

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

**VIVIANE GOMES DA COSTA ABREU**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DAS PARTES  
AÉREAS DE *Lychnophora pinaster* Mart.**

**Belo Horizonte**

**2013**

UFMG/ICEX/DQ.984<sup>a</sup>  
T.446<sup>a</sup>

VIVIANE GOMES DA COSTA ABREU

**ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DAS PARTES AÉREAS DE *Lychnophora  
pinaster* Mart.**

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

**Belo Horizonte**

**2013**

**A162e** Abreu, Viviane Gomes da Costa

**2013** Estudo fitoquímico e biológico da partes aéreas de *Lychnophora pinaster* Mart [manuscrito] /

**T** Viviane Gomes da Costa Abreu. 2013.

[xi], 146 f. : il.

Bibliografia: 122-129

Orientador: Antônio Flávio de Carvalho Alcântara

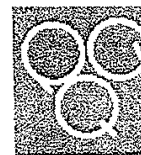
Co-orientadora: Dorila Piló Veloso

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

**1. Química orgânica - Teses 2. Triterpenos - Teses 3. Óleos essenciais –  
Teses 4. Radiação gama - Teses I. Alcântara, Antônio Flávio de Carvalho,  
Orientador II. Piló Veloso, Dorila, Co-orientadora III. Título.**

UFMG

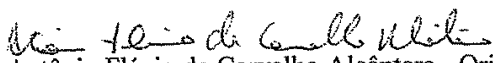
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEX  
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG  
TEL.: 031 - 3409-5732  
FAX: 031 - 3409-5711  
E-MAIL: pgquimic@qui.ufmg.br




"Estudo Fitoquímico e Biológico das Partes Aéreas de *Lychnophora pinaster*  
Mart"

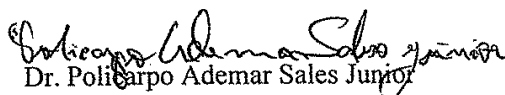
Viviane Gomes da Costa Abreu

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

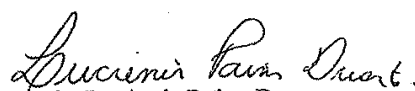
  
Prof. Antônio Flávio de Carvalho Alcântara - Orientador  
UFMG

  
Profa. Dorila Piló Veloso - Coorientadora  
UFMG

  
Profa. Patrícia Machado de Oliveira  
UFVJM

  
Dr. Polícarpo Ademar Sales Júnior  
FIOCRUZ-MG

  
Profa. Denise Carmona Cara Machado  
UFMG

  
Profa. Lucienir Pains Duarte  
UFMG

Belo Horizonte, 14 de agosto de 2013.

## DEDICATÓRIA

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

Ao meu querido esposo Cleber Otávio e ao meu querido filho Davi que está por vir.

Aos meus pais, Jayme e Imaculada, e minhas irmãs, Janaína e Joyce.

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

*“A ciência não é uma ilusão,  
mas seria uma ilusão acreditar  
que poderemos encontrar noutra lugar  
o que ela não nos pode dar. ”*

*Sigmund Freud*

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Primeiramente agradeço à Deus, por estar sempre presente em minha vida, e certamente por acreditar nele *superei* todos os obstáculos que encontrei nesta caminhada, e agradeço ainda por me conceder um filho(a) em um dos momentos mais especiais da minha vida.

Agradeço imensamente ao meu esposo Cleber Abreu, que durante todo este período esteve ao meu lado, sempre com palavras positivas, amorosas e incentivadoras sem as quais *não* teria forças para continuar em busca de meus sonhos.

Aos meus pais, Jayme e Imaculada, presenças marcantes nesta fase de minha vida, sem as orientações que recebi no início de minha vida estudantil *já* teria chegado onde cheguei. São os responsáveis pelo alicerce educacional.

Às minhas irmãs queridas, Janaína e Joyce, exemplos profissionais, sem o incentivo e apoio recebidos durante este período também *não* chegaria onde cheguei. Tenho por vocês uma profunda admiração.

Ao meu cunhado Maurinho, exemplo de companheirismo e de bondade.

Ao meu orientador Dr. Antônio Flávio Carvalho Alcântara, o qual me acolheu quando aqui cheguei, um exemplo de profissional, paciente e amigo, com quem dividi vários momentos de angústia e sempre com palavras incentivadoras e um bom humor incrível tornava o meu dia realmente incrível. Agradeço a valiosa orientação recebida durante este período.

À Dra. Dorila Piló-Veloso pela co-orientação, uma pessoa de uma sabedoria admirável.

Ao Geone, amigo que se tornou valioso, obrigada por toda a sua contribuição neste trabalho, companheirismo, estes anos ao seu lado foram realmente incríveis, te admiro muito.

Ao Thiago, Alison e Clináscia, obrigada por todo o companheirismo durante o curso.

À Bianca, Brenda, Luciana, Michelle, Priscila, Sandro e Rodrigo, alunos de iniciação científica, pela imensa contribuição neste trabalho.

À Dra. Denise Carmona, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e ao Dr. Humberto Fontoura, da Universidade Estadual de Goiás, agradeço pela imensa contribuição nos ensaios de atividade anti-inflamatória.

À Dra. Vany Ferraz, do Departamento de Química da UFMG, pela valiosa colaboração na obtenção dos cromatogramas de CG.

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

À equipe do Laboratório de Ressonância Nuclear Magnética do Departamento de Química da UFMG pela obtenção dos espectros de RMN.

Aos professores Dra. Dorila Piló-Veloso, Dra. Jacqueline Takahashi, Dra. Lúcia Pimenta, Dr. Ângelo de Fátima, Dra. Clésia Nascentes, Dra. Ana Luiza Quadros e Dra. Maria Amélia pelo apoio dispensado durante o curso de pós-graduação, sem o qual jamais teria conseguido concluir os créditos exigidos.

Aos órgãos financiadores de pesquisa, CNPQ, CAPES e FAPEMIG e à Universidade Federal de Minas Gerais.

À Paulete, Kátia e LÍlian pela prontidão e presteza com que nos auxiliam.

À equipe de limpeza por tornar o nosso ambiente de trabalho mais agradável.

À equipe de porteiros por nos receber diariamente com um belo bom dia.

À todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho que é apenas parte de um sonho maior.

*"Ciência é, antes de tudo, um conjunto de atitudes.  
É uma disposição para lidar com fatos  
e não com o que foi dito por alguém a respeito deles."*

*Frederick Skinner*

## RESUMO

Estudos etnofarmacológicos indicaram o uso de extratos de espécies do gênero *Lychnophora* (Asteraceae) como anti-inflamatório. As partes aéreas de *Lychnophora pinaster* Mart. foram submetidas a extração a frio em hexano e posteriormente em etanol, obtendo-se os extratos HE e EE, uma outra parte foi submetida a decocção em água para obtenção do extrato aquoso, EA. Esses extratos foram submetidos a estudo biomonitorado, sendo possível a identificação de fitoconstituintes provenientes do fracionamento cromatográfico de HE e EA, que foram caracterizados por IV e RMN. As frações em hexano e diclorometano de HE forneceram os triterpenos pentacíclicos 3-*O*-acetil- $\alpha$ -amirina,  $\alpha$ -amirina e lupeol, e o sesquiterpeno ácido 2,8-dihidroxi-8,11,11-trimetil-12-oxabicyclo[7.2.1]dode-4-en-4-óico, composto descrito pela primeira vez na literatura. A fração fenólica de EA foi submetida a fracionamento cromatográfico por HPLC e forneceu o flavonoide quercetina. A atividade anti-inflamatória alegada em estudos etnofarmacológicos foi confirmada através de modelo experimental desenvolvido neste trabalho. O triterpeno lupeol mostrou uma redução significativa da intensidade do processo inflamatório, entretanto, este mesmo fitoconstituente em mistura com o triterpeno  $\alpha$ -amirina e a  $\alpha$ -amirina isolada mostraram uma redução menos significativa do processo inflamatório. Os estudos teóricos realizados com estes dois triterpenos estabeleceram uma relação entre estrutura química e atividade biológica, uma vez que através dos cálculos de contribuições atômicas para formação dos orbitais moleculares para os dois triterpenos foi possível verificar a importância do sistema  $\pi$  no mecanismo de ação do lupeol, uma vez que tal sistema se encontra mais disponível na estrutura deste triterpeno para interação com o sítio ativo. Em relação aos testes tripanocidas, o sesquiterpeno ácido 2,8-dihidroxi-8,11,11-trimetil-12-oxabicyclo[7.2.1]dode-4-en-4-óico mostrou significativa atividade, embora menor que a atividade apresentada pelo controle. Os estudos com radiação gama indicaram que os triterpenos  $\alpha$ -amirina, *O*Ac- $\alpha$ -amirina e lupeol submetidos à radiação não sofreram alteração detectável por



RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ . A mesma análise pode ser feita com a fração fenólica de EA submetida à radiação, uma vez que não houve formação de produto radiolítico na dose de 3,0 kGy. No entanto, as substâncias em maior concentração neste extrato apresentaram diminuição de concentração, mostrando que esta dose apenas degrada os compostos fenólicos deste extrato sem formação de produtos radiolíticos. O estudo com radiação do material vegetal para posterior extração dos óleos essenciais mostrou que a proporção relativa dos compostos não é alterada de forma dose-dependente. A partir do estudo dos óleos essenciais foi possível identificar dez compostos, sendo que nove foram identificados pela primeira vez no óleo essencial de *L. pinaster*: 2-metil-2-feniletanoato de propila, *cis*- $\alpha$ -bisaboleno, *cis*- $\alpha$ -bisaboleno epóxido, espatulenol, *trans*- $\alpha$ -bergamotol, *cis*-lanceol, *trans*- $\alpha$ -bisaboleno epóxido, acetato de nerolidil e metanoato de *n*-hexadecanoila.

**Palavras-chaves:** *Lychnophora pinaster*, atividade anti-inflamatória, triterpenos, radiação gama, atividade tripanocida, óleos essenciais.

## ABSTRACT

Ethnopharmacological studies have indicated the use of extracts of the genus *Lychnophora* (Asteraceae) as anti-inflammatory. The aerial parts of *Lychnophora pinaster* Mart. have been subjected to cold extraction in hexane and then in ethanol, obtaining extracts HE and EE, another part have been subjected to water decoction to obtain the extract aqueous EA. These extracts have been subjected to bioassay-guided study, making it possible to identify phytochemicals from the fractionation of HE and EA, which have been characterized by IR and NMR. The fractions from dichloromethane and hexane from HE have provided the pentacyclic triterpenes 3-*O*-acetyl- $\alpha$ -amyrin,  $\alpha$ -amyrin and lupeol, and sesquiterpene 2,8-dihydroxy, 8,11,11-trimethyl-12-oxabicyclo [7.2.1] dode-4-ene-4-oic acid, compound described at the first time in the literature. The phenolic fraction of EA have been submitted to fractionation by HPLC and have provided the flavonoid quercetin. The anti-inflammatory activity alleged in ethnopharmacological studies has been confirmed by experimental model developed in this work. The triterpene lupeol has showed a significant reduction of the intensity of the inflammatory process, however, this same phytoconstituent mixed with triterpene  $\alpha$ -amyrin and  $\alpha$ -amyrin isolated have showed a less significant reduction of the inflammatory process. Theoretical studies carried out with these two triterpenes have established a relationship between chemical structure and biological activity, since by calculating the atomic contributions to the formation of molecular orbitals for the two triterpenes was possible to verify the importance of  $\pi$  system in the mechanism of action of lupeol, since such a system is more available in this triterpene for interaction with the active site. Concerning about trypanocidal tests the sesquiterpene 2,8-dihydroxy, 8,11,11-trimethyl-12-oxabicyclo [7.2.1] dode-4-ene-4-oic acid has showed significant activity, although lower than the activity presented by control. Studies with gamma radiation have indicated that the triterpenes  $\alpha$ -amyrin, *O*Ac- $\alpha$ -amyrin and lupeol submitted to radiation have not change detectable by  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$ . The same analysis has

been made with the phenolic fraction obtained from EA, once there was no product formation in a dose radiolytic of 3.0 kGy. However, the substances in higher concentration in this extract have showed a decrease in concentration, showing that this dose degrades only this phenolic compounds without formation of radiolytic products. The study of radiation from the plant material for subsequent extraction of essential oils has showed the relative proportion of the compounds has not been altered in a dose-dependent. From the study of the essential oils was possible to identify ten compounds, and nine of ten compounds were first identified in the essential oil of 2-methyl-2-propyl feniletanoato, cis- $\alpha$ -bisabolene, cis-epoxide  $\alpha$ -bisabolene, spathulenol, trans- $\alpha$ -bergamotol, cis-lanceol, trans-epoxide- $\alpha$ -bisabolene, nerolidyl acetate and *n*-hexadecanoil metanoate.

**Keywords:** *Lychnophora pinaster*, anti-inflammatory activity, triterpenes, gamma radiation, trypanocidal activity, essential oils.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS E ESQUEMAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xi
APRESENTAÇÃO.....	1
CAPÍTULO I – <i>Lychnophora pinaster</i> .....	4
I.1. A família Asteraceae.....	5
I.2. O gênero <i>Lychnophora</i> .....	5
I.3. A espécie <i>Lychnophora pinaster</i> Mart.....	7
I.3.1. Atividade biológica.....	9
I.3.2. Constituintes químicos isolados anteriormente em <i>L. pinaster</i> .....	9
CAPÍTULO II – ESTUDOS FITOQUÍMICOS E ESTRUTURAIS.....	14
II.1. Introdução.....	15
II.2. Materiais e Métodos.....	15
II.3. Metodologia fitoquímica.....	17
II.3.1. Coleta do material vegetal.....	17
II.3.2. Obtenção dos extratos hexânico (EH) e etanólico (EE).....	17
II.3.3. Fracionamento do extrato hexânico de <i>L. pinaster</i> (EH).....	18
II.3.4. Testes Químicos (Teste de Lieberman-Burchard).....	22
II.4. Análise estrutural dos fitoconstituintes isolados do Extrato Hexânico.....	23
II.4.1. Análise Estrutural de EH-H1-R2-1 (LpI).....	23
II.4.2. Análise Estrutural de EH-H1-R4 (LpII).....	28
II.4.3. Análise Estrutural de EH-H1-R6 (LpIII).....	31
II.4.4. Análise Estrutural de EH-H1-R7 (LpIV).....	33

II.4.5. Análise Estrutural de EH-H2-H9A1-1 (LpIII).....	36
II.4.6. Análise Estrutural de EH-D5-S4 (LpV).....	36
<b>CAPÍTULO III – ESTUDOS DO EFEITO DA RADIAÇÃO GAMA EM EXTRATOS, FRAÇÕES E FITOCONSTITUINTES ISOLADOS DE <i>L. pinaster</i>.....</b>	<b>52</b>
III.1. O uso da radiação gama em plantas.....	53
III.2. Materiais e Métodos.....	54
III.3. Efeito da radiação gama em triterpenos.....	54
III. 3.1. Procedimento experimental.....	54
III. 3.2. Resultados e Discussão.....	54
III.4. Análise do extrato fenólico irradiado.....	56
III.4.1. Procedimento experimental.....	56
III.4.2. Obtenção do extrato fenólico.....	57
III.4.3. Prospecção Fitoquímica.....	58
III.4.4. Resultados da Prospecção Fitoquímica.....	59
III.4.5. Análise por CLAE da fração fenólica (FF-I).....	60
III.5. Análise de óleos essenciais.....	68
III.5.1. Parte experimental.....	68
III.5.2. Resultados e Discussão.....	70
III.5.3. Efeito da radiação gama na composição dos óleos essenciais.....	75
<b>CAPÍTULO IV – ESTUDOS BIOLÓGICOS E DA RELAÇÃO ESTRUTURA QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA.....</b>	<b>78</b>
IV.1. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....	79
IV.1.1. Introdução.....	79
IV.1.2. Materiais e Métodos.....	81
IV.1.2.1. Preparação do gel.....	82

IV.1.3.1. Obtenção da lesão muscular.....	83
IV.1.3.2. Tratamento da lesão por fonoforese.....	84
IV.1.3.3. Obtenção das Lâminas Histológicas.....	84
IV.1.4. Resultados e Discussão.....	85
IV.2. ATIVIDADE TRIPANOCIDA.....	108
IV.2.1. Introdução.....	108
IV.2.2. Procedimento experimental.....	109
IV.2.3. Resultados e Discussão.....	110
IV.3. ESTUDOS TEÓRICOS DA RELAÇÃO ESTRUTURA QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	112
IV.3.1. Introdução.....	112
IV.3.2. Metodologia Teórica.....	112
IV.3.3. Resultados e Discussão.....	113
CONCLUSÕES.....	117
I. Dos Estudos Fitoquímicos.....	118
II. Dos Estudos Biológicos.....	118
III. Dos Estudos com radiação gama.....	119
IV. Considerações finais.....	120
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122
ANEXO I.....	130
ANEXO II.....	143
ANEXO III.....	145

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>FIGURA I.1.</b> Distribuição geográfica das espécies do gênero <i>Lychnophora</i> no Brasil.	6
<b>FIGURA I.2.</b> Representantes das seis seções do gênero <i>Lychnophora</i> : (A) seção <i>Lychnophora</i> , (B) seção <i>Lychnophoriopsis</i> , (C) seção <i>Lychnophorioides</i> , (D) seção <i>Sphaeranthus</i> , (E) seção <i>Chronopappus</i> e (F) seção <i>Lychnocephaliopsis</i> .	7
<b>FIGURA I.3.</b> Fotografias de exemplares de <i>Lychnophora pinaster</i> Mart.	8
<b>FIGURA I.4.</b> Estrutura química de fitoconstituintes isolados anteriormente das partes aéreas de <i>L. pinaster</i> .	10
<b>FIGURA I.5.</b> Estrutura química de fitoconstituintes isolados anteriormente das partes aéreas de <i>L. pinaster</i> .	11
<b>FIGURA I.6.</b> Estrutura química de fitoconstituintes isolados previamente das folhas <i>L. pinaster</i> : 3-OAc-lupeol ( <b>1</b> ), 3-OAc-pseudotaraxasterol ( <b>2</b> ), 3-OAc- $\alpha$ -amirina ( <b>3</b> ), 4,4-dimetil-cholesta-22-24-dien-5-ol ( <b>4</b> ), $\alpha$ -amirina ( <b>5</b> ) e lupeol ( <b>6</b> ); dos caules: ( <b>5</b> ), ( <b>6</b> ), 3 $\beta$ -OAc, $\Delta^7$ -baurenila ( <b>7</b> ), friedelina ( <b>8</b> ), estigmasterol ( <b>9</b> ) e $\beta$ -sitosterol ( <b>10</b> ); flores: <b>9</b> e <b>10</b> .	12
<b>FIGURA II.1.</b> Espectro de absorção na região do Infravermelho de LpI (KBr).	23
<b>FIGURA II.2.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de LpI (200 MHz; $\text{CDCl}_3$ ).	24
<b>FIGURA II.3.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de LpI (50 MHz; $\text{CDCl}_3$ ).	26
<b>FIGURA II.4.</b> Subespectro DEPT 135° de LpI (50 MHz; $\text{CDCl}_3$ ).	26
<b>FIGURA II.5.</b> Espectro de absorção na região do Infravermelho de LpII (KBr).	28

<b>FIGURA II.6.</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de LpII (200 MHz; $\text{CDCl}_3$ ).	29
<b>FIGURA II.7.</b>	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de LpII (50 MHz; $\text{CDCl}_3$ ).	30
<b>FIGURA II.8.</b>	Subespectro DEPT $135^\circ$ de LpII (50 MHz; $\text{CDCl}_3$ ).	31
<b>FIGURA II.9.</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de LpIII (200 MHz; $\text{CDCl}_3$ ).	32
<b>FIGURA II.10.</b>	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de LpIII (50 MHz; $\text{CDCl}_3$ ).	33
<b>FIGURA II.11.</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de LpIV (200 MHz; $\text{CDCl}_3$ ).	34
<b>FIGURA II.12.</b>	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de LpIV (50 MHz; $\text{CDCl}_3$ ).	35
<b>FIGURA II.13.</b>	Subespectro DEPT $135^\circ$ de LpIV (50 MHz; $\text{CDCl}_3$ ).	36
<b>FIGURA II.14.</b>	Espectro de absorção na região do Infravermelho de LpV (KBr).	37
<b>FIGURA II.15.</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de LpV (400 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ).	38
<b>FIGURA II.16.</b>	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de LpV (100 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ).	39
<b>FIGURA II.17.</b>	Subespectro DEP $135^\circ$ de LpV (100 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ).	39
<b>FIGURA II.18.</b>	Mapa de contornos HSQC de LpV ( $^1\text{H}$ : 400 MHz; $^{13}\text{C}$ : 100 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ).	41
<b>FIGURA II.19.</b>	Expansão do mapa de contornos HSQC de LpV ( $^1\text{H}$ : 400 MHz; $^{13}\text{C}$ : 100 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ).	42
<b>FIGURA II.20.</b>	Expansão do mapa de contornos HSQC de LpV ( $^1\text{H}$ : 400 MHz; $^{13}\text{C}$ : 100 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ).	43
<b>FIGURA II.21.</b>	Mapa de contornos COSY de LpV (400 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ).	44
<b>FIGURA II.22.</b>	Expansão do mapa de contornos COSY de LpV (400 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ).	45
<b>FIGURA II.23.</b>	Mapa de contornos HMBC de LpV ( $^1\text{H}$ : 400 MHz; $^{13}\text{C}$ : 100 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ).	46



<b>FIGURA II.24.</b>	Expansão do mapa de contornos HMBC de LpV ( $^1\text{H}$ : 400 MHz; $^{13}\text{C}$ : 100 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ).	47
<b>FIGURA II.25.</b>	Correlação entre dados teóricos e experimentais de RMN de $^{13}\text{C}$ para LpV.	51
<b>FIGURA III.1.</b>	Foto dos resultados dos testes químicos para identificação de (A) flavonoides e (B) alcaloides.	59
<b>FIGURA III.2.</b>	Estrutura básica dos flavonoides.	60
<b>FIGURA III.3.</b>	Cromatograma de CLAE de FF a 280 (preto) e 360 nm (rosa) em TR entre 0,0 e 60,0 min.	61
<b>FIGURA III.4.</b>	Cromatograma de CLAE a 280 (preto) e 360 nm (rosa) em TR entre 0,0 e 60,0 min de FF-I submetida a radiação gama com dose de 3 kGy.	62
<b>FIGURA III.5.</b>	Cromatograma de CLAE a 280 nm de FF (preto) e FF-I (vermelho) em TR entre 0,0 e 60,0 min.	62
<b>FIGURA III.6.</b>	Cromatograma de CLAE com a sobreposição de FF a 280 (preto) e 360 nm (vermelho) com mistura de padrões de rutina (TR = 5,33 min), quercetina (TR = 14,05 min) e canferol (27,53 min) em TR entre 0,0 e 30,0 min.	64
<b>FIGURA III.7.</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de LpVI (400 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ).	65
<b>FIGURA III.8.</b>	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de LpVI (100 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).	66
<b>FIGURA III.9.</b>	Subespectro DEPT 135° de LpVI (100 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ).	67
<b>FIGURA III.10.</b>	Cromatograma de CG-FID dos padrões de hidrocarbonetos injetados nas mesmas condições experimentais de análise para os óleos essenciais.	71

<b>FIGURA III.11.</b>	Cromatograma de CG-FID de OEA <sub>0</sub> entre 0 e 40 min.	72
<b>FIGURA III.12.</b>	Cromatograma de CG-EM de OEA <sub>0</sub> entre 0 e 40 min.	73
<b>FIGURA III.13.</b>	Cromatograma de CG-EM de OEA <sub>0</sub> ampliado na região entre 12 e 30 min.	73
<b>FIGURA III.14.</b>	Estrutura química das substâncias identificadas no óleo essencial de <i>L. pinaster</i> .	75
<b>FIGURA III.15.</b>	Gráfico da variação do percentual relativo dos compostos identificados no óleo essencial de <i>L. pinaster</i> .	77
<b>FIGURA IV.1.</b>	Fotomicrografia do aspecto histológico geral da lesão após o trauma muscular.	85
<b>FIGURA IV.2.</b>	Fotomicrografias de histologia do tecido subcutâneo dos músculos da pata de ratos controle (esquerda) e submetido a tratamento com Dexametasona (direita) após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C).	90
<b>FIGURA IV.3.</b>	Fotomicrografias de histologia do tecido subcutâneo dos músculos da pata de ratos controle (esquerda) e submetido a tratamento com EH (direita) após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C).	91
<b>FIGURA IV.4.</b>	Fotomicrografias de histologia do tecido subcutâneo dos músculos da pata de ratos controle (esquerda) e submetido a tratamento com EE (direita) após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C).	92
<b>FIGURA IV.5.</b>	Fotomicrografias de histologia do tecido subcutâneo dos músculos da pata de ratos controle (esquerda) e submetido a tratamento com EH-H1 (direita) após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C).	93

- FIGURA IV.6.** Fotomicrografias de histologia do tecido subcutâneo dos músculos da pata de rato controle (esquerda) e submetido a tratamento com EH-D1 (direita) após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C). 94
- FIGURA IV.7.** Fotomicrografias de histologia do tecido subcutâneo dos músculos da pata de ratos controle (esquerda) e submetido a tratamento com EH-A1 (direita) após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C). 95
- FIGURA IV.8.** Fotomicrografias de histologia do tecido subcutâneo dos músculos da pata de ratos controle (esquerda) e submetido a tratamento com LpIII (direita) após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C). 96
- FIGURA IV.9.** Fotomicrografias de histologia do tecido subcutâneo dos músculos da pata de ratos controle (esquerda) e submetido a tratamento com LpIV (direita) após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C). 97
- FIGURA IV.10.** Fotomicrografias de histologia do tecido subcutâneo dos músculos da pata de ratos controle (esquerda) e submetido a tratamento com mistura de LpIII e LpIV (direita) após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C). 98
- FIGURA IV.11.** Fotomicrografias de histologia do tecido subcutâneo dos músculos da pata de ratos controle (esquerda) e submetido a tratamento com mistura de *OAc*-pseudotaraxasterol e *OAc*-lupeol (direita) após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C). 99

<b>FIGURA IV.12.</b>	Fotomicrografias de histologia do tecido subcutâneo dos músculos da pata de ratos controle (esquerda) e submetido a tratamento com mistura de estigmasterol e $\beta$ -sitosterol (direita) após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C).	100
<b>FIGURA IV.13.</b>	Fotomicrografias de histologia do tecido subcutâneo dos músculos da pata de ratos controle (esquerda) e submetido a tratamento com EA (direita) após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C).	101
<b>FIGURA IV.14.</b>	Fotomicrografias de histologia do tecido subcutâneo dos músculos da pata de ratos controle (esquerda) e submetido a tratamento com FA (direita) após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C).	102
<b>FIGURA IV.15.</b>	Fotomicrografias de histologia do tecido subcutâneo dos músculos da pata de ratos controle (esquerda) e submetido a tratamento com FF (direita) após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C).	103
<b>FIGURA IV.16.</b>	Fotomicrografias de histologia do tecido subcutâneo dos músculos da pata de ratos controle (esquerda) e submetido a tratamento com LpVI (direita) após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C).	104
<b>FIGURA IV.17.</b>	População orbital do HOMO (A) e HOMO-1 (B) da $\alpha$ -amirina.	114
<b>FIGURA IV.18.</b>	População orbital do HOMO (C) e HOMO-1 (D) do lupeol.	114
<b>FIGURA IV.19</b>	População orbital do LUMO (E) e LUMO+1 (F) da $\alpha$ -amirina.	115
<b>FIGURA IV.20</b>	População orbital do LUMO (G) e LUMO+1 (H) do lupeol.	116

- FIGURA A.1.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do triterpeno  $\alpha$ -amirina irradiado com dose de 10 kGy (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) (figura maior), comparado com espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do triterpeno  $\alpha$ -amirina não irradiado (200 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) (figura menor). 131
- FIGURA A.2.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do triterpeno  $\alpha$ -amirina irradiado com dose de 50 kGy (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) (figura maior), comparado com espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do triterpeno  $\alpha$ -amirina não irradiado (200 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) (figura menor). 132
- FIGURA A.3.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do triterpeno  $\alpha$ -amirina irradiado na dose de 10 kGy (100 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) (figura maior), comparado com espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do triterpeno  $\alpha$ -amirina não irradiado (50 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) (figura menor). 133
- FIGURA A.4.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do triterpeno  $\alpha$ -amirina irradiado na dose de 50 kGy (100 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) (figura maior), comparado com espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do triterpeno  $\alpha$ -amirina não irradiado (50 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) (figura menor). 134
- FIGURA A.5.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do triterpeno 3-OAc- $\alpha$ -amirina irradiado com dose de 10 kGy (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) (figura maior), comparado com espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do triterpeno 3-OAc- $\alpha$ -amirina não irradiado (200 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) (figura menor). 135
- FIGURA A.6.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do triterpeno 3-OAc- $\alpha$ -amirina irradiado com dose de 50 kGy (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) (figura maior), comparado com espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do triterpeno 3-OAc- $\alpha$ -amirina não irradiado (200 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) (figura menor). 136
- FIGURA A.7.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do triterpeno 3-OAc- $\alpha$ -amirina

	irradiado na dose de 10 kGy (100 MHz; CDCl <sub>3</sub> ) (figura maior), comparado com espectro de RMN de <sup>13</sup> C do triterpeno 3-OAc- $\alpha$ -amirina não irradiado (50 MHz; CDCl <sub>3</sub> ) (figura menor).	137
<b>FIGURA A.8.</b>	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C do triterpeno 3-OAc- $\alpha$ -amirina irradiado na dose de 50 kGy (100 MHz; CDCl <sub>3</sub> ) (figura maior), comparado com espectro de RMN de <sup>13</sup> C do triterpeno 3-OAc- $\alpha$ -amirina não irradiado (50 MHz; CDCl <sub>3</sub> ) (figura menor).	138
<b>FIGURA A.9.</b>	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do triterpeno lupeol irradiado com dose de 10 kGy (400 MHz; CDCl <sub>3</sub> ) (figura maior), comparado com espectro de RMN de <sup>1</sup> H do triterpeno lupeol não irradiado (200 MHz; CDCl <sub>3</sub> ) (figura menor).	139
<b>FIGURA A.10.</b>	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do triterpeno lupeol irradiado com dose de 50 kGy (400 MHz; CDCl <sub>3</sub> ) (figura maior), comparado com espectro de RMN de <sup>1</sup> H do triterpeno lupeol não irradiado (200 MHz; CDCl <sub>3</sub> ) (figura menor).	140
<b>FIGURA A.11.</b>	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C do triterpeno lupeol irradiado na dose de 10 kGy (100 MHz; CDCl <sub>3</sub> ) (figura maior), comparado com espectro de RMN de <sup>13</sup> C do triterpeno lupeol não irradiado (50 MHz; CDCl <sub>3</sub> ) (figura menor).	141
<b>FIGURA A.12.</b>	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C do triterpeno lupeol irradiado na dose de 50 kGy (100 MHz; CDCl <sub>3</sub> ) (figura maior), comparado com espectro de RMN de <sup>13</sup> C do triterpeno lupeol não irradiado (50 MHz; CDCl <sub>3</sub> ) (figura menor).	142
<b>FIGURA A.13.</b>	Cromatogramas de CG-FID para OEA <sub>0</sub> (preto), OEA <sub>3</sub> (vermelho), OEA <sub>10</sub> (azul) e OEA <sub>20</sub> (verde).	144

## LISTA DE TABELAS E ESQUEMAS

		Página
<b>TABELA I.1.</b>	Classificação taxonômica da espécie <i>Lychnophora pinaster</i>	8
<b>TABELA II.1.</b>	Frações e grupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EH	18
<b>TABELA II.2.</b>	Frações e grupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EH-H1	19
<b>TABELA II.3.</b>	Frações e grupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EH-H2	20
<b>TABELA II.4.</b>	Frações e grupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EH-D	21
<b>TABELA II.5.</b>	Frações e grupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EH-D5	22
<b>TABELA II.6.</b>	Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ de LpI e da literatura para os triterpenos 3- $\beta$ -OAc- $\alpha$ -amirina, 3- $\beta$ -esteariloxi-ursan-12-eno, 3- $\beta$ -OAc-lupeol e 3- $\beta$ -esteariloxi-lup-20(29)-eno	27
<b>TABELA II.7.</b>	Dados de RMN 1D e 2D de LpV, incluindo dados de RMN de $^{13}\text{C}$ do ácido licnofóico	48
<b>TABELA II.8.</b>	Dados teóricos e experimentais de RMN de $^{13}\text{C}$ para LpV	50
<b>TABELA III.1.</b>	Valores de tempo de retenção (TR, min), área e altura dos picos do cromatograma de CLAE de FF e FF-I	63
<b>TABELA III.2.</b>	Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ para LpVI e quercetina	67
<b>TABELA III.3.</b>	Massas dos óleos essenciais obtidos após hidrodestilação	70
<b>TABELA III.4.</b>	Índice de Kóvats e tempo de retenção dos padrões de hidrocarbonetos lineares	72

<b>TABELA III.5.</b>	Substâncias e dados de CG de OEA <sub>0</sub>	74
<b>TABELA III.6.</b>	Proporção relativa dos constituintes de OEA <sub>0</sub> , OEA <sub>3</sub> , OEA <sub>10</sub> e OEA <sub>20</sub> , a partir das análises por CG-FID	76
<b>TABELA IV.1.</b>	Concentração dos extratos, frações e substâncias isoladas de <i>L. pinaster</i> e submetidas a testes de atividade anti-inflamatória	82
<b>TABELA IV.2.</b>	Escores atribuídos para a atividade anti-inflamatória observada nas patas dos ratos tratados	105
<b>TABELA IV.3.</b>	Classificação da atividade anti-inflamatória observada nas patas dos ratos tratados com extratos, frações e substâncias isoladas de <i>L. pinaster</i>	106
<b>TABELA IV.4.</b>	Resultado da atividade tripanocida de extrato, frações e substâncias isoladas de <i>L. pinaster</i>	111
<b>ESQUEMA II.1.</b>	Preparação dos extratos hexânico e etanólico de <i>L. pinaster</i>	18
<b>ESQUEMA III.1.</b>	Sequência metodológica para o isolamento dos constituintes polares do extrato aquoso de <i>L. pinaster</i>	58



## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\delta$	- Deslocamento Químico
CCD	- Cromatografia em camada delgada
CCS	- Cromatografia em coluna de sílica gel
$d$	- Duplete
$dd$	- Duplete Duplo
DEPT 135°	- <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i> – ângulo 135°
IV	- Infravermelho
$J$	- Constante de acoplamento escalar
$m$	- Multiplete
RMN de $^{13}\text{C}$	- Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN de $^1\text{H}$	- Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
$s$	- Simpleto
TMS	- Tetrametilsilano
DCM	- Diclorometano



# APRESENTAÇÃO

A espécie vegetal *Lychnophora pinaster* apresenta-se distribuída largamente na região do cerrado brasileiro, sendo empregada na medicina popular como anti-inflamatório. Considerando essa importância biológica, foi desenvolvido o estudo fitoquímico das partes aéreas da planta como um dos objetivos deste trabalho. Assim, foram identificados fitoconstituintes que tiveram a sua atividade biológica testada com o intuito de comprovar a atividade biológica alegada em estudos etnofarmacológicos.

No Capítulo I é apresentado inicialmente um levantamento bibliográfico sobre a espécie *Lychnophora pinaster*, indicando as designações que lhes são atribuídas, sua classificação taxonômica, sua distribuição geográfica, suas características morfológicas e anatômicas, seus usos populares e sua importância biológica.

No Capítulo II são descritos os estudos fitoquímicos, inicialmente, no item de materiais e métodos são descritos os equipamentos utilizados nos procedimentos fitoquímicos, posteriormente é descrita a metodologia para os estudos fitoquímicos. Na parte fitoquímica, é apresentado o estudo sobre as partes aéreas de *L. pinaster* envolvendo a coleta do material vegetal, o preparo da amostra, a obtenção do extrato bruto, a análise cromatográfica do extrato hexânico e das frações oriundas deste extrato, bem como a purificação dos fitoconstituintes isolados. São descritas também as análises espectrométricas que proporcionaram a elucidação estrutural dos fitoconstituintes isolados.

No Capítulo III são descritos os estudos do efeito da radiação gama em extratos, frações e fitoconstituintes isolados da planta. Inicialmente é descrito o efeito da radiação em triterpenos, posteriormente é feita a análise do extrato fenólico e a análise dos óleos essenciais que foram obtidos após a planta ser submetida a radiação.

No Capítulo IV são relatados os ensaios biológicos realizados, ensaios de atividade anti-inflamatória e ensaios de atividade tripanocida. Inicialmente é descrito o modelo experimental desenvolvido para os ensaios de atividade anti-inflamatória, o preparo dos extratos, frações e fitoconstituintes que foram utilizados no ensaio, os animais e o preparo das lâminas histológicas. Para os ensaios de atividade tripanocida, inicialmente são apresentadas a metodologia utilizada, as amostras testadas e as formas evolutivas do parasita a serem testadas. Ao final deste capítulo são descritos os estudos teóricos que foram realizados com os fitoconstituintes lupeol e  $\alpha$ -amirina que apresentaram resultados satisfatórios nos ensaios de atividade anti-inflamatória. Assim, foram realizados cálculos teóricos de otimização de geometria e cálculos das contribuições dos orbitais atômicos para formação dos orbitais moleculares do lupeol e  $\alpha$ -amirina utilizando o software Gaussian 03. Através deste estudo foi possível inferir sobre os efeitos das contribuições atômicas para os orbitais HOMO-1, HOMO, LUMO e LUMO+1 e, conseqüentemente, sobre a reatividade e a regioselectividade tanto em ataques eletrofílicos quanto em ataques nucleofílicos envolvendo o lupeol e a  $\alpha$ -amirina.

As conclusões gerais são apresentadas ao final do trabalho, e são apresentadas de forma bem geral pois as descrições mais detalhadas sobre as análises são apresentadas respectivamente no final de cada capítulo. Por último, nos Anexos, são apresentados os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  dos triterpenos submetidos a radiação gama, e os cromatogramas dos óleos essenciais obtidos após a planta ser submetida a radiação.



## CAPÍTULO I

### *Lychnophora pinaster*



### **I.1. A família Asteraceae**

A família Asteraceae compreende cerca de 23.000 espécies distribuídas em 1.600 gêneros,<sup>1</sup> sendo o grupo sistemático mais numeroso dentro das Angiospermas.<sup>2</sup> São plantas de aspectos extremamente variados, principalmente pequenas ervas ou arbustos, e, raramente, árvores.<sup>3</sup> Cerca de 98% de espécies destes gêneros são representadas por plantas de pequeno porte e encontradas em todos os tipos de habitats, principalmente nas regiões tropicais e montanhosas da América do Sul.<sup>4</sup>

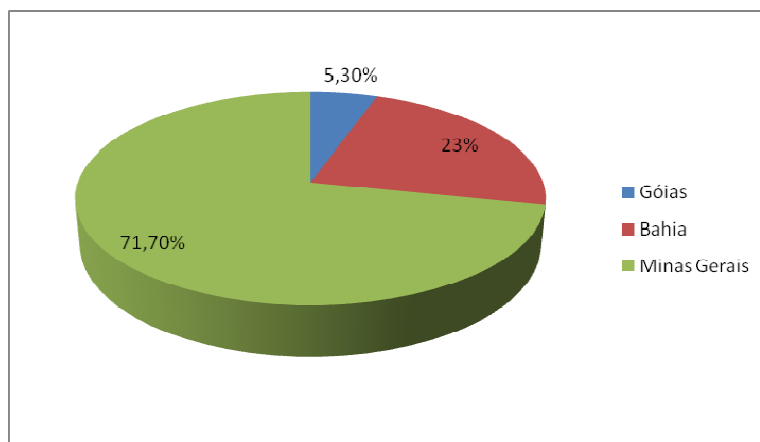
Plantas dessa família são estudadas extensivamente quanto à sua composição química e atividade biológica, sendo que muitas espécies têm proporcionado o desenvolvimento de novos fármacos e inseticidas,<sup>5</sup> além do isolamento de uma variedade de metabólitos secundários empregados no tratamento e prevenção de várias doenças.<sup>6</sup>

### **I.2. O Gênero *Lychnophora***

O gênero *Lychnophora* (Asteraceae) é endêmico na região central do Brasil, principalmente em campos rupestres dos Estados de Minas Gerais, Goiás e Bahia,<sup>7</sup> conforme mostrado na Figura I.1 (pág. 6). Este gênero compreende 68 espécies.<sup>8</sup> A Figura I.2 (pág. 7) mostra representantes das seis seções estabelecidas para o gênero *Lychnophora*. As fotos são de membros representantes das seis seções das subdivisões propostas para o gênero *Lychnophora*.<sup>9</sup> Todos os representantes são plantas de pequeno porte. Espécies deste gênero são utilizadas popularmente no tratamento de feridas, dor, reumatismo e inflamação.<sup>10</sup> Estas espécies mostram também atividades antitumoral,<sup>11</sup> antimicrobiana,<sup>12</sup> analgésica,<sup>13</sup> antioxidante, anticonvulsivante<sup>14</sup> e tripanocida.<sup>15</sup> Essas atividades biológicas têm sido atribuídas a lactonas sesquiterpênicas, lignanas e

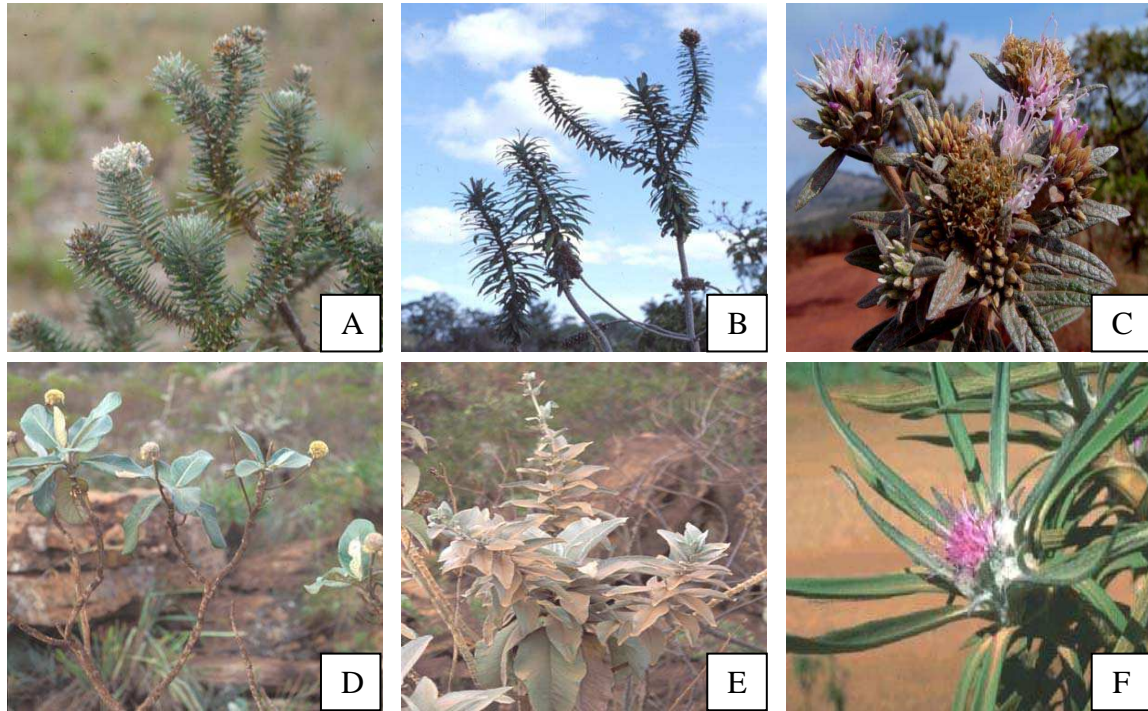


derivados do ácido cafeoilquínico, que foram isolados anteriormente de extratos polares das folhas e raízes dessas espécies.<sup>16</sup> A atividade tripanocida de espécies de *Lychnophora* tem sido atribuída a flavonoides e lactonas sesquiterpênicas, além de ácidos isolados de seus extratos alcoólicos.<sup>17</sup> Várias espécies do gênero *Lychnophora* apresentam propriedades reportadas anteriormente que são consagradas pela medicina popular, sendo utilizadas como sucedâneas da *Arnica montana* L., nativa da Europa e cujas propriedades foram comprovadas cientificamente.<sup>18-20</sup>



**Figura I.1.** Distribuição geográfica das espécies do gênero *Lychnophora* no Brasil.<sup>7</sup>

Devido à coleta predatória, áreas de distribuição restrita, populações pequenas ou isoladas e destruição do *habitat*, muitas espécies de *Lychnophora* encontram-se ameaçadas de extinção,<sup>21</sup> enquadrando-se em situações de perigo (*L. diamantina* Jones & Coile., *L. gardneri* Sch. Bip. e *L. pohlii* Sch. Bip.), vulneráveis (*L. ericoides* Mart., *L. graomogolense* Semir. e *L. pinaster* Mart.), criticamente em perigo (*L. albertinoides* Gardner., *L. brunoides* Mart. e *L. souzae* H. Rob.) ou, provavelmente, extintas (*L. humillima* Sch. Bip., *L. reticulata* Gardner. e *L. salicifolia* Mart.).<sup>22-24</sup>



**Figura I.2.** Representantes das seis seções do gênero *Lychnophora*: (A) seção *Lychnophora*, (B) seção *Lychnophoriopsis*, (C) seção *Lychnophorioides*, (D) seção *Sphaeranthus*, (E) seção *Chronopappus* e (F) seção *Lychnocephaliopsis*.<sup>9</sup>

### I.3. A espécie *Lychnophora pinaster* Mart.

*Lychnophora pinaster* Mart. (Figura I.3, pág. 8), pertencente a seção *Lychnophora*, é uma espécie que apresenta propriedades medicinais e crescimento arbustivo. Sua ocorrência é restrita a campos rupestres, constituindo-se por afloramento entre rochas situadas entre 800 a 2000 m de altitude, sendo considerada endêmica nos Estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás (Figura I.1, pág. 6).<sup>24</sup> Essa espécie apresenta sinonímia botânica extensa: *Vernonia trichocarpa* Spreng., *Piptocoma lychnophorioides* Less., *Lychnophora trichocarpa* Spreng., *Lychnophora affinis* Gardh., *Lychnophora brunioides* var. *affinis* (Gardh) Baker., *Lychnophora rosmarinus* Pohl., *Lychnophora rosmarinus* var. *eurosmarinus* Schults-Bip., *Lychnophora rosmarinus* var. *normalis* Schults-Bip., *Lychnophora brunioides* var. *pinifolia* Baker., *Lychnophora pumilio* Pohl.

e *Lychnophora piptocoma* Schults-Bip. Popularmente, a planta recebe nomenclatura vulgar variada, como arnica mineira, candeia, arnica-da-serra ou, simplesmente, arnica.



**Figura I.3.** Fotografias de exemplares de *Lychnophora pinaster* Mart. (Fotos da autora)

A Tabela I.1 apresenta a classificação taxonômica clássica da espécie *Lychnophora pinaster* proposta por Cronquist em 1981.<sup>25</sup>

**Tabela I.1.** Classificação taxonômica da espécie *Lychnophora pinaster*

Classe	Magnoliopsida (Angiospermae)
Sub-Classe	Magnolidae (Dicotyledonae)
Superordem	Magnoliiflorae
Família	Asteraceae
Gênero	<i>Lychnophora</i>
Espécie	<i>L. pinaster</i> Mart.

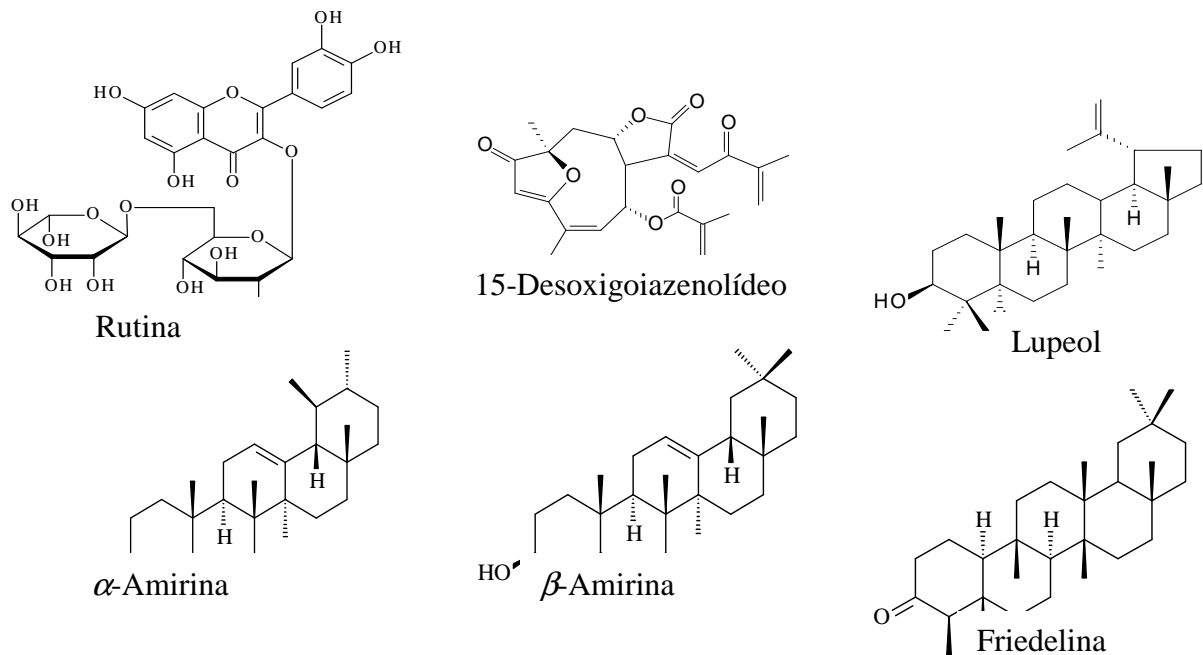
### I.3.1. Atividade biológica

*L. pinaster* é uma planta medicinal com amplo espectro farmacológico, apresentando atividades anestésica, antimicrobiana, antireumática, cicatrizante e anti-inflamatória, além do uso em casos de contusões, inchaços, hematomas, traumatismos e varizes.<sup>26</sup> Os ramos, folhas e flores são utilizados popularmente na forma de infusão, extrato alcoólico, cataplasma ou pomada.<sup>27</sup> A administração da *L. pinaster* na forma de florais auxilia a cicatrização e traumatismos, além de ferimentos, contusões, cirurgias e traumas psíquicos.<sup>28</sup>

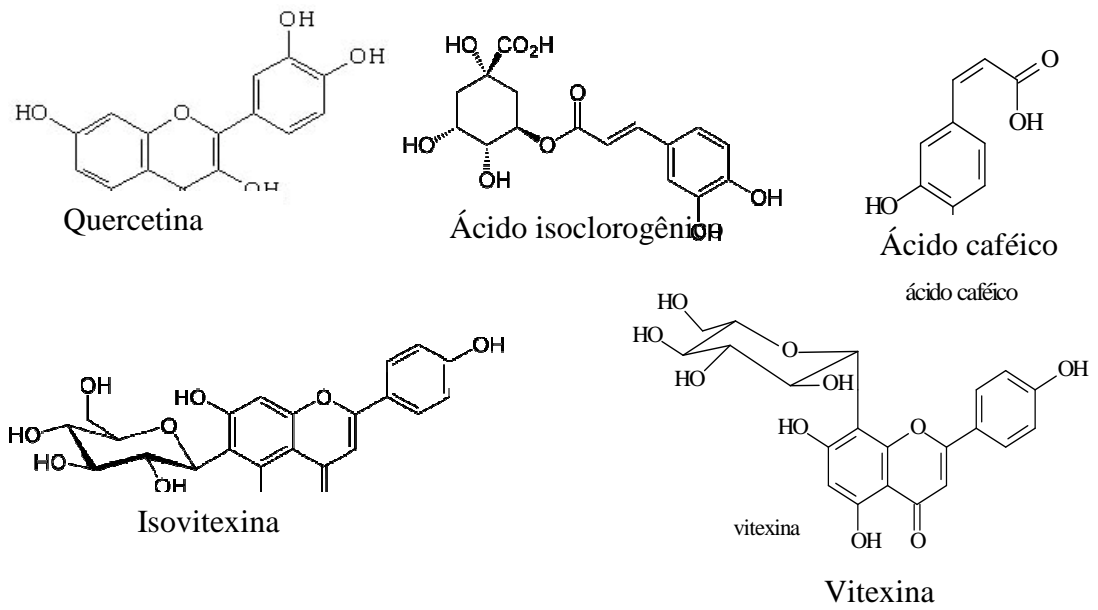
### I.3.2. Constituintes químicos isolados anteriormente em *L. pinaster*<sup>29-34</sup>

Os flavonoides rutina, quercetina e isovitexina, ácidos isoclorogênico e caféico, derivados sesquiterpênicos<sup>32,33</sup> e os triterpenos lupeol, friedelina e mistura de  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina<sup>34</sup> foram isolados anteriormente das partes aéreas de *L. pinaster* (Figuras I.4 e I.5, pág. 10 e 11, respectivamente). Em trabalho descrito recentemente na literatura<sup>29</sup> é relatado o isolamento dos triterpenos 3-OAc-lupeol, 3-OAc-pseudotaraxasterol, 3-OAc- $\alpha$ -amirina, lupeol,  $\alpha$ -amirina e 4,4-dimetil-cholesta-22,24-dien-5-ol a partir das folhas da planta.<sup>29</sup> Do caule foram isolados 3 $\beta$ -OAc-baurenila, friedelina, lupeol,  $\alpha$ -amirina e os esteroides estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol. Ambos os esteroides foram isolados também do extrato das flores (Figura I.6, pág. 12).<sup>29</sup> Os fitoconstituintes isolados foram submetidos a testes de atividade antimicrobiana e tripanocida, sendo que  $\alpha$ -amirina e uma mistura de  $\alpha$ -amirina e lupeol forneceram resultados positivos para atividade contra a bactéria *Staphylococcus aureus*, com concentração inibitória mínima maior que 1,0 mg/mL. As mesmas substâncias forneceram também resultados positivos para atividade tripanocida contra tripomastigotas, formas sanguíneas do parasita *Trypanosoma cruzi*,

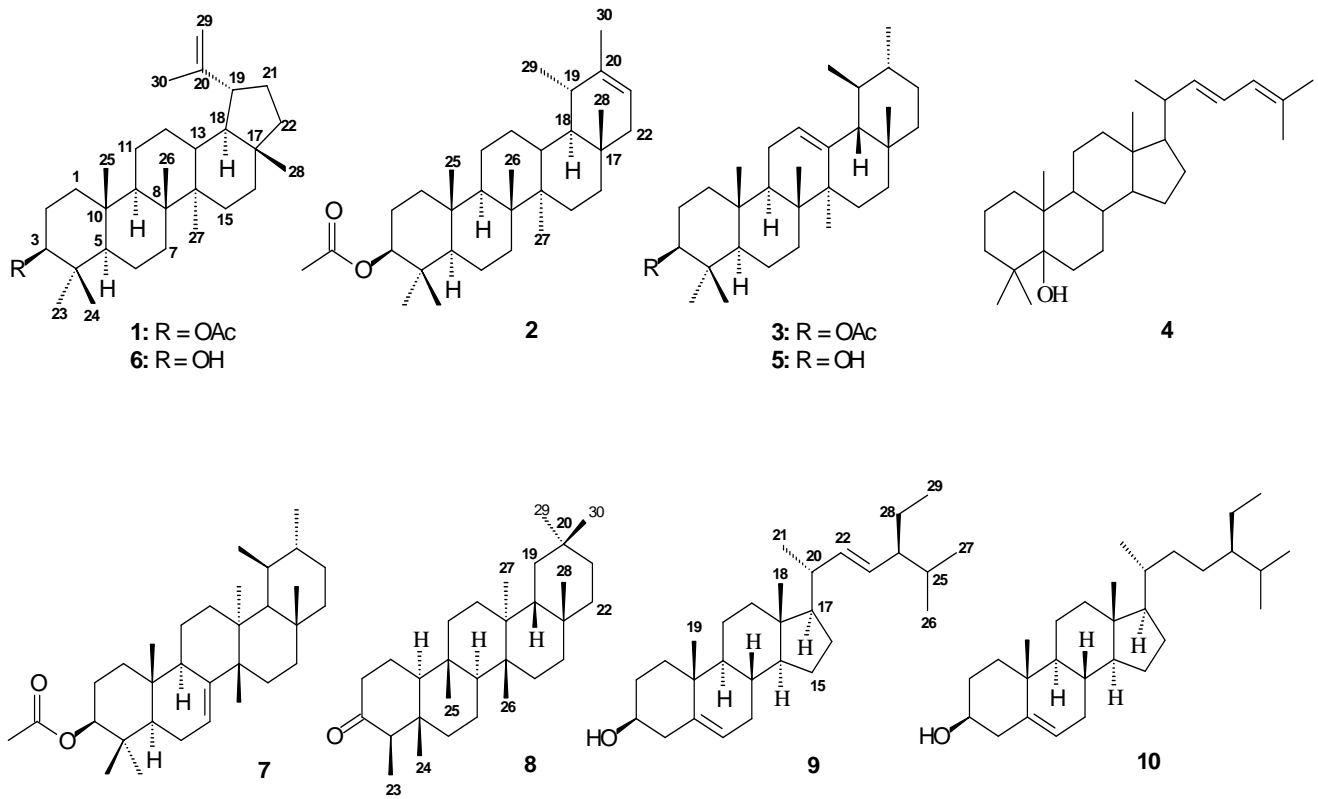
porém com atividades consideradas baixas.<sup>35</sup> Somente o fitoconstituente 3-OAc- $\alpha$ -amirina, que difere do triterpeno  $\alpha$ -amirina em um grupo acetila na posição C-3, não mostrou atividade em ambos os testes biológicos realizados.<sup>29</sup>



**Figura I.4.** Estrutura química de fitoconstituente isolados anteriormente das partes aéreas de *L. pinaster*.<sup>32-34</sup>



**Figura I.5.** Estrutura química de fitoconstituintes isolados anteriormente das partes aéreas de *L. pinaster*.<sup>32-34</sup>



**Figura I.6.** Estrutura química de fitoconstituintes isolados previamente das folhas de *L. pinaster*: 3-OAc-lupeol (1), 3-OAc-pseudotaraxasterol (2), 3-OAc- $\alpha$ -amirina (3), 4,4-dimetil-cholesta-22,24-dien-5-ol (4),  $\alpha$ -amirina (5) e lupeol (6); dos caules: (5), (6), 3 $\beta$ -OAc, $\Delta^7$ -baurenila (7), friedelina (8), estigmasterol (9) e  $\beta$ -sitosterol (10) e de flores: 9 e 10.<sup>29</sup>

Neste trabalho realizou-se o estudo fitoquímico monitorado por testes biológicos dos extratos hexânico e etanólico das partes aéreas de *L. pinaster*, com o intuito de validar a atividade anti-inflamatória e tripanocida alegada pela medicina popular. Além disto, foi avaliada a influência da radiação gama em frações, fitoconstituintes e na obtenção de óleos essenciais da planta, visando isolar e investigar a formação de produtos radiolíticos, visto que as técnicas de esterilização de plantas medicinais são realizadas frequentemente pela utilização de radiação gama.





**CAPÍTULO II**  
**ESTUDOS FITOQUÍMICOS E ESTRUTURAIS**

## II.1. Introdução

A descoberta de produtos naturais biologicamente ativos está ligada intimamente à comunidade científica mundial. Vários trabalhos na literatura reportam potenciais terapêuticos para as plantas na forma *in natura*, de extratos ou de produtos naturais.<sup>36</sup> As etapas e requerimentos para descoberta, desenvolvimento e comercialização de produtos naturais estão descritas amplamente na literatura.<sup>37</sup> Historicamente, os produtos naturais são considerados como a principal fonte de princípios ativos, sendo que mais de 90% das classes terapêuticas disponíveis atualmente no mercado são derivadas de protótipos naturais,<sup>37</sup> justificando a importância dos trabalhos com plantas.

Neste sentido, a cromatografia ocupa posição de destaque para o isolamento de produtos naturais<sup>38</sup> e para o estudo de extratos apolares em fitoquímica clássica. A cromatografia em coluna pode ser considerada ainda uma técnica eficiente para o isolamento de fitoconstituintes.

## II.2. Materiais e Métodos

Nas cromatografias em coluna (CC) foram empregadas colunas de vidro de diversos diâmetros e eluídas normalmente sob pressão atmosférica. A proporção utilizada entre amostra e fase estacionária foi aproximadamente de 1:30. As fases estacionárias utilizadas foram sílica gel 60 Merck (70-230 Mesh) e Sephadex LH-20.

Nas cromatografias por exclusão em gel, Sephadex LH-20 foi mantido em contato com o solvente a ser utilizado como fase móvel por 24 h e, em seguida, empacotado em coluna de vidro até a total sedimentação do suporte. Os extratos foram dissolvidos em quantidades suficientes da fase móvel e, então, aplicados no topo da coluna até a absorção completa no suporte. Em seguida, houve eluição no solvente apropriado.<sup>39</sup>

Nas cromatografias em camada delgada (CCD) foram empregadas placas de vidro recobertas por sílica-gel 60 G Merck de 0,25 mm de espessura e ativadas a 100 °C. Os reveladores cromatográficos foram radiação na região do ultravioleta (luz UV;  $\lambda = 254$  e 366 nm), vapores de iodo e solução vanilina/ácido perclórico. Este último revelador foi preparado pela mistura de partes iguais de uma solução constituída por 1,0 g de vanilina em 100 mL de etanol com outra solução constituída por 3 mL de ácido perclórico (70%) em 97 mL de água. A cromatoplaça foi borrifada com essa solução e aquecida em estufa por 10 min a 100 °C.

Os pontos de fusão não corrigidos foram determinados em aparelho Mettler FP80 SNR H22439. As análises por espectroscopia de absorção na região do Infravermelho (IV) foram realizadas em espectrômetro Perkin Elmer – *Spectrum One* (KBr).

As análises por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram realizadas em espectrômetro Bruker DPX-200 e DRX-400 linha *AVANCE*. Os deslocamentos químicos foram registrados em unidade  $\delta$  e as constantes de acoplamento ( $J$ ) em Hz. Tetrametilsilano (TMS) foi empregado como padrão de referência interno, tendo  $\text{CDCl}_3$  ou  $\text{CD}_3\text{OD}$  como solvente.

Para os testes de prospecção fitoquímica, alíquotas (~2,0 mg) da amostra foram colocadas em um tubo de ensaio e solubilizadas em 3 mL de clorofórmio. No tubo de ensaio foram colocados lentamente 3 mL de anidrido acético e 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. O aparecimento de coloração violeta indica a presença de triterpenos e o aparecimento de coloração verde indica a presença de esteroides na amostra.

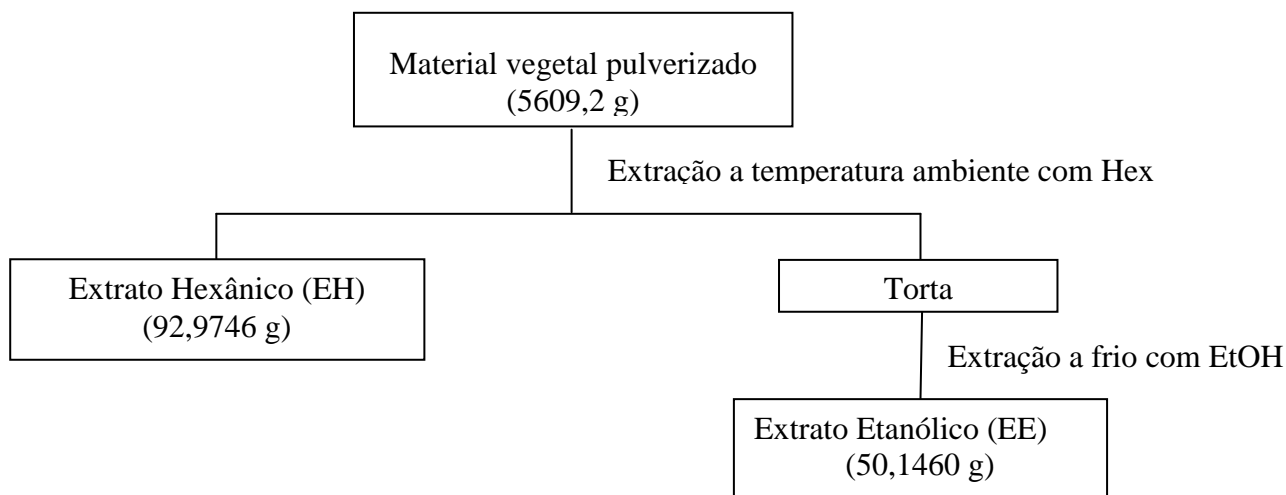
### II.3. Metodologia Fitoquímica

#### II.3.1. Coleta do material vegetal

A amostra de *Lychnophora pinaster* Mart. foi coletada no Condomínio Retiro das Pedras, Serra da Moeda (Município de Nova Lima, MG – Brasil) em 16 de junho de 2009. A identificação botânica do material vegetal foi feita por comparação com exsicata depositada no Herbário do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o código BHCB: 24.322.

#### II.3.2. Obtenção dos extratos hexânico (EH) e etanólico (EE)

As partes aéreas da planta (folhas, flores e galhos) foram submetidas à secagem em estufa por aproximadamente uma semana, a temperatura média de 60 °C. O material vegetal foi pulverizado em moinho de esferas, as partes aéreas pulverizadas (5609,2 g) foram colocadas em um erlenmeyer de 5 L e adicionou-se hexano (Hex) até submergir todo o material pulverizado. A extração foi realizada a temperatura ambiente (18 a 24 °C) por sete dias. A mistura foi filtrada em funil de placa de vidro sinterizado. Posteriormente, a solução hexânica do material vegetal foi concentrada, empregando-se evaporador rotativo a temperatura de aproximadamente 60 °C, obtendo-se, após evaporação do solvente, o extrato hexânico (EH; 92,9746 g). A torta obtida no processo de preparação do extrato hexânico foi submetida à maceração em etanol (EtOH), obtendo-se o extrato etanólico (EE; 50,1460 g). O Esquema II.1 (pág.18) mostra a sequência da preparação dos extratos hexânico e etanólico de *L. pinaster*.



**Esquema II.1.** Preparação dos extratos hexânico e etanólico de *L. pinaster*.

### II.3.3. Fracionamento do extrato hexânico de *L. pinaster* (EH)

O extrato EH foi submetido a fracionamento por CC de sílica gel, sendo coletadas 253 frações de 250 mL eluídas em Hex, diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), EtOH e metanol (MeOH), em gradiente crescente de polaridade. Após análise comparativa por CCD de sílica gel, as frações foram reunidas em grupos, conforme Tabela II.1.

**Tabela II.1.** Frações e grupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EH

Fração	Eluente	Grupo	Massa (g)
1 a 110	Hex	EH-H1	24,5721
111 a 128		EH-H2	12,4558
129 a 177	DCM	EH-D	31,2412
178 a 230	AcOEt	EH-A	6,2458
231 a 240	EtOH	EH-E	2,4581
241 a 247	MeOH	EH-M	1,8745
248 a 253	MeOH/H <sub>2</sub> O	EH-M/H	0,9874

Uma alíquota do grupo EH-H1 (1,9760 g) foi submetida a fracionamento por CC de sílica gel, sendo coletadas 79 frações de 125 mL eluídas em Hex e AcOEt, em gradiente crescente de polaridade. Após análise comparativa por CCD, as frações foram reunidas em grupos, conforme Tabela II.2.

**Tabela II.2.** Frações e grupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EH-H1

Fração	Eluente	Grupo	Massa (g)
1	Hex/AcOEt (9:1)	EH-H1-R1-1	0,2411
2 a 8		EH-H1-R1-2	0,1351
9 a 17	Hex/AcOEt (3:1)	EH-H1-R2-1	0,1628
18 a 22		EH-H1-R2-2	0,0947
23 a 29	Hex/AcOEt (1:1)	EH-H1-R3	0,0836
30 a 39	Hex/AcOEt (1:3)	EH-H1-R4	0,0425
40 a 45	AcOEt	EH-H1-R5	0,0418
46 a 55	AcOEt/EtOH (1:1)	EH-H1-R6	0,0100
56 a 63	EtOH	EH-H1-R7	0,0271
64 a 73	MeOH	EH-H1-R8	0,0545
74 a 79	MeOH/H <sub>2</sub> O	EH-H1-R9	0,0212

As amostras dos grupos EH-H1-R2-1 (LpI), EH-H1-R4 (LpII), EH-H1-R6 (LpIII) e EH-H1-R7 (LpIV) foram submetidas à recristalização em MeOH, fornecendo sólidos brancos e perfis cromatográficos pouco complexos. Análises espectroscópicas indicaram que EH-H1-R2-1 trata-se de uma mistura dos triterpenos 3-OAc- $\alpha$ -amirina e 3-OAc-lupeol (LpI; 0,0908 g), EH-H1-R4 do triterpeno 3-OAc- $\alpha$ -amirina (LpII; 0,0335 g), EH-H1-R6 da  $\alpha$ -amirina (LpIII; 0,008 g) e EH-H1-R7 do lupeol (LpIV; 0,0243 g).

O grupo EH-H2 (ver Tabela II.1, pág. 18) foi submetido a fracionamento por CC de sílica gel, sendo coletadas 40 frações de 125 mL eluídas em Hex e AcOEt, em gradiente crescente de polaridade. Após análise comparativa por CCD, as frações foram reunidas em grupos, conforme Tabela II.3. O grupo EH-H2-H9A1-1 foi recristalizado em MeOH, fornecendo um sólido branco de fusão na faixa de 128 a 134 °C. Através das análises espectroscópicas verificou-se que EH-H2-H9A1-1 trata-se do triterpeno  $\alpha$ -amirina (LpIII; 1,8363 g).

**Tabela II.3.** Frações e grupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EH-H2

Fração	Eluente	Grupo	Massa (g)
1	Hex	EH-H2-H1	0,0971
2		EH-H2-H2	2,0621
3 e 4		EH-H2-H3	0,1938
5		EH-H2-H4	0,0576
6		Hex/AcOEt (9:1)	EH-H2-H9A1-1
7 a 10	EH-H2-H9A1-2		4,9506
11 a 15	Hex/AcOEt (7:3)	EH-H2-H7A3-1	0,1449
16 a 19		EH-H2-H7A3-2	0,0347
20 a 22		EH-H2-H7A3-3	0,1041
23 a 26		EH-H2-H7A3-4	0,0722
27		EH-H2-H7A3-5	0,0487
28 a 31		EH-H2-H7A3-6	0,0562
32 a 35		EH-H2-H7A3-7	0,0518
36 a 40		EH-H2-H7A3-8	0,0345

O grupo EH-D (ver Tabela II.1, pág. 18) apresentou-se como material viscoso contendo clorofila que foi identificada por cromatografia em camada delgada e revelado por luz UV. Uma alíquota deste grupo (12,4024 g) foi submetida à extração de clorofila através da adição de metanol a quente e posterior filtração com sílica. Após a eliminação do metanol, este grupo (10,8422 g) foi recromatografado em CC de sílica e eluído conforme Tabela II.4 (pág. 21).



**Tabela II.4.** Frações e grupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EH-D

Fração	Eluente	Grupo	Massa (g)
1 a 5	DCM	EH-D1	0,9760
6 a 15		EH-D2	0,5600
16		EH-D3	1,8733
17, 18 e 21 a 24		EH-D4	2,3437
19 e 20		EH-D5	0,3142
25 a 30		EH-D6	0,1740
31 a 36		EH-D7	0,0874
37 e 38		EH-D8	0,0804
39 a 41		EH-D9	0,0019
42 a 43		EH-D10	0,0122
44 e 45		EH-D11	0,0200
46		EH-D12	0,0019
47 a 49		EH-D13	0,0020
50 a 54		EH-D14	0,0212
55 a 59		EH-D15	0,0064
60 a 64		EH-D16	0,0862
65 a 74		EH-D17	0,1774
75 a 79		EH-D18	0,0020
80 a 84		EH-D19	0,0417
85 a 90		EH-D20	0,0542
91 a 94		EH-D21	0,0401
95		EH-D22	0,0297
96		EH-D23	0,0351
97 a 100	AcOEt	EH-A1	0,0921
101 a 103	AcOEt/MeOH (1:1)	EH-A1M1-1	0,1422
104		EH-A1M1-2	0,1733
105		EH-A1M1-3	0,1738
106		EH-A1M1-4	0,1956
107		EH-A1M1-5	0,1308
108		EH-A1M1-6	0,1113
109		EH-A1M1-7	0,0978
110		EH-A1M1-8	0,0827
111 a 114		EH-A1M1-9	0,4402
115		EH-A1M1-10	0,3542
116 e 117		EH-A1M1-11	0,5741
118		EH-A1M1-12	0,0830
119		EH-A1M1-13	0,1555
120		EH-A1M1-14	0,0385
121 a 123	Água/MeOH (1:1)	EH-M1A1-1	0,0218

O grupo EH-D5 apresentou-se como mistura por CCD, sendo, então, submetido à coluna cromatográfica de Sephadex LH-20. Suas frações foram reunidas após análise

comparativa por CCD, conforme Tabela II.5. A fração EH-D5-S4 apresentou-se como sólido branco após recristalização em hexano, sendo submetida a análises espectroscópicas que indicaram tratar-se de ácido 2,8-dihidroxi-8,11,11-trimetil-12-oxabicyclo[7.2.1]dode-4-en-4-óico (LpV), uma substância inédita derivada do ácido licnofóico.<sup>31</sup>

**Tabela II.5.** Frações e grupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EH-D5

Fração	Eluente	Grupo	Massa
1	MeOH	EH-D5-S1	0,0432
2		EH-D5-S2	0,0217
3		EH-D5-S3	0,0234
4		EH-D5-S4	0,0313
5		EH-D5-S5	0,0347
6		EH-D5-S6	0,0287
7		EH-D5-S7	0,0154

O fracionamento cromatográfico das demais frações oriundas do extrato hexânico e frações oriundas do extrato etanólico proporcionou misturas complexas de difícil caracterização, não sendo portanto trabalhadas.

#### II.3.4. Testes Químicos (Teste de Lieberman-Burchard)

Alíquotas (~2,0 mg) da amostra foram colocadas em um tubo de ensaio e solubilizadas em 3 mL de clorofórmio. No tubo de ensaio foram colocados lentamente 3 mL de anidrido acético e 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. O aparecimento de coloração violeta indica a presença de triterpenos e o aparecimento de coloração verde indica a presença de esteroides na amostra.

## II.4. Análise estrutural dos fitoconstituintes isolados do Extrato Hexânico

Através da metodologia clássica de cromatografia foi feito o estudo das partes aéreas de *L. pinaster*, que possibilitou o isolamento e purificação de cinco substâncias. Suas estruturas foram analisadas por métodos físicos e espectroscópicos.

### II.4.1. Análise Estrutural de EH-H1-R2-1 (LpI)

A amostra LpI apresentou-se como um sólido branco, faixa de fusão entre 180,0 e 186,0 °C. O teste de Lieberman-Burchard foi positivo para triterpenos. A Figura II.1 apresenta o espectro de absorção na região do IV de LpI. As absorções na região de 2920 a 2848  $\text{cm}^{-1}$  são características de estiramentos C–H de grupos alifáticos. A absorção em 1735  $\text{cm}^{-1}$  é característica de estiramento C=O de ésteres alifáticos. As absorções em 1462 e 1377  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas a deformações angulares de grupos metila e metilênicos. As absorções em 1244 e 1177  $\text{cm}^{-1}$  podem ser atribuídas respectivamente a estiramentos C–O assimétrico e simétrico de ésteres. As absorções em 730 e 719  $\text{cm}^{-1}$  são características de deformação angular de grupos metilênicos de cadeia metilênica com mais de quatro átomos de carbono.

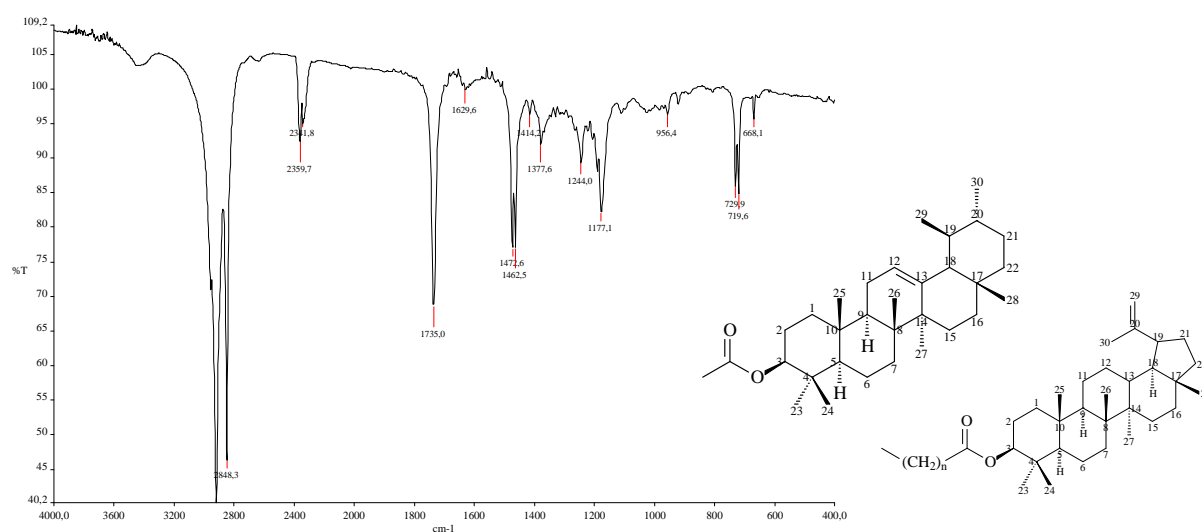
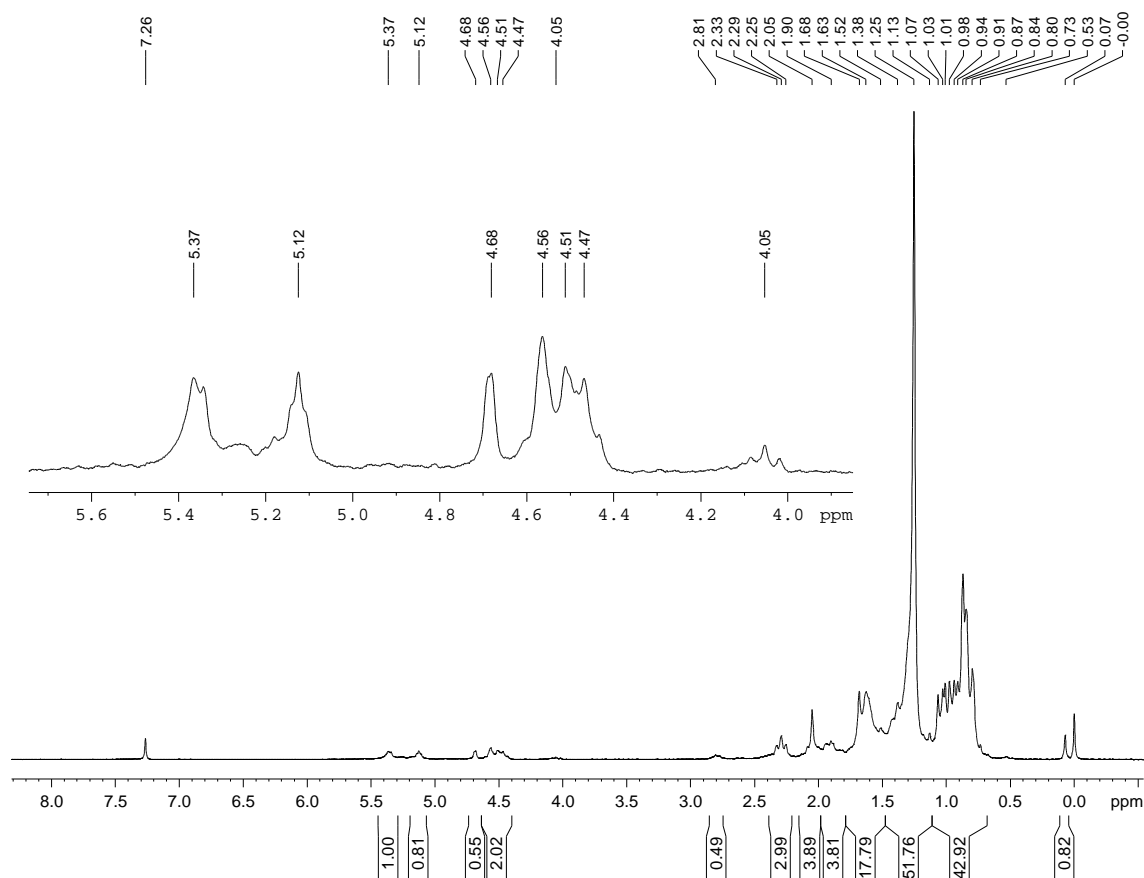


Figura II.1. Espectro de absorção na região do Infravermelho de LpI (KBr).

A Figura II.2 mostra o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de LpI. Os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  5,37-5,12 e 4,68-4,56 podem ser atribuídos a átomos de hidrogênio alquênico. O sinal multipletto registrado em  $\delta_{\text{H}}$  4,47-4,51 pode ser atribuído a átomos de hidrogênio ligado a carbono  $\text{sp}^3$  oxigenado. Os sinais registrados entre  $\delta_{\text{H}}$  2,50 e 0,50 são característicos de átomos de hidrogênio de grupos alifáticos. O sinal tripleto registrado em  $\delta_{\text{H}}$  2,29 ( $J = 7,3$  e  $7,6$  Hz), juntamente com um sinal intenso registrado em  $\delta_{\text{H}}$  1,25 pode ser atribuído a presença de uma cadeia lateral ligada ao grupo carbonila. A presença de um sinal simpleto em  $\delta_{\text{H}}$  2,05 pode ser atribuída a hidrogênio metílico de um grupo acetila.



**Figura II.2.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de LpI (200 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).

As Figuras II.3 e II.4 (pág. 26) apresentam respectivamente o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e subespectro DEPT  $135^\circ$  de LpI, que foram analisados comparativamente. Os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  150,9 (correspondente a carbono não hidrogenado) e 109,4 (correspondente a carbono metilênico) são característicos de triterpenos da série dos lupanos e o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  80,6 pode ser atribuído ao carbono carbinólico C-3 esterificado do lupeol.<sup>40</sup> Por sua vez, os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  139,6 (correspondente a carbono alquênico não hidrogenado),  $\delta_{\text{C}}$  124,3 (correspondente a átomos de carbono monohidrogenado de grupos alquênlicos) e  $\delta_{\text{C}}$  80,9 (correspondente a átomo de carbono carbinólico) são característicos da  $\alpha$ -amirina esterificada.<sup>40</sup> O sinal intenso em  $\delta_{\text{C}}$  29,5 pode ser atribuído a átomos de carbono de grupos metilênicos de éster graxo de cadeia longa de um dos triterpenos presentes na amostra, confirmado pela presença do sinal em  $\delta_{\text{C}}$  173,7. Os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  173,7 e 171,0 podem ser atribuídos a átomos de carbono carbonílico de grupos ésteres, confirmando o proposto pela análise do espectro no IV (Figura II.1, pág. 23). A presença do sinal em  $\delta_{\text{C}}$  171,0 pode ser atribuída a presença de um triterpeno acetilado, e o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  173,7 pode ser atribuído a um triterpeno com um grupo alcanofila em C3 na cadeia lateral.<sup>41</sup> O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  21,3 pode ser atribuído ao átomo de carbono metílico do grupo acetila. Através da análise comparativa com espectros e dados da literatura<sup>41</sup>, conforme mostrado na Tabela II.6 (pág. 27), pode-se propor que LpI trata-se de uma mistura dos triterpenos 3- $\beta$ -esteariloxi-lup-20(29)-eno e 3- $\beta$ -OAc- $\alpha$ -amirina. Estes compostos foram identificados previamente na espécie *L. pinaster*.<sup>29</sup> Atividades antinociceptiva e anti-inflamatória são algumas das atividades biológicas descritas na literatura para estes compostos.

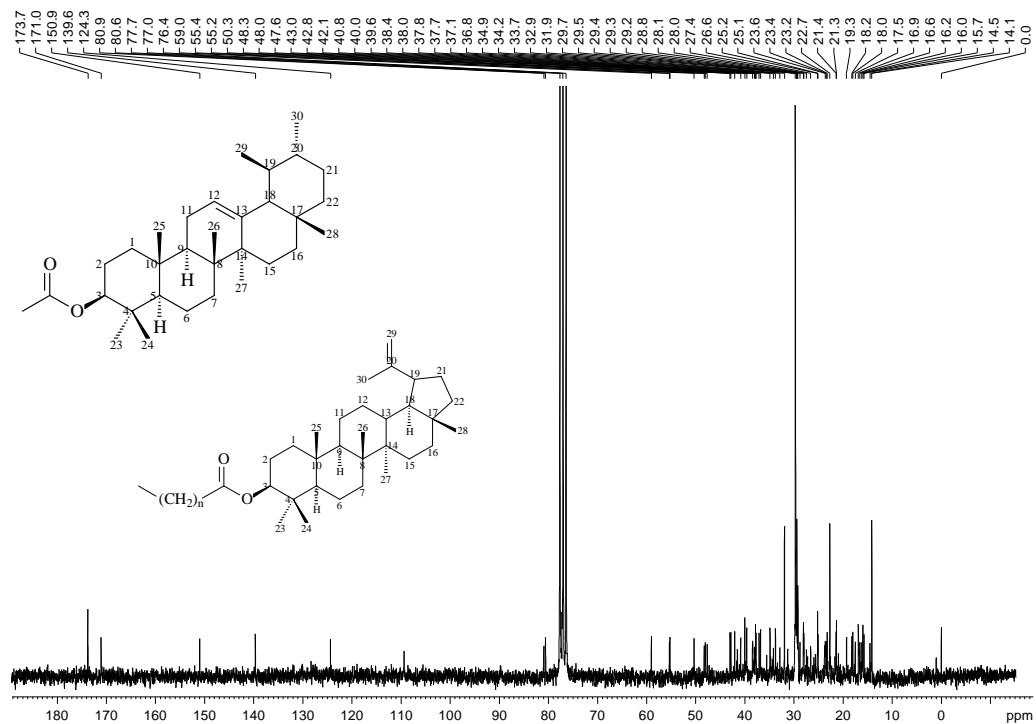


Figura II.3. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C de LpI (50 MHz; CDCl<sub>3</sub>).

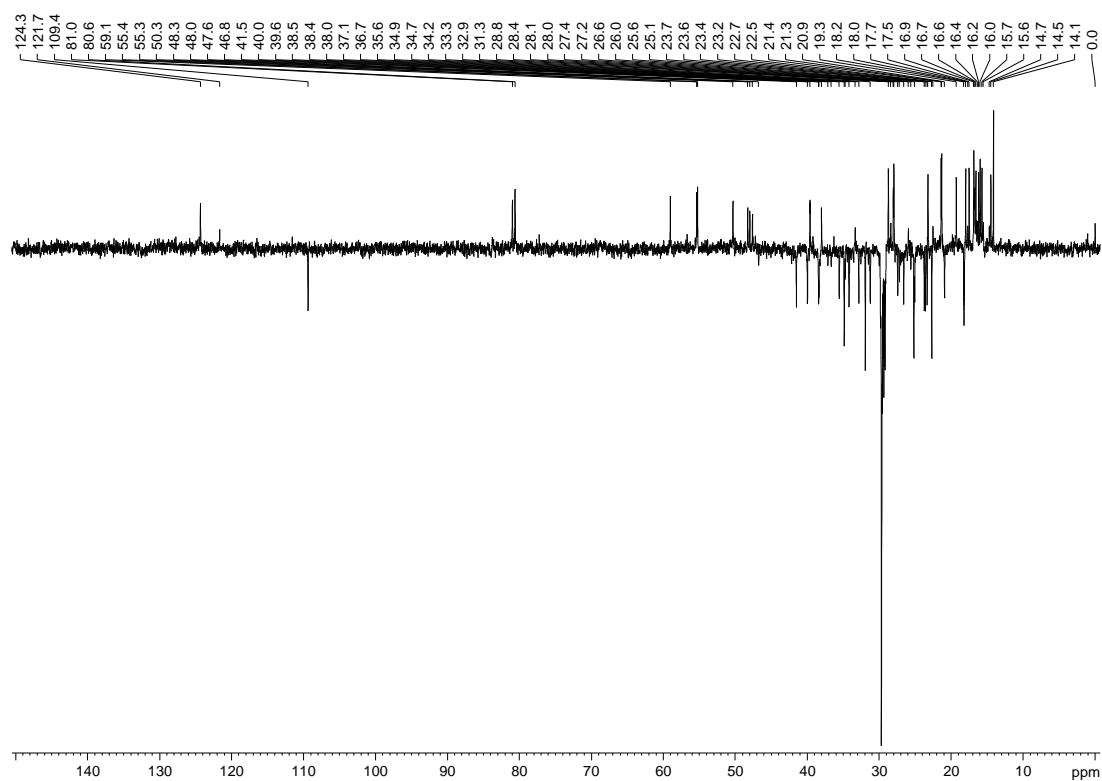
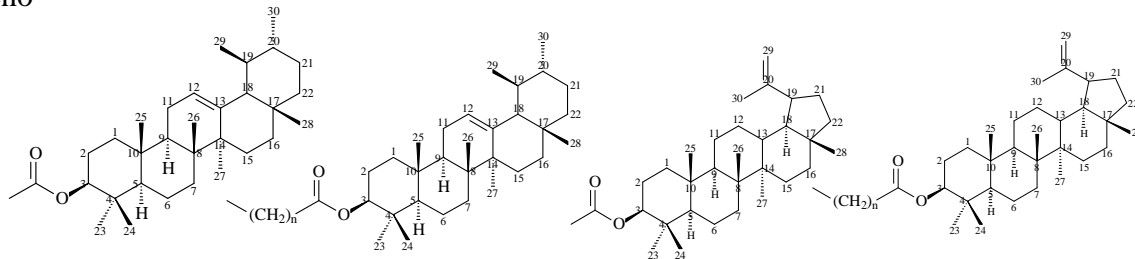


Figura II.4. Subespectro DEPT 135° de LpI (50 MHz; CDCl<sub>3</sub>).

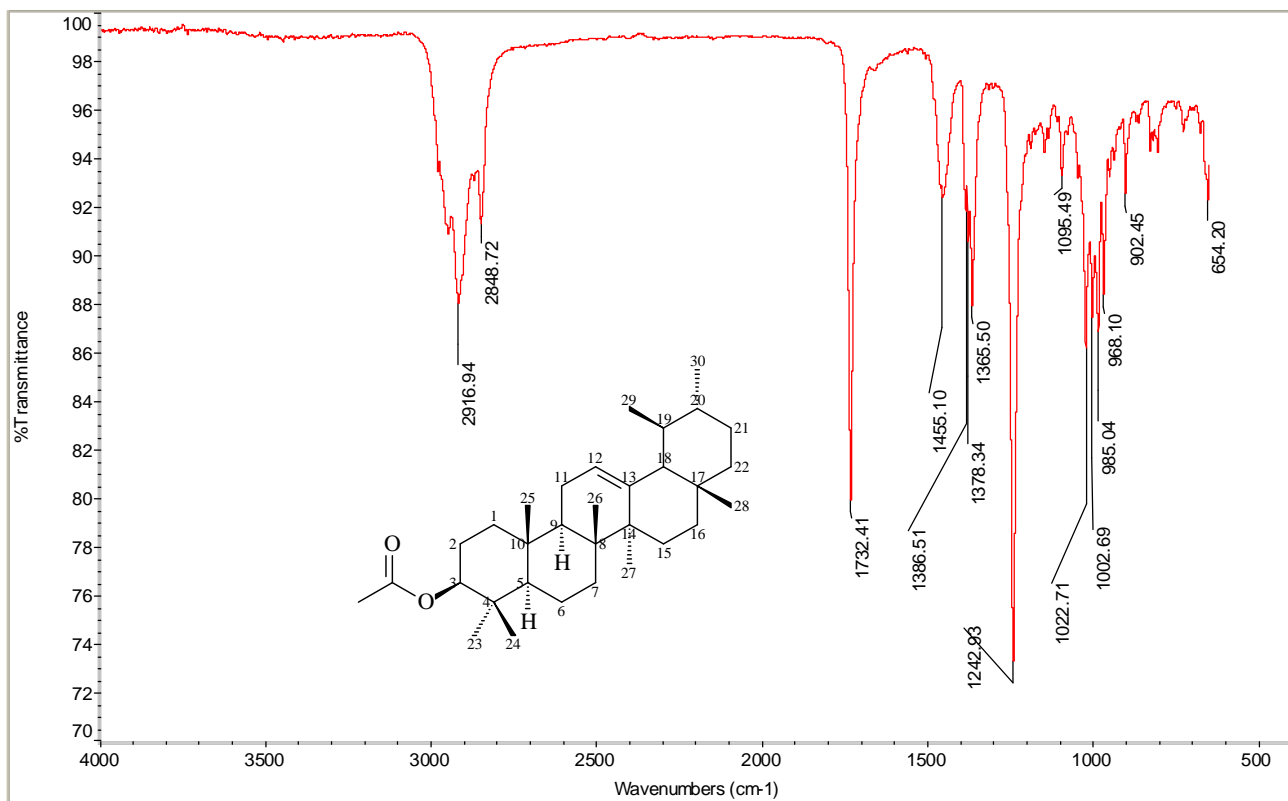
**Tabela II.6.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de LpI e da literatura para os triterpenos 3- $\beta$ -OAc- $\alpha$ -amirina, 3- $\beta$ -esteariloxi-ursan-12-eno, 3- $\beta$ -OAc-lupeol e 3- $\beta$ -esteariloxi-lup-20(29)-eno<sup>41</sup>



Carbono	LpI	3- $\beta$ -OAc- $\alpha$ -amirina	3- $\beta$ -esteariloxi-ursan-12-eno	LpI	3- $\beta$ -OAc-lupeol	3- $\beta$ -esteariloxi-lup-20(29)-eno
1	38,4	38,4	38,5	38,4	38,6	38,3
2	27,4	23,7	23,7	28,0	23,6	23,7
3	80,6	80,9	80,6	80,9	80,7	80,6
4	38,4	37,8	37,8	38,4	37,7	37,8
5	55,2	55,3	55,3	55,4	55,3	55,3
6	18,2	18,3	18,3	18,0	18,0	18,2
7	32,9	32,9	32,9	34,2	34,2	34,2
8	40,0	40,1	40,1	40,8	40,8	40,8
9	47,6	47,7	47,7	50,3	50,3	50,3
10	36,8	36,9	36,9	37,1	37,0	37,0
11	23,2	23,4	23,4	21,3	20,6	20,9
12	124,3	124,4	124,4	25,2	26,5	25,1
13	139,6	139,9	139,7	38,0	38,0	38,0
14	42,1	42,1	42,1	42,8	42,7	42,8
15	28,8	26,7	26,7	27,4	27,4	27,4
16	26,6	28,2	28,1	34,9	35,5	35,5
17	33,7	33,8	33,8	43,0	42,9	42,9
18	59,0	59,2	59,1	48,3	48,2	48,2
19	39,6	39,6	39,6	48,0	47,9	48,0
20	39,7	39,7	39,7	150,9	150,4	150,9
21	29,7	31,3	31,3	29,5	29,8	29,7
22	41,5	41,6	41,6	40,0	39,9	39,9
23	28,1	28,1	28,1	28,1	28,0	27,9
24	15,7	16,7	16,8	16,0	15,9	16,6
25	15,6	15,6	15,8	16,2	16,1	16,1
26	16,9	16,9	16,9	15,9	16,5	15,9
27	23,4	23,3	23,3	14,5	14,5	14,5
28	28,1	28,7	28,8	17,5	17,5	17,9
29	17,5	17,5	17,5	109,4	109,3	109,4
30	21,4	21,4	21,4	19,3	19,2	19,3
-(C=O)-O-	171,0	170,9	173,5	173,7	170,4	173,7

### II.4.2. Análise Estrutural de EH-H1-R4 (LpII)

A amostra LpII apresentou-se como um sólido branco com fusão na faixa de 177,0 a 180,0 °C. O teste de Lieberman-Burchard foi positivo para triterpenos. A Figura II.5 apresenta o espectro no IV de LpII. As absorções entre 2916 e 2848  $\text{cm}^{-1}$  são características de estiramentos C-H de grupos alifáticos. A absorção intensa em 1732  $\text{cm}^{-1}$  pode ser atribuída a estiramentos C=O de um grupo éster. As absorções em 1455, 1386 e 1378  $\text{cm}^{-1}$  são devidas a estiramentos C-C e deformações angulares de H-C-H de cadeias alifáticas. As absorções em 1243 e 1023  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas respectivamente a estiramentos C-O assimétrico e simétrico.

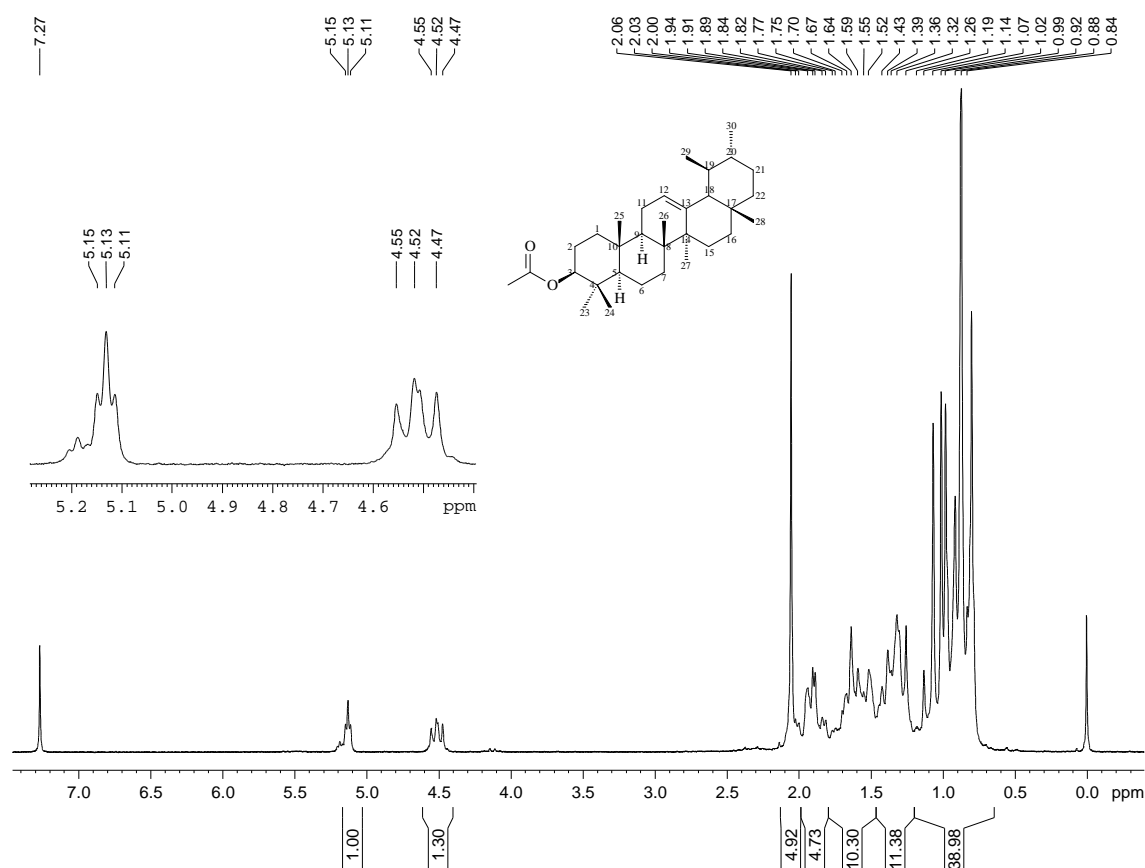


**Figura II.5.** Espectro de absorção na região do Infravermelho de LpII (KBr).

A Figura II.6 (pág. 29) mostra o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de LpII. O sinal triplo em  $\delta_{\text{H}}$  5,13 ( $J = 4,0$  Hz), adjacente a  $\text{CH}_2$ , é característico de átomos de hidrogênio



alquênico. O sinal duplo duplete em  $\delta_H$  4,52 ( $J = 6,0$  e  $2,0$  Hz) é característico de hidrogênio ligado a carbono carbinólico adjacente a grupo metilênico com átomos de hidrogênio quimicamente distintos com hidrogênio adjacente a  $CH_2$  quimicamente distinto.<sup>42</sup> O sinal simpleto em  $\delta_H$  2,05 pode ser atribuído ao hidrogênio metílico do grupo acetila. Os demais sinais de hidrogênio registrados entre  $\delta_H$  2,50 e 0,80 são característicos de átomos de hidrogênio de grupos alifáticos de triterpenos pentacíclicos. O sinal intenso registrado em  $\delta_H$  0,92 pode ser atribuído a átomos de hidrogênio de grupos metilênicos de cadeia alifática longa de um contaminante.



**Figura II.6.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de LpII (200 MHz; CDCl<sub>3</sub>).

As Figuras II.7 (pág. 30) e II.8 (pág. 31) apresentam respectivamente o espectro de RMN de <sup>13</sup>C e o subespectro DEPT 135° de LpII, que foram analisados

comparativamente. O sinal em  $\delta_C$  171,0 pode ser atribuído ao átomo de carbono carbonílico de um grupo éster, confirmando a análise do espectro no IV (Figura II.5, pág. 28). O sinal em  $\delta_C$  139,6 corresponde a carbono alquênico não hydrogenado e o sinal em  $\delta_C$  124,3 corresponde a carbono olefínico, sendo similares aos dados de RMN de  $^{13}C$  descritos na literatura para a  $\alpha$ -amirina acetilada (Tabela II.6, pág. 27). O sinal em  $\delta_C$  23,2 pode ser atribuído ao átomo de carbono metílico do grupo acetila. O sinal intenso registrado em  $\delta_C$  29,7 pode ser atribuído a átomos de carbono de grupos metilênicos de cadeia alifática longa de um outro composto presente na amostra. Portanto, os dados de RMN de LpII podem ser atribuídos a 3- $\beta$ -O-acetil- $\alpha$ -amirina, além de um contaminante de cadeia longa.

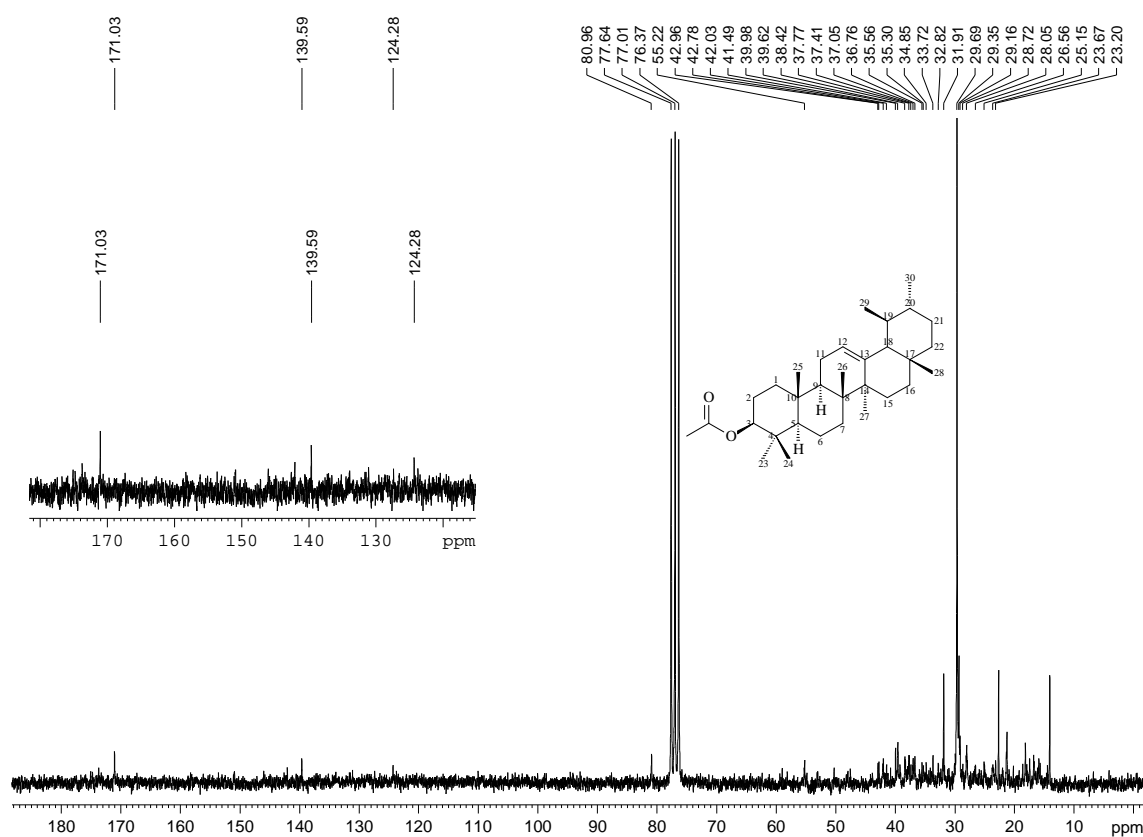
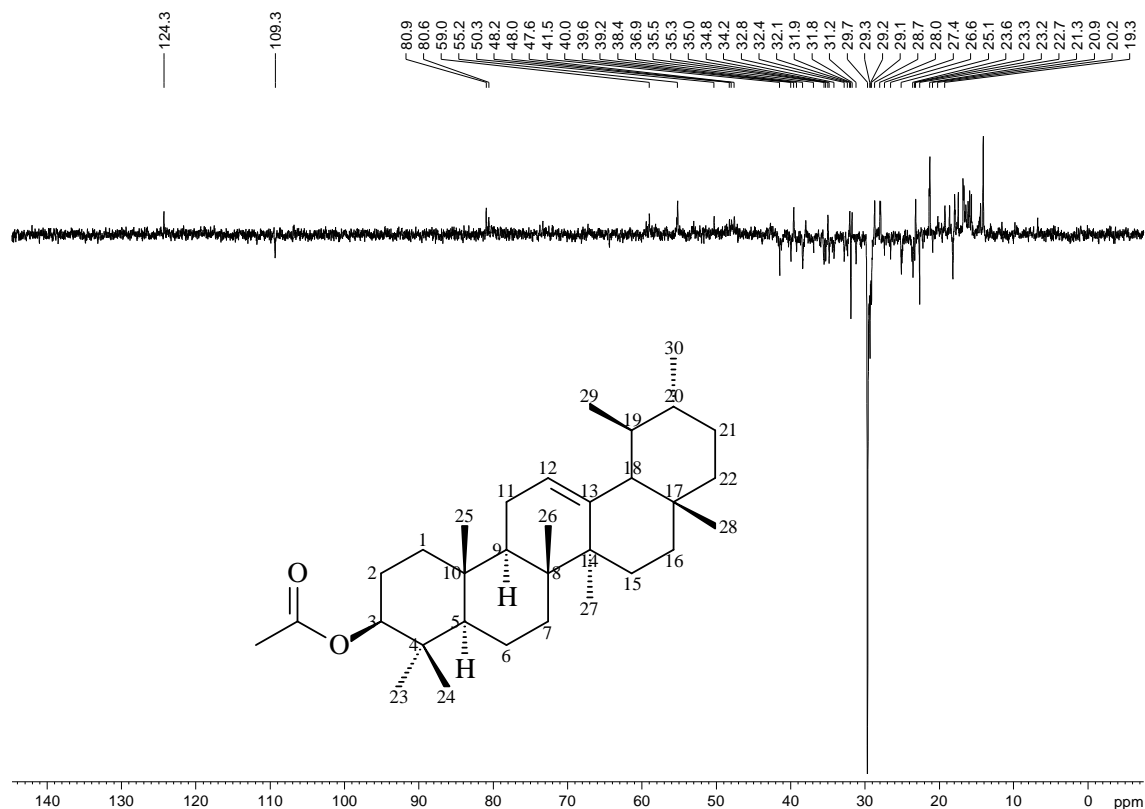


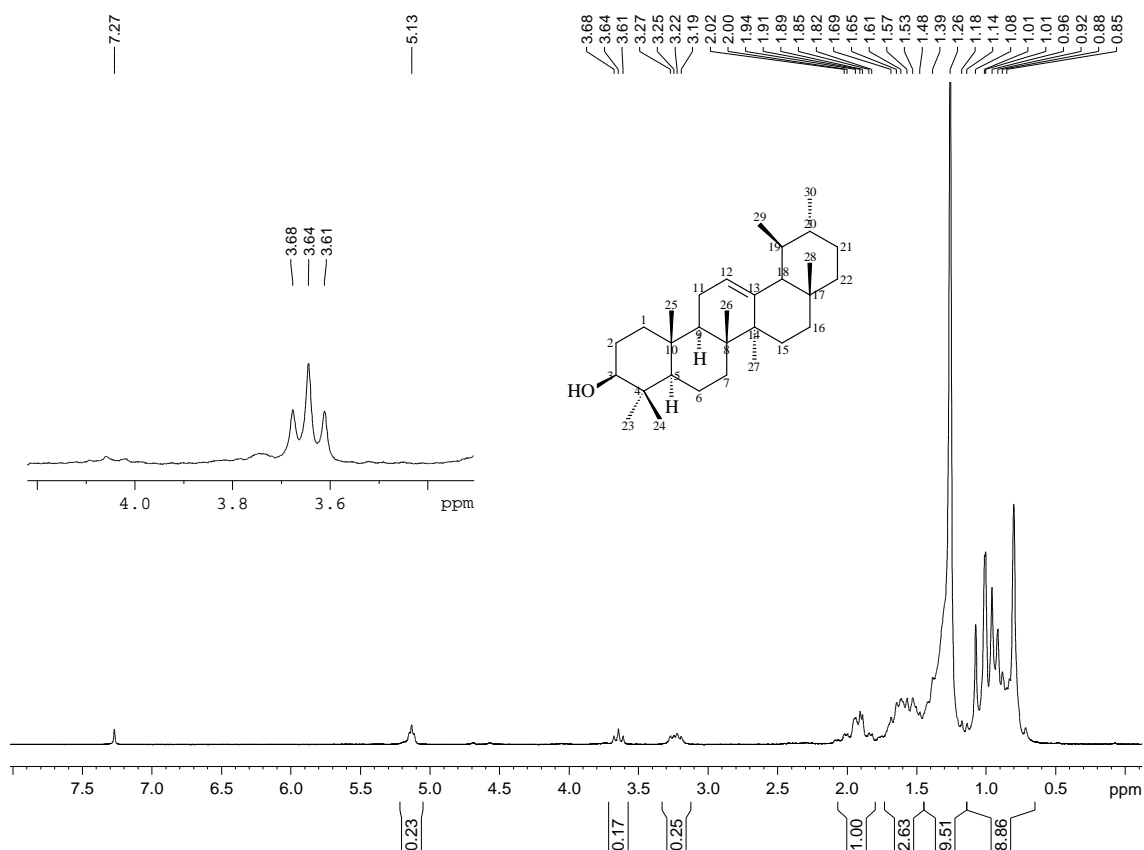
Figura II.7. Espectro de RMN de  $^{13}C$  de LpII (50 MHz;  $CDCl_3$ ).



**Figura II.8.** Subespectro DEPT 135° de LpII (50 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).

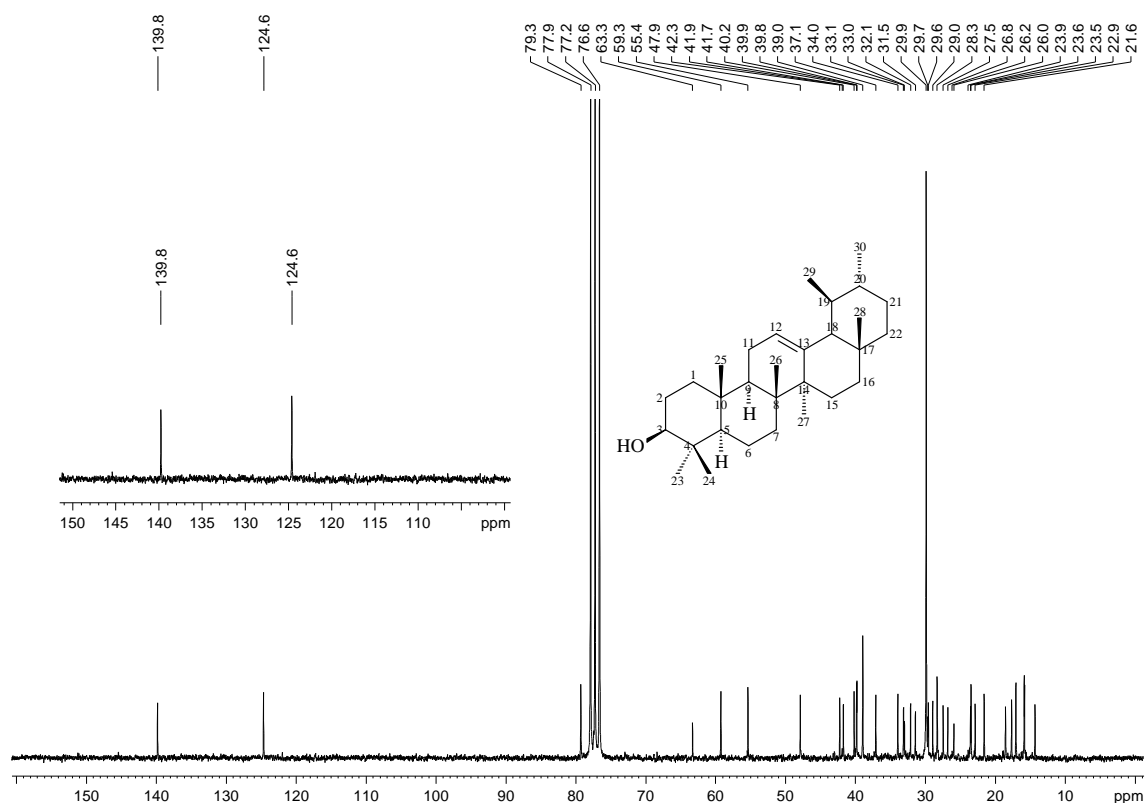
### II.4.3. Análise Estrutural de EH-H1-R6 (LpIII)

A amostra LpIII apresentou-se como um sólido branco de fusão na faixa de 182,0 a 186,0 °C. O teste de Lieberman-Burchard foi positivo para triterpenos. A Figura II.9 (pág. 32) mostra o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de LpIII. O sinal triplete registrado em  $\delta_{\text{H}}$  5,13 é característico de átomos de hidrogênio alquenílico. O sinal triplete em  $\delta_{\text{H}}$  3,64 ( $J = 6,5$  Hz) é característico de hidrogênio ligado a carbono carbinólico. O sinal simples em  $\delta_{\text{H}}$  0,92 pode ser atribuído a átomos de hidrogênio metílico. Os demais sinais de hidrogênio registrados entre  $\delta_{\text{H}}$  2,50 e 0,80 são característicos de átomos de hidrogênio alifático de triterpenos pentacíclicos. O sinal intenso em  $\delta_{\text{H}}$  1,26 pode ser atribuído a átomos de hidrogênio de grupos metilênicos de cadeia alifática longa pertencentes a outro composto presente na amostra.



**Figura II.9.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de LpIII (200 MHz; CDCl<sub>3</sub>).

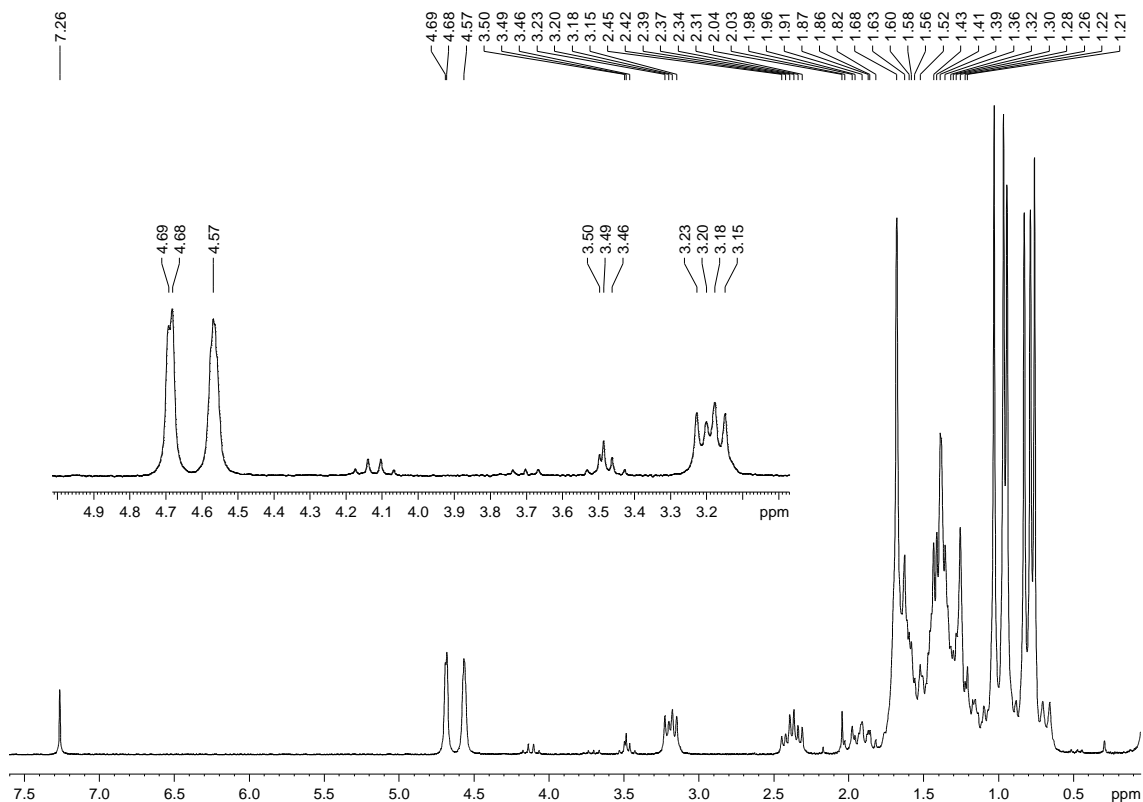
A Figura II.10 (pág. 33) apresenta o espectro de RMN de <sup>13</sup>C de LpIII. Este espectro é similar àqueles apresentados anteriormente (Figuras II.7 e II.8, págs. 30 e 31, respectivamente), indicando tratar-se do triterpeno pentacíclico  $\alpha$ -amirina.<sup>42</sup> O sinal intenso em  $\delta_C$  29,7 pode ser atribuído a átomos de carbono de grupos metilênicos de cadeia alifática longa de contaminante presente na amostra.



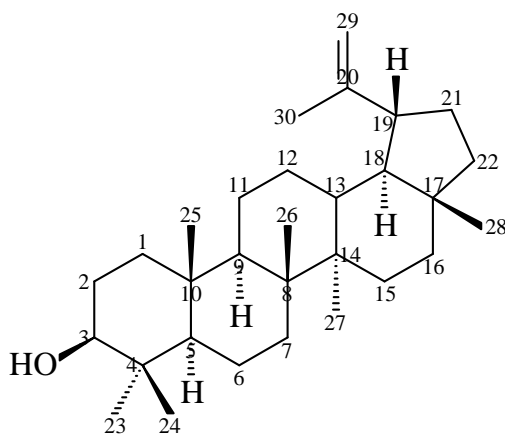
**Figura II.10.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de LpIII (50 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).

#### II.4.4. Análise Estrutural de EH-H1-R7 (LpIV)

A amostra LpIV apresentou teste de Lieberman-Burchard positivo para triterpenos. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de LpIV (Figura II.11, pág. 34) mostra sinais em  $\delta_{\text{H}}$  4,68-4,57 que podem ser atribuídos a átomos de hidrogênio olefínico. O sinal multipletto registrado em  $\delta_{\text{H}}$  3,23-3,15 pode ser atribuído ao átomo de hidrogênio carbinólico em C-3 de triterpenos. Os vários sinais sobrepostos na região entre  $\delta_{\text{H}}$  2,50 e 0,50 são característicos de átomos de hidrogênio de grupos alifáticos.



**Figura II.11.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de LpIV (200 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura II.12, pág. 35) e o subespectro DEPT 135° (Figura II.13, pág. 36) de LpIV foram analisados comparativamente. Os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  150,9 (correspondente a carbono  $\text{sp}^2$  não hidrogenado) e 109,3 (correspondente a carbono  $\text{sp}^2$  metilênico) são característicos de triterpenos da série dos lupanos. O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  78,9 pode ser atribuído ao carbono carbinólico C-3 de triterpenos. Através da

análise dos espectros pode-se propor que LpIV trata-se do triterpeno lupeol, cujos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  são muito similares a dados da literatura.<sup>40</sup> Este triterpeno foi isolado também em trabalhos anteriores<sup>29</sup> e diversas atividade biológicas são reportadas a este composto, entre elas antiprotozoária, anti-inflamatória e antitumoral.<sup>43</sup>

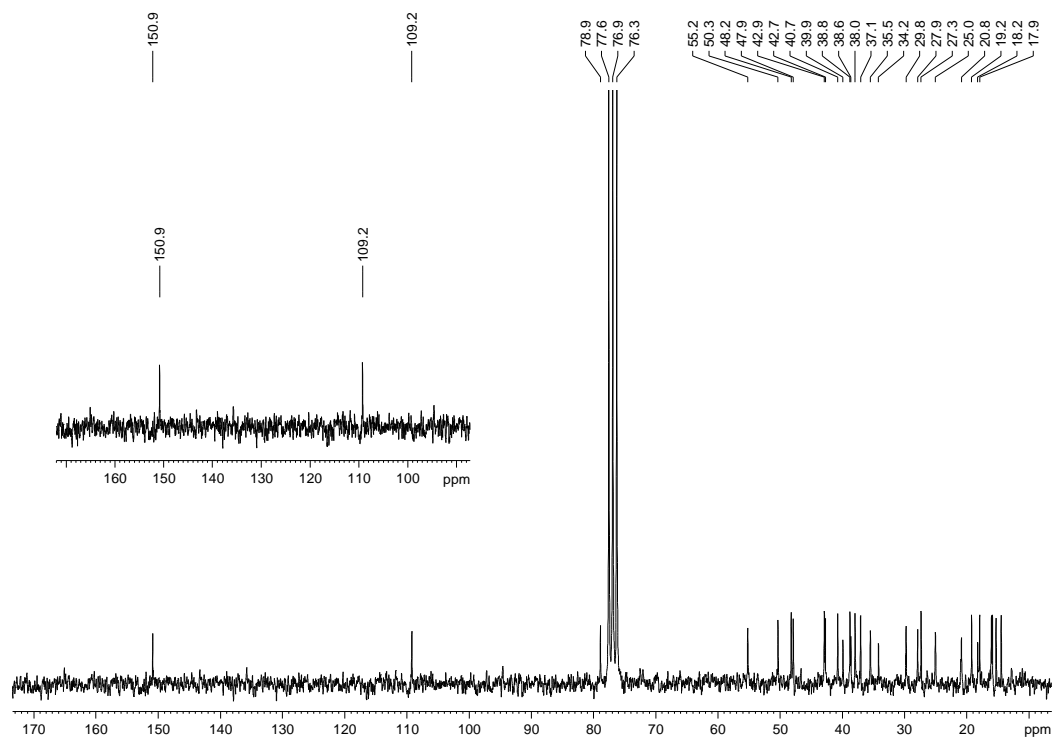
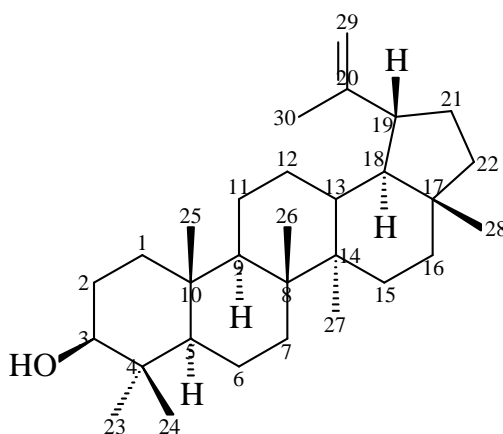
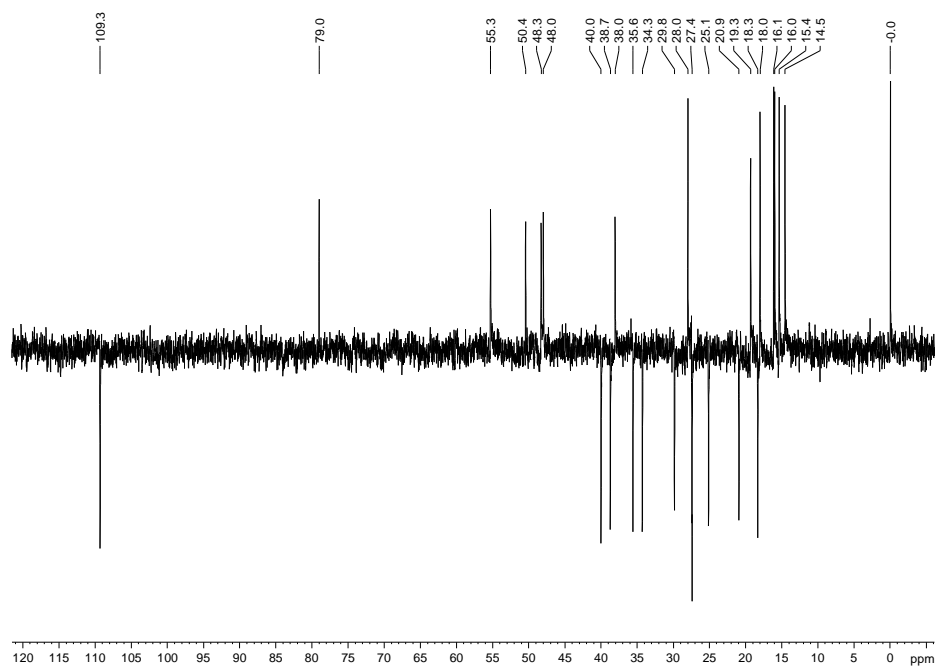


Figura II.12. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de LpIV (50 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).





**Figura II.13.** Subespectro DEPT 135° de LpIV (50 MHz; CDCl<sub>3</sub>).

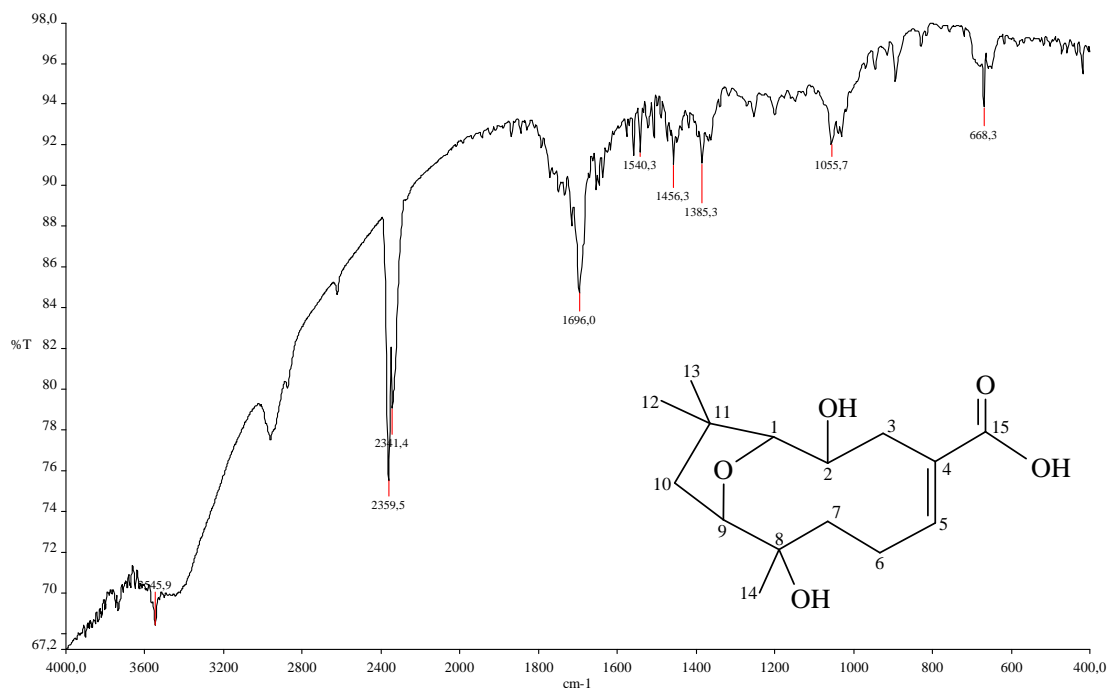
#### II.4.5. Análise Estrutural de EH-H2-H9A1-1 (LpIII)

A amostra EH-H2-H9A1-1 apresentou os mesmos dados espectroscópicos de LpIII (págs. 31 a 33), indicando tratar-se de  $\alpha$ -amirina.

#### II.4.6. Análise Estrutural de EH-D5-S4 (LpV)

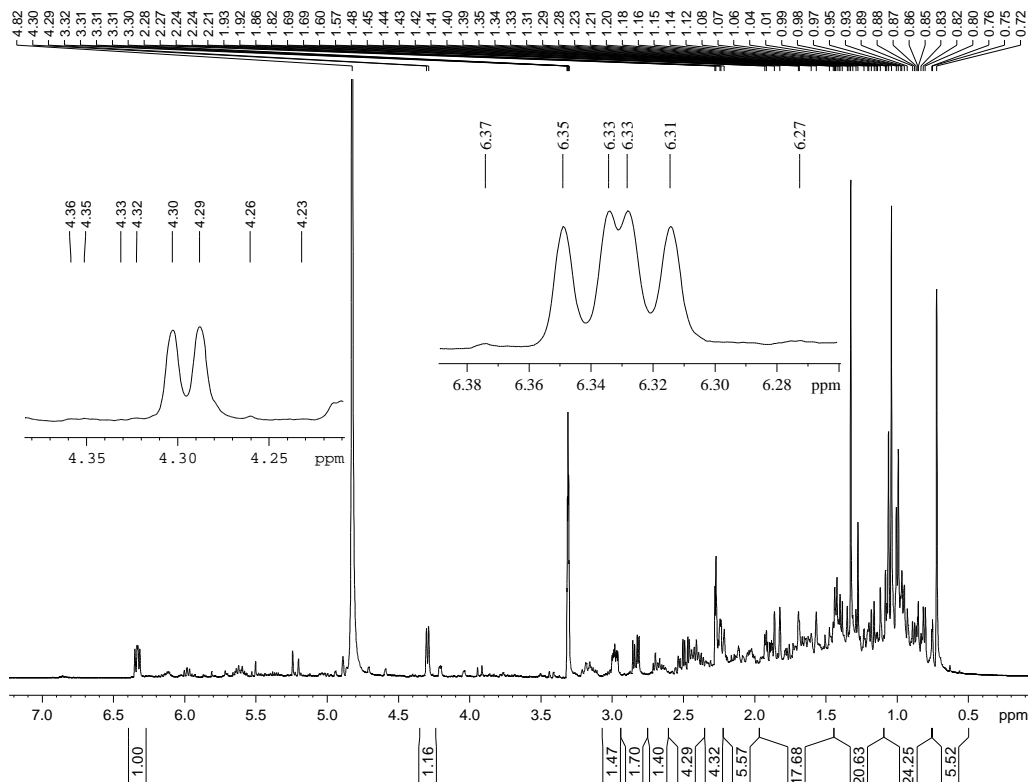
A amostra LpV apresentou-se como um sólido branco. A Figura II.14 (pág. 37) apresenta o espectro no IV de LpV. As absorções intensas acima de 3200 cm<sup>-1</sup> indicam a presença de grupos hidroxila na estrutura de LpV. As absorções entre 2950 e 2840 cm<sup>-1</sup> são características de estiramentos C-H de grupos alifáticos. A absorção intensa em 1696 cm<sup>-1</sup> é atribuída a estiramentos C=O de ácidos carboxílicos conjugados. As absorções em 1456 e 1385 cm<sup>-1</sup> são devidas a estiramentos C-C e deformações angulares de H-C-H de cadeias alifáticas. A absorção em 1056 cm<sup>-1</sup> pode ser atribuída a estiramentos C-O.





**Figura II.14.** Espectro de absorção na região do Infravermelho de LpV (KBr).

A Figura II.15 (pág. 38) mostra o espectro de RMN de <sup>1</sup>H de LpV. O sinal duplo duplete em  $\delta_{\text{H}}$  6,35 ( $J = 8,78$  e  $6,08$  Hz) pode ser atribuído a átomo de hidrogênio alquênico adjacente a grupo metilênico com átomos de hidrogênio quimicamente diferentes. O sinal duplete em  $\delta_{\text{H}}$  4,31 ( $J = 4,00$  Hz) pode ser atribuído a hidrogênio ligado a carbono oxigenado.



**Figura II.15.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de LpV (400 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

As Figuras II.16 e II.17 (pág. 39) mostram respectivamente os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e o subespectro DEPT  $135^\circ$  de LpV, que foram analisados comparativamente. Os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  indicam uma estrutura com 15 átomos de carbono, compatível com a classe dos sesquiterpenos, sendo três átomos de carbono metílico, quatro átomos de carbono metilênico, quatro átomos de carbono metínico, três átomos de carbono não hidrogenado e um átomo de carbono carboxílico. O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  173,5 é característico de carbono carboxílico. Os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  136,2 e 135,2 podem ser atribuídos a átomos de carbono alquênico, sendo que o sinal em menor deslocamento químico correspondente a carbono não hidrogenado.

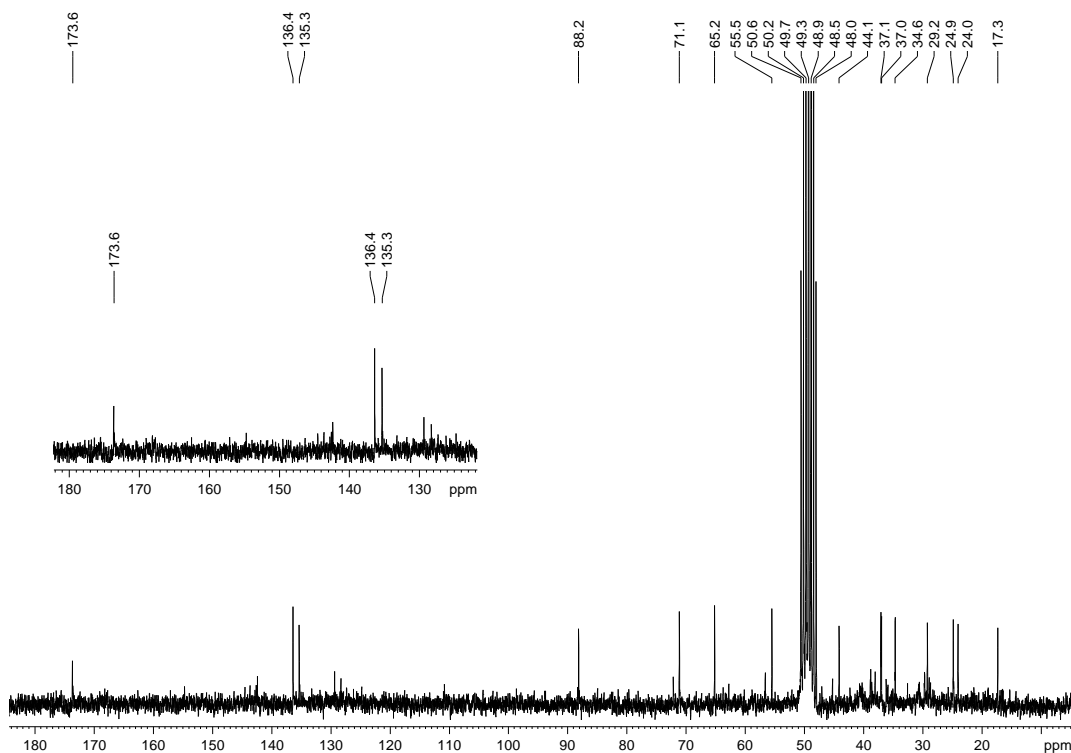


Figura II.16. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de LpV (100 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

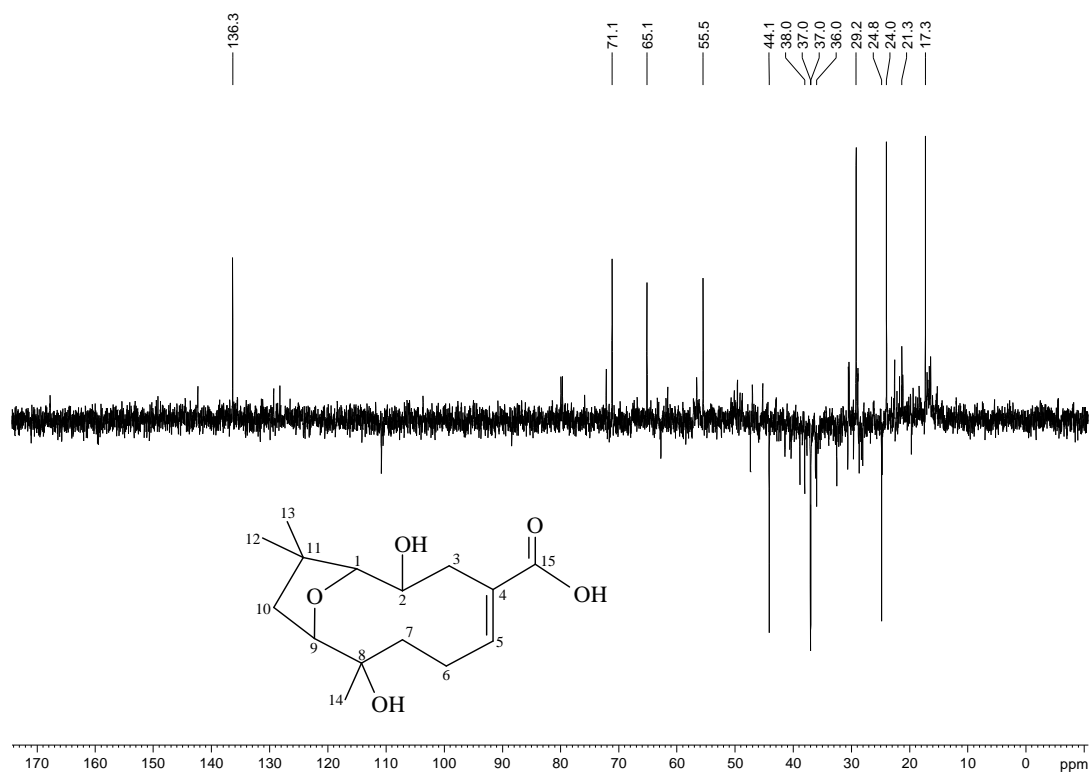


Figura II.17. Subspectro DEP 135° de LpV (100 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

As Figuras II.18 (pág. 41), II.19 (pág. 42) e II.20 (pág. 43) apresentam mapas de contornos HSQC de LpV. O sinal multipletto em  $\delta_{\text{H}} 2,90$  correlaciona-se com o sinal de carbono em  $\delta_{\text{C}} 55,5$ . O sinal dupletto em  $\delta_{\text{H}} 2,27$  correlaciona-se com o sinal de carbono em  $\delta_{\text{C}} 65,2$  e o sinal dupletto em  $\delta_{\text{H}} 4,31$  ( $J = 4,00$  Hz) correlaciona-se com o sinal de carbono em  $\delta_{\text{C}} 71,0$ , sugerindo a presença de três átomos de carbono mono-hidrogenado e oxigenado na estrutura. Os sinais em  $\delta_{\text{H}} 2,24$  e  $2,46$  correlacionam-se com o sinal de carbono em  $\delta_{\text{C}} 24,7$ . Os sinais em  $\delta_{\text{H}} 1,89$  e  $2,48$  correlacionam-se com o sinal de carbono em  $\delta_{\text{C}} 36,8$ . Os sinais em  $\delta_{\text{H}} 2,23$  e  $2,83$  correlacionam-se com os sinais de carbono em  $\delta_{\text{C}} 36,9$  e os sinais em  $\delta_{\text{H}} 1,40$  e  $1,80$  correlacionam-se com o sinal de carbono em  $\delta_{\text{C}} 44,0$ , sugerindo a existência de quatro grupos metilênicos com átomos de hidrogênio não equivalentes na estrutura, característico de estrutura cíclica. O sinal em  $\delta_{\text{H}} 0,72$  correlaciona-se com o sinal de carbono em  $\delta_{\text{C}} 17,2$ . O sinal em  $\delta_{\text{H}} 1,30$  correlaciona-se com o sinal de carbono em  $\delta_{\text{C}} 23,9$  e o sinal em  $\delta_{\text{H}} 1,12$  correlaciona-se com o sinal de carbono em  $\delta_{\text{C}} 28,8$ , sugerindo a existência de três grupos metila na estrutura. O sinal duplo dupletto em  $\delta_{\text{H}} 6,35$  ( $J = 8,78$  e  $6,08$  Hz) correlaciona-se com o sinal de carbono em  $\delta_{\text{C}} 136,0$ , sugerindo a presença de carbono alquênico mono-hidrogenado e de carbono não hidrogenado em  $\delta_{\text{C}} 135,2$ .

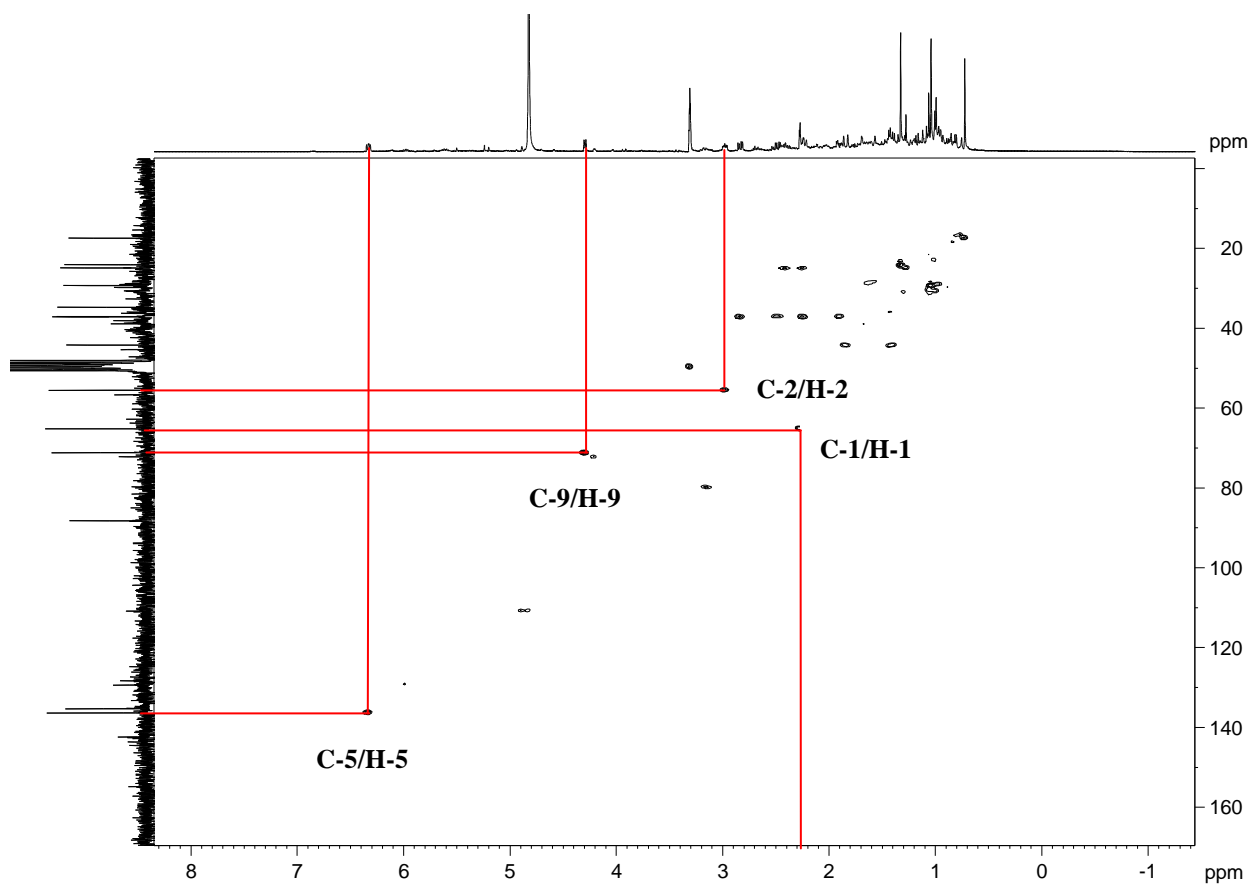
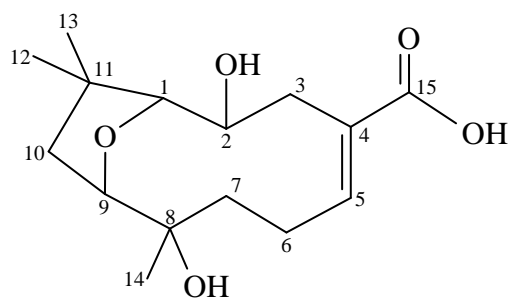
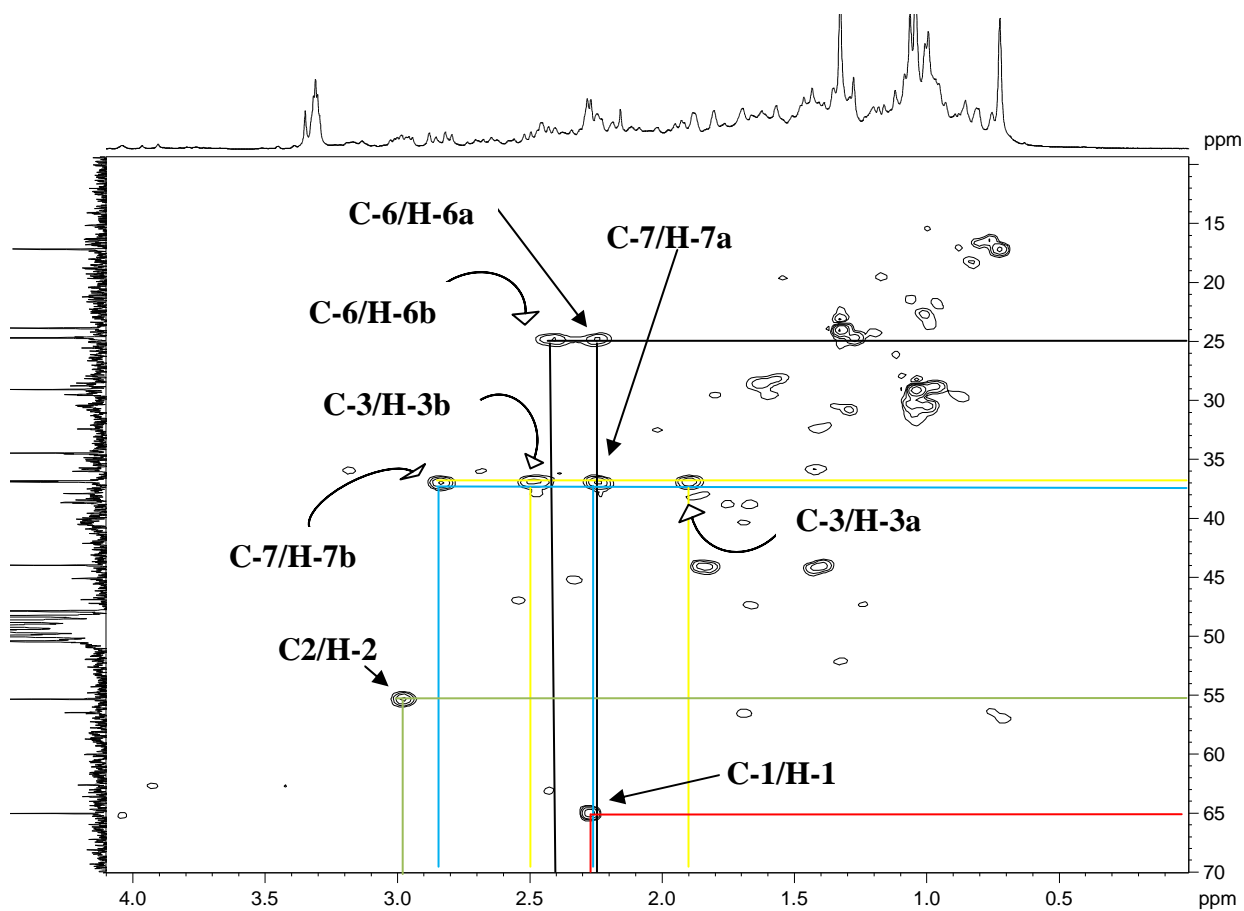
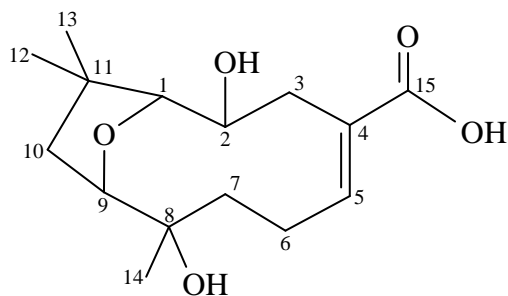


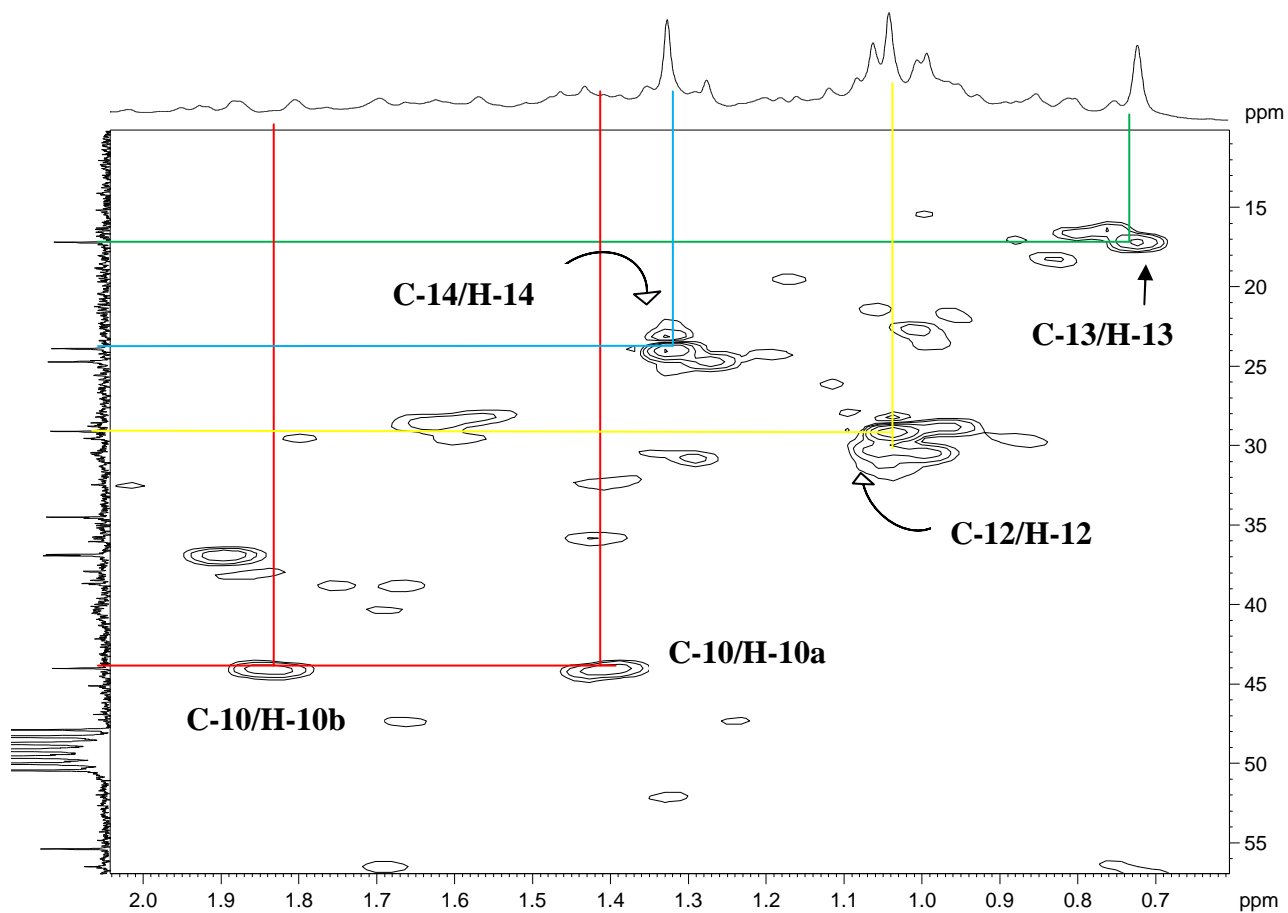
Figura II.18. Mapa de contornos HSQC de LpV ( $^1\text{H}$ : 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 100 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



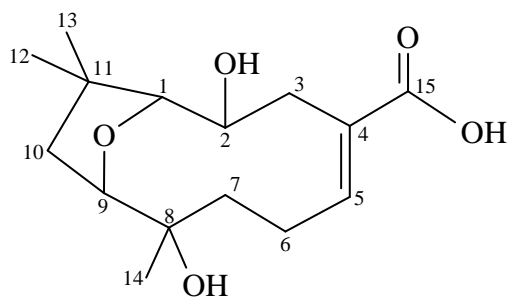


**Figura II.19.** Expansão do mapa de contornos HSQC de LpV ( $^1\text{H}$ : 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 100 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

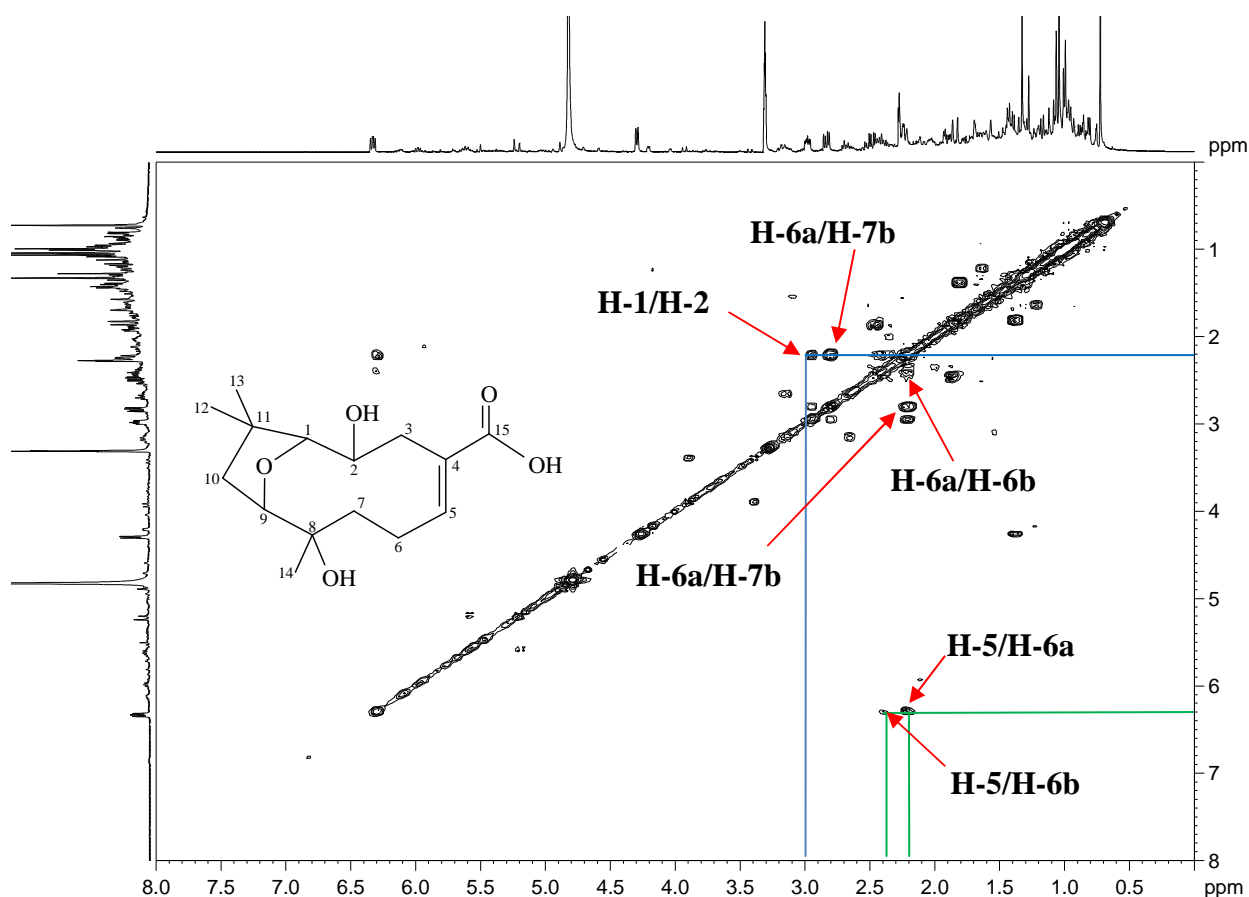




**Figura II.20.** Expansão do mapa de contornos HSQC de LpV ( $^1\text{H}$ : 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 100 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

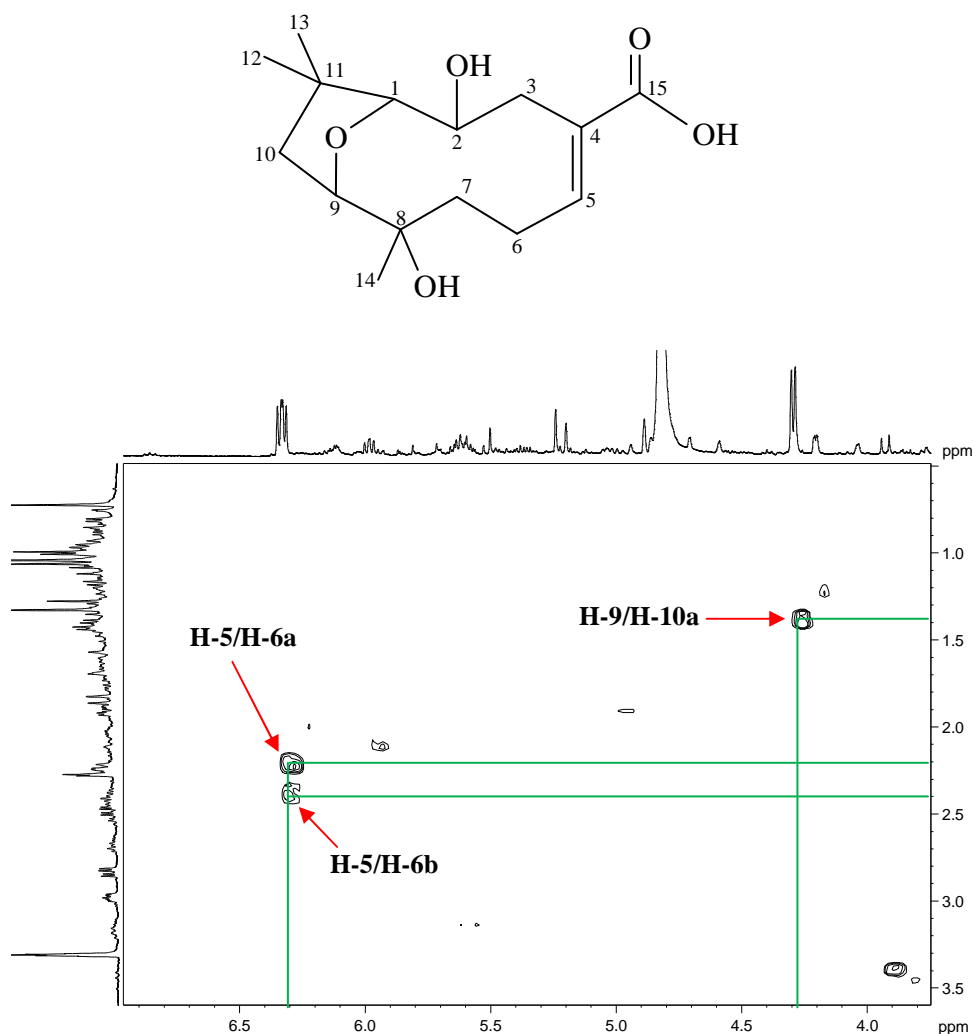


As Figuras II.21 (pág. 44) e II.22 (pág. 45) mostram mapas de contornos  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY de LpV. O sinal em  $\delta_{\text{H}}$  2,27 (H-1) correlaciona-se com o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  2,90 (H-2). O sinal em  $\delta_{\text{H}}$  6,35 (H-5) correlaciona-se com os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  2,24 (H-6a) e 2,46 (H-6b), confirmando a posição do hidrogênio alquênico na estrutura. O sinal em  $\delta_{\text{H}}$  2,23 (H-7a) correlaciona-se com os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  2,24 (H-6a) e 2,46 (H-6b), e o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  2,83 (H-7b) correlaciona-se com o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  2,24 (H-6a). O sinal em  $\delta_{\text{H}}$  1,40 (H-10a) correlaciona-se com o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  4,31 (H-9).



**Figura II.21.** Mapa de contornos COSY de LpV (400 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

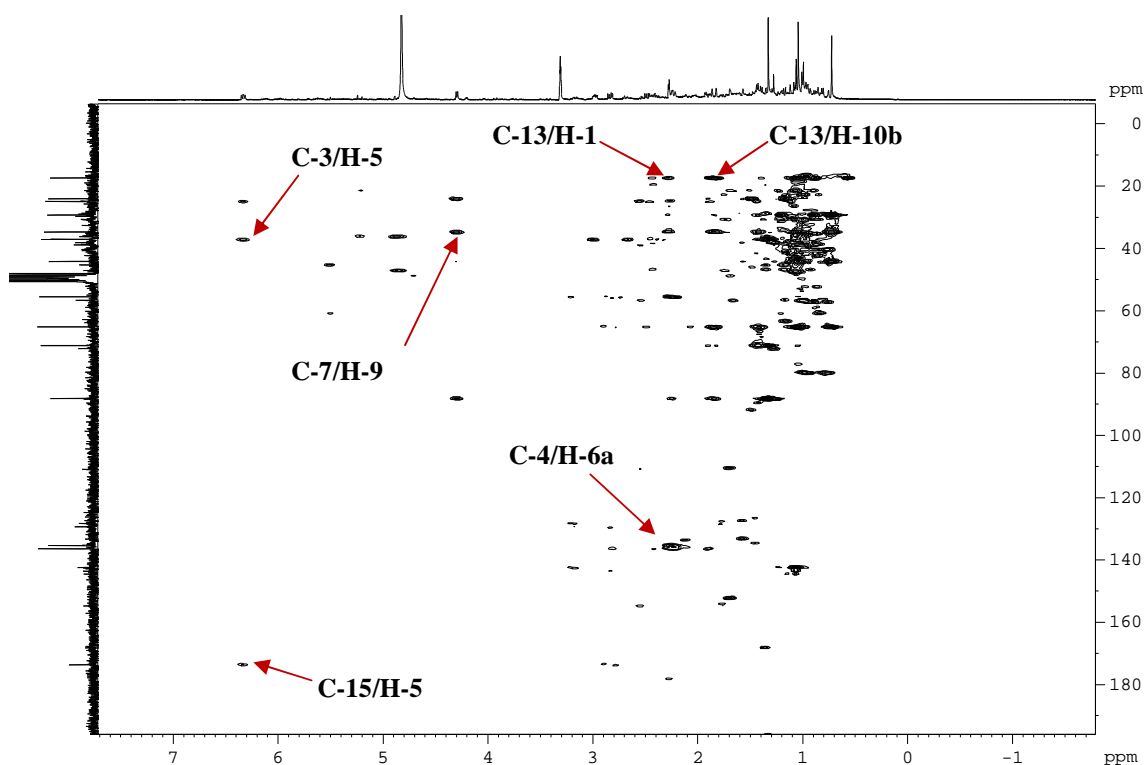




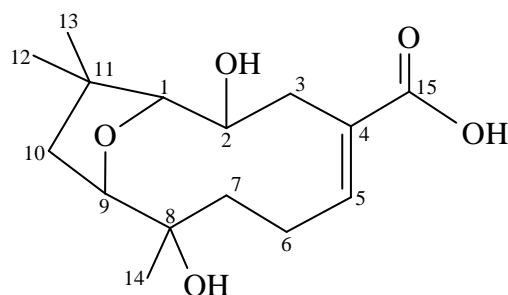
**Figura II.22.** Expansão do mapa de contornos COSY de LpV (400 MHz; CD<sub>3</sub>OD).

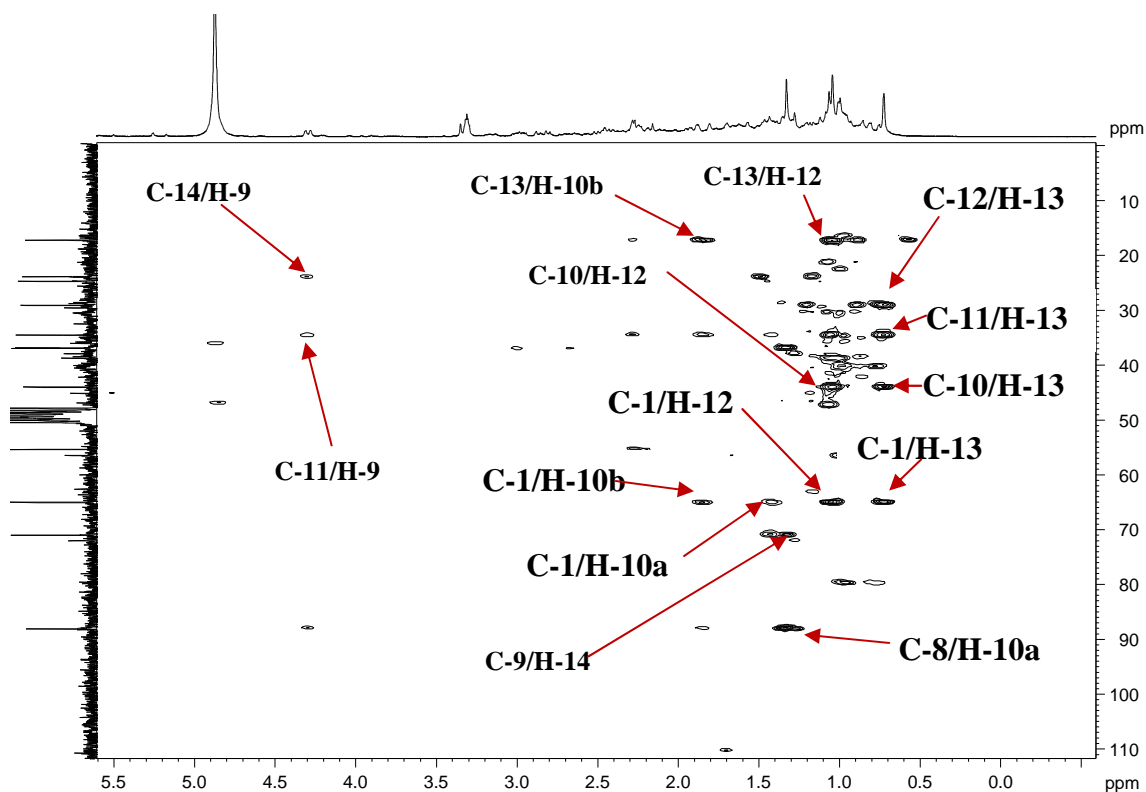
As Figuras II.23 (pág. 46) e II.24 (pág.47) apresentam os mapas de contornos <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC de LpV. O sinal em  $\delta_H$  65,2 (C-1) correlaciona-se com os sinais em  $\delta_H$  1,12 (H-12), 0,72 (H-13), 1,40 (H-10a) e 1,80 (H-10b), estabelecendo a posição do átomo de carbono oxigenado na estrutura. O sinal em  $\delta_H$  36,8 (C-3) correlaciona-se com o sinal em  $\delta_H$  6,35 (H-5). O sinal em  $\delta_H$  135,2 (C-4) correlaciona-se com o sinal em  $\delta_H$  2,24 (H-6a). O sinal em  $\delta_H$  36,9 (C-7) correlaciona-se com os sinais em  $\delta_H$  6,35 (H-5) e  $\delta_H$  4,31 (H-9). O sinal em  $\delta_H$  88,2 (C-8) correlaciona-se com os sinais em  $\delta_H$  1,40 (H-10a) e  $\delta_H$

1,80 (H-10b). O sinal em  $\delta_H$  71,0 (C-9) correlaciona-se com o sinal em  $\delta_H$  1,30 (H-14). O sinal em  $\delta_H$  44,0 (C-10) correlaciona-se com os sinais em  $\delta_H$  1,12 (H-12) e  $\delta_H$  0,72 (H-13). O sinal em  $\delta_H$  34,5 (C-11) correlaciona-se com o sinal em  $\delta_H$  4,35 (H-9). O sinal em  $\delta_H$  28,8 (C-12) correlaciona-se com o sinal em  $\delta_H$  0,72 (H-13). O sinal em  $\delta_H$  17,2 (C-13) correlaciona-se com os sinais em  $\delta_H$  2,27 (H-1), 1,80 (H-10b) e 1,12 (H-12). O sinal em  $\delta_H$  173,5 (C-15) correlaciona-se com o sinal em  $\delta_H$  6,35 (H-5), indicando a posição da carboxila  $\alpha,\beta$ -insaturada.

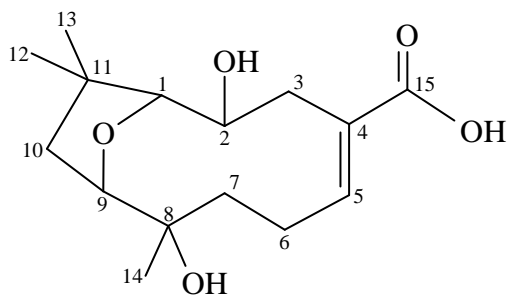


**Figura II.23.** Mapa de contornos HMBC de LpV ( $^1\text{H}$ : 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 100 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



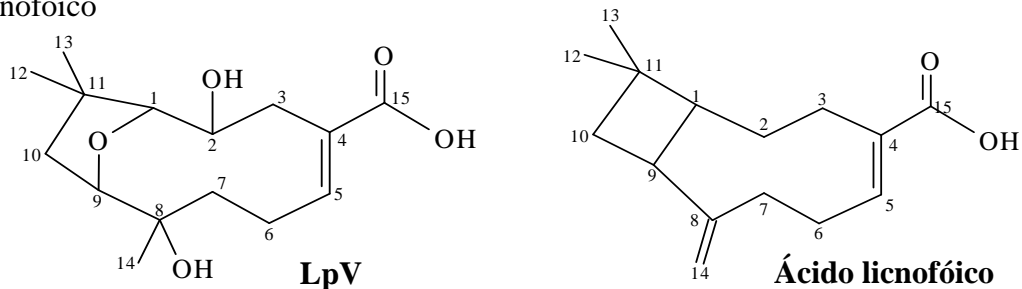


**Figura II.24.** Expansão do mapa de contornos HMBC de LpV ( $^1\text{H}$ : 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 100 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



A Tabela II.7 (pág. 48) apresenta os dados de RMN 1D e 2D de LpV, correspondendo a ácido 2,8-dihidroxi-8,11,11-trimetil-12-oxabicyclo[7.2.1]dode-4-en-4-óico.

**Tabela II.7.** Dados de RMN 1D e 2D de LpV, incluindo dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  do ácido licnofóico



C	HMQC ( $^1J$ )		$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY	HMBC ( $^{2,3}J$ )	$\delta_{\text{C}}$ Ácido licnofóico <sup>31</sup>
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult; $J$ )			
1	65,2	2,27 ( <i>m</i> )	H-2	H-10a, H-10b, H-12 e H-13	51,9
2	55,5	2,90 ( <i>m</i> )	H-1, H-3a e H-3b	-	27,3
3	36,8	1,89 e 2,48 ( <i>m</i> )	H-2	H-5	23,7
4	135,2	-	-	H-6a	132,2
5	136,0	6,35 ( <i>dd</i> ; $J=8,78$ e 6,08 Hz)	H-6a e H-6b	-	144,8
6	24,7	2,24 e 2,46 ( <i>m</i> )	H-5, H-7a e H-7b,	-	33,9
7	36,9	2,23 e 2,83 ( <i>m</i> )	H-6a, H-6b	H-5 e H-9	28,6
8	88,2	-	-	H-10a e H-10b	154,5
9	71,0	4,31 ( <i>d</i> ; $J= 4,00$ Hz)	H-10a	H-14	40,1
10	44,0	1,40 e 1,80 ( <i>m</i> )	H-9	H-12 e H-13	40,2
11	34,5	-	-	H-9	33,3
12	28,8	1,12 ( <i>m</i> )	-	H-13	22,9
13	17,2	0,72 ( <i>m</i> )	-	H-1, H-10b e H-12	29,7
14	23,9	1,30 ( <i>m</i> )		H-9	111,4
15	173,5	-	-	H-5	173,3

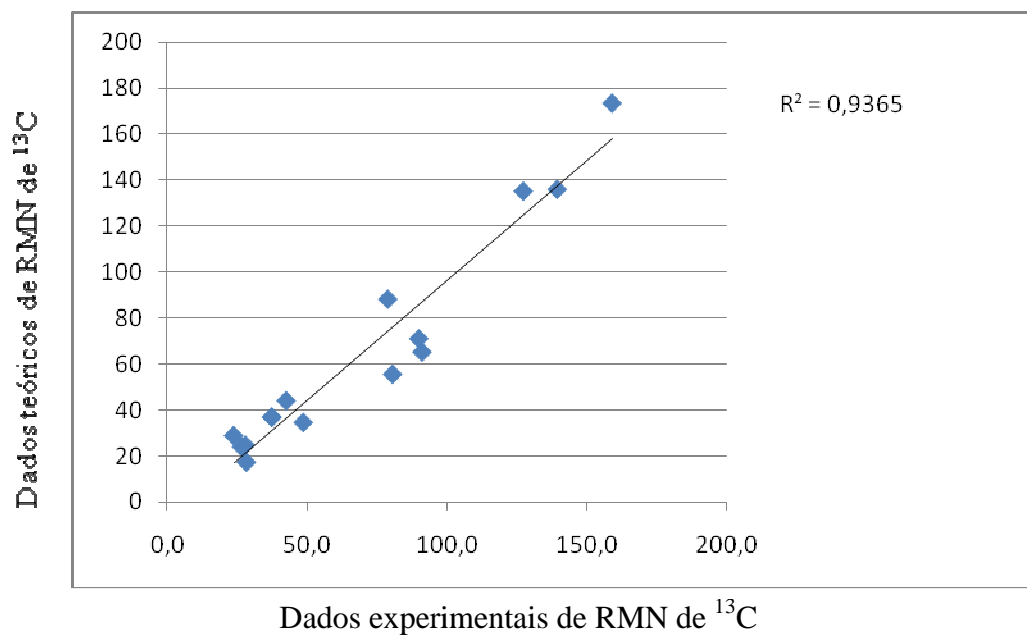
O ácido 2,8-dihidroxi-8,11,11-trimetil-12-oxabicyclo[7.2.1]dode-4-en-4-óico, está sendo descrito pela primeira vez na literatura e pertence à mesma classe química do ácido licnofóico, isolado previamente de *L. pinaster*.<sup>31</sup>

Cálculos teóricos de otimização de geometria foram realizados para a estrutura LpV. Em seguida cálculos teóricos de RMN de <sup>13</sup>C foram realizados para a estrutura otimizada de LpV. A otimização de geometria de LpV foi realizada utilizando o software Gaussian 03.<sup>44</sup> As geometrias obtidas previamente a partir de cálculos semi-empíricos PM3 foram usadas como modelos iniciais nas otimizações de geometria empregando cálculos B3LYP com conjunto de base 6-31G\*. A literatura descreve que cálculos teóricos em nível B3LYP têm fornecido resultados com altos coeficientes de correlação para compostos orgânicos.<sup>45</sup> A Tabela II.8 (pág. 50) mostra os dados teóricos e experimentais de RMN de <sup>13</sup>C para LpV.

**Tabela II.8.** Dados teóricos e experimentais de RMN de  $^{13}\text{C}$  para LpV

<b>C</b>	<b>Experimental</b>	<b>Teórico</b>
1	65,2	91,1
2	55,5	80,6
3	36,8	37,6
4	135,2	127,3
5	136,0	139,4
6	24,7	28,1
7	36,9	37,5
8	88,2	78,9
9	71,0	90,0
10	44,0	42,7
11	34,5	48,8
12	28,8	23,9
13	17,2	28,5
14	23,9	26,8
15	173,5	159,0

A Figura II.25 mostra a correlação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  experimental e teórico de LpV. Através da análise destes dados é possível inferir que existe uma boa correlação entre os dados teóricos e experimentais, o que corrobora com a estrutura proposta para LpV.



**Figura II.25.** Correlação entre dados teóricos e experimentais de RMN de  $^{13}\text{C}$  para LpV.





**CAPÍTULO III**

**ESTUDOS DO EFEITO DA RADIAÇÃO**

**GAMA EM EXTRATOS, FRAÇÕES E**

**FITOCONSTITUINTES ISOLADOS DE**

*L. pinaster*

### III.1. O uso da radiação gama em plantas

A radiação constitui-se em um dos métodos mais seguros e eficientes de descontaminação microbiológica de plantas.<sup>46</sup> Este método promove danos estruturais nas moléculas de DNA, afetando a reprodutibilidade de microorganismos e, como consequência, ocorre a diminuição da quantidade de micotoxinas no material irradiado.<sup>47</sup> A redução de microorganismos no material irradiado é observada normalmente em doses inferiores a 10 kGy. Entretanto, alguns estudos relatam que os materiais irradiados em doses superiores a 10 kGy são descontaminados microbiologicamente, sem comprometer suas capacidades nutricionais e propriedades farmacológicas.<sup>48,49</sup>

A radiação provoca também alterações nas membranas das células e, geralmente, promove uma melhor extração dos seus constituintes.<sup>50</sup> Alguns estudos na literatura relatam variação da concentração de alcoóis, aldeídos, ésteres, furanos ou compostos com grupos cetona em extratos de plantas que foram submetidos a diferentes doses de radiação.<sup>51</sup>

Os trabalhos com radiação gama são bastante promissores, uma vez que a radiação representa um importante método de descontaminação microbiológica. Neste sentido, a avaliação da influência de diferentes doses de radiação em extratos, fitoconstituintes ou óleos essenciais extraídos de plantas constitui-se um importante método para avaliar a influência da radiação na integridade química desses materiais. Portanto, neste capítulo são relatados os estudos da radiação gama em triterpenos, na fração fenólica obtida do extrato aquoso das partes aéreas de *L. pinaster* e dos óleos essenciais obtidos a partir do material vegetal submetido a radiação.

### III.2. Materiais e Métodos

Os experimentos com radiação gama foram realizados em equipamento do tipo Irradiador Panorâmico Multipropósito de Categoria II, Modelo/número de série IR-214 e tipo GB-127, com fonte de Cobalto-60 estocada a seco em atividade máxima de 2.200 TBq ou 60.000 Ci.

### III.3. Efeito da radiação gama em triterpenos

Os triterpenos constituem-se uma classe de produtos naturais amplamente distribuída no reino vegetal e, dentro dessa ampla classe, existem alguns que ocorrem com uma maior frequência nos vegetais, como o lupeol e a  $\alpha$ -amirina.<sup>42</sup> Estes compostos são pentacíclicos, apresentando apenas um grupo funcional no C-3 e uma ligação dupla no esqueleto carbônico. Com o intuito de avaliar o efeito da radiação gama na integridade química destes compostos, lupeol,  $\alpha$ -amirina e um derivado acetilado da  $\alpha$ -amirina foram submetidos à radiação.

#### III.3.1. Procedimento experimental

Para a realização dos ensaios, amostras (50 mg) dos triterpenos  $\alpha$ -amirina, 3-OAc- $\alpha$ -amirina e lupeol, isolados de *L. pinaster*, foram submetidas à radiação gama nas doses de 10 e 50 kGy para determinação de derivados radiolíticos.

#### III.3.2. Resultados e Discussão

As Figuras A.1 a A.4 (Anexo I, págs. 131 a 134) apresentam os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  do triterpeno  $\alpha$ -amirina submetido a doses de radiação gama de 10 e 50 kGy. Uma similaridade é observada entre todos os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de

$^{13}\text{C}$  da  $\alpha$ -amirina irradiada e não irradiada. Assim, este triterpeno não apresenta modificações em sua estrutura após radiação gama nas doses empregadas.

O derivado acetilado da  $\alpha$ -amirina foi submetido também à radiação gama nas mesmas condições. As Figuras A.5 a A.8 (Anexo I, págs. 135 a 138) apresentam os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  do triterpeno *OAc- $\alpha$ -amirina* submetido a doses de radiação gama de 10 e 50 kGy. Da mesma forma que para  $\alpha$ -amirina, uma similaridade é observada para os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  do triterpeno irradiado e não irradiado. No entanto, para este triterpeno é possível observar uma diminuição da intensidade dos sinais na região de  $\delta_{\text{C}}10,0-30,0$ , sinais característicos de átomos de carbono de cadeia alifática de um contaminante na amostra. Estes resultados sugerem uma maior sensibilidade da cadeia alifáticos a radiação gama. Portanto, este triterpeno não sofre também alterações estruturais sob ação da radiação gama.

As Figuras A.9 a A.12 (Anexo I, págs. 139 a 142) apresentam os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  do lupeol, submetido a doses de radiação gama de 10 e 50 kGy. Assim como para os dois compostos anteriormente estudados, observa-se uma similaridade desses espectros com os respectivos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  de amostra não irradiadas de lupeol.

Como resultado, as substâncias  $\alpha$ -amirina, *OAc- $\alpha$ -amirina* e lupeol irradiadas não mostraram diferenças nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  quando estes foram comparados aos espectros de amostras autênticas não submetidas à irradiação. Nas doses utilizadas não houve a formação de produtos radiolíticos detectáveis por RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  a 400 MHz e 100 MHz, respectivamente.

### III.4. Análise do extrato fenólico irradiado

Vários efeitos benéficos à saúde têm sido atribuídos aos compostos fenólicos presentes nos vegetais. Estudos epidemiológicos *in vitro* e clínicos mostram múltiplos efeitos biológicos relacionados aos compostos fenólicos, tais como atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e anticarcinogênica.<sup>52</sup>

Alguns trabalhos na literatura reportam uma diminuição da concentração de compostos fenólicos em extratos de plantas expostos à radiação devido à propriedade radioprotetora destes compostos.<sup>53</sup> Neste sentido, o extrato fenólico de *L. pinaster* foi submetido a dose de 3 kGy para posterior análise da influência da radiação na concentração dos compostos fenólicos neste extrato e avaliação da formação de produtos radiolíticos.

#### III.4.1. Procedimento experimental

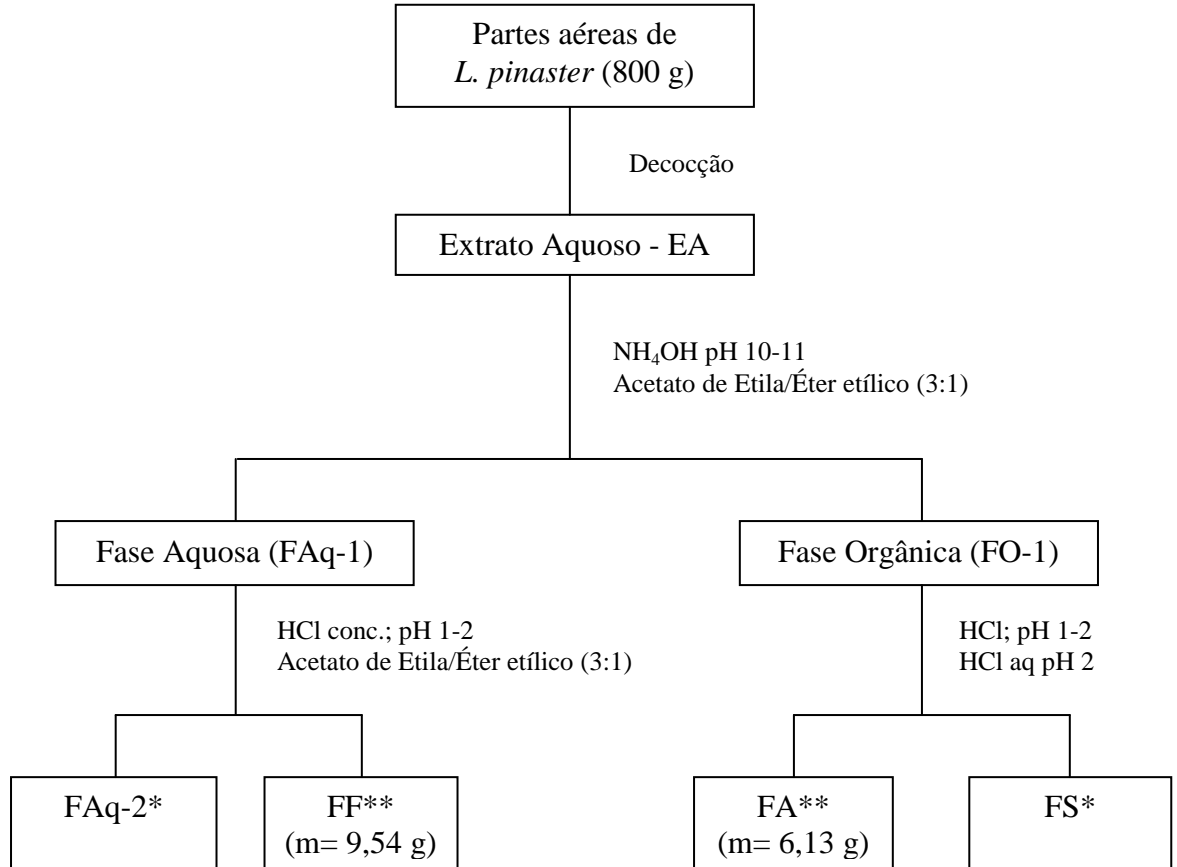
As análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em escala analítica foram realizadas em cromatógrafo líquido Shimadzu, constituído por duas bombas LC-20AT, detector UV/VIS SPD-20A, *software* LCsolution v.1.21 (Shimadzu) e coluna ODS Hypersil (C18), com dimensões de 250 mm x 4,6 mm x 5 mm (Supelco).<sup>54-56</sup> As amostras foram analisadas por CLAE no modo isocrático, utilizando uma mistura dos eluentes A (metanol) e B (solução água:ácido trifluoroacético; 99,5:0,5 v/v; pH 4,3) como fases móveis contendo 20% de A e 80% de B, em um intervalo de 0,0 a 40,0 min. O volume de injeção foi de 20  $\mu$ L, injetado manualmente, com fluxo mantendo-se constante a uma taxa de 1,0 mL/min. Os dados cromatográficos para todas as doses de radiação gama foram obtidos, analisados e armazenados a 280 e 360 nm.

As análises por CLAE no método preparativo foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu, constituído por uma bomba (LC-10AV), detector UV/VIS (SPD-10 AV), *software* PC/Chrom (u8A Scientific) e coluna Dyna-max microsorb (C18) 10C-5250 x 10 mm (Varian). A fase móvel no modo isocrático foi a mesma descrita acima para CLAE em escala analítica, com um volume de injeção de 2 mL, aplicada manualmente a uma taxa de fluxo de 4,7 mL/min, de acordo com as especificações "Scale-up" linear da coluna. Os dados cromatográficos obtidos foram analisados e armazenados a 280 nm. Após este procedimento, as amostras foram liofilizadas em equipamento Termo Fisher FR-Drying Digital Unit (Scientific). Em seguida, as amostras foram estocadas a -18 °C até o momento das análises espectroscópicas.

#### **III.4.2. Obtenção do extrato fenólico**

Partes aéreas pulverizadas de *L. pinaster* (800,00 g) foram submetidas à decocção com água por 2 h a temperatura de 60 °C. Em seguida, a mistura foi filtrada, obtendo-se o extrato aquoso de *L. pinaster* (EA). O extrato EA foi colocado em funil de separação, sendo adicionado hidróxido de amônio até pH 10–11. Em seguida foram adicionados 100 mL de solução AcOEt:EtOEt (3:1), obtendo-se duas fases, sendo uma fase aquosa (FAq1) e a outra fase orgânica (FO-1), que foram separadas. FAq-1 foi acidificada com HCl concentrado até pH 1–2 e submetida à extração com solução AcOEt:EtOEt (3:1), obtendo-se a fase aquosa (FAq-2), rica em aminoácidos, ácidos orgânicos e açúcares, e a fase orgânica (FF), rica em compostos fenólicos do tipo flavonoides. Por sua vez, FO-1 foi acidificada com HCl concentrado até pH 2 e submetida à extração com solução de HCl (pH 2), obtendo-se a fase aquosa (FA), rica em alcaloides, e a fase orgânica (FS), rica em saponinas. O Esquema III.1 (pág. 58)

apresenta a sequência metodológica para o isolamento dos constituintes polares do extrato EA de *L. pinaster*.



\*As frações FAq-2 e FS não foram estudadas.

\*\*As frações FF e FA foram submetidas a testes biológicos (capítulo IV).

**Esquema III.1.** Sequência metodológica para o isolamento dos constituintes polares do extrato aquoso de *L. pinaster*.

### III.4.3. Prospecção Fitoquímica

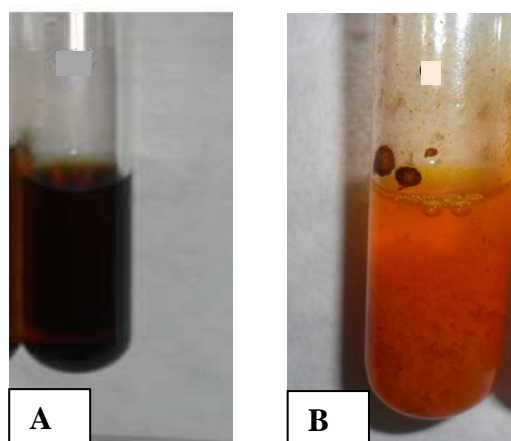
Alíquotas (~2,0 mg) da amostra foram solubilizadas em 2 mL de água e colocadas em um tubo de ensaio. Hidróxido de amônia foi adicionado no tubo de ensaio até pH 11. O aparecimento de coloração amarela indica a presença de flavonas,

flavonois e xantonas. Coloração vermelha púrpura indica a presença de chalconas e auronas. Por sua vez, a coloração vermelha laranja indica a presença de flavonoides na amostra.

Alíquotas (~2,0 mg) da amostra foram solubilizadas em 2 mL de água e colocadas em um tubo de ensaio. Neste tubo foram colocadas três gotas do reagente de Dragendorff para precipitação de alcaloides. A formação de precipitado floculoso indica a presença de alcaloides na amostra.

#### III.4.4. Resultados da Prospecção Fitoquímica

A Figura III.1 mostra respectivamente os resultados dos testes químicos para compostos fenólicos (A) e alcaloídicos (B) nas diferentes frações. A coloração levemente avermelhada após a adição de hidróxido de amônia na fração FF (A) indica a presença de flavonoides na amostra testada. A presença de alcaloides na fração FA (B) foi evidenciada pelo aparecimento de precipitado floculoso nas amostras após a adição do reagente de Dragendorff.



**Figura III.1.** Foto dos resultados dos testes químicos para identificação de (A) flavonoides e (B) alcaloides.

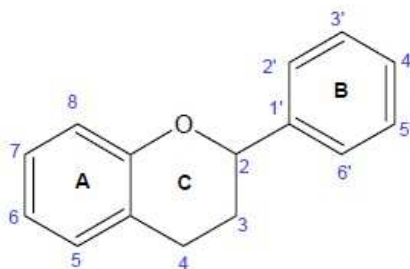


A partir da marcha química realizada foram obtidas as frações fenólica (FF), fração aquosa (FAq-2), alcaloídica (FA) e fração rica em saponinas (FS) das partes aéreas de *L. pinaster*. As frações FF e FA foram submetidas a testes de atividade anti-inflamatória uma vez que vários estudos na literatura reportam a atividade anti-inflamatória de compostos fenólicos e alcaloídicos. Como apenas a fração FF apresentou atividade anti-inflamatória (Cap. IV), somente esta fração foi submetida a radiação gama.

#### III.4.5. Análise por CLAE da fração fenólica (FF-I)

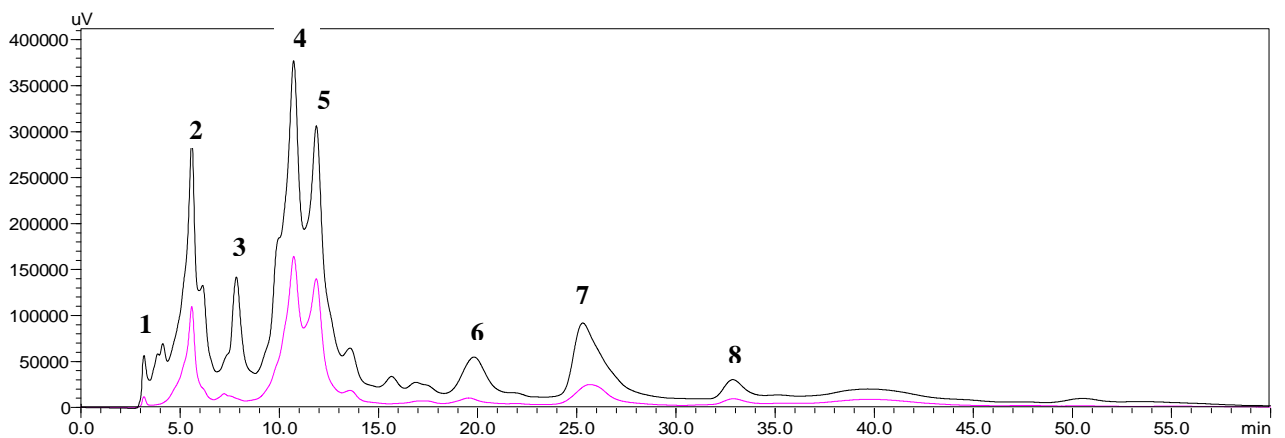
Uma alíquota da fração flavonoídica (FF, ver Esquema III.1, pág. 58) foi submetida à radiação gama na dose de 3 kGy, uma vez que se trata de uma fração e não de uma substância foi utilizada uma dose menor de radiação. Após a radiação foi obtida a fração FF-I para determinação de possíveis constituintes radiolíticos. Em seguida, o material irradiado foi submetido a análises por CLAE.

Os flavonoides apresentam espectro de emissão no UV com dois máximos de emissão, um na região entre 240-285 nm (atribuída ao anel A) e outro na região de 300-400 nm (atribuída ao anel B) (Figura III.2).<sup>57</sup> Por isto, a avaliação dos cromatogramas foi realizada em ambas as regiões do espectro no UV (280 e 360 nm).



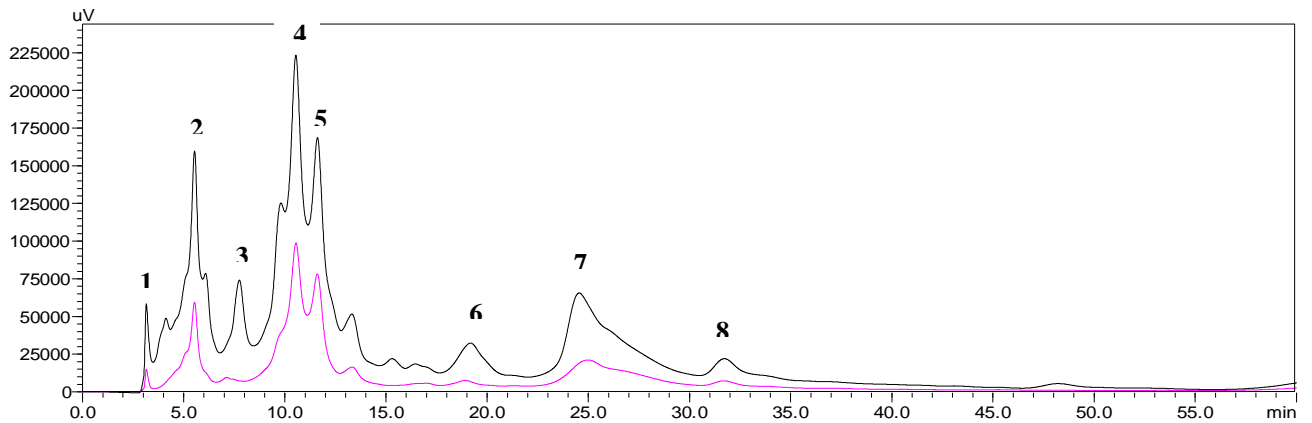
**Figura III.2.** Estrutura básica dos flavonoides.

A Figura III.3 mostra os cromatogramas de CLAE a 280 e 360 nm de FF. Os picos **1**, **2**, **4**, **5**, **6**, **7** e **8** (TR = 3,15, 5,53, 10,54, 11,60, 19,17, 24,54 e 31,72 min, respectivamente) apresentam maiores valores de área em 280 nm do que no cromatograma a 360 nm. No cromatograma de CLAE a 360 nm (Figura III.3), não é observado o pico **3** (TR = 7,75 min) presente no cromatograma de CLAE a 280 nm. Portanto, o comprimento de onda a 280 nm apresenta-se mais apropriado para as análises analíticas do efeito da radiação na fração FF e para o isolamento por CLAE semi-preparativo dos constituintes fenólicos de FF. O cromatograma de FF apresenta oito picos principais, indicando tratar-se de uma mistura rica em estruturas fenólicas. O pico **4** registrado em TR = 10,54 min é o mais intenso, seguido decrescentemente pelos picos **5** e **2** (TR = 11,60 e 5,53 min, respectivamente). Os demais picos correspondem a substâncias fenólicas com menores proporções relativas em FF.



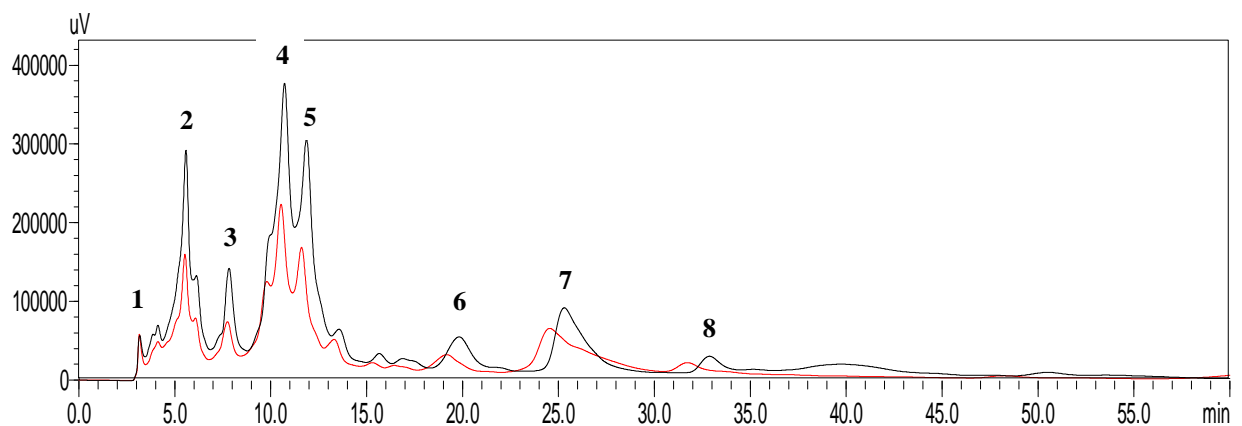
**Figura III.3.** Cromatograma de CLAE de FF a 280 nm (preto) e a 360 nm (rosa) em TR entre 0,0 e 60,0 min.

A Figura III.4 mostra os cromatogramas de CLAE a 280 e 360 nm de FF-I.



**Figura III.4.** Cromatograma de CLAE a 280 nm (preto) e a 360 nm (rosa) em TR entre 0,0 e 60,0 min de FF-I submetida a radiação gama com dose de 3 kGy.

A Figura III.5 mostra o cromatograma de CLAE a 280 nm de FF comparado com o cromatograma correspondente de FF-I (Figura III.4). Através da análise dos cromatogramas de FF e FF-I (Figura III.3, pág. 61, e Figura III.4) foi possível o cálculo das áreas de cada pico (Tabela III.1, pág. 63) sendo, então, possível observar uma diminuição da intensidade dos picos 2 a 8 após a dose de radiação de 3 kGy. Por sua vez, o pico 1 mostrou ligeiro aumento da intensidade, indicando a presença de um produto radiolítico.



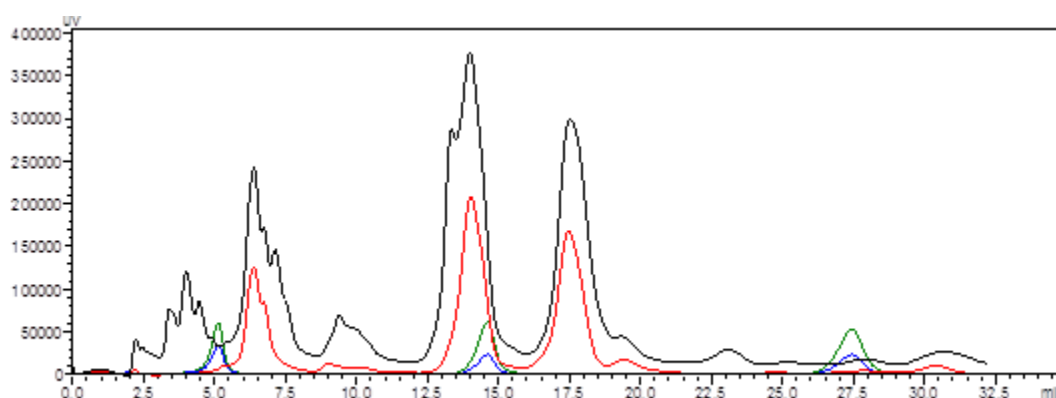
**Figura III.5.** Cromatograma de CLAE a 280 nm de FF (preto) e FF-I (vermelho) em TR entre 0,0 e 60,0 min.

A Tabela III.1 mostra os valores de TR, área e altura dos picos dos respectivos cromatogramas de CLAE de FF e FF-I. A radiação gama a 3 kGy promoveu a diminuição da intensidade dos picos **2** a **8**, estes dados corroboram com trabalhos na literatura que reportam uma diminuição da concentração de compostos fenólicos em extratos de plantas expostos à radiação, devido à propriedade radioprotetora destes compostos. No entanto, observa-se um aumento da intensidade do pico **1**, podendo-se inferir que o composto fenólico atribuído ao pico **1**, com TR = 3,1 min, sofre um aumento da concentração com a dose de 3 kGy.

**Tabela III.1.** Valores de tempo de retenção (TR, min), área e altura dos picos do cromatograma de CLAE a 280 nm de FF e FF-I

<b>Doses de radiação gama = 0 (FF) e 3 kGy (FF-I)</b>					
<b>Picos</b>	<b>TR</b>	<b>Área (FF)</b>	<b>Área (FF-I)</b>	<b>Altura (FF)</b>	<b>Altura (FF-I)</b>
<b>1</b>	3,15	420.789,70	562.607,60	38.469,00	48.392,50
<b>2</b>	5,53	10.205.533,50	5.307.159,80	243.737,30	125.893,80
<b>3</b>	7,75	3.319.053,70	1.522.458,30	102.975,50	45.402,50
<b>4</b>	10,54	9.661.417,60	5.659.684,70	218.864,60	126.803,30
<b>5</b>	11,60	3.742.225,70	2.197.363,40	148.147,20	78.608,90
<b>6</b>	19,17	2.730.000,40	1.428.613,90	37.104,80	18.893,20
<b>7</b>	24,54	7.911.546,50	6.175.520,80	79.072,30	49.525,40
<b>8</b>	31,72	1.136.826,90	754.101,10	18.194,80	10.824,20

A análise do perfil do cromatograma de FF-I foi comparada com uma mistura de padrões de rutina, quercetina e canferol. A injeção dos padrões foi realizada nas mesmas condições experimentais de injeção da amostra. A sobreposição dos cromatogramas de FF-I com a mistura de padrões é mostrada na Figura III.6. A análise dos cromatogramas permite inferir que o flavonoide quercetina está presente na amostra FF-I.



**Figura III.6.** Cromatograma de CLAE com a sobreposição de FF-I a 280 nm (preto) e a 360 nm (vermelho) com mistura de padrões de rutina (TR = 5,33 min), quercetina (TR = 14,05 min) e canferol (27,53 min) em TR entre 0,0 e 30,0 min.

Análises de FF-I por CLAE em coluna semi-preparativa foram realizadas com o intuito de isolar o produto radiolítico. Alíquotas de 2,0 mL de FF-I foram injetadas no cromatógrafo sendo o sistema otimizado para um fluxo de 4,7 mL/min e mantidas as mesmas condições experimentais de análise no método analítico.

Após trinta injeções sucessivas foi possível isolar o fitoconstituente LpVI, que foi submetido à liofilização e posterior análise espectroscópica, sendo identificado como o flavonoide quercetina. A Figura III.7 (pág. 65) mostra o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  desta substância. O espectro expandido de RMN de  $^1\text{H}$  de LpVI possibilitou melhor

visualização dos sinais na região de  $\delta_H$  7,74-6,20, característicos de átomos de hidrogênio aromático de flavonoides.

Os sinais de hidrogênio registrados em  $\delta_H$  7,74 (H-2'; d,  $J = 2,0$  Hz), 6,92 (H-5'; d,  $J = 8,4$  Hz) e 7,64 (H-6'; dd,  $J = 8,4$  e  $2,0$  Hz) indicam acoplamento meta entre H-2' e H-6' e acoplamento orto entre H-5' e H-6'. Esta análise é compatível com a presença de duas hidroxilas no anel B em C-3' e C-4'. Os dupletos registrados em  $\delta_H$  6,19 (H-6;  $J = 2,0$  Hz) e 6,40 (H-8;  $J = 2,0$  Hz) são compatíveis com a existência de um acoplamento meta de um anel aromático, atribuído ao anel A da estrutura flavanoídica substituída em C-5 e C-7.<sup>58</sup>

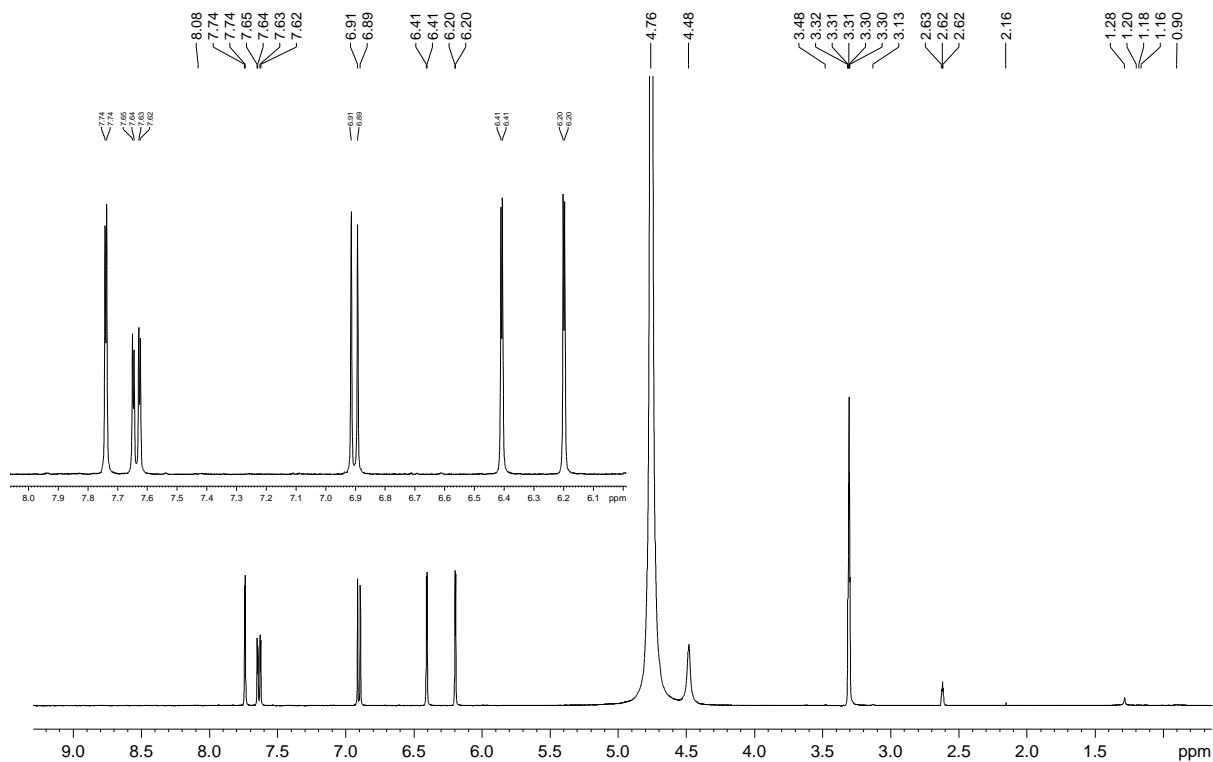
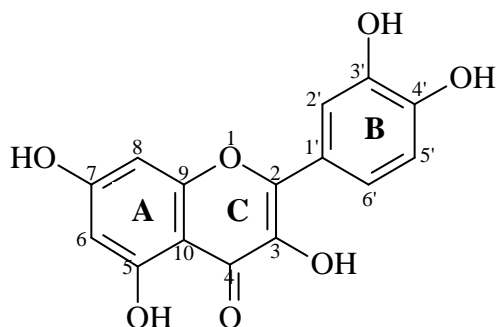


Figura III.7. Espectro de RMN de  $^1H$  de LpVI (400 MHz,  $CD_3OD$ ).



Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT (Figuras III.8, pág. 66 e Figura III.9, pág. 67), analisados comparativamente, indicam a presença de cinco átomos de carbono mono-hidrogenados, confirmando, após a comparação com dados da literatura (Tabela III.2, pág. 67), que a amostra LpVI trata-se do flavonoide quercetina.<sup>59</sup> Embora trabalhos na literatura reportem o isolamento de quercetina no gênero *Lychnophora*, é a primeira vez que é descrito o isolamento deste flavonoide na espécie *L. pinaster*. A literatura descreve atividades biológicas diversas para este composto, como atividade antiviral, tripanocida e anti-inflamatória.<sup>60</sup>

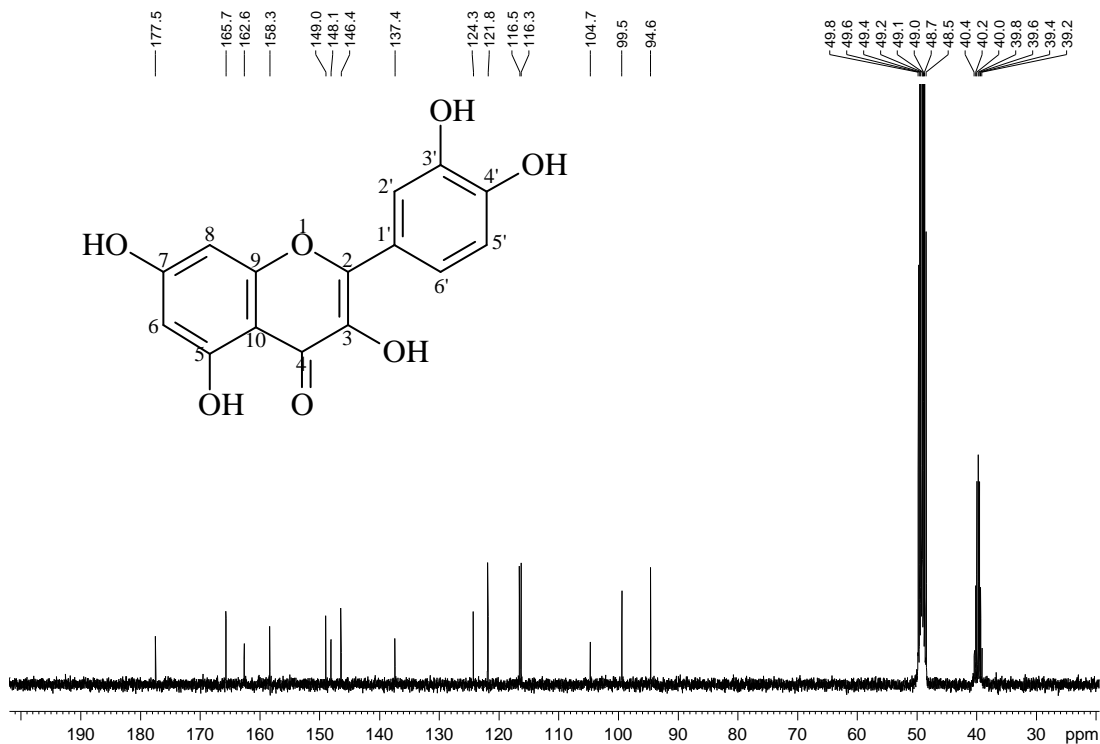


Figura III.8. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de LpVI (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

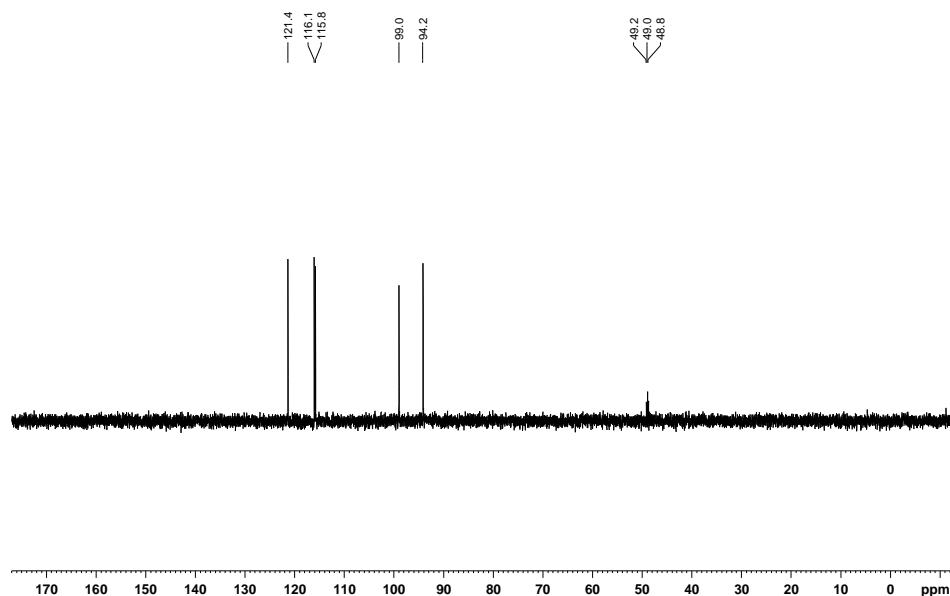
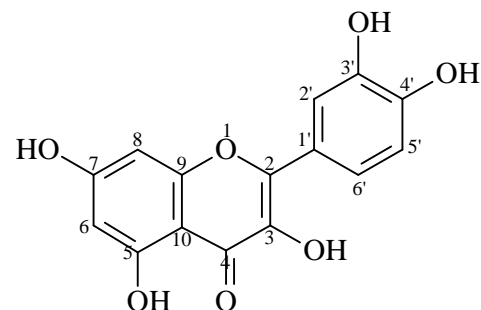


Figura III.9. Subespectro DEPT 135° de LpVI (100 MHz; CD<sub>3</sub>OD).

Tabela III.2. Dados de RMN de <sup>13</sup>C para LpVI e quercetina<sup>59</sup>

C	LpVI	Quercetina
2	148,1	147,8
3	137,4	137,1
4	177,5	177,2
5	162,6	162,3
6	99,0	99,1
7	165,7	165,3
8	94,2	94,4
9	158,3	158,1
10	104,7	104,1
1'	124,3	124,0
2'	115,8	115,9
3'	146,4	148,5
4'	148,9	146,0
5'	116,1	116,1
6'	121,4	121,6





### III.5. Análise de óleos essenciais

Os óleos essenciais são constituídos por uma mistura de substâncias voláteis do metabolismo especializado, conhecido também como metabolismo secundário, utilizado amplamente pelo ser humano como aromatizante e por suas atividades terapêutica, antimicrobiana e antioxidante.<sup>61</sup>

Óleos essenciais extraídos de espécies vegetais apresentam atividades biológicas contra fungos e bactérias e representam papel ecológico importante nas interações planta-inseto.<sup>62</sup>

Alguns estudos na literatura reportam variações na proporção relativa dos constituintes dos óleos essenciais quando o material vegetal do qual eles são extraídos é exposto anteriormente a doses inferiores a 10 kGy.<sup>63</sup> A literatura descreve apenas um estudo sobre a avaliação da composição química do óleo essencial de *L. pinaster*. Porém, não há uma avaliação da influência da integridade química dos compostos presentes no óleo essencial quando o material vegetal é submetido à radiação gama. Portanto, este trabalho descreve a extração de óleos essenciais do material submetido à radiação gama.

#### III.5.1. Parte experimental

Para a obtenção dos óleos essenciais de *L. pinaster* (OE) foram separadas quatro amostras das partes aéreas contendo 250 g cada, das quais uma não foi submetida à radiação gama (E<sub>0</sub>; 0,0 kGy) e três foram submetidas a doses de 3,0; 10,0 e 20,0 kGy (E<sub>3</sub>, E<sub>10</sub> e E<sub>20</sub>, respectivamente). Estas quatro amostras foram submetidas em seguida à hidrodestilação durante 2 h, utilizando um aparelho do tipo Clevenger. Cada emulsão aquosa concentrada foi submetida à extração com diclorometano (DCM), evaporando-se

o solvente a temperatura ambiente. Os óleos essenciais (líquidos viscosos e amarelos) foram obtidos a partir de E<sub>0</sub>, E<sub>3</sub>, E<sub>10</sub> e E<sub>20</sub> e denominados por OE<sub>0</sub> (0,0793 g), OE<sub>3</sub> (0,1240 g), OE<sub>10</sub> (0,1901 g) e OE<sub>20</sub> (0,1312 g), respectivamente. Estes óleos essenciais foram imediatamente analisados por CG-FID.

As análises por cromatografia gasosa (CG-FID) foram realizadas em cromatógrafo a gás HP5890 equipado com detector por ionização de chamas. Uma coluna Equity5 (Supelco) 30 m x 0,25 mm x 0,2 μm (HP) foi utilizada com gradiente de temperatura: 60 °C, 0 min, 3 °C/min até 270 °C; injetor (“split” de 1/50) a 270 °C e detector a 280 °C. Hidrogênio foi utilizado como gás de arraste (2 mL/min). Volume de injeção foi de 2 μL. Concentração da amostra foi 1,0% em clorofórmio.

As análises por CG acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM) foram realizadas em equipamento Shimadzu (QP5050A) equipado com uma coluna capilar (DB-5, 30 m x 0,25 mm, com uma espessura de filme 0,25 μm). Hélio foi utilizado como gás de transporte a uma taxa de fluxo de 2 mL/min, utilizando as mesmas condições descritas acima para as análise em CG-FID. Os dados obtidos foram manipulados usando o *software* AMDIS (*Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System*). Os constituintes foram identificados através de comparação do perfil de fragmentação do espectro de massas da amostra com o correspondente padrão de fragmentação de massas do banco de dados disponível no programa NIST 2.0 (2005).

### III.5.2 Resultados e Discussão

A quantidade de óleo essencial obtido a partir da hidrodestilação das partes aéreas irradiadas (OEA<sub>3</sub>, OEA<sub>10</sub> e OEA<sub>20</sub>) foi maior do que OEA<sub>0</sub>. A Tabela III.3 mostra a massa de óleos essenciais que foi obtida após extração das partes aéreas por hidrodestilação utilizando aparelho Clevenger.

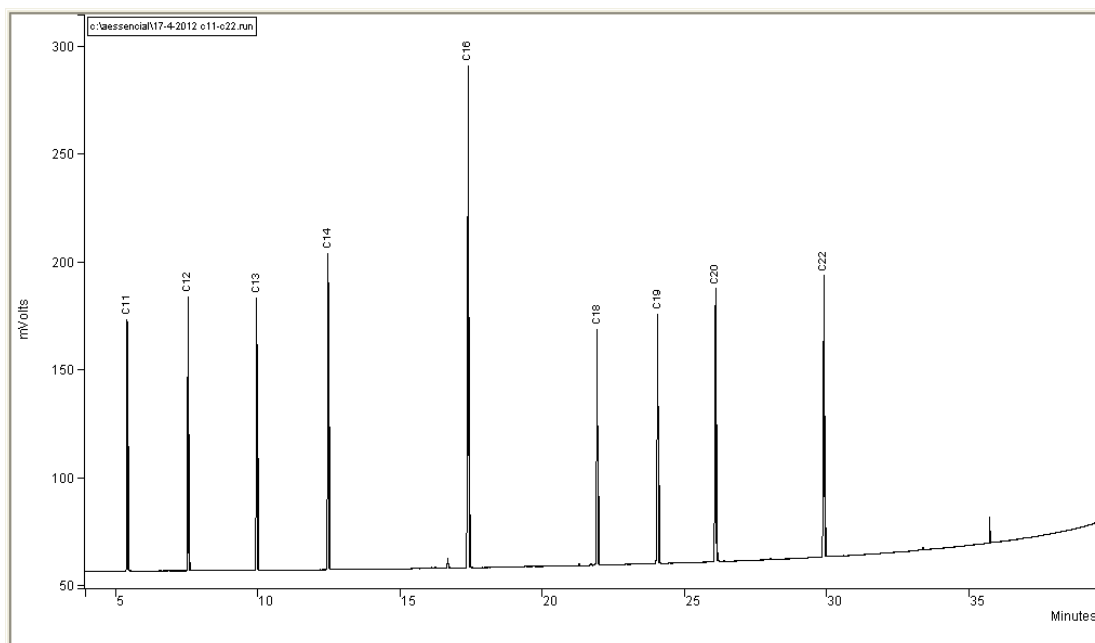
Estes resultados confirmam que a radiação gama pode causar danos as membranas celulares da célula vegetal<sup>64</sup> e, como consequência, o processo de extração dos óleos essenciais pode tornar-se mais favorecido quando o material vegetal é submetido à radioesterilização.<sup>65</sup> No entanto, a quantidade de OEA<sub>20</sub> (0,1312 g) é maior do que a quantidade de OEA<sub>3</sub> (0,1240 g) e menor do que OEA<sub>10</sub> (0,1901 g), indicando que a quantidade de óleo essencial não é diretamente proporcional à dose de radiação.

**Tabela III.3.** Massa dos óleos essenciais obtidos após hidrodestilação

Amostra	Massa (g)	Dose de radiação (kGy)
OEA <sub>0</sub>	0,0793	0
OEA <sub>3</sub>	0,1240	3
OEA <sub>10</sub>	0,1901	10
OEA <sub>20</sub>	0,1312	20

As amostras de óleo essencial (OEA<sub>0</sub>, OEA<sub>3</sub>, OEA<sub>10</sub> e OEA<sub>20</sub>) foram submetidas à análise por cromatografia a gás e a análise dos picos foi baseada no método Kováts<sup>66</sup> e comparação com dados da literatura. A Figura III.10 (pág. 71) mostra o cromatograma

dos padrões de hidrocarbonetos que foram injetados no cromatógrafo nas mesmas condições experimentais de análise dos óleos essenciais.

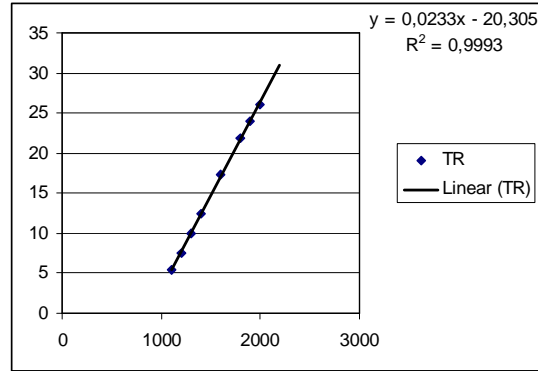


**Figura III.10.** Cromatograma de CG-FID dos padrões de hidrocarbonetos injetados nas mesmas condições experimentais de análise para os óleos essenciais.

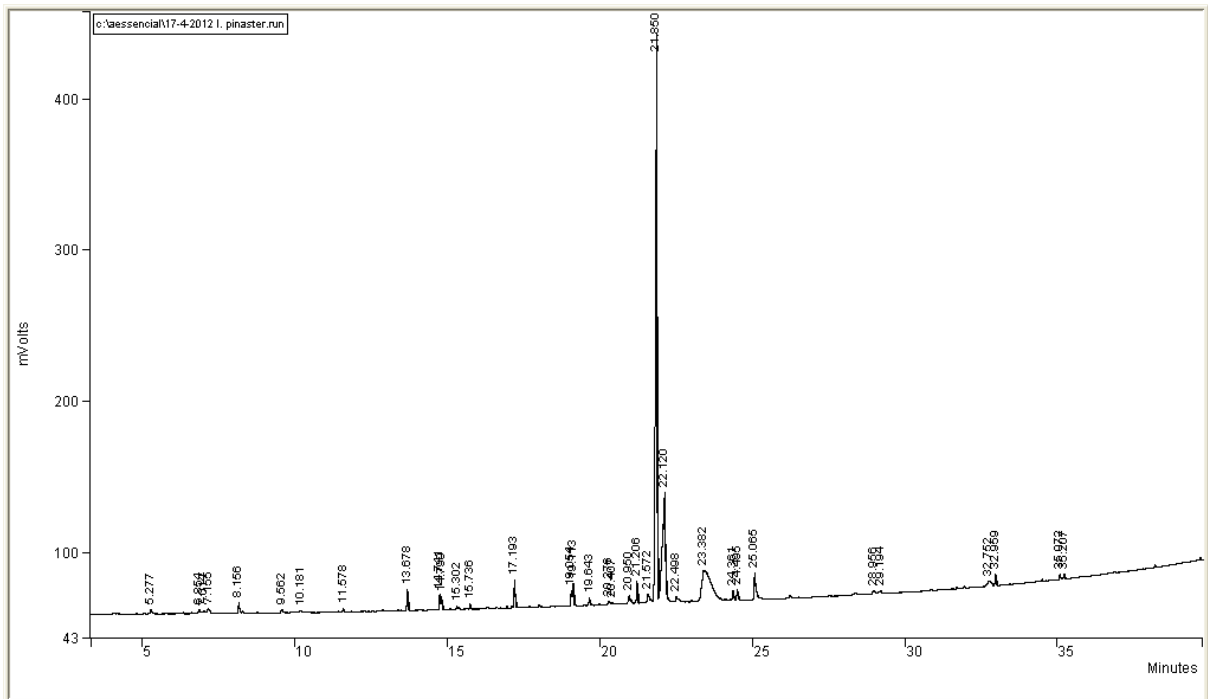
A partir da análise do cromatograma da Figura III.10 foi possível o cálculo do índice de Kóvats baseado nos tempos de retenção dos padrões de hidrocarbonetos injetados, conforme Tabela III.4, pág. 72. A Tabela III.4 (pág. 72) mostra o índice de Kóvats e tempo de retenção dos padrões de hidrocarbonetos injetados.

**Tabela III.4.** Índice de Kóvats e tempo de retenção dos padrões de hidrocarbonetos lineares

hc	IK	TR
C <sub>11</sub>	1100	5,38
C <sub>12</sub>	1200	7,522
C <sub>13</sub>	1300	9,936
C <sub>14</sub>	1400	12,448
C <sub>16</sub>	1600	17,378
C <sub>18</sub>	1800	21,908
C <sub>19</sub>	1900	24,037
C <sub>20</sub>	2000	26,073
C <sub>22</sub>	2200	29,883



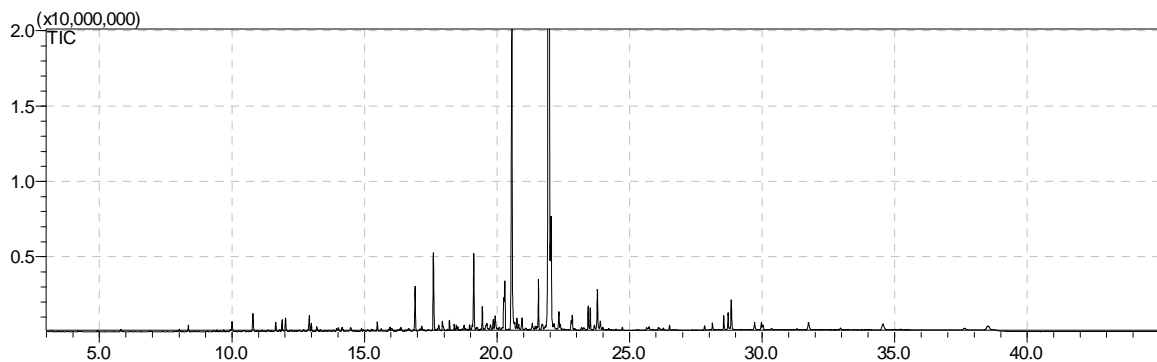
A Figura III.11 mostra o cromatograma obtido da amostra de óleo essencial não submetido a radiação (OEA<sub>0</sub>).



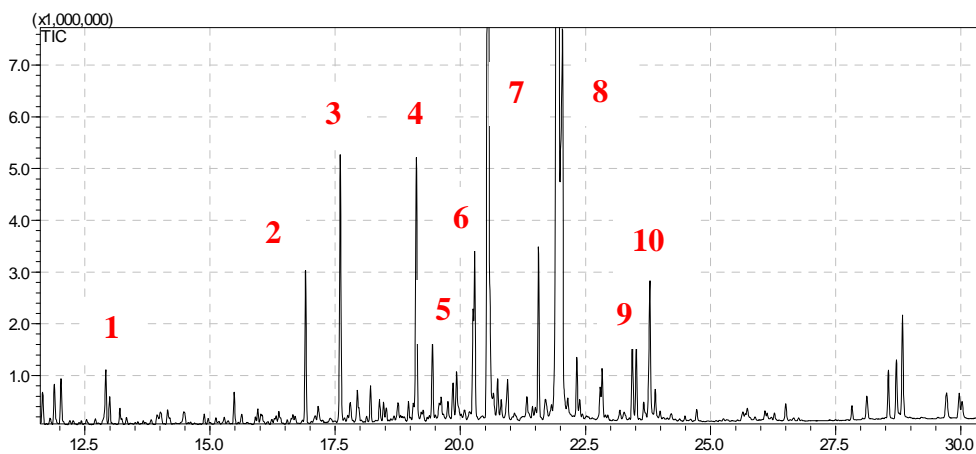
**Figura III.11.** Cromatograma de CG-FID para OEA<sub>0</sub> de 0 e 40 min.

A amostra de óleo essencial (OEA<sub>0</sub>) foi submetida também à análise em cromatógrafo CG-EM. As Figuras III.12 e III.13 (pág. 73) mostram os cromatogramas

obtidos para OEA<sub>0</sub>. A análise do cromatograma obtido para OEA<sub>0</sub> indica a presença de 10 picos majoritários, registrados na região de 13,68 a 23,80 min. A atribuição química aos picos registrados no CG-FID de OEA<sub>0</sub> baseou-se no método de Kováts. Além disso, os picos observados no cromatograma CG-EM de OEA<sub>0</sub> foram atribuídos também quimicamente através do padrão de fragmentação de massas do banco de dados (NIST 2.0, 2005).



**Figura III.12.** Cromatograma de CG-EM para OEA<sub>0</sub> entre 0 e 40 min.



**Figura III.13.** Cromatograma de CG-EM para OEA<sub>0</sub> ampliado na região entre 12 e 30 min.

A Tabela III.5 (pág. 74) mostra os dados de CG dos componentes identificados em OEA<sub>0</sub>. Os índices de retenção de Kóvats calculados (IKC) são próximos aos índices correspondentes obtidos a partir de dados da literatura (IKL), sendo possível a

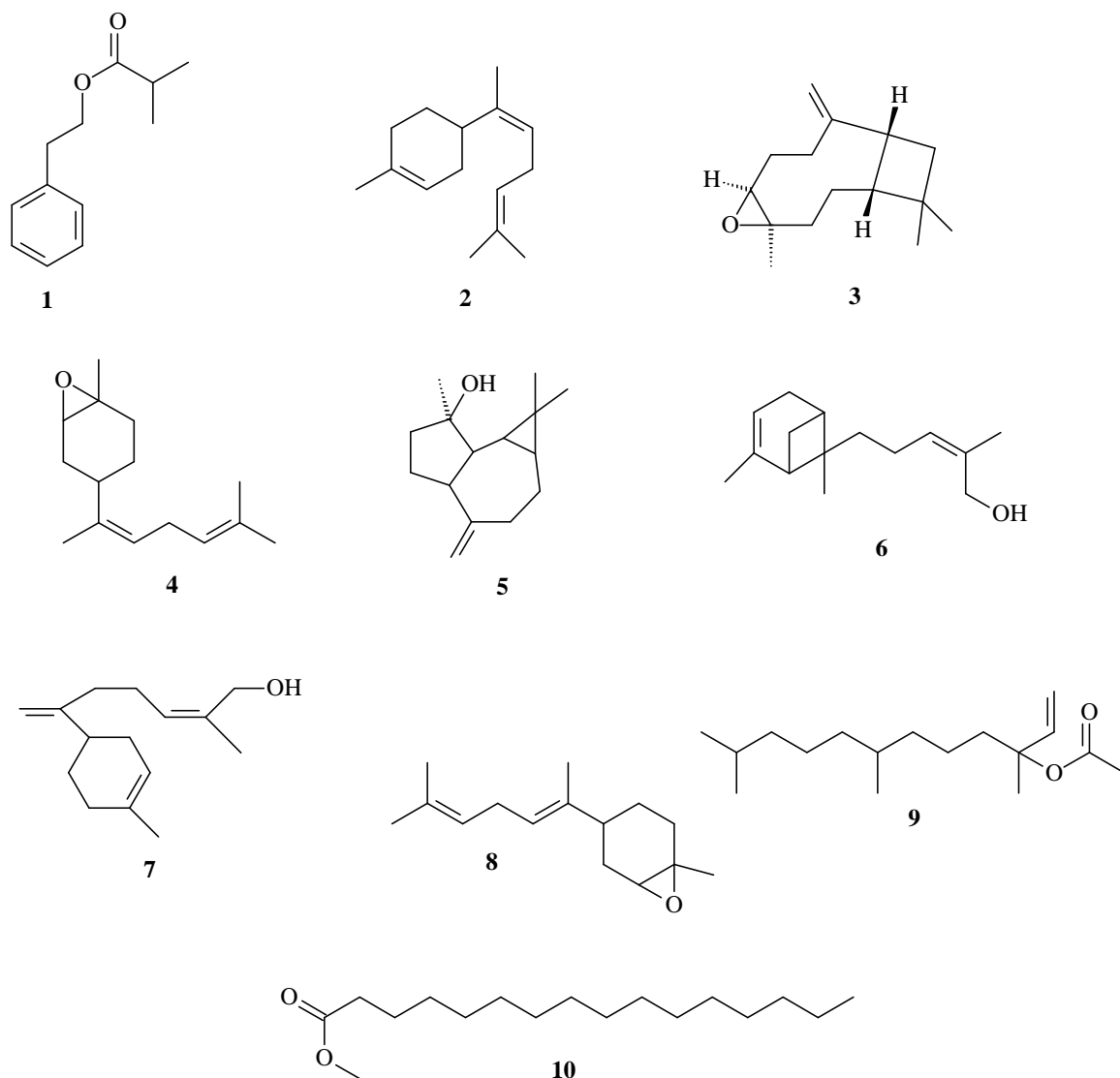
identificação dos componentes com tempos de retenção registrados entre 13,68 a 23,80 min, o que possibilitou a identificação dos constituintes majoritários no óleo essencial de *L. pinaster*.

**Tabela III.5.** Constituintes e dados de CG de OEA<sub>0</sub>\*

<b>Composto</b> (Figura III.14, pág. 75)	<b>TR</b>	<b>Área</b>	<b>PR</b>	<b>IKC</b>	<b>IKL</b>	<b>PS</b>
2-metil-2-feniletanoato de propila (1)	13,678	28.039,00	0,911	1458	1396	85
<i>Z-α</i> -Bisaboleno (2)	17,193	53.293,00	1,731	1609	1536	84
Óxido de cariofileno (3)	17,622	325.039,00	10,559	1689	1573	84
<i>Z-α</i> -Bisaboleno epóxido (4)	19,112	358.284,00	11,639	1692	1704	83
Espatuleno (5)	19,472	38.393,00	1,247	1782	1619	84
<i>Z-α</i> -Bergamotol (6)	20,269	82.639,00	2,685	1797	1693	81
<i>Z</i> -Lanceol (7)	20,582	556.857,00	18,090	1809	1755	80
<i>E-α</i> -Bisaboleno epóxido (8)	22,115	1.324.551,00	43,029	1821	1708	84
Acetato de nerolidil (9)	23,446	36.788,00	1,195	1878	1735	82
Metanoato de <i>n</i> -hexadecanoila (10)	23,800	40.537,00	1,317	1947	1972	94

\*TR= tempos de retenção; Área= área sob o pico; PR= porcentagem relativa da área sob o pico; IKC= índice de retenção de Kováts calculado; IKL= índice de retenção de Kováts da literatura; PS= porcentagem de similaridade baseada no banco de dados NIST 2.0.

A Figura III.14 mostra os constituintes identificados no óleo essencial OE<sub>0</sub> de *L. pinaster*.



**Figura III.14.** Estrutura química dos constituintes identificados no óleo essencial de *L. pinaster*.

### III.5.3. Efeito da radiação gama na composição dos óleos essenciais

Através das análises de CG-FID foi possível calcular a proporção relativa de compostos majoritários presentes nas amostras irradiadas (OEA<sub>3</sub>, OEA<sub>10</sub> e OEA<sub>20</sub>)



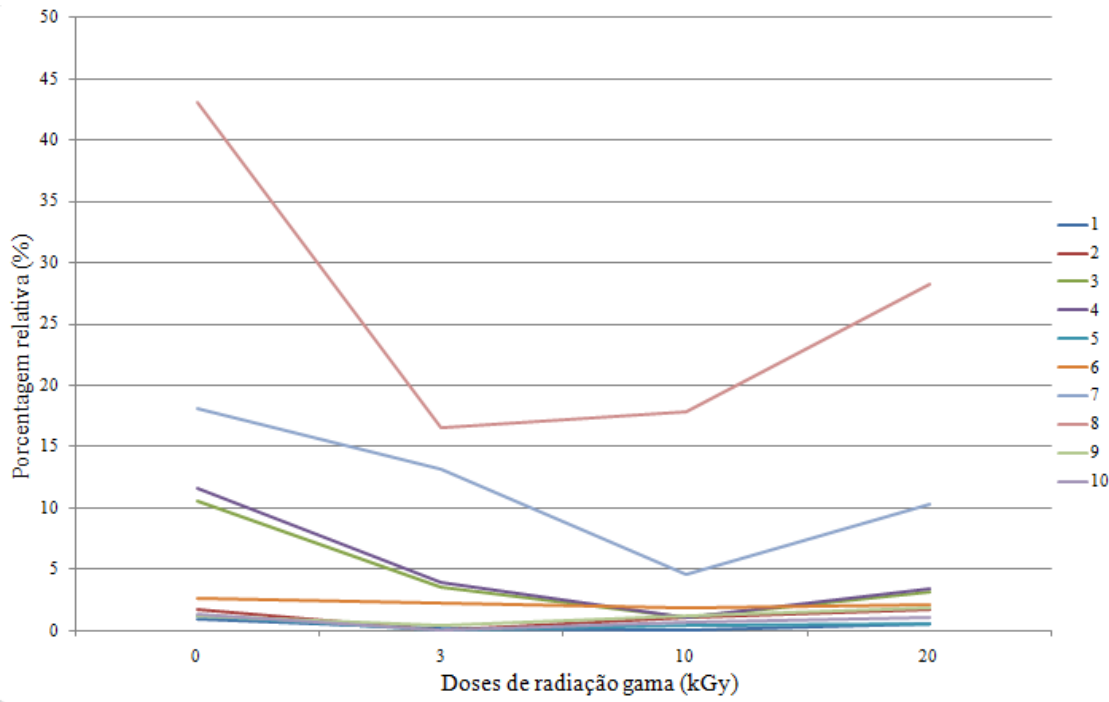
comparado com a amostra que não foi submetida à radiação (OEA<sub>0</sub>) (Figura A.13, Anexo II, pág. 144). A Tabela III.6 mostra a proporção relativa dos componentes de OEA<sub>0</sub>, OEA<sub>3</sub>, OEA<sub>10</sub> e OEA<sub>20</sub> com base em análises CG-FID.

**Tabela III.6.** Proporção relativa dos componentes de OEA<sub>0</sub>, OEA<sub>3</sub>, OEA<sub>10</sub> e OEA<sub>20</sub> a partir das análises por CG-FID

Composto (Figura III.14, pág. 75)	TR	PR (%)	PR (%)	PR (%)	PR (%)
		OEA <sub>0</sub>	OEA <sub>3</sub>	OEA <sub>10</sub>	OEA <sub>20</sub>
2-metil-2-feniletanoato de propila (1)	13,678	0,911	0,138	0,055	0,541
<i>Z</i> - $\alpha$ -Bisaboleno (2)	17,193	1,731	0,038	1,058	1,725
Óxido de cariofileno (3)	19,054	10,559	3,514	1,025	3,089
<i>Z</i> - $\alpha$ -Bisaboleno epóxido (4)	19,112	11,639	3,873	1,1298	3,405
Espatuleno (5)	21,206	1,247	0,068	0,363	0,549
<i>Z</i> - $\alpha$ -Bergamotol (6)	21,573	2,685	2,244	1,907	2,109
<i>Z</i> -Lanceol (7)	21,846	18,090	13,134	4,562	10,261
<i>E</i> - $\alpha$ -Bisaboleno epóxido (8)	22,115	43,029	16,609	17,823	28,243
Acetato de nerolidil (9)	23,446	1,195	0,431	1,156	1,872
Metanoato de <i>n</i> -hexadecanoíla (10)	25,065	1,317	0,078	0,654	1,015

A Figura III.15, pág. 77, mostra a variação percentual da concentração dos constituintes identificados nos óleos essenciais de *L. pinaster* que foram submetidos a

radiação. Pela análise da Figura III.15 é possível observar que a dose de 3 kGy promoveu uma diminuição na concentração de todos os compostos apresentados. A dose de 20 kGy promoveu uma diminuição menos significativa do que a dose de 3 e 10 kGy. Estes resultados sugerem que a diminuição do percentual relativo destes compostos não é proporcional à dose aplicada.

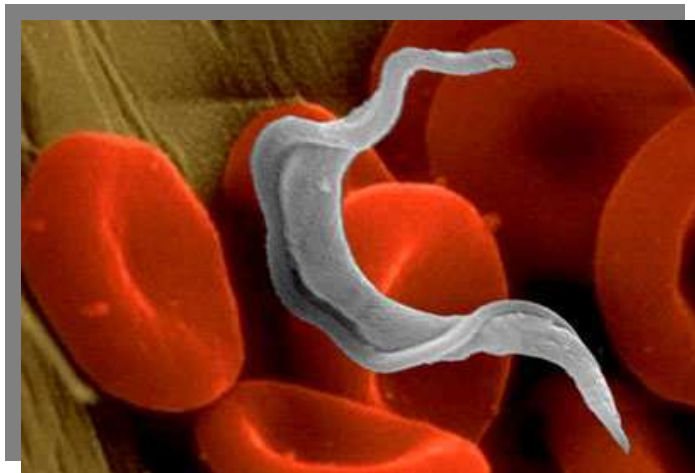
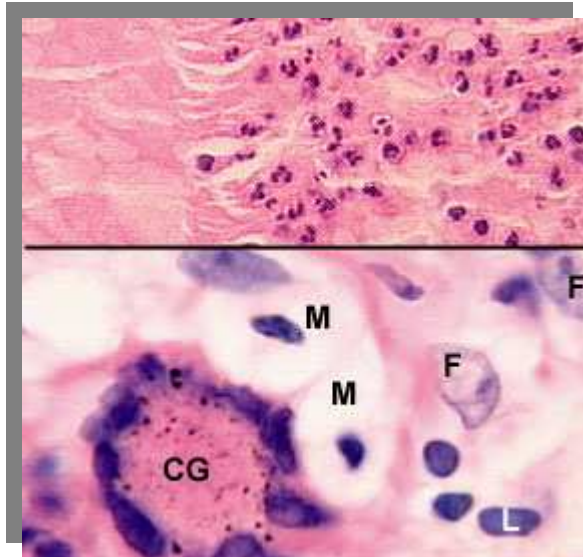


**Figura III.15.** Variação do percentual relativo dos compostos identificados nos óleos essenciais de *L. pinaster*.



# CAPÍTULO IV

## ENSAIOS BIOLÓGICOS RELAÇÃO ESTRUTURA QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA



## IV.1. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

### IV.1.1. Introdução

A inflamação é um processo relacionado com várias patologias, dentre as quais se destacam infecções respiratórias, asma e doenças autoimunes. É uma resposta do organismo frente a uma infecção ou injúria tecidual, tendo como objetivo a eliminação da causa inicial da lesão celular provocada por patógenos ou por ação de agentes físicos.<sup>67,68</sup>

A inflamação envolve basicamente dois mecanismos de defesa. Um deles é a resposta imunológica inata, responsável pelas características da região inflamada (vermelhidão, edema, calor, dor e perda de função, além de migração leucocitária nas primeiras 48 hs). Neste tipo de resposta estão envolvidos os linfócitos NK, neutrófilos (células polimorfonucleares, PMN), macrófagos, eosinófilos e basófilos. O outro é a resposta imunológica adquirida, em que há produção de anticorpos específicos ou citocinas contra um determinado agente agressor. Neste tipo de resposta estão envolvidos os linfócitos T e B e os macrófagos. Em alguns casos, a resposta inflamatória inicial não é suficiente para suprimir o processo inflamatório evoluindo para um estado de inflamação crônico.<sup>68</sup>

A reação inflamatória é um evento complexo que envolve o reconhecimento do agente/estímulo lesivo para sua posterior destruição e tentativa de reconstruir o tecido danificado.<sup>69</sup> Esse processo é uma resposta orgânica provocada por estímulos nocivos que envolvem numerosos mediadores de origem celular e plasmática, com efeitos biológicos interdependentes que culminam com a reparação do tecido e a restauração da função.<sup>70</sup>

A resposta orgânica a uma injúria envolve alterações hemodinâmicas importantes, tais como a vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, e, posteriormente, a migração principalmente dos neutrófilos (PMN) aos tecidos perivasculares.<sup>71</sup>

A área inflamada, em nível macroscópico, exhibe respostas inatas como características marcantes. O resultado final do processo inflamatório pode ser a cura ou a inflamação crônica, caso a resposta não seja suficiente para suprimir o processo inflamatório ou quando o patógeno ou a substância nociva persistir e o processo evoluir.<sup>72</sup>

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) estão entre os medicamentos mais utilizados amplamente, devido às suas eficácias para uma vasta gama de condições de dor e inflamação.<sup>73</sup> No entanto, a administração a longo prazo dos AINEs pode induzir úlceras gastro-intestinal, hemorragias e distúrbios renais, devido à sua inibição não-seletiva tanto constitutiva (isoforma COX-1) quanto induzida (isoforma COX-2) das enzimas ciclo-oxigenases.<sup>74</sup>

Por outro lado, inibidores seletivos da isoforma COX-2 apresentando toxicidade gastro-intestinal reduzida têm sido associados a efeitos cardiovasculares adversos.<sup>75</sup> O controle da dor inflamatória é ainda um grande desafio devido aos efeitos colaterais deletérios atribuídos ao uso prolongado dos AINEs e sua ineficácia em alguns casos. Atualmente, há um maior interesse no desenvolvimento de fármacos modificadores da doença. As citocinas têm sido consideradas um elo entre as lesões celulares e os sinais de inflamação, tais como migração celular, edema, febre e hiperalgesia.<sup>76</sup> Em contraste com os AINEs, os inibidores da produção de citocinas apresentam efeitos modificadores da doença, por inibirem a produção de mediadores ligados aos processos inflamatórios. Estes inibidores de citocinas representam conseqüentemente uma melhor estratégia terapêutica para o controle de doenças inflamatórias.<sup>77</sup>

A alta incidência de câncer tem sido associada com a inflamação. O câncer e a inflamação decorrem geralmente do estresse oxidativo, gerando mutações progressivas e levando ao desenvolvimento tumoral. Alguns triterpenoides comuns em plantas são conhecidos por suas atividades anti-inflamatória e antitumoral.<sup>78</sup> Devido ao grande potencial biológico das plantas medicinais e ao fato dos graves efeitos colaterais que os anti-inflamatórios utilizados causam, os vegetais constituem um potencial na busca de novas alternativas medicamentosas para o tratamento de inflamações. Neste sentido, extratos, frações e substâncias isoladas de *Lychnophora pinaster* foram testados para conferir a atividade anti-inflamatória alegada, conforme levantamentos etnofarmacológicos sobre a planta. Foram testadas também misturas de *OAc*-lupeol e *OAc*-pseudotaraxasterol, bem como de estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol isolados de *L. pinaster* em trabalho anterior.<sup>29</sup>

#### **IV.1.2. Materiais e métodos**

Os ratos Wistar foram adquiridos da empresa Bioagri no Município de Planaltina-DF. Os animais pesando em média 325 g e com aproximadamente 75 dias de vida foram mantidos em biotério e ciclo claro/escuro de 12/12 h. Todos os ratos tiveram livre acesso a água e ração da marca Purina<sup>®</sup>.

Os testes de atividade anti-inflamatória foram realizados empregando o aparelho de ultra-som microcontrolado modelo Sonopulse Special, fabricado pela empresa Ibramed. As frequências de ultra-som foram 1,0 ou 3,0 MHz no mesmo cabeçote, emissão contínua e pulsada (razão de pulso 1/5 a uma frequência de 100 MHz), com intensidade regulável de 0,1 a 2 W/cm<sup>2</sup> e ERA de 1 cm.

Após a obtenção da lesão muscular, os músculos lesionados foram processados e parafinizados para obtenção de lâminas histológicas. As peças foram cortadas em micrótomo Leica com 4  $\mu\text{m}$  de espessura, sendo as lâminas coradas pelo método de hematoxilina e eosina, para análise histológica e fotomicrografia utilizando um microscópio da marca Zeiss.

#### IV.1.2.1. Preparação do gel

O tratamento dos ratos foi realizado com amostras preparadas na forma de gel ou creme a 0,5% e 3,0%, sendo obtidas, a partir do extrato bruto, frações e substâncias isoladas das partes aéreas de *L. pinaster*, conforme Tabela IV.1.

**Tabela IV.1.** Concentração dos extratos, frações e substâncias isoladas das partes aéreas de *L. pinaster* e submetidas a testes de atividade anti-inflamatória

Amostra	Concentração (% m/m)	Base utilizada para incorporação
Dexametasona	0,5	Creme lanette
Extrato bruto hexânico (EH)	3,0	Gel Carbopol
Extrato bruto etanólico (EE)	3,0	Gel Carbopol
Extrato aquoso (EA)	3,0	Gel Carbopol
Fração hexânica do extrato hexânico (EH-H1)	3,0	Gel Carbopol
Fração diclorometano do extrato hexânico (EH-D1)	3,0	Gel Carbopol
Fração acetato de etila do extrato hexânico (EH-A1)	3,0	Creme Polawax
Extrato flavonoídico (FF)	0,5	Gel Natrosol
Extrato alcaloídico (FA)	0,5	Creme Lanette



Mistura de $\alpha$ -amirina e lupeol (LpIII e Lp IV)	0,5	Gel Carbopol
$\alpha$ -Amirina (LpIII)	0,5	Gel Carbopol
Lupeol (LpIV)	0,5	Gel Carbopol
Mistura de <i>OAc</i> -lupeol e <i>OAc</i> -pseudotaraxasterol <sup>29</sup>	0,5	Gel Carbopol
Mistura de estigmasterol e $\beta$ -sitosterol <sup>29</sup>	0,5	Gel Carbopol
Quercetina (LpVI)	0,5	Gel Carbopol

#### IV.1.3.1. Obtenção da Lesão muscular

A anestesia intraperitoneal foi realizada com ketamina e xilazina (respectivamente, 10 e 4 mg/kg de peso corporal, diluídos em 1 mL de solução fisiológica). Os animais foram separados em três grupos: um grupo controle negativo sem tratamento, um grupo controle positivo padrão, tratado com dexametasona 0,1% em creme, e 10 grupos tratados com extratos brutos, frações e substâncias isoladas. Os animais sofreram trauma muscular gerado pelo impacto de um peso de 300 g solto a 30 cm de altura no tríceps sural e isquiotibiais das partes traseiras. Após a lesão a tricotomia da região glútea bilateral de todas as patas foi realizada, seguida pela aplicação dos géis preparados previamente com as amostras. Após 24 h de tratamento, os animais foram anestesiados e sacrificados para a coleta dos músculos. Os outros sacrifícios foram repetidos após 48 e 72 h de lesão.

Todo o experimento foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação no Uso Animal (CETEA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o protocolo número 222/11(Anexo III, pág. 145).

#### IV.1.3.2. Tratamento da lesão por fonoforese

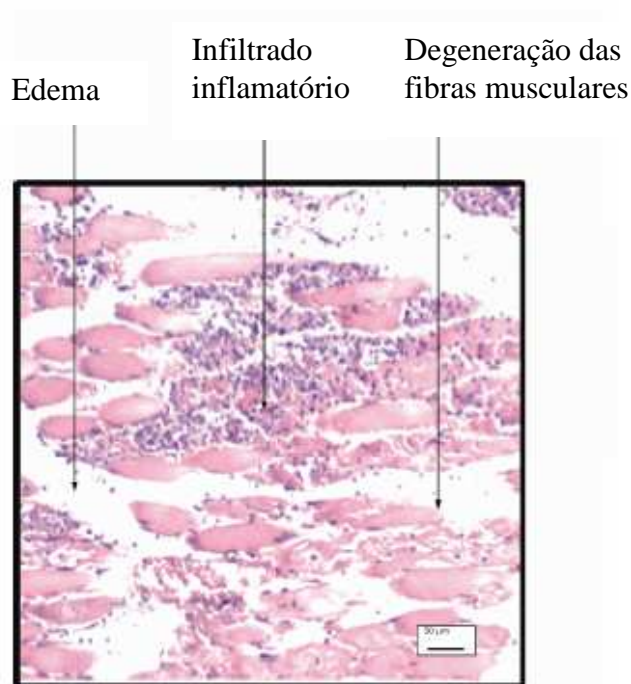
Os grupos de animais (n = 36) sofreram trauma muscular nas duas patas (patas direita e esquerda traseiras). Após 24 h da lesão, a pata direita de cada animal foi tratada com ultra-som terapêutico no modo pulsátil a uma frequência de 1 MHz, com intensidade de 0,5 W/cm<sup>2</sup> por 9 min (conforme indicação do aparelho). O tratamento foi realizado uma vez ao dia durante três dias seguidos (24, 48 e 72 h), utilizando-se como acoplante as substâncias puras a 0,5% e as frações e o extrato bruto a 3%, incorporados na forma de gel carbopol, gel natrosol ou creme lanette, conforme Tabela IV.1 (pág. 82). Os géis e cremes utilizados como acoplantes não influenciaram o tratamento, servindo apenas como acoplantes.<sup>80</sup> Os resultados foram expressos pela capacidade de reduzir o infiltrado inflamatório.

#### IV.1.3.3. Obtenção das Lâminas Histológicas

Partes dos músculos contendo a área lesada foram seccionadas pela retirada de tendão a tendão do músculo inteiro (tríceps sural e isquiotibiais) em cortes medianos e, posteriormente, fixados em solução de formol em PBS (tampão fosfato salino) a 10% durante 24 h. Em seguida, foram desidratados em etanol a 70% por mais 24 h. Após esse período, continuou-se a desidratação dos tecidos em concentrações crescentes de etanol, (a 80%, 85%, 90% e 95%), durante 30 min em cada concentração e, posteriormente, em três imersões em etanol a 100% de 30 min cada. Em seguida, as partes dos músculos foram submetidas a três imersões sucessivas em xilol, de 30 min cada e, depois, por três imersões sucessivas em parafina líquida, de 30 min cada, obtendo-se blocos individuais de parafina com o músculo disposto longitudinalmente.

#### IV.1.4. Resultados e Discussão

O estímulo lesivo decorrente do trauma muscular gerou um quadro patológico nas patas dos ratos, descrito histologicamente por edema, infiltrado inflamatório, degeneração de fibras musculares e hemorragia. A Figura IV.1 mostra o aspecto histológico da lesão após o trauma muscular. Nessa figura estão indicados o infiltrado inflamatório, o edema e a degeneração das fibras musculares. Foi possível observar inflamação intensa e presença de pontos de edema e hemorragia generalizada em todas as patas que não receberam qualquer tratamento.



**Figura IV.1.** Fotomicrografia do aspecto histológico geral da lesão após o trauma muscular.

A atividade anti-inflamatória de extratos, frações e fitoconstituintes isolados das partes aéreas de *L. pinaster* foi analisada pelos aspectos histológicos para caracterizar infiltrados inflamatórios. A Figura IV.2 (pág. 90) mostra o aspecto histológico do músculo lesionado das patas dos ratos, sem tratamento (grupo controle negativo) e após três tempos de tratamento (24, 48 e 72 h de lesão). A seção apresenta uma grande região de edema (áreas em branco) e infiltrado inflamatório (pontos roxos). Os tecidos musculares são representados por coloração rosa na Figura IV.2 (pág. 90). Um padrão normal do tecido muscular deve apresentar fibras contínuas. No entanto, a fragmentação do tecido muscular indica a degeneração significativa de fibras musculares.<sup>81</sup>

O aspecto histológico dos músculos lesionados e tratados com dexametasona (controle positivo) mostra diminuição significativa do infiltrado inflamatório em relação ao músculo sem tratamento, apresentando-se leve após 24 (A) e 48 h (B), retornando a aspecto sem lesão após 72 h (C). O edema apresenta-se moderado a leve e a degeneração das fibras musculares é leve após 24 h de lesão. A dexametasona foi escolhida como controle positivo por ser considerada como um fármaco anti-inflamatório potente.<sup>82,83</sup>

As Figuras IV.3 e IV.4 (págs. 91 e 92) mostram o aspecto histológico dos músculos tratados com EH e EE, respectivamente. Em ambos os tratamentos o infiltrado inflamatório é de ligeiro a moderado após 24 (A) e 48 h (B), aumentando para moderado após 72 h (C). Estes resultados sugerem uma complexidade de diferentes efeitos sinérgicos e antagônicos dos constituintes de EH e EE em sua ação anti-inflamatória. Por outro lado, o edema e a degeneração das fibras musculares permanecem leves durante o período de tratamento.

As Figuras IV.5, IV.6 e IV.7 (págs. 93, 94 e 95) mostram o aspecto histológico dos músculos tratados com EH-H1, EH-D1 e EH-A1. As três frações mostram aumento de infiltrado

inflamatório após 72 h de tratamento, não mostrando melhora significativa do processo inflamatório.

As Figuras IV.8 a IV.12 (págs. 96 a 100) mostram os aspectos histológicos dos músculos tratados com os triterpenos e esteroides isolados de EH. A Figura IV.8 (pág. 96) mostra o aspecto histológico dos músculos tratados com o triterpeno  $\alpha$ -amirina. A seção apresenta edema e degeneração das fibras musculares severos no período de 24 (A) a 48 h (B), diminuindo para moderado após 72 h (C). A análise histológica mostra infiltrado inflamatório ligeiro a moderado neste mesmo período, mostrando uma ação anti-inflamatória tardia da  $\alpha$ -amirina.

A Figura IV.9 (pág. 97) mostra o aspecto histológico dos músculos tratados com o triterpeno lupeol. A seção apresenta um tecido muscular com pouca ocorrência de edema, degenerações das fibras musculares e infiltrado inflamatório. Algumas áreas de infiltrado inflamatório e edema são observadas após 24 h (A), sendo insignificantes após 48 h (B), mostrando uma potência anti-inflamatória deste triterpeno.

A Figura IV.10 (pág. 98) mostra o aspecto histológico dos músculos tratados com a mistura de  $\alpha$ -amirina e lupeol. A seção apresenta um tecido com aspecto moderado para infiltrado inflamatório. Estes resultados sugerem atividade intermediária de suas ações inflamatórias tratadas isoladamente, exceto após 72 h (C), quando o edema, a degeneração das fibras musculares e o infiltrado inflamatório não são mais observados nas seções correspondentes.

A mistura de  $\alpha$ -amirina e lupeol promoveu uma redução nas lesões inflamatórias, podendo estar associadas com mediadores inflamatórios mais tardios. O triterpeno lupeol promoveu uma melhoria no processo inflamatório de forma mais rápida e evidente, o que sugere que o triterpeno  $\alpha$ -amirina presente em mistura com o triterpeno lupeol pode exercer alguma

ação antagonista no processo de tratamento, uma vez que a concentração de  $\alpha$ -amirina na mistura era maior. A atividade inflamatória baixa sugerida para EH (Figura IV.3, pág. 91) pode estar relacionada a uma baixa concentração de triterpenos neste extrato, principalmente o triterpeno lupeol, que mostrou ser muito ativo.

A Figura IV.11 (pág. 99) mostra o aspecto histológico dos músculos tratados com a mistura de 3-*O*-acetil-lupeol e 3-*O*-acetil-pseudotaraxasterol. A seção apresenta edema generalizado e moderada degeneração das fibras musculares. O infiltrado inflamatório é leve a moderado após 24 h (A) e moderado após 48 h (B), sendo novamente de leve a moderado após 72 h (C), mostrando que esta mistura não promoveu uma melhora significativa do processo inflamatório.

A Figura IV.12 (pág. 100) mostra o aspecto histológico dos músculos tratados com a mistura de estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol. A seção apresenta edema generalizado e degeneração das fibras musculares moderada de 24 a 72 h. No entanto, infiltrados inflamatórios são moderados após 24 h (A), leve após 48 h (B) e inexistente após 72 h (C) de tratamento. Devido a presença de edema generalizado e degeneração das fibras musculares pode-se inferir que esta mistura não promove de forma significativa a diminuição do processo inflamatório.

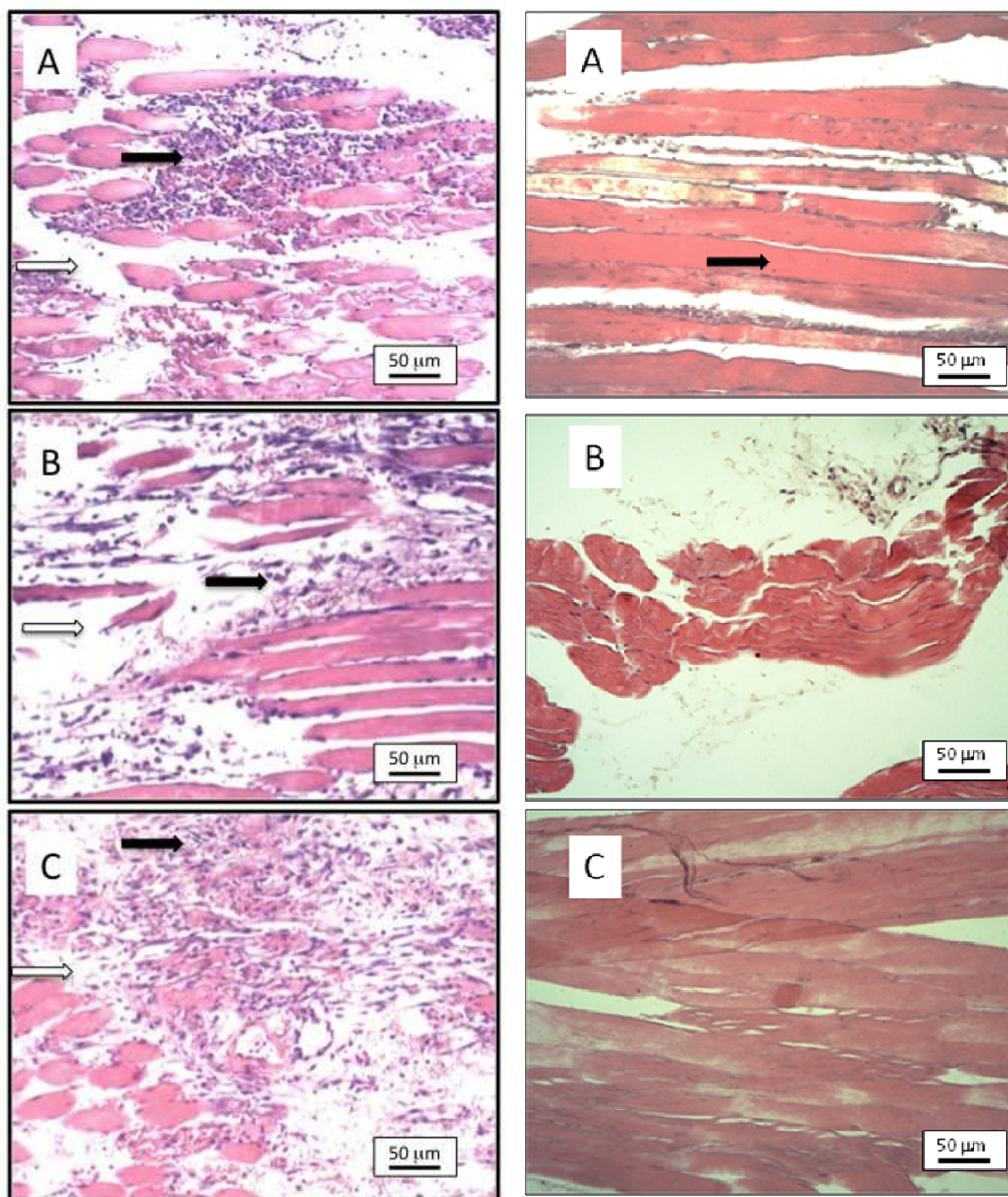
A Figura IV.13 (pág. 101) mostra o aspecto histológico dos músculos tratados com EA. A seção apresenta edema grave após 24 (A) e 48 h (B), reduzindo para leve após 72 h (C). A degeneração das fibras musculares é leve durante este período de tratamento. O infiltrado inflamatório também é leve após 24 h (A), aumentando para moderado após 48 h (B). No entanto, uma diminuição significativa do infiltrado inflamatório pode ser observada após 72 h (C). A análise destes resultados permite propor a presença de substâncias com potência anti-

inflamatória neste extrato, uma vez que houve diminuição significativa do processo inflamatório no período analisado.

A Figura IV.14 (pág. 102) mostra o aspecto histológico dos músculos tratados com a fração FA. A seção apresenta lesão moderada após 24 h (A) e lesão leve após 48 h (B), porém com significativo aumento do infiltrado inflamatório após 72 h (C). O edema e a degeneração das fibras musculares são leves após 24 (A) e 48 h (B), aumentando para moderados a graves após 72 h (C), mostrando que as substâncias presentes na fração FA não apresentam potência anti-inflamatória.

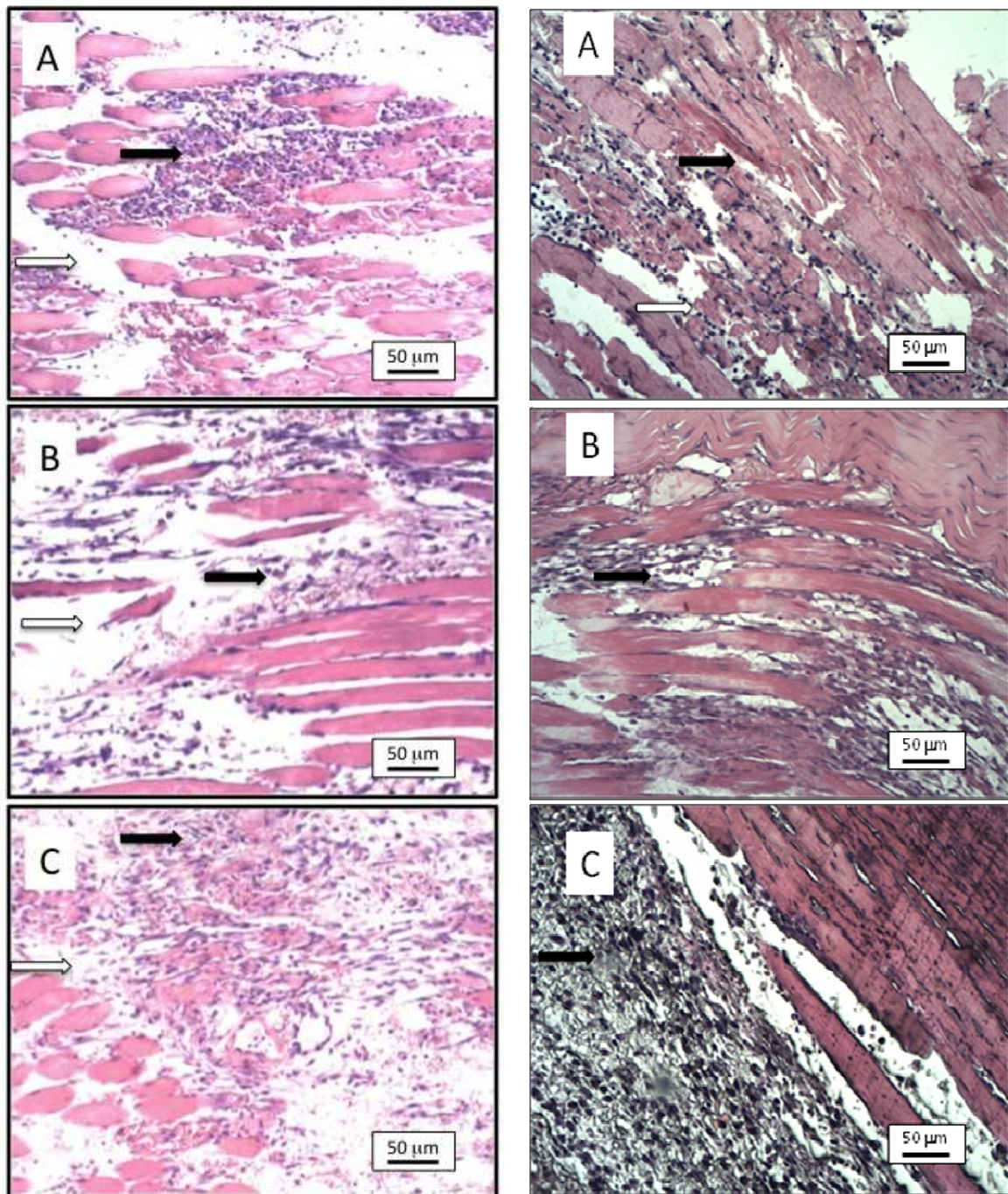
A Figura IV.15 (pág. 103) mostra o aspecto histológico dos músculos tratados com a fração FF. A seção indica edema grave e leve degeneração das fibras musculares após 24 h (A), permanecendo inalterados após 72 h (C) de tratamento. O infiltrado inflamatório é leve após 24 h (A), leve a moderado após 48 h (B) e, novamente, leve após 72 h (C), indicando uma alta proporção de componentes ativos.

A Figura IV.16 (pág. 104) mostra o aspecto histológico dos músculos tratados com o flavonóide quercetina. A seção indica a presença leve de edema, sem degeneração das fibras musculares após 24 a 72 h. O infiltrado inflamatório é leve após 24 h (A), não sendo observado após 48 (B) e 72 h (C). Estes resultados sugerem que a ação anti-inflamatória de FF (Figura IV.15, pág. 103) pode ser atribuída a quercetina.

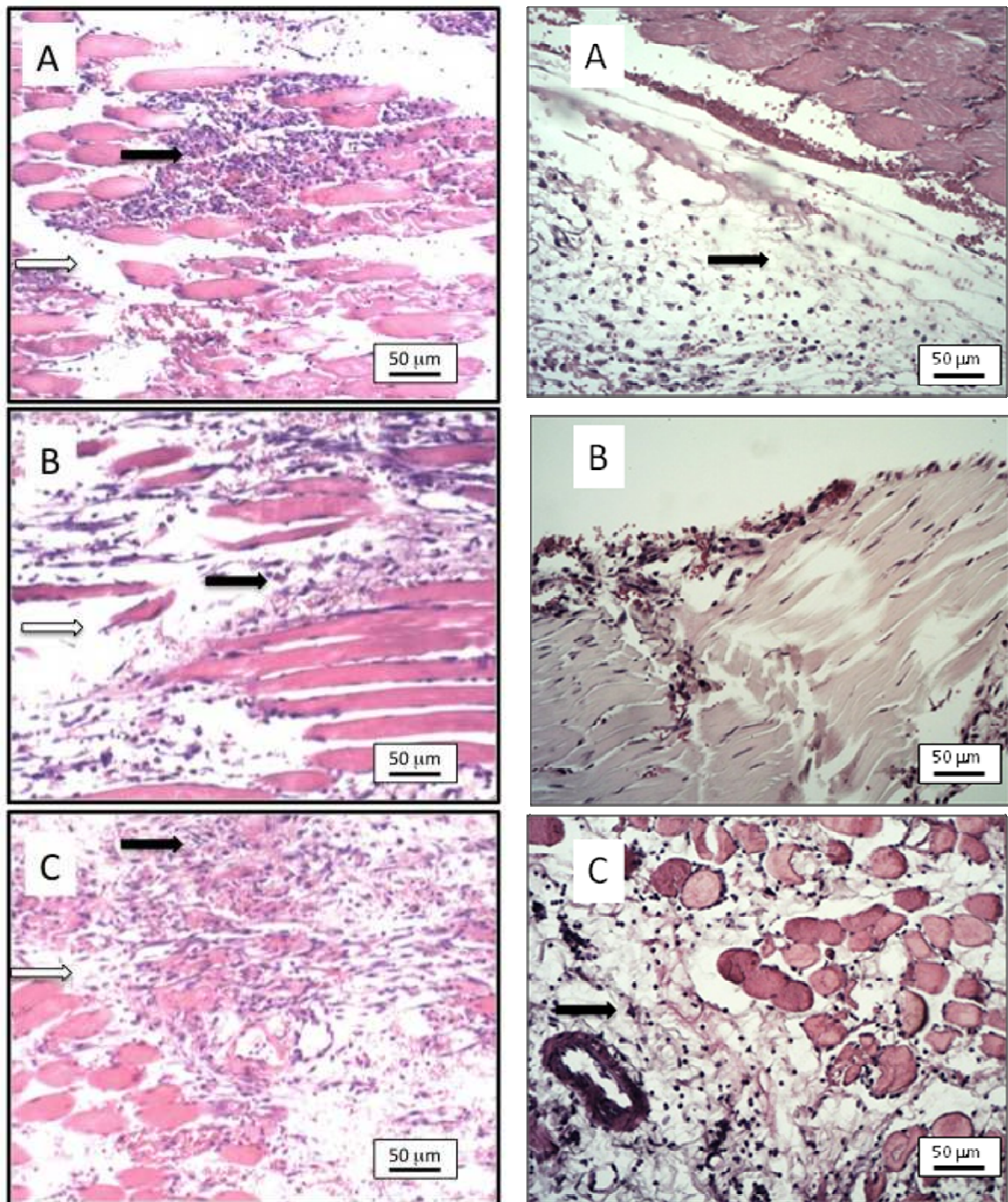


**Figura IV.2.** Fotomicrografias de histologia do tecido subcutâneo dos músculos da pata de ratos controle (esquerda) e submetido a tratamento com Dexametasona (direita) após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C).

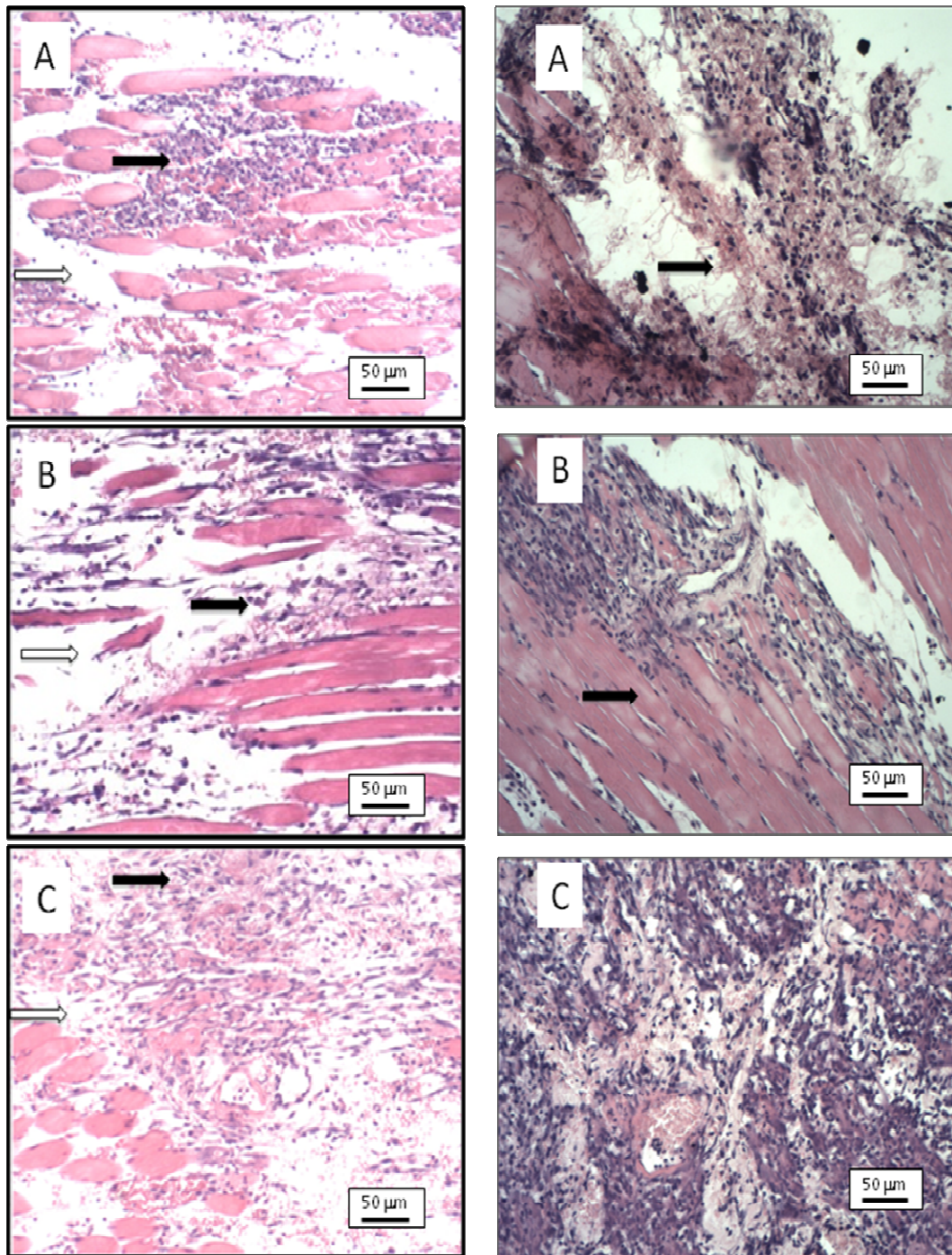




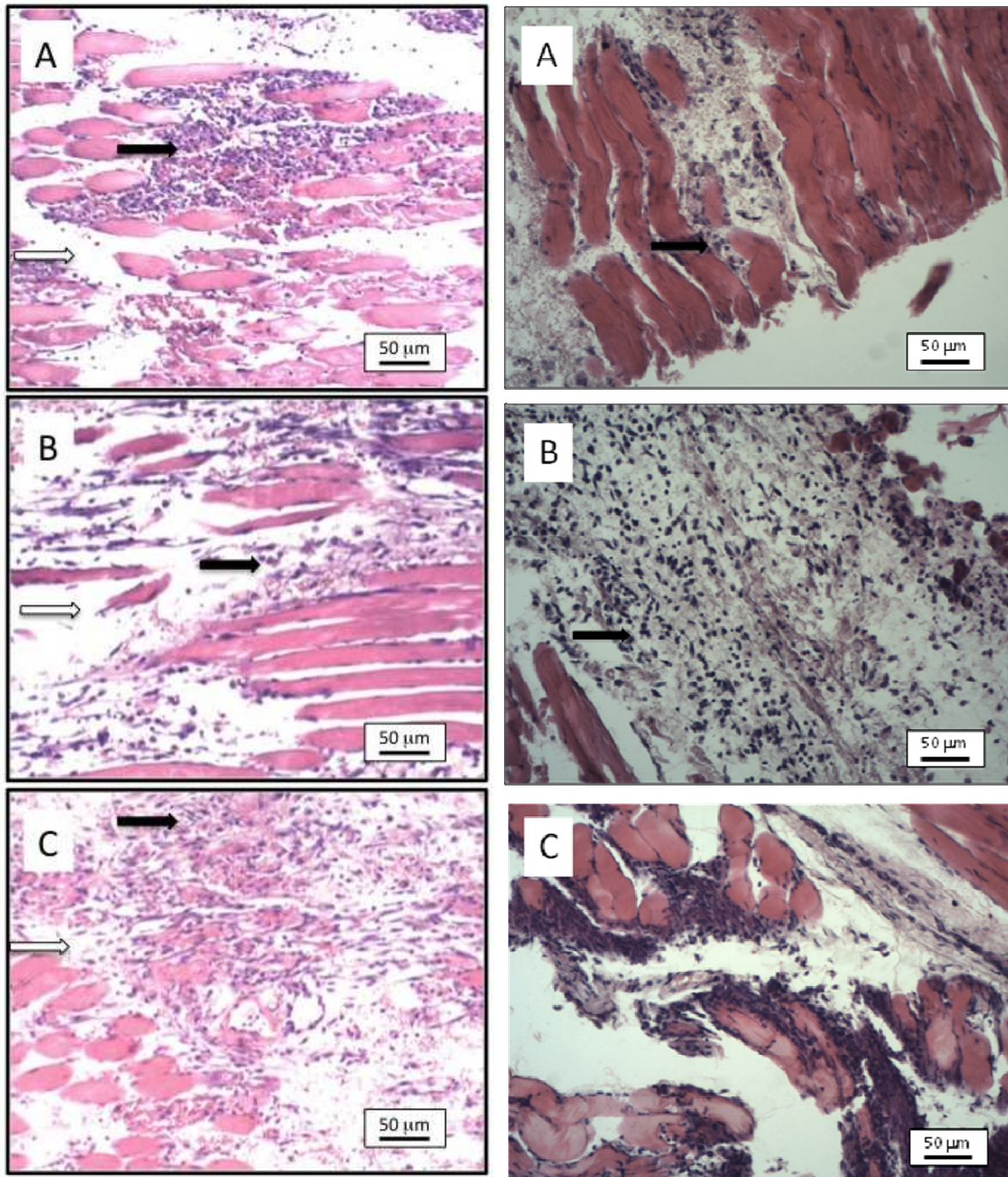
**Figura IV.3.** Fotomicrografias de histologia do tecido subcutâneo dos músculos da pata de ratos controle (esquerda) e submetido a tratamento com EH (direita) após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C).



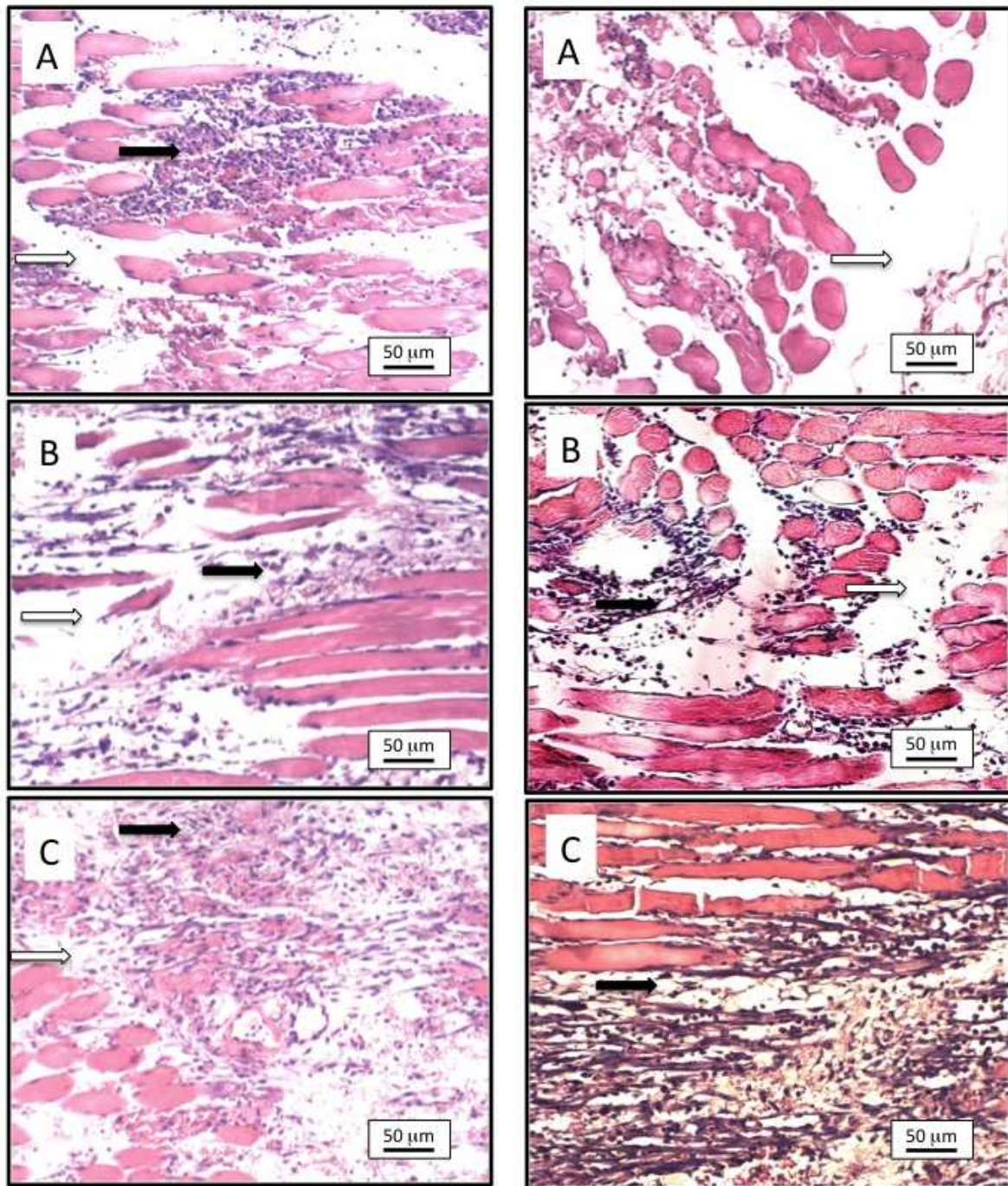
**Figura IV.4.** Fotomicrografias de histologia do tecido subcutâneo dos músculos da pata de ratos controle (esquerda) e submetido a tratamento com EE (direita) após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C).



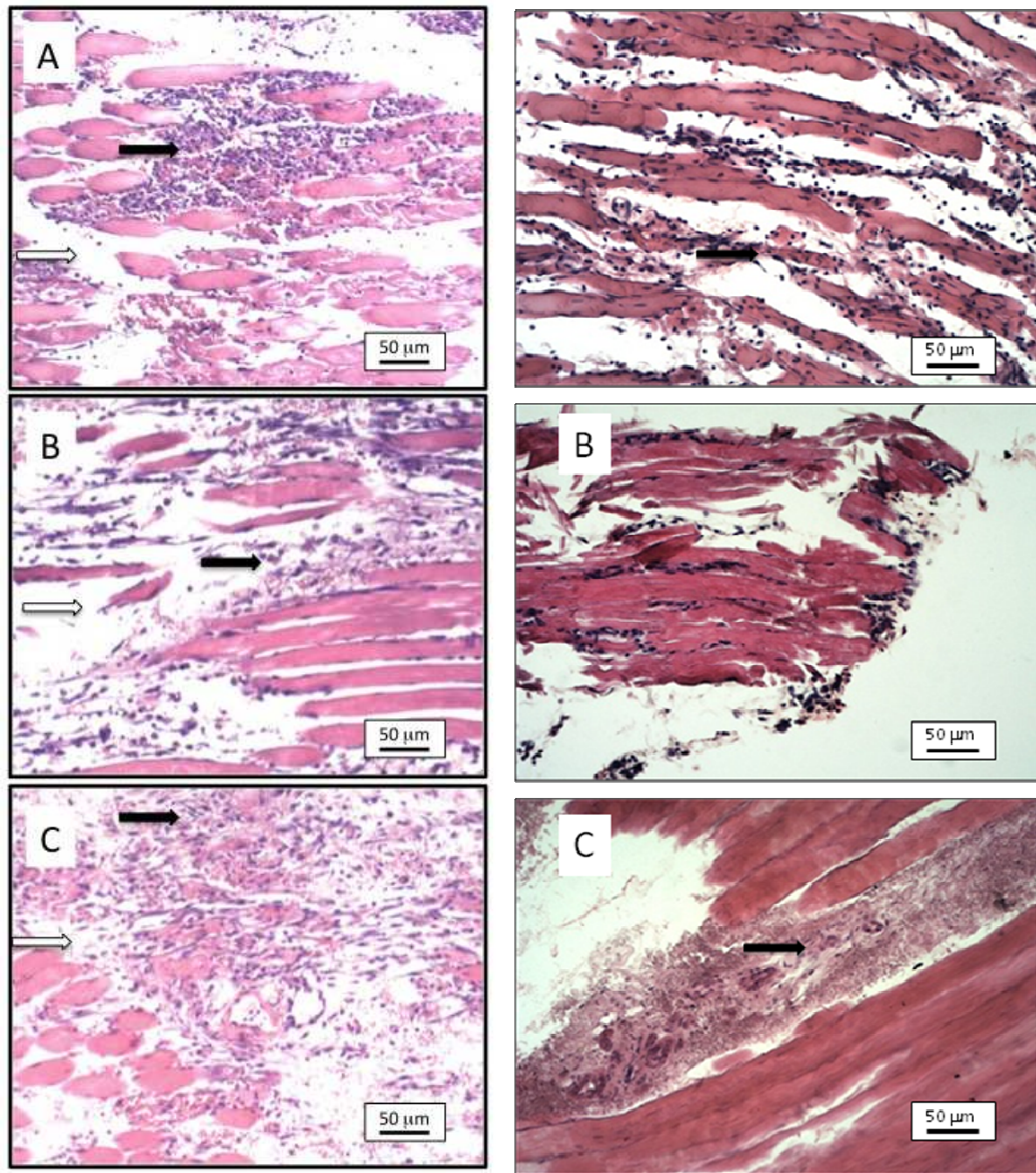
**Figura IV.5.** Fotomicrografias de histologia do tecido subcutâneo dos músculos da pata de ratos controle (esquerda) e submetido a tratamento com EH-H1 (direita) após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C).



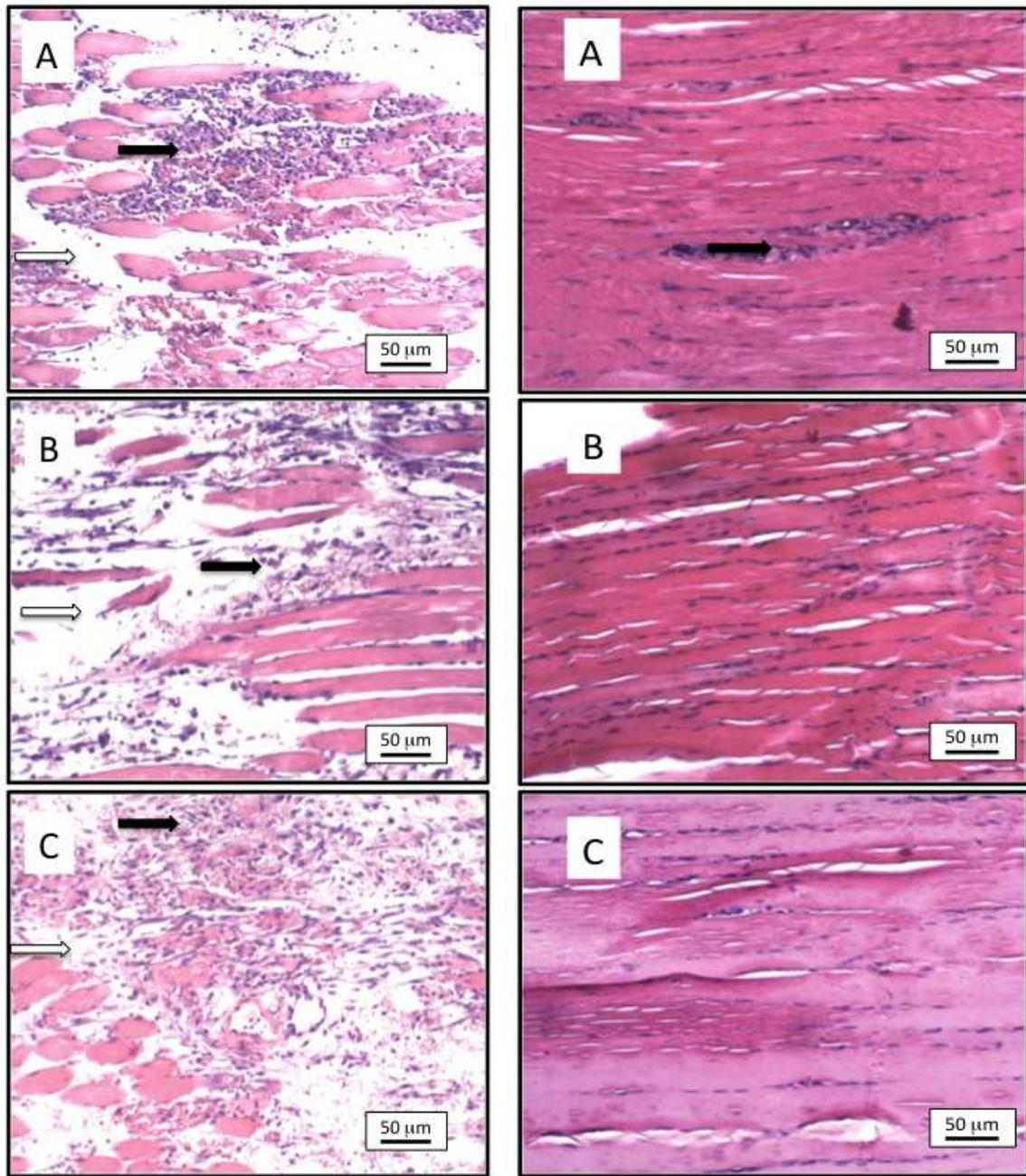
**Figura IV.6.** Fotomicrografias de histologia do tecido subcutâneo dos músculos da pata de ratos controle (esquerda) e submetido a tratamento com EH-D1 (direita) após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C).



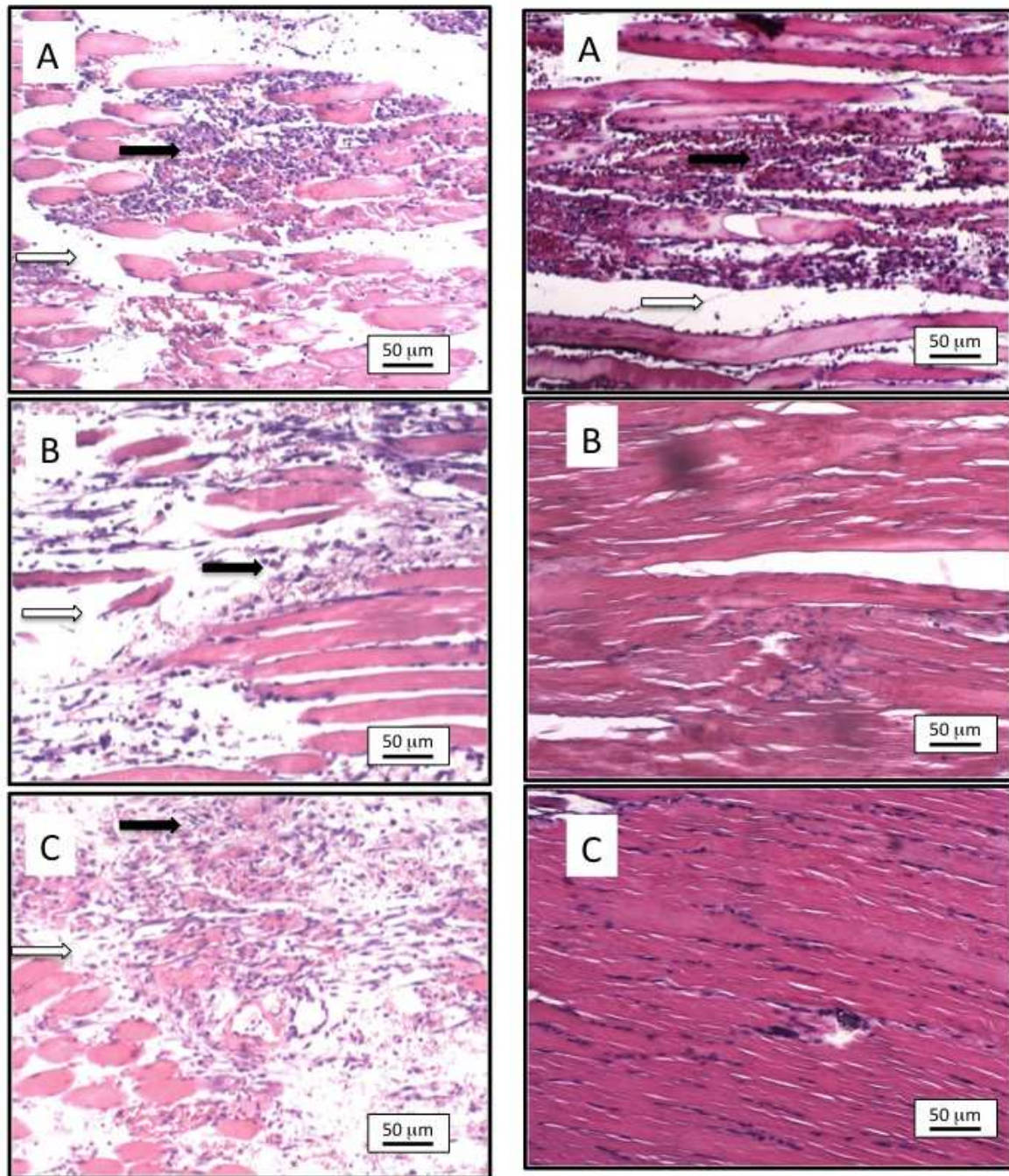
**Figura IV.7.** Fotomicrografias de histologia do tecido subcutâneo dos músculos da pata de ratos controle (esquerda) e submetido a tratamento com EH-A1 (direita) após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C).



**Figura IV.8.** Fotomicrografias de histologia do tecido subcutâneo dos músculos da pata de ratos controle (esquerda) e submetido a tratamento com  $\alpha$ -amirina, LpIII (direita) após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C).

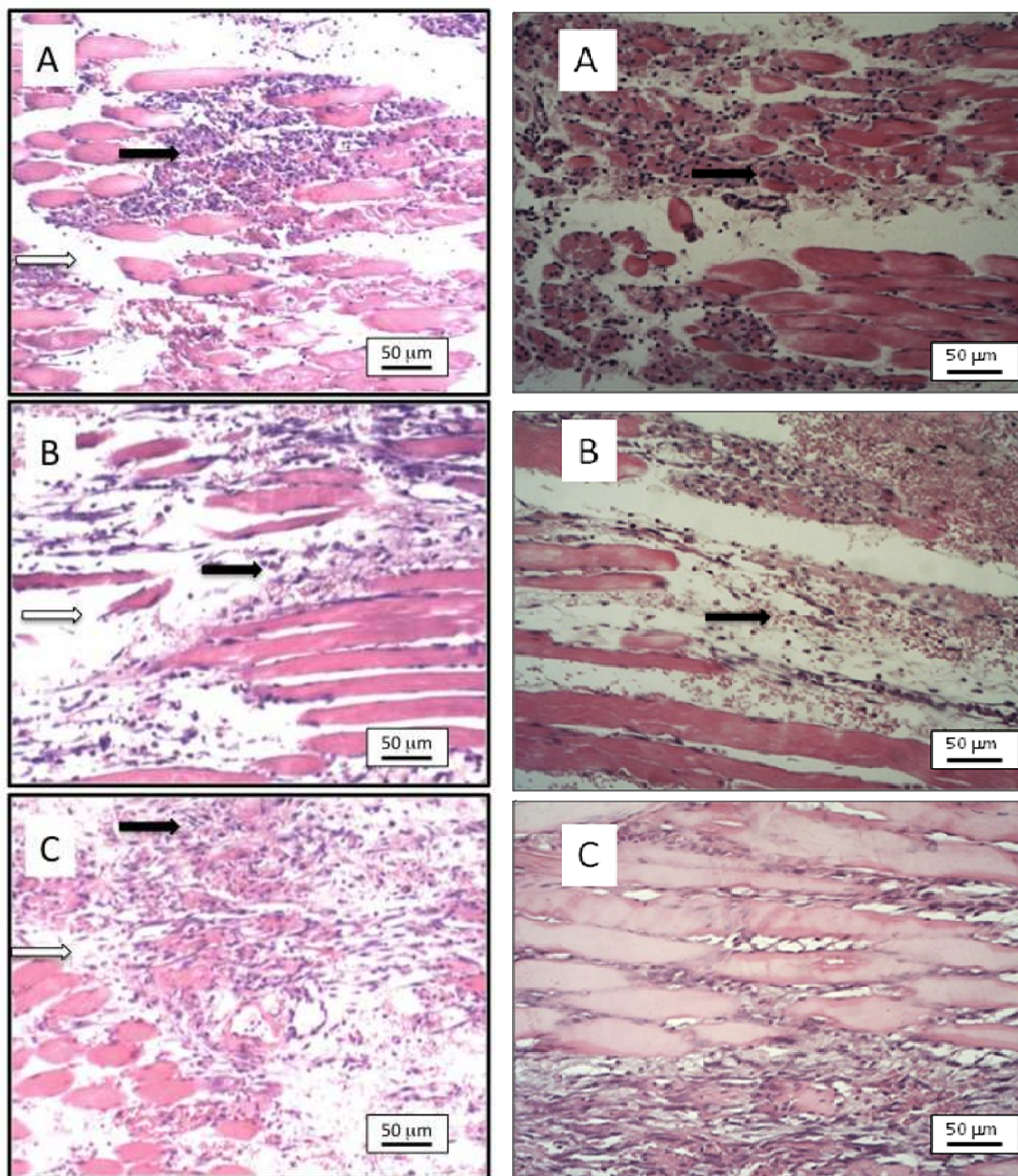


**Figura IV.9.** Fotomicrografias de histologia do tecido subcutâneo dos músculos da pata de ratos controle (esquerda) e submetido a tratamento com lupeol, LpIV (direita) após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C).

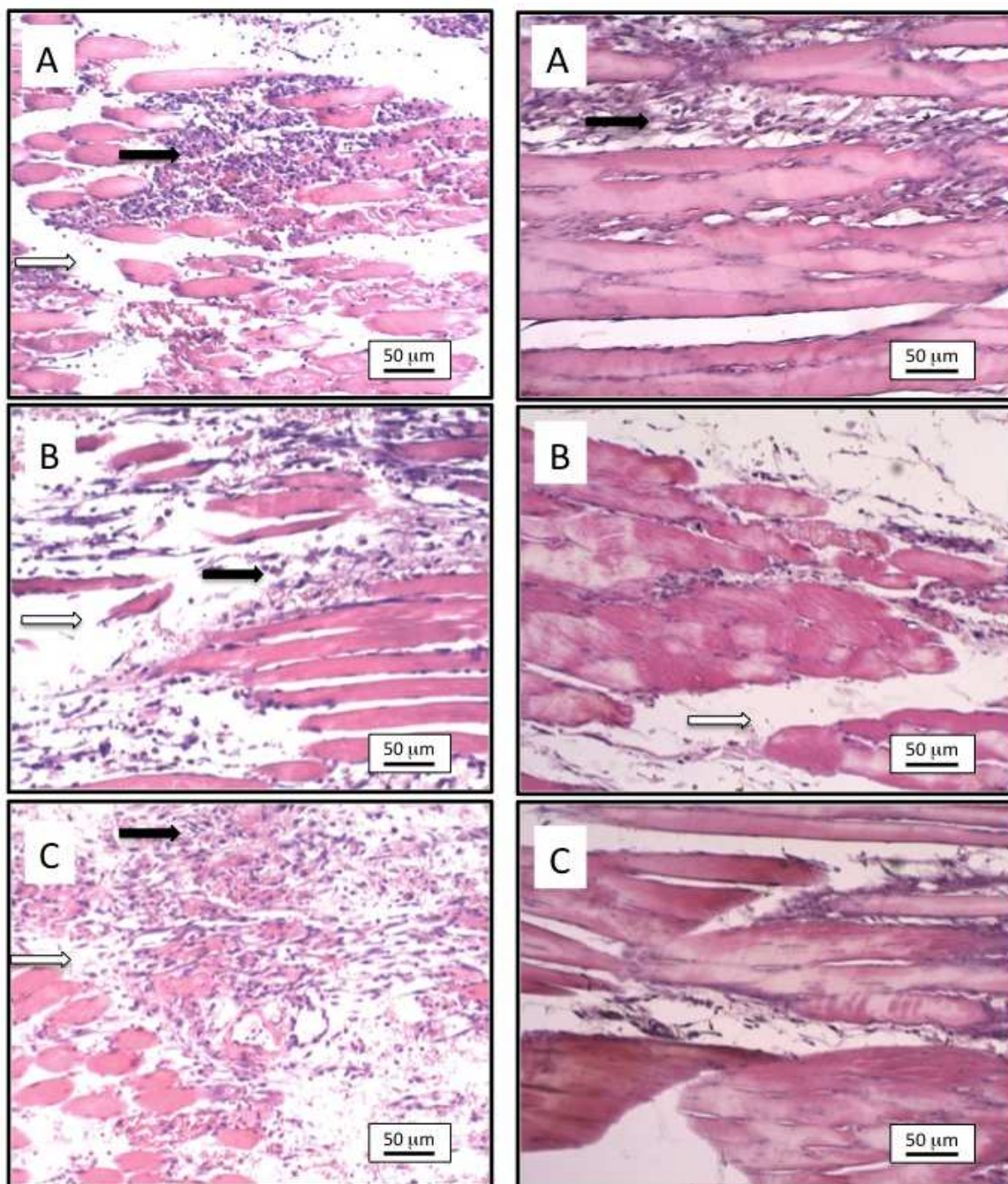


**Figura IV.10.** Fotomicrografias de histologia do tecido subcutâneo dos músculos da pata de ratos controle (esquerda) e submetido a tratamento com mistura de  $\alpha$ -amirina e lupeol, LpIII e LpIV (direita) após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C).

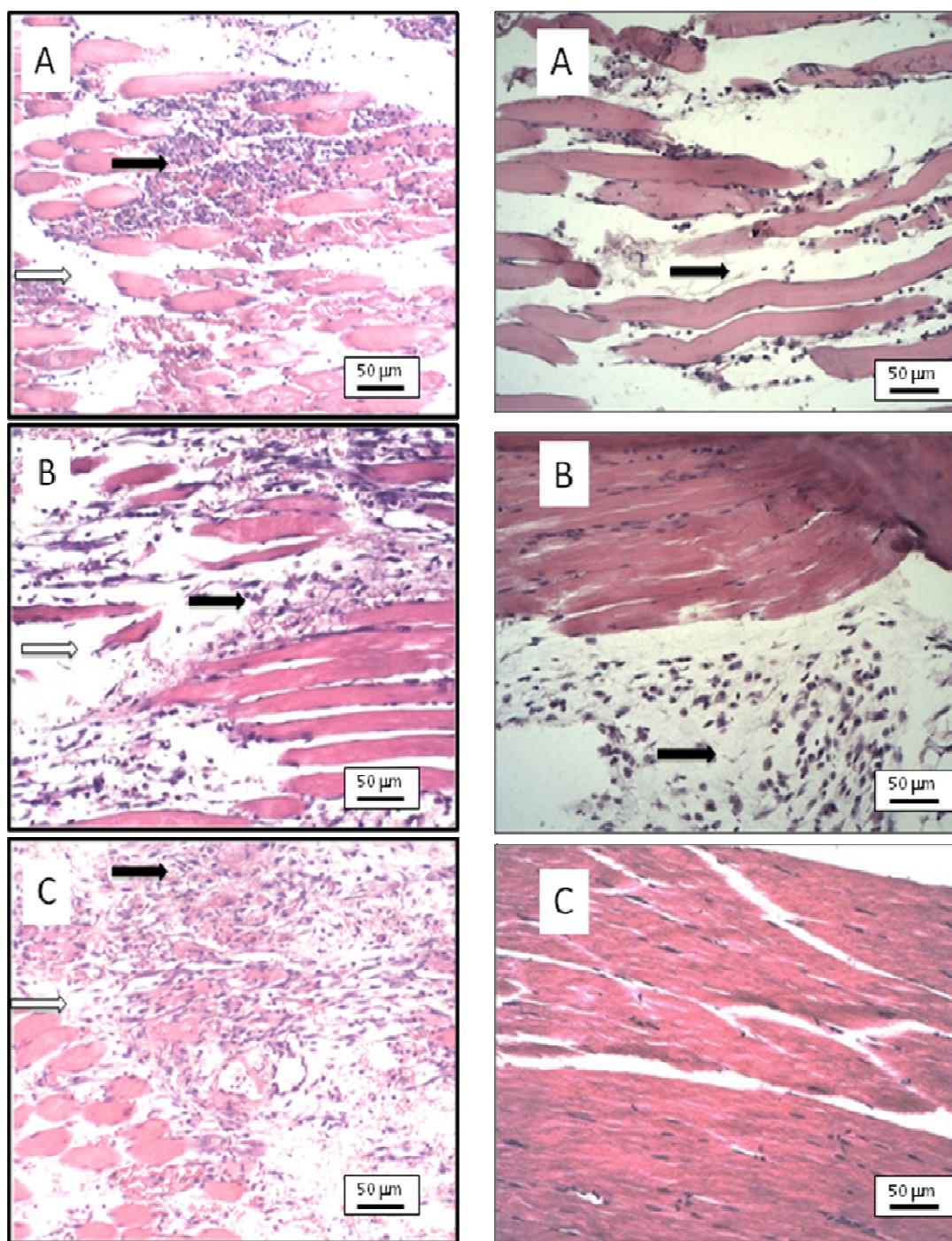




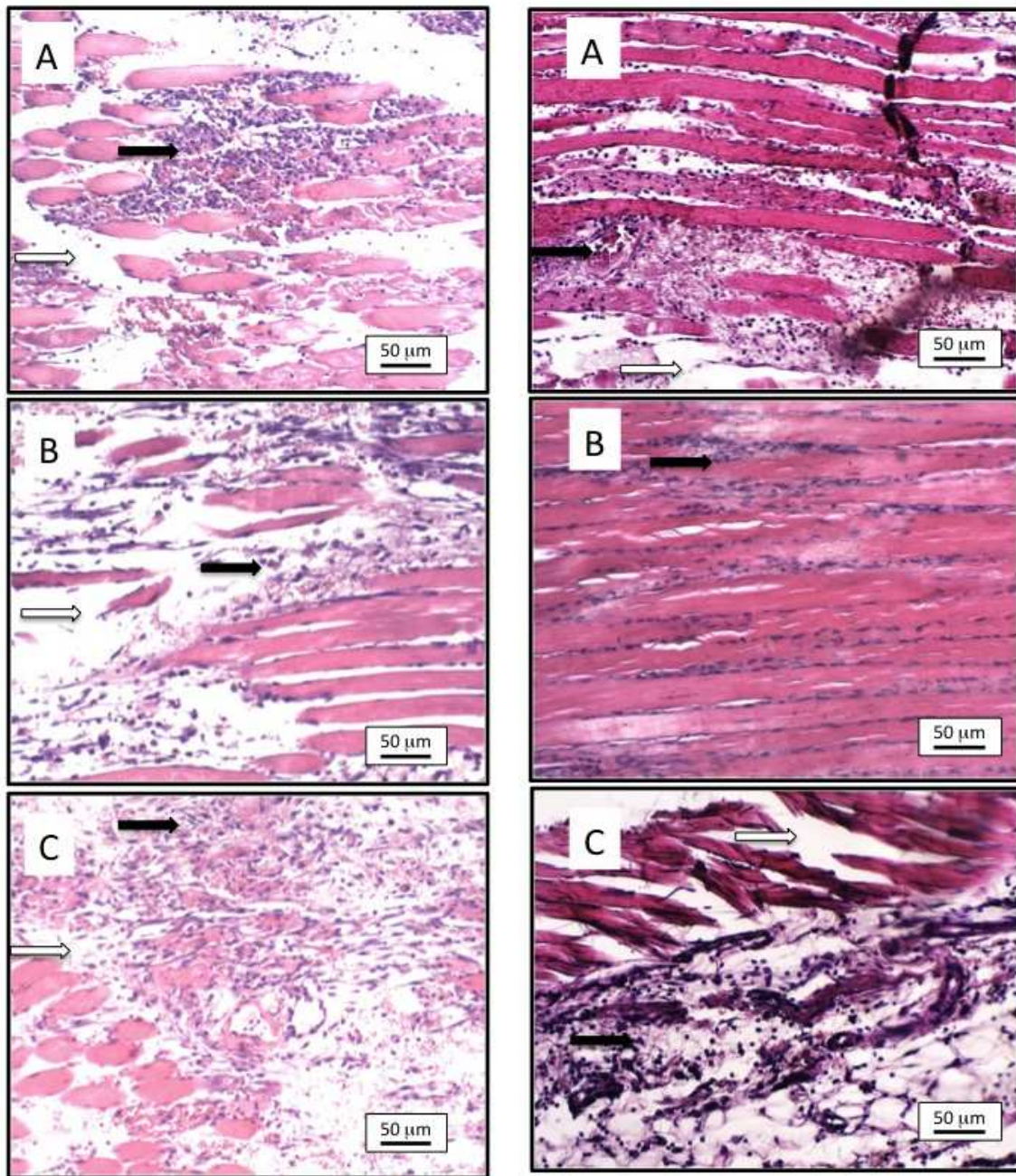
**Figura IV.11.** Fotomicrografias de histologia do tecido subcutâneo dos músculos da pata de ratos controle (esquerda) e submetido a tratamento com mistura de *OAc*-pseudotaraxasterol e *OAc*-lupeol (direita) após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C).



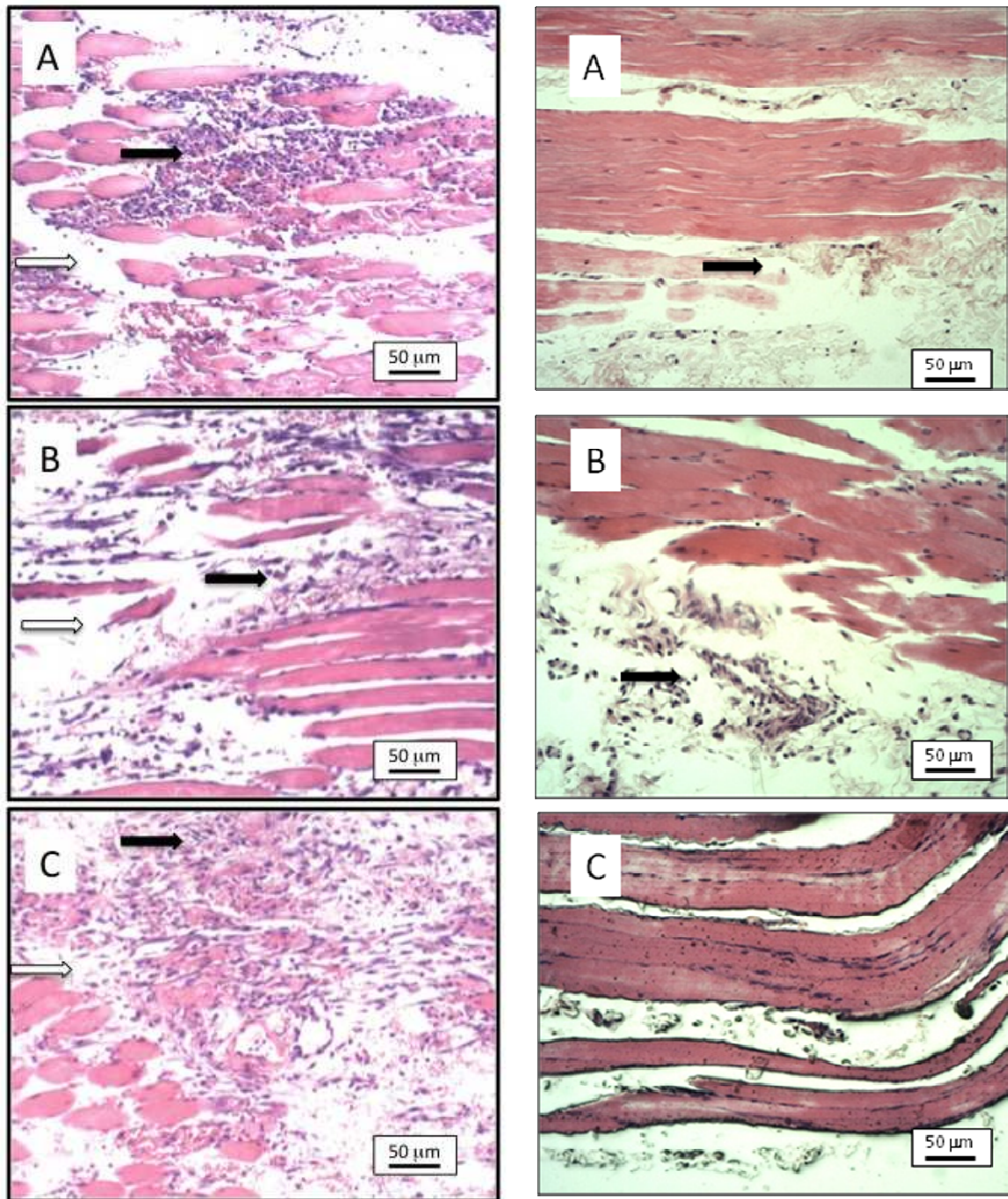
**Figura IV.12.** Fotomicrografias de histologia do tecido subcutâneo dos músculos da pata de ratos controle (esquerda) e submetido a tratamento com mistura de estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol (direita) após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C).



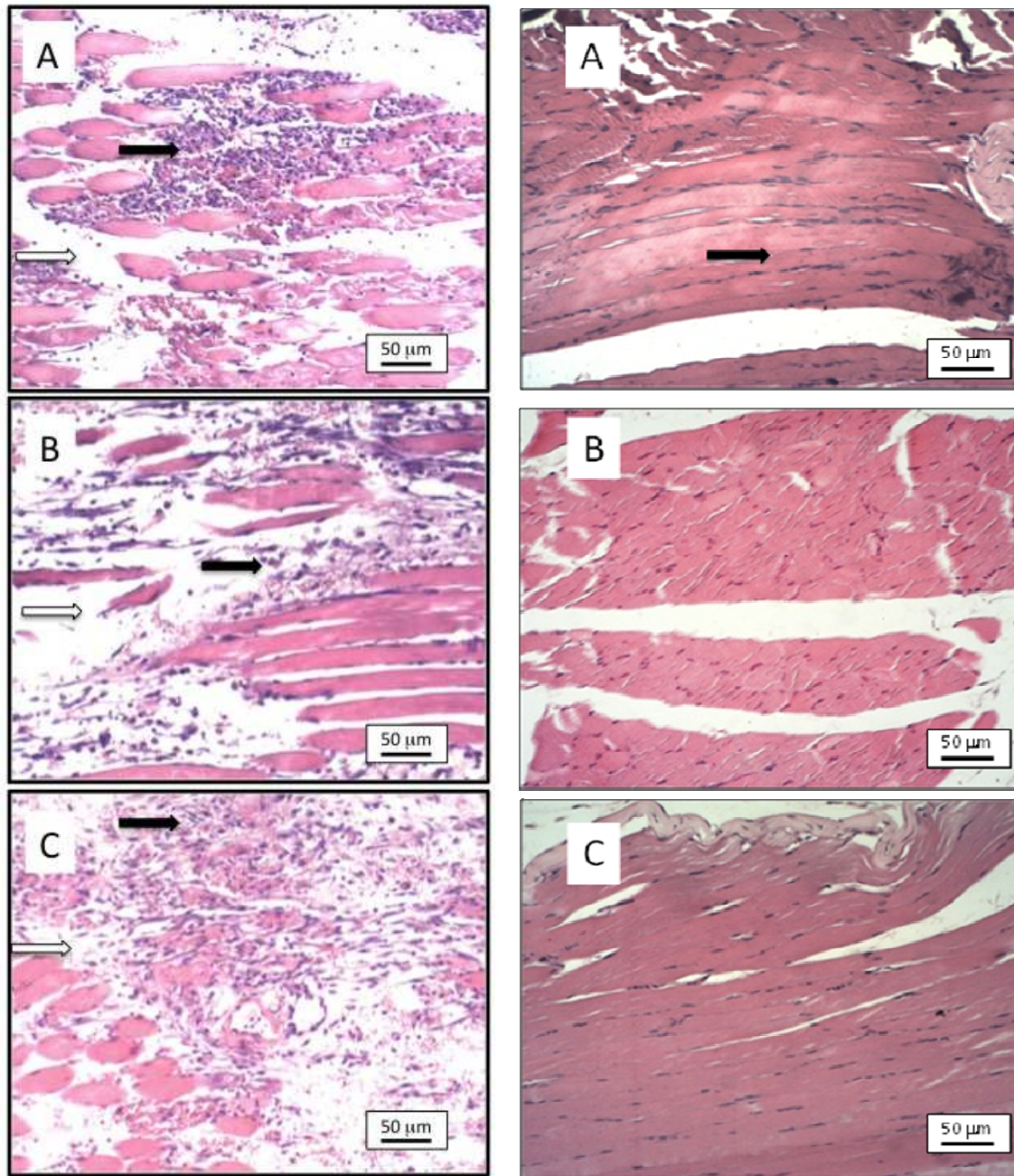
**Figura IV.13.** Fotomicrografias de histologia do tecido subcutâneo dos músculos da pata de ratos controle (esquerda) e submetido a tratamento com EA (direita) após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C).



**Figura IV.14.** Fotomicrografias de histologia do tecido subcutâneo dos músculos da pata de ratos controle (esquerda) e submetido a tratamento com FA (direita) após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C).



**Figura IV.15.** Fotomicrografias de histologia do tecido subcutâneo dos músculos da pata de ratos controle (esquerda) e submetido a tratamento com FF (direita) após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C).



**Figura IV.16.** Fotomicrografias de histologia do tecido subcutâneo dos músculos da pata de ratos controle (esquerda) e submetido a tratamento com LpVI (direita) após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C).

Com o intuito de comparar a atividade anti-inflamatória dos extratos, frações e substâncias analisados foram atribuídos escores de 0 a 5, baseados nos aspectos histológicos qualitativos da lesão, para as patas que receberam tratamento, conforme Tabela IV.2.

**Tabela IV.2.** Escores atribuídos para a atividade anti-inflamatória observada nas patas dos ratos tratados

<b>Escore</b>	<b>Classificação da lesão</b>
0	Sem lesão
1	Lesão branda
2	Lesão leve a moderada
3	Lesão moderada
4	Lesão moderada a grave
5	Lesão grave

A Tabela IV.3, pág. 106, mostra a atribuição dos escores para a atividade anti-inflamatória observada nas patas dos ratos tratados para os extratos, frações e substâncias isoladas de *L. pinaster*.

**Tabela IV.3.** Classificação da atividade anti-inflamatória observada nas patas dos ratos tratados com extratos, frações e substâncias isoladas de *L. pinaster*.

Amostra	Após 24 h de tratamento	Após 48 h de tratamento	Após 72 h de tratamento
Controle sem tratamento	3	2	2
Dexametasona	1	1	0
EH	2	1	3
EE	3	2	2
EH-H1	5	3	5
EH-D1	3	4	3
EH-A1	3	2	2
LpIII ( $\alpha$ -amirina)	2	1	2
LpIV (lupeol)	1	0	0
Mistura de LpIII e LpIV (lupeol e $\alpha$ -amirina)	2	1	0
Mistura de OAc-lupeol e OAc-pseudotaraxasterol <sup>29</sup>	3	3	2
Mistura de estigmasterol e $\beta$ -sitosterol <sup>29</sup>	2	2	1
EA	1	3	0
FA	3	1	3
FF	1	2	1
LpVI (quercetina)	1	0	0

Após a análise de todos os grupos, pôde-se verificar que a 24 h do tratamento o estímulo lesivo gera um quadro patológico na pata do rato marcado histologicamente por edema, hemorragia e infiltrado inflamatório. O infiltrado inflamatório foi predominantemente polimorfonuclear e localizado entre as fibras musculares. Após 48 h, há predominância de



infiltrado em regiões perimusculares, organização inicial marcada pela presença de matriz extracelular e de fibrina. Após 72 h há ainda a presença de um infiltrado inflamatório, marcado predominantemente por células mononucleares e fibras de tecido conjuntivo. Uma inflamação intensa é observada em todas as patas que não receberam qualquer tratamento, além da presença de alguns pontos de hemorragia e edema generalizado.

Os resultados deste trabalho sugerem que a aplicação tópica de esteróides, triterpenos e flavonóides diminui significativamente o processo inflamatório gerado por lesão muscular. Os resultados mais significativos foram obtidos com lupeol e quercetina, que promoveram uma significativa redução de inflamação no período de 24 a 72 h de tratamento. A aplicação transdérmica de gel com lupeol e quercetina em patas de ratos utilizando fonoforese atenua o perfil inflamatório. Por conseguinte, um maior potencial anti-inflamatório pode ser esperado para uma aplicação tópica destas substâncias em relação ao padrão de dexametasona.

## IV.2. ATIVIDADE TRIPANOCIDA

### IV.2.1. Introdução

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. O parasita possui um ciclo de vida complexo, exibindo formas morfológicas e funcionais bastante distintas. Estas formas alternam-se entre duas fases, uma no inseto vetor e outra no hospedeiro. As formas evolutivas do parasita constituem-se por epimastigotas, no inseto vetor, e amastigotas, em células de mamíferos. Os tripomastigotas metacíclicos são as formas infectantes no hospedeiro.<sup>84</sup> Esta doença representa atualmente um importante problema de saúde pública em regiões endêmicas, afetando anualmente mais de 18 milhões de pessoas, somente na América do Sul.<sup>85,86</sup> A doença de Chagas resulta em mais de 50.000 mortes a cada ano,<sup>87</sup> não existindo atualmente nenhum tratamento eficaz para esta doença. As drogas Nifurtimox e Benzonidazol são as únicas utilizadas para o tratamento da fase aguda da doença, sendo, entretanto, mal toleradas e insatisfatórias devido aos frequentes efeitos colaterais a elas associados.<sup>88</sup>

Em virtude do grande potencial biológico dos produtos naturais, as plantas medicinais podem se tornar uma alternativa promissora ao tratamento da doença de Chagas. De fato, a atividade tripanocida tem sido associada a vários produtos naturais, incluindo alguns fitoconstituintes isolados de *L. pinaster*.<sup>89</sup> A atividade tripanocida de muitas espécies vegetais tem sido atribuída à presença do lupeol, triterpeno encontrado geralmente nessas plantas.<sup>90,91</sup> Neste sentido, justifica-se a avaliação tripanocida das frações e fitoconstituintes isolados de *L. pinaster*.

#### IV.2.2. Procedimento experimental

Os extratos foram testados através de ensaio colorimétrico,<sup>92</sup> com algumas modificações.<sup>93</sup> Este ensaio utiliza uma cepa de *T. cruzi* (*Tulahuen*) transformada para expressar  $\beta$ -galactosidase, enzima que é capaz de catalisar uma reação colorimétrica quando o vermelho de cloro-fenol- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (CPRG) for utilizado como substrato.

No ensaio com formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* provenientes de cultura de tecido, cerca de 4.000 células L929 por poço foram semeadas em placas de 96 poços, seguindo incubação durante a noite em estufa, a 37 °C, para a adesão da célula à superfície. Após incubação, a infecção foi feita com 10 tripomastigotas provenientes de cultura de tecidos/célula, durante 2 h. Após esse período, o meio contendo os parasitas extracelulares foi substituído por meio novo e a placa novamente incubada a 37 °C durante 48 h. Além dos extratos naturais diluídos nas concentrações de **20 e 10  $\mu$ g/ mL**. Após incubação a 37 °C por 96 h, foi adicionado o substrato CPRG aos poços. A placa foi incubada a 37 °C e a leitura foi realizada após 16-20 h em espectrofotômetro utilizando um filtro de 570 nm. Simultaneamente, os seguintes controles foram utilizados: células não infectadas, células infectadas não tratadas, benzonidazol a 1  $\mu$ g/mL (3,81  $\mu$ M) (controle positivo) e DMSO diluído em meio a uma concentração final de 1% (controle negativo). Os resultados foram expressos por porcentagem de redução da absorvância dos poços experimentais em comparação com a absorvância dos poços contendo células infectadas não tratadas.

### IV.2.3. Resultados e Discussão

A Tabela IV.4 (pág. 111) apresenta o resultado dos testes tripanocidas para o extrato bruto, frações e substâncias isoladas de *L. pinaster*. A amostra LpV correspondente ao composto inédito, ácido 2,8-dihidroxi-8,11,11-trimetil-12-oxabicyclo[7.2.1]dode-4-en-4-óico, mostra-se ativa contra as formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* provenientes de cultura de tecido, apresentando-se como um agente promissor no combate a estas formas evolutivas do parasita. No entanto, esta amostra foi ativa somente na concentração de 20 µg/mL, pois, em concentrações mais baixas (10 µg/mL), mostra-se inativa. Este resultado é compatível com dados da literatura que reportam a atividade tripanocida de vários derivados sesquiterpênicos. O flavonoide quercetina mostrou-se também ativo, porém com baixo índice de seletividade o que inviabiliza a recomendação para ensaios *in vivo*.

**Tabela IV.4.** Resultado de atividade tripanocida de extrato, frações e substâncias isoladas de *L. pinaster*

Composto	IC <sub>50</sub> sobre o parasita (µg/mL) <sup>1</sup>	IC <sub>50</sub> sobre as células (µg/mL) <sup>2</sup>	Índice de Seletividade <sup>3</sup>
Extrato hexânico (EH)	Inativo*	-	-
Extrato etanólico (EE)	Inativo*	-	-
Mistura de 3OAc- $\alpha$ -amirina e 3OAc-lupeol (LpI)	Inativo*	-	-
$\alpha$ -Amirina (LpIII)	Inativo*	-	-
Lupeol (LpIV)	Inativo*	-	-
Ácido 2,8-dihidroxi-8,11,11-trimetil-12-oxabicyclo[7.2.1]dode-4-en-4-óico (LpV)	31,7 µg/mL	80 µg/mL	2,5
Fração fenólica (FF)	Inativo*		
Quercetina (LpVI)	28,6 µg/mL	60 µg/mL	2,1
Benzonidazol	1 µg/mL	625 µg/mL	625

<sup>1</sup> Concentração do composto que reduz em 50% o crescimento parasitário.

<sup>2</sup> Concentração do composto que induz 50% de morte celular.

<sup>3</sup> IC<sub>50</sub> do composto sobre as células dividido pelo IC<sub>50</sub> do composto sobre o parasita.

\*Compostos inativos quando testados a 40 µg/mL.

## **IV.3. ESTUDOS TEÓRICOS DA RELAÇÃO ESTRUTURA QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA**

### **IV.3.1. Introdução**

Os triterpenos  $\alpha$ -amirina e lupeol foram obtidos em mistura, em trabalho anterior<sup>29</sup>, e como substâncias puras. As suas atividades anti-inflamatórias foram testadas no modelo experimental desenvolvido neste trabalho. Embora estas substâncias sejam estruturalmente semelhantes, os testes de atividade anti-inflamatória mostraram-se significativamente diferentes. O lupeol apresentou alta atividade anti-inflamatória e a  $\alpha$ -amirina, baixa atividade anti-inflamatória. Com o intuito de investigar a relação entre estrutura química e atividade biológica destes triterpenos foram realizados cálculos teóricos de otimização de geometria e posterior cálculo de contribuição dos orbitais atômicos para os orbitais moleculares de fronteira (HOMO e LUMO).

### **IV.3.2. Metodologia Teórica**

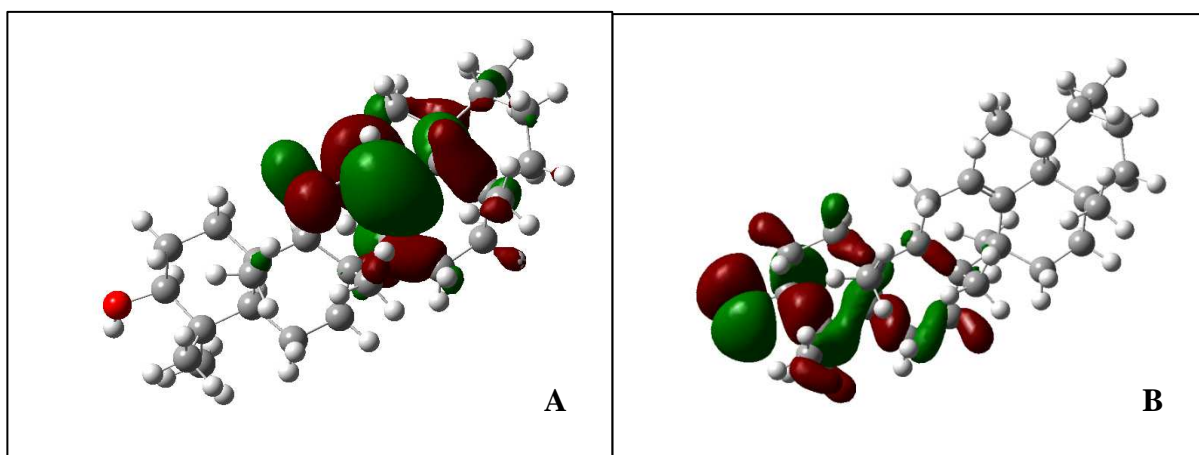
Estudos teóricos foram realizados utilizando o software Gaussian 03.<sup>44</sup> As geometrias obtidas previamente a partir de cálculos semi-empíricos PM3 foram usadas como modelos iniciais nas otimizações de geometria empregando cálculos DFT com conjunto de base 6-31G\*.

As geometrias otimizadas foram caracterizadas como mínimos verdadeiros sobre a superfície de energia potencial (PES), quando todas as frequências harmônicas das estruturas foram reais. A energia eletrônica nuclear ( $E$ ) das geometrias otimizadas foi dada em unidades atômicas (*Hartree*). Após a otimização das geometrias para estes triterpenos foram realizados cálculos de população orbital em mesmo nível de teoria.

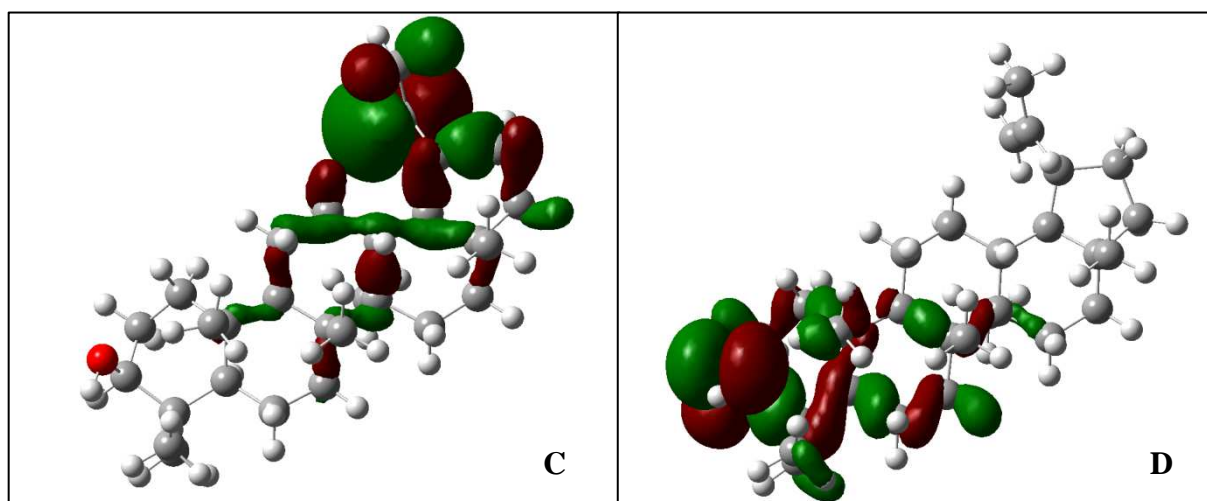
### IV.3.3. Resultados e Discussão

As Figuras IV.17 e IV.18 (pág. 114) mostram, respectivamente, a população orbital do HOMO e HOMO-1 da  $\alpha$ -amirina e do lupeol. A população orbital do HOMO da  $\alpha$ -amirina (A) e lupeol (B) concentra-se principalmente no sistema  $\pi$  dos dois triterpenos, ao passo que a população orbital do HOMO-1 (B e D) concentra-se principalmente nos átomos do anel A de ambos. A similaridade do HOMO-1 de ambos os terpenos não reflete a diferença entre suas atividades anti-inflamatórias. Por sua vez, a atividade anti-inflamatória do lupeol pode ser atribuída à concentração da população orbital no sistema  $\pi$  envolvendo os átomos de carbono C-20 e C-29 no HOMO.

Como resultado, a atividade anti-inflamatória observada para o lupeol pode ser mediada por ataques nucleofílicos do HOMO. A população orbital do HOMO da  $\alpha$ -amirina concentra-se no sistema  $\pi$  envolvendo C-12 e C-13. Estes resultados sugerem uma regioespecificidade da olefina na atividade anti-inflamatória do lupeol.



**Figura IV.17.** População orbital do HOMO (A) e HOMO-1 (B) da  $\alpha$ -amirina.



**Figura IV.18.** População orbital do HOMO (C) e HOMO-1 (D) do lupeol .

As Figuras IV.19 (pág. 115) e IV.20 (pág. 116) mostram, respectivamente, os orbitais de fronteira LUMO e LUMO+1 para  $\alpha$ -amirina e lupeol, respectivamente. A população orbital do LUMO da  $\alpha$ -amirina e lupeol concentra-se principalmente no sistema  $\pi$  dos dois triterpenos, ao passo que a população orbital do LUMO+1 concentra-se, também, principalmente nos átomos do anel A de ambos. Da mesma forma a similaridade do LUMO+1 de ambos os terpenos não reflete a diferença entre suas atividades anti-inflamatórias. Estes resultados sugerem que o sistema  $\pi$



seja um alvo para a atividade anti-inflamatória. É possível observar também que o carbono olefínico da  $\alpha$ -amirina encontra-se mais impedido estericamente do que a dupla exocíclica do lupeol, podendo-se inferir que, sendo o sistema  $\pi$  importante alvo na atividade anti-inflamatória, o fato do impedimento estérico da  $\alpha$ -amirina ser mais significativo pode estar influenciando a baixa atividade anti-inflamatória deste triterpeno em relação ao lupeol, que se mostrou ser bem mais ativo. É importante ressaltar também que existe um número bem significativo de trabalhos que reportam atividades biológicas diversas ao lupeol.<sup>94</sup>

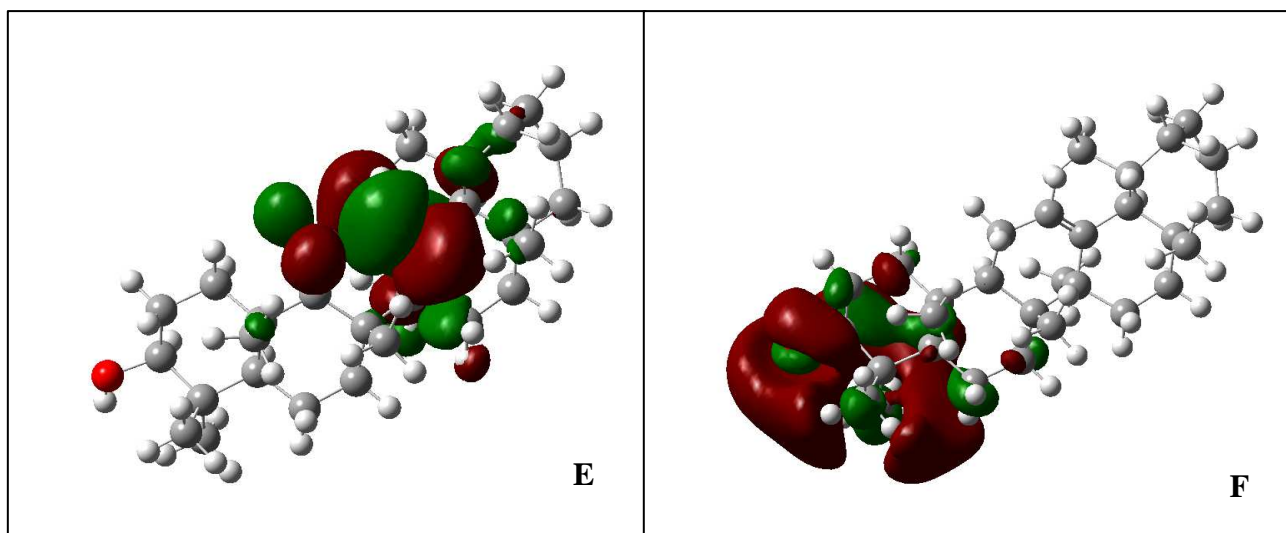
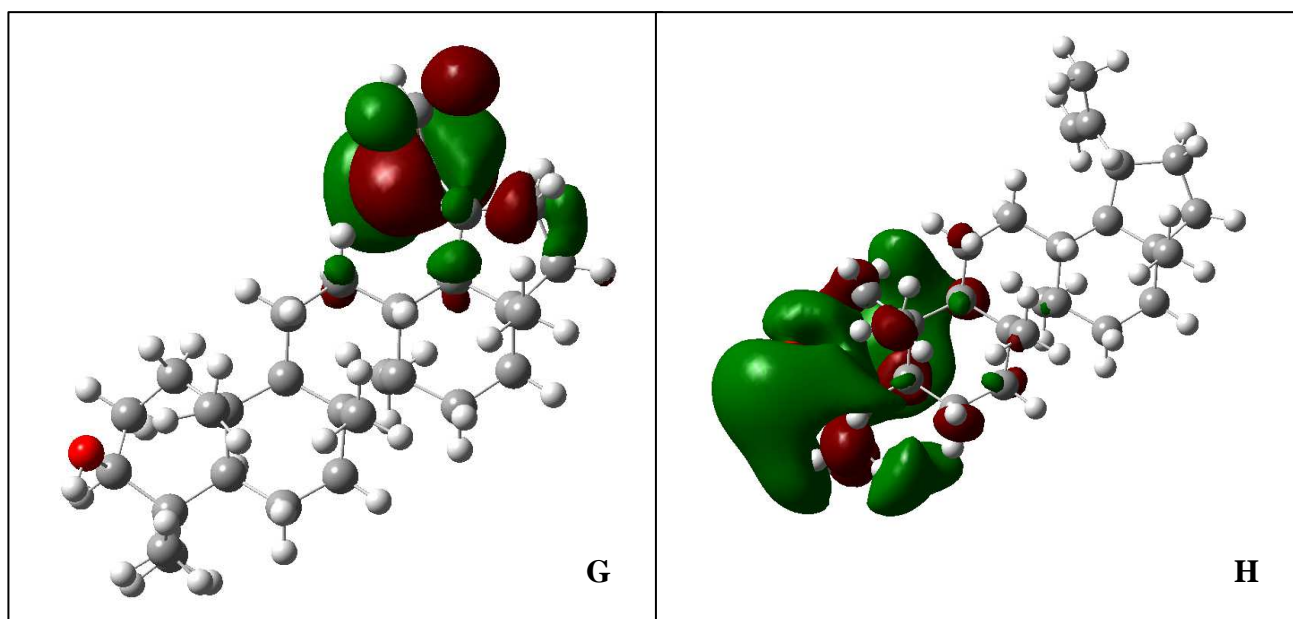


Figura IV.19. População orbital do LUMO (E) e LUMO+1 (F) da  $\alpha$ -amirina.



**Figura IV.20.** População orbital do LUMO (G) e LUMO+1 (H) do lupeol.

Finalmente, deve-se considerar também que os resultados dos estudos de população orbital não sugerem o envolvimento dos átomos do anel A na atividade anti-inflamatória do lupeol.



## CONCLUSÕES

## I. Dos Estudos Fitoquímicos

A partir do estudo biomonitorado de *L. pinaster* realizado foi possível o isolamento e a identificação de alguns fitoconstituintes provenientes do fracionamento cromatográfico das partes aéreas da planta. Assim, verificou-se a presença dos triterpenos pentacíclicos 3-*O*-acetil- $\alpha$ -amirina, 3-*O*-acetil-lupeol,  $\alpha$ -amirina e lupeol, presentes no extrato hexânico e isolados anteriormente nas diferentes partes da planta,<sup>29</sup> além do sesquiterpeno ácido 2,8-dihidroxi-8,11,11-trimetil-12-oxabicyclo[7.2.1]dode-4-en-4-óico, composto descrito pela primeira vez na literatura.

A partir do estudo do extrato aquoso foi possível a obtenção de frações ricas em compostos fenólicos, em alcaloides e em saponinas. A partir da fração rica em compostos fenólicos foi possível o isolamento e identificação do flavonoide quercetina.

A partir do estudo dos óleos essenciais foi possível identificar dez compostos, sendo que nove foram identificados pela primeira vez no óleo essencial de *L. pinaster*: 2-metil-2-feniletanoato de propila, *Z*- $\alpha$ -bisaboleno, *Z*- $\alpha$ -bisaboleno epóxido, espatulenol, *Z*- $\alpha$ -bergamotol, *Z*-lanceol, *E*- $\alpha$ -bisaboleno epóxido, acetato de nerolidil e metanoato de *n*-hexadecanoila.

## II. Dos Estudos Biológicos

Os testes biológicos realizados confirmaram a atividade biológica alegada pela medicina popular, como a atividade anti-inflamatória. A atividade anti-inflamatória apresentada pela fração EH1-H1-R7, atribuída quimicamente ao triterpeno lupeol, mostrou uma redução significativa da intensidade do processo inflamatório. Entretanto, o mesmo fitoconstituinte em mistura com o triterpeno  $\alpha$ -amirina mostrou também uma melhora, porém através de mecanismos mais tardios, o que pode significar uma influência do triterpeno  $\alpha$ -amirina no mecanismo de ação do lupeol, uma vez que a  $\alpha$ -amirina se mostrou ser bem menos ativa.

Neste sentido, os estudos teóricos estabeleceram uma relação entre estrutura química e atividade biológica, uma vez que através dos cálculos de contribuições atômicas para formação dos orbitais moleculares para os dois triterpenos foi possível verificar a importância do sistema  $\pi$  no mecanismo de ação do lupeol, uma vez que tal sistema se encontra mais disponível na estrutura para interação com o sítio ativo.

Em relação aos testes tripanocidas, o sesquiterpeno ácido 2,8-dihidroxi-8,11,11-trimetil-12-oxabicyclo[7.2.1]dode-4-en-4-óico mostrou significativa atividade, embora menor que a atividade apresentada pelo controle. No entanto, uma baixa solubilidade deste composto no meio de cultura utilizado para o ensaio pode ter ocasionado essa baixa atividade.

### III. Dos Estudos com radiação gama

Os estudos com radiação gama indicaram até o momento que os triterpenos  $\alpha$ -amirina, *OAc*- $\alpha$ -amirina e lupeol submetidos à radiação não sofreram alteração significativa detectável por RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ .

A mesma análise pode ser feita com o extrato flavanoídico submetido à radiação, uma vez que não houve formação de produto radiolítico na dose de 3,0 kGy. No entanto, as substâncias em maior concentração neste extrato apresentaram diminuição de concentração, mostrando que esta dose degrada os compostos fenólicos deste extrato.

O estudo com radiação do material vegetal para posterior extração dos óleos essenciais mostrou que a radiação promove alteração nas membranas das células, observada através do aumento da massa dos óleos essenciais obtidos após a radiação do material vegetal. Este estudo mostrou também que a proporção relativa dos compostos não é alterada de forma dose-dependente.

#### IV. Considerações finais

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

Como resultado do estudo fitoquímico e biológico de *L. pinaster*, foram publicados quatro artigos científicos em revistas especializadas: (i) Evaluation of the bactericidal and trypanocidal activities of triterpenes isolated from the leaves, stems, and flowers of *Lychnophora pinaster* Mart., *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 21 (4), 2011; (ii) Constituintes químicos do cerne de *Brosimum potabile* (Moraceae), *Acta Amazônica*, vol. 40 (4), 2010; (iii) Structural identification of aristolochic acids and aristolactams by correlations between calculated carbon chemical shifts and  $^{13}\text{C}$  NMR data, *Structural Chemistry*, v. 23, 2012; (iv) Pentacyclic triterpenes and steroids isolated from the stem bark of *Sacoglottis uchi* Hube, aceito para publicação na *Acta Amazônica*. (Anexo III)

Dois artigos foram submetidos a revistas especializadas: (i) Anti-inflammatory effects in muscle injury by transdermal application of gel with *Lychnophora pinaster* aerial part using phonophoresis in rats, *BMC Complementary and Alternative Medicine*; (ii) Anti-inflammatory activity of a new glycosylated luteolin derivative isolated from leaves of *Justicia acuminatissima* (Acanthaceae), *Journal of Medicinal Chemistry*: (Anexo IV)

Um capítulo de livro foi publicado: (i) Relationships between chemical structure and bactericidal activity of pentacyclic triterpenes presenting six-membered rings against Gram-negative bacteria, em *Antibacterial Agents / Book 2*, ISBN 979-953-307-747-4 (Anexo V).

Foram apresentados também seis trabalhos em eventos científicos: (i) Estudo biológico das partes aéreas de *L. pinaster*, apresentado na 33ª Reunião Annual da Sociedade

Brasileira de Química, Águas de Lindóia, São Paulo, no período de 28-31/05/2010; (ii) Constituintes químicos isolados do caule de *Brosimum potabile*, apresentado na 33ª Reunião Annual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, São Paulo, no período de 28-31/05/2010; (iii) Estudos teóricos relacionados à atividade tripanocida de triterpenos e esteróides isolados de *Lychnophora pinaster* apresentado no 2º Simpósio Íbero-Americano de Química Orgânica, Santiago de Compostela, Espanha, no período de 7-12/09/2010; (iv) Avaliação da atividade antioxidante de extratos e substâncias isoladas de *Lychnophora pinaster* Mart. apresentado no XX Simpósio de Plantas Mediciniais, João Pessoa, Paraíba, no período de 14-17/09/2010; (v) Estudos Teóricos Relacionados à Atividade Tripanocida de Triterpenos e Esteroides Isolados de *Lychnophora pinaster* Mart. (Asteraceae) apresentado XXIV Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, Viçosa, Minas Gerais, no período de 30-01/11/2010; (vi) Avaliação da atividade anti-inflamatória de triterpenos isolados de *Lychnophora pinaster* apresentado no XXV Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, Lavras, Minas Gerais, no período de 12-14/11/2011. (Anexo VI).





## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Gao, T.; Yao, H.; Song, H.; Zhu, Y.; Liu, C.; Chen, S. *BMC Evol Biol.* **2010**, *10*, 324.
2. Verdi, L.G.; Brighente, I. M. C.; Pizzolatti, M. G. *Quím. Nova.* **2005**, *1*, 28.
3. Heywood, V. H. *Flowering plants of the world*, Oxford University Press: New York, **1993**.
4. Joly, A. B. *Botânica: introdução a taxonomia vegetal*, 7<sup>a</sup> ed., Cia Editora Nacional: São Paulo, **1967**.
5. Zomlefer, W. B.; *Guide to flowering plant families*, Chapel Hill & London: Carolina, USA, **1994**.
6. Emerenciano, V. P.; Militão, J. S. L. T.; Campos, C. C.; Romofe, P.; Kaplan, M. A. C.; Zambon, M.; Brant, A. J. C. *Biochem. Syst. Ecol.* **2001**, *29*, 947.
7. Robinson H. Generic and sub-tribal classification of American Vernoniaeae. *Smiths. Contrib. Bot.* **1999**, *89*, 11.
8. Mansanares, M. E.; Forni-Martins, E. R.; Semir, J. *Caryologia.* **2002**, *55*, 367.
9. Semir, J. Revisão taxonômica de *Lychnophora* Mart. (Vernoniaeae: Compositae). Tese de Doutorado. UNICAMP, SP. **1991**. 305 p.
10. Borsato, M. L. C.; Graef, C. F. F.; Souza, G. E. P.; Lopes, N. P. *Phytochem.* **2000**, *55*.
11. Merten, J.; Hennig, A.; Schwab, P.; Frohlich, R.; Tokalov, S. V.; Gutzeit, H.O.; Metz, P. *Eur J. Org. Chem.* **2006**, *5*.
12. Saúde, D. A.; Barrero, A. F.; Oltra, J. E.; Justicia, J.; Raslan, D. S.; Silva, E. A. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2002**, *12*.
13. Ferraz Filha, Z. S.; Vitolo, I. F.; Fietto, L. G.; Lombardi, J. A.; Saúde-Guimarães, D. *A. J. Ethnopharmacol.* **2006**, *107*.
14. Taleb-Contini, S. H.; Santos, W. F.; Mortari, M. R.; Lopes, N. P.; Lopes, J. L. C. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2008**, *102*.

15. Graef, C. F. F.; Albuquerque, S.; Lopes, J. L. C. *Fitoterapia*. **2004**, 76.
16. Santos, M. D.; Gobbo-Neto, L.; Albarella, L.; Souza, G. E. P.; Lopes, N. P. J. *Ethnopharmacol.* **2005**, 96.
17. Takeara, R.; Albuquerque, S.; Lopes, N. P.; Lopes, J. L. C. *Phytomed.* **2003**, 10.
18. Santos, C. A. M. *Plantas medicinais (Herbarium, flora et scientia)*. 2ed. Cone: São Paulo, **1988**.
19. Maciel, R. L.; Moreira-Campos, L. M.; Silva, B. C.; Brandão, M. G. L. *Rev. Bras. Farmacog.* **2006**, 16, 1.
20. <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 19/05/2013.
21. Melo, L. Q.; Ciampi, A. Y.; Vieira, R. F. *Acta Bot. Bras.* **2009**, 23, 1.
22. Mendonça, M. P.; Luis, L. V. Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais. Fundação Biodiversas – Fundação Zoo-botânica de Belo Horizonte: Belo Horizonte, **2000**.
23. <http://www.biobiversitas.org.br/mg-especies-ameacadas-pdf>. Acesso em 21/01/13.
24. Melo, P. R. B.; Oliveira, J. A.; Pinto, J. E. B. P.; Castro, E. M.; Vieira, A. R.; Evangelista, J. R. E. *Ciênc. Agrotec. Lavras.* **2007**, 31, 1.
25. Cronquist, A. An integrated system of classification of flowering plants: *The New York botanical garden*. New York: Columbia University, **1981**.
26. Silveira, D.; Wagner, H.; Chiari, E.; Lombardi, J. A.; Assunção, A. C.; Raslan, D. S. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2005**, 15, 4.
27. Rodrigues, V. E. G.; Carvalho, D. A. *Ciênc. Agrotec. Lavras.* **2001**, 1, 25.
28. Souza, A. V. Propagação *in vitro* e aspectos anatômicos de arnica (*Lychnophora pinaster*) Mart. Dissertação de Mestrado. UFLA, MG. **2003**. 127p.

29. Abreu, V. G. C.; Takahashi, J. A.; Duarte, L. P.; Piló-Veloso, D.; Junior, P. A. S.; Alves, R. O.; Romanha, A. J.; Alcântara, A. F. C. *Rev Bras Farmacog.* **2011**, *21*, 3.
30. Júnior, A. C. O.; Faquin, V.; Pinto, J. E. B. P.; Sobrinho, R. R. L.; Bertolucci, S. K. *V. Hortic. Bras.* **2005**, *23*, 3.
31. Alcântara, A. F. C.; Silveira, D.; Chiari, E.; Oliveira, A. B.; Guimarães, J. E.; Raslan, D. S. *Ecl. Quim.* **2005**, *30*, 37.
32. Haber, L. L. Caracterização da diversidade genética via marcador microssatélite, e constituintes do óleo essencial de *Lychnophora pinaster* Mart. Tese de Doutorado. UNESP, SP. **2008**. 138p.
33. Leite, A. C.; Ambrozin, A. R. P.; Fernandes, J. B.; Vieira P. C.; Silva M. F. G. F.; Albuquerque, S. *Planta Med.* **2008**, 74.
34. Dias, M. O.; Lidilhone, H.; Pinto, A. C. *Quim. Nova.* **2011**, *4*, 34.
35. Fournet, A.; Angelo, A.; Muñoz, V.; Roblot, F.; Hocquemiller, R.; Cavé, A. J. *Ethnopharmacol.* **1992**, 37.
36. Kinghorn, A. D.; Balunas, M. J. *Life science.* **2005**, 78.
37. Newman, D. J.; Gragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2007**, 70.
38. Phillipson, J. D. *Phytochem.* **2007**, 68.
39. Salituro, G. M.; Dufresne, C. *Natural Products Isolation*, Humana Press: Totowa, NJ. **1998**.
40. Mahato, S. B., Kundu, A. P. *Phytochem.* **1994**, *37*, 6.
41. Miranda, R. R. S. Estudo fitoquímico e avaliação do potencial farmacológico de *Maytenus salicifolia* Reissek. Tese de Doutorado. UFMG, MG. **2007**. 351p.
42. Olea, R. S. G.; Roque, N. F. *Quím. Nova.* **1990**, *13*, 4.
43. Gallo, M. B. C.; Sarachine, M. J. *Int. J. Biom. Pharm. Sci.* **2009**, *1*, 3.

- 
44. M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, J.A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K.N. Kudin, J.C. Burant, J.M. Millam, S.S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Oyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J.E. Knox, H.P. Hratchian, J.B. Cross, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, P.Y. Ayala, K. Morokuma, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, V.G. Zakrzewski, S. Dapprich, A.D. Daniels, M.C. Strain, O. Farkas, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, Q. Cui, A.G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, C. Gonzalez, J.A. Pople, Gaussian 09, Revision B.04, Gaussian Inc.: Pittsburgh PA, **2009**.
45. Jacquemin, D.; Femenias, A.; Chermette, H.; Ciofini, I.; Adamo, C.; André, J. M.; Perpète, E. A. *J. Phys. Chem. A* **2006**, 110.
46. Chatterjee, S.; Sharma, P. S. *Radiat. Phys. Chem.* **2012**, 81.
47. Caillet, S.; Ursachi, L.; Shareck, F.; Lacroix, M. *J. Food. Sci.* **2009**, 74.
48. Hanis, T.; Mnukova, J.; Jelen, P.; Klir, P.; Perez, B.; Pesel, M. *Cereal Chem.* **1988**, 65.
49. Aziz, H. H.; Moussa, L. A. A. *Food Control.* **2002**, 13.
50. Byun, M. W.; Yook, H. S.; Kim, K. S.; Chung, C. K. *Radiat. Phys. Chem.* 1999, 54.
51. Silva, T. M.; Dias, M. D.; Pereira, M. T.; Takahashi, J. A.; Ferraz, V. P.; Piló-Veloso, D.; Alcântara, A. F. C. *Radiat. Phys. Chem.* 2012, 107.

52. Abe, L. T.; Da Mota, R. V.; Lajolo, F. M.; Genovese, M. I. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2007, 27, 2.
53. Gyawali, R.; Seo, H. Y.; Lee, H. J.; Song, H. P.; Kim, D. H.; Byun, M. W.; Kim, K. *S. Radiat. Phys. Chem.* 2006, 75.
54. Medana, C.; Carbone, F.; Aigotti, R.; Appendino, G.; Baiocchi, C. *Phytochem. Anal.* 2008, 19.
55. Gardana, C.; Scaglianti, M.; Pietta, P.; Simonetti, P. *J. Pharm. Biom. Anal.* 2007, 45.
56. Chirinos, R.; Betalleluz-Pallardel, I.; Huamán, A.; Arbizu, C. *Food Chem.* 2009, 113.
57. Harborne, J. B.; Mabry, T. J.; Mabry, H. *The Flavonoids*. USA. University of Texas, Austin. 1975.
58. Alves, C. Q. Estudo químico e avaliação biológica de duas espécies de leguminosae: *Dioclea virgata* e *Cenostigma macrophyllum*. Tese de Doutorado. UFBA, BA. 2012. 212p.
59. Martins, L. R. R.; Cortez, L. E. R.; Dias-Filho, B. P.; Nakamura, C. V.; Ferreira, A. G.; Cortez, D. A. G. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2006, 4, 16.
60. Souza, S. A. Estudo químico e avaliação da atividade antioxidante da geoprópolis da abelha sem ferrão Jandaira (*Melipona subnitida* Ducke). Dissertação de Mestrado. UFRPE, PE. 2012. 112p.
61. Oliveira, A. C. J.; Faquim, V.; Pinto, J. E. B. P.; Lima, S. R. R.; Bertolucci, S. K. V. *Hort. Bras.* 2005, 3, 23.
62. Perrucci, S.; Macchioni, G.; Cioni, P. L.; Famini, G.; Morelli, I. *J. Nat. Prod.* 1995, 58.
63. Haddad, M.; Herent, M. F.; Tilquin, B. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55.

64. Norberg, A. N.; Serra-Freire, N. M. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 1993, 35, 6.
65. Lima, K. S. C.; Souza, L. B.; Godoy, R. L. O.; França, T. C. C.; Lima, A. L. S. *Radiat. Phys. Chem.* **2011**, 80.
66. Visentainer, J. V.; Franco, M. R. B. Ácidos graxos em óleos e gorduras: Identificação e Quantificação. Tese de Doutorado. UFG, GO. **2006**. 117p.
67. Cotran, R. S.; Kumar, V.; Collins, T. (Trad. Barbosa, J. B.; De Vasconcelos, M. M.; Voeux, P. J.); Robbins – Patologia Estrutural e Funcional, 6<sup>a</sup> ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, **2000**.
68. Nathan, C. *Nature*. **2002**, 26, 420.
69. Rao, T. S.; Currie, J. L.; Shaffer, A. F.; Isakson, P. C. *Inflammation*. **1993**, 17, 6.
70. Crisco, J. J. *Am. J. Sports Med.* **1994**, 22, 5.
71. Tidball, J. G. *Med. Sci. Sports Exerc.* **1995**, 21.
72. Nonato, F. R.; Nogueira, T. M. O.; Barros, T. A. A.; Lucchese, A. M.; Oliveira, C. E. C.; Santos, R. R.; Soares, M. B. P.; Villarreal, C. F. *J. Ethnopharm.* **2010**, 46.
73. Tapiero, H.; Couvreur, P.; Tew, K. D.; *Biomed. Pharm.* **2002**, 56.
74. Dogné, J. M.; Supuran, C. T.; Pratico, D. *J. Med. Chem.* **2005**, 48.
75. Dinarello, C. A. *European J. Immun.* **2007**, 1.
76. Geiger, T.; Rordorf, C.; Cosenti-Vargas, A.; Ferrini, P.G.; Widler, L.; Glatt, M.; Vosbeck, K. *J. Rheum.* **1994**. 21.
77. Diniz, M. O.; Ferreira, L. C. S. *Estud Av.* **2010**. 70, 24.
78. Dalla Vechia, L.; Gnoatto, S. B.; Gosmann, G. *Quim. Nova.* **2009**, 32, 5.
79. Filho, S. B.; Machado, S. *Univap.* **2006**, 13, 23.
80. Fontoura, H. S.; Azevedo, R. B. *Fisiot. Brasil.* **2008**, 9.
81. Morel, C. M. *Parasit. Today.* **2000**, 16.



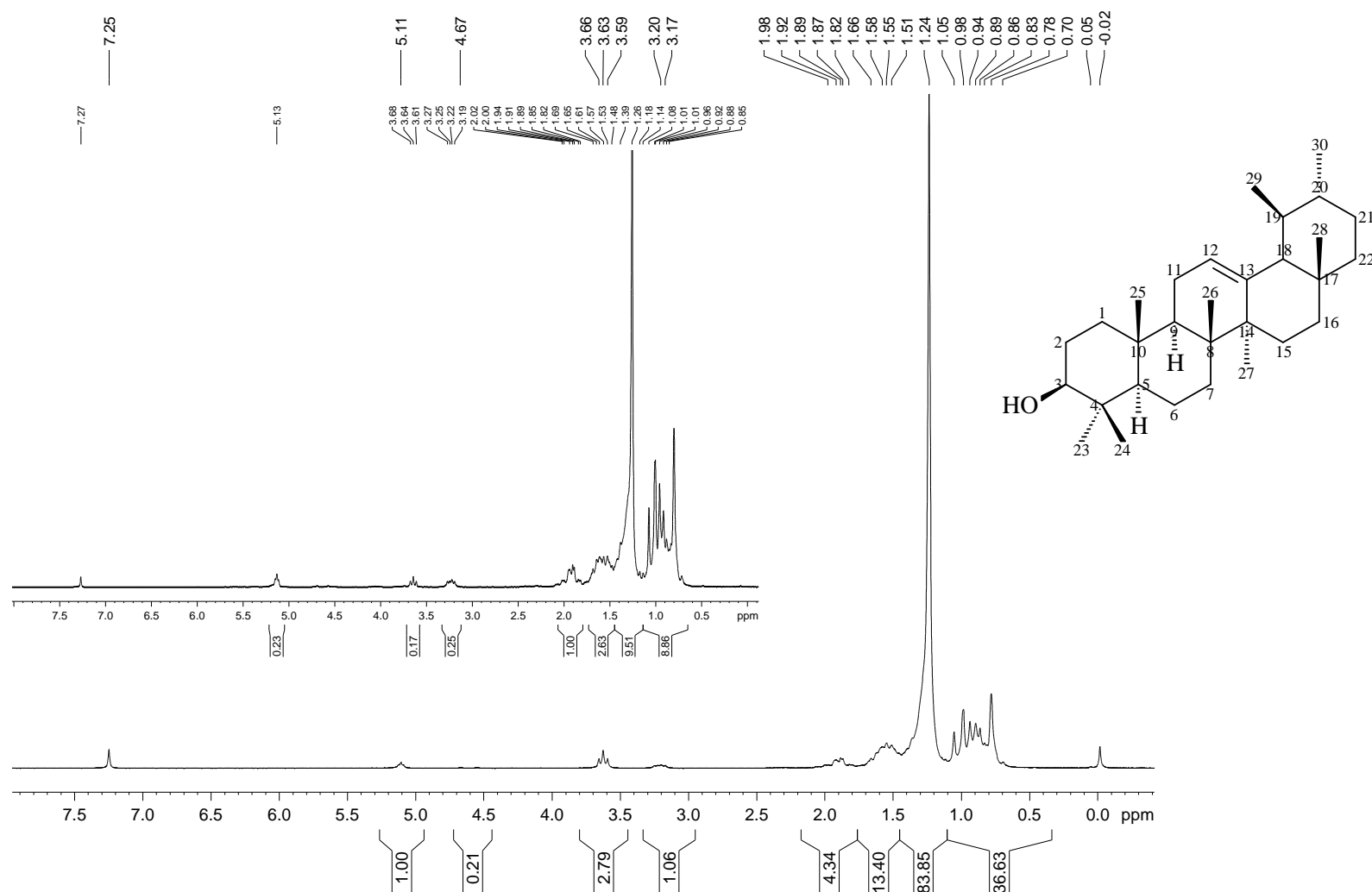
82. Cabral, M. M. O.; Barbosa-Filho, J. M.; Maia, G. L. A.; Chaves, M. C. O.; Braga, M. V.; De Souza, W.; Soares, R. O. A. *Experim. Parasit.* **2010**, 124.
83. World Health Organization; Division of Control of Tropical Diseases. 2006.
84. Higuchi, M. L. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia.* **1995**, 64.
85. Freymann, D. M.; Wenck, M. A.; Engel, J. C.; Feng, J.; Focia, P. J.; Eakin, A. E.; Craig, S. P. *Chem. Biol.* **2000**, 7.
86. Oliveira, A. B.; Saude, D. A.; Perry, K. S. P. Duarte, D. S.; Raslan, D. S.; Boaventura, M. A. D; Chiari, E. *Phytother. Res.* **1996**, 10.
87. Rahman, S. H.; Mohammad, S. *Life Sciences.* **2011**, 88.
88. Ferreira, H. O. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **1990**, 4, 23.
89. Royo, V. A. Síntese e avaliação das atividades tripanocidas e antimicrobiana de derivados de lignanas ariltetralínicas. Tese de doutorado. USP. SP. **2008**. 158 p.
90. Júnior, P. T. S.; Dall'Oglio, E. L.; Silva, L. E.; Figueiredo, U. S.; Vieira, P. C.; Machado, H. V.; Santos, L. G. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2009**, 1, 19.
91. Ambrozin, A. R. P. Estudo fitoquímico de plantas das famílias Rutaceae e Meliaceae visando o isolamento de substâncias protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos antichagásicos e antileishmanioses. Tese de Doutorado. UFSCar, SP. **2004**. 241p.
92. Buckner, F. S.; Verlinde, C. L.; La Flamme, A. C.; Van Voorhis, W. C. *Antimicrob. Ag. Chemother.* **1996**, 40.
93. Oliveira, R. B.; Vaz, A. B. M.; Alves, R. O.; Liarte, D. B.; Donnici, C.; Romanha, A. J.; Zani, C. L. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **2006**, 101.
94. Noldin, V. F.; Filho, V. C.; Monache, F. D.; Benassi, J. C.; Christmann, I. L.; Pedrosa, R. C.; Yunes, R. A. *Quím. Nova.* **2003**, 3, 26.

**ANEXO I**

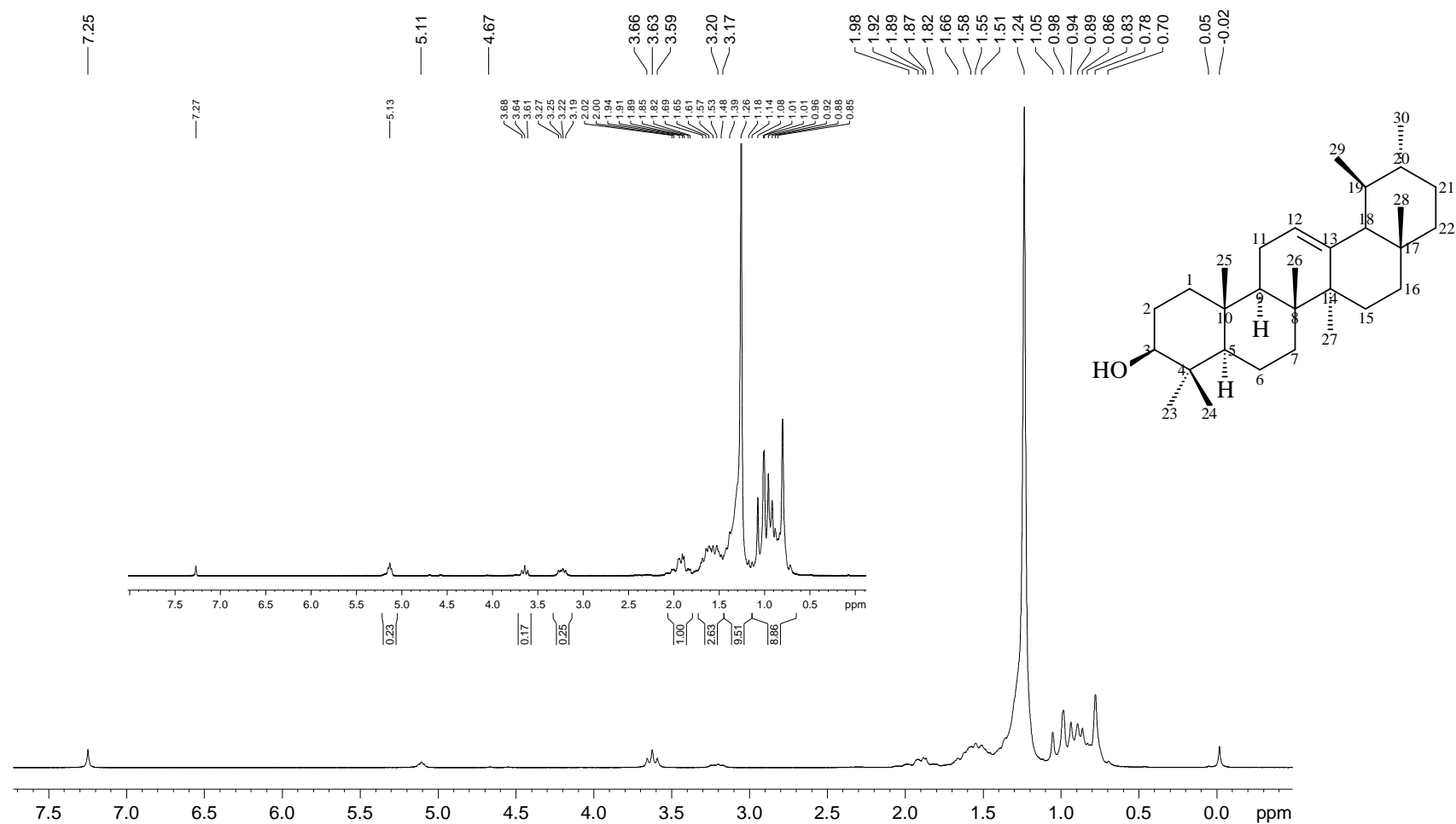
**ESPECTROS DE TRITERPENOS**

**ESTUDADOS PARA ANÁLISE DOS EFEITOS**

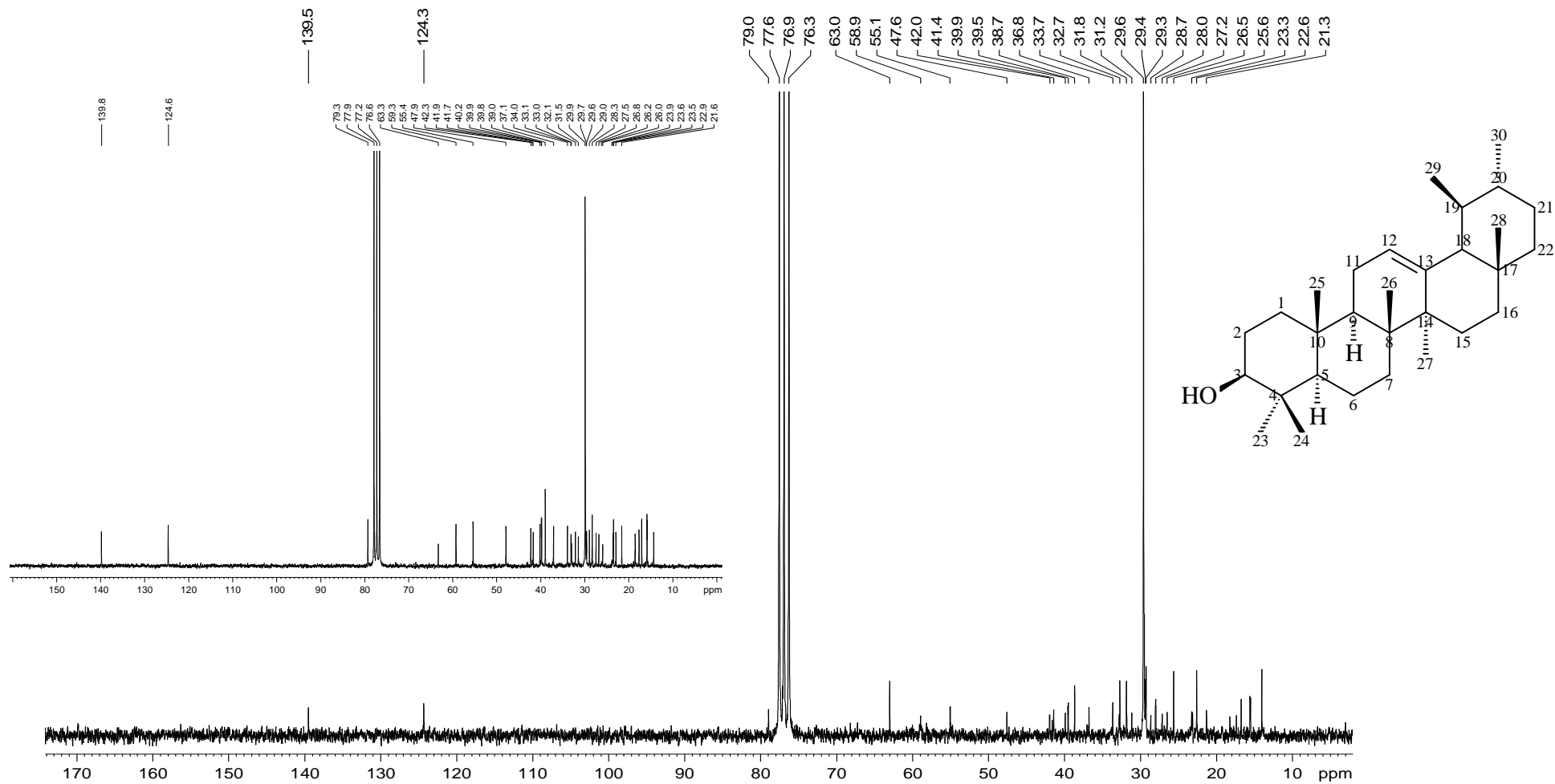
**DA RADIAÇÃO GAMA**



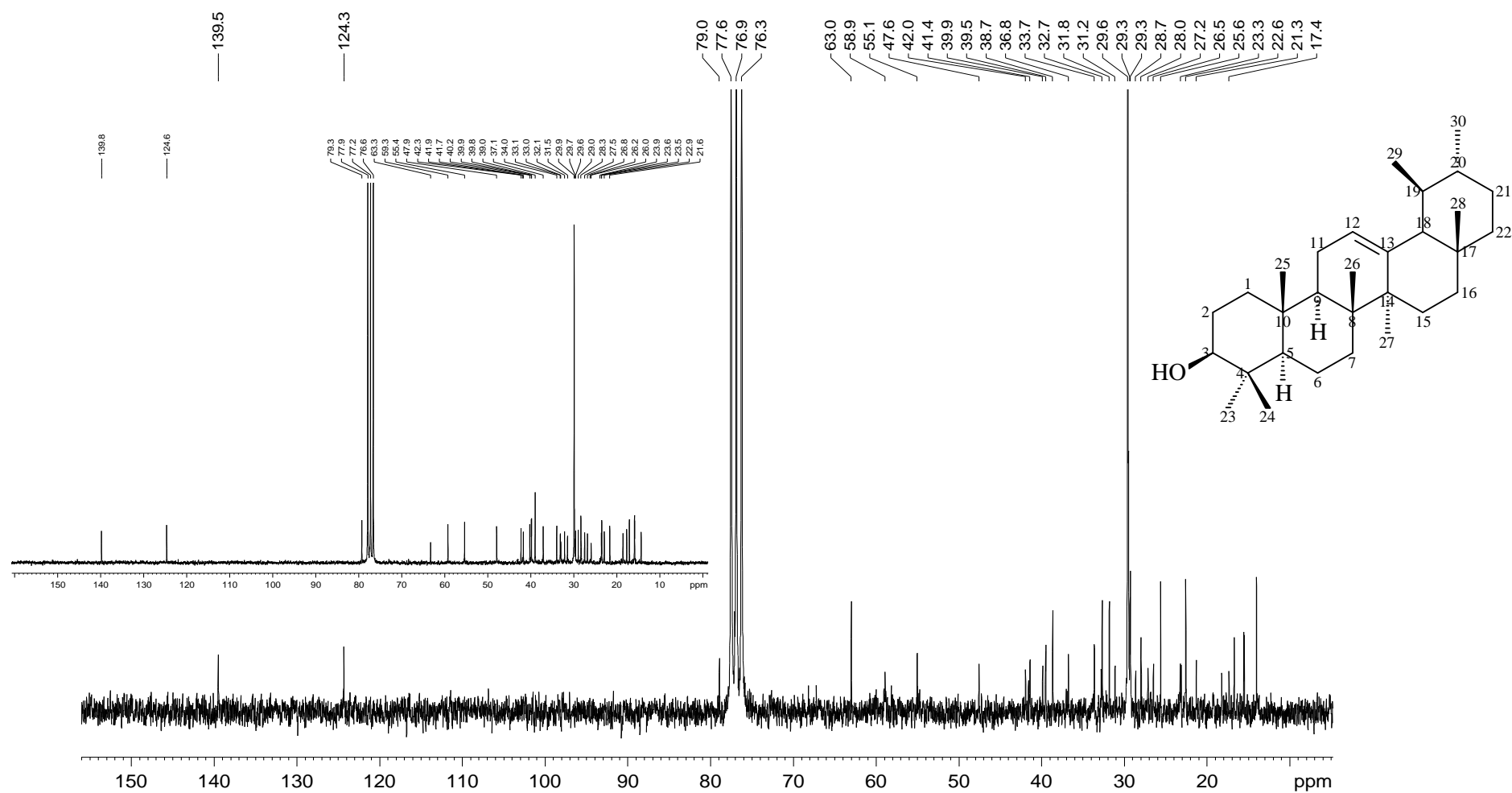
**Figura A.1.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do triterpeno  $\alpha$ -amirina irradiado com dose de 10 kGy (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) (figura maior), comparado com espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do triterpeno  $\alpha$ -amirina não irradiado (200 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) (figura menor).



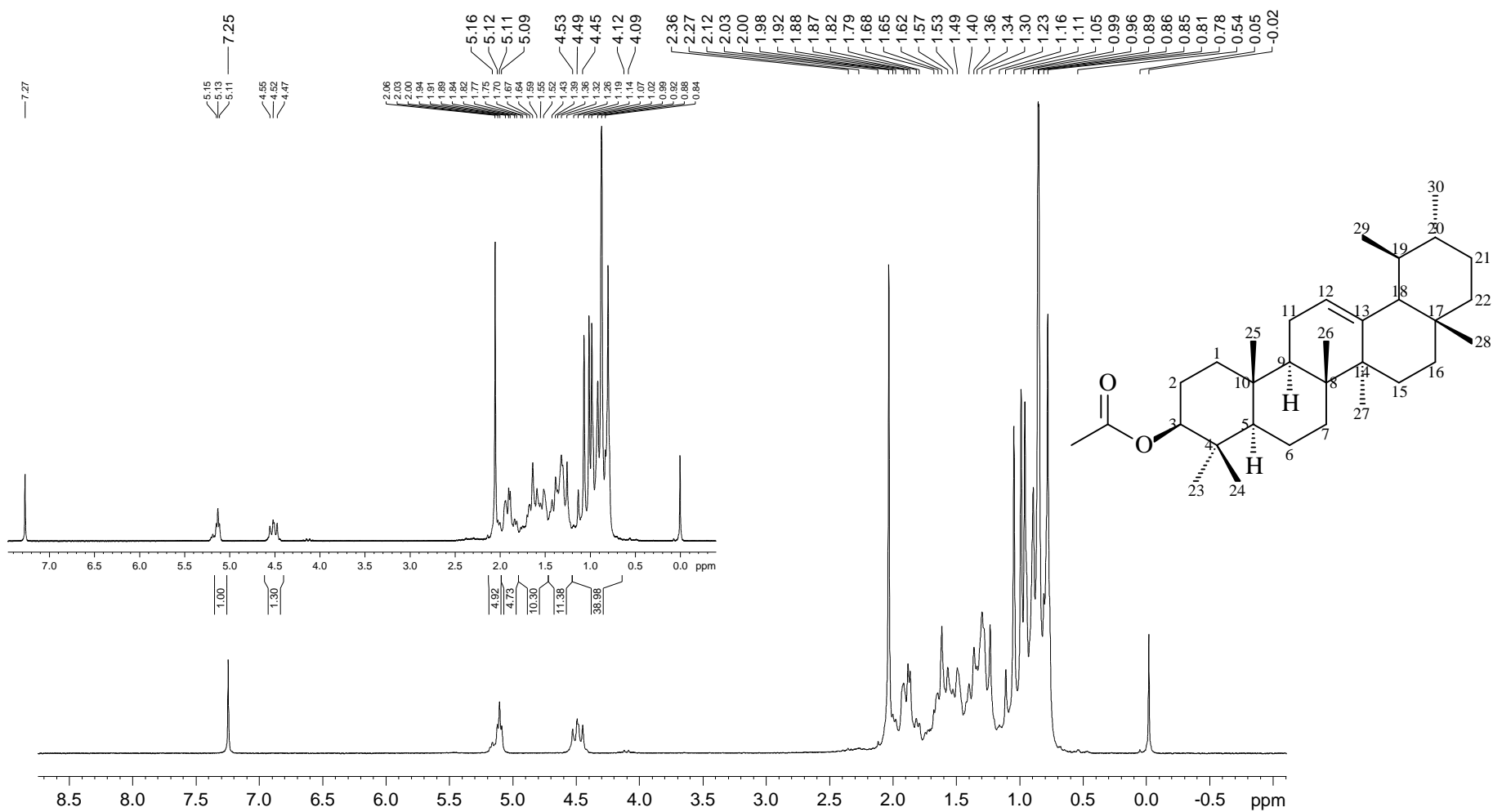
**Figura A.2.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do triterpeno  $\alpha$ -amirina irradiado com dose de 50 kGy (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) (figura maior), comparado com espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do triterpeno  $\alpha$ -amirina não irradiado (200 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) (figura menor).



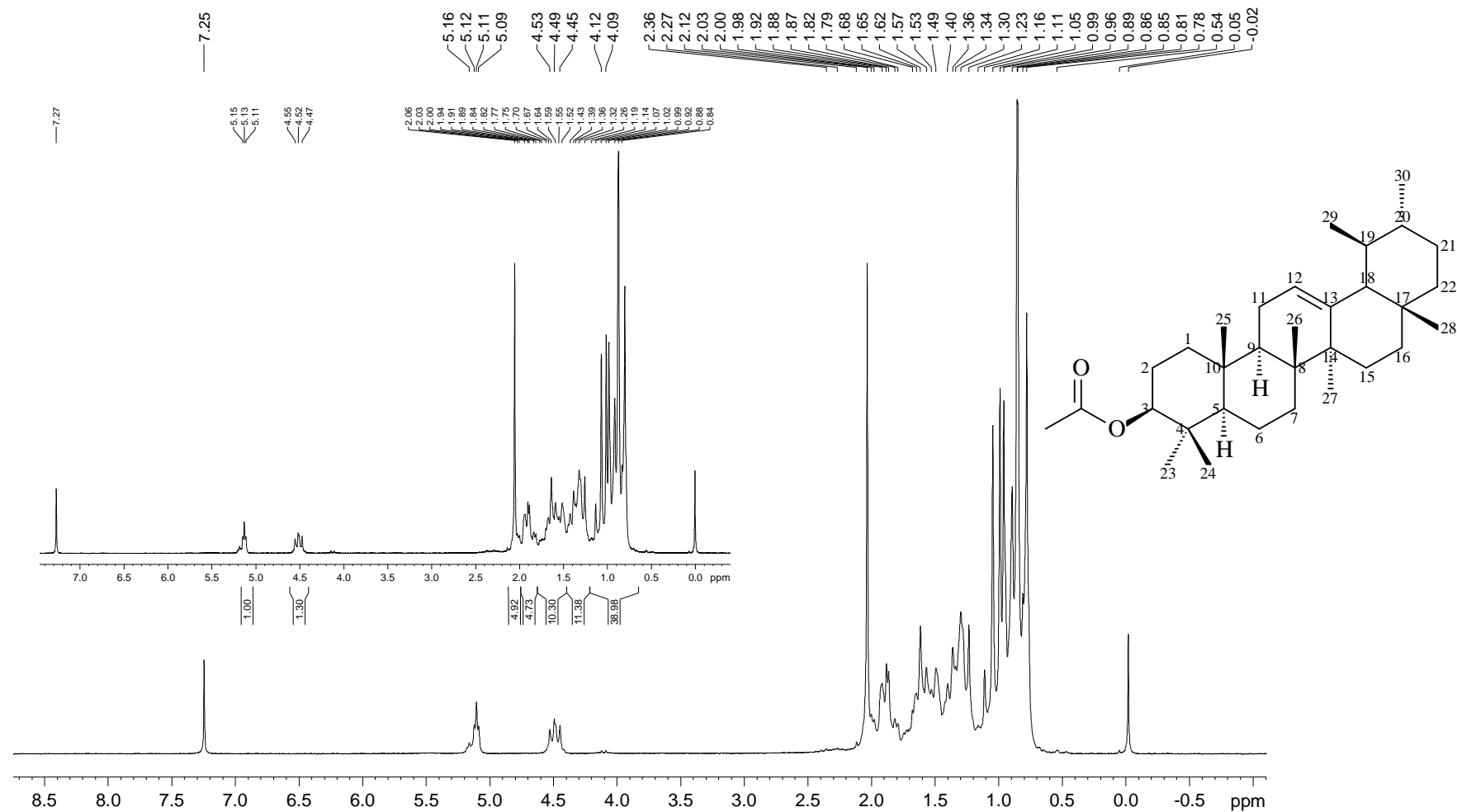
**Figura A.3.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do triterpene  $\alpha$ -amirina irradiado na dose de 10 kGy (100 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) (figura maior), comparado com espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do triterpene  $\alpha$ -amirina não irradiado (50 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) (figura menor).



**Figura A.4.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do triterpeno  $\alpha$ -amirina irradiado na dose de 50 kGy (100 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) (figura maior), comparado com espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do triterpeno  $\alpha$ -amirina não irradiado (50 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) (figura menor).

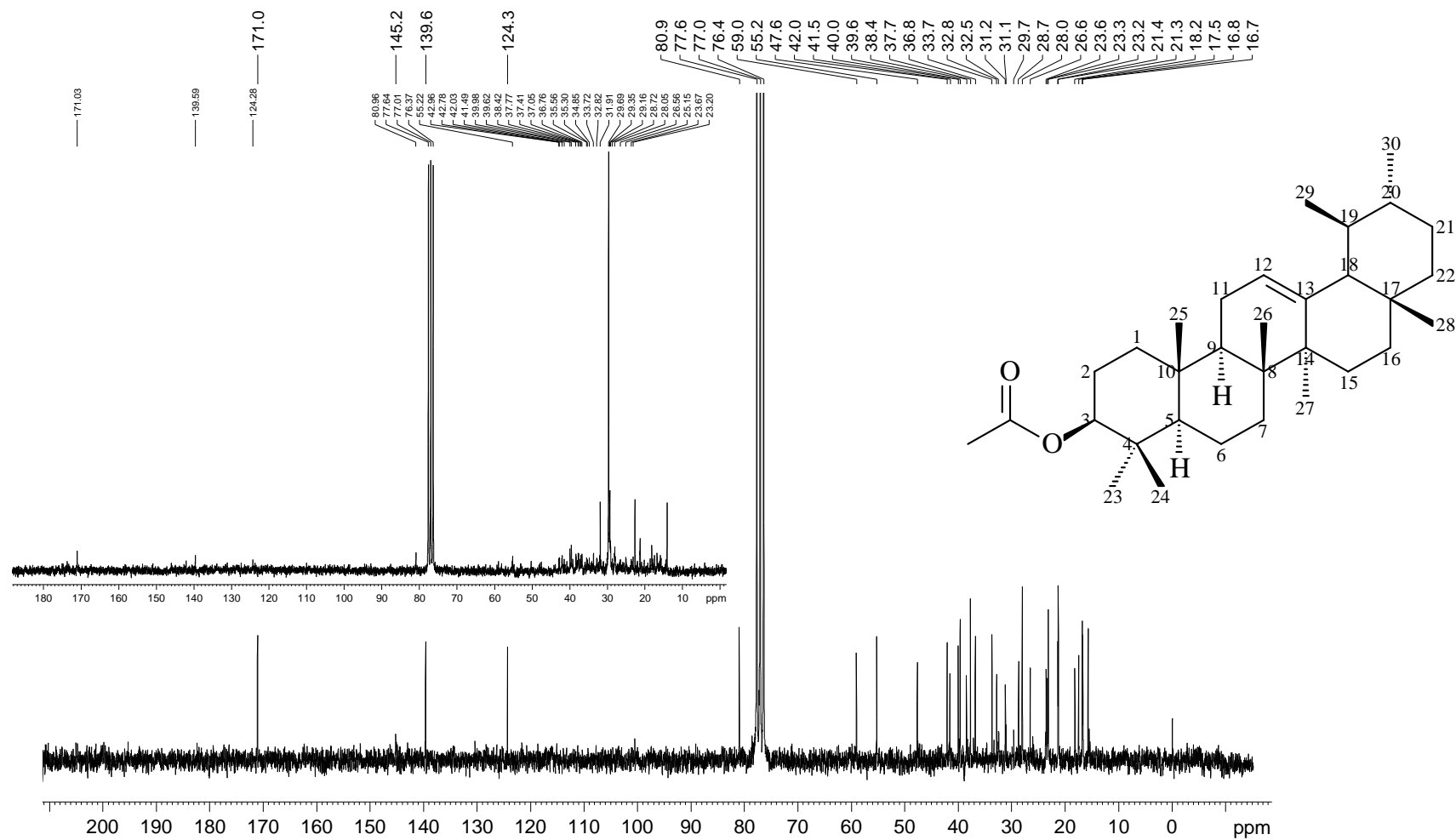


**Figura A.5.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do triterpeno 3-OAc- $\alpha$ -amirina irradiado com dose de 10 kGy (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) (figura maior), comparado com espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do triterpeno 3-OAc- $\alpha$ -amirina não irradiado (200 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) (figura menor).

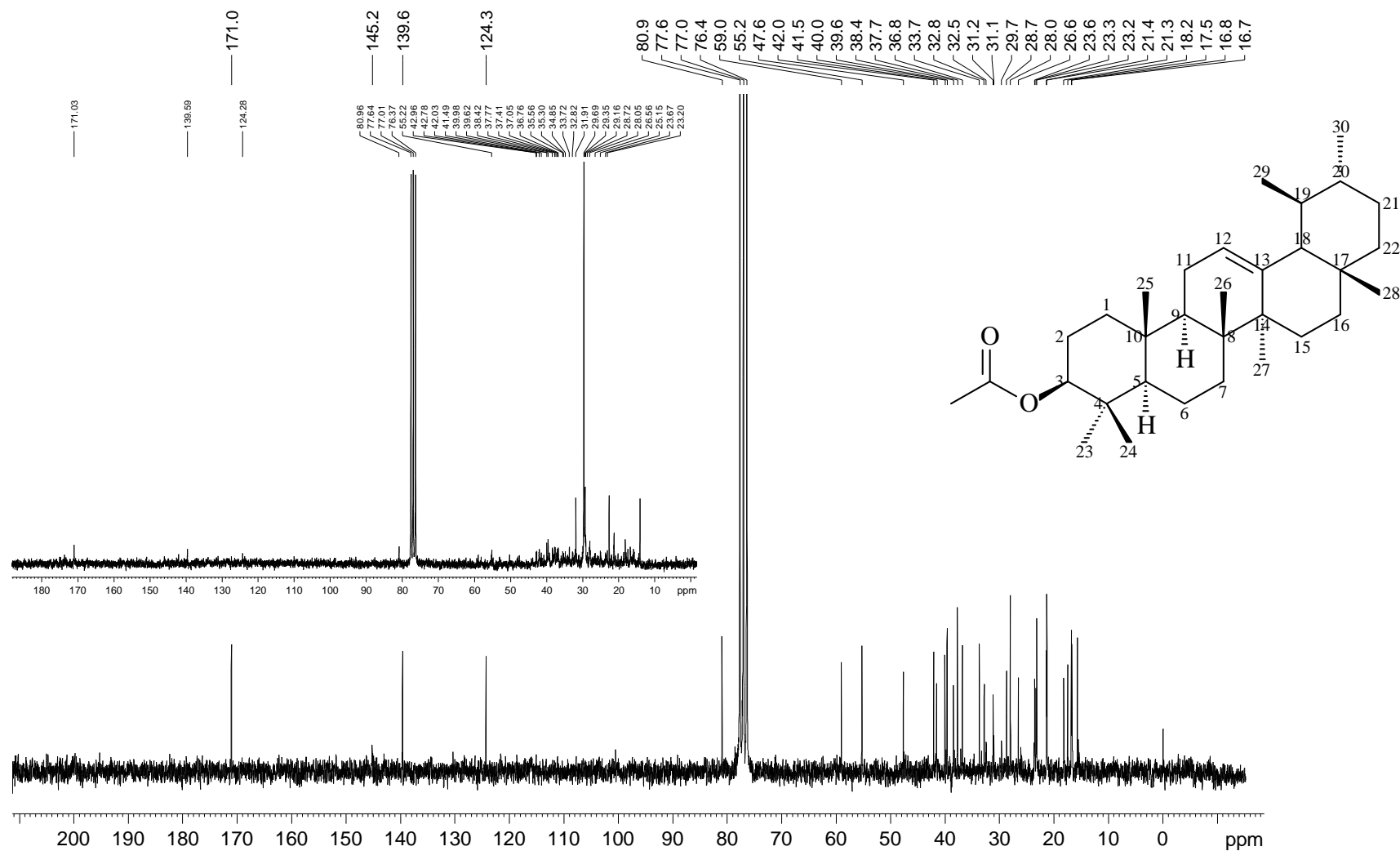


**Figura A.6.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do triterpeno 3-OAc-α-amirina irradiado com dose de 50 kGy (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>) (figura maior), comparado com espectro de RMN de <sup>1</sup>H do triterpeno 3-OAc-α-amirina não irradiado (200 MHz; CDCl<sub>3</sub>) (figura menor).

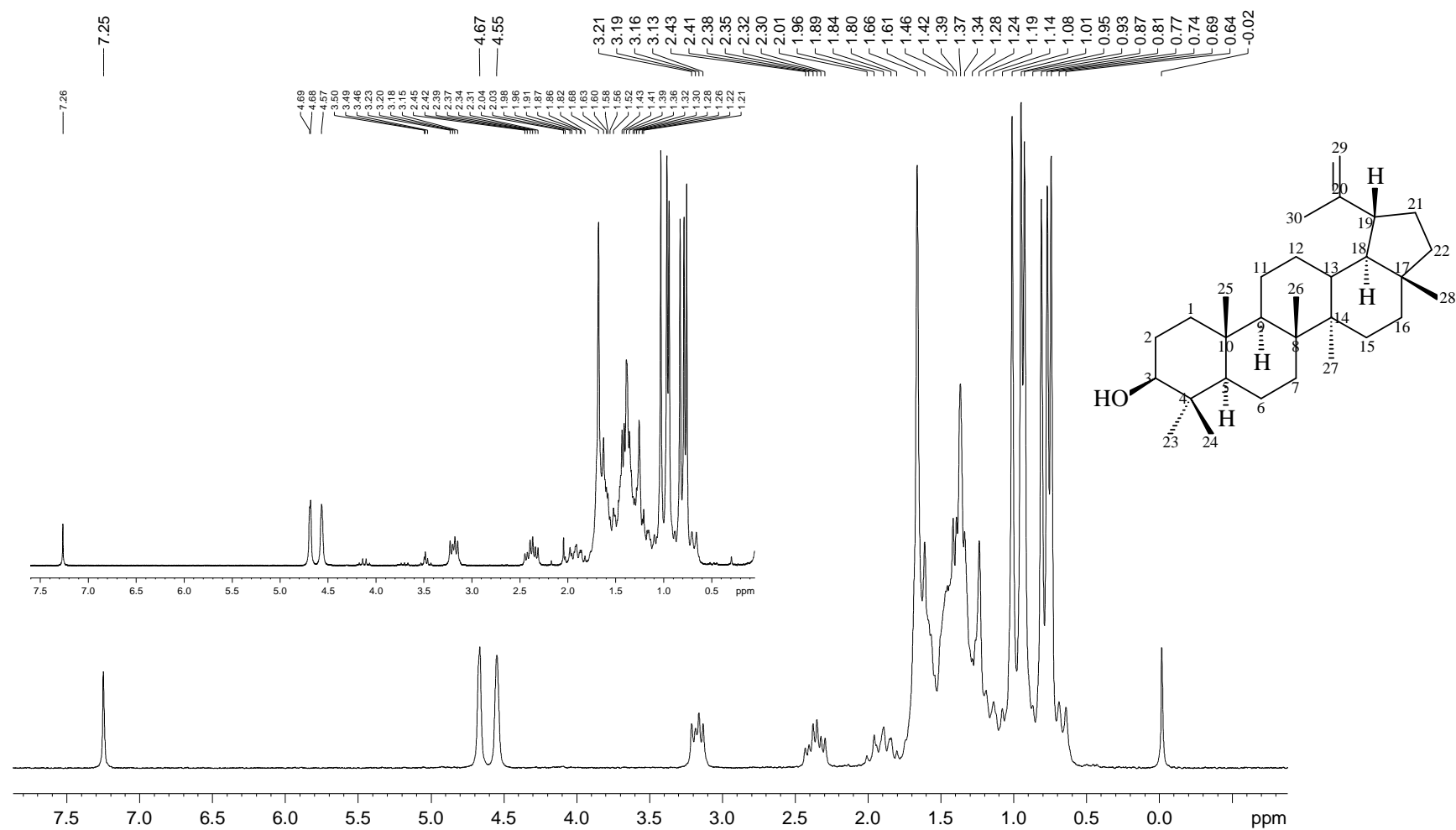




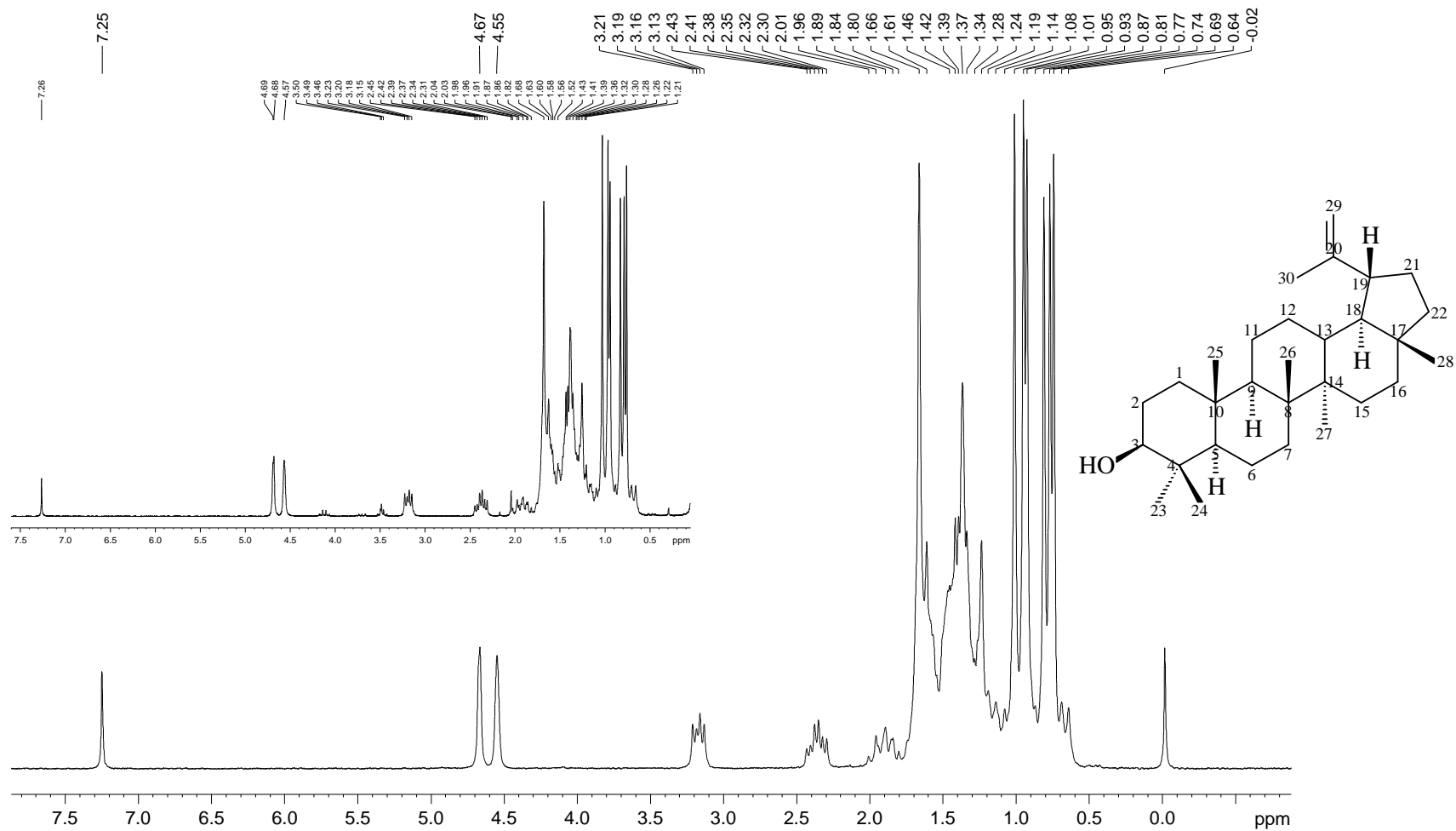
**Figura A.7.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do triterpeno 3-OAc- $\alpha$ -amirina irradiado na dose de 10 kGy (100 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) (figura maior), comparado com espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do triterpeno 3-OAc- $\alpha$ -amirina não irradiado (50 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) (figura menor).



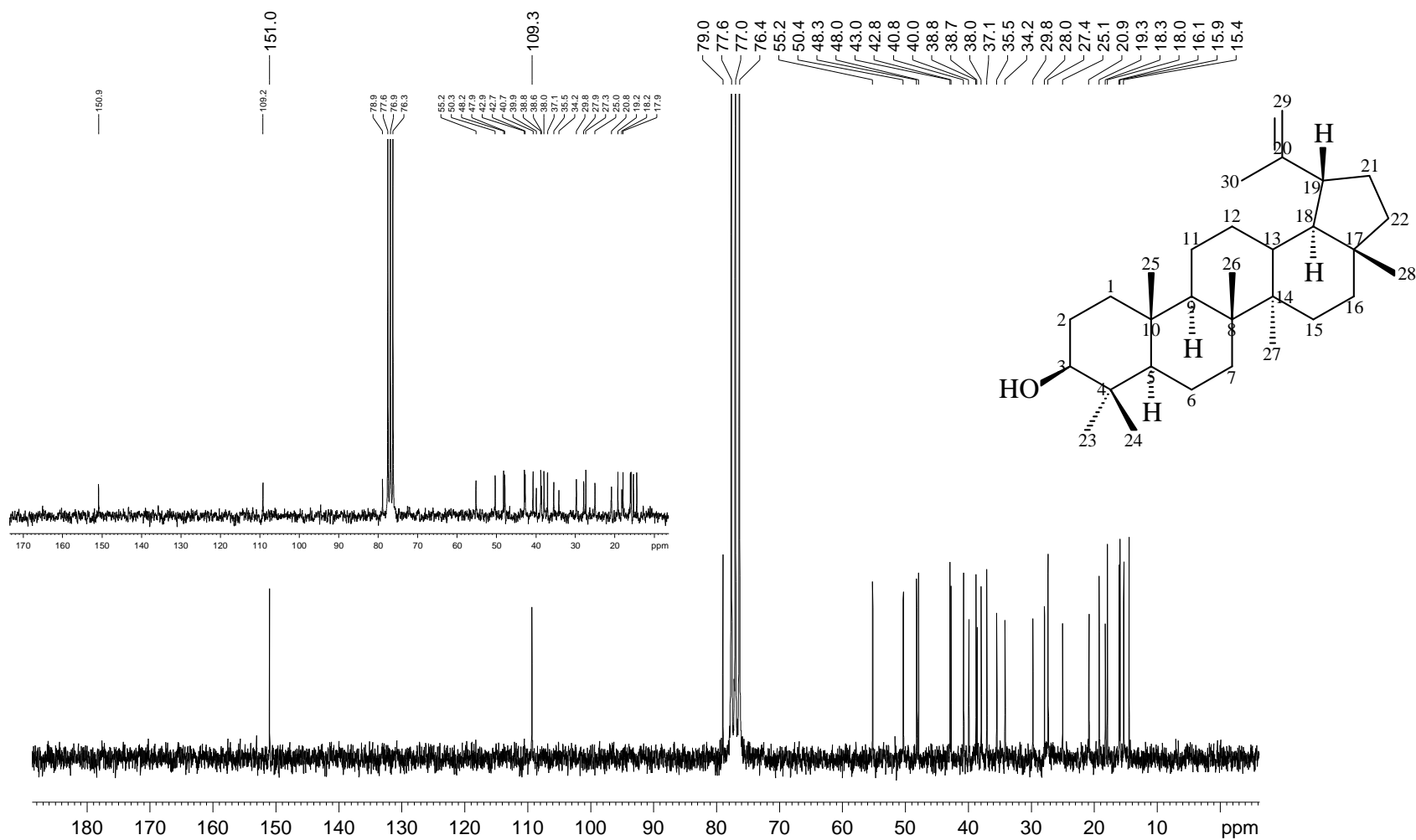
**Figura A.8.** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C do triterpeno 3-OAc-α-amirina irradiado na dose de 50 kGy (100 MHz; CDCl<sub>3</sub>) (figura maior), comparado com espectro de RMN de <sup>13</sup>C do triterpeno 3-OAc-α-amirina não irradiado (50 MHz; CDCl<sub>3</sub>) (figura menor).



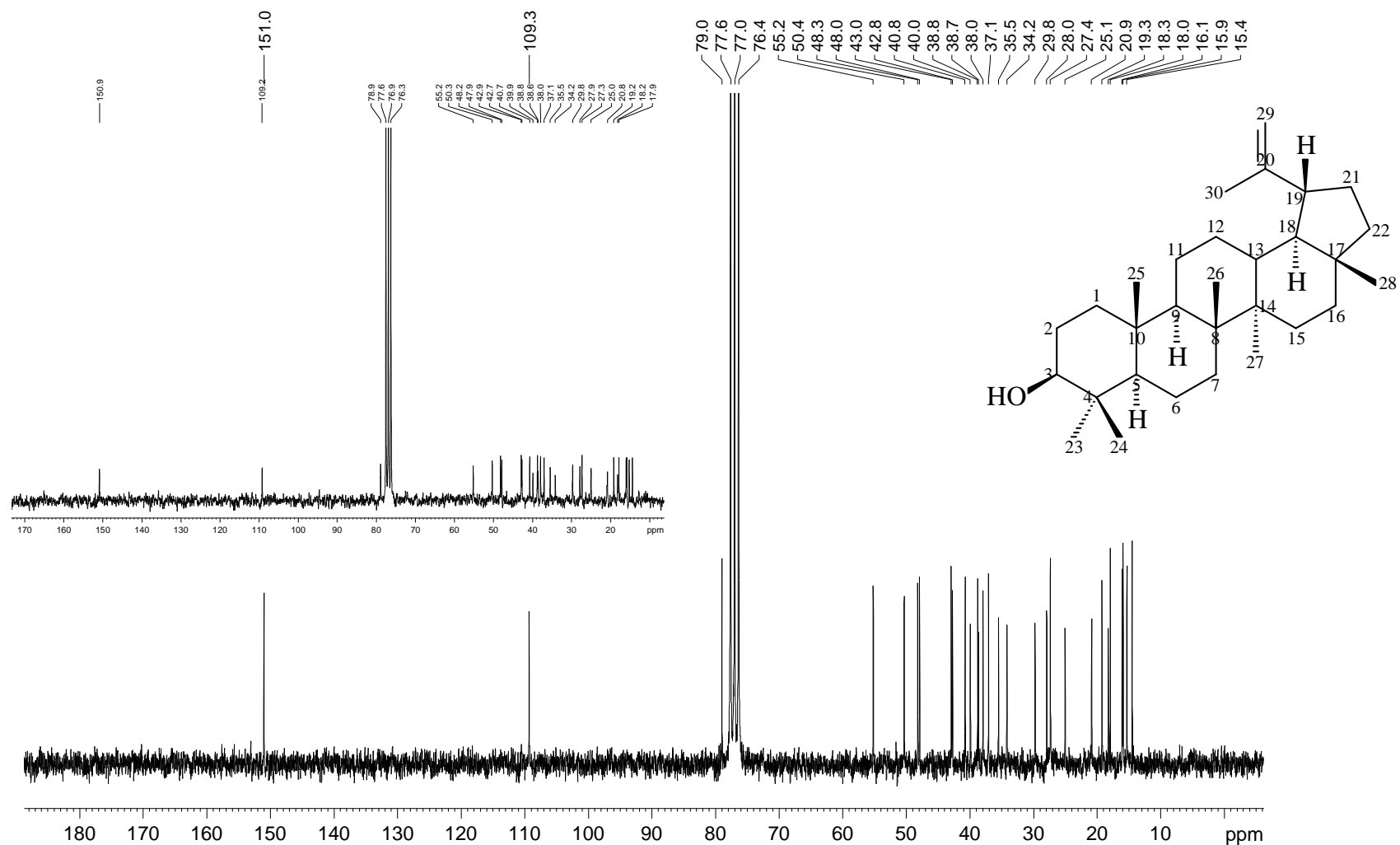
**Figura A.9.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do triterpeno lupeol irradiado com dose de 10 kGy (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) (figura maior), comparado com espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do triterpeno lupeol não irradiado (200 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) (figura menor).



**Figura A.10.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do triterpeno lupeol irradiado com dose de 50 kGy (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) (figura maior), comparado com espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do triterpeno lupeol não irradiado (200 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) (figura menor).



**Figura A.11.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do triterpeno lupeol irradiado na dose de 10 kGy (100 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) (figura maior), comparado com espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do triterpeno lupeol não irradiado (50 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) (figura menor).



**Figura A.12.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do triterpeno lupeol irradiado na dose de 50 kGy (100 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) (figura maior), comparado com espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do triterpeno lupeol não irradiado (50 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) (figura menor).

**ANEXO II**

**CROMATOGRAMAS DOS ÓLEOS**

**ESSENCIAIS OBTIDOS DE *L. pinaster***

**ESTUDADOS PARA ANÁLISE DOS EFEITOS**

**DA RADIAÇÃO GAMA**

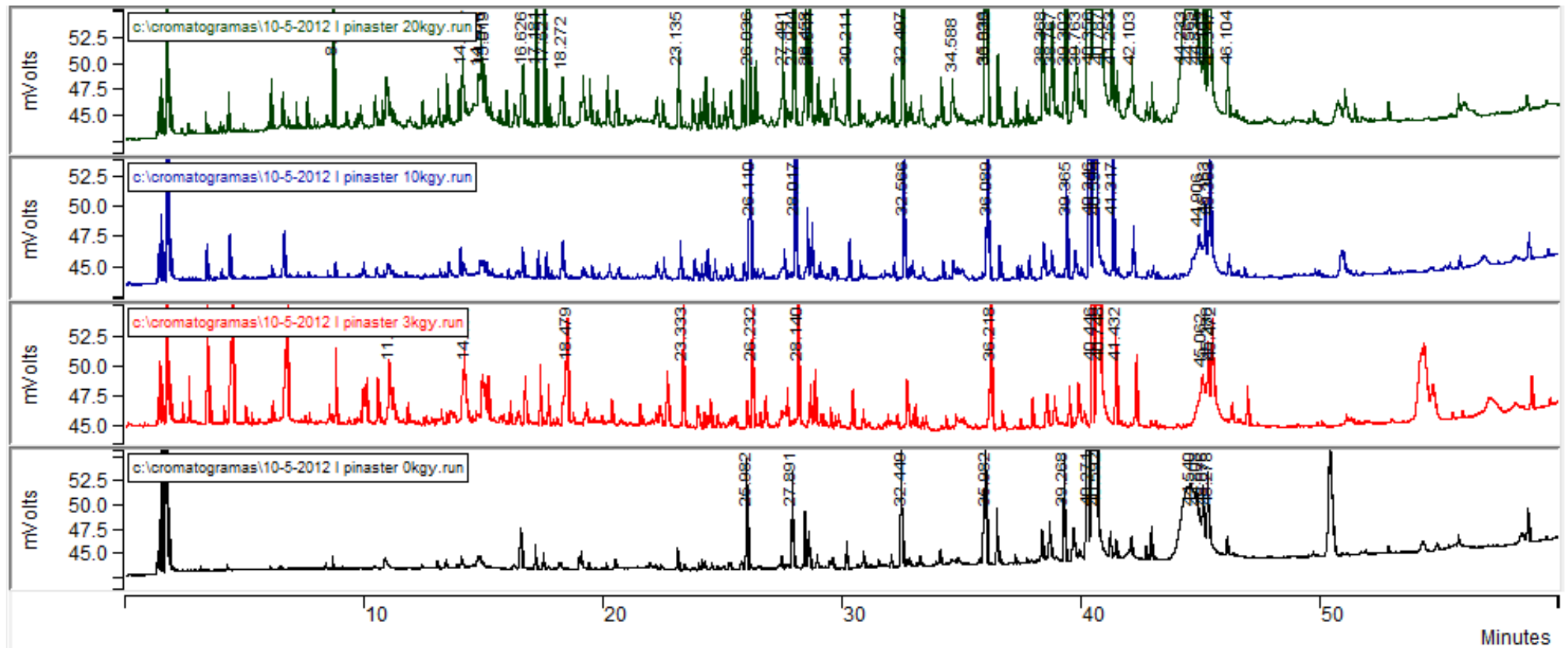


Figura A.13. Cromatogramas de CG-FID para OEA<sub>0</sub> (preto), OEA<sub>3</sub> (vermelho), OEA<sub>10</sub> (azul) e OEA<sub>20</sub> (verde).



## **ANEXO III**



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

**CERTIFICADO**

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

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

**CERTIFICATE**

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

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

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

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

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