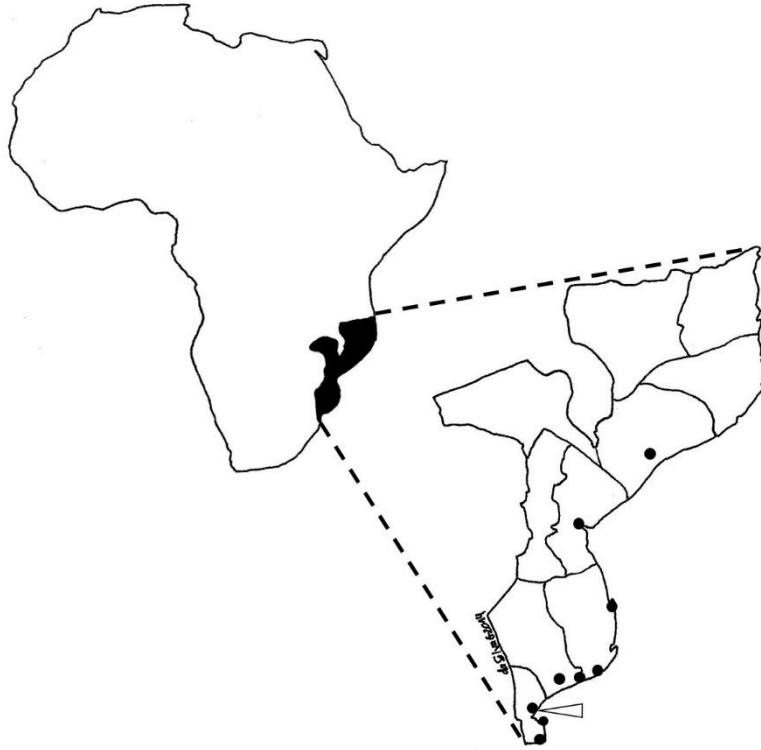


Figura 1. Distribuição geográfica descrita para *Gymnosporia arenicola*, em Moçambique. A distribuição geográfica desta espécie no país e o local de colheita do material usado neste estudo são assinalados com pontos e seta, respetivamente. Ilustração do autor

1.3 Aspectos botânicos

1.3.1 Nomenclatura e etimologia binomial

Gymnosporia arenicola Jordaan

- Jordaan, M., 1999. *S. Afr. J. Bot.* **65**(5&6): 315-20.

O epíteto genérico **Gymnosporia**, deriva de caracteres morfoanatômicos da semente e do fruto desta espécie, sendo formado pela decomposição da palavra de origem grega *gymnos* (despido) e *spora* (sementes).⁴

O epíteto específico **arenicola** refere-se ao habitat preferencial desta espécie, sendo composto pela palavra de origem latina *arena* (areia) e *cola* (habitante).¹

1.3.2 Descrição anatomo-morfológica

Arbusto, pequena árvore ou mais raramente sufrútice nodoso, até 7 m de altura, provido de espinhos, glabro.

Braquiblastos muito curtos. Ramos novos angulosos e castanho-avermelhados, que se tornam gradualmente mais cilíndricos (afilados) e cinzentos com a idade, frequentemente com zooecídias. Espinhos axilares (ou terminando em ramos axilares) robustos, até 95 mm de comprimento. Folhas fasciculadas (evoluindo para alternas na terminação da ramificação), glabras, coriáceas, esverdeadas, pecioladas, com limbo indiviso muito variável de arredondado a emarginado (agudo), de contorno inteiro ou com recortes do tipo marginal dentado, com dentação irregular limitada à metade mais distal, lâmina obovada, 30-56(-70) x 17-35 mm, vértice acunhado a arredondado, margem progressivamente coriácea, revoluta, com venação óbvia na página inferior, nervação proeminente na página inferior e amarela em espécimes secos, pecíolo curto, 1-2 mm de comprimento. Estípulas subuladas, margem fimbriada, \pm 1 mm de comprimento. Inflorescência do tipo cimeria dicasial em ramos ou panículas axilares, mais curta que as folhas, com pedúnculo 4-15 mm de comprimento e pedicelo 5-8 mm de comprimento. Flores 5-9 por cimeria, brancas ou amareladas, pentaméricas, não aromáticas, dióicas. Sépalas 5(6), \pm 1,5 mm de comprimento, ovadas, margem ciliolada. Pétalas 5, 1-3 mm de comprimento, triangulares, margem assimétrica desigual. Disco com 1 mm de diâmetro. Flores masculinas providas de estames mais compridos que as pétalas, dotadas de filamentos 3 mm de comprimento, com origem no disco, e providas de anteras 0,5 mm de comprimento, pistilódio pequeno, filete curto, não ramificado. Flores femininas com estilete e estigma mais longo que as pétalas, com estaminódios mais curtos que os estames das flores masculinas e estilete 1,5 mm de comprimento, com estigma bífido, projetado horizontalmente. Ovário 3-locular, com 2 óvulos por lóculo. Cápsula com 3 valvas, subglobosóide, coriácea, verrucosa, 7-9 mm de comprimento, amarela a laranja-avermelhada, e com estiletos persistentes na frutificação. Semente elipsóide 1-3, castanho-avermelhada escura, 3 mm de comprimento, com arilo amarelado cobrindo parcialmente a parte inferior da semente.¹

Na Figura 2 são apresentadas algumas fotografias de *Gymnosporia arenicola* no seu habitat natural, na praia da Macaneta e em Marraquene.

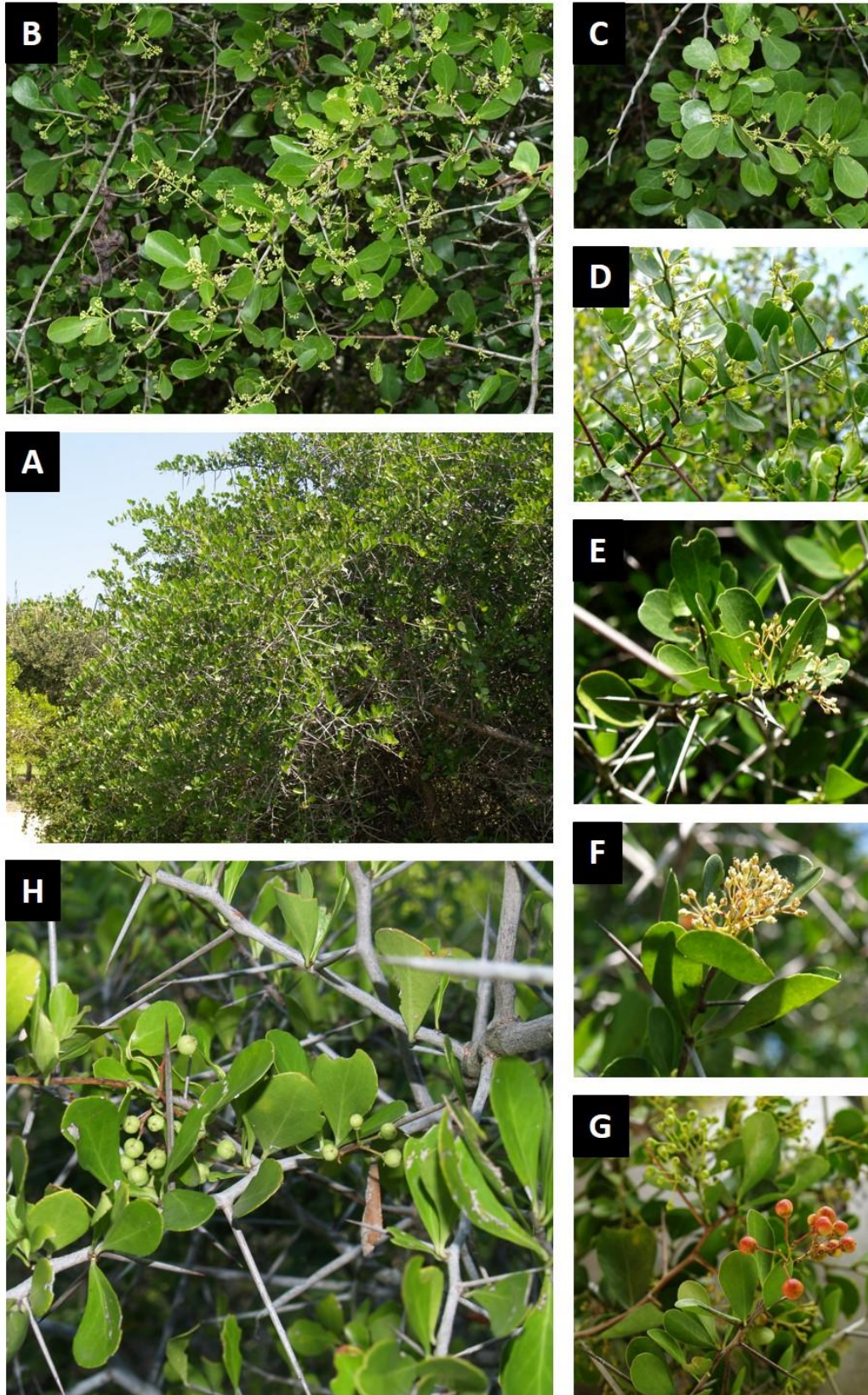


Figura 2. *Gymnosporia arenicola* no habitat natural, na praia da Macaneta (Moçambique). Aspetto geral do arbusto (A) e detalhes dos seus ramos floridos (B-F) e frutificados (G-H). Fotografias gentilmente cedidas pela Prof.a Doutora E. T. Gomes.

Na Figura 3 é apresentada uma ilustração esquemática do ramo florido e frutificado de *Gymnosporia arenicola*.

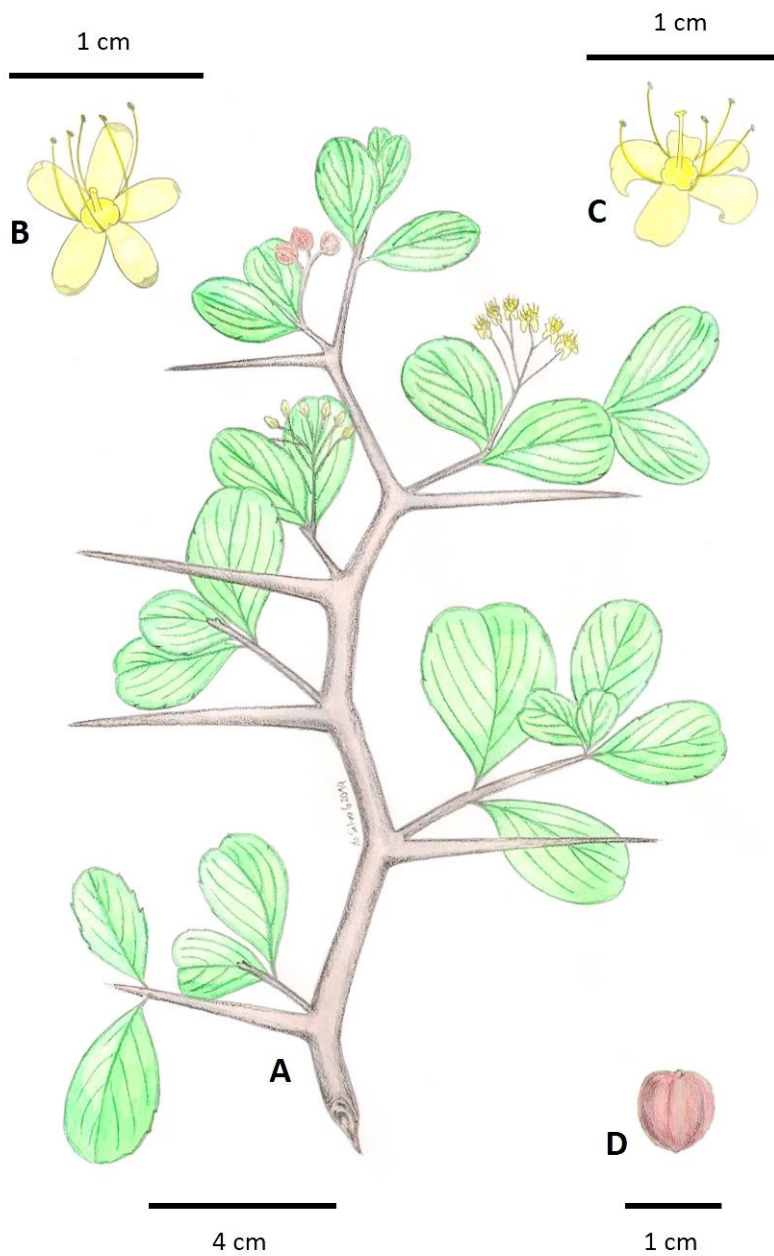


Figura 3. Gravura com detalhes da parte aérea de *Gymnosporia arenicola*. Ramo florido (A), flores masculinas (B), flores femininas (C) e cápsula (D). Escala gráfica: A = 4 cm; B-D = 1 cm. Ilustração do autor.

1.3.3 Sinonímias homotípicas

Gymnosporia arenicola, recentemente reclassificado, tem como sinónimo único *Maytenus heterophylla* var. *arenaria* N. Robson.

Por sua vez, *Maytenus heterophylla*, apresenta as seguintes 43 sinonímias homotípicas: *Cassine szyszyłowiczii* Kuntze, *Catha buxifolia* (L.) G. Don, *C. cymosa* (Soland.) C. Presl., *C. heterophylla* (Eckl. & Zeyh.) Presl., *Celastrus andongensis* Oliv., *C. angularis* Sond., *C. buxifolius* L., *C. cymosus* Soland., *C. ellipticus* Thunb., *C. empleurigiolius* Eckl. & Zeyh., *C. goniecaulis* Eckl. & Zeyh., *C. heterophyllus* Eckl. & Zeyh., *C. humilis* Eckl. & Zeyh., *C. lanceolatus* E. Mey. Ex Sond., *C. linearis* L. f., *C. multiflorus* Lam., *C. parvifolius* Eckl. & Zeyh., *C. patens* Eckl. & Zeyh., *C. polyacanthus* sensu Eyles, *C. polyanthemos* Eckl. & Zeyh., *C. rhombifolius* Eckl. & Zeyh., *C. spathephyllus* Eckl. & Zeyh., *C. venenatus* Eckl. & Zeyh., *Elaeodendron glaucum* sensu Szyszyl., *Gymnosporia acanthophora* Loes., *G. angularis* (Sond.) Sim, For. & For., *G. brevipetala* Loes., *G. buxifolia* (L.) Szyszyl., *G. buxifolioides* Loes., *G. capitata* var. *tenuifolia* Loes., *G. condensata* Sprague, *G. crataegiflora* Davison, *G. elliptica* (Thunb.) Schonl., *G. glauca* Loes., *G. heterophylla* (Eckl. & Zeyh.) Loes., *G. lanceolata* (E. Mey. Ex Sond.) Loes., *G. linearis* (L. f.) Loes., *G. maranguensis* (Loes.) Loes., *G. rhombifolia* (Eckl. & Zeyh.) Bolus & Wolley-Dod, *G. senegalensis* var. *maranguensis* Loes., *G. trigyna* sensu Perrier, *G. uniflora* Davison, *G. woodii* Szyszyl, *Maytenus angolensis* Exell & Mendonça, *M. brevipetala* (Loes.) Wilczek, *M. cymosa* (Soland.) Exell.^{5,6}

1.3.4 Enquadramento taxonómico

A classificação taxonómica da família Celastraceae foi recentemente alterada ao nível do género, passando o género *Gymnosporia* (Wight & Arn.) Hook. f. a abranger espécies do antigo género *Maytenus* Molina, com base em caracteres macromorfológicos (tais como a presença de braquiblastos, espinhos, tipos de inflorescência e floração) e da anatomia da folha,⁷ suportados por estudos de genética molecular.^{8,9,10} Desta forma, reconhece-se atualmente o género *Gymnosporia* como um grupo monofilético.^{4,11,12}

Contudo, e conforme a atual circunscrição do género *Maytenus* Mol. emend Mol., e após a sua redefinição do género *Gymnosporia* (Wight & Arn.) Hook.f., permanece claramente um grupo heterogéneo de espécies. Este ponto de vista é apoiado por outros autores.^{4,11} Por outro lado, o

género *Gymnosporia* (após inclusão de algumas espécies do género *Maytenus*) também é um táxon heterogéneo, continuando a necessitar de uma divisão mais natural entre grupos.¹¹

De acordo com o sistema de classificação vegetal correntemente adotado pelo Grupo de Filogenia das Angiospérmicas,^{13,14,15} e nas presentes regras de nomenclatura adotadas pela Convenção de Melbourne, a posição sistemática da secção *Buxifoliae* do género *Gymnosporia* é a seguinte:

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

Superdivisão: Spermatophyta

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Equisetopsida C. Agardh

Subclasse: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superordem: Rosanae Takht.

Ordem: Celastrales Link

Família: Celastraceae R. Br.

Género: *Gymnosporia* (Wight & Arn.) Benth. & Hook. f.

Secção: *Buxifoliae* Jordaan

1.3.5 Nomes comuns

Por tradução direta do inglês, a partir da fonte original onde é reconhecida pela primeira vez, *Gymnosporia arenicola* é conhecida vernaculamente como ‘Espinheira da areia’.¹ No entanto, a espécie também é designada por outros nomes, consoante os países africanos onde ocorre naturalmente, nomeadamente na Tanzânia, Moçambique e África do Sul.

Na Tabela 1 são apresentadas as várias designações vernáculas pelas quais *M. heterophylla* (Eckl & Zeyh.) Robson é conhecido, uma vez que de *Maytenus heterophylla* var. *arenaria* N. Robson. é considerado sinónimo homotípico de *G. arenicola* Jordaan.

Tabela 1. Nomes vernáculos de *Gymnosporia arenicola*

País	Nome vernáculo	Referência
Tanzânia	Mjengamanyigu (etnia Makonde) Ndegamau (etnia Swahili)	5
Moçambique	Chichangua, mpimpalo, n'qokola, pumbulo, xhilangua (distrito de Maputo) Chichangua (distrito de Gaza) Libatzondze (distrito de Inhambane) Dimbazou (distrito de Manica) Muiua ^{Erro! Marcador não definido.} (distrito da Zambézia) Khala-mavu (distrito de Tete)	16,17
África do Sul	Ingqowangane, ingqowangane yehlanze, isibhubu, isibulu, isihlangu, umkhozo, umquqo, usala, usolo (província de Natal)	6

1.3.6 Estudos botânicos anteriores

A anatomia e micromorfologia de algumas espécies da família Celastraceae já foram caracterizadas, com o objetivo da seleção de caracteres anatómicos para a identificação das espécies.^{18,19,20,21,22} A estrutura epidérmica e a ontogenia estomática nalgumas espécies da família Celastraceae já foi estudada por outros autores.²³ A utilização de vários parâmetros microscópicos já foi descrita para a identificação de *Gymnosporia rothiana* (Walp) Lawson, com determinação do IE, razão entre parênquima em paliçada e parênquima lacunoso, número de ínsulas e número de nervuras.²⁰

1.4 Aspectos etnomédicos e estudos anteriores químicos e biológicos

Apesar de não existirem dados desta natureza direcionados concretamente para *G. arenicola* Jordaan são apresentados os dados existentes para *M. heterophylla* (Eckl & Zeyh.) Robson, uma vez que de *Maytenus heterophylla* var. *arenaria* N. Robson. é considerado sinónimo homotípico de *G. arenicola* Jordaan.

1.4.1 Utilização na medicina tradicional

Os dados etnomédicos disponíveis sobre a utilização da planta na medicina tradicional africana por vezes carecem de alguma especificidade, porém tanto a casca, como as folhas e as raízes são usadas na medicina tradicional para diversas aplicações.²⁴

1.4.1.1 Tanzânia

Na Tanzânia, as folhas de *M. heterophylla* são usadas no tratamento da dismenorreia.⁵ O decoto das raízes é usado no tratamento de doenças de natureza microbiana, sendo aplicado em abscessos, parasitoses helmínticas.^{25,26} O decoto das raízes é ainda recomendado no tratamento da epilepsia, de hérnias e sífilis.^{25,26}

1.4.1.2 Moçambique

Em Moçambique é recomendada a infusão das folhas verdes de *M. heterophylla* para o tratamento da desinteria (nomeadamente de origem amebiana). Estas folhas piladas são aplicadas em feridas e também podem ser misturadas com farinha e água e aplicadas como penso para tratamento local da dor. A infusão das folhas é usada no tratamento da tosse.¹⁶

1.4.1.3 África do Sul

Os espinhos de *M. heterophylla*, misturados com os espinhos de *Phoenix reclinata* Jacq. e com as raízes de *Euclea natalensis* A. DC. e *Capparis tomentosa* Lam., são fervidas e posteriormente atadas a um instrumento afiado, que é espetado no peito, em caso de pleurisia. Infusões da casca são administradas oralmente como eméticos ou sob a forma de enema para o tratamento da diarreia. Infusões da folha e da casca são administradas em animais para tratamento da diarreia.⁶

1.4.2 Outros usos

M. heterophylla é considerada e usada como fixadora das dunas.¹⁶ Para além desse uso, na praia da Macaneta esta espécie é usada como arbusto decorativo em jardins.¹⁷ O epicarpo verde é usado para marcar a pele em tatuagens.¹⁶ Os espinhos são empregues como adorno do cabelo, como agulhas e outros pequenos instrumentos pontiagudos.¹⁶

A madeira é muito compacta, dura e pesada, usando para fazer utensílios domésticos, como colheres e bancos e também muito apropriada para esculturas e no fabrico de instrumentos musicais.¹⁶ No Lesoto, a madeira usa-se como lenha e na construção civil.¹⁶

Em certas partes da África Austral, os frutos são usados como alimentos por pessoas e pássaros, as folhas e a casca são pastadas por alguns mamíferos selvagens e outros.¹⁶

1.4.3 Estudos biológicos

Recentemente, foi desenvolvido pelo nosso grupo de investigação o estudo *in vivo* da atividade anti-inflamatória *per os* de um extrato etanólico (70%) das folhas de *Gymnosporia arenicola*, em modelos animais. O extrato demonstrou atividade anti-inflamatória significativa ($p < 0,05$), em rato, no modelo do edema da pata, induzido pelo carragenano. Não foi observada toxicidade hepática e renal significativa, a 1200 mg/Kg. O mesmo extrato demonstrou não produzir toxicidade aguda hepática e renal significativa em ratinhos.²⁷ Estes resultados são consistentes com a utilização de *G. arenicola* na medicina tradicional africana, nomeadamente no tratamento da inflamação.²⁸

Também foi estudada *in vitro*, pelo nosso grupo de investigação, a atividade antioxidante de um extrato etanólico (70%) das folhas de *G. arenicola* e frações líquido-líquido obtidas a partir do mesmo extrato. A atividade do extrato foi determinada por bioautografia, no extrato etanólico e nas frações étereadas, acetato-etílicas, n-butanólicas e aquosas e correlacionada com a presença de constituintes fenólicos.^{29,30}

O nosso grupo de investigação também fez um rastreio *in vitro* da atividade de extratos etanólicos de plantas da flora medicinal de Moçambique, incluindo *G. arenicola*, contra estirpes sensíveis e resistentes de *Mycobacterium tuberculosis*. O estudo da atividade antimicobacteriana, por radiometria, abrangeu extratos etanólicos (70%) da raiz, caules e folhas de *G. arenicola*. Este estudo ainda incluiu a localização da atividade nas frações líquido-líquido obtidas a partir do extrato etanólico das folhas de *G. arenicola*.³⁰

1.5 Aspectos químicos

Para além dos estudos apresentados pelo nosso grupo de investigação, tanto quanto é do nosso conhecimento não há quaisquer estudos fitoquímicos reportados visando *G. arenicola*. No entanto, tendo em conta que *Maytenus heterophylla* var. *arenaria* N. Robson. é considerado

sinónimo homotípico de *G. arenicola*, e com o objetivo de uma revisão bibliográfica mais extensa, são incluídos nesta compilação os estudos publicados relativos também a *M. heterophylla* (Eckl & Zeyh.) Robson.

1.5.1 Metabolitos identificados

Maytenus heterophylla apresenta classes diversas de metabolitos secundários, isolados em diferentes partes da planta e incluindo alcalóides, terpenóides, flavonóides e glucósidos.

Os três alcalóides identificados até ao momento e representados na Figura 4 apresentam uma grande diversidade estrutural, pertencendo à classe dos alcalóides derivados da espermidina (celacinina, **1**), sesquiterpenos oligo-nicotínicos (heterofilina, **2**) e maitansinóides ou ansamacrólidos (maitansina, **3**).

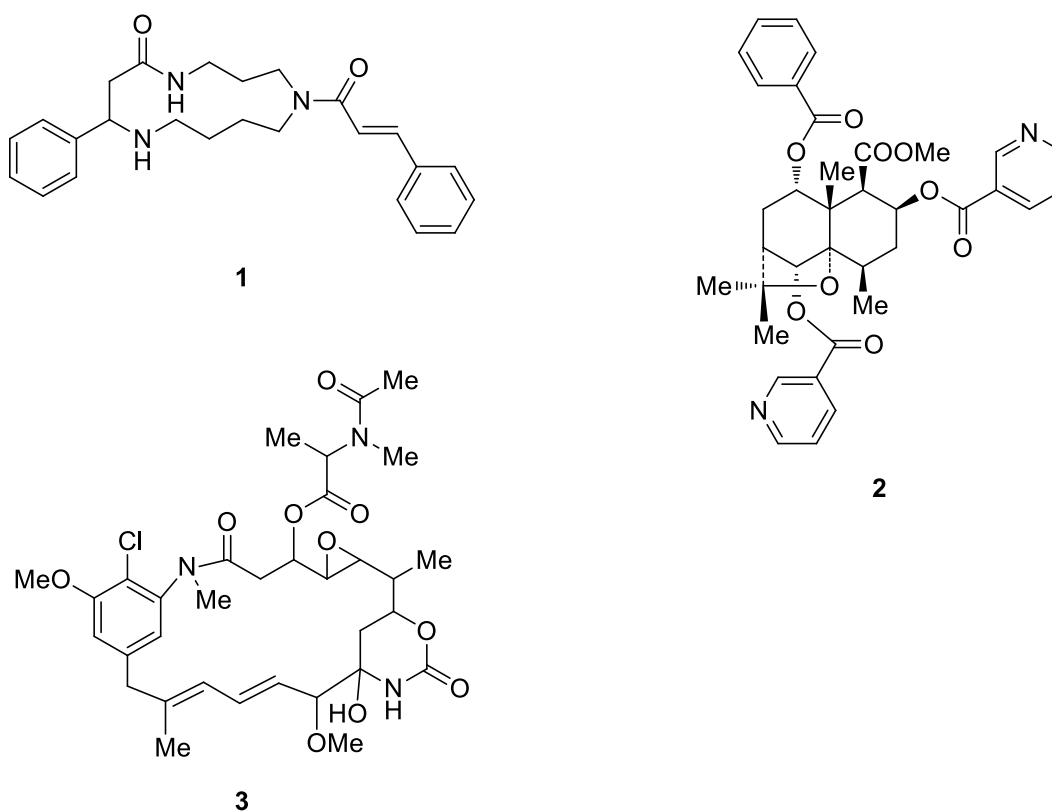


Figura 4. Estruturas dos alcalóides identificados em *Maytenus heterophylla*

O isolamento de alcalóides derivados da espermidina na espécie em estudo foi reportada, com o isolamento da celacinina (**1**).³¹ Apesar da importância taxonómica da ocorrência deste tipo de

alcalóide na família Celastraceae, não há dados concretos sobre o isolamento e identificação da celacinina no córtex de *M. heterophylla*.⁶ Posteriormente foi identificado o 1 β -acetoxi-9 α -benzoiloxi-2 β ,6 α -dinicotinoiloxi- β -di-hidroagarofurano (**2**), um éster do ácido nicotínico equivocadamente designado por heterofilina, a partir do fracionamento cromatográfico de um extrato etanólico das folhas de *M. heterophylla*, através de *CC-flash*, *CC*, e *CPTLC*.³² Nesta espécie também foi reportado o isolamento da maitansina (**3**) a partir dos caules, não havendo quaisquer dados sobre o seu isolamento e identificação.⁶

O interesse no isolamento e na síntese de alcalóides da espermidina, como a celacinina (**2**), está relacionado com a complexidade estrutural e propriedades terapêuticas atribuídas a estes macrociclos,^{33,34} derivados biossinteticamente derivados da L-Ornitina ou L-Arginina *via* putrescina.³⁵ Um largo espectro de atividade biológica foi atribuído a membros da família das poliaminas, onde se incluem propriedades citotóxicas destes compostos.^{36,37,38,39,40,41} A ocorrência e a biossíntese destes estruturas macrocíclicas têm uma distribuição restrita na Natureza,⁴² ocorrendo de forma limitada em famílias vegetais, como a família Celastraceae.^{31,43}

O isolamento derivado do di-hidro- β -agarofurano, como o alcalóide **2**, também é relevante do ponto de vista quimiotaxonômico, uma vez que a maioria destes compostos foram isolados e identificados na família Celastraceae.^{44,45,46}

Os oito triterpenóides identificados e representados na Figura 5 são do tipo pentacíclico (predominantemente de esqueleto estrutural 6/6/6/6/6, ou também 6/6/6/6/5) e pertencem maioritariamente à série do oleano (ácido 3 α -hidroxi-2-oxofriedelano-20 α -carboxílico, **4**; ácido maitenfólico, **5**; β -amirina, **6**; *epifriedelanol* ou *epifriedelinol*, **7**; e *friedelina*, **8**) e do lupano (lup-20(29)-eno-1 β ,3 β -diol, **9**; e *lupeol*, **10**). Também foram identificados um triterpenóide quinônico, a *pristimerina* (**11**), isolado a partir da casca da raiz de *M. heterophylla*.

O ácido 3 α -hidroxi-2-oxofriedelano-20 α -carboxílico (**4**), o ácido maitenfólico (**5**), a β -amirina (**6**), e o lup-20(29)-eno-1 β ,3 β -diol (**9**) foram isolados conjuntamente com o 1 β -acetoxi-9 α -benzoiloxi-2 β ,6 α -dinicotinoiloxi- β -di-hidroagarofurano (**2**) a partir do extrato etanólico (96%) das folhas de *M. heterophylla*, seguidos por fracionamento por *CC-flash*, *CC*, e *CPTLC*.³² Não há detalhes relativos ao isolamento e identificação do *epifriedelanol* ou *epifriedelinol* (**7**) e da *friedelina* (**8**) a partir da casca de *M. heterophylla*, na literatura consultada.⁶

O *lupeol* (**10**) e a *pristimerina* (**11**) foram isolados a partir do córtex da raiz de *M. heterophylla*, submetido a uma partição líquido-líquido com éter dietílico e metanol. A fase orgânica foi

posteriormente purificada por CC, inicialmente com sílica gel, sendo as frações resultantes re-purificadas por CC com sílica RP-C₁₈.⁴⁷

O isolamento da pristimerina em *M. heterophylla* é particularmente relevante do ponto de vista quimiotaxonômico, tendo em conta que os triterpenos quinônicos ocorrem estritamente na família Celastraceae, e são por este motivo considerado marcadores quimiotaxonômicos.⁴⁸ Nesta família, a generalidade dos triterpenos identificados até ao momento correspondem à serie do friedelano-oleano⁴⁹ e foi inclusivamente postulada uma relação biogenética entre derivados do oleano e triterpenóides quinônicos.^{50,51,52,53,54}

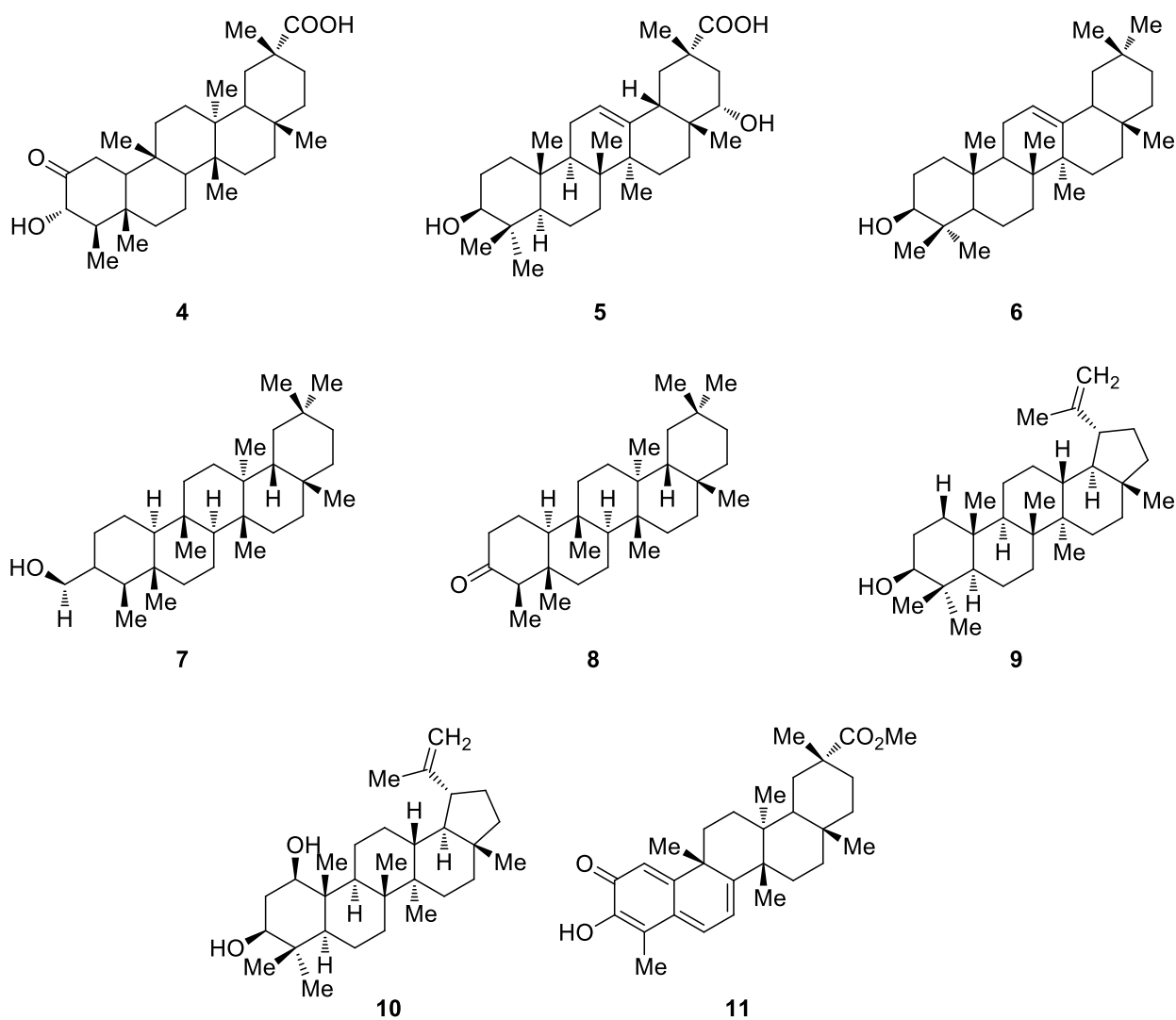


Figura 5. Estruturas dos triterpenóides identificados em *Maytenus heterophylla*

No extracto etanólico (96%) das folhas de *M. heterophylla* foram ainda identificados dois flavonóides, pertencentes à classe dos 3-flavanóis, a (-)-epicatequina (**12**) e a (-)-4'-metilepigalocatequina (**13**).³² Em trabalhos anteriores, desenvolvidos pelo nosso grupo de investigação, estabeleceu-se o perfil cromatográfico dos flavonóides do extracto etanólico e frações líquido-líquido obtidas a partir do extracto etanólico das folhas de *G. arenicola*.^{29,30} Na literatura encontram-se ainda referências à existência de taninos nesta espécie, não existindo dados relativos ao seu isolamento, purificação e elucidação estrutural.¹⁶

Os 3-flavanóis identificados, a (-)-epicatequina (**12**) e a (-)-4'-metilepigalocatequina (**13**), foram isolados nas frações finais do extracto etanólico das folhas de *M. heterophylla*, purificados por CC-flash.³²

Os dados da caracterização preliminar do extracto por TLC e LC-UV/DAD do extracto etanólico das folhas de *G. arenicola* e respetivas frações líquido-líquido são sugestivas e consistentes com a presença de mono- e diglucósidos da luteolina.^{29,30}

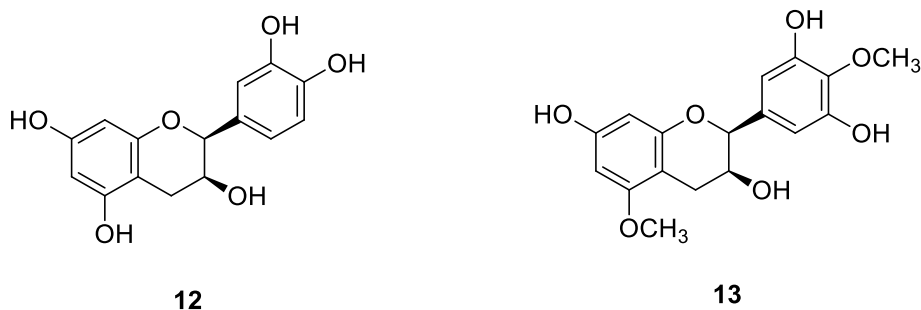


Figura 6. Estruturas dos flavonóides identificados em *Maytenus heterophylla*

Na literatura estão descritos ainda dois glucósidos (um monossacarídeo e um dissacarídeo) identificados em *M. heterophylla*, o 2-acetilfenol-1- β -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 6)- β -D-xilpiranósido (**14**) e o dulcitol (**15**). Não há dados adicionais sobre o isolamento do dulcitol, na bibliografia consultada.¹⁶

O 2-acetilfenol-1- β -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 6)- β -D-xilpiranósido (**14**) foi isolados a partir do córtex da raiz de *M. heterophylla*, submetido a uma partição líquido-líquido com éter dietílico e metanol. A fase metanólica foi posteriormente purificada por CC, com Sephadex LH-20, sendo uma das frações resultantes re-purificada por CC em RP-C₁₈.⁴⁷

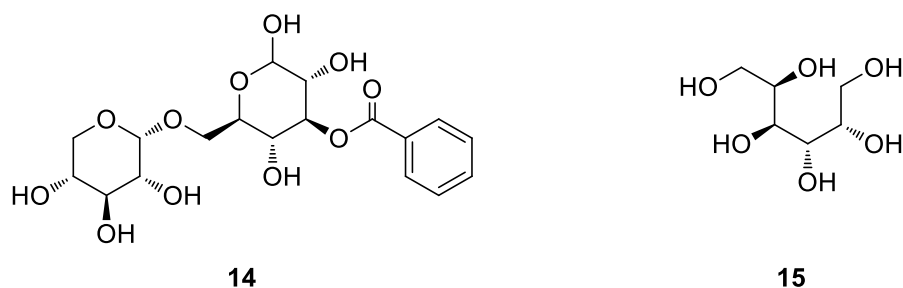


Figura 7. Estruturas dos glucósidos identificados em *Maytenus heterophylla*

1.5.2 Atividade biológica atribuída aos metabolitos

Até ao momento foram identificados por outros autores quinze compostos, dotados de um largo espectro de atividade biológica, potencialmente justificativos da utilização de *G. arenicola* (e *M. heterophylla*) num largo espectro de patologias na medicina tradicional africana.

A celacinina (**1**) isolada no córtex de *Maytenus heterophylla* e nas raízes de *Tripterygium wilfordii* Hook, foi inicialmente identificada em *Maytenus arbutifolia* (Hochst., ex Rich) R. Wilczek, sendo descrito este tipo de macrociclo como protótipo quimiotaxonómico da família Celastraceae.⁵⁵ Este composto (**1**), e outros alcalóides de *Tripterygium wilfordii*, revelaram atividade inseticida marcada.⁵⁶ O interesse em compostos baseados neste protótipo estrutural, e na respectiva síntese *via* macrolactamização dos seus precursores sintéticos, levou à caracterização estrutural de novos derivados, assim como ao desenvolvimento de novas rotas de síntese para a sua preparação.⁵⁷

O 1 β -acetoxi-9 α -benzoiloxi-2 β ,6 α -dinicotinoiloxi- β -di-hidroagarofurano (**2**), isolado pela primeira vez em *Maytenus heterophylla*, revelou-se inactivo contra *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.³²

A maitansina (**3**) isolada e identificada nos caules de *Maytenus heterophylla*, e originalmente identificada em *Maytenus serrata*, revelou atividade anti-leucémica, em rato e ratinho⁵⁸ e atividade antimicrobiana, nomeadamente contra *Penicillium avellaneum* UC-4376.⁵⁹ Este composto é um ansamacrólido da classe das ansamicinas, considerados compostos de elevado interesse para a indústria farmacêutica, devido à sua potencial atividade antibiótica. Por outro lado, a maitansina (e outras ansamicinas) são dotados de elevada citotoxicidade,^{60,61,62} já foram testadas em sistemas experimentais para explorar o seu potencial antitumoral.^{63,64,65} e também foram inclusivamente alvo de rastreio em ensaios clínicos.⁶⁶

O ácido 3 α -hidroxi-2-oxofriedelano-20 α -carboxílico (**4**) previamente isolado e identificado em *Austroplenckia populnea* Reiss (Celastraceae), revelou atividade antimicrobiana *in vitro*, com valores de MIC compreendidos entre 12,5 e 50 $\mu\text{g/mL}$ *Staphylococcus aureus* (MIC = 12,5 $\mu\text{g/mL}$), *Pseudomonas aeruginosa* (com uma MIC = 25,0 $\mu\text{g/mL}$), *Cryptococcus neoformans* (com uma MIC de 50 $\mu\text{g/mL}$) e *Candida albicans* (com uma MIC = 50 $\mu\text{g/mL}$).³²

O ácido maitenfólico (**5**) isolado pela primeira vez em *Maytenus arbutifolia* (Hochst. ex A.Rich.) R.Wilczek,⁶⁷ mostrou atividade promissora *in vivo* contra a leucemia linfocítica P-388, em ratinhos BDF₁.⁶⁸ O composto foi também isolado em *M. heterophylla* e a sua atividade antimicrobiana contra *C. albicans*, *C. neoformans*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* destacou-se entre os restantes compostos (MIC = 12,5 $\mu\text{g/mL}$).³²

A β -amirina (**6**) isolada a partir das folhas de *M. heterophylla*, já foi previamente identificada em numerosas outras espécies vegetais, entre estas *M. arbutifolia*. Estudos anteriores reportam a bioatividade da β -amirina (**6**), contra microrganismos e na resposta inflamatória, entre outros.⁶⁹

O epifriedelanol ou epifriedelinol (**7**) isolado anteriormente noutra espécie botânica da família Celastraceae, como *Dillenia papuana* Martelli e *M. undata* (Thunb.) Blakelock, revelou atividade anti-tumoral⁷⁰ e anti-senescência em células primárias humanas.⁷¹

A friedelina (**8**) isolado anteriormente numerosas espécies vegetais demonstrou um largo espectro de actividade biológica, nomeadamente antimicrobiana,^{72,73,74} antitumoral,⁷⁵ anti-inflamatória e antipirética.⁷⁶

O lup-20(29)-eno-1 β ,3 β -diol (**9**), isolado pela primeira vez em *M. heterophylla*, revelou-se inativo contra *C. albicans*, *C. neoformans*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*.³²

O lupeol (**10**), previamente identificado noutras espécies vegetais, revelou um largo espectro de atividades biológicas, como agente anti-artrítico, anti-inflamatório, anti-malárico, antitumoral quimio- e hepatoprotetor.⁷⁷

A pristimerina (**11**) isolado anteriormente em *M. senegalensis* (Lam.) Exell, revelou *in vitro* atividade anti-malárica contra estirpes resistentes de *Plasmodium falciparum* (Dd2), com uma IC₅₀ de 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. No mesmo estudo, a pristimirina (**11**), revelou atividade contra promastigotas de *Leishmania major*, com uma IC₅₀ de 6,8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e, na mesma concentração, citotoxicidade no modelo de proliferação linfocítica.⁷⁸ A pristimirina revelou atividade antiviral, contra o *Cytomegalovirus* humano, com uma IC₅₀ de 0,53 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.⁴⁷

A (-)-epicatequina (**12**) apresenta um largo espectro de atividades biológicas, entre as quais atividade antiviral, antioxidante, redutora dos níveis séricos de colesterol, e potenciadora do estado de vasorelaxamento em células de músculo liso.^{79,80} O consumo de (-)-epicatequina (**12**) parece estar associado com o aumento da resistência ao exercício físico.^{81,82,83}

A (-)-4'-metilepigalocatequina (**13**), isolada anteriormente em *M. rigida* Mart., revelou atividade espasmolítica *ex vivo* em intestino de porquinho-da-Índia.^{84,85}

O 2-acetilfenol-1- β -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 6)- β -D-xilpiranósido (**14**) foi isolado pela primeira vez em *Cynanchum hancockianum* (Maxim) Al. Iljinski, no entanto ainda não há estudos relativos à sua atividade biológica.⁸⁶

O dulcitol (**15**), um monossacarídeo amplamente distribuído na Natureza, também foi anteriormente isolado em *M. ebenifolia* Reissek. O dulcitol (**15**) revelou propriedades antitumorais interessantes, inibindo a leucemia, sem demonstrar citotoxicidade em células não-leucêmicas.⁸⁷

2.1 Reagentes

Diferentes graus de pureza para os solventes utilizados foram usados de acordo com os requisitos de cada métodos de extração ou purificação. Para o efeito, foram usados reagentes comerciais Merck, sem qualquer purificação adicional, de grau técnico para os processos extrativos e de grau analítico para os processos de purificação.

A água utilizada para os processos de extração e isolamento foi obtida a partir do sistema de purificação UHQ MKII da Elga.

2.2 Material vegetal

As folhas de *Gymnosporia arenicola* Jordaan necessárias para o estudo botânico e fitoquímico foram colhidas na região de Marracuene (Moçambique) inicialmente em Fevereiro de 2006 por Olga Maria Duarte Silva, tendo sido posteriormente recolhidas novas amostras em Março de 2011 por Elsa Teixeira Gomes. O material vegetal foi posteriormente seco em condições controladas de humidade ($75 \pm 5 \%$) e temperatura ($21 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$), ao abrigo da luz.

A identificação deste material botânico foi feita inicialmente por Maria Adélia Diniz (Herbário LISC, Jardim Botânico Tropical, Lisboa), tendo sido depositado um exemplar voucher sob o código O. Silva, s.n., 1.10.2006 no Herbário LISC. A identificação da segunda colheita foi também feita por Maria Adélia Diniz, por comparação com o exemplar voucher anteriormente depositado e preservado no Herbário LISC (código O. Silva, s.n., 1.10.2006).

Uma fração do material usado nestes estudos foi preservada em frasco de vidro âmbar esmerilado, parafinado e mantido à temperatura ambiente (ao abrigo da humidade e luz).

2.2 Métodos de análise botânica

2.2.1 Análise macroscópica

O material vegetal seco (inteiro) foi observado a olho nú e com uma lupa Olympus SZ61, acoplada com uma fonte de luz Olympus KL1500LCD e um sistema de registo fotográfico

Olympus ColorView IIIu (Tóquio, Japão). O processamento fotográfico foi realizado com recurso ao programa Cell^D 2006 Olympus Software (Tóquio, Japão).

A análise macroscópica visou a observação do aspeto geral do material vegetal quanto às suas características de cor, brilho, cheiro, sensibilidade ao tato, textura e venação.

Para esta análise foram necessárias cerca de 30 folhas adultas.

2.2.2 Análise microscópica em microscópio ótico

Preparações extemporânea do material vegetal pulverizado, ou em corte histológico transversal ou paradérmico, foram observadas num microscópio ótico Olympus CX40 e um sistema de registo fotográfico Olympus ColorView IIIu (Tóquio, Japão). O processamento fotográfico foi realizado com recurso ao programa Cell^D 2006 Olympus Software (Tóquio, Japão). O material a observar foi colocado entre lâmina e lamela, sob o meio de montagem.

A análise microscópica foi feita com cerca de 10 réplicas.

2.2.3 Análise microscópica em microscópio eletrónico de varrimento

O material vegetal foi desidratado e montado num suporte metálico e posteriormente metalizado com ouro num metalizador JEOL JS-1200 Fine Coater. A observação foi feita num microscópio JEOL JSM-5200LV, com sistema de aquisição direta de imagem, da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

A microscopia eletrónica de varrimento é correntemente usada para fins análogos ao da microscopia ótica, na identificação de microcaracteres com valor diagnóstico para fármacos vegetais. O uso da microscopia eletrónica para permite a obtenção de imagens com maior resolução, e tridimensionais. Esta técnica é frequentemente utilizada na análise topológica de uma grande variedade de materiais e desempenham um papel importante na autenticação de matérias-primas, intermediários e produtos acabados de origem vegetal.⁸⁸

A análise microscópica foi feita com cerca de 10 réplicas.

2.2.4 Obtenção de cortes histológicos transversais

A análise microscópica de fármacos vegetais, tal como é preconizada nas Farmacopeias atuais, pressupõe a necessidade da redução do fármaco a pó.^{89,90,91} No entanto, tendo em conta que o processo de pulverização resulta na destruição da maioria dos tecidos e com vista à obtenção de

elementos de diagnose botânica, a análise microscópica do fármaco pulverizado costuma ser precedida pela elaboração de cortes histológicos.⁹²

Estes cortes são efetuados normalmente segundo dois planos de orientação, o corte transversal e o corte paradérmico (raramente são feitos no plano longitudinal). Este procedimento, não previsto nas Farmacopeias, é justificado porque a análise de cortes histológicos permite prever e justificar a presença de determinados elementos celulares e eventualmente detetar contaminações, resultantes da presença de tecidos que não deveriam figurar no pó de determinado fármaco. Desta forma não é de estranhar que se encontrem no campo de observação do microscópio algumas células praticamente isoladas e/ou fragmentadas (como acontece com elementos do xilema e fibras), resultantes da rebentação dos tecidos.⁸⁹

Esta metodologia facilita também a identificação e quantificação de parâmetros fundamentais para a análise microscópica de fármacos, *e.g.* Índice Estomático (*IE*), proporção entre parênquima em paliçada e lacunoso.⁸⁸

Para a análise anatómica das folhas fizeram-se cortes histológicos do material hidratado e amolecido, em água destilada ou numa solução glicerinada. Os cortes transversais foram executados à mão livre, ao nível do terço médio inferior da folha.

A preconização de cortes histológicos transversais permite analisar a organização do mesófilo e facilita a observação detalhada dos feixes vasculares.⁹³

Montaram-se os cortes transversais, numa solução aquosa de hidrato de cloral (60 %), com o objetivo da observação privilegiada de inclusões celulares (cristais de oxalato de cálcio), inclusões celulares (idioblastos), assim como de tricomas e a visualização do tecido.⁹²

Os cortes transversais, também foram usados para a preconização das técnicas histoquímicas.

2.2.5 Obtenção de cortes histológicos paradérmicos

Com o intuito de verificar o padrão de distribuição de estomas nas faces abaxial e adaxial do material vegetal, assim como o tipo de estoma predominante e facilitar o cálculo do índice estomático (*IE*) procedeu-se à realização de cortes histológicos tangenciais.

O índice estomático (*IE*) foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$IE = \frac{100 \times \text{número de estomas}}{\text{número de células epidérmicas} + \text{número de estomas}}$$

Para cada amostra foram feitas 10 medições numa área da folha correspondente a 1 mm², de acordo com as recomendações da farmacopeia.⁹⁴

Os cortes paradérmicos foram efetuados em planos paralelos (ou tangenciais) à lâmina foliar, de forma a facilitar a visualização das células epidérmicas e anexos epidérmicos (tricomos e estomas).

2.2.6 Obtenção do material vegetal pulverizado

Com o objetivo de analisar também o fármaco pulverizado, o material vegetal foi moído num moinho Christy & Norris.

O material pulverizado foi montado entre lâmina e lamela, com uma solução aquosa de hidrato de cloral.

2.2.7 Procedimentos histoquímicos

A preconização de reações histoquímicas é uma técnica corrente para detetar a presença de determinadas classes químicas no material vegetal, baseada no uso de reagentes cromáticos para deteção de conteúdos celulares. A identificação de determinadas estruturas microscópicas (*e.g.* amiloplastos) possibilita e facilita a identificação de matérias-primas de origem vegetal com interesse farmacêutico, e por esse motivo as reações histoquímicas são incluídas como elementos de diagnose em algumas farmacopeias.⁹⁵

Assim, realizaram-se testes histoquímicos com base nas classes de metabolitos secundários já descritas para esta espécie, direcionados concretamente para a presença de alcalóides, triterpenóides e compostos fenólicos. Para além da pesquisa de conteúdos ergásticos, foi ainda realizada a pesquisa de amido e lípidos nos cortes histológicos.

Para a deteção de alcalóides utilizou-se o reagente de Dittmar⁹⁶, para os triterpenóides com grupo carbonilo usou-se o reagente de Brady⁹⁷ e para os compostos *o*-dihidroxifenólicos usou-se o cloreto férrico⁹⁸. Para deteção dos lípidos totais usou-se o Vermelho Sudão III⁹⁹ e para o amido o soluto de Lugol.¹⁰⁰

Todas as reações histoquímicas propostas foram realizados em cortes transversais, procedendo à imersão do material vegetal em reagentes específicos, registando-se as alterações respetivas, por

comparação com o material não sujeito à reação (para evitar inferências devidas à eventual pigmentação natural de compostos), de acordo com as recomendações.¹⁰¹

2.2.7.1 Detecção microquímica de alcalóides

A detecção de alcalóides foi efetuada a partir do reagente de Dittmar e baseia-se na capacidade desta classe de compostos alcalóides formarem precipitados corados (em meio ácido) na presença de iodo, na forma de poli-iodetos complexos.

Os cortes transversais são montados, entre lâmina e lamela, no próprio reagente de Dittmar durante 5 – 10 minutos, sendo posteriormente lavados rapidamente com água. Os alcalóides coram de castanho-avermelhado.

2.2.7.2 Detecção microquímica de triterpenóides

A presença de triterpenóides contendo grupo carbonilo foi evidenciada com o reagente de Brady (dinitrofenil-hidrazina, DNPH). Esta hidrazina reage especificamente com compostos portadores de um grupo carbonílico, como cetonas e aldeídos. A reação cromática deve-se à formação de dinitrofenil-hidrazonas, resultantes da condensação ou adição-eliminação (adição nucleofílica do grupo amina ao grupo carbonílico, seguida da remoção de uma molécula de água).¹⁰²

Os cortes transversais são montados numa solução saturada de DNPH em ácido clorídrico (2 N, 25 °C), entre lâmina e lamela, e observam-se decorridos 10 minutos, após lavagem rápida com água.⁹⁸ Os triterpenóides coram de vermelho-alaranjado.

2.2.7.3 Detecção microquímica de compostos fenólicos

A detecção de compostos *o*-dihidroxifenólicos é realizada através da reação com o cloreto de ferro (III). Na presença de sistemas *o*-dihidroxi, o ferro (III) forma quelatos, por coordenação aos dois grupos hidroxilo fenólicos, em posições *orto*.

Os cortes transversais são montados numa solução aquosa de tricloreto de ferro a 10% (m/V), entre lâmina e lamela, e observam-se decorridos 10 minutos, após lavagem rápida com água.⁹⁸

Os fenóis coram de negro.

2.2.7.4 Detecção microquímica de amido

A identificação de amido é efetuada através da reação com o soluto de Lugol, composto por uma solução de iodo com iodeto de potássio (I₂KI). A amilose, cadeia disposta em hélice com 6 anéis glicopirranósicos de conformação em cadeira, forma um complexo amido-iodo azul-escuro na presença de iões iodeto, num processo que parece envolver as formas I₃⁻ e ou I₅⁻.¹⁰³ As moléculas do halogénio dispõem-se ao longo do eixo da hélice sob a forma de um complexo iodo-amilose devido a interações dipolares electroestáticas.

Desta forma os cortes transversais foram montados em soluto de Lugol durante 5 a 10 minutos e posteriormente lavados em água. O amido é evidenciado pela coloração azul-escuro.⁹⁸

2.2.7.5 Detecção microquímica de lípidos totais

Para reconhecer os lípidos nos cortes histológicos, empregam-se habitualmente reagentes corantes lipofílicos (*e.g.* Vermelho Sudão III) que coram os lípidos com a sua própria cor. Contudo, esta deteção carece de alguma especificidade e cora de igual modo óleos, ceras, essências, substâncias resinosas, látices, e decorridos alguns minutos também a cutina e a suberina.

Os cortes transversais são montados no próprio reagente (solução etanólica de Sudão III, temperatura ambiente) entre lâmina e lamela, e observam-se após lavagem hidroetanólica decorrido 15-30 minutos. Em simultâneo observaram-se, de igual modo, cortes histológicos não sujeitos ao teste histoquímico.⁹⁸

2.3 Métodos extrativos

2.3.1 Extração com etanol a 70%

Após pulverização num moinho Christy & Norris, 90,0 g do material vegetal seco foram extraídas até à exaustão e à temperatura ambiente (22 °C) em etanol 70%. As extrações foram feitas na proporção mínima de 10 mL de solvente/g de material vegetal seco. O extrato etanólico obtido, após filtração em filtro de placa porosa G4, foi concentrado num evaporador rotativo (Büchi R-210, Suíça), até completa remoção de etanol e utilizando uma temperatura inferior a 40 °C. O resíduo aquoso, foi seco por liofilização, usando-se para o efeito um liofilizador Heto Lyolab 3000 (Heto-Holten A/S, Dinamarca). O extrato liofilizado amorfo assim obtido foram

preservados a -20 °C, até serem posteriormente utilizados no rastreamento da atividade antimicrobiana contra *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

2.3.2 Extração alcaloídica

Uma solução aquosa de ácido *orto*-fosfórico (0,1 M; 0,1180 mol) foi adicionada às folhas secas e pulverizadas de *G. arenicola* (114,2 g), com extração assistida por ultrassons durante 5 minutos. A solução acídica resultante foi filtrada e precipitada/neutralizada com a quantidade equimolar de carbonato de sódio (0,1 M; 0,118 mol). A solução filtrada foi fracionada por extração com éter dietílico isento de peróxidos (3 x 100 mL). As fases orgânicas resultantes foram secas em sulfato de sódio anidro e evaporadas à secura num evaporador rotativo (Büchi R-210, Suíça) à temperatura ambiente, com obtenção do extrato alcaloídico total (5,6585 g).

2.4 Métodos cromatográficos preparativos

2.4.1 LPLC

A purificação em LPLC foi efetuada numa coluna Lobar, tamanho B, pré-cheia com LiChroprep RP₁₈, 40-63 µm de *mesh* (Merck). A eluição foi assistida por uma bomba FMI modelo RP-G150 e um coletor automático de frações, regulado para uma velocidade de fluxo de 2 mL.min⁻¹.

O extrato alcaloídico total foi dissolvido em metanol (60 %) e subsequentemente fracionado por LPLC, usando um sistema metanol-água (60:40, V/V), com obtenção de 3 frações. Cada fração foi evaporada à secura num evaporador rotativo (Büchi R-210, Suíça) a uma temperatura inferior a 40 °C.

A purificação em LPLC foi controlada por TLC, em folhas de alumínio revestidas de Silica gel 60 F₂₅₄ ou Silica HPTLC RP₁₈ F_{254S} (Merck), usando como revelador de aspensão o reagente de Dragendorff ou iodoplatinato.

2.4.2 CC

Esta técnica foi utilizada no processo de purificação final de uma das 3 frações isoladas por LPLC. A purificação final em CC foi efetuada numa coluna (300 x 15 mm), utilizando como fase

estaciona um gel de Sephadex LH-20 (Sigma Chemical Co.) intumescido na fase móvel utilizada, um sistema metanol-água (60:40, V/V).

A fração 3 (50,8 mg) foi redissolvida em metanol (60 %) e posteriormente purificada por permeação numa coluna de Sephadex LH-20, usando um sistema metanol-água (60:40, V/V), para obtenção de uma fração única. Esta fração foi evaporada à secura num evaporador rotativo (Büchi R-210, Suíça) a temperatura inferior a 40 °C, com o isolamento de (2*S*)-9-benzoil-2-fenil-1-metil-1,5,9-triazaciclotridecan-4-ona **16**.

A purificação em CC foi controlada por TLC, em folhas de alumínio revestidas de Silica gel 60 F₂₅₄ ou Silica HPTLC RP₁₈ F_{254S} (Merck), usando como revelador de aspensão o reagente de Dragendorff ou iodoplatinato.

2.5 Métodos biológicos

2.5.1 Avaliação da atividade antimicrobiana

O rastreio da atividade antimicrobiana foi realizado na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, com colaboração do Dr. Juan Cirera, sob orientação científica da Professora Doutora Aida Duarte.

Para a determinação qualitativa e quantitativa da atividade antimicrobiana prepararam-se soluções dos extratos etanólicos liofilizados das folhas de *G. arenicola*, por dissolução em dimetilsulfóxido (10%) à concentração final de 10 mg.mL⁻¹.

2.5.1.1 Microrganismos testados

Os microrganismos utilizados para este rastreio foram obtidas pela Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa a partir da *American Type Culture Collection* (ATCC; Manassas, VA, USA) e encontram-se referenciados na Tabela 2.

Tabela 2. Estirpes utilizadas no rastreamento da atividade antimicrobiana

Tipo	Microrganismo	Referência
Coco Gram positivo	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 435628
	<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 10240
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
Bacilo Gram negativo	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27953
Levedura	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231

2.5.1.2 Determinação qualitativa

A avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana do extrato etanólico foi realizada através do método de difusão em meio sólido.

As bactérias foram cultivadas em placas de Petri contendo meio de agar Mueller-Hinton (Difco.) e *C. albicans* foi cultivada sobre meio de agar casitone (Pasteur). Os halos de inibição foram observados à volta de orifícios de 6 mm de diâmetro, contendo 30 µL de solução (equivalente a 300 µg de extrato etanólico). As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h.

Todos os ensaios foram repetidos em triplicado e contra testemunhos de solvente (dimetilsulfóxido 10%).

2.5.1.3 Determinação quantitativa

A determinação quantitativa da atividade antimicrobiana do extrato etanólico foi utilizada pelo método da diluição em meio líquido.

A amostra foi adicionada ao meio líquido Mueller-Hinton, inoculado com a suspensão bacteriana correspondente, ou ao meio Yeast Malt Agar, no caso de *C. albicans*.

O intervalo de concentrações testado foi de 5000 µg.mL⁻¹ a 48 µg.mL⁻¹.

Todos os ensaios foram repetidos em triplicado e contra testemunhos de solvente (dimetilsulfóxido 10%).

2.5.2 Avaliação da atividade antitumoral

O rastreio da atividade antitumoral do composto isolado **16** foi realizado em colaboração com o Centro de Investigação em Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior (CICS-UBI), concretamente com a Doutora Ana Martinho e com a Professora Doutora Ana Paula Duarte.

Para a determinação quantitativa da atividade antitumoral deste composto, prepararam-se soluções do composto isolado **16**, obtidas por dissolução em dimetilsulfóxido (10%) com vista à obtenção das concentrações finais de 0, 1, 10, 50, 100 e 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

2.5.2.1 Culturas celulares

As linhas celulares MCF-10A, MCF-7, PNT1A e PC3 foram obtidas pelo Centro de Investigação em Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior (CICS-UBI), a partir da *American Type Culture Collection* (ATCC; Manassas, VA, USA) e foram incubadas em frascos de cultura de 75 ou 150 cm^2 em meio apropriado, suplementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS), 100 U/mL de penicilina e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina, numa incubadora humidificada com 95 % de ar / 5 % de CO_2 a 37 °C. As células MCF-10A foram incubadas em meio de William (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) com 10 ng/mL de fator de crescimento epidérmico (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de insulina (Sigma-Aldrich, Inc.); as células MCF-7 foram incubadas em meio de Dulbecco modificado por Eagle medium (DMEM; Sigma-Aldrich, Inc.); e as restantes células PNT1A e PC3 foram incubadas em RPMI 1640 com 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich, Inc.). Após o crescimento celular atingir aproximadamente 90 - 95 % de confluência, nos frasco de cultura, as células foram sujeitas a triptinização e inoculadas em quadruplicado em placas de 96 poços (10 000 células por poço; Nunc, Apogent, Denmark) e deixadas a aderir por 24 - 48 h. Após ser atingida uma confluência de 80 - 90 %, o meio em cada poço foi substituído por um meio correspondente desprovido de soro e após 12 h, as células foram incubadas com 0, 1, 10, 50, 100 ou 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de composto isolado **16** durante 12, 24, 48 ou 60 h.

2.5.2.2 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio do brometo de 3-(2,5-difenil-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-tetrazólio (MTT; Sigma-Aldrich, Inc.).¹⁰⁴ Resumidamente, as réplicas dos ensaios foram incubados com uma solução de MTT, a 0.5 mg/mL , num meio desprovido de soro, por 120 - 180

minutos a 37 °C. MTT foi transformado num precipitado insolúvel em água, posteriormente solubilizado pela adição de 40 mM de HCl em isopropanol. Após 5 minutos de incubação ao abrigo da luz, com agitação suave, a solução foi transferida para uma nova placa e a absorvância foi medida a 570 nm usando um leitor de microplacas (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Para cada ensaio foram feitas 3 réplicas ($n = 3$).

2.6 Métodos físico-químicos

Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT-135, HMBC, HMQC, NOESY e COSY foram obtidos num aparelho Bruker Avance 400, operando a 400 MHz) usando o tetrametilsilano (TMS), como padrão interno. Os desvios químicos (δ , ppm) indicados foram obtidos à temperatura ambiente e em solução de CDCl_3 . Nas caracterizações efetuadas por RMN de ^1H , indica-se a multiplicidade dos sinais e as respetivas constantes de acoplamento (J , Hz).

Os espectros de massa foram adquiridos num espectrómetro de massa MALDI-TOF, no modelo Voyager-DETM PRO Workstation (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), operando com um refletor positivo, sem matriz, com calibração externa e operando na gama m/z de 10-500 Da. As rotações óticas foram medidas num polarímetro automático Perkin Elmer 241 ($l = 0.1$ dm), a 21 °C, usando o CHCl_3 como solvente e sendo o $[\alpha]_D$ medido em 10^{-1} deg.cm².g⁻¹.

3.1 Estudo botânico

A análise macroscópica da folha de *G. arenicola* (Figura 8) revelou uma margem simples e inteira, apresentando uma coloração verde-pálida, com uma lâmina oblonga ou ovada a obovada. Verificou-se que o ápice da folha era redondo a emarginado, com base cuneada. Observou-se uma margem coriácea, revoluta, inteira a irregularmente serrilhada, com um pecíolo curto. Constatou-se que a superfície da folha era aparentemente glauca, glabra, coriácea a subcoriácea. Na superfície abaxial da folha a venação e a nervura central revelaram-se mais proeminentes.

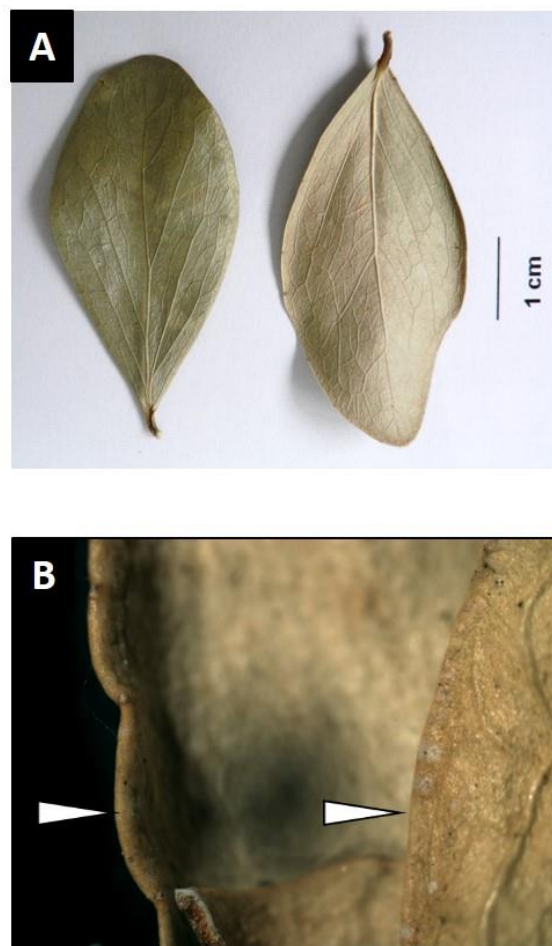


Figura 8. Folhas de *Gymnosporia arenicola*, observadas a olho nú e à lupa, evidenciando uma folha peciolada, simples e inteira, com limbo oblongo ou ovado a obovado e com margem inteira a irregularmente serrilhada. (A) Observação a olho nú, com vista da superfície adaxial e abaxial da folha, à esquerda e à direita, respectivamente. (B) Observação à lupa de detalhes da margem foliar (seta). Escala gráfica: A = 1 cm. Ampliação: B = 4x.

A análise dos cortes transversais da folha de *G. arenicola* (Figura 9), em microscopia ótica, mostrou a existência de uma organização assimétrica do mesófilo, constituído por 3 – 5 camadas de parênquima em paliçada (Figura 9A) e várias camadas de parênquima esponjoso, com uma razão entre parênquima esponjoso e parênquima em paliçada de 0,60. As epidermes superior (Figura 9B) e inferior (Figura 9C-E) revelaram ser unisseriadas e revestidas por uma camada espessa de cutícula lisa. Foram observados idioblastos cristalíferos contendo drusas de oxalato de cálcio, numa camada de células hipodérmicas claramente diferenciada e observada imediatamente abaixo da epiderme superior (Figura 9B). A análise das células do parênquima em paliçada revelaram uma forma e disposição colunares, com o seu eixo maior perpendicularmente orientado para a epiderme superior, com paredes lisas, distintamente espessadas e pontuadas (Figura 9B). As células da epiderme inferior apresentam grandes semelhanças com as da epiderme superior, apresentando menores dimensões, e com estrias na cutícula por vezes menos marcadas (Figura 9C). Foram igualmente observadas células do parênquima esponjoso de forma irregular (Figura 9D), paredes das células epidérmicas contendo papilas de pequenas dimensões (Figura 9E). Tricomas tetores multicelulares unisseriados são observados ocasionalmente (Figura 9F).

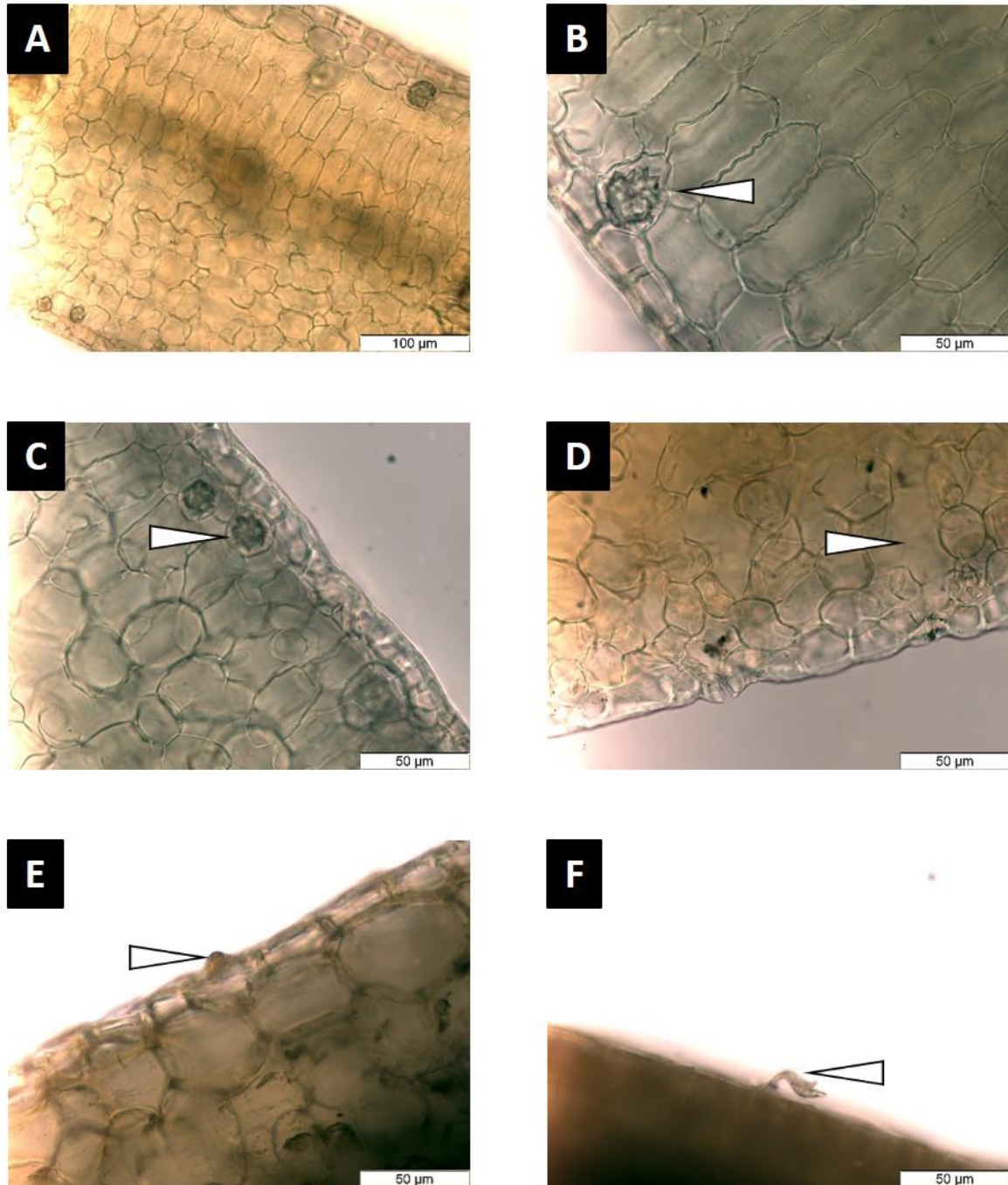


Figura 9. Principais características dos cortes transversais da folha de *G. arenicola*. (A) Pormenor da lâmina foliar, evidenciando a organização assimétrica do mesófilo, constituído por 3 camadas de parênquima em paliçada, e a constituição do clorênquima (formado por 60 % de parênquima esponjoso). (B) Pormenor da cutícula espessa visível na epiderme superior, idioblastos cristalíferos contendo drusas de oxalato de cálcio na hipoderme (seta) e ocorrência de paredes espessas e perfuradas no parênquima em paliçada. (C) Pormenor dos idioblastos cristalíferos contendo drusas de oxalato de cálcio visíveis no parênquima lacunoso (seta) e da cutícula espessa, características da epiderme inferior. (D) Pormenor do parênquima lacunoso com células irregulares a ocorrer na epiderme inferior e alguns estomas, e respetiva camara sub-estomática (seta). (E) Pormenor das células papiladas observadas na epiderme inferior (seta). (F) Pormenor de tricoma tetor multicelular unisseriado, visível na epiderme inferior (seta). Escala gráfica: A = 100 µm; B-F = 50 µm.

Os cortes histológicos efectuados ao nível da nervura central da folha (Figura 10) revelaram a presença de um feixe vascular anficrival, fechado e colateral com o xilema, rodeado por uma bainha descontínua de esclerênquima. O floema revelou estar disposto em posição externa em relação ao xilema, estando voltado para a epiderme inferior (superfície abaxial) e o xilema voltado para a epiderme superior (superfície adaxial). Observou-se ainda um colênquima desenvolvido e angular, na proximidade de ambas as epidermes e presença de drusas de oxalato de cálcio no floema.

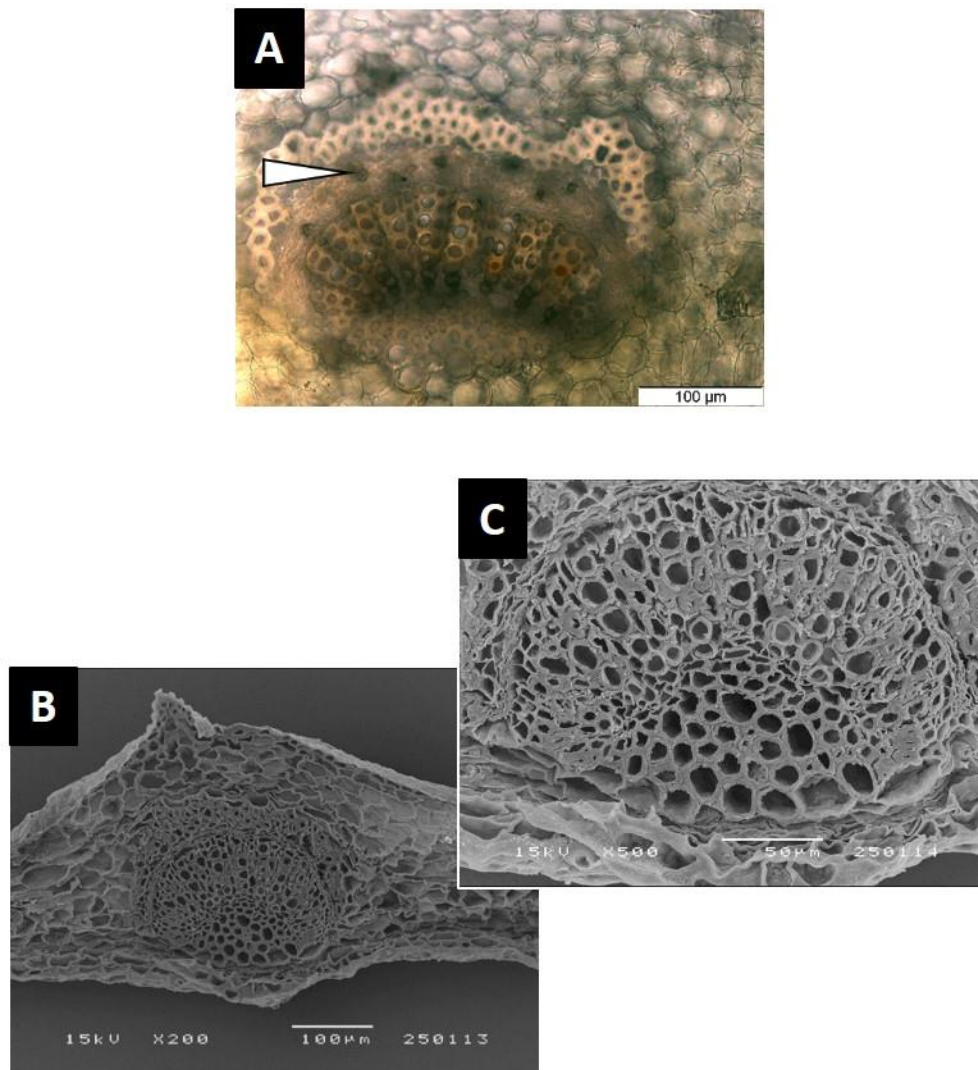


Figura 10. Principais características dos cortes transversais da folha de *G. arenicola* observados em microscopia ótica (A) e em microscopia eletrónica de varrimento (B), revelando detalhes ao nível da estrutura da nervura central (C). Pormenor das drusas de oxalato de cálcio, próximas do floema, facilmente observáveis em microscopia ótica (seta). Escala gráfica: A e B = 100 μ m; C = 50 μ m.

Os idioblastos cristalíferos, contendo drusas de oxalato de cálcio, foram observados na hipoderme (Figura 9A e B), colênquima e próximo do floema (Figura 9C e 10A).

A análise da superfície da folha (Figura 11), observada em microscopia ótica e eletrônica de varrimento, revelou a presença uma cutícula ligeiramente sinuosa em ambas as epidermes (Figura 11A, C e F), uma epiderme superior composta por células poligonais a retangulares de parede lisa, distintamente pontuada, sendo visível nalgumas células corpos brilhantes peculiares (Figura 11B), uma distribuição aleatória de estomas (Figura 11C), e uma epiderme inferior com células morfológicamente semelhantes às da epiderme superior, mas de menor tamanho e com estrias menos evidentes (Figura 11D). Foi observado um anel de 4 – 6 células subsidiárias em redor de estomas anomocíticos (Figura 11D), ocorrendo estes com maior frequência que os estomas paracíticos (Figura 11E).

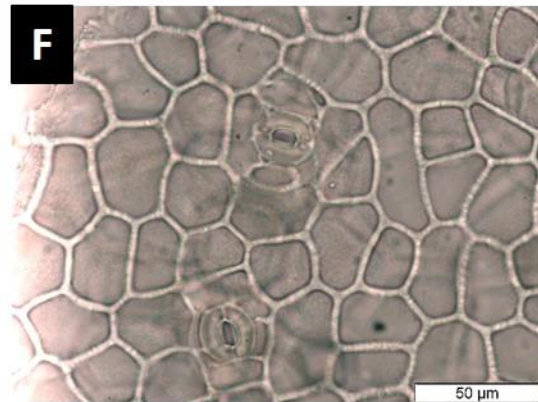
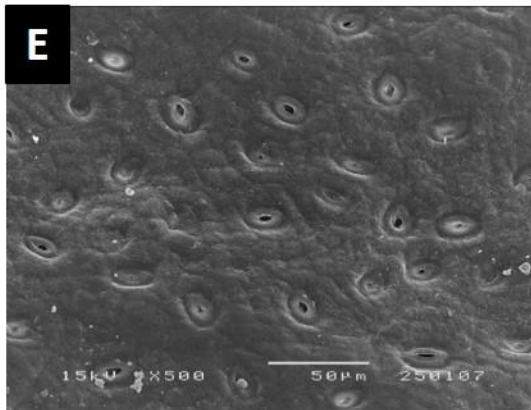
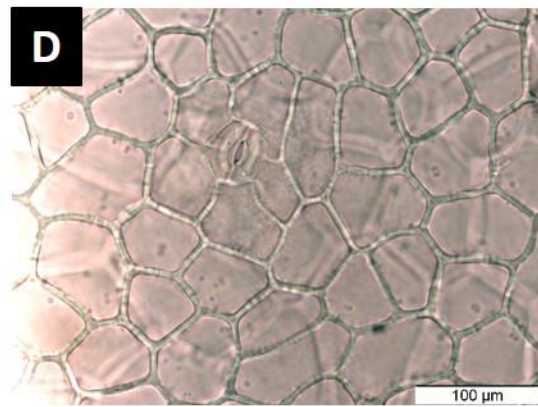
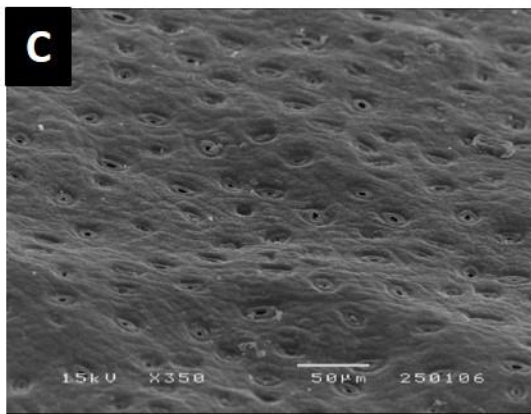
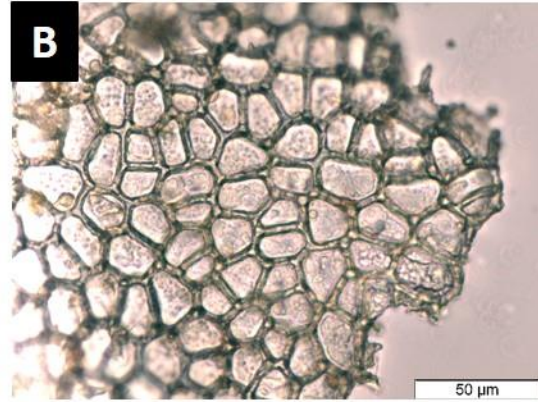
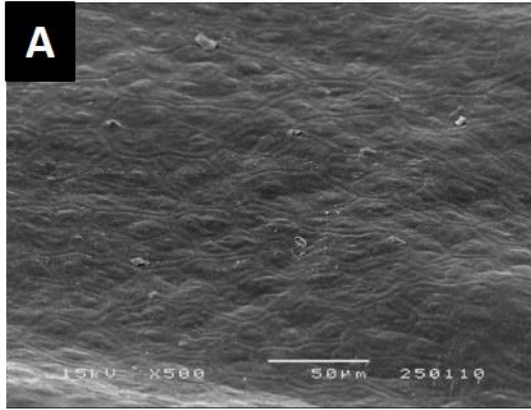


Figura 11 Vista superior da folha de *G. arenicola*, em microscopia eletrônica de varrimento (A,C,E) e microscopia ótica (B, D, F). (A) Pormenor da epiderme superior, revelando a morfologia das células epidérmicas e cutícula. (B) Células epidérmicas de parede lisa, distintamente sulcadas, e corpos brilhantes em algumas células. (C) Epiderme inferior, mostrando distribuição aleatória de estomas. (D) Epiderme inferior, com um estoma anomocítico. (E) Epiderme inferior, revelando uma cutícula ligeiramente sinuosa. (F) Epiderme inferior contendo um estoma paracítico e um anomocítico. Escala gráfica: A-C e E-F = 50 µm; D = 100 µm.

Na Tabela 3 são apresentados os parâmetros macro- e microscópicos da análise das folhas de *G. arenicola* quantificados no presente estudo e considerados relevantes para a respectiva diagnose botânica.

Tabela 3. Parâmetros quantitativos macro- e microscópicos da folha de *G. arenicola*

Estrutura	Dimensão	Média	Desvio padrão
Lâmina	Comprimento	5,8 cm	1,0
	Largura	2,6 cm	0,2
Cutícula	Espessura	5,30 µm	0,67
Idioblastos cristalíferos	Diâmetro	23,04 µm	5,84
Epiderme superior	Comprimento	16,24 µm	0,77
	Altura	30,13 µm	2,58
Hipoderme	Comprimento	33,54 µm	4,53
	Altura	26,63 µm	2,65
Epiderme inferior	Comprimento	15,25 µm	1,11
	Altura	32,25 µm	4,83
Parênquima em paliçada	Comprimento	50,30 µm	4,96
	Altura	19,88 µm	0,76
Parênquima lacunoso	Comprimento	33,14 µm	1,91
	Altura	34,83 µm	2,30
Células papiladas	Altura	4,00 µm	0,40
Tricomas tetores	Comprimento	27,00 µm	4,10

A observação do pó resultante da pulverização das folhas secas de *G. arenicola* revelou uma coloração esverdeada e a análise microscópica do material vegetal pulverizado confirmou a presença das estruturas supramencionadas, sendo os elementos mais frequentemente observados os idioblastos cristalíferos contendo drusas de oxalato de cálcio nas células hipodérmicas (Figura 12A), no parênquima esponjoso (Figura 12B) e sobre as nervuras e áreas insulares (Figura 12C). A ocorrência de outros elementos característicos, tais como estomas anomocíticos e paracíticos, e fragmentos de epiderme contendo corpos brilhantes nas células da região estomática (Figura 9D), fragmentos da epiderme inferior contendo pequenas papilas (Figura 12E) e fragmentos de tecido vasculares contendo fibras de esclerênquima (Figura 12F).

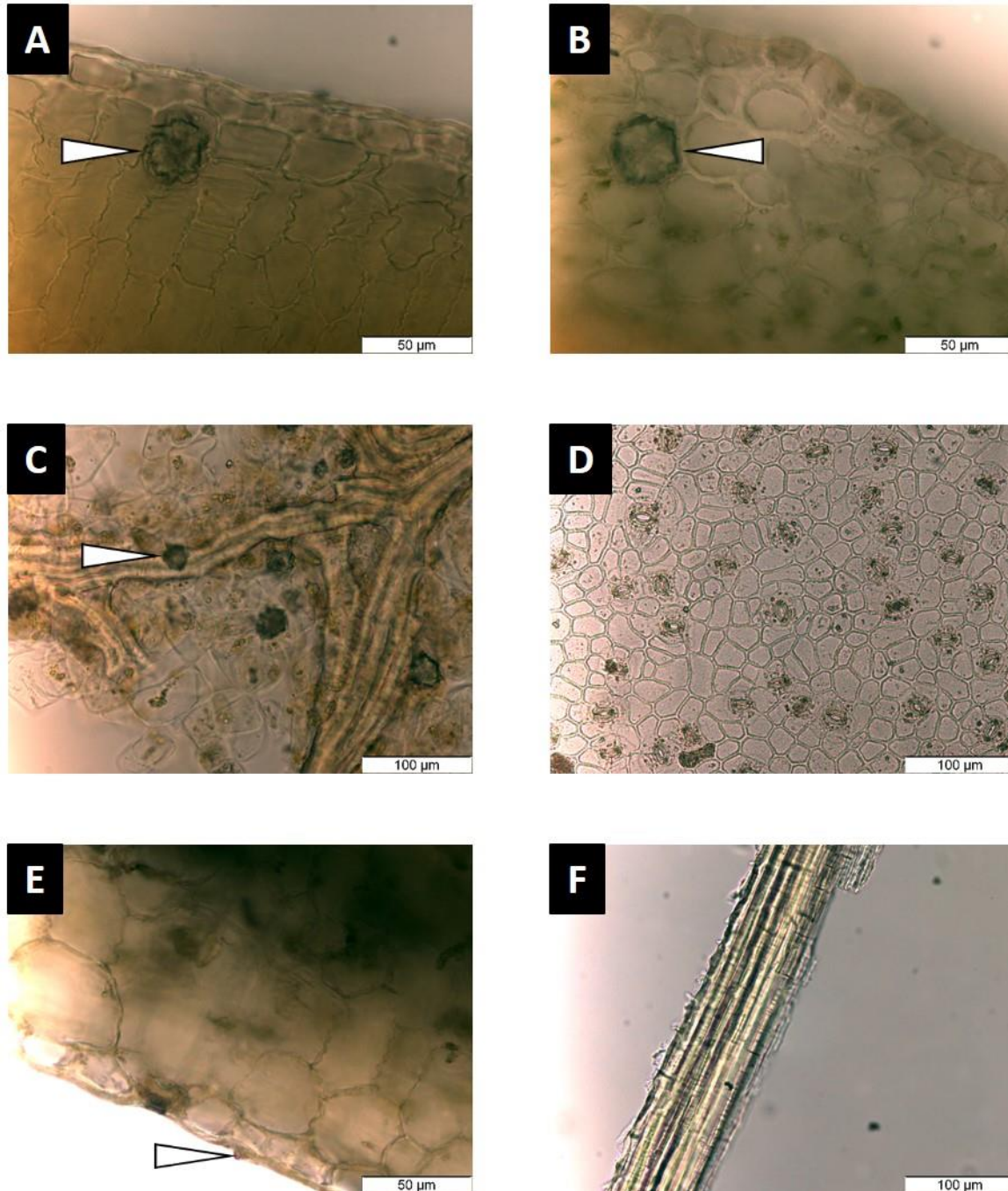


Figura 12. Principais características microscópicas do pó das folhas de *G. arenicola*. Drusas de oxalato de cálcio inseridas em idioblastos cristalíferos na hipoderme (A) e no parênquima lacunoso (B), sobre as fibras vasculares e nas zonas insulares (C). (D) Estomas anomocíticos e paracíticos num fragmento da epiderme, e corpos brilhantes. (E) Célula papilada localizada ao lado de um estoma. (F) Fragmento de fibras de esclerênquima. Escala gráfica: A, B e F = 50 µm; C, D e E = 100 µm.

Na Figura 13 são ilustrados os elementos microscópicos característicos de *G. arenicola*, vistos em cortes paradérmicos, transversais e no material vegetal pulverizado.

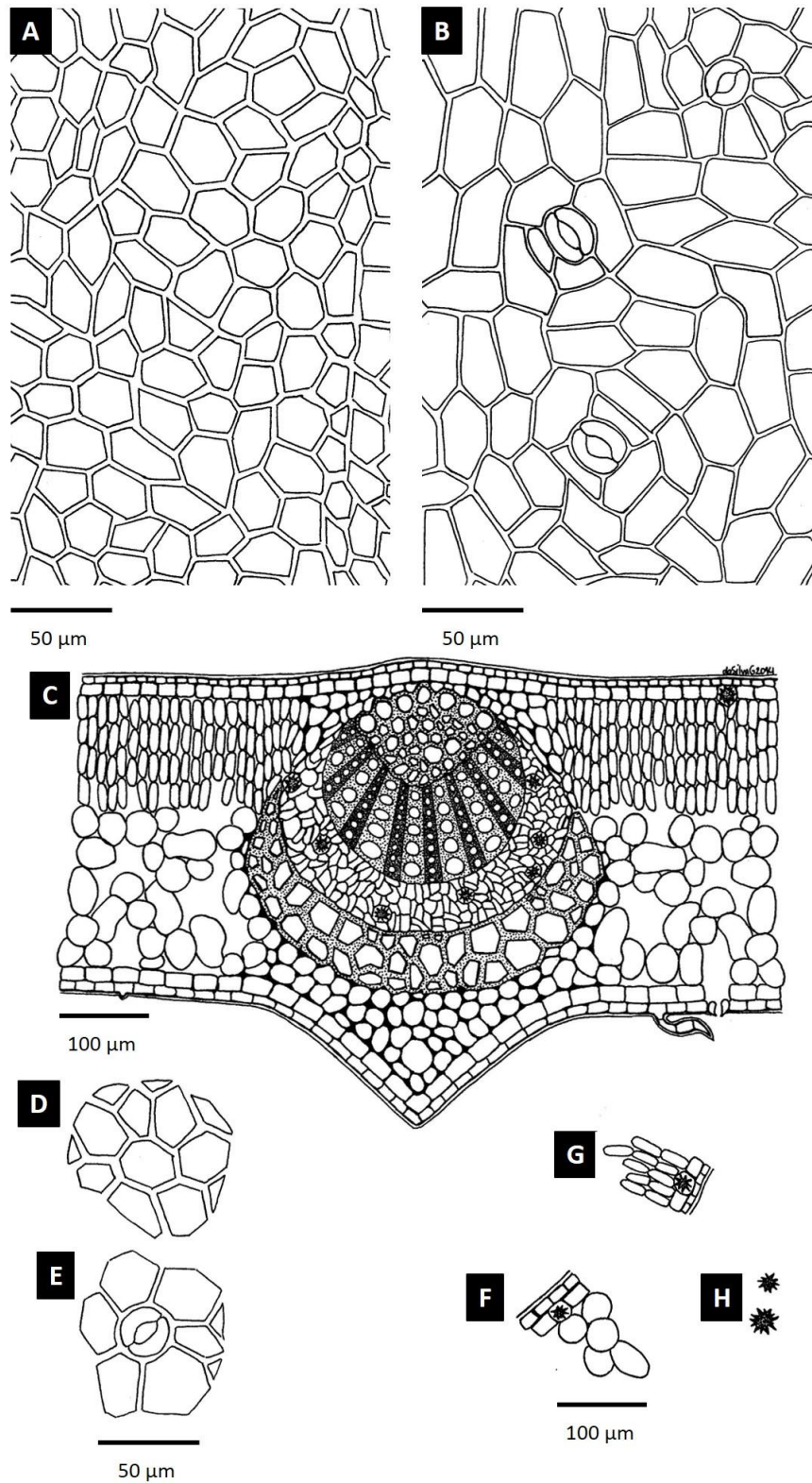


Figura 13. Ilustração esquemática das características microscópicas da folha de *G. arenicola*. Pormenor da epiderme adaxial (A) e abaxial (B). (C) Aspeto geral do corte transversal. Fragmentos da epiderme adaxial (D) e abaxial (E). Fragmentos do clorênquima, contendo parênquima lacunoso (F) e em paliçada (G). (H) Drusas de oxalato de cálcio isoladas. Escala gráfica: A, B, D, E = 50 μm ; C, F-H = 100 μm . Ilustração do autor.

Os resultados da localização histoquímica *in situ* de alcalóides, *o*-di-hidroxifenóis, terpenóides carbonilados, lípidos totais e amido são apresentados na Tabela 4 e na Figura 14.

Tabela 4. Dados histoquímicos relevantes para localização de alguns dos constituintes da folha de *G. arenicola*

Reagente cromático	Deteção	Coloração	Localização
Cloreto férrico	<i>o</i> -Di-hidroxifenóis	Castanho escuro-preto	Mesófilo
Reagente de Dittmar	Alcalóides	Castanho	Mesófilo
2,4-DNPH	Terpenóides carbonilados	Vermelho-laranja	Colênquima, nervura central e vesículas
Vermelho de Sudão III	Lípidos totais	Vermelho	Epiderme e cutícula
Soluto de Lugol	Amido	Azul escuro	Mesófilo

Os alcalóides foram detetados pelo aparecimento de conteúdo celular acastanhado nas células próximas das nervuras e nas células parenquimatosas (Figura 14B). A presença de *o*-di-hidroxifenóis foi confirmada pelo aparecimento da coloração castanha escura ao nível das células do mesófilo (Figura 14D). Os terpenóides carbonilados foram identificados pelo aparecimento da coloração vermelho-alaranjada no colênquima (Figura 14F) e em vacúolos nas células do mesófilo (Figura 14H). Os amiloplastos foram detetados pelo aparecimento da coloração azul no mesófilo. Os lípidos totais foram confirmados nas células epidérmicas e cutícula, pelo aparecimento da coloração avermelhada (Figura 14J). As Figuras 14A, C, E, G, I e K mostram os controlos negativos para os testes histoquímicos usados, respetivamente.

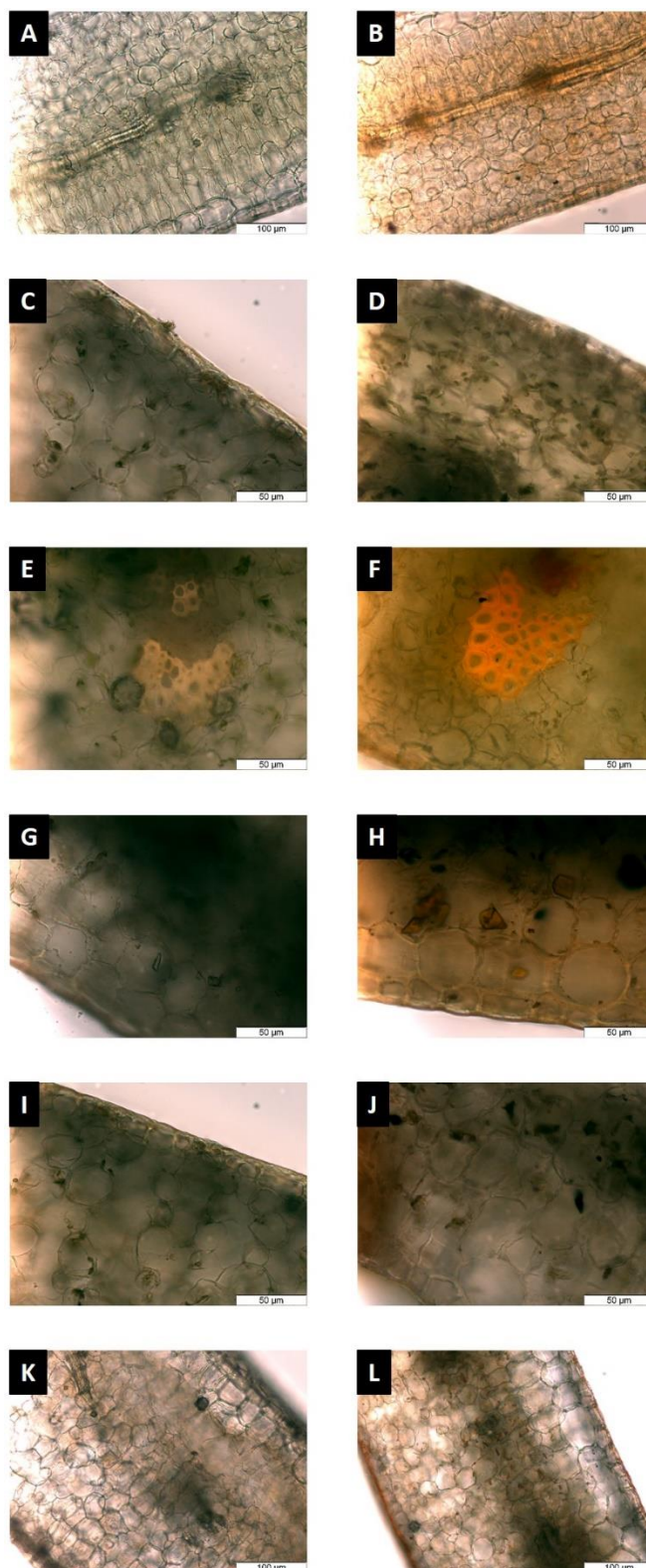


Figura 14. Localização histoquímica das principais classes de constituintes em cortes transversais da folha de *G. arenicola*. (A), (C), (E), (G), (I), (K) Controle negativo; (B) Detecção de alcalóides; (D), (F) Detecção de *o*-di-hidroxifenóis; (J) Detecção de amido; (L) Detecção de lípidos totais. Escala gráfica: A, B, K, L = 100 µm; C-J = 50 µm.

3.2 Estudo químico

3.2.1 Métodos extrativos e isolamento de um dos constituintes

Para a preparação do extrato etanólico (70%) das folhas de *G. arenicola* foram utilizadas 11,100 L de solvente, para 90,0 g de material pulverizado, ao que corresponde um rendimento do processo extrativo de 20%.

Para a extração alcaloídica das folhas de *G. arenicola* foram utilizadas 114,2 g de material pulverizado, com um rendimento de 5% (em alcalóides totais). Do isolamento do extrato alcaloídico foram obtidas 50,8 mg da fração 3, cuja purificação final rendeu 7,8 mg de composto puro **16**, suficientes para a sua caracterização estrutural completa e avaliação biológica.

3.2.2 Identificação estrutural de um dos constituintes

O composto **16** foi isolado sob a forma de um sólido castanho amorfo e apresentou um desvio polarimétrico de -13,27 (*c* 0,9, CHCl₃).

O espectro de massa revelou um pico base a *m/z* 416,1712 correspondente ao pico [M+Na]⁺(Figura 16).

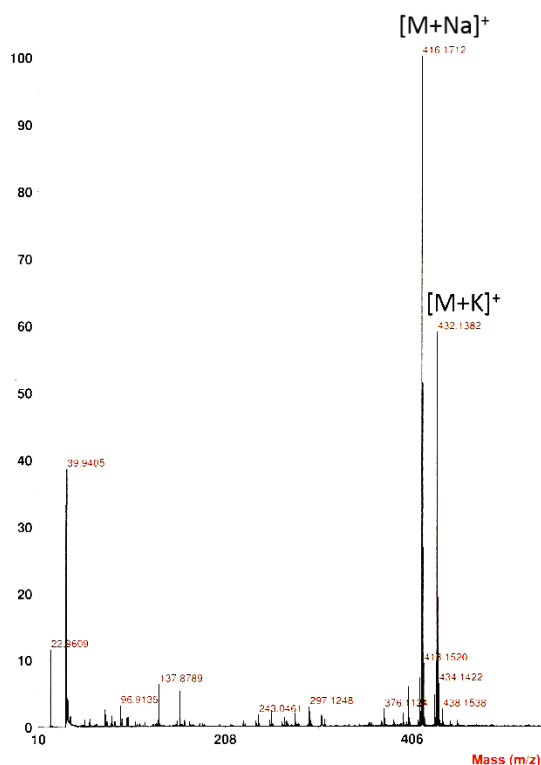


Figura 15. Espectro de massa do composto **16**

Na Figura 16 é apresentado um espectro de RMN de ^1H do composto **16**, com uma expansão na região aromática e outra expansão na região alifática, com a atribuição dos assinalamentos respectivos. A análise da multiplicidade dos sinais e as respectivas constantes de acoplamento são apresentadas na Tabela 3.

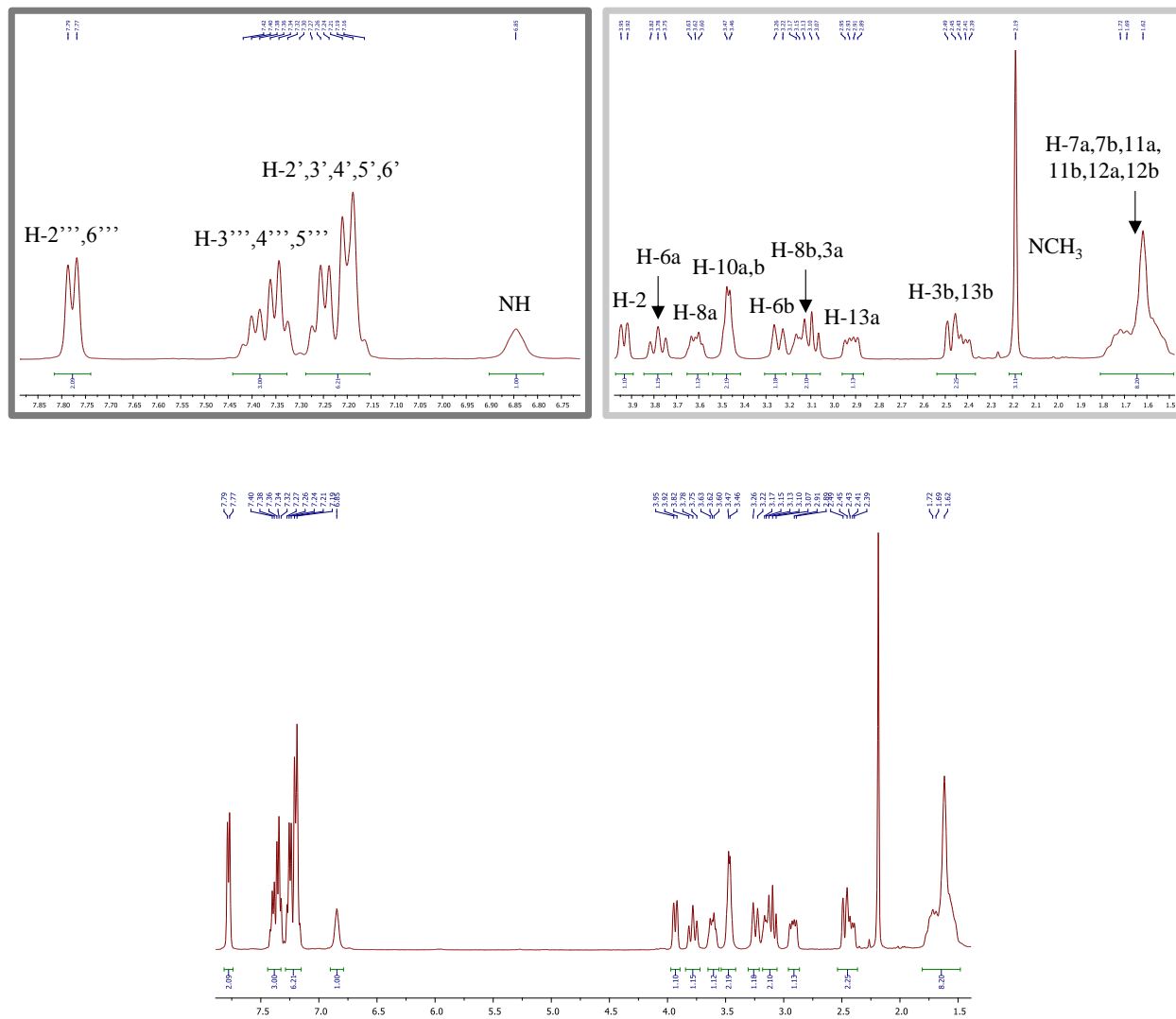


Figura 16. Espectro de RMN de ^1H do composto **16**

Na Figura 17 é apresentado um espectro de RMN de ^{13}C do composto **16**, com uma expansão na região aromática e outra expansão na região alifática, com a atribuição dos assinalamentos respectivos. A análise deste espectro de ^{13}C é apresentada na Tabela 5.

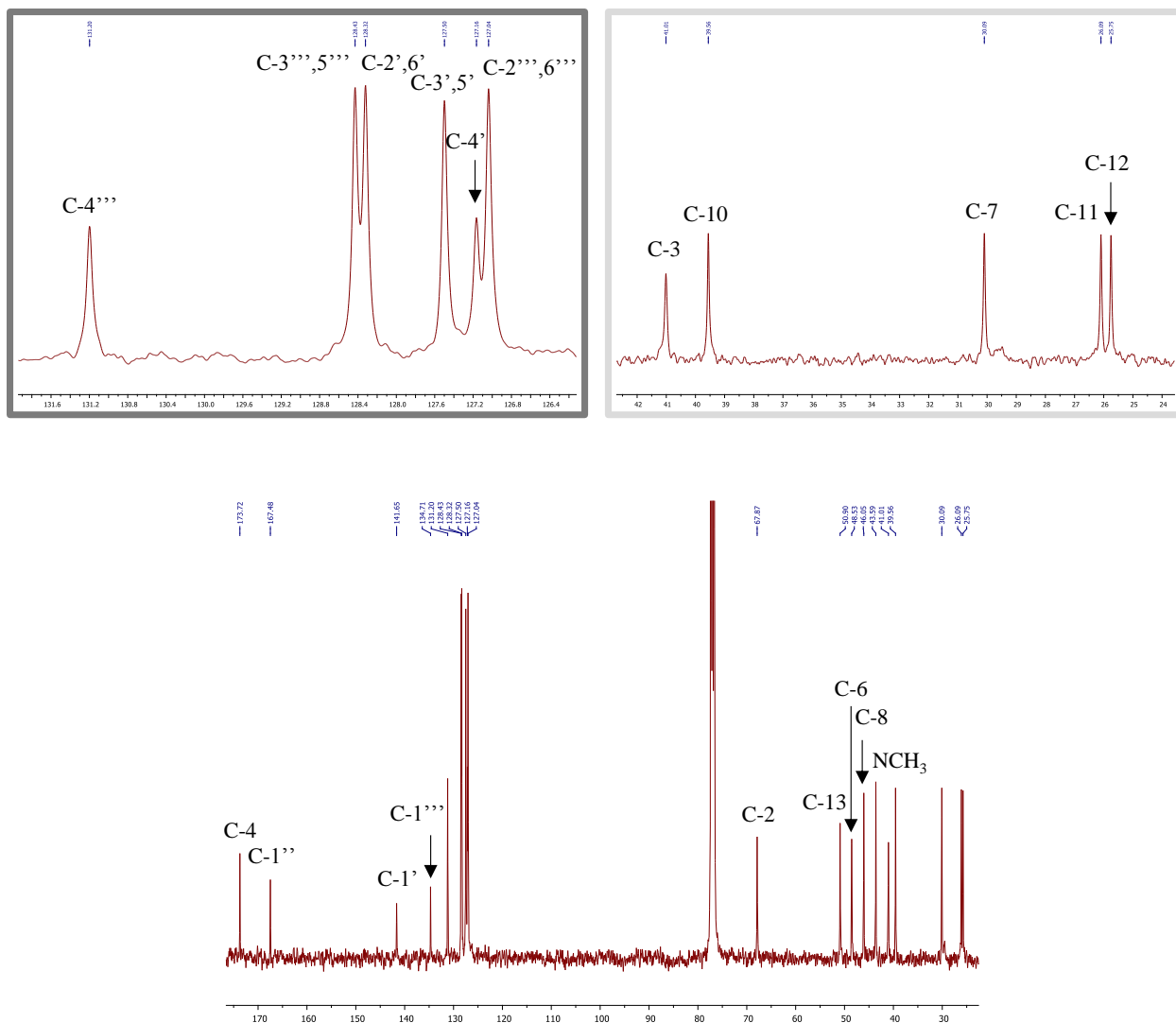


Figura 17. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **16**

Na Figura 18 é apresentado um espectro de DEPT-135 do composto **16**, onde é visível o assinalamento do metino alifático (δ_{C} 67,87 ppm) e do grupo metilo (δ_{C} 43,59 ppm).

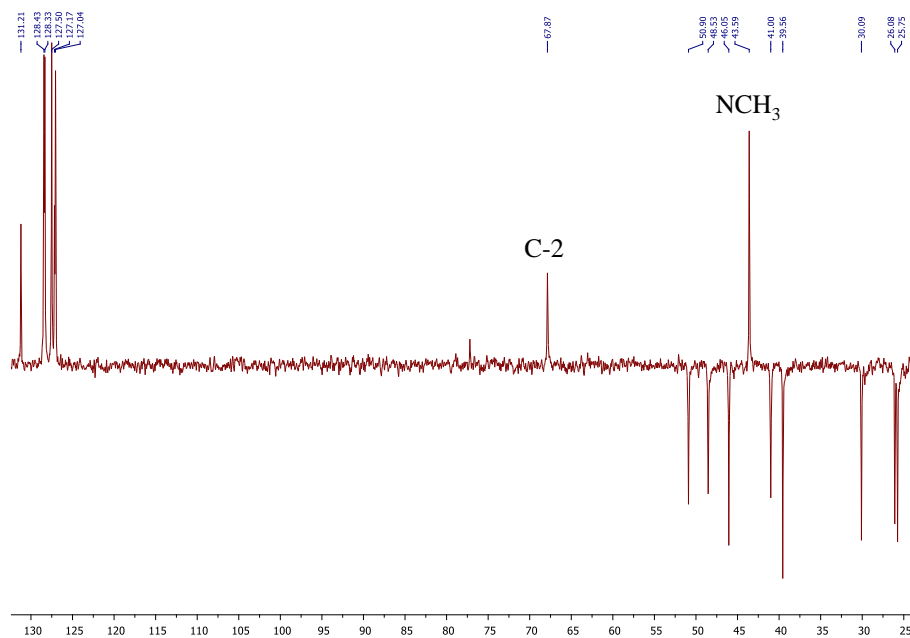


Figura 18. Espectro de RMN de DEPT-135 do composto **16**

Na Figura 19 é apresentada uma projeção interna de HSQC, onde são visíveis algumas conectividades importantes do composto **16** para atribuição dos assinalamentos de todos os prótons e carbonos alifáticos.

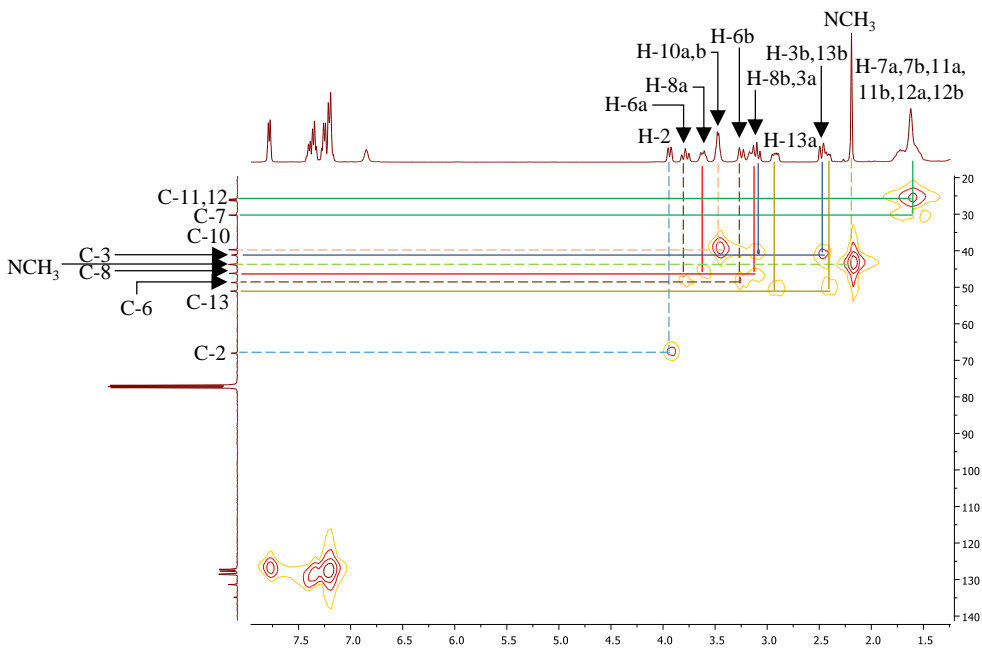


Figura 19. Projeção interna de HSQC do composto **16**

Na Figura 20 é apresentada uma projeção interna de HMBC, com uma expansão, onde são visíveis algumas conectividades importantes do composto **16** para atribuição dos assinalamentos de carbonos aromáticos e alifáticos, a partir dos prótons correspondentes.

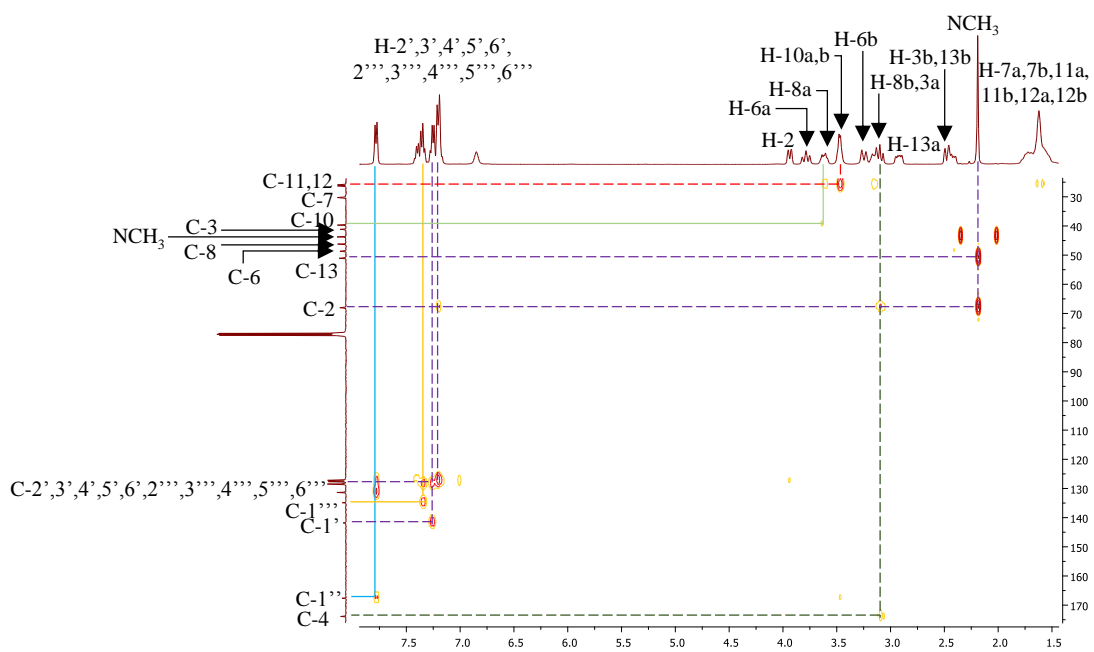
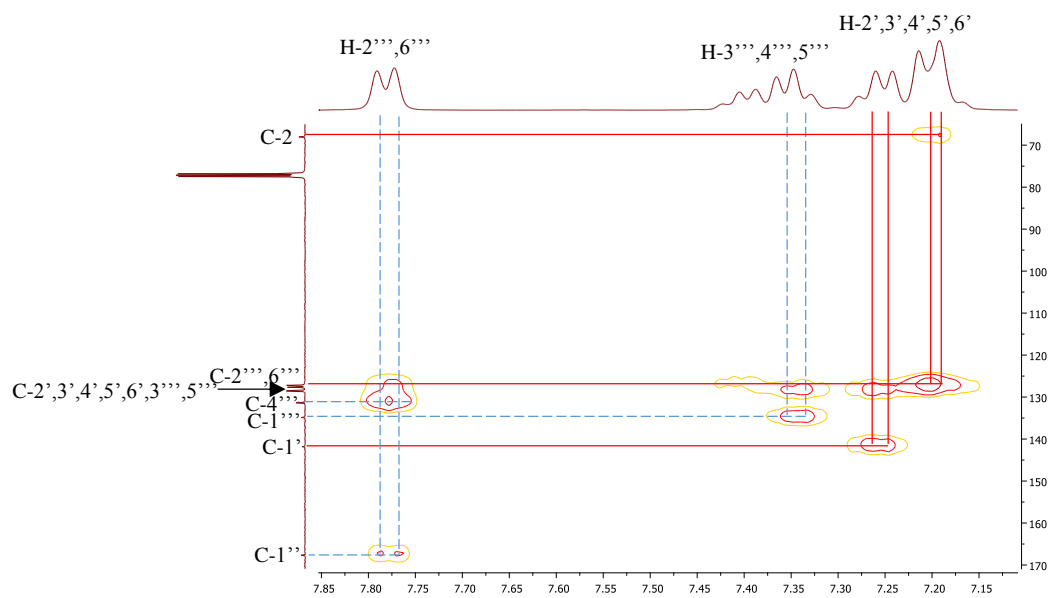


Figura 20. Projeção interna de HMBC do composto 16

Tabela 5. Dados espectroscópicos de RMN de ^{13}C , ^1H e HMBC da (2*S*)-9-benzoil-2-fenil-1-metil-1,5,9-triazaciclotridecan-4-ona **1** (400 MHz, CDCl_3)

Posição	δ_{C} , tipo	δ_{H} , (<i>J</i> , em Hz)	HMBC*
Unidade espermidina			
<i>N</i> - CH_3	43,59; CH_3	2,19 s	2; 13
2	67,88; CH	3,93 d (11,2)	4
3a; 3b	41,01; CH_2	3,07 t (12,1), 2,45 m	2; 4
4	173,72; C	-	-
5	-	6,85 br s	-
6a; 6b	48,53; CH_2	3,78 t (12,1); 3,24 d (15,3)	8
7a; 7b	30,10; CH_2	1,61-1,71 m	-
8a; 8b	46,05; CH_2	3,58-3,63 m; 3,13-3,16 m	6
10a; 10b	39,56; CH_2	3,47 d (5,0)	1''; 12
11a; 11b	26,10; CH_2	1,61-1,71 m	-
12a; 12b	25,75; CH_2	1,61-1,71 m	-
13a; 13b	50,91; CH_2	2,92 m; 2,38-2,49 m	-
Unidade fenólica			
1'	141,65; C	-	-
2'; 6'	128,32; CH	7,16-7,27 m	2
3'; 5'	127,50; CH	7,16-7,27 m	1'
4'	127,17; CH	7,16-7,27 m	-
Unidade benzoílica			
1''	167,48; C	-	-
1'''	134,71; C	-	-
2'''; 6'''	127,04; CH	7,78 d (7,4)	1''
3'''; 5'''	128,43; CH	7,30-7,41 m	1'''
4'''	131,20; CH	7,30-7,41 m	-

*Conectividades de HMBC, otimizadas para 6 Hz, de prótons que se correlacionam com o carbono indicado

3.3 Estudos biológicos

3.3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana

Os resultados do rastreio da atividade antimicrobiana revelaram que os microrganismos testados (*Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*) não apresentam suscetibilidade do extrato etanólico de *G. arenicola*, para a gama de concentrações testada (48-5000 μg).

3.3.2 Avaliação da atividade antitumoral

Na Tabela 6 são apresentados os resultados da avaliação da atividade citotóxica nas células PNT1A, com concentração e períodos de incubação crescentes.

Tabela 6. Percentagem de células viáveis em relação aos controlos \pm desvio padrão nas células PNT1A dependendo da concentração do composto **16** (μM) e período de incubação (h)

PNT1A						
Incubation (h)	0 μM	1 μM	10 μM	50 μM	100 μM	200 μM
12	100.0	91.5 \pm 3.8*	86.1 \pm 5.0*	78.0 \pm 2.9*	72.8 \pm 5.1*	62.6 \pm 3.7*
24	100.0	95.7 \pm 2.5*	96.5 \pm 2.0*	84.5 \pm 1.8*	66.6 \pm 3.4*	53.3 \pm 1.8*
48	100.0	98.7 \pm 2.3	89.4 \pm 1.9*	92.0 \pm 4.2*	52.1 \pm 2.3*	35.4 \pm 0.7*
60	100.0	95.8 \pm 5.1	105.2 \pm 5.2	103.6 \pm 2.5	55.2 \pm 1.6*	37.3 \pm 1.2*

*Valores correspondentes para $p < 0.05$

Na Tabela 7 são apresentados os resultados da avaliação da atividade citotóxica nas células PC3, com concentração e períodos de incubação crescentes.

Tabela 7. Percentagem de células viáveis em relação aos controlos \pm desvio padrão nas células PC3 dependendo da concentração do composto **16** (μM) (μM) e período de incubação (h)

PC3						
Incubação (h)	0 μM	1 μM	10 μM	50 μM	100 μM	200 μM
12	100.0	91.5 \pm 2.5*	81.3 \pm 3.0*	83.8 \pm 2.7*	76.4 \pm 3.5*	65.2 \pm 5.2*
24	100.0	98.0 \pm 1.2	94.4 \pm 1.7*	96.7 \pm 5.4	90.7 \pm 3.4*	75.3 \pm 3.6*
48	100.0	86.6 \pm 2.8*	71.7 \pm 2.2*	78.9 \pm 3.7*	70.4 \pm 1.8*	60.9 \pm 1.8*
60	100.0	90.6 \pm 0.9*	85.3 \pm 4.9*	76.8 \pm 0.5*	71.1 \pm 5.1*	61.1 \pm 1.5*

*Valores correspondentes para $p < 0.05$

Na Figura 21 é apresentado um gráfico com a comparação dos resultados da viabilidade celular de células da próstata, em linhas celulares cancerígenas e não cancerígenas.

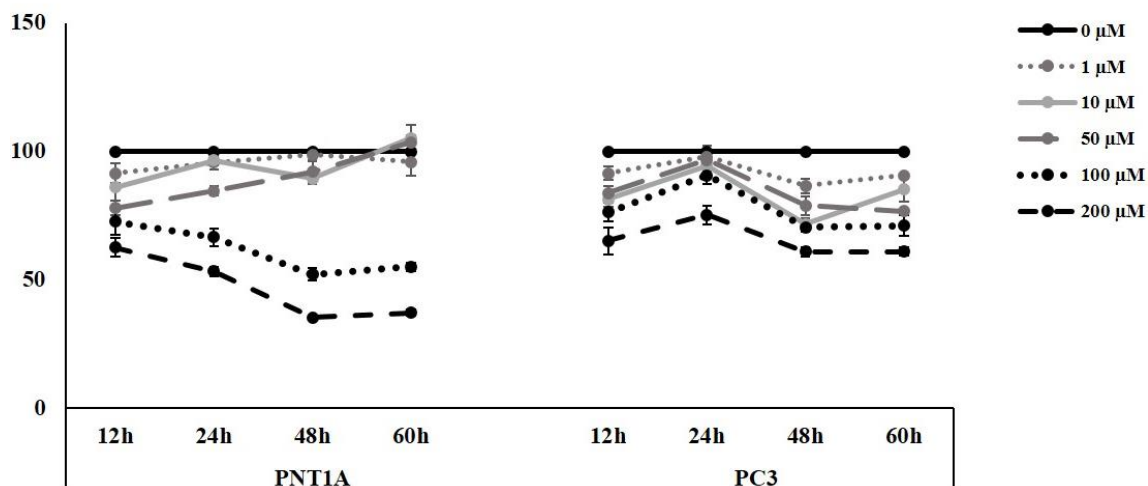


Figura 21. Citotoxicidade produzida pelo composto **16** nas células PNT1A e PC3. A viabilidade celular foi expressa como percentagem relativa de células viáveis tratadas com o composto **16** (μM), por comparação com os controlos (células não tratadas) dependendo da concentração (μM) e período de incubação (h). Os dados são expressos em média aritmética \pm desvio padrão de três ensaios independentes.

Na Tabela 8 são apresentados os resultados da avaliação da atividade citotóxica nas células MCF10A, com concentração e períodos de incubação crescentes.

Tabela 8. Percentagem de células viáveis em relação aos controlos \pm desvio padrão nas células MCF10A dependendo da concentração do composto **16** (μM) (μM) e período de incubação (h)

MCF10A						
Incubation (h)	0 μM	1 μM	10 μM	50 μM	100 μM	200 μM
12	100.0	112.0 \pm 2.1*	100.7 \pm 9.9	97.8 \pm 10.5	94.4 \pm 4.9*	81.8 \pm 2.9*
24	100.0	121.3 \pm 13.9*	107.5 \pm 7.1	92.1 \pm 7.6	71.4 \pm 8.6*	56.7 \pm 1.9*
48	100.0	119.3 \pm 2.6*	103.4 \pm 2.5	99.5 \pm 6.5	82.0 \pm 2.6*	54.0 \pm 5.0*
60	100.0	110.8 \pm 2.1*	95.6 \pm 2.7	93.9 \pm 5.9*	62.6 \pm 3.4*	26.2 \pm 3.6*

*Valores correspondentes para $p < 0.05$

Na Tabela 9 são apresentados os resultados da avaliação da atividade citotóxica nas células MCF7, com concentração e períodos de incubação crescentes.

Tabela 9. Percentagem de células viáveis em relação aos controles \pm desvio padrão nas células MCF10A dependendo da concentração do composto **16** (μM) e período de incubação (h)

MCF7						
Incubação (h)	0 μM	1 μM	10 μM	50 μM	100 μM	200 μM
12	100.0	$91.0 \pm 4.5^*$	$87.2 \pm 5.6^*$	$75.2 \pm 6.3^*$	$65.4 \pm 3.4^*$	$54.3 \pm 2.2^*$
24	100.0	$108.6 \pm 4.2^*$	107.6 ± 5.4	$92.0 \pm 3.0^*$	$80.2 \pm 4.9^*$	$51.4 \pm 9.8^*$
48	100.0	$107.8 \pm 1.3^*$	99.0 ± 3.4	$89.8 \pm 3.2^*$	$82.2 \pm 0.9^*$	$32.7 \pm 1.6^*$
60	100.0	97.5 ± 4.1	$93.6 \pm 2.2^*$	$87.2 \pm 7.2^*$	$67.9 \pm 5.4^*$	$19.3 \pm 0.8^*$

*Valores correspondentes para $p < 0.05$

Na Figura 22 é apresentado um gráfico com a comparação dos resultados da viabilidade celular de células de tecido mamário, em linhas celulares cancerígenas e não cancerígenas.

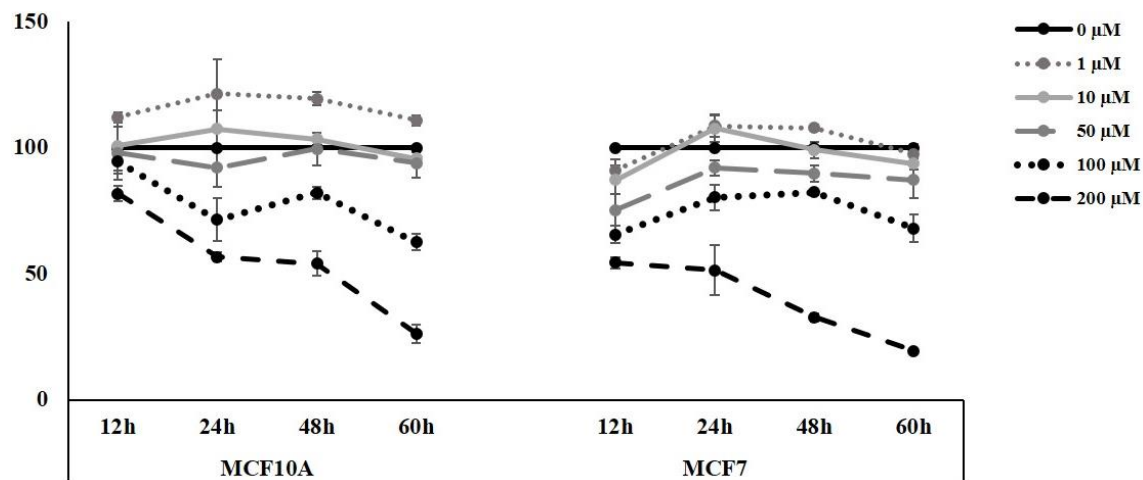


Figura 22. Citotoxicidade produzida pelo composto **16** nas células MCF10 e MCF7. A viabilidade celular foi expressa como percentagem relativa de células viáveis tratadas com (2*S*)-9-benzoil-2-fenil-1-metil-1,5,9-triazaciclotridecan-4-ona **1**, por comparação com os controles (células não tratadas) dependendo da concentração (μM) e período de incubação (h). Os dados são expressos em média aritmética \pm desvio padrão de três ensaios independentes

4.1 Estudo botânico

As características microscópicas das folhas de *G. arenicola* estão em concordância com a descrição de Jordaan e van Wyk,¹ e permitem a fácil distinção de *Gymnosporia senegalensis* (Lam.) Loes. Estas características distintivas são particularmente relevantes devido à aparente semelhança anatomo-morfológica entre estas espécies medicinais, pelo facto de ambas coexistirem em algumas regiões geográficas e por terem usos etnomédicos comuns.¹⁰⁵ A coexistência de ambas as espécies nos mercados tradicionais podem estar na origem de eventuais adulterações ou contaminações vegetais e conduzir a erros na identificação da espécie na população.

A análise microscópica da folha de *G. arenicola* revelou a presença de uma cutícula estriada e papilosa. A presença de papilas é útil para fins de diagnose botânica e serve propósitos taxonómicos nas Celastraceas.⁴ A observação de uma cutícula espessa e conspícua, a revestir a epiderme é um caracter anatómico previamente reportado na família Celastraceae e concretamente no género *Gymnosporia*.¹⁰⁶ Esta característica já foi estudada particularmente em algumas espécies da família Celastraceae, *e.g.* *Maytenus boaria*,¹⁰⁷ *M. ilicifolia*,¹⁰⁸ *M. oleoides*¹⁰⁹ e *M. rigida*.¹¹⁰ De acordo com os autores anteriores, a cutícula para além de prevenir a perda de água contra a evaporação descontrolada e evitar o colapso durante o processo de desidratação, tem valor taxonómico e pode ser usada para fins de diagnose botânica. A presença de papilas é útil para fins de identificação botânica, no entanto os nossos resultados não estão de acordo com as observações de Jordaan e van Wyk⁴ para a secção *Buxifoliae* Jordaan do género *Gymnosporia*. Nesta secção *Buxifoliae* não é esperada a presença de papilas, com algumas exceções (e *G. arenicola* não é mencionado como exceção).

A presença de colênquima angular entre a epiderme superior nesta espécie, já foi reportada noutras espécies deste género botânico, *e.g.* *G. rothiana*.²⁰

Como foi mencionado anteriormente, ocorre uma camada claramente diferenciada de células hipodérmicas de parede espessa, e esta característica é consistente com as observações de Jordaan e van Wyk.⁴

Os idioblastos cristalíferos contendo drusas de oxalato de cálcio ocorrem frequentemente na hipoderme e clorênquima. O padrão de distribuição destes idioblastos está de acordo com as observações de Jordaan e van Wyk.⁴ De acordo com Metcalfe e colaboradores, estes cristais de oxalato ocorrem frequentemente na família Celastraceae, nomeadamente nos géneros *Elaeodendron*, *Catha* e *Maytenus*.^{20,105}

Por outro lado, diferentes funções biológicas foram atribuídas aos idioblastos cristalíferos, nomeadamente o armazenamento do ião cálcio, a prevenção da acumulação tóxica de oxalato, o suporte mecânico dos tecidos e a proteção contra herbívoros.¹¹¹

Os estomas anomocíticos e paracíticos estão presentes nesta espécie tal como anteriormente descrito noutras espécies do género *Maytenus*.¹⁰⁹ Os estomas anomocíticos já foram descritos no género *Gymnosporia*.²⁰

A observação de tricomas tetraes e multicelulares unisseriados nesta espécie, não está de acordo com as características descritas por Jordaan e van Wyk⁴ para a secção *Buxifoliae*. A presença destas estruturas não é esperada na secção *Buxifoliae*, com algumas exceções (e *G. arenicola* não está incluído nas exceções previstas). A ocorrência de tricomas tetraes não é frequente na família Celastraceae.²⁰

O mesófilo apresenta uma organização dorsiventral e a nervura central apresenta um feixe vascular anficribral e colateral. Metcalfe e Chalk¹⁰⁶ indicaram a presença de mesófilos dorsiventrais e isobilaterais em *Gymnosporia* spp. A observação de um mesófilo dorsiventral está de acordo com as conclusões de Jordaan e van Wyk⁴ para a secção *Buxifoliae*.

Os resultados histoquímicos sugerem a presença de *o*-di-hidroxi-fenóis, terpenóides carbonilados, alcalóides, lípidos totais e amido. A deteção e localização *in situ* de alguns destes constituintes podem ser parcialmente correlacionado com o isolamento de alguns compostos pertencentes a estas classes, descritos em estudos fitoquímicos anteriores.³²

A análise histoquímica dos cortes transversais permitiu a identificação dos lípidos totais na cutícula e na superfície das células epidérmicas, terpenóides carbonilados em células do colênquima nas proximidades da nervura central e alcalóides, *o*-di-hidroxi-fenóis e grãos de amido no mesófilo foliar.

A deteção de fenóis confirma a presença de células taníferas na secção *Buxifoliae*.⁴ Metcalfe e Chalk¹⁰⁶ observaram a presença de células de armazenamento de compostos fenólicos no mesófilo de espécies pertencentes ao género *Cassine*, *Euonymus*, *Gymnosporia*, *Maytenus*,

Microtropis, *Myginda*, *Pachystima*, *Siphonodon*, *Wimmeria* e *Zinowiewia*. De acordo com Beckman estas células especializadas, distribuídas na generalidade dos tecidos, sintetizam e armazenam os compostos fenólicos nos seus vacúolos durante o processo normal de diferenciação celular.¹¹² Propriedades antimicrobianas envolvendo a inibição de enzimas extracelulares, fosforilação oxidativa ou privação dos substratos necessários ao crescimento microbiano são atribuídas aos compostos fenólicos, nomeadamente aos taninos.¹¹³

De acordo com Metcalfe e Chalk¹¹⁴ a análise histoquímica é muito interessante para a anatomia sistemática, uma vez que estes estudos acrescentam frequentemente padrões de distribuição celular distintivos/restritivos e contribuem para descrever relações filogenéticas entre membros de um determinado grupo.

4.2 Estudo químico

O rendimento obtido em ambos processos extrativos está de acordo com os rendimentos esperados, tendo em conta a natureza dos extratos.

A obtenção de apenas 7,8 mg do composto **16**, está relacionada provavelmente com perdas nos processos de purificação e com a eventual (e muito pouco provável) degradação do composto isolado. Tendo em conta que o composto isolado foi identificado pela primeira vez, não há dados na literatura que justifiquem essa perda, no entanto a sua estrutura deixa antever dificuldades no seu isolamento.

Foi isolado um novo alcalóide macrocíclico a partir do extrato alcaloídico das folhas pulverizadas de *Gymnosporia arenicola* por LPLC e CC. A elucidação estrutural deste novo alcalóide permitiu a identificação inequívoca de um novo derivado quiral da espermidina, designado por (2*S*)-9-benzoil-2-fenil-1-metil-1,5,9-triazaciclotridecan-4-ona **1**. A estrutura e a numeração do composto é apresentada na Figura 23.

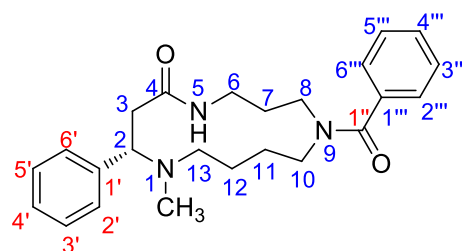


Figura 23. Estrutura e numeração da (2*S*)-9-benzoil-2-fenil-1-metil-1,5,9-triazaciclotridecan-4-ona **16**

A (2*S*)-9-benzoil-2-fenil-1-metil-1,5,9-triazaciclotridecan-4-ona **16** foi obtida na forma de um amorfo acastanhado e com um odor característico. A fórmula molecular do composto foi deduzida a partir dos dados de HR-MS e da RMN de ^{13}C , como $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_2$.

A interpretação inicial do RMN de ^1H e ^{13}C RMN indicou que o composto posteriormente identificado como (2*S*)-9-benzoil-2-fenil-1-metil-1,5,9-triazaciclotridecan-4-ona **16** continha onze metinos (dez aromáticos e um alifático), oito metilenos e um metilo. Quatro carbonos sp^2 (dois carbonílicos e dois aromáticos) foram revelados no espectro de RMN de ^{13}C e a sua ausência foi observada no espectro de DEPT-135, o que confirma a sua presença na estrutura do alcalóide isolado. A identificação dos grupos metino e metilo, na região alifática do espectro de RMN de ^{13}C , foi facilitada pelo espectro de DEPT-135. As correlações a longa distância ($\text{H-2} \rightarrow \text{C-4}$; $\text{H-2}''',6''' \rightarrow \text{C-1}''$; $\text{H-3}',5' \rightarrow \text{C-1}'$; $\text{H-3}''',5''' \rightarrow \text{C-1}'''$), observadas no espectro de HMBC permitiram os assinalamentos dos quatro carbonos quaternários, as quais eram consistentes com as correlações a curta distância do espectro de HMQC.

A ausência de carbonos sp^2 adicionais (e/ou carbonos sp) nos dados monodimensionais de RMN, sugerem a presença de dois anéis aromáticos monossustituídos e um macrociclo monocíclico, cujo número de carbonos restante é sugestivo de uma unidade espermidina. A presença de dois anéis aromáticos monossustituídos foi sugerida pelos sinais a δ_{H} 7,16 – 7,77 ppm, mas os desvios químicos e a multiplicidade dos sinais de um desses anéis eram indicativos da presença de uma unidade benzoilo. A presença de um grupo sacador de elétrons no anel aromático é responsável pela redução da densidade eletrônica e condiciona o aparecimento das ressonâncias dos prótons em posição *orto* a campo mais baixo. Este fenómeno de RMN, apresentado na Figura 24, facilita a diferenciação dos sinais das unidades benzoilo e fenilo.

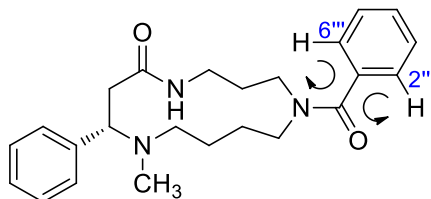


Figura 24. Efeito de ressonância na unidade benzoilo

A presença da unidade benzoilo foi confirmada pelas correlações de HMBC. O carbono carbonílico a δ_C 167.48 ppm foi atribuído ao carbono C-1'' baseado na correlação supracitada com os prótons H-2''',6'''. Os restantes carbonos aromáticos foram assinalados com base nas correlações de HMBC e os prótons correspondentes assinalados com base nas correlações de HMQC. A correlação entre H-2''',6'''' e H-3''',5'''' presente nas conectividades evidentes no espectro COSY confirmou o assinalamento destes prótons na unidade benzoilo. Os restantes prótons aromáticos a δ_H 7.16-7.27 (m, 5H) foram atribuídos à unidade fenilo e confirmados pelas correlações de HMBC.

Os restantes prótons alifáticos foram atribuídos às ressonâncias de uma unidade espermidina monocíclica. O assinalamento desses prótons foi possível com base na correlação H-2→C-4 supramencionada e pela confirmação de correlações de HMBC adicionais com os restantes sinais (N-CH₃→C-2, C-13; H-3→C-2,C-4; H-6→C-8; H-8→C-6; H-10→C-11, C-12, C-1''). Todas as conectividades foram confirmadas por correlações de COSY (H-2→H-3a, H-3b; H-6a→H-6b, H-7; H-8→H-7; H-10→H-11; H-6b→H-7; H-3a→H-3b, H-2; H-13a→H-13b, H-12; H-3b→H-2, H-3a). A presença de um singuleto largo (H-5) a δ_H 6.85 ppm é consistente com a presença de um próton lábil, típico de um próton amídico. As correlações de NOESY (NH→H-10, H-11, H-12) são consistentes com o arranjo espacial da molécula proposta.

As principais conectividades a longa distância observadas no espectro de HMBC e necessárias para a elucidação estrutural inequívoca desta estrutura estão representadas na Figura 25.

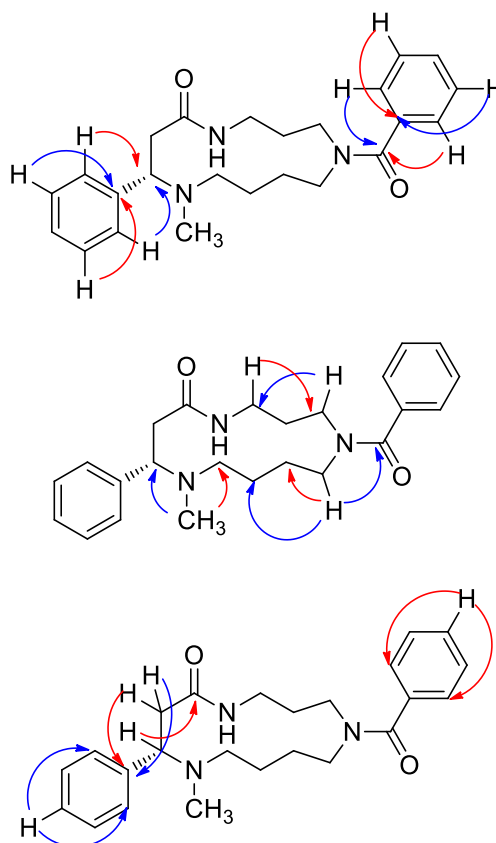
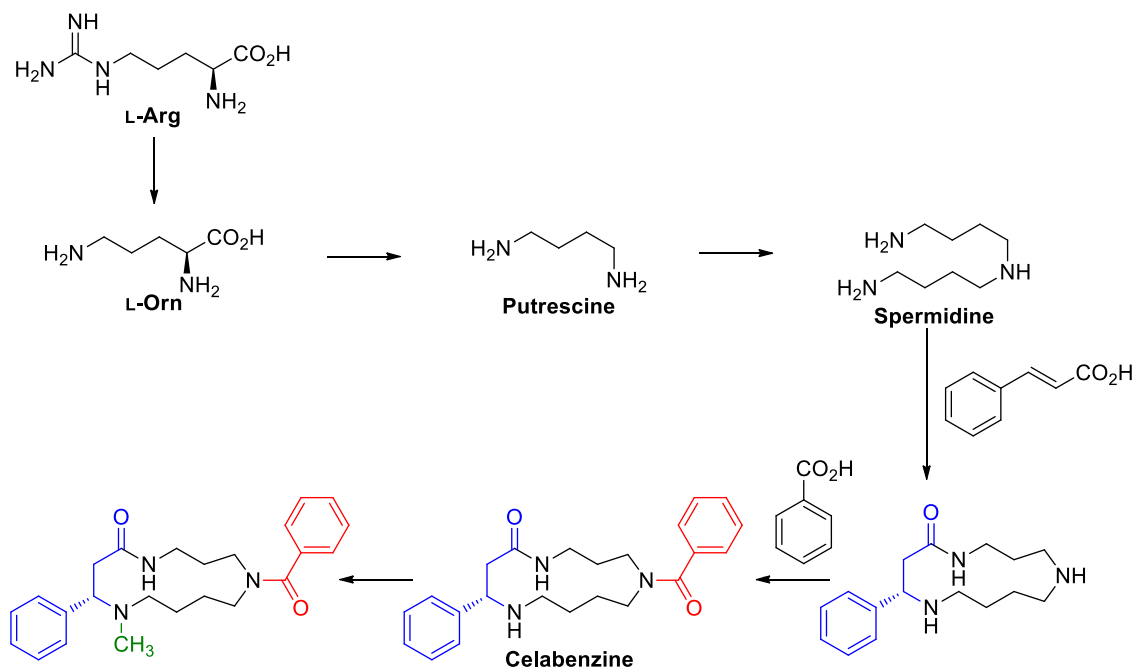


Figura 25. Principais conectividades observadas nos espectros de HMBC de (2*S*)-9-benzoil-2-fenil-1-metil-1,5,9-triazaciclotridecan-4-ona **16**

As propriedades quiróticas deste novo alcalóide foram determinadas experimentalmente num polarímetro e o composto isolado demonstrou ser opticamente ativo, tal como previsto. Este fenómeno é consistente com os estudos anteriores de Kuebne e colaboradores, que observou que todos os alcalóides da espermidina isolados (com exceção dos derivados da ciclocelabenzina) são levogiros, apresentando valores negativos de $[\alpha]_D$.⁵⁷

No Esquema 1 é apresentada uma rota biossintética plausível para a formação da (2*S*)-9-benzoil-2-fenil-1-metil-1,5,9-triazaciclotridecan-4-ona **16**.^{115, 116, 117, 118, 119} Para tal, é proposta a lactamização da espermidina *via* cinamoilação e ciclização intramolecular do intermediário sintético, com formação do produto diazactâmico, a (2*S*)-fenil-1,5,9-triazacyclotridecan-4-one. Esta proposta também inclui a benzoilação da diazactâma, resultando na formação da celabenzina. Finalmente a biossíntese da (2*S*)-9-benzoil-2-fenil-1-metil-1,5,9-triazaciclotridecan-4-ona **16** é concluída *via* *N*-metilação da celabenzina.



Esquema 1. Rota biossintética proposta para a formação da (2*S*)-9-benzoil-2-fenil-1-metil-1,5,9-triazaciclotridecan-4-ona **16**

4.3 Estudos biológicos

4.3.1 Atividade antimicrobiana

Os resultados obtidos indicam que o extrato etanólico de *G. arenicola* não apresenta atividade antimicrobiana para a gama de concentrações testada e para os microrganismos testados, o que não está de acordo com alguns dos seus usos etnomédicos na medicina tradicional africana.

4.3.2 Atividade antitumoral

As células PNT1A, PC3, MCF10A e MCF7 foram incubadas com 0, 1, 10, 50, 100 ou 200 μM por 12, 24, 48 ou 60 h e, depois, a toxicidade *in vitro* da (2*S*)-9-benzoil-2-fenil-1-metil-1,5,9-triazaciclotridecan-4-ona **16** foi avaliada através do ensaio do MTT.

Como é visível nas Tabelas 4 e 5 (e na Figura 15) para 1, 10 e 50 μM de (2*S*)-9-benzoil-2-fenil-1-metil-1,5,9-triazaciclotridecan-4-ona **16**, a viabilidade celular das células PC3 (linha celular derivada de adenocarcinoma da próstata) foi inferior, por comparação com as células PNT1A (linha celular derivada de tecido prostático não carcinogénico). No entanto, para altas concentrações do composto (100 e 200 μM), este efeito é revertido, apresentando as células carcinogénicas viabilidade celular superior à das células não carcinogénicas do mesmo tecido

prostático. Por comparação com os controlos, os dados revelam que, em qualquer período de incubação testado, 1, 10 e 50 μM de (2*S*)-9-benzoil-2-fenil-1-metil-1,5,9-triazaciclotridecan-4-ona **1** são preferencialmente citotóxicos para a linha carcinogénica, e 100 e 200 μM deste composto são preferencialmente citotóxicos para a linha não carcinogénica.

De forma análoga foram feitos ensaios em linhas celulares MCF10A e MCF7 e, tal como é apresentado nas Tabelas 6 e 7 (e na Figura 16), a incubação de (2*S*)-9-benzoil-2-fenil-1-metil-1,5,9-triazaciclotridecan-4-ona **16** em células MCF10A (derivadas de tecido mamário não carcinogénico) resultou em efeitos citotóxicos similares ou menos pronunciados, quando comparados com os resultados das células MCF7 (derivadas de tecido mamário carcinogénico). Para além disso, os dados revelaram que a concentração testada mais elevada de (2*S*)-9-benzoil-2-fenil-1-metil-1,5,9-triazaciclotridecan-4-ona **16** resultou na indução da maior citotoxicidade avaliada e ambas as linhas celulares, com efeitos mais pronunciados em células carcinogénicas. Por exemplo, a incubação de 200 μM de (2*S*)-9-benzoil-2-fenil-1-metil-1,5,9-triazaciclotridecan-4-ona **16** por 48 e 60 h resultou no decréscimo da viabilidade celular de 100 % a $54,0 \pm 5,0$ e $26,2 \pm 3,6$ em células MCF10A, e $32,7 \pm 1,6$ e $19,3 \pm 0,8$ em células MCF7, respetivamente. Resumidamente, os resultados obtidos em células derivadas de tecido mamário mostram que de (2*S*)-9-benzoil-2-fenil-1-metil-1,5,9-triazaciclotridecan-4-ona **16** é mais citotóxico em linhas cancerígenas, em comparação com as linhas não cancerígenas. Assim, este composto mostra de forma preliminar que pode ser um promissor agente anticancerígeno. No entanto, estudos futuros mais detalhados são necessários para averiguar as potencialidades terapêuticas que parecem estar associadas a este composto.

A análise macro- e microscópica continua a ser uma metodologia simples para identificar fármacos vegetais e a presença de adulteração/contaminação dos mesmos.

Estes resultados constituem novos parâmetros para a caracterização botânica da folha de *Gymnosporia arenicola*, baseado nos padrões das farmacopeias ocidentais para o controlo de qualidade macro- e microscópico de fármacos vegetais. Consequentemente, estes resultados podem ser eventualmente incluídos numa futura monografia da folha de *G. arenicola*.

Como foi mencionado anteriormente *G. arenicola* é caracterizado por certas características anatómicas da folha. Os tipos de estomas predominantes, as formas e o padrão de distribuição dos cristais de oxalato de cálcio também revelaram ser características anatómicas importantes para a autenticação deste fármaco vegetal, o que por outro lado também confirma a relevância destes marcadores botânicos na taxonomia da família Celastraceae.¹²⁰ A epiderme, hipoderme, organização do mesófilo e a presença de tricomas e papilas revelaram ser caracteres úteis para a identificação desta planta, tal como constatado por Jordaan e van Wyk.⁴ Estes resultados confirmam também algumas características observadas na família Celastraceae, como a presença de papilas e tricomas tetraes multicelulares unisseriados.²³ Este estudo também acrescenta que a folha de *G. arenicola* apresenta tricomas tetraes, papilas e hipoderme, o que ainda não tinha sido descrito na seção *Buxifoliae* Jordaan do género *Gymnosporia*.⁴

Para além dos métodos convencionais propostos pela generalidade das farmacopeias ocidentais, os resultados da análise histoquímica e obtidos em microscopia eletrónica de varrimento revelaram-se úteis para a diagnose botânica. O uso de microscopia eletrónica de varrimento permitiu a obtenção de imagens mais detalhadas de algumas estruturas previamente observadas em microscopia ótica, a aquisição de imagens tridimensionais e a análise da topologia superficial de materiais vegetais, com maior poder de resolução. Por outro lado, os resultados da análise histoquímica confirmaram a presença de classes de compostos previamente identificados (alcalóides, flavonóides e terpenóides) e permitiram a localização *in situ* dos mesmos, no mesófilo foliar. Estes resultados podem ser considerados como critérios de identificação

preliminar anteriores ao teste de identificação química, obrigatório em todas as farmacopeias ocidentais.

Este estudo propõe marcadores morfo-anatômicos, baseados em critérios macro- e microscópicos, para a diagnose botânica da folha de *G. arenicola*, e devem ser considerados para inclusão numa futura monografia oficial para o controlo de qualidades do fármaco vegetal.

Os resultados do estudo fitoquímico da extração direcionada para alcalóides da folha de *Gymnosporia arenicola* permitiram o isolamento e elucidação estrutural um novo alcalóide, caracterizado pela presença de um anel macrolactâmico de 13 membros contendo uma unidade espermidina, ligada por um azoto a um grupo benzoilo. A estrutura deste novo alcalóide foi revelada com recurso a técnicas espectroscópicas convencionais de ^1H e ^{13}C , com análise mono- e bidimensional, caracterizada por espetrometria de massa de alta resolução e polarimetria. Foi proposta uma via biossintética possível para este novo macrociclo, justificativa da sua presença na planta (e da quiralidade do composto). A citotoxicidade do novo alcalóide foi avaliada em quatro linhas celulares ATCC, duas não carcinogénicas (PNT1A e MCF10A) e duas carcinogénicas (PC3 e MCF7), pelo ensaio MTT. O alcalóide revelou citotoxicidade seletiva, em linhas mamárias, para células cancerígenas MCF-7, por comparação com os resultados obtidos em células não cancerígenas MCF-10A.

O isolamento da (2*S*)-9-benzoil-2-fenil-1-metil-1,5,9-triazaciclotridecan-4-ona **16** por um lado contribui para reforçar o potencial da família Celastraceae enquanto fonte de compostos com espectro de atividade de promissor para o tratamento do cancro (à semelhança da maitansina, do triptolido e do triptolido), e por outro lado tem interesse taxonómico, enquanto isolamento de mais um derivado da espermidina nesta família.^{121,122}

6

Considerações finais e perspectivas futuras

Os resultados por nós obtidos são particularmente importantes para os utilizadores dos sistemas de saúde africanos, devido à elevada dependência de plantas medicinais e escassez de dados relativos ao perfil farmacológico e toxicológico de algumas dessas plantas, como *G. arenicola*. Para além da escassa informação farmacológica e toxicológica destas plantas medicinais, acresce pouca informação descrita para a sua identificação botânica e química. Na ausência de uma monografia farmacopeica para um fármaco vegetal, como *G. arenicola* folha, o estabelecimento de marcadores macro- e microanatómicos é essencial para a garantia da sua qualidade, e consequentemente da sua segurança e eficácia.¹²³

A ausência de atividade antimicrobiana revelada pelo extrato etanólico nos microrganismos testados, pode conduzir à avaliação da suscetibilidade do extrato contra outros agentes patogénicos, a partir das indicações da medicina tradicional.

O novo constituinte marcador identificado na planta medicinal em estudo, a (2*S*)-9-benzoil-2-fenil-1-metil-1,5,9-triazaciclotridecan-4-ona **16** é um marcador químico passível de utilização em protocolos de identificação química e os resultados promissores obtidos na avaliação da atividade citotóxica específica deste composto, demonstrada para células MCF7 justificam a continuação dos estudos relativos a esta planta medicinal. Alguns compostos ainda não identificados em *G. arenicola*, mas já isolados a partir do seu extrato alcalóidico, podem vir a revelar atividade biológica igualmente promissora.

Referências bibliográficas

-
- ¹ Jordaan M, van Wyk AE (1999) Systematic studies in subfamily Celastroideae (Celastraceae) in Southern Africa: two new species of *Gymnosporia* from Maputaland Centre of Endemism. *South African Journal of Botany* **65**(5&6): 315-20.
- ² Da Silva MC, Izidine S, Amude AB (2004) *A preliminary checklist of the vascular plants of Mozambique*, Southern African Botanical Network Report No. 30. Pretória: Sabonet.
- ³ Raimondo D, von Staden L, Foden W, Victor JE, Helme NA, Turner RC, Kamundi DA, Manyama PA (2009) *Red List of South African Plants*, Strelitzia 25. Pretória: South African National Biodiversity Institute.
- ⁴ Jordaan M, van Wyk AE (2006) Sectional classification of *Gymnosporia* (Celastraceae), with notes on the nomenclatural and taxonomic history of the genus. *Taxon* **55**(2): 515-25.
- ⁵ Hedberg I, Hedberg O, Madati PJ (1982) Inventory of plants used in traditional medicine in Tanzania. I. Plants of the families Acanthaceae-Cucurbitaceae. *Journal of Ethnopharmacology* **6**(1): 29-60.
- ⁶ Hutchings A, Scott AH, Lewis G, Cunningham AB (1996) *Zulu Medicinal Plants – An Inventory*. Pretória: University of Natal Press. pp. 181-182.
- ⁷ Jordaan M (1995) *A taxonomic revision of the spiny members of subfamily Celastroideae (Celastraceae) in southern Africa*, Tese de Mestrado. Pretória: Universidade de Pretória.
- ⁸ Simmons MP, Hedin JP (1999) Relationships and morphological character change among genera of Celastraceae *sensu lato* (including Hippocrateaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* **86**(3): 723-757.
- ⁹ Simmons MP, Clevinger CC, Savolainen V, Archer RH, Mathews S, Doyle JJ (2001) Phylogeny of the Celastraceae inferred from phytochrome B gene sequence and morphology. *American Journal of Botany* **88**(2): 313-325.
- ¹⁰ Simmons MP, Savolainen V, Clevinger CC, Archer RH, Davis JI (2001) Phylogeny of the Celastraceae inferred from 26S nuclear ribosomal DNA, phytochrome B, rbcL, atpB, and morphology. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **19**(3): 353-366.
- ¹¹ Jordaan M, van Wyk AE (2003) Reinstatement of *Gymnosporia* (Celastraceae): implications for the Flora Malesiana region. *Telopea* **10**(1):155-67.

-
- ¹² Jordaan M (2012) *A monograph of the genus Gymnosporia (Celastraceae)*, Tese de Doutorado. Pretória: Universidade de Pretória.
- ¹³ APG III (2009) An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* **161**(2):105-121.
- ¹⁴ Chase MW, Reveal JL (2009) A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* **161**(2): 121-127.
- ¹⁵ Haston EJ, Richardson E, Stevens PF, Chase MW, Harris DJ (2009) The linear angiosperm phylogeny group (LAPG) III: a linear sequence of the families in APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* **161**(2): 128-31.
- ¹⁶ Jansen PCM, Mendes O (1991) *Celastraceae. Plantas medicinais – seu uso tradicional em Moçambique*, Vol. 4. Maputo: Imprensa do Partido. pp. 27-53
- ¹⁷ Dados pessoalmente recolhidos pela Professora Doutora Elsa Teixeira Gomes, na praia da Macaneta (Maputo).
- ¹⁸ Duarte MR, Debur MC (2005) Stem and leaf morphoanatomy of *Maytenus ilicifolia*. *Fitoterapia* **76**(1): 41-49.
- ¹⁹ Gomes SMA (2001) *Anatomia Foliar como Subsídio à Taxonomia da Subfamília Hippocrateoideae (Celastraceae)*, Tese de Mestrado. Minas Gerais: Universidade Federal de Viçosa.
- ²⁰ Jain AS, Surana SJ, Bothara RC (2009) Pharmacognostic and Physico-Chemical Evaluation of the leaves of *Gymnosporia rothiana* (Walp) Lawson (Celastraceae). *Journal of Pharmacy Research* **2**(5): 991-993.
- ²¹ Joffily A, Vieira RC (2005) Anatomia foliar de *Maytenus* Mol. emend Mol. (Celastraceae), ocorrente no estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* **19**(3): 549-561.
- ²² Lin Q, Zhang Z (2010) *Microtropis longicarpa* and *M. dawweishanensis* (Celastraceae), two new species from Yunnan, China. *Annales Botanici Fennici* **47**(2): 141-147.
- ²³ Pant DD, Kidwai PF (1965) Epidermal structure and stomatal ontogeny in some Celastraceae. *New phytologist* **65**(3): 288-295.
- ²⁴ Neuwinger HD (2000) *African traditional medicine: A Dictionary of Plant Use and Applications*. Estugarda: MedpharmScientific Publishers.

-
- ²⁵ Haerdi F (1964) Die Eingeborenen-Heilpflanzen des Ulanga-Distriktes Tangajikas (Ostafrika). *Acta Tropica*. Suppl. **8**: 1-278.
- ²⁶ Kokwaro O (1976) *Medicinal Plants of East Africa*. Naerobi: East African Literature Bureau.
- ²⁷ Da Silva G, Taniça M, Rocha J, Serrano R, Gomes ET, Sepodes B, Silva O (2011) *In vivo* anti-inflammatory effect and toxicological screening of *Maytenus heterophylla* and *Maytenus senegalensis* extracts. *Human & Experimental Toxicology* **30**(7): 693-700.
- ²⁸ Da Silva G, Serrano R, Silva O (2011) *Maytenus heterophylla* and *Maytenus senegalensis*, two traditional herbal medicines. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine* **2**(1): 59-65.
- ²⁹ da Silva G, Gomes ET, Silva O (2008) Estudos fitoquímico e de actividade biológica de espécies moçambicanas do género *Maytenus*. *Actas do Workshop Plantas Mediciniais e Práticas Fitoterapêuticas nos Trópicos*. Outubro, Lisboa (Portugal).
- ³⁰ Da Silva G (2009) *Plantas medicinais como agentes antimicrobianos e anti-inflamatórios*, Tese de Mestrado. Lisboa: Universidade de Lisboa.
- ³¹ Wagner H, Burghart J (1977) Chemical constituents of the Celastraceae. IV. Spermidine alkaloids and triterpenes from *Maytenus heterophylla* and *Pleurostyliia africana*. *Planta Medica* **32A**(1): 9-14.
- ³² Orabi KY, Al-Qasoumi SI, El-Olemy MM, Mossa JS, Muhammad I (2001) Dihydroagarofuran Alkaloid and Triterpenes from *Maytenus heterophylla* and *Maytenus arbutifolia*. *Phytochemistry* **58**(3): 475-80.
- ³³ Bachrach U (1973) *Function of Naturally occurring polyamines*. Nova Iorque: Academic Press.
- ³⁴ Guggisberg A, Hesse M (1998) *The Alkaloids*, Vol. 50. Nova Iorque: Academic Press. pp. 219–257.
- ³⁵ Buckingham J (2014) *Dictionary of Natural products on CD-ROM*. Londres: Chapman and Hall. pp. 203–204.
- ³⁶ Campbell RA, Morris DR, Bartos D, Davies GD, Bartos F (1978) *Advances in Polyamine Research*, Vol. 1 e 2. Nova Iorque: Raven Press.
- ³⁷ Smith TA, Negrel J, Bird CR (1983) *The cinnamic acid amides of the di and polyamines*. In *Advances in Polyamine Research*, Vol. 4 (Bachrach U, Kaye A, Chayen R, Eds). Nova Iorque: Raven Press. pp. 347-370.

-
- ³⁸ Ganem B (1982) New chemistry of naturally occurring polyamines. *Accounts of Chemical Research* **15**(9): 290-298.
- ³⁹ Walchli-Schaer E, Eugster CH (1978) Synthese von threo-cis/threo-trans- und erythro-cis/erythro-trans-Dihydropalustrin. 17. Mitteilung über Schachtelhalmalkaloide. *Helvetica Chimica Acta* **61**(2): 928-935.
- ⁴⁰ Wagner H, Burghart J, Blatt S (1978) Pleurostylin, ein neues macrocyclisches spermidinalkaloid aus *Pleurostyliia africana* Loes. *Tetrahedron Letters* **19**(9): 781-782.
- ⁴¹ Wagner H, Burghart J (1982) Macrocyclische Spermidinalkaloide aus *Maytenus mossambicensis* (KLOTZSCH) BLAKELOCK 12. Mitteilung über Celastraceen-Inhaltsstoffe. *Helvetica Chimica Acta* **65**(3): 739-752.
- ⁴² Badawi MM, Bernauer K, van den Broek P, Gröger D, Guggisberg A, John S, Kompiš I, Schneider F, Veith H-J, Hesse M, Schmid H (1973) Macrocyclic spermidine and spermine alkaloids. *Pure and Applied Chemistry* **33**(1): 81-108.
- ⁴³ Kupchan SM, Hintz HPJ, Smith RM, Karim A, Cass MW, Court WA, Yatagai M (1977) *Journal of Organic Chemistry* **42**(23): 3660-3664.
- ⁴⁴ Gao J-M, Wu W-J, Zhang J-W, Konish Y (2007) The dihydro- β -agarofuran sesquiterpenoids. *Natural Product Reports*, **24**(5): 1153-1189.
- ⁴⁵ Spivey AC, Weston M, Woodhead S (2002) Celastraceae sesquiterpenoids: biological activity and synthesis. *Chemical Society Reviews* **31**(1): 43-59.
- ⁴⁶ Su X-H, Zhang M-L, Zahn W-H, Huo C-H, Shi Q-W, Gu Y-C, Kiyota H (2009) Chemical and Pharmacological Studies in the Plants from Genus *Celastrus*. *Chemistry & Biodiversity*, **6**(2): 146-160.
- ⁴⁷ Murayama T, Eizuru Y, Yamada R, Sadanari H, Matsubara K, Rukung G, Tolo FM, Mungai GM, Kofi-Tsekpo M (2007) Anticytomegalovirus activity of pristimerin, a triterpenoid quinone methide isolated from *Maytenus heterophylla* (Eckl. & Zeyh.). *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* **18**(3): 133-139.
- ⁴⁸ Bruning R, Wagner H (1978) Übersicht über die Celastraceen-Inhaltsstoffe: Chemie, chemotaxonomie, biosynthese, pharmakologie. *Phytochemistry* **17**(11): 1821-1858.

-
- ⁴⁹ Alvarenga N, Ferro EA (2006) *Bioactive triterpenes and related compounds from Celastraceae*. In *Studies in Natural Products Chemistry*, Vol. 33 (Atta-ur-Rahman, Ed.). Amsterdão: Elsevier. pp. 239-307.
- ⁵⁰ Marini-Bettolo GB (1979) Un grupo particular de substancias naturales. Las fenoldienonas triterpenicas. *Revista Latinoamericana de Quimica* **10**(3): 97-104.
- ⁵¹ Kutney JP, Beale MH, Salisbury PJ, Stuart KL, Worth BR, Towsley PM, Chalmers WT, Nilsson K, Jacoli GC (1981) Isolation and characterization of natural products from plant tissue cultures of *Maytenus buchananii*. *Phytochemistry*, **20**(4): 653-657.
- ⁵² Gunaherath GMKB, Gunatilaka AAL (1983) Studies on terpenoids and steroids. Part 3. Structure and synthesis of a new phenolic D:A-Friedo-24-noroleanane triterpenoid, zeylasterone, from *Kokoona zeylanica*. *Journal of Chemical Society, Perkin Transactions 1* **24**: 2845-2847.
- ⁵³ Gunatilaka AAL, Nanayakkara NPD (1984) Studies on terpenoids and steroids-2; structures of two new tri- and tetra-oxygenated D:A Friedo-oleanan triterpenes from *Kokoona zeylanica*. *Tetrahedron* **40**(4): 805-809.
- ⁵⁴ Corsino J, Alécio AC, Ribeiro ML, França SC, Pereira AMS, Duarte IB, Furlan M (1998) Quantitative determination of maytenin and 22 β -hydroxymaytenin in callus of *Maytenus aquifolium* (Celastraceae) by reversed phase high performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis* **9**(5): 245-247.
- ⁵⁵ Kupchan SM, Hintz HPJ, Smith RM, Karim A, Cass MW, Court WA, Yatagai M (1974) Celacinnine, a novel macrocyclic spermidine alkaloid prototype. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **9**: 329-330.
- ⁵⁶ Beroza M (1953) Alkaloids from *Tripterygium wilfordii* Hood. The structure of wilforine, wilfordine, wilforgine and wilfortrine. *Journal of the American Chemical Society* **75**(1):44-49.
- ⁵⁷ Kuehne P, Guggisberg A, Hesse M (1997) 122. Synthesis and Chiroptical Properties of the 13-Membered Spermidine Alkaloids (-)-(S)-Celacinnine, (0)-(S)-Celabenzine, (-)-(S)-Celafurine and (+)-(S)-Viburinine. *Helvetica Chimica Acta* **80**(6): 1803-1809.
- ⁵⁸ Kupchan SM, Komoda Y, Court WA, Thomas GJ, Smith RM, Karim A, Gilmore CJ, Haltiwanger RC, Bryan RF (1972) Tumor inhibitors. LXXIII. Maytansine, a novel antileukemic ansa macrolide from *Maytenus ovatus*. *Journal of the American Chemical Society* **94**(4): 1354-1356.

-
- ⁵⁹ Hanka LJ, Barnett MS (1974) Microbial assays of maytansine and its homologues. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **6**(5): 651-652.
- ⁶⁰ Komoda Y, Kishi T (1980) *Maytansinoids*. In *Anticancer Agents Based on Natural Product Models* (Douros J, Cassady JM, Eds.). Nova Iorque: Academic Press. pp. 353-89.
- ⁶¹ Reider PJ, Roland DM (1984) *Maytansinoids*. In *The Alkaloids* (Brossi A, Ed.). Nova Iorque: Academic Press. pp. 71-156.
- ⁶² Smith Jr CR, Powell RG (1984) *Chemistry and pharmacology of maytansinoid alkaloids*. In *Alkaloids* (Pelletier SW, Eds.). Nova Iorque: John Wiley and Sons. pp. 149-204.
- ⁶³ Chari RVJ, Martell BA, Gross JL, Cook SB, Shah SA, Blättler WA, McKenzie SJ, Goldmacher VS (1992) Immunoconjugates containing novel maytansinoids: promising anticancer drugs. *Cancer Research* **52**(1): 127-131.
- ⁶⁴ Okamoto K, Harada K, Ikeyama S, Isawa S (1992) Therapeutic effect of ansamitocin targeted to tumor by a bispecific monoclonal antibody. *Japanese Journal of Cancer Research* **83**(7): 761-768.
- ⁶⁵ Liu C, Tadayoni BM, Bourret LA, Mattocks KM, Derr SM, Widdison WC, Kedersha NL, Ariniello PD, Goldmacher VS, Lambert JM, Blättler WA, Chari RVJ (1996) Eradication of large colon tumor xerografts by targeted delivery of maytansinoids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**(16): 8618-8623.
- ⁶⁶ Issell BF, Crooke ST (1978) Maytansine. *Cancer Treatment Reviews* **5**(4): 199-207.
- ⁶⁷ Lee KH, Nozaki H, Hall IH, Kasai R, Hirayama T, Suzuki H, Wu RY, Huang HC (1982) Antitumor agents, 60. Maytansine, an antileukemic principle from *Maytenus diversifolia*. *Journal of Natural Products* **45**(4): 509-510.
- ⁶⁸ Nozaki H, Suzuki H, Lee K-H, McPhail AT (1982) Structure and Stereochemistry of Maytenfolic Acid and Maytenfoliol, Two New Antileukemic Triterpenes from *Maytenus diversifolia*: X-Ray Crystal Structures. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **18**: 1048-1051.
- ⁶⁹ Vázquez LH, Palazon J, Navarro-Ocaña A (2012) *The Pentacyclic Triterpenes α,β -amyriins: A Review of Sources and Biological Activities*. In *Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health* (Rao V, Ed.) Rijeka: InTech Publishers. pp. 487-502.

-
- ⁷⁰ Kundu JK, Rouf ASS, Hossain N, Hasan CM, Rashid MA (2000) Antitumor activity of epifriedelanol from *Vitis trifolia*. *Fitoterapia*, **71**(5), 577-579.
- ⁷¹ Yang HH, Son JK, Jung B, Zheng M, Kim JR (2011) Epifriedelanol from the root bark of *Ulmus davidiana* inhibits cellular senescence in human primary cells. *Planta Medica* **77**(5): 441-449.
- ⁷² Mann A, Ibrahim K, Oyewale AO, Amupitan JO, Fatope MO, Okogun JI (2011) Antimycobacterial Friedelane-terpenoid from the Root Bark of *Terminalia avicennioides*. *American Journal of Chemistry* **1**(2): 52-55.
- ⁷³ Ghosha P, Mandala A, Chakrabortya M, Saha A (2010) Triterpenoids from *Quercus suber* and their antimicrobial and phytotoxic activities. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, **2**(4):714-721.
- ⁷⁴ Ogunnusi TA, Oso BA, Dosumu OO (2010) Isolation and antibacterial activity of triterpenes from *Euphorbia kamerunica* Pax. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* **4**(1): 158-167.
- ⁷⁵ Lu B, Liu L, Zhen X, Wu X, Zhang Y (2010) Anti-tumor activity of triterpenoid-rich extract from bamboo shavings (*Caulis bambusae* in Taeniam). *African Journal of Biotechnology* **9**(38): 6430-6436.
- ⁷⁶ Antonisamy P, Duraipandiyar V, I Savarimuthu (2011) Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of friedelin isolated from *Azima tetracantha* Lam. in mouse and rat models. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* **63**(8): 1070-1077.
- ⁷⁷ Gallo MBC, Sarachina MJ (2009) Biological activities of lupeol. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* **3**(1): 46-66.
- ⁷⁸ Khalid SA, Friedrichsen GM, Christensen SB, El Tahir A, Satti GM (2007) Isolation and characterization of pristimerin as the antiplasmodial and antileishmanial agent of *Maytenus senegalensis* (Lam.) Exell. *Arkivoc* **9**: 129-134.
- ⁷⁹ Rekshmyd'dharan S, Roy A (2013) Epicatechin- Nature's Extraordinary Therapeutic Agent: A Review. *International Journal PharmTech, Research* **5**(4): 1816-1822.
- ⁸⁰ Fraga CG, Oteiza PI (2011) Dietary flavonoids: Role of (-)-epicatechin and related procyanidins in cell signaling. *Free Radical Biology & Medicine* **51**(4): 813-823.

-
- ⁸¹ Gutierrez-Salmean G, Ciaraldi TP, Nogueira L, Barboza J, Taub PR, Hogan MC, Henry RR, Meaney E, Villarreal F, Ceballos G, Ramirez-Sanchez I (2014) Effects of (-)-epicatechin on molecular modulators of skeletal muscle growth and differentiation. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **25**(1): 91-94.
- ⁸² Nogueira L, Ramirez-Sanchez I, Perkins GA, Murphy A, Taub PR, Ceballos G, Villarreal FJ, Hogan MC, Malek MH (2011) (-)-Epicatechin enhances fatigue resistance and oxidative capacity in mouse muscle. *The Journal of Physiology* **589**(18): 4615-4631.
- ⁸³ Hüttemann M, Lee I, Perkins GA, Britton SL, Koch LG, Malek MH (2013) (-)-Epicatechin is associated with increased angiogenic and mitochondrial signalling in the hindlimb of rats selectively bred for innate low running capacity. *Clinical Science*. **124**(11): 663-674.
- ⁸⁴ da Rocha MB, Souza FV, dos Santos Estevam C, Pizza C, Sant'ana AE, Marçal RM (2012) Antispasmodic effect of 4'-methylepigallocatechin on guinea pig ileum. *Fitoterapia*, **83**(7): 1286-1290.
- ⁸⁵ Marçal RM, Rocha MB, Souza FVM, Estevam CS, Pizza C, Sant'ana AEG (2007) Investigations on the mechanisms of action of 4-methylepigallocatechin in the guinea-pig ileum. *Planta Medica* **73**(9): SL_029.
- ⁸⁶ Lou H, Li X, Zhu T, Li W (1993) Sinaptic acid esters and a phenolic glycoside from *Cynanchum hancockianum*. *Phytochemistry* **32**(5): 1283-1286.
- ⁸⁷ Shirota O, Morita H, Takeya K, Itokawa H (1998) Isolation of antitumor substance, dulcitol, from *Maytenus ebenifolia*. *Natural Medicines* **52**(2): 184-186.
- ⁸⁸ Serrano R, da Silva G, Silva O (2010) *Application of Light and Scanning Electron Microscopy in the Identification of Herbal Medicines*. In *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education* (Méndez-Vilas A, Díaz J, Eds.) Badajoz: Formatex. pp. 182-190.
- ⁸⁹ Valentão P, Andrade P, Seabra R (2005) *Capítulo 2 – Análise Macroscópica e Microscópica em Farmacognosia*. In *Farmacognosia e Fitoquímica* (Da Cunha AP, Ed). Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. pp. 17-35.
- ⁹⁰ Jackson BP, Snowdon DW (1968) *Powdered vegetable drugs: An Atlas of Microscopy for use in the Identification and Authentication of some Plant Materials employed as Medicinal Agents*. Londres: J. & A. Churchill Ltd.

-
- ⁹¹ Stahl E (1973) *Drug Analysis by Chromatography and Microscopy - A Practical Supplement to Pharmacopoeias*. Michigan: Ann Arbor Science Publishers.
- ⁹² De Oliveira F, Akisue G, Akisue MK (1998) *Farmacognosia*. São Paulo: Editora Atheneu.
- ⁹³ Upton R, Graff A, Jolliffe G, Länger R, Williamson E (2011) *Chapter 8: Diagnostic Characteristics of Tissues*. In *American Herbal Pharmacopoeia: Botanical Pharmacognosy – Microscopic Characterization of Botanical Medicines* (Upton R, Graff A, Jolliffe G, Länger R, Williamson E, Eds.). Boca Raton: CRC Press. pp. 130-154.
- ⁹⁴ European Directorate for the quality of medicines (2007) *European Pharmacopoeia*, 6th Ed. Estrasburgo: Council of Europe.
- ⁹⁵ Farias MR (1999) *Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais*. In *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*, 5^a edição (Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, de Mello JCP, Mentz, Petrovick PR, Eds.). Porto alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. pp. 262-88.
- ⁹⁶ Furr Y, Mahlberg PG (1981) Histochemical analysis of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products* **44**(2): 153-159.
- ⁹⁷ Ganter P, Jollés G (1969) *Histochimie normal et pathologic*. Paris: Gauthier-Villars Ed.
- ⁹⁸ Johansen DA (1940) *Plant microtechnique*. Nova Iorque: McGraw-Hill.
- ⁹⁹ Bronner R (1975) Simultaneous demonstration of lipids and starch in plant tissue. *Stain Technology* **50**(1): 1-4.
- ¹⁰⁰ Pearse AGE (1995) *Histochemistry: Theoretical and applied*. Edimburgo: Churchill Livingstone.
- ¹⁰¹ Ascensão L (2004) *Métodos histoquímicos em vegetais. Tópicos especiais em histoquímica vegetais*, Apostila 1. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. p. 22.
- ¹⁰² Brady OL, Elsmie GV (1926) The use of 2:4-dinitrophenylhydrazine as a reagent for aldehydes and ketones. *Analyst* **51**: 77-78.
- ¹⁰³ Saenger W (1984) The structure of the blue starch-iodine complex. *Naturwissenschaften* **71**(1): 31-36.
- ¹⁰⁴ Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **65**(1&2): 55-63.

-
- ¹⁰⁵ Serrano R, Gomes ET, Silva O (2008) Botanical characterization of *Maytenus senegalensis* leaf an African medicinal plant. *Planta Medica* **74**(9): 1131.
- ¹⁰⁶ Metcalfe CR, Chalk L (1950) *Anatomy of dicotyledons: leaves, stem, and woods in relation to taxonomy with notes on economic uses*. Oxford: Clarendon.
- ¹⁰⁷ Metcalfe CR, Chalk L (1981) *Anatomy of dicotyledons*, 2nd Ed. Oxford: Clarendon.
- ¹⁰⁸ Bernardi HH, Wasicky M (1959) Algumas pesquisas sobre a “Espinheira-santa” ou “Cancerosa” *Maytenus ilicifolia*, Martius, usada como remédio popular no Rio Grande do Sul. Santa Maria: Universidade Federal do Rio Grande do Sul Ed.
- ¹⁰⁹ Hlwatika CNM, Johnson CT, Bhat RB (1998) The foliar anatomy and morphology of two scrub species in relation to forest colonization of fynbos on Table Mountain (South Africa). *Biologia (Bratisl)* **53**(1): 73-80.
- ¹¹⁰ da Rocha CS, Pimentel RMM, Randau KP, Xavier HS (2004) Morfoanatomia de Folhas de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae); uma Espécie Utilizada Como Medicinal no Nordeste do Brasil. *Acta Farmacéutica Bonaerense* **23**(4): 472-476.
- ¹¹¹ Franceschi VR, Horner Jr HT (1980) Calcium oxalate crystals in plants. *The Botanical Review* **46**(4): 361-427.
- ¹¹² Beckman CH (2000) Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defense responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology* **57**(3): 101-110.
- ¹¹³ Scalbert A (1991) Antimicrobial properties of tannin. *Phytochemistry* **30**(12): 3875-3883.
- ¹¹⁴ Metcalfe CR, Chalk L (1983) *Anatomy of dicotyledons*, 2nd ed. Nova Iorque: Oxford University Press.
- ¹¹⁵ Dewick, PM (2009) *Medicinal Natural Products – A Biosynthetic Approach*. Chichester: Wiley. pp. 311-312.
- ¹¹⁶ Le Lamer A-C, Ibrahim N, Manjary F, Mallet-Ladeira S, Girardi C, Valentin A, Fabre N, Moulis C (2013) Macrocyclic Spermidine Alkaloids from *Androya decaryi* L. Perrier. *Molecules* **18**(4): 3962-3971.
- ¹¹⁷ Bienz S, Bisseger P, Guggisberg A, Hesse M (2005) Polyamine alkaloids. *Natural Product Reports* **22**: 647-658.

-
- ¹¹⁸ Nezbedová L, Drandarov K, Deschamps N, Werner C, Hesse M (2001) Biogenesis and function of macrocyclic spermine alkaloids. *Arkivoc* **8**: 154-164.
- ¹¹⁹ Kaur-Sawhney R, Tiburcio AF, Altabella T, Galston AW (2003) Polyamines in plants: An overview. *Journal of Cell and Molecular Biology* **2**: 1-12.
- ¹²⁰ Gomes SMA, Lombardi JA (2010) Leaf anatomy as a contribution to the taxonomy of Salacioideae N. Hallé ex Thorne & Reveal (Celastraceae). *Plant Systematics and Evolution* **289**(1&2): 13-33.
- ¹²¹ Barclay AS, Perdue Jr RE (1976) Distribution of anticancer activity in higher plants. *Cancer Treatment Reports* **60**(8): 1081-1113.
- ¹²² Cragg GM, Newman DJ (2005) Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology* **100**(1&2): 72-79.