

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

THIAGO DE MELO SILVA

**AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DE CONSTITUINTES
QUÍMICOS DE *Echinodorus macrophyllus* (CHAPÉU-DE-
COURO) TRATADA POR IRRADIAÇÃO GAMA**

Belo Horizonte

2010

UFMG/ICEx/DQ. 824^a

D. 476^a

THIAGO DE MELO SILVA

**Avaliação da Integridade de Constituintes Químicos de
Echinodorus macrophyllus (Chapéu-de-couro) Tratada por
Irradiação Gama.**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Química – Química Orgânica.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Belo Horizonte

2010

Silva, Thiago de Melo.
S586a Avaliação da integridade de constituintes químicos
2010 de *Echinodorus macrophyllus* (chapéu-de-couro) tratada
D por irradiação gama / Thiago de Melo Silva. 2010.
ix, 100 f.: il.

Orientador: Antônio Flávio de Carvalho Alcântara.
Coorientadora: Vany Perpétua Ferraz.

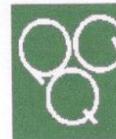
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Minas Gerais. Departamento de Química.
Bibliografia: f. 82-89.

1. Química orgânica - Teses 2. *Echinodorus
macrophyllus* - Teses 3. Plantas - Efeito dos raios
gama - Teses 4. Flavonóides - Teses I. Alcântara,
Antônio Flávio de Carvalho, Orientador II. Ferraz,
Vany Perpétua, Coorientadora III. Título.

CDU 043



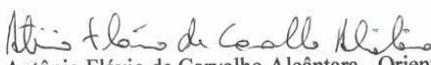
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEx
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 3409-5732
FAX: 031 - 3409-5711
E-MAIL: pgquimic@qui.ufmg.br

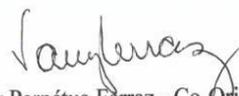


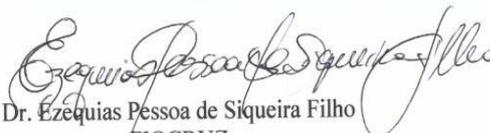
"Avaliação da Integridade de Constituintes Químicos de *Echinodorus macrophyllus* (Chapéu-de-couro) Tratada por Irradiação Gama"

Thiago de Melo Silva

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Prof. Antônio Flávio de Carvalho Alcântara - Orientador
UFMG


Profa. Vany Perpétua Ferraz - Co-Orientadora
UFMG


Dr. Ezequias Pessoa de Siqueira Filho
FIOCRUZ


Prof. Jarbas Magalhães Resende
UFMG

Belo Horizonte, 23 de julho de 2010.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação primeiramente à Deus, sem Ele nada seria possível.

Aos meus pais, Evando e Sandra, e meus irmãos, Roger e Gustavo.

Aos meus orientadores Dr. Antônio Flávio Carvalho de Alcântara, Dra. Vany Perpétua Ferraz e Dra. Dorila Piló-Veloso.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende. Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes.”

Leonardo da Vinci

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Inicialmente agradeço à Deus, por todas as conquistas neste trabalho.

Aos meus pais, Evando Salmo e Sandra Lúcia, pelo apoio incondicional que sempre me têm dado.

À Débora, minha namorada, que sempre deu força e apoio para continuar nessa batalha.

Aos meus irmãos Roger e Gustavo.

Ao orientador deste trabalho Prof. Dr. Antônio Flávio Carvalho Alcântara, agradeço imensamente a orientação recebida durante esse período, especialmente pelas contribuições valiosas para a minha formação.

À Dra. Vany Perpétua Ferraz pela co-orientação, sobretudo pelos ensinamentos e análises de cromatografia líquida.

À Profa. Dra. Dorila Piló-Veloso pelas sugestões e contribuições durante essa trajetória.

Aos pesquisadores Dr. Alexandre Soares Leal e Dr. Márcio Tadeu do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN), pela colaboração na irradiação das amostras.

À Profa. Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi pela colaboração nos ensaios microbiológicos.

Aos professores Dr. Fernando Carazza, Dr. José Dias de Souza Filho, Dra. Rossimíriam Pereira de Freitas, Dra. Rosemeire Brondi Alves, Dra. Lúcia Pinheiro Pimenta, Dr. Claudio Luis Donnici e Dr. Geraldo Magela, professores das disciplinas do curso de pós-graduação.

Ao Geone, amigo inseparável, que aos poucos se tornou melhor amigo, e me ensinou muitas coisas.

À Viviane, por ser tão paciente e, principalmente, muito amiga.

Ao Alison, grande amigo que possui um otimismo invejável.

À Marilda por seus incentivos, sua alegria, sua amizade. Uma pessoa em quem todos podem confiar.

À Míriam, aluna de iniciação científica, pela enorme colaboração no trabalho.

Aos estagiários Keiler e Henrique que, de certa forma, ajudaram em alguns experimentos.

Aos colegas do curso de pós-graduação, Liliane, Júlio, Fabrício, Diego, Fernando e Cássia.

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

AGRADECIMENTOS

À toda equipe do Laboratório 276 do Departamento de Química da UFMG pela amizade.
(Michele, Flávia, Laís, Geone, Adalberto, Felipe, Flávio e Rosângela).

Ao pessoal do Lab 246 (Rodrigo Verly, Victor Hugo, Samuel e Bruno)

À equipe do Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG pela obtenção dos espectros de absorção na região do Infravermelho.

À equipe do Laboratório de Ressonância Nuclear Magnética de Alta Resolução (LAREMAR) do Departamento de Química da UFMG pela obtenção dos espectros de RMN.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida e à Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	i
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
APRESENTAÇÃO	1
CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO - A Espécie <i>Echinodorus macrophyllus</i> Mich. e Radiação Gama.....	7
1. A Família Alismataceae.....	8
2. O Gênero <i>Echinodorus</i>	8
3. A Espécie <i>Echinodorus macrophyllus</i> Mich	11
3.1. Características Morfológicas.....	11
3.2. Distribuição, Nomes Populares e Classificação Taxonômica.....	12
3.3. Atividade Biológica.....	13
3.4. Constituintes Químicos Isolados em <i>Echinodorus macrophyllus</i>	14
4. Tecnologias de Descontaminação Microbiana	16
4.1. Radiação Ionizante	17
4.2. Radiação Gama	18
5. Alterações Provocadas pela Radiação Gama	21
CAPÍTULO II: PARTE EXPERIMENTAL	23

1. Equipamentos	24
2. Testes Microbiológicos	24
3. Metodologia Biológica	25
Teste de Difusão em Ágar	25
4. Metodologia Fitoquímica	25
4.1. Material Vegetal.....	25
4.2. Obtenção dos Extratos Submetidos à Irradiação	26
4.2.1. Isolamento dos Constituintes Polares.....	27
4.2.2. Testes Químicos para Identificação Estrutural	28
4.2.2.1. Teste para Flavonóides	28
4.2.2.2. Teste para Alcalóides	28
4.2.2.3. Teste para Saponinas	28
4.2.3. Análise Cromatográfica das Frações de EAq.....	28
4.2.3.1. Análise por CLAE das Frações FB Submetidas a Diferentes Energias de Irradiação Gama	29
4.2.3.2. Análise por CLAE das Frações FF Submetidas a Diferentes Energias de Irradiação Gama	29
4.2.3.3. Análise por CLAE das Frações FA Submetidas a Diferentes Energias de Irradiação Gama	30
4.2.3.4. Análise por CLAE das Frações FS Submetidas a Diferentes Energias de Irradiação Gama	30
4.3. Extrato Submetido ao Fracionamento Fitoquímico	31

4.3.1. Fracionamento Cromatográfico de FB*	31
4.3.2. Fracionamento Cromatográfico de FF*	31
4.3.3. Fracionamento Cromatográfico de FA*	33
4.3.4. Fracionamento Cromatográfico de FS*	33
CAPÍTULO III: RESULTADOS E DISCUSSÃO - Análise por CLAE das Frações	
Obtidas das Folhas de <i>Echinodorus macrophyllus</i>	34
1. Análise das Frações Fenólicas (FF)	35
2. Análise das Frações Alcaloídicas (FA)	46
3. Análise das Frações Saponínicas (FS)	52
CAPÍTULO IV: RESULTADOS E DISCUSSÃO - Análise Estrutural de	
Fitoconstituintes Isolados da Fração Fenólica	57
1. Análise Estrutural de F-03	58
2. Análise Estrutural de F-05	66
CAPÍTULO V: RESULTADOS E DISCUSSÃO - Teste de Atividade Antimicrobiana	
das Frações das Folhas de <i>Echinodorus macrophyllus</i>	75
1. Teste de Difusão em Ágar	76
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	79
1. Análise Fitoquímica	80
2. Atividade Antimicrobiana	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
ANEXOS	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de Etila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AR	Área Relativa
CBE	Companhia Brasileira de Esterificação
CDTN	Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear
CG	Cromatografia a gás
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
DCM	Diclorometano
DEPT-135°	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i> – ângulo 135°
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAq	Extrato aquoso
EAq ₀	Extrato aquoso sem irradiação gama
EAq ₁	Extrato aquoso com 1 kGy de energia de irradiação gama
EAq ₃	Extrato aquoso com 3 kGy de energia de irradiação gama
EAq ₅	Extrato aquoso com 5 kGy de energia de irradiação gama
EAq ₁₀	Extrato aquoso com 10 kGy de energia de irradiação gama
EAq ₂₀	Extrato aquoso com 20 kGy de energia de irradiação gama
EE	Extrato Etanólico
EE ₀	Extrato Etanólico sem irradiação gama
EE ₁	Extrato Etanólico com 1 kGy de energia de irradiação gama
EE ₃	Extrato Etanólico com 3 kGy de energia de irradiação gama
EE ₅	Extrato Etanólico com 5 kGy de energia de irradiação gama
EE ₁₀	Extrato Etanólico com 10 kGy de energia de irradiação gama
EE ₂₀	Extrato Etanólico com 20 kGy de energia de irradiação gama

EH	Extrato Hexânico
EH ₀	Extrato hexânico sem irradiação gama
EH ₁	Extrato Hexânico com 1 kGy de energia de irradiação gama
EH ₃	Extrato Hexânico com 3 kGy de energia de irradiação gama
EH ₅	Extrato Hexânico com 5 kGy de energia de irradiação gama
EH ₁₀	Extrato Hexânico com 10 kGy de energia de irradiação gama
EH ₂₀	Extrato Hexânico com 20 kGy de energia de irradiação gama
ENI	Extrato Aquoso Não Irradiado
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ESR	Espectroscopia de Ressonância de Spin de Elétron
EtOH	Etanol
FA	Fração alcaloídica
FA ₀	Fração Alcaloídica sem irradiação
FA ₁	Fração Alcaloídica com 1 kGy de energia de irradiação gama
FA ₃	Fração Alcaloídica com 3 kGy de energia de irradiação gama
FA ₅	Fração Alcaloídica com 5 kGy de energia de irradiação gama
FA ₁₀	Fração Alcaloídica com 10 kGy de energia de irradiação gama
FA ₂₀	Fração Alcaloídica com 20 kGy de energia de irradiação gama
FB	Fração Rica em aminoácidos, ácidos orgânicos e açúcares
FF	Fração Fenólica
FF ₀	Fração Fenólica sem irradiação
FF ₁	Fração Fenólica com 1 kGy de energia de irradiação gama
FF ₃	Fração Fenólica com 3 kGy de energia de irradiação gama
FF ₅	Fração Fenólica com 5 kGy de energia de irradiação gama
FF ₁₀	Fração Fenólica com 10 kGy de energia de irradiação gama
FF ₂₀	Fração Fenólica com 20 kGy de energia de irradiação gama
FS	Fração saponínica

FS ₀	Fração saponínica sem irradiação gama
FS ₁	Fração Saponínica com 1 kGy de energia de irradiação gama
FS ₃	Fração Saponínica com 3 kGy de energia de irradiação gama
FS ₅	Fração Saponínica com 5 kGy de energia de irradiação gama
FS ₁₀	Fração Saponínica com 10 kGy de energia de irradiação gama
FS ₂₀	Fração Saponínica com 20 kGy de energia de irradiação gama
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
Hz	Hertz
IBPM	Instituto Brasileiro de Plantas Medicinais
IDC	Instituto de Defesa do Consumidor
IV	Infravermelho
IV-ATR	Espectroscopia no infravermelho por Refletância Total Atenuada
<i>J</i>	Constante de acoplamento escalar
MeOH	Metanol
MS-Brasil	Ministério da Saúde do Brasil
PAL	Phenilalanina-amonia-liase
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TL	Termoluminescência
TMS	Tetrametilsilano
TR	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
UV/Vis	Ultravioleta/visível
δ	Deslocamento Químico
λ	Comprimento de onda

LISTA DE FIGURAS

Figura I.1. Fitoconstituintes isolados da espécie <i>E. grandiglorus</i> . ^{31,33}	10
Figura I.2. Exemplares da espécie <i>Echinodorus macrophyllus</i> Mich. ³⁶⁻³⁸	11
Figura I.3. Distribuição geográfica da espécie <i>E. macrophyllus</i> no Brasil. ⁴⁰	12
Figura I.4. Estrutura química de fitoconstituintes isolados de <i>Echinodorus macrophyllus</i> . ⁴³⁻⁴⁶ ..	15
Figura I.5. Espectro eletromagnético. ⁵⁰	18
Figura I.6. Países que usam a tecnologia de radiação gama para fins comerciais. ⁵⁰	19
Figura I.7. Quantidade estimada em 1.000 toneladas de produtos irradiados em países que utilizam a técnica de radiação gama com o passar dos anos. ⁵⁰	20
Figura II.1. Sequência metodológica para obtenção dos extratos hexânicos (EH's) e etanólicos (EE's) a partir das amostras das folhas de <i>E. macrophyllus</i> Mich submetidas à irradiação gama.	26
Figura II.2. Sequência metodológica para o isolamento dos constituintes polares dos EE's das folhas de <i>E. macrophyllus</i> Mich.....	27
Figura III.1. Cromatograma de CLAE de FF₀ a 280 nm em TR entre 0,0 e 30,0 min.	36
Figura III.2. Ampliações do cromatograma de CLAE de FF₀ a 280 nm: (a) ampliação em TR entre 2,5 – 10,5 min e (b) ampliação em TR entre 10,5 – 28,5 min.....	37
Figura III.3. Cromatograma de CLAE de FF₀ a 254 nm em TR entre 0,0 e 30,0 min.	38
Figura III.4. Ampliações do cromatograma de CLAE de FF₀ a 254 nm: (a) ampliação em TR entre 2,5 – 10,5 min e (b) ampliação em TR entre 10,5 – 28,5 min.....	39
Figura III.5. Cromatogramas de CLAE a 280 nm de FF₁ , FF₃ , FF₅ , FF₁₀ e FF₂₀ comparados com o cromatograma correspondente de FF₀	41

Figura III.6. Ampliações dos cromatogramas de CLAE a 280 nm de FF₁ , FF₃ , FF₅ , FF₁₀ , FF₂₀ comparados com o cromatograma correspondente de FF₀ : (a) ampliação em TR entre 2,4 – 11,0 min e (b) ampliação em TR entre 11,0 – 30 min.	42
Figura III.7. Cromatogramas de CLAE a 254 nm de FF₁ , FF₃ , FF₅ , FF₁₀ e FF₂₀ comparados com o cromatograma correspondente de FF₀	43
Figura III.8. Ampliações dos cromatogramas de CLAE a 254 nm de FF₁ , FF₃ , FF₅ , FF₁₀ , FF₂₀ comparados com o cromatograma correspondente de FF₀ : (a) ampliação em TR entre 1,4 – 11,0 min e (b) ampliação em TR entre 11,0 – 30,0 min.	44
Figura III.9. Gráfico da variação da área de picos a 280 nm do cromatograma de CLAE de FF em função da energia de irradiação gama: (a) Picos 10, 14, 17, 18 e 19; (b) pico 2 e (c) picos 7 e 12.....	45
Figura III.10. Cromatograma de CLAE de FA₀ a 280 nm em TR entre 0,0 e 15,0 min.	47
Figura III.11. Ampliações do cromatograma de CLAE de FA₀ a 280 nm: (a) ampliação em TR entre 2,5 – 4,5 min e (b) ampliação em TR entre 3,6 – 4,4 min.....	48
Figura III.12. Cromatogramas de CLAE a 280 nm de FA₁ , FA₃ , FA₅ , FA₁₀ e FA₂₀ comparados com o cromatograma correspondente de FA₀	50
Figura III.13. Ampliação dos cromatogramas de CLAE a 280 nm de FA₁ , FA₃ , FA₅ , FA₁₀ , FA₂₀ comparados com o cromatograma correspondente de FA₀ , TR entre 2,65 – 5,0 min.....	51
Figura III.14. Gráfico da variação da área dos picos 2 e 3 a 280 nm do cromatograma de CLAE de FA em função da energia de irradiação gama..	51
Figura III.15. Cromatograma de CLAE de FS₀ a 210 nm em TR entre 0,0 e 10,0 min.	52
Figura III.16. Ampliação do cromatograma de CLAE de FS₀ a 210 nm em TR entre 5,5 - 8,3 min.....	53
Figura III.17. Cromatogramas de CLAE a 210 nm de FS₁ , FS₃ , FS₅ , FS₁₀ e FS₂₀ comparados com o cromatograma correspondente de FS₀	55

Figura III.18. Ampliação dos cromatogramas de CLAE a 210 nm de FS₁ , FS₃ , FS₅ , FS₁₀ , FS₂₀ comparados com o cromatograma correspondente de FS₀ , TR entre 5,5 – 8,1 min.	56
Figura III.19. Gráfico da variação da área dos picos 1 e 2 a 210 nm do cromatograma de CLAE de FA em função da energia de irradiação gama. min.....	56
Figura IV.1. Cromatograma de CLAE de F-03.	58
Figura IV.2. Espectro de absorção na região do UV de F-03.	58
Figura IV.3. Espectro de absorção na região do infravermelho de F-04 (ATR, cm ⁻¹).	59
Figura IV.4. Espectro de RMN de ¹ H de F-03 (400 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆).....	60
Figura IV.5. (A) Espectro de RMN de ¹³ C e (B) subespectro DEPT 135° de F-03 (100 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆).....	61
Figura IV.6. Mapa de contornos HSQC de F-03 (¹ H: 400 MHz; ¹³ C: 100 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆).....	62
Figura IV.7. Mapa de contornos HMBC de F-03 (¹ H: 400 MHz; ¹³ C: 100 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆)....	63
Figura IV.8. Mapa de contornos COSY de F-03 (400 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆).	64
Figura IV.9. Cromatograma de CLAE de F-05.	66
Figura IV.10. Espectro de absorção na região do UV de F-05	66
Figura IV.11. Espectro de absorção na região do infravermelho de F-04 (ATR; cm ⁻¹).	67
Figura IV.12. Espectro de RMN de ¹ H de F-05 (400 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆).....	68
Figura IV.13. (A) Espectro de RMN de ¹³ C e (B) subespectro DEPT 135° de F-05 (100 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆).....	69
Figura IV.14. Mapa de contornos HSQC de F-05 (¹ H: 400 MHz; ¹³ C: 100 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆)...	70
Figura IV.15. Mapa de contornos HMBC de F-05 (¹ H: 400 MHz; ¹³ C: 100 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆).	71
Figura IV.16. Mapa de contornos COSY de F-05 (400 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆).	72

LISTA DE TABELAS

Tabela I.1. Espécies do gênero <i>Echinodorus</i> , atividades biológicas e fitoconstituintes isolados ..	9
Tabela I.2. Classificação taxonômica da espécie <i>Echinodorus macrophyllus</i>	13
Tabela I.3. Principais métodos utilizados na descontaminação microbiana	16
Tabela II.1. Massa das frações de EAq (FF , FA e FS) de amostras das folhas submetidas a diferentes energias de radiação gama	29
Tabela II.2. Fracionamento da fração FF* do ENI e suas propriedades físicas.....	32
Tabela III.1. Valores de tempo de retenção (TR, min), área e intensidades dos picos do cromatograma de CLAE de FF₀ a 280 nm mostrado na Figura III.1	36
Tabela III.2. Valores de tempo de retenção (TR, min), área e intensidade dos picos do cromatograma de CLAE de FF₀ a 254 nm mostrado na Figura III.3	38
Tabela III.3. Valores de tempo de retenção (TR, min), área e intensidade dos picos do cromatograma de CLAE de FA₀ a 280 nm mostrado na Figura III.5	47
Tabela III.4. Valores de tempo de retenção (TR, min), área e intensidade dos picos do cromatograma de FS₀ mostrado na Figura III.7 a 210 nm.....	53
Tabela IV.1. Dados de RMN de ¹ H e de ¹³ C de F-03 e os descritos na literatura para o ácido <i>trans</i> -ferúlico.....	65
Tabela IV.2. Atribuição dos sinais de RMN de ¹ H e de ¹³ C de F-05	74
Tabela V.1. Resultados de testes microbiológicos de halo de inibição de EH e EE das folhas de <i>E. macrophyllus</i> frente a diferentes espécies de bactérias e a uma espécie de fungo	76
Tabela V.2. Resultados de testes microbiológicos de halo de inibição frente a <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Bacillus subtilis</i> dos EH e EE das folhas de <i>E. macrophyllus</i> submetidas à diferentes energias de irradiação gama.....	77

RESUMO

Os fitoterápicos usados pela medicina popular apresentam normalmente um elevado nível de contaminação microbiológica (bactérias e fungos). A irradiação gama tem sido uma alternativa para aumentar o tempo de conservação e diminuir a contaminação microbiológica de produtos fitoterápicos. *Echinodorus macrophyllus* Mich. (chapéu-de-couro) é muito utilizada popularmente como agente diurético, antiarrítmico, anti-inflamatório e anti-reumático. Neste trabalho é descrito um estudo do efeito da irradiação gama sobre as folhas desta espécie. Amostras das folhas foram submetidas a diferentes energias de irradiação gama e os respectivos extratos contendo componentes fenólicos, alcaloídico e saponínicos foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com a finalidade de investigar a integridade dos constituintes químicos. Cromatogramas de CLAE desses extratos mostraram alterações de concentração de seus componentes, sugerindo a formação de produtos radiolíticos. Na fração fenólica foram identificados dois constituintes, o ácido *trans*-ferúlico e uma flavona inédita denominada de 6-*C*-hexa-hidroxi-apigenina. Além disso, as amostras irradiadas foram submetidas a extrações sucessivas com hexano e etanol. Os extratos obtidos (EH e EE, respectivamente) foram testados frente à diferentes linhagens de bactérias. Ambos os extratos foram ativos frente a *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*, independente da energia de irradiação gama. Porém, uma diminuição da atividade antibacteriana de EH foi observada frente a *S. aureus* quando ocorre aumento da energia de irradiação gama. O contrário foi observado no EE, ocorrendo o aumento da atividade antimicrobiana ao aumentar a de energia de irradiação gama.

Palavras-chaves: *Echinodorus macrophyllus*, Irradiação gama, Compostos fenólicos, Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

The herbal drugs used in popular medicine show a high level of microbiological contamination (bacteria and fungi). Gamma irradiation has been an alternative to increase shelf life and reduce microbial contamination of herbal products. *Echinodorus macrophyllus* Mich. (Chapéu-de-couro) is very popularly used as diuretic, antiarrhythmic, antiinflammatory and antirheumatic. This work describes a study of the effect caused by gamma irradiation on its leaves. Leaf samples were subjected to different gamma irradiation energies and the respective polar extracts containing phenolic, alkaloidic and saponinic compounds were analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), in order to compare their chemistry integrity. HPLC chromatograms of these extracts showed changes in concentration of their components, suggesting formation of radiolytic products. In the phenolic fraction two constituents were identified, the *trans*-ferulic acid and a flavone called 6-C-hexa-hydroxy-apigenin which is firstly described in the literature. The irradiated samples were submitted to successive extraction with hexane and ethanol. In addition, the extracts (HE and EE, respectively) were tested on the different strains of bacteria. The extracts EH and EE were active against *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*, independently of the gamma irradiation energy of. However, a decrease of the EH antibacterial activity observed against *S. aureus* when gamma irradiation energy is increased. The opposite is observed for the EE, an increase of antimicrobial activity when the energy of the gamma irradiation is increased.

Key Words: *Echinodorus macrophyllus*, Gamma irradiation, Phenolic compounds, Antibacterial activity.

APRESENTAÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 80% da população mundial consome ervas e outras plantas medicinais,¹ os quais são usadas com excelentes resultados em assistência primária à saúde.² O mercado mundial de ervas encontra-se em expansão, tendo movimentado cerca de US\$ 60 bilhões em 2000.³ No Brasil, o Instituto Brasileiro de Plantas Medicinais (IBPM) estima em R\$ 500 milhões o comércio anual de plantas medicinais e dos medicamentos fitoterápicos elaborados. No entanto, a maior parte da produção é ainda artesanal, localizada e não ocupa grandes proporções.³

O aumento progressivo da produção de medicamentos fitoterápicos tem sido acompanhado pela preocupação em relação à qualidade destes produtos, tendo em vista que as falsificações e as adulterações são frequentes.⁴ Os principais fatores que comprometem a qualidade e segurança das ervas são o meio onde foram cultivadas, os métodos, a colheita, o processamento pós-colheita, o transporte, a forma como são embaladas e o armazenamento dos produtos naturais, resultando elevado risco de contaminações microbiológica e química.¹

As toxinas naturais produzidas por microorganismos podem ser divididas em três categorias: toxinas bacterianas, micotoxinas e ficotoxinas.⁵ As patologias parasitárias como micoses sistêmicas causadas por *Paracoccidioides brasilienses*, infecções causadas por bactérias do gênero *Salmonella* e microorganismos associados ao processo de extração/beneficiamento de plantas, podem produzir substâncias nocivas aos seres humanos.⁶ Algumas bactérias da família Bacillaceae, presentes em plantas usadas para preparação de chás medicinais, são resistentes às condições térmicas aplicadas em infusões.⁷

O processo de prevenção e o controle das micotoxinas não apresentam ainda um modelo seguro e eficaz. O tratamento por irradiação gama (radioesterilização) tem sido uma alternativa para aumentar o tempo de conservação, diminuindo a contaminação microbiológica de alimentos e produtos fitoterápicos.⁸ Através dessa técnica, o material vegetal é submetido a doses controladas de radiação ionizante, reduzindo a flora microbiana sem afetar, porém, a sua

qualidade terapêutica. Algumas espécies de vegetais (alecrim, manjeriço e alcachofra) foram irradiadas a doses de 10, 20 e 30 kGy sem alteração de suas ações terapêuticas.⁹ Nos estudos da contaminação fúngica e da produção de micotoxinas em frutas, foi verificada a presença de ácido penicílico, patulina, ácido ciclopiazônico, citrinina, ocratoxina A e aflatoxina B1. Entretanto, a irradiação dessas frutas a doses de 1,5 e 3,5 kGy diminuiu significativamente a microbiota fúngica e a produção de micotoxinas decresceu com o aumento da dose de irradiação.¹⁰

Em 1983, a comissão do *Codex Alimentarius* aprovou a radioesterilização de alimentos a doses abaixo de 10 kGy, o que vem sendo utilizado atualmente em 52 países. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou em 2001 radioesterilização de alimentos a doses não estipuladas, desde que sejam suficientes para alcançar a finalidade pretendida e não comprometam a integridade do produto. Em 2004, a ANVISA exigiu o registro de controle de qualidade de medicamentos fitoterápicos, incluindo a pesquisa de eventuais alterações estruturais da matéria-prima (droga vegetal). A Companhia Brasileira de Esterilização (CBE) atende aos maiores produtores de fitoterápicos instalados no país, que preferem não divulgar ao público que estão empregando essa técnica, por temerem possíveis rejeições pelos consumidores.¹¹

O Instituto de Defesa do Consumidor (IDC) alerta sobre novos estudos que relatam produtos radiolíticos, nocivos aos seres humanos, formados a partir de reações tanto de lipídeos com oxigênio molecular quanto do decaimento causado pelos efeitos diretos e indiretos da radiação.¹² De fato, certos hidrocarbonetos voláteis ausentes em alimentos não irradiados são observados em alimentos submetidos à radioesterilização. Após irradiação a vácuo entre 5 e 60 kGy das frações lipídicas de alguns alimentos, foram identificados hidrocarbonetos, aldeídos, ésteres metílicos e etílicos, ácidos graxos livres e 2-alkilciclobutanonas, cujas concentrações aumentam com a dose e/ou temperatura da irradiação.^{13,14} Métodos de detecção padronizados e validados são disponíveis para muitos alimentos.¹⁵ Os hidrocarbonetos voláteis isolados da

fração lipídica de alimentos irradiados podem ser identificados por cromatografia gasosa. Compostos aromáticos, como o 1,3-bis(1,1-dimetiletil)benzeno, têm sido apontados como marcadores de alimentos irradiados.^{16,17}

Apesar de o Ministério da Saúde do Brasil (MS-Brasil) ter regulamentado em 1995 os procedimentos para a produção de medicamentos fitoterápicos, estes não têm nenhum controle sanitário, pois a farmacovigilância é incipiente e praticamente inexistente. Além da poeira, outros contaminantes podem levar ao desenvolvimento de quantidades significativas de esporos de bactérias e fungos em fitoterápicos.³ Como resultado, as plantas comercializadas para fins medicinais no Brasil são normalmente de má qualidade. Desde 1999, com a proibição do uso de óxido de etileno na descontaminação de produtos vegetais que não sejam objetos de uso médico-hospitalar (Portaria Interministerial nº 482 dos Ministérios da Saúde e do Trabalho), a busca por tecnologias seguras de descontaminação é de grande interesse. Vários métodos de desinfecção têm sido sugeridos, tais como o uso de radiação eletromagnética, pulso fotodinâmico e tratamento com CO₂. Entretanto, a radioesterilização tem-se mostrado como a alternativa mais adequada e segura para a descontaminação de produtos alimentícios e fitoterápicos.

No Brasil, a radioesterilização está prevista na legislação, mas é pouco difundida.¹⁸ Uma das razões é a resistência do consumidor devida à desinformação, principalmente sobre a segurança do processo, qualidade nutricional do produto irradiado e métodos confiáveis de detecção que possam ser empregados como padrão.¹⁹ A exigência da legislação e do mercado consumidor pela correta rotulagem de produtos radioesterilizados tem estimulado o estudo de métodos de identificação desses produtos para evitar a re-irradiação, controlar a dose absorvida, verificar o cumprimento dos níveis mínimos de exigência microbiológica, além de contribuir para o maior controle e ampliação do mercado internacional de fitoterápico.

Neste contexto, torna-se importante estudar mais exaustivamente as condições experimentais para a radioesterilização de produtos fitoterápicos. A espécie *Echinodorus*

macrophyllus Mich. (chapéu-de-couro) é uma planta de grande expressão na medicina popular, apresentando propriedades adstringentes e sendo usada no combate a inflamações de garganta e de feridas que não cicatrizam.²⁰ O extrativismo dessa espécie tem levado ao risco de sua extinção em algumas regiões. Até o presente, poucos estudos fitoquímicos sobre essa espécie foram realizados, tendo sido identificados alcalóides, glicídeos, óleos essenciais, ácidos orgânicos, heterosídeos e taninos. Alguns estudos sugerem que o princípio ativo da planta seja o equinodol (ácido equinóico), um diterpeno predominante no extrato etanólico das folhas secas da planta.²¹

Este trabalho tem como objetivo a “Avaliação da Segurança de *Echinodorus macrophyllus* Mich (chapéu-de-couro) Tratada por Irradiação Gama: Contaminação Microbiológica, Detecção de Produtos Radiolíticos e Integridade dos Princípios Ativos.” A relevância deste trabalho reside no uso de técnicas modernas para a execução de um projeto que trata de uma demanda atual de importância econômica indiscutível para o Brasil, além do desenvolvimento de metodologias dentro de demandas reconhecidas pela ANVISA. Por ser uma espécie vegetal com poucos estudos fitoquímicos registrados na literatura, um estudo fitoquímico mais exaustivo torna-se apropriado e oportuno.

No Capítulo I é apresentado inicialmente, um levantamento sobre as principais características de representantes da família Alismataceae e do gênero *Echinodorus*, tais como as características morfológicas, distribuição, nomes populares e classificação taxonômica da espécie *E. macrophyllus*. Em seguida, são apresentados levantamentos sobre os constituintes químicos isolados em populações do gênero *Echinodorus* e as principais atividades biológicas relatadas em representantes do gênero e na espécie *E. macrophyllus*. Finalmente, no Capítulo I são descritas também algumas tecnologias de descontaminação, principalmente a radiação ionizante, dando maior enfoque à radiação gama e a possíveis alterações estruturais quando substâncias químicas são submetidas a esta técnica.

No Capítulo II são apresentados os materiais e equipamentos empregados nas análises cromatográfica das frações, além da descrição do método de isolamento usando cromatografia líquida de alta-eficiência (CLAE) semi-preparativa e de caracterização estrutural dos fitoconstituintes por espectroscopias nas regiões do Ultravioleta (UV), Infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 1D e 2D. Em seguida, são descritos os procedimentos experimentais realizados nos testes de atividade antimicrobiana dos extratos hexânicos e etanólicos submetidos à irradiação gama.

O Capítulo III descreve os resultados e discussão das análises por CLAE das frações das folhas da espécie *Echinodorus macrophyllus*, evidenciando as principais alterações nos fitoconstituintes presentes nas frações contendo compostos fenólicos, alcaloídicos e saponínicos.

O Capítulo IV descreve os resultados e discussão do isolamento dos fitoconstituintes das folhas da planta por CLAE semi-preparativa. As análises estruturais dos fitoconstituintes foram realizadas a partir dos dados de UV, IV e RMN 1D (RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e DEPT 135°) e 2D (COSY, HSQC e HMBC).

No Capítulo V são apresentados os resultados e discussão dos ensaios biológicos realizados com extratos hexânicos e etanólicos das folhas da planta. Através desses ensaios foi possível avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos irradiados.

CAPÍTULO I:

INTRODUÇÃO

A Espécie *Echinodorus macrophyllus* Mich. e

Radiação Gama

1. A Família Alismataceae

Alismataceae pertence à classe das Liliopsida (monocotiledôneas), correspondendo, em número de espécies, à segunda maior classe das Angiospermas.²² A família é constituída por cerca de 100 espécies e 16 gêneros. Dentre seus gêneros, *Echinodorus* e *Sagittaria* possuem as maiores diversidades específicas, apresentando 45 e 35 espécies, respectivamente.²³ As plantas dessa família são normalmente aquáticas ou semi-aquáticas, sendo encontradas frequentemente em lagos, pântanos, rios e córregos de água doce. A grande maioria das espécies é caracterizada por plantas com raízes fixadas na água ou em brejos e apresentam folhas eretas ou flutuantes, sendo halófitas ou hidrófitas.²⁴

As espécies dessa família são distribuídas amplamente em todos os continentes e apresentam poucas diferenças evolutivas entre si. De um modo geral, as espécies são classificadas por diferentes formas e, por isso, apresentam várias sinonímias.²⁵ Suas espécies são usadas como fontes de alimentos e de fitoterápicos e na ornamentação de aquários e lagoas.

2. O Gênero *Echinodorus*

O gênero *Echinodorus* é constituído por plantas aquáticas e pantaneiras que crescem ocasionalmente submergidas, mas possuem folhas e inflorescências predominantemente emersas, ou seja, são halófitas.²⁶

A Tabela I.1 (p. 9) apresenta as espécies conhecidas do gênero *Echinodorus*, contendo várias espécies neotrópicas e distribuídas em todo continente americano, principalmente no Brasil.²⁷ No Brasil, são encontradas 17 espécies, distribuídas principalmente nos estados de São Paulo e Minas Gerais e na região do Nordeste Brasileiro.²⁷ No Nordeste, predominam formas intermediárias; isto é, populações híbridas apresentando indivíduos com características de duas ou mais espécies do gênero.²⁸

Tabela I.1. Espécies do gênero *Echinodorus*, atividades biológicas e fitoconstituintes isolados

Espécies	Atividade biológica	Fitoconstituintes isolados
<i>Echinodorus amazonicus</i> Rataj		
<i>Echinodorus andrieuxii</i>		
<i>Echinodorus angustifolius</i>		
<i>Echinodorus argentinensis</i>		
<i>Echinodorus aschersonianus</i>		
<i>Echinodorus berteroi</i>	Efeito antiepiléptico ²⁹	
<i>Echinodorus bleheri</i>		
<i>Echinodorus bracteatus</i>		
<i>Echinodorus bolivianus</i>		
<i>Echinodorus cordifolius</i>		
<i>Echinodorus ellipticus</i>	Redução de caspa e queda de cabelo ³⁰	
<i>Echinodorus glaucus</i>		
<i>Echinodorus grandiflorus</i>	Reumatismo, doenças de pele e fígado ³¹ , entre outras	1 - 20
<i>Echinodorus grisebachii</i>		
<i>Echinodorus horizontalis</i>		
<i>Echinodorus isthmicus</i>		
<i>Echinodorus tunicatus</i>		
<i>Echinodorus latifolia</i>		
<i>Echinodorus longiscapus</i>		
<i>Echinodorus macrophyllus</i>	Antiofídica, diurética, anti-reumática, anti-inflamatória ^{26,31} , entre outras	3, 21 - 31
<i>Echinodorus martii</i>		
<i>Echinodorus nymphaeifolius</i>		
<i>Echinodorus opacus</i>		
<i>Echinodorus Osiris</i>		
<i>Echinodorus ovalis</i>		
<i>Echinodorus paniculata</i>		
<i>Echinodorus parviflorus</i>		
<i>Echinodorus scaber</i>		
<i>Echinodorus subalatus</i>		
<i>Echinodorus tenellus</i>		
<i>Echinodorus trialatus</i>		
<i>Echinodorus uruguayensis</i>		
<i>Echinodorus virgatus</i>		

Poucos estudos fitoquímicos sobre espécies do gênero *Echinodorus* são descritos na literatura. A espécie *Echinodorus grandiflorus* tem sido muito estudada, descrevendo-se principalmente o isolamento de ácidos graxos, diterpenos, triterpenos e esteróides.³¹ Nesta espécie, o fitoconstituente isolado em maior quantidade é o ácido equinóico (**1**; Figura I.1), um diterpeno predominante no extrato etanólico das folhas e relacionado com a atividade biológica da planta.^{32, 33}

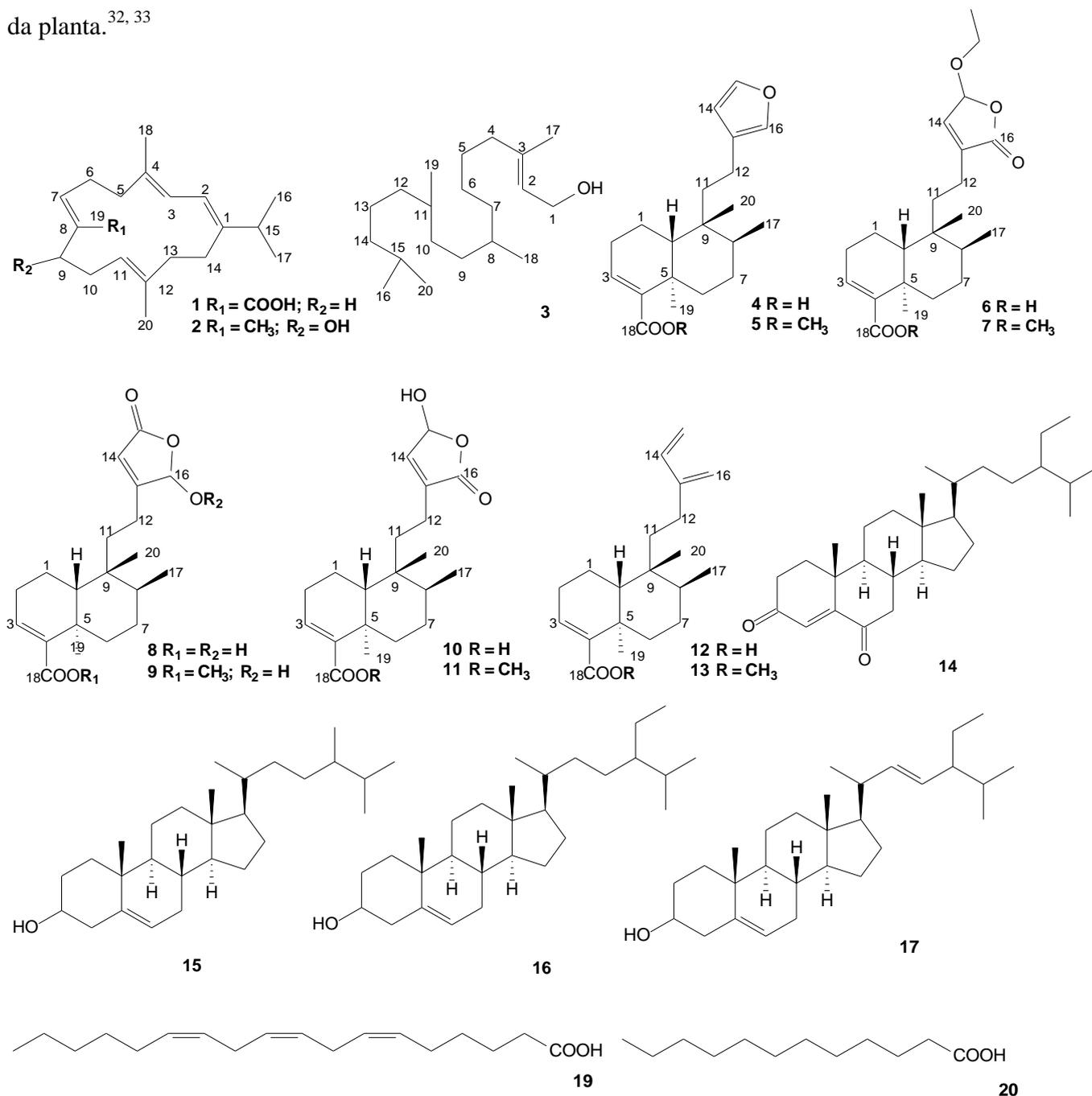


Figura I.1. Fitoconstituintes isolados da espécie *E. grandiflorus*.^{31,33}

3. A Espécie *Echinodorus macrophyllus* Mich

3.1. Características Morfológicas

A espécie *E. macrophyllus* foi descrita pela primeira vez por Micheli em 1881.²⁶ As folhas são pecioladas, ovais de base cordiforme, agudas ou acuminadas no ápice, limbos inteiros, comprimentos entre 20 e 40 cm e larguras entre 15 e 35 cm, com superfície rugosa, áspera e de 11 a 13 nervuras principais na página inferior. O pecíolo é longo, coriáceo, medindo até 70 cm de comprimento, com sulcos longitudinais e providos de estrias longitudinais. As flores são brancas, hermafroditas, perfeitas, numerosas, dispostas em racimos e alongadas.^{34, 35} A Figura I. 2 apresenta fotos de exemplares da espécie *Echinodorus macrophyllus* Mich.



Figura I.2. Exemplares da espécie *Echinodorus macrophyllus* Mich.³⁶⁻³⁸

3.2. Distribuição, Nomes Populares e Classificação Taxonômica

Os exemplares dessa espécie são encontrados na América do Sul, principalmente no Brasil e, mais precisamente, em áreas alagadas da Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. Nos estados das Regiões Norte (Roraima, Amapá e Pará), Nordeste (Piauí e Bahia), Centro-Oeste (Mato Grosso), Sudeste (Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais) e Sul (Paraná)³⁹ é conhecida popularmente como chapéu-de-couro, congonha-de-bugre, congonha-do-campo e erva-de-bugre.⁴⁰ A distribuição geográfica da espécie está apresentada no mapa da Figura I.3.

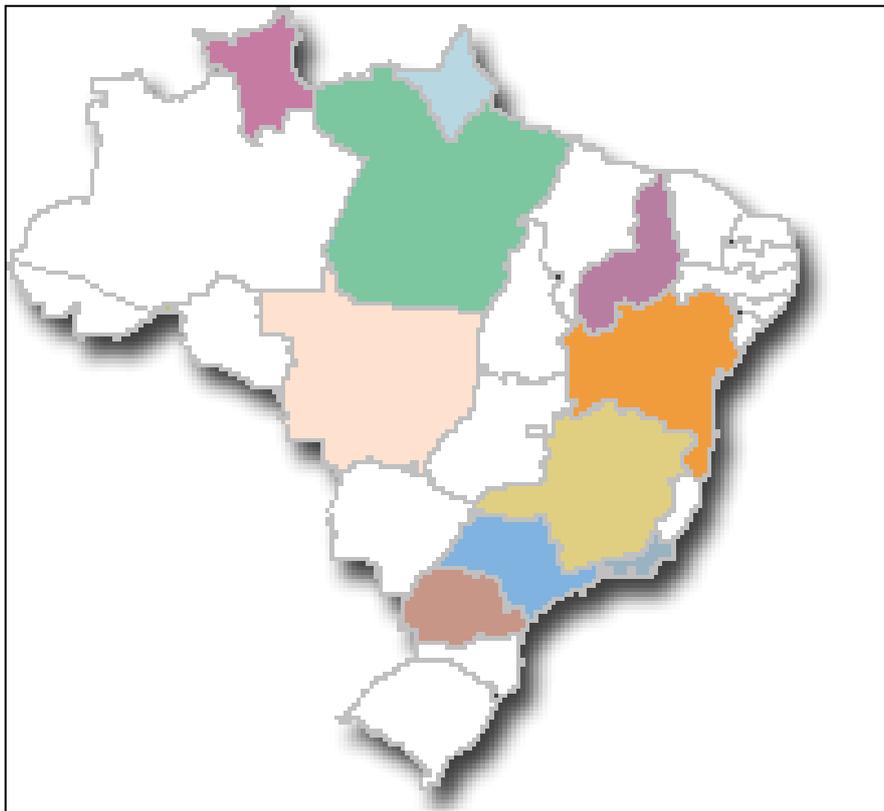


Figura I.3. Distribuição geográfica da espécie *E. macrophyllus* no Brasil.⁴⁰

A Tabela I.2 mostra a classificação taxonômica da espécie *Echinodorus macrophyllus* Mich. de acordo com Cronquist, em 1988.²²

Tabela I.2. Classificação taxonômica da espécie *Echinodorus macrophyllus*

Reino:	Plantae
Divisão:	Magnoliophyta
Classe:	Liliopsida
Ordem:	Alismatales
Família	Alismataceae
Gênero	<i>Echinodorus</i>
Espécie:	<i>Echinodorus macrophyllus</i> Michelli

3.3. Atividade Biológica

E. macrophyllus e *E. grandiflorus* são as únicas espécies do gênero que são utilizadas na medicina tradicional. *Echinodorus macrophyllus* está inscrita nas primeiras edições da Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil (1929 e 1959), nas edições posteriores foi retirada, pois seu uso como fitoterápico depende do avanço de novos estudos.³⁵

Echinodorus macrophyllus é uma planta medicinal que possui um amplo espectro farmacológico, apresentando atividades depurativa, emoliente, tônica, anti-sifilítica, antiofídica, diurética, anti-reumática, anti-inflamatória e no tratamento de aterosclerose e doenças de pele, fígado e das vias urinárias (litíase e nefrite).³¹ Apesar de poucos estudos terem sido descritos na literatura, há relatos que confirmam os efeitos imunossupressores⁴¹ e citotóxico em doses elevadas da planta.⁴² Sob o ponto de vista farmacológico, extratos aquosos da planta têm efeitos imunossupressores. Estes efeitos podem fazer parte do tratamento da resposta humoral exacerbada e/ou condições de resposta imune celular em doenças imunoinflamatória crônica, doenças autoimunes, transplantes e enxertos.

Além disso, as folhas da planta são utilizadas popularmente através de decocção com água, nas formas de chá, tinturas ou em pó, além da maceração do rizoma em etanol para uso tópico em feridas e no reumatismo.³⁹

3.4. Constituintes Químicos Isolados em *Echinodorus macrophyllus*

Até o presente, poucos estudos fitoquímicos sobre essa espécie foram realizados, tendo sido identificados alcalóides, glicídeos, óleos essenciais, ácidos orgânicos, heterosídeos e taninos, através de testes de identificação estrutural.

Porém, alguns estudos mostraram o isolamento e identificação dos diterpenos *trans*-fitol³¹ (**3**), echinofilina A (**21**), echinofilina B (**22**), echinofilina C (**23**), echinofilina D (**24**), echinofilina E (**25**), echinofilina F (**26**), chapecoderina A (**27**), chapecoderina B (**28**), chapecoderina C (**29**), echinodolideo A (**30**) e echinodolideo B (**31**), cujas estruturas químicas são mostradas na Figura I.4 (p.15). Os compostos **30** e **31** são considerados derivados do ácido equinóico **1** isolado da espécie *Echinodorus grandiflorus*.⁴³⁻⁴⁶

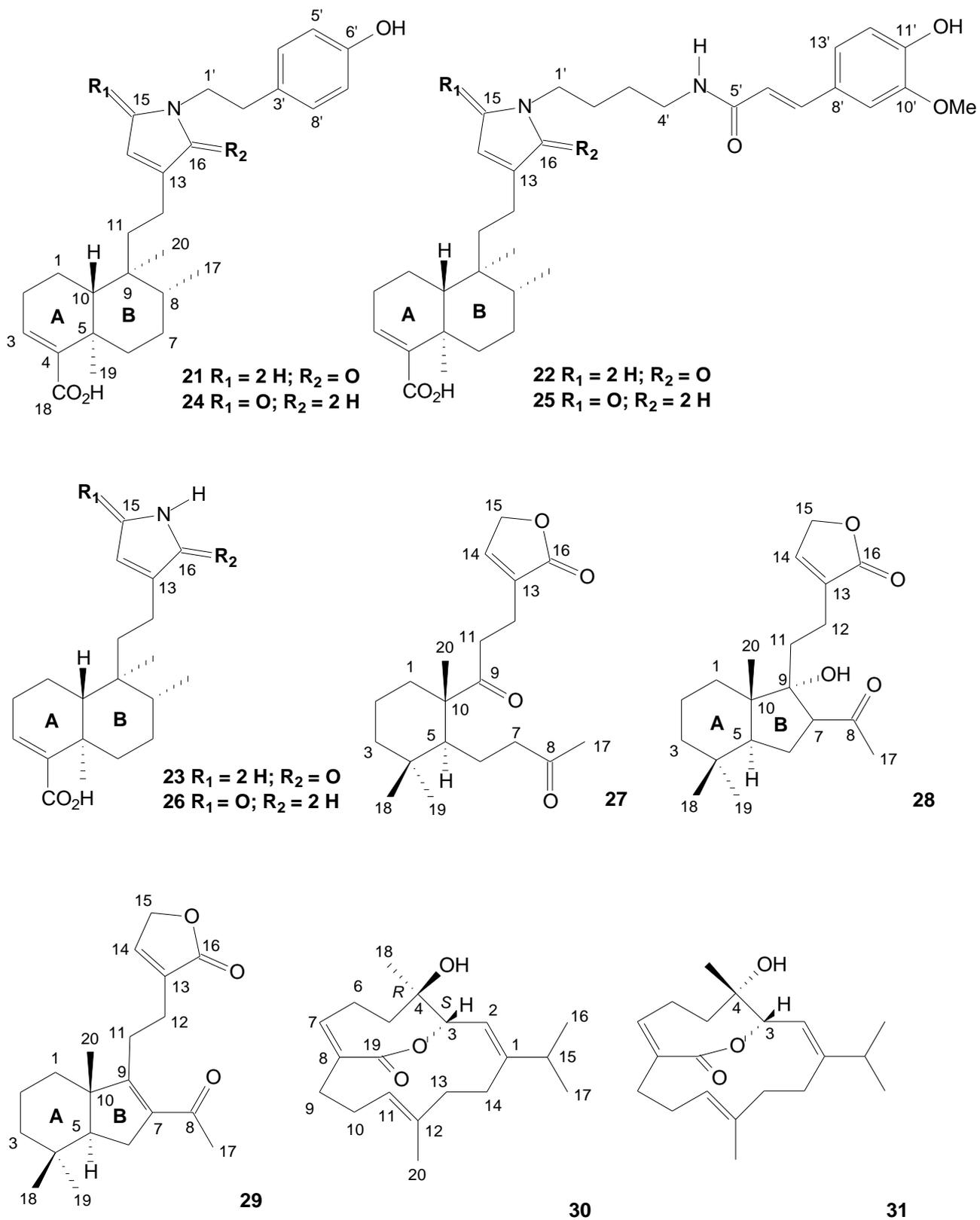


Figura I.4. Estrutura química de fitoconstituintes isolados de *Echinodorus macrophyllus*.⁴³⁻⁴⁶

4. Tecnologias de Descontaminação Microbiana

Descontaminação microbiana é a diminuição ou remoção de microorganismos presentes em um determinado material. Para esse objetivo pode-se fazer uso de métodos físicos ou químicos, que atuam na permeabilidade da membrana celular, provocando vazamento do conteúdo celular ou causando danos às proteínas e aos ácidos nucleicos. Esses métodos são frequentemente letais para os microorganismos. Os vírus com envelopes lipídicos são os menos resistentes, seguidos pelas bactérias Gram-positivas, vírus sem envelopes, fungos, bactérias Gram-negativas, protozoários, cistos de protozoários, micobactérias e endosporos de bactérias. Por sua vez, os príons são os agentes patogênicos mais resistentes. Na Tabela I.3 são mostradas as principais tecnologias de descontaminação microbiana.^{47,48}

Tabela I.3. Principais métodos utilizados na descontaminação microbiana

Métodos Físicos	Métodos Químicos
Calor Úmido	Fenol e Compostos Fenólicos
Pasteurização	Biguanidas (Clorexidina)
Calor Seco	Halogênios (Iodo e Cloro)
Filtração	Alcoóis
Refrigeração	Metais Pesados
Congelamento	Agentes de Superfície (Sabões e detergentes)
Liofilização	Ácidos Orgânicos
Alta Pressão	Aldeídos
Dessecação	Esterilizantes Gasosos
Pressão Osmótica	Peroxigênios (Agentes Oxidantes)
Radiação Não-Ionizante	
Radiação Ionizante	

4.1. Radiação Ionizante

O uso da radiação ionizante na preservação de alimentos iniciou-se antes de 1920, mas foi somente entre 1950 e 1960 que um maior número de pesquisas foram conduzidas, principalmente pelo exército americano, utilizando doses variadas de irradiação.⁴⁹

A radiação utilizada para a descontaminação pode ser alcançada através da aplicação de raios gama (utilizando os radioisótopos Cobalto-60 ou Césio-137), feixes de elétrons de alta energia (energia superior a 10 MeV, apresentando pouca penetrabilidade) ou raios-x (energia superior a 5 MeV). O princípio da radiação consiste na formação de elétrons energéticos randomicamente em toda a matéria, resultando na geração de íons moleculares energéticos. Estes íons podem estar sujeitos a capturar elétrons, a dissociar, dependendo da complexidade e da estabilidade do íon molecular formado, ou ainda a rearranjar rapidamente em moléculas mais estáveis, através de reações íon/molécula.⁴⁹

Através do uso de radiação ionizante, várias alterações podem acontecer na matéria, principalmente alterações químicas que podem ocorrer por dois caminhos: efeitos primários e efeitos secundários. Pelos efeitos primários, os produtos radiolíticos podem surgir como resultado da absorção de energia direta pela matéria absorvente. Os efeitos secundários ocorrem como resultado da alta reatividade de radicais-livres e íons excitados produzidos via efeitos primários. Esta alta reatividade dos intermediários pode favorecer várias reações conduzindo à formação de substâncias estáveis, alterando quimicamente os constituintes da matéria.⁴⁹

Devido aos avanços do uso da radiação ionizante, vários métodos para determinar o processo da irradiação podem ser utilizados, destacando-se a (i) espectroscopia de ressonância de spin de elétron (ESR), que quantifica a concentração dos radicais-livres formados na matéria irradiada; (ii) termoluminescência (TL), que quantifica a presença de moléculas excitadas através da emissão de luz do material em aquecimento; (iii) métodos físicos, que se baseiam nas propriedades físicas como, por exemplo, viscosidade; (iv) métodos químicos, que quantificam os

produtos radiolíticos formados, por exemplo pelo uso de Cromatografia a Gás (CG) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE); e (v) métodos biológicos, que se baseiam nas mudanças dos microorganismos viáveis.^{49,50}

4.2. Radiação Gama

Os raios- γ do espectro eletromagnético têm comprimentos de onda curtos, de alta energia conforme apresentado na Figura I.5. Apesar de o processo de prevenção e controle das micotoxinas não apresentar ainda um modelo seguro e eficaz,⁸ o tratamento por irradiação gama (radioesterilização) tem sido uma alternativa para aumentar o tempo de conservação/armazenamento, através do bloqueio do brotamento de bulbos, atraso da maturação e diminuição da contaminação microbiológica de alimentos e produtos fitoterápicos.^{51,52}

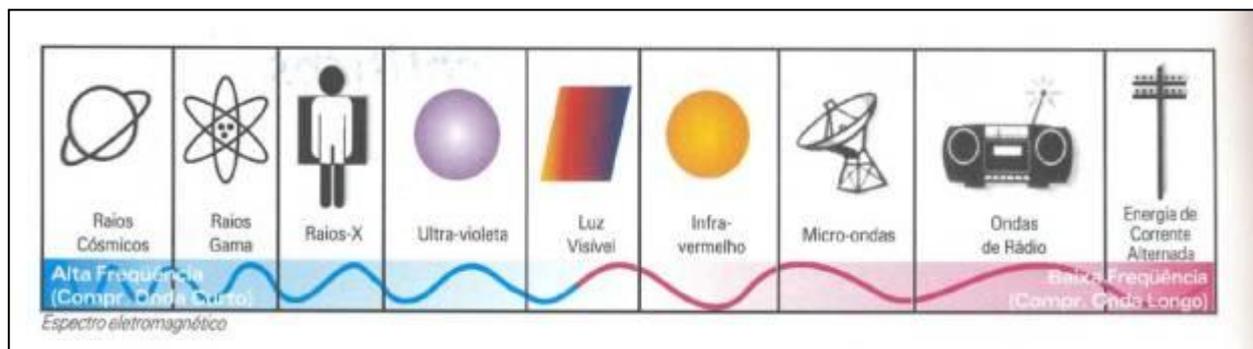


Figura I.5. Espectro eletromagnético.⁵⁰

A radiação gama possui algumas vantagens em relação às demais técnicas de radiação ionizante, pois apresenta alto poder de penetração, baixa reatividade química, baixos níveis de resíduos e apenas um pequeno aumento de temperatura no material irradiado. Com isso, o uso de radiação gama vem crescendo nos últimos anos, principalmente para esterilização de produtos farmacêuticos.⁵³ Numerosos estudos estabelecem que a radiação gama pode ser considerada radiologicamente, microbiologicamente e toxicologicamente segura.

Em 1999, mais de 30 países empregavam radioesterilização de produtos alimentares para uso comercial,⁵⁰ recentemente, em 2008, 52 países permitiam e empregavam a radiação gama em aproximadamente 250 produtos alimentícios.⁵⁴ A Figura I.6. apresenta os países que fazem uso da tecnologia de radiação gama em radioesterilização para fins comerciais.

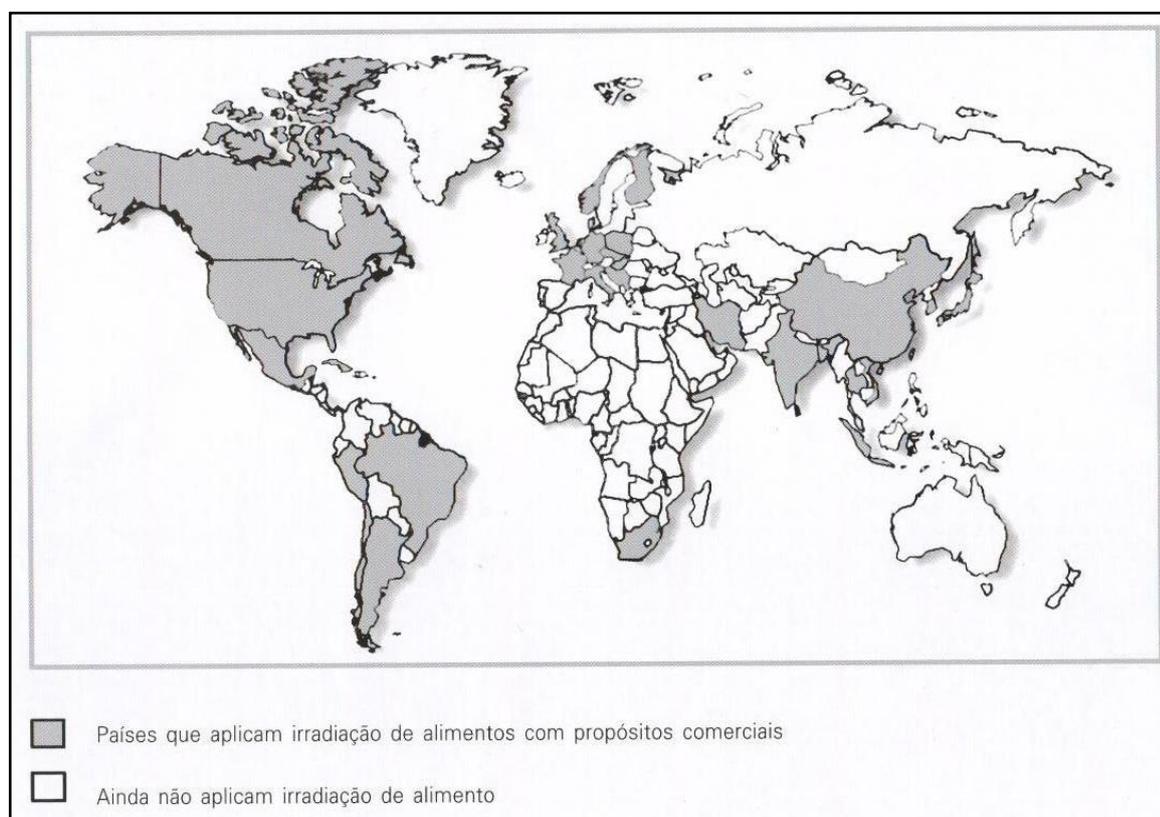


Figura I.6. Países que usam a tecnologia de radiação gama para fins comerciais.⁵⁰

Outro fator que demonstra a crescente evolução do uso da radiação gama é a quantidade de volume de material seco irradiado. Em 1987, iniciou-se o uso desta tecnologia para fins comerciais. Naquela época, a quantidade de material irradiado era superior a 10.000 ton/ano em todos os países que utilizavam a radiação gama. Em 1998, ocorreu um aumento de 800%, resultando em um montante de aproximadamente 80.000 toneladas de material irradiado em todos os países.⁵⁰ A Figura I.7 mostra a evolução mundial em quantidade de material seco irradiado com a finalidade de permitir uma melhor conservação e comercialização do mesmo.

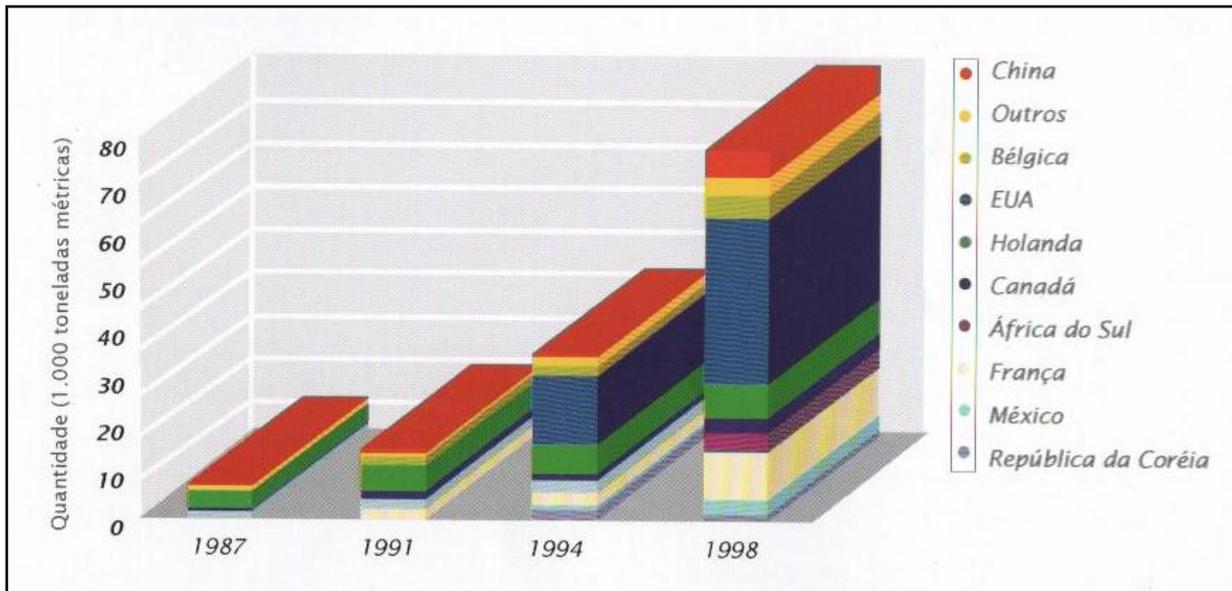


Figura I.7. Quantidade estimada em 1.000 toneladas de produtos irradiados em países que utilizam a técnica de radiação gama com o passar dos anos.⁵⁰

Foi relatado que a irradiação a doses de até 10 kGy (sendo que, 1 kGy = 1 joule de energia absorvida por kg de material irradiado) foi eficiente no tratamento de descontaminação de 17 ervas medicinais e em seis extratos de fitoterápicos, reduzindo em 99,998% a quantidade de bactérias aeróbias, fungos e leveduras, sem causar alterações significativas em suas atividades biológicas.⁵⁵ Porém, cada país possui uma legislação específica para controle sanitário e, conseqüentemente, estipula a dosagem de irradiação para cada material. A Comunidade Européia determinou em 1999 o uso de doses em até 10 kGy, o **US Food and Drug Administration** (FDA) limitou o uso de raios- γ em até 30 kGy em ervas culinárias, sementes, temperos, vegetais e mistura de substâncias aromáticas de vegetais. Porém, para eliminação do *Clostridium botulinum*, o US Army Natick Research and Development Laboratories estipulou dosagem de 41,2 kGy e, na África do Sul, é permitido o uso de até 45 kGy de energia de irradiação gama.⁵⁶⁻⁵⁸ No Brasil, a ANVISA aprovou em 2001 radioesterilização de alimentos a doses não estipuladas, desde que sejam suficientes para alcançar a finalidade pretendida e não comprometam a integridade do produto.⁵⁹

5. Alterações Provocadas pela Radiação Gama

Conforme citado no item 4.1, o uso de radiação ionizante, principalmente raios- γ , pode provocar uma diminuição da concentração de alguns fitoconstituintes presentes nos fitoterápicos irradiados devido a radicais-livres formados. Porém, outros estudos demonstram que, dependendo da dose de radiação ionizante e do estado do material a ser irradiado, esse tipo de energia pode aumentar a atividade fisiológica das células vegetais e de microorganismos fotossintéticos, devido a alguns fatores, tais como, o aumento da proliferação celular, a melhora da taxa de germinação e/ou crescimento e o aumento da resistência ao “stress”. Raios- γ podem modificar também a estrutura das enzimas presentes nos vegetais e, dependendo da dose de irradiação, aumentar a concentração de alguns fitoconstituintes.^{60,61}

Acredita-se que esse melhoramento da atividade fisiológica se deve a uma sinalização celular direta com a participação de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), que são produzidas principalmente por irradiação da água ou indireta, através de sinalizadores celulares ativados pelas ERO no meio extracelular vizinho.⁶⁰

Recentes estudos demonstraram que raios- γ podem aprimorar a qualidade sensorial de alguns vegetais, principalmente por aumentar a quebra de precursores e liberação dos glicosídeos responsáveis pelo aroma. Porém, na espécie *Vanilla planiflora*, a concentração de vanilina, ácido vanilínico, *p*-hidroxi-benzaldeído, ácido *p*-hidroxi-benzóico e glicose vanilínica (compostos responsáveis pelo aroma) não foi afetada pelo uso da radiação gama e, dessa forma, a qualidade sensorial da espécie não foi aprimorada.⁶² Em adição, estudos citam também alterações de cor em extratos naturais. Extrato da espécie *Hizikia fusiformis* apresentou sua cor negra substituída por uma coloração mais clara após aplicação de 10 kGy de intensidade de energia de radiação gama.⁶³

Na espécie *Allium fistulosum* L. foram identificados 35 compostos voláteis e, através do uso de radiação gama, os compostos contendo enxofre diminuíram sua concentração com o

aumento da energia de radiação ionizante incidente. Porém, alguns grupos funcionais não seguem essa tendência dependente da dose. Compostos contendo grupos ácido, álcool, aldeído, éster, furano ou cetona têm suas concentrações alteradas com uso de radiação, diminuindo ou aumentando a concentração nas diferentes energias incidentes.⁶⁴

A enzima Phenilalanina-amônia-liase (PAL) é responsável principalmente pela biossíntese de antocianinas e compostos fenólicos. O uso da radiação gama aumenta a atividade da enzima, principalmente em doses que variam entre 1,6 – 2,0 kGy. Porém, esse aumento é mais pronunciado quando o material vegetal é armazenado por longo período.⁶⁵

O uso da radiação em ervas fitoterápicas pode favorecer a atividade antioxidante, pelo aumento da concentração dos compostos fenólicos presentes, principalmente por aumentar a atividade da enzima PAL. Os raios- γ diminuem ou aumentam a concentração dos compostos fenólicos, dependendo da dose incidida. Sabe-se que o uso de uma dose de 8 e 10 kGy em algumas espécies faz aumentar o conteúdo estruturas fenólicas e a atividade antioxidante da espécie.^{61,63}

Similar aos compostos fenólicos, a biossíntese das antocianinas é regulada principalmente pela enzima PAL. Na literatura foi encontrado que a aplicação de 2 kGy proporciona o aumento da concentração de antocianinas com pico máximo em 1,1 kGy em pêssegos (*Prunus pérsica Bausch*). Porém, ao serem aplicadas doses superiores a 10 kGy, ocorre diminuição da concentração.^{61,66}

Foram testadas as atividades diurética, espasmolítica, colagogo (aumento da secreção da bili), digestiva, antibiótica, calmativa e antiinflamatória para 10 preparações fitoterápicas. Nesse estudo, foi mostrado que, em doses de até 10 kGy, as preparações apresentam ação terapêutica idêntica à do material não irradiado.⁶⁷

CAPÍTULO II:

PARTE EXPERIMENTAL

1. Equipamentos

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em escala analítica foram realizadas em Cromatógrafo líquido SHIMADZU, constituído de 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 5 μ m (SUPELCO). Para análises semi-preparativas e conseguinte separação de fitoconstituintes foi usado o Cromatógrafo líquido SHIMADZU constituído de uma bomba LC-10AV, detector UV/VIS SPD-10AV, software PC/Chrom+ (u8A Scientific) e coluna DYNAMAX MICROSORB C 18 10C-5, 250 x 10,0 mm (VARIAN) protegida por uma pré-coluna.

Após os procedimentos semi-preparativos, as amostras foram liofilizadas empregando o equipamento TermoFisher SCIENTIFIC FR-Drying Digital Unit. As determinações de pontos de fusão foram realizadas em aparelho METTLER FP80 SNR H22439. As análises por espectroscopia de absorção na região do Infravermelho (IV) foram realizadas em espectrômetro Spectrum One (ATR) – PERKIN ELMER.

As análises por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram realizadas em espectrômetros BRUKER DPX-200 e DRX-400 linha *ADVANCE*. Os deslocamentos químicos foram registrados em unidade δ em ppm e as constantes de acoplamento (*J*) em Hz. Tetrametilsilano (TMS) foi empregado como padrão de referência interna, tendo DMSO-*d*₆ como solvente.

2. Testes Microbiológicos

Os bioensaios foram realizados empregando-se bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 29212; *Bacillus cereus* ATCC 11778 e *Bacillus subtilis* ATCC 6633), Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 e *Citrobacter freundii* ATCC 8090) e uma levedura

(*Candida albicans* ATCC 18804). Os testes foram realizados sob a orientação da profa. Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi do Departamento de Química da UFMG.

3. Metodologia Biológica

Testes de Difusão em Ágar

No teste de difusão em Ágar,⁶⁹ as bactérias foram individualmente inoculadas em tubos de ensaio contendo 2 mL do meio infuso de cérebro e coração (BHI; 37,0 g/L) e, posteriormente, incubadas em estufa a 37 °C por 18 h. Uma alíquota de 0,5 mL deste material foi transferida a um tubo contendo 4,5 mL de solução salina estéril constituída por soluções aquosas de NaCl (9,0 g/L) e MgSO₄.7H₂O (0,5 g/L). Foram preparadas placas de Petri contendo o meio de cultura antibiótico nº 1 (27,0 g/L) e 0,4 mL do inóculo bacteriano. Discos contendo 100 µg da amostra foram colocados nas placas com o auxílio de uma pinça estéril. Um disco contendo o controle positivo (disco impregnado com o antibiótico cloranfenicol e miconazol) ou o controle negativo (disco impregnado com o solvente utilizado para solubilizar a amostra) foi colocado no centro de cada placa. A leitura dos halos de inibição foi feita após 24 h de incubação.

4. Metodologia Fitoquímica

4.1. Material Vegetal

As folhas de *Echinodorus macrophyllus* Mich. foram adquiridas no Mercado Central de Belo Horizonte em agosto de 2008, coletadas previamente no município de Esmeraldas (MG). Uma exsicata da espécie vegetal encontra-se depositada no Herbário do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o código: BHCB 28.557.

4.2. Obtenção dos Extratos Submetidos à Irradiação

Seis amostras secas e pulverizadas contendo 100 g das folhas de *Echinodorus macrophyllus* Mich. foram colocadas em embalagens “Zip Lock”, sacos herméticos. Uma delas não foi submetida à irradiação gama e, as outras, submetidas a energias de 1,0, 3,0, 5,0, 10,0 e 20 kGy no aparelho de Gama – Cell com fonte de ^{60}Co , pelo Dr. Alexandre Soares Leal do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN).

As amostras foram transferidas para erlenmeyers de 500 mL e submetidas sucessivamente à extração com hexano e etanol à temperatura ambiente por uma semana, obtendo-se, após filtração sob sucção em funil de vidro sinterizado, os extratos hexânicos (EH's) e etanólicos (EE's), respectivamente. A Figura II.1 apresenta a sequência metodológica para obtenção dos extratos hexânicos (EH₀, EH₁, EH₃, EH₅, EH₁₀ e EH₂₀) e etanólicos (EE₀, EE₁, EE₃, EE₅, EE₁₀ e EE₂₀) a partir das amostras das folhas de *E. macrophyllus* Mich., submetidas à diferentes energias de irradiação gama.

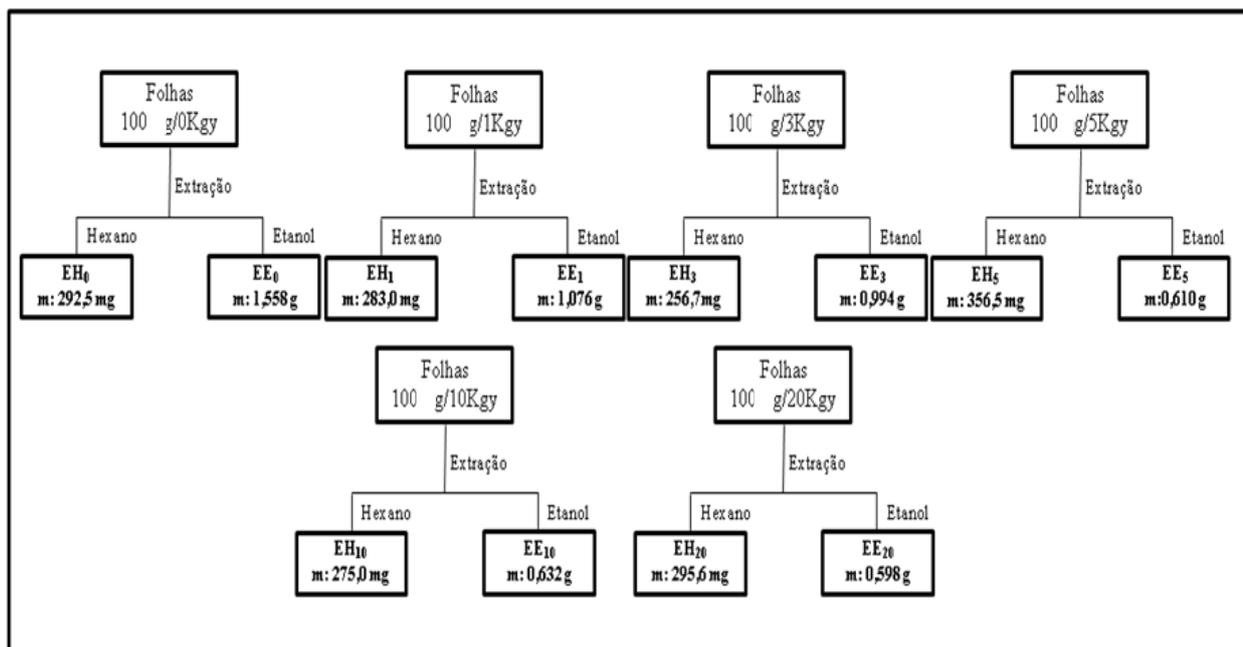


Figura II.1. Sequência metodológica para obtenção dos extratos hexânicos (EH's) e etanólicos (EE's) a partir das amostras das folhas de *E. macrophyllus* Mich submetidas à irradiação gama.

4.2.1. Isolamento dos Constituintes Polares⁷⁰

Uma parte (0,5 g) dos extratos etanólicos (EE's) foi submetida à decocção com água por 2 h a temperatura de 60 °C, sendo, em seguida, filtrada, obtendo-se os extratos aquosos correspondentes (EAq₀, EAq₁, EAq₃, EAq₅, EAq₁₀ e EAq₂₀). Os EAq's foram colocados em funil de adição e hidróxido de amônia foi adicionado até pH 10–11 e, em seguida, 100 mL de solução acetato de etila:éter etílico (3:1), obtendo-se duas fases: a Fase Aquosa e a Fase Orgânica que foram então separadas. A Fase Aquosa foi acidificada com HCl até pH 1–2 e submetida à extração com solução acetato de etila:éter etílico (3:1), obtendo-se a fase aquosa **FB**, rica em aminoácidos, ácidos orgânicos e açúcares, e a fase orgânica **FF**, rica em compostos fenólicos do tipo flavonóides. Por sua vez, a Fase Orgânica foi acidificada com HCl até pH 2 e submetida à extração com solução de Água acidificada com HCl (pH = 2), obtendo-se a fase aquosa **FA**, rica em alcalóides, e a fase orgânica **FS**, rica em saponinas. A Figura II.2 apresenta a sequência metodológica para o isolamento dos constituintes polares dos EE's das folhas de *E. macrophyllum* Mich.

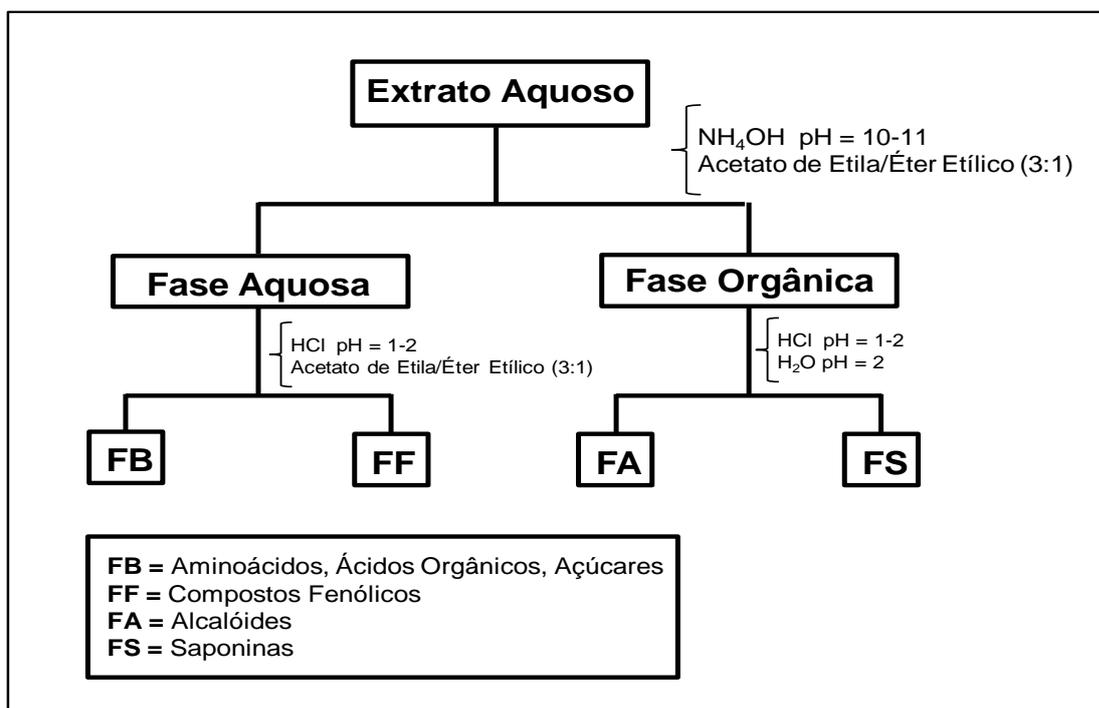


Figura II.2. Sequência metodológica para o isolamento dos constituintes polares dos EE's das folhas de *E. macrophyllum* Mich.

4.2.2. Testes Químicos para Identificação Estrutural⁶⁸

4.2.2.1. Teste para Flavonóides

Uma alíquota (~2,0 mg) da fração **FF₀** em 2 mL de água foi colocada em um tubo de ensaio. Hidróxido de amônia 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.

4.2.2.2. Teste para Alcalóides

Alíquotas (~2,0 mg) da fração **FA₀** em 2 mL de água foram colocadas em dois tubos de ensaio. Nos tubos de ensaio foram colocadas respectivamente três gotas dos reagentes de Hager e Dragendorff para precipitação de alcalóides. A formação de precipitado floculoso empregando um dos reagentes indica a presença de alcalóides na amostra.

4.2.2.3. Teste para Saponinas

Uma alíquota (~2,0 mg) da fração **FS₀** em 2 mL de água foi colocada em um tubo de ensaio. O tubo foi submetido a agitação vigorosa por 2 min. A formação de espuma persistente é indicativa da presença de saponinas na amostra.

4.2.3. Análise Cromatográfica das Frações de EAq

A Tabela II.1 (p. 29) mostra a massa das frações de EAq contendo compostos fenólicos (**FF**), alcalóides (**FA**) e saponinas (**FS**) das folhas da planta submetidas a diferentes energias de irradiação gama. A fração **FB** ainda não foi estudada.

Tabela II.1. Massa das frações de **EAq** (**FF**, **FA** e **FS**) de amostras das folhas submetidas a diferentes energias de radiação gama

Amostra	Fração/Massa (mg)		
	FF	FA	FS
Sem irradiação	123,0	636,2	31,6
1 kGy	136,3	281,7	33,8
3 kGy	96,6	127,3	15,4
5 kGy	74,4	60,9	22,7
10 kGy	68,5	40,5	16,9
20 kGy	42,4	21,7	33,9

4.2.3.1. Análise por CLAE das Frações FB Submetidas a Diferentes Energias de Irradiação

Gama

As frações FB submetidas a diferentes níveis de energia estão sendo estudadas; resultados não foram ainda concluídos.

4.2.3.2. Análise por CLAE das Frações FF Submetidas a Diferentes Energias de Irradiação

Gama

Análises por CLAE foram realizadas para investigar o efeito da energia de irradiação gama sobre as amostras de **FF**. Assim, alíquotas de **FF** foram analisadas por CLAE, no modo isocrático, utilizando uma mistura empregando os eluentes (**A**) metanol e (**B**) água:ácido trifluoroacético (99,5:0,5 v/v, pH 4,3) como fases móveis contendo 70% de **B** e 30% de **A** em um intervalo de 0,0 a 30,0 min. O volume de injeção foi de 20 µL, injetado manualmente, com fluxo mantendo-se constante a uma taxa de 1,0 mL/min e utilizando coluna ODS HYPERSIL (C18), 250 x 4,6 mm 5 µm (SUPELCO).⁷¹⁻⁷³ Os dados cromatográficos para todos os níveis de irradiação foram obtidos, analisados e armazenados a 280 nm e 254 nm.

4.2.3.3. Análise por CLAE das Frações FA Submetidas a Diferentes Energias de Irradiação

Gama

A fim de avaliar a influência da irradiação gama nos compostos químicos presentes nas frações **FA**, análises por CLAE foram realizadas utilizando fase móvel composta por dois solventes: (**A**) acetonitrila e (**B**) solução tampão de fosfato de potássio (pH 7,0). Em um sistema de gradiente isocrático, a concentração foi mantida em 90% de **B** e 10% de **A** de 0,0 a 15,0 min. Injetou-se manualmente 20 µL de cada amostra, o fluxo taxa de 1,0 mL/min e utilizou-se coluna ODS HYPERSIL (C18), 250 x 4,6 mm 5 µm (SUPELCO).^{74,75} Os cromatogramas foram obtidos e analisados a 280 e 327 nm. Apesar de a literatura indicar o comprimento de onda de 327 nm como apropriado para as análises, os resultados obtidos neste comprimento de onda foram insatisfatórios, portanto não foram analisados.

4.2.3.4. Análise por CLAE das Frações FS Submetidas a Diferentes Energias de Irradiação

Gama

As frações de **FS** obtidas foram analisadas utilizando um sistema eluente composto por dois solventes: (**A**) acetonitrila e (**B**) água:ácido trifloroacético (99,5:0,5 v/v pH 4,3). Da mesma forma, o processo foi isocrático, mantendo-se a uma concentração de 70% de **B** e 30% de **A** por dez minutos. As amostras (**FS**₀, **FS**₁, **FS**₃, **FS**₅, **FS**₁₀ e **FS**₂₀) foram aplicadas manualmente com um volume de injeção igual a 20 µL, fluxo constante de 1,0 mL/min e coluna ODS HYPERSIL (C18), 250 x 4,6 mm 5 µm (SUPELCO).⁷⁶⁻⁷⁸ Os cromatogramas obtidos foram analisados e armazenados a 210 e 250 nm. Apesar de a literatura citar o comprimento de onda de 250 nm como apropriado para este tipo de análise, os resultados obtidos neste comprimento de onda não foram satisfatórios, portanto não foram analisados.

4.3. Extrato Submetido ao Fracionamento Fitoquímico

As folhas secas e pulverizadas (500 g) de *Echinodorus macrophyllus* Mich. foram submetidas aos mesmos procedimentos descritos nos itens 4.2.1 (Isolamento dos constituintes polares) e 4.2.3 (Análise Cromatográfica das Frações de EAq). Assim sendo, obteve-se o extrato aquoso não irradiado (**ENI***) e, por sua vez, as frações **FB***, **FF***, **FA*** e **FS*** correspondentes, conforme Figura II.2 (p. 27).

4.3.1. Fracionamento Cromatográfico de **FB***

O fracionamento da amostra **FB*** (aminoácidos, açúcares e ácidos orgânicos) ainda está sendo estudado; resultados não foram concluídos.

4.3.2. Fracionamento Cromatográfico de **FF***

Com a finalidade de isolar e identificar os fitoconstituintes presentes nas folhas de *Echinodorus macrophyllus* Mich., realizou-se um fracionamento semi-preparativo da fração **FF***.

Utilizando o sistema isocrático citado no item 4.2.3.2, foi preparado uma solução contendo dois solventes, (**A**) metanol e (**B**) água:ácido trifluoroacético (99,5:0,5 v/v) com uma concentração final de 70% de **B**, visto que o cromatógrafo é composto por apenas uma bomba.

Operando com volume de injeção de 2 mL, aplicados manualmente e fluxo constante de 4,7 mL/min, de acordo com as especificações “Scale-up” linear da coluna DYNAMAX MICROSORB C 18 10C-5, 250 x 10,0 mm (VARIAN) utilizada, os cromatogramas foram obtidos a $\lambda = 280$ nm e armazenados utilizando o software PC/Chrom+. Os fitoconstituintes foram separados manualmente, liofilizados e pesados conforme mostrado na Tabela II.2 (p. 32).

Tabela II.2. Fracionamento da fração **FF*** do **ENI** e suas propriedades físicas

Fitoconstituente	Massa (mg)	Tempo de Retenção (min.)	p.f (°C)
F01	2,80	9,75	-
F02	4,50	14,08	-
F03	5,70	15,77	-
F04	8,30	17,28	-
F05	26,10	29,27	197,0-202,2

A fração **F01** apresentou-se como um sólido marrom. CLAE $t_r = 9,75$ min; UV (nm) $\lambda_{\max} = 280,73$ e $311,72$. IV (ATR cm^{-1}) ν 3243, 2942, 1667, 1590, 1515, 1435, 1290, 1261, 1186, 1131, 1028, 799 e 722.

A fração **F02** apresentou-se como um sólido marrom. CLAE $t_r = 14,08$ min; UV (nm) $\lambda_{\max} = 311,52$. IV (ATR cm^{-1}) ν 3321, 2934, 1671, 1625, 1604, 1514, 1438, 1192, 1138, 1094, 978, 797, 722 e 699.

A fração **F03** apresentou-se como um sólido marrom e foi identificado com **ácido *trans*-ferúlico**. CLAE $t_r = 15,77$ min; UV (nm) $\lambda_{\max} = 288,09$ e $349,53$. IV (ATR cm^{-1}) ν 3434, 2941, 1666, 1619, 1599, 1515, 1432, 1275, 1184, 1135, 1033, 850, 801 e 723. RMN de ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) δ_c 167,9, 149,0, 147,8, 144,4, 125,7, 122,7, 115,6, 115,4, 111,1 e 55,6.

A fração **F04** apresentou-se como um sólido marrom. CLAE $t_r = 17,28$ min; UV (nm) $\lambda_{\max} = 220,97$ e $293,31$. IV (ATR cm^{-1}) ν 3262, 1651, 1606, 1490, 1443, 1348, 1265, 1185, 1133, 1079, 1021, 840, 799 e 722.

A fração **F05** apresentou-se como um sólido marrom, com p.f = 197,0-202,2 °C. CLAE $t_r = 29,27$ min; UV (nm) $\lambda_{\max} = 221,0$ e $295,65$. IV (ATR cm^{-1}) ν 3240, 1645, 1607, 1574, 1488, 1440, 1353, 1247, 1182, 1079, 1019, 830 e 722. RMN de ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) δ_c 181,9, 163,5, 163,2, 161,1, 160,6, 156,1, 128,4, 128,4, 121,0, 115,9, 115,9, 108,8, 103,3, 102,7, 93,5, 81,5, 78,9, 73,0, 70,5, 70,1 e 61,4.

4.3.3. Fracionamento Cromatográfico de FA*

O fracionamento da amostra **FA*** (alcalóides) está sendo estudado ainda; resultados não foram concluídos.

4.3.4. Fracionamento Cromatográfico de FS*

O fracionamento da amostra **FS*** (saponinas) está sendo estudado ainda; resultados não foram concluídos.

CAPÍTULO III:

RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Análise por CLAE das Frações Obtidas das Folhas de *Echinodorus*
*macrophyllus***

1. Análise das Frações Fenólicas (FF)

A Fração Fenólica (FF) apresentou coloração amarela e testes químicos positivos para estruturas flavonoídicas (flavonas, flavonóis e xantonas). A Figura III.1 (p. 36) mostra o cromatograma de CLAE a 280 nm da fração fenólica das folhas de *Echinodorus macrophyllus* Mich. não submetida à irradiação gama (FF₀) e a Tabela III.1 mostra os valores de tempo de retenção (TR), área e intensidade dos picos do cromatograma de CLAE correspondente. Ampliações do cromatograma de CLAE de FF₀ a 280 nm são mostrados na Figura III.2 (p. 37). O cromatograma de FF₀ apresenta 19 picos, indicando tratar-se de uma mistura rica em estruturas fenólicas. O pico 12 registrado em TR = 9,13 min é o mais intenso, seguido decrescentemente pelos picos 19 e 7 (TR = 27,08 e 5,87 min, respectivamente). Os demais picos correspondem a substâncias fenólicas com pequenas proporções relativas em FF₀.

A Figura III.3 (p. 38) mostra o cromatograma de CLAE a 254 nm de FF₀ e a Tabela III.2 mostra os valores de TR, área e intensidade dos picos do cromatograma de CLAE correspondente. Ampliações do cromatograma de CLAE de FF₀ a 254 nm são mostrados na Figura III.4 (p. 39). O pico 12 registrado em TR = 9,13 min é também o mais intenso, porém seguido decrescentemente pelos picos 7 e 19 (TR = 5,87 e 27,08 min, respectivamente). Os demais picos correspondem a substâncias fenólicas com pequenas proporções relativas em FF₀.

No cromatograma de CLAE de FF₀ a 254 nm (Figura III.3), os picos 6, 7 e 16 (TR = 5,51, 5,87 e 14,16 min, respectivamente) apresentam maiores valores de área do que no cromatograma a 280 nm (Figura III.1). Entretanto, na Figura III.3, não são observados os picos 4 e 11 (TR = 4,62 e 8,62 min) presentes no cromatograma da Figura III.1. Portanto, o cromatograma a 280 nm apresenta-se mais apropriado para as análises e para o isolamento por CLAE dos constituintes fenólicos de FF₀.

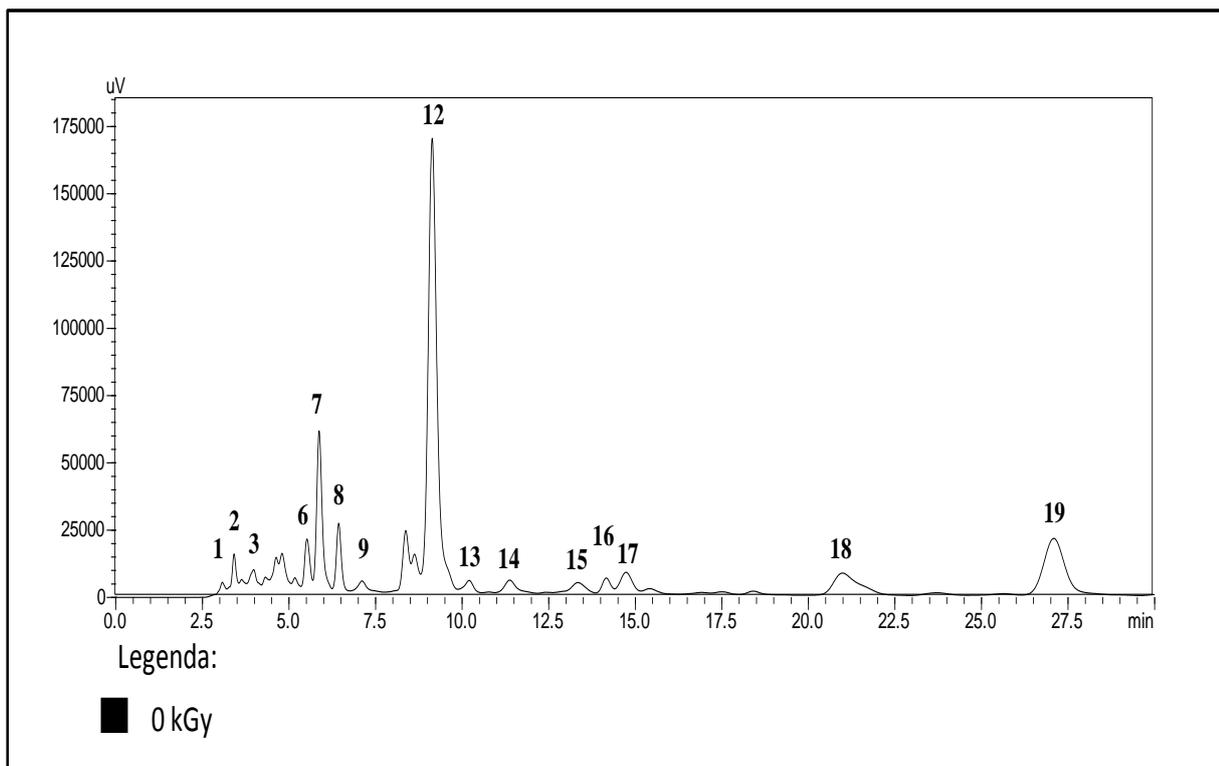


Figura III.1. Cromatograma de CLAE de FF_0 a 280 nm em TR entre 0,0 e 30,0 min.

Tabela III.1. Valores de tempo de retenção (TR, min), área e intensidade dos picos do cromatograma de CLAE de FF_0 a 280 nm mostrado na Figura III.1

Energia de irradiação = 0 kGy							
Picos	TR	Área	Intensidade	Picos	TR	AR	Intensidade
1	3,07	26.608,4	3.332,9	11	8,62	182.503,7	13.904,8
2	3,41	77.850,9	11.744,5	12	9,13	3.018.210,8	168.584,1
3	3,97	57.009,1	5.412,6	13	10,20	83.713,6	4.471,0
4	4,62	75.175,3	8.805,2	14	11,37	112.038,9	4.731,7
5	4,79	110.532,9	10.616,5	15	13,34	106.755,4	3.785,5
6	5,51	180.376,2	17.842,7	16	14,16	88.305,2	5.365,3
7	5,87	640.180,1	58.415,1	17	14,73	163.576,0	7.195,8
8	6,43	237.828,6	24.767,0	18	20,98	417.447,5	8.174,6
9	7,11	66.455,5	3.866,1	19	27,08	922.350,8	21.106,8
10	8,37	281.674,1	22.637,4				

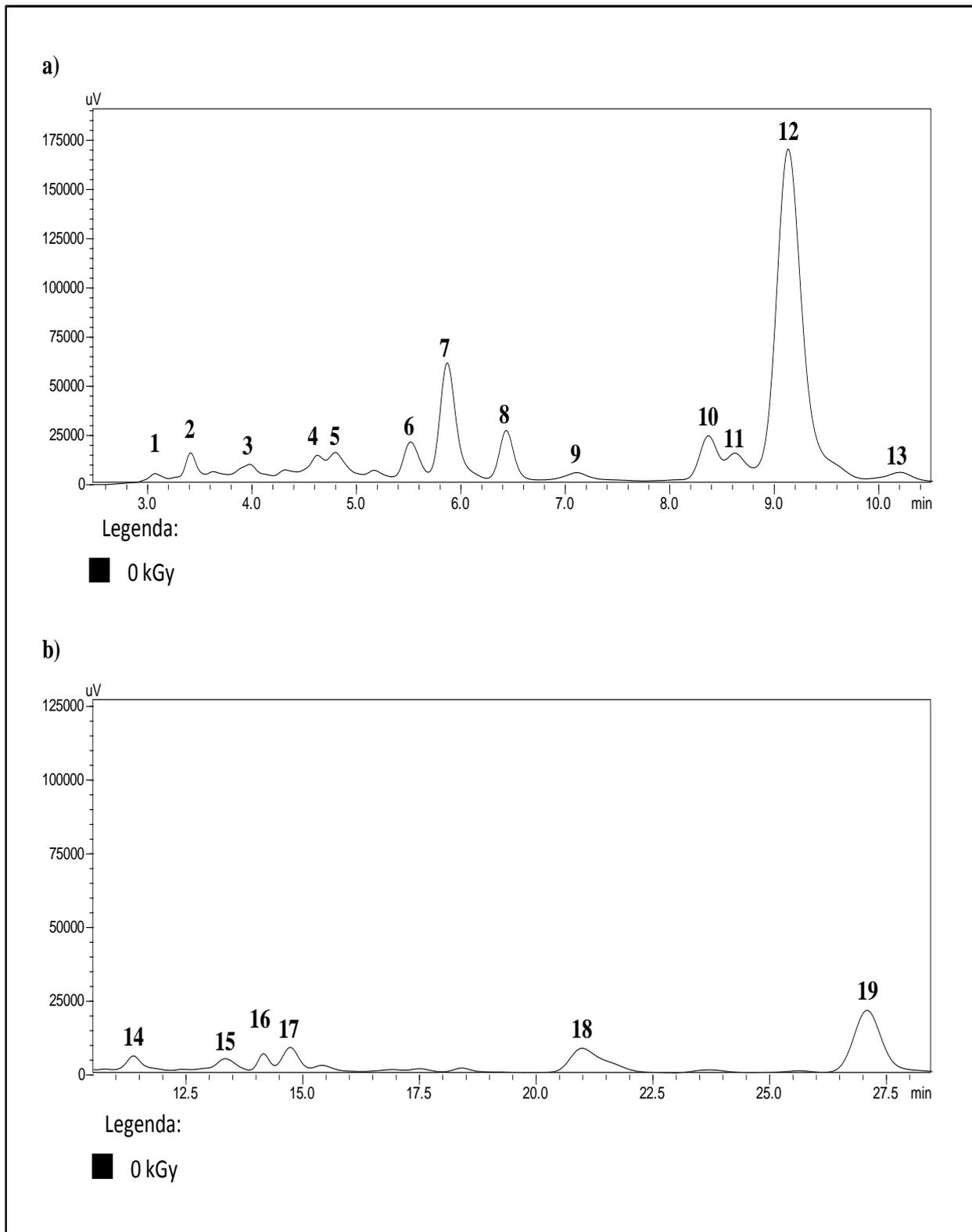


Figura III.2. Ampliações do cromatograma de CLAE de FF_0 a 280 nm: (a) ampliação em TR entre 2,5 – 10,5 min e (b) ampliação em TR entre 10,5 – 28,5 min.

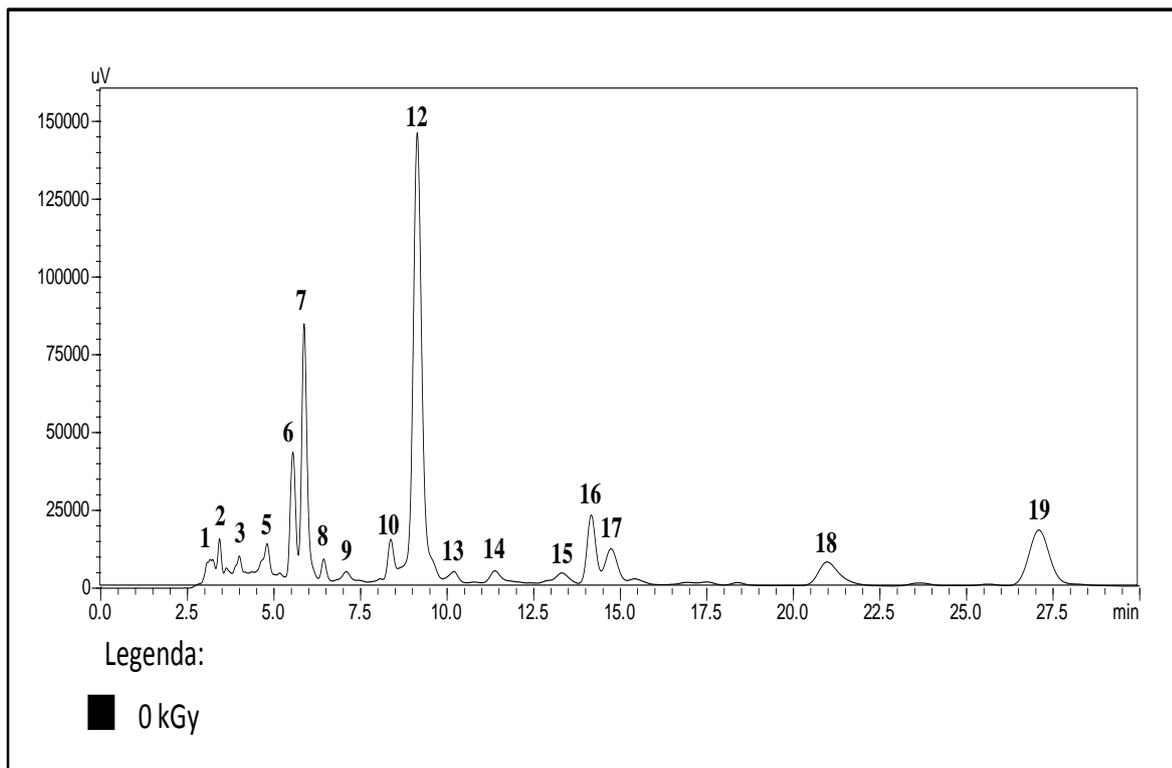


Figura III.3. Cromatograma de CLAE de FF_0 a 254 nm em TR entre 0,0 e 30,0 min.

Tabela III.2. Valores de tempo de retenção (TR, min), área e intensidade dos picos do cromatograma de CLAE de FF_0 a 254 nm mostrado na Figura III.3

Energia de irradiação = 0 kGy							
Picos	TR	Área	Intensidade	Picos	TR	AR	Intensidade
1	3,15	70.223,6	4.678,2	11	-	-	-
2	3,42	60.978,7	10.270,5	12	9,13	2.587.568,1	143.954,0
3	4,00	10.221,8	3.108,1	13	10,19	67.973,3	3.460,1
4	-	-	-	14	11,38	93.258,3	3.862,5
5	4,80	38.796,8	5.929,9	15	13,31	95.908,5	3.318,9
6	5,54	428.499,3	40.304,0	16	14,16	379.714,5	21.708,0
7	5,87	899.116,2	81.902,9	17	14,73	243.804,3	10.521,6
8	6,43	64.329,2	6.801,9	18	20,97	336.224,3	7.640,7
9	7,08	44.369,5	2.875,6	19	27,08	762.113,8	17.863,9
10	8,37	175.729,2	12.979,5				

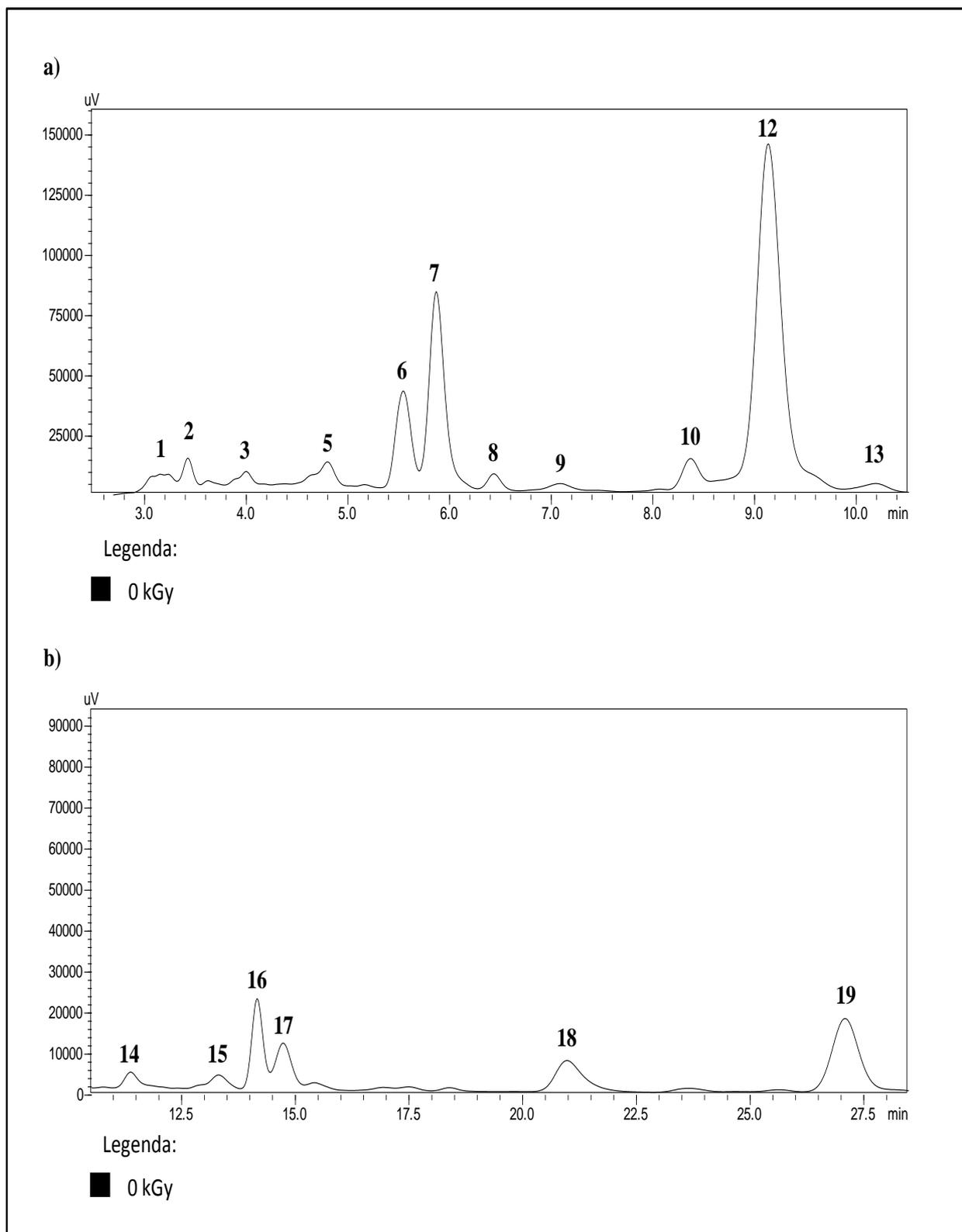


Figura III.4. Ampliações do cromatograma de CLAE de FF_0 a 254 nm: (a) ampliação em TR entre 2,5 – 10,5 min e (b) ampliação em TR entre 10,5 – 28,5 min.

A Figura III.5 (p. 41) mostra os cromatogramas de CLAE a 280 nm das frações fenólica das folhas da planta submetidas à irradiação gama sob energias de 1,0, 3,0, 5,0, 10,0 e 20,0 kGy (**FF₁**, **FF₃**, **FF₅**, **FF₁₀** e **FF₂₀**, respectivamente), comparados com o cromatograma correspondente de **FF₀** (mostrado anteriormente na Figura III.1). Ampliações destes cromatogramas são mostradas na Figura III.6 (p. 42). Tabelas com os valores de TR, área e intensidade dos picos dos cromatogramas de CLAE de **FF₁**, **FF₃**, **FF₅**, **FF₁₀** e **FF₂₀** são mostrados nos Anexos A-1 a A-5 (p. 91-93), respectivamente. Por sua vez, a Figura III.7 (p. 43) mostra os cromatogramas de CLAE a 254 nm de **FF₁**, **FF₃**, **FF₅**, **FF₁₀** e **FF₂₀** comparados também com o cromatograma correspondente de **FF₀** (mostrado anteriormente na Figura III.2). Ampliações destes cromatogramas são mostradas na Figura III.8 (p. 44). Tabelas com os valores de TR, área e intensidade dos picos dos cromatogramas de CLAE de **FF₁**, **FF₃**, **FF₅**, **FF₁₀** e **FF₂₀** são mostrados nos Anexos A-6 a A-10 (p. 93-95), respectivamente.

Os cromatogramas de CLAE de **FF₁**, **FF₃**, **FF₅**, **FF₁₀** e **FF₂₀** tanto em 280 nm quanto em 254 nm mostram algumas alterações em relação ao cromatograma de CLAE correspondente de **FF₀**. De um modo geral, a grande maioria dos picos diminui as suas proporções relativas quando ocorre um aumento da energia de irradiação gama sob as amostras. A diminuição dos valores das áreas com o aumento da energia de irradiação gama sob as amostras torna-se bem acentuada para os picos 10, 14, 17, 18 e 19 (TR = 8,37, 11,37, 14,73, 20,98 e 27,08 min, respectivamente), conforme mostrado no gráfico (a) da Figura III.9 (p. 45), mesmo quando a amostra é submetida à irradiação gama sob energia de 1 kGy. Por outro lado, verifica-se um aumento do valor da área com o aumento da energia de irradiação gama sob as amostra para o pico 2 (TR = 3,40 min), gráfico (b) Figura III.9 (p. 45), indicando que a substância pode ser um produto radiolítico (provavelmente derivado de glicose, ácido fórmico ou aldeído acético) que, por serem extremamente polares, apresentam tempos de retenção relativamente baixos.

Além disso, os cromatogramas de CLAE mostram uma variação da proporção relativa dos picos 7 e 12 (TR = 5,87 e 9,13 min, respectivamente), gráfico (c) Figura III.9 (p. 45) porém sendo registrados mesmo quando a amostra é irradiada com energia de 20 kGy. Desta forma, pode-se considerar que estas substâncias sofrem degradação por irradiação gama, porém permanecem constante com o aumento da energia.

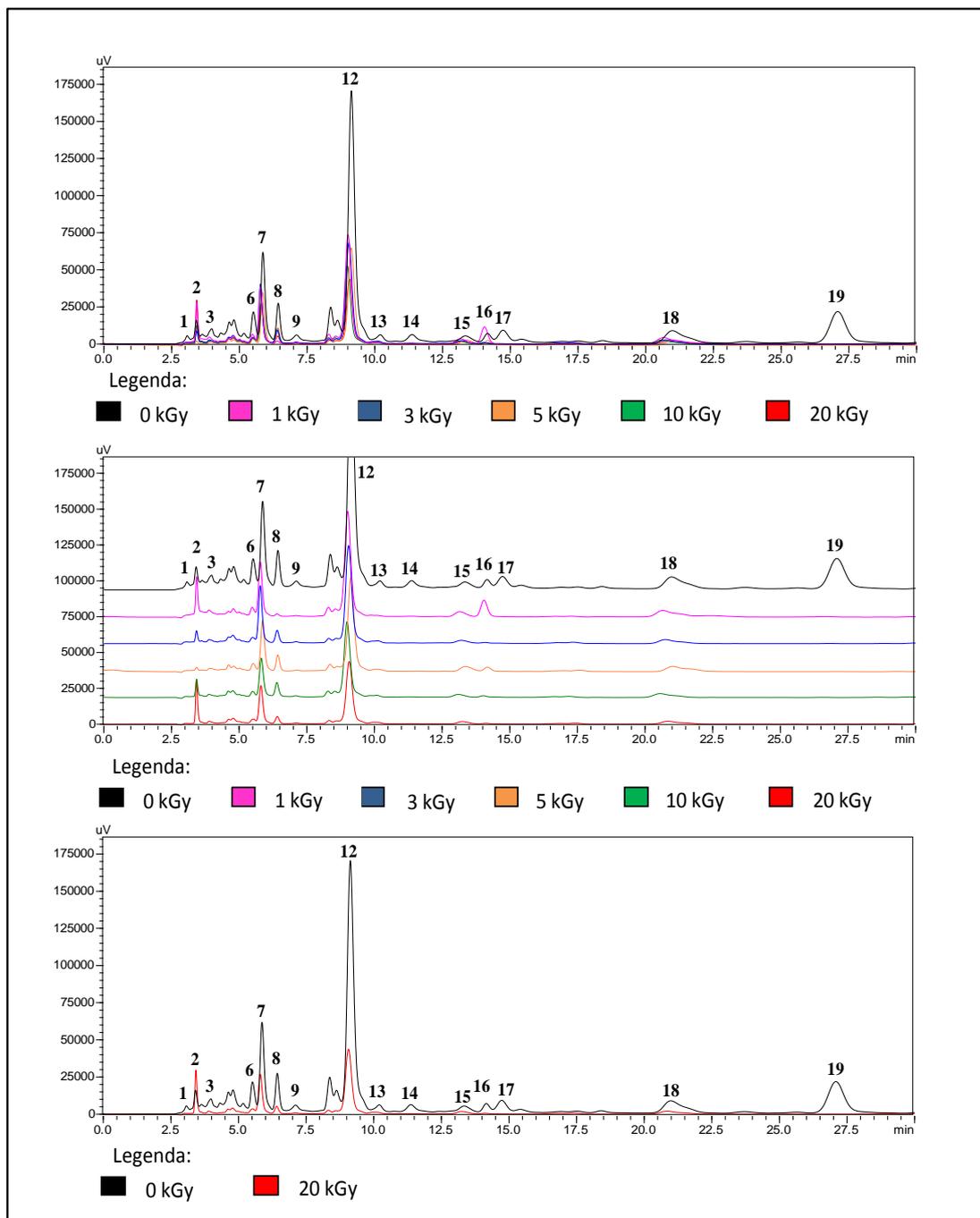


Figura III.5. Cromatogramas de CLAE a 280 nm de **FF₁**, **FF₃**, **FF₅**, **FF₁₀** e **FF₂₀** comparados com o cromatograma correspondente de **FF₀**.

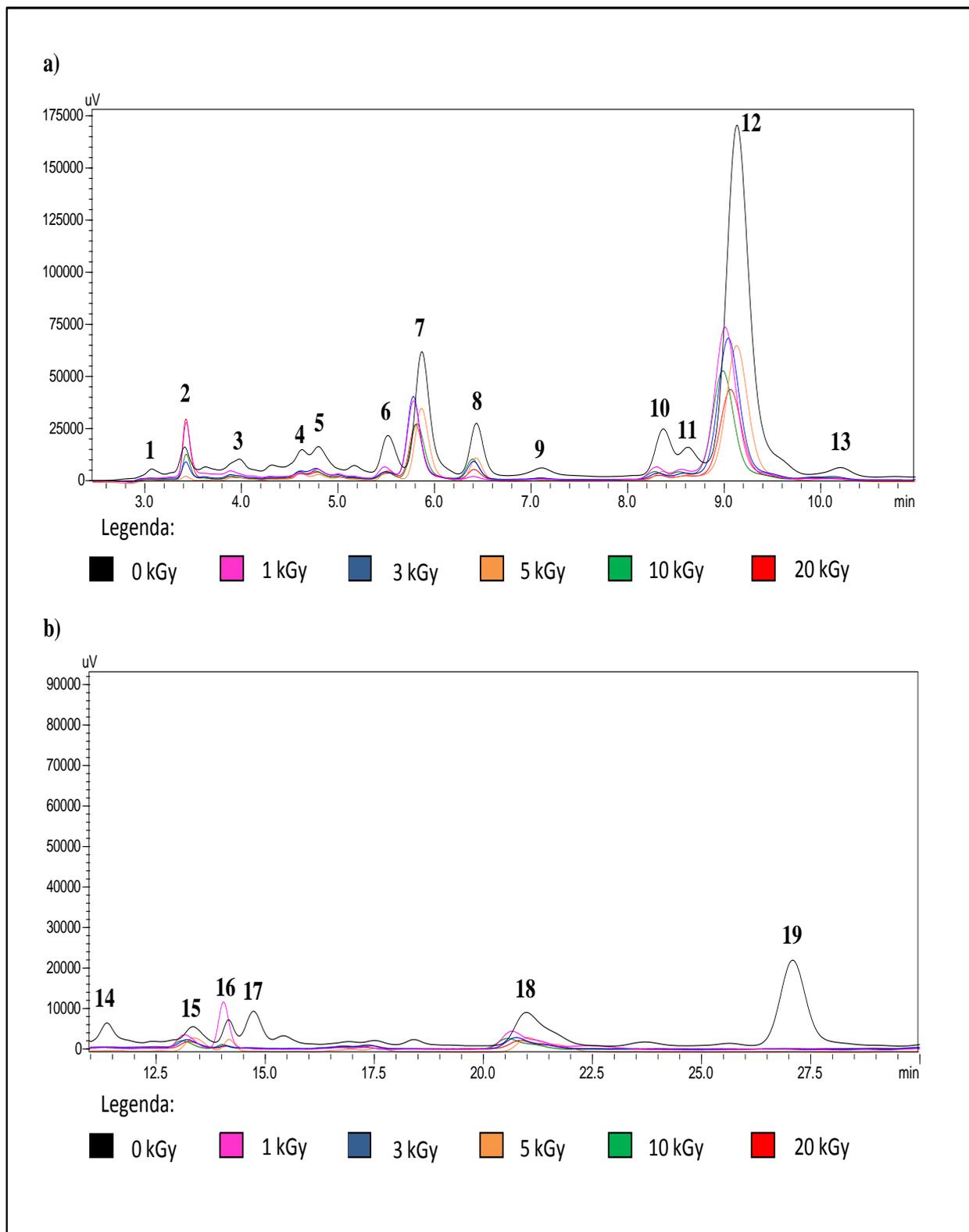


Figura III.6. Ampliações dos cromatogramas de CLAE a 280 nm de **FF₁**, **FF₃**, **FF₅**, **FF₁₀**, **FF₂₀** comparados com o cromatograma correspondente de **FF₀**: (a) ampliação em TR entre 2,4 – 11,0 min e (b) ampliação em TR entre 11,0 – 30 min.

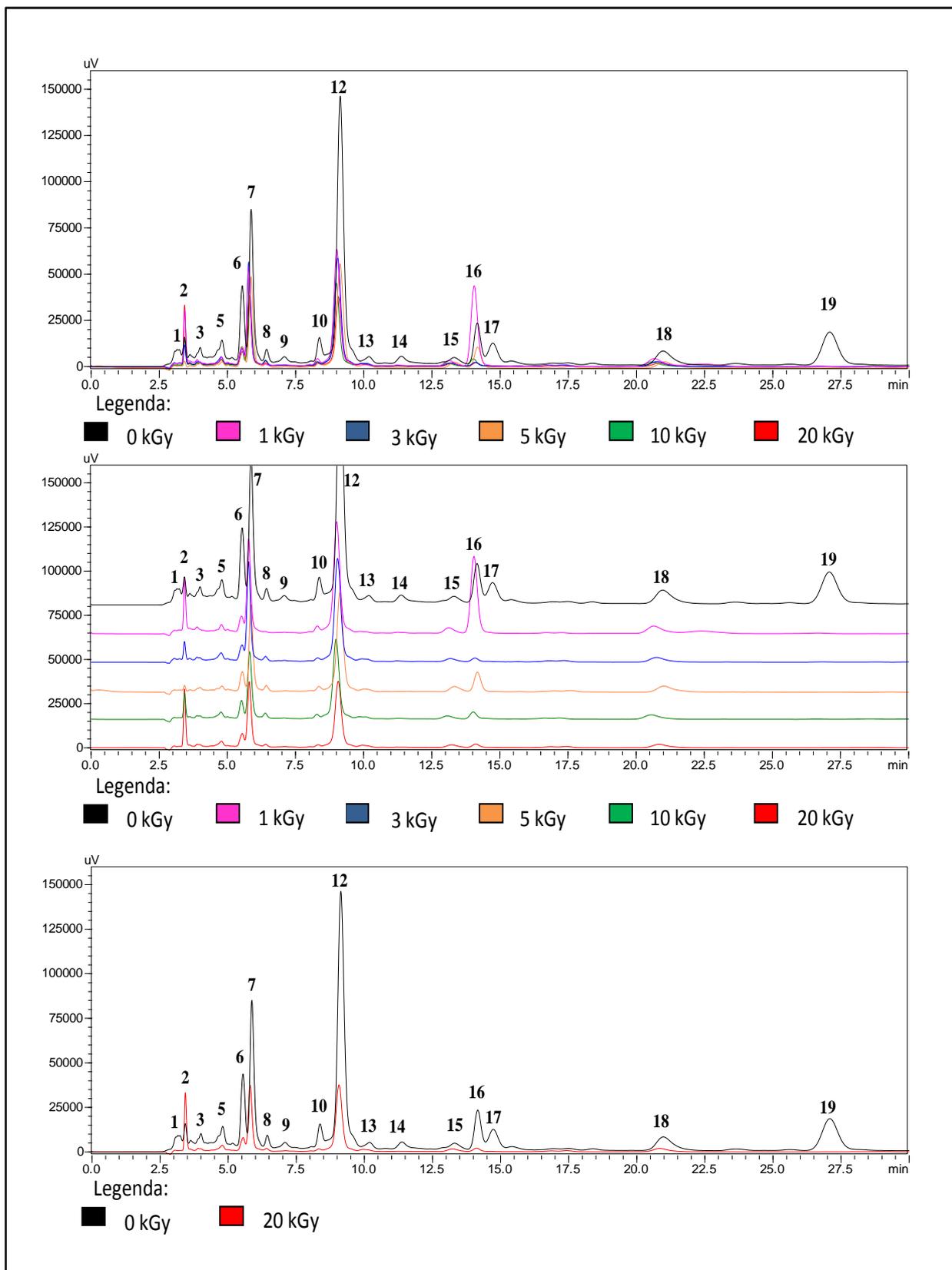


Figura III.7. Cromatogramas de CLAE a 254 nm de FF₁, FF₃, FF₅, FF₁₀ e FF₂₀ comparados com o cromatograma correspondente de FF₀.

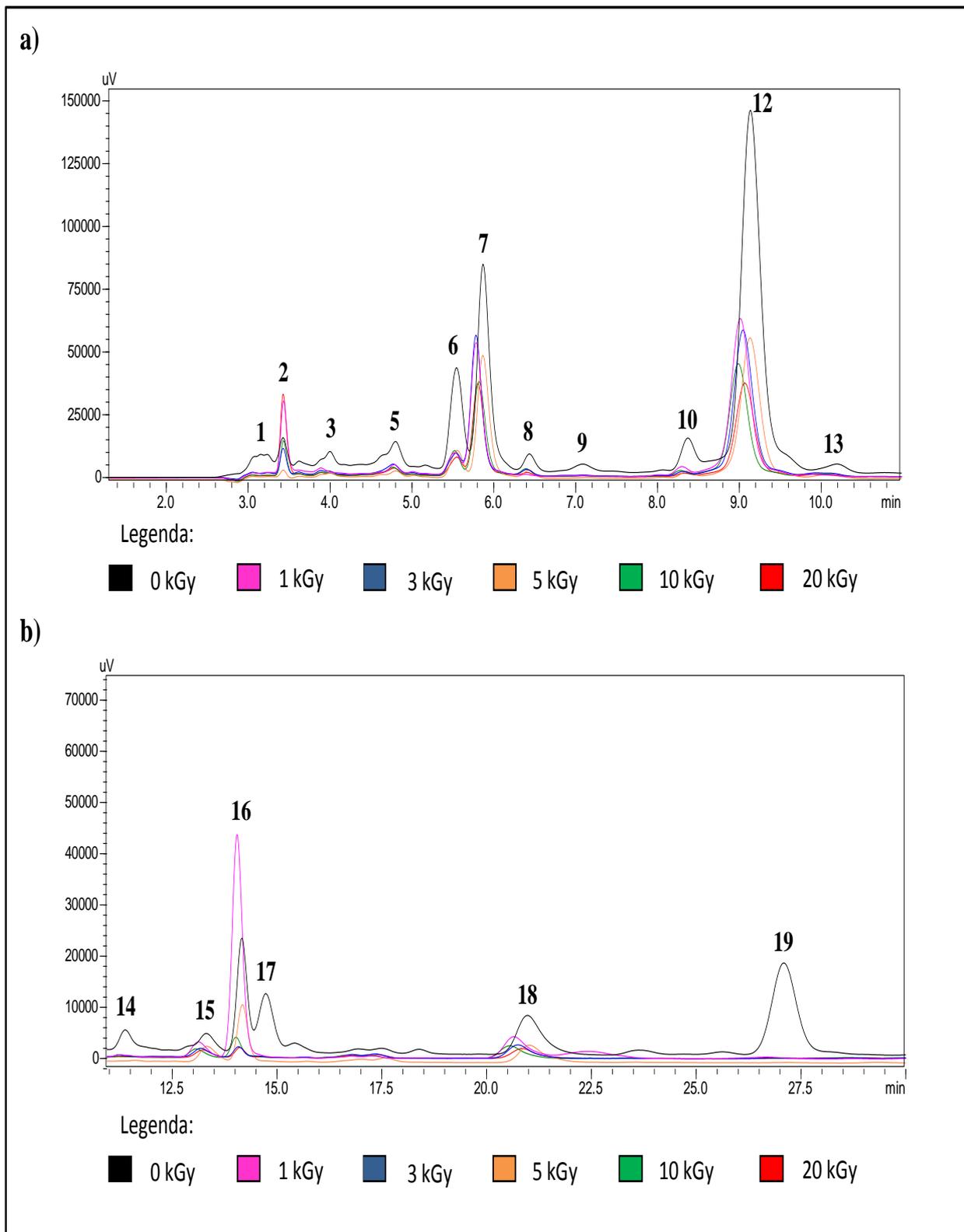


Figura III.8. Ampliações dos cromatogramas de CLAE a 254 nm de **FF₁**, **FF₃**, **FF₅**, **FF₁₀**, **FF₂₀** comparados com o cromatograma correspondente de **FF₀**: (a) ampliação em TR entre 1,4 – 11,0 min e (b) ampliação em TR entre 11,0 – 30,0 min.

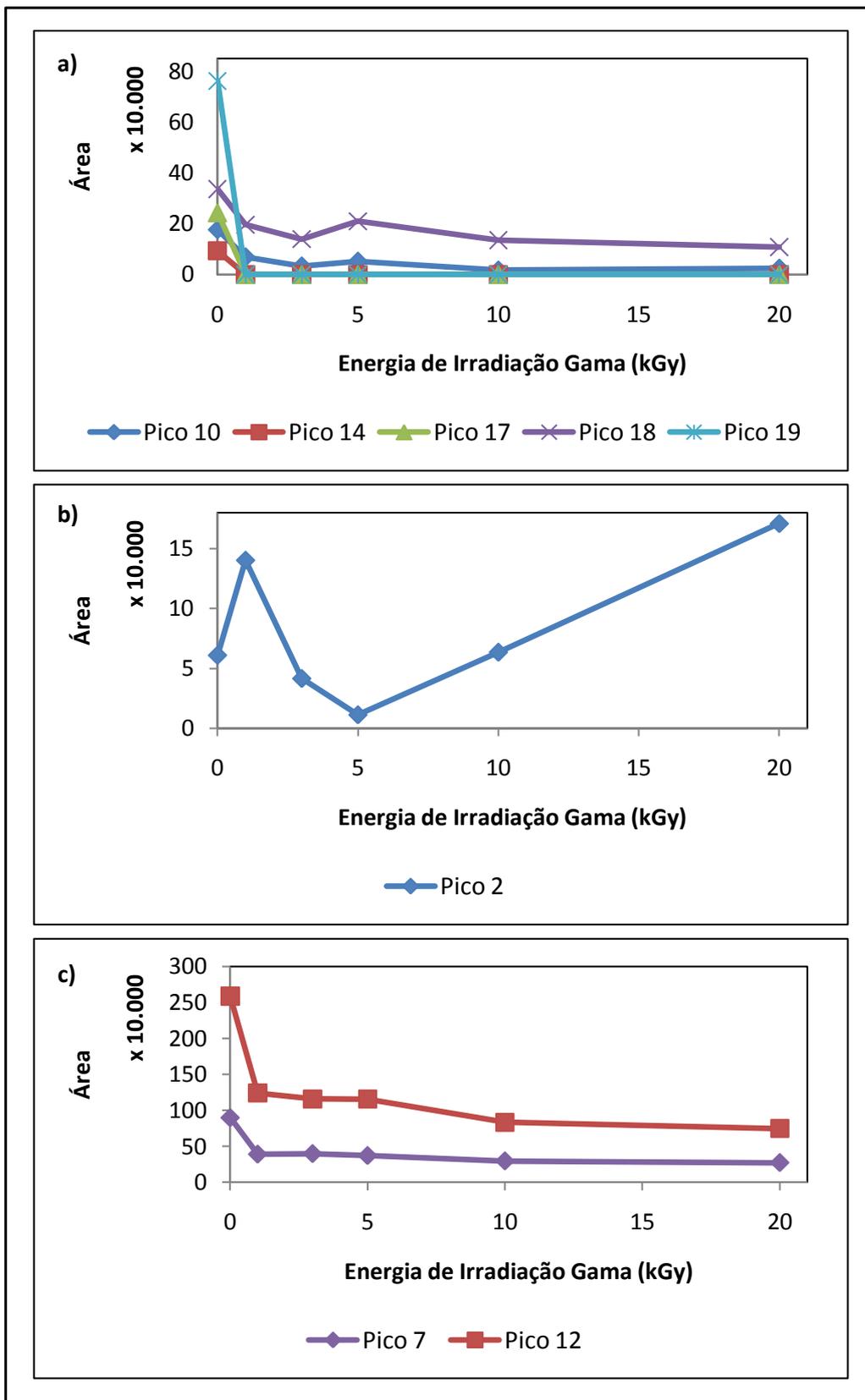


Figura III.9. Gráfico da variação da área de picos a 280 nm do cromatograma de CLAE de **FF** em função da energia de irradiação gama: (a) Picos 10, 14, 17, 18 e 19; (b) pico 2 e (c) picos 7 e 12.

2. Análise das Frações Alcaloídicas (FA)

A Fração Alcaloídica (FA) apresentou-se como uma solução incolor, precipitando um sólido branco na presença dos reagentes de Hager e Dragendorff nos testes químicos para alcalóides. A Figura III.10 (p. 47) mostra o cromatograma de CLAE a 280 nm da fração alcaloídica das folhas de *Echinodorus macrophyllus* Mich. não submetida à irradiação gama (FA₀) e a Tabela III.3 (p. 47) mostra os valores de TR, área e intensidade dos picos do cromatograma de CLAE correspondente. Ampliação do cromatograma de CLAE de FA₀ a 280 nm é mostrado na Figura III.11 (p. 48). O cromatograma de CLAE de FA₀ apresenta dois picos bastante intensos e bem definidos: o pico 1 registrado em TR = 2,83 min e o pico 2 mais intenso em TR = 3,88 min. O pico 1 foi registrado no denominado “tempo morto” da coluna (TR ~ 2,80 min), podendo ser uma impureza do solvente empregado na análise e não necessariamente um fitoconstituente presente nas folhas de *E. macrophyllus* Mich.

A presença de poucos constituintes alcaloídicos na espécie *Echinodorus macrophyllus* Mich. pode ser interessante sob o ponto de vista biológico, considerando que a maior partes dos alcalóides são classificados como substâncias tóxicas.

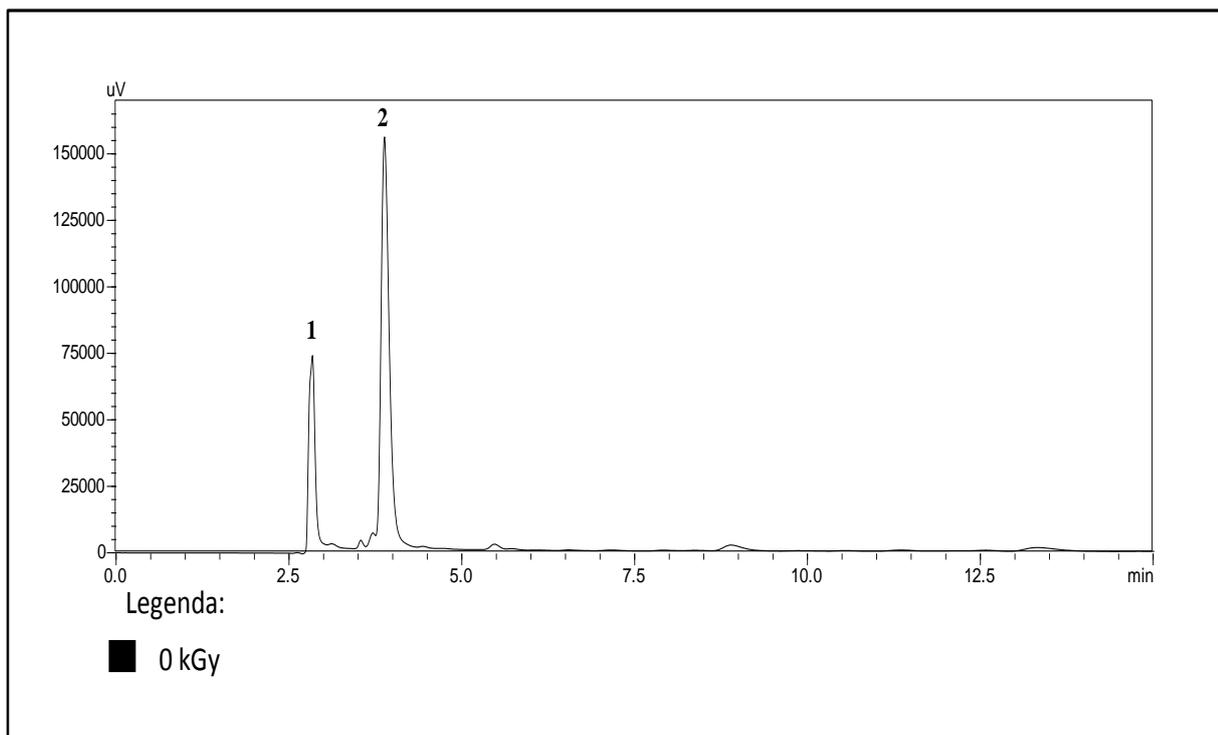


Figura III.10. Cromatograma de CLAE de FA_0 a 280 nm em TR entre 0,0 e 15,0 min.

Tabela III.3. Valores de tempo de retenção (TR, min), área e intensidade dos picos do cromatograma de CLAE de FA_0 a 280 nm mostrado na Figura III.5

Energia de irradiação = 0 kGy			
Picos	TR	Área	Intensidade
1	2,83	448.407,3	72.746,9
2	3,88	1.185.603,8	150.563,0

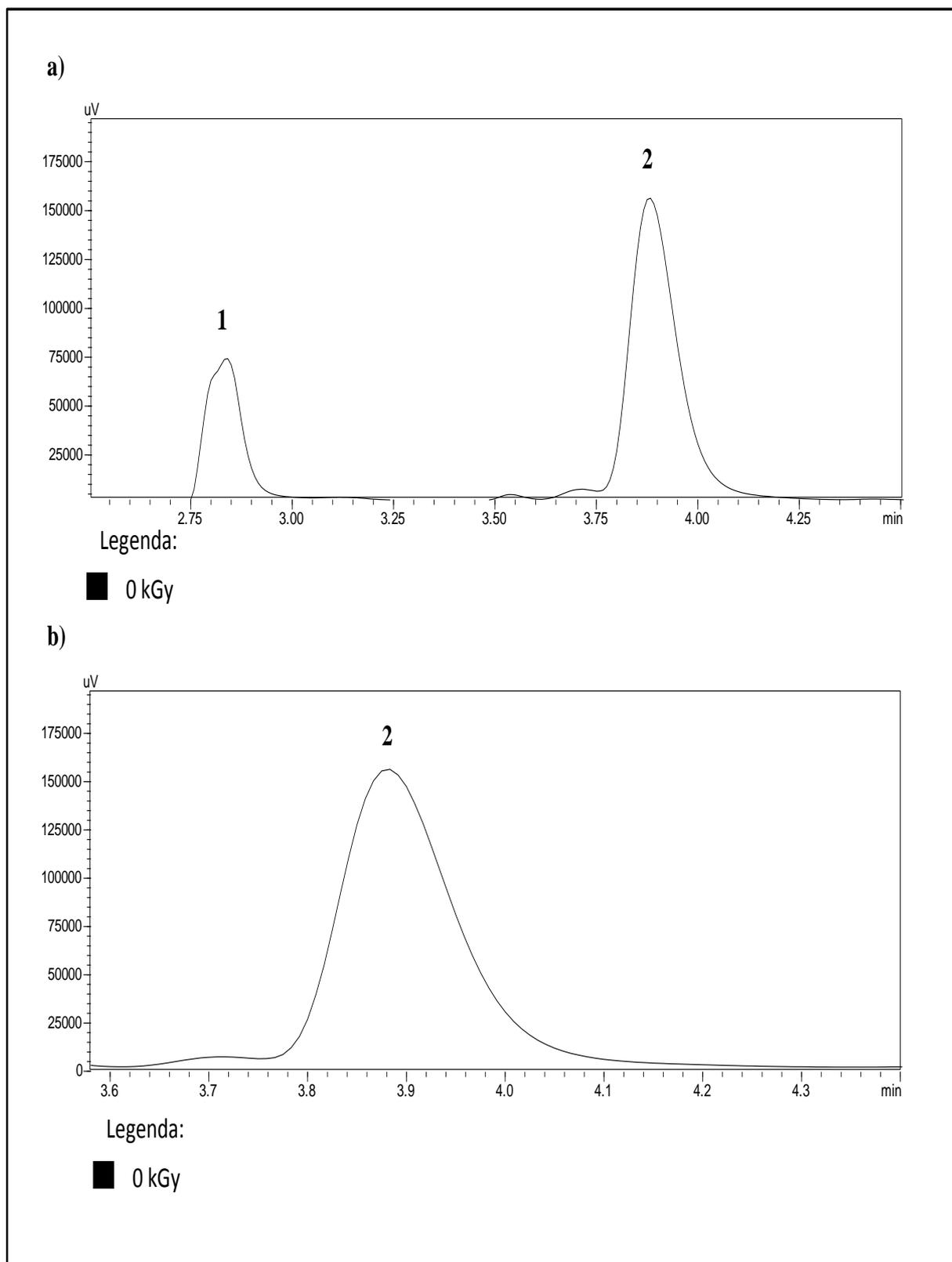


Figura III.11. Ampliações do cromatograma de CLAE de FA_0 a 280 nm: (a) ampliação em TR entre 2,5 – 4,5 min e (b) ampliação em TR entre 3,6 – 4,4 min.

Alíquotas das Frações Alcaloídicas (FA) das folhas de *E. macrophyllus* Mich. foram submetidas à irradiação gama a 1,0, 3,0, 5,0, 10,0, 20,0 kGy (FA₁, FA₃, FA₅, FA₁₀, FA₂₀, respectivamente). A Figura III.12 (p. 50) mostra os cromatogramas de CLAE a 280 nm das frações FA₁, FA₃, FA₅, FA₁₀ e FA₂₀, comparados com o cromatograma correspondente de FA₀ (mostrado anteriormente na Figura III.11). Ampliações destes cromatogramas são mostradas na Figura III.13 (p. 51). Tabelas com os valores de TR, área e intensidade dos picos dos cromatogramas de CLAE de FA₁, FA₃, FA₅, FA₁₀ e FA₂₀ são mostrados nos Anexos A-11 a A-15 (p. 96 e 97), respectivamente. Os cromatogramas da Figura III.12 mostram que o pico 2 (TR = 3,88 min) sofre variação em sua proporção na área das amostras quando submetida à irradiação, porém é observada mesmo sob irradiação a 20 kGy, também mostrado na Figura III.14. Por outro lado, um pico em TR = 4,49 min aparece a partir da amostra irradiação a 1 kGy, diminuindo sua proporção relativa com o aumento da energia de irradiação, tratando-se portanto de um produto radiolítico. Percebe-se também que tal produto radiolítico formado com maior intensidade quando submetida à irradiação gama a 1 kGy de intensidade de energia ocorre a diminuição de sua formação com o aumento da intensidade de energia irradiante.

Assim, mais estudos químicos e biológicos tornam-se apropriados para avaliar os possíveis efeitos adversos do material vegetal depois da utilização de energia de irradiação gama.

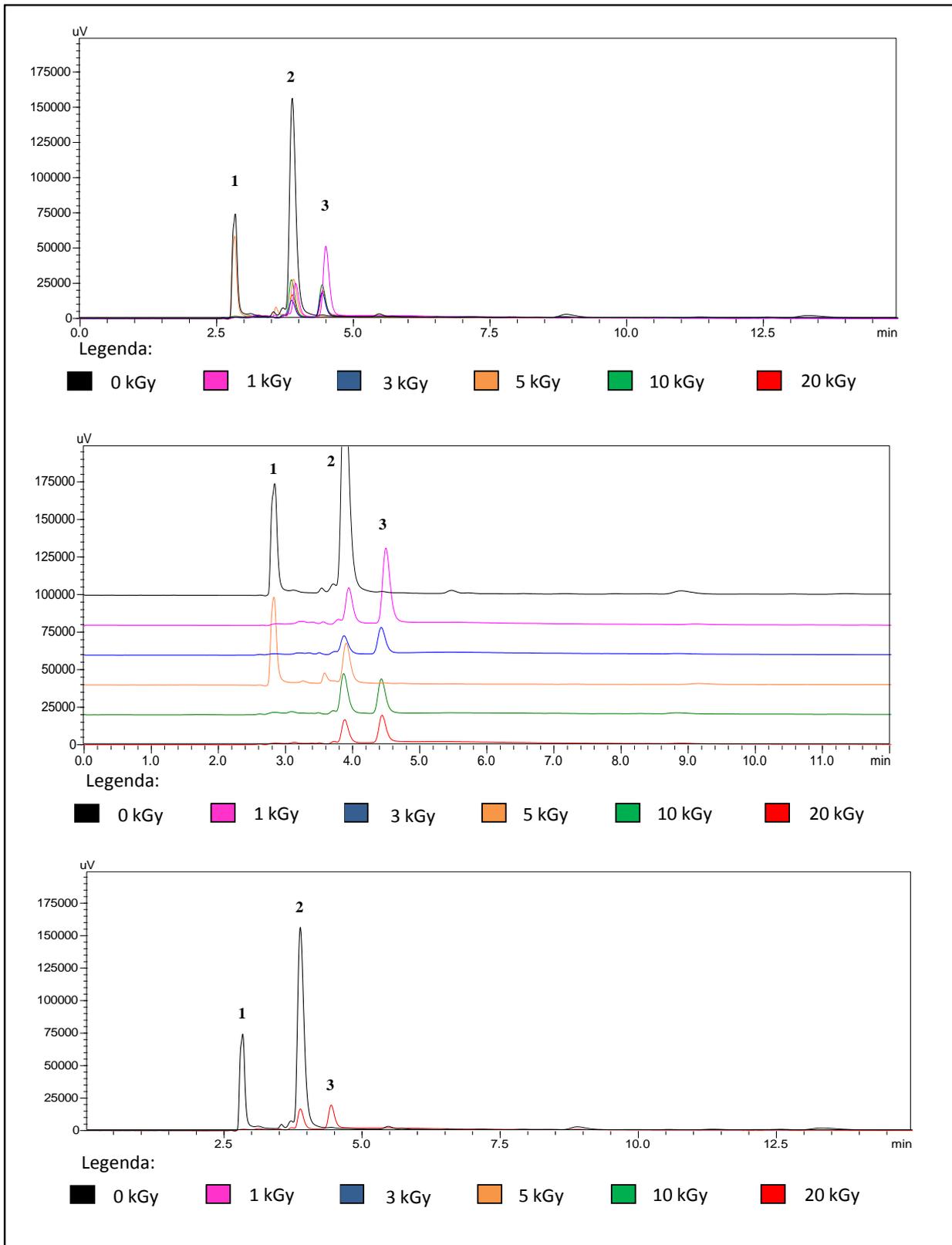


Figura III.12. Cromatogramas de CLAE a 280 nm de FA₁, FA₃, FA₅, FA₁₀ e FA₂₀ comparados com o cromatograma correspondente de FA₀.

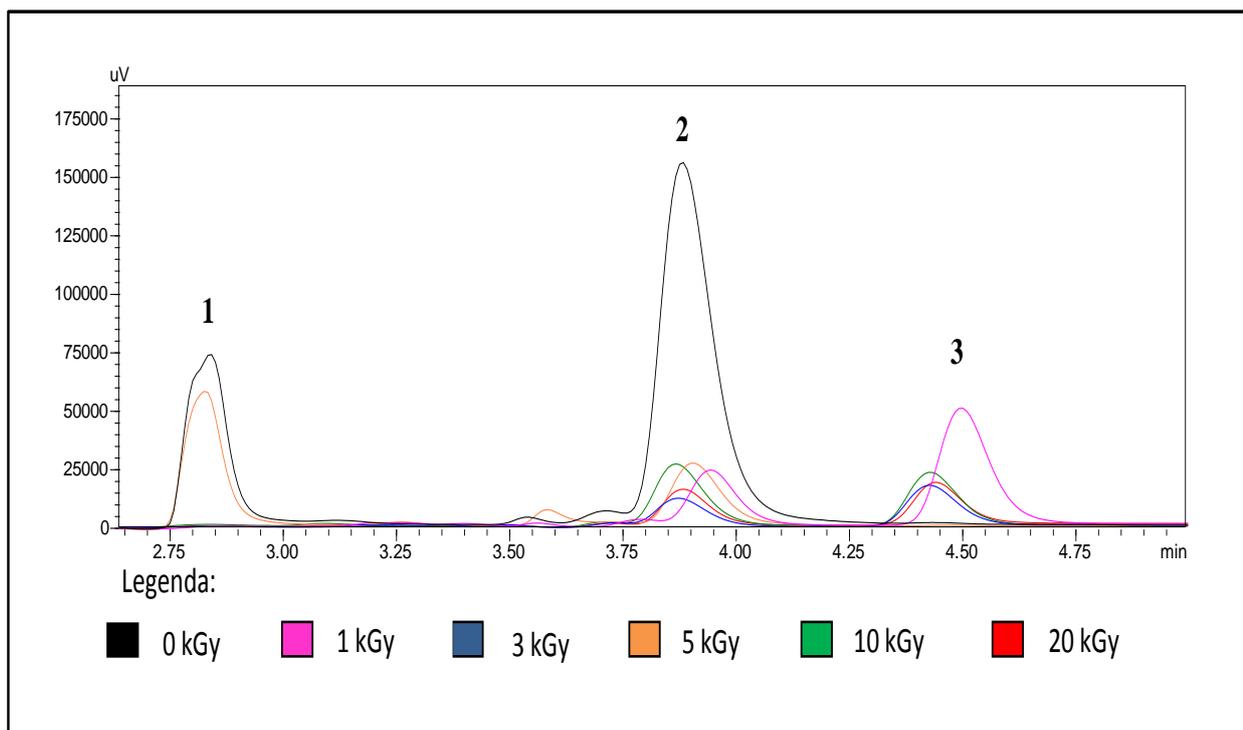


Figura III.13. Ampliação dos cromatogramas de CLAE a 280 nm de FA₁, FA₃, FA₅, FA₁₀, FA₂₀ comparados com o cromatograma correspondente de FA₀, TR entre 2,65 – 5,0 min.

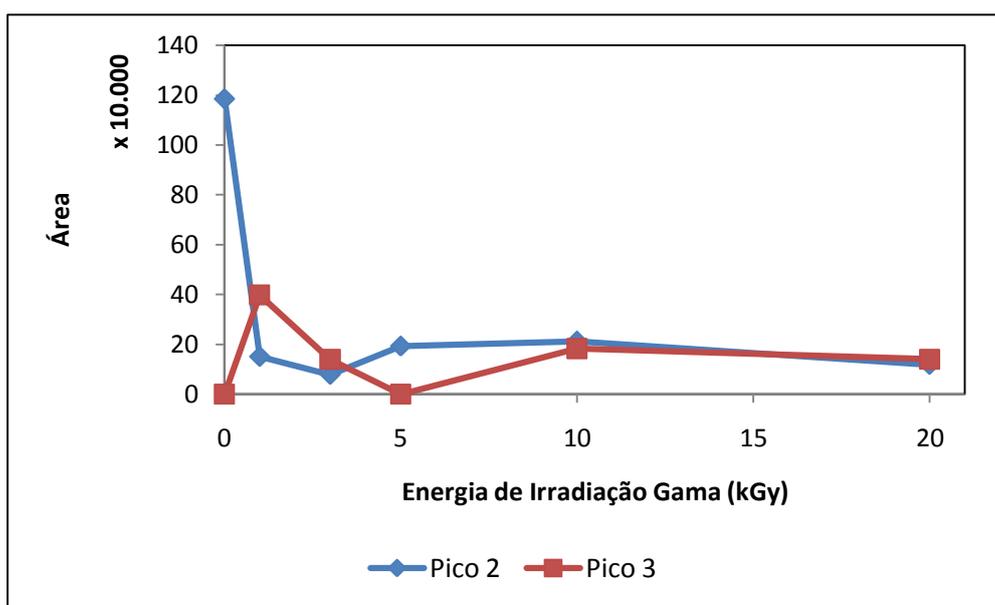


Figura III.14. Gráfico da variação da área dos picos 2 e 3 a 280 nm do cromatograma de CLAE de FA em função da energia de irradiação gama.

3. Análise das Frações Saponínicas (FS)

A Fração Saponínica (FS) apresentou uma coloração ligeiramente amarela em solução aquosa e, ao ser agitada vigorosamente, observou-se a formação de espuma, indicativa da presença de saponinas. A Figura III.15 mostra o cromatograma de CLAE a 210 nm da fração saponínica das folhas de *Echinodorus macrophyllus* Mich. não submetida à irradiação gama (FS₀) e a Tabela III.4 (p. 53) mostra os valores de TR, área e intensidade dos picos do cromatograma de CLAE correspondente. Ampliação do cromatograma de CLAE de FS₀ a 210 nm é mostrado na Figura III.16 (p. 53).

O cromatograma CLAE de FS₀ (Figura III.15) apresenta dois picos característicos de saponinas (TR = 5,75 e 7,95 min), sendo aquele de menor tempo de retenção significativamente mais intenso. O pico com TR = 2,80 min corresponde ao solvente (água) utilizado na diluição da amostra. O pico atribuído ao solvente foi confirmado pela semelhança com o cromatograma de CLAE da água, conforme mostrado no Anexo A-16 (p. 98).

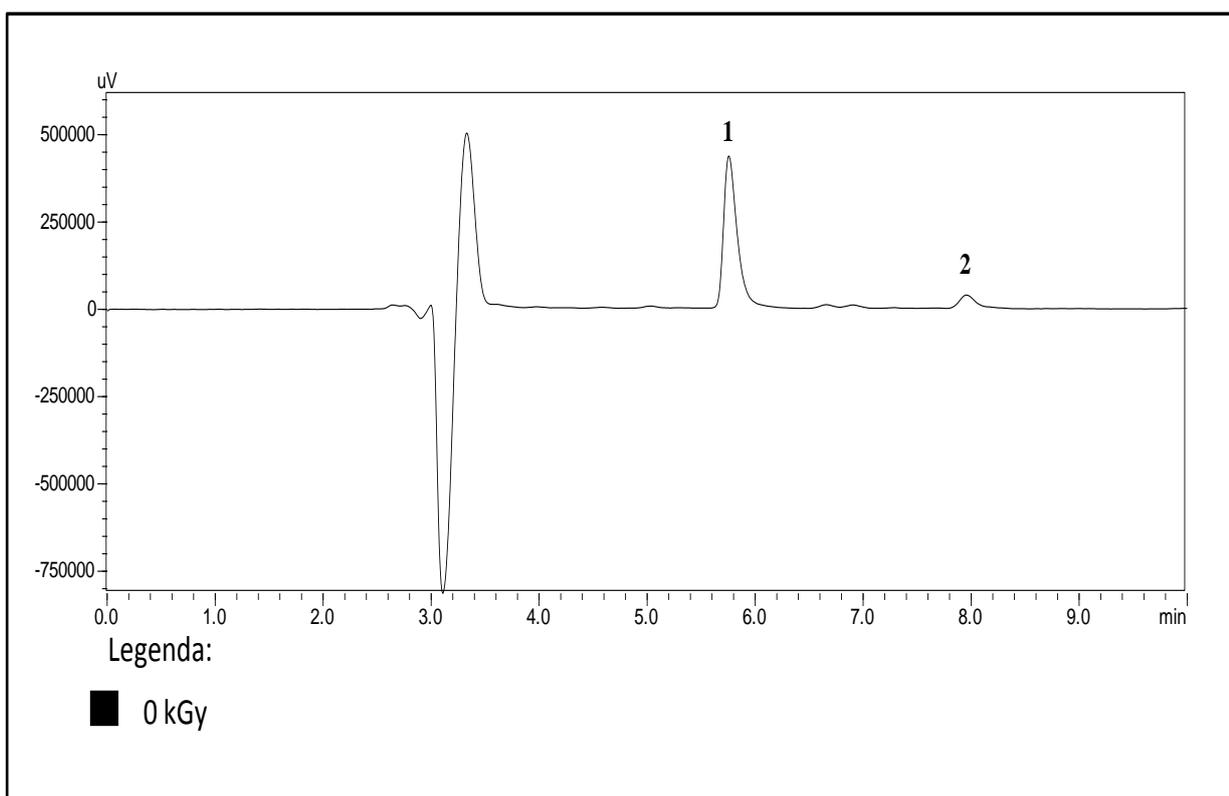


Figura III.15. Cromatograma de CLAE de FS₀ a 210 nm em TR entre 0,0 e 10,0 min.

Tabela III.4. Valores de tempo de retenção (TR, min), área e intensidade dos picos do cromatograma de **FS₀** mostrado na Figura III.7 a 210 nm

Energia de irradiação = 0 kGy			
Picos	TR	Área	Intensidade
1	5,75	3.837.940,9	435.408,1
2	7,95	409.964,2	37.971,1

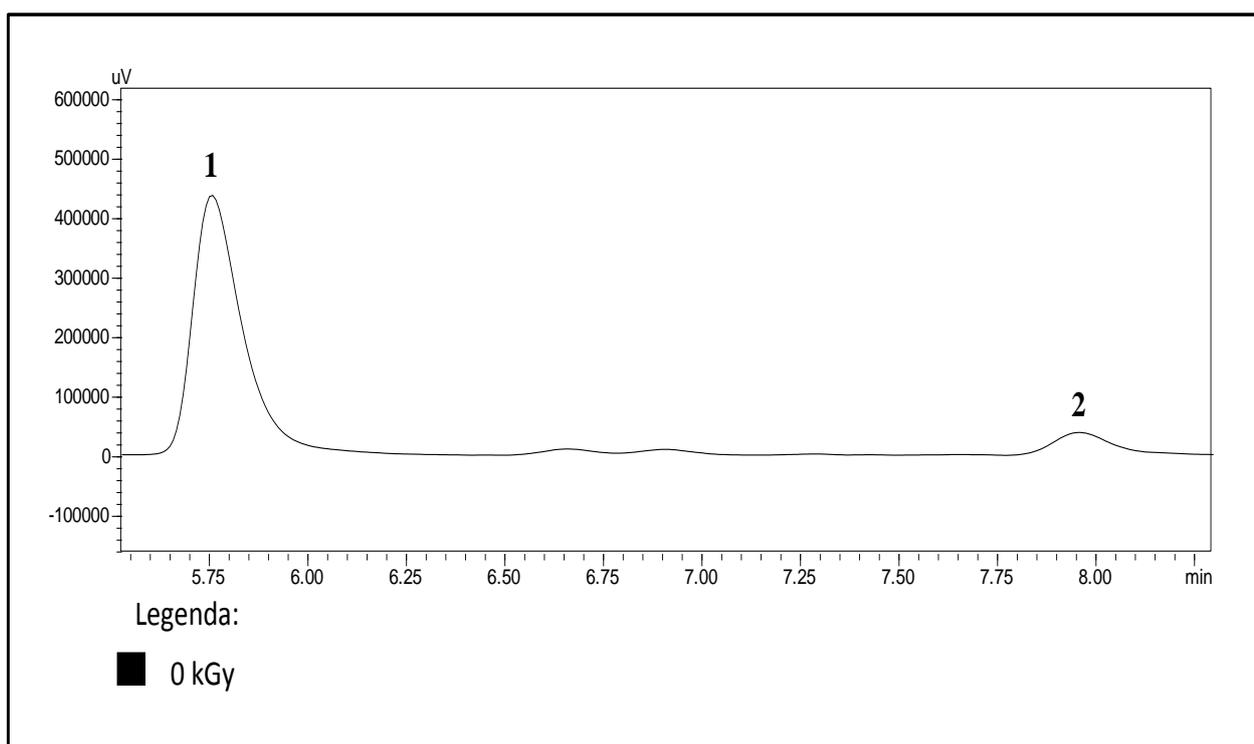


Figura III.16. Ampliação do cromatograma de CLAE de **FS₀** a 210 nm em TR entre 5,5 – 8,3 min.

Alíquotas das Frações Saponínicas (**FS**) das folhas de *E. macrophyllus* Mich. foram submetidas à irradiação gama a 1,0, 3,0, 5,0, 10,0, 20,0 kGy (**FS₁**, **FS₃**, **FS₅**, **FS₁₀**, **FS₂₀**, respectivamente). A Figura III.17 (p. 55) mostra os cromatogramas de CLAE a 210 nm das frações **FS₁**, **FS₃**, **FS₅**, **FS₁₀** e **FS₂₀**, comparados com o cromatograma correspondente de **FA₀**

(mostrado anteriormente na Figura III.16). Ampliações destes cromatogramas são mostradas na Figura III.18 (p. 56). Tabelas com os valores de TR, área e intensidade dos picos dos cromatogramas de CLAE de **FS₁**, **FS₃**, **FS₅**, **FS₁₀** e **FS₂₀** são mostrados nos Anexos A-17 a A-21 (p. 98-100), respectivamente.

No gráfico da Figura III.19 (p. 56) a intensidade do pico 1 (TR = 5,75 min) aumenta quando se aplica 1 e 5 kGy sobre as amostras. O aumento da concentração desse fitoconstituente com essa energia de radiação gama incidida pode ser explicado por uma melhoras na extração desse fitoconstituente com o uso de radiação gama. Porém, para as demais amostras (**FS₃**, **FS₁₀** e **FS₂₀**) ocorre diminuição da concentração do fitoconstituente. Também é observado na Figura III.19 que a intensidade do pico 2 (TR = 7,95 min) diminui com o aumento da energia de irradiação sob a amostra. A substância correspondente a este pico desaparece mesmo quando a amostra é submetida a 1,0 kGy, indicando tratar-se ser uma saponina muito instável sob estas condições experimentais.

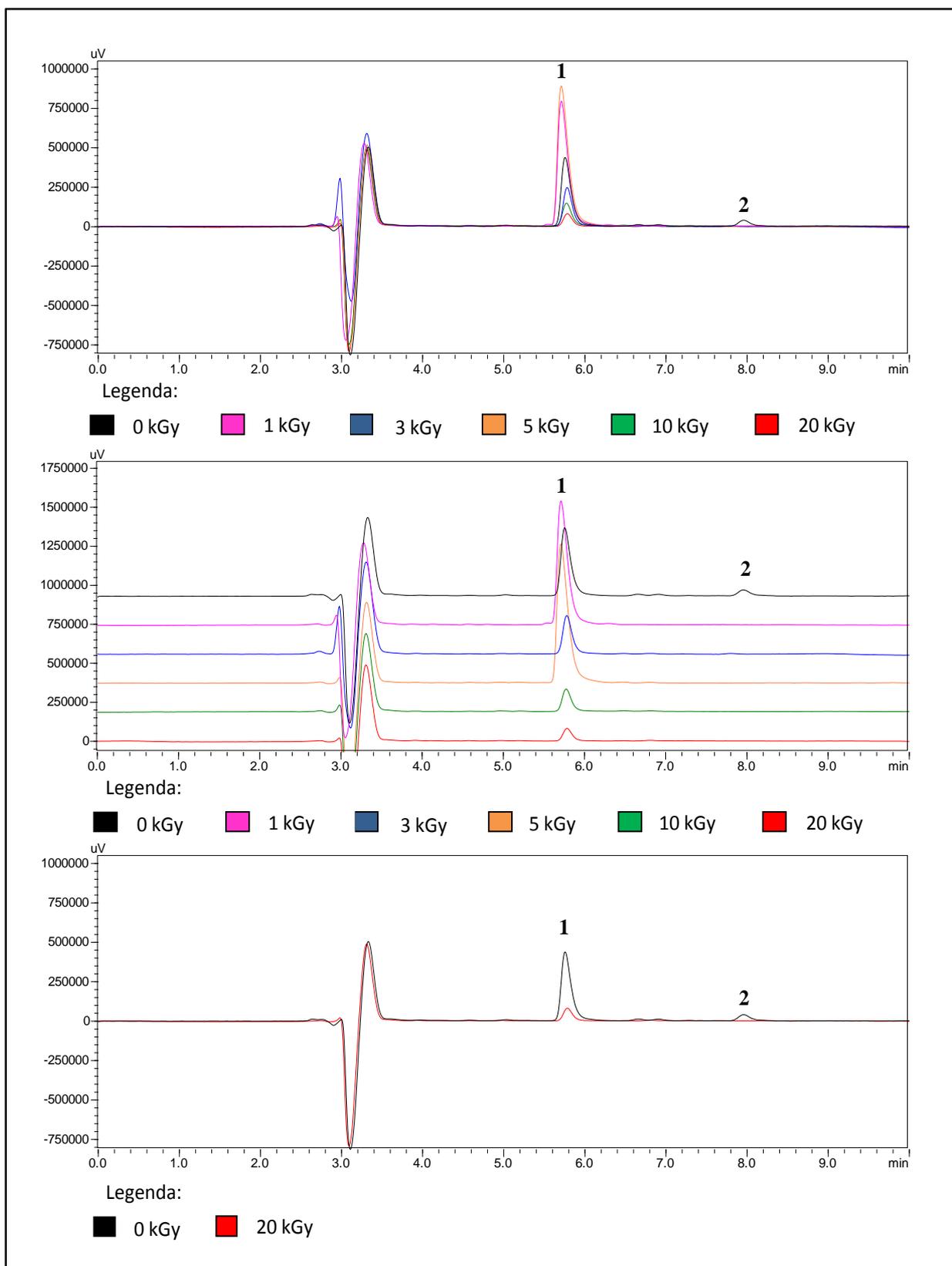


Figura III.17. Cromatogramas CLAE a 210 nm de FS₁, FS₃, FS₅, FS₁₀ e FS₂₀ comparados com o cromatograma correspondente de FS₀.

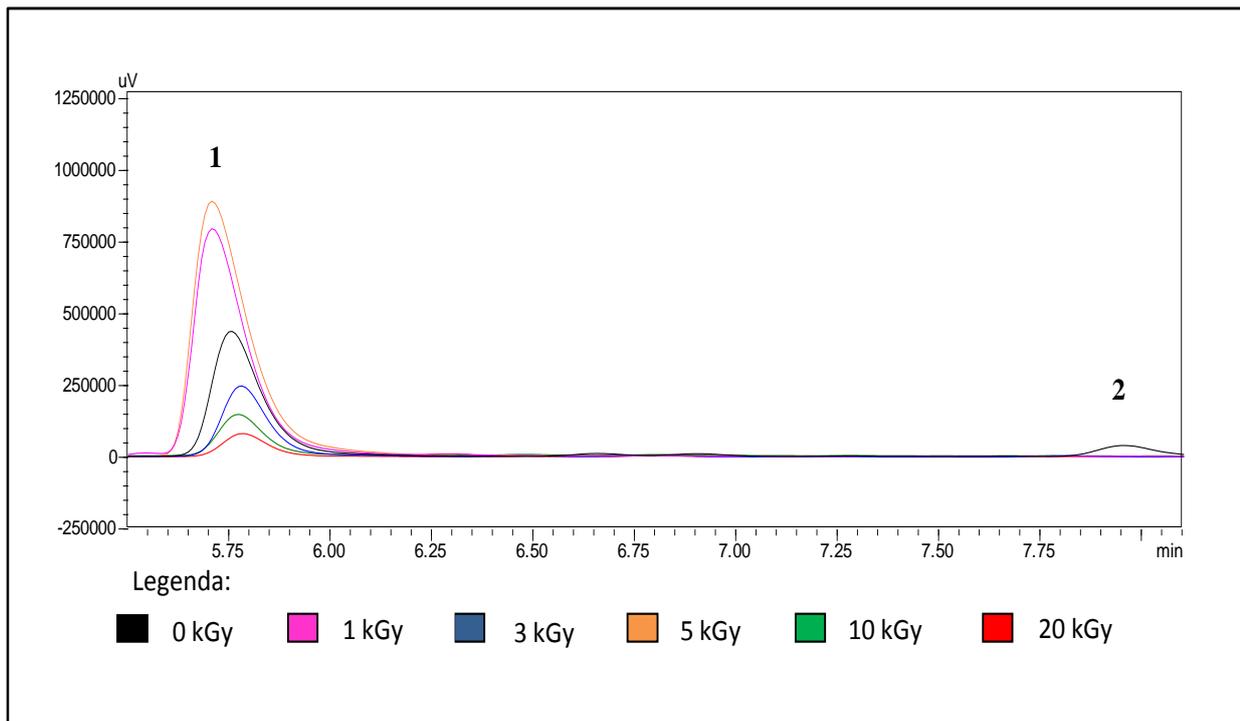


Figura III.18. Ampliação dos cromatogramas de CLAE a 210 nm de **FS₁**, **FS₃**, **FS₅**, **FS₁₀**, **FS₂₀** comparados com o cromatograma correspondente de **FS₀**, TR entre 5,5 – 8,1 min.

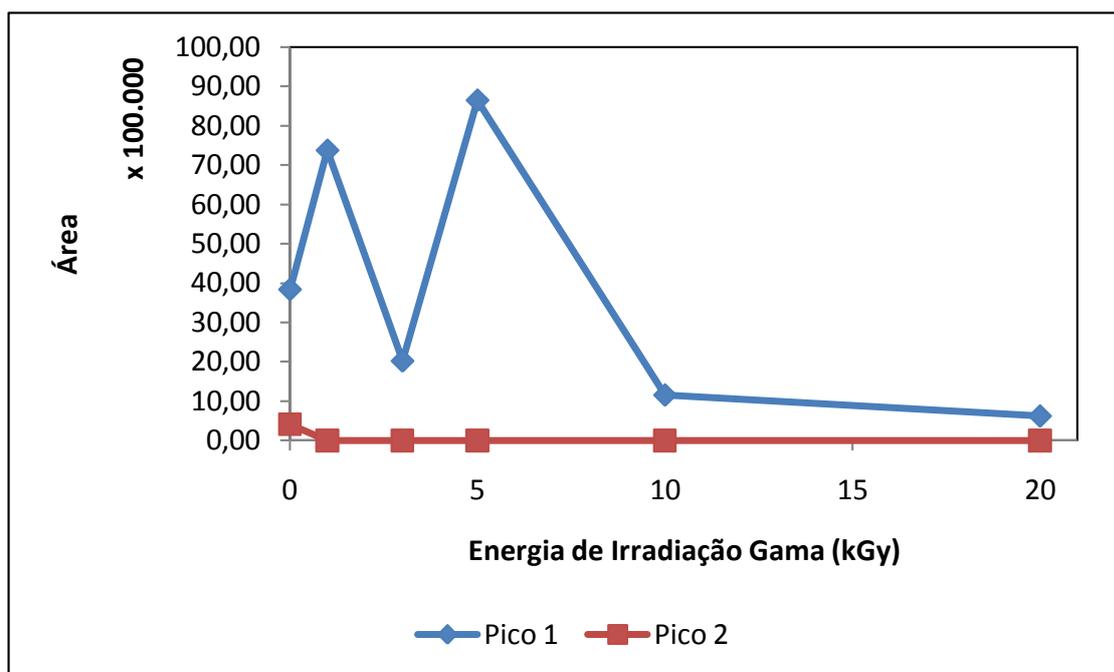


Figura III.19. Gráfico da variação da área dos picos 1 e 2 a 210 nm do cromatograma de CLAE de **FA** em função da energia de irradiação gama.

CAPÍTULO IV:

RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Análise Estrutural de Fitoconstituintes Isolados da
Fração Fenólica**

1. Análise Estrutural de F-03

A fração F-03 corresponde ao pico 17 (TR = 15,77 min) do cromatograma de CLAE do extrato flavonoídico das folhas de *E. macrophyllus*, apresentado na Figura III.1 (p. 36). Esta fração foi isolada por CLAE semi-preparativa, apresentando-se como um sólido marrom e não foi possível medir seu ponto de fusão por ser altamente higroscópico. A Figura IV.1 mostra o cromatograma de CLAE de F-03.

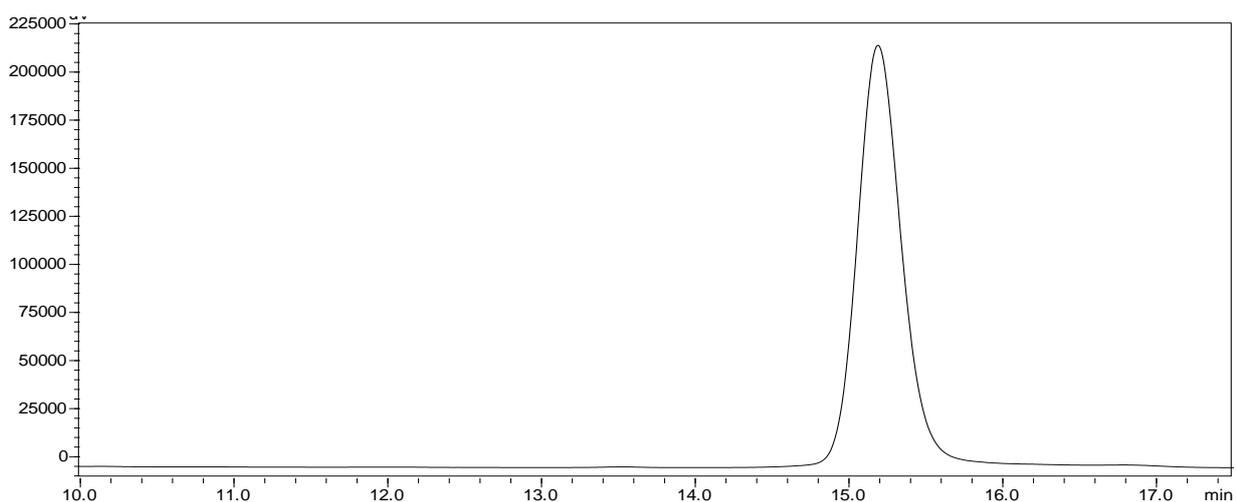


Figura IV.1. Cromatograma de CLAE de F-03.

A Figura IV.2 apresenta o espectro de absorção na região do Ultravioleta (UV) de F-03. A absorção larga em $\lambda_{\max} = 394,53$ nm é característica de esqueleto contendo sistema π conjugado, conforme relatado na literatura.⁷⁹

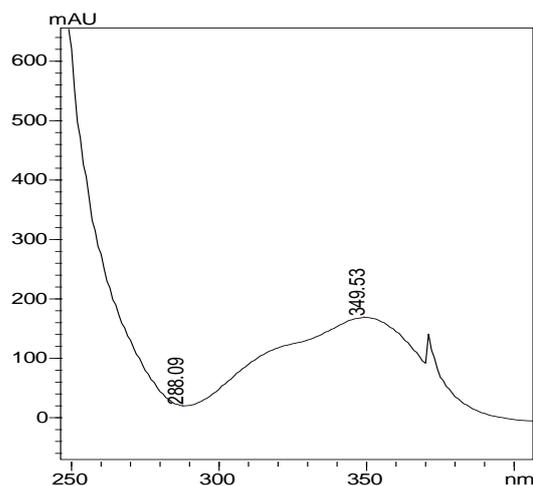


Figura IV.2. Espectro de absorção na região do UV de F-03.

A Figura IV.3 apresenta o espectro de absorção na região do Infravermelho (IV) de F-03. A absorção larga em 3434 cm^{-1} é característica do estiramento O-H de ácidos carboxílicos ou fenóis em ligação de hidrogênio. A absorção pouco intensa acima de 3000 cm^{-1} é característica de estiramento C-H de carbono sp^2 de grupos alquênílicos ou aromáticos. A absorção em 2941 cm^{-1} é característica de estiramento C-H de carbono sp^3 alifático. Absorção em 1666 cm^{-1} é característica de estiramento C=O de ácidos carboxílicos conjugado a sistema π . As absorções em 1619 , 1599 e 1515 cm^{-1} são características de vibrações de esqueleto aromático. As absorções intensas em 1184 e 1135 cm^{-1} podem ser atribuídas respectivamente aos estiramentos C-O assimétrico e simétrico de ácidos carboxílicos e fenol. A absorção em 946 cm^{-1} é característica de deformação angular fora do plano de O-H. As absorções em 850 , 801 e 725 podem ser atribuídas a deformações angulares fora do plano de C=C-H de grupos alquênílicos e aromáticos.

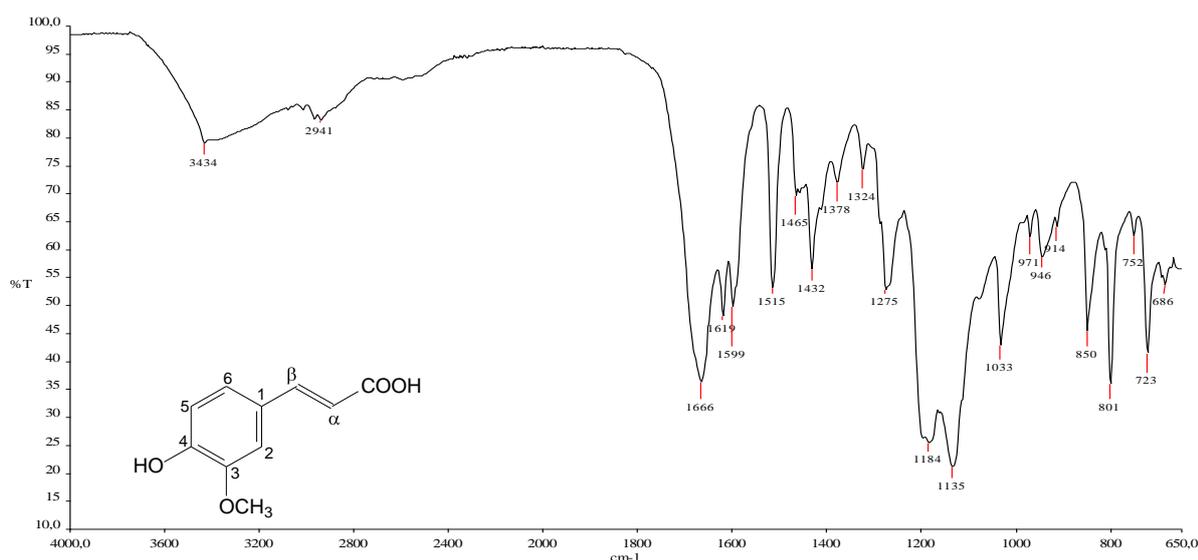


Figura IV.3. Espectro de absorção na região do infravermelho de F-04 (ATR, cm^{-1}).

A Figura IV.4 apresenta o espectro de RMN de ^1H de F-03. Os sinais simpletos em δ_{H} 12,10 e 9,56 podem ser atribuídos a átomos de hidrogênio de ácidos carboxílicos e fenóis. Os sinais dupletos registrados em δ_{H} 7,48 e 6,35 apresentam a mesma constante de acoplamento ($J = 15,8\text{ Hz}$), podendo ser atribuídos a átomos de hidrogênio *trans* alquenos. Da mesma forma, os

sinais dupletos em δ_H 7,08 e 6,79 apresentam a mesma constante de acoplamento ($J = 8,1$ Hz) e podem ser atribuídos a átomos de hidrogênio aromáticos e vicinais. Por sua vez, o sinal simpleto em δ_H 7,27 pode ser atribuído a hidrogênio aromático ou de alquenos que não se encontra adjacente a carbono hidrogenado. Finalmente, o sinal simpleto em δ_H 3,81, correspondente a três átomos de hidrogênio, é característico de grupo metoxila.

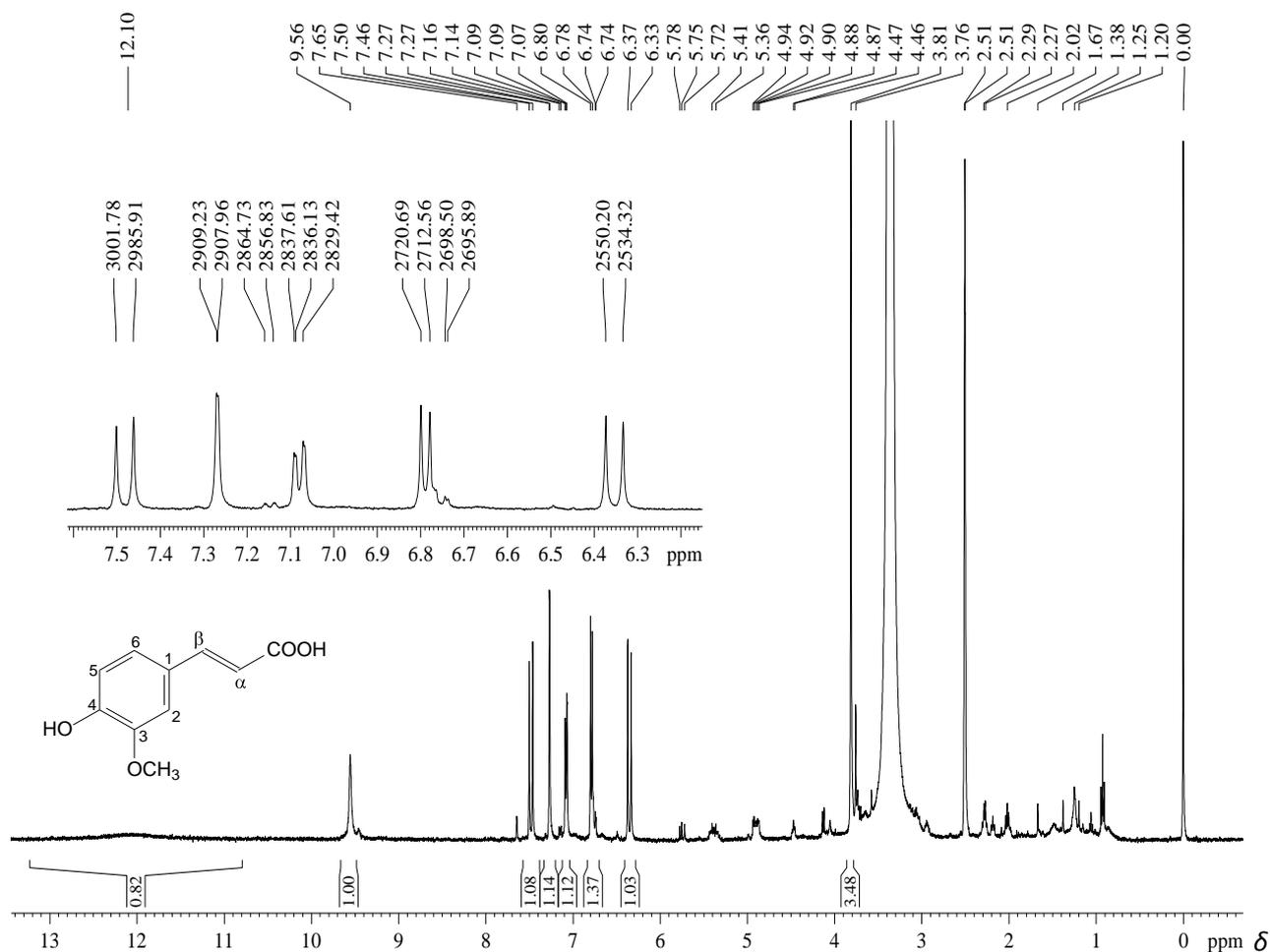


Figura IV.4. Espectro de RMN de 1H de F-03 (400 MHz; DMSO- d_6).

A Figura IV.5 apresenta o espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT 135° de F-03. O sinal em δ_C 167,9 pode ser atribuído a carbono de ácido carboxílico. Os sinais em δ_C 149,0, 147,8 e 125,7 correspondem a átomos de carbono sp^2 não hidrogenados. Os sinais em δ_C 144,4, 122,7, 115,6, 115,4 e 111,1 correspondem a átomos de carbono sp^2 mono-hidrogenados. O sinal em δ_C 55,6 pode ser atribuído a carbono de metoxila. Assim, pela análise dos dados de IV e

RMN de ^1H e ^{13}C , foi possível estabelecer que F-03 possui um anel aromático tri-substituído, pois apresenta três sinais correspondentes a átomos de hidrogênio aromáticos. Além disso, F-03 apresenta uma hidroxila fenólica, uma metoxila fenólica, uma dupla ligação C=C de alqueno *trans* dissustituído e um grupo ácido carboxílico. Estas informações estão de acordo com a estrutura química do ácido *trans*-ferúlico.

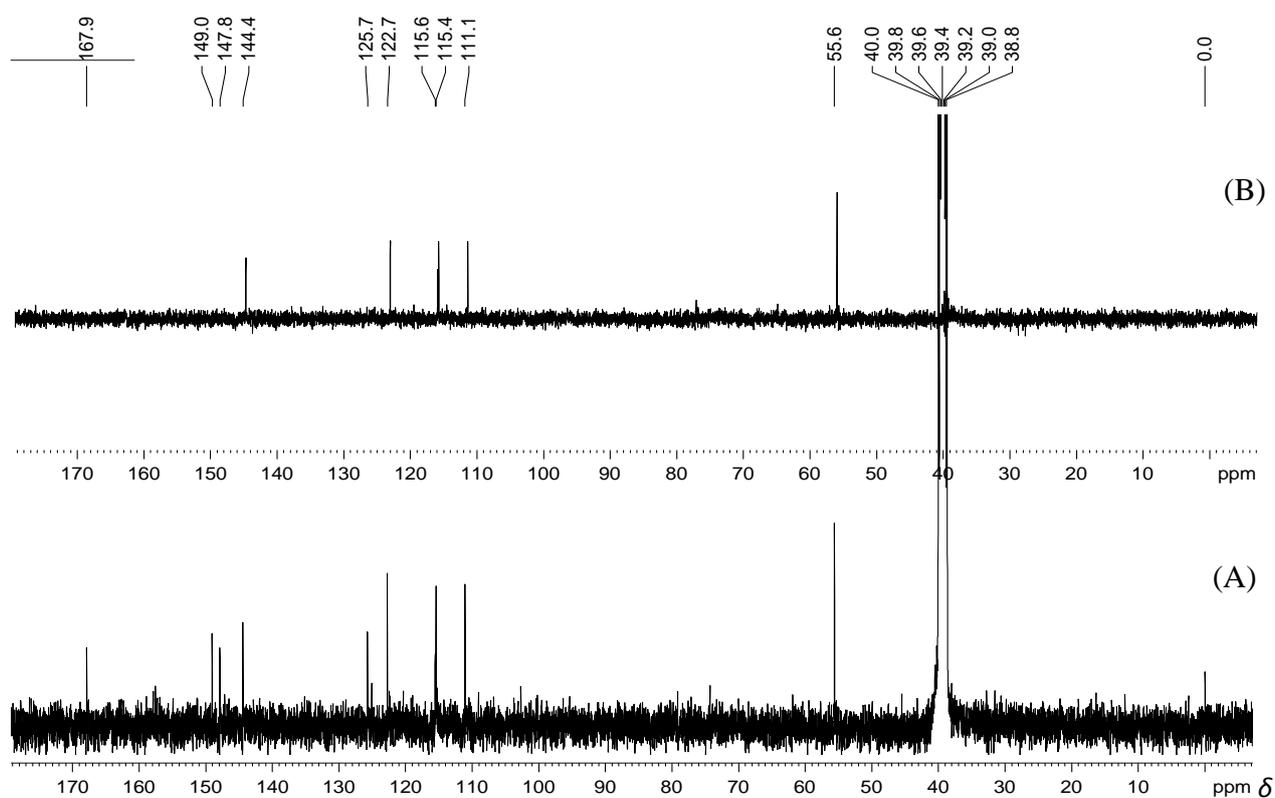


Figura IV.5. (A) Espectro de RMN de ^{13}C e (B) subespectro DEPT 135° de F-03 (100 MHz; DMSO-*d*₆).

A Figura IV.6 apresenta o mapa de contornos HSQC de F-03. O sinal de hidrogênio em δ_{H} 7,48 (H- β) correlaciona-se com o sinal de carbono em δ_{C} 144,4 (C- β). O sinal em δ_{H} 7,08 (H-6) correlaciona-se com o sinal em δ_{C} 122,7 (C-6). O sinal em δ_{H} 6,35 (C- α) correlaciona-se com o sinal em δ_{C} 115,6 (C- α). O sinal em δ_{H} 6,79 (H-5) correlaciona-se com o sinal em δ_{C} 115,4 (C-5). O sinal em δ_{H} 7,27 (C-2) correlaciona-se com o sinal em δ_{C} 111,1 (C-2). Finalmente, o sinal em δ_{H} 3,81 (OCH₃) correlaciona-se com o sinal em δ_{C} 55,6 (OCH₃).

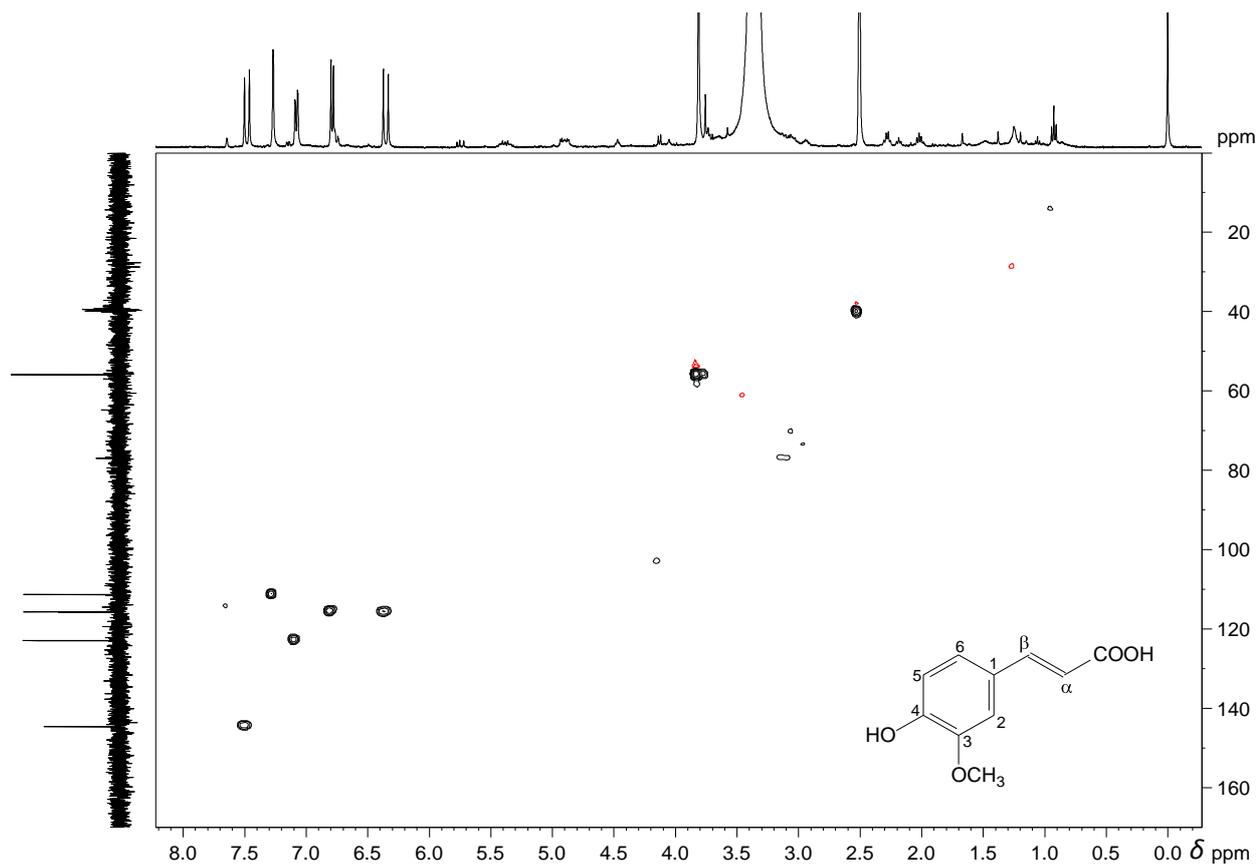


Figura IV.6. Mapa de contornos HSQC de F-03 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; $\text{DMSO-}d_6$).

A Figura IV.7 apresenta o mapa de contornos HMBC de F-03. O sinal de hidrogênio em δ_{H} 7,48 (H- β) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_{C} 111,1 (C-2), 122,7 (C-6) e 167,9 (COOH), estas correlações confirmam que o carbono carboxílico não se encontra diretamente ligado ao anel aromático, mas ligado ao grupo alqueno. O sinal de hidrogênio em δ_{H} 7,27 (H-2) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_{C} 122,7 (C-6), 144,4 (C- β) e 149,0 (C-4), essas correlações estabelecem a posição do grupo alqueno no anel aromático.. O sinal de hidrogênio em δ_{H} 7,08 (H-6) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_{C} 111,1 (C-2), 144,4 (C- β) e 149,0 (C-4). O sinal de hidrogênio em δ_{H} 6,79 (H-5) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_{C} 125,7 (C-1) e 147,8 (C-3). O sinal de hidrogênio em δ_{H} 6,35 (H- α) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_{C} 125,7 (C-1) e 167,9 (COOH). O sinal de hidrogênio em δ_{H} 3,81 (OCH_3)

correlaciona-se com o sinal de carbono em δ_C 147,8 (C-3), localizando a metoxila no anel aromático.

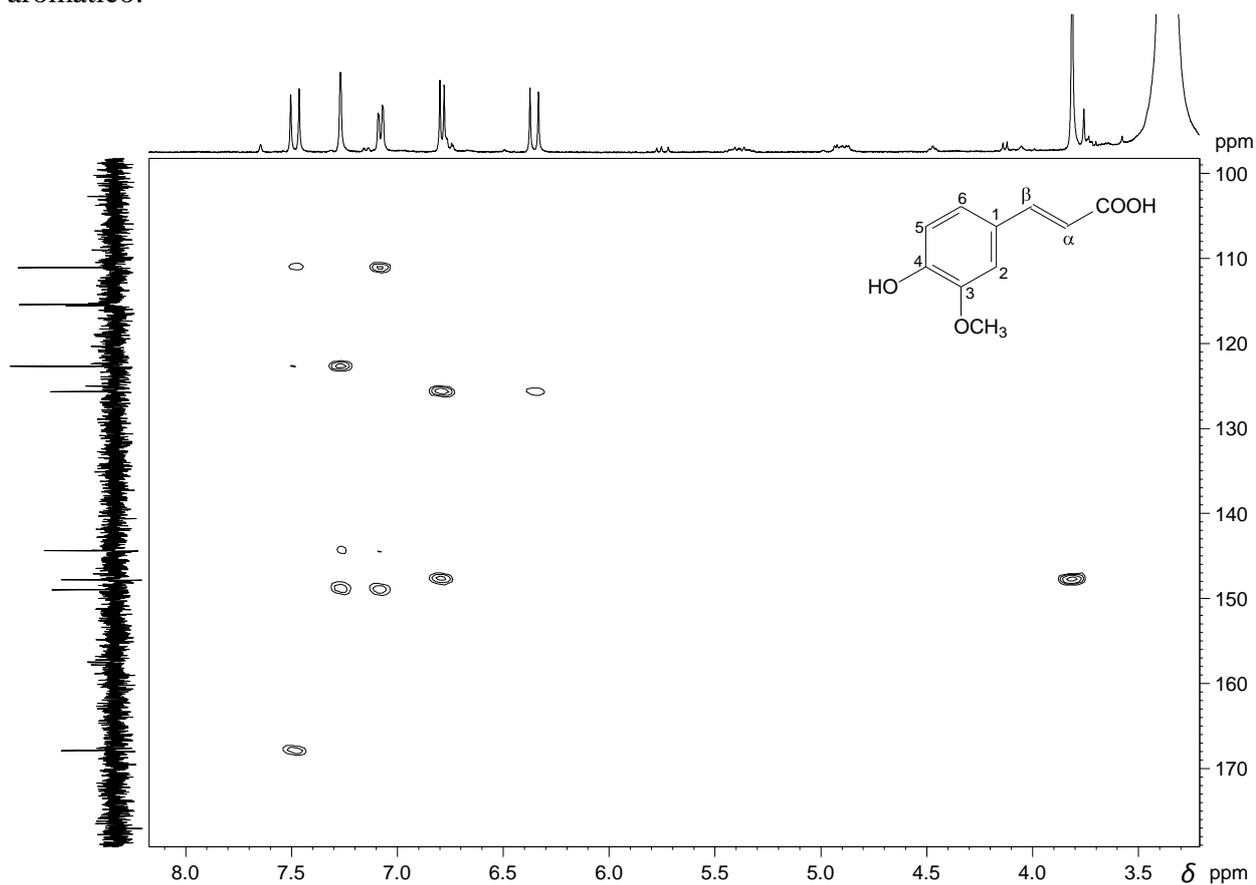


Figura IV.7. Mapa de contornos HMBC de F-03 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; DMSO-*d*6).

A Figura IV.8 apresenta o mapa de contornos COSY de F-03. O mapa de contornos mostra correlação do sinal em δ_{H} 7,48 (H- β) com o sinal em δ_{H} 6,35 (H- α). A correlação do sinal em δ_{H} 7,08 (H-6) com o sinal em δ_{H} 6,79 (H-5) estabelece que a substituição no anel aromático é 1,3,4-tri-substituído.

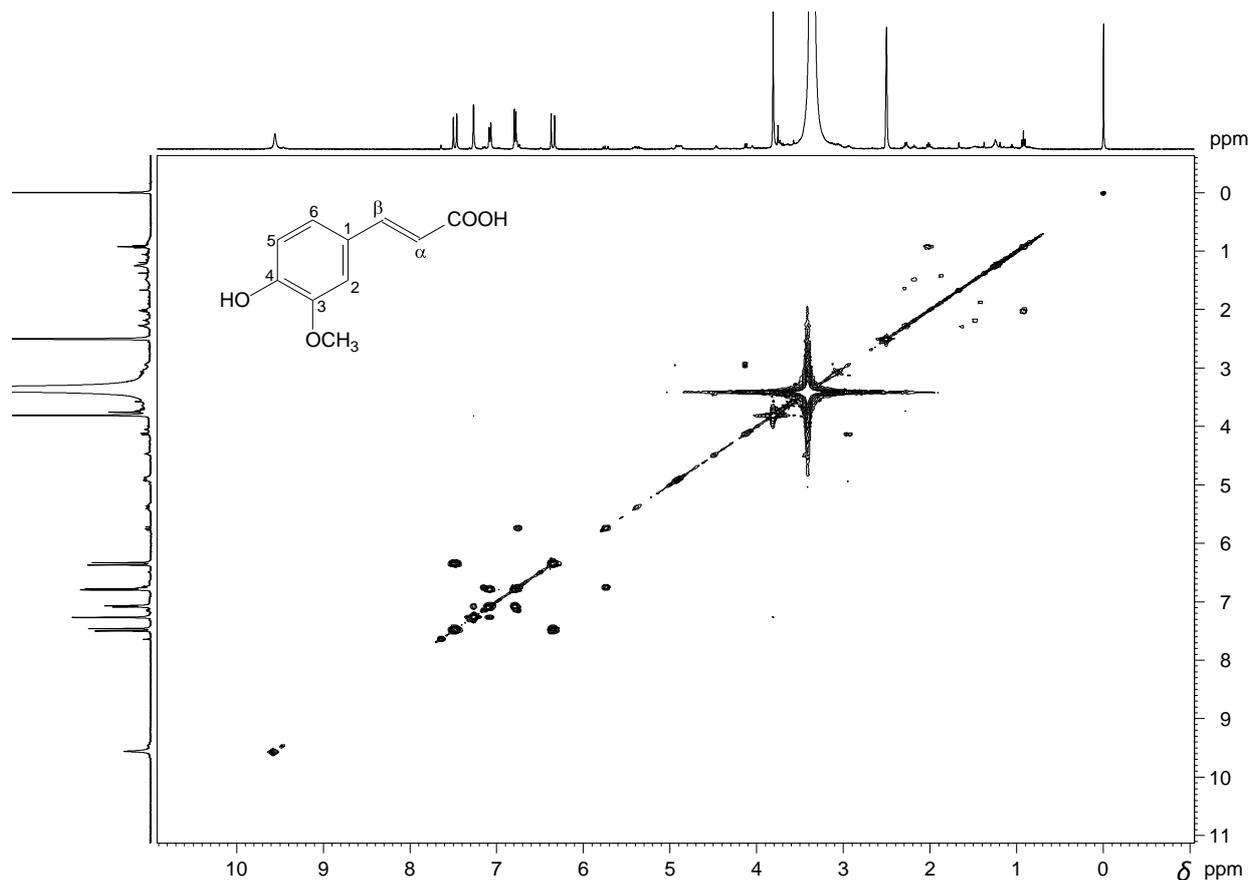


Figura IV.8. Mapa de contornos COSY de F-03 (400 MHz; DMSO-*d*₆).

Os dados de IV e de RMN (1D e 2D) indicaram que F-03 se trata do ácido *trans*-ferúlico (**33**). De fato, os dados de RMN de ¹H e de ¹³C de F-03 estão de acordo com os dados correspondentes atribuídos a **33** descritos na literatura, conforme mostrado na Tabela IV.1.⁸⁰ As variações de deslocamento químico entre F-03 e **33** podem ser atribuídas aos solventes não serem o mesmo em ambos os experimentos, sendo DMSO-*d*₆ e CD₃OD, respectivamente.

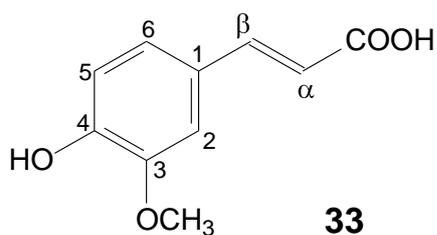


Tabela IV.1. Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de F-03 e os descritos na literatura para o ácido *trans*-ferúlico

Átomo	Literatura ⁸⁰ CD ₃ OD		Experimental DMSO- <i>d</i> ₆	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)
1	127,8	-	125,7	-
2	111,6	7,18	111,1	7,27
3	151,5	-	147,8	-
4	149,9	-	148,9	-
5	116,5	6,82	115,4	6,79
6	124,0	7,07	122,7	7,08
α	115,9	6,31	115,6	6,35
β	147,0	7,59	144,3	7,48
COOH	171,2		167,9	12,10
OCH₃	56,5	3,89	55,6	3,84
OH fenólico				9,56

O ácido ferúlico é encontrado principalmente em frutas, sementes e raízes de diferentes espécies vegetais.^{81,82} Além de apresentar propriedades antioxidantes, este ácido apresenta um amplo espectro de atividades biológicas, tais como vaso-relaxante, anti-inflamatória, antiviral, analgésica, cardiovascular, hipotensiva, bem como efeito terapêutico contra cancer, diabetes e doenças neurodegenerativas.⁸³⁻⁸⁹

2. Análise Estrutural de F-05

A fração F-05 corresponde ao pico 19 (TR = 29,27 min) do cromatograma de CLAE do extrato flavonoídico das folhas de *E. macrophyllus*, apresentado na Figura III.1 (p. 36). Esta fração foi isolada por CLAE semi-preparativa, apresentando-se como um sólido amarelo e faixa de fusão entre 197,0 – 202,2° C. A Figura IV.9 mostra o cromatograma de CLAE de F-05 após o seu isolamento, indicando tratar-se de um sólido em alto grau de pureza.

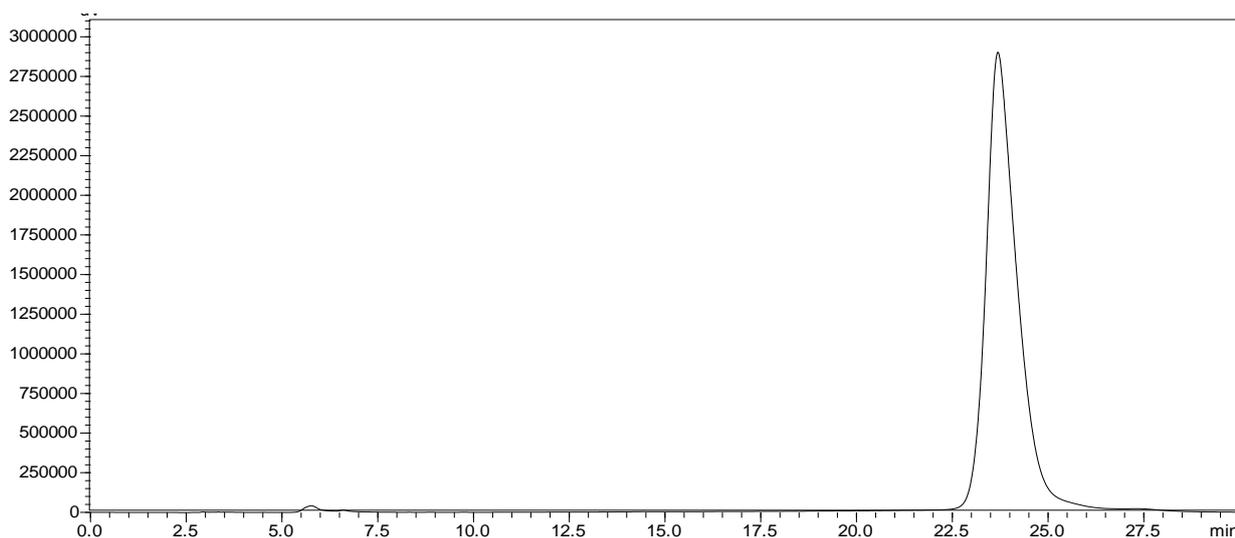


Figura IV.9. Cromatograma CLAE de F-05.

A Figura IV.10 apresenta o espectro de UV de F-05. O espectro mostra uma banda intensa em $\lambda_{\text{max}} = 221,0$ nm e uma outra banda pouco intensa em $\lambda_{\text{max}} = 295,65$ nm. Estas absorções são características de flavonóides.⁹⁰

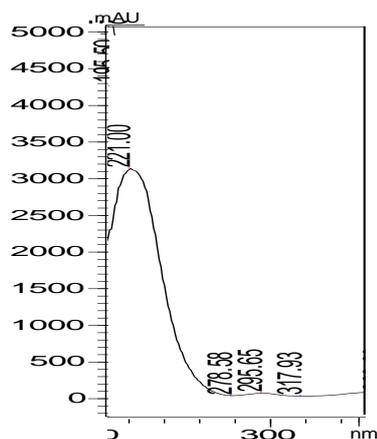


Figura IV.10. Espectro de absorção na região do UV de F-05.

A Figura IV.11 apresenta o espectro de IV de IV de F-05. A absorção larga em 3240 cm^{-1} é característica do estiramento de O-H em ligação de hidrogênio muito intensa. As absorções entre 1645 e 1574 cm^{-1} são características dos estiramentos C=O, C=C e de vibrações de esqueleto aromático. Outras vibrações do esqueleto aromático podem ser observadas também pelas absorções em 1488 e 1440 cm^{-1} . As várias absorções entre 1247 e 1019 cm^{-1} podem ser atribuídas a diferentes estiramentos de C-O, assimétricos e simétricos, indicando que a estrutura de F-05 apresentam muitas ligações C-O, mais precisamente de grupos hidroxila que se encontram em ligações de hidrogênio intensas. Finalmente, as absorções entre 935 e 830 cm^{-1} pode ser atribuída a deformação angular de C=C-H fora do plano de alquenos ou estruturas aromáticas.

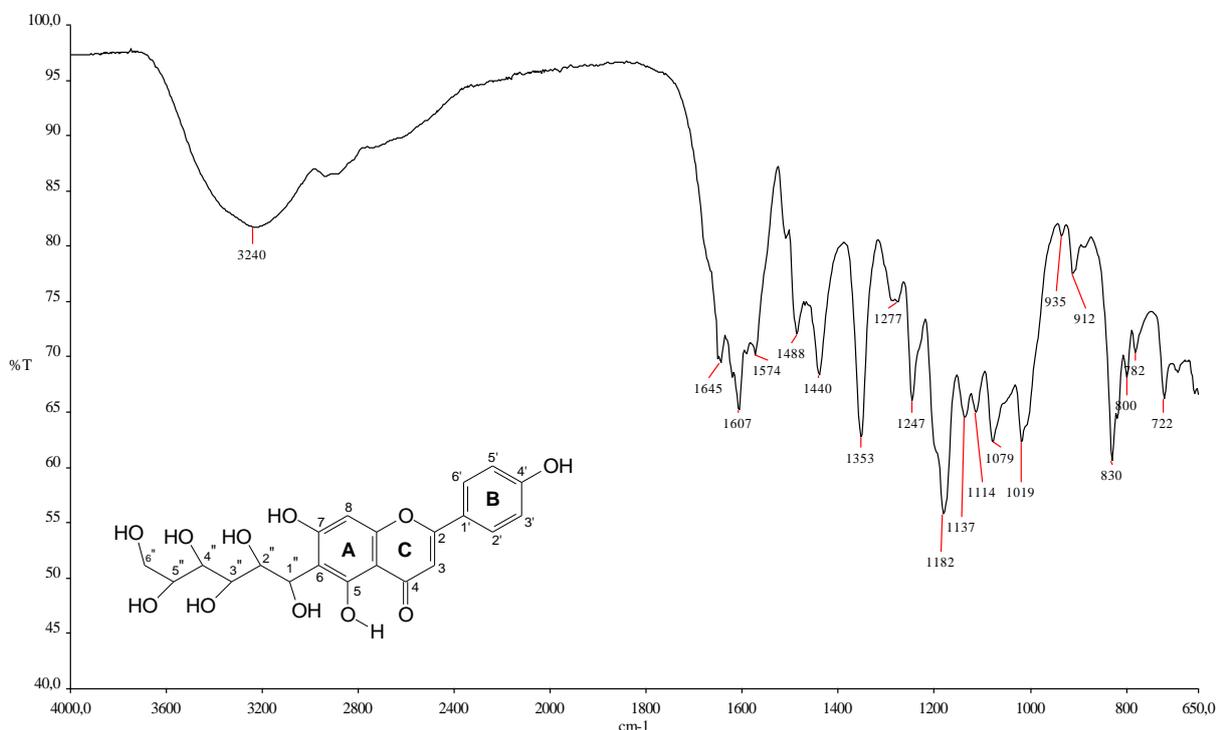


Figura IV.11. Espectro de absorção na região do infravermelho de F-04 (ATR; cm^{-1}).

A Figura IV.12 mostra o espectro de RMN de ^1H de F-05. O sinal simpleto em δ_{H} 13,55 e os sinais largos em δ_{H} 10,64 e 10,41 são característicos de átomos de hidrogênio de hidroxila de ácidos carboxílicos e/ou fenóis em ligação de hidrogênio. Os sinais dupletos aparentes AA'BB' registrados em δ_{H} 7,93 e 6,94 (cada sinal correspondendo a dois átomos de hidrogênio)

apresentam a mesma constante de acoplamento aparente ($J = 8,8$ Hz), sendo atribuídos a átomos de hidrogênio aromáticos em átomos de carbono adjacentes.

Os sinais simples em δ_H 6,78 e 6,53 (cada sinal correspondendo a um hidrogênio) podem ser atribuídos a átomos de hidrogênio aromáticos não adjacentes a carbonos hidrogenados. Os sinais em δ_H 4,88 (m; OH-4''), 4,87 (m; OH-1''), 4,61 (m; OH-2'' e H-3''), 4,49 (s; OH-6''), 4,05 (s; H-2''), 3,70 (m; H-6''), 3,38 (m; H-6''), 3,17 (m; H-1'', H-5'', H-4'' e OH-5'') podem ser atribuídos átomos de hidrogênio de grupos hidroxila e/ou de carbonos carbinólicos, característicos de carboidratos.

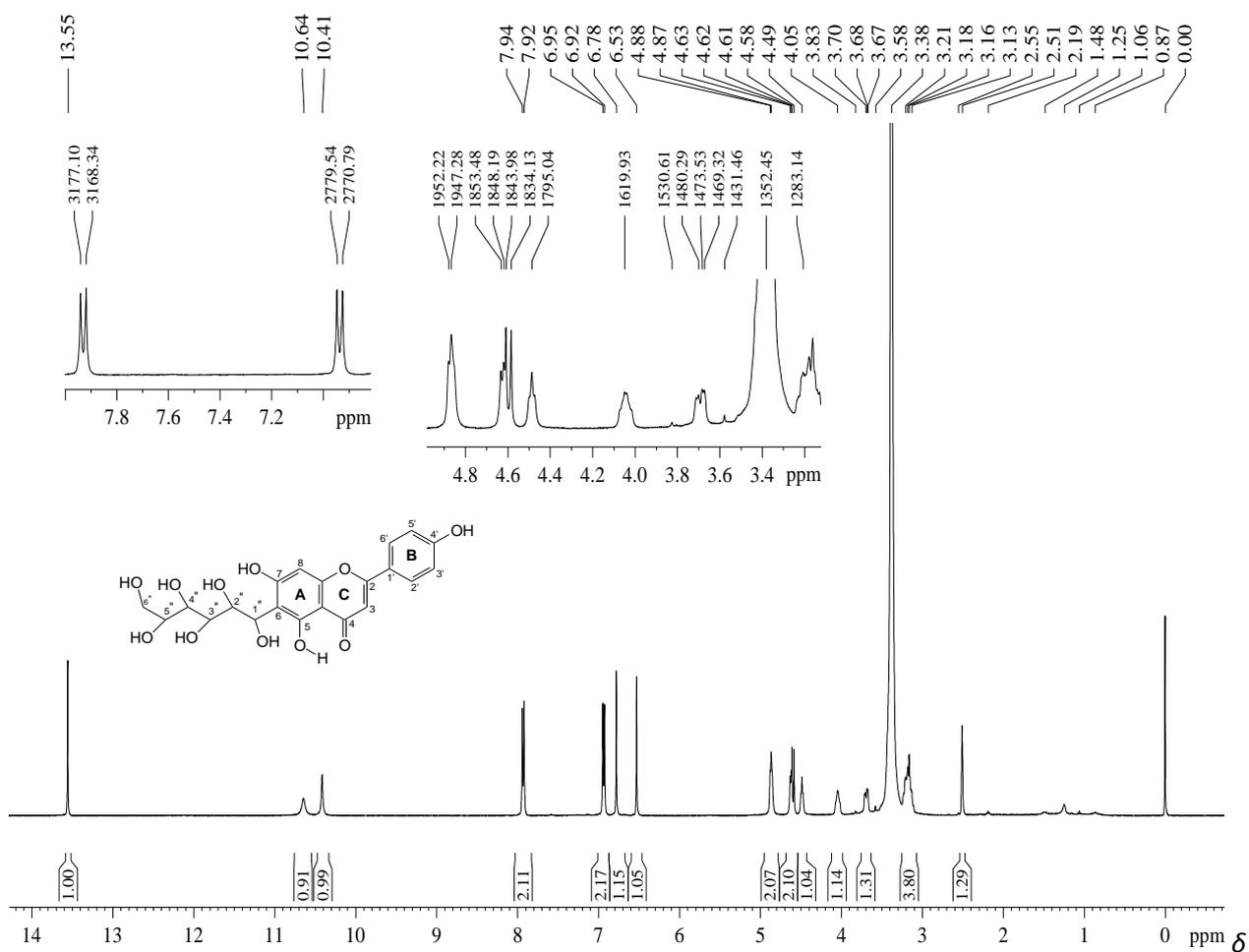


Figura IV.12. Espectro de RMN de ^1H de F-05 (400 MHz; $\text{DMSO-}d_6$).

A Figura IV.13 apresenta o espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT 135° de F-05.

O sinal em δ_C 181,9 poder ser atribuído ao carbono ligado à carbonila de cetona conjugada a

sistema π . Os sinais de carbono não-hidrogenado em δ_C 163,5, 163,2, 161,1, 160,6 e 156,1 podem ser atribuídos a átomos de carbono não hidrogenado aromáticos ligados a oxigênio. Os sinais em δ_C 128,4 e 115,9 (ambos os sinais correspondendo a dois átomos de carbono mono-hidrogenado e são característicos de anel aromático 1,4-dissubstituído). Os sinais em δ_C 121,0, 102,7 e 93,5 (cada sinal correspondendo a um carbono) podem ser atribuídos a átomos de carbono mono-hidrogenado de outros anéis aromáticos. Os sinais em δ_C 108,8 e 103,3 correspondem a átomos de carbono não-hidrogenado de anéis aromáticos. Os demais sinais são característicos de átomos de carbono carbinólico, registrados em δ_C 81,5, 78,9, 73,0, 70,5, 70,1 e 61,4. Os dados de IV e de RMN de ^1H e de ^{13}C indicam que F-05 apresenta uma estrutura flavonoídica com anel B 1,4-dissubstituído, com uma dupla ligação entre C-2 – C-3 no anel C, e o anel A trissubstituído.

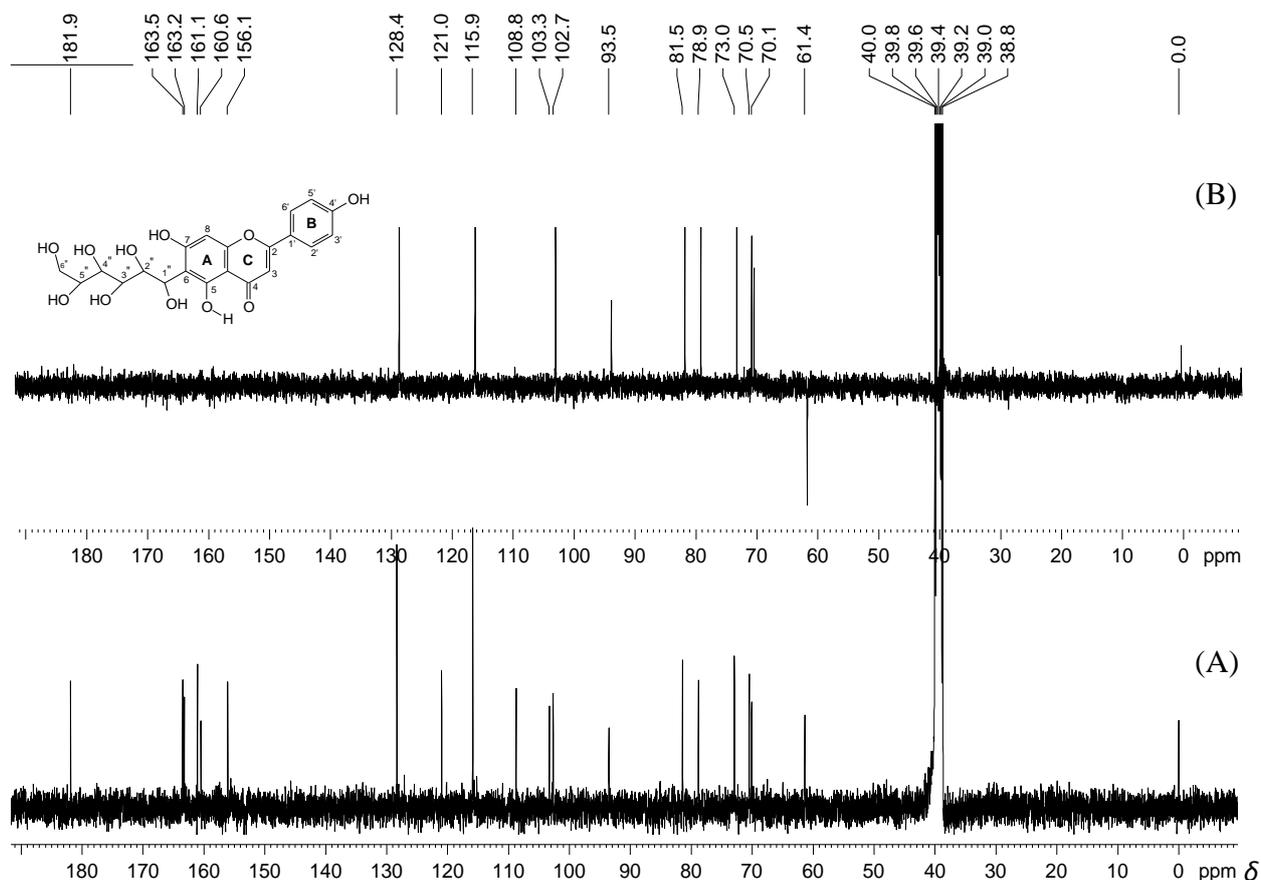


Figura IV.13. (A) Espectro de RMN de ^{13}C e (B) subspectro DEPT 135° de F-05 (100 MHz; DMSO-*d*6).

A Figura IV.14 apresenta o mapa de contornos HSQC de F-05. O sinal de hidrogênio em δ_H 7,93 (H-2'/6') correlaciona-se com o sinal de carbono em δ_C 128,4 (C-2'/6'). O sinal em δ_H 6,94 (H-3'/5') correlaciona-se com com δ_C 115,9 (C-3'/5'). O sinal em δ_H 6,78 (H-3) correlaciona-se com o sinal em δ_C 102,7 (C-3). O sinal em δ_H 6,53 (H-8) correlaciona-se com o sinal em δ_C 93,5 (C-8). O sinal em δ_H 4,61 (H-1'') correlaciona-se com o sinal em δ_C 73,0 (C-1''). O sinal em δ_H 4,05 (H-2'') correlaciona-se com o sinal em δ_C 70,1 (C-2''). O sinal em δ_H 3,17 (H-3'', H-4'' e H-5'') correlaciona-se com os sinais em δ_C 78,9 (C-3''), 81,5 (C-4'') e 70,5 (C-5''). Finalmente, os sinais em δ_H 3,70 (H-6''a) e 3,38 (H-6''b) correlacionam-se com o sinal em δ_C 61,4 (C-6'').

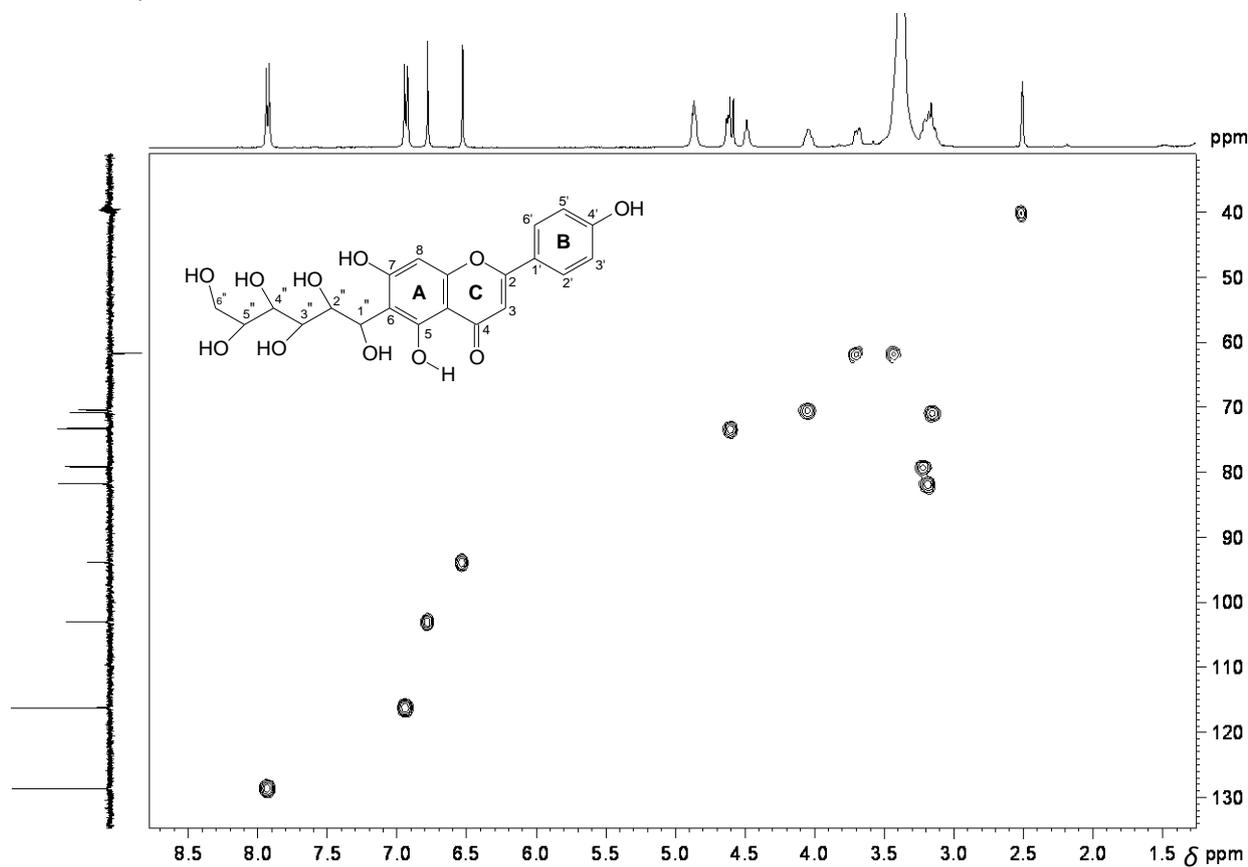


Figura IV.14. Mapa de contornos HSQC de F-05 (1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; DMSO-*d*6).

A Figura IV.15 apresenta o mapa de contornos HMBC de F-05. O sinal de hidrogênio em δ_H 13,55 (OH-5) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 102,7 (C-3), 108,8 (C-6) e 160,6 (C-5), estas correlações indicam que o sinal em δ_H 13,55 corresponde a uma hidroxila de

fenol com ligação de hidrogênio com o oxigênio carbonílico, descartando ser atribuído a um grupo ácido carboxílico. O sinal de hidrogênio em δ_H 10,41 (OH-4') correlaciona-se com o sinal de carbono em δ_C 115,9 (C-3'/5'), indicando a presença de uma hidroxila de fenol no carbono C-4' do anel B. O sinal de hidrogênio em δ_H 7,93 (H-2'/6') correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 163,5 (C-2) e 161,1 (C-4'), indicando a conexão entre os anéis C e B. O sinal de hidrogênio em δ_H 6,93 (H-3'/5') correlaciona-se com o sinal de carbono em δ_C 121,0 (C-1'). O sinal de hidrogênio em δ_H 6,78 (H-3) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 103,3 (C-10), 121,0 (C-1'), 163,5 (C-2) e 181,9 (C-4), indicando a posição do carbono carbonílico. O sinal de hidrogênio em δ_H 6,53 (H-8) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 103,3 (C-10), 108,8 (C-6), 156,1 (C-9), 163,2 (C-7), 181,9 (C-4). O sinal de hidrogênio em δ_H 4,61 (H-1'') correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 70,1 (C-2''), 108,8 (C-6), 160,6 (C-5) e 163,2 (C-7), estas correlações indicam a presença de hidroxilas fenólicas em C-7 e C-5, bem como do carboidrato substituinte em C-6 no anel A.

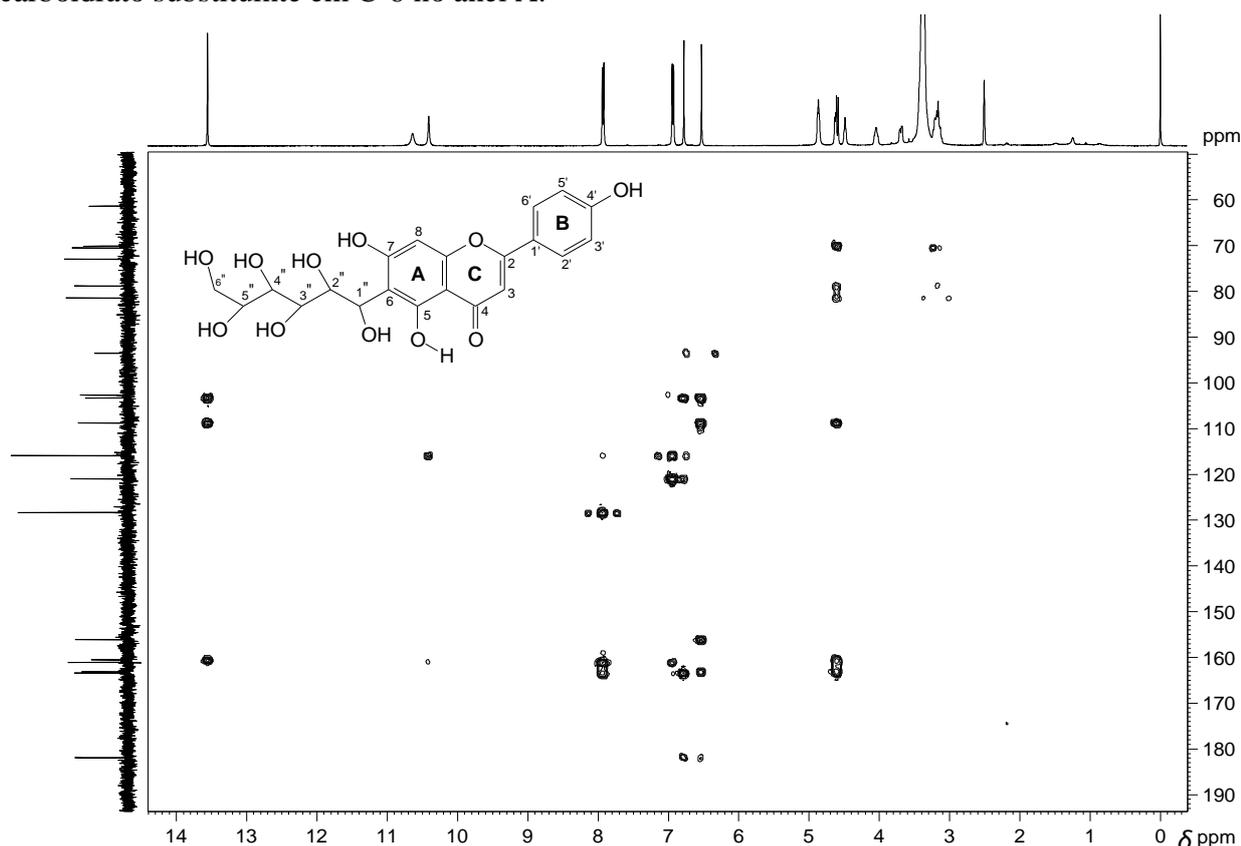


Figura IV.15. Mapa de contornos HMBC de F-05 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; DMSO-*d*6).

A Figura IV.16 mostra o mapa de contornos COSY de F-05. O sinal em δ_{H} 7,93 (H-2'/6') correlaciona-se com o sinal em δ_{H} 6,93 (H-3'/5'). O sinal em δ_{H} 4,88 (OH-3''/4'') correlaciona-se com o sinal em δ_{H} 3,17 (H-3''/4''). O sinal em δ_{H} 4,61 (H-1'') correlaciona-se com o sinal em δ_{H} 4,05 (H-2''). O sinal em δ_{H} 4,49 (OH-6'') correlaciona-se com os sinais em δ_{H} 3,38 (H-6''), 3,70 (H-6''). O sinal em δ_{H} 4,05 (H-2'') correlaciona-se com os sinais em δ_{H} 3,17 (H-3''). Estas correlações dos sinais na região entre δ_{H} 4,61 e 3,17 indicam que os carbonos carbinólicos encontram-se conectados sucessivamente, característicos de carboidratos de cadeia alicíclica.

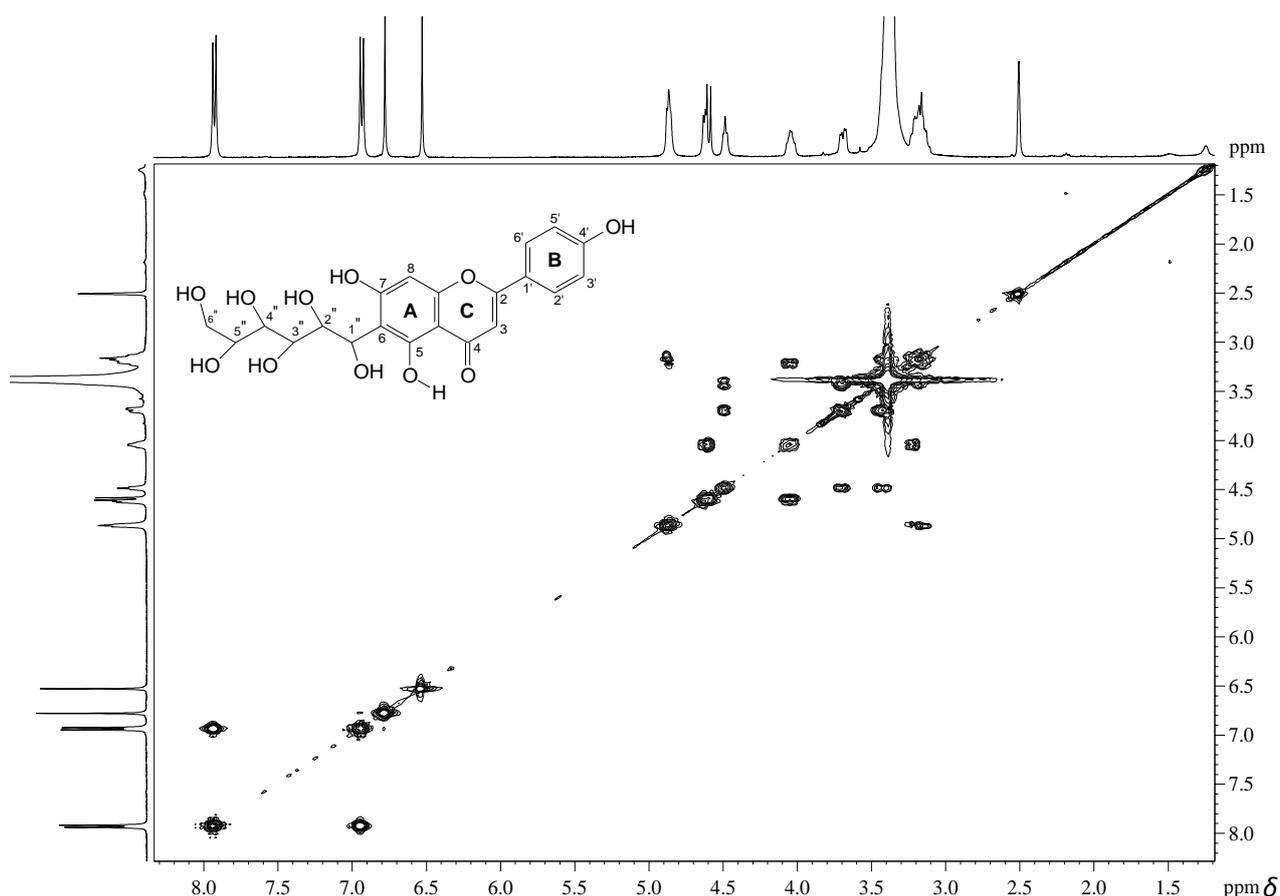


Figura IV.16. Mapa de contornos COSY de F-05 (400 MHz; DMSO-*d*₆).

Os dados de IV e de RMN (1D e 2D) indicam que F-05 trata-se uma flavona inédita denominada de 6-C-hexa-hidroxi-apigenina (**34**). A literatura registra uma C-glicosídeo estruturalmente muito semelhante a **34**, diferindo na posição do glicosídeo no anel A do esqueleto flavonoídico e da existência de uma hidroxila em C-4', denominado de homo-orientina

(35).⁸⁸ A literatura não registra dados de RMN de **35**, não permitindo fazer uma comparação de seus dados com aqueles obtidos para **34**, que estão mostrados na Tabela IV.2.

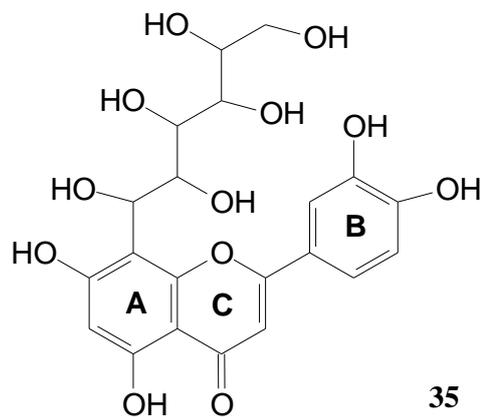
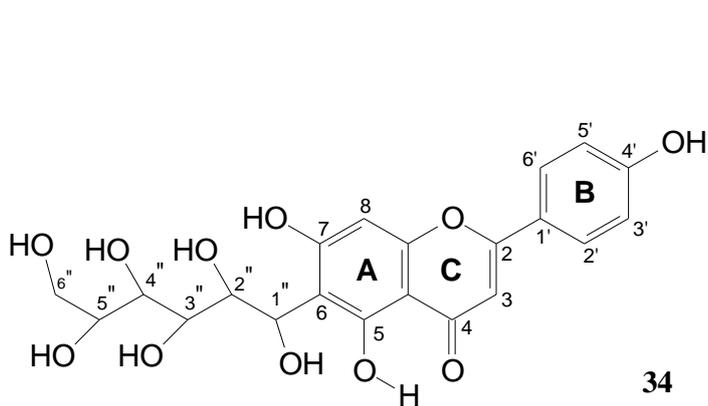


Tabela IV.2. Atribuição dos sinais de RMN de ^1H e de ^{13}C de F-05

Átomo	Experimental DMSO- <i>d</i> 6		
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{H} OH (ppm)
1	-	-	-
2	163,5	-	-
3	102,7	6,78	-
4	181,9	-	-
5	160,6	-	13,55
6	108,8	-	-
7	163,2	-	10,64
8	93,5	6,53	-
9	156,1	-	-
10	103,3	-	-
1'	121,0	-	-
2'	128,4	7,93	-
3'	115,9	6,94	-
4'	161,1	-	10,41
5'	115,9	6,94	-
6'	128,4	7,93	-
1''	73,0	4,61	4,61
2''	70,1	4,05	4,05
3''	78,9	3,17	4,88
4''	81,5	3,17	4,88
5''	70,5	3,17	3,17
6''	61,4	3,70 e 3,38	4,49

CAPÍTULO V:

RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Teste de Atividade Antimicrobiana das Frações das Folhas de *Echinodorus
macrophyllus***

1. Teste de Difusão em Ágar

O Extrato Hexânico (**EH₀**) e o Extrato Etanólico (**EE₀**) das folhas de *Echinodorus macrophyllus* Mich. foram submetidos aos testes de difusão em ágar. A Tabela V.1 apresenta os resultados dos testes de difusão em ágar com diferentes espécies de bactérias (*Staphylococcus aureus* ATCC 29212; *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Citrobacter freundii* ATCC 8090) e uma espécie de fungo (*Candida albicans* ATCC 18804). Os testes não indicaram atividade antimicrobiana para extratos testados frente a *B. cereus*, *E. coli*, *C. freundii* e *C. albicans*. Porém, ambos os extratos apresentaram uma atividade bactericida frente a *S. aureus* e *B. subtilis*.

Tabela V.1. Resultados de testes microbiológicos de halo de inibição de EH e EE das folhas de *E. macrophyllus* frente a diferentes espécies de bactérias e a uma espécie de fungo

Microorganismo	EH ₀	EE ₀
<i>Staphylococcus aureus</i> ^(a)	Positivo	Positivo
<i>Bacillus cereus</i> ^(a)	Negativo	Negativo
<i>Bacillus subtilis</i> ^(a)	Positivo	Positivo
<i>Escherichia coli</i> ^(a)	Negativo	Negativo
<i>Citrobacter freundii</i> ^(a)	Negativo	Negativo
<i>Candida albicans</i> ^(b)	Negativo	Negativo

^(a) Controle: Cloranfenicol 30 µg

^(b) Controle: Miconazol 30 µg

Após determinar quais microrganismos foram sensíveis a **EH₀** e a **EE₀**, o teste de difusão em ágar foi realizado novamente para os mesmos extratos, porém submetidos às diferentes energias de irradiação gama. Os testes foram realizados em duplicata e a Tabela V.2 apresenta os resultados de halo de inibição dos extratos hexânicos (**EH**) e dos etanólicos (**EE**) submetidos à irradiação gama nas energias de 1,0, 3,0, 5,0, 10,0 e 20,0 kGy (**EH₁**, **EH₃**, **EH₅**, **EH₁₀**, **EH₂₀**, **EE₁**, **EE₃**, **EE₅**, **EE₁₀** e **EE₂₀**, respectivamente), comparado com **EH₀** e **EE₀**.

Tabela V.2. Resultados de testes microbiológicos de halo de inibição frente a *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* dos EH e EE das folhas de *E. macrophyllus* submetidas à diferentes energias de irradiação gama

Amostra	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Bacillus subtilis</i>		
	Experimento 1 (mm)	Experimento 2 (mm)	média	Experimento 1 (mm)	Experimento 2 (mm)	média
EH₀	9,34	7,55	8,45	10,79	8,86	9,83
EH₁	7,64	7,51	7,58	9,71	9,57	9,64
EH₃	7,38	6,98	7,18	9,72	9,73	9,73
EH₅	8,18	7,17	7,68	9,61	9,83	9,72
EH₁₀	7,64	7,94	7,79	7,73	9,18	8,46
EH₂₀	7,00	8,20	7,60	9,91	9,56	9,74
EE₀	7,48	7,28	7,38	9,43	10,84	10,14
EE₁	9,12	9,21	9,17	10,34	12,07	11,21
EE₃	9,64	9,26	9,45	10,97	11,07	11,02
EE₅	8,45	9,01	8,73	9,66	10,11	9,89
EE₁₀	8,83	8,73	8,78	10,21	9,66	9,94
EE₂₀	8,88	9,28	9,08	9,41	9,81	9,61
Controle	33,79	31,67	32,73	27,99	31,76	29,88

Controle: Cloranfenicol 30 µg

Pela Tabela V.2, percebe-se que os extratos das folhas de *E. macrophyllus* possuem uma atividade bactericida bastante significativa, apesar de apresentar-se em apenas 1/3 da atividade do controle, possivelmente hidrossolubilidade e quantidade dos fitoconstituintes presentes na amostra devem ser levadas em consideração. O meio (ágar) contido na placa de petri é aquoso, portanto compostos hidrossolúveis apresentam maior solubilidade na placa (possuem maior difusão). Dessa forma, valores maiores de halo de inibição podem ser obtidos com compostos polares. Por sua vez, o controle positivo apresenta cloranfenicol (100%) e os extratos são constituídos de uma grande variedade de compostos que apresentam substâncias ativas em uma porcentagem mínima. Dessa forma, os valores dos halos de inibição dos extratos tendem a ser menores que o halo do controle utilizado.

Ao analisar a influencia da irradiação gama (Tabela V.2), nota-se que frente ao *B. subtilis* tanto os **EH** quanto **EE** a atividade bactericida não é alterada. Porém, frente ao *S. aureus*, uma diminuição da atividade antibacteriana é observado para **EH** e, no geral, com o aumento da energia de irradiação gama há uma diminuição da atividade. O contrario é observado no **EE**, verifica-se um aumento de atividade para todas as amostras irradiadas com irradiação gama. Mais estudos são necessários para o completo entendimento do fato observado.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

1. Análise Fitoquímica

A análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) da fração fenólica (**FF**), alcaloídica (**FA**) e saponínica (**FS**) das folhas da espécie *Echinodorus macrophyllus* (chapéu-de-couro) indicou a presença de 19 compostos fenólicos, um alcalóide e duas saponinas. A grande quantidade de compostos fenólicos nas folhas sugere que as propriedades medicinais alegadas à espécie estejam relacionadas a essa classe de compostos.

Além disto, a análise por CLAE permitiu verificar também que o uso da irradiação gama para descontaminação do material vegetal provoca alterações na composição química de **FF**, **FA** e de **FS**. No geral, verifica-se diminuição da concentração dos constituintes das frações flavanoídicas submetidas a irradiação gama com energias de 0, 1, 3, 5, 10 e 20 kGy (**FF**₀, **FF**₁, **FF**₃, **FF**₅, **FF**₁₀ e **FF**₂₀) quando ocorre o aumento da energia desta irradiação. Porém, o pico 2 (TR = 3,40 min) do cromatograma de CLAE mostra um aumento de concentração com o aumento da energia de irradiação gama, indicando tratar-se de um produto radiolítico. O extrato **FF**₀ foi submetido a fracionamento por CLAE semi-preparativa, resultando no isolamento de dois compostos. As análises por IV e RMN (1D e 2D) desses compostos indicaram tratar-se do ácido *trans*-ferúlico, isolado pela primeira vez na espécie, e da flavona 6-C-hexa-hidroxi-apigenina, cuja estrutura é descrita pela primeira vez na literatura.

A análise por CLAE das frações alcaloídicas **FA**₀, **FA**₁, **FA**₃, **FA**₅, **FA**₁₀ e **FA**₂₀ indica uma variação da concentração do componente correspondente ao pico 2 (TR = 3,88 min) do cromatograma. Porém, a variação de concentração da substância representada por esse pico não se correlaciona com o aumento da energia da irradiação gama. Além disto, o pico 3 (TR = 4,49 min) aumenta sua proporção a energias maiores de irradiação gama, indicando tratar-se também de um compostos radiolítico.

A análise por CLAE de **FS**₀, **FS**₁, **FS**₃, **FS**₅, **FS**₁₀ e **FS**₂₀ indica um aumento de concentração do pico 1 (TR = 5,75 min) com irradiação gama a 1 e 5 kGy e diminuição de

concentração com irradiação gama a 3, 10 e 20 kGy. A intensidade do pico 2 (TR = 7,95 min) diminui e, até mesmo, desaparece sob irradiação gama a partir de 1 kGy, mostrando ser uma saponina bastante instável sob essas condições.

Estes resultados dão importância e justificam a continuidade do trabalho fitoquímico, com a análise das frações apolares, bem como o estudo das frações polares que não foram estudadas ainda e, principalmente, identificação dos possíveis produtos radiolíticos formados a partir do uso de irradiação gama.

2. Atividade Antimicrobiana

Os extratos das folhas de *E. macrophyllus* possuem atividade bactericida bastante significativa, apesar de apresentar apenas 1/3 da atividade do controle frente a *B. subtilis* e *Staphylococcus aureus*.

Apesar de não se verificar um efeito da energia da irradiação gama sob a atividade bactericida dos extratos EH e EE frente a *B. subtilis*, EH mostra, no geral, uma diminuição de atividade frente *S. aureus* e o contrário é observado no EE, cujas amostras irradiadas foram mais ativas que a não irradiada com irradiação gama.

Como perspectiva, pretende-se dar continuidade do trabalho fitoquímico de isolamento de constituintes das frações ainda não estudadas, bem como avaliar a atividade biológica *in vivo* e *in vitro* de extratos, frações e constituintes que forem isolados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO Guidelines on good agricultural and collection Practices (GACP) for medicinal plants. World Health Organization, Geneva, 2003.
2. WHO Traditional Medicines Strategy: 2002-2005 – World Health Organization, Geneva, 2002.
3. BRANDÃO, M. G. L.; FREIRE, N.; VIANNA-SOARES, C. D. **Avaliação de qualidade de amostras comerciais de camomila.** Ca. Saúde Pública. 1998. p. 613-616 v.14.
4. ROCHA, L. O.; SOARES, M. M. S. R.; CORRÊA, C. L. **Análise da contaminação fúngica em amostras de *Cassia acutifolia* Delile (sene) e *Peumus boldus* (Molina) Lyons (boldo-do-Chile) comercializadas na cidade de Campinas, Brasil.** Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2004. p. 522 - 523 v. 40 n.4.
5. BHATNAGAR, D.; YU, J.; EHRlich, K. C. **Toxins of filamentous fungi.** *Chemical Immunology.* 2002. p. 167-206 v. 81.
6. YU, Y.; JEONG, I.; PARK, H.; OH, H.; JUNG, U.; JO, S. **Toxicology and stability of the components of an irradiated Korean medicinal herb, *Paeonia radix*.** 2004. p. 115-119 v. 71.
7. SEO, H. Y.; KIM, J. H.; SONG, H. P.; KIM, D. H.; BYUN, M. W.; KWON, J. H.; KIM, K. S. **Effects of gamma irradiation on the yields of volatile extracts of *Angelica gigas* Nakai.** Radiation Physics and Chemistry. 2007. p. 1869-1874 v. 76.
8. PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S.; ABRANTES, F. M.; SANTOS, L. G.; SOARES, C. R.; VELOSO, T. **Occurrence of aflatoxin M1 in milk consumed in the city of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil from August, 98 to April 99.** Ciencia e Tecnologia de Alimentos. 1999. p. 420-423 v. 19.
9. VIEIRA, I. F. R.; LEAL, A. S.; KRAMBROCK, K.; TAMBOURG, E. B. **Identification of irradiated medicinal plants by electron paramagnetic resonance.** Braz. J. Food Technol. 2007. p. 63-69 v. 10.
10. AZIZ, N. H.; MOUSSA, L. A. A. **Influence of gamma-irradiation on mycotoxin producing moulds and mycotoxins in fruits.** Food Control. 2002. p. 281-288 v. 13.
11. Giurlandi, S.; **Revista Brasileira Nuclear.** 2001. p. 2246 v. 8.
12. SCHREIBER, G. A.; HELLE, N.; BOGL, K. W. **Detection of irradiated food – Methods and routine applications.** J. Radiat. Biol. 1993. p. 105 v. 63.
13. NAWAR, W.W. **Lipids.**In: FENNEMA, O.R., ed. Food chemistry. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1985. p.139-244.
14. Letellier, P. R.; Nawar, W. W. **2-Alkylcyclobutanones from radiolysis of triglycerides.** Lipids. 1972. p. 75-76 v. 7.
15. DELINCEE, H. **Analytical methods to identify irradiated food – a review.** Radiation Physics and Chemistry. 2002. p. 455-458 v. 63.

16. BHATTACHARJEE, P.; SINGHAL, R.; GHOLAP, A. S.; VARIYAR, P. S.; BONGIRWAR, D. R. **Compositional profiles of γ - irradiated cashew nuts.** Food Chemistry. 2003. p. 159-163 v. 80.
17. Kim, H.; Cho, W.; Ahn, J.; Cho, D.; Cha, Y. **Identification of radiolytic marker compounds in the irradiated beef extract powder by volatile analysis.** Microchemical Journal. 2005. p. 127–137 v. 80.
18. BRASIL. Resolução RDC-nº 21, de 26 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico para Irradiação de Alimentos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, DF. Diário Oficial da União, 29 de janeiro de 2001.
19. BRUHN, C.M. **Consumer acceptance of irradiated foods theory and reality. Radiation Physical Chemistry.** 1998. p. 129-133 v. 52
20. CORRÊA, A. D.; BATISTA, R. S.; QUINTAS, L.E.; **Plantas medicinais – do cultivo à terapêutica.** Petrópolis, RJ: Vozes, 1998.
21. BEVILAQUA, G. A. P.; NEDEL, J. L.; ZUANAZZI, J. A.; CORREA, C. T. **DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE CHAPÉU DE COURO (*Echinodorus* spp.) NO RIO GRANDE DO SUL.** Ciência Rural. 2001. p. 213-218 v. 31.
22. CRONQUIST, A. **The Evolution and Classification of Flowering Plants.** Nova York. The New York Botanical Garden. 1988. 2 ed. p. 555.
23. JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. **Plant Systematics: a Phylogenetic Approach.** Sunderland. Sinauer Associates, Inc. 2008. 3 ed. p. 249-254.
24. HAYNES, R. R.; LES, D. H.; HOLM-NIELSEN, L. B. **Alismataceae** Em: KUBITZKI, K. **The Families and Genera of Vascular Plants-Flowering Plants Monocotyledons Alismatanae and Commelinanae (Except Graminae).** Alemanha. Springer. 1998. p. 11-15 v. 4.
25. LEHTONEN, S. **Systematics of the Alismataceae – A morphological evaluation.** Aquatic Botany. 2009 p. 279-290 v. 91.
26. HAINES, R. R.; HOLM-NIELSEN, L. B. **Notes on *Echinodorus* (Alismataceae).** Brittonia. 1986. p. 325-332 v. 38.
27. COSTA, J. Y.; FORNI-MARTINS, E. R.; VANZELA, A. L. L. **Karyotipe characterization of five Brazilian species of *Echinodorus* (Alismataceae) with chromosomal banding and 45S rDNA FISH.** Plant Systematics and Evolution. 2006 p. 119-127 v. 257.
28. MATIAS, L. Q. **O Gênero *Echinodorus* (Alismataceae) no domínio da Caatinga brasileira.** Rodriguesia. 2007. p. 743-774 v. 58.

29. BUZNEGO, M. T.; PÉREZ-SAAD, H. **Behavioral and Antiepileptic Effect of Acute Administration of the Extract of the Aquatic Plant *Echinodorus berteroi* (Sprengel) Fassett (Upright burhead)**. *Epilepsy & Behavior*. 2006. p. 40-45 v. 9.
30. MASAHIRO, O.; TSUJI, Y.; MAKARA, T.; SAKAMOTO, O. **Preparation for External Use for Skin/External Preparation Effective in Preventing and Reducing Dandruff and Falling Hair**. Kokai Tokkyo Koho. 1998.
31. TANAKA, C. M. A. **Constituintes Químicos de Cinco Espécies de *Echinodorus* e Avaliação do Beta Pineno como Substrato para Obtenção de Quirons mais Elaborados**. Tese de Doutorado da Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. 2000. p. 298.
32. TANAKA, C.M.A.; SARRAGIOTTO, M. H.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; MARSAIOLI, A. F. **A Cembrane from *Echinodorus grandiflorus***. *Phytochemistry*. 1997. p. 1547-1549 v. 44 n. 8.
33. COSTA, M.; TANAKA, C. M. A.; IMAMURA, P. M.; MARSAIOLI, A. J. **Isolation and Synthesis of a New Clerodane from *Echinodorus grandiflorus***. *Phytochemistry*. 1999. p. 117-122 v 50.
34. OLIVEIRA, F.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. São Paulo . Atheneu. 1991
35. LEITE, J. P. V.; PIMENTA, D. S.; GOMES, R. S. D. L.; DANTAS-BARROS, A. M. **Contribuição ao Estudo Farmacobotânico da *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli (chapéu-de-couro) – Alismataceae**. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2007. p. 242-248 v.17 n.2.
36. FILHO, A. G. Disponível em: http://www.forumaquario.com.br/portal/atlas_plant/f_echinodorus_macrophyllus.html
Acessado em: 13 maio 2010.
37. **Especial “A cura pelas Plantas – chapéu de couro**. Disponível em: <http://www.veleirovirtual.com/2008/09/26/especial-a-cura-pelas-plantas-chapeu-de-couro.html>
Acessado em: 13 maio 2010.
38. SOBRINHO, F. A. P.; SILVA, B. R. **Notas sobre *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli, uma planta aquática ornamental e medicinal**. Disponível em: <http://www.watergardenersinternational.org/journal/2-2/bruno/page1p.html>
Acessado em: 13 maio 2010.
39. MATIAS, L.Q. 2010. Alismataceae *in* **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB004264>.
Acessado em: 13 maio 2010
40. TOLEDO, M. R. S.; MORALES, L. A.; CONCI, M.; OLIVO, A. M.; SIMPLICIO, T. T.; VALÉRIO, D.; SOUZA, F. P.; VIEIRA, M. C.; BAZZANO, T. S. C.; HEREDITA, N. A. Z.; SCALON, S. P. Q.; LIMA, Z. V. **Comparação da Fitotoxicidade dos Extratos Aquosos de *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Mich. em Ratas Prenhes**. Disponível em: http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/arquivo/download/biblioteca/44_717.pdf. Acessado em: 13 maio 2010

41. PINTO, A. C.; REGO, C. G.; SIQUEIRA, A. M.; CARDOSO, C. C.; REIS, P. A.; MARQUES, E. A.; COELHO, M. G. P.; SABINO, K. C. C. **Immunosuppressive Effects of *Echinodorus macrophyllus* Aqueous Extract.** Journal of Ethnopharmacology. 2007. p. 435-439 v. 111.
42. LOPES, L. C.; ALBANO, F.; LARANJA, G. A.; ALVES, L. M.; SILVA, L. F. M.; SOUZA, G. P.; ARAUJO, I. M.; NOGUEIRA-NETO, J. F.; FELZENSZWALB, I.; KOVARY, K. **Toxicological evaluation by in vitro and in vivo assays of na aqueous extract prepared from *Echinodorus macrophyllus* leaves.** Toxicology Letters. 2000. p. 189-198 v.116.
43. KOBAYASHI, J.; SEKIGUCHI, M.; SHIGEMORI, H.; OHSAKI, A. **Echinophyllins A and B, Novel Nitrogen-Containing Clerodane Diterpenoids from *Echinodorus macrophyllus*.** Tetrahedron Letters. 2000. p. 2939-2943 v. 41.
44. KOBAYASHI, J.; SEKIGUCHI, M.; SHIMAMOTO, S.; SHIGEMORI, H.; OHSAKI, A. **Echinophyllins C-F, New Nitrogen-Containing Clerodane Diterpenoids from *Echinodorus macrophyllus*.** Journal of Natural Products. 2000. p. 1576-1579 v. 63.
45. KOBAYASHI, J.; SEKIGUCHI, M.; SHIGEMORI, H.; OHSAKI, A. **Chapecoderins A-C, New Labdane-Derived Diterpenoids from *Echinodorus macrophyllus*.** Journal of Natural Products. 2000. p. 375-377 v.63.
46. SHIGEMORI, H.; SHIMAMOTO, S.; SEKIGUCHI, M.; OHSAKI, A.; KOBAYASHI, J. **Echinolides A and B, New Cembrane Diterpenoids with an Eighth-Membered Lactone Ring from Leaves of *Echinodorus macrophyllus*.** Journal of Natural Products. 2002. p. 82-84 v. 65.
47. TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. **Microbiologia.** Artmed. 2005. 8 ed. p. 920.
48. MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFAÜER, M. A. **Microbiologia Médica.** Elsevier. 2006. 5 ed. p. 979.
49. MOREHOUSE, K. M.; KOMOLPRASERT, V. **Irradiation of Food and Packaging: An Overview.** ACS Symposium Series; American Chemical Society. 2004. p. 1-11.
50. Grupo Consultivo Internacional Sobre Irradiação de Alimentos (ICGFI). **Fatos Sobre Irradiação de Alimentos.** 1999. p. 1-46.
51. Prado, G.; Carvalho, E. P.; Madeira, J. E. G. C.; Morais, V. A. D.; Oliveira, M. S.; Corrêa, R. F.; Cardoso, V. N. **Efeito da irradiação (⁶⁰Co) na frequência fúngica de amendoim *in natura* em função do tempo de prateleira.** Ciênc. Tecnol. Aliment. 1999. p. 930-936 v. 30.
52. PRADO, G.; Oliveira, M. S.; Abrantes, F. M.; Santos, L. G.; Soares, C. R.; Veloso, T. **Occurrence of aflatoxin M₁ in milk consumed in the city of Belo Horizonte - Minas Gerais / Brasil - August/98 to April/99.** Ciênc. Tecnol. Aliment. 1999. p. 420-423 v. 19.
53. HUANG, C. H.; LEE, S. C.; CHEN, Y. S.; YAO, C. H. **Evaluation of Co-gamma radiosterilization on Chinese medicines with HPLC/FTIR.** Biomedical Chromatography. 2010.

54. SHIM, S. L.; HWANG, I. M.; RYU, K. Y.; JUNG, M. S.; SEO, H. Y.; KIM, H. Y.; SONG, H. P.; KIM, J. H.; LEE, J. W.; BYUN, M. W.; KWON, J. H.; KIM, K. S. **Effect of γ -irradiation on the volatile compounds of medicinal herb, *Paeoniae Radix***. Radiation Physics and Chemistry. 2009. p. 665-669 v. 78.
55. MIGDAL, W.; OWCZARCZYK, B.; KEDZIA, B.; HOLDERNA-KEDZIA, E.; SEGIET-KUJAWA, E. **THE EFFECT OF IONIZING RADIATION ON MICROBIOLOGICAL DECONTAMINATION OF MEDICAL HERBS AND BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS**. Radiation Physics and Chemistry. 1998. p. 91-94 v. 52.
56. SUHAJ, M.; RÁCOVÁ, J.; POLOVKA, M.; BREZOVÁ, V. **Effect of γ -irradiation on antioxidant activity of Black pepper (*Piper nigrum* L.)**. Food Chemistry. 2006. p. 696-704 v. 97.
57. RAJENDRA, G.; HYE-YOUNG, S.; HYUN-JU, L.; HYUN-PA, S.; DONG-HO, K.; MYUNG-WOO, B.; KUONG-SU, K. **Effect of γ -irradiation on volatile compounds of dried Welsh onion (*Allium fistulosum* L.)**. Radiation Physics and Chemistry. 2006. p. 322-328 v. 75.
58. PARK, J. G.; YOON, Y.; PARK, J. N.; HAN, I. J.; SONG, B. S.; KIM, J. H.; KIM, W. G.; HWANG, H. J.; HAN, S. B. **Effects of gamma irradiation and electron beam irradiation on quality, sensory, and bacterial populations in beef sausage patties**. Meat Science. 2010. p. 368-372 v. 85.
59. ANVISA. Resolução N° 21, de 26 de janeiro de 2001.
60. KIM, J. H.; CHUNG, B. Y.; KIM, J. S.; WI, S. G. **Effects of *in Planta* Gamma-Irradiation on Growth, Photosynthesis, and Antioxidative Capacity of Red Pepper (*Capsicum annuum* L.) Plants**. Journal of Plant Biology. 2005. p. 47-56 v. 48.
61. ZHU, F.; CAI, Y. Z.; BAO, J.; CORKE, H. **Effect of γ -irradiation on phenolic compounds in rice grain**. Food Chemistry. 2010. p. 74-77 v. 120.
62. KUMAR, K. K.; ANANTHAKUMAR, A. A.; AHMAD, R.; ADHIKARI, S.; VARIYAR, P. S.; SHARMA, A. **Effect of gamma-radiation on major aroma compounds and vanillin glucoside of cured vanilla beans (*Vanilla planifolia*)**. Food Chemistry. 2010. p. 841-845 v. 122.
63. CHOI, J. I.; KIM, H. J.; KIM, H. J.; CHUN, B. S.; AHN, D. H.; KIM, G. H.; LEE, J.W. **Changes in colour and antioxidant activities of *Hizikia fusiformis* cooking drips by gamma irradiation**. LWT – Food Science and Tecnology. 2010. p. 1074-1078 v. 43
64. GYAWALI, R.; SEO, H. Y.; LEE, H. J.; SONG, H. P.; KIM, D. H.; BYUN, M. W.; KIM, K. S. **Effect of γ -irradiation on volatile compounds of dried Welsh onion (*Allium fistulosum* L.)**. Radiation Physics and Chemistry. 2006 p. 322-328 v. 75.
65. HUSSAIN, P. R.; WANI, A. M.; MEENA, R. S.; DAR, M. A. **Gamma irradiation induced enhancement of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and antioxidant activity in peach (*Prunus pérsica* Bausch, Cv. Elberta)**. Radiation Physics and Chemistry. 2010. doi:10.1016/j.radphyschem.2010.03.018.

66. HUSSAIN, P. R.; MEENA, R. S.; DAR, M. A.; WANI, A. M. **Studies on enhancing the keeping quality of peach (*Prunus pérsica Bausch*) Cv. Elberta by gamma-irradiation.** Radiation Physics and Chemistry. 2008. p. 473-481 v. 77.
67. OWCZARCZYK, H. B.; MIGDAL, W.; KEDZIA, B. **The pharmacological activity of medicinal herbs after microbiological decontamination by irradiation.** Radiation Physics and Chemistry. 2000. p. 331-335 v. 57.
68. MATOS, F. J. A.; **Introdução à Fitoquímica Experimental.** Fortaleza: UFC, 1988.
69. TAKAHASHI, J. A.; PEREIRA, C. R.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D.; SILVA, L. G. F. E. **Antibacterial Activity of Eight Brazilian Annonaceae Plants.** Natural Product Letters. 2006. p. 21-26 v.20.
70. MELO, M. M.; JÚNIOR, D. V.; PINTO, M. C. L.; SILVEIRA, J. B.; FERRAZ, V.; ECCO, R.; PAES, P. R. O. **Intoxicação Experimental com Extratos de *Mascagnia rígida* (Malpighiaceae) em Camundongos.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2008. p.631-640 v.6 n.3.
71. GARDANA, C.; SCAGLIANTI, M.; PIETTA, P.; SIMONETTI, P. **Analysis of the Polyphenolic Fraction of Propolis from Different Sources by Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2007. p.390-399 v.45.
72. CHIRINOS, R.; BETALLELUZ-PALLARDEL, I.; HUAMÁN, A.; ARBIZU, C. **HPLC-DAD Characterisation of Phenolic Compounds from Andean Oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) Tubers and Their Contribution to the Antioxidant Capacity.** Food Chemistry. 2009. p. 1243-1251 v.113.
73. MEDANA, C.; CARBONE, F.; AIGOTTI, R.; APPENDINO, G.; BAIOCCHI, C. **Selective Analysis of Phenolic Compounds in Propolis by HPLC-MS/MS.** Phytochemical Analysis. 2008. p. 32-39 v.19.
74. SZEPESEY, L.; FEHER, I.; SZEPESEY, G.; GAZDAG, M. **High-performance Liquid Chromatography of Ergot Alkaloids.** Journal of Chromatography A. 2002. p. 271-280 v. 149, 11.
75. LIU, Q.; LIU, Y.; ZHENG, Y.; HONGGUI, Z. **Determination of 4 Kinds of Alkaloids in *Sophora flavescens* Ait. By HPLC.** Shizhen Guoyi Guoyao. 2006. p. 2211-2212 v. 17 n. 11.
76. LI, L.; SHENG, Y.; ZHANG, J.; WANG, C.; GUO, D. **HPLC Determination of Four Active Saponins from *Panax notoginseng* in Rat Serum and its Application to Pharmacokinetic Studies.** Biomedical Chromatography. 2004. p. 849-856 v.18.
77. WANG, C.; WU, J. A.; MCENTEE, E.; YUAN, C. **Saponins Composition in American Ginseng Leaf and Berry Assayed by High-Performance Liquid Chromatography.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2006. p. 2261-2266 v.54.

78. YANG, M.; SUN, J.; LU, Z.; CHEN, G.; GUAN, S.; LIU, X.; JIANG, B.; YE, M.; GUO D. **Phytochemical Analysis of Traditional Chinese Medicine Using Liquid Chromatography Coupled With Mass Spectrometry.** Journal of Chromatography A. 2009. p. 2045-2062 v.1216.
79. SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos.** Guanabara dois S. A. 1979. 3 ed. p. 299.
80. PRACHAYASITTIKUL, S.; SUPHAPONG, S.; WORACHARTCHEEWAN, A.; LAWUNG, R.; RUCHIRAWAT, S.; PRACHAYASITTIKUL, V. **Bioactive Metabolites from *Spilanthes acmella* Murr.** Molecules. 2009. p. 850-867 v. 14.
81. SRINIVASAN, M.; SUDHEER, A. R.; MENON, V. P. **Ferulic Acid: therapeutic potential through its antioxidant property.** Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition. 2007. p. 92-100 v. 42.
82. POQUET, L.; CLIFFORD, M. N.; WILLIAMSON, G. **Transport and metabolism of ferulic acid through the colonic epithelium.** Drug Metabolism and Disposition. 2008. p. 190-197 v. 36.
83. RHYU, M. R.; KIM, J. H.; KIM, E.Y. ***Radix angelica* elicits both nitric oxide-dependent and calcium influx-mediated relaxation in rat aorta.** Journal of Cardiovascular Pharmacology. 2005. p. 99-104 v. 46.
84. NONOYAMA, M.; TANAKA, A.; LAI, P. K.; KONNO, K.; KAWAZOE, Y.; SAKAGAMI, H. **Methods of inhibiting HIV replication in vitro using polymer of *p*-hydroxylated cinnamic acids.** US Pat.5346695. Chemical Abstract. 1994, 121, 272157.
85. OZAKI, Y. **Antiinflammatory effect of tetramethylpyrazine and ferulic acid.** Chemical & Pharmaceutical. Bulletin.1992. p. 954-956 v. 40.
86. KANSKI, J.; AKSENOVA, M.; STOYANOVA, A.; BUTTERFIELD, D. A. **Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: structure-activity studies.** Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition. 2002. p. 273-281 v. 13.
87. HAN, C.; DING, H.; CASTO, B.; STONER, G. D.; D'AMBROSIO, S. M. **Inhibition of the growth ofpre-malignant and malignant human oral cell lines by extracts and components of black raspberries.** Nutrition and Cancer. 2005. p. 207-217 v. 51.
88. SUZUKI, A.; KAGAWA, D.; FUJII, A.; OCHIAI, R.; TOKIMITSU, I.; SAITO, I. **Short and long-term effects of ferulic acid on blood pressure in spontaneously hypertensive rats.** American Journal of Hypertension. 2002. p. 351-357 v. 15.
89. HOEPPEN, B. H.; SMIT, C. J. B.; ROUX, D. G. **The Flavone C-Glycosides and Flavonol O-Glycosides of *Aspalathus acuminatus* (Rooibos Tea).** Biochemistry Journal. 1962. p. 507-511 v. 83.
90. GATTUSO, G.; BARRECA, D.; CARISTI, C.; GARGIULLI, C.; LEUZZI, U. **Distribution of Flavonoids and Furocoumarins in Juices from Cultivars of *Citrus bergamia* Risso.** J. Agric. Food Chem. 2007. p. 9921-9927 v. 55.

ANEXOS

Anexo A-1. Valores de tempo de retenção (TR, min), área e altura dos picos registrados no cromatograma de **FF₁** a 280 nm

Energia de irradiação = 1 kGy							
Picos	TR	Área	Altura	Picos	TR	AR	Altura
1	-	-	-	11	8,56	56.011,1	4.661,3
2	3,43	140.253,3	25.148,6	12	9,01	1.240.987,6	72.751,7
3	3,88	13.820,9	1.839,0	13	-	-	-
4	4,60	10.431,6	1.547,8	14	-	-	-
5	4,78	25.203,9	3.117,1	15	13,15	97.377,1	3.420,9
6	5,48	51.840,8	5.487,4	16	14,04	207.543,8	11.576,2
7	5,78	390.005,8	37.401,5	17	-	-	-
8	6,40	13.857,0	1.532,1	18	20,65	195.830,8	4.193,2
9	-	-	-	19	-	-	-
10	8,30	68.945,8	5.915,7				

Anexo A-2. Valores de tempo de retenção (TR, min), área e altura dos picos registrados no cromatograma de **FF₃** a 280 nm

Energia de irradiação = 3 kGy							
Picos	TR	Área	Altura	Picos	TR	AR	Altura
1	-	-	-	11	8,59	34.642,1	2.809,4
2	3,42	41.553,7	7.673,9	12	9,04	1.158.244,1	67.424,2
3	3,89	18.853,7	1.670,6	13	-	-	-
4	4,61	18.969,7	2.613,8	14	-	-	-
5	4,77	33.204,9	3.540,9	15	13,20	52.150,2	1.839,9
6	5,50	33.700,6	3.239,1	16	14,07	7.572,9	481,6
7	5,78	397.638,7	39.459,0	17	-	-	-
8	6,40	82.184,4	8.541,7	18	20,75	138.927,2	2.803,1
9	-	-	-	19	-	-	-
10	8,31	33.278,9	2.903,4				

Anexo A-3. Valores de tempo de retenção (TR, min), área e altura dos picos registrados no cromatograma de **FF₅** a 280 nm

Energia de irradiação = 5 kGy							
Picos	TR	Área	Altura	Picos	TR	AR	Altura
1	-	-	-	11	8,63	34.712,0	2.941,3
2	3,42	11.272,7	2.022,2	12	9,13	1.156.844,5	64.947,5
3	3,91	16.544,7	1.242,6	13	-	-	-
4	4,61	25.144,6	3.362,0	14	-	-	-
5	4,80	19.149,7	2.234,7	15	13,35	102.576,9	3.358,2
6	5,51	49.390,5	4.891,2	16	14,17	55.536,4	2.989,2
7	5,86	370.307,7	34.733,6	17	-	-	-
8	6,43	105.185,7	11.078,0	18	21,02	209.490,7	3.633,9
9	-	-	-	19	-	-	-
10	8,36	51.885,1	4.354,6				

Anexo A-4. Valores de tempo de retenção (TR, min), área e altura dos picos registrados no cromatograma de **FF₁₀** a 280 nm

Energia de irradiação = 10 kGy							
Picos	TR	Área	Altura	Picos	TR	AR	Altura
1	-	-	-	11	8,53	17.524,2	1.799,0
2	3,42	63.533,1	11.719,1	12	8,98	833.392,2	50.945,6
3	3,88	15.166,7	1.397,0	13	-	-	-
4	4,60	22.265,2	2.945,4	14	-	-	-
5	4,76	27.307,8	3.010,8	15	13,09	53.033,9	1.881,3
6	5,50	34.300,3	3.482,3	16	14,02	14.956,8	925,7
7	5,82	295.374,9	26.772,3	17	-	-	-
8	6,39	101.288,0	9.829,6	18	20,55	135.372,4	2.687,7
9	-	-	-	19	-	-	-
10	8,28	17.241,0	2.348,3				

Anexo A-5. Valores de tempo de retenção (TR, min), área e altura dos picos registrados no cromatograma de **FF₂₀** a 280 nm

Energia de irradiação = 20 kGy							
Picos	TR	Área	Altura	Picos	TR	AR	Altura
1	-	-	-	11	8,60	20.937,8	1.808,8
2	3,42	170.862,9	29.080,4	12	9,06	747.933,0	43.133,2
3	3,89	15.703,1	1.446,7	13	-	-	-
4	4,61	19.079,6	2.192,6	14	-	-	-
5	4,78	26.918,7	2.730,2	15	13,24	46.976,7	1.612,0
6	5,52	29.823,1	2.714,3	16	14,11	7.637,3	475,5
7	5,80	272.489,1	26.157,5	17	-	-	-
8	6,41	46.170,4	4.844,6	18	20,85	107.868,6	2.054,7
9	-	-	-	19	-	-	-
10	8,32	24.562,2	2.120,3				

Anexo A-6. Valores de tempo de retenção (TR, min), área e altura dos picos registrados no cromatograma de **FF₁** a 254 nm

Energia de irradiação = 1 kGy							
Picos	TR	Área	Altura	Picos	TR	AR	Altura
1	-	-	-	11	-	-	-
2	3,43	150.922,2	28.273,5	12	9,01	1.089.722,8	62.324,4
3	3,88	13.883,3	1.674,1	13	-	-	-
4	-	-	-	14	-	-	-
5	4,78	29.935,7	3.325,9	15	13,12	79.375,4	3.024,2
6	5,52	89.194,8	8.579,4	16	14,04	777.917,8	43.544,1
7	5,78	538.279,1	52.521,7	17	-	-	-
8	-	-	-	18	20,65	145.881,0	3.921,8
9	-	-	-	19	-	-	-
10	8,30	37.574,5	3.306,3				

Anexo A-7. Valores de tempo de retenção (TR, min), área e altura dos picos registrados no cromatograma de **FF₃** a 254 nm

Energia de irradiação = 3 kGy							
Picos	TR	Área	Altura	Picos	TR	AR	Altura
1	-	-	-	11	-	-	-
2	3,42	52.220,1	10.090,9	12	9,04	1.007.583,1	57.755,3
3	3,88	16.232,0	1.448,1	13	-	-	-
4	-	-	-	14	-	-	-
5	4,77	42.428,4	3.682,3	15	13,18	44.506,7	1.670,2
6	5,54	41.569,5	4.870,1	16	14,08	36.949,0	2.069,9
7	5,78	453.007,7	51.452,7	17	-	-	-
8	-	-	-	18	20,74	108.302,1	2.633,2
9	-	-	-	19	-	-	-
10	8,31	18.383,4	1.632,0				

Anexo A-8. Valores de tempo de retenção (TR, min), área e altura dos picos registrados no cromatograma de **FF₅** a 254 nm

Energia de irradiação = 5 kGy							
Picos	TR	Área	Altura	Picos	TR	AR	Altura
1	-	-	-	11	-	-	-
2	3,43	14.644,1	2.921,2	12	9,13	1.010.915,0	55.819,2
3	4,00	19.568,2	1.698,2	13	-	-	-
4	-	-	-	14	-	-	-
5	4,80	13.445,2	1.796,8	15	13,32	79.505,6	2.942,6
6	5,55	113.880,5	10.868,7	16	14,17	193.163,2	11.011,8
7	5,86	519.783,7	48.813,5	17	-	-	-
8	-	-	-	18	21,02	142.867,7	3.363,4
9	-	-	-	19	-	-	-
10	8,36	30.377,1	2.518,2				

Anexo A-9. Valores de tempo de retenção (TR, min), área e altura dos picos registrados no cromatograma de **FF₁₀** a 254 nm

Energia de irradiação = 10 kGy							
Picos	TR	Área	Altura	Picos	TR	AR	Altura
1	-	-	-	11	-	-	-
2	3,42	170.818,8	32.019,0	12	9,06	679.307,9	37.346,8
3	3,89	13.005,9	1.176,6	13	-	-	-
4	-	-	-	14	-	-	-
5	4,78	32.073,9	2.676,5	15	13,22	40.261,3	1.477,0
6	5,54	74.694,3	7.212,8	16	14,11	38.653,8	1.963,4
7	5,80	370.586,1	36.494,6	17	-	-	-
8	-	-	-	18	20,84	79.563,8	1.922,3
9	-	-	-	19	-	-	-
10	8,32	18.775,3	1.434,6				

Anexo A-10. Valores de tempo de retenção (TR, min), área e altura dos picos registrados no cromatograma de **FF₂₀** a 254 nm

Energia de irradiação = 20 kGy							
Picos	TR	Área	Altura	Picos	TR	AR	Altura
1	-	-	-	11	-	-	-
2	3,42	181.369,1	32.405,6	12	9,06	676.522,7	37.308,8
3	3,89	13.172,7	1.181,9	13	-	-	-
4	-	-	-	14	-	-	-
5	4,78	32.073,9	2.676,5	15	13,22	40.261,3	1.477,0
6	5,54	70.770,4	6.955,6	16	14,11	38.653,8	1.963,4
7	5,80	351.304,4	35.974,8	17	-	-	-
8	-	-	-	18	20,84	79.982,0	1.926,2
9	-	-	-	19	-	-	-
10	8,32	17.548,9	1.376,8				

Anexo A-11. Valores de tempo de retenção (TR, min), área e altura dos picos registrados no cromatograma de FA₁ a 280 nm

Energia de irradiação = 1 kGy			
Picos	TR	Área	Altura
1	-	-	-
2	3,94	150.460,7	22.038,7
3	4,49	398.118,9	49.765,0

Anexo A-12. Valores de tempo de retenção (TR, min), área e altura dos picos registrados no cromatograma de FA₃ a 280 nm

Energia de irradiação = 3 kGy			
Picos	TR	Área	Altura
1	-	-	-
2	3,87	78.622,1	10.914,8
3	4,42	140.022,6	17.330,6

Anexo A-13. Valores de tempo de retenção (TR, min), área e altura dos picos registrados no cromatograma de FA₅ a 280 nm

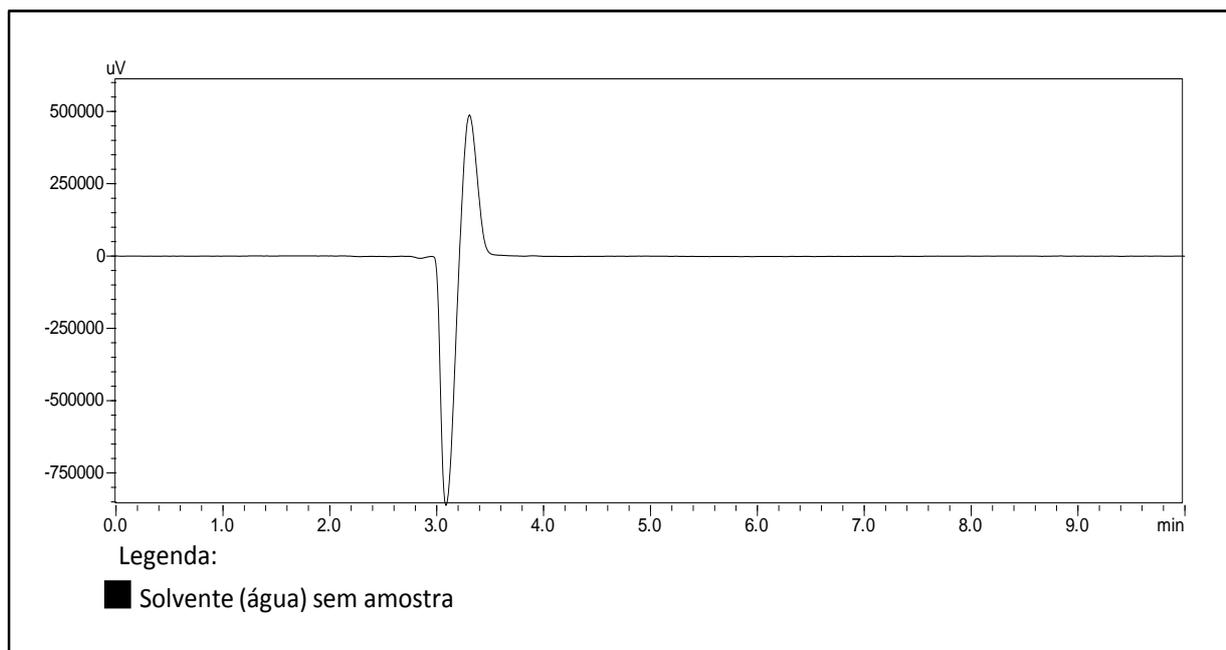
Energia de irradiação = 5 kGy			
Picos	TR	Área	Altura
1	2,82	340.220,2	57.839,4
2	3,90	192.594,6	25.617,2
3	-	-	-

Anexo A-14. Valores de tempo de retenção (TR, min), área e altura dos picos registrados no cromatograma de FA₁₀ a 280 nm

Energia de irradiação = 10 kGy			
Picos	TR	Área	Altura
1	-	-	-
2	3,86	212.337,0	26.354,5
3	4,43	183.112,4	22.810,8

Anexo A-15. Valores de tempo de retenção (TR, min), área e altura dos picos registrados no cromatograma de FA₂₀ a 280 nm

Energia de irradiação = 20 kGy			
Picos	TR	Área	Altura
1	-	-	-
2	3,88	118.637,2	15.536,1
3	4,44	140.361,3	18.017,7



Anexo A-16. Cromatograma CLAE do solvente (água) utilizado na diluição das amostras **FS**, a 210 nm.

Anexo A-17. Valores de tempo de retenção (TR, min), área e altura dos picos registrados no cromatograma de **FS₁** a 210 nm

Energia de irradiação = 1 kGy			
Picos	TR	Área	Altura
1	5,71	7.372.618,6	791.813,5
2	-	-	-

Anexo A-18. Valores de tempo de retenção (TR, min), área e altura dos picos registrados no cromatograma de **FS₃** a 210 nm

Energia de irradiação = 3 kGy			
Picos	TR	Área	Altura
1	5,78	2.020.650,1	245.554,8
2	-	-	-

Anexo A-19. Valores de tempo de retenção (TR, min), área e altura dos picos registrados no cromatograma de **FS₅** a 210 nm

Energia de irradiação = 5 kGy			
Picos	TR	Área	Altura
1	5,71	8.644.675,7	888.780,7
2	-	-	-

Anexo A-20. Valores de tempo de retenção (TR, min), área e altura dos picos registrados no cromatograma de **FS₁₀** a 210 nm

Energia de irradiação = 10 kGy			
Picos	TR	Área	Altura
1	5,77	1.154.417,1	143.006,5
2	-	-	-

Anexo A-21. Valores de tempo de retenção (TR, min), área e altura dos picos registrados no cromatograma de **FS₂₀** a 210 nm

Energia de irradiação = 20 kGy			
Picos	TR	Área	Altura
1	5,78	620.892,3	79.851,8
2	-	-	-