

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

GEONE MAIA CORRÊA

**Estudo fitoquímico de *Justicia acuminatissima* (Acanthaceae):
caracterização química, avaliação biológica, contaminação fúngica e
detecção de produtos radiolíticos**

**Belo Horizonte - MG
2013**

UFMG/ICE_x/DQ. 979^a

T. 442^a

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

**Estudo fitoquímico de *Justicia acuminatissima* (Acanthaceae):
caracterização química, avaliação biológica, contaminação fúngica e
detecção de produtos radiolíticos**

**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.**

**Orientador: Prof. Dr. Antônio Flávio de Carvalho Alcântara
Co-Orientadora: Profa. Dra. Dorila Piló-Veloso**

**Belo Horizonte - MG
2013**

Corrêa, Geone Maia

Estudo fitoquímico de *justicia acuminatissima* (Acanthaceae) : caracterização química, avaliação biológica, contaminação fúngica e detecção de produtos radiolíticos / Geone Maia Corrêa. 2013.

xix, 160 f. : il.

Orientador: Antônio Elávio de Carvalho Alcântara.

Coorientadora: Dorila Piló Veloso.

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

Inclui bibliografia.

1. Química orgânica - Teses 2. Acantacea - Teses 3. Microondas - Teses 4. Agentes antibacterianos - Teses



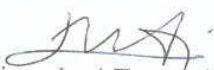
"Estudo Fitoquímico de *Justicia acuminatissima* (Acanthaceae): Caracterização Química, Avaliação Biológica, Contaminação Fúngica e Detecção de Produtos Radiolíticos"

Geone Maia Corrêa

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Prof. Antônio Flávio de Carvalho Alcântara - Orientador
UFMG


Profa. Dorila Piló Veloso - Coorientadora
UFMG


Prof. Francisco José Torres de Aquino
UFU


Prof. Humberto de Sousa Fontoura
UEG


Profa. Roqueline Rodrigues Silva
UFMG


Profa. Lúcia Pinheiro Santos Pimenta
UFMG

Belo Horizonte, 02 de agosto de 2013.

Dedicatória

Dedico esta tese a minha família, em especial minha esposa Ana Neide por ser tão especial em minha vida.

Aos meus filhos Rafael, Ana Cecília e Beatriz, eles são os melhores presentes que recebi, sou muito feliz e completo ao lado deles.

Aos meus orientadores prof. Dr. Antônio Flávio de Carvalho Alcântara e profa. Dra. Dorila Piló-Veloso.

"É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar; é melhor tentar ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final; eu prefiro nas chuvas caminhar, do que em dias tristes em casa me esconder; prefiro ser feliz embora louco, do que em conformidade viver".

Martin Luther King

Agradecimentos especiais

Agradeço a Deus por ter me dado forças para superar essa longa jornada.

À Minha esposa Ana Neide, por ter sido forte, compreensível e principalmente por sempre me apoiar e nunca deixar desanimar em nenhum momento. Obrigado por fazer eu me sentir bem todos os dias. Deus foi muito generoso em colocar você em minha vida. “A distância faz ao amor aquilo que o vento faz ao fogo: apaga o pequeno, inflama o grande”.

Ao meu primogênito Rafael e as minhas princesinhas Ana Cecília e Beatriz por completarem minha vida.

Aos meus pais Vanda e Jorge por sempre me incentivar nos estudos, em especial a minha mãe por nunca deixar eu desistir de nada.

Às minhas irmãs (Mônica, Geruza, Jória e Suene) pelo apoio e incentivos sempre recebidos. Todas sabem o quanto são importantes na minha vida.

Aos meus cunhados (Paulo, Clécio, Gilson e Marcelo), obrigado por cuidar tão bem das minhas irmãs, admiro demais todos vocês.

À minha querida cunhada Miriam Pontes e meu grande amigo Wellington Rabelo muito obrigado por gostar tanto da minha família.

Aos demais “filhos” (Kairo, Mariana, Felipe, Izabel, Leticia, Otávio e Victor). Amo todos vocês incondicionalmente.

À Jack por nos ajudar a cuidar das crianças de um jeito tão especial.

Ao meu orientador prof. Dr. Antônio Flávio de Carvalho Alcântara, um ser humano incrível. Agradeço a valiosa orientação recebida durante este período. Muito obrigado por tudo.

À profa. Dra. Dorila Piló-Veloso pela co-orientação, pessoa de uma inteligência admirável. Muito obrigado pela oportunidade.

" Há homens que lutam um dia e são bons, há outros que lutam um ano e são melhores, há os que lutam muitos anos e são muito bons. Mas há os que lutam toda a vida e estes são imprescindíveis"

(Bertold Brecht)

Agradecimentos

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

Ao prof. Dr. Humberto Fontoura da Universidade Estadual de Goiás pela contribuição nos testes farmacológicos. Um cara incrivelmente prestativo e muito importante neste trabalho.

À profa. Dra. Denise Carmona do Instituto de Ciências biológicas (departamento de morfologia) da UFMG pela grande colaboração neste trabalho (elaboração e avaliação das lâminas de atividade anti-inflamatória), uma pessoa admirável e muito generosa.

Ao Dr. Márcio Tadeu Teixeira e sua equipe do laboratório de radiação gama do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN), pela cooperação no projeto durante as etapas de radiação gama do material vegetal estudado.

Às profa(s). Dras. Lucienir Pains Duarte, Henriete da Silva Vieira e Roqueline Rodrigues Silva do Departamento de Química da UFMG pelas valiosas contribuições durante o exame de qualificação.

Ao Dr. Álvaro José Romanha e Dr. Policarpo Ademar Sales Junior do Centro de Pesquisas René Rachou, pela imensa contribuição na realização dos ensaios parasitológicos.

Ao Dr. Lucas Magalhães Abreu da Universidade Federal de Lavras pela identificação da espécie (*Aspergillus aculeatus*).

Às Alunas de Iniciação científica Débora Abreu, Ana Paula Silva e Caroline Gonzaga, muito obrigado por tudo. Espero ter contribuído na formação profissional de todas vocês. Esse trabalho é nosso, Muito obrigado mesmo!

Aos professores do DQ/UFMG em especial à prof. Dra. Rosemeire Brondi Alves pela orientação do estágio em docência de química. Prof. Dr. Fernando Carazza (*in memoriam*) e profa. Dra. Dorila Piló-Veloso a todos muito obrigado pelos ensinamentos.

À Dra. Vanny Perpetua Ferraz do laboratório de cromatografia do Departamento de Química da UFMG pelas valiosas contribuições durante as análises em CLAE.

Aos inesquecíveis colegas da turma de Química orgânica avançada II (Cleiton Moreira, Lucas Arantes, Fernando Armini e Adriana Bracarense), foi tudo muito fácil ao lado de vocês. E assim a gente vai

Ao Lucas Arantes pelas análises de espectrometria massas.

À minha amiga Viviane Abreu, não tem como agradecer a sua amizade, acredito que sempre ficarei com déficit, suas palavras de apoio e incentivo nessa jornada jamais serão esquecidas, sem contar com as inúmeras contribuições e sugestões para o meu trabalho. “Pode ser que um dia nos afastemos... Mas, se formos amigos de verdade, a amizade nos reaproximará”.

Ao meu amigo Thiago de Melo, obrigado pela acolhida, sugestões no trabalho, e ensinamentos. Agradeço pela sua amizade e espero que seja sempre fiel.

Às alunas Flávia Rodrigues, Michele Bastos e Miriam Druffayer, obrigado por toda a amizade e atenção. São todas muito especiais pra mim.

À Bruna Gomes ex-aluna de iniciação do DQ/UFMG pela colaboração nos testes de atividade antimicrobiana.

Aos estagiários do Cefet-MG Priscila Siqueira e Rodrigo Xavier agradeço pela amizade. Vocês são muito especiais.

Aos demais alunos do Laboratório 276 do DQ/UFMG Brenda Albuquerque, Bianca Thaise e Sandro Pinho.

Aos Professores do ICET/UFAM em especial aos Dr(s). Margarida Carmo, Anderson Guimarães, Renata Takeara, Gustavo Hattori, Alcicley Abreu, Fábio Ferreira, Izabel Reis e Alex Martins pelo apoio e incentivos na liberação para o doutorado.

Ao meu irmão mineiro Ricardo Coelho, por me aturar esses anos. Por isso minha eterna gratidão a você. “Nenhum caminho é longo demais, quando um verdadeiro amigo nos acompanha”.

Ao Amigo Kelvin Souza e sua família. Muito obrigado pela sua amizade fraternal.

Ao meu Amigo da UFVJM Prof. Dr. Rodrigo Verly, contato inicial e grande incentivador para realização do doutorado na UFMG. Um cara muito hospitaleiro que jamais esquecerei.

À minha amiga Dra. Débora Costa Reis pela amizade, incentivo e apoio na realização do doutorado.

À doutoranda Clináscia Rodrigues Rocha pela amizade e a Profa. Dra. Nísia Andrade Villela Dessimoni Pinto (UFVJM), pela colaboração nas análises de minerais.

À equipe do Laboratório 258 do Departamento de Química da UFMG pela colaboração na determinação dos pontos de fusão. Em especial ao Vitor Munhoz e Roberta Viana, pela amizade.

Aos meus amigos (Márcio Vasconcelos e Renato Camilo) que sempre mostram que a distância nunca apaga uma amizade verdadeira.

Aos meus amigos de graduação Adriane Gama, Juvino Rodrigues, Léia Claudiano, Verônica Oliveira, Junior Ribeiro, Dominique Fernandes, Ronny Araújo e Sandra Márcia, mesmo ausente, sempre lembrei todos nessa jornada, obrigado a todos pelos incentivos que de alguns eram quase diários.

À Paulete e à Lilian da Secretaria da Pós-graduação do DQ/UFMG pela prontidão e presteza com que sempre nos auxiliam.

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

À UFAM, pela liberação e apoio durante o doutorado.

À FAPEAM pela bolsa concedida.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

“Para conseguir a amizade de uma pessoa digna é preciso desenvolvermos em nós mesmos as qualidades que naquela admiramos.”

Sócrates

Resumo

A espécie *Justicia acuminatissima* (Acanthaceae) é uma planta medicinal conhecida popularmente como “sara-tudo”. As folhas são utilizadas amplamente na Região Amazônica para alívio de processos inflamatórios. A partir dessas informações, este trabalho teve como objetivo realizar estudos químicos e ensaios farmacológicos para comprovar cientificamente seu uso. Para isso, folhas e galhos foram coletados no Município de Itacoatiara-AM. Após secagem e moagem procedeu-se à maceração separadamente em etanol e etanol a 70% do material botânico coletado. Os extratos brutos obtidos em etanol foram fracionados com solventes em ordem crescente de polaridade, utilizando como eluentes hexano, DCM, AcOEt e MeOH. Dessa forma foram obtidas quatro frações a partir das folhas e o mesmo foi realizado com os galhos. Um extrato aquoso foi também preparado a partir do decocto das folhas.

A investigação fitoquímica das frações obtidas das folhas e galhos de *J. acuminatissima* proporcionou o isolamento dos esteroides sitosterol e mistura de sitosterol com estigmasterol, além dos triterpenos lupeol, acil-lupeol, friedelina, friedelinol, mistura de lupeol com α -amirina e β -amirina, mistura de betulina e eritrodiol e ácido betulínico, isolados a partir das frações em hexano e diclorometano das folhas e galhos. As frações em acetato de etila das folhas e galhos proporcionaram o isolamento dos esteroides glicosilados sitosterol e estigmasterol em mistura, além do ácido *p*-hidroxibenzóico e de um alcaloide inédito (3-etil-8-oxa-3-azabicyclo[3,2,1]octano-1,6,7-triol). A mistura de α -glucose e β -glucose, além da sacarose foram isoladas a partir do extrato em metanol das folhas.

O estudo fitoquímico do extrato aquoso das folhas de *J. acuminatissima* foi realizado por meio de análises em CLAE preparativa. Como resultado, um novo derivado de luteolina glicosilada foi isolado: luteolina-3'-*O*- β -xilofuranosídeo. Além disso, três outros derivados de luteolina glicosilada foram descritos pela primeira vez no gênero *Justicia*: luteolina-5-*O*- β -rutinosídeo, luteolina-7-*O*- β -rutinosídeo e luteolina-7-*O*- β -glicosídeo. Estudos teóricos foram realizados para os flavonoides obtidos. Essas análises auxiliaram a elucidação desses compostos.

Em relação aos estudos farmacológicos, extratos apolares da folha e alguns triterpenos mostraram atividades antimicrobiana e anti-inflamatória. Além disso, a fração em AcOEt das folhas mostrou ação antimicrobiana significativa contra *E. coli* e *C. albicans*, as frações em DCM exibiram ação maior do que 60% para todos os micro-organismos testados na concentração de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As frações FAF, FDF, FMF e FF, além do lupeol, luteolina-3'-*O*-xilofuranosídeo e da mistura de β -sitosterol e estigmasterol mostraram redução no quadro inflamatório das patas de ratos. É importante salientar que, durante os estudos com *J. acuminatissima*, realizaram-se análises em CLAE para verificar possíveis alterações químicas após utilização de raios gama como método de descontaminação dessa espécie. Como resultados, percebeu-se que a incidência de radiação gama até 20 kGy não interfere na integridade química de *J. acuminatissima*. Além disso, estes estudos mostram que doses de 3,0 kGy são suficientes para a eliminação de *Aspergillus aculeatus*, espécie de fungo predominante nas folhas da espécie estudada.

Palavras-chave: Acanthaceae, *Justicia acuminatissima*, triterpenos, flavonoides, atividade anti-inflamatória, atividade antimicrobiana e radiação gama.

Abstract

Justicia acuminatissima (Acanthaceae) is a medicinal plant, popularly known as "sara-tudo". This species is widely used in the Amazon region to relief inflammatory processes. The literature does not describe chemical and biological studies for this species. This study aimed to conduct chemical and pharmacological studies that prove their scientific use. Leaves and twigs were collected in Itacoatiara city - Amazonas state. After drying and grinding the material (separately) was performed the maceration with ethanol and ethanol 70% (v/v), yielding the respective crude extract. The leaf and twigs extracts obtained in ethanol were fractionated with solvents in an order of increasing polarity, such as hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and methanol. Thus four fractions from the leaves and four fractions from the twig were obtained.

Phytochemical studies of the hexane fractions of leaves and twigs of *J. acuminatissima* provided sitosterol, a mixture of stigmasterol with sitosterol, lupeol, acyl-lupeol, friedelin, friedelinol, mixture of α -amyrin and lupeol, betulinic acid and the mixture of erythrodiol with betulin. The fractions of ethyl acetate from the leaves and twigs provided the isolation of a mixture of stigmasterol and sitosterol glucoside, besides the 4-hydroxy-benzoic acid and new alkaloid (3-ethyl-8-oxa-3-azabicyclo [3,2,1] octane-1,6,7-triol). A mixture of α -glucose and β -glucose, sucrose was isolated from the methanol extract of the leaves.

Study of aqueous extract of leaves of *J. acuminatissima* was performed by HPLC analysis. As a result, a new derivative of luteolin glycosides was isolated: luteolin-3'-*O*-xylofuranoside. In addition, three other luteolin glycoside derivatives were obtained for the first time for the *Justicia*: luteolin-5-*O*-rutinoside, luteolin-7-*O*-rutinoside, and luteolin-7-*O*-glucoside. Theoretical studies were performed to flavonoids. These analyses allowed the elucidation of these compounds.

The polar extract, nonpolar extract and some triterpenes and flavonoids exhibited antimicrobial and anti-inflammatory activities. Furthermore, the ethyl acetate fraction showed a expressive antimicrobial activity against *E. coli* and *C. albicans*. The dichloromethane fraction of leaves presented a 60% higher activity against all microorganisms tested using the same concentration of 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. The fractions FAF, FDF, FMF, FF, lupeol, luteolin-3'-*O*-xylofuranoside, and the mixture of β -sitosterol/stigmasterol showed a significative reduction in the inflammatory process of rats paws. It is worth highlighting that during the studies with *J. acuminatissima* was performed HPLC analysis to check for possible chemical changes after use of gamma rays as a decontamination method of this species. As a result, it was found that the gamma radiation up to 20 kGy did not interfere in the chemical integrity of *J. acuminatissima*. Furthermore, it was observed that a dose of 3.0 kGy was enough for the elimination of *Aspergillus aculeatus*, predominant fungi on the leaves of the species studied.

Key Words: Acanthaceae, *Justicia acuminatissima*, triterpenes, flavonoids, anti-inflammatory activity, antimicrobial activity and gamma radiation.

Lista de Tabelas

Tabela 1.1 Espécies do gênero <i>Justicia</i> e suas distribuições geográficas	05
Tabela 1.2 Informações etnofarmacológicas de espécies do gênero <i>Justicia</i>	07
Tabela 1.3 Atividades farmacológicas de espécies do gênero <i>Justicia</i>	10
Tabela 1.4 Atividade biológica de substâncias isoladas de espécies de <i>Justicia</i>	15
Tabela 3.1. Resultados da prospecção fitoquímica dos extratos brutos das folhas e galhos de <i>J. acuminatissima</i> .	45
Tabela 3.2 Dados de RMN de ^{13}C de FHF-HD10, incluindo dados de RMN de ^{13}C de β -sitosterol e estigmasterol descritos na literatura	63
Tabela 3.3 Dados de RMN de ^{13}C de FHF-HD3, FHF-HD18 e FHF-HD25, incluindo dados de RMN de ^{13}C da friedelina, friedelinol e α -amirina descritos na literatura	64
Tabela 3.4 Dados de RMN de ^{13}C de FHG-HD14, FDF-DA23 e FDF-DA30, incluindo dados de RMN de ^{13}C do lupeol, betulina, eritrodiol e ácido betulínico descritos na literatura	65
Tabela 3.5 Dados de RMN de ^{13}C de FAF-DA8 incluindo dados de RMN de ^{13}C de sitosterol-3- <i>O</i> -D-glicopiranosídeo e estigmasterol-3- β - <i>O</i> -D-glicopiranosídeo	66
Tabela 3.6 Dados de RMN de ^{13}C de FDG-DA15 incluindo dados de RMN de ^{13}C de Acil-lupeol	67
Tabela 3.7 Dados de RMN de ^{13}C de FF4, incluindo dados de RMN de ^{13}C da luteolina e xilofuranose descritos na literatura (Orhan <i>et al.</i> , 2012; Rinaldo <i>et al.</i> , 2007)	71
Tabela 3.8 Dados de RMN de ^{13}C de FF3, incluindo dados de RMN de ^{13}C da luteolina-7- <i>O</i> - β -glicosídeo descritos na literatura (Jiang <i>et al.</i> , 2010)	75
Tabela 3.9 Dados de RMN de ^{13}C de FF1, incluindo dados de RMN de ^{13}C da luteolina-5- <i>O</i> - β -rutinosídeo descritos na literatura (Zarzuolo <i>et al.</i> , 1995)	80
Tabela 3.10 Dados de RMN de ^{13}C de FF2, incluindo dados de RMN de ^{13}C da luteolina-7- <i>O</i> - β -rutinosídeo descritos na literatura (Orhan <i>et al.</i> , 2012)	82
Tabela 4.1 Diâmetro médio dos monoesporos de <i>Aspergillus aculeatus</i> após cada dose de irradiação gama	95
Tabela 5.1 Concentração dos géis a partir das amostras de <i>J. acuminatissima</i>	100
Tabela 5.2 Atribuição de escores para a atividade anti-inflamatória observada nas patas dos ratos tratados	119
Tabela 5.3 Atividade tripanocida de extrato, frações e substâncias isoladas de <i>J. acuminatissima</i>	122
Tabela 5.4 Screening da atividade antimicrobiana de extratos, frações e fitoconstituintes de <i>J. acuminatissima</i>	125
Tabela 6.1 Quantidade diária de elementos micronutrientes recomendados para adultos	129
Tabela 6.2 Principais funções dos elementos micronutrientes nos seres humanos	130
Tabela 6.3 Principais funções dos elementos macro nutrientes	131
Tabela 6.4 Concentração de elementos macronutrientes presentes nas amostras de <i>J. acuminatissima</i>	135
Tabela 6.5 Concentração de elementos micronutrientes presentes na matéria bruta de <i>J. acuminatissima</i>	136

Lista de Figuras

Figura 1.1 Fotos das folhas e flores de <i>Justicia acuminatissima</i> .	25
Figura 2.1 Placa cromatográfica preparativa revelada sob luz UV a 366 nm do sólido cristalino FAF-D7-1.	38
Figura 3.1 (A) Tubo de ensaio contendo a amostra FF, mostrando teste positivo para compostos fenólicos; (B) e (C) placas cromatográficas de sílica gel eluídas em AcOEt/ácido fórmico/ácido acético/H ₂ O (100:11:11:27) e reveladas com NH ₄ OH (mostrando manchas amarelas) e KOH 10% sob luz UV 366 (mostrando manchas azuis), indicando respectivamente as presenças de compostos fenólicos e cumarinas.	47
Figura 3.2 (A) Tubo de ensaio contendo FAL, mostrando teste positivo para alcalóides; (B) Tubo de ensaio contendo FS, mostrando teste positivo para saponinas.	47
Figura 3.3 Placa cromatográfica de FHG (a), FHF (b), FDG (c), FDF (d), FAF (e), FAG (f), β -sitosterol-estigmasterol (g) e lupeol (h) eluída em Hex/AcOEt (7:3) e reveladas em vanilina ácida.	48
Figura 4.1 Cromatograma de CLAE em 370 nm de FF ₀ , fração das folhas de <i>J. acuminatissima</i> não submetida a radiação gama.	87
Figura 4.2 Cromatograma de CLAE em 370 nm de FF ₁ .	87
Figura 4.3 Cromatograma de CLAE em 370 nm de FF ₃ .	88
Figura 4.4 Cromatograma de CLAE em 370 nm de FF ₅ .	88
Figura 4.5 Cromatograma de CALE em 370 nm de FF ₁₀ .	88
Figura 4.6 Cromatograma de CLAE em 370 nm de FF ₂₀ .	89
Figura 4.7 Cromatograma de CLAE em 370 nm de FFJ ₀ , fração fenólica de <i>J. acuminatissima</i> não irradiadas.	89
Figura 4.8 Cromatograma de CLAE em 370 nm de FFJ ₁ .	90
Figura 4.9 Cromatograma de CLAE em 370 nm de FFJ ₃ .	90
Figura 4.10 Cromatograma de CLAE em 370 nm de FFJ ₅ .	90
Figura 4.11 Cromatograma de CLAE em 370 nm de FFJ ₁₀ .	91
Figura 4.12 Cromatograma de CLAE em 370 nm de FFJ ₂₀ .	91
Figura 4.13 Cromatograma de CLAE em 370 nm da sobreposição de FFJ ₀ , FFJ ₁ , FFJ ₃ , FFJ ₅ , FFJ ₁₀ e FFJ ₂₀ das folhas de <i>J. acuminatissima</i> .	91
Figura 4.14 Espécie de <i>Aspergillus aculeatus</i> .	95
Figura 4.15 Monoesporos de <i>Aspergillus aculeatus</i> viáveis após dose de 1,0kGy.	95
Figura 5.1 (A) Mecanismo gerador de lesão por impacto, segundo o modelo de Fontoura (2007); (B) Animal anestesiado submetido ao mecanismo gerador da lesão por impacto; (C) Aspecto visual da lesão muscular.	101
Figura 5.2 Animal anestesiado submetido a tratamento com ultra-som terapêutico.	102
Figura 5.3 (A) Retirada do músculo para fixação em formol a 10%; (B) Parte do músculo removida para obtenção das laminas histológicas; (C) Músculos fixados em formol a 10%.	103
Figura 5.4 Fotomicrografia de histologia de tecido subcutâneo da pata de rato submetido à lesão por impacto sem tratamento (pata controle) (1), pata tratada com dexametasona (controle positivo) em (A) 24 h, (B) 48 h e (C) 72 h.	107
Figura 5.5 Fotomicrografias de histologia de tecido subcutâneo da pata de rato submetido a tratamento com FHF (1), FHG (2) e pata controle (3) em (A) 24 h, (B) 48 h e (C) 72h.	108
Figura 5.6 Fotomicrografias de histologia de tecido subcutâneo da pata de rato submetido a tratamento com FDG (1), FDF (2) e pata controle (3) em (A) 24 h, (B) 48 h e (C) 72h.	109
Figura 5.7 Fotomicrografias de histologia de tecido subcutâneo da pata de rato submetido a tratamento com FAG (1), FAF (2) e pata controle (3) em (A) 24 h, (B) 48 h e (C) 72 h.	110

Figura 5.8 Fotomicrografias de histologia de tecido subcutâneo da pata de rato submetido a tratamento com FMG (1), FMF (2) e pata controle (3) em (A) 24 h, (B) 48 h e (C) 72h.	111
Figura 5.9 Fotomicrografias de histologia de tecido subcutâneo da pata de rato submetido a tratamento com EEF (1), EEG (2) e pata controle (3) em (A) 24 h, (B) 48 h e (C) 72h.	112
Figura 5.10 Fotomicrografias de histologia de tecido subcutâneo da pata de rato submetido a tratamento com EE7G (1), EE7F (2) e pata controle (3) em (A) 24 h, (B) 48 h e (C) 72h.	113
Figura 5.11 Fotomicrografias de histologia de tecido subcutâneo da pata de rato submetido a tratamento com FHG-HD14 (1) e pata controle (2) em (A) 24 h, (B) 48 h e (C) 72 h.	114
Figura 5.12 Fotomicrografias de histologia de tecido subcutâneo da pata de rato submetido a tratamento com FHF-HD10 (1) e pata controle (2) em (A) 24 h, (B) 48 h e (C) 72 h.	115
Figura 5.13 Fotomicrografias de histologia de tecido subcutâneo da pata de rato submetido a tratamento com FAF-DA8 (1) e pata controle (2) em (A) 24 h, (B) 48 h e (C) 72 h.	116
Figura 5.14 Fotomicrografias de histologia de tecido subcutâneo da pata de rato submetido a tratamento com Luteolina-7'- <i>O</i> - β -rutinosideo (1), Luteolina-7'- <i>O</i> - β -glicosideo (2), Luteolina-3'- <i>O</i> - β -xilofuranosideo (3), Luteolina-5'- <i>O</i> - β -rutinosideo (4), FF (5) em 24 h, 48 h e 72 h.	118
Figura 5.15 Exemplo de microplaca do ensaio antibacteriano e antifúngico.	124

Lista de Esquemas

Esquema 2.1 Procedimento experimental para a obtenção dos extratos brutos das folhas de <i>J. acuminatissima</i> .	30
Esquema 2.2 Procedimento experimental para a obtenção das frações das folhas de <i>J. acuminatissima</i> .	31
Esquema 2.3 Procedimento experimental para a obtenção dos extratos brutos dos galhos de <i>J. acuminatissima</i> .	31
Esquema 2.4 Procedimento experimental para a obtenção das frações dos galhos de <i>J. acuminatissima</i> .	32
Esquema 2.5 Procedimento experimental do fracionamento cromatográfico de FHG.	33
Esquema 2.6 Procedimento experimental do fracionamento cromatográfico de FHF.	34
Esquema 2.7 Procedimento experimental do fracionamento cromatográfico de FDG.	35
Esquema 2.8 Procedimento experimental do fracionamento cromatográfico de FDF.	36
Esquema 2.9 Procedimento experimental do fracionamento cromatográfico de FAG.	37
Esquema 2.10 Procedimento experimental do fracionamento cromatográfico de FAF.	38
Esquema 2.11 Procedimento experimental do fracionamento cromatográfico de FMF.	39
Esquema 2.12 Procedimento experimental do fracionamento cromatográfico de FMF-AM25.	40
Esquema 2.13 Procedimento experimental do fracionamento cromatográfico de AM20.	41
Esquema 2.14 Sequência metodológica para o isolamento dos constituintes polares do FAqF.	42

Lista de Símbolos e Abreviaturas

δ - Deslocamento Químico
BHI- Brain heart infusion
CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência
CCD - Cromatografia em camada delgada
CCS - Cromatografia em coluna de sílica gel
CIM - Concentração Inibitória Mínima
COSY – *Correlation Spectroscopy*
DEPT 135° - *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer* – ângulo 135°
HMBC - *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*
HMQC - *Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*
HSQC - *Heteronuclear Single Quantum Coherence*
Hz - Hertz
IV - Infravermelho
J - Constante de acoplamento escalar
kGy- kilogray
NOESY - *Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*
RMN de ¹³C - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN de ¹H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
TMS - Tetrametilsilano
TR - Tempo de retenção
ATR - Espectroscopia no infravermelho por Refletância Total Atenuada
DCM - Diclorometano
AcOEt - Acetato de Etila
EtOH - Etanol
MeOH– Metanol
UV- Ultravioleta
°C- Graus Celsius
 μ L- microlitro
 μ g/mL- micrograma por mililitro
mL- mililitro
1D- unidimensional
2D- bidimensional
TFA-ácido trifluoroacético

SUMÁRIO

1. Capítulo 1: Introdução	02
1.1. Família Acanthaceae	03
1.2. Gênero <i>Justicia</i>	03
1.3. Informação de espécies de <i>Justicia</i> utilizadas na medicina tradicional	04
1.4. Substâncias isoladas do gênero <i>Justicia</i>	11
1.5. Atividades farmacológicas de substâncias isoladas do gênero <i>Justicia</i>	12
1.6. <i>Justicia acuminatissima</i>	25
1.7. Objetivos	26
2. Capítulo 2: Parte Experimental (Fitoquímica)	27
2.1. Materiais e Métodos	28
2.2. Análise Fitoquímica	30
2.2.1. Coleta e identificação botânica	30
2.2.2. Secagem e Moagem	30
2.2.3. Obtenção dos extratos brutos e frações	30
2.2.4. Prospecção Fitoquímica	32
2.2.5. Fracionamento Cromatográfico de FHG	33
2.2.6. Fracionamento Cromatográfico de FHF	34
2.2.7. Fracionamento Cromatográfico de FDG	34
2.2.8. Fracionamento Cromatográfico de FDF	35
2.2.9. Fracionamento Cromatográfico de FAG	36
2.2.10. Fracionamento Cromatográfico de FAF	37
2.2.11. Fracionamento Cromatográfico de FMF	39
2.3. Obtenção das frações polares das folhas para análise em CLAE	41
2.3.1. Fracionamento Cromatográfico de FF em CLAE	42
2.4. Óleos vegetais	43
2.4.1. Coleta do material	43
2.4.2. Extração dos óleos essenciais	43
3. Capítulo 3: Identificação estrutural dos fitoconstituintes	44
3.1. Prospecção fitoquímica	45
3.2. Análises por CCD das frações FHF, FHG, FDF, FDG, FAF, FAG	48
3.3. Identificação dos compostos isolados de FHF	48
3.3.1. Análise Estrutural de FHF-HD3	48
3.3.2. Análise Estrutural de FHF-HD10	49
3.3.3. Análise Estrutural de FHF-HD18	50
3.4. Identificação dos compostos isolados de FHG	51
3.4.1. Análise Estrutural de FHG-HD14	51
3.4.2. Análise Estrutural de FHG-HD22	51
3.5. Identificação dos compostos isolados de FDF	52
3.5.1. Análise Estrutural de FDF-HD4	52
3.5.2. Análise Estrutural de FDF-HD9	52
3.5.3. Análise Estrutural de FDF-HD25	53
3.5.4. Análise Estrutural de FDF-DA23	54
3.5.5. Análise Estrutural de FDF-DA30	55
3.6. Identificação dos compostos isolados de FDG	55
3.6.1. Análise Estrutural de FDG-HD4	55
3.6.2. Análise Estrutural de FDG-HD15	56

3.7. Identificação dos compostos isolados de FAF	57
3.7.1. Análise Estrutural de FAF-D7-1	57
3.7.2. Análise Estrutural de FAF-DA8	59
3.7.3. Análise Estrutural de FAF-A9	59
3.8. Identificação dos compostos isolados de FAG	60
3.8.1. Análise Estrutural de FAG-DA10	60
3.9. Identificação dos compostos isolados de FMF	61
3.9.1. Análise Estrutural de AM20-M12	61
3.9.2. Análise Estrutural de AM20-M14	61
3.10. Identificação dos compostos isolados de FAqF	68
3.10.1. Análise Estrutural de FF4	68
3.10.2. Análise Estrutural de FF3	71
3.10.3. Análise Estrutural de FF1 e FF2	75
4. Capítulo 4: Efeitos da radiação gama em compostos fenólicos de <i>J. acuminatissima</i> e na avaliação letal em <i>Aspergillus aculeatus</i>	83
4A. Efeitos da radiação gama em compostos fenólicos de <i>J. acuminatissima</i>	84
4.1A. Introdução	84
4.2A. Materiais e métodos	85
4.2A.1. Efeito da radiação gama nos constituintes fenólicos das folhas de <i>J. acuminatissima</i> (Método 1)	85
4.2A.2. Radiação gama no material vegetal	85
4.2A.2.1 Obtenção das frações fenólicas	86
4.2A.2.2. Análises em CLAE	86
4.3A. Efeito da radiação gama nos constituintes fenólicos das folhas de <i>J. acuminatissima</i> (Método 2)	86
4.3A.1. Obtenção da fração fenólica	86
4.3A.2. Radiação gama das frações fenólicas e análise em CLAE	87
4.4A. Resultados e Discussão	87
4.4A.1. Análise por CLAE das amostras irradiadas (método 1)	87
4.5A. Análise por CLAE das amostras irradiadas (método 2)	89
4B. Avaliação da Dose Letal por Radiação Gama em <i>Aspergillus aculeatus</i>	92
4.1B. Introdução	92
4.2B. Materiais e métodos	93
4.3B. Resultados e Discussão	94
5. Capítulo 5: Testes Biológicos	97
5.1. Ensaio de atividade anti-inflamatória	98
5.1.2. Introdução	98
5.1.3. Materiais e métodos	99
5.1.3.1. Preparação do gel	100
5.1.3.2. Aparelho de Ultra-som	100
5.1.3.3. Obtenção da lesão muscular	101
5.1.3.4. Obtenção das lâminas histológicas	102
5.1.3.5. Resultados e Discussão	103
5.2. Testes de atividade contra <i>Trypanosoma cruzi</i>	120
5.2.1. Introdução	120
5.2.3. Materiais e métodos	121
5.2.4. Resultados e Discussão	122

5.3. Testes de atividade antimicobiana	123
5.3.1. Introdução	123
5.3.2. Materiais e métodos	124
5.3.3. Resultados e Discussão	125
6. Capítulo 6: Análises de Metais	127
6.1. Introdução	128
6.2. Materiais e métodos	134
6.3. Resultados e Discussão	135
Conclusões	138
Referências Bibliográficas	140



Capítulo 1- Introdução

1. Introdução

A natureza desperta continuamente um fascínio encantador no ser humano, não somente pelos recursos oferecidos para sua nutrição e manutenção na terra, mas, também, por ser sua principal fonte de inspiração e aprendizado. A busca incessante pela compreensão das leis da natureza e o desafio de transpor barreiras à sua sobrevivência, como o clima e as doenças, são fatores que levaram o ser humano ao atual estágio de desenvolvimento científico (Viegas-Junior *et al.*, 2006). Estudos etnobotânicos são frequentemente significativos em divulgar espécies vegetais de uso medicinal importante em uma determinada região, especialmente para a descoberta de novos princípios ativos (Muthee *et al.*, 2011).

O descobrimento de novas drogas a partir de produtos naturais é uma das ferramentas que tem contribuído bastante para o desenvolvimento da química (Cordell, 2000). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente de 25% a 30% das novas drogas avaliadas para fins medicinais são oriundas de plantas, fungos ou outras espécies biológicas (WHO, 2006). A OMS avalia também que 65% a 80% da população mundial, especialmente dos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, não têm acesso aos medicamentos modernos, dependendo essencialmente de plantas para tratamentos primários de doenças (WHO, 2002). No entanto, poucas espécies utilizadas popularmente têm sido estudadas cientificamente quanto à sua qualidade, segurança e eficácia (Calixto, 2005).

O conhecimento sobre plantas medicinais é um dos maiores recursos terapêuticos de muitas comunidades e grupos étnicos (Maciel *et al.*, 2002). No Brasil, a utilização da medicina tradicional não é diferente, uma vez que o país é detentor de cerca de 20% da biodiversidade mundial, com destaque para a Floresta Amazônica, a maior do planeta, que se apresenta como uma fonte inestimável de matérias-primas para fins econômicos, sociais, científicos e de saúde (Souza *et al.*, 2004). A Amazônia Brasileira constitui-se hoje em um dos maiores bancos genéticos do mundo, sendo o Brasil detentor de um terço da flora mundial (Yunes *et al.*, 2001).

Como exemplo do potencial da biodiversidade da Região Amazônica, um levantamento realizado no período de 1993 a 1994 descreveu cerca de 113 espécies de plantas de uso medicinal (Milliken & Bruce, 1997). Em 1996, outras 85 espécies de plantas e fungos foram descritas, sendo 38 dessas espécies utilizadas tradicionalmente por grupos de comunidades Yanomami como antimaláricas e febrífugas. Algumas outras espécies foram descritas por ribeirinhos no tratamento da leishmaniose, uma doença de elevada incidência na Região Amazônica. Mais recentemente, 229 espécies de uso medicinal foram descritas pela comunidade de Marudá no Estado do Pará (Coelho-Ferreira *et al.*, 2009).

Sendo assim, considerando a riqueza da flora amazônica, torna-se premente a investigação de novas drogas a partir do estudo fitoquímico de espécies vegetais encontradas na região. Neste trabalho é descrito o estudo fitoquímico e biológico de *Justicia acuminatissima* (Acanthaceae), uma espécie vegetal bastante utilizada na medicina tradicional da Região Amazônica.

1.1. Família Acanthaceae

A família Acanthaceae pertence à superordem Lamiiflorae, ordem Scrophulariales (sensu Dahlgren), e compreende cerca de 250 gêneros com 2.500 espécies (Wasshausen, 2004), distribuídas amplamente nos trópicos de todo o mundo e pouco representadas nas regiões temperadas (Mabberley, 1997). As árvores são raras, sendo a maioria encontrada como arbustos, ervas ou trepadeiras, xerófitas e pantanosas. O Brasil constitui um de seus principais centros de diversidade, apresentando aproximadamente 40 gêneros com 542 espécies (Barroso, 1986).

1.2. Gênero *Justicia*

Justicia apresenta cerca de 600 espécies e distribuição pantropical, sendo assim um dos gêneros mais amplos da família Acanthaceae (Graham, 1990). No entanto, o número total de espécies de *Justicia* na flora brasileira é desconhecido. As espécies desse gênero são descritas como ervas, subarbustos, arbustos, lianas ou, mais raramente, árvores. As plantas são hermafroditas, apresentam normalmente folhas opostas, simples e sem estípulas. As flores são isoladas ou em inflorescências. As brácteas e bractéolas são muitas vezes coloridas e vistosas. O cálice é persistente no fruto (Kameyama, 2006).

1.3. Informação de espécies de *Justicia* utilizadas na medicina tradicional

Muitas espécies de *Justicia* são usadas pela medicina popular, principalmente para o tratamento de problemas respiratórios (como broncodilatadores) (Joshi & Joshi, 2000), doenças de pele, inflamações, hemorróidas, distúrbios de estômago (como digestivo), febre (Kumar *et al.*, 2005), reumatismo, artrite, dor de cabeça, dor de ouvido, câncer (Ratnasooriya *et al.*, 2007) e HIV/SIDA (Lamorde *et al.*, 2010)

A Tabela 1.1 (p. 5) apresenta as espécies de *Justicia* utilizadas pela medicina popular, bem como sua distribuição geográfica e registros de estudos químicos e biológicos. A Tabela 1.2 (p. 7) apresenta o uso dessas espécies pela medicina popular, indicando a parte utilizada, modo de preparo, uso popular e a região onde é utilizada. A Tabela 1.3 (p. 10) apresenta as espécies do gênero *Justicia* com avaliações biológicas comprovadas cientificamente (Corrêa & Alcântara, 2012).

A espécie *Justicia adhatoda* é usada no tratamento de bronquites. Uma colher de chá da pasta de suas raízes é misturada com pasta de alho e pimenta, sendo tomada com leite materno pela manhã durante cerca de sete dias. Esta espécie apresentou 100% de eficácia no tratamento de bronquite na Índia (Aswal *et al.*, 1984).

A medicina popular em torno da aldeia Kotagiri na Índia faz uso de uma mistura de pó de raízes de *Cassia occidentalis* (Caesalpineae), *Derris brevipes* (Papilionaceae) e *Justicia simplex* para controlar a fertilidade. A administração desta mistura por alguns dias após a menstruação impede a concepção, sem nenhum efeito tóxico. Após esse tratamento, o número de crianças nascidas foi significativamente menor em relação ao controle, ratificando o uso das raízes dessa espécie como abortivo (Badami *et al.*, 2003). Outro exemplo é o uso medicinal da espécie *Justicia ciliata* para o tratamento de febre e dor (Day *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 1996).

Tabela 1.1 Espécies do gênero *Justicia* e suas distribuições geográficas

Espécie	Sinonímia (nome popular)	Distribuição Geográfica	Informação química	Informação biológica	Referência
<i>J. adhatoda L.</i>	<i>Adhatoda vasica</i> Ness (malabar nut e vasaka)	Nepal, Índia e Paquistão	Sim	Sim	Aswal <i>et al.</i> , 1984; Kumar <i>et al.</i> , 2005
<i>J. albobracteata L.</i>	Não descrita	Guatemala	Não	Sim	Awad <i>et al.</i> , 2009
<i>J. anselliana</i>	<i>Adhatoda anseliana</i> Ness (damandojé)	África (Mali, Guiné, Liberia, Gana, Nigéria, Togo e Benin)	Sim	Sim	Kpoviessi <i>et al.</i> , 2006
<i>J. aurea Schltl.</i>	<i>Cyrtanthera aurea Schltl.</i> , <i>Jacobina aurea Schltl.</i> e <i>Justicia umbrosa Benth.</i> (Justicia-amarela e Jacobina-amarela)	Guatemala	Não	Sim	Awad <i>et al.</i> , 2009
<i>J. betonica</i>	<i>Nicoteba betonica</i> (white shrimp plant)	Tailândia	Sim	Sim	Day <i>et al.</i> , 1999; Kanchanapoom <i>et al.</i> , 2004; Subbaraju <i>et al.</i> , 2004
<i>J. calycina Nees</i>	<i>J. acuminatissima</i> (sara-tudo)	Suriname	Não	Sim	Ruysschaert <i>et al.</i> , 2009
<i>J. cataractae</i>	Não descrita	Venezuela	Sim	Sim	Jiménez <i>et al.</i> , 2001
<i>J. ciliata</i>	<i>Dianthera ciliata</i>	Taiwan	Sim	Sim	Day <i>et al.</i> , 1999; Day <i>et al.</i> , 2000
<i>J. comata L.</i>	(marsh water-willow)	Peru	Não	Sim	McKenna <i>et al.</i> , 2011
<i>J. diffusa Willd</i>	<i>J. procumbens L.</i>	Índia	Não	Sim	Ignacimuthu <i>et al.</i> , 2008
<i>J. dumetorum Morong</i>	<i>Justicia squalida</i>	Bolivia	Não	Sim	Bourdy <i>et al.</i> , 2004
<i>J. extensa</i>	<i>Justicia talbotii</i> (castellana Hiern)	Gabão	Sim	Sim	Wang & Ripka, 1983; Ibrahim <i>et al.</i> , 2000
<i>J. flava Vahl</i>	<i>Adhatoda flava</i> (yellow justicea)	África	Sim	Sim	Rajakumar & Shivanna, 2009
<i>J. gendarussa Burm F.</i>	<i>Gendarussa vulgaris</i> Ness (daun rusa e gandarusa)	China, Índia, Sri Lanka e Malásia	Sim	Sim	Hadi & Bremner, 2001; Mruthunjaya & Hukkeri, 2007; Wahi <i>et al.</i> , 1974; Sridhar <i>et al.</i> , 2006
<i>J. ghiesbreghtiana</i>	<i>J. spicigera</i> (muitle, muicle e mexican honeysuckle)	México	Sim	Não	Ismail <i>et al.</i> , 1998; Euler & Alam, 1982
<i>J. glauca</i>	(Glaucous justicia)	México	Sim	Não	Subbaraju <i>et al.</i> , 1991; Vega-Avila <i>et al.</i> , 2009

Tabela 1.1 Continuação

Espécie	Sinonímia (nome popular)	Distribuição Geográfica	Informação química	Informação biológica	Referência
<i>J. hayatai</i>	<i>Justicia procumbens</i> L. var. <i>hayatai</i> <i>Yamamoto</i>	Taiwan	Sim	Não	Fukamiya & Lee, 1986
<i>J. heterocarpa</i> T. Anders.	<i>J. dinteri</i> S. Moore	Angola, Namíbia, Malawi, Moçambique, Zambia, Zimbabwe e África do Sul	Sim	Não	Al-Juaid & Abdel-Mojib, 2004 Ssegawa & Kasenene, 2007
<i>J. hyssopifolia</i> L.	(Mataprieta)	Ilhas Canárias	Sim	Não	Woradulayapinij <i>et al.</i> , 2005; Navarro <i>et al.</i> , 2001a
<i>J. ideogenes</i>	Não descrita	Brasil	Não	Sim	Schultes, 1993; Adams <i>et al.</i> , 2007
<i>J. insularis</i>	(Mmeme e kpahunmarogu)	Nigéria	Não	Sim	Ajibesin <i>et al.</i> , 2008
<i>J. neesii</i> Ramamoorthy	<i>J. micrantha</i> Wall.	Índia	Sim	Sim	Rajasekhar & Subbaraju, 2000; Chariandy <i>et al.</i> , 1999
<i>J. patentiflora</i> Hemsl.	<i>Mananthes patentiflora</i> Bremek.	Vietnam	Sim	Sim	Susplugas <i>et al.</i> , 2005
<i>J. pectoralis</i> Jacq.	(Tilia, chambá e papa uwii)	América Tropical	Sim	Sim	Leal <i>et al.</i> , 2000; Lino <i>et al.</i> , 1997; Moreno <i>et al.</i> , 1994; Cano & Volpato, 2004;
<i>J. plectrants</i>	Não descrita	Brasil	Não	Sim	Leão <i>et al.</i> , 2007
<i>J. procumbens</i> L.	(Ramakrishna theertham)	Taiwan e Índia	Sim	Sim	Chen <i>et al.</i> , 1996; Chen <i>et al.</i> , 1995; Savithramma <i>et al.</i> , 2007; Asano, 1996
<i>J. prostrata</i> Gambe	Não descrita	Índia	Sim	Sim	Sanmugapriya <i>et al.</i> , 2005a e 2005b
<i>J. purpurea</i> L.	<i>Justicia carnea</i>	Índia	Sim	Sim	Kavitha <i>et al.</i> , 2003
<i>J. reptans</i> Swatz	(Mutuquinha)	Brasil	Sim	Sim	Rodrigues <i>et al.</i> , 2010
<i>J. rhodoptera</i>	Não descrita	Madagascar	Sim	Sim	Williams, 2003
<i>J. schimperiana</i>	(Sensel, simiza, timisa e dumoga)	Etiópia	Não	Sim	Umer <i>et al.</i> , 2010
<i>J. secunda</i>	(Brudu uwí)	Suriname	Não	Sim	Teklehaymanot, 2009
<i>J. sericea</i>	(Inca Queen)	Peru	Não	Sim	Rojas <i>et al.</i> , 2003
<i>J. simplex</i>	Não descrita	Índia	Sim	Sim	Badami <i>et al.</i> , 2003
<i>J. spicigera</i>	(Mohintli)	México	Sim	Sim	Meckes <i>et al.</i> , 2004
<i>J. valida</i>	Não descrita	Taiwan	Não	Sim	Woradulayapinij <i>et al.</i> , 2005

Tabela 1.2 Informações etnofarmacológicas de espécies do gênero *Justicia*

Espécie	Parte utilizada	Uso popular	Preparação/ Administração	Região	Referência
<i>J. adhatoda</i>	Raiz	Bronquite	Colher de chá de pasta da raiz	Índia	Aswal <i>et al.</i> , 1984; Joshi & Joshi, 2000
	Flor, fruto e raiz	Febre, tosse, asma e anti-helmíntico	Suco	Índia	Kumar <i>et al.</i> , 2005; Joshi & Joshi, 2000
	Folha	Diarréia e tumor	Suco	Índia	Kumar <i>et al.</i> , 2005
	Folha e raiz	Expectorante, tuberculose, abortivo, antimicrobiano, antitussígeno e anticâncer	ND	Índia	Roja, 2011
<i>J. anselliana</i>	Folha	Doenças do coração	Decocção	Benin	Kpoviéssi <i>et al.</i> , 2009
	Raiz	Doenças do coração e inflamação dos testículos	Decocção	Benin	Kpoviéssi <i>et al.</i> , 2009
<i>J. betonica</i>	Partes aéreas	Diarréia e inflamação	ND	Índia	Kanchanapoon <i>et al.</i> , 2004
	Folha	HIV/AIDS	ND	Uganda	Lamorde <i>et al.</i> , 2010
<i>J. calycina</i>	Todas as partes	Utilizado para crianças quando estão aprendendo a andar	Bebê delicadamente “chicoteado” com a planta	Suriname	Ruyschaert <i>et al.</i> , 2009
<i>J. ciliata</i>	Todas as partes	Febre e dor	ND	China	Day <i>et al.</i> , 2000
<i>J. diffusa</i>	Folha	Doenças de pele	Pasta	Índia	Ignacimuthu <i>et al.</i> , 2008
<i>J. dumetorum</i>	Folha e flor	Infecção dos olhos	Gotas de suco nos olhos	Bolívia	Bourdy <i>et al.</i> , 2004
<i>J. extensa</i>	Todas as partes	Ictiotóxico (afeta o sistema respiratório dos peixes por paralisia)	Folhas, cascas e frutos esmagados	Gabão	Ibrahim <i>et al.</i> , 2000
<i>J. flava</i>	Semente	Dor de dente e náuseas	Pó	Sudão	El-Kamali, 2009
	Folha e flor	Hemorroidas e desordens estomacais	ND	Gana	Agbovie <i>et al.</i> , 2002
	Folha	HIV/AIDS	ND	Uganda	Lamorde <i>et al.</i> , 2010
<i>J. gendarussa</i>	Folha	Febre, hemiplegia, reumatismo, artrite, dor de cabeça, dor de ouvido, dores musculares, distúrbios respiratórios e problemas digestivos	Decocção	China e Índia	Ratnasooriya <i>et al.</i> , 2007
		Dor muscular e osso fraturado	Pasta aquecida aplicada sobre a área afetada	Malásia	Ahmad & Holdsworth, 2003
		Reumatismo e artrites	Cataplasma	Vietnã	Ahmad & Holdsworth, 2003
		Analgésico para tratar hemiplegia, reumatismo, artrite, dor de cabeça e dor de ouvido	Decocção	Sri Lanka	Ratnasooriya <i>et al.</i> , 2007
	Galho	Banho durante o parto	Decocção	Malásia	Ahmad & Holdsworth, 2003
	Todas as partes	Hemorroidas e febre	Decocção	Índia	Gurib-Fakin <i>et al.</i> , 1996
	Todas as partes	Dor e febre	Decocção	Brasil	De Albuquerque <i>et al.</i> , 2007

ND = Não descrito

Tabela 1.2 Continuação

Espécie	Parte utilizada	Uso popular	Preparação/ Administração	Região	Referência
<i>J. ghiesbreghtiana</i>	Folha	Disenteria	Decocção	México	Euler & Alam, 1982
<i>J. ideogenes</i>	Todas as partes	Tratamento de tremor	Decocção	América do sul	Schultes, 1993; Adams <i>et al.</i> , 2007
<i>J. insularis</i>	Folha	Dor de dente e laxante	Decocção	Nigéria	Ajibesin <i>et al.</i> , 2008
	Folha	Malária	Infusão mistura com <i>Ambrosia maritima</i>	Uganda	Adjanohoun <i>et al.</i> , 1993; Tabuti, 2008
<i>J. neesii</i>	Todas as partes	Anticâncer	Extrato etanólico	Índia	Rajasekhar & Subbaraju, 2000; Chariandy <i>et al.</i> , 1999
<i>J. pectoralis</i>	Folha	Asma, tosse, bronquite e expectorante	Xarope	Brasil	Agra <i>et al.</i> , 2007
	Folha	Cólica, diurético, febre e tosse	Infusão	Equador	Tene <i>et al.</i> , 2007
		Erupção cutânea	Esmagado	Caribe	Longuefosse & Nossin, 1996
	Partes aéreas	Catarro, erupção alérgica, insônia (sonífero), nervosismo, sedativo e hipotensor	Infusão	Cuba	Moreno <i>et al.</i> , 1994; Cano & Volpato, 2004
		Infecção pulmonar	ND	América do Sul	MacRae & Towers, 1984
	Todas as partes	Asma	suco	Suriname	Teklehaymanot, 2009
		Epilepsia	ND	Belize	Awad <i>et al.</i> , 2009
Folha e casca	Antidiabético, doenças respiratórias, doenças da próstata, antibacteriana e sedativo	ND	Colômbia	Lizcano <i>et al.</i> , 2010	
<i>J. plectratus</i>	Folha	Dor de cabeça	Banho	Brasil	Leão <i>et al.</i> , 2007
<i>J. procumbens</i>	Folha	Asma	Decocção	Índia	Savithramma <i>et al.</i> 2007
	Raiz	Febre tifóide	Decocção	Nepal	Joshi & Joshi, 2000
	Partes aéreas	Isca de peixe	Suco	Taiwan	Chen <i>et al.</i> , 1996; Fukumiya & Lee, 1986
	Todas as partes	Febre, dor devido a faringolaríngea, inflamação e câncer	Suco	Taiwan	Chen <i>et al.</i> , 1996
		Doenças da laringe e câncer	ND	China	Asano <i>et al.</i> , 1996

ND = Não descrito

Tabela 1.2 Continuação

Espécie	Parte utilizada	Uso popular	Preparação/ Administração	Região	Referência
<i>J. reptans</i>	Folha	Cólica	Infusão	Região Amazônica	Rodrigues <i>et al.</i> , 2010
<i>J. schimperiana</i>	Folha	Diarréia	Suco de folhas frescas esmagadas, tomado por via oral	Etiópia	Teklehaymanot, 2009
	Folha	Doenças do fígado	ND	Etiópia	Umer <i>et al.</i> , 2010
<i>J. secunda</i>	Folha	Depressão e anemia	Infusão	Costa do Marfim	N'Guessan <i>et al.</i> , 2010
	Todas as partes	Anemia	Criança banhada com decocção	Suriname e Congo	Teklehaymanot, 2009
<i>J. sericea</i>	Partes aéreas	Vaginite e inflamação		Peru	Rojas <i>et al.</i> , 2003
<i>J. simplex</i>	Raiz	Abortivo	Mistura do pó com plantas diferentes	Índia	Badami <i>et al.</i> , 2003
<i>J. spicigera</i>	Folha	Estimulante, cólica, inflamação (infecção da pele causada por ácaro) e diarréia	Decocção	México	Meckes <i>et al.</i> , 2004
	Partes aéreas	Infecção nos rins, estimulante, disenteria, cólica, câncer de útero e diabetes	Decocção	México	Vega-Avila <i>et al.</i> , 2009; Alonso-Castro <i>et al.</i> , 2011
	Folha	Diabetes	Infusão	México	Andrade-Cetto & Heinrich, 2005

ND = Não descrito

Tabela 1.3 Atividades farmacológicas de espécies do gênero *Justicia*

Espécie	Parte testada	Atividade biológica	Extrato	Referência
<i>J. albobracteata</i>	Folha	Epilepsia e ansiedade	EtOH	Awad <i>et al.</i> , 2009
<i>J. adhatoda</i>	Folha	Atividade hepatoprotetora	Aquoso	Bhattacharyya <i>et al.</i> , 2005
<i>J. anselliana</i>	Folha e raiz	Alelopática	EtOH	Ahanchede <i>et al.</i> , 2004
<i>J. aurea</i>	Folha	Epilepsia e ansiedade	EtOH	Awad <i>et al.</i> , 2009
<i>J. cataractae</i>	Todas as partes	Anti-hipertensiva	EtOH	Jiménez <i>et al.</i> , 2001
<i>J. ciliata</i>	Todas as partes	Inibição do carcinoma cervical humano	MeOH	Day <i>et al.</i> , 1999
<i>J. comata</i>	Todas as partes	Tratamento de deficiência cognitiva	Aquoso	McKenna <i>et al.</i> , 2011
<i>J. extensa</i>	Folha	Inseticida e antiviral	EtOH	Wang & Ripka, 1983
<i>J. gendarussa</i>	Folha	Antiartrose	EtOH	Paval <i>et al.</i> , 2009
	Partes aéreas	Inibição da transcriptase reversa do HIV tipo 1	Aquoso	Sridhar <i>et al.</i> , 2006
	Folha	Antinociceptiva e antioxidante	Aquoso	Ratnasooriya <i>et al.</i> , 2007a
	Folha	Imunossupressora	MeOH	Arokiyaraj <i>et al.</i> , 2007
<i>J. neesii</i>	Todas as partes	Inibição da leucemia linfocítica P388 em camundongos	EtOH	Chariandy <i>et al.</i> , 1999; Rajasekhar & Subbaraju, 2000
<i>J. patentiflora</i>	Folha e casca	Inibição do crescimento das células tumorais	AcOEt	Susplugas <i>et al.</i> , 2005
<i>J. pectoralis</i>	Folha	Bactericida e larvicida	AcOEt	Chariandy <i>et al.</i> , 1999
	Partes aéreas	Estrogênica, progestogênica e anti-inflamatória	MeOH	Locklear <i>et al.</i> , 2010
	Folha	Epilepsia e ansiedade	EtOH	Awad <i>et al.</i> , 2009
<i>J. procumbens</i>	Todas as partes	Inibição do crescimento das células tumorais e agregação de plaquetas	MeOH	Chen <i>et al.</i> , 1996; Fukamiya & Lee, 1986
	Partes aéreas	Inibição do vírus da estomatite vesicular (VSV)	MeOH	Asano <i>et al.</i> , 1996
<i>J. prostrata</i>	Folha	Anti-inflamatória, antiulcerogênica e antidepressivo	Aquoso e EtOH	Sanmugapriya <i>et al.</i> , 2005
<i>J. reptans</i>	Folha	Inibição da replicação do vírus HIV	EtOH	Bedoya <i>et al.</i> , 2008
<i>J. rhodoptera</i>	Folha	Inibição da linhagem de células humanas de câncer de ovário		Williams, 2003
<i>J. spicigera</i>	Folha	Anti-inflamatória	Hexano, CHCl ₃ e MeOH	Meckes <i>et al.</i> , 2004
	Folha	Antitumoral	Aquoso	Cáceres-Cortés <i>et al.</i> , 2001
	Partes aéreas	Inibição de linhas de células humanas de câncer	EtOH e Aquoso	Alonso-Castro <i>et al.</i> , 2011
	Partes aéreas	Antiprotozoaria	MeOH	Peraza-sanches <i>et al.</i> , 2005
<i>J. schimperiana</i>	Folha	Hepatoprotetora	Hidroalcoólico	Umer <i>et al.</i> , 2010
<i>J. valida</i>	Partes aéreas	Inibição da transcriptase reversa do HIV tipo 1 <i>in vitro</i>	Aquoso	Woradulayapini <i>et al.</i> , 2005

1.4. Substâncias isoladas do gênero *Justicia*

A família Acanthaceae apresenta uma grande diversidade de classes de compostos, tais como alcaloides, lignanas, flavonoides, terpenoides (iridoides, diterpenos e triterpenos) e aminas biogênicas (Angonese *et al.*, 1992). As espécies do gênero *Justicia* são conhecidas por apresentarem alcaloides, lignanas, compostos fenólicos, óleos essenciais, flavonoides e aminas aromáticas (Prajogo *et al.*, 2007).

As estruturas das substâncias citadas neste subitem estão apresentadas nas páginas 20 a 24.

No estudo fitoquímico de *J. cataractae* foram isolados triterpenoides e flavonoides (Jiménez *et al.*, 2001) e no extrato hidroalcolólico das folhas de *J. pectoralis*, a cumarina umbeliferona (**1**) (Lino *et al.*, 1997; Hui *et al.*, 1986; Leal *et al.*, 2000).

Uma triagem fitoquímica preliminar revelou a presença de lignanas, triterpenos e compostos fenólicos no extrato alcoólico de *J. prostrata*, enquanto que compostos fenólicos e glicosídeos foram identificados no extrato aquoso (Sanmugapriya *et al.*, 2005b). Nas folhas de *J. adhatoda* foram isolados os alcaloides vasicina (**9**), vasicinona (**10**) e vacisinol (**13**), além de óleos essenciais, vitamina C, β -caroteno e uma mistura de ácidos graxos, aos quais foram atribuídos os efeitos medicinais da planta (Subhashini & Arunachalam, 2010). Esteroides e triterpenos, que apresentaram efeito alelopático sobre o feijão-caupi (Kpoviessi *et al.*, 2006), foram isolados do extrato alcoólico das partes aéreas de *J. anselliana*.

As lignanas são os principais grupos de compostos relatados neste gênero (Ikram & Huq, 1966; Amim & Mehta, 1959; Bhalla *et al.*, 1982; Mehta *et al.*, 1963; Chakravarthy *et al.*, 1982; Ismail *et al.*, 1998; Lorenz *et al.*, 1999), em particular, lignanas arilnaftalídeos (Rao, 1978). As espécies utilizadas na medicina popular e estudadas cientificamente evidenciam a presença de lignanas. Um exemplo é a espécie medicinal *J. gendarussa*. Além dessa classe de compostos, flavonoides, alcaloides e esteroides foram isolados também desta espécie (Wahi *et al.*, 1974). Os compostos isolados desse gênero são apresentados na Tabela 1.4 (p. 15), bem como, suas informações biológicas.

Por exemplo, as lignanas cilinaftalídeo A (**36**), cilinaftalídeo B (**37**), heliobuftalmina (**45**), chinensinaftol metil éter (**39**), justicidina A (**46**), neojusticina B (**54**), taiwanina E metil éter (**58**), chinensinaftol (**38**), difilina (**42**), 4'-dimetil éter metil chinensinaftol (**41**) e uma lignana glicosilada (tuberculatina; **34**) foram isoladas de *J. ciliata* (Day *et al.*, 1999).

Estudos fitoquímicos mostraram que as folhas secas de *J. extensa* contêm cerca de 1% de justicidina P (**51**) (Wang & Ripka, 1983). Uma investigação química de *J. spicigera* relatou

a presença de ácidos graxos (Domínguez *et al.*, 1990), enquanto que a separação cromatográfica dos extratos de *J. heterocarpa* indicou a presença de ácidos graxos, terpenos, esteroides e lignanas (Al-Juaid & Abdel-Mojib, 2004).

No estudo do extrato acetato de etila de *J. patentiflora* foram isolados justicidina A (46), difilina (42), taiwanina E (57), tuberculatina (34), carinatona (35), justicinol (52), justiflorinol (53), patentiflorina A (31) e patentiflorina B (32). Carinatona (35), difilina (42), justicidina A (46), taiwanina E (57) e tuberculatina (34) foram encontrados também em *J. patentiflora* (Susplugas *et al.*, 2005).

1.5. Atividades farmacológicas de substâncias isoladas do gênero *Justicia*

As lignanas mostram diversos efeitos biológicos, tais como atividade citotóxica (Fukamiya & Lee, 1986; Hui *et al.*, 1986), antiangiogênica, leishmanicida, hipolipidêmica, antifúngica, antiasmática (Vasilev & Ionkova, 2005), antiviral (Bedoya *et al.*, 2008; Asano *et al.*, 1996), antineoplásica (Gordaliza *et al.*, 2000), piscicida (Munakata *et al.*, 1965), inseticida, tratamento da depressão, cardiotônica (Ghosal *et al.*, 1979), antiagregante plaquetário, analgésica (Chen *et al.*, 1996), inibidora da peroxidação lipídica e anti-inflamatória (Navarro *et al.*, 2004). Lignanas obtidas de *J. pectoralis* são citotóxicas para leucemia (Hui *et al.*, 1986).

Compostos fenólicos têm sido descritos também para esse gênero, com variadas atividades biológicas. A apigenina (3), por exemplo, foi relatada por exercer efeitos anti-inflamatórios como na redução do estresse oxidativo e impedimento da expressão de vários fatores inflamatórios (Sawatzky *et al.*, 2006). Há também relatos sobre o flavonoide vitexina (5), que age como um potente agente anti-inflamatório (Sridhar *et al.*, 2006).

A atividade anti-inflamatória de *J. spicigera* foi relatada na literatura (Meckes *et al.*, 2004). Uma potente atividade anti-inflamatória foi descrita também na literatura para uma lignana glicosilada isolada de *J. ciliata* (Day *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 1996). Por sua vez, as propriedades anti-inflamatórias dos extratos aquoso e alcoólico de *J. prostrata* foram atribuídas à presença de compostos fenólicos (Sanmugapriya *et al.*, 2005a). A cumarina umbeliferona (1), isolada do extrato hidroalcoólico das folhas de *J. pectoralis*, mostrou atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e broncodilatadora (Leal *et al.*, 2000; Lino *et al.*, 1997).

Algumas espécies de *Justicia*, *J. adhatoda* (Ikram & Huq, 1966; Amim & Mehta, 1959; Bhalla *et al.*, 1982; Mehta *et al.*, 1963), *J. gendarussa* (Chakarvarthy *et al.*, 1982) e *J. ghiesbreghtiana* (Ismail *et al.*, 1998; Lorenz *et al.*, 1999) produziram alcalóides bioativos. Vasicina (9) e vasicinona (10) têm sido relatadas como os componentes ativos de *J. adhatoda*.

O elenosídeo (**22**) possui ação ansiolítica como sedação e indução de relaxamento muscular (Navarro *et al.*, 2001a). Após o tratamento, observou-se que este composto atua com ações muito semelhantes a outros medicamentos tranquilizantes (Irwin, 1968). O efeito citotóxico do elenosídeo (**22**) foi também verificado para linhagens de células cancerosas humanas em uma faixa de concentração de 10^{-5} a 10^{-4} M. Em camundongos, apresentou DL₅₀ de 305 mg/kg e propriedades depressoras do sistema nervoso central (SNC) em doses de 25, 50 e 100 mg/kg. Assim, elenosídeo (**22**) parece ser um sedativo com citotoxicidade de largo espectro (Navarro *et al.*, 2001b). Não foi observada letalidade após cinco dias da administração desta substância (Alonso *et al.*, 1997). Por ter atividade antiviral, inseticida, cardiotônica, inibição da peroxidação lipídica analgésica, anti-inflamatória, antagonista do fator de ativação plaquetária, depressão do SNC e propriedades de estimulação, foi sugerido que a sua ação é semelhante a dos barbitúricos sedativos-hipnóticos (Navarro *et al.*, 2004).

Justicidina A (**46**), isolada de *J. betonica*, mostrou potente efeito citotóxico contra diferentes linhagens de células tumorais *in vitro*. No entanto, a substância justiciresinol (**62**) apresentou baixa citotoxicidade contra três linhagens de células tumorais humanas: A-549 (carcinoma de pulmão humano, ED₅₀ 31,3 pg/mL), MCF-7 (câncer de mama humano, ED₅₀ 22,3 pg/mL) e HT-29 (adenocarcinoma de cólon humano, ED₅₀ 18,3 pg/mL) (Subbaraju *et al.*, 1991).

Os compostos justicidina A (**46**) e B (**47**), difilina apiosídeo (**43**), difilina (**42**) e difilina apiosídeo-5-acetato (**44**) mostram forte atividade contra o vírus da estomatite vesicular (com MIC inferiores a 0,25 µg/mL) e baixa citotoxicidade (MIC > 31 µg/mL) contra as células pulmonares cultivadas de coelho (RL-33) (Asano *et al.*, 1996).

Para os compostos justicidin B (**47**) e justicidin E (**48**) foi descrita a inibição da agregação plaquetária induzida por adrenalina (Wu *et al.*, 2007). Estes compostos apresentaram um efeito inibitório sobre a ciclooxygenase-1 (COX-1). Os compostos neojusticina A (**54**), B (**55**), justicidina A (**46**), taiwanina E (**57**) e taiwanina E metil éter (**58**) inibiram agregação plaquetária (Chen *et al.*, 1996).

Podofilotoxina (**63**) foi incluída em uma ampla variedade de protocolos de quimioterapia. Esse composto foi usado como um precursor para a semi-síntese de derivados em terapêutica antineoplásica (Canel *et al.*, 2000).

O extrato em etanol de *J. reptans* mostra um efeito virucida sobre o HIV. Estudos revelam que essa espécie contém flavonoides glicosilados como principais componentes, porém esses flavonoides não foram identificados estruturalmente (Bedoya *et al.*, 2008). Este

tipo de composto tem sido relatado previamente por exibir propriedades anti-HIV como inibidores de integrase ou transcriptase reversa (Kumar *et al.*, 2005).

Como visto, espécies de *Justicia* apresentam atividades citotóxicas e antitumorais (Kpoviessi *et al.*, 2009), sendo empregadas também como hepatoprotetoras (Jasemine *et al.*, 2007), antigripais e no tratamento de infecções (Gulfraz *et al.*, 2008). Além de alcaloides (Zhang *et al.*, 2009), espécies do gênero apresentam-se ricas em lignanas (Hu *et al.*, 2008). Desta forma, a avaliação da composição química e o estudo da atividade antimicrobiana e anti-inflamatória de extratos e frações de *J. acuminatissima* poderão contribuir para o desenvolvimento de novos fitoterápicos ou, por outro lado, determinar constituintes químicos tóxicos e que apresentem efeitos indesejáveis à saúde humana.

Tabela 1.4 Atividade biológica de substâncias isoladas de espécies de *Justicia*

Composto	Atividade biológica	Espécie	Extrato/ fração	Referência
Umbeliferona (1)	Anti-inflamatória, analgésica e broncodilatadora	<i>J. pectoralis</i>	EtOH/H ₂ O	Leal <i>et al.</i> , 2000; Lino <i>et al.</i> , 1997
3',4'-Di-hidroxi-flavonol (2)	Antioxidante, previne o diabetes e vasodilatadora	<i>J. cataractae</i>	EtOH/H ₂ O	Jiménez <i>et al.</i> , 2001; Woodman <i>et al.</i> , 2005; Woodman & Malakul, 2009; Wang <i>et al.</i> , 2004
Apigenina (3)	Anti-inflamatória e propriedades antitumorais	<i>J. gendarussa</i>	EtOH	Wahi <i>et al.</i> , 1974; Sawatzky <i>et al.</i> , 2006; Cai <i>et al.</i> , 2011
Caempferitrina (4)	Antimicrobiana, anti-inflamatória e reduz o nível de glicose no sangue	<i>J. spicigera</i>	CHCl ₃	Dominguez <i>et al.</i> , 1990; Abdel-Ghani <i>et al.</i> , 2001; Fang <i>et al.</i> , 2005; Cazarolli <i>et al.</i> , 2006
Vitexina (5)	Anti-inflamatória e antinociceptiva	<i>J. gendarussa</i>	EtOH	Wahi <i>et al.</i> , 1974; Sridhar <i>et al.</i> , 2006; Gorzalczany <i>et al.</i> , 2011
5 <i>H</i> ,6 <i>H</i> -Quinindolin-11-ona (6)	ND	<i>J. betonica</i>	Éter/AcOEt	Subbaraju <i>et al.</i> , 2004
10 <i>H</i> -Quindolina (7)	Antitumoral	<i>J. betonica</i>	Éter/AcOEt	Subbaraju <i>et al.</i> , 2004; Caprio <i>et al.</i> , 2000
Jusbetonina (8)	Antitumoral	<i>J. betonica</i>	CHCl ₃ /MeOH	Subbaraju <i>et al.</i> , 2004; Caprio <i>et al.</i> , 2000
Vasicina (9)	Broncodilatadora, uterotônica e anti-inflamatória	<i>J. adhatoda</i>	EtOH	Ikram & Huq, 1966; Amin & Mehta, 1959; Bhalla <i>et al.</i> , 1982; Mehta <i>et al.</i> , 1963; Chakravarthy <i>et al.</i> , 1982; Ismail <i>et al.</i> , 1998; Lorenz <i>et al.</i> , 1999; Jindal <i>et al.</i> , 1988; Claeson <i>et al.</i> , 2000; Rachana <i>et al.</i> , 2011
Vasicinona (10)	Broncodilatadora	<i>J. adhatoda</i>	EtOH	Ikram & Huq, 1966; Amin & Mehta, 1959; Bhalla <i>et al.</i> , 1982; Mehta <i>et al.</i> , 1963; Chakravarthy <i>et al.</i> , 1982; Ismail <i>et al.</i> , 1998; Lorenz <i>et al.</i> , 1999; Jindal <i>et al.</i> , 1998; Rachana <i>et al.</i> , 2011
Alantoina (11)	Anti-inflamatória e úlcera	<i>J. spicigera</i>		Dominguez <i>et al.</i> , 1990; Niu <i>et al.</i> , 2010
6 <i>H</i> -Quinindolina (12)	ND	<i>J. betonica</i>	Éter/AcOEt	Subbaraju <i>et al.</i> , 2004
Vasicinol (13)	Broncodilatadora	<i>J. adhatoda</i>	EtOH	Ikram & Huq, 1966; Amin & Mehta, 1959; Bhalla <i>et al.</i> , 1982; Mehta <i>et al.</i> , 1963; Chakravarthy <i>et al.</i> , 1982; Ismail <i>et al.</i> , 1998; Lorenz <i>et al.</i> , 1999; Jindal <i>et al.</i> , 1998; Rachana <i>et al.</i> , 2011
Justiciosídeo A (14)	ND	<i>J. betonica</i>	MeOH/H ₂ O	Kanchanapoom <i>et al.</i> , 2004
Justiciosídeo B (15)	ND	<i>J. betonica</i>	MeOH/H ₂ O	Kanchanapoom <i>et al.</i> , 2004

ND = Não descrito

Tabela 1.4 Continuação

Composto	Atividade biológica	Espécie	Extrato/ fração	Referência
Justiciosídeo C (16)	ND	<i>J. betonica</i>	MeOH/H ₂ O	Kanchanapoom <i>et al.</i> , 2004
Justiciosídeo D (17)	ND	<i>J. betonica</i>	MeOH/H ₂ O	Kanchanapoom <i>et al.</i> , 2004
Justiciosídeo E (18)	ND	<i>J. betonica</i>	MeOH/H ₂ O	Kanchanapoom <i>et al.</i> , 2005
Justiciosídeo F (19)	ND	<i>J. betonica</i>	MeOH/H ₂ O	Kanchanapoom <i>et al.</i> , 2005
Justiciosídeo G (20)	ND	<i>J. betonica</i>	MeOH/H ₂ O	Kanchanapoom <i>et al.</i> , 2005
Justicisaponina (21)	Antiabortiva	<i>J. simplex</i>	MeOH	Ghosal <i>et al.</i> , 1981; Badami <i>et al.</i> , 2003
Elenosídeo (22)	Sedativa, relaxante muscular, citotóxica, antiviral, inseticida, cardiotônica, inibição da peroxidação lipídica, analgésica e anti-inflamatória	<i>J. hyssopifolia</i>	AcOEt	Navarro <i>et al.</i> , 2001a e 2001b; Alonso <i>et al.</i> , 1997
Clestantina B (23)	Antitumoral	<i>J. purpurea</i>	MeOH	Kavitha <i>et al.</i> , 2003; Pradheepkumar <i>et al.</i> , 2000
Juspurpurina (24)	ND	<i>J. purpurea</i>	MeOH	Kavitha <i>et al.</i> , 2003
Justalacnina (25)	ND	<i>J. purpurea</i>	MeOH	Kavitha <i>et al.</i> , 2003
Justicidinósídeo A (26)	Atividade antiviral	<i>J. procumbens</i>	MeOH	Asano <i>et al.</i> , 1996
Justicidinósídeo B (27)	Atividade antiviral	<i>J. procumbens</i>	MeOH	Asano <i>et al.</i> , 1996
Justicidinósídeo C (28)	Atividade antiviral	<i>J. procumbens</i>	MeOH	Asano <i>et al.</i> , 1996
Neesiinosídeo A (29)	ND	<i>J. neesii</i>	MeOH	Subbaraju <i>et al.</i> , 2004
4'- <i>O</i> -Acetilpatentiflorina B (30)	ND	<i>J. patentiflora</i>	AcOEt	Susplugas <i>et al.</i> , 2005
Patentiflorina A (31)	Citotoxicidade para carcinomas humanos	<i>J. patentiflora</i>	AcOEt	Susplugas <i>et al.</i> , 2005

ND = Não descrito

Tabela 1.4 Continuação

Composto	Atividade biológica	Espécie	Extrato/ fração	Referência
Patentiflorina B (32)	Citotoxicidade para carcinomas humanos	<i>J. patentiflora</i>	AcOEt	Susplugas <i>et al.</i> , 2005
Procumbenosídeo A (33)	Antitumoral	<i>J. procumbens</i>	MeOH	Day <i>et al.</i> , 2002; Lu <i>et al.</i> , 2008
Tuberculatina (34)	Antitumoral	<i>J. ciliata</i>	ND	Day <i>et al.</i> , 1999; Lu <i>et al.</i> , 2008
		<i>J. betonica</i>		
Carinatona (35)		<i>J. patentiflora</i>	ND	Susplugas <i>et al.</i> , 2005
Cilinaftalídeo A (36)	Antitumoral	<i>J. betonica</i>	CH ₂ Cl ₂ /MeOH	Day <i>et al.</i> , 1999
		<i>J. ciliata</i>		
Cilinaftalídeo B (37)	Efeito sobre a agregação plaquetária induzida pela adrenalina	<i>J. betonica</i>	CH ₂ Cl ₂ /MeOH	Day <i>et al.</i> , 1999; Wenga <i>et al.</i> , 2004
		<i>J. ciliata</i>		
		<i>J. procumbens</i>	MeOH	
Chinensinaftol (38)		<i>J. betonica</i>	ND	
		<i>J. procumbens</i>	EtOH	Chen <i>et al.</i> , 1996
Chinensinaftol metil éter (39)	Agregação plaquetária	<i>J. ciliata</i>	CH ₂ Cl ₂	Day <i>et al.</i> , 1999
		<i>J. procumbens</i>	EtOH	Chen <i>et al.</i> , 1996
Criptoxantina (40)	Antioxidante	<i>J. spicigera</i>	EtOH	Dominguez <i>et al.</i> , 1990; Slavin <i>et al.</i> , 2009
4'-Dimetil chinensinaftol metil éter (41)	Agregação plaquetária	<i>J. ciliata</i>	CH ₂ Cl ₂ /MeOH	Day <i>et al.</i> , 1999
		<i>J. procumbens</i>	EtOH	Chen <i>et al.</i> , 1996
Difilina (42)	Citotóxica e antiviral	<i>J. extensa</i>	EtOH	Wang & Ripka, 1983
		<i>J. procumbens</i>	MeOH	Chen <i>et al.</i> , 1996; Asano <i>et al.</i> , 1996; Fukamiya & Lee, 1986
		<i>J. ciliata</i>	CH ₂ Cl ₂ -MeOH	Day <i>et al.</i> , 1999
Difilina apiosídeo (43)	Citotóxica e antiviral	<i>J. procumbens</i>	MeOH	Asano <i>et al.</i> , 1996
Difilina apiosídeo-5-acetato (44)	Citotóxica e antiviral	<i>J. procumbens</i>	MeOH	Asano <i>et al.</i> , 1996
Heliobuftalmina (45)	Antineoplásica	<i>J. ciliata</i>	CH ₂ Cl ₂	Day <i>et al.</i> , 1999; Duarte <i>et al.</i> , 2010

ND = Não descrito

Tabela 1.4 Continuação

Composto	Atividade biológica	Espécie	Extrato/ fração	Referencia
Justicidina A (46)	Citotóxica, antiviral e apoptose induzida em células de hepatoma humano	<i>J. extensa</i>	EtOH	Wang & Ripka, 1983
		<i>J. betonica</i>		Day <i>et al.</i> , 1999; Munakata <i>et al.</i> , 1965
		<i>J. procumbens</i>	MeOH	Chen <i>et al.</i> , 1996; Asano <i>et al.</i> , 1996; Fukamiya & Lee, 1986; Su <i>et al.</i> , 2006
		<i>J. rhodoptera</i>	ND	Williams, 2003
Justicidina B (47)	Antiplaquetária, citotóxica, antiviral, fungicida, antiprotozoária contra o <i>T. cruzi</i> , antimalárica e antireumática	<i>J. purpurea</i>	MeOH	Kavitha <i>et al.</i> , 2003; Rao <i>et al.</i> , 2006; Wu <i>et al.</i> , 2007; Gertsch <i>et al.</i> , 2003; Kaur <i>et al.</i> , 2009; Baba <i>et al.</i> , 1996
		<i>J. procumbens</i>	EOH	Chen <i>et al.</i> , 1996
		<i>J. procumbens</i>	MeOH	Asano <i>et al.</i> , 1996
Justicidina E (48)	Inibição da síntese de leucotrienos por leucócitos humanos	<i>J. procumbens</i>	MeOH	Fukamiya & Lee, 1986; Thérien <i>et al.</i> , 1993
Jusmicrantina (49)		<i>J. neesii</i>	EtOH	Rajasekhar & Subbaraju, 2000
Jusmicrantina metil éter (50)		<i>J. neesii</i>	EtOH	Rajasekhar & Subbaraju, 2000
Justicidina P (51)		<i>J. extensa</i>	EtOH	Wang & Ripka, 1983
Justicinol (52)	Leve efeito sobre o SNC	<i>J. patentiflora</i>	AcOEt	Susplugas <i>et al.</i> , 2005
Justiflorinol (53)		<i>J. patentiflora</i>	AcOEt	Susplugas <i>et al.</i> , 2005
Neojusticina B (54)		<i>J. ciliata</i>	CH ₂ Cl ₂ - Me ₂ CO	Day <i>et al.</i> , 1999
		<i>J. procumbens</i>	EtOH	Asano <i>et al.</i> , 1996; Fukamiya & Lee, 1986; Chen <i>et al.</i> , 1996
Neojusticina A (55)	Inibição antiplaquetária	<i>J. procumbens</i>	EtOH e MeOH	Chen <i>et al.</i> , 1996; Fukamiya & Lee, 1986; Wu <i>et al.</i> , 2007
		<i>J. procumbens</i>	MeOH	Asano <i>et al.</i> , 1996; Fukamiya & Lee, 1986
Sesamina (56)	Angiogênica	<i>J. purpurea</i>	MeOH	Kavitha <i>et al.</i> , 2003; Chung <i>et al.</i> , 2010

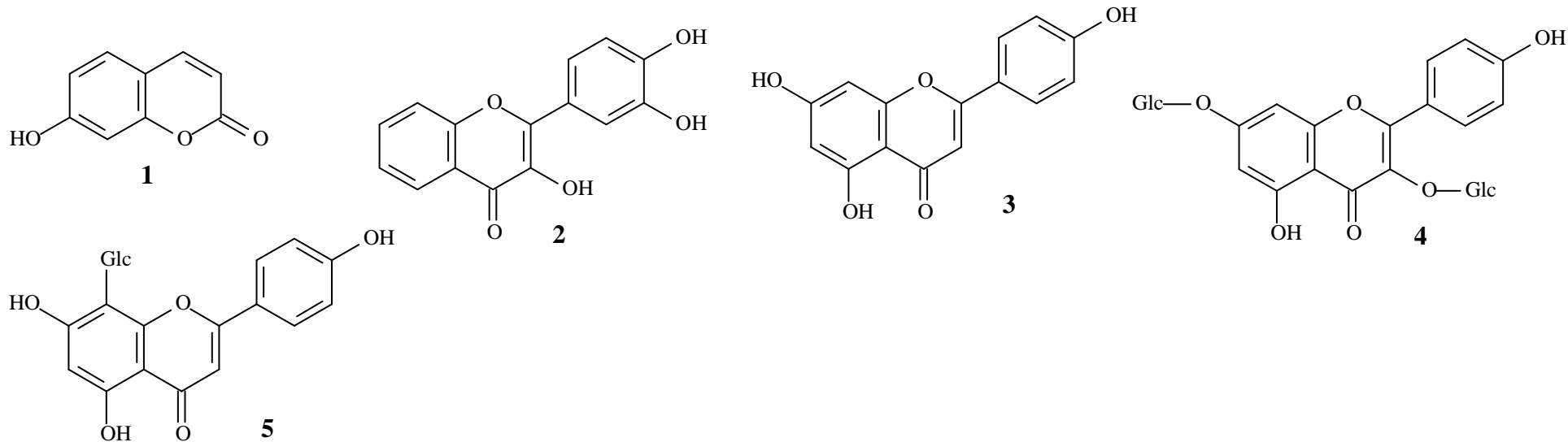
ND = Não descrito

Tabela 1.4 Continuação

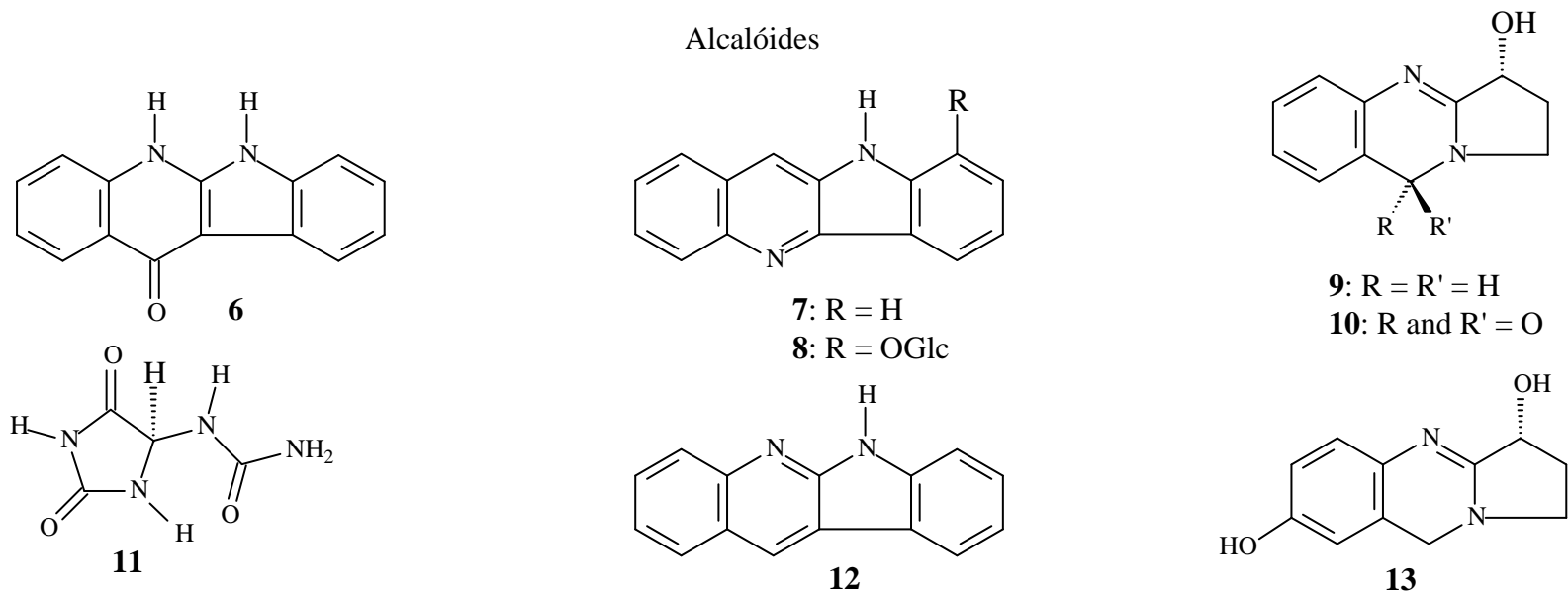
Composto	Atividade biológica	Espécie	Extrato/ fração	Referência
Taiwanina E (57)	Inibição da agregação plaquetária e antitumoral	<i>J. procumbens</i>	EtOH	Chen <i>et al.</i> , 1996; Chang <i>et al.</i> , 2000
Taiwanina E metil éter (58)	Inibição da agregação plaquetária e citotoxicidade contra carcinoma cervical humano	<i>J. purpurea</i>	MeOH	Kavitha <i>et al.</i> , 2003
		<i>J. betonica</i>		Day <i>et al.</i> , 1999
		<i>J. procumbens</i>	EtOH	Chen <i>et al.</i> , 1996
Xantoxilol (59)	Antitumoral	<i>J. purpurea</i>	MeOH	Kavitha <i>et al.</i> , 2003; Konoshima & Atta-Ur-Rahman, 2000
(+)-Isolariciresinol (60)	Anti-inflamatória	<i>J. flava</i>	ND	Rajakumar & Shivanna, 2009; Küpeli <i>et al.</i> , 2003
Helioxantina (61)	Hepatite B, replicação viral e antitumoral	<i>J. flava</i>	ND	Rajakumar & Shivanna, 2009; Tseng <i>et al.</i> , 2008; Chang <i>et al.</i> , 2000
Justiciresinol (62)	Citotóxica	<i>J. glauca</i>	AcOEt	Subbaraju <i>et al.</i> , 1991
Podofilotoxina (63)	Quimioterapia do câncer	<i>J. flava</i>		Rajakumar & Shivanna, 2009; Meckes <i>et al.</i> , 2004; Canel <i>et al.</i> , 2000

ND = Não descrito

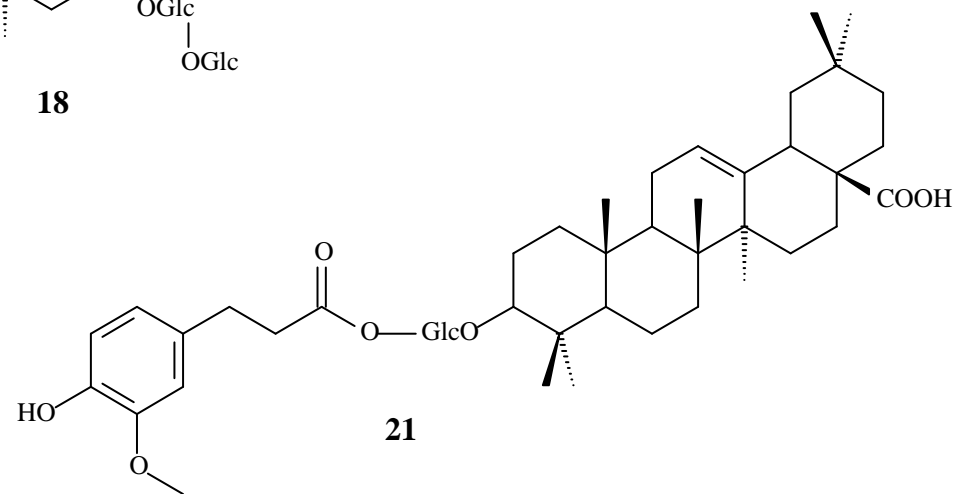
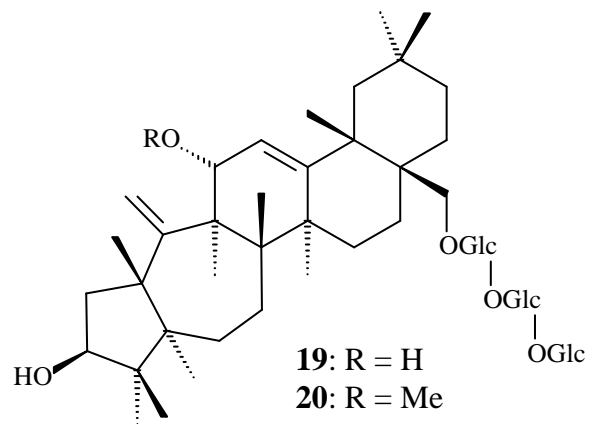
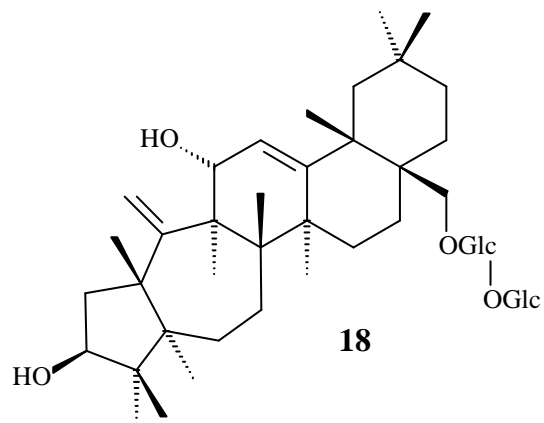
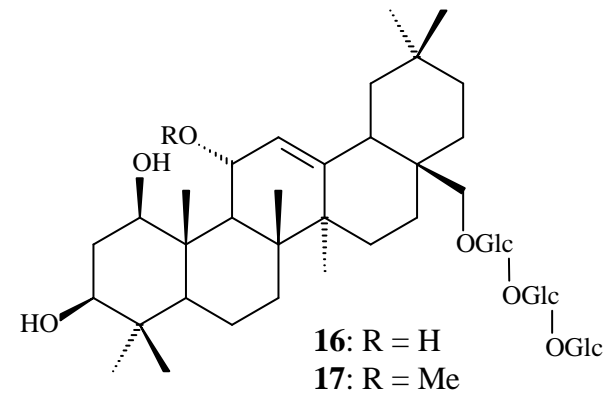
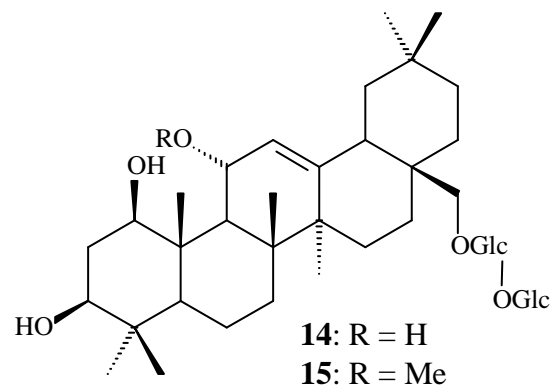
Compostos Fenólicos



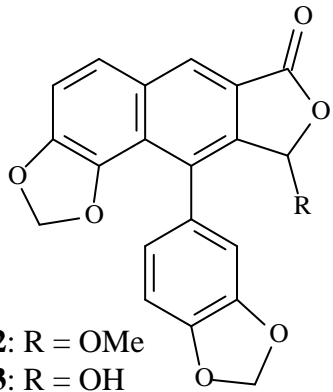
Alcalóides



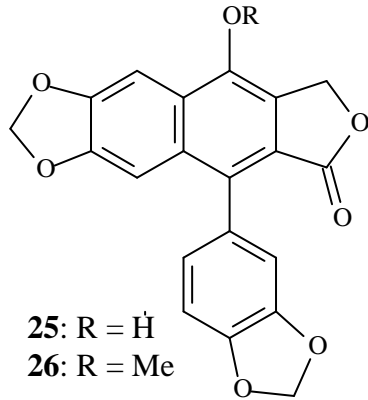
Saponinas



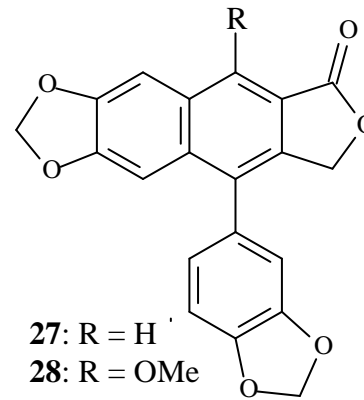
Lignanas



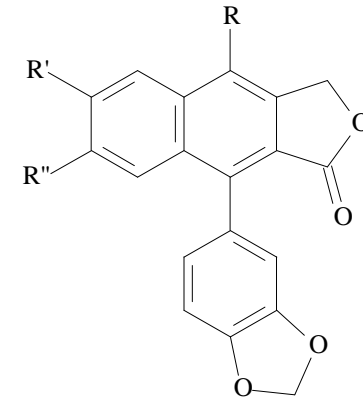
- 22: R = OMe
 23: R = OH
 24: R = H



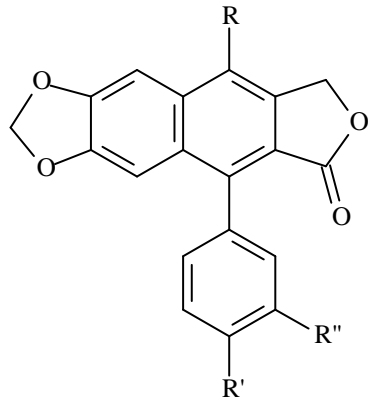
- 25: R = H
 26: R = Me



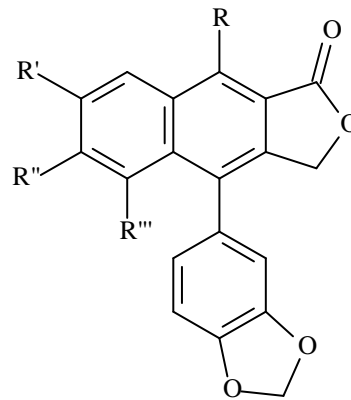
- 27: R = H
 28: R = OMe



- 29: R = H; R' = R'' = OMe
 30: R = OH; R' = R'' = OMe
 31: R = R' = R'' = OMe
 32: R = OGlc; R' = R'' = OMe
 33: R = OGlc-OGlc; Me; R' = R'' = OMe
 34: R = OGlc-OGlc; Me; R' = R'' = OMe
 35: R = OGlc; Me; R' = R'' = OMe
 36: R = OGlc; Me; R' = R'' = OMe
 37: R = O-*D*-apiofuranosyl; Me; R' = R'' = OMe

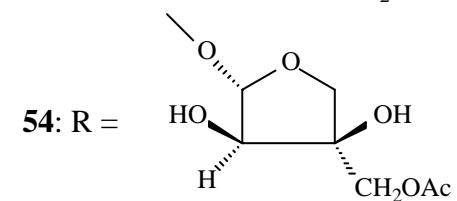
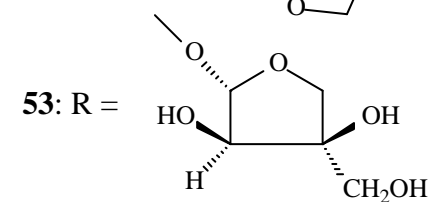
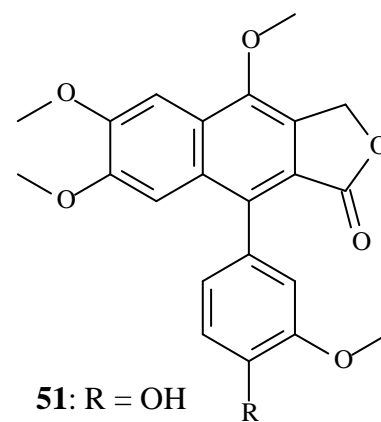
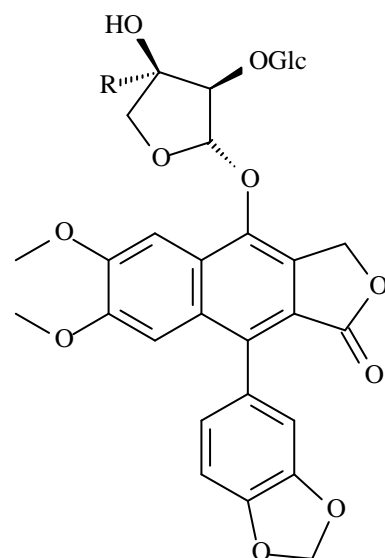
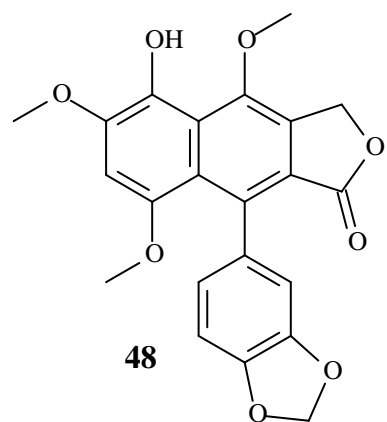
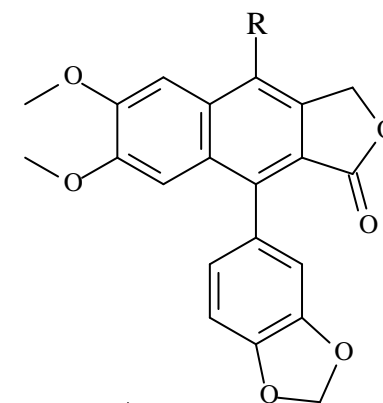
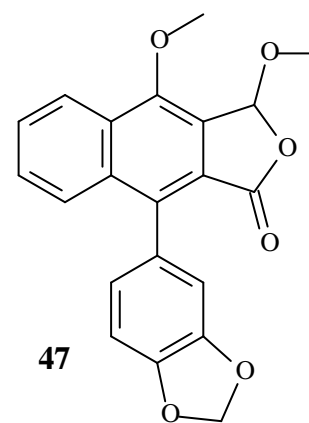
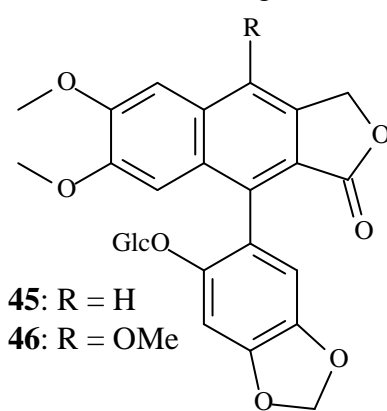
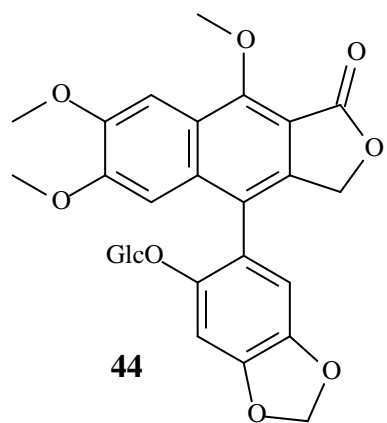


- 38: R = H = R' = R'' = OMe
 39: R = OMe; R' = OH; R'' = OGlc
 40: R = R'' = OMe; R' = OH
 41: R = OH; R' = R'' = OMe



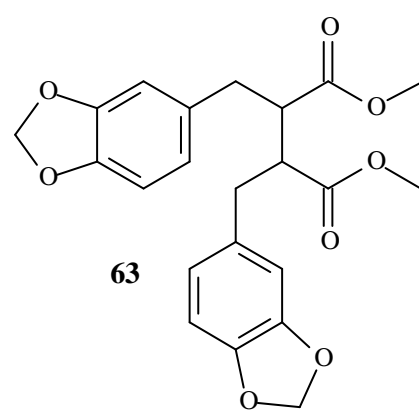
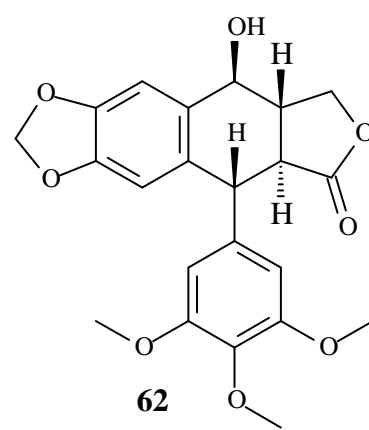
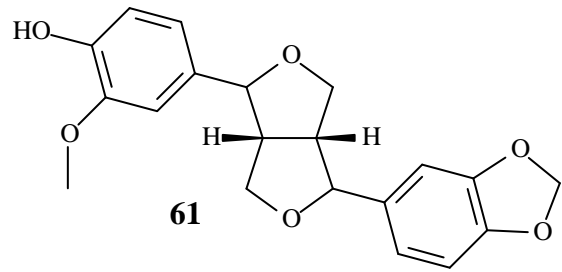
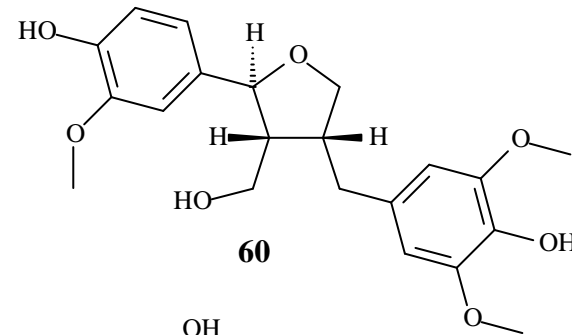
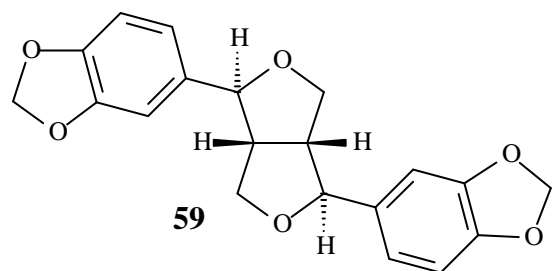
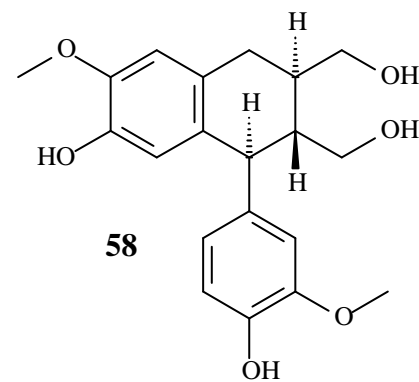
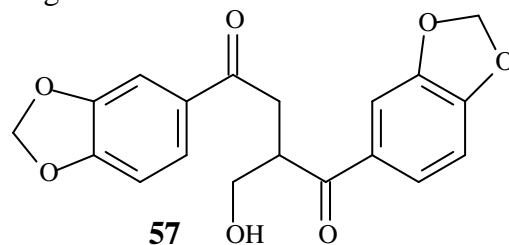
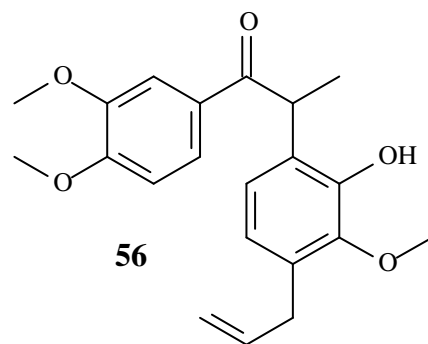
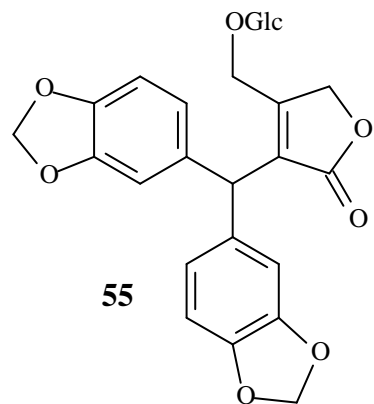
- 42: R = R' = H; R'' = OH; R''' = OGlc
 43: R = R' = R'' = OMe; R''' = H

Lignanas



49: R = CH₂O-β-D-xylopyranosyl
50: R = CH₂OH

Lignanas



1.6. *Justicia acuminatissima*

A espécie *Justicia acuminatissima* (Figura 1.1) tem como sinônima *Justicia calycina*, sendo uma espécie vegetal utilizada amplamente pela população do Estado do Amazonas devido às suas propriedades medicinais anti-inflamatórias. A espécie é conhecida popularmente como “sara-tudo” e suas folhas são utilizadas em decoctos, infusões e macerações (Verdam *et al.*, 2009). O chá das folhas é utilizado para alívio e cura de doenças inflamatórias em diferentes processos extrativos (Santos, 2006). A decoção das folhas e do caule é utilizada no tratamento de diarreia, dores no estômago e intestino (Cassino, 2010). Essa espécie, além de propriedades medicinais, possui também finalidades ornamentais.

A literatura consultada não descreve estudos químicos ou biológicos sobre essa espécie, através de buscas realizadas em bases de dados científicas, tais como *Web of science*, *Science direct* e *Scifinder*.

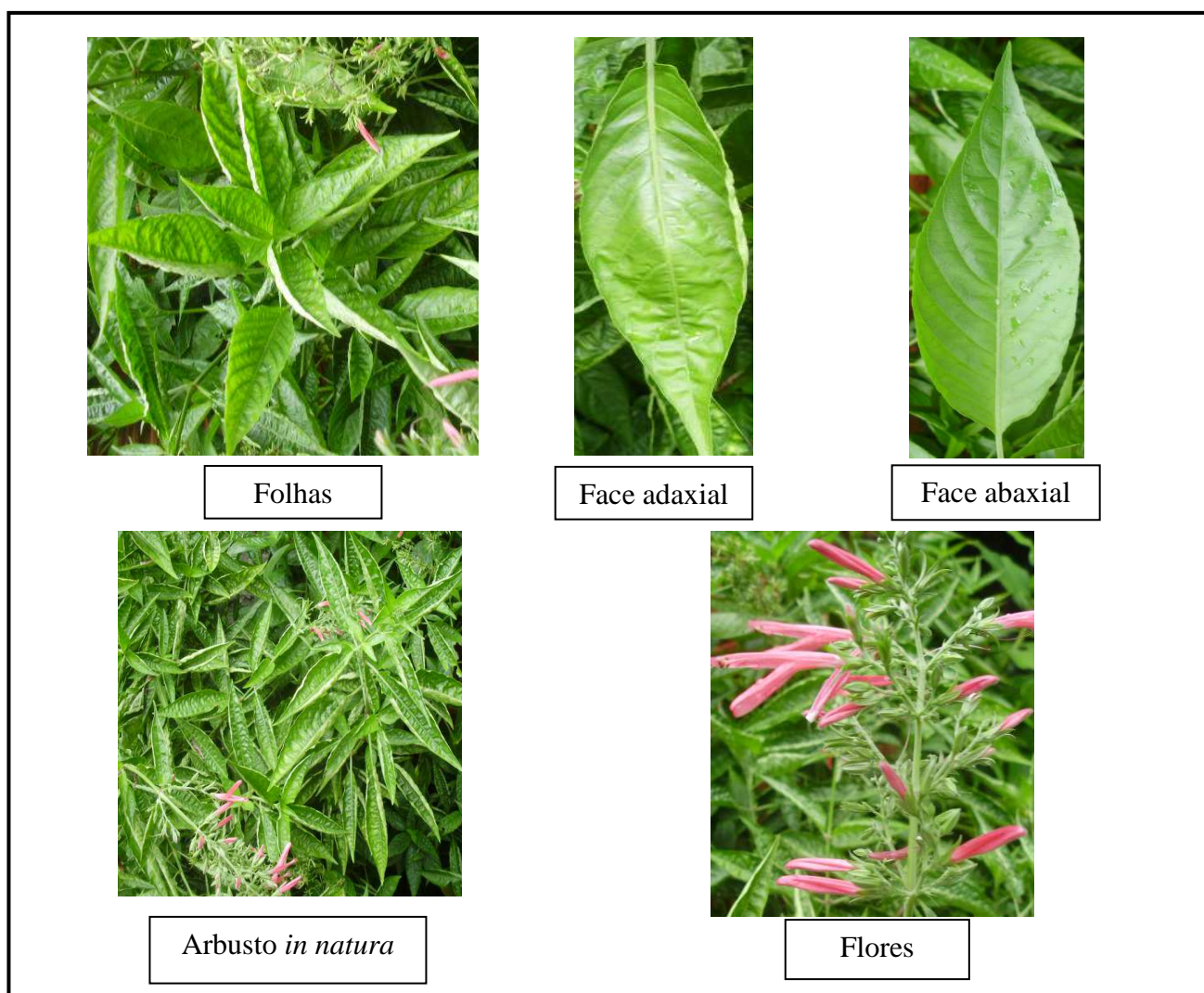


Figura 1.1 Fotos das folhas e flores de *Justicia acuminatissima*.

1.7. Objetivos

1.7.1 Objetivo Geral:

Este trabalho tem como objetivo geral estudar química e farmacologicamente a espécie *Justicia acuminatissima*.

1.7.2 Objetivos específicos:

Como objetivos específicos têm-se: (i) o estudo do efeito da radioesterilização sobre a integridade química de *J. acuminatissima*; (ii) avaliação das atividades biológicas dos extratos brutos e frações (tais como, anti-inflamatória, antimicrobiana e tripanocida); (iii) análise da composição química do material vegetal por espectrometria de massas e por espectroscopias de absorção na região do infravermelho e de RMN de ^1H e de ^{13}C ; (iv) avaliação dos materiais irradiados da espécie vegetal e a detecção de produtos radiolíticos; (v) verificação do efeito da radiação gama na capacidade de destruir a microbiota fúngica.

Capítulo 2

Procedimiento Experimental (Fitoquímica)

2.1. Materiais e Métodos

Os fracionamentos empregando cromatografia em coluna (CC) foram realizados em coluna de vidro, utilizando sílica gel 60 0,063-0,200 μm (70-230 mesh ASTM) da Merck e Sephadex LH-20 como fases estacionárias. O comprimento e o diâmetro das colunas utilizadas variaram de acordo com as quantidades de amostra cromatografadas. As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas em cromatofolhas de sílica gel 60 Merck, com indicador de fluorescência F₂₅₄.

As análises por cromatografia em camada preparativa (CCP) foram realizadas em cromatoplasmas de tamanho 20 x 20 cm² e 10 x 10 cm² e espessura de 1,0 mm. As placas foram preparadas usando 20 g de sílica gel 60 GF254 da Merck e 50 mL de água destilada. Após a evaporação de água a temperatura ambiente, as placas foram ativadas em estufa a 100 °C.

Os solventes empregados em cromatografia foram das marcas Merck, Synth e Aldrich P.A. Para a obtenção de espectros de RMN foram utilizados os solventes DMSO-d₆, CDCl₃ ou C₅D₅N da Merck.

A revelação das cromatoplasmas em camada fina foi feita por exposição à luz ultravioleta em 254 e 365 nm e/ou mediante borrifação com soluções reveladoras. A solução de vanilina sulfúrica foi preparada a partir de solução A (5%-10% de ácido sulfúrico em etanol) e solução B (1% de vanilina em etanol). A cromatoplasma foi borrifada com uma mistura da solução A e B na proporção 1:1 e aquecida a 100 °C por alguns minutos (Mattos, 1997). A solução de ácido sulfúrico em etanol foi preparada contendo de 5%-10% de ácido sulfúrico em etanol. A cromatoplasma foi borrifada e aquecida a 100 °C por alguns minutos (Mattos, 1997). A solução de anisaldeído sulfúrico foi preparada com 0,5 mL de anisaldeído, 10 mL de ácido acético glacial, 85 mL de metanol e 5 mL de H₂SO₄ concentrado. A cromatoplasma foi borrifada e aquecida a 100 °C por alguns minutos (Wagner *et al.*, 1996).

A determinação do ponto de fusão (p.f.) foi realizada em aparelho da marca METTLER FP80 SNR H22439, com valores não corrigidos. Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram registrados em aparelho Perkin Elmer, modelo Spectrum RXI com transformada de Fourier. As análises foram feitas utilizando-se pastilhas comprimidas de 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 e de ¹³C e DEPT 135°) e bidimensionais (HSQC, HMBC, COSY e NOESY) foram registrados em espectrômetros Bruker DPX-200 (200 MHz) e Bruker DRX-400 (400 MHz) linha AVANCE, com solventes deuterados, utilizando o tetrametilsilano (TMS) ou o próprio

solvente como referência interna, sendo os deslocamentos químicos (δ) dados em unidades ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em escala analítica foram realizadas em cromatógrafo líquido Shimadzu, constituído por duas bombas LC-20AT, detector UV/VIS SPD-20A, “software” LCsolution v.1.21 (Shimadzu) e coluna ODS Hypersil (C18), 250 x 4,6 mm e 5 μ m (Supelco). As análises foram acompanhadas por espectroscopia Ultravioleta-Visível na região de 200 a 600 nm e fluxo de 1 mL/min.

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em escala preparativa foram realizadas em cromatógrafo líquido Varian ProStar constituído por detector UV-Vis PS 325, bomba PS210, injetor manual e “software” Galaxy Workstation. As condições cromatográficas foram otimizadas utilizando uma coluna ODS Hypersil (C18), 250 x 10,0 mm e 5 μ m (Supelco). A taxa de fluxo foi de 4,0 mL/min. As análises foram acompanhadas por comprimento de onda de 280 nm e o volume de injeção foi de 1 mL.

Metanol e acetonitrila utilizados nas diferentes análises por CLAE (analítica e preparativa) foram de alta qualidade – grau CLAE/UV – TEDIA. A água foi obtida por destilação em sistema Milli-Q. Os solventes foram filtrados em filtro 0,45 μ m (Millipore) antes da utilização.

As análises em LCMS foram realizadas em um espectrômetro Shimadzu LCMS-IT-TOF no Departamento de Química da UFMG nas seguintes condições: ESI em modo positivo com o fluxo de gás de nebulização 1,5 L/Min, CDL temperatura a 200 °C e temperatura do bloco de aquecimento a 200 °C. As amostras foram solubilizadas em metanol e 5 mL foram injectadas na interface de electropulverização com um fluxo de 0,2 ml / min com uma mistura de metanol: água (1:1).

Estudos teóricos foram realizados utilizando o software Gaussian 09. As geometrias obtidas a partir de cálculos *ab-initio* foram usadas como modelos iniciais nas otimizações de geometria empregando cálculos DFT (*Density Functional Theory*), com conjunto de base em mesmo nível de energia BLYP/6-31G*. (Alcântara *et al.*, 2006). A energia eletrônica nuclear (E) das geometrias otimizadas foi dada em unidades atômicas (*Hartree*). As geometrias otimizadas foram utilizadas para o cálculo de deslocamento químico de carbono nos mesmos níveis de teoria. Valores calculados de deslocamento químico do carbono ($^{\text{calc}}\delta_{\text{C}}$) foram determinados em relação aos valores correspondentes calculados para o tetrametilsilano, usado como padrão de referência. Correlação entre os valores de $^{\text{calc}}\delta_{\text{C}}$ e os deslocamentos químicos determinados experimentalmente (δ_{C}) foram obtidos utilizando o software OriginTM Standard 7.5. Os valores calculados de $^{\text{calc}}\delta_{\text{C}}$ e δ_{C} foram plotados nos eixos x e y,

respectivamente. As curvas de correlação (${}^{\text{calc}}\delta_C/\delta_C$) foram submetidas a um ajuste linear, obtendo-se coeficiente de correlação (R^2) e inclinação da curva de R^2 (α), fornecidos pelo próprio programa (Alcântara *et al.*, 2006).

2.2. Análise Fitoquímica

2.2.1. Coleta e identificação botânica

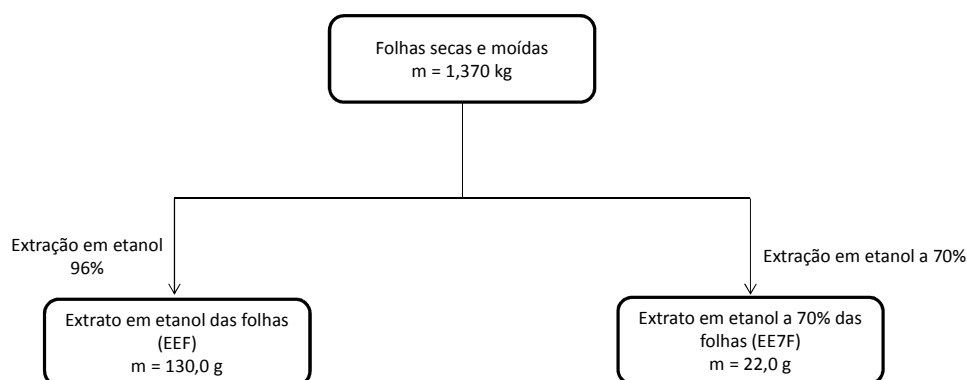
O material botânico in natura de *Justicia acuminatissima* foi coletado no Município de Itacoatiara (AM), localizado nas coordenadas S 03° 08' 28,8" e W 58° 26' 54,3". As folhas e galhos da planta foram coletados e separados para a extração. Uma parte da amostra (folhas, frutos e flores) foi selecionada para preparação de exsiccata, que se encontra depositada no Herbário da Universidade Federal do Amazonas, no Instituto de Ciências Biológicas, sob o número 8270.

2.2.2. Secagem e Moagem

As folhas e galhos da espécie *J. acuminatissima* foram secadas à 45 °C em estufa de ar circulante e, após separação, foram reduzidas a pedaços menores, pulverizados em moinho com quatro facas da marca Wiley.

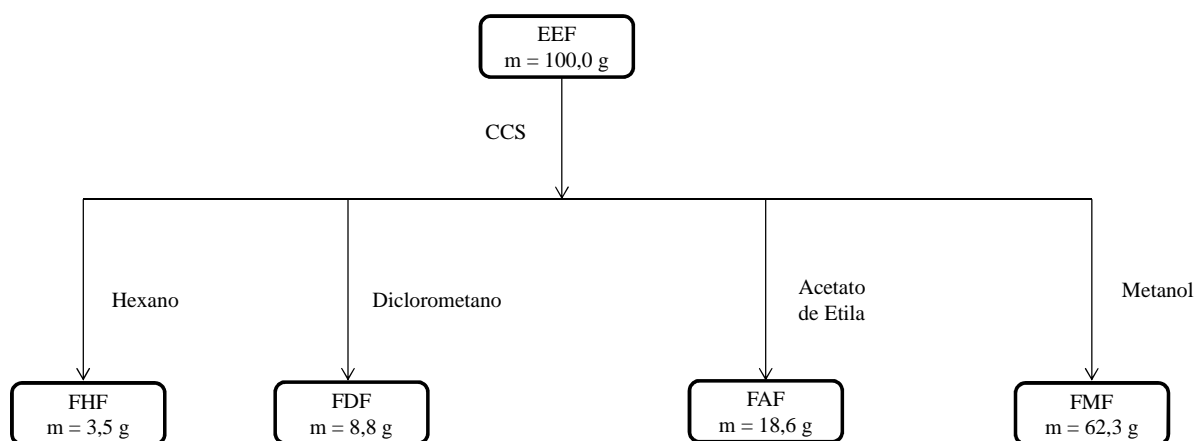
2.2.3. Obtenção dos extratos brutos e frações

O Esquema 2.1 apresenta o procedimento experimental para a obtenção por maceração do extrato bruto das folhas da planta. As folhas secas e moídas foram submetidas à extração a frio (maceração) com etanol absoluto 96%, repetindo-se a operação com a mesma amostra a cada três dias, por três vezes. Em seguida, a maceração foi feita com etanol a 70%, sendo repetido o mesmo procedimento da extração com etanol. Os extratos foram concentrados a pressão reduzida e temperatura a 40 °C em evaporador rotativo e, em seguida, mantidos em dessecador, obtendo-se o extrato em etanol das folhas (EEF, m = 130,0 g) e o extrato em etanol a 70% das folhas (EE7F, m = 22,0 g).



Esquema 2.1 Etapas da obtenção dos extratos brutos das folhas de *J. acuminatissima*.

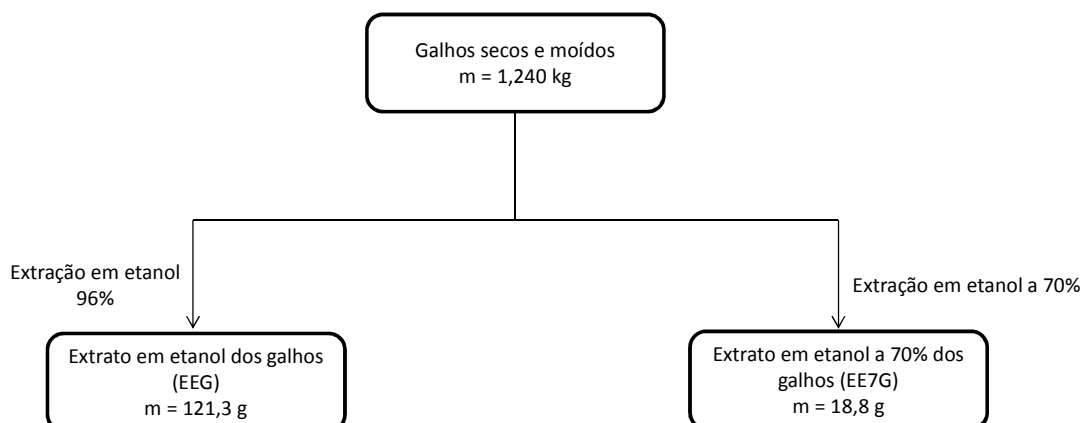
O Esquema 2.2 apresenta o fracionamento de 100 g de EEF realizado em coluna filtrante (CCS) utilizando 250 g de sílica e empregando hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol como eluentes, obtendo-se a fração em hexano das folhas (FHF), fração em diclorometano das folhas (FDF), fração em acetato de etila das folhas (FAF) e fração em metanol das folhas (FMF). As frações foram concentradas em evaporador rotativo.



Esquema 2.2 Etapas da obtenção das frações das folhas de *J. acuminatissima*.

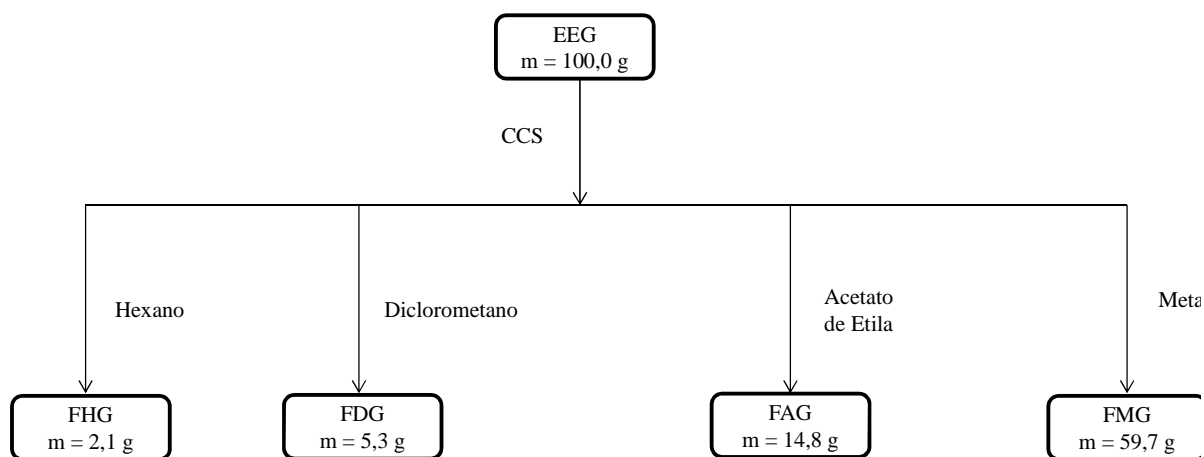
O Esquema 2.3 apresenta o procedimento experimental para a obtenção por maceração do extrato bruto dos galhos da planta. Os galhos secos e moídos foram submetidos à extração a frio (maceração) com etanol absoluto 96%, repetindo-se a operação com a mesma amostra a cada três dias, por três vezes. Em seguida, a maceração foi feita com etanol a 70%, sendo repetido o mesmo procedimento da extração com etanol.

Os extratos foram concentrados à pressão reduzida e temperatura a 40 °C em evaporador rotativo e, em seguida, mantidos em dessecador, obtendo-se o extrato em etanol dos galhos (EEG, m = 121,3 g) e o extrato em etanol a 70% dos galhos (EE7G, m = 18,8 g).



Esquema 2.3 Etapas da obtenção dos extratos brutos dos galhos de *J. acuminatissima*.

O Esquema 2.4 resume o fracionamento de 100 g de EEG realizado em coluna filtrante (CCS) utilizando 250 g de sílica e empregando hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol como eluentes, obtendo-se a fração em hexano dos galhos (FHG), fração em diclorometano dos galhos (FDG), fração em acetato de etila dos galhos (FAG) e fração em metanol dos galhos (FMG). As frações foram concentradas em evaporador rotativo.



Esquema 2.4 Etapas da obtenção das frações dos galhos de *J. acuminatissima*.

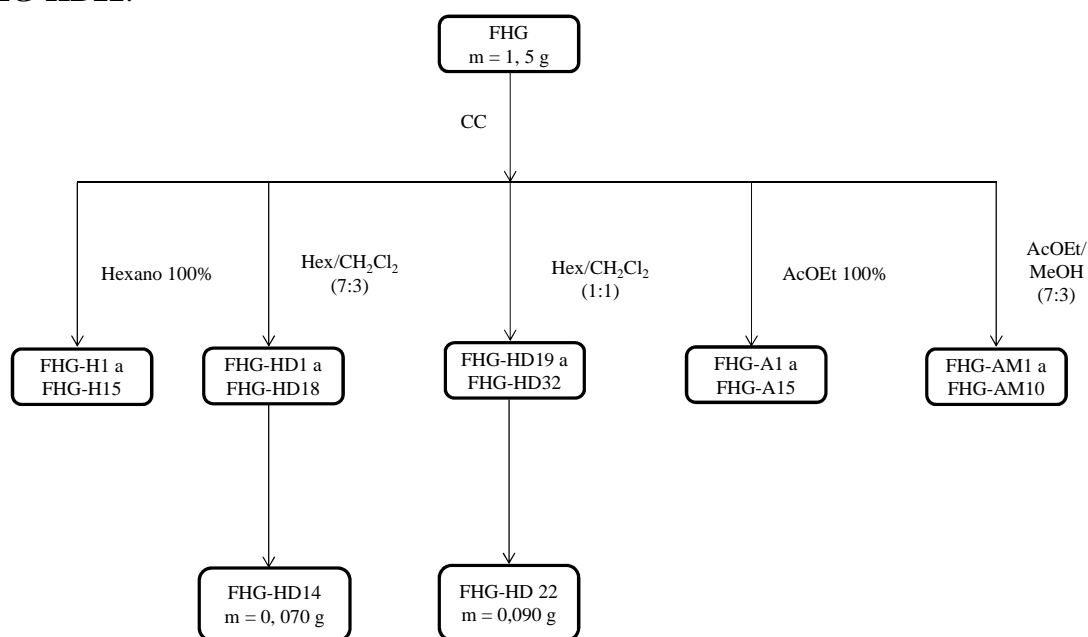
2.2.4. Prospecção Fitoquímica

Alíquotas dos extratos brutos e frações obtidas a partir do material botânico de *J. acuminatissima* foram analisadas para detectar as principais classes químicas presentes nos extratos (Mattos, 1997), principalmente alcaloides, esteroides, fenóis, flavonoides, cumarinas, saponinas, taninos e triterpenos. No teste para detecção de triterpenos e esteroides, uma alíquota (~2,0 mg) do extrato e/ou fração diluída em clorofórmio foi misturada em um tubo de ensaio com o reagente de Liebermann-Burchard (2 mL de anidrido acético e duas gotas de ácido sulfúrico concentrado). O aparecimento de cores rósea, azul ou verde indica a presença de triterpenos e/ou esteroides. Para a detecção de taninos, uma alíquota (~2,0 mg) do extrato e/ou fração diluída em 2,0 mL de água foi misturada a uma solução de cloreto férrico (10%). A cor azul sugere a presença de taninos hidrolisáveis e a verde, de taninos condensados. No teste para flavonoides, uma alíquota (~2,0 mg) do extrato e/ou fração em 2 mL de água foi colocada em um tubo de ensaio. Hidróxido de amônio foi adicionado ao tubo de ensaio até pH 11. O aparecimento de coloração amarela indica a presença de flavonas, flavonóis e xantonas. Coloração vermelha púrpura indica a presença de chalconas e auronas. Por sua vez, a coloração vermelha/laranja indica a presença de flavanonóis na amostra. No teste para

alcaloides, uma alíquota (~2,0 mg) do extrato e/ou fração em 2 mL de água foi misturada em um tubo de ensaio com o reagente de Dragendorff. A formação de precipitado floculoso empregando o reagente indica a presença de alcaloides na amostra. No teste para saponinas, uma alíquota (~2,0 mg) da amostra em 2 mL de água foi colocada em um tubo de ensaio. O tubo foi submetido à agitação vigorosa por 2 min. A formação de espuma persistente é indicativa da presença de saponinas na amostra. Para o teste de cumarinas utilizou-se como reagente uma mistura 10% (p/v) de hidróxido de sódio em água destilada para revelar placas cromatográficas sob luz UV (360 nm). O aparecimento de coloração azul confirma a presença de cumarinas na amostra.

2.2.5. Fracionamento Cromatográfico de FHG

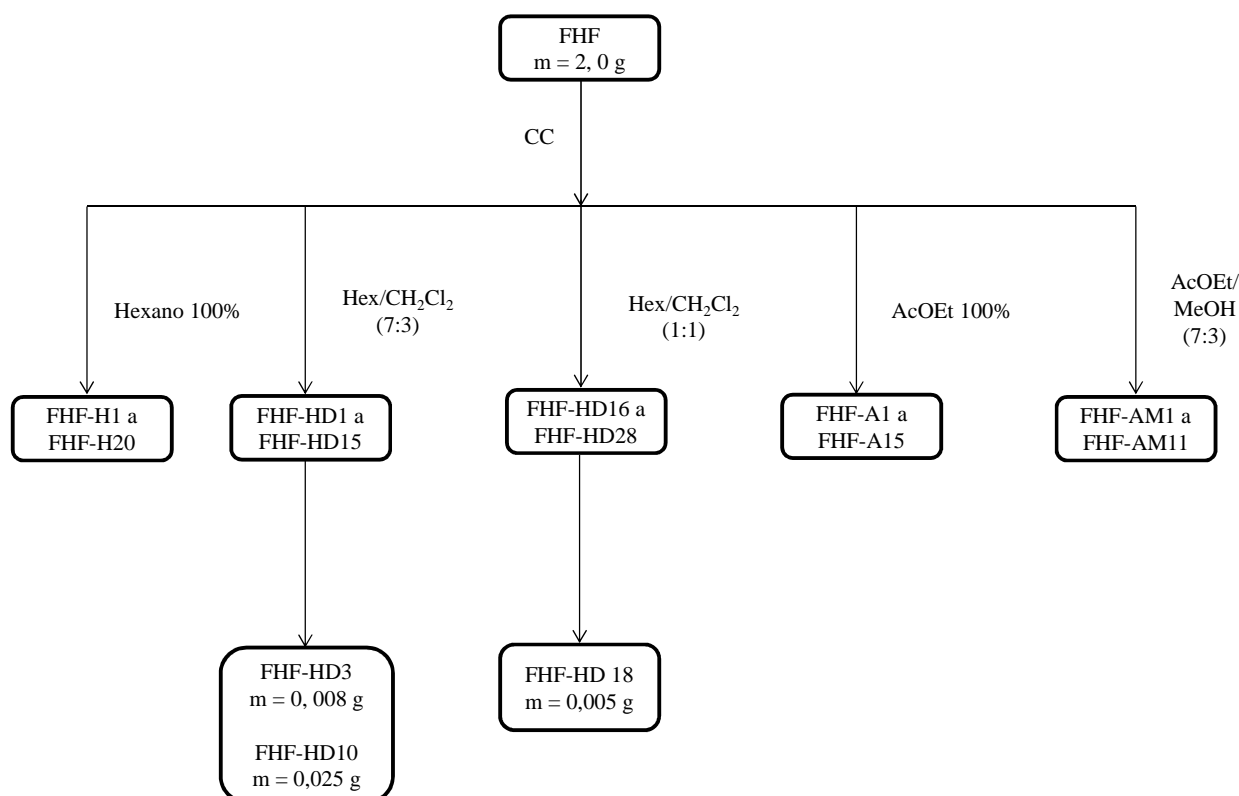
O Esquema 2.5 apresenta etapas do fracionamento cromatográfico de FHG. Uma alíquota de FHG (1,5 g) foi submetida a fracionamento cromatográfico em coluna aberta (2,5 cm de diâmetro e 70 cm de altura) e empacotada com sílica gel 60, tendo como fases móveis hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, em gradiente crescente de polaridade. As frações foram coletadas em frascos de 20 mL, obtendo-se 72 frações que foram reunidas conforme semelhança de perfis nas análises por CCD. As frações FHG-HD13 a FHG-HD15 (0,070 g) forneceram sólidos cristalinos brancos e foram reunidas segundo análises por CCD e denominadas de **FHG-HD14**. As frações FHG-HD20 a FHG-HD24 (0,090 g) forneceram sólidos cristalinos brancos e foram reunidas segundo análises por CCD e denominadas de **FHG-HD22**.



Esquema 2.5 Etapas do fracionamento cromatográfico de FHG.

2.2.6. Fracionamento Cromatográfico de FHF

O Esquema 2.6 apresenta as etapas do fracionamento cromatográfico de FHF. Uma alíquota de FHF (2,0 g) foi submetida a fracionamento cromatográfico em coluna aberta (2,5 cm de diâmetro e 70 cm de altura) e empacotada com sílica gel 60, tendo como fases móveis hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, em gradiente crescente de eluição. As frações foram coletadas em frascos de 20 mL, obtendo-se 74 frações que foram reunidas conforme semelhança de perfis nas análises por CCD. A fração **FHF-HD3** forneceu um sólido incolor (0,008 g). As frações FHF-HD9 a FHF-HD11 (0,025 g) forneceram sólidos cristalinos brancos e foram reunidas segundo análises por CCD e denominadas de **FHF-HD10**. A fração **FHF-HD18** forneceu um sólido incolor (0,005 g).

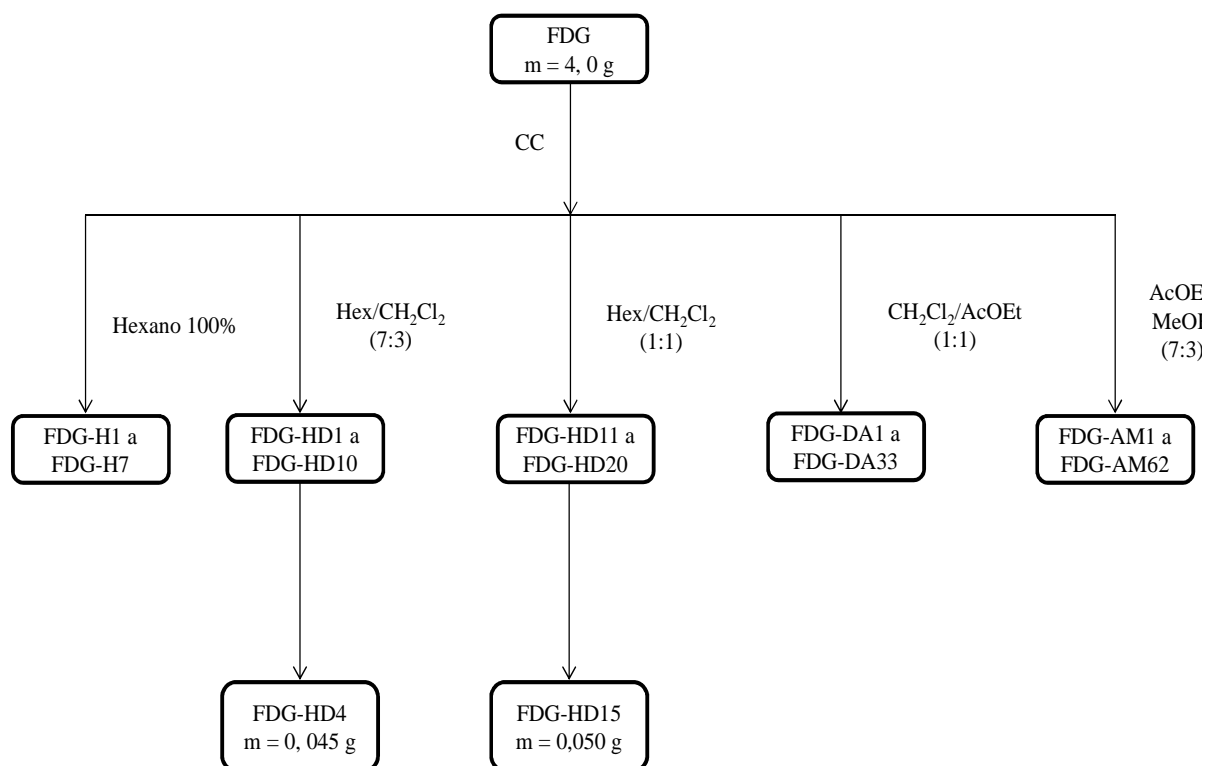


Esquema 2.6 Etapas do fracionamento cromatográfico de FHF.

2.2.7. Fracionamento Cromatográfico de FDG

O Esquema 2.7 (p. 35) apresenta as etapas do fracionamento cromatográfico de FDG. Uma alíquota de FDG (4,0 g) foi submetida a fracionamento cromatográfico em coluna aberta (4,5 cm de diâmetro e 90 cm de altura) e empacotada com sílica gel 60, tendo como fases

móveis hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, em gradiente crescente de polaridade. As frações foram coletadas em frascos de 20 mL, obtendo-se 122 frações que foram reunidas conforme semelhança de perfis nas análises por CCD. As frações FDG-HD1 a FDG-HD6 foram reunidas, fornecendo um sólido incolor (0,045 g), denominadas por **FDG-HD4**. As frações FDG-HD13 a FDG-HD17 (0,050 g) forneceram sólidos cristalinos brancos e foram reunidas segundo análises por CCD e denominadas de **FDG-HD15**.

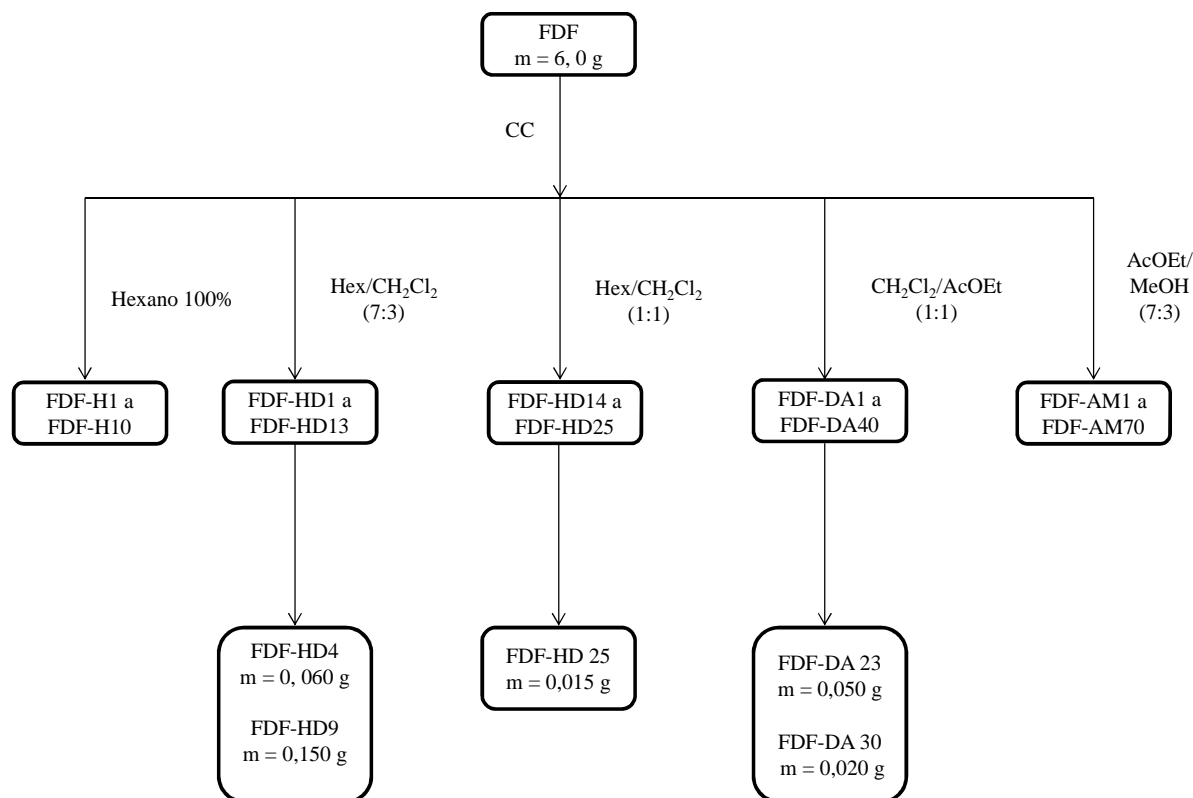


Esquema 2.7 Procedimento experimental do fracionamento cromatográfico de FDG.

2.2.8. Fracionamento Cromatográfico de FDF

O Esquema 2.8 (p. 36) apresenta as etapas do fracionamento cromatográfico de FDF. Uma alíquota de FDF (6,0 g) foi submetida a fracionamento cromatográfico em coluna aberta (4,5 cm de diâmetro e 90 cm de altura) e empacotada com sílica gel 60, tendo como fases móveis hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, em gradiente crescente de eluição. As frações foram coletadas em frascos de 20 mL, obtendo-se 145 frações que foram reunidas conforme semelhança de perfis nas análises por CCD. As frações FDF-HD3 a FDF-HD5 foram reunidas, fornecendo um sólido incolor (0,060 g), denominadas por **FDF-HD4**. As frações FDF-HD7 a FDF-HD12 foram reunidas, fornecendo um sólido incolor (0,150 g), denominadas por **FDF-HD9**. A fração **FDF-HD25** forneceu um sólido cristalino branco

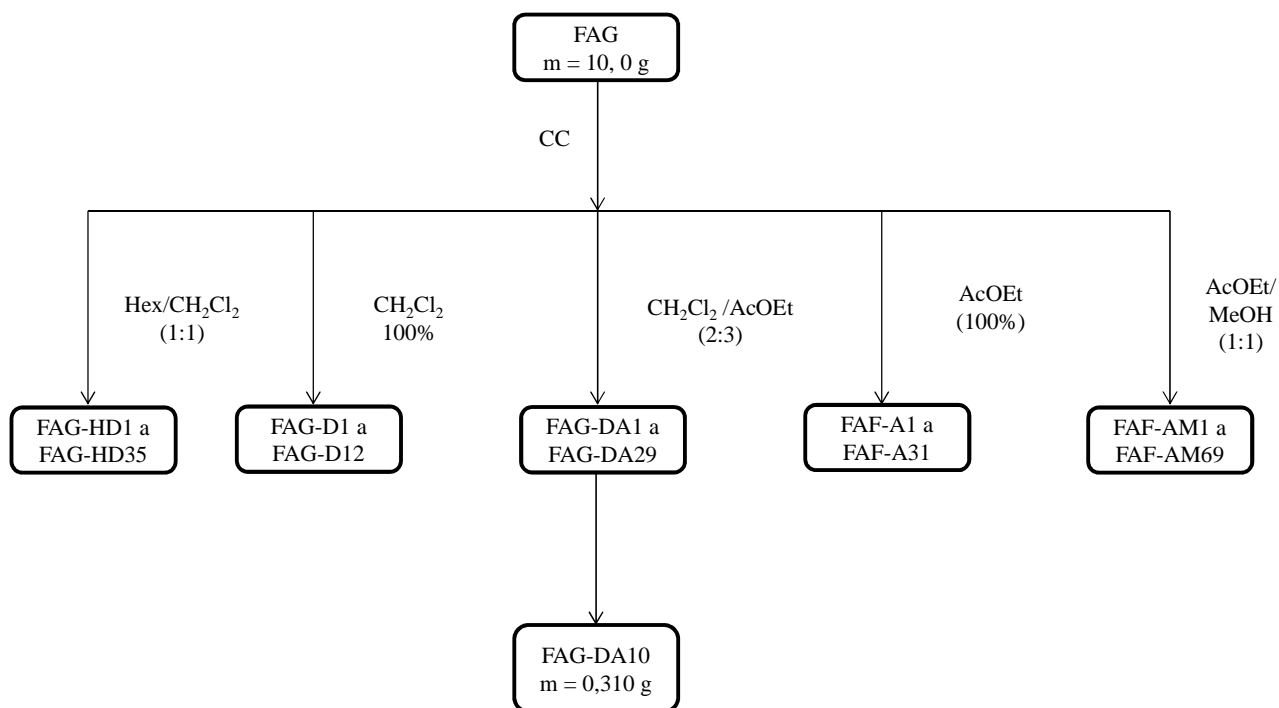
(0,015 g). As frações FDF-DA22 a FDF-DA24 foram reunidas, fornecendo um sólido incolor (0,050 g), denominadas por **FDF-DA23**. A fração **FDF-DA30** forneceu um sólido cristalino branco (0,020 g).



Esquema 2.8 Etapas do fracionamento cromatográfico de FDF.

2.2.9. Fracionamento Cromatográfico de FAG

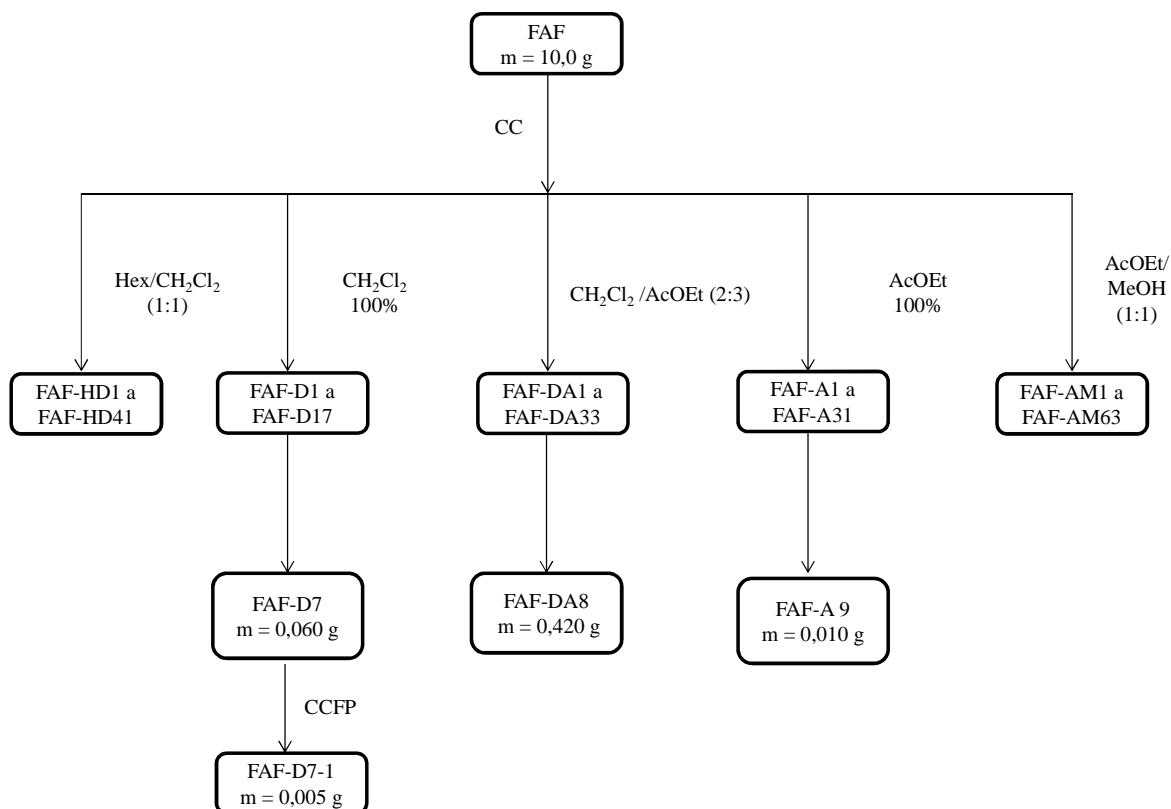
O Esquema 2.9 (p. 37) apresenta as etapas do fracionamento cromatográfico de FAG. Uma alíquota de FAG (10,0 g) foi submetida a fracionamento cromatográfico em coluna aberta (diâmetro de 4,0 cm e altura de 90,0 cm) e empacotada com 160,0 g com sílica gel 60, tendo como fases móveis hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, em gradiente crescente de eluição. As frações foram coletadas em frascos de 20 mL, fornecendo 176 frações. As frações FAG-DA3 a FAG-DA17 foram reunidas, fornecendo um sólido incolor amorfo denominado de **FAG-DA10** (0,310 g).



Esquema 2.9 Etapas do fracionamento cromatográfico de FAG.

2.2.10. Fracionamento Cromatográfico de FAF

O Esquema 2.10 (p. 38) apresenta as etapas do fracionamento cromatográfico de FAF. Uma alíquota de FAF (10,0 g) foi submetida a fracionamento cromatográfico em coluna aberta (diâmetro de 4,0 cm e altura de 90,0 cm) e empacotada com 160 g com sílica gel 60, tendo como fases móveis hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, em gradiente crescente de eluição. As frações foram coletadas em frascos de 20 mL, fornecendo 185 frações. Após análise por CCD, as frações FAF-D1 a FAF-D17 foram reunidas e submetidas a purificação por cromatografia de camada preparativa utilizando como fase móvel hexano e acetato de etila (1:1). O material foi removido da placa de CCP conforme luz UV a 366 nm (Figura 2.1, p. 38), solubilizado em metanol e, posteriormente, filtrado, fornecendo um sólido cristalino denominado de **FAF-D7-1**. As frações FAF-DA1 a FAF-DA33 foram reunidas, fornecendo um sólido incolor amorfo denominado de **FAF-DA8**. A fração **FAF-A9** forneceu um sólido cristalino.



Esquema 2.10 Etapas do fracionamento cromatográfico de FAF.

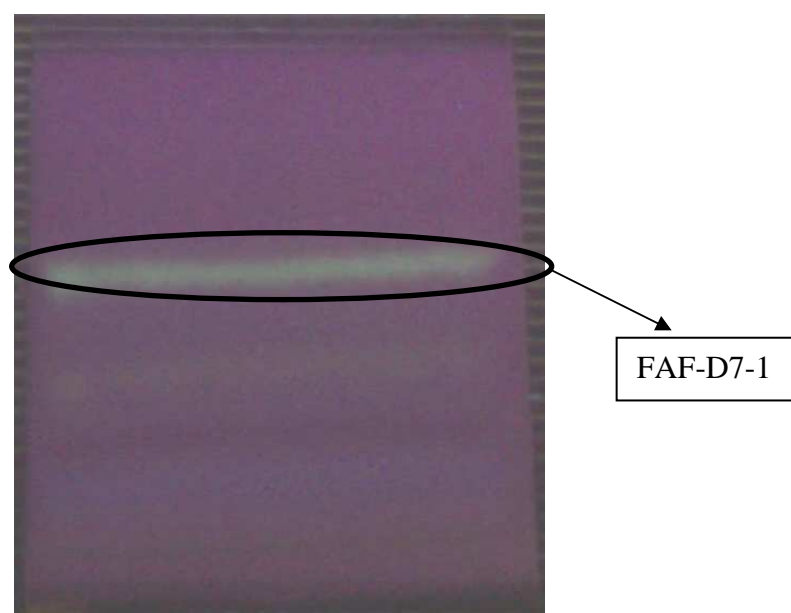
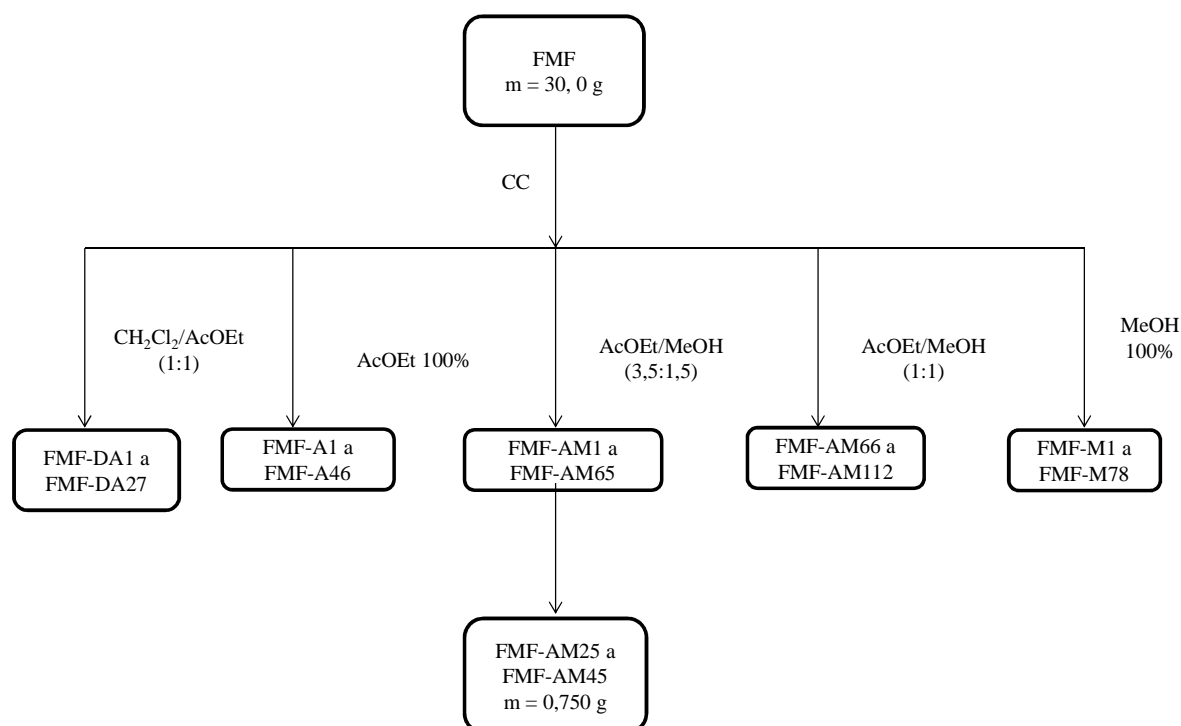


Figura 2.1 fotografia da placa cromatográfica preparativa revelada sob luz UV a 366 nm do sólido cristalino FAF-D7-1.

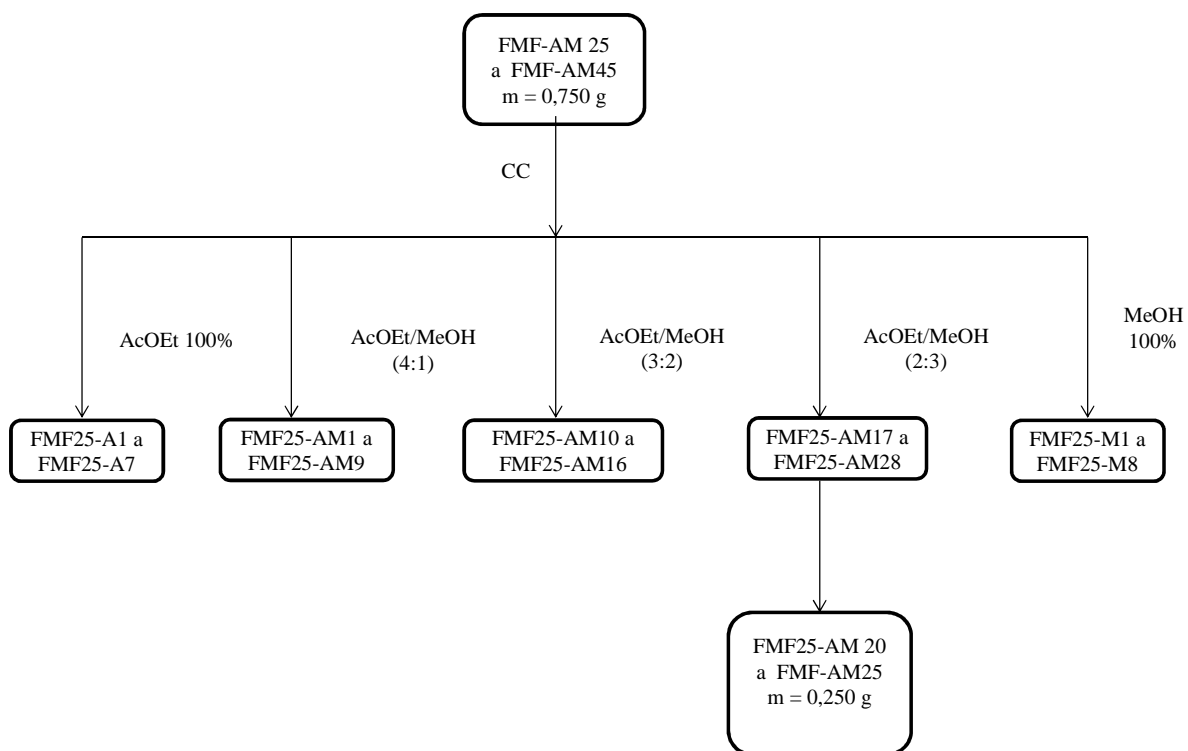
2.2.11. Fracionamento Cromatográfico de FMF

O Esquema 2.11 apresenta as etapas do fracionamento cromatográfico de FMF. Uma alíquota de FMF (30,0 g) foi submetida a fracionamento cromatográfico em coluna aberta (diâmetro de 6,0 cm e altura de 120,0 cm) e empacotada com 240 g com sílica gel 60, tendo como fases móveis hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, em gradiente crescente de eluição. As frações foram coletadas em frascos de 30 mL, fornecendo 263 frações.



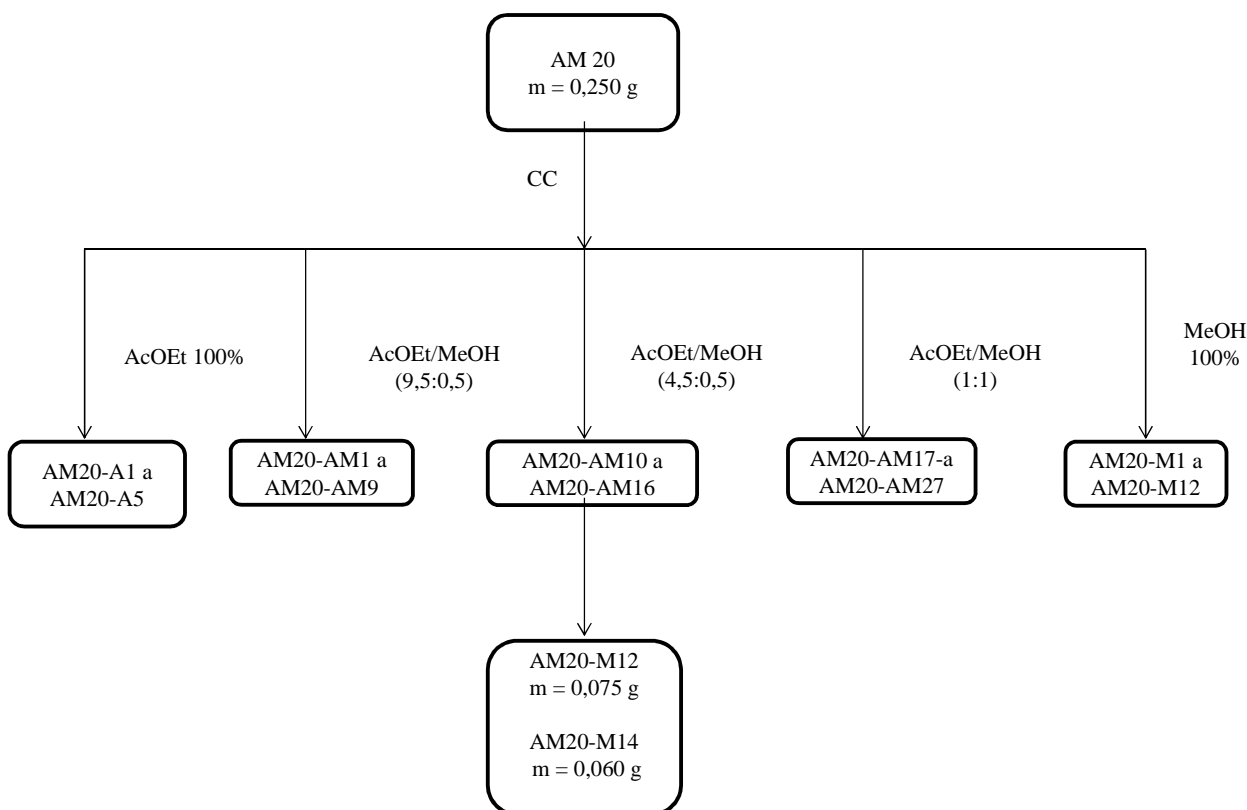
Esquema 2.11 Etapas do fracionamento cromatográfico de FMF.

Após análise por CCD, as frações FMF-AM25 a FMF-AM45 codificadas como **FMF-AM25** (m= 0,750 g) foram reunidas e novamente submetidas a fracionamento cromatográfico em coluna (Esquema 2.12, p. 40). O grupo FMF-AM25 (0,750 g) foi cromatografado em coluna aberta (2,5 cm de diâmetro e 70 cm de altura) e empacotada com sílica gel 60, tendo como fases móveis acetato de etila e metanol, em gradiente crescente de eluição. As frações foram coletadas em frascos de 20 mL, obtendo-se 43 frações que foram reunidas conforme semelhança de perfis nas análises por CCD. As frações FMF25-AM20 a FMF25-AM25 (0,250 g) foram reunidas e codificadas como AM20 e, novamente, purificadas (Esquema 2.13, p. 41).



Esquema 2.12 Etapas do fracionamento cromatográfico de FMF-AM25.

O Esquema 2.13 (p. 41) apresenta as etapas do fracionamento cromatográfico de AM20. A amostra (0,250 g) foi cromatografada em coluna aberta (1,5 cm de diâmetro e 90 cm de altura) e empacotada com sílica gel 60, tendo como fases móveis acetato de etila e metanol, em gradiente crescente de eluição. As frações foram coletadas em frascos de 20 mL, obtendo-se 44 frações que foram reunidas conforme semelhança de perfis nas análises por CCD. As frações **AM20-M12** e **AM20-M14** forneceram sólidos cristalinos.

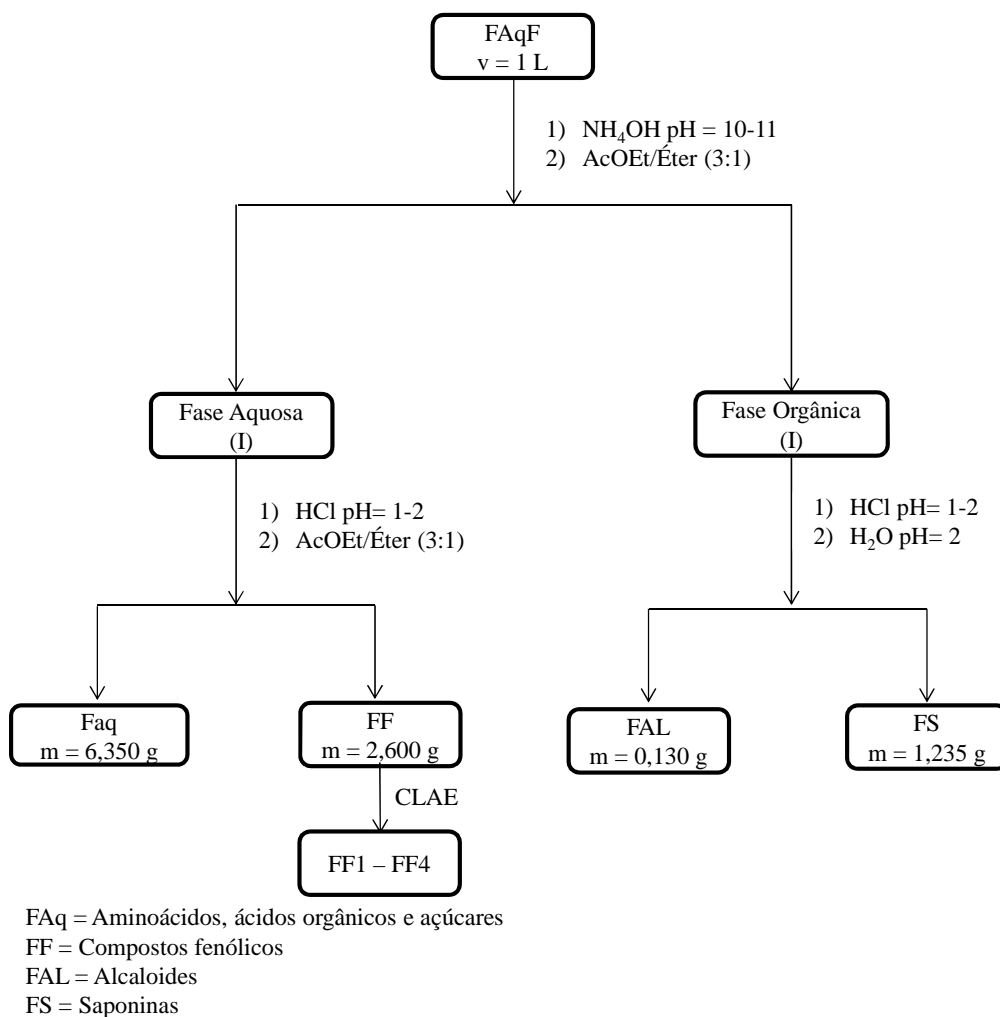


Esquema 2.13 Procedimento experimental do fracionamento cromatográfico de AM20.

2.3. Obtenção de frações polares das folhas para análise em CLAE

As folhas secas e trituradas (100,0 g) foram submetidas à decocção em 1 L de água por 2 h a 60 °C. Após filtração, a fase líquida foi alcalinizada com hidróxido de amônio 25% até pH 10–11, obtendo-se uma fase aquosa básica das folhas da planta (FAqF). A amostra FAqF foi colocada em um funil de separação e, em seguida, acrescentada uma solução de acetato de etila/éter etílico (3:1), separando-se a fase aquosa (I) da fase orgânica (I).

A fase aquosa (I) foi acidificada com HCl até pH 1–2 e submetida à extração com solução de acetato de etila/éter etílico (3:1), obtendo-se a fase aquosa ácida **FAq**, rica em aminoácidos, ácidos orgânicos e açúcares, e a fase orgânica **FF**, rica em compostos fenólicos do tipo flavonoides. Por sua vez, a fase orgânica (I) foi acidificada com HCl até pH 2 e submetida à extração com solução de aquosa ácida (pH 2), obtendo-se a fase aquosa denominada **FAL**, rica em alcaloides, e a fase orgânica (II) codificada como **FS**, rica em saponinas. O Esquema 2.14 (p. 42) apresenta a sequência metodológica para isolamento dos constituintes polares do extrato aquoso de *J. acuminatissima*.



Esquema 2.14 Sequência metodológica para o isolamento de constituintes polares do FAqF.

Para a detecção das classes de compostos obtidos dos constituintes polares das folhas foram realizados testes de prospecção fitoquímica para os compostos fenólicos, alcaloides e saponinas conforme descrito anteriormente no item 2.2.4 (p. 32).

2.3.1 Fracionamento cromatográfico de FF em CLAE

Uma alíquota da fração FF (~1,5 g) foi cromatografada em CLAE-preparativa. Para o isolamento dos fitoconstituintes foi utilizado como fase móvel solução de água 0,5% TFA e Acetonitrila na proporção (70:30) em modo isocrático e fluxo de 4,0 mL/min. Os compostos codificados como FF1 (TR = 5,0-5,5 min, m= 9,0 mg), FF2 (TR = 5,7 min, m= 15,0 mg), FF3 (TR = 10,5 min, m= 7,0 mg) e FF4 (TR = 15,0 min, m= 15,0 mg) foram secados em rotavapor e posteriormente liofilizados.

2.4. Óleos essenciais

2.4.1 Coleta do material vegetal

As folhas de *J. acuminatissima* foram coletadas bimestralmente no ano de 2009. As coletas foram iniciadas em janeiro/2009 e finalizadas em novembro/2009. Durante esse período, as coletas foram realizadas em três horários (manhã, tarde e noite) no Município de Itacoatiara-AM, para tentativas de obtenção do óleo essencial.

2.4.2 Extração dos óleos essenciais

As folhas de *Justicia acuminatissima* recém-coletadas (~300 g) foram acondicionadas em balão de 5 L juntamente com 2 L de água destilada e submetidas ao processo de hidrodestilação em aparelho doseador tipo Clevenger, por um período de 6 h (Matos, 2000).

Capítulo 3

Identificação estrutural dos fitoconstituintes

3.1. Prospecção fitoquímica

A Tabela 3.1 apresenta os resultados da prospecção fitoquímica dos extratos brutos e frações das folhas e galhos de *J. acuminatissima*. As frações FHF, FHG, FDF e FDG mostraram testes positivos para triterpenos e esteroides, sendo que, as frações em diclorometano mostraram concentrações maiores. Essas classes de compostos foram confirmadas por teste positivo para terpenos com o reagente de Liebermann-Burchard. No gênero *Justicia* existem poucos relatos do isolamento de triterpenos e esteroides. Nas espécies *J. anselliana*, *J. adhatoda* e *J. flava* foram isolados os esteroides β -sitosterol, estigmasterol e campesterol, além do sitosterol glicosilado e dos triterpenos lupeol e α -amirina (Kpoviéssi *et al.*, 2006; McGaw *et al.*, 2008).

Tabela 3.1 Resultados da prospecção fitoquímica dos extratos brutos das folhas e galhos de *J. acuminatissima*

Classe de substâncias	Folhas						Galhos					
	FHF	FDF	FAF	FMF	EE7F	EEF	FHG	FDG	FAG	FMG	EE7G	EEG
Triterpenos	+	+++	+	-	-	+	+	+++	+	-	-	+
Esteroides	++	+++	+	-	-	+	++	++	+	-	-	+
Antocianidinas, antocianinas e flavonoides	-	-	-	+++	-	++	-	-	-	+	-	-
Alcaloides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Taninos	-	-	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	+++
Fenóis	+	-	-	+++	+	+	-	+	-	+	+	+
Saponinas	-	-	+	+++	+++	+++	-	-	+	+	+++	+++
Cumarinas	-	-	++	++	+	+	-	-	++	+	+	-
Flavononas, Flavonóis, flavononóis e xantonas	-	-	-	++	-	-	-	-	-	++	-	-
Leucoantocianidinas, catequinas e flavononas	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-

(-) = não observado; (+) = baixa concentração; (++) = concentração moderada; (+++) = alta concentração; FA = fração em acetato de etila; FH = fração em hexano; FD = fração em diclorometano; FM = fração em metanol; EE = extrato em etanol; EE7 = extrato em etanol a 70%.

Os triterpenos, taninos, compostos fenólicos e saponinas foram detectados nas frações FAF, FAG, EE7F e EE7G. As cumarinas foram detectadas nessas mesmas frações. Isto é muito interessante, pois a classe das cumarinas foi descrita no gênero na espécie *J. pectoralis* (Leal *et al.*, 2000). A cumarina umbeliferone (1, p. 20) foi isolada desta espécie e possui diferentes propriedades medicinais, tais como antinoceptiva, anti-inflamatória e broncodilatadora (Lino *et al.*, 1997). Os compostos fenólicos foram detectados principalmente nas frações em metanol tanto das folhas quanto dos galhos. Espécies deste gênero são conhecidas por conter alcaloides, lignanas, compostos fenólicos, óleos essenciais, flavonoides e aminas aromáticas (Prajogo *et al.*, 2007). No entanto, os extratos e frações da espécie *J. acuminatissima* apresentaram teste negativo para alcaloides.

Em relação aos óleos essenciais, foram realizadas coletas em diferentes estações do ano (janeiro, março, maio, julho, setembro e novembro de 2009). No entanto, o material vegetal de nenhuma dessas coletas propiciou a obtenção de óleos essenciais.

A Figura 3.1 (p. 47) mostra os resultados dos testes de prospecção fitoquímica para a fração fenólica (FF) do extrato aquoso das folhas de *J. acuminatissima*. A Figura 3.1 (A) mostra o teste de detecção de compostos fenólicos, cujos resultados foram positivos. As Figuras 3.1 (B) e 3.1 (C) mostram as placas cromatográficas da fração fenólica em sílica gel eluída em AcOEt/ácido fórmico/ácido acético/H₂O (100:11:11:27) e reveladas com hidróxido de amônio e hidróxido de potássio 10%, respectivamente. As manchas amarelas na Figura 3.1 (B) indicam presença de compostos fenólicos e as manchas azuis na Figura 3.1 (C) indicam a presença de cumarinas.

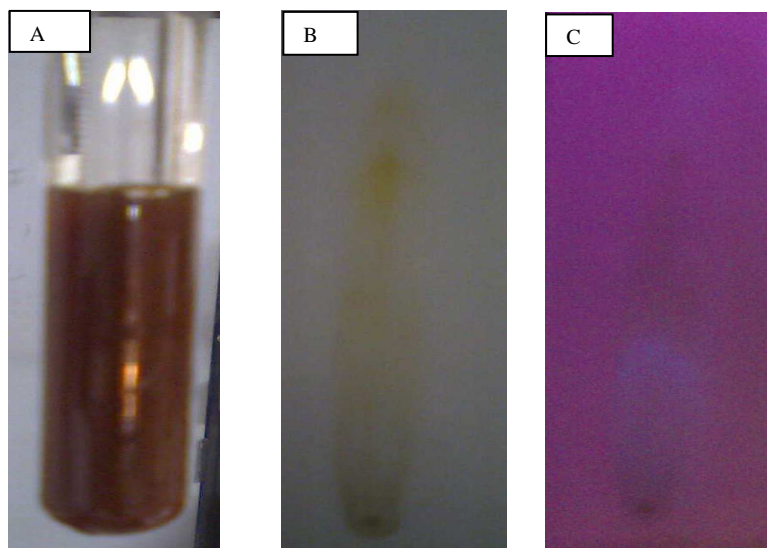


Figura 3.1 Fotografia dos testes fitoquímicos para a fração fenólica: (A) Tubo de ensaio contendo a amostra FF, mostrando teste positivo para compostos fenólicos; (B) e (C) placas cromatográficas de sílica gel eluídas em AcOEt/ácido fórmico/ácido acético/H₂O (100:11:11:27) e reveladas com NH₄OH (mostrando manchas amarelas) e KOH 10% sob luz UV 366 (mostrando manchas azuis), indicando respectivamente as presenças de compostos fenólicos e cumarinas.

A Figura 3.2 mostra os resultados dos testes de prospecção fitoquímica para as frações alcaloídicas (FAL) e saponínicas (FS) (Esquema 2.14, p. 42). A Figura 3.2 (A) mostra o teste de detecção para alcaloides, cujos resultados revelaram a formação de precipitado após adição do reagente de Dragendorff. A Figura 3.2 (B) mostra o teste positivo para saponinas, com formação abundante de espuma.

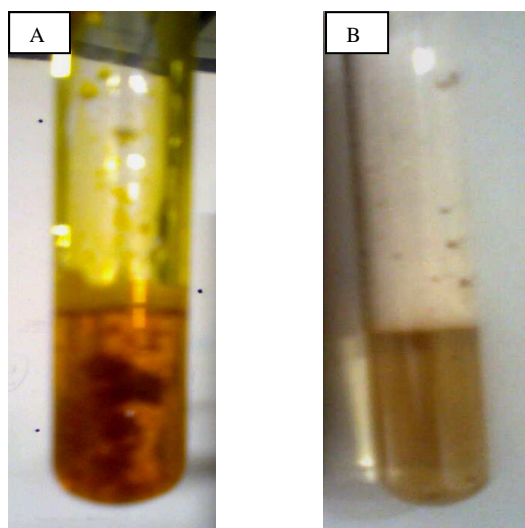


Figura 3.2 Fotografia de testes químicos: (A) Tubo de ensaio contendo FAL, mostrando teste positivo para alcaloides; (B) Tubo de ensaio contendo FS, mostrando teste positivo para saponinas.

3.2. Análises por CCD das frações FHF, FHG, FDF, FDG, FAF e FAG

A Figura 3.3 mostra a placa cromatográfica de FHF, FHG, FDF, FDG, FAF e FAG, mistura de β -sitosterol e estigmasterol e do triterpeno pentacíclico lupeol em sílica gel com eluição em Hex/AcOEt (7:3). A análise comparativa da eluição das amostras na placa cromatográfica indica uma similaridade entre os constituintes das frações FHF, FHG, FDF e FDG. Para as mesmas frações foi possível detectar as presenças da mistura β -sitosterol e estigmasterol e do triterpeno lupeol.

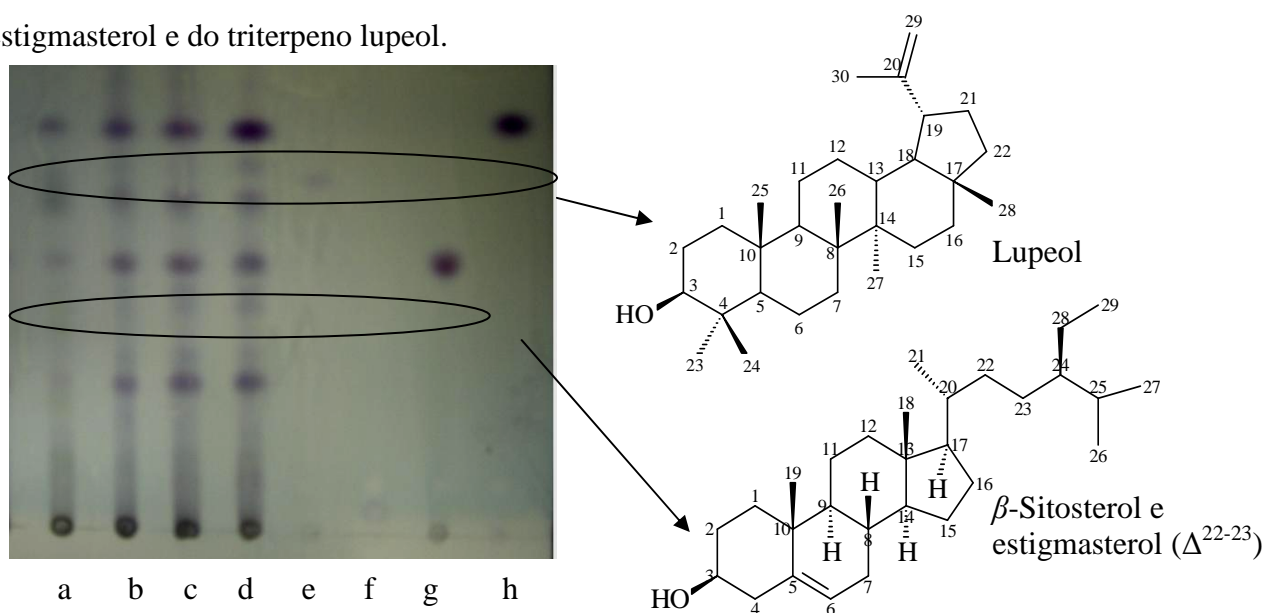


Figura 3.3 Fotografia da placa cromatográfica de FHG (a), FHF (b), FDG (c), FDF (d), FAF (e), FAG (f), β -sitosterol-estigmasterol (g) e lupeol (h) eluída em Hex/AcOEt (7:3) e revelada em vanilina ácida.

3.3. Identificação dos compostos isolados de FHF

Os espectros de todas as substâncias estão apresentados no Anexo I. Para aquelas cuja atribuição não se encontra apresentada em tabela, a listagem dos dados encontra-se ao final da respectiva discussão.

3.3.1. Análise Estrutural de FHF-HD3

A amostra FHF-HD3 foi isolada do extrato em hexano das folhas de *J. acuminatissima* após fracionamentos em coluna de sílica gel e recristalização com clorofórmio, obtendo-se um sólido incolor de p.f. = 247,3-251,8 °C. Apresentou teste de Liebermann-Burchard positivo para triterpenos.

O espectro de RMN de ^1H (Figura A1, p. 161) mostra sinais simples e intensos de hidrogênio entre δ_{H} 1,21 e 0,75, além de multipletos entre δ_{H} 1,22 e 2,50 que são característicos de grupos metila e de átomos de hidrogênio alifático. O espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT 135° (Figuras A2 e A3, p. 162 e 163, respectivamente) mostram um

sinal em δ_C 213,5, atribuído a um carbono carbonílico, e sinais entre δ_C 59,9-7,2 atribuídos a carbono saturado. Os dados de RMN de ^{13}C do composto FHF-HD3 estão de acordo com os descritos na literatura para friedelina (Tabela 3.3, p. 64) (Mahato & Kundu, 1994). Os triterpenos possuem poucos relatos em espécies de *Justicia*. Esse triterpeno é descrito pela primeira vez neste gênero.

3.3.2. Análise Estrutural de FHF-HD10

A amostra FHF-HD10 foi isolada do extrato em hexano das folhas de *J. acuminatissima* após fracionamento em coluna de sílica gel e recristalização com clorofórmio, obtendo-se um sólido incolor de p.f. = 135,2-141,4 °C. Apresentou teste de Liebermann-Burchard positivo para esteroides.

O espectro no infravermelho de FHF-HD10 (Figura A4, p. 154) mostra banda de absorção em 3278 cm^{-1} atribuída a estiramento de O-H, confirmada pela absorção em aproximadamente 1096 cm^{-1} , atribuída ao estiramento de C-O. As absorções na região de 3000 a 2800 cm^{-1} e de 1464 e 1378 cm^{-1} foram atribuídas respectivamente a estiramento de deformação angular de C-H de cadeia alifática (Silverstein *et al.*, 2006; Pavia *et al.*, 2010). A absorção em 1066 cm^{-1} é característica de estiramento C-O, compatível com hidroxila equatorial de esteróis. A absorção em 992 cm^{-1} é característica de ligação C=C *trans* dissubstituída da cadeia lateral de esteróis (Goad, 1991).

O espectro de RMN de 1H de FHF-HD10 (Figura A5, p. 155) mostra um sinal em δ_H 5,35 que pode ser atribuído a hidrogênio olefínico H-6 tanto do β -sitosterol quanto do estigmasterol. O multiplete em δ_H 5,22-5,02 pode ser atribuído aos átomos de hidrogênio H-22 e H-23 do estigmasterol. O sinal em δ_H 3,55-3,51 pode ser atribuído ao hidrogênio carbinólico H-3 do β -sitosterol e estigmasterol. Os vários sinais observados na região em δ_H 2,40 - 0,60 podem ser atribuídos aos átomos de hidrogênio da cadeia alifática de ambos os esteroides.

O espectro de RMN de ^{13}C e o subespectro de DEPT 135° (Figuras A6 e A7, p. 156 e 157, respectivamente) mostram os sinais característicos de átomos de carbono alquenílico em δ_C 140,8 (não-hidrogenado) e 121,7 (mono-hidrogenado) atribuídos ao C-5 e C-6 respectivamente, do β -sitosterol e estigmasterol. Os sinais em δ_C 138,3 e 129,3 (ambos mono-hidrogenados) podem ser atribuídos respectivamente ao C-22 e C-23 do estigmasterol. Os demais sinais de RMN de ^{13}C foram atribuídos conforme comparação com dados de RMN de ^{13}C do β -sitosterol e estigmasterol descritos na literatura (Brandão, 1991) (Tabela 3.2 p. 59).

Os dados mostram que a proporção de β -sitosterol e estigmasterol na mistura é praticamente semelhante.

Os esteroides são pouco relatados em espécies de *Justicia*, sendo os da mistura acima citada isolados anteriormente, além do campesterol, nas espécies *J. anselliana* (Kpoviéssi *et al.*, 2006), *J. adhatoda* e *J. flava* (McGaw *et al.*, 2008).

3.3.3. Análise Estrutural de FHF-HD18

A amostra FHF-HD18 foi isolada do extrato em hexano das folhas de *J. acuminatissima* após fracionamento em coluna de sílica gel e recristalização com clorofórmio, obtendo-se um sólido incolor de p.f. = 263,0-267,2 °C. Apresentou teste de Liebermann-Burchard positivo para triterpenos.

O espectro de RMN de ^1H (Figura A8, p. 158) mostra sinais simples entre δ_{H} 1,34-0,80 e multipletos entre δ_{H} 2,01 e 1,37 que são característicos de átomos de hidrogênio alifático. O espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT 135⁰ (Figuras A9 e A10, p. 159 e 160, respectivamente) mostram um sinal em δ_{C} 72,3, atribuído a um carbono carbinólico em C-3, e sinais entre δ_{C} 61,5-11,8 (A9, p. 159) atribuídos a carbono saturado. Os dados de RMN de ^{13}C do composto FHF-HD18 estão de acordo com os descritos na literatura para β -friedelinol (Tabela 3.3, p. 60) (Mahato & Kundu, 1994). Esse triterpeno é descrito pela primeira vez neste gênero.

3.4. Identificação dos compostos isolados de FHG

3.4.1. Análise Estrutural de FHG-HD14

A amostra FHG-HD14 foi isolada da fração em hexano dos galhos de *J. acuminatissima* após fracionamento em coluna de sílica gel. O sólido amorfo e incolor de p.f. = 212,5- 215,2 °C apresentou teste de Liebermann-Burchard positivo para triterpenos.

O espectro no IV de FHG-HD14 (Figura A11, p. 161) mostra banda de absorção em 3276 cm⁻¹ característica de estiramento OH. As absorções entre 2961 e 2864 cm⁻¹ podem ser atribuídas a estiramentos simétricos C-H de grupos alifáticos. A absorção de baixa intensidade registrada em 1665 cm⁻¹ pode ser atribuída ao estiramento C=C de grupos alquênílicos. As absorções intensas em 1464,4 e 1381,7 cm⁻¹ podem ser atribuídas a deformação angular de grupos metila e metilênicos de cadeia alifática. As absorções próximas a 1062,4 cm⁻¹ podem ser atribuídas a estiramento C-O.

O espectro de RMN de ¹H de FHG-HD14 (Figura A12, p. 162) mostra sinais em δ_H 4,68 e 4,57 atribuídos a átomos de hidrogênio olefínicos. O sinal multiplete registrado em δ_H 3,23-3,15 pode ser atribuído a hidrogênio carbinólico. Os vários sinais registrados entre δ_H 2,45 e 0,80 podem ser atribuídos a átomos de hidrogênio alifático.

O espectro de RMN de ¹³C e o subespectro de DEPT 135° (Figuras A13 e A14, p. 163 e 164, respectivamente) mostram sinais em δ_C 150,9 (carbono não-hidrogenado) e δ_C 109,2 (carbono metilênico) característicos de átomos de carbono alquênílico C-20 e C-29, respectivamente, de triterpenos do esqueleto lupano. O sinal registrado em δ_C em 78,9 pode ser atribuído ao carbono carbinólico C-3 do anel lupano sugerindo tratar-se do lupeol. Os demais sinais são registrados entre δ_C 55,2 e 14,5 e estão de acordo com os dados descritos na literatura para o triterpeno lupeol (Tabela 3.4, p. 61). No gênero *Justicia* esse triterpeno foi descrito apenas para a espécie *J. anselliana* (Kpoviéssi *et al.*, 2006) e *J. flava* (McGaw *et al.*, 2008).

3.4.2. Análise Estrutural de FHG-HD22

A amostra FHG-HD22 foi isolada do extrato em hexano dos galhos de *J. acuminatissima* após fracionamentos em coluna de sílica gel e recristalização com clorofórmio, obtendo-se um sólido incolor de p.f. = 139,7-142,5 °C. Apresentou teste de Liebermann-Burchard positivo para esteroides.

A análise espectrométrica estrutural realizada para FHG-HD22 foi semelhante à de FHF-HD10 (p. 47). Os espectros de RMN de ^1H (Figura A15), de ^{13}C (Figura A16) e subespectro DEPT 135° (Figura A17) de FHG-HD22, encontram-se nas p. 165, 166 e 167, respectivamente, sugerindo que o composto FHG-HD22 é a mistura dos esteroides β -sitosterol e estigmasterol (Tabela 3.2, p.59). A comparação entre os picos sugerem que a proporção de β -sitosterol na mistura é maior do que a de estigmasterol.

3.5. Identificação dos compostos isolados de FDF

3.5.1. Análise Estrutural de FDF-HD4

A amostra FDF-HD4 foi isolada da fração em diclorometano das folhas de *J. acuminatissima* após o fracionamento em coluna de sílica gel e recristalização com clorofórmio, obtendo-se um sólido incolor de p.f. = $132,5\text{-}134,7^\circ\text{C}$. Apresentou teste de Liebermann-Burchard positivo para esteroides.

Esse composto também foi isolado em mistura com estigmasterol durante o fracionamento de FHF. A análise estrutural realizada para FDF-HD4 foi semelhante à de FHF-HD10 (p. 47). Os espectros de RMN de ^1H (Figura A18), de ^{13}C (Figura A19) e subespectro DEPT 135° (Figura A20) de FDF-HD4 encontram-se nas p. 168, 169 e 170, respectivamente, sugerindo que o composto FDF-HD4 é o esteroide β -sitosterol (Tabela 3.2, p. 59).

3.5.2. Análise Estrutural de FDF-HD9

A amostra FDF-HD9 foi isolada da fração em diclorometano das folhas de *J. acuminatissima* após fracionamento em coluna de sílica gel e recristalização com clorofórmio, obtendo-se um sólido incolor de p.f. = $209,0\text{-}213,8^\circ\text{C}$. Apresentou teste de Liebermann-Burchard positivo para triterpenos.

A análise espectrométrica realizada para FDF-HD9 foi semelhante à de FHG-HD14 (p. 49). Os espectros de RMN de ^1H (Figura A21), de ^{13}C (Figura A22) e subespectro DEPT 135° (Figura A23) de FDF-HD9, encontram-se nas p. 171, 172 e 173, respectivamente, sugerindo que o composto FDF-HD9 é o triterpeno lupeol (Tabela 3.4, p.61).

3.5.3. Análise Estrutural de FDF-HD25

A amostra FDF-HD25 foi isolada da fração em diclorometano das folhas de *J. acuminatissima* após fracionamento em coluna de sílica gel e recristalização em clorofórmio e metanol, obtendo-se um sólido branco amorfo de p.f. = 192,6-195,2 °C. Apresentou teste de Liebermann-Burchard positivo para triterpenos.

O espectro no IV de FDF-HD25 (Figura A24, p. 174) mostra banda de absorção em 3421 cm⁻¹, característica de estiramento de hidroxila. Absorções em 2916, 2848 e 1472, 1389 cm⁻¹ foram atribuídas respectivamente a estiramento e a deformação angular de C-H de cadeia alifática. As absorções em 1172 e 1109 cm⁻¹ são características de estiramento C-O (Silverstein *et al.*, 2006; Pavia *et al.*, 2010).

O espectro de RMN de ¹H (Figura A25, p. 175) mostra sinais em δ_H 5,13 e 5,12 e δ_H 4,68-4,56 atribuídos a átomos de hidrogênio alquênico. Os outros sinais de hidrogênio são registrados entre δ_H 2,0 e 0,8. O espectro de RMN de ¹³C (Figura A26, p. 176) mostra sinais em δ_C 79,1 característico de carbono hidroxilado. Os sinais em δ_C 139,6 e 124,5 são característicos de triterpeno com esqueleto tipo ursano e os sinais em δ_C 121,8 e 145,1 são característicos de triterpeno com esqueleto tipo oleanano. Os sinais em δ_C 150,9 (carbono não hidrogenado) e δ_C 109,3 (carbono metilênico observado em fase negativa no subespectro DEPT 135°) (Figura A27, p. 177) são característicos de triterpenos de esqueleto lupano. Os dados de RMN de ¹³C de FDF-HD25 estão de acordo com os descritos na literatura para os triterpenos α -amirina, β -amirina e lupeol (Tabelas 3.3 e 3.4, p. 60 e 61, respectivamente) (Mahato & Kundu, 1994). No gênero *Justicia*, o triterpeno lupeol foi descrito apenas para a espécie *J. anselliana* (Kpoviéssi *et al.*, 2006), enquanto que α -amirina e β -amirina foram descritas para *J. anselliana* (Kpoviéssi *et al.*, 2006) e *J. adhatoda* (Dhankhar *et al.*, 2011).

3.5.4. Análise Estrutural de FDF-DA23

A amostra FDF-DA23 foi isolada da fração em diclorometano das folhas de *J. acuminatissima* após fracionamento em coluna de sílica gel e recristalização em clorofórmio e metanol, obtendo-se um sólido branco cristalino de p.f. = 248,0-251,6 °C. Apresentou teste de Liebermann-Burchard positivo para triterpenos.

O espectro no IV de FDF-DA23 (Figura A28, p. 178) mostra banda de absorção em 3372 cm⁻¹ característica de estiramento de hidroxila. Absorções em 2925, 2854 e 1393 cm⁻¹ foram atribuídas respectivamente a estiramento e a deformação angular de C-H de cadeia alifática. A absorção em 1128 cm⁻¹ é característica de estiramento C-O (Silverstein *et al.*, 2006; Pavia *et al.*, 2010).

O espectro de RMN de ¹H de FDF-DA23 (Figura A29, p. 179) mostra sinais em δ_H 5,30 e 5,20, além de sinais em δ_H 4,69 e 4,58 atribuídos a átomos de hidrogênio alquênico. Os sinais registrados em δ_H 3,36-3,17 podem ser atribuídos a hidrogênio carbinólico. Os vários sinais registrados entre δ_H 2,45 e 0,80 podem ser atribuídos a átomos de hidrogênio de grupos alifáticos.

O espectro de RMN de ¹³C e o subspectro de DEPT 135° (Figuras A30 e A31, p. 180 e 181, respectivamente) mostram sinais em δ_C 150,5 (carbono não-hidrogenado) e δ_C 109,7 (carbono metilênico) característicos dos átomos de carbono alquênicos C-20 e C-29, respectivamente, de triterpenos do esqueleto tipo lupano. O sinal registrado em δ_C em 79,0 pode ser atribuído ao carbono carbinólico C-3 do lupano. O sinal registrado em δ_C em 60,6 pode ser atribuído ao carbono metilênico e hidroxilado C-28 da betulina.

O espectro de RMN de ¹³C e o subspectro de DEPT 135° (Figuras A30 e A31, p. 180 e 181, respectivamente) também mostram em δ_C 144,2 (carbono não-hidrogenado) e δ_C 122,3 (carbono metínico) característicos dos átomos de carbono alquênico C-13 e C-12, respectivamente, de triterpenos do esqueleto oleanano. O sinal registrado em δ_C em 79,0 pode ser atribuído também ao carbono carbinólico C-3 do oleanano. O sinal registrado em δ_C em 69,7 pode ser atribuído ao carbono metilênico hidroxilado C-28 do eritrodiol. Os dados de RMN de ¹³C de FDF-DA23 estão de acordo com os dados descritos na literatura para uma mistura de triterpenos betulina e eritrodiol (Tabela 3.4, p. 61) (Mahato & Kundu, 1994). Os dados mostram que a proporção da betulina na mistura é maior do que a de eritrodiol. Esses compostos são descritos pela primeira vez no gênero *Justicia*.

3.5.5. Análise Estrutural de FDF-DA30

A amostra FDF-DA30 foi isolada da fração em diclorometano das folhas de *J. acuminatissima* após fracionamento em coluna de sílica gel e recristalização em clorofórmio e metanol, obtendo-se um sólido branco cristalino de p.f. = 280,4-282,8 °C. Apresentou teste de Liebermann-Burchard positivo para triterpenos.

O espectro no IV de FDF-DA30 (Figura A32, p. 182) mostra banda de absorção em 3330 cm⁻¹ característica de estiramento de hidroxila. Absorções em 2944, 2871 e 1453, 1379 cm⁻¹ foram atribuídas a estiramento e a deformação angular respectivamente de C-H de cadeia alifática. As absorções em 1124, 1071 e 1042 cm⁻¹ são características de estiramento C-O (Silverstein *et al.*, 2006; Pavia *et al.*, 2010).

O espectro de RMN de ¹H de FDF-DA30 (Figura A33, p. 183) mostra sinais em δ_H 4,94 e 4,77 atribuídos a átomos de hidrogênio alquênico. O multipeto registrado em δ_H 3,61-3,40 pode ser atribuído a hidrogênio carbinólico. Os vários sinais registrados entre δ_H 2,73 e 0,81 podem ser atribuídos a átomos de hidrogênio de grupos alifáticos.

O espectro de RMN de ¹³C e o subespectro de DEPT 135° (Figuras A34 e A35, p. 184 e 185, respectivamente) mostram sinais em δ_C 151,5 (carbono não-hidrogenado) e δ_C 110,1 observado em fase negativa no subespectro DEPT 135°(carbono metilênico) que são característicos dos átomos de carbono alquênico C-20 e C-29, respectivamente, de triterpenos do esqueleto do tipo lupano. O sinal registrado em δ_C em 78,3 pode ser atribuído ao carbono carbinólico C-3 do lupano. O sinal registrado em δ_C em 179,1 pode ser atribuído ao carbono carboxílico C-28. Os dados de RMN de ¹³C de FDF-DA30 estão de acordo com os dados correspondentes descritos na literatura para o triterpeno ácido betulínico (Tabela 3.4, p. 61) (Mahato & Kundu, 1994). Esse composto é descrito pela primeira vez no gênero *Justicia*.

3.6. Identificação dos compostos isolados de FDG

3.6.1. Análise Estrutural de FDG-HD4

A amostra FDG-HD4 foi isolada da fração em diclorometano dos galhos de *J. acuminatissima* após fracionamento em coluna de sílica gel e recristalização com clorofórmio e metanol, obtendo-se um sólido cristalino de p.f. = 249,4-252,8 °C. Apresentou teste de Liebermann-Burchard positivo para triterpenos.

A análise estrutural realizada para FDG-HD4 foi semelhante à realizada para FDF-DA23 (p. 51). Os espectros de RMN de ^1H (Figura A36), de ^{13}C (Figura A37) e subespectro DEPT 135° (Figura A38) de FDG-HD4 encontram-se nas p. 186, 187 e 188, respectivamente, sugerindo que FDG-HD4 é uma mistura dos triterpenos betulina e eritrodiol (Tabela 3.4, p. 61).

3.6.2. Análise Estrutural de FDG-HD15

A amostra FDG-HD15 foi isolada da fração em diclorometano dos galhos de *J. acuminatissima* após fracionamento em coluna de sílica gel e recristalização com clorofórmio e metanol, obtendo-se um sólido branco amarelado amorfo de p.f. = 235,8-240,0 °C.

O espectro de RMN de ^1H de FDG-HD15 (Figura A39, p. 189) mostra um sinal em δ_{H} 5,36 atribuído ao hidrogênio olefínico H-6 do β -sitosterol. Os sinais em δ_{H} 4,68 e 4,57 são atribuídos a átomos de hidrogênio alquênico da dupla exocíclica em C-29 de triterpeno com esqueleto lupano. O multiplete registrado em δ_{H} 3,97-4,00 pode ser atribuído a hidrogênio carbinólico. Os vários sinais registrados entre δ_{H} 2,33 e 0,68 podem ser atribuídos a átomos de hidrogênio de grupos alifáticos.

O espectro de RMN de ^{13}C e o subespectro de DEPT 135° (Figuras A40 e A41, p. 190 e 191, respectivamente) mostram os sinais característicos de átomos de carbono alquênico em δ_{C} 140,9 (não-hidrogenado) e 121,9 (mono-hidrogenado) atribuídos a C-5 e C-6 do β -sitosterol, respectivamente. O sinal em δ_{C} 80,3 é característico de carbono acilado na posição C-3. Os sinais em δ_{C} 151,2 (carbono não hidrogenado) e δ_{C} 109,5 (carbono metilênico, observado em fase negativa no subespectro DEPT 135°) são característicos de triterpenos de esqueleto do tipo lupano. Os dados de RMN de ^{13}C de FDF-HD25 estão de acordo com os dados correspondentes descritos na literatura para mistura de β -sitosterol e lupeol acilado (Tabela 3.6, p. 63).

3.7. Identificação dos compostos isolados de FAF

3.7.1. Análise Estrutural de FAF-D7-1

A amostra FAF-D7-1 foi isolada da fração em acetato de etila das folhas de *J. acuminatissima*, apresentando-se como um sólido amarelo amorfo. A Figura A42 (p. 192) mostra o espectro no IV de FAF-D7-1. A banda em 3342 cm^{-1} é característica de estiramento de O-H. Absorção em 2931 cm^{-1} atribuída a estiramento de C-H de cadeia alifática. Os sinais intensos registrados em 1117 , 1057 e 1017 cm^{-1} são característicos de estiramento de C-O.

O espectro de RMN de ^1H de FAF-D7-1 (Figura A43, p. 193) mostra um duplete em $\delta_{\text{H}} 4,10$ ($J = 8,0\text{ Hz}$), um tripleto registrado em $\delta_{\text{H}} 3,95$ ($J = 8,0\text{ Hz}$), sinais sobrepostos na região $\delta_{\text{H}} 3,78$ - $3,53$ e um multipletto em $\delta_{\text{H}} 3,31$ característico de átomos de hidrogênio carbinólico. O tripleto em $\delta_{\text{H}} 1,15$ ($J = 7,0\text{ Hz}$) é característico de átomos de hidrogênio de grupo metila ligado a um grupo metileno.

O espectro de RMN de ^{13}C e o subespectro de DEPT 135° (Figuras A44 e A45, p. 194 e 195, respectivamente) mostram um sinal em $\delta_{\text{C}} 105,4$ de carbono não-hidrogenado ligado a dois átomos de oxigênio. Os sinais registrados em $\delta_{\text{C}} 83,5$, $78,6$ e $77,4$ correspondem a átomos de carbono ligados a oxigênio e mono-hidrogenado. Os sinais em $\delta_{\text{C}} 65,1$, $62,1$ e $58,0$ correspondem a átomos de carbono metilênicos ligados a nitrogênio. O sinal em $\delta_{\text{C}} 16,2$ é atribuído a átomo de carbono de grupo metila.

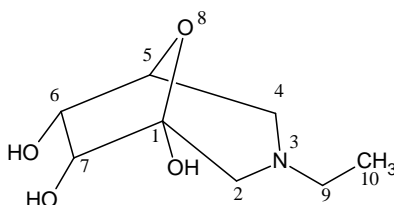
O mapa de contornos HSQC de FAF-D7-1 (Figura A46, p. 196) mostra correlação do sinal em $\delta_{\text{H}} 4,10$ com o sinal de carbono em $\delta_{\text{C}} 78,6$. O sinal registrado em $\delta_{\text{H}} 3,95$ mostra correlação com o sinal de carbono em $\delta_{\text{C}} 77,4$. O sinal em $\delta_{\text{H}} 3,75$ correlaciona-se com o sinal de carbono em $\delta_{\text{C}} 83,5$. Os sinais em $\delta_{\text{H}} 3,72$ e $3,58$ mostram correlação com o sinal de carbono em $\delta_{\text{C}} 65,1$. Os sinais registrados em $\delta_{\text{H}} 3,77$ e $3,55$ mostram correlação com o sinal de carbono em $\delta_{\text{C}} 58,0$ e os sinais em $\delta_{\text{H}} 3,65$ e $3,54$ correlacionam-se com o sinal de carbono em $\delta_{\text{C}} 62,1$. O sinal em $\delta_{\text{H}} 1,15$ apresenta correlação com o sinal de carbono registrado em $\delta_{\text{C}} 16,2$.

O mapa de contornos COSY de FAF-D7-1 (Figura A47, p. 197) mostra correlação entre os sinais de hidrogênio em $\delta_{\text{H}} 4,10$ e $3,95$. O sinal em $\delta_{\text{H}} 3,95$ correlaciona-se também com o sinal em $\delta_{\text{H}} 3,75$. O sinal em $\delta_{\text{H}} 1,15$ correlaciona-se com os sinais de hidrogênio em $\delta_{\text{H}} 3,77$ e $3,55$.

O mapa de contornos HMBC de FAF-D7-1 (Figura A48, p. 198) mostra correlação do sinal de hidrogênio em $\delta_{\text{H}} 4,10$ com o sinal de carbono metínico registrado em $\delta_{\text{C}} 77,4$ e com

o sinal de carbono metilênico em δ_C 62,1. O sinal de hidrogênio em δ_H 3,95 correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 65,1 e 83,5. O sinal de hidrogênio em δ_H 3,75 correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 105,4 e 65,1. Os sinais de hidrogênio registrados em δ_H 3,72 e 3,58 correlacionam-se com o sinal de carbono em δ_C 77,4. O sinal de hidrogênio em δ_H 1,15 correlaciona-se com o sinal de carbono em δ_C 58,0. As análises de RMN sugerem que o composto FAF-D7-1, corresponde à substância 3-etil-8-oxa-3-azabicyclo [3,2,1] octano-1,6,7-triol. De acordo com o levantamento feito na literatura esta é uma substância inédita.

Cálculos BLYP/6-31G * de otimização da geometria foram realizados para FAF-D7-1 com uma geometria de partida com base em diferentes estruturas de 3-etil-8-oxa-3-azabicyclo [3.2.1] octano-1,6,7-triol. A estrutura 3-etil-8-oxa-3-azabicyclo [3.2.1] octano-1,6,7-triol contendo os grupos hidroxila na posição *endo* nos átomos de carbono 6 e 7 (E = -669,23573863 Hartree) é a mais estável quando comparada às demais estruturas analisadas. Além disso, cálculos de deslocamento químico de carbono foram realizados para as geometrias otimizadas em mesmo nível de cálculo. Correlações de dados experimentais de RMN de ^{13}C de FAF-D7-1 com deslocamentos químicos de carbono calculados de 8-oxa-3-azabicyclo [3.2.1] octano-1,6,7-triol-3-etil ($R^2 = 0,9920$) mostram maior coeficiente de correlação do que para as demais estruturas analisadas. Como resultado, as análises experimentais e teóricas de FAF-D7-1 correspondem ao alcaloide 3-etil-8-oxa-3-azabicyclo [3.2.1] octano-1,6,7-triol.



3-etil-8-oxa-3-azabicyclo [3.2.1] octano-1,6,7-triol: IV (ATR; cm^{-1}) ν 3342, 2931, 1117, 1057, 1027, 1921, 668, e 616; RMN de ^1H (400 MHz; CD_3OD) δ_H 4,10 (H-7), 3,95 (H-6), 1,15 (H-10); RMN de ^{13}C (100 MHz; CD_3OD) δ_C 105,5 (C-1), 83,5 (C-5), 78,6 (C-7), 77,4 (C-6), 65,1 (C-4), 62,1 (C-2), 58,0 (C-9) e 16,0 (C-10).

3.7.2. Análise Estrutural de FAF-DA8

A amostra FAF-DA8 foi isolada da fração em acetato de etila das folhas de *J. acuminatissima* após fracionamento em coluna de sílica gel e recristalização em clorofórmio e metanol, obtendo-se um sólido branco amorfo de p.f. = 282,2-286,8 °C. Apresentou teste de Liebermann-Burchard positivo para esteroides.

O espectro na região no IV de FAF-DA8 (Figura A49, p. 199) mostra banda de absorção em 3448 cm⁻¹ atribuída a estiramento de O-H. As absorções na região de 2917, 2848 cm⁻¹ e de 1471 e 1378 cm⁻¹ foram atribuídas respectivamente a estiramento angular de C-H de cadeia alifática (Silverstein *et al.*, 2006; Pavia *et al.*, 2010).

O espectro de RMN de ¹H de FAF-DA8 (Figura A50, p. 200) mostra vários sinais na região entre δ_H 5,38 e 3,95 característicos de átomos de hidrogênio alquênico, carbinólico e de grupos hidroxílicos (Kojima *et al.*, 1990; Kasai *et al.*, 1987). Os demais sinais registrados entre δ_H 1,76 e 0,68 podem ser atribuídos a átomos de hidrogênio alifático de esteroides.

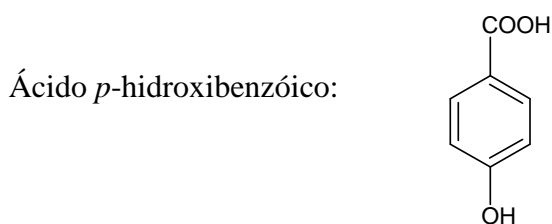
O espectro de RMN de ¹³C e o subespectro de DEPT 135° de FAF-DA8 (Figuras A51 e A52, p. 201 e 202, respectivamente) mostram sinais similares aos registrados para FHF-HD10 (Figuras A6 e A7, p. 156 e 157, respectivamente), indicando que FAF-DA8 trata-se de uma mistura de derivados de β - sitosterol e estigmasterol. Os sinais registrados em δ_C 102,6, 78,5, 78,3, 75,4, 71,7 e 62,9 podem ser atribuídos a um substituinte glicosídeo em C-3 de ambos os esteroides. A Tabela 3.5 (p. 62) mostra dados de RMN de ¹³C de FAF-DA8 e do sitosterol-3-*O*-D-glicopiranosídeo e estigmasterol-3- β -*O*-D-glicopiranosídeo. No gênero *Justicia*, esses compostos foram relatados apenas para a espécie *J. flava* (McGaw *et al.*, 2008).

3.7.3. Análise Estrutural de FAF-A9

A amostra FAF-A9 foi isolada da fração em acetato de etila das folhas de *J. acuminatissima* após fracionamento em coluna de sílica gel e recristalizada em clorofórmio e metanol, obtendo-se um sólido cristalino de p.f. = 122,4-123,6 °C.

O espectro de RMN de ¹H de FAF-A9 (Figura A53, p. 203) mostra sinais em δ_H 7,80 (2H, *d*, *J* = 8,0 Hz) e 6,84 (2H, *d*, *J* = 8,0 Hz) atribuídos a hidrogênio aromático. O sinal registrado em δ_H 10,6 é atribuído a hidrogênio carboxílico. O espectro de RMN de ¹³C e o subespectro de DEPT 135° (Figuras A54 e A55, p. 204) mostra sinal em δ_C 167,2 atribuído a carbono carboxílico (COOH). Sinais registrados em δ_C 161,6 e 121,4 são atribuídos a carbono

aromático não hidrogenado e sinais em δ_C 131,6 e 115,3 são atribuídos a átomos de carbono aromático hidrogenado. Os dados de RMN de ^{13}C de FAF-A9 estão de acordo com os dados descritos na literatura para o ácido *p*-hidroxibenzóico (Yayli *et al.*, 2003).



Ácido *p*-hidroxibenzóico: RMN de 1H (400 MHz; CD_3OD) δ_H 10,6 (COOH), 7,80 (H-2 e H-6), 6,84 (H-3 e H-5); ^{13}C NMR (CD_3OD): δ (ppm); 167,2 (COOH), 161,6 (C-4), 131,6 (C-2 e C-6), 121,4 (C-1), 115,3 (C-3 e C-5). Esse composto é descrito pela primeira vez em espécies do gênero *Justicia*.

3.8. Identificação dos compostos isolados de FAG

3.8.1. Análise Estrutural de FAG-DA10

A amostra FAG-DA10 foi isolada da fração em acetato de etila dos galhos de *J. acuminatissima* após fracionamento em coluna de sílica gel e recristalização com clorofórmio, obtendo-se um sólido incolor de p.f. = 289,0-294,8 °C. Apresentou teste de Liebermann-Burchard positivo para esteroides.

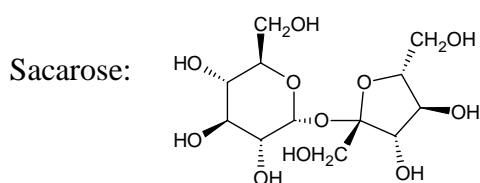
Uma mistura similar de compostos foi isolada anteriormente durante o fracionamento de FAF e codificada como FAF-DA8. A análise estrutural realizada para FAG-DA10 foi semelhante à de FAF-DA8 (p. 56). Os espectros de RMN de 1H (Figura A56), de ^{13}C (Figura A57) e subespectro DEPT 135° (Figura A58) de FAG-DA10 encontram-se nas p. 205, 206, e 207, respectivamente. Os dados de RMN de ^{13}C de FAG-DA10 estão de acordo com os correspondentes descritos na literatura para mistura de sitosterol-3-*O*-D-glicopiranosídeo e estigmasterol-3- β -*O*-D-glicopiranosídeo (Tabela 3.5, p. 62).

3.9. Identificação dos compostos isolados de FMF

3.9.1. Análise Estrutural AM20-M12

A amostra AM20-M12 foi isolada da fração em metanol das folhas de *J. acuminatissima* após fracionamento em coluna de sílica gel, obtendo-se um sólido incolor de p.f. = 186,0-188,2 °C.

O espectro de RMN de ^1H de AM20-M12 (Figura A59, p. 208) mostra sinais em δ_H 4,12 e 3,25 atribuídos a átomos de hidrogênio metínicos ligados a carbono hidroxilado. O sinal em δ_H 5,31 (*d*, $J = 4,0$ Hz) foi atribuído a hidrogênio ligado a carbono anomérico. O espectro de RMN de ^{13}C de AM20-M12 e o subspectro DEPT 135° (Figuras A60 e A61, p. 209 e 210, respectivamente) mostram 12 sinais. Os sinais registrados em δ_C 62,3, 61,4 e 60,1 são atribuídos a átomos de carbono ligado a oxigênio. O sinal em δ_C 103,7 (carbono quaternário) foi atribuído a carbono anomérico. Em comparação com os dados da literatura, foi verificado que o composto AM20-M12 corresponde ao dissacarídeo sacarose (Breitmaier & Voelter, 1989; Bubb, 2006).



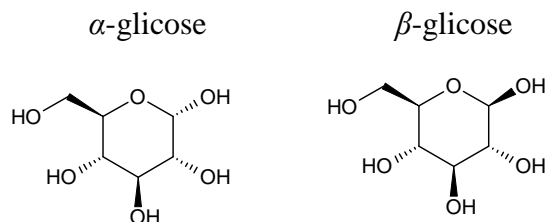
sólido p.f. 181-185 °C, RMN de ^{13}C (100 MHz; D_2O) δ_C 92,2 (C-1), 74,0 (C-3), 72,6 (C-2), 72,4 (C-5), 71,1 (C-4), 61,4 (C-6) [glicose], 103,7 (C-2'), 81,3 (C-5'), 76,4 (C-3'), 69,2 (C-4'), 62,3 (C-6') 60,1 (C-1') [frutose]. O isolamento deste composto é descrito pela primeira vez em espécies de *Justicia*.

3.9.2. Análise Estrutural de AM20-M14

A amostra AM20-M14 foi isolada da fração em metanol das folhas de *J. acuminatissima* após fracionamento em coluna de sílica gel, obtendo-se um sólido incolor de p.f. = 145,2-147,4 °C. O espectro de RMN de ^1H de AM20-M14 (Figura A62, p. 211) mostra sinais entre δ_H 3,85 e 3,05 atribuídos a átomos de hidrogênio metínico de carbono hidroxilado, sinal registrado em δ_H 5,08 (*d*, $J = 7,6$ Hz) atribuído a átomo de hidrogênio anomérico. O espectro de RMN de ^{13}C de AM20-M14 e o subspectro DEPT 135° (Figuras A63 e A64, p. 212 e 213, respectivamente) mostram 12 sinais. Os sinais registrados em δ_C 97,1 e 93,3 correspondem a átomos de carbono anomérico. Os sinais registrados em δ_C 61,9 e 61,8 foram atribuídos a

átomos de carbono metilênico oxigenado. A comparação com dados da literatura evidencia que o composto AM20-M14 corresponde à estrutura do monossacarídeo D-glicose (Breitmaier e Voelter, 1989; Bubb, 2006).

Mistura de α -D e β -D-glicose:



Sólido, p.f 147-151 °C, RMN de ^{13}C (100 MHz; D_2O) 97,1(C-1 β), 93,3 (C-1 α), 77,1 (C-4 α), 76,9 (C-4 β), 75,3 (C-5 β), 73,9 (C-2 β), 72,7 (C-3 β), 72,6 (C-3 α), 70,8 (C-2 α), 70,8 (C-5 α), 61,9 (C-6 α), 61,8(C-6 β). Esses compostos são descrito pela primeira vez em espécie de *Justicia*.

Tabela 3.2 Dados de RMN de ^{13}C de FHF-HD10, incluindo dados de RMN de ^{13}C de β -sitosterol e estigmasterol descritos na literatura (Brandão, 1991)

Átomo	FHF-HD10	β -Sitosterol	FHF-HD10	Estigmasterol
C-1	37,3	37,3	37,3	37,3
C-2	31,6	31,6	31,9	31,6
C-3	71,8	71,8	71,8	71,8
C-4	42,3	42,3	42,3	42,3
C-5	140,8	140,8	140,8	140,8
C-6	121,7	121,7	121,7	121,7
C-7	31,9	31,9	31,9	31,9
C-8	31,9	31,9	31,9	31,9
C-9	50,1	50,1	50,1	50,1
C-10	36,5	36,5	36,5	36,5
C-11	21,1	21,1	21,1	21,1
C-12	39,8	39,8	39,8	39,8
C-13	42,3	42,3	42,3	42,3
C-14	56,8	56,8	56,8	56,8
C-15	24,3	24,3	24,3	24,3
C-16	28,9	28,9	29,1	29,1
C-17	56,1	56,1	56,1	56,1
C-18	11,9	11,9	12,0	12,0
C-19	19,4	19,4	19,4	19,4
C-20	36,2	36,2	40,5	40,5
C-21	18,8	18,8	21,1	21,1
C-22	33,9	33,9	138,3	138,3
C-23	26,1	26,1	129,3	129,3
C-24	45,8	45,8	51,1	51,3
C-25	29,1	29,1	31,9	31,9
C-26	19,8	19,8	21,1	21,1
C-27	19,0	19,0	19,0	19,0
C-28	23,1	23,1	25,4	25,4
C-29	12,3	12,3	12,3	12,3

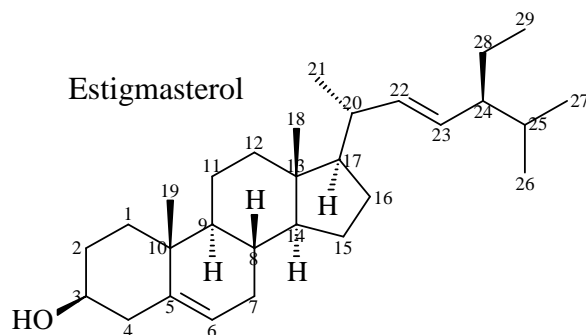
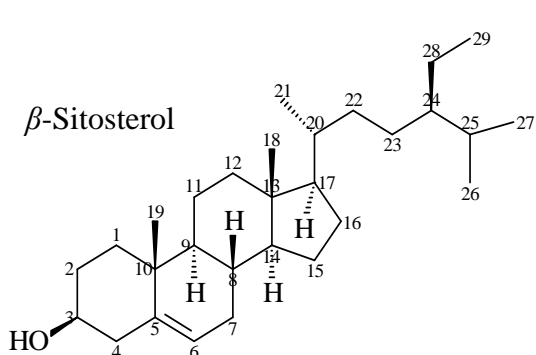


Tabela 3.3 Dados de RMN de ^{13}C de FHF-HD3, FHF-HD18 e FHF-HD25, incluindo dados de RMN de ^{13}C da friedelina, friedelinol e α -amirina descritos na literatura (Mahato & Kundu, 1994); Salazar *et al.*, 2000)

C	FHF-HD3	Friedelina	FHF-HD18	Friedelinol	FDF-HD25	α -Amirina	FDF-HD25	β -Amirina
C-1	22,6	22,3	15,9	16,1	38,7	38,7	38,7	38,7
C-2	41,7	41,5	36,1	36,1	27,2	27,2	27,3	27,3
C-3	213,5	213,2	72,4	71,6	79,1	78,3	79,0	79,0
C-4	58,6	58,2	49,4	49,6	38,7	38,7	38,8	38,8
C-5	42,5	42,1	30,0	30,0	55,2	55,2	55,3	55,3
C-6	41,9	41,3	41,8	41,9	18,3	18,3	18,4	18,5
C-7	18,6	18,2	16,5	17,6	32,9	32,9	32,9	32,8
C-8	56,5	56,1	53,2	52,3	40,0	40,0	38,8	38,8
C-9	37,8	37,4	37,1	37,2	47,7	47,7	47,7	47,7
C-10	59,9	59,4	61,5	61,6	36,9	36,9	37,2	37,6
C-11	36,0	35,6	35,6	35,6	23,3	23,3	23,4	23,6
C-12	30,9	30,5	30,7	30,7	124,4	124,3	121,8	121,8
C-13	40,1	39,7	38,4	38,4	139,6	139,3	145,1	145,1
C-14	38,7	38,3	39,3	39,6	42,1	42,0	41,6	41,8
C-15	32,4	32,4	31,8	32,4	28,7	28,7	26,7	26,2
C-16	36,4	36,0	35,4	35,8	26,6	26,6	27,0	27,0
C-17	30,4	30,0	30,0	30,0	33,7	33,7	32,5	32,5
C-18	43,2	43,8	42,9	42,8	59,0	58,9	47,4	47,4
C-19	35,4	35,3	35,4	35,4	39,6	39,6	46,9	46,9
C-20	28,5	28,1	28,2	28,1	39,6	39,6	39,6	31,1
C-21	32,8	32,7	32,8	32,7	31,2	31,2	34,3	34,8
C-22	39,6	39,2	38,4	38,2	41,5	41,5	37,2	37,2
C-23	7,2	6,8	11,8	11,6	28,1	28,1	28,2	28,2
C-24	15,0	14,6	15,9	16,3	15,6	15,6	15,6	15,5
C-25	18,6	17,9	17,6	18,2	15,6	15,6	15,6	15,6
C-26	20,6	20,2	20,1	20,1	16,9	16,8	16,8	16,9
C-27	19,0	18,6	18,3	18,6	23,3	23,3	26,0	26,0
C-28	32,1	32,1	31,8	32,0	28,1	28,1	28,2	28,4
C-29	35,7	35,0	35,0	35,0	17,4	17,4	33,5	33,3
C-30	31,6	31,8	31,9	31,7	21,4	21,3	23,4	23,7

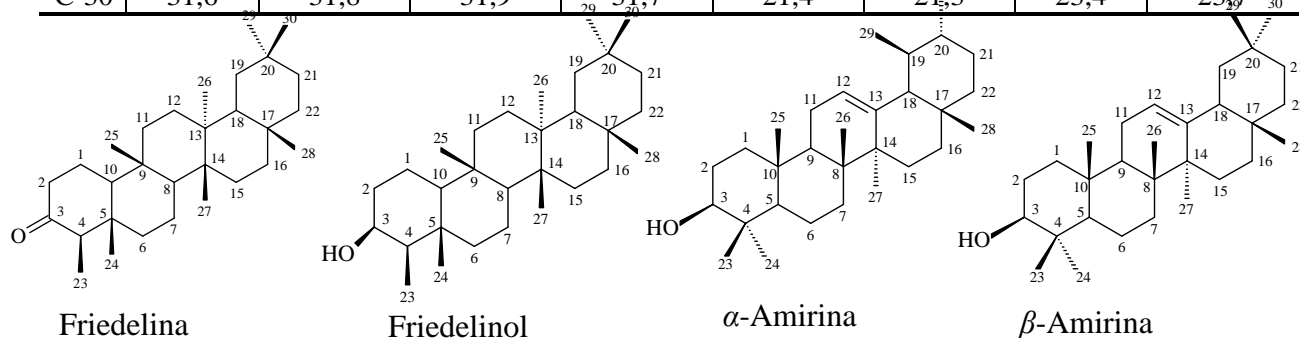


Tabela 3.4 Dados de RMN de ^{13}C de FHG-HD14, FDF-DA23 e FDF-DA30, incluindo dados de RMN de ^{13}C do lupeol, betulina, eritrodiool e ácido betulínico descritos na literatura (Kojima, 1990); (Mahato & Kundu, 1994)

C	FHG-HD14	Lupeol	FDF-DA23	Betulina	FDF-DA23	Eritrodiool	FDF-DA30	Ac. Betulínico
C-1	38,6	38,7	38,6	38,8	38,6	38,6	39,4	38,7
C-2	27,3	27,4	27,2	27,2	27,2	27,2	28,4	28,3
C-3	78,9	78,9	79,0	78,9	79,0	79,0	78,3	78,9
C-4	38,8	38,8	38,8	38,9	38,8	38,8	39,6	38,8
C-5	55,2	55,3	55,3	55,3	55,2	55,2	56,0	55,3
C-6	18,2	18,3	18,3	18,3	18,3	18,4	18,9	18,3
C-7	34,2	34,2	34,0	34,3	32,6	32,6	34,9	34,3
C-8	40,7	40,8	41,0	40,9	39,8	39,8	41,2	41,2
C-9	50,3	50,4	50,4	50,4	47,6	47,6	51,0	50,5
C-10	37,1	37,1	37,2	37,2	37,0	36,9	37,7	37,2
C-11	20,8	20,9	20,9	20,9	23,6	23,6	21,3	20,8
C-12	25,0	25,1	25,2	25,3	122,3	122,3	26,2	25,5
C-13	38,0	38,0	37,3	37,3	144,2	144,2	38,7	38,4
C-14	42,9	42,8	42,7	42,7	41,7	41,7	42,9	42,4
C-15	27,3	27,4	27,0	27,0	25,6	25,6	31,3	30,5
C-16	35,5	35,5	29,2	29,2	22,0	22,0	33,0	32,1
C-17	42,7	43,0	47,8	47,8	39,8	39,8	56,7	56,3
C-18	48,2	48,2	48,8	48,8	42,4	42,3	47,9	47,8
C-19	47,9	47,9	47,6	47,8	46,5	46,5	49,8	49,2
C-20	150,9	150,9	150,5	150,6	31,0	31,0	151,5	150,3
C-21	29,8	29,8	29,8	29,8	34,3	34,1	30,4	31,2
C-22	39,9	40,0	34,3	34,0	31,0	31,0	37,6	37,0
C-23	27,9	28,0	28,0	28,0	28,1	28,1	28,8	27,9
C-24	15,3	15,4	16,0	15,4	15,5	15,5	16,4	16,3
C-25	16,0	16,1	16,1	16,1	15,6	15,5	16,5	16,0
C-26	15,9	15,9	15,6	16,0	16,8	16,7	16,5	16,1
C-27	14,5	14,5	14,8	14,8	25,8	25,9	15,0	14,7
C-28	17,9	18,0	60,6	60,2	69,7	69,7	179,1	180,5
C-29	109,2	109,3	109,7	109,6	33,2	33,2	110,1	109,6
C-30	19,2	19,3	19,1	19,1	23,5	23,6	19,6	19,4

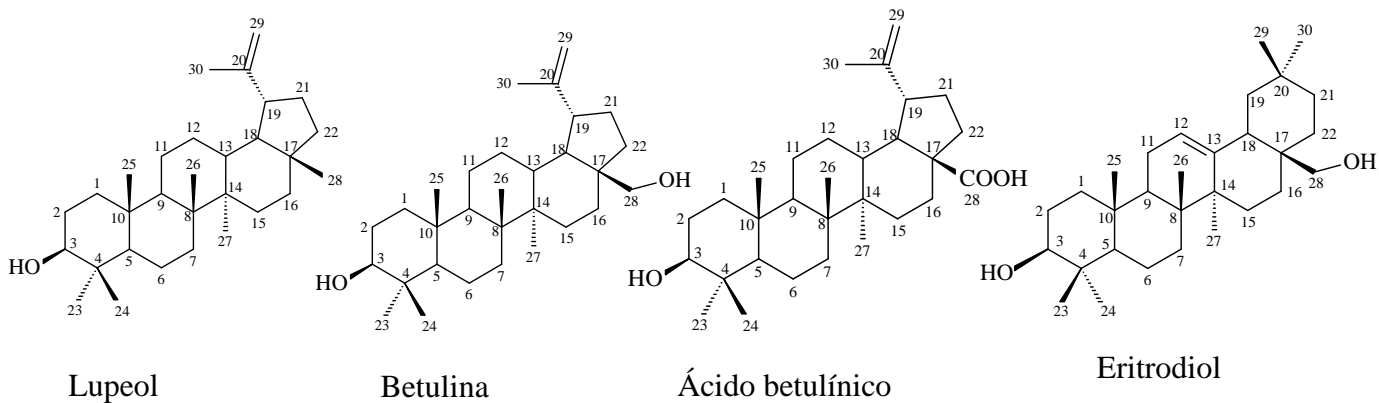


Tabela 3.5 Dados de RMN de ^{13}C de FAF-DA8 incluindo dados de RMN de ^{13}C de sitosterol-3-*O*-D-glicopiranosídeo e estigmasterol-3- β -*O*-D-glicopiranosídeo (Kojima *et al.*, 1990)

Átomo	FAF-DA8	Sitosterol-3- <i>O</i> -D-glicopiranosídeo	FAF-DA8	Estigmasterol -3- <i>O</i> -D-glicopiranosídeo
C-1	37,6	37,6	37,6	37,6
C-2	30,3	30,3	30,3	30,3
C-3	78,2	78,2	78,2	78,2
C-4	39,4	39,4	39,4	39,4
C-5	141,0	141,0	141,0	141,0
C-6	122,0	122,0	122,0	122,0
C-7	32,2	32,2	32,2	32,2
C-8	32,1	32,1	32,1	32,1
C-9	50,4	50,4	50,4	50,4
C-10	37,0	37,0	37,0	37,0
C-11	21,3	21,4	21,3	21,5
C-12	40,0	40,0	39,9	39,9
C-13	42,4	42,4	42,4	42,4
C-14	57,0	56,9	57,0	57,0
C-15	24,6	24,6	24,6	24,7
C-16	28,6	28,6	29,4	29,4
C-17	56,3	56,3	56,2	56,2
C-18	12,0	12,0	12,2	12,0
C-19	19,3	19,3	19,3	19,3
C-20	36,5	36,5	36,5	36,5
C-21	19,1	19,1	21,5	21,5
C-22	34,3	34,3	138,9	138,9
C-23	26,5	26,5	129,5	129,5
C-24	46,1	46,1	51,5	51,5
C-25	29,6	29,6	32,2	32,7
C-26	19,5	19,5	21,5	21,4
C-27	20,0	20,0	20,0	20,0
C-28	23,5	23,5	25,8	25,7
C-29	12,2	12,2	12,6	12,6
C-1'	102,6	102,6	102,6	102,6
C-2'	75,4	75,4	75,4	75,4
C-3'	78,6	78,6	78,6	78,6
C-4'	71,7	71,7	71,7	71,7
C-5'	78,5	78,5	78,5	78,5
C-6'	62,9	62,9	62,9	62,9

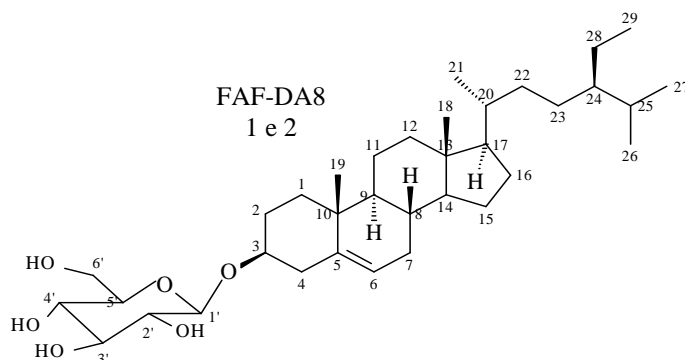
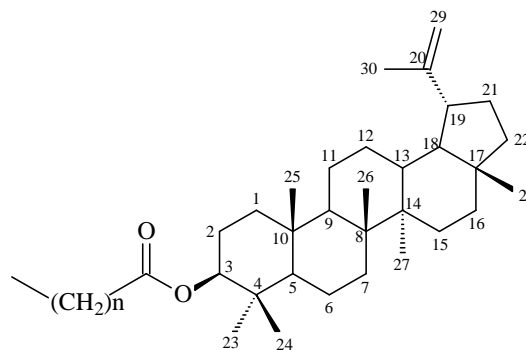


Tabela 3.6 Dados de RMN de ^{13}C de FDG-DA15 incluindo dados de RMN de ^{13}C de Acil-lupeol (Barros, 2008)

C	FDG-HD15	Acil lupeol
C-1	38,5	38,4
C-2	23,7	23,7
C-3	80,3	80,6
C-4	37,8	37,8
C-5	55,6	55,4
C-6	18,3	18,2
C-7	34,1	34,2
C-8	40,7	40,8
C-9	49,6	50,3
C-10	37,5	37,1
C-11	20,8	20,9
C-12	25,3	25,1
C-13	38,5	38,0
C-14	42,1	42,8
C-15	27,5	27,4
C-16	35,8	35,6
C-17	43,5	43,0
C-18	48,5	48,3
C-19	48,2	48,0
C-20	152,3	150,9
C-21	30,1	29,8
C-22	40,1	40,0
C-23	27,5	27,9
C-24	16,8	16,9
C-25	16,2	16,2
C-26	15,9	15,9
C-27	14,5	14,5
C-28	18,0	18,0
C-29	110,6	109,3
C-30	19,2	19,3
COO	174,9	173,7
(CH ₂) _n	29,6	29,2
CH ₃	14,4	14,2



Lupeol-acilado

3.10. Identificação dos compostos isolados de FAqF

3.10.1 Análise Estrutural de FF4

A amostra FF4 foi isolada após decocção em água das folhas de *J. acuminatissima*, conforme indicado no esquema 2.14 (p. 41) e posterior fracionamento por CLAE (TR = 15 min).

A Figura A65 (p. 214) mostra o espectro na região do IV de FF4. A banda de absorção em 3262 cm^{-1} é característica de estiramento de O-H. As absorções registradas em 1185, 1133, 1079 e 1021 cm^{-1} são características de estiramento de C-O. A absorção em 1651 cm^{-1} é característica de estiramento de carbonila conjugada.

O Composto FF4 foi obtido por CLAE (TR = 15,00 min). A análise do espectro de massas de FF4 obtido por LC-MS (Figura A66, p. 215) mostra que o composto possui fórmula molecular contendo 20 átomos de carbono, 18 átomos de hidrogênio e 10 átomos de oxigênio.

O espectro de RMN de ^1H (Figura A67, p. 216) mostra sinais registrados em δ_{H} 7,48 (*m*), 7,45 (*m*) e 6,91(*d*) atribuídos a átomos de hidrogênio (H-6'), (H-2') e (H-5'), respectivamente de anel B flavanoídico. O sinal de hidrogênio em δ_{H} 6,75 foi atribuído ao hidrogênio (H-3) do anel C de flavonoide. Os sinais de hidrogênio registrados em δ_{H} 6,80 (*d*) e 6,43 (*d*) foram atribuídos a átomos de hidrogênio (H-8) e (H-6), respectivamente do anel A. Os sinais em δ_{H} 5,0 (*d*) a 2,5 são característicos de resíduo de glicosídeo (Orhan *et al.*, 2012).

O espectro de RMN de ^{13}C e o subespectro DEPT 135° (Figuras A68 e A69, p. 217 e 218, respectivamente) mostram um sinal em δ_{C} 181,9 (C-4) atribuído a carbono carbonílico. Seis sinais registrados em δ_{C} 164,5 (C-2), 162,7 (C-7), 161,1 (C-5), 157,0 (C-9), 149,9 (C-4') e 145,8 (C-3') foram atribuídos a átomos de carbono aromático oxigenado. Os sinais registrados em δ_{C} 121,4 (C-1') e 105,4 (C-10) foram atribuídos a átomos de carbono aromático não-hidrogenado.

O mapa de contornos de HSQC (Figura A70, p. 219) mostra correlação dos sinais de hidrogênio em δ_{H} 7,48 (H-6'), 7,45 (H-2'), 6,91 (H-5'), 6,75 (H-3), 6,80 (H-8) e 6,43 (H-6) com os sinais registrados em δ_{C} 119,2 (C-6'), 113,6 (C-2'), 116,0 (C-5'), 103,1 (C-3), 94,6 (C-8) e 99,5 (C-6), respectivamente. O sinal de hidrogênio em δ_{H} 5,08 (H-1'') correlaciona-se com o sinal registrado em δ_{C} 100,3 (C-1''), sendo atribuído ao sinal do hidrogênio e carbono anomérico respectivamente de resíduo glicosídico.

Os sinais de hidrogênio em δ_{H} 3,28 (H-4''), 3,18 (H-3''), 3,16 (H-2'') exibem correlação com os sinais registrados em δ_{C} 69,2 (C-4''), 76,2 (C-3'') e 72,9 (C-2''),

respectivamente e foram atribuídos a átomos de carbono mono-hidrogenado do resíduo glicosídico. E, finalmente, os sinais registrados em δ_H 3,78 (H-5'') e 3,29 (H-5'') exibem correlação com o sinal registrado em δ_C 65,8 (C-5'') atribuído ao carbono metilênico do resíduo glicosídico.

O mapa de contornos HMBC (Figuras A71 e A72, p. 220 e 221, respectivamente) mostra correlações do sinal de hidrogênio em δ_H 7,48 (H-6') com os sinais de carbono em δ_C 164,5 (C-2), 149,9 (C-4') e 113,6 (C-2'). O sinal de hidrogênio em δ_H 7,45 (H-2') correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 164,5 (C-2), 149,9 (C-4'), 145,8 (C-3') e 119,2 (C-6'). O sinal de hidrogênio em δ_H 6,91 (H-5') correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 119,2 (C-6'), 145,8 (C-3') e 121,4 (C-1'). Estas correlações HMBC dos sinais em δ_H 7,48 (H-6'), 7,45 (H-2') e δ_H 6,91 (H-5') correspondem a um anel aromático contendo grupos hidroxila em posições *meta* e *para* ao substituinte em C-1'. O sinal de hidrogênio em δ_H 6,75 (H-3) mostra correlações HMBC com sinais de carbono em δ_C 181,9 (C-4), 164,5 (C-2), 121,4 (C-1') e 105,4 (C-10). O sinal de hidrogênio em δ_H 6,80 (H-8) mostra correlações HMBC com sinais de carbono em δ_C 162,7 (C-7), 157,0 (C-9), 105,4 (C-10) e 99,5 (C-6). O sinal de hidrogênio em δ_H 6,43 (H-6) mostra correlações HMBC com sinais de carbono em δ_C 162,7 (C-7), 161,1 (C-5), 105,4 (C-10) e 94,6 (C-8).

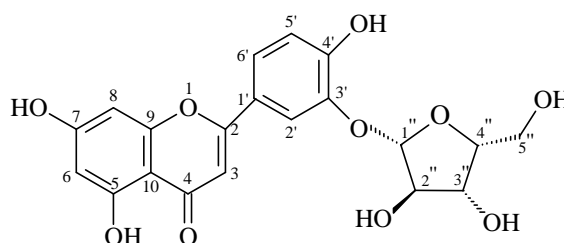
O mapa de contornos COSY (Figura A73, p. 222) mostra uma forte correlação entre os sinais de hidrogênio em δ_H 7,48 (H-6') e 6,91 (H-5'), com a constante de acoplamento ($J = 8,4$ Hz) característica de átomos de hidrogênio vicinais em um anel aromático.

Uma correlação fraca entre os sinais de hidrogênio em δ_H 6,80 (H-8) e 6,43 (H-6) ($J = 2,0$ Hz) é característica de átomos de hidrogênio em posição *meta* em anel aromático. O mapa de contornos COSY mostra também correlações entre os sinais de hidrogênio em δ_H 5,08 (H-1'') e 3,16 (H-2'') ($J = 8,0$ Hz), que é característico de átomos de hidrogênio nas posições anti-periplanar no anel glicosídico. As análises de RMN de FF4 estão de acordo com os dados correspondentes de um derivado da luteolina (Orhan *et al.*, 2012)

O resíduo glicosídico contém quatro átomos de carbono metínicos e um carbono metilênico, característico de um anel de cinco membros. As análises de RMN do resíduo glicosídico de FF4 estão em concordância com os dados correspondentes do resíduo de xilofuranose (Rinaldo *et al.*, 2007; Jung *et al.*, 2012; Veitch *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2000; Koleckar *et al.*, 2010 e Tian *et al.*, 2010). No entanto, análises de RMN 2D não determinam a posição do resíduo glicosídico no esqueleto da luteolina, isto é, não permitem deduzir se este se encontra na posição 5-, 7-, 4' ou 3'.

Cálculos BLYP/6-31G * de otimização da geometria foram realizados para FF4 com uma geometria de partida com base em diferentes estruturas de luteolina-*O*- β -xilofuranose: luteolina-5-*O*- β -xilofuranose (FF4a), luteolina-7-*O*- β -xilofuranose (FF4b), luteolina-3'-*O*- β -xilofuranose (FF4c) e luteolina-4'-*O*- β -xilofuranose (FF4d). A estrutura FF4c ($E = -1524,71304556$ Hartree) é a mais estável quando comparada com FF4a, FF4b e FF4d ($\Delta E = 10,2, 4,3$ e $4,0$ kcal/mol, respectivamente). Além disso, cálculos de deslocamento químico de carbono foram realizados para as geometrias otimizadas de FF4a a FF4d em mesmo nível de cálculo. Correlações de dados experimentais de RMN de ^{13}C de FF4 com deslocamentos químicos de ^{13}C calculados de FF4c ($R^2 = 0,9645$) mostram maior coeficiente de correlação do que FF4a, FF4b e FF4d ($R^2 = 0,9582, 0,8328$ e $0,9538$, respectivamente). Como resultado, as análises experimentais e teóricas de FF4 permitem propor a luteolina-3'-*O*- β -xilofuranose. Um flavonóide glicosilado ainda não descrito na literatura.

Luteolina-3'-*O*- β -xilofuranose (**FF4**):



CLAE TR = 15,0 min (15,0 mg); sólido amorfo amarelo; p.f. 242–245 °C; IV (ATR; cm^{-1}) ν 3262, 1651, 1606, 1185, 1133, 1079 e 1021; RMN de ^1H (400 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) δ_{H} 13,01 (C-5-OH), 7,48-7,45 (2H; multipeto largo; H-2' e H-6'), 6,91 (1H; d, $J = 8,4$ Hz; H-5'), 6,80 (1H; d, $J = 2,0$ Hz; H-8), 6,75 (1H; s; H-3), 6,43 (1H; d, $J = 2,0$ Hz; H-6), 5,08 (1H; d, $J = 8,0$ Hz; H-1'') e sobreposição de sinais em δ_{H} 3,85 a 2,50 característico de resíduo de glicosídeo; RMN de ^{13}C (100 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) δ_{C} 181,9 (C-4), 164,5 (C-2), 162,7 (C-7), 161,1 (C-5), 157,0 (C-9), 149,9 (C-4'), 145,8 (C-3'), 121,4 (C-1'), 119,2 (C-6'), 116,0 (C-5'), 113,6 (C-2'), 105,4 (C-10), 103,1 (C-3), 100,3 (C-1''), 99,5 (C-6), 94,6 (C-8), 76,2 (C-3''), 72,9 (C-2''), 69,2 (C-4'') e 65,8 (C-5''); HRESIMS $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 419,0639, correspondente a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$.

Tabela 3.7 Dados de RMN de ^{13}C de FF4, incluindo dados de RMN de ^{13}C da luteolina e xilofuranose descritos na literatura (Orhan *et al.*, 2012; Rinaldo *et al.*, 2007)

C	Luteolina ^{13}C	FF4	Xilofuranose ^{13}C	FF4
2	164,5	164,5	103.1 (C-1'')	100,3
3	103,3	103,1	73.3 (C-2'')	72,9
4	182,2	181,9	76.1 (C-3'')	76,2
5	157,5-161,0	161,1	69.6 (C-4'')	69,2
6	99,2	99,5	66.0 (C-5'')	65,8
7	164,7	162,7		
8	94,2	94,6		
9	156,2-161,4	157,0		
10	104,2	105,4		
1'	119,3	121,4		
2'	113,8	113,6		
3'	146,2	145,8		
4'	150,1	149,9		
5'	116,4	116,0		
6'	122,1	119,2		

3.10.2 Análise Estrutural de FF3

A amostra FF3 foi isolada após decocção em água das folhas de *J. acuminatissima*, conforme indicado no esquema 2.14 (p. 41) e posterior fracionamento por CLAE (TR = 10,5 min).

A Figura A74 (p. 223) mostra o espectro de absorção na região do IV de FF3. A banda de absorção em 3372 cm^{-1} é característica de estiramento de O-H. A banda de absorção registrada em 1684 cm^{-1} é característica de estiramento de carbono carbonílico conjugado. As bandas de absorções registradas em 1246 , 1152 e 1119 cm^{-1} são características de estiramento de C-O.

O composto FF3 foi obtido por CLAE TR = 10,50 min. A análise do espectro de massas de FF3 obtido por LC-MS (Figura A75, p. 224) mostra que o composto possui fórmula molecular contendo 21 átomos de carbono, 20 átomos de hidrogênio e 11 átomos de oxigênio.

O espectro de RMN de ^1H (Figura A76, p. 225) mostra sinais registrados em δ_{H} 12,98 (C-5-OH), 10,06 e 9,47 atribuídos a átomos de hidrogênio fenólico. Os sinais registrados em δ_{H} 7,45, 7,44 e 6,80 são atribuídos a átomos de hidrogênio (H-6'), (H-2') e (H-5'), respectivamente de anel B flavanoídico. O sinal de hidrogênio em δ_{H} 6,69 foi atribuído ao hidrogênio (H-3) do anel C de flavonoide. Os sinais de hidrogênio registrados em δ_{H} 6,74 e 6,45 são atribuídos a átomos de hidrogênio (H-8) e (H-6), respectivamente do anel A. Os sinais entre δ_{H} 5,40 a 2,68 são característicos de resíduo de glicosídeo, sendo o sinal registrado em δ_{H} 5,08 (*d*, $J = 8,0$ Hz) atribuído ao hidrogênio anomérico do resíduo glicosídico (Orhan *et al.*, 2012). Os dados de deslocamento químico dos átomos de carbono mostram semelhança com os dados da estrutura de luteolina-3'-*O*- β -xilofuranose observados por análise de RMN 2D (p. 64)

O mapa de contornos de HSQC (Figuras A77 e A78, p. 226 e 227, respectivamente) mostra correlação dos sinais de hidrogênio em δ_{H} 7,45 (H-6'), 7,44 (H-2'), 6,80 (H-5'), 6,74 (H-8), 6,69 (H-3) e 6,45 (H-6) com os sinais registrados em δ_{C} 119,2 (C-6'), 113,0 (C-2'), 116,0 (C-5'), 94,2 (C-8), 103,0 (C-3) e 99,7 (C-6), respectivamente. O sinal de hidrogênio em δ_{H} 5,08 (H-1'') correlaciona-se com o sinal registrado em δ_{C} 99,0 (C-1''), sendo atribuído a carbono anomérico de resíduo glicosídico.

O mapa de contornos HMBC (Figuras A79 e A80, p. 228 e 229, respectivamente) mostra correlações do sinal de hidrogênio em δ_{H} 7,45 (H-6') com os sinais de carbono em δ_{C} 164,0 (C-2), 151,0 (C-4') e 113,0 (C-2'). O sinal de hidrogênio em δ_{H} 7,44 (H-2') correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_{C} 164,0 (C-2), 151,0 (C-4'), 146,0 (C-3') e 119,2 (C-6').

O sinal de hidrogênio em δ_{H} 6,80 (H-5') correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_{C} 119,2 (C-6'), 146,0 (C-3') e 121,6 (C-1'). As correlações HMBC dos sinais em δ_{H} 7,45 (H-6'), 7,44 (H-2') e δ_{H} 6,80 (H-5') correspondem a um anel aromático contendo grupos hidroxila em posições *meta* e *para* ao substituinte C-1'. O sinal de hidrogênio em δ_{H} 6,69 (H-3) mostra correlações HMBC com sinais de carbono em δ_{C} 182,4 (C-4), 164,0 (C-2), 121,6 (C-1') e 106,4 (C-10). O sinal de hidrogênio em δ_{H} 6,74 (H-8) mostra correlações HMBC com sinais de carbono em δ_{C} 165,1 (C-7), 157,0 (C-9), 106,4 (C-10) e 99,7 (C-6). O sinal de hidrogênio

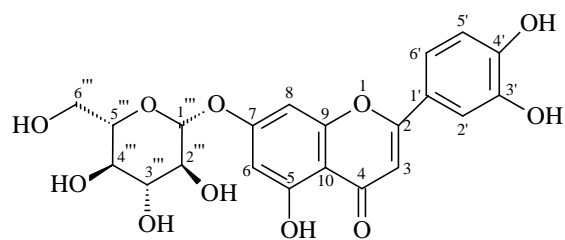
em δ_H 6,45 (H-6) mostra correlações HMBC com sinais de carbono em δ_C 165,1 (C-7), 162,1 (C-5), 106,4 (C-10) e 94,2 (C-8). O sinal em 5,08 com o sinal em 165,1 (C-7), mostrando que o açúcar encontra-se substituído no carbono C-7 do anel A do flavonoide.

O mapa de contornos COSY (Figura A81, p. 230) mostra uma forte correlação entre os sinais de hidrogênio em δ_H 7,45 (H-6') e 6,80 (H-5'), com a constante de acoplamento ($J = 8,0$ Hz) característica de átomos de hidrogênio vicinais em um anel aromático. Uma correlação fraca entre os sinais de hidrogênio em δ_H 6,74 (H-8) e 6,45 (H-6) ($J = 2,0$ Hz) é característica de átomos de hidrogênio em posição *meta* em anel aromático.

As análises de RMN de FF3 correspondem a um derivado de luteolina glicosilada. O resíduo glicosídico contém um carbono metínico di-oxigenado, quatro átomos de carbono metínico mono-oxigenado e um átomo de carbono metilênico oxigenado, sendo característico de um anel de seis membros, atribuído à glicose. O espectro de RMN de 1H (Figura A76, p. 225) e análise de RMN de ^{13}C de FF3 estão em concordância com os dados apresentados na literatura para a luteolina-*O*-glicosídeo (Orhan *et al.*, 2012 e Jiang *et al.*, 2010).

Cálculos BLYP/6-31G * de otimização da geometria foram realizados para FF3 com uma geometria de partida com base em diferentes estruturas de luteolina-*O*-glicosídeo: luteolina-5-*O*-glicosídeo (FF3a), luteolina-7-*O*-glicosídeo (FF3b), luteolina-3'-*O*-glicosídeo (FF3c) e luteolina-4'-*O*-glicosídeo (FF3d). A estrutura FF3b ($E = -16939,20974987$ Hartree) é a mais estável quando comparada com FF3a, FF4c e FF4d ($\Delta E = 0,8, 2,9$ e $8,7$ kcal/mol, respectivamente). Além disso, cálculos de deslocamento químico de ^{13}C foram realizados para as geometrias otimizadas de FF3a a FF3d em mesmo nível de cálculo. Correlações de dados experimentais de RMN de ^{13}C de FF3 com deslocamentos químicos de ^{13}C calculados de FF3b ($R^2 = 0,9860$) mostram maior coeficiente de correlação do que FF3a, FF3c e FF3d ($R^2 = 0,9733, 0,9836$ e $0,9766$, respectivamente). Como resultado, as análises experimentais e teóricas de FF3 permitem propor a luteolina-7-*O*- β -glicosídeo (3b), um flavonoide glicosilado ainda não descrito em espécies de *Justicia*.

Luteolina-7-*O*- β -glicosídeo (**FF3**):



CLAE TR = 10,50 min (7,0 mg); sólido amorfo amarelo; p.f. 260–263 °C; IV (ATR; cm^{-1}) ν 3372, 2955, 2924, 2853, 1739, 1716, 1684, 1604, 1516, 1455, 1152, 1119, 743; RMN de ^1H (400 MHz; DMSO-d_6) δ_{H} 12,98 (C-5-OH), 10,06 (fenólico OH), 9,47 (fenólico OH), 7,45 (1H; dd, $J = 8,0$ and $2,0$ Hz; H-6'), 7,44 (1H; d, $J = 2,0$ Hz; H-2'), 6,87 (1H; d, $J = 8,0$ Hz; H-5'), 6,74 (1H; d, $J = 2,0$ Hz; H-8), 6,69 (1H; s; H-3), 6,45 (1H; d, $J = 2,0$ Hz; H-6), 5,08 (1H; d, $J = 8,0$ Hz; H-1''), 3,70 (1H; d, $J = 10,8$ Hz; H-6''a) e sobreposição de sinais entre δ_{H} 5,40 a 2,68 característico de resíduo de glicose; RMN de ^{13}C (100 MHz; DMSO-d_6) δ_{C} 182,4 (C-4), 165,1 (C-7), 164,0 (C-2), 162,1 (C-5), 157,0 (C-9), 151,0 (C-4'), 146,0 (C-3'), 121,6 (C-1'), 119,2 (C-6'), 116,0 (C-5'), 113,0 (C-2'), 106,4 (C-10), 103,0 (C-3), 99,7 (C-6), 99,0 (C-1''), 94,2 (C-8), 76,6 (C-3''), 75,8 (C-5''), 72,5 (C-2''), 69,1 (C-4'') e 60,1 (C-6''); HRESIMS $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 449,1199, correspondente a fórmula molecular de $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$.

Tabela 3.8 Dados de RMN de ^{13}C de FF3, incluindo dados de RMN de ^{13}C da luteolina-7-*O*- β -glicosídeo descritos na literatura (Jiang *et al.*, 2010)

C	Luteolina ^{13}C	FF3	7- <i>O</i> - β -glicosídeo ^{13}C	FF3
2	165.1	164,0	100.5 C-1'	99,0
3	103.8	103,0	73.8 C-2'	72,5
4	182.6	182,4	77.0 C-3'	76,6
5	161.8	162,1	70.2 C-4'	69,1
6	100.2	99,7	77.8 C-5'	75,8
7	163.6	165,1	61.3 C-6'	60,1
8	95.4	94,2		
9	157.6	157,0		
10	106.0	106,4		
1'	122.0	121,6		
2'	114.2	113,0		
3'	146.5	146,0		
4'	150.6	151,0		
5'	116.7	116,0		
6'	119.9	119,2		

3.10.3 Análise Estrutural de FF1 e FF2

As amostras FF1 e FF2 foram isoladas após decocção em água das folhas de *J. acuminatissima*, conforme indicado no esquema 2.14 (p. 41) e posterior fracionamento por CLAE (TR = 5,0-5,5 e 5,7 min, respectivamente).

Os compostos FF1 e FF2 foram obtidos por CLAE TR = 5,0-5,5 e 5,7 min, respectivamente. Os espectros de massas de FF1 e FF2 obtidos por LC-MS (Figuras A83 e A92, p. 232 e 241, respectivamente) mostram que os compostos possuem fórmulas

moleculares semelhantes contendo 27 átomos de carbono, 30 átomos de hidrogênio e 15 átomos de oxigênio.

FF1

A Figura A82 (p. 231) mostra o espectro de absorção na região do IV de FF1. A banda de absorção larga em 3386 cm^{-1} é característica de estiramento de O-H. As bandas de absorções em 1721 e 1674 cm^{-1} são características de estiramento de carbonila. As bandas de absorções em 1182 , 1135 , 1053 e 1021 cm^{-1} são características de estiramento de C-O.

O espectro de RMN de ^1H (Figura A84, p. 233) mostra sinal largo registrados em δ_{H} 7,40 atribuído a (H-2' e H-6'). Sinal em δ_{H} 6,92 atribuído a (H-5') de anel B flavanoídico. O sinal de hidrogênio em δ_{H} 6,59 atribuído ao hidrogênio (H-3) do anel C de flavonoide. Os sinais de hidrogênio registrados em δ_{H} 6,73 e 6,51 atribuídos a átomos de hidrogênio (H-8) e (H-6), respectivamente do anel A. Sinais na região de δ_{H} 5,00 e 3,00 são característicos de resíduo de glicosídeo (Orhan *et al.*, 2012).

O espectro de RMN de ^{13}C e o subespectro DEPT 135° (Figuras A85 e A86, p. 234 e 235, respectivamente) mostram um sinal em δ_{C} 184,1 (C-4) atribuído a um carbono carbonílico. Seis sinais registrados em δ_{C} 167,1 (C-2), 164,9 (C-7), 163,1 (C-5), 159,0 (C-9), 151,3 (C-4') e 147,1 (C-3') foram atribuídos a átomos de carbono aromático oxigenado. Os sinais registrados em δ_{C} 123,7 (C-1') e 107,2 (C-10) foram atribuídos a átomos de carbono aromático não-hidrogenado.

O mapa de contornos de HSQC (Figura A87, p. 236) mostra correlação dos sinais de hidrogênio em δ_{H} 7,40 (H-6'), 7,40 (H-2'), 6,92 (H-5'), 6,59 (H-3), 6,73 (H-8) e 6,51 (H-6) com os sinais registrados em δ_{C} 120,8 (C-6'), 114,4 (C-2'), 117,0 (C-5'), 104,4 (C-3), 96,3 (C-8) e 101,3 (C-6), respectivamente. O sinal de hidrogênio em δ_{H} 5,08 (H-1'') correlaciona-se com o sinal registrado em δ_{C} 101,7 (C-1''), sendo atribuído a carbono anomérico de resíduo glicosídico.

O mapa de contornos COSY (Figura A90, p. 239) mostra uma forte correlação entre os sinais de hidrogênio em δ_{H} 7,40 (H-6') e 6,92 (H-5'), com a constante de acoplamento ($J = 8,0\text{ Hz}$) característica de átomos de hidrogênio vicinais em um anel aromático.

Uma correlação fraca entre os sinais de hidrogênio em δ_{H} 6,73 (H-8) e 6,51 (H-6) ($J = 2,0\text{ Hz}$) é característica de átomos de hidrogênio em posição *meta* em anel aromático.

O mapa de contornos HMBC (Figuras A88 e A89, p. 237 e 238, respectivamente) mostra correlações do sinal de hidrogênio em δ_{H} 7,40 (H-6') com os sinais de carbono em δ_{C} 167,1 (C-2), 151,3 (C-4') e 114,4 (C-2'). O sinal de hidrogênio em δ_{H} 7,40 (H-2') correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_{C} 167,1 (C-2), 151,3 (C-4'), 147,1 (C-3') e

120,8 (C-6'). O sinal de hidrogênio em δ_H 6,91 (H-5') correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 120,8 (C-6'), 147,1 (C-3') e 123,7 (C-1'). Estas correlações HMBC dos sinais em δ_H 7,40 (H-6' e H-2') e δ_H 6,92 (H-5') correspondem a um anel aromático contendo grupos hidroxila em posições *meta* e *para* ao substituinte do C-1'. O sinal de hidrogênio em δ_H 6,59 (H-3) mostra correlações HMBC com sinais de carbono em δ_C 184,1 (C-4), 167,1 (C-2), 123,7 (C-1') e 107,2 (C-10). O sinal de hidrogênio em δ_H 6,73 (H-8) mostra correlações HMBC com sinais de carbono em δ_C 164,9 (C-7), 159,0 (C-9), 107,2 (C-10) e 101,3 (C-6). O sinal de hidrogênio em δ_H 6,51 (H-6) mostra correlações HMBC com sinais de carbono em δ_C 164,9 (C-7), 163,1 (C-5), 107,2 (C-10) e 96,3 (C-8).

FF2

A Figura A91 (p. 240) mostra o espectro de absorção na região do IV de FF2. A banda de absorção em 3240 cm^{-1} é característica de estiramento de O-H. A banda de absorção registrada em 1645 cm^{-1} é característica de estiramento de carbonila conjugada. As bandas de absorções em 1182 , 1137 , 1114 , 1079 e 1019 cm^{-1} são características de estiramento de C-O.

O espectro de RMN de ^1H (Figura A93, p. 242) mostra sinal em δ_H 12,97 atribuído a hidrogênio fenólico (C-5-OH). Sinais registrados em δ_H 7,46, 7,42 e 6,92 são atribuídos a átomos de hidrogênio (H-6'), (H-2') e (H-5'), respectivamente de anel B flavanoídico. O sinal de hidrogênio em δ_H 6,66 é atribuído ao hidrogênio (H-3) do anel C de flavonoide. Os sinais de hidrogênio registrados em δ_H 6,78 e 6,49 atribuídos a átomos de hidrogênio (H-8) e (H-6), respectivamente do anel A. Os sinais em δ_H 5,00 e 3,00 são característicos de resíduo de glicosídeo (Orhan *et al.*, 2012).

O espectro de RMN de ^{13}C e o subespectro DEPT 135° (Figuras A94 e A95, p. 243 e 244, respectivamente) mostram um sinal em δ_C 181,9 (C-4) atribuído a um carbono carbonílico. Seis sinais registrados em δ_C 164,6 (C-2), 162,9 (C-7), 161,2 (C-5), 156,9 (C-9), 149,9 (C-4') e 145,7 (C-3') foram atribuídos a átomos de carbono aromático oxigenado. Os sinais registrados em δ_C 121,4 (C-1') e 105,5 (C-10) foram atribuídos a átomos de carbono aromático não-hidrogenado.

O mapa de contornos de HSQC (Figuras A96 e A97, p. 245 e 246, respectivamente) mostra correlação dos sinais de hidrogênio em δ_H 7,46 (H-6'), 7,42 (H-2'), 6,92 (H-5'), 6,66 (H-3), 6,78 (H-8) e 6,49 (H-6) com os sinais registrados em δ_C 119,2 (C-6'), 113,5 (C-2'), 116,1 (C-5'), 103,2 (C-3), 94,8 (C-8) e 99,5 (C-6), respectivamente. O sinal de hidrogênio em δ_H 5,07 (H-1'') correlaciona-se com o sinal registrado em δ_C 99,9 (C-1''), sendo atribuído a carbono anomérico da glicose.

O mapa de contornos COSY (Figura A100, p. 249) mostra uma forte correlação entre os sinais de hidrogênio em δ_H 7,46 (H-6') e 6,92 (H-5'), com a constante de acoplamento ($J = 8,0$ Hz) característica de átomos de hidrogênio vicinais em um anel aromático.

Uma correlação fraca entre os sinais de hidrogênio em δ_H 6,78 (H-8) e 6,49 (H-6) ($J = 2,0$ Hz) é característica de átomos de hidrogênio em posição *meta* em anel aromático.

O mapa de contornos HMBC (Figuras A98 e A99, p. 247 e 248, respectivamente) mostra correlações do sinal de hidrogênio em δ_H 7,46 (H-6') com os sinais de carbono em δ_C 164,6 (C-2), 149,9 (C-4') e 113,5 (C-2'). O sinal de hidrogênio em δ_H 7,42 (H-2') correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 164,6 (C-2), 149,9 (C-4'), 145,7 (C-3') e 119,2 (C-6'). O sinal de hidrogênio em δ_H 6,92 (H-5') correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 119,2 (C-6'), 145,7 (C-3') e 121,4 (C-1'). Estas correlações HMBC dos sinais em δ_H 7,46 (H-6'), 7,42 (H-2') e δ_H 6,92 (H-5') correspondem a um anel aromático contendo grupos hidroxila em posições *meta* e *para* ao substituinte do carbono C-1'. O sinal de hidrogênio em δ_H 6,66 (H-3) mostra correlações HMBC com sinais de carbono em δ_C 181,9 (C-4), 164,6 (C-2), 121,4 (C-1') e 105,5 (C-10). O sinal de hidrogênio em δ_H 6,78 (H-8) mostra correlações HMBC com sinais de carbono em δ_C 162,9 (C-7), 156,9 (C-9), 105,5 (C-10) e 99,5 (C-6). O sinal de hidrogênio em δ_H 6,49 (H-6) mostra correlações HMBC com sinais de carbono em δ_C 162,9 (C-7), 161,2 (C-5), 105,5 (C-10) e 94,8 (C-8).

Essas análises de RMN permitiram observar que os compostos FF1 e FF2 correspondem também a derivados glicosilados de luteolina. Além disso, os espectros de RMN de ^{13}C e os subespectros DEPT 135° mostram que o resíduo glicosídico de ambos os derivados contém dois átomos de carbono metínicos di-oxigenado, oito átomos de carbono metínicos mono-oxigenado, um átomo de carbono metilênico oxigenado e um átomo de carbono metílico. Estes sinais são característicos de carbono de um anel de seis membros, atribuído a um resíduo de ramnose, ligado a outro anel de seis membros, atribuído a um resíduo de glicose, correspondente então ao resíduo rutinosídeo (Kim *et al.*, 2000).

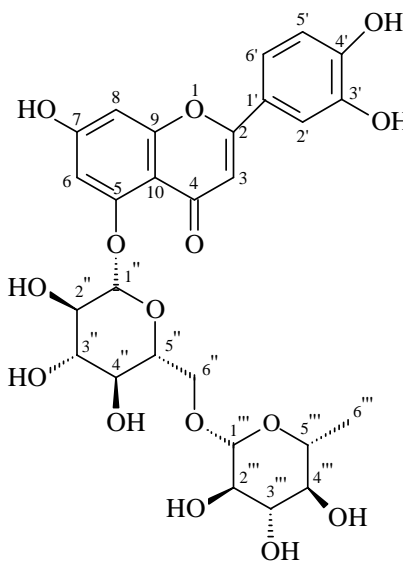
Para auxiliar na identificação dos compostos cálculos BLYP/6-31G* de otimização da geometria foram realizados para FF1 e FF2 com uma geometria de partida com base em diferentes estruturas de luteolina-*O*-rutinosídeo: luteolina-5-*O*-rutinosídeo (A), luteolina-7-*O*-rutinosídeo (B), luteolina-3'-*O*-rutinosídeo (C) e luteolina-4'-*O*-rutinosídeo (D). Para a estrutura C ($E = -2174,56297311$ Hartree) cálculos mostram uma geometria mais estável quando comparados com A, B e D ($\Delta E = 15,9, 1,2$ e $5,2$ kcal/mol, respectivamente).

O espectro de RMN de ^1H de FF1 não mostra sinal registrado entre δ_H 13,0-12,0 (A 84, p. 233), o que é característico de C-5-OH. Como resultado, estudos de RMN experimental

e teórico mostram que o composto FF1 corresponde a luteolina-5-*O*-rutinosídeo (A), um flavonoide glicosilado ainda não descrito em espécies de *Justicia*.

Correlações de RMN ^{13}C experimental de FF2 comparados com os deslocamentos químicos de A, B, C e D mostram os seguintes coeficientes de correlação ($R^2 = 0,9803$, $0,9796$, $0,9776$ e $0,9766$, respectivamente). No entanto, o mapa de contornos HMBC de FF2 (Figuras A98 e A99, p. 247 e 248, respectivamente) mostra correlação de δ_{H} 5,07 com δ_{C} 162,9, correspondentes a luteolina-7-*O*- β -rutinosídeo, um flavonoide glicosilado ainda não descrito em espécies de *Justicia*.

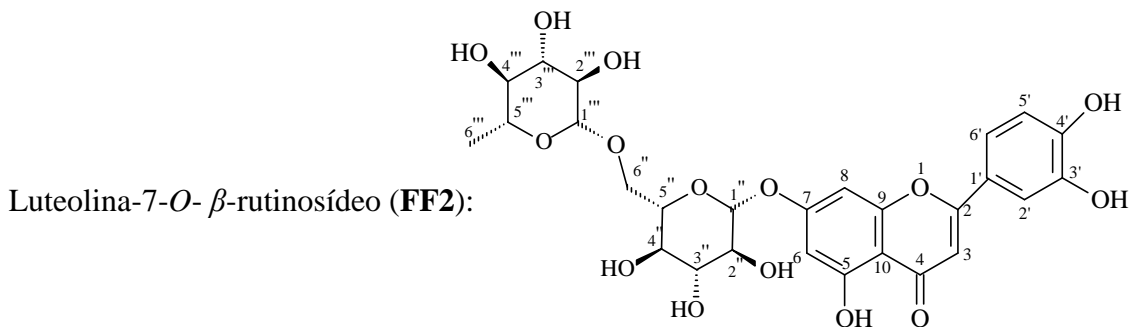
Luteolina-5-*O*- β -rutinosídeo (**FF1**):



CLAE TR = 5,00–5,50 min (9,0 mg); sólido amorfo amarelo; p.f 285–289 °C; IV (ATR; cm^{-1}) ν 3386, 2931, 2865, 1721, 1674, 1182, 1135, 1053 e 1021; RMN de ^1H (400 MHz; CD_3OD) δ_{H} 7,40 (2H; sinal largo; H-2' e H-6'), 6,91 (1H; d, $J = 8,0$ Hz; H-5'), 6,73 (1H; s; H-8), 6,59 (1H; s; H-3), 6,51 (1H; s; H-6) e sinais entre δ_{H} 5,00 e 3,00 característicos de resíduo glicosilado; RMN de ^{13}C (100 MHz; CD_3OD) δ_{C} 184,1 (C-4), 167,1 (C-2), 164,9 (C-7), 163,1 (C-5), 159,0 (C-9), 151,3 (C-4'), 147,1 (C-3'), 123,7 (C-1'), 120,8 (C-6'), 117,0 (C-5'), 114,4 (C-2'), 107,2 (C-10), 104,4 (C-3), 102,2 (C-1''), 101,7 (C-1'''), 101,3 (C-6), 96,3 (C-8), 77,9 (C-3''), 77,3 (C-5''), 74,9 (C-2''), 74,2 (C-4'''), 72,6 (C-3'''), 72,2 (C-2'''), 71,5 (C-4'''), 69,9 (C-5'''), 67,6 (C-6'') e 18,0 (C-6'''); HRESIMS $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 595,1402, correspondente a fórmula molecular $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$.

Tabela 3.9 Dados de RMN de ^{13}C de FF1, incluindo dados de RMN de ^{13}C da luteolina-5-*O*- β -rutinosídeo descritos na literatura (Zarzuelo et al., 1995)

C	Luteolina ^{13}C	FF1	5- <i>O</i> Rutinoside ^{13}C	FF1
2	162.8	167,1	99.8 C-1''	102,2
3	104.0	104,4	99.4 C-1'''	101,7
4	181.1	184,1	73 C-2''' e C-3'''	72,2 e 72,6
5	144.0	163,1	76.3 C-2''	74,9
6	113.5	101,3	77.0 C-3'' e C-5''	77,9 e 77,3
7	164.4	164,9	73.1 C-4''	71,5
8	94.6	96,3	76.3 C-4'''	74,2
9	156.8	159,0	69.4 C-5'''	69,9
10	105.2	107,2	18.7 C-6'''	18,0
1'	121.2	123,7	67.5 C-6''	67,6
2'	115.9	114,4		
3'	145.7	147,1		
4'	149.8	151,3		
5'	115.4	117,0		
6'	119.0	120,8		



CLAE TR = 5,70 min (15,0 mg); sólido amorfo amarelo; p.f. 292–296 °C; IV (ATR; cm^{-1}) ν 3240, 1645, 1607, 1182, 1137, 1114, 1079 e 1019; RMN de ^1H (400 MHz; DMSO-d_6) δ_{H} 12,97 (C-5–OH), 7,46 (1H; dd, $J = 8,0$ and $2,0$ Hz; H-6'), 7,42 (1H; d, $J = 2,0$ Hz; H-2'), 6,92 (1H; d, $J = 8,0$ Hz; H-5'), 6,78 (1H; d, $J = 2,0$ Hz; H-8), 6,66 (1H; s; H-3), 6,49 (1H; d, $J = 2,0$ Hz; H-6), 5,07 (1H; d, $J = 7,5$ Hz; H-1''), 4,56 (1H; d, $J = 1,5$ Hz; H-1'''), sinais em δ_{H} 5,00 a 3,00 característicos de resíduo glicosilado e 1,18 (3H; d, $J = 6,2$ Hz; H-6'''); RMN de ^{13}C (100 MHz; DMSO-d_6) δ_{C} 181,9 (C-4), 164,6 (C-2), 162,9 (C-7), 161,2 (C-5), 156,9 (C-9), 149,9 (C-4'), 145,7 (C-3'), 121,4 (C-1'), 119,2 (C-6'), 116,1 (C-5'), 113,5 (C-2'), 105,5 (C-10), 103,2 (C-3), 100,5 (C-1'''), 99,9 (C-1''), 99,5 (C-6), 94,8 (C-8), 76,3 (C-3'''), 75,6 (C-5''), 73,1 (C-2''), 72,0 (C-4'''), 70,7 (C-3'''), 70,3 (C-2''), 69,6 (C-4''), 68,3 (C-5'''), 66,0 (C-6'') e 17,8 (C-6'''); HRESIMS $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 595,1518, correspondente a fórmula molecular de $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$.

Em resumo a análise estrutural dos metabólitos secundários isolados de *J. acuminatissima* permitiu verificar a ocorrência de β -sitosterol e estigmasterol, nas formas livres e glicosiladas, bem como de lupeol, eritrodiool e betulina em suas folhas e em seus galhos. Destes últimos ainda foi isolado o β -sitosterol em mistura com lupeol acilado. As folhas apresentaram maior diversidade em componentes, pois dela ainda foram isolados o friedelinol, a friedelina, o alcaloide inédito 3-etil-8-oxa-3azabicyclo[3,2,1]-octano-1,6,7-triol, α -amirina, β -amirina, o ácido betulínico e quatro derivados da luteolina: luteolina-3'-*O*- β -xilofuranose, luteolina-7-*O*-glicosídeo, luteolina-5-*O*-rutinosídeo e luteolina-7-*O*-rutinosídeo. A exceção de α -amirina, lupeol, β -sitosterol e estigmasterol, todos os demais compostos foram isolados pela primeira vez no gênero *Justicia*. Finalmente, das folhas foram ainda isolados o ácido p-hidroxibenzóico, a sacarose e α e β glicose, todos ainda não relatados para o gênero. No entanto estes são considerados metabólitos primários e estão presentes em todos os vegetais.

Tabela 3.10 Dados de RMN de ^{13}C de FF2, incluindo dados de RMN de ^{13}C da luteolina-7-*O*- β -rutinosídeo descritos na literatura (Orhan *et al.*, 2012)

C	Luteolina ^{13}C	FF2	7- <i>O</i> - β - Rutinoside ^{13}C	FF2
2	165.6	164,6	100.4 C-1''''	100,5
3	103.1	103,2	100.9 C-1'''	99,9
4	182.8	181,9	71.3 C-2''''	70,3
5	161.7	161,2	72.9 C-2'''	73,1
6	100.0	99,5	70.9 C-3''''	70,7
7	163.5	162,9	76.0 C-3'''	76,3
8	95.0	94,8	73.6 C-4''''	72,0
9	157.6	156,9	70.2 C-4'''	69,6
10	105.9	105,5	68.6 C-5''''	68,3
1'	122.3	121,4	76.6 C-5'''	75,6
2'	113.2	113,5	16.7 C-6''''	17,8
3'	145.7	145,7	66.4 C-6'''	66,0
4'	149.9	149,9		
5'	115.7	116,1		
6'	119.5	119,2		

Capítulo 4

Efeitos da Radiação

gama em compostos

fenólicos de *J.*

acuminatissima e na

avaliação da dose letal

em *Aspergillus*

aculeatus

Neste trabalho foram realizados dois estudos envolvendo radiação gama. Estes estudos tiveram como objetivos: A) avaliar os efeitos da radiação gama em compostos fenólicos de *J. acuminatissima* e B) avaliar a dose letal de radiação em *Aspergillus aculeatus*.

4A. Efeitos da radiação gama em compostos fenólicos de *J. acuminatissima*

4.1A. Introdução:

Muitas plantas medicinais são tradicionalmente usadas como medicamentos em diferentes regiões do mundo (WHO, 2002). Os medicamentos fitoterápicos são de origem vegetal, acreditando-se que eles possuam menos efeitos colaterais e sejam seguros para o consumo. No entanto, a contaminação microbiológica de plantas medicinais pode ocorrer durante o processamento de pré ou pós-colheita, sendo considerada de grande preocupação (Soriani *et al.*, 2005). A partir desses fatos, existe uma preocupação constante com o consumidor em relação à qualidade das matérias-primas. Para isso, pesquisas envolvendo eliminação da carga microbiana presente em plantas medicinais são extremamente relevantes.

O tratamento de produtos de ervas medicinais por radiação gama proporciona uma alternativa eficaz para reduzir ou eliminar a contaminação microbiana (Farkas, 1998), além de ser um processo físico tecnicamente viável, econômico, seguro e não deixa resíduos tóxicos (Diehl, 1995).

A dose média global máxima absorvida e aplicável em ervas aromáticas secas, especiarias e condimentos vegetais para esterilização é de 10 kGy, de acordo com o Codex Alimentarius Norma Geral para a radiação (Polovka & Suhaj, 2010). Os raios gama de radionuclídeos Co-60 e Cs-137 são utilizados na radiação de alimentos (Kovács & Keresztes, 2002) para a descontaminação de ervas com doses variando de 3 a 10 kGy, mostrando-se uma alternativa bastante adequada em relação a fumigação ou vapor (Farkas, 1998). A radiação gama a uma dose de 7,5 kGy para materiais vegetais resulta na esterilização total de bactérias aeróbias, fungos e coliformes abaixo dos níveis detectáveis (Byun *et al.*, 1998).

Porém, estudos sugerem que o tratamento de tecidos de plantas com raios gama está sujeito a uma condição de tensão, devido à formação de radicais oxidativos intracelulares. Estes radicais originam-se durante a radiólise da água presente no material (Kovács & Keresztes, 2002). Os radicais formados podem reagir com os componentes celulares para provocar a peroxidação dos lipídeos da membrana (Schaich & Pryor 1980).

A radiação por raios gama induz estresse oxidativo com geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), incluindo peróxido de hidrogênio, ânion superóxido, radicais hidroxila e outras espécies de oxigênio em células (Mikkelsen & Wardman, 2003). Estas ROS podem causar danos funcionais nas proteínas, lipídeos e DNA, resultando eventualmente em morte celular (Halliwell & Gutteridge, 1990). A atividade celular normal pode resultar em produção de níveis baixos de radicais. No entanto, a concentração destes radicais é observada em plantas expostas a diversos tipos de estresse ambiental livres de oxigênio (Price *et al.*, 1989). A radiação induz várias deficiências funcionais para os sistemas de membranas celulares por meio de alterações das suas propriedades físico-químicas e fisiológicas, tais como a viscosidade, composição química e da permeabilidade (Polivoda *et al.*, 1990). Há poucas informações bioquímicas disponíveis em materiais vegetais. E investigações com outras organelas celulares das plantas são valiosas para uma compreensão abrangente sobre o efeito da radiação em biomembranas de organismos vivos. Neste contexto um dos objetivos do presente trabalho foi verificar possíveis alterações químicas em frações fenólicas de *J. acuminatissima* utilizando radiação gama como método de descontaminação dessa espécie vegetal.

4.2A. Materiais e métodos

Dois métodos foram utilizados: um primeiro envolvendo a aplicação da radiação ao material vegetal (folhas) e posterior obtenção das frações fenólicas deste material, e um segundo, pelo qual primeiramente obteve-se a fração fenólica que posteriormente foi então submetida à radiação gama.

4.2A.1. Efeito da radiação gama nos constituintes fenólicos das folhas de *J. acuminatissima* (Método 1)

4.2A.2. Radiação gama no material vegetal

As folhas de *Justicia acuminatissima* foram coletadas, secas e, posteriormente, moídas. O material vegetal (600 g) foi transferido igualmente para seis placas de petri.

Uma placa de *Petri* contendo o material vegetal foi separada e não submetida ao processo de radiação gama. As demais placas foram submetidas às seguintes doses de radiação gama: 1,0, 3,0, 5,0, 10,0 e 20,0 kGy.

As amostras foram irradiadas em equipamento do tipo Irradiador Panorâmico Múltipropósito de Categoria II, Modelo/número de série IR-214 e tipo GB-127, com fonte de Cobalto-60 estocada a seco em atividade máxima de 2.200 TBq ou 60.000 Ci.

4.2A.2.1. Obtenção das frações fenólicas

As seis amostras, a não irradiada e as previamente irradiadas, foram submetidas à mesma sequência metodológica descrita no Esquema 2.14 do Capítulo 2 (p. 41) para obtenção das frações fenólicas. A fração fenólica não submetida à radiação gama foi codificada como (FF₀) e as demais frações foram codificadas como FF₁, FF₃, FF₅, FF₁₀ e FF₂₀ de acordo com a dose de radiação recebida, isto é, 1,0, 3,0, 5,0, 10,0 e 20,0 kGy, respectivamente.

4.2A.2.2. Análises em CLAE

As amostras foram solubilizadas em metanol (10 mg/mL) e centrifugadas a 12×10^3 rpm durante 5 min em centrífuga Eppendorf, modelo mini-spin.

As análises por CLAE das frações fenólicas foram realizadas utilizando equipamento descrito no Ítem 2.1 do capítulo 2, (p. 29) com fluxo de 0,7 mL/min em modo isocrático e solução de água em ácido trifluoracético 0,05% e metanol na proporção (70:30) como fase móvel. O detector foi selecionado para leitura a 280 e 370 nm.

4.3A. Efeito da radiação gama nos constituintes fenólicos das folhas de *J. acuminatissima* (Método 2)

4.3A.1. Obtenção da fração fenólica

O material vegetal seco e moído (100 g) foi separado e, em seguida, procedeu-se à mesma sequência metodológica descrita no Esquema 2.14 do Capítulo 2 (p. 41) para obtenção da fração fenólica (FFJ; 2,5 g). Assim neste método 2 primeiramente procedeu-se à obtenção da fração fenólica para depois irradiá-la.

4.3A.2. Radiação gama das frações fenólicas e análise em CLAE

Alíquotas de FFJ (10 mg) foram transferidas para seis microtubos do tipo Ependorff e codificadas como FFJ₀, FFJ₁, FFJ₃, FFJ₅, FFJ₁₀ e FFJ₂₀ para amostra não irradiada e radiadas a doses de 1,0, 3,0, 5,0, 10,0, e 20,0 kGy, respectivamente.

As amostras foram irradiadas e analisadas por CLAE sob as mesmas condições descritas no item anterior Método 1 (item, 4.2A.1 e 4.2A.2.2, p. 85).

4.4A. Resultados e discussão

4.4A.1. Análise por CLAE das amostras irradiadas (método 1)

A Figura 4.1 apresenta o cromatograma de CLAE de FF₀ das folhas de *J. acuminatissima* não submetidas à radiação gama. Os picos 1, 2, 3 e 5 (TR = 1,93, 2,33, 3,90 e 8,12 min, respectivamente) são os mais intensos no cromatograma. Por outro lado, os picos 4 e 6 (TR = 5,38 e 12,68 min) são de baixas intensidades.

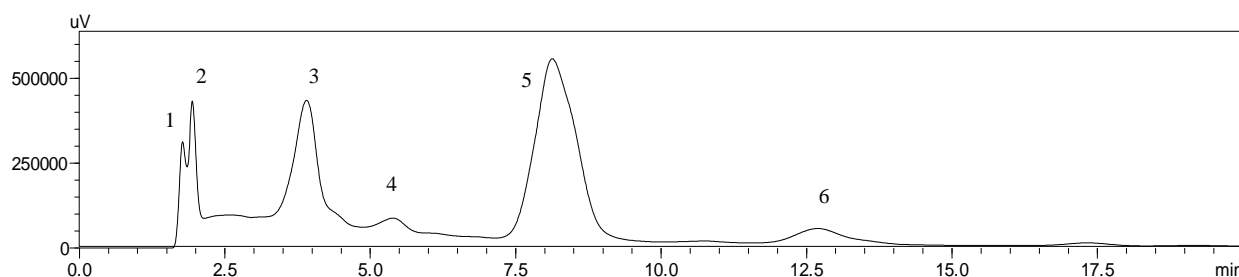


Figura 4.1 Cromatograma de CLAE em 370 nm de FF₀, fração das folhas de *J. acuminatissima* não submetida a radiação gama.

As Figuras 4.2 a 4.6 apresentam os cromatogramas de CLAE das frações FF₁ a FF₂₀, respectivamente. O cromatograma de CLAE de FF₁ (Figura 4.2) mostra a diminuição de intensidade dos picos 1, 5 e 6 e o surgimento dos picos A (TR = 2,75 min) e B (TR = 17,40 min) em relação ao cromatograma de CLAE de FF₀ (Figura 4.1). Os picos A e B correspondem a produtos radiolíticos.

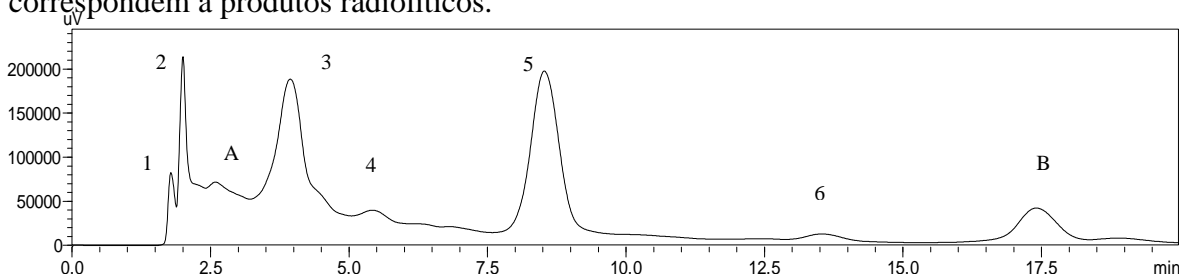


Figura 4.2 Cromatograma de CLAE em 370 nm de FF₁.

O cromatograma de CLAE de FF₃ (Figura 4.3) mostra a diminuição de intensidade dos picos 1, 3 e 5, a ausência do pico 6 e o surgimento dos picos A (TR = 2,75 min) e C (TR = 7,38 min) em relação ao cromatograma de CLAE de FF₀ (Figura 4.1). Os picos A e C correspondem a produtos radiolíticos.

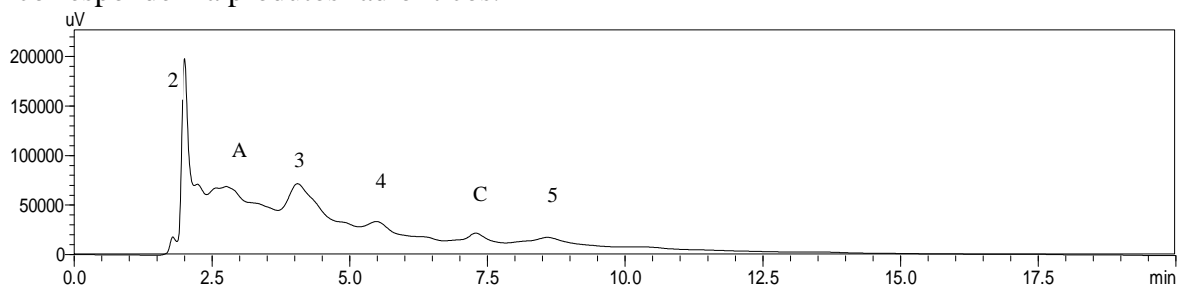


Figura 4.3 Cromatograma de CLAE em 370 nm de FF₃.

O cromatograma de CLAE de FF₅ (Figura 4.4) mostra a diminuição de intensidade dos picos 1, 3 e 5, a ausência do pico 6 e o surgimento do picos A (TR = 2,75 min) em comparação com o cromatograma de CLAE de FF₀ (Figura 4.1). O pico A corresponde a um produto radiolítico.

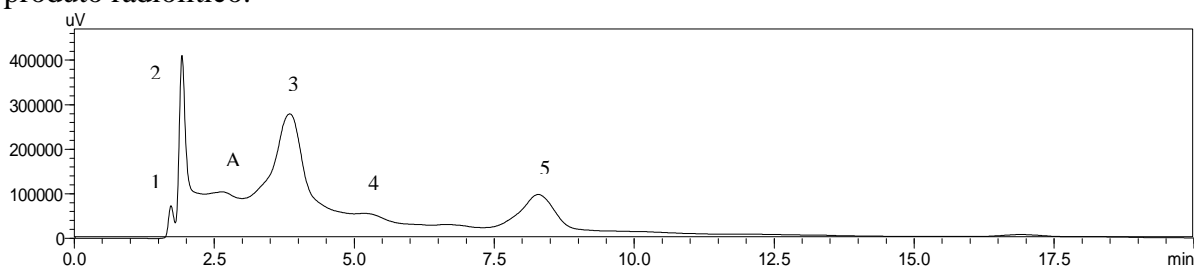


Figura 4.4 Cromatograma de CLAE em 370 nm de FF₅.

O cromatograma de CLAE de FF₁₀ (Figura 4.5) mostra a diminuição de intensidade dos picos 1, 2 e 5, aumento da intensidade do pico 3 e ausência do pico 6, além do surgimento dos picos A (TR = 2,75 min) e B (TR = 17,40 min) em comparação com o cromatograma de CLAE de FF₀ (Figura 4.1). Os picos A e B correspondem a produtos radiolíticos.

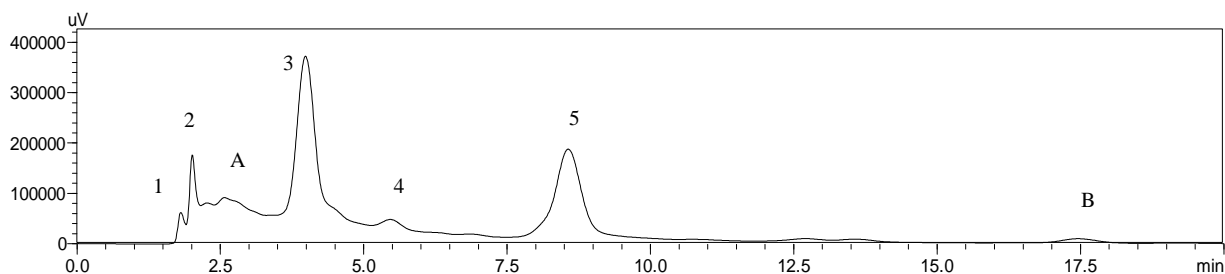


Figura 4.5 Cromatograma de CLAE em 370 nm de FF₁₀.

O cromatograma de CLAE de FF₂₀ (Figura 4.6) mostra diminuição de intensidade do pico 1, 2 e 3 ausência dos picos 4, 5 e 6 e o surgimento do picos A e B quando comparado com o cromatograma de CLAE de FF₀ (Figura 4.1). Os picos A e B correspondem a produtos radiolíticos.

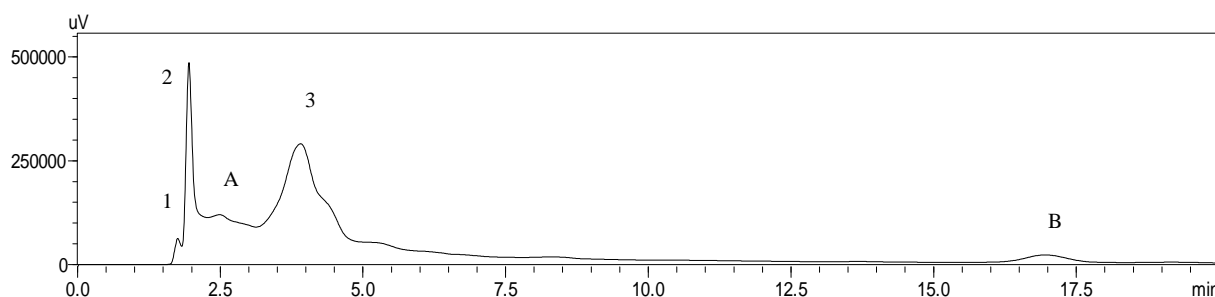


Figura 4.6 Cromatograma de CLAE em 370 nm de FF₂₀.

Os cromatogramas de CLAE das frações fenólicas das folhas de *J. acuminatissima* utilizando o método 1 mostram que as doses de radiação gama utilizadas influenciam a integridade química do material vegetal investigado. As doses de 1,0 a 20,0 kGy promovem a formação de produtos radiolíticos, além de alterações das intensidades dos picos das amostras irradiadas em comparação com a amostra não submetida à radiação gama.

4.5A. Análise por CLAE das amostras irradiadas (método 2)

A Figura 4.7 apresenta o cromatograma de CLAE de FFJ₀, fração fenólica das folhas de *J. acuminatissima* não submetidas à radiação gama. Os picos 1 e 2 (TR = 2,75 e 4,25 min, respectivamente) são os mais intensos no cromatograma. Por outro lado, os demais picos são de baixas intensidades.

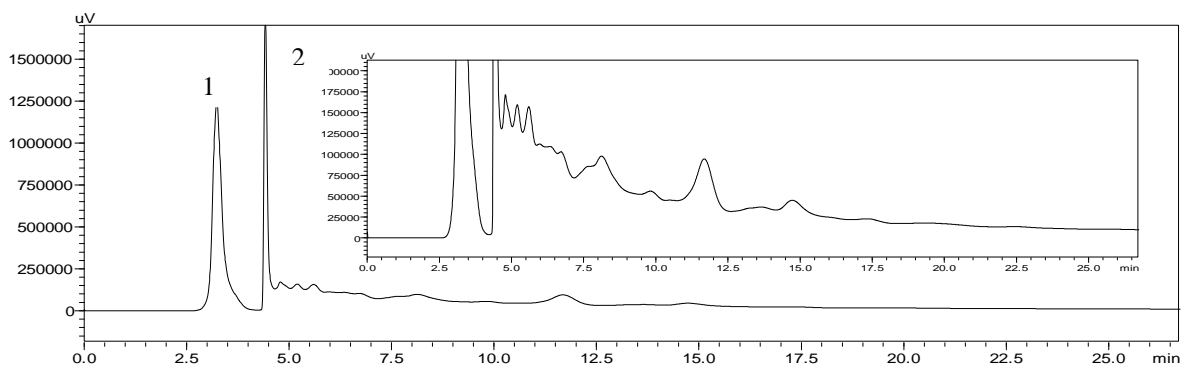


Figura 4.7 Cromatograma de CLAE em 370 nm de FFJ₀, fração fenólica de *J. acuminatissima* não irradiada.

As Figuras 4.8 a 4.13 apresentam os cromatogramas de CLAE das frações fenólicas FFJ₁, FFJ₃, FFJ₅, FFJ₁₀ e FFJ₂₀ de *J. acuminatissima* submetidas a radiação gama com doses de 1,0, 3,0, 5,0, 10,0 e 20,0 kGy, respectivamente.

Os cromatogramas de CLAE dessas frações utilizando o Método 2 não mostram influência da radiação gama. Uma vez que, nos cromatogramas não há formação de produtos radiolíticos e as intensidades dos picos não apresentam variações.

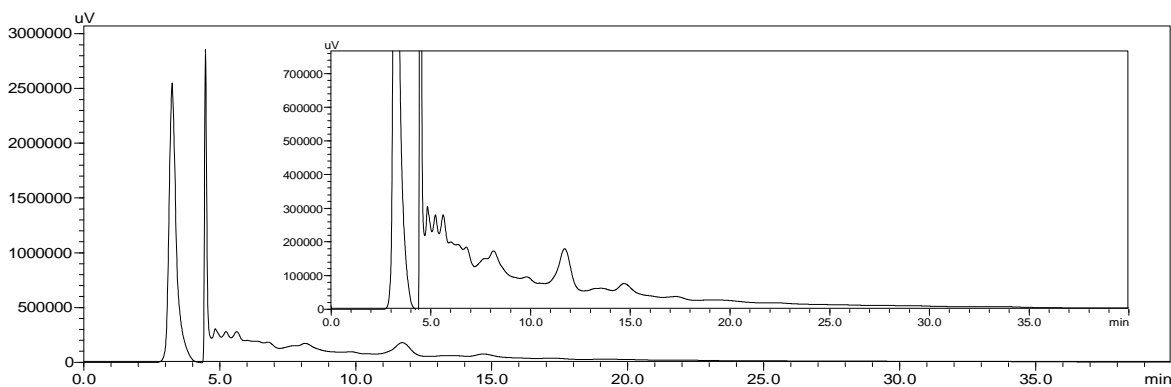


Figura 4.8 Cromatograma de CLAE em 370 nm de FFJ₁.

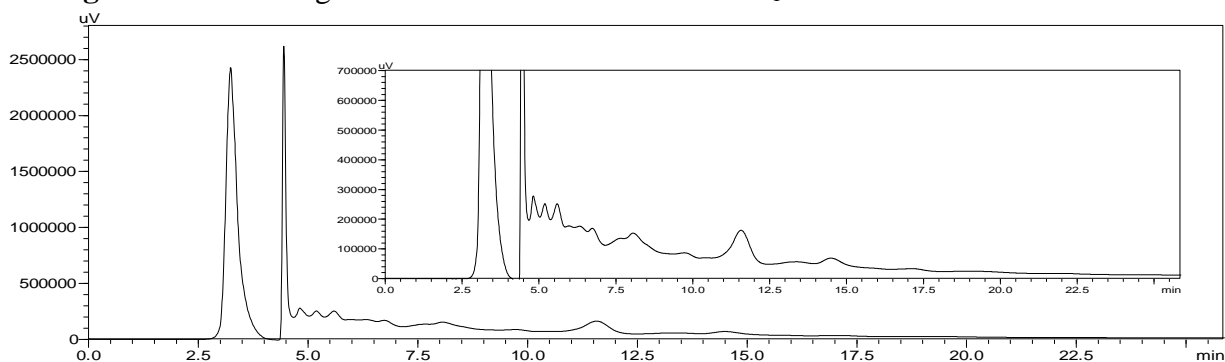


Figura 4.9 Cromatograma de CLAE em 370 nm de FFJ₃.

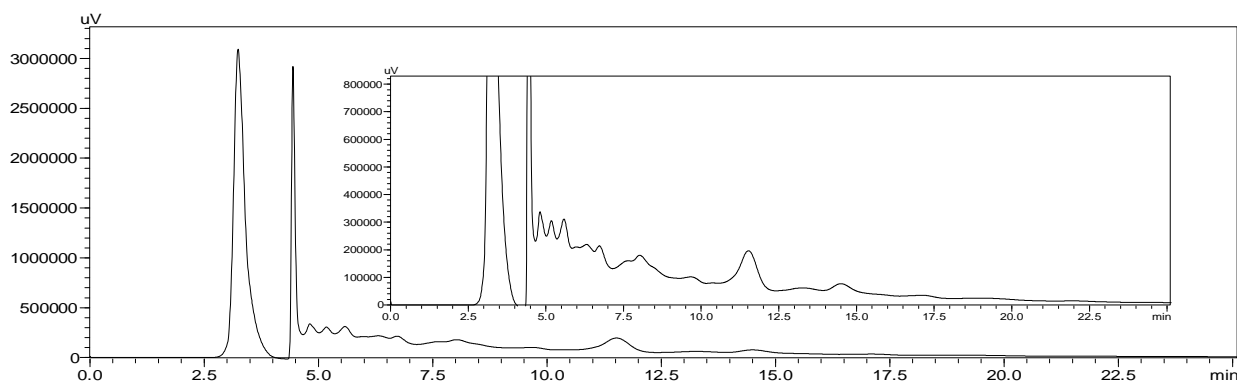


Figura 4.10 Cromatograma de CLAE em 370 nm de FFJ₅.

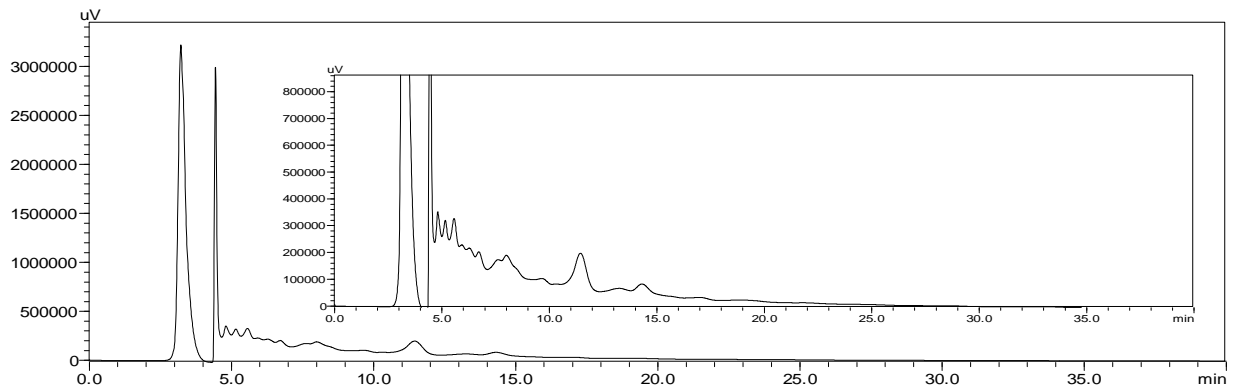


Figura 4.11 Cromatograma de CLAE em 370 nm de FFJ₁₀.

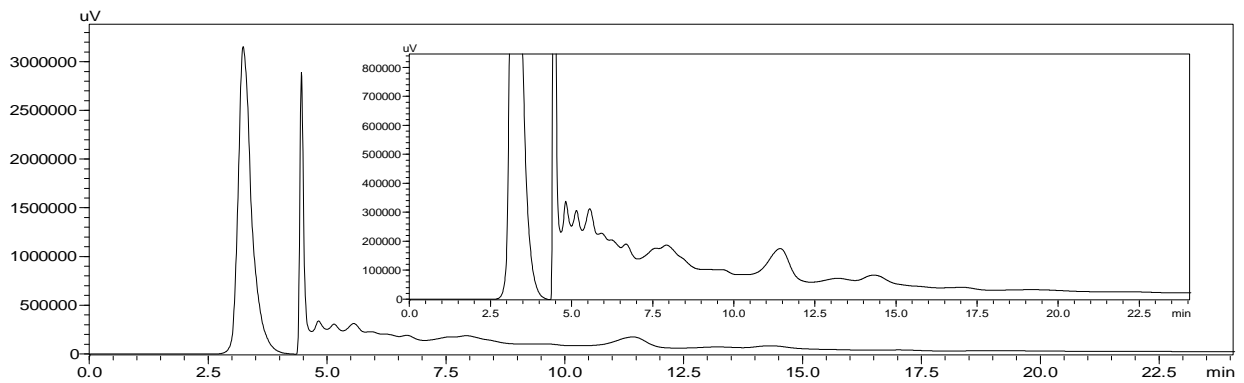


Figura 4.12 Cromatograma de CLAE em 370 nm de FFJ₂₀.

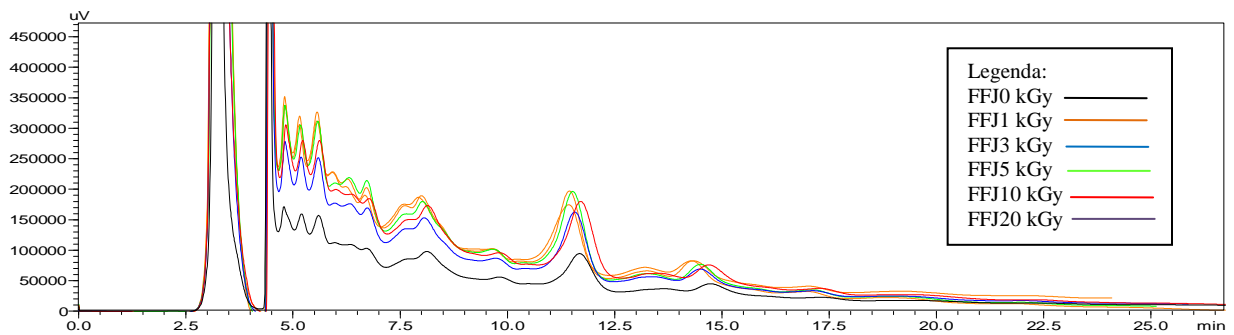


Figura 4.13 Cromatograma de CLAE em 370 nm da sobreposição de FFJ₀, FFJ₁, FFJ₃, FFJ₅, FFJ₁₀ e FFJ₂₀ das folhas de *J. acuminatissima*.

Os resultados obtidos empregando o método 1, mostra a formação de produtos radiolíticos. Em contrapartida, esses resultados não são observados nos cromatogramas quando se emprega o método 2.

Para o método 1 as folhas foram inicialmente irradiadas e, posteriormente, realizou-se a marcha química. Apesar de seguir o mesmo protocolo para obtenção das frações fenólicas, o

processo possui diversas etapas, e isto pode ter ocasionado diferenças nos cromatogramas obtidos. Para o método 2, empregou-se um único processo extrativo para obtenção da fração fenólica, seguido da radiação das frações. Após análises, percebeu-se que não houve alteração química após essas doses de radiação aplicadas. Dessa forma, fica evidente que a radiação gama não interfere na integridade química dos compostos fenólicos de *J. acuminatissima*. Portanto, o método 2 é o mais indicado para verificar alterações na integridade química dos constituintes. É importante salientar que autores afirmam que doses de radiação até 10 kGy são permitidas em alimentos e derivados de produtos naturais sem influenciar na integridade dos princípios ativos (Khattak & Simpson, 2009). Esses estudos podem contribuir com informações valiosas, uma vez que doses até 20 kGy não acarretam modificações nos compostos fenólicos de *J. acuminatissima*.

4B. Avaliação da dose letal por radiação gama em *Aspergillus aculeatus*

4.1B. Introdução

As plantas são altamente suscetíveis à contaminação microbiana devida à água e solo onde se encontram, além da colheita, armazenamento e processamento (Aouidi et al., 2011; Bhat et al., 2010). Materiais contaminados representam um perigo para a saúde e podem causar também a deterioração dos produtos farmacêuticos e alimentares associados. A presença de contaminantes microbianos pode afetar a eficácia e a estabilidade dos compostos ativos das plantas durante o armazenamento (Thomas, et al., 2008). Uma tecnologia adequada para a descontaminação torna-se necessária para melhorar a qualidade higiênica dos materiais vegetais, tornando-os adequados para uso humano e comercialização (Bhat et al., 2010; Katusin-Razem et al., 2001).

Os métodos convencionais de descontaminação microbiana são a fumigação com óxido de etileno gasoso ou brometo de metila. Esses métodos são cada vez mais restritos por razões de segurança, saúde e problemas ambientais. A radiação gama é conhecida como um método de descontaminação de alimentos e plantas, sendo um método de tecnologia confiável e eficaz no armazenamento, distribuição e, principalmente, na comercialização desses produtos (Khattak & Simpson, 2009). Além disso, essa tecnologia pode ser usada para melhorar o aspecto de extratos vegetais empregados pelas indústrias alimentícias ou de

cosméticos e, segundo alguns estudos, sem alteração adversa de suas atividades biológicas (Jeong et al., 2009; Jo et al., 2003).

A radiação de alimentos é o método cada vez mais reconhecido como um meio de reduzir as perdas devidas à contaminação microbiológica e danos causados por insetos. A utilização dessa técnica pode reduzir também a dependência de fumigantes químicos e conservantes usados atualmente pela indústria de alimentos e melhorar a qualidade higiênica dos alimentos (Byun et al., 1999).

A ANVISA aprovou em 2001 a radioesterilização de alimentos a doses não estipuladas, desde que sejam suficientes para alcançar a finalidade pretendida e não comprometer a integridade do produto. Dessa forma, a determinação da dose letal em espécies de fungos colonizadores destes vegetais pode propiciar informações valiosas sobre doses específicas de desinfecção.

O gênero *Aspergillus* compreende cerca de 180 espécies de fungos filamentosos, incluindo várias espécies de valor comercial e, também, vários patógenos como o *Aspergillus flavus*, produtor de toxinas contaminantes de alimentos e rações (Pera & Patterson, 2002).

As espécies de *Aspergillus* são importantes fontes de enzimas e apresentam um papel importante no ciclo global do carbono. Estas espécies são encontradas principalmente em solos, apresentando uma grande variedade de enzimas hidrolíticas e oxidativas envolvidas na degradação da lignocelulose vegetal. *Aspergillus aculeatus* é uma espécie ubíqua que é isolada comumente a partir de frutas em decomposição (Skojot et al., 2001).

Devido à escassez de informações sobre resistência de espécies de *Aspergillus* à radiação gama, no presente trabalho objetivou-se determinar a dose necessária para a descontaminação por *A. aculeatus*.

4.2B. Materiais e métodos

A espécie de fungo *Aspergillus aculeatus* foi obtida das folhas de *J. acuminatissima*. *Aspergillus aculeatus* foi analisada seguindo o protocolo descrito por Klich (2002). Os meios de cultivo utilizados foram MEA (*Malt Extract Agar*) e CYA (*Czapek Yeast Agar*), mantidos a 25 °C no escuro durante sete dias.

Para a identificação fúngica foram analisadas as colônias e a micromorfologia. As características consideradas das colônias foram diâmetro de crescimento, cor do micélio, cor da esporulação, massa de esporos, presença e características dos esclerócios, cor do verso e

produção de pigmentos solúveis no meio de cultura. As características micromorfológicas foram tamanho, forma e cor dos conídios (esporos assexuais), tamanho, forma, cor e número de camada de células (uni ou bisseriada) das vesículas e rugosidade das estipes.

Para o fungo codificado como As-05-321 foram observadas em CYA as seguintes características: diâmetro de 55-60 mm, micélio branco nas bordas, esporulação marrom escura, verso sem cor, ausência de esclerócios ou pigmentos no meio.

Em meio MEA foram observadas as seguintes características: diâmetro de 55-60 mm, micélio branco, acinzentado no centro, esporulação marrom escura e esporulação marrom clara no centro (variegado) e verso pouco amarelado. Os conídios são elipsoidais marrons escuros, rugosos com espinhos, 3-5 μm . As vesículas são globosas, marrons, uni-seriadas, 45-65 μm . As Estipes são lisas, incolores, ficando marrons na extremidade. Estas características são compatíveis com *Aspergillus aculeatus*.

A amostra *Aspergillus aculeatus* foi isolada e posteriormente repicada em placas de Petri contendo meio de “Sabouraud Dextrose Agar” e mantida a temperatura ambiente por cinco dias. Este tempo foi suficiente para que os monoesporos atingissem o diâmetro médio de aproximadamente 4,0 cm. As placas foram submetidas a diferentes doses de radiação gama para a determinação da dose letal. O diâmetro médio dos monoesporos foi comparado com o diâmetro médio dos monoesporos submetidos a radiação gama. As placas foram preparadas em triplicata.

4.3B. Resultados e Discussão

A Figura 4.14 (p. 95) mostra a placa de *Petri* contendo os monoesporos do fungo *Aspergillus aculeatus*. Os monoesporos viáveis foram submetidos à radiação e, após cada dose de radiação gama, a espécie foi repicada novamente para avaliação de seu crescimento, sendo determinado o diâmetro médio dos monoesporos das placas em triplicata.

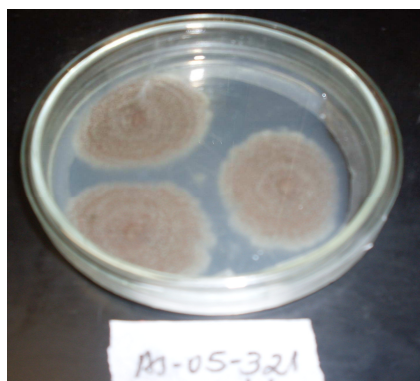


Figura 4.14 Fotografia da placa de *Petri* contendo monoesporos da espécie de *Aspergillus aculeatus*.

O fungo foi mantido a temperatura ambiente por cinco dias (mesmas condições iniciais) para avaliação do seu crescimento (Figura 4.15). Os resultados estão apresentados na Tabela 4.1.

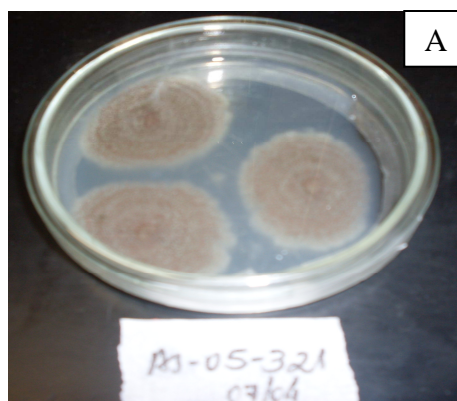


Figura 4.15 Fotografia da placa de *Petri* contendo monoesporos de *Aspergillus aculeatus* (A) viáveis após dose de 1,0 kGy.

Tabela 4.1 Diâmetro médio dos monoesporos de *Aspergillus aculeatus* após cada dose de irradiação gama

Espécie	Dose de Radiação (kGy)	Diâmetro médio (cm)
<i>Aspergillus aculeatus</i>	1	3,2 ± 0,1
	2	3,3 ± 0,1
	2,5	2,7±0,2
	3	0

Uma amostra da espécie *Aspergillus aculeatus* submetida à radiação gama de 3,0 kGy não sofreu crescimento após quatro dias do repique, mostrando ser esta a dose indicada para inibição do crescimento dessa espécie.

Essa espécie de fungo irradiada foi selecionada por ser a espécie mais abundante em *J. acuminatissima*. Dessa forma, pode-se propor que, para descontaminação fúngica ideal em *J. acuminatissima*, seria necessária uma dose de irradiação mínima de 3,0 kGy.

Pode-se considerar que essas informações são bastante valiosas, pois a dose necessária para a descontaminação do material vegetal estudado encontra-se dentro dos valores estabelecidos pelos órgãos de saúde e dentro dos parâmetros que as literaturas julgam ser suficiente para fins de radioesterelização (Khattak & Simpson, 2009), além disso, doses de até 20 kGy não afetam os princípios ativos da espécie vegetal estudada.

Capítulo 5 –

Testes

Biológicos

5.1. Ensaios de atividade anti-inflamatória

5.1.2. Introdução

A inflamação é um processo relacionado com algumas patologias, incluindo infecções respiratórias, asma e doenças autoimunes. A inflamação é uma resposta do organismo frente a uma infecção ou a uma injúria tecidual, tendo como objetivo a eliminação da causa inicial da lesão celular provocada por patógenos ou por ação de agentes físicos (Coutinho *et al.*, 2009; Cotran, 2000).

A área inflamada exibe em nível macroscópico características marcantes. A região atingida torna-se avermelhada, edemaciada, quente e dolorosa, havendo interferência ou alteração da sua função (Luengo, 2005). O processo compreende basicamente dois mecanismos de defesa. Um mecanismo é a resposta inespecífica (resposta inata), responsável pelas características da região inflamada. O outro mecanismo é a resposta imunológica, em que há produção de anticorpos específicos contra um determinado agente agressor. A resposta inflamatória inicial nem sempre é suficiente para a regeneração do tecido e o processo pode evoluir para um estado de inflamação crônica (Cotran, 2000).

A reação inflamatória é um evento complexo que envolve o reconhecimento do agente/estímulo lesivo, para sua posterior destruição e tentativa de reconstruir o tecido danificado (Nathan, 2002). Esse processo é uma resposta orgânica provocada por estímulos nocivos que envolvem numerosos mediadores de origem celular e plasmática, com efeitos biológicos interdependentes que culminam com a reparação do tecido e a restauração da função (Sprada, 2010; Rao, 1993).

Atualmente, as doenças inflamatórias têm sido tratadas com anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) e não esteroidais (AINEs). Os AINEs estão entre os medicamentos mais amplamente utilizados devido à sua eficácia para uma ampla gama de condições de dor e inflamação (Nonato *et al.*, 2010). No entanto, o uso destes medicamentos a longo prazo pode induzir úlceras gastro-intestinais, hemorragias e distúrbios renais, devido à sua inibição não-seletiva tanto constitutiva quanto induzida das isoformas das enzimas ciclo-oxigenases (COX-1 e COX-2, respectivamente) (Tapiero *et al.*, 2002). Por outro lado, inibidores seletivos da isoforma COX-2 com a toxicidade gastro-intestinal reduzida têm sido associados a efeitos cardiovasculares adversos (Dogné *et al.*, 2005). Devido aos efeitos colaterais deletérios atribuídos ao uso prolongado dos AINEs e sua ineficácia em

alguns casos, o controle da dor inflamatória é ainda um grande desafio. Atualmente, tem ocorrido um maior interesse no desenvolvimento de drogas anti-inflamatórias. Esse interesse deve-se em parte a alta incidência de câncer associada com processos inflamatórios, decorrentes geralmente do estresse oxidativo, responsável por gerar mutações progressivas, levando ao desenvolvimento tumoral (Vechia *et al.*, 2009).

Alguns triterpenóides comuns em plantas apresentam atividade anti-inflamatória. Por extensão, a atividade antitumoral dessa classe de compostos pode estar relacionada às suas propriedades anti-inflamatórias (Vechia *et al.*, 2009). Os flavonoides são amplamente distribuídos pelo reino vegetal e notáveis por suas diversificadas ações biológicas, dentre elas têm-se a capacidade de agir sobre a inflamação e o sistema imunológico, o que lhes confere um enorme potencial farmacológico. Dessa forma, os flavonoides representam uma alternativa promissora frente aos processos inflamatórios (Coutinho *et al.*, 2009).

Assim, o grande potencial biológico dos metabólitos secundários encontrados em espécies vegetais e os graves efeitos colaterais dos anti-inflamatórios utilizados nas terapias estimulam a busca de novas alternativas para o tratamento de inflamações. Espécies de *Justicia* são utilizadas popularmente para o tratamento de inflamação, sendo algumas delas com descrições científicas comprovadas, como, por exemplo, *J. pectoralis* (Locklear *et al.*, 2010), *J. spicigera* (Meckes *et al.*, 2004) e *J. gendarussa* (Jothimanivannan *et al.*, 2010). Substâncias puras isoladas deste gênero são citadas na literatura para inflamação. A cumarina umbeliferona (**1**, p. 20) é reportada ser responsável pela ação anti-inflamatória da espécie *J. pectoralis* (Locklear *et al.*, 2010; Leal *et al.*, 2000; Lino *et al.*, 1997). Essa classe de compostos foi detectada nas análises de prospecção fitoquímica da espécie *J. acuminatissima* que é utilizada tradicionalmente pelos povos amazônicos para o tratamento de inflamação (Cassino, 2010). No entanto, o uso popular dessa planta não possui comprovação científica. Sendo assim, neste trabalho extratos brutos, frações e substâncias puras isoladas das folhas e galhos de *J. acuminatissima* foram testadas para investigar cientificamente o seu potencial anti-inflamatório.

5.1.3. Materiais e métodos

Ratos Wistar foram adquiridos da empresa Bioagri no Município de Planaltina-DF. Os animais pesando em média 325 g e com aproximadamente 75 dias de vida foram mantidos em biotério e ciclo claro/escuro de 12/12 h. Os ratos tiveram acesso a água e ração comercial de

marca Purina®. Durante a pesquisa, os animais permaneceram em Laboratório, onde foram mantidos em condições semelhantes ao do biotério. Neste trabalho, seguiu-se a metodologia utilizada por Fontoura (2007), que relata a eficiência da utilização do aparelho de ultra-som.

5.1.3.1. Preparação do Gel

As amostras puras, misturas, frações e extratos brutos das folhas e galhos de *J. acuminatissima* foram preparadas na forma de gel em concentrações conforme apresentadas na Tabela 5.1

Tabela 5.1 Concentração dos géis a partir das amostras de *J. acuminatissima*

Amostra	Código	Concentração (% m/m)	Base utilizada para incorporação
Fração em hexano das folhas	FHF	3,0%	Gel carbopol
Fração em DCM das folhas	FDF	3,0%	Gel carbopol
Fração em AcOEt das folhas	FAF	3,0%	Crema Polawax
Fração em metanol das folhas	FMF	3,0%	Gel natrosol
Extrato em etanol das folhas	EEF	6,0%	Gel natrosol
Extrato em etanol a 70% das folhas	EE7F	6,0%	Crema lanette
Fração em hexano dos galhos	FHG	3,0%	Gel carbopol
Fração em DCM dos galhos	FDG	3,0%	Gel carbopol
Fração em AcOEt dos galhos	FAG	3,0%	Crema Polawax
Fração em metanol dos galhos	FMG	3,0%	Crema polawax
Extrato em etanol dos galhos	EEG	6,0%	Gel natrosol
Extrato em etanol a 70% dos galhos	EE7G	6,0%	Crema lanette
β -Sitosterol e estigmasterol	FHF-HD10	0,5%	Gel carbopol
β -Sitosterol e estigmasterol glicosilados	FAF-DA8	0,5%	Gel carbopol
Lupeol	FHG-HD14	0,5%	Gel carbopol
Fração fenólica das folhas	FF	3,0%	Gel carbopol
Luteolina-5- <i>O</i> -rutinosídeo	FF1	0,5%	Gel carbopol
Luteolina-7- <i>O</i> -rutinosídeo	FF2	0,5%	Gel carbopol
Luteolina-7- <i>O</i> -glicosídeo	FF3	0,5%	Gel carbopol
Luteolina-3- <i>O</i> - β -xilofuranose	FF4	0,5%	Gel carbopol
Dexametasona	-	0,1%	Crema lanette

5.1.3.2. Aparelho de Ultra-som

O tratamento das patas de ratos com os géis das amostras da planta (extratos brutos, frações, substâncias puras e misturas) foi realizado empregando-se o aparelho de ultra-som microcontrolado modelo Sonopulse Special 1,0 MHz e 3,0 MHz, da marca Ibramed, com frequências de ultra-som de 1,0 ou 3,0 MHz no mesmo cabeçote, com emissão contínua e

pulsada (razão de pulso 1/5 a uma frequência de 100 MHz), intensidade regulável de 0,1 a 2,0 W/cm² e ERA de 1 cm. O aparelho foi calibrado pelo fabricante para uso neste experimento.

5.1.3.3. Obtenção da lesão muscular

Todo o experimento foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação no Uso Animal (CETEA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o protocolo número 222/11(Anexo II).

Após anestesia intraperitoneal com ketamina e xilazina (respectivamente, 10,0 e 4,0 mg/kg de peso corporal) diluída em 1 mL de solução fisiológica, os animais foram separados em grupos: um grupo controle negativo (sem tratamento), um grupo controle positivo (tratamento padrão com dexametasona 0,1% em creme) e 10 grupos de tratamento com as amostras selecionadas de *J. acuminatissima*. Em cada grupo os animais receberam o tratamento uma vez ao dia por três dias consecutivos (24, 48 e 72 h). 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 traseiras (Figura 5.1), (Fontoura, 2007).

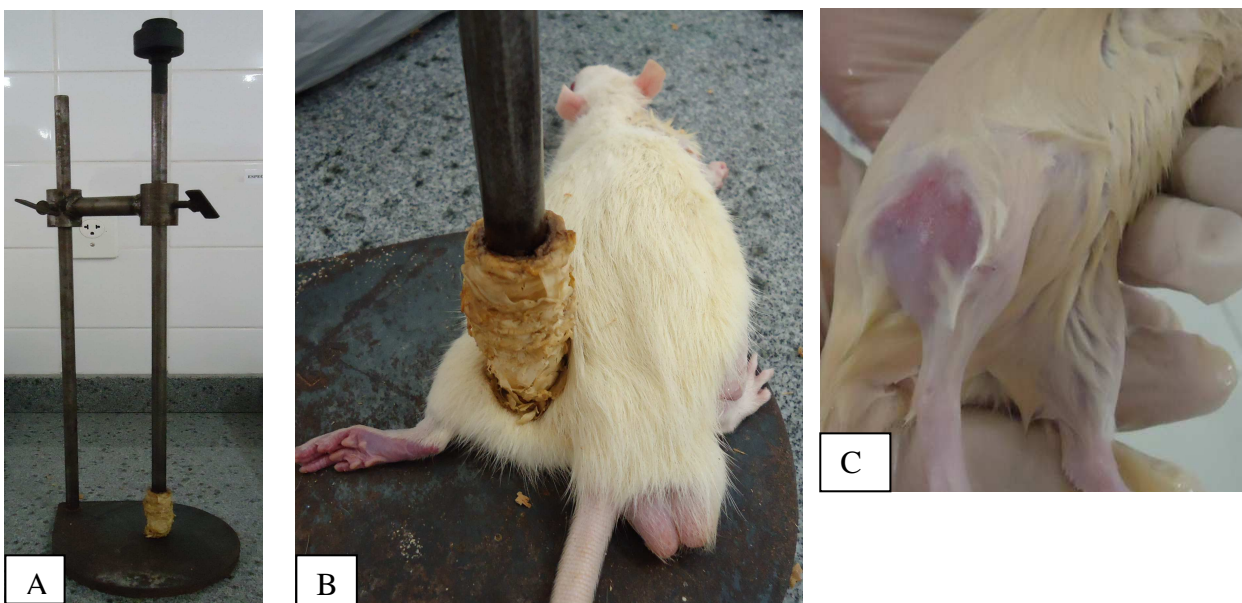


Figura 5.1 (A) Mecanismo gerador de lesão por impacto, segundo o modelo de Fontoura (2007); (B) Animal anestesiado submetido ao mecanismo gerador da lesão por impacto; (C) Aspecto visual da lesão muscular.

Após 24 h da lesão, a pata direita do animal foi tratada com ultra-som terapêutico (Figura 5.2, p. 93) no modo pulsátil a uma frequência de 1 MHz, com intensidade de 0,5 W/cm² por 9 min (conforme indicação do aparelho), uma vez ao dia e durante três dias

seguidos (24, 48 e 72 h). As substâncias puras e misturas 0,5%, frações a 3,0% e extratos brutos a 6%, na forma de gel, foram utilizados como acoplante, conforme a Tabela 5.1 (p. 100). Os géis e cremes utilizados como acoplantes não influenciaram o tratamento, servindo, portanto, somente como acoplantes (Fontoura, 2007). A pata esquerda serviu como controle interno e recebeu o acoplamento do cabeçote pelo mesmo tempo. Porém, com o aparelho desligado e sem o gel, seguindo assim o mesmo protocolo da pata tratada. Os resultados foram expressos pela capacidade de reduzir o infiltrado inflamatório.



Figura 5.2 Animal anestesiado submetido a tratamento com ultra-som terapêutico.

5.1.3.4. Obtenção das lâminas histológicas

Partes dos músculos contendo a área lesada foram obtidas pela retirada, de tendão a tendão, do músculo inteiro (tríceps sural e isquiotibiais) em cortes medianos e, posteriormente, fixados em solução de formol em PBS a 10% durante 24 h (Figura 5.3, p. 103). Em seguida, os músculos foram desidratados em etanol a 70% por 24 h. A desidratação dos músculos foi realizada sucessivamente sob imersão por 30 min em etanol a 80%, 85%, 90%, 95% e, depois, três vezes, em etanol a 100%. 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), dispendo longitudinalmente os músculos em blocos individuais. As peças foram cortadas em micrótomo Leica com 5 μ m de espessura, sendo as lâminas coradas pelo método de hematoxilina e eosina. As análises histológicas, de fotomicrografia, foram realizadas utilizando-se um microscópio da marca Zeiss.

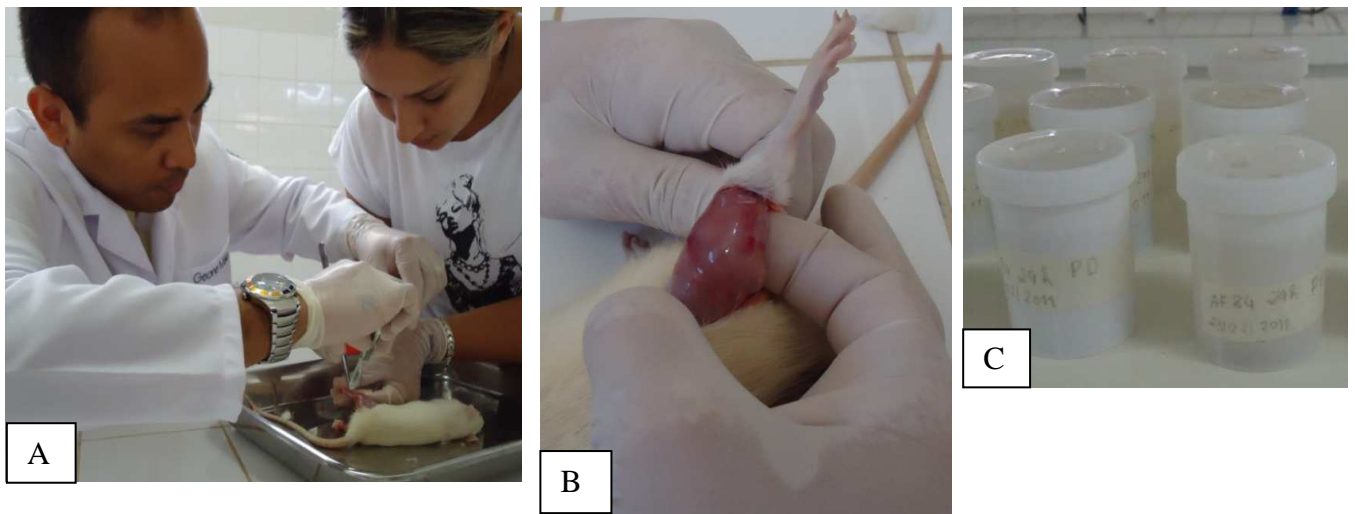


Figura 5.3 (A) Retirada do músculo para fixação em formol a 10%; (B) Parte do músculo removida para obtenção das lâminas histológicas; (C) Músculos fixados em formol a 10%.

5.1.3.5. Resultados e Discussão

O trauma muscular provocado nas patas de ratos gerou um quadro patológico descrito histologicamente por edema, infiltrado inflamatório e hemorragia. A Figura 5.4 (p. 107) mostra a comparação das lâminas histológicas das patas de ratos não tratadas (controle negativo) e tratadas com dexametasona (controle positivo) após 24, 48 e 72 h de lesão. Para este ensaio de atividade anti-inflamatória foi utilizado a dexametasona como controle positivo por ser considerado um potente fármaco com ação anti-inflamatória (Coutinho *et al.*, 2009). Nas figuras, as setas pretas indicam o infiltrado inflamatório, as setas brancas indicam edema e os asteriscos indicam a degeneração das fibras musculares.

A seção do controle negativo apresenta em todos os tempos de análise uma grande região de edema (áreas em branco na figura) e infiltrado inflamatório (pontos roxos espalhados na figura), verifica-se ainda a presença de hemorragia generalizada. Os tecidos musculares são representados por coloração rosa. Um padrão normal do tecido muscular deve apresentar fibras contínuas. No entanto, a fragmentação do tecido muscular observado no material histológico do controle negativo indica a degeneração significativa de fibras musculares (Huard *et al.*, 2002).

O aspecto histológico dos músculos tratados com dexametasona (controle positivo) mostra significativa diminuição do infiltrado inflamatório após a lesão, apresentando-se leve após 24 e 48 h, sendo observado um aspecto sem lesão após 72 h. O edema apresentou-se de

moderado a leve e degeneração das fibras musculares mostrou-se leve após 24 h de lesão quando comparada com os músculos sem tratamento.

A seção histológica das patas tratadas com FHF (Figura 5.5, p. 108) mostra a presença moderada de infiltrado inflamatório no tempo em 24 h. Após 48 h de tratamento, observa-se lesão branda com significativa diminuição de infiltrado inflamatório e com algumas regiões marcadas por edema. Após 72 h de tratamento, as análises mostram um tecido sem lesão e com regeneração das fibras musculares. Dessa forma, a fração FHF pode ser considerada bastante eficaz na diminuição do infiltrado inflamatório e edema.

A seção histológica das patas tratadas com FHG (Figura 5.5, p. 108) mostra a presença de infiltrado inflamatório de leve a moderado nos tempos em 24 e 48 h. Após 72 h de tratamento, o aspecto histológico da lâmina mostra lesão branda, além da ausência de regiões com edema. Ambas as frações (FHF e FHG) apresentam perfil químico bastante semelhantes com misturas de esteroides e triterpenos. A pequena diferença observada no potencial anti-inflamatório dessas frações pode estar associada com a concentração desses compostos nas amostras, pois, triterpenos e esteróides possuem ação anti-inflamatória (Ko *et al.*, 2008).

A seção histológica das patas tratadas com FDF (Figura 5.6, p. 109) mostra ligeira presença de infiltrado inflamatório no tempo em 24 h. Após 48 e 72 h de tratamento, o aspecto histológico da lâmina mostra ausência de infiltrado inflamatório e de regiões com edema.

A seção histológica das patas tratadas com FDG (Figura 5.6, p. 109) é marcada pela presença de infiltrado inflamatório de leve a moderado apenas no tempo em 48 h. Por outro lado, observa-se ausência de infiltrado inflamatório e edema nos tempos em 24 e 72 h. O perfil químico de ambas as frações é bastante semelhante, com a presença de esteroides e triterpenos.

Assim, tanto as frações em hexano quanto as frações em diclorometano apresentaram potencial anti-inflamatório bastante promissor. Porém, as frações em diclorometano foram mais eficazes na redução do quadro inflamatório quando comparadas com todas as frações avaliadas de *J. acuminatissima*. Este fato pode estar relacionado à maior concentração de triterpenos presentes nessas frações, pois, essa classe de compostos é muito descrita na literatura como potentes agentes anti-inflamatórios (Alvarenga & Ferro, 2006).

A seção histológica das patas tratadas com FAF (Figura 5.7, p. 110) mostra ligeira presença de infiltrado inflamatório nos tempos em 24 e 48 h. Após 72 h de tratamento observa-se um aspecto sem lesão, ausência de edema e de fibras musculares degeneradas.

A seção histológica das patas tratadas com FAG (Figura 5.7, p. 110) mostra presença de infiltrado inflamatório de leve a moderado nos tempos em 24 e 48 h, além de regiões marcadas por edema. Após 72 h de tratamento é observada ainda ligeira presença de infiltrado inflamatório, porém com diminuição da degeneração das fibras musculares. Essas frações apresentam também bons resultados quanto ao potencial anti-inflamatórios. Ensaio farmacognósticos mostram semelhança quanto ao perfil químico de FAF e FAG com presença de esteroides e triterpenos, além de cumarinas. Essas classes de compostos são relatadas quanto ao potencial anti-inflamatório (Leal *et al.*, 2000).

A seção histológica das patas de ratos tratadas com FMF (Figura 5.8, p. 111) mostra a presença de infiltrado inflamatório de leve a moderado, além de regiões marcadas por edema nos tempos de 24 e 48 h. Contudo, após 72 h, o aspecto histológico mostra ausência de infiltrado inflamatório e edema, além de mostrar a regeneração de fibras musculares. Sendo assim, a fração FMF pode ser considerada muito eficiente na diminuição do quadro inflamatório.

A seção histológica das patas de ratos tratadas com FMG (Figura 5.8, p. 111) difere bastante quando comparada com as tratadas com FMF. Após 24 h observa-se a presença de leve a moderada de infiltrado inflamatório e edema. Ao contrário de FMF, FMG mostra ser menos eficiente, pois, os tratamentos realizados com essa fração em 48 e 72 h mostram um quadro moderado de infiltrado inflamatório, além de regiões com edema e de degeneração de fibras musculares. O perfil químico dessas frações é também muito semelhante. Contudo a concentração de compostos fenólicos nas folhas é maior que nos galhos. Isto deve ser um dos fatores que contribuem para a diferença do potencial anti-inflamatório dessas frações.

A seção histológica das patas de ratos tratadas EEF (Figura 5.9, p. 112) mostra a presença de infiltrado inflamatório de leve a moderado, além de regiões marcadas por edema e degeneração das fibras musculares nos tempos em 24 e 48 h. Porém, após 72 h de tratamento, observa-se ligeira presença de infiltrado inflamatório e edema, além de regeneração de fibras musculares. Sendo assim, o extrato bruto EEF mostra ser eficiente na diminuição do quadro inflamatório.

Para EEG (Figura 5.9, p. 112), o aspecto histológico difere bastante quando comparado com EEF. No tempo em 24 h observa-se a presença moderada de infiltrado inflamatório e edema e ao contrário de EEF, o extrato bruto EEG não apresenta potencial anti-inflamatório, pois, após 48 h de tratamento observa-se um quadro de infiltrado inflamatório de moderado a grave, além de regiões com edema e de degeneração de fibras musculares. Após 72 h observa-se um quadro inflamatório grave além de regiões marcadas por edema e de

fibras musculares degeneradas. Os extratos brutos em etanol possuem também semelhanças, porém compostos fenólicos e cumarinas foram detectados apenas nas folhas. Outro fator importante é que apenas as folhas são indicadas na medicina popular para inflamação, justificando assim esses estudos (Corrêa & Alcântara, 2012).

A seção histológica das patas tratadas com EE7F (Figura 5.10, p. 113) mostra a presença de infiltrado inflamatório de leve a moderado, além de regiões marcadas por edema e degeneração das fibras musculares no tempo em 24 h. Porém, após 48 e 72 h de tratamento é observada a presença moderada de infiltrado inflamatório e edema. Sendo assim, o extrato bruto EE7F não mostra eficiência na diminuição do quadro inflamatório.

Para patas de ratos tratadas com EE7G (Figura 5.10, p. 113) o aspecto histológico não difere quando comparado com EE7F. Após 24 e 48 h observa-se a presença moderada de infiltrado inflamatório e edema. O extrato bruto EE7G não apresenta potencial anti-inflamatório, pois, após 72 h de tratamento observa-se um quadro de infiltrado inflamatório de moderado a grave, além de regiões com edema e de degeneração de fibras musculares.

Estudos de atividades anti-inflamatória com espécies de *Justicia* são bastante relevantes, pois, um trabalho recente mostra o grande potencial desse gênero contra doenças relacionadas com a inflamação (Corrêa & Alcântara, 2012).

As fotomicrografias histológicas das patas tratadas com FHG-HD14, FHF-HD10 e FAF-DA8 são apresentadas nas Figuras 5.11, 5.12 e 5.13 (p. 114, 115 e 116, respectivamente). O aspecto histológico mostra a presença de infiltrado inflamatório de leve a moderado no tratamento com FHF-HD10 após 24 h. Por outro lado, observa-se ligeiro infiltrado inflamatório no tratamento com FDG-HD14 e FAF-DA8. Após 48 e 72 h, as patas de ratos tratadas com FAF-DA8 mostram ligeiro quadro inflamatório. Enquanto que os aspectos histológicos das patas de ratos tratadas com FDG-HD14 (lupeol) e FHF-HD10 (β -sitosterol e estigmasterol) mostram redução significativa do quadro inflamatório, ausência de regiões com edema e a regeneração das fibras musculares, mostrando que essas substâncias são eficazes no tratamento da inflamação. O lupeol apresenta resultados satisfatórios para atividade anti-inflamatória em outros modelos (Siddique & Saleem, 2011), sendo confirmado o seu potencial com o modelo utilizado no presente trabalho.

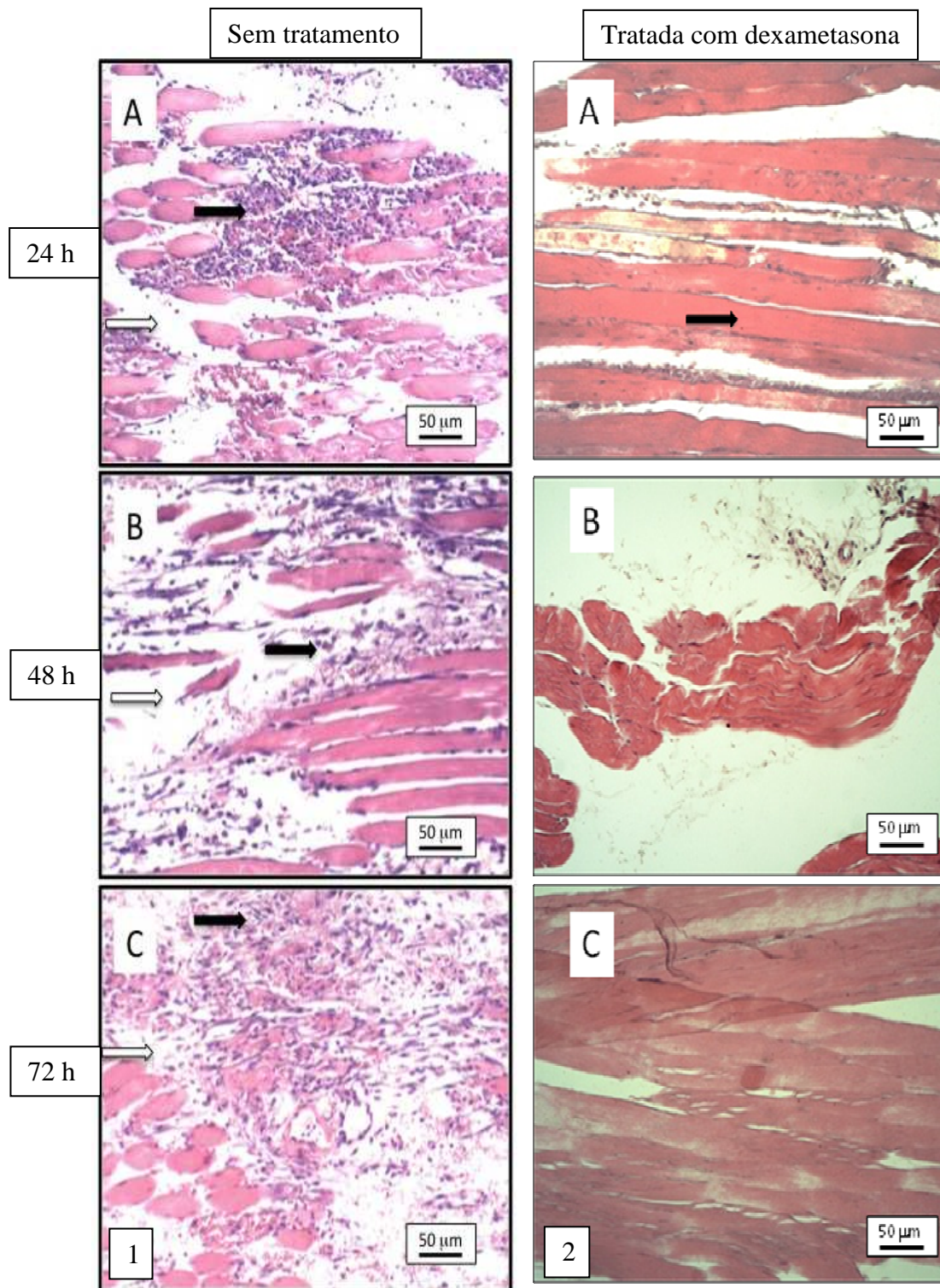


Figura 5.4 Fotomicrografia histológica do tecido muscular da pata de rato submetido à lesão por impacto sem tratamento (pata controle) (1), pata tratada com dexametasona (controle positivo, 2) em (A) 24 h, (B) 48 h e (C) 72 h.

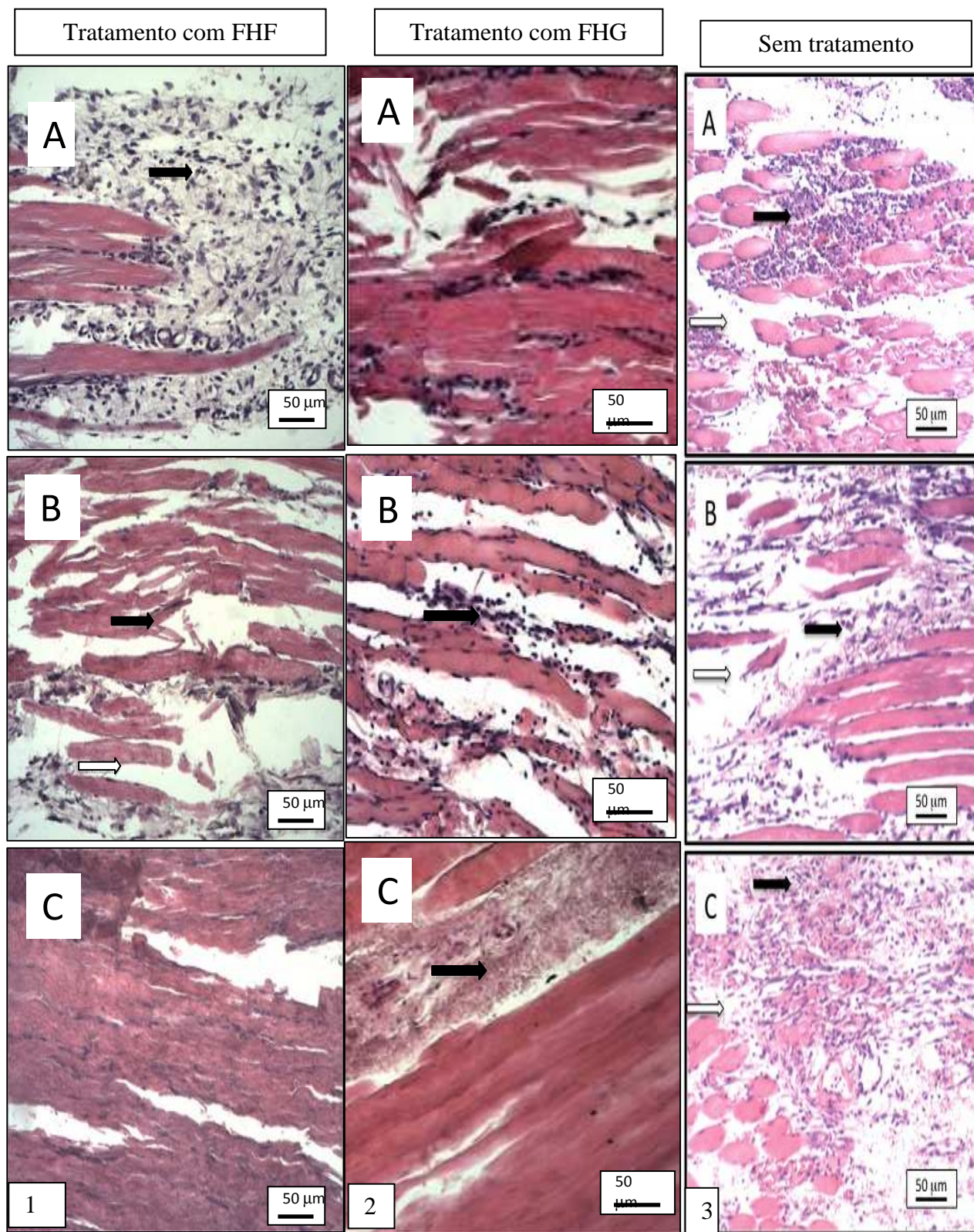


Figura 5.5 Fotomicrografias histológicas de tecido muscular da pata de rato submetido a tratamento com FHF (1), FHG (2) e pata controle (3) em (A) 24 h, (B) 48 h e (C) 72h.

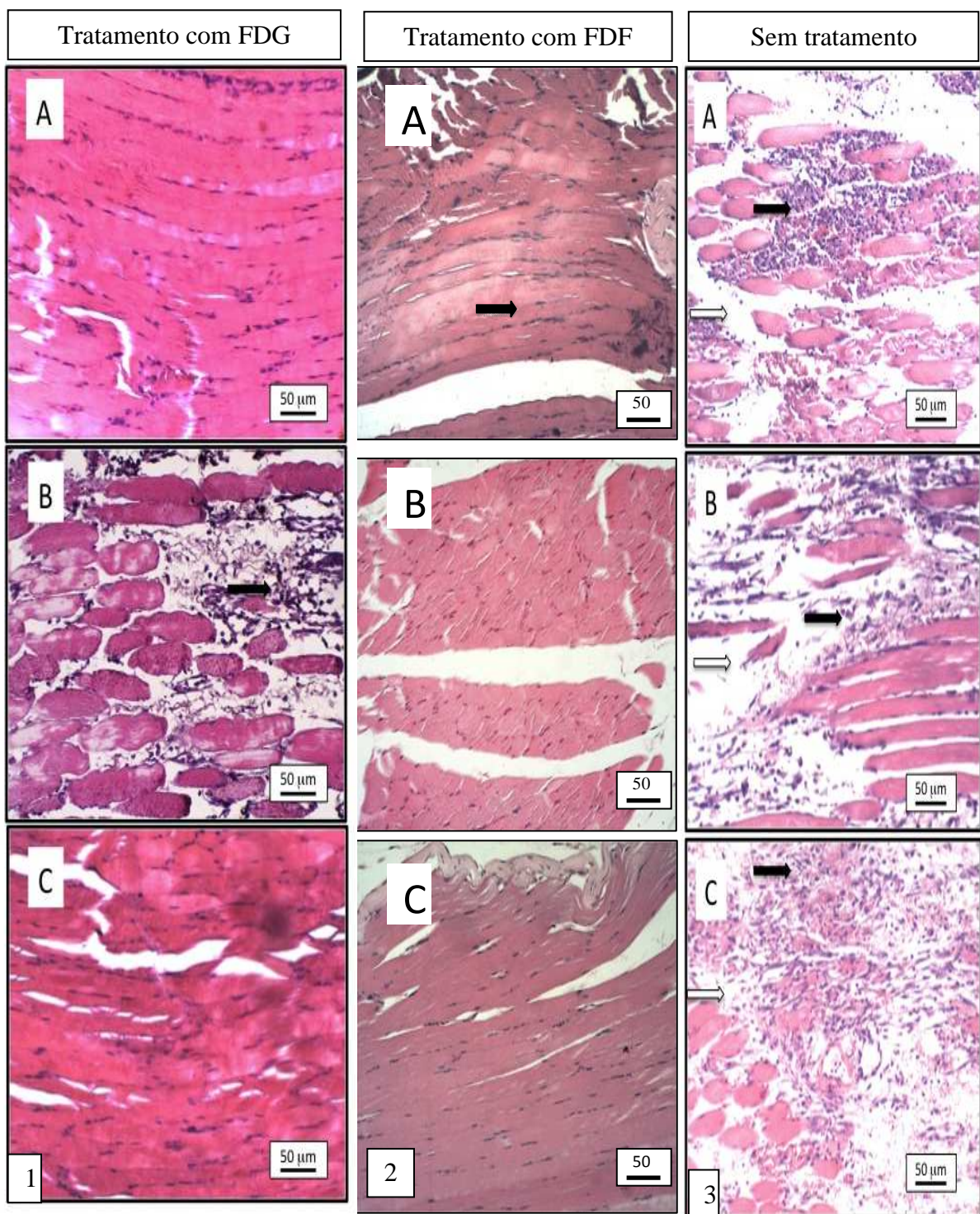


Figura 5.6 Fotomicrografias histológicas de tecido muscular da pata de rato submetido a tratamento com FDG (1), FDF (2) e pata controle (3) em (A) 24 h, (B) 48 h e (C) 72h.

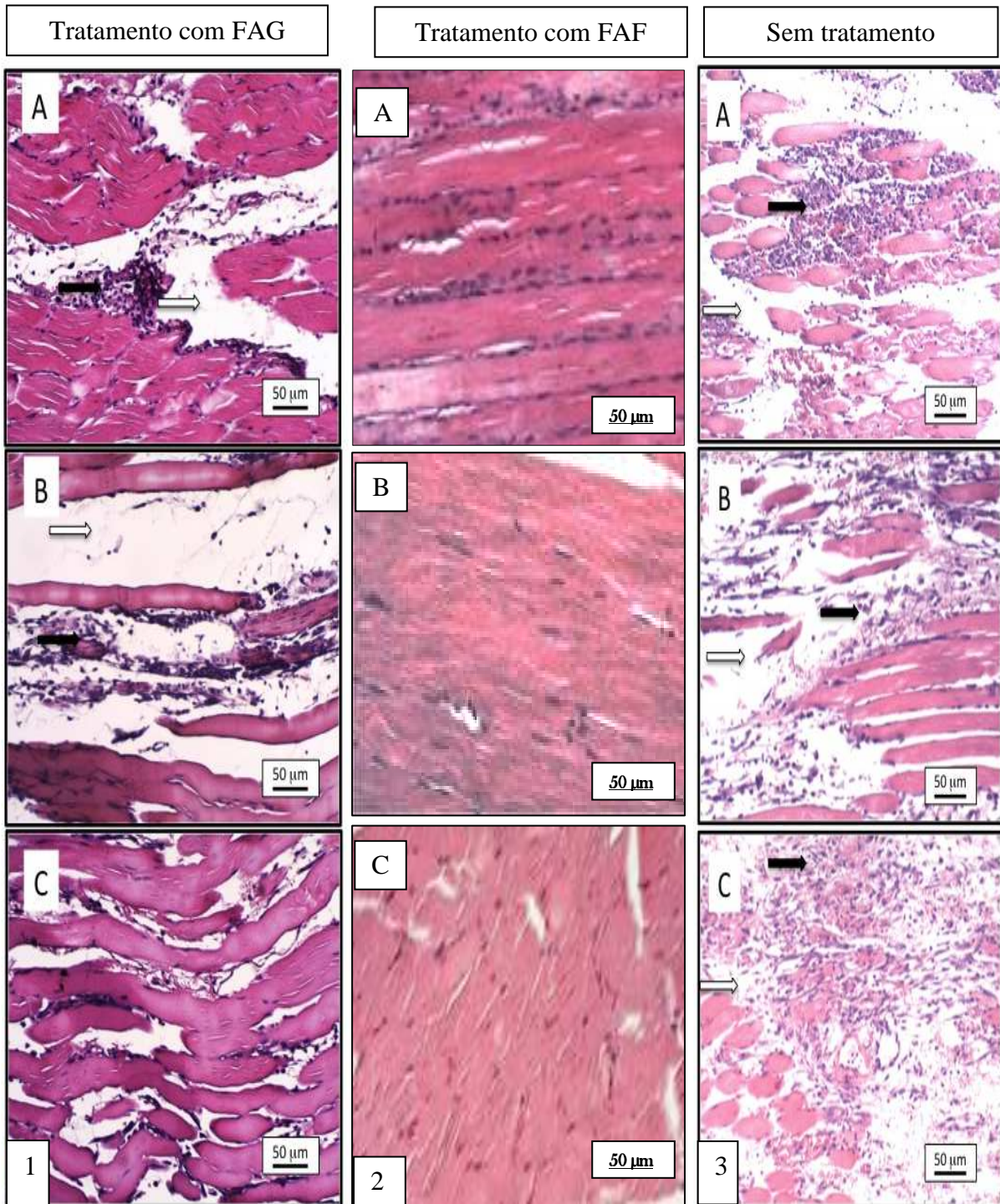


Figura 5.7 Fotomicrografias histológicas de tecido muscular da pata de rato submetido a tratamento com FAG (1), FAF (2) e pata controle (3) em (A) 24 h, (B) 48 h e (C) 72 h.

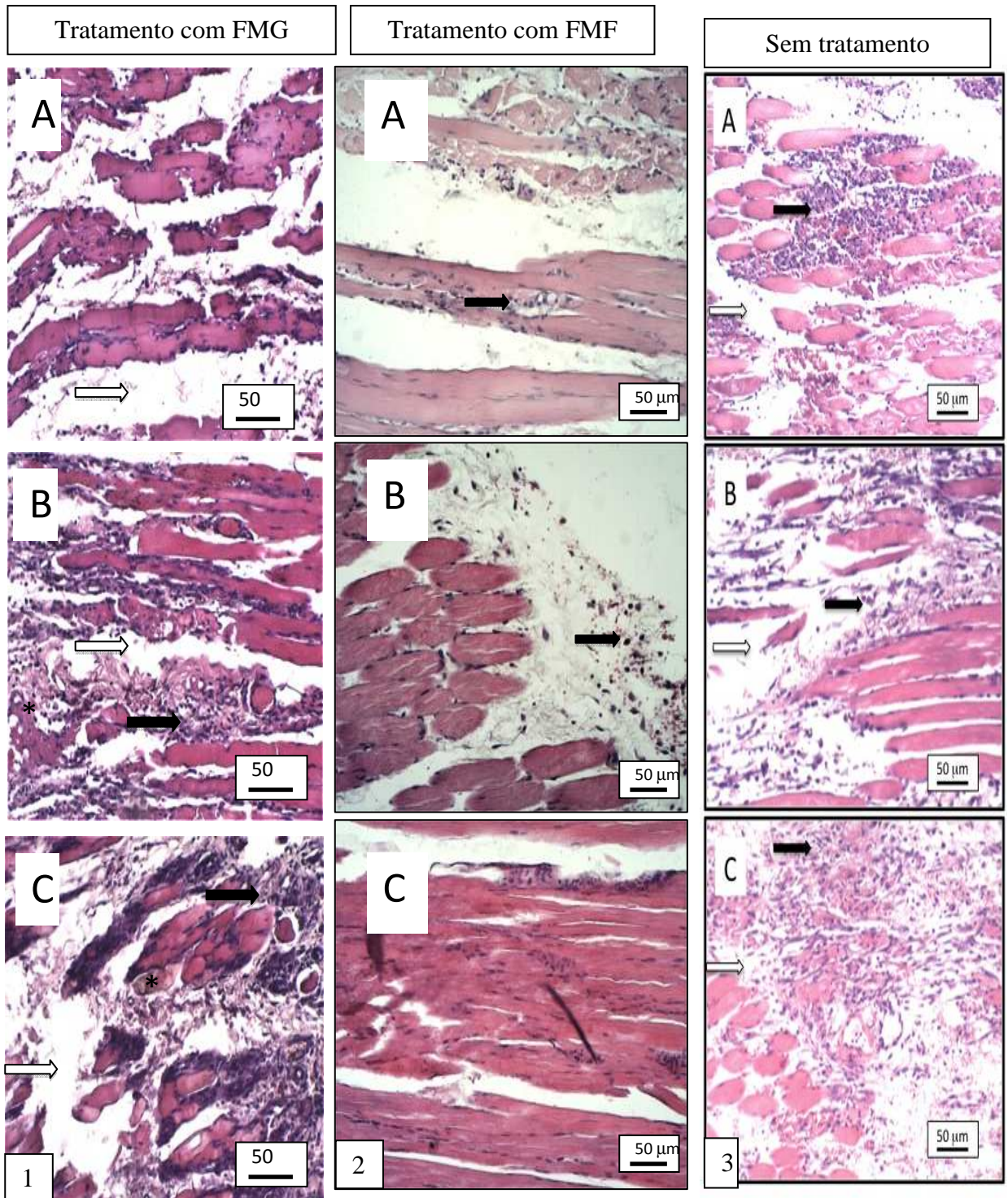


Figura 5.8 Fotomicrografias histológicas de tecido muscular da pata de rato submetido a tratamento com FMG (1), FMF (2) e pata controle (3) em (A) 24 h, (B) 48 h e (C) 72h.

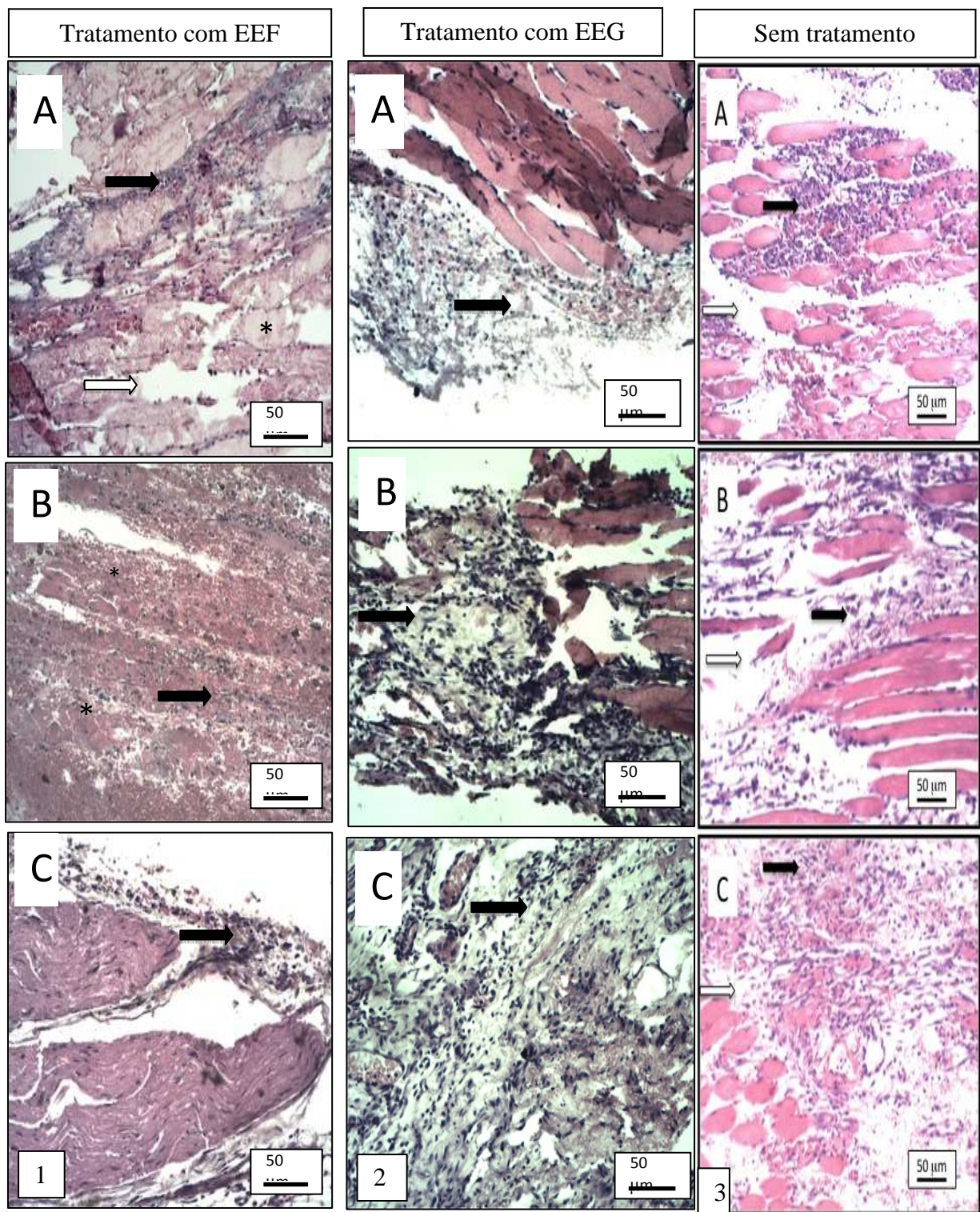


Figura 5.9 Fotomicrografias histológicas de tecido muscular da pata de rato submetido a tratamento com EEF (1), EEG (2) e pata controle (3) em (A) 24 h, (B) 48 h e (C) 72h.

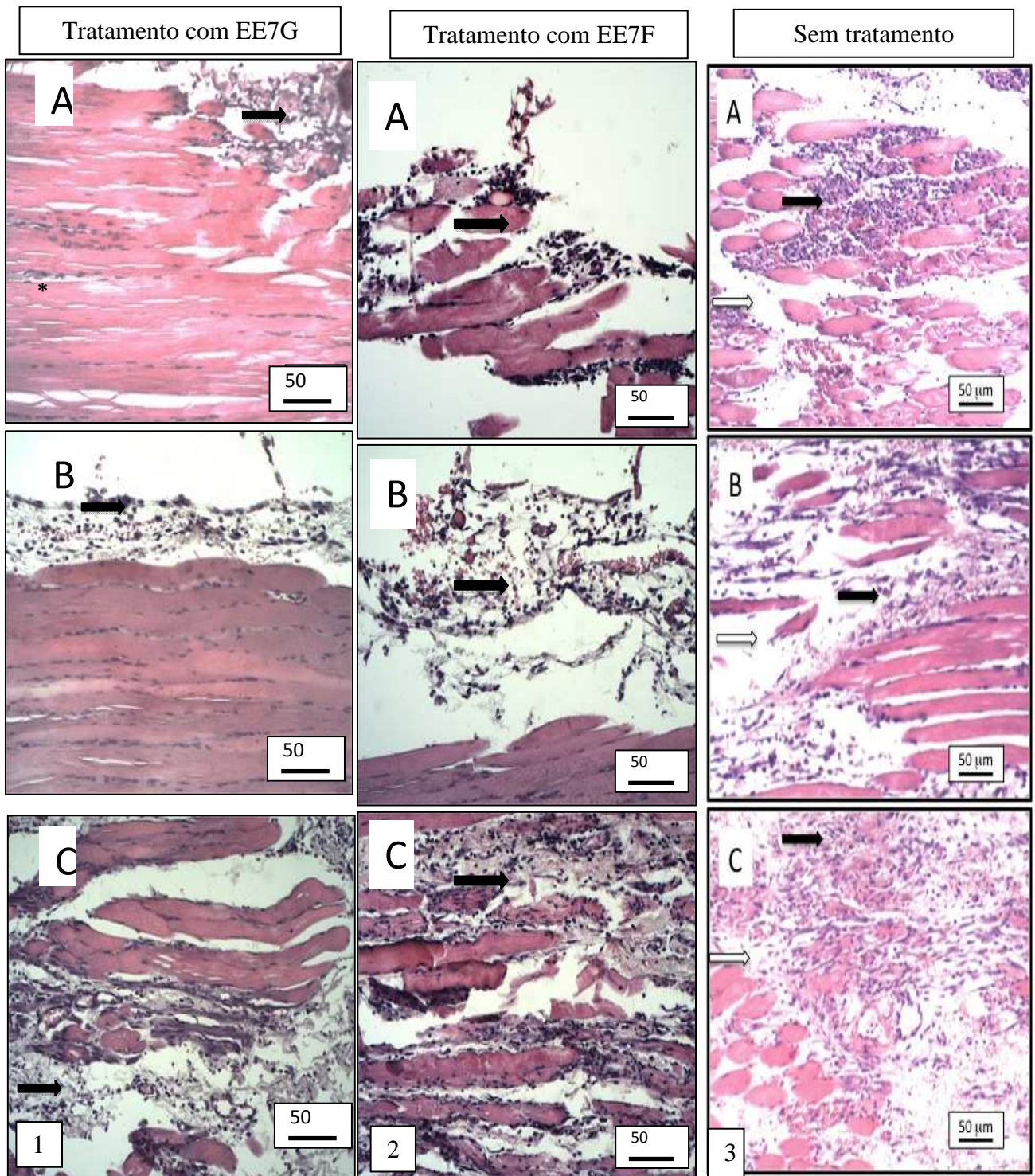


Figura 5.10 Fotomicrografias histológicas de tecido muscular da pata de rato submetido a tratamento com EE7G (1), EE7F (2) e pata controle (3) em (A) 24 h, (B) 48 h e (C) 72h.

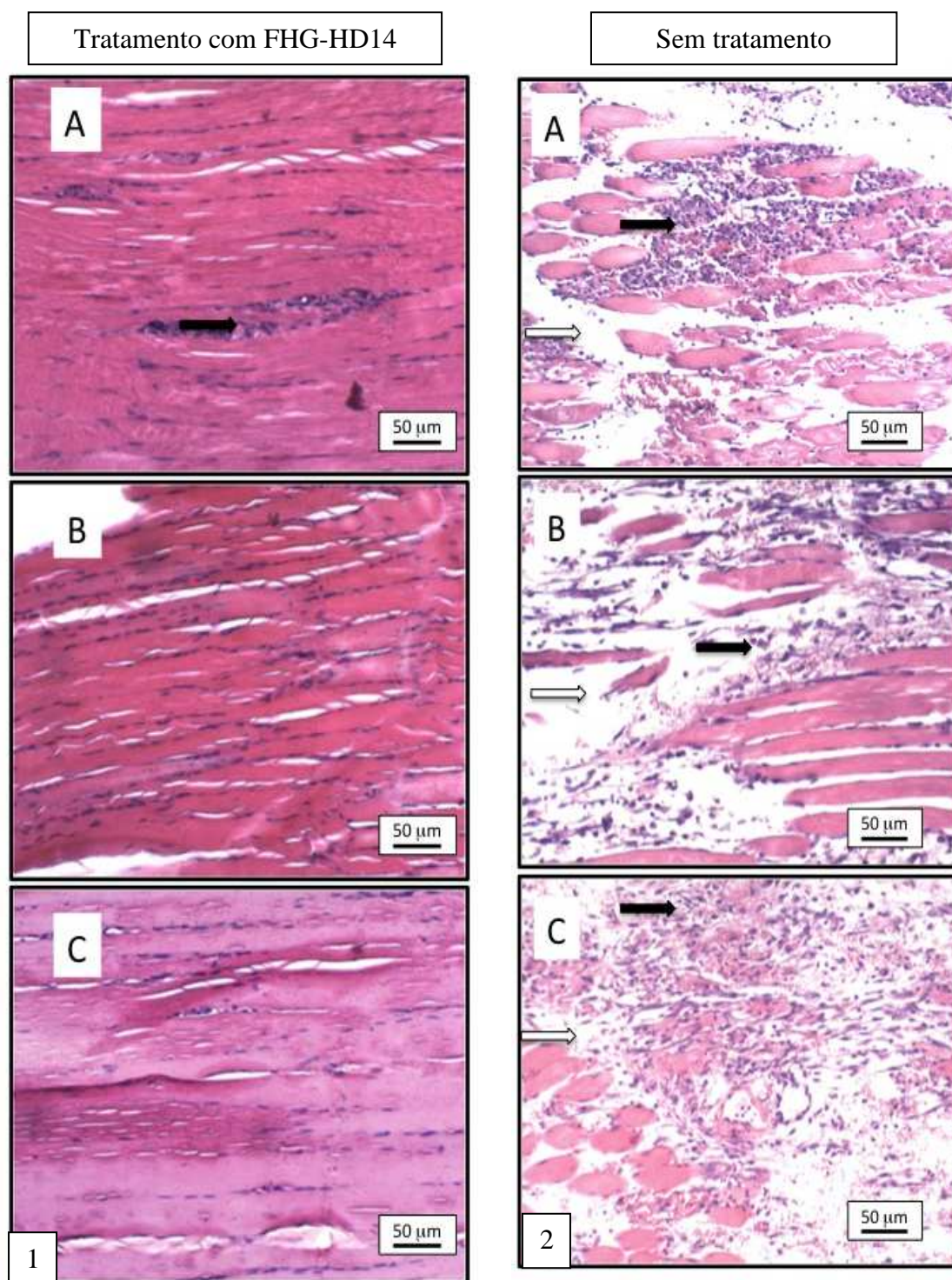


Figura 5.11 Fotomicrografias histológicas de tecido muscular da pata de rato submetido a tratamento com FHG-HD14 (1) e pata controle (2) em (A) 24 h, (B) 48 h e (C) 72 h.

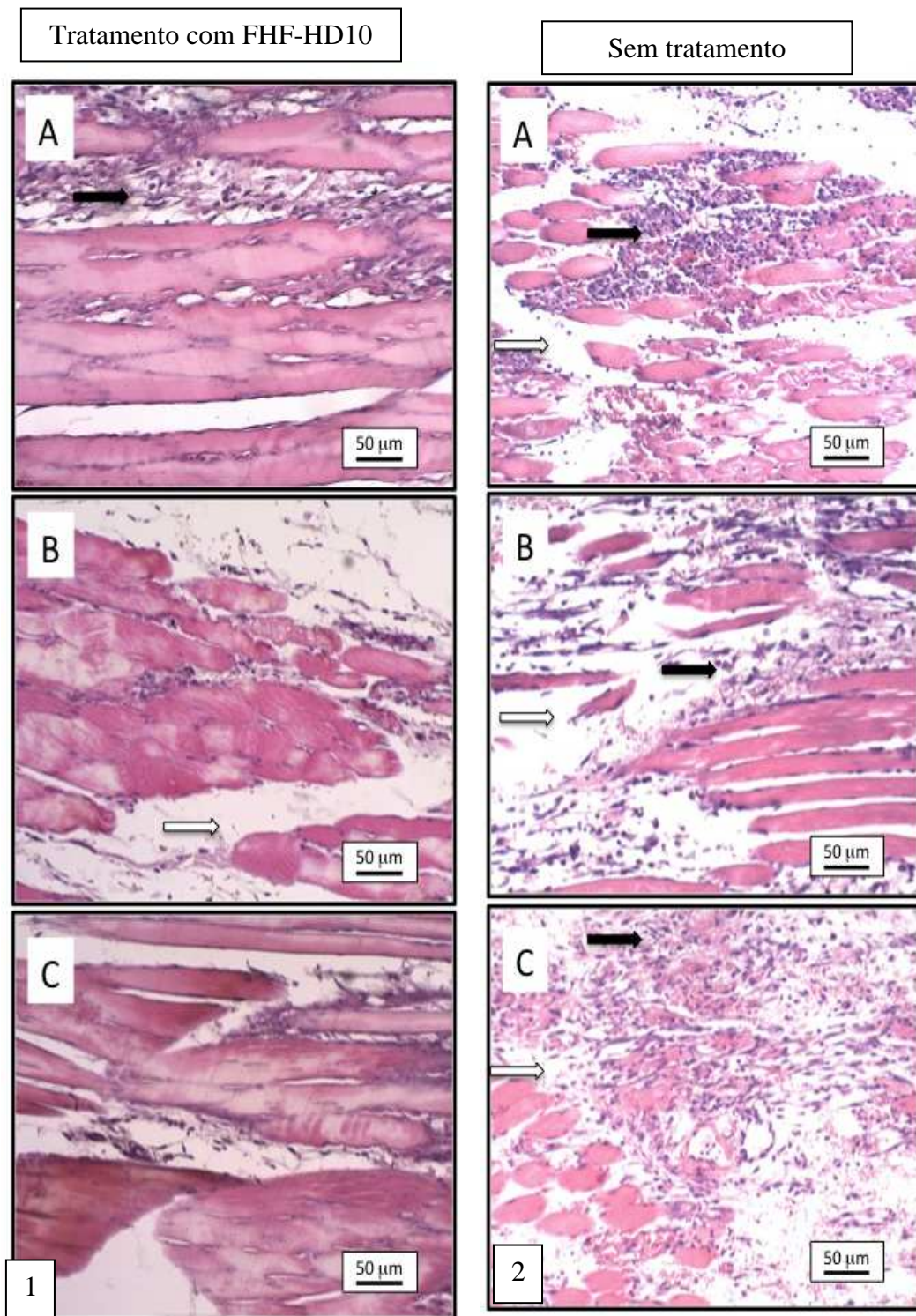


Figura 5.12 Fotomicrografias histológicas de tecido muscular da pata de rato submetido a tratamento com FHF-HD10 (1) e pata controle (2) em (A) 24 h, (B) 48 h e (C) 72 h.

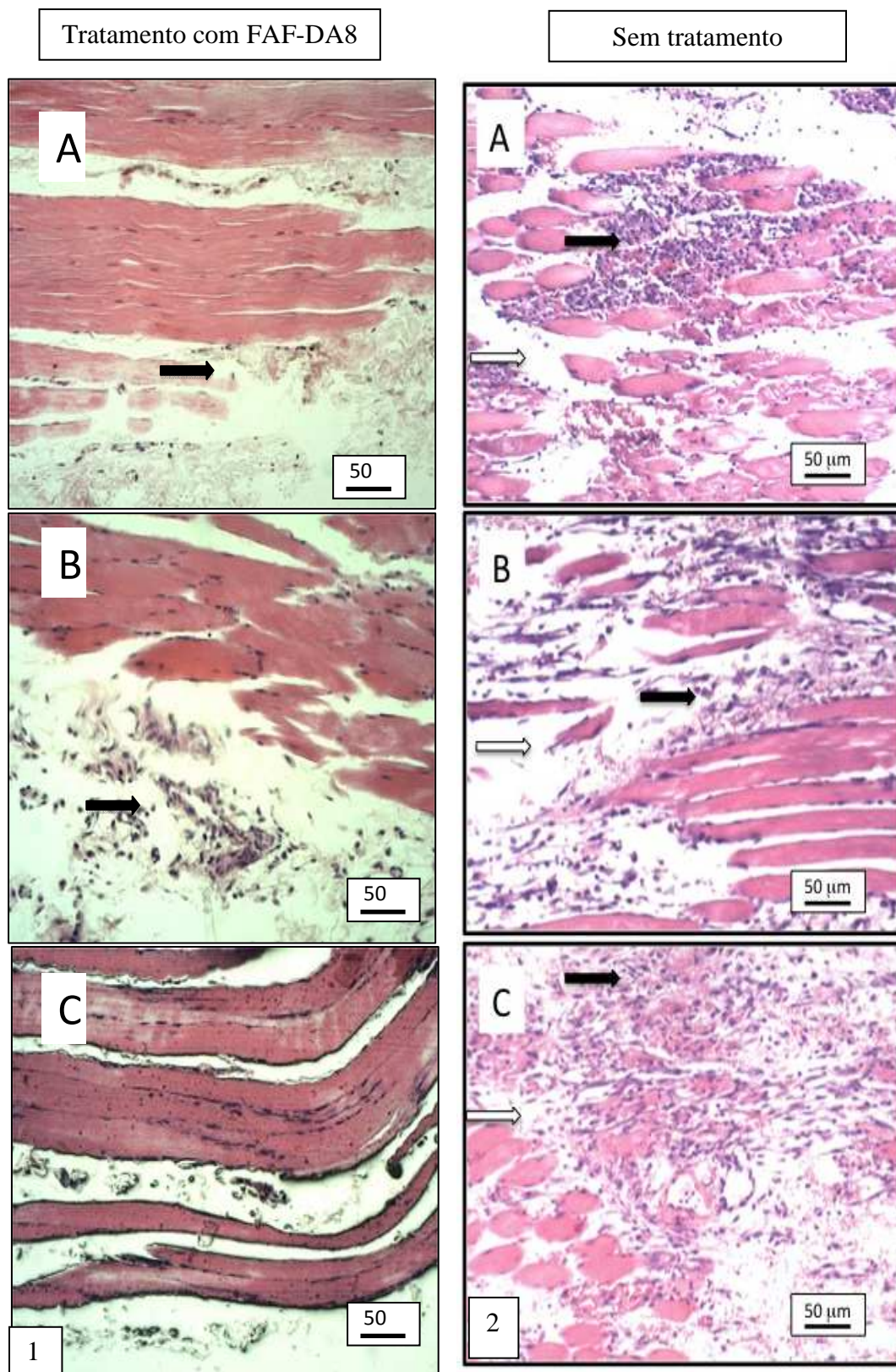


Figura 5.13 Fotomicrografias histológicas de tecido muscular da pata de rato submetido a tratamento com FAF-DA8 (1) e pata controle (2) em (A) 24 h, (B) 48 h e (C) 72 h.

A Figura 5.14 (p. 118) mostra fotomicrografias histológicas do tecido muscular das patas de ratos submetidas à lesão por impacto e tratamento com fração fenólica (FF), luteolina-5-*O*- β -rutinosídeo, luteolina-7-*O*- β -rutinosídeo, luteolina-7-*O*- β -glicosídeo e luteolina-3'-*O*- β -xilofuranose nos tempos em (A) 24 h, (B) 48 h e (C) 72 h.

Após 24 h o aspecto histológico dos músculos tratados com FF mostra a presença grave de infiltrado inflamatório, além de regiões marcadas por edema e degeneração das fibras musculares. Após 48 h de tratamento observa-se a presença moderada de infiltrado inflamatório. Porém, após 72 h de tratamento observa-se uma ligeira presença de quadro infiltrado inflamatório, mostrando que essa fração possui ação anti-inflamatória, por um mecanismo mais tardio no tratamento da inflamação.

O aspecto histológico dos músculos tratados com luteolina-5-*O*-rutinosídeo mostra presença de infiltrado inflamatório de moderado a grave, além da presença de regiões marcada por edemas e degeneração de fibras musculares em todos os tempos de tratamento, não revelando assim potencial na redução do quadro inflamatório.

Análises histológicas das patas de ratos tratadas com luteolina-7-*O*-rutinosídeo e luteolina-7-*O*-glicosídeo mostram resultados semelhantes. Durante o tratamento com esses compostos, observa-se em todos os tempos de tratamento presença de quadro inflamatório de leve a moderado, além da presença de regiões marcada por edemas. Esses compostos não apresentam também melhoras significativas do quadro inflamatório nas patas de ratos.

O aspecto histológico dos músculos tratados com luteolina-3'-*O*- β -xilofuranose mostra moderada presença de infiltrado inflamatório após 24 h. Após 48 h de tratamento ocorre significativa diminuição do quadro inflamatório. As análises mostram que após 72 h de tratamento ocorre regeneração das fibras musculares, além da ausência de edemas e redução das lesões caracterizadas pelo desaparecimento de infiltrado inflamatório. Dessa forma, estes estudos mostram ser valiosos, pois, o flavonoide puro e a fração fenólica mostraram-se eficientes na diminuição do quadro inflamatório.

De acordo com a literatura, compostos fenólicos são considerados eficientes no tratamento da inflamação (Coutinho *et al.*, 2009). Além disso, esses compostos foram obtidos das folhas de *J. acuminatissima* que é uma espécie vegetal bastante utilizada na Amazônia principalmente para tratamento de doenças que envolvem processos inflamatórios (Verdam *et al.*, 2009).

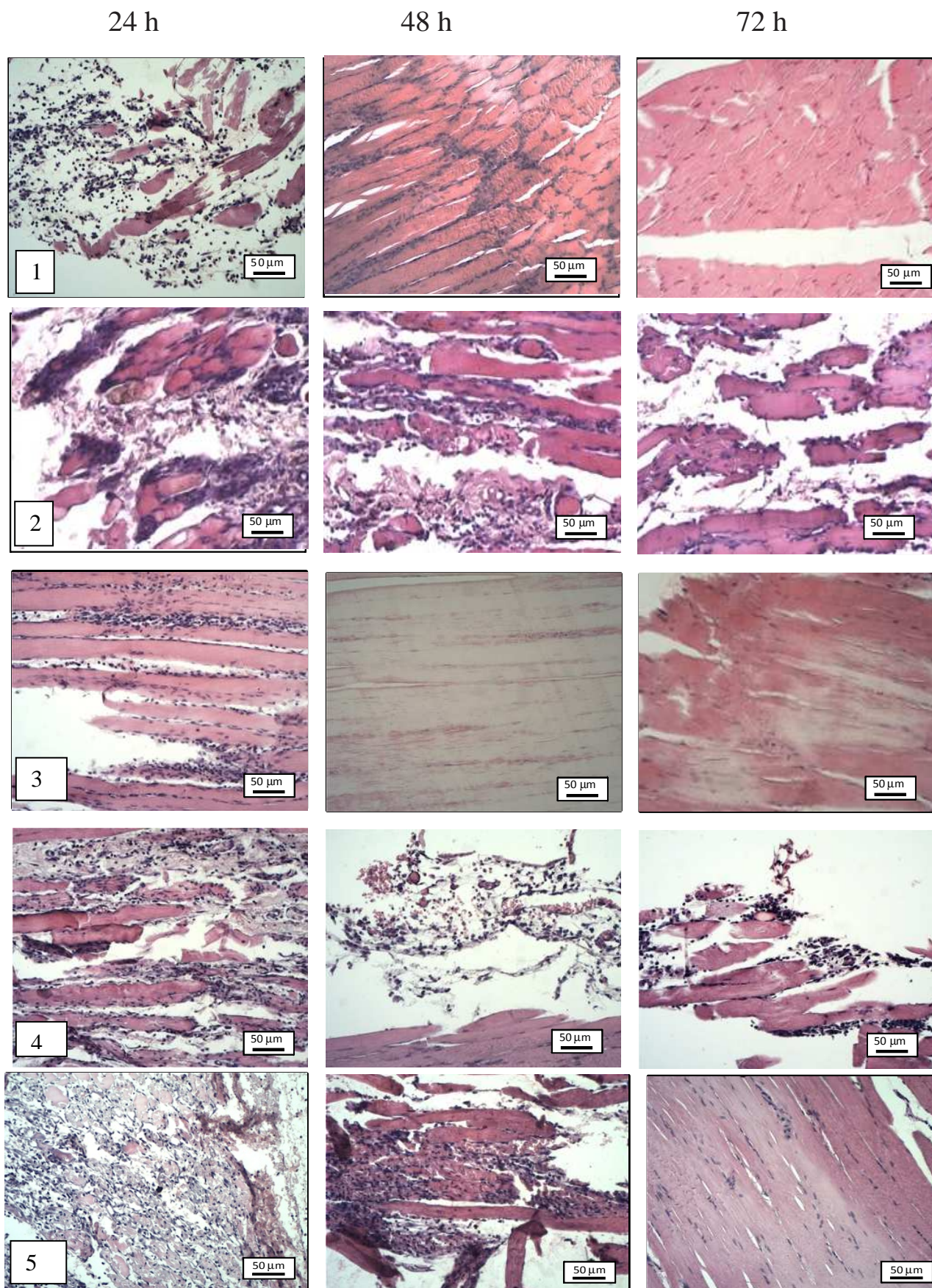


Figura 5.14 Fotomicrografias histológicas de tecido muscular da pata de rato submetido a tratamento com luteolina-7-*O*- β -rutinosídeo (1), luteolina-7-*O*- β -glicosídeo (2), luteolina-3-*O*- β -xilofuranosídeo (3), luteolina-5-*O*- β -rutinosídeo (4), FF (5) em 24 h, 48 h e 72 h.

Para as patas de ratos tratadas com dexametasona (controle positivo), patas sem tratamento e patas de ratos tratadas com as amostras obtidas de *J. acuminatissima* foram atribuídos escores para a avaliação da atividade anti-inflamatória conforme Tabela 5.2.

Tabela 5.2 Atribuição de escores para a atividade anti-inflamatória observada nas patas dos ratos tratados

Amostra	Tratamento em 24 h	Tratamento em 48 h	Tratamento em 72 h
Controle sem tratamento	3	2	1
Dexametasona (controle positivo)	1	1	0
FHF	3	1	0
FDF	1	0	0
FAF	1	1	0
FMF	2	2	0
EEF	2	3	3
EE7F	2	2	4
FHG	2	2	1
FDG	0	2	0
FAG	2	2	1
FMG	2	3	3
EEG	3	4	5
EE7G	2	2	4
β -Sitosterol e estigmasterol	2	1	0
β -Sitosterol e estigmasterol glicosilados	1	2	1
Lupeol	1	0	0
FF	5	3	1
Luteolina-5- <i>O</i> - β -rutinosideo	4	3	3
Luteolina-7- <i>O</i> - β -rutinosideo	3	3	2
Luteolina-7- <i>O</i> - β -glicosideo	3	3	2
Luteolina-3'- <i>O</i> - β -xilofuranose	3	1	0

Legenda: 0 - sem lesão; 1 – lesão branda; 2 – lesão leve a moderada; 3 – lesão moderada, 4 – lesão moderada a grave; 5 – lesão grave.

Os estudos realizados para avaliar o potencial anti-inflamatório de *J. acuminatissima* foram muito relevantes, pois, as frações obtidas do extrato bruto em etanol (FHF, FHG, FDF, FDG, FAF, FAG e FMF) e compostos purificados dessas frações (β -sitosterol e estigmasterol, β -sitosterol e estigmasterol glicosilados e lupeol), mostraram ser eficazes na redução do

quadro inflamatório de patas de ratos. Outro fato importante é a ação anti-inflamatória da fração fenólica obtida por decocção das folhas, bem como, do composto inédito luteolina-3'-*O*- β -xilofuranose isolado a partir de FF que também mostrou ação para inflamação. Esses estudos justificam o uso dessa espécie na medicina tradicional da Região Amazônica.

5.2. TESTES DE ATIVIDADE *Trypanosoma cruzi*

5.2.1. Introdução

A doença de Chagas é causada pelo *Trypanosoma cruzi* e representa um importante problema de saúde pública em regiões endêmicas. O agente causador da doença de Chagas infecta mais de 18 milhões de pessoas a cada ano na América do Sul (Morel, 2000) e resulta em mais de 50.000 mortes a cada ano (Higuchi, 1995).

As opções de tratamento são limitadas ainda, devido à toxicidade dos fármacos disponíveis, resistência do parasita e atividade de drogas ineficiente durante a fase crônica da doença (Astelbauer *et al.*, 2010). Nifurtimox e benzonidazol são usados para tratar a fase aguda da doença de Chagas, porém provocam efeitos colaterais tóxicos (Freyman *et al.*, 2000). Nifurtimox provoca anorexia, distúrbios gastrintestinais, neuropatias e erupção cutânea (Berger *et al.*, 1998).

O *T. cruzi* é um parasito dotado de grande diversidade genética. De modo geral, os clones e populações estudados têm sido diferenciados, mediante estudos de perfil molecular e isoenzimático em três grupos ou linhagens. Os grupos GI e GIII são basicamente de origem silvestre e vinculados naturalmente a marsupiais. O grupo Z2 é encontrado na América do Sul, ligado naturalmente a primatas (Miles, 1999; Zingales *et al.*, 1999; Souza, 2000).

O protozoário é digenético, polifilético e distribuído largamente na natureza. A circulação de seus espécimes ocorria primitivamente entre insetos vetores e mamíferos silvestres há 150 milhões de anos (*Triatominae, Hemiptera, Reduviidae*) (Hoare, 1972; Brener, 1979; Gonzáles & Duarte, 1994). A transmissão do *T. cruzi* por via oral (VO) tem caráter habitual em seu ciclo enzoótico primitivo, através da ingestão por mamíferos suscetíveis a vetores e reservatórios infectados. No caso do ser humano, a transmissão ocorre de maneira esporádica e circunstancial, através de alimentos contaminados com o parasita, principalmente a partir de triatomíneos ou de suas dejeções (Dias, 2000; WHO, 2002; Carlier *et al.*, 2002). A transmissão pode ocorrer também através da ingestão de carne de caça crua ou mal cozida, ingestão de alimentos contaminados por urina ou secreção anal de marsupiais infectados, por

acidentes em laboratório ou por meio de hábitos primitivos de ingestão de triatomíneos (Amado-Neto *et al.*, 1975; Deane *et al.*, 1984; Dias & Macedo, 2005; Storino & Jorg, 1994).

T. cruzi possui um ciclo de vida complexo, exibindo formas morfológicas e funcionais bastante distintas. Estas classificam-se em duas fases: epimastigotas (no inseto vetor) e amastigotas (em células de mamíferos). Além disso, são classificados em duas formas infectantes, mas não replicativas, tripomastigotas metacíclicos (no inseto vetor) e tripomastigotas na circulação sanguínea de mamíferos (Cabral *et al.*, 2010).

As plantas medicinais podem ser uma alternativa no tratamento da doença de Chagas, sendo uma fonte de novos fármacos com alta atividade e baixa toxicidade. Por exemplo, o lupeol inibe de forma significativa o crescimento de *T. cruzi* e *Leishmania* (Siddique & Saleem, 2011; Fournet *et al.*, 1992). O ácido betulínico mostra atividade tripanocida expressiva (75,4% na concentração de 500 µg/mL) (Domínguez-Carmona *et al.*, 2010; Campos *et al.*, 2005). Desta forma, extratos e frações de *J. acuminatissima* foram avaliadas contra o protozoário *T. Cruzi*.

5.2.2. Materiais e métodos

Os extratos foram testados por meio do ensaio colorimétrico (Buckner *et al.*, 1996; Oliveira *et al.*, 2006). Este ensaio utiliza uma cepa de *T. cruzi* (Tulahuen) transformada para expressar β-galactosidase, enzima que é capaz de catalisar uma reação colorimétrica quando um composto vermelho, clorofenil-β-D-galactopiranosídeo (CPRG), é utilizado como substrato.

Os ensaios foram realizados com formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* provenientes de cultura de tecido. Cerca de 4.000 células L929 por poço foram semeadas em placas de 96 poços, com incubação “overnight” em estufa a 37 °C para a adesão da célula à superfície. Após incubação, a infecção foi feita com 10 tripomastigotas provenientes de cultura de tecidos/célula. Após 2 h, o meio contendo os parasitas extracelulares foi substituído por um meio novo e a placa novamente incubada a 37 °C por 48 h. O meio de cultura foi substituído por um meio novo e por substâncias, frações e extratos naturais, conforme dispostos na Tabela 5.3 (p. 122), diluídos nas concentrações de **20 e 10 µg/mL**. Após incubação a 37 °C por 96 h, foi adicionado o substrato CPRG nos poços e a placa foi incubada a 37 °C. A leitura foi realizada após 16-20 h em espectrofotômetro, utilizando um filtro de 570 nm. Concomitantemente, foram utilizados como controles positivos células não infectadas, células infectadas não tratadas e Benzonidazol a 1 µg/mL (3,81 µM). O DMSO

diluído a uma concentração final de 1% foi utilizado como controle negativo. Os resultados foram expressos como a porcentagem de redução da absorvância das amostras dispostas nos poços em comparação com a absorvância das amostras de células infectadas não tratadas dispostas também nos poços.

5.2.3. Resultados e Discussão

A Tabela 5.3 mostra os resultados de atividade tripanocida do extrato bruto, frações e substâncias isoladas de *J. acuminatissima*. A atividade dos compostos testados sobre as formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* de cultivo celular pode ser descrita como inativa, pois houve redução mínima no crescimento do parasita. Contudo, a fração FAF pode ser considerada tóxica na concentração de 20 µg/mL. Essa fração promoveu 100% de morte das células hospedeiras do *T. cruzi*. Porém, quando testada em concentração mais baixa (10 µg/mL), não apresentou redução nas formas amastigotas e tripomastigotas, sendo, portanto, inativa.

Tabela 5.3 Atividade tripanocida de extrato, frações e substâncias isoladas de *J. acuminatissima*

Amostra	Código	Concentração (µg/mL)	% Atividade
Fração em hexano das folhas	FHF	20	10
Fração em DCM das folhas	FDF	20	7
Fração em AcOEt das folhas	FAF	20	Tóxico
		10	0
Fração em MeOH das folhas	FMF	20	3
Extrato em etanol a 70% das folhas	EE7F	20	6
Lupeol	FHG-HD14	20	0
β -sitosterol e estigmasterol glicosilados	FAF-DA8	10	13
Fração fenólica das folhas	FF	40	0
Fração alcaloídica das folhas	FAL	40	0
Fração saponínica das folhas	FS	40	0
Luteolina-3- <i>O</i> - β -xilofuranose	FF4	40	0
Luteolina-7- <i>O</i> -rutinosídeo	FF2	40	0
Benzonidazol (controle positivo)	-	1 µg/mL (3,81 µM)	78
Dimetil-sulfóxido (controle negativo)	DMSO	1%	0

Os estudos envolvendo atividade contra cepas de *T. cruzi* não evidenciaram ação para nenhuma fração e substâncias testadas. Dos compostos apolares isolados de *J.*

acuminatissima, apenas o lupeol possui relatos na literatura com atividade tripanocida (Siddique & Saleem 2011; Fournet *et al.*, 1992). Durante os ensaios realizados neste trabalho a concentração do lupeol utilizada foi menor do que a concentração utilizada nos trabalhos citados, este fato deve ser um dos fatores da inatividade do lupeol no presente trabalho. Os flavonoides testados também não mostraram atividade tripanocida. A literatura mostra que os flavonóides luteolina e vicenina-2 possuem atividade contra *T. cruzi* apenas na concentração de 500 µg/mL (Saúde-Guimarães & Faria, 2007), neste trabalho os derivados de luteolina foram testados na concentração de 40 µg/mL.

5.3. Teste de atividade antimicrobiana

5.3.1. Introdução

A ocorrência de patógenos resistentes é um fator a ser considerado na busca de novos compostos antimicrobianos (Catão *et al.*, 2005). O aparecimento de resistência é causado principalmente pelo uso crescente e inadequado de antimicrobianos, procedimentos invasivos, grande número de hospedeiros susceptíveis e falhas terapêuticas, ocasionando aumento da transmissão de organismos multirresistentes. Muitas cepas são resistentes a compostos antimicrobianos (Catão *et al.*, 2005).

Metabólitos secundários produzidos por plantas constituem-se em uma importante fonte de substâncias bioativas (Mbosso *et al.*, 2010). Plantas superiores apresentam amplo espectro de atividade e inibição comprovada contra bactérias e fungos (Duarte *et al.*, 2004). Essas propriedades terapêuticas são atribuídas a produtos do metabolismo secundário, como terpenóides e compostos fenólicos (Adam *et al.*, 1998). Extratos e óleos de várias espécies vegetais mostraram-se eficientes no controle de fungos relacionados a infecções da pele, bactérias patogênicas bucais e uma variedade de bactérias *Gram*-negativas e *Gram*-positivas (Duarte *et al.*, 2004). Dentre as espécies de *Justicia*, *J. pectoralis* apresenta atividade antibacteriana, especialmente para *Escherichia Coli*, *Staphylococcus Epidermidis* e *Enterococcus Faecalis* (Lizcano *et al.*, 2010; Ssegawa & Kasenene, 2007).

5.3.2 Materiais e métodos

As cepas das bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*) e do fungo *Candida albicans* foram incubadas por 24 h a 37 °C em meio BHI. A turbidez foi ajustada com auxílio de um espectrofotômetro modelo SP – 22, marca BIOSPECTRO, sendo adicionada água estéril para realizar leitura entre 75% e 76% de transmitância em comprimento de onda fixo de 530 nm.

Para avaliar as atividades antibacterianas e antifúngicas do extrato bruto, frações e substâncias obtidas de *J. acuminatissima* foram usadas cepas da coleção do Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios de Bactérias da UFMG.

Foram usadas microplacas constituídas por 96 poços (8 linhas e 12 colunas). As microplacas foram preparadas a partir da adição de 100 µL da amostra nos poços e 100 µL do inóculo do micro-organismo ou da suspensão de esporos. Para o controle dos extratos foram adicionados 100 µL da solução da amostra nos poços e 100 µL de água destilada estéril. Para o controle dos micro-organismos foram adicionados 100 µL do meio de cultura BHI e 100 µL do inóculo do micro-organismo ou da suspensão de esporos. Para o controle da esterilidade do meio de cultura foram adicionados 100 µL do meio de cultura BHI e 100 µL de água destilada estéril.

A disposição das amostras na microplaca foi realizada como mostrada na Figura 5.15. Os ensaios antibacterianos e antifúngicos foram realizados a uma concentração fixa de 250 µg/mL.

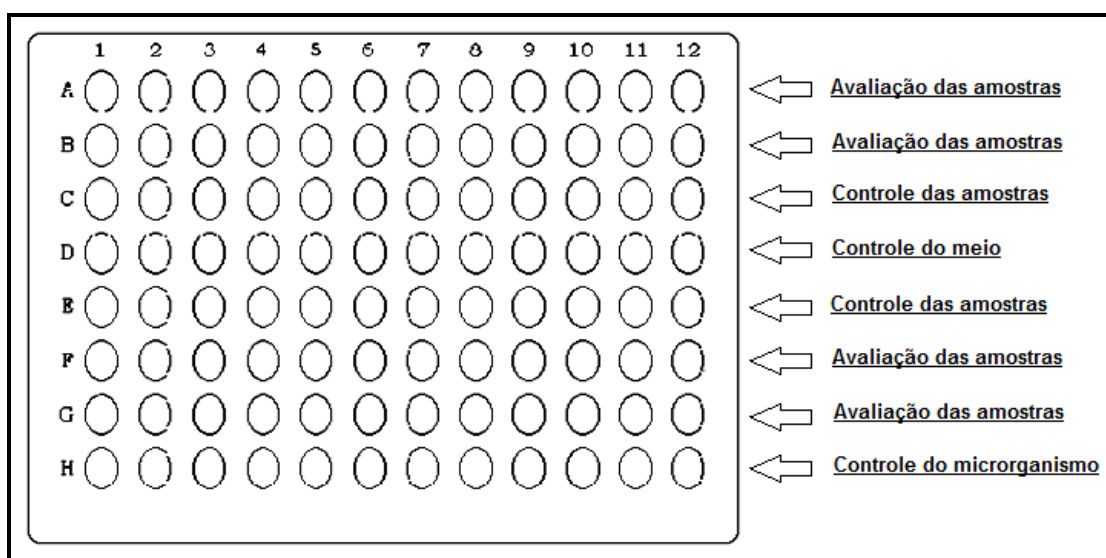


Figura 5.15 Exemplo de microplaca do ensaio antibacteriano e antifúngico.

As microplacas preparadas foram incubadas em estufa Quimis Q-316.12, série 807.131, a 37 °C durante 48 h. As leituras foram realizadas em aparelho ELISA (Thermoplate, modelo: TP-READER), em comprimento de onda fixo de 492 nm, com 24 e 48 h para os testes antibacterianos e para o fungo *Candida albicans*.

5.3.3. Resultados e Discussão

A Tabela 5.4 mostra os valores de inibição em percentagem das amostras testadas na concentração de 250 µg/mL de *J. acuminatissima* frente a bactérias e fungo. As amostras FDF, FAF e EEF apresentam inibição no crescimento das bactérias *Gram*-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*), *Gram*-negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*) e do fungo *Candida albicans*.

Tabela 5.4. Screening da atividade antimicrobiana de extratos, frações e fitoconstituintes de *J. acuminatissima*

Micro-organismo	% inibição a 250 µg/mL							
	Amostra							
	FHF	FDF	FAF	EEF	EE7F	FMG	FAF-DA8	FHG-HD14
<i>C. albicans</i> (ATCC 18804)	7,8±2,5	94,4±1,6	42,0±2,5	*ND	6,4±1,5	3,98±0,3	16,5±1,0	3,5±1,0
<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)	0	65,4±3,0	38,5±,9	57,7±1,2	0	14,4±2,5	5,3±1,4	9,5±2,7
<i>B. cereus</i> (ATCC 11779)	0	76,0±1,3	41,8±1,0	55,0±1,1	0	2,2±0,7	10,0±1,1	0
<i>S. typhimurium</i> (ATCC 14028)	0	75,2±0,5	45,0±1,2	63,3±0,5	0	1,2±0,2	3,7±0,5	4,6±1,5
<i>E. coli</i> (ATCC 25723)	0	61,0±1,2	39,5±1,2	67,5±0,5	0	0	4,5±2,6	5,7±,6

FHF = Fração em hexano das folhas, FDF = Fração em diclorometano das folhas, FAF = Fração em acetato de etila das folhas, EEF = Extrato em etanol das folhas, EE7F = extrato em etanol a 70% das folhas, FMG = Fração em metanol dos galhos, FAF-DA8 = mistura de sitosterol e estigmasterol glicosilado, FHG-HD14 = lupeol.

As amostras FDF e EEF apresentam maiores percentagens de inibição de crescimento para todos os micro-organismos testados. FDF apresentou inibição que varia entre 61% e 76% para bactérias e de 94% de inibição ao crescimento do fungo *C. albicans*, enquanto EEF mostrou variação de 55% a 67% de inibição para bactérias, seguido por FAF, que variou de 38% a 45% de inibição para crescimento de bactérias e 42% para o fungo. As demais amostras podem ser consideradas inativas, uma vez que, na concentração testada de 250 µg/mL, apresentam baixas percentagens de inibição para o crescimento dos micro-organismos avaliados.

A partir da fração FDF foram isolados compostos da classe de esteroides e triterpenos. Os ensaios de prospecção fitoquímica detectaram essas mesmas classes de compostos em EEF. Esses compostos são conhecidos por possuírem potencial antimicrobiano (Popova *et al.*, 2009; Fontanay *et al.*, 2008; Mathabe *et al.*, 2008; Katerere *et al.*, 2003). Para a fração FAF, além dessas classes, foi observada a presença de compostos fenólicos e saponinas, substâncias que possuem também atividade antimicrobiana (Sun *et al.*, 2010). A literatura relata que a espécie *J. pectoralis* apresenta atividade antibacteriana para cepas de *E. coli*, *S. epidermidis* e *E. faecalis* (Chariandy *et al.*, 1999).

Capítulo 6 – Análises de metais

6.1 Introdução

Assim como as proteínas, gorduras, carboidratos e vitaminas, os minerais são um grupo de nutrientes necessários à saúde humana. Os minerais, como também as vitaminas, não podem ser sintetizados pelo organismo e, por isso, devem ser assimilados através da alimentação. Não fornecem calorias, mas desempenham diversas funções essenciais no organismo (Barroso *et al.*, 2009).

Os minerais são constituintes estruturais dos tecidos corpóreos. Por exemplo, o cálcio e o fósforo formam os ossos e dentes, são reguladores orgânicos que controlam os impulsos nervosos, a atividade muscular, o balanço ácido-base do organismo e são componentes ou ativadores/reguladores de muitas enzimas (Frieden, 1984).

Cada mineral é requerido em quantidades específicas, em uma faixa que varia de microgramas a gramas por dia. Os elementos essenciais ao ser humano são agrupados em elementos macronutrientes, necessários em quantidades superiores a 100 mg ao dia, destacando-se cálcio, fósforo, sódio, potássio, cloro, magnésio e enxofre. Os elementos micronutrientes são necessários em pequenas quantidades ao dia (de miligramas a microgramas) como ferro, cobre, cobalto, zinco, manganês, iodo, molibdênio, selênio, flúor e cromo. Há ainda outros minerais que são tóxicos como chumbo, cádmio, mercúrio, arsênio e bário (Barroso *et al.*, 2009).

A Tabela 6.1 (p. 129) apresenta a quantidade necessária de elementos micronutrientes que devem ser ingeridos diariamente (Frieden, 1984). As Tabelas 6.2 e 6.3 (p. 130 e 131, respectivamente) mostram algumas funções biológicas de alguns elementos micronutrientes e efeitos que podem ocorrer com a sua falta ou excesso, respectivamente.

O excesso na ingestão de um elemento micronutriente ou macronutriente pode acarretar prejuízos na absorção e utilização de outro. Por exemplo, a absorção de zinco pode ser afetada por suplementação de ferro, enquanto que a ingestão de zinco em excesso pode reduzir a absorção de cobre (Barroso *et al.*, 2009).

Os metais potássio, sódio, fósforo, cálcio e magnésio são indispensáveis ao ser humano. Outros como cobre, zinco são considerados também indispensáveis, porém possuem limites aceitáveis de consumo, podendo ser tóxicos quando em níveis elevados (Kimura & Itakawa, 1990; Slupski, 2005).

Tabela 6.1 Quantidade diária de elementos micronutrientes recomendados para adultos

Elemento micronutriente	Quantidade (mg/dia) (Haase, 2008)
Ferro	18 (mulher)
	10 (homem)
Zinco	15
Manganês	2,5-5,0
Flúor	1,5-4,0
Cobre	2,0-3,0
Níquel	0,17-0,70
Molibdênio	0,15-0,50
Cromo	0,05-0,20
Selênio	0,05-0,50
Iodo	0,15

A pesquisa sistemática dos elementos nutrientes biológicos iniciou-se em 1869 com a descoberta por J. Raulin da essencialidade do zinco para o crescimento de uma espécie de fungo “*Aspergillus niger*”. Raulin mostrou que a espécie de *A. niger* crescia somente se quantidades de zinco fossem adicionadas ao meio de cultura (Haase, 2008).

Um elemento é dito essencial quando sua falta ao corpo humano produz um mau funcionamento do organismo. Há também elementos que favorecem as reações biológicas embora sua carência ou deficiência não cause efeitos drásticos como acontece com os elementos essenciais. Um elemento essencial pode ser tóxico em determinadas condições, especialmente quando está em concentração elevada. Além disso, existem elementos que, mesmo em baixas concentrações, são considerados também tóxicos para os organismos vivos (Haase, 2008).

Tabela 6.2 Principais funções dos elementos micronutrientes nos seres humanos

Elemento micronutriente	Deficiência	Excesso	Função	Referência
Cobalto	Anemia macrocítica ou perniciosa	Superprodução de eritrócitos, hiperplasia da medula óssea, reticulocitose e aumento do volume sanguíneo	Constituinte da cianocobalamina (vitamina B12), essencial para a função normal de todas as células	Harper, 1982; Frausto, 1991
Cobre	Formação de colágeno	Doença de Wilson	Necessária para o transporte de elétrons durante a respiração aeróbica, lisil oxidase que catalisa a formação do colágeno e elastina e ceruloplasmina, que é essencial para absorção e transporte de ferro	McDowell, 1992
Cromo	Intolerância à glicose, crescimento desordenado, neuropatia periférica, balanço nitrogenado negativo e redução do quociente respiratório	Tóxico como cromato, câncer de pulmão e dermatite de contato, principalmente no homem	Associado ao metabolismo da glicose	McDowell, 1992
Ferro	Anemia ferropriva e perdas sanguíneas não habituais	Lesão tecidual, ulceração de mucosas, acidose metabólica, dano hepático e alveolar e insuficiência renal (doses de 3 a 10 g/dia)	Componente da hemoglobina e mioglobina, importante na transferência de O ₂	Frausto, 1991
Manganês	Esterilidade, anomalias esqueléticas e ataxia de prole de mães deficientes	Sintomas semelhantes às doenças de Parkinson e Wilson	Ativador de diversas enzimas	Harper, 1982;
Molibdênio	Problemas no crescimento	Anemia e desinteria	Inferência na absorção de Cu ²⁺	Frausto, 1991
Zinco	Alterações na gustação, diarreia, depressão mental, paranóias, dermatites oral e perioral e alopecia	Irritação gastrointestinal ou vômitos e deficiência de cobre	Constituinte de diversas enzimas e insulina, importante no metabolismo dos ácidos nucléicos.	McDowell, 1992

Tabela 6.3 Principais funções dos elementos macronutrientes

Elemento macronutriente	Deficiência	Excesso	Função	Referência
Cálcio	Raquitismo, osteoporose, escorbuto e tetania	Hipercalcemia e calcificação intensa nos tecidos delicados (rins e pulmões)	Crescimento, lactação, construção e manutenção dos ossos e dentes, formação do coágulo, transporte nas membranas celulares, transmissão nervosa e regulação dos batimentos cardíacos	Harper, 1982
Magnésio	Anorexia, falta de crescimento, tetania, alterações eletrocardiográficas e neuromusculares	-	Síntese protéica, contratilidade muscular e excitação dos nervos	Frausto, 1991
Potássio	Fraqueza muscular, apatia mental e insuficiência cardíaca	Confusão mental, dormência nas extremidades, respiração fraca e enfraquecimento da ação cardíaca	Manutenção do equilíbrio hídrico normal, equilíbrio osmótico e equilíbrio ácido-básico normais, regulação da atividade neuromuscular e crescimento celular	Frausto, 1991
Sódio	Não há normalmente	Hipertensão arterial	Regulação do fluído extracelular e do volume plasmático, condução do impulso nervoso e controle da contração muscular	Harper, 1982
Fósforo	Manifestações neuromusculares, esqueléticas, hematológicas e renais	hemacromatoses	Atua no sistema de tampão, faz parte da estrutura das membranas celulares e componente essencial dos ácidos nucléicos	Frausto, 1991

Existem cada vez mais indícios de que a suplementação com minerais pode ajudar a prevenir várias formas de câncer, doenças cardíacas e alguns outros processos degenerativos (Hendler, 1994)

Alguns elementos, incluindo cobre, zinco, manganês, ferro e molibdênio, são essenciais para o crescimento das plantas. Exceção do boro, pois este elemento é considerado tóxico para plantas em altas concentrações. Outros elementos como cobalto e selênio não são considerados essenciais para as plantas, mas, sim, para o ser humano. Enquanto que outros elementos como cádmio, chumbo, cromo, níquel, mercúrio e arsênio têm efeitos tóxicos quando encontrados livres no organismo e, normalmente, são considerados como

contaminantes. A grande quantidade desses elementos encontrados nas plantas é devida à contaminação do solo pela própria atividade

humana. Os solos são contaminados constantemente por metais pesados e elementos tóxicos através de fertilizantes agrotóxicos, causando assim contaminação em grande escala. Um exemplo é a concentração de cobre e zinco em solos de produção de frutas cítricas e outras colheitas (Zhenli *et al.*, 2005).

O conteúdo mineral dos tecidos vegetais pode ser afetado por vários fatores ambientais e práticas agronômicas, incluindo a localização geográfica das plantas, composição do solo, fontes de água, irrigação e utilização de componentes fertilizantes (Yada *et al.*, 2011).

O conteúdo mineral pode ser influenciado pelas características de uma espécie vegetal e pela distribuição em certos tecidos para o papel fisiológico da parte da planta. Os minerais mais abundantes encontrados em plantas são potássio, cálcio, magnésio, ferro, fósforo, enxofre e nitrogênio (Yada *et al.*, 2011)

As plantas requerem uma quantidade adequada de elementos para as suas funções biológicas e fisiológicas. A deficiência ocorre quando as plantas não conseguem absorver quantidades suficientes desses elementos no solo e, conseqüentemente, causa a formação anormal de pigmentação, tamanho, má formação dos tecidos da planta e redução na taxa de realização da fotossíntese das folhas (Zhenli *et al.*, 2005).

A análise química de plantas tem servido de instrumento para a divulgação de tecnologias que visam à produção econômica de culturas. No Brasil, embora essa prática seja bem mais antiga, é crescente o seu interesse. Dois fatores têm contribuído para isso: o desenvolvimento de equipamentos para análise e o conhecimento acumulado sobre o assunto. A análise química tem múltiplos objetivos, principalmente diagnosticar ou confirmar sintomas de deficiência de elementos nutrientes e avaliar o estado nutricional de uma planta ou cultura (Boaretto *et al.*, 2003).

A legislação brasileira segue a Resolução RDC nº 24, de 15 de fevereiro de 2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Suplementos vitamínicos e de minerais para fins deste regulamento, denominados simplesmente de "suplementos", servem para complementar com estes nutrientes a dieta diária de uma pessoa saudável. Isto se dá em casos onde sua ingestão a partir da alimentação seja insuficiente ou quando a dieta requerer suplementação. Devem conter um mínimo de 25% e no máximo até 100% da Ingestão Diária Recomendada

(IDR) de vitaminas e ou minerais, na porção diária indicada pelo fabricante, não podendo substituir os alimentos e nem serem considerados como dieta exclusiva.

O consumo de plantas medicinais como medicamento tem sido aplicado largamente em comunidades e indústrias farmacêuticas. Esse tipo de terapia aumentou o consumo de produtos naturais, principalmente nos países em desenvolvimento. Porém, a contaminação das plantas medicinais pelo solo, água, atmosfera, pesticidas, metais pesados e aflatoxinas é um problema crescente que pode acarretar danos à saúde devidos ao consumo dessas plantas (Abou-Arab, 1999).

As plantas medicinais têm um importante papel para a medicina tradicional e o aumento do uso das plantas nas últimas décadas contribuiu para a administração de minerais essenciais e não essenciais a crianças, jovens e adultos, sendo, portanto, importante avaliar o conteúdo dos metais nas espécies vegetais (Ajasa *et al.*, 2004).

Elementos nutrientes têm um papel tanto curativo como preventivo no combate a doenças, despertando o interesse para se estabelecer o nível dos elementos metálicos nas plantas, ainda mais que em níveis elevados os metais podem ser perigosos e tóxicos (Schumacker *et al.*, 1991; Somers, 1983). A organização Mundial de Saúde (WHO, 1992) enfatiza a necessidade de assegurar o controle de qualidade das plantas medicinais utilizando técnicas modernas e aplicando padrões adequados. Esse controle analítico pode garantir especialmente para as plantas medicinais a pureza, segurança e eficácia do produto.

Numerosos processos são afetados ou regulados pelos elementos nutrientes. Embora os níveis de macronutrientes requeridos sejam fixos, eles podem variar, dependendo de muitos fatores, como a espécie da planta, genótipo, condições de crescimento, diferentes órgãos e tecidos (Razić *et al.*, 2005).

A técnica de espectrometria de absorção atômica (EAA) é aplicada largamente para a determinação de metais em materiais de origem natural (Wieteska *et al.*, 1996).

Para a segurança do consumo de *J. acuminatissima* como fitoterápico é importante a avaliação da concentração de elementos presentes na planta. Neste trabalho realizaram-se as análises de minerais (P, K, Ca, Mg, B, Fe, Zn, Co e Mn) presentes nas folhas, flores e galhos finos.

6.2 Materiais e métodos

As análises dos elementos micronutrientes (Fe, Co, Mn e Zn) e macronutrientes (K, Ca, Mg, B e P) foram realizadas empregando-se o fotômetro de chama do modelo Analyser 910 e o espectrômetro de absorção atômica (EAA) modelo SpectrAA-50B, equipado com duas posições para lâmpadas de catodo oco de seleção manual e queimador (ar/acetileno ou óxido nitroso/acetileno).

O material botânico de *J. acuminatissima* coletado com o auxílio de um facão de aço inoxidável foi separado previamente em folhas, flores galhos. Posteriormente, as amostras foram colocadas em estufa a uma temperatura de 60 °C e pesadas em intervalos de 20 min, para se determinar o teor de umidade.

As amostras (folhas, galhos e flores) foram lavadas inicialmente com água corrente para remoção de limo e líquens e de impurezas que poderiam mascarar os resultados. Em seguida, as amostras foram lavadas com água Milli-Q. Após a lavagem das amostras, estas foram mantidas em estufa a 60 °C durante nove dias, para a remoção de toda a água contida nos tecidos celulares.

O material seco das folhas, flores e galhos finos foi moído em um moinho de quatro facas de aço inoxidável para evitar contaminação com metal. Em seguida, o material moído foi colocado em vidro desmineralizado e com tampas plásticas.

Para a desmineralização das vidrarias, as mesmas foram imersas por 24 h em solução de ácido nítrico a 20%. Em seguida as vidrarias foram lavadas com água Milli-Q, e, posteriormente, foi realizada a secagem do material em estufa.

Para a abertura das amostras, uma quantidade de 0,5 g de amostra (folhas, flores e galhos) foi transferida para cadinhos de porcelana e incineradas em forno de mufla a 550 °C durante 6 h. Em seguida, as cinzas obtidas foram dissolvidas em 10 mL de solução de HCl 0,1 mol/L e homogeneizadas. Após retirada de 2,0 mL da solução para a análise de boro, completou-se o volume com água destilada até 50 mL, sendo esse material reservado para determinação dos demais elementos, denominado de amostra 1. As análises realizadas seguiram metodologia estabelecida pela Embrapa (1999).

Os teores de boro e fósforo foram determinados em fotômetro de chama.

Para a análise do boro, uma solução de azometina H 0,45% foi adicionada aos 2,0 mL retirados da solução inicial, com acréscimo de solução tampão e posterior leitura em 420 nm.

Para a quantificação da concentração de fósforo, uma alíquota (5 mL) de solução sulfomolibdica (solução aquosa de ácido ascórbico 1% e 20 g de molibdato de amônio) foi

adicionada à amostra 1. Após a fixação da cor, fez-se leitura em espectrofotômetro em 660 nm.

As análises de cálcio, magnésio, potássio, ferro, zinco, cobalto e manganês foram realizadas empregando-se espectrofotometria de absorção atômica. O aparelho foi calibrado em condições específicas de comprimento de onda, bem como utilizaram-se lâmpadas específicas para cada elemento avaliado.

Curvas analíticas foram preparadas com cinco pontos cada, porém em concentrações diferentes de acordo com o elemento a ser analisado. Os resultados obtidos para cálcio, magnésio, potássio, fósforo, zinco, cobre, ferro, manganês e boro foram expressos em mg/1000 g.

6.3 Resultados e Discussão

Os valores de concentração dos elementos macronutrientes presentes na matéria bruta (folhas, galhos e flores) de *J. acuminatissima* são mostrados na Tabela 6.4.

Tabela 6.4 Concentração de elementos macronutrientes presentes nas amostras de *J. acuminatissima*

Parte da planta	Concentração (mg.kg ⁻¹)				
	P	K	Ca	Mg	B
Galhos	188,2±2,6	194,2±3,1	880,0±35	114,0±4,9	132,9±5,2
Flores	500,6±10,9	103,9±1,0	111,0±3	18,6±0,2	166,9±1,9
Folhas	139,8±3,3	134,3±2,1	127,0±3	18,8±0,3	163,4±4,6

Os resultados obtidos indicam que os elementos macronutrientes detectados estão em níveis aceitáveis para o consumo humano. A espécie em estudo apresentou quantidades razoáveis de elementos macronutrientes para as folhas e galhos. Contudo, ocorre um acúmulo excessivo de cálcio, potássio e magnésio nos galhos quando comparado com as folhas e flores. O cálcio possui um acúmulo sete vezes maior nos galhos comparado aos resultados das flores e folhas. Para o magnésio, foi detectado um acúmulo seis vezes maior nos galhos

em relação às folhas e flores. Valores de concentração de cálcio, magnésio e potássio nas folhas são muito semelhantes aos determinados nas flores. Os elementos boro e fósforo apresentam concentrações muito semelhantes em todas as partes da planta.

Os valores de concentração dos elementos micronutrientes presentes nas amostras (folhas, galhos e flores) de *J. acuminatissima* estão dispostos na Tabela 6.5.

Tabela 6.5 Concentração de elementos micronutrientes presentes na matéria bruta de *J. acuminatissima*

Parte da planta	Concentração (mg.kg ⁻¹)			
	Fe	Zn	Co	Mn
Galhos	25,83±0,18	64,05±1,31	5,91±0,18	7,83±0,65
Flores	34,41±2,20	202,08±1,82	9,46±0,36	55,65±0,74
Folhas	8,61±0,15	6,31±1,12	2,36±0,05	29,56±0,42

Nas análises dos elementos micronutrientes, é necessário que os valores de concentração estejam dentro da faixa tolerável de ingestão diária, para que não apresentem risco a saúde humana (Frieden, 1984).

Em relação aos resultados dos elementos micronutrientes avaliados nas amostras, as flores de *J. acuminatissima* possuem um maior acúmulo de todos os elementos pesquisados (Fe, Zn, Co e Mn), sendo a maior diferença para o zinco (202,08 mg/kg) quando comparado com as folhas e galhos (6,31 e 64,05 mg/kg respectivamente).

O ferro, zinco e cobalto estão presentes nos galhos em maior concentração em comparação com as folhas. Apenas o elemento manganês (29,56 mg/kg) possui concentração superior nas folhas em relação ao galhos (7,83 mg/kg), porém menos concentrado em relação às flores (55,65 mg/kg).

Os valores obtidos desses nutrientes para as folhas e galhos (partes utilizadas na medicina popular) possuem níveis aceitáveis de consumo. O consumo diário de ferro permitido é de 10 mg e 18 mg para homens e mulheres, respectivamente (Frieden, 1984). Os valores para esta espécie vegetal encontram-se abaixo do nível permitido. As concentrações dos elementos micronutrientes não excedem, de qualquer forma, os limites toleráveis de consumo diário.

Em resumo, assim como para os elementos macronutrientes, os resultados obtidos para os elementos micronutrientes indicam níveis de concentração aceitáveis para o consumo humano. Estes estudos mostram grande variação da concentração dos elementos pesquisados nas diferentes partes da planta, porém esta informação está de acordo com os trabalhos registrados na literatura, uma vez que, as quantidades de elementos macro e micronutrientes são acumuladas em concentrações diferentes nos órgãos das espécies vegetais (Arceusz et al., 2010; Dushenkov et al., 1995; Ajasa et al., 2004). Essas análises são importantes, devido ao fato desta espécie ser consumida cotidianamente pela população da Amazônia, dessa forma, este trabalho foi realizado com a finalidade de verificar se os níveis de concentração desses elementos estão dentro da faixa de ingestão diária, contribuindo assim com valiosas informações para esta espécie medicinal.

CONCLUSÕES

No presente trabalho foi investigado o perfil químico e as atividades farmacológicas de *J. acuminatissima*. Análises farmacognósticas indicam que as frações obtidas das folhas e galhos mostram similaridades em seus constituintes químicos. Os estudos fitoquímicos realizados com folhas e galhos de *J. acuminatissima* resultaram na identificação de 22 compostos. Para as frações em hexano, diclorometano e acetato de etila foram detectados principalmente esteroides e triterpenos. O estudo dessas frações proporcionou o isolamento dos esteroides β -sitosterol e estigmasterol, além da mistura de β -sitosterol e estigmasterol glicosilados. Os triterpenos lupeol, friedelina, friedelinol, ácido betulínico, betulina, α -amirina, β -amirina, lupeol acilado e eritrodiool foram obtidos também dessas frações.

A partir da fração em acetato de etila das folhas foram obtidos também o ácido-*p*-hidroxibenzóico e o alcaloide inédito 3-etil-8-oxa-3-azabicyclo[3,2,1]octano-1,6,7-triol. Estudos com a fração em metanol das folhas resultaram no isolamento dos açúcares α -glicose e β -glicose em mistura, além da sacarose.

Os ensaios de prospecção fitoquímica das frações obtidas do extrato aquoso das folhas mostraram testes positivos característicos de compostos fenólicos, alcaloides e saponinas. Os estudos fitoquímicos da fração fenólica das folhas proporcionou o isolamento de quatro flavonóides: luteolina-3'-*O*- β -xilofuranose (composto ainda não descrito na literatura), luteolina-7-*O*- β -glicosídeo, luteolina-7-*O*- β -rutinosídeo e luteolina-5-*O*- β -rutinosídeo. Esses compostos são descritos pela primeira vez na literatura para espécies de *Justicia*.

As avaliações dos cromatogramas por CLAE das amostras submetidas a radiação gama em comparação com a amostra não irradiada permitem sugerir que não há influência da radiação gama em todas as doses utilizadas, pois não foram observados produtos radiolíticos. Dessa forma, pode-se considerar que a técnica de radiação gama é uma ferramenta ideal para a descontaminação microbiológica deste vegetal.

A espécie fúngica (*Aspergillus aculeatus*) predominante em *J. acuminatissima* foi eliminada com dose de 3,0 kGy. Esse dado é muito valioso, pois, estudos por CLAE mostraram que doses de até 20 kGy, não afetam a integridade química dos compostos fenólicos de *J. acuminatissima*.

Em relação aos testes farmacológicos, os resultados da atividade anti-inflamatória são muito promissores, pois frações e alguns fitoconstituintes isolados da planta mostraram resultados relevantes para o modelo avaliado. Esses resultados comprovam a existência de substâncias com potencial anti-inflamatório, confirmando, dessa forma, as informações populares, através dos relatos etnofarmacológicos disponíveis na literatura para o vegetal em estudo.

As frações FAF, FDF e FF e as substâncias FHF-HD10 (β -sitosterol e estigmasterol), FHG-HD14 (lupeol), FAF-DA8 (β -sitosterol e estigmasterol glicosilados) e FF4 (luteolina-3'-*O*- β -xilofuranose), isoladas de *J. acuminatissima*, mostraram atividades bastante significativas contra o processo inflamatório, enquanto que as mesmas frações e substâncias não apresentaram inibição para o parasita *T. cruzi*.

As frações FDF e FAF e o extrato bruto em etanol EEF mostraram atividade antimicrobiana para bactérias *Gram*-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) e *Gram*-negativa (*Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*) e antifúngica para *C. albicans*. Essas informações são bastante importantes pelo fato de poucas espécies deste gênero serem relatadas para o uso contra micro-organismos resistentes aos medicamentos utilizados normalmente.

As análises de minerais indicam acúmulo excessivo de alguns elementos macro e micronutrientes em partes diferentes do vegetal e há predominância da concentração de potássio, cálcio e magnésio nos galhos. Porém, as quantidades encontradas tanto dos elementos micro quanto macronutrientes avaliados não excedem os limites toleráveis de consumo humano. Estes resultados sugerem o uso sem restrições da planta para fins medicinais pela população.

Os resultados obtidos na avaliação de *Justicia acuminatissima* justificam a continuidade dos estudos desta espécie, além de, reafirmar a importância dos estudos químicos e farmacológicos das diversas famílias de plantas medicinais existentes na flora brasileira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Ghani NT, Shoukry AF, El Nashar RM 2001. Flow injection potentiometric determination of pipazethate hydrochloride. *Analyst* 126: 79-85.

Abou-Arab AAK, Kawther MS, EL Tantawy ME, Badea RI, Khayria N 1999. Quantity estimation of some contaminants in commonly used medicinal plants in the Egyptian market. *Food Chem* 67: 357-363.

Adam K, Sivropoulou A, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M 1998. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* Essential Oils against Human Pathogenic Fungi. *J Agric Food Chem* 46: 1739-1745.

Adams M, Gmunder F, Hamburger M 2007. Plants traditionally used in age related brain disorders - A survey of ethnobotanical literature. *J Ethnopharmacol* 113: 363-381.

Adjanohoun EJ, Ahyi MRA, Aké AL, Alia AM, Amai CA, Gbile ZO, Johnson CLA, Kakooko ZO, Lutakome HK, Morakinyo O, Mubiru NK, Ogwal-Okeng JW, Sofowora EA 1993. Traditional medicine and pharmacopoeia - contribution to ethnobotanical and floristic studies in Uganda. Scientific, Technical and Research Commission of the Organization of the African Unity (OAU/STRC). 433 pp.

Agbovie T, Ofusohene-Djan W, Crensil OR, Dennis F, Odamtten GT, Amponsah. K 2002. Conservation and Sustainable Use of Medicinal Plants in Ghana Ethnobotanical Survey. (<http://www.unep-wcmc.org/species/plants/ghana>, accessed in March/2011).

Agra MF, Freitas PF, Barbosa-Filho JM 2007. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev Braz Pharmacogn* 17: 114-140.

Ahanchede A, Gbehounou G, Kossou KD, Yayi E, Akpo E 2004. Contribution à l'étude de la caractérisation du pouvoir allélopathique de *Justicia anselliana* (Nees) T. Anders: approche de bioessais utilisant des extraits obtenus à partir du matériel végétal sèche. *Ann Sci Agron Bénin* 6: 1-2.

Ahmad FB, Holdsworth DK 2003. Medicinal plants of Sabah, East Malaysia - Part I. *Pharm Biol* 41: 340-346.

Ajasa AMO, Bello MO, Ibrahim AO, Ogunwande IA, Olawore NO 2004. Heavy trace metals and macronutrients status in herbal plants of Nigeria. *Food Chem* 85: 67-71.

Ajibesin KK, Ekpo BA, Bala DN, Essien EE, Adesanya SA 2008. Ethnobotanical survey of Akwa Ibom State of Nigeria. *J Ethnopharmacol* 115: 387-408.

Alcântara AFC, Piló-Veloso D; De Almeida WB, Maltha CRA, Barbosa, LCA 2006. Conformational Analysis of 8-Oxabicyclo[3.2.1]Oct-6-en-3-one Derivatives by NMR and Theoretical Calculations. *J Mol Struct* 791: 180-185.

Al-Juaid SS, Abdel-Mojib MA 2004. A Novel Podophyllotoxin Lignan from *Justicia heterocarpa*. *Chem Pharmaceut Bull* 52: 507-509.

Alonso SJ, Navarro E, Trujillo J, Jorge E, Pérez C 1997. Profile of activity and cytotoxic screening of elenoside. *Method Find Exp Clin Pharmacol* 19: 186-187.

Alonso-Castro AJ, Villarreal ML, Salazar-Olivo LA, Gomez-Sanchez M, Dominguez F, Garcia-Carranca A 2011. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *J Ethnopharmacol* 133: 945-972.

Alvarenga N, Ferro EA 2006. Bioactive triterpenes and related compounds from celastraceae. *Stud Nat Prod Chem*, 33: 239-307.

Amado-Neto V, Santos RR, Gioia I 1975. Estudo experimental sobre o congelamento do plasma e implicações referentes à transmissão da doença de Chagas em serviços de hemoterapia. *Rev Soc Bras Med Trop* 9: 129-132.

Amin AH, Mehta DR 1959. Bronchodilator alkaloid from *Adhatoda vasica*. *Nature* 184: 1317-1318.

Andrade-Cetto A, Heinrich M 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol* 99: 325–348.

Angonese MT, Moreira DL, Kaplan MAC 1992. Perfil químico da familia acanthaceae. *Bol Mus Biol Mello Leitão* 1: 3-6.

Aouidi F, Ayari S, Ferhi H, Roussos S, Hamdi M 2011. Gamma irradiation of air-dried olive leaves: Effective decontamination and impact on the antioxidative properties and on phenolic compounds. *Food Chem* 127: 1105–1113

Arceusz A, Radecka I, Wesolowski M 2010. Identification of diversity in elements content in medicinal plants belonging to different plant families *Food Chem* 120: 52–58.

Arokiyaraj S, Perinbam K, Agastian P, Balaraju K 2007. Immunosuppressive effect of medicinal plants of Kolli hills on mitogen-stimulated proliferation of the human peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. *Indian J Pharmacol* 39: 180-183.

Asano J, Chiba K, Tada M, Yoshii T 1996. Antiviral activity of lignans and their glycosides from *Justicia Procumbens*. *Phytochemistry* 42: 713-717.

Astelbauer F, Obwaller A, Raninger A, Brem B, Greger H, Duchêne M, Wernsdorfer W, Walochnik J 2010. High antitrypanosomal activity of plant-derived sulphur-containing amides. *Int J Antimicrob Ag* 36: 570–572.

Aswal BS, Bhakuni DS, Goel AK, Kar K, Mehrotra BN, Mukherjee KC 1984. Screening of Indian plants for biological activity: Part X. *Indian J Exp Biol* 22: 312-332.

Awad R, Ahmed F, Bourbonnais-Spear N, Mullally M, Ta CA, Tang A, Merali Z, Maquin P, Caal F, Cal V, Poveda L, Vindas PS, Trudeau VL, Arnason JT 2009. Ethnopharmacology of Q'eqchi' Maya antiepileptic and anxiolytic plants: Effects on the GABAergic system. *J Ethnopharmacol* 125: 257-264

Baba A, Kawamura N, Makino H, Ohta Y, Taketomi S, Sohda T 1996. Studies on disease-modifying antirheumatic drugs: Synthesis of novel quinoline and quinazoline derivatives and their antiinflammatory effect. *J Med Chem* 39: 5176-5182.

Badami S, Aneesh R, Sankar S, Sathishkumar MN, Suresh B, Rajan S 2003. Antifertility activity of *Derris brevipes* variety coriacea. *J Ethnopharmacol* 84: 99-104.

Barros IMC. Contribuição ao estudo químico e biológico de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae). Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas UNB, 2008. 129p.

Barroso GM 1986. Sistemática de Angiospermas do Brasil. Imprensa Universitária: Viçosa-MG: 3: 8-16.

Barroso MF, Silva A, Ramos S, Oliva-Teles MT, Delerue-Matos C, Sales MGF, Oliveira MBPP 2009. Flavoured versus natural waters: Macromineral (Ca, Mg, K, Na) and micromineral (Fe, Cu, Zn) contents. *Food Chem* 116: 580-589.

Bedoya LM, Alvarez A, Bermejo M, Gonzalez N, Beltran M, Sanchez-Palomino S, Cruz SM, Gaitán I, Del Olmo E, Escarcena R, Garcia PA, Cáceres A, Feliciano AS, Alcamí J 2008. Guatemalan plants extracts as virucides against HIV-1 infection. *Phytomedicine* 15: 520-524.

Berger I, Barrientos AC, Cáceres A, Hernández M, Rastrelli L, Passreiter CM, Kubelka W 1998. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. *J Ethnopharmacol* 62: 107-115.

Bhalla HL, Cruz JLD, Kokate CK 1982. Improved method of extraction and analysis of vasicine and vasicinone, the alkaloids of *Adhatoda vasica* Nees. *Indian Drugs* 20: 16-18.

Bhat R, Sridhar KR, Karim AA 2010. Microbial quality evaluation and effective decontamination of nutraceutically valued lotus seeds by electron beams and gamma irradiation. *Radiat Phys Chem* 79: 976-981.

Bhattacharyya D, Pandit S, Jana U, Sen S, Sur TK 2005 Hepatoprotective activity of *Adhatoda vasica* aqueous leaf extract on δ -galactosamine-induced liver damage in rats. *Fitoterapia* 76: 223-225.

Boaretto AE, Muraoka T, Boaretto RM 2003. Absorção e translocação de Mn, Zn e B Aplicados via foliar em Citros. Laranja, Cordeirópolis, v. 24, n. 1, p. 177-197.

Bourdy G, Michel LRC, Roca-Coulthard A 2004. Pharmacopoeia in a shamanistic society: the Izoceño-Guaraní (Bolivian Chaco). *J Ethnopharmacol* 91: 189-208.

Brandão MGL 1991. Estudo Químico das raízes do *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke planta utilizada popularmente na Amazônia como preventivo da malária. Tese de Doutorado, Belo Horizonte, Minas Gerais - Brasil UFMG-ICEx/DQ.00223 T.00047.

Brasil. 2001 Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA. Resolução N° 21, de 26 de janeiro de 2001.

Brasil. 2004. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução – RDC N° 48 de 16/03/2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 17 mar. 2004.

Breitmaier E, Voelter W. Carbon-13 NMR spectroscopy - High-resolution methods and applications in organic chemistry and biochemistry, 3rd ed., VCH: Weinheim, 1989.

Brener Z. O parasito: relações hospedeiro-parasito. In: Brener Z, Andrade ZA (orgs) *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 1-41, 1979.

Bubb WA. NMR Spectroscopy in the Study of Carbohydrates: Characterizing the Structural Complexity Concepts in Magnetic Resonance Part A, Vol. 19A(1) 1–19 (2003). School of Molecular and Microbial Biosciences, University of Sydney, New South Wales 2006, Australia

Buckner FS, Verlinde CL, La Flamme AC, Van Voorhis WC 1996. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 2592-2597.

Byun MW, Yook HS, Kang IJ, Chung CK, Kwon JH, Choi KJ 1998. Comparative effects of gamma irradiation and ozone treatment on hygienic quality of Korean red ginseng powder. *Rad Phys Chem* 52: 95–99.

Byun MW, Yook HS, Kim KS, Chung CK 1999. Effects of gamma irradiation on physiological effectiveness of Korean medicinal herbs. *Radiat Phys Chem* 54: 291-300.

Cabral MMO, Barbosa-Filho JM, Maia GLA, Chaves MCO, Braga MV, De Souza W, Soares ROA 2010. Neolignans from plants in northeastern Brazil (Lauraceae) with activity against *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* 124: 319–324.

Cáceres-Cortés JR, Cantú-Garza FA, Mendoza-Mata MT, Chavez-González MA, Ramos-Andujano G, Zambrano-Ramírez IR 2001. Cytotoxic activity of *Justicia spicigera* is inhibited by bcl-2 proto-oncogene and induces apoptosis in a cell cycle dependent fashion. *Phytother Res* 8: 691-697.

Cai J, Zhao XL, Liu AW, Nian H, Zhang SH 2011. Apigenin inhibits hepatoma cell growth through alteration of gene expression patterns. *Phytomedicine* 18: 366-373.

- Calixto JB 2005. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America A personal view. *J Ethnopharmacol* 100: 131–134.
- Campos FR, Januario AH, Rosas LV, Nascimento SKR, Pereira PS, Franca SC., Cordeiro MSC, Toldo MPA, Albuquerque S 2005. Trypanocidal activity of extracts and fractions of *Bertholletia excelsa*. *Fitoterapia* 76 : 26–29
- Canel C, Moraes RM, Dayan FE, Ferreira D 2000. Podophyllotoxin. *Phytochemistry* 54: 115-120
- Cano JH, Volpato G 2004. Herbal mixtures in the traditional medicine of Eastern Cuba. *J Ethnopharmacol* 90: 293-316.
- Caprio V, Guyen B, Opoku-Boahen Y, Mann J, Gowan AM, Kelland LM, Readd MA, Neidled S 2000. A Novel Inhibitor of Human Telomerase Derived from 10*H*-Indolo [3,2-*b*]quinoline. *Bioorg Med Chem Lett* 10: 2063-2066.
- Carlier Y, Dias JCP, Luquetti AO, Hontebeyrie M, Torrico F, Truyens C. Trypanosomiase américaine ou maladie de Chagas. Encyclopédie Médico-Chirurgicale 8: 505-A20, 2002.
- Cassino, MF 2010. Estudo etnobotânico de plantas medicinais em comunidades de várzea do rio Solimões, Amazonas e aspectos farmacognósticos de *Justicia pectoralis* Jacq. forma mutuquinha (Acanthaceae)/ Mariana Franco Cassino. Dissertação de mestrado INPA. Manaus-AM.
- Catão RMR, Barbosa-filho JM, Gutierrez SJC, Lima EOL, Pereira MSV, Arruda TA, Antunes RMP 2005. Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Riparinas sobre Cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* Multirresistentes *RBAC* 37: 247-249.
- Cazarolli LH, Zanatta L, Jorge AP, De Sousa E, Horst H, Woehl VM, Pizzolatti MG, Szpoganicz B, Silva FR 2006. Follow-up studies on glycosylated flavonoids and their complexes with vanadium: their anti-hyperglycemic potential role in diabetes. *Chem-Biol Interact* 163: 177-191.
- Chakravarthy AK, Dastidar PPG, Pakrashi SC 1982. Simple aromatic amines from *Justicia gendarussa*. ¹³C NMR spectra of the bases and their analogues. *Tetrahedron lett* 38: 1797-1802.
- Chang ST, Wang DSY, Wu CL, Shiah SG, Kuo YH, Chang CJ 2000. Cytotoxicity of extractives from *Taiwania cryptomerioides* heartwood. *Phytochemistry* 55: 227-232.
- Chariandy CM, Seaforth CE, Phelps RH, Pollard GV, Khambay BPS 1999. Screening of medicinal plants from Trinidad and Tobago for antimicrobial and insecticidal properties. *J Ethnopharmacol* 64: 265-270.
- Chen CC, Hsin WW, Ko FN, Huang YL, Ou JC, Teng CM 1996. Antiplatelet aryl-naphthalide lignans from *Justicia procumbens*. *J Nat Prod* 59: 1149-1150.

- Chen, CC, Lin CF, Huang YL, Ko FN, Teng CM 1995. Bioactive constituents from the flower buds and peduncles of *Lindera megaphylla*. *J Nat Prod* 58: 1423-1425.
- Chung BH, Lee JJ, Kim JD, Jeoung D, Lee H, Choe J, Ha KS, Kwon YG, Kim YM 2010. Angiogenic activity of sesamin through the activation of multiple signal pathways. *Biochem Bioph Res Co* 391: 254-260.
- Claeson UP, Malmfors T, Wikman G, Bruhn JG 2000. *Adhatoda vasica*: a critical review of ethnopharmacological and toxicological data. *J Ethnopharmacol* 72: 1-20.
- Coelho-Ferreira M 2009. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). *J Ethnopharmacol* 126: 159–175
- Cordell GA 2000. Biodiversity and drug – a symbiotic relationship. *Phytochemistry* 55: 463-480.
- Corrêa GM, Alcântara AFC 2012. Chemical constituents and biological activities of species of *Justicia* - a review. *Rev Bras Farmacog* 22: 220-238.
- Cotran RS, Kumar V, Collins T (Trad. Barbosa JB, De Vasconcelos MM, Voeux PJ) – Patologia Estrutural e Funcional, 6ª ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2000.
- Coutinho MAS, Muzitano MF, Costa SS 2009. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. *Rev Virtual Quim* 3: 241-256.
- Day S, Chiu N, Won S, Lin C 1999. Cytotoxic Lignans of *Justicia ciliata*. *J Nat Prod* 62: 1056-1058.
- Day SH, Chiu NY, Tsao LT, Wang JP, Lin CN 2000. New lignan glycosides with potent antiinflammatory effect, isolated from *Justicia ciliata*. *J Nat Prod* 63: 1560-1562.
- De Albuquerque UP, Monteiro JM, Ramos MA, De Amorim ELC 2007. Medicinal and magic plants from a public market in Northeast of Brazil. *J Ethnopharmacol* 110: 76-91.
- Deane MP, Lenzi HL, Jansen AM 1984. Trypanosoma cruzi: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 79: 513-515.
- Dhankhar S, Kaur R, Ruhil S, Balhara M, Dhankhar S, Chhillar AK 2011. A review on *Justicia adhatoda*: A potential source of natural medicine. *AJPS* 11: 620-627.
- Dias JCP, Macedo VO. Doença de Chagas. In: Coura JR (org) Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 557-593, 2005.
- Dias JCP. Epidemiologia. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral Neto M (orgs) Trypanosoma cruzi e doença de Chagas. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 48-74, 2000.

- Diehl JF (1995). The safety of irradiated food. 2nd edition. Marcel Dekker, N.Y. and Basel
- Dogné JM, Supuran CT, Pratico D 2005. Adverse cardiovascular effects of the coxibs. *J Med Chem* 48: 2251–2257.
- Domínguez XA, Achenbach H, González CC, Ferré-D'Amore AR 1990. Estudio químico del muñile (*Justicia spicigera*). *Rev Latinoamer Quím* 21: 142-143.
- Domínguez-Carmona DB, Escalante-Erosa F, García-Sosa K, Ruiz-Pinell G, Gutierrez-Yapu D, Chan-Bacab J, Gimenez-Turba A, Pena-Rodríguez LM 2010. Antiprotozoal activity of Betulinic acid derivatives. *Phytomedicine* 17: 379–382.
- Duarte MCT, Figueira GM, Pereira B, Magalhães PM, Delarmelina C 2004. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. *Rev Bras Farmacogn* 4: 06-08.
- Duarte N, Lage H, Abrantes M, Ferreira MJU 2010. Phenolic compounds as selective antineoplastic agents against multidrug-resistant human cancer cells. *Planta Med* 76: 975-980.
- Dushenkov V, Kumar PBAN, Motto H, Raskin I 1995. Rhizofiltration: the use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Env Sci Technol* 29: 1239–1245.
- El-Kamali HH 2009. Ethnopharmacology of Medicinal Plants used in North Kordofan (Western Sudan). *Ethnobot Leaflets* 13: 203-210.
- Euler KL, Alam M 1982. Isolation of kaempferitrin from *Justicia spicigera*. *J Nat Prod* 45: 220-221.
- Fang SH, Rao YK, Tzeng YM 2005. Inhibitory effects of flavonol glycosides from *Cinnamomum osmophloeum* on inflammatory mediators in LPS/IFN-gamma-activated murine macrophages. *Bioorg Med Chem* 13: 2381-2388.
- Farkas J 1998. Irradiation as method for decontaminating food: a review. *Int. J. Food Microbiol* 44: 189–204.
- Fontanay S, Grare M, Mayer J, Finance C, Duval RE 2008. Ursolic, oleanolic and betulinic acids: Antibacterial spectra and selectivity indexes. *J Ethnopharmacol* 120: 272–276.
- Fontoura HS. Influencia das atividades antiinflamatórias da arnica (*Lychnophora ericoides*) no tratamento de lesões musculares através do uso de fonoforese. Tese de doutorado programa de pós-graduação em ciências da saúde Universidade de Brasília UnB, 2007.
- Fournet A, Angelo A, Muñoz V, Roblot F, Hocquemiller R, Cavé A 1992. Biological and chemical studies of *Pera benensis*, a Bolivian plant used in folk medicine as a treatment of cutaneous leishmaniasis. *J Ethnopharmacol* 37:159–64 1992
- Frausto JJR 1991 The biological chemistry elements – The inorganic chemistry of life. Claredon press. Oxford.

Freyman DM, Wenck MA, Engel JC, Feng J, Focia PJ, Eakin AE, Craig SP 2000. Efficient identification of inhibitors targeting the closed active site conformation of the HPRT from *Trypanosoma cruzi*. *Chem Biol* 7: 957–968.

Frieden E 1984. *Biochemistry of Essential Ultratrace Elements*. Plenum Press – New York and London.

Fukamiya N, Lee K 1986 Antitumor agents, 81. Justicidin-A and diphyllin, two cytotoxic principles from *Justicia procumbens*. *J Nat Prod* 49: 348-350.

Gertsch J, Tobler RT, Brun R, Sticher O, Heilmann J 2003. Antifungal, antiprotozoal, cytotoxic and piscicidal properties of Justicidin B and a new aryl-naphthalide lignan from *Phyllanthus piscatorum*. *Planta Med* 69: 420-424.

Ghosal S, Banerjee S, Frahm AW 1979. Prostalidins A, B, C and retrochinensin: A new antidepressant: 4-aryl-2,3-naphthalide lignans from *Justicia prostrata*. *Chem Ind* 23: 854-855.

Ghosal S, Srivastava AK, Srivastava RS, Chattopadhyay S, Maitra M 1981. Chemical constituents of *Justicia*. Part 4. Justicisaponin-I, a new triterpenoid saponin from *Justicia simplex*. *Planta Med* 42: 279-283.

Goad LJ 1991. Phytosterols. In: Charlwood, B.V. e Banthorpe, D.V. (Eds.). *Methods in Plant Biochemistry*. Academic Press, London, p. 399-434.

González CS, Durante EI. Agente etiológico: *Trypanosoma cruzi*. In: Storino R, Milei J (orgs) *Enfermedad de Chagas*. Buenos Aires, Doyma Argentina, p.31-40, 1994.

Gordaliza M, Castro MA, Del Corral JMM, San Feliciano A 2000. Antitumor Properties of Podophyllotoxin and Related Compounds. *Curr Pharm Design* 6: 1811-1839.

Gorzalczany S, Marrassini C, Miño J, Acevedo C, Ferraro G 2011. Antinociceptive activity of ethanolic extract and isolated compounds of *Urtica circularis*. *J Ethnopharmacol* 134: 733–738.

Graham VAW 1990. Delimitation and infra-generic classification of *Justicia* (Acanthaceae). *Kew Bull* 43: 551-624.

Gulfraz M, Asad MJ, Qaddir G, Mehmood S, Shaukat S, Parveen Z 2008. Phytochemical analysis of *Justicia adhatoda* and *Berberis lyceum*. *J Chem Soc Pakistan* 30: 453-457.

Gurib-Fakin A, Sewraj MD, Gueho J, Dulloo E 1996. Medicinal plants of Rodrigues. *Pharm Biol* 34: 2-14.

Haase H, Overbeck S, Rink L. 2008. Zinc supplementation for the treatment or prevention of disease: Current status and future perspectives. *Exp Gerontol* 43: 394–408.

- Hadi S, Bremner JB 2001. Initial Studies on Alkaloids from Lombok Medicinal Plants. *Molecules* 6: 117-129.
- Halliwell B, Gutteridge JM. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186: 1–85.
- Harper HA 1992. Manual de química fisiológica. Atheneu editora. São paulo. 157p.
- Hendler SS 1994. A Enciclopédia de Vitaminas e Minerais. Ed. Campus, Rio de Janeiro. 504p.
- Higuchi ML 1995. Chagas' disease. Importance of the parasite in the pathogenesis of the cardiac chronic disease. *Arquiv Bras Cardiol* 64: 251–254.
- Hoare C. The Trypanosomes of Mammals. 2nd edição, Blackwell Scientific Publication, Oxford, 1972.
- Huard J, Li Y, Fu FH 2002. Muscle injuries and repair: current trends in research. *J Bone Joint Surg Am* 84A: 822-832.
- Hu JF, Starks CM, Garo E, Hough GW, Rice SM, Goering MG, O'Neil-Johnson M, Eldridge GR 2008. Laxanol, a new 2,5-diaryl-3,4-dihydroxymethyltetrahydrofuran type lignan from *Justicia laxa*. *J Chem Res* 1: 20-21
- Hui HY, Chang CJ, McLaughlin JL, Powell GP 1986. Justicidin B, a bioactive trace lignan from the seeds of *Sesbania drummondii*. *J Nat Prod* 49: 1175-1176.
- Ibrahim B, M'batchi B, Mounzeo H, Bourobou H 2000. Effect of *Tephrosia vogelii* and *Justicia extensa* on *Tilapia nilotica* in vivo. *J Ethnopharmacol* 69: 99-104.
- Ignacimuthu S, Ayyanar M, Sankarasivaraman K 2008. Ethnobotanical study of medicinal plants used by Paliyar tribals in Theni district of Tamil Nadu, India. *Fitoterapia* 79: 562-568.
- Ikram MM, Huq ME 1966. Estimation of vasicine from the flowering tops of *Adhatoda vasica*. *Pakistan J Sci Res* 18: 109-110.
- Irwin S 1968. Comprehensive observational assessment: A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia* 13: 222-257.
- Ismail LD, Lorenz P, Stermitz FR 1998. Isolation and synthesis of an α -malamic acid derivative from *Justicia ghiesbreghtiana*. *J Nat Prod* 61: 1174-1176.
- Jasemine S, Srivastava RS, Singh SK 2007. Hepatoprotective Effect of Crude Extract and Isolated Lignans of *Justica simplex* against CCl₄ induced Hepatotoxicity. *Pharmaceutical Biol* 45: 274-277.

Jeong IY, Lee HJ, Park YD, Chang HJ, Choi DS, Byun MW 2009. Effects of gamma irradiation on total polyphenols, radical scavenging activities and decolourization of *Nelumbo nucifera* extracts. *Radiat Phys Chem* 78: 575–577.

Jiang X, Shi S, Zhang Y, Chen X 2010. Excellent Combination of HPLC-RSD-DAD-ESI/MS and HSCCC Experiments to Screen and Identify Radical Scavengers from *Neo-Taraxacum siphonanthun*. *J Braz Chem Soc* 8: 1524-1529.

Jiménez G, Hasegawa M, Estrada A, Rodryguez M, Mendez J, Castillo A, Gonzales-Mujica F, Motta N, Vasquez J, Romero-Vechionne E 2001. Biological screening of plants of the Venezuelan Amazons. *J Ethnopharmacol* 77 p. 77–83.

Jindal DP, Chattopadhaya R, Minu M 1998. Development of beta 2-adrenoceptor agonists: (antiasthmatics-1). *Indian Drugs* 35: 606-639.

Jo C, Son JH, Lee HJ, Byun MW 2003. Irradiation application of colour removal and purification of green tea leave extract. *Radiat Phys Chem* 66: 179–184.

Joshi AR, Joshi K 2000. Indigenous knowledge and uses of medicinal plants by local communities of the Kali Gandaki Watershed Area, Nepal. *J Ethnopharmacol* 73: 175-183.

Jothimanivannan C, Kumar RS, Subramanian N 2010 Anti-inflammatory and analgesic activities of ethanol extract of aerial parts of *Justicia gendarussa* Burm. *Int J Pharmacol* 6: 278-83.

Jung HA, Jin SE, Min BS, Kim BW, Choi JS 2012. Anti-inflammatory activity of Korean thistle *Cirsium maackii* and its major flavonoid, luteolin 5-O-glucoside. *Food Chem Toxicol* 50: 2171–2179.

Kameyama C. 2006. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Acanthaceae. *Rodriguésia* 57: 149-154.

Kanchanapoom T, Noiarsa P, Kasai R, Otsuka H, Ruchirawat S 2005. Justiciosides E–G, triterpenoidal glycosides with an unusual skeleton from *Justicia betonica*. *Tetrahedron* 61: 2583-2587.

Kanchanapoom T, Noiarsa P, Ruchirawat S, Kasai R, Otsuka H 2004. Triterpenoidal glycosides from *Justicia betonica*. *Phytochemistry* 65: 2613-2618.

Kasai R, Matsumoto K, Nier RL, Morita T, Awazu A, Zhou J, Tanaka O 1987. Sweet and bitter curcubitane glycosides from *Hemsleya carnosiflora*, *Phytochemistry* 26: 1731-1736.

Katerere DR, Gray AI, Nash RJ, Waigh RD 2003. Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolated from African Combretaceae. *Phytochemistry* 63: 81–88

Katusin-Razem B, Novak B, Razem D 2001. Microbiological decontamination of botanical raw materials and corresponding pharmaceutical products by irradiation. *Radiat Phys Chem* 62: 261–275.

- Kaur K, Jain M, Kaur T, Jain R 2009. Antimalarials from nature. *Bioorg Med Chem* 17: 3229-3256.
- Kavitha J, Gopalaiah K, Rajasekhar DG, Subbaraju V 2003. Juspurpurin, an unusual secolognan glycoside from *Justicia purpurea*. *J Nat Prod* 66: 1113-1115.
- Khattak KF, Simpson TJ 2009. Effect of gamma irradiation on the microbial load, nutrient composition and free radical scavenging activity of *Nelumbonucifera* rhizome. *Radiat Phys Chem* 78: 206–212.
- Kim NM, Kim J, Chung HY, Choi JS 2000. Isolation of Luteolin 7-O-rutinoside and Esculetin with Potential Antioxidant Activity from the Aerial Parts of *Artemisia Montana*. *Arch Pharm Res* 3: 237-239.
- Kimura M, Itokawa Y 1990. Cooking losses of minerals in foods and its nutritional significance. *J Nutr Sci Vitaminol* 36: 25–S33.
- Klich MA. Identification of common *Aspergillus* species. Utrecht, Netherlands: Central albureau voor Schimmel cultures. Pp. 116. ISBN 90-70-351-46-3, 2002.
- Ko HH, Hung CF, Wang JP, Lin CN 2008. Antiinflammatory triterpenoids and steroids from *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae*. *Phytochemistry* 69: 234-239.
- Kojima H, sato N, Hatano A, Ogura H 1990. Sterol glucosides from *prunella vulgaris* *Phytochemistry* 29: 2351-2355.
- Koleckar V, Opletal L, Macakova K, Jahodar L, Jun D, Kunes J, Kuca K 2010. New antioxidant flavonoid isolated from *Leuzea carthamoides*. *J Enz Inhibit Med Chem* 1: 143–145.
- Konoshima T, Atta-Ur-Rahman T 2000. Anti-tumor-promoting activities (cancer chemopreventive activities) of natural products. *Stud Nat Prod Chem* 24: 215-267.
- Kovács E, Keresztes A 2002. Effect on gamma and UV-B/C radiation on plants cells. *Micron* 33: 199-210.
- Kpoviéssi DSS, Gbenou JD, Gbaguidi FA, Ahoussi L, Accrombessi GC, Moudachirou M, Quetin-leclercq JQ 2009. *J. Essential Oil Res* 21:83-87.
- Kpoviéssi S, Gbaguidi F, Gbenou J, Accrombessi G, Haddad M, Moudachirou M, Quetin-Leclercq J 2006. Allelopathic effects on cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) plant and cytotoxic activities of sterols and triterpenes isolated from *Justicia anselliana* (NEES) T. Anders. *Electron J Nat Subs (EJNS)* 1: 12-19.
- Kumar A, Ram J, Samarth RM, Kumar M 2005. Modulatory influence of *Adhatoda vasica* Nees leaf extract against gamma irradiation in Swiss albino mice. *Phytomedicine* 12: 285-293.

Küpeli E, Erdemoglu N, Yesilada E, Sener B 2003. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of taxoids and lignans from the heartwood of *Taxus baccata* L. *J Ethnopharmacol* 89: 265-270.

Lamorde M, Tabuti JRS, Obua C, Kukunda-Byobona C, Lanyero H, Byakika-Kibwika P, Bbosa GS, Lubega A, Ogwal-Okeng J, Ryan M, Waako PJ, Merry C 2010. Medicinal plants used by traditional medicine practitioners for the treatment of HIV/AIDS and related conditions in Uganda. *J Ethnopharmacol* 130: 43-53.

Leal LKAM, Ferreira AAG, Bezerra GA, Matos FJA, Viana GSB 2000. Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. *J Ethnopharmacol* 70: 151-159.

Leão R, Ferreira MRC, Jardim MAG 2007. Levantamento de plantas de uso terapêutico no município de Santa Bárbara do Pará, Estado do Pará, Brasil. *Rev Bras Farm* 88: 21-25.

Lino CS, Viana, GSB, Matos, FJA 1997. Analgesic and antiinflammatory activities of *Justicia pectoralis* Jacq and its main constituents: coumarin and umbelliferone. *Phytother Res* 11: 211-215.

Lizcano LJ, Bakkali F, Ruiz-Larrea MB, Ruiz-Sanz JI 2010. Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use. *Food Chem* 119: 1566–1570.

Locklear TD, Huang Y, Frasor J, Doyle BJ, Perez A, Gomez-Laurito J, Mahadya GB 2010. Estrogenic and progestagenic effects of extracts of *Justicia pectoralis* Jacq., an herbal medicine from Costa Rica used for the treatment of menopause and PMS. *Maturitas* 66: 315-322.

Longuefosse JL, Nossin E 1996. Medical ethnobotany survey in Martiniq. *J Ethnopharmacol* 53: 117-142.

Lorenz P, Stermitz FR, Ismail LD 1999. An amide of l-threo- γ hydroxyglutamic acid from *Justicia ghiesbreghtiana*. *Phytochemistry* 52: 63-66.

Lu YH, Wei BL, Ko HH, Lin CN 2008. DNA strand-scission by phloroglucinols and lignans from heartwood of *Garcinia subelliptica* Merr. and *Justicia* plants. *Phytochemistry* 69: 225-233.

Luengo, MB 2005. Uma revisão histórica dos Principais acontecimentos da imunologia e da farmacologia na busca do entendimento e tratamento das doenças inflamatórias *Rev. Eletrôn Farm: 2: 64-72.*

Mabberley DJ 1997. The plant-book: a portable dictionary of the vascular plants. Cambridge University Press, Cambridge.

Maciel MAM, Pinto CA, Veiga-Junior, FV, Grynberg, NF, Echevarria A 2002. Plantas Medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. *Quím Nova* 25: 429-438.

- MacRae WD, Towers GHN 1984. *Justicia Pectoralis*: A study of the basis for it's use a hallucinogenic snuff ingredient. *J Ethnopharmacol* 12: 93-111.
- Mahato SB, Kundu AP 1994. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids - a compilation and some salient features. *Phytochemistry* 37: 1517–1575.
- Mathabe MC, Hussein AA, Nikolova RV, Basson AE, Meyer JJM, Lall N 2008. Antibacterial activities and cytotoxicity of terpenoids isolated from *Spirostachys Africana*. *J Ethnopharmacol* 116: 194–197.
- Mattos FJA 1997. Introdução à Fitoquímica Experimental. 2ª ed. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 141p.
- Matos FJA Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. 2. ed., Fortaleza: Imprensa Universitária, 2000. 346p.
- Mbosso EJT, Ngouela S, Nguedia JCA, Beng VP, Rohmer M, Tsamo E 2010. In vitro antimicrobial activity of extracts and compounds of some selected medicinal plants from Cameroon. *J Ethnopharmacol* 128: 476–481.
- McDowell, L.R. *Minerals in animal and human nutrition*. San Diego: Academic, 1992. 524 p.
- McGaw LJ, Lall N, Meyer JJM, Eloff JN 2008. The potential of South African plants against *Mycobacterium* infections. *J Ethnopharmacol* 119: 482–500.
- McKenna DJ, Ruiz JM, Hoye TR, Roth BL, Shoemaker AT 2011. Receptor screening technologies in the evaluation of Amazonian ethnomedicines with potential applications to cognitive deficits. *J Ethnopharmacol* 134: 475-492.
- Meckes M, David-Rivera AD, Nava-Aguilar V, Jimenez A 2004. Activity of some Mexican medicinal plant extracts on carrageenan-induced rat paw edema. *Phytomedicine* 11: 446-451.
- Mehta DR, Naravane JS, Desai RM 1963. Vasicinone. A bronchodilator principle from *Adhatoda vasica* Nees (N. O. Acanthaceae). *J Org Chem* 28: 445-448.
- Mikkelsen RB, Wardman P 2003. Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene* 22: 5734–5754.
- Miles MA. The agent. In: Gilles HM (org) Protozoal Diseases. Arnold Editora, London, p. 313-322, 1999.
- Milliken W, Bruce A 1997. The use of medicinal plants by Yanomami indians of Brazil. *Journal of Botany* 50: 10-25.
- Morel, C.M., 2000. Reaching maturity – 25 years of the TDR. *Parasitol Today* 16: 522–528.

- Moreno E, Valero M, Herrera P 1994. El uso de plantas mágicas y medicinales por las parteras tradicionales cubanas. *Fontqueria* 39: 219-241.
- Mruthunjaya K, Hukkeri VI 2007. Antioxidant and free radical scavenging potential of *Justicia gendarussa* Burm leaves *in vitro*. *Nat Prod Sci* 13: 199-206.
- Munakata K, Marumo S, Ohta K, Chen Y 1965. Justicidin A and B, the fish-killing components of *Justicia hayatai* var. *decumbes*. *Tetrahedron Lett* 47: 4167-4170.
- Muthee JK, Gakuyaa DW, Mbaria JM, Kareru PG, Mulei CM, Njonge FK 2011. Ethnobotanical study of anthelmintic and other medicinal plants traditionally used in Loitoktok district of Kenya. *J Ethnopharmacol* 135: 15–21.
- N'Guessan K, Kouassi KH, Ouattara K 2010. Plants used to treat anaemia, in traditional medicine, by Abbey and Krobou populations, in the South of Côte-d'Ivoire. *J Appl Sci Res* 6: 1291-1297.
- Nathan C 2002. Points of control in inflammation. *Nature* 420: 846-852.
- Navarro E, Alonso SJ, Trujillo J, Jorge E, Pérez C 2001a. General behavior, toxicity, and cytotoxic activity of elenoside, a lignan from *Justicia hyssopifolia*. *J Nat Prod* 64: 134-135.
- Navarro E, Alonso SJ, Trujillo J, Jorge E, Pérez C 2001b. Pharmacological effects of elenoside, an arylnaphthalene lignan. *Biol Pharm Bull* 24: 254-258.
- Navarro E, Alonso SJ, Trujillo J, Jorge E, Pérez C 2004. Central nervous activity of elenoside *Phytomedicine* 11: 498-503.
- Niu CS, Chen W, Wu HT, Cheng KC, Wen YJ, Lin KC, Cheng JT 2010. Decrease of plasma glucose by allantoin, an active principle of yam (*Dioscorea* spp.), in streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J Agric Food Chem* 58: 12031-12035.
- Nonato FR, Nogueira TMO, Barros TAA, Lucchese AM, Oliveira CEC, Santos RR, Soares MBP, Villarreal CF 2010. Antinociceptive and antiinflammatory activities of *Adiantum latifolium* Lam. Evidence for a role of IL-1 β inhibition. *J Ethnopharmacol*. 136: 518-524.
- Oliveira RB, Vaz ABM, Alves RO, Liarte DB, Donnici C, Romanha AJ, Zani CL 2006. Arylfurans as potential *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase inhibitors. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 101: 169-173.
- Orhan F, Baris O, Yanmis D, Bal T, Guvenalp Z, Gulluce M 2012. Isolation of some luteolin derivatives from *Mentha longifolia* (L.) Hudson subsp. *longifolia* and determination of their genotoxic potencies. *Food Chem* 135: 764–769.
- Paval J, Kaitheri SK, Potu BK, Govindan S, Kumar RS, Narayanan SN, Moorkoth S 2009. Anti-arthritic potential of the plant *Justicia gendarussa* Burm F. *Clinics* 64: 357-360.

- Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JR 2010. Introdução a espectroscopia. Tradução da 4ª edição Norte americana. São Paulo editora: Cengage Learning.
- Peraza-Sánchez S, Poot-Kantún S, Torres-Tapia LW, May-Pat F, Simá-Polanco P, Cedillo-Rivera R 2005. Screening of native plants from Yucatan for anti-*Giardia lamblia* activity. *Pharm Biol* 43: 594-598.
- Pera S, Patterson TF 2002. Invasive *Aspergillus* infections in hematologic malignancy patients. *Semin Respir Infect* 2: 99-105.
- Polivoda BI, Konev VV, Popov GA 1990. Biophysical Aspects of Radiation Injury of Biomembranes. *Pharmacol Ther* 52: 35– 84.
- Polovka M, Suhaj M 2010. Detection of caraway and bay leaves irradiation based on their extracts antioxidant properties evaluation. *Food Chem* 119: 391–401.
- Popova M, Trusheva B, Gyosheva M, Tsvetkova I, Bankova V 2009. Antibacterial triterpenes from the threatened wood-decay fungus *Fomitopsis rosea*. *Fitoterapia* 80: 263–266.
- Pradheepkumar CP, Panneerselvam N, Shanmugam G 2000. Cleistanthin A causes DNA strand breaks and induces apoptosis in cultured cells. *Mutat Res* 464: 185–193.
- Prajogo EWB, Guliet D, Queiroz EF, Wolfender JL, Aucky H, Cholies ZN, Hostettmann K 2007. Int. Symp. Biology, Chemistry, Pharmacology and Clinical Studies of Asian Plants, Surabaya, Indonesia, p. 13.
- Price AH, Atherton NM, Hendry GAF 1989. Plants Under Drought-Stress Generate Activated Oxigen. *Free Rad Res Comms* 8 (1): 61-66.
- Rachana, Sujata B, Mamta P, Manoj KP, Sonam S 2011. Review and future perspectives of using vasicine, and related compounds. *IGJPS* 1: 85-98.
- Rajakumar N, Shivanna MB 2009. Ethno-medicinal application of plants in the eastern region of Shimoga district, Karnataka, India. *J Ethnopharmacol* 126: 64-73
- Rajasekhar D, Subbaraju GV 2000. Jusmicranthin, a new aryl-naphthalide lignan from *Justicia neesii*. *Fitoterapia* 71: 598-599.
- Rao, CBS. in *Chemistry of lignans*, Andhra University Press, Visakhapatnam, 1978.
- Rao TS, Currie JL, Shaffer AF, Isakson PC 1993. Comparative evaluation of arachidonic acid(aa)- and tetradecanoylphorbol acetate(TPA)- induced dermal inflammation. *Inflammation* 17: 723-741.
- Rao YK, Fang SH, Tzeng YM 2006. Anti-inflammatory activities of constituents isolated from *Phyllanthus polyphyllus*. *J Ethnopharmacol* 103: 181-186.

- Ratnasooriya WD, Deraniyagala SA, Dehigaspitiya DC 2007. Antinociceptive activity and toxicological study of aqueous leaf extract of *Justicia gendarussa* Burn F. in rats. *Pharmacogn Mag* 3: 145-155.
- Razić, AS, Onjia B, Potkonjak J 2005 Determination of metal content in some herbal drugs empirical and chemometric approach. *Talanta* 67: 233-239.
- Rinaldo D, Rodrigues CM, Rodrigues J, Sannomiya M, Santos LC, Vilegas W 2007. New Flavone from the Leaves of *Neea theifera* (Nyctaginaceae). *J Braz Chem Soc* 6: 1132-1135.
- Rodrigues E, Duarte-Almeida JM, Pires JM 2010. Perfil farmacológico e fitoquímico de plantas indicadas pelos caboclos do Parque Nacional do Jaú (AM) como potenciais analgésicas. Parte I. *Rev Bras Farmacogn* 20: 981-991.
- Roja G, Vikrant BH, Sandur SK, Sharma A, Pushpa KK 2011. Accumulation of vasicine and vasicinone in tissue cultures of *Adhatoda vasica* and evaluation of the free radical-scavenging activities of the various crude extracts. *Food Chem* 126: 1033-1038.
- Rojas R, Bustamante B, Bauer J, Fernández I, Albán J, Lock O 2003. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 88: 199-204.
- Ruyschaert S, Van Andel T, Van de Putte K, Van Damme P 2009. Bathe the baby to make it strong and healthy: Plant use and child care among Saramaccan Maroons in Suriname. *J Ethnopharmacol* 121: 148-170.
- Salazar GCM, Silva GDF, Duarte LP, Vieira Filho SA, Lula IS 2000. Two epimeric friedelane triterpenes isolated from *Maytenus truncata* Reiss: ^1H and ^{13}C chemical shift assignments. *Mag Reson Chem* 38: 977-980.
- Sanmugapriya E, Shanmugasundaram P, Venkataraman S 2005a. Effect of conventional antihypertensive drugs on hypolipidemic action of garlic in rats. *Indian J Exp Biol* 43: 176-181.
- Sanmugapriya E, Shanmugasundaram P, Venkataraman S 2005b. Anti-inflammatory activity of *Justicia prostrata* Gamble in acute and sub-acute models of inflammation. *Inflammopharmacology* 13: 493-500.
- Santos JL 2006. Uso e diversidade de espécies vegetais cultivadas na reserva de desenvolvimento sustentável do tupé, Manaus, Amazonas 86 p. dissertação de mestrado em agricultura no tropico úmido – Instituto de Pesquisas da Amazonia.
- Saúde-Guimarães DA, Faria AR 2007. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. *Rev bras farmacogn* 17(3): 455-465.
- Savithramma N, Sulochana C, Rao KN 2007. Ethnobotanical survey of plants used to treat asthma in Andhra Pradesh, India. *J Ethnopharmacol* 113: 54-61.

- Sawatzky D, Willoughby D, Colville-Nash P, Rossi A 2006. The involvement of the apoptosis-modulating proteins Erk 1/2, Bcl-xL, and Bax in the resolution of acute inflammation *in vivo*. *Am J Pathol* 168: 33-41.
- Schaich KM, Pryor WA 1980. Free radical initiation in proteins and amino acids by ionizing and ultraviolet radiations and lipid oxidation — part I: Ionizing radiation *Rev. Fd. Sci. Nutr.* 13,89-129.
- Schultes RE 1993. Plants in treating senile dementia in the Northwest Amazon. *J Ethnopharmacol* 38: 129-135.
- Schumacker M, Bosque MA, Domingo JL, Corbella J 1991. Dietary intake of lead and cadmium from foods in Tarragona Province, Spain. *Bull Env Cont Toxicol* 46: 320–328.
- Siddique HR, Saleem M 2011 Beneficial health effects of lupeol triterpene: a review of preclinical studies. *Life Sci* 14:285-93.
- Silverstein RM, Bassler GC, Morrill RM 2006. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7. ed. Rio de Janeiro editora: Livros Técnicos e Científicos.
- Skojot M, Kauppinen S, Kofod LV, Fuglsang C, Pauly M, Dalboge H, Andersen LN 2001 functional cloning of an endi-arabinanase from *Aspergillus aculeatus* and its heterologous expression in *A. or Yzae* and tobacco. *Mol Genet Genomica* 265: 913-921.
- Slavin M, Kenworthy W, Yu LL 2009. Antioxidant properties, phytochemical composition, and antiproliferative activity of maryland-grown soybeans with colored seed coats. *J Agric Food Chem* 57: 11174-11185.
- Słupski J, Lisiewska Z, Kmiecik W 2005. Contents of macro and microelements in fresh and frozen dill (*Anethum graveolens* L.) *Food Chem* 91: 737–743.
- Somers E 1983. The toxic potential of trace metals in foods. A review. *J Food Sci* 39: 215–217.
- Soriani RR, Satomi LC, Pinto TJ 2005. Effects of ionizing radiation in ginkgo and guarana. *Rad Physic Chem*, 4: 239-242.
- Souza AQL, Souza ADL, Filho SA, Pinheiro MLB, Sarquis MIM, Pereira JO 2004. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta amaz* 2: 185 – 195.
- Souza W. O parasito e sua interação com os hospedeiros. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral Neto M (orgs) *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 88-126, 2000.
- Sprada ER, Arruda AMS 2010. Atividade antiinflamatória e antinociceptiva do extrato bruto aquoso do caule da *Araucaria angustifolia*. Disponível em: <http://www.medcenter.com/medscape/content.aspx?id=25778&langType=1046>

Acessado em: 15/05/2011

Sridhar C, Krishnaraju AV, Subbaraju GV 2006. Antiinflammatory constituents of *Teramnus labialis*. *Indian J Pharm Sci* 68: 111-114.

Ssegawa P, Kasenene JM 2007. Medicinal plant diversity and uses in the Sango bay area, Southern Uganda. *J Ethnopharmacol* 113: 521-540.

Storino R, Jorg ME. Vias de infección y aspectos clínicos. In: Storino R, Milei J (orgs) Enfermedad de Chagas. Buenos Aires, Doyma Argentina, p. 132-141, 1994.

Su CL, Huang LLH, Huang LM, Lee LMHJC, Lin CN, Won SJ 2006. Caspase-8 acts as a key upstream executor of mitochondria during justicidin A-induced apoptosis in human hepatoma cells. *FEBS Lett* 580: 3185-3191.

Subbaraju GV, Kavitha JDR, Rajasekhar D, Jimenez JI 2004. Jusbetonin, the first indolo [3,2-b] quinoline alkaloid glycoside, from *Justicia betonica*. *J Nat Prod* 67: 461-462.

Subbaraju GV, Kumar KK, Raju BL, Pillai KR, Reddy MC 1991. Justiciresinol, a new furanoid lignan from *Justicia glauca*. *J Nat Prod* 6: 1639-1641.

Subhashini S, Arunachalam KD 2010. Investigations on the phytochemical activities and wound healing properties of *Adhatoda vasica* leave in Swiss albino mice. *African J Plant Sci* 12: 467-479.

Sun YX, Liu J, Yu H, Gong C 2010. Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from the roots of *Pulsatilla chinensis* with less adverse reactions. *Int Immunopharmacol* 10: 584-590.

Susplugas S, Van Hung N, Bignon J, Thoison O, Kruczynski A, Sévenet T, Guéritte F 2005. Cytotoxic aryl-naphthalene lignans from a Vietnamese acanthaceae, *Justicia patentiflora*. *J Nat Prod* 68: 734-738.

Tabuti JRS 2008. Herbal medicines used in the treatment of malaria in Budiope country, Uganda. *J Ethnopharmacol* 116: 33-42.

Tapiero H, Ba GN, Couvreur P, Tew KD 2002. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. *Biomed Pharmacot* 56: 215-222.

Teklehaymanot T 2009. Ethnobotanical study of knowledge and medicinal plants use by the people in Dek Island in Ethiopia. *J Ethnopharmacol* 124: 69-78.

Tene V, Malagón O, Finzi PV, Vidari G, Armijos C, Zaragoza T 2007. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchi, Ecuador. *J Ethnopharmacol* 111: 63-81.

Thérien M, Fitzsimmons BJ, Scheigets J, Macdonald D, Choo LY, Guay J, Falguyret JP, Riendeau D 1993. Justicidin E: A new leukotriene biosynthesis inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett* 3: 2063-2066.

Thomas J, Senthilkumar RS, Kumar RR, Mandal AKA, Muraleedharan N 2008. Induction of gamma-irradiation for decontamination and to increase the storage stability of black teas. *Food Chem* 106: 180–184.

Tian Y, Sun LM, Liu XQ, Li B, Wang Q, Dong JX 2010. Anti-HBV active flavone glucosides from *Euphorbia humifusa* Willd. *Fitoterapia* 81: 799–802.

Tseng YP, Kuo YH, Hu CP, Jeng KS, Janmanchi D, Lin CH, Chou CK, Yeh SF 2008. The role of helioxanthin in inhibiting human hepatitis B viral replication and gene expression by interfering with the host transcriptional machinery of viral promoters. *Antivir Res* 77: 206–214.

Umer S, Asres K, Veeresham C. 2010 Hepatoprotective activities of two Ethiopian medicinal. Plant *Pharm Biol* 48: 461-468.

Vasilev NP, Ionkova I 2005. Cytotoxic activity of extracts from *Linum* cell cultures *Fitoterapia* 76: 50–53.

Vechia LD, Gnoatto SCB, Gosmann G 2009. Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, antiinflamatória e antioxidante. *Quím Nova* 32: 1245-1252.

Viegas-Junior RC, Bolzani VS, Barreiro EJ 2006. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. *Quím Nova* 29: 326-337.

Vega-Avila E, Espejo-Serna A, Alarcon-Aguilar F, Velazco-Lesama R 2009. Cytotoxic activity of four Mexican medicinal plants. *P W Pharmacol Soc* 52: 78-82.

Veitch NC, Elliott PC, Kite GC, Lewis GP 2010. Flavonoid glycosides of the black locust tree, *Robinia pseudoacacia* (Leguminosae) *Phytochemistry* 71: 479–486.

Verdam MCS, Ohana DT, Pereira MM, Lima ES, Dias JFG 2009. Estudo da influência de *Justicia acuminatissima* (Miq.) Bremek. Sobre a agregação plaquetária e coagulação sanguínea. *Visão Acadêmica* (Curitiba) 10: 35-42

Wagner H, Bladt S, Zgainski EM 1996 *Plant Drug Analysis Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München*, 320p.

Wahi SP, Wahi AK, Kapoor R 1974. Chemical study of the leaf of *Justicia gendarussa* Burm. *JRIM* 9: 65-66.

Wang S, Disting GJ, Woodman OL, Maya CN 2004. Selective vasodilator and chronotropic actions of 3,4-dihydroxyflavonol in conscious sheep. *Eur J Pharmacol* 491: 43-51.

Wang CLJ, Ripka WC 1983. Total synthesis of justikidin P. A new lignan lactone from *Justicia extensa*. *J Org Chem* 48: 2555-2557.

- Wasshausen DC, Wood JRI 2004. Acanthaceae of Bolivia. *Contr U S Natl Herb* 49: 1-152.
- Wenga JR, Koa HH, Yeha TL, Linb HC, Lina CN 2004. New aryl-naphthalide lignans and antiplatelet constituents. *Arch Pharm Pharm Med Chem* 337: 207-212.
- Wieteska E, Ziek A, Drzewihska A 1996. Extraction as a method for preparation of vegetable samples for the determination of trace metals by atomic absorption spectrometry. *Anal Chim Acta* 330: 251-257.
- Williams RB, Hoch J, Glass TE, Evans R, Miller JS, Wisse JH, Kingston DGI 2003. A novel cytotoxic guttiferone analogue from *Garcinia macrophylla* from the Suriname Rainforest. *Planta Med* 69: 864-866.
- Woradulayapinij W, Soonthornchareonnon N, Wiwa C 2005. *In vitro* HIV type 1 reverse transcriptase inhibitory activities of Thai medicinal plants and *Canna indica* L. rhizomes. *J Ethnopharmacol* 101: 84-89.
- Woodman OL, Meeker WF, Boujaoude M 2005. Vasorelaxant and antioxidant activity of flavonols and flavones: structure - activity relationships. *J Cardiovasc Pharmacol* 46: 302-309.
- Woodman OL, Malakul W 2009. 3',4'-Dihydroxyflavonol prevents diabetes-induced endothelial dysfunction in rat aorta. *Life Sci* 85: 54-59.
- World Health Organization, 2006. Division of Control of Tropical Diseases. <<http://www.who.int/tdr/publications/publications/pdf>>
- World Health Organization (WHO) 2002. Programme for the surveillance and control of leishmaniasis. Disponivel em: (<http://www.who.int/emc/diseases/leish/index.html>). Acessado em: 04/02/2010.
- World Health Organization (WHO) (1992). Expert committee on specification for pharmaceuticals preparation. Report Geneva WHO 32 (pp. 44-52, 75-76). WHO technical report series 823.
- World Health Organization (WHO) 2006. Guidelines for the treatment of malaria/WHO:226 press.
- Wu CM, Wu SC, Chung WJ, Lin HC, Chen KT, Chen YC, Hsu MF, Yang JM, Wang JP, Lin CN 2007. Antiplatelet effect and selective binding to cyclooxygenase (COX) by molecular docking analysis of flavonoids and lignans. *Int J Mol Sci* 8: 830-841.
- Yada S, Lapsley K, Huang G 2011. A review of composition studies of cultivated almonds: Macronutrients and micronutrients. *J Food Comp Anal* 24: 469-480.
- Yayli N, Yildirim N, Usta A, Ozkurt S, Akgun V 2003. Chemical Constituents of *Campanula lactiflora*. *Turk J Chem* 27: 749- 55.

Yunes RA, Pedrosa RC, Filho VC 2001. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Quím Nova* 24: 147-152.

Zarzuelo A, Gámez J M, Utrilla P, Jiménez J, Jiménez I 1995. Luteolin 5-rutinoside from *salvia la vandulifolia* ssp. *Oxyodon*. *Phytochemistry* 40: 1321-1322.

Zhang Z, Wang S, Shixi W, Wan S, Ren S, Li W, Jiang T 2009. Efficient synthesis of jusbetonin, an indolo[3,2-*b*]quinoline glycoside, and its derivatives. *Carbohydrate Res* 344: 291-297.

Zhenli LH, Xiaoe EY, Peter JS 2005. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *J Trace Elem Med Biol* 19: 125–140.

Zingales B, Stolf BS, Souto RP, Fernandez O, Briones MRS 1999. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages base don ribosomal RNA sequences. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 159-164,.

Anexo 1

Espectros

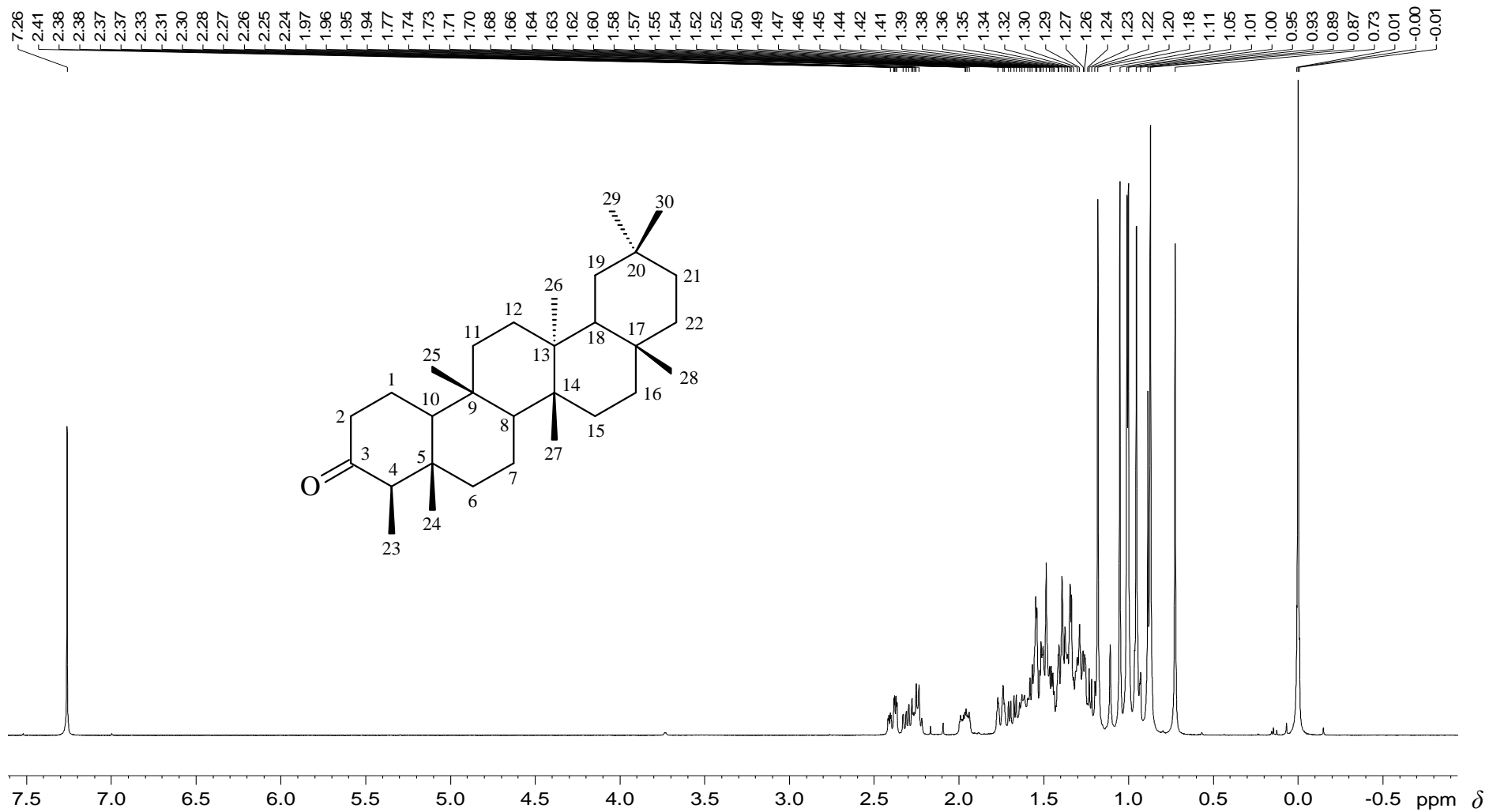


Figura A1. Espectro de RMN de ¹H de FHF-HD3 (400 MHz; CDCl₃): Friedelina.

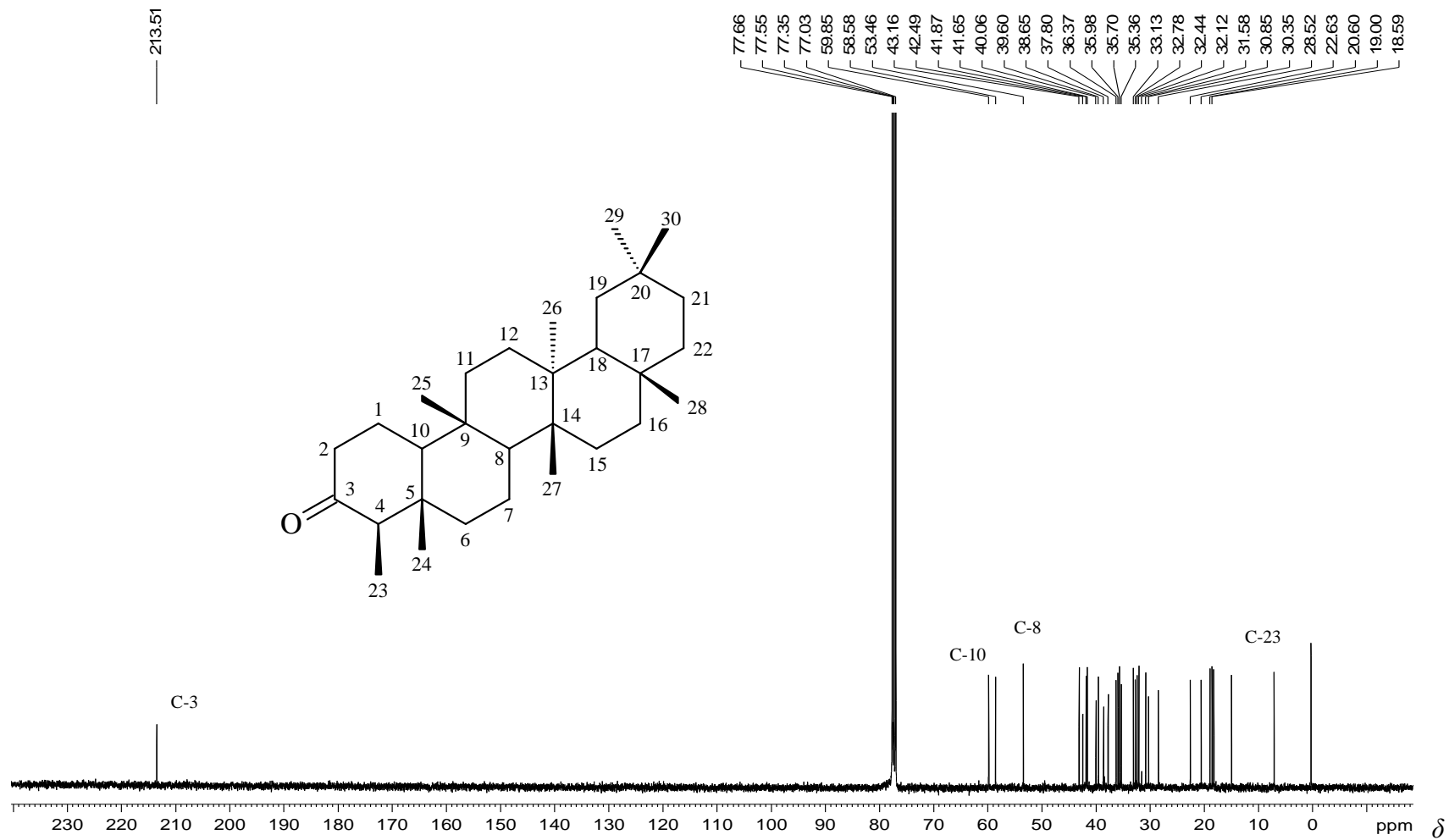


Figura A2. Espectro de RMN de ^{13}C de FHF-HD3 (100 MHz; CDCl_3): Friedelina.

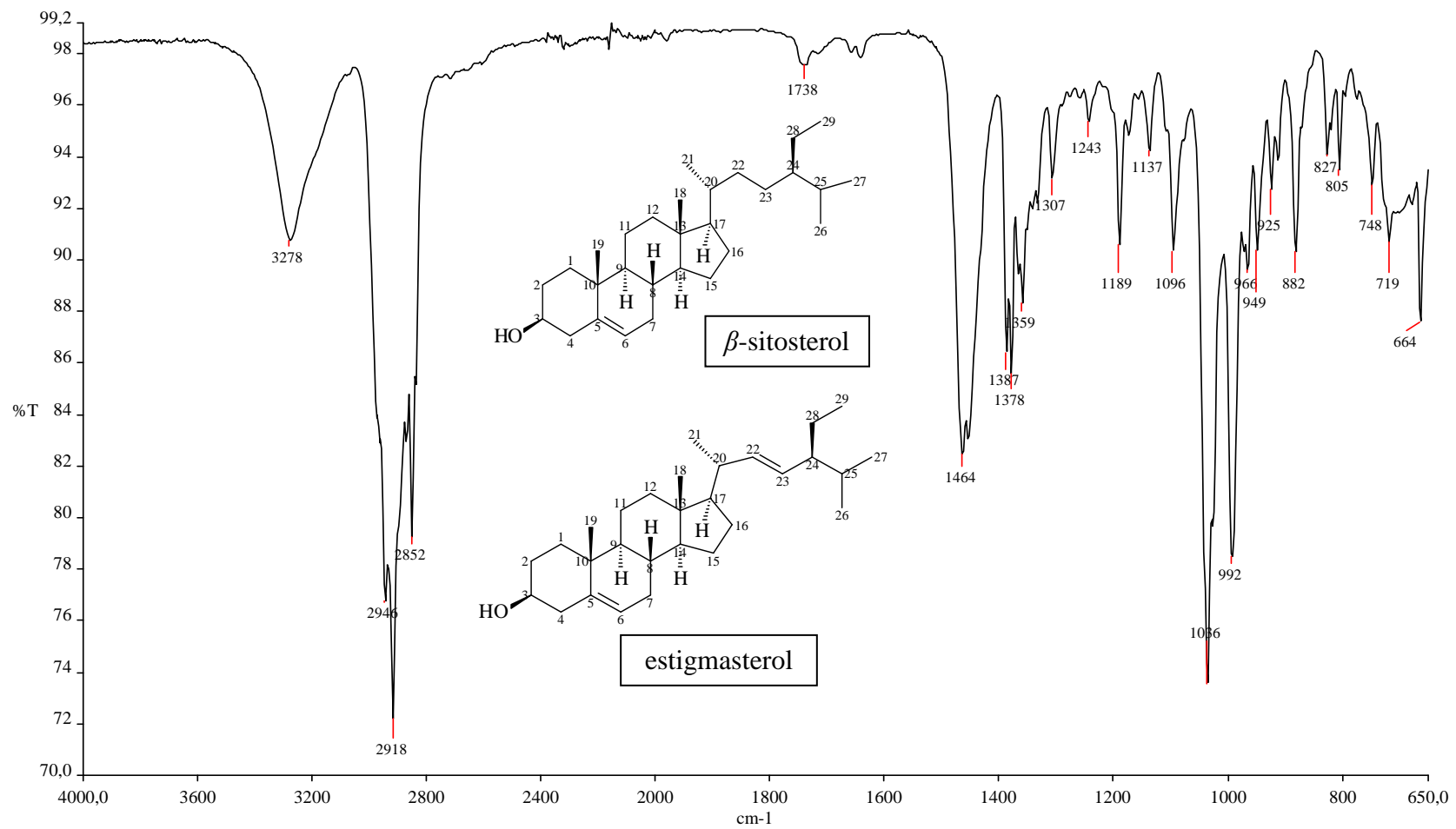


Figura A4. Espectro de absorção na região do Infravermelho de FHF-HD10 (ATR, cm^{-1}): mistura de β -sitosterol e estigmasterol.

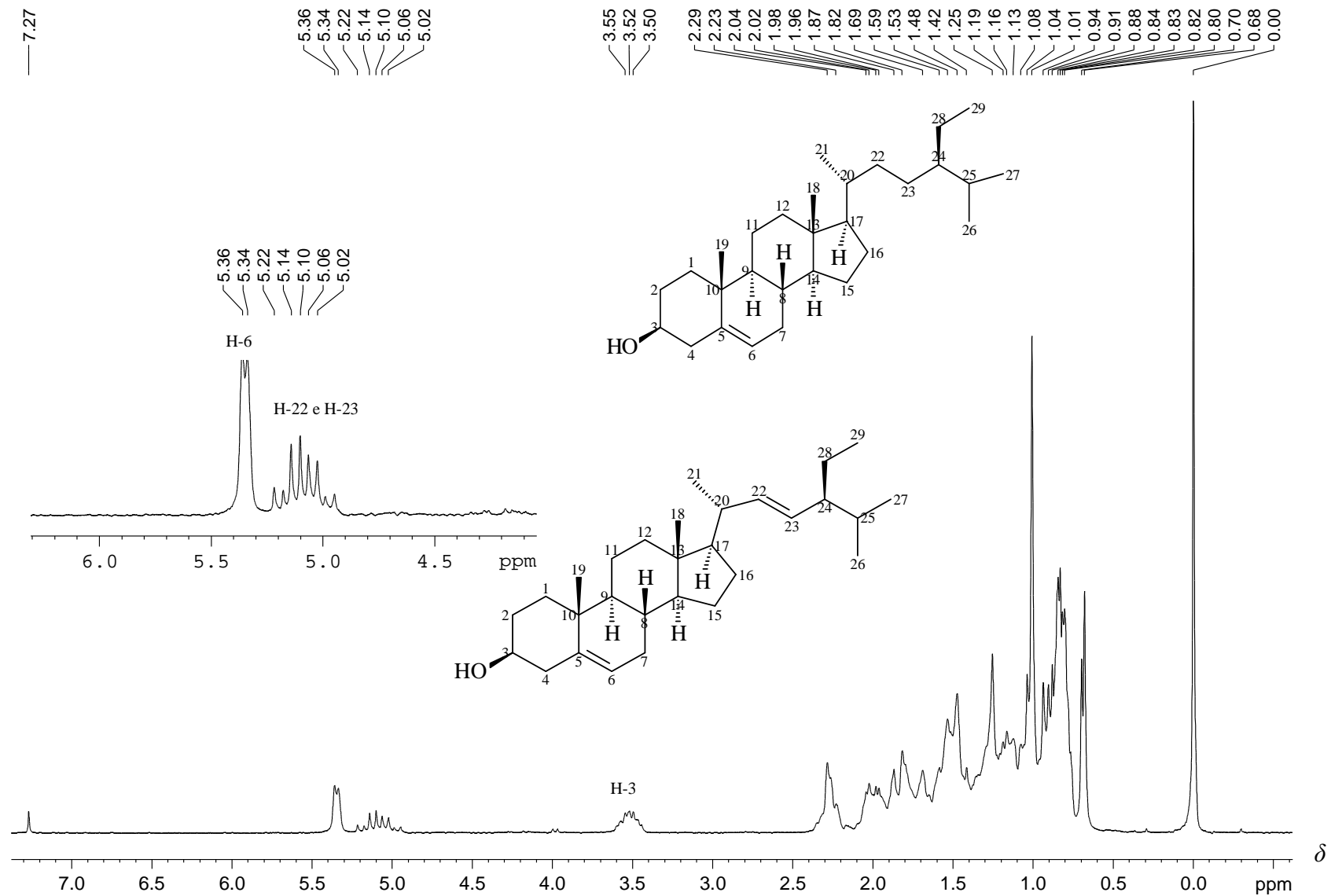


Figura A5. Espectro de RMN de ^1H de FHF-HD10 (200 MHz, CDCl_3): mistura de β -sitosterol e estigmasterol.

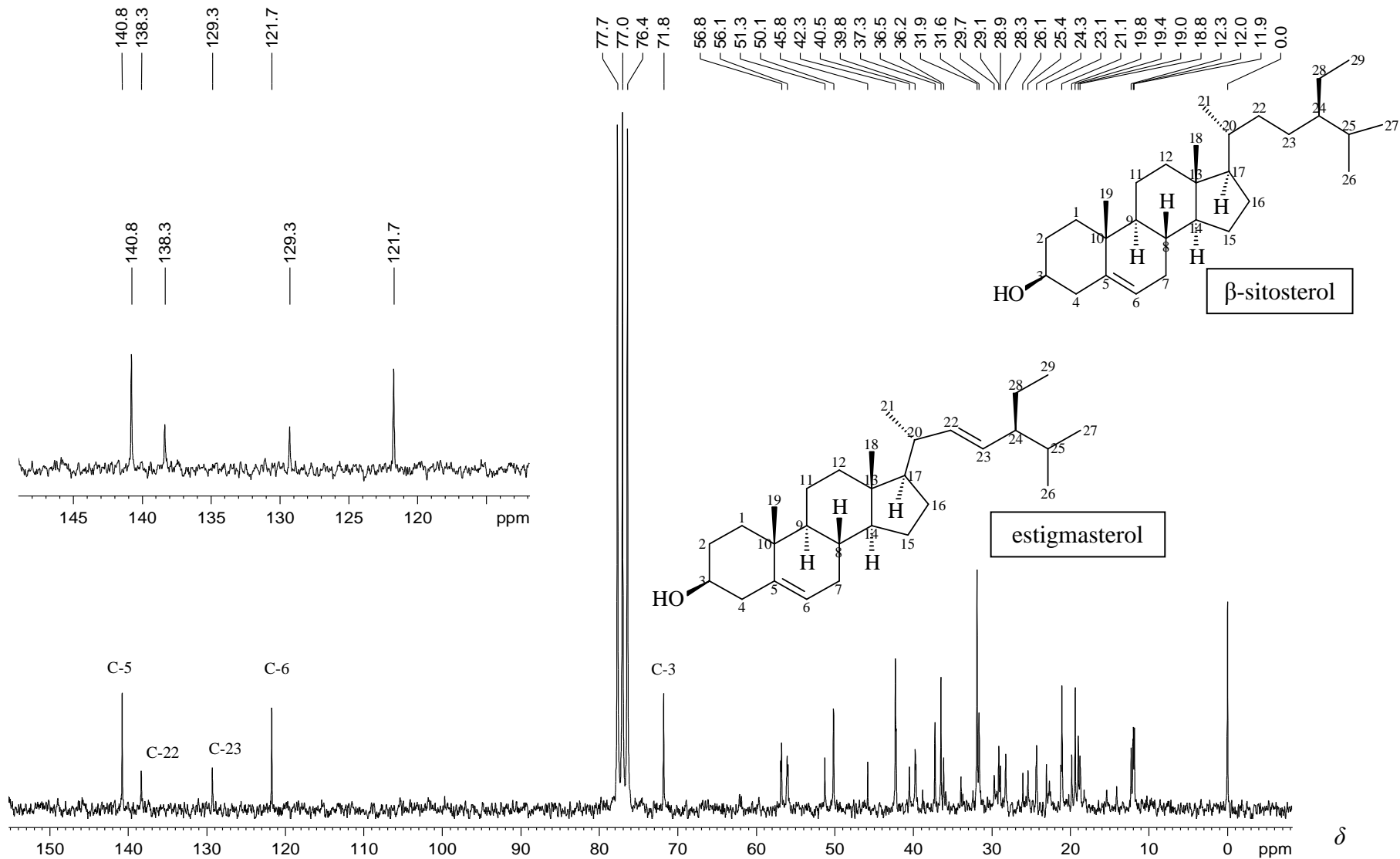


Figura A6. Espectro de RMN de ^{13}C de FHF-HD10 (50 MHz; CDCl_3): mistura de β -sitosterol e estigmasterol.

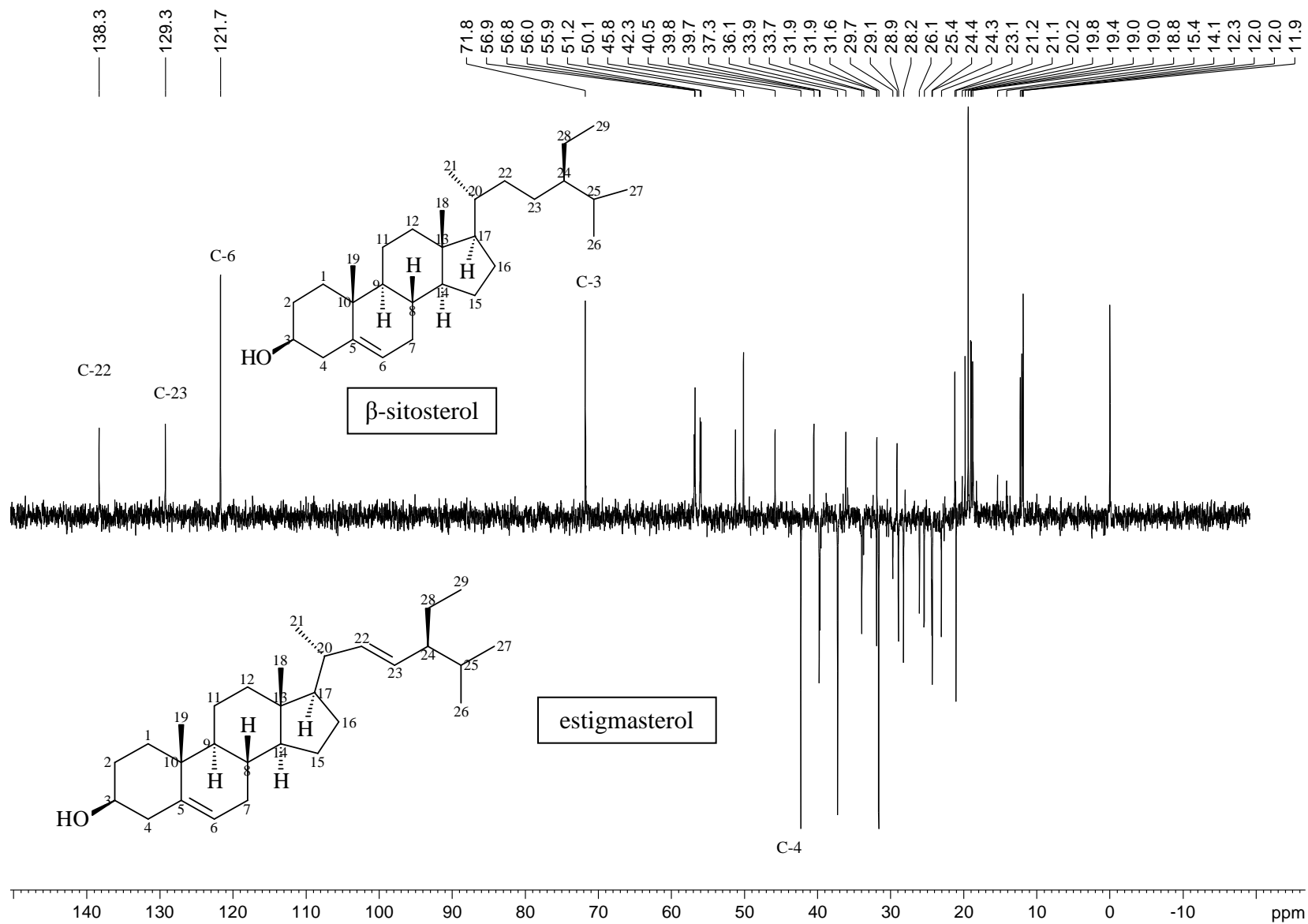


Figura A7. Subespectro de DEPT 135° de FHF-HD10 (50 MHz; CDCl₃): mistura de β -sitosterol e estigmasterol.

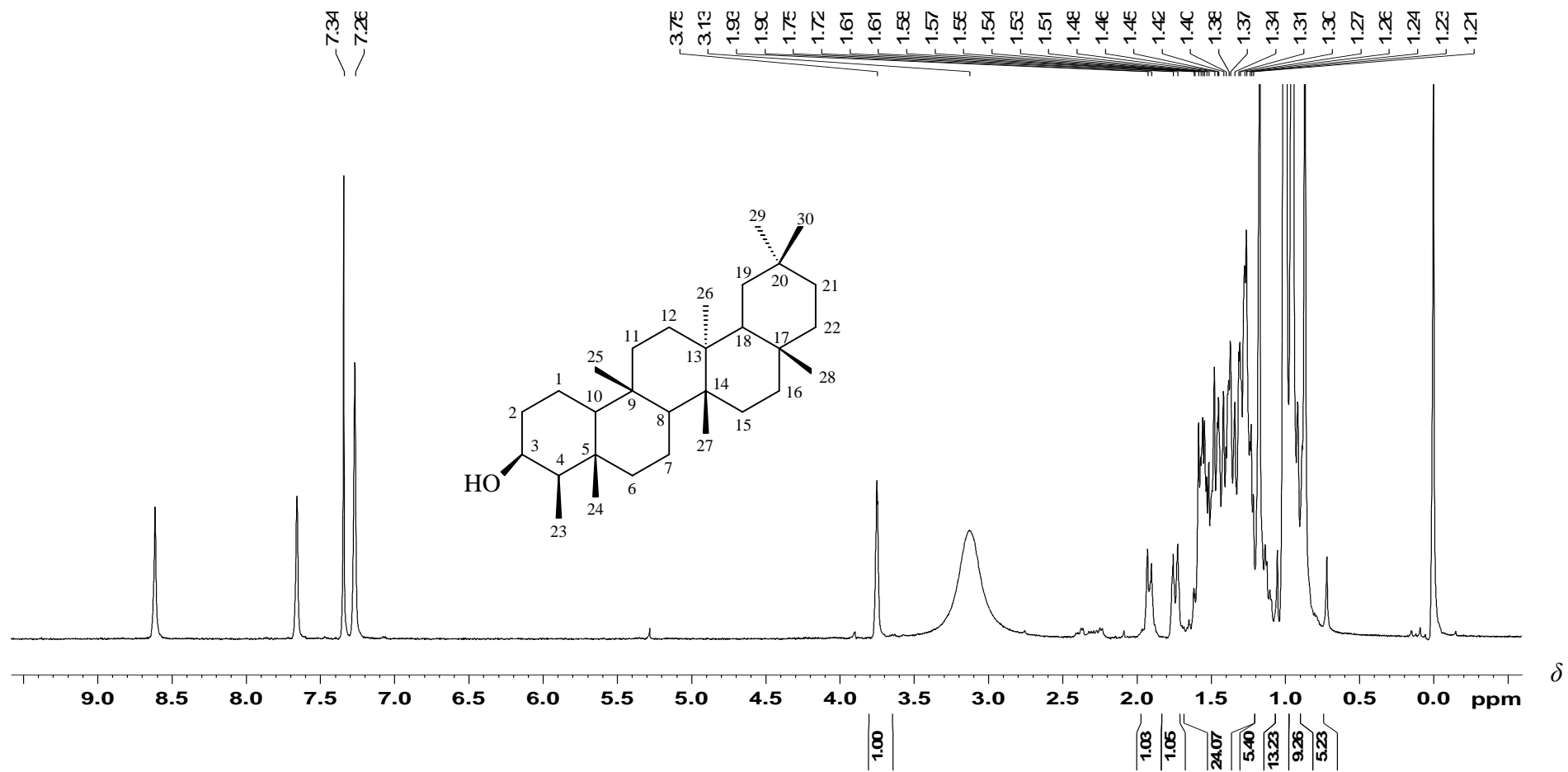


Figura A8. Espectro de RMN de ¹H de FHF-HD18 (400 MHz; CDCl₃ + Pyr-d₅): Friedelinol.

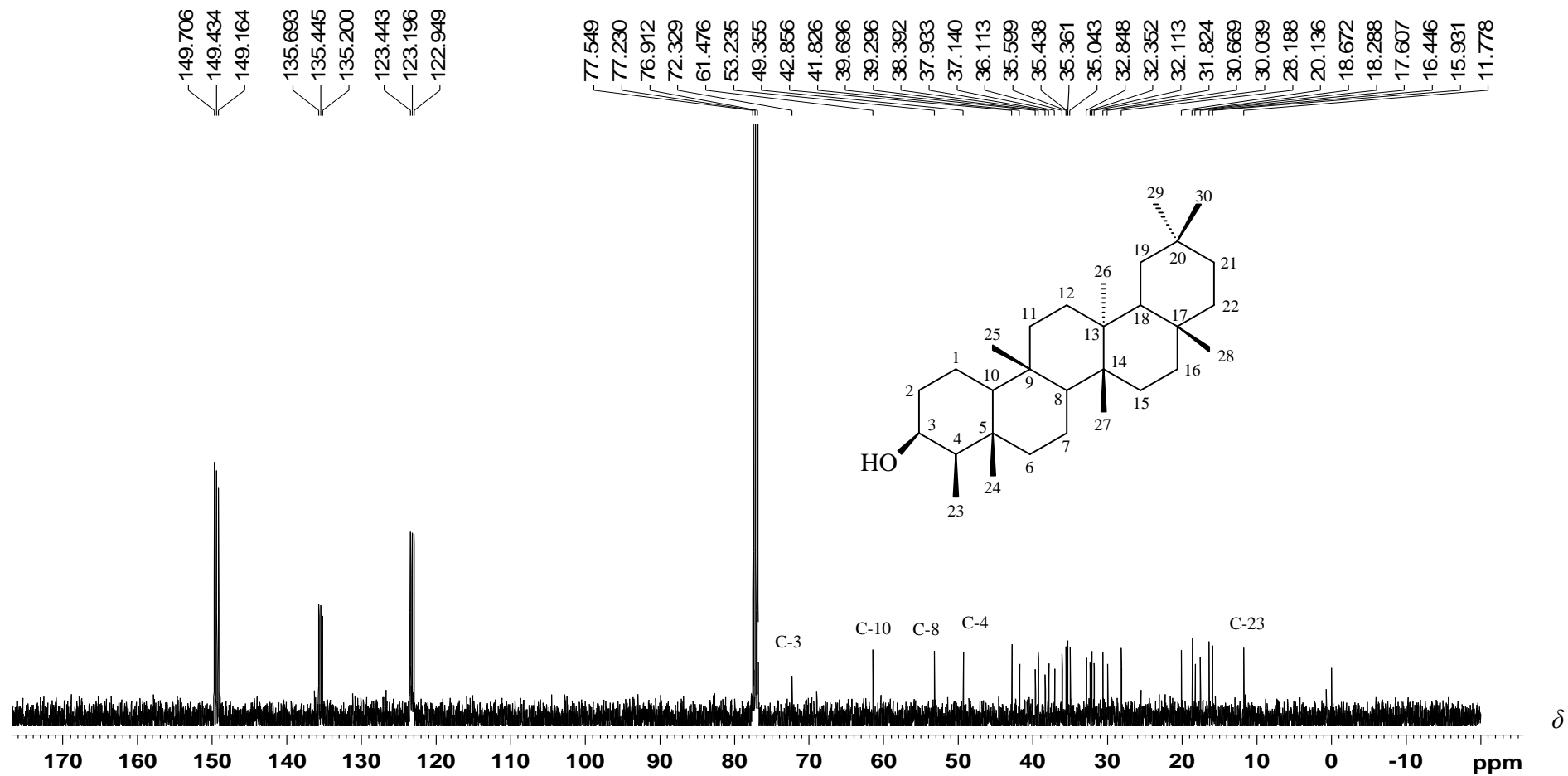


Figura A9. Espectro de RMN de ^{13}C de FHF-HD18 (100 MHz; $\text{CDCl}_3 + \text{Pyr-d}_5$): Friedelinol.

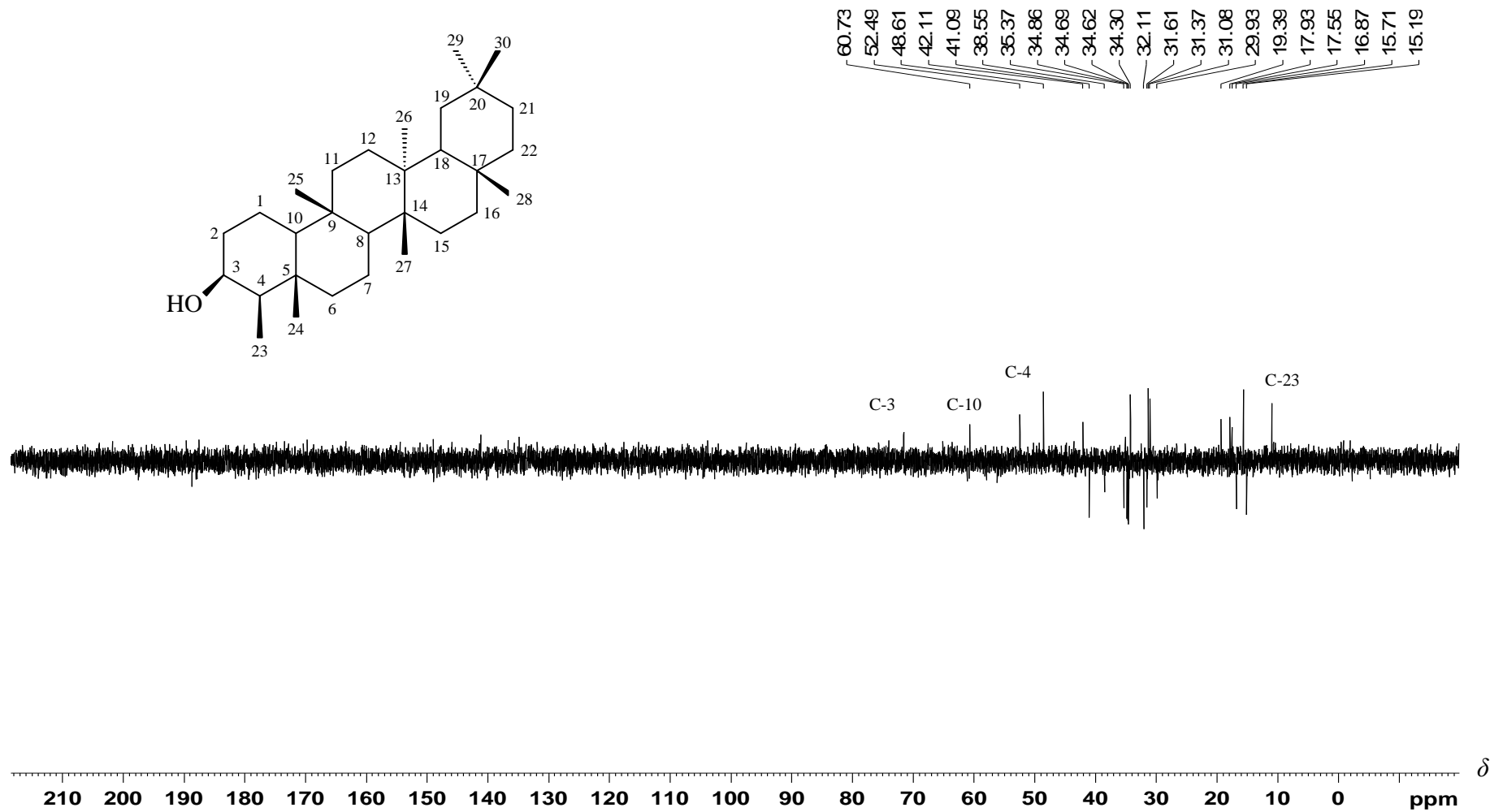


Figura A10. Subespectro de DEPT 135° de FHF-HD18 (100 MHz; CDCl₃ + Pyr-d₅): Friedelinol.

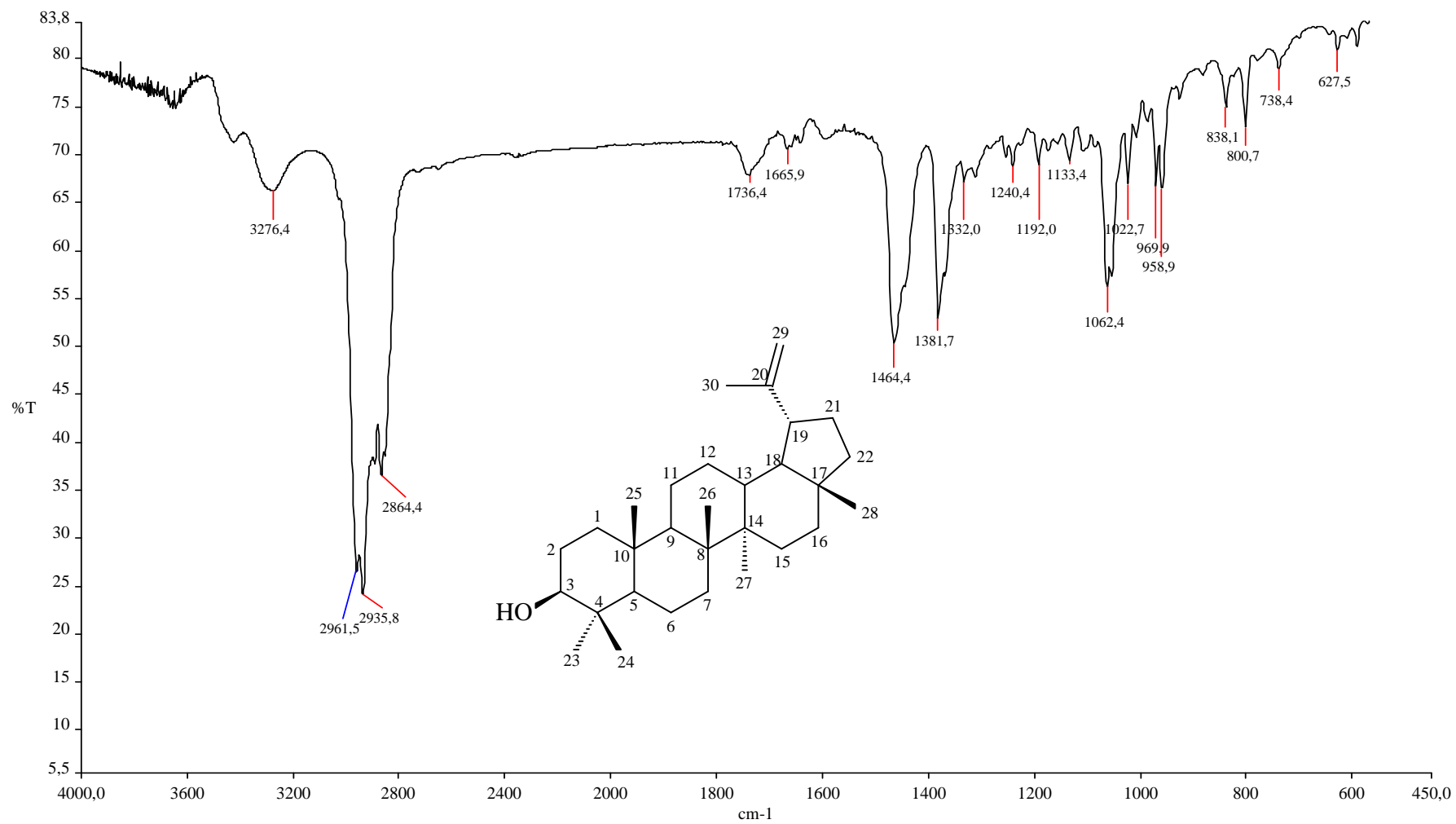


Figura A11. Espectro de absorção na região do Infravermelho de FHG-HD14 (ATR, cm⁻¹): Lupeol.

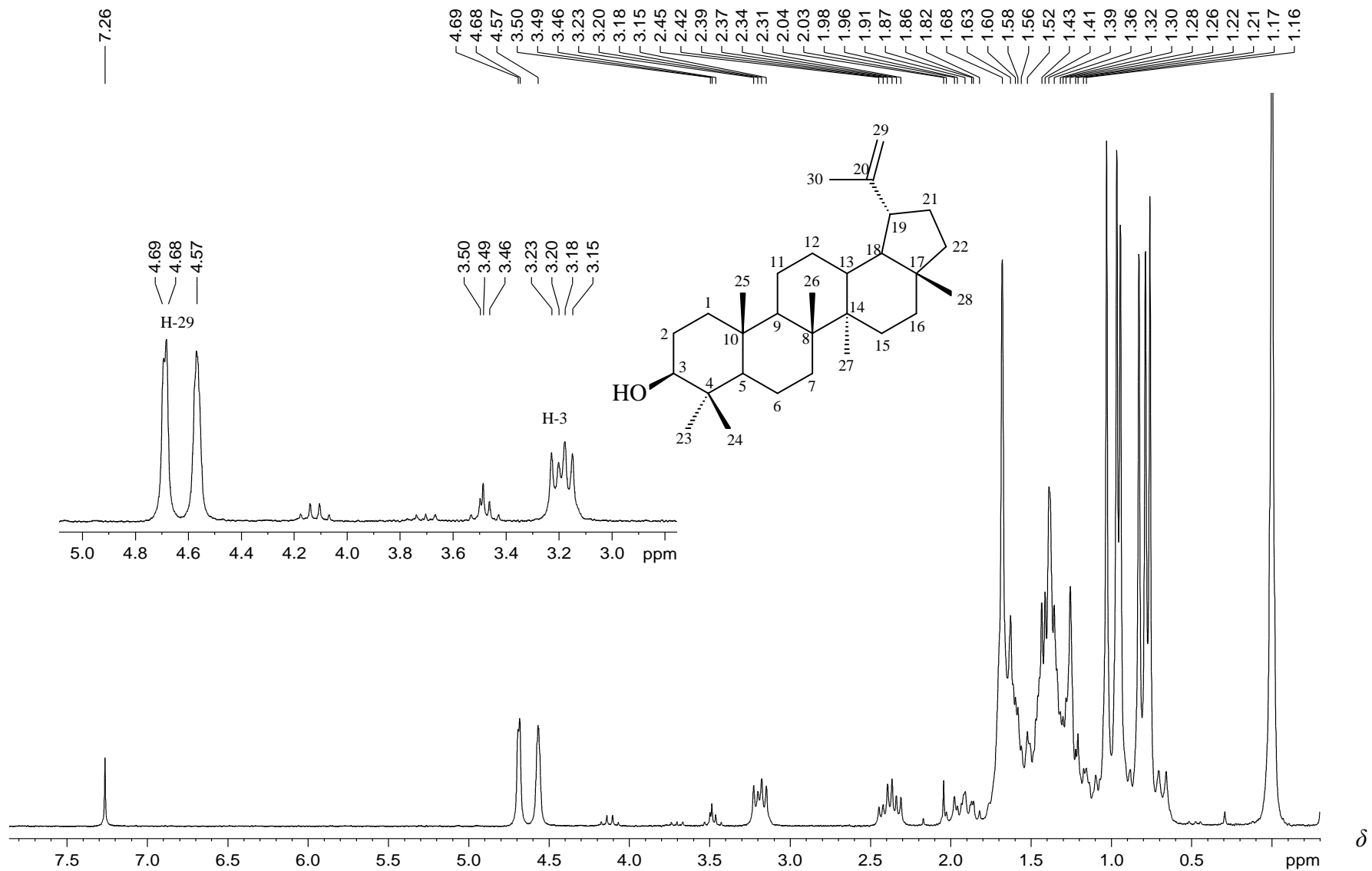


Figura A12. Espectro de RMN de ^1H de FHG-HD14 (200 MHz; CDCl_3): Lupeol.

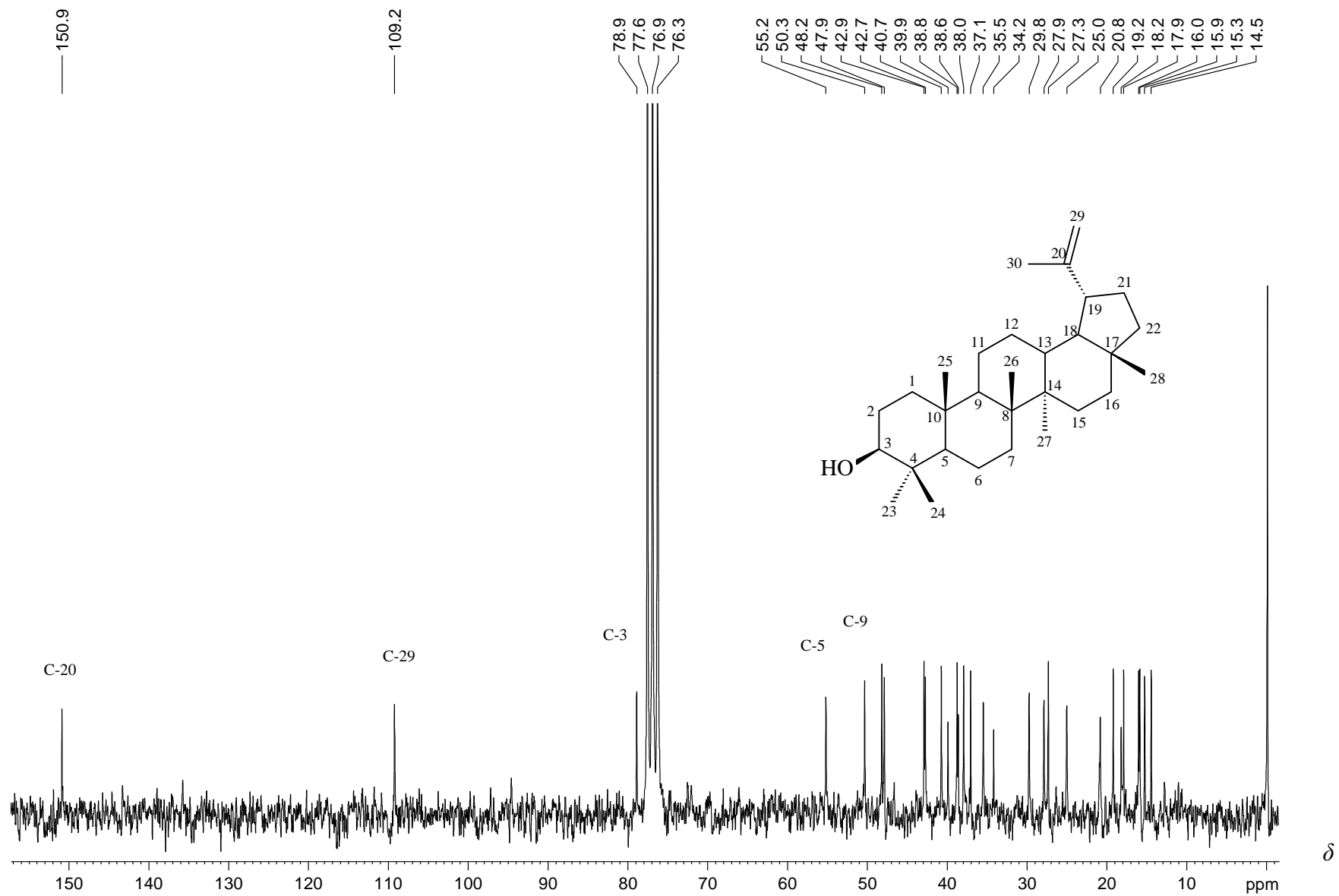


Figura A13. Espectro de RMN de ^{13}C de FHG-HD14 (50 MHz; CDCl_3): Lupeol.

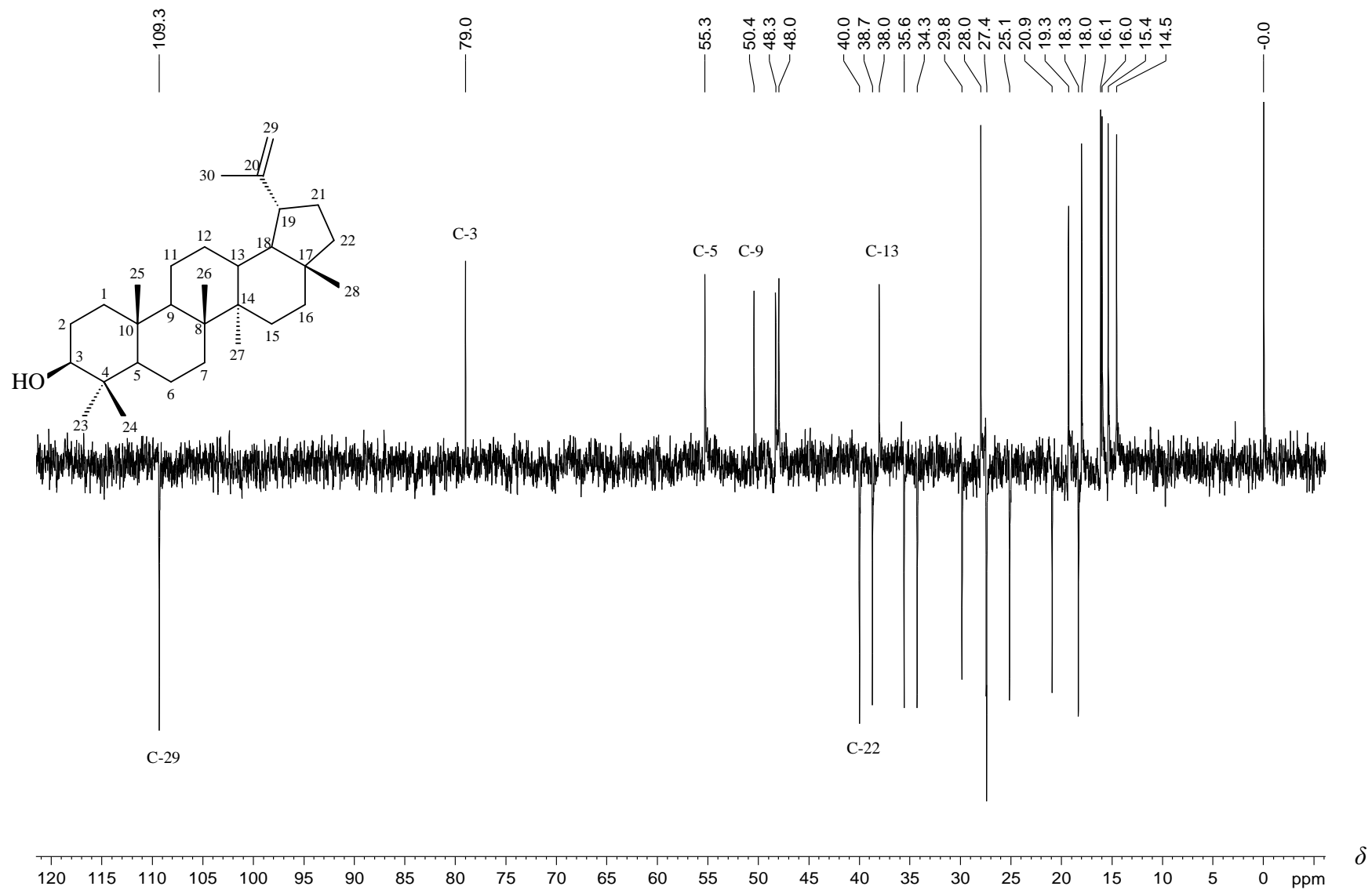


Figura A14. Subespectro de DEPT 135° de FHG-HD14 (50 MHz; CDCl₃): Lupeol.

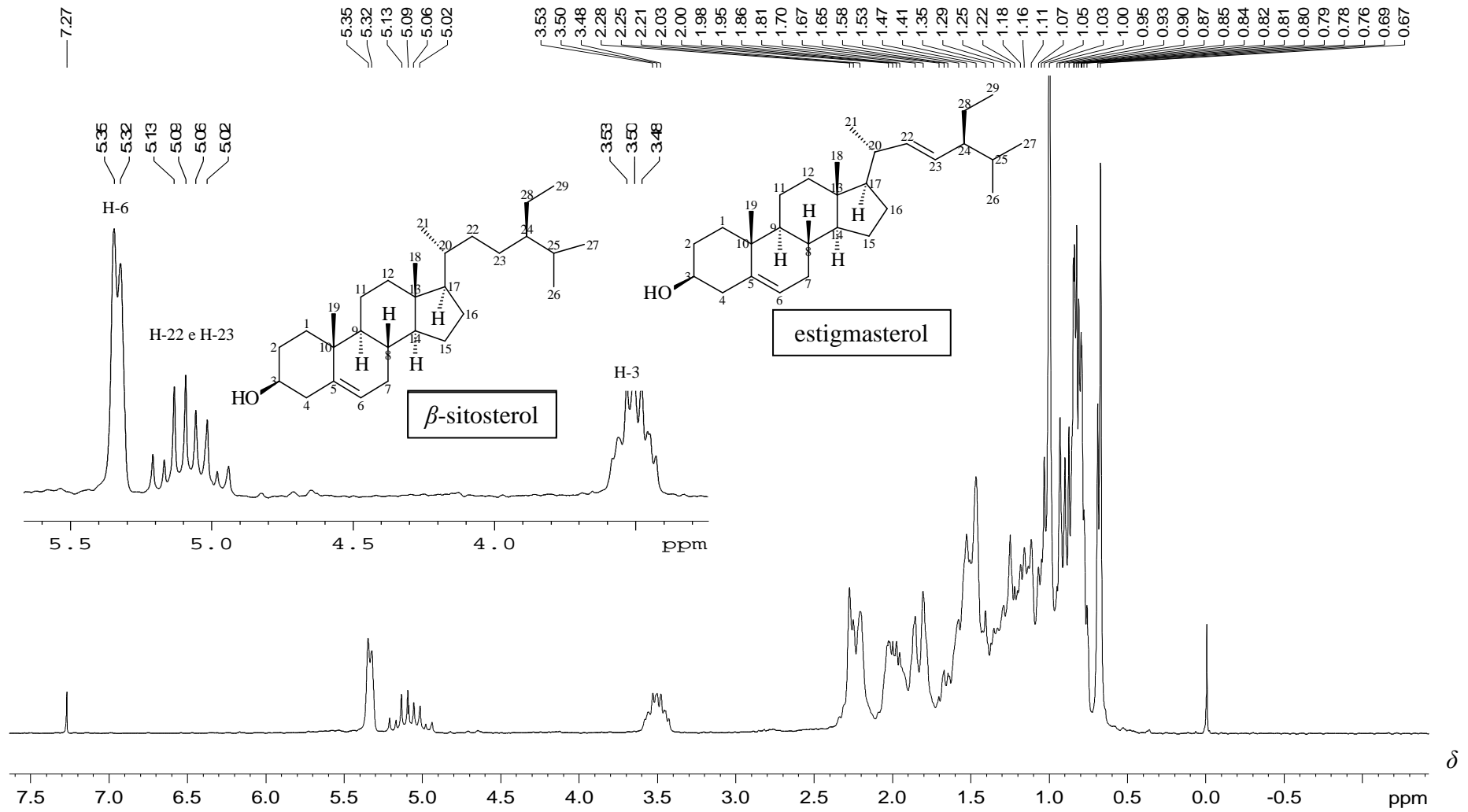


Figura A15. Espectro de RMN de ¹H de FHG-HD22 (200 MHz, CDCl₃): mistura de β-sitosterol e estigmasterol.

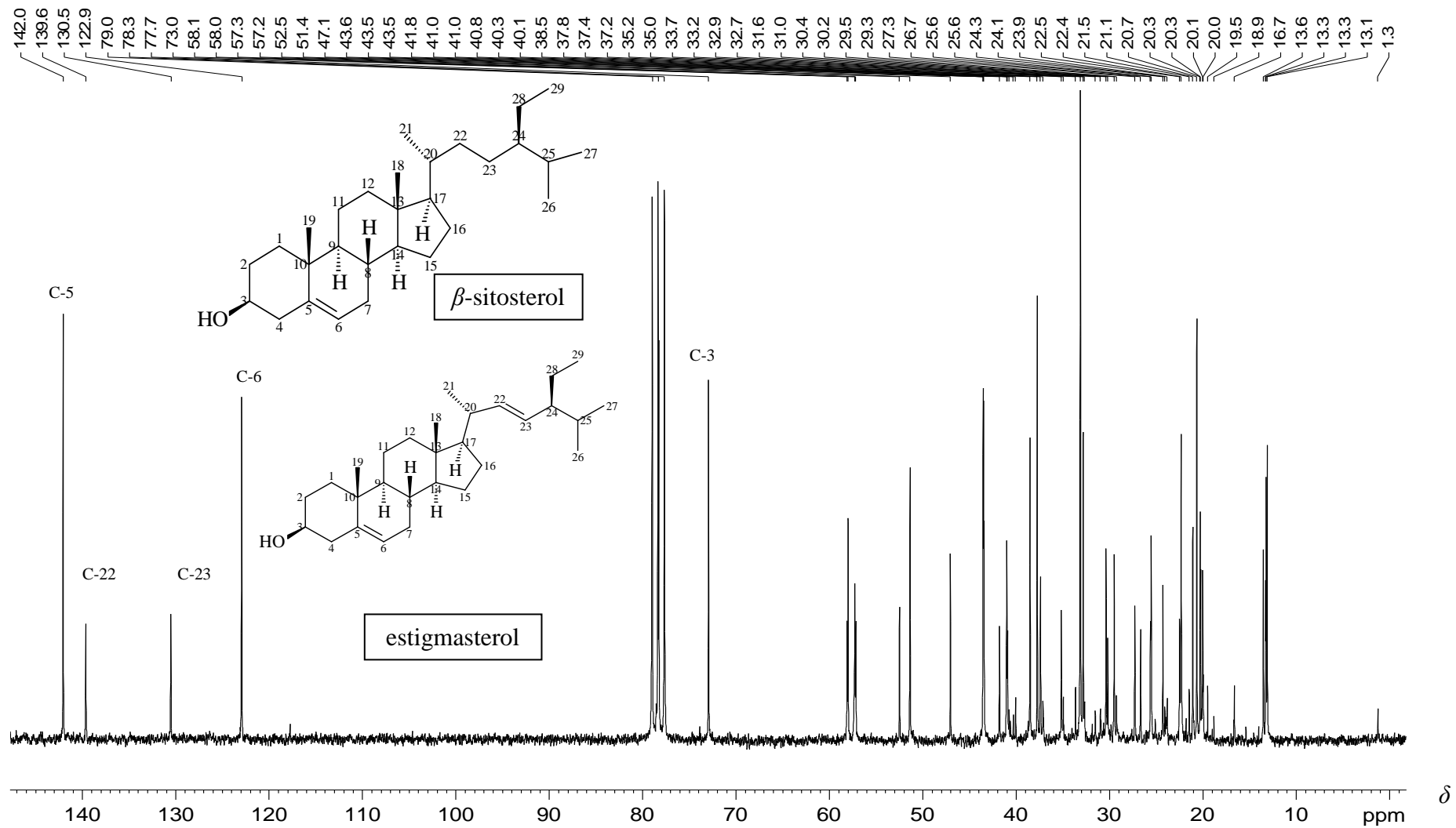


Figura A16. Espectro de RMN de ^{13}C de FHG-HD22 (50 MHz; CDCl_3): mistura de β -sitosterol e estigmasterol.

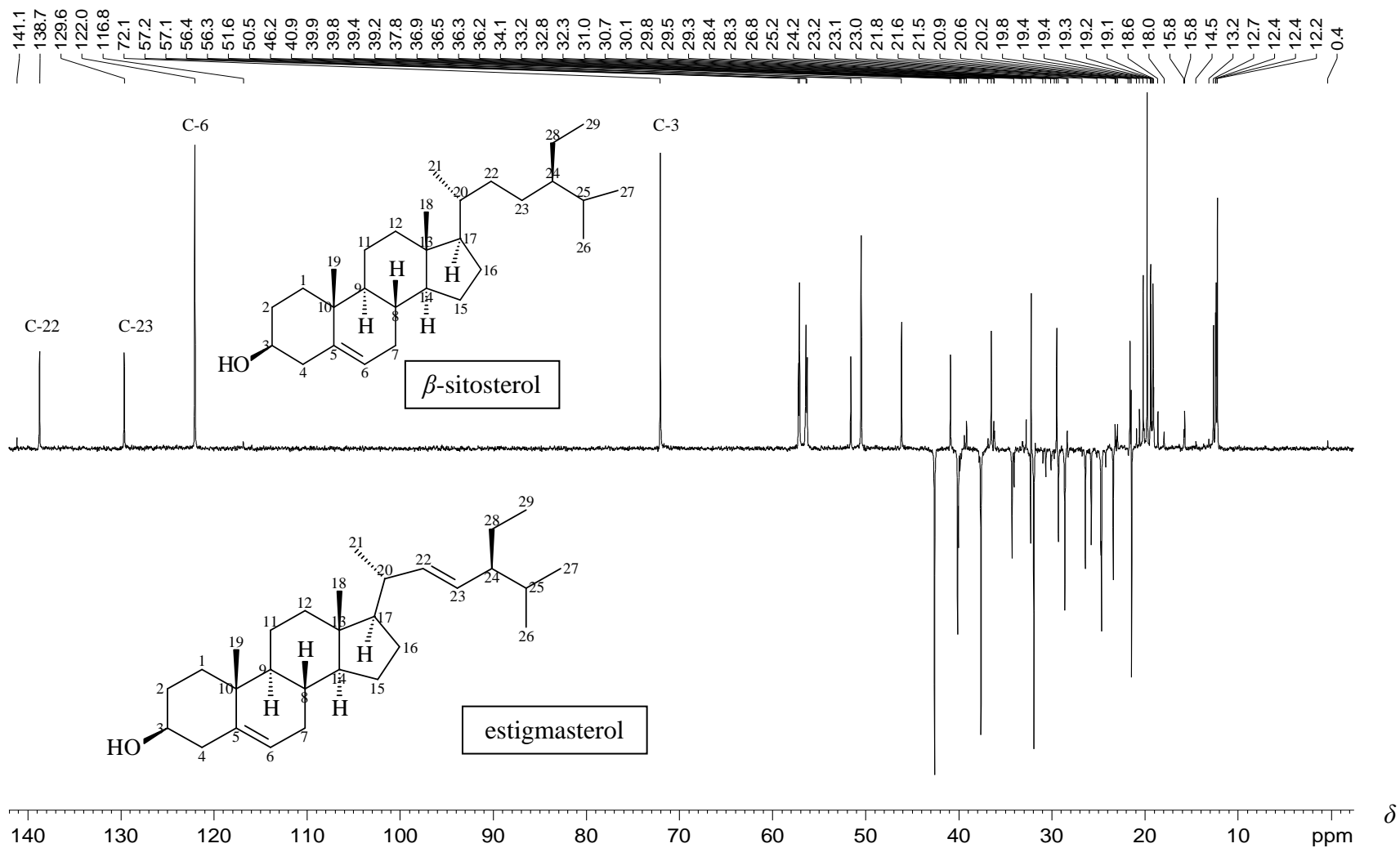


Figura A17. Subespectro de DEPT 135° de FHG-HD22 (50 MHz; CDCl₃): mistura de β -sitosterol e estigmasterol.

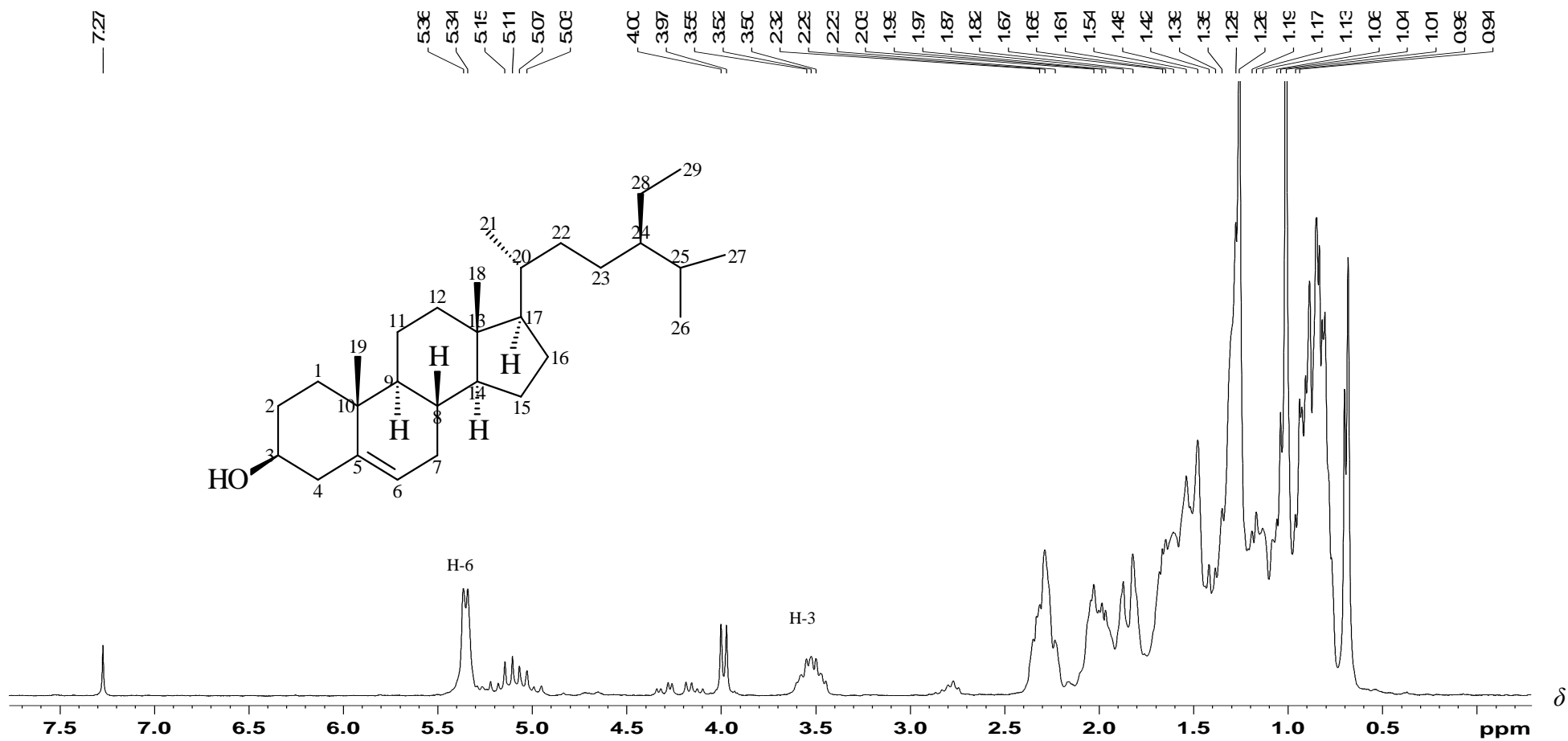


Figura A18. Espectro de RMN de ¹H de FDF-HD4 (200 MHz, CDCl₃): β-sitosterol.

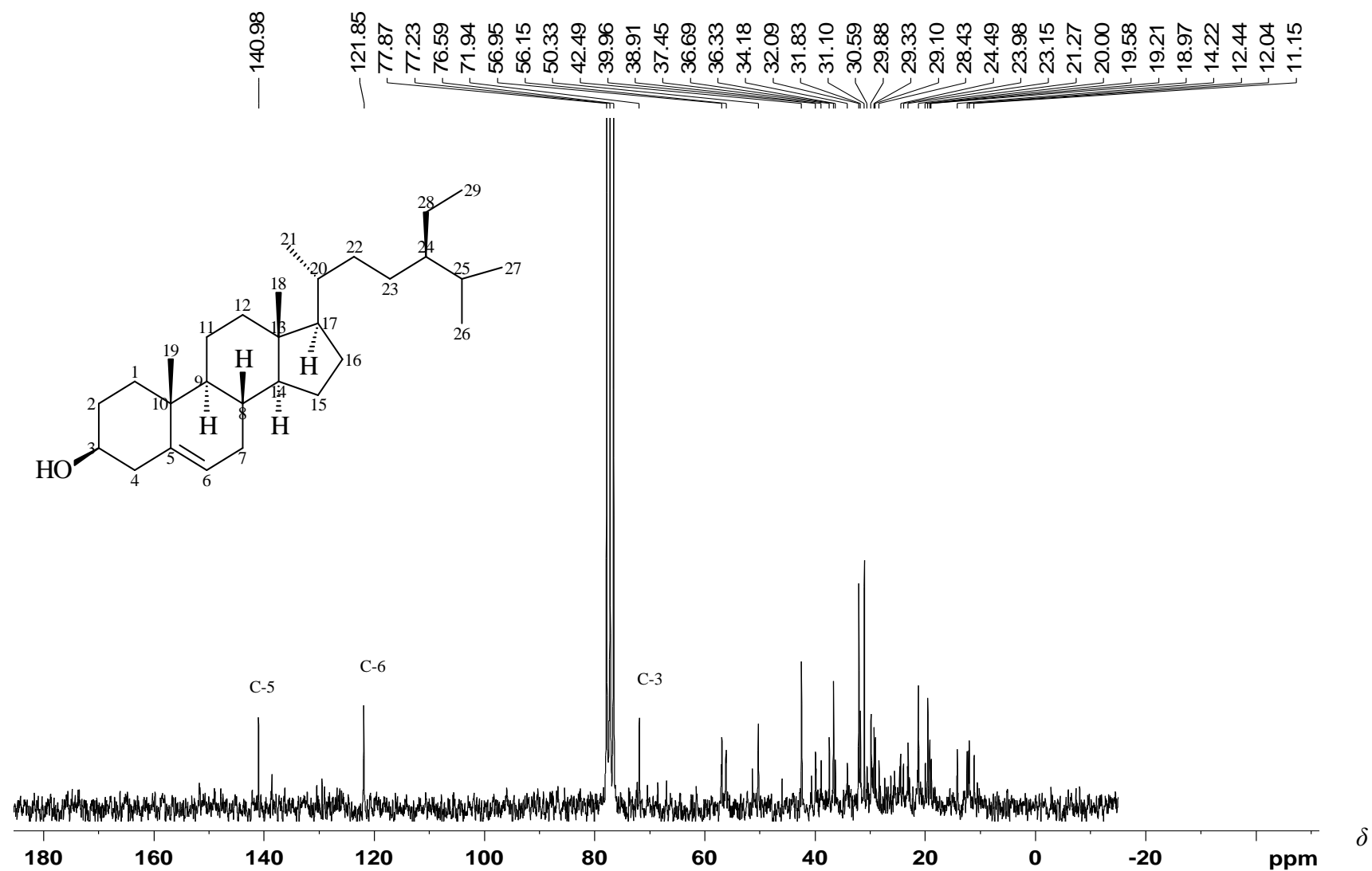


Figura A19. Espectro de RMN de ^{13}C de FDF-HD4 (50 MHz; CDCl_3): β -sitosterol.

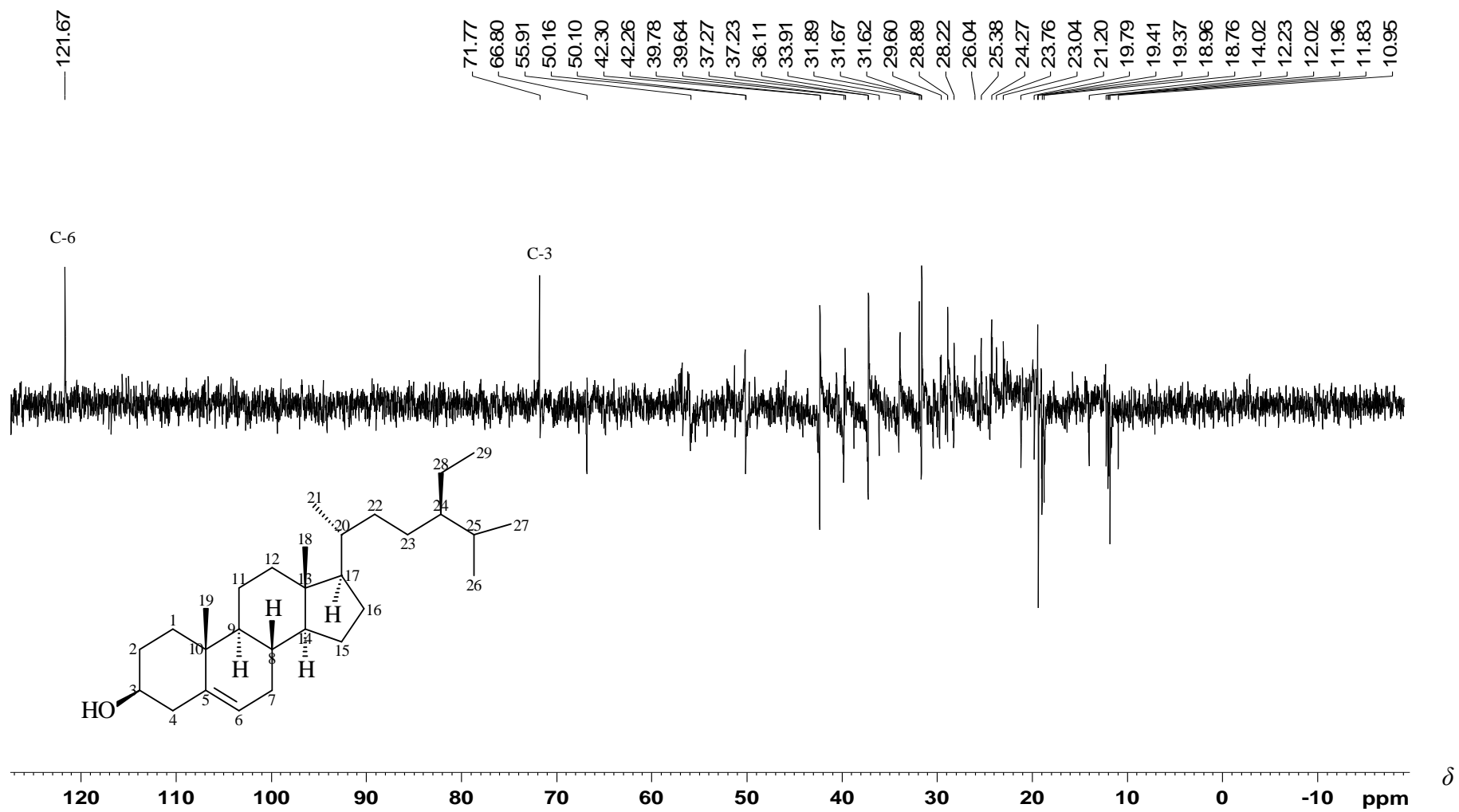


Figura A20. Subespectro de DEPT 135° de FDF-HD4 (50 MHz; CDCl₃): β -sitosterol.

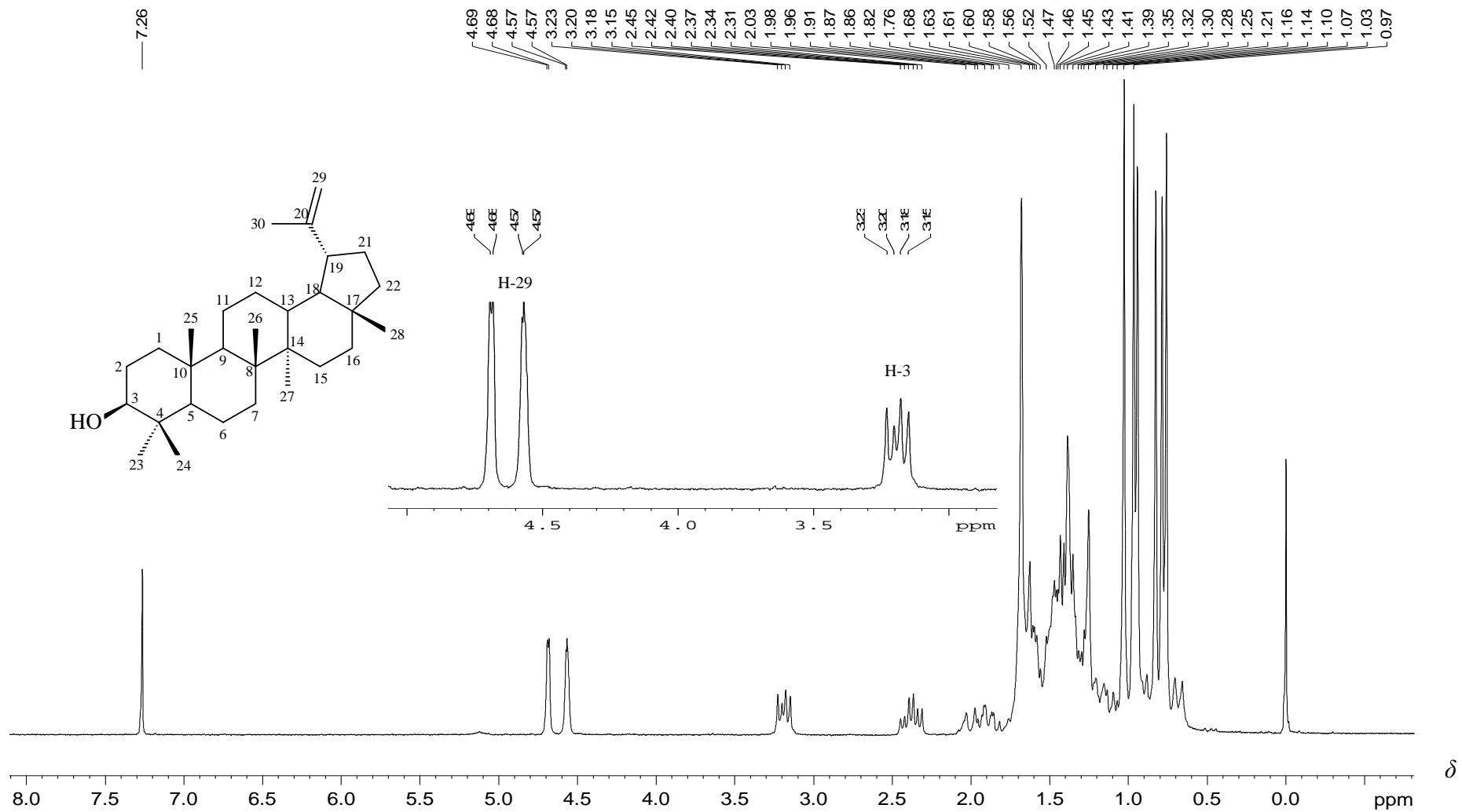


Figura A21. Espectro de RMN de ^1H de FDF-HD9 (200 MHz, CDCl_3): Lupeol.

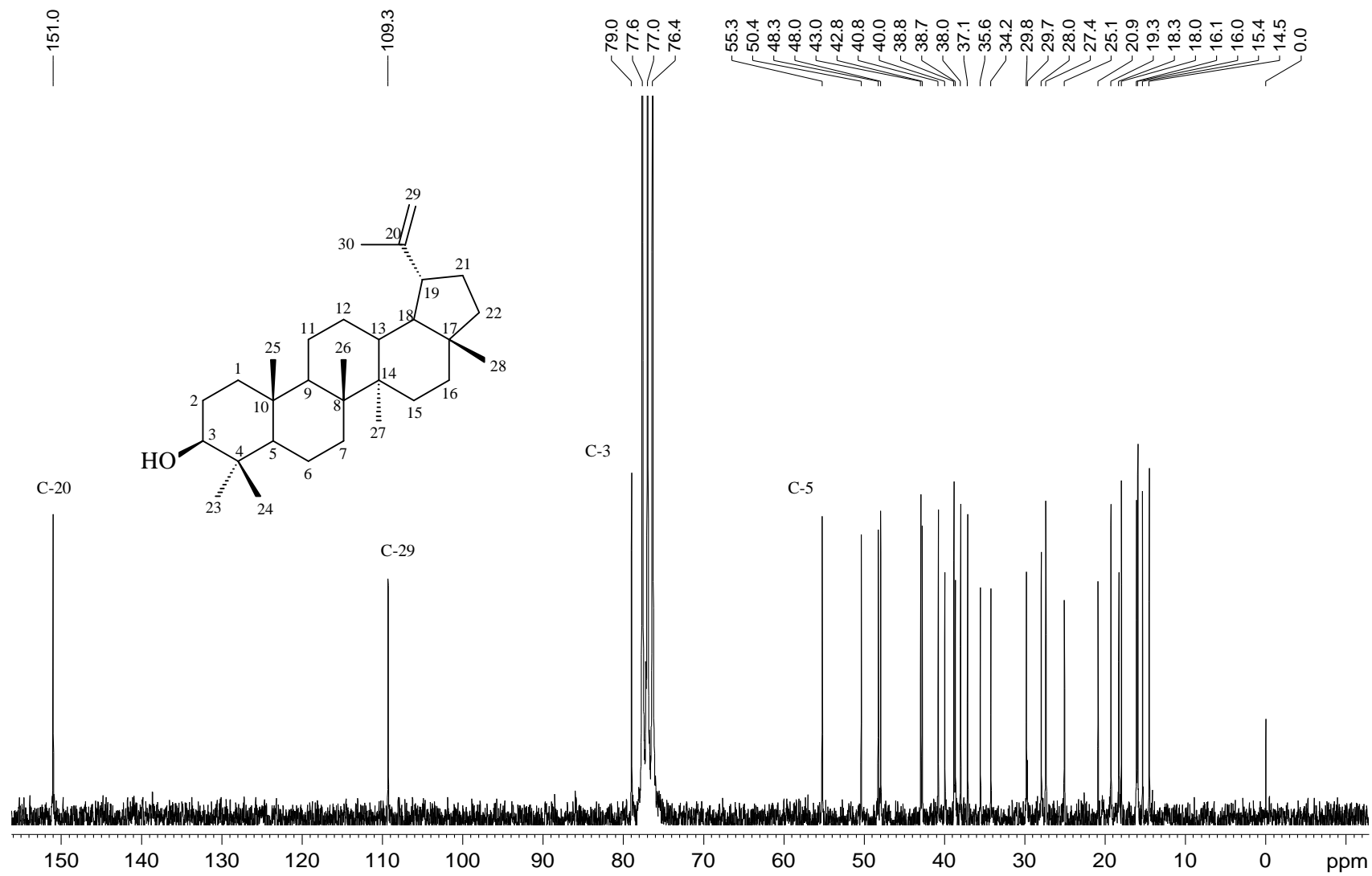


Figura A22. Espectro de RMN de ^{13}C de FDF-HD9 (50 MHz; CDCl_3): Lupeol.

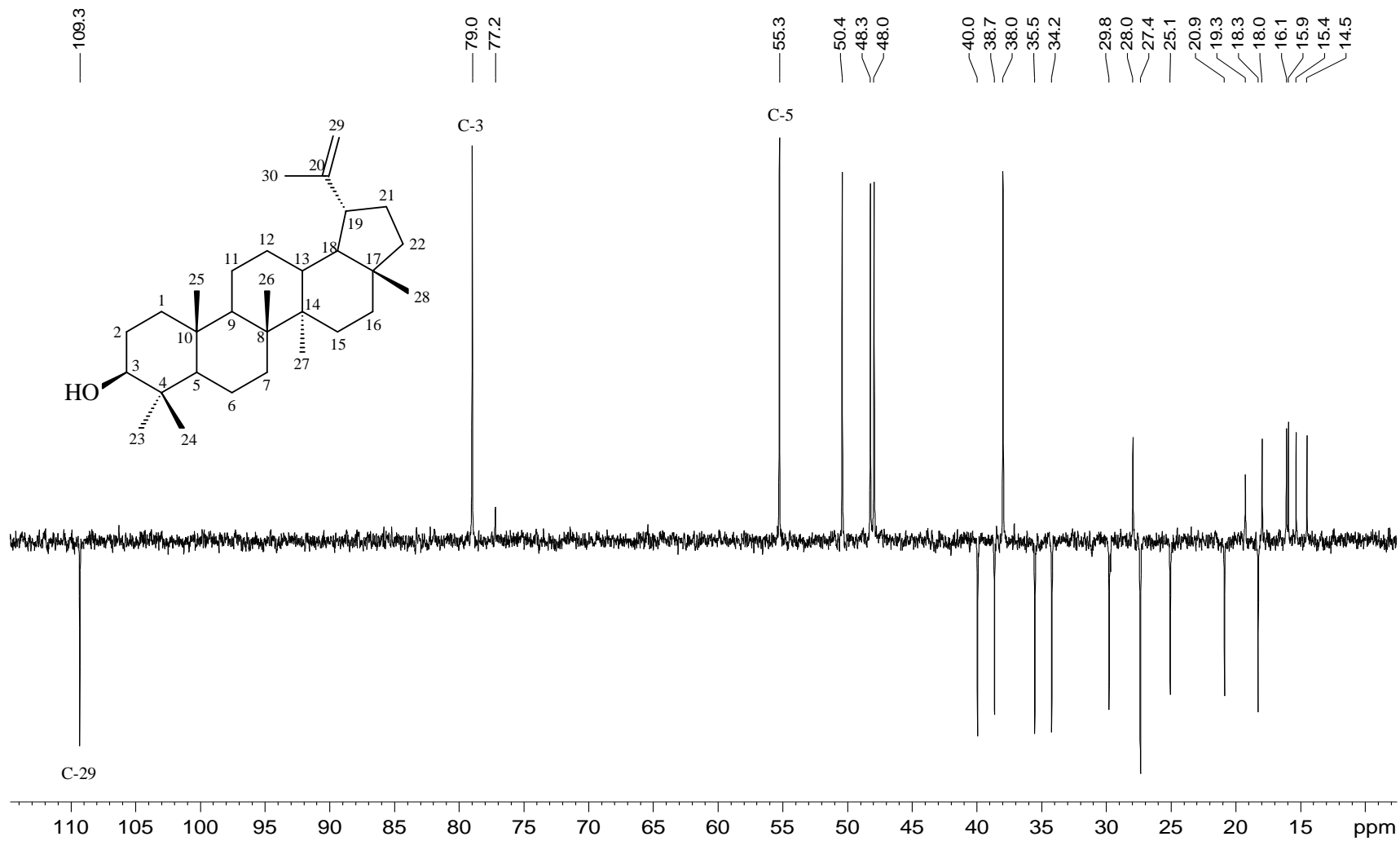


Figura A23. Subespectro de DEPT 135° de FDF-HD9 (50 MHz; CDCl₃): Lupeol.

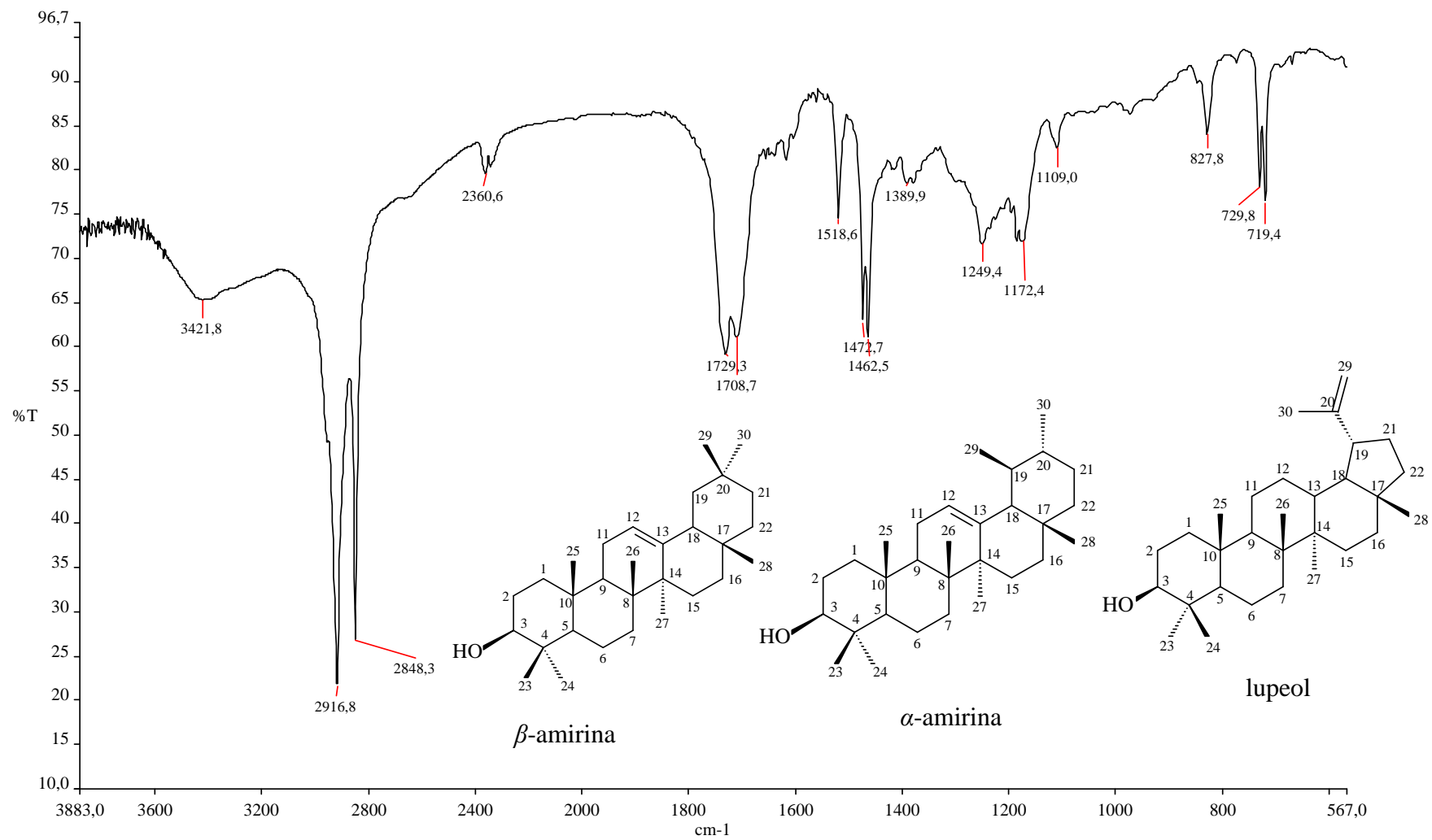


Figura A24. Espectro de absorção na região do Infravermelho de FDF-HD25 (ATR, cm⁻¹): mistura de α -amirina, β -amirina e lupeol.

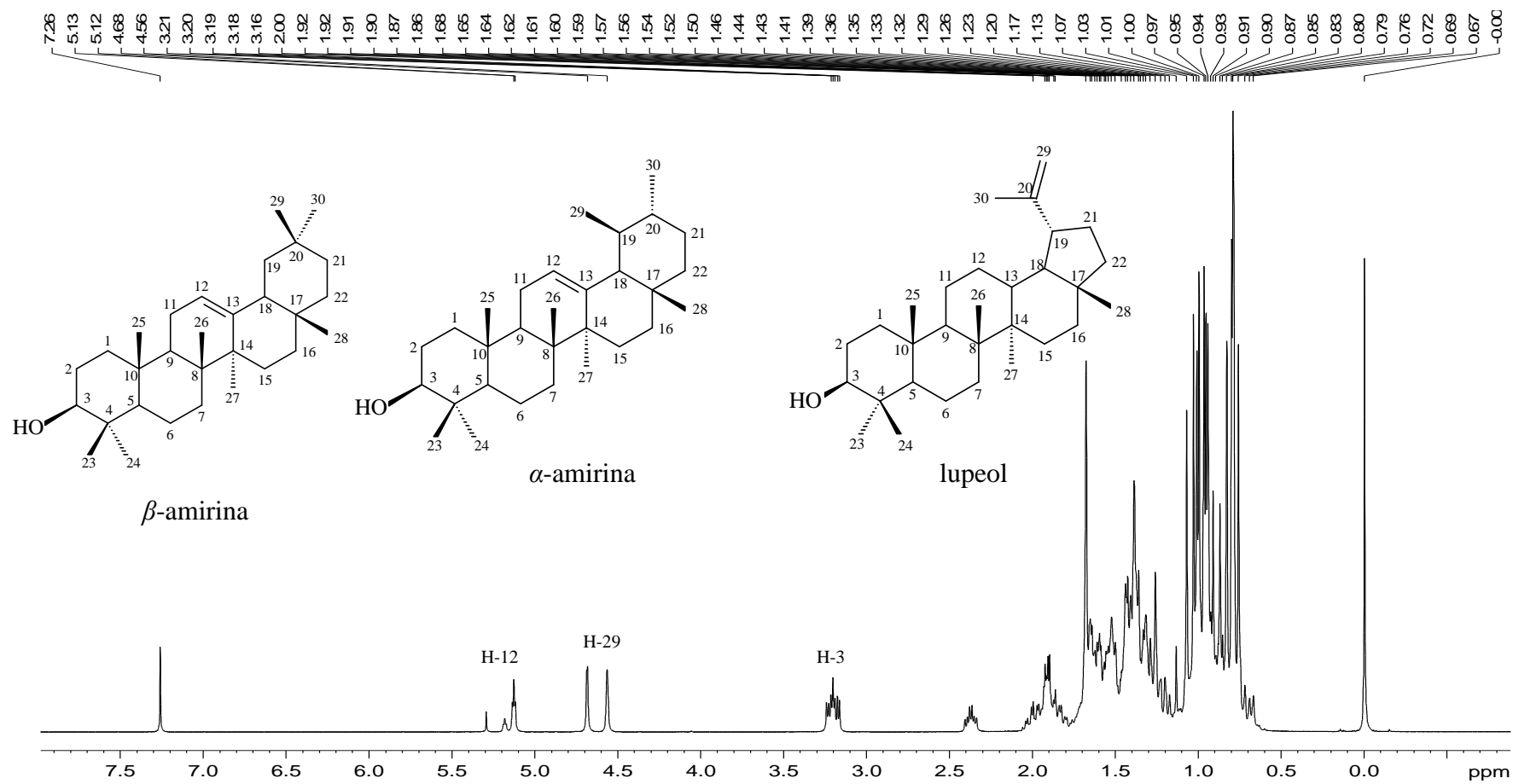


Figura A25. Espectro de RMN de ^1H de FDF-HD25 (200 MHz; CDCl_3): mistura de α -amirina, β -amirina e lupeol.

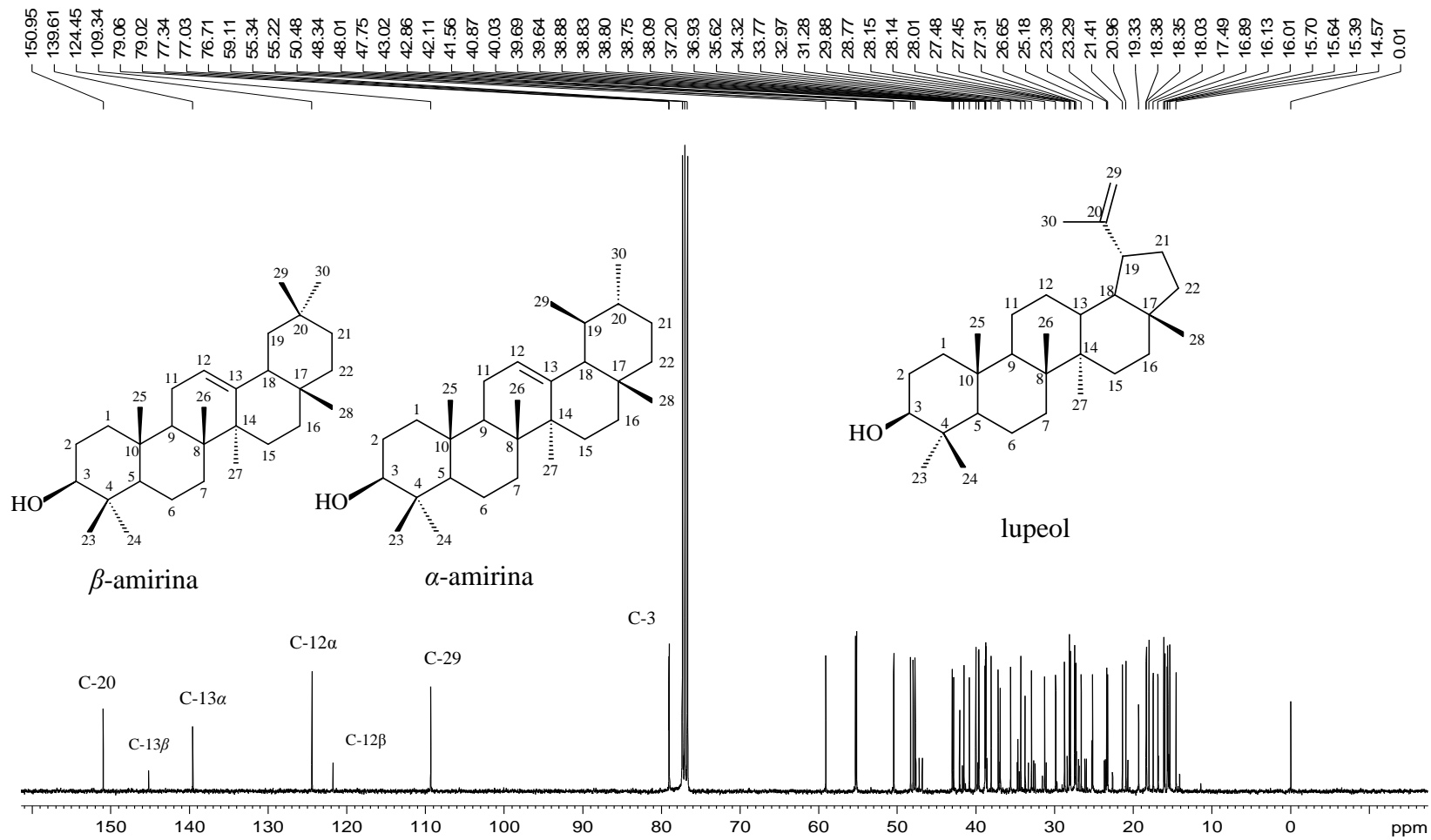


Figura A26. Espectro de RMN de ^{13}C de FDF-HD25 (50 MHz; CDCl_3): mistura de α -amirina, β -amirina e lupeol.

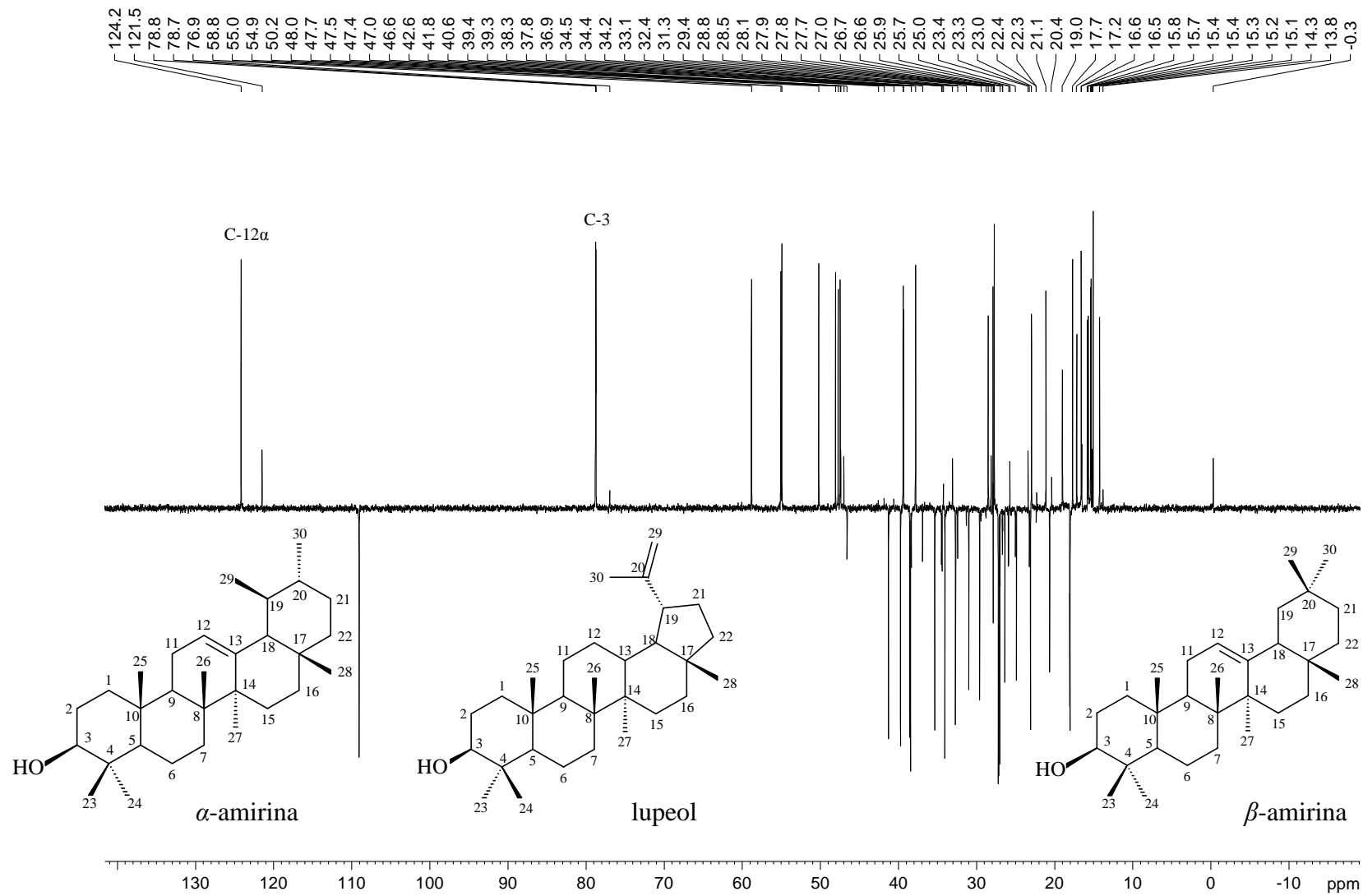


Figura A27. Subespectro de DEPT 135° de FDF-HD25 (50 MHz; CDCl₃): mistura de α -amirina, β -amirina e lupeol.

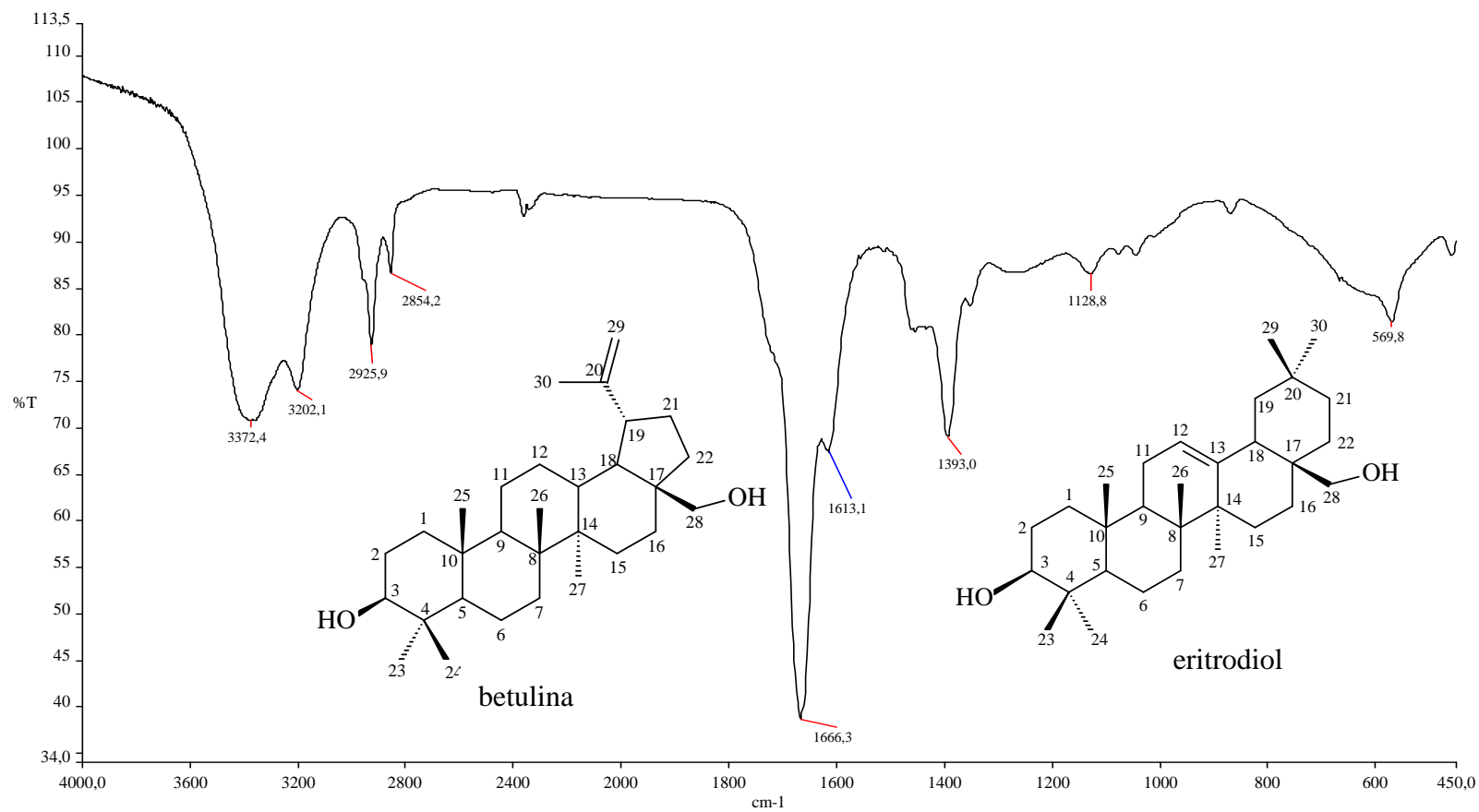


Figura A28. Espectro de absorção na região do Infravermelho de FDF-DA23 (ATR, cm⁻¹): mistura de betulina e eritrodíol.

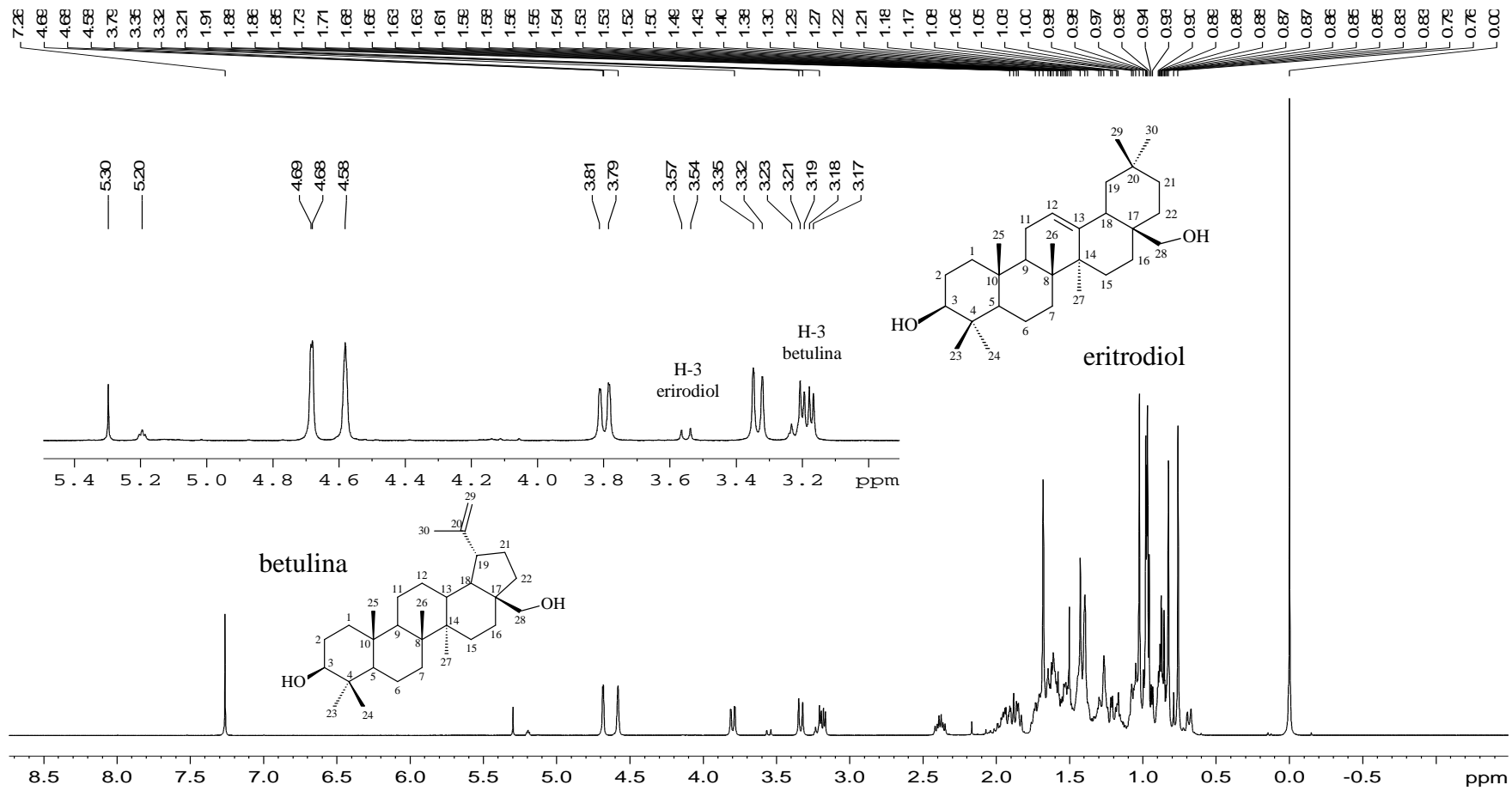


Figura A29. Espectro de RMN de ^1H de FDF-DA23 (200 MHz; CDCl_3): mistura de betulina e eritrodiol.

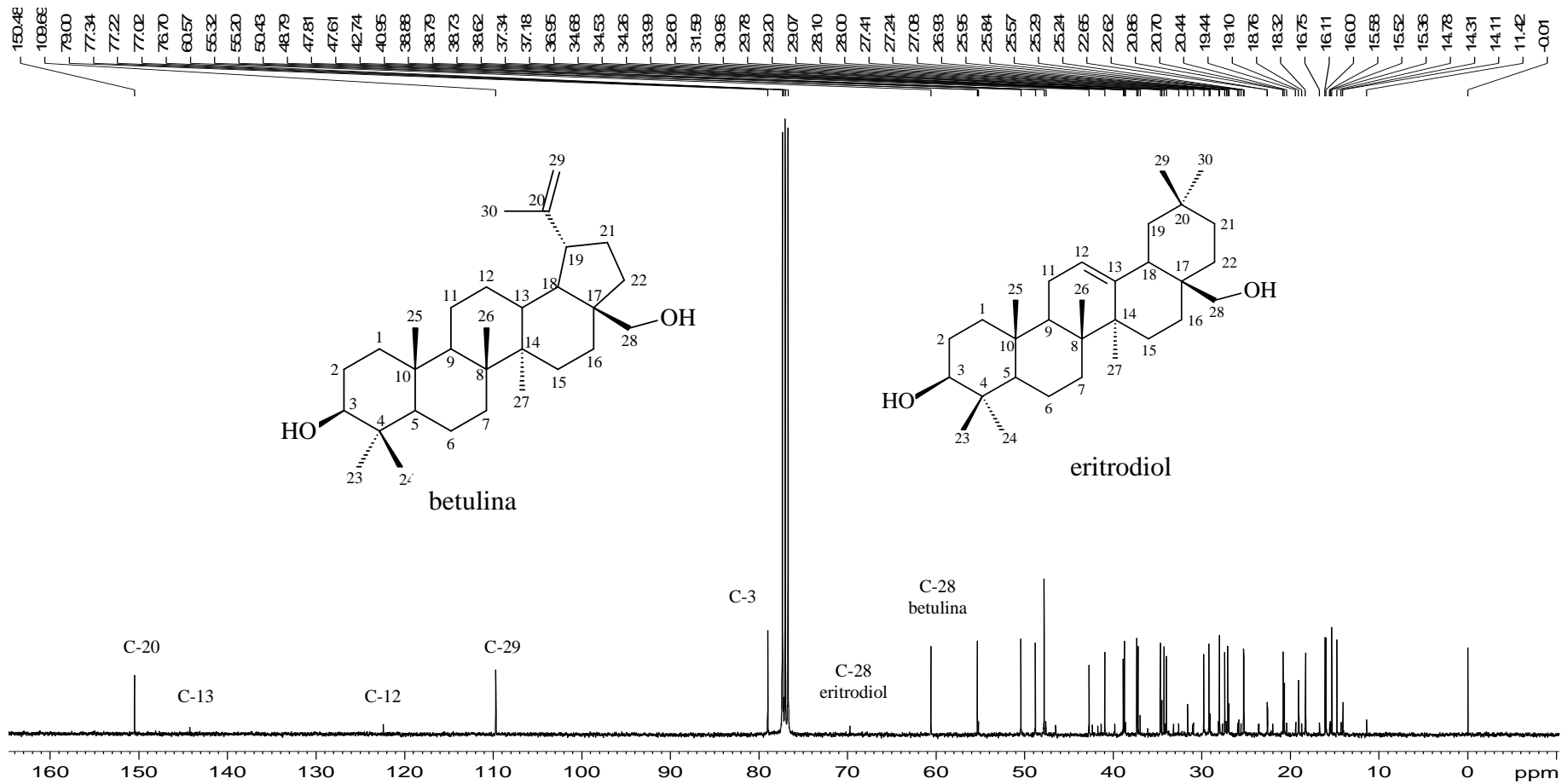


Figura A30. Espectro de RMN de ^{13}C de FDF-DA23 (50 MHz; CDCl_3): mistura de betulina e eritrodiool.

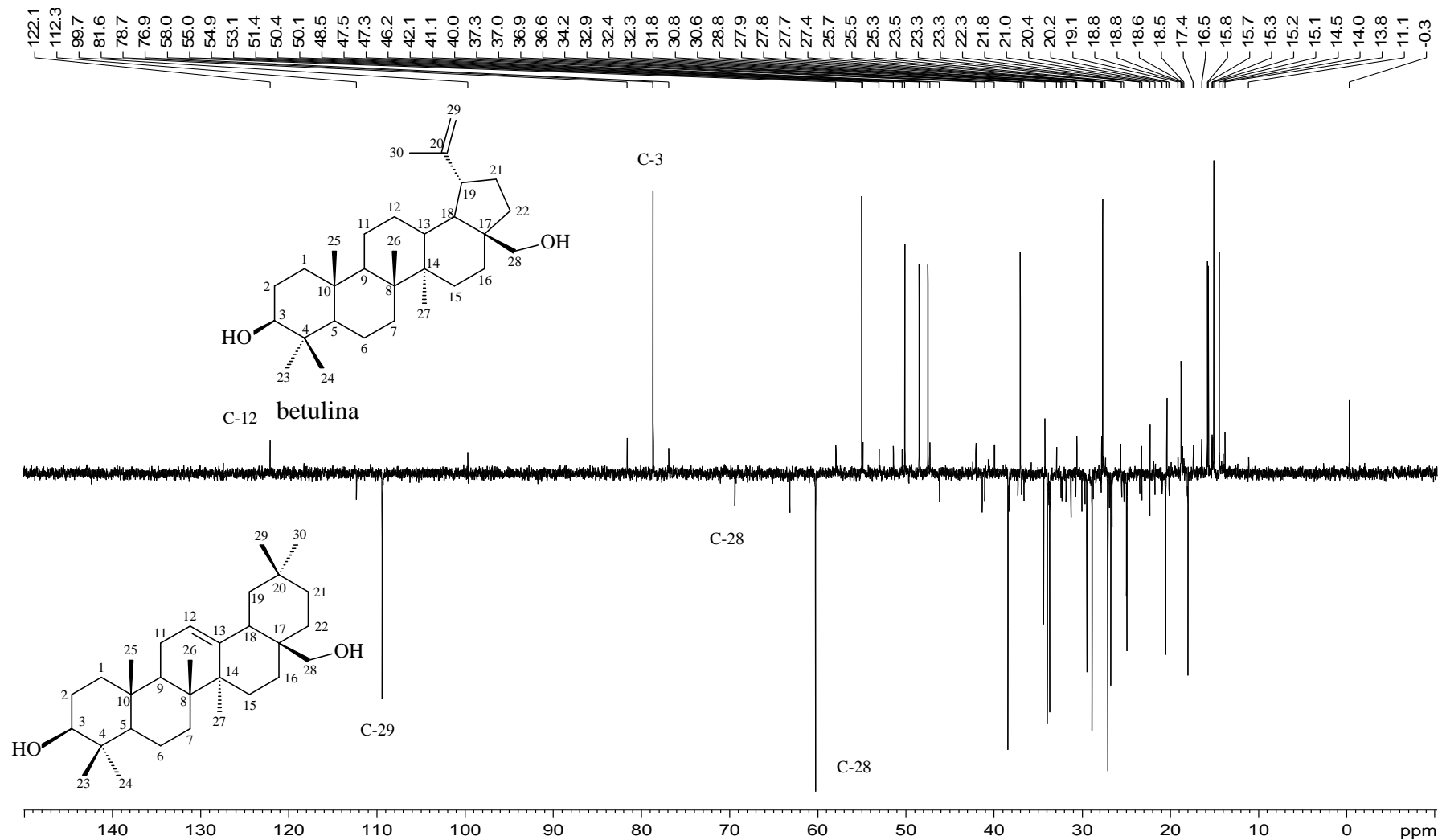


Figura A31. Subespectro de DEPT 135° de FDF-DA23 (50 MHz; CDCl₃): mistura de betulina e eritrodiol.

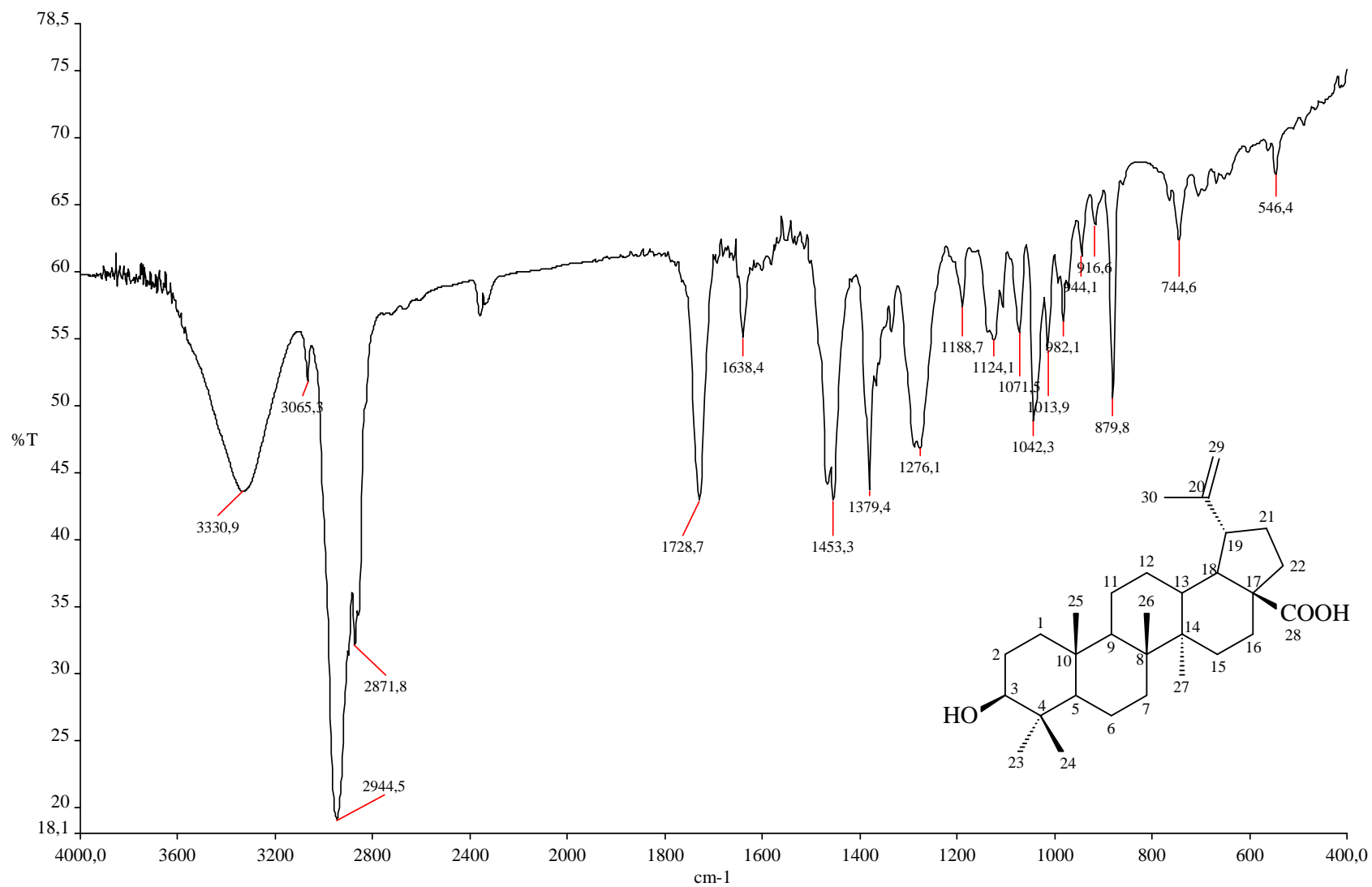


Figura A32. Espectro de absorção na região do Infravermelho de FDF-DA30 (ATR, cm⁻¹): Ácido betulínico.

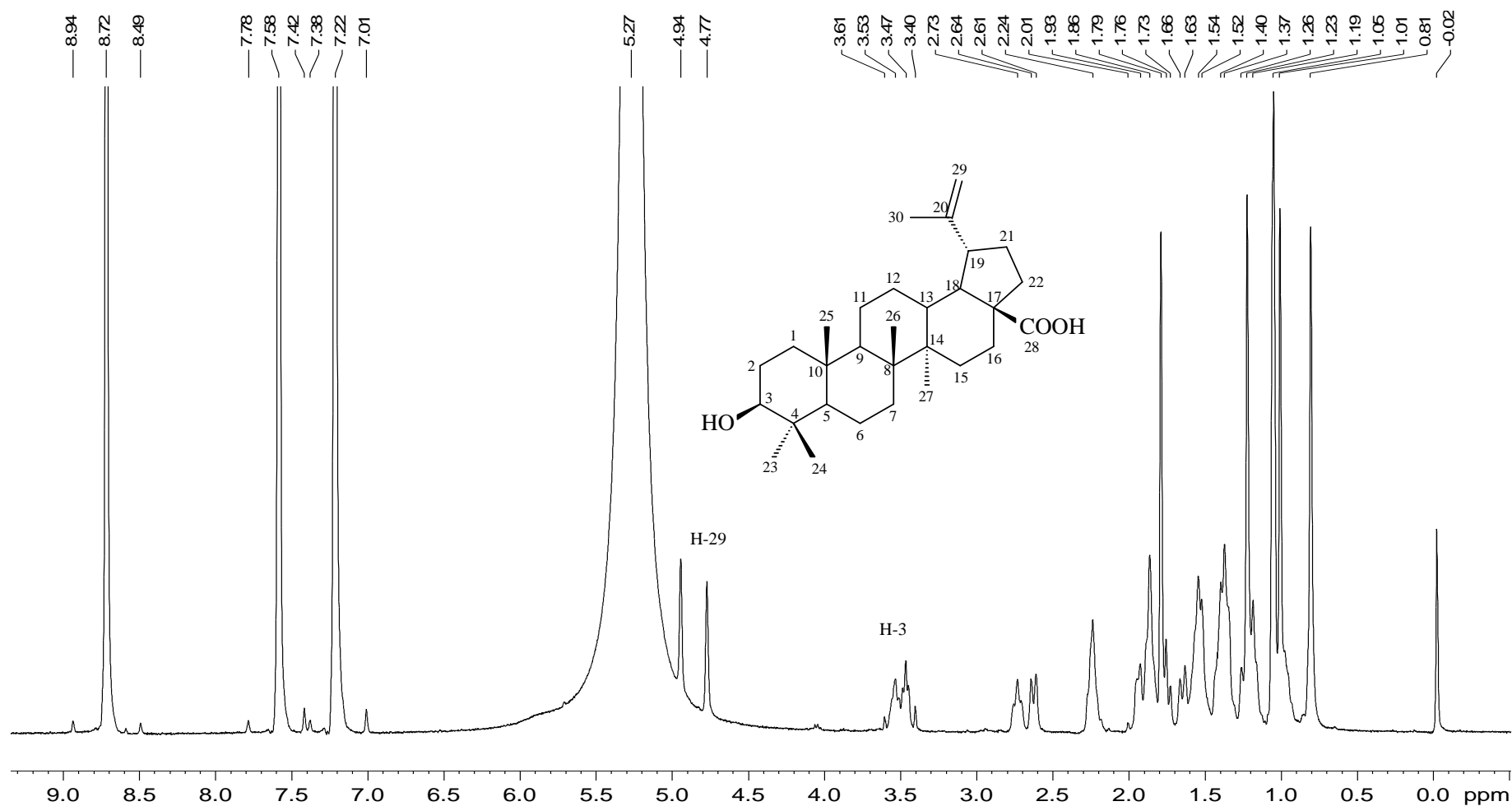


Figura A33. Espectro de RMN de ^1H de FDF-DA30 (400 MHz; Pyr-d_6): Ácido betulínico.

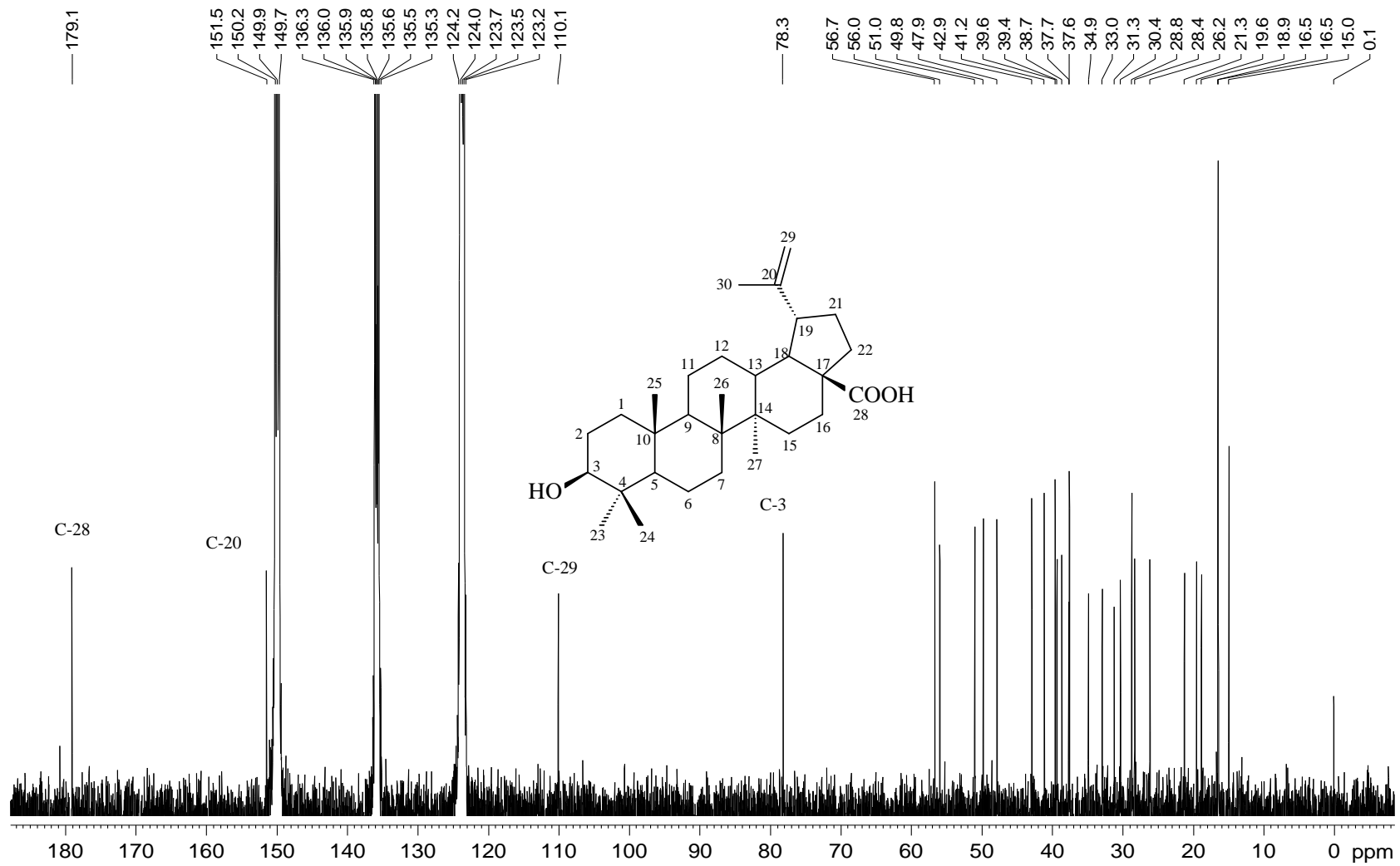


Figura A34. Espectro de RMN de ^{13}C de FDF-DA30 (100 MHz; Pyr- d_6): Ácido betulínico.

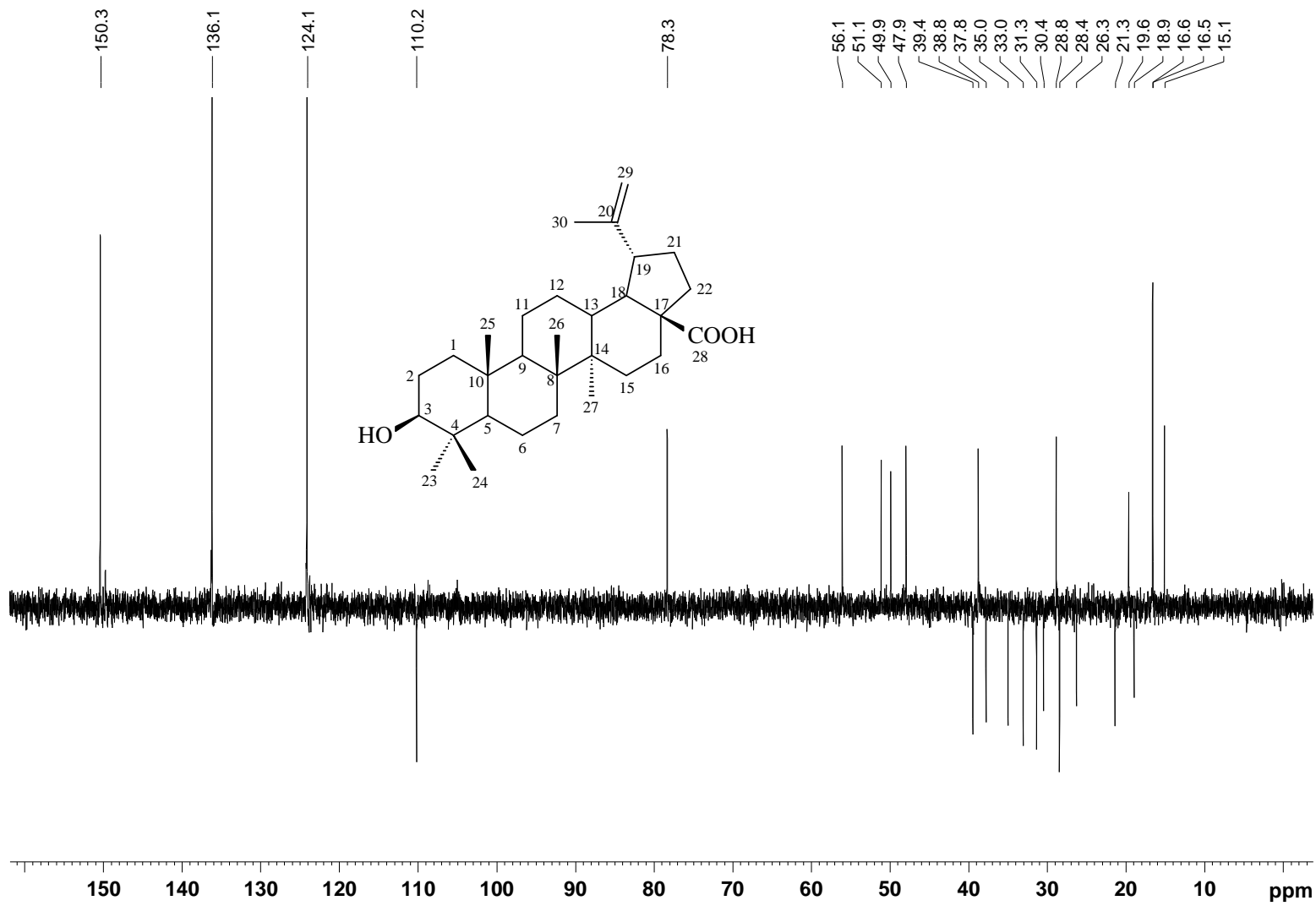


Figura A35. Subespectro de DEPT 135° de FDF-DA30 (100 MHz; Pyr-d₆): Ácido betulínico.

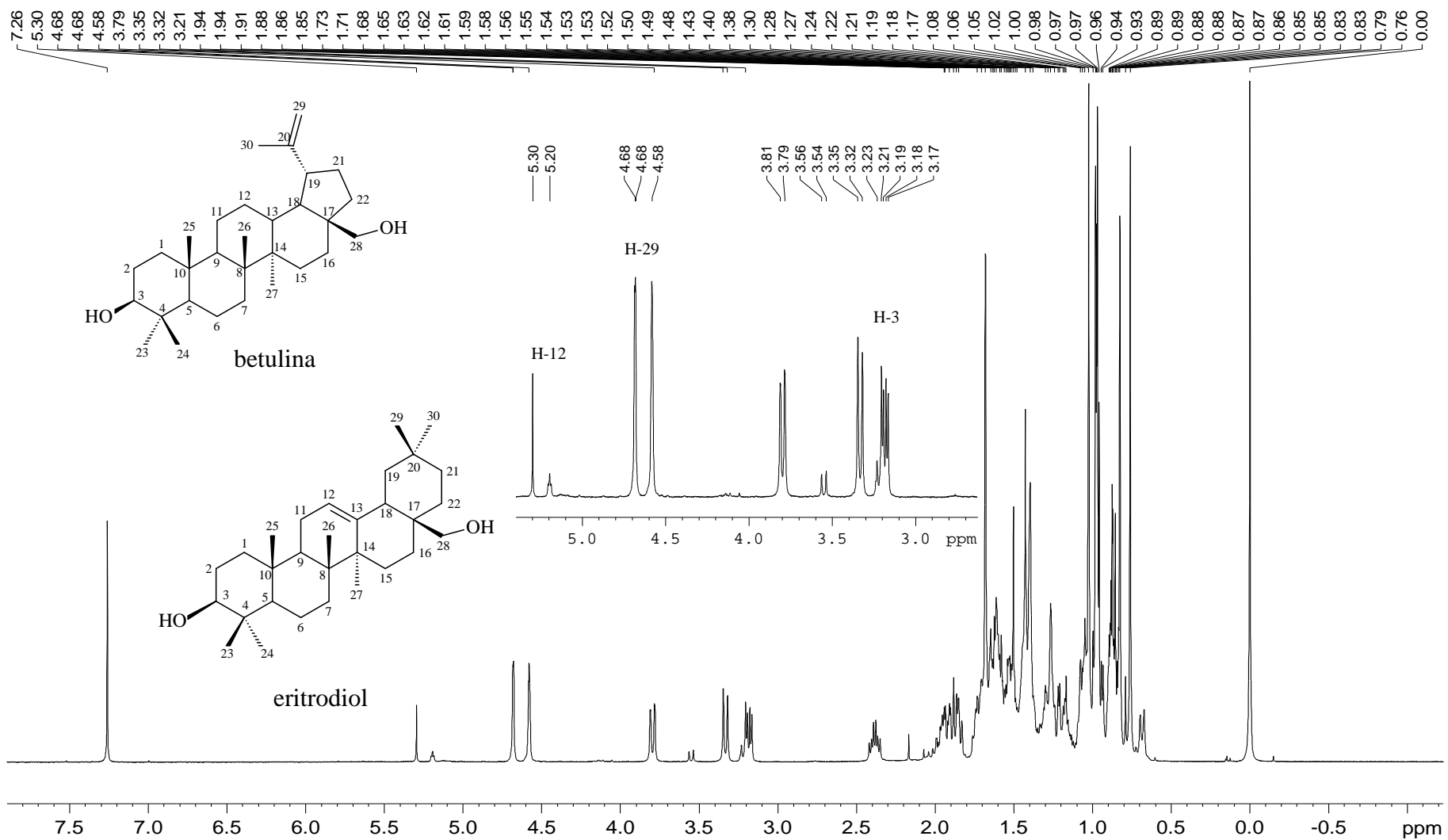


Figura A36. Espectro de RMN de ^1H de FDG-HD4 (200 MHz, CDCl_3): mistura de betulina e eritrodiol.

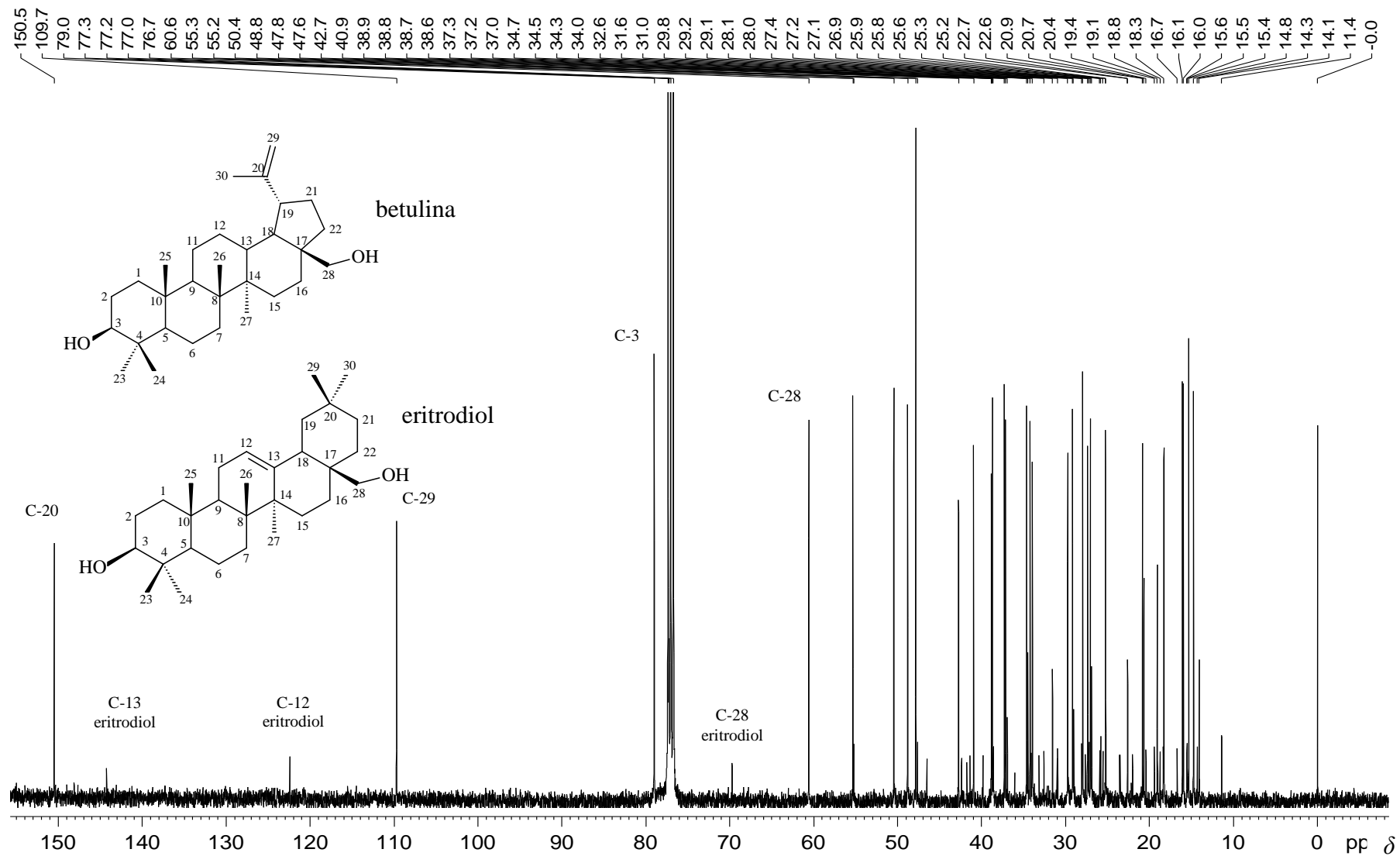


Figura A37. Espectro de RMN de ^{13}C de FDG-HD4 (50 MHz; CDCl_3): mistura de betulina e eritrodiol.

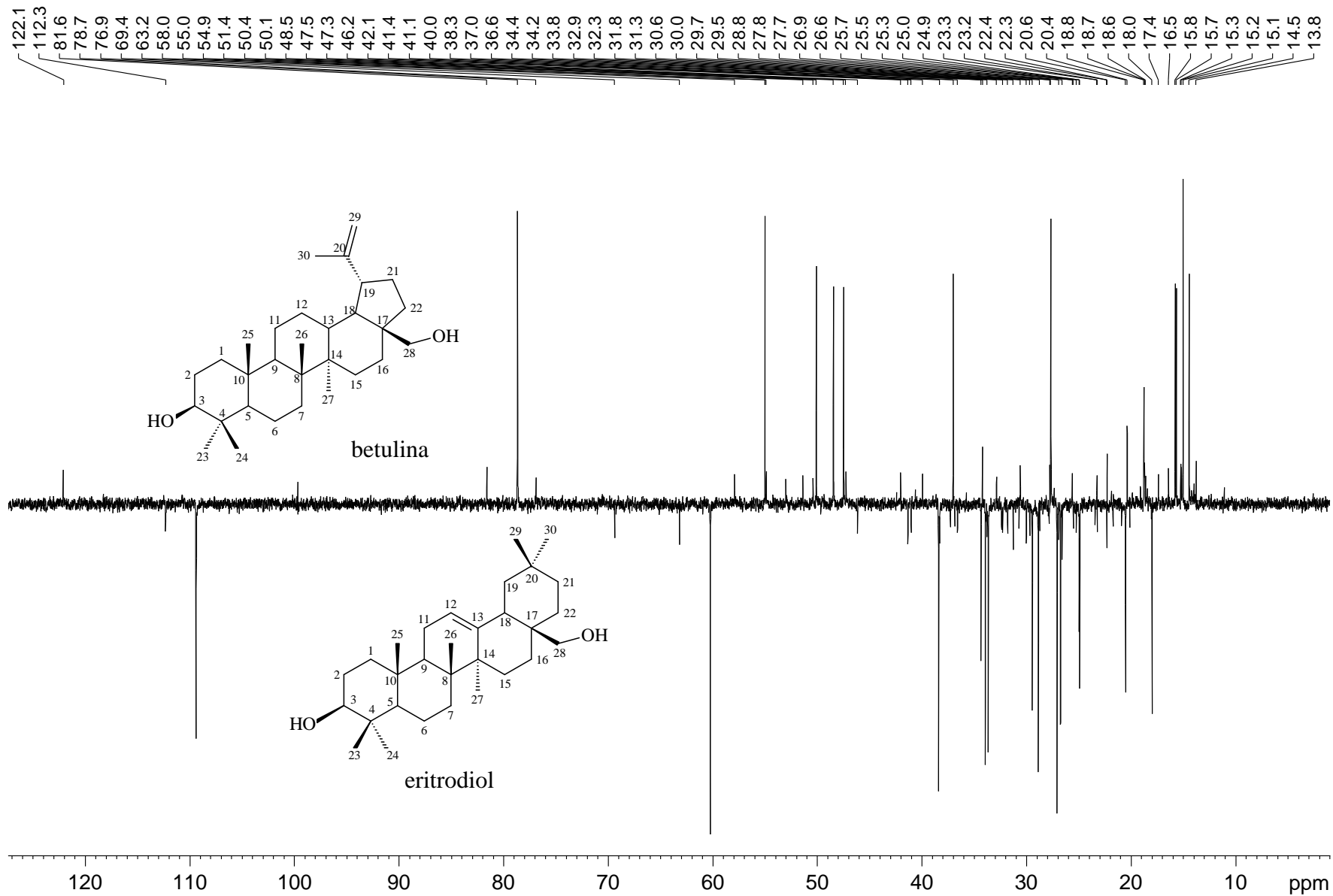


Figura A38. Subespectro de DEPT 135° de FDG-HD4 (50 MHz; CDCl₃): mistura de betulina e eritrodiol.

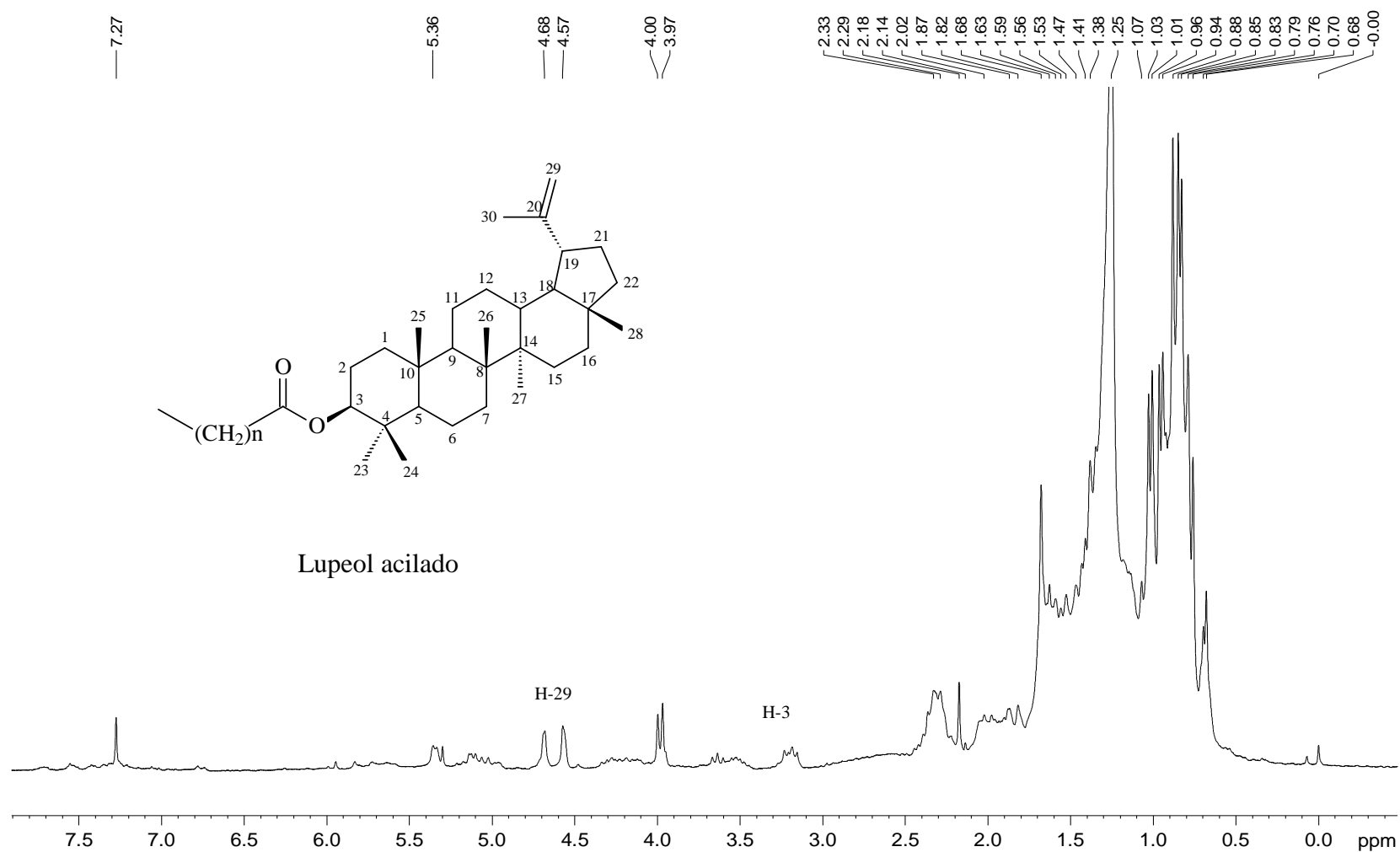


Figura A39. Espectro de RMN de 1H de FDG-HD15 (200 MHz, $CDCl_3$): mistura de β - sitosterol e lupeol acilado.

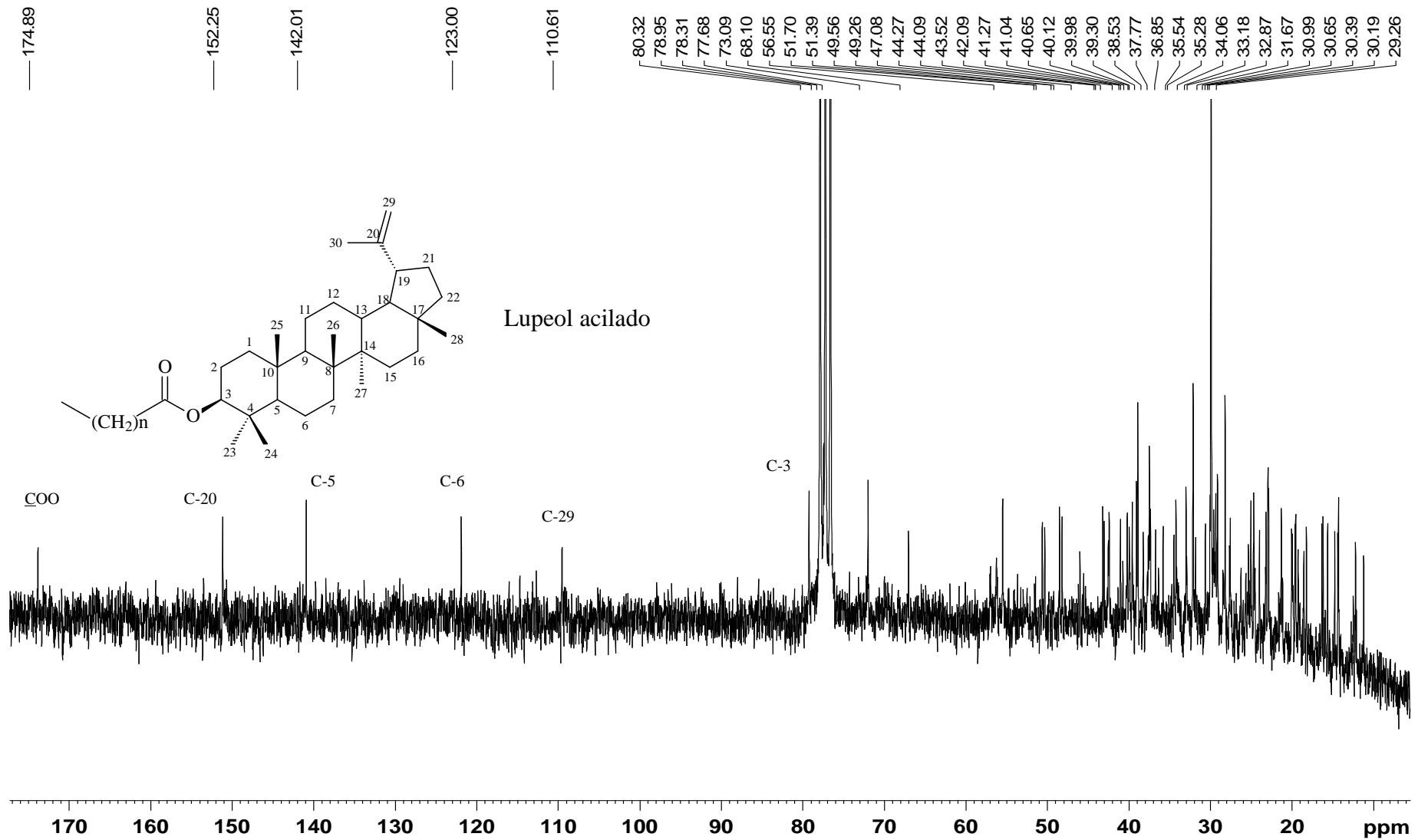


Figura A40. Espectro de RMN de ^{13}C de FDG-HD15 (50 MHz; $CDCl_3$): mistura de β - sitosterol e lupeol acilado.

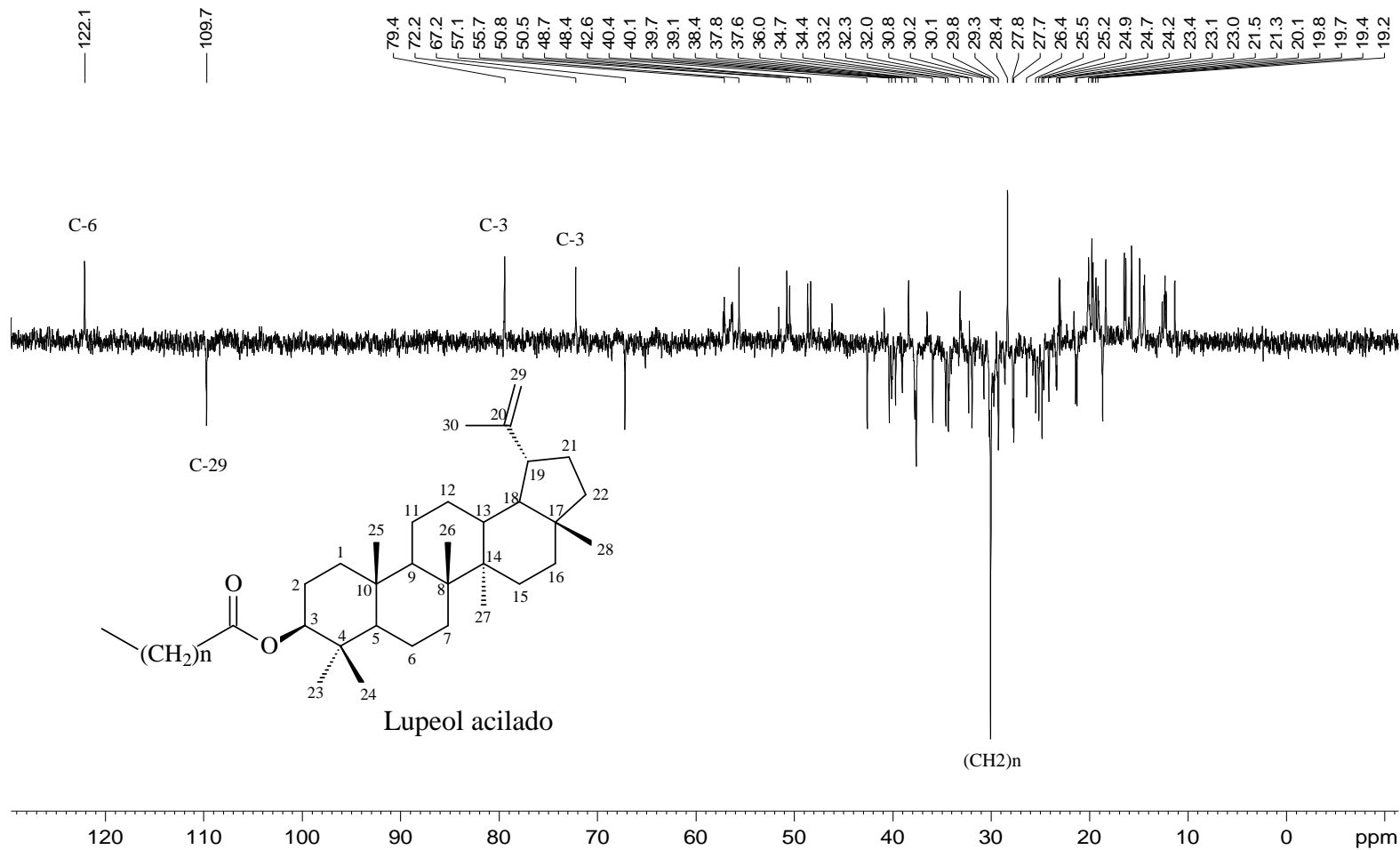


Figura A41. Subespectro de DEPT 135° de FDG-HD15 (50 MHz; $CDCl_3$): mistura de β - sitosterol e lupeol acilado.

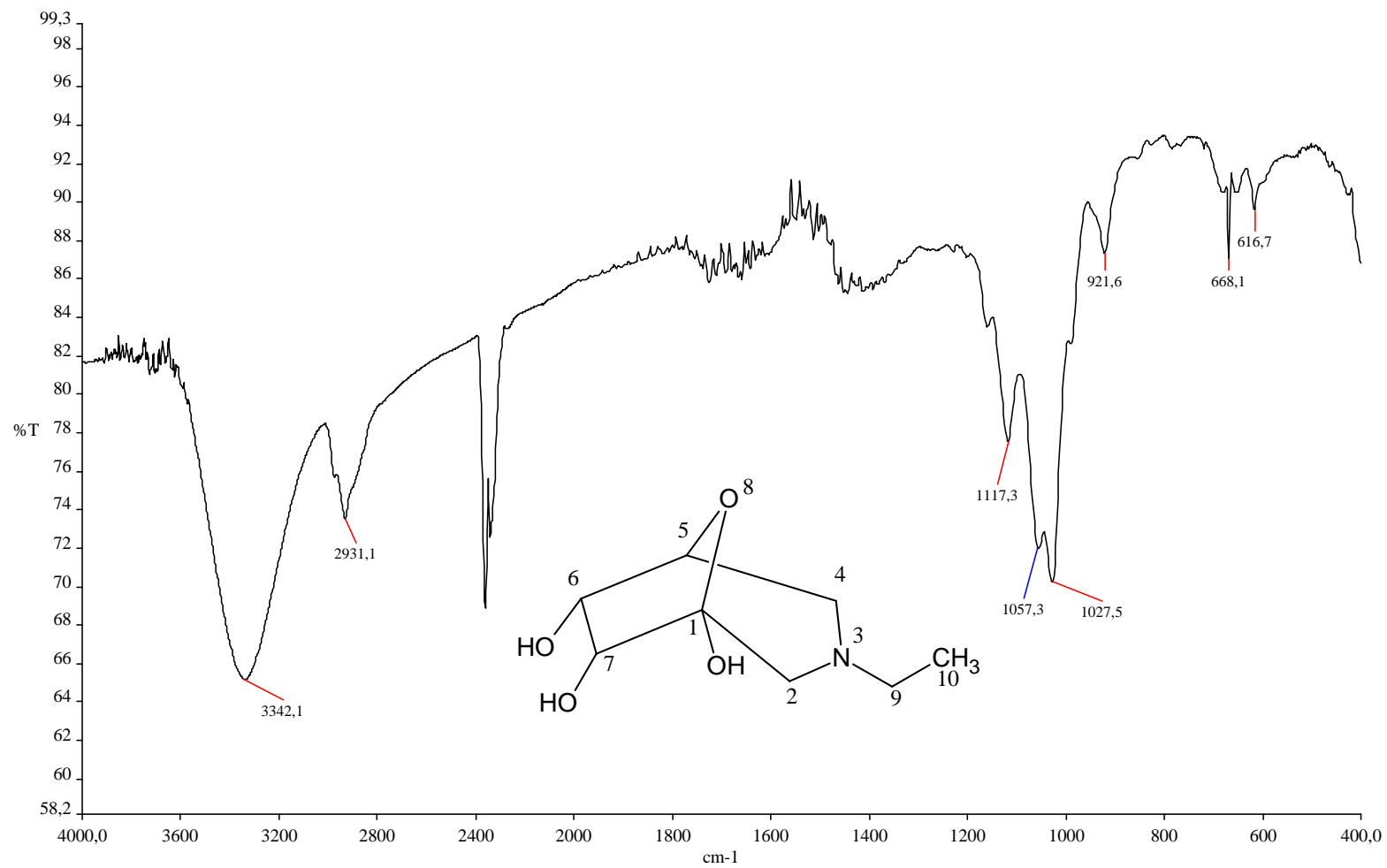


Figura A42. Espectro de absorção na região do Infravermelho de FAF-D7-1 (ATR, cm⁻¹): 3-etil-8-oxa-3-azabicyclo [3,2,1] octano-1,6,7-triol.

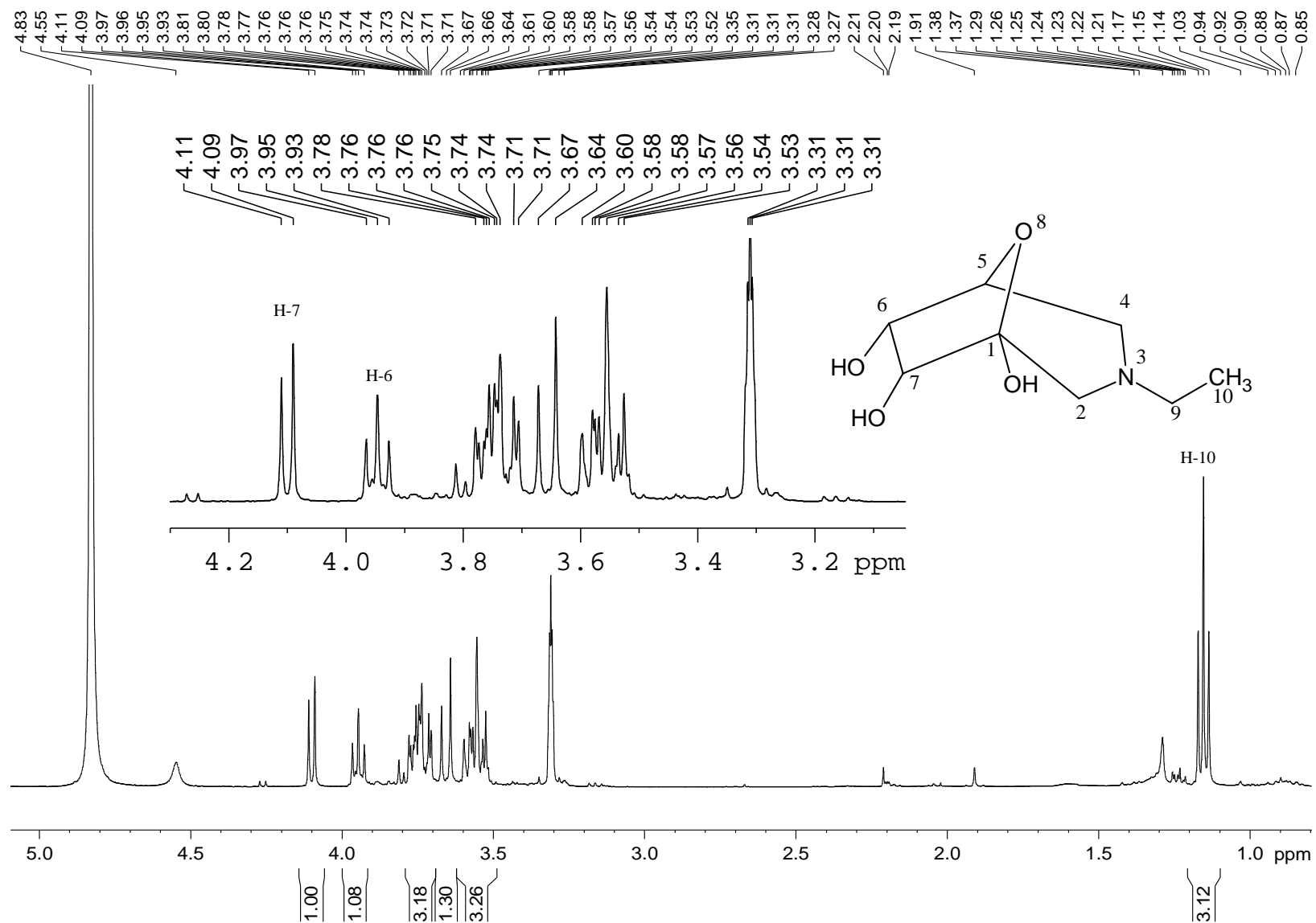


Figura A43. Espectro de RMN de ¹H de FAF-D7-1 (400 MHz; CD₃OD): 3-etil-8-oxa-3-azabicyclo [3,2,1] octano-1,6,7-triol.

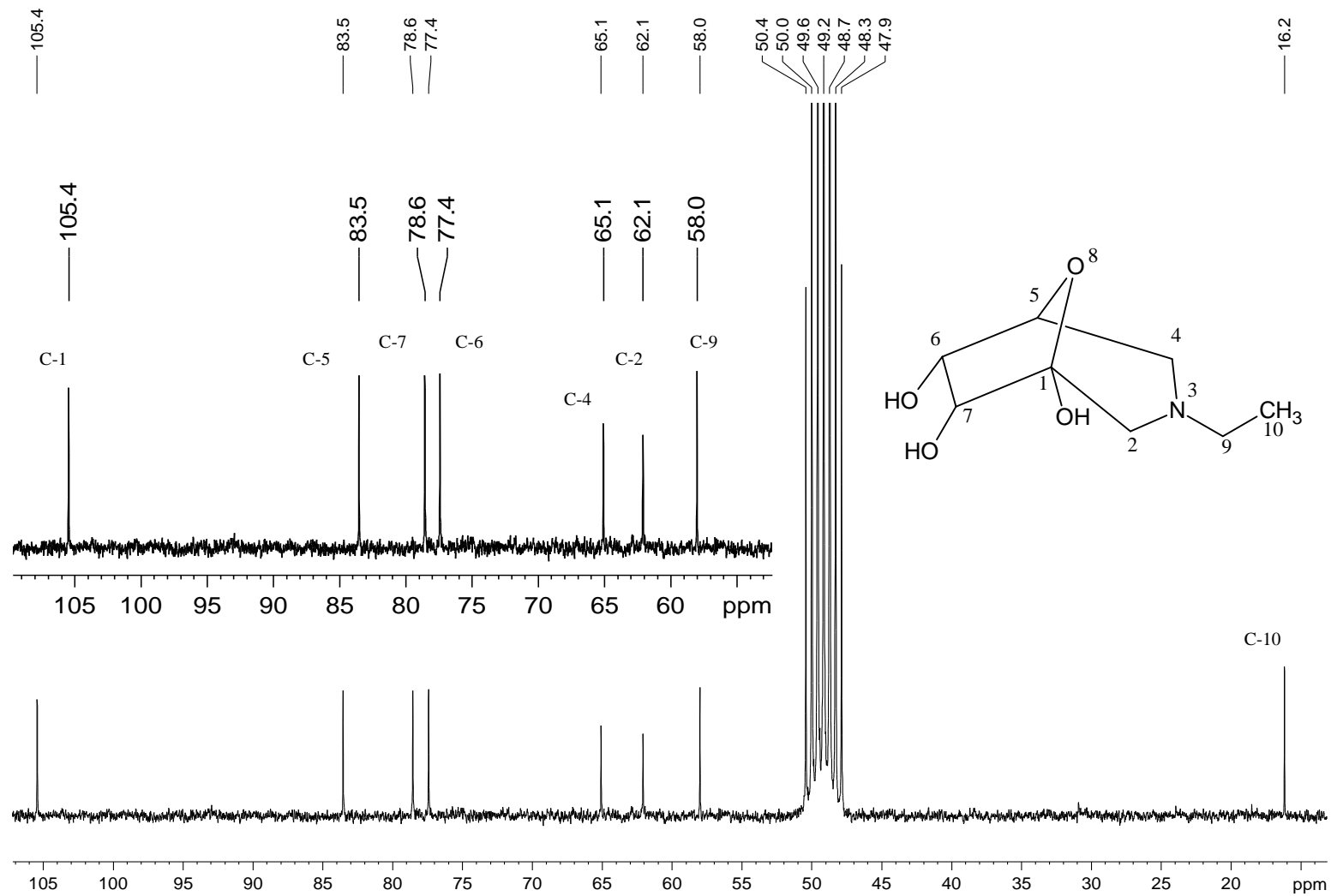


Figura A44. Espectro de RMN de ^{13}C de FAF-D7-1 (100 MHz; CD_3OD): 3-etil-8-oxa-3-azabicyclo [3,2,1] octano-1,6,7-triol.

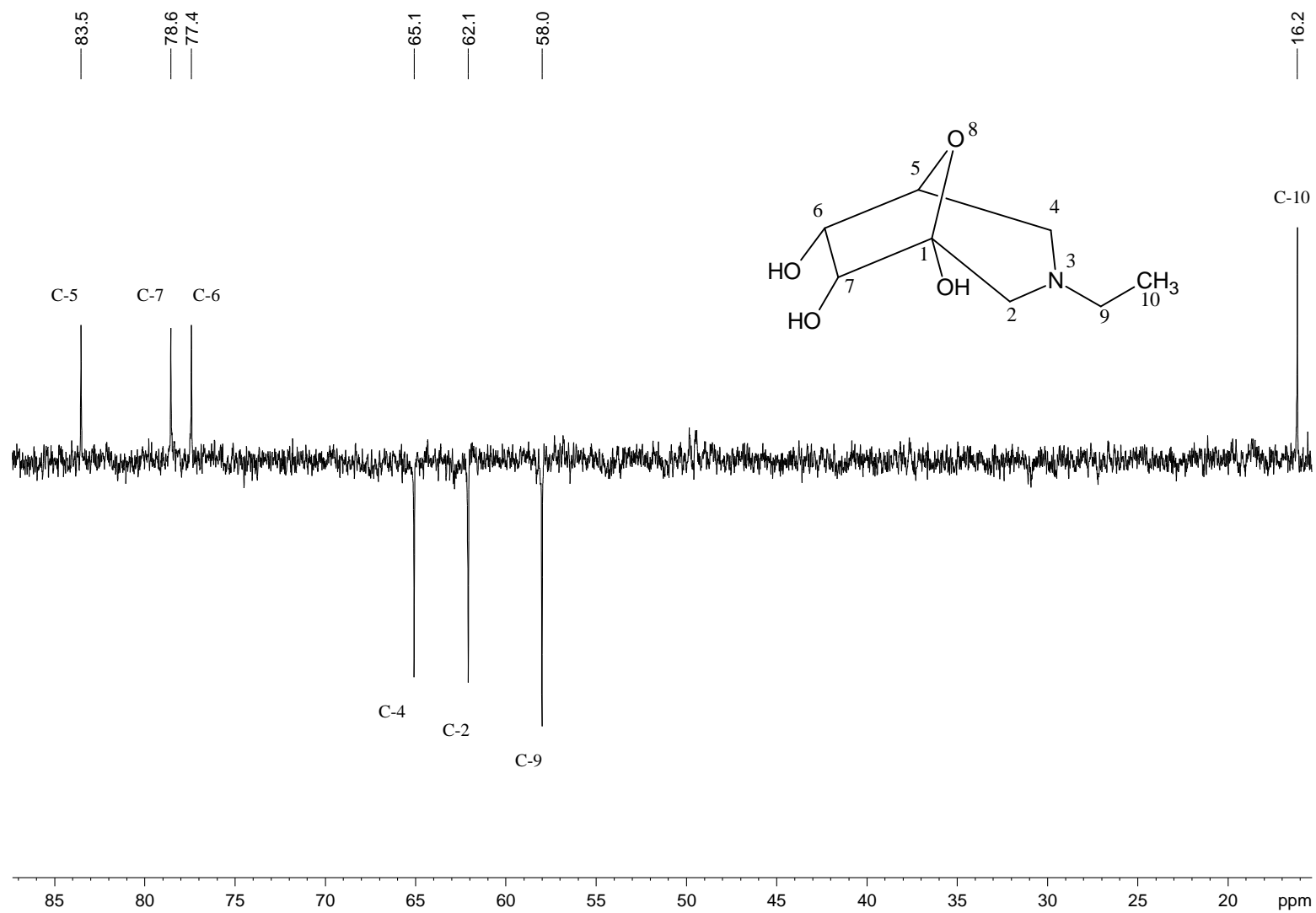


Figura A45. Subespectro de DEPT 135° de FAF-D7-1 (100 MHz; CD₃OD): 3-etil-8-oxa-3-azabicyclo [3,2,1] octano-1,6,7-triol.

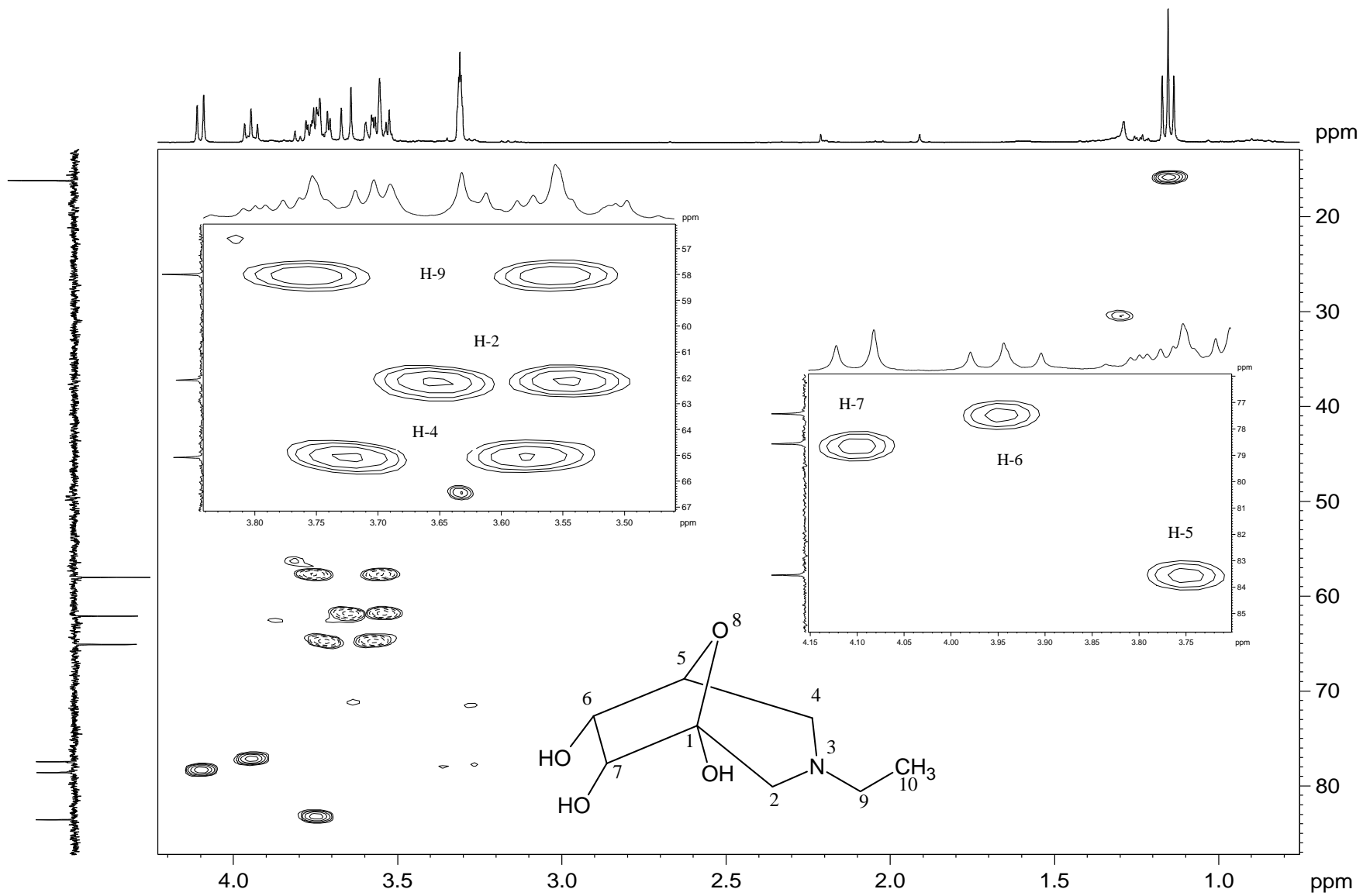


Figura A46. Mapa de contornos HSQC de FAF-D7-1 (100 MHz; CD₃OD): 3-etil-8-oxa-3-azabicyclo [3,2,1] octano-1,6,7-triol.

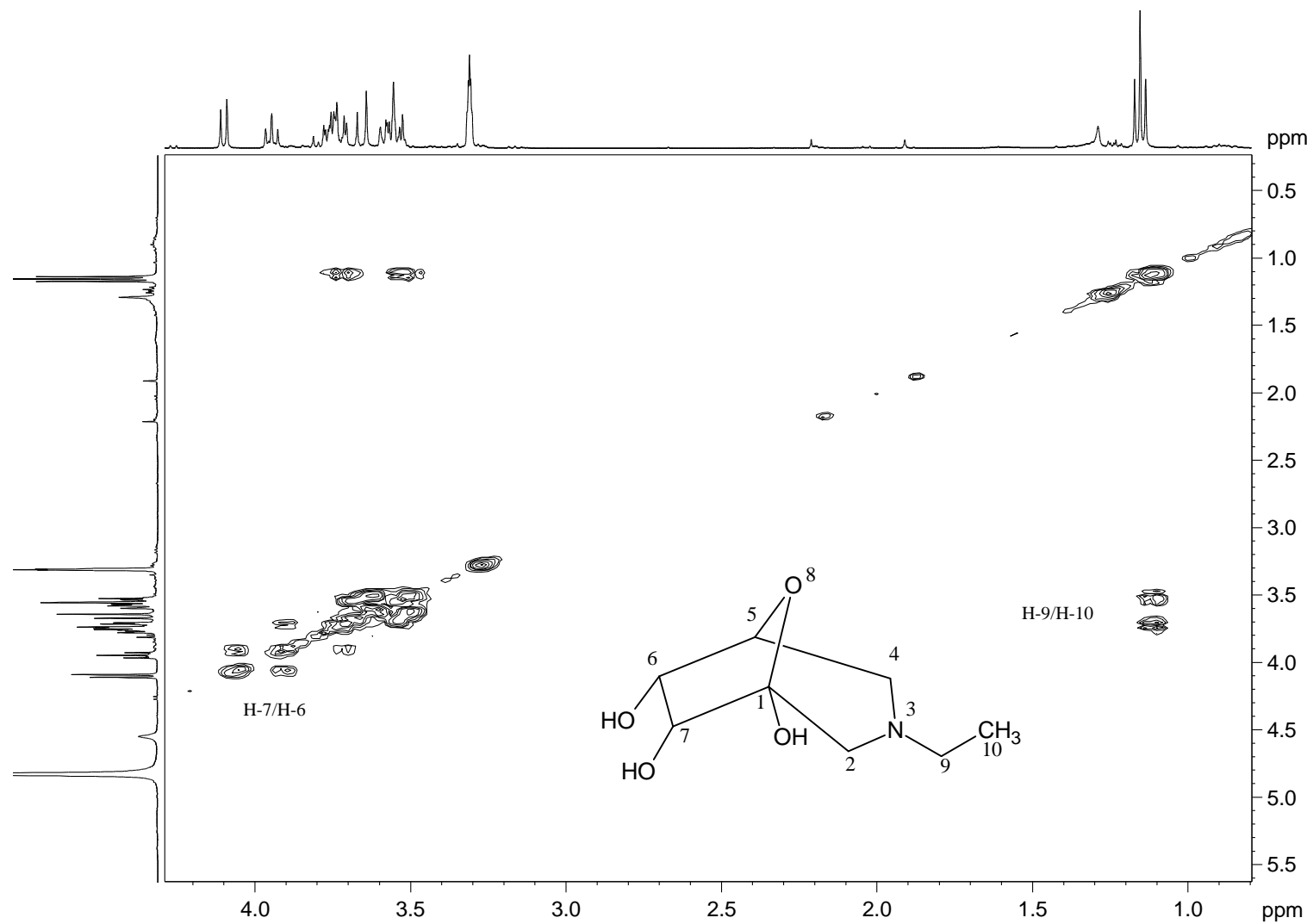


Figura A47. Mapa de contornos COSY de FAF-D7-1 (400 MHz; CD₃OD) 3-etil-8-oxa-3-azabicyclo [3,2,1] octano-1,6,7-triol.

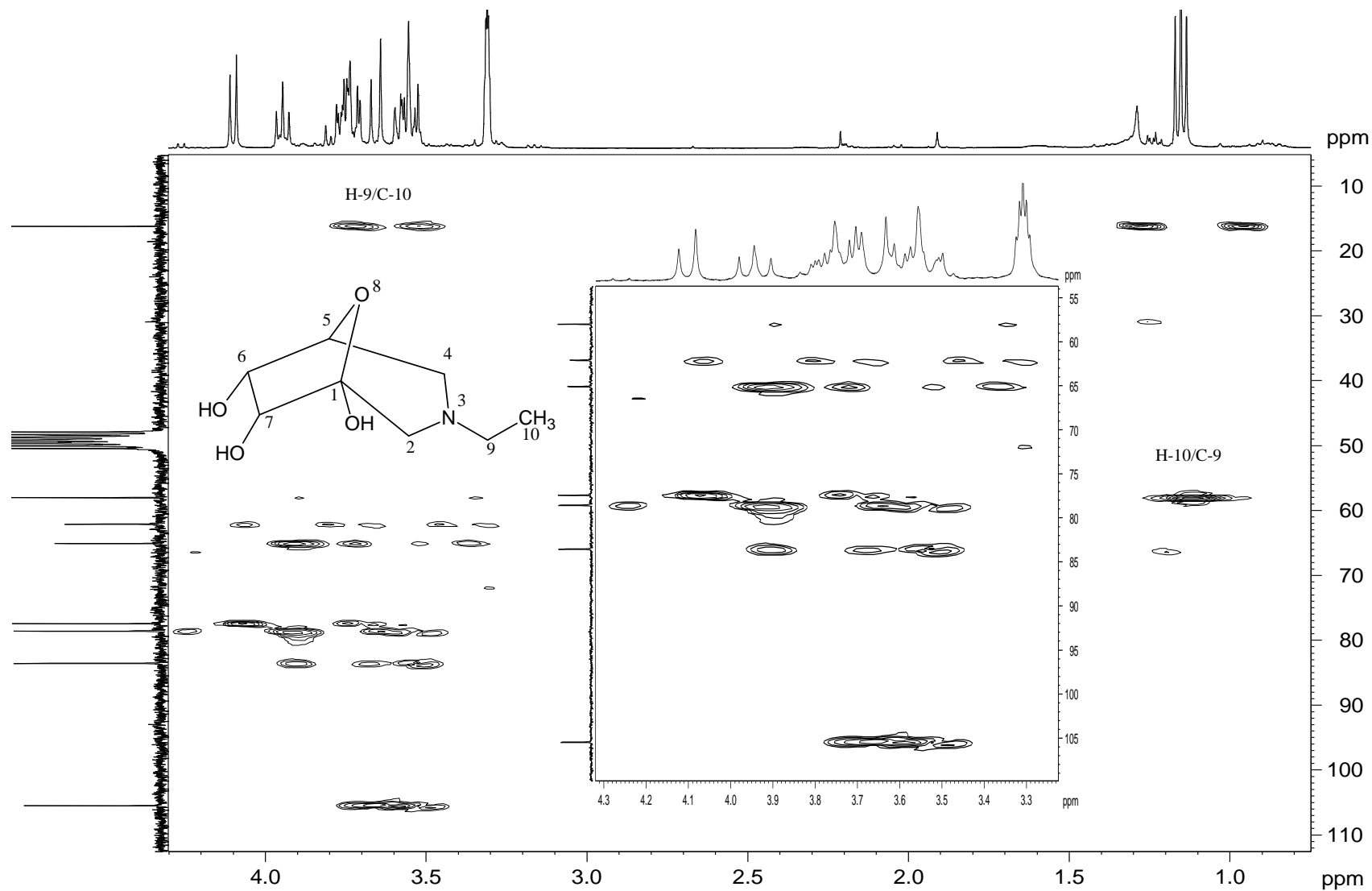


Figura A48. Mapa de correlação HMBC de FAF-D7-1 (100 MHz; CD_3OD) 3-etil-8-oxa-3-azabicyclo [3,2,1] octano-1,6,7-triol.

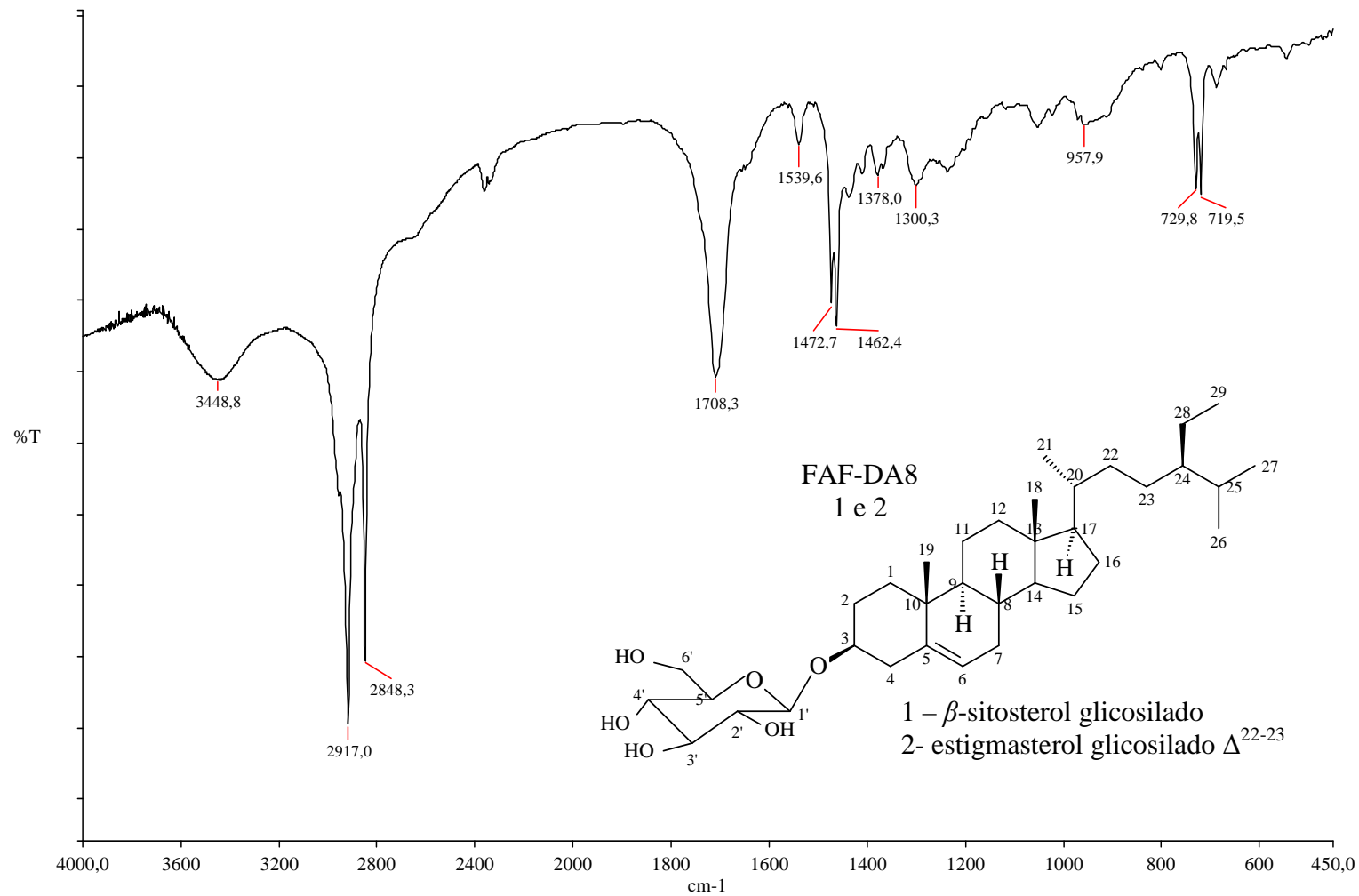


Figura A49. Espectro de absorção na região do Infravermelho de FAF-DA8 (ATR, cm^{-1}): mistura de β -sitosterol e estigmasterol glicosilados.

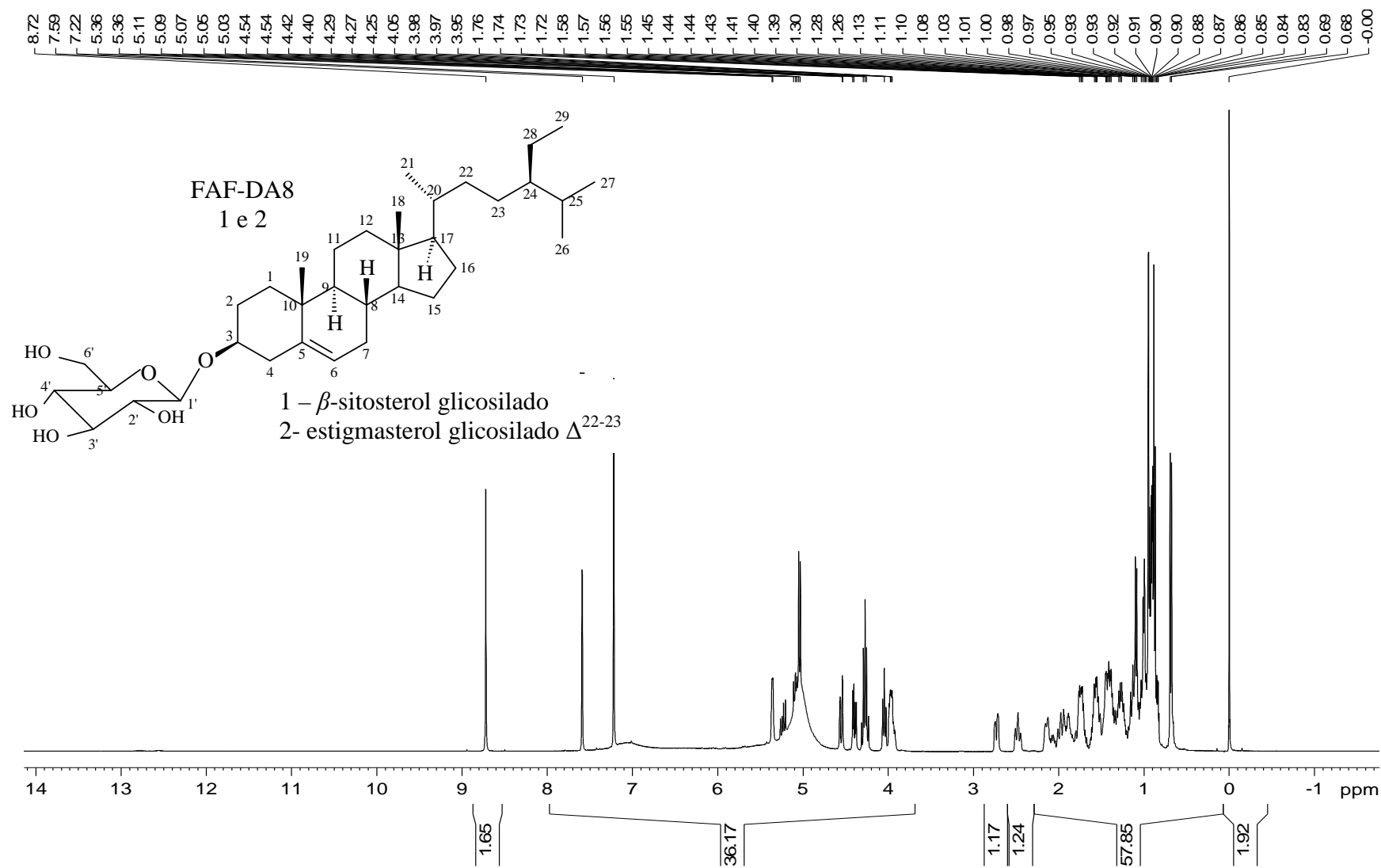


Figura A50. Espectro de RMN de ^1H de FAF-DA8 (200 MHz; Pyr- d_6): mistura de β -sitosterol e estigmasterol glicosilado.

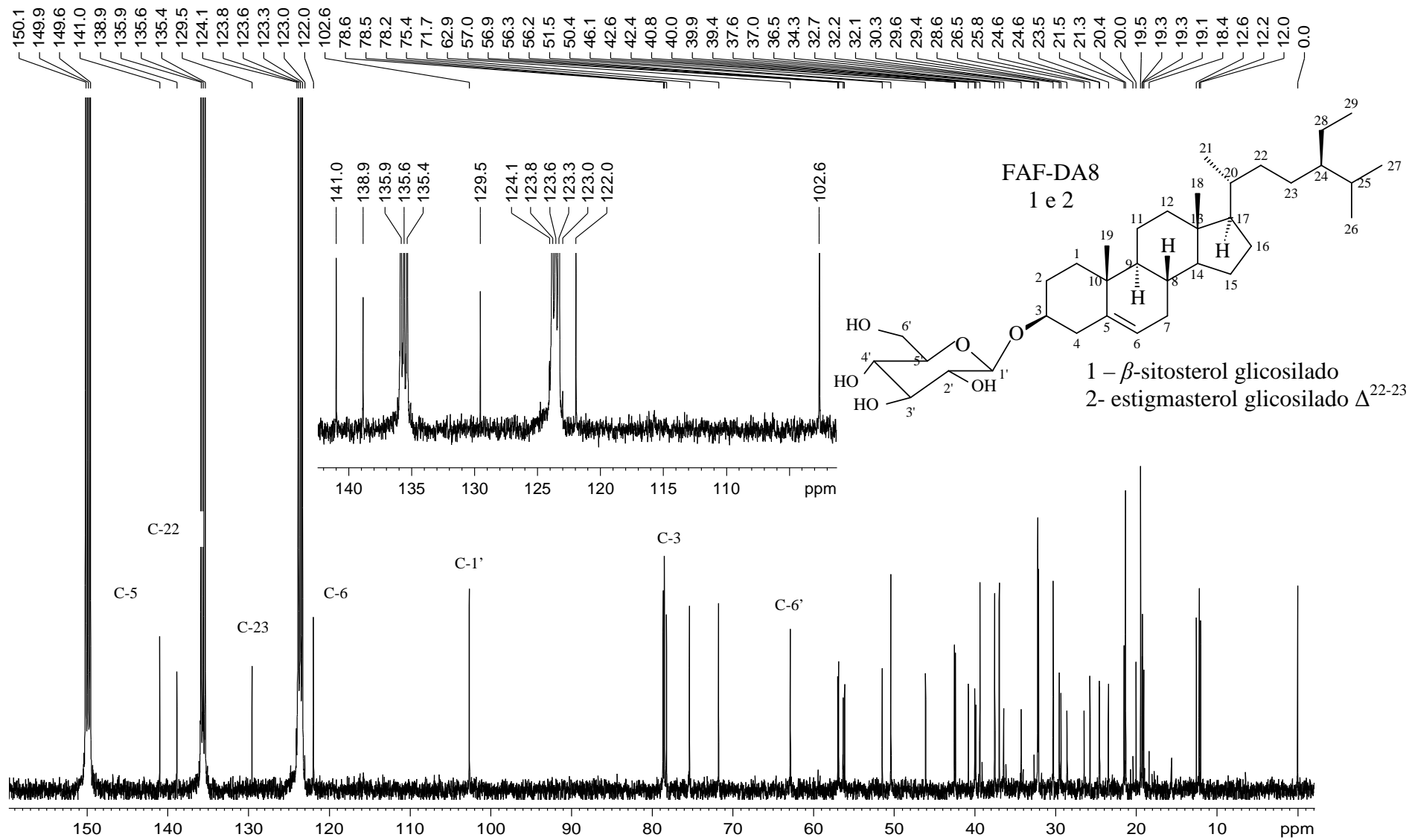


Figura A51. Espectro de RMN ^{13}C de FAF-DA8 (50 MHz; Pyr- d_6): mistura de β -sitosterol e estigmasterol glicosilado.

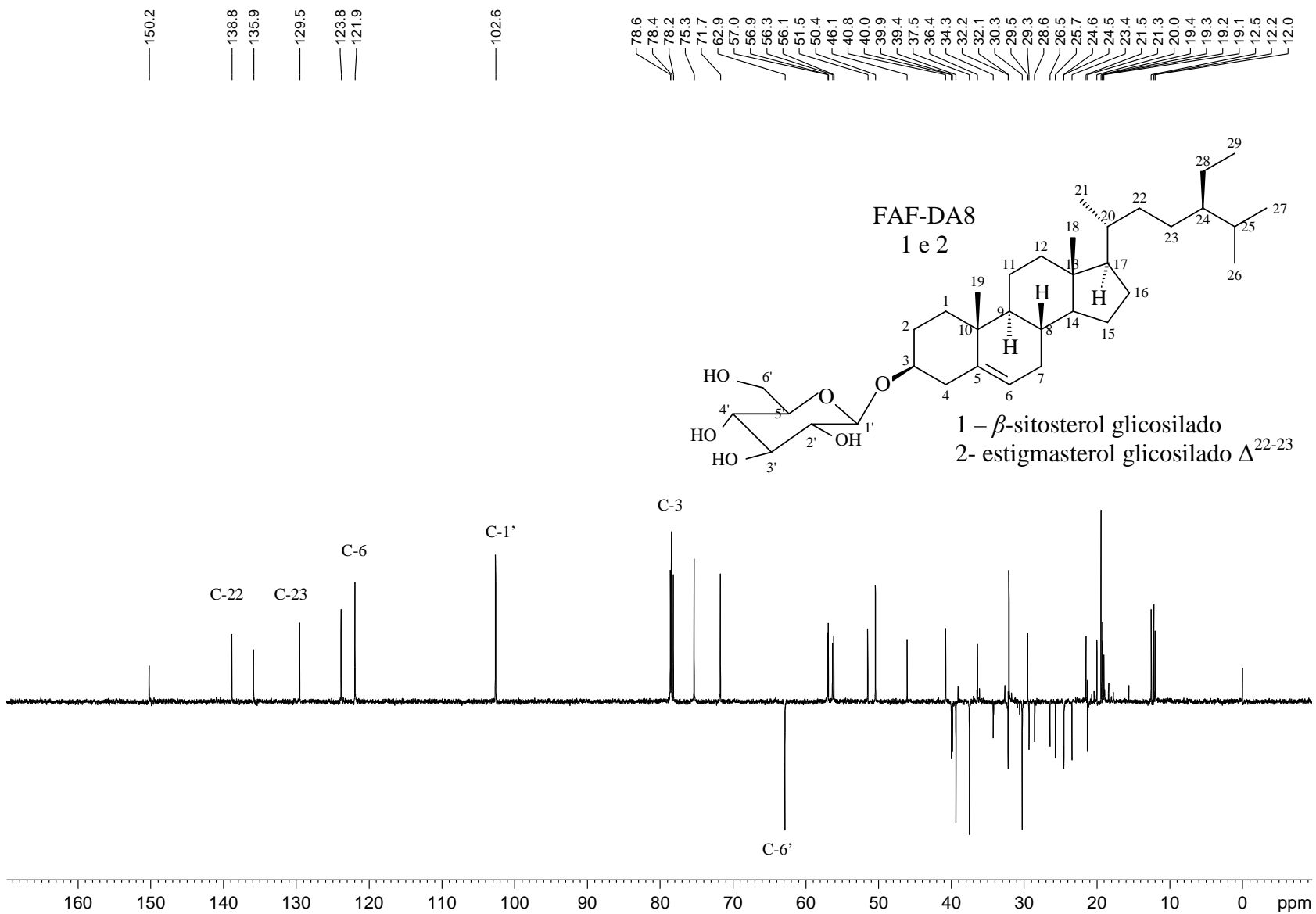


Figura A52. Espectro de DEPT 135° de FAF-DA8 (50 MHz; Pyr-d₆): mistura de β-sitosterol e estigmasterol glicosilado.

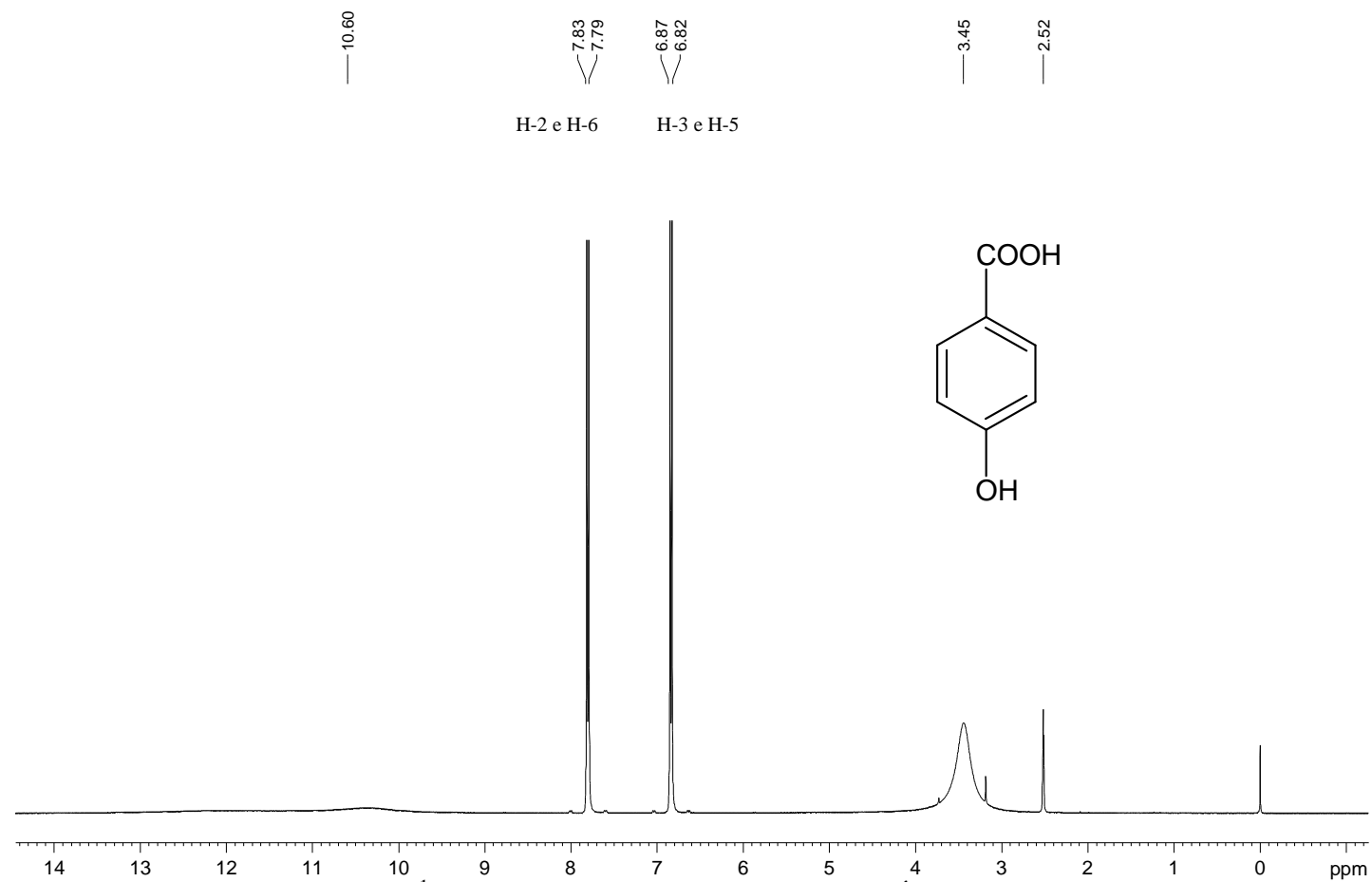


Figura A53. Espectro de RMN de ^1H de FAF-DA9 (400 MHz; CD_3OD): Ácido p-hidroxibenzóico.

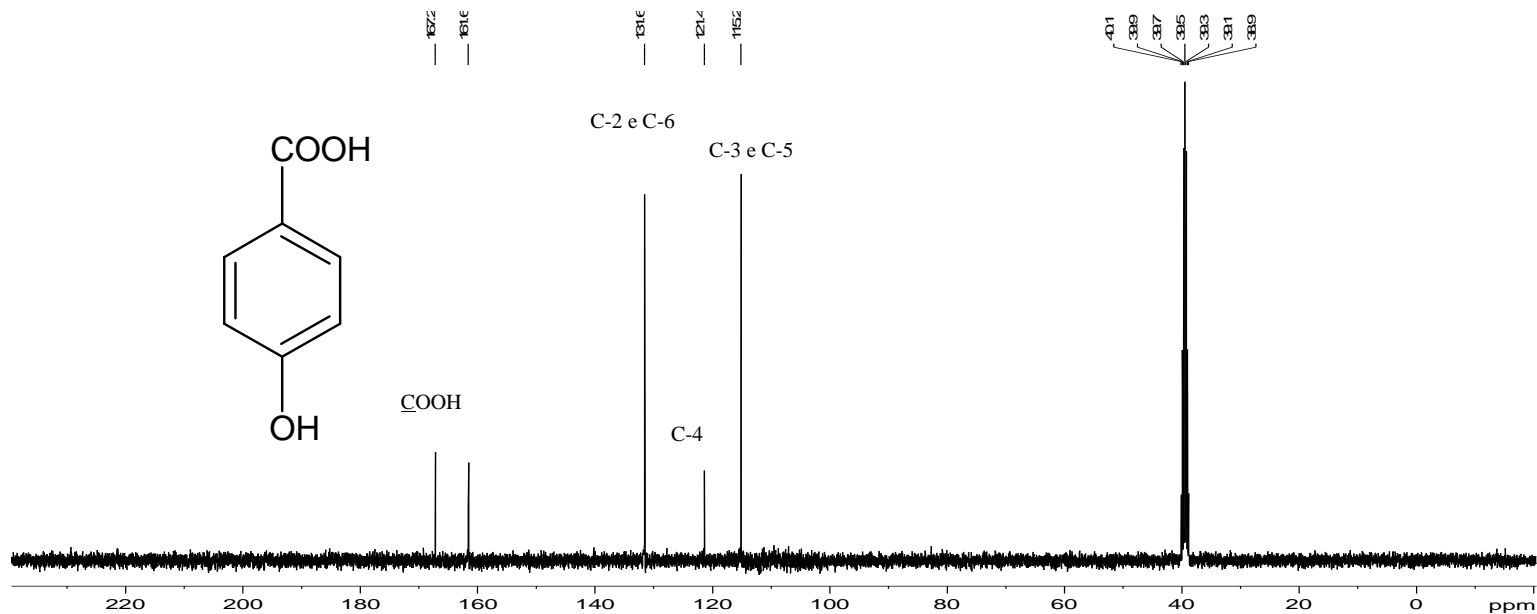


Figura A54. Espectro de RMN de ^{13}C de FAF-DA9 (100 MHz; CD_3OD) Ácido p-hidroxibenzóico.

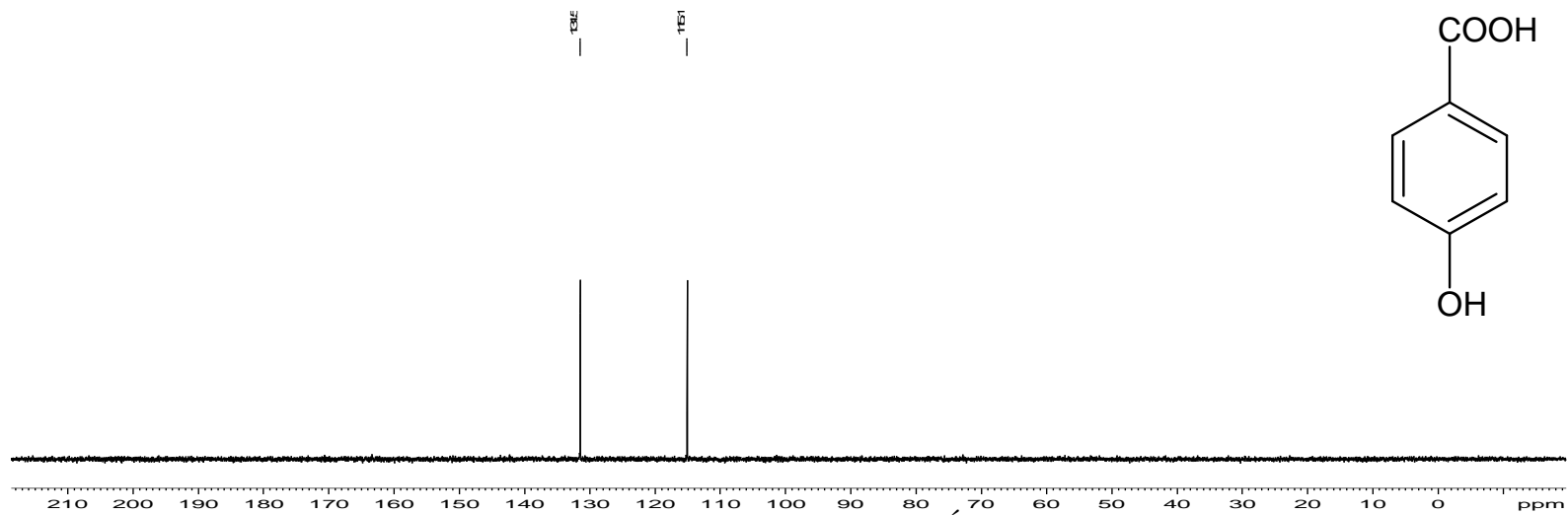


Figura A55. Subespectro de DEPT 135° de FAF-DA9 (100 MHz; CD_3OD) Ácido p-hidroxibenzóico.

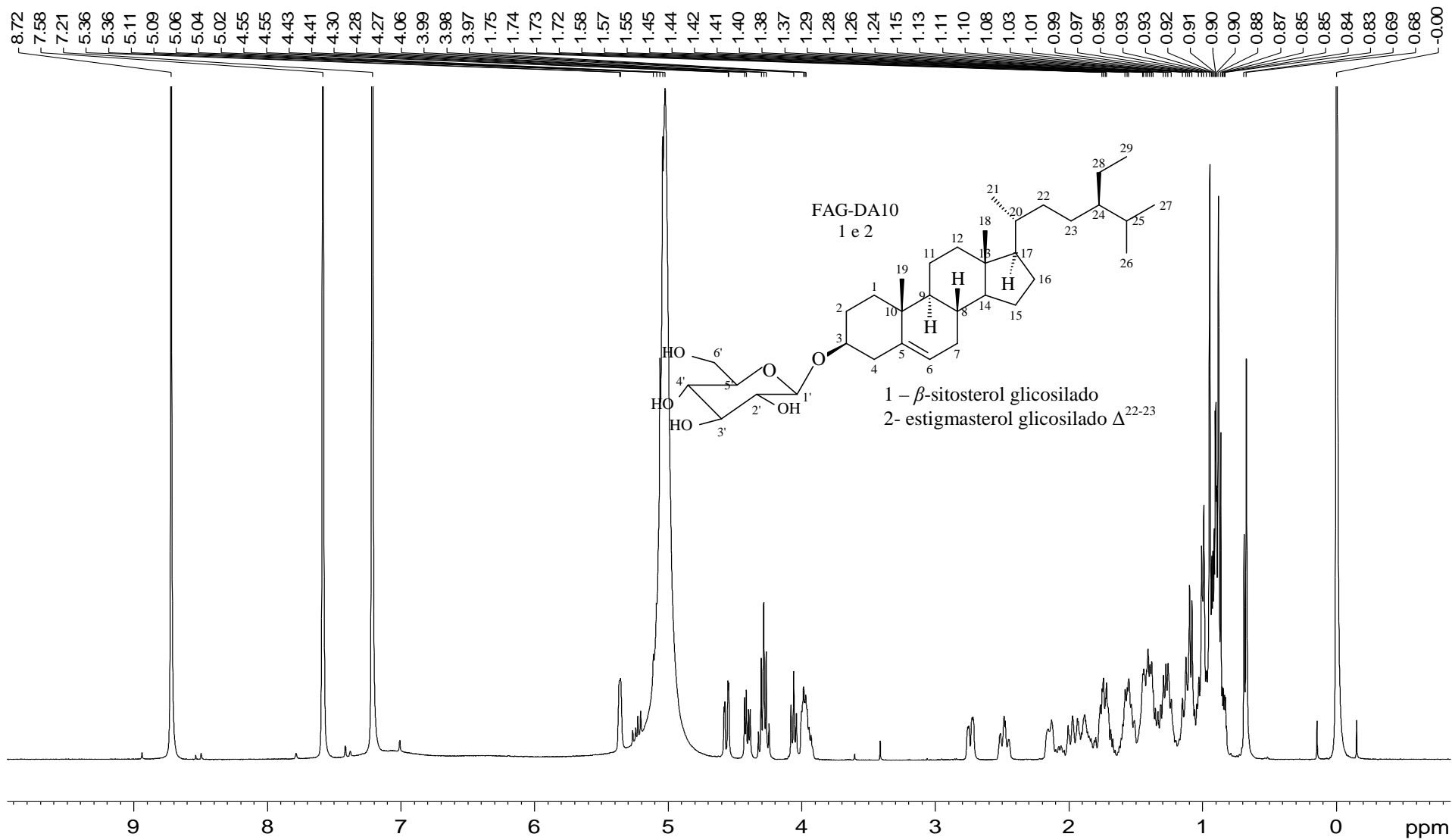


Figura A56. Espectro de RMN de ¹H de FAG-DA10 (200 MHz; Pyr-d₆) mistura de β-sitosterol e estigmasterol glicosilado.

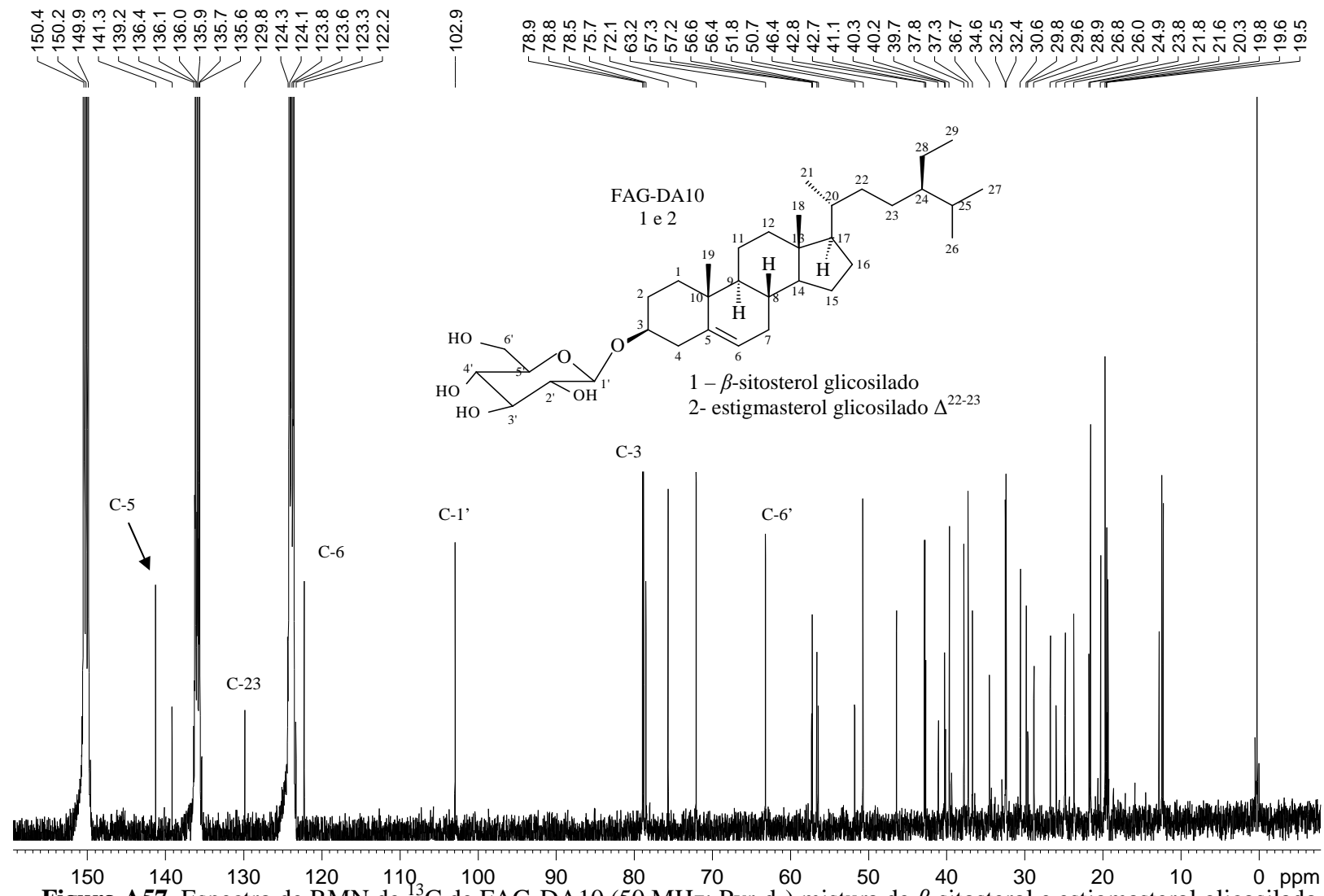


Figura A57. Espectro de RMN de ^{13}C de FAG-DA10 (50 MHz; Pyr- d_6) mistura de β -sitosterol e estigmasterol glicosilado.

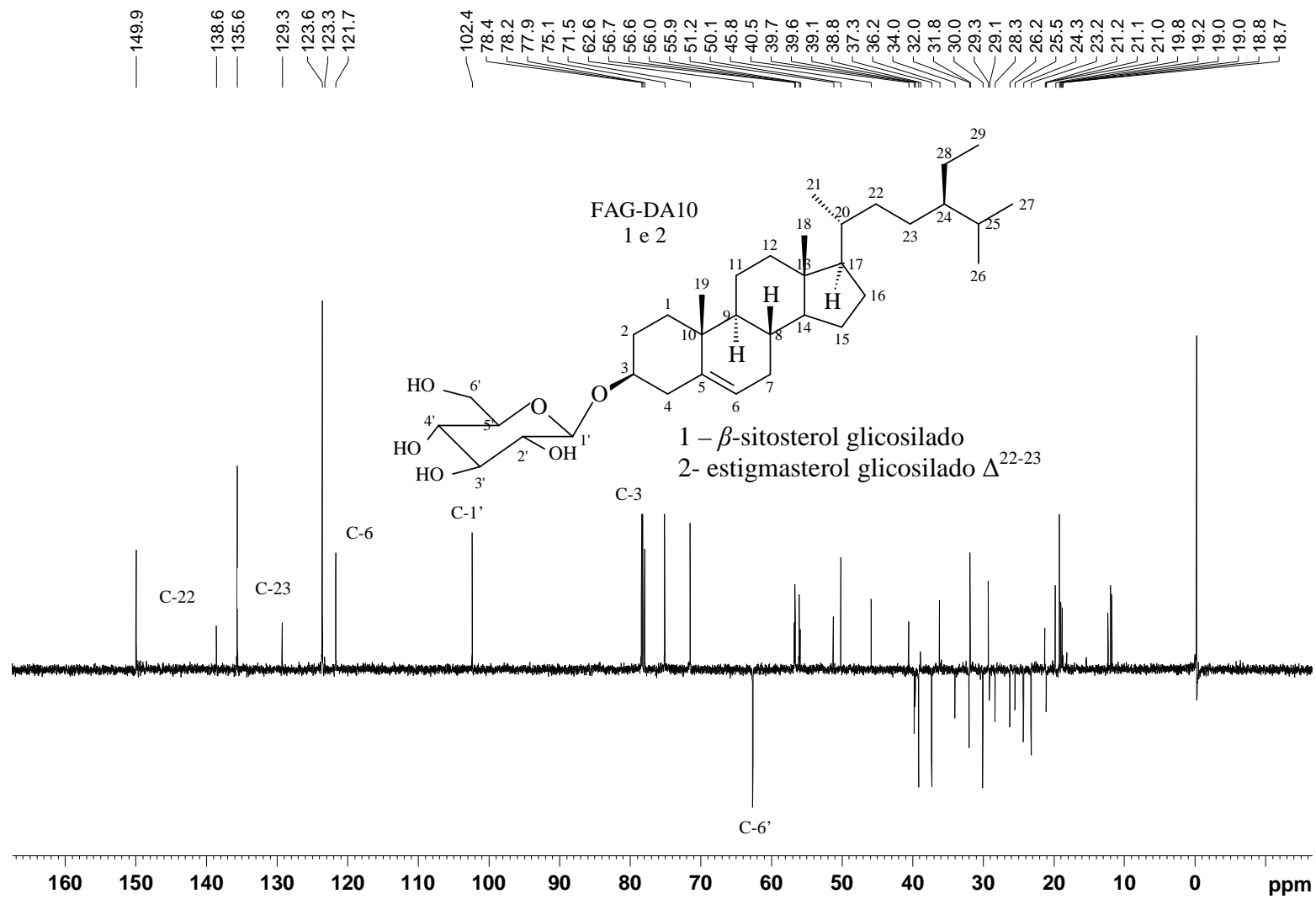


Figura A58. Subespectro de DEPT 135° de FAG-DA10 (50 MHz; Pyr-d₆) mistura de β -sitosterol e estigmasterol glicosilado.

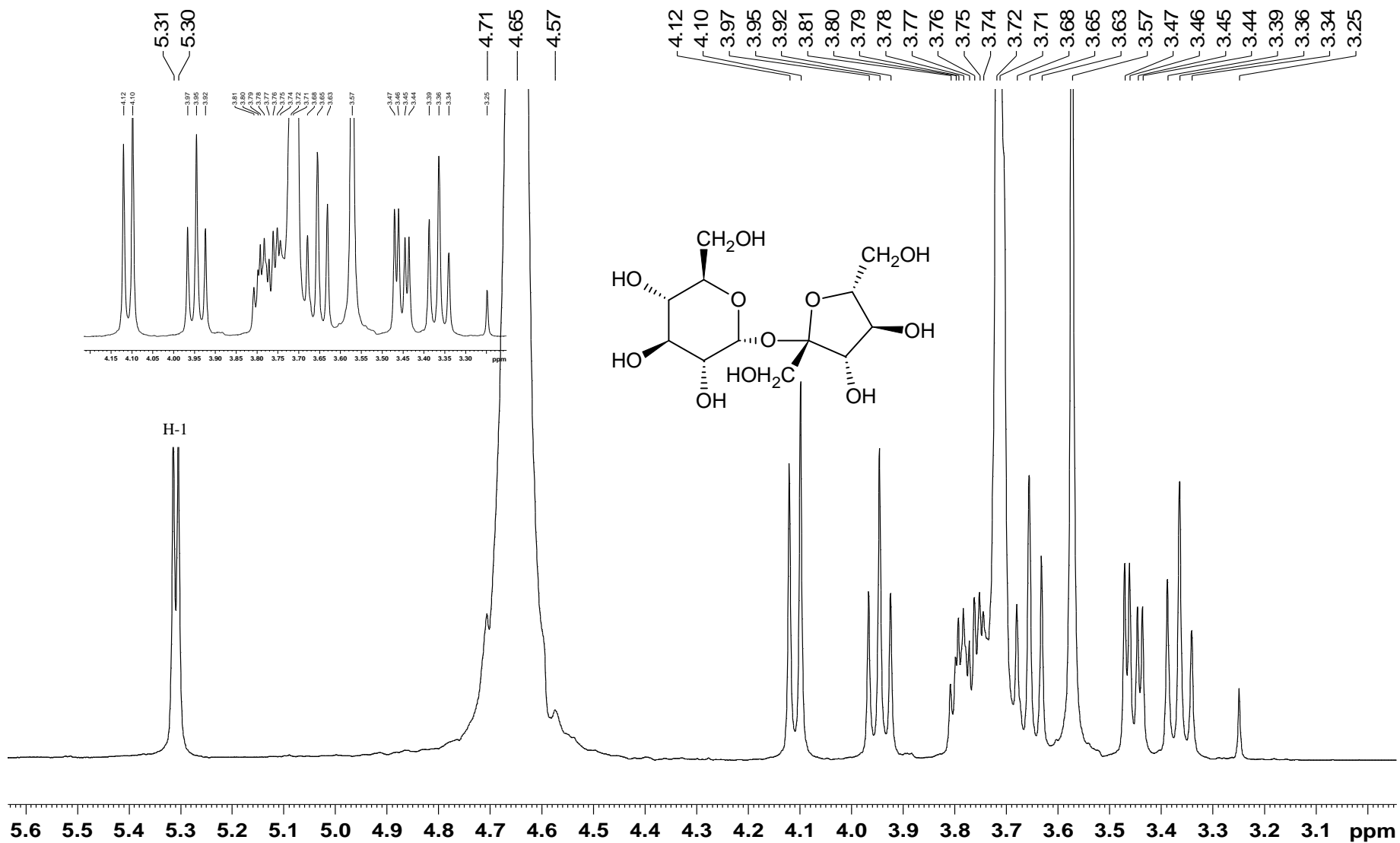


Figura A59. Espectro de RMN de ^1H de AM20-M12 (400 MHz; D_2O): Sacarose.

δ

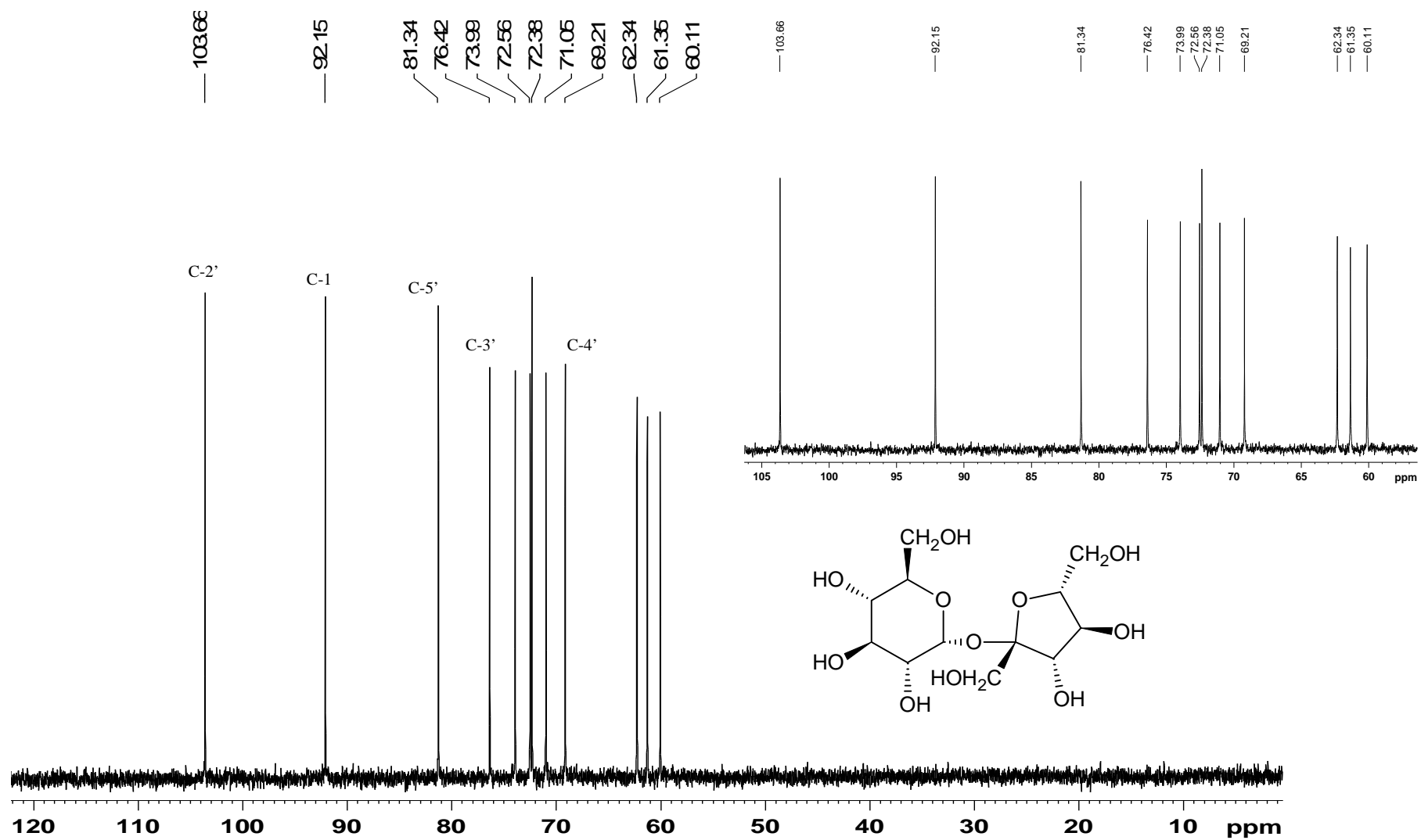


Figura A60. Espectro de RMN de ^{13}C de AM20-M12 (100 MHz; D_2O): Sacarose.

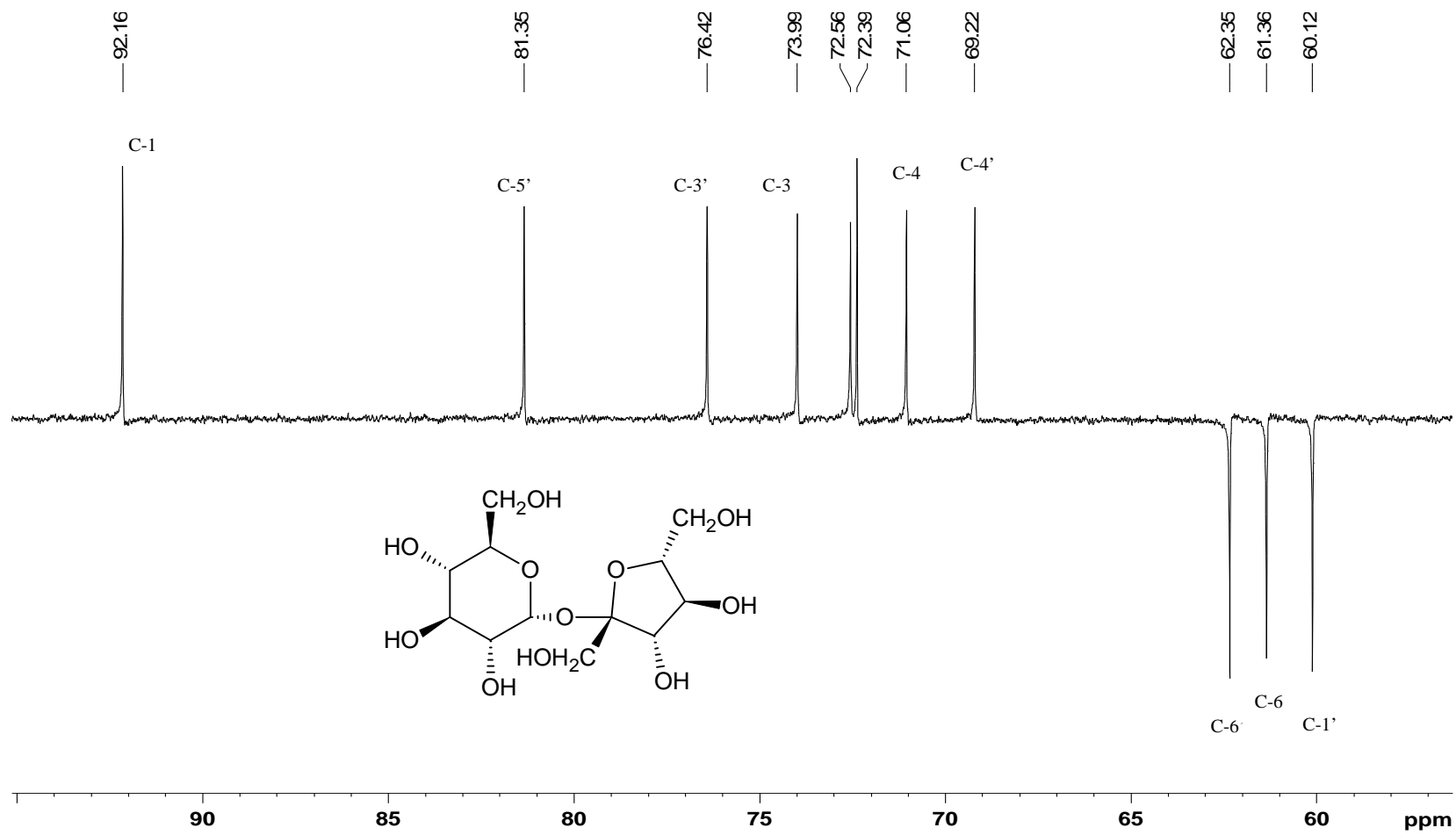


Figura A61. Subespectro de DEPT 135° de AM20-M12 (100 MHz; D₂O): Sacarose.

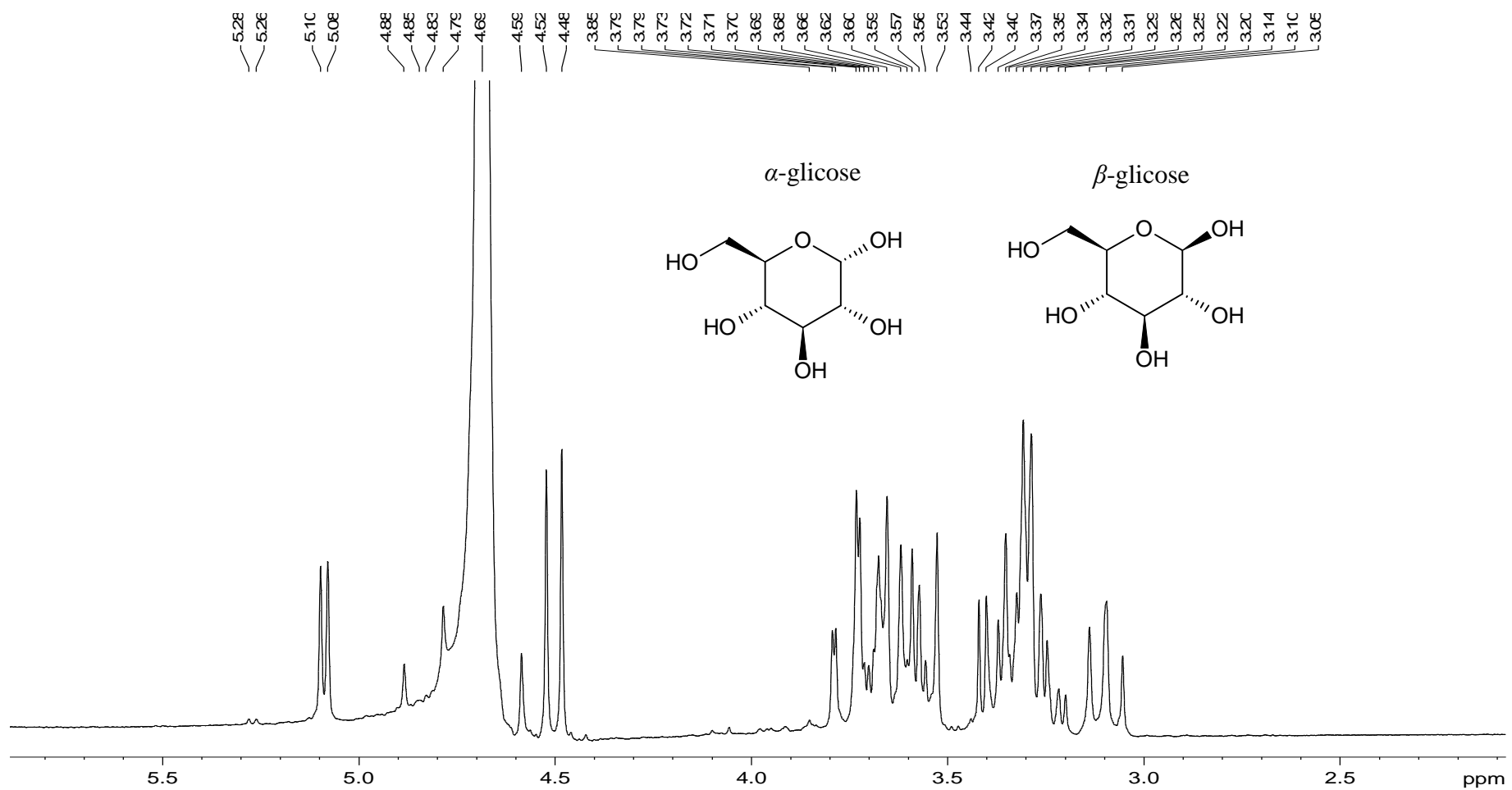


Figura A62. Espectro de RMN de ^1H de AM20-M14 (400 MHz; D_2O): mistura de α -glicose e β -glicose.

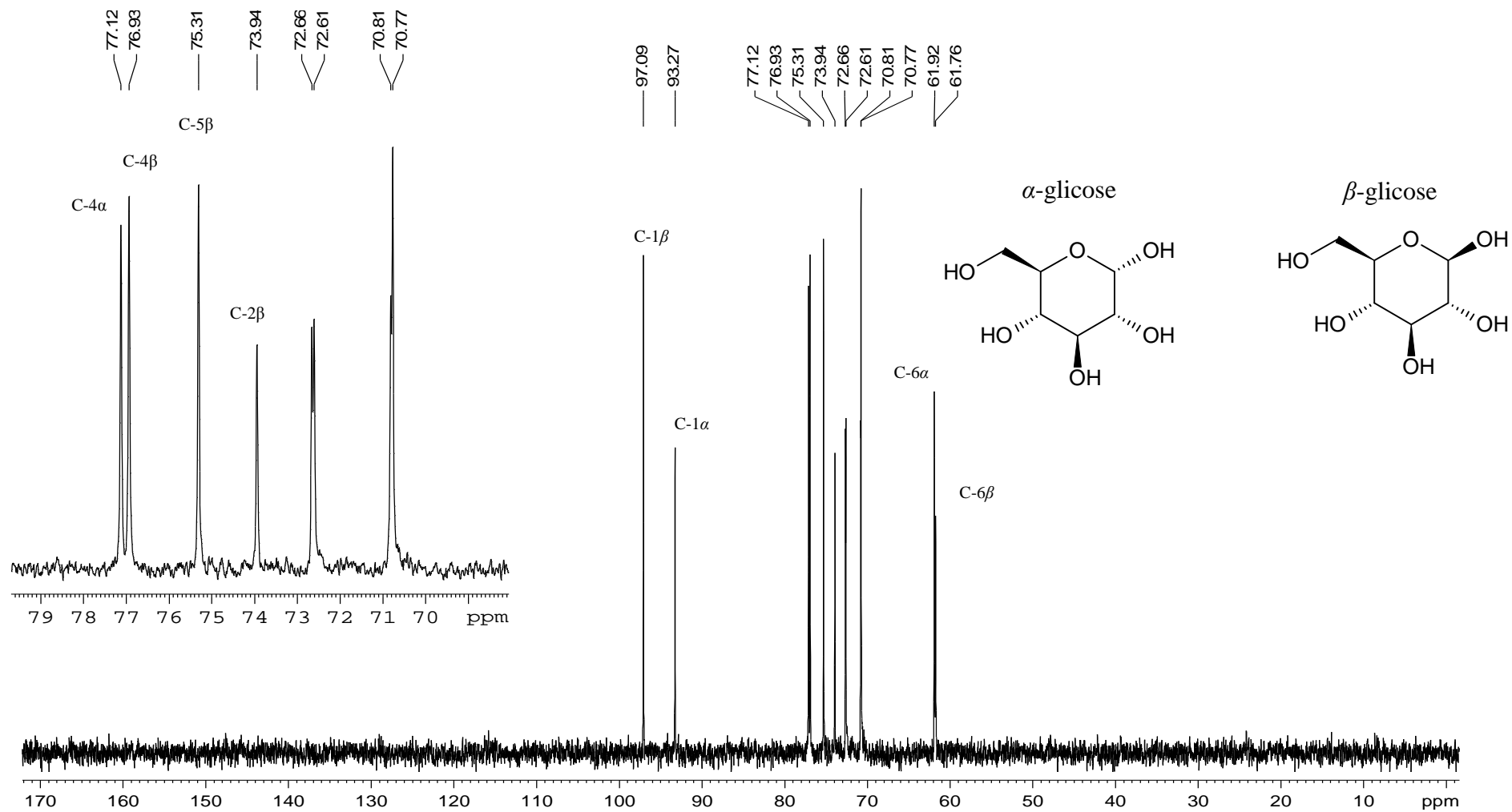


Figura A63. Espectro de RMN de ^{13}C de AM20-M14 (100 MHz; D_2O): mistura de α -glicose e β -glicose.

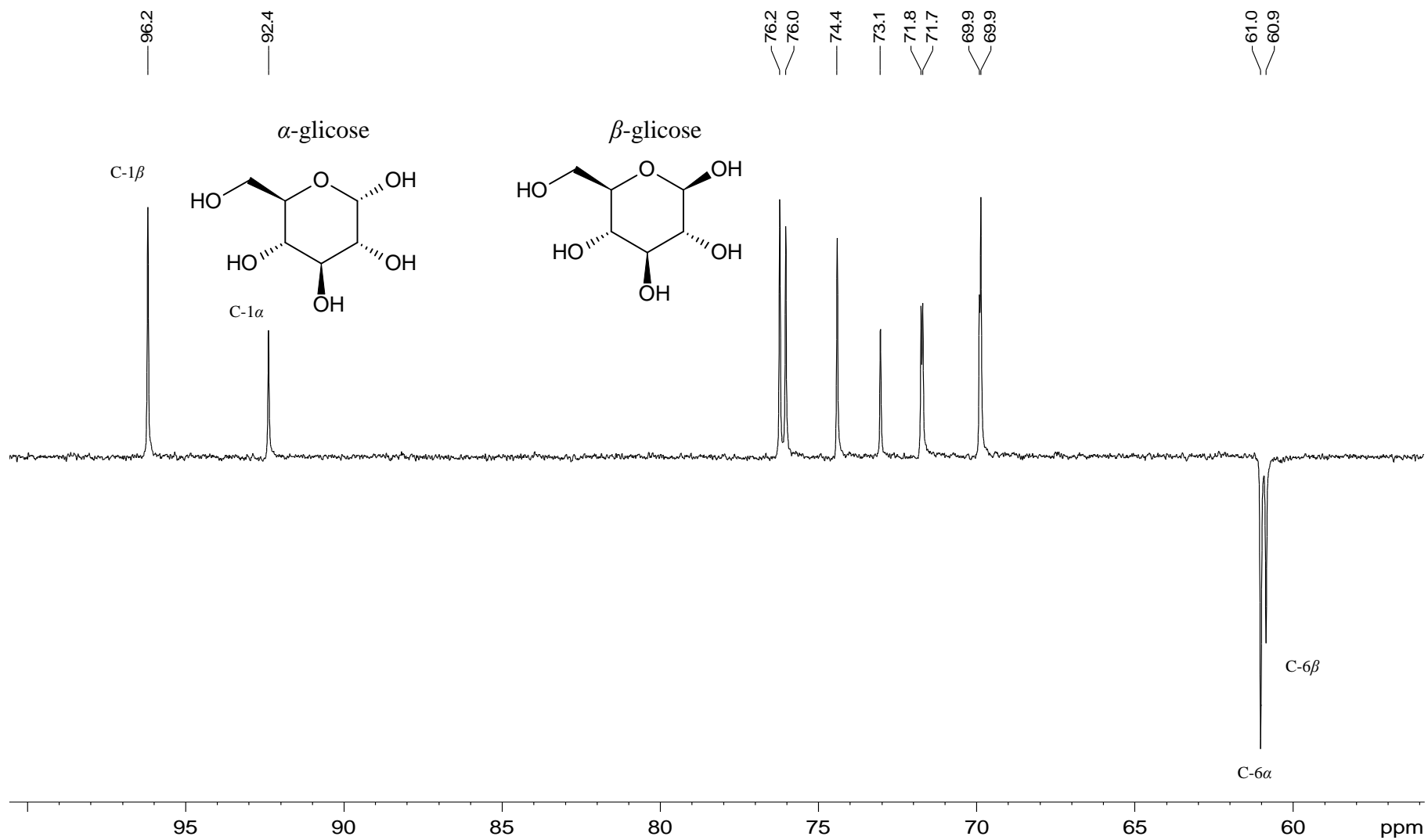


Figura A64. Subespectro de DEPT 135° de AM20-M14 (100 MHz; D₂O): mistura de α -glicose e β -glicose.

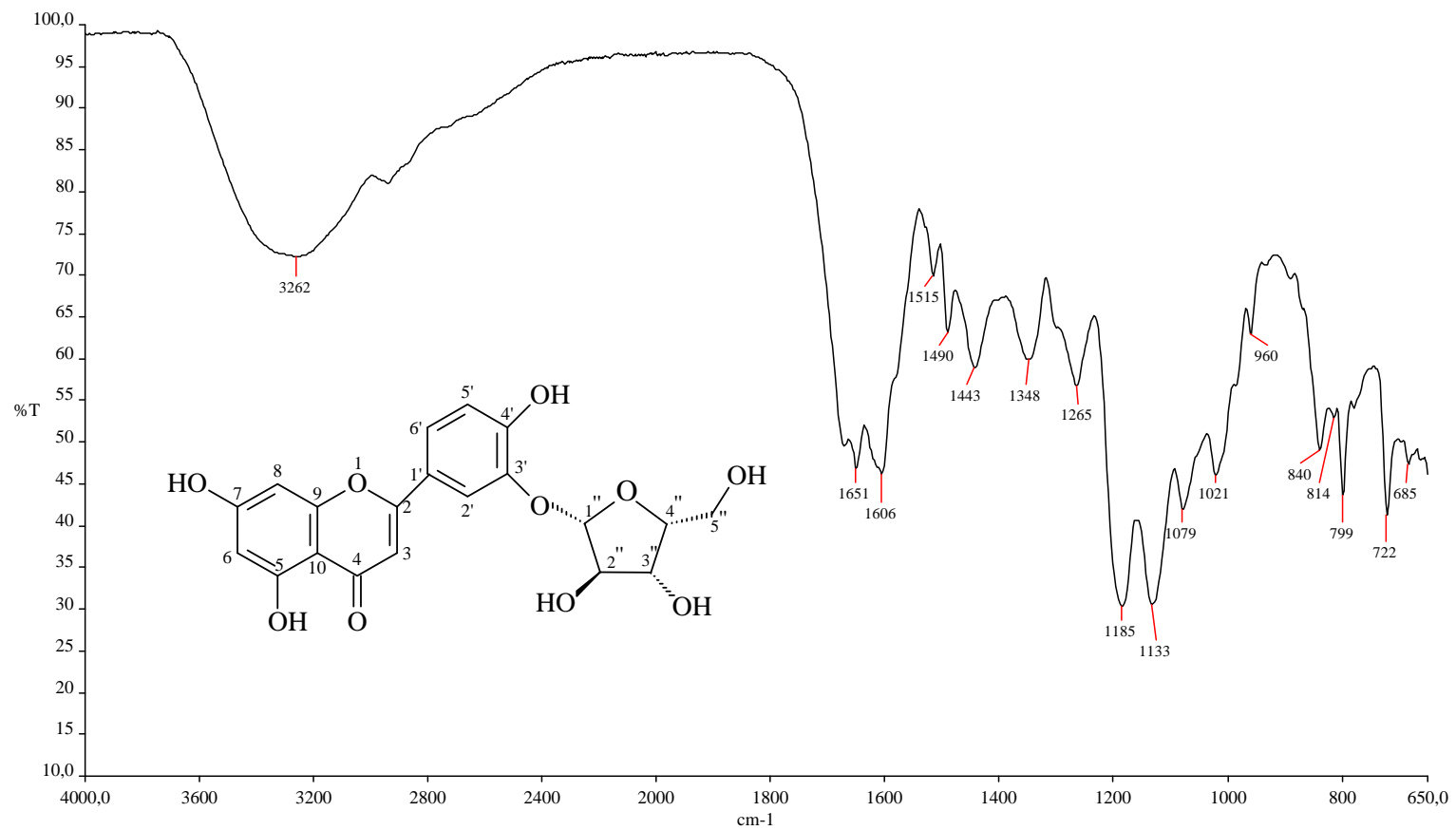


Figura A65. Espectro de absorção na região do Infravermelho de FF4 (ATR, cm⁻¹).

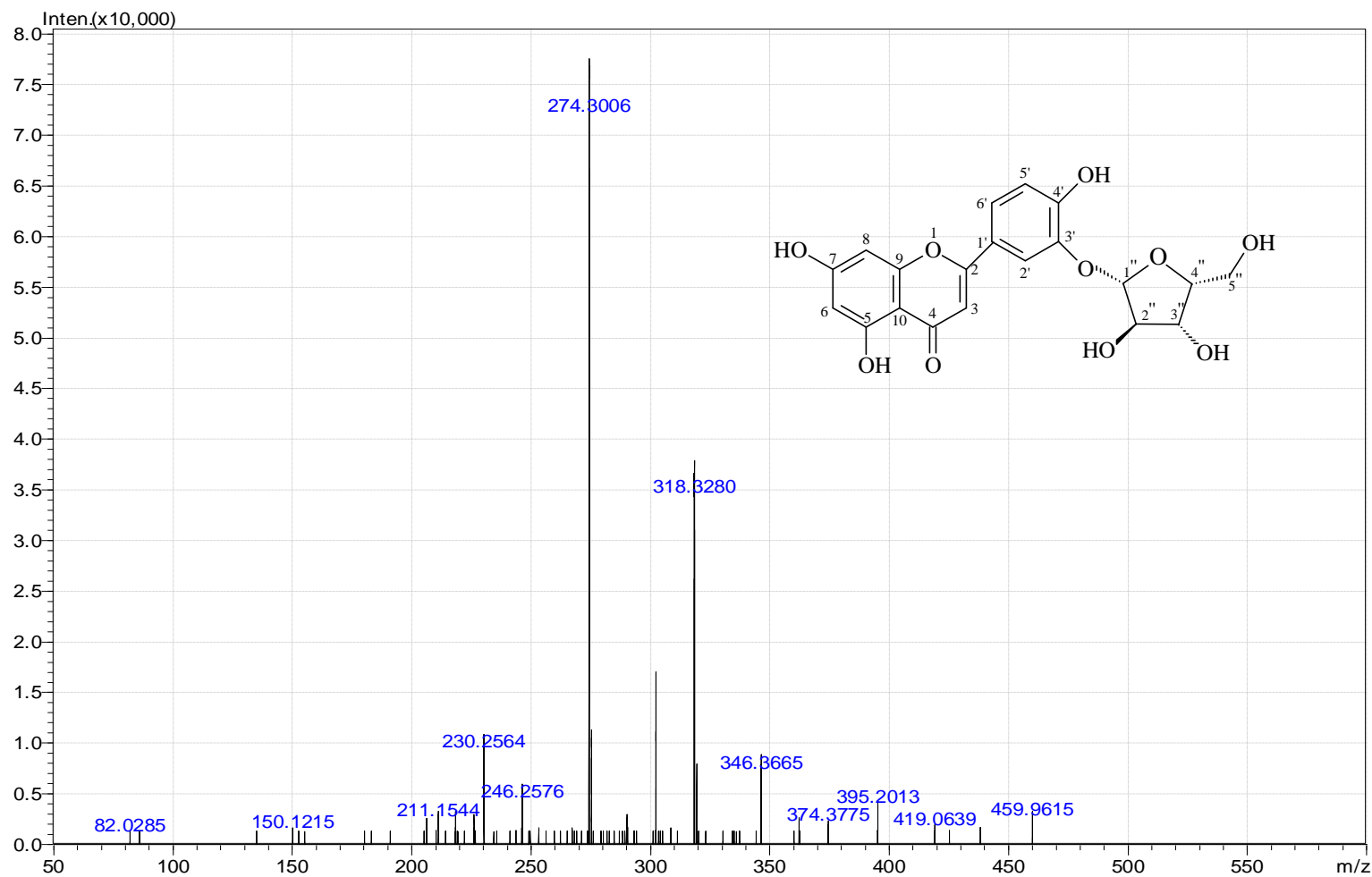


Figura A66. Espectro ESI(+)-MS de FF4: Luteolina-3'-O- β -xilofuranose.

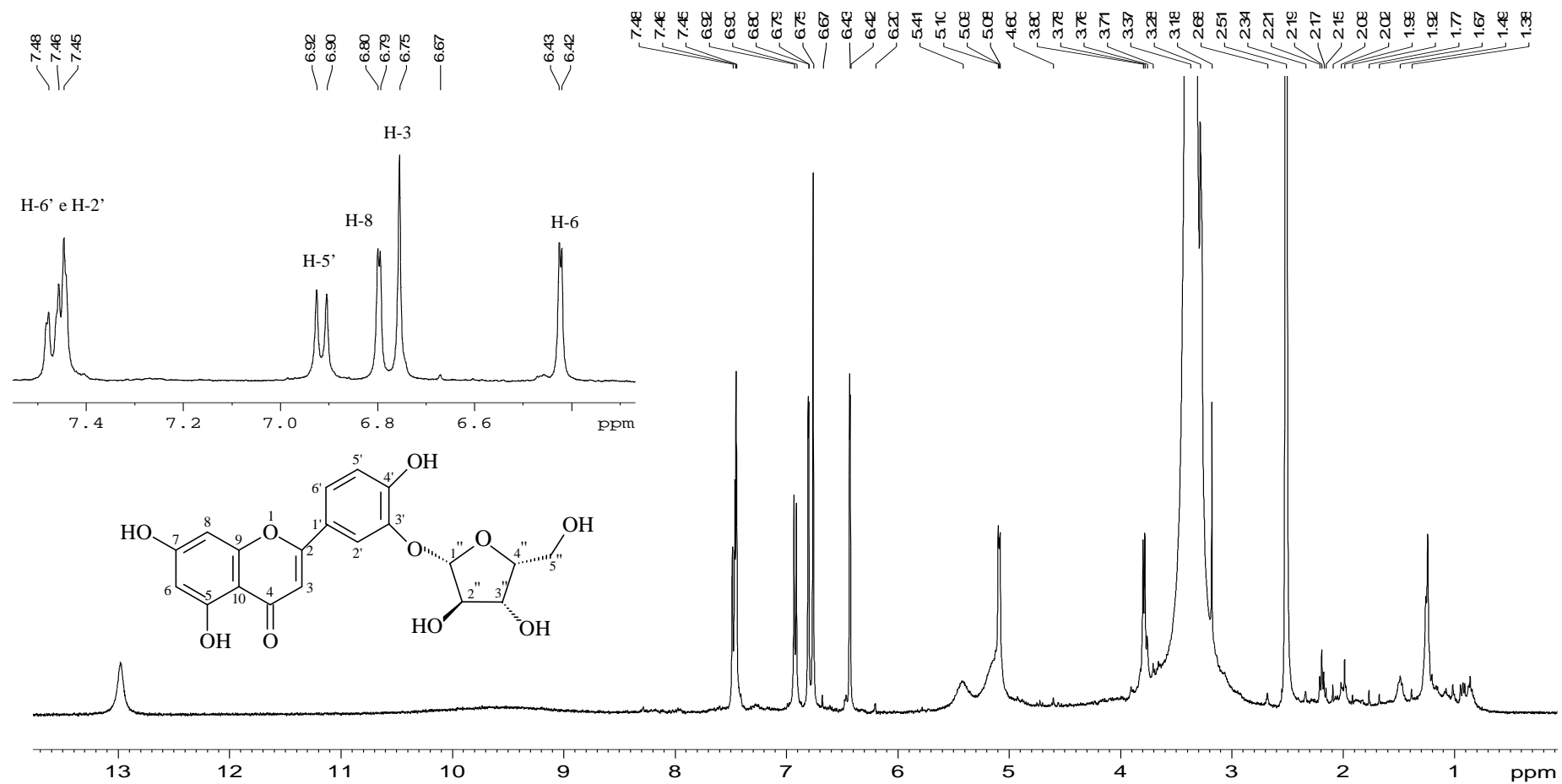


Figura A67. Espectro de RMN de ^1H de FF4 (400 MHz; DMSO-d_6): Luteolina-3'- O - β -xilofuranose.

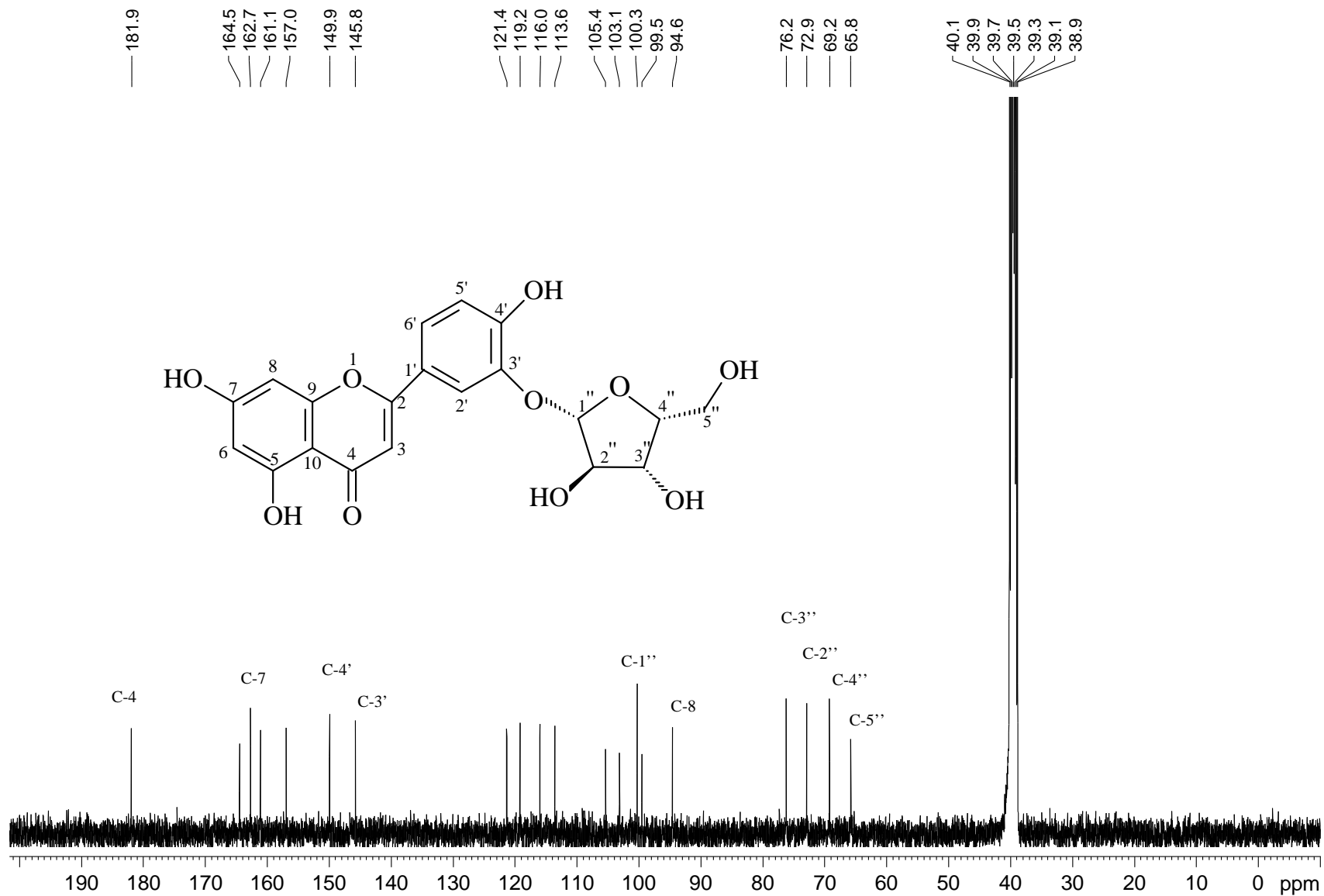


Figura A68. Espectro de RMN de ^{13}C de FF4 (100 MHz; DMSO-d_6): Luteolina-3'- O - β -xilofuranose.

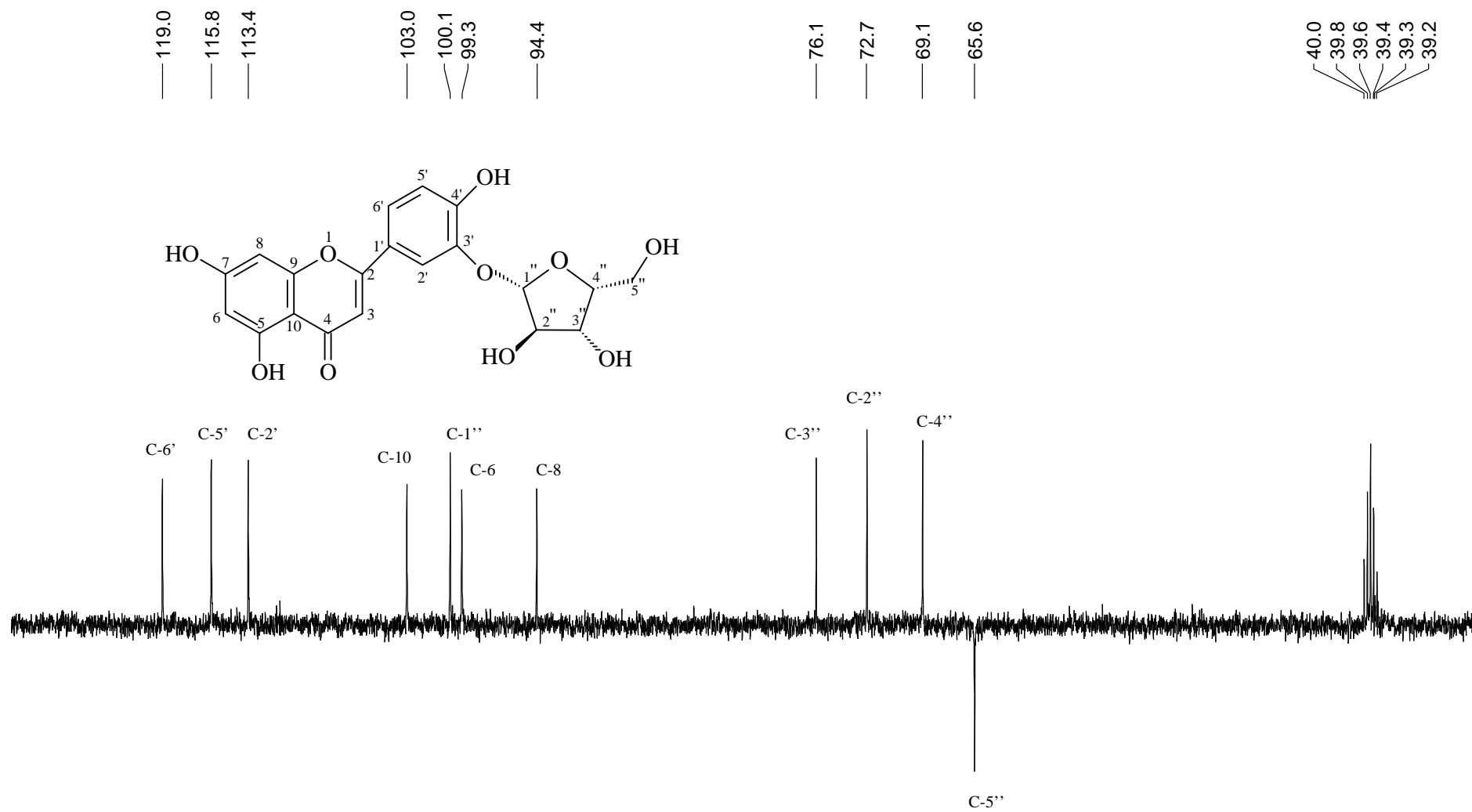


Figura A69. Subespectro de DEPT 135° de FF4 (100 MHz; DMSO-d₆): Luteolina-3'-O-β-xilofuranose.

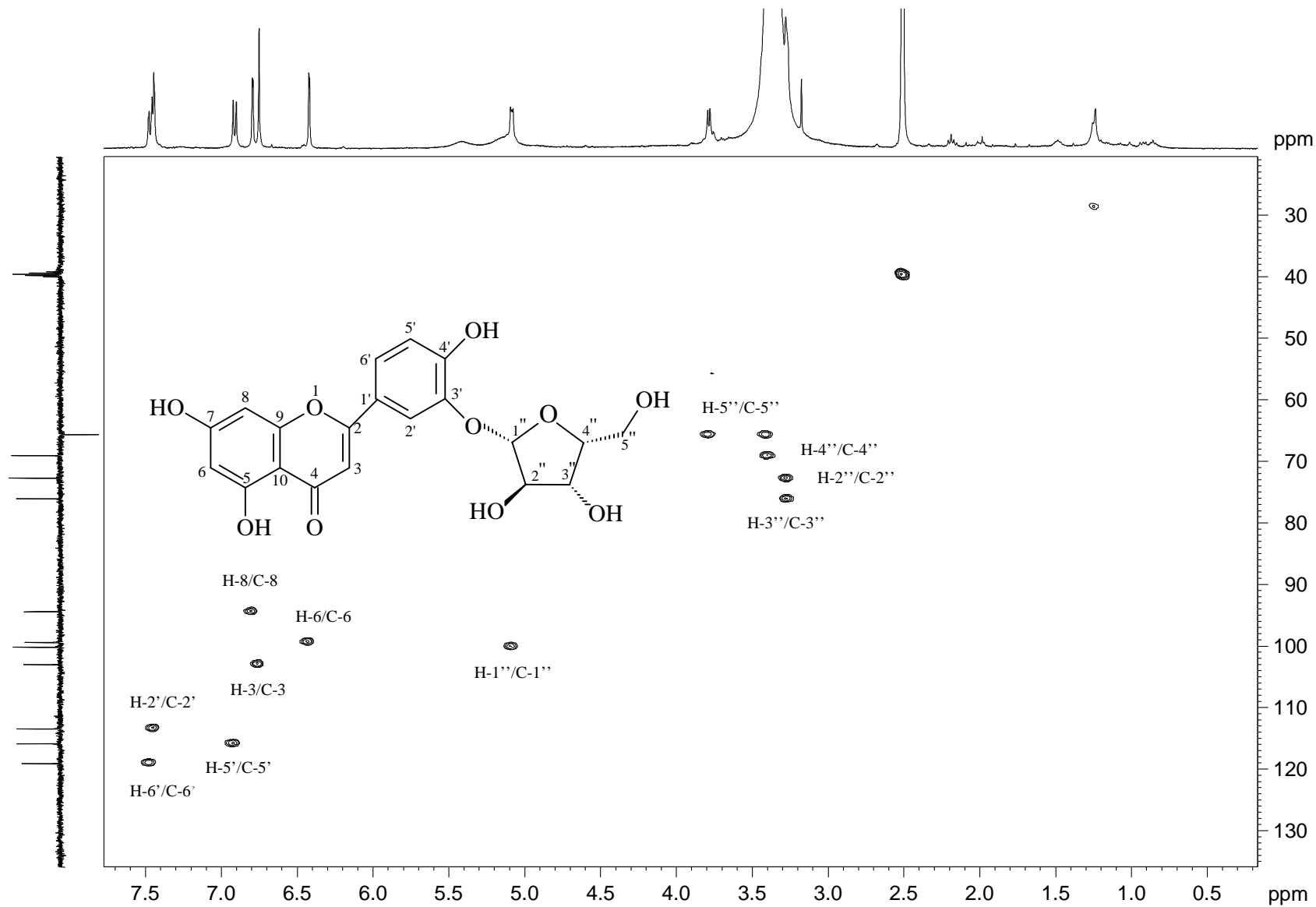


Figura A70. Mapa de correlação HSQC de FF4 (100 MHz; DMSO- d_6): Luteolina-3'- O - β -xilofuranose.

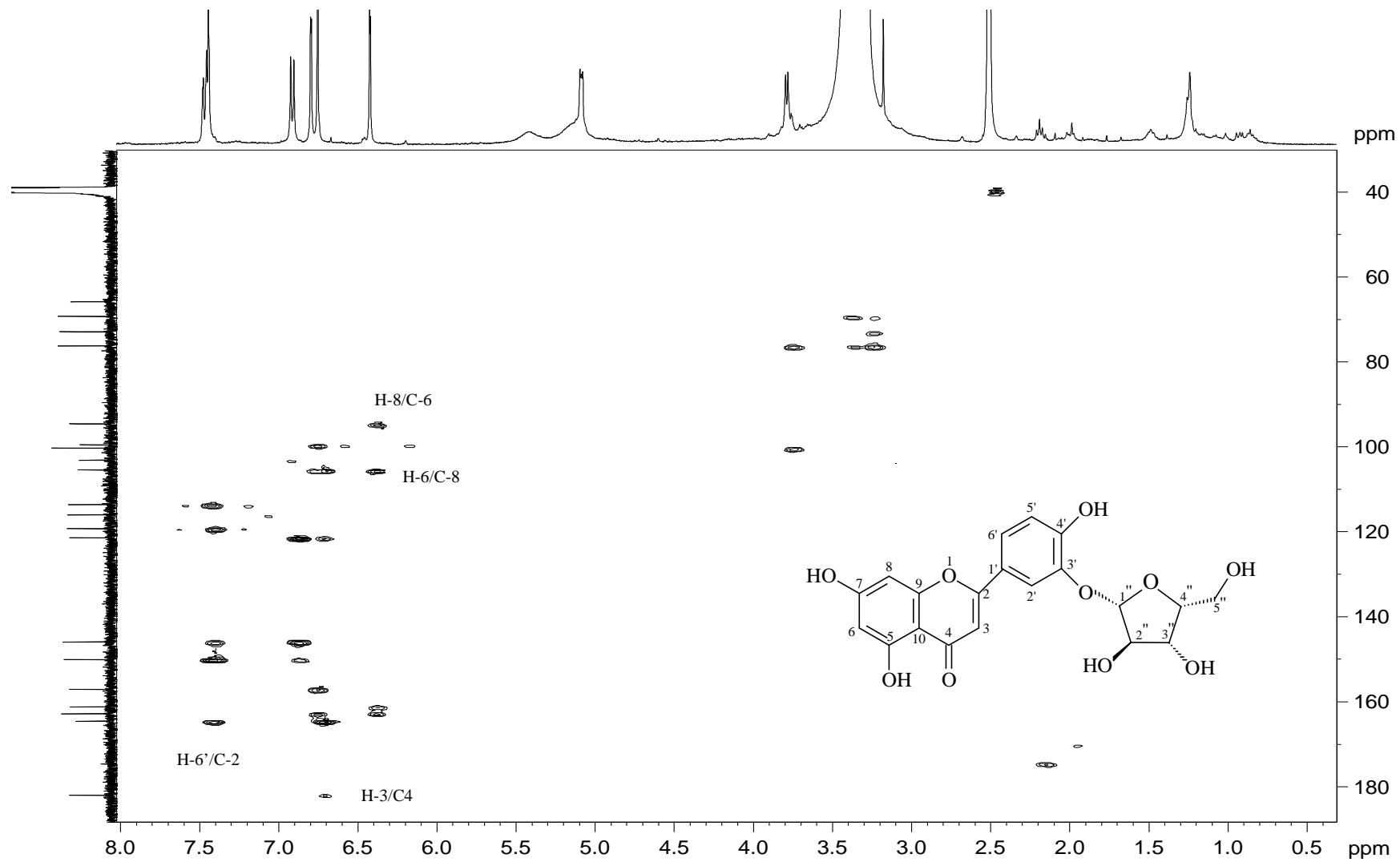


Figura A71. Mapa de correlação HMBC de FF4 (100 MHz; DMSO- d_6): Luteolina-3'- O - β -xilofuranose.

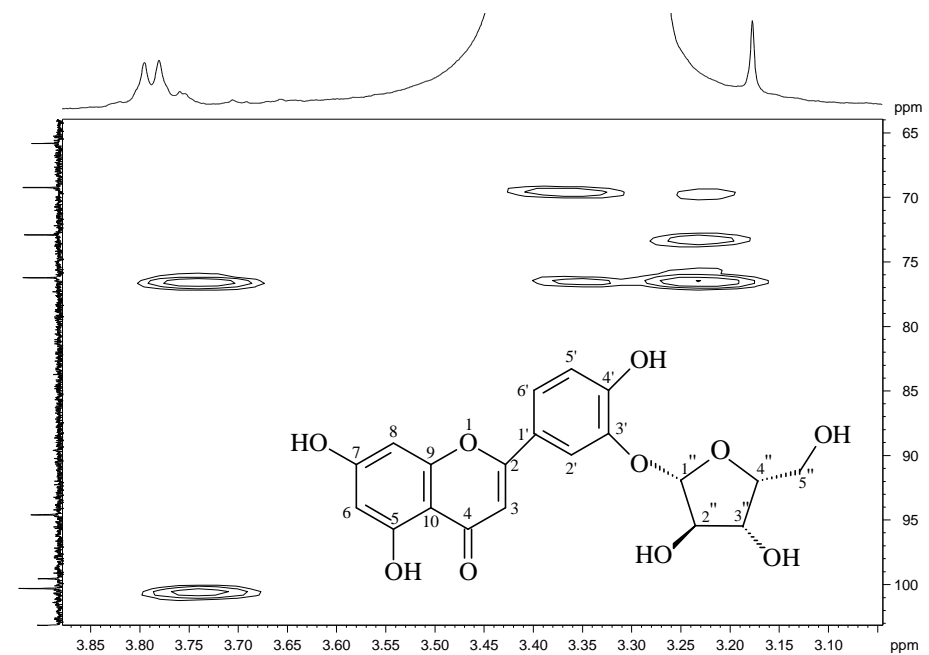
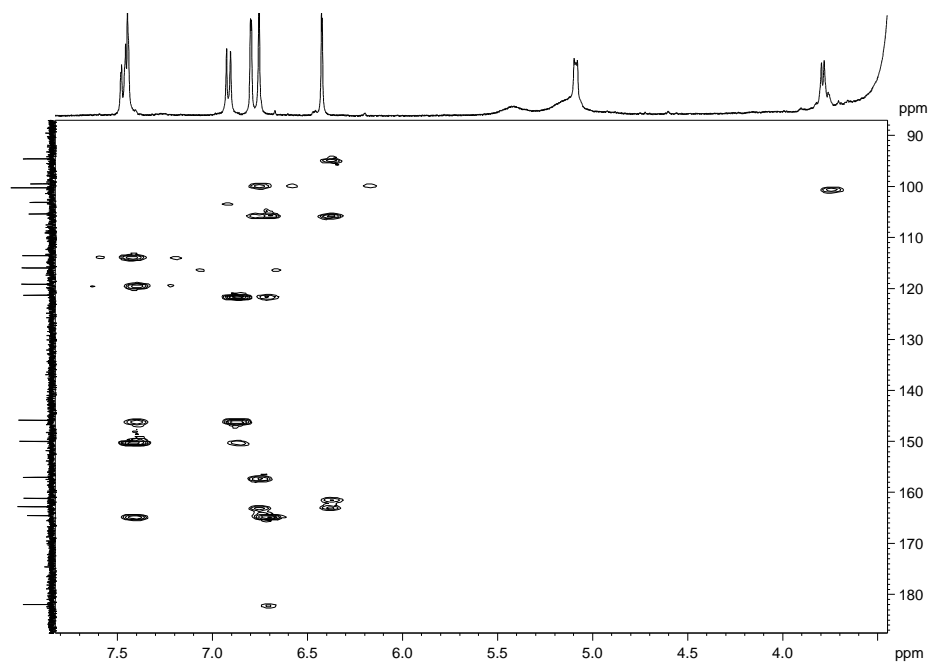


Figura A72. Ampliações do Mapa de correlação HMBC de FF4 (100 MHz; DMSO-d₆): Luteolina-3'-O-β-xilofuranose.

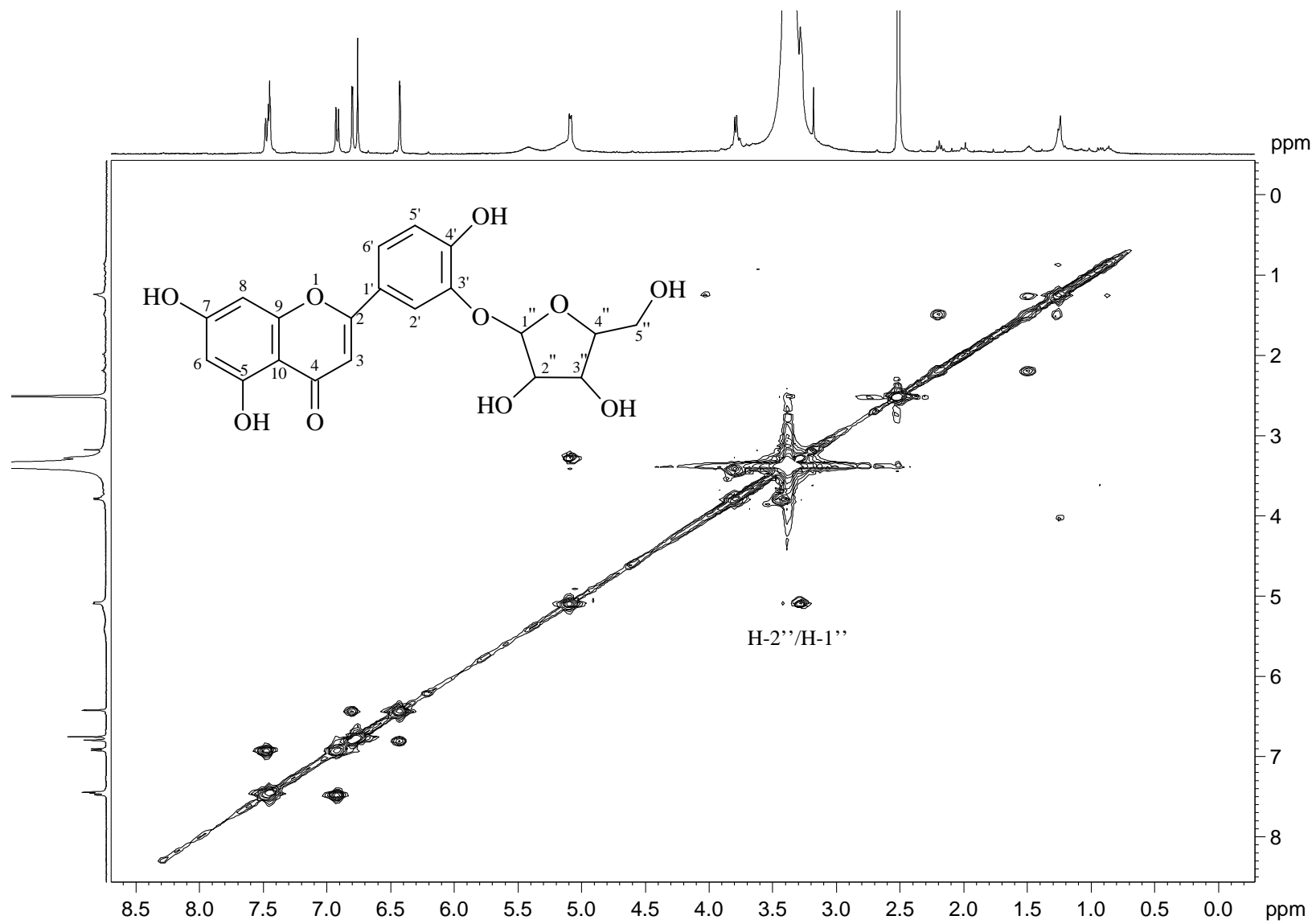


Figura A73. Mapa de correlação COSY de FF4 (400 MHz; DMSO- d_6): Luteolina-3'-O- β -xilofuranose.

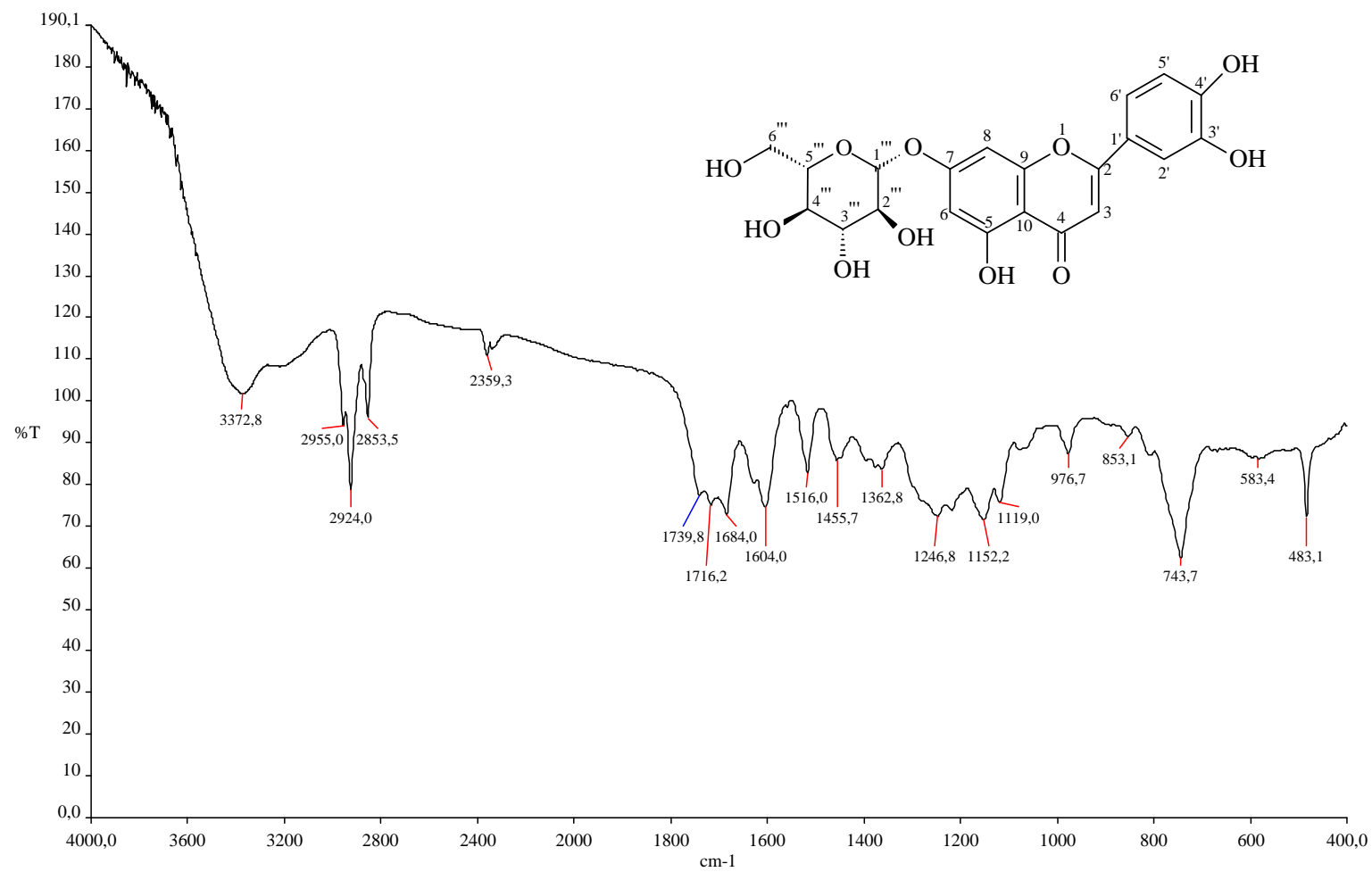


Figura A74. Espectro de absorção na região do Infravermelho de FF3 (ATR, cm⁻¹): Luteolina-7-*O*-β-glicosídeo.

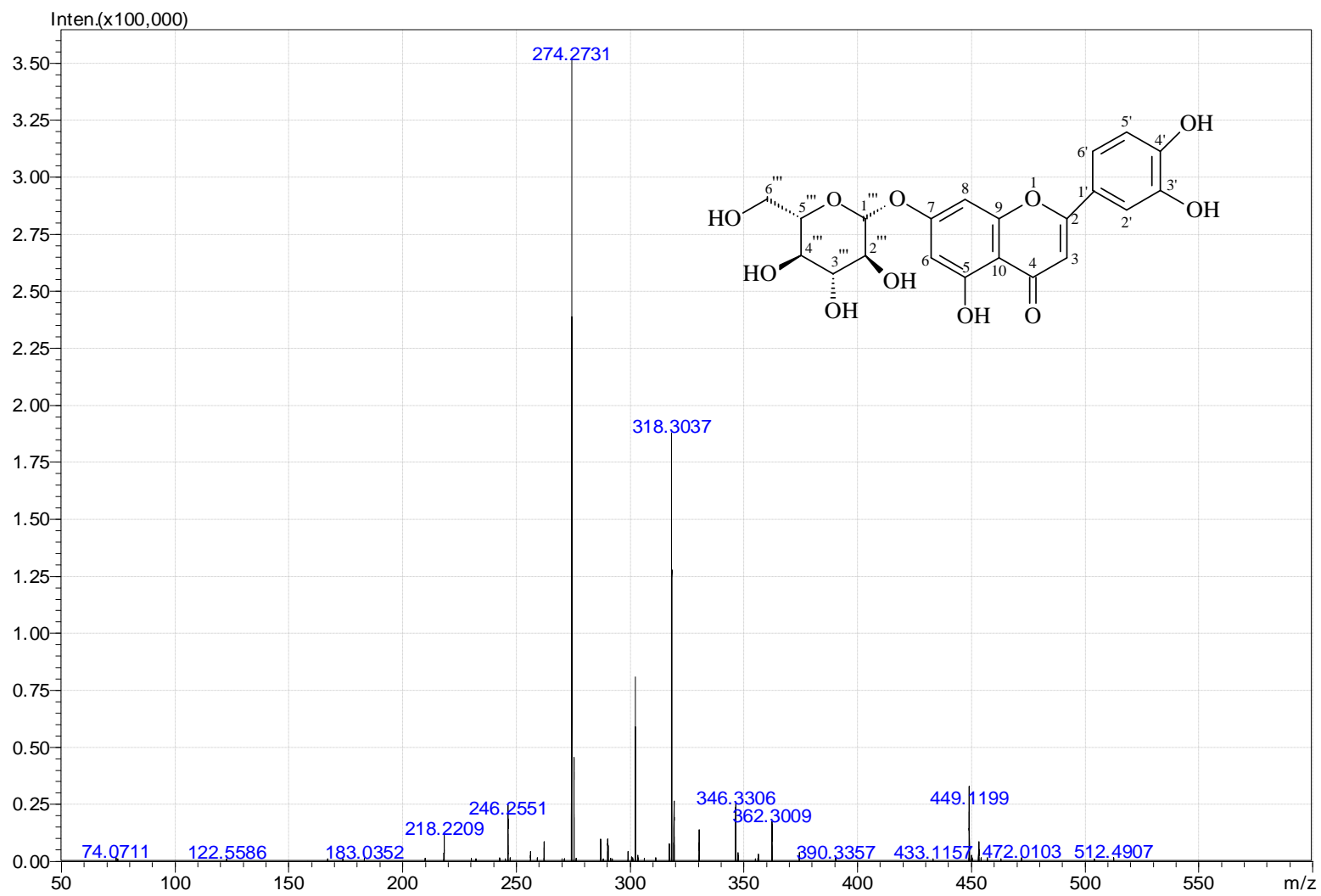


Figura A75. Espectro ESI(+)-MS de FF3: Luteolina-7-*O*- β -glicosídeo.

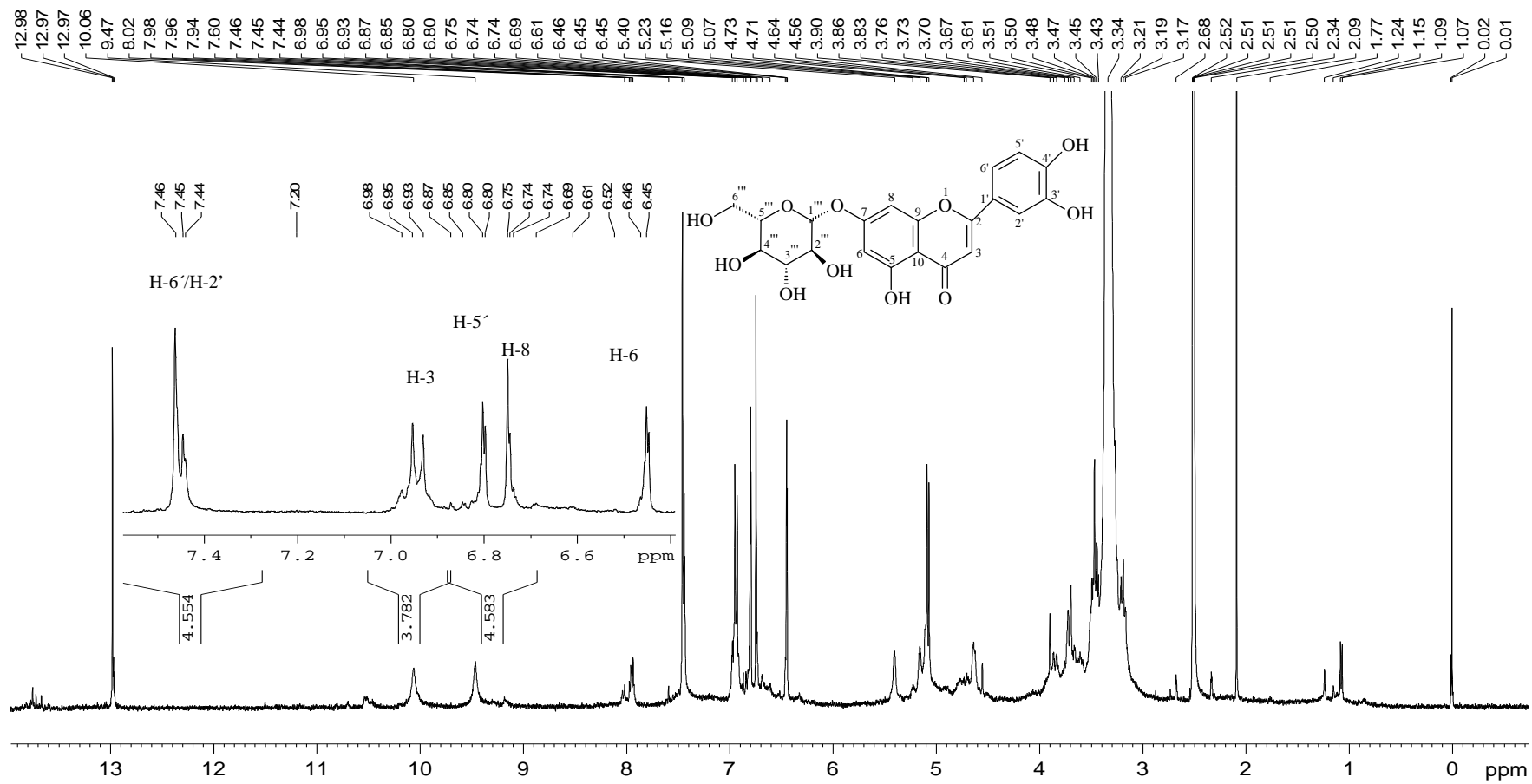


Figura A76. Espectro de RMN de ^1H de FF3 (400 MHz; DMSO-d_6): Luteolina-7- O - β -glicosídeo.

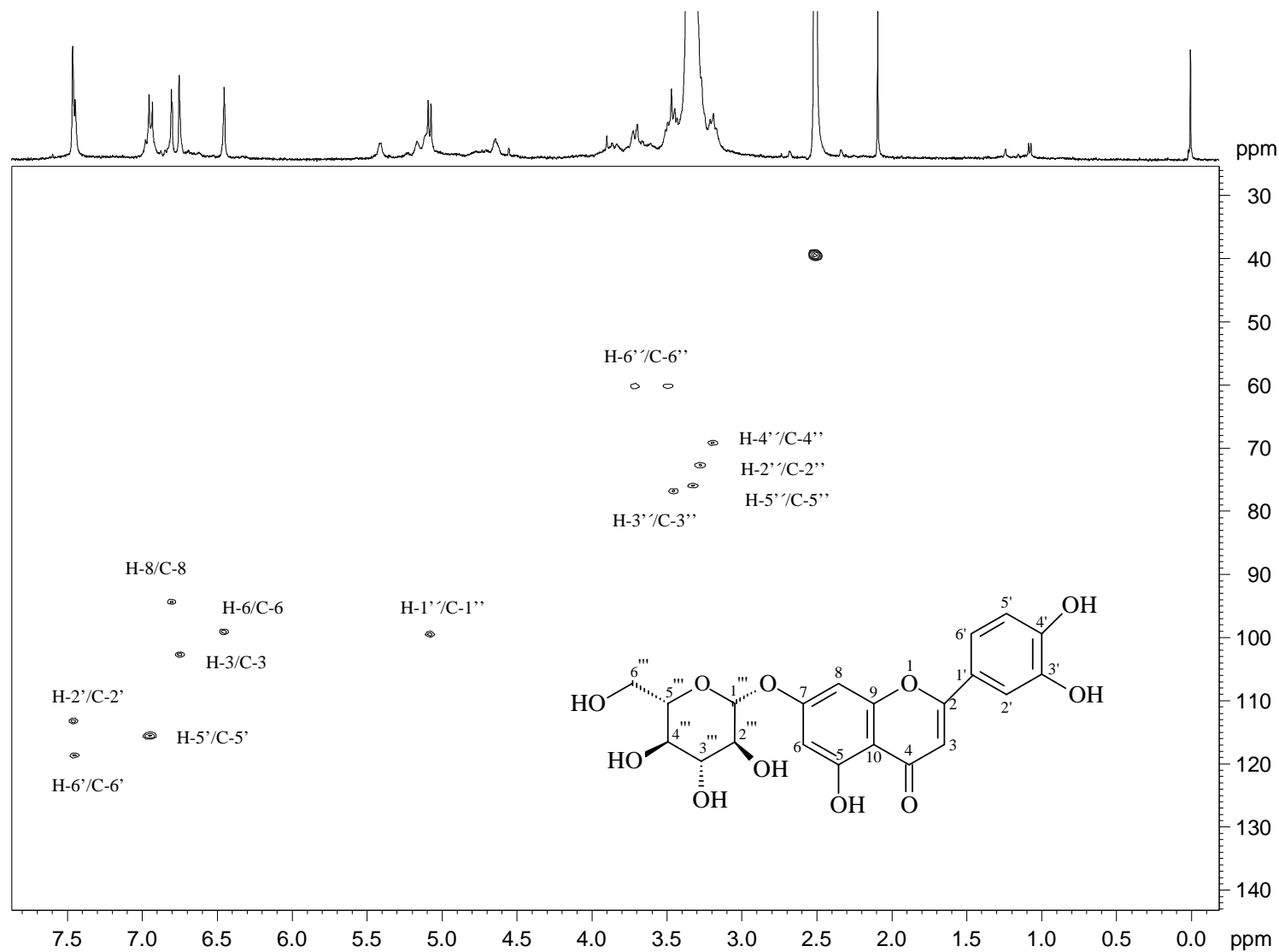


Figura A77. Mapa de contornos HSQC de FF3 (100 MHz; DMSO- d_6): Luteolina-7-O- β -glicosídeo.

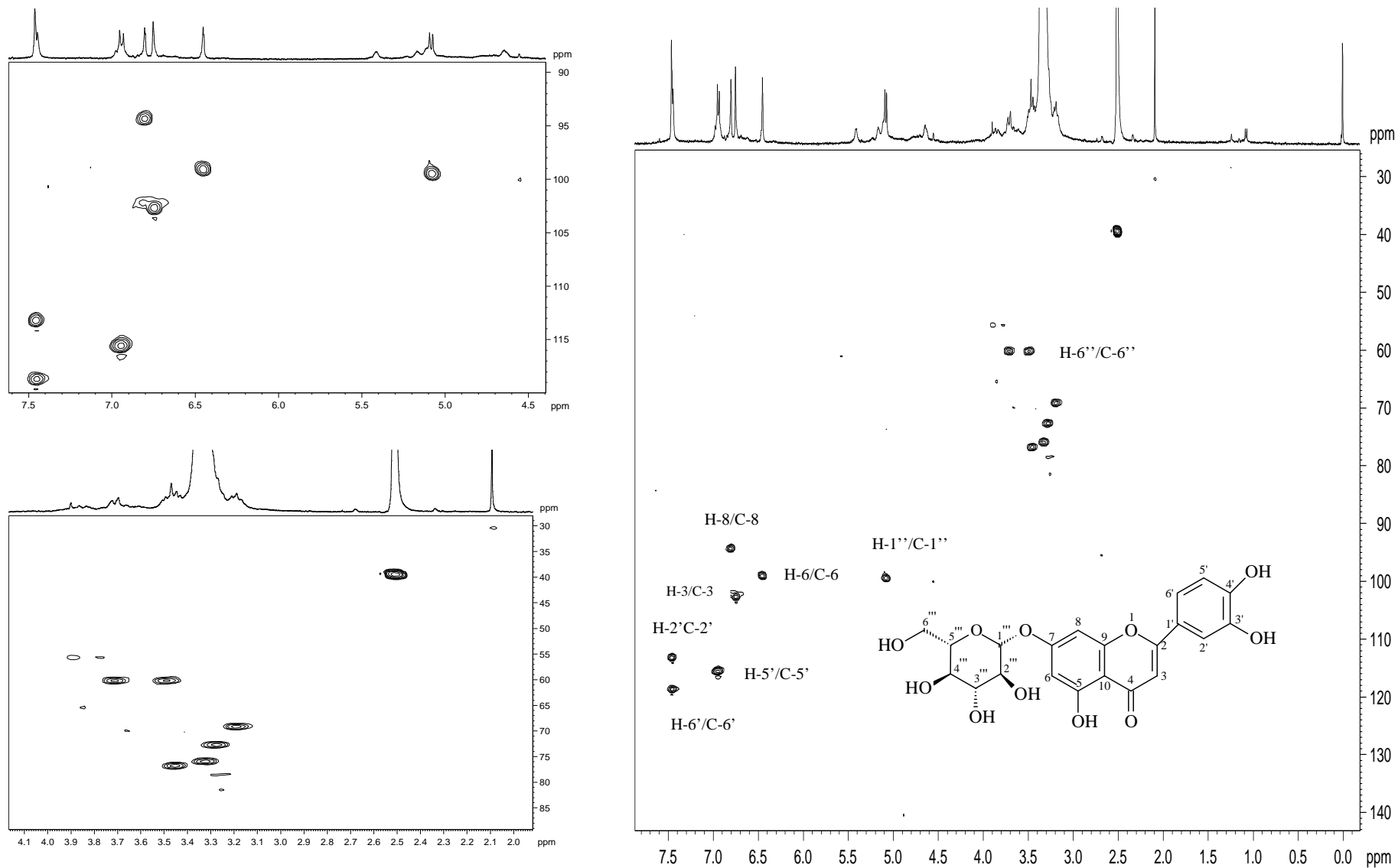


Figura A78. Ampliações do Mapa de correlação HSQC de FF3(100 MHz; DMSO- d_6): Luteolina-7- O - β -glicosídeo.

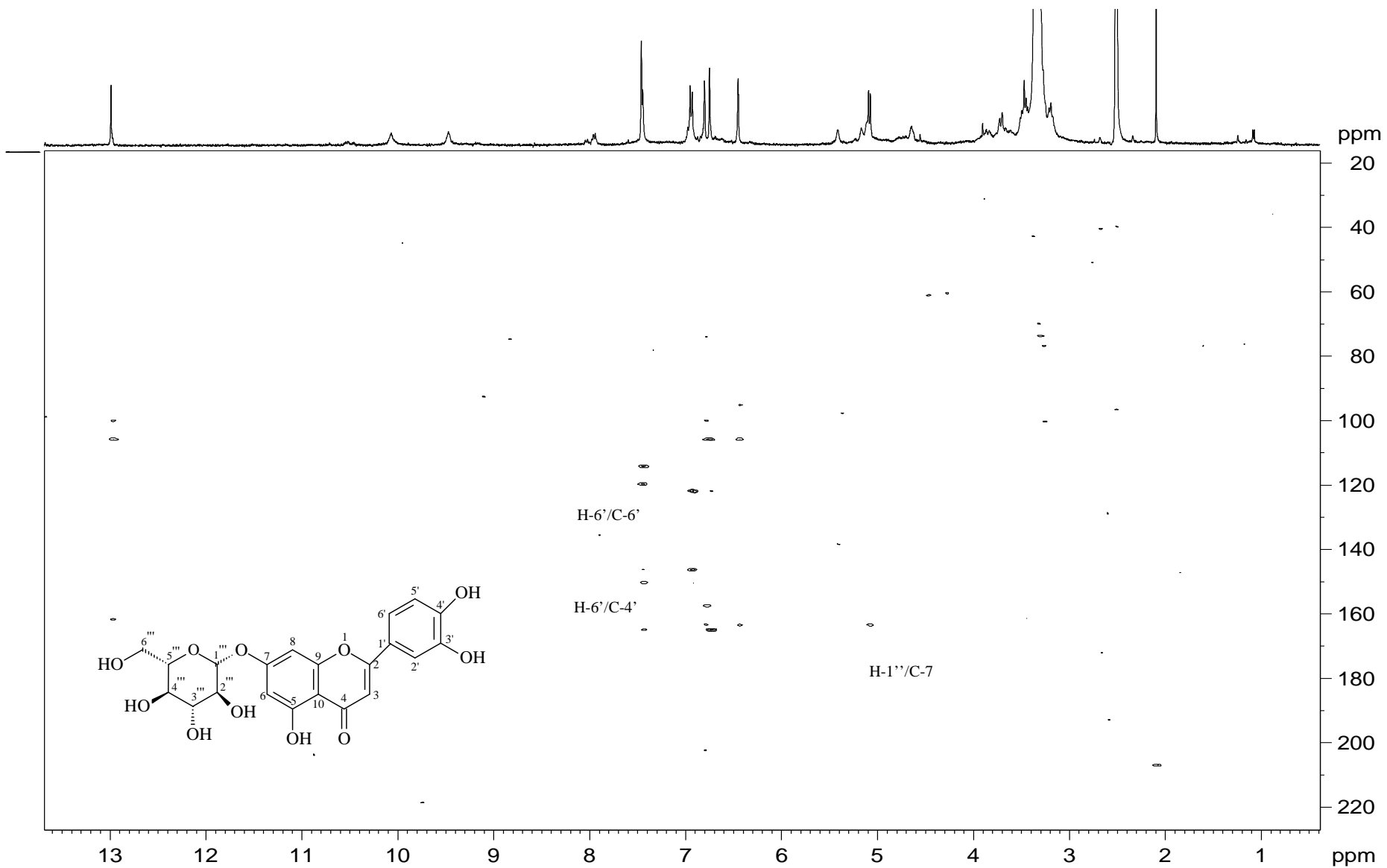


Figura A79. Mapa de correlação HMBC de FF3 (100 MHz; DMSO- d_6): Luteolina-7- O - β -glicosídeo.

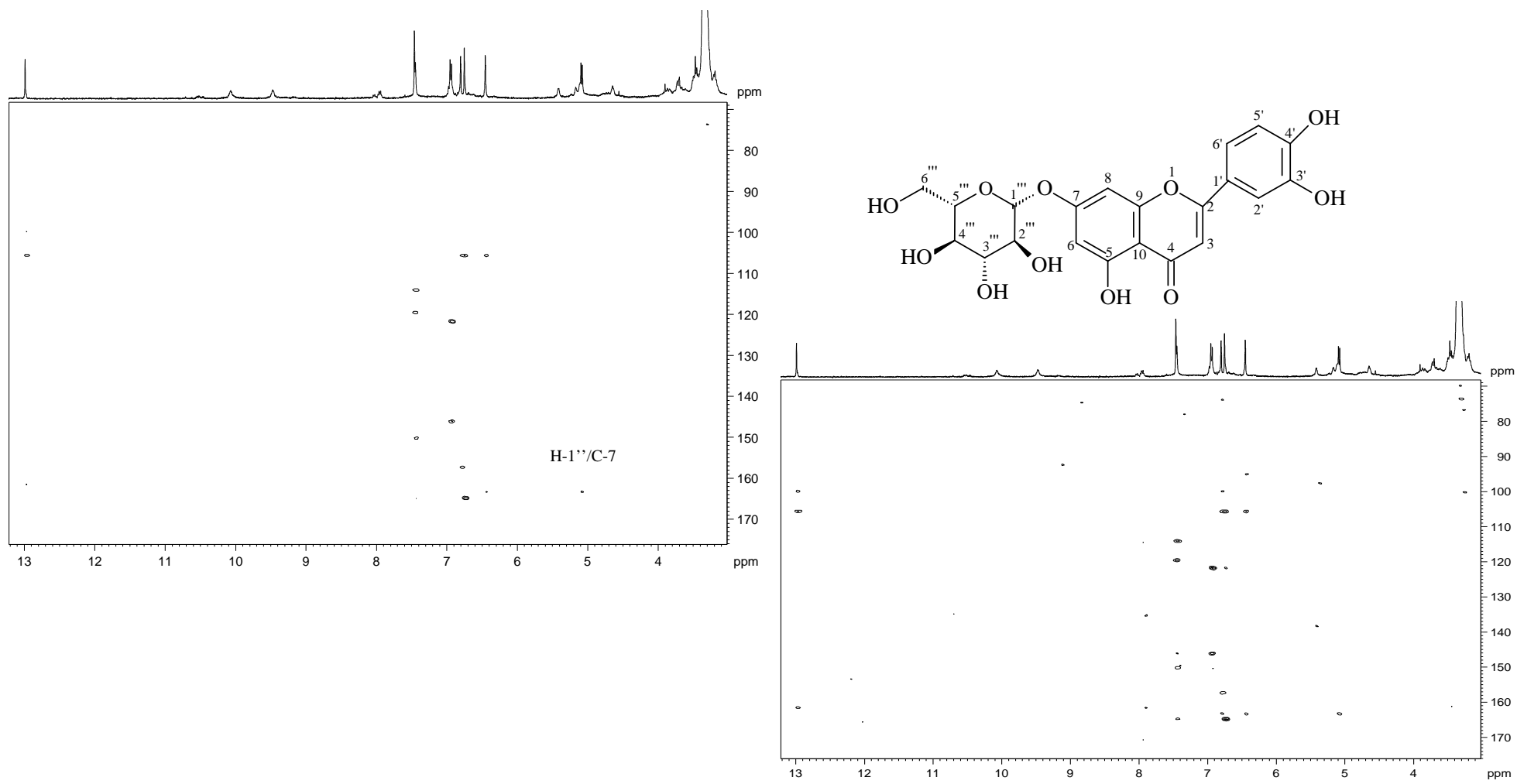


Figura A80. Ampliações do Mapa de correlação HMBC de FF3 (100 MHz; DMSO-d₆): Luteolina-7-*O*-β-glicosídeo.

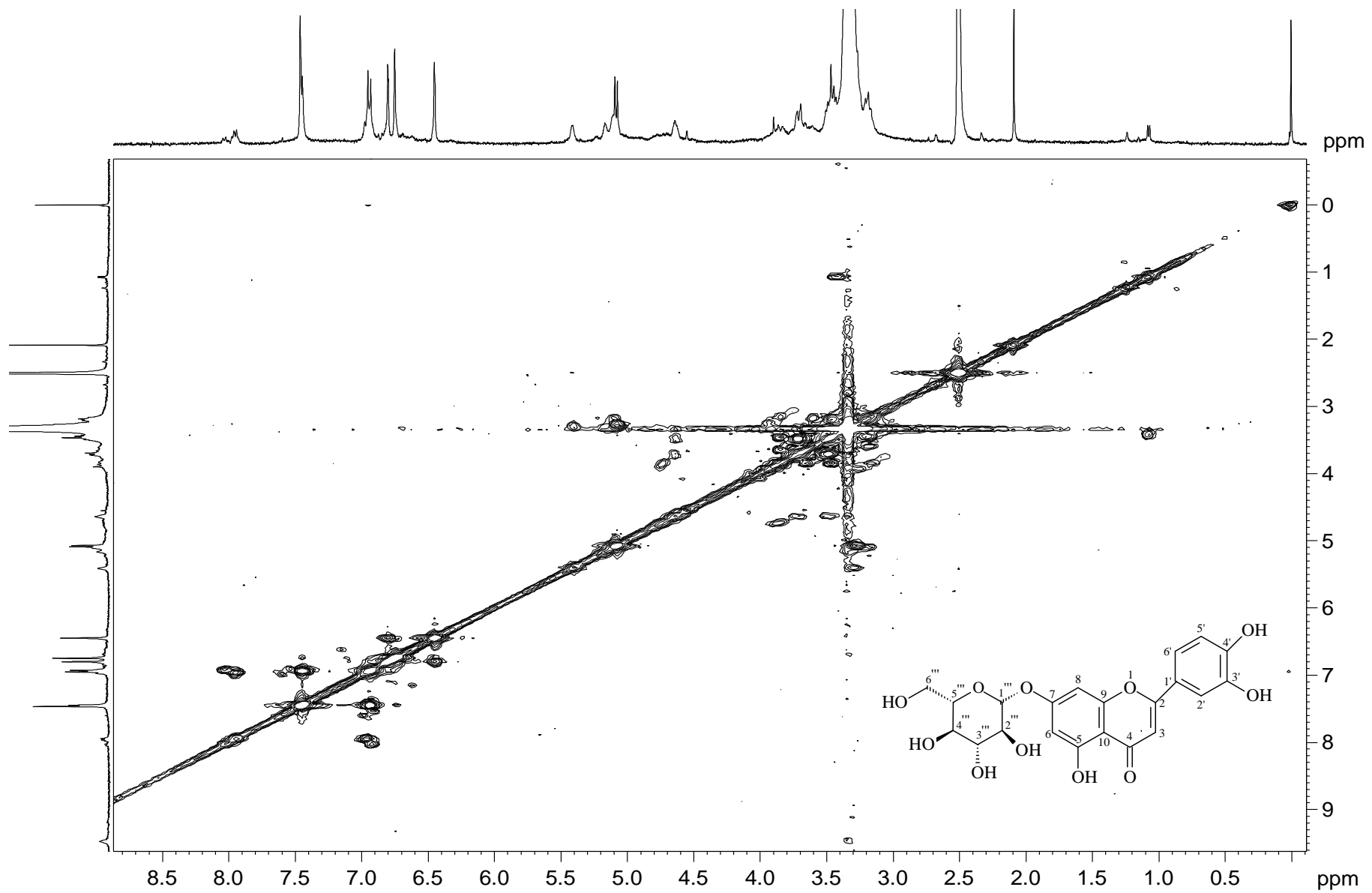


Figura A81. Mapa de correlação COSY de FF3 (400 MHz; DMSO-d₆): Luteolina-7-*O*-β-glicosídeo.

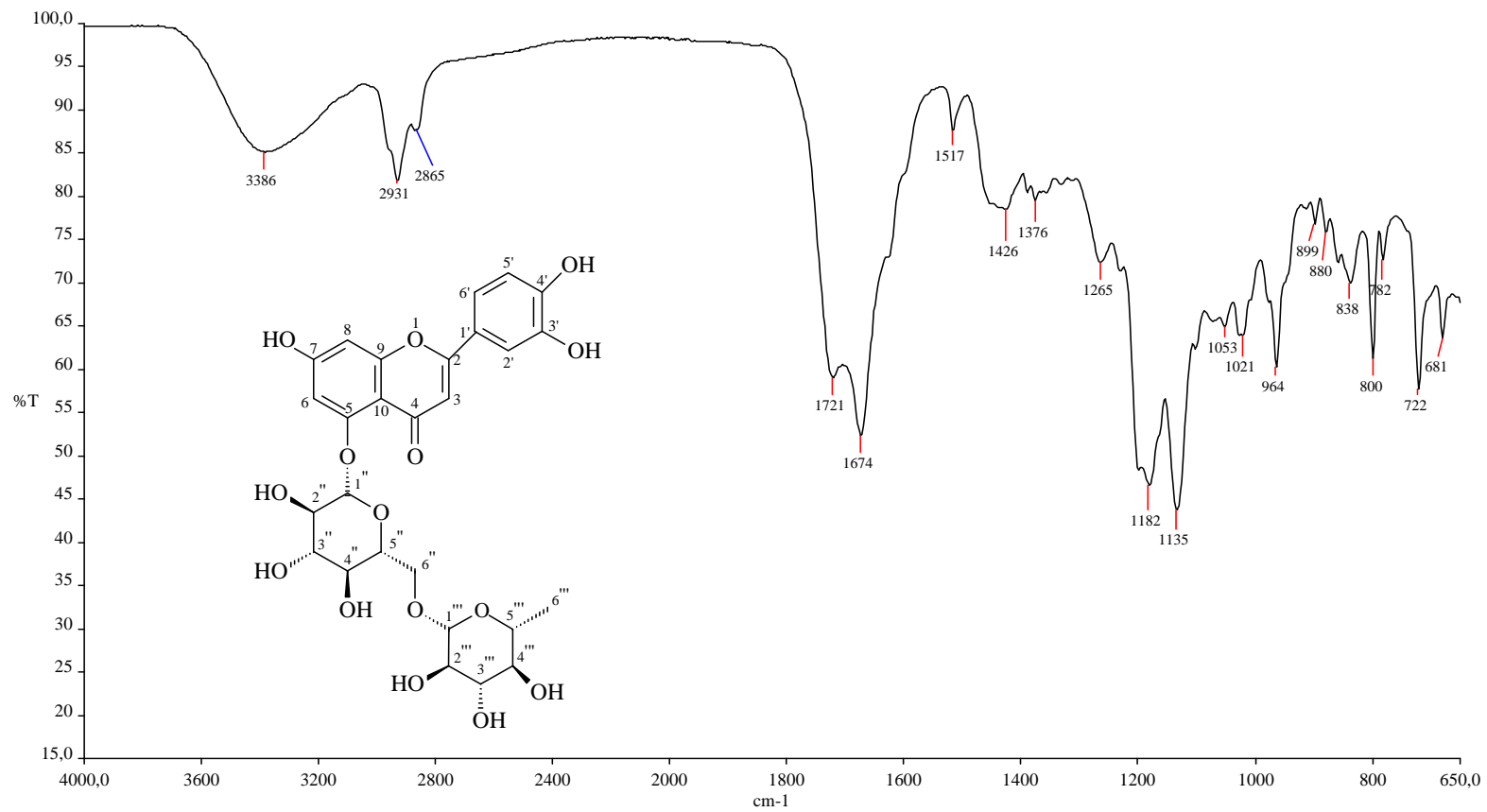


Figura A82. Espectro de absorção na região do Infravermelho de FF1 (ATR, cm⁻¹).

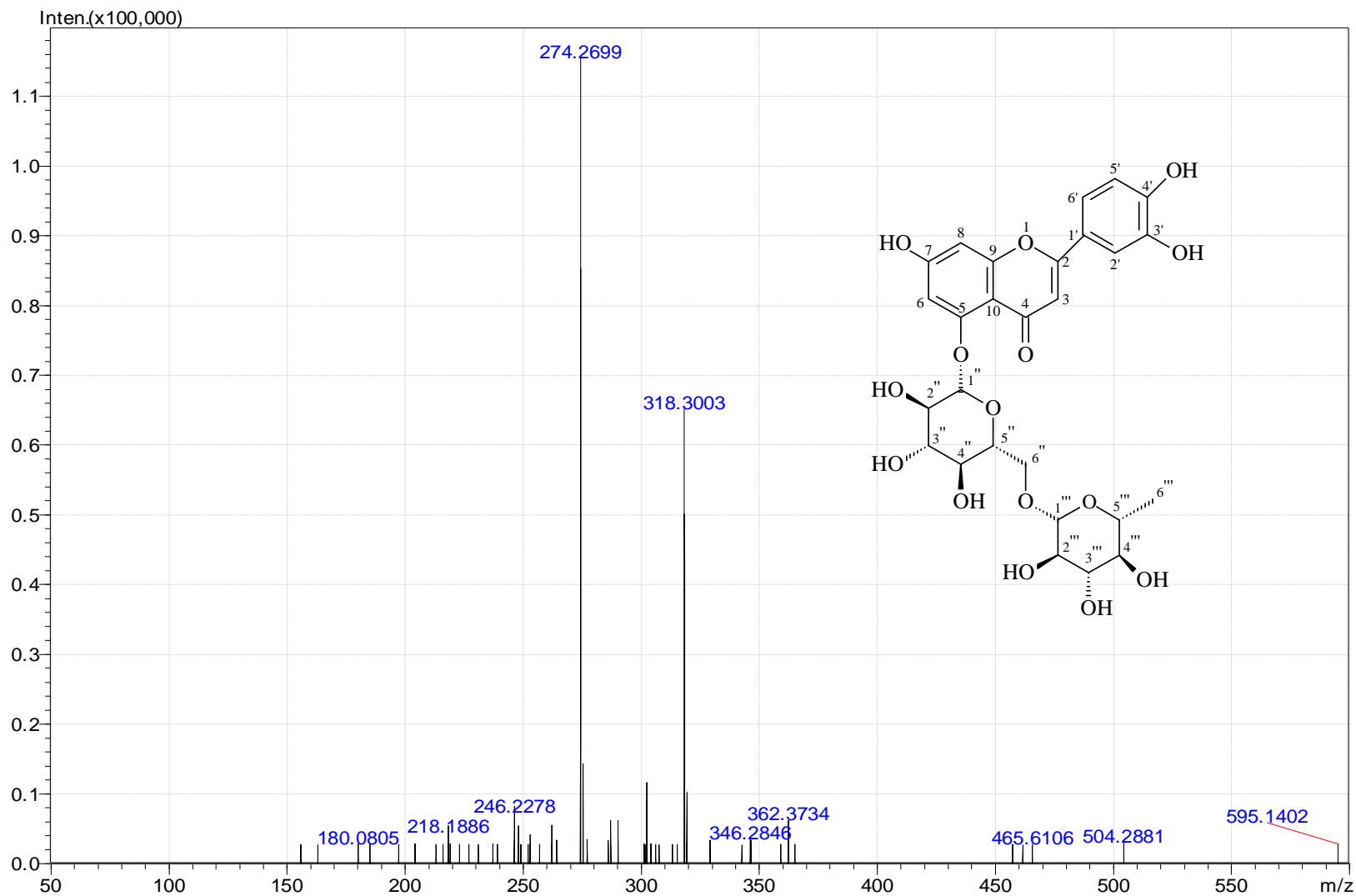


Figura A83. Espectro ESI(+)-MS de FF1: Luteolina-5-O-β-rutinosídeo.

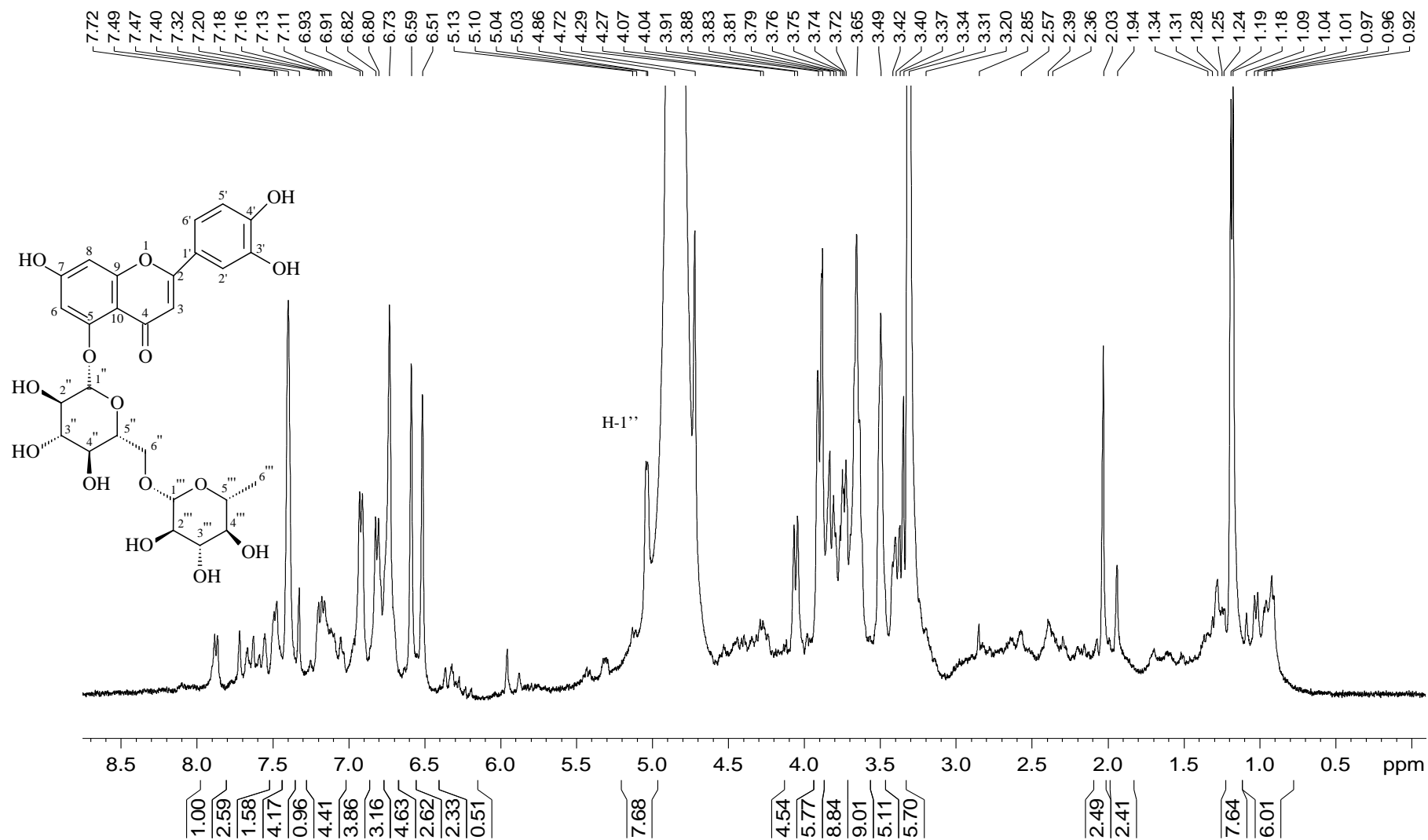


Figura A84. Espectro de RMN de ^1H de FF1 (400 MHz; CD_3OD): Luteolina-5-*O*- β -rutinosido.

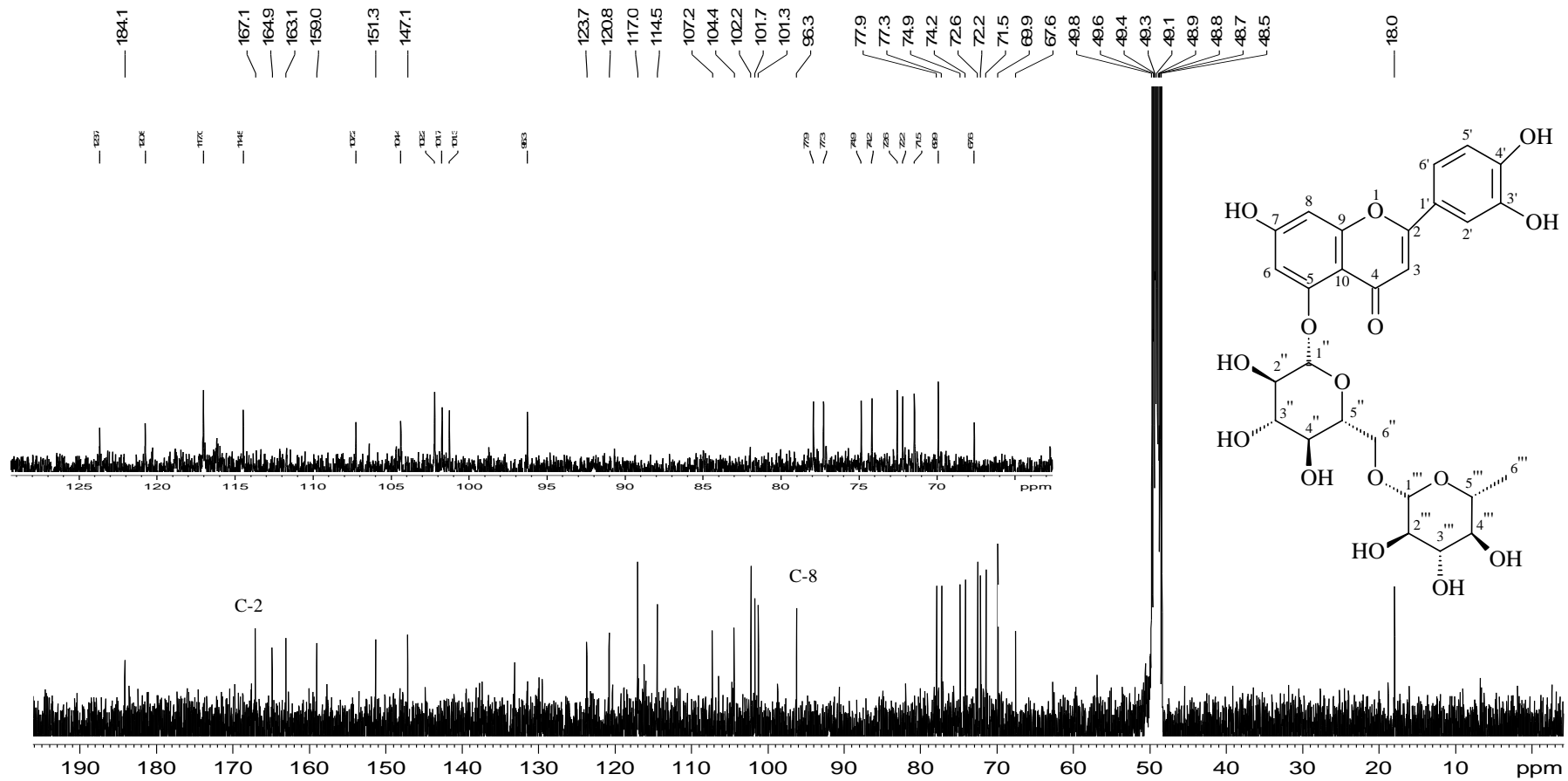


Figura A85. Espectro de RMN de ^{13}C de FF1 (100 MHz; CD_3OD): Luteolina-5-O- β -rutinosídeo.

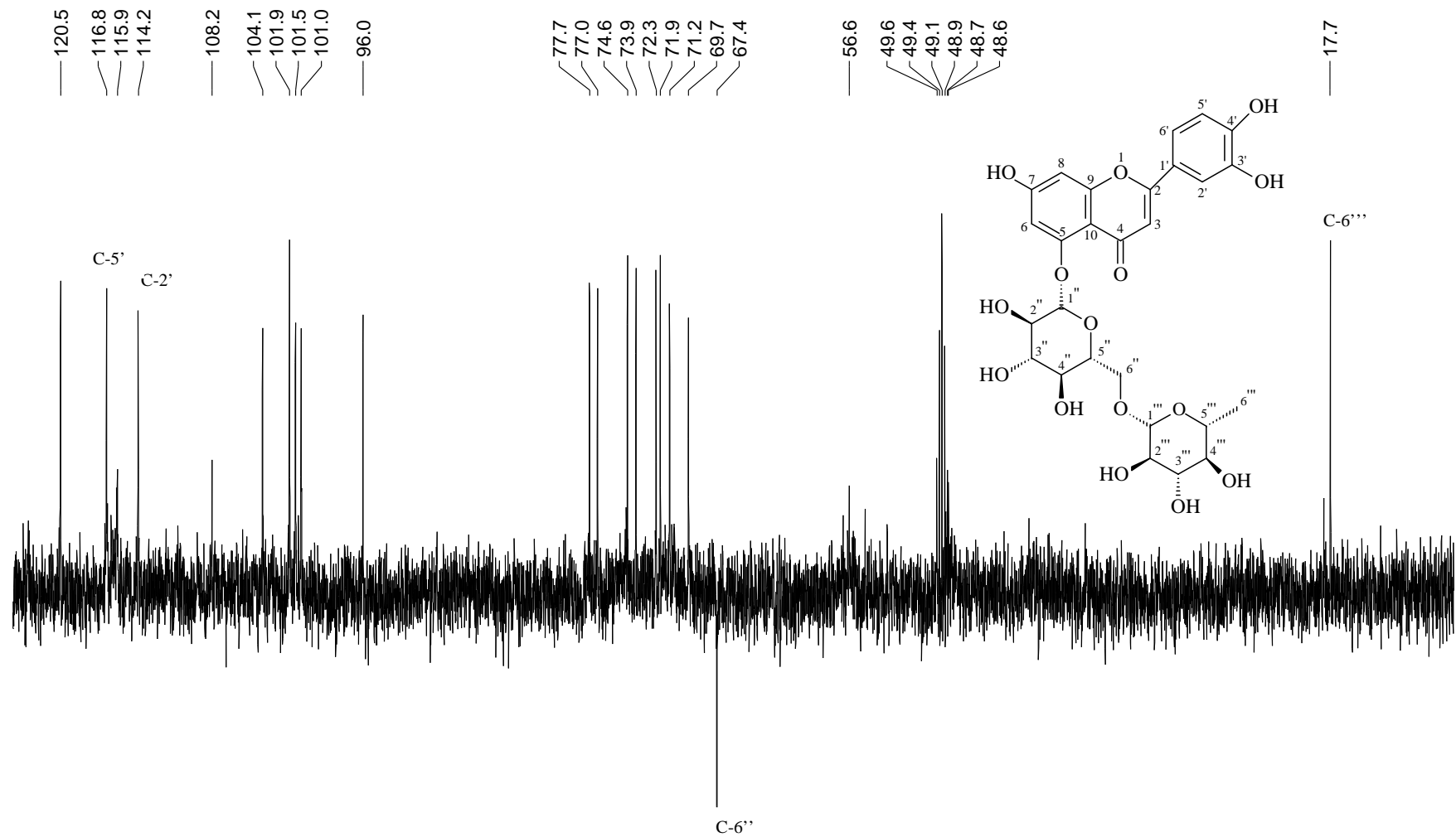


Figura A86. Subespectro de DEPT 135° de FF1 (100 MHz; CD₃OD): Luteolina-5-*O*-β-rutinosídeo.

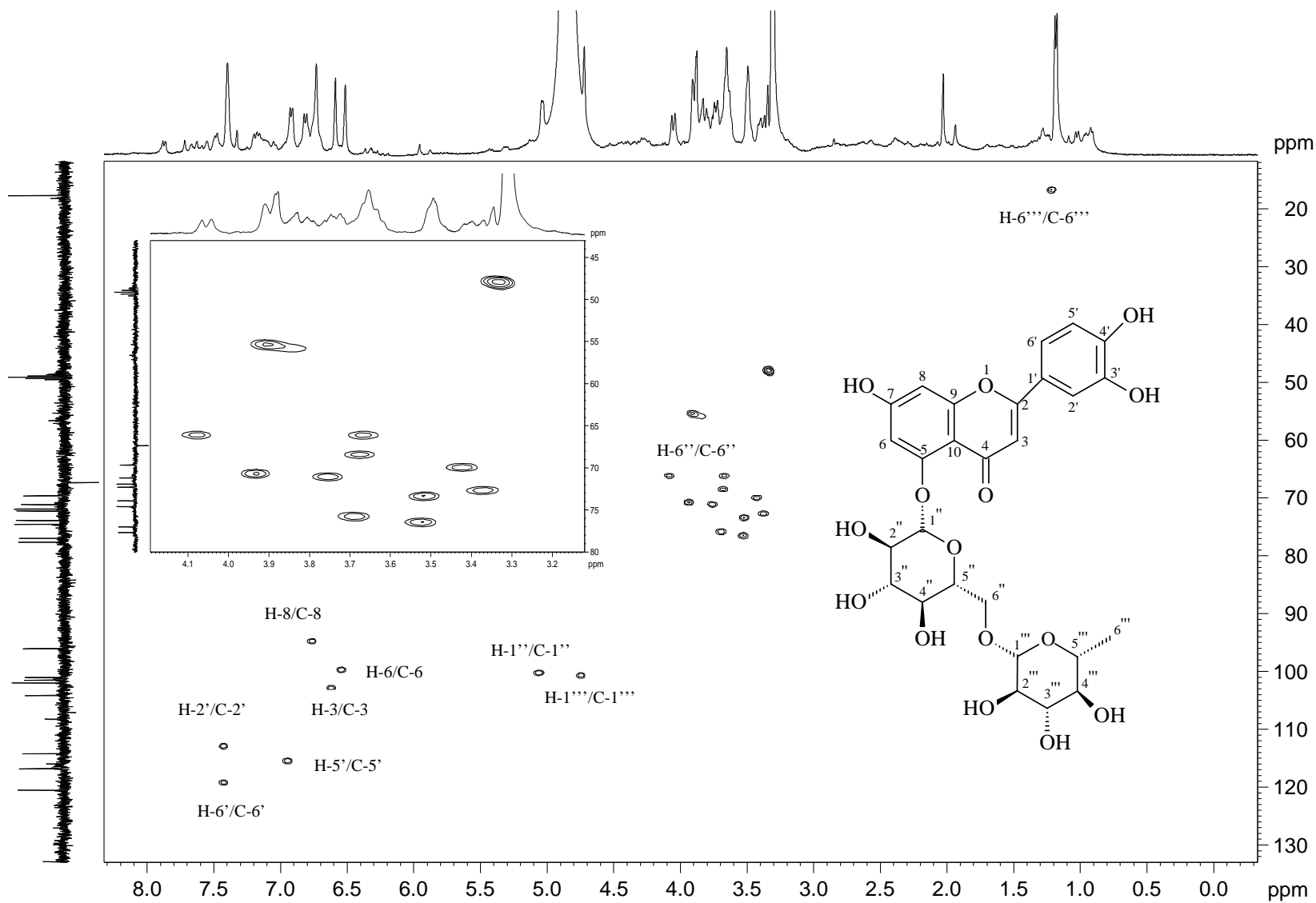


Figura A87. Mapa de contornos HSQC de FF1 (100 MHz; CD_3OD): Luteolina-5-O- β -rutinosídeo.

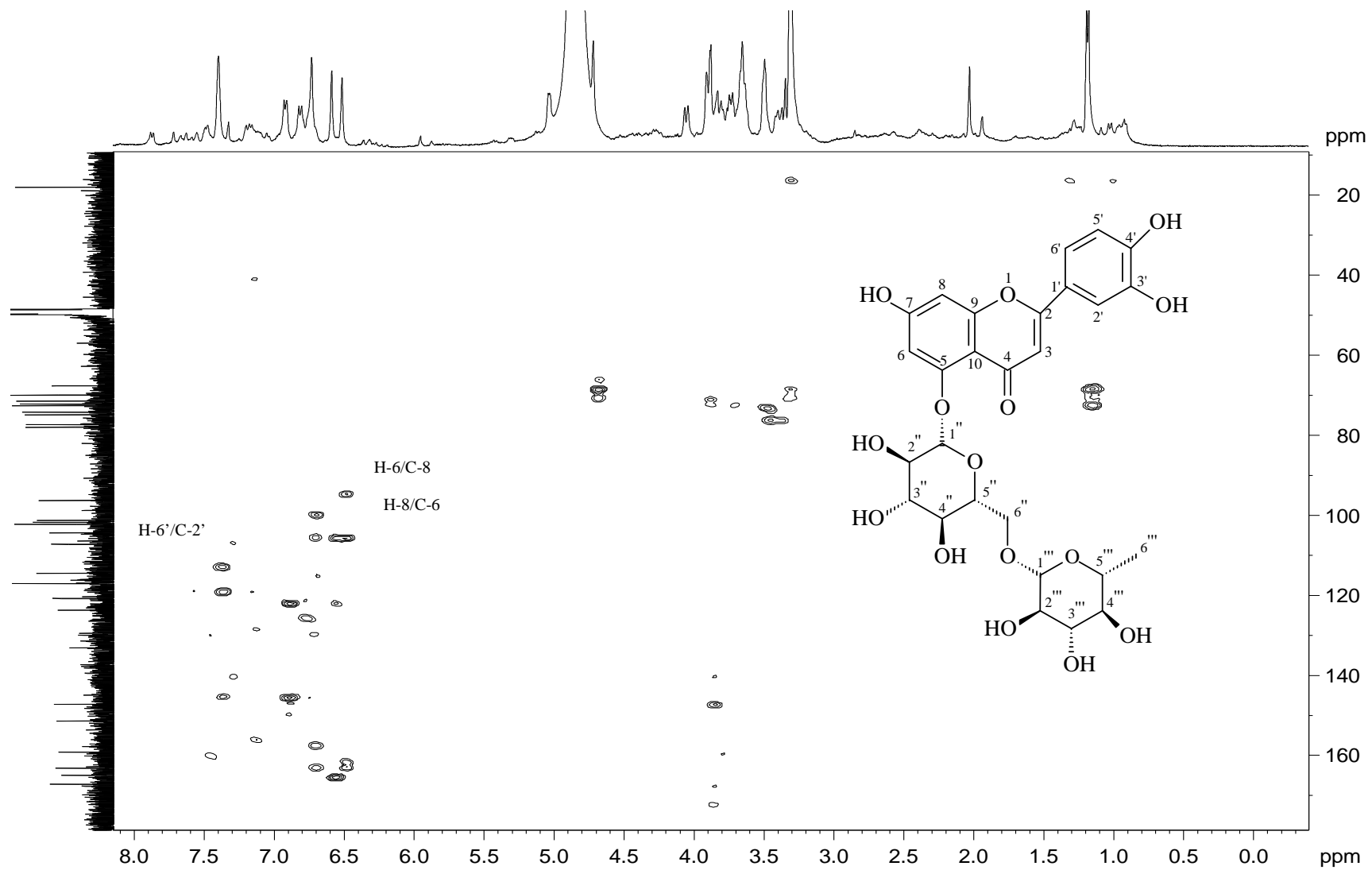


Figura A88. Mapa de correlação HMBC FF1 (100 MHz; CD₃OD): Luteolina-5-O-β-rutinosídeo.

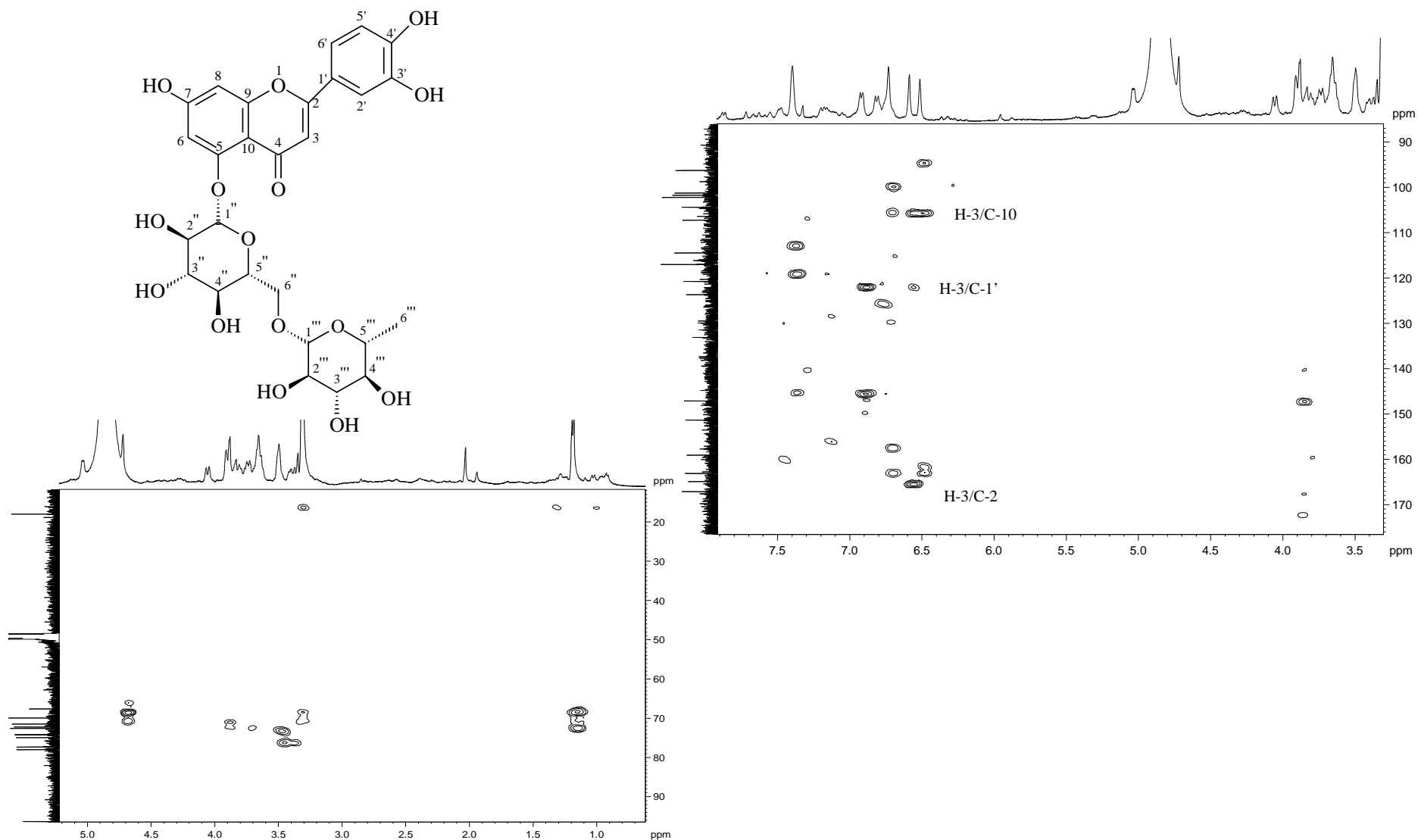


Figura A89. Ampliações do Mapa de correlação HMBC de FF1 (100 MHz; CD₃OD): Luteolina-5-*O*-β-rutinosídeo.

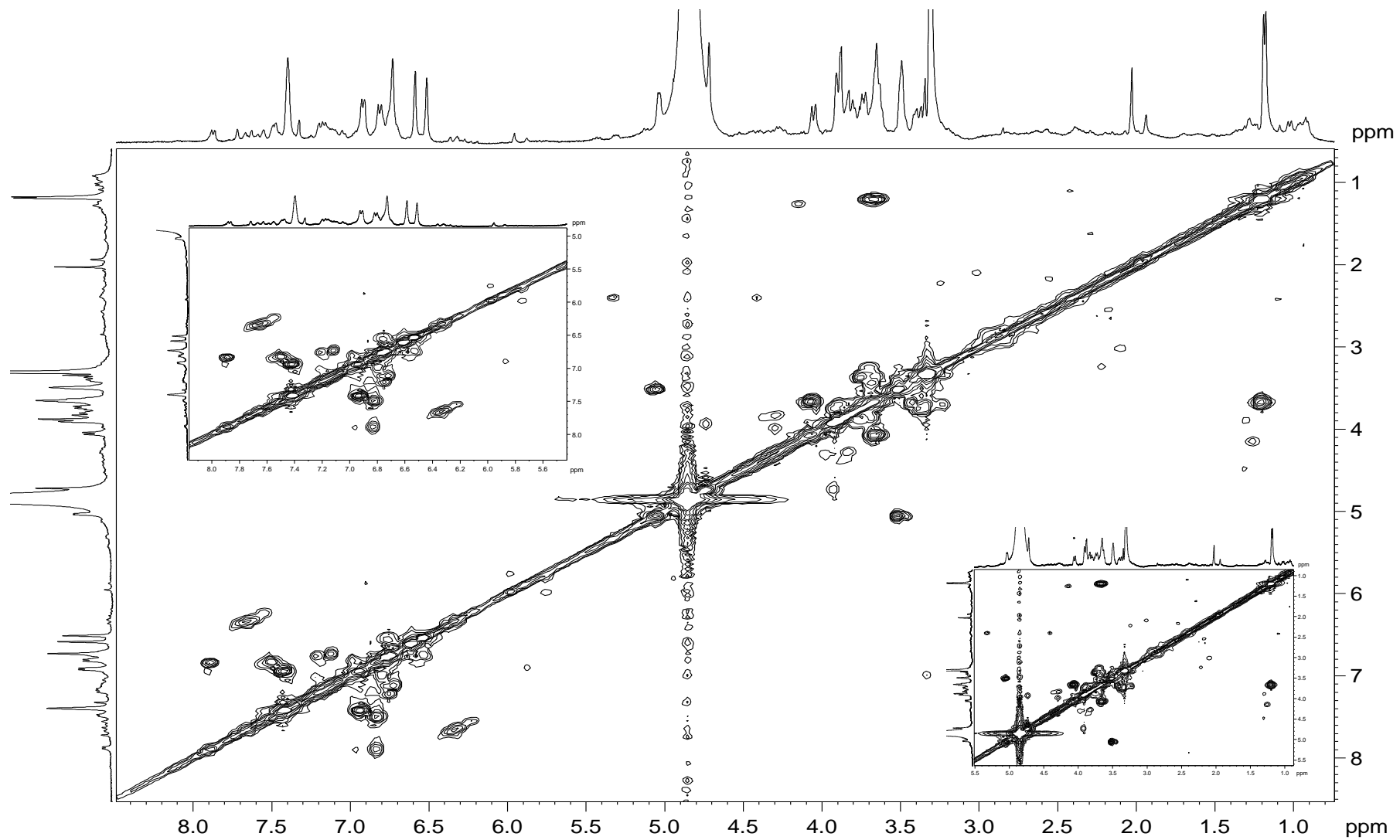


Figura A90. Mapa de contornos COSY de FF1 (400 MHz; CD₃OD): Luteolina-5-O- β-rutinosídeo.

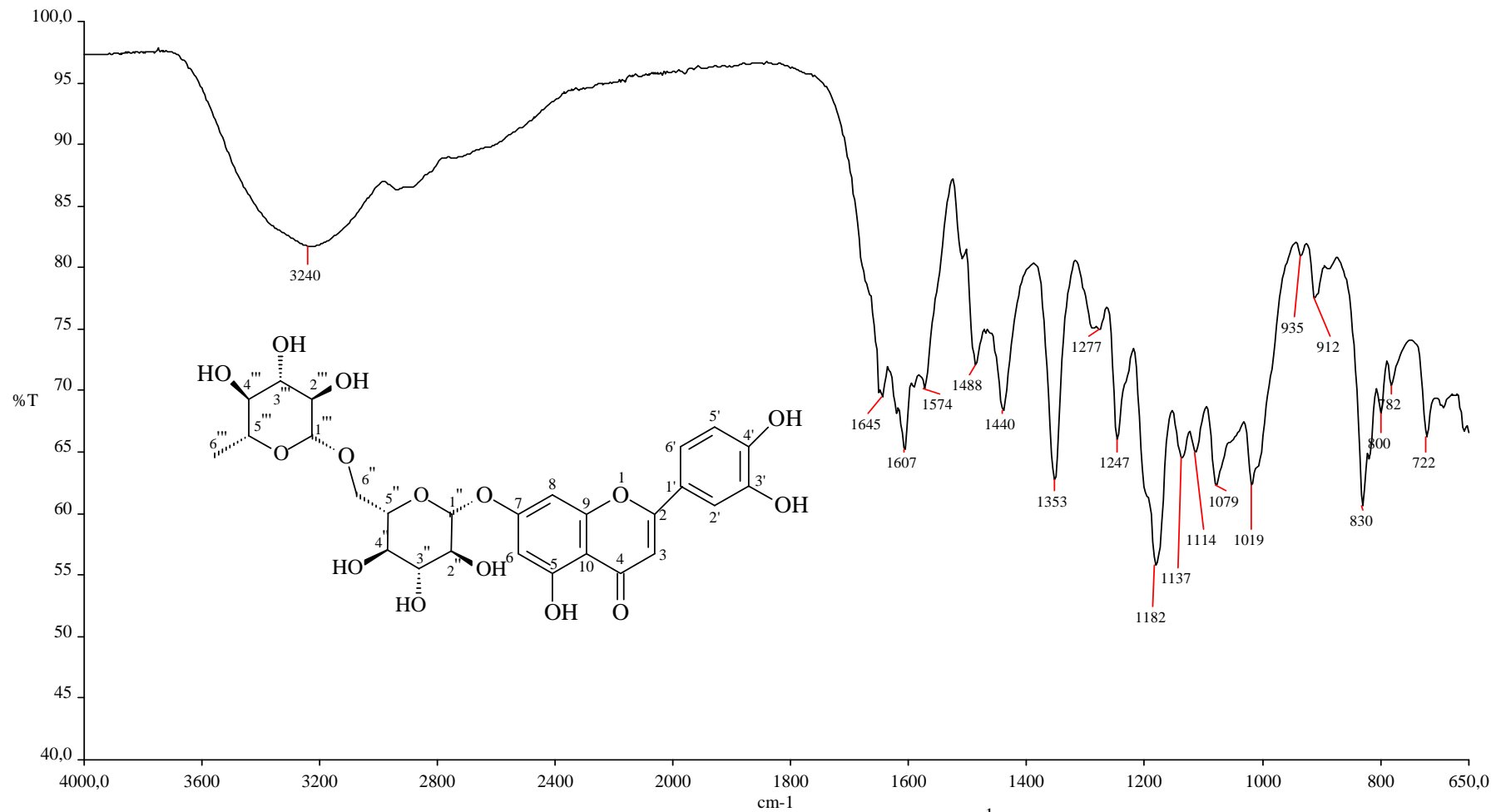


Figura A91. Espectro de absorção na região do Infravermelho de FF2 (ATR, cm⁻¹): Luteolina-7-*O*-β-rutinosídeo.

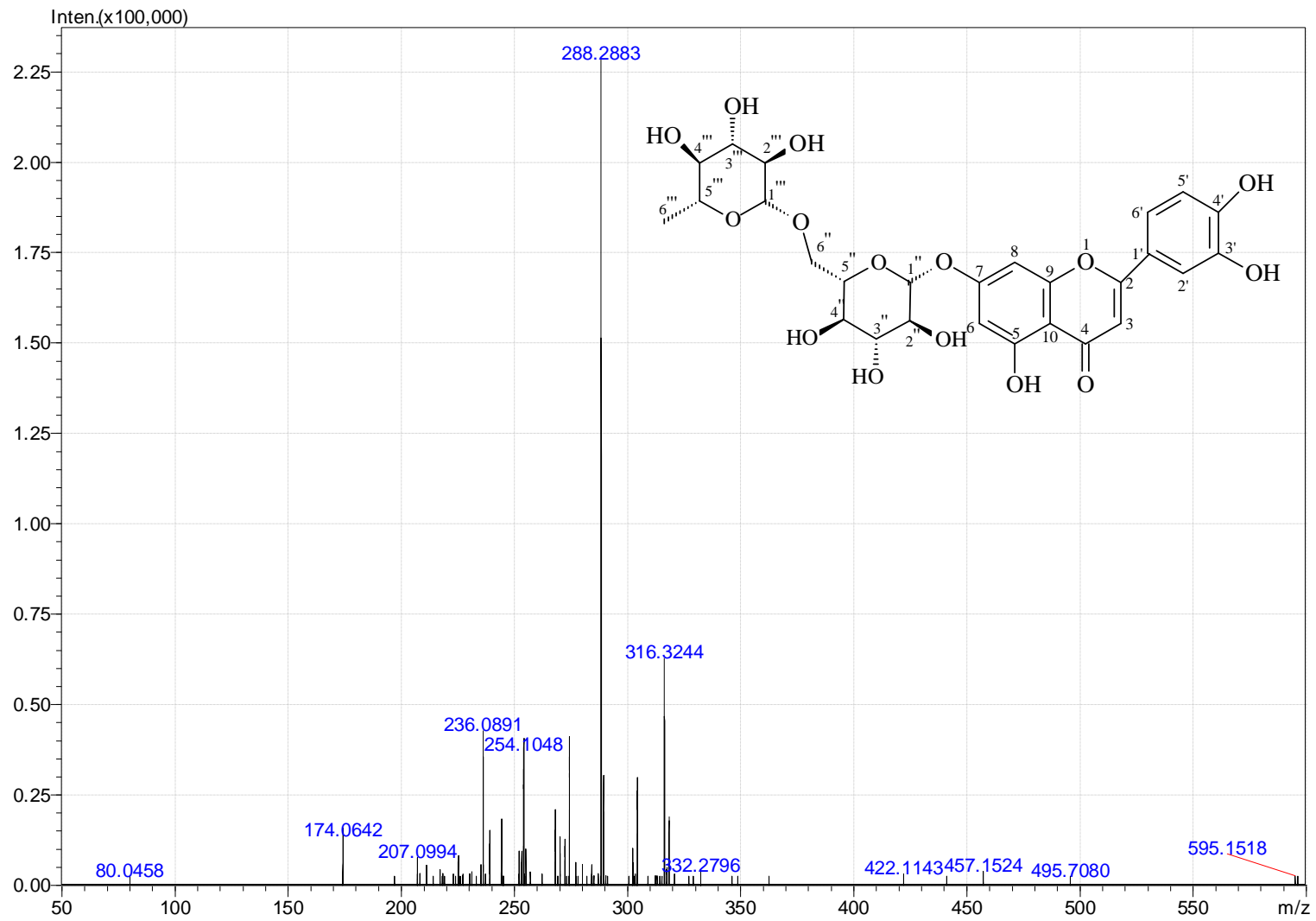


Figura A92. Espectro ESI(+)-MS de FF2: Luteolina-7-O-β-rutinosídeo.

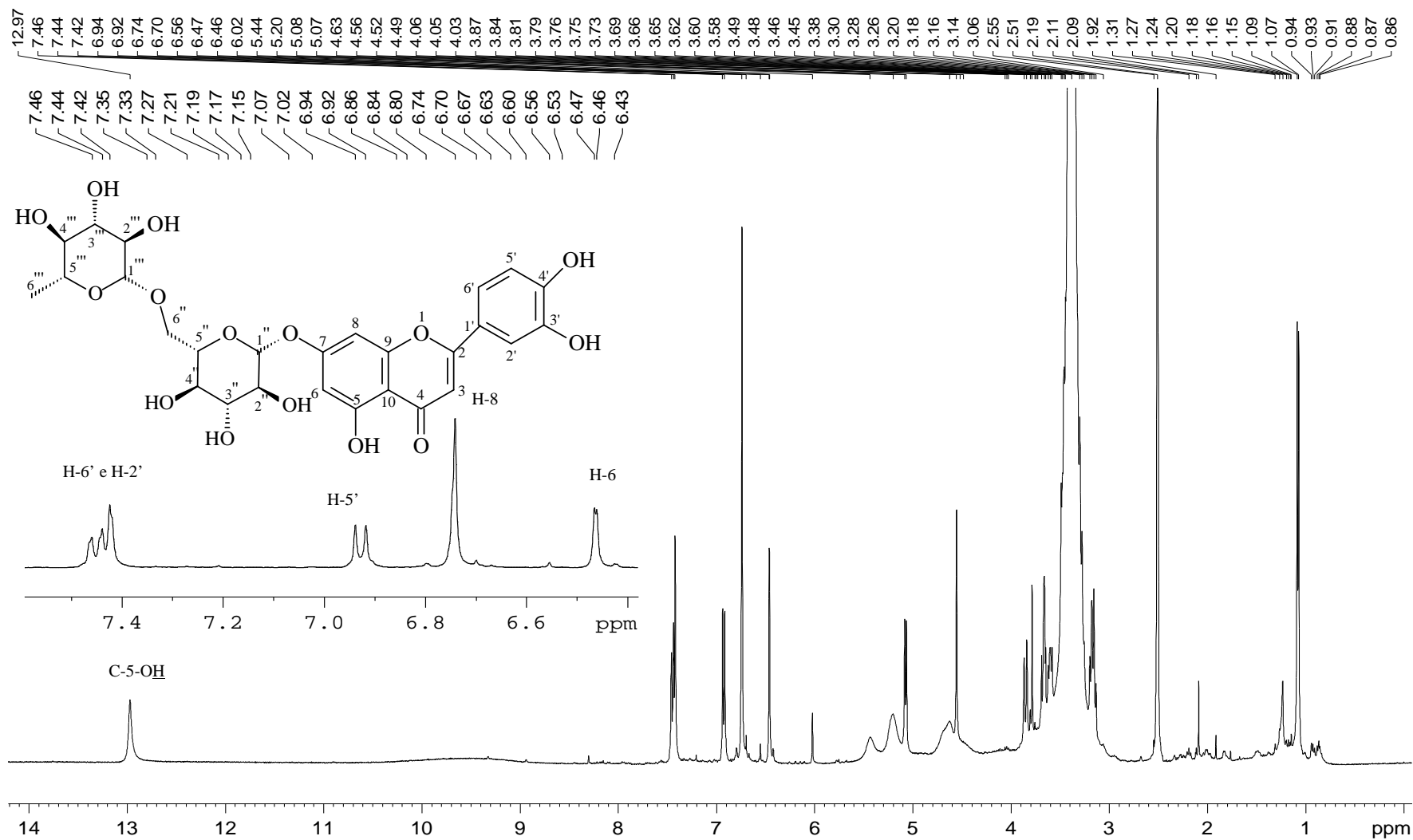


Figura A93. Espectro de RMN de ^1H de FF2 (400 MHz; DMSO-d_6): Luteolina-7-O- β -rutinosídeo.

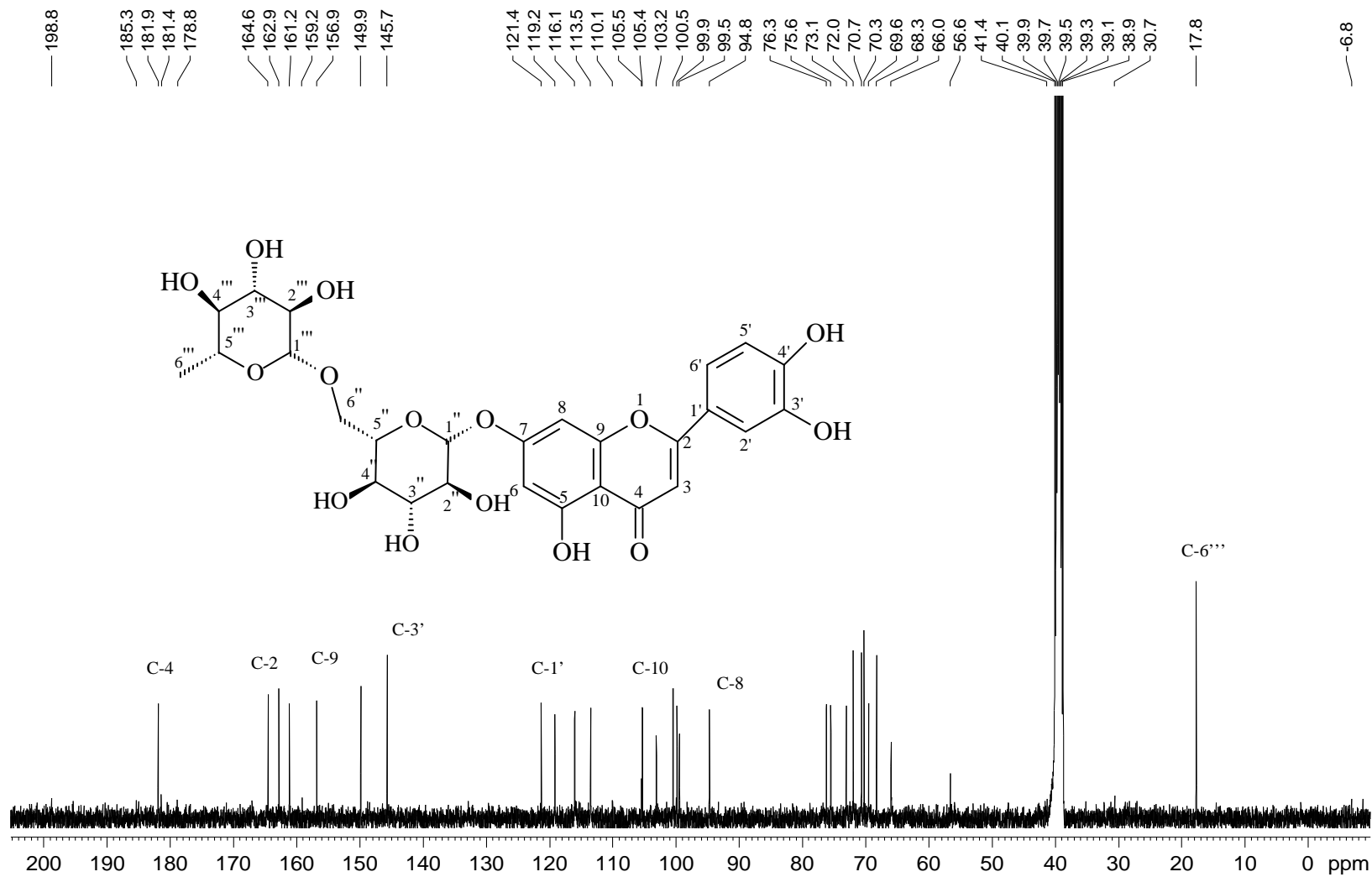


Figura A94. Espectro de RMN de ^{13}C de FF2 (100 MHz; DMSO- d_6): Luteolina-7-O- β -rutinosídeo.

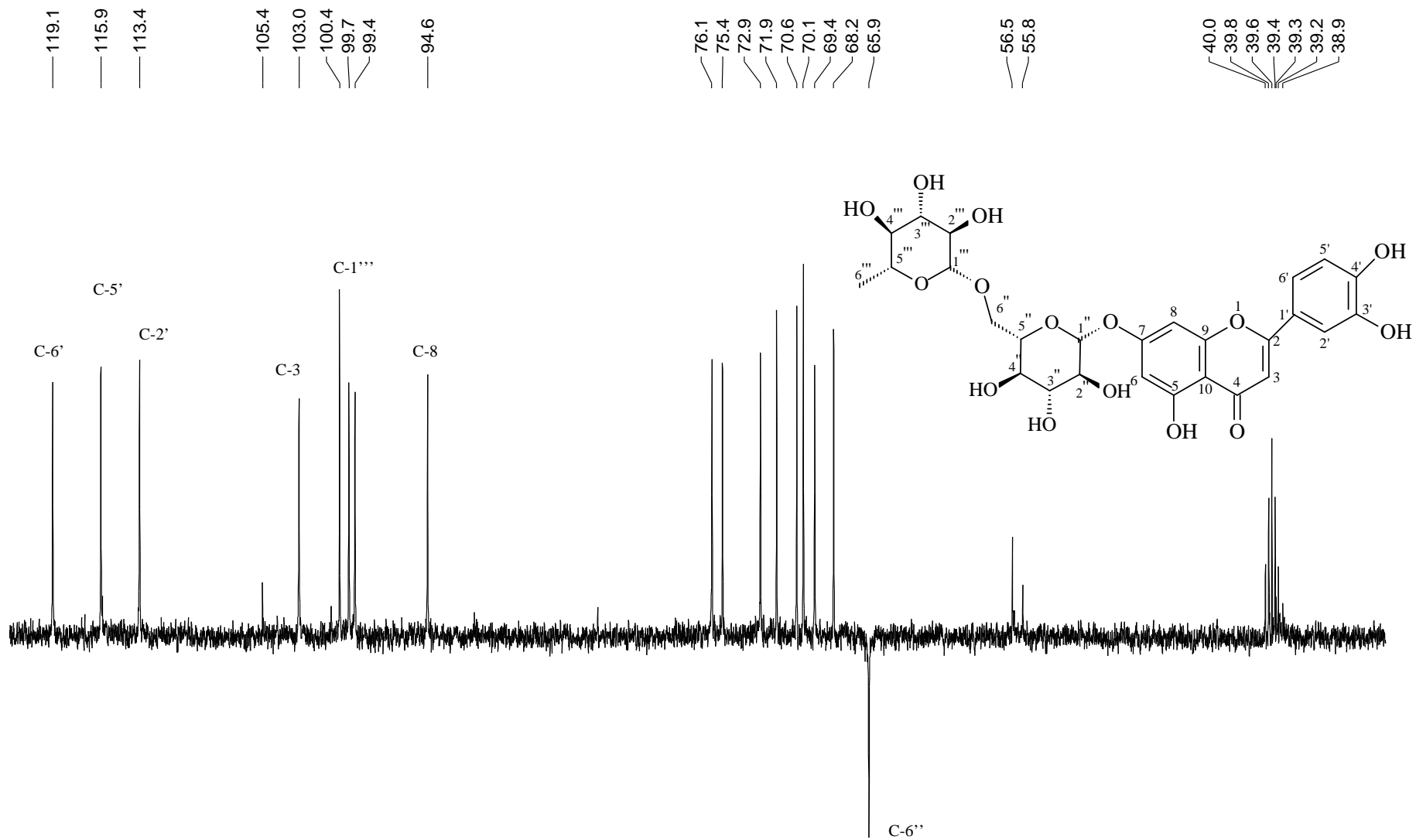


Figura A95. Subespectro de DEPT 135° de FF2 (100 MHz; DMSO-d₆): Luteolina-7-*O*-β-rutinosídeo.

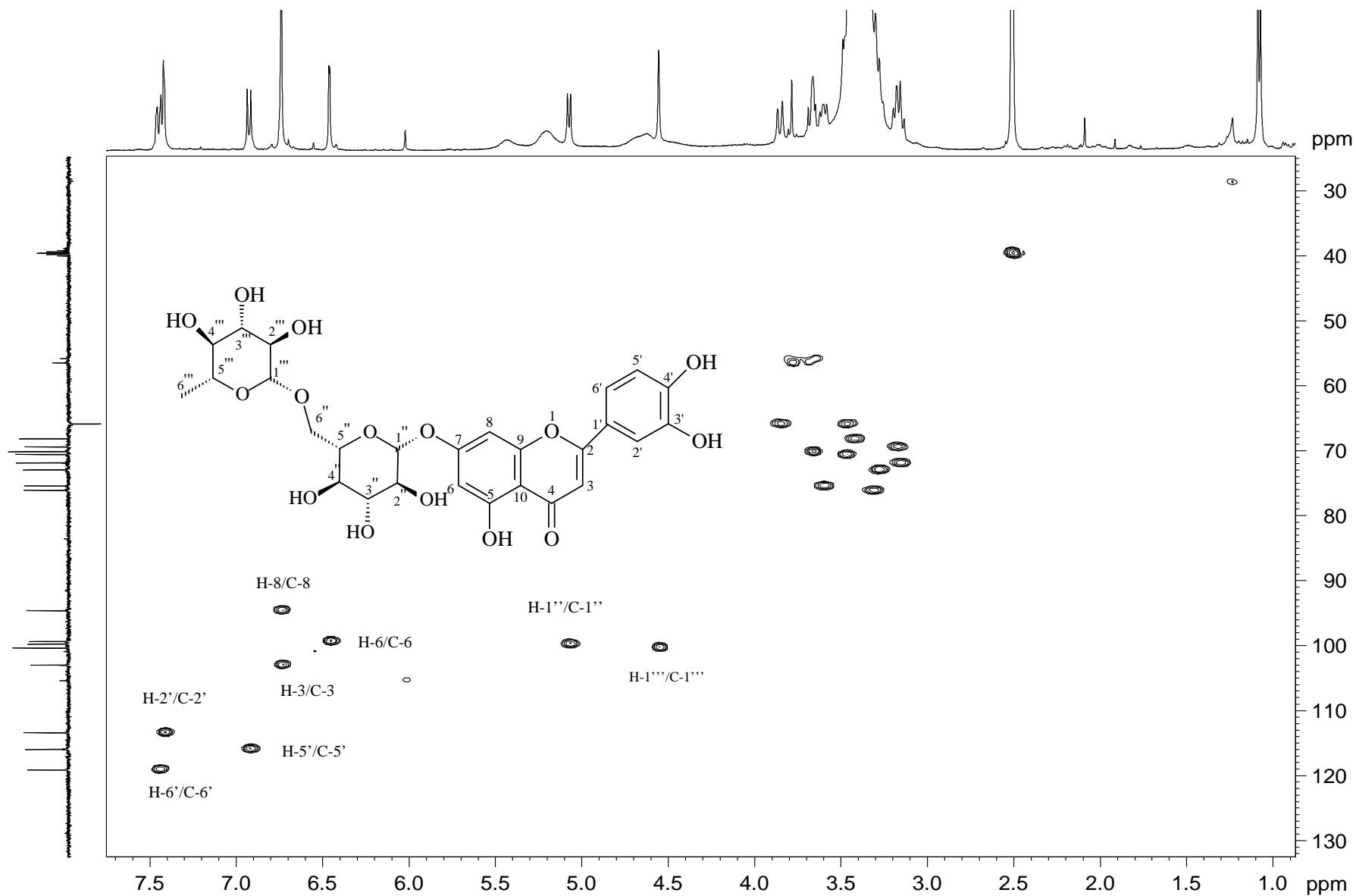


Figura A96. Mapa de correlação HSQC de FF2 (100 MHz; DMSO- d_6): Luteolina-7-O- β -rutinosídeo.

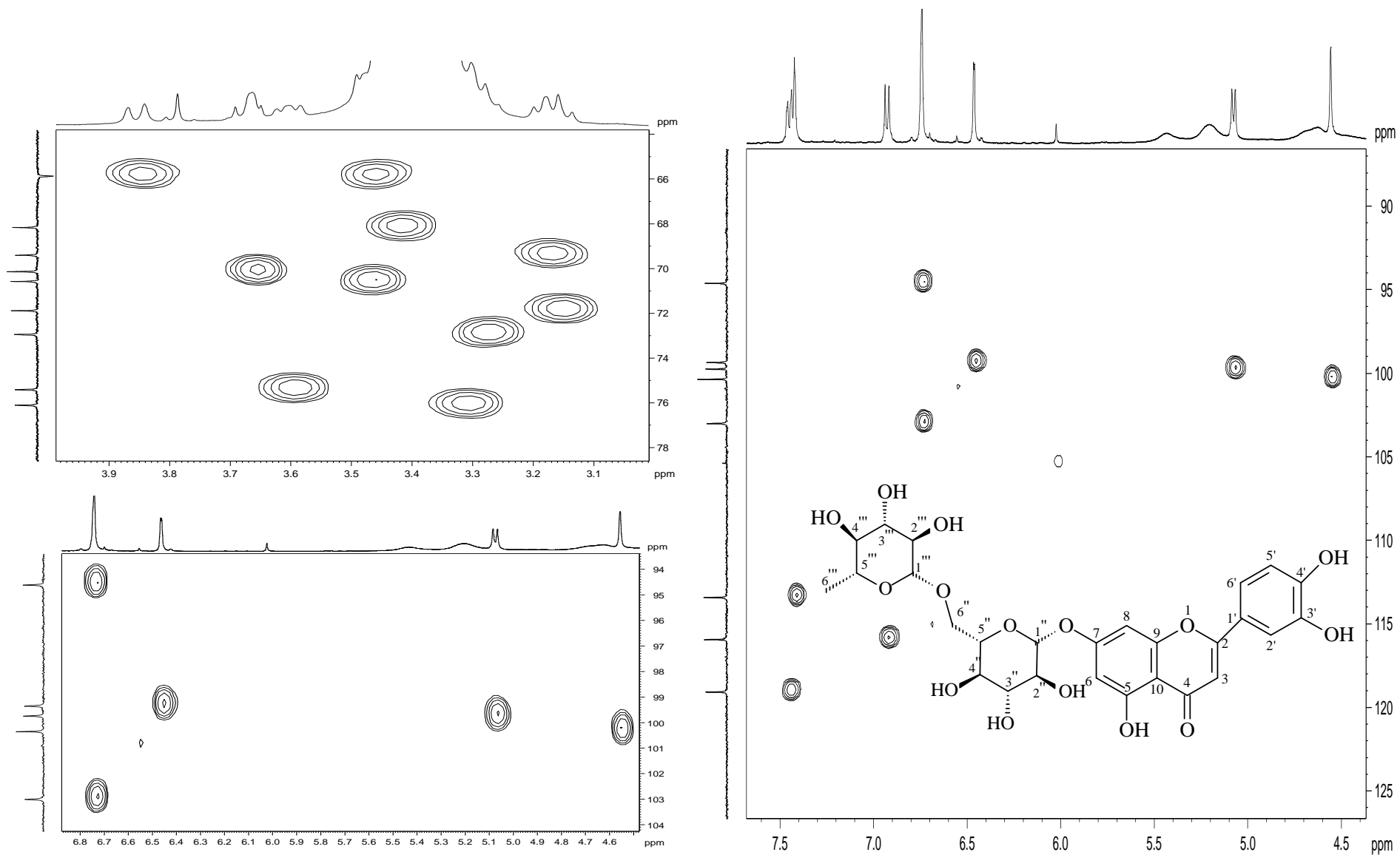


Figura A97. Ampliações do Mapa de correlação HSQC de FF2 (100 MHz; DMSO-d₆): Luteolina-7-O- β-rutinosídeo.

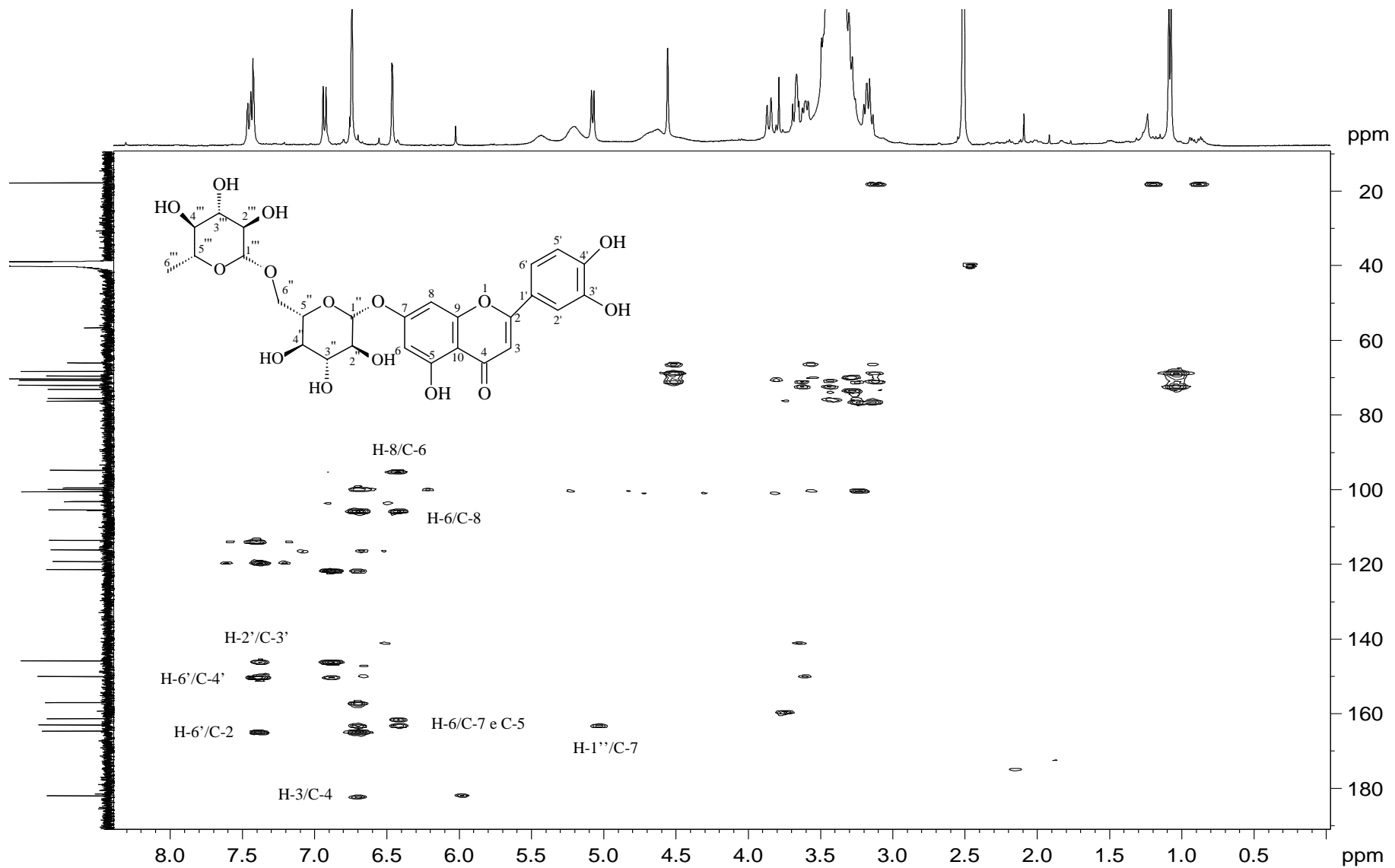


Figura A98. Mapa de correlação HMBC de FF2 (100 MHz; DMSO-d₆): Luteolina-7-O- β-rutinosídeo.

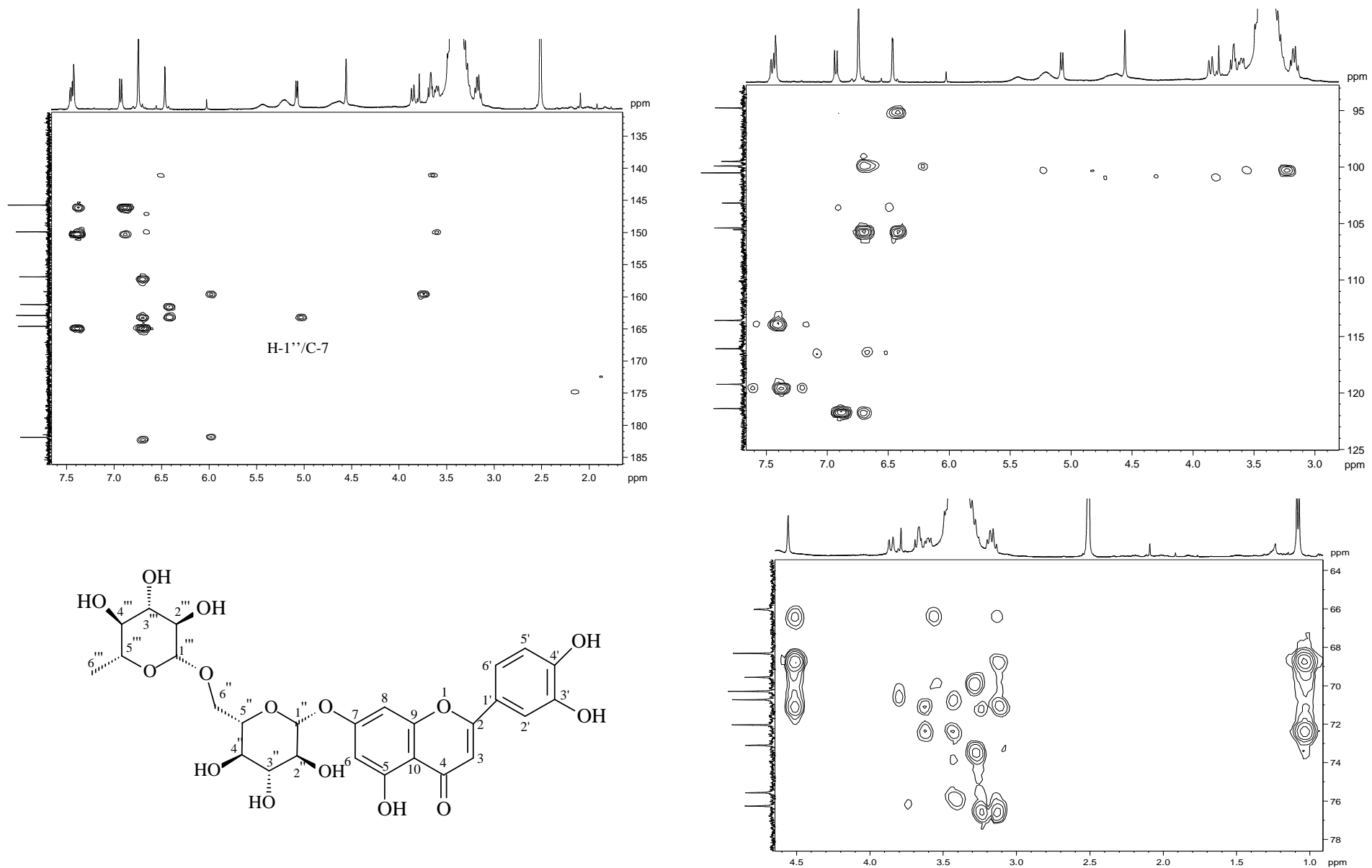


Figura A99. Ampliações do Mapa de correlação HMBC de FF2 (100 MHz; DMSO- d_6): Luteolina-7- O - β -rutinosídeo.

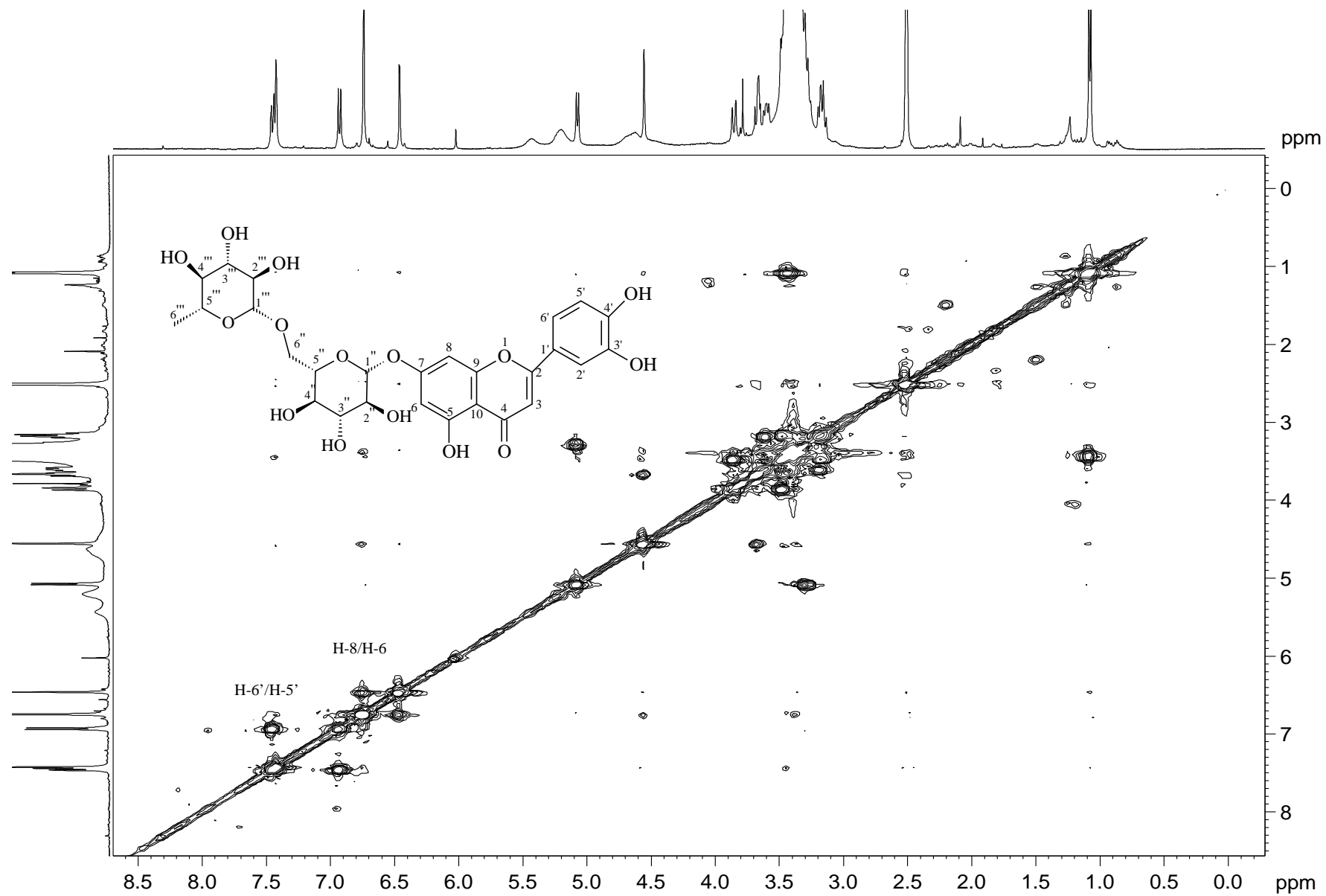


Figura A100. Mapa de correlação COSY de FF2 (400 MHz; DMSO- d_6): Luteolina-7- O - β -rutinosídeo.

Anexo 2

Certificado

comitê de

ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo no 222/2011**, relativo ao projeto intitulado **“Estudo fitoquímico das partes aéreas de *Lychnophora ericoides*, *Lychnophora pinaster*, *Aristolochia esperanzae*, *Echinodorus macrophyllus* e *Justicia acuminatissima* acompanhado por testes de atividade anti-inflamatória”**, que tem como responsável(is) **Antônio Flávio de Carvalho Alcântara**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **7/12/2011**.

Este certificado expira-se em **7/12/2016**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol no 222/2011**, related to the project entitled **“Phytochemical study of aerial parts of *Lychnophora ericoides*, *Lychnophora pinaster*, *Aristolochia esperanzae*, *Echinodorus macrophyllus* and *Justicia acuminatissima* followed by testing anti-inflammatory activity”**, under the supervisors of **Antônio Flávio de Carvalho Alcântara**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **December 7, 2011**.

This certificate expires in **December 7, 2016**.

Belo Horizonte, **12 de Dezembro de 2011**.

Profa. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

