

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

Thiago de Melo Silva

**Estudos Fitoquímicos e dos Efeitos da Radiação Gama
em *Echinodorus macrophyllus* (Chapéu-de-couro) e em
Óleos Essenciais de *Inga laurina* e *Eucalyptus grandis*
(Eucalipto).**

**Phytochemical Studies and Gamma Radiation Effects
in *Echinodorus macrophyllus* (Chapéu-de-couro) and
Essential Oils of *Inga laurina* and *Eucalyptus grandis*
(Eucalipto).**

Belo Horizonte

2014

UFMG/ICEx/DQ. 1038^a

T. 469^a

THIAGO DE MELO SILVA

Estudos Fitoquímicos e dos Efeitos da Radiação Gama em *Echinodorus macrophyllus* (Chapéu-de-couro) e em Óleos Essenciais de *Inga laurina* e *Eucalyptus grandis* (Eucalipto).

Phytochemical Studies and Gamma Radiation Effects in *Echinodorus macrophyllus* (Chapéu-de-couro) and Essential Oils of *Inga laurina* and *Eucalyptus grandis* (Eucalipto).

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

2014

UFMG

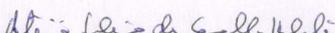
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEx
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 3409-5732
FAX: 031 - 3409-5711
E-MAIL: pgquimic@qui.ufmg.br

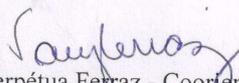


"Estudos Fitoquímicos e dos Efeitos da Radiação Gama em *Echinodorus macrophyllus* (Chapéu-de-couro) e em Óleos Essenciais de *Inga laurina* e *Eucalyptus grandis* (Eucalipto)"

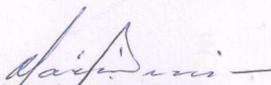
Thiago de Melo Silva

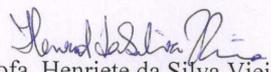
Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

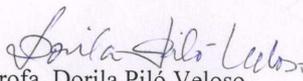

Prof. Antônio Flávio de Carvalho Alcântara - Orientador
UFMG


Prof.ª Vany Perpétua Ferraz - Coorientadora
UFMG


Prof. Antônio Jacinto Demuner
UFV


Prof. Márcio Tadeu Pereira
CNEN


Prof.ª Henriete da Silva Vieira
UFMG


Prof.ª Dorila Piló Veloso
UFMG

Belo Horizonte, 21 de agosto de 2014.

S586e Silva, Thiago de Melo
2014 Estudos fitoquímicos e dos efeitos da radiação gama em *Echinodorus macrophyllus* (chapéu-de-couro) e em óleos essenciais de *Inga laurina* e *Eucalyptus grandis* (eucalipto) [manuscrito] / Thiago de Melo Silva. 2014. [xv], 155 f. : il.

Orientador: Antônio Flávio de Carvalho Alcântara.

Coorientadora: Vâny Perpétua Ferraz.

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

1. Química orgânica - Teses 2. *Eucalyptus grandis* - Teses 3. *Echinodorus* - Teses 4. Plantas - Efeito dos raios gama - Teses 5. Flavonóides - Teses 6. Ingá (Botânica) - Teses I. Alcântara, Antônio Flávio de Carvalho, Orientador II. Ferraz, Vâny Perpétua, Coorientadora III. Título.

CDU 043

DEDICATÓRIA

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

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

Aos meus orientadores Dr. Antônio Flávio Carvalho de Alcântara e Dra. Vany Perpétua Ferraz.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

(Albert Einstein)

“Alguns homens vêem as coisas como são, e dizem ‘Por quê?’ Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo ‘Por que não?’”

(Geroge Bernard Shaw)

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

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

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

Aos meus irmãos Roger e Gustavo.

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

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

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

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

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

Aos professores Dr. Luiz Cláudio de Almeida Barbosa, Dr. José Dias de Souza Filho, Dra. Rossimíriam Pereira de Freitas, Dra. Rosemeire Brondi Alves, Dra. Lúcia Pinheiro Pimenta, Dr. Claudio Luis Donnici, Dra. Maria Amélia Diamantino Boaventura e Dr. Geraldo Magela, professores das disciplinas do curso de pós-graduação.

À Clináscia e seu marido Fernando, amigos desde a época de graduação, os quais tiveram convivência por muitos anos e puderam me ensinar várias coisas. Eles para mim são exemplo de força, respeito e educação.

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

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

Ao Alison, grande amigo que possui um otimismo invejável.

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

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

Aos colegas do curso de pós-graduação, Liliane, Júlio, Fabrício, Fernando, Vanessa, Bruno, Laura, Alan, Gisele, Cleiton e Bruna.

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa concedida e à Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

SÚMARIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
APRESENTAÇÃO.....	1
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO.....	9
1. Descontaminação Microbiológica.....	10
1.1. Radiação Ionizante.....	10
1.2. Radiação Gama.....	12
2. Alterações Provocadas pelo Uso de Radiação gama.....	13
2.1. Alterações Organolépticas.....	14
2.2. Alterações na Constituição de Terpenos.....	14
2.3. Alteração na Constituição de Alcalóides.....	15
2.4. Alteração na Constituição Fenólica.....	16
2.5. Alteração na Atividade Biológica.....	17
3. A Família Alismataceae.....	17
4. O Gênero <i>Echinodorus</i>.....	18
5. A Espécie <i>Echinodorus macrophyllus</i>.....	19
5.1. Características Morfológicas.....	19
5.2. Distribuição, Nomes Populares e Classificação Taxonômica.....	19
5.3. Atividade Biológica.....	21
5.4. Constituintes Químicos Isolados de <i>Echinodorus macrophyllus</i>	21

6. A Família Fabaceae	23
7. O Gênero <i>Inga</i>	23
8. A Espécie <i>Inga laurina</i>	24
8.1. Características Morfológicas	24
8.2. Distribuição, Nomes Populares e Classificação Taxonômica	25
8.3. Constituintes Químicos Isolados de <i>Inga laurina</i> e Atividade Biológica	26
9. A Família Myrtaceae	27
10. Gênero <i>Eucalyptus</i>	27
11. A Espécie <i>Eucalyptus grandis</i>	28
11.1 Características Morfológicas	28
11.2. Distribuição, Nomes Populares e Classificação Taxonômica	29
11.3. Constituintes Químicos Isolados de <i>Eucalyptus grandis</i> e Atividade Biológica	30
CAPÍTULO II - PARTE EXPERIMENTAL	32
1. Equipamentos	33
2. Contaminação Microbiana	34
2.1. Contagem de Microrganismos Presentes em Amostras Vegetais	34
2.2. Obtenção dos Microrganismos e Identificação das Espécies	35
3. Metodologia Fitoquímica	35
3.1. Material Vegetal	35
3.1.1. <i>Echinodorus macrophyllus</i>	35
3.1.2. <i>Inga laurina</i>	35
3.1.3. <i>Eucalyptus grandis</i>	35
3.2. Obtenção dos Extratos em Hexano e Etanol das folhas de <i>E. macrophyllus</i>	36
3.2.1. Fracionamento do Extrato em Hexano de <i>Echinodorus macrophyllus</i>	36

3.3. Análise por CG do Óleo Essencial Obtido das Folhas de <i>E. macrophyllus</i> , <i>I. laurina</i> e <i>E. grandis</i> Antes e Após Serem Submetidos à Radiação gama.....	40
3.3.1 Obtenção do Material Vegetal Submetido à Radiação gama.....	40
3.3.2. Extração do Óleo Essencial.....	40
3.3.3. Análises do óleo essencial por CG-FID.....	41
3.3.4. Análises do óleo essencial por CG-EM.....	41
3.4. Obtenção do Extrato Aquoso de <i>E. macrophyllus</i> , Isolamento e Radiação dos Constituintes Polares.....	42
3.4.1. Análise por CLAE das Frações FF Submetidas a Diferentes Doses de Radiação gama.....	43
3.4.2. Análise por CLAE das Frações FA Submetidas a Diferentes Doses de Radiação gama.....	43
3.4.3. Análise por CLAE das Frações FS Submetidas a Diferentes Doses de Radiação gama.....	44
3.5. Extrato Submetido ao Fracionamento Fitoquímico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	44
3.5.1. Fracionamento Cromatográfico de FF*.....	45
4. Atividade Antioxidante.....	45
4.1. Atividade Antioxidante pelo Sequestro de Radical Livre (FRSA).....	46
4.2. Determinação da Atividade Antioxidante Total (AAT).....	46
CAPÍTULO III - RESULTADOS E DISCUSSÃO – Análise por CLAE das frações de <i>E. macrophyllus</i> submetidas à radiação gama.....	48
1. Análise das Frações Fenólicas (FF) de <i>E. macrophyllus</i>.....	49
2. Análise da Fração Alcaloídica (FA) de <i>E. macrophyllus</i>.....	54
3. Análise da Fração Saponínica (FS) de <i>E. macrophyllus</i>.....	57

CAPÍTULO IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO – Óleos essenciais	61
1. Óleo essencial de <i>Echinodorus macrophyllus</i>	62
1.1. Análises químicas do óleo essencial.....	62
1.2. Efeito da radiação gama sobre os óleos essenciais de <i>E. macrophyllus</i>	66
2. Óleo essencial de <i>Inga laurina</i>	69
2.1. Análises químicas do óleo essencial.....	69
2.2. Efeito da radiação gama sobre os óleos essenciais de <i>I. laurina</i>	75
3. Óleo essencial de <i>Eucalyptus grandis</i>	77
3.1. Análises químicas do óleo essencial.....	77
3.2. Efeito da radiação gama sobre os óleos essenciais de <i>E. grandis</i>	80
CAPÍTULO V - RESULTADOS E DISCUSSÃO – Identificação e análise	
estrutural fitoquímica de constituintes de <i>E. macrophyllus</i>	82
1. Análise do Extrato em Hexano de <i>Echinodorus macrophyllus</i>	83
1.1. Grupo HR02	83
1.2. Grupo HR05	85
1.3. Grupo HR06	86
1.4. Grupo HR07	88
1.5. Grupo HR08	89
1.6. Fração AR01.....	90
1.7. Fração AR02.....	92
1.8. Fração AR03.....	93
1.9. Fração B05.....	94
1.10. Fração C02.....	96
1.11. Fração D02	98

2. Análise das Frações Obtidas de Fracionamento por CLAE do Extrato Polar de <i>Echinodorus macrophyllus</i>	104
2.1. Elucidação Estrutural de F01.....	104
2.2. Elucidação Estrutural de F02.....	109
2.3. Elucidação Estrutural de F03.....	116
2.4. Elucidação Estrutural de F05.....	122
2.5. Elucidação Estrutural de F04.....	129
CAPÍTULO VI - RESULTADOS E DISCUSSÃO	133
1. Radiação Gama Versus Contaminação Microbiológica	134
2. Atividade Antioxidante	135
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	137
1. Análise por CLAE das Frações Submetidas à Radiação Gama	138
2. Óleo essencial	139
3. Análise Fitoquímica	140
4. Contaminação Microbiana e Atividade Biológica	141
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	142
ANEXOS	152

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

AA	Alquil aldeído derivado de ácido graxo
AAT	Atividade Antioxidante Total
ABFIT	Associação Brasileira de Fitoterapia
AcOEt	Acetato de Etila
AG	Ácido graxo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AO	Alquil álcool derivado de ácido graxo
AR	Área Relativa
CBE	Companhia Brasileira de Esterificação
CDC	Compostos derivados de carotenóides
CDTN	Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear
CG	Cromatografia a gás
CG-FID	Cromatografia a gás acoplada ao detector FID
CG-MS	Cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
DAG	Derivado de ácido graxo
DCM	Diclorometano
DEPT-135°	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i> – ângulo 135°
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DT	Diterpeno
Eaq	Extrato aquoso
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio

ESR	Espectroscopia de Ressonância de Spin de Elétron
EtOH	Etanol
FA	Fração alcaloídica
FA ₀	Fração Alcaloídica sem irradiação
FA ₁₀	Fração Alcaloídica com 10 kGy de energia de irradiação gama
FA ₂₀	Fração Alcaloídica com 20 kGy de energia de irradiação gama
FA ₅	Fração Alcaloídica com 5 kGy de energia de irradiação gama
FB	Fração Rica em aminoácidos, ácidos orgânicos e açúcares
FDA	US Food and Drug Administration
FF	Fração Fenólica
FF ₀	Fração Fenólica sem irradiação
FF ₁₀	Fração Fenólica com 10 kGy de energia de irradiação gama
FF ₂₀	Fração Fenólica com 20 kGy de energia de irradiação gama
FF ₅	Fração Fenólica com 5 kGy de energia de irradiação gama
FS	Fração saponínica
FS ₀	Fração saponínica sem irradiação gama
FS ₁₀	Fração Saponínica com 10 kGy de energia de irradiação gama
FS ₂₀	Fração Saponínica com 20 kGy de energia de irradiação gama
FS ₅	Fração Saponínica com 5 kGy de energia de irradiação gama
Gy	Gray
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IBPM	Instituto Brasileiro de Plantas Medicinais
IDC	Instituto de Defesa do Consumidor
IV	Infravermelho
IV-ATR	Espectroscopia no infravermelho por Refletância Total Atenuada
<i>J</i>	Constante de acoplamento escalar

MA	Monoterpeno acíclico
MS-Brasil	Ministério da Saúde do Brasil
O	Classes não definida
OEI	Óleo essencial de <i>Inga laurina</i>
OEI ₀	Óleo essencial de <i>Inga laurina</i> sem irradiação gama
OEI ₁	Óleo essencial de <i>Inga laurina</i> com 1 kGy de energia de radiação gama
OEI ₁₀	Óleo essencial de <i>Inga laurina</i> com 10 kGy de energia de radiação gama
OEI ₂₀	Óleo essencial de <i>Inga laurina</i> com 20 kGy de energia de radiação gama
OEI ₃	Óleo essencial de <i>Inga laurina</i> com 3 kGy de energia de radiação gama
OEI ₅	Óleo essencial de <i>Inga laurina</i> com 5 kGy de energia de radiação gama
PAL	Phenilalanina-amonia-liase
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SIN	Sinônimo
ST	Sesquiterpeno
TL	Termoluminescência
TMS	Tetrametilsilano
TR	Tempo de retenção
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV	Ultravioleta
UV/Vis	Ultravioleta/visível
δ	Deslocamento Químico
λ	Comprimento de onda

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química de alguns compostos químicos presentes em alimentos contaminados por fungos (1-6), marcador de alimentos irradiados (7) e isolados de <i>Echinodorus macrophyllus</i> (8 e 9).....	8
Figura I.1. Principais países que fazem uso da tecnologia de radiação gama para fins comerciais em 1999.....	13
Figura I.2. Estrutura química dos constituintes terpênicos presentes em óleo essencial de espécies vegetais.	15
Figura I.3. Estrutura química dos alcalóides identificados em espécies vegetais.....	16
Figura I.4. Exemplos da espécie <i>Echinodorus macrophyllus</i> (Filho, 2010; Sobrinho & Silva, 2010).	19
Figura I.5. Distribuição geográfica da espécie <i>E. macrophyllus</i> no Brasil (Matias, 2010). ...	20
Figura I.6. Estrutura química de fitoconstituintes isolados de <i>Echinodorus macrophyllus</i>	22
Figura I.7. Exemplos da espécie <i>Inga laurina</i> (SW.) Willd (Gilson, 2012).	24
Figura I.8. Distribuição geográfica da espécie <i>Inga laurina</i> no Brasil (Matias, 2010).	25
Figura I.9. Estrutura da miricetina isolada de <i>Inga laurina</i>	26
Figura I.10. Exemplos da espécie <i>Eucalyptus grandis</i> (Smith, 2014).	28
Figura I.11. Distribuição geográfica da espécie <i>Eucalyptus grandis</i> no Brasil (Matias, 2014).	29
Figura I.12. Triterpenos pentacíclicos identificados nas folhas de <i>Eucalyptus grandis</i>	30
Figura I.13. Estrutura química dos compostos identificados no caule de <i>Eucalyptus grandis</i>	31
Figura II.1. Esquema de obtenção dos extratos em hexano e etanol de <i>Echinodorus macrophyllus</i>	36

Figura II.2. Sequência metodológica para o isolamento dos constituintes polares do EAq das folhas de <i>E. macrophyllus</i> .	43
Figura III.1. Cromatograma de CLAE a 280 nm de FF ₀ em TR entre 0,0 e 40,0 min.	49
Figura III.2. Cromatogramas de CLAE a 280 nm de FF ₅ , FF ₁₀ e FF ₂₀ comparados com o cromatograma correspondente de FF ₀ .	51
Figura III.3. Ampliações dos cromatogramas de CLAE a 280 nm de FF ₅ , FF ₁₀ e FF ₂₀ comparados com o cromatograma correspondente de FF ₀ : (A) ampliação em TR entre 0,0 – 10,0 min e (B) ampliação em TR entre 10,0 – 25,0 min.	52
Figura III.4. Gráficos da variação da área de picos do cromatograma de CLAE a 280 nm de FF em função da dose de radiação gama: picos 2, 3, 6, 9, 10 e 12 (A); picos 4 e 5 (B) e picos 1, 7, 8 e 11 (C).	53
Figura III.5. Cromatograma de CLAE a 220 nm de FA ₀ em TR entre 0,0 e 15,0 min.	54
Figura III.6. Cromatogramas de CLAE a 220 nm de FA ₅ , FA ₁₀ e FA ₂₀ comparados com o cromatograma correspondente de FA ₀ .	56
Figura III.7. Gráfico da variação da área do pico 1 do cromatograma de CLAE a 220 nm de FA em função da dose de radiação gama.	57
Figura III.8. Cromatograma de CLAE a 210 nm de FS ₀ em TR entre 0,0 e 10,0 min.	58
Figura III.9. Cromatogramas CLAE a 210 nm de FS ₅ , FS ₁₀ e FS ₂₀ e o cromatograma correspondente de FS ₀ .	59
Figura III.10. Gráfico da variação da área dos picos 1, 2 e 3 do cromatograma de CLAE a 210 nm de FS em função da dose de radiação gama.	60
Figura IV.1. Cromatograma de CG-FID do óleo essencial isolado das folhas de <i>E. macrophyllus</i> (OEEM ₀), os compostos indicados são mostrados na Tabela IV.1 (p.63).	62
Figura IV.2. Estrutura química dos principais componentes identificados no óleo essencial das folhas de <i>E. macrophyllus</i> .	64

Figura IV.3. Estrutura química dos principais componentes identificados no óleo essencial de <i>I. laurina</i>	74
Figura IV.4. Estrutura química dos principais componentes do óleo essencial de <i>E. grandis</i>	79
Figura V.1. Cromatograma de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas do grupo HR02.....	83
Figura V.2. Estrutura química dos fitoconstituintes identificados por CG-EM do grupo HR02 obtidos do extrato em hexano das folhas de <i>E. macrophyllus</i>	84
Figura V.3. Cromatograma de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas do grupo HR05.....	85
Figura V.4. Estrutura química dos fitoconstituintes identificados por CG-EM do grupo HR05 obtidos do extrato em hexano das folhas de <i>E. macrophyllus</i>	86
Figura V.5. Cromatograma de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas do grupo HR06.....	86
Figura V.6. Estrutura química dos fitoconstituintes identificados por CG-EM do grupo HR06 obtidos do extrato em hexano das folhas de <i>E. macrophyllus</i>	87
Figura V.7. Cromatograma de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas do grupo HR07.....	88
Figura V.8. Estrutura química dos fitoconstituintes identificados por CG-EM do grupo HR07 obtidos do extrato em hexano das folhas de <i>E. macrophyllus</i>	89
Figura V.9. Cromatograma de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas do grupo HR08.....	89
Figura V.10. Estrutura química dos fitoconstituintes identificados por CG-EM do grupo HR08 obtidos do extrato em hexano das folhas de <i>E. macrophyllus</i>	90
Figura V.11. Cromatograma de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas da fração AR01.	90

Figura V.12. Estrutura química dos fitoconstituintes identificados por CG-EM da fração AR01 obtida do refração do grupo HR09 do extrato em hexano das folhas de <i>E. macrophyllum</i> .	91
Figura V.13. Cromatograma de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas da fração AR02.	92
Figura V.14. Estrutura química dos fitoconstituintes identificados por CG-EM da fração AR02 obtida do refração do grupo HR09 do extrato em hexano das folhas de <i>E. macrophyllum</i> .	93
Figura V.15. Cromatograma de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas da fração AR03.	93
Figura V.16. Estrutura química dos fitoconstituintes identificados por CG-EM da fração AR03 obtida do refração do grupo HR09 do extrato em hexano das folhas de <i>E. macrophyllum</i> .	94
Figura V.17. Cromatograma de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas da fração B05.	95
Figura V.18. Estrutura química dos fitoconstituintes identificados por CG-EM da fração B05 obtida do refração da fração AR13 do extrato em hexano das folhas de <i>E. macrophyllum</i> .	96
Figura V.19. Cromatograma de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas da fração C02.	96
Figura V.20. Estrutura química dos fitoconstituintes identificados por CG-EM da fração C02 obtida do refração da fração B03 e B04 do extrato em hexano das folhas de <i>E. macrophyllum</i> .	98
Figura V.21. Cromatograma de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas da fração D02.	99

Figura V.22. Estrutura química dos fitoconstituintes identificados por CG-EM da fração D02 obtida do refractionamento da fração C07 do extrato em hexano das folhas de <i>E. macrophyllus</i> .	100
Figura V.23. Espectro de absorção na região do Infravermelho de D02 (ATR, cm^{-1}).	101
Figura V.24. Espectro de RMN de ^1H de D02 (200 MHz; CDCl_3).	102
Figura V.25. Espectro de RMN de ^{13}C (A) e subespectro DEPT 135° (B) de D02 (50 MHz; CDCl_3).	102
Figura V.26. Espectro de absorção na região do infravermelho de F01 (ATR; cm^{-1}).	104
Figura V.27. Espectro de RMN de ^1H de F01 (400 MHz; $\text{DMSO-}d_6$).	105
Figura V.28. Espectro de RMN de ^{13}C (A) e subespectro DEPT 135° (B) de F01 (100 MHz; $\text{DMSO-}d_6$).	106
Figura V.29. Mapa de contornos HSQC de F01 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; $\text{DMSO-}d_6$).	107
Figura V.30. Mapa de contornos HMBC de F01 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; $\text{DMSO-}d_6$).	107
Figura V.31. Espectro de absorção na região do infravermelho de F02 (ATR; cm^{-1}).	109
Figura V.32. Espectro de RMN de ^1H de F02 (400 MHz; $\text{DMSO-}d_6$).	110
Figura V.33. Espectro de RMN de ^{13}C (A) e subespectro DEPT 135° (B) de F02 (100 MHz; $\text{DMSO-}d_6$).	111
Figura V.34. Mapa de contornos HSQC de F02 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; $\text{DMSO-}d_6$).	112
Figura V.35. Mapa de contornos HMBC de F02 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; $\text{DMSO-}d_6$).	113
Figura V.36. Mapa de contornos COSY de F02 (400 MHz; $\text{DMSO-}d_6$).	114
Figura V.37. Espectro de absorção na região do infravermelho de F03 (ATR; cm^{-1}).	116
Figura V.38. Espectro de RMN de ^1H de F03 (400 MHz; $\text{DMSO-}d_6$).	117

Figura V.39. Espectro de RMN de ^{13}C (A) e subespectro DEPT 135° (B) de F03 (100 MHz; DMSO- <i>d</i> 6).....	118
Figura V.40. Mapa de contornos HSQC de F03 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; DMSO- <i>d</i> 6).	119
Figura V.41. Mapa de contornos HMBC de F03 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; DMSO- <i>d</i> 6).	120
Figura V.42. Mapa de contornos COSY de F03 (400 MHz; DMSO- <i>d</i> 6).	120
Figura V.43. Espectro de absorção na região do infravermelho de F05 (ATR; cm^{-1}).	122
Figura V.44. Espectro de RMN de ^1H de F05 (400 MHz; DMSO- <i>d</i> 6).....	123
Figura V.45. Espectro de RMN de ^{13}C (A) e subespectro DEPT 135° (B) de F05 (100 MHz; DMSO- <i>d</i> 6).....	124
Figura V.46. Mapa de contornos HSQC de F05 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; DMSO- <i>d</i> 6).	125
Figura V.47. Mapa de contornos HMBC de F05 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; DMSO- <i>d</i> 6).	126
Figura V.48. Mapa de contornos COSY de F05 (400 MHz; DMSO- <i>d</i> 6).	127
Figura V.49. Espectro de absorção na região do infravermelho de F04 (ATR; cm^{-1}).	129
Figura V.50. Espectro de RMN de ^1H de F04 (400 MHz; DMSO- <i>d</i> 6).....	130
Figura V.51. Espectro de RMN de ^{13}C (A) e subespectro DEPT 135° (B) de F04 (100 MHz; DMSO- <i>d</i> 6).....	130
Figura VI.1. UFCs existentes na amostra não submetida à radiação gama (0,0 kGy) e nas amostras submetidas a doses de 1,0, 3,0, 5,0, 10,0 e 20,0 kGy.....	134
Figura VI.2. Percentagem de FRSA dos fitoconstituintes F01, F03 e F05 comparados com o padrão de ácido gálico.	135
Figura 1. Estrutura química dos constituintes isolados e identificados nas folhas de <i>Echinodorus macrophyllus</i>	140

LISTA DE TABELAS

Tabela I.1. Principais métodos físicos e químicos utilizados em descontaminações microbianas	10
Tabela I.2. Classificação taxonômica da espécie <i>Echinodorus macrophyllus</i>	20
Tabela I.3. Classificação taxonômica da espécie <i>Inga laurina</i>	26
Tabela II.1. Frações e grupos resultantes do fracionamento cromatográfico de EH em sílica gel	37
Tabela II.2. Frações e grupos resultantes do fracionamento cromatográfico de HR09 em sílica gel	38
Tabela II.3. Frações e grupos resultantes do fracionamento cromatográfico de AR13 em sílica gel	38
Tabela II.4. Frações e grupos resultantes do fracionamento cromatográfico de B03 e B04 em sílica gel	39
Tabela II.5. Frações e grupos resultantes do fracionamento cromatográfico de C07 em sílica gel	39
Tabela II.6. Massa do óleo essencial extraído das folhas de <i>E. macrophyllus</i> , <i>I. laurina</i> e <i>E. grandis</i> submetidas a diferentes doses de radiação gama	41
Tabela II.7. Massa dos fitoconstituintes isolados por CLAE preparativo das folhas de <i>E. macrophyllus</i>	45
Tabela III.1. Valores de tempo de retenção (TR; em min), área e intensidade dos picos do cromatograma de CLAE a 280 nm de FF ₀ mostrado na Figura III.1 (p. 49)	50
Tabela III.2. Valor de tempo de retenção (TR; em min), área e intensidade do pico do cromatograma de CLAE a 220 nm de FA ₀ mostrado na Figura III.5	54
Tabela III.3. Valores de tempo de retenção (TR; em min), área e intensidade dos picos do cromatograma CLAE a 210 nm de FS ₀ mostrado na Figura III.8	58

Tabela IV.1. Classe química e dados de CG dos componentes de OEEM ₀ : tempo de retenção (TR), índice de Kováts calculado (CKRI), índice de Kováts na literatura (LKRI) e porcentagem relativa das áreas dos picos (AP).....	63
Tabela IV.2. Atividade biológica dos componentes do óleo essencial das folhas de <i>E. macrophyllus</i>	66
Tabela IV.3. Porcentagem relativa dos fitoconstituintes presentes no óleo essencial extraído a partir das folhas da espécie <i>E. macrophyllus</i> submetidas a diferentes doses de radiação gama	68
Tabela IV.4. Classe química e dados de CG-EM dos compostos identificados em OEIL ₀ : tempo de retenção (TR, min), índice de Kováts calculado (CKRI), índice de Kováts encontrado na literatura (LKRI), porcentagem relativa da área do pico (AR), fórmula molecular (MM) e fragmentação (intensidade relativa %)	70
Tabela IV.5. Porcentagem relativa dos componentes dos óleos essenciais extraídos das folhas de <i>I. laurina</i> submetidas a diferentes doses de radiação gama.....	76
Tabela IV.6. Porcentagem relativa dos constituintes reunidos em grupos funcionais e classes químicas	77
Tabela IV.7. Classe química e dados de CG dos compostos identificados em OEEG ₀ : tempo de retenção (TR, min), concentração (mg/mL), índice de Kováts calculados (CKRI) e índice de Kováts encontrado na literatura (LKRI).....	78
Tabela IV.8. Concentração (mg/mL) dos componentes dos óleos essenciais extraídos das folhas de <i>E. grandis</i> submetidas a diferentes doses de radiação gama	81
Tabela V.1. Dados de CG-EM: pico, tempo de retenção (min), atribuição e porcentagem de similaridade dos fitoconstituintes identificados no grupo HR02 obtido do extrato em hexano das folhas de <i>E. macrophyllus</i>	84

Tabela V.2. Dados de CG-EM: pico, tempo de retenção (min), atribuição e porcentagem de similaridade dos fitoconstituintes identificados no grupo HR05 obtido do extrato em hexano das folhas de <i>E. macrophyllus</i>	85
Tabela V.3. Dados de CG-EM: pico, tempo de retenção (min), atribuição e porcentagem de similaridade dos fitoconstituintes identificados no grupo HR06 obtido do extrato em hexano das folhas de <i>E. macrophyllus</i>	87
Tabela V.4. Dados de CG-EM: pico, tempo de retenção (min), atribuição e porcentagem de similaridade dos fitoconstituintes identificados no grupo HR07 obtido do extrato em hexano das folhas de <i>E. macrophyllus</i>	88
Tabela V.5. Dados de CG-EM: pico, tempo de retenção (min), atribuição e porcentagem de similaridade dos fitoconstituintes encontrados no grupo HR08 obtido do extrato em hexano das folhas de <i>E. macrophyllus</i>	89
Tabela V.6. Dados de CG-EM: pico, tempo de retenção (min), atribuição e porcentagem de similaridade dos fitoconstituintes identificados na fração AR01 obtida do refração de HR09 do extrato em hexano das folhas de <i>E. macrophyllus</i>	91
Tabela V.7. Dados de CG-EM: pico, tempo de retenção (min), atribuição e porcentagem de similaridade dos fitoconstituintes identificados na fração AR02 obtida do refração de HR09 do extrato em hexano das folhas de <i>E. macrophyllus</i>	92
Tabela V.8. Dados de CG-EM: pico, tempo de retenção (min), atribuição e porcentagem de similaridade dos fitoconstituintes identificados na fração AR03 obtida do refração de HR09 do extrato em hexano das folhas de <i>E. macrophyllus</i>	94
Tabela V.9. Dados de CG-EM: pico, tempo de retenção (min), atribuição e porcentagem de similaridade dos fitoconstituintes identificados na fração B05 obtida do refração de AR13 do extrato em hexano das folhas de <i>E. macrophyllus</i>	95

Tabela V.10. Dados de CG-EM: pico, tempo de retenção (min), atribuição e porcentagem de similaridade dos fitoconstituintes identificados na fração C02 obtida do refração de B03 e B04 do extrato em hexano das folhas de <i>E. macrophyllus</i>	97
Tabela V.11. Dados de CG-EM: pico, tempo de retenção (min), atribuição e porcentagem de similaridade dos fitoconstituintes identificados na fração D02 obtida do refração de C07 do extrato em hexano das folhas de <i>E. macrophyllus</i>	99
Tabela V.12. Dados de RMN de ¹³ C de D02 e dos esteróides β -sitosterol e estigmasterol descritos na literatura (Brandão, 1991)	103
Tabela V.13. Dados de RMN de ¹ H e de ¹³ C de F01 e os descritos na literatura para o ácido <i>trans</i> -aconítico (Cai <i>et al.</i> , 2001)	108
Tabela V.14. Dados de RMN de ¹ H e de ¹³ C de F02 e os descritos na literatura para o ácido <i>trans</i> -ferúlico (Prachayasittiku <i>et al.</i> , 2009).....	115
Tabela V.15. Dados de RMN de ¹ H e de ¹³ C de F03 e os descritos na literatura para o ácido cafeoilatrônico (Saleem <i>et al.</i> , 2004)	121
Tabela V.16. Dados de RMN de ¹ H e de ¹³ C de F05 e os descritos na literatura para a isovitexina (Lin <i>et al.</i> , 2000)	128
Tabela V.17. Dados de RMN de ¹ H e de ¹³ C de F04 e os descritos na literatura para a isoorientina (Lin <i>et al.</i> , 2000).....	132
Tabela VI.1. Valores em UFC/mL e UFC/g para cada uma das amostras submetidas à radiação gama a doses de 1,0, 3,0, 5,0, 10,0 e 20,0 kGy e uma amostra não irradiada (0 kGy)	134
Tabela VI.2. Valores da concentração máxima efetiva para reduzir em 50% a concentração de DPPH, (EC ₅₀ em mg/mL), dos fitoconstituintes isolados F01, F03 e F05.....	136

RESUMO

Os medicamentos de origem vegetal usados pela medicina popular apresentam normalmente um elevado nível de contaminação microbiológica. Existem vários métodos para a descontaminação microbiana de produtos fitoterápicos e a radiação gama tem sido uma alternativa, aumentando o tempo de conservação. As espécies *Echinodorus macrophyllus*, *Inga laurina* e *Eucalyptus grandis* são utilizadas pela população brasileira para diversos fins medicinais. Neste trabalho foi investigado o efeito da radiação gama sobre as frações contendo compostos fenólicos, saponinas e alcalóides de *E. macrophyllus*. O uso da radiação com a finalidade de descontaminação microbiológica não provoca mudanças significativas na composição das amostras. Além disso, foi avaliada a composição do óleo essencial das folhas dessas três espécies após serem submetidas à radiação e os resultados obtidos não estão ligados diretamente à dose de radiação gama. O uso de uma dose de 10 kGy é suficiente para total descontaminação das folhas de *Echinodorus macrophyllus*. Através de um estudo fitoquímico foi possível identificar diversas substâncias presentes no extrato em hexano obtidos das folhas de *E. macrophyllus*, além de isolar e identificar estruturalmente dois triterpenos: estigmasterol e β -sitosterol. Por sua vez na fração contendo compostos fenólicos foram identificados ácido *trans*-aconítico, ácido *trans*-ferúlico, ácido cafeoiltartrônico, isovitexina e isoorientina. Os extratos e substâncias isoladas de *E. macrophyllus* foram submetidos a testes de atividade antioxidante por sequestro do radical DPPH e atividade antioxidante total, mostrando alto poder antioxidante.

Palavras-chaves: *Echinodorus macrophyllus*, *Inga laurina*, *Eucalyptus grandis*, Radiação gama, Extrato em hexano, Compostos fenólicos, Atividade antioxidante.

ABSTRACT

The plant materials are usually used in the popular medicine with a high degree of microbiological contamination. There are several methods for microbial decontamination of herbal products and gamma radiation has been an alternative which also increases storage time. *Echinodorus macrophyllus*, *Inga laurina*, and *Eucalyptus grandis* are used by the Brazilian population for various medicinal purposes. In the present study the effect of gamma radiation on fractions containing phenolic compounds, alkaloids and saponins from leaves of *E. macrophyllus* was investigated. The use of radiation to microbial decontamination does not cause significant changes in the composition of the samples. Furthermore, the composition of the essential oil of leaves of these three species was evaluated after radiation and the results obtained are not directly connected to the dose of gamma radiation. A dose of 10 kGy was sufficient for complete decontamination of the leaves of *Echinodorus macrophyllus*. Different compounds were identified from the phytochemical study of leaves of *E. macrophyllus*. The hexane extract mainly provided two triterpenes: stigmasterol and β -sitosterol. The fraction containing phenolic compounds provided *trans*-aconitic acid, *trans*-ferulic, cafeoiltartronic acid, isovitexin, and isoorientina. Extracts and compounds isolated from *E. macrophyllus* were submitted to tests of antioxidant activity by scavenging the DPPH radical and total antioxidant activity, showing high antioxidant power.

Key Words: *Echinodorus macrophyllus*, *Inga laurina*, *Eucalyptus grandis*, gamma Radiation, Hexane extract, Phenolic compounds, Antioxidant activity.

APRESENTAÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde, cerca de 80% da população mundial fazem uso de ervas e outras plantas medicinais (WHO, 2003), com excelentes resultados em assistência primária à saúde (Koseki *et al.*, 2002; WHO, 2002). No Brasil, a Associação Brasileira de Fitoterapia estima em R\$ 500 milhões o consumo anual de plantas e medicamentos fitoterápicos elaborados, apesar de a maior parte da produção ser ainda artesanal, localizada e não ocupar grandes áreas de cultivo.

O aumento progressivo da produção de medicamentos fitoterápicos tem sido acompanhado pela preocupação em relação à qualidade destes produtos, tendo em vista que as falsificações e as adulterações são frequentes (Rocha *et al.*, 2004). Além disso, o meio onde foram cultivados, os métodos, colheita, processamento pós-colheita, transporte, forma como são embalados e armazenamento dos produtos naturais resultam em elevados riscos de contaminações microbiológica e química, sendo os principais fatores comprometedores da qualidade e segurança das ervas (WHO, 2003).

As toxinas naturais produzidas por microrganismos presentes em fitoterápicos podem ser divididas em três categorias: toxinas bacterianas, micotoxinas e ficotoxinas (Bhatnagar *et al.*, 2002). As patologias parasitárias como micoses sistêmicas causadas por *Paracoccidioides brasilienses*, infecções causadas por bactérias do gênero *Salmonella* e microrganismos associados ao processo de extração/beneficiamento de plantas podem produzir substâncias nocivas aos seres humanos (Yu *et al.*, 2004). Algumas bactérias da família Bacillaceae, presentes em plantas usadas para preparação de chás, são resistentes às condições térmicas aplicadas em infusões (Seo *et al.*, 2007).

A contaminação fúngica pode resultar na produção de micotoxinas, sendo detectada em várias plantas medicinais e alimentos (Batista *et al.*, 2002). A incidência dessas toxinas em produtos agrícolas representa um grande impacto negativo na economia das regiões afetadas (Rustom, 1997; Batista *et al.*, 2002). Essas toxinas provocam resposta tóxica em animais, mesmo quando ingeridas em baixas concentrações. Em exposição aguda ou crônica, as

micotoxinas podem provocar câncer, toxidez renal, neurológica e imunossupressão (Bennett & Klich, 2003). Os fungos do gênero *Fusarium* são descritos como patógenos de plantas, produzindo micotoxinas antes e após a colheita. Por sua vez, os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são contaminantes de alimentos durante a secagem e armazenamento.

O processo de prevenção e controle das micotoxinas não apresenta ainda um modelo seguro e eficaz. O tratamento por radiação gama (radioesterilização) tem sido uma alternativa para aumentar o tempo de conservação/armazenamento pelo bloqueio do brotamento de bulbos, atraso da maturação e diminuição da contaminação microbiológica de alimentos e produtos fitoterápicos. Por meio dessa técnica, o material vegetal é submetido a doses controladas de radiação ionizante, reduzindo a flora microbiana, sem afetar a qualidade terapêutica do material. A radiação a doses de até 10 kGy (sendo que 1 kGy = 1 joule de energia absorvida por massa em kg de material irradiado) foi eficiente no tratamento de 17 ervas medicinais, reduzindo em 99,998% a contaminação por bactérias aeróbias, fungos e leveduras, sem causar alterações significativas em suas atividades biológicas (Migdal *et al.*, 1998). Algumas ervas foram radiadas a doses de 10, 20 e 30 kGy, sem alteração de suas ações terapêuticas. A maioria das ervas não sofreu alteração da concentração de compostos fenólicos e taninos quando submetidas à radiação a doses de 10 kGy (Koseki *et al.*, 2002). Da mesma forma, a radiação gama não causou degradação significativa de β -caroteno (Koseki *et al.*, 2002). No estudo da contaminação fúngica e da produção de micotoxinas em frutas, a presença de ácido penicílico (1), patulina (2), ácido ciclopiazônico (3), citrinina (4), ocratoxina A (5) e aflatoxina B1 (6), Figura 1. (p. 8), tem sido verificada em frutas. A radiação dessas frutas a doses de 1,5 a 3,5 kGy diminuiu significativamente a microbiota fúngica e a produção de micotoxinas decresceu com o aumento da dose de radiação (Migdal *et al.*, 1998).

Em 1983, a comissão do *Codex Alimentarius* aprovou a radioesterilização de alimentos a doses abaixo de 10 kGy e, atualmente, 52 países utilizam essa técnica para fins comerciais (Aziz & Moussa, 2002). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou em 2001 a radioesterilização de alimentos a doses não estipuladas, desde que sejam suficientes para alcançar a finalidade pretendida e não comprometer a integridade do produto. Em 2004, a ANVISA exigiu o registro de controle de qualidade de medicamentos fitoterápicos, incluindo a pesquisa de eventuais alterações estruturais da matéria-prima (droga vegetal).

O Instituto de Defesa do Consumidor alerta sobre novos estudos que relatam a contaminação de alimentos por produtos radiolíticos nocivos ao ser humano, formados a partir de reações tanto de lipídeos com oxigênio molecular quanto de decaimento causado pelos efeitos diretos e indiretos da radiação (Shim *et al.*, 2009). De fato, certos hidrocarbonetos voláteis ausentes em alimentos não irradiados são observados em alimentos submetidos à radioesterilização. Após radiação entre 5 e 60 kGy das frações lipídicas de alguns alimentos a vácuo, foram identificados hidrocarbonetos, aldeídos, ésteres metílicos e etílicos, ácidos graxos livres e 2-alkilciclobutanonas, cujas concentrações aumentam com a dose e/ou temperatura da radiação (Nawar, 1986; Schreiber *et al.*, 1993). Métodos de detecção padronizados e validados são disponíveis para muitos alimentos (Letellier & Nawar, 1972). Os hidrocarbonetos voláteis isolados da fração lipídica de alimentos irradiados podem ser identificados por cromatografia à gás na fração apolar dos lipídeos (Nawar *et al.*, 1990). Compostos aromáticos, como o 1,3-bis(1,1-dimetiletil)benzeno (7, Figura 1, p. 8), têm sido apontados como marcadores de alimentos irradiados (Delincee, 2002).

Apesar de o Ministério da Saúde do Brasil ter regulamentado em 1995 os procedimentos para a produção de medicamentos fitoterápicos, a farmacovigilância é incipiente e, praticamente, inexistente e a produção não tem controle sanitário apropriado. Além da poeira, outros contaminantes podem levar ao desenvolvimento de quantidades

significativas de esporos de bactérias e fungos em fitoterápicos (Seo *et al.*, 2007). Como resultado, as plantas comercializadas para fins medicinais no Brasil são normalmente de má qualidade. Desde 1999, com a proibição do uso de óxido de etileno na descontaminação de qualquer produto que não seja objeto de uso médico-hospitalar (Portaria Interministerial nº 482 dos Ministérios da Saúde e do Trabalho), a busca por tecnologias seguras de descontaminação microbiológica é de grande interesse comercial. Vários métodos de desinfecção têm sido sugeridos, tais como o uso de radiação eletromagnética, pulso fotodinâmico e tratamento com CO₂. Entretanto, a radioesterilização apresenta-se como a alternativa mais adequada e segura para a descontaminação de produtos alimentícios e fitoterápicos (Seo *et al.*, 2007).

No Brasil, a radioesterilização está prevista na legislação, mas é pouco difundida (Shim *et al.*, 2009). Uma das razões é a resistência do consumidor devida à desinformação, principalmente sobre a segurança do processo, qualidade nutricional do produto irradiado e métodos confiáveis de detecção que possam ser empregados como padrão (Bhattacharjee *et al.*, 2002). A exigência da legislação e do mercado consumidor pela correta rotulagem de produtos radioesterilizados tem estimulado o estudo de métodos de identificação desses produtos para evitar a re-irradiação, controlar a dose absorvida e verificar o cumprimento dos níveis mínimos de exigência microbiológica, além de contribuir para o maior controle e ampliação do mercado internacional (ANVISA, 2001; Kim *et al.*, 2005b).

A análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) da fração fenólica (**FF**), alcaloídica (**FA**) e saponínica (**FS**) das folhas de *Echinodorus macrophyllus* (“chapéu-de-couro”) submetidas à radiação gama mostrou alterações na composição química dessas frações (Silva, 2010). Uma diminuição de concentração de alguns componentes foi verificada quando ocorre o aumento da energia de radiação gama. Por outro lado, alguns componentes mostraram um aumento de concentração com o aumento da energia de radiação gama,

podendo tratar-se de produtos radiolíticos (Silva, 2010). Nesse estudo prévio foram isolados também ácido *trans*-ferúlico (8) e 6-C-hexa-hidroxi-apigenina (9), Figura 1 (p. 8).

Os resultados obtidos no estudo prévio acima citado indicaram a importância e justificaram a continuidade do trabalho com o estudo das frações que, ainda, não tinham sido estudadas fitoquimicamente para a espécie *Echinodorus macrophyllus*. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo estabelecer as condições experimentais para a radioesterilização de produtos fitoterápicos (*I. laurina* e *E. grandis*), baseando-se na metodologia aplicada ao estudo de *E. macrophyllus*. No presente trabalho, a metodologia desenvolvida para ao estudo de *E. macrophyllus* foi aplicada no estudo de *I. laurina* e *E. grandis*.

No Capítulo I (INTRODUÇÃO) é apresentado inicialmente um levantamento sobre as técnicas de descontaminação microbiana, principalmente sobre a radiação gama e as alterações provocadas pelo uso dessa radiação: alterações organolépticas, na constituição de terpenos, alcalóides, fenóis e na atividade biológica. Por fim, este capítulo descreve as famílias Alismataceae, Fabaceae e Myrtaceae, os gêneros *Echinodorus*, *Inga* e *Eucalyptus* e as espécies *Echinodorus macrophyllus*, *Inga laurina* e *Eucalyptus grandis*.

O Capítulo II (PARTE EXPERIMENTAL) descreve os materiais e equipamentos empregados nas análises cromatográfica das frações, o método utilizado para contagem de microrganismos presentes em amostras vegetais. Além disso, este capítulo descreve o isolamento e identificação dos constituintes dos óleos essenciais (CG-FID e CG-MS) e dos métodos de análise de cromatografia líquida de alta-eficiência (CLAE), analítica e preparativa, e de caracterização estrutural dos fitoconstituintes por espectroscopias nas regiões do Ultravioleta (UV), Infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 1D e 2D. Finalmente, a análise de atividade antioxidante é descrita também.

O Capítulo III (RESULTADOS E DISCUSSÃO), *Análise por CLAE das frações de E. macrophyllus submetidas à radiação gama*, descreve as análises por CLAE analítico das

frações submetidas à radiação gama da espécie *Echinodorus macrophyllus*, evidenciando as principais alterações nos fitoconstituintes presentes nas frações contendo compostos fenólicos, alcaloídicos e saponínicos.

O Capítulo IV (RESULTADOS E DISCUSSÃO), *Óleos essenciais*, descreve o isolamento, identificação e quantificação dos óleos essenciais que não foram submetidos a radiação gama e daqueles submetidos à radiação gama das espécies *Echinodorus macrophyllus*, *Inga laurina* e *Eucalyptus grandis*.

O Capítulo V (RESULTADOS E DISCUSSÃO), *Identificação e análise estrutural fitoquímica de constituintes de E. macrophyllus*, descreve o isolamento dos fitoconstituintes das folhas de *Echinodorus macrophyllus* por CLAE preparativa. A análise estrutural dos fitoconstituintes foi realizada a partir dos dados de UV, IV e RMN 1D (RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e DEPT 135°) e 2D (COSY, HSQC e HMBC).

O Capítulo VI (RESULTADOS E DISCUSSÃO), *Contaminação microbiana e atividade antioxidante*, descreve os ensaios biológicos: teste de contaminação microbiana, isolamento e identificação, além dos testes de atividade antioxidante e anti-inflamatória.

Os anexos apresentam os efeitos do uso de radiação gama, os dados com área, tempo de retenção e intensidades das frações **FF**, **FA** e **FS** submetidas à radiação gama (5,0, 10,0 e 20,0 kGy).

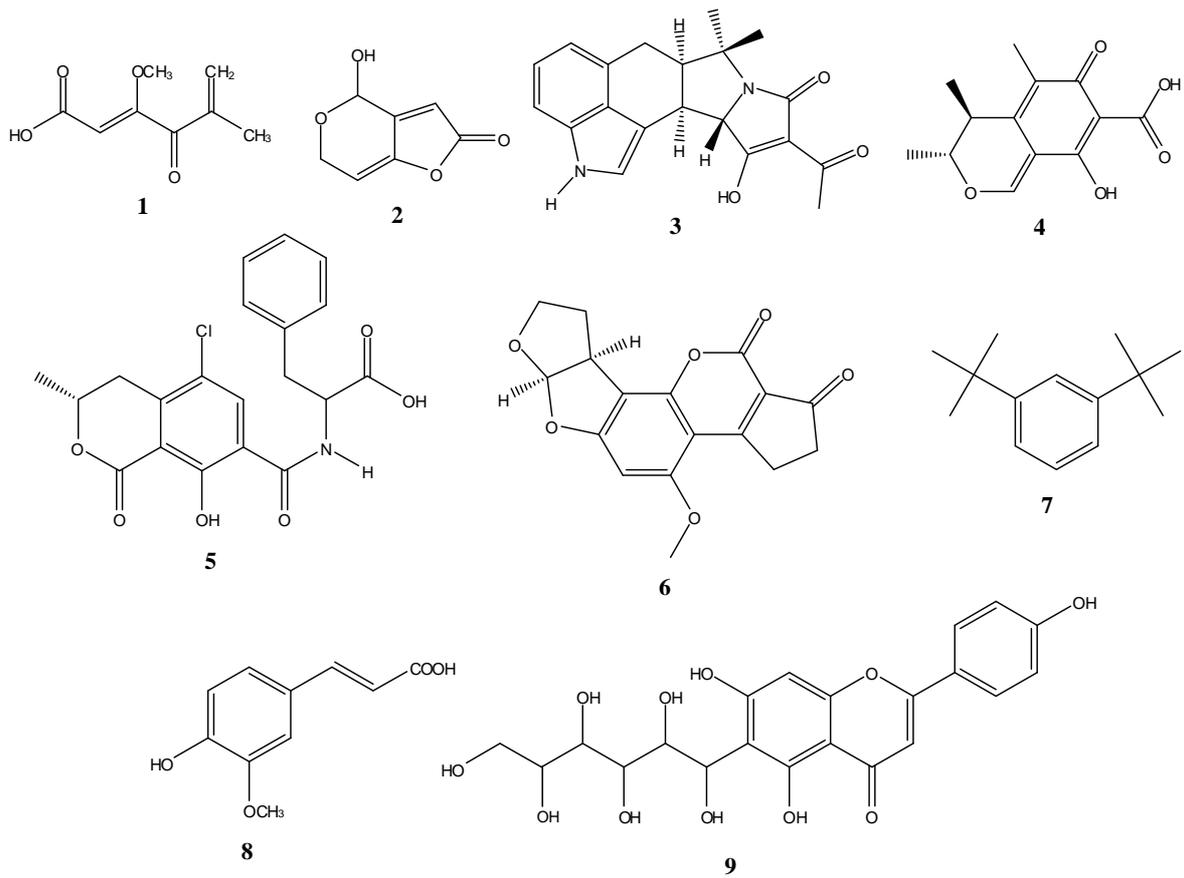


Figura 1. Estrutura química de alguns compostos químicos presentes em alimentos contaminados por fungos (1-6), marcador de alimentos irradiados (7) e isolados de *Echinodorus macrophyllus* (8 e 9).

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO

1. Descontaminação Microbiológica

Descontaminação microbiana é a diminuição ou remoção de microrganismos presentes em um determinado material. As descontaminações microbianas têm sido realizadas por métodos físicos e/ou químicos que atuam principalmente na permeabilidade da membrana celular do microrganismo, promovendo vazamento do seu conteúdo ou causando danos às proteínas e aos ácidos nucleicos. Os vírus com envelopes lipídicos são os menos resistentes, seguidos pelas bactérias *Gram*-positivas, vírus sem envelopes, fungos, bactérias *Gram*-negativas, protozoários, cistos de protozoários, micobactérias e endosporos de bactérias. Por sua vez, os príons são os agentes patogênicos mais resistentes. A Tabela I.1 mostra os principais métodos de descontaminação microbiana (Tortora *et al.*, 2005; Murray *et al.*, 2006).

Tabela I.1. Principais métodos físicos e químicos utilizados em descontaminações microbianas

Método Físico	Método Químico
Calor úmido	Fenol e compostos fenólicos
Pasteurização	Biguanidas (clorexidina)
Calor seco	Halogênios (iodo e cloro)
Filtração	Alcoóis
Refrigeração	Metais pesados
Congelamento	Agentes de superfície (sabões e detergentes)
Liofilização	Ácidos orgânicos
Alta pressão	Aldeídos
Dessecação	Esterilizantes gasosos
Pressão osmótica	Peróxidos (agentes oxidantes)
Radiação não-ionizante	
Radiação ionizante	

1.1. Radiação Ionizante

A energia presente na radiação ionizante é superior à energia de interação dos elétrons de um átomo com o seu núcleo, sendo, portanto, suficiente para promover (excitar) elétrons de orbitais atômicos ou moleculares em seus estados fundamentais (Koseki *et al.*, 2002).

O uso da radiação ionizante na preservação de alimentos iniciou-se antes de 1920. Um número maior de pesquisas utilizando doses variadas de radiação foi publicado somente entre 1950 e 1960, principalmente pelo exército americano (Morehouse & Komolprasert, 2004).

A radiação ionizante utilizada para a descontaminação microbiana pode ser obtida pela aplicação de raios gama (com radioisótopos $^{60}\text{Cobalto}$ ou $^{137}\text{Césio}$), feixes de elétrons de alta energia (com energia superior a 10 MeV, apresentando pouca penetrabilidade) ou raios-x (com energia superior a 5 MeV). O princípio da radiação consiste na formação de elétrons energéticos que se localizam randomicamente em toda a matéria, resultando na geração de íons moleculares energéticos. Dependendo da complexidade estrutural e da estabilidade do íon molecular formado, estes íons podem capturar elétrons, dissociar-se ou, ainda, rearranjar rapidamente em moléculas mais estáveis, através de reações envolvendo íon-molécula (Morehouse & Komolprasert, 2004).

O uso de radiação ionizante pode causar várias alterações na matéria, principalmente alterações químicas por dois caminhos, considerando-se tanto efeitos primários quanto efeitos secundários. Pelos efeitos primários, os produtos radiolíticos podem ser formados como resultado da absorção de energia direta pela matéria. Os efeitos secundários ocorrem como resultado da alta reatividade de radicais-livres e íons excitados produzidos via efeitos primários. Esta alta reatividade dos intermediários pode favorecer várias reações, com alteração química dos constituintes da matéria, conduzindo à formação de substâncias estáveis (Morehouse & Komolprasert, 2004).

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

quantificam os produtos radiolíticos formados, por exemplo, pelo uso de Cromatografia a gás (CG) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE); e (v) métodos biológicos, que se baseiam nas alterações dos microrganismos viáveis (ICGFI, 1999; Morehouse & Komolprasert, 2004).

1.2. Radiação Gama

Os raios- γ do espectro eletromagnético têm comprimentos de onda muito pequenos e, conseqüentemente, são de alta energia. Apesar de o processo de prevenção e controle das micotoxinas não apresentar ainda um modelo seguro e eficaz (Prado *et al.*, 1999), o tratamento por radiação gama (radioesterilização) tem sido uma alternativa para aumentar o tempo de conservação/armazenamento, através do bloqueio do brotamento de bulbos, atraso da maturação e diminuição da contaminação microbiológica de alimentos e produtos fitoterápicos (Prado *et al.*, 1999a; Prado *et al.*, 1999b).

A radiação gama possui algumas vantagens em relação às demais técnicas de radiação ionizante, pois apresenta alto poder de penetração, baixa reatividade química e baixos níveis de resíduos, resultando em um pequeno aumento de temperatura do material irradiado. Com isso, o uso de radiação gama vem crescendo nos últimos anos, principalmente para esterilização de produtos farmacêuticos (Huang *et al.*, 2010). Numerosos estudos estabelecem que a radiação gama pode ser considerada radiologicamente, microbiologicamente e toxicologicamente segura.

Em 1999, mais de 30 países empregavam radioesterilização de produtos alimentares para uso comercial (IGCFI, 1999). Em 2008, 52 países permitiam e empregavam a radiação gama em aproximadamente 250 produtos alimentícios (Shim *et al.*, 2009). A Figura I.1 (p. 13) apresenta os principais países que fazem uso atualmente da tecnologia de radiação gama em radioesterilização para fins comerciais.

Cada país possui uma legislação específica para controle sanitário e, conseqüentemente, estipula a dosagem de radiação para cada material. A Comunidade Européia determinou em 1999 o uso de doses de até 10 kGy. O US Food and Drug Administration limitou o uso de raios- γ em até 30 kGy para ervas culinárias, sementes, temperos, vegetais e misturas de substâncias aromáticas de vegetais. Porém, para eliminação do *Clostridium botulinum*, o US Army Natick Research and Development Laboratories estipulou dosagem de 41,2 kGy e, na África do Sul, é permitido o uso de até 45 kGy de energia de radiação gama (Suhaj *et al.*, 2006; Rajendra *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2010).

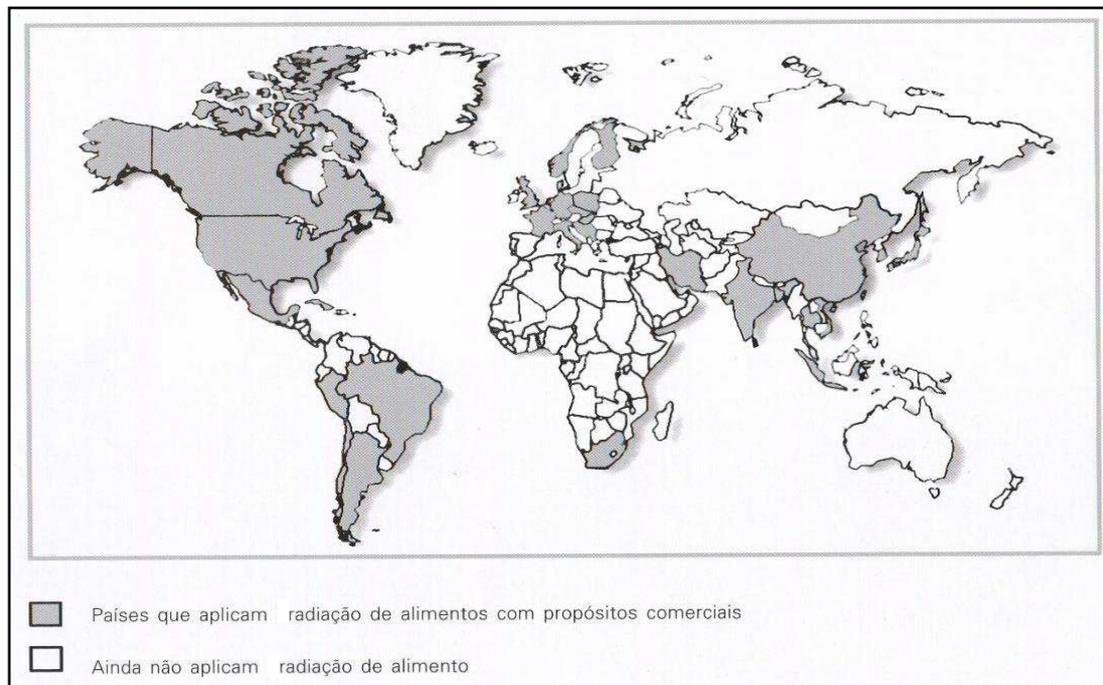


Figura I.1. Principais países que fazem uso da tecnologia de radiação gama para fins comerciais em 1999.

2. Alterações Provocadas pelo Uso de Radiação gama

O uso de radiação ionizante, principalmente raios- γ , pode diminuir a concentração de alguns fitoconstituintes presentes nos fitoterápicos irradiados, devido à formação de radicais-livres. Porém, outros estudos mostram que, dependendo da dose de radiação ionizante e da propriedade do material, a radiação gama pode aumentar a atividade fisiológica das células vegetais e de microrganismos fotossintéticos. A alteração da atividade fisiológica é devida a

alguns fatores, tais como, o aumento da proliferação celular, a melhora da taxa de germinação e/ou crescimento e o aumento da resistência ao “stress”. Raios- γ podem modificar também a estrutura de enzimas presentes nos vegetais e, dependendo da dose de radiação, aumentar a concentração de alguns fitoconstituintes (Kim *et al.*, 2005a; Zhu *et al.*, 2010).

A diminuição da concentração de alguns fitoconstituintes no material irradiado pode ser atribuída a efeitos indiretos e, em alguns casos, a efeitos diretos da radiação. Alguns estudos confirmam a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), principalmente através da radiólise de moléculas de água, e de espécies reativas de nitrogênio (ERN). Essas espécies atuam como radicais-livres e podem atacar e/ou degradar outras substâncias presentes no material vegetal, ou seja, através de efeitos indiretos (Adhikari *et al.*, 2011).

2.1. Alterações Organolépticas

Estudos recentes mostram que raios- γ podem aprimorar a qualidade sensorial de alguns vegetais, principalmente por aumentar a quebra de precursores e liberação dos glicosídeos responsáveis pelo aroma. Porém, a concentração de vanilina, ácido vanilínico, *p*-hidroxibenzaldeído, ácido *p*-hidroxibenzóico e vanilina glicosilada (compostos responsáveis pelo aroma) na espécie *Vanilla planiflora* não foi afetada pelo uso da radiação gama e, dessa forma, a qualidade sensorial da espécie não foi aprimorada (Kumar *et al.*, 2010). Por sua vez, alguns estudos citam alterações de cor em extratos naturais. Como exemplo, o extrato da espécie *Hizikia fusiformis* apresentou sua coloração escura alterada para uma coloração clara após exposição a radiação gama a dose de 10 kGy (Choi *et al.*, 2010).

2.2. Alterações na Constituição de Terpenos

Vários estudos mostram que o uso da radiação gama pode tanto aumentar quanto diminuir a concentração de substâncias terpênicas no material vegetal, principalmente de monoterpenos em óleos essenciais. Substâncias tais como α -pineno, sabineno, mirceno,

limoneno e γ -terpineno (Figura I.2) teve suas concentrações aumentadas em três variedades de *Maroc late* (laranjas) quando se faz uso de raios- γ (Belli-Donini & Baraldi, 1977; Moussaid *et al.*, 2004). O aumento da concentração dos terpenos oxigenados β -eudesmol, α -eudesmol e verbenona (Figura I.2) foi verificado quando o óleo essencial de *Angelica gigas* Nakai foi submetido à radiação gama (Seo *et al.*, 2007).

Porém, outros estudos mostram uma diminuição da quantidade de óleo essencial extraído de *Piper nigrum* (pimenta preta) (Piggott & Othman, 1993), de *D*-limoneno, mirceno e de outros compostos voláteis nos extratos de *Citrus paradisi* quando submetidos a dose de 1 kGy (Vanamala *et al.*, 2007), além da degradação de linalol, antranilato de metila e citral (Figura I.2) foi verificada em cascas de *Maroc late* (Moussaid *et al.*, 2004).

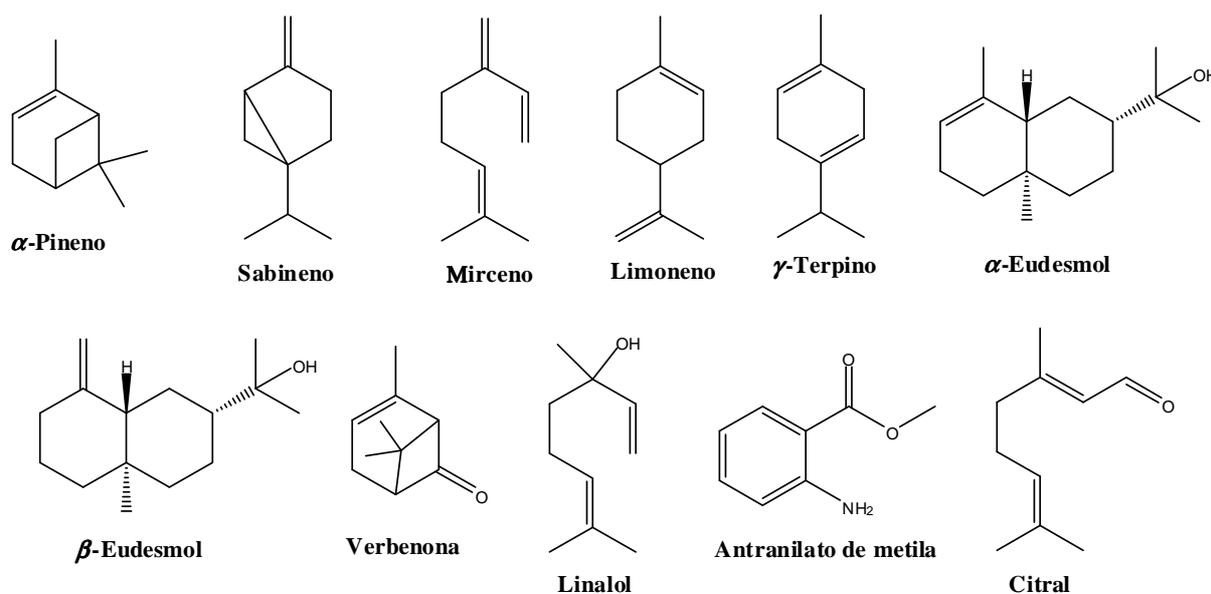


Figura I.2. Estrutura química dos constituintes terpênicos presentes em óleo essencial de espécies vegetais.

2.3. Alteração na Constituição de Alcalóides

A radiação gama provoca também alterações da concentração de alcalóides. O uso de radiação gama em injeções de morfina e efedrina (Figura I.3, p. 16), com a finalidade de descontaminação, resulta em suas decomposições e diminuição da atividade destes alcalóides (Chakchir & Bobkov, 1978). Uma diminuição da concentração de alcalóides (etilenoimina e colchicina) (Figura I.3; p. 16) ocorre também ao expor exemplares das espécies *Peganum*

harmala e *Ageratum conyzoides* à radiação gama (Agarwal & Verma, 1988; Gadzhieva & Faradzhev, 2007). Porém, o aumento da concentração dos alcalóides hiosciamina e hioscina (Figura I.3) tem sido verificado quando exemplares das espécies *H. niger* e *D. stramonium* são submetidos à radiação gama. A radiação gama favorece a biossíntese dos principais compostos que propiciam a atividade de *D. stramonium*, espécie rica em compostos alcaloídicos (El-Hamidi *et al.*, 1966; Malik *et al.*, 1972; Popiashvili *et al.*, 2006).

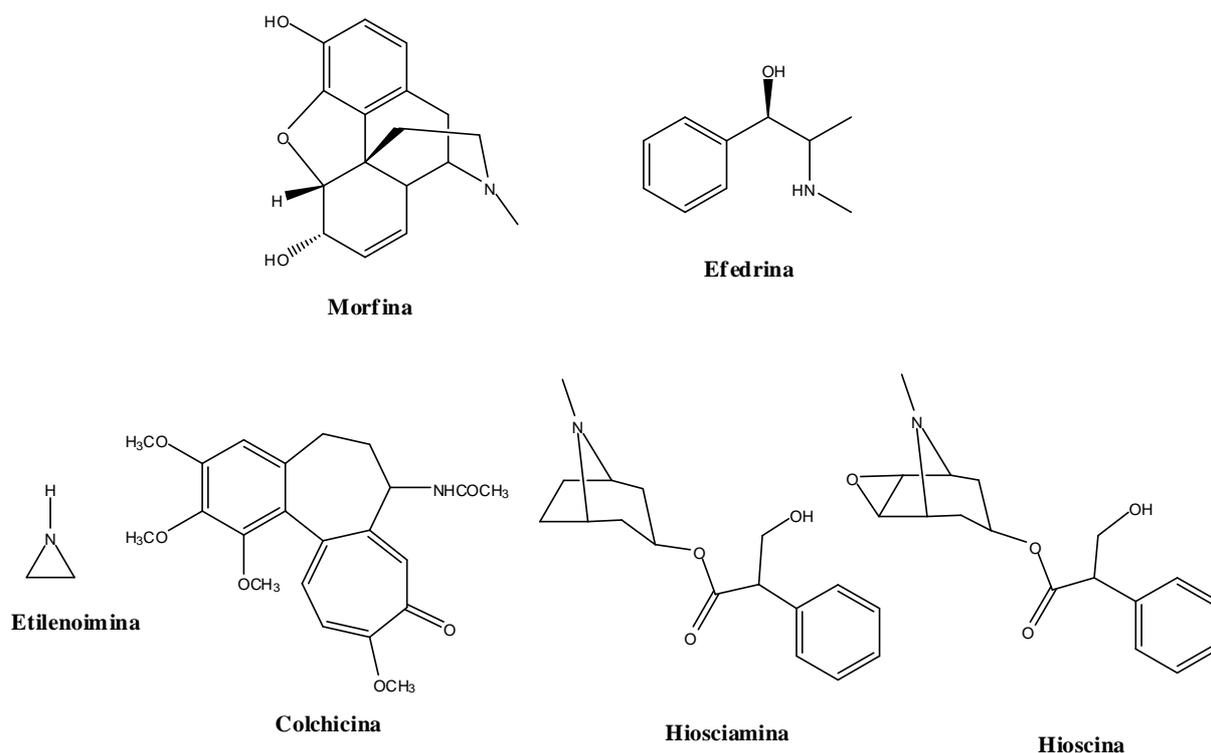


Figura I.3. Estrutura química dos alcalóides identificados em espécies vegetais.

2.4. Alteração na Constituição Fenólica

A enzima fenilalanina-amoníaco-liase (PAL) é responsável pela biossíntese de antocianinas e compostos fenólicos. O uso da radiação gama aumenta a atividade desta enzima, principalmente a doses que variam entre 1,6 e 2,0 kGy. O aumento do processo enzimático é mais pronunciado quando o material vegetal é armazenado por longos períodos (HUSSAIN *et al.*, 2010).

Assim, o uso da radiação em ervas fitoterápicas pode favorecer a atividade antioxidante, pelo aumento da concentração dos compostos fenólicos, porém, os raios- γ podem tanto

diminuir quanto aumentar a concentração dos compostos fenólicos, dependendo da dose incidida. O uso de doses entre 8 e 10 kGy aumenta a concentração de compostos fenólicos e a atividade antioxidante em algumas espécies (Zhu *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2010).

Similar aos compostos fenólicos, a biossíntese das antocianinas é regulada principalmente pela enzima PAL. O aumento da concentração de antocianinas em *Prunus persica* Bausch (pêssego) foi verificado quando a amostra foi submetida à radiação a dose de 1,1 kGy. Porém, a diminuição da concentração de constituintes fenólicos nesse vegetal foi verificada a doses superiores a 10 kGy (Morehouse & Komolprasert, 2004; Hussain *et al.*, 2008).

A diminuição da concentração de constituintes fenólicos e da atividade antioxidante em extratos irradiados foi verificada recentemente, quando as folhas de *Echinodorus macrophyllus* foram submetidas às doses de 1,0, 3,0, 5,0, 10,0 e 20,0 kGy. Esse fato mostra o poder radioprotetor da espécie estudada (Silva *et al.*, 2012).

2.5. Alteração na Atividade Biológica

As atividades diurética, espasmolítica, colagogo (aumento da secreção da bili), digestiva, antibiótica, calmativa e anti-inflamatória foram testadas para 10 preparações fitoterápicas. Nesse estudo, foi mostrado que, a doses de até 10 kGy, as preparações apresentam ação terapêutica idêntica à do material não irradiado (Owczarczyk *et al.*, 2000).

3. A Família Alismataceae

Alismataceae pertence à classe das Liliopsida (monocotiledôneas), correspondendo, em número de espécies, à segunda maior classe das Angiospermas (Cronquist, 1988). A família é constituída por cerca de 100 espécies e 16 gêneros. Dentre seus gêneros, *Echinodorus* e *Sagittaria* possuem as maiores diversidades específicas, apresentando 45 e 35 espécies, respectivamente (Judd *et al.*, 2008). As plantas dessa família são normalmente aquáticas ou

semi-aquáticas, sendo encontradas frequentemente em lagos, pântanos, rios ou córregos de água doce. A grande maioria das espécies é caracterizada por plantas com raízes fixas na água ou em brejos e apresentam folhas eretas ou flutuantes, sendo halófitas ou hidrófitas (Haynes *et al.*, 1998).

As espécies dessa família são distribuídas amplamente em todos os continentes e apresentam poucas diferenças evolutivas entre si. De modo geral, as espécies são classificadas por diferentes formas e, por isso, apresentam várias sinonímias (Lehtonen, 2009). Suas espécies são usadas como fontes de alimentos e de fitoterápicos e na ornamentação de aquários e lagoas.

4. O Gênero *Echinodorus*

O gênero *Echinodorus* é constituído por plantas aquáticas e pantaneiras que crescem ocasionalmente submergidas, mas possuem folhas e inflorescências predominantemente emersas, ou seja, são halófitas (Haines & Holm-Nielsen, 1986).

No Brasil, são encontradas 17 espécies, distribuídas principalmente nos Estados de São Paulo e Minas Gerais e no Nordeste Brasileiro (Costa *et al.*, 2006). No Nordeste, predominam formas intermediárias; isto é, populações híbridas apresentando indivíduos com características de duas ou mais espécies do gênero (Matias, 2007).

Poucos estudos fitoquímicos sobre espécies do gênero *Echinodorus* são descritos na literatura. A espécie *Echinodorus grandiflorus* tem sido estudada, descrevendo-se principalmente o isolamento de ácidos graxos, diterpenos, triterpenos e esteróides (Tanaka, 2000). Nesta espécie, o diterpeno denominado ácido equinóico (**10**) Figura I.4 (p. 19) é o fitoconstituente isolado em maior proporção no extrato etanólico das folhas e relacionado com a atividade biológica da planta (Tanaka *et al.*, 1997; Costa *et al.*, 1999).

5. A Espécie *Echinodorus macrophyllus*

5.1. Características Morfológicas

A espécie *E. macrophyllus* foi descrita pela primeira vez por Micheli em 1881 (Lehtonen, 2009). As folhas são pecioladas, ovais de base cordiforme, agudas ou acuminadas no ápice, limbos inteiros, comprimentos entre 20 e 40 cm e largas entre 15 e 35 cm, com superfície rugosa, áspera e de 11 a 13 nervuras principais na página inferior. O pecíolo é longo, coriáceo, medindo até 70 cm de comprimento, com sulcos longitudinais e providos de estrias longitudinais. As flores são brancas, hermafroditas, perfeitas, numerosas, dispostas em racismos e alongadas (Oliveira & Akisue, 1991; Leite *et al.*, 2007). A Figura I.4 apresenta fotos de exemplares da espécie *Echinodorus macrophyllus* Mich.



Figura I.4. Exemplares da espécie *Echinodorus macrophyllus* (Filho, 2010; Sobrinho & Silva, 2010).

5.2. Distribuição, Nomes Populares e Classificação Taxonômica

Os exemplares dessa espécie são encontrados na América do Sul, principalmente no Brasil e, mais precisamente, em áreas alagadas da Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. Nos

estados das Regiões Norte (Roraima, Amapá e Pará), Nordeste (Piauí e Bahia), Centro-Oeste (Mato Grosso), Sudeste (Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais) e Sul (Paraná), nos estados coloridos (Matias, 2010) é conhecida popularmente como “chapéu-de-couro”, “congonha-de-bugre”, “congonha-do-campo” ou “erva-de-bugre” (Toledo *et al.*, 2010). A distribuição geográfica da espécie está apresentada no mapa da Figura I.5.



Figura I.5. Distribuição geográfica da espécie *E. macrophyllus* no Brasil (Matias, 2010).

A Tabela I.2 mostra a classificação taxonômica da espécie *Echinodoros macrophyllus* Mich. de acordo com Cronquist, em 1988.

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

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

5.3. Atividade Biológica

E. macrophyllus e *E. grandiflorus* são as únicas espécies do gênero que são utilizadas na medicina tradicional. *E. macrophyllus* foi inscrita nas primeiras edições da Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil (1929 e 1959), tendo sido retirada nas edições posteriores, pois seu uso como fitoterápico depende do avanço de novos estudos (Leite *et al.*, 2007).

E. macrophyllus é uma planta medicinal que possui um amplo espectro farmacológico, apresentando atividades depurativa, emoliente, tônica, anti-sifilítica, antiofídica, diurética, anti-reumática, anti-inflamatória e empregada no tratamento de aterosclerose e doenças de pele, fígado e das vias urinárias (litíase e nefrite) (Tanaka, 2000). Apesar de poucos estudos terem sido descritos na literatura, há relatos que confirmam os efeitos imunossupressor e citotóxico em doses elevadas da planta (Lopes *et al.*, 2000; Pinto *et al.*, 2007). Sob o ponto de vista farmacológico, extratos aquosos da planta têm efeitos imunossupressores. Estes efeitos podem fazer parte do tratamento da resposta humoral exacerbada e/ou condições de resposta imune celular em doenças imunoinflamatória crônica, doenças autoimunes, transplantes e enxertos.

Além disso, as folhas da planta são utilizadas popularmente por decocção com água, na forma de chás, tinturas ou em pó, além da maceração do rizoma em etanol para uso tópico em feridas e no reumatismo (Matias, 2010).

5.4. Constituintes Químicos Isolados de *Echinodorus macrophyllus*

Até o presente, poucos estudos fitoquímicos sobre *E. macrophyllus* foram realizados, tendo sido identificados por testes químicos representantes das classes dos alcalóides, glicídeos, óleos essenciais, ácidos orgânicos, heterosídeos e taninos.

Alguns estudos mostraram o isolamento e identificação dos diterpenos *trans*-fitol (**11**), echinofilina A (**12**), echinofilina B (**13**), echinofilina C (**14**), echinofilina D (**15**), echinofilina E (**16**), echinofilina F (**17**), chapecoderina A (**18**), chapecoderina B (**19**), chapecoderina C

(20), echinodolideo A (21) e echinodolideo B (22), cujas estruturas químicas são mostradas na Figura I.6. Os compostos 21 e 22 são considerados derivados do ácido equinóico 10 isolado da espécie *E. grandiflorus* (Migdal *et al.*, 1998; Kobayashi *et al.*, 2000a; Kobayashi *et al.*, 2000b; Kobayashi *et al.*, 2000c; Shigemori *et al.*, 2002).

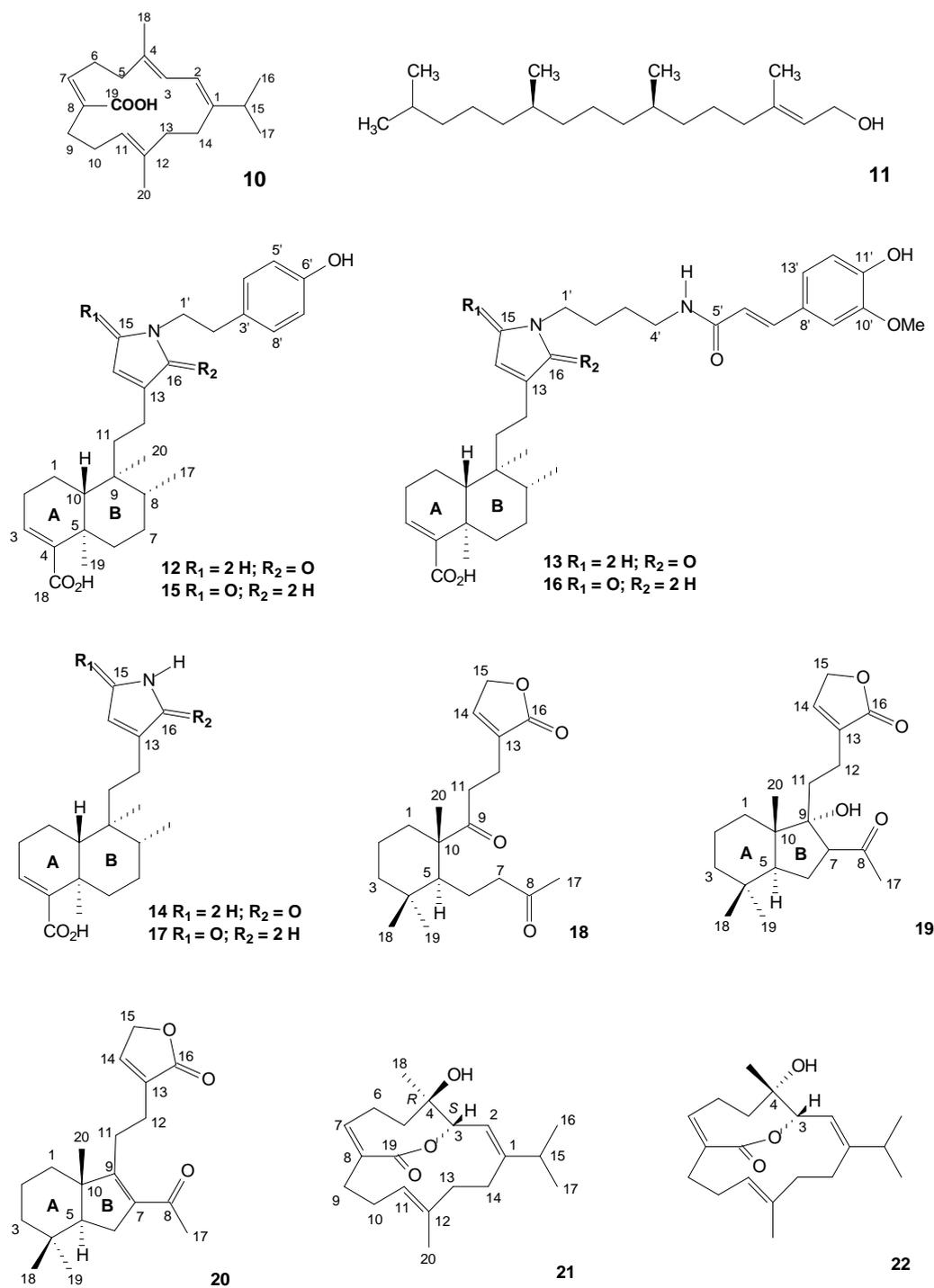


Figura I.6. Estrutura química de fitoconstituintes isolados de *Echinodorus macrophyllus*.

6. A Família Fabaceae

A família Fabaceae é uma das maiores dentre as dicotiledôneas, com mais de 19.000 espécies distribuídas amplamente em todos os continentes. Seus representantes ocupam os mais variados habitats (Lewis *et al.*, 2005), concentrando-se nas regiões tropicais e subtropicais, apresentando significativa riqueza para a composição arbórea das formações florestais (Vitousek *et al.*, 2002; Broughton *et al.*, 2003). Suas plantas são de hábito variado, desde grandes árvores das matas tropicais a arbustos, subarbustos, ervas anuais ou perenes (Bell *et al.*, 1978). No Brasil é uma das mais diversas e abundantes famílias de plantas superiores, presente praticamente em todos os biomas (Vitousek *et al.*, 2002; Broughton *et al.*, 2003).

A família Fabaceae é constituída por vegetais que fornecem os mais diversos produtos como alimentos, forragem para a criação de gado, substâncias medicinais, pesticidas, combustíveis e produtos industriais (Ottobelli *et al.*, 2011).

7. O Gênero *Inga*

O nome *Inga* tem origem indígena no termo angá, que significa em tupi "que possui semente" (Possette & Rodrigues, 2010). O gênero *Inga* é um dos maiores gêneros de leguminosas com cerca de 400 espécies. Destas, 140 espécies são encontradas no Brasil, sendo 93 espécies encontradas no litoral brasileiro (Mata & Felix, 2007). Com origem nas florestas tropicais de baixa elevação do Brasil, estende-se até o norte do México. *Inga* caracteriza-se basicamente por apresentar folhas paripenadas, com nectário na raque foliar, localizado entre cada par de folíolos e legume, com sementes envolvidas por sarcotesta carnosa e adocicada. Suas espécies apresentam potencial econômico no reflorestamento, fitoterapia, produção de energia e alimentação (Pritchard *et al.*, 1995; Morton, 1998; Caramori *et al.*, 2008).

8. A Espécie *Inga laurina*

8.1. Características Morfológicas

A espécie *Inga laurina* é representada por árvores de até 15 m de altura com ramos cilíndricos a levemente angulosos. Suas folhas são pecioladas, vestigialmente aladas, glabras, alas terminais pouco proeminentes, cuneadas, dispostas normalmente em perfil de “U”. A planta apresenta 1-2 pares de folíolos elípticos com nectários sésseis ou elevados até 1 mm de altura, com inflorescências em espigas cilíndricas. As flores são sésseis com cálices campanulados, corolas infundibuliformes e pétalas de 4,5 a 5 mm. Os frutos são sésseis, coriáceos, glabros, amarelos quando maduros e inseridos excentricamente nos pedúnculos, oblongos com sementes elípticas, verdes, adocicada e comestível. Floresce principalmente entre os meses de setembro e novembro e frutifica entre os meses de dezembro e janeiro (Machado *et al.*, 2007; Sousa *et al.*, 2011). A Figura I.7 apresenta fotos de exemplares da espécie *Inga laurina* (SW.) Willd.



Figura I.7. Exemplares da espécie *Inga laurina* (SW.) Willd (Gilson, 2012).

8.2. Distribuição, Nomes Populares e Classificação Taxonômica

Inga laurina não é endêmica do Brasil, sendo encontrada na Amazônia, na Caatinga, no Cerrado e na Mata Atlântica, principalmente nas Regiões Norte (Pará, Amazonas e Acre), Nordeste (Maranhão, Ceará, Paraíba, Pernambuco e Bahia), Centro-Oeste (Goiás, Distrito Federal e Mato Grosso do Sul) e Sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Rio de Janeiro) nos estados coloridos (Matias, 2010). A distribuição geográfica desta espécie é apresentada no mapa da Figura I.8, sendo popularmente conhecida, no Brasil, como ingá branco e plantada amplamente como uma árvore de sombra em áreas urbanas (Machado *et al.*, 2007).

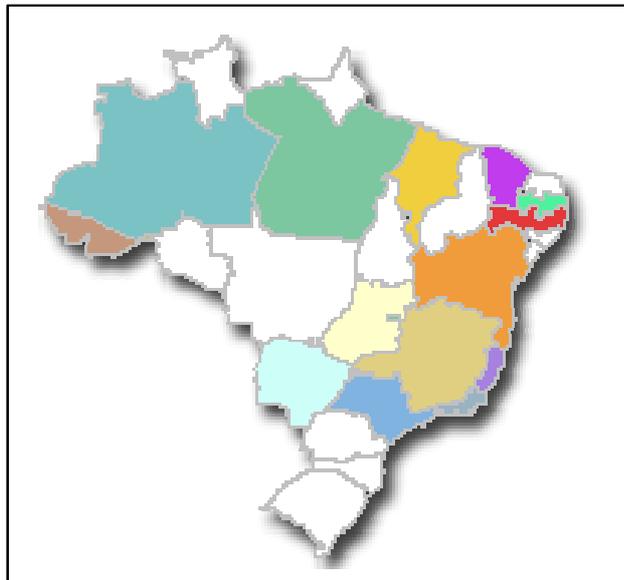


Figura I.8. Distribuição geográfica da espécie *Inga laurina* no Brasil (Matias, 2010).

A Tabela I.3 (p. 26) mostra a classificação taxonômica da espécie *I. laurina* de acordo com Cronquist, em 1988.

Tabela I.3. Classificação taxonômica da espécie *Inga laurina*

Reino:	Plantae
Divisão:	Magnoliophyta
Classe:	Magnoliopsida
Ordem:	Fabales
Família:	Fabaceae
Gênero	<i>Inga</i>
Espécie:	<i>Inga laurina</i> (SW.) Willd

8.3. Constituintes Químicos Isolados de *Inga laurina* e Atividade Biológica

Embora *I. laurina* seja importante na flora brasileira, seus constituintes químicos e bioquímicos são pouco conhecidos (Machado *et al.*, 2007). Galoil-depsídeos derivados da tirosina compreendem a grande maioria dos metabólitos fenólicos encontrados nas folhas jovens de *I. laurina* e apresentam considerável atividade antioxidante frente ao radical DPPH quando comparados com a vitamina C (Venkateswara *et al.*, 2011). Outro metabólito fenólico encontrado nas folhas desta espécie é o flavonóide miricetina (**23**, Figura I.9) (Lokvan *et al.*, 2007).

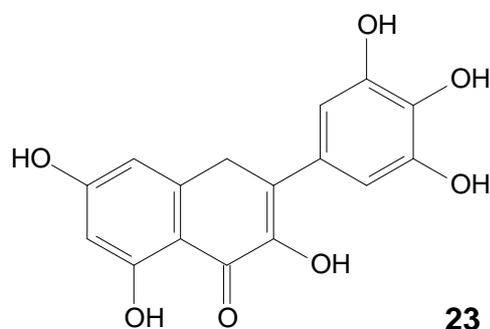


Figura I.9. Estrutura da miricetina isolada de *Inga laurina*.

O inibidor de tripsina (ILTI) é um polipeptídeo isolado em sementes do *I. laurina*. Este tipo de inibidor forma complexos estáveis com proteases alvo, bloqueando, alterando ou impedindo o acesso ao sítio ativo da enzima. Este fitoconstituente pode estar envolvido nos mecanismos de defesa deste vegetal contra pragas e doenças, além de ter um papel no tratamento de patologias humanas, tais como na coagulação do sangue, hemorragia, inflamação e câncer (Machado *et al.*, 2007).

9. A Família Myrtaceae

A família Myrtaceae pertence à ordem das Myrtales (Dicotiledônea) e compreende cerca de 133 gêneros e mais de 3.800 espécies de árvores ou arbustos que se distribuem por todos os continentes, à exceção da Antártica, mas com nítida predominância nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Wilson *et al.*, 2001; Stefanello *et al.*, 2011). No Brasil, Myrtaceae é uma das famílias mais importantes, sendo representada por aproximadamente 1.000 espécies em várias formações vegetais (Pereira *et al.*, 2012).

Representantes desta família são fontes ricas em compostos biologicamente ativos (Maciel *et al.*, 2010). Várias espécies da família Myrtaceae são cultivadas devido os seus frutos comestíveis de raro sabor e gosto (Stefanello *et al.*, 2011), além de seus efeitos no tratamento de diarreias, antioxidante, hipolipidêmico e efeito larvicida dentre outros (Park *et al.*, 2011; Vieira *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2012; Araújo *et al.*, 2014). Porém, outras espécies da família Myrtaceae estão sob risco de extinção, desaparecendo da natureza antes mesmo que se tenha conhecimento básico de sua biologia e química (Pereira *et al.*, 2012).

10. Gênero *Eucalyptus*

Dentro da família Myrtaceae, o gênero *Eucalyptus* é economicamente o mais importante, sendo composto por mais de 700 espécies (Santos *et al.*, 2013). Muitas espécies desse gênero apresentam taxa de crescimento rápido, adaptabilidade a diferentes solos e climas e resistência a estresses bióticos, além da facilidade de propagação. Especialmente no Brasil, Chile, África do Sul, Portugal e Índia, a madeira de espécies de *Eucalyptus* é utilizada amplamente para a produção de pasta de celulose e papel (Oliveira *et al.*, 2012). No Brasil, árvores de *Eucalyptus* são as mais plantadas em projetos de reflorestamento, podendo ser cultivadas em vários tipos de solo incluindo, solos ácidos e pobres em nutrientes (Bini *et al.*, 2012).

11. A Espécie *Eucalyptus grandis*

11.1 Características Morfológicas

A espécie *Eucalyptus grandis* é representada por árvores possuindo cascas lisa, áspera na base ou em flocos, de coloração cinza a marrom. Uma árvore adulta pode chegar a 50 m de altura, embora alguns exemplares atinjam 80 m de altura. Apresenta folhas lanceoladas, verde escuro brilhante e com 10 a 16 cm de comprimento e 2 a 3 cm de largura. As folhas são dispostas alternadamente ao longo da ramos e com textura coriácea, com glândulas que contêm óleos voláteis perfumados. As flores brancas aparecem a partir de meados do mês de abril até agosto e estão dispostas em grupos de sete a onze cabeças de flor. As flores são em forma de cone em botão que medem de 5 a 8 mm de comprimento e 4-7 mm de espessura, sendo cobertas por uma membrana (Babalola *et al.*, 2013a; Babalola *et al.*, 2013b; Santos *et al.*, 2013). A Figura I.10 apresenta fotos de exemplares da espécie *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden.



Figura I.10. Exemplares da espécie *Eucalyptus grandis* (Smith, 2014).

11.2. Distribuição, Nomes Populares e Classificação Taxonômica

A espécie *Eucalyptus grandis*, pertencente à família das Myrtaceae, é uma árvore nativa da costa leste da Austrália. No Brasil encontra-se distribuída em todas as regiões: Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul, nos estados coloridos. A distribuição geográfica dessa espécie é apresentada na Figura I.11. *E. grandis* é conhecida popularmente, no Brasil, como “eucalipto”, “calipe”, “eucalipto-prateado”, “eucalipto-cheiroso”.



Figura I.11. Distribuição geográfica da espécie *Eucalyptus grandis* no Brasil (Matias, 2014).

Eucalyptus grandis é a espécie de *Eucalyptus* mais cultivada para fins comerciais, especialmente no Brasil e na África do Sul (Santos *et al.*, 2013). A Tabela I.4 mostra a classificação taxonômica da espécie *E. grandis* de acordo com Cronquist, em 1988.

Tabela I.4. Classificação taxonômica da espécie *Eucalyptus grandis*

Reino:	Plantae
Divisão:	Angiosperma
Classe:	Dicotiledônea
Ordem:	Myrtales
Família:	Myrtaceae
Gênero	<i>Eucalyptus</i>
Espécie:	<i>Eucalyptus grandis</i> Hill ex Maiden

11.3. Constituintes Químicos Isolados de *Eucalyptus grandis* e Atividade Biológica

Eucalyptus grandis tem sido bastante estudado e suas folhas contêm os triterpenos pentacíclicos: ácido oleanólico (24), ácido ursólico (25), ácido betulínico (26) e ácido maslínico (27) (Babalola *et al.*, 2013a; Babalola *et al.*, 2013b) (Figura I.12).

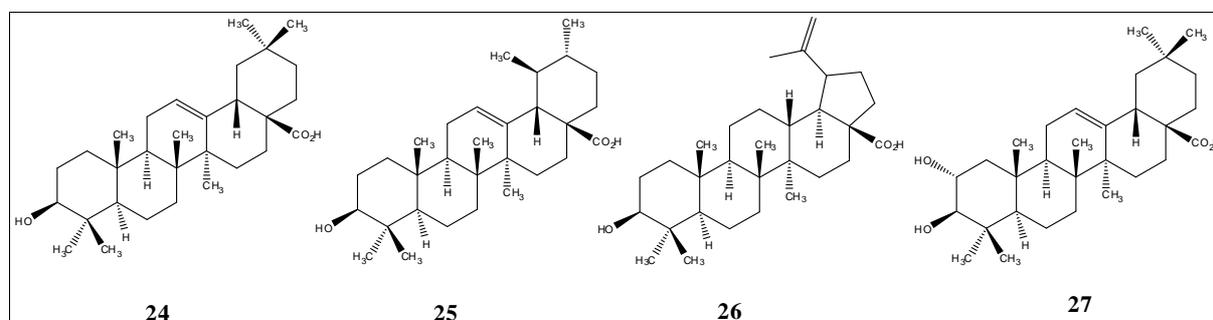


Figura I.12. Triterpenos pentacíclicos identificados nas folhas de *Eucalyptus grandis*.

Além disso, no caule de *E. grandis* foram identificados por CLAE-EM 26 compostos fenólicos: ácido quínico (28), galoilglicose (29), ácido gálico (30), ácido protocatecuico (31), galato de metila (32), digaloilglicose (33), catequina (34), ácido gálico-galoilglicose (35), metil-floroglucinol-*O*-galoilglicose (36), cafeinato de isoprenila (37), ácido elágico hexosídeo (38), trigaloilglicose (39), galato de diepicatequina (40), taxifolina (41), ácido elágico (42), ácido elágico pentosídeo (43), metil-floroglucinol-*O*-digaloilglicose (44), ácido dimetil-elágico glicosídeo (45), isoramnetina pentosídeo (46), isoramnetina raminosídeo (47), floridizina (48), eriodictiol (49), quercetina (50), dimetil-hesperetina (51), cinamoil-galoilglicose (52), floretina (53). A Figura I.13 (p. 31) mostra a estrutura química dos compostos identificados no caule de *Eucalyptus grandis*.

O óleo essencial extraído das folhas de *E. grandis* é relatado como anti-séptico, desinfetante e antioxidante. A decoção das folhas dessa espécie é utilizada no tratamento de gripe, constipações, dores de garganta e tuberculose (Babalola *et al.*, 2013a; Babalola *et al.*, 2013b; Soyngbe *et al.*, 2013).

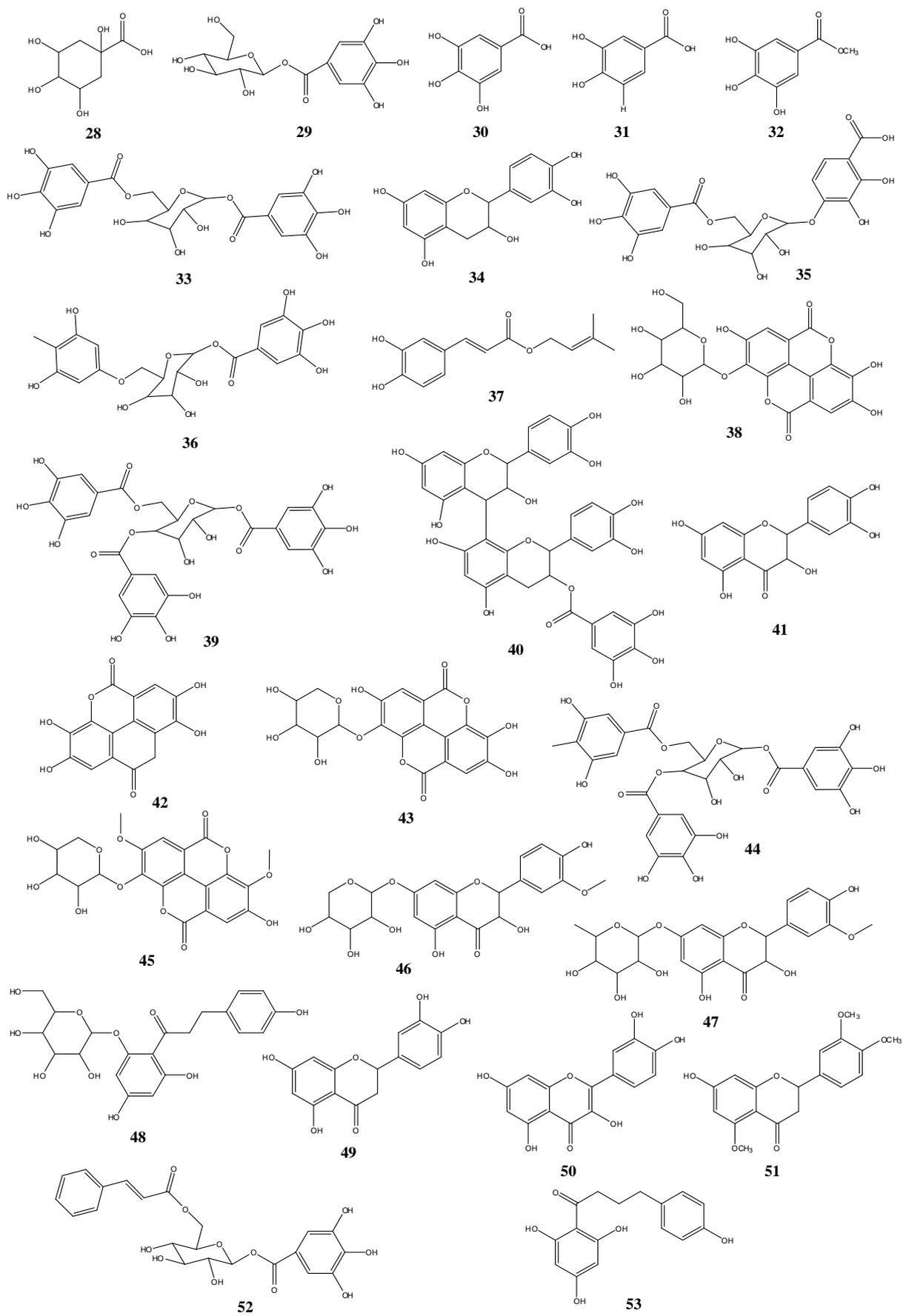


Figura I.13. Estrutura química dos compostos identificados no caule de *Eucalyptus grandis*.

CAPÍTULO II

PARTE EXPERIMENTAL

1. Equipamentos

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em escala analítica foram realizadas em cromatógrafo líquido SHIMADZU, equipado com duas bombas LC-20AT, detector UV/VIS SPD-20A, software LCsolution v.1.21 (SHIMADZU) e coluna NSTC18, com dimensão de 250 mm x 3,0 mm x 5 μ m, LC100111 (NST). Para análises preparativas e conseguinte separação de fitoconstituintes foi usado o cromatógrafo líquido VARIAN PRO STAR, equipado com uma bomba PS210, detector UV/VIS PS325, coluna NSTC18, com dimensão de 250 mm x 10,0 mm x 5 μ m, LC280211 (NST) e software GALAXIE v. 1.10.0.5550.

Após os procedimentos preparativos, as amostras foram liofilizadas empregando o equipamento TermoFisher SCIENTIFIC, FR-Drying Digital Unit. As determinações de ponto de fusão foram realizadas em aparelho METTLER FP80 SNR H22439. As análises por espectroscopia de absorção na região do Infravermelho (IV) foram realizadas em espectrômetro Spectrum One (ATR) – PERKIN ELMER. As leituras das absorbâncias para a análise da atividade antioxidante foram realizadas em espectrofotômetro UV-Visível, UVmini-1240, SHIMADZU.

A determinação das substâncias presentes na fração em hexano de *Echinodorus macrophyllus* e nos óleos essenciais foram realizadas por análises de CG-FID em aparelho HP Gas Chromatography HP 5890, com detector FID. As separações foram realizadas em coluna capilar Equity-5 (30 m x 0,25 mm com 0,25 μ m de espessura) e as análises de CG-Massas em aparelho SHIMADZU GC-MS QP5050A, equipado com coluna capilar DB-5 (30 m x 0,25 mm com 0,25 μ m de espessura) acoplado ao detector de massas.

As análises por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram realizadas em espectrômetro BRUKER DRX-400 linha AVANCE. Os deslocamentos químicos foram registrados em unidade δ em ppm e as constantes de acoplamento escalar (J)

em Hz. Tetrametilsilano (TMS) foi empregado como padrão de referência interna, tendo DMSO- d_6 como solvente.

As amostras foram submetidas à radiação gama, no Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear – CDTN, no radiador Gama - Cell com fonte de irradiação de ^{60}Co . A taxa de dose da radiação gama foi de 2,50 kGy/h com erro de $\pm 0,02$ kGy.

2. Contaminação Microbiana

2.1. Contagem de Microrganismos Presentes em Amostras Vegetais

As folhas da espécie *E. macrophyllus* foram submetidas a doses de radiação gama de 0,0, 1,0, 3,0, 5,0, 10,0 e 20,0 kGy. Uma massa de 100 mg do material vegetal foi misturada a 10 mL de caldo Sabouraud, preparada previamente (20 g de caldo para 1 L de água). A solução foi agitada vigorosamente durante 1 h, sendo, em seguida, diluída com auxílio de uma pipeta esterilizada (1 mL da solução em tubo de ensaio contendo 9 mL de água esterilizada). A diluição foi homogeneizada e repetida, obtendo-se cinco diluições seriadas.

Um volume de 0,1 mL foi retirado de cada diluição e espalhado por toda a superfície de placas contendo Agar Sabouraud, utilizando alça de Drigalski e, em seguida, encubada para favorecer o crescimento microbiano. Todo o procedimento foi realizado em duplicata (Santos *et al.*, 2006).

As colônias foram contadas e as unidades formadoras de colônias (UFC) foram calculadas para todas as amostras submetidas à radiação gama, de acordo com a Equação 1.

$$\text{UFC} = (\text{n}^\circ \text{ de colônias}) \times 10 \times (\text{diluição utilizada para a contagem}) \quad (1)$$

2.2. *Obtenção dos Microrganismos e Identificação das Espécies*

Os fungos foram isolados usando alça de Henle e transferidos para outra placa contendo Agar Sabouraud, sendo aplicados em quatro pontos da placa. Este procedimento é conhecido como isolamento e purificação dos microrganismos.

Após estarem totalmente puros, os fungos foram transferidos para tubos de ensaios contendo Agar Sabouraud e armazenados em geladeira.

3. Metodologia Fitoquímica

3.1. *Material Vegetal*

3.1.1. *Echinodorus macrophyllus*

As folhas de *E. macrophyllus* foram adquiridas no Mercado Central de Belo Horizonte em agosto de 2010, coletadas previamente no Município de Esmeraldas (MG). Uma exsicata da espécie vegetal encontra-se depositada no Herbário do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o código: BHCB 28.557.

3.1.2. *Inga laurina*

As folhas de *I. laurina* foram coletadas no Município de Uberlândia (MG) latitude 18°55'53'' S e longitude 48°16'23'' W, em janeiro de 2012. Uma exsicata da espécie vegetal encontra-se depositada no Herbário da Universidade Federal de Uberlândia sob o código: Voucher n° 61752.

3.1.3. *Eucalyptus grandis*

As folhas de *E. grandis* foram coletadas na fazenda Quilombo no Município de Monte Alegre de Minas (MG) latitude 19°00'24,28" S e longitude 48°43'21,18" W, em fevereiro de 2013.

3.2. Obtenção dos Extratos em Hexano e Etanol das folhas de *E. macrophyllus*

As partes aéreas de *Echinodorus macrophyllus* foram submetidas à secagem em estufa por aproximadamente uma semana, à temperatura média de 60 °C. O material vegetal foi pulverizado em moinho de esferas, obtendo-se as massas indicadas na Figura II.1. As partes aéreas pulverizadas (1532,20 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 à temperatura de aproximadamente 60 °C e obtendo-se, após evaporação do solvente, o extrato em hexano (EH; 32,9746 g). A torta obtida no processo de preparação do extrato em hexano foi submetida a nova extração com etanol (EtOH) a frio, obtendo-se o extrato em etanol (EE; 98,1460 g).

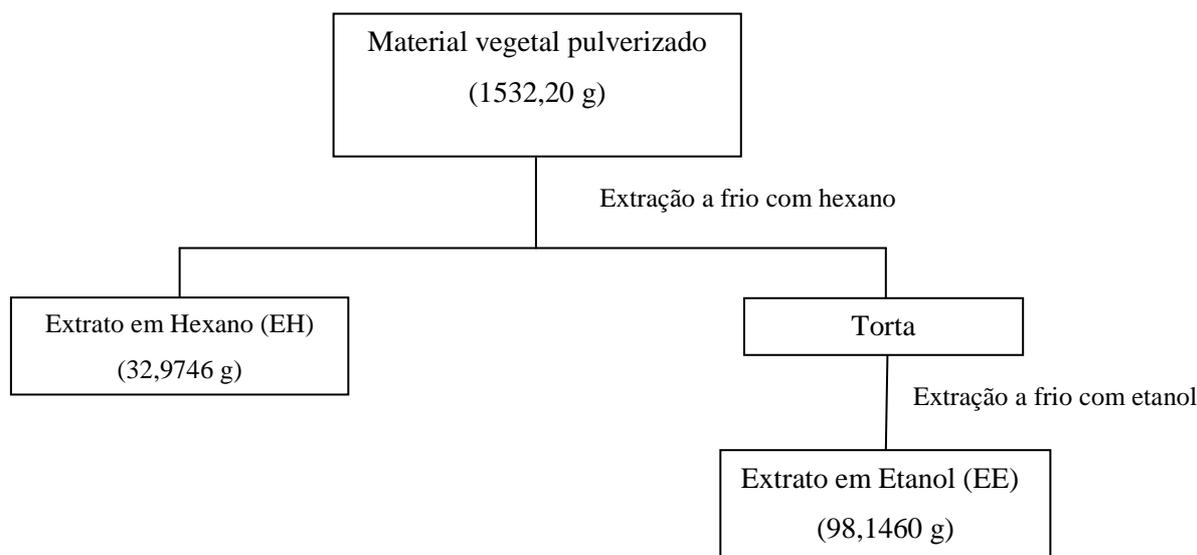


Figura II.1. Esquema de obtenção dos extratos em hexano e etanol de *Echinodorus macrophyllus*.

3.2.1. Fracionamento do Extrato em Hexano de *Echinodorus macrophyllus*

O extrato em hexano (EH, 20,0 g) foi submetido ao fracionamento em coluna cromatográfica (CC) de sílica gel, sendo coletadas 110 frações de 250 mL eluídas em hexano (Hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e etanol (EtOH), em gradiente

crescente de polaridade. Após análise comparativa por cromatografia em camada delgada (CCD) de sílica gel, as frações foram reunidas em grupos, conforme Tabela II.1.

Tabela II.1. Frações e grupos resultantes do fracionamento cromatográfico de EH em sílica gel

Fração	Eluente	Grupo	Massa (g)
01-05	Hexano	HR01	0,021
06-10	Hexano	HR02	0,013
11-13	Hexano	HR03	0,005
14-16	Hexano	HR04	0,007
17-20	Hexano	HR05	0,005
21-23	Hexano	HR06	0,011
24-30	Hexano	HR07	0,018
31-40	Hexano	HR08	0,054
41-44	Hexano	HR09	0,358
48-51	DCM	HR10	0,220
52-58	DCM	HR11	0,158
59-64	DCM	HR12	0,359
65-69	Acetato	HR13	0,115
70-73	Acetato	HR14	0,296
74-76	Acetato	HR15	0,420
77-80	Acetato	HR16	0,250
81-83	Acetato	HR17	0,119
84-88	Etanol	HR18	0,358
89-91	Etanol	HR19	0,323
92-95	Etanol	HR20	0,259
96-100	Etanol	HR21	0,113
101-103	Etanol	HR22	0,100
104-110	Etanol	HR23	0,090

Os grupos HR02, HR05, HR06, HR07 e HR08, após total evaporação do solvente, foram submetidos à cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas, e, por comparação com a biblioteca NIST, foi possível identificar por similaridade do espectro de massas alguns constituintes presentes no extrato em hexano de *E. macrophyllus*.

O grupo HR09 foi submetido novamente ao fracionamento por CC de sílica gel, sendo coletadas 141 frações de 125 mL eluídas em Hex, AcOEt e EtOH 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 resultantes do fracionamento cromatográfico de HR09 em sílica gel

Fração	Eluente	Grupo	Massa (g)
1-2	Hexano	AR01	0,010
3-7	Hexano	AR02	0,008
8-13	Hexano	AR03	0,010
14-20	Hexano	AR04	0,005
21-50	Acetato	AR05	0,004
51-64	Acetato	AR06	0,008
65-74	Acetato	AR07	0,010
75-77	Acetato	AR08	0,005
78-114	Acetato	AR09	0,009
115-119	Acetato	AR10	0,007
120-131	Acetato	AR11	0,008
132-135	EtOH	AR12	0,001
136-141	EtOH	AR13	0,258

Os grupos AR01, AR02 e AR03 foram submetidos à cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas. Enquanto que o grupo AR13 (0,258 g) foi fracionado novamente em CC de sílica gel usando como eluente a mistura isocrática DCM/MeOH (4:1), obtendo-se 40 frações que foram reunidas conforme Tabela II.3.

Tabela II.3. Frações e grupos resultantes do fracionamento cromatográfico de AR13 em sílica gel

Fração	Eluente	Grupo	Massa (g)
1-2	DCM/Metanol (4:1)	B01	0,015
3	DCM/Metanol (4:1)	B02	0,002
4-9	DCM/Metanol (4:1)	B03	0,008
10-12	DCM/Metanol (4:1)	B04	0,152
13-16	DCM/Metanol (4:1)	B05	0,010
17	DCM/Metanol (4:1)	B06	0,008
18-19	DCM/Metanol (4:1)	B07	0,015
20-40	DCM/Metanol (4:1)	B08	0,020

O grupo B05 foi submetido à cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas. Enquanto que os grupos B03 e B04 foram reunidos e fracionados novamente em CC de sílica gel usando como eluente a mistura isocrática DCM/Hexano (2:1), obtendo-se 114 frações que foram reunidas conforme Tabela II.4.

Tabela II.4. Frações e grupos resultantes do fracionamento cromatográfico de B03 e B04 em sílica gel

Fração	Eluente	Grupo	Massa (g)
1-4	DCM/Hexano (2:1)	C01	0,001
5-9	DCM/Hexano (2:1)	C02	0,002
10-20	DCM/Hexano (2:1)	C03	0,001
21-33	DCM/Hexano (2:1)	C04	0,002
36-43	DCM/Hexano (2:1)	C05	0,001
44-59	DCM/Hexano (2:1)	C06	0,001
60-64	DCM/Hexano (2:1)	C07	0,120
65-103	DCM/Hexano (2:1)	C08	0,020
104-105	DCM/Hexano (2:1)	C09	0,005
106-114	DCM/Hexano (2:1)	C10	0,002

O grupo C02 foi submetido à cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas. Enquanto que o grupo C07 (0,120 g) foi fracionado novamente em CC de sílica gel usando como eluente DCM, obtendo 32 frações que foram reunidas conforme Tabela II.5.

Tabela II.5. Frações e grupos resultantes do fracionamento cromatográfico de C07 em sílica gel

Fração	Eluente	Grupo	Massa (g)
1-5	DCM	D01	0,008
6-10	DCM	D02	0,017
11-20	DCM	D03	0,002
21-26	DCM	D04	0,008
26-32	DCM	D05	0,005

O grupo D02 (0,017 g) foi submetido à recristalização em MeOH, fornecendo sólido branco que foi submetido à cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas e à análise estrutural por Ressonância Magnética Nuclear.

3.3. Análise por CG do Óleo Essencial Obtido das Folhas de *E. macrophyllus*, *I. laurina* e *E. grandis* Antes e Após Serem Submetidos à Radiação gama

3.3.1 Obtenção do Material Vegetal Submetido à Radiação gama

As folhas de *Echinodorus macrophyllus*, *Inga laurina* e *Eucalyptus grandis* foram secadas e pulverizadas. Seis amostras pulverizadas contendo cada uma 250 g de *E. macrophyllus*, seis amostras pulverizadas contendo cada uma 100 g de *I. laurina* e seis amostras pulverizadas contendo 60 g de *E. grandis* foram colocadas em embalagens “Zip Lock” de sacos de polietileno herméticos. Uma amostra de cada espécie vegetal não foi submetida à radiação gama e as outras amostras submetidas a doses de 1,0, 3,0, 5,0, 10,0 e 20,0 kGy em aparelho de Gama-Cell com fonte de ^{60}Co .

3.3.2. Extração do Óleo Essencial

Após submetidas à radiação gama, todas as amostras de *E. macrophyllus*, *I. laurina* e *E. grandis* foram submetidas a hidrodestilação em aparelho de Clevenger com 3 L de água, durante 5 h, para *E. macrophyllus*, 3 L de água e 3 h para *I. laurina* e 1 L de água durante 2 h para *E. grandis*. Essas amostras já tinham sido analisadas previamente para determinar quantidade de amostra e o tempo da hidrodestilação. Após a hidrodestilação, os óleos essenciais foram particionados com diclorometano e, em seguida, submetidos à evaporação do solvente (Pimenta *et al.*, 2006). A Tabela II.6 (p. 41) apresenta a massa dos óleos essenciais isolados de *E. macrophyllus*, *Inga laurina* e *E. grandis*.

Tabela II.6. Massa do óleo essencial extraído das folhas de *E. macrophyllus*, *I. laurina* e *E. grandis* submetidas a diferentes doses de radiação gama

Dose de Irradiação	Massa (mg) de óleo essencial extraído de <i>E. macrophyllus</i>	Massa (mg) de óleo essencial extraído de <i>I. laurina</i>	Massa (mg) de óleo essencial extraído de <i>E. grandis</i>
0 kGy	69,5	3,3	277,8
1 kGy	167,4	3,7	423,1
3 kGy	115,9	1,4	454,4
5 kGy	180,0	1,4	486,1
10 kGy	145,3	2,4	498,7
20kGy	104,5	1,8	458,3

3.3.3. Análises do óleo essencial por CG-FID

As análises de CG-FID foram realizadas em aparelho HP5890 com detector FID. Hidrogênio foi usado como gás de arraste com fluxo de 2 mL/min. Exatamente 1 μ L das amostras foi injetado com gradiente de temperatura de 60 °C, 0 min, 3 °C/min até 270 °C. As temperaturas do injetor e do detector foram de 270 e 300 °C, respectivamente (Pimenta *et al.*, 2006; Radulovic *et al.*, 2010).

As amostras foram diluídas em clorofórmio (1% p/v) e os constituintes foram identificados usando os parâmetros de índice de retenção baseados no método de Kováts com comparação com índices de retenção linear de padrões (C₁₀-C₁₈).

3.3.4. Análises do óleo essencial por CG-EM

As análises por CG-Massas foram realizadas em aparelho SHIMADZU com detector de Massas. Hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 2 mL/min, as condições cromatográficas foram as mesmas descritas acima nas análises de CG-FID (Pimenta *et al.*, 2006; Radulovic *et al.*, 2010).

Os dados espectrométricos foram manipulados usando o software GCMSolutions. A identificação foi realizada pela comparação dos picos obtidos no espectro de massas com aqueles do banco de dados NIST8.

3.4. Obtenção do Extrato Aquoso de *E. macrophyllus*, Isolamento e Radiação dos Constituintes Polares

As folhas da espécie *Echinodorus macrophyllus* (250 g) foram submetidas à decocção com água por 2 h à temperatura de 60 °C, sendo, em seguida, filtradas, obtendo-se o extrato aquoso de *E. macrophyllus* (EAq). EAq foi colocado em funil de adição e hidróxido de amônia foi adicionado até pH 10–11. Em seguida, 100 mL de solução acetato de etila:éter etílico (3:1) foram adicionados, obtendo-se duas fases: a Fase Aquosa e a Fase Orgânica que foram, então, separadas. A Fase Aquosa foi acidificada com HCl até pH 1–2 e submetida novamente à extração com solução acetato de etila:éter etílico (3:1), obtendo-se a fase aquosa **FB** (rica em aminoácidos, ácidos orgânicos e açúcares) e a fase orgânica **FF** (rica em compostos fenólicos do tipo flavonóides). Por sua vez, a Fase Orgânica foi acidificada com HCl até pH 2 e submetida à extração com solução de água acidificada com HCl (pH 2), obtendo-se a fase aquosa **FA** (rica em alcalóides) e a fase orgânica **FS** (rica em saponinas). A Figura II.2 (p. 43) apresenta a sequência metodológica para o isolamento dos constituintes polares do EAq das folhas de *E. macrophyllus* (Silva *et al.*, 2012).

Após a obtenção das frações ricas em compostos fenólicos, saponinas e alcalóides, diluíram-se 50 μ L de **FF** em 950 μ L em água e 200 μ L de **FS** em 800 μ L em água, enquanto que **FA** não foi diluída. Em seguida, o volume de 1 mL foi submetido à radiação gama em doses de 0,0, 5,0, 10,0 e 20,0 kGy, obtendo-se as frações irradiadas correspondentes (**FF**₀, **FF**₅, **FF**₁₀, **FF**₂₀, **FA**₀, **FA**₅, **FA**₁₀, **FA**₂₀, **FS**₀, **FS**₅, **FS**₁₀ e **FS**₂₀, respectivamente).

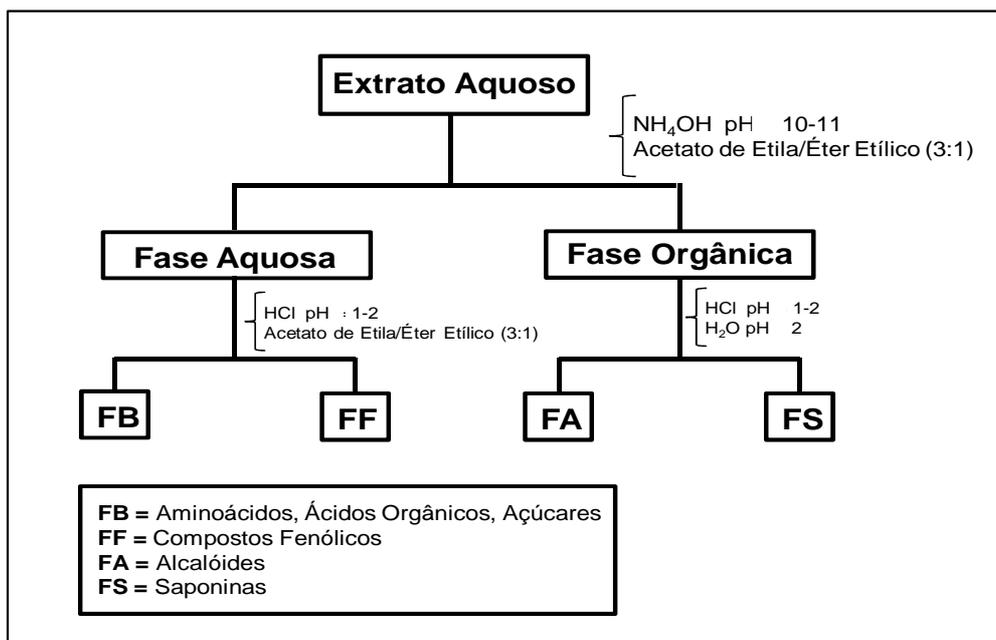


Figura II.2. Sequência metodológica para o isolamento dos constituintes polares do EAQ das folhas de *E. macrophyllum*.

3.4.1. Análise por CLAE das Frações FF Submetidas a Diferentes Doses de Radiação gama

Análises por CLAE foram realizadas com a finalidade de investigar o efeito da radiação gama e possível formação das espécies reativas de oxigênio (EROs) sobre as amostras de **FF**. Dessa forma, alíquotas de **FF₀**, **FF₅**, **FF₁₀** e **FF₂₀** foram analisadas por CLAE, no modo isocrático, utilizando uma mistura de solventes, empregando os eluentes (**A**) metanol e (**B**) água:ácido trifluoroacético (99,5:0,5 v/v, pH 4,3) como fase móvel, contendo 70% de **B** e 30% de **A** em um intervalo de 0,0 a 40,0 min. O volume de injeção foi de 20 µL, injetado manualmente, com fluxo mantendo-se constante a uma taxa de 0,7 mL/min e utilizando coluna NSTC18 (250 mm x 3,0 mm x 5 µm) LC100111 (NST) (Gardana *et al.*, 2007; Medana *et al.*, 2008; Chirinos *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2012). Os dados cromatográficos para todas as amostras foram obtidos, analisados e armazenados a 280 nm e 254 nm.

3.4.2. Análise por CLAE das Frações FA Submetidas a Diferentes Doses de Radiação gama

A fim de avaliar a influência da radiação gama nos constituintes das amostras e na possível formação de EROs presentes nas frações **FA₀**, **FA₅**, **FA₁₀** e **FA₂₀**, análises por CLAE

foram realizadas utilizando fase móvel constituída por dois solventes: (A) metanol e (B) água. Em um sistema de gradiente isocrático, a concentração foi mantida em 90% de B e 10% de A de 0,0 a 15,0 min. Injetaram-se manualmente 20 µL de cada amostra, o fluxo de 0,7 mL/min e utilizou-se coluna NSTC18 (250 mm x 3,0 mm x 5 µm) LC100111 (NST) (Szepesy *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2012). Os cromatogramas foram obtidos e analisados a 220 e 280 nm.

3.4.3. Análise por CLAE das Frações FS Submetidas a Diferentes Doses de Radiação gama

As frações **FS₀**, **FS₅**, **FS₁₀** e **FS₂₀** foram analisadas utilizando um sistema eluente composto por dois solventes: (A) acetonitrila e (B) água:ácido trifloroacético (99,5:0,5 v/v pH 4,3). Da mesma forma, o processo foi isocrático, mantendo-se a uma concentração de 70% de B e 30% de A por 15 min. As amostras foram aplicadas manualmente com um volume de injeção igual a 20 µL, fluxo constante de 0,7 mL/min e coluna NSTC18 (250 mm x 3,0 mm x 5 µm) LC100111 (NST) (Li *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2012). Os cromatogramas obtidos foram analisados e armazenados a 210 e 250 nm. Apesar de a literatura citar o comprimento de onda de 250 nm como apropriado para este tipo de análise, os resultados obtidos neste comprimento de onda não foram satisfatórios e, portanto, não foram analisados.

3.5. Extrato Submetido ao Fracionamento Fitoquímico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

As folhas secas e pulverizadas (1 kg) de *Echinodorus macrophyllus* foram submetidas aos mesmos procedimentos descritos nos itens 3.4 (Obtenção do Extrato Aquoso de *E. macrophyllus*, Isolamento e Radiação dos Constituintes Polares) e 3.4.1. (Análise por CLAE das Frações FF Submetidas a Diferentes Doses de Radiação gama). Sendo assim, as folhas sofreram decocção em água à 60 °C durante 2 horas obtendo-se o extrato aquoso não

irradiado (**ENI***), após filtração o extrato aquoso foi particionado em diferentes valores de pH e obtiveram-se por sua vez, as frações **FB***, **FF***, **FA*** e **FS*** correspondentes, conforme Figura II.2 (p. 43). As frações **FB***, **FA*** e **FS*** não foram estudadas ainda.

3.5.1. Fracionamento Cromatográfico de *FF**

Com a finalidade de isolar e identificar os fitoconstituintes presentes nas folhas de *E. macrophyllus*, realizou-se um fracionamento preparativo da fração **FF***. Utilizando o sistema isocrático descrito no item 3.6.1, foi preparada uma solução contendo dois solventes, (**A**) metanol e (**B**) água:ácido trifluoroacético (99,5:0,5 v/v), com uma concentração final de 70% de **B**, visto que o cromatógrafo é composto por apenas uma bomba.

Um volume de injeção de 1 mL foi aplicado manualmente com fluxo constante de 4,7 mL/min, de acordo com as especificações “Scale-up” linear da coluna NSTC18 (250 mm x 10,0 mm x 5 μ m) LC280211 (NST). Os cromatogramas foram obtidos a $\lambda = 280$ nm e armazenados utilizando o software GALAXIE. Os fitoconstituintes foram separados manualmente, liofilizados e pesados conforme mostrado na Tabela II.7.

Tabela II.7. Massa dos fitoconstituintes isolados por CLAE preparativo das folhas de *E. macrophyllus*

Constituinte	Massa (mg)
F01	52,30
F02	5,70
F03	22,50
F04	7,90
F05	8,30

4. Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante das frações fenólicas foi analisada qualitativamente por cromatografia em camada delgada (CCD) e revelada com solução em metanol de β -caroteno

(0,02%) e DPPH (0,2%) (De Abreu *et al.*, 2008). As análises quantitativas foram realizadas pelas metodologias: Atividade Antioxidante pelo Sequestro de Radical Livre (FRSA) e Atividade Antioxidante Total (AAT).

4.1. Atividade Antioxidante pelo Sequestro de Radical Livre (FRSA)

Uma quantidade de 1 mg dos compostos isolados de **FF*** (F01, F03 e F05) foi diluída em 10 mL de metanol, obtendo-se uma solução 0,1 mg/mL. Um volume de 100 μ L das amostras foi colocado em contato com 5 mL de solução em metanol de DPPH (0,1 mM). A mistura resultante foi agitada vigorosamente em vórtex e mantida em repouso por 30 min. Um tubo contendo apenas 100 μ L de metanol e 5 mL de DPPH foi usado como controle e outro contendo apenas metanol foi utilizado como branco. Um volume de 100 μ L de uma solução em metanol de ácido gálico a 100 ppm foi utilizado como padrão. As absorbâncias foram medidas a 517 nm e todos os testes de atividade antioxidante foram realizados em duplicata. A atividade de sequestro do radical-livre de DPPH (Free Radical Scavering Activity, FRSA) foi expressa como porcentagem de inibição e calculada usando a Equação 2 (Silva *et al.*, 2012).

$$FRSA (\%) = \frac{(Absorbância\ Controle - Absorbância\ Amostra)}{Absorbância\ Controle} \times 100\% \quad (2)$$

4.2. Determinação da Atividade Antioxidante Total (AAT)

Partindo da mesma solução preparada no item anterior (1 mg da substância em 10 mL de metanol) para os constituintes fenólicos extraídos de **FF***, prepararam-se três diluições diferentes (0,10, 0,05 e 0,01 mg/mL). Em uma sala escura e sob temperatura ambiente transferiu-se 0,1 mL de cada solução e adicionaram-se 3,9 mL de DPPH (0,06 nM) em tubos de ensaio, em triplicata. Utilizaram 0,1 mL de metanol com 3,9 mL de DPPH como solução

controle e, como branco, apenas metanol. A leitura das absorvâncias foi realizada a 515 nm e, através da reta do gráfico para cada constituinte (F1, F3 e F5), foi possível calcular EC_{50} , ou seja, a quantidade exata para que possa captura 50% dos radicais-livres de DPPH (Rufino *et al.*, 2007).

CAPÍTULO III

RESULTADOS E DISCUSSÃO

*Análise por CLAE das frações de *E. macrophyllus* submetidas à radiação*

gama

1. Análise das Frações Fenólicas (FF) de *E. macrophyllus*

A fração fenólica (FF) apresentou-se como uma solução amarela. A Figura III.1 mostra o cromatograma de CLAE da fração fenólica não submetida à radiação gama (FF₀) e a Tabela III.1 (p. 50) mostra os valores de tempo de retenção (TR; em min), área e intensidade dos picos do cromatograma de CLAE correspondente. O cromatograma de FF₀ apresenta 12 picos, podendo ser considerado como uma mistura rica em compostos fenólicos. O pico 6 registrado em TR = 6,81 min é o mais intenso, seguido pelos picos 3, 2, 12 e 10 (TR = 4,21, 2,93, 22,07 e 15,67, respectivamente). Os demais picos são pouco intensos, correspondendo a substâncias fenólicas em menores proporções.

Os cromatogramas de CLAE foram obtidos a 280 e 254 nm. Porém, somente o cromatograma obtido a 280 nm foi analisado, por apresentar melhor resolução dos picos dos fitoconstituintes da fração fenólica.

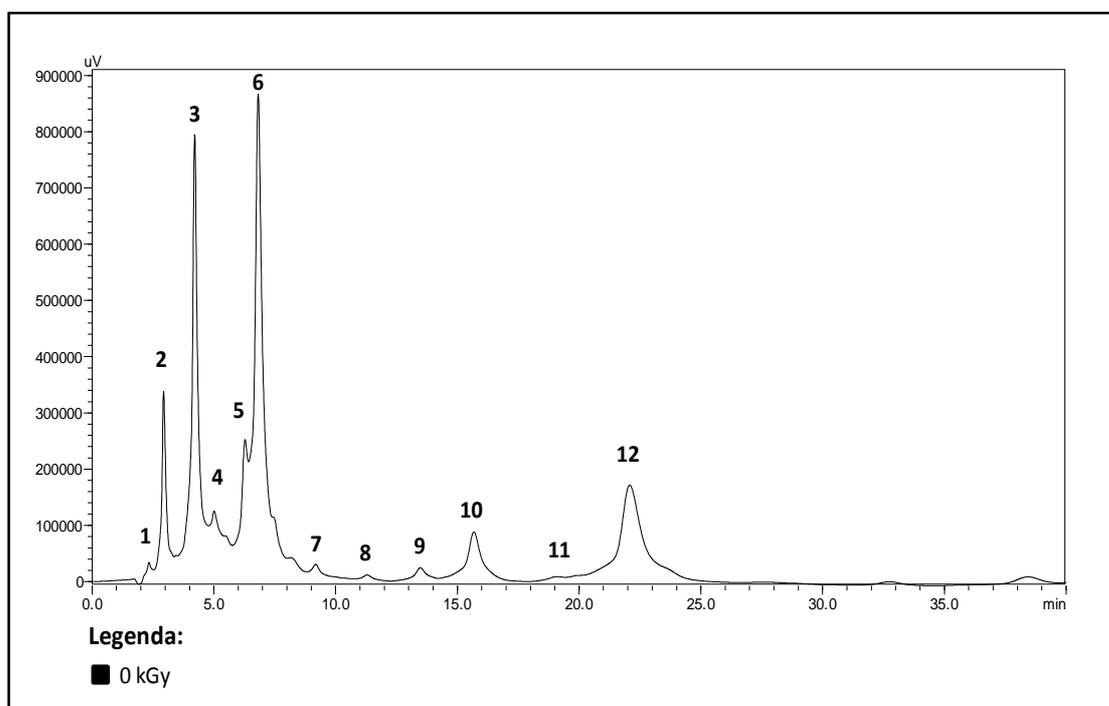


Figura III.1. Cromatograma de CLAE a 280 nm de FF₀ em TR entre 0,0 e 40,0 min.

Tabela III.1. Valores de tempo de retenção (TR; em min), área e intensidade dos picos do cromatograma de CLAE a 280 nm de **FF₀** mostrado na Figura III.1 (p. 49)

Dose de radiação = 0,0 kGy							
Pico	TR (min)	Área	Intensidade	Pico	TR (min)	Área	Intensidade
1	2,33	302.917,0	23092,3	7	9,18	271.300,8	15564,3
2	2,93	3.558.541,9	306482,8	8	11,29	184.245,7	7743,2
3	4,21	10.657.033,4	717818,3	9	13,48	621.756,0	20251,8
4	5,01	417.225,5	32377,4	10	15,67	3.606.880,3	83530,2
5	6,28	897.579,4	86834,1	11	19,10	91.417,5	3161,9
6	6,81	12.069.805,8	690797,6	12	22,07	8.665.047,9	152137,4

A Figura III.2 (p. 51) mostra os cromatogramas de CLAE a 280 nm das frações fenólicas submetidas à radiação gama a doses de 5,0, 10,0 e 20,0 kGy (**FF₅**, **FF₁₀** e **FF₂₀**, respectivamente), comparados com o cromatograma correspondente de **FF₀** (mostrado anteriormente na Figura III.1). Ampliações destes cromatogramas são mostradas na Figura III.3 (p. 52). As Tabelas com os valores de TR, área e intensidade dos picos dos cromatogramas de CLAE de **FF₅**, **FF₁₀** e **FF₂₀** são mostradas nos Anexos A-1 a A-3 (p. 153), respectivamente.

Os cromatogramas apresentam modificações na concentração dos fitoconstituintes quando os extratos são submetidos à radiação gama. A grande maioria dos constituintes diminui sua concentração no extrato com o uso da radiação gama. Essa diminuição é significativa para os picos 2, 3, 6, 9, 10 e 12 (TR = 2,93, 4,21, 6,81, 13,48, 15,67 e 22,07 min, respectivamente), conforme mostrado no gráfico (A) da Figura III.4 (p. 53). Este efeito pode ser explicado considerando que EROs podem reagir com a amostra e diminuir a concentração de alguns dos componentes da fração fenólica. Para o pico 4 (TR = 5,01 min) ocorre uma diminuição da concentração em dose menor e, com o aumento da dose de radiação, a concentração aproxima-se ao da amostra não irradiada. O contrário é observado para o pico 5 (TR = 6,28 min) em que há um leve aumento da concentração em doses menores e, com o aumento da dose, ocorre uma diminuição da concentração, conforme mostrado no gráfico (B)

da Figura III.4. Por sua vez, ocorre um aumento da concentração dos picos 1, 7, 8 e 11 (TR = 2,33, 9,18, 11,29 e 19,10 min, respectivamente), conforme mostrado no gráfico (C) da Figura III.4 (p. 53). Nos casos dos picos 7, 8 e 11, devido a baixa resolução do cromatograma nesse intervalo de tempo, o cálculo da área dos picos torna-se impreciso e, no caso do pico 1, pode ser considerado como possível produto radiolítico.

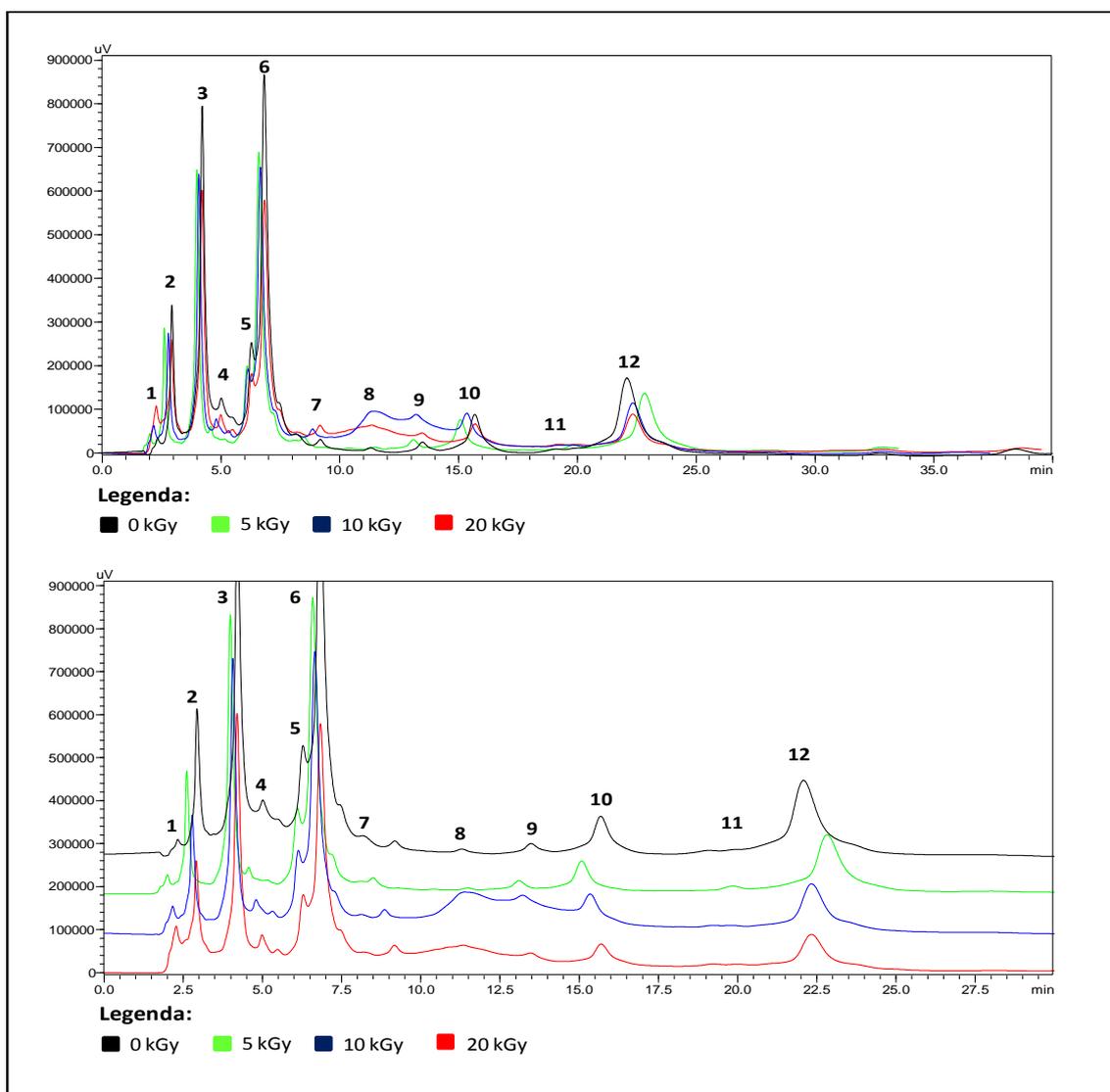


Figura III.2. Cromatogramas de CLAE a 280 nm de FF_5 , FF_{10} e FF_{20} comparados com o cromatograma correspondente de FF_0 .

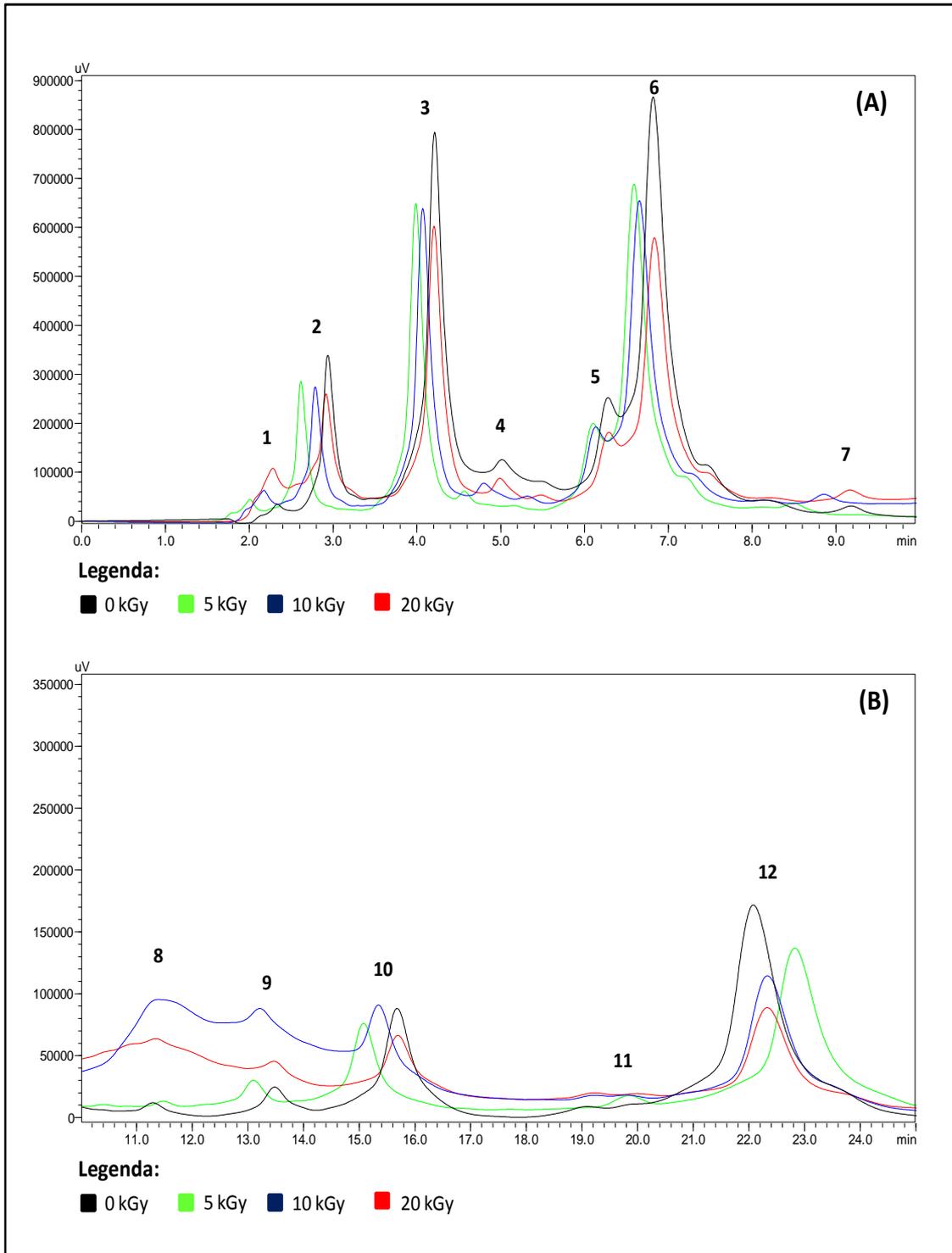


Figura III.3. Ampliações dos cromatogramas de CLAE a 280 nm de **FF₅**, **FF₁₀** e **FF₂₀** comparados com o cromatograma correspondente de **FF₀**: (A) ampliação em TR entre 0,0 – 10,0 min e (B) ampliação em TR entre 10,0 – 25,0 min.

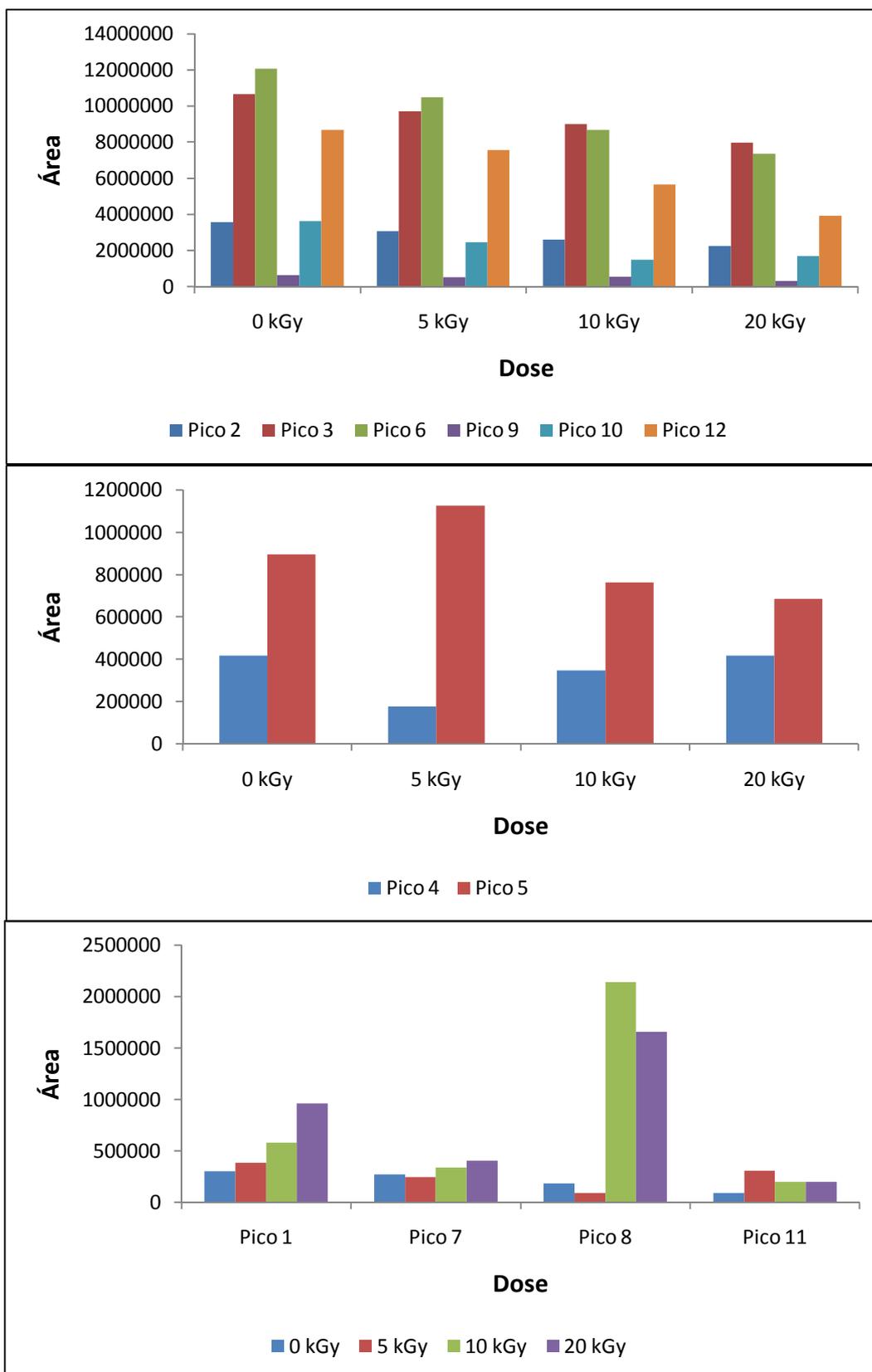


Figura III.4. Gráficos da variação da área de picos do cromatograma de CLAE a 280 nm de **FF** em função da dose de radiação gama: picos 2, 3, 6, 9, 10 e 12 (A); picos 4 e 5 (B) e picos 1, 7, 8 e 11 (C).

2. Análise da Fração Alcaloídica (FA) de *E. macrophyllus*

A fração alcaloídica (FA) apresentou-se como uma solução incolor. A Figura III.5 mostra o cromatograma de CLAE da fração alcaloídica não submetida à radiação gama (FA₀) e a Tabela III.2 mostra o valor de tempo de retenção (TR; em min), área e intensidade do pico do cromatograma de CLAE correspondente. O cromatograma CLAE de FA₀ apresenta apenas um pico muito intenso, pico 1 (TR = 3,08 min), mostrando que a espécie *E. macrophyllus* não é rica em alcalóides.

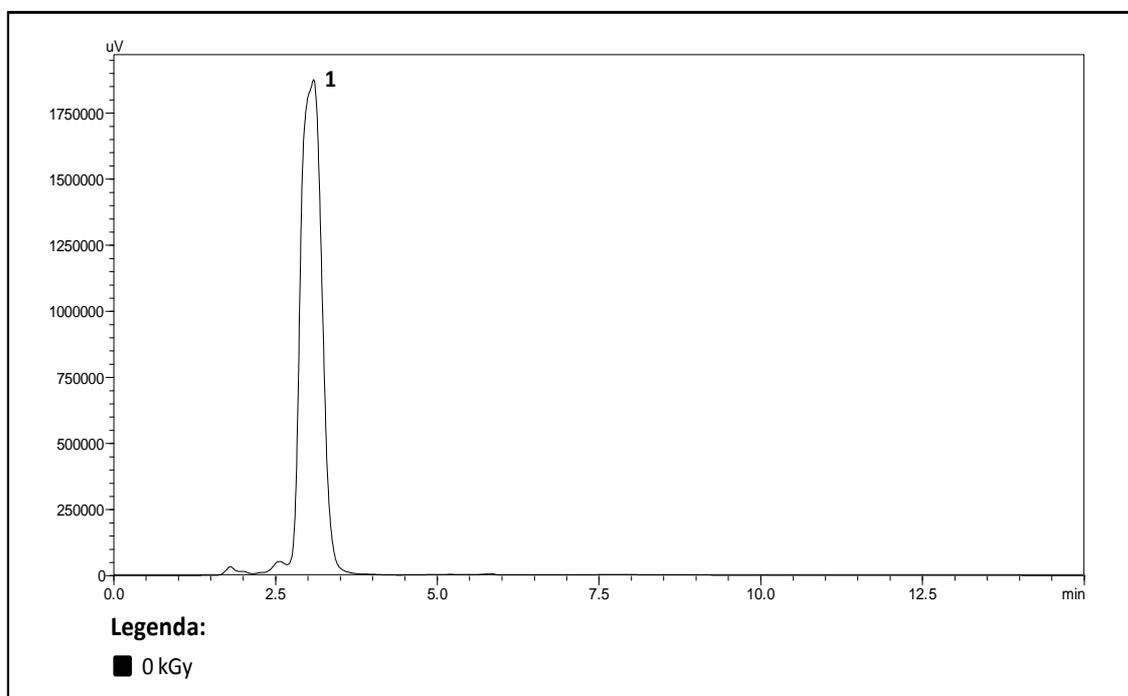


Figura III.5. Cromatograma de CLAE a 220 nm de FA₀ em TR entre 0,0 e 15,0 min.

Tabela III.2. Valor de tempo de retenção (TR; em min), área e intensidade do pico do cromatograma de CLAE a 220 nm de FA₀ mostrado na Figura III.5

Dose de radiação = 0 kGy			
Pico	TR (min)	Área	Intensidade
1	3,08	40.786.439,6	1.845.419,0

Alíquotas das frações alcaloídicas (**FA**) foram submetidas à dose de 5,0, 10,0 e 20,0 kGy (**FA₅**, **FA₁₀** e **FA₂₀**, respectivamente). A Figura III.6 (p. 56) mostra os cromatogramas de CLAE a 220 nm das frações **FA₅**, **FA₁₀** e **FA₂₀**, comparados com o cromatograma correspondente de **FA₀** (mostrado anteriormente na Figura III.5). Tabelas com os valores de TR, área e intensidade do pico dos cromatogramas de CLAE de **FA₅**, **FA₁₀** e **FA₂₀** são mostrados nos Anexos A-4 a A-6 (p. 154), respectivamente. Os cromatogramas da Figura III.6 mostram uma variação pequena da área do pico 1 (TR = 3,08 min) quando as amostras foram submetidas a diferentes doses de radiação gama. Isto sugere que a substância correspondente ao pico 1 é estável quando exposta à radiação gama, conforme mostrado no gráfico da Figura III.7 (p. 57).

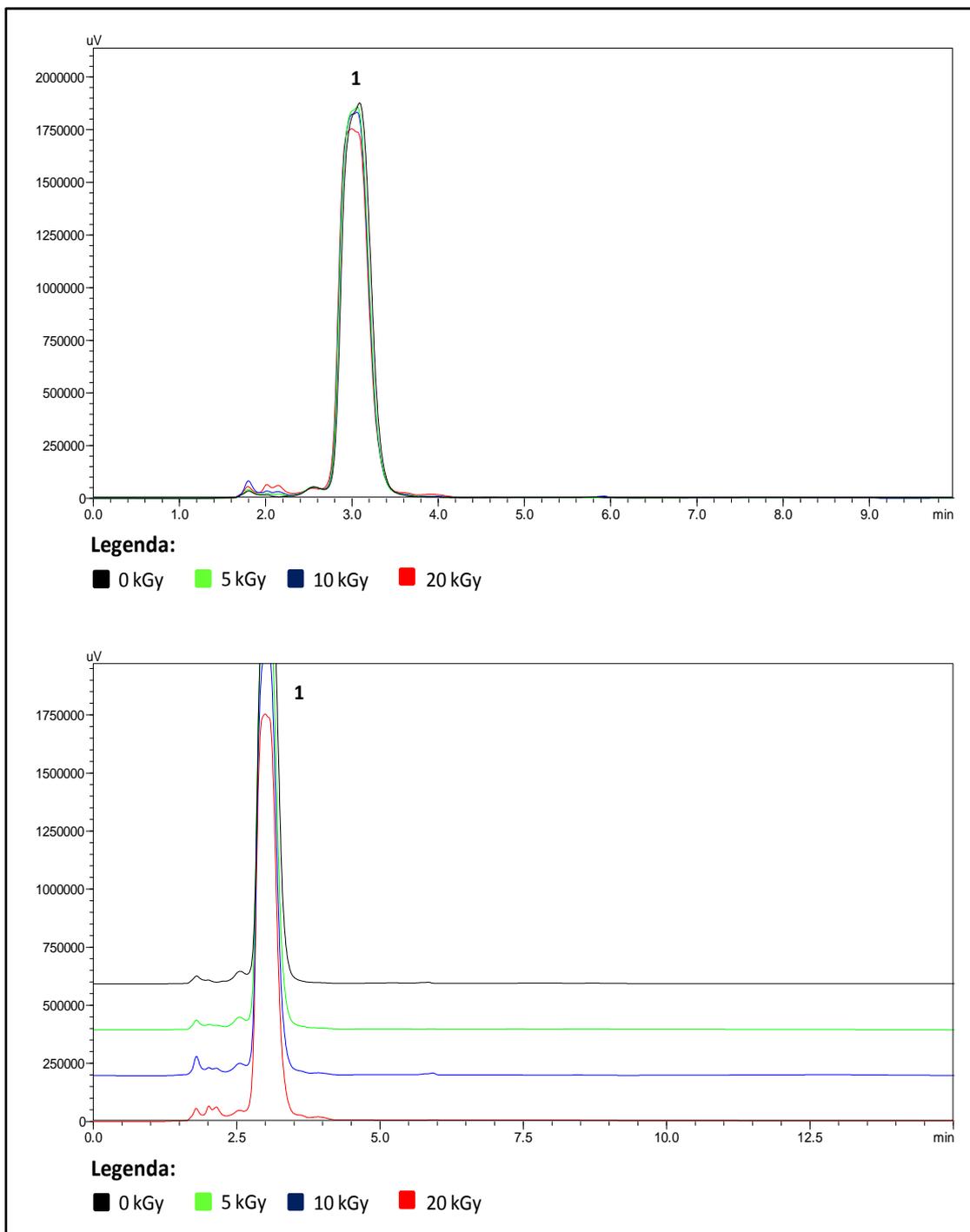


Figura III.6. Cromatogramas de CLAE a 220 nm de FA₅, FA₁₀ e FA₂₀ comparados com o cromatograma correspondente de FA₀.

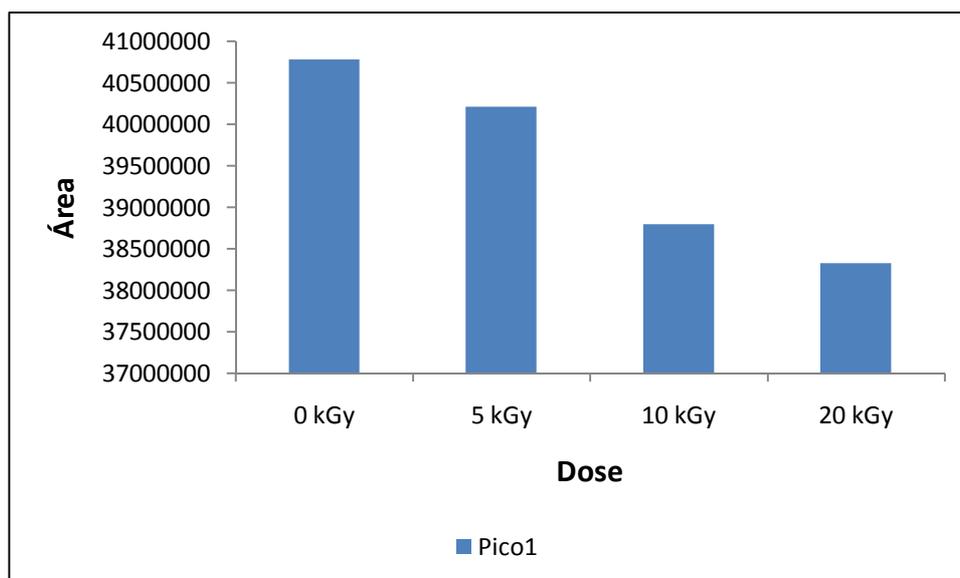


Figura III.7. Gráfico da variação da área do pico 1 do cromatograma de CLAE a 220 nm de FA em função da dose de radiação gama.

3. Análise da Fração Saponínica (FS) de *E. macrophyllum*

A fração saponínica (FS) apresentou uma coloração ligeiramente amarelada. A Figura III.8 (p. 58) mostra o cromatograma de CLAE da fração saponínica não submetida à radiação gama (FS₀) e a Tabela III.3 (p. 58) mostra os valores de TR (min), área e intensidade dos picos do cromatograma de CLAE correspondente.

O cromatograma CLAE de FS₀ (Figura III.8) apresenta três picos correspondentes a saponinas (TR = 3,20, 4,69 e 7,10 min). O pico 2 é o mais intenso e os demais, apresentam-se em pequenas proporções. O pico com TR aproximadamente de 2,50 min corresponde ao solvente (água) utilizado na diluição da amostra. O pico atribuído ao solvente foi confirmado pela semelhança com o cromatograma de CLAE da água, conforme mostrado no Anexo A-7 (p. 154).

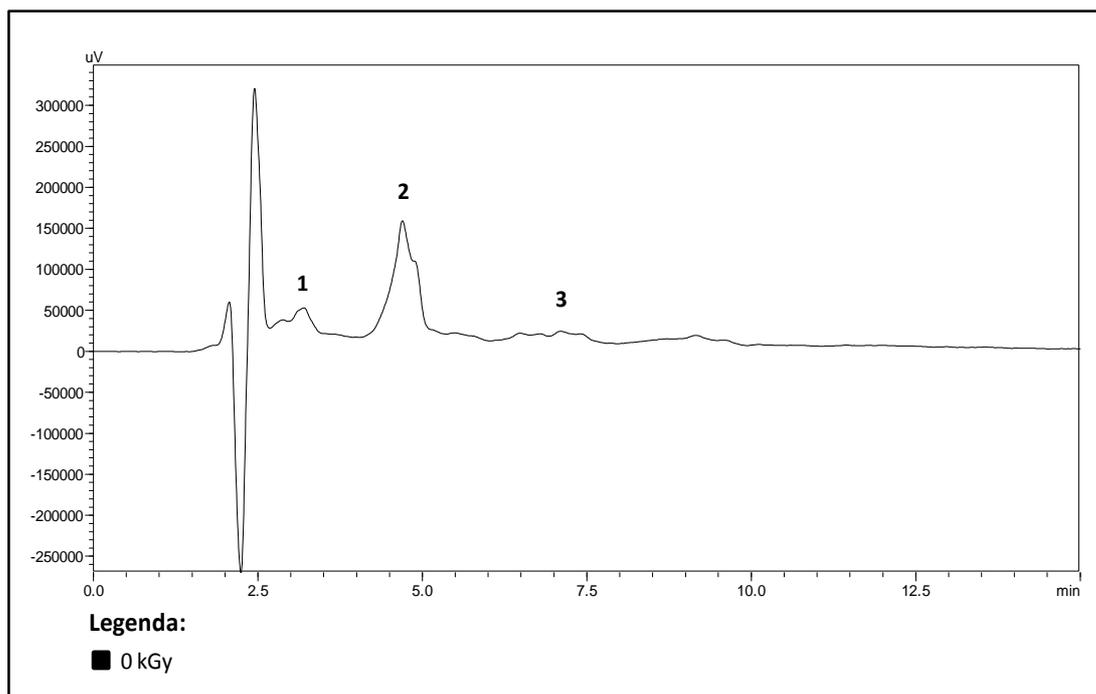


Figura III.8. Cromatograma de CLAE a 210 nm de **FS₀** em TR entre 0,0 e 10,0 min.

Tabela III.3. Valores de tempo de retenção (TR; em min), área e intensidade dos picos do cromatograma CLAE a 210 nm de **FS₀** mostrado na Figura III.8

Dose de radiação = 0 kGy			
Pico	TR (min)	Área	Intensidade
1	3,20	167.378,1	20.279,8
2	4,69	3.390.874,3	139.671,1
3	7,10	729.020,7	13.517,4

A Figura III.9 (p. 59) mostra os cromatogramas de CLAE a 210 nm das frações saponínicas submetidas à radiação gama a doses de 5,0, 10,0 e 20,0 kGy (**FS₅**, **FS₁₀** e **FS₂₀**, respectivamente) e o cromatograma correspondente de **FF₀** (mostrado anteriormente na Figura III.8). Tabelas com os valores de TR, área e intensidade dos picos dos cromatogramas de CLAE de **FF₅**, **FF₁₀** e **FF₂₀** são mostrados nos Anexos A-8 a A-10 (p. 155), respectivamente.

Os cromatogramas mostram alterações na concentração das saponinas quando os extratos são submetidos à radiação gama. Todos os três constituintes diminuiram a

concentração com o aumento da radiação gama. Em doses de 20 kGy, todos os compostos foram consumidos, confirmando a reatividade das EROs e os efeitos diretos nas espécies orgânicas presentes no extrato aquoso, conforme mostrado no gráfico da Figura III.10 (p. 60).

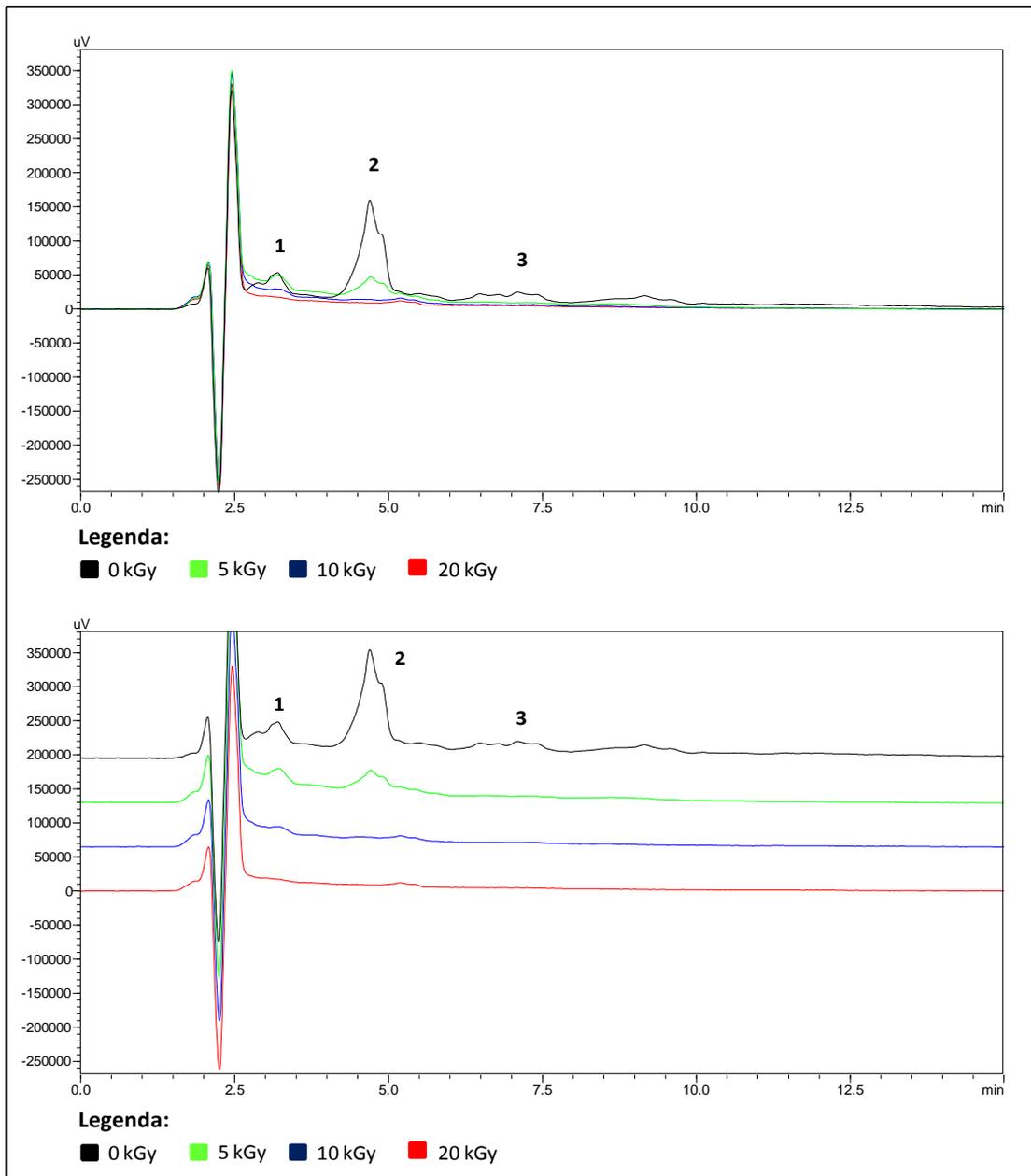


Figura III.9. Cromatogramas CLAE a 210 nm de FS₅, FS₁₀ e FS₂₀ e o cromatograma correspondente de FS₀.

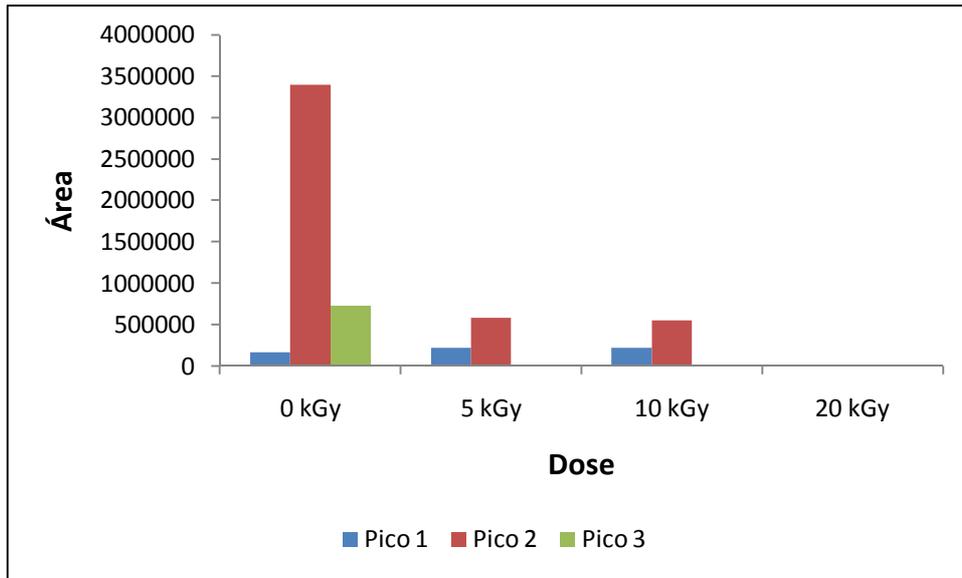


Figura III.10. Gráfico da variação da área dos picos 1, 2 e 3 do cromatograma de CLAE a 210 nm de FS em função da dose de radiação gama.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Óleos essenciais

1. Óleo essencial de *Echinodorus macrophyllus*

1.1. Análises químicas do óleo essencial

As análises do cromatograma de CG-FID e CG-EM do óleo essencial isolado das folhas de *Echinodorus macrophyllus* (OEEM₀) mostraram a presença de vinte picos relativamente intensos, registrados entre 9,25-67,67 min (Figura IV.1). A atribuição química dos picos GC-FID de OEEM₀ foi baseada no método Kováts. Além disso, os picos de GC-EM de OEEM₀ foram comparados quimicamente com o banco de dados do padrão NIST.

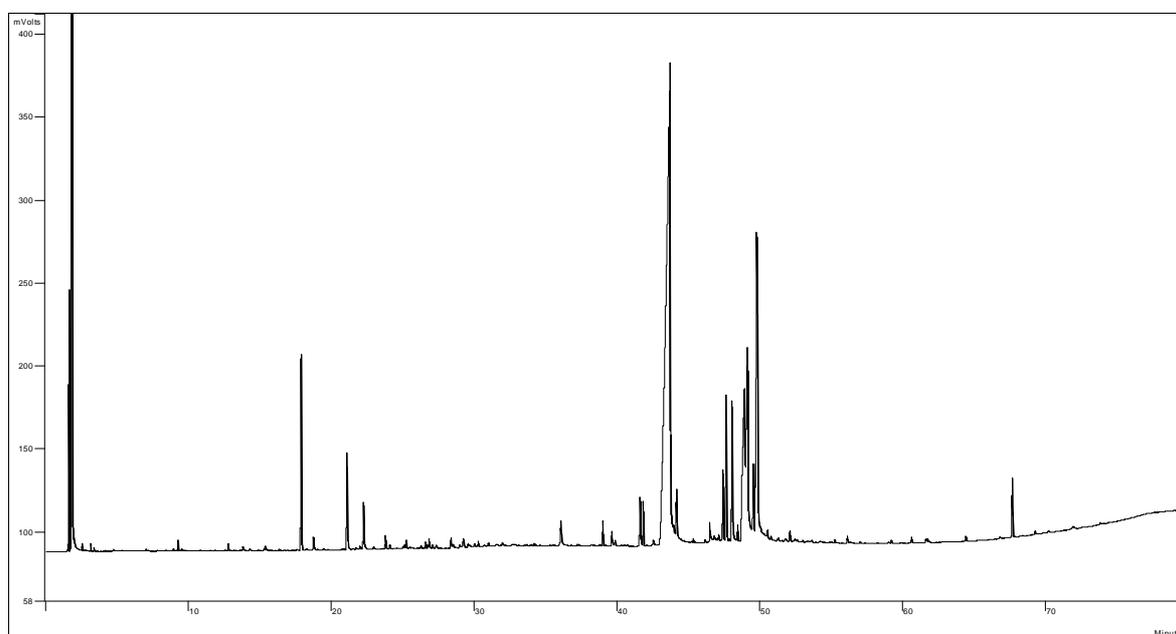


Figura IV.1. Cromatograma de CG-FID do óleo essencial isolado das folhas de *E. macrophyllus* (OEEM₀), os compostos indicados são mostrados na Tabela IV.1 (p.63).

A Tabela IV.1 (p. 63) indica a classe química e os dados de cromatografia gasosa dos componentes identificados em OEEM₀. Os índices de Kováts calculados dos picos no cromatograma de OEEM₀ (CKRI) são muito próximos aos índices de Kováts correspondentes obtidos na literatura (LKRI), principalmente para aqueles registrados com tempo de retenção entre 9,25 e 44,16 min, atribuídos aos compostos **54 a 64** (p. 64), respectivamente. Os picos no cromatograma de OEEM₀ correspondem às substâncias apresentadas na Figura IV.2

(p.64): um monoterpene acíclico (AM; composto **54**), três derivados carotenóides (CD; compostos **55**, **61** e **62**), um monoterpene bicíclico (BM; composto **56**), quatro sesquiterpenos (ST; compostos **57-60**), nove ésteres carboxílicos (CE; compostos **63-66** e **68-72**), um diterpene (DT; composto **67**) e um triterpene (TT; composto **73**). A porcentagem relativa das áreas dos picos (AP) no cromatograma de CG de OEEM₀ indica que o óleo essencial extraído das folhas de *E. macrophyllus* é rico em ésteres carboxílicos, principalmente os compostos **63** (44,28%), **71** (12,67%), **69** (7,94) e **68** (7,85%). O composto derivado de carotenóide **55** (2,93%), o diterpene **67** (2,93%) e o monoterpene **56** (1,68%) são outros importantes constituintes químicos encontrados no óleo essencial obtido das folhas da planta.

Tabela IV.1. Classe química e dados de CG dos componentes de OEEM₀: tempo de retenção (TR), índice de Kováts calculado (CKRI), índice de Kováts na literatura (LKRI) e porcentagem relativa das áreas dos picos (AP)

Composto	Classe	TR (min)	CKRI	LKRI	AP (%)
Linalol (54)	AM	9,25	1092	1098	0,11
Di-hidroedulano (55)	CD	17,88	1304	1300	2,93
2-(Butanona)-(+)-3-careno (56)	BM	21,08	1382	1387	1,68
β -Cariofileno (57)	ST	22,23	1410	1418	0,83
α -Cariofileno (58)	ST	23,77	1448	1454	0,22
(<i>E</i>)-Nerolidol (59)	ST	28,35	1560	1564	0,19
Drimenol (60)	ST	36,06	1749	1759	0,66
Hexa-hidrofarnesil acetona (61)	CD	38,99	1821	1835	0,40
(<i>E,E</i>)-Farnesil acetona (62)	CD	41,60	1885	1918	0,93
Palmitato de metila (63)	CE	41,83	1891	1921	44,28
Palmitato de etila (64)	CE	44,16	1948	1993	1,22
Linolato de metila (65)	CE	47,41	2027	2092	1,34
Linolenato de metila (66)	CE	47,63	2033	2098	2,58
(<i>E</i>)-Fitol (67)	DT	48,04	2043	2114	2,93
Estearato de metila (68)	CE	48,42	2052	2112	7,85
(<i>E,E,E</i>)-11,14,17-Eicosatrienoato de metila (69)	CE	49,12	2069	2061	7,94
Linolato de etila (70)	CE	49,54	2080	2155	1,70
Linolenato de etila (71)	CE	49,77	2085	2214	12,67
Estearato de etila (72)	CE	50,52	2104	2194	0,11
Esqualeno (73)	TT	67,67	2524	2790	0,99

AM = monoterpene acíclico; CD = derivado de carotenóide; BM = monoterpene bicíclico; ST = sesquiterpene; CE = éster carboxílico; DT = diterpene; TT = triterpene.

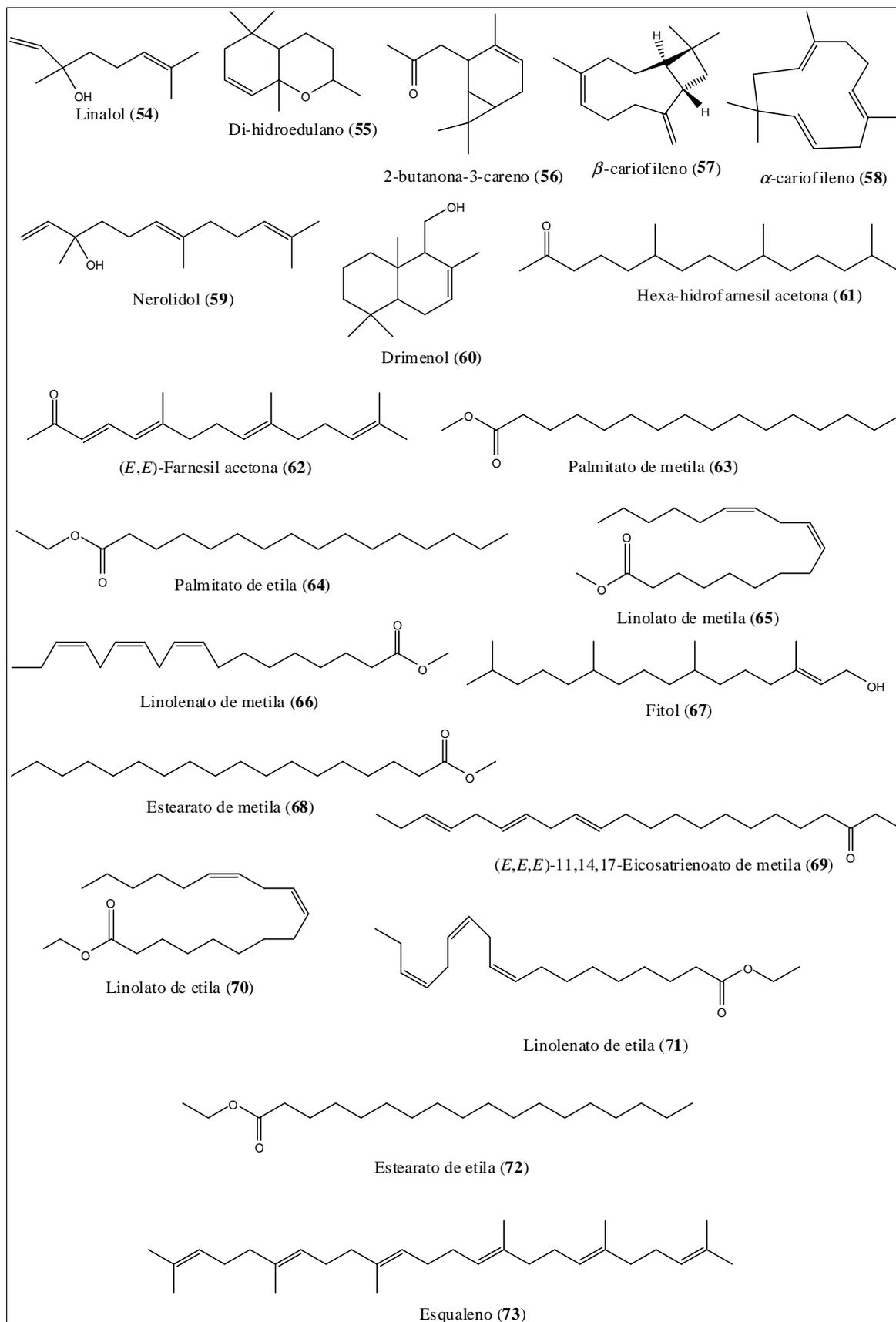


Figura IV.2. Estrutura química dos principais componentes identificados no óleo essencial das folhas de *E. macrophyllus*.

Algumas atividades biológicas são descritas para os componentes do óleo essencial de *E. macrophyllus* (Tabela IV.2; p. 66) e, também, podem ser observadas para a espécie. Por exemplo, linalol (composto **54**) apresenta atividade antioxidante e anticâncer (Kamatou & Viljoen, 2008), enquanto que di-hidroedulano (composto **55**) exibe atividade citotóxica (Stojković *et al.*, 2011). Uma informação detalhada sobre a atividade biológica de cada composto é apresentada na Tabela IV.2.

Tabela IV.2. Atividade biológica dos componentes do óleo essencial das folhas de *E. macrophyllus*

Composto	Atividade biológica
54	Antimicrobiano, anti-inflamatório, anticarcinogênico, antioxidante, inseticida (Kamatou & Viljoen, 2008), antinociceptivo, anestésico local, inibidor de colinesterase, modulador da atividade nos circuitos glutamatérgicos e modificador dos receptores de nicotina (Peana <i>et al.</i> , 2004).
55	Antioxidante, antimicrobiano e citotóxico (Skaltsa <i>et al.</i> , 2003; Sarikurku <i>et al.</i> , 2008; Conforti <i>et al.</i> , 2009; Stojković <i>et al.</i> , 2011).
56	Anabólico (Jeong <i>et al.</i> , 2008), antimalárico, antimicrobiano (Kamatou <i>et al.</i> , 2005), anti-inflamatório (Olufunke <i>et al.</i> , 2009) e inibidor da ação da enzima acetilcolinesterase (Miyazawa & Yamafuji, 2005).
57/58	Anti-inflamatório, antibiótico, antioxidante, anticarcinogênico, inseticida, antimicrobiano e anestésico (Legault e Pichette, 2007; Gertsch <i>et al.</i> , 2008; Leandro <i>et al.</i> , 2012),
59	Leishmanicida e nematocida (Arruda <i>et al.</i> , 2005; Abdel-Rahman <i>et al.</i> , 2013).
60	Antialimentar, antibacteriano, antifúngico, citotóxico, inseticida, anti-alérgico, piscicida, moluscicida e regula o crescimento de plantas (Vlad, 2006).
61/62	Antioxidante, antimicrobiano (Maua <i>et al.</i> , 2003; Sahin <i>et al.</i> , 2004), repelente de mosquito (Innocent <i>et al.</i> , 2010) e reduz os níveis de colesterol (Sinensky <i>et al.</i> , 1994).
63	Antimicrobiano, acaricida, repelente de insetos e afeta o sistema neuroendócrino (Wang <i>et al.</i> , 2009; Satyal <i>et al.</i> , 2012).
64	Ativa enzimas antioxidantes: dismutase, catalase e peroxidase (Dziri & Hosni, 2012), antioxidante, hipocolesterolêmico, nematocida, pesticida, antiandrogênico, inibe a ação da enzima 5-alfa redutase (Rajeswari <i>et al.</i> , 2012; Jegadeeswari <i>et al.</i> , 2012) e provoca pancreatite em ratos (Werner <i>et al.</i> , 1997).
65	Antioxidante, antimicrobiano, antifúngico e anti-inflamatório (Singh & Majumdar, 1997; Palma & Taylor, 1999).
66	Antioxidante, anti-inflamatório e repelente de mosquito (Tunón <i>et al.</i> , 1994; Singh & Majumdar, 1997; Conforti <i>et al.</i> , 2007).
67	Antimicrobiano, anti-inflamatório, anticancerígeno e diurético (Rajeswari <i>et al.</i> , 2012).
68	Anti-inflamatório, antimicrobiano e antimalárico (Silva <i>et al.</i> , 2004; Hua <i>et al.</i> , 2006).
69	Antioxidante, antimicrobiano e antifúngico (Huang <i>et al.</i> , 2007).
70	Antioxidante, anticancerígeno e repelente de mosquito (Tunón <i>et al.</i> , 1994; Ali <i>et al.</i> , 2012).
71	Antioxidante, hipoglicêmico, nematocida e microbiano (Tundis <i>et al.</i> , 2011; Faizi <i>et al.</i> , 2011).
72	Antioxidante e hipoglicêmico (Tundis <i>et al.</i> , 2011).
73	Antibacteriano, antioxidante, anticarcinogênico, imuno-estimulante, quimiopreventivo, inibe a ação da lipoxigenase, pesticida e diurético (Pacheco <i>et al.</i> , 2009; Abreu <i>et al.</i> , 2011; Rajeswari <i>et al.</i> , 2012).

1.2. Efeito da radiação gama sobre os óleos essenciais de *E. macrophyllus*

Pela análise da Tabela II.6 (p. 41), as quantidades dos óleos essenciais obtidos a partir da hidrodestilação das folhas irradiadas (OEEM₁, OEEM₃, OEEM₅, OEEM₁₀ e OEEM₂₀) foram maiores do que OEEM₀ (ver seção de isolamento do óleo essencial de *E. macrophyllus*, p. 40). Estes resultados indicam que radiação gama provoca danos nas membranas celulares

das folhas (Dhanya *et al.*, 2011) e, como consequência, o processo de extração do óleo essencial torna-se mais favorecido quando o material vegetal foi submetido à radiação. No entanto, a quantidade de OEEM₁ (0,1673 g) é maior do que a quantidade de OEEM₃ (0,1159 g) e menor do que OEEM₅ (0,1800 g). Dessa forma, pode-se propor que a quantidade de óleo essencial obtido das folhas de *E. macrophyllus* não é proporcionalmente relacionada à dose de radiação.

A Tabela IV.3 (p. 68) mostra a proporção relativa dos constituintes isolados dos OEEM₁, OEEM₃, OEEM₅, OEEM₁₀ e OEEM₂₀ com base em análises CG-FID. A mudança na concentração de alguns componentes de óleo essencial pode ser atribuída à eficiência de extração e à estabilidade química e estrutural destes componentes quando as folhas são expostas à radiação gama.

Os compostos **54**, **58**, **60-62**, **64**, **65** e **69** mostraram aumento das proporções relativas quando as amostras foram expostas à radiação gama. Por outro lado, os compostos **55**, **57**, **63**, **71** e **73** mostraram diminuição das proporções relativas quando as amostras foram expostas à radiação gama. As amostras submetidas à radiação gama não mostraram uma mudança significativa na proporção relativa para os outros compostos (**56**, **59**, **66**, **67**, **68**, **70** e **72**).

Mudanças no perfil cromatográfico dos óleos essenciais podem ser observadas também quando os fitoconstituintes são agrupados em classes químicas (Tabela IV.3; p. 68). A concentração de monoterpenos acíclicos e sesquiterpenos aumenta quando a planta foi exposta à radiação gama. Por outro lado, a concentração dos componentes de outras classes químicas nas amostras radiadas foi ligeiramente menor, ou seja, para triterpeno, diterpeno, ésteres e derivados de carotenóides. No entanto, o efeito da radiação gama não é o mesmo para os diferentes compostos em cada classe química. Exemplos são observados para os ésteres carboxílicos: a concentração dos compostos **64** e **69** aumenta quando se utiliza uma maior dose de radiação, enquanto que a concentração dos compostos **63** e **71** diminui nas mesmas condições. Como resultado, os efeitos da radiação gama são intrínsecos e específicos

para certos compostos. Os compostos de mesma classe química podem apresentar efeitos diferentes quando submetidos à radiação gama. Além disso, a variação da concentração dos componentes dos óleos essenciais não é dependente da dose de radiação gama.

Tabela IV.3. Porcentagem relativa dos fitoconstituintes presentes no óleo essencial extraído a partir das folhas da espécie *E. macrophyllus* submetidas a diferentes doses de radiação gama

Composto	Classe química	Dose de radiação gama/porcentagem relativa dos constituintes					
		0,0 kGy	1,0 kGy	3,0 kGy	5,0 kGy	10,0 kGy	20,0 kGy
54	AM	0,11	0,20	0,18	0,16	0,33	0,38
55	CD	2,93	0,86	0,78	1,13	0,88	1,07
56	BM	1,68	1,32	1,49	1,58	1,79	1,50
57	ST	0,83	0,47	0,57	0,51	0,63	0,53
58	ST	0,22	0,46	0,75	0,57	0,77	0,88
59	ST	0,19	0,35	0,48	0,48	0,29	0,25
60	ST	0,66	1,20	1,53	1,56	1,52	1,65
61	CD	0,40	0,91	0,96	0,93	0,85	1,02
62	CD	0,93	1,44	1,45	1,39	1,36	1,45
63	CE	44,28	43,80	38,08	41,50	36,57	39,84
64	CE	1,22	1,73	1,87	1,65	1,51	2,91
65	CE	1,34	1,78	2,18	1,98	1,70	1,49
66	CE	2,58	3,40	4,17	3,73	3,16	2,69
67	DT	2,93	2,84	2,99	2,85	2,60	2,24
68	CE	7,84	8,20	8,61	8,67	9,12	7,88
69	CE	7,94	11,68	11,29	11,37	12,18	10,04
70	CE	1,70	2,31	2,59	2,27	2,27	1,86
71	CE	12,67	4,70	8,06	6,44	7,60	6,97
72	CE	0,11	0,21	0,21	0,18	0,14	0,12
73	TT	0,99	0,72	0,73	0,70	0,61	0,51
Total		91,55	88,58	88,97	89,65	85,88	85,28
Monoterpeno acíclico		0,11	0,20	0,18	0,16	0,33	0,38
Derivados de carotenóide		4,26	3,21	3,19	3,45	3,09	3,54
Monoterpeno bicíclico		1,68	1,32	1,49	1,58	1,79	1,50
Sesquiterpenos		1,90	2,48	3,33	3,12	3,21	3,31
Ésteres carboxílicos		79,68	77,81	77,06	77,79	74,25	73,80
Diterpeno		2,93	2,84	2,99	2,85	2,60	2,24
Triterpeno		0,99	0,72	0,73	0,70	0,61	0,51

2. Óleo essencial de *Inga laurina*

2.1. Análises químicas do óleo essencial

A Tabela IV.4 (p. 70) apresenta os dados de CG-FID e CG-EM dos componentes identificados de OEIL₀. Ambos os cromatogramas de CG de OEIL₀ mostram 48 picos relativamente intensos, registrados entre 6,16 e 51,01 min. A atribuição química dos picos de CG-FID do OEIL₀ foi baseada no método Kováts. Além disso, os picos de CG-EM foram atribuídos quimicamente através da comparação com banco de dados de fragmentação padrão NIST.

Os índices de Kováts (CKRI) estão muito próximos aos índices correspondentes obtidos a partir da literatura (LKRI). Os fitoconstituintes registrados no cromatograma de CG do OEIL₀ correspondem às substâncias apresentadas na Figura IV.3 (p. 74): nove cetonas (KE; compostos **74, 75, 80, 98, 100, 101, 102, 106 e 117**), seis ácidos graxos (FA; compostos **76, 84, 89, 111, 115 e 120**), oito alcoóis (AL; compostos **77, 81, 85, 86, 94, 103, 119 e 121**), seis ésteres ou lactona (ES; compostos **79, 93, 96, 97, 114 e 116**), sete aldeídos (AD; compostos **87, 90, 91, 99, 107, 109 e 40**), três éteres (ET; compostos **81, 94 e 105**) e 11 hidrocarbonetos (HY; compostos **78, 82, 83, 88, 92, 95, 104, 108, 110, 112 e 118**). Compostos que apresentaram mais do que uma função química foram classificados em dois ou mais grupos. Considerando a classe química, cinco picos no cromatograma de OEIL₀ correspondem a monoterpenos (MT; compostos **81, 86, 101, 102 e 105**), quatro derivados de carotenóides (CD; compostos **87, 91, 98 e 117**), um sesquiterpeno (ST; composto **95**) e três diterpenos (DT; compostos **112, 119 e 121**).

A porcentagem relativa dos fitoconstituintes indica que as folhas de *I. laurina* são ricas em: ácidos graxos (23,25%), principalmente **120** (18,23%) e **76** (3,37%); cetonas (13,71%), principalmente **106** (6,16%) e **102** (3,94%); e hidrocarbonetos (11,94%), principalmente **110** (4,96%).

Tabela IV.4. Classe química e dados de CG-EM dos compostos identificados em OEIL₀: tempo de retenção (TR, min), índice de Kováts calculado (CKRI), índice de Kováts encontrado na literatura (LKRI), porcentagem relativa da área do pico (AR), fórmula molecular (MM) e fragmentação (intensidade relativa em %) [Atribuição]

Composto	Classe química	TR (min)	CKRI	LKRI	AR (%)	Molecular Formula (MM)	Fragmentação: <i>m/z</i> (intensidade relativa em %) [Atribuição]
6-Metil-6-hepten-2-ona (74)	KE	6,158	961	966	0,107	C ₈ H ₁₄ O (126,19)	126 (3) [M] ⁺ , 68 (33) [M-C ₃ H ₆ O] ⁺ e 43 (100) [M-C ₆ H ₁₁] ⁺
6-Metil-5-hepten-2-ona (75)	KE	6,414	967	985	0,174	C ₈ H ₁₄ O (126,19)	126 (1) [M] ⁺ , 55 (42) [M-C ₄ H ₇ O] ⁺ e 43 (100) [M-C ₆ H ₁₁] ⁺
Ácido hexanóico (76)	FA	6,850	978	990	3,371	C ₆ H ₁₂ O ₂ (116,16)	73 (42) [M-C ₃ H ₇] ⁺ e 60 (100) [M-C ₄ H ₈] ⁺
Álcool benzílico (77)	AL	7,236	988	1032	0,242	C ₇ H ₈ O (108,14)	108 (79) [M] ⁺ , 107 (52) [M-H] ⁺ e 79 (100) [M-H, -CO] ⁺
4-Metildecano (78)	HY	7,990	1007	1061	1,134	C ₁₁ H ₂₄ (156,31)	71 (82) [M-C ₆ H ₁₃] ⁺ , 57 (81) [M-C ₇ H ₁₅] ⁺ e 43 (100) [M-C ₈ H ₁₇] ⁺
Dicarbetoimetano (79)	ES	8,590	1023	1069	0,261	C ₆ H ₁₂ O ₄ (160,17)	133 (61) [M-C ₂ H ₃] ⁺ , 115 (87) [M-OC ₂ H ₅] ⁺ e 43 (100) [M-C ₅ H ₂ O ₃] ⁺
3,5-(<i>E,E</i>)-Octadien-2-ona (80)	KE	8,798	1028	1093	0,153	C ₈ H ₁₂ O (124,18)	124 (28) [M] ⁺ , 95 (97) [M-C ₂ H ₅] ⁺ e 43 (100) [M-C ₅ H ₅ O] ⁺
(<i>Z</i>)-Óxido de linalol (81)	ET/AL/MT	9,228	1039	1087	0,366	C ₁₀ H ₁₈ O ₂ (170,25)	59 (100) [M-C ₇ H ₁₁ O] ⁺ , 43 (66) [M-CH ₃ , -C ₇ H ₁₂ O] ⁺ e 41 (52) [M-H ₂ O, -C ₇ H ₁₁ O] ⁺
3,7-Dimetildecano (82)	HY	9,397	1043	1133	0,055	C ₁₂ H ₂₆ (170,33)	85 (42) [M-C ₆ H ₁₃] ⁺ , 57 (85) [M-C ₈ H ₁₇] ⁺ e 43 (100) [M-C ₉ H ₁₉] ⁺
1-Dodecino (83)	HY	9,644	1050	1184	0,070	C ₁₂ H ₂₂ (166,30)	81 (80) [M-C ₆ H ₁₃] ⁺ , 67 (64) [M-C ₇ H ₁₅] ⁺ , 43 [M-C ₉ H ₁₇] ⁺ e 41 (100) [M-C ₉ H ₁₇] ⁺
Ácido octanóico (84)	FA	9,703	1051	1186	0,040	C ₈ H ₁₆ O ₂ (144,21)	73 (60) [M-C ₃ H ₁₁] ⁺ , 60 (100) [M-C ₇ H ₁₄] ⁺ e 43 (50) [M-C ₅ H ₉ O ₂] ⁺
3,4-Dimetilciclo-hexanol (85)	AL	9,938	1057	-	0,155	C ₈ H ₁₆ O (128,21)	128 (19) [M] ⁺ , 71 (100) [M-C ₄ H ₇] ⁺ e 43 (97) [M-C ₅ H ₉ O] ⁺
(<i>E</i>)-2,6-Dimetil-3,7-octadieno-2,6-diol (86)	AL/MT	10,136	1062	1189	1,011	C ₁₀ H ₁₈ O ₂ (170,25)	82 (54) [M-H ₂ O, -C ₄ H ₇ O] ⁺ , 71 (100) [M-C ₆ H ₁₁ O] ⁺ e 43 (64) [M-H ₂ O, -C ₇ H ₉ O] ⁺

α -Ciclocitral (87)	AD/CD	10,528	1072	1095	0,363	C ₁₀ H ₁₆ O (152,23)	123 (100) [M-CO] ⁺ e 43 (52) [M-C ₇ H ₉ O] ⁺
2,3,3-Trimetil-octano (88)	HY	10,720	1077	-	0,083	C ₁₁ H ₂₄ (156,31)	71 (73) [M-C ₆ H ₁₃] ⁺ , 57 (73) [M-C ₇ H ₁₅] ⁺ e 43 (100) [M-C ₈ H ₁₇] ⁺
Ácido α -etilcapróico (89)	FA	11,187	1089	1114	0,806	C ₈ H ₁₆ O ₂ (144,21)	88 (95) [M-C ₄ H ₈] ⁺ , 73 (100) [M-C ₄ H ₈ , -CH ₃] ⁺ e 57 (60) [M-C ₄ H ₇ O ₂] ⁺
(<i>E,Z</i>)-2,6-Nonadienal (90)	AD	11,880	1107	1155	0,227	C ₉ H ₁₆ O (140,22)	70 (55) [M-H, -C ₅ H ₁₀] ⁺ , 69 (54) [M-C ₅ H ₉] ⁺ e 41 (100) [M-C ₆ H ₉] ⁺
Safranal (91)	AD/CD	14,078	1163	1201	0,621	C ₁₀ H ₁₄ O (150,21)	150 (32) [M] ⁺ , 121 (61) [M-CHO] ⁺ e 107 (100) [M-C ₂ H ₅ O] ⁺
3,4,5,6-Tetrametil-octano (92)	HY	15,141	1190	-	0,407	C ₁₂ H ₂₆ (170,33)	71 (48) [M-CH ₃ , -C ₆ H ₁₂] ⁺ , 57 (88) [M-C ₈ H ₁₇] ⁺ e 43 (100) [M-CH ₃ , -C ₈ H ₁₆] ⁺
2-Etil-hexil acrilato (93)	ES	16,456	1223	1215	3,037	C ₁₁ H ₂₀ O ₂ (184,27)	70 (70) [M-C ₄ H ₅ O ₂ , -C ₂ H ₅] ⁺ e 55 (100) [M-C ₈ H ₁₇ O] ⁺
<i>p</i> -Vinilguaiacol (94)	AL/ET	18,338	1271	1309	0,554	C ₉ H ₁₀ O ₂ (150,17)	150 (100) [M] ⁺ , 135 (87) [M-CH ₃] ⁺ e 107 (43) [M-CH ₃ , -CO] ⁺
2,6,11-Trimetil-dodecano (95)	HY/ST	18,878	1285	-	0,797	C ₁₅ H ₃₂ (212,41)	71 (86) [M-C ₁₀ H ₂₁] ⁺ , 57 (100) [M-C ₁₁ H ₂₃] ⁺ e 43 (98) [M-C ₁₂ H ₂₅] ⁺
γ -Amilbutirolactona (96)	ES	20,183	1318	1361	0,834	C ₉ H ₁₆ O ₂ (156,22)	85 (100) [M-C ₅ H ₁₁] ⁺ e 43 (30) [M-C ₆ H ₉ O ₂] ⁺
Caproato de <i>cis</i> - β -hexenila (97)	ES	22,340	1373	1386	0,269	C ₁₂ H ₂₂ O ₂ (198,30)	82 (100) [M-C ₆ H ₁₂ O ₂] ⁺ e 43 (63) [M-C ₉ H ₁₅ O ₂] ⁺
(1 <i>Z</i>)-2-Propanona-1-(3,5,5-trimetil-2-ciclohexen-1-ilideno) (98)	KE/CD	22,625	1380	1436	0,634	C ₁₂ H ₁₈ O (178,27)	178 (45) [M] ⁺ e 163 (100) [M-CH ₃] ⁺
Dodecanal (99)	AD	23,134	1393	1420	0,468	C ₁₂ H ₂₄ O (184,31)	82 (48) [M-H ₂ O, -C ₁₀ H ₂₀] ⁺ , 57 (98) [M-C ₉ H ₁₉] ⁺ e 43 (100) [M-C ₁₀ H ₂₁] ⁺
4-(2,4,4-Trimetilciclo-hexa-1,5-dienil)-but-3-en-2-ona (100)	KE	23,278	1397	1440	0,500	C ₁₃ H ₁₈ O (190,28)	190 (29) [M] ⁺ , 175 (43) [M-CH ₃] ⁺ e 43 (100) [M-C ₁₁ H ₁₄] ⁺
<i>trans</i> -Geranilacetona (101)	KE/MT	25,150	1445	1452	1,407	C ₁₃ H ₂₂ O (194,31)	194 (1) [M] ⁺ , 69 (40) [M-C ₈ H ₁₃] ⁺ e 43 (100) [M-C ₁₁ H ₁₉] ⁺
β -Ionona (102)	KE/MT	26,201	1471	1494	3,941	C ₁₃ H ₂₀ O (192,29)	192 (5) [M] ⁺ , 177 (100) [M-CH ₃] ⁺ e 43 (90) [M-C ₁₀ H ₁₇] ⁺

2,4-Di- <i>tert</i> -butil-fenol (103)	AL	27,632	1508	1512	3,095	C ₁₄ H ₂₂ O (206,32)	206 (18) [M] ⁺ , 191 (100) [M-CH ₃] ⁺ e 57 (50) [M-C ₁₀ H ₁₄ O] ⁺
Pentadecano (104)	HY	28,141	1521	1500	0,239	C ₁₅ H ₃₂ (212,41)	71 (87) [M-C ₁₀ H ₂₁] ⁺ , 57 (100) [M-C ₁₁ H ₂₃] ⁺ e 43 (84) [M-C ₁₂ H ₂₅] ⁺
Linalol etil éter (105)	ET/MT	29,011	1543	-	0,621	C ₁₂ H ₂₂ O (182,30)	55 (42) [M-C ₈ H ₁₅ O] ⁺ e 43 (100) [M-C ₉ H ₁₅] ⁺
Benzofenona (106)	KE	30,992	1593	1604	6,160	C ₁₃ H ₁₀ O (182,22)	182 (39) [M] ⁺ , 105 (100) [M-C ₆ H ₆] ⁺ e 77 (68) [M-C ₆ H ₅ , -CO] ⁺
Tetradecanal (107)	AD	31,654	1610	1618	1,119	C ₁₄ H ₂₈ O (212,37)	82 (50) [M-H ₂ O, -C ₁₀ H ₂₀] ⁺ , 57 (98) [M-C ₁₀ H ₂₁] ⁺ e 43 (100) [M-C ₁₂ H ₂₅] ⁺
Hexadecano (108)	HY	32,166	1623	1600	0,276	C ₁₆ H ₃₄ (226,44)	71 (63) [M-C ₁₁ H ₂₃] ⁺ , 57 (100) [M-C ₁₂ H ₂₅] ⁺ e 43 (77) [M-C ₁₃ H ₂₇] ⁺
Pentadecanal (109)	AD	35,860	1717	1717	0,285	C ₁₅ H ₃₀ O (226,40)	82 (58) [M-H ₂ O, -C ₁₀ H ₂₀] ⁺ , 57 (100) [M-C ₁₂ H ₂₅] ⁺ e 43 (91) [M-C ₁₃ H ₂₇] ⁺
8-Metil-heptadecano (110)	HY	36,642	1737	1738	4,961	C ₁₈ H ₃₈ (254,49)	71 (86) [M-C ₁₃ H ₂₇] ⁺ , 57 (100) [M-C ₁₄ H ₂₉] ⁺ e 43 (83) [M-C ₁₅ H ₃₁] ⁺
Ácido tetradecanóico (111)	FA	37,732	1765	1770	0,271	C ₁₄ H ₂₈ O ₂ (228,37)	73 (68) [M-C ₁₁ H ₂₃] ⁺ , 57 (94) [M-H ₂ O, -C ₁₁ H ₂₁] ⁺ e 43 (100) [M-H ₂ O, -C ₁₂ H ₂₃] ⁺
2,6,11,15-Tetrametil-hexadecano (112)	HY/DT	38,470	1784	1810	2,016	C ₂₀ H ₄₂ (282,54)	71 (91) [M-C ₁₄ H ₂₉] ⁺ , 57 (100) [M-C ₁₅ H ₃₁] ⁺ e 43 (85) [M-C ₁₆ H ₃₃] ⁺
Hexadecanal (113)	AD	39,550	1811	1815	0,178	C ₁₆ H ₃₂ O (240,42)	82 (55) [M-H ₂ O, -C ₁₀ H ₂₀] ⁺ , 57 (100) [M-C ₁₃ H ₂₇] ⁺ e 43 (95) [M-C ₁₄ H ₂₉] ⁺
Di-isobutil-ftalato (114)	ES	40,377	1832	1873	0,197	C ₁₆ H ₂₂ O ₄ (278,34)	149 (100) [M-C ₃ H ₆ O, -C ₄ H ₉] ⁺ , 57 (34) [M-C ₁₂ H ₁₃ O ₄] ⁺ e 41 (16) [M-C ₁₂ H ₁₃ O ₃ , -CH ₄ O] ⁺
Ácido pentadecanóico (115)	FA	41,158	1852	1863	0,533	C ₁₅ H ₃₀ O ₂ (242,39)	242 (57) [M] ⁺ , 57 (94) [M-C ₁₂ H ₂₃] ⁺ e 43 (100) [M-C ₁₃ H ₂₅] ⁺
2-Oxoottadecanoato de metila (116)	ES	42,258	1880	-	2,017	C ₁₉ H ₃₆ O ₃ (312,49)	85 (46) [M-CH ₂ O, -C ₁₄ H ₂₇] ⁺ , 71 (61) [M-CH ₂ O, -C ₁₅ H ₂₉] ⁺ e 57 (100) [M-CH ₂ O, -C ₁₆ H ₃₁] ⁺
Farnesil acetona (117)	KE/CD	42,880	1896	1919	0,631	C ₁₈ H ₃₀ O (262,43)	262 (5) [M] ⁺ , 69 (90) [M-C ₁₃ H ₂₁ O] ⁺ e 43 (100) [M-C ₁₆ H ₂₇] ⁺

Nonadecano (118)	HY	43,102	1901	1900	1,903	C ₁₉ H ₄₀ (268,52)	71 (67) [M-C ₁₄ H ₂₉] ⁺ ; 57 (100) [M-C ₁₅ H ₃₁] ⁺ e 43 (65) [M-C ₁₆ H ₃₃] ⁺
Isofitol (119)	AL/DT	44,772	1944	1949	0,924	C ₂₀ H ₄₀ O (296,53)	57 (43) [M-C ₂ H ₄ , -C ₁₅ H ₃₁] ⁺ ; 71 (100) [M-C ₁₆ H ₃₃] ⁺ e 43 (44) [M-C ₁₇ H ₃₃ O] ⁺
Ácido <i>n</i> -hexadecanóico (120)	FA	45,596	1965	1972	18,233	C ₁₆ H ₃₂ O (256,42)	73 (87) [M-C ₁₃ H ₂₇] ⁺ ; 57 (85) [M-H ₂ O, -C ₁₃ H ₂₅] ⁺ e 43 (100) [M-H ₂ O, -C ₁₄ H ₂₇] ⁺
Fitol (121)	AL/DT	51,010	2104	2135	1,611	C ₂₀ H ₄₀ O (296,53)	71 (100) [M-C ₁₆ H ₃₃] ⁺ ; 57 (37) [M-C ₂ H ₄ , -C ₁₅ H ₃₁] ⁺ e 43 (41) [M-C ₁₇ H ₃₃ O] ⁺
Total					67,357		

AD = aldeído; AL = álcool; ES = éster; ET = éter; FA = ácido graxo; HY = hidrocarboneto; KE = cetona; MT = monoterpene; ST = sesquiterpene; DT = diterpene; CD = derivado de carotenóide.

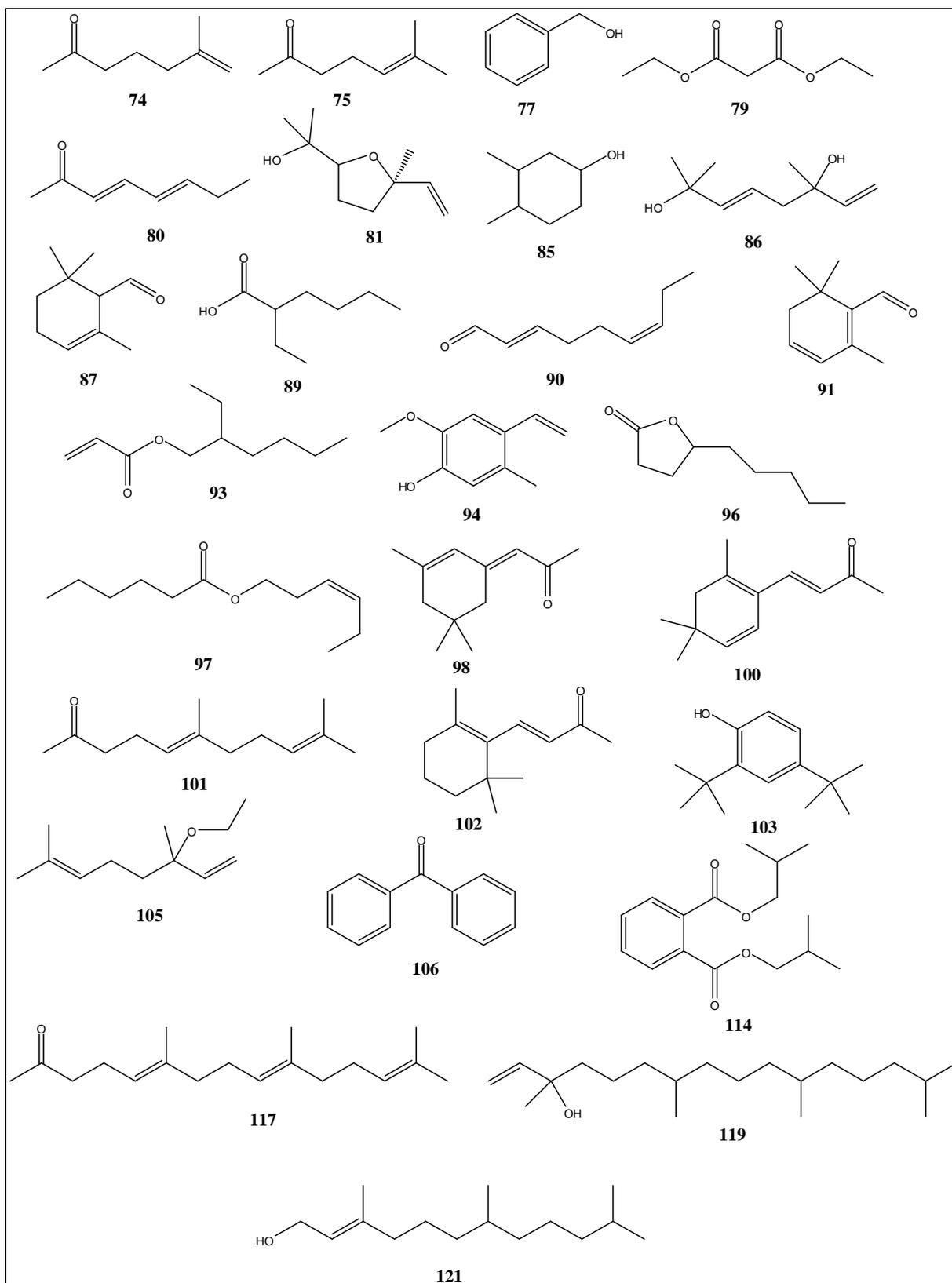


Figura IV.3. Estrutura química dos principais componentes identificados no óleo essencial de *I. laurina*.

2.2. Efeito da radiação gama sobre os óleos essenciais de *I. laurina*

A partir da análise da Tabela II.6 (p. 41), a quantidade do óleo essencial obtida por hidrodestilação das folhas irradiadas de *I. laurina* (OEIL₀, OEIL₁, OEIL₃, OEIL₅, OEIL₁₀ e OEIL₂₀) foi diferente em relação à amostra não irradiada (OEIL₀) (ver seção de isolamento do óleo essencial, p.40). Apesar do processo de extração ter sido mais favorecido para OEIL₁ (3,70 mg) do que para OEIL₀ (3,30 mg), a quantidade de OEIL₁ é maior do que a quantidade de OEIL₃ (1,40 mg) e OEIL₅ (1,40 mg), ou seja, a quantidade do óleo essencial extraído não é diretamente proporcional à dose de radiação. Estes resultados confirmam que a radiação gama provoca danos às membranas celulares de folha (Dhanya *et al.*, 2011). Assim, o processo de extração do óleo essencial é dependente da dose de radiação em que o material vegetal foi exposto à radiação.

A Tabela IV.5 (p. 76) mostra a proporção relativa dos componentes dos OEIL₀, OEIL₁, OEIL₃, OEIL₅, OEIL₁₀ e OEIL₂₀. A mudança na concentração de alguns componentes do óleo essencial pode ser atribuída à eficiência da extração e a estabilidades/labilidade química e estrutural destes componentes, quando as folhas são expostas à radiação gama.

Os efeitos de radiação gama nos óleos essenciais podem ser observados também quando os seus componentes químicos são agrupados em classes químicas (Tabela IV.6; p. 77). A proporção de ácidos graxos (FA) é aumentada quando as folhas de *I. laurina* são expostas à radiação gama e, por outro lado, as proporções de ésteres (ES), alcoóis (AL), aldeídos (AD) e éteres (ET) são menores nas mesmas condições. No entanto, o efeito da radiação gama não é o mesmo para os diferentes compostos em cada classe química. Um exemplo são os alcoóis **119** e **121** (p. 74). Este último mostra uma diminuição significativa na proporção quando as folhas são expostas à radiação, enquanto que a proporção de **119** não é alterada significativamente em diferentes doses de radiação.

Tabela IV.5. Porcentagem relativa dos componentes dos óleos essenciais extraídos das folhas de *I. laurina* submetidas a diferentes doses de radiação gama

Constituinte	0,0 kGy	1,0 kGy	3,0 kGy	5,0 kGy	10,0 kGy	20,0 kGy
74	0,107	0,176	0,031	0,076	0,355	0,255
75	0,174	0,131	0,010	0,046	0,282	0,125
76	3,371	3,063	1,976	3,148	2,879	2,312
77	0,242	0,283	0,147	0,208	0,276	0,247
78	1,134	1,146	0,747	0,959	0,844	0,829
79	0,261	0,229	0,080	0,151	0,196	0,132
80	0,153	0,217	0,090	0,141	0,157	0,146
81	0,366	0,336	0,171	0,301	0,342	0,245
82	0,055	0,127	0,040	0,096	0,116	0,080
83	0,070	0,075	0,013	0,040	0,061	0,051
84	0,040	0,035	0,030	0,020	0,029	0,023
85	0,155	0,199	0,100	0,113	0,120	0,127
86	1,011	0,970	0,814	0,889	0,772	0,644
87	0,363	0,402	0,174	0,266	0,281	0,275
88	0,083	0,137	0,026	0,048	0,058	0,072
89	0,806	0,861	0,389	0,523	0,518	0,523
90	0,227	0,204	0,134	0,172	0,184	0,168
91	0,621	0,631	0,488	0,574	0,403	0,496
92	0,407	0,567	0,167	0,229	0,350	0,381
93	3,037	0,557	1,701	3,847	3,102	3,381
94	0,554	0,630	0,558	0,556	0,512	0,624
95	0,797	2,345	0,533	1,101	0,421	0,596
96	0,834	0,366	0,237	0,332	0,789	0,486
97	0,269	0,246	0,227	0,254	0,219	0,190
98	0,634	0,614	0,667	0,628	0,584	0,540
99	0,468	0,584	0,328	0,393	0,368	0,389
100	0,500	0,771	0,375	0,342	0,307	0,328
101	1,407	2,163	1,267	1,237	1,350	1,461
102	3,941	4,917	3,269	3,086	3,180	3,549
103	3,095	3,659	2,137	2,104	2,092	2,061
104	0,239	0,262	0,275	0,250	0,218	0,268
105	0,621	0,533	0,556	0,570	0,427	0,402
106	6,160	5,862	8,541	7,258	8,116	6,210
107	1,119	0,742	0,817	0,851	0,756	0,785
108	0,276	0,114	0,293	0,113	0,108	0,140
109	0,285	0,272	0,388	0,633	0,433	0,442
110	4,961	4,973	3,806	4,245	3,492	4,221
111	0,271	0,270	0,337	0,295	0,300	0,289
112	2,016	1,632	2,595	2,087	2,323	2,401
113	0,178	0,176	0,139	0,147	0,122	0,127
114	0,197	0,221	0,197	0,186	0,171	0,247
115	0,533	0,701	0,544	0,539	0,532	0,502
116	2,017	1,850	2,000	2,009	1,719	1,607
117	0,631	0,666	0,620	0,616	0,516	0,551
118	1,903	1,935	1,824	1,782	1,513	1,695
119	0,924	0,867	0,936	0,957	0,945	0,952
120	18,233	16,325	28,603	21,675	24,283	23,889
121	1,611	0,264	0,696	0,641	0,720	0,616
Total	67,357	64,306	70,093	66,734	67,841	66,080

Tabela IV.6. Porcentagem relativa dos constituintes reunidos em grupos funcionais e classes químicas

Grupo funcional	0,0 kGy	1,0 kGy	3,0 kGy	5,0 kGy	10,0 kGy	20,0 kGy
ES	6,615	3,469	4,442	6,779	6,196	6,043
FA	23,254	21,255	31,879	26,200	28,541	27,538
KE	13,707	15,517	14,870	13,430	14,847	13,165
AL	7,958	7,208	5,559	5,769	5,779	5,516
AD	3,261	3,011	2,468	3,036	2,547	2,682
ET	1,541	1,499	1,285	1,427	1,281	1,271
HY	11,941	13,313	10,319	10,950	9,504	10,734
Classe	0,0 kGy	1,0 kGy	3,0 kGy	5,0 kGy	10,0 kGy	20,0 kGy
MT	7,346	8,919	6,077	6,083	6,071	6,301
CD	2,249	2,313	1,949	2,084	1,784	1,862
DT	4,551	2,763	4,227	3,685	3,988	3,969
ST	0,797	2,345	0,533	1,101	0,421	0,596

3. Óleo essencial de *Eucalyptus grandis*

3.1. Análises químicas do óleo essencial

Na Tabela IV.7 (p. 78) são apresentados os dados de CG-FID e CG-EM dos componentes do óleo essencial extraído das folhas de *Eucalyptus grandis* (OEEG₀). Nesta análise foram adicionados dois padrões internos, undecano (2,92 mg/mL) e octadecano (2,98 mg/mL), que não interferiram na análise. A concentração de cada um dos compostos identificados no OEEG₀ foi calculada levando em consideração as áreas dos padrões em relação às concentrações dos mesmos. A atribuição química dos picos de CG-FID de OEEG₀ foi baseada no método Kováts. Além disso, os picos de CG-EM foram atribuídos quimicamente através da comparação com banco de dados de fragmentação padrão NIST. A estrutura dos fitoconstituintes encontrados no óleo essencial de *E. grandis* é apresentada na Figura IV.4 (p. 79).

Os fitoconstituintes registrados no cromatograma de CG do OEEG₀ pertencem à classe dos monoterpenos acíclico (MA; composto **6**), monoterpeno cíclico (MC; compostos **122**, **123**, **124**, **125**, **126**, **128**, **130**, **131** e **132**) e dos sesquiterpenos (ST; compostos **133**, **134**, **135**,

136, 137, 138 e 139). Os monoterpenos α -pineno (2,74 mg/mL) e eucaliptol (2,49 mg/mL) apresentam-se em maior concentração no óleo essencial de *Eucalyptus grandis*.

Tabela IV.7. Classe química e dados de CG dos compostos identificados em OEEG₀: tempo de retenção (TR, min), concentração (mg/mL), índice de Kováts calculados (CKRI) e índice de Kováts encontrado na literatura (LKRI)

Composto	Classe química	TR	Concentração (mg/mL)	CKRI	LKRI
α -Pineno (122)	MC	2,562	2,74	1025	941
Canfeno (123)	MC	2,734	0,049	1030	951
Limoneno (124)	MC	3,087	0,031	1041	1024
<i>m</i> -Cimeno (125)	MC	3,878	0,36	1064	1037
Eucaliptol (126)	MC	3,941	2,49	1066	1046
<i>trans</i> -Ocimeno (127)	MA	4,014	0,037	1068	1055
α -Fenchol (128)	MC	5,068	0,027	1099	1098
Undecano (Padrão interno; 129)	HY	5,341	2,92	1107	1100
Isoborneol (130)	MC	5,975	0,024	1126	1154
α -Terpineol (131)	MC	7,833	0,18	1181	1197
Acetato de α -terpineol (132)	MC	13,088	0,54	1338	1350
β -Cariofileno (133)	ST	15,431	0,12	1407	1419
Aromadendreno (134)	ST	16,125	0,028	1428	1442
Germacreno B (135)	ST	18,256	0,12	1491	1556
δ -Cadineno (136)	ST	19,314	0,075	1523	1562
(<i>E</i>)-Nerolidol (137)	ST	21,054	0,058	1574	1567
(-)-Espatulenol (138)	ST	21,303	0,16	1582	1582
Óxido de cariofileno (139)	ST	21,497	0,052	1588	1617
Octadecano (Padrão interno; 140)	HY	29,243	2,98	1817	1800

MC = monoterpeno cíclico; MA = monoterpeno acíclico; HY = hidrocarboneto; ST = sesquiterpeno.

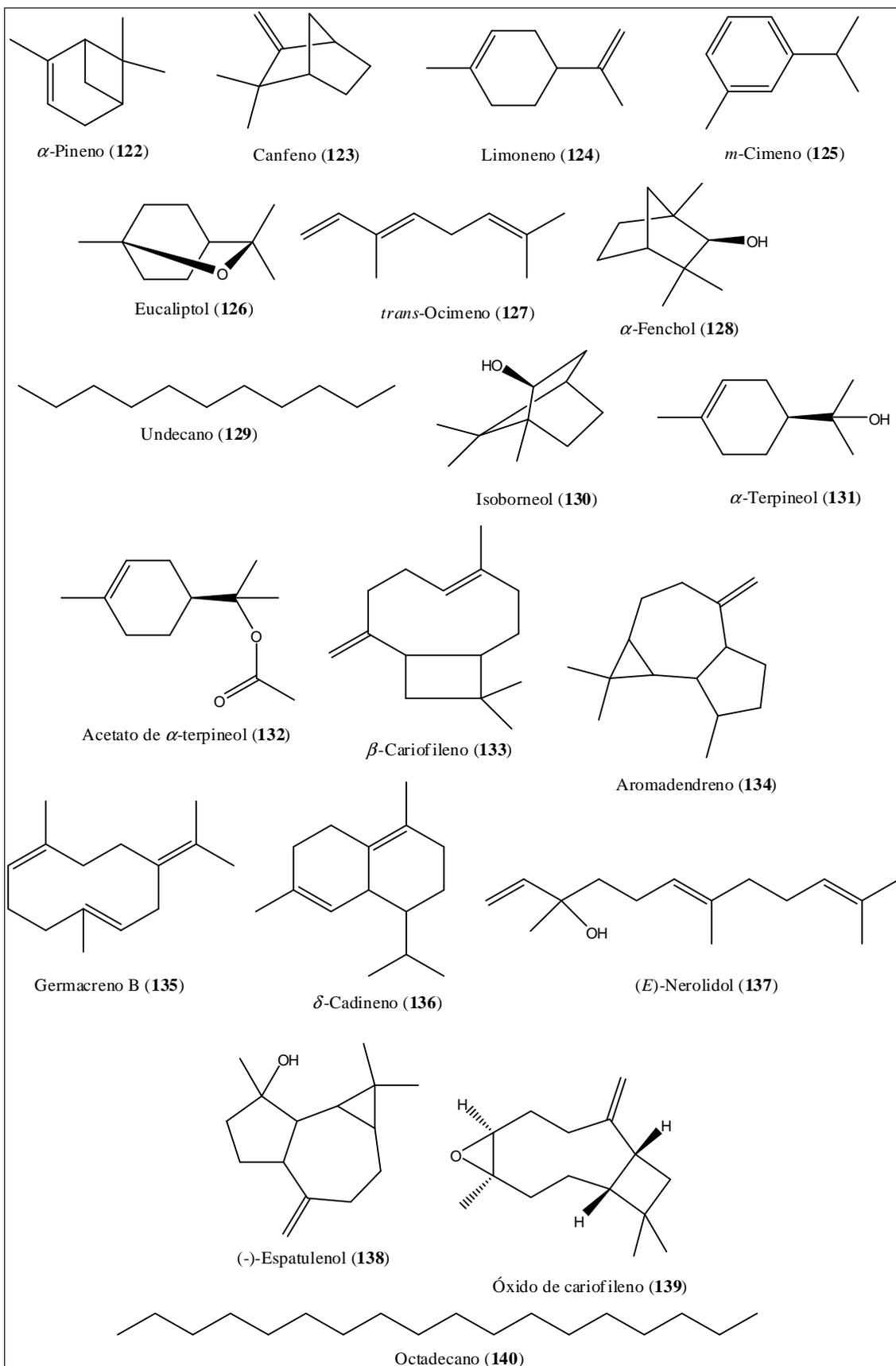


Figura IV.4. Estrutura química dos principais componentes do óleo essencial de *E. grandis*.

3.2. Efeito da radiação gama sobre os óleos essenciais de *E. grandis*

A partir da análise da Tabela II.6 (p. 41), a quantidade do óleo essencial obtida por hidrodestilação das folhas irradiadas (OEEG₁, OEEG₃, OEEG₅, OEEG₁₀ e OEEG₂₀) foram diferentes em relação a OEEG₀ (ver seção de isolamento do óleo essencial, p. 40). O aumento da radiação gama sobre as folhas de *E. grandis* provoca um aumento da extração do óleo essencial. Porém, quando se utiliza dose de 20 kGy, observa-se uma pequena diminuição em relação as outras amostras irradiadas, porém é ainda maior que OEEG₀, ou seja, a quantidade do óleo essencial extraído não é diretamente proporcional à dose de radiação. Estes resultados indicam que a radiação gama provoca danos às membranas celulares das folhas (Dhanya *et al.*, 2011). Assim, o processo de extração do óleo essencial é dependente da dose de radiação, em que o material vegetal foi exposto à radiação.

A Tabela IV.8 (p. 81) mostra a concentração (mg/mL) dos componentes dos OEEG₀, OEEG₁, OEEG₃, OEEG₅, OEEG₁₀ e OEEG₂₀. Para a grande maioria dos compostos, com exceção do composto **5**, observa-se um aumento de concentração com o aumento da dose de radiação que as folhas foram submetidas. Porém, com dose de 10 kGy ocorre uma diminuição da concentração dos componentes em relação às outras amostras irradiadas. Assim, cada constituinte se comporta de forma diferente quando submetidos a diferentes doses de radiação gama, portanto não sendo dependente da dose.

Tabela IV.8. Concentração (mg/mL) dos componentes dos óleos essenciais extraídos das folhas de *E. grandis* submetidas a diferentes doses de radiação gama

Composto	0,0 kGy	1,0 kGy	3,0 kGy	5,0 kGy	10,0 kGy	20,0 kGy
122	2,74	2,9	3,00	3,05	2,94	3,27
123	0,049	0,049	0,050	0,050	0,047	0,050
124	0,031	0,032	0,035	0,034	0,033	0,036
125	0,36	0,36	0,37	0,38	0,37	0,39
126	2,49	2,44	2,43	2,51	2,34	2,51
127	0,037	0,040	0,039	0,040	0,038	0,040
128	0,027	0,030	0,034	0,031	0,033	0,032
129	2,92	2,92	2,92	2,92	2,92	2,92
130	0,024	0,026	0,028	0,027	0,026	0,026
131	0,18	0,20	0,20	0,21	0,18	0,18
132	0,54	0,59	0,59	0,62	0,57	0,59
133	0,12	0,14	0,14	0,15	0,15	0,16
134	0,028	0,036	0,035	0,041	0,041	0,042
135	0,12	0,14	0,16	0,15	0,15	0,16
136	0,075	0,090	0,093	0,10	0,099	0,099
137	0,058	0,072	0,074	0,075	0,071	0,070
138	0,16	0,18	0,20	0,20	0,20	0,19
139	0,052	0,059	0,067	0,073	0,068	0,069
140	2,98	2,98	2,98	2,98	2,98	2,98
<hr/>						
Monoterpeno acíclico	0,037	0,040	0,039	0,040	0,038	0,040
Monoterpeno cíclico	6,441	6,627	6,737	6,912	6,539	7,084
Sesquiterpeno	0,613	0,717	0,769	0,789	0,779	0,79

CAPÍTULO V

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificação e análise estrutural fitoquímica de constituintes de E.

macrophyllus

1. Análise do Extrato em Hexano de *Echinodorus macrophyllus*

Após todo o fracionamento cromatográfico das partes aéreas de *Echinodorus macrophyllus* (ver seção 3.2.1 Fracionamento do Extrato em Hexano de *Echinodorus macrophyllus*, p. 36) foram obtidos 11 grupos de interesse que foram analisados por CG-EM: HR02, HR05, HR06, HR07, HR08, AR01, AR02, AR03, B05, C02 e D02, sendo que para este último foram realizadas análises por RMN. Na análise por CG-EM foram considerados apenas os picos mais intensos e com porcentagem de similaridade com a substância presente na biblioteca NIST superior a 80%.

1.1. Grupo HR02

A Figura V.1 mostra o cromatograma de uma amostra por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas do grupo HR02. O grupo HR02 é constituído por 10 substâncias, sendo **147** (hexa-hidrofarnesil acetona), **150** (fitol) e **148** (farnesil acetona), os fitoconstituintes com maiores concentrações na amostra. Alguns picos do cromatograma, que também são intensos, não foram identificados devido à baixa porcentagem de similaridade ou não apresentaram correspondência apropriada com nenhuma substância da biblioteca NIST.

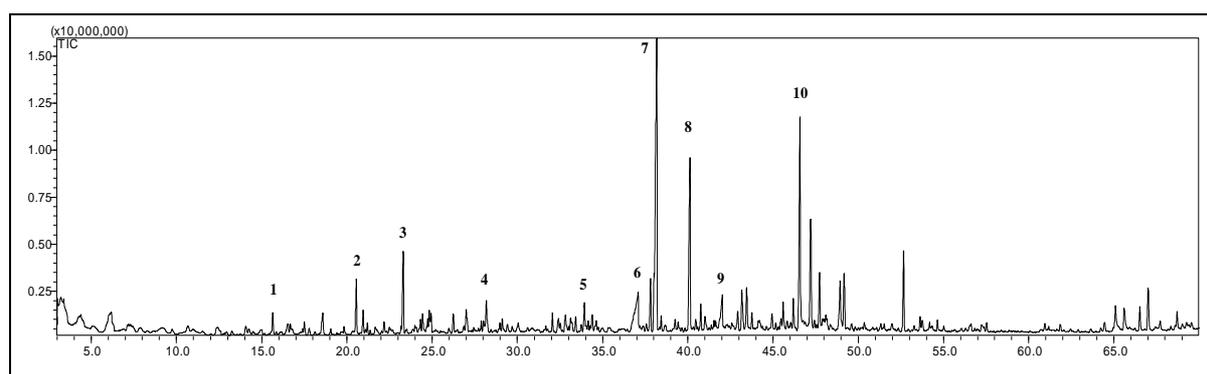


Figura V.1. Cromatograma de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas do grupo HR02.

A Tabela V.1 (p. 84) mostra os dados de cromatografia a gás: tempo de retenção, atribuição e porcentagem de similaridade dos 10 fitoconstituintes encontrados no grupo HR02

obtido do extrato em hexano das folhas de *E. macrophyllum*. A estrutura dos fitoconstituintes identificados no grupo HR02 é mostrada na Figura V.2.

Tabela V.1. Dados de CG-EM: pico, tempo de retenção (min), atribuição e porcentagem de similaridade dos fitoconstituintes identificados no grupo HR02 obtido do extrato em hexano das folhas de *E. macrophyllum*

HR02					
Pico	Substância	Tempo de retenção (min)	Atribuição	% Similaridade	
1	141	15,648	2-Isopropenil-5-metil-hex-4-enal	91	
2	142	20,544	1,2:6,7-Diepóxi-linalol	80	
3	143	23,300	<i>trans</i> -Geranilacetona	96	
4	144	28,181	Óxido de cariofileno	91	
5	145	33,932	Geranilgeraniol	82	
6	146	37,097	Widdrol	81	
7	147	38,165	Hexa-hidrofarnesil acetona	95	
8	148	40,118	Farnesil acetona	90	
9	149	42,024	3-Desóxi-estradiol	83	
10	150	46,581	Fitol	97	

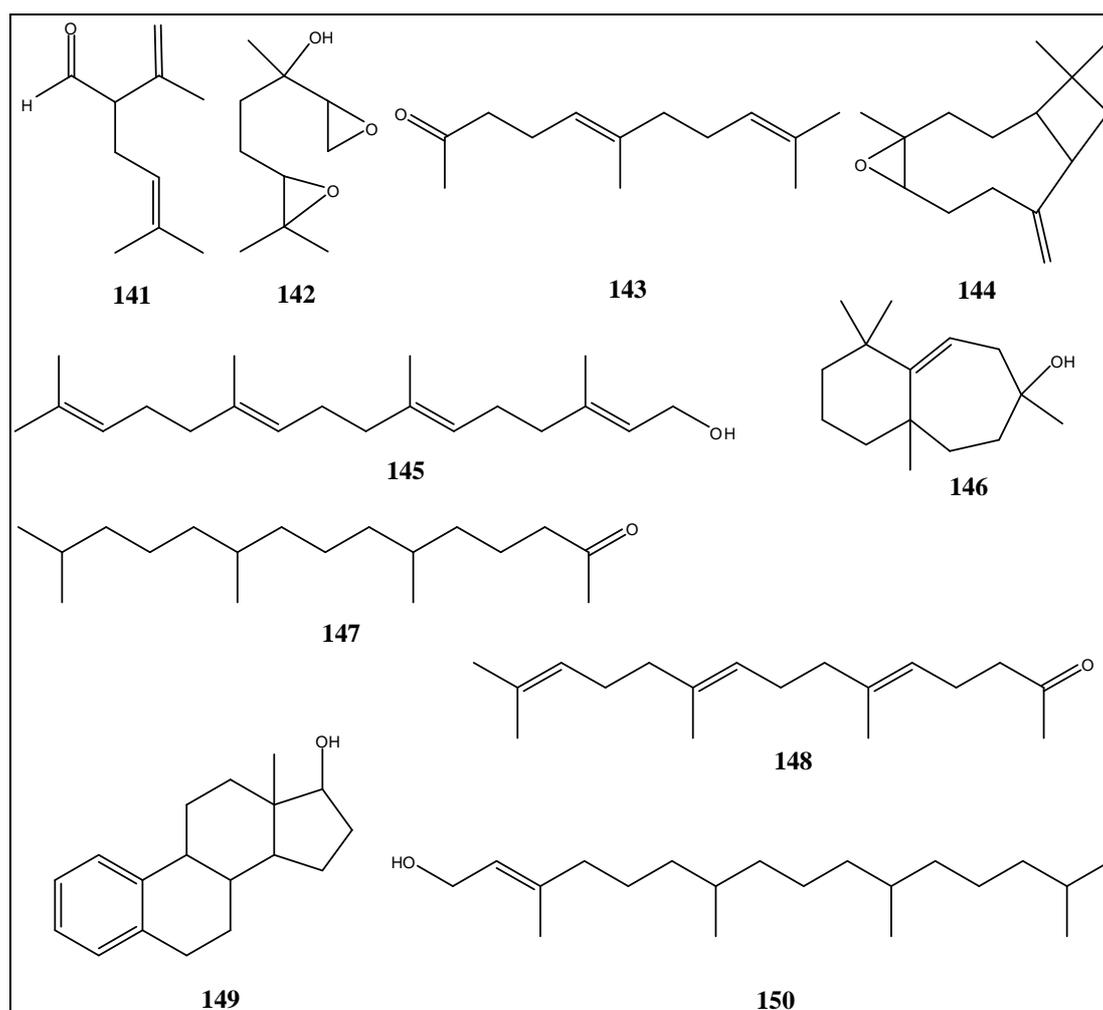


Figura V.2. Estrutura química dos fitoconstituintes identificados por CG-EM do grupo HR02 obtidos do extrato em hexano das folhas de *E. macrophyllum*.

1.2. Grupo HR05

A Figura V.3 mostra o cromatograma de uma amostra por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas do grupo HR05. No grupo HR05 foram identificadas sete substâncias. O composto **147** (hexa-hidrofarnesil acetona) apresenta concentração muito superior em relação aos demais compostos, sendo seguido pelos compostos **155** (ácido palmítico) e **156** (estigmasterol). Da mesma forma que o grupo HR02, alguns picos não foram identificados devido à baixa porcentagem de similaridade ou não apresentaram correspondência apropriada com nenhuma substância da biblioteca NIST.

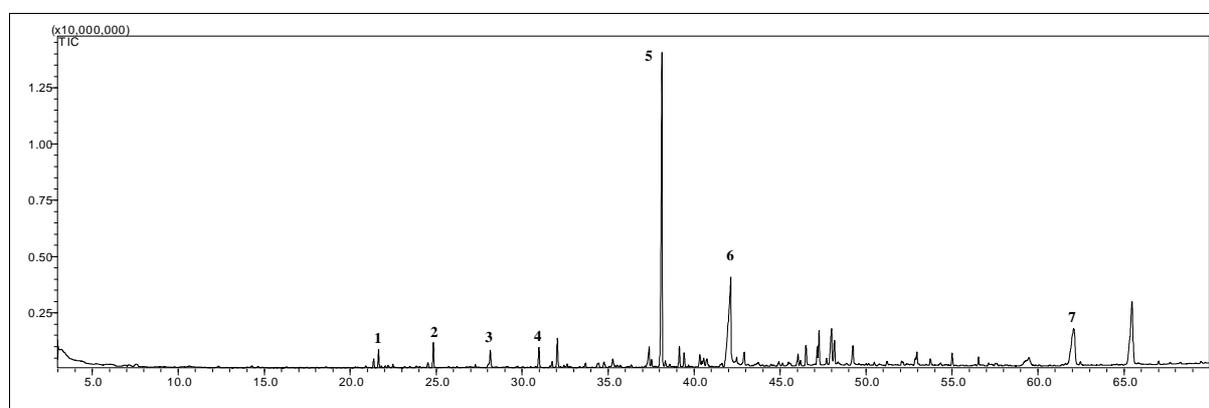


Figura V.3. Cromatograma de cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas do grupo HR05.

A Tabela V.2 mostra os dados de cromatografia a gás: tempo de retenção (min), atribuição e porcentagem de similaridade dos sete fitoconstituintes identificados no grupo HR05 obtido do extrato em hexano das folhas de *E. macrophyllus*. A estrutura dos fitoconstituintes identificados no grupo HR05 é mostrada na Figura V.4 (p. 86).

Tabela V.2. Dados de CG-EM: pico, tempo de retenção (min), atribuição e porcentagem de similaridade dos fitoconstituintes identificados no grupo HR05 obtido do extrato em hexano das folhas de *E. macrophyllus*

HR05					
Pico	Substância	Tempo de retenção (min)	Atribuição	% Similaridade	
1	151	21,654	Tetra-hidrogeranil acetona	89	
2	152	24,833	Hexadecano	90	
3	153	28,148	Ácido 3-hidroxi-dodecanóico	83	
4	154	30,968	Hexa-hidro farnesol	93	
5	147	38,158	Hexa-hidrofarnesil acetona	94	
6	155	42,127	Ácido palmítico	93	
7	156	62,080	Estigmasterol	83	

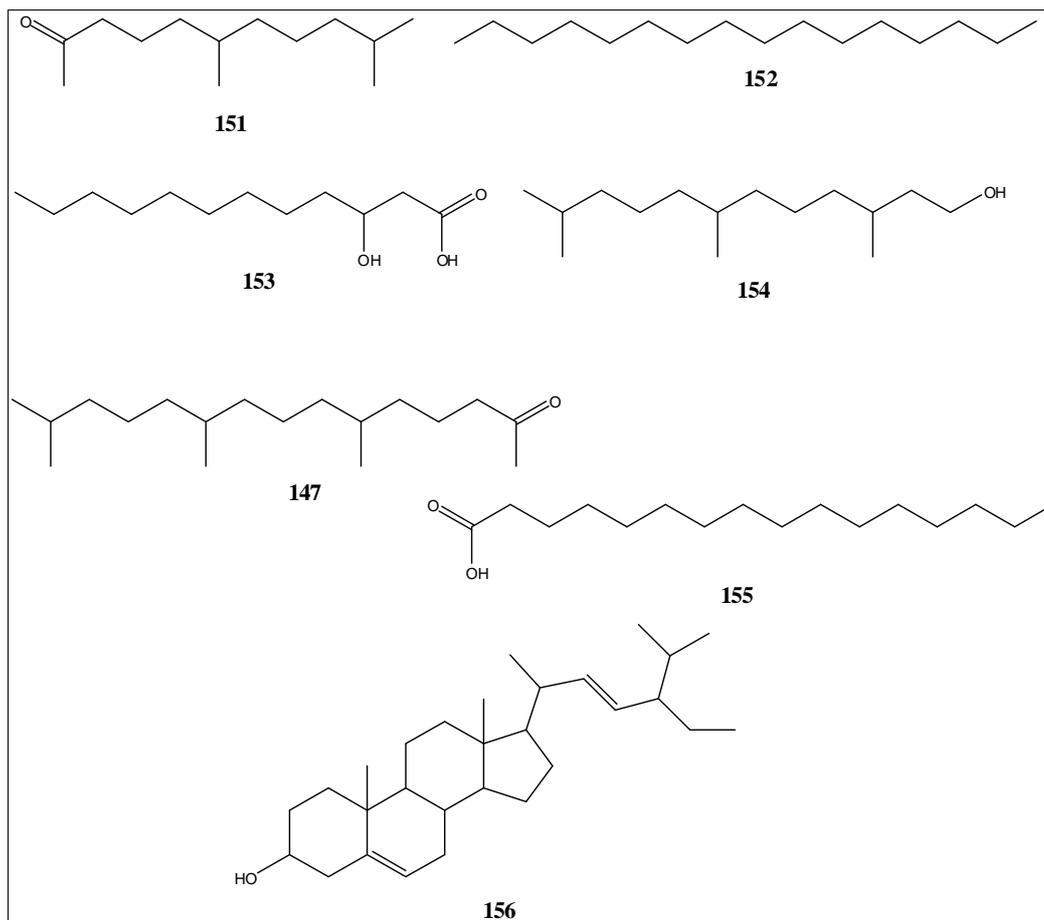


Figura V.4. Estrutura química dos fitoconstituintes identificados por CG-EM do grupo HR05 obtidos do extrato em hexano das folhas de *E. macrophyllus*.

1.3. Grupo HR06

A Figura V.5 mostra o cromatograma de uma amostra por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas do grupo HR06. Quatro picos foram identificados no grupo HR06 obtido do extrato em hexano das folhas de *E. macrophyllus*.

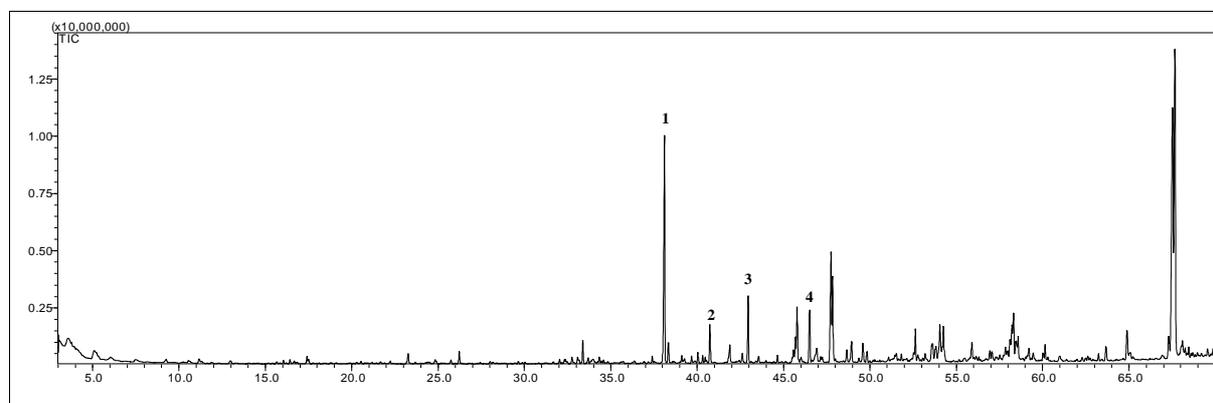


Figura V.5. Cromatograma de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas do grupo HR06.

A Tabela V.3 mostra os dados de cromatografia a gás: tempo de retenção (min), atribuição e porcentagem de similaridade dos quatro fitoconstituintes identificados no grupo HR06 obtido do extrato em hexano das folhas de *E. macrophyllus*.

Tabela V.3. Dados de CG-EM: pico, tempo de retenção (min), atribuição e porcentagem de similaridade dos fitoconstituintes identificados no grupo HR06 obtido do extrato em hexano das folhas de *E. macrophyllus*

HR06				
Pico	Substância	Tempo de retenção (min)	Atribuição	% Similaridade
1	147	38,088	Hexa-hidrofarnesil acetona	94
2	157	40,741	Palmitato de metila	93
3	158	42,943	Palmitato de etila	88
4	150	46,497	Fitol	95

O pico mais intenso não foi identificado por não apresentar similaridade com nenhuma substância da biblioteca NIST. O pico **1** (hexa-hidrofarnesil acetona) mostra-se muito intenso, sendo seguido pelo pico **3** (palmitato de etila), **4** (fitol) e **2** (palmitato de metila). A estrutura dos fitoconstituintes identificados no grupo HR06 é mostrada na Figura V.6.

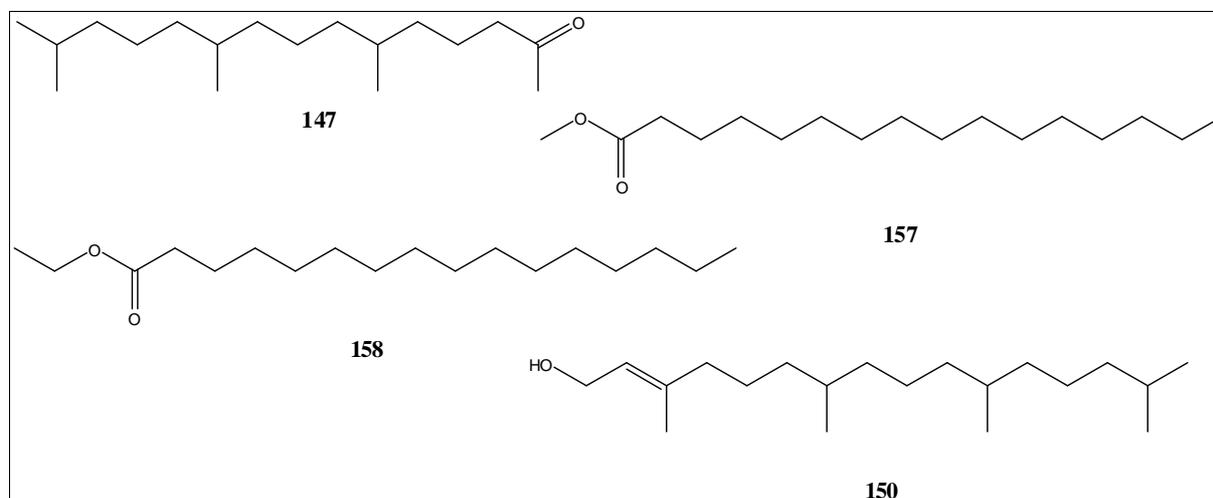


Figura V.6. Estrutura química dos fitoconstituintes identificados por CG-EM do grupo HR06 obtidos do extrato em hexano das folhas de *E. macrophyllus*.

1.4. Grupo HR07

A Figura V.7 mostra o cromatograma de uma amostra por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas do grupo HR07. No cromatograma de CG foram identificados 3 fitoconstituintes.

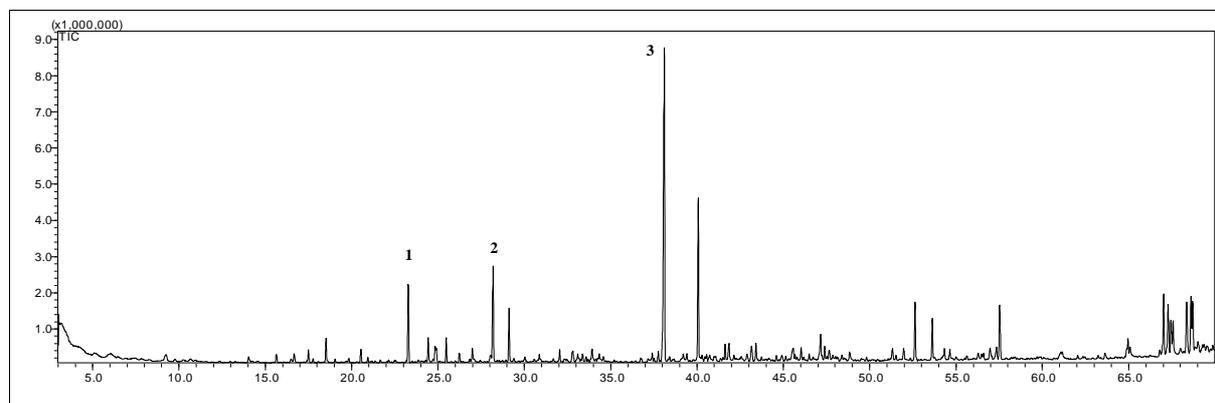


Figura V.7. Cromatograma de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas do grupo HR07.

A Tabela V.4 mostra os dados de cromatografia gasosa: tempo de retenção (min), atribuição e porcentagem de similaridade dos três fitoconstituintes identificados no grupo HR07 obtido do extrato em hexano das folhas de *E. macrophyllus*.

Tabela V.4. Dados de CG-EM: pico, tempo de retenção (min), atribuição e porcentagem de similaridade dos fitoconstituintes identificados no grupo HR07 obtido do extrato em hexano das folhas de *E. macrophyllus*

HR07				
Pico	Substância	Tempo de retenção (min)	Atribuição	% Similaridade
1	143	23,303	<i>trans</i> -Geranilacetona	83
2	159	28,208	4,5-epóxi-cariofileno	94
3	147	38,143	Hexa-hidrofarnesil acetona	92

Alguns picos não foram identificados por não apresentarem similaridades a nenhuma estrutura da biblioteca NIST. O pico 3 (hexa-hidrofarnesil acetona) é o mais abundante, seguido pelos picos 2 (4,5-epóxi-cariofileno) e 1 (*trans*-geranilacetona). A estrutura dos fitoconstituintes identificados no grupo HR07 é mostrada na Figura V.8 (p. 89).

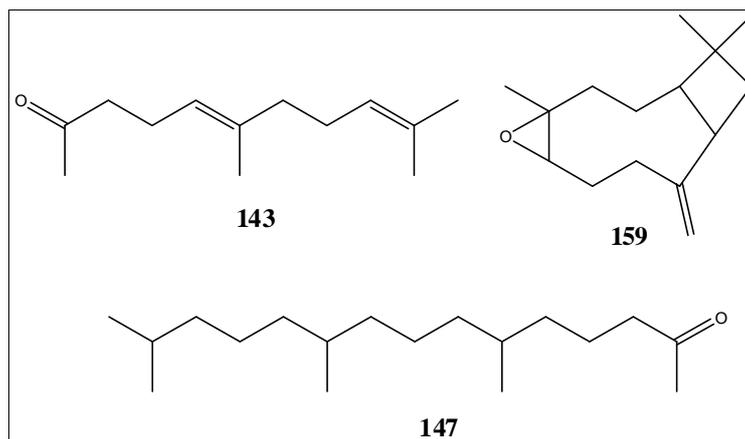


Figura V.8. Estrutura química dos fitoconstituintes identificados por CG-EM do grupo HR07 obtidos do extrato em hexano das folhas de *E. macrophyllus*.

1.5. Grupo HR08

A Figura V.9 mostra o cromatograma de uma amostra por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas do grupo HR08. Apesar da complexidade do cromatograma de CG de HR08 somente um pico foi identificado.

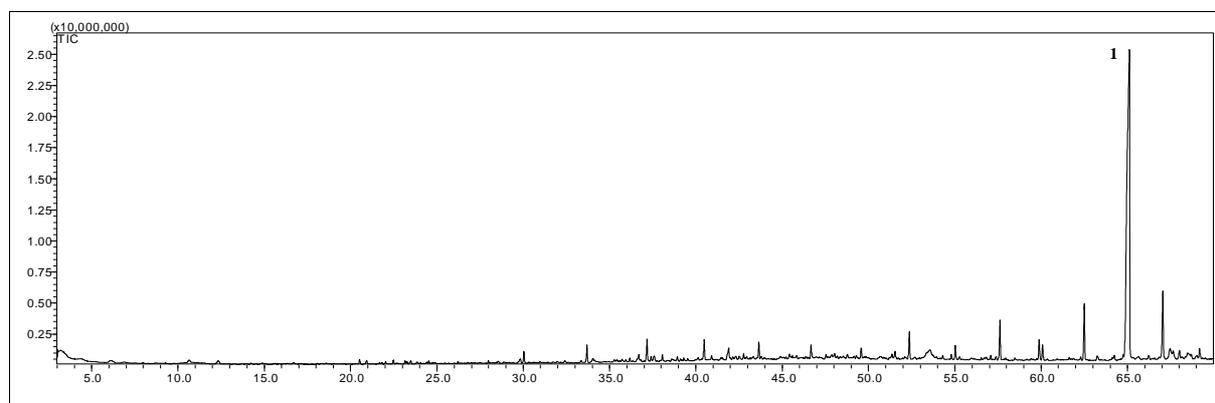


Figura V.9. Cromatograma de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas do grupo HR08.

A Tabela V.5 mostra os dados de cromatografia a gás: tempo de retenção (min), atribuição e porcentagem de similaridade do fitoconstituente identificado no grupo HR08 obtido do extrato em hexano das folhas de *E. macrophyllus*.

Tabela V.5. Dados de CG-EM: pico, tempo de retenção (min), atribuição e porcentagem de similaridade do fitoconstituente encontrado no grupo HR08 obtido do extrato em hexano das folhas de *E. macrophyllus*

HR08				
Pico	Substância	Tempo de retenção (min)	Atribuição	% Similaridade
1	160	65,152	Esqualeno	89

No grupo HR08 foi identificado o triterpeno esqualeno. A estrutura do fitoconstituente identificado no grupo HR08 é mostrada na Figura V.10.

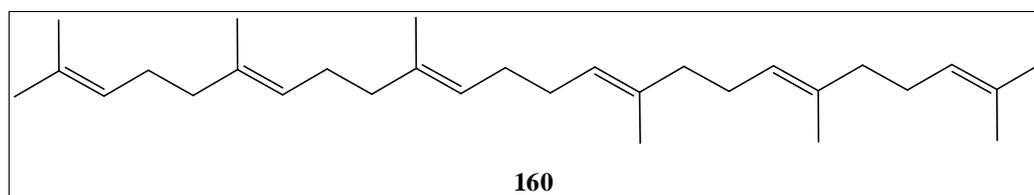


Figura V.10. Estrutura química do fitoconstituente identificado por CG-EM do grupo HR08 obtidos do extrato em hexano das folhas de *E. macrophyllus*.

1.6. Fração AR01

As frações denominadas AR foram obtidas do fracionamento cromatográfico do grupo HR09. A Figura V.11 mostra o cromatograma de uma amostra por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas da fração AR01. No cromatograma de CG são registrados sete picos intensos entre TR = 38,0 e 50,0 min e dois picos próximos a TR = 60,0 min.

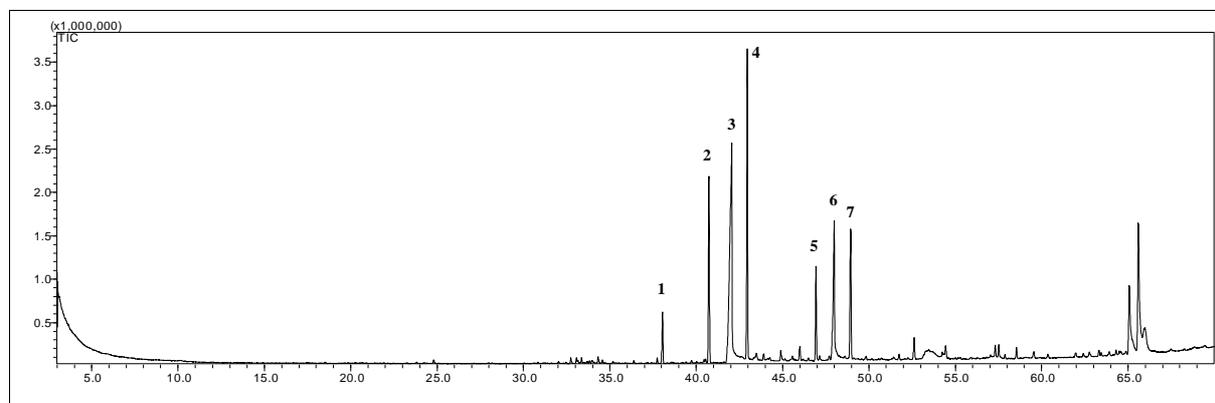


Figura V.11. Cromatograma de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas da fração AR01.

A Tabela V.6 (p. 91) mostra os dados de cromatografia a gás: tempo de retenção (min), atribuição e porcentagem de similaridade dos sete fitoconstituente identificados na fração AR01 obtida do refracionamento de HR09 do extrato em hexano das folhas de *E. macrophyllus*.

Tabela V.6. Dados de CG-EM: pico, tempo de retenção (min), atribuição e porcentagem de similaridade dos fitoconstituintes identificados na fração AR01 obtida do refração de HR09 do extrato em hexano das folhas de *E. macrophyllum*

AR01				
Pico	Substância	Tempo de retenção (min)	Atribuição	% Similaridade
1	147	38,019	Hexa-hidrofarnesil acetona	91
2	157	40,751	Palmitato de metila	94
3	155	42,055	Ácido palmítico	93
4	158	42,924	Palmitato de etila	90
5	161	46,960	Estearato de metila	91
6	162	48,015	Ácido esteárico	90
7	163	48,947	Docosonoato de etila	80

Assim como nos grupos anteriormente, alguns fitoconstituintes não foram identificados por não apresentarem similaridades a nenhuma estrutura da biblioteca NIST. A fração AR01 contém em maior quantidade o constituinte correspondente ao pico **4** (hexa-hidrofarnesil acetona), seguido do pico **3** (ácido palmítico) e pico **2** (palmitato de metila). A estrutura dos fitoconstituintes identificados na fração AR01 é mostrada na Figura V.12.



Figura V.12. Estrutura química dos fitoconstituintes identificados por CG-EM da fração AR01 obtida do refração do grupo HR09 do extrato em hexano das folhas de *E. macrophyllum*.

1.7. Fração AR02

A Figura V.13 mostra o cromatograma de uma amostra por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas da fração AR02. No cromatograma de CG são registrados vários picos entre 40,0 e 50,0 min.

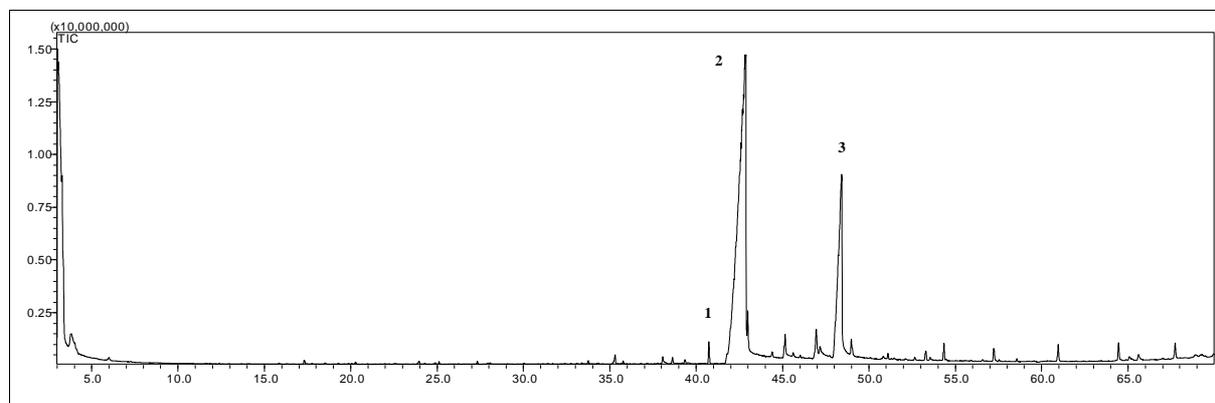


Figura V.13. Cromatograma de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas da fração AR02.

A Tabela V.7 mostra os dados de cromatografia a gás: tempo de retenção (min), atribuição e porcentagem de similaridade dos três fitoconstituintes identificados na fração AR02 obtida do refractionamento de HR09 do extrato em hexano das folhas de *E. macrophyllus*.

Tabela V.7. Dados de CG-EM: pico, tempo de retenção (min), atribuição e porcentagem de similaridade dos fitoconstituintes identificados na fração AR02 obtida do refractionamento de HR09 do extrato em hexano das folhas de *E. macrophyllus*

AR02				
Pico	Substância	Tempo de retenção (min)	Atribuição	% Similaridade
1	157	40,751	Palmitato de metila	84
2	155	42,862	Ácido palmítico	93
3	162	48,388	Ácido esteárico	93

Os fitoconstituintes identificados mostraram as maiores concentrações na amostra, sendo o pico **2** (ácido palmítico) o mais intenso, seguido pelo pico **3** (ácido esteárico) e pelo pico **1**, em menor concentração, (palmitato de etila). A estrutura dos fitoconstituintes identificados na fração AR02 é mostrada na Figura V.14 (p. 93).

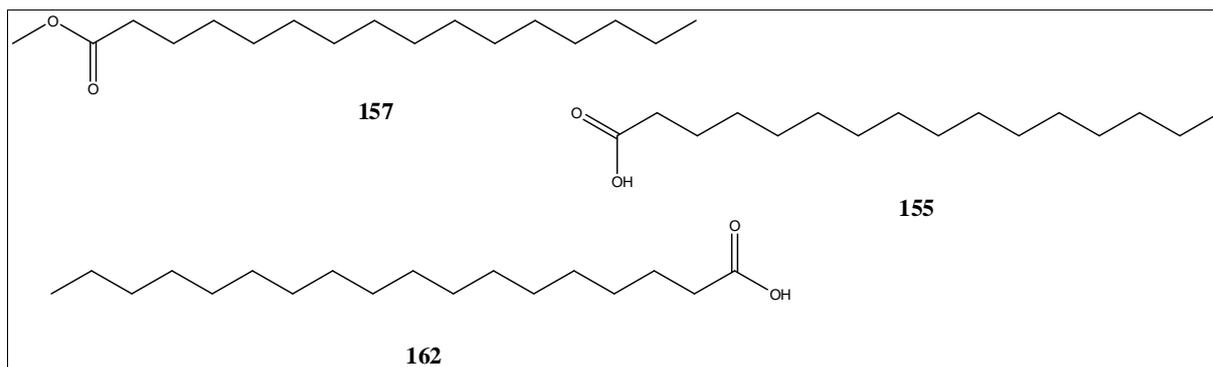


Figura V.14. Estrutura química dos fitoconstituintes identificados por CG-EM da fração AR02 obtida do refractionamento do grupo HR09 do extrato em hexano das folhas de *E. macrophyllus*.

1.8. Fração AR03

A Figura V.15 mostra o cromatograma de uma amostra por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas da fração AR03. No cromatograma de CG são numerados cinco fitoconstituintes nessa fração entre TR = 35,0 e 50,0 min.

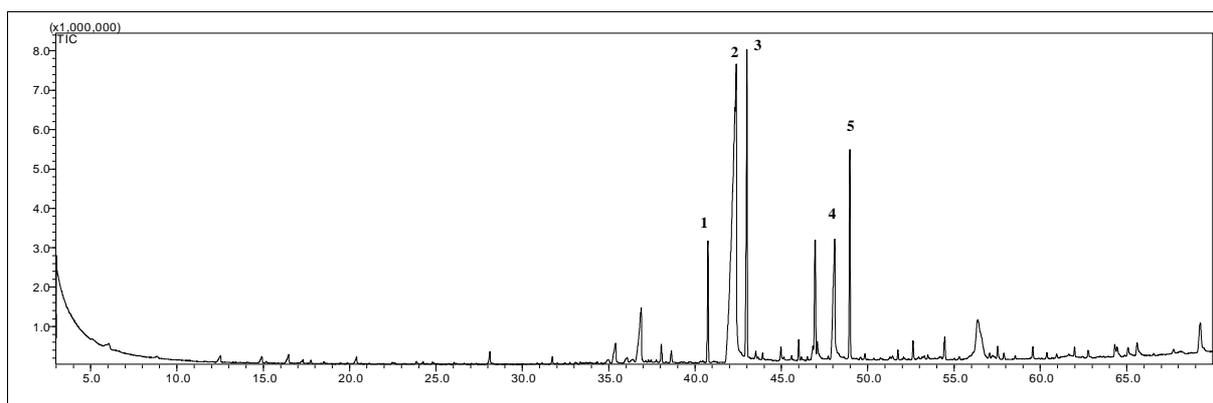


Figura V.15. Cromatograma de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas da fração AR03.

A Tabela V.8 (p. 94) mostra os dados de cromatografia a gás: tempo de retenção (min), atribuição e porcentagem de similaridade dos cinco fitoconstituintes identificados na fração AR03 obtida do refractionamento de HR09 do extrato em hexano das folhas de *E. macrophyllus*.

Tabela V.8. Dados de CG-EM: pico, tempo de retenção (min), atribuição e porcentagem de similaridade dos fitoconstituintes identificados na fração AR03 obtida do refração de HR09 do extrato em hexano das folhas de *E. macrophyllum*

AR03				
Pico	Substância	Tempo de retenção (min)	Atribuição	% Similaridade
1	157	40,751	Palmitato de metila	95
2	155	42,303	Ácido palmítico	94
3	158	42,896	Palmitato de etila	94
4	162	48,077	Ácido esteárico	91
5	164	48,947	Estearato de etila	89

A fração apresenta-se muito rica em fitoconstituintes, mas não foi identificada a grande maioria dos picos no cromatograma de CG por não apresentarem similaridades com nenhuma substância da biblioteca NIST. O pico 3 (palmitato de etila) apresenta-se em maior concentração e o pico 2 (ácido palmítico) em concentração ligeiramente menor que 3, enquanto que o pico 5 (estearato de etila) em menor concentração. A estrutura dos fitoconstituintes identificados na fração AR03 é mostrada na Figura V.16.

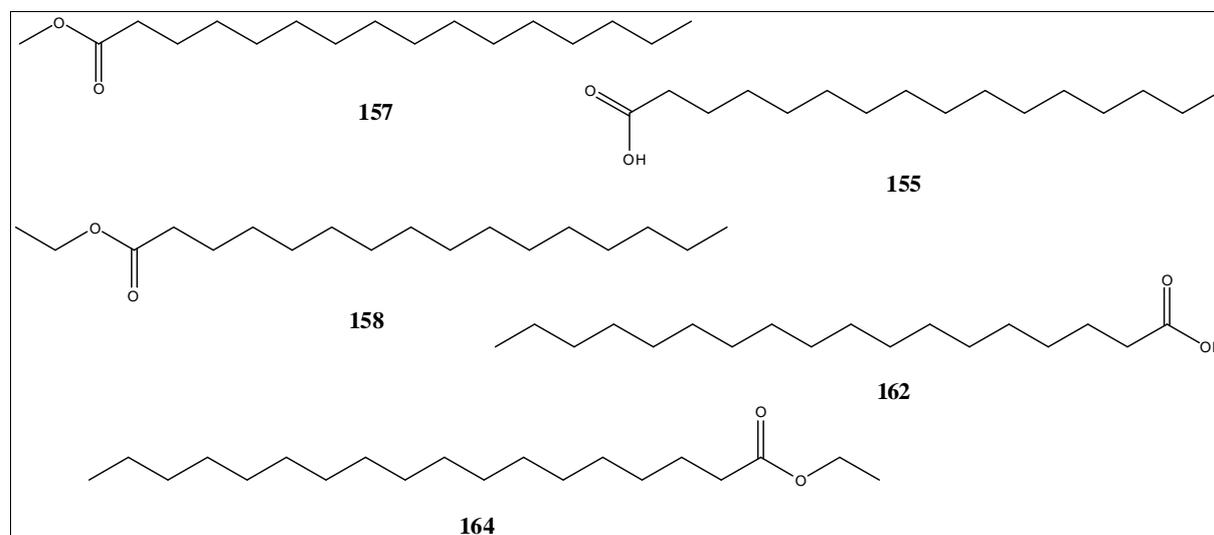


Figura V.16. Estrutura química dos fitoconstituintes identificados por CG-EM da fração AR03 obtida do refração do grupo HR09 do extrato em hexano das folhas de *E. macrophyllum*.

1.9. Fração B05

A fração B05 foi obtida do refração da fração AR13 do extrato em hexano das folhas de *E. macrophyllum*. A Figura V.17 (p. 95) mostra o cromatograma de uma amostra por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas da fração B05. A fração mostrou-se

simples, sendo possível identificar três fitoconstituintes nessa fração entre TR = 35,0 e 50,0 min.

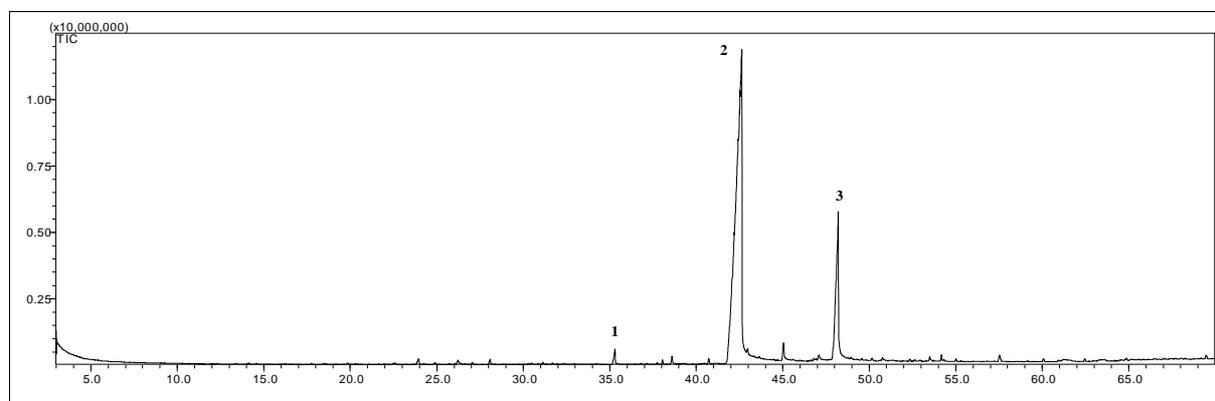


Figura V.17. Cromatograma de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas da fração B05.

A Tabela V.9 mostra os dados de cromatografia a gás: tempo de retenção (min), atribuição e porcentagem de similaridade dos três fitoconstituintes identificados na fração B05 obtida do refractionamento de AR13 do extrato em hexano das folhas de *E. macrophyllus*.

Tabela V.9. Dados de CG-EM: pico, tempo de retenção (min), atribuição e porcentagem de similaridade dos fitoconstituintes identificados na fração B05 obtida do refractionamento de AR13 do extrato em hexano das folhas de *E. macrophyllus*

B05				
Pico	Substância	Tempo de retenção (min)	Atribuição	% Similaridade
1	165	35,287	Ácido mirístico	89
2	155	42,613	Ácido palmítico	93
3	162	48,201	Ácido esteárico	91

Na fração B05 foi possível identificar dois picos intensos: pico 2 (ácido palmítico) e pico 3 (ácido esteárico) e um menos intenso, o pico 1 (ácido mirístico). A estrutura dos fitoconstituintes identificados na fração B05 é mostrada na Figura V.18 (p. 96).

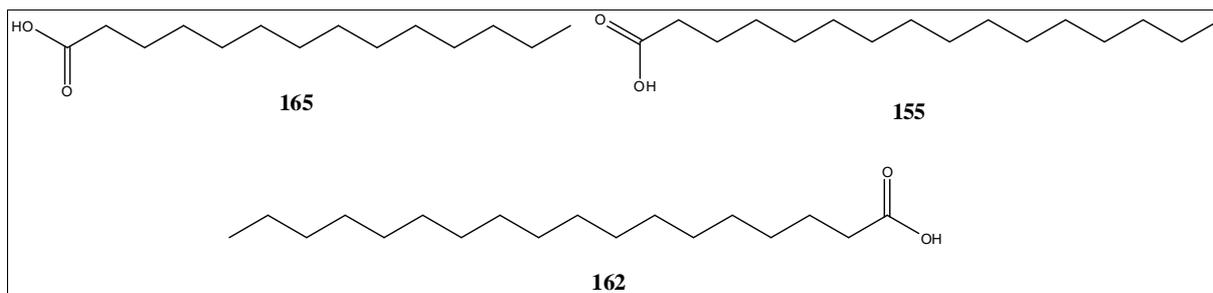


Figura V.18. Estrutura química dos fitoconstituintes identificados por CG-EM da fração B05 obtida do refractionamento da fração AR13 do extrato em hexano das folhas de *E. macrophyllus*.

1.10. Fração C02

A fração C02 foi obtida a partir do refractionamento das frações B03 e B04 obtida do extrato em hexano da espécie *E. macrophyllus*. A Figura V.19 mostra o cromatograma de uma amostra por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas da fração C02. A fração C02 é rica em fitoconstituintes apresentando um número grande de fitoconstituintes identificados (11 substâncias).

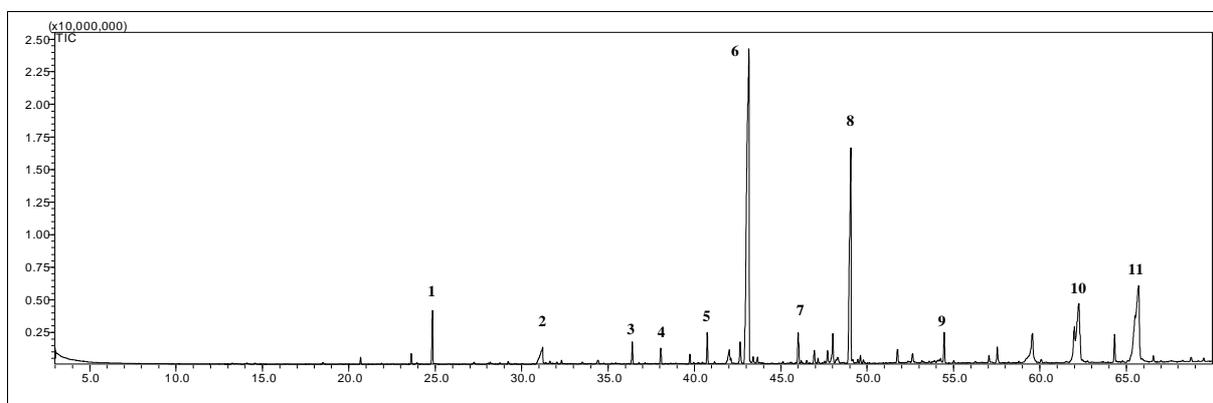


Figura V.19. Cromatograma de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas da fração C02.

A Tabela V.10 (p. 97) mostra os dados de cromatografia a gás: tempo de retenção (min), atribuição e porcentagem de similaridade dos onze fitoconstituintes identificados na fração C02 obtida do refractionamento de B03 e B04 do extrato em hexano das folhas de *E. macrophyllus*.

Tabela V.10. Dados de CG-EM: pico, tempo de retenção (min), atribuição e porcentagem de similaridade dos fitoconstituintes identificados na fração C02 obtida do refração de B03 e B04 do extrato em hexano das folhas de *E. macrophyllus*

C02				
Pico	Substância	Tempo de retenção (min)	Atribuição	% Similaridade
1	166	24,856	9-Oxononanoato de etila	93
2	167	31,251	Ácido nonadienóico	80
3	168	36,404	Miristato de etila	90
4	147	38,081	Hexa-hidrofarnesil acetona	89
5	157	40,751	Palmitato de metila	90
6	158	43,172	Palmitato de etila	94
7	169	46,028	Heptadecanoato de etila	91
8	164	49,071	Estearato de etila	93
9	163	54,473	Docosanoato de etila	80
10	170	62,234	Estigmasterol	87
11	171	65,711	β -Sitosterol	81

O pico **6** (palmitato de etila) é o mais intenso no cromatograma de CG. O pico **8** (estearato de etila) apresenta-se também em alta concentração relativa na amostra. Os demais fitoconstituintes estão em menores concentrações tendo sido identificados alguns ácidos graxos e os triterpenos estigmasterol e β -sitosterol presentes nessa fração. A estrutura dos fitoconstituintes encontrados na fração C02 é mostrada na Figura V.20 (p. 98).

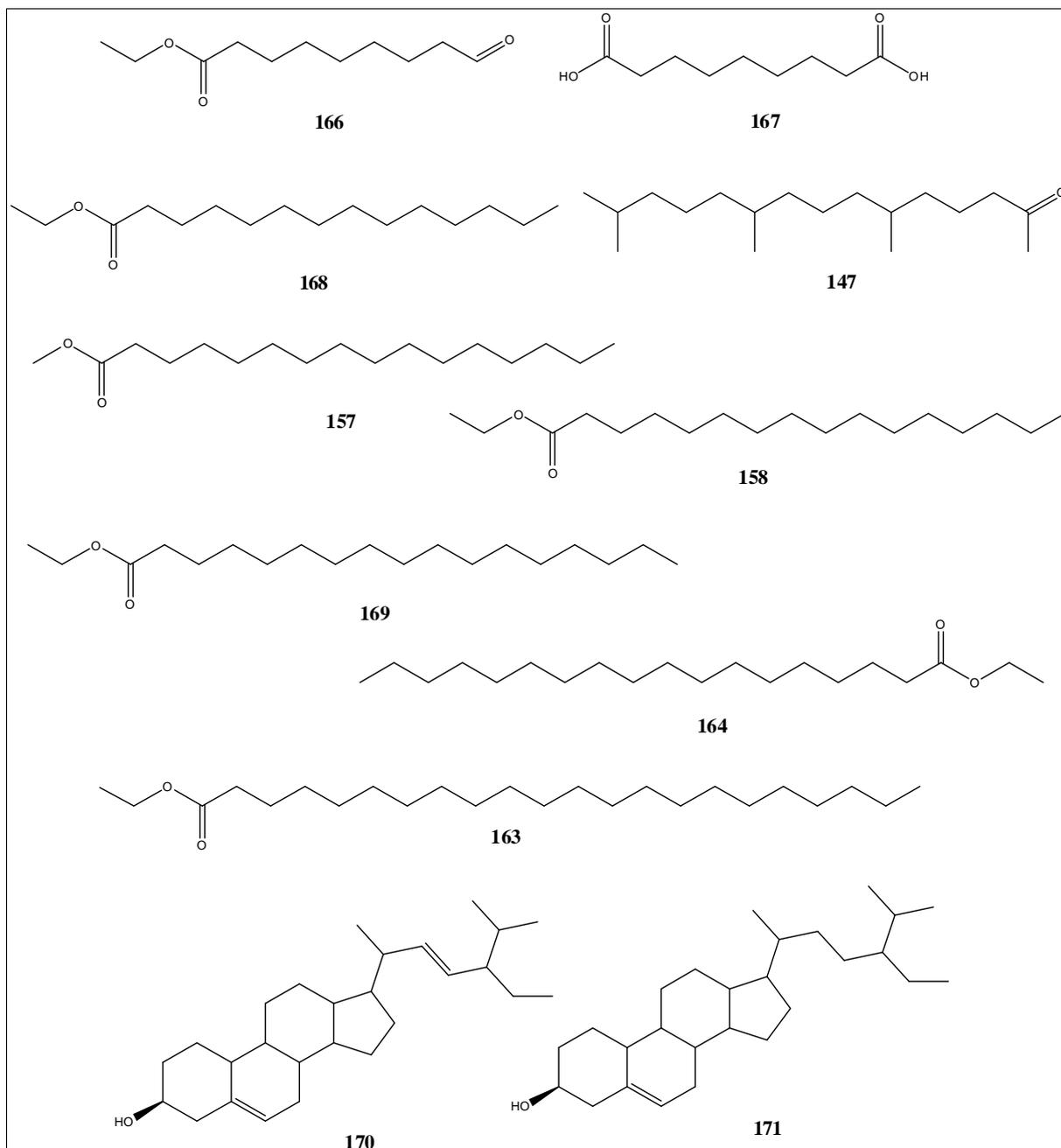


Figura V.20. Estrutura química dos fitoconstituintes identificados por CG-EM da fração C02 obtida do refractionamento da fração B03 e B04 do extrato em hexano das folhas de *E. macrophyllus*.

1.11. Fração D02

A fração D02 foi obtida do refractionamento da fração C07 do extrato em hexano da espécie *E. macrophyllus*. A Figura V.21 (p. 99) mostra o cromatograma de uma amostra por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas da fração D02. Na fração foram identificados quatro picos presentes na amostra, entre TR = 42,0 e 66,0 min.

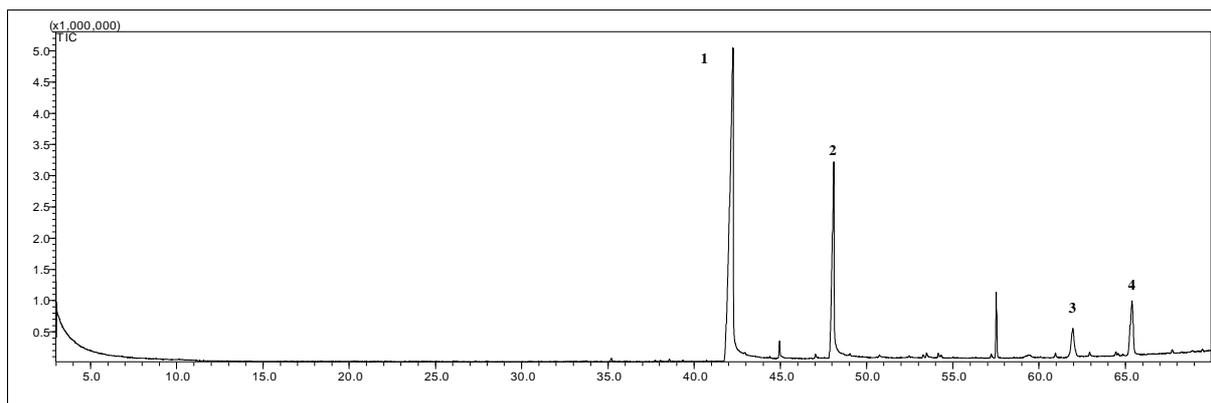


Figura V.21. Cromatograma de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas da fração D02.

A Tabela V.11 mostra os dados de cromatografia a gás: tempo de retenção (min), atribuição e porcentagem de similaridade dos quatro fitoconstituintes identificados na fração D02 obtida do refração de C07 do extrato em hexano das folhas de *E. macrophyllum*.

Tabela V.11. Dados de CG-EM: pico, tempo de retenção (min), atribuição e porcentagem de similaridade dos fitoconstituintes identificados na fração D02 obtida do refração de C07 do extrato em hexano das folhas de *E. macrophyllum*

D02				
Pico	Substância	Tempo de retenção (min)	Atribuição	% Similaridade
1	155	42,241	Ácido palmítico	94
2	162	48,077	Ácido esteárico	92
3	170	61,985	Estigmasterol	88
4	171	65,338	β -Sistosterol	82

O pico **1** (ácido palmítico) apresentou-se como o mais intenso no cromatograma de CG. O pico **2** (ácido esteárico) apresenta-se também em alta concentração relativa na amostra. Também foram identificados o pico **3** (Estigmasterol) e o pico **4** (β -Sistosterol). A estrutura dos fitoconstituintes encontrados na fração D02 é mostrada na Figura V.22 (p. 100).

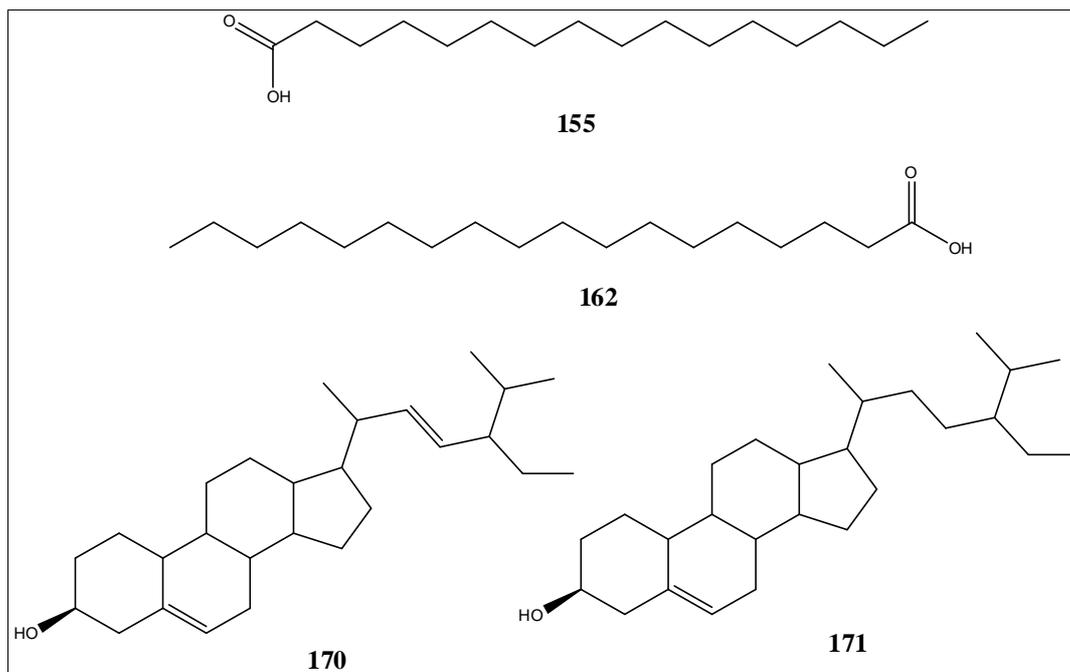


Figura V.22. Estrutura química dos fitoconstituintes identificados por CG-EM da fração D02 obtida do refractionamento da fração C07 do extrato em hexano das folhas de *E. macrophyllus*.

A fração D02 (17 mg) apresentou-se como um sólido branco com faixa de fusão entre 135,2-141,4 °C. A Figura V.23 (p. 101) mostra o espectro de absorção na região do infravermelho de D02. A absorção em 3278 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento de O-H, confirmada pela absorção em 1096 cm^{-1} , atribuída ao estiramento de C-O. As bandas na região de 3000 a 2800 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento da ligação C-H de cadeia alifática. A absorção em 1066 cm^{-1} é característica de estiramento C-O, compatível com hidroxila de esteróis. A absorção em 992 cm^{-1} é característica de ligação C=C *trans* dissubstituída da cadeia lateral de esteróis.

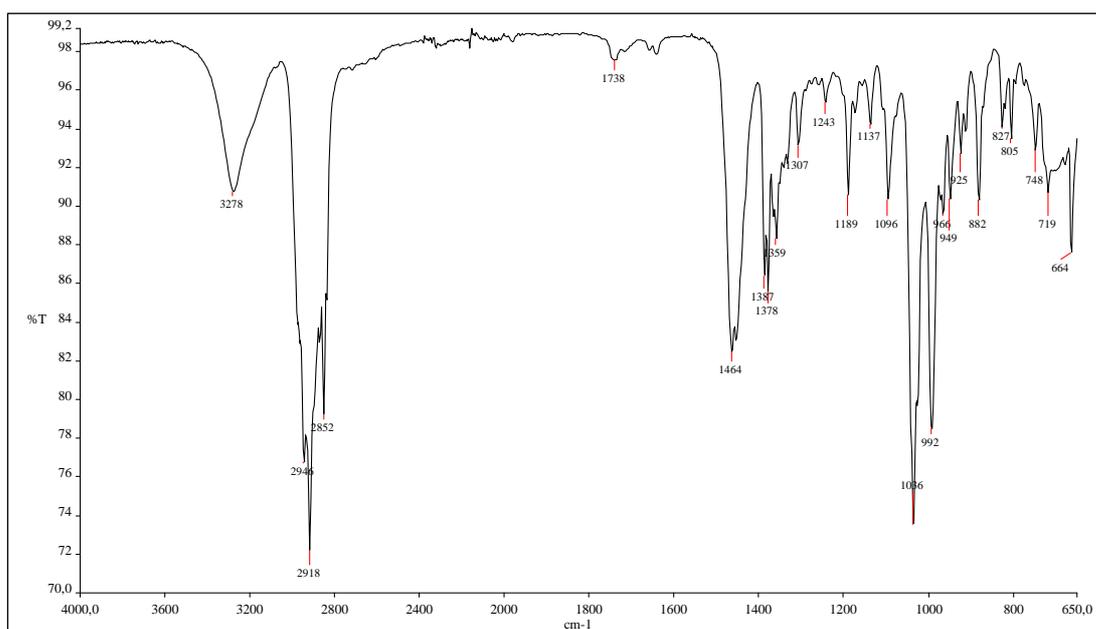


Figura V.23. Espectro de absorção na região do Infravermelho de D02 (ATR, cm^{-1}).

A Figura V.24 (p. 102) apresenta o espectro de RMN de ^1H de D02. O sinal em δ_{H} 5,35 pode ser atribuído ao hidrogênio olefínico H-6 tanto do β -sitosterol quanto do estigmasterol. O sinal multipletto em δ_{H} 5,22 - 5,02 pode ser atribuído aos átomos de hidrogênio H-22 e H-23 do estigmasterol. O sinal em δ_{H} 3,55 - 3,51 pode ser atribuído ao hidrogênio carbinólico H-3 do β -sitosterol e estigmasterol. Os vários sinais sobrepostos na região em δ_{H} 2,40 - 0,60 podem ser atribuídos aos átomos de hidrogênio da cadeia alifática de ambos os esteroides.

A Figura V.25 (p. 102) apresenta o espectro de RMN de ^{13}C e o subspectro de DEPT 135° de D02. Os sinais em δ_{C} 140,7 (C-não hidrogenado) e 121,7 (C-hidrogenado) podem ser atribuídos respectivamente a C-5 e C-6 do β -sitosterol e estigmasterol. Os sinais em δ_{C} 138,3 e 129,3 (ambos C-hidrogenados) podem ser atribuídos respectivamente a C-22 e C-23 do estigmasterol. Os demais sinais de RMN de ^{13}C foram atribuídos conforme comparação com dados de RMN de ^{13}C do β -sitosterol e estigmasterol descritos na literatura e apresentados na Tabela V.12, p. 103 (Brandão, 1991).

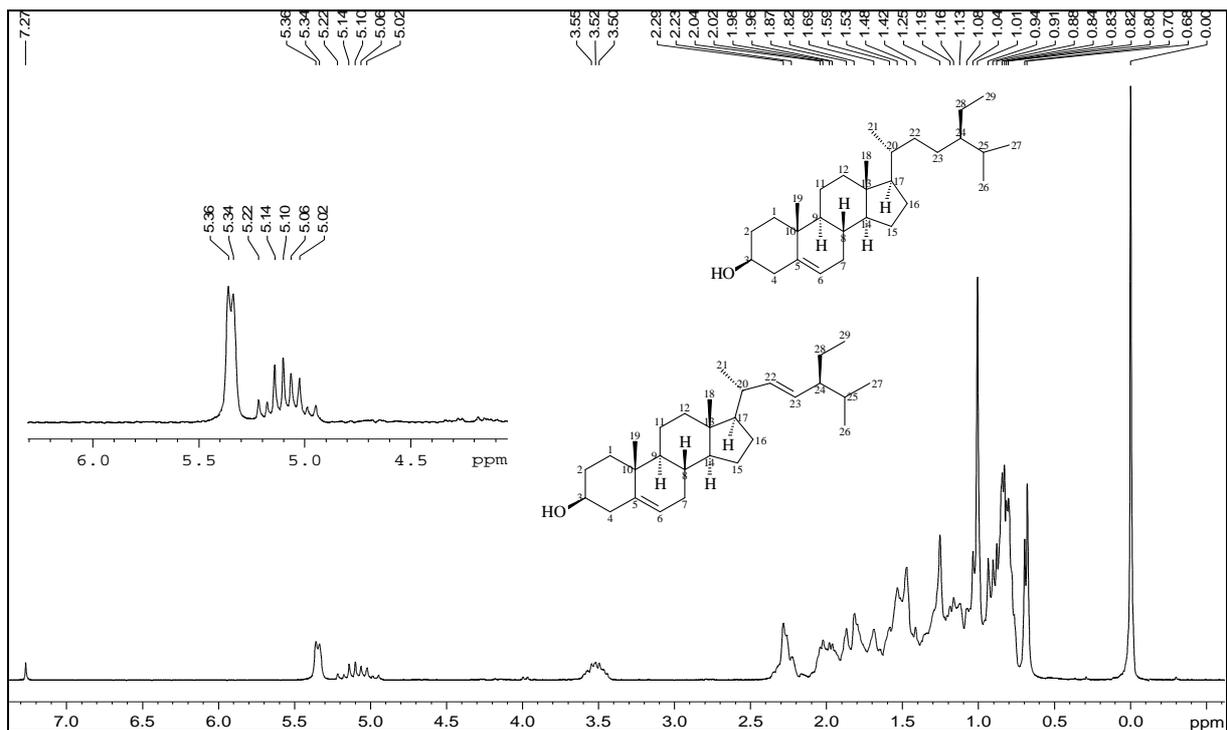


Figura V.24. Espectro de RMN de ^1H de D02 (200 MHz; CDCl_3).

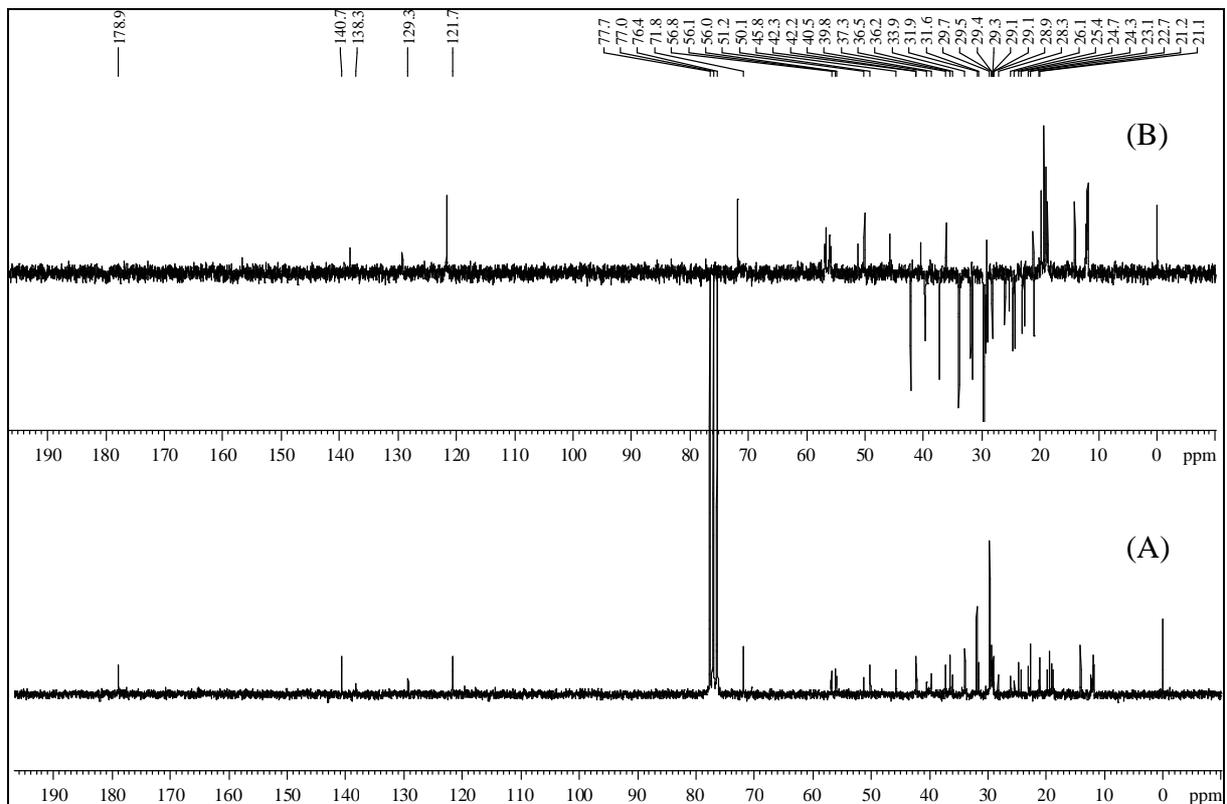


Figura V.25. Espectro de RMN de ^{13}C (A) e subspectro DEPT 135° (B) de D02 (50 MHz; CDCl_3).

Tabela V.12. Dados de RMN de ^{13}C de D02 e dos esteróides β -sitosterol e estigmasterol descritos na literatura (Brandão, 1991)

Átomo	D02	β -Sitosterol	D02	Estigmasterol
C-1	37,3	37,3	37,3	37,3
C-2	31,6	31,6	31,6	31,6
C-3	71,8	71,8	71,8	71,8
C-4	42,3	42,3	42,3	42,3
C-5	140,7	140,8	140,7	140,8
C-6	121,7	121,7	121,7	121,7
C-7	31,9	31,9	31,9	31,9
C-8	31,9	31,9	31,9	31,9
C-9	50,1	50,1	50,1	50,1
C-10	36,5	36,5	36,5	36,5
C-11	21,1	21,1	21,1	21,1
C-12	39,8	39,8	39,8	39,8
C-13	42,3	42,3	42,3	42,3
C-14	56,8	56,8	56,8	56,8
C-15	24,3	24,3	24,3	24,3
C-16	28,9	28,9	29,1	29,1
C-17	56,1	56,1	56,1	56,1
C-18	11,9	11,9	12,0	12,0
C-19	19,4	19,4	19,4	19,4
C-20	36,2	36,2	40,5	40,5
C-21	18,8	18,8	21,1	21,1
C-22	33,9	33,9	138,3	138,3
C-23	26,1	26,1	129,3	129,3
C-24	45,8	45,8	51,2	51,3
C-25	29,1	29,1	31,9	31,9
C-26	19,8	19,8	21,2	21,1
C-27	19,0	19,0	19,0	19,0
C-28	23,1	23,1	25,4	25,4
C-29	12,2	12,3	12,2	12,3

O espectro de RMN de ^{13}C mostra um sinal em δ_{C} em 178,9 e vários outros sinais característicos de carbono alifático que podem ser atribuídos ao ácido palmítico e ácido esteárico presentes na amostra D02.

2. Análise das Frações Obtidas de Fracionamento por CLAE do Extrato Polar de *Echinodorus macrophyllus*

2.1. Elucidação Estrutural de F01

A fração F01 corresponde ao pico 2 (TR = 2,93 min) do cromatograma de CLAE a 280 nm do extrato fenólico das folhas de *E. macrophyllus*, conforme apresentado na Figura III.1 (p. 49). Esta fração foi isolada por CLAE preparativa, apresentando-se como um sólido branco e faixa de fusão entre 139,2 – 142,9 °C.

A Figura V.26 apresenta o espectro de absorção na região do infravermelho de F01. A absorção larga em 3406 cm^{-1} é característica do estiramento O-H de ácido carboxílico em ligação de hidrogênio. A absorção pouco intensa acima de 3081 cm^{-1} é característica de estiramento C-H de carbono de grupo alquênico. As absorções em 1725 e 1699 cm^{-1} são características de estiramento C=O de ácido carboxílico e de ácido carboxílico conjugado a sistema π , respectivamente. A absorção em 1419 cm^{-1} é característica do estiramento C=C. As absorções em 911 e 900 cm^{-1} são características de deformação angular fora do plano de O-H.

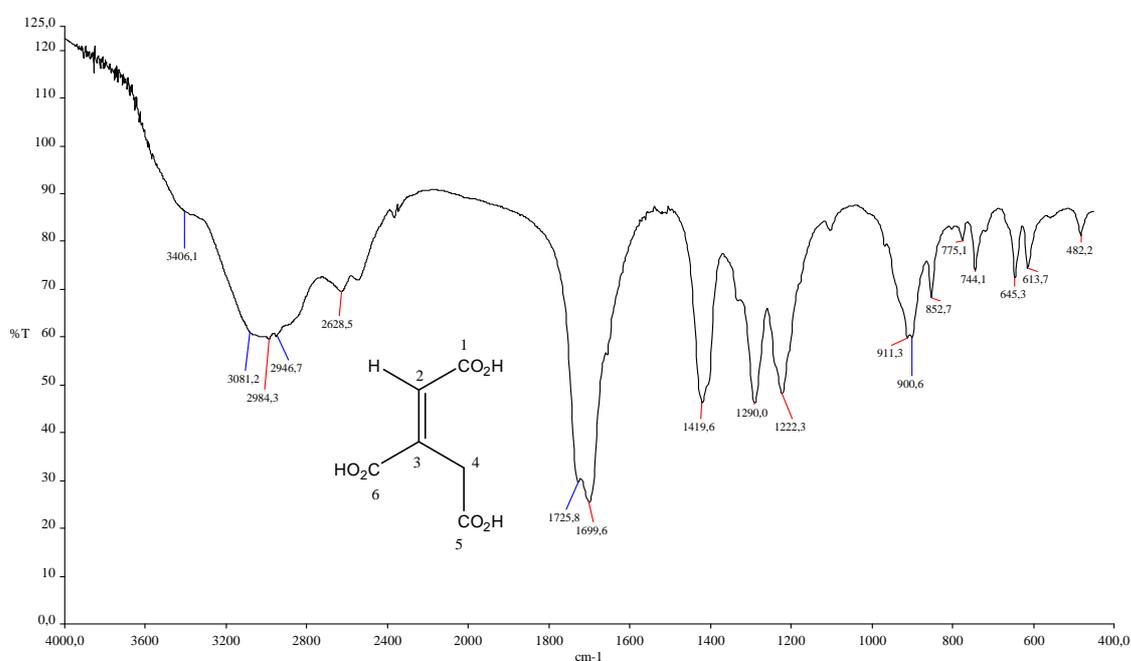


Figura V.26. Espectro de absorção na região do infravermelho de F01 (ATR; cm^{-1}).

A Figura V.27 apresenta o espectro de RMN de ^1H de F01. O sinal largo em δ_{H} 12,62 é característico de hidrogênio de ácido carboxílico. O sinal simpleto em δ_{H} 6,73 pode ser atribuído a hidrogênio alquênico e o sinal simpleto em δ_{H} 3,73 pode ser atribuído a hidrogênio metilênico. O sinal de hidrogênio em δ_{H} 2,43 pode ser atribuído a impurezas presentes na amostra.

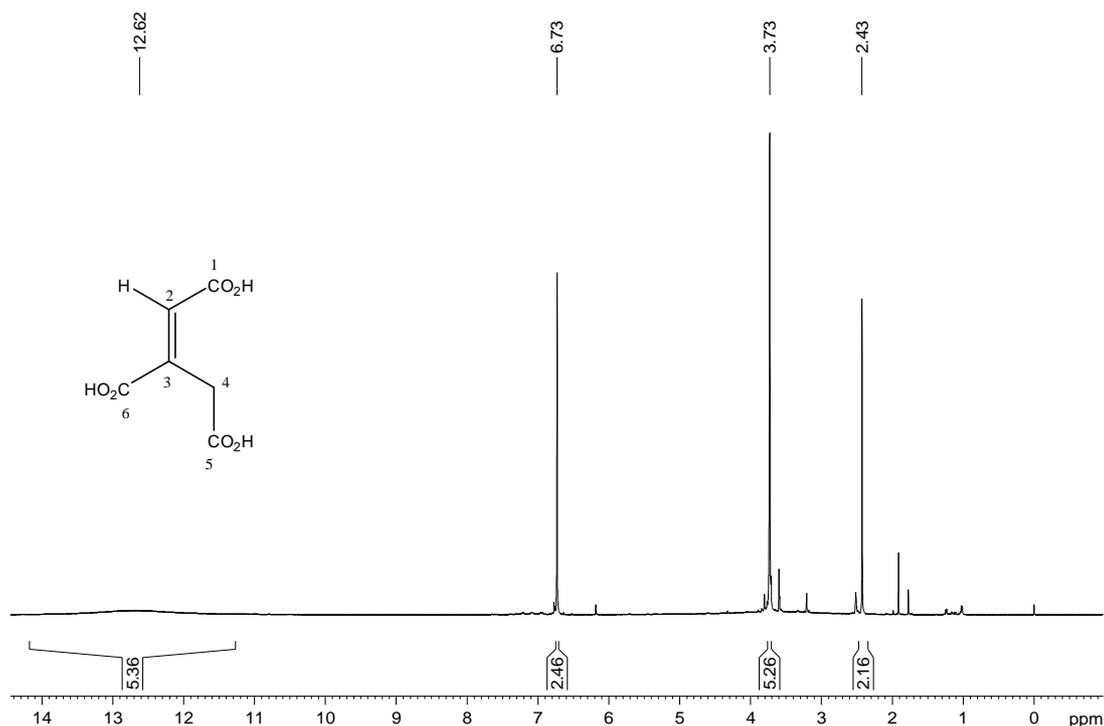


Figura V.27. Espectro de RMN de ^1H de F01 (400 MHz; DMSO-*d*6).

A Figura V.28 (p. 106) apresenta o espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT 135° de F01. Os sinais de carbono não hidrogenado em δ_{C} 171,1, 167,4 e 166,6 são característicos de ácidos carboxílicos. Os sinais de carbono em δ_{C} 140,3 e 128,9 são característicos de grupos alquênicos. O espectro de RMN de ^{13}C de F01 mostra também um sinal de carbono em δ_{C} 32,8 em fase negativa, característico de carbono metilênico. Os sinais de carbono em δ_{C} 173,7 e 28,8 foram atribuídos a impurezas presentes na amostra.

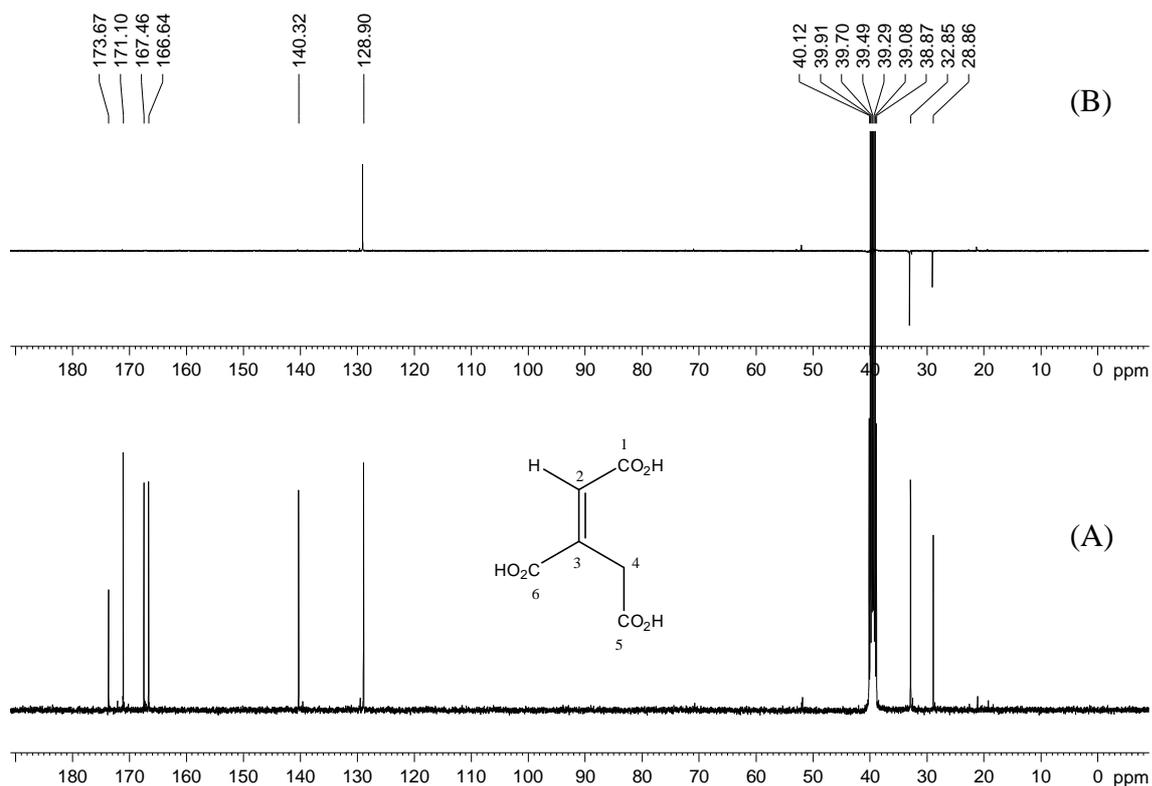


Figura V.28. Espectro de RMN de ^{13}C (A) e subspectro DEPT 135° (B) de F01 (100 MHz; DMSO-*d*₆).

O mapa de contornos HSQC (Figura V.29; p. 107) de F01 mostra correlação do sinal em δ_{H} 6,73 com o sinal em δ_{C} 128,9 e do sinal em δ_{H} 3,73 com o sinal em δ_{C} 32,8. O mapa de contornos HMBC (Figura V.30, p.107) mostra correlação do sinal de hidrogênio em δ_{H} 6,73 com os sinais de carbono em δ_{C} 167,46, 166,64, 140,3 e 32,8. O sinal de hidrogênio em δ_{H} 3,73 correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_{C} 171,1, 167,4 e 140,3. O sinal de hidrogênio em δ_{H} 2,43 e o sinais de carbono em δ_{C} 173,7 e 28,8 foram atribuídos a impurezas presentes na amostra.

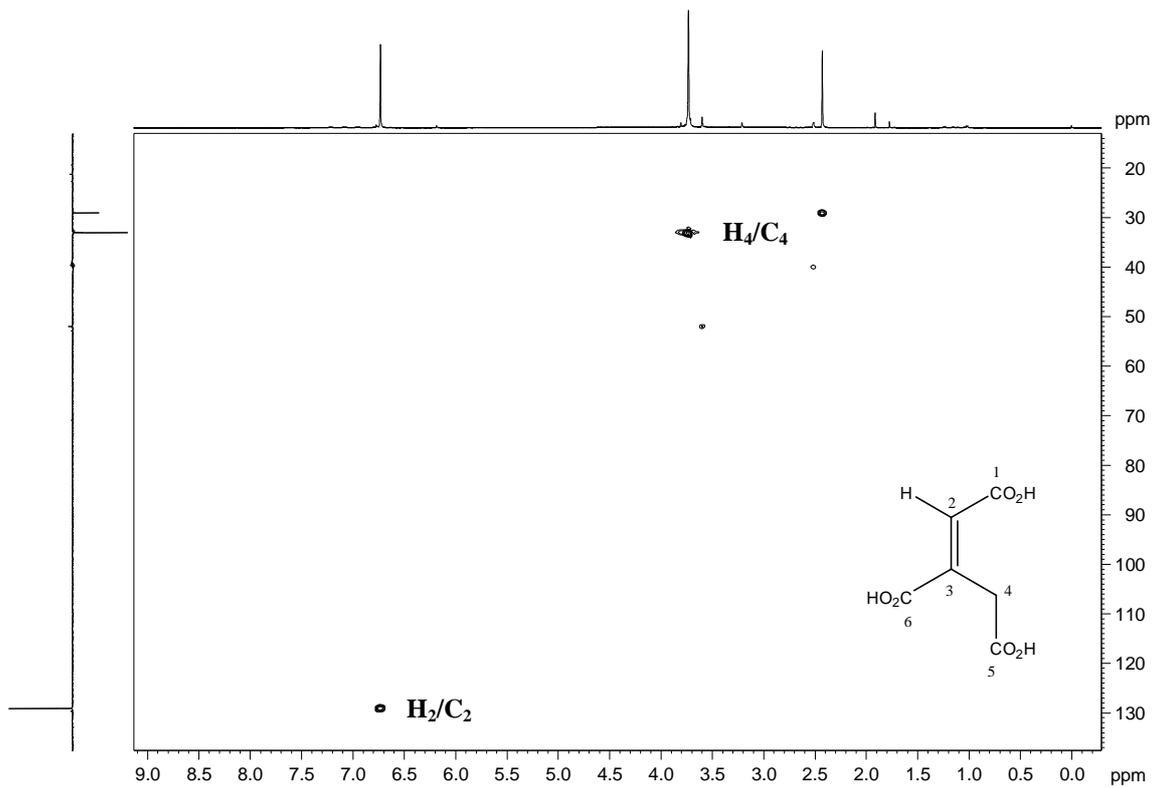


Figura V.29. Mapa de contornos HSQC de F01 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; $\text{DMSO-}d_6$).

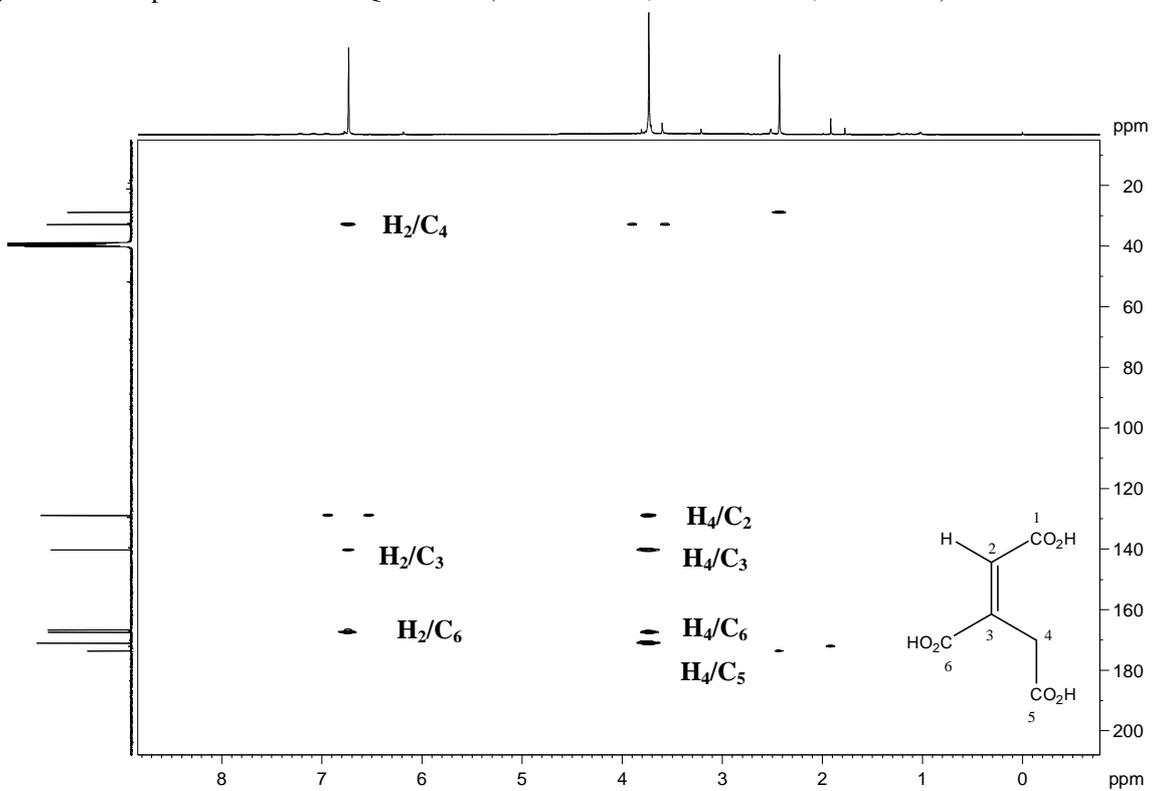
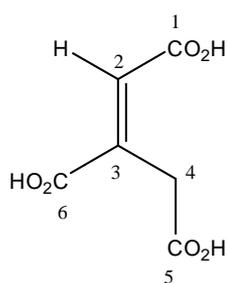


Figura V.30. Mapa de contornos HMBC de F01 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; $\text{DMSO-}d_6$).

A análise elementar de F01 indicou %C = 40,70%; %H = 3,52%; e %O = 55,78%, correspondendo à fórmula empírica C₆H₆O₆ (análise elementar calculada para C₆H₆O₆ %C = 41,35%; %H = 3,45%; e %O = 55,20%). Os dados experimentais indicam que F01 trata-se do ácido *trans*-aconítico. De fato, os dados de RMN de ¹H e de ¹³C de F01 estão de acordo com os dados correspondentes a esta substância descritos na literatura, conforme mostrado na Tabela V.13 (Cai *et al.*, 2001).



F01

Tabela V.13. Dados de RMN de ¹H e de ¹³C de F01 e os descritos na literatura para o ácido *trans*-aconítico (Cai *et al.*, 2001)

Átomo	Ácido <i>trans</i> -aconítico (D ₂ O)		F01 (DMSO- <i>d</i> ₆)	
	δ _C (ppm)	δ _H (ppm)	δ _C (ppm)	δ _H (ppm)
1	168,1		166,6	
2	130,2	6,9	128,9	6,7
3	139,0		140,3	
4	32,9	3,7	32,8	3,7
5	174,3		171,1	
6	168,9		167,4	

2.2. Elucidação Estrutural de F02

A fração F02 corresponde ao pico 9 (TR = 13,48 min) do cromatograma de CLAE do extrato fenólico das folhas de *E. macrophyllus*, apresentado na Figura III.1 (p. 49). Esta fração foi isolada por CLAE preparativa, apresentando-se como um sólido marrom com intervalo de fusão entre 169,1 – 172,8 °C.

A Figura V.31 apresenta o espectro de absorção na região do infravermelho de F02. A absorção larga em 3434 cm^{-1} é característica do estiramento O-H de ácido carboxílico e/ou fenol em ligação de hidrogênio. A absorção em 2941 cm^{-1} é característica de estiramento C-H de carbono alifático. A absorção em 1666 cm^{-1} é característica de estiramento C=O de ácido carboxílico conjugado a sistema π . As absorções em 1619, 1599 e 1515 cm^{-1} são características de vibrações de esqueleto aromático. As absorções intensas em 1184 e 1135 cm^{-1} podem ser atribuídas respectivamente aos estiramentos C-O assimétrico e simétrico de ácido carboxílico, fenol e/ou grupo alcoxila.

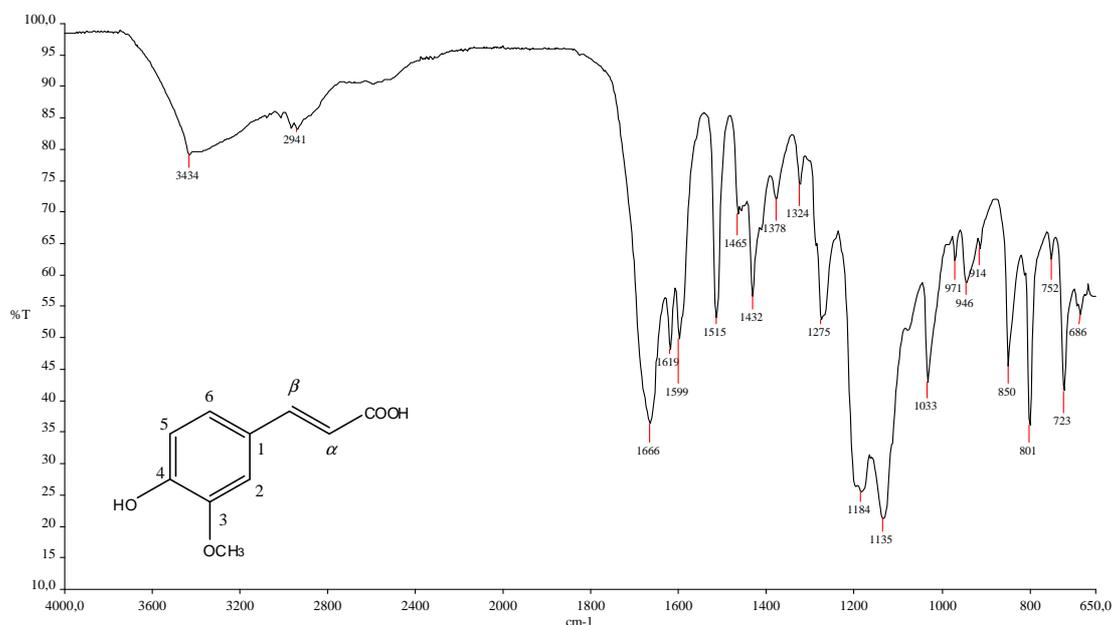


Figura V.31. Espectro de absorção na região do infravermelho de F02 (ATR; cm^{-1}).

A Figura V.32 apresenta o espectro de RMN de ^1H de F02. Os sinais em δ_{H} 12,10 e 9,56 podem ser atribuídos respectivamente a átomos de hidrogênio de ácido carboxílico e de fenol. Os sinais dupletos registrados em δ_{H} 7,48 e 6,35 apresentam a mesma constante de acoplamento ($J = 15,8$ Hz), podem ser atribuídos a átomos de hidrogênio *trans* em alquenos. Da mesma forma, os sinais dupletos em δ_{H} 7,08 e 6,79 apresentam a mesma constante de acoplamento ($J = 8,1$ Hz) e podem ser atribuídos a átomos de hidrogênio aromáticos e vicinais. Por sua vez, o sinal simpleto em δ_{H} 7,27 pode ser atribuído a hidrogênio aromático que não se encontra adjacente a carbono hidrogenado. Finalmente, o sinal simpleto em δ_{H} 3,81, correspondente a três átomos de hidrogênio, é característico de grupo metoxila.

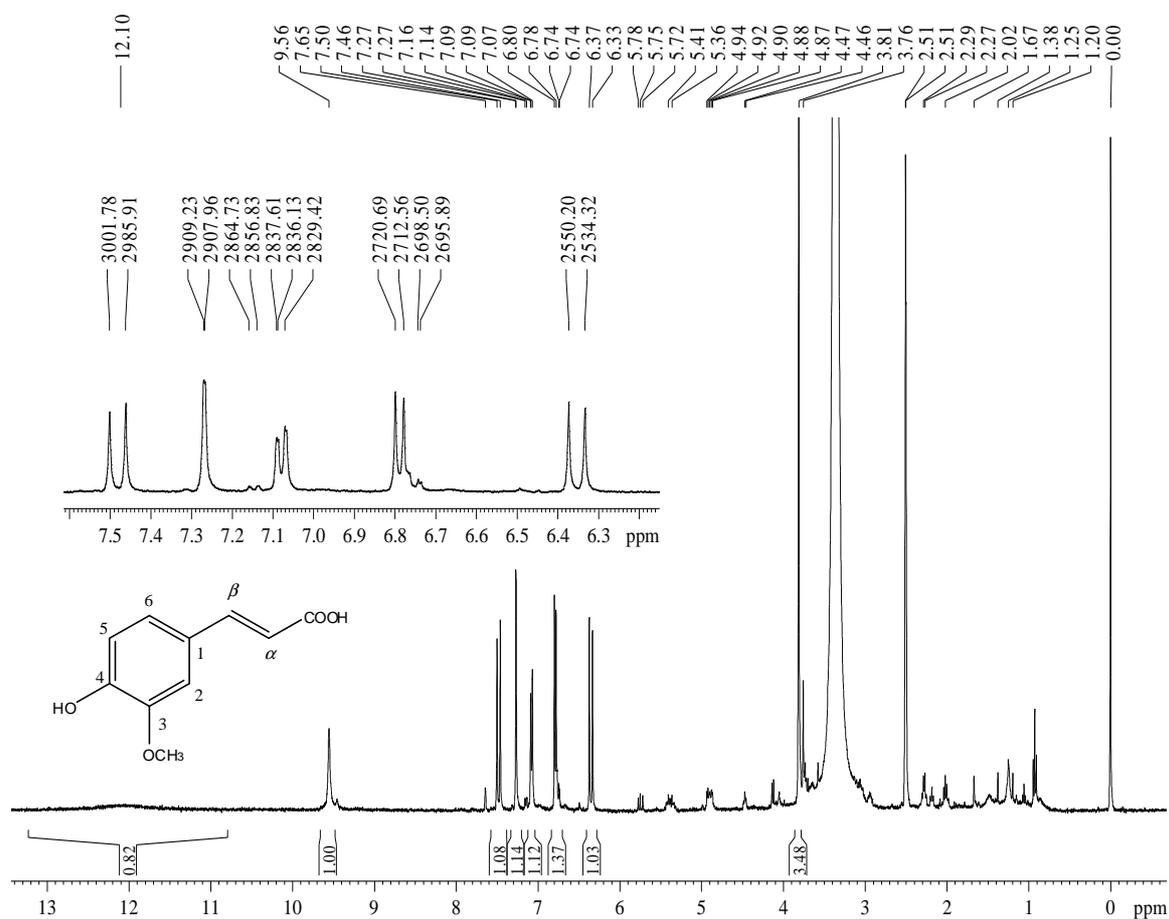


Figura V.32. Espectro de RMN de ^1H de F02 (400 MHz; DMSO-*d*₆).

A Figura V.33 (p. 111) apresenta o espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT 135° de F02. O sinal em δ_{C} 167,9 pode ser atribuído a carbono de ácido carboxílico. Os sinais em

δ_C 148,9, 147,8 e 125,7 correspondem a átomos de carbono sp^2 não hidrogenado. Os sinais em δ_C 144,4, 122,7, 115,6, 115,4 e 111,1 correspondem a átomos de carbono sp^2 mono-hidrogenado. O sinal em δ_C 55,6 pode ser atribuído a carbono de metoxila. Assim, pela análise dos dados de IV e RMN de 1H e ^{13}C , foi possível estabelecer que F02 possui um anel aromático trissubstituído, pois apresenta três sinais correspondentes a átomos de hidrogênio aromático. Além disto, F02 apresenta uma hidroxila fenólica, uma metoxila fenólica, uma dupla ligação C=C de alqueno *trans* dissustituído e um grupo ácido carboxílico.

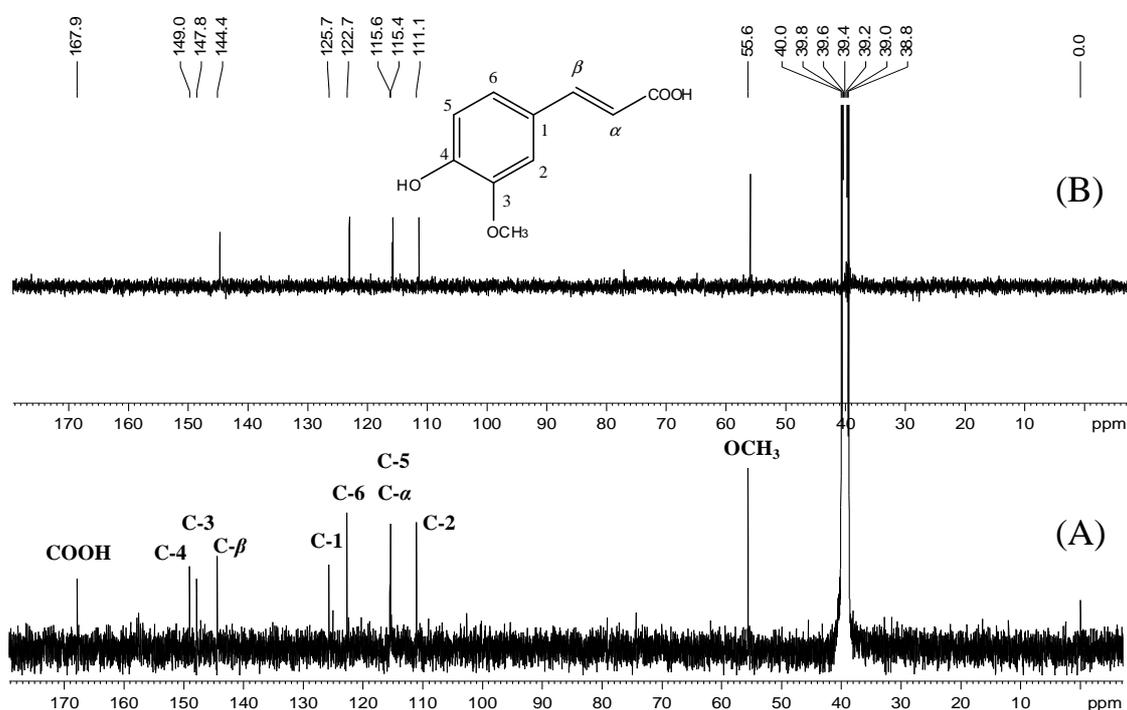


Figura V.33. Espectro de RMN de ^{13}C (A) e subspectro DEPT 135° (B) de F02 (100 MHz; DMSO-*d*₆).

A Figura V.34 (p. 112) apresenta o mapa de contornos HSQC de F02. O sinal de hidrogênio em δ_H 7,48 (H β) correlaciona-se com o sinal de carbono em δ_C 144,4 (C β). O sinal em δ_H 7,08 (H-6) correlaciona-se com o sinal em δ_C 122,7 (C-6). O sinal em δ_H 6,35 (H α) correlaciona-se com o sinal em δ_C 115,6 (C α). O sinal em δ_H 6,79 (H-5) correlaciona-se com o sinal em δ_C 115,4 (C-5). O sinal em δ_H 7,27 (C-2) correlaciona-se com o sinal em δ_C 111,1

(C-2). Finalmente, o sinal em δ_H 3,81 (OCH₃) correlaciona-se com o sinal em δ_C 55,6 (OCH₃).

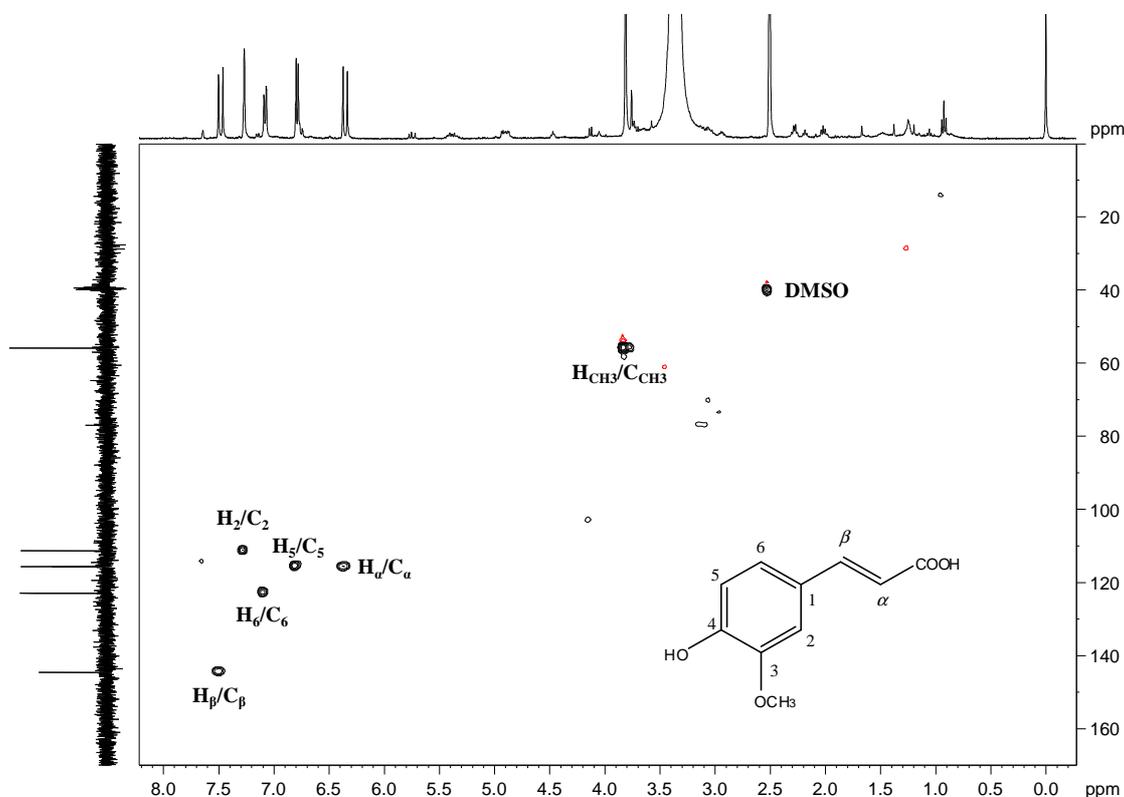


Figura V.34. Mapa de contornos HSQC de F02 (¹H: 400 MHz; ¹³C: 100 MHz; DMSO-*d*6).

A Figura V.35 (p. 113) apresenta o mapa de contornos HMBC de F02. O sinal de hidrogênio em δ_H 7,48 (H β) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 111,1 (C-2), 122,7 (C-6) e 167,9 (COOH). Estas correlações confirmam que o carbono carboxílico não se encontra diretamente ligado ao anel aromático, mas ligado ao grupo alqueno. O sinal de hidrogênio em δ_H 7,27 (H-2) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 122,7 (C-6), 144,4 (C β) e 149,0 (C-4). Estas correlações estabelecem a posição do grupo alqueno no anel aromático. O sinal de hidrogênio em δ_H 7,08 (H-6) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 111,1 (C-2), 144,4 (C β) e 149,0 (C-4). O sinal de hidrogênio em δ_H 6,79 (H-5) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 125,7 (C-1) e 147,8 (C-3). O sinal de hidrogênio em δ_H 6,35 (H α) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 125,7 (C-1) e

167,9 (COOH). O sinal de hidrogênio em δ_H 3,81 (OCH₃) correlaciona-se com o sinal de carbono em δ_C 147,8 (C-3), localizando a metoxila no anel aromático.

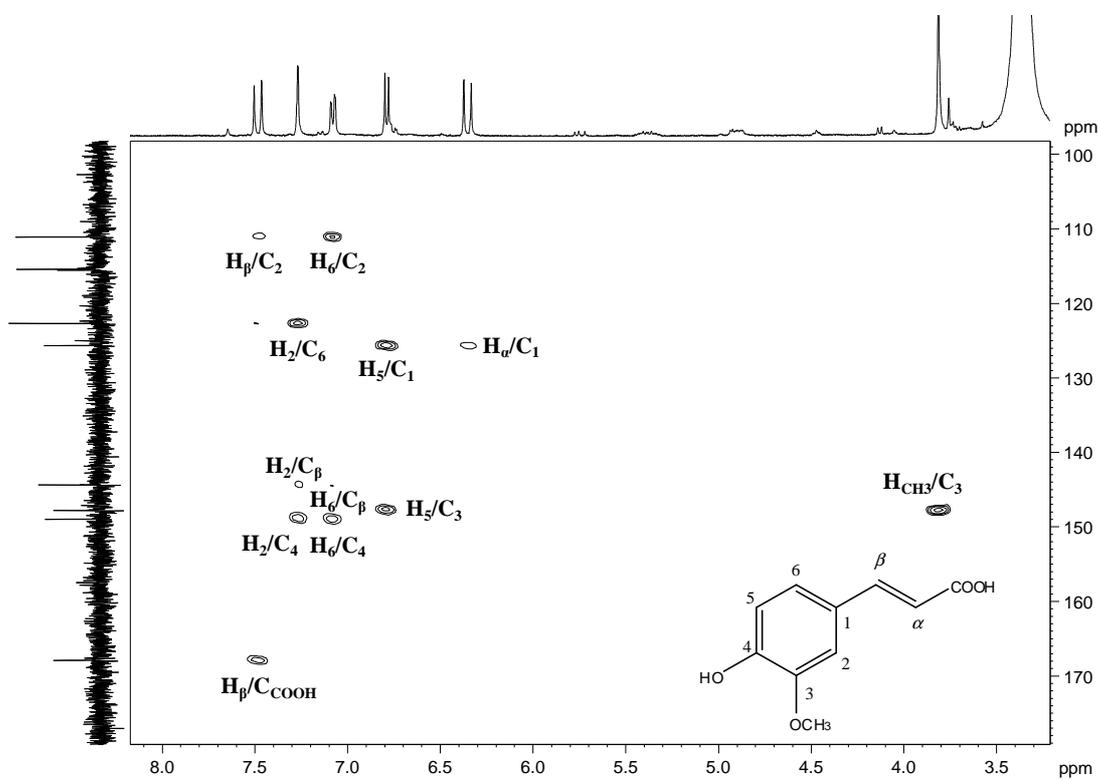


Figura V.35. Mapa de contornos HMBC de F02 (¹H: 400 MHz; ¹³C: 100 MHz; DMSO-*d*₆).

A Figura V.36 (p. 114) apresenta o mapa de contornos COSY de F02. Este mapa de contornos mostra correlação do sinal em δ_H 7,48 (H β) com o sinal em δ_H 6,35 (H α). A correlação do sinal em δ_H 7,08 (H-6) com o sinal em δ_H 6,79 (H-5) e estabelece que o anel aromático é 1,3,4-trissubstituído.

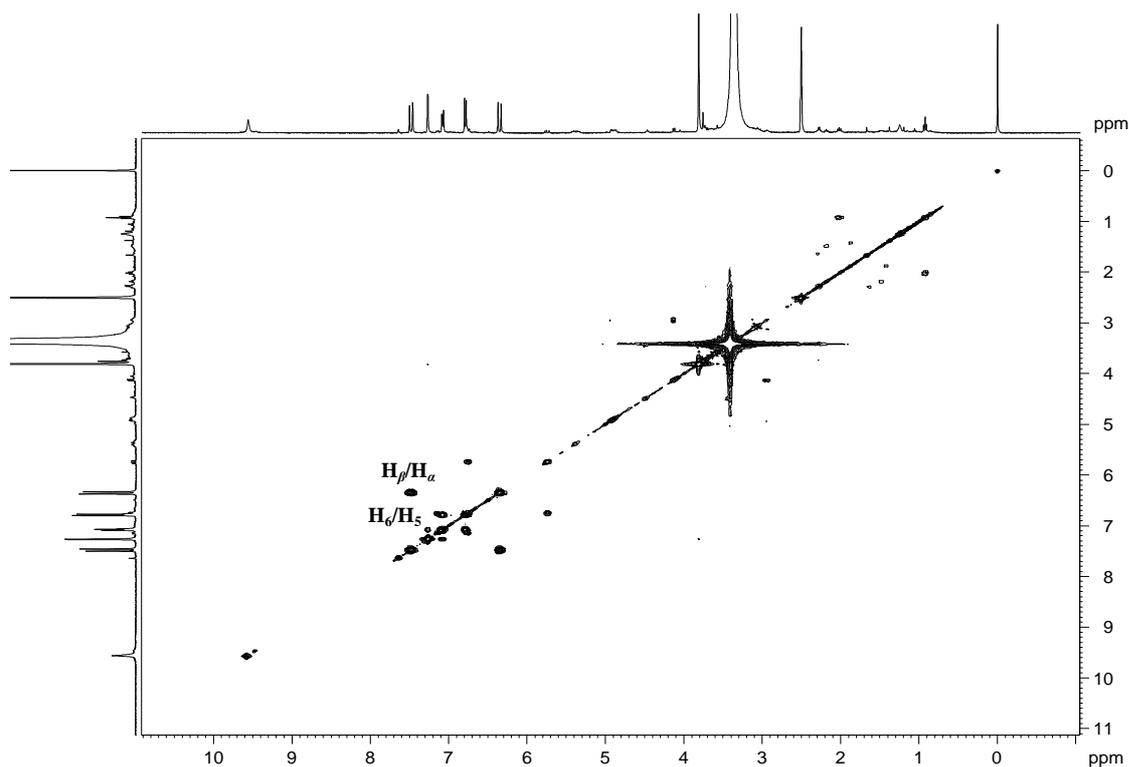


Figura V.36. Mapa de contornos COSY de F02 (400 MHz; DMSO-*d*6).

Os dados de IV e de RMN (1D e 2D) indicam que F02 trata-se do ácido *trans*-ferúlico. De fato, os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de F02 estão de acordo com os dados correspondentes atribuídos a esta substância descritos na literatura (Prachayasittiku *et al.*, 2009), conforme mostrado na Tabela V.14 (p. 115).

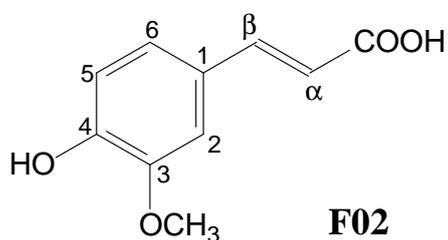


Tabela V.14. Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de FO2 e os descritos na literatura para o ácido *trans*-ferúlico (Prachayasittiku *et al.*, 2009)

Átomo	Ácido <i>trans</i> -ferúlico ¹¹¹ (CD ₃ OD)		FO2 (DMSO- <i>d</i> ₆)	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)
1	127,8	-	125,7	-
2	111,6	7,18	111,1	7,27
3	151,5	-	147,8	-
4	149,9	-	148,9	-
5	116,5	6,82	115,4	6,79
6	124,0	7,07	122,7	7,08
α	115,9	6,31	115,6	6,35
β	147,0	7,59	144,3	7,48
COOH	171,2		167,9	12,10
OCH ₃	56,5	3,89	55,6	3,84
OH fenólico				9,56

O ácido ferúlico é encontrado principalmente em frutas, sementes e raízes de diferentes espécies vegetais (Srinivasan *et al.*, 2007; Poquet *et al.*, 2008). Além de apresentar propriedades antioxidantes, este ácido apresenta um amplo espectro de atividades biológicas, tais como vaso-relaxante, anti-inflamatória, antiviral, analgésica, cardiovascular e hipotensiva, bem como efeito terapêutico contra câncer, diabetes e doenças neurodegenerativas (Hoeppen *et al.*, 1962; Ozaki, 1992; Nonoyama *et al.*, 1994; Kanski *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2002; Rhyu *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2005).

2.3. Elucidação Estrutural de F03

A fração F03 corresponde ao pico 10 (TR = 15,67 min) do cromatograma de CLAE do extrato fenólico das folhas de *E. macrophyllus*, apresentado na Figura III.1 (p. 49). Esta fração foi isolada por CLAE preparativa, apresentando-se como um sólido marrom com intervalo de fusão entre 175,6 – 178,1 °C.

A Figura V.37 apresenta o espectro na região do IV de F03. A absorção larga em 3372 cm⁻¹ é característica do estiramento de O-H em ligação de hidrogênio. As absorções em 2955 e 2924 cm⁻¹ são características de estiramento C-H de carbono alifático. As absorções em 1739, 1716 e 1684 cm⁻¹ são características de estiramento C=O de ésteres e ácidos carboxílicos conjugados. As absorções em 1604 e 1516 cm⁻¹ são características de vibrações de esqueleto aromático. As absorções intensas em 1246 e 1152 e 1119 cm⁻¹ podem ser atribuídas respectivamente aos estiramentos C-O assimétrico e simétrico de ácidos carboxílicos e fenol.

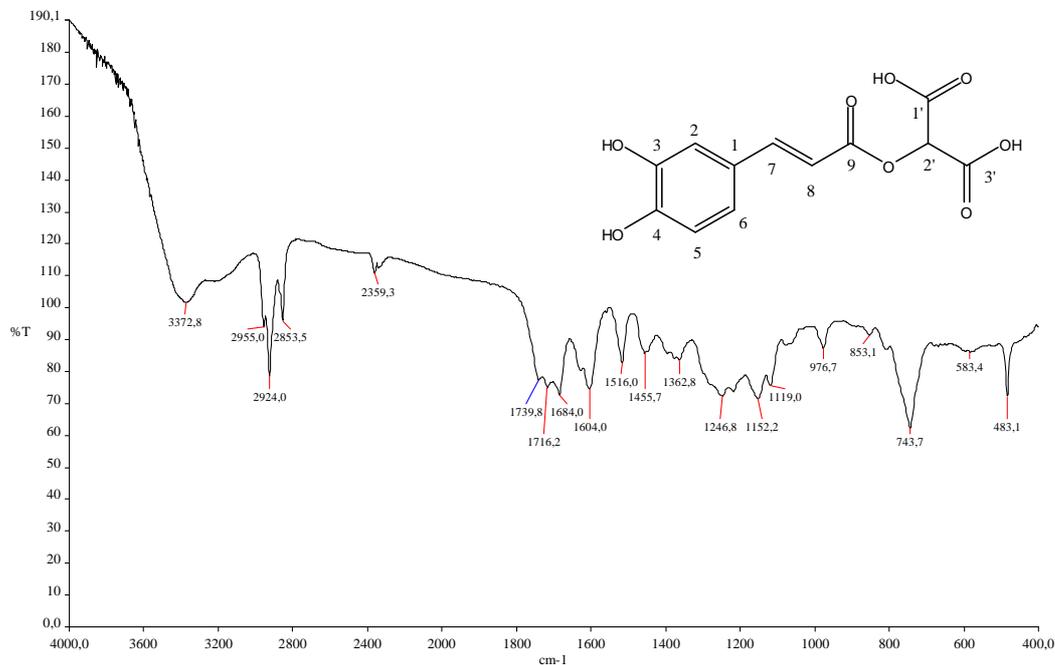


Figura V.37. Espectro de absorção na região do infravermelho de F03 (ATR; cm⁻¹).

A Figura V.38 (p. 117) apresenta o espectro de RMN de ¹H de F03. Os sinais simpletos em δ_H 9,69 e 9,18 podem ser atribuídos a hidroxilas fenólicas. Os sinais dupletos em δ_H 7,56 e

6,45 ($J = 15,6$ Hz) podem ser atribuídos a átomos de hidrogênio alquênico em posição *trans*. O sinal simpleto em δ_{H} 7,09 e os sinais dupletos δ_{H} 7,07 e 6,70 ($J = 8,4$ Hz) podem ser atribuídos a átomos de hidrogênio aromático. O sinal de hidrogênio simpleto em δ_{H} 5,84 pode ser atribuído a hidrogênio α -dicarbonílico.

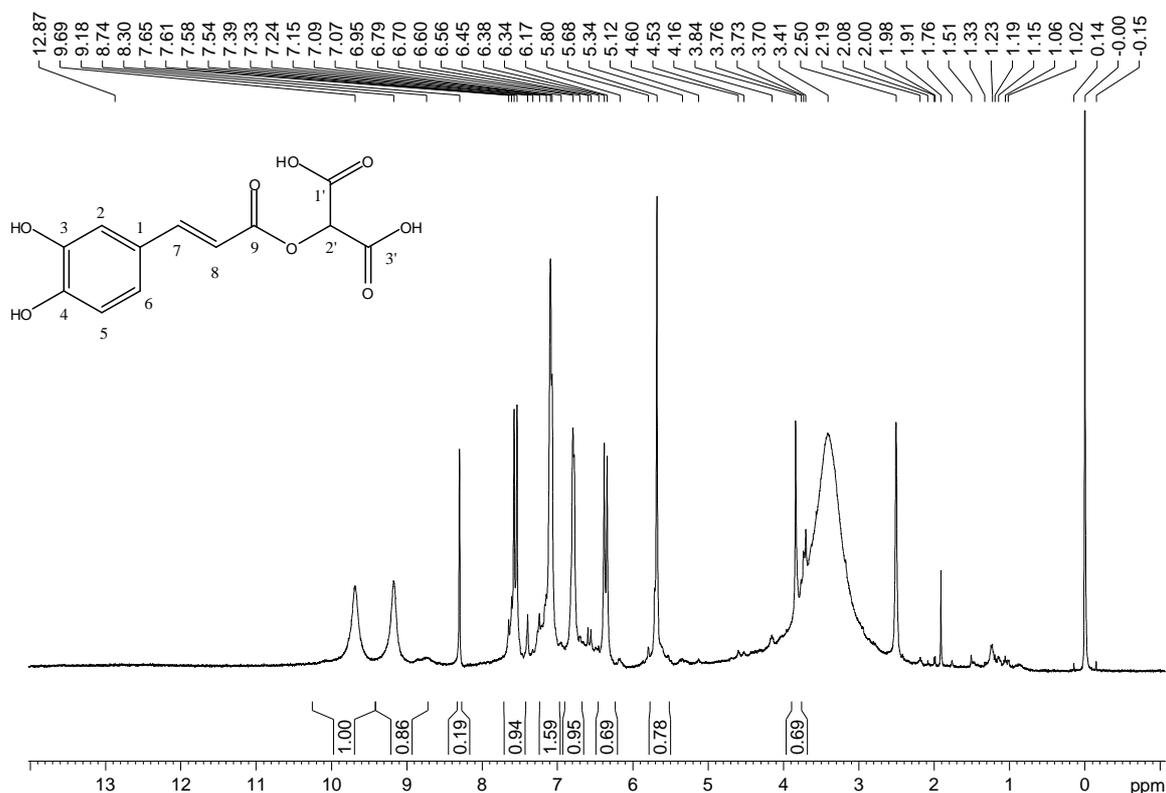


Figura V.38. Espectro de RMN de ^1H de F03 (400 MHz; DMSO- d_6).

A Figura V.39 (p. 118) apresenta o espectro de RMN de ^{13}C e o subspectro DEPT 135° de F03. O sinal em δ_{C} 167,4 pode ser atribuído a átomos de carbono de ácido carboxílico. O sinal em δ_{C} 165,4 pode ser atribuído ao carbono carbonílico de éster. Os sinais em δ_{C} 148,7 e 145,5 podem ser atribuídos a átomos de carbono aromático hidroxilado. Os sinais em δ_{C} 121,6, 115,7 e 115,1 podem ser atribuídos a átomos de carbono aromático mono-hidrogenado. Os sinais em δ_{C} 146,8 e 112,3 podem ser atribuídos a átomos de carbono alquênico mono-hidrogenado. O sinal em δ_{C} 125,1 pode ser atribuído a carbono aromático não-hidrogenado. O sinal em δ_{C} 70,6 pode ser atribuído a carbono metínico ligado a oxigênio e α -carbonílico.

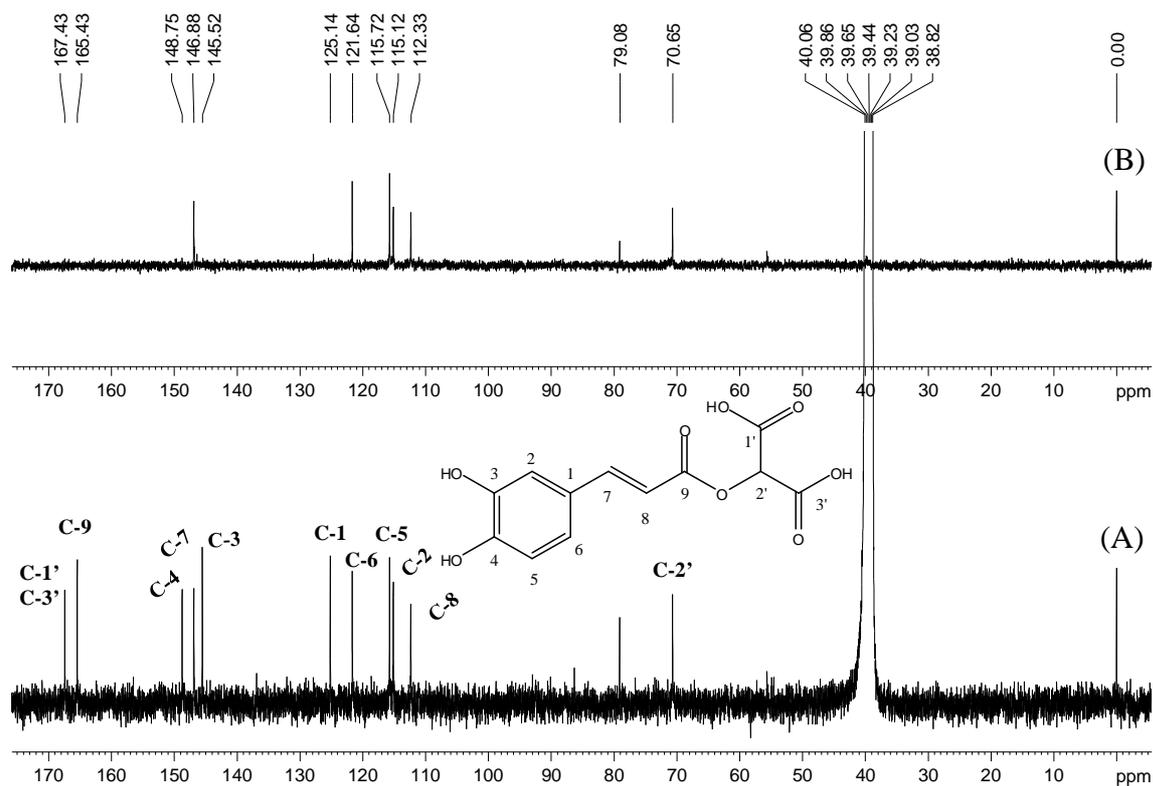


Figura V.39. Espectro de RMN de ^{13}C (A) e subspectro DEPT 135° (B) de F03 (100 MHz; DMSO-*d*₆).

A Figura V.40 (p. 119) apresenta o mapa de contornos HSQC para F03. O sinal de hidrogênio em δ_{H} 7,56 correlaciona-se com o sinal de carbono em δ_{C} 146,8. O sinal em δ_{H} 7,09 correlaciona-se com o sinal em δ_{C} 115,1. O sinal em δ_{H} 7,07 correlaciona-se com o sinal em δ_{C} 121,6. O sinal em δ_{H} 6,70 correlaciona com o sinal em δ_{C} 115,7. O sinal em δ_{H} 6,45 correlaciona-se com o sinal em δ_{C} 112,3. O sinal em δ_{H} 5,84 correlaciona-se com o sinal em δ_{C} 70,6.

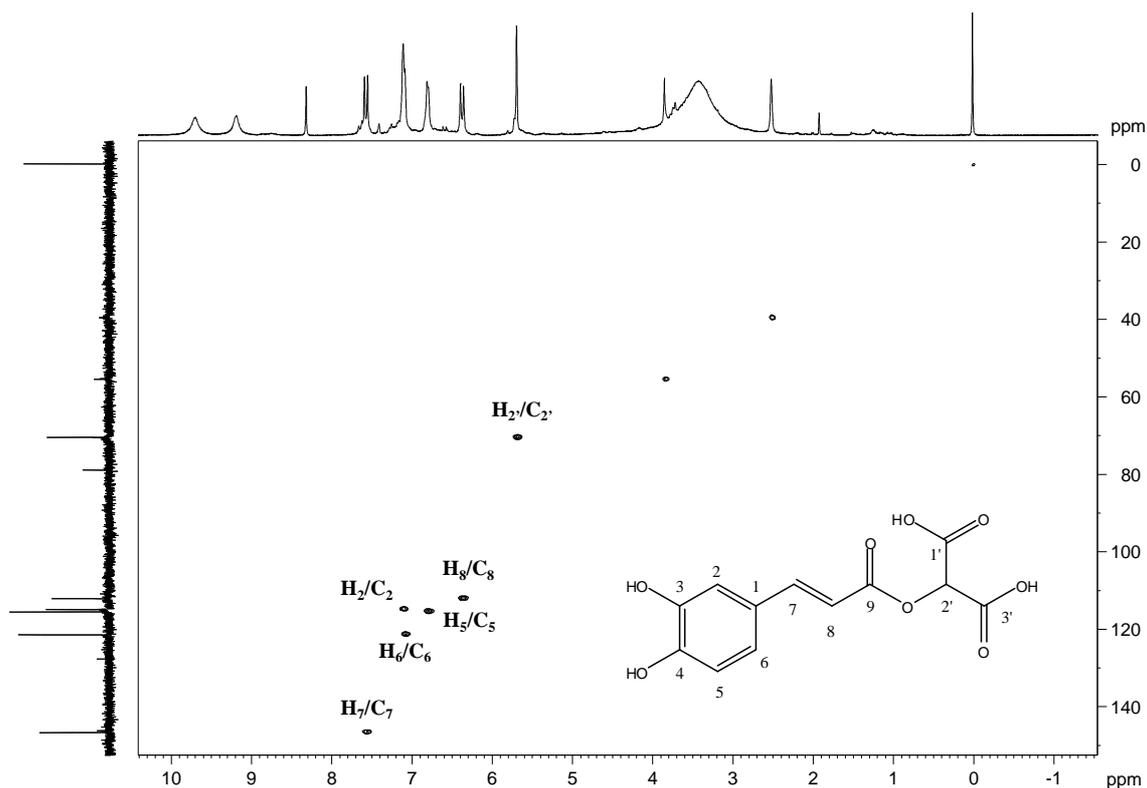


Figura V.40. Mapa de contornos HSQC de F03 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; $\text{DMSO-}d_6$).

A Figura V.41 (p. 120) apresenta o mapa de contornos HMBC de F03. O sinal de hidrogênio em δ_{H} 7,07 correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_{C} 148,7, 146,9 e 115,1. O sinal de hidrogênio em δ_{H} 6,70 correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_{C} 145,5 e 125,1. O sinal de hidrogênio em δ_{H} 5,84 correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_{C} 167,4 e 165,4.

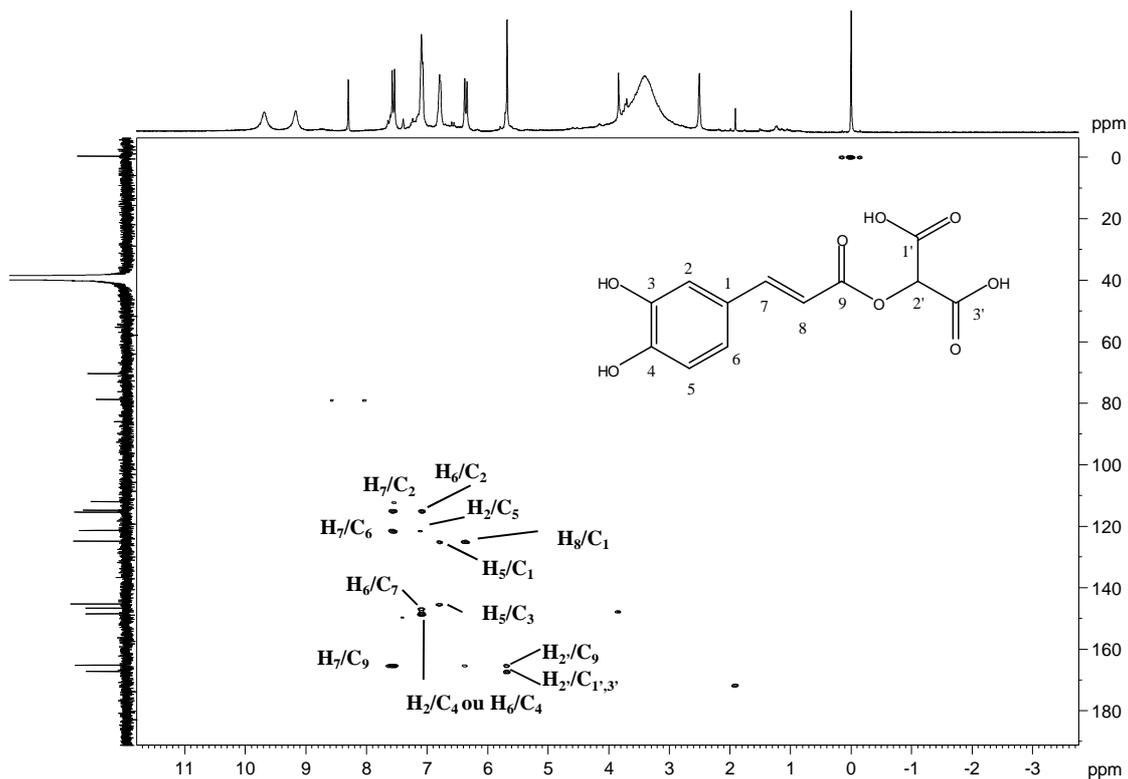


Figura V.41. Mapa de contornos HMBC de F03 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; $\text{DMSO-}d_6$).

A Figura V.42 apresenta o mapa de contornos COSY de F03. Este mapa de contornos apresenta correlação do sinal em δ_{H} 7,07 com o sinal em δ_{H} 6,70 e do sinal em δ_{H} 7,56 com o sinal em δ_{H} 6,45.

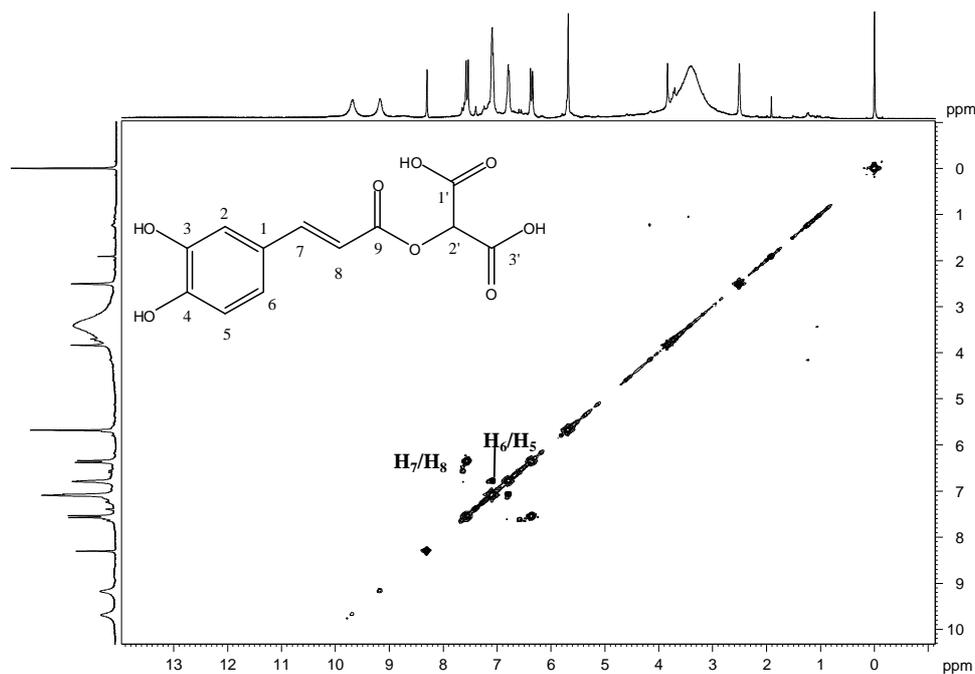


Figura V.42. Mapa de contornos COSY de F03 (400 MHz; $\text{DMSO-}d_6$).

A análise elementar de F03 indicou %C = 42,86%; %H = 4,76%; e %O = 52,38%, correspondendo à fórmula empírica de C₁₂H₁₀O₈.3H₂O (análise elementar calculada de C₁₂H₁₀O₈.3H₂O indica %C = 42,86%; %H = 4,76%; e %O = 52,32%). Os dados de IV e de RMN (1D e 2D) indicaram que F03 trata-se do ácido cafeoiltrartrônico. De fato, os dados de RMN de ¹H e de ¹³C de F03 estão de acordo com os dados correspondentes atribuídos a esta substância descritos na literatura (Saleem *et al.*, 2004), conforme mostrado na Tabela IV.15.

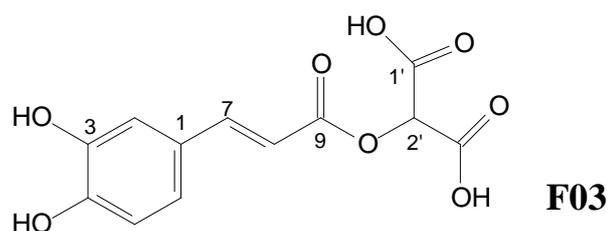


Tabela V.15. Dados de RMN de ¹H e de ¹³C de F03 e os descritos na literatura para o ácido cafeoiltrartrônico (Saleem *et al.*, 2004)

Átomo	Ácido	FO3 (DMSO- <i>d</i> ₆)	
	cafeoiltrartrônico (CD ₃ OD)	δ _C (ppm)	δ _H (ppm)
1	125,6	125,1	
2	112,3	115,1	7,09
3	146,6	145,5	
4	151,0	148,7	
5	113,6	115,7	6,70
6	122,5	121,6	7,07
7	147,5	146,9	7,56
8	115,7	112,3	6,45
9	167,5	165,4	
1'	169,2	167,4	
2'	74,8	70,6	5,84
3'	169,0	167,4	

2.4. Elucidação Estrutural de F05

A fração F05 corresponde ao pico 12 (TR = 22,07 min) do cromatograma de CLAE do extrato fenólico das folhas de *E. macrophyllus*, apresentado na Figura III.1 (p. 49). Esta fração apresenta-se como um sólido amarelo e faixa de fusão entre 197,0 – 202,2 °C.

A Figura V.43 apresenta o espectro na região do IV de F05. A absorção larga em 3240 cm^{-1} é característica do estiramento de O-H em ligação de hidrogênio muito intensa. As absorções entre 1645 e 1574 cm^{-1} são características respectivamente dos estiramentos de C=O conjugado e de C=C. Vibrações do esqueleto aromático podem ser observadas pelas absorções em 1488 e 1440 cm^{-1} . As várias absorções entre 1247 e 1019 cm^{-1} podem ser atribuídas a diferentes estiramentos de C-O, assimétricos e simétricos, indicando que a estrutura de F05 apresenta muitas ligações C-O.

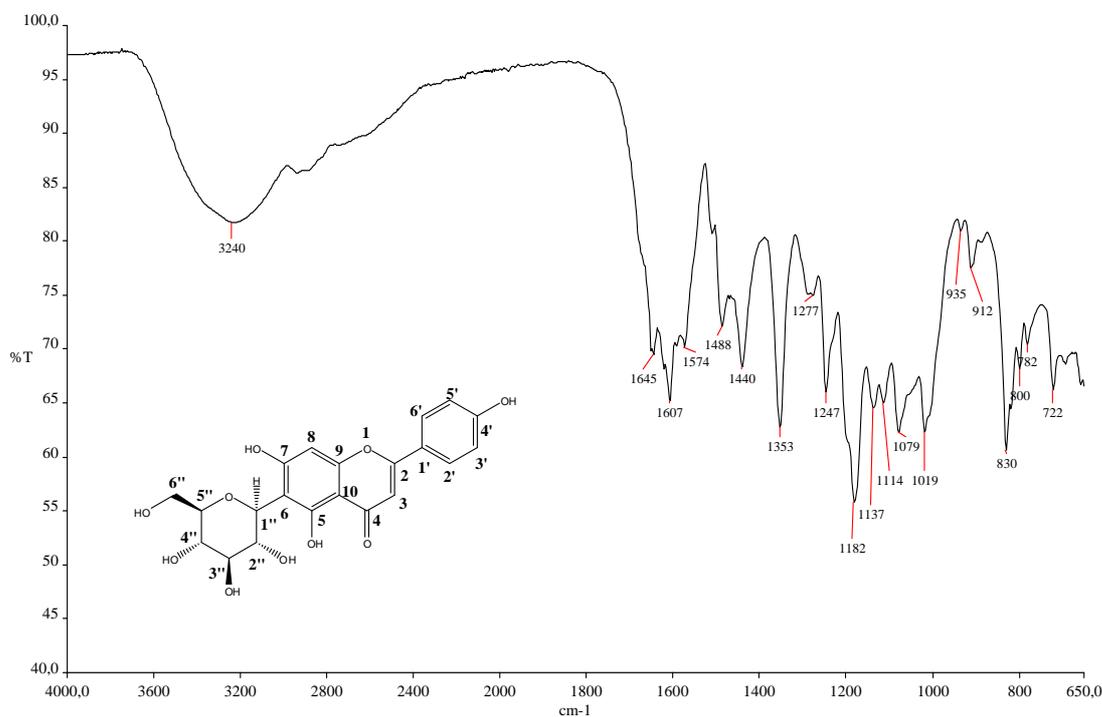


Figura V.43. Espectro de absorção na região do infravermelho de F05 (ATR; cm^{-1}).

A Figura V.44 (p. 123) mostra o espectro de RMN de ^1H de F05. O sinal em δ_{H} 13,55 e os sinais largos em δ_{H} 10,64 e 10,41 são característicos de átomos de hidrogênio de hidroxila

de fenóis em ligação de hidrogênio. Os sinais dupletos registrados em δ_H 7,93 e 6,93 (cada sinal correspondendo a dois átomos de hidrogênio) apresentam a mesma constante de acoplamento ($J = 8,8$ Hz), sendo atribuídos a átomos de hidrogênio aromático e vicinal.

Os sinais simples em δ_H 6,78 e 6,53 (cada sinal correspondendo a um hidrogênio) podem ser atribuídos a átomos de hidrogênio aromático não adjacente a átomos de carbono hidrogenado. Os sinais em δ_H 4,88 (m; OH-4''), 4,87 (m; OH-1''), 4,61 (m; OH-2'' e H-1''), 4,49 (s; OH-6'') podem ser atribuídos a átomos de hidrogênio de grupos hidroxila. Os sinais em δ_H 4,05 (s; H-2''), 3,70 (m; H-6''a), 3,38 (m; H-6''b) e 3,17 (m; H-3'', H-4'', H-5'' e OH-5'') são característicos de carboidrato.

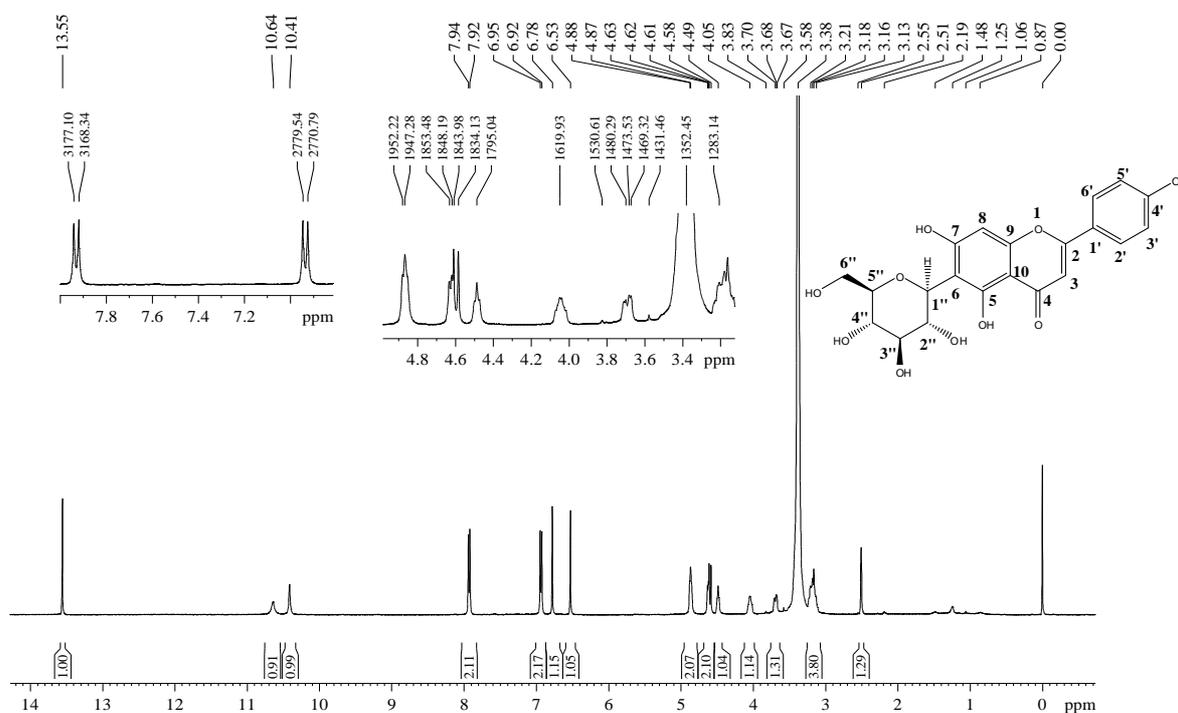


Figura V.44. Espectro de RMN de 1H de F05 (400 MHz; DMSO- d_6).

A Figura V.45 (p. 124) apresenta o espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT 135° de F05. O sinal em δ_C 181,9 pode ser atribuído ao carbono ligado à carbonila de cetona conjugada a sistema π . Os sinais de carbono não-hidrogenado em δ_C 163,5, 163,2, 161,1, 160,6 e 156,1 podem ser atribuídos a átomos de carbono não hidrogenado aromático ligados a

oxigênio. Os sinais em δ_C 128,4 e 115,9, mais intensos, correspondendo a átomos de carbono mono-hidrogenado, são característicos de anel aromático 1,4-dissubstituído. Os sinais em δ_C 121,0, 102,7 e 93,5, menos intensos, podem ser atribuídos a átomos de carbono mono-hidrogenado de outros anéis aromáticos. Os sinais em δ_C 108,8 e 103,3 correspondem a átomos de carbono não-hidrogenado de anéis aromáticos. Os demais sinais são característicos de átomos de carbono carbinólico, registrados em δ_C 81,5, 78,9, 73,0, 70,5, 70,1 e 61,4.

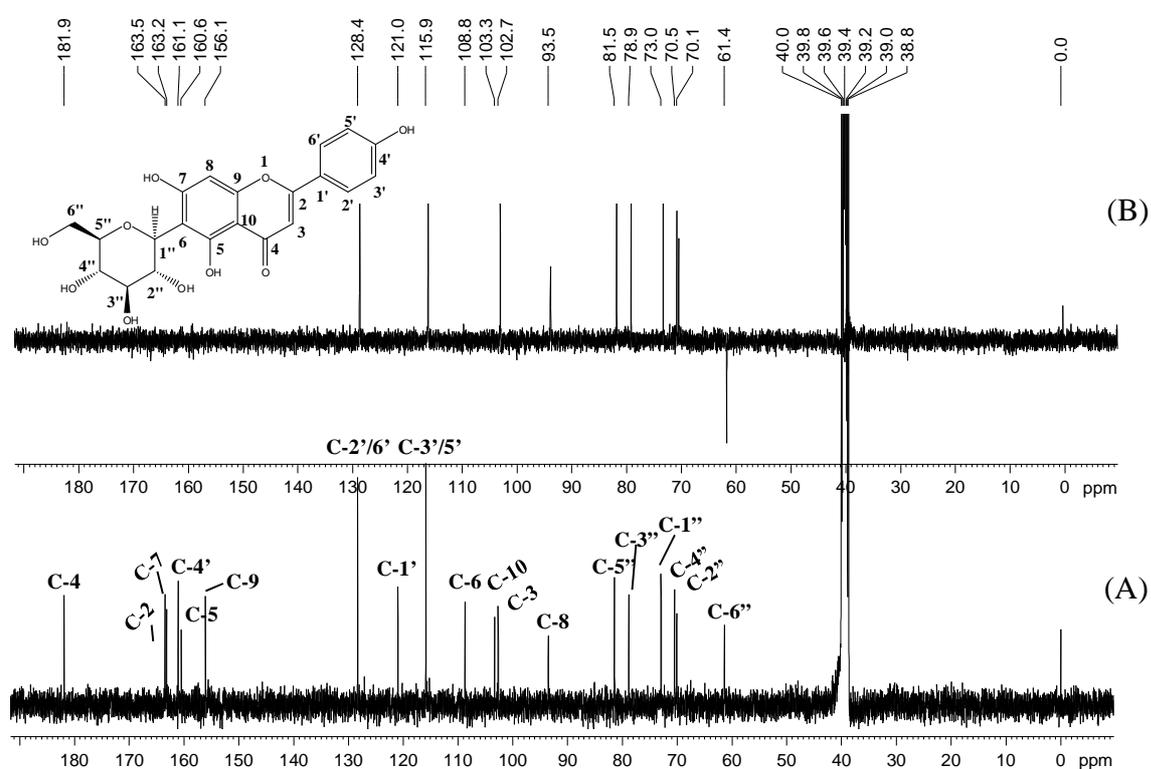


Figura V.45. Espectro de RMN de ^{13}C (A) e subspectro DEPT 135° (B) de F05 (100 MHz; DMSO-*d*6).

A Figura V.46 (p. 125) apresenta o mapa de contornos HSQC de F05. O sinal de hidrogênio em δ_H 7,93 (H-2'/6') correlaciona-se com o sinal de carbono em δ_C 128,4 (C-2'/6'). O sinal em δ_H 6,93 (H-3'/5') correlaciona-se com o sinal δ_C 115,9 (C-3'/5'). O sinal em δ_H 6,78 (H-3) correlaciona-se com o sinal em δ_C 102,7 (C-3). O sinal em δ_H 6,53 (H-8) correlaciona-se com o sinal em δ_C 93,5 (C-8). O sinal em δ_H 4,61 (H-1'') correlaciona-se com

o sinal em δ_C 73,0 (C-1''). O sinal em δ_H 4,05 (H-2'') correlaciona-se com o sinal em δ_C 70,1 (C-2''). O sinal em δ_H 3,17 (H-3'', H-4'' e H-5'') correlaciona-se com os sinais em δ_C 78,9 (C-3''), 70,5 (C-4'') e 81,5 (C-5''). Finalmente, os sinais em δ_H 3,70 (H-6''a) e 3,38 (H-6''b) correlacionam-se com o sinal em δ_C 61,4 (C-6'').

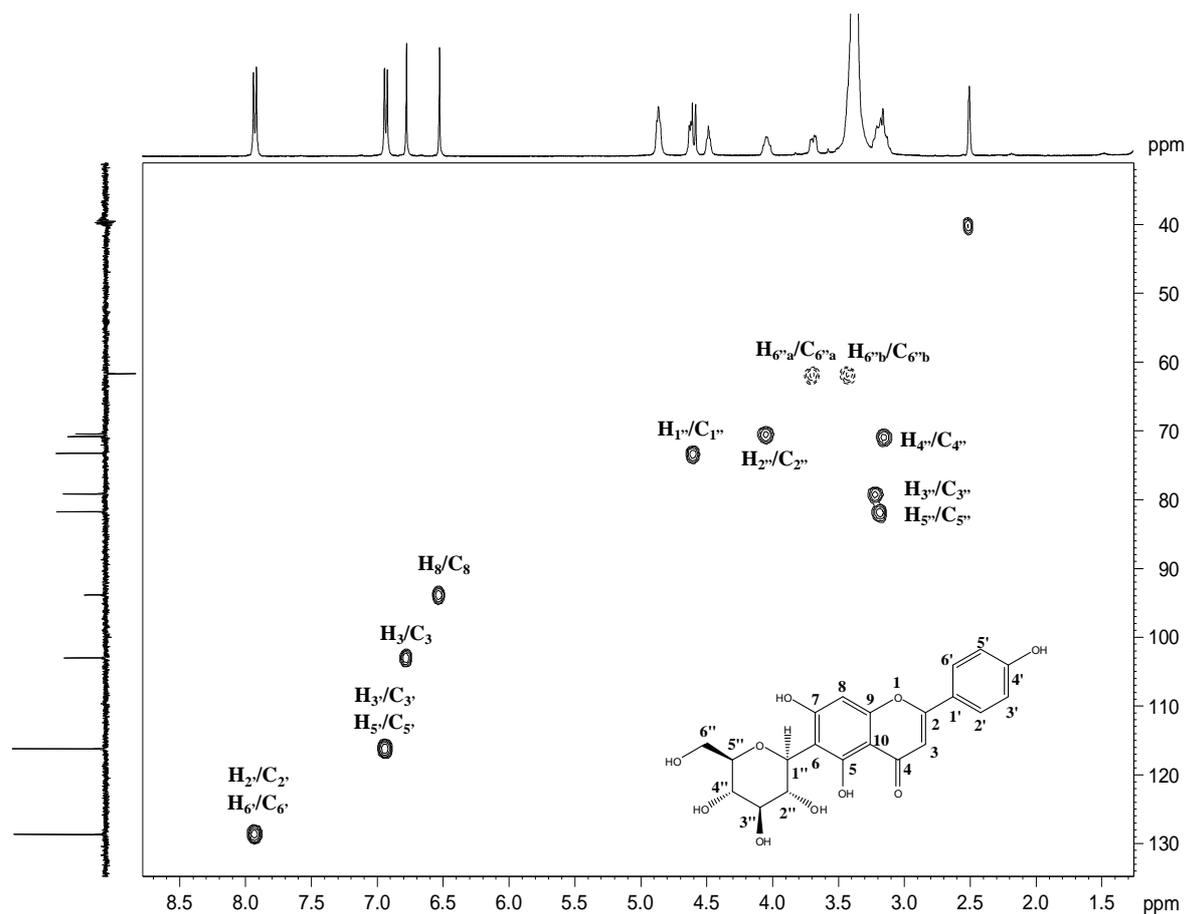


Figura V.46. Mapa de contornos HSQC de F05 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; DMSO-*d*₆).

A Figura V.47 (p. 126) apresenta o mapa de contornos HMBC de F05. O sinal de hidrogênio em δ_H 13,55 (OH-5) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 103,3 (C-10), 108,8 (C-6) e 160,6 (C-5). Estas correlações indicam que o sinal em δ_H 13,55 corresponde a uma hidroxila de fenol com ligação de hidrogênio com o oxigênio carbonílico, não sendo, portanto, atribuído a um grupo ácido carboxílico. O sinal de hidrogênio em δ_H 10,41 (OH-4') correlaciona-se com o sinal de carbono em δ_C 115,9 (C-3'/5'), indicando a presença de uma

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

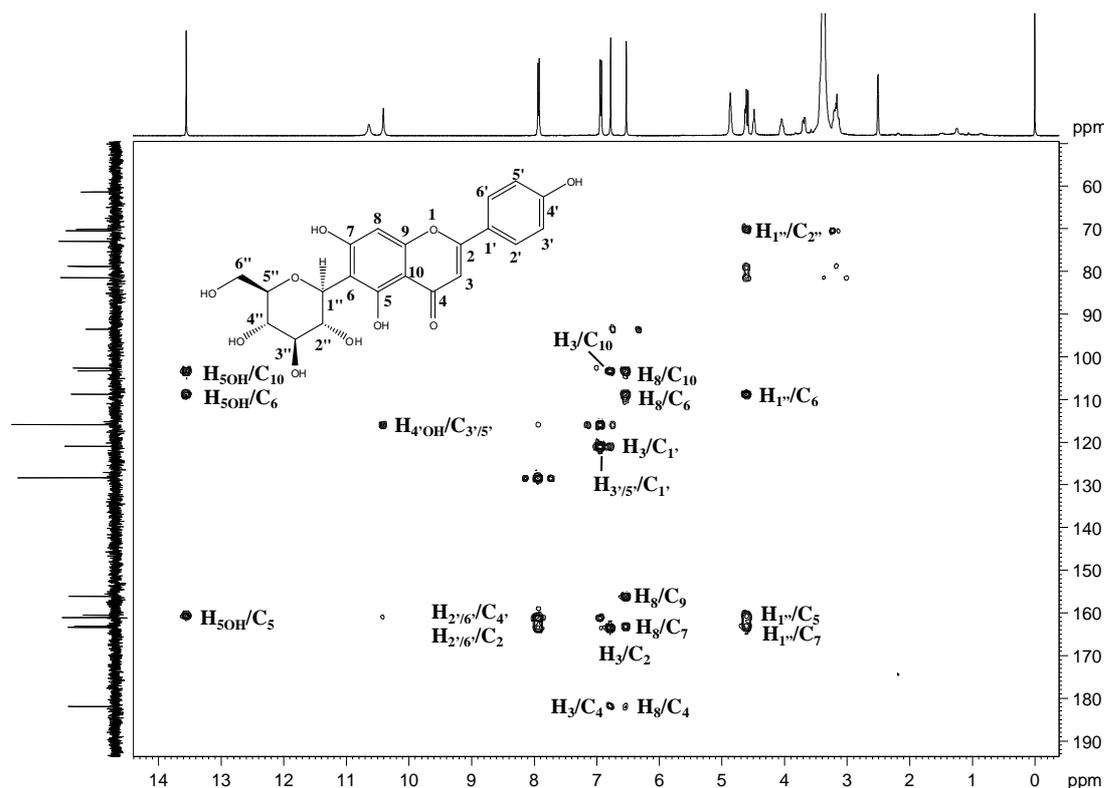


Figura V.47. Mapa de contornos HMBC de F05 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; DMSO-*d*₆).

A Figura V.48 mostra o mapa de contornos COSY de F05. O sinal em δ_H 7,93 (H-2'/6') correlaciona-se com o sinal em δ_H 6,93 (H-3'/5'). O sinal em δ_H 4,88 (OH-3''/4'') correlaciona-se com o sinal em δ_H 3,17 (H-3''/4''). O sinal em δ_H 4,61 (H-1'') correlaciona-se com o sinal em δ_H 4,05 (H-2''). O sinal em δ_H 4,49 (OH-6'') correlaciona-se com os sinais em δ_H 3,38 (H-6''), 3,70 (H-6''). O sinal em δ_H 4,05 (H-2'') correlaciona-se com os sinais em δ_H 3,17 (H-3''). Estas correlações dos sinais na região entre δ_H 4,61 e 3,17 indicam que os átomos de carbono carbinólico encontram-se conectados sucessivamente, característicos de carboidratos.

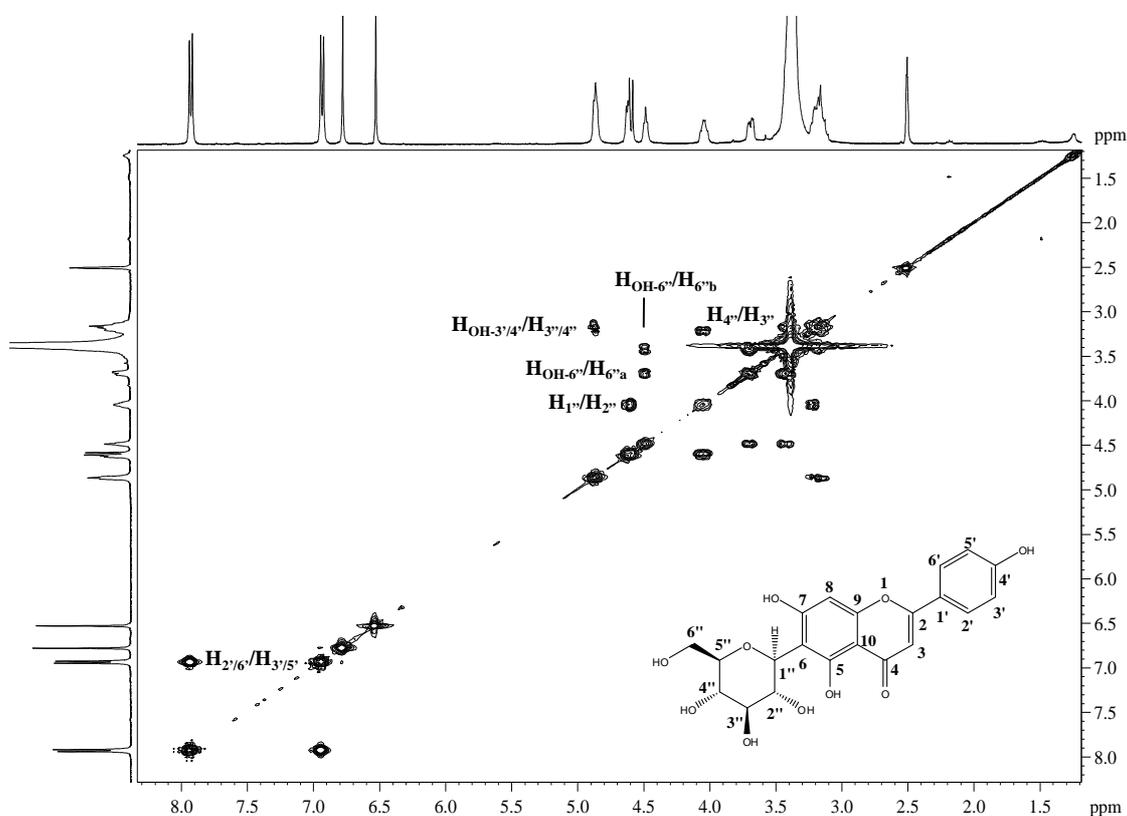
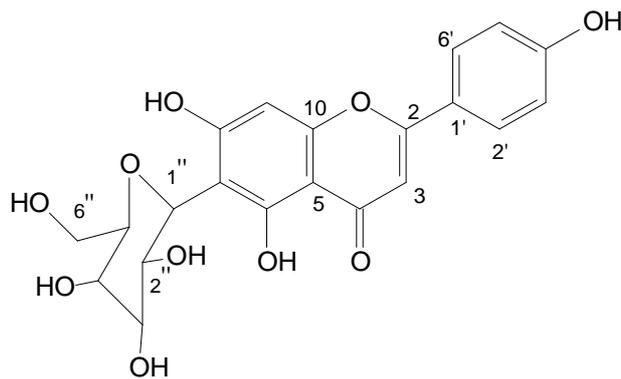


Figura V.48. Mapa de contornos COSY de F05 (400 MHz; DMSO-*d*₆).

Os dados de IV e de RMN (1D e 2D) indicam que F05 trata-se da isovitexina. De fato, os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de F05 estão de acordo com os dados correspondentes atribuídos a esta substância descritos na literatura (Lin *et al.*, 2000), conforme mostrado na Tabela V.16 (p. 128).



F05

Tabela V.16. Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de F05 e os descritos na literatura para a isovitexina (Lin *et al.*, 2000)

Átomo	Isovitexina (D_2O)	F05 ($\text{DMSO-}d_6$)	
	δ_{C} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)
1	-	-	-
2	163,5	163,5	-
3	102,8	102,7	6,78
4	181,9	181,9	-
5	161,2	160,6	-
6	108,8	108,8	-
7	163,2	163,2	-
8	93,7	93,5	6,53
9	156,2	156,1	-
10	103,4	103,3	-
1'	121,1	121,0	-
2'	128,4	128,4	7,93
3'	116,0	115,9	6,94
4'	160,6	161,1	-
5'	116,0	115,9	6,94
6'	128,4	128,4	7,93
1''	73,1	73,0	4,61
2''	70,6	70,1	4,05
3''	78,8	78,9	3,17
4''	70,5	70,5	3,17
5''	81,7	81,5	3,17
6''	61,3	61,4	3,70 e 3,38

2.5. Elucidação Estrutural de F04

A fração F04 corresponde ao pico 11 (TR = 19,10 min) do cromatograma de CLAE do extrato fenólico das folhas de *E. macrophyllus*, apresentado na Figura III.1 (p. 49).

A Figura V.49 apresenta o espectro infravermelho de F04. A absorção larga em 3262 cm^{-1} é característica do estiramento de O-H em ligação de hidrogênio muito intensa. As absorções entre 1651 e 1606 cm^{-1} são características respectivamente de estiramento C=O e de C=C conjugada. As vibrações do esqueleto aromático podem ser atribuídas às absorções em 1515, 1490 e 1443 cm^{-1} . As várias absorções entre 1185 e 1133 cm^{-1} podem ser atribuídas a diferentes estiramentos de C-O, assimétricos e simétricos. Os dados de IV indicam que F04 trata-se de um flavonoide.

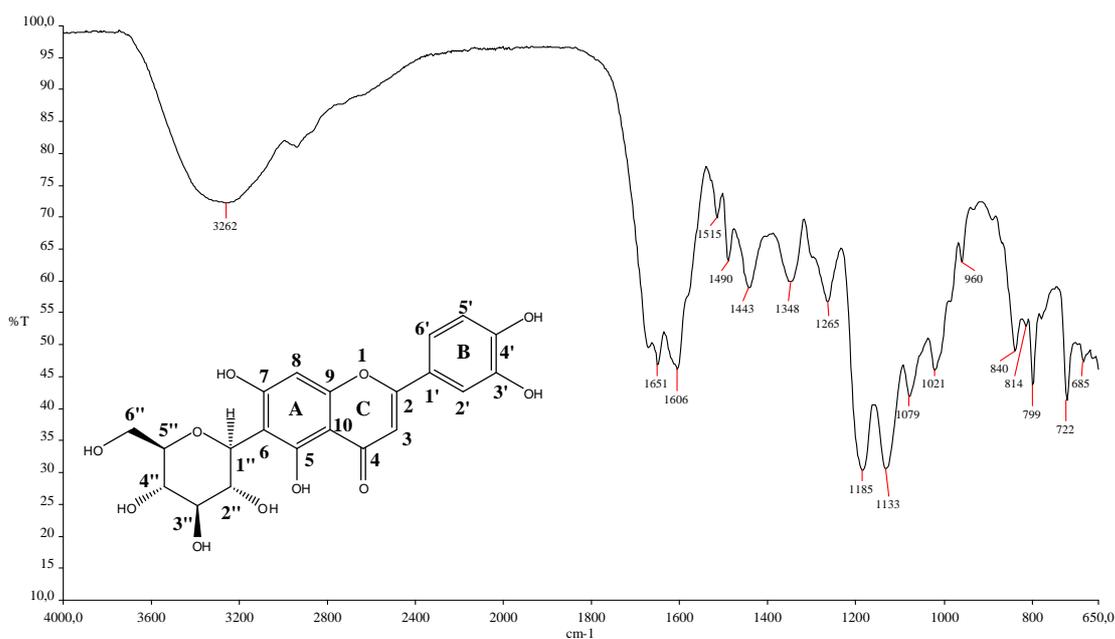


Figura V.49. Espectro de absorção na região do infravermelho de F04 (ATR; cm^{-1}).

Os dados 1D e 2D de RMN são bastantes similares aos de F05, exceto aqueles relatados para o anel B. O espectro de RMN de ^1H mostra sinais largos de hidrogênio em δ_{H} 9,96 e 9,48 que podem ser atribuídos a átomos de hidrogênio de grupo fenólico ligado a C-4' e C-3', respectivamente. O espectro de RMN de ^{13}C (Figura V.51, p. 130) apresenta-se semelhante ao observado da substância F05 (p. 124).

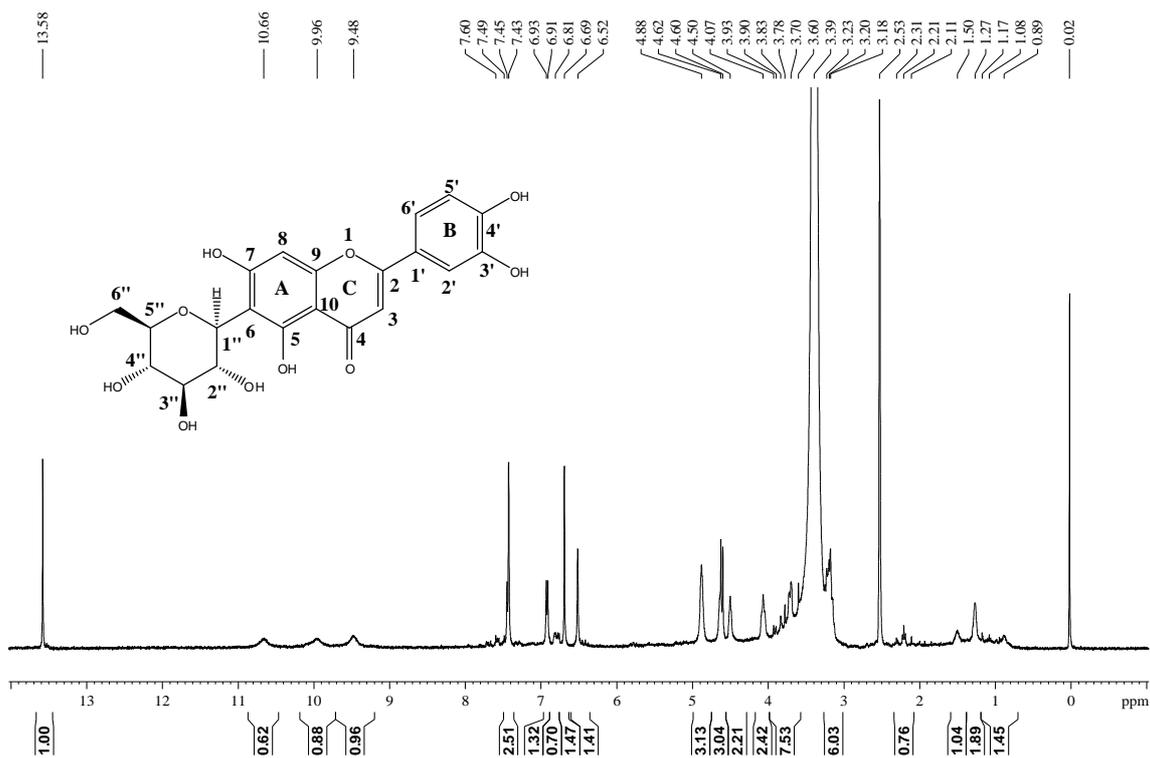


Figura V.50. Espectro de RMN de ^1H de F04 (400 MHz; DMSO- d_6).

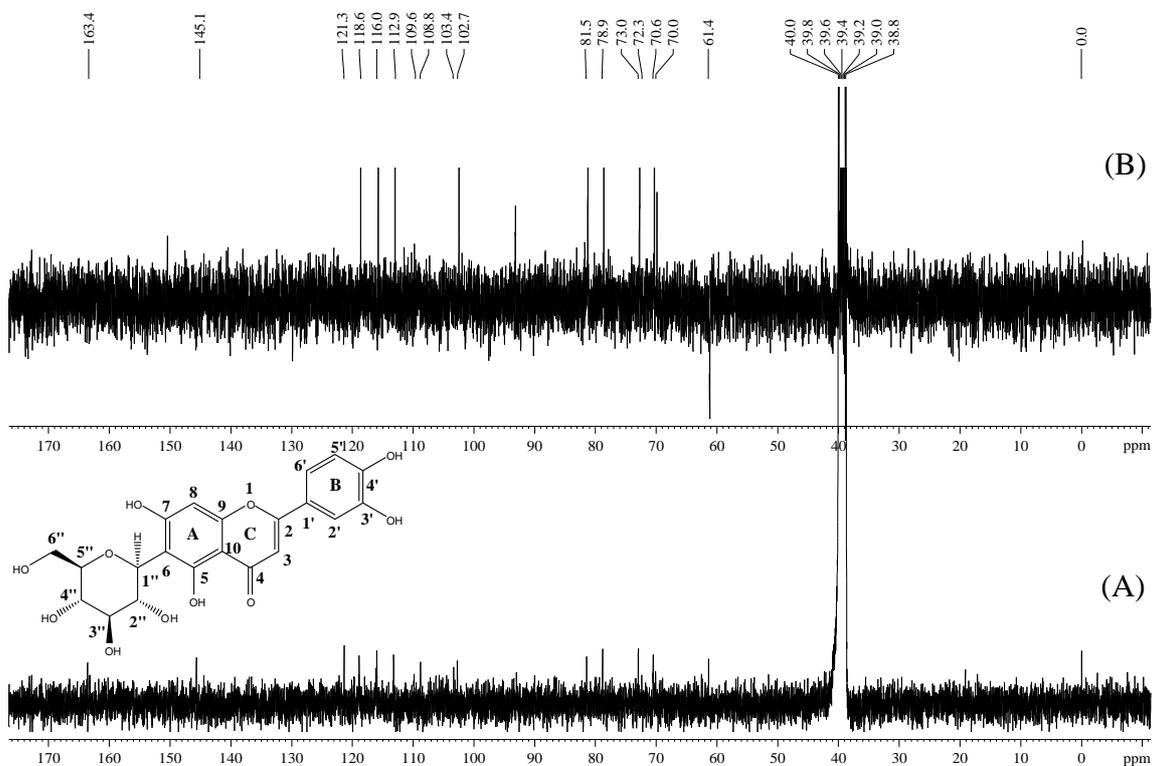
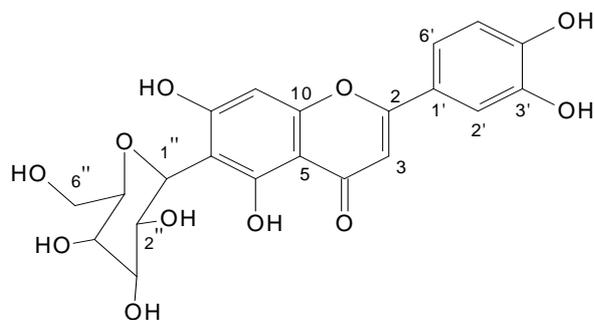


Figura V.51. Espectro de RMN de ^{13}C (A) e subespectro DEPT 135° (B) de F04 (100 MHz; DMSO- d_6).

Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de F04 estão de acordo com os dados descritos na literatura atribuídos a isoorientina (Lin *et al.*, 2000), conforme mostrado na Tabela V.17 (p. 132).



F04

Tabela V.17. Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de F04 e os descritos na literatura para a isoorientina (Lin *et al.*, 2000)

Átomo	Isoorientina (D_2O)	Experimental ($\text{DMSO}-d_6$)	
	δ_{C} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)
1	-	-	-
2	163,6	163,4	
3	102,8	102,7	6,69
4	181,8	-	
5	160,6	160,6	
6	108,8	108,8	
7	163,2	-	
8	93,5	93,4	6,52
9	156,2	-	
10	103,4	103,4	
1'	121,4	121,4	
2'	113,3	112,9	7,43
3'	145,7	-	
4'	149,6	-	
5'	116,0	116,0	6,92
6'	118,9	118,6	7,49
1''	73,1	72,3	4,60
2''	70,6	70,0	4,07
3''	78,9	78,9	3,23–3,20
4''	70,3	70,6	3,23–3,20
5''	81,4	81,6	3,23–3,20
6''	61,4	61,4	3,70 e 3,39

CAPÍTULO VI

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Contaminação microbiana e atividade antioxidante

1. Radiação Gama *Versus* Contaminação Microbiológica

Na literatura existem diversos trabalhos que mostram a eficiência do uso da radiação gama na descontaminação microbiana presente nos materiais vegetais. Porém, nenhum desses estudos foi realizado para a espécie *E. macrophyllus*. Dessa forma, amostras irradiadas a doses de 1,0, 3,0, 5,0, 10,0 e 20,0 kGy e uma não irradiada (0,0 kGy) foram testadas com a finalidade de observar o efeito da radiação gama sobre a contaminação microbiológica nas folhas de *E. macrophyllus*. A Tabela VI.1 e a Figura VI.1 mostram a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) presentes em cada amostra submetida à radiação gama.

Tabela VI.1. Valores em UFC/mL e UFC/g para cada uma das amostras submetidas à radiação gama a doses de 1,0, 3,0, 5,0, 10,0 e 20,0 kGy e uma amostra não irradiada (0 kGy)

Radiação Gama (kGy)	UFC/mL (1)	UFC/mL (2)	Média (UFC/mL)	Média (UFC/g)
0,0	$3,60 \times 10^5$	$4,79 \times 10^5$	$4,20 \times 10^5$	$3,81 \times 10^6$
1,0	$7,00 \times 10^3$	$3,00 \times 10^3$	$5,00 \times 10^3$	$4,55 \times 10^4$
3,0	$1,00 \times 10^3$	$2,00 \times 10^3$	$1,50 \times 10^3$	$1,36 \times 10^4$
5,0	$5,00 \times 10^3$	$2,00 \times 10^3$	$3,50 \times 10^3$	$3,18 \times 10^4$
10,0	$1,00 \times 10^3$	$1,00 \times 10^3$	$1,00 \times 10^3$	$9,09 \times 10^3$
20,0	0	0	0	0

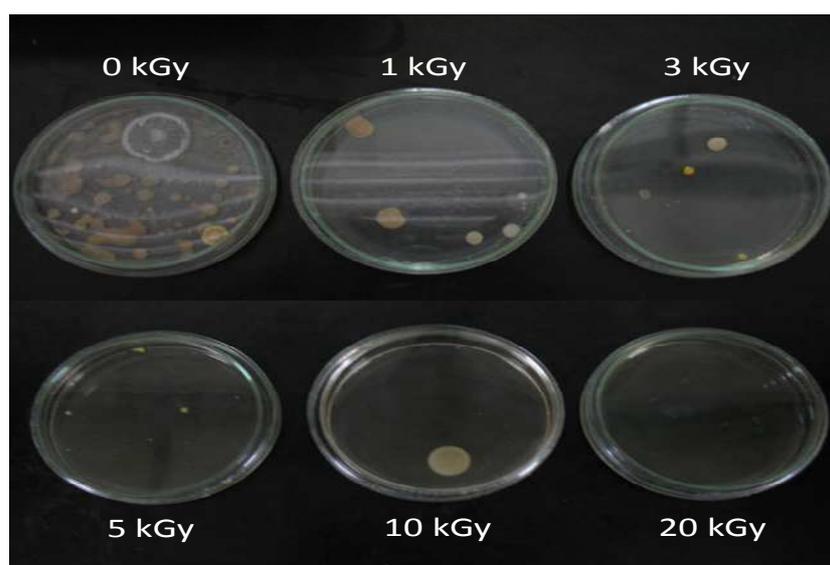


Figura VI.1. UFCs existentes na amostra não submetida à radiação gama (0,0 kGy) e nas amostras submetidas a doses de 1,0, 3,0, 5,0, 10,0 e 20,0 kGy.

Segundo a OMS, a contaminação por microrganismos permitida é, no máximo, de $5,0 \times 10^3$ UFC/g para materiais vegetais (Klein *et al.*, 2009). Portanto, os resultados obtidos indicam que o uso da radiação gama é adequado e eficiente para a descontaminação do material vegetal em doses superiores à 10,0 kGy, uma vez que, para essa dose, apresentou $9,09 \times 10^3$ UFC/g e, ao fazer uso da dose de 20,0 kGy, as amostras apresentaram-se totalmente livre de contaminação microbiana.

Portanto, o uso de doses acima de 10,0 kGy são eficientes para a descontaminação das folhas da espécie *E. macrophyllus*. Os resultados são favoráveis ao uso da radiação gama, podendo ser uma técnica mais difundida com o objetivo da descontaminação microbiológica. Porém, outros estudos deverão ser realizados a fim de avaliar principalmente os fatores químicos envolvidos no uso desta técnica.

2. Atividade Antioxidante

Todos os compostos analisados qualitativamente mostraram resultados positivos em cromatografia em camada delgada (CCD) para ambos os reveladores utilizados (β -caroteno e DPPH). A Figura VI.2 mostra os resultados de sequestro do radical-livre de DPPH (% FRSA) das amostras **F01** (ácido *trans*-aconítico), **F03** (ácido cafeoiltartrônico) e **F05** (isovintexina) comparados com o ácido gálico (padrão).

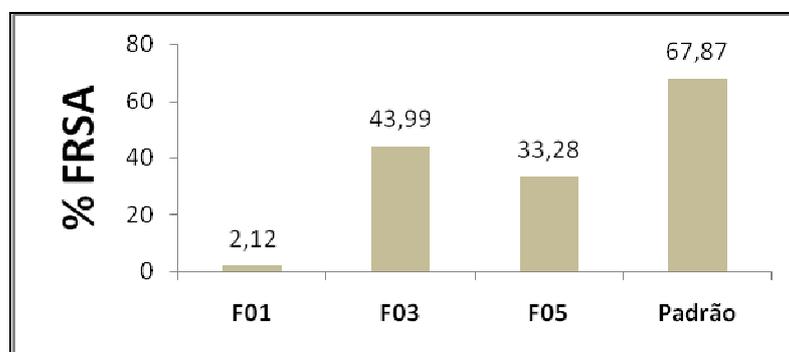


Figura VI.2. Percentagem de FRSA dos fitoconstituintes **F01**, **F03** e **F05** comparados com o padrão de ácido gálico.

Além disso, foi possível calcular a concentração máxima efetiva para reduzir em 50% a concentração de DPPH (EC_{50}). Os resultados estão mostrados na Tabela VI.2.

Tabela VI.2. Valores da concentração máxima efetiva para reduzir em 50% a concentração de DPPH, (EC_{50} em mg/mL), dos fitoconstituintes isolados **F01**, **F03** e **F05**

Fitoconstituente	EC_{50} (mg/mL)
F01	1,40
F03	0,065
F05	0,174

A partir dos resultados apresentados na Figura VI.2 (p. 135) e Tabela VI.2 pode-se observar que todos os compostos analisados apresentam atividade antioxidante com sequestro de radical-livre de DPPH. O composto **F01** (ácido cafeoilatrônico) apresenta baixo poder de atividade antioxidante quando comparado com o padrão de ácido gálico. Os fitoconstituintes **F03** (ácido cafeoilatrônico) e **F05** (isovitexina) apresentam alta atividade antioxidante com maior ação de **F03**.

Pelos valores de EC_{50} calculados para esses compostos, verifica que **F03** apresenta menor valor numérico, levando à interpretação de que se necessita menor quantidade em massa de **F03** para obter o mesmo resultado de captura do radical-livre de DPPH, seguido por **F05** e **F01**. Dessa forma, o fitoconstituente **F03** é o que apresenta maior atividade antioxidante, seguido por **F05**. O fitoconstituente **F01** possui atividade, porém sua ação é pouco significativa.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

1. Análise por CLAE das Frações Submetidas à Radiação Gama

A análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) da fração fenólica (**FF**), alcaloídica (**FA**) e saponínica (**FS**) das folhas de *Echinodorus macrophyllus* indicou a presença de 12 compostos fenólicos, um alcalóide e duas saponinas. Devido à maior presença de compostos fenólicos pode-se propor que a atividade biológica e as informações etnofarmacológicas da espécie estejam relacionadas principalmente a essa classe de compostos químicos. Além disso, as análises por CLAE mostram que o uso de radiação gama nas frações promove mudanças na composição química das frações **FF**, **FA** e **FS**.

A análise por CLAE de **FF** mostrou que a maioria dos picos diminui de intensidade com o aumento da dose de radiação gama de 0,0, 5,0, 10,0 e 20,0 kGy (**FF₀**, **FF₅**, **FF₁₀** e **FF₂₀**, respectivamente). Ocorre diminuição da intensidade dos picos 2, 3, 6, 9, 10 e 12 (TR = 2,93, 4,21, 6,81, 13,48, 15,67 e 22,07 min, respectivamente). Para o pico 4 (TR = 5,01 min) ocorre uma diminuição a doses menores e um aumento a doses maiores de radiação, o contrário é observado para o pico 5 (TR = 6,28 min), pois a doses menores há um aumento de concentração e a doses maiores, uma diminuição da concentração. Porém, um aumento é notado para os picos 1, 7, 8 e 11 (TR = 2,33, 9,18, 11,29 e 19,10 min, respectivamente). A análise por CLAE de **FA** mostrou apenas um composto e que ocorre uma ligeira diminuição desse constituinte com o aumento da dose de radiação gama (**FA₀**, **FA₅**, **FA₁₀** e **FA₂₀**). No caso da fração **FS**, o uso da radiação gama promove diminuição da concentração dos fitoconstituintes e, a doses maiores, a 20 kGy, esses constituintes não são mais detectados. Esses resultados de diminuição da concentração comprovam a existência de espécies reativas de oxigênio que atuam na degradação dos outros componentes da amostra e ainda a ação direta da radiação nesses compostos.

Esses resultados mostram a importância do uso da energia de radiação gama em folhas e frações obtidas de material vegetal na avaliação da estabilidade dos fitoconstituintes presentes nas amostras. O uso dessa energia depende da espécie e dos materiais submetidos a doses de

radiação gama. Portanto, estudos individuais para cada espécie, para cada classe de substância e o uso de novas tecnologias para a detecção dos produtos radiolíticos devem ser realizados em trabalhos futuros. Assim, esse trabalho possibilitou um estudo piloto dessa linha de pesquisa e uma fonte de inspiração para novos trabalhos de forma a melhorar a qualidade dos produtos fitoterápicos comercializados no Brasil.

2. Óleo essencial

As análises por CG-FID e CG-EM dos óleos essenciais extraídos por hidrodestilação das espécies *Echinodorus macrophyllus*, *Inga laurina* e *Euclyptus grandis* permitiram a identificação de **22**, **48** e **17** componentes presentes respectivamente nos óleos essenciais dessas espécies.

A análise do óleo essencial de *Echinodorus macrophyllus* permitiu verificar que o óleo essencial é rico em ésteres carboxílicos, principalmente o componente **63** (44,28%) e o uso da radiação gama provoca mudanças na constituição desse óleo. Os componentes **54**, **58**, **60-62**, **64**, **65** e **69** mostraram aumento de suas proporções relativas quando a amostra foi exposta a radiação gama. Por outro lado, os componentes **55**, **57**, **63**, **71** e **73** mostraram diminuição de suas proporções relativas quando a amostra foi exposta a radiação gama.

O óleo essencial de *Inga laurina* é rico em ácidos graxos, principalmente o componente **120** (18,23%). Por sua vez, o óleo de *Eucalyptus grandis* é rico em monoterpenos cíclicos, principalmente o componente **122**. O uso da radiação gama provoca também mudanças na constituição química desse óleo.

Esses resultados mostram a importância da investigação do uso da radiação gama em óleos essenciais, principalmente daquelas espécies que são utilizadas pela população brasileira no dia a dia.

3. Análise Fitoquímica

As análises por CG-EM permitiram identificar a presença de vários compostos, principalmente de ácidos graxos e ésteres carboxílicos em *Echinodorus macrophyllus*. O composto hexa-hidrofarnesil acetona encontra-se em maior número de frações. Ainda foi possível isolar e identificar por técnicas espectroscópicas os triterpenos: estigmasterol e β -sistosterol (Figura 1).

A partir do fracionamento por CLAE preparativo da fração **FF₀** foi possível isolar cinco compostos (picos 2, 9, 10, 11 e 12). As análises por IV e RMN (1D e 2D) desses compostos indicaram tratarem-se do ácido *trans*-aconítico, ácido *trans*-ferúlico, ácido cafeoiltartrônico, isoorientina e isovitexina, respectivamente (Figura 1).

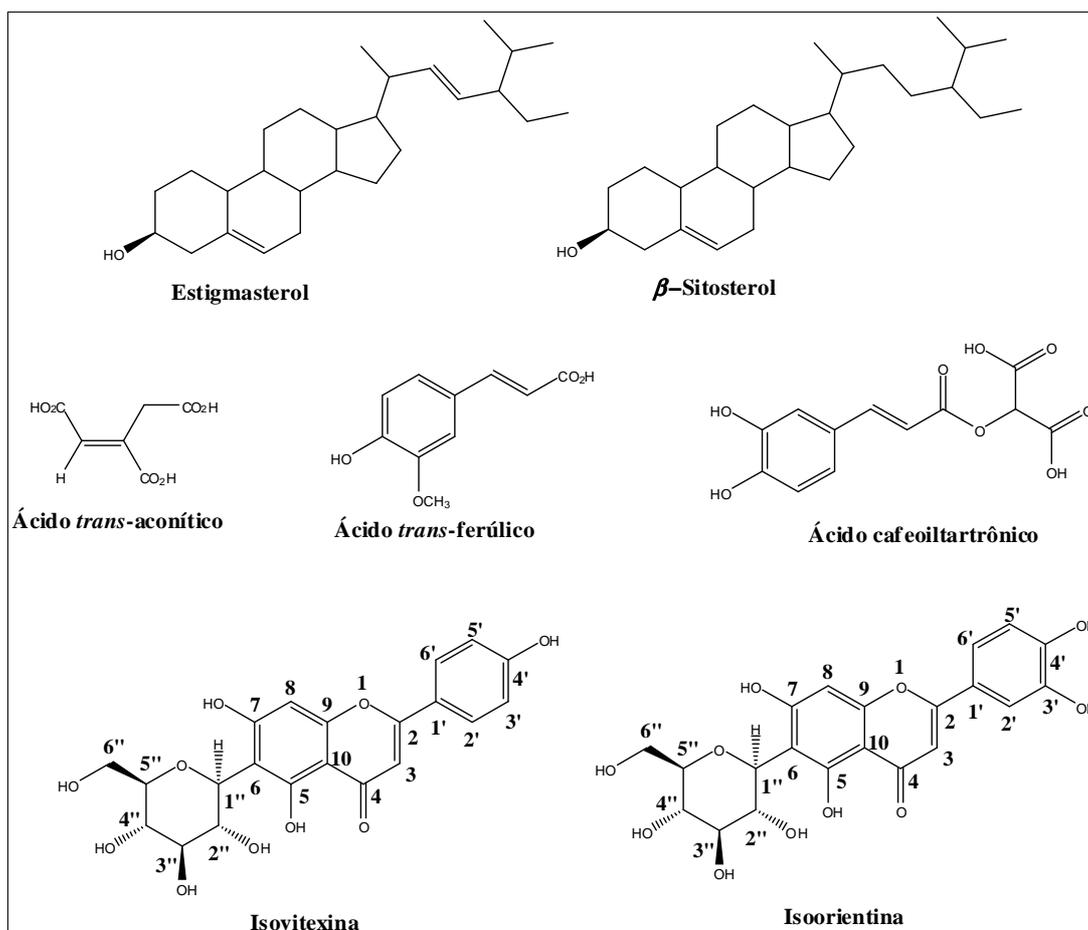


Figura 2. Estrutura química dos constituintes isolados e identificados nas folhas de *Echinodorus macrophyllus*.

Estes resultados dão importância e justificam a continuidade do trabalho fitoquímico com a análise das frações apolares, bem como o estudo das frações polares que não foram

estudadas ainda, principalmente identificação dos possíveis produtos radiolíticos formados a partir do uso de radiação gama e estudo das outras espécies vegetais.

4. Contaminação Microbiana e Atividade Biológica

Através da contagem das unidades formadoras de colônias foi possível observar que o uso de radiação gama no material vegetal provoca diminuição da contaminação microbiana em *Echinodorus macrophyllus*. Doses superiores a 10 kGy podem ser suficientes para tornarem as amostras totalmente livres de contaminação microbiana.

Além disso, foi possível verificar que o extrato aquoso e os constituintes extraídos da espécie *E. macrophyllus* apresentam alta atividade antioxidante, sendo que o ácido cafeoiltartrônico é o fitoconstituente com maior poder antioxidante, seguido por isovitexina e ácido *trans*-aconítico.

Como perspectiva, pretende-se dar continuidade do trabalho fitoquímico de isolamento de constituintes das frações não estudadas ainda desta espécie e das outras espécies, bem como avaliar a atividade biológica *in vivo* e *in vitro*, principalmente a atividade anti-inflamatória de extratos, frações e constituintes a serem isolados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-RAHMAN, F. H.; ALANIZ, N. M.; SALEH, M. A. **Nematicidal activity of terpenoids.** *Molecules*. 2013. p. 16-22 v. 48.
- 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. **Evaluation of the bactericidal and trypanocidal activities of triterpenes isolated from the leaves, stem, and flowers of *Lychnophora pinaster*.** *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2011. p. 615-621 v. 21.
- ADHIKARI, S.; TILAK, J. C.; DEVASAGAYAM, T. P. A. **Free radical reactions of a naturally occurring flavone baicalein and possible mechanisms towards its membrane protective properties.** *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*. 2011. p. 275-282 v. 48.
- AGARWAL, P.; VERMA, S. **Effect of chemical and irradiation on the alkaloid contents of *Ageratum conyzoides* Linn.** *National Academy Science Letters*. 1988. p. 349-350 v. 11.
- ALI, M. R.; YOUNG, M. J.; GYAWALI, R.; MOSADDIK, A.; RYU, Y. C.; CHO, S. K. **Mango (*Mangifera indica* L.) peel extracts inhibit proliferation of HeLa human cervical carcinoma cell via induction of apoptosis.** *Journal of Korean Society Applied Biology Chemistry*. 2012. p. 397-405 v. 55.
- ANVISA. Resolução RDC N° 21, de 26 de janeiro de 2001.
- ANVISA. Resolução RDC N° 48, de 16 de março de 2004.
- ARAÚJO, C. R. R.; ESTEVES, E. A.; DESSIMONI-PINTO, N. A.V.; BATISTA, A. G. ***Myrciaria cauliflora* pell flour had a hypolipidemic effect in rats fed a moderately high-fat diet.** *Journal of Medicinal Food*. 2014. p. 262-267 v.17.
- ARRUDA, D. C.; D'ALEXANDRI, F. L.; KATZIN, A. M.; ULIANA, S. R. B. **Antileishmanial activity of the terpene nerolidol.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005. p. 1679-1687 v. 49.
- AZIZ, N. H.; MOUSSA, L. A. A. **Influence of gamma-irradiation on mycotoxin in producing moulds and mycotoxins in fruits.** *Food Control*. 2002. p. 281-288 v. 13.
- BABALOLA, I. T.; ADELAKUN, E. A.; SHODE, F. O. **Isolation of ursolic acid (3 β -hydroxyurs-12-em-28-oic acid) from the leaves of *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden.** *Achives of Applied Science Research*. 2013a. p. 33-37 v. 5.
- BABALOLA, I. T.; SHODE, F. O.; ADELAKUN, E. A.; OPOKU, A. R.; MOSA, R.A. **Platelet-aggregation inhibitory activity of oleanolic acid, ursolic acid, betulinic acid, and maslinic acid.** *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2013b. p. 54-60 v. 1.
- BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M.; PRADO, G.; SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. **Toxigenic fungi associated with processed (Green) coffee beans (*Coffea arabica* L.).** *International Journal Food Microbiology*. 2002. p. 293-300 v. 85.
- BELL, E. A., LACKEY, J. A., POLHILL, R. M. **Systematic significance of canavanine in the Papilionoideae (Faboideae).** *Biochemical Systematic Ecology*. 1978. p. 201-212 v. 6.
- BELLI-DONINI, M. L.; BARALDI, D. **Relationship between peel damage and the accumulation of limonene in four varieties of irradiated oranges.** *Environmental and Experimental Botany*. 1977. p. 161-165 v. 17.
- BENNETT, J. W.; KLICH, M. **Mycotoxins.** *Clinical Microbiology Review*. 2003. p. 497-516 v. 16.
- BHATNAGAR, D.; YU, J.; EHRLICH, K. C. **Toxins of filamentous fungi.** *Chemical Immunology*. 2002. p. 167-206 v. 81.
- BHATTACHARJEE, P.; SINGHAL, R. S.; GHOLAP, A. S.; VARIYAR, P. S.; BONGIRWAR, D. R. **Hydrocarbons as marker compounds for irradiated cashew nuts.** *Food Chemistry*. 2002. p. 151-157 v. 80.
- BINI, D.; FIGUEIREDO, A. F.; SILVA, M. C. P.; VASCONCELLOS, R. L. F.; CARDOSO, E. J. B. N. **Microbial biomass and activity in litter during the initial development of pure and mixed plantation of *Eucalyptus grandis* and *Acacia mangium*.** *Revista Brasileira de Ciências do Solo*. 2012. p. 76-85 v. 37.
- BRANDÃO, M. G. L. 1991. **Estudo Químico das raízes do *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke planta utilizada popularmente na Amazônia como preventivo da malária.** 1991. Tese de Doutorado, Belo Horizonte, Minas Gerais - Brasil UFMG-ICEx/DQ.00223 T.00047.
- BROUGHTON, W. J.; ERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYDEN, J. **Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes.** *Plant and Soil*. 2003. p. 55-128.

- CAI, H.; STROUSE, J.; DURLAO, D.; JUNG, M. E.; CLARKE, S. **Distinct reactions catalyzed by bacterial and yeast *trans*-aconitate**. *Biochemistry*. 2001. p. 2210-2219 v. 40.
- CARAMORI, S. S.; SOUZA, A. A.; FERNANDES, K. F. **Caracterização bioquímica de frutos de *Inga Alba* (Sw.) Willd. e *Inga cylindrica* Mart. (Fabaceae)**. *Revista Saúde e Ambiente*. 2008. p. 16-23 v. 9.
- CHAKCHIR, B. A.; BOBKOV, Y. G. **Effect of ionizing radiation on some drugs**. *Voenno-Meditsinskii Zhurnal*. 1978. p. 44-45 v. 6.
- CHIRINOS, R.; BETALLELUZ-PALLARDEL, I.; HUAMÁN, A.; ARBIZU, C. **HPLC-DAD Characterisation of Phenolic Compounds from Andean Oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) Tubers and Their Contribution to the Antioxidant Capacity**. *Food Chemistry*. 2009. p. 1243-1251 v. 113.
- CHOI, J. I.; KIM, H. J.; KIM, H. J.; CHUN, B. S.; AHN, D. H.; KIM, G. H.; LEE, J.W. **Changes in colour and antioxidant activities of *Hizikia fusiformis* cooking drips by gamma irradiation**. *LWT – Food Science and Technology*. 2010. p. 1074-1078 v. 43.
- CONFORTI, F.; MENICHINI, F.; FORMISANO, C.; RIGANO, D.; SENATORE, F.; ARNOLD, N. A.; PIOZZI, F. **Comparative chemical composition, free radical-scavenging and cytotoxic properties of essential oils of six *Stachys* species from different regions of the Mediterranean area**. *Food Chemistry*. 2009. p. 898-905 v. 116.
- CONFORTI, F.; STATTI, G. A.; MENICHINI, F. **Chemical and biological variability of hot pepper fruits (*Capsicum annuum* var. *acuminatum* L.) in relation to maturity stage**. *Food Chemistry*. 2007. p. 1096-1104 v. 102.
- COSTA, J. Y.; FORNI-MARTINS, E. R.; VANZELA, A. L. L. **Karyotype characterization of five Brazilian species of *Echinodorus* (Alismataceae) with chromosomal banding and 45S rDNA FISH**. *Plant Systematics and Evolution*. 2006. p. 119-127 v. 257.
- COSTA, M.; TANAKA, C. M. A.; IMAMURA, P. M.; MARSAIOLI, A. J. **Isolation and Syntesis of a New Clerodane from *Echinodorus grandiflorus***. *Phytochemistry*. 1999. p. 117-122 v. 50.
- CRONQUIST, A. **The Evolution and Classification of Flowering Plants**. Nova York. The New York Botanical Garden. 1988. 2 ed. p. 555
- DE ABREU, H. A.; LAGO, I. A. S.; SOUZA, G. P.; PILÓ-VELOSO, D.; DUARTE, H. A.; ALCÂNTARA, A. F. C. **Antioxidant actitivity of (+)-bergenin - a phytoconstituent isolated from the bark of *Sacoglottis uchi* Huber (Humireaceae)**. *Organic Biomolecule Chemistry*. 2008. p. 2713-2718 v. 6.
- DELINCEE, H. **Analytical methods to identify irradiated food – a review**. *Radiation Physics and Chemistry*. 2002. p. 455-458 v. 63.
- DHANYA, R.; MISHRA, B. B.; KHALEEL, K. M. **Effect of gamma irradiation on curcuminoids and volatile oils of fresh turmeric (*Curcuma longa*)**. *Radiation Physics and Chemistry*. 2011. p. 1247-1249 v. 80.
- DZIRI, S.; HOSNI, K. **Effects of cement dust on volatile oil constituents and antioxidative metabolism of Aleppo pine (*Pinus halepensis*) needles**. *Acta Physiology Plant*. 2012. p. 1669-1678 v. 34.
- EL-HAMIDI, A.; SALEH, M. R. I.; HAMDY, H. **Effect of gamma radiation on *Datura stramonium* var *inermis* grown in U.A.R.** *Abhandlungen der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Klasse fuer Chemie, Geologie und Biologie*. 1966. p. 563-566 v. 3.
- FAIZI, S.; FAYYAZ, S.; BANO, S.; IQBAL, E. Y.; LUBNA, SIDDIQI, H.; NAZ, A. **Isolation of nematicidal compounds from *Tagetes patula* L. yellow flowers: structure-activity relationship studies against cyst Nematode *Heterodera zae* infective stage larvae**. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2011. p. 9080-9093 v. 59.
- FILHO, A. G. Disponível em:
http://www.forumaquario.com.br/portal/atlas_plant/f_echinodorus_macrophyllus.html
- Acessado em: 13 maio 2010.
- GADZHIEVA, H. H.; FARADZHEV, S. A. **Structural changes in *Peganum Harmala* caused by γ radiation**. *Elektronnaya Obrabotka Materialov*. 2007. p. 97-101 v. 5.
- GARDANA, C.; SCAGLIANTI, M.; PIETTA, P.; SIMONETTI, P. **Analysis of the Polyphenolic Fraction of Propolis from Different Sources by Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry**. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2007. p.390-399 v. 45.
- GERTSCH, J.; LEONTI, M.; RADUNER, S.; RACZ, I.; CHEN, J. Z.; XIE, X. Q.; ALTMANN, K. H.;

- KARSAK, M.; ZIMMER, A. **Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid**. Proceeding of the Nation Academy of Science of the United States of America. 2008. p. 9099-9104 v. 105.
- GILSON, M.. Disponível em: <http://www.visoflora.com/photos-nature/inga-laurina.html>. Acessado em: 26 de junho de 2012.
- Grupo Consultivo Internacional Sobre Irradiação de Alimentos (ICGFI). **Fatos Sobre Irradiação de Alimentos**. 1999. p. 1-46.
- HAINES, R. R.; HOLM-NIELSEN, L. B. **Notes on *Echinodorus* (Alismataceae)**. Brittonia. 1986. p. 325-332 v. 38.
- HAN, C.; DING, H.; CASTO, B.; STONER, G. D.; D'AMBROSIO, S. M. **Inhibition of the growth of pre-malignant and malignant human oral cell lines by extracts and components of black raspberries**. Nutrition and Cancer. 2005. p. 207-217 v. 51.
- HAYNES, R. R.; LES, D. H.; HOLM-NIELSEN, L. B. **Alismataceae** Em: KUBITZKI, K. **The Families and Genera of Vascular Plants-Flowering Plants Monocotyledons Alismatanae and Commelinanae (Except Graminae)**. Alemanha. Springer. 1998. p. 11-15 v. 4.
- HOEPPEN, B. H.; SMIT, C. J. B.; ROUX, D. G. **The Flavone C-Glycosides and Flavonol O-Glycosides of *Aspalathus acuminatus* (Rooibos Tea)**. Biochemistry Journal. 1962. p. 507-511 v. 83.
- HUA, K. F.; HSU, H. Y.; SU, Y. C.; LIN, I. F.; YANG, S. S.; CHEN, Y. M.; CHAO, L. K. **Study on the anti-inflammatory activity of methanol extract from seagrass *Zostera japonica***. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 2006. p. 306-311 v. 54.
- HUANG, C. H.; LEE, S. C.; CHEN, Y. S.; YAO, C. H. **Evaluation of Co-gamma radiosterilization on Chinese medicines with HPLC/FTIR**. Biomedical Chromatography. 2010. p.1179-1184 v. 24.
- HUANG, W. Y.; CAI, Y. Z.; XING, J.; CORKE, H.; SUN, M. **A potencial antioxidant resource: endophytic fungi from medicinal plants**. Economic Botany. 2007. p. 14-30 v. 61.
- HUSSAIN, P. R.; MEENA, R. S.; DAR, M. A.; WANI, A. M. **Studies on enhancing the keeping quality of peach (*Prunus pérsica Bausch*) Cv. Elberta by gamma-irradiation**. Radiation Physics and Chemistry. 2008. p. 473-481 v. 77.
- HUSSAIN, P. R.; WANI, A. M.; MEENA, R. S.; DAR, M. A. **Gamma irradiation induced enhancement of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and antioxidant activity in peach (*Prunus pérsica Bausch*, Cv. Elberta)**. Radiation Physics and Chemistry. 2010. p. 982-989 v. 79.
- INNOCENT, E.; JOSEPH, C. C.; GIKONYO, N. K.; NKUNYA, M. H.; HASSANALI, A. **Constituents of the essential oil of *Suregada zanzibariensis* leaves are repellent to the mosquito, *Anopheles gambiae* s.s.** Journal of Insect Science. 2010. p. 1-8 v. 10.
- JEGADEESWARI, P.; NISHANTHINI, A.; MUTHUKUMARASAMY, S.; MOHAN, V. R. **GC-MS analysis of bioactive components of *Aristolochia krysagathra* (Aristolochiaceae)**. Journal of Current Chemistry Pharmaceutica Science. 2012. p. 226-232 v. 2.
- JEONG, J. G.; KIM, Y. S.; MIN, Y. K.; KIM, S. H. **Low concentration of 3-Carene stimulates the differentiation of mouse osteoblastic MC3T3-E1 subclone 4 Cells**. Phytotherapy Research. 2008. p. 18-22 v. 22.
- JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. **Plant Systematics: a Phylogenetic Approach**. Sunderland. Sinauer Associates, Inc. 2008. 3 ed. p. 249-254.
- KAMATOU, G. P. P.; VILJOEN, A. M. 2008. **Linalool - A review of a biologically active compound of commercial importance**. Natural Products Communication. 2008. p. 1183-1192 v. 3.
- KAMATOU, G. P.; VILJOEN, A. M.; GONO-BWALYA, A. B.; VAN ZYL, R. L.; VAN VUUREN, S. F.; LOURENS, A. C.; BASER, K. H.; DEMIRCI, B.; LINDSEY, K. L.; VAN STADEN J.; STEENKAMP, P. **The *in vitro* pharmacological activities and a chemical investigation of three South African *Salvia* species**. Journal of Ethnopharmacology. 2005. p. 382-390 v. 102.
- KANSKI, J.; AKSENOVA, M.; STOYANOVA, A.; BUTTERFIELD, D. A. **Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems *in vitro*: structure-activity studies**. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition. 2002. p. 273-281 v. 13.
- KIM, H.; CHO, W. J.; AHN, J. S.; CHO, D. H.; CHA, Y. J. **Identification of radiolytic marker**

compounds in the irradiated beef extract powder by volatile analysis. Microchemical Journal. 2005a. p. 127-137 v. 80.

KIM, J. H.; CHUNG, B. Y.; KIM, J. S.; WI, S. G. **Effects of in Planta Gamma-Irradiation on Growth, Photosynthesis, and Antioxidative Capacity of Red Pepper (*Capsicum annuum* L.) Plants.** Journal of Plant Biology. 2005b. p. 47-56 v. 48.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. **Fitoterápicos: um Mercado promissor.** Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences. 2009. p. 241-248 v. 30.

KOBAYASHI, J.; SEKIGUCHI, M.; SHIGEMORI, H.; OHSAKI, A. **Chapecoderins A-C, New Labdane-Derived Diterpenoids from *Echinodorus macrophyllus*.** Journal of Natural Products. 2000c. p. 375-377 v.63.

KOBAYASHI, J.; SEKIGUCHI, M.; SHIGEMORI, H.; OHSAKI, A. **Echinophyllins A and B, Novel Nitrogen-Containing Clerodane Diterpenoids from *Echinodorus macrophyllus*.** Tetrahedron Letters. 2000a. p. 2939-2943 v. 41.

KOBAYASHI, J.; SEKIGUCHI, M.; SHIMAMOTO, S.; SHIGEMORI, H.; OHSAKI, A. **Echinophyllins C-F, New Nitrogen-Containing Clerodane Diterpenoids from *Echinodorus macrophyllus*.** Journal of Natural Products. 2000b. p. 1576-1579 v. 63.

KOSEKI P. M.; VILLAVICENCIO, A. L. C. H.; BRITO, M. S.; NAHME, L. C.; SEBASTIAO, K. I.; RELA, P. R.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B.; MANCINI-FILHO, J.; FREITAS, P. C. D. **Effects of irradiation in medicinal and eatable herbs.** Radiation Physics and Chemistry. 2002. p. 681-684 v. 23.

KUMAR, K. K.; ANANTHAKUMAR, A. A.; AHMAD, R.; ADHIKARI, S.; VARIYAR, P. S.; SHARMA, A. **Effect of gamma-radiation on major aroma compounds and vanillin glucoside of cured vanilla beans (*Vanilla planifolia*).** Food Chemistry. 2010. p. 841-845 v. 122

LEANDRO, L. M.; VARGAS, F. S.; BARBOSA, P. C. S.; NEVES, J. K. O.; SILVA, J. A.; VEIGA-JUNIOR, V. F. **Chemistry and Biological Activities of Terpenoids from Copaiba (*Copaifera* spp.) Oleoresins.** Molecules. 2012. p. 3866-3889 v. 17.

LEGAULT, J.; PICHETTE, A. **Potentiating effect of beta-caryophyllene on anticancer activity of alpha-humulene, isocaryophyllene and paclitaxel.** Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2007. p. 1643-1647 v. 59.

LEHTONEN, S. **Systematics of the Alismataceae – A morphological evaluation.** Aquatic Botany. 2009 p. 279-290 v. 91.

LEITE, J. P. V.; PIMENTA, D. S.; GOMES, R. S. D. L.; DANTAS-BARROS, A. M. **Contribuição ao Estudo Farmacobotânico da *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli (chapéu-de-couro) – Alismataceae.** Revista Brasileira de Farmacognosia. 2007. p. 242-248 v.17.

LETELLIER, P. R.; NAWAR, W. W. **2-Alkylcyclobutanones from the radiolysis of triglycerides.** Lipids. 1972. p. 75-76 v. 7

LEWIS, G. P.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. **Legumes of the world.** Royal Botanic Gardens. 2005. p. 577.

LI, L.; SHENG, Y.; ZHANG, J.; WANG, C.; GUO, D. **HPLC Determination of Four Active Saponins from *Panax notoginseng* in Rat Serum and its Application to Pharmacokinetic Studies.** Biomedical Chromatography. 2004. p. 849-856 v.18.

LIN, Y.; KUO, Y.; SHIAO, M.; CHEN, C.; OU, J. **Flavonoid Glycosides from *Terminalia catappa* L.** Journal of Chinese Chemical Society. 2000. p. 253-256 v. 47.

LIU, Q.; LIU, Y.; ZHENG, Y.; HONGGUI, Z. **Determination of 4 Kinds of Alkaloids in *Sophora flavescens* Ait. By HPLC.** Shizhen Guoyi Guoyao. 2006. p. 2211-2212 v. 17 n. 11.

LOKVAN, J.; CLAUSEN, T. P.; GRAPV, D.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A. **Galloyl desides of tyrosine from young leaves of *Inga laurina*.** Journal of Natural Products. 2007. p. 134-136 v. 70.

LOPES, L. C.; ALBANO, F.; LARANJA, G. A.; ALVES, L. M.; SILVA, L. F. M.; SOUZA, G. P.; ARAUJO, I. M.; NOGUEIRA-NETO, J. F.; FELZENSZWALB, I.; KOVARY, K. **Toxicological evaluation by in vitro and in vivo assays of na aqueous extract prepared from *Echinodorus macrophyllus* leaves.** Toxicology Letters. 2000. p. 189-198 v. 116.

MACHEDO, M. L.R.; GARCIA, V. A.; FREIRE, N. G. M.; RICHARDSON, N. **Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Willd.**

Phytochemistry. 2007. p. 1104-1111 v. 68.

MACIEL, M. V.; MORAIS, S. M.; BEVILAQUA, C. M. I.; SILVA, R. A.; BARROS, R. S.; SOUZA, R. N.; SOUZA, L. C.; BRITO, E. S.; SOUZA-NETO, M. A. **Chemical composition of *Eucalyptus* spp. essential oils and their insecticidal effects on *Lutzomyia longipalpis***. Veterinary Pathology. 2010. p. 1-7 v. 167.

MALIK, S.; AKRAM, M.; SHAFIQ-UR-REHMAN; MALIK, N. A. **Effect of cobalt-60 gamma radiation on the growth and alkaloidal contents medicinal plants. I. Hyoscyamus Níger (Solanaceae)**. Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research. 1972. p. 384-385 v. 15.

MATA, M. F.; FELIX, L. P. **Flora da Paraíba, Brasil: *Inga* Mill. (Leguminosae – Mimosoideae)**. Revista Brasileira de Biociências. 2007. p. 135-137 v. 5.

MATIAS, L. Q. **O Gênero *Echinodorus* (Alismataceae) no domínio da Caatinga brasileira**. Rodriguesia. 2007. p. 743-774 v. 58.

MATIAS, L.Q. 2010. Alismataceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB004264>. Acessado em: 13 maio 2010

MAUA, J. L.; KO, P. T.; CHYAU, C. C. **Aroma characterization and antioxidant activity of supercritical carbon dioxide extracts from *Terminalia catappa* leaves**. Food Research International. 2003. p. 97-104 v. 36.

MEDANA, C.; CARBONE, F.; AIGOTTI, R.; APPENDINO, G.; BAIOCCHI, C. **Selective Analysis of Phenolic Compounds in Propolis by HPLC-MS/MS**. Phytochemical Analysis. 2008. p. 32-39 v. 19.

MIGDAL, W.; OWCZARCZYK, B.; KEDZIA, B.; HOLDERNA-KEDZIA, E.; SEGIET-KUJAWA, E. **THE EFFECT OF IONIZING RADIATION ON MICROBIOLOGICAL DECONTAMINATION OF MEDICAL HERBS AND BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS**. Radiation Physics and Chemistry. 1998. p. 91-94 v. 52.

MIYAZAWA, M.; YAMAFUJI, C. **Inhibition of acetylcholinesterase activity by bicyclic monoterpenoids**. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 2005. p. 1765-1768 v. 53.

MOREHOUSE, K. M.; KOMOLPRASERT, V. **Irradiation of Food and Packaging: An Overview**. ACS Symposium Series; American Chemical Society. 2004. p. 1-11.

MORTON, T. C. **Chemotaxonomic significance of hydroxylated pipecolic acids in Central American *Inga* (Fabaceae: Mimosoideae: Ingeae)**. Biochemica Systematics and Ecology. 1998. p. 379-401 v. 26.

MOUSSAID, M.; CAILLET, S.; NKETSIA-TABIRI, J.; BOUBEKRI, C.; LACROIX, M. **Effects of irradiation in combination with waxing on the essential oils in orange peel**. Journal of Science of Food and Agriculture. 2004. p. 1657-1662 v. 84.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFAÜER, M. A. **Microbiologia Médica**. Elsevier. 2006. 5 ed. p. 979.

NAWAR, W. W.; ZHU, Z. R.; YOO, Y. J. **Radiolytic products of lipids as markers for the detection of irradiated food**. Food Irradiation and Chemist, Ed. Johnston and M.H. Stevenson. 1990. p. 13-24

NAWAR, W.W. **Volatiles from food irradiation**. Food Review International. 1986 p. 45-78 v. 2

NONOYAMA, M.; TANAKA, A.; LAI, P. K.; KONNO, K.; KAWAZOE, Y.; SAKAGAMI, H. **Methods of inhibiting HIV replication in vitro using polymer of *p*-hydroxylated cinnamic acids**. US Pat.5346695. Chemical Abstract. 1994, 121, 272157.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. São Paulo . Atheneu. 1991.

OLIVEIRA, L. A.; BRETON, M. C.; BASTOLLA, F. M.; CAMARGO, S. S.; MARGIS, R.; FRAZZON, J.; PASQUALI, G. **Reference genes for the normalization of gene expression in *Eucalyptus* species**. Plant & Cell Physiology. 2012. p. 405-422 v. 53.

OLUFUNKE, D. M.; OLADOSU, I. A.; ADELEKE, O.; ALI, M. S. **Chemical composition and anti-inflammatory activity of the essential oil of the aerial part of *Mezoneuron benthamianum* Baill. (Caesalpinoideae)**. European Journal of Applied Science. 2009. p. 30-33 v. 1.

OTTOBELLI, I.; FACUNDO, V. A.; ZULIANE, J.; LUZ, C. C.; BRASIL, H. O. B.; MILITÃO, J. S.L.T.; BRAZ-FILHO, R. **Estudo químico de duas plantas medicinais da amazônia: *Philodendron scabrum* k. Krause (araceae) e *Vatairea guianensis* aubl. (fabaceae)**. Acta Amazônica. 2011. p. 393-400 v. 41.

OWCZARCZYK, H. B.; MIGDAL, W.; KEDZIA, B. **The pharmacological activity of medicinal herbs**

after microbiological decontamination by irradiation. Radiation Physics and Chemistry. 2000. p. 331-335 v. 57.

OZAKI, Y. **Antiinflammatory effect of tetramethylpyrazine and ferulic acid.** Chemical & Pharmaceutical Bulletin. 1992. p. 954-956 v. 40.

PACHECO, A. G.; OLIVEIRA, P. M.; PILÓ-VELOSO, D.; ALCÂNTARA, A. F. C. **¹³C NMR data of diterpenes isolated from *Aristolochia esperanzae* species.** Molecules. 2009. p. 1245-1262 v. 14.

PALMA, M.; TAYLOR, L. T. **Fractional extraction of compounds from grape seeds by supercritical fluid extraction and analysis for antimicrobial and agrochemical activities.** Journal of Agriculture and Food Chemistry. 1999. p. 5044-5048 v. 47.

PARK, H. M.; KIM, J.; CHANG, K. S.; KIM, B. S.; YANG, Y. J.; KIM, G. H.; SHIM, S. C.; PARK, I. K. **Larvicidal activity of Myrtaceae essential oils and their components against *Aedes aegypti*, acute toxicity on *Daphnia magna*, and aqueous residue.** Journal of Medical Entomology. 2011. p. 405-410 v. 48.

PARK, J. G.; YOON, Y.; PARK, J. N.; HAN, I. J.; SONG, B. S.; KIM, J. H.; KIM, W. G.; HWANG, H. J.; HAN, S. B. **Effects of gamma irradiation and electron beam irradiation on quality, sensory, and bacterial populations in beef sausage patties.** Meat Science. 2010. p. 368-372 v. 85.

PEANA, A. T.; DE MONTIS, M. G.; NIEDDU, E.; SPANO, M. T.; D'AQUILA, P. S.; PIPPIA, P. **Profile of spinal and supra-spinal antinociception of (-)-linalool.** European Journal of Pharmacology. 2004. p. 165-174 v. 485.

PEREIRA, M. C.; STEFFENS, R. S.; JABLONSKI, A.; HERTZ, P. F.; RIOS, A. O.; VIZZOTTO, M.; FLÔRES, S. H. **Characterization and antioxidant potential of brazilian fruits from the Myrtaceae family.** Journal of Agriculture and Food Chemistry. 2012. p. 3061-3067 v. 60.

PIGGOTT, J. R.; OTHMAN, Z. **Effect of irradiation on volatile oils of black pepper.** Food Chemistry. 1993. p. 115-119 v. 46.

PIMENTA, D. S.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A.C. **Essential oil from two population of *Echinodorus grandiflorus* (Cham & Schldl.) Micheli (Chapéu de couro).** Anais da Academia Brasileira de Ciências. 2006. p. 623-628 v. 78.

PINTO, A. C.; REGO, C. G.; SIQUEIRA, A. M.; CARDOSO, C. C.; REIS, P. A.; MARQUES, E. A.; COELHO, M. G. P.; SABINO, K. C. C. **Immunosuppressive Effects of *Echinodorus macrophyllus* Aqueous Extract.** Journal of Ethnopharmacology. 2007. p. 435-439 v. 111.

POPIASHVILI, N.; POPIASHVILI E.; GOGEBASHVILI, M. **The influence of gamma-radiation on intensity of alkaloids biosynthesis.** Bulletin of the Georgian Academy of Science. 2006. p. 402-404 v. 173.

POQUET, L.; CLIFFORD, M. N.; WILLIAMSON, G. **Transport and metabolism of ferulic acid through the colonic epithelium.** Drug Metabolism and Disposition. 2008. p. 190-197 v. 36.

POSSETTE, R. F. S.; RODRIGUES, W. A. **O gênero *Inga* Mill. (Leguminosae – Mimosoideae) no estado do Paraná, Brasil.** Acta Botânica Brasílica. 2010. p. 354-368 v. 24.

PRACHAYASITTIKUL, S.; SUPHAPONG, S.; WORACHARTCHEEWAN, A.; LAWUNG, R.; RUCHIRAWAT, S.; PRACHAYASITTIKUL, V. **Bioactive Metabolites from *Spilanthes acmella* Murr.** Molecules. 2009. p. 850-867 v. 14.

PRADO, G.; CARVALHO, E. P.; MADEIRA, J. E. G. C.; MORAIS, V. A. D.; OLIVEIRA, M. S.; CORRÊA, R. F.; CARDOSO, V. N. **Efeito da irradiação (⁶⁰Co) na frequência fúngica de amendoim *in natura* em função do tempo de prateleira.** Ciênc. Tecnol. Aliment. 1999b. p. 930-936 v. 30.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S.; ABRANTES, F. M.; SANTOS, L. G.; SOARES, C. R.; VELOSO, T. **Occurrence of aflatoxin M1 in milk consumed in the city of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil from August, 98 to April 99.** Ciencia e Tecnologia de Alimentos. 1999a. p. 420-423 v. 19.

PRITCHARD, H. W.; HAYE, A. J.; WRIGHT, W. J.; STEADMAN, K. J. **A comparative study of seed viability in *Inga* species: desiccation tolerance in relation to the physical characteristics and chemical composition of the embryo.** Seed Science and Technology. 1995. p. 77-89 v. 23.

RADULOVIC, N.; DORDEVIC, N.; MARKOVIC, M.; PALIC, R. **Volatile constituents of *Glechoma hirsuta* Waldst. & Kit. and *G. hederacea* L. (Lamiacead).** Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia. 2010. p. 67-76 v. 24.

RAJENDRA, G.; HYE-YOUNG, S.; HYUN-JU, L.; HYUN-PA, S.; DONG-HO, K.; MYUNG-WOO, B.;

KUONG-SU, K. **Effect of γ -irradiation on volatile compounds of dried Welsh onion (*Allium fistulosum* L.).** Radiation Physics and Chemistry. 2006. p. 322-328 v. 75.

RAJESWARI, G.; MURUGAN, M.; MOHAN, V. R. **GC-MS analysis of bioactive components of *Hugonia mystax* L. (Linaceae).** Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Science. 2012. p. 301-308 v. 3.

RHYU, M. R.; KIM, J. H.; KIM, E. Y. ***Radix angelica* elicits both nitric oxide-dependent and calcium influx-mediated relaxation in rat aorta.** Journal of Cardiovascular Pharmacology. 2005. p. 99-104 v. 46.

ROCHA, L. O.; SOARES, M. M. S. R.; CORRÊA, C. L. **Análise da contaminação fúngica em amostras de *Cassia acutifolia* Delile (sene) e *Peumus boldus* (Molina) Lyons (boldo-do-Chile) comercializadas na cidade de Campinas, Brasil.** Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2004. p. 522-523 v. 40.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITC, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH.** Comunicado Técnico. On line SEBRAE. 2007. p. 1-4.

RUSTOM, I. Y. S. **Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods.** Food Chemistry. 1997. p. 57-67 v. 59.

SAHIN, F.; GÜLLÜCE, M.; DAFERERA, D.; SÖKMEN, A.; SÖKMEN, M.; POLISSIOU M.; AGAR, G.; ÖZER, H. **Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey.** Food Control. 2004. p. 549-557 v. 15.

SALEEM, M.; KIM, H. J.; JIN, C.; LEE, Y. S. **Antioxidant caffeic acid derivatives from leaves of *Parthenocissus tricuspidata*.** Archives Pharmacie Research. 2004. p. 300-304 v. 27.

SANTOS, J. B.; SILVA, A. A.; COSTA, M. D.; JAKELAITIS, A.; VIVIAN, R.; SANTOS, E. A. **Ação de herbicidas sobre o crescimento de estirpe de *Rhizobium tropici*.** Planta Daninha. 2006. p. 457-465 v. 24.

SANTOS, S. A. O.; VILELA, C.; FREIRE, C. S. R.; NETO, C. P.; SILVESTRE, A. J. D. **Ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry applied to the identification of valuable phenolic compounds from *Eucalyptus* wood.** Journal of Chromatography B. 2013. p. 65-74 v. 938.

SARIKURKCU, C.; TEPE, B.; DAFERERA, D.; POLISSIOU, M.; HARMANDAR, M. **Studies on the antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Marrubium globosum* subsp. *globosum* (Lamiaceae) by three different chemical assays.** Bioresource Technology. 2008. p. 4239-4246 v. 99.

SATYAL, P.; PAUDEL, P.; POUDEL, A.; SETZER, W. N. **Chemical composition and biological activities of essential oil from leaf and bark of *Nyctanthes arbor-tristis* L. from Nepal.** Open Access Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 2012. p. 1-4 v. 3.

SCHREIBER, G. A.; HELLE, N.; BOEGL, K. W. **Detection of irradiated food – methods and routine applications.** International Journal Radiation Biology. 1993. p. 105-130 v. 63.

SEO, H. Y.; KIM, J. H.; SONG, H. P.; KIM, D. H.; BYUN, M. W.; KWON, J. H.; KIM, K. S. **Effects of gamma irradiation on the yields of volatile extracts of *Angelica gigas* Nakai.** Radiation Physics and Chemistry. 2007. p. 1869-1874 v. 76.

SHIGEMORI, H.; SHIMAMOTO, S.; SEKIGUCHI, M.; OHSAKI, A.; KOBAYASHI, J. **Echinolides A and B, New Cembrane Diterpenoids with an Eighth-Membered Lactone Ring from Leaves of *Echinodorus macrophyllus*.** Journal of Natural Products. 2002. p. 82-84 v. 65.

SHIM, S. L.; HWANG, I. M.; RYU, K. Y.; JUNG, M. S.; SEO, H. Y.; KIM, H. Y.; SONG, H. P.; KIM, J. H.; LEE, J. W.; BYUN, M. W.; KWON, J. H.; KIM, K. S. **Effect of γ -irradiation on the volatile compounds of medicinal herb, *Paeoniae radix*.** Radiation Physics and Chemistry. 2009. p. 665-669 v. 78.

SILVA, T. B. C.; ALVES, V. L.; MENDONÇA, L. V. H.; CONSERVA, L. M.; ROCHA, E. M. M.; ANDRADE, E. H. A.; LEMOS, R. P. L. 2004. **Chemical constituents and preliminary antimalarial activity of *Humiria balsamifera*.** Pharmaceutical Biology. 2004. p. 94-97 v. 42.

Silva, T. M. **Avaliação da Segurança de Plantas Medicinais Tratadas por Irradiação Gama: Contaminação Fúngica, Detecção de Produtos Radiolíticos e Integridade dos Princípios Ativos de *Echinodorus macrophyllus* Mich.,** Dissertação de Mestrado, Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

SILVA, T. M. DIAS, M. D.; PEREIRA, M. T.; TAKAHASHI, J. A.; FERRAZ, V. P.; PILÓ-VELOSO, D.; ALCANTARA, A. F. C. **Effect of γ -radiation of phenol fractions obtained from the leaves of *Echinodorus***

macrophyllus Mich. Radiation Physics and Chemistry. 2012. p. 22-26 v. 81.

SINENSKY, M.; MCLAIN, T.; FANTLE, K. **Expression of prelamin A but not mature lamin A confers sensitivity of DNA biosynthesis to lovastatin on F9 teratocarcinoma cells.** Journal of Cell Science. 1994. p. 2215-2218 v. 107.

SINGH, S.; MAJUMDAR, D. K. **Evaluation of antiinflammatory activity of fatty acids of *Ocimum sanctum* fixed oil.** Indian Journal of Experimental Biology. 1997. p. 380-383 v. 35.

SKAL TSA, H. D.; DEMETZOS, C.; LAZARI, D.; SOKOVIC, M. **Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight *Stachys* species from Greece.** Phytochemistry. 2004. p. 743-752 v. 64.

SMITH, J. Disponível em: http://www.ctahr.hawaii.edu/forestry/trees/Dalbergia_Eucalyptus.html. Acessado em: 06 de Junho de 2014.

SOBRINHO, F. A. P.; SILVA, B. R. **Notas sobre *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli, uma planta aquática ornamental e medicinal.** Disponível em: <http://www.watergardenersinternational.org/journal/2-2/bruno/page1p.html>. Acessado em: 13 maio 2010.

SOUSA, J. S.; BASTOS, M. N. C.; GURGEL, E. S. C. **O gênero *Inga* (Leguminosae-Mimosoideae) na província petroffera de Urucu, Coari, Amazonas, Brasil.** Rodriguesia. 2011. p. 283-297 v. 62.

SOYINGBE, O. S.; OYEDEJI, A.; BASSON, A. K.; OPOKU, A. R. **The essential oil of *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden inhibits microbial growth by inducing membrane damage.** Chinese Medicine. 2013. p. 7-14 v. 4.

SRINIVASAN, M.; SUDHEER, A. R.; MENON, V. P. **Ferulic Acid: therapeutic potential through its antioxidant property.** Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition. 2007. p. 92-100 v. 42.

STEFANELLO, M. E. A.; PASCOAL, A. C.R.F.; SALVADOR, M. J. **Essential oils from neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties.** Chemistry & Biodiversity. 2011. p. 73-94 v. 8.

STOJKOVIĆ, D.; SOKOVIĆ, M.; GLAMOČLIJA, J.; DŽAMIĆ A.; ĆIRIĆ, A.; RISTIĆ, M.; GRUBIŠI, D. **Chemical composition and antimicrobial activity of *Vitex agnus-castus* L. fruits and leaves essential oils.** Food Chemistry. 2011. p. 1017-1022 v. 128.

SUHAJ, M.; RÁCOVÁ, J.; POLOVKA, M.; BREZOVÁ, V. **Effect of γ -irradiation on antioxidant activity of Black pepper (*Piper nigrum* L.).** Food Chemistry. 2006. p. 696-704 v. 97.

SUZUKI, A.; KAGAWA, D.; FUJII, A.; OCHIAI, R.; TOKIMITSU, I.; SAITO, I. **Short and long-term effects of ferulic acid on blood pressure in spontaneously hypertensive rats.** American Journal of Hypertension. 2002. p. 351-357 v. 15.

SZEPESY, L.; FEHE'R, I.; SZEPESI, G.; GAZDAG, M. **High-performance Liquid Chromatography of Ergot Alkaloids.** Journal of Chromatography A. 2002. p. 271-280 v. 149.

TANAKA, C. M. A. **Constituintes Químicos de Cinco Espécies de *Echinodorus* e Avaliação do Beta Pineno como Substrato para Obtenção de Quirons mais Elaborados.** Tese de Doutorado da Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. 2000. p. 298.

TANAKA, C.M.A.; SARRAGIOTTO, M. H.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; MARSAIOLI, A. F. A **Cembrane from *Echinodorus gradiflorus*.** Phytochemistry. 1997. p. 1547-1549 v. 44 n. 8.

TOLEDO, M. R. S.; MORALES, L. A.; CONCI, M.; OLIVO, A. M.; SIMPLICIO, T. T.; VALÉRIO, D.; SOUZA, F. P.; VIEIRA, M. C.; BAZZANO, T. S. C.; HEREDITA, N. A. Z.; SCALON, S. P. Q.; LIMA, Z. V. **Comparação da Fitotoxicidade dos Extratos Aquosos de *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Mich. em Ratas Prenhes.** Disponível em: http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/arquivo/download/biblioteca/44_717.pdf. Acessado em: 13 maio 2012

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. **Microbiologia.** Artmed. 2005. 8 ed. p. 920.

TUNÓN, H.; THORSELL, W.; BOHLIN, L. **Mosquito repelling activity of compounds occurring in *Achillea millefolium* L. (Asteraceae).** Economic Botany. 1994. p. 111-120 v. 48.

VANAMALA, J.; COBB, G.; LOAIZA, J.; YOO, K.; PIKE, L. M.; PATIL, B. S. **Ionizing radiation and marketing simulation on bioactive compounds and quality of grapefruit (*Citrus paradisi* c.v. Rio Red).** Food Chemistry. 2007. p. 1404-1411 v. 105.

VENKATESWARA, B. R.; RAMANJANEYULU, K.; RAMBABU, T.; DEVI, C. H. B. T. S. **Synthesis and antioxidant activity of galloyltyrosine, derivatives from young leaves of *Inga laurina*.** International Journal

of Pharma and Bio Science. 2011. p. 39-44 v. 2.

VIEIRA, P. M.; VERONEZI, E.; SILVA, C. R.; CHEN-CHEN, L. **Detection of genotoxic, citotoxic, and protective activities of *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae) in mice.** Journal of Medicinal Food. 2012. p. 563-567 v. 15.

VITOUSEK, P. M.; CASSMAN, K.; CLEVELAND, C.; CREWS, T.; FIELD, C. B.; GRIMM, N. B.; HOWARTH, R. W.; MARINO, R.; MARTINELLI, L.; RASTETTER, E. B.; SPRENT, J. I. **Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation.** Biogeochemistry. 2002. p. 1-45 v. 57.

VLAD, P. F. **Synthetic investigations in the field of drimane sesquiterpenoids.** In: **Atta-ur-Rahman.** 2006. Bioactive Natural Products. Londres: Elsevier 33ª edição. p. 393-432.

WANG, C.; WU, J. A.; MCENTEE, E.; YUAN, C. **Saponins Composition in American Ginseng Leaf and Berry Assayed by High-Performance Liquid Chromatography.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2006. p. 2261-2266 v.54.

WANG, Y. N.; WANG, H. X.; SHEN, Z. J.; ZHAO, L. L.; CLARKE, S. R.; SUN, J. H.; DU, Y. Y.; SHI, G. L. **Methyl palmitate, an acaricidal compound occurring in green walnut husks.** 2009. Journal of Economic Entomology. p. 196-202 v. 102.

WERNER, J.; LAPOSATA, M.; FERNANDEZ-DEL CASTILLO, C.; SAGHIR, M.; IOZZO, R. V.; LEWANDROWSKI, K. B.; WARSHAW, A. L. **Pancreatic injury in rats induced by fatty acid ethyl ester, a nonoxidative metabolite of alcohol.** 1997. Gastroenterology. p. 286-294 v. 113.

WHO Guidelines on good agricultural and collection Practices (GACP) for medicinal plants. World Health Organization, Geneva, 2003.

WHO Traditional Medicines Strategy: 2002-2005 – World Health Organization, Geneva, 2002.

WILSON, P. G.; O'BRIEN, M. M.; GADEK, P. A.; QUINN, C. J. **Myrtaceae revisited: a reassessment of infrafamilial groups.** American Journal of Botany. 2001. p. 2013-2025 v. 88.

YANG, M.; SUN, J.; LU, Z.; CHEN, G.; GUAN, S.; LIU, X.; JIANG, B.; YE, M.; GUO D. **Phytochemical Analysis of Traditional Chinese Medicine Using Liquid Chromatography Coupled With Mass Spectrometry.** Journal of Chromatography A. 2009. p. 2045-2062 v. 1216.

YU, Y.; JEONG, I.; PARK, H.; OH, H.; JUNG, U.; JO, S. **Toxicology and stability of the components of an irradiated Korean medicinal herb, *Paeonia radix*.** Radiation Physics and Chemistry. 2004. p. 115-119 v. 71.

ZHU, F.; CAI, Y. Z.; BAO, J.; CORKE, H. **Effect of γ -irradiation on phenolic compounds in rice grain.** Food Chemistry. 2010. p. 74-77 v. 120.

ANEXOS

Anexo A-1. Valores de tempo de retenção (TR; min), área e altura dos picos registrados no cromatograma de CLAE de **FF₅** a 280 nm

Dose de radiação = 5 kGy							
Pico	TR (min)	Área	Intensidade	Pico	TR (min)	Área	Intensidade
1	2,39	384.028,5	28349,8	7	10,13	246.888,8	13801,5
2	3,12	3.043.347,9	256892,0	8	13,69	93.814,7	4219,8
3	4,75	9.691.896,7	608292,1	9	15,63	511.962,2	17702,8
4	5,44	176.664,8	19207,3	10	17,99	2.435.381,9	61468,1
5	7,28	1.127.533,9	83141,1	11	23,68	307.917,6	7973,6
6	7,86	10.492.425,5	549707,8	12	27,24	7.545.500,0	115488,0

Anexo A-2. Valores de tempo de retenção (TR; min), área e altura dos picos registrados no cromatograma de CLAE de **FF₁₀** a 280 nm

Dose de radiação = 10 kGy							
Pico	TR (min)	Área	Intensidade	Pico	TR (min)	Área	Intensidade
1	2,32	582.156,5	40460,9	7	9,48	340.510,2	18657,0
2	2,98	2.589.914,8	233030,3	8	12,19	2.138.319,9	33398,0
3	4,35	8.971.318,2	595445,1	9	14,14	525.439,4	16128,8
4	5,13	347.962,8	26509,5	10	16,42	1.477.751,4	47045,0
5	6,57	763.818,6	68041,9	11	21,20	200.283,4	2958,0
6	7,12	8.647.358,2	502227,1	12	23,91	5.646.842,5	95628,3

Anexo A-3. Valores de tempo de retenção (TR; min), área e altura dos picos registrados no cromatograma de CLAE de **FF₂₀** a 280 nm

Dose de radiação = 20 kGy							
Pico	TR (min)	Área	Intensidade	Pico	TR (min)	Área	Intensidade
1	2,30	960.674,7	63722,5	7	9,28	408.175,8	21099,7
2	2,95	2.242.011,6	195336,6	8	11,48	1.658.859,6	19972,6
3	4,25	7.947.248,3	546828,1	9	13,62	297.855,4	10939,8
4	5,05	419.001,4	34180,5	10	15,88	1.679.017,6	43370,1
5	6,36	685.918,7	63014,5	11	19,46	200.295,2	3743,6
6	6,91	7.339.435,7	438017,4	12	22,59	3.914.928,9	70933,0

Anexo A-4. Valores de tempo de retenção (TR; min), área e altura do pico registrado no cromatograma de CLAE de FA₅ a 220 nm

Dose de radiação = 5 kGy			
Pico	TR (min)	Área	Intensidade
1	3,06	40.216.635,7	1.827.651,9

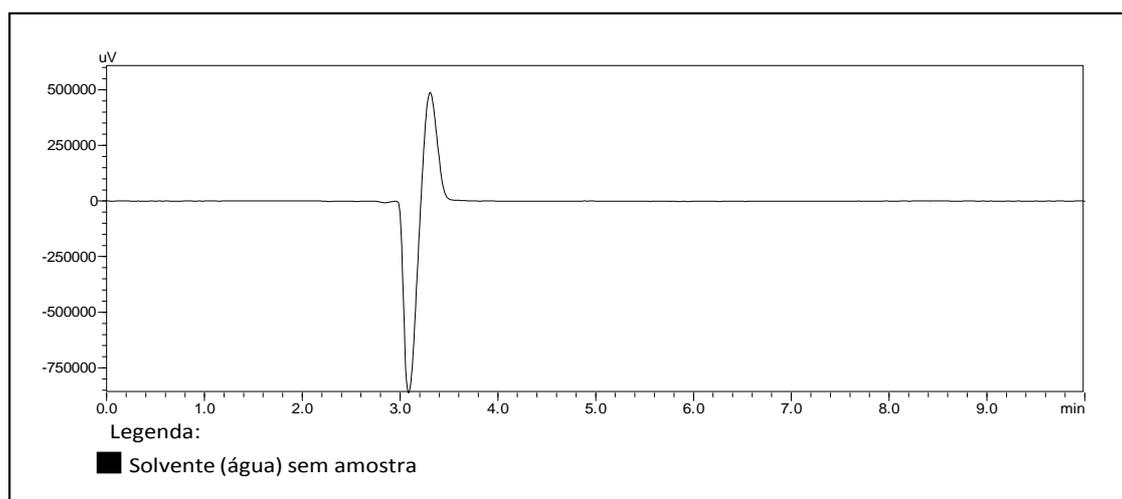
Anexo A-5. Valores de tempo de retenção (TR; min), área e altura do pico registrado no cromatograma de CLAE de FA₁₀ a 220 nm

Dose de radiação = 10 kGy			
Pico	TR (min)	Área	Intensidade
1	3,06	38.795.331,8	1.795.930,0

Anexo A-6. Valores de tempo de retenção (TR; min), área e altura dos picos registrado no cromatograma de CLAE de FA₂₀ a 220 nm

Dose de radiação = 20 kGy			
Pico	TR (min)	Área	Intensidade
1	3,00	38.326.291,7	1.715.576,5

Anexo A-7. Cromatograma CLAE do solvente (água) utilizado na diluição das amostras FS, a 210 nm.



Anexo A-8. Valores de tempo de retenção (TR; min), área e altura dos picos registrados no cromatograma de CLAE de **FS₅** a 210 nm

Dose de radiação = 5 kGy			
Pico	TR (min)	Área	Intensidade
1	3,22	226.714,3	15.318,0
2	4,71	587.336,5	25.257,0
3	-	0	0

Anexo A-9. Valores de tempo de retenção (TR; min), área e altura dos picos registrados no cromatograma de CLAE de **FS₁₀** a 210 nm

Dose de radiação = 5 kGy			
Pico	TR (min)	Área	Intensidade
1	3,22	221.003,3	15.127,6
2	4,71	552.797,9	24.523,7
3	-	0	0

Anexo A-10. Valores de tempo de retenção (TR; min), área e altura dos picos registrados no cromatograma de CLAE de **FS₂₀** a 210 nm

Dose de radiação = 5 kGy			
Pico	TR (min)	Área	Intensidade
1	-	0	0
2	-	0	0
3	-	0	0