

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

Clináscia Rodrigues Rocha Araújo

**Estudos Fitoquímicos, Biológicos e Avaliação da
Radiação Gama na Descontaminação Microbiana
e na Integridade dos Princípios Ativos da Casca
do Caule de *Luehea ochrophylla* MART**

Belo Horizonte

2016

UFMG/ICEx/DQ. 1183^a
T. 534^a

CLINÁSCIA RODRIGUES ROCHA ARAÚJO

**Estudos Fitoquímicos, Biológicos e Avaliação da
Radiação Gama na Descontaminação Microbiana
e na Integridade dos Princípios Ativos da Casca
do Caule de *Luehea ochrophylla* MART**

Tese apresentada ao
Departamento de Química
do Instituto de Ciências
Exatas da Universidade
Federal de Minas Gerais
como requisito parcial
para a obtenção do grau
de Doutor em Ciências –
Química.

Belo Horizonte

2016

A663e
2016
T

Araújo, Clináscia Rodrigues Rocha

Estudos fitoquímicos, biológicos e dos efeitos da radiação gama na descontaminação microbiana e na integridade dos princípios ativos das cascas do caule de *Luehea ochrophylla* MART [manuscrito] / Clináscia Rodrigues Rocha Araújo. 2016.
[xx], 181 f. : il.

Orientador: Antônio Flávio de Carvalho Alcântara.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais - Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Química orgânica - Teses 2. Produtos naturais - Efeito da radiação - Teses 3. Testes biológicos - Teses 4. Plantas medicinais - Teses I. Alcântara, Antônio Flávio de Carvalho, Orientador II. Título.

CDU 043

**"Estudos Fitoquímicos, Biológicos e dos Efeitos da Radiação Gama na
Descontaminação Microbiana e na Integridade dos Princípios Ativos das Cascas
do Caule de Luehea ochrophylla MART"**

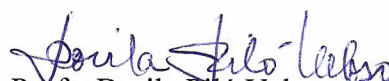
Clinascia Rodrigues Rocha Araujo

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Prof. Antônio Flávio de Carvalho Alcântara - Orientador
UFMG


Profa. Nisia Andrade Villela Dessimoni Pinto
UFVJM


Prof. Sandro Luiz Barbosa dos Santos
UFVJM


Profa. Dorila Piló Veloso
UFMG


Profa. Rosemeire Brondi Alves
UFMG

Belo Horizonte, 19 de dezembro de 2016.

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese primeiramente a Deus “porque d’Ele e por Ele, e para Ele, são todas as coisas; glória, pois, a Ele eternamente” (Romanos 11:36).

Ao meu querido marido Fernando Alves Araújo.

Aos meus amados pais Nair Rodrigues Rocha e Nilson Cassiano Rocha (*in memoriam*).

Ao meu querido orientador Dr. Antônio Flávio de Carvalho Alcântara.

AGRADECIMENTOS

Agradeço de todo o meu coração a Deus pela vida, pelo cuidado, por me permitir viver este sonho, por me capacitar e por estar comigo todos os dias.

Agradeço aos meus pais Nair Rodrigues Rocha e Nilson Cassiano Rocha (*in memoriam*) por sonharem com este momento antes mesmo que eu pudesse cogitar sua possibilidade. Agradeço a Deus por me presentear com vocês, melhores pais do mundo.

Agradeço aos meus irmãos Renata, Júnia, Nilson e Lincoln pela parceria e cooperação.

Agradeço imensamente ao meu marido, Fernando, pelo apoio, companheirismo e por sonhar comigo. Sem o seu incentivo isso não seria possível. Obrigada por fazer parte da minha vida.

Agradeço aos meus sogros e cunhados Sr. Ladico, Dona Helena, Crislaine, Leandro, Maíra, Selma, Adilson, Célia, Ronaldo, Sidney, Sílvio, Gilberto, Silas, Tânia e Érica. Em especial, agradeço à Silvana e Sandra pela amizade. “O amigo ama em todos os momentos; é um irmão na adversidade” (Provérbios 17:17).

Agradeço à Dona Dalila e Luciana pelo carinho, amizade e cuidado. Vocês são minha linda família em Belo Horizonte.

Ao Dr. Antônio Flávio de Carvalho Alcântara pela orientação, acolhimento, paciência e ensinamentos, além do enorme bom humor que permitiu que esta caminhada fosse menos árdua.

À Dra. Roqueline Rodrigues Silva pela disponibilidade, presença e amizade.

Ao Thiago pela amizade que se estende desde a graduação. Obrigada pelos conselhos e ensinamentos.

Ao Geone, Viviane, Alison pelos ensinamentos durante o tempo de convivência no laboratório.

À Náuvia e Cecília pelo companheirismo durante o curso.

Às estagiárias Brenda, Débora Martins, Camila, Débora Nérís, Mariana e Júlia por contribuírem para a realização deste trabalho.

À Bruna Terra e a Aura Blandón pela grande amizade e companheirismo. “Um olhar amigo consola e anima o coração.” (Provérbios 15:30).

À Vanessa Gontijo, Louise e Roberta por me suportarem durante todo este período.

Aos amigos do Gecob e Neplan pelo auxílio, socorro, amizade, guloseimas (rsrsrsr), cafés (que não foram poucos), conversas e risada. Obrigada pela boa convivência durante todo esse tempo. Todos vocês são especiais para mim!

À Karla Gusmão pela amizade, cuidado e carinho. Obrigada por sempre me incentivar a continuar.

Aos primos do laboratório 258 (Felipe, Breno, Virgílio, Marco e Lídia) pela ajuda, amizade, conversas, brincadeiras, geladeira (rsrsrsr).

Aos amigos da célula Liberdade por tornarem as minhas noites de sexta-feira mais felizes.

Aos professores do Departamento de Química da UFMG, em especial à profa. Dra. Rosemeire Brondi Alves pela orientação nas disciplinas de Estágio em Docência de Química, Ensinamentos Práticos de RMN, Química Orgânica Avançada I e Química Orgânica Avançada II. Obrigada pela disposição em ensinar e por se preocupar com o aprendizado do aluno.

À equipe do Herbário Dendrológico Jeanine Felfili (HDJF) do Departamento de Engenharia Florestal da Faculdade de Ciências Agrárias da UFVJM pelo recebimento de amostras do material vegetal.

À Amanda Rigueti Corrêa da Escola Nacional de Botânica Tropical – Instituto de Pesquisa Jardim Botânico (RJ) pela identificação do material vegetal.

Ao Dr. Márcio Tadeu Pereira e sua equipe do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN) pela irradiação do material vegetal.

À profa. Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi do Departamento de Química da UFMG pela valiosa colaboração nos ensaios microbiológicos.

Ao prof. Dr. Klaus Wilhelm Heinrich Krambrock do Departamento de Física da UFMG e à doutoranda Daniele Cristina Ferreira pela disponibilidade nas análises de RPE.

Ao Dr. Ezequias Pessoa de Siqueira Filho e ao Dr. Markus Kohlhoff do laboratório de Química de Produtos Naturais do Centro de Pesquisas René Rachou-Fiocruz (BH) pela disponibilidade nas análises de LC-DAD-MS, além das dicas e ensinamentos.

À profa. Dra. Elaine Maria de Souza-Fagundes do Instituto de Ciências Biológicas do Departamento de Fisiologia da UFMG pela valiosa colaboração nos ensaios de atividade antitumoral.

Ao professor Dr. Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo e à minha querida amiga Michaelle Santos do laboratório de Imunologia do Centro Integrado de Pós-Graduação e Pesquisa em Saúde da UFVJM pela valiosa colaboração nos ensaios anti-inflamatórios.

Ao Dr. Policarpo Ademar Sales Junior do laboratório de Parasitologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou-Fiocruz (BH) pela colaboração nos testes de atividade tripanocida.

À minha querida profa. Dra. Nísia Andrade Villela Dessimoni Pinto do laboratório de Biomassas do Cerrado da UFVJM pelo carinho, confiança e colaboração nas análises da atividade antioxidante.

À profa. Dra Lúcia Pinheiro Santos Pimenta e à querida Ana Cláudia Botelho Leite do laboratório de Químio e Bioprospecção de Plantas do Cerrado da UFMG também pelas análises de atividade de antioxidante.

À profa. Dra. Dalva Ester da Costa Ferreira do laboratório de Química Teórica do Departamento de Química da UFVJM pela colaboração nos cálculos teóricos.

À Dra. Vany Ferraz do laboratório de Cromatografia do Departamento de Química da UFMG pelos ensinamentos práticos sobre o HPLC e colaboração na análise dos ácidos graxos.

Às profa(s). Dra(s). Dorila Piló-Veloso, Henriete da Silva Vieira e Rosemeire Brondi Alves do Departamento de Química da UFMG pelas valiosas contribuições durante o exame de qualificação.

À Alessandra Dinotte, Paulete, Lilian, Fernanda e demais funcionários da Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Química da UFMG pela prontidão e presteza com que sempre me auxiliaram.

À equipe do LAREMAR/UFMG pela ajuda na obtenção dos espectros de RMN.

Aos porteiros do Departamento de Química da UFMG, em especial ao Sr. Luiz, pelo carinho e sorrisos com os quais fui recebida todos os dias.

“Do meu telescópio eu via Deus caminhar! A maravilha, a harmonia e a organização do universo só pode ter se efetuado conforme um plano de um Ser que tudo sabe e tudo pode. Isso fica sendo a minha última e mais elevada descoberta” (Isaac Newton).

Resumo

A espécie *Luehea ochrophylla* (Malvaceae) é uma árvore conhecida popularmente como “açóita-cavalo”. Representantes de *L. ochrophylla* são encontrados no Brasil, Paraguai e Argentina, sendo que, no Brasil, ocorrem nas regiões Norte, Nordeste e Sudeste. Sua casca é empregada no tratamento de inflamações, reumatismo e artrite, enquanto suas flores e folhas são utilizadas no tratamento da hemorragia, blenorragia, tosse e diarreia.

Diante dessas informações e da ausência de estudos disponíveis na literatura com representantes da espécie *L. ochrophylla*, este trabalho teve como objetivo realizar estudos fitoquímicos e ensaios farmacológicos para comprovar cientificamente as alegações populares de seu uso.

Para tanto, cascas do caule de *L. ochrophylla* foram adquiridas no Mercado Central de Belo Horizonte, tendo sido previamente coletadas em agosto de 2012, no Município de Esmeraldas (MG).

Após pulverização do material vegetal, procedeu-se à maceração em Hex e, posteriormente, em EtOH. Os extratos obtidos foram fracionados com solventes em ordem crescente de polaridade, utilizando como eluentes Hex, DCM, AcOEt, EtOH e MeOH.

Um extrato aquoso foi preparado também a partir da decocção com água da casca do caule, sendo, posteriormente, executada uma sequência metodológica para a obtenção das frações fenólica, saponínica e alcaloídica.

A investigação fitoquímica dos extratos e frações obtidas da casca do caule de *L. ochrophylla* proporcionou o isolamento, a partir do extrato hexânico, dos triterpenos friedelina, β -friedelinol, lupeol, pseudotaraxasterol e ácido betulínico, além do esteroide β -sitosterol. No extrato etanólico foram identificados os triterpenos taraxasterol e lupeol, além do esteroide β -sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo. Deste extrato, foram isolados também os flavonoides (-)-epicatequina e (+)-epicatequina-(4 β -8)-epicatequina, conhecida como procianidina B2. Com exceção do lupeol, β -sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo e (-)-epicatequina, todos os demais compostos foram descritos pela primeira vez para o gênero *Luehea*.

O estudo fitoquímico do extrato aquoso da casca do caule de *L. ochrophylla* foi realizado por análises em CLAE preparativa. Como resultado, foi isolado e identificado o ácido *trans*-aconítico.

Como parte dos estudos com *L. ochrophylla* foram realizadas análises para identificar a dosagem de radiação gama suficiente para promover a descontaminação microbiológica e as

possíveis alterações químicas após exposição a este tipo de radiação. Como resultado, verificou-se que a incidência de radiação gama em doses iguais ou superiores a 5,0 kGy foi suficiente para a total eliminação de *Lecythophora decumbens* e *Eurotium chevalieri* L. Mangin, espécies de fungos encontradas na casca do caule do vegetal estudado. Foi verificado que a maioria dos fitoconstituintes da fração fenólica teve sua concentração diminuída quando o material vegetal foi exposto até mesmo à menor dose de radiação gama utilizada (1,0 kGy). O ácido *trans*-aconítico foi o mais afetado pela radiação gama com redução de 95,38% em relação à concentração apresentada por amostras não irradiadas. Foi verificado que a radiação gama promove a hidratação do ácido *trans*-aconítico com consequente formação dos ácidos cítrico e isocítrico, sendo necessária a presença concomitante da água durante a exposição a essa radiação ionizante.

Em relação aos estudos farmacológicos, a fração em acetato de etila (FA) apresentou, *in vitro*, inibição da proliferação de linfócitos semelhante à inibição apresentada pela Dexametasona (padrão positivo). Além disso, extrato hexânico (EH), FA e o ácido betulínico promoveram a reestruturação das fibras musculares e diminuíram as regiões de edema e infiltrado inflamatório quando em análise da atividade anti-inflamatória tópica *in vivo*. Estas observações confirmam a atividade anti-inflamatória alegada etnofarmacologicamente. Uma importante e promissora atividade antitumoral foi apresentada pelo β -sitosterol-3-O- β -D-glicopiranosídeo frente à linhagem de células de cânceres de cólon e reto. O extrato etanólico (EE) apresentou atividade contra os microrganismos *Staphylococcus sanguinis*, *Salmonella typhimurium* e *Candida albicans*. A casca do caule de *L. ochrophylla* apresentou também atividade antioxidante semelhante à atividade apresentada pelo ácido ascórbico utilizado como padrão positivo.

Palavras-chave: *Luehea ochrophylla*, triterpenos, esteroides, flavonoide, radiação gama, atividade anti-inflamatória, atividade antimicrobiana e atividade antioxidante.

Abstract

Luehea ochrophylla (Malvaceae) is a tree known popularly as "açoita-cavalo." Representatives of *L. ochrophylla* are found in Brazil, Paraguay, and Argentina. In Brazil, *Luehea ochrophylla* occurs in the North, Northeast, and Southeast regions. Its bark is used in the treatment of inflammations, rheumatism and arthritis, while its flowers and leaves are used to treat bleeding, gonorrhea, cough, and diarrhea.

Considering these informations and the lack of studies about *L. ochrophylla*, this present work aimed perform phytochemical studies and pharmacological essay to prove scientifically its popular use.

L. ochrophylla stem bark was acquired in Belo Horizonte Central Market, having been collected in August 2012 in the city of Esmeraldas (MG).

After grinding of the plant material, it was performed the maceration with hexane and posteriorly ethanol. The extracts obtained were fractionated using solvents in order of increasing polarity using hexane, DCM, EtOAc, EtOH, and MeOH as eluents.

An aqueous extract was also prepared from the decoction with water of the stem bark, being posteriorly performed a methodological sequence to obtain the phenolic, saponinic, and alkaloidal fractions.

Phytochemical investigation of the hexane extract obtained from stem bark of *L. ochrophylla* provides isolation of triterpenoids friedelin, β -friedelinol, lupeol, pseudotaraxasterol, and betulinic acid in addition to β -sitosterol. From the ethanolic extract were identified triterpenes lupeol and taraxasterol besides the β -sitosterol-3-*O*- β -D-glucopyranoside steroid. From this extract, the flavonoids (-)-epicatechin and (+)-epicatechin-(4 β -8)-epicatechin, known as procyanidin B2, were also isolated. With exception of lupeol, β -sitosterol-3-*O*- β -D-glucopyranoside, and (-)-epicatechin, all compounds were first described for *Luehea* genus.

The phytochemical study of aqueous extract of stem bark of *L. ochrophylla* was performed by preparative HPLC analysis. As a result, was isolated and identified the *trans*-aconitic acid.

L. ochrophylla analyzes were performed to verify sufficient gamma radiation dosage to promote the microbiological decontamination and possible chemical changes after use of gamma rays. As a result, it was noticed that the incidence of gamma radiation at doses equal to or greater than 5.0 kGy had to be sufficient for the total elimination of *Lecythophora*

decumbens and *Eurotium chevalieri* L. Mangin, fungi species predominant in stem bark of plant studied. It was found that most of phytochemicals of the phenolic fraction had its concentration decreased when the plant material was exposed to even the smallest dose of radiation used range (1.0 kGy). The *trans*-aconitic acid was the most affected by gamma radiation with a reduction of 95.38% over the concentration by non-irradiated samples. It has been proposed that gamma radiation promotes hydration of the *trans*-aconitic acid to citric and isocitric acids by radical and ionic reactions, requiring the concomitant presence of the water during this exposure to ionizing radiation.

The fraction in ethyl acetate (**FA**) showed anti-inflammatory activity, *in vitro*, similar to activity presented by dexamethasone (positive pattern). In addition, hexane extract (**EH**), **FA** and betulinic acid promoted the restructuring of muscle fibers and decreased edema and inflammatory infiltrate regions when analyzing the topical anti-inflammatory activity *in vivo*. These observations confirm the anti-inflammatory activity ethnopharmacological alleged. An important and promising antitumor activity was presented by β -sitosterol-3-*O*- β -D-glucopyranoside for the line of colorectal cancers cells. Ethanol extract (**EE**) showed activity against *Staphylococcus sanguinis*, *Salmonella typhimurium* e *Candida albicans*. The *L. ochrophylla* of stem bark also showed antioxidant activity similar to activity presented by ascorbic acid used as a positive standard.

Keywords: *Luehea ochrophylla*, triterpenes, steroids, flavonoid, gamma radiation, anti-inflammatory, antimicrobial and antioxidant activities.

LISTA DE FIGURAS

Figura I.1. Representantes do gênero <i>Luhea</i> : <i>L. divaricata</i> (A), <i>L. candida</i> (B), <i>L. paniculata</i> (C e D), <i>L. grandiflora</i> (E)	6
Figura I.2. Estrutura química de fitoconstituintes isolados de espécies do gênero <i>Luehea</i> : ácido 3 β - <i>p</i> -hidroxibenzoil tormêntico (1), ácido maslínico (2), vitexina (3), sitosterol glicosilado (4), (-)-epicatequina (5), estigmasterol (6), lupeol (7), α -amirina (8), β -amirina (9), 3-acetato- β -amirina (10), lupenona (11), ácido oleanólico (12), rutina (13), quercetina (14) e (+)-catequina (15)	8
Figura I.3. Distribuição geográfica de <i>L. ochrophylla</i> no Brasil	7
Figura I.4. Folhas, flores, frutos e árvores de <i>L. ochrophylla</i>	9
Figura II.1. Estrutura química da morfina (16), digitoxina (17) e digoxina (18)	11
Figura II.2. Estrutura química da vimblastina (19), vincristina (20) e paclitaxel (21)	12
Figura II.3. Cromatograma de CLAE a 280 nm de FF (TR entre 0,0 e 20 min); concentração A:B (1:4), onde A = metanol e B = solução água:ácido trifluoracético 99,5:0,5	28
Figura II.4. Foto dos resultados obtidos para os testes de prospecção fitoquímica. Presença de triterpenos em EH (A), flavonoides em EE (B), saponinas em EE (C), saponinas em FS (D) e compostos fenólicos em FF (E)	29
Figura III.1. UFCs existentes na amostra não submetida à radiação gama (0,0 kGy) e nas amostras submetidas a doses de 1,0, 3,0, 5,0, 10,0 e 20,0 kGy	65
Figura III.2. Espectros de RPE da casca do caule de <i>L. ochrophylla</i> submetida a diferentes doses de radiação gama	66
Figura III.3. Concentração de radicais livres na casca do caule de <i>L. ochrophylla</i> em função da dose de radiação gama (A). Curva do decaimento com o tempo (h) do sinal de RPE para a casca do caule de <i>L. ochrophylla</i> irradiada a 20,0 kGy (B)	67
Figura III.4. Cromatograma de CLAE a 280 nm de FF ₀ (TR entre 0,0 e 20 min); Concentração A:B (1:4), onde A = metanol e B = solução água:ácido trifluoracético 99,5:0,5	68
Figura III.5. (A) Sobreposição total dos cromatogramas de CLAE a 280 nm de FF ₀ , FF ₁ , FF ₃ , FF ₅ , FF ₁₀ e FF ₂₀ (TR entre 0,0 e 20,0 min); (B) Sobreposição parcial dos cromatogramas de CLAE a 280 nm de FF ₀ , FF ₁ , FF ₃ , FF ₅ , FF ₁₀ e FF ₂₀ (TR entre 0,0 e 20,0 min); Concentração A:B (1:4), onde A = metanol e B = solução água:ácido trifluoracético 99,5:0,5	69
Figura III.6. Gráficos da variação da área de picos dos cromatogramas de CLAE a 280 nm de FF em função da dose de radiação gama	70
Figura III.7. Cromatograma de CLAE a 210 nm de FS (TR entre 0,0 e 15,0 min); Concentração	

A:B (3:7), onde A = metanol e B = solução água:ácido trifluoracético 99,5:0,5	71
Figura III.8. (A) Sobreposição total dos cromatogramas de CLAE a 210 nm de FS₀ , FS₁ , FS₃ , FS₅ , FS₁₀ e FS₂₀ (TR entre 0,0 e 15,0min); (B) Sobreposição parcial dos cromatogramas de CLAE a 210 nm de FS₀ , FS₁ , FS₃ , FS₅ , FS₁₀ e FS₂₀ (TR entre 0,0 e 15,0min); Concentração A:B (3:7), onde A = metanol e B = solução água:ácido trifluoracético 99,5:0,5	72
Figura III.9. Gráfico da variação das áreas do pico 2 nos cromatogramas de CLAE a 210 nm de FS em função da dose de radiação gama	73
Figura III.10. Cromatograma de CLAE a 280 nm da amostra controle (TS₀) do ácido <i>trans</i> -aconítico (TR entre 0,0 e 7,0 min); concentração A:B (1:4), onde A = metanol e B = solução água:ácido trifluoracético 99,5:0,5	74
Figura III.11. (A) Sobreposição total dos cromatogramas de CLAE a 280 nm de amostras sólidas do ácido <i>trans</i> -aconítico (TS₀ , TS₁ , TS₃ , TS₅ , TS₁₀ e TS₂₀ ; TR entre 0,0 e 7,0 min); (B) Sobreposição parcial dos cromatogramas de CLAE a 280 nm de amostras sólidas do ácido <i>trans</i> -aconítico (TS₀ , TS₁ , TS₃ , TS₅ , TS₁₀ e TS₂₀ ; TR entre 0,0 e 7,0 min); Concentração A:B (1:4), onde A = metanol e B = solução água:ácido trifluoracético 99,5:0,5	75
Figura III.12. Gráficos da variação das áreas do pico em amostras do ácido <i>trans</i> -aconítico sólido em função da dose de radiação gama. Barras seguidas por mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5%	75
Figura III.13. Espectros de RPE do ácido <i>trans</i> -aconítico irradiado em forma sólida em função da dose de radiação gama (A); Espectros de RPE do ácido <i>trans</i> -aconítico irradiado em solução aquosa em função da dose de radiação gama (B)	76
Figura III.14. Estruturas de ressonância para um dos radicais formados pela irradiação do ácido <i>trans</i> -aconítico	77
Figura III.15. Cromatograma de CLAE a 280 nm de TA₀ (TR entre 0,0 e 7,0 min); Concentração A:B (1:4), onde A = metanol e B = solução água:ácido trifluoracético 99,5:0,5	78
Figura III.16. (A) Sobreposição total dos cromatogramas de CLAE a 280 nm de amostras solubilizadas em água do ácido <i>trans</i> -aconítico (TA₀ , TA₁ , TA₃ , TA₅ , TA₁₀ e TA₂₀ ; TR entre 0,0 e 7,0 min); (B) Sobreposição parcial dos cromatogramas de CLAE a 280 nm de amostras solubilizadas em água do ácido <i>trans</i> -aconítico (TA₀ , TA₁ , TA₃ , TA₅ , TA₁₀ e TA₂₀ ; TR entre 0,0 e 7,0 min); Concentração A:B (1:4), onde A = metanol e B = solução água:ácido trifluoracético 99,5:0,5.....	78
Figura III.17. Gráfico da variação da área de picos do ácido <i>trans</i> -aconítico solubilizado em água e irradiado em função da dose de radiação gama. Barras seguidas por letras diferentes são diferentes significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5%	79
Figura III.18. Espectros de RMN de ¹ H [400 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆] do ácido <i>trans</i> -aconítico submetido a diferentes doses de radiação em meio aquoso	81

Figura III.19. Energia livre calculada, nível de cálculo B3LYP/6-31++G(d,p), na adição de uma molécula de água ao ácido <i>trans</i> -aconítico no estado gasoso e não considerando interações intermoleculares	82
Figura III.20. Energia livre calculada, nível de cálculo B3LYP/6-31++G(d,p), na adição de $\cdot\text{H}$ seguida da adição do $\cdot\text{OH}$ aos radicais terciário (a) e secundário (b) com formação do ácido cítrico e isocítrico, respectivamente	82
Figura III.21. Energia livre calculada, nível de cálculo B3LYP/6-31++G(d,p), na adição de ^+H seguida da adição do $\cdot\text{OH}$ ao carbocátion terciário (a) e secundário (b) com formação do ácido cítrico e isocítrico, respectivamente	83
Figura III.22. Variação de energia livre calculada, nível de cálculo B3LYP/6-31++G(d,p), na adição de $\cdot\text{H}$ à molécula do ácido <i>trans</i> -aconítico e formação de radicais terciário e secundário (A); na adição de $\text{HO}\cdot$ à molécula do ácido <i>trans</i> -aconítico e formação de radicais terciário e secundário (B); na adição de H^+ à molécula do ácido <i>trans</i> -aconítico e formação de carbocátions terciário e secundário (C)	84
Figura IV.1. Estrutura química da cisplatina (33)	87
Figura IV.2. Ciclo de vida do protozoário <i>T. cruzi</i> nos diferentes hospedeiros. Contaminação do barbeiro (1); Formas tripomastigotas no estômago do barbeiro (2); Diferenciação de tripomastigotas em epimastigotas (3); Multiplicação de epimastigotas por divisão binária (4); Diferenciação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos no intestino posterior (5); Deposição a forma tripomastigota metacíclica sobre a pele do mamífero através da urina e fezes (6 e 7); Fagocitose de tripomastigotas metacíclicos por macrófagos (8 e 9); Diferenciação de tripomastigotas em amastigotas e lise do vacúolo (10); Multiplicação de amastigota por divisão binária (11); Diferenciação de amastigotas e rompimento da célula (12, 13 e 14); Tripomastigotas (15a) e amastigotas (15b) infectando novas células.....	92
Figura IV.3. Estrutura química do Nifurtimox (34) e do Benzonidazol (35)	93
Figura IV.4. Sequência de procedimentos utilizados para a análise de proliferação celular pela diluição do VPD450. O gráfico de distribuição pontual FSC-H x FSC-A foi utilizado para selecionar os <i>singlets</i> celulares (A), seguido da obtenção de gráfico de distribuição pontual FSC-H x SSC-A utilizado para a seleção da população de linfócitos nas culturas (B). Em seguida, foram utilizados histogramas de VPD450 <i>versus</i> número de eventos para definir as regiões M1 a M7, com os quais foi obtido o índice de proliferação (IP) para a população de linfócitos. Os histogramas C e D representam cultura não estimulada (controle) e cultura estimulada com PHA..	101
Figura IV.5. Animal anestesiado sendo submetido ao mecanismo gerador da lesão por impacto (A); Animais após tricotomia em região glútea bilateral (B) e animal anestesiado e submetido a tratamento com ultra-som terapêutico (C)	104

Figura IV.6. Efeito do extrato EE e frações FA e FE da casca do caule de <i>L. ochrophylla</i> sobre a viabilidade celular, após 24 horas de cultura. Percentual de PBMC viáveis nas culturas controle, DMSO e nas culturas tratadas com o EE , FA e FE da casca do caule de <i>L. ochrophylla</i> em diferentes concentrações, avaliado por exclusão com azul de Tripán, utilizando câmara de Neubauer (n = 6). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (DP) da viabilidade nos diferentes grupos. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$, Kruskal-Wallis com <i>post hoc</i> de Dunns) são identificadas pelas letras “a” e “b”, para as comparações em relação às culturas controle (CON) e DMSO, respectivamente	110
Figura IV.7. Efeito do extrato EE e frações FA e FE da casca do caule de <i>L. ochrophylla</i> sobre a viabilidade celular, após 5 dias de cultura. Percentual de PBMC viáveis nas culturas controle, DMSO e nas culturas tratadas com o EE , FA e FE da casca do caule de <i>L. ochrophylla</i> em diferentes concentrações, avaliado por exclusão com azul de Tripán, utilizando câmara de Neubauer (n = 6). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão da viabilidade nos diferentes grupos. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$, Kruskal-Wallis com <i>post hoc</i> de Dunns) são identificadas pelas letras “a” e “b”, para as comparações em relação às culturas controle (CON) e DMSO, respectivamente.	111
Figura IV.8. Índice de proliferação de linfócitos em culturas não estimuladas (controle negativo - CON), culturas estimuladas com PHA e tratadas com Dexametasona 15 µM (controle positivo). EE , FA , FE da casca do caule de <i>L. ochrophylla</i> . Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão da inibição da proliferação celular nos diferentes grupos. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são identificadas pelas letras “a” e “b”, para as comparações em relação às culturas PHA e DMSO, respectivamente. Método estatístico utilizado – ANOVA seguido por Tukey.....	112
Figura IV.9. Histograma representativo da análise da proliferação celular em culturas estimuladas com PHA (A) e tratadas com Dexametasona (B) e concentrações de 50,0 e 25,0 µg/mL (C e D, respectivamente) de FA da casca do caule de <i>L. ochrophylla</i>	113
Figura IV.10. Aspecto histológico de patas de ratos sem tratamento e após 24 h da injúria muscular (grupo controle negativo). Regiões de infiltrado inflamatório, edema e degeneração de fibras musculares são indicadas pelas setas.	114
Figura IV.11. Fotomicrografias (objetiva 10x) de histologia de tecido subcutâneo da pata de rato não submetido a tratamento e submetido a tratamento com dexametasona, EH , FA , β -sitosterol, ácido betulínico, (-)-epicatequina e β -sitosterol-3-O- β -D-glicopiranosídeo após 24, 48 e 72 h	117

Figura A1. Espectro de absorção na região do infravermelho do composto 22 (KBr, cm^{-1}): friedelina	143
Figura A2. Espectro de RMN de ^1H [200 MHz; CDCl_3] do composto 22 : friedelina	143
Figura A3. Espectro de RMN de ^{13}C [50 MHz; CDCl_3] do composto 22 : friedelina	144
Figura A4. Subespectro de DEPT 135 [50 MHz; CDCl_3] do composto 22 : friedelina	144
Figura A5. Espectro de absorção na região do infravermelho do composto 23 (KBr, cm^{-1}): β - friedelinol	145
Figura A6. Espectro de RMN de ^1H [400 MHz; CDCl_3] do composto 23 : β -friedelinol	145
Figura A7. Espectro de RMN de ^{13}C [100 MHz; CDCl_3] do composto 23 : β -friedelinol	146
Figura A8. Subespectro de DEPT 135 [100 MHz; CDCl_3] do composto 23 : β -friedelinol	146
Figura A9. Espectro de absorção na região do infravermelho do composto 24 (KBr, cm^{-1}): lupeol.....	147
Figura A10. Espectro de RMN de ^1H [200 MHz; CDCl_3] do composto 24 : lupeol	147
Figura A11. Espectro de RMN de ^{13}C [50 MHz; CDCl_3] do composto 24 : lupeol	148
Figura A12. Subespectro de DEPT 135 [50 MHz; CDCl_3] do composto 24 : lupeol	148
Figura A13. Espectro de absorção na região do infravermelho de EH-G4-3 (KBr, cm^{-1}): lupeol (24) e pseudotaraxasterol (25)	149
Figura A14. Espectro de RMN de ^1H [400 MHz; CDCl_3] de EH-G4-3: lupeol (24) e pseudotaraxasterol (25)	149
Figura A15. Espectro de RMN de ^{13}C [100 MHz; CDCl_3] de EH-G4-3: lupeol (24) e pseudotaraxasterol (25)	150
Figura A16. Subespectro de DEPT 135 [100 MHz; CDCl_3] de EH-G4-3: lupeol (24) e pseudotaraxasterol (25)	150
Figura A17. Espectro de absorção na região do infravermelho do composto 26 (KBr, cm^{-1}): β - sitosterol	151
Figura A18. Espectro de RMN de ^1H [200 MHz; CDCl_3] do composto 26 : β -sitosterol	151
Figura A19. Espectro de RMN de ^{13}C [50 MHz; CDCl_3] do composto 26 : β -sitosterol	152
Figura A20. Subespectro de DEPT 135 [50 MHz; CDCl_3] do composto 26 : β -sitosterol	152
Figura A21. Espectro de absorção na região do infravermelho do composto 27 (KBr, cm^{-1}): ácido betulínico	153
Figura A22. Espectro de RMN de ^1H [400 MHz; CDCl_3 e $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$] do composto 27 : ácido betulínico	153
Figura A23. Espectro de RMN de ^{13}C [100 MHz; CDCl_3 e $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$] do composto 27 : ácido betulínico	154
Figura A24. Subespectro de DEPT 135 [400 MHz; CDCl_3 e $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$] do composto 27 : ácido betulínico	154

Figura A25. Espectro de absorção na região do infravermelho de EE-FD-3: lupeol (24) e taraxasterol (28)	155
Figura A26. Espectro de RMN de ^1H [400 MHz; CDCl_3] de EE-FD-3: lupeol (24) e taraxasterol (28)	155
Figura A27. Espectro de RMN de ^{13}C [100 MHz; CDCl_3] de EE-FD-3: lupeol (24) e taraxasterol (28)	156
Figura A28. Subespectro de DEPT 135 [100 MHz; CDCl_3] de EE-FD-3: lupeol (24) e taraxasterol (28)	156
Figura A29. Espectro de absorção na região do infravermelho do composto 29 (ATR, cm^{-1}): (-)-epicatequina	157
Figura A30. Espectro de RMN de ^1H [400 MHz; CD_3OD] a 40 °C do composto 29 : (-)-epicatequina	157
Figura A31. Espectro de RMN de ^{13}C [100 MHz; CD_3OD] do composto 29 : (-)-epicatequina ...	158
Figura A132. Subespectro de DEPT 135 do composto 29 [100 MHz; CD_3OD]: (-)-epicatequina	158
Figura A33. Mapa de contornos HSQC do composto 29 [400 MHz; CD_3OD]: (-)-epicatequina .	159
Figura A34. Expansão do mapa de contornos HSQC do composto 29 [400 MHz; CD_3OD]: (-)-epicatequina	159
Figura A35. Mapa de contornos HMBC do composto 29 [400 MHz; CD_3OD]: (-)-epicatequina.	160
Figura A36. Expansão do mapa de contorno HMBC do composto 29 [400 MHz; CD_3OD]: (-)-epicatequina	160
Figura A37. Mapa de contornos COSY do composto 29 [400 MHz; CD_3OD]: (-)-epicatequina .	161
Figura A38. Mapa de contornos NOESY do composto 29 [400 MHz; CD_3OD]: (-)-epicatequina	161
Figura A39. Espectro de HR-ESI-MS-(+) do composto 29 : (-)-epicatequina	162
Figura A40. Espectro de absorção na região do infravermelho do composto 30 (ATR, cm^{-1}): β -sitosterol-3- <i>O</i> - β -D-glicopiranosídeo.....	162
Figura A41. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 30 [100 MHz; $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$]: β -sitosterol-3- <i>O</i> - β -D-glicopiranosídeo	163
Figura A42. Subespectro de DEPT 135 do composto 30 [100 MHz; $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$]: β -sitosterol-3- <i>O</i> - β -D-glicopiranosídeo	163
Figura A43. Espectro de RMN de ^1H do composto 30 [400 MHz; $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$]: β -sitosterol-3- <i>O</i> - β -D-glicopiranosídeo	164
Figura A44. Mapa de contornos HSQC de 30 [400 MHz; $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$]: β -sitosterol-3- <i>O</i> - β -D-glicopiranosídeo	164

Figura A45. Mapa de contornos HMBC de 30 [400 MHz; C ₅ D ₅ N]: β -sitosterol-3- <i>O</i> - β -D-glicopiranosídeo	165
Figura A46. Espectro de absorção na região do infravermelho do composto 31 (ATR, cm ⁻¹): (+)-epicatequina-(4 β -8)-epicatequina	165
Figura A47. Espectro de RMN de ¹³ C [100 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆] do composto 31 : (+)-epicatequina-(4 β -8)-epicatequina	166
Figura A48. Subespectro de DEPT 135 do composto 31 [100 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆]: (+)-epicatequina-(4 β -8)-epicatequina	166
Figura A49. Espectro de RMN de ¹ H [400 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆] do composto 31 : (+)-epicatequina-(4 β -8)-epicatequina	167
Figura A50. Mapa de contornos HSQC do composto 31 [400 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆]: (+)-epicatequina-(4 β -8)-epicatequina	167
Figura 51. Mapa de contornos HMBC do composto 31 [400 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆]: (+)-epicatequina-(4 β -8)-epicatequina	168
Figura A52. Mapa de contornos COSY do composto 31 [400 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆]: (+)-epicatequina-(4 β -8)-epicatequina	168
Figura A53. Mapa de contornos NOESY do composto 31 [400 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆]: (+)-epicatequina-(4 β -8)-epicatequina	169
Figura A54. Espectro de HR-ESI-MS-(+) do composto 31 : (+)-epicatequina-(4 β -8)-epicatequina	169
Figura A55. Espectro de absorção na região do infravermelho do composto 32 (ATR, cm ⁻¹): ácido <i>trans</i> -aconítico	170
Figura A56. Espectro de RMN de ¹ H do composto 32 [400 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆]: ácido <i>trans</i> -aconítico	170
Figura A57. Espectro de RMN de ¹³ C [100 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆] do composto 32 : ácido <i>trans</i> -aconítico	171
Figura A58. Subespectro de DEPT 135 do composto 32 (100 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆): ácido <i>trans</i> -aconítico	171
Figura A59. Mapa de contornos HSQC de 32 [400 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆]: ácido <i>trans</i> -aconítico	172
Figura A60. Mapa de contornos HMBC de 32 [400 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆]: ácido <i>trans</i> -aconítico	172

Figura A61. Cromatograma de CLAE com a sobreposição de FF (A) a 280 nm com o padrão de ácido <i>trans</i> -aconítico (B) (TR = 2,8 min)	174
Figura A62. Cromatograma CLAE a 210 nm do solvente (água) utilizado na diluição das amostras FS	175
Figura A63. Cromatogramas de LC/MS de TA₀ , TA₁ , TA₃ , TA₅ , TA₁₀ e TA₂₀ (TR entre 0,0 e 20,0 min); Condição de análise: 0,0 a 13,0 min, concentração inicial A → B (9,5 → 0,5), 13,01 a 14,0 min, concentração A:B (100,0: 0,0), 14,01 a 20,0, concentração A:B (9,5:0,5).....	177

LISTA DE TABELAS

Tabela II.1. Frações e grupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EH da casca do caule de <i>L. ochrophylla</i>	17
Tabela II.2. Frações e subgrupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EH-G3	18
Tabela II.3. Frações e subgrupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EH-G4	18
Tabela II.4. Frações e subgrupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EH-G5	19
Tabela II.5. Frações e subgrupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EH-G6	20
Tabela II.6. Frações e grupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EE ...	20
Tabela II.7. Frações e subgrupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EE-FD	21
Tabela II.8. Frações e subgrupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EE-FA	22
Tabela II.9. Frações e subgrupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EE-FA-2	22
Tabela II.10. Frações e subgrupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EE-FA-2-2	23
Tabela II.11. Frações e subgrupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EE-FA-4	23
Tabela II.12. Frações e subgrupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EE-FA-4-3	24
Tabela II.13. Frações e subgrupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EE-FA-4-3b	24
Tabela II.14. Frações e subgrupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EE-FA-4-3b3	24
Tabela II.15. Frações e subgrupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EE-FA-5	25
Tabela II.16. Frações e subgrupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EE-FE-Ac	25
Tabela II.17. Frações e subgrupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EE-FE-Ac-2	26
Tabela II.18. Composição relativa (%) de ácidos graxos da casca do caule de <i>L. ochrophylla</i> ..	30

Tabela II.19. Dados de RMN de ^{13}C do composto 22 e dados descritos na literatura para a friedelina	31
Tabela II.20. Dados de RMN de ^{13}C do composto 23 e dados descritos na literatura para o β -friedelinol	33
Tabela II.21. Dados de RMN de ^{13}C do composto 24 e dados descritos na literatura para o lupeol	35
Tabela II.22. Dados de RMN de ^{13}C dos compostos presentes na fração EH-G4-3 e dados descritos na literatura para o lupeol e pseudotaraxasterol	37
Tabela II.23. Dados de RMN de ^{13}C do composto 26 e dados descritos na literatura para o β -sitosterol	39
Tabela II.24. Dados de RMN de ^{13}C do composto 27 e dados descritos na literatura para o ácido betulínico	41
Tabela II.25. Dados de RMN de ^{13}C dos compostos presentes na fração EE-FD-3 e dados descritos na literatura para o lupeol e taraxasterol	43
Tabela II.26. Dados de RMN de ^{13}C do composto 29 e dados descritos na literatura para a (-)-epicatequina	46
Tabela II.27. Dados de RMN de ^{13}C do composto 30 e dados descritos na literatura para o β -sitosterol-3- <i>O</i> - β -D-glicopiranosídeo	49
Tabela II.28. Dados de RMN de ^{13}C do composto 31 e dados descritos na literatura para a epicatequina-(4 β -8)-epicatequina	52
Tabela II.29. Dados de RMN de ^{13}C do composto 32 e dados descritos na literatura para o ácido <i>trans</i> -aconítico	54
 Tabela III.1. Valores em UFC/mL e UFC/g para amostras submetidas a diferentes doses de radiação gama	64
Tabela III.2. Dados de CLAE (tempo de retenção e área relativa) a 280 nm da amostra FF₀	68
Tabela III.3. Dados de CLAE (tempo de retenção e área relativa) a 210 nm da amostra FS₀	72
 Tabela IV.1. Concentrações do extrato EE e frações FA e FE da casca do caule de <i>L. ochrophylla</i> utilizada nas culturas de viabilidade	99
Tabela IV.2. Concentração dos géis a partir das amostras de <i>L. ochrophylla</i>	102
Tabela IV.3. Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) do β -sitosterol-3- <i>O</i> - β -D-glicopiranosídeo e lupeol frente a células MDA-MB-231 e MCF-7 (carcinomas mamários), HCT-116 (carcinoma de cólon e reto) e Vero (não tumorais)	106
Tabela IV.4. Atividade tripanocida <i>in vitro</i> de extratos, frações e algumas substâncias isoladas da casca do caule de <i>L. ochrophylla</i>	118

Tabela IV.5. CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) de extratos e frações da casca do caule de <i>L. ochrophylla</i> contra microrganismos	119
Tabela IV.6. Valores de CI_{50} para a captura de radicais livres por extratos e frações de <i>L. ochrophylla</i>	119
Tabela A1. Dados de CLAE (tempo de retenção e área dos picos) a 280 nm das frações fenólicas expostas à diferentes doses de radiação gama: FF₀ , FF₁ , FF₃ , FF₅ , FF₁₀ e FF₂₀	174
Tabela A2. Dados de CLAE (tempo de retenção e área dos picos) a 210 nm das frações saponínicas expostas a diferentes doses de radiação gama: FS₀ , FS₁ , FS₃ , FS₅ , FS₁₀ e FS₂₀	175
Tabela A3. Média das áreas dos picos referentes ao ácido <i>trans</i> -aconítico não solubilizado e irradiado	175
Tabela A4. Média das áreas dos picos referentes ao ácido <i>trans</i> -aconítico em solução aquosa (1,0 mg/mL) e irradiado	176

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

AcOEt - Acetato de etila

AINEs - Anti-inflamatórios não esteroidais

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC - *American Type Culture Collection*

BHI - Ágar infusão de cérebro e coração

CC - Cromatografia em coluna

CCD - Cromatografia em camada delgada

CG – Cromatografia gasosa

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

COSY - *Correlation Spectroscopy*

COX-1- Ciclo-oxigenase-1

COX-2 -Ciclo-oxigenase-2

CPRG - Vermelho de cloro-fenol- β -D-galactopiranosídeo

DCM - Diclorometano

DEPT-135 - *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer* – ângulo 135°

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - *Desoxyribunucleic acid*

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

EAq - Extrato aquoso

EE - Extrato etanólico

EE-FA - Fração em acetato de etila do extrato etanólico

EE-FD - Fração em diclorometano do extrato etanólico

EE-FE - Fração em etanol do extrato etanólico

EH - Extrato hexânico

EMAG - Éstes metílicos de ácidos graxos

ERO - Espécies reativas de oxigênio

EtOH - Etanol

FA - Fração alcaloídica

FAO - *Food and Agriculture Organization*

FAq-I - Fração aquosa 1

FB - Fração rica em aminoácidos e açúcares

FDA - *Food and Drug Administration*

FE - Fração etanólica

FF - Fração fenólica

FF₀ - Fração fenólica não irradiada

FF₁ - Fração fenólica irradiada com 1 kGy de radiação gama

FF₃ - Fração fenólica irradiada com 3 kGy de radiação gama

FF₅ - Fração fenólica irradiada com 5 kGy de radiação gama

FF₁₀ - Fração fenólica irradiada com 10 kGy de radiação gama

FF₂₀ - Fração fenólica irradiada com 20 kGy de radiação gama

F_{Org-I} - Fração orgânica 1

FS - Fração saponínica

FS₀ - Fração saponínica não irradiada

FS₁ - Fração saponínica irradiada com 1 kGy de radiação gama

FS₃ - Fração saponínica irradiada com 3 kGy de radiação gama

FS₅ - Fração saponínica irradiada com 5 kGy de radiação gama

FS₁₀ - Fração saponínica irradiada com 10 kGy de radiação gama

FS₂₀ - Fração saponínica irradiada com 20 kGy de radiação gama

HCT-116 - *Human Colon Carcinoma Cell Line*

Hex - hexano

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

HMBC - *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

HSQC - *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

IV-ATR - Espectroscopia no infravermelho por refletância total atenuada

J - Constante de acoplamento escalar

kGy - kilogray

LC-DAD-MS - Cromatógrafo líquido acoplado à espectrometria de massas

LDH - Lactato desidrogenase

MCF-7 - *Human breast adenocarcinoma cell line*

MDA-MB-231 - *Human breast adenocarcinoma cell line*

MeOH - Metanol

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NOESY - *Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*

OMS - Organização Mundial de Saúde

PAL - Phenilalanina-amônia-liase

PBMC - Células mononucleares do sangue periférico

PBS - Tampão fosfato de salina

PHA - Fito-hemaglutinina

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

RF - Fator de retenção

RMN de ^{13}C - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

RMN de ^1H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RPE - Ressonância Paramagnética Eletrônica

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute medium*

TA₀ - Ácido *trans*-aconítico em solução aquosa não irradiado

TA₁ - Ácido *trans*-aconítico em solução aquosa irradiado com 1 kGy de radiação gama

TA₃ - Ácido *trans*-aconítico em solução aquosa irradiado com 3 kGy de radiação gama

TA₅ - Ácido *trans*-aconítico em solução aquosa irradiado com 5 kGy de radiação gama

TA₁₀ - Ácido *trans*-aconítico em solução aquosa irradiado com 10 kGy de radiação gama

TA₂₀ - Ácido *trans*-aconítico em solução aquosa irradiado com 20 kGy de radiação gama

TFA - ácido trifluoroacético

TR - Tempo de retenção

TS₀ - Ácido *trans*-aconítico em pó não irradiado

TS₁ - Ácido *trans*-aconítico em pó irradiado com 1 kGy de radiação gama

TS₃ - Ácido *trans*-aconítico em pó irradiado com 3 kGy de radiação gama

TS₅ - Ácido *trans*-aconítico em pó irradiado com 5 kGy de radiação gama

TS₁₀ - Ácido *trans*-aconítico em pó irradiado com 10 kGy de radiação gama

TS₂₀ - Ácido *trans*-aconítico em pó irradiado com 20 kGy de radiação gama

UFC - Unidade formadora de colônia

Vero - Células não tumorais originadas dos rins do macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*)

VPD 450 - *Violet Proliferation Dye 450*

LISTA DE ESQUEMAS E EQUAÇÕES

Esquema II.1. Etapas da obtenção dos extratos brutos da casca do caule de <i>L. ochrophylla</i>	15
Esquema II.2. Sequência metodológica para o isolamento de constituintes de FF de <i>L. ochrophylla</i>	27
Equação III.1. UFC/mL	61
Equação III.2. ΔG^{total}	63
Equação IV.1. Inibição da viabilidade (%)	97
Equação IV.2. Índice de proliferação para a população de linfócitos	101
Equação IV.3. Atividade antioxidante (%)	105

LISTA DE ANEXOS

Anexo I. Espectros	142
Anexo II. Cromatogramas e dados de CLAE	173
Anexo III. Termo de consentimento livre esclarecido	178
Anexo IV. Termo de livre consentimento pós-informado	180

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	iii
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS	xvi
LISTA DE ESQUEMAS E EQUAÇÕES	xix
LISTA DE ANEXOS	xx
 Apresentação	 1
 CAPÍTULO I. <i>Luehea ochrophylla</i>	 4
I.1. Família Malvaceae	5
I.2. Gênero <i>Luehea</i>	5
I.3. A espécie <i>Luehea ochrophylla</i> Mart	7
 CAPÍTULO II. Estudos fitoquímicos e determinação estrutural	 10
II.1. Introdução	11
II.2. Materiais e métodos	13
II.2.1. Metodologia fitoquímica	15
II.2.1.1. Obtenção do material vegetal	15
II.2.1.2. Obtenção dos extratos hexânico e etanólico de <i>L. ochrophylla</i>	15
II.2.1.3. Prospecção fitoquímica dos extratos hexânico e etanólico de <i>L. ochrophylla</i>	16
II.2.1.4. Perfil de ácidos graxos	16
II.2.1.5. Fracionamento do extrato hexânico da casca do caule de <i>L. ochrophylla</i>	17
II.2.1.6. Fracionamento do extrato etanólico da casca do caule de <i>L. ochrophylla</i>	20
II.2.1.7. Obtenção do extrato aquoso e da fração fenólica de <i>L. ochrophylla</i> Mart	26
II.2.1.8. Prospecção fitoquímica de frações do extrato aquoso de <i>L. ochrophylla</i> Mart	27
II.2.1.9. Estudo da fração fenólica de <i>L. ochrophylla</i>	27
II.3. Resultados e discussão	28
II.3.1. Prospecção fitoquímica	28
II.3.2. Identificação estrutural dos fitoconstituintes de EH e EE	29
II.3.2.1. Análise de ácidos graxos	29
II.3.2.2. Análise estrutural do composto 22	30
II.3.2.3. Análise estrutural do composto 23	32

II.3.2.4. Análise estrutural do composto 24	33
II.3.2.5. Análise estrutural da fração EH-G4-3	35
II.3.2.6. Análise estrutural do composto 26	38
II.3.2.7. Análise estrutural do composto 27	39
II.3.2.8. Análise estrutural da fração EE-FD-3	41
II.3.2.9. Análise estrutural do composto 29	44
II.3.2.10. Análise estrutural do composto 30	47
II.3.2.11. Análise estrutural do composto 31	49
II.3.2.12. Análise estrutural do composto 32	52
 CAPÍTULO III. Avaliação da descontaminação microbiológica e da influência da radiação gama em extratos, frações e fitoconstituintes presentes no caule de <i>L. ochrophylla</i>	55
III.1. Introdução	56
III.1.1. Descontaminação microbiológica	56
III.1.2. Efeito da radiação gama nos constituintes químicos de plantas	57
III.2. Materiais e métodos	59
III.2.1. Obtenção do material vegetal	60
III.2.2. Exposição do material vegetal e do ácido <i>trans</i> -aconítico à radiação gama	60
III.2.3. Contagem de microrganismos	60
III.2.4. Presença de radicais livres	61
III.2.5. Frações fenólicas e saponínicas da casca do caule de <i>L. ochrophylla</i>	61
III.2.6. Análise do ácido <i>trans</i> -aconítico	62
III.2.7. Estudo teórico da formação de produtos radiolíticos a partir do ácido <i>trans</i> -aconítico ...	63
III.3. Resultados e discussão	63
III.3.1. Radiação gama na descontaminação microbiológica	63
III.3.2. Análise da presença de radicais livres no material vegetal irradiado	65
III.3.3. Análise das diferentes doses de radiação gama sobre a fração fenólica (FF).....	67
III.3.4. Análise das diferentes doses de radiação gama sobre a fração saponínica (FS)	71
III.3.5. Análise da radiação gama no ácido <i>trans</i> -aconítico	73
 CAPÍTULO IV. Atividades biológicas: antitumoral, anti-inflamatória, tripanocida, antimicrobiana e antioxidante	85
IV.1. Introdução	86
IV.1.1. Câncer	86
IV.1.2. Inflamação	88
IV.1.3. Doença de Chagas	90

IV.1.4. Infecções bacterianas e fúngicas	93
IV.1.5. Estresse oxidativo	94
IV.2. Materiais e métodos	96
IV.2.1. Atividade antitumoral	96
IV.2.2. Triagem anti-inflamatória <i>in vitro</i>	98
IV.2.2.1. Obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humano	98
IV.2.2.2. Efeito de EE, FA e FE da casca do caule de <i>L. ochrophylla</i> sobre a viabilidade de PBMC humanas	98
IV.2.2.3. Análise do efeito de EE, FA e FE da casca do caule de <i>L. ochrophylla</i> sobre a proliferação de linfócitos humanos	99
IV.2.3. Atividade anti-inflamatória <i>in vivo</i>	102
IV.2.3.1. Animais	102
IV.2.3.2. Preparação do gel	102
IV.2.3.3. Obtenção de lesões musculares, tratamento e obtenção de lâminas histológicas	102
IV.2.4. Atividade tripanocida	104
IV.2.5. Triagem antimicrobiana	105
IV.2.6. Triagem da atividade antioxidante	105
IV.3. Resultados e discussão	106
IV.3.1. Atividade antitumoral	106
IV.3.2. Triagem anti-inflamatória <i>in vitro</i>	108
IV.3.2.1. Efeito de EE, FA e FE da casca do caule de <i>L. ochrophylla</i> sobre a viabilidade das células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC)	108
IV.3.2.2. Análise do efeito de EE, FA e FE da casca do caule de <i>L. ochrophylla</i> sobre a proliferação de linfócitos humanos	111
IV.3.3. Atividade anti-inflamatória <i>in vivo</i>	114
IV.3.4. Atividade tripanocida	116
IV.3.5. Atividade antimicrobiana	118
IV.3.6. Atividade antioxidante	119
Conclusões	121
I. Dos estudos fitoquímicos	122
II. Dos estudos com radiação gama	122
III. Dos estudos biológicos	123
IV. Considerações finais	124
Referências bibliográficas	125
Anexo I. Espectros	142

Anexo II. Cromatogramas e dados de CLAE	173
Anexo III. Termo de consentimento livre e esclarecido	178
Anexo IV. Termo de livre consentimento pós-informado	180

Apresentação

A espécie vegetal *Luehea ochrophylla* apresenta distribuição predominante em regiões de solo arenoso, sendo encontrada largamente no cerrado brasileiro. *L. ochrophylla* é empregada pela medicina popular como anti-inflamatório, além de ser utilizada também no tratamento da hemorragia, tosse e diarreia. Considerando sua importância medicamentosa e a ausência de estudos prévios com este vegetal, foram realizados estudos fitoquímicos e biológicos com extratos, frações e fitoconstituintes isolados da casca do caule de *L. ochrophylla*. Sendo assim, este trabalho teve como um dos objetivos comprovar a ação terapêutica alegada em estudos etnofarmacológicos para este vegetal.

Inicialmente, no Capítulo I é apresentado um levantamento bibliográfico sobre a família Malvaceae, gênero *Luehea* e espécie *L. ochrophylla*. São apresentadas as características morfológicas, anatômicas e a distribuição geográfica, além da utilização popular deste vegetal.

No Capítulo II é descrito o estudo fitoquímico, bem como os materiais, equipamentos e métodos utilizados para a realização deste trabalho. Neste capítulo é apresentado o estudo sobre a casca do caule de *L. ochrophylla*, envolvendo a aquisição do material vegetal, identificação botânica, obtenção dos extratos hexânico, etanólico e aquoso, análises cromatográficas dos extratos obtidos e das frações oriundas destes, bem como a purificação dos fitoconstituintes isolados. São descritas também as análises espectroscópicas que proporcionaram a elucidação estrutural dos fitoconstituintes obtidos.

No Capítulo III é descrito o estudo do efeito da radiação gama na descontaminação microbiológica do material vegetal. Em um segundo momento, são relatados os efeitos desta radiação sobre as frações fenólica e saponínica, obtidas a partir do extrato aquoso. Ao final deste capítulo é avaliado o efeito da radiação gama sobre o ácido *trans*-aconítico, presente também no extrato aquoso da casca do caule de *L. ochrophylla*.

No Capítulo IV são relatados os ensaios de atividade antitumoral, anti-inflamatória, tripanocida, antimicrobiana e antioxidante dos extratos, frações e/ou fitoconstituintes isolados. Inicialmente é descrito o ensaio antitumoral de extratos, frações e fitoconstituintes de *L. ochrophylla* frente às linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231 (carcinomas mamários) e HCT-116 (carcinoma de cólon e reto). Em um segundo momento, são relatados os modelos experimentais para os ensaios de atividade anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo*. Para tanto são descritos a coleta do sangue periférico de voluntários humanos, a obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMC), o efeito de extratos e frações da casca do caule de *L. ochrophylla* sobre a proliferação de linfócitos, além da preparação das amostras na

forma de géis para uso tópico, obtenção das lesões musculares, tratamento dos animais experimentais e obtenção de lâminas histológicas. Para os ensaios de atividade tripanocida, são apresentadas as formas evolutivas do *Tripanossoma cruzi* e a metodologia colorimétrica utilizada. Quanto à atividade antimicrobiana, são apresentados os microrganismos utilizados e a metodologia. Ao final deste capítulo são descritos os estudos da atividade antioxidante de captura do radical livre DPPH pelos extratos e frações de *L. ochrophylla*.

As conclusões gerais e as considerações são apresentadas ao final do trabalho. Por último, nos Anexos, são apresentados os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , DEPT 135 e mapas de contornos ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC, ^1H - ^1H COSY e ^1H - ^1H NOESY, além dos espectros de IV, EM e cromatogramas de CLAE dos fitoconstituintes isolados. São apresentados também valores de tempo de retenção e áreas dos picos de **FF₀**, **FF₁**, **FF₃**, **FF₅**, **FF₁₀**, **FF₂₀**, **FS₀**, **FS₁**, **FS₃**, **FS₅**, **FS₁₀**, **FS₂₀**, do ácido *trans*-aconítico não solubilizado e irradiado e do ácido *trans*-aconítico em solução aquosa e irradiado, bem como os termos de consentimento dos doadores voluntários de sangue.

CAPÍTULO I

Luehea ochrophylla

I.1. Família Malvaceae

Malvaceae, uma das famílias mais dominantes nas florestas neotropicais, compreende cerca de 4500 espécies distribuídas em, aproximadamente, 250 gêneros.¹ São plantas predominantemente herbáceas e com representantes de considerável valor econômico, sendo utilizadas para fins medicinais, como alimento, na ornamentação, indústria têxtil ou, ainda, como forrageiras.² A ocorrência de 80 gêneros e 400 espécies pertencentes à família Malvaceae foi relatada no Brasil.³

Plantas dessa família são estudadas quanto à composição química e atividade biológica, sendo descrito o isolamento de importantes metabólitos secundários, tais como alcaloides,^{4,5} flavonoides,^{6,7} esteroides^{6,7} e taninos.⁸ As atividades antioxidante,⁷ antifúngica,⁹ antiparasitária,¹⁰ citotóxica contra carcinomas de pulmão e mama,¹¹ dentre outras atividades biológicas, têm sido relatadas para representantes da família Malvaceae.

Alguns autores, baseados em informações quimiotaxonômicas, morfológicas e biogeográficas, têm considerado as famílias Tiliaceae, Bombacaceae e Sterculiaceae como uma expansão da Malvaceae.^{12,13}

I.2. Gênero *Luehea*

O gênero *Luehea* Willd., tradicionalmente pertencente à família Tiliaceae, foi incluído recentemente na família Malvaceae e subfamília Grewioideae.¹² *Luehea* é um pequeno gênero americano que compreende 18 espécies com distribuição neotropical, desde o México até o Uruguai e Argentina.¹⁴ Doze espécies deste gênero são encontradas no Brasil, principalmente nas regiões Centro-Oeste e Sudeste.¹⁵

O gênero *Luehea* é caracterizado por incluir tanto árvores quanto arbustos com dispersão irregular, sendo frequentes ao longo de rios, terrenos rochosos e íngremes. Apresentam flores médias ou grandes, rosas ou brancas. A maturação dos frutos ocorre geralmente entre os meses de maio e agosto.¹⁴

Espécies do gênero *Luehea* são plantas de rápido crescimento e possuem características ornamentais recomendadas para o paisagismo em geral. São utilizadas em reflorestamentos de áreas degradadas e, por apresentarem madeiras de alta qualidade, são utilizadas na confecção de móveis vergados apresentando, dessa forma, grande importância econômica.¹⁴ Na Figura I.1 (A-E; pág. 6) são apresentadas árvores, partes aéreas, frutos e flores de representantes do gênero *Luehea*.

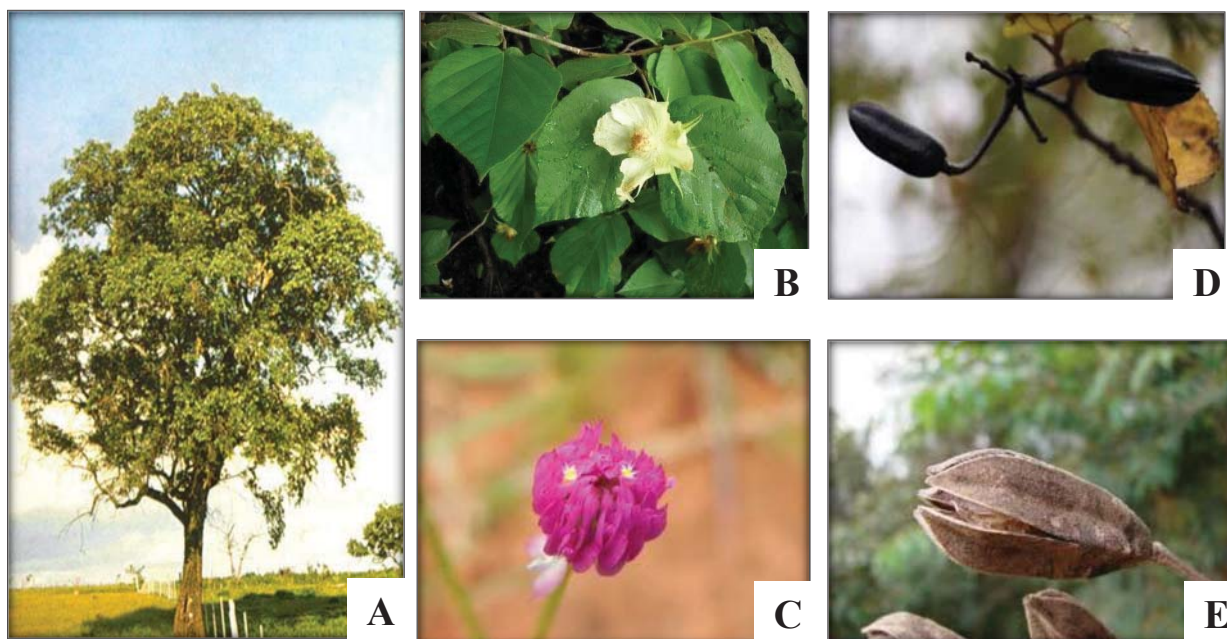


Figura I.1. Representantes do gênero *Luhea*: *L. divaricata* (A), *L. candida* (B), *L. paniculata* (C e D), *L. grandiflora* (E).^{16,17}

Algumas espécies do gênero *Luehea* são conhecidas no Brasil como “açoita-cavalo”, “ibatingui” ou “pau-de-canga”.¹⁸ As cascas do caule dessas espécies são utilizadas popularmente como adstringentes,¹⁹ bem como no tratamento da artrite, reumatismo, leucorreia, tumores, feridas gangrenosas¹⁸ e espinhas.²⁰ Suas flores são utilizadas no tratamento da bronquite e as raízes como depurativa.¹⁸ As folhas de algumas espécies do gênero *Luehea* são utilizadas popularmente contra a disenteria e a gonorreia,¹⁹ além de serem utilizadas como diurético.²¹

A casca de *Luehea divaricata* apresenta comprovada atividade antimicrobiana contra os fungos *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Epidermophyton floccosum*, responsáveis por causar infecções em animais e humanos, denominadas de dermatofitoses. A atividade antimicrobiana de *L. divaricata* está associada, provavelmente, à inibição da síntese dos polímeros da parede celular de microrganismos.²⁰ A casca de *L. divaricata* apresenta também propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e imunoestimulatórias, quando testada *in vivo*.²² As partes aéreas deste vegetal apresentam atividade bactericida contra *Micrococcus luteus*²³ e atividade contra os vírus causadores do herpes simples tipos 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2),²⁴ além de atividade antioxidante de captura de radicais livres.²⁵

A casca de *L. paniculata* apresenta atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*²⁴ e as folhas de *L. speciosa* apresentam atividade antioxidante de captura do radical livre DPPH.²⁶

Poucos constituintes químicos de espécies do gênero *Luehea* têm sido descritos na literatura (Figura I.2; pág. 8). O ácido 3 β -*p*-hidroxibenzoil tormêntico (1), ácido maslínico (2), vitexina (3) e sitosterol glicosilado (4) foram isolados das folhas de *L. divaricata*. Os compostos (-)-epicatequina (5), estigmasterol (6), lupeol (7) e α -amirina (8) foram identificados da casca do caule de *L. divaricata*.²⁷ Os compostos β -amirina (9), 3-acetato- β -amirina (10), lupenona (11), ácido oleanólico (12), ácido maslínico (2) e rutina (13) foram isolados das folhas de *L. paniculata*.²⁸ Os flavonoides quercetina (14) e (+)-catequina (15) foram isolados das folhas de *L. speciosa*.²⁶

I.3. A espécie *Luehea ochrophylla* Mart

L. ochrophylla é encontrada no Brasil, Paraguai e Argentina, sendo que, no Brasil, ocorre nas regiões Centro-Oeste, Nordeste e Sudeste, com predominância no cerrado e em solo arenoso.²⁹ A Figura I.3 apresenta a distribuição geográfica de *L. ochrophylla* no Brasil.



Figura I.3. Distribuição geográfica de *L.ochrophylla* no Brasil.³⁰

L. ochrophylla é caracterizada por árvores de 5-12 m de altura com troncos de até 60 cm de diâmetro. As folhas são coriáceas, ovaladas, elípticas ou inequiláteras, com margem serrada medindo até 13 cm de comprimento e 7 cm de largura. O estigma é 5-lobado, as falanges possuem de nove a dez estames e o epicálice tem de oito a nove bracteolas. As flores são brancas com estames amarelos e hermafroditas. Os frutos são capsulados, loculicida e deiscente. Florescem nos meses de agosto e setembro e frutificam nos meses de outubro e novembro.³¹ *L. ochrophylla* é semelhante à *L. paniculata* no aspecto geral, distinguindo apenas na morfologia da folha pelo tipo de estigma, número de estames por falange e de bracteolas no epicálice.²⁹ A Figura I.4 (pág. 9) apresenta a árvore, folhas, flores e fruto de *L. ochrophylla*.

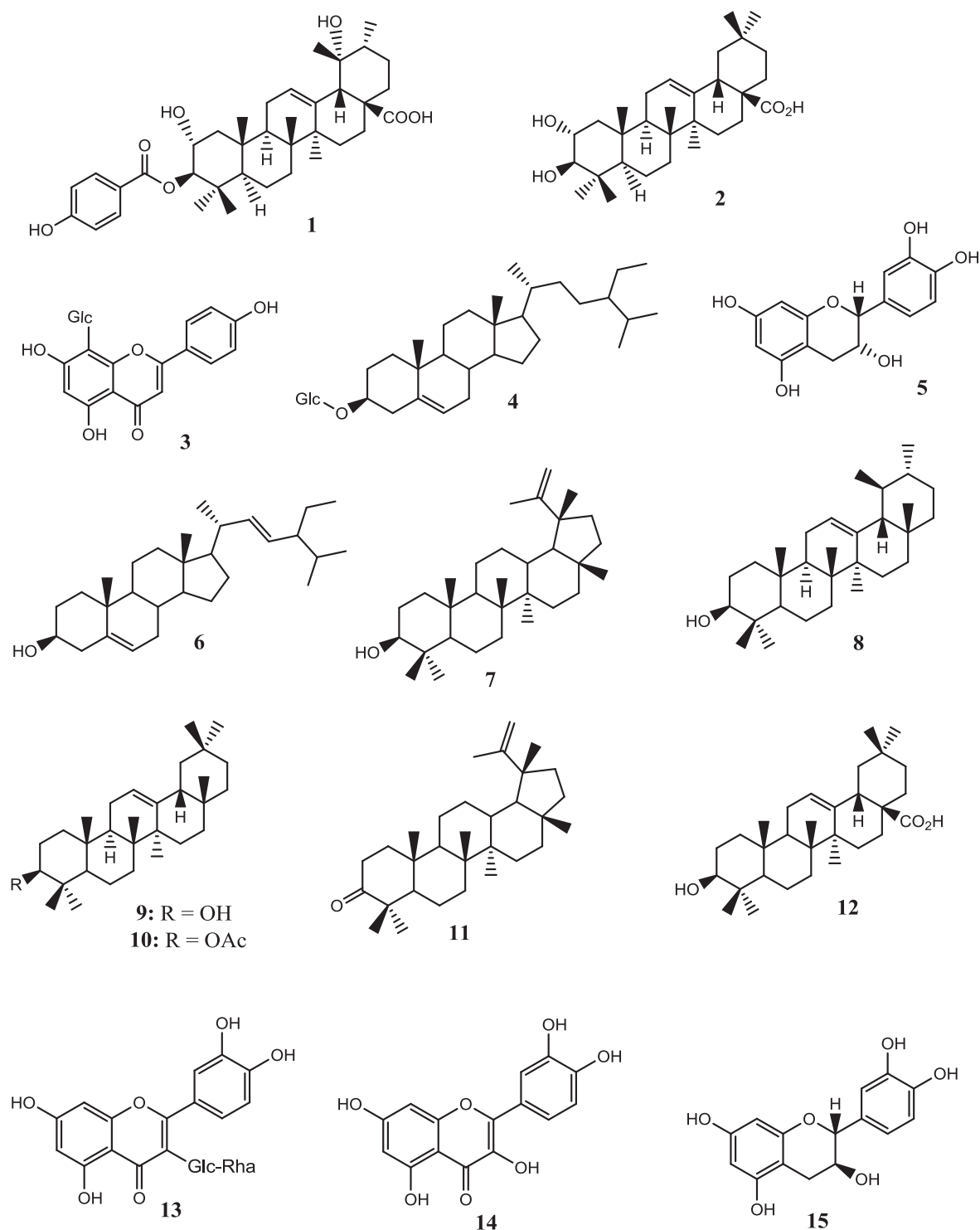


Figura I.2. Estrutura química de fitoconstituintes isolados de espécies do gênero *Luehea*: ácido 3β-*p*-hidroxibenzoil tormêntico (1), ácido maslínico (2), vitexina (3), sitosterol glicosilado (4), (-)-epicatequina (5), estigmasterol (6), lupeol (7), α-amirina (8), β-amirina (9), 3-acetato-β-amirina (10), lupenona (11), ácido oleanólico (12), rutina (13), quercetina (14) e (+)-catequina (15).

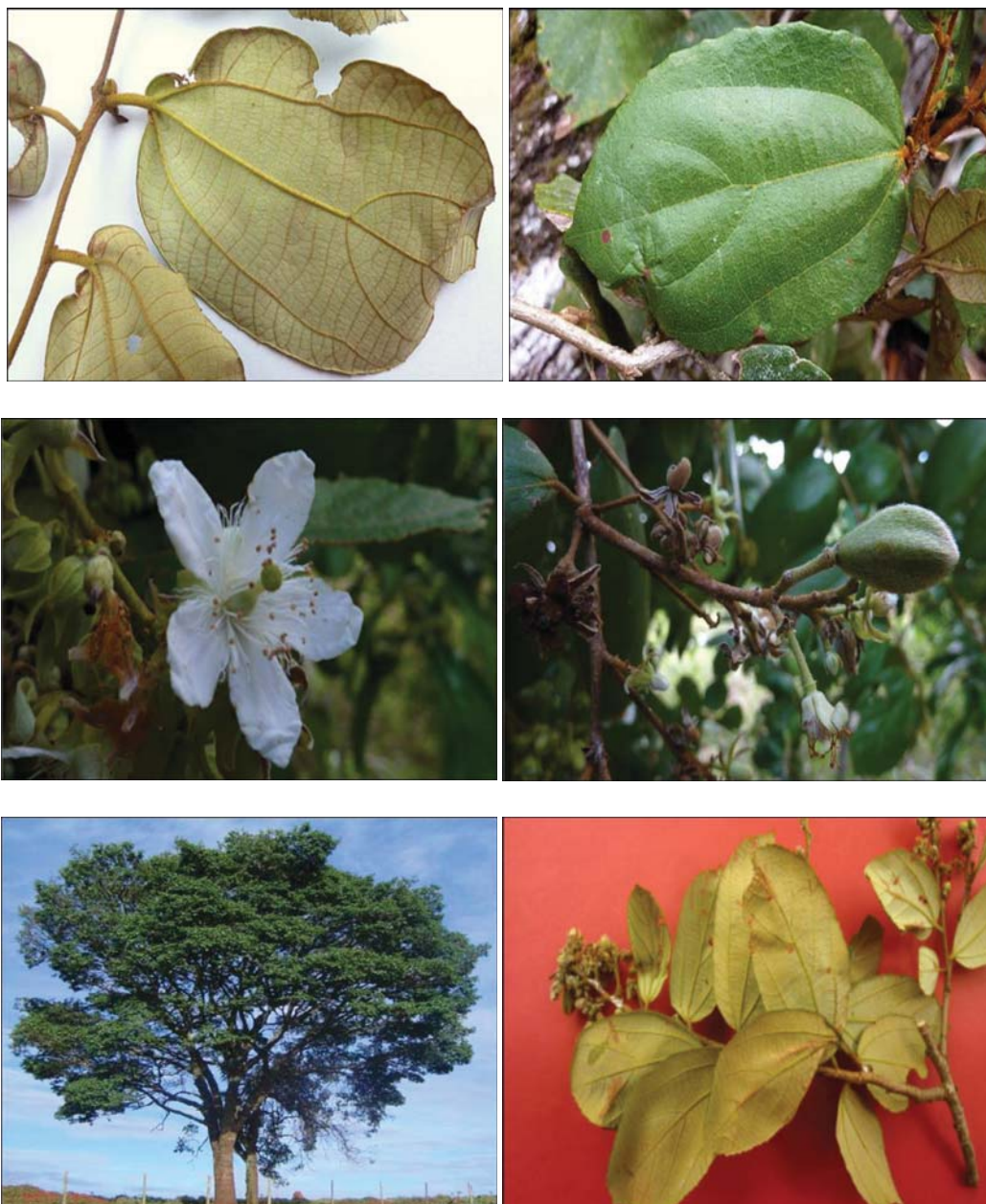


Figura I.4. Folhas, flores, frutos e árvores de *L. ochrophylla*.³²

Levantamentos etnofarmacológicos indicam que *L. ochrophylla* é conhecida popularmente como “açoita-cavalo” ou “pereira da mata”. Sua casca é empregada no tratamento do reumatismo e artrite. As suas flores e folhas são utilizadas no tratamento da hemorragia, tosse e diarreia.³³ A literatura não registra estudos farmacológicos ou fitoquímicos sobre esta espécie.

CAPÍTULO II

Estudos fitoquímicos e determinação estrutural

II.1. Introdução

A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura ou prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade.³⁴ A descoberta das propriedades úteis ou nocivas dos vegetais tem suas raízes no conhecimento empírico.³⁵

Indícios arqueológicos datados de 4000 anos a.C. indicam a utilização de *Papaver somniferum* no combate à dor. Esta espécie é conhecida popularmente como papoula e utilizada para a extração do ópio, cujo componente majoritário é a morfina (**16**) (Figura II.1). *Digitalis purpurea* e *Digitalis lanata*, das quais se extraem a digitoxina (**17**) e digoxina (**18**), (Figura II.1), são utilizadas também desde tempos remotos no tratamento de doenças do coração.³⁶ Porém, a primeira descrição sobre o uso de plantas medicinais é datada de 2800 a.C. na obra do imperador chinês Shen Wung intitulada Pen Ts'ao ou “A Grande Fitoterapia”. No Brasil, a utilização de plantas medicinais sofreu influência da cultura africana, indígena e européia,³⁵ sendo que a primeira descrição sobre o uso de plantas medicinais foi feita em 1587 no Tratado Descritivo do Brasil.³⁶

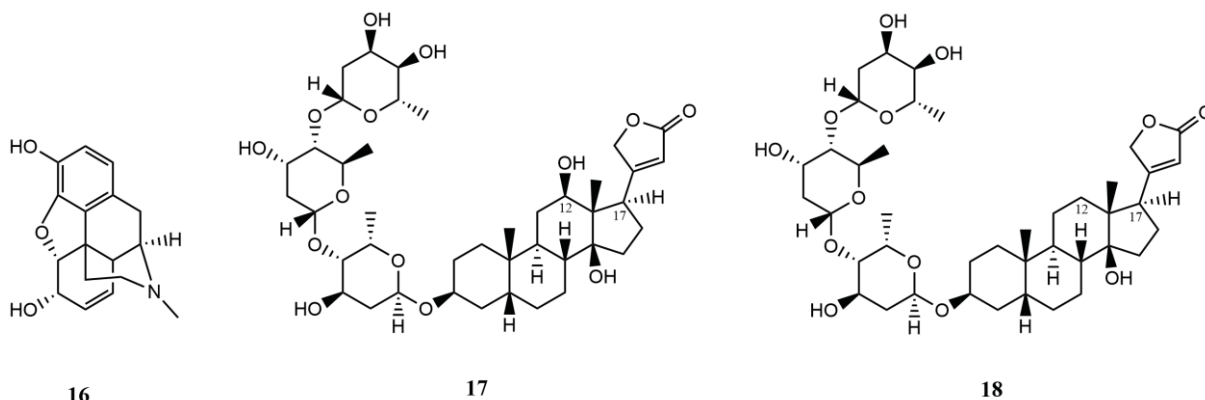


Figura II.1. Estrutura química da morfina (**16**), digitoxina (**17**) e digoxina (**18**).

O estudo de plantas medicinais teve maior avanço a partir do século XIX, devido ao progresso científico na área da química, que permitiu separar, identificar e analisar princípios ativos vegetais.³⁷ Porém, muitas espécies vegetais ainda são usadas popularmente sem respaldo científico quanto a segurança e eficácia no tratamento de enfermidades. Em todo o mundo, apenas 5% das plantas foram estudadas de alguma maneira quanto ao seu emprego medicinal e, na maioria dos casos, sem grande aprofundamento nos aspectos fitoquímicos ou farmacológicos.³⁸

Segundo a Organização Mundial de Saúde, 80% da população mundial não têm acesso ao atendimento primário em saúde,³⁹ sendo que o conhecimento sobre plantas medicinais

simboliza, muitas vezes, o único recurso terapêutico de algumas comunidades e grupos étnicos desfavorecidos economicamente.⁴⁰ Por outro lado, em países desenvolvidos, uma grande parcela da população faz uso de plantas medicinais, influenciada por razões culturais⁴¹ e pelo modismo do consumo de produtos naturais.⁴²

Alguns fatores têm contribuído para o aumento do interesse em plantas medicinais, dentre eles a grande eficácia de algumas substâncias antitumorais obtidas de plantas, como os alcaloides vimblastina (**19**) e vincristina (**20**) (Figura II.2), extraídos da espécie *Catharanthus roseus*, descobertos no final dos anos 60 e considerados ainda de grande utilidade no tratamento da leucemia e cânceres de ovário e testículos.⁴³ Outro exemplo é o paclitaxel (**21**) (Figura II.2), extraído da espécie *Taxus brevifolia* e utilizado no tratamento de cânceres ginecológicos.⁴⁴

O Brasil tem incentivado a fitoterapia como prática oficial da medicina através da inclusão, no Sistema Único de Saúde (SUS), de plantas ou preparações nos cuidados básicos da população carente.⁴² Porém, quais extratos são realmente ativos, quando podem ser prescritos e como devem ser preparados, são questões que misturam o conhecimento popular ao científico e devem ser respondidas através de estudos, principalmente, nas áreas de fitoquímica e etnofarmacologia.

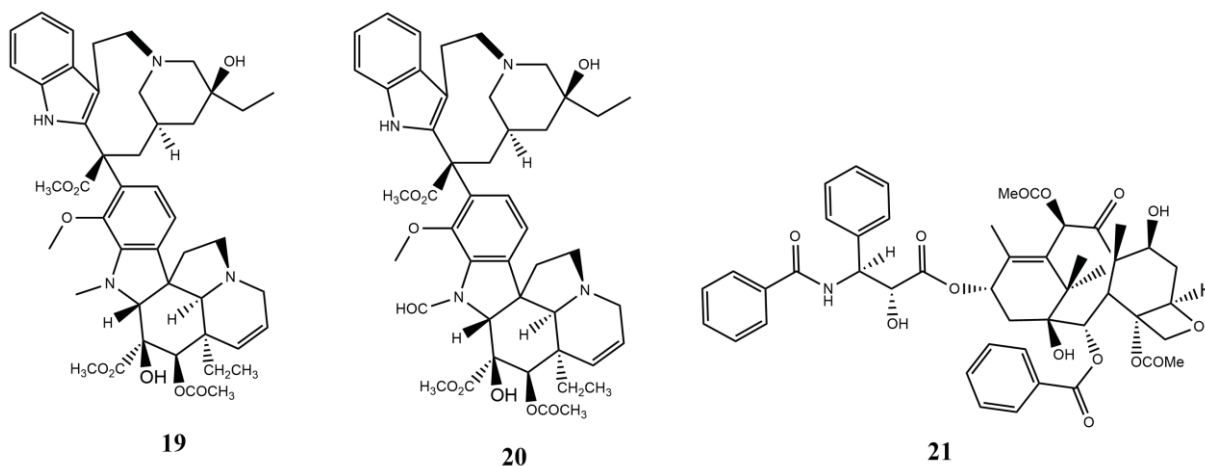


Figura II.2. Estrutura química da vimblastina (**19**), vincristina (**20**) e paclitaxel (**21**).

Diante disso, a pesquisa fitoquímica tem por objetivo conhecer e avaliar a presença dos constituintes químicos em espécies vegetais. Quando não se dispõe de estudos químicos sobre as espécies de interesse, a análise fitoquímica preliminar pode indicar os grupos de metabólitos secundários relevantes da mesma. Para o Brasil, a fitoquímica é muito importante

quando se considera a grande riqueza vegetal ainda sem estudo e as possibilidades para o desenvolvimento de novos medicamentos.³⁶

Dentre as espécies vegetais ainda sem estudos fitoquímicos ou farmacológicos tem-se *Luehea ochrophylla*, popularmente conhecida como “açoita-cavalo” ou “pereira da mata”. A utilização popular de espécies do gênero *Luehea* no tratamento do reumatismo, artrite, hemorragia, blenorragia, tosse e diarreia^{18,19,20} e a ausência de relatos disponíveis na literatura sobre os fitoconstituintes de *L. ochrophylla* tornam o seu estudo necessário e oportuno, fato que justifica as análises descritas no decorrer deste e dos próximos capítulos.

II.2. Materiais e métodos

Nas cromatografias em coluna (CC) foram empregadas colunas de vidro, de diversos diâmetros, para eluição dos extratos e frações, na maioria das vezes, a pressão atmosférica. As fases estacionárias utilizadas foram sílica gel 60 G com tamanho de partícula entre 0,063-0,200 μm (70-230 mesh ASTM, Merck) e Sephadex LH-20 (Sigma). A proporção utilizada entre amostra e fase estacionária foi aproximadamente de 1:30. Nas cromatografias por exclusão em gel, Sephadex LH-20 foi mantido em contato com MeOH por 24 h e, em seguida, empacotado em coluna de vidro até a total sedimentação no suporte. Os extratos foram dissolvidos em quantidades mínimas (suficiente apenas para a dissolução) de MeOH, utilizado como fase móvel, e, então, aplicados no topo da coluna até a absorção completa no suporte, seguida por eluição neste solvente. As CC foram realizadas empregando também cartuchos comerciais SNAP 10 g, SNAP 25 g, SNAP 50 g e SNAP 100 g (Biotage[®]) preenchidos com sílica gel 60 G com tamanho de partícula entre 0,04 - 0,063 μm (230-400 mesh, Merck) para eluição dos extratos e frações, a média pressão, em cromatógrafo automático (Isolera One Biotage[®]) equipado com detector UV/VIS.

Nas cromatografias em camada delgada (CCD) foram empregadas placas de vidro recobertas por sílica-gel 60 G Merck de 250 μm de espessura, ativadas a 100 °C. Foram empregadas também cromatofolhas de sílica gel 60 G Merck, com indicador de fluorescência F₂₅₄. A revelação das cromatoplacas em camada delgada foi feita por exposição à luz ultravioleta (UV) em $\lambda = 254$ e 366 nm e/ou mediante borrifação com solução reveladora de vanilina/ácido perclórico. Este último revelador foi preparado pela mistura de partes iguais de uma solução A (1,0 g de vanilina em 100,0 mL de etanol) com uma solução B (3,0 mL de ácido perclórico (70%) em 97,0 mL de água). As cromatoplacas borrifadas com essa solução

foram aquecidas em estufa a 100 °C até ser verificado o aparecimento de cores.⁴⁵ Os solventes empregados em cromatografia foram das marcas Merck, Synth e Aldrich P.A.

Na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em escala analítica, foi utilizado cromatógrafo líquido SHIMADZU, constituído por duas bombas LC-20AT, detector UV/VIS SPD-20A, software LCsolution v.1.21 (SHIMADZU) e coluna NSTC18, 250 mm x 3,0 mm x 5 µm, LC100111 (NST). CLAE, em escala preparativa, foi realizada em cromatógrafo líquido VARIAN PRO STAR constituído por uma bomba PS210, detector UV/VIS PS325, coluna NSTC18, 250 mm x 10,0 mm x 5 µm, LC280211 (NST) e software GALAXIE v. 1.10.0.5550.

Na cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de Massas (LC-DAD-MS) foi utilizado cromatógrafo líquido SHIMADZU, equipado com duas bombas LC30AD e um detector de arranjo de diodos SPD M-20A e coluna Shim-pack[®] C18 4,6 mm x 5 µm x 250 mm. Um fluxo de 200 µL/min foi usado e o efluente direcionado totalmente para espectrômetro de massas (Bruker Daltonics) com ionização por electrospray (ESI) no modo positivo.

A cromatografia gasosa (CG) foi realizada em cromatógrafo a gás HP7820A (Agilent), equipado com detector de ionização de chama. Foi empregada coluna HP-INNOWax (HP) 15 m x 0,25 mm x 0,20 µm. O programa EZChrom Elite Compact (Agilent) foi utilizado para a aquisição de dados.

As análises por espectroscopia de absorção na região do Infravermelho (IV) foram realizadas em espectrômetros Perkin Elmer -*Spectrum One* (ATR) e SHIMADZU FTIR-8400 (KBr). O máximo de frequência das absorções ($\nu_{\text{máx}}$) foi dado em cm^{-1} .

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) unidimensionais (RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT 135) e bidimensionais (^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC, ^1H - ^1H COSY e ^1H - ^1H NOESY) foram registrados em espectrômetros Bruker DPX-200 e DRX-400 linha *AVANCE*. Os deslocamentos químicos foram registrados em unidade δ em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hz. Tetrametilsilano (TMS) foi empregado como padrão de referência interno, tendo CDCl_3 , $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, CD_3OD ou $\text{DMSO}-d_6$ como solventes.

A determinação da faixa de fusão (p.f.) foi realizada em aparelho da marca METTLER FP80 SNR H22439, com valores não corrigidos. Valores de rotação óptica $[\alpha]_D^{20}$ foram medidos em polarímetro Bellingham & Stanley ADP-220. A liofilização das amostras foi realizada em equipamento TermoFisher SCIENTIFIC, FR-Drying Digital Unit e a pulverização das amostras foi realizada em moinho de facas da marca Willey.

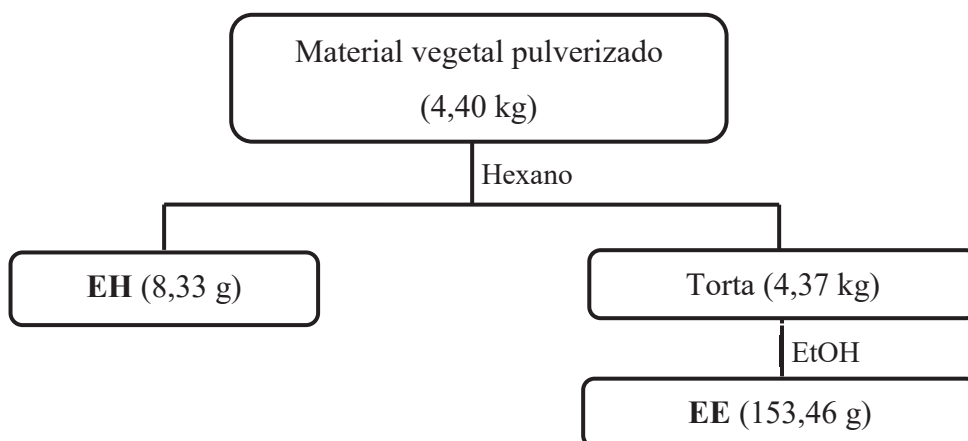
II.2.1. Metodologia fitoquímica

II.2.1.1. Obtenção do material vegetal

Amostras de *L. ochrophylla* foram adquiridas no Mercado Central de Belo Horizonte, tendo sido coletadas em agosto de 2012, no Município de Esmeraldas (MG). As amostras foram identificadas por Ms. Amanda Rigueti Corrêa da Escola Nacional de Botânica Tropical - Instituto de Pesquisa Jardim Botânico - Rio de Janeiro, Brasil. Uma exsicata da espécie vegetal encontra-se depositada no Herbário Dendrológico Jeanine Felfili (HDJF) do Departamento de Engenharia Florestal da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (Campus Diamantina), sob o número de registro HDJF-4571.

II.2.1.2. Obtenção dos extratos hexânico e etanólico de *L. ochrophylla*

Cascas pulverizadas (4,40 kg) do caule de *L. ochrophylla* foram submetidas à extração a frio (maceração) com hexano (Hex) em volume suficiente para a total submersão da amostra. Repetiu-se o processo de maceração com a mesma amostra a cada três dias, por três vezes. A torta, após extração com Hex, foi submetida ao mesmo processo de maceração empregando EtOH como solvente. Os extratos foram concentrados empregando evaporador rotativo a aproximadamente 60 °C e pressão reduzida. Após evaporação completa dos solventes, obtiveram-se os extratos **EH** (8,33 g) e **EE** (153,46 g), respectivamente. No Esquema II.1 estão apresentadas as etapas de obtenção dos extratos em Hex e em EtOH da casca do caule de *L. ochrophylla*.



Esquema II.1. Etapas da obtenção dos extratos brutos da casca do caule de *L. ochrophylla*.

II.2.1.3. Prospecção fitoquímica dos extratos hexânico e etanólico de *L. ochrophylla*

Alíquotas dos extratos brutos **EH** e **EE** de *L. ochrophylla* foram analisadas a fim de detectar as principais classes químicas presentes. No teste para detecção de triterpenos e esteroides, uma alíquota (~ 2,0 mg) de **EH** solubilizada em CHCl_3 foi adicionada ao reagente de Liebermann-Burchard (2,0 mL de anidrido acético e duas gotas de ácido sulfúrico concentrado). O aparecimento das cores rósea e azul-esverdeada indica a presença de triterpenos e esteroides, respectivamente. No teste para a detecção de flavonoides, uma alíquota (~ 2,0 mg) de **EE** solubilizada em 2,0 mL de água destilada foi adicionada a hidróxido de amônio até pH 11. O aparecimento de coloração amarela indica a presença de flavonas, flavonois e xantonas; coloração vermelho-púrpura indica a presença de chalconas e auronas. Por sua vez, a coloração vermelho-alaranjado indica a presença de flavanoides na amostra. Para a confirmação da presença de flavonoides na amostra, uma alíquota (~ 2,0 mg) de **EE** solubilizada em 3,0 mL de MeOH foi adicionada a 1,0 mL de HCl concentrado e magnésio em fita. O aparecimento de coloração entre rosa e vermelho-escuro confirma a presença dessa classe química. No teste para a detecção de saponinas, uma alíquota (~ 2,0 mg) de **EE** solubilizada em 2,0 mL de água destilada foi submetida à agitação vigorosa por 2 min, sendo que a formação de espuma persistente indica a presença de saponinas na amostra. No teste para alcaloides, uma alíquota (~ 2,0 mg) de **EE** solubilizada em 2,0 mL de água destilada foi adicionada ao reagente de Dragendorff, a formação de precipitado floculoso indica a presença de alcaloides na amostra. Para a detecção de taninos e fenóis, uma alíquota (~ 2,0 mg) de **EE** solubilizada em 2,0 mL de água destilada foi adicionada a uma solução de cloreto férrico (10%). O aparecimento da cor azul sugere a presença de taninos hidrolisáveis, ao passo que o aparecimento da cor verde sugere a presença de taninos condensados.⁴⁵

II.2.1.4. Perfil de ácidos graxos

Ácidos graxos de **EH** foram convertidos em seus correspondentes ésteres metílicos (EMAGs), por esterificação. Resumidamente o extrato hexânico (100,0 mg) foi dissolvido em KOH 0,5 M (2,0 mL). Após aquecimento em banho de água a 50 °C, adicionou-se 2,0 mL de $\text{BF}_3\text{:MeOH}$ e a mistura foi fervida durante 2 minutos. Após resfriamento o volume foi completado para 25,0 mL com solução saturada de NaCl. Os ésteres foram extraídos com Hex e a camada orgânica foi separada. A camada em Hex foi lavada com uma solução de bicarbonato de potássio (4,0 mL a 2%), seca com Na_2SO_4 anidro e filtrada. O solvente orgânico foi removido sob pressão reduzida em evaporador rotativo para fornecer ésteres

metílicos.⁴⁶ EMAGs foram analisados por CG sob as seguintes condições: 70 °C, 0 min e aumento da temperatura a uma taxa de 7 °C/min até 240 °C; injetor (split de 1/50) a 250 °C e detector a 260 °C. Hidrogênio foi utilizado como gás de arraste (3 mL/min) e o volume de injeção foi de 1,0 µL. EMAGs foram identificados pela comparação com padrões EMAG C14-C22 (Supelco, Cat. No. 18917). As composições percentuais de EMAGs foram determinadas com auxílio do software GC Solution.

II.2.1.5. Fracionamento do extrato hexânico da casca do caule de *L. ochrophylla*

EH (5,0 g) foi submetido a fracionamento por CC de sílica gel, sendo coletadas 65 frações de 25,0 mL eluídas em Hex, CHCl₃, EtOH e mistura destes em gradiente crescente de polaridade. Após análise comparativa por CCD, as frações foram reunidas em grupos, conforme a Tabela II.1.

Tabela II.1. Frações e grupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EH da casca do caule de *L. ochrophylla*

Fração	Eluente	Grupo	Massa (g)
1-6	Hex Hex/CHCl ₃ (9:1) Hex/CHCl ₃ (7:3)	EH-G1	0,5322
7-29	Hex/CHCl ₃ (1:1)	EH-G2	0,1155
30-32		EH-G3	0,0400
33-43		EH-G4	1,8300
44-51		EH-G5	0,3960
52-62	Hex/CHCl ₃ (3:7) Hex/CHCl ₃ (1:9) CHCl ₃ CHCl ₃ /EtOH (9,5:0,5)	EH-G6	0,3078
63-65	EtOH	EH-G7	0,0482

O grupo EH-G1(Tabela II.1) apresentou-se como uma solução oleosa e foi analisado por IV e CG. Foi possível identificar 11 constituintes em uma mistura de hidrocarbonetos, sendo pentadecano, tetradecano, hexadecano e 2,6,10,15-tetrametil-heptadecano os constituintes presentes em maior proporção na amostra.

O grupo EH-G2 (Tabela II.1) foi submetido a recristalização em MeOH, fornecendo um sólido branco com fusão na faixa de 241,7 a 244,5 °C. Pelas análises espectroscópicas verificou-se que o sólido obtido trata-se do triterpeno friedelina (**22**; 41,4 mg).

O grupo EH-G3 (Tabela II.1; pág. 17) foi submetido a fracionamento por CC de sílica gel, sendo coletadas 32 frações de 2,0 mL eluídas de forma isocrática com Hex/CHCl₃ (3:7). Após análises comparativas por CCD, as frações foram reunidas em grupos, conforme Tabela II.2.

Tabela II.2. Frações e subgrupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EH-G3

Fração	Eluente	Subgrupo	Massa (g)
1-13	Hex/CHCl ₃ (3:7)	EH-G3-1	0,0012
14-20		EH-G3-2	0,0032
21-27		EH-G3-3	0,0098
28-32		EH-G3-4	0,0063

O subgrupo EH-G3-3 (Tabela II.2) foi submetido a CCD, juntamente com o sólido **22**. Valores iguais de RF juntamente com os dados das análises de RMN de ¹H, RMN de ¹³C e Dept 135 indicaram que EH-G3-3 trata-se de uma quantidade adicional do triterpeno friedelina (9,8 mg).

O subgrupo EH-G3-4 (Tabela II.2) forneceu um sólido branco com fusão na faixa de 273,0 a 277,4 °C. Pelas análises espectroscópicas verificou-se que o sólido obtido trata-se do triterpeno β-friedelinol (**23**; 6,3 mg).

O grupo EH-G4 (Tabela II.1; pág. 17) foi submetido a fracionamento por CC de sílica gel sob pressão, sendo coletadas 42 frações de 20,0 mL eluídas em Hex, CH₂Cl₂, AcOEt, EtOH e mistura destes em gradiente crescente de polaridade. Após análises comparativas por CCD, as frações foram reunidas em grupos, conforme Tabela II.3.

Tabela II.3. Frações e subgrupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EH-G4

Fração	Eluente	Subgrupo	Massa (g)
1-13	Hex Hex/CH ₂ Cl ₂ (9:1) Hex/CH ₂ Cl ₂ (7:3)	EH-G4-1	0,0023
14-16	Hex/ CH ₂ Cl ₂ (7:3)	EH-G4-2	0,2360
17-19	CH ₂ Cl ₂	EH-G4-3	0,0152
20-31	CH ₂ Cl ₂	EH-G4-4	0,5980
32-35	CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (9:1)	EH-G4-5	0,0213
35-42	CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (7:3) AcOEt EtOH	EH-G4-6	0,0042

O subgrupo EH-G4-2 (Tabela II.3; pág. 18) foi submetido à recristalização em EtOH e forneceu um sólido branco com fusão na faixa de 181,0 a 183,2 °C. Pelas análises espectroscópicas verificou-se que o sólido obtido trata-se do triterpeno lupeol (**24**; 67,0 mg).

O subgrupo EH-G4-3 (Tabela II.3; pág. 18) foi submetido à recristalização em EtOH e, por análises espectroscópicas, foi identificada a mistura dos triterpenos lupeol e pseudo-taraxasterol (**24** e **25**, respectivamente; 4,0 mg).

O subgrupo EH-G4-4 (Tabela II.3; pág. 18) foi submetido à recristalização em EtOH e forneceu um sólido branco com fusão na faixa de 135,0 a 138,0 °C. Pelas análises espectroscópicas verificou-se que o sólido obtido trata-se do esteroide β -sitosterol (**26**; 147,0 mg).

O grupo EH-G5 (Tabela II.1; pág. 17) foi submetido a fracionamento por CC de sílica gel, sendo coletadas 44 frações de 12,0 mL, eluídas em CH₂Cl₂, AcOEt, EtOH e mistura destes em gradiente crescente de polaridade. Após análises comparativas por CCD, as frações foram reunidas em grupos, conforme Tabela II.4.

Tabela II.4. Frações e subgrupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EH-G5

Fração	Eluente	Subgrupo	Massa (g)
1-7	CH ₂ Cl ₂	EH-G5-1	0,0134
8-26	CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (9:1)	EH-G5-2	0,0230
27-30	CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (1:1)	EH-G5-3	0,0156
31-42	AcOEt AcOEt/EtOH (1:1)	EH-G5-4	0,0582
43-44	EtOH	EH-G5-5	0,0082

O subgrupo EH-G5-3 (Tabela II.4) apresentou-se como sólido branco, com fusão na faixa de 132,5 a 135,4 °C, após recristalização em MeOH foi submetido a CCD, juntamente com o sólido **26**. Valores iguais de RF juntamente com os dados das análises de RMN de ¹H, RMN de ¹³C e Dept 135 indicaram que EH-G5-3 trata-se de uma quantidade adicional do esteroide β -sitosterol (15,6 mg).

O subgrupo EH-G5-4 (Tabela II.4) foi submetido a CCD, juntamente com o sólido **24**. Valores iguais de RF juntamente com os dados das análises de RMN de ¹H, RMN de ¹³C e Dept 135 indicaram que EH-G5-4 trata-se de uma quantidade adicional do triterpeno lupeol (58,2 mg).

O grupo EH-G6 (Tabela II.1; pág. 17) foi submetido a fracionamento por CC de sílica gel, sendo coletadas 20 frações de 18,0 mL eluídas em Hex, CH₂Cl₂, AcOEt, MeOH e

misturas destes em gradiente crescente de polaridade. Após análise comparativa por CCD, as frações foram reunidas em subgrupos, conforme Tabela II.5.

Tabela II.5. Frações e subgrupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EH-G6

Fração	Eluente	Subgrupo	Massa (g)
1-5	Hex CH ₂ Cl ₂	EH-G6-1	0,0045
6-11	CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (9:1) CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (7:3)	EH-G6-2	0,0023
12-14	AcOEt AcOEt/MeOH (9:1)	EH-G6-3	0,0610
15-20	AcOEt/MeOH (7:3) MeOH	EH-G6-4	0,0220

O subgrupo EH-G6-3 (Tabela II.5) foi submetido à recristalização em MeOH, fornecendo um sólido branco com fusão na faixa de 275,8 a 276,6 °C. Pelas análises espectroscópicas verificou-se que o sólido obtido trata-se do triterpeno ácido betulínico (**27**; 18,0 mg).

II.2.1.6. Fracionamento do extrato etanólico da casca do caule de *L. ochrophylla*

EE (140,246 g) foi submetido a fracionamento por CC de sílica gel, sendo coletadas 377 frações de 250,0 mL eluídas em CH₂Cl₂, AcOEt e EtOH em gradiente crescente de polaridade. As amostras coletadas com os diferentes solventes foram reunidas em grupos, conforme a Tabela II.6.

Tabela II.6. Frações e grupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EE

Fração	Eluente	Grupo	Massa (g)
1-129	CH ₂ Cl ₂	EE-FD	5,2527
130-230	AcOEt	EE-FA	13,2251
231-377	EtOH	EE-FE	110,8500

O grupo EE-FD (2,00 g; Tabela II.6) foi submetido a fracionamento por CC de sílica gel, sendo coletadas 296 frações de 15,0 mL eluídas em Hex, CH₂Cl₂, AcOEt, EtOH e misturas destes em gradiente crescente de polaridade. Após análises comparativas por CCD, as frações foram reunidas em grupos, conforme Tabela II.7 (pág. 21).

Tabela II.7. Frações e subgrupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EE-FD

Fração	Eluente	Subgrupo	Massa (g)
1-58	Hex	EE-FD-1	0,0423
59-102	Hex/CH ₂ Cl ₂ (9:1)	EE-FD-2	0,0205
103-115	Hex/CH ₂ Cl ₂ (7:3) Hex/CH ₂ Cl ₂ (3:7) Hex/CH ₂ Cl ₂ (9:1)	EE-FD-3	0,0128
116-254	CH ₂ Cl ₂ CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (9:1) CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (7:3)	EE-FD-4	0,4587
255-270	CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (3:7) CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (9:1)	EE-FD-5	0,078
271-296	AcOEt EtOH	EE-FD-6	0,1441

Os subgrupos EE-FD-1 e EE-FD-2 (Tabela II.7) apresentaram-se como sólidos brancos e foram submetidos a CCD, juntamente com o sólido **22** e **23**. Valores iguais de RF juntamente com os dados das análises de RMN de ¹H, RMN de ¹³C e Dept 135 indicaram que EE-FD-1 trata-se de uma quantidade adicional do triterpeno friedelina (42,3 mg) e EE-FD-2 trata-se de uma mistura dos triterpenos friedelina e β -friedelinol (20,5 mg).

O subgrupo EE-FD-3 (Tabela II.7) foi submetido à recristalização em MeOH, fornecendo um sólido branco. Pelas análises espectroscópicas verificou-se que o sólido obtido trata-se de uma mistura dos triterpenos lupeol e taraxasterol (**24** e **28**, respectivamente; 10,0 mg).

O subgrupo EE-FD-4 (Tabela II.7) foi submetido à recristalização em MeOH e à CCD juntamente com o sólido **24**. Valores iguais de RF juntamente com os dados das análises de RMN de ¹H, RMN de ¹³C e Dept 135 indicaram que o sólido obtido a partir de EE-FD-4 trata-se de uma quantidade adicional do triterpeno lupeol (212,7 mg)

O subgrupo EE-FD-6 (Tabela II.7) foi submetido à recristalização em MeOH e à CCD juntamente com o sólido **27**. Valores iguais de RF e análises espectroscópicas indicaram que o sólido obtido a partir de EE-FD-6 trata-se de uma quantidade adicional do triterpeno ácido betulínico (97,3 mg).

O grupo EE-FA (7,00 g; Tabela II.6; pág. 20) foi submetido a fracionamento por CC de sílica gel, sendo coletadas 314 frações de 18,0 mL eluídas em CH₂Cl₂, AcOEt, MeOH e misturas destes em gradiente crescente de polaridade. Após análises comparativas por CCD, as frações foram reunidas em grupos, conforme Tabela II.8 (pág. 22).

Tabela II.8. Frações e subgrupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EE-FA

Fração	Eluente	Subgrupo	Massa (g)
1-32	CH ₂ Cl ₂	EE-FA-1	0,0250
33-110	CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (9:1)		
111-246	CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (3:2)	EE-FA-2	0,4000
	CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (2:3)		
247-293	AcOEt	EE-FA-3	0,5920
294-314	AcOEt		
	AcOEt/EtOH (9:1)	EE-FA-4	1,5000
	AcOEt		
	AcOEt/MeOH (1:1)	EE-FA-5	2,6941
	MeOH		

O subgrupo EE-FA-2 (Tabela II.8) foi submetido a fracionamento por CC de sílica gel sob pressão, sendo coletadas 132 frações de 15,0 mL eluídas de forma isocrática com CHCl₃/AcOEt (1:9). Após análises comparativas por CCD, as frações foram reunidas em grupos, conforme Tabela II.9.

Tabela II.9. Frações e subgrupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EE-FA-2

Fração	Eluente	Subgrupo	Massa (g)
1-35	CHCl ₃ /AcOEt (1:9)	EE-FA-2-1	0,0034
36-46	CHCl ₃ /AcOEt (1:9)	EE-FA-2-2	0,1920
47-125	CHCl ₃ /AcOEt (1:9)	EE-FA-2-3	0,0791
126-132	CHCl ₃ /AcOEt (1:9)	EE-FA-2-4	0,0062

O subgrupo EE-FA-2-2 (Tabela II.9) foi submetido a fracionamento por CC de sílica gel sob pressão, sendo coletadas 20 frações de 15,0 mL eluídas em CHCl₃, AcOEt, MeOH e misturas destes em gradiente crescente de polaridade. Após análises comparativas por CCD, as frações foram reunidas em grupos, conforme Tabela II.10 (pág. 23).

O subgrupo EE-FA-2-2b forneceu um sólido marrom com fusão na faixa de 235,8 a 238,0 °C. Pelas análises espectroscópicas verificou-se que o sólido obtido trata-se do flavonoide (-)-epicatequina (**29**; 122,2 mg).

O subgrupo EE-FA-3 (Tabela II.8) foi submetido à recristalização em MeOH, fornecendo um sólido amarelo com fusão na faixa de 280,4 a 284,2 °C. Pelas análises espectroscópicas verificou-se que o sólido obtido trata-se do esteroide β -sitosterol-3-O- β -D-glicopiranosídeo (**30**; 40,0 mg).

Tabela II.10. Frações e subgrupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EE-FA-2-2

Fração	Eluente	Subgrupo	Massa (g)
1-5	CHCl ₃	EE-FA-2-2a	0,0015
6-9	CHCl ₃ /AcOEt (2:3)	EE-FA-2-2b	0,1222
10-14	AcOEt	EE-FA-2-2c	0,0125
15-20	MeOH	EE-FA-2-2d	0,0076

O subgrupo EE-FA-4 (Tabela II.8; pág. 22) foi submetido a fracionamento por CC de sílica gel, sendo coletadas 162 frações de 18,0 mL eluídas em CH₂Cl₂, AcOEt, EtOH e misturas destes em gradiente crescente de polaridade. Após análises comparativas por CCD, as frações foram reunidas em grupos, conforme Tabela II.11.

Tabela II.11. Frações e subgrupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EE-FA-4

Fração	Eluente	Subgrupo	Massa (g)
1-37	CH ₂ Cl ₂ CH ₂ Cl ₂ / AcOEt (4:1)	EE-FA-4-1	0,0259
38-77	CH ₂ Cl ₂ / AcOEt (3:2)	EE-FA-4-2	0,0146
78-112	CH ₂ Cl ₂ / AcOEt (1:4)	EE-FA-4-3	0,5261
113-117	AcOEt	EE-FA-4-4	0,2336
118-147	AcOEt/EtOH (9:1) AcOEt/EtOH (4:1) AcOEt/EtOH (1:1)	EE-FA-4-5	0,1298
148-162	AcOEt/EtOH (1:4) AcOEt/EtOH (1:9) EtOH	EE-FA-4-6	0,0063

O subgrupo EE-FA-4-3 (Tabela II.11) foi submetido a fracionamento por CC de sílica gel sob pressão, sendo coletadas 68 frações de 12,0 mL eluídas de forma isocrática com CHCl₃/AcOEt (1:9). Após análises comparativas por CCD, as frações foram reunidas em grupos, conforme Tabela II.12 (pág. 24).

O subgrupo EE-FA-4-3a (Tabela II.12; pág. 24) foi submetido a análises espectroscópicas e indicou tratar-se de uma quantidade adicional de (-)-epicatequina (**29**; 21,7 mg).

O subgrupo EE-FA-4-3b (Tabela II.12; pág. 24) foi submetido a fracionamento por CC de sílica gel sob pressão, sendo coletadas 69 frações de 10,0 mL eluídas de forma isocrática com CH₂Cl₂/AcOEt (4:1). Após análises comparativas por CCD, as frações foram reunidas em grupos, conforme Tabela II.13 (pág. 24).

Tabela II.12. Frações e subgrupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EE-FA-4-3

Fração	Eluente	Subgrupo	Massa (g)
1-13	CHCl ₃ /AcOEt (1:9)	EE-FA-4-3a	0,0217
14-18	CHCl ₃ /AcOEt (1:9)	EE-FA-4-3b	0,2645
19-25	CHCl ₃ /AcOEt (1:9)	EE-FA-4-3c	0,1747
26-66	CHCl ₃ /AcOEt (1:9)	EE-FA-4-3d	0,0630
67-68	CHCl ₃ /AcOEt (1:9)	EE-FA-4-3e	0,1188

Tabela II.13. Frações e subgrupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EE-FA-4-3b

Fração	Eluente	Subgrupo	Massa (g)
1-10	CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (4:1)	EE-FA-4-3b1	0,0771
11-14	CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (4:1)	EE-FA-4-3b2	0,0092
15-29	CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (4:1)	EE-FA-4-3b3	0,1153
30-62	CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (4:1)	EE-FA-4-3b4	0,0185
63-64	CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (4:1)	EE-FA-4-3b5	0,0212

O subgrupo EE-FA-4-3b1 (Tabela II.13) foi submetido a análises espectroscópicas e indicou tratar-se de uma quantidade adicional do flavonoide (-)-epicatequina (**29**; 77,1 mg).

O subgrupo EE-FA-4-3b3 (Tabela II.13) foi submetido a fracionamento por CC de Sephadex, sendo coletadas 50 frações de 3,0 mL eluídas de forma isocrática com MeOH. Após análises comparativas por CCD, as frações foram reunidas em grupos, conforme Tabela II.14.

Tabela II.14. Frações e subgrupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EE-FA-4-3b3

Fração	Eluente	Subgrupo	Massa (g)
1-14	MeOH	EE-FA-4-3b3a	0,0062
15-46	MeOH	EE-FA-4-3b3b	0,0541
47-50	MeOH	EE-FA-4-3b3c	0,0001

O subgrupo EE-FA-4-3b3b (Tabela II.14) forneceu um sólido alaranjado com fusão na faixa de 190,5 a 194,2 °C. Pelas análises espectroscópicas verificou-se que o sólido obtido trata-se da procianidina (+)-epicatequina-(4 β -8)-epicatequina (**31**; 54,1 mg).

O subgrupo EE-FA-5 (300,0 mg; Tabela II.8; pág. 22) foi submetido a fracionamento por CC de sílica gel sob pressão, sendo coletadas 74 frações de 15,0 mL eluídas de forma

isocrática com $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}/\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ (1,0:8,5:0,5). Após análises comparativas por CCD, as frações foram reunidas em grupos, conforme Tabela II.15.

Tabela II.15. Frações e subgrupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EE-FA-5

Fração	Eluente	Subgrupo	Massa (g)
1-14	$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}/\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ (1,0:8,5:0,5)	EE-FA-5-1	0,0403
15-16	$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}/\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ (1,0:8,5:0,5)	EE-FA-5-2	0,0086
17-18	$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}/\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ (1,0:8,5:0,5)	EE-FA-5-3	0,0272
19-74	$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}/\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ (1,0:8,5:0,5)	EE-FA-5-4	0,0162

O subgrupo EE-FA-5-1 (Tabela II.15) foi submetido a análises espectroscópicas e indicou tratar-se de uma quantidade adicional do flavonoide (-)-epicatequina (**29**; 40,3 mg).

O grupo EE-FE (Tabela II.6; pág. 20) foi submetido à extração com AcOEt, EtOH e MeOH, fornecendo os subgrupos EE-FE-Ac (2,8861 g), EE-FE-Et (9,0162 g) e EE-FE-Me (7,4189 g), respectivamente.

O subgrupo EE-FE-Ac (1,0 g) foi submetido a CC de sílica gel sob pressão, sendo coletadas 210 frações de 12,0 mL eluídas em CH_2Cl_2 , AcOEt, MeOH e misturas destes em gradiente crescente de polaridade. Após análises comparativas por CCD, as frações foram reunidas em grupos, conforme Tabela II.16.

Tabela II.16. Frações e subgrupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EE-FE-Ac

Fração	Eluente	Subgrupo	Massa (g)
1-53	CH_2Cl_2 AcOEt	EE-FE-Ac-1	0,0016
54-120	AcOEt/MeOH (7:3)	EE-FE-Ac-2	0,0850
121-169	AcOEt/MeOH (1:1)	EE-FE-Ac-3	0,3557
170-210	AcOEt/MeOH (3:7) MeOH	EE-FE-Ac-4	0,1269

O subgrupo EE-FE-Ac-2 (Tabela II.16) foi submetido a fracionamento por CC de sílica gel, sendo coletadas 94 frações de 1,5 mL eluídas em CH_2Cl_2 , AcOEt, MeOH e misturas destes em gradiente crescente de polaridade. Após análises comparativas por CCD, as frações foram reunidas em grupos, conforme Tabela II.17 (pág. 26).

Tabela II.17. Frações e subgrupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EE-FE-Ac-2

Fração	Eluente	Subgrupo	Massa (g)
1-20	CH ₂ Cl ₂	EE-FE-Ac-2a	0,0026
21-70	AcOEt/CH ₂ Cl ₂ (4:1)	EE-FE-Ac-2b	0,0528
71-88	AcOEt	EE-FE-Ac-2c	0,0167
89-94	MeOH	EE-FE-Ac-2d	0,0013

O subgrupo EE-FE-Ac-2b (Tabela II.17) forneceu um sólido marrom com fusão na faixa de 235,8 a 238,0 °C. Pelas análises espectroscópicas confirmou-se que o sólido obtido trata-se de uma quantidade adicional do flavonoide (-)-epicatequina (**29**; 52,8 mg).

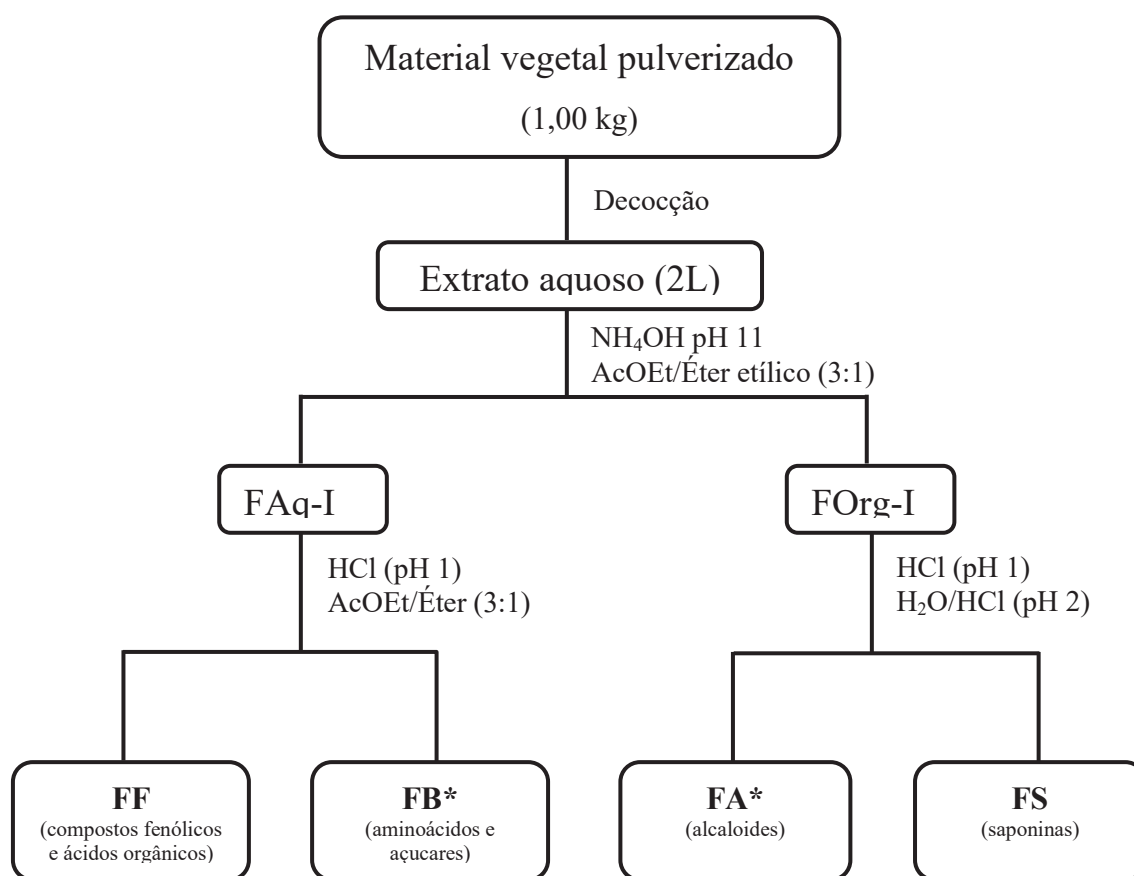
II.2.1.7. Obtenção do extrato aquoso e da fração fenólica de *L. ochrophylla* Mart

Cascas pulverizadas (1,00 kg) do caule de *L. ochrophylla* foram submetidas a decocção com água, em volume suficiente para a total submersão da amostra, por 4 h a 60 °C, sendo, em seguida, maceradas por 30 h a temperatura ambiente. A mistura obtida foi filtrada, fornecendo o extrato aquoso (EAq) de *L. ochrophylla*.

EAq foi colocado em funil de separação, sendo adicionado hidróxido de amônio até pH 11,0. Em seguida foram adicionados, por três vezes, 300,0 mL de solução de acetato de etila/éter etílico (3:1), obtendo-se as fases aquosa (FAq-I) e a fase orgânica (FOrg-I), que foram separadas empregando um funil de separação.

FAq-I foi acidificada com HCl até pH 1,0 e, novamente, submetida à extração com solução de acetato de etila/éter etílico (3:1), obtendo-se uma fase orgânica constituída, principalmente, por compostos fenólicos e ácidos orgânicos (fração fenólica, **FF**) e uma fase aquosa constituída, principalmente, por aminoácidos e açúcares (**FB**).⁴⁷

FOrg-I foi acidificada também com HCl até pH 1,0 e submetida à extração com solução aquosa de HCl (pH 2,0), obtendo-se uma fase aquosa constituída principalmente por alcaloides (fração alcaloídica, **FA**) e uma fase orgânica constituída principalmente por saponinas (fração saponínica, **FS**).⁴⁷ **FF** e **FS** foram adicionadas a 100,0 mL de água destilada e submetidas à evaporação dos solventes orgânicos, empregando evaporador rotatório. O Esquema II.2 (pág. 27) apresenta a sequência metodológica para a obtenção das frações **FF**, **FB**, **FA** e **FS** da casca de *L. ochrophylla*.



***FB** não foi estudada uma vez que se trata de uma fração espessa e de difícil manuseio; **FA** não foi estudada, pois a casca do caule de *L. ochrophylla* apresentou resultado negativo para a presença de alcaloides.

Esquema II.2. Sequência metodológica para o isolamento de constituintes de **FF** de *L. ochrophylla*.

II.2.1.8. Prospecção fitoquímica de frações do extrato aquoso de *L. ochrophylla* Mart

Alíquotas das frações **FF** e **FS** de *L. ochrophylla* foram analisadas a fim de confirmar as principais classes químicas presentes. **FF** e **FS** foram submetidas aos mesmos testes descrito no capítulo II (pág. 16) para a detecção de fenóis e saponinas, respectivamente.

II.2.1.9. Estudo da fração fenólica de *L. ochrophylla*

FF foi submetida a CLAE preparativa com fase móvel isocrática constituída pelos eluentes **A** (metanol) e **B** (água:ácido trifluoroacético 99,5:0,5 v/v, pH 4,0) contendo 80% de **B** e 20% de **A** em um intervalo de 0,0 a 20,0 min. A Figura II.3 (pág. 28) apresenta o cromatograma de **FF** obtido a 280 nm.

A amostra referente ao pico **F-2** (TR = 2,8 min), após liofilização, forneceu um sólido amarelo e impuro (**32**; 52,2 mg). Pelas análises espectroscópicas e comparação com

substâncias previamente isoladas de plantas e disponíveis em nosso laboratório, verificou-se que a amostra contém o ácido *trans*-aconítico como um de seus constituintes.

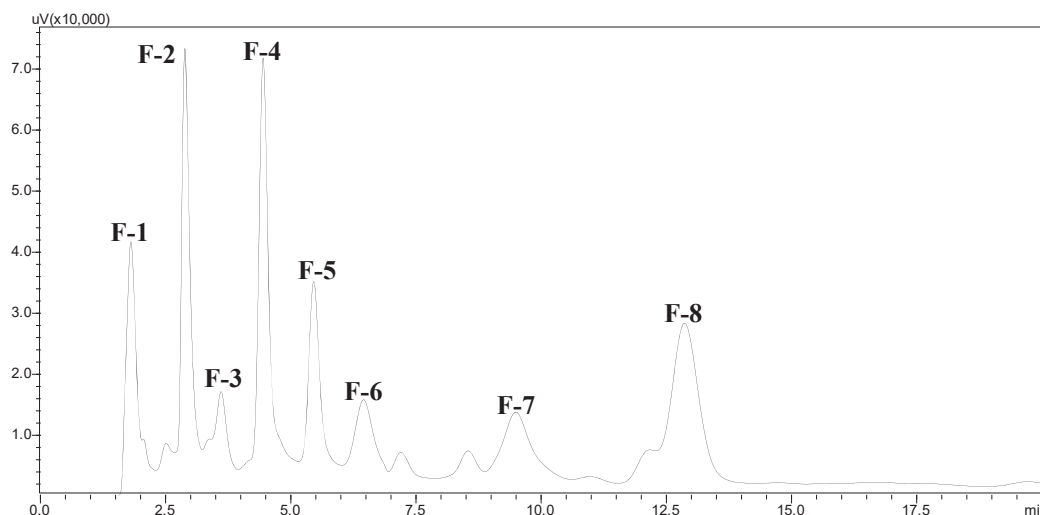


Figura II.3. Cromatograma de CLAE a 280 nm de **FF** (TR entre 0,0 e 20 min); concentração A:B (1:4), onde A = metanol e B = solução água:ácido trifluoracético 99,5:0,5.

II.3. Resultados e Discussão

II.3.1. Prospecção fitoquímica

A Figura II.4 (pág. 29) apresenta os resultados positivos para os testes químicos da presença de triterpenos (A) em **EH**, flavonoides (B) e saponinas (C) em **EE**. São apresentados também os resultados positivos para a presença de saponinas (D) em **FS** e compostos fenólicos (E) em **FF**.

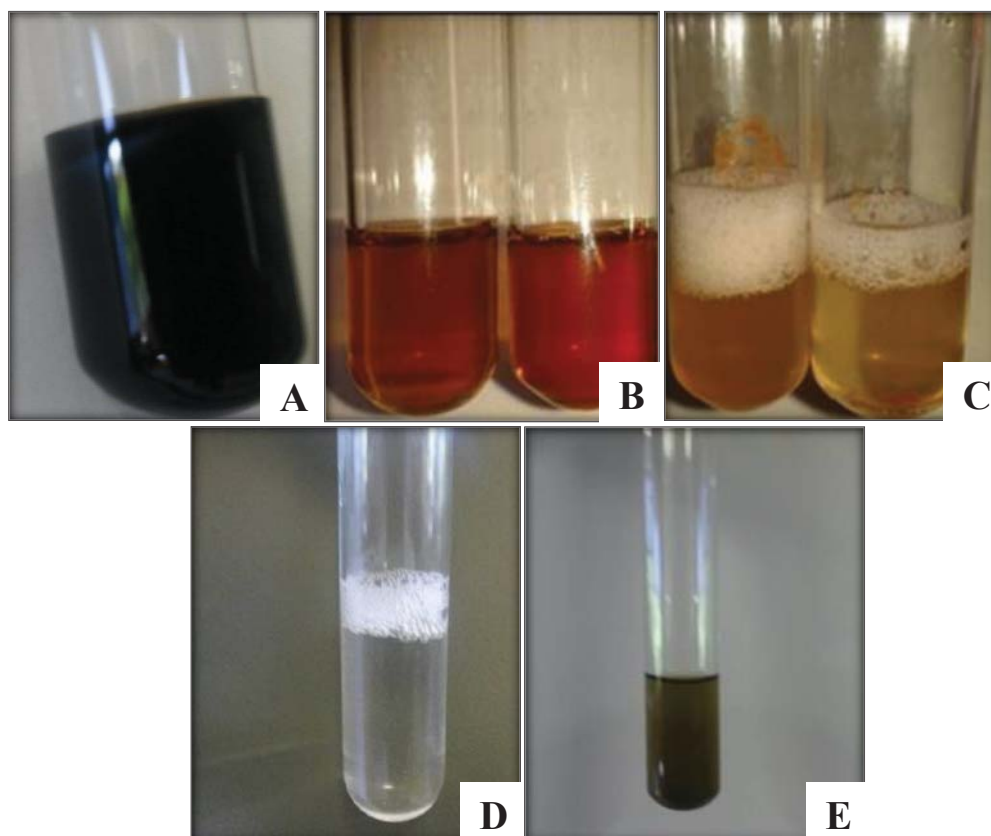


Figura II.4. Foto dos resultados obtidos para os testes de prospecção fitoquímica. Presença de triterpenos em **EH** (A), flavonoides em **EE** (B), saponinas em **EE** (C), saponinas em **FS** (D) e compostos fenólicos em **FF** (E).

II.3.2. Identificação estrutural dos fitoconstituintes de EH e EE

II.3.2.1. Análise de ácidos graxos

A composição de ácidos graxos da casca do caule de *L. ochrophylla* é mostrada na Tabela II.18 (pág. 30). Os ácidos hexadecanóico (palmítico) e tetradecanóico (mirístico) são os ácidos graxos em maiores proporções em **EH** com 25,40% e 23,12%, respectivamente, seguidos pelos ácidos 9(Z)-octadecanóico (oléico) e 9(Z),12(Z)-octadecadienóico (linoléico) com 15,97% e 11,67%, respectivamente. **EH** contém também outros ácidos em menores proporções, tais como os ácidos octadecanóico (esteárico), dodecanóico (láurico), 6(Z),9(Z),12(Z)-octadecatrienóico (γ -linolênico) e 9(Z)-hexadecanóico (palmitoleico).

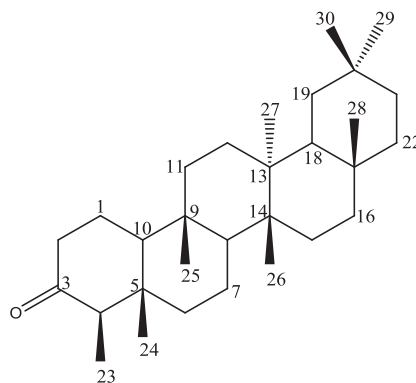
O perfil de ácidos graxos da casca do caule de *L. ochrophylla* é consistente com os dados da literatura que indicam os ácidos palmítico, mirístico, oleico, linoleico, esteárico e linolênico como os ácidos graxos mais abundantes na natureza.⁴⁸

Tabela II.18. Composição relativa (%) de ácidos graxos da casca do caule de *L. ochrophylla*

Ácido graxo	Tempo de retenção (min)	Porcentagem relativa (%)
C12:0 (láurico)	4,473	3,12
C14:0 (mirístico)	7,031	23,12
C16:0 (palmítico)	9,578	25,40
C16:1 (palmitoleico)	9,778	1,06
C18:0 (eteárico)	11,987	7,35
C18:1 (oleico)	12,123	15,97
C18:2 (linoleico)	12,598	11,67
C18:3 (γ -linolênico)	13,298	1,67
Outros		10,64

A investigação sobre o teor de ácidos graxos tornou-se um tema de grande interesse devido aos efeitos benéficos sobre a saúde humana. O ácido oleico pode impedir a progressão da adrenoleucodistrofia, uma doença fatal que afeta o cérebro e glândulas supra-renais, além de ser responsável pela redução da pressão sanguínea.⁴⁸ Ácidos graxos poli-insaturados, tais como ácido linoleico e ácido linolênico são essenciais para o metabolismo, com efeitos benéficos sobre a saúde humana. A ausência destes tem sido relacionada com doenças cardiovasculares.⁴⁹

II.3.2.2. Análise estrutural do composto 22



O composto **22**, isolado a partir de EH-G2, apresentou-se como um sólido branco com fusão na faixa de 241,7 a 244,5 °C (Literatura = 250,0 a 253,6°C)⁴⁹. O espectro no IV do composto **22** (Figura A1; pág. 143) apresenta absorções entre 2970 e 2868 cm⁻¹ características de estiramentos assimétricos e simétricos, respectivamente, da ligação C-H de compostos alifáticos. A absorção em 1714 cm⁻¹ é característica de estiramento de ligação C=O de carbonila de cetona. As absorções em 1458 e 1390 cm⁻¹ são características de deformações angulares no plano de ligação C-H de grupos alifáticos.⁵⁰

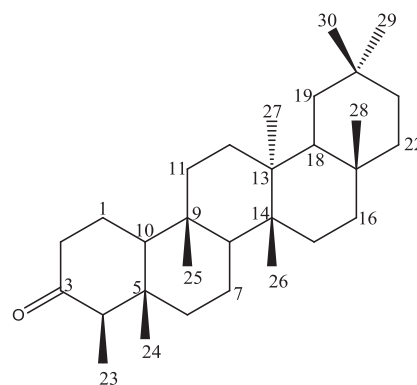
O espectro de RMN de ^1H (Figura A2; pág. 143) apresenta apenas sinais entre δ_{H} 2,42 e 0,73, característicos de hidrogênio alifático. O espectro de RMN de ^{13}C (Figura A3; pág. 144) apresenta 30 sinais de núcleos de carbono e pelo subespectro DEPT 135 (Figura A4; pág. 144) observa-se que são de oito CH_3 , 11 CH_2 , quatro CH e sete C , característicos de triterpeno da série friedelano. O espectro de RMN de ^{13}C apresenta sinais em δ_{C} 213,2 e entre δ_{C} 59,5 e 6,8, característicos de carbono carbonílico e de núcleos de carbono saturado, respectivamente.^{51,52}

Estas informações aliadas à comparação com os dados de RMN de ^{13}C da literatura (Tabela II.19) permitiram identificar o composto **22** como sendo friedelina. O triterpeno friedelina está sendo descrito pela primeira vez no gênero *Luehea*.

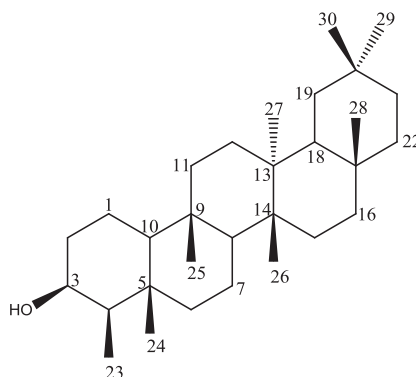
Tabela II.19. Dados de RMN de ^{13}C do composto **22** e dados descritos na literatura para a friedelina⁵²

C	δ_{C}^* de 22	δ_{C}^* da Friedelina	C	δ_{C}^* de 22	δ_{C}^* da Friedelina
1	22,3	22,3	16	36,0	36,0
2	41,5	41,5	17	30,0	30,0
3	213,2	213,2	18	42,8	42,8
4	58,2	58,2	19	35,4**	35,6
5	42,2	42,1	20	28,2	28,2
6	41,3	41,3	21	32,8	32,8
7	18,3	18,2	22	39,3	39,3
8	53,1	53,1	23	6,8	6,8
9	37,5	37,4	24	14,7	14,7
10	59,5	59,4	25	18,0	18,0
11	35,6**	35,6	26	20,3	20,3
12	30,5	30,5	27	18,7	18,7
13	39,7	39,7	28	32,1	32,1
14	38,3	38,3	29	35,0	35,0
15	32,4	32,4	30	31,8	31,8

*Solvente: CDCl_3 ; **Podem estar trocados.



II.3.2.3. Análise estrutural do composto 23



O composto **23**, isolado a partir de EH-G3-4, apresentou-se como um sólido branco com fusão na faixa de 252,0 a 257,4 °C (Literatura = 243,0 a 247,8 °C).⁴⁹ O espectro no IV do composto **23** (Figura A5; pág. 145) apresenta absorção em 3478 cm⁻¹, característica de estiramentos de ligação O-H de grupos hidroxila. As absorções entre 3004 e 2868 cm⁻¹ são características de estiramentos assimétricos e simétricos, respectivamente, da ligação C-H de grupos alifáticos. As absorções em 1448 cm⁻¹ e 1386 cm⁻¹ são características de deformações angulares no plano de C-H de grupos alifáticos e no plano da ligação O-H de grupos hidroxila, respectivamente.⁵⁰

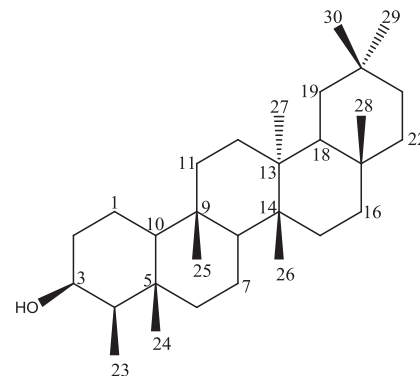
O espectro de RMN de ¹H (Figura A6; pág. 145) apresenta um multipeto centrado em δ_H 3,73, característico de hidrogênio carbinólico. Sinais entre δ_H 1,92 e 0,73 são característicos de hidrogênio alifático. O espectro de RMN de ¹³C (Figura A7; pág. 146) apresenta 30 sinais de núcleos de carbono e pelo subespectro DEPT 135 (Figura A8; pág. 146) observa-se que são de oito CH₃, 11 CH₂, cinco CH e seis C, característicos de triterpeno da série friedelano. O espectro de RMN de ¹³C apresenta sinais em δ_C 72,8 e entre δ_C 61,4 e 11,6 característicos de carbono carbinólico e de núcleos de carbono saturado, respectivamente.^{51,52}

Estas informações aliadas à comparação com os dados de RMN de ¹³C da literatura (Tabela II.20; pág. 33) permitiram identificar o composto **23** como sendo β -friedelinol. O triterpeno β -friedelinol está sendo descrito pela primeira vez no gênero *Luehea*.

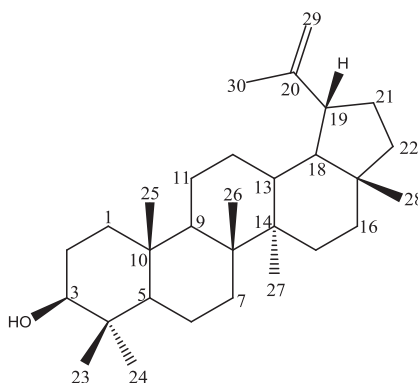
Tabela II.20. Dados de RMN de ^{13}C do composto **23** e dados descritos na literatura para o β -friedelinol⁵²

C	δ_{C}^* de 23	δ_{C}^* do β -Friedelinol	C	δ_{C}^* de 23	δ_{C}^* do β -Friedelinol
1	15,8	16,1	16	35,7**	35,8
2	36,1	36,1	17	30,0	30,0
3	72,8	71,6	18	42,9	42,8
4	49,2	49,6	19	35,4**	35,4
5	30,0	30,0	20	28,2	28,1
6	41,8	41,9	21	32,8	32,7
7	17,6	17,6	22	38,4	38,2
8	53,2	52,3	23	11,6	11,6
9	37,1	37,2	24	16,4	16,3
10	61,4	61,6	25	18,3	18,2
11	35,6**	35,6	26	20,1	20,1
12	30,7	30,7	27	18,7	18,6
13	38,4	38,4	28	32,1	32,0
14	39,7	39,6	29	35,0	35,0
15	32,4	32,4	30	31,8	31,7

*Solvente: CDCl_3 ; **Podem estar trocados.



II.3.2.4. Análise estrutural do composto **24**



O composto **24**, isolado a partir de EH-G4-2, apresentou-se como um sólido branco com fusão na faixa de 181,0 a 183,2 °C (Literatura = 165,0 a 170,0 °C).⁵³ O espectro no IV do composto **24** (Figura A9; pág. 147) apresenta uma banda larga de absorção em 3400 cm^{-1} , característica de estiramento da ligação O-H de grupo hidroxila. Absorções entre 2938 e 2850 cm^{-1} são características de estiramentos C-H de grupos alifáticos. A absorção registrada em 1638 cm^{-1} é característica de estiramento C=C de alqueno. Absorções em 1454 e 1382 cm^{-1} são características de deformações angulares de grupos metila e metilênicos de cadeia alifática.⁵⁰

O espectro de RMN de ^1H (Figura A10; pág. 147) apresenta sinais em δ_{H} 4,68 e 4,56, característicos de hidrogênio olefinico. O multipeto centrado em δ_{H} 3,18 é característico de hidrogênio carbinólico. Os vários sinais entre δ_{H} 2,44 e 0,76 são característicos de hidrogênio alifático. O espectro de RMN de ^{13}C (Figura A11; pág. 148) apresenta 30 sinais de núcleos de carbono e pelo subespectro DEPT 135 (Figura A12; pág. 148) observa-se que são de sete CH_3 , 11 CH_2 , seis CH e seis C . O espectro de RMN de ^{13}C apresenta sinais em δ_{C} 151,1 e 109,5, característicos de carbono alquenílico da série lupano. O sinal em δ_{C} 79,1 é característico de carbono carbinólico do anel lupano. Os demais sinais registrados entre δ_{C} 55,4 e 14,7 são de núcleos de carbono saturado.^{51,52}

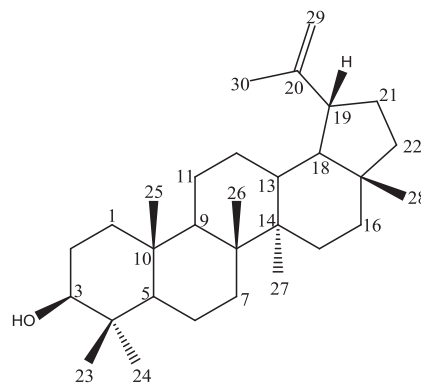
Estas informações aliadas à comparação com os dados de RMN de ^{13}C da literatura (Tabela II.21; pág. 35) permitiram identificar o composto **24** como sendo lupeol. No gênero *Luehea* esse triterpeno foi descrito para as espécies *L. Divaricata* e *L. candicans*.^{27, 54}

Dentre os compostos isolados no estudo fitoquímico da casca do caule de *L. ochrophylla*, o triterpeno lupeol foi encontrado em grande quantidade. Inúmeras atividades biológicas são descritas na literatura para o lupeol, tais como as atividades nefroprotetora⁵⁵ e hepatoprotetora,⁵⁶ bem como a atividade anti-inflamatória, responsável pela redução do edema e do infiltrado inflamatório.⁵⁷ A atividade antidiabética do lupeol está associada à redução da glicose no sangue pelo estímulo à utilização de glicose pela musculatura esquelética.^{58,59} Diante disso e da abundante presença do lupeol no extrato em hexano e na fração em CH_2Cl_2 do extrato em EtOH, é possível sugerir tais atividades biológicas mencionadas para a casca do caule de *L. ochrophylla*, além de justificar o seu uso popular no tratamento do reumatismo e da artrite.

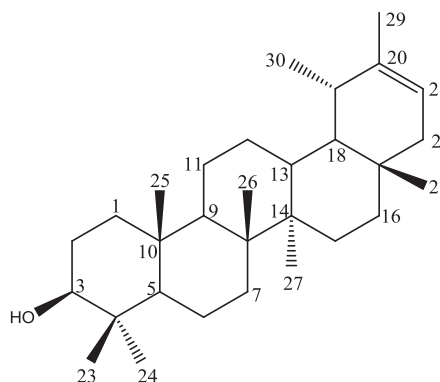
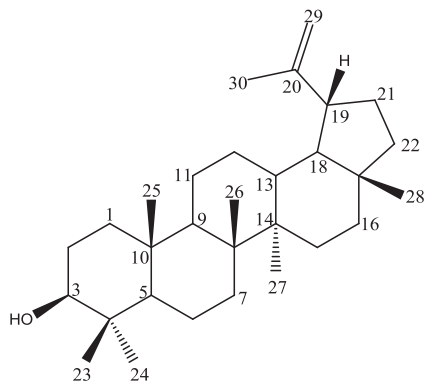
Tabela II.21. Dados de RMN de ^{13}C do composto **24** e dados descritos na literatura para o lupeol⁵²

C	δ_{C}^* de 24	δ_{C}^* do Lupeol	C	δ_{C}^* de 24	δ_{C}^* do Lupeol
1	38,8**	38,7	16	35,7	35,5
2	27,5	27,4	17	43,1	43,0
3	79,1	78,9	18	48,4	48,2
4	38,9**	38,8	19	48,1	47,9
5	55,4	55,3	20	151,1	150,9
6	18,4	18,3	21	30,0	29,8
7	34,4	34,2	22	40,1	40,0
8	40,9	40,8	23	28,1	28,0
9	50,6	50,4	24	15,5	15,4
10	37,3	37,1	25	16,3	16,1
11	21,0	20,9	26	16,1	15,9
12	25,2	25,1	27	14,7	14,5
13	38,1	38,0	28	18,1	18,0
14	43,0	42,8	29	109,5	109,3
15	27,5	27,4	30	19,4	19,3

*Solvente: CDCl_3 ; **Podem estar trocados.



II.3.2.5. Análise estrutural da fração EH-G4-3



EH-G4-3 apresentou-se como um sólido branco. O espectro no IV (Figura A13; pág. 149) apresenta uma banda larga de absorção em 3442 cm^{-1} , característica de estiramento da ligação O-H de grupo hidroxila. Absorções entre 2942 e 2852 cm^{-1} são características de estiramentos C-H de grupos alifáticos. As absorções registradas em 1640 cm^{-1} e 1382 cm^{-1} são características de estiramento C=C de alqueno e deformação angular de grupos metila e metilênicos de cadeia alifática, respectivamente.⁵⁰

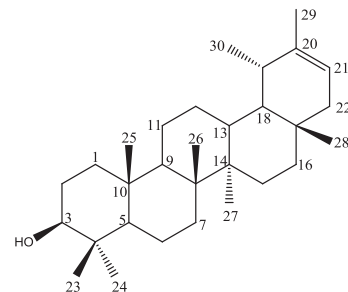
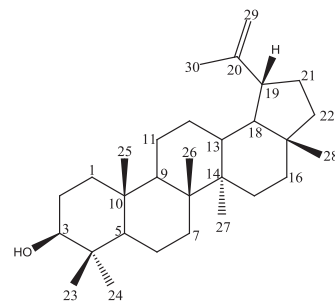
O espectro de RMN de ^1H (Figura A14; pág. 149) apresenta sinais em δ_{H} 5,18, 4,69 e 4,57 característicos de hidrogênio olefínico. O multipeto centrado em δ_{H} 3,20 é característico de hidrogênio carbinólico. Os vários sinais registrados entre δ_{H} 2,43 e 0,67 são característicos

de hidrogênio alifático. O espectro de RMN de ^{13}C (Figura A15; pág. 150) apresenta 49 sinais de núcleos de carbono e pelo subespectro DEPT 135 (Figura A16; pág. 150) observa-se que são de 11 CH_3 , 16 CH_2 , 10 CH e 12 C . O espectro de RMN de ^{13}C apresenta sinais em δ_{C} 151,0 e 109,3, característicos de carbono alquenílico da série lupano. Os sinais em δ_{C} 139,9 e 118,9 são característicos de carbono alquenílico de triterpenos de esqueleto do tipo pseudotaraxasterano. O sinal registrado em δ_{C} 79,0 é característico de carbono carbinólico. Os demais sinais registrados entre δ_{C} 55,3 e 14,6 são característicos de carbono saturado.^{51,52}

Estas informações aliadas à comparação com os dados de RMN de ^{13}C da literatura (Tabela II.22; pág. 37) permitiram identificar afração EH-G4-3 como sendo uma mistura dos triterpenos lupeol (**24**) e pseudotaraxasterol (**25**). O triterpeno pseudotaraxasterol está sendo descrito pela primeira vez no gênero *Luehea*.

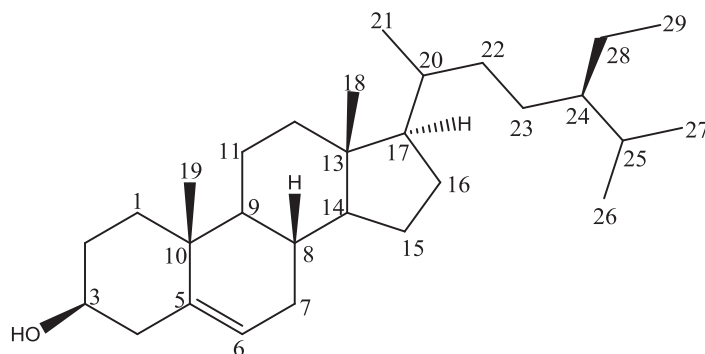
Tabela II.22. Dados de RMN de ^{13}C dos compostos presentes na fração EH-G4-3 e dados descritos na literatura para o lupeol e pseudotaraxasterol⁵²

C	δ_{C}^* de 24	δ_{C}^* do Lupeol	C	δ_{C}^* de 24	δ_{C}^* do Lupeol
1	38,9**	38,7	16	35,6	35,5
2	27,4	27,4	17	43,0	43,0
3	79,0	78,9	18	48,3***	48,2
4	38,8**	38,8	19	48,0***	47,9
5	55,3	55,3	20	151,0	150,9
6	18,3	18,3	21	29,9	29,8
7	34,3	34,2	22	40,0	40,0
8	40,9	40,8	23	28,0	28,0
9	50,5	50,4	24	15,6	15,4
10	37,1	37,1	25	16,1****	16,1
11	21,0	20,9	26	16,0****	15,9
12	25,2	25,1	27	14,6	14,5
13	38,1	38,0	28	18,0	18,0
14	42,9	42,8	29	109,3	109,3
15	27,5	27,4	30	19,3	19,3
C	δ_{C}^* de 25	δ_{C}^* do Pseudotaraxasterol	C	δ_{C}^* de 25	δ_{C}^* do Pseudotaraxasterol
1	38,8**	38,8	16	36,7	36,7
2	27,5	27,4	17	34,4	34,4
3	79,0	79,0	18	48,8	48,7
4	38,9**	38,9	19	36,3	36,3
5	55,3	55,3	20	139,9	139,8
6	18,3	18,3	21	118,9	118,9
7	34,3	34,3	22	42,2*****	42,2
8	41,1	41,1	23	28,0	28,0
9	50,5	50,4	24	15,6	15,4
10	37,1	37,1	25	16,3	16,3
11	21,6	21,6	26	16,1	16,1
12	27,7	27,6	27	14,8	14,8
13	39,3	39,2	28	17,7	17,7
14	42,4*****	42,3	29	22,6	22,5
15	27,1	27,0	30	21,6	21,7



*Solvente: CDCl_3 ; **Podem estar trocados; ***Podem estar trocados; ****Podem estar trocados; *****Podem estar trocados.

II.3.2.6 Análise estrutural do composto 26



O composto **26**, obtido a partir de EH-G4-4, apresentou-se como um sólido branco com fusão na faixa de 135,0 a 138,0 °C (Literatura = 136,0 a 145,0 °C).⁶⁰ O espectro no IV do composto **26** (Figura A17; pág. 151) apresenta uma absorção larga em 3428 cm⁻¹, característica de estiramento da ligação O-H de grupos hidroxila. As absorções entre 2960 e 2850 cm⁻¹ são características de estiramentos assimétricos e simétricos de C-H de grupos alifáticos. A absorção em 1466 cm⁻¹ é característica de deformação angular de C-H de grupos alifáticos. A absorção em 1052 cm⁻¹ é característica de estiramento de C-O.⁵⁰

O espectro de RMN de ¹H (Figura A18; pág. 151) apresenta um multiplete centrado em δ_H 5,35, característico de hidrogênio olefínico. O multiplete centrado em δ_H 3,52 é característico de hidrogênio carbinólico. Os sinais entre δ_H 2,32 e 0,65 são característicos de hidrogênio alifático. O espectro de RMN de ¹³C (Figura A19; pág. 152) apresenta 29 sinais de núcleos de carbono e pelo subespectro DEPT 135 (Figura A20; pág. 152) observa-se que são de seis CH₃, 11 CH₂, oito CH e quatro C. O espectro de RMN de ¹³C apresenta sinais em δ_C 140,8 e 121,7, característicos de carbono alquenílico de esteroide. O sinal registrado em δ_C 71,8 é característico de carbono carbinólico. Os demais sinais registrados entre δ_C 56,8 e 11,9 são característicos de núcleos de carbono saturado.^{51,61}

Estas informações aliadas à comparação com os dados de RMN de ¹³C da literatura (Tabela II.23; pág. 39) permitiram identificar o composto **26** como sendo o esteroide β -sitosterol. O β -sitosterol está sendo descrito pela primeira vez no gênero *Luehea*.

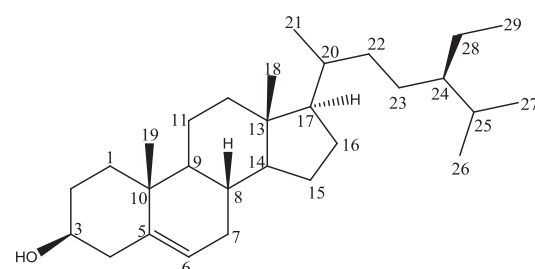
Dentre os compostos isolados da casca do caule de *L. ochrophylla*, o β -sitosterol encontra-se, também, dentre os de maiores porcentagens. Estudos têm evidenciado que o β -sitosterol inibe o crescimento e promove a apoptose em diversas linhagens de células cancerígenas,⁶² além de inibir a oxidação do colesterol ruim LDL (lipoproteína de baixa densidade) e, com isso, diminuir os riscos de aterosclerose.⁶³ O β -sitosterol tem sido utilizado

também no tratamento do diabetes, da inflamação⁶⁴ e da hipertrofia benigna da próstata, bem como para aumentar o fluxo urinário.⁶⁵

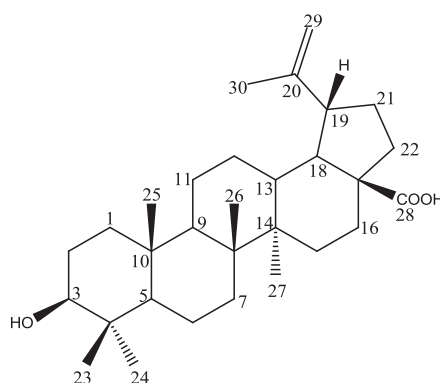
Tabela II.23. Dados de RMN de ¹³C do composto **26** e dados descritos na literatura para o β -sitosterol⁶¹

C	δ_C^* de 26	δ_C do β -Sitosterol	C	δ_C^* de 26	δ_C do β -Sitosterol
1	37,3	37,3	16	28,2	28,2
2	31,7**	31,7	17	56,1	56,1
3	71,8	71,8	18	11,9	11,9
4	42,3	42,4	19	19,4	19,4
5	140,8	140,8	20	36,2	36,2
6	121,7	121,7	21	18,8	18,8
7	31,9**	31,9	22	34,0	34,0
8	31,9**	31,9	23	26,1	26,2
9	50,2	50,2	24	45,9	45,9
10	36,5	36,5	25	29,2	29,2
11	21,1	21,1	26	19,8	19,8
12	39,8	39,8	27	19,1	19,1
13	42,3	42,3	28	23,1	23,1
14	56,8	56,8	29	12,0	12,0
15	24,3	24,3			

*Solvente: CDCl₃; **Podem estar trocados.



II.3.2.7. Análise estrutural do composto 27



O composto **27**, obtido a partir de EH-G6-3, apresentou-se como um sólido branco com fusão na faixa de 275,8 a 276,6 °C (Literatura = 285,2 °C).⁶⁶ O espectro no IV de **27** (Figura A21; pág. 153) apresenta absorção larga em 3448 cm⁻¹, característica de estiramento da ligação O-H de grupo hidroxila. As absorções entre 2942 e 2868 cm⁻¹ são características de estiramentos assimétricos e simétricos da ligação C-H de grupos alifáticos. A absorção em

1686 cm^{-1} é característica de estiramento C=O de ácidos carboxílicos. As absorções entre 1462 e 1376 cm^{-1} são características de deformações angulares de C-H de grupos alifáticos.⁵⁰

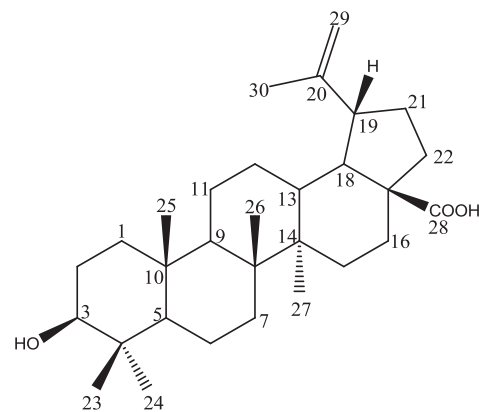
O espectro de RMN de ^1H (Figura A22; pág. 153) apresenta sinais em δ_{H} 4,82 e 4,65, característicos de hidrogênio olefínico. O multipeto centrado em δ_{H} 3,23 é característico de hidrogênio carbinólico. Os vários sinais entre δ_{H} 2,49 e 0,73 são característicos de hidrogênio alifático. O espectro de RMN de ^{13}C (Figura A23; pág. 154) apresenta 30 sinais de núcleos de carbono e pelo subespectro DEPT 135 (Figura A24; pág. 154) pode-se classificá-los como sendo de seis CH_3 , 11 CH_2 , seis CH e sete C. O espectro de RMN de ^{13}C apresenta sinal em δ_{C} 179,1, característico de carbono carboxílico. Os sinais em δ_{C} 151,0 e 109,4 são característicos de carbono alquenílico de triterpenos de esqueleto do tipo lupano. O sinal em 78,4 é característico de carbono carbinólico. Os demais sinais registrados entre δ_{C} 56,4 e 14,7 são característicos de núcleos de carbono saturado.^{51,52}

Estas informações aliadas à comparação com os dados de RMN de ^{13}C da literatura (Tabela II.24; pág. 41) permitiram identificar o composto **27** como sendo o ácido betulínico. Esse composto é descrito pela primeira vez no gênero *Luehea*.

O ácido betulínico é também um dos mais abundantes compostos presentes no caule de *L. ochrophylla*. Este triterpeno apresenta atividade anticâncer e atividade anti-HIV.⁶⁷ Em células cancerosas, o ácido betulínico é um agente citotóxico que desencadeia a apoptose via efeito direto sobre as mitocôndrias.⁶⁸ Quanto à atividade anti-HIV, embora o mecanismo exato não tenha sido elucidado, sugere-se que o ácido betulínico e seus análogos atuem na fase inicial do ciclo de vida do HIV, impedindo a penetração do vírus nas células hospedeiras.^{67,69}

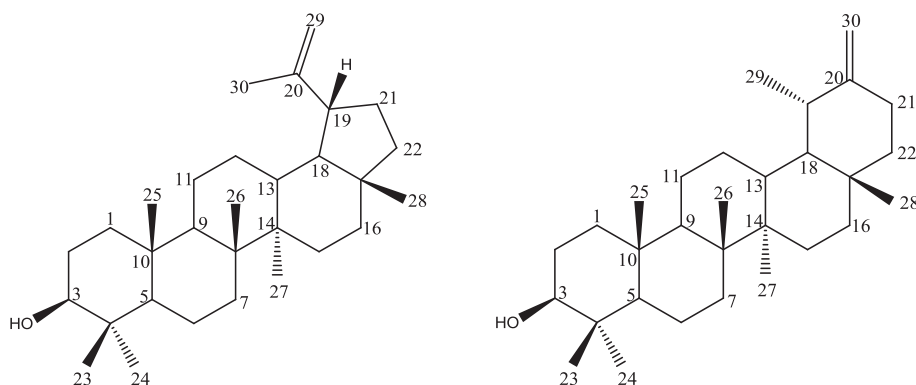
Tabela II.24. Dados de RMN de ^{13}C do composto **27** e dados descritos na literatura para o ácido betulínico⁵²

C	δ_{C}^* de 27	δ_{C}^{**} do Ácido betulínico	C	δ_{C}^* de 27	δ_{C}^{**} do Ácido betulínico
1	39,0***	38,7	16	32,6	32,1
2	28,2	28,3	17	56,4	56,3
3	78,4	78,9	18	47,1	47,8
4	39,1***	38,8	19	49,4	49,2
5	55,6	55,3	20	151,0	150,3
6	18,4	18,3	21	30,9	31,2
7	34,5	34,3	22	37,3	37,0
8	40,8	41,2	23	27,6	27,9
9	50,7	50,5	24	15,7	16,3
10	37,3	37,2	25	16,1****	16,1
11	21,0	20,8	26	16,2****	16,1
12	25,7	25,5	27	14,7	14,7
13	38,3	38,4	28	179,1	180,5
14	42,5	42,4	29	109,4	109,6
15	29,9	30,5	30	19,4	19,4



*Solvente: CDCl_3 e $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$; **Solvente: CDCl_3 ; ***Podem estar trocados; ****Podem estar trocados.

II.3.2.8. Análise estrutural da fração EE-FD-3



A fração EE-FD-3 apresentou-se como um sólido branco. O espectro no IV (Figura A25; pág. 155) apresenta absorção larga em 3422 cm^{-1} , característica de estiramento da ligação O-H de grupo hidroxila. Absorções entre 2940 e 2852 cm^{-1} são características de estiramentos C-H de grupos alifáticos. As absorções em 1630 e 1382 cm^{-1} são características de estiramento C=C de alqueno e deformação angular de grupos metila e metilênicos de cadeia alifática, respectivamente.⁵⁰

O espectro de RMN de ^1H (Figura A26; pág. 155) apresenta sinais entre δ_{H} 4,69 e 4,08, característicos de hidrogênio olefínico. Os multipletos centrados em δ_{H} 3,20 e 3,64 são

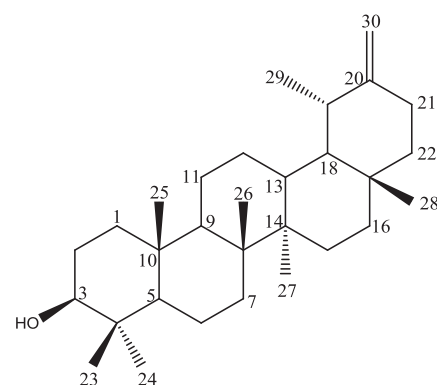
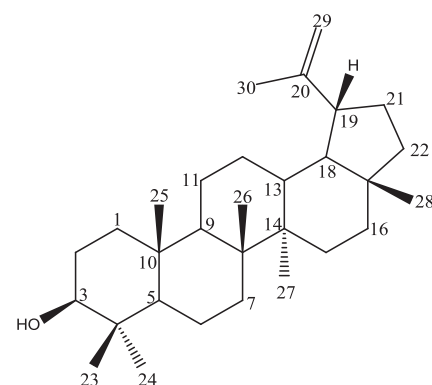
característicos de hidrogênio carbinólico. Os sinais entre δ_H 2,43 e 0,76 são característicos de núcleos de hidrogênio alifático. O espectro de RMN de ^{13}C (Figura A27; pág. 156) apresenta 53 sinais de núcleos de carbono e pelo subespectro DEPT 135 (Figura A28; pág. 156) pode-se classificá-los como sendo de 12 CH_3 , 20 CH_2 , 11 CH e 10 C . O espectro de RMN de ^{13}C apresenta sinais em δ_C 151,0 e 109,1, característicos de carbono alquenílico da série lupano. Os sinais em δ_C 154,6 e 107,1 são característicos de carbono alquenílico de triterpenos de esqueleto do tipo taraxasterano. O sinal em δ_C 79,0 é característico de carbono carbinólico. Os demais sinais registrados entre δ_C 55,4 e 14,6 são característicos de núcleos de carbono saturado.^{51,52}

Estas informações aliadas à comparação com os dados de RMN de ^{13}C da literatura (Tabela II.25; pág. 43) permitiram identificar a fração EE-FD-3 como sendo uma mistura dos triterpenos lupeol (**24**) e taraxasterol (**28**). O triterpeno taraxasterol está sendo descrito pela primeira vez no gênero *Luehea*.

Tabela II.25. Dados de RMN de ^{13}C dos compostos presentes na fração EE-FD-3 e dados descritos na literatura para o lupeol e taraxasterol⁵²

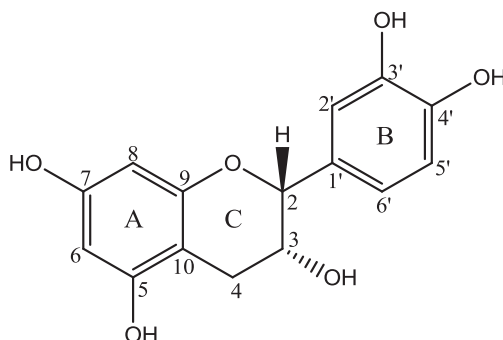
C	δ_{C}^* de 24	δ_{C}^* do Lupeol	C	δ_{C}^* de 24	δ_{C}^* do Lupeol
1	38,8**	38,7	16	35,6	35,5
2	27,5	27,4	17	43,0	43,0
3	79,0	78,9	18	48,3	48,2
4	38,9**	38,8	19	48,0	47,9
5	55,4	55,3	20	151,0	150,9
6	18,3	18,3	21	29,9	29,8
7	34,3	34,2	22	40,0	40,0
8	40,8	40,8	23	28,0	28,0
9	50,5	50,4	24	15,4	15,4
10	37,1	37,1	25	16,1***	16,1
11	21,0	20,9	26	16,0***	15,9
12	25,2	25,1	27	14,6	14,5
13	38,1	38,0	28	18,0	18,0
14	42,9	42,8	29	109,1	109,3
15	27,4	27,4	30	19,3	19,3

C	δ_{C}^* de 28	δ_{C}^* do Taraxasterol	C	δ_{C}^* de 28	δ_{C}^* do Taraxasterol
1	38,8****	38,8	16	38,3	38,3
2	26,7	27,4	17	34,5	34,5
3	79,0	79,0	18	48,7	48,7
4	38,7****	38,8	19	39,4	39,4
5	55,4	55,4	20	154,6	154,6
6	18,3	18,3	21	25,6	25,6
7	34,1	34,1	22	38,9	38,9
8	40,9	40,9	23	28,0	28,0
9	50,5	50,5	24	15,4	15,4
10	37,1	37,1	25	16,8	16,8
11	21,5	21,4	26	15,9	15,9
12	26,2	26,2	27	14,8	14,8
13	39,2	39,2	28	19,5	19,5
14	42,0	42,0	29	25,5	25,5
15	26,7	26,6	30	107,2	107,2



*Solvente: CDCl_3 ; **Podem estar trocados; ***Podem estar trocados; ****Podem estar trocados.

II.3.2.9. Análise estrutural do composto 29



O composto **29**, obtido a partir de EE-FA-2-2b, apresentou-se como um sólido marrom com fusão na faixa de 235,8 a 238,0 °C (Literatura = 235,0 a 237 °C).⁷⁰ O espectro no IV do composto **29** (Figura A29; pág. 157) indica uma absorção em 3288 cm⁻¹, característica de estiramento da ligação O-H de grupo hidroxila. As absorções em 1598, 1516 e 1440 cm⁻¹ são características de estiramentos da ligação C=C de anéis aromáticos. As absorções em 1278 e 1061 cm⁻¹ são características de estiramentos da ligação C-O de fenol e álcool, respectivamente.⁵⁰

Uma vez que alguns sinais presentes no espectro de RMN de ¹H foram superpostos pelo sinal referente à água residual (δ_H 4,87)⁷¹ quando analisado em temperatura ambiente, este espectro foi novamente obtido a temperatura de 40°C (Figura A30; pág. 157). O novo espectro permitiu elucidar com maior clareza a estrutura referente ao composto **29**. A análise do espectro de RMN de ¹H permitiu identificar a presença de sinais em região característica de hidrogênio aromático (δ_H 8,00 a 6,00). Os dois dupletos em δ_H 7,16 (J = 1,5 Hz) e 6,94 (J = 8,0 Hz) e o duplete duplo em δ_H 6,99 (J = 8,0 e 1,5 Hz), característicos de hidrogênio em anel aromático trissubstituído e em um sistema de spin AMX, podem ser atribuídos, respectivamente, a H-2', H-5' e H-6' de flavonoide. Os dupletos em δ_H 6,13 (J = 2,2 Hz) e 6,11 (J = 2,2 Hz) podem ser atribuídos aos núcleos de hidrogênio aromático H-6 e H-8, respectivamente. O simpleto em δ_H 5,00 pode ser atribuído ao hidrogênio benzil-oximetínico (H-2). O multiplete centrado em δ_H 4,36 pode ser atribuído ao hidrogênio alifático (H-3) do anel C do núcleo flavanoidico. Os dupletos duplos em δ_H 3,04 (J = 15,4 e 4,0 Hz) e 2,92 (J = 15,4 e 4,0 Hz) podem ser atribuídos aos núcleos de hidrogênio metilênico (H-4a e H-4b, respectivamente).⁷²

A análise do espectro de RMN de ¹³C (Figura A31; pág. 158) e do subespectro DEPT-135 (Figura A32; pág. 158) permitiu identificar 15 sinais de carbono, sendo de um CH₂ (δ_C

29,2), sete CH e sete C. Estes sinais confirmam tratar-se de um flavonoide da classe dos flavan-3-ol.⁷³ O espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT 135 apresentam sinais em δ_{C} 158,0 (C-7), 157,7 (C-5), 157,4 (C-9), 145,9 (C-3') e 145,8 (C-4') que foram atribuídos a núcleos de carbono aromático e oxigenado. Sinais em δ_{C} 132,3 (C-1') e 100,1 (C-10) foram atribuídos a núcleos de carbono aromático não hydrogenado. Sinais em δ_{C} 119,4 (C-6'), 115,9 (C-5'), 115,3 (C-2'), 96,4 (C-6) e 95,9 (C-8) foram atribuídos a núcleos de carbono aromático e hydrogenado. Sinais em δ_{C} 80,0, 67,5 e 29,2 foram atribuídos ao carbono benzil-oximetínico (C-2), carbono hidroxilado (C-3) e carbono metilênico (C-4), respectivamente.⁷²

O mapa de contornos HSQC (Figuras A33 e A34; pág. 159) permite correlacionar os sinais de hidrogênio em δ_{H} 7,16 (H-2'), 6,99 (H-6') e 6,94 (H-5') com os sinais de carbono aromático, correspondentes ao anel B do núcleo flavan-3-ol, em δ_{C} 115,3 (C-2'), 119,4 (C-6') e 115,9 (C-5'), respectivamente. Os sinais de hidrogênio em δ_{H} 6,13 (H-6) e 6,11 (H-8) correlacionam-se com os sinais de carbono, correspondentes ao anel A do núcleo flavan-3-ol, em δ_{C} 96,4 (C-6) e 95,9 (C-8), respectivamente. Os sinais de hidrogênio em δ_{H} 5,00 (H-2) e 4,36 (H-3) correlacionam-se com os sinais em δ_{C} 80,0 (C-2) e 67,5 (C-3), respectivamente. Os sinais de hidrogênio em δ_{H} 3,04 (H-4a) e 2,92 (H-4b) correlacionam-se com o sinal de carbono metilênico em δ_{C} 29,2 (C-4). Os sinais de carbono em δ_{C} 80,0 (C-2), 67,5 (C-3) e 29,2 são correspondentes ao anel C do núcleo flavan-3-ol.

O mapa de contornos HMBC (Figuras A35 e A36, pág. 160) apresenta correlações dos sinais de hidrogênio em δ_{H} 7,16 (H-2') e 6,99 (H-6') com o sinal de carbono em δ_{C} 80,0 (C-2). Estas correlações permitem afirmar que o anel B encontra-se ligado ao anel C pelo núcleo de carbono C-2. Correlações no HMBC entre o sinal de hidrogênio em δ_{H} 7,16 (H-2') e o sinal de carbono em δ_{C} 119,4 (C-6'), entre o sinal de hidrogênio em δ_{H} 6,99 (H-6') e o sinal de carbono em δ_{C} 115,3 (C-2') e entre o sinal de hidrogênio em δ_{H} 6,94 (H-5') e o sinal de carbono em δ_{C} 145,9 (C-3') são apresentadas. Estas correlações evidenciam as posições das hidroxilas no anel B do núcleo flavan-3-ol, fato corroborado pelo deslocamento químico dos respectivos núcleos de carbonos. Correlações no HMBC entre o sinal de hidrogênio em δ_{H} 6,13 (H-6) e o sinal de carbono em δ_{C} 95,9 (C-8) e entre o sinal de hidrogênio em δ_{H} 6,11 (H-8) e o sinal de carbono em δ_{C} 96,4 (C-6) evidenciam as posições das hidroxilas no anel A do núcleo flavan-3-ol. Correlações do sinal de hidrogênio em δ_{H} 5,00 (H-2) com o sinal de carbono em δ_{C} 29,2 (C-4) e dos sinais de hidrogênio em δ_{H} 3,04 (H-4a) e 2,92 (H-4b) com o sinal de carbono em δ_{C} 157,6 (C-5) confirmam a posição do carbono metilênico.

O mapa de contornos COSY (Figura A37; pág. 161) apresenta correlação entre o sinal de hidrogênio em δ_H 5,00 (H-2) e os sinais de hidrogênio em δ_H 7,16 (H-2') e 4,36 (H-3). Correlações no COSY são registradas entre o sinal de hidrogênio em δ_H 4,36 (H-3) e os sinais de hidrogênio em δ_H 3,04 (H-4a) e 2,92 (H-4b).

O mapa de contornos NOESY (Figura A38; pág. 161) apresenta correlação entre o sinal de hidrogênio em δ_H 5,00 (H-2) e os sinais de hidrogênio em δ_H 4,36 (H-3) e 3,04 (H-4a). Estas correlações permitem definir a disposição espacial dos átomos de hidrogênio em C-2, C-3 e C-4. O núcleo de hidrogênio H-4a encontra-se em posição cis aos núcleos de hidrogênio H-2 e H-3. Estas informações aliadas à comparação com os dados de RMN de ^{13}C da literatura (Tabela II.26) permitiram identificar o composto **29** como sendo a epicatequina. Esta estrutura foi confirmada pelo pico observado no espectro de massas $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 291,0867, compatível com a sua fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$ (Figura A39; pág. 162).

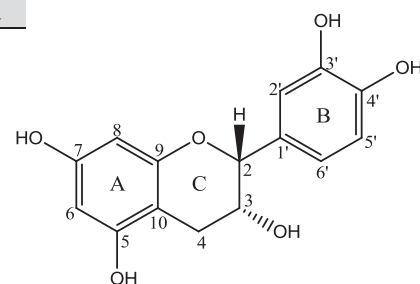
A medida da rotação óptica específica $[\alpha]_D^{20} = -50,0$ ($c = 6 \text{ mg mL}^{-1}$; MeOH; ca. 20 °C) [Literatura: $[\alpha]_D^{24} = -55,7$ ($c = 1,0 \text{ mg mL}^{-1}$; 50% água e acetona; ca. 24 °C)]⁷⁰ permitiu classificar o composto **29** como (-)-epicatequina. No gênero *Luehea*, este flavonoide foi descrito apenas para a casca do caule de *L. divaricata*.²⁷

A (-)-epicatequina se mostrou um dos mais abundantes compostos presentes na casca do caule de *L. ochrophylla*. Este composto apresenta considerável atividade antioxidante na captura de radicais livres e co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico. A importância de substâncias antioxidantes pode ser explicada pela sua correlação com a capacidade de inibir ou retardar patologias relacionadas ao estresse oxidativo, como o câncer, doenças cardiovasculares e envelhecimento das células.⁷⁴

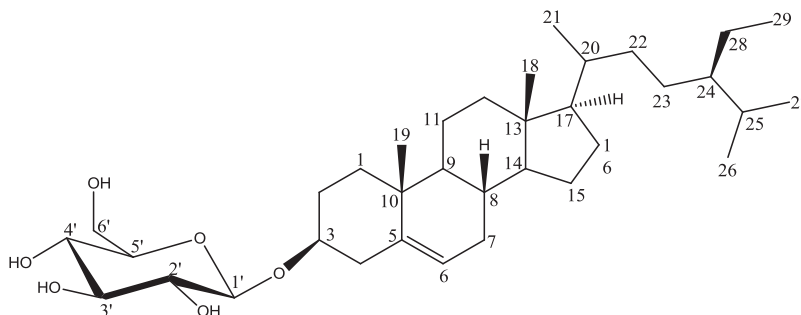
Tabela II.26. Dados de RMN de ^{13}C do composto **29** e dados descritos na literatura para a (-)-epicatequina⁷⁰

C	δ_C^* de 29	δ_C^* da (-)-epicatequina	C	δ_C^* de 29	δ_C^* da (-)-epicatequina
2	79,9	79,9	10	100,1	100,1
3	67,5	67,5	1'	132,3	132,3
4	29,2	29,3	2'	115,9	115,9
5	157,6**	158,0	3'	145,9***	146,0
6	96,4	96,5	4'	145,8***	145,8
7	157,9**	157,7	5'	119,4	119,4
8	95,9	95,9	6'	115,3	115,4
9	157,3**	157,4			

*Solvente: CD_3OD ; **Podem estar trocados; ***Podem estar trocados.



II.3.2.10. Análise estrutural do composto 30



O composto **30**, obtido a partir de EE-FA-3, apresentou-se como um sólido amarelo com fusão na faixa de 280,4 a 284,2 °C (Literatura = 275,0 a 277 °C).⁷⁵ O espectro no IV do composto **30** (Figura A40; pág. 162) apresenta uma banda larga de absorção em 3392 cm⁻¹, característica de estiramento da ligação O-H de grupos hidroxila. As absorções entre 2960 e 2850 cm⁻¹ são características de estiramentos assimétricos e simétricos de C-H de grupos alifáticos. As absorções entre 1466 e 1372 cm⁻¹ são características de deformações angulares de C-H de grupos alquilas. As absorções entre 1166 e 1024 cm⁻¹ são características de estiramentos C-O.⁵⁰

O espectro de RMN de ¹³C e subespectro DEPT 135 (Figuras A41 e A42, respectivamente; pág. 163) apresentam 35 sinais de carbono, sendo que seis deles se encontram na região de carbono hidroxilado (δ_C 80,0 a 60,0) sugerindo uma estrutura glicosilada. Os sinais em δ_C 141,2 e 122,2 são característicos de carbono alquenílico de esteroide e, foram comparados com os sinais apresentados no espectro de RMN de ¹³C pelo composto **26**, β -sitosterol. A partir dessa comparação, foi possível sugerir que o composto **30** trata-se do β -sitosterol glicosilado. Sendo assim, os sinais em δ_C 141,2 e 122,2 foram atribuídos, respectivamente, aos núcleos de carbono C-5 e C-6. Os sinais em δ_C 102,9, 78,9, 78,7, 75,6, 72,0 e 63,1 foram atribuídos, respectivamente, aos núcleos de carbono C-1', C-3', C-5', C-2', C-4' e C-6' do resíduo glicosídico.⁷⁵ Os sinais de carbono do resíduo glicosídico foram equivalentes aos sinais de carbono apresentados na literatura para a Glicose.⁷⁶ O sinal em δ_C 78,5 foi atribuído ao carbono carbinólico C-3. Os demais sinais registrados entre δ_C 57,2 e 12,3 foram atribuídos aos núcleos de carbono saturado.⁷⁵

O espectro de RMN de ¹H (Figura A43; pág. 164) apresenta multipletos centrados em δ_H 5,37 atribuído ao hidrogênio alquenílico H-6. O sinal em δ_H 5,05 foi atribuído ao hidrogênio H-1'. Os dupletos duplos em δ_H 4,57 ($J = 11,7$ e $2,1$ Hz) e 4,41 ($J = 11,7$ e $5,4$ Hz) foram

atribuídos, respectivamente, aos núcleos de hidrogênio H-6'a e H-6'b. O multiplete centrado em δ_H 4,29 foi atribuído aos núcleos de hidrogênio H-3' e H-4'. O tripleto centrado em δ_H 4,07 ($J = 8,7$ Hz) foi atribuído ao hidrogênio H-2'. O multiplete centrado em δ_H 3,99 foi atribuído aos núcleos de hidrogênio H-5' e H-3. Sinais entre δ_H 2,17 e 0,68 foram atribuídos a núcleos de hidrogênio alifático.⁷⁵

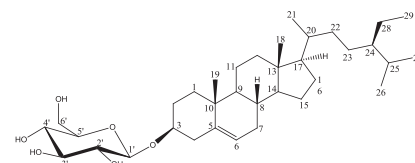
O mapa de contornos HSQC (Figura A44; pág. 164) permite correlacionar os sinais em δ_H 5,05 (H-1'), 4,07 (H-2') e 3,99 (H-5') com os sinais em δ_C 102,9 (C-1'), 75,6 (C-2'), e 78,5 (C-5'), respectivamente. O sinal em δ_H 4,29 (H-3' e H-4') correlaciona-se com os sinais em δ_C 78,9 (C-3') e 72,0 (C-4'). Os sinais em δ_H 4,57 (H-6'a) e 4,41 (H-6'b) correlacionam-se com o sinal em δ_C 63,1 (C-6').

O mapa de contornos HMBC (Figura A45; pág. 165) permite correlacionar o sinal em δ_H 3,99 (H-3) com o sinal em δ_C 102,9 (C-1'). Esta correlação indica a ligação da molécula de glicose ao sitosterol pelo carbono carbinólico C-3.

Estas informações aliadas à comparação com os dados de RMN de ^{13}C da literatura (Tabela II.27; pág. 49) permitiram identificar o composto **30** como sendo o esteroide β -sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo. No gênero *Luehea* esse esteroide foi descrito apenas em amostras de folhas de *L. divaricata*.²⁷

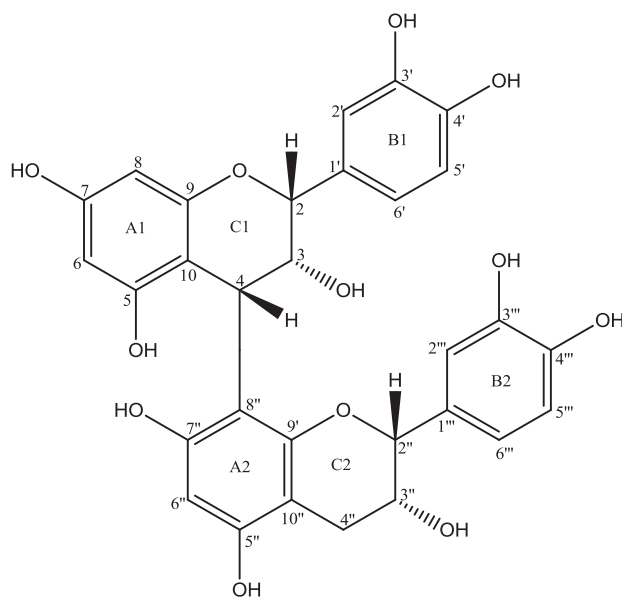
Tabela II.27. Dados de RMN de ^{13}C do composto **30** e dados descritos na literatura para o β -sitosterol-3-O- β -D-glicopiranosídeo⁷⁵

C	δ_{C}^* de 30	δ_{C}^* do β -sitosterol-3-O- β - D-glicopiranosídeo	C	δ_{C}^* de 30	δ_{C}^* do β -sitosterol-3-O- β - D-glicopiranosídeo
1	37,8	37,5	19	19,5****	19,3
2	30,6	30,3	20	36,7	36,4
3	78,5	78,2	21	19,3****	19,0
4	39,7	39,4	22	34,5	34,3
5	141,2	140,9	23	26,7	26,4
6	122,2	122,0	24	46,4	46,1
7	32,5**	32,2	25	29,8	29,5
8	32,4**	32,1	26	20,3	19,5
9	50,7	50,4	27	19,7****	20,0
10	37,2	37,0	28	23,7	23,4
11	21,6	21,3	29	12,5***	12,2
12	40,3	40,0	1'	102,9	102,6
13	42,8	42,5	2'	75,6	75,4
14	57,2	56,9	3'	78,9	78,6
15	24,8	24,5	4'	72,0	71,7
16	28,8	28,6	5'	78,7	78,5
17	56,6	56,3	6'	63,1	62,9
18	12,3***	12,0			



*Solvente: Piridina- d_5 ; **Podem estar trocados; ***Podem estar trocados; ****Podem estar trocados

II.3.2.11. Análise estrutural do composto **31**



O composto **31**, obtido a partir de EE-FA-4-3b3b, apresentou-se como um sólido alaranjado com fusão na faixa de 190,5 a 194,2 °C (Literatura = 194,5 a 195,0 °C).⁷⁷ O espectro no IV de **31** (Figura A46; pág. 165) apresenta absorção em 3264 cm^{-1} , característica

de estiramento da ligação O-H de grupo hidroxila. A absorção em 1604 cm^{-1} é característica de estiramento da ligação C=C de aromático. A absorção em 1145 cm^{-1} é característica de estiramento da ligação C-O de fenol.⁵⁰

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura A47; pág. 166) e do subespectro DEPT-135 (Figura A48; pág. 166) permitiu identificar sinais semelhantes aos anteriormente apresentados para o composto **29**, identificado como (-)-epicatequina. Contudo, devido ao maior número de sinais de carbono, foi proposto que poderia tratar-se de duas unidades flavanoídicas. Sendo assim, fez-se uma análise mais minuciosa, visando verificar a presença de um dímero de flavonoide. O espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT 135 apresentam sinais em δ_{C} 156,5 (C-7 e C-7''), 154,3 (C-5 e C-5''), 153,7 (C-9 e C-9''), 144,4 (C-3' e C-3'') e 143,9 (C-4' e C-4''), atribuídos a núcleos de carbono aromático oxigenado. Sinais em δ_{C} 131,1 (C-1'), 130,2 (C-1''), 107,0 (C-8''), 101,7 (C-10) e 98,6 (C-10'') foram atribuídos a núcleos de carbono aromático não hidrogenado. Sinais em δ_{C} 117,6 (C-6' e C-6''), 114,8 (C-5' e C-5''), 114,3 (C-2' e C-2''), 95,7 (C-8), 94,5 (C-6) e 93,7 (C-6'') foram atribuídos aos demais núcleos de carbono aromático hidrogenado. Sinais em δ_{C} 77,5 e 75,2 foram atribuídos aos núcleos de carbono benzil-oximetínico (C-2'' e C-2, respectivamente). Sinais em δ_{C} 71,3 e 64,5 foram atribuídos aos núcleos de carbono C-3 e C-3'', respectivamente. Sinais em δ_{C} 35,5 e 27,5 foram atribuídos aos núcleos de carbono C-4 e C-4'', respectivamente.⁷⁸

A análise do espectro de RMN de ^1H (Figura A49; pág. 167) permitiu identificar a presença de sinais em regiões características de núcleos de hidrogênio aromático (δ_{H} 8,00 a 6,00). O espectro de RMN de ^1H apresenta sinais entre δ_{H} 7,00 e 6,54, atribuídos aos núcleos de hidrogênio H-2', H-2'', H-5', H-5'', H-6' e H-6''. Os sinais em δ_{H} 5,82, 5,79 e 5,72 foram atribuídos aos núcleos de hidrogênio H-6, H-8 e H-6'', respectivamente. Os sinais em δ_{H} 4,95 e 4,91 foram atribuídos aos núcleos de hidrogênio H-2 e H-2'', respectivamente. Os sinais em δ_{H} 4,45, 4,18 e 3,64 foram atribuídos aos núcleos de hidrogênio H-4, H-3'' e H-3, respectivamente. Os multipletos em δ_{H} 2,73 e 2,37 foram atribuídos aos núcleos de hidrogênio geminais (H-4''a e H-4''b, respectivamente).⁷⁸

O mapa de contornos HSQC (Figura A50; pág. 167) permite correlacionar os sinais em δ_{H} 5,82 (H-6), 5,79 (H-8) e 5,72 (H-6'') com os sinais em δ_{C} 94,5 (C-6), 95,7 (C-8) e 93,7 (C-6''), respectivamente. Os sinais em δ_{H} 4,95 (H-2), 4,91 (H-2''), 4,45 (H-4), 4,18 (H-3'') e 3,64 (H-3) correlacionam-se com os sinais em δ_{C} 75,2 (C-2), 77,5 (C-2''), 35,5 (C-4), 64,5 (C-3'') e 71,3 (C-3), respectivamente. Os sinais em δ_{H} 2,73 e 2,37 (H-4''a e H-4''b, respectivamente) apresentam correlação com o sinal de carbono em δ_{C} 27,5 (C-4').

O mapa de contornos HMBC (Figura A51; pág. 168) apresenta correlações dos sinais de hidrogênio em δ_H 4,95 (H-2) e 4,91 (H-2'') com os sinais em δ_C 131,1 (C-1') e 130,2 (C-1''). A observação dessas correlações permitiu afirmar que os anéis B1 e B2 encontram-se ligados aos anéis C1 e C2 pelos átomos de carbono C-2 e C-2'', respectivamente. O sinal em δ_H 4,45 (H-4) apresenta correlação com os sinais em δ_C 106,9 (H-8''). Esta correlação indica que os monômeros flavonoídicos encontram-se unidos pelos átomos de carbono C-4 e C-8''.

O mapa de contornos COSY (Figura A52; pág. 168) apresenta correlação entre o sinal em δ_H 4,18 (H-3'') e os sinais em δ_H 2,73 e 2,37 (H-4''a e H-4''b, respectivamente). Além disso, no mapa de contornos COSY é observada correlação entre o sinal em δ_H 4,45 (H-4) e o sinal em δ_H 3,64 (H-3).

O mapa de contornos NOESY (Figura A53; pág. 169) apresenta correlações do sinal em δ_H 3,64 (H-3) com os sinais em δ_H 4,95 (H-2) e 4,45 (H-4). O sinal em δ_H 4,18 (H-3'') correlaciona-se com os sinais em δ_H 4,91 (H-2'') e 2,71 (H-4a).

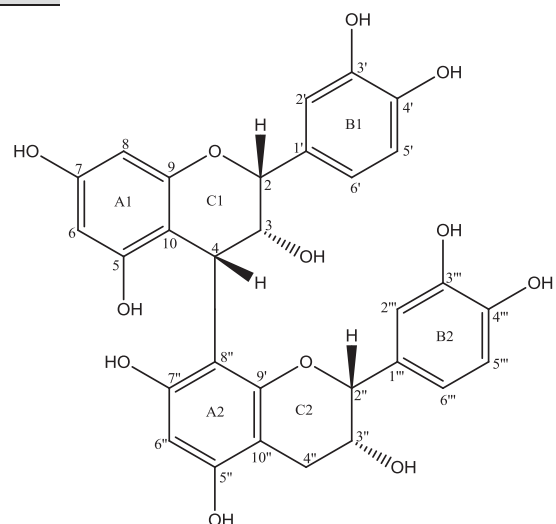
Estas informações aliadas à comparação com os dados de RMN de ^{13}C da literatura (Tabela II.28; pág. 52) permitiram identificar o composto **31** como sendo epicatequina-(4 β -8)-epicatequina. Esta estrutura foi confirmada pelo pico $[M+H]^+$ em $m/z = 579,1503$ observado no espectro de massas (Figura A54; pág. 169) e compatível com a fórmula molecular $C_{30}H_{26}O_{12}$.

A medida da rotação óptica específica $[\alpha]_D^{20} = +38,0$ ($c = 3$ mg mL $^{-1}$; MeOH; ca. 20 °C) [Literatura: $[\alpha]_D^{20} = +29,3$ ($c = 0,16$ mg mL $^{-1}$; etanol; ca. 20 °C)]⁷⁷ permitiu classificar o composto **31** como (+)-epicatequina-(4 β -8)-epicatequina. A (+)-epicatequina-(4 β -8)-epicatequina está sendo descrita pela primeira vez no gênero *Luehea*.

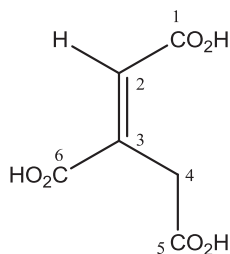
Tabela II.28. Dados de RMN de ^{13}C do composto **31** e dados descritos na literatura para a (+)-epicatequina-(4 β -8)-epicatequina⁷⁸

C	δ_{C}^* de 31	δ_{C}^{**} da(+)- epicatequina- (4 β -8)- epicatequina	C	δ_{C}^* de 31	δ_{C}^{**} da (+)- epicatequina- (4 β -8)- epicatequina
2	75,2	76,8	2''	77,5	79,1
3	71,3	72,8	3''	64,5	66,3
4	35,5	36,8	4''	27,5	28,9
5	154,3	157,5	5''	154,3	157,5
6	94,5	96,5	6''	93,6	96,5
7	156,5	158,2	7''	156,5	155,7
8	95,7	96,9	8''	106,9	107,0
9	153,7	155,7	9''	153,7	155,7
10	101,7	100,5	10''	98,6	100,5
1'	131,1	132,7	1'''	130,2	131,9
2'	114,3	114,4	2'''	114,3	114,4
3'	144,4	145,2	3'''	144,4	145,2
4'	143,9	145,1	4'''	143,9	145,3
5'	114,8	115,1	5'''	114,8	115,1
6'	117,6	119,0	6'''	117,6	119,2

*Solvente: DMSO- d_6 ; **Solvente:Acetona- d_6 .



II.3.2.12. Análise estrutural do composto **32**



O composto **32**, obtido a partir de **FF** (pico 2; TR = 2,8 min), apresentou-se como um sólido amarelo e impuro. O espectro no IV do composto **32** (Figura A55; pág. 170) apresenta absorção em 3448, característica de estiramento da ligação O-H de ácido carboxílico em ligação de hidrogênio. As absorções em 1708 cm^{-1} e 1654 cm^{-1} são características de estiramento C=O de ácido carboxílico e de C=C, respectivamente. A absorção entre 1420 e 1406 cm^{-1} é característica de dobramento C-O-H. A absorção em 1290 cm^{-1} é característica de estiramento C-O.⁵⁰

A análise do espectro de RMN de ^1H (Figura A56; pág. 170) permitiu identificar a presença de sinal em região característica de núcleos de hidrogênio vinila (δ_{H} 7,0 a 4,0).

Sendo assim, no espectro de RMN de ^1H , os simpletos em δ_{H} 6,72 e 3,71 podem ser atribuídos a hidrogênio alquênico e metilênico, respectivamente.⁵¹

A análise do espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT 135 (Figuras A57 e A58; pág. 171) permitiu identificar sinais de carbono em região característica de carbono sp^2 de alceno (δ_{C} 150 a 110). Além disso, foi possível verificar a presença de sinais de carbono em região característica de carbono de ácido carboxílico (δ_{C} 185 a 150).⁵¹ Estes sinais sugerem tratar-se de um ácido orgânico de cadeia insaturada. Os sinais em δ_{C} 171,2, 167,6 e 166,8 podem ser atribuídos a carbonilas de ácidos carboxílicos. Os sinais em δ_{C} 140,3 e 129,0 podem ser atribuídos aos núcleos de carbono alquênico. O sinal em δ_{C} 33,0 pode ser atribuído a núcleo de carbono metilênico.

O mapa de contornos HSQC (Figura A59; pág. 172) permite correlacionar o sinal de hidrogênio em δ_{H} 6,72 (H-2) com o sinal de carbono em δ_{C} 129,0 (C-2) e o sinal de hidrogênio em δ_{H} 3,71 (H-4) com o sinal de carbono em δ_{C} 33,0 (C-4).

O mapa de contornos HMBC (Figura A60, pág. 172) apresenta correlações entre o sinal de hidrogênio em δ_{H} 6,72 (H-2) com os sinais de carbono em δ_{C} 167,6 (C-6), 140,3 (C-3) e 33,0 (C-4). O sinal de hidrogênio em δ_{H} 3,71 (H-4) apresenta correlações com os sinais de carbono em δ_{C} 171,2 (C-5), 167,6 (C-6), 140,3 (C-3) e 129,0 (C-2). Essas correlações permitiram identificar o composto **32** como sendo o ácido *trans*-aconítico. Estas informações aliadas à comparação com os dados de RMN de ^{13}C da literatura (Tabela II.29, pág. 54) confirmam tratar-se deste composto.

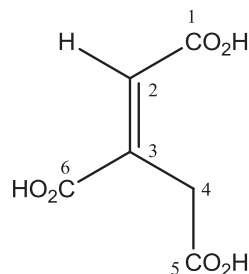
O sinal de hidrogênio em δ_{H} 2,43 e os sinais de carbono em δ_{C} 173,7 e 29,0, por não apresentarem correlações no HMBC com os demais sinais, foram atribuídos a impurezas presentes na amostra. A presença do ácido *trans*-aconítico e de impurezas na amostra foi confirmada também pela análise de LC/MS para o composto **32** solubilizado em água (Figura A63, pág. 177). Outra confirmação da presença do ácido *trans*-aconítico na amostra **FF** foi obtida pela comparação entre os cromatogramas de **FF** e padrão de ácido *trans*-aconítico previamente isolado e disponível em nosso laboratório (Figura A61; pág. 174). A injeção do padrão foi realizada nas mesmas condições experimentais de injeção da amostra.

O ácido *trans*-aconítico é o ácido orgânico mais abundante em *Saccharum officinarum* (cana-de-açúcar)⁷⁹. A presença deste ácido foi relatada também em folhas de *Echinodorus grandiflorus* (chapéu-de-couro),⁸⁰ porém está sendo descrito pela primeira vez no gênero *Luehea*.

Tabela II.29. Dados de RMN de ^{13}C do composto **32** e dados descritos na literatura para o ácido *trans*-aconítico⁸¹

C	δ_{C}^* de 34	δ_{C}^* do ácido <i>trans</i>-aconítico
1	166,8	167,8
2	129,0	129,3
3	140,3	140,6
4	33,0	33,1
5	171,2	171,7
6	167,6	167,8

*Solvente: DMSO- d_6



CAPÍTULO III

**Avaliação da descontaminação
microbiológica e da influência da
radiação gama em extratos, frações
e fitoconstituintes do caule de *L.
ochrophylla***

III.1. Introdução

III.1.1. Descontaminação microbiológica

Uma grande parte da população mundial depende essencialmente de plantas medicinais para os cuidados primários de saúde.^{40,41} No entanto, plantas medicinais são altamente suscetíveis à contaminação microbiológica devido ao meio em que crescem (água e solo), colheita e armazenamento.⁸² A contaminação microbiológica de plantas medicinais pode reduzir a sua qualidade e afetar a eficácia e a estabilidade dos compostos ativos.⁸³ Em alguns casos, a presença destes contaminantes em materiais vegetais pode causar doenças como infecções bacterianas e fungicas.^{84,85}

A descontaminação microbiológica por óxido de etileno ou brometo de metila tem sido proibida na maioria dos países desenvolvidos devido aos riscos para a saúde humana (potencial cancerígeno) e ao meio ambiente. Por outro lado, a descontaminação por tratamentos a altas temperaturas, pode resultar na redução da bioatividade dos compostos ativos.⁸⁶

O tratamento de plantas medicinais com radiação gama (radiação ionizante empregando radioisótopos de ⁶⁰Cobalto ou ¹³⁷Césio) é uma alternativa eficaz para reduzir ou eliminar a contaminação microbiológica.⁸⁶ A radiação gama pode impedir a multiplicação dos microrganismos e provocar alterações nas estruturas moleculares destes como consequência da ação direta e/ou indireta sobre a fita de DNA. A ação indireta, também denominada de ação por difusão, sugere que a inativação do DNA ocorre como resultado da produção de radicais-livres iniciados em uma reação secundária.⁸⁷

O uso da radiação gama na descontaminação microbiológica em produtos alimentícios, visando à segurança alimentar, iniciou-se antes de 1920.⁸⁸ Porém, as pesquisas utilizando a radiação gama na descontaminação foram publicadas a partir de 1960, principalmente pelo exército americano.⁸⁹ Em 2008, 52 países permitiam e empregavam a radiação gama em aproximadamente 250 produtos alimentícios.⁹⁰

No Brasil, a primeira regulamentação sobre a irradiação de alimentos foi aprovada em 1973, sendo este regulamento revisto e ampliado em 2001 (Resolução - RDC Nº 21, de 26 de janeiro de 2001). O regulamento brasileiro prevê que a dose de radiação absorvida seja suficiente para o propósito de desinfestação, redução da carga de microrganismos ou esterilização, sem causar perdas nutricionais e funcionais ou alterações sensoriais ao alimento.⁹¹

Um número crescente de estudos tem avaliado a utilização da radiação gama para minimizar a contaminação microbiológica de plantas medicinais utilizadas por vias oral e/ou tópica.^{82,86,92} Embora seja preconizado que doses de 3,0 a 10,0 kGy (1 Gy = 1 J/kg) de radiação gama sejam suficientes para promover a descontaminação,⁹² a dose de esterilização depende da carga microbiológica inicial, bem como da sensibilidade dos microrganismos presentes.⁹³ Como exemplos, estudos realizados com amostras de plantas secas de *Fagonia arabica*, quando tratadas com doses de 2,0 a 6,0 kGy de radiação gama, mostraram redução da contagem de bactérias para níveis comercialmente aceitáveis.⁸⁴ A dose de 10,0 kGy de radiação gama mostrou ser suficiente para descontaminar raízes secas de *Panax quinquefolius* (ginseng) e mantê-las em condição estéril a temperatura ambiente durante seis meses.⁹⁴ Amostras de *Cynara scolymus* (alcachofra), *Peumus boldus* (boldo), *Matricaria recutita* (camomila), *Echinodorus grandiflorus* (chapéu de couro) e *Cassia acutifolia* (sene) apresentaram redução nos níveis de contaminação fúngica por *Aspergillus* a partir de 10,0 kGy.⁹⁵

Quanto aos microrganismos, foi verificado que os príons são os mais resistentes à radiação gama necessitando de maior dose para sua completa eliminação. Em seguida, em ordem decrescente de resistência à radiação gama tem-se as micobactérias, protozoários, bactérias *Gram*-negativas, fungos, vírus não envelopados, bactérias *Gram*-positivas e vírus com invólucro lipídico.⁹⁶

III.1.2. Efeito da radiação gama nos constituintes químicos de plantas

A radiação gama pode induzir alterações nas propriedades químicas e físicas do material irradiado, uma vez que a incidência de raios gama resulta em uma condição de tensão ou estresse oxidativo, devido à formação de elétrons de alta energia localizados difusamente em toda a matéria, com consequente formação de radicais-livres, tais como o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila ($OH^{\bullet}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e íons moleculares de altas energias. Esses radicais e íons reagem com proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e metabólitos secundários, resultando em perturbações celulares.^{89,97} Os radicais-livres podem ser de curta ou longa duração. Radicais de curta duração são consumidos imediatamente por reações do tipo despolimerização, oxidação ou formação de insaturações. Radicais de longa duração são detectáveis mesmo após alguns dias do término da radiação.⁸⁸

A presença de radicais livres, espécies paramagnéticas, pode ser detectada pela espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE). A RPE é um método útil para

avaliar o efeito da radiação ionizante através da determinação, a partir da intensidade do sinal de RPE, da concentração dos radicais livres presentes na amostra. O sinal de RPE presente no espectro aparece sob a forma matemática da derivada da curva da absorção e a concentração dos radicais livres presentes pode ser calculada pela área sob a curva resultante. Em alguns poucos casos específicos, a identidade dos radicais livres presentes na amostra pode ser determinada pelo aspecto característico do espectro de RPE.⁹⁸

Dentre as perturbações celulares promovidas por radicais livres, são comuns as deficiências funcionais resultante de alterações da viscosidade, carga de superfície, composição química e permeabilidade dos sistemas de membrana celular.⁹⁹ O efeito da radiação gama sobre a matéria depende do nível de energia, além da composição, do estado físico e temperatura do material irradiado. Algumas substâncias são resistentes à radiação, principalmente quando presentes em materiais desidratados. No entanto, estas mesmas substâncias podem sofrer decomposição quando irradiadas sob a forma de solução aquosa ou suspensão. Danos decorrentes da radiação podem se manifestar por alterações na coloração, elasticidade, resistência ao cisalhamento e compressão, alteração da atividade biológica, além dos danos relacionados à toxicidade causada pela decomposição de produtos radicalares.^{87,100}

Estudos têm demonstrado que o tratamento com a radiação gama promove, em compostos fenólicos, redução ou aumento da concentração de maneira dependente da dose aplicada.¹⁰¹ Alguns autores sugerem que a redução da concentração de compostos fenólicos seja atribuída aos efeitos radioprotetor e antioxidante que desempenham.^{101,102} Todavia, o aumento da concentração destes compostos pode ser atribuído ao aumento, promovido pela radiação gama, na atividade da enzima fenilalanina-amoníaco-liase (PAL), responsável por catalisar, em plantas, o primeiro passo na biossíntese de metabólitos secundários, tais como flavonoides, isoflavonoides, cumarinas e ligninas.¹⁰³ Além disso, a radiação gama causa danos à membrana celular de plantas e promove usualmente melhor extração de seus constituintes.¹⁰⁴

Até o momento, poucos estudos foram realizados visando avaliar o efeito da radiação gama sobre alcaloides e saponinas. A literatura descreve um aumento no conteúdo dos alcaloides vimblastina e vincristina (**19** e **20**, respectivamente; pág. 12) como resposta ao aumento da atividade da enzima L-triptofano descarboxilase, enzima envolvida nas fases iniciais da biossíntese de alcaloides indólicos.¹⁰⁵ Quanto às saponinas, não têm sido relatadas alterações no teor ou perfil destas sob efeito da radiação gama. As saponinas têm sido consideradas estáveis frente às doses inferiores a 35,0 kGy de radiação gama.^{106,107}

Apesar do uso da radiação gama ser uma técnica aprovada por diversas agências reguladoras (FDA, OMS, FAO e ANVISA), o mercado de plantas medicinais irradiadas ainda não atingiu o nível desejado, devido provavelmente ao desconhecimento, por parte da população, que acredita, muitas vezes, que o material vegetal ou alimento exposto à radiação torna-se radioativo.¹⁰⁸ Porém, o interesse no estudo dos efeitos produzidos pela radiação ionizante em amostras de compostos orgânicos vegetais tem aumentado e algumas questões relacionadas com mudanças na estrutura e nas propriedades dos compostos têm recebido considerável interesse, passando a ser intensamente estudadas.^{96, 104, 107,109,110, 111}

III.2. Materiais e métodos

Um irradiador Panorâmico Múltipropósito de Categoria II GammaBeam-127 modelo IR-214 Nordion, equipado com uma fonte de Cobalto-60 foi utilizado para radiação das amostras vegetais. A taxa da dose de radiação gama foi de 2,50 kGy/h com erro de $\pm 0,02$ kGy.

Na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em escala analítica foi utilizado um cromatógrafo líquido SHIMADZU, constituído por duas bombas LC-20AT, detector UV/VIS SPD-20A, software LCsolution v.1.21 (SHIMADZU) e coluna NSTC18, 250 mm x 3,0 mm x 5 μ m, LC100111 (NST).

Na cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de Massas (LC-DAD-MS) foi utilizado um cromatógrafo líquido SHIMADZU, equipado com duas bombas LC30AD e um detector de arranjo de diodos SPD M-20A e coluna Shim-pack[®] C18 x 4,6 mm x 5 μ m. Um fluxo de 200 μ L/min foi usado e o efluente totalmente direcionado para espectrômetro de massas (Bruker Daltonics) com ionização por electrospray (ESI) no modo positivo. O LC-DAD-MS foi conduzido de modo isocrático usando a mistura de água (A, 95%) e MeOH (B, 5%) por 20 min.

Os espectros de RPE foram obtidos em espectrômetro Magnettech 400 operado em frequência de microondas próxima a 9,4 GHz (banda-X).

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ¹H) foram registrados em espectrômetros Bruker DRX-400 linha *AVANCE*. Os deslocamentos químicos foram registrados em unidade δ (em ppm) e as constantes de acoplamento (*J*) em Hz. Tetrametilsilano (TMS) foi empregado como padrão de referência interno, tendo DMSO-*d*₆ como solvente.

III.2.1. Obtenção do material vegetal

Amostras de *Luehea ochrophylla* foram adquiridas no Mercado Central de Belo Horizonte, tendo sido previamente coletadas em agosto de 2012, no Município de Esmeraldas (MG). As amostras foram identificadas por Ms. Amanda Rigueti Corrêa da Escola Nacional de Botânica Tropical - Instituto de Pesquisa Jardim Botânico – Rio de Janeiro, Brasil. Uma exsicata da espécie vegetal encontra-se depositada no Herbário Dendrológico Jeanine Felfili (HDJF) do Departamento de Engenharia Florestal da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (Campus Diamantina), sob o número de registro HDJF-4571.

III.2.2. Exposição do material vegetal e do ácido *trans*-aconítico à radiação gama

Seis amostras contendo 150,0 g e outras seis amostras contendo 1,0 g de cascas pulverizadas do caule de *L. ochrophylla* foram colocadas em sacos de polietileno contendo um sistema hermético “Zip Lock”. As amostras foram submetidas a doses de 0,0 (amostra controle), 1,0, 3,0, 5,0, 10,0 e 20,0 kGy.

Seis eppendorfs contendo 1,0 mg de ácido *trans*-aconítico sólido, seis eppendorfs contendo 1,0 mg de ácido *trans*-aconítico em solução aquosa (1,0 mg/mL) e, posteriormente, outros seis eppendorfs contendo 5,0 mg de ácido *trans*-aconítico em solução aquosa (1,0 mg/mL) foram submetidos às mesmas doses de radiação gama. O ácido *trans*-aconítico utilizado foi previamente isolado da casca do caule de *L. ochrophylla* (pág. 52)

A radiação do material vegetal e do ácido *trans*-aconítico foi realizada a temperatura ambiente e a dose absorvida foi controlada pela distância das amostras à fonte.

III.2.3. Contagem de microrganismos

Os sacos de polietileno contendo 150,0 g de amostras irradiadas e controle do material vegetal foram abertos, sob condições assépticas, para a retirada de amostras de 100,0 mg. Cada amostra foi adicionada, separadamente, em tubos de ensaio esterilizados, juntamente com 10,0 mL de caldo sabouraud (20,0 g de caldo para 1,0 L de água) e, submetidas à agitação vigorosa, resultando em soluções iniciais. Com o auxílio de uma pipeta esterilizada, 1,0 mL de cada solução inicial foi transferido para tubos de ensaio contendo 9,0 mL de água esterilizada. Os tubos foram agitados e 1,0 mL desta nova solução foi transferido para outros tubos de ensaio contendo também 9,0 mL de água esterilizada. A solução obtida foi homogeneizada em vórtex e a diluição repetida por mais três vezes, obtendo-se cinco

diluições seriadas. Um volume de 0,25 mL foi retirado de cada diluição e espalhado por toda a superfície das placas de Petri contendo ágar sabouraud. Todo o procedimento foi realizado em duplicata.¹⁰⁶ Após 67 h a temperatura ambiente, as colônias foram contadas e as unidades formadoras de colônias (UFC) foram calculadas, para todas as amostras submetidas à radiação gama, conforme a Equação III.1.

$$\text{UFC/mL} = (\text{n}^\circ \text{ de colônias}) \times 25 \times (\text{diluição utilizada para a contagem}) \quad \text{Equação III.1}$$

Para a identificação das espécies de microrganismos presentes em amostras controle, após o período destinado ao crescimento (67 h), algumas colônias foram isoladas usando alça de platina e transferidas para placas de Petri contendo ágar sabouraud. Duas dessas placas foram enviadas para identificação terceirizada pela Fundação André Tonsello (Campinas - SP - Brasil).

III.2.4. Presença de radicais livres

As amostras irradiadas e controle do material vegetal (1,0 g) foram introduzidas, imediatamente após a irradiação, em tubos de quartzo de 3,0 mm de diâmetro interno e submetidas à análise por RPE. Os espectros de RPE foram obtidos a temperatura ambiente.

Amostras irradiadas e controle do ácido *trans*-aconítico sólido e solubilizado em água (1,0 mg) foram, rapidamente, introduzidas em capilares. Estes capilares foram também introduzidos em tubos de quartzo de 3,0 mm de diâmetro para análise por RPE.

III.2.5. Frações fenólicas e saponínicas da casca do caule de *L. ochrophylla*

Uma massa de 100,0 g das amostras irradiadas e controle foi submetida à mesma sequência metodológica descrita no Capítulo II (pág. 27). Foram obtidas as frações fenólicas (FF₀, FF₁, FF₃, FF₅, FF₁₀ e FF₂₀) e saponínicas (FS₀, FS₁, FS₃, FS₅, FS₁₀ e FS₂₀) para as amostras submetidas, respectivamente, às doses de 0,0, 1,0, 3,0, 5,0, 10,0 e 20,0 kGy.

As amostras de FF e FS submetidas a diferentes doses de radiação gama foram acrescidas de 100,0 mL de água destilada e concentradas em evaporador rotativo a temperatura de 40 °C e pressão reduzida. Após a evaporação do solvente orgânico as amostras foram mantidas sobre refrigeração até análise por CLAE.

Alíquotas de FF₀, FF₁, FF₃, FF₅, FF₁₀ e FF₂₀ foram analisadas por CLAE, modo isocrático, utilizando misturas de solventes empregando os eluentes A (metanol) e B

(água:ácido trifluoroacético 99,5:0,5 v/v, pH 4,0) como fase móvel, contendo 80% de B e 20% de A durante 20 min. O fluxo manteve-se constante a uma taxa de 0,7 mL/min e o volume de injeção foi de 20,0 µL (injetado manualmente para cada amostra).⁹⁶ Os dados cromatográficos para todas as amostras foram obtidos a 280 e 254 nm.

Alíquotas de FS₀, FS₁, FS₃, FS₅, FS₁₀ e FS₂₀ foram analisadas por CLAE, modo isocrático, utilizando uma mistura de solventes empregando os eluentes A (metanol) e B (água:ácido trifluoroacético 99,5:0,5 v/v, pH 4,0) como fase móvel, contendo 70% de B e 30% de A em um intervalo de 0,0 a 15,0 min. O fluxo manteve-se constante a uma taxa de 0,7 mL/min e o volume de injeção foi de 20,0 µL (injetado manualmente para cada amostra).⁹⁶ Os dados cromatográficos para todas as amostras foram obtidos a 210 e 254 nm.

III.2.6. Análise do ácido *trans*-aconítico

Inicialmente, as amostras contendo 1,0 mg de ácido *trans*-aconítico sólido foram solubilizadas em 1,0 mL de água desionizada e analisadas por CLAE, modo isocrático, utilizando misturas de solventes empregando os eluentes A (metanol) e B (água:ácido trifluoroacético 99,5:0,5 v/v, pH 4,0) como fase móvel, contendo 80% de B e 20% de A durante 7,5 min. O fluxo manteve-se constante a uma taxa de 0,7 mL/min e o volume de injeção foi de 20,0 µL (injetado manualmente para cada amostra). O mesmo procedimento de análise foi realizado para as amostras de ácido *trans*-aconítico solubilizado em água (1,0 mg). Os dados cromatográficos para todas as amostras foram obtidos e analisados a 280 e 254 nm.

As amostras do ácido *trans*-aconítico, solubilizado em água e irradiado, foram analisadas também por LC-DAD-MS no modo gradiente, utilizando misturas de solventes empregando os eluentes A (metanol) e B (água) como fase móvel, contendo inicialmente 95% de B e 5% de A. A corrida foi realizada durante 20 min sendo que, aos 13 min atingiu-se a concentração de 100% de A que foi mantida durante 1 min. Nos últimos 6 min a fase móvel utilizada foi 95% de B e 5% de A. Um fluxo de 200 µL/min foi usado e o efluente totalmente direcionado para o espectrômetro de massas (Bruker Daltonics) com ionização por electrospray (ESI) no modo negativo.

Por fim, amostras do ácido *trans*-aconítico (5,0 mg), solubilizado em água e irradiado, foram liofilizadas e, posteriormente, submetidas a análises de RMN de ¹H.

Os testes citados foram realizados em três repetições sendo utilizada a análise de variância ANOVA para avaliar as diferenças nas concentrações do ácido *trans*-aconítico submetido às doses de 0,0, 1,0, 3,0, 5,0, 10,0 e 20,0 kGy de radiação gama. O teste de

comparação múltipla de Tukey foi adotado com nível de significância $p < 0,05$ em software Statistica[®] versão 7.0 (Statsoft Inc., 2004).

III.2.7. Estudo teórico da formação de produtos radiolíticos a partir do ácido *trans*-aconítico

A adição dos radicais $H^\bullet$ e $^\bullet OH$ e dos íons H^+ e OH^- ao ácido *trans*-aconítico foi estudada utilizando cálculos de mecânica quântica. As estruturas das moléculas foram otimizadas utilizando o método Teoria do Funcional de Densidade (DFT), empregando o funcional B3LYP e o conjunto de funções de base 6-31++G(d,p). As estruturas foram caracterizadas como estrutura de mínimo na superfície de energia com todas as frequências harmônicas obtidas no nível de cálculo B3LYP/6-31++G(d,p). Para determinar a variação da energia livre de Gibbs da reação (ΔG^{total}), considerou-se o modelo da supermolécula, como esquematizado na equação abaixo:

$$\Delta G^{total} = \Sigma G^{produtos} - \Sigma G^{reagentes} \quad \text{Equação III.2}$$

Todos os cálculos foram realizados utilizando o pacote computacional Gauss99.

III.3. Resultados e Discussão

III.3.1. Radiação gama na descontaminação microbiológica

Os microrganismos isolados do material vegetal não irradiado foram identificados, por sequenciamento de DNA da região ribossomal e taxonomia convencional como sendo os fungos *Lecythophora decumbens* e *Eurotium chevalieri* L. Mangin.

Fungos do gênero *Lecythophora* são isolados geralmente em madeiras ou cascas de diferentes árvores, folhas, água, alimentos e solo, sendo que, alguns dos representantes desse gênero são conhecidos por serem agentes causadores de doenças em humanos, tais como ceratite, abscessos subcutâneos, peritonite e endocardite.^{112,113} Fungos do gênero *Eurotium* são frequentemente isolados de alimentos secos, sendo que, a maioria das espécies deste gênero produz pigmentos e metabólitos secundários. Os metabólitos secundários produzidos não são claramente patogênicos embora tenha sido relatada a produção de compostos tóxicos por espécies como *E. chevalieri*.¹¹⁴ Espécies de *Eurotium* são geralmente os primeiros colonizadores de materiais vegetais e produtos alimentícios com baixo teor de água. O fungo

E. chevalieri é um dos responsáveis por promover a deterioração de uma grande variedade de alimentos, incluindo sementes e grãos.¹¹⁵

De acordo com os padrões estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS), a maioria das ervas, quando manuseada em condições de higiene e testada por métodos adequados de amostragem, não deve conter mais do que $5,0 \times 10^3$ UFC/g.¹¹⁶ Na literatura não há dados disponíveis sobre a variação na carga microbiológica de *L. ochrophylla* quanto tratada com radiação ionizante. A Tabela III.1 apresenta valores de UFC/mL e UFC/g para amostras da casca do caule de *L. ochrophylla* submetidas às diferentes doses de radiação gama.

Tabela III.1. Valores em UFC/mL e UFC/g para amostras submetidas a diferentes doses de radiação gama

Dose (kGy)	UFC/mL (1)	UFC/mL (2)	Média (UFC/mL)	Média (UFC/g)
0,0	$4,82 \times 10^2$	$5,27 \times 10^2$	$5,04 \times 10^2$	$5,04 \times 10^4$
1,0	$2,00 \times 10^2$	$1,25 \times 10^2$	$1,62 \times 10^2$	$1,62 \times 10^4$
3,0	$1,25 \times 10^2$	$0,50 \times 10^2$	$0,87 \times 10^2$	$0,87 \times 10^4$
5,0	-	-	-	-
10,0	-	-	-	-
20,0	-	-	-	-

Os resultados obtidos indicam que o uso da radiação gama é efetivo para a descontaminação da casca do caule de *L. ochrophylla* em doses iguais ou superiores a 5,0 kGy, uma vez que as amostras submetidas a essas doses de radiação apresentaram-se totalmente livre de contaminação microbiológica. Este resultado pode ser qualitativamente visualizado na Figura III.1 (pág. 65). As placas de Petri referentes às amostras expostas a doses de 5,0, 10,0 e 20,0 kGy não apresentaram contaminação microbiológica. Por sua vez, as amostras controle e irradiadas com doses de 1,0 e 3,0 kGy apresentaram pontos brancos e viscosos característicos de crescimento de microrganismos no meio.

A radiação gama em doses iguais ou superiores a 5,0 kGy, apresenta-se como uma alternativa viável para a descontaminação da casca do caule de *L. ochrophylla*. A dose de 5,0 kGy, suficiente para descontaminar a amostra testada, encontra-se dentro dos limites de segurança estabelecidos pela OMS para o tratamento de alimentos e materiais vegetais com a radiação gama. Segundo essa organização, materiais vegetais e alimentos submetidos a doses baixas de radiação (até 10,0 kGy) são seguros e isentos da necessidade de testes toxicológicos.⁸³

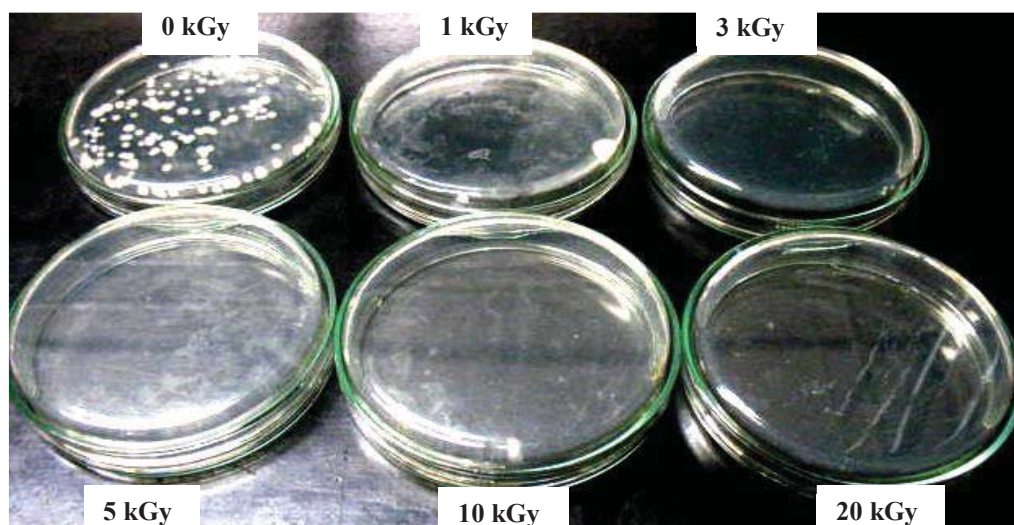


Figura III.1. UFCs existentes na amostra não submetida à radiação gama (0,0 kGy) e nas amostras submetidas a doses de 1,0, 3,0, 5,0, 10,0 e 20,0 kGy.

A sensibilidade dos fungos *Lecythophora decumbens* e *Eurotium chevalieri* L. Mangin à radiação gama está sendo descrita pela primeira vez. Porém, esses resultados estão em conformidade com estudos previamente descritos na literatura que relatam a eficácia da radiação gama à dose de 5,0 kGy para a descontaminação de fungos como o *Aspergillus ochraceus*, *A. parasiticus*, *A. flavus* e *A. fumigatus* em plantas medicinais.¹¹⁷ Foi relatada também a completa inibição do crescimento de fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Alternaria* e *Curvularia* com doses de 1,0 a 3,0 kGy.¹¹⁸

A diferença nas doses requeridas para a inativação dos fungos deve-se, provavelmente, a características inerentes destes.¹¹⁹ É sugerido que o teor de água micelial, pigmentos, aminoácidos, proteínas e gorduras possam ser responsáveis pela radioproteção e, consequentemente, rádio-resistência apresentada por alguns microrganismos.¹¹⁷

A importância dos dados apresentados está no fato de que, ultimamente, o número de relatos negativos para a saúde, em pacientes em uso de plantas medicinais, tem aumentado em todo o mundo, sendo a má qualidade desses materiais vegetais um dos principais motivos.⁸⁴ A determinação do método e da dose suficiente para eliminar a contaminação microbiológica em *L. ochrophylla* é um requisito crucial para a segurança dos consumidores.⁸³

III.3.2. Análise da presença de radicais livres no material vegetal irradiado

Conforme descrito anteriormente, a absorção da radiação gama por materiais vegetais pode induzir a formação de radicais livres, ou seja, de espécies que apresentam elétrons desemparelhados, espécies paramagnéticas.¹²⁰ A Figura III.2 (pág. 66) apresenta os espectros

de RPE obtidos para amostras do caule de *Luehea ochrophylla* expostas a diferentes doses de radiação gama.

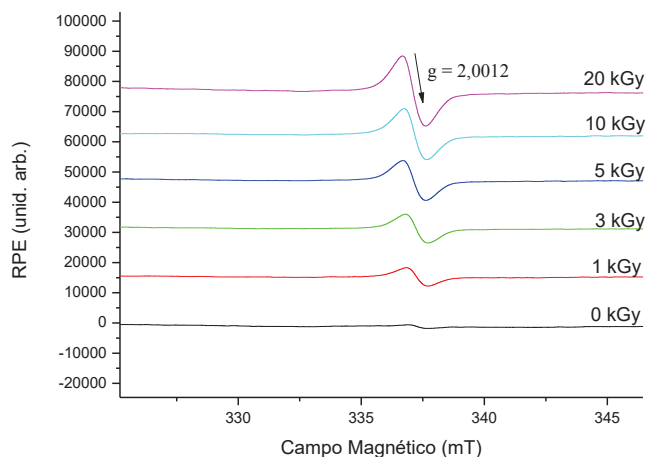


Figura III.2. Espectros de RPE da casca do caule de *L. ochrophylla* submetida a diferentes doses de radiação gama.

A amostra não irradiada da casca do caule de *L. ochrophylla* apresenta uma intensidade mínima, quase não detectada, de sinais em RPE. Todavia, a análise das amostras expostas à radiação gama confirma a formação de radicais livres pela presença de um centro paramagnético cujo fator g (fator giromagnético do elétron) equivale a 2,0012.

O fator g por si só, não fornece uma informação sobre a estrutura dos compostos. Porém, tem sido relatado que os radicais de açúcar e de celulose são os principais componentes visualizados em espectros de RPE em materiais vegetais irradiados. Este relato é baseado no fato de que os monossacarídeos e dissacarídeos são passíveis de detecção por apresentarem considerável estabilidade. Todavia, poucos estudos têm sido realizados para identificar os radicais específicos responsáveis por sinais individuais em materiais vegetais uma vez que os espectros de RPE são complexos e resultantes da sobreposição de vários radicais orgânicos derivados de tecidos vegetais.¹²¹

A concentração dos radicais livres formados pode ser determinada a partir da intensidade do sinal de RPE. As amostras de casca seca do caule de *L. ochrophylla* irradiadas apresentam sinal de RPE variando de forma não linear com a dose de radiação gama recebida. A intensidade do sinal de RPE atinge o limite de saturação em torno de 20,0 kGy conforme apresentado na Figura III.3A (pág. 67). Este comportamento sugere um aumento da sensibilidade da amostra da casca do caule de *Luehea ochrophylla* até doses de 20,0 kGy.

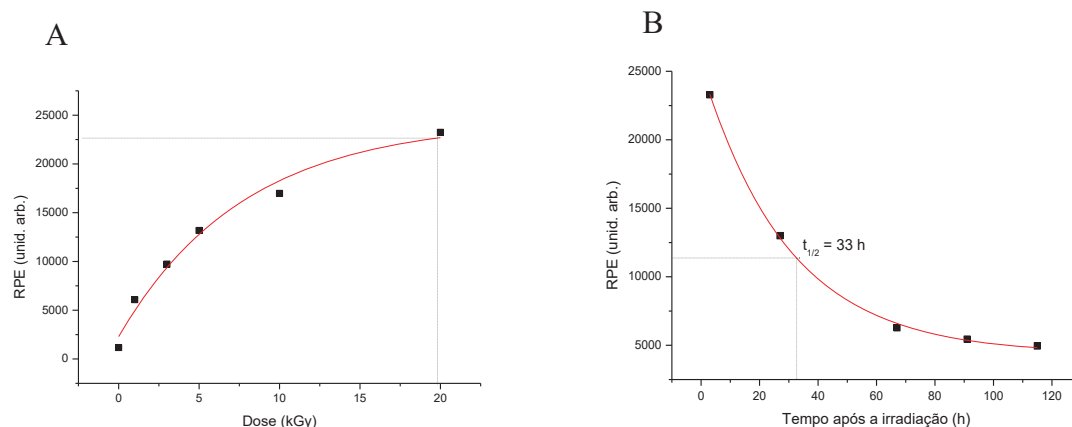


Figura III.3. Concentração de radicais livres na casca do caule de *L. ochrophylla* em função da dose de radiação gama (A). Curva do decaimento com o tempo (h) do sinal de RPE para a casca do caule de *L. ochrophylla* irradiada a 20,0 kGy (B).

Os radicais livres são espécies transientes e muito reativas, fato que resulta em um tempo de meia vida geralmente curto.¹²² Contudo, em amostras secas, os radicais formados podem ser relativamente estáveis e com o tempo de vida suficiente para a sua detecção.⁹⁸ O decaimento exponencial em função do tempo, na quantidade de radicais livres presentes na casca do caule de *L. ochrophylla*, é apresentado na Figura III.3B. Nesta figura percebe-se que o tempo de meia vida das espécies radicalares presentes na amostra é de aproximadamente 33 h. Conforme apresentado, a intensidade dos sinais de RPE diminuiu significativamente após três dias de irradiação.

A diminuição da quantidade de radicais livres presentes na amostra pode ser justificada pela ocorrência de reações radicalares de terminação. Essas reações promovem a combinação de radicais livres para produzir substâncias diamagnéticas e, portanto, não detectáveis por RPE.^{123,124}

Os resultados apresentados são condizentes com os dados descritos na literatura para a especiarias como *Capsicum annuum* (páprica), *Piper nigrum* (pimenta-do reino escura), *Brassica juncea* (mostarda) e *Cinnamomum verum* (canela) irradiadas com doses de até 20,0 kGy. Os radicais livres formados em amostras irradiadas destas especiarias apresentaram uma diminuição na intensidade dos sinais em cerca de quatro dias após a irradiação.⁹⁸

III.3.3. Análise das diferentes doses de radiação gama sobre a fração fenólica (FF)

A fração fenólica (FF) apresentou-se como uma solução alaranjada. A Figura III.4 (pág. 68) apresenta o cromatograma de CLAE da amostra controle da casca do caule de *L. ochrophylla*, ou seja, amostra não submetida à radiação gama (FF₀). Na Tabela III.2 (pág. 68) são apresentados os valores de tempo de retenção (TR; em min) e as áreas relativas dos picos

dos cromatogramas de CLAE correspondentes. Os cromatogramas de CLAE foram obtidos a 280 e 254 nm, porém, somente os cromatogramas obtidos a 280 nm foram analisados, por apresentarem melhores resoluções dos picos.

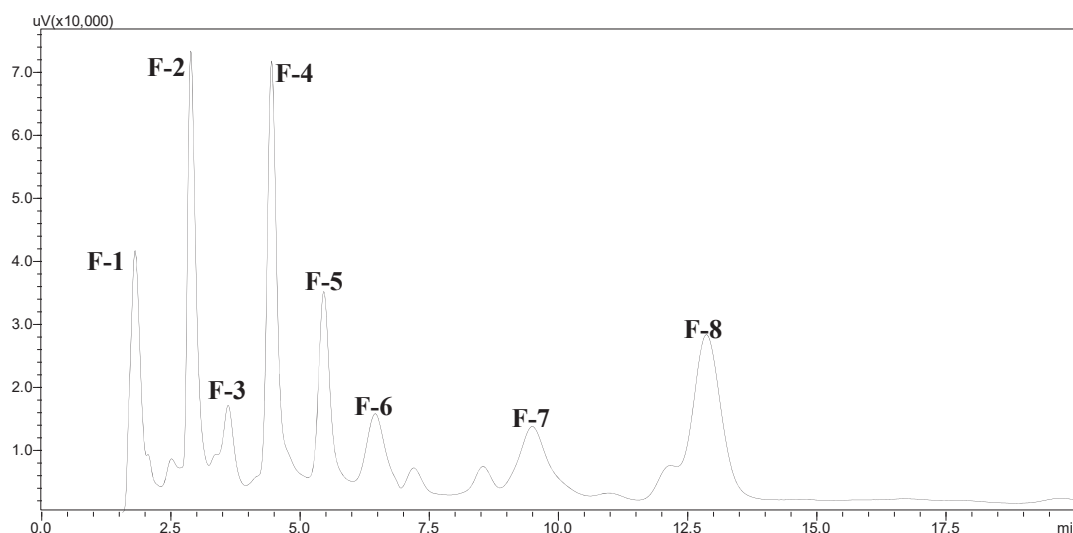


Figura III.4. Cromatograma de CLAE a 280 nm de **FF₀** (TR entre 0,0 e 20 min); Concentração A:B (1:4), onde A = metanol e B = solução água:ácido trifluoracético 99,5:0,5.

O cromatograma de **FF₀** apresenta oito picos mais intensos e as frações **FFs** podem ser consideradas como misturas ricas em compostos fenólicos. Os picos 4 e 2, registrados em TR = 4,44 e 2,88 min, respectivamente, são os de maiores valores de áreas relativas, seguidos pelos picos 8, 1, 5, 7, 6 e 3 (TR = 12,86, 1,80, 5,45, 9,49, 6,45 e 3,60 min, respectivamente).

Tabela III.2. Dados de CLAE (tempo de retenção e área relativa) a 280 nm da amostra **FF₀**

Dose de radiação = 0,0 kGy		
Pico	TR (min)	Área
1	1,80	455.023,3
2	2,88	703.893,9
3	3,60	75.442,2
4	4,44	751.202,9
5	5,45	411.475,8
6	6,45	266.842,8
7	9,49	289.930,1
8	12,86	612.507,7

Na Figura III.5 (pág. 69) é apresentada uma comparação entre os cromatogramas de CLAE a 280 nm da fração fenólica controle e das frações submetidas à radiação gama a doses de 1,0, 3,0, 5,0, 10,0 e 20,0 kGy (**FF₁**, **FF₃**, **FF₅**, **FF₁₀** e **FF₂₀**, respectivamente). Os valores de

TR e áreas relativas dos picos dos cromatogramas de CLAE de **FF₀**, **FF₁**, **FF₃**, **FF₅**, **FF₁₀** e **FF₂₀** são apresentados na Tabela A1 (pág. 174).

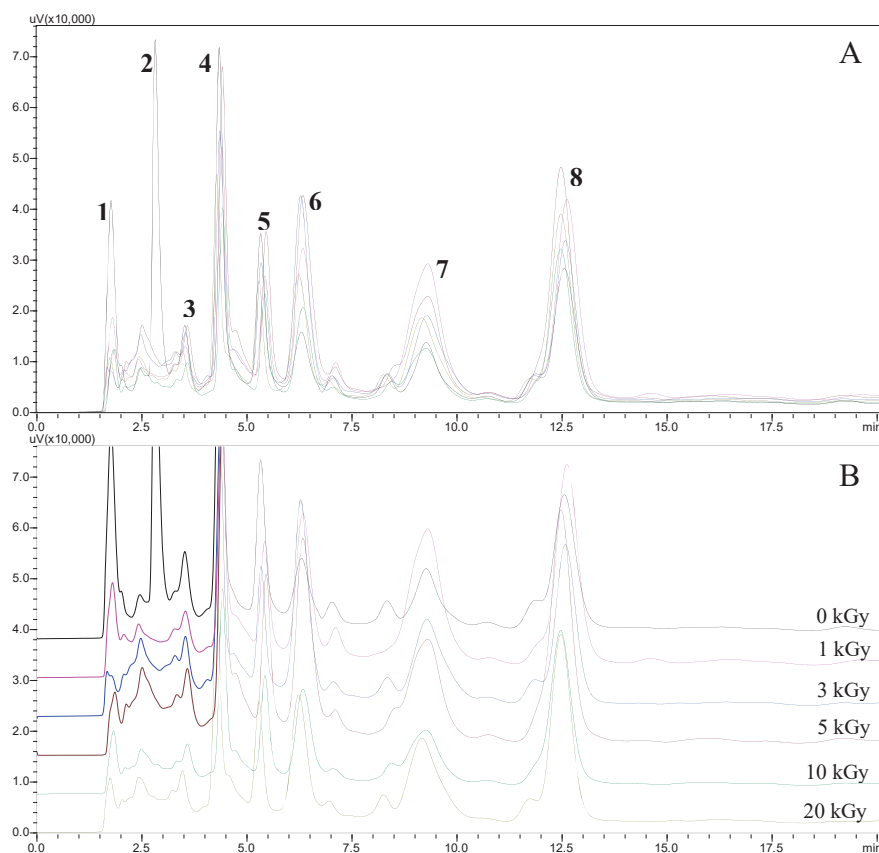


Figura III.5. (A) Sobreposição total dos cromatogramas de CLAE a 280 nm de **FF₀**, **FF₁**, **FF₃**, **FF₅**, **FF₁₀** e **FF₂₀** (TR entre 0,0 e 20,0 min); (B) Sobreposição parcial dos cromatogramas de CLAE a 280 nm de **FF₀**, **FF₁**, **FF₃**, **FF₅**, **FF₁₀** e **FF₂₀** (TR entre 0,0 e 20,0 min); Concentração A:B (1:4), onde A = metanol e B = solução água:ácido trifluoracético 99,5:0,5.

Os cromatogramas apresentam modificações nas áreas relativas dos picos quando as amostras da casca do caule de *L. ochrophylla* são submetidas à radiação gama. A maioria dos picos de **FF** tem sua área relativa diminuída em amostras expostas a esse tipo de radiação ionizante. A diminuição na área pode ser percebida para os picos 1, 2, 3 (exceto a 5,0 kGy), 4 e 5. Os picos 1 e 2 sofrem grandes diminuições em suas áreas, sendo correspondentes, respectivamente, a 81,57% (em amostra exposta a 5,0 kGy) e 95,38% (em amostra exposta a 1,0 kGy) em relação às áreas apresentadas em **FF₀**. Os picos 6, 7 e 8 (exceto a 20,0 kGy) têm suas áreas aumentadas em amostras expostas à radiação gama, sendo que os picos 6 e 7 apresentam valores de áreas triplicados, em amostras expostas, respectivamente, a 3,0 e 1,0 kGy de radiação em relação às suas áreas correspondentes em **FF₀**. Na Figura III.6 (pág. 70) é melhor apresentada a variação da área relativa dos picos registrados nos cromatogramas de CLAE a 280 nm para **FFs** expostas a diferentes doses de radiação gama.

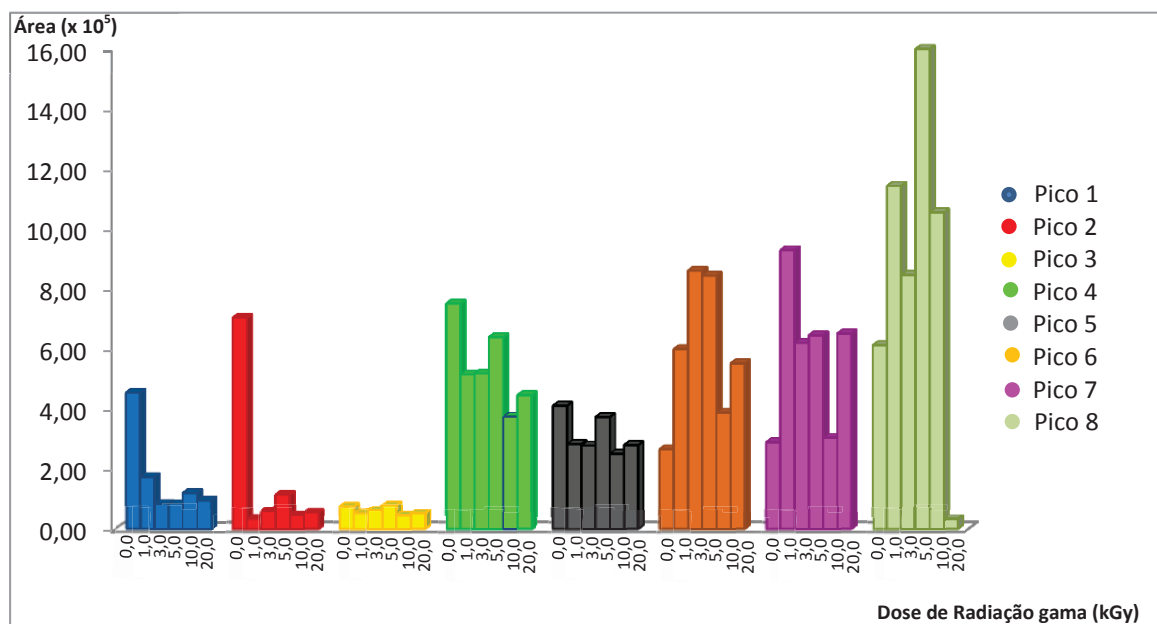


Figura III.6. Gráficos da variação da área de picos dos cromatogramas de CLAE a 280 nm de FFs em função da dose de radiação gama.

Estudos têm demonstrado que a exposição de plantas a condições de estresse oxidativo (exemplo: promovidos pela refrigeração, meio salino e radiação ionizante) induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como o $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e $HO^{\cdot}$ em células. Todavia, as células vegetais podem tolerar ROS por mecanismos endógenos de proteção enzimáticos e não enzimáticos. A diminuição na concentração de compostos fenólicos presentes em amostras irradiadas tem sido atribuída ao efeito radioprotetor e antioxidante apresentado por estes compostos.^{96,102} Os compostos fenólicos, ao reagirem facilmente com ROS, atuam como um sistema de defesa não enzimático e, por isso, podem ter sua concentração diminuída no meio.¹²⁵

Os dados apresentados para o fitoconstituente correspondente ao pico **F-2** (TR = 2,88 min), identificado como ácido *trans*-aconítico (**32**) (capítulo II; pág. 52), são similares aos resultados previamente apresentados para este mesmo composto na fração fenólica das folhas de *E. macrophyllus*. O ácido *trans*-aconítico apresenta alta sensibilidade à radiação, uma vez que tem sua intensidade e área consideravelmente diminuídas em amostras irradiadas.⁹⁶

Algumas justificativas podem ser dadas para o aumento na área dos picos 6, 7 e 8, em amostras de **FF** irradiadas, quando comparadas com **FF₀**. Uma possibilidade para o aumento na área destes picos é o aumento na atividade da enzima PAL ou na sua síntese. Como citado anteriormente, a enzima PAL é fundamental para a realização do primeiro passo da via de síntese dos compostos fenólicos. O aumento da atividade da PAL pelas células vegetais

ocorre em resposta às condições de estresses como a presença de ferimentos, seca, radiação, deficiências nutricionais, tratamento com herbicida e ataques de insetos. Estudos realizados previamente em amostras de *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) apresentaram um aumento, quase linear, na atividade da PAL em amostras submetidas a doses crescentes de radiação gama.¹²⁵ Diante disso, foi sugerido que a radiação gama podem induzir o acúmulo de metabólitos secundários como consequência do aumento da síntese ou da atividade da enzima PAL.

Estudos têm demonstrado também que a radiação gama promove o aumento da concentração de compostos fenólicos como um resultado de um aumento na extração dos mesmos.¹²⁶ A radiação gama pode causar danos às membranas celulares de plantas e, com isso, facilitar a extração destes fitoconstituintes.¹⁰⁴

III.3.4. Análise das diferentes doses de radiação gama sobre a fração saponínica (FS)

A fração saponínica (FS) apresentou-se como uma solução transparente. A Figura III.7 apresenta o cromatograma de CLAE da amostra controle da casca do caule de *L. ochrophylla*, ou seja, não submetida à radiação gama (FS₀). Os cromatogramas de CLAE de FS foram obtidos a 210 e 254 nm, porém, somente os cromatogramas obtidos a 210 nm foram analisados, por apresentarem melhores resoluções dos picos.

No cromatograma de FS₀ observam-se apenas dois picos, sendo o pico 1 (TR = 2,08 min), correspondente ao solvente (água) utilizado na diluição da amostra. O pico atribuído ao solvente foi confirmado pela semelhança com o cromatograma de CLAE da água, conforme mostrado na Figura A62 (pág. 175). A Tabela III.3 (pág. 72) apresenta os valores de tempo de retenção (TR; em min) e a área relativa do pico do cromatograma de CLAE correspondente.

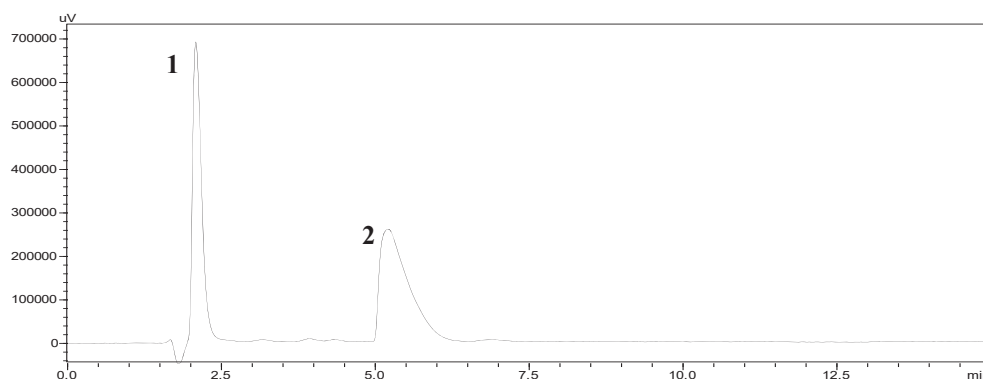


Figura III.7. Cromatograma de CLAE a 210 nm de FS (TR entre 0,0 e 15,0 min); concentração A:B (3:7), onde A = metanol e B = solução água:ácido trifluoracético 99,5:0,5.

Tabela III.3. Dados de CLAE (tempo de retenção e área relativa) a 210 nm da amostra **FS₀**

Dose de radiação = 0,0 kGy		
Pico	TR (min)	Área
2	5,21	7.848.971,3

A Figura III.8 apresenta uma comparação entre os cromatogramas de CLAE a 210 nm da fração saponínica controle e das frações submetidas à radiação gama em doses de 1,0, 3,0, 5,0, 10,0 e 20,0 kGy (**FS₁**, **FS₃**, **FS₅**, **FS₁₀** e **FS₂₀**, respectivamente). Os valores de TR e área dos picos dos cromatogramas de CLAE de **FS₀**, **FS₁**, **FS₃**, **FS₅**, **FS₁₀** e **FS₂₀** são apresentados na Tabela A2 (pág. 175).

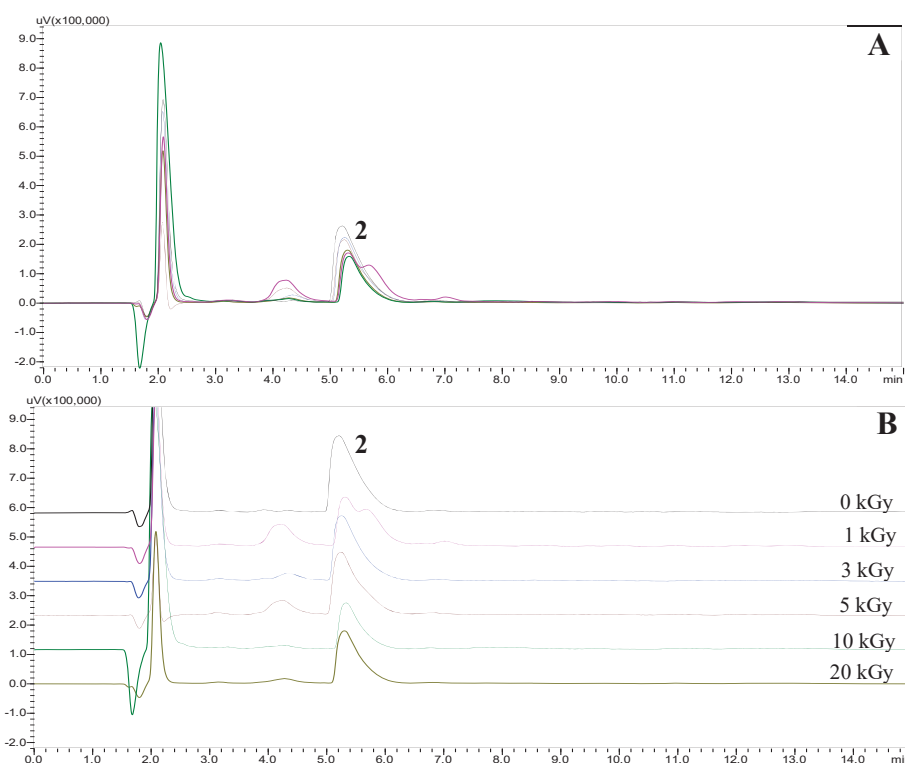


Figura III.8. (A) Sobreposição total dos cromatogramas de CLAE a 210 nm de **FS₀**, **FS₁**, **FS₃**, **FS₅**, **FS₁₀** e **FS₂₀** (TR entre 0,0 e 15,0min); (B) Sobreposição parcial dos cromatogramas de CLAE a 210 nm de **FS₀**, **FS₁**, **FS₃**, **FS₅**, **FS₁₀** e **FS₂₀** (TR entre 0,0 e 15,0min); Concentração A:B (3:7), onde A = metanol e B = solução água:ácido trifluoracético 99,5:0,5.

Observa-se pelos cromatogramas uma redução na área do pico 2 quando em amostras submetidas à radiação gama. Essa redução na área é mais expressiva em amostras submetidas a 1,0 (79,7%) e 10,0 kGy (54,6%) de radiação. A Figura III.9 (pág. 73) apresenta as variações das áreas do pico 2 nos cromatogramas de CLAE a 210 nm.

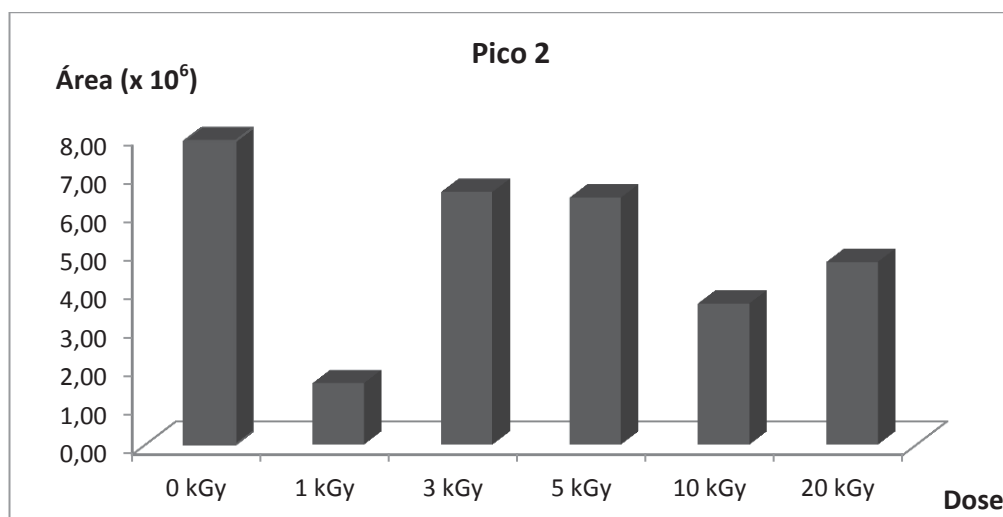


Figura III.9. Gráfico da variação das áreas do pico 2 nos cromatogramas de CLAE a 210 nm de FS em função da dose de radiação gama.

A diminuição na área do pico 2 coincide com o aparecimento de um pico em TR = 4,23 min, o que pode ser considerado como um possível produto radiolítico resultante da degradação do composto presente na amostra controle.

Os dados apresentados são condizentes com o estudo previamente realizado com a fração saponínica de folha de *E. macrophyllus*, verificando-se uma diminuição, com o aumento da dose de radiação gama, na concentração de todos os constituintes saponínicos presentes nas amostras avaliadas.¹²⁷

III.3.5. Análise da radiação gama no ácido *trans*-aconítico

O fitoconstituente correspondente ao pico F-2 (TR = 2,88 min) foi previamente identificado como sendo o ácido *trans*-aconítico (**32**) (capítulo II; pág. 52). A literatura relata que o ácido *trans*-aconítico é resultante do metabolismo do açúcar, sendo encontrado em plantas medicinais como o *Echinodorus grandiflorus* (chapéu de couro),¹²⁸ cereais como *Triticum* spp (trigo), *Hordeum vulgare* (cevada), *Zea mays* e *Sorghum bicolor* (milho e sorgo, respectivamente) e, principalmente, em gramíneas como *Saccharum officinarum* (cana-de-açúcar).¹³⁰ O ácido *trans*-aconítico apresenta atividades anti-inflamatória¹²⁸ e antiparasitária contra a *Leishmania donovani*, agente etiológico da leishmaniose visceral.^{128,129}

Conforme foi verificado nas análises de CLAE de FF₀ a FF₂₀, o pico do ácido *trans*-aconítico sofre intensa diminuição em sua concentração quando em amostras da casca do caule de *L. ochrophylla* submetidas a diferentes doses de radiação gama (Figuras III.5 e III.6;

págs. 69 e 70). Essa diminuição da concentração do ácido *trans*-aconítico pode sugerir sua degradação com consequente perda ou diminuição de suas atividades biológicas.

Diante desta observação, foi proposto um estudo mais detalhado do comportamento do ácido *trans*-aconítico quando submetido a diferentes doses de radiação gama em presença ou ausência da água como solvente. Sendo assim, para as amostras de ácido *trans*-aconítico irradiadas na ausência da água como solvente (sólidas), a Figura III.10 apresenta o cromatograma de CLAE a 280 nm da amostra controle do ácido *trans*-aconítico, ou seja, não submetida à radiação gama (TS_0). Na Figura III.11 (pág. 75) é apresentada uma comparação entre o cromatograma de CLAE a 280 nm da amostra controle do ácido *trans*-aconítico e os cromatogramas de CLAE deste ácido submetido a doses de 1,0, 3,0, 5,0, 10,0 e 20,0 kGy ($TS_1, TS_3, TS_5, TS_{10}$ e TS_{20} , respectivamente) de radiação gama. Os cromatogramas de CLAE foram obtidos a 280 e 254 nm, porém somente os cromatogramas obtidos a 280 nm foram apresentados, visto que são idênticos aos obtidos a 254 nm.

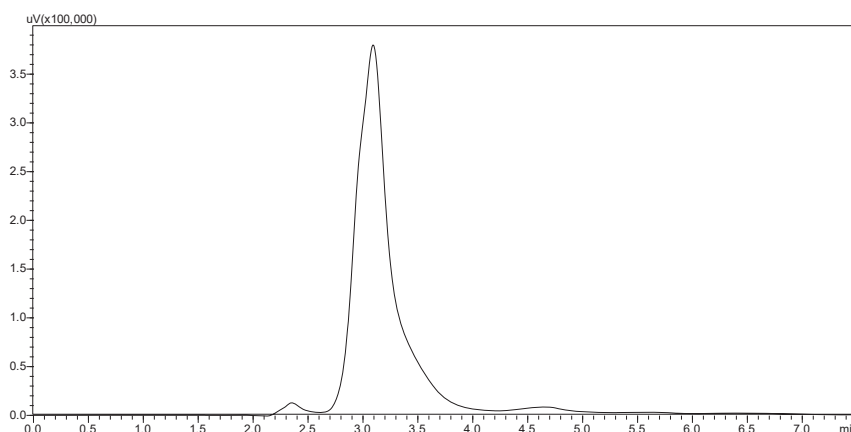


Figura III.10. Cromatograma de CLAE a 280 nm da amostra controle (TS_0) do ácido *trans*-aconítico (TR entre 0,0 e 7,0 min); Concentração A:B (1:4), onde A = metanol e B = solução água:ácido trifluoracético 99,5:0,5.

Na Figura III.12 (pág. 75) e na Tabela A3 (pág. 175) são apresentadas as variações das proporções relativas do ácido *trans*-aconítico e a média (resultante da análise em triplicata) das áreas dos picos para as amostras sólidas expostas à radiação gama. Pela análise estatística realizada pelo teste de Tukey não foram verificadas alterações significativas ($p < 0,05$) nas concentrações das amostras avaliadas.

A análise das Figuras III.11 (pág. 75) e III.12 (pág. 75) indica que o ácido *trans*-aconítico, quando irradiado em forma sólida, não sofre alterações em sua quantidade visto que, as amostras irradiadas apresentam o mesmo perfil e intensidade dos sinais quando comparadas com a amostra não irradiada.

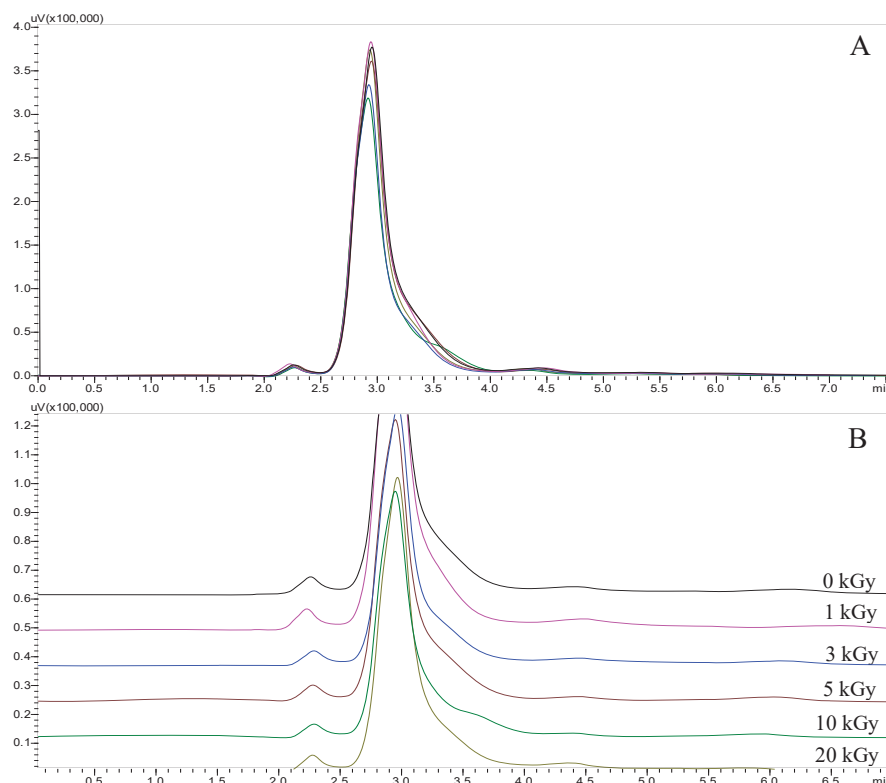


Figura III.11. (A) Sobreposição total dos cromatogramas de CLAE a 280 nm de amostras sólidas do ácido *trans*-aconítico (TS₀, TS₁, TS₃, TS₅, TS₁₀ e TS₂₀; TR entre 0,0 e 7,0 min); (B) Sobreposição parcial dos cromatogramas de CLAE a 280 nm de amostras sólidas do ácido *trans*-aconítico (TS₀, TS₁, TS₃, TS₅, TS₁₀ e TS₂₀; TR entre 0,0 e 7,0 min); Concentração A:B (1:4), onde A = metanol e B = solução água:ácido trifluoracético 99,5:0,5.

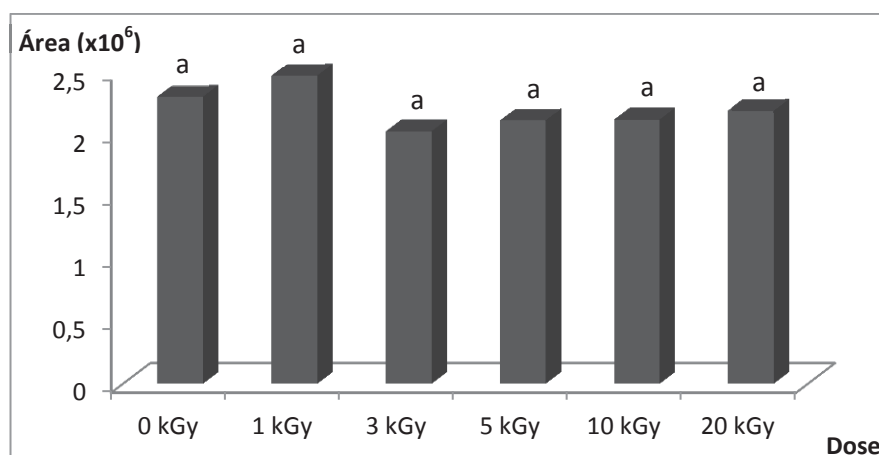


Figura III.12. Gráficos da variação das áreas do pico em amostras do ácido *trans*-aconítico sólido em função da dose de radiação gama. Barras seguidas por mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Estudos sobre a radiação gama induzindo modificações químicas em componentes individuais são escassos. A literatura não relata o efeito da radiação gama sobre o conteúdo do

ácido *trans*-aconítico. Porém, a ocorrência de alterações promovidas pela radiação ionizante depende, dentre outros fatores, do conteúdo de água e das condições de radiação, como dose, temperatura, ausência ou presença de oxigênio.⁹⁸

Embora não tenham sido observadas alterações significativas no conteúdo total do ácido *trans*-aconítico irradiado em forma sólida, foram realizadas análises de RPE para verificar a possível formação de radicais livres pela radiação ionizante. Na Figura III.13A são apresentados os espectros de RPE obtidos para amostras do ácido *trans*-aconítico sólido exposto a diferentes doses de radiação gama.

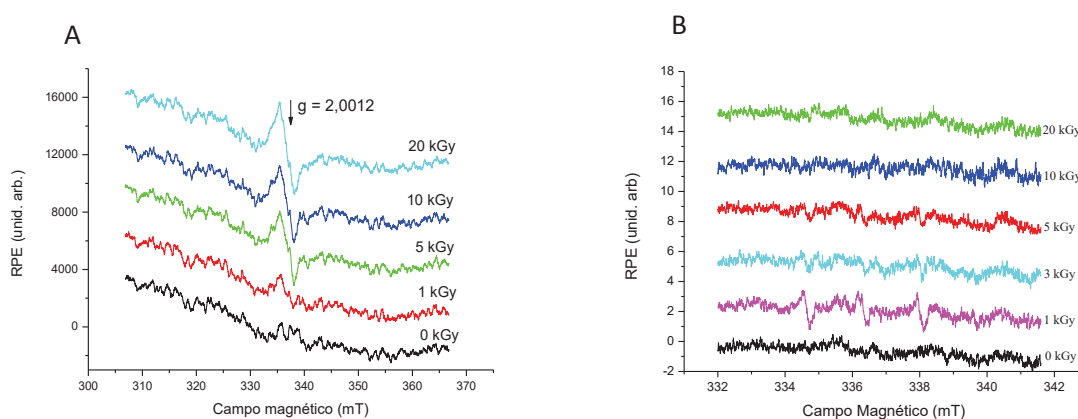


Figura III.13. Espectros de RPE do ácido *trans*-aconítico irradiado em forma sólida em função da dose de radiação gama (A); Espectros de RPE do ácido *trans*-aconítico irradiado em solução aquosa em função da dose de radiação gama (B).

Os espectros de RPE do ácido *trans*-aconítico irradiado em forma sólida apresentam sinais referentes à presença de radicais livres nas amostras expostas a doses de 5,0, 10,0 e 20,0 kGy de radiação gama. Este resultado está em conformidade com a literatura que relata a formação de radicais livres e relativamente estáveis em amostras irradiadas na ausência de água.⁹⁸

Estudos sobre o efeito da radiação gama em compostos orgânicos têm sugerido a obtenção de diferentes radicais formados pela abstração do radical $H^\bullet$ e quebra homolítica de ligações covalentes. Como exemplo, o ácido málico ($HOOCCH_2CHOHCOOH$) e o aminoácido valina $[(CH_3)_2CHCH(NHCH_3)COOH]$ quando expostos à radiação gama apresentam os radicais $HOOCCH_2C^\bullet HCOOH$ e $[(CH_3)_2C^\bullet CH(NHCH_3)COOH]$ como os principais radicais formados e resultantes das abstração do $OH^\bullet$ e $H^\bullet$, respectivamente.¹³⁰

A intensa energia emitida por núcleos radioativos faz com que moléculas como a do ácido *trans*-aconítico, quando expostas à radiação gama, sofram a abstração de átomos de hidrogênio, elétrons ou quebra homolítica. A abstração de um radical $H^\bullet$ a partir do carbono

metilênico da molécula do ácido *trans*-aconítico, permite um maior número de estruturas de ressonância, fato que resulta em uma estabilização eletrônica adicional do radical formado.¹²³ Sendo assim, é possível sugerir que o radical $\text{HOOCCHC}(\text{COOH})\text{CH}^{\bullet}\text{COOH}$ esteja presente entre os inúmeros radicais prováveis de serem formados (Figura III.14).

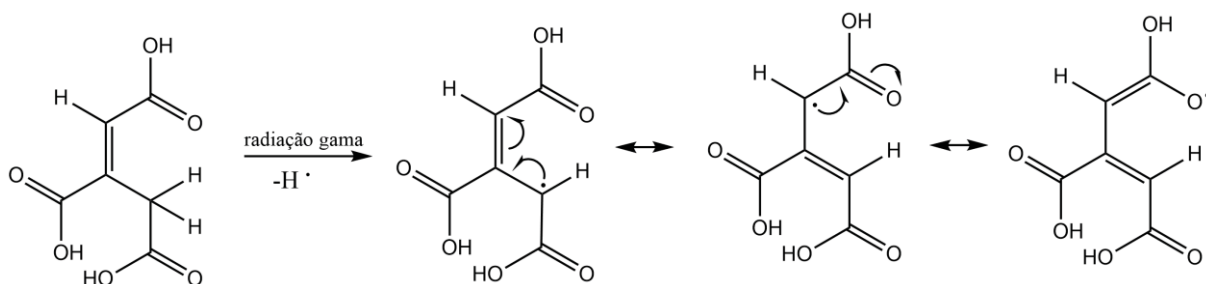


Figura III.14. Estruturas de ressonância para um dos radicais formados pela irradiação do ácido *trans*-aconítico.

Quanto ao efeito da radiação gama sobre o ácido *trans*-aconítico irradiado em presença da água como solvente, a Figura III.15 (pág. 78) apresenta o cromatograma de CLAE a 280 nm da amostra controle (TA_0) do ácido *trans*-aconítico em solução aquosa (1,0 mg/mL). Na Figura III.16 (pág. 78) é apresentada uma comparação entre o cromatograma de CLAE a 280 nm da amostra controle do ácido *trans*-aconítico e os cromatogramas de CLAE do ácido *trans*-aconítico em solução aquosa (1,0 mg/mL) submetidos a doses de 1,0, 3,0, 5,0, 10,0 e 20,0 kGy (TA_1 , TA_3 , TA_5 , TA_{10} e TA_{20} , respectivamente) de radiação gama. Os cromatogramas de CLAE foram obtidos a 280 e 254 nm, porém, somente os cromatogramas obtidos a 280 nm foram apresentados, visto que se mostraram idênticos aos obtidos a 254 nm.

Os cromatogramas obtidos para o ácido *trans*-aconítico indicam que, em meio aquoso, este ácido apresenta comportamento diferente do apresentado quando irradiado em sua forma sólida, não solubilizada. O tratamento com a radiação gama promoveu uma brusca diminuição na quantidade do ácido *trans*-aconítico.

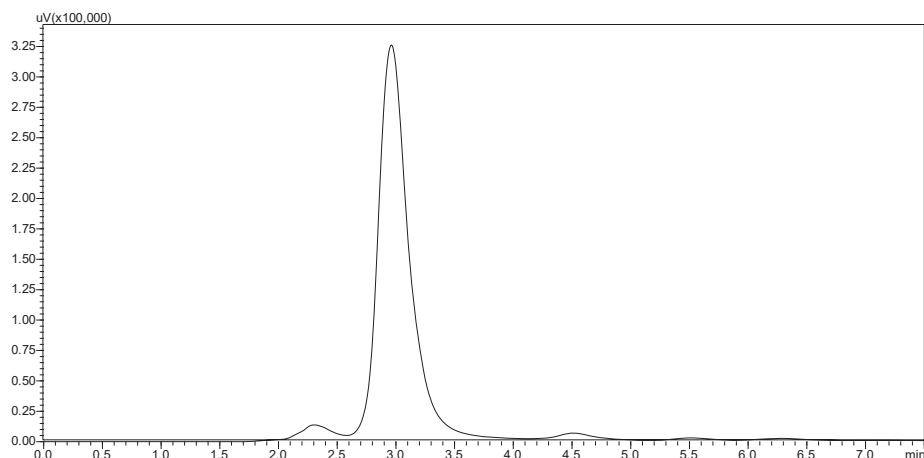


Figura III.15. Cromatograma de CLAE a 280 nm de TA_0 (TR entre 0,0 e 7,0 min); Concentração A:B (1:4), onde A = metanol e B = solução água:ácido trifluoracético 99,5:0,5.

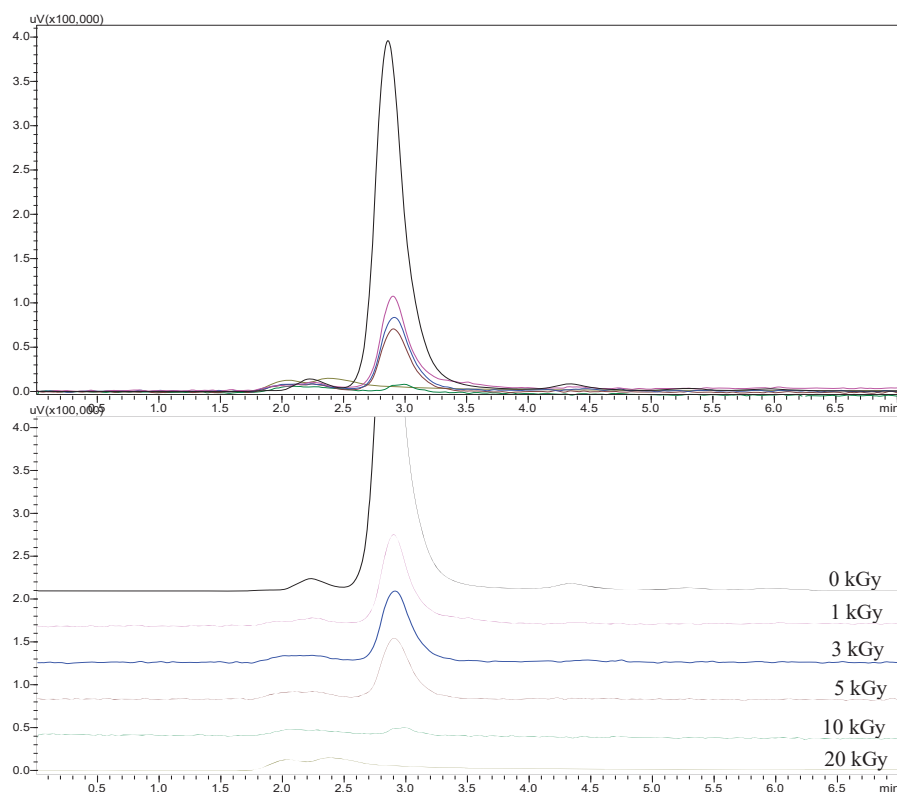


Figura III.16. (A) Sobreposição total dos cromatogramas de CLAE a 280 nm de amostras solubilizadas em água do ácido *trans*-aconítico (TA_0 , TA_1 , TA_3 , TA_5 , TA_{10} e TA_{20} ; TR entre 0,0 e 7,0 min); (B) Sobreposição parcial dos cromatogramas de CLAE a 280 nm de amostras solubilizadas em água do ácido *trans*-aconítico (TA_0 , TA_1 , TA_3 , TA_5 , TA_{10} e TA_{20} ; TR entre 0,0 e 7,0 min); Concentração A:B (1:4), onde A = metanol e B = solução água:ácido trifluoracético 99,5:0,5.

Na Figura III.17 (pág. 79) é apresentada a variação das proporções relativas do ácido *trans*-aconítico em solução aquosa em função das diferentes doses de radiação. A tabela A4

(pág. 176) apresenta a média (resultante da análise em triplicata) das áreas dos picos referentes à amostra controle e amostras irradiadas do ácido *trans*-aconítico, solubilizado em água e irradiado. Pela análise estatística realizada pelo teste de Tukey foi possível verificar que a concentração do ácido *trans*-aconítico solubilizado em água sofre diminuição significativa ($p < 0,05$) em amostras irradiadas até mesmo com a menor dose de radiação testada. As concentrações do ácido *trans*-aconítico em amostras submetidas a 1,0, 3,0 e 5,0 kGy de radiação gama não apresentam diferenças significativas entre si. A mesma relação foi verificada para as amostras submetidas a 10,0 e 20,0 kGy de radiação gama.

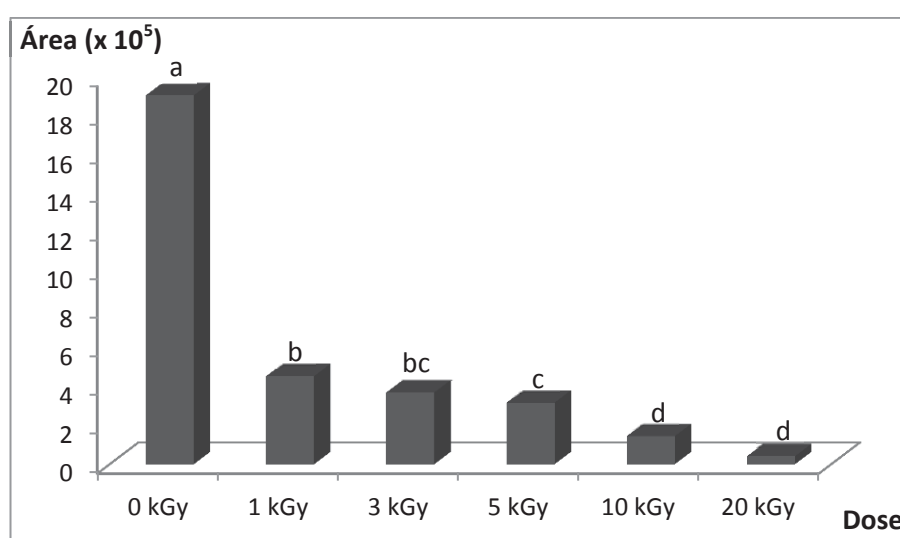


Figura III.17. Gráfico da variação da área de picos do ácido *trans*-aconítico solubilizado em água e irradiado em função da dose de radiação gama. Barras seguidas por letras diferentes são diferentes significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

A diminuição, em função da dose de radiação gama, das concentrações do ácido *trans*-aconítico solubilizado em água e irradiado confirmou a observação para a fração **FF** e indicou uma possível degradação deste ácido quando em solução.

Visando entender o comportamento do ácido *trans*-aconítico em solução aquosa foram realizadas análises por RPE das amostras submetidas às diferentes doses de radiação gama. Contudo, os espectros de RPE deste ácido em solução aquosa não apresentam sinais referentes à presença de radicais livres nas amostras avaliadas (Figura III.13B; pág.76). A ausência de radicais livres em solução aquosa é decorrente do fato de que a molécula da água sofre facilmente radiólise quando exposta à radiação ionizante, produzindo, devido às reações primárias de excitação e ionização, as espécies H_2O^{+*} , elétrons livres aquosos (e^-_{aq}), $\text{H}^\bullet$, $\text{OH}^\bullet$, H^+ e OH^- .^{131,132,133} A ausência de sinais em espectros de RPE do ácido *trans*-aconítico

irradiado em solução aquosa pode ser justificada pelo fato de que os radicais livres formados podem reagir entre si ou com moléculas próximas, conduzindo a reações em cadeia que levam à formação de radicais livres secundários. Estes radicais podem capturar elétrons no meio, dando origem a substâncias neutras e, portanto, não detectáveis por RPE.¹²⁰

Sendo assim, é possível afirmar que, embora o ácido *trans*-aconítico forme radicais livres quando exposto a radiação gama, a presença da água e dos radicais decorrentes de sua radiólise no meio faz com que os radicais do ácido sejam rapidamente consumidos em reações radicalares.¹³⁴

O consumo do ácido *trans*-aconítico quando irradiado em solução aquosa foi demonstrado por análise de RMN de ¹H (Figura III.18; pág. 81) realizada imediatamente após a irradiação e sucessiva liofilização das amostras. Conforme a elucidação estrutural descrita no Capítulo II (pág. 52), os simpletos em δ_H 6,72 e 3,72 foram atribuídos aos núcleos de hidrogênio alquênico e metilênico, respectivamente.⁵¹ É possível verificar nos espectros de RMN de ¹H a diminuição gradual da intensidade dos sinais em δ_H 6,72 e 3,72. Estes sinais não são registrados no espectro da amostra submetida a radiação de 20,0 kGy.

A diminuição na quantidade do ácido *trans*-aconítico quando irradiado em solução aquosa foi verificada também por análises de LC/MS (Figura A63; pág. 177). O pico do íon [M-H]⁻ em $m/z = 173,0089$ e TR = 3,7 min referente ao ácido *trans*-aconítico aparece em todas as amostras submetidas ou não a radiação gama. Porém, em doses iguais e superiores a 3,0 kGy é possível observar o aparecimento de um pico em TR = 2,1 min e [M-H]⁻ em $m/z = 191,0198$. O pico observado em TR = 2,1 min é atribuído ao ácido cítrico e referente à adição de uma molécula de água [M-H]⁻ + 18,0109 ao ácido *trans*-aconítico. A porcentagem relativa do pico em TR = 2,1 min apresenta-se crescente com o aumento da dose de radiação gama absorvida, sendo correspondente a 5,40%, 9,34%, 15,24% e 28,39% para as amostras irradiadas a 3,0, 5,0, 10,0 e 20,0 kGy, respectivamente.

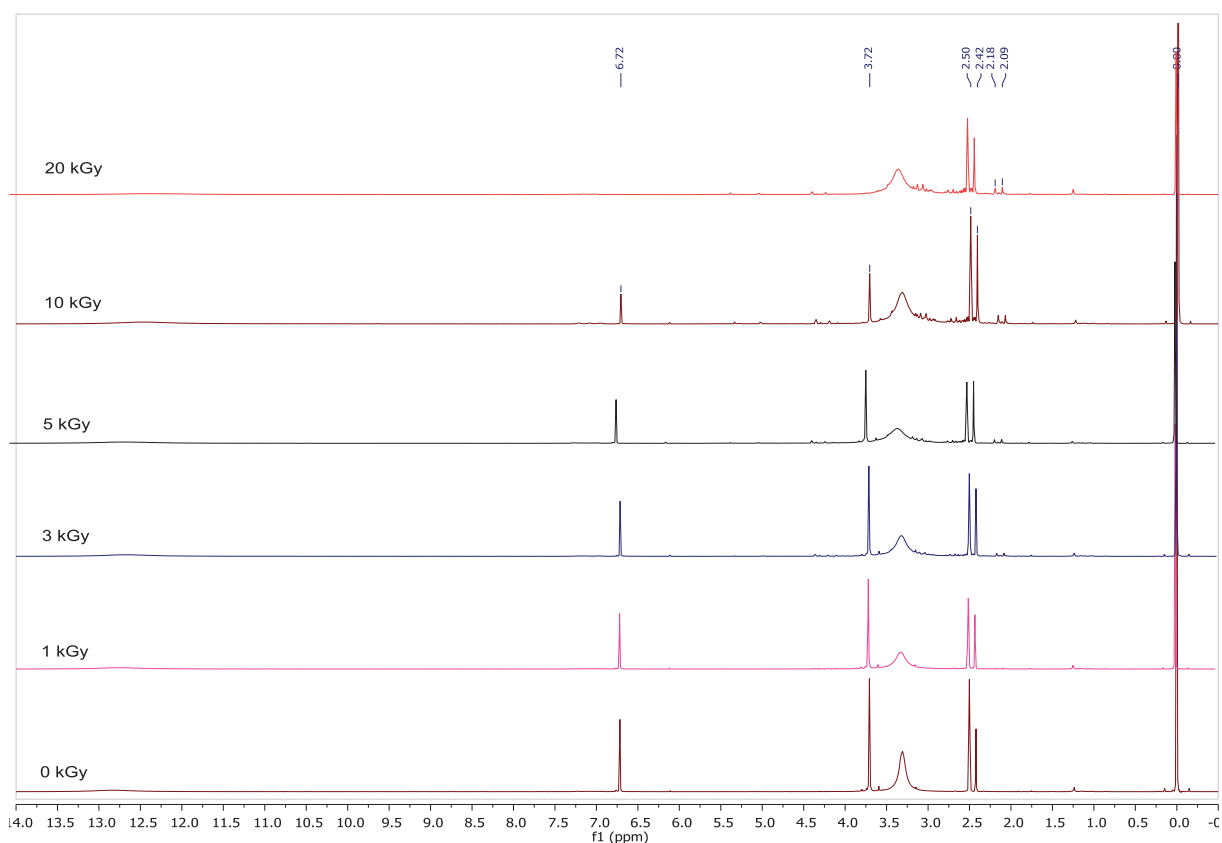
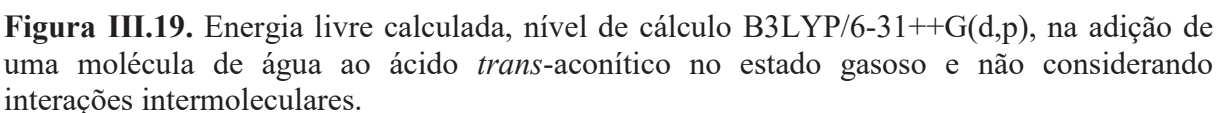


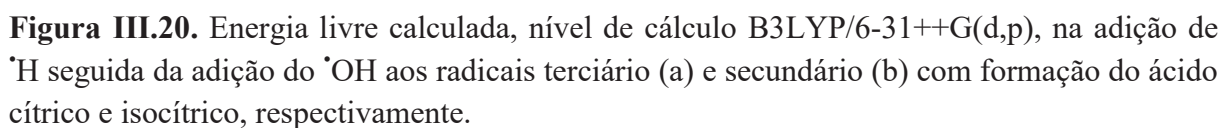
Figura III.18. Espectros de RMN de ^1H [400 MHz; $\text{DMSO-}d_6$] do ácido *trans*-aconítico submetido a diferentes doses de radiação em meio aquoso.

Considerando os dados experimentais que indicam uma reação de hidratação do ácido *trans*-aconítico quando exposto a radiação gama, cálculos teóricos foram realizados para investigar os possíveis mecanismos e produtos desta reação.

Inicialmente, os resultados teóricos permitiram verificar que, na ausência de radiação gama, a adição de uma molécula de água ao ácido *trans*-aconítico não ocorre de maneira espontânea (Figura III.19; pág. 82). A reação de hidratação do ácido *trans*-aconítico na ausência de radiação gama como fonte de energia não é favorável termodinamicamente, pois apresenta valor positivo para a variação da energia livre de Gibbs ($\Delta G^{\text{total}} = 5,73 \text{ kcal/mol}$).



Mecanismo radicalar



Mecanismo iônico

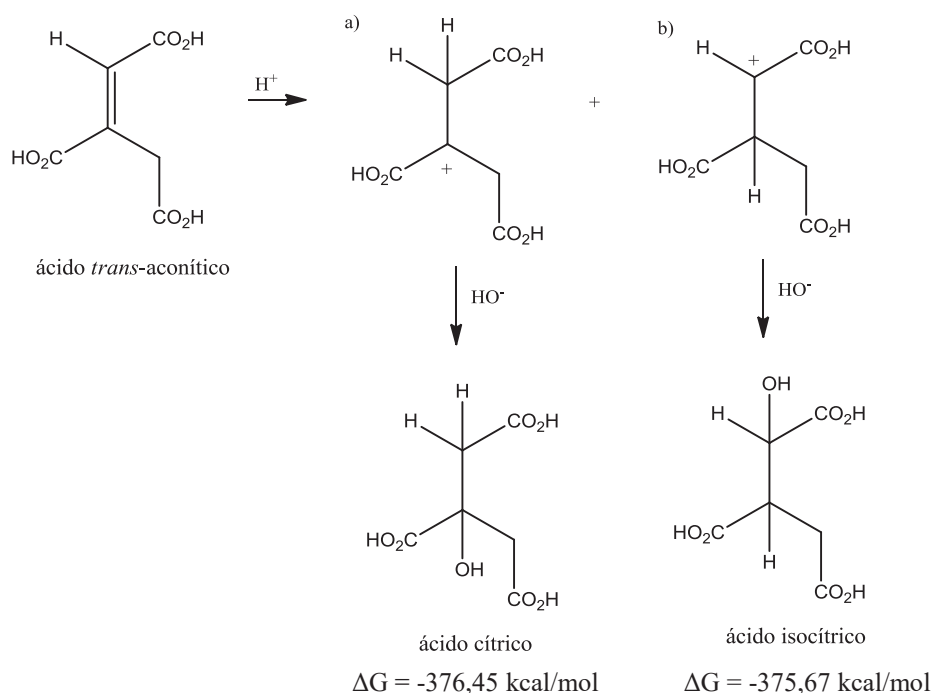


Figura III.21. Energia livre calculada, nível de cálculo B3LYP/6-31++G(d,p), na adição de H^+ seguida da adição do OH^- ao carbocátion terciário (a) e secundário (b) com formação do ácido cítrico e isocítrico, respectivamente.

Tais reações se processam preferencialmente com a formação de radical ou carbocátion terciários, uma vez que estes se apresentam mais estáveis quando comparados com os possíveis radicais e carbocátions secundários (Figura III.22; pág. 84).

A adição de $\text{H}^\bullet$ à dupla ligação da molécula do ácido *trans*-aconítico com posterior adição de $\text{OH}^\bullet$ aos radicais terciário e secundário ocorre de maneira espontânea com $\Delta G = -101,33 \text{ kcal/mol}$ e $-100,56 \text{ kcal/mol}$ e formação dos ácidos cítrico e isocítrico, respectivamente (Figura III.20; mecanismo radicalar; pág. 82). A adição de $\text{OH}^\bullet$ à dupla ligação da molécula do ácido *trans*-aconítico com posterior adição de $\text{H}^\bullet$ aos radicais terciário e secundário ocorre também de maneira espontânea com os mesmos valores de ΔG para a formação dos ácidos cítrico e isocítrico. A pequena variação nos valores da energia livre de Gibbs entre os produtos formados permite indicar a presença do ácido cítrico e do ácido isocítrico no meio reacional. A adição eletrofílica do íon H^+ à insaturação $\text{C}=\text{C}$ do ácido *trans*-aconítico com posterior adição do íon OH^- ao carbocátion terciário formado é também um processo bastante favorável e espontâneo com $\Delta G = -376,45 \text{ kcal/mol}$ (Figura III.21). A formação do ácido cítrico via adição eletrofílica e reação radicalar corrobora a prévia

indicação, por análises de LC/MS, do ácido cítrico como um dos principais produtos formados pela exposição do ácido *trans*-aconítico à radiação gama (Figura A63, pág. 177).

Os ácidos cítrico e isocítrico são os principais produtos radiolíticos do ácido *trans*-aconítico em meio aquoso, sendo o ácido cítrico um ácido orgânico comum em espécies vegetais.^{79,80} O ácido cítrico tem importante papel no processo de respiração celular de organismos aeróbicos e constitui a primeira substância a ser formada durante o ciclo de Krebs, conhecido também como ciclo do ácido cítrico, que ocorre no interior das mitocôndrias. Sendo assim, o ácido cítrico está relacionado com a obtenção de energia para as atividades desenvolvidas pelas células.¹³⁵

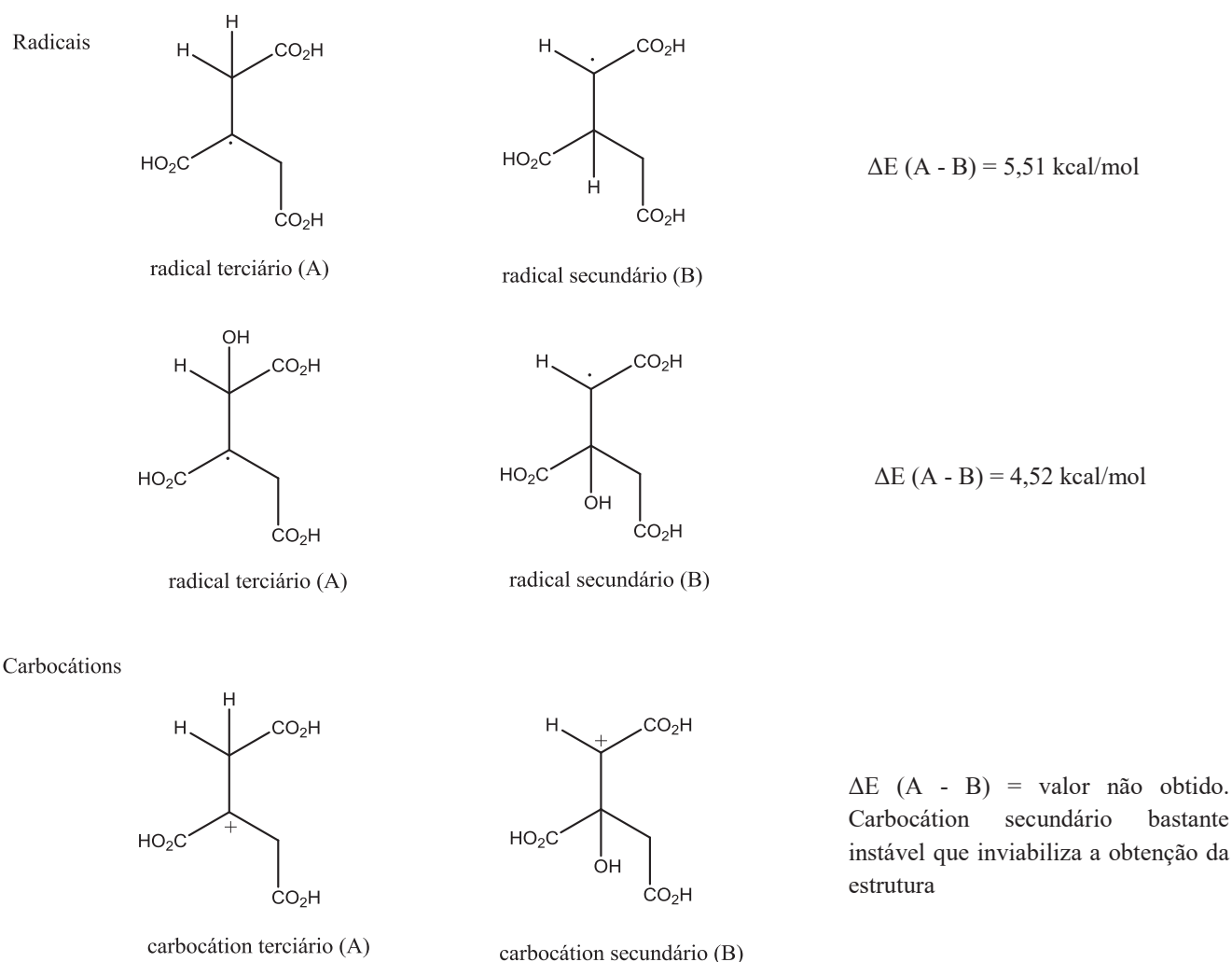


Figura III.22. Variação de energia livre calculada, nível de cálculo B3LYP/6-31++G(d,p), na adição de $\cdot\text{H}$ à molécula do ácido *trans*-aconítico e formação de radicais terciário e secundário (A); na adição de $\text{HO}\cdot$ à molécula do ácido *trans*-aconítico e formação de radicais terciário e secundário (B); na adição de H^+ à molécula do ácido *trans*-aconítico e formação de carbocátions terciário e secundário (C).

CAPÍTULO IV

**Atividades biológicas: antitumoral,
anti-inflamatória, tripanocida,
antimicrobiana e antioxidante**

IV.1. Introdução

IV.1.1. Câncer

Segundo a Organização Mundial da Saúde, o câncer está entre as principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, sendo responsável por aproximadamente 8,2 milhões de mortes em 2012. No ano de 2015 foram relatados mais de 14 milhões de novos casos dessa doença, além da triste expectativa de um aumento de cerca de 70% ao longo das próximas duas décadas.¹³⁶

No Brasil, os diagnósticos mais frequentes entre os homens são de cânceres de próstata, pulmão, estômago, cólon, reto e esôfago. Em mulheres, a predominância é do câncer de mama, seguido pelos cânceres de colo uterino, cólon, reto, pulmão e estômago.¹³⁷

O câncer é uma manifestação complexa de instabilidade genômica celular causada por fatores genéticos ou ambientais capazes de levar à interrupção e/ou desregulação de funções biológicas básicas, tais como a diferenciação morfológica e funcional e a multiplicação celular. A multiplicação e diferenciação celular em células não cancerosas ocorrem sob o controle de um sistema integrado e complexo que mantém a população celular dentro de limites fisiológicos. Alterações nesse sistema regulatório resultam em distúrbios do crescimento e/ou da diferenciação com consequente desenvolvimento das chamadas neoplasias. Portanto, uma neoplasia pode ser entendida como uma proliferação celular anormal, descontrolada e autônoma, na qual as células reduzem ou perdem a capacidade de se diferenciarem, em consequência de alterações nos genes e proteínas que regulam tais atividades.¹³⁸

O desenvolvimento do câncer, chamado também de processo de carcinogênese, dá-se lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa origine um tumor detectável. O estágio de iniciação da carcinogênese é caracterizado pela ação de um agente carcinogênico (agente oncoiniciador) que provoca modificações em alguns dos genes celulares. Neste estágio, o DNA acumula uma série de mutações decorrentes de alterações na sequência, perdas, ganhos e rearranjos cromossômicos. Porém, é necessário um longo e continuado contato com o agente cancerígeno promotor, sendo que a retirada deste, muitas vezes, interrompe o processo. Em um segundo momento, a célula iniciada é transformada em célula cancerosa, de forma lenta e gradual e, as alterações estruturais e/ou funcionais levam à ativação de proto-oncogenes e inativação de genes supressores de tumor, além de comprometer também genes de reparo e genes de apoptose. Após a instalação do câncer,

ocorre uma multiplicação celular descontrolada que evolui até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença.¹³⁹

O tratamento do câncer inclui processos cirúrgicos, terapia radioativa, quimioterapia e terapia biológica (imunoterapia e terapia gênica). A aplicação isolada ou a associação de tais modalidades tem aumentado a chance de cura da doença. Embora a quimioterapia tenha como objetivo a destruição das células neoplásicas, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não-específica, lesando células malignas e normais, particularmente as células de rápido crescimento, como as gastrintestinais, capilares e do sistema imunológico. Esse fato explica a ocorrência dos inúmeros efeitos adversos altamente deletérios para o organismo em decorrência da quimioterapia.¹⁴⁰

A *cis*-diaminodicloroplatina (II), conhecida como cisplatina (*cis*-[Pt (NH₃)₂Cl₂]) (**33**; Figura IV.1), foi descoberta em 1960 e tem sido utilizada amplamente como um agente único ou em combinação com outros agentes antineoplásicos, no tratamento de diversos tipos de cânceres, incluindo cânceres de pulmão, ovário, testículos, cabeça e pescoço. Estudos mecanísticos indicam que a cisplatina se liga de forma covalente a um resíduo de guanina. O DNA contendo a cisplatina ligada ao resíduo de guanina tem sua conformação distorcida com consequente inibição da replicação e transcrição, fato que leva à ativação de múltiplas vias de sinalização, interrupção do ciclo celular e apoptose. A indução de apoptose é responsável pela atividade anti-câncer da cisplatina.^{141,142}

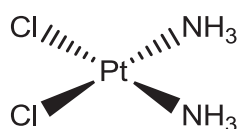


Figura IV.1. Estrutura química da cisplatina (**33**).

Apesar do sucesso clínico da cisplatina como o primeiro agente quimioterapêutico para o tratamento de vários tipos de cânceres, sua administração continuada é bastante limitada em função de reações adversas (náusea, vômitos, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, neurotoxicidade, mielotoxicidade e ototoxicidade) e do desenvolvimento de resistência a esta droga.¹⁴³ Acredita-se que os mecanismos de resistência à cisplatina incluem aumento da desintoxicação, aumento da reparação do DNA, alterações na expressão e ativação de genes envolvidos em vias de morte celular, bem como autofagia.¹⁴²

Diante disso, um dos grandes desafios enfrentados na quimioterapia do câncer é a obtenção de agentes antineoplásicos que apresentem baixa toxicidade e elevada eficácia antitumoral. O interesse em produtos naturais como uma alternativa às drogas sintéticas para o tratamento do câncer é, em grande parte, devido à enorme variedade destes, fato que permite o seu direcionamento para múltiplos alvos de atuação antineoplásica incluindo atividades de supressão da proliferação, modulação de atividades enzimáticas de estimulação do sistema imunológico e apoptose.^{139,144} Um número crescente de estudos tem demonstrado que os metabólitos secundários de plantas desempenham importante papel no tratamento do câncer.¹⁴⁵

IV.1.2. Inflamação

A inflamação é uma resposta do organismo frente a uma infecção ou injúria tecidual, provocada por patógenos ou pela ação de agentes físicos e tem como objetivo a eliminação da causa inicial da lesão, além do reparo do tecido danificado. Embora a inflamação auxilie a remoção das infecções, dos estímulos nocivos e cicatrização, a reação inflamatória pode causar danos consideráveis caso não ocorra de maneira eficiente e sincronizada.^{146,147}

A cascata de eventos desencadeada após a entrada do agente agressor ou frente ao dano tecidual resulta no aumento do diâmetro e da permeabilidade vascular, bem como no recrutamento de leucócitos circulantes que tentam remover, por fagocitose, o agente lesivo. Esses eventos ocorrem como consequência de uma interação complexa entre os diferentes tipos celulares e os vários mediadores solúveis produzidos durante o processo inflamatório. Os mediadores inflamatórios incluem os metabólitos do ácido araquidônico, histamina, óxido nítrico, espécies reativas de oxigênio, metaloproteinases, quimiocinas e citocinas.^{148,149} Alguns destes mediadores inflamatórios resultam em respostas sistêmicas ao processo inflamatório como, por exemplo, febre, hipotensão e leucocitose.¹⁵⁰

A resposta do organismo à infecção ou injúria tecidual pode ser imunológica inata (não específica), caracterizada pela migração leucocitária nas primeiras 48 h e pelos sinais macroscópicos como o calor, rubor, edema, dor e perda de função.¹⁵¹ Neste tipo de resposta estão envolvidos os neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, basófilos, células dendríticas e mastócitos. A outra resposta inflamatória do organismo à infecção ou injúria tecidual é a imunológica adaptativa (específica), caracterizada pela produção de anticorpos específicos que atuam contra um determinado agente agressor e secreção de diversas citocinas que

orquestram a ação efetora dos linfócitos. Neste tipo de resposta estão envolvidos os linfócitos e os macrófagos.¹⁴⁷

Quando a ação do agente inflamatório cessa, inicia-se um processo de resolução da resposta inflamatória caracterizado pela redução da liberação de mediadores, recuperação do estado hemodinâmico original, reparo tecidual e eliminação das células inflamatórias por recirculação sistêmica, drenagem linfática ou por morte celular. Entretanto, o processo inflamatório pode seguir outro curso que não a resolução e progredir para um processo inflamatório crônico como resultado da persistência do agente agressor ou falhas nos processos de resolução.¹⁵²

Dessa forma, os eventos promovidos pelas células do sistema imune inato são importantes para iniciar a cascata inflamatória, porém a ativação da imunidade adaptativa, que consiste na expansão de um pequeno número de linfócitos que participam dos processos tardios da inflamação, é crucial para a resolução do processo inflamatório.¹⁵² Os linfócitos são os principais componentes celulares da resposta adaptativa, sendo divididos em linfócitos B, responsáveis pela produção de anticorpos, e linfócitos T, que amplificam a resposta antígeno-específica, contribuem para a resposta imune mediada por células e para a resposta reguladora. Quando ativados, diante da exposição ao antígeno apresentado por células especializadas do sistema imune inato, os linfócitos T reconhecem especificamente o antígeno e secretam a citocina IL-2, a qual atua como um fator de crescimento autócrino nessas células, promovendo expansão clonal e proliferação. Esse evento precede as respostas efetoras, orquestradas por citocinas, dos linfócitos T, assim como na resposta imune inata.¹⁵³

Fármacos anti-inflamatórios são capazes de interferir no processo reacional de defesa do organismo, minimizando os danos e proporcionando maior conforto ao paciente. Atualmente, os principais agentes anti-inflamatórios são representados pelos glicocorticóides e pelos anti-inflamatórios não esteroidais.¹⁵⁴

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) encontram-se entre os medicamentos mais prescritos em todo o mundo, sendo empregados para o tratamento da inflamação, dor e edema, como também nas osteoartrites, artrite reumatoide e distúrbios músculo-esqueléticos.¹⁵⁵ Atuam inibindo a enzima ciclo-oxigenase (COX), impedindo a formação de prostaglandinas e de tromboxanos, mediadores do processo inflamatório. A isoforma COX-1 é expressa de forma constante na maioria dos tecidos e está envolvida na sinalização entre células e na homeostasia tecidual. A isoforma COX-2, expressada constitutivamente no

cérebro, rins e alguns outros tecidos. Sua produção pelos macrófagos é induzida nas inflamações e tende a facilitar a resposta inflamatória.¹⁵⁴

As consequências do bloqueio da COX-1 no trato gastrointestinal são a inibição da proteção de sua mucosa e o aumento da secreção ácida, podendo levar à erosão, ulceração, perfuração e hemorragia. Porém, os inibidores seletivos da COX-2 podem levar a um desequilíbrio dos prostanoídes hemostáticos, aumentando o risco de trombose e de eventos vasculares, além da perda do efeito protetor da COX-2 na isquemia miocárdica e no infarto do miocárdio.¹⁵⁵ Os AINEs comprometem a função renal e promovem a retenção de sódio e água. O uso prolongado de AINEs pode alterar os efeitos anti-hipertensivos de diuréticos betabloqueadores e inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA) resultando na elevação de 5 a 6 mmHg da pressão arterial média.¹⁵⁶

Quanto aos glicocorticoides, a ação anti-inflamatória deve-se, em grande parte, à inibição da transcrição do gene da enzima COX-2, à indução da proteína lipocortina (inibidora da enzima fosfolipase A) e à redução da produção de citocinas pro-inflamatórias. São muito utilizados na terapia das doenças autoimunes, na prevenção e/ou tratamento da rejeição de transplantes. Seus excelentes efeitos terapêuticos como anti-inflamatórios e imunossupressores são frequentemente acompanhados por graves e, algumas vezes, irreversíveis efeitos colaterais, como diabetes *mellitus*, úlcera péptica, síndrome de Cushing, osteoporose, atrofia cutânea, psicose e glaucoma.¹⁵⁷

Nos últimos anos, tem sido questionada a segurança do uso dos AINEs e glicocorticoides na prática clínica e, como consequência muitos destes fármacos, disponíveis comercialmente, têm sido retirados do mercado em virtude de seus efeitos colaterais. Neste sentido, plantas medicinais são potencialmente importantes por constituírem uma boa alternativa na busca de soluções medicamentosas para o tratamento de inflamações devido ao grande potencial biológico que apresentam.¹⁵⁵

IV.1.3. Doença de Chagas

A doença de Chagas, conhecida também como tripanossomíase americana, é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e vítima mais de 50.000 pessoas anualmente.¹⁵⁸ Embora sua prevalência global tenha diminuído de 18 a 20 milhões em 1991 para cerca de 6 a 7 milhões em 2015 (OMS), a doença de Chagas continua sendo uma das doenças parasitárias mais graves do mundo.¹⁵⁹ Dentre os custos com as doenças transmitidas por vetores, a doença de Chagas representa o segundo maior peso econômico na América Latina.¹⁶⁰

A doença de Chagas é infecciosa e está associada à pobreza, más condições de habitação e êxodo rural.¹⁶⁰ Em áreas endêmicas, a transmissão desta doença ocorre, principalmente, pelo contato com fezes e/ou urina de triatomíneos hematófagos (conhecidos como 'barbeiros' ou 'chupões') infectados. O *T. cruzi* pode ser transmitido também pela ingestão de alimentos ou bebidas contaminadas, transfusões de sangue de doadores infectados, transplantes de órgãos e transmissão vertical pela passagem do parasita de uma mãe infectada para o recém-nascido, durante a gravidez ou o parto. Atualmente, com o aumento da imigração, a doença de Chagas tem deixado de ser um problema de saúde limitado aos países da América Central e América do Sul, sendo observada em áreas como a Europa e Estados Unidos.¹⁶¹

O *T. cruzi* possui um ciclo de vida complexo, exibindo formas morfológicas e funcionais distintas. Estas formas alternam-se entre duas fases: uma no inseto vetor e outra no hospedeiro mamífero.¹⁶² No inseto vetor, o parasita em sua forma tripomastigota, ingerida durante o repasto sanguíneo, se diferencia em epimastigota, ou seja, na forma que se multiplica por divisão binária no intestino do vetor. A forma epimastigota, sofre nova diferenciação em tripomastigota metacíclica quando na ampola retal do inseto.¹⁶³ A transmissão natural ao hospedeiro mamífero ocorre pela penetração do parasita em sua forma tripomastigota metacíclica, proveniente das fezes ou urina do vetor infectado e depositada sobre a pele do hospedeiro durante a hematofagia. Os parasitas entram no corpo do indivíduo quando este, instintivamente, ao coçar espalha as fezes no local da picada, nos olhos, na boca, ou em qualquer ruptura da pele. Os tripomastigotas possuem a capacidade de infectar diferentes tipos celulares, onde se multiplicam por divisão binária dando origem à forma amastigota.¹⁶⁴ Esta última forma diferencia-se em tripomastigotas que, por sua vez, invadem a corrente sanguínea. Os tripomastigotas circulantes não se multiplicam, a menos que invadam outras células ou sejam ingeridos por um inseto vetor durante a refeição sanguínea,¹⁶⁵ Figura VI.2 (pág. 92).

A doença de Chagas é lentamente progressiva e a fase aguda da infecção evidencia-se por um nódulo elevado e doloroso (o chagoma) no local da inoculação. Outros sinais podem estar ausentes ou variar desde febre, adenite, exantema ou hepatoesplenomegalia até miocardite aguda e morte. Os pacientes que superam a infecção aguda, que dura de umas poucas semanas a meses, geralmente permanecem assintomáticos durante anos. Com o passar do tempo, doenças crônicas do coração e do trato gastrintestinal podem se manifestar, sendo que a destruição progressiva das células miocárdicas e dos neurônios do plexo mioentérico pode ser

resultante do tropismo do *T. cruzi* por células musculares.¹⁶⁵ A possibilidade de uma patogênese auto-imune foi sugerida também como a responsável pelas lesões cardíacas.¹⁶⁶

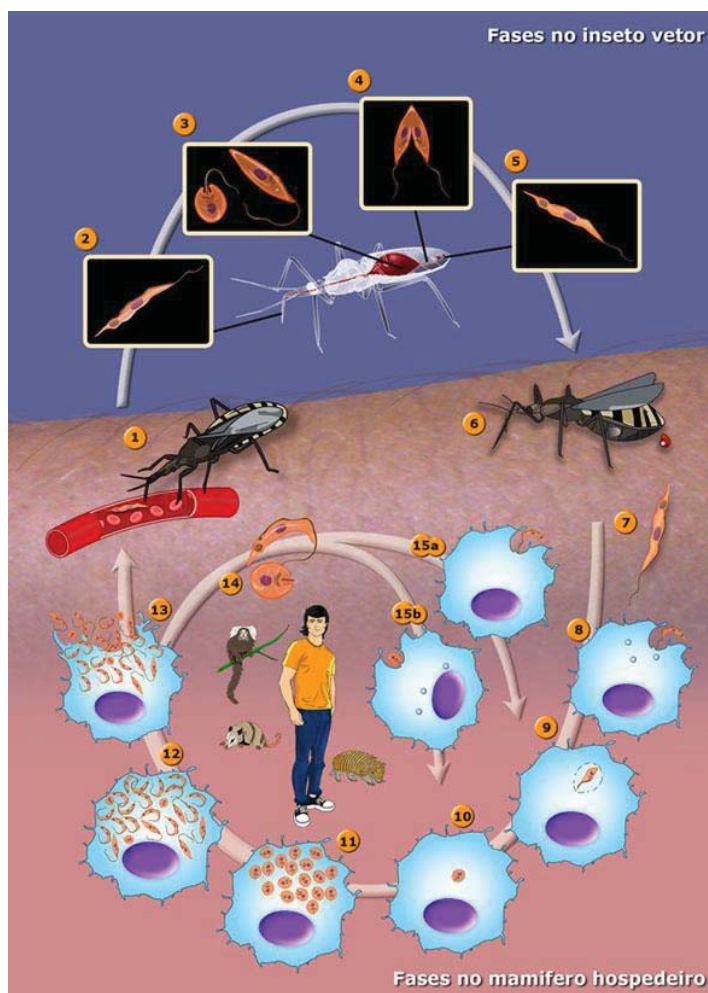


Figura IV.2. Ciclo de vida do protozoário *T. cruzi* nos diferentes hospedeiros. Contaminação do barbeiro (1); Formas tripomastigotas no estômago do barbeiro (2); Diferenciação de tripomastigotas em epimastigotas (3); Multiplicação de epimastigotas por divisão binária (4); Diferenciação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos no intestino posterior (5); Deposição a forma tripomastigota metacíclica sobre a pele do mamífero através da urina e fezes (6 e 7); Fagocitose de tripomastigotas metacíclicos por macrófagos (8 e 9); Diferenciação de tripomastigotas em amastigotas e lise do vacúolo (10); Multiplicação de amastigota por divisão binária (11); Diferenciação de amastigotas e rompimento da célula (12, 13 e 14); Tripomastigotas (15a) e amastigotas (15b) infectando novas células.¹⁶⁷

A quimioterapia para a doença de Chagas baseia-se em dois fármacos Nifurtimox (34) e Benzonidazol (35) (Figura IV.3; pág. 93), eficazes quase que 100% na cura da doença se administrados logo após a infecção, no início da fase aguda. Todavia, a eficiência destes fármacos na fase crônica da doença está ainda em discussão. A principal desvantagem desses tratamentos medicamentosos é a sua alta toxicidade manifestada em efeitos secundários, tais

como câibras, vômitos, anorexia, doenças alérgicas, insônia, linfadenopatia, dor muscular, depressão na medula espinhal, trombocitopenia, agranulocitose, polineuropatia e parestesia.¹⁶⁵

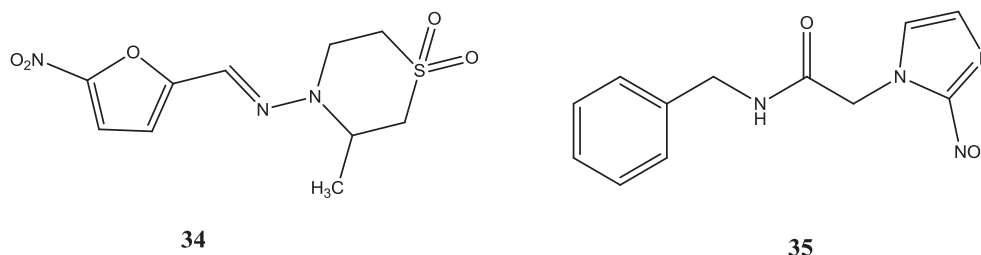


Figura IV.3. Estrutura química do Nifurtimox (**34**) e do Benzonidazol (**35**).

Aproximadamente, 16% dos pacientes crônicos tratados com Nifurtimox e Benzonidazol abandonam o tratamento por causa de seus efeitos colaterais.¹⁶⁵ Considerando a inexistência de tratamento adequado para essa infecção na fase crônica da doença, a OMS tem enfatizado a necessidade de desenvolvimento de novas drogas com atividade tripanocida e efeitos colaterais limitados.¹⁶⁸

Em virtude do grande potencial biológico dos produtos naturais, pesquisas com plantas medicinais podem levar à descoberta de compostos promissores no tratamento da doença de Chagas.

IV.1.4. Infecções bacterianas e fúngicas

As bactérias podem penetrar nos hospedeiros através de brechas na pele (cortes e queimaduras), inalação, ingestão ou transmissão sexual, sendo que infecções bacterianas são responsáveis por doença como pneumonia, faringite, erisipelas, meningite, gonorréia, coqueluche, difteria, tétano, sífilis, tuberculose e hanseníase.¹⁴⁶

Quanto aos fungos, estes podem causar infecções superficiais (pele, cabelo e unhas) ou profundas (disseminadas sistemicamente). As infecções fúngicas normalmente têm cura espontânea ou permanecem latentes em hospedeiros normais. Em indivíduos imunodeficientes, os fungos podem dar origem a infecções caracterizadas por necrose tecidual, hemorragia e oclusão vascular. Nos últimos anos, a incidência e gravidade das doenças fúngicas em pacientes imunodeficientes têm aumentado consideravelmente. Clinicamente, candidíase e aspergilose respondem respectivamente por 80% e 90% das infecções fúngicas sistêmicas em pacientes imunocomprometidos.¹⁴⁶

A resistência microbiana ameaça a prevenção e o tratamento de infecções causadas por bactérias, parasitas, vírus e fungos. Essa resistência refere-se a cepas de microrganismos que

multiplicam em presença de concentrações mais altas de antimicrobianos do que as que provêm de doses terapêuticas dadas a humanos.¹⁶⁹

A resistência microbiana é preocupação mundial, sendo que em 2004, foi estimado que mais de 70% das bactérias patogênicas são resistentes a, pelo menos, um dos antibióticos disponíveis atualmente no mercado. As chamadas 'superbactérias' (organismos resistentes à maior parte dos antibióticos utilizados clinicamente) estão surgindo em um ritmo acelerado.¹⁷⁰ A grande resistência de microrganismos patogênicos a múltiplas drogas tem aumentado devido ao uso indiscriminado de antibióticos.¹⁷¹

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da RDC 20/2011, determinou que a comercialização de antimicrobianos deve ser feita com retenção da receita médica. Tal medida foi adotada na tentativa de coibir o uso indiscriminado de antimicrobianos e, conseqüentemente, diminuir a propagação da resistência a esses fármacos.¹⁷²

Neste contexto, os produtos de origem vegetal surgem como uma alternativa promissora, uma vez que aproximadamente 70% dos novos antimicrobianos aprovados entre 1981 e 2002 pelo Food and Drug Administration (FDA) são de origem natural. Além disso, as plantas constituem uma excelente fonte de substâncias para novas drogas antimicrobianas, tendo em vista que sua diversidade molecular supera aquela derivada dos processos de origem sintética.¹⁷³ Portanto, é relevante o estudo de plantas medicinais na tentativa de descobrir alternativas para o controle de bactérias e fungos patogênicos, uma vez que o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas tem sido requerido constantemente na terapia clínica.

IV.1.5. Estresse oxidativo

Os sistemas biológicos, desde os mais simples, como os procariontes, até os mais especializados, como os mamíferos, exceto os microrganismos anaeróbicos, produzem, como um subproduto do metabolismo normal, radicais livres, tais como os radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$), hidroperoxila ($\text{HOO}\cdot$) e o ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$).¹⁷⁴ Radicais livres podem ser formados também durante processos patológicos ou serem oriundos de fontes exógenas físicas e/ou químicas. Os radicais livres podem causar danos ao DNA ou oxidar lipídios e proteínas. Radicais livres atacam as cadeias de ácidos graxos poli-insaturados dos fosfolipídios e do colesterol, abstraindo um hidrogênio do grupo metileno bis-alílico, iniciando assim o processo de peroxidação lipídica nas membranas celulares. Os radicais de

carbono formados podem reagir com o oxigênio, originando radicais peroxila que, por sua vez, podem atacar novas cadeias de ácidos graxos poliinsaturados, propagando a reação.¹⁷⁵

A produção de radicais livres é controlada por compostos antioxidantes de origem endógena (exemplo: enzima superóxido dismutase) ou provenientes da dieta alimentar e outras fontes. Todavia, o desequilíbrio entre a produção de radicais livres e sua remoção pelos sistemas químicos e enzimáticos de defesa antioxidante pode promover alterações funcionais em diversos tecidos e órgãos além de lesões oxidativas de caráter cumulativo.¹⁷⁵

Estudos têm evidenciado que algumas doenças degenerativas crônicas, tais como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, aterosclerose, diabetes *mellitus*, envelhecimento precoce, câncer, artrite, malária, AIDS e doenças do coração, estejam relacionadas com o estresse oxidativo causado por radicais livres.^{174,176}

A partir do início dos anos 1980, o interesse em encontrar antioxidantes naturais, tanto para o uso farmacêutico quanto para o emprego em produtos alimentícios aumentou consideravelmente.¹⁷⁷ Os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células.¹⁷⁵

Os antioxidantes são classificados em primários e secundários. Os antioxidantes primários são capazes de interromper a cadeia de radicais, cedendo hidrogênio a um radical livre e assumindo a forma de radical estável. Os antioxidantes secundários reduzem o processo de iniciação da cadeia radicalar, utilizando agentes quelantes de metais, como, por exemplo, o ácido etilenodiaminotetracético e o ácido cítrico.¹⁷⁸ De forma geral, denominam-se antioxidantes as substâncias que, presentes em concentrações baixas comparadas ao substrato oxidável, retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato. Os radicais formados a partir de antioxidantes não são reativos para propagar a reação em cadeia, sendo neutralizados por reação com outro radical, formando produtos estáveis.¹⁷⁵

Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, de forma a permitir uma rápida seleção de substâncias e/ou misturas potencialmente interessantes, na neutralização ou interrupção da formação de radicais livres.¹⁷⁹ Dentre estes métodos destaca-se o método de sequestro do radical livre DPPH[•], 2,2-difenil-1-picril-hidrazila. Este método está baseado na transferência de elétrons do radical estável DPPH[•] para um composto oxidante. Essa transferência de elétrons pode ser visualizada pelo descoramento da solução de cor violeta contendo DPPH[•], quando da adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio convertendo-o em DPPH-H. A partir dos resultados obtidos,

determina-se a porcentagem de atividade antioxidante (quantidade de DPPH[•] consumida pelo antioxidante) e/ou a porcentagem de DPPH[•] remanescente no meio reacional.¹⁸⁰

IV.2. Materiais e métodos

Para a realização dos testes biológicos, o coquetel antibiótico/antimicótico (penicilina G 100 UI/mL, estreptomicina 100 µg/mL e anfotericina B 250 ng/mL) e os reagentes Ficoll-Histopaque 1077, L-glutamina, PHA (Fito-hemaglutinina), MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil-2,5-difenil)-2H-tetrazólio) e DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) foram adquiridos da Sigma Aldrich. O RPMI e o soro fetal bovino foram adquiridos da Gibco. Os tubos para coleta sanguínea contendo heparina foram adquiridos da Vacutainer e o BD *Horizon Violet Proliferation Dye* 450 (VPD 450) foi adquirido da Becton Dickinson. A dexametasona utilizada foi Decadron[®] injetável, 4 mg/mL, Aché Laboratórios Farmacêuticos.

Para os testes de proliferação celular foi utilizado o citômetro de fluxo (FACSCANTO II[®]) da Becton Dickinson. Após aquisição dos eventos, foi feita a análise da proliferação celular utilizando o programa FACSDIVA[®].

As leituras de absorbância para a análise da atividade antioxidante foram realizadas em espectrofotômetro UV-VIS, UVmini-1240, SHIMADZU. As leituras de absorbância para a análise da atividade antimicrobiana foram realizadas em espectrofotômetro UV-VIS, marca BIOSPECTRO, modelo SP-22. As leituras de absorbância para a análise da atividade antitumoral foram realizadas em leitor de microplacas de ELISA VersaMax, marca Molecular Devices.

IV.2.1. Atividade antitumoral

Foram utilizadas linhagens celulares MCF-7 (carcinoma mamário positivo para receptor de estrógeno), MDA-MB-231 (carcinoma mamário, triplo negativo), HCT-116 (carcinoma de cólon e reto) e Vero (células não tumorais originada de rim do macaco verde africano, *Cercopithecus aethiops*). Todas as linhagens celulares foram mantidas na fase de crescimento logarítmica em meio RPMI-1640 suplementado com 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 2 µmol/L de L-glutamina e 10% de soro fetal bovino. As culturas foram mantidas a 37°C em uma incubadora com 5% de CO₂ e 95% de ar. As células MCF-7, MDA-MB-231, HCT-116 e Vero foram inoculadas em densidade celular de 10.000

células por poço. As placas foram pré-incubadas por 24 h a 37 °C a fim de permitir a adaptação das células antes da adição dos compostos a serem testados.

A citotoxicidade foi quantificada através do ensaio colorimétrico com MTT, o qual mede a viabilidade metabólica celular. O MTT é um sal de coloração amarela que é reduzido apenas por desidrogenases mitocondriais de células vivas, formando o (*E,Z*)-5-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-1,3-difenil formazan (Formazan), um produto de coloração roxa e insolúvel em água.¹⁸¹

A triagem foi feita com soluções em concentração de 30 µg/mL de **HE**, **EE**, **FD**, **FA**, **FE**, friedelina, lupeol, β -sitosterol, β -sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo e (-)-epicatequina, contendo no máximo 0,1% de DMSO. Após a adição dos compostos, as placas foram incubadas por 48 h em atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade relativa. Grupos controles foram usados incluindo células tratadas com soluções de 0,1% de DMSO (controle negativo) e 10 µmol/L de cisplatina (controle positivo).

Após 44 h de incubação com as soluções de teste, 20 µL de solução de MTT (5mg/mL em solução salina) foram adicionados a cada poço e as culturas foram incubadas novamente por mais 4 h para metabolização do MTT à Formazan pelas células viáveis. Após este tempo, o sobrenadante foi removido e 200 µL de uma solução 0,04 mol/L de HCl em álcool isopropílico foram adicionados para dissolver os cristais de Formazan. A densidade ótica foi medida em um espectrofotômetro a 595 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da viabilidade celular, usando como comparação a solução controle de 0,1% de DMSO e foram calculados de acordo com a Equação IV.1:

$$\text{Inibição da viabilidade (\%)} = [1 - (\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{CP})/(\text{CN} - \text{CP})] \times 100 \quad \text{Equação IV.1}$$

Onde Abs_{amostra}, CP e CN se referem às respectivas absorbâncias da amostra, controle positivo e controle negativo.¹⁸¹

Os compostos que mostraram inibição do crescimento acima de 50% na fase de triagem foram testados em uma série de micro diluições com concentrações variando entre 1x10⁻⁵ - 1x10⁻¹¹ mol/L. As concentrações que reduzem a viabilidade celular a 50% (CI₅₀) foram determinadas graficamente pela obtenção de curvas dose-resposta, utilizando-se o programa Prima 5 (GraphPad Software Inc.). Todos os testes foram feitos em triplicatas, em três experimentos independentes.

IV.2.2. Triagem anti-inflamatória *in vitro*

Para a triagem anti-inflamatória *in vitro*, foi coletado sangue periférico de cinco voluntários abordados nas dependências da UFVJM. A coleta do sangue foi realizada após o preenchimento, pelo participante, do consentimento livre e esclarecido (Anexos III e IV, págs. 178 e 180) e da observação dos critérios: indivíduos com idade entre 18 e 39 anos, que não reportem doença infecciosa, autoimune, crônico degenerativa ou de hipersensibilidade e que não estejam em uso de anti-inflamatórios esteroidais e/ou não esteroidais, bem como mulheres que, além de preencherem os critérios citados, não sejam gestantes. A amostra biológica consistiu de 15 mL de sangue venoso, coletados de forma asséptica por punção da veia antecubital mediana, na fossa antecubital, utilizando tubos a vácuo heparinizados. Após a utilização da amostra biológica nas análises, todo o material remanescente foi descartado adequadamente.¹⁸² As análises realizadas foram avaliadas e aprovadas pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) sob registro 569.313/2014.

IV.2.2.1. Obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humano

Inicialmente, 15 mL de sangue periférico venoso, coletados em tubos a vácuo contendo heparina, foram diluídos na proporção 1:1 em Tampão Fosfato de Salina (PBS) (NaCl 1,50 M; Na₂HPO₄ 0,08M; NaH₂PO₄ 0,02M, pH 7,20 - 7,40). O sangue diluído em PBS foi empilhado cuidadosamente sobre o reagente Ficoll-Histopaque 1077 na proporção de 2:1. As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram obtidas por meio de gradiente de densidade durante centrifugação (400 g, 21°C, 30 min) com Ficoll-Histopaque 1077.¹⁸³ O anel de PBMC, formado após a centrifugação, foi recolhido e lavado duas vezes em PBS (250 g, 4°C, 15 min). Em seguida, as células foram ressuspensas em 1 mL de PBS ou RPMI completo, ou seja, suplementado com L-glutamina 2 mM, soro fetal bovino (10%) e coquetel antibiótico/antimicótico (penicilina G 100 UI/mL, estreptomicina 100 µg/mL e anfotericina B 250 ng/mL). Foi feito o ajuste da concentração celular para uma concentração de 1×10^7 células/mL por meio de contagem em câmara de Neubauer.

IV.2.2.2. Efeito de EE, FA e FE da casca do caule de *L. ochrophylla* sobre a viabilidade de PBMC humanas

Com o intuito de verificar em quais concentrações o extrato EE e as frações FA e FE não são tóxicos às PBMC humanas, realizou-se o ensaio de viabilidade celular pelo método de

exclusão com Azul de Tripan. O Azul de Tripan é um corante que atravessa apenas membranas celulares de células mortas tornando-as azuis. Células vivas não são coradas devido aos seus controles de transporte transmembrana que não permitem a penetração deste corante.¹⁸⁴

As PBMC, previamente obtidas e a 50,0 µL de suspensão celular (cerca de 5×10^5 células) foram incubadas em meio contendo RPMI completo, na ausência (controle) ou presença do extrato e frações em três diferentes concentrações finais escolhidas aleatoriamente, conforme Tabela IV.1. Culturas celulares tratadas com DMSO, em substituição ao extrato, constituíram o grupo controle do solvente. As culturas foram realizadas em tubos de polipropileno (Falcon 2059) e incubadas por 24 h ou cinco dias em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂. Após esse tempo, as células foram removidas dos tubos por lavagem com 2 mL de PBS, transferidas para tubos Falcon 2059 e centrifugadas (300 g, 21 °C, 10 min).

Em seguida, após adição de 10 µL das suspensões celulares a 190 µL Azul de Tripan a 0,4%, realizou-se a contagem, em câmara de Neubauer, das células viáveis (não coradas) dentre as células totais. A viabilidade celular foi determinada pelo percentual de células viáveis.

Tabela IV.1. Concentrações do extrato EE e frações FA e FE da casca do caule de *L. ochrophylla* utilizada nas culturas de viabilidade

Extrato e fração	Concentração (µg/mL)	
	Cultura de 24 horas	Cultura de 5 dias
EE	100, 60 e 30	30, 15 e 7,5
FA	200, 100 e 50	100, 50 e 25
FE	100, 60 e 30	60, 30 e 15

IV.2.2.3. Análise do efeito de EE, FA e FE da casca do caule de *L. ochrophylla* sobre a proliferação de linfócitos humanos

Foi utilizada a técnica de incorporação e decaimento da fluorescência do *Violet Proliferation Dye 450* (VPD450), um corante excitável no laser violeta do citômetro de fluxo e que é funcionalmente similar ao diacetato carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE).¹⁸⁵

Uma quantidade equivalente a 1×10^7 PBMC foi suspensa em PBS e incubada com 1 µM de BD *Horizon Violet Proliferation Dye 450* (VPD 450) por 15 min em banho-maria. Em

seguida, as suspensões celulares foram lavadas por centrifugação (500 g, 10 min, 18°C) com 10 mL de PBS, e o sobrenadante foi descartado. A reação foi interrompida pela adição de 10 mL de RPMI contendo 10% de soro fetal bovino, seguida por centrifugação (500 g, 10 min, 18°C). O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em RPMI completo.

Para avaliar o efeito inibitório de **EE**, **FA** e **FE** da casca do caule de *L. ochrophylla* sobre a resposta proliferativa de linfócitos, foram confeccionadas culturas estimuladas com o mitógeno fito-hemaglutinina (PHA) na presença do extrato.

Aproximadamente 5×10^5 células foram incubadas em RPMI completo, sendo estimuladas com 10 µL de PHA (5 µg/mL) e simultaneamente tratadas, ou não, com **EE**, **FA** e **FE** da casca do caule de *L. ochrophylla* em concentrações para as quais não foi verificada diminuição significativa da viabilidade de PBMC humanas, além do DMSO representando a cultura controle do solvente. Como controle de inibição, células estimuladas com PHA foram tratadas com 8,0 µg/mL de Dexametasona, dose farmacológica que corresponde a 15 µM (Fosfato Dissódico de Dexametasona - Decadron[®] injetável, 4 mg/mL), um anti-inflamatório que inibe a ativação de leucócitos.¹⁸⁶

As culturas foram confeccionadas em placas de 24 poços e foram incubadas por cinco dias em estufa úmida, a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, as células foram retiradas da placa e transferidas para tubos de poliestireno, onde foram lavadas duas vezes com PBS gelado (200g, 4°C, 10 min). As células foram ressuspensas em PBS e foi feita a determinação da proliferação celular pela medida do decaimento da fluorescência do VPD450, utilizando a citometria de fluxo com aquisição de 50.000 eventos.

Em gráficos de distribuição pontual em função do tamanho celular em área (FSC-A) *versus* o tamanho celular em altura (FSC-H), selecionou-se a região *Singlets* (Figura IV.4A; pág. 101). Em outro gráfico correspondente aos eventos da região de *Singlets*, através dos parâmetros FSC-H *versus* a complexidade interna celular em altura (SSC-H), a população de linfócitos foi delimitada (Figura IV.4B; pág. 101). Os eventos na região de linfócitos foram analisados para intensidade de fluorescência do VPD450, utilizando histogramas de fluorescência para VPD450 em função do número de eventos. O marcador M1 foi definido como o pico de células que não proliferaram na análise de linfócitos (Figura IV.4C; pág. 101) corados com VPD450 sem estímulo mitogênico e cultivados por cinco dias. Os marcadores M2 a M7 foram definidos de acordo com o padrão de marcação para VPD450, correspondente ao perfil proliferativo das células analisadas e representam o número de ciclos de

proliferações celulares obtidos ao longo dos cinco dias de estimulação das culturas celulares com PHA (Figuras IV.4D).

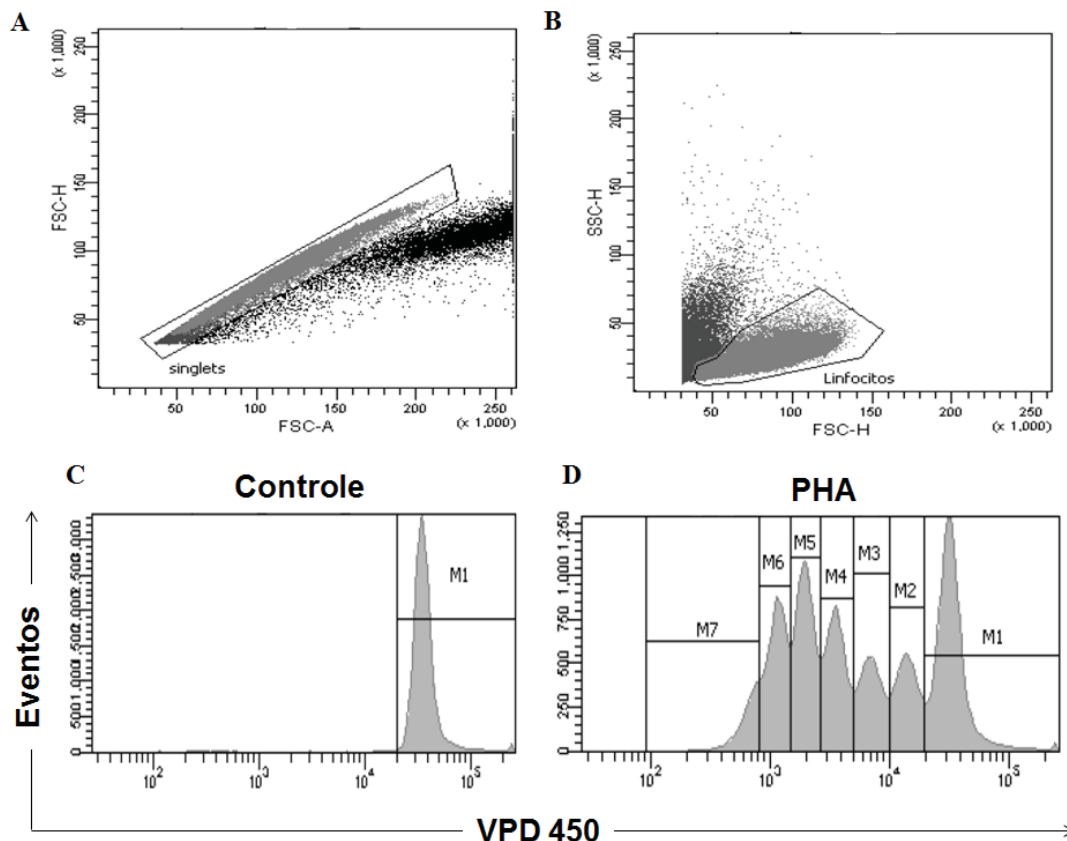


Figura IV.4. Sequência de procedimentos utilizados para a análise de proliferação celular pela diluição do VPD450. O gráfico de distribuição pontual FSC-H x FSC-A foi utilizado para selecionar os *singlets* celulares (A), seguido da obtenção de gráfico de distribuição pontual FSC-H x SSC-A utilizado para a seleção da população de linfócitos nas culturas (B). Em seguida, foram utilizados histogramas de VPD450 *versus* número de eventos para definir as regiões M1 a M7, com os quais foi obtido o índice de proliferação (IP) para a população de linfócitos. Os histogramas C e D representam cultura não estimulada (controle) e cultura estimulada com PHA.

O índice de proliferação (IP) foi calculado como a Equação IV.2:

$$IP = \frac{100 - Y}{Y} \quad \text{Equação IV.2}$$

sendo,

$$Y(\%) = \frac{X0}{2} + \frac{X1}{4} + \frac{X2}{8} + \frac{X3}{16} + \frac{X4}{32} + \frac{X5}{64} + \frac{X6}{128} + \frac{X7}{128}$$

X0 representa a porcentagem de células que não se dividiram (localizadas em M1), e X1 a X7 representam os picos de divisão gradual (localizados de M2 a M7).¹⁸⁷

Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e as análises foram realizadas utilizando o programa Prisma 5 (GraphPad Software Inc.). Para análise da normalidade dos dados foi utilizado o teste Shapiro-Wilk e a diferença entre as variáveis com distribuição normal foi testada utilizando ANOVA com *Post Hoc* de Tukey. Para as variáveis com distribuição assimétrica, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis com *Post Hoc* de Dunns. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

IV.2.3. Atividade anti-inflamatória *in vivo*

IV.2.3.1. Animais

Os experimentos foram realizados utilizando ratos machos Wistar com peso entre 200,0 e 300,0 g e adquiridos da empresa Bioagri no Município de Planaltina-DF. Os animais foram mantidos em gaiolas de plástico em biotério a $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12/12 h, com livre acesso a água e ração. Os animais foram aclimatizados durante quatro dias antes do início dos experimentos.

IV.2.3.2. Preparação do Gel

Os compostos isolados, frações e extratos brutos da casca do caule de *L. ochrophylla* foram incorporados a gel de carbopol nas concentrações apresentadas na Tabela IV.2.

Tabela IV.2. Concentração dos géis a partir das amostras de *L. ochrophylla*

Amostra	Concentração
EH	6,0%
FA	3,0%
Ácido betulínico	0,5%
β -sitosterol	0,5%
(-)-epicatequina	0,5%
β -sitosterol-3- <i>O</i> - β -D-glicopiranosídeo	0,5%
Dexametasona	0,1%

IV.2.3.3. Obtenção de lesões musculares, tratamento e obtenção de lâminas histológicas

Inicialmente, ketamina e xilazina (80,0 e 10,0 mg/kg de peso corporal, respectivamente) foram diluídas em 1,00 mL de solução fisiológica e utilizadas para a anestesia intraperitoneal. Após anestesia, os animais sofreram trauma muscular gerado pelo impacto de um peso de 300 g solto a 30 cm de altura no tríceps sural e isquiotibiais das

patas direita e esquerda traseiras, (Figura IV.5A; pág. 104). Os animais foram separados em oito grupos ($n = 3$ para cada grupo): grupo controle negativo (sem tratamento), grupo controle positivo (animais tratados com dexametasona) e seis grupos de tratamento (animais tratados com **EH**, **FA**, ácido betulínico, β -sitosterol, (-)-epicatequina e β -sitosterol-3-*O*- β -*D*-glucopiranosídeo)⁵⁷.

Após lesão muscular foi realizada tricotomia (raspagem dos pelos) em região glútea bilateral de ambas as patas feridas (Figura IV.5B; pág. 104). Após 24 h de lesão, a pata direita de cada animal foi tratada pela aplicação dos géis previamente preparados e utilização de ultra-som terapêutico no modo pulsado a uma frequência de 1 MHz, com uma intensidade de $0,5 \text{ W} / \text{cm}^2$ para 9 min (Figura IV.5C; pág. 104).¹⁸⁸ A pata esquerda de cada animal foi utilizada como controle interno e recebeu o acoplamento do cabeçote do ultra-som terapêutico durante o mesmo tempo, porém, com o aparelho desligado e sem o gel, seguindo assim o mesmo protocolo da pata tratada.

Após 24 h de tratamento, um animal de cada grupo foi anestesiado e sacrificado para a retirada dos músculos afetados pela lesão. Outros sacrifícios foram repetidos após 48 e 72 h. Os músculos removidos da pata foram fixados em solução de formol em PBS a 10% durante 24 h. Em seguida, os músculos foram desidratados em etanol a 70% por 24 h. Posteriormente, os músculos desidratados foram imersos em xilol por 30 min (repetindo a imersão por mais duas vezes) e em parafina líquida (repetindo a imersão outras duas vezes), dispondo longitudinalmente os músculos em blocos individuais. Os cortes ($5 \mu\text{m}$ de espessura) foram corados por hematoxilina e eosina para análise histológica. Uma área representativa foi selecionada para análise microscópica qualitativa da resposta inflamatória celular, com uma objetiva de 5x, 10x e 20x.¹⁸⁹ Os resultados foram expressos pela capacidade de diminuir o infiltrado inflamatório. Todo o experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFMG, sob o código de registro 341/2016.



Figura IV.5. Animal anestesiado sendo submetido ao mecanismo gerador da lesão por impacto (A); Animais após tricotomia em região glútea bilateral (B) e animal anestesiado e submetido a tratamento com ultra-som terapêutico (C).

IV.2.4. Atividade tripanocida

Os extratos **EH** e **EE** e as frações **FD**, **FA** e **FE** além da friedelina, lupeol, β -sitosterol e β -sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo, isolados da casca do caule de *L. ochrophylla*, foram dissolvidos em DMSO (concentração final do solvente < 1%) e avaliados para a atividade tripanocida através de ensaio colorimétrico. Este ensaio utiliza uma cepa de *T. cruzi* (Tulahuen) transformada para expressar β -galactosidase, enzima capaz de catalisar uma reação colorimétrica quando o vermelho de cloro-fenol- β -D-galactopiranosídeo (CPRG) é utilizado como substrato.

No ensaio com formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* provenientes de cultura de tecido, 4000 células L929 foram semeadas, por poço, em placas de 96 poços e, em seguida, incubadas durante o período da noite em estufa a 37 °C para a adesão destas à superfície. Após incubação, a infecção foi feita com 10 tripomastigotas/célula, provenientes de cultura de tecidos, durante 2 h. Após esse período, o meio contendo os parasitas extracelulares foi substituído por novo meio e a placa foi novamente incubada a 37 °C durante 48 h. Em seguida, o meio de cultura foi substituído novamente por meio novo e acrescido dos extratos, frações e substâncias diluídos em concentrações de 80, 40, 20 e 10 μ g/ mL. Após incubação a 37 °C por 96 h, foi adicionado o substrato CPRG aos poços e a placa foi novamente incubada a 37 °C, sendo a leitura realizada após 16-20 h em espectrofotômetro a 570 nm. Simultaneamente, os seguintes controles foram utilizados: células não infectadas, células infectadas não tratadas, benzonidazol a 1 μ g/mL (3,81 μ M; controle positivo) e DMSO diluído em meio a uma concentração final de 1% (controle negativo). Os resultados foram expressos como a concentração que reduz 50% do crescimento parasitário (CI₅₀).^{190,191}

IV.2.5. Triagem antimicrobiana

As cepas das bactérias *Gram*-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Staphylococcus sanguinis* ATCC 49456), *Gram*-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25723 e *Salmonella typhimurium* ATCC 14028) e do fungo *Candida albicans* (ATCC 18804) foram incubadas por 24 h a 37 °C em meio BHI (Infuso cérebro coração). A turbidez foi ajustada com auxílio de um espectrofotômetro, sendo adicionada água estéril para realizar leitura entre 75% e 76% de transmitância em comprimento de onda fixo de 625 nm.

Os extratos **EH** e **EE** e frações **FD**, **FA** e **FE** foram testados na concentração de 250,00, 125,00, 62,50, 31,30, 15,60, 7,80, 3,90 e 1,95 µg/mL, dissolvidos em DMSO. Foram usadas microplacas de 96 poços preparadas a partir da adição de 100 µL da amostra e 100 µL do inóculo do microrganismo a ser testado. O crescimento de microrganismos foi induzido por incubação a 37 °C durante 48 h.¹⁹² Para as bactérias, o controle positivo utilizado foi a ampicilina e para a levedura utilizou-se o miconazol. Todos os ensaios de microdiluição foram realizados em quintuplicata. Os valores de IC₅₀ foram calculados por interpolação linear quando houve inibição do crescimento microbiano superior a 50% na concentração mais elevada ensaiada.

IV.2.6. Triagem da atividade antioxidante

Os extratos **EH** e **EE** e as frações **FD**, **FA** e **FE** foram solubilizados em MeOH nas concentrações de 5,0, 10,0, 15,0, e 30,0 µg/mL. Em ambiente escuro, alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram adicionadas a 3,9 mL da solução de DPPH 0,024 µg/mL. Os dados de absorvância foram registrados em 517 nm após 30 min da adição da solução de DPPH. O ácido ascórbico foi utilizado como padrão positivo. O teste foi realizado em triplicata e a leitura do branco correspondente (padrão negativo) foi registrada. A capacidade de reduzir o radical DPPH (% de atividade sequestradora de radicais livres ou % de atividade antioxidante) foi calculada utilizando a Equação IV.3.

$$\text{Atividade antioxidante (\%)} = [(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{controle}}] \times 100 \quad \text{Equação IV.3}$$

onde A_{controle} é a absorvância da solução de DPPH e A_{amostra} é a absorvância da amostra com o DPPH.^{193,194}

Para uma melhor comparação da atividade sequestradora dos radicais livres DPPH, os resultados obtidos foram expressos como valores de CI₅₀, calculados a partir da análise de

regressão não-linear pelo programa Prism GraphPad.¹⁹⁵ Os valores de CI_{50} representam a concentração na qual os radicais DPPH foram reduzidos em 50%. Valores baixos de CI_{50} são indicativos de forte atividade sequestradora de radical DPPH.

IV.3. Resultado e Discussão

IV.3.1. Atividade antitumoral

Dentre os extratos, frações e substâncias testadas, apenas o β -sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo e o lupeol foram capazes de inibir mais do que 50% do crescimento das linhagens celulares utilizadas na triagem. Apenas esses dois compostos tiveram a CI_{50} determinada. Os resultados do teste de citotoxicidade do β -sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo e lupeol sobre as células MDA-MB-231 e MCF-7 (carcinomas mamários), HCT-116 (carcinoma de cólon e reto) e Vero (não tumorais) são apresentados na Tabela IV.3.

O β -sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo e o lupeol apresentam maior citotoxicidade frente às linhagens tumorais testadas, quando comparados com a cisplatina (controle positivo). Porém, apenas o β -sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo apresenta alto índice de seletividade (> 2) para células HCT-116. Estudos têm sugerido que valores baixos de índice de seletividade ($IS < 2$), são indicativos de toxicidade.¹⁹⁶ Por este critério, o β -sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo pode ser considerado como um potente agente citotóxico contra carcinomas de cólon e reto e dotado de baixa toxicidade para células normais.

Tabela IV.3. Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) do β -sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo e lupeol frente a células MDA-MB-231 e MCF-7 (carcinomas mamários), HCT-116 (carcinoma de cólon e reto) e Vero (não tumorais)

	MDA-MB-231		MCF-7		HCT-116		Vero
Compostos	$CI_{50} \pm DP$	IS	$CI_{50} \pm DP$	IS	$CI_{50} \pm DP$	IS	$CI_{50} \pm DP$
β -sitosterol-3- <i>O</i> - β -D-glicopiranosídeo	$33,0 \pm 10,1$	0,60	$11,0 \pm 5,20$	1,90	$1,28 \pm 0,70$	16,4	$21,0 \pm 9,9$
Lupeol	$60,0 \pm 17,2$	0,80	$67,0 \pm 22,4$	0,80	$35,2 \pm 13,2$	1,50	$51,0 \pm 18,2$
Cisplatina	> 100		> 100		> 100		$13,05 \pm 0,6$

DP = Desvio padrão. IS = índice de seletividade calculado pela razão entre a CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) determinada para células Vero/ CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) determinada para células tumorais.¹⁹⁶

Estudos anteriores relataram também expressiva atividade citotóxica do β -sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo frente a linhagens celulares HCT-116 ($CI_{50} = 3,2 \mu\text{g/mL}$), MCF-7

($CI_{50} = 8,52 \mu\text{g/mL}$), PC-12 (câncer de pulmão; $CI_{50} = 1,90 \mu\text{g/mL}$)^{197,198} e Caco-2 (adenocarcinoma de cólon humano; $CI_{50} = 194,84 \mu\text{g/mL}$).¹⁹⁹

A atividade citotóxica de esteroides glicosilados tem sido atribuída à capacidade apresentada pela porção aglicona para formar um sistema com o colesterol na biomembrana, ao passo que o açúcar (hidrofílico) permanece fora da limitação celular onde interage com glicolípídeos e glicoproteínas. Como consequência, são formados poros na biomembrana que a torna permeável e passível de apoptose.¹⁹⁹

A capacidade apresentada pelo β -sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo de formar poros na biomembrana permite que este composto atue também como um potente agente de inversão. Estudos têm verificado que a co-incubação de doxorrubicina (agente antineoplásico) com o β -sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo resulta em um aumento significativo da citotoxicidade da doxorrubicina com redução de 2,32 unidades de sua CI_{50} em células Caco-2, indicando que a sensibilidade dessas células à doxorrubicina é restaurada em presença do β -sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo. A atuação do β -sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo como agente inversor de resistência a drogas tem como mecanismo a inibição da proteína de transporte P-glicoproteína (P-gp) que atua bombeando, para fora da célula, os agentes lipofílicos que entraram via livre difusão. A alta-expressão da P-gp tem sido associada com a resistência celular a inúmeros fármacos e sua inibição pode aumentar a concentração intracelular de fármacos citotóxicos. O β -sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo é capaz de inverter substancialmente a resistência de células Caco-2, restaurando a citotoxicidade de drogas.¹⁹⁹

O lupeol, embora tenha inibido mais do que 50% do crescimento celular durante a triagem citotóxica, não apresentou $IS > 2$ para nenhuma das linhagens celulares testadas, sendo, portanto, considerado como não seletivo para células tumorais. Porém, estudos anteriores indicam este composto como um possível agente antineoplásico em virtude de sua atividade citotóxica relacionada com a estimulação da apoptose em linhagens celulares MCF7 e MDA-MB-231.²⁰⁰ Além disso a literatura relata atividade citotóxica do lupeol frente a células humanas de leucemia (HL-60), câncer gástrico (SGC-7901) e câncer pancreático (PANC-1).²⁰¹

Diante do que foi apresentado é possível dizer que a casca do caule de *L. ochrophylla* é fonte de compostos com potencial atividade antineoplásica para o tratamento do câncer de cólon e reto. O β -sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo, que apresenta expressiva atividade citotóxica frente à linhagem celular HCT-116, está presente em grande concentração na fração

em acetato de etila obtida a partir do extrato etanólico da casca do caule deste vegetal (ver capítulo II, pág. 47).

A expressiva atividade citotóxica verificada para o β -sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo frente à linhagem celular HCT-116 é de grande importância, visto que tumores sólidos, como o da linhagem HCT-116, são considerados extremamente resistentes aos quimioterápicos disponíveis atualmente. Além disso, as combinações das quimioterapias convencionais como FOLFOX (5-fluorouracil, ácido folínico e oxaliplatina), FOLFIRI (5-fluorouracil, ácido folínico e irinotecano), IFL (irinotecano, fluorouracila e leucovorina) e XELOX (capecitabina e oxaliplatina) têm limitada eficácia e estão associadas com uma toxicidade significativa.²⁰²

Embora sejam necessários mais estudos que comprovem a atuação do β -sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo bem como o seu mecanismo de ação, esses dados são motivadores visto que o câncer de cólon e reto é uma das neoplasias malignas mais frequentes no ocidente e, no Brasil, representa a quarta causa de óbitos, sendo que cerca de metade dos pacientes morre em menos de cinco anos, após o início do tratamento.²⁰³

IV.3.2. Triagem anti-inflamatória *in vitro*

IV.3.2.1. Efeito de EE, FA e FE da casca do caule de *L. ochrophylla* sobre a viabilidade das células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC)

A determinação de quais concentrações do extrato EE e frações FA e FE da casca do caule de *L. ochrophylla* não são tóxicas para culturas de células faz-se necessária, visto que a indução de morte celular é prejudicial para a investigação da atividade anti-inflamatória. A viabilidade celular de EE, FA e FE sobre PBMC, após 24 h e cinco dias de cultura é apresentada nas Figuras IV.6 (pág. 110) e IV.7 (pág. 111), respectivamente.

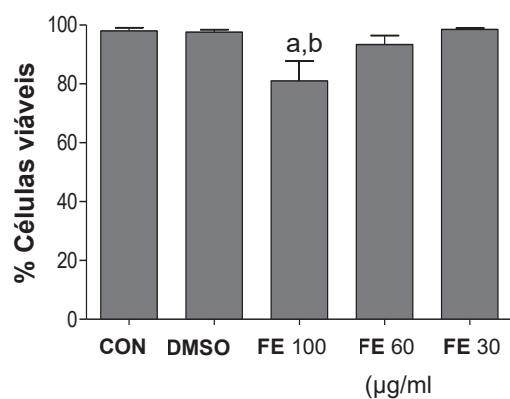
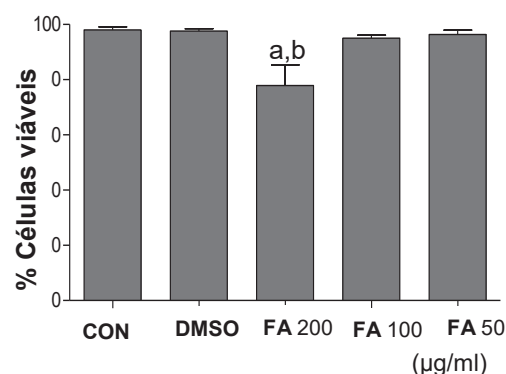
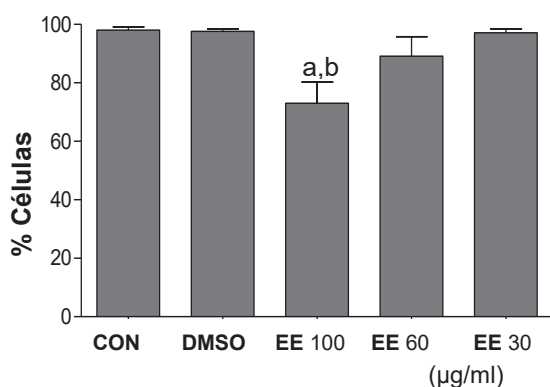
Após 24 h de cultura, EE nas concentrações de 60 e 30 $\mu\text{g/mL}$, FA nas concentrações de 100,0 e 50,0 $\mu\text{g/mL}$ e FE nas concentrações de 60,0 e 30,0 $\mu\text{g/mL}$ não reduziram a viabilidade celular quando comparado às culturas controle e solvente. Contudo, houve indução de morte celular quando as culturas foram tratadas com EE na concentração de 100,0 $\mu\text{g/mL}$, FA na concentração de 200,0 $\mu\text{g/mL}$ e FE na concentração de 100,0 $\mu\text{g/mL}$.

Após cinco dias de cultura, EE nas concentrações de 15,0 e 7,5 $\mu\text{g/mL}$, FA nas concentrações de 50,0 e 25,0 $\mu\text{g/mL}$ e FE nas concentrações de 30,0 e 15,0 $\mu\text{g/mL}$ não reduziram a viabilidade celular quando comparados às culturas controle e solvente. Contudo,

houve indução de morte celular quando as culturas foram tratadas com **EE** na concentração de 30,0 µg/mL, **FA** na concentração de 100,0 µg/mL e **FE** na concentração de 60,0 µg/mL.

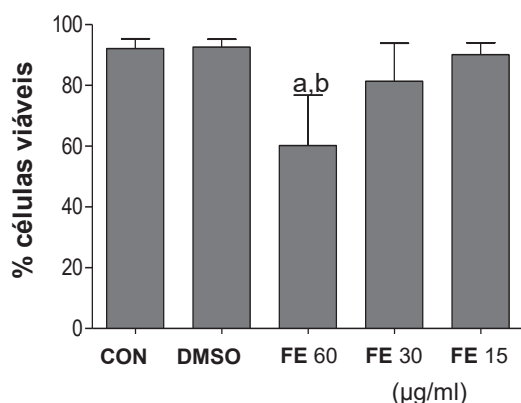
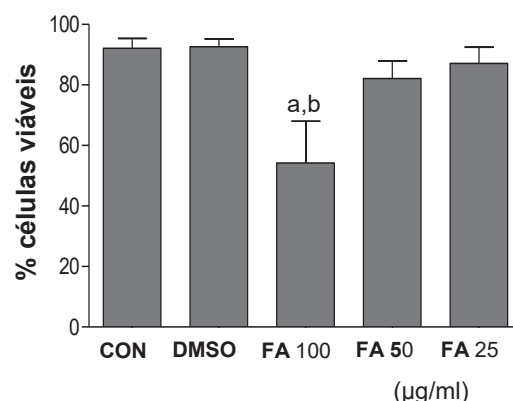
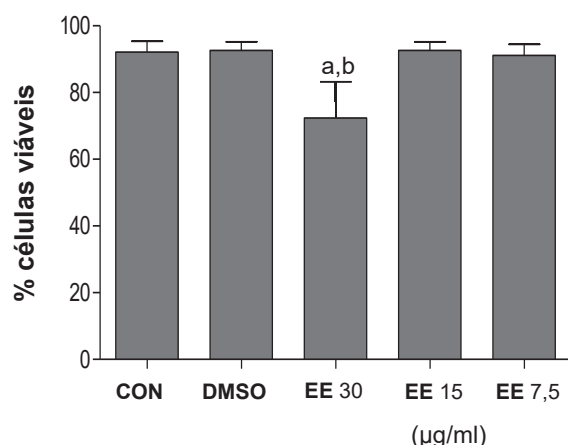
Os dados apresentados para a viabilidade celular, ou seja, a determinação de quais concentrações de **EE**, **FA** e **FE** da casca do caule de *L. ochrophylla* não são tóxicas para culturas celulares, foram utilizados como parâmetros para os testes de proliferação de linfócitos. Assim, uma vez que a avaliação da proliferação celular, em que PBMC são mantidas em contato com o extrato ou fração durante cinco dias, as concentrações finais de **EE**, **FA** e **FE** nas culturas foram iguais ou inferiores a 15,0, 50,0 e 30,0 µg/mL, respectivamente.

Os dados de viabilidade celular apresentados por **EE**, **FA** e **FE** da casca do caule de *L. ochrophylla* podem ser utilizados em investigações futuras servindo como ponto de partida para estudos que visem avaliar a ação dos constituintes ativos de **EE**, **FA** e **FE** sobre parâmetros sanguíneos e que necessitam da confecção de culturas de sangue total ou de células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC).



Viabilidade celular após 24 h			
	µg/mL	Média	DP
EE	30	97,17	1,33
EE	60	89,17	6,59
EE	100	73,00 ^{a,b}	7,24
FA	50	96,33	1,63
FA	100	95,00	1,09
FA	200	77,83 ^{a,b}	7,55
FE	30	98,50	0,58
FE	60	93,33	3,14
FE	100	81,00 ^{a,b}	6,75
Controle		98,00	1,09
DMSO		97,67	0,82

Figura IV.6. Efeito do extrato EE e frações FA e FE da casca do caule de *L. ochrophylla* sobre a viabilidade celular, após 24 horas de cultura. Percentual de PBMC viáveis nas culturas controle, DMSO e nas culturas tratadas com o EE, FA e FE da casca do caule de *L. ochrophylla* em diferentes concentrações, avaliado por exclusão com azul de Tripán, utilizando câmara de Neubauer (n = 6). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (DP) da viabilidade nos diferentes grupos. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$, Kruskal-Wallis com *post hoc* de Dunns) são identificadas pelas letras “a” e “b”, para as comparações em relação às culturas controle (CON) e DMSO, respectivamente.



Viabilidade celular após 5 dias			
	µg/mL	Média	DP
EE	7,5	91,17	3,25
EE	15	92,67	2,58
EE	30	72,33 ^{a,b}	10,89
FA	25	87,17	5,27
FA	50	82,17	5,71
FA	100	54,17 ^{a,b}	13,89
FE	15	90,17	3,87
FE	30	81,33	12,53
FE	60	60,17 ^{a,b}	16,64
Controle		92,17	3,19
DMSO		92,67	2,58

Figura IV.7. Efeito do extrato EE e frações FA e FE da casca do caule de *L. ochrophylla* sobre a viabilidade celular, após cinco dias de cultura. Percentual de PBMC viáveis nas culturas controle, DMSO e nas culturas tratadas com o EE, FA e FE da casca do caule de *L. ochrophylla* em diferentes concentrações, avaliado por exclusão com azul de Tripán, utilizando câmara de Neubauer (n = 6). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão da viabilidade nos diferentes grupos. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$, Kruskal-Wallis com *post hoc* de Dunns) são identificadas pelas letras “a” e “b”, para as comparações em relação às culturas controle (CON) e DMSO, respectivamente.

IV.3.2.2. Análise do efeito de EE, FA e FE da casca do caule de *L. ochrophylla* sobre a proliferação de linfócitos humanos

Os efeitos do extrato EE e frações FA e FE da casca do caule de *L. ochrophylla* sobre a resposta proliferativa de linfócitos são apresentados na Figura IV.8 (pág. 112). Os resultados indicam que FA nas concentrações de 25,0 e 50,0 µg/mL reduziu, de forma significativa, o

índice de proliferação de linfócitos quando comparada às culturas estimuladas com PHA (lectina de *Phaseolus vulgaris*) que apresenta forte ação mitógena sobre linfócitos T pela interação com os carboidratos presentes nos receptores para antígenos dessas células.²⁰⁴ Essa diminuição do índice de proliferação celular de linfócitos por FA é comparada à diminuição apresentada pela Dexametasona, utilizada como controle positivo de inibição (Figura IV.9; pág. 113). A observação da não alteração do índice de proliferação celular pelo solvente DMSO permite afirmar que a redução observada da proliferação foi exclusivamente devido à presença de FA nas culturas.

A expressiva atividade anti-inflamatória de FA, avaliada pela inibição da proliferação de linfócitos, se deve à composição desta fração, constituída, principalmente, pela (-)-epicatequina e (+)-epicatequina-(4 β -8)-epicatequina, além do esteroide β -sitosterol-3-O- β -D-glicopiranosídeo.

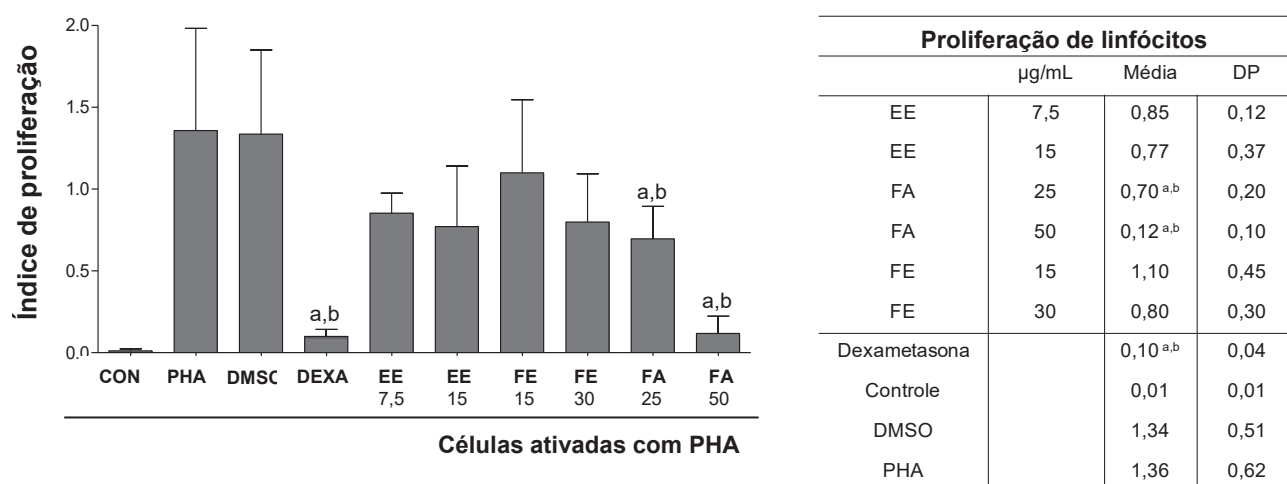


Figura IV.8. Índice de proliferação de linfócitos em culturas não estimuladas (controle negativo - CON), culturas estimuladas com PHA e tratadas com Dexametasona 15 μM (controle positivo), EE, FA, FE da casca do caule de *L. ochrophylla*. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão da inibição da proliferação celular nos diferentes grupos. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são identificadas pelas letras “a” e “b”, para as comparações em relação às culturas PHA e DMSO, respectivamente. Método estatístico utilizado – ANOVA seguido por Tukey.

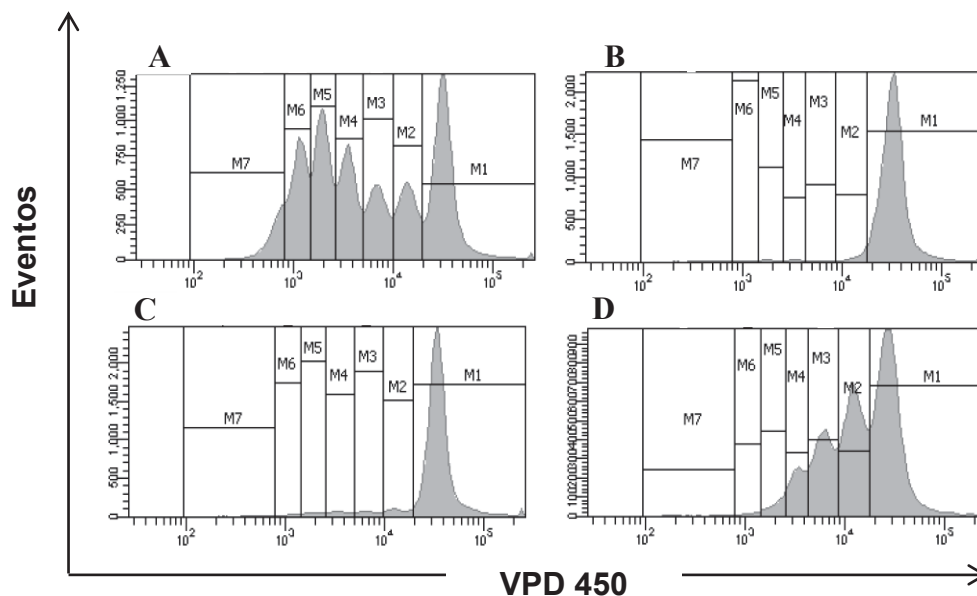


Figura IV.9. Histograma representativo da análise da proliferação celular em culturas estimuladas com PHA (A) e tratadas com Dexametasona (B) e concentrações de 50,0 e 25,0 µg/mL (C e D, respectivamente) de FA da casca do caule de *L. ochrophylla*.

Estudos disponíveis na literatura afirmam que os flavonoides apresentam, *in vitro*, atividade anti-inflamatória por atuarem inibindo a proliferação de linfócitos T e a produção de citocinas pro-inflamatórias, além de modularem a atividade das enzimas tais como fosfolipase A2, ciclo-oxigenase, lipooxigenase e óxido nítrico sintase (NOS).¹⁵⁵

A (-)-epicatequina, presente em grande concentração na casca do caule de *L. ochrophylla*, tem apresentado capacidade para modular a ativação de NFκB (fator de transcrição nuclear kappa B) e a produção de citocinas em estudos *in vitro*.²⁰⁵ Estudos realizados *in vivo*, confirmam a (-)-epicatequina como um agente anti-inflamatório em concentrações entre 0,1 a 1,0 mM, visto que inibe a formação de nitrito, um derivado do óxido nítrico, além de inibir a expressão de IL-1β (interleucina 1-beta).²⁰⁶

A atividade anti-inflamatória observada para FA é importante, uma vez que diversas outras doenças, incluindo o diabetes, câncer, aterosclerose e obesidade têm componentes inflamatórios importantes.²⁰⁶

Estudos epidemiológicos fornecem evidências consistentes de que a incidência da aterosclerose pode ser mediada por um aumento constante dos níveis circulantes de fatores inflamatórios. Em ensaios *in vivo*, ratos tratados com epicatequina apresentaram, durante todo o período do estudo, menores níveis da apolipoproteína (SAA) produzida pelo fígado durante processos inflamatórios e que serve como um marcador para riscos de doenças cardiovasculares. Esta diminuição da inflamação vascular, promovida pela epicatequina, foi

fundamentada pelos resultados imuno-histoquímicos que revelaram também uma diminuição do número de neutrófilos em lesões de animais tratados com este flavonoide.^{207,208,209}

IV.3.3. Atividade anti-inflamatória *in vivo*

A observação da atividade anti-inflamatória de **EH**, **FA** e compostos isolados da casca do caule de *L. ochrophylla* foi realizada com base na análise histológica para a caracterização de infiltrados inflamatórios, edemas e degeneração de fibras musculares. A Figura IV.10 apresenta o aspecto histológico de patas de ratos sem tratamento e após 24 h da injúria muscular (grupo controle negativo). A secção apresenta uma região de edema (em branco), infiltrado inflamatório (pontos pretos espalhados) e fragmentação de tecidos musculares (linhas rosas descontínuas). A Figura IV.11 (pág. 117) apresenta o aspecto histológico de injúrias musculares de patas de ratos sem tratamento e patas tratadas com dexametasona (grupo controle positivo), **EH**, **FA**, β -sitosterol, ácido betulínico, (-)-epicatequina e β -sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo, após 24, 48 e 72 h.

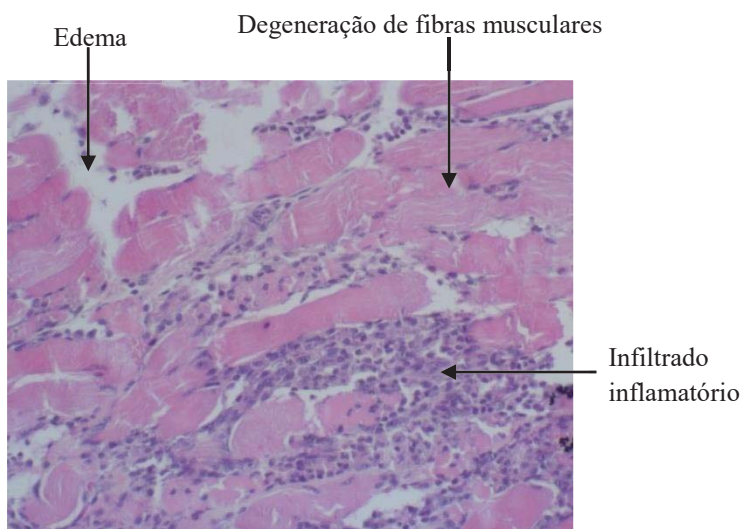


Figura IV.10. Aspecto histológico de patas de ratos sem tratamento e após 24 h da injúria muscular (grupo controle negativo). Regiões de infiltrado inflamatório, edema e degeneração de fibras musculares são indicadas pelas setas.

Após 24 h da lesão muscular, o grupo controle negativo apresentou infiltrado inflamatório, edema e fibras musculares descontínuas. Após 48 e 72 h, um considerável aumento do infiltrado inflamatório e do edema foi observado para o mesmo grupo.

O grupo tratado com dexametasona (controle positivo), após 24 e 48 h de lesão muscular, apresentou pequena quantidade de infiltrado inflamatório embora tenha sido

possível verificar regiões de edema. Após 72 h, a secção histológica mostrou uma área com significativa regeneração das fibras musculares, ausência de infiltrado inflamatório e poucas regiões de edema.

EH e **FA** apresentaram considerável atividade anti-inflamatória após 24, 48 e 72 h de tratamento. Após 72 h de tratamento houve quase que uma total regeneração das fibras musculares, ausência de infiltrado inflamatório e edema, podendo tais resultados ser equiparados aos apresentados pelo controle positivo.

O ácido betulínico, isolado a partir de **EH**, apresentou alta atividade anti-inflamatória verificada pela regeneração das fibras musculares, redução de infiltrados inflamatórios e edema em 72 h de tratamento. Essa observação permite sugerir que a atividade anti-inflamatória de **EH** pode ser resultante de um efeito deste composto e demais constituintes deste extrato, como exemplo, o lupeol e taraxasterol.

A literatura relata atividade anti-inflamatória do ácido betulínico pela supressão de leucócitos, neutrófilos e células mononucleares, bem como pela diminuição dos níveis de exudatos no local da inflamação.²¹⁰ Os mecanismos anti-inflamatórios do ácido betulínico são justificados pela inibição da liberação de mediadores pró-inflamatórios como óxido nítrico (NO), interleucina 1-beta (IL-1 β), fator de necrose tumoral (TNF- α) e diminuição dos níveis de prostaglandina H2 sintase, também conhecida como cicloxigenase (COX-2).^{210, 211} Quanto ao β -sitosterol, a literatura relata sua atividade anti-inflamatória pela inibição de edema de orelha induzido por xileno,²¹² bem como pela diminuição dos níveis de leucócitos, neutrófilo e da atividade das enzimas mieloperoxidase e adenosina-desaminase.²¹³ Dentre os demais constituintes de **EH**, o lupeol e o taraxasterol apresentam comprovada atividade anti-inflamatória *in vivo*. O lupeol reduz o edema, a degeneração das fibras musculares e o infiltrado inflamatório em até 72 h de tratamento,⁵⁷ enquanto o taraxasterol apresenta eficácia comparável à prednisolona no modelo de inflamação provocada pela formalina.²¹⁴

Quanto aos constituintes de **FA**, o β -sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo apresentou atividade anti-inflamatória, uma vez que promoveu uma diminuição do edema em 72 h de tratamento, embora após esse período tenha sido possível verificar a presença de infiltrados inflamatórios. Esses dados estão em conformidade com a literatura que relata uma moderada atividade anti-inflamatória do β -sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo sobre a inibição da liberação de NO.²¹⁵ A (-)-epicatequina, presente também em grande concentração em **FA**, apresentou pequena atividade anti-inflamatória, sendo que após 48 h de tratamento foi verificado intenso infiltrado inflamatório e, após 72 h, foi ainda verificada uma considerável

região de edema. Embora a procianidina B2 não tenha sido avaliada quanto à atividade anti-inflamatória em virtude da quantidade isolada em **FA**, a literatura relata alta atividade anti-inflamatória para este composto. A atividade anti-inflamatória relatada para a procianidina B2 em modelo de inflamação em orelha de rato foi maior do que a apresentada pela indometacina e ácido glicirretínico, normalmente usados como agentes anti-inflamatórios.²¹⁶

IV.3.4. Atividade tripanocida

A Tabela IV.4 (pág. 118) apresenta os resultados do teste tripanocida com os extratos **HE** e **EE**, as frações **FD**, **FA** e **FE** e os compostos friedelina, lupeol, β -sitosterol e β -sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo sobre as formas amastigotas e tripomastigotas de *T.cruzi* de cultivo celular.

Os menores valores de CI_{50} observados para o extrato **EH** e as frações **FD** e **FA** permitem que estes sejam classificados como os melhores candidatos para estudos futuros. Porém, a atividade tripanocida de **EH** parece não estar associada à friedelina, lupeol e β -sitosterol (presentes em grande quantidade em **EH**), embora, sejam necessários novos testes em diferentes solventes, uma vez que tais compostos mostraram solubilidade baixa em DMSO.

Embora os valores de CI_{50} observados para **EH**, **FD** e **FA** sejam animadores, este extrato e estas frações não foram considerados para testes *in vivo* devido ao fato de que os índices de seletividade apresentados foram menores do que o recomendado (> 10), pelo Programa Fiocruz de Investigação e Desenvolvimento Tecnológico, para o prosseguimento dos ensaios clínicos.

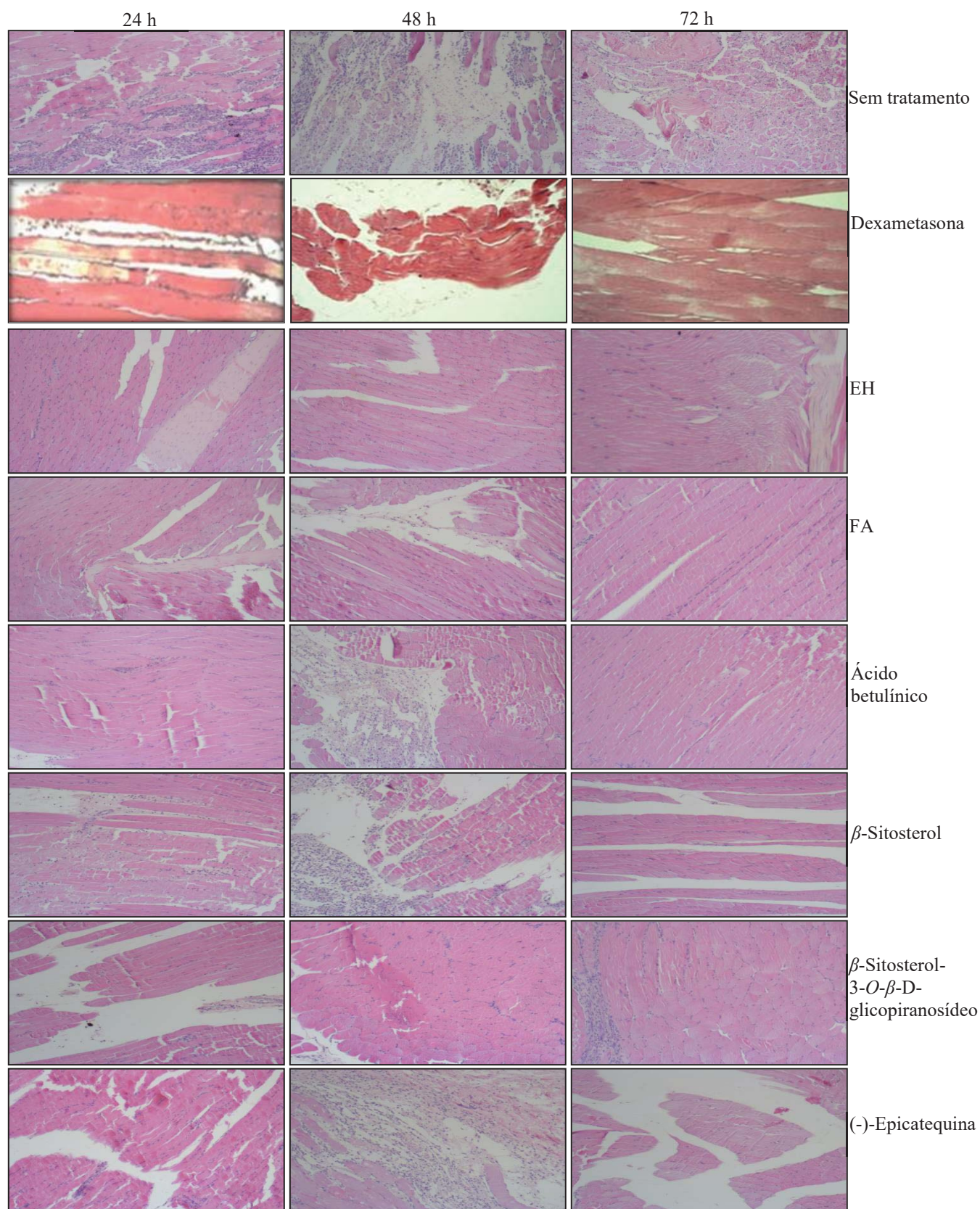


Figura IV.11. Fotomicrografias (objetiva 10x) de histologia de tecido subcutâneo da pata de rato não submetido a tratamento e submetido a tratamento com dexametasona, **EH**, **FA**, β -sitosterol, ácido betulínico, (-)-epicatequina e β -sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo após 24, 48 e 72 h.

Tabela IV.4. Atividade tripanocida *in vitro* de extratos, frações e algumas substâncias isoladas da casca do caule de *L. ochrophylla*

Amostra	CI ₅₀ (µg/mL) em tripomastigotas ^a	CI ₅₀ (µg/mL) linhagem L929 ^b	Índice de seletividade ^c
EH	30,0	80	2,7
EE	67,0	80	1,2
FD	25,6	40	1,6
FA	28,1	40	1,4
FE	> 40	< 80	< 2,0
Friedelina [#]	-	-	-
Lupeol	-	< 20	-
β-sitosterol [#]	-	-	-
β-sitosterol-3-O-β-D-glicopiranosídeo	-	-	-
Benzonidazol	1	625	625,0

(a) concentração da amostra que reduz em 50% o crescimento parasitário; (b) concentração da amostra que induz 50% de morte celular (L929); (c) CI₅₀ do composto sobre as células dividido pelo CI₅₀ do composto sobre o parasita; (#) presença de precipitados na solução estoque.

IV.3.5. Atividade antimicrobiana

A Tabela IV.5 (pág. 119) apresenta os valores de CI₅₀ obtidos para as amostras e padrões analisados nas concentrações de 250,00, 125,00, 62,50, 31,30, 15,60, 7,80, 3,90 e 1,95 µg / mL frente aos microrganismos *Staphylococcus sanguinis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Candida albicans*.

A triagem antimicrobiana mostrou que a melhor atividade de extratos e frações de *L. ochrophylla* foi observada contra *C. albicans*. A seletividade mostrada por **FE** frente a este fungo é importante, uma vez que os agentes antimicrobianos de espectro estreito são uma necessidade urgente na terapêutica. Por outro lado, **EE** apresentou o maior espectro de ação entre as amostras analisadas, sendo ativo contra *Staphylococcus sanguinis*, *Salmonella typhimurium* e *C. albicans*. Nenhum dos extratos e frações testados exibe atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Tabela IV.5. CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) de extratos e frações da casca do caule de *L. ochrophylla* contra microrganismos

Cepa	EH	EE	FD	FA	FE	Ampicilina	Miconazol
<i>S. sanguinis</i>	126.0	221.6	164.2	> 250.0	> 250.0	< 1.95	NT
<i>S. aureus</i>	> 250.0	> 250.0	> 250.0	> 250.0	> 250.0	< 1.95	NT
<i>E. coli</i>	> 250.0	> 250.0	> 250.0	> 250.0	> 250.0	< 1.95	NT
<i>S. typhimurium</i>	> 250.0	124.4	> 250.0	198.1	> 250.0	< 1.95	NT
<i>C. albicans</i>	> 250.0	17.4	65.7	> 250.0	3.4	NT	< 1.95

NT = No tested.

IV.3.6. Atividade antioxidante

Os valores de CI_{50} obtidos para as amostras testadas e para o padrão são apresentados na Tabela IV.6.

Tabela IV.6. Valores de CI_{50} para a captura de radicais livres por extratos e frações de *L. ochrophylla*

Amostra	$CI_{50}(\mu\text{g/mL})^*$
EH	$8,55^a \pm 0,30$
EE	$12,56^a \pm 0,27$
FD	$11,20^a \pm 0,13$
FA	$10,22^a \pm 0,20$
FE	$11,72^a \pm 0,59$
Ácido ascórbico	$12,47^a \pm 0,43$

*Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste-ANOVA.

Os valores de CI_{50} para as amostras e padrão não foram estatisticamente diferentes, indicando alta atividade antioxidante DPPH dos extratos e frações da casca do caule de *L. ochrophylla*.

A considerável atividade antioxidante da casca do caule de *L. ochrophylla* pode ser atribuída à presença de ácidos orgânicos e compostos fenólicos, tais como (-)-epicatequina e procianidina B2, uma vez que todos estes compostos são conhecidos pela eficiente capacidade sequestradora de radicais livres.^{74,217}

A literatura relata que as unidades de flavan-3-ol suprimem efetivamente a peroxidação lipídica em meios biológicos. Essa atividade antioxidante tem sido atribuída às hidroxilas das unidades de catecol presentes no anel “B” desses compostos. A presença de dois grupos hidroxila em posição orto permite a formação de ligação de hidrogênio e, posteriormente, a abstração de um dos seus átomos de H. Esta reação é suficientemente rápida

quando comparada com demais grupos passíveis de oxidação e, por isso, permite que as moléculas contendo o grupo catecol sejam classificadas como de alta atividade antioxidante.²¹⁸

A atividade antioxidante observada para os extratos e frações da casca de *L. ochrophylla* é uma das justificativas para as consideráveis atividades antitumorais e anti-proliferativas observadas para esse vegetal.

Conclusões

I. Dos estudos fitoquímicos

A partir do estudo fitoquímico foi possível o isolamento e a identificação de alguns fitoconstituintes provenientes do fracionamento cromatográfico da casca do caule de *L. ochrophylla*. Assim, verificou-se a presença no extrato hexânico dos triterpenos friedelina, β -friedelinol, lupeol, pseudotaraxasterol e ácido betulínico, além do esteroide β -sitosterol. No extrato etanólico foram identificados os triterpenos taraxasterol e lupeol, além do esteroide β -sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo. Deste extrato, foram isolados também o flavonoide (-)-epicatequina e a procianidina B2, (+)-epicatequina-(4 β -8)-epicatequina. Com exceção do lupeol, β -sitosterol glicosilado e (-)-epicatequina todos os demais compostos estão sendo descritos pela primeira vez para o gênero *Luehea*. A partir do estudo do extrato aquoso foi possível a obtenção de frações constituídas principalmente por compostos fenólicos e ácidos orgânicos, alcaloides e saponinas. A partir da fração constituída por compostos fenólicos e ácidos orgânicos, foi possível o isolamento e identificação do ácido *trans*-aconítico.

II. Dos estudos com radiação gama

As análises de sequenciamento de DNA e taxonomia convencional permitiram identificar os fungos *Lecythophora decumbens* e *Eurotium chevalieri* L. Mangin como os principais microrganismos encontrados nas amostras de *L. ochrophylla* adquiridas no Mercado Central de Belo Horizonte. Todavia, doses iguais ou superiores a 5,0 kGy de radiação gama apresentaram-se suficientes para a total descontaminação das amostras avaliadas.

A análise da fração constituída por compostos fenólicos e ácidos orgânicos (**FF**), exposta a diferentes doses de radiação gama, apresentou modificações na concentração de seus fitoconstituintes. Foi verificado que, a maioria dos fitoconstituintes de **FF** tem sua concentração diminuída até mesmo quando o material vegetal foi exposto à menor dose de radiação gama (1,0 kGy). O fitoconstituente identificado previamente como ácido *trans*-aconítico foi o mais afetado pela radiação gama, uma vez que sofreu uma diminuição em sua concentração correspondente a 95,38% em relação à concentração apresentada por amostras não exposta à radiação. Quanto à fração constituída principalmente por saponinas, foi verificado também que a radiação gama promoveu uma redução na concentração destes compostos.

Com o intuito de investigar a degradação do ácido *trans*-aconítico, foram realizadas as mesmas análises para este ácido irradiado em sua forma sólida e em solução aquosa. Foi

verificado, portanto, que a irradiação gama promove a transformação do ácido *trans*-aconítico via reação radicalar e iônica em ácido cítrico e isocítrico. Porém, para tanto é necessária a presença concomitante da água e de ácido *trans*-aconítico durante a exposição à radiação gama. Essa observação permite a suposição de que o material vegetal irradiado para a obtenção de **FF**, embora aparentemente seco, deveria conter água residual para a formação do ácido cítrico e isocítrico via hidratação do ácido *trans*-aconítico.

III. Dos estudos biológicos

Os testes biológicos realizados confirmaram a atividade anti-inflamatória alegada pela medicina popular. A atividade anti-inflamatória de inibição da proliferação de linfócitos apresentada pela fração em acetato de etila (**FA**) foi atribuída aos flavonoides (-)-epicatequina e (+)-epicatequina-(4 β -8)-epicatequina, além do β -sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo, presentes em consideráveis concentrações na casca do caule de *L. ochrophylla*. Cabe ressaltar que a atividade anti-inflamatória de **FA** é semelhante à atividade apresentada pelo padrão positivo Dexametasona. A atividade anti-inflamatória tópica avaliada pela diminuição do edema, diminuição de infiltrados inflamatórios e a regeneração do tecido muscular foi atribuída ao extrato em hexano (**HE**), **FA** e ácido betulínico.

Uma importante e promissora atividade antitumoral foi apresentada pelo β -sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo frente à linhagem de células de cânceres de cólon e reto.

O extrato em hexano (**EH**) e as frações em diclorometano e acetato de etila (**FD** e **FA**, respectivamente) apresentaram os melhores valores para atividade tripanocida. Porém, a atividade tripanocida de **EH** parece não estar associada à friedelina, lupeol e β -sitosterol, uma vez que tais compostos isoladamente não promoveram a morte destes parasitas.

Quanto à atividade antimicrobiana, a melhor atividade de extratos e frações de *L. ochrophylla* foi observada contra *C. albicans*.

A casca do caule de *L. ochrophylla* apresentou atividade antioxidante semelhante a do ácido ascórbico, utilizado como padrão positivo. Esse dado é extremamente relevante visto que esta atividade é importante na prevenção de inúmeras doenças como a aterosclerose, cânceres e envelhecimento precoce.

IV. Considerações finais

Os resultados obtidos na avaliação de *Luehea ochrophylla* reafirmam a importância dos estudos químicos e biológicos das diversas famílias de plantas medicinais existentes na flora brasileira, além de justificarem a continuidade dos estudos desta espécie.

Referência bibliográfica

1. M. R. Carvalho, F. A. Herrera, C. A. Jaramillo, S. L. Wing, R. Callejas (2011). Paleocene Malvaceae from Northern South America and their biogeographical implications. *American Journal of Botany* 98, 1337-1355.
2. M. G. Bovini, R. M. Carvalho-Okano, M. F. Vieira (2001). Malvaceae A. Juss. no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil. *Rodriguésia* 52, 17-47.
3. V. C. Souza, H. Lorenzi (2005). Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 639 p.
4. R. K. Sutradhar, A. K. M. M. Rahman, M. U. Ahmad, K. Saha (2007). Alkaloids of *Sida cordifolia* L. *India Journal of Chemistry* 46, 1896-1900.
5. A. L. Silveira, M. A. S. Gomes, R. N. Silva Filho, M. R. V. Santos, I. A. Medeiros, J. M. Barbosa Filho (2003). Evaluation of the cardiovascular effects of vasicine, an alkaloid isolated from the leaves of *Sida cordifolia* L. (Malvaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 13, 37-39.
6. D. A. Costa, D. A. Silva, A. C. Cavalcanti, M. A. A. Medeiros, J. T. Lima, J. M. S. Cavalcante, B. A. Silva, M. F. Agra, M. F. V. Souza (2007). Chemical constituents from *Bakeridesia pickelii* Monteiro (Malvaceae) and the relaxant activity of kaempferol-3-O- β -D-(6''-E-p-coumaroyl) glucopyranoside on guinea-pig ileum. *Química Nova* 30, 901-903.
7. D. A. Silva, T. M. S. Silva, A. C. S. Lins, D. A. Costa, J. M. S. Cavalcante, W. N. Matias, M. F. V. Souza, R. B. Filho (2006). Constituintes químicos e atividade antioxidante de *Sida galheirensis* Ulbr. (Malvaceae). *Química Nova* 29, 1250-1254.
8. H. C. Lane, M. F. Schuster (1981). Condensed tannins of cotton leaves. *Phytochemistry* 20, 425-427.
9. H. S. Rosa, V. B. Camargo, G. Camargo, C. V. Garcia, A. M. Fuentefria, A. S. Mendez (2015). Ecdysteroids in *Sida tuberculata* R.E. Fries (Malvaceae): Chemical composition by LC-ESI-MS and selective anti-*Candida krusei* activity. *Food Chemistry* 182, 193-199.
10. S. Cretton, L. Bréant, L. Pourrez, C. Ambuehl, R. Perozzo, L. Marcourt, M. Kaiser, M. Cuendet, P. Christen (2015). Chemical constituents from *Waltheria indica* exert *in vitro* activity against *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. *Fitoterapia* 105, 55-60.
11. P. L. Wu, T. H. Chuang, C. X. He, T. S. Wu (2004). Cytotoxicity of phenylpropanoid esters from the stems of *Hibiscus taiwanensis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 12, 2193-2197.
12. C. Bayer, M. F. Fay, A. Y. Bruijn, V. Savolainen, C. M. Morton, K. Kubitzki, W. S. Alverson, M. W. Chase (1999). Support for an expanded family concept of Malvaceae within a recircumscribed order Malvales: a combined analysis of plastid *atpB* and *rbcL* DNA sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society* 129, 267-303.

13. W. S. Alverson, B. A. Whitlock, R. Nyffeler, C. Bayer, D. A. Baum (1999). Phylogeny of the core Malvales: evidence from NDHF sequence data. *American Journal of Botany* 86, 1474-1486.
14. E. C. Lattar, B. G. Galati, M. S. Ferrucci (2012). Ultrastructural study of pollen and anther development in *Luehea divaricata* (Malvaceae, Grewioideae) and its systematic implications: Role of tapetal transfer cells, orbicules and male germ unit. *Flora* 207, 888-894.
15. P. E. R. Carvalho (1994). Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Colombo: Embrapa – CNPF; Brasília: Embrapa-SPI, 640 p.
16. Disponível em: http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=1343. Acesso 25/01/2014 às 17:46 h.
17. Disponível em: <http://www.floresdocerrado.fot.br/outrosloais/f2812.htm> e <http://www.floresdocerrado.fot.br/pantanal/f2786.htm>. Acesso 25/01/2014 às 18:06 h.
18. L. P. Felício, E. M. Silva, V. Ribeiro, C. T. Miranda, I. L. B. F. Vieira, D. C. S. Passos, A. K. S. Ferreira, C. R. Vale, D. C. S. Lima, S. Carvalho, W. B. Nunes (2011). Mutagenic potential and modulatory effects of the medicinal plant *Luehea divaricata* (Malvaceae) in somatic cells of *Drosophila melanogaster*: SMART/wing. *Genetics and Molecular Research* 10, 6-24.
19. J. T. C. Júnior, S. M. Morais, C. G. Martins, L. G. Vieira, M. F. B. Morais-Braga, J. N. P. Carneiro, A. J. P. Machado, I. R. A. Menezes, S. R. Tintino, H. D. M. Coutinho (2015). Phytochemical Analysis and Modulation of Antibiotic Activity by *Luehea paniculata* Mart. & Zucc. (Malvaceae) in Multiresistant Clinical Isolates of *Candida* Spp. *BioMed Research International* 2015, 1-10.
20. S. Zacchino, C. Santecchia, S. Lopez, S. Cattuso, J. D. Mufioz, A. Cruafies, E. Vivot, M. C. Cruafies, A. Salinas, R. E. Ruiz, S. Ruiz (1998). *In vitro* antifungal evaluation and studies on mode of action of eight selected species from the Argentine flora. *Phytomedicine* 5, 389-395.
21. J. C. A. Tanaka, G. J. Vidotti, C. C. Silva (2003). A New Tormentic Acid Derivative from *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). *Journal of the Brazilian Chemical* 14, 475-478.
22. R. L. Rosa, G. M. Nardi, A. G. F. Januário, R. Boçois, K. P. Bagatini, S. J. R. Bonatto, A. O. Pinto, J. R. N. Ferreira, L. N. B. Mariano, R. Niero, F. Iagher (2014). Anti-inflammatory, analgesic, and immunostimulatory effects of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (Malvaceae) bark. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 50, 599-610.
23. G. C. Souza, A. P. S. Haas, G. L. von Poser, E. E. S. Schapoval, E. Elisabetsky (2004). Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 90, 135-143.
24. C. M. O. Simoes, M. Faikenberg, L. A. Mentz, E. P. Schenkel, M. Amoros, L. Girre (1999). Antiviral activity of South Brazilian medicinal plant extracts. *Phytomedicine* 6, 205-214.
25. L. P. Arantes, D. Colle, M. L. Machado, D. C. Zamberlan, C. L. C. Tassi, R. C. da Cruz, M. P. Manfron, M. L. Athayde, F. A. A. Soares (2014). *Luehea divaricata* Mart.

Anticholinesterase and antioxidant activity in a *Caenorhabditis elegans* model system. *Industrial Crops and Products* 62, 265-271.

26. P. S. Port's, R. C. Chisté, H. T. Godoy, M. A. Prado (2013). The phenolic compounds and the antioxidant potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian region. *Food Research International* 53, 875-881.
27. J. C. A. Tanaka, C. C. Silva, B. P. D. Filho, C. V. Nakamura, J. E. Carvalho, M. A. Foglio (2005). Constituintes químicos de *Luehea divaricata* MART. (Tiliaceae). *Química Nova* 28, 834-837.
28. V. G. Alves, E. A. Rosa, N. P. Coelho, F. Vandresen, C. C. Silva (2014). Chemical constituents from leaves of *Luehea paniculata*. *Chemistry of Natural Compounds* 50, 770-771.
29. M. C. Tschá, M. F. Sales, G. L. Esteves (2002). Tiliaceae Juss. No estado de Pernambuco, Brasil. *Hoehnea* 29, 1-18.
30. Disponível em: http://eol.org/data_objects/21305951. Acesso: 04/12/2015 às 09:00.
31. P. E. R. Carvalho (2010). Espécies arbóreas brasileiras. Embrapa informações Tecnológica; Brasília - DF, 634 p.
32. Disponível em: http://www.flickr.com/photos/plants_of_russian_in_brazil/4204236540/ Acesso: 25/01/2014 às 18:10.
33. E. C. S. Lopes, V. B. Bomfim, N. M. Porto, M. F. Agra (2014). Estudo Farmacobotânico Foliar de *Luehea ochrophylla* Mart. (Malvaceae). Congresso Latino Americano de Botânica. Disponível em: www.botanica.org.br/trabalhos-cientificos/65CNBot/5533-BTE.pdf.
34. V. F. V. Junior, A. C. Pinto, M. A. M. Maciel (2005). Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova* 28, 519-528.
35. M. I. Tomazzoni, R. R. B. Negrelle, M. L. Centa (2006). Fitoterapia popular: A busca instrumental enquanto prática terapêutica. *Texto Contexto Enfermagem* 15, 115-21.
36. M. A. Foglio, C. L. Queiroga, I. M. O. Sousa, R. A. F. Rodrigues (2006). Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. *Multiciência: Construindo a História dos Produtos Naturais*. http://www.multiciencia.unicamp.br/art04_7.htm, acesso em dezembro de 2015.
37. S. Pacheco, R. G. Borguini, M. C. P. A. Santiago, L. S. M. Nascimento, R. L. O. Godoy (2015). História da Cromatografia Líquida. *Revista Virtual de Química* 7, 1225-1271.
38. V. C. Filho, R. A. Yunes (1997). Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova* 21, 99-105.
39. M. C. R. Bruning, G. B. G. Mosegui, C. M. M. Vianna (2012). A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu - Paraná: a visão dos profissionais de saúde. *Ciência & Saúde Coletiva* 17, 2675-2685.

40. M. A. M. Maciel, A. C. Pinto, V. F. V. Júnior, N. F. Grynberg, A. Echevarria (2002). Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova* 25, 429-438.
41. M. F. Agra, P. F. Freitas, J. M. Barbosa-Filho (2007). Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17, 114-140.
42. V. F. V. Junior (2008). Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18, 308-313.
43. H. N. Brandão, J. P. David, R. D. Couto, J. A. P. Nascimento, J. M. David (2010). Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Química Nova* 33, 1359-1369.
44. M. V. N. Souza (2004). Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. *Química Nova* 27, 308-312.
45. F. J. A. Mattos (1997). Introdução à fitoquímica experimental. 2º edição. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 141 p.
46. G. Tel, M. Öztürk, M. E. Duru, B. Doğan, M. Harmandar (2013). Fatty acid composition, antioxidant, anticholinesterase and tyrosinase inhibitory activities of four *Serratula* species from Anatolia. *Records of Natural Products* 7, 86-95.
47. A. F. C. Ribeiro, T. C. Telles, V. P. Ferraz, E. M. Souza-Fagundes, G. D. Cassali, A. T. Carvalho, M. M. Melo (2011). Effect of *Arrabidaea chicha* extracts on the Ehrlich solid tumor development. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 22, 364-373.
48. R. Vianni, R. Braz-Filho (1996). Ácidos graxos naturais: Importância e ocorrência em alimentos. *Química Nova* 19, 400-407.
49. M. F. O. Almeida, A. C. R. de Melo, M. L. B. Pinheiro, J. R. A. Silva, A. D. L. de Souza, A. Barison, F. R. Campos, A. C. F. Amaral, G. M. C. Machado, L. L. P. Leon (2011). Constituintes químicos e atividade leishmanicida de *Gustavia elliptica* (Lecythidaceae). *Química Nova* 34, 1182-1187.
50. L. C. A. Barbosa (2007). Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos. 1º edição. UFV, Viçosa, 189 p.
51. D. L. Pavia, G. M. Lampman, G. S. Kriz, J. R. Vyvyan (2010). Introdução a espectroscopia. 4º edição. Cengage Learning, São Paulo, 716 p.
52. S. B. Mahato, A. P. Kundu (1994). ¹³C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids - a compilation and some salient features. *Phytochemistry* 37, 1517-1575.
53. R. L. R. P. Jácome, A. B. Oliveira, D. S. Raslan, H. Wagner (2004). Estudo químico e perfil cromatográfico das cascas de *Aspidosperma parvifolium* A. DC. ("Paupereira"). *Química Nova* 27, 897-900.

54. D. A. Silva, V. G. Alves, D. M. M. Franco, L. C. Ribeiro, M. C. Souza, L. Kato, J. E. Carvalho, L. K. Kohn, C. M. A. Oliveira, C. C. Silva. (2012). Antiproliferative activity of *Luehea candicans* Mart. et Zucc. (Tiliaceae). Natural Products Research 26, 364-369.
55. V. Sudhahar, S. A. Kumar, P. Varalakshmi, V. Sujatha (2008) Protective effect of lupeol and lupeol linoleate in hypercholesterolemia associated renal damage. Molecular and Cellular Biochemistry 317, 11-20.
56. S. P. Preetha, M. Kanniappan, E. Selvakumar, M. Nagaraj, P. Varalakshmi (2006) Lupeol ameliorates aflatoxin B1-induced peroxidative hepatic damage in rats. Comparative Biochemistry and Physiology - Parte C: Toxicology & Pharmacology 143, 333-339.
57. V. G. C. Abreu, G. M. Correa, T. M. Silva, H. S. Fontoura, D. C. Cara, D. Piló-Veloso, A. F. C. Alcântara (2013). Anti-inflammatory effects in muscle injury by transdermal application of gel with *Lychnophora pinaster* aerial parts using phonophoresis in rats. BMC Complementary and Alternative Medicine 13, 270-278.
58. M. F. Khan, D. P. Mishra, E. Ramakrishna, A. K. Rawat, A. Mishra, A. K. Srivastava, R. Maurya (2014). Design and synthesis of lupeol analogues and their in vitro PTP-1B inhibitory activity. Medicinal Chemistry Research 23, 4156-4166.
59. M. F. Khan, C. K. Maurya, K. Dev, D. Arha, A. K. Rai, A. K. Tamrakar, R. Maurya (2014). Design and synthesis of lupeol analogues and their glucose uptake stimulatory effect in L6 skeletal muscle cells. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 24, 2674-2679.
60. W. L. Xu, Y. B. Huang, J. H. Qian, O. Sha, Y. Q. Wang (2005). Separation and purification of stigmasterol and β -sitosterol from phytosterol mixtures by solvent crystallization method. Separation and Purification Technology 41, 173-178.
61. A. L. M. Nasser, F. R. Pavan, N. Boralle, G. J. Zocolo, L. C. dos Santos, M. R. R. de Marchi, C. Q. F. Leite, W. Vilegas (2013). Esteroides e Triterpenos de espécies de *Qualea* - Bioatividade sobre *Mycobacterium tuberculosis*. Revista Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada 34, 513-517.
62. K. Hąc-Wydro (2013). Studies on β -sitosterol and ceramide-induced alterations in the properties of cholesterol/sphingomyelin/ganglioside monolayers. Biochimica e Biophysica Acta 1828, 2460-2469.
63. M. Vivancos, J. J. Moreno (2008). Effect of resveratrol, tyrosol and beta-sitosterol on oxidised low-density lipoprotein-stimulated oxidative stress, arachidonic acid release and prostaglandin E2 synthesis by RAW 264.7 macrophages. British Journal Nutrition 99, 1199-207.
64. B. Sudhamalla, M. Gokara, N. Ahalawat, D. G. Amooru, R. Subramanyam (2010). Molecular dynamics simulation and binding studies of β -sitosterol with human serum albumin and its biological relevance. The Journal of Physical Chemistry B 114, 9054-9062.

65. K. F. Klippel, D. M. Hiltl, B. Schipp (1997). A multicentric, placebo-controlled, double-blind clinical trial of beta-sitosterol (phytosterol) for the treatment of benign prostatic hyperplasia. German BPH-Phyto Study group. *British Journal of Urology* 80, 427-32.
66. F. O. Silva, I. R. Oliveira, M. G. V. Silva, R. Braz-Filho (2010). Constituintes químicos das folhas de *Senna spectabilis* (DC) Irwin & Barneby var. *excelsa* (Schrad.) Irwin & Barneby. *Química Nova* 33, 1874-1876.
67. R. D. Goff, J. S. Thorson (2009). Enhancing the divergent activities of betulinic acid via neoglycosylation. *Organic letters* 11, 461-464.
68. S. Fulda, C. Scaffidi, S. A. Susin, P. H. Krammer, G. Kroemer, M. E. Peter, K. M. Debatin (1998). Activation of mitochondria and release of mitochondrial apoptogenic factors by betulinic acid. *The journal of biological chemistry* 273, 33942-33948.
69. Z. Dang, K. Qian, P. Ho, L. Zhu, K. H. Lee, L. Huang, C. H. Chen (2012). Synthesis of betulinic acid derivatives as entry inhibitors against HIV-1 and bevirimat-resistant HIV-1 variants. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22, 5190-5194.
70. R. Seto, H. Nakamura, F. Nanjo, Y. Hara (1997). Preparation of epimers of tea catechins by heat treatment. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 61, 1434-1439.
71. G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg (2010). NMR chemical shifts of trace impurities: common laboratory solvents, organics, and gases in deuterated solvents relevant to the organometallic chemistry. *Organometallics* 29, 2176-2179.
72. L. T. Lôbo, K. C. F. Castro, M. S. P. Arruda, M. N. da Silva, A. C. Arruda, A. H. Müller, G. M. S. P. Arruda, A. S. Santos, A. P. S. Souza Filho (2008). Potencial alelopático de catequinas de *Tachigali myrmecophyla* (Leguminosae). *Química Nova* 31, 493-497.
73. P. K. E. Agrawal (1989). Carbon-13 NMR of Flavonoids, *Studies in Organic Chemistry-39: Methods in Signal Assignment*, 1^o edição, Elsevier, New York, 564 p.
74. A. L. B. S Barreiros, M. L. Barreiros, J. M. David, J. P. David, L. P. Queiroz (2003). Atividade antioxidante de substâncias presentes em *Dioclea violacea* e *Erythroxylum nummularia*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 13, 8-11.
75. Y. Mizushina, R. Nakanishi, I. Kuriyama, K. Kamiya, T. Satake, N. Shimazaki, O. Koiwai, Y. Uchiyama, Y. Yonezawa, M. Takemura, K. Sakaguchi, H. Yoshida (2006). β -Sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside: A eukaryotic DNA polymerase λ inhibitor. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 99, 100-107.
76. Z. S. He, G. I. Fan (1996). 27-nor-triterpenoid glycosides from *Adina rubella*. *Phytochemistry* 42, 1391 -1393.
77. Y. Mohri, M. Sagehashi, T. Yamada, Y. Hattori, K. Morimura, Y. Hamauzu, T. Kamo, M. Hirota, H. Makabe (2009). An efficient synthesis of procyanidins using equimolar condensation of catechin and/or epicatechin catalyzed by ytterbium triflate. *Heterocycles*, 79, 549-563.

78. A. A. Shahat (2006). Procyanidins from *Adansonia digitata*. *Pharmaceutical Biology* 44, 445-450.
79. G. Montoya, J. Londono, P. Cortes, O. Izquierdo (2014). Quantitation of *trans*-aconitic acid in different stages of the sugar-manufacturing process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 8314–8318.
80. M. Schnitzler, F. Petereit, A. Nahrstedt (2007). *Trans*-Aconitic acid, glucosylflavones and hydroxycinnamoyltartaric acids from the leaves of *Echinodorus grandiflorus* ssp. *aureus*, a Brazilian medicinal plant. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 17, 149-154.
81. W. Piang-Siong, P. De Caro, C. Lacaze-Dufaure, A. S. C. Sing, W. Hoareau (2012). Effect of catalytic conditions on the synthesis of new aconitate esters. *Industrial Crops and Products* 35, 203-210.
82. F. Aouidi, S. Ayari, H. Ferhi, S. Roussos, M. Hamdi (2011). Gamma irradiation of air-dried olive leaves: Effective decontamination and impact on the antioxidative properties and on phenolic compounds. *Food Chemistry* 127, 1105-1113.
83. H. W. Wen, H. P. Chung, F. I. Chou, I. H. Lin, P. C. Hsieh (2006). Effect of gamma irradiation on microbial decontamination, and chemical and sensory characteristic of lycium fruit. *Radiation Physics and Chemistry* 75, 596-603.
84. K. F. Khattak (2012). Evaluation of microbial loads, physical characteristics, chemical constituents and biological properties of radiation processed *Fagonia arábica*. *Radiation Physics and Chemistry* 81, 679-685.
85. M. T. Brandl (2008). Plant Lesions Promote the Rapid Multiplication of *Escherichia coli* O157:H7 on Postharvest Lettuce. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 5285-5289.
86. S. Kumar, S. Gautam, S. Powar, A. Sharma (2010). Microbial decontamination of medicinally important herbals using gamma radiation and their biochemical characterisation. *Food Chemistry* 119, 328-335.
87. N. G. S. Gopal (1978). Radiation sterilization of pharmaceuticals and polymers. *Radiation Physics and Chemistry*. 12, 35-50.
88. G. J. Hallman (2011). Phytosanitary Applications of Irradiation. *Phytosanitary Applications of Irradiation. Comprehensive reviews in food science and food safety* 10, 143 -151.
89. K. M. Morehouse, V. Komolprasert (2004). Irradiation of Food and Packaging: An Overview. *ACS Symposium Series; American Chemical Society*, 1-11.
90. S. L. Shim, I. M. Hwang, K. Y. Ryu, M. S. Jung, H. Y. Seo, H. Y. Kim, H. P. Song, J. H. Kim, J. W. Lee, M. W. Byun, J. H. Kwon, K. S. Kim (2009). Effect of γ -irradiation on the volatile compounds of medicinal herb, *Paeoniae radix*. *Radiation Physics and Chemistry* 78, 665-669.
91. Anvisa (2001). Resolução RDC N°. 21. Brasília: Diário Oficial da União (29.01.2001).

92. J. Yun, X. Li, X. Fan, Y. Tang, Y. Xiao, S. Wan (2012). Effect of gamma irradiation on microbial load, physicochemical and sensory characteristics of soybeans (*Glycine max* L. Merrill). *Radiation Physics and Chemistry* 81, 1198-1202.
93. K. Aleksieva, O. Lagunov, K. Dimov, N. D. Yordanov (2011). EPR study on non- and gamma-irradiated herbal pills. *Radiation Physics and Chemistry* 80, 767-770.
94. H. W. Wen, M. F. Hsieh, Y. T. Wang, H. P. Chung, P. C. Hsieh, I. H. Lin, F. I. Chou (2010). Application of gamma irradiation in ginseng for both photodegradation of pesticide pentachloronitrobenzene and microbial decontamination. *Journal of Hazardous Materials* 176, 280-287.
95. G. Prado, M. C. Andrade, M. S. Oliveira (2009). Efeito da irradiação na microbiota fúngica de plantas medicinais. *Ciências e Agrotecnologia*, 33, 1372-1378.
96. T. M. Silva, M. D. Dias, M. T. Pereira, J. A. Takahashi, V. P. Ferraz, D. Piló-Veloso, A. F. C. Alcântara (2012). Effect of the γ -radiation on phenol fractions obtained from the leaves of *Echinodorus macrophyllus* Mich. *Radiation Physics Chemistry* 81, 22-26.
97. P. Siddhuraju, H. P. S. Makkar, K. Becker (2002). The effect of ionising radiation on antinutritional factors and the nutritional value of plant materials with reference to human and animal food. *Food Chemistry* 78, 187-205.
98. A. S. Leal, K. Krambrock, K. Guedes, R. R. Rodrigues (2004). Ressonância paramagnética eletrônica-RPE aplicada à análise de especiarias irradiadas (com radiação gama). *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 24, 427-430.
99. S. Jan, T. Parween, T.O. Siddiqi, X. Mahmooduzzafar (2012). Effect of gamma radiation on morphological, biochemical, and physiological aspects of plants and plant products. *Environmental Reviews* 20, 17-39.
100. D. Razem, B. Katusin-Razem (2008). The effects of irradiation on controlled drug delivery controlled drug release systems. *Radiation Physics and Chemistry* 77, 288-344.
101. C. Furgeri, T. C. F. Nunes, G. B. Fanaro, M. F. F. Souza, D. H. M. Bastos, A. L. C. H. Villavicencio (2009). Evaluation of phenolic compounds in maté (*Ilex paraguariensis*) processed by gamma radiation. *Radiation Physics and Chemistry* 78, 639-641.
102. S. Mohajer, R. M. Taha, M. M. Lay, A. K. Esmaili, M. Khalili (2014). Stimulatory Effects of Gamma Irradiation on Phytochemical Properties, Mitotic Behaviour, and Nutritional Composition of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.). *The Scientific World Journal*, doi org/10.1155/2014/854093.
103. H. Oufedjikh, M. Mahrouz, M. J. Amiot, M. Lacroix (2000). Effect of γ -Irradiation on Phenolic Compounds and Phenylalanine Ammonia-Lyase Activity during Storage in Relation to Peel Injury from Peel of *Citrus clementina* Hort. Ex. Tanaka. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 559-565.

104. T. M. Silva, R. R. S. Miranda, V. P. Ferraz, M. T. Pereira, E. P. de Siqueira, A. F. C. Alcântara (2013). Changes in the essential oil composition of leaves of *Echinodorus macrophyllus* exposed to γ -radiation. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy* 23, 600-607.
105. M. Naeem, M. Idrees, T. Aftab, M. M. Alam, M. M. A. Khan, M. Uddin, L. Varshney (2015). Radiation Processed Carrageenan Improves Plant Growth, Physiological Activities, and Alkaloids Production in *Catharanthus roseus* L. *Advances in Botany* <http://dx.doi.org/10.1155/2015/150474>.
106. J. H. Kwon, J. M. R. Bélanger, M. Sigouin, J. Lanthier, C. Willemot, J. R. J. Paré (1990). Chemical constituents of *Panax ginseng* exposed to γ -irradiation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38, 830-834.
107. G. E. Zúñiga, M. P. Junqueira-Gonçalves, M. Pizarro, R. Contreras, A. Tapia, S. Silva (2012). Effect of ionizing energy on extracts of *Quillaja saponaria* to be used as an antimicrobial agent on irradiated edible coating for fresh strawberries. *Radiation Physics and Chemistry* 81, 64-69.
108. J. H. Behrens, M. N. Barcellos, L. J. Frewer, T. P. Nunes, M. Landgraf (2009). Brazilian consumer views on food irradiation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10, 383-389.
109. F. G. Velasco, F. H. M. Luzardo, F. Guzman, O. Rodriguez, I. C. Hernandez, S. Barroso, O. D. Rizo (2014). Gamma radiation effects on molecular characteristic of vegetable tannins. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 299, 1787-1792.
110. D. Rodríguez-Linares, E. Codorniu-Hernández, Y. Aguilera-Corrales, M. Rapado-Paneque, R. Quert-Alvarez, N. Ferro (2009). Structural changes on citronellol induced by gamma radiation. *Journal of Physical Organic Chemistry* 22, 527-532.
111. Mohajer, S.; Taha, R. M.; Lay, M. M.; Esmaeili, A. K.; Khalili, M. Stimulatory Effects of Gamma Irradiation on Phytochemical Properties, Mitotic Behaviour, and Nutritional Composition of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia Scop.*). *The Scientific World Journal*, 2014, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/854093>.
112. Z. Khan, J. Gené, S. Ahmad, J. Cano, N. Al-Sweih, L. Joseph, R. Chandy, J. Guarro (2013). *Coniochaeta polymorpha*, a new species from endotracheal aspirate of a preterm neonate, and transfer of *Lecythophora* species to *Coniochaeta*. *Antonie van Leeuwenhoek* 104, 243-252.
113. U. Damm, P. H. Fourie, P. W. Crous (2010). *Coniochaeta (Lecythophora)*, *Collophora* gen. nov. and *Phaeomoniella* species associated with wood necroses of *Prunus* trees. *Persoonia* 24, 60-80.
114. M. D. Wu, M. J. Cheng, S. Y. Hsieh, G. F. Yuan (2014). Chemical constituents of the fungus of *Eurotium chevalieri* BCRC 07F0022. *Chemistry of Natural Compounds* 49, 1175-1176.
115. C. Char, S. Guerrero, L. González, S. M. Alzamora (2005). Growth Response of *Eurotium chevalieri*, *Aspergillus fumigatus* and *Penicillium brevicompactum* in Argentine Milk Jam. *Food Science and Technology International* 11, 297-305.

116. T.Klein, R.Longhini, M. L.Bruschi, J. C. P. Mello (2009).Fitoterápicos: um Mercado promissor. Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences 30, 241-248.
117. N. H. Aziz, M. Z. El-Fouly, M. R. Abu-Shady, L. A. A. Moussa (1997). Effect of Gamma Radiation on the Survival of Fungal and Actinomycetal Florae Contaminating Medicinal Plants. Applied Radiation and Isotopes48, 71-76, 1997.
118. J. P. Maity, A. Chakraborty, S. Chanda, S. C. Santra (2008). Effect of gamma radiation on growth and survival of common seed-borne fungi in India. Radiation Physics and Chemistry 77, 907-912.
119. J. Choi, S. Lim (2016). Inactivation of fungal contaminants on Korean traditional cashbox by gamma irradiation. Radiation Physics and Chemistry118, 70-74.
120. D. Marcu, G. Damian, C. Cosma, V. Cristea (2013). Gamma radiation effects on seed germination, growth and pigment content, and ESR study of induced free radicals in maize (*Zea mays*). Journal of Biological Physics 39, 625-634.
121. R. Yamaoki, S. Kimura, M. Ohta (2015). Evaluation of absorbed dose in irradiated sugar-containing plant material (peony roots) by an ESR method. Radiation Physics and Chemistry 117, 41-47.
122. W. He, Y. Liu, W. G. Wamer, J. J. Yin (2014). Electron spin resonance spectroscopy for the study of nanomaterial-mediated generation of reactive oxygen species. Journal of food and drug analysis 22, 49-63.
123. J. P. Clayden, N. Greeves, S. Warren, P. D. Wothers (2007). Organic Chemistry. 2º edição. Oxford University Press, New York, p. 1508.
124. T. W. G. Solomons, C. B. Fryhle (2009). Química Orgânica, 9º edição. LTC, Rio de Janeiro, p. 675.
125. H. S. El-Beltagi, O. K. Ahmed, W. El-Desouky (2011). Effect of low doses g-irradiation on oxidative stress and secondary metabolites production of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) callus culture. Radiation Physics and Chemistry 80, 968-976.
126. K. F. Khattak, T. J. Simpson, Ihasnullah (2008). Effect of gamma irradiation on the extraction yield, total. Food Chemistry 110, 967-972.
127. T. M. Silva (2014). Estudos Fitoquímicos e dos Efeitos da Radiação Gama em *Echinodorus macrophyllus* (Chapéu-de-couro) e em Óleos Essenciais de *Inga laurina* e *Eucalyptus grandis* (Eucalipto). Tese de Doutorado, Belo Horizonte, Minas Gerais - Brasil UFMG-ICEX/DQ.1038^a T.469^a.
128. S. Misra, T. Sanyal, D. Sarkar, P. K. Bhattacharya, D. K. Ghosh (1989). Evaluation of Antileishmanial Activity of *trans*-Aconitic Acid. Biochemical Medicine and Metabolic Biology 42, 171-178.

129. S. Ka, K. Kar, P. K. Bhatitacharya, D. K. Ghosh (1993). Experimental Visceral Leishmaniasis: Role of *trans*-Aconitic Acid in Combined Chemotherapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37, 2459-2465.
130. M. H. Baskan, M. Aydin, S. Osmanoglu (2010). Investigation of ^{60}Co γ -irradiated L-(-) malic acid, N-methyl-DL-valine and L-glutamic acid γ -ethyl ester by electron paramagnetic resonance technique. *Journal of Molecular Structure* 983, 200-202.
131. C. D. Jonah (1995). A short history of the radiation chemistry of water. *Radiation Research* 144, 141-147.
132. S. Farooq, C. N. Kurucz, T. D. Waite, W. J. Cooper (1993). Disinfection of wastewaters: high-energy electron vs gamma irradiation. *Water Research* 27, 1177-1184.
133. S. Sanguanmith, J. Meesungnoen, J. P. Jay-Gerin (2013). Time-dependent yield of $\cdot\text{OH}$ radicals in the low linear energy transfer radiolysis of water between 25 and 350 °C. *Chemical Physics Letters* 588, 82-86.
134. H. Atrous, N. Benbettaieb, F. Hosni, S. Danthine, C. Blecker, H. Attia, D. Ghorbel (2015). Effect of γ -radiation on free radicals formation, structural changes and functional properties of wheat starch. *International Journal of Biological Macromolecules* 80, 64-76.
135. A. L. Lehninger, D. L. Nelson, M. M. Cox (2000). *Princípios de Bioquímica*. 2. edição. Sarvier, São Paulo, 839 p.
136. WHO em :<http://www.who.int/topics/cancer/en/>. Acesso: 14/04/2016.
137. M. R. Guerra, C. V. M. Gallo, G. A. S. Mendonça (2005). The risk of cancer in Brazil: tendencies and recent epidemiologic studies. *Revista Brasileira de Cancerologia* 51, 227-234.
138. G. Brasileiro-Filho, F. E. L. Pereira, R. C. Guimarães (2006). *Bogliolo: Patologia*. 7ª. edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1472 p.
139. V. L. Almeida, A. L., L. C. B. Reina, C. A. Montanari, C. L. Donnici, M. T. P. Lopes (2005). Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova* 28, 118-129.
140. B. G. Katzung (1998). *Farmacologia Básica e Clínica*. 4ª edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1147 p.
141. B. Chiavarino, M. E. Crestoni, S. Fornarini, D. Scuderi, J. Y. Salpin, 2013. Interaction of Cisplatin with Adenine and Guanine: A Combined IRMPD, MS/MS, and Theoretical Study. *Journal of the American Chemical Society* 135, 1445-1455.
142. J. Wang, G. S. Wu (2014). Role of Autophagy in Cisplatin Resistance in Ovarian Cancer Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 289, 17163-17173.
143. M. H. Hanigan, P. Devarajan (2003). Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. *Journal of Cancer Therapy* 1, 47-61.

144. S. S. Vundru, R. K. Kale, R. P. Singh (2013). β -sitosterol induces G1 arrest and causes depolarization of mitochondrial membrane potential in breast carcinoma MDA-MB-231 cells. BMC Complementary and Alternative Medicine 13, 280-289.
145. L. Lin, Q. Gao, C. Cui, H. Zhao, L. Fu, L. Chen, B. Yang, W. Luo, M. Zhao (2012). Isolation and identification of ent-kaurane-type diterpenoids from *Rabdosia serra* (MAXIM.) HARA leaf and their inhibitory activities against HepG-2, MCF-7, and HL-60 cell lines. Food Chemistry 131, 1009-1014.
146. R. S. Cotran, A. K. Abbas, N. Fausto, S. L. Robbins, V. Kumar (2005). Patologia - Bases patológicas das doenças. 7ª edição. Elsevier, Rio de Janeiro 1592 p.
147. C. Nathan (2002). Points of control in inflammation. Nature 420, 846-852.
148. A. Koj, D. Magielska-Zero, J. Bereta, A. Kurdowska, H. Rokita, J. Gauldie (1988). The cascade of inflammatory cytokines regulating synthesis of acute phase proteins. The Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine 13, 255-256.
149. E. R. K. M. J. Van, S. Wopereis, C. Rubingh, V. T. Van, E. Verheij, N. H. Cnubben, T. L. Pedersen, J. W. Newman, A. K. Smilde, J. D. G. Van, H. F. Hendriks, O. B. Van (2010). Insight in modulation of inflammation in response to diclofenac intervention: a human intervention study. BMC Medical Genomics 23, 3-5.
150. R. Ross (1994). The role of T lymphocytes in inflammation. Proceedings of the National Academy Sciences 91, 2879.
151. J. L. Turk (1994). Inflammation: John Hunter's "A treatise on the blood, inflammation and gun-shot wounds". International Journal of Experimental Pathology 75, 385-395.
152. C. N. Serhan, S. D. Buckley, D. W. Gilroy, C. Haslett, L. A. O'Neill, M. Perretti, A. G. Rossi, J. L. Wallace (2011). Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. The FASEB Journal 21, 325-332.
153. W. M. Cruvinel, D. Mesquita Júnior, J. A. P. Araújo, T. T. T. Catelan, A. W. S. Souza, N. P. Silva, L. E. C. Andrade (2010). Immune system – Part I: Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. Revista Brasileira de Reumatologia 50, 434-461.
154. T. Ganguly, L. P. Bandheka, K. B. Sainis (2001). Immunomodulatory effect of *Tylophora indica* on Con A induced lymphoproliferation. Phytochemistry 8, 431-437.
155. M. A. S. Coutinho, M. F. Muzitano, S. S. Costa (2009). Flavonoides: Potenciais Agentes Terapêuticos para o Processo Inflamatório. Revista Virtual de Química 1, 241-256.
156. M. Batlouni (2010). Anti-Inflamatórios Não Esteroides: Efeitos Cardiovasculares, Cérebro-Vasculares e Renais. Arquivos Brasileiros de Cardiologia 94, 556-563.
157. M. Castro (2005). Efeitos Antiinflamatórios e Antiproliferativos dos Glicocorticóides: Concordância ou Discordância? Arquivos Brasileiros de Endocrinol e Metabologia 49, 334-336.

158. M. L. Higuchi (1995). O parasita e a patogenia da forma crônica da doença de Chagas. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 64: 251-254.
159. Caryn Bern (2015). Chagas' Disease. *The New England Journal of Medicine* 373, 456-466.
160. L. Valencia, D. L. Muñoz, S. M. Robledo, F. Echeverría, G. J. Arango, I. D. Vélez, O. Triana (2011). Actividad tripanocida y citotóxica de extractos de plantas colombianas. *Biomédica* 31, 552-559.
161. M. I. González-Tomé, M. Rivera, I. Camaño, F. Norman, M. Flores-Chávez, L. Rodríguez-Gómez, V. Fumadó, M. G. L. Hortelano, R. López-Vélez, L. I. González-Granado, A. García-Burguillo, M. M. Santos, O. Ávila (2013). Recomendaciones para el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de La embarazada y del niño con enfermedad de Chagas. *Enfermagem da Infecção Microbiologica Clinica* 31, 535-542.
162. V. P. Emerenciano, J. S. L. T. Militão, C. C. Campos, P. Romofe, M. A. C. Kaplan, M. Zambon, A. J. C. Brant (2001). Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae. *Biochemical Systematics and Ecology* 29, 947-957.
163. M. A. Miles (2003). American trypanosomiasis (Chagas disease). In: Cook, G.C.; Zumla, A. (eds). *Manson's Tropical Diseases*. W.B. Saunders, Londres, 1325-1337.
164. Z. Brener, Z. A. Andrade, M. Barral-Neto (2000). *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas. 2ª edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1-15 p.
165. L. S. Goodman, A. Gilman (2006). *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 11ª edição. McGraw-Hill Interamericana do Brasil, Rio de Janeiro. 1848 p.
166. D. Fabbro, E. Velázquez, N. Mendoza, M. Streiger, E. Arias, S. Denner, M. D. Barco, N. Amicone, C. Pravia, N. Malagrino, A. M. Ruiz (2007). Evaluación de ELISA F29 como marcador de eficacia Del tratamiento etiológico en la enfermedad de Chagas. *Parasitologia Latinoamericana* 62, 103- 111.
167. <http://www.open.edu/openlearnworks/mod/page/view.php?id=40817>. Acesso 20/02/2016 às 18:20.
168. G. Polanco-Hernández, F. Escalante-Erosa, K. García-Sosa, M. J. Chan-Bacab, H. Sagua-Franco, J. González, L. Osorio-Rodríguez, L. M. Peña-Rodríguez (2012). Metabolites from the leaf extract of *Serjania yucatanensis* with trypanocidal activity against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research* 111, 451-455.
169. Wannmacher (2004). Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: Uma guerra perdida? *Uso racional de medicamentos* 1, 1-6.
170. A. L. Demain, S. Sanchez (2009). Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics* 62, 5-16.
171. R. Rojas, B. Bustamante, J. Bauer, I. Fernandez, J. Alban, O. Lock (2003). Antimicrobial activity of selected Peruvian plants. *Journal of Ethnopharmacology* 88, 199-204.

172. Anvisa (2011). Resolução RDC Nº. 20. Brasília: Diário Oficial da União (09.05.2011).
173. T. S. Novais, J. F. O. Costa, J. P. L. David, J. M. David, L. P. Queiroz, F. França, A. M. Giulietti, M. B. P. Soares, R. R. Santos (2003). Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 14, 8-11.
174. A. R. R. Vicentino, F. S. Menezes (2007). Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 17, 384-387.
175. C. M. M. Sousa, H. R. Silva, G. M. Vieira-Jr., M. C. C. Ayres, C. L. S. Costa, D. S. Araújo, L. C. D. Cavalcante, E. D. S. Barros, P. B. de M. Araújo, M. S. Brandão e M. H. Chaves (2007). Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, 30, 351-355.
176. O. Sorg (2004). Oxidative stress: a theoretical model or biological reality? *Comptes Rendus Biologies* 327, 649-662.
177. S. Okonogi, C. Duangrat, S. Anuchpreeda, S. Tachakittirungrod, S. Chowwanapoonpohn (2007). Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. *Food Chemistry* 103, 839-846.
178. D. Andreo, N. Jorge (2006). Antioxidantes naturais: técnicas de extração. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos* 24, 319-336.
179. J. M. Duarte-Almeida, R. J. Santos, M. I. Genovese, F. M. Lajolo (2006). Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH $\cdot$. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos* 26, 446-452.
180. A. C. Oliveira, I. B. Valentim, M. O. F. Goulart, C. A. Silva, E. J. H. Bechara, M. T. S. Trevisan (2009). Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova* 32, 689-702.
181. T. Mosmann (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 65, 55 - 63.
182. Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica: Medicina Laboratorial para coleta de sangue venoso (2010). 2. edição. Minha Editora, Barueri - SP, p. 130.
183. H. M. S. Bicalho, M. C. Gontijo, J. A. Nogueira-Machado (1981). A simple technique for simultaneous human leukocytes separation. *Journal of Immunology Methods*, 40, 115-116. 1981.
184. E. Dib, E. B. Rodrigues, M. Maia, C. H. Meyer, F. M. Penha, B. A. Furlani, E. P. F. Costa, M. E. Farah (2009). Corantes vitais em cromovitrectomia. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 72, 845-850.
185. A. B. Lyons (1999). Divided we stand: Tracking cell proliferation with carboxyfluorescein diacetatesuccinimidyl ester. *Immunology and Cell Biology* 77, 509-515.

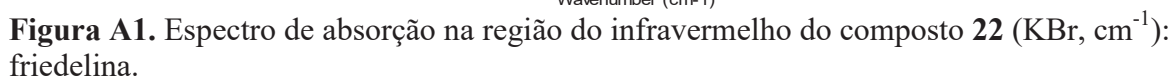
186. C. M. Spies, T. Gaber, M. Hahne, L. Naumann, R. Tripmacher, S. Schellmann, C. Stahn, G. R. Burmester, A. Radbruch, F. Buttgerit (2010). Rimexolone inhibits proliferation, cytokine expression and signal transduction of humanCD4⁺ T-cells. *Immunology Letters*131, 24-32.
187. R. Angulo, D. A. Fulcher (1998). Measurement of Candida-Specific Blastogenesis: Comparison of Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester Labelling of T Cells, ThymidineIncorporation, and CD69 Expression. *Cytometry* 34, 143-151.
188. H. S. Fontoura, R. B. Azevedo (2008). Influence of anti-inflammatory properties of ultrasound therapy in muscle injuries treatment. *The Brazilian Journal of Physical Therapy* 9, 17-22.
189. G. M. Corrêa, V. G. C. Abreu, D. A. A. Martins, J. A. Takahashi, H. S. Fontoura, D. C. Cara, D. Piló-Veloso, A. F. C. Alcântara (2014). Anti-inflammatory and antimicrobial activities of steroids and triterpenes isolated from aerial parts of *Justicia acuminatissima* (Acanthaceae). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 6, 75-81.
190. F. S. Buckner, C. L. Verlinde, A. C. La Flamme, W. C. Van Voorhis (1996). Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*40, 2592-2597
191. A. J. Romanha, S. L. Castro, M. N. C. Soeiro, J. Lannes-Vieira, I. Ribeiro, A. Talvani, B. Bourdin, B. Blum, B. Olivieri, C. Zani, C. Spadafora, E. Chiari, E. Chatelain, G. Chaves, J. E. Calzada, J. M. Bustamante, L. H. Freitas-Junior, L. I. Romero, M. T. Bahia, M. Lotrowska, M. Soares, S. G. Andrade, T. Armstrong, W. Degraeve, Z. A. Andrade (2010). *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 105, 233-238.
192. I. P. Ferreira, G. M. Lima, E. B. Paniago, W. R. Rocha, J. A. Takahashi, C. B. Pinheiro, J. D. Ardisson (2012). Design, structural and spectroscopic elucidation, and the *in vitro* biological activities of new diorganotin dithiocarbamates. *European Journal of Medicinal Chemistry* 58, 493-503.
193. C. Sánchez-Moreno (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International* 8, 121-137.
194. W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LTW - Food Science and Technology* 28, 25-30.
195. Z. Chen, R. Bertin, G. Froldi (2013). EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. *Food Chemisry* 138, 414-420.
196. R. B. Badisa, S. F. Darling-Reed, P. Joseph, J. S. Cooperwood, L. M. Latinwo, C. B. Goodman (2009). Selective Cytotoxic Activities of Two Novel Synthetic Drugs on Human Breast Carcinoma MCF-7 Cells. *Anticancer Research* 29, 2993-2996.
197. M. Ono, M. Koto, H. Komatsu, Keiji Igoshi, H. Kobayashi, Y. Ito, T. Nohara (2004). Cytotoxic Triterpenes and Sterol from the Fruit of Rabbiteye Blueberry (*Vaccinium ashei*). *Food Science and Technology Research*10, 56-59.

198. T. S. El-Alfy, S. M. Ezzat, A.K. Hegazy, A. M. M. Amer, G. M. Kamel (2011). Isolation of biologically active constituents from *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori. (family: Moringaceae) growing in Egypt. *Pharmacognosy Magazine* 7, 109-115.
199. M. Z. El-Readi, D. Hamdan, N. Farrag, A. El-Shazly, M. Wink (2010). Inhibition of P-glycoprotein activity by limonin and other secondary metabolites from Citrus species in human colon and leukaemia cell lines. *European Journal of Pharmacology* 626, 139-145.
200. M. Behbahani (2014). Evaluation of In Vitro Anticancer Activity of *Ocimum Basilicum*, *Alhagi Maurorum*, *Calendula Officinalis* and Their Parasite *Cuscuta Campestris*. *Plos One* 9, 1-13.
201. Q. Y. Liu, F. Wang, L. Zhang, J. M. Xie, P. Li, Y. H. Zhang (2015). A Hydroxylated Lupeol-Based Triterpenoid Ester Isolated from the *Scurrula parasitica* Parasitic on *Nerium indicum*. *Helvetica Chimica Acta* 98, 627-632.
202. L. M. Tonon, S. R. Secoli, R. Caponero (2007). Câncer colorretal: uma revisão da abordagem terapêutica com bevacizumabe. *Revista Brasileira de Cancerologia* 53, 173-182.
203. R. C. Attolini; C. W. Gallon (2010). Life Quality and Nutritional Profile of Colostomized Colorectal Cancer Patients. *Revista Brasileira de Cancerologia* 30, 289-298.
204. M. Kanellopoulos, S. Petris, G. Leca, M. J. Crumpton (1985). The mitogenic lectin from *Phaseolus vulgaris* does not recognize the T3 antigen of human T lymphocytes. *European Journal of Immunology* 15, 457-486, 1985.
205. M. A. Vazquez-Prieto, A. Bettaieb, F. G. Haj, C. G. Fraga, P. I. Oteiza (2012). (-)-Epicatechin prevents TNF α -induced activation of signaling cascades involved in inflammation and insulin sensitivity in 3T3-L1 adipocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 527, 113-118.
206. J. Shay, H. A. Elbaz, I. Lee, S. P. Zielske, M. H. Malek, M. Hüttemann (2015). Molecular Mechanisms and Therapeutic Effects of (-)-Epicatechin and Other Polyphenols in Cancer, Inflammation, Diabetes, and Neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2015, 1-13.
207. D. G. Franco (2010). Fator de transcrição nuclear kappa b no sistema nervoso central: do fisiológico ao patológico. *Revista da Biologia* 4, 35-39.
208. M. Morrison, R. van der Heijden, P. Heeringa, E. Kaijzel, L. Verschuren, R. Blomhoff, T. Kooistra, R. Kleemann (2014). Epicatechin attenuates atherosclerosis and exerts anti-inflammatory effects on diet-induced human-CRP and NF κ B in vivo. *Atherosclerosis* 233, 149-156.
209. A. Chait, C. Y. Han, J. F. Oram, J. W. Heinecke (2005). Lipoprotein-associated inflammatory proteins: markers or mediators of cardiovascular disease? *Journal of Lipid Research* 46, 389-403.

210. J. P. Benincá, J. B. Dalmarco, M. G. Pizzolatti, T. S. Frode (2011). Analysis of the anti-inflammatory properties of *Rosmarinus officinalis* L. in mice. Food Chemistry 124, 468-475.
211. J. C. Tsai, W. H. Peng, T. H. Chiu, S. C. Lai, C. Y. Lee (2011). Anti-inflammatory effects of *Scoparia dulcis* L. and betulinic Acid. The American Journal of Chinese Medicine 39, 943-956.
212. L. J. Huang, W. Y. Gao, X. Li, W. S. Zhao, L. Q. Huang, C. X. Liu (2010). Evaluation of the *in vivo* Anti-inflammatory effects of extracts from *Pyrus bretschneideri* Rehd. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58, 8983-8987.
213. J. Koelzer, D. A. Pereira, J. B. Dalmarco, M. G. Pizzolatti, T. S. Fröde (2009). Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Lotus corniculatus*. Food Chemistry 117, 444-450.
214. É. R. Shakurova, T. I. Parfenova, R. Sh. Sufiyarova, A. Z. Khalilova, V. R. Akhmetova, S. A. Bashkatov (2008). Synthesis and anti-inflammatory activity of acyl derivatives of taraxasterol. Pharmaceutical Chemistry Journal 42, 319-321.
215. S. H. Fang, Y. K. Rao, Y. M. Tzeng (2008). Anti-oxidant and inflammatory mediator's growth inhibitory effects of compounds isolated from *Phyllanthus urinaria*. Journal of Ethnopharmacology 116, 333-340.
216. M. Katoh, Y. Oizumi, Y. Mohri, M. Hirota, H. Makabe (2012). Synthesis of procyanidin B1, B2, and B4 and their anti-inflammatory activity: the effect of 4-alkoxy group of catechin and/or epicatechin electrophiles for condensation. Letters in Organic Chemistry 9, 233-238.
217. J. P. David, E. O. Santos, M. S. Miranda, A. L. B. S. Barreiros, I. D. Santos, J. M. David (2002). Atividade antioxidante da epicatequina-(2 β →7,4 β →8)-epicatequina isolada de *Dioclea lasiophylla*. Revista Brasileira de Farmacognosia 12, 05-06.
218. I. Tejero, N. González-García, A. González-Lafont, J. M. Lluch (2007). Tunneling in Green Tea: Understanding the Antioxidant Activity of Catechol-Containing Compounds. A Variational Transition-State Theory Study. Journal of American Chemical Society 129, 5846-5854.

Anexo I

Espectros



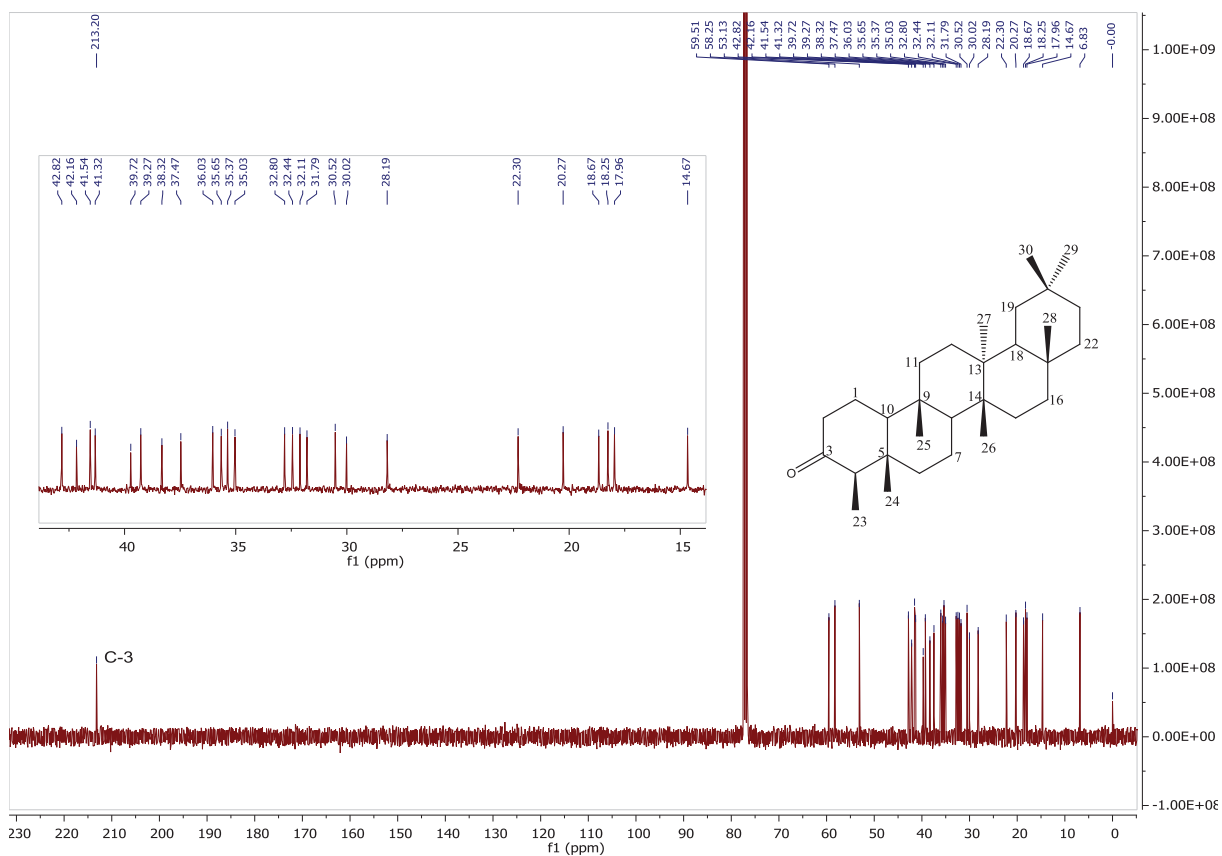


Figura A3. Espectro de RMN de ^{13}C [50 MHz; CDCl_3] do composto **22**: friedelina.

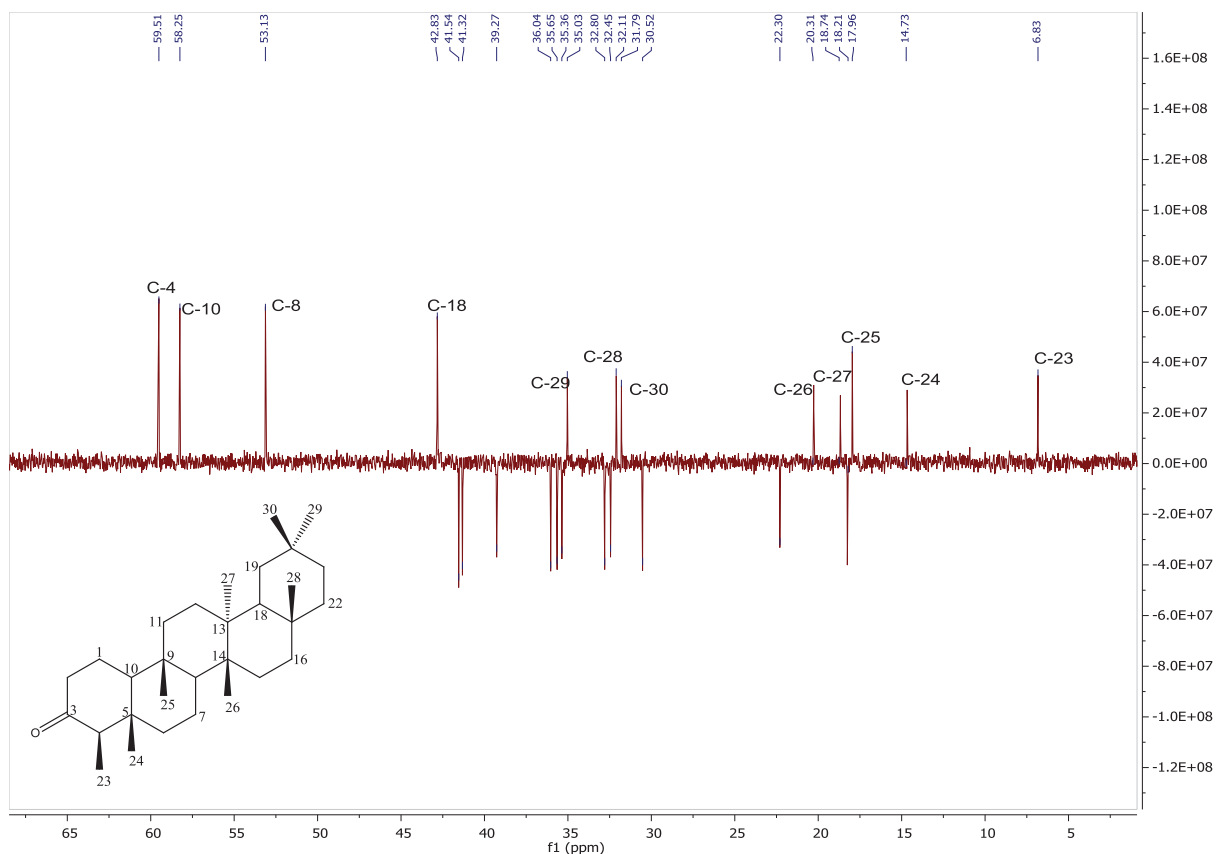


Figura A4. Subespectro de DEPT 135 [50 MHz; CDCl_3] do composto **22**: friedelina.

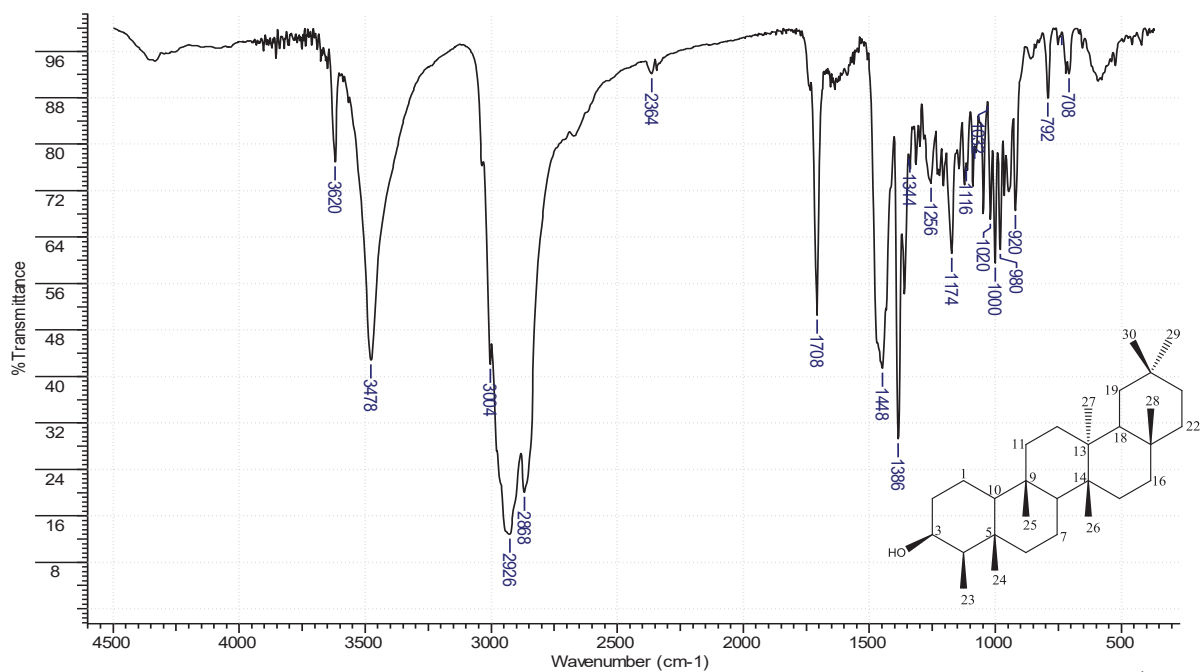


Figura A5. Espectro de absorção na região do infravermelho do composto **23** (KBr, cm^{-1}): β -friedelinol.

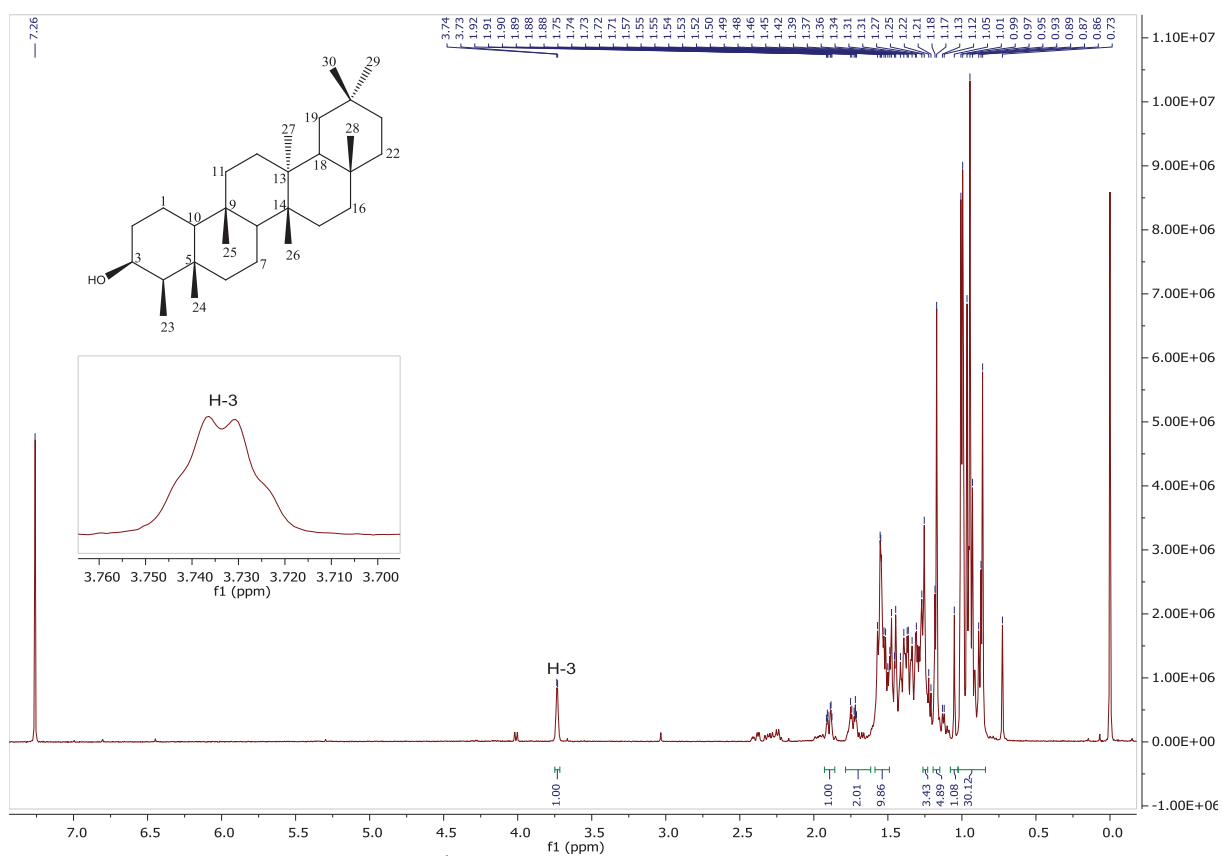


Figura A6. Espectro de RMN de ^1H [400 MHz; CDCl_3] do composto **23**: β -friedelinol.

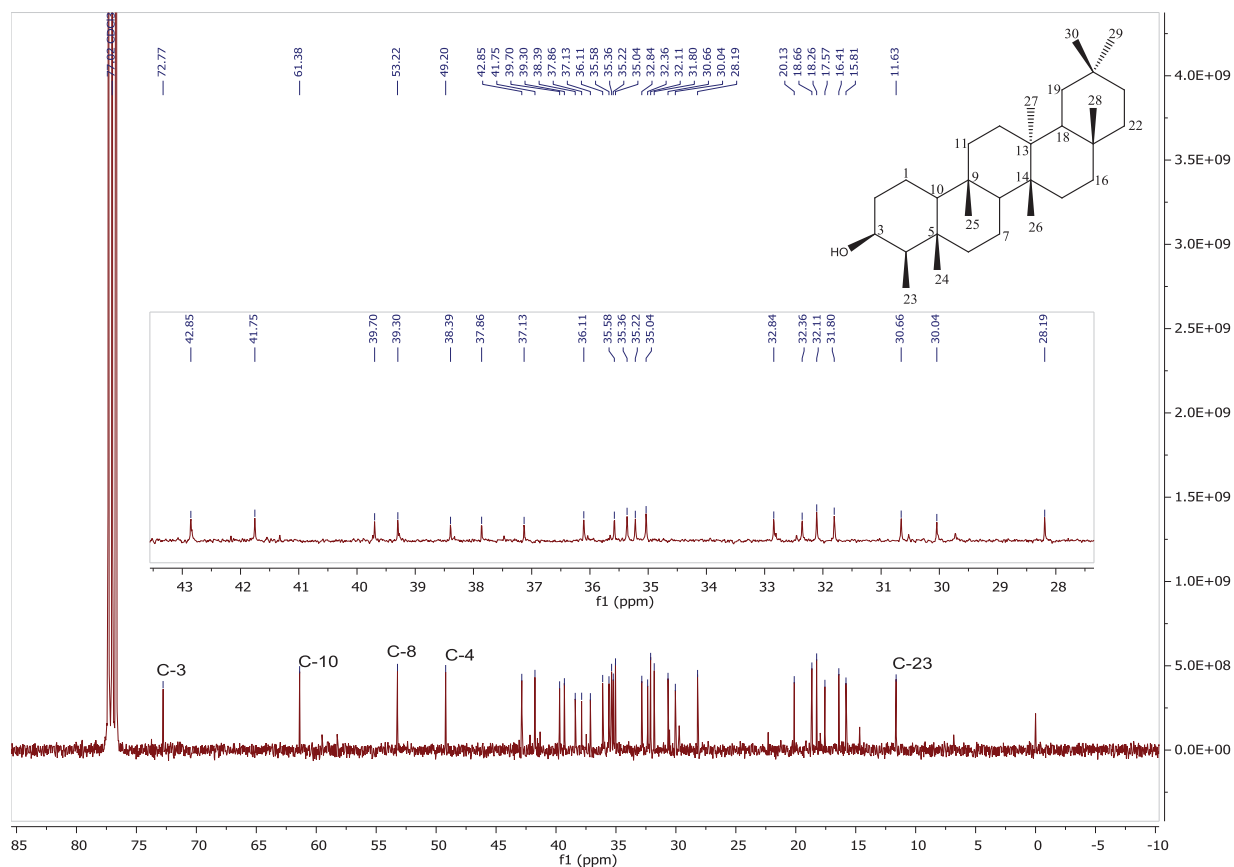


Figura A7. Espectro de RMN de ^{13}C [100 MHz; CDCl_3] do composto **23**: β -friedelinol.

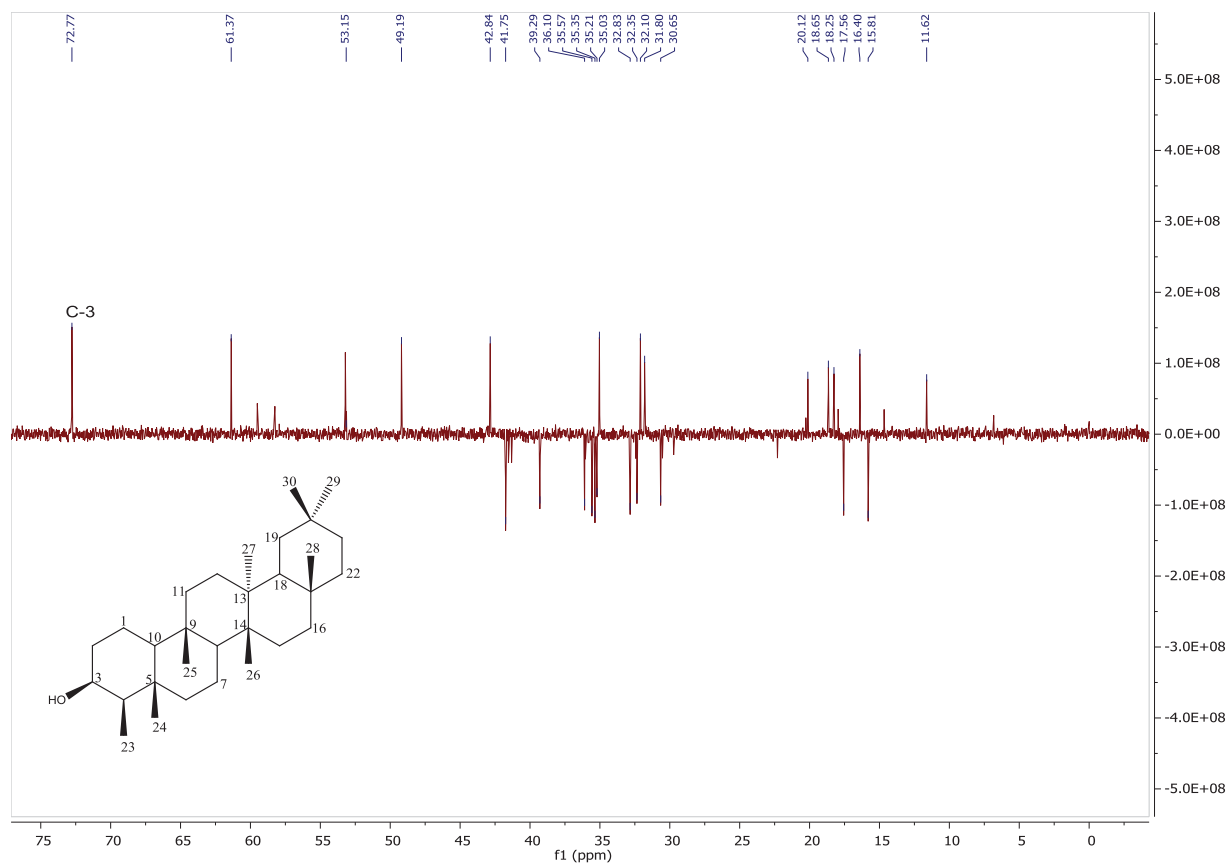


Figura A8. Subespectro de DEPT 135 [100 MHz; CDCl_3] do composto **23**: β -friedelinol.

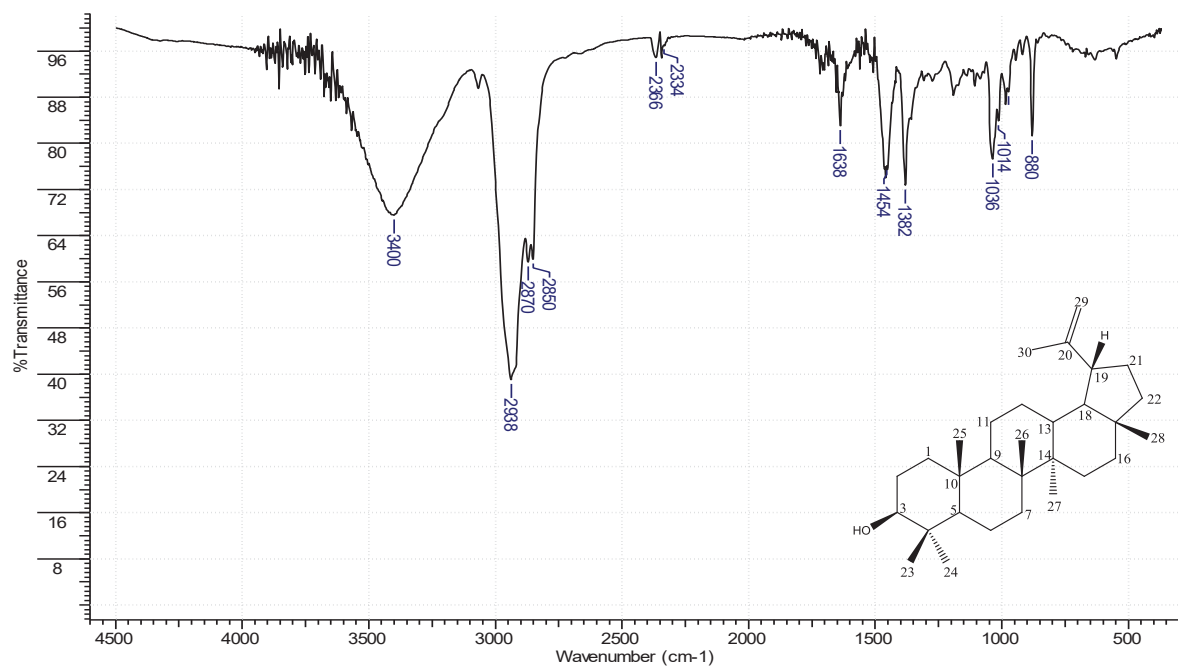


Figura A9. Espectro de absorção na região do infravermelho do composto **24** (KBr, cm⁻¹): lupeol.

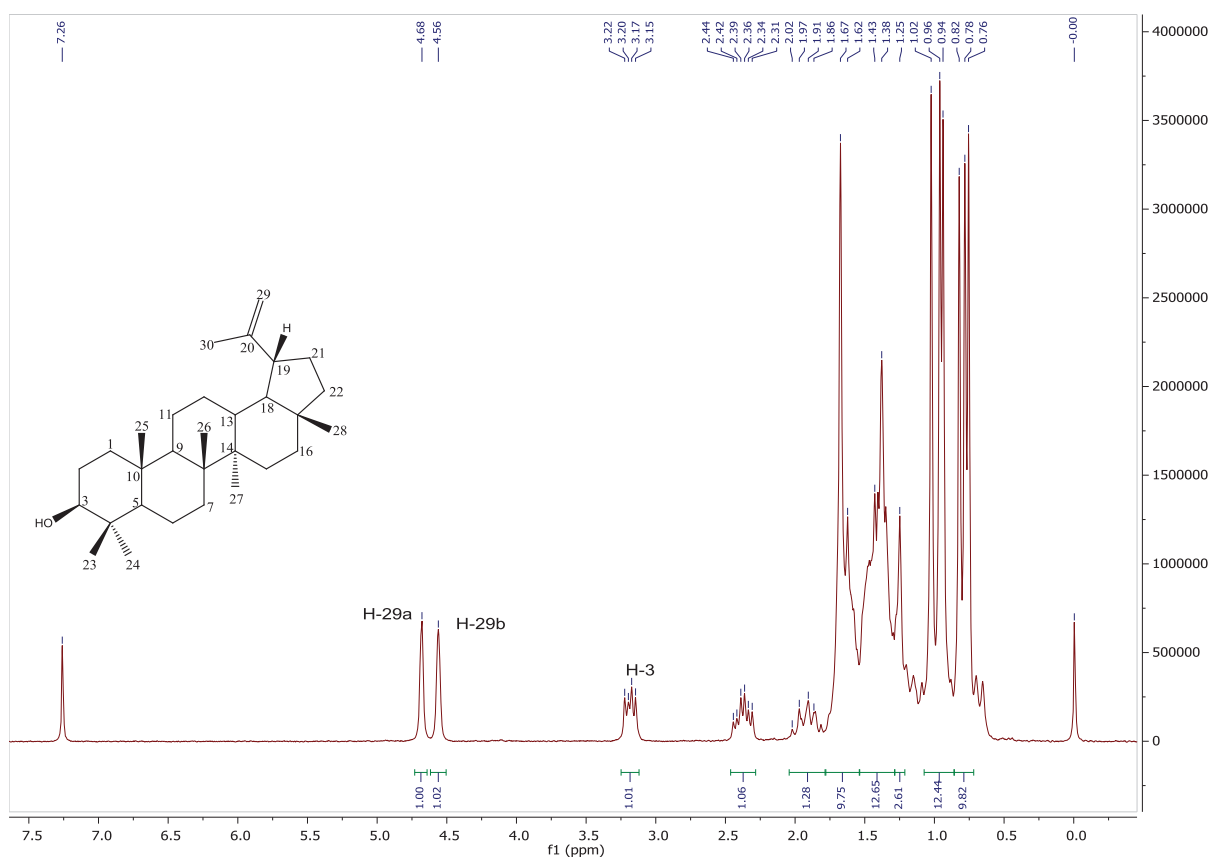


Figura A10. Espectro de RMN de ¹H [200 MHz; CDCl₃] do composto **24**: lupeol.

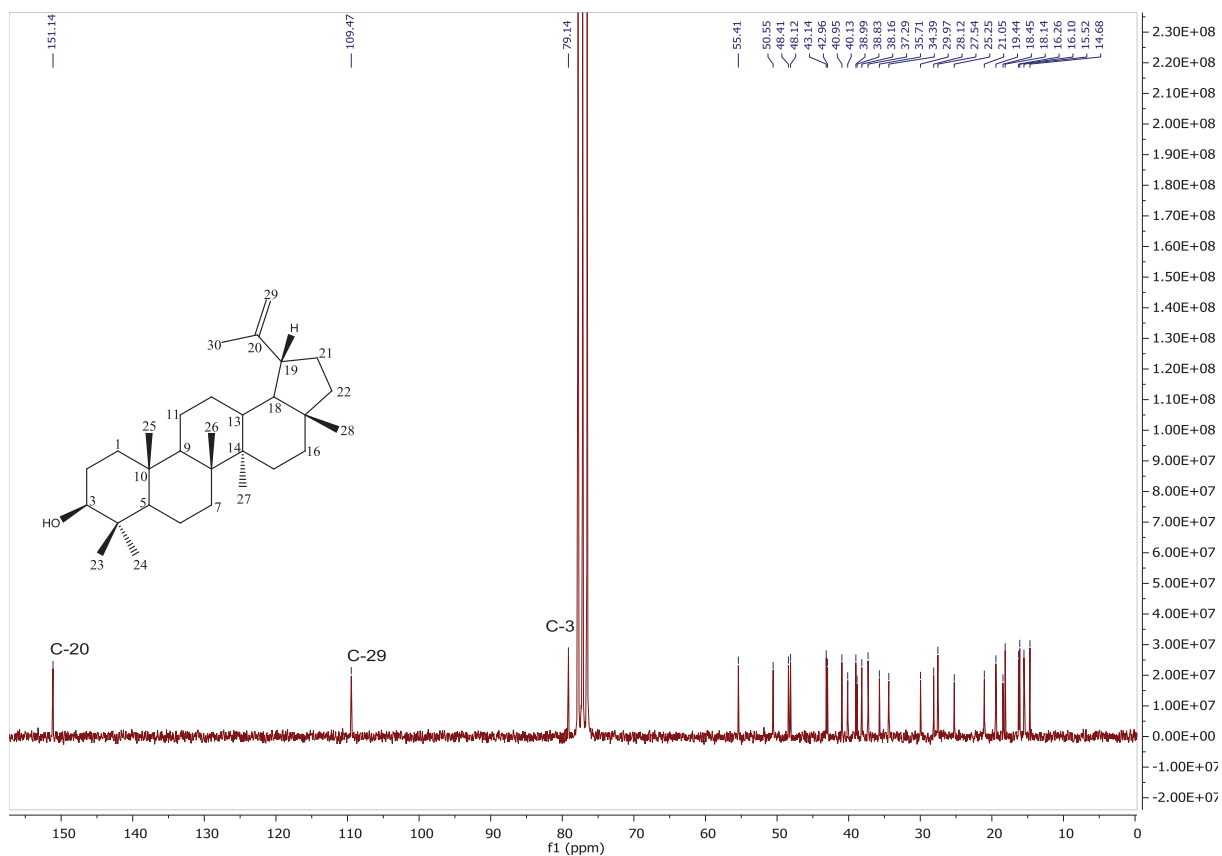


Figura A11. Espectro de RMN de ^{13}C [50 MHz; CDCl_3] do composto **24**: lupeol.

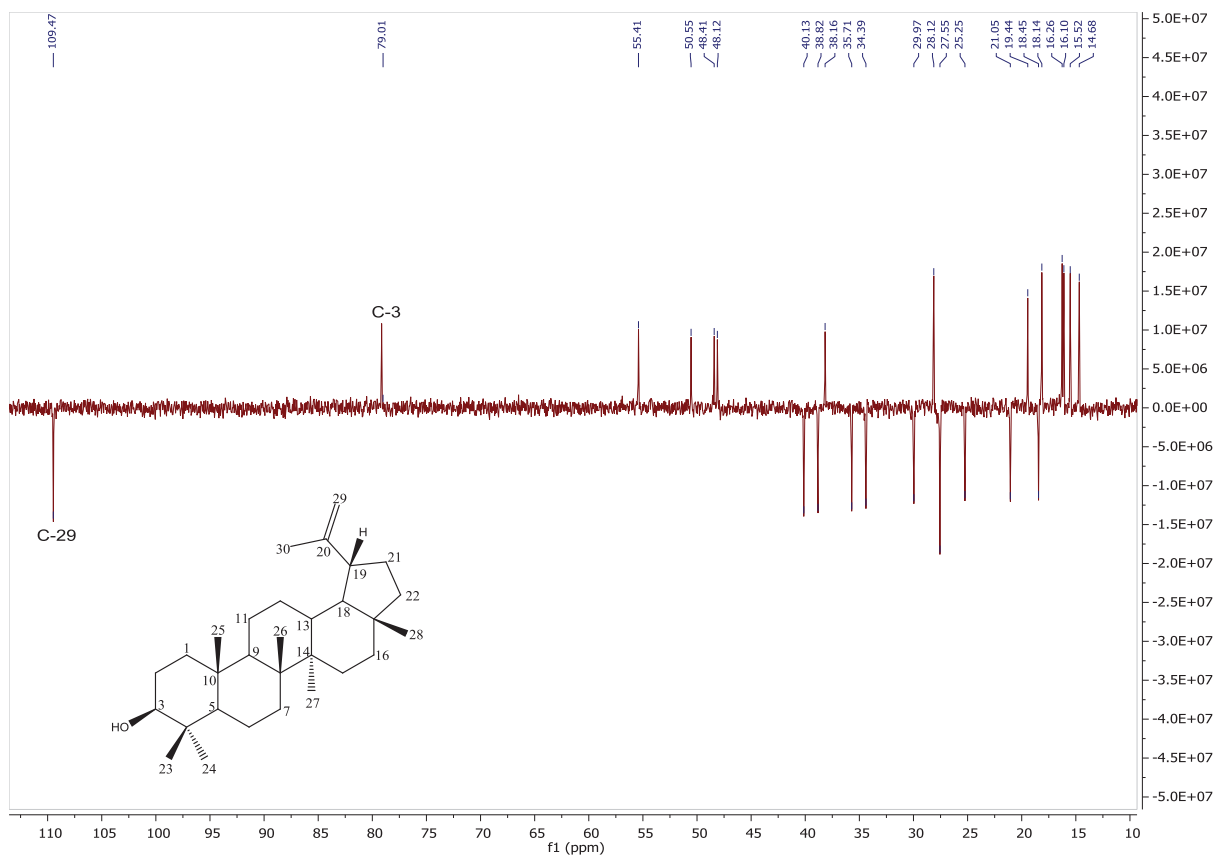


Figura A12. Subespectro de DEPT 135 [50 MHz; CDCl_3] do composto **24**: lupeol.

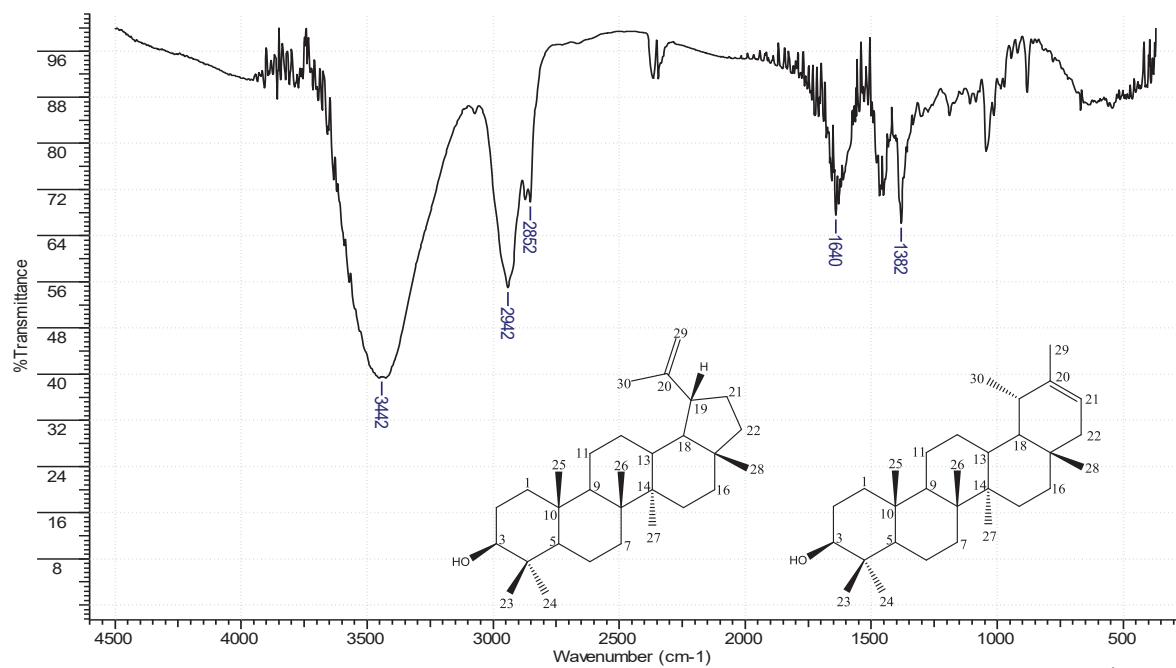


Figura A13. Espectro de absorção na região do infravermelho de EH-G4-3 (KBr, cm^{-1}): lupeol (24) e pseudotaraxasterol (25).

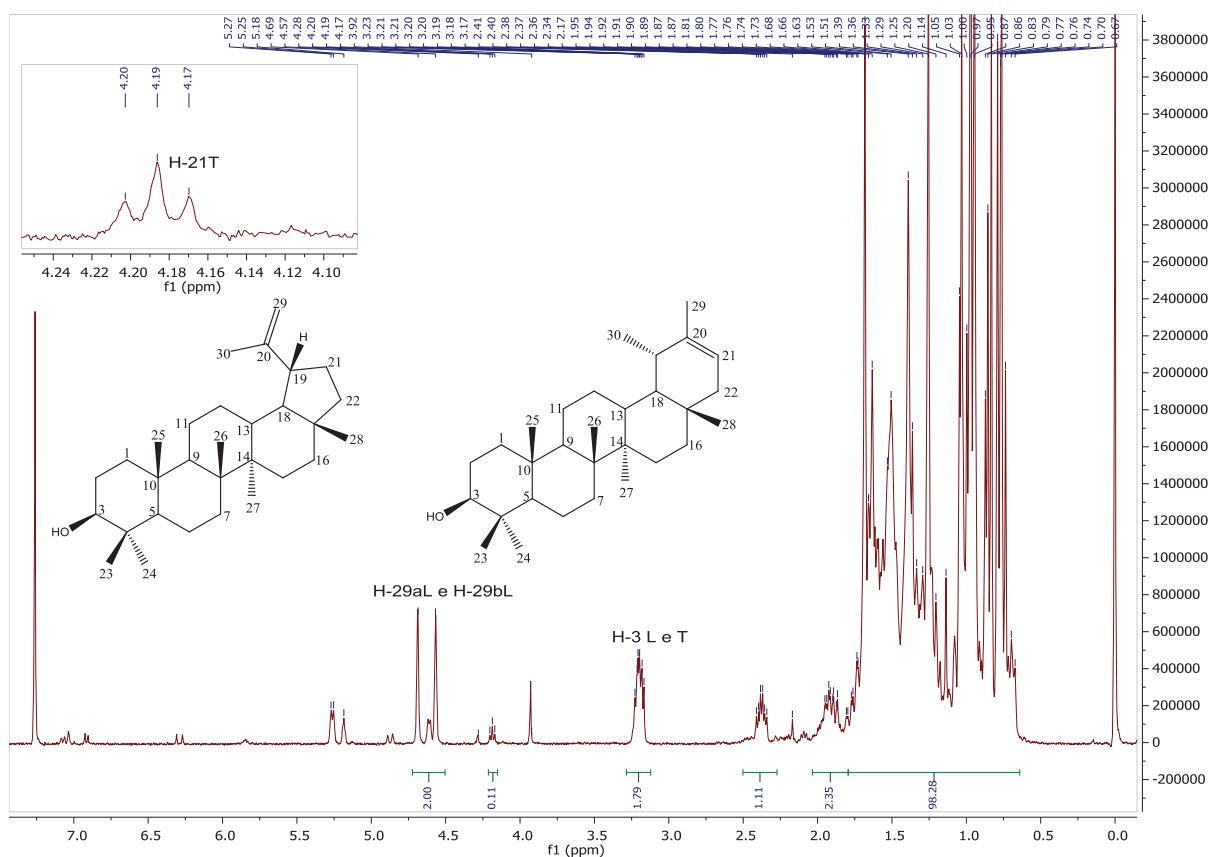


Figura A14. Espectro de RMN de ^1H [400 MHz; CDCl_3] de EH-G4-3: lupeol (24) e pseudotaraxasterol (25).

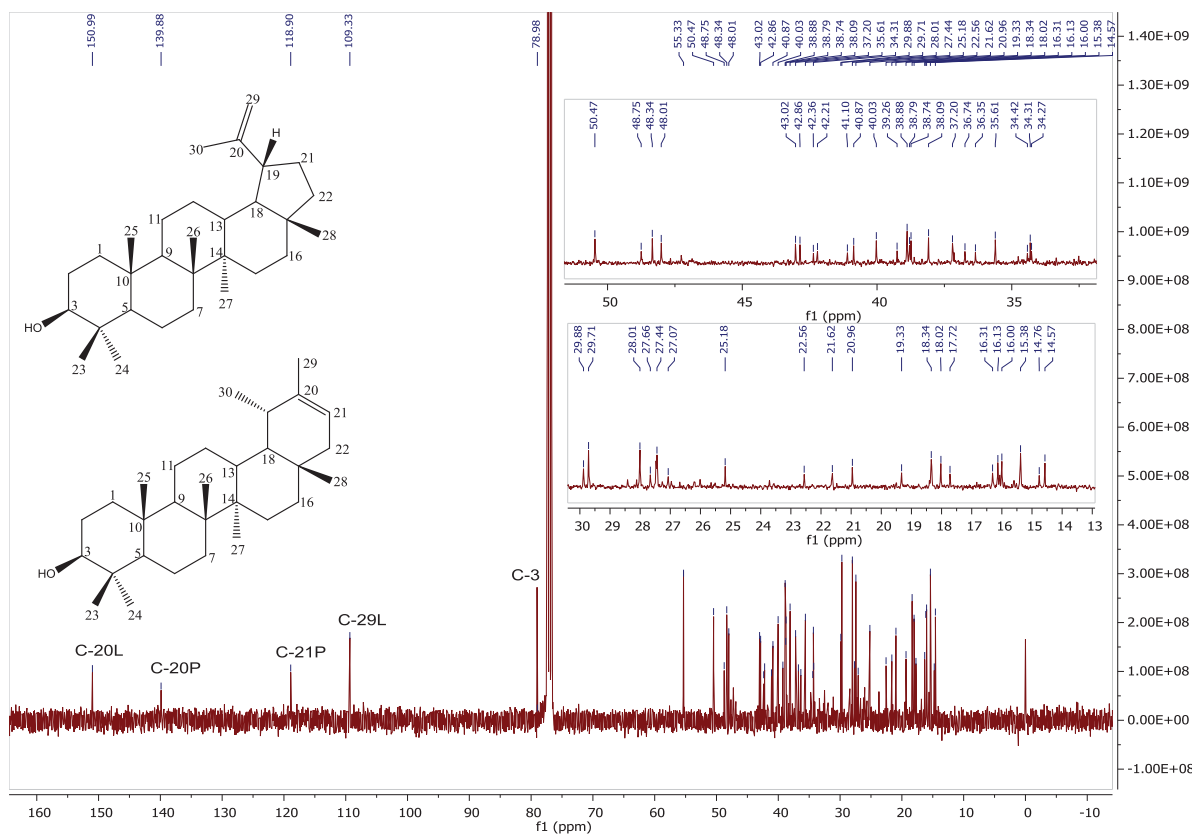


Figura A15. Espectro de RMN de ^{13}C [100 MHz; CDCl_3] de EH-G4-3: lupeol (24) e pseudotaraxasterol (25).

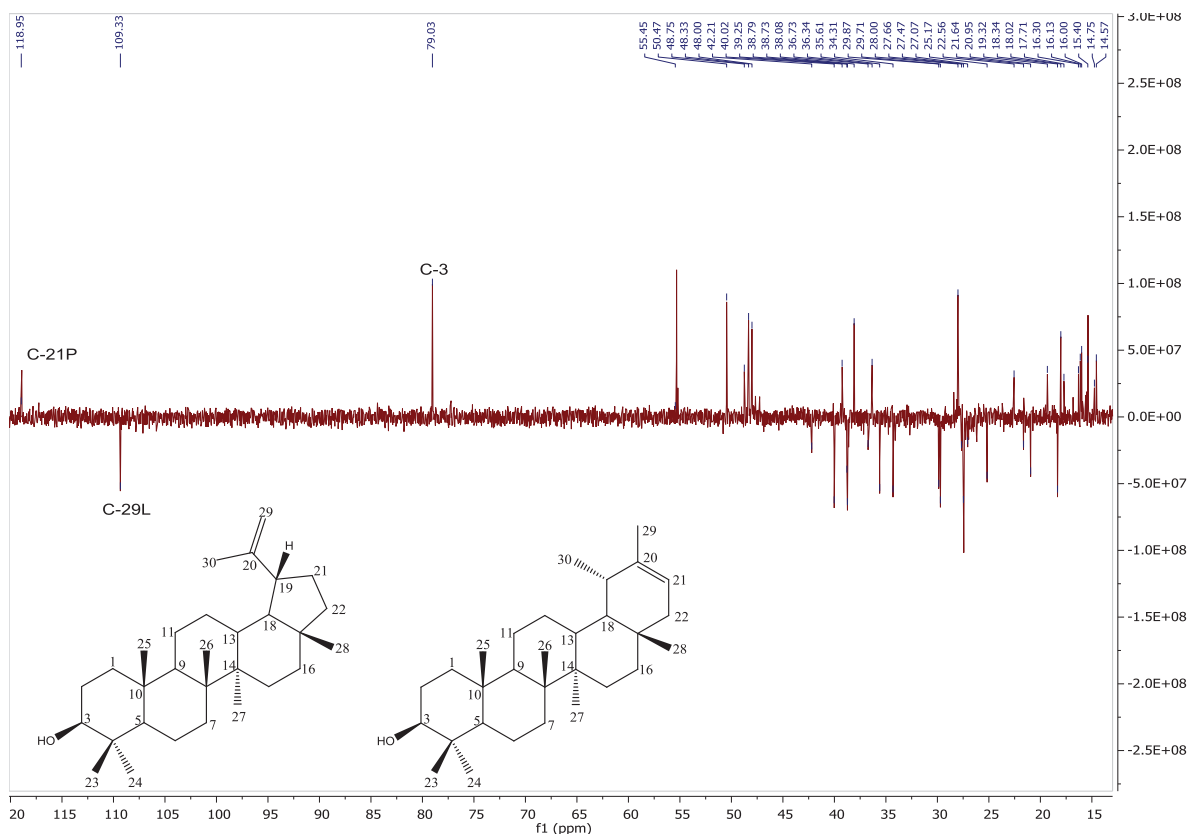


Figura A16. Subespectro de DEPT 135 [100 MHz; CDCl_3] de EH-G4-3: lupeol (24) e pseudotaraxasterol (25).

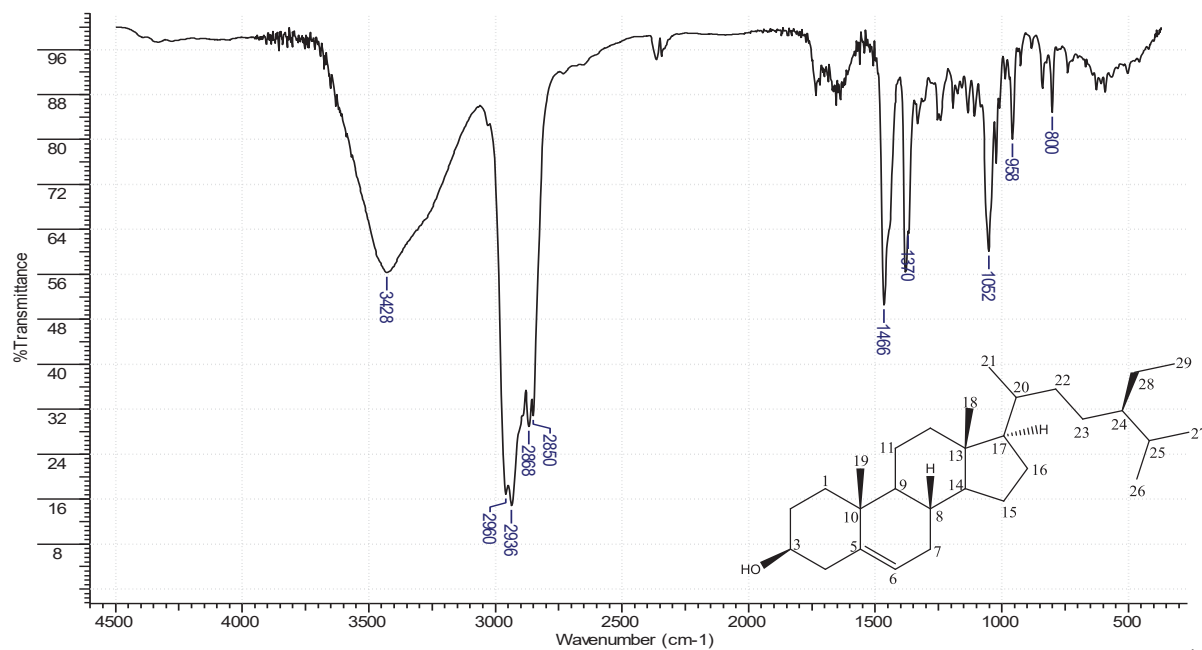


Figura A17. Espectro de absorção na região do infravermelho do composto **26** (KBr, cm⁻¹): β -sitosterol.

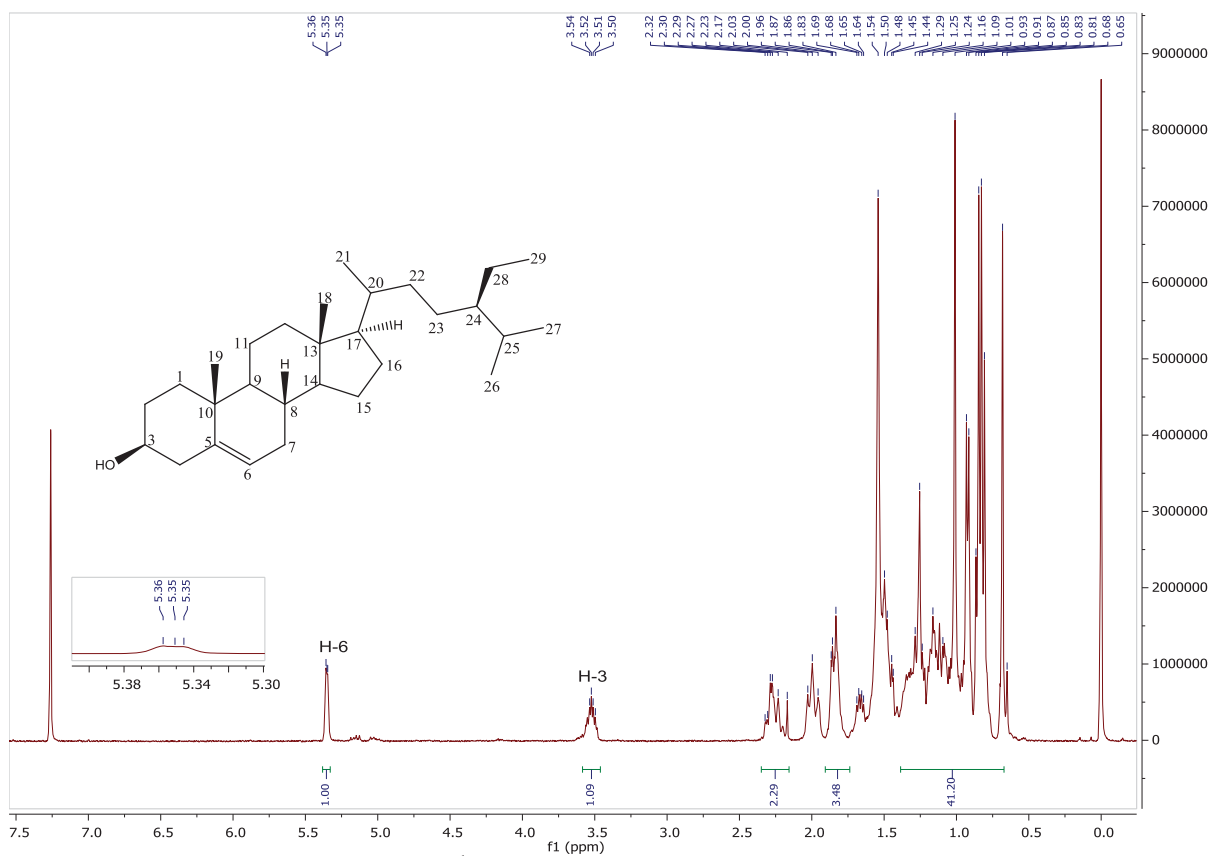


Figura A18. Espectro de RMN de ¹H [200 MHz; CDCl₃] do composto **26**: β -sitosterol.

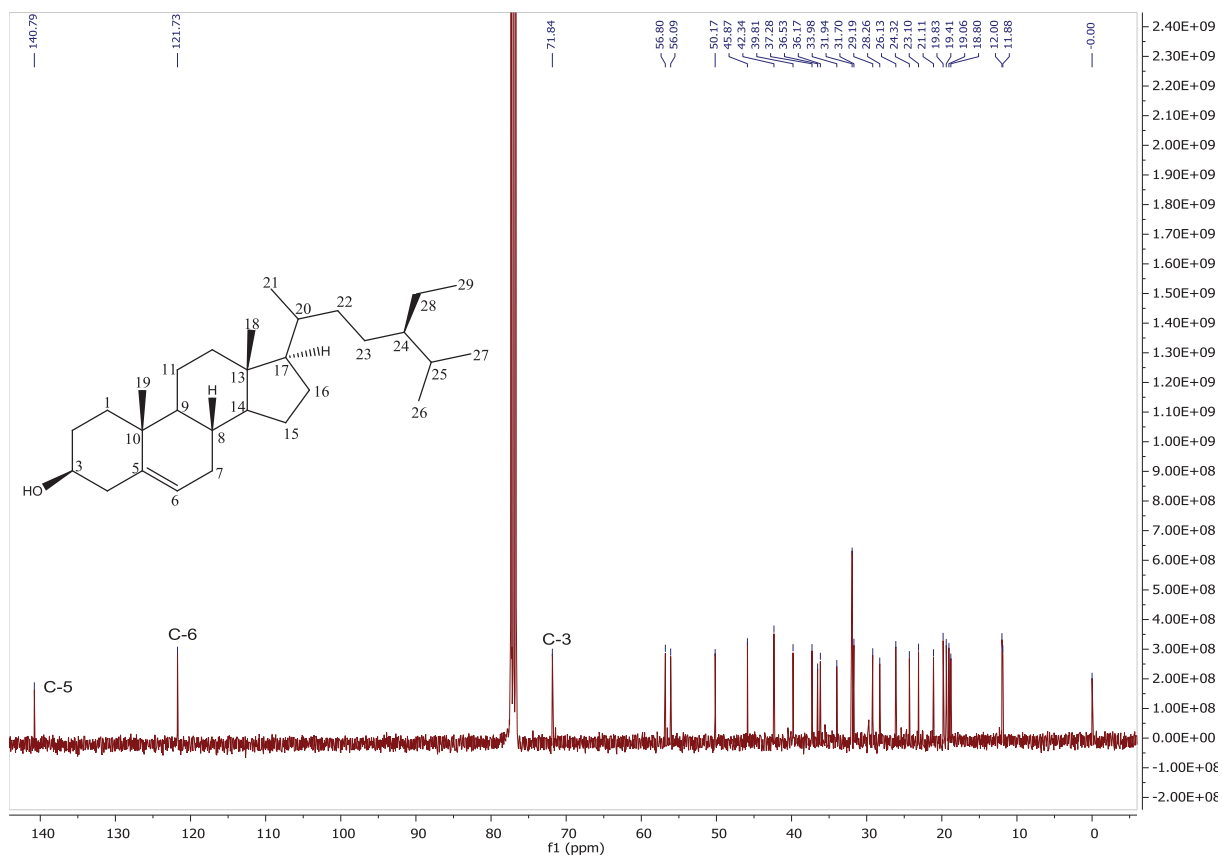


Figura A19. Espectro de RMN de ^{13}C [50 MHz; CDCl_3] do composto **26**: β -sitosterol.

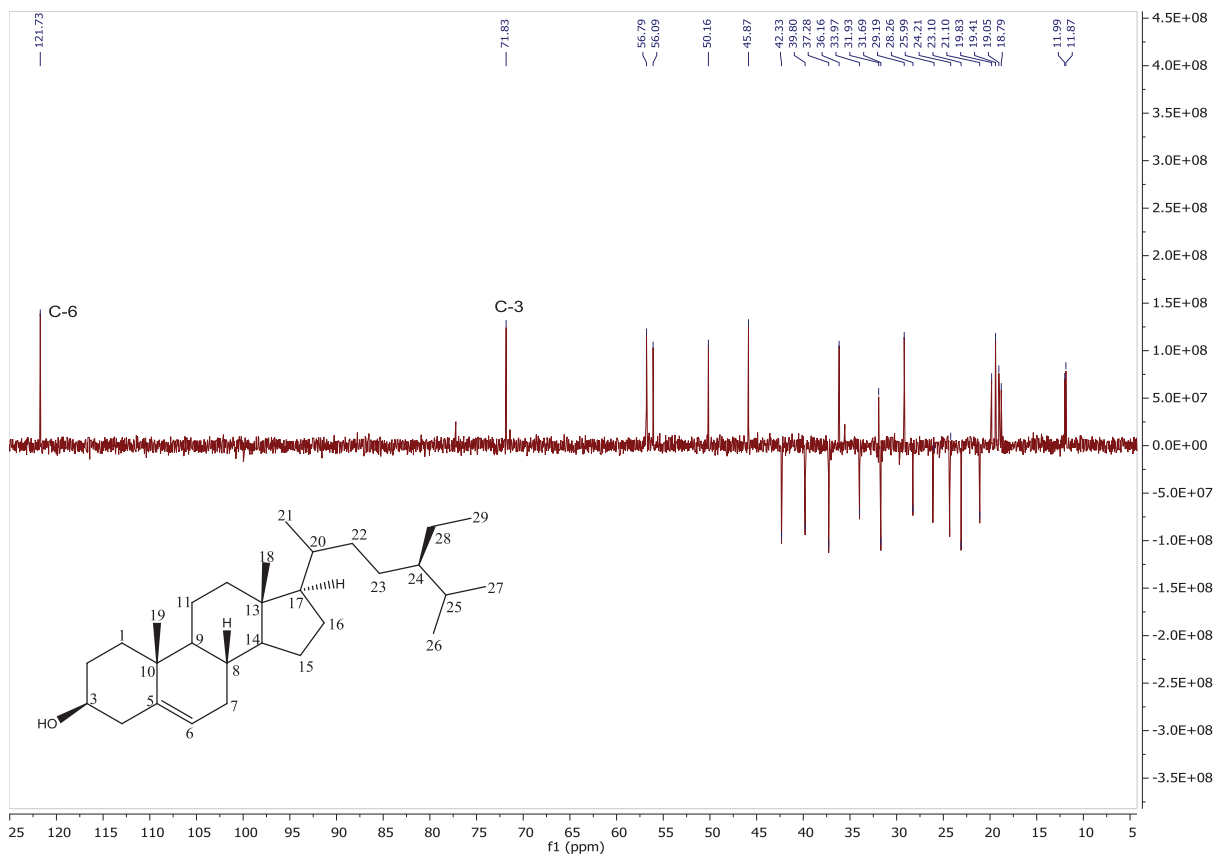
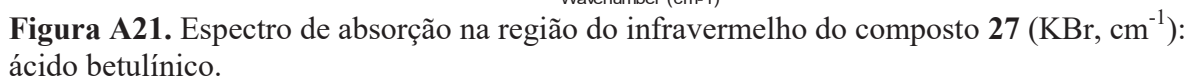


Figura A20. Subespectro de DEPT 135 [50 MHz; CDCl_3] do composto **26**: β -sitosterol.



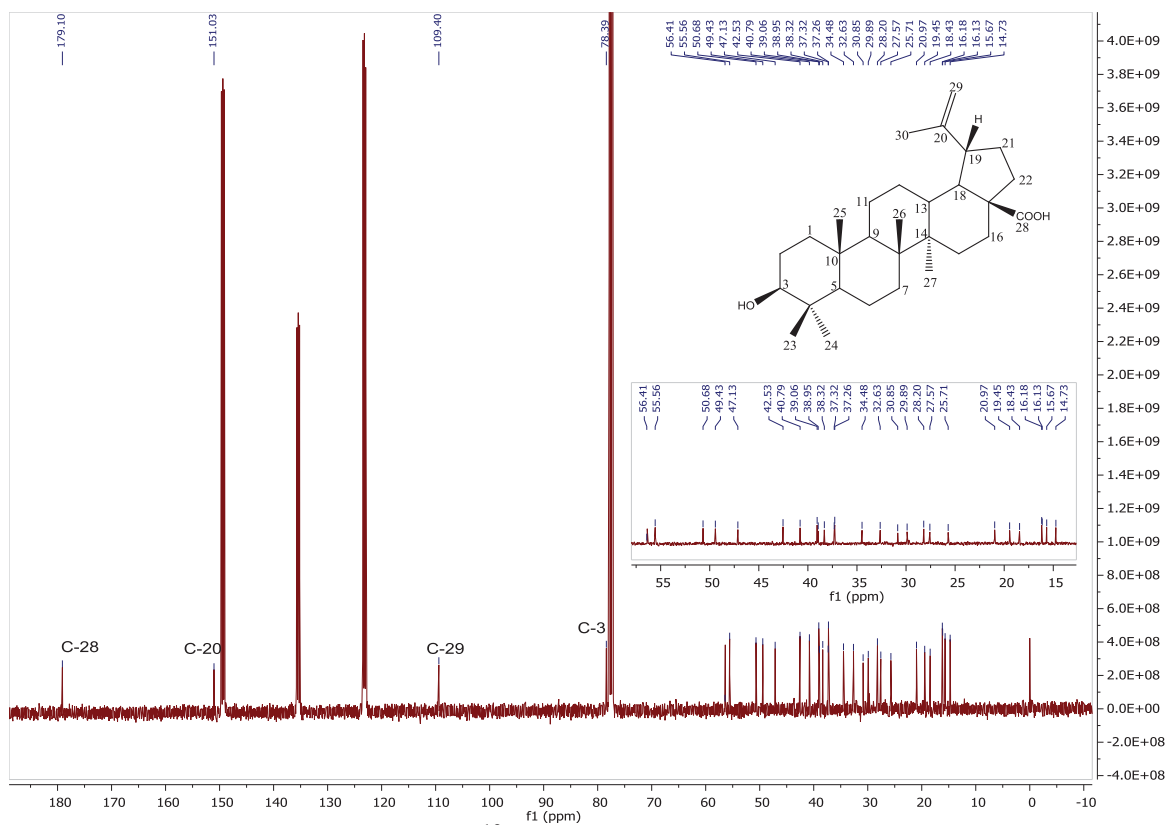


Figura A23. Espectro de RMN de ^{13}C [100 MHz; CDCl_3 e $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$] do composto **27**: ácido betulínico.

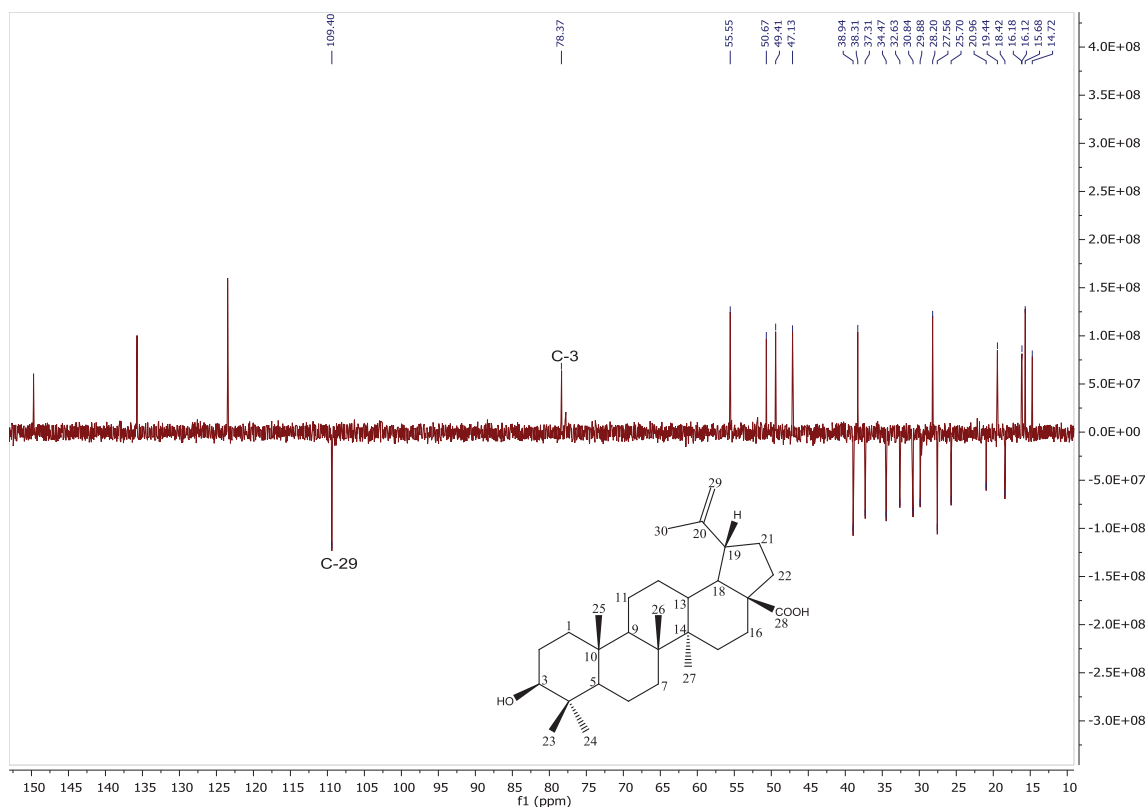


Figura A24. Subespectro de DEPT 135 [100 MHz; CDCl_3 e $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$] do composto **27**: ácido betulínico.

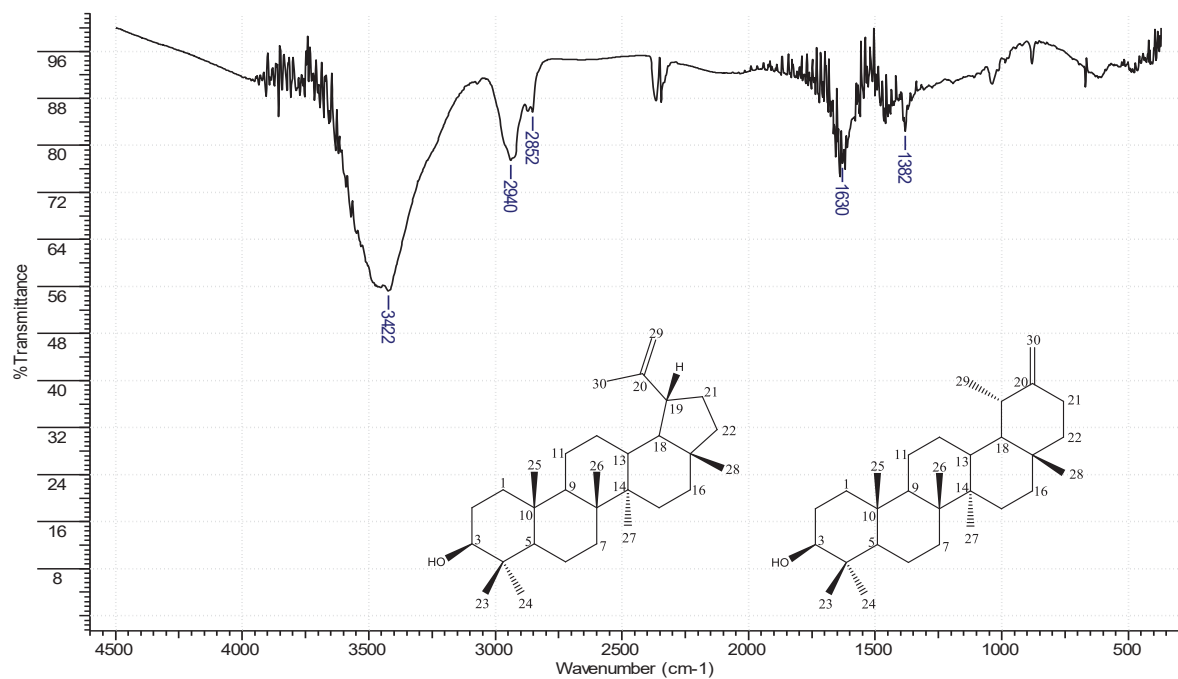


Figura A25. Espectro de absorção na região do infravermelho de EE-FD-3: lupeol (24) e taraxasterol (28).

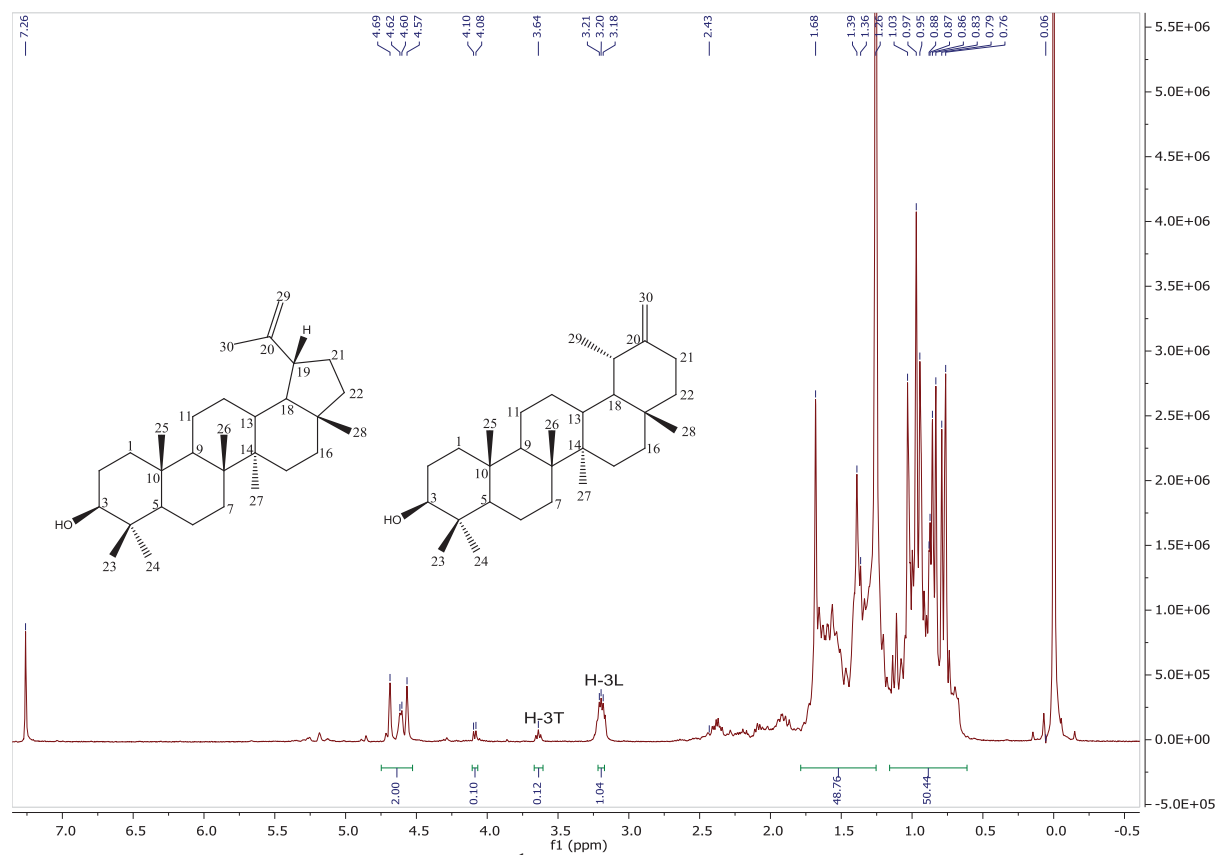


Figura A26. Espectro de RMN de ¹H [400 MHz; CDCl₃] de EE-FD-3: lupeol (24) e taraxasterol (28).

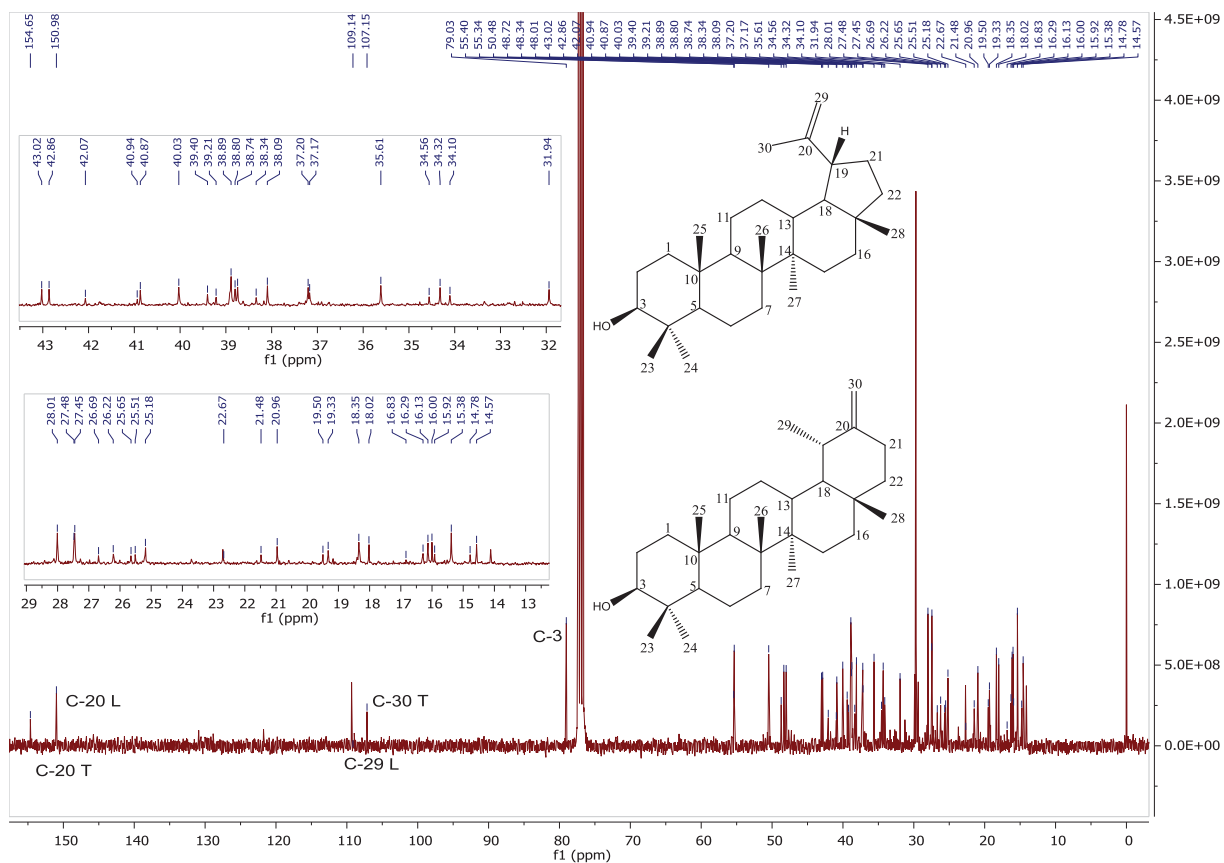


Figura A27. Espectro de RMN de ^{13}C [100 MHz; CDCl_3] de EE-FD-3: lupeol (24) e taraxasterol (28).

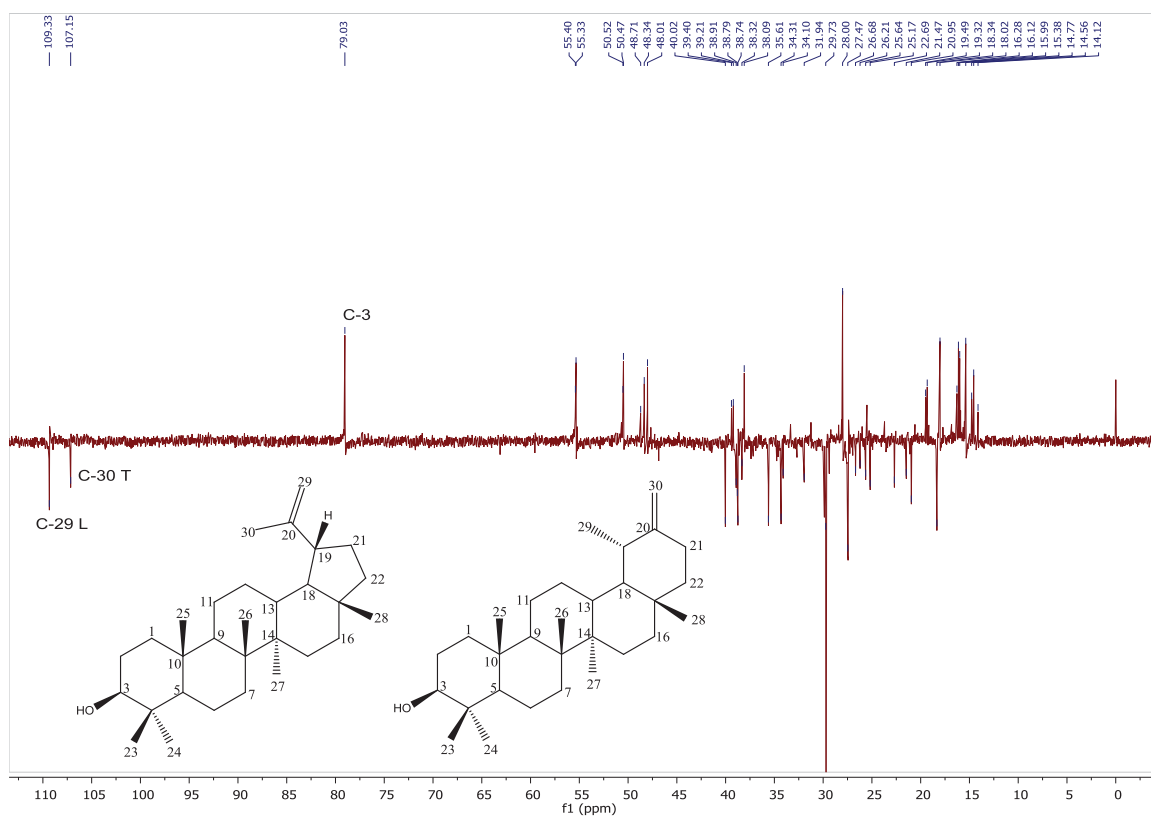


Figura A28. Subespectro de DEPT 135 [100 MHz; CDCl_3] de EE-FD-3: lupeol (24) e taraxasterol (28).

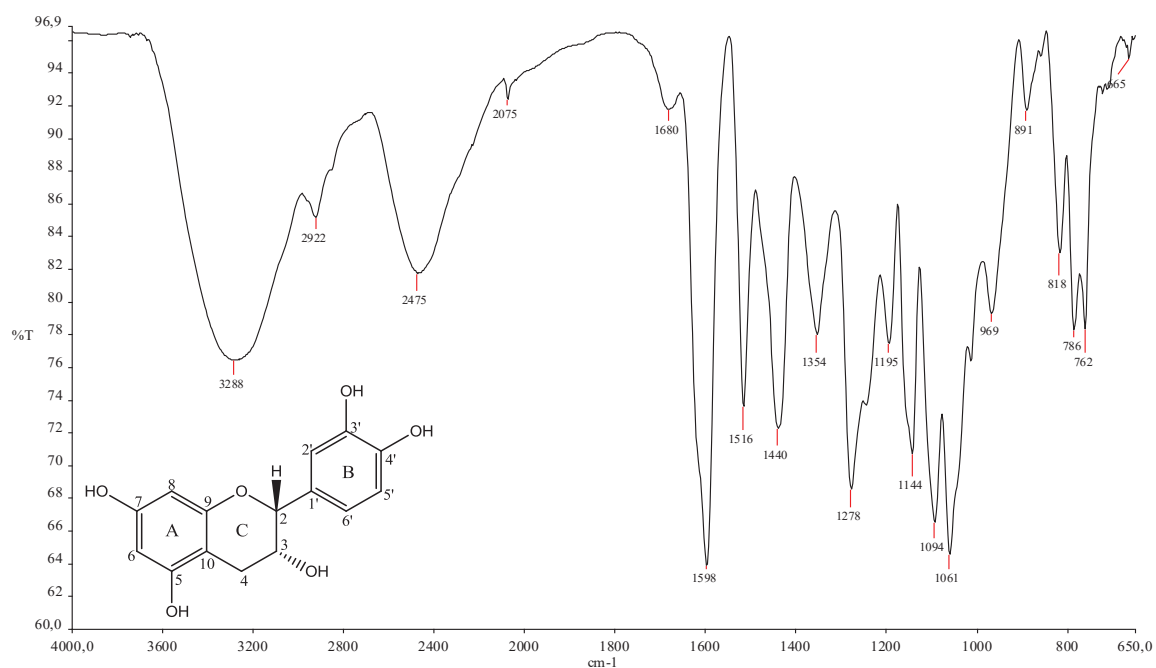


Figura A29. Espectro de absorção na região do infravermelho do composto **29** (ATR, cm^{-1}): (-)-epicatequina.

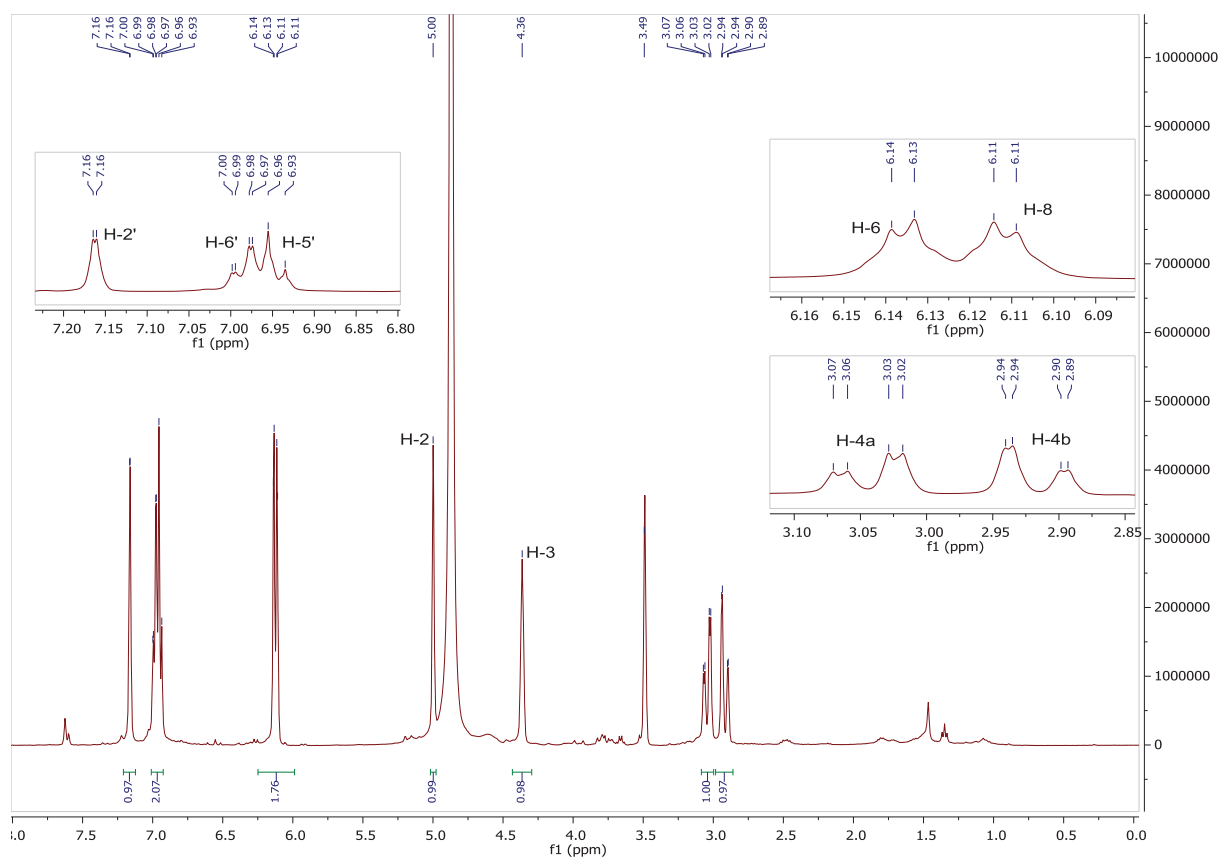


Figura A30. Espectro de RMN de ^1H [400 MHz; CD_3OD] a 40 °C do composto **29**: (-)-epicatequina.

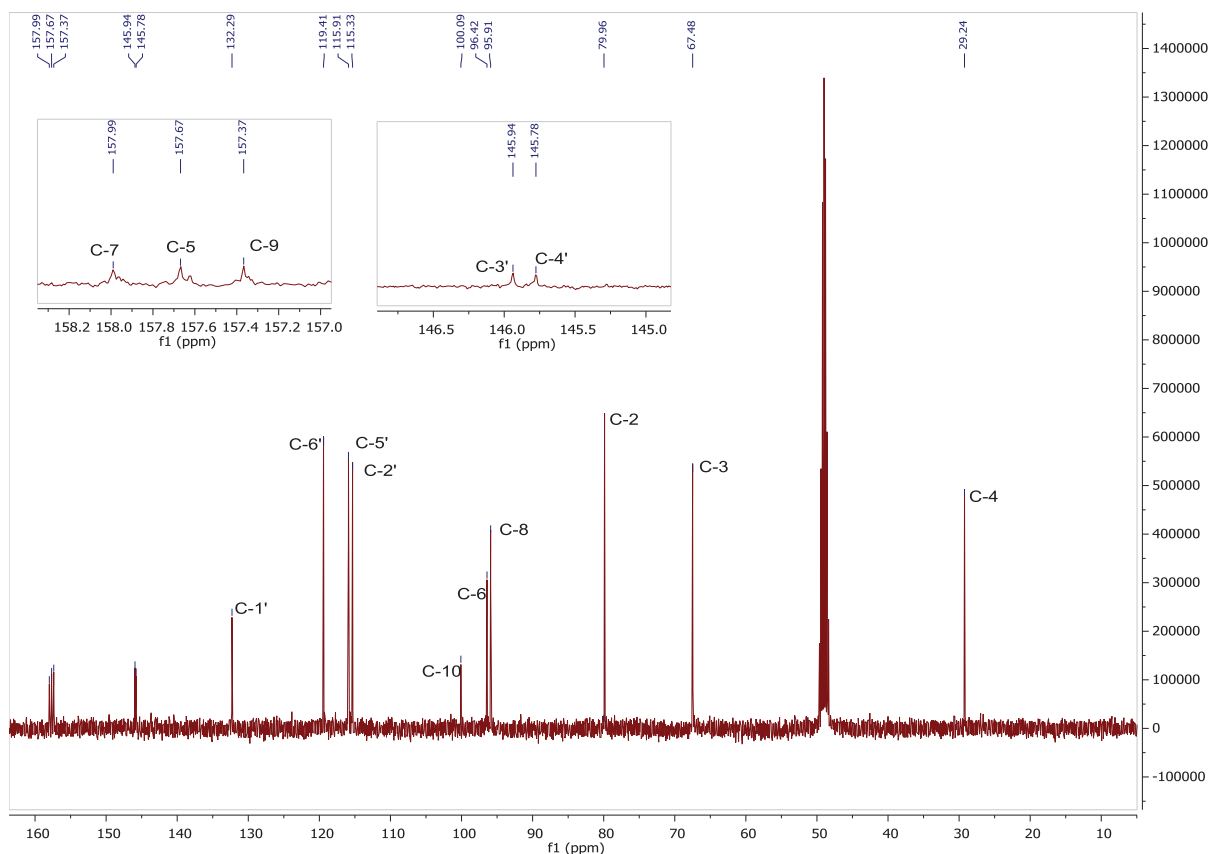


Figura A31. Espectro de RMN de ^{13}C [100 MHz; CD_3OD] do composto **29**: (-)-epicatequina.

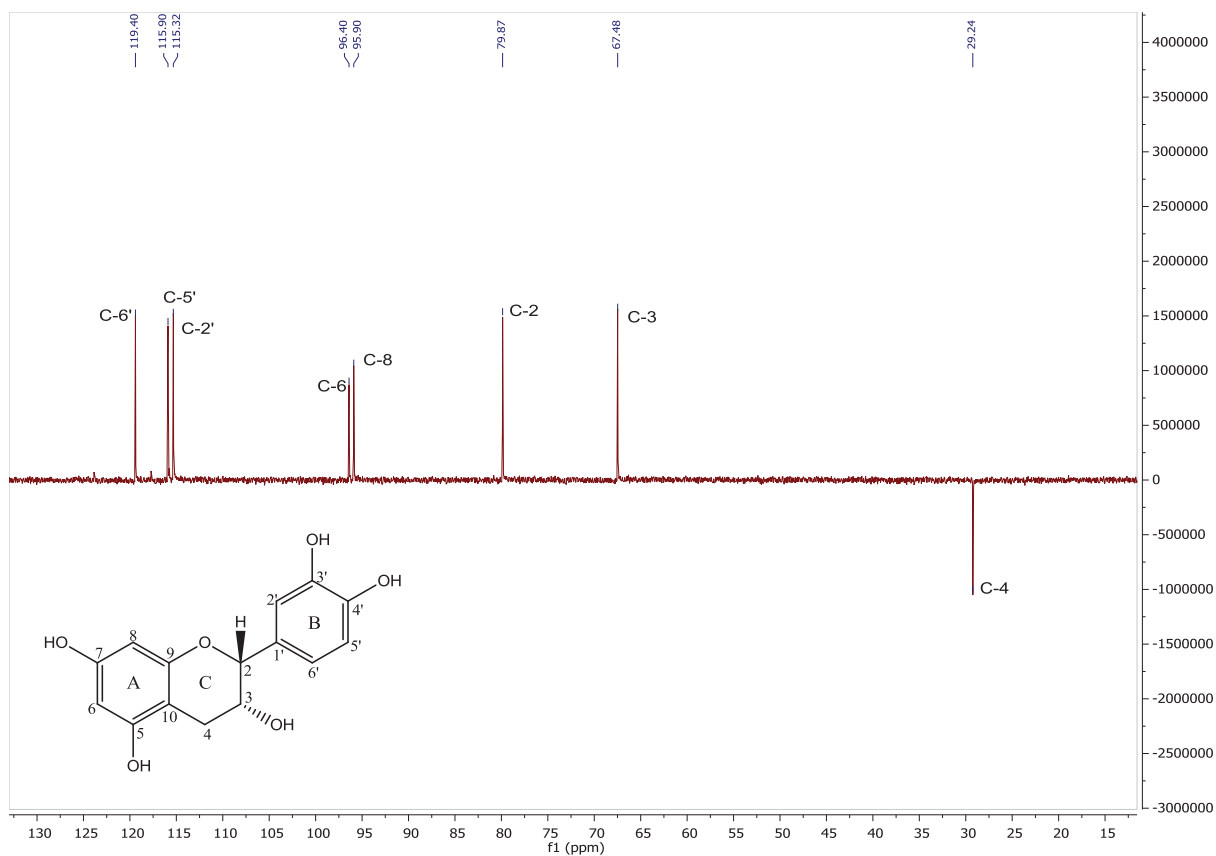


Figura A32. Subespectro de DEPT 135 do composto **29** [100 MHz; CD_3OD]: (-)-epicatequina.

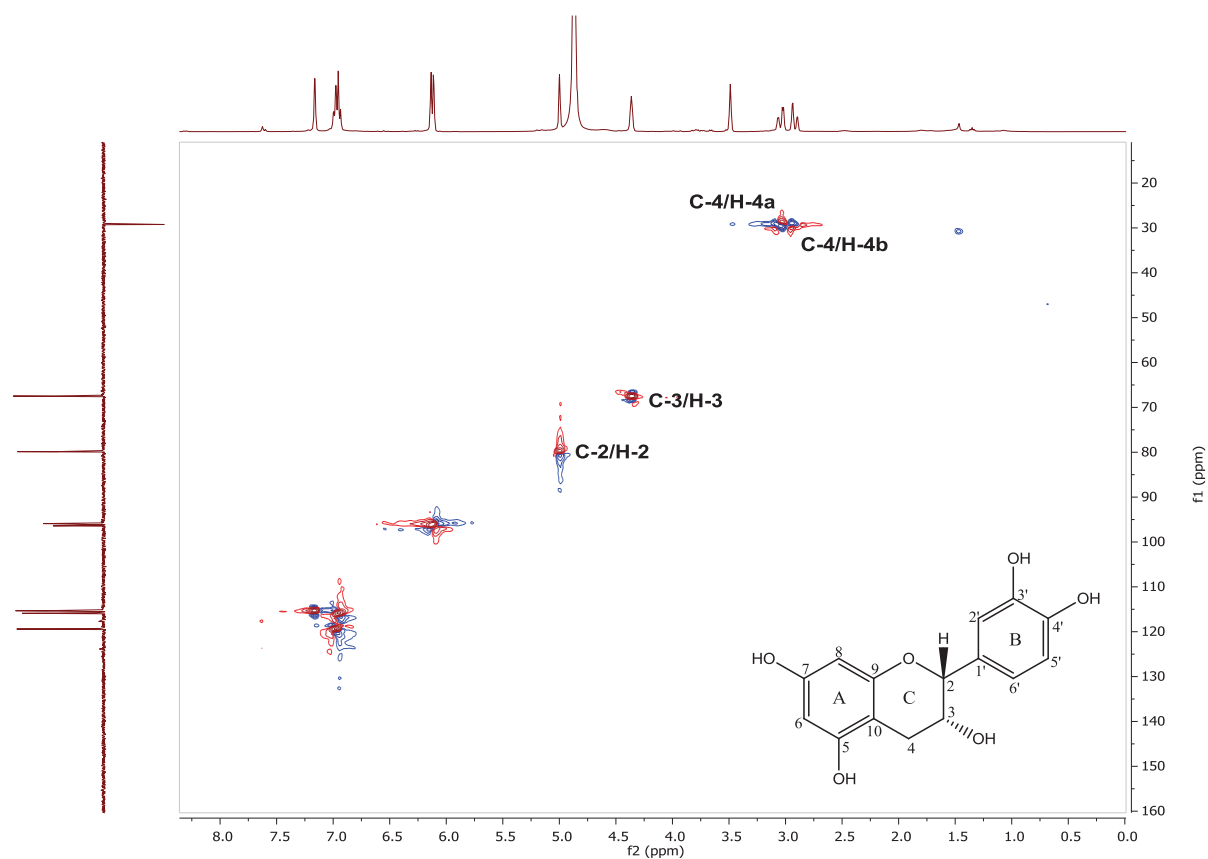


Figura A33. Mapa de contornos HSQC do composto **29** [400 MHz; CD₃OD]: (-)-epicatequina.

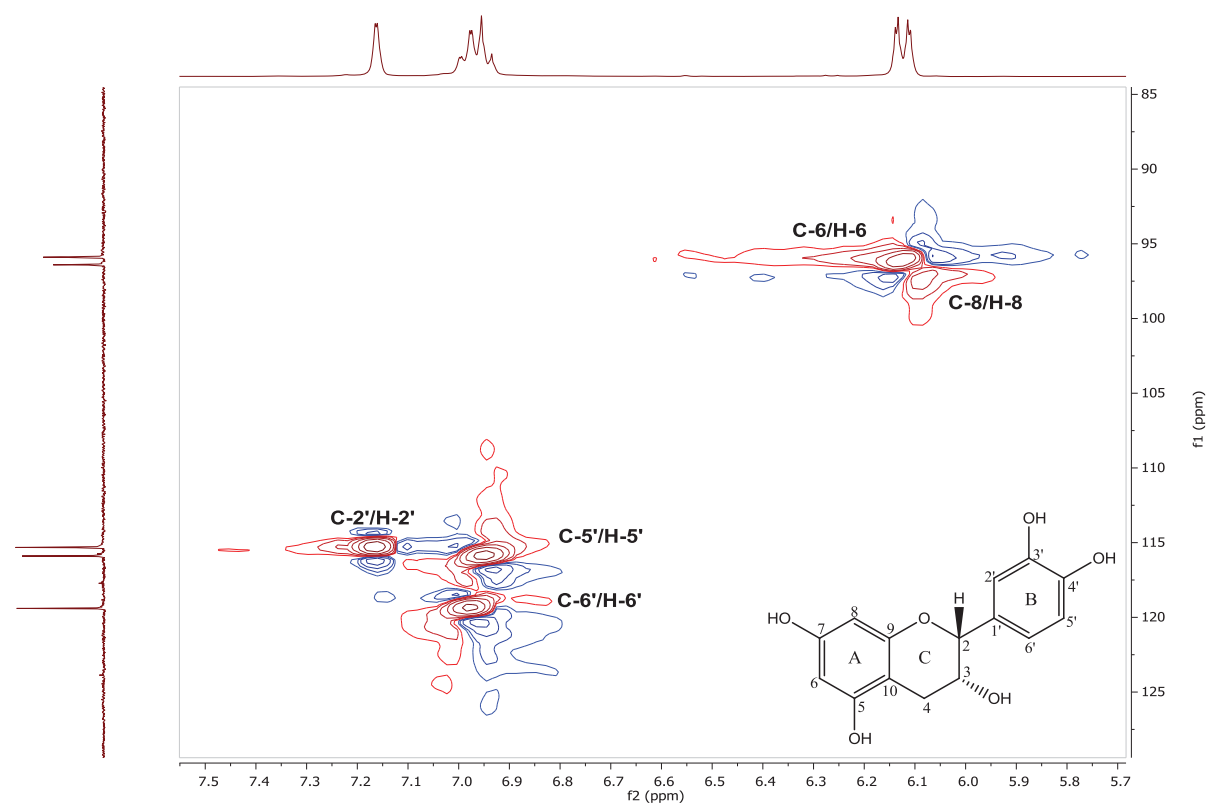


Figura A34. Expansão do mapa de contornos HSQC do composto **29** [400 MHz; CD₃OD]: (-)-epicatequina.

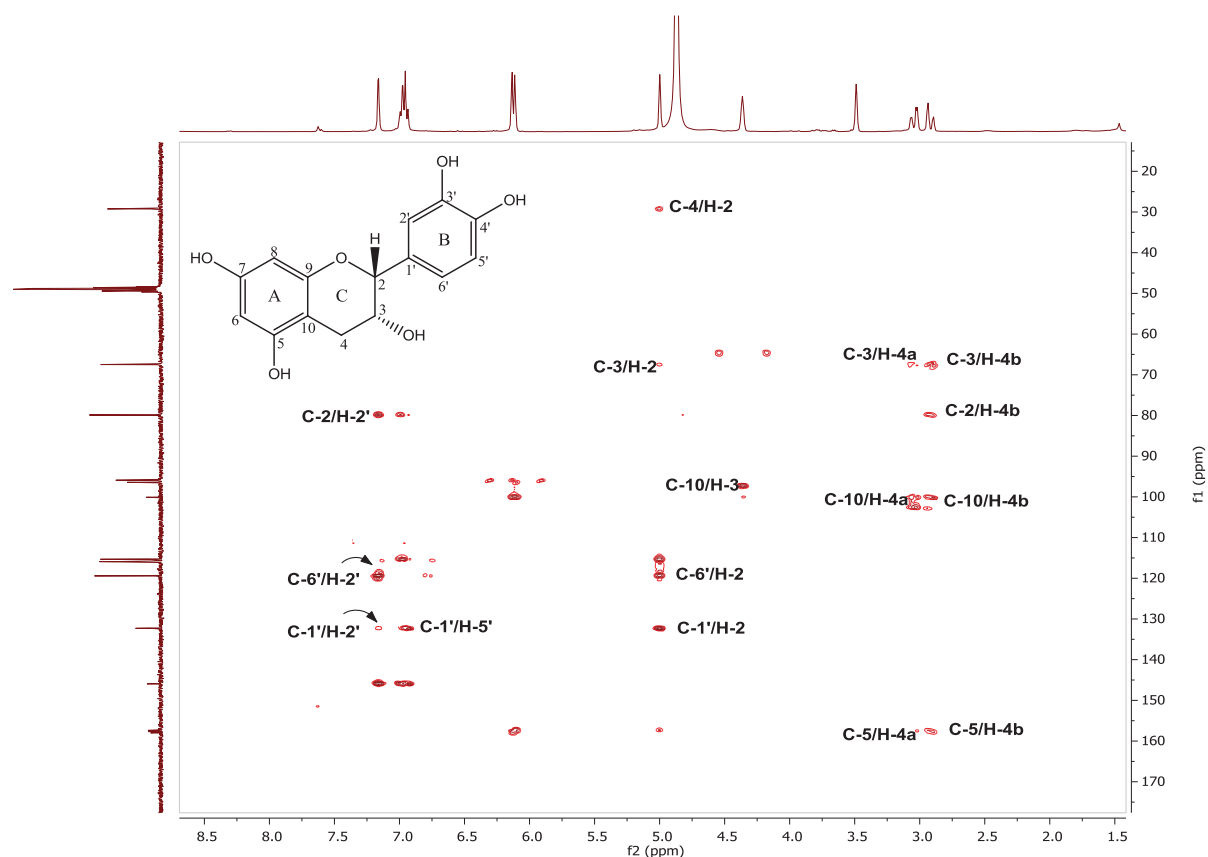


Figura A35. Mapa de contornos HMBC do composto **29** [400 MHz; CD₃OD]: (-)-epicatequina.

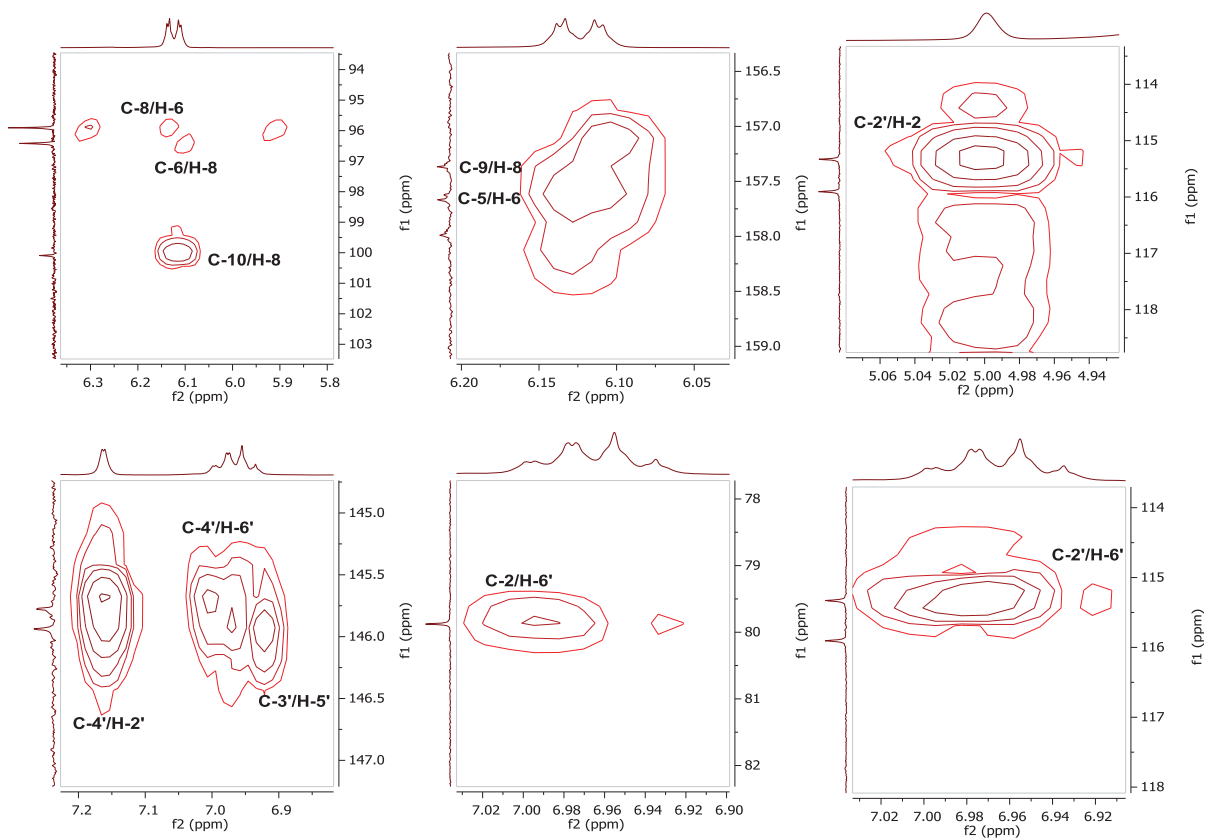


Figura A36. Expansão do mapa de contorno HMBC do composto **29** [400 MHz; CD₃OD]: (-)-epicatequina.

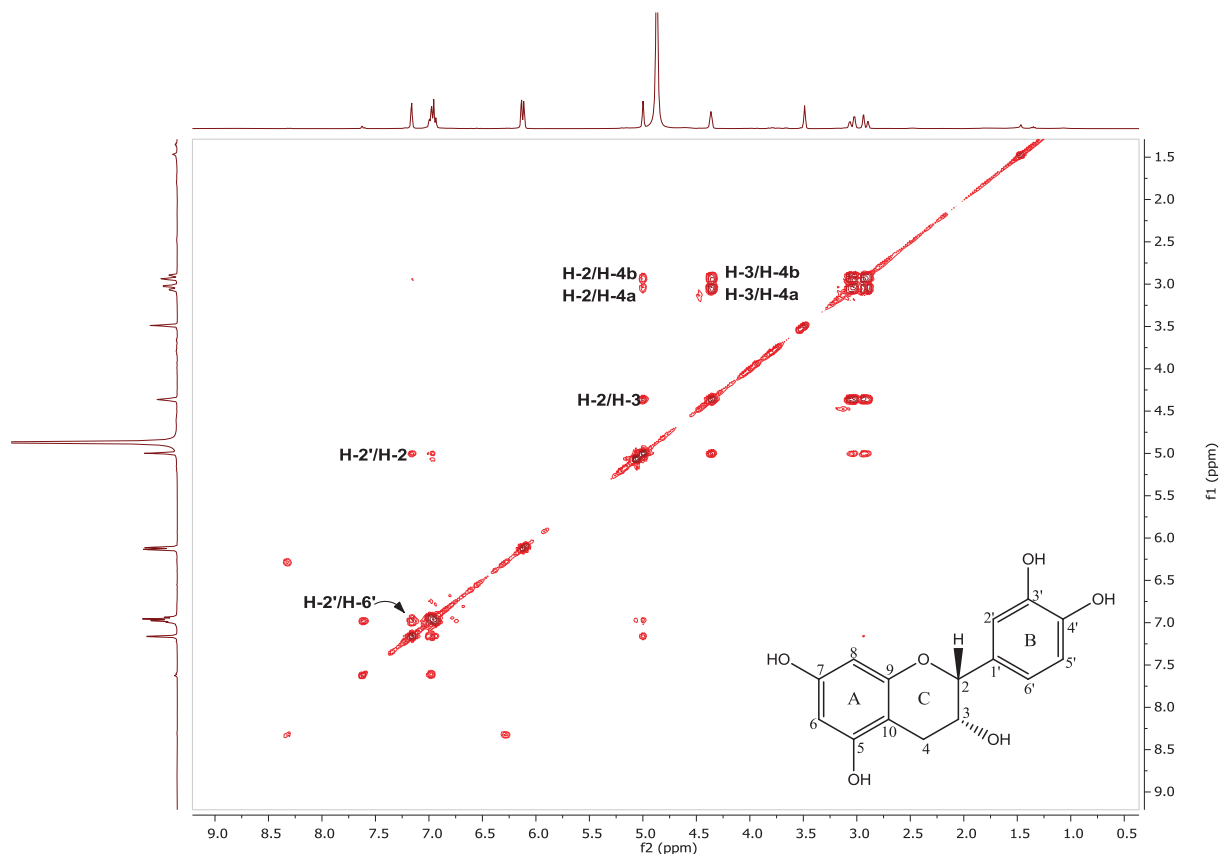


Figura A37. Mapa de contornos COSY do composto **29** [400 MHz; CD₃OD]: (-)-epicatequina.

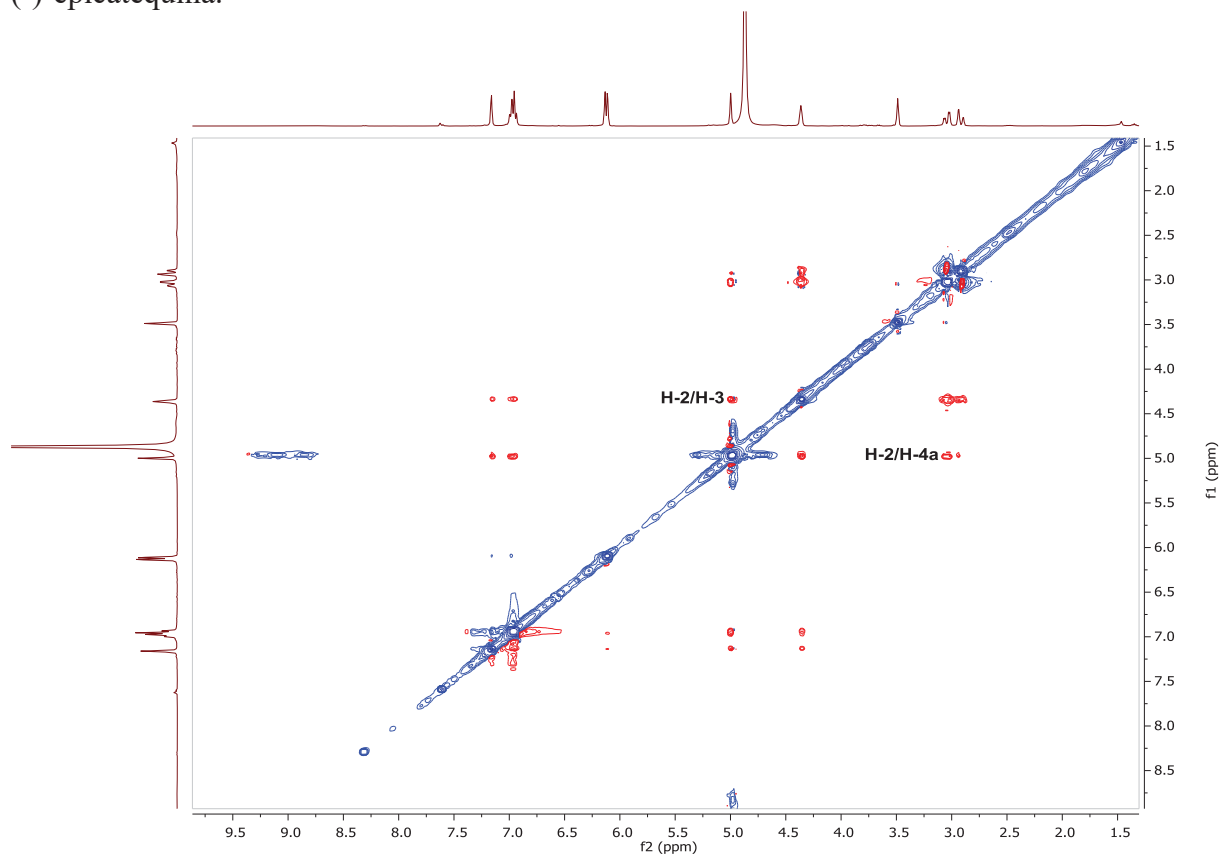


Figura A38. Mapa de contornos NOESY do composto **29** [400 MHz; CD₃OD]: (-)-epicatequina.

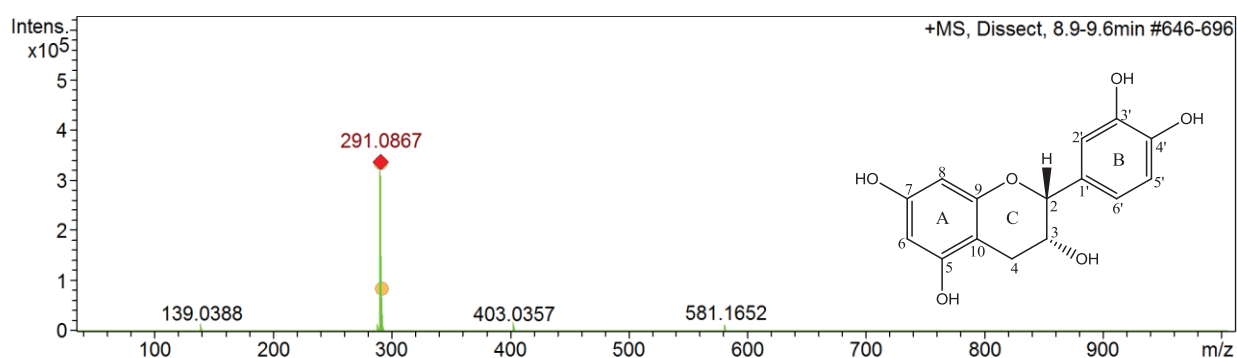


Figura A39. Espectro de HR-ESI-MS-(+) do composto **29**: (-)-epicatequina.

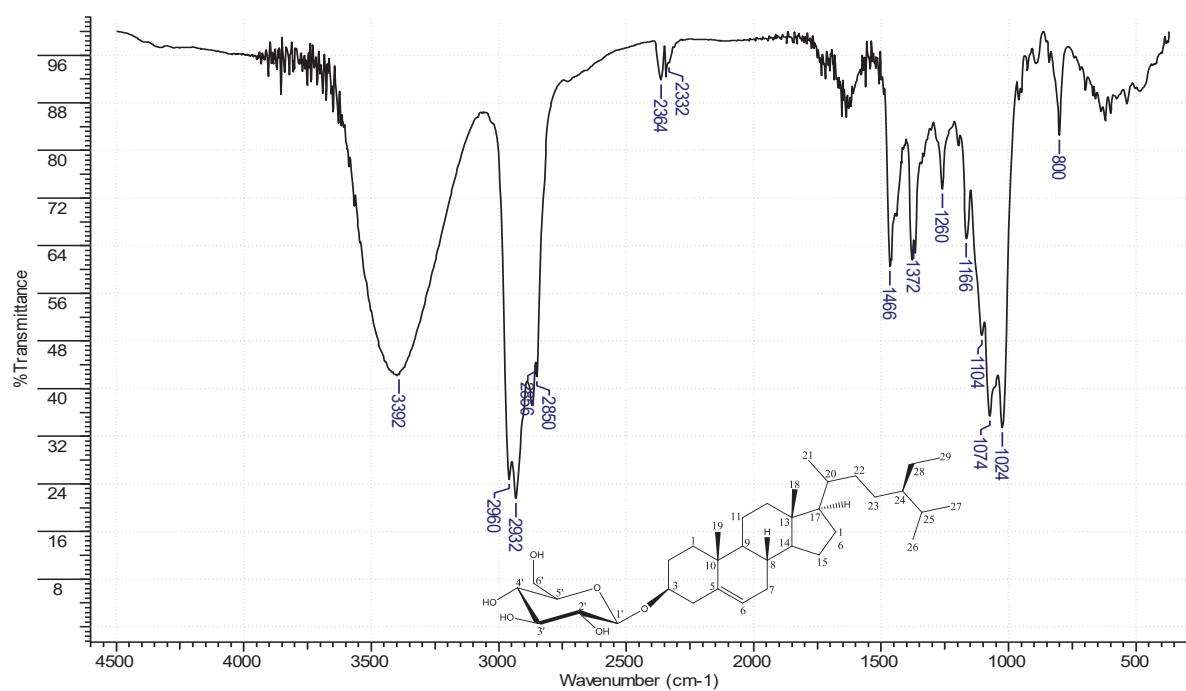


Figura A40. Espectro de absorção na região do infravermelho do composto **30** (ATR, cm^{-1}): β -sitosterol-3- O - β -D-glicopiranosídeo.

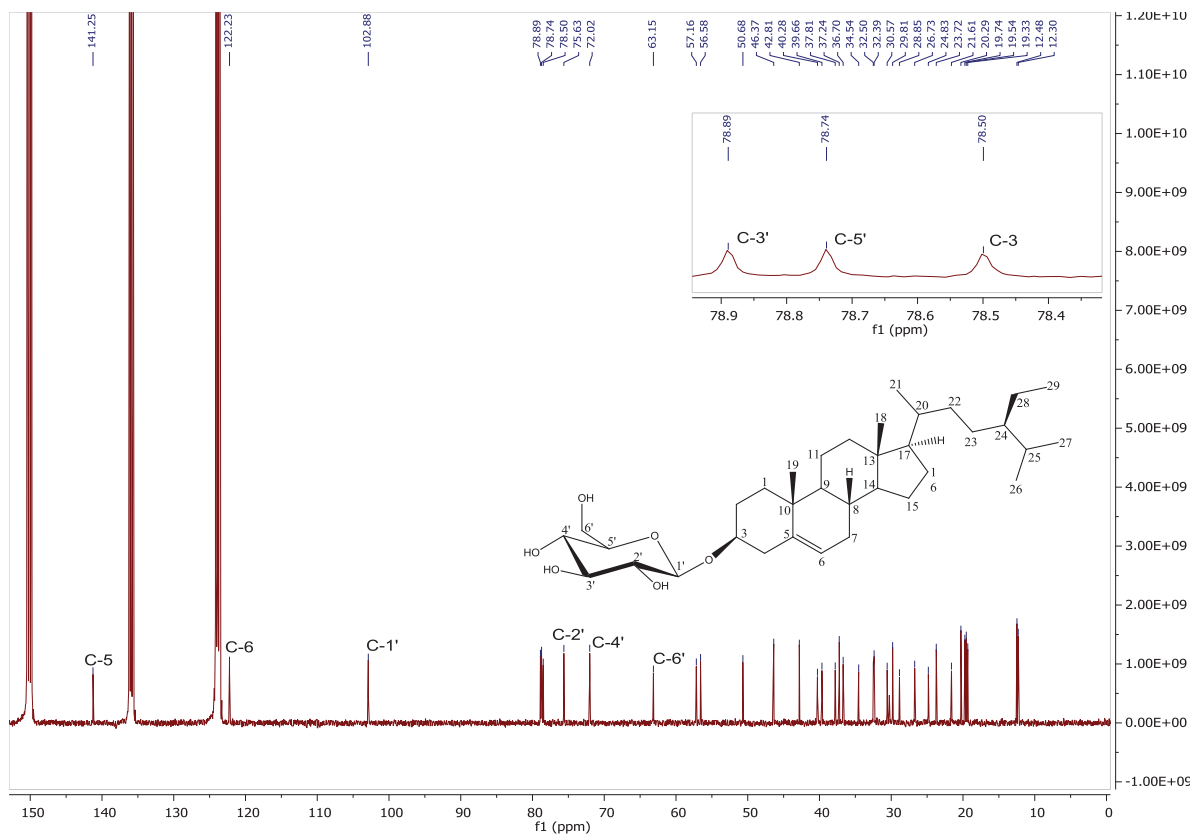


Figura A41. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **30** [100 MHz; $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$]: β -sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo.

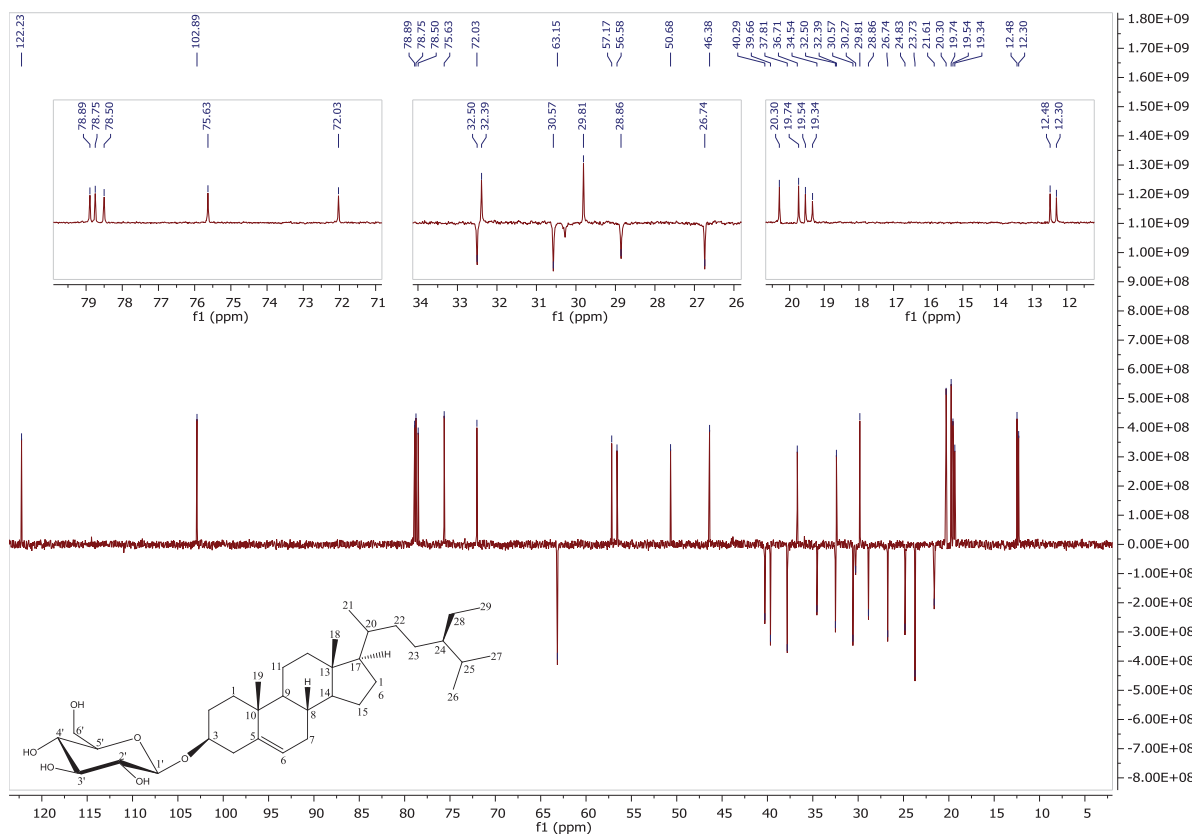


Figura A42. Subespectro de DEPT 135 do composto **30** [100 MHz; $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$]: β -sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo.

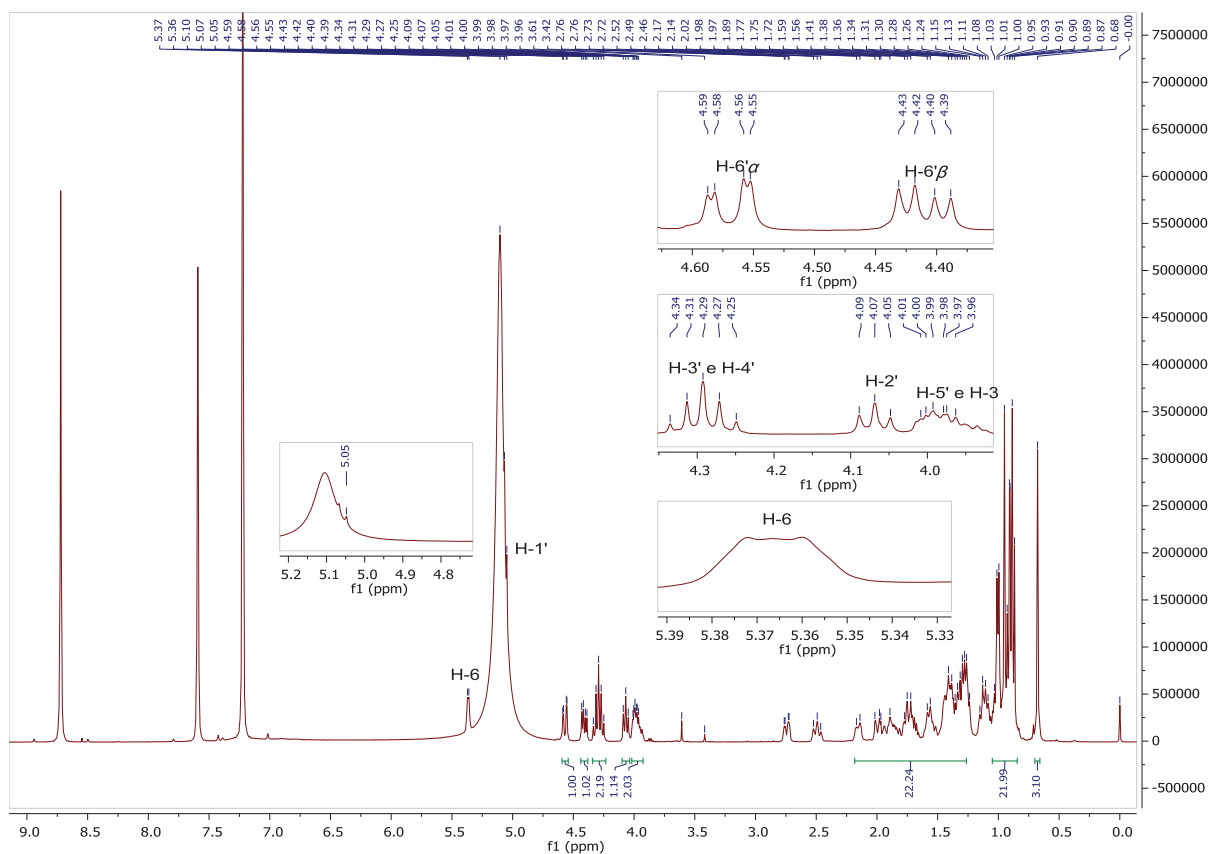


Figura A43. Espectro de RMN de ^1H do composto **30** [400 MHz; $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$]: β -sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo.

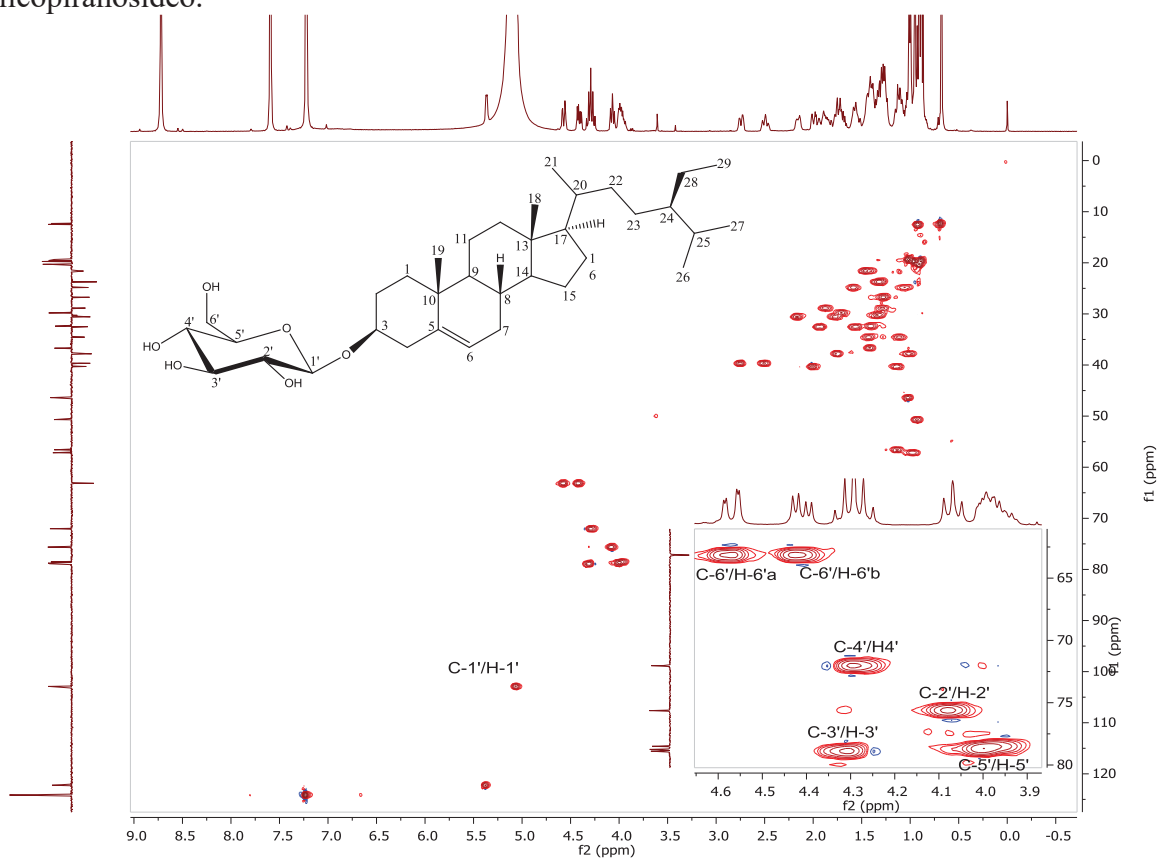


Figura A44. Mapa de contornos HSQC do composto **30** [400 MHz; $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$]: β -sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo.

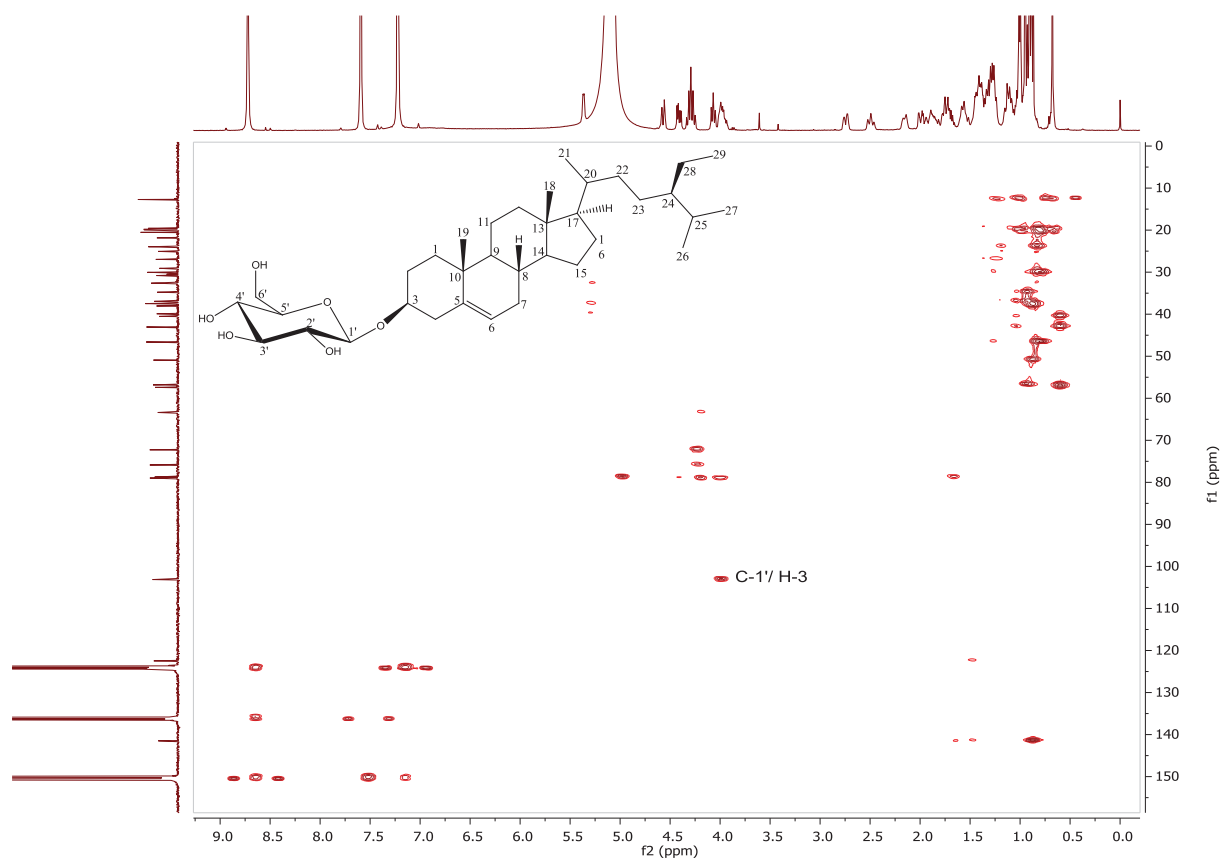


Figura A45. Mapa de contornos HMBC do composto **30** [400 MHz; C_5D_5N]: β -sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo.

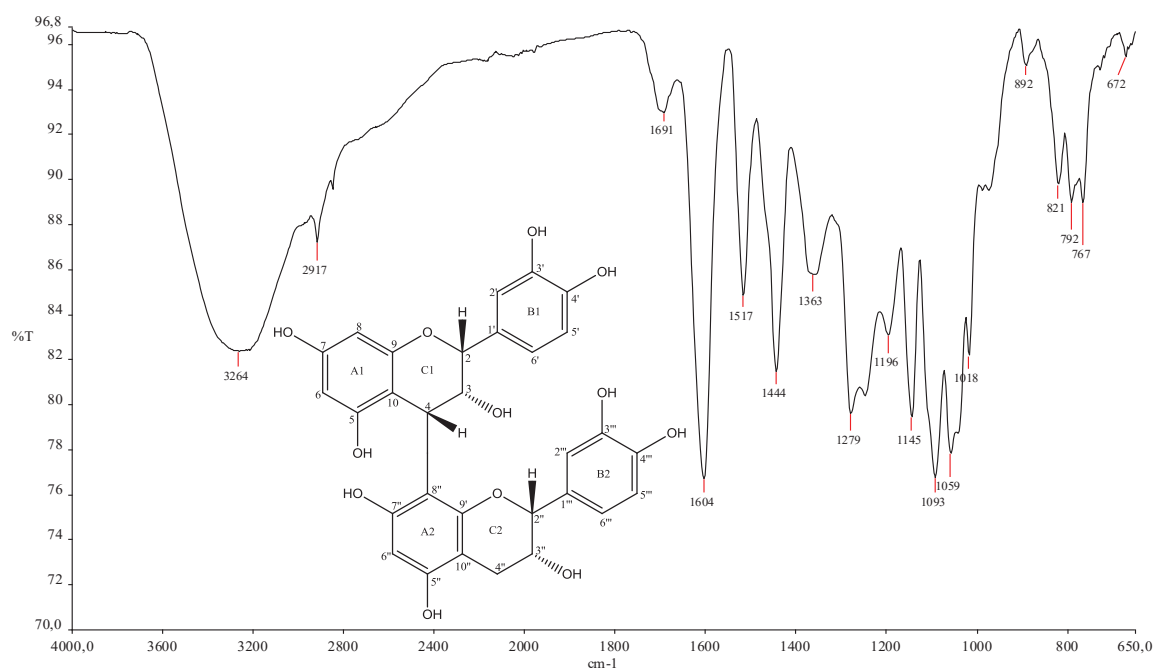


Figura A46. Espectro de absorção na região do infravermelho do composto **31** (ATR, cm^{-1}): (+)-epicatequina-(4 β -8)-epicatequina.

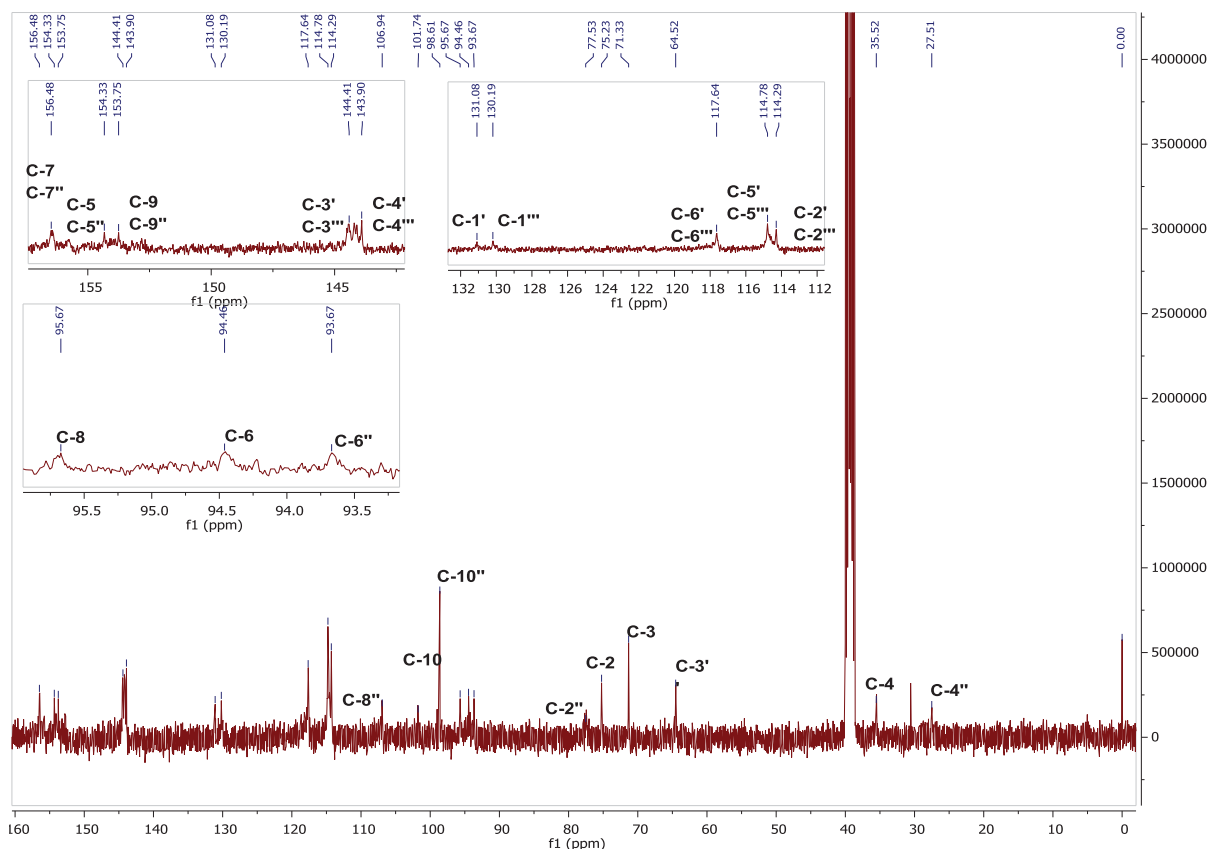


Figura A47. Espectro de RMN de ^{13}C [100 MHz; $\text{DMSO}-d_6$] do composto **31**: (+)-epicatequina-(4 β -8)-epicatequina.

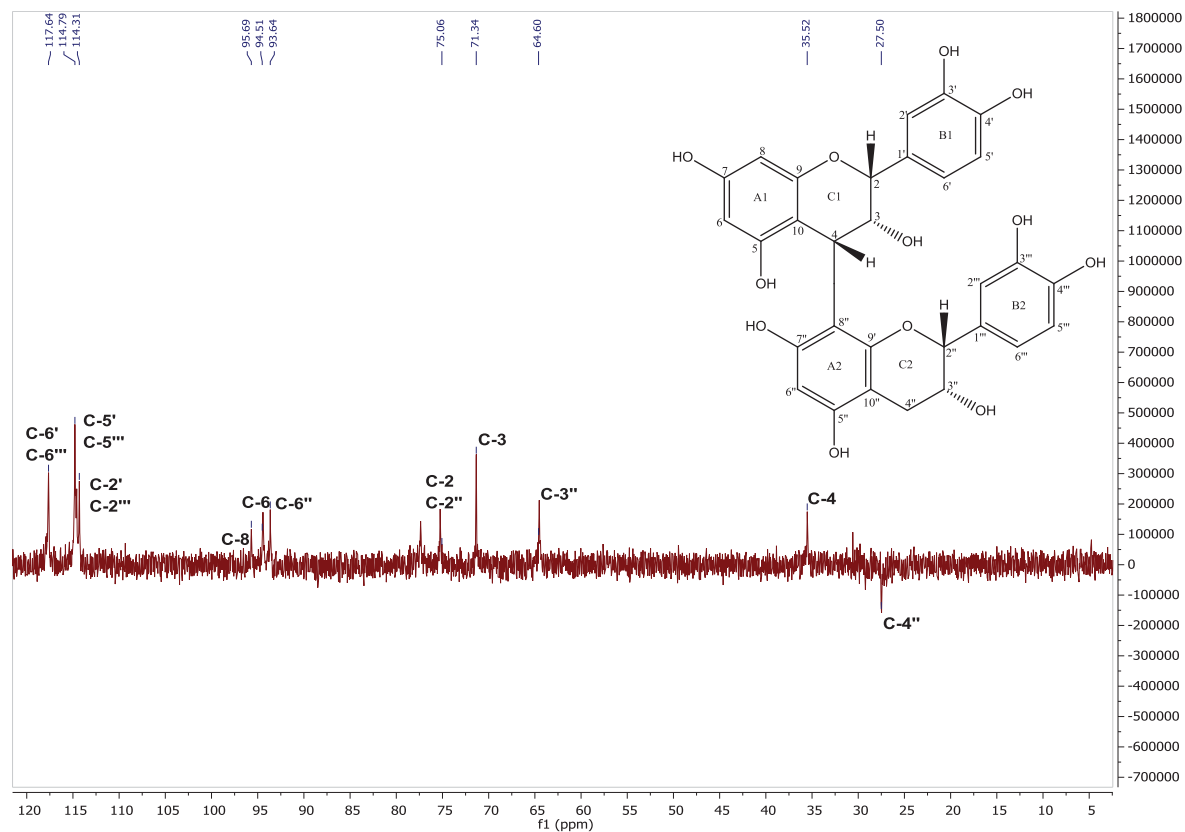


Figura A48. Subespectro de DEPT 135 do composto **31** [100 MHz; $\text{DMSO}-d_6$]: (+)-epicatequina-(4 β -8)-epicatequina.

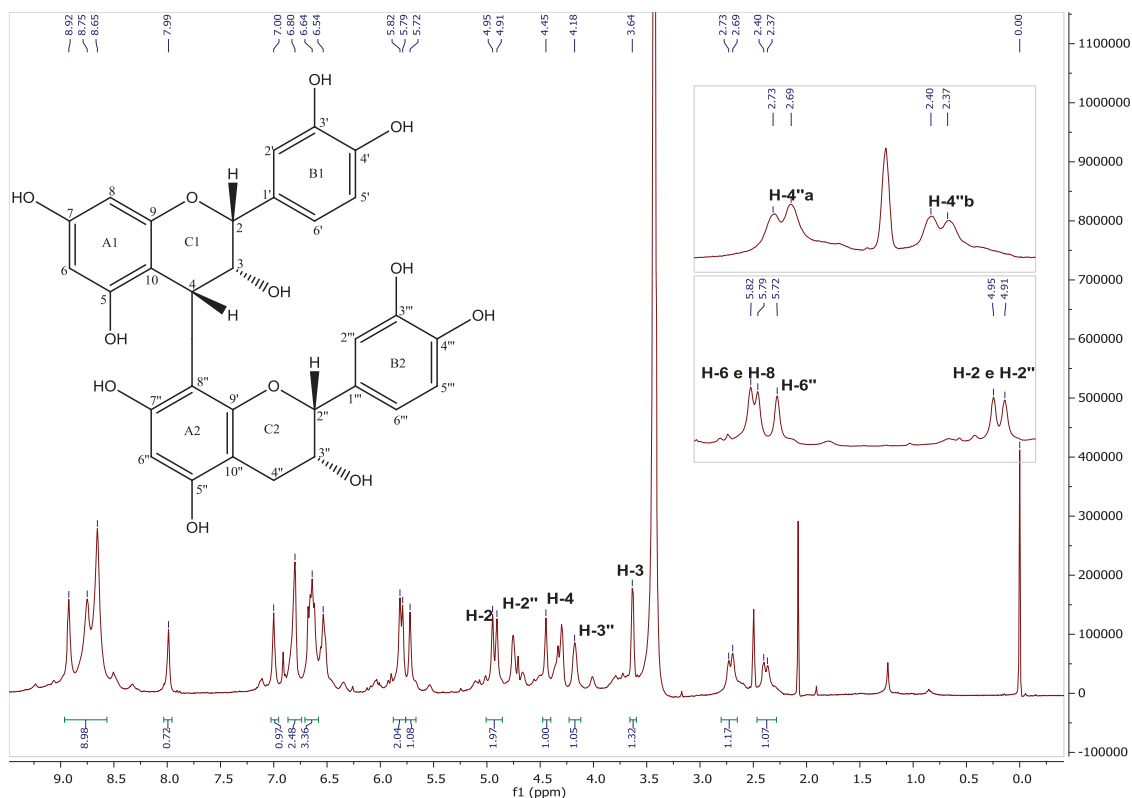


Figura A49. Espectro de RMN de ¹H [400 MHz; DMSO-*d*₆] do composto **31**: (+)-epicatequina-(4 β -8)-epicatequina.

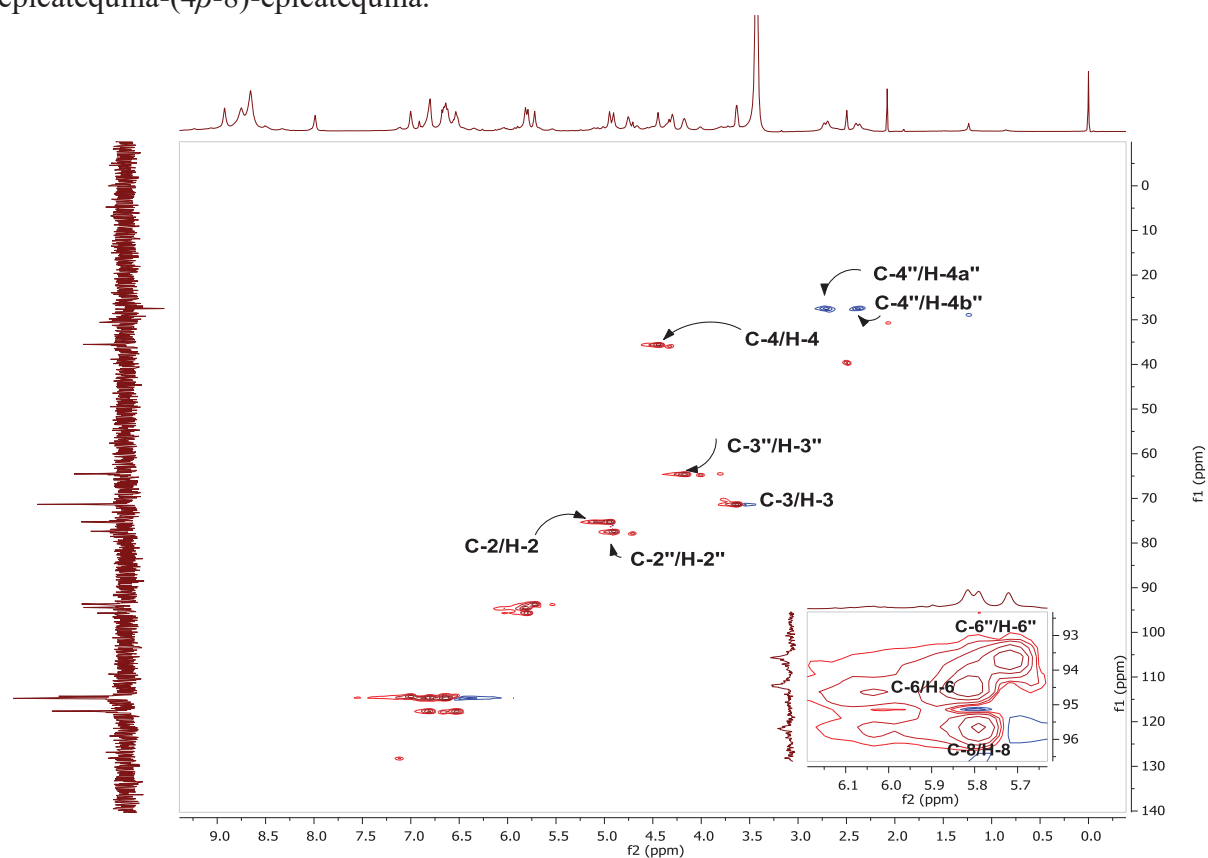


Figura A50. Mapa de contornos HSQC do composto **31** [400 MHz; DMSO-*d*₆]: (+)-epicatequina-(4 β -8)-epicatequina.

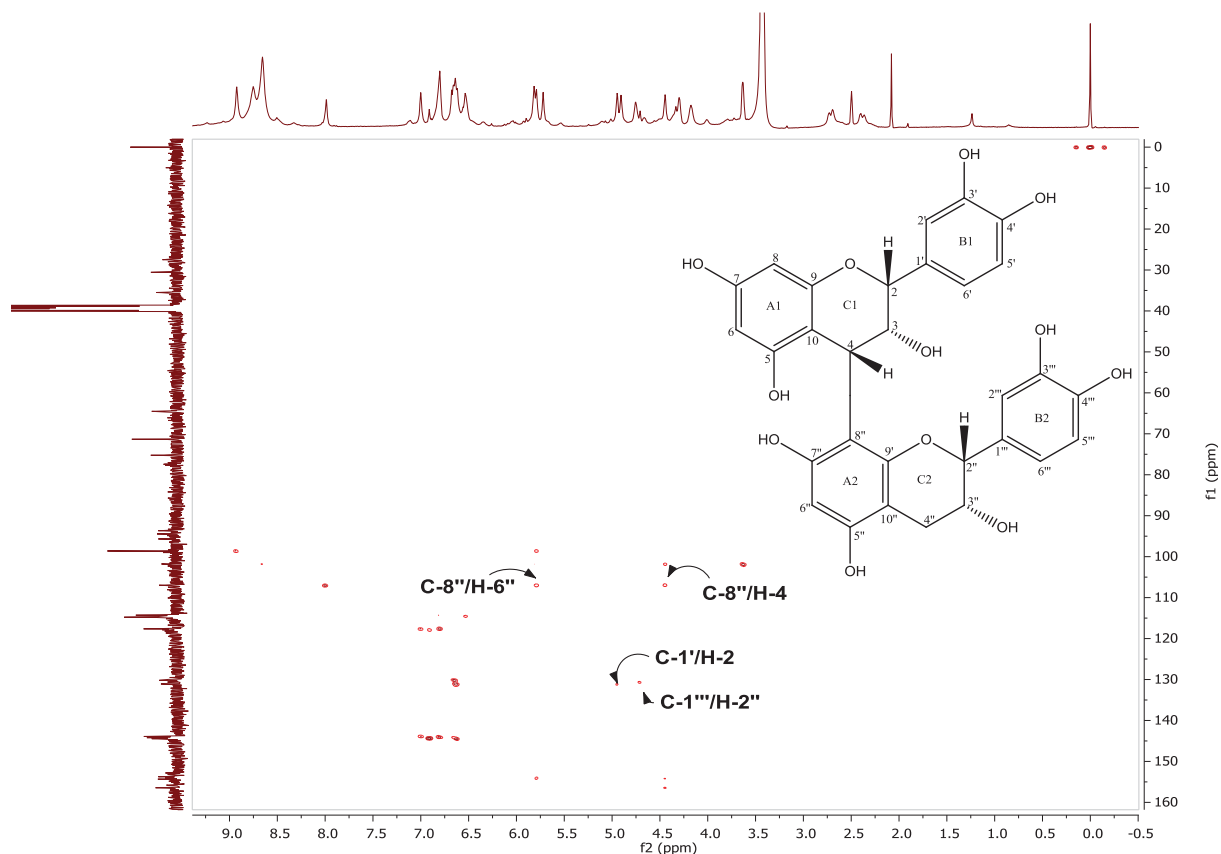


Figura A51. Mapa de contornos HMBC do composto **31** [400 MHz; DMSO- d_6]: (+)-epicatequina-(4 β -8)-epicatequina.

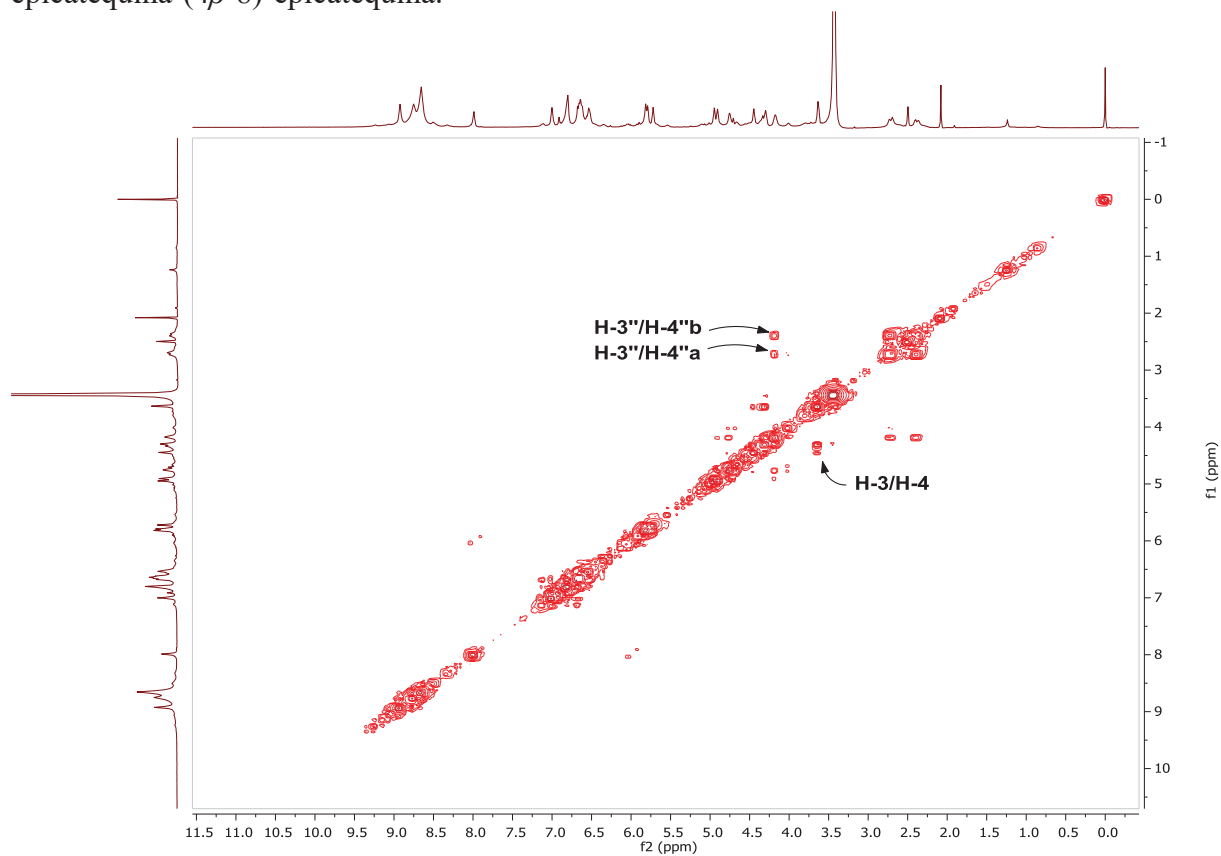


Figura A52. Mapa de contornos COSY do composto **31** [400 MHz; DMSO- d_6]: (+)-epicatequina-(4 β -8)-epicatequina.

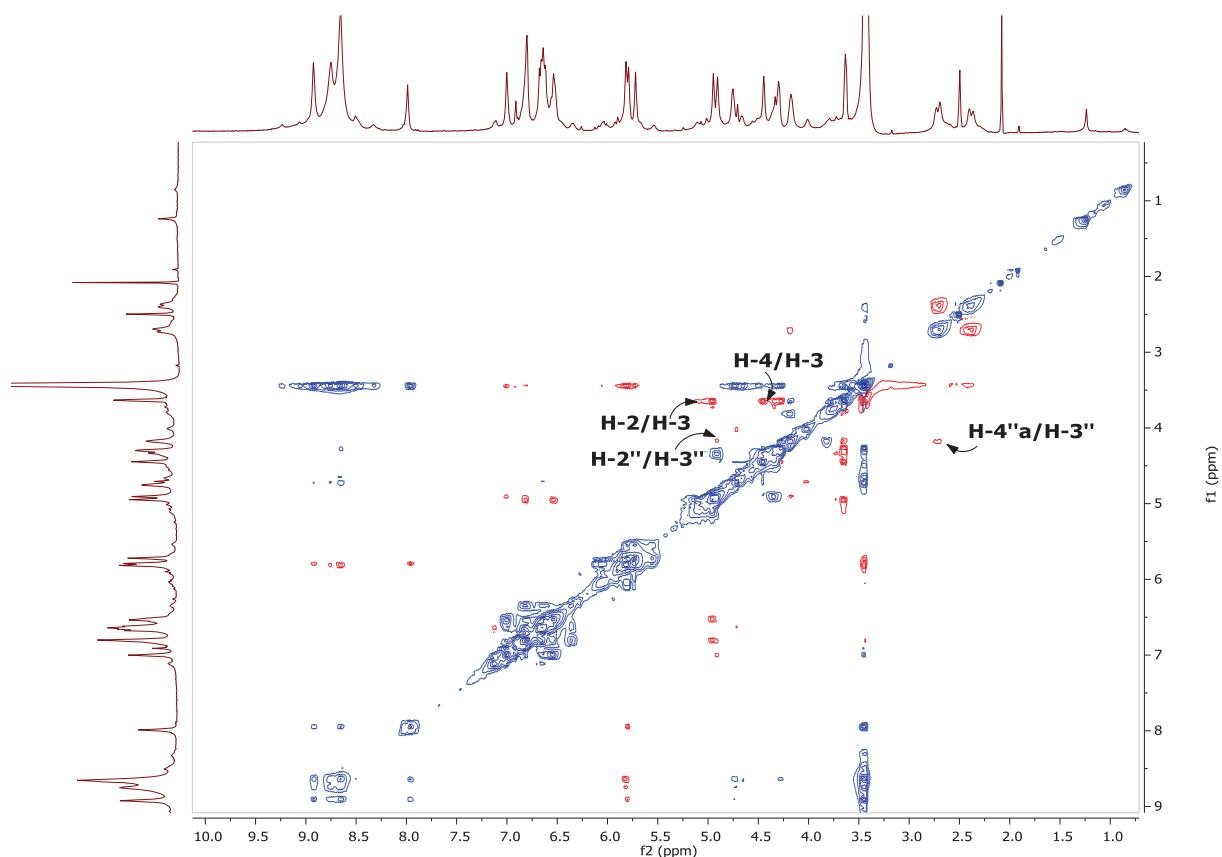


Figura A53. Mapa de contornos NOESY do composto **31** [400 MHz; DMSO- d_6]: (+)-epicatequina-(4 β -8)-epicatequina.

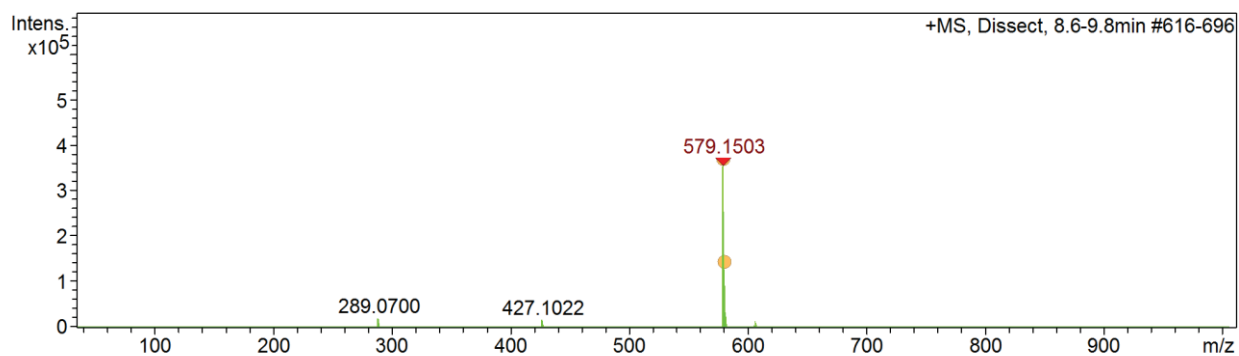
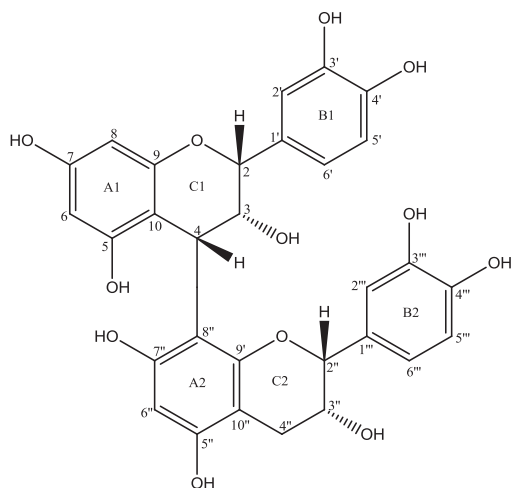


Figura A54. Espectro de HR-ESI-MS-(+) do composto **31**: (+)-epicatequina-(4 β -8)-epicatequina.



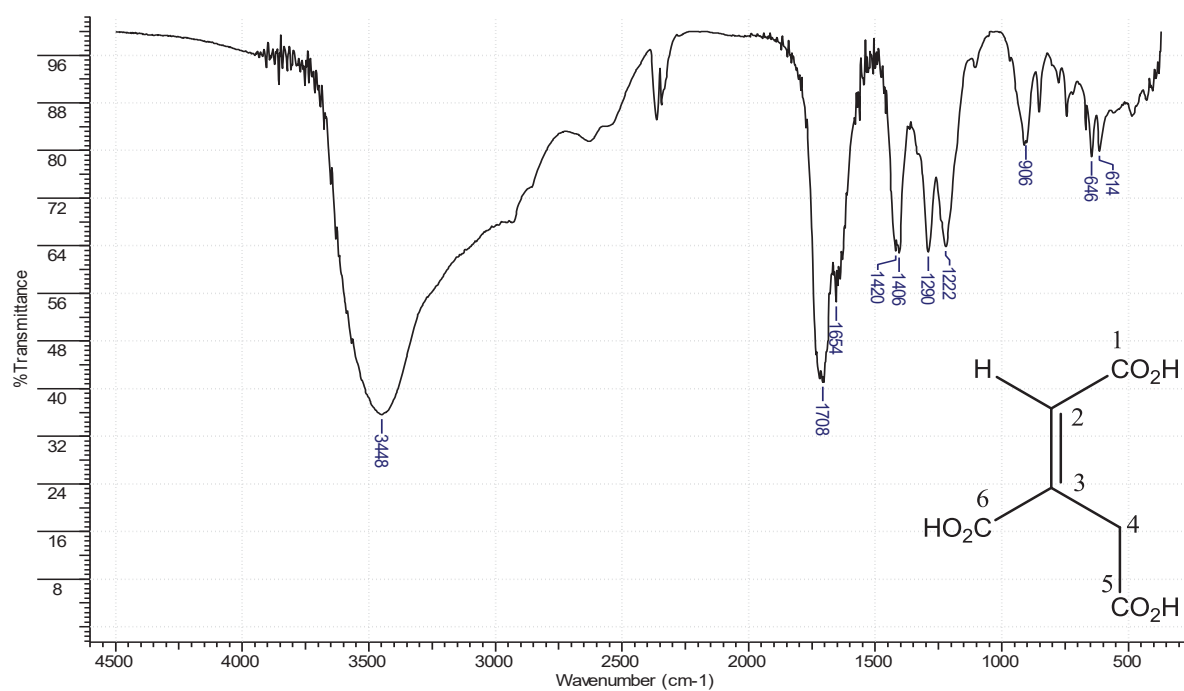


Figura A55. Espectro de absorção na região do infravermelho do composto **32** (ATR, cm^{-1}): ácido *trans*-aconítico.

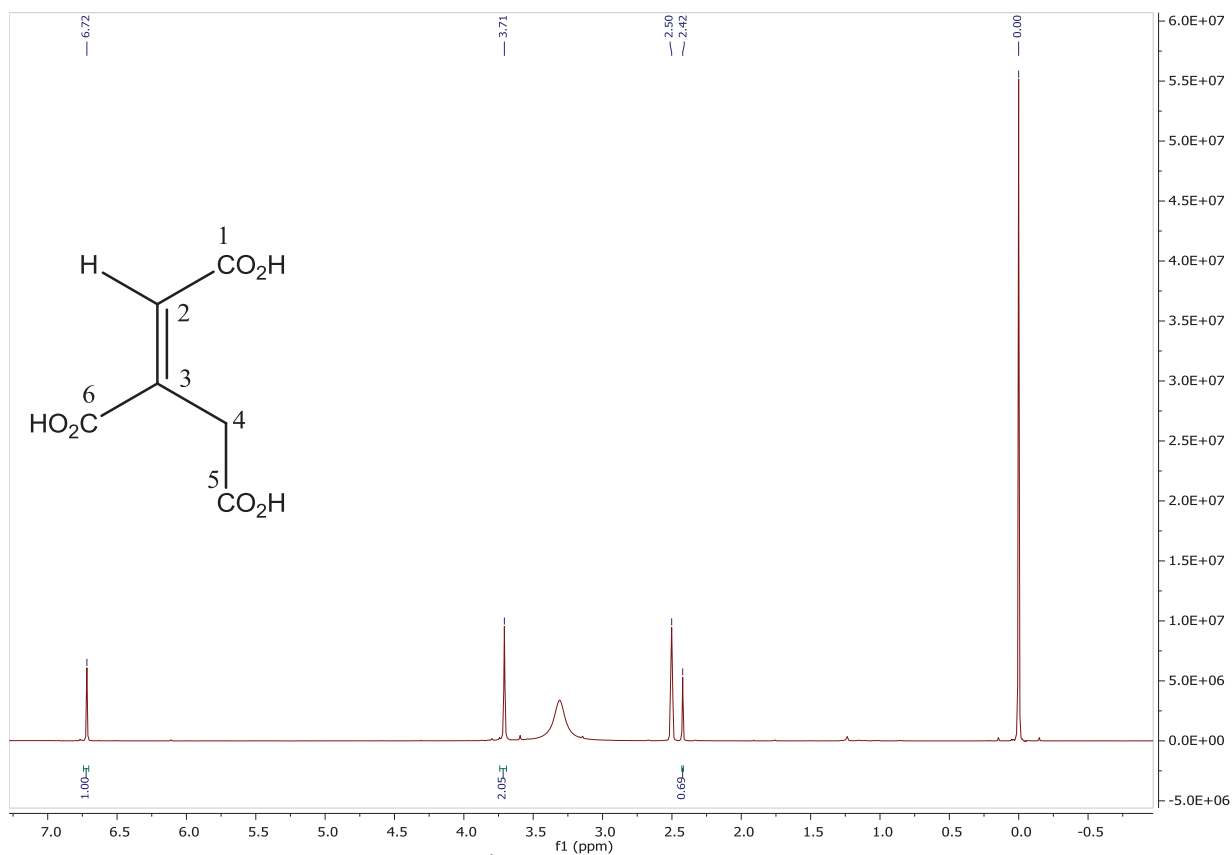


Figura A56. Espectro de RMN de ^1H do composto **32** [400 MHz; $\text{DMSO}-d_6$]: ácido *trans*-aconítico.

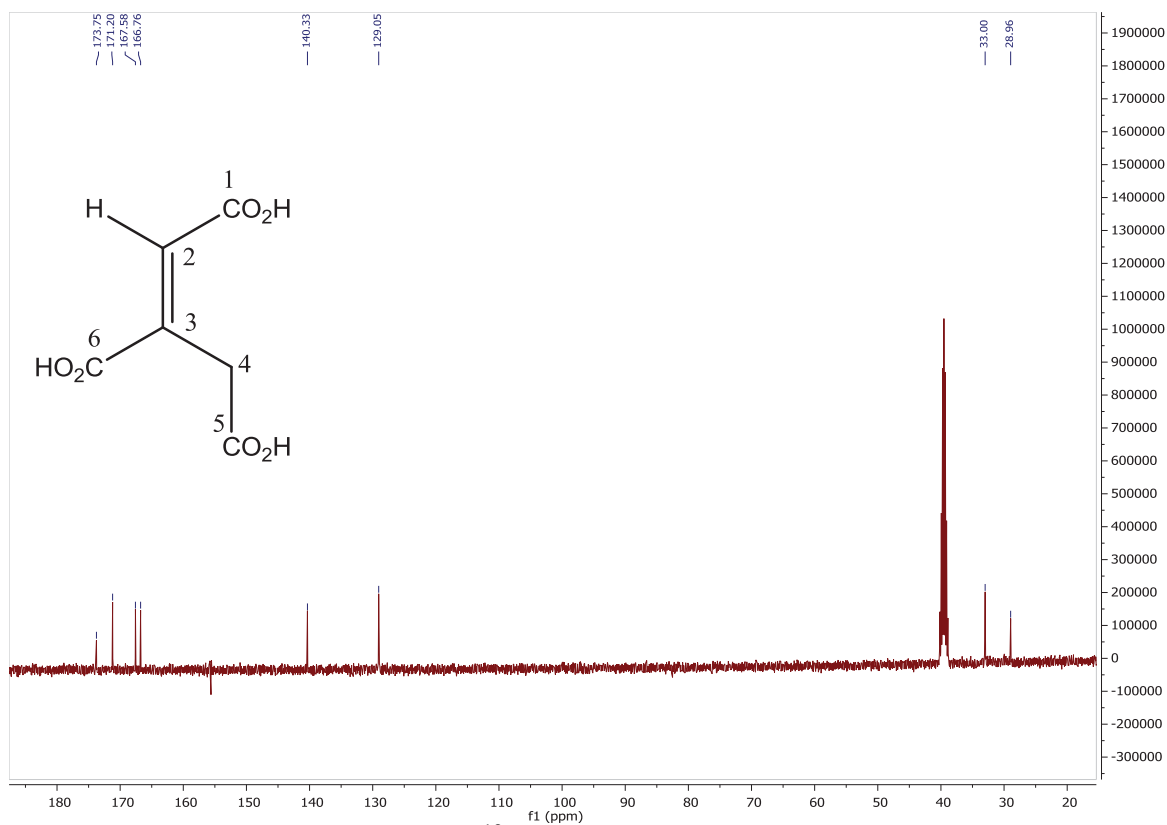


Figura A57. Espectro de RMN de ^{13}C [100 MHz; DMSO-*d*₆] do composto **32**: ácido *trans*-aconítico.

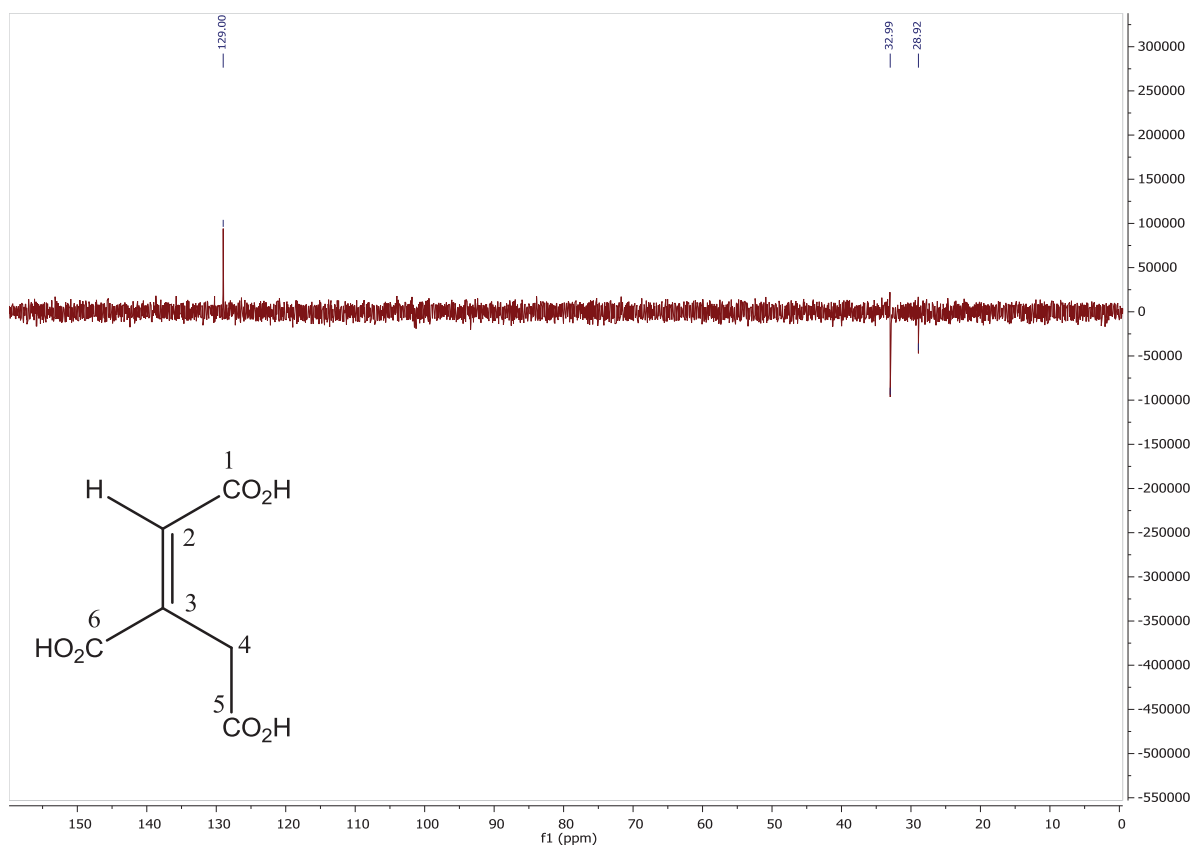


Figura A58. Subespectro de DEPT 135 do composto **32** (100 MHz; DMSO-*d*₆): ácido *trans*-aconítico.

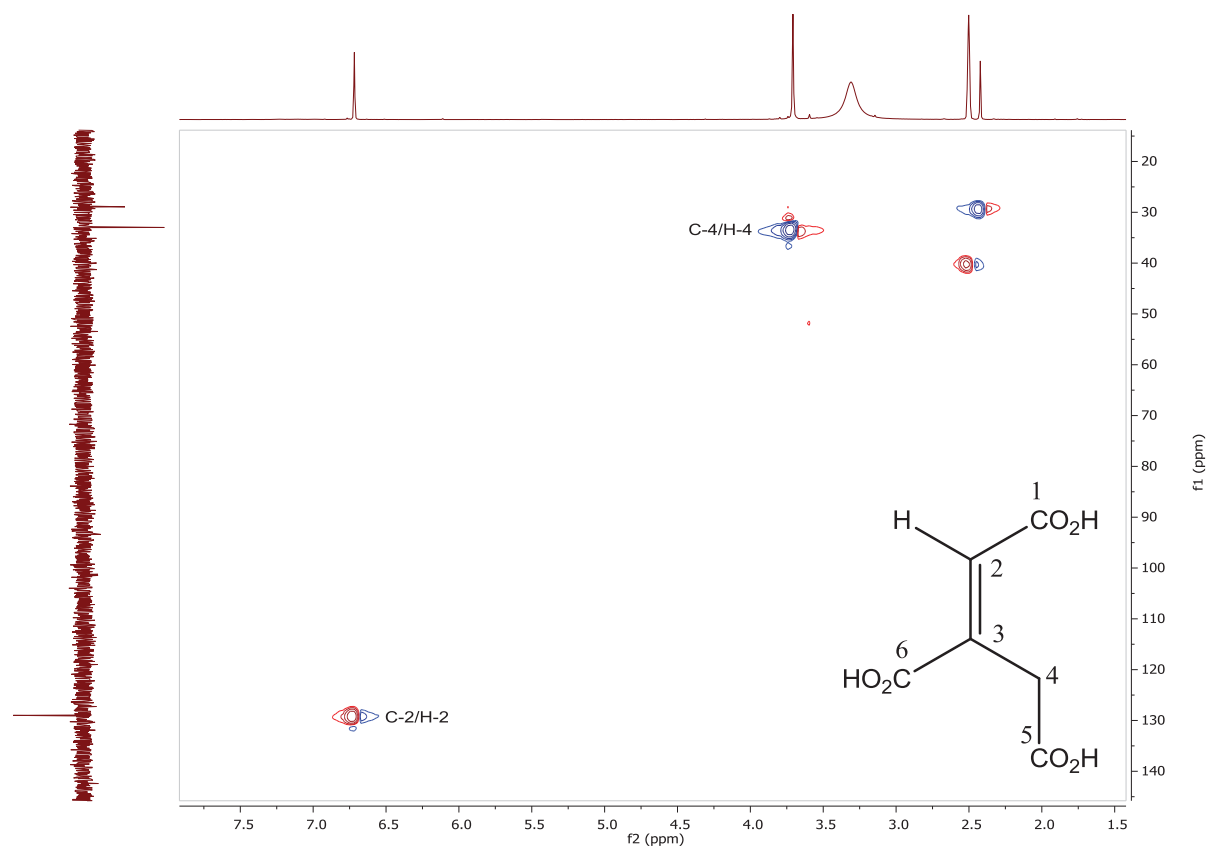


Figura A59. Mapa de contornos HSQC do composto **32** [400 MHz; DMSO- d_6]: ácido *trans*-aconítico.

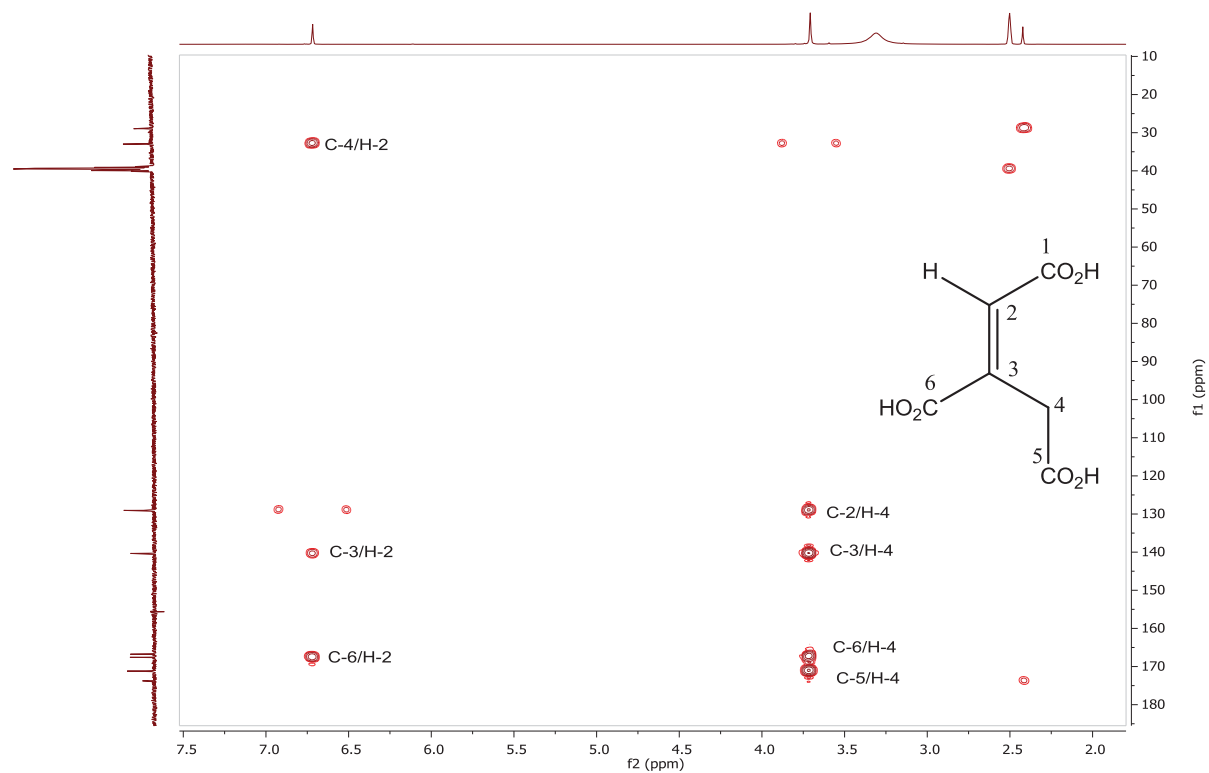


Figura A60. Mapa de contornos HMBC do composto **32** [400 MHz; DMSO- d_6]: ácido *trans*-aconítico.

Anexo II

Cromatogramas e dados de CLAE

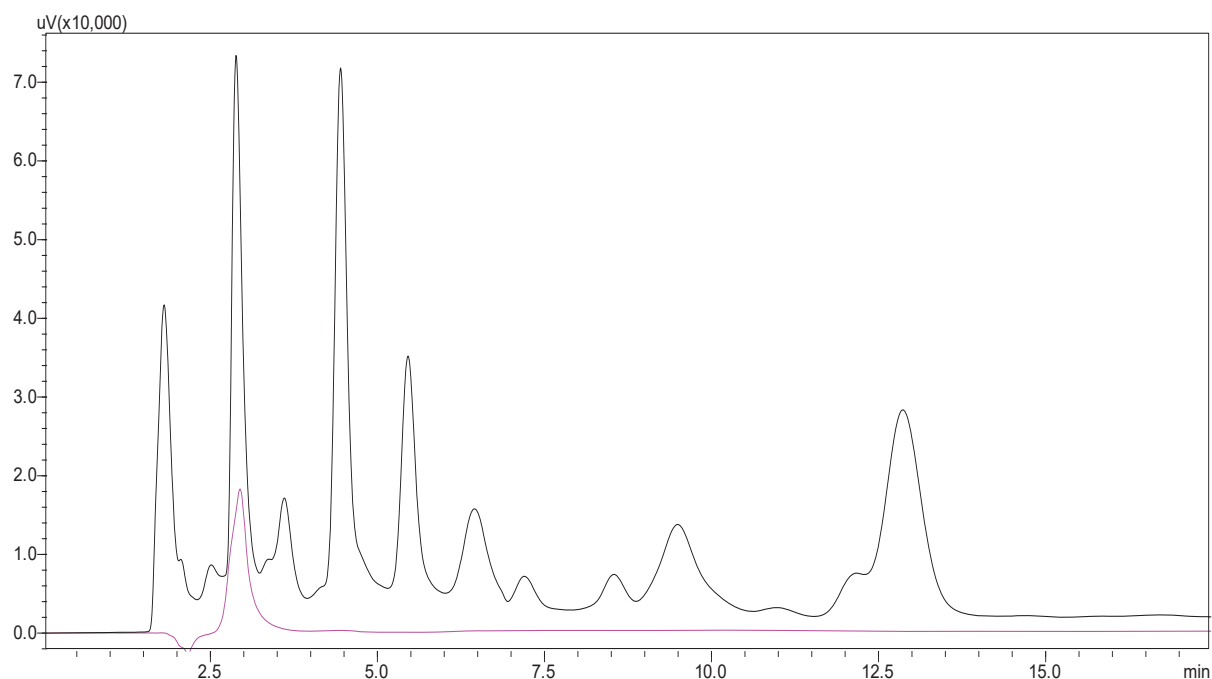


Figura A61. Cromatograma de CLAE com a sobreposição de FF (A) a 280 nm com o padrão de ácido *trans*-aconítico (B) (TR = 2,8 min).

Tabela A1. Dados de CLAE (tempo de retenção e área dos picos) a 280 nm das frações fenólicas expostas à diferentes doses de radiação gama: FF₀, FF₁, FF₃, FF₅, FF₁₀ e FF₂₀

0,0 kGy			1,0 kGy		3,0 kGy	
Pico	TR	Área	TR	Área	TR	Área
1	1,80	455.023,3	1,79	174.172,7	1,72	84.553,7
2	2,88	703.893,9	2,42	32.521,5	2,54	57.724,9
3	3,60	75.442,2	3,53	51.217,4	3,64	60.968,3
4	4,44	751.202,9	4,40	515.319,7	4,49	518.468,3
5	5,45	411.475,8	5,42	284.409,5	5,50	279.018,3
6	6,45	266.842,8	6,32	599.659,6	6,47	860.386,1
7	9,49	289.930,1	9,30	928.484,7	9,56	620.701,0
8	12,86	612.507,7	12,61	1.141.956,6	12,96	846.463,4

5,0 kGy			10,0 kGy		20,0 kGy	
TR	Área		TR	Área	TR	Área
1	1,84	83.860,0	1,821	121.392,1	1,82	96.312,9
2	2,49	115.420,4	2,478	45.342,1	2,54	55.852,7
3	3,56	79.165,0	3,576	44.575,2	3,62	52.373,3
4	4,39	639.277,8	4,414	375.168,1	4,48	446.750,5
5	5,42	373.917,2	5,424	251.639,7	5,52	280.642,8
6	6,29	844.254,7	6,327	388.382,3	6,51	552.236,6
7	9,24	645.690,8	9,256	304.943,4	9,58	651.321,0
8	12,40	1.597.099,8	12,463	1.054.044,3	12,28	31.004,9

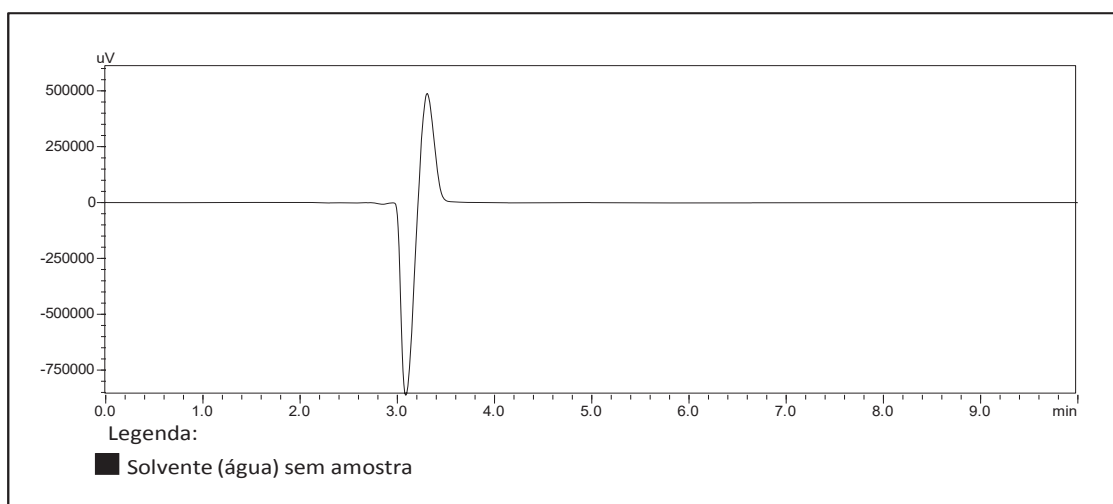


Figura A62. Cromatograma CLAE a 210 nm do solvente (água) utilizado na diluição das amostras FS.

Tabela A2. Dados de CLAE (tempo de retenção e área dos picos) a 210 nm das frações saponínicas expostas a diferentes doses de radiação gama: FS₀, FS₁, FS₃, FS₅, FS₁₀ e FS₂₀

Pico	0,0 kGy		1,0 kGy		3,0 kGy	
	TR	Área	TR	Área	TR	Área
2	5,21	7.848.971,3	5,31	1.589.899,0	5,25	6.534.030,5

Pico	5,0 kGy		10,0 kGy		20,0 kGy	
	TR	Área	TR	Área	TR	Área
2	5,25	6.386.557,2	5,33	3.561.975,3	5,30	4.726.881,6

Tabela A3. Médias das áreas dos picos referentes ao ácido *trans*-aconítico não solubilizado e irradiado.

0,0 kGy	1,0 kGy	3,0 kGy	5,0 kGy	10,0 kGy	20,0 kGy
2300484,7 ^a	2469701,5 ^a	2022636,1 ^a	2110504,5 ^a	2116510,6 ^a	2188334,1 ^a

Valores expressos em média da área do pico. Diferentes letras em uma mesma linha indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os valores observados pelo teste de Tukey.

Tabela A4. Médias das áreas dos picos referentes ao ácido *trans*-aconítico em solução aquosa (1,0 mg/mL) e irradiado.

0,0 kGy	1,0 kGy	3,0 kGy	5,0 kGy	10,0 kGy	20,0 kGy
7130113,7 ^a	2033434,1 ^b	1741694,0 ^{bc}	1528101,8 ^c	272036,7 ^d	245759,7 ^d

Valores expressos em média da área do pico. Diferentes letras em uma mesma linha indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os valores observados pelo teste de Tukey.

Results

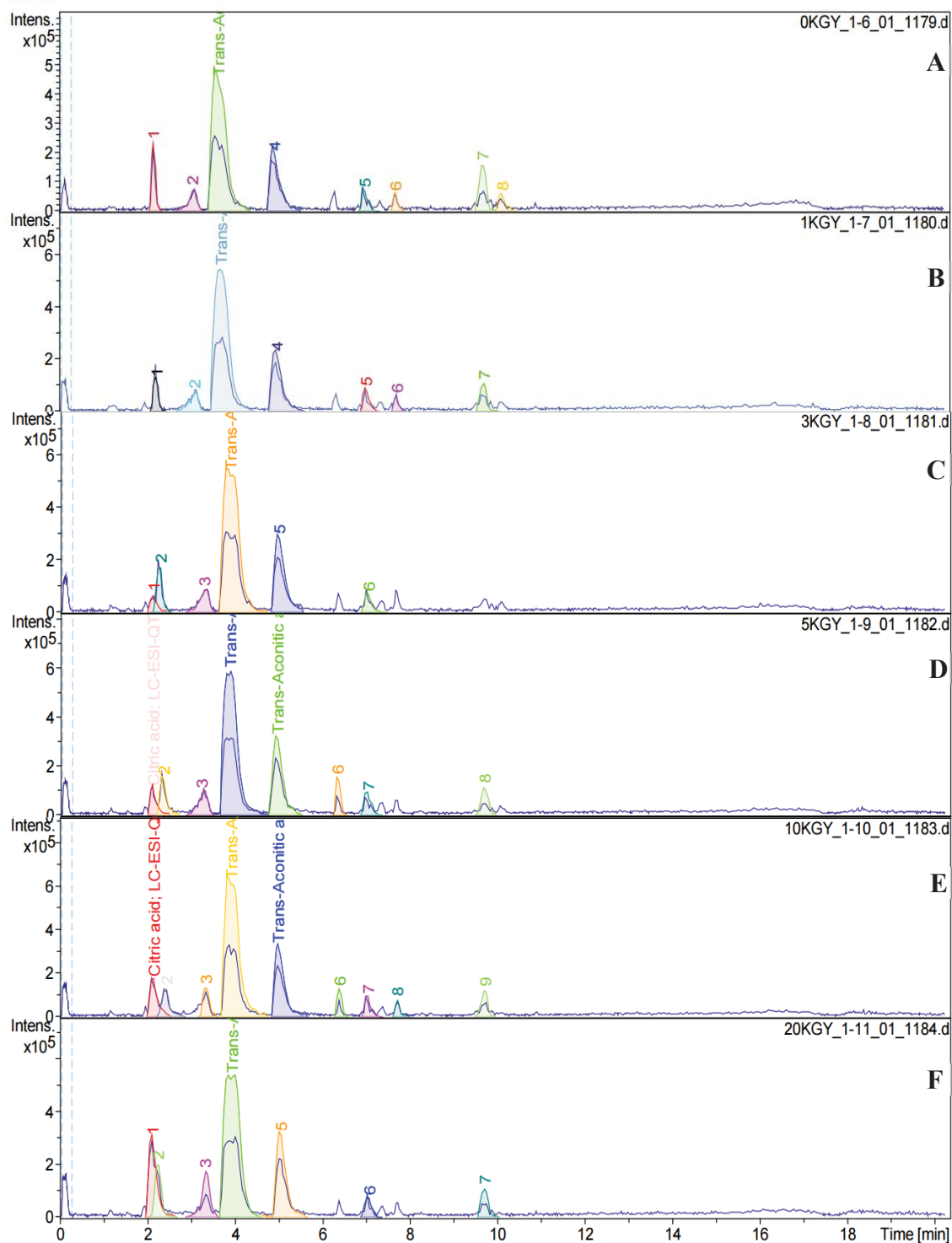


Figura A63. Cromatogramas de LC/MS de TA₀, TA₁, TA₃, TA₅, TA₁₀ e TA₂₀ (TR entre 0,0 e 20,0 min); Condição de análise: 0,0 a 13,0 min, concentração inicial A → B (9,5 → 0,5), 13,01 a 14,0 min, concentração A:B (100,0: 0,0), 14,01 a 20,0, concentração A:B (9,5:0,5).

Anexo III

Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Termo de esclarecimento

Convidamos você a participar do projeto de pesquisa intitulado **“Elaboração de extratoteca e banco de dados químicos e biológicos a partir de plantas nativas da região de Diamantina – MG (Vale do Jequitinhonha)”** que será realizado na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) e tem por objetivo avaliar se essas plantas tem efeito sobre o sangue. Você está sendo convidado a participar desse estudo por ter idade entre 20 e 39 anos e por não estar tomando remédios. Se você concordar em participar do estudo iremos coletar (tirar) um pouco de seu sangue (15 mL) na veia do braço (da mesma maneira que é coletado quando você faz algum exame de sangue), em dia e horário a combinar. No laboratório vamos fazer testes com seu sangue usando as plantas e o que sobrar do sangue não será guardado, sendo descartado com todo o cuidado. A coleta do sangue será feita em uma veia de seu braço, podendo causar uma leve dor na hora e uma pequena mancha roxa que desaparecerá em 3 a 4 dias após a coleta. Outros riscos mais raros (não é comum acontecer) de sua participação incluem tontura, enjôo e de contaminação. A coleta será feita por pessoa treinada, em local limpo e reservado, equipado com maca, utilizando material estéril e descartável. Ao doar seu sangue para este projeto você estará contribuindo para os conhecimentos sobre esta planta que é utilizada na medicina popular. Os seus dados serão mantidos em sigilo (segredo) e sua identidade não será revelada. Só os pesquisadores envolvidos no projeto terão acesso aos dados, que serão utilizados apenas para fins de pesquisa e divulgação científica em congressos, livros e revistas, mas sua identidade não será divulgada. Você não receberá qualquer forma de remuneração (pagamento) pela sua participação no estudo e você não terá nenhum gasto (portanto, não está previsto nenhuma forma de ressarcimento). Quaisquer dúvidas que possam surgir durante o andamento deste estudo por parte do voluntário poderão ser esclarecidas junto aos membros da equipe responsáveis pelo projeto, pessoalmente ou por telefone. Se depois de autorizar a coleta, você não quiser que seu sangue seja usado, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta do sangue, independente do motivo e sem prejuízo na sua relação com os pesquisadores e a UFVJM. Os pesquisadores responsáveis por este projeto podem decidir sobre a sua exclusão do estudo por razões científicas, a respeito das quais você deverá ser devidamente informado. Em caso de qualquer dúvida você deverá e/ou poderá entrar em contato a qualquer hora com a pesquisadora responsável Michaelle Geralda dos Santos pelo telefone (38)9977-9991 ou pelo e-mail michaelleg Santos@gmail.com. Você também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFVJM no Campus JK, Rodovia MGT 367, Km 583, nº 5000, Alto da Jacuba, CEP 39100-000, Diamantina – MG, telefone: (38) 3532- 1240 ou pelo e-mail cep@ufvjm.edu.br para informações sobre a aprovação do projeto pelo comitê.

Anexo IV

Termo de livre consentimento pós- informado

TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Eu discuti os riscos e benefícios da minha participação no estudo intitulado **“Elaboração de extratoteca e banco de dados químicos e biológicos a partir de plantas nativas da região de Diamantina – MG (Vale do Jequitinhonha)”** com os pesquisadores envolvidos. Eu li e compreendi todos os procedimentos que envolvem esta pesquisa e tive tempo suficiente para considerar a minha participação no estudo. Eu perguntei e obtive as respostas para todas as minhas dúvidas. Eu sei que posso me recusar a participar deste estudo ou que posso abandoná-lo a qualquer momento sem qualquer constrangimento ou prejuízo. Eu também compreendo que os pesquisadores podem decidir a minha exclusão do estudo por razões científicas, sobre as quais eu serei devidamente informado. Não terei nenhuma remuneração e nenhum gasto por participar do projeto. Tenho uma cópia deste formulário, o qual foi assinado em duas vias idênticas e rubricadas.

Portanto, aqui forneço o meu consentimento para participar desse estudo durante todos os testes realizados.

Diamantina, _____

Assinatura do voluntário: _____

Testemunha: _____

Testemunha: _____

Declaro que expliquei todos os objetivos, benefícios e riscos deste estudo ao voluntário, dentro dos limites de meus conhecimentos científicos.

Pesquisador responsável: _____

Michaelle Geralda dos Santos (38) 9977- 9991
michaelleg Santos@gmail.com

Comitê de Ética em Pesquisa da UFVJM
Campus JK – Rodovia MGT 367 – Km 583 – nº 5000 – Alto da Jacuba
CEP: 39.100-000 Diamantina - MG
Coordenação: Prof. Dr. Disney Oliver Sivieri Júnior
Vice-coordenação: Prof. Dr. Robson Campos Silva
Telefone: (38) 3532-1240/3532-1200
E-mail: cep@ufvjm.edu.br