

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

Aura Maria Blandon Osorio

Estudo fitoquímico das folhas de *Solanum stipulaceum* Roem. & Schult. e  
composição, atividade biológica e efeito da radiação gama nos óleos essenciais  
obtidos a partir das suas flores e folhas

Belo Horizonte

2015

UFMG/ICEx/DQ. 1.123

D. 617

AURA MARIA BLANDON OSORIO

**Estudo fitoquímico das folhas de *Solanum stipulaceum* Roem. & Schult. e  
composição, atividade biológica e efeito da radiação gama nos óleos  
essenciais obtidos a partir das suas flores e folhas**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do  
Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais  
como requisito parcial para obtenção do grau de  
Mestre em Química – Química Orgânica.

Belo Horizonte

2015

B642e Blandon Osorio, Aura Maria  
2015 Estudo fitoquímico das folhas de Solanum  
D stipulaceum Roem. & Schult. e composição, atividade  
biológica e efeito da radiação gama nos óleos  
essenciais obtidos a partir das suas flores e folhas  
[manuscrito] / Aura Maria Blandon Osorio. 2015.  
[vii], 100 f. : il.

Orientador: Antônio Flávio de Carvalho Alcântara.  
Coorientadora: Lucienir Pains Duarte.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Minas Gerais - Departamento de Química.  
Inclui bibliografia.

1. Química orgânica - Teses 2. Solanaceae - Teses  
3. Raios gama - Teses 4. Essências e óleos essenciais  
- Teses 5. Antioxidantes - Teses 6. Produtos naturais  
- Teses I. Alcântara, Antônio Flávio de Carvalho,  
Orientador II. Duarte, Lucienir Pains, Coorientadora  
III. Título.


CDU 043

**"Estudo Fitoquímico das Folhas de *Solanum stipulaceum* Roem. & Schult. e  
Composição, Atividade Biológica e Efeito da Radiação Gama nos Óleos  
Essenciais Obtidos a Partir das suas Flores e Folhas"**

**Aura Maria Blandon Osorio**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

  
Prof. Antônio Flávio de Carvalho Alcântara - Orientador  
UFMG

  
Prof. Lucienir Pains Duarte - Coorientadora  
UFMG

  
Prof. Jacqueline Aparecida Takahashi  
UFMG

  
Prof. Ana Maria de Resende Machado  
CEFET-MG

Belo Horizonte, 20 de novembro de 2015.



## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Humberto Blandón e Liliana Osorio, pelo amor e apoio incondicional que sempre me têm dado. Suas palavras de alento foram fundamentais para finalizar esta etapa da minha vida.

A minha irmã, Angélica Blandón, pelo carinho, apoio e alegria.

A toda minha família pelo apoio e acompanhamento, mesmo na distância o seu carinho foi fundamental para culminar este processo.

Ao orientador deste trabalho Prof. Dr. Antônio Flávio de Carvalho Alcântara por ter me recebido amavelmente no grupo de pesquisa, pela orientação recebida durante este projeto, a compreensão e o apoio.

À coorientadora deste trabalho Profa. Dra. Lucienir Pains Duarte, agradeço imensamente pela ajuda, as importantes contribuições ao projeto, os ensinamentos no laboratório e o carinho.

À Profa. Dr. Maria Olívia Mercadante-Simões pela coleta da planta.

Ao Dr. Márcio Tadeu Pereira e o Antônio de Jesus Temoteo do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN) pela irradiação das amostras.

À Dra. Vany Perpétua Férraz pela análise dos óleos essenciais e a colaboração.

Ao Prof. Dr. Adriano de Paula Sabino e a Fernanda Evangelista pela colaboração nos ensaios de citotoxicidade, o qual enriqueceu enormemente este trabalho.

À Profa. Dra. Lúcia Pinheiro de Santos pela colaboração nos ensaios da atividade antioxidante.

Ao Prof. Dr. Klaus Krambrock pela colaboração nas análises por Ressonância Paramagnética Eletrônica.

Aos professores Dra. Rosemeire Brondi Alves, Dra. Rossimiriam Pereira de Freitas, Dr. João Pedro Braga, Dr. Geraldo Magela de Lima, Dr. José Dias de Souza Filho, Dr. Adão Aparecido Sabino e Dra. Dayse Carvalho da Silva Martins, professores das disciplinas cursadas durante o mestrado, pelos ensinamentos transmitidos.

Às minhas Marias, Bruna Silva Terra e Clinascia Rodrigues Rocha, pela amizade, o carinho, o apoio e a colaboração durante essa etapa da minha vida no Brasil.

Ao Rafael Pereira e Breno Barbosa, a melhor turma de RMN, pela amizade e os ensinamentos.

Ao Thiago de Melo Silva, pelos ensinamentos e a colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À equipe do GEQOB e do NEPLAM, pela amizade, colaboração e compreensão.

Às meninas do grupo de pesquisa, Náuvia e Cecília, pelo companheirismo.

Ao Pedro Dantas, primeiro estagiário, pela importante colaboração no início deste trabalho.

À Isabel Valero e Stefanya Velásquez, pelo grande apoio e ajuda desde o momento em que cheguei ao Brasil.

À Norma P. Durán pela amizade e o carinho, sempre disposta a conversar e me apoiar.

Ao Prof. Oscar Marino Mosquera pelo apoio desde o curso de graduação, pela preocupação e ajuda constante durante o mestrado e por ter possibilitado a parceria entre a UTP e a UFMG.

Ao Programa de Pós-graduação em Química da UFMG e à UTP pela parceria que permitiu fazer o processo seletivo para o mestrado na Colômbia.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

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

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	i
LISTA DE TABELAS .....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	iv
RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	vii
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUÇÃO .....	1
1. Família Solanaceae .....	2
1.1. Gênero <i>Solanum</i> .....	2
1.2. Espécie <i>Solanum stipulaceum</i> .....	3
2. Óleos essenciais.....	5
3. Uso da radiação gama em plantas.....	7
4. Efeito da radiação gama em óleos essenciais .....	8
CAPÍTULO II.....	11
OBJETIVOS .....	11
CAPÍTULO III .....	13
PARTE EXPERIMENTAL .....	13
1. Equipamentos .....	14
2. Material vegetal .....	14
3. Estudo fitoquímico .....	14
4. Obtenção dos óleos essenciais .....	16
5. Efeito da radiação gama .....	17
6. Cálculo do rendimento da extração .....	18
7. Análises por cromatografia a gás.....	18
8. Avaliação da atividade citotóxica.....	19

9. Avaliação da atividade antioxidante.....	20
10. Análise estatística .....	21
CAPÍTULO V .....	22
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	22
ESTUDO FITOQUÍMICO DAS FOLHAS .....	22
1. Análise estrutural.....	23
CAPÍTULO V .....	41
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FLORES E FOLHAS.....	41
1. Óleo essencial das flores de <i>S. stipulaceum</i> .....	42
2. Óleos essenciais das folhas de <i>S. stipulaceum</i> .....	56
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	76
ANEXO I.....	87
Artigo publicado no Journal of the Brazilian Chemical Society.....	87
ANEXO II .....	98
Resumo aceito no 3rd Annual International Conference on Pharmaceutical Sciences ..	98



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição da família Solanaceae ao redor do mundo.....	2
Figura 2. Ilustração e distribuição geográfica de <i>Solanum stipulaceum</i> no Brasil.....	3
Figura 3. Estrutura química dos compostos identificados nas folhas de <i>S. stipulaceum</i> .....	4
Figura 4. Estrutura química dos alcaloides isolados dos frutos de <i>S. stipulaceum</i> .....	5
Figura 5. Estrutura química dos alcaloides isolados do caule de <i>S. stipulaceum</i> .....	5
Figura 6. Estrutura química dos compostos identificados no óleo essencial das folhas de <i>S. stipulaceum</i> .....	6
Figura 7. Esquema do efeito indireto da radiação gama no DNA bacteriano. ....	8
Figura 8. Cromatograma de CG-FID da amostra SSFO-I. ....	23
Figura 9. Espectro de absorção na região do infravermelho de SSFO-II (ATR). ....	25
Figura 10. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de SSFO-II (400 MHz; CDCl <sub>3</sub> ).....	26
Figura 11. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C e subespectro DEPT-135° de SSFO-II (100 MHz; CDCl <sub>3</sub> ).....	27
Figura 12. Espectro de absorção na região do infravermelho de SSFO-III (KBr). ....	30
Figura 13. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de SSFO-III (400 MHz; CDCl <sub>3</sub> ).....	31
Figura 14. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C e subespectro DEPT 135° de SSFO-III (100 MHz; CDCl <sub>3</sub> ).....	32
Figura 15. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de SSFO-IV (400 MHz; CDCl <sub>3</sub> ).....	35
Figura 16. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C e subespectro DEPT-135° de SSFO-IV (100 MHz; CDCl <sub>3</sub> ).....	36
Figura 17. Expansão do mapa de contornos HSQC de SSFO-IV (400 MHz; CDCl <sub>3</sub> ).....	39
Figura 18. Expansão do mapa de contornos HMBC de SSFO-IV (400 MHz; CDCl <sub>3</sub> ).....	40
Figura 19. Cromatograma de CG-FID dos padrões de hidrocarbonetos lineares.....	42
Figura 20. Cromatograma de CG-FID do óleo essencial isolado das flores de <i>Solanum stipulaceum</i> coletadas em maio (FL-M).....	43
Figura 21. Estrutura química dos compostos identificados no óleo essencial das flores de <i>S. stipulaceum</i> (OEFL-M). ....	45
Figura 22. Cromatogramas de CG-FID dos óleos essenciais obtidos das flores de maio, OEFL-M (a), e setembro, OEFL-S (b). ....	47
Figura 23. Cromatogramas de CG-FID dos óleos essenciais das flores de <i>S. stipulaceum</i> não irradiadas e irradiadas. ....	51

Figura 24. Composição dos constituintes majoritários dos óleos essenciais obtidos das flores coletadas em setembro e submetidas a diferentes doses de radiação gama.....	53
Figura 25. Proposta da oxidação do $\beta$ -cariofileno por ação de radicais hidroxila ( $\cdot$ OH) para a formação de óxido de cariofileno. ....	54
Figura 26. Cromatograma de CG-FID dos padrões de hidrocarbonetos lineares.....	57
Figura 27. Cromatograma de CG-FID do óleo essencial das folhas de <i>S. stipulaceum</i> . ....	58
Figura 28. Estrutura química dos compostos identificados no óleo essencial das folhas de <i>S. stipulaceum</i> coletadas em setembro (FO-S). ....	60
Figura 29. Cromatogramas de CG-FID dos óleos essenciais isolados das flores FL-S (A) e folhas FO-S (B) de <i>S. stipulaceum</i> . ....	62
Figura 30. Espectros de RPE das folhas de <i>S. stipulaceum</i> (FO-S) submetidas a diferentes doses de radiação gama. ....	63
Figura 31. Curva de decaimento do sinal da RPE com o tempo para as folhas de <i>S. stipulaceum</i> irradiadas a 20,0 kGy. ....	64
Figura 32. Cromatogramas de CG-FID dos óleos essenciais obtidos das folhas da amostra controle e as amostras irradiadas .....	65
Figura 33. Composição dos constituintes majoritários dos óleos essenciais obtidos das folhas coletadas em setembro e submetidas a radiação gama. ....	68

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estudos descritos na literatura sobre o efeito da radiação gama em óleos essenciais	9
Tabela 2. Composição de hidrocarbonetos na amostra SSFO-I	23
Tabela 3. Atribuição dos sinais de RMN de $^{13}\text{C}$ e de $^1\text{H}$ de SSFO-II a partir dos dados de RMN de farnesilfarnesol descritos na literatura	28
Tabela 4. Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ de SSFO-III e de $\beta$ -sitosterol e estigmasterol descritos na literatura	33
Tabela 5. Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ de SSFO-IV e de bis-(2-etil-hexil) ftalato descritos na literatura	37
Tabela 6. Padrões de hidrocarbonetos lineares para cálculo do índice de retenção linear	42
Tabela 7. Constituintes químicos do óleo essencial das flores de <i>S. stipulaceum</i> (FL-M)	44
Tabela 8. Constituintes químicos dos óleos essenciais das flores de <i>S. stipulaceum</i> obtidos em maio (FL-M) e setembro (FL-S)	49
Tabela 9. Rendimento da extração dos óleos essenciais das flores de <i>S. stipulaceum</i> coletadas em setembro e submetidas a radiação gama	50
Tabela 10. Composição química dos óleos essenciais obtidos das flores irradiadas de <i>S. stipulaceum</i> coletadas em setembro	52
Tabela 11. Atividade citotóxica <i>in vitro</i> dos óleos essenciais das flores irradiadas	55
Tabela 12. Padrões de hidrocarbonetos lineares para cálculo de índice de retenção linear	57
Tabela 13. Constituintes químicos e informações cromatográficas do óleo essencial das folhas de <i>S. stipulaceum</i> coletados no mês de setembro	59
Tabela 14. Compostos identificados nos óleos essenciais das folhas de outras espécies do género <i>Solanum</i> comuns aos constituintes do óleo essencial de <i>S. stipulaceum</i>	61
Tabela 15. Rendimento dos óleos essenciais obtidos das folhas de <i>S. stipulaceum</i>	64
Tabela 16. Composição química dos óleos essenciais das folhas irradiadas de <i>S. stipulaceum</i> coletadas em setembro	66
Tabela 17. Atividade antioxidante dos óleos essenciais das folhas de <i>S. stipulaceum</i>	69
Tabela 18. Atividade citotóxica <i>in vitro</i> dos óleos essenciais das folhas de <i>S. stipulaceum</i> , etoposídeo (controle) e $\beta$ -cariofileno (padrão)	71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\delta$	Dislocamento químico
ANOVA	Análise de variância
CCD	Cromatografia de camada delgada
CDTN	Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear
CE <sub>50</sub>	Concentração efetiva 50
CG	Cromatografia a gás
CL <sub>50</sub>	Concentração letal 50
DCM	Diclorometano
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i> (Intensificação sem distorção por transferência de polarização)
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
DP	Desvio padrão
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EM	Espectrometria de massas
FID	<i>Flame Ionization Detector</i> (Detector de ionização por chama)
FL-M	Flores coletadas em maio
FL-S	Flores coletadas em setembro
FO-M	Folhas coletados em maio
FO-S	Folhas coletados em setembro
HL-60	Linhagem celular de leucemia promielocítica aguda humana ATCC # CCL-240
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i> (Correlação espectroscópica heteronuclear bidimensional, a longa distância)
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i> (Correlação espectroscópica heteronuclear, bidimensional)
CI <sub>50</sub>	Concentração inibitória 50
IK	Índice de Kóvats
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
MPLC	<i>Medium pressure liquid chromatography</i> (cromatografia líquida de média pressão)

OEFL-M	Óleo essencial das flores coletadas em maio
OEFL-S	Óleo essencial das flores coletadas em setembro
OEFO	Óleo essencial das folhas
PR	Porcentagem relativa
PS	Porcentagem de similaridade
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPE	Ressonância Paramagnética Eletrônica
THP-1	Linhagem celular de leucemia monocítica aguda ATCC# TIB-202
TR	Tempo de retenção
Wi-26VA4	Linhagem celular de fibroblastos de pulmão ATCC# CCL-95.1

## RESUMO

O uso das plantas como fitoterápicos tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, aumentando também o interesse da população, das agências de saúde e das indústrias farmacêuticas em garantir a qualidade microbiológica e físico-química das plantas medicinais e os seus produtos derivados. Dentre os métodos usados atualmente na descontaminação microbiológica de materiais vegetais, destaca-se a radiação gama como uma das técnicas mais eficientes. Porém, pela alta energia que este tipo de radiação possui, o material vegetal pode ser quimicamente alterado, afetando a sua composição e as suas propriedades biológicas. A espécie *Solanum stipulaceum* Roem & Schult (*Solanaceae*) é endêmica e nativa do Brasil, amplamente usada pela população brasileira com fins terapêuticos, mas ainda pouco estudada química e farmacologicamente. Neste contexto, foi avaliado o efeito da radiação gama na composição química de óleos essenciais das flores e folhas de *S. stipulaceum* e nas suas propriedades antioxidantes e citotóxicas. Inicialmente, foi feito o estudo da composição química dos óleos essenciais das suas flores, identificando como principais componentes  $\beta$ -cariofileno,  $\gamma$ -gurjuneno e  $\beta$ -gurjuneno nas flores coletadas em maio e  $\beta$ -cariofileno, óxido de cariofileno e  $\gamma$ -gurjuneno nas flores coletadas em setembro. Quanto ao óleo essencial das folhas,  $\beta$ -cariofileno,  $\gamma$ -elemeno,  $\beta$ -espatulenol, óxido de cariofileno e  $\delta$ -cadinol foram identificados como os principais compostos voláteis. Os resultados com amostras irradiadas mostraram que as flores apresentam maior susceptibilidade à radiação gama, sendo que, com a dose de 20,0 kGy, a composição da maioria dos compostos voláteis decresce significativamente, mas estes óleos essenciais não apresentaram importante atividade antileucêmica. Por outro lado, a composição química do óleo essencial das folhas não foi afetada significativamente e isto foi relacionado com a presença de radicais livres nas folhas. No entanto, alterações irregulares foram observadas na atividade antioxidante e antileucêmica deste óleo. Além disso, foi realizado o estudo fitoquímico do extrato hexânico e da fração em diclorometano do extrato etanólico das folhas de *S. stipulaceum*, sendo identificados os compostos  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, farnesilfarnesol e bis-(2-etil-hexil) ftalato.

**Palavras-chave:** *Solanum stipulaceum*, radiação gama, óleo essencial, atividade antioxidante, atividade antileucêmica, ressonância paramagnética eletrônica.

## ABSTRACT

### **Phytochemical study of *Solanum stipulaceum* Roem. & Schult. leaves and composition, biological activity and gamma-radiation effect on the essential oils from its flowers and leaves**

The use of plants as herbal medicines and their derivatives has considerably increased in the last years, as well as the interest of general population, health agencies and pharmaceutical industries to ensure the microbiological and physicochemical quality. Among the microbial decontamination methods for plant materials, gamma radiation is one of the most efficient techniques. However, the high energy of this type of radiation can chemically change the plant material, affecting its chemical composition and biological properties. The species *Solanum stipulaceum* Roem & Schult (Solanaceae) is an endemic and native Brazilian plant, widely used by the population for therapeutic purposes, but it has not been well studied chemical and pharmacologically. In this context, the gamma radiation effect on the composition of essential oil from flowers and leaves of *S. stipulaceum* and its antioxidant and cytotoxic properties was evaluated. Initially, the study of the composition of essential oil from flowers was made, identifying  $\beta$ -caryophyllene,  $\gamma$ -gurjunene, and  $\beta$ -gurjunene as main components in flowers, collected in May, and  $\beta$ -caryophyllene, caryophyllene oxide and  $\gamma$ -gurjunene in flowers collected in September. In the essential oil from leaves,  $\beta$ -caryophyllene,  $\gamma$ -elemene,  $\beta$ -spathulenol, caryophyllene oxide and  $\delta$ -cadinol were identified as the major volatile compounds. The results obtained with the irradiated samples showed that flowers are more susceptible to gamma-radiation, whereas, at a dose of 20.0 kGy, the composition of the most volatile compounds decreases significantly. Moreover, these essential oils did not show significant antileukemic activity. The composition of essential oil from leaves was unaffected and this was associated with the presence of free radicals in the non-irradiated leaves. However, irregular changes were observed in the antioxidant and antileukemic activities of these oils. In addition, the phytochemical study of the hexane extract and dichloromethane fraction of the ethanol extract from leaves of *S. stipulaceum* was made and it allowed to identify the compounds  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, farnesilfarnesol and bis (2-ethylhexyl) phthalate.

**Key Words:** *Solanum stipulaceum*, gamma-radiation, essential oil, antioxidant activity, antileukemic activity, electronic paramagnetic resonance.

# **CAPÍTULO I**

## **INTRODUÇÃO**



## 1. Família Solanaceae

A família Solanaceae compõe um dos maiores grupos dentre as angiospermas, contando com 96 gêneros e cerca de 3000 espécies. Dentre os gêneros mais importantes desta família, encontram-se *Solanum* com um número estimado de 1400 espécies, *Lycianthes* (com 200 espécies), *Cestrum* (com 175 espécies), *Nicotiana* (com 95 espécies) e *Physalis* (com 90 espécies).<sup>1</sup> A Figura 1 mostra a distribuição desta família ao redor do mundo. A sua maior diversidade concentra-se na América do Sul e no Brasil, onde está representada por 34 gêneros e 474 espécies, das quais 228 são endêmicas do país. O Estado de Minas Gerais, com 196 espécies identificadas, é um dos estados brasileiros com maior número de espécies reportadas para esta família.<sup>2</sup>



**Figura 1.** Distribuição da família Solanaceae ao redor do mundo.<sup>3</sup>

De grande importância comercial e econômica, destacam-se na família diversas espécies que apresentam usos alimentício, medicinal e ornamental, como *Solanum tuberosum* (batata), *Solanum lycopersicum* (tomate) e *Solanum melongena* (beringela), além de *Nicotiana tabacum*, espécie cultivada em todo o mundo para a produção de tabaco.<sup>4</sup>

A importância da família Solanaceae é destacada no Brasil, tendo sido selecionada como uma das famílias pilotos para o início do projeto Flora do Brasil, o qual busca descrever em 2020 a extraordinária diversidade de plantas do país.<sup>5</sup>

### 1.1. Gênero *Solanum*

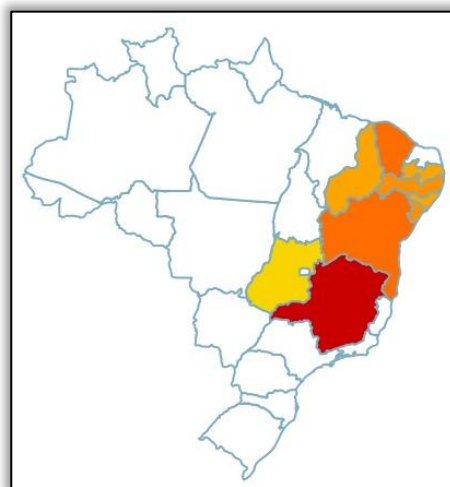
O gênero *Solanum* é um dos maiores dentre as angiospermas, contando com aproximadamente 1400 espécies.<sup>5</sup> O gênero concentra a maior quantidade de espécies na

região dos Andes e no Sudeste Brasileiro. Este gênero foi descrito pela primeira vez por Lineu em 1753 e as suas espécies podem ser encontradas em diferentes habitat, desde pequenas ervas até árvores. Porém o hábito arbustivo é predominante.<sup>6</sup>

A grande variedade de espécies deste gênero tem gerado uma ampla variedade de metabólitos secundários isolados e identificados, dentre os mais conhecidos encontram-se glicoalcaloides, saponinas, compostos fenólicos, esteróis e flavonoides. Estes metabólitos apresentam um amplo espectro de atividades farmacológicas reportadas, tais como antibacteriana, antifúngica, citotóxica, antioxidante, hipotensiva e hepatoprotetora.<sup>7</sup>

## 1.2. Espécie *Solanum stipulaceum*

A espécie *Solanum stipulaceum* Roem & Schult é uma planta endêmica e nativa do Brasil. Seus representantes encontram-se distribuídos no Nordeste Brasileiro (nos Estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí e Sergipe), na Região Centro-Oeste (em Goiás) e na Região Sudeste (em Minas Gerais), como mostrado na Figura 2. É comum encontrá-la em regiões de cerrado, caatinga e mata atlântica.<sup>2</sup>



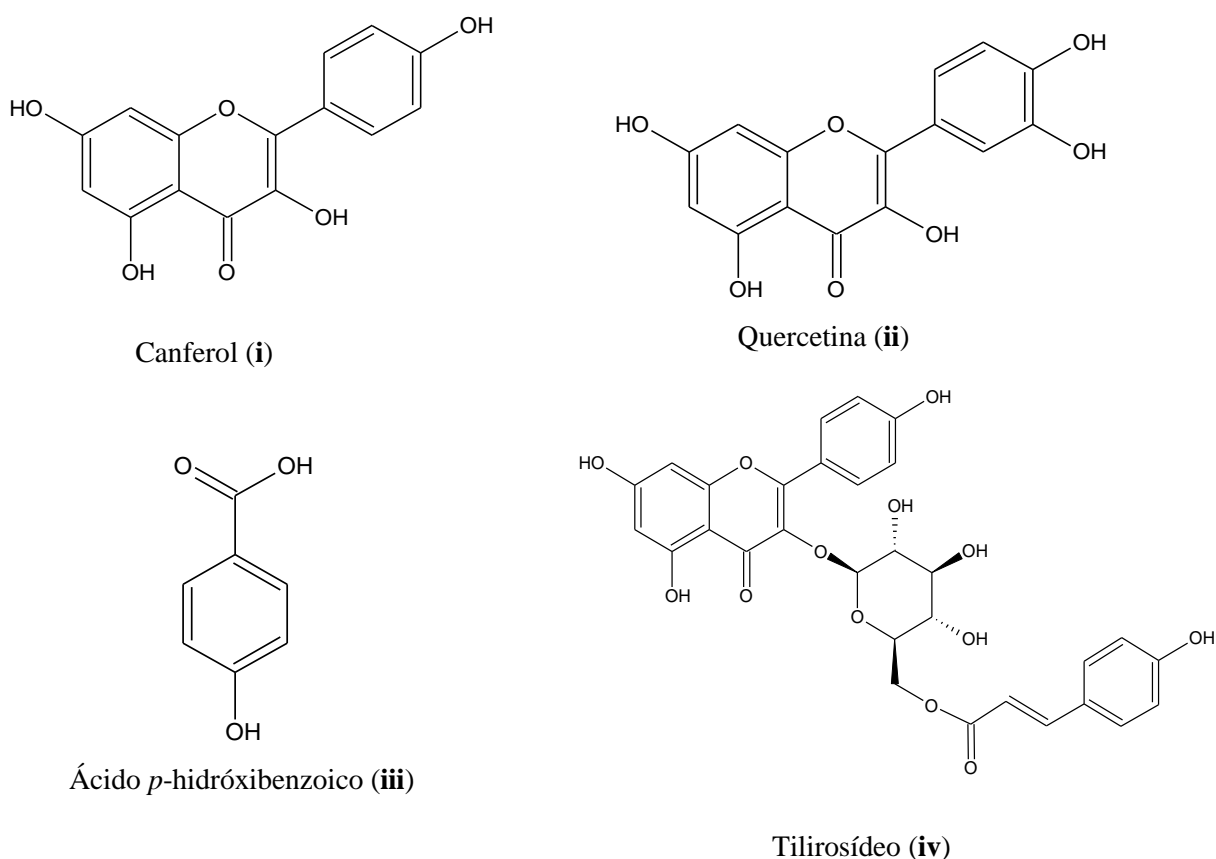
**Figura 2.** Ilustração e distribuição geográfica de *Solanum stipulaceum* no Brasil.<sup>2</sup>

Diversos estudos têm sido descritos na literatura relatando diferentes atividades biológicas dos extratos obtidos desta espécie vegetal. Atividade moluscicida do extrato alcaloídico das folhas e do caule foi testada contra *Biomphalaria glabrata*, encontrando que o extrato do caule é efetivo no controle da esquistossomose com  $CL_{50} = 45,2 \mu\text{g/mL}$ .<sup>8</sup> Efeito cardiovascular foi relatado também para o extrato etanólico do caule de *S. stipulaceum*, sendo descrita redução da pressão arterial em ratos com um perfil dependente da concentração do

extrato.<sup>9</sup> Por sua vez, o extrato alcaloídico da raiz desta espécie mostrou bioatividade contra *Artemia salina* com  $CL_{50} = 823,1 \mu\text{g/mL}$  e contra *Biomphalaria glabrata* com  $CL_{50} = 48,49 \mu\text{g/mL}$ .<sup>10-11</sup>

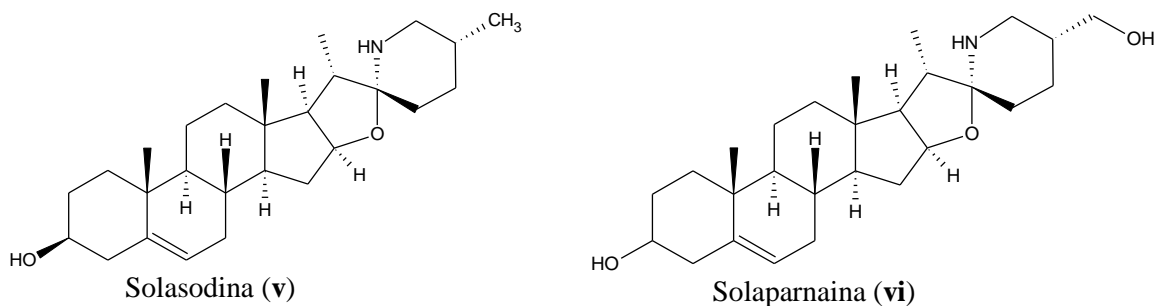
O uso popular desta espécie na Região Nordeste do Brasil como antiulcerogênica foi relatado e confirmado para o extrato aquoso das folhas, obtendo-se resultados significativos com dose de 200 mg/kg.<sup>12</sup> Atividade antioxidante foi reportada para o extrato metanólico das folhas de *S. stipulaceum* com  $CE_{50} = 66,72 \mu\text{g/mL}$ , sendo que os compostos canferol (i), quercetina (ii), ácido *p*-hidroxibenzoico (iii) e tilirosídeo (iv) foram isolados desse extrato. A atividade antioxidante foi atribuída à quercetina, pois esta apresentou  $CE_{50} = 1,75 \mu\text{g/mL}$  quando testada pura. Os mesmos compostos foram identificados nos tricomas desta espécie.<sup>13-</sup>

14

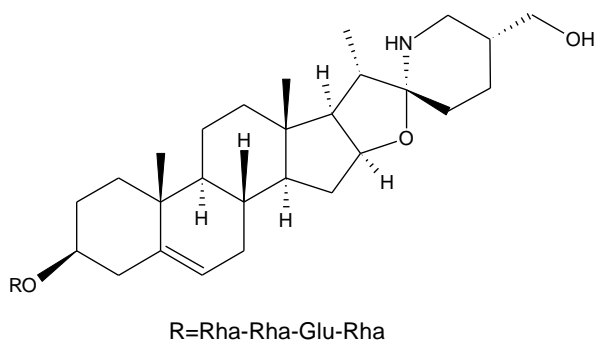
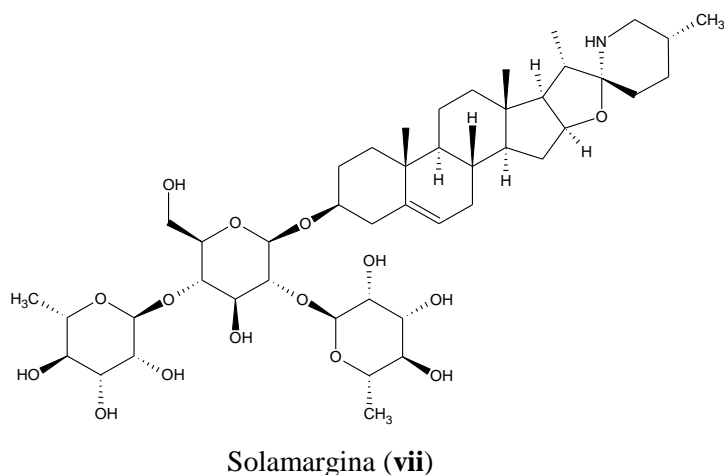


**Figura 3.** Estrutura química dos compostos identificados nas folhas de *S. stipulaceum*.

Em relação a metabólitos do extrato etanólico de *S. stipulaceum* foi relatado o isolamento dos alcaloides solasodina (v) e solaparnaina (vi) dos frutos. No extrato etanólico do caule e dos galhos foram identificados os compostos solamargina (vii) e 3-*O*-ramnopiranosil-*O*-ramnopiranosil-*O*-glucopiranosil-*O*-ramnopiranosil solaparnaina (viii).<sup>15</sup>



**Figura 4.** Estrutura química dos alcaloides isolados dos frutos de *S. stipulaceum*.



3-*O*-ramnopiranosil-*O*-ramnopiranosil-*O*-glucopiranosil-*O*-ramnopiranosil solaparnaina (viii)

**Figura 5.** Estrutura química dos alcaloides isolados do caule de *S. stipulaceum*.

## 2. Óleos essenciais

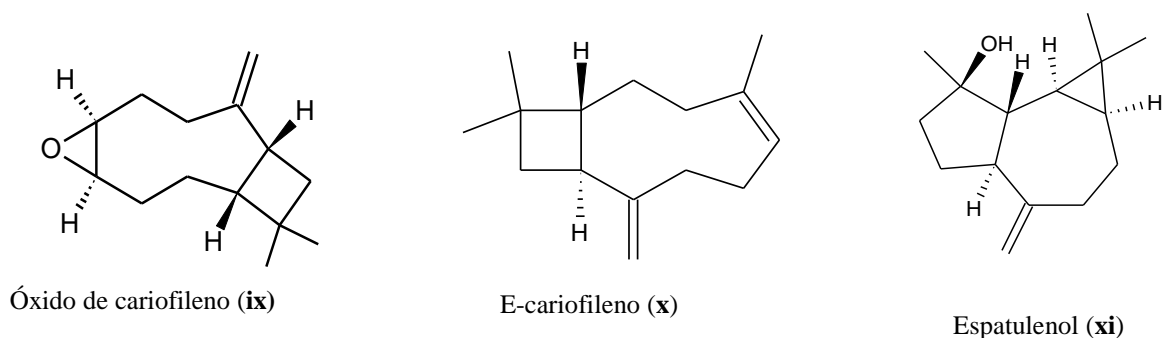
Os óleos essenciais são misturas de produtos naturais voláteis obtidos principalmente de plantas aromáticas, sendo encontrados como líquidos solúveis em solventes orgânicos e, geralmente, apresentam densidade menor que a água. Os constituintes dos óleos essenciais podem ser sintetizados por todos os órgãos da planta, como flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutos, raízes ou cascas.<sup>16</sup>

Os procedimentos de extração destes óleos são variados e, geralmente, dependem do produto desejado, infraestrutura e tempo disponíveis. Assim, alguns dos métodos de extração mais conhecidos são destilação por arraste de vapor de água, hidrodestilação, extração com fluidos supercríticos e extração com micro-ondas.

Diferentes usos são descritos para os óleos essenciais. Pela sua fragrância são utilizados pela indústria cosmética, perfumaria, alimentícia e farmacêutica.<sup>17</sup> Mas, são também conhecidas diversas propriedades medicinais, tais como antibacteriana, antifúngica, analgésica, anti-inflamatória e anticarcinogênica.<sup>17</sup> Na natureza, os óleos essenciais desempenham um papel importante na proteção das plantas contra micro-organismos, insetos e animais herbívoros, podendo atrair também alguns organismos para favorecer a dispersão de pólen e sementes.<sup>16</sup>

A característica principal dos componentes químicos dos óleos essenciais é a sua baixa massa molecular, sendo altamente voláteis. Esses constituintes são divididos geralmente em dois grupos; um grupo é constituído por terpenos e terpenoides e o segundo, por compostos aromáticos e alifáticos.<sup>16</sup> Dois ou três componentes majoritários (20-70%) podem caracterizar um óleo essencial, sendo que estes compostos determinam as suas propriedades biológicas. No entanto, a composição química pode variar de acordo com o clima, qualidade do solo, órgão da planta, idade e estágio do ciclo vegetativo.<sup>18</sup>

No caso da espécie vegetal *Solanum stipulaceum*, a composição do óleo essencial das folhas foi relatada anteriormente na literatura, tendo sido identificados os compostos óxido de cariofileno (**ix**), *E*-cariofileno (**x**) e espatulenol (**xi**) como constituintes majoritários.<sup>19</sup> Porém, propriedades biológicas para este óleo essencial ainda não foram reportadas.



**Figura 6.** Estrutura química dos compostos identificados no óleo essencial das folhas de *S. stipulaceum*.

### 3. Uso da radiação gama em plantas

O uso das plantas com fins medicinais desempenha um papel importante na atenção primária de saúde da população mundial.<sup>20</sup> No Brasil, estima-se que 82% da população utiliza produtos à base de plantas medicinais no tratamento de doenças.<sup>21</sup> Segundo projeções do Instituto Brasileiro de Plantas Medicinais (IBPM), o mercado de medicamentos fitoterápicos movimentava de 400 a 500 milhões de dólares por ano no país o que justifica o interesse em manter a qualidade físico-química e microbiológica destes produtos.<sup>22</sup>

A qualidade microbiológica e físico-química das plantas e dos produtos elaborados a partir das mesmas depende do meio onde foram cultivados, dos métodos da coleta, do processamento pós-coleta, do transporte, a forma como são embaladas e do armazenamento.<sup>23</sup> Uma alternativa que permite manter a qualidade microbiológica de alimentos e plantas medicinais após coleta é o tratamento por radiação gama.<sup>22</sup> No ano 2010, aproximadamente 400.000 toneladas de alimentos no mundo foram irradiados. O uso deste tipo de radiação tem aumentado rapidamente, pois atualmente um milhão de toneladas de alimentos por ano são irradiadas com fins de descontaminação microbiológica.<sup>24</sup>

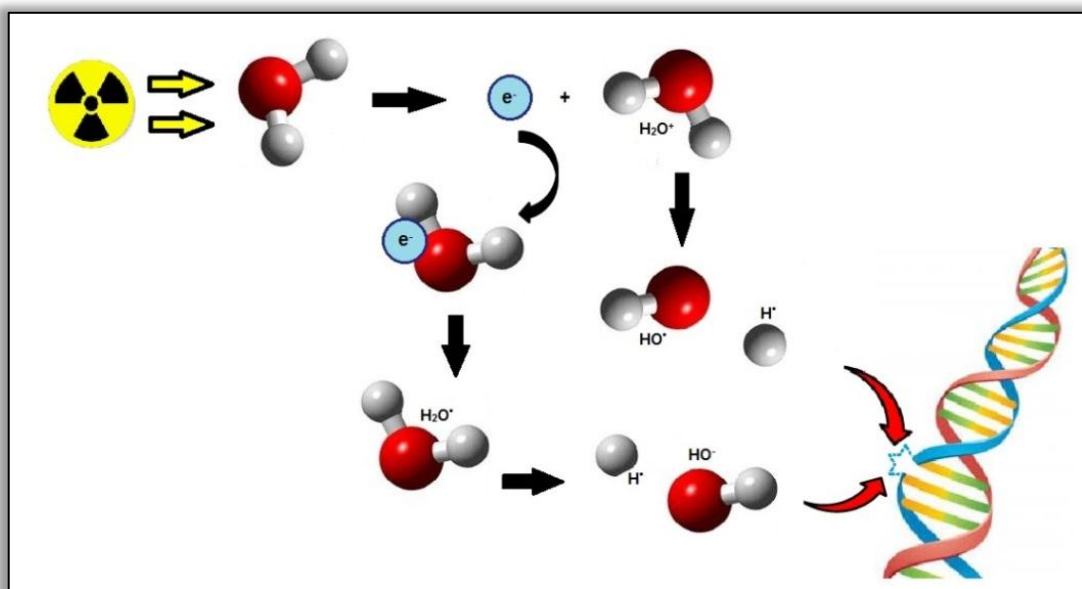
A radiação gama é um tipo de radiação ionizante com alto poder de penetração e grande quantidade de energia. Os raios gama são emitidos na região do espectro eletromagnético de menor comprimento de onda ( $<10^{-12}$  m). Este tipo de radiação é produzido pela desintegração de núcleos de Cobalto-60 ou Césio-137. Apesar de existirem outras fontes de radiação gama, somente  $^{60}\text{Co}$  e  $^{137}\text{Cs}$  são indicados para processos de irradiação com fins de esterilização.<sup>25</sup>

A radiação gama tem a capacidade de quebrar ligações químicas. Devido à alta energia que possui, pode iniciar reações em quaisquer condições de temperatura, pressão ou estado da matéria, sem o uso de catalisadores. Nos processos de esterilização, os raios gama causam a quebra do DNA bacteriano, inibindo a divisão celular, motivo pelo qual são utilizados amplamente na esterilização de produtos médico-cirúrgicos, farmacêuticos, alimentícios e cosméticos.<sup>26</sup>

Atualmente, nos processos de esterilização, a dose máxima de radiação permitida é aquela em que o objetivo de descontaminação é atingido, sem causar alterações que comprometam a qualidade do produto e a segurança do consumidor.<sup>25</sup> Segundo a Organização Mundial da Saúde a irradiação de produtos alimentícios, plantas aromáticas e especiarias, até um dose total média de 10 kGy, não apresenta nenhum risco toxicológico.<sup>27</sup>

Dentre as vantagens do uso da radiação gama para a esterilização, são incluídas a melhor garantia de esterilidade do produto, a ausência de resíduos como é o caso do óxido de etileno, maior capacidade de penetração do que outros tipos de radiação (radiação e-beam) e a ocorrência do processo ocorre a baixas temperaturas.<sup>28</sup>

A radiação gama nos organismos vivos pode atuar direta ou indiretamente. Normalmente, os efeitos indiretos são uma parte importante da ação total da radiação. Estes efeitos ocorrem pela produção de compostos radiolíticos da molécula de água que são radicais  $\cdot\text{OH}$ ,  $\cdot\text{H}$  e elétrons ( $e^-$ ). Esses radicais instáveis reagem com moléculas de DNA da célula bacteriana, podendo causar mutações ou, até mesmo, a morte celular, como mostrado na Figura 7. Também é possível a reação desses radicais com macromoléculas como proteínas ou lipídeos, compostos fundamentais para a sobrevivência celular. No entanto, há ainda dúvidas consideráveis quanto à natureza das lesões envolvidas, embora pareça certa que a letalidade ocorre principalmente como consequência de danos genéticos.<sup>26</sup>



**Figura 7.** Esquema do efeito indireto da radiação gama no DNA bacteriano.

#### **4. Efeito da radiação gama em óleos essenciais**

Apesar de o uso da radiação gama se encontrar-se amplamente disseminado para a preservação de alimentos, ervas, condimentos e produtos agrícolas, alterações nos tecidos vegetais ou nos fitoconstituintes podem ser provocadas.<sup>29-30</sup> Consequentemente, estudos sobre a estabilidade de produtos irradiados e a permanência da sua composição química e da sua

atividade farmacológica têm sido desenvolvidos nos últimos anos.<sup>31</sup> Assim, alguns autores têm apresentado especial atenção nos óleos essenciais de espécies vegetais submetidas a radiação gama. Alguns exemplos são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Estudos descritos na literatura sobre o efeito da radiação gama em óleos essenciais

<b>Espécie (Parte estudada)</b>	<b>Dose de radiação gama (kGy)</b>
<b>Estudos realizados sobre a composição</b>	
<i>Curcuma longa</i> (rizomas) <sup>32</sup>	10
<i>Eucalyptus radiata</i> (folhas) <sup>33</sup>	25
<i>Lavandula angustifolia</i> (flores) <sup>33</sup>	25
<i>Linum usitatissimum</i> (sementes) <sup>34</sup>	2,5; 4,0; 5,5 e 7,0
<i>Monodora myristica</i> (sementes) <sup>35</sup>	15
<i>Origanum vulgare</i> (folhas) <sup>36</sup>	1, 2, 3, 5, 10 e 15
<i>Piper nigrum</i> (tempero em pó) <sup>29</sup>	5, 10 e 30
<i>Thymus vulgaris thymoliferum</i> (folhas) <sup>33</sup>	25
<i>Turnera diffusa</i> (rizomas) <sup>37</sup>	5, 10, 15 e 20
<i>Zingiber montanum</i> (rizomas) <sup>30</sup>	10 e 25
<b>Estudos realizados sobre o rendimento e a composição</b>	
<i>Angelica gigas</i> Nakai (raízes) <sup>38</sup>	1, 3, 5, 10 e 20
<i>Rosmarinus officinalis</i> (tempero em pó) <sup>39</sup>	8, 12 e 17
<i>Thymus vidgaris</i> (tempero em pó) <sup>39</sup>	7, 12 e 17
<b>Estudos realizados sobre a composição e as propriedades antioxidantes</b>	
<i>Cuminum cyminum</i> (sementes) <sup>40</sup>	10 e 25
<i>Mentha piperita</i> (folhas) <sup>41</sup>	10 e 25
<i>Lavandula angustifolia</i> Mill (óleo puro) <sup>42</sup>	0,005, 0,010, 0,020 e 0,030
<b>Estudos realizados sobre a composição, a atividade antibacteriana e antioxidante</b>	
<i>Carum carvi</i> (raízes) <sup>43</sup>	10 e 20
<i>Mentha pulegium</i> (flores e folhas) <sup>44</sup>	10, 20 e 30
<i>Thymus vulgaris</i> (flores e folhas) <sup>44</sup>	10, 20 e 30
<i>Zataria multiflora</i> (partes aéreas) <sup>45</sup>	10 e 25



O efeito da radiação gama nos óleos essenciais depende de vários fatores, dentre eles, dose e taxa de radiação, espécie vegetal, parte da planta estudada, estado da amostra, temperatura de radiação e estocagem e tempo de estocagem. No caso dos óleos essenciais de *T. vulgaris*, *E. radiata*, *L. angustifolia*, *C. longa*, *M. myristica* e *Z. montanum*, o efeito da radiação na sua composição foi insignificante. No entanto, a composição dos constituintes voláteis de *T. diffusa*, *P. nigrum*, *L. usitatissimum* e *O. vulgare* foi afetada de maneira significativa pela radiação gama. Por outro lado, as propriedades biológicas dos óleos essenciais de *C. cuminum*, *M. piperita*, *L. angustifolia*, *C. carvi*, *Z. multiflora*, *T. vulgaris* e *M. pulegium* não foram afetadas significativamente pela aplicação da radiação gama.

## **CAPÍTULO II**

### **OBJETIVOS**

Este trabalho teve como objetivo geral realizar o estudo fitoquímico das folhas de *Solanum stipulaceum* Roem. & Schult e estudar a composição, efeito da radiação gama e atividade biológica dos óleos essenciais obtidos a partir das suas flores e folhas.

Como objetivos específicos, têm-se:

- Isolar os metabólitos secundários do extrato hexânico e etanólico das folhas de *S. stipulaceum*;
- Determinar a estrutura química dos metabólitos isolados, através de um estudo detalhado utilizando métodos espectroscópicos, tais como espectrometria de massas, espectroscopia de absorção na região do infravermelho e espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ ;
- Obter os óleos essenciais das flores e folhas de *S. stipulaceum*;
- Estudar a composição química e as propriedades antioxidante e antileucêmica dos óleos essenciais obtidos;
- Avaliar as alterações qualitativas e quantitativas nos óleos essenciais decorrentes do tratamento de radioesterilização do material vegetal.

**CAPÍTULO III**  
**PARTE EXPERIMENTAL**

## 1. Equipamentos

Os espectros de RMN unidimensionais e bidimensionais foram registrados em espectrofotômetro Bruker DRX-400 (400 MHz) linha *ADVANCE*.

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

As análises por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) foram realizadas em um equipamento GCMS-QP2010 ULTRA da Shimadzu.

As análises por cromatografia a gás com detector de ionização por chama (CG-FID) foram realizadas em um cromatógrafo a gás HP 7820A da Agilent.

Um irradiador Panorâmico Múltipropósito de Categoria II GammaBeam-127 modelo IR-214 Nordion, equipado com uma fonte de Cobalto-60 foi utilizado para irradiação das amostras vegetais.

Isolera™ Spektra One foi utilizada para a realização de cromatografia de coluna de média pressão (MPLC).

Espectrofotômetro de microplacas Thermo Scientific™ Multiskan™ GO foi utilizado para a leitura das microplacas do ensaio de atividade antioxidante.

Espectrofotômetro SpectraMax® M5e foi utilizado na leitura das microplacas do ensaio de atividade citotóxica.

## 2. Material vegetal

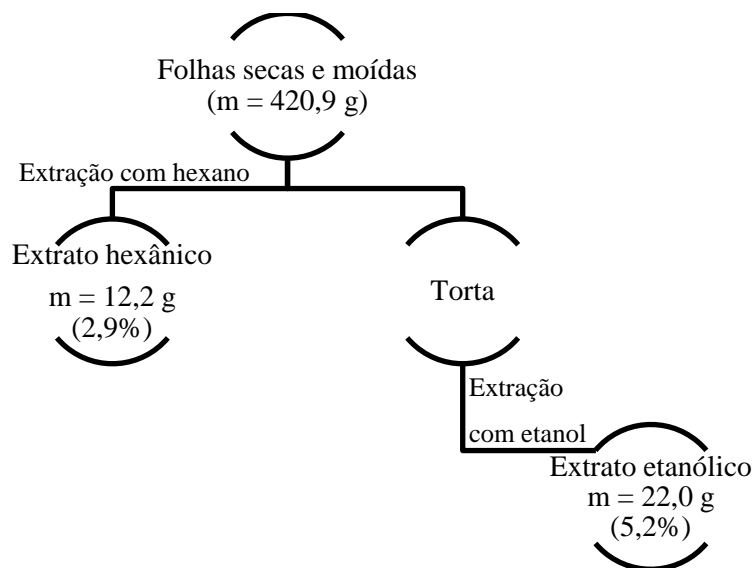
As flores e as folhas de *S. stipulaceum* foram coletadas em local aberto e ensolarado, nos arredores da cidade de Montes Claros (MG), região de cerrado, altitude 600 m, em maio (FL-M e FO-M) e em setembro (FL-S e FO-S) de 2014 pela Profa. Dr. Maria Olívia Mercadante-Simões, que fez também a identificação do material. Uma exsicata da espécie vegetal foi depositada no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o código: BHCB 169873.

## 3. Estudo fitoquímico

### 3.1. Obtenção dos extratos

As folhas de *S. stipulaceum* coletadas em maio (FO-M) foram secadas a temperatura ambiente e, em seguida, pulverizadas em moinho de martelo. Feito isso, as folhas foram submetidas à extração a frio (maceração) com hexano, repetindo-se a operação com a torta

resultante da extração a cada três dias, por três vezes. O resíduo foi então extraído com etanol, seguindo o mesmo procedimento para a extração com hexano.



### 3.2. *Elaboração dos extratos obtidos a partir das folhas de S. stipulaceum*

O extrato hexânico (EH) foi obtido como um material oleoso e verde. Uma parte do EH (4,5 g) foi separada e submetida à cromatografia líquida de meia pressão utilizando cartucho SNAP 100 g, com hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em mistura, como eluentes em ordem crescente de polaridade. Foram coletadas 200 frações de 20 mL, que posteriormente, foram reunidas em 37 grupos conforme similaridade do perfil cromatográfico observado em placas de CCD.

**Grupo EH1 (frações 7 - 10).** Foi obtido um sólido branco (331,5 mg; 2,7%) que, devido ao caráter fortemente apolar, foi submetido à análise por CG-FID (coluna: HP5 30 m × 0,32 mm × 0,25 µm; gradiente de temperatura: 200 °C, 0 min, 10 °C/min, 300 °C; injetor splitless a 300 °C; detector a 320 °C; gás de arraste: H<sub>2</sub> a 3 mL/min), sendo identificado como uma mistura de hidrocarbonetos (**SSFO-I**).

**Grupo EH18 (frações 71-75).** Foi obtido um líquido amarelo (92,1 mg) que foi submetido a uma MPLC usando cartucho SNAP Ultra 10 g com hexano, clorofórmio e metanol, puros ou em mistura, como eluentes. O subgrupo EH18-I (frações 12 a 15; 46,4 mg; 0,38%) foi submetido às análises no IV, de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C, A comparação dos dados obtidos com os da literatura levou à identificação deste subgrupo como farnesilfarnesol (**SSFO-II**).

**Grupo EH29 (frações 123-133).** Foi obtido um sólido verde escuro (721,7 mg) que foi submetido à lavagem em metanol seguida por filtração. Um sólido branco levemente esverdeado foi obtido e 9 mg deste sólido foram submetidos à cromatografia de camada delgada preparativa, usando como eluente uma mistura de clorofórmio e acetato de etila (9:1). Foram obtidas quatro frações. O subgrupo EH29-s2 (2,0 mg; 0,02%) foi submetido à análises no IV e de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ . A comparação dos dados obtidos com os da literatura levou à identificação deste subgrupo como sendo uma mistura dos esteroides  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol (**SSFO-III**).

O extrato etanólico (EE) foi obtido como um material pastoso e verde (22,0 g) e foi submetido à cromatografia de coluna de sílica filtrante com hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol puros como eluentes em ordem crescente de polaridade, sendo obtida uma fração por cada solvente de eluição. A fração diclorometânica (2,428 g) foi submetida à coluna cromatográfica de sílica com hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em mistura, como eluentes. Foram coletadas 110 frações de aproximadamente 20 mL, que posteriormente, foram reunidas em oito grupos, conforme similaridade do perfil cromatográfico observado em placas de CCD.

**Grupo EE6 (frações 64-67).** Foi obtido como um líquido amarelado (68,1 mg) que foi submetido a cromatografia de coluna com hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou em mistura, como eluentes. Foram obtidas 28 frações reunidas em três subgrupos. O subgrupo EE6-II (9,3 mg; 0,08%) foi submetido a análise de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ . A comparação dos dados obtidos com os da literatura levou à identificação deste subgrupo como sendo o bis-(2-etil-hexil) ftalato (**SSFO-IV**).

As demais frações e grupos não foram trabalhados.

## **4. Obtenção dos óleos essenciais**

### **4.1. Obtenção do óleo essencial das flores (FL-M)**

As flores de *S. stipulaceum* coletadas em maio (24,0 g) foram submetidas a hidrodestilação em aparelho Clevenger com 800 mL de água durante 5 h. A emulsão aquosa concentrada foi submetida à extração com diclorometano (DCM) e secada com sulfato de

sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). Após filtração e evaporação do solvente a temperatura ambiente, o óleo essencial foi obtido, pesado e analisado por CG-FID e CG-EM, sendo preparadas amostras de 1% (m/v) em clorofórmio para análise.

#### **4.2. Obtenção do óleo essencial das flores (FL-S)**

O procedimento 4.1 foi realizado também com as flores coletadas em setembro (20 g). O óleo essencial obtido foi analisado imediatamente por CG-FID e CG-EM.

#### **4.3. Obtenção do óleo essencial das folhas FO-S**

As folhas de *S. stipulaceum* coletadas em setembro (50 g) foram submetidas a hidrodestilação em aparelho Clevenger com 1000 mL de água durante 5 h. A emulsão aquosa concentrada foi submetida à extração com DCM e secada com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , após filtração evaporou-se o solvente a temperatura ambiente. Este procedimento de extração foi realizado em triplicata. Os óleos essenciais obtidos foram pesados e analisados por CG-FID e CG-EM, sendo preparadas amostras de 1% (m/v) em clorofórmio para análise.

### **5. Efeito da radiação gama**

#### **5.1. Irradiação do material vegetal**

Cinco amostras das flores de *S. stipulaceum* coletadas em setembro (FL-S) e colocadas em sacolas plásticas, contendo cada uma 20 g, foram submetidas a radiação gama a doses de 1,0, 2,5, 5,0, 10,0 e 20,0 kGy (FL-S<sub>1</sub>, FL-S<sub>2,5</sub>, FL-S<sub>5</sub>, FL-S<sub>10</sub> e FL-S<sub>20</sub>, respectivamente).

Por sua vez, quinze amostras das folhas de *S. stipulaceum* coletadas em setembro (FO-S) e colocadas em sacolas plásticas, contendo cada uma 50 g, foram irradiadas às mesmas doses de radiação gama obtendo as amostras: FO-S<sub>1</sub>, FO-S<sub>2,5</sub>, FO-S<sub>5</sub>, FO-S<sub>10</sub> e FO-S<sub>20</sub>. A disponibilidade de material vegetal permitiu realizar a irradiação das folhas em triplicata.

A irradiação do material vegetal foi realizada a temperatura ambiente e a dose de radiação absorvida foi controlada pelo tempo de exposição de cada amostra à fonte. Este procedimento foi realizado no Laboratório de Irradiação Gama do Centro de Tecnologia Nuclear de Belo Horizonte em colaboração com o Dr. Marcio Tadeu Pereira.

#### **5.2. Obtenção dos óleos essenciais das flores irradiadas**

Os óleos essenciais das flores irradiadas de *S. stipulaceum* foram obtidos através de hidrodestilação com 800 mL de água durante 5 h, utilizando aparelho do tipo Clevenger. Cada emulsão aquosa concentrada foi submetida à extração com DCM, secada com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro,



filtrada e o solvente evaporado a temperatura ambiente. Os óleos essenciais (líquidos viscosos e amarelados) foram pesados e analisados por CG-FID e CG-EM, sendo preparadas amostras de 1% (m/v) em clorofórmio para análise.

### **5.3. Análise por Ressonância Paramagnética Eletrônica das folhas (RPE)**

Cinco amostras contendo cada uma 1,0 g de folhas secas e moídas, coletadas em setembro (FO-S), foram submetidas a radiação gama a doses de 1,0, 2,5, 5,0, 10,0 e 20,0 kGy (FO-S<sub>1</sub>, FO-S<sub>2,5</sub>, FO-S<sub>5</sub>, FO-S<sub>10</sub> e FO-S<sub>20</sub>, respectivamente), sendo que a dose absorvida foi controlada segundo a distância da amostra à fonte, mantendo o tempo de irradiação igual para todas as amostras. Para a obtenção do espectro, as amostras foram introduzidas em tubos de quartzo de 3 mm de diâmetro interno e os espectros de RPE foram obtidos a temperatura ambiente no Laboratório de Ressonância Magnética do Departamento de Física da Universidade Federal de Minas Gerais em colaboração com o Professor Dr. Klaus Wilhelm Heinrich Krambrock.

### **5.4. Obtenção dos óleos essenciais das folhas irradiadas**

Os óleos essenciais das folhas de *S. stipulaceum* irradiadas foram obtidos através de hidrodestilação com 1000 mL de água durante 5 h, utilizando aparelho do tipo Clevenger. Cada emulsão aquosa concentrada foi submetida à extração com DCM, secada com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrada e o solvente evaporado a temperatura ambiente. Os óleos foram pesados e analisados por CG-FID e CG-EM, sendo preparadas amostras de 1% (m/v) em clorofórmio para análise.

## **6. Cálculo do rendimento da extração**

O rendimento da extração dos óleos essenciais foi calculado segundo a Equação 1:

$$\text{Rendimento \% óleo} = \frac{\text{Massa de óleo essencial}}{\text{Massa de material vegetal}} \times 100 \quad (1)$$

## **7. Análises por cromatografia a gás**

As análises por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) foram realizadas usando uma coluna Rxi-1MS (Restek) 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm com gradiente de temperatura: 70 °C (2 min), 5 °C/min até 250 °C. Injetor (“Split” de 1:10) a 250 °C. Volume de injeção foi 1 µL. Hélio foi usado como gás de arrastre com fluxo de 1,5

mL/min. A temperatura da interface CG-EM e do detector foi 260 °C. Os espectros de massas foram obtidos a 70 eV.

Os dados obtidos foram analisados usando o software GCMSolutions (Shimadzu) e a identificação foi realizada pela comparação do espectro de fragmentação dos compostos relativos aos picos obtidos na cromatografia com aqueles espectros de massas do banco de dados NIST11.

A análise por cromatografia a gás com detector de ionização de chama (CG-FID) foi realizada usando uma coluna HP5 (Agilent) 30 m x 0,32 mm x 0,25 µm com gradiente de temperatura: 70 °C até 250 °C a 3 °C/min. Injetor (“Split” de 1:30) a 250 °C. Volume de injeção foi 1 µL. Hidrogênio foi usado como gás de arraste com fluxo de 1,5 mL/min. A temperatura do detector FID foi 260 °C. Os dados obtidos foram analisados usando o software EZChrom Elite (Agilent).

Os constituintes químicos do óleo essencial foram identificados através do índice de retenção linear baseado no método de Kováts<sup>46</sup> para condições não isotérmicas utilizando a definição de Van Den Dool e Kratz<sup>47</sup>. A Equação 2 foi usada para o cálculo do índice de retenção linear cada composto:

$$I = 100 \times \left[ n + (N - n) \frac{t'_r - t_{r(n)}}{t_{r(N)} - t_{r(n)}} \right] \quad (2)$$

Onde,

I: Índice de retenção linear de Van den Dool e Kratz.

n: Número de átomos de carbono do menor *n*-alcano.

N: Número de átomos de carbono do maior *n*-alcano.

$t_{r(n)}$ : Tempo de retenção do menor *n*-alcano.

$t_{r(N)}$ : Tempo de retenção do maior *n*-alcano.

$t'_r$ : Tempo de retenção do composto a identificar.

## 8. Avaliação da atividade citotóxica

A atividade citotóxica dos óleos essenciais obtidos a partir das flores e folhas de *S. stipulaceum* foi avaliada pelo ensaio colorimétrico do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). Nesse ensaio foram utilizadas células tumorais de leucemia promielocítica aguda humana ATCC# CCL-240 (HL-60), leucemia monocítica aguda ATCC# TIB-202 (THP-1) e células normais de fibroblastos de pulmão ATCC# CCL-95.1 (Wi-26VA4). As células foram colocadas em microplacas de 96 poços (2x10<sup>5</sup> células/poço) e

incubadas durante 24 h a 37 °C em uma atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse tempo, os poços foram lavados com o meio de cultura (RPMI-1640 + 20 % de soro fetal bovino inativado + 2 mM de L-glutamina) e incubados com os óleos essenciais a concentrações entre 0,1 e 100 µg/mL. Após 48 h de incubação, as microplacas foram tratadas com MTT (5 mg/mL). A leitura colorimétrica foi realizada a 550 nm. O experimento foi realizado em triplicata. A citotoxicidade foi determinada como porcentagem de redução na absorbância *versus* células de controle não tratadas. Os resultados são apresentados como a média do CI<sub>50</sub> (concentração do óleo que reduz a viabilidade celular a 50%), esse dados foram calculados através do software OriginPro 8.0 (OriginLab Corporation).

Esses experimentos foram realizados pela doutoranda Fernanda Cristina Gontijo Evangelista no Laboratório de Hematologia Clínica e Molecular do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia em colaboração com o Professor Dr. Adriano de Paula Sabino.

## 9. Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos óleos essenciais obtidos a partir das folhas de *S. stipulaceum* foi avaliada pelo método de captura do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) de acordo com a metodologia proposta por Mensor e colaboradores<sup>48</sup> com algumas modificações. Soluções de cada óleo essencial com concentração igual a 10 mg/mL foram preparadas em metanol. Diluições sucessivas 1:2 foram realizadas em microplacas de 96 poços, obtendo-se concentrações do óleo essencial desde 5 mg/mL até 0,078 mg/mL. 40 µL de uma solução 0,2 mM de DPPH em metanol foram adicionados a cada solução de ensaio. Metanol e solução do óleo essencial foram usados como branco e solução de DPPH e metanol foram usados como controle. Esses ensaios foram realizados em triplicata. Uma solução de ácido ascórbico a 0,5 mg/mL em metanol foi empregada como controle positivo. Após 30 min de reação a temperatura ambiente e ausência de luz, a absorbância foi medida a 517 nm. Esses experimentos foram realizados no Laboratório de Químico e Bioprospecção de Plantas do Cerrado, no Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais em colaboração com a Professora Dra. Lúcia Pinheiro Santos Pimenta.

A porcentagem de atividade antioxidante de cada solução de óleo essencial foi calculada segundo a Equação 3:

$$\%AA = 100 - \left[ \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100}{Abs_{controle}} \right] \quad (3)$$

A partir das curvas de concentração do óleo essencial *versus* porcentagem de atividade antioxidante foram calculados os valores da concentração efetiva 50 (CE<sub>50</sub>), que é a concentração do óleo em que 50% do radical DPPH é reduzido. Estes valores foram calculados através de regressão não linear usando o pacote estatístico GraphPad Prism.<sup>49</sup>

## **10. Análise estatística**

O efeito da radiação gama sobre o rendimento e a composição do óleo essencial das folhas de *Solanum stipulaceum* foi avaliado através de uma análise de variância (ANOVA) a um nível de significância  $p < 0,05$  usando o pacote estatístico SPSS14 para Windows.

Esta análise foi realizada apenas para as folhas devido à disponibilidade do material vegetal para irradiação.

**CAPÍTULO V**

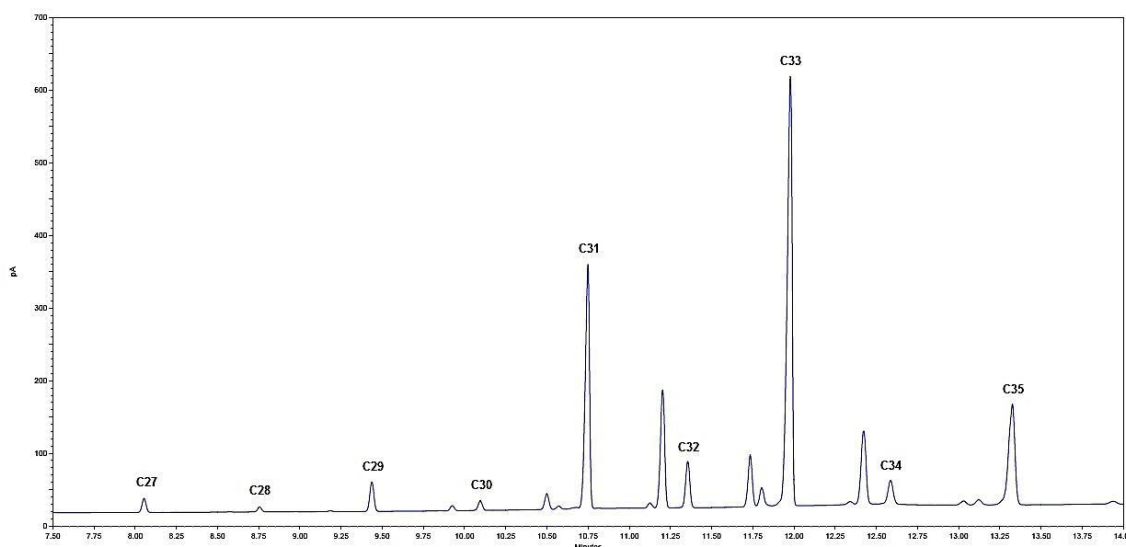
**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

**ESTUDO FITOQUÍMICO DAS FOLHAS**

## 1. Análise estrutural

### 1.1. SSFO-I

A amostra SSFO-I foi isolada como um sólido branco após a primeira coluna de fracionamento do extrato hexânico, sendo identificada como uma mistura de hidrocarbonetos após análise por CG-FID e CG-EM. A Figura 8 apresenta o cromatograma de CG-FID da amostra SSFO-I, no qual foram identificados hidrocarbonetos desde vinte e sete até trinta e cinco átomos de carbono, após comparação dos tempos de retenção dos picos no cromatograma com o tempo de retenção de padrões de hidrocarbonetos saturados.



**Figura 8.** Cromatograma de CG-FID da amostra SSFO-I.

A Tabela 2 apresenta a composição porcentual dos hidrocarbonetos identificados na amostra SSFO-I, tendo sido possível a identificação do 75,62% da composição total da amostra.

**Tabela 2.** Composição de hidrocarbonetos na amostra SSFO-I

Hidrocarboneto	$C_nH_{2n+2}$ n	TR (min)	% Área
Heptacosano	27	8,092	0,99
Octacosano	28	8,793	0,36
Nonacosano	29	9,475	2,09
Triacotano	30	10,134	0,73
Hentriacotano	31	10,788	18,07
Dotriacotano	32	11,393	3,40
Tritriacotano	33	12,016	36,10
Tetratriacontano	34	12,625	2,86
Pentatriacontano	35	13,364	11,02
<b>% Total identificado</b>			<b>75,62</b>

## 1.2. SSFO-II

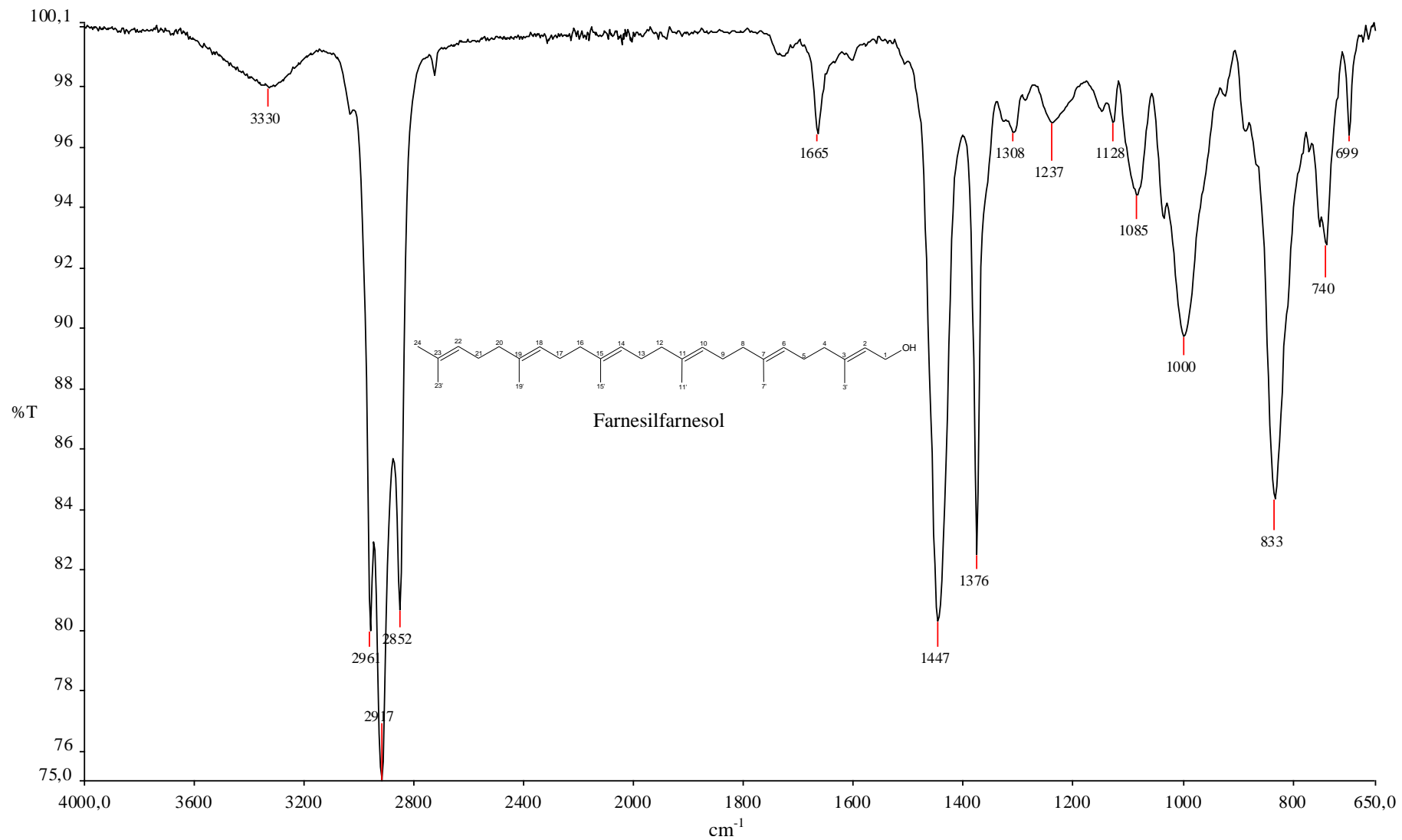
A amostra SSFO-II foi isolada após fracionamento por MPLC, obtendo-se um óleo amarelado, que foi analisado por infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear (RMN).

O espectro na região do infravermelho de SSFO-II é apresentado na Figura 9 (pág. 25), no qual é observada uma absorção em  $3330\text{ cm}^{-1}$  atribuída à deformação axial da ligação O-H. As bandas de absorção na região de  $2961 - 2852\text{ cm}^{-1}$ , em  $1447\text{ cm}^{-1}$  e  $1376\text{ cm}^{-1}$  foram atribuídas à deformação axial da ligação C-H de grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ . A absorção em  $1665\text{ cm}^{-1}$  foi atribuída ao estiramento de ligação dupla C=C de alqueno trissubstituído. A absorção em  $1000\text{ cm}^{-1}$  foi associada com o estiramento da ligação C-O de álcool primário. A absorção em  $833\text{ cm}^{-1}$  foi atribuída ao dobramento da ligação C-H para alqueno trissubstituído. Por fim, a absorção em  $740\text{ cm}^{-1}$  foi associada com o dobramento dos grupos  $\text{CH}_2$  no plano.<sup>50</sup>

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 10, pág. 26) apresenta um sinal tripleto ( $J=14,4\text{ Hz}$ ) em  $\delta_{\text{H}} 5,45$  integrando para um átomo de hidrogênio que foi atribuído ao H-2 do farnesilfarnesol. O sinal simpleto em  $\delta_{\text{H}} 5,12$  corresponde a átomos de hidrogênio olefínicos. O sinal duplete ( $J = 16\text{ Hz}$ ) em  $\delta_{\text{H}} 4,09$  foi atribuído ao H-1. O sinal multiplete em  $\delta_{\text{H}} 2,04$  foi atribuído aos átomos de hidrogênio dos grupos  $\text{CH}_2$  do farnesilfarnesol. Os sinais simpletos em  $\delta_{\text{H}} 1,75$ ,  $1,68$  e  $1,60$  foram atribuídos a grupos  $\text{CH}_3$ .

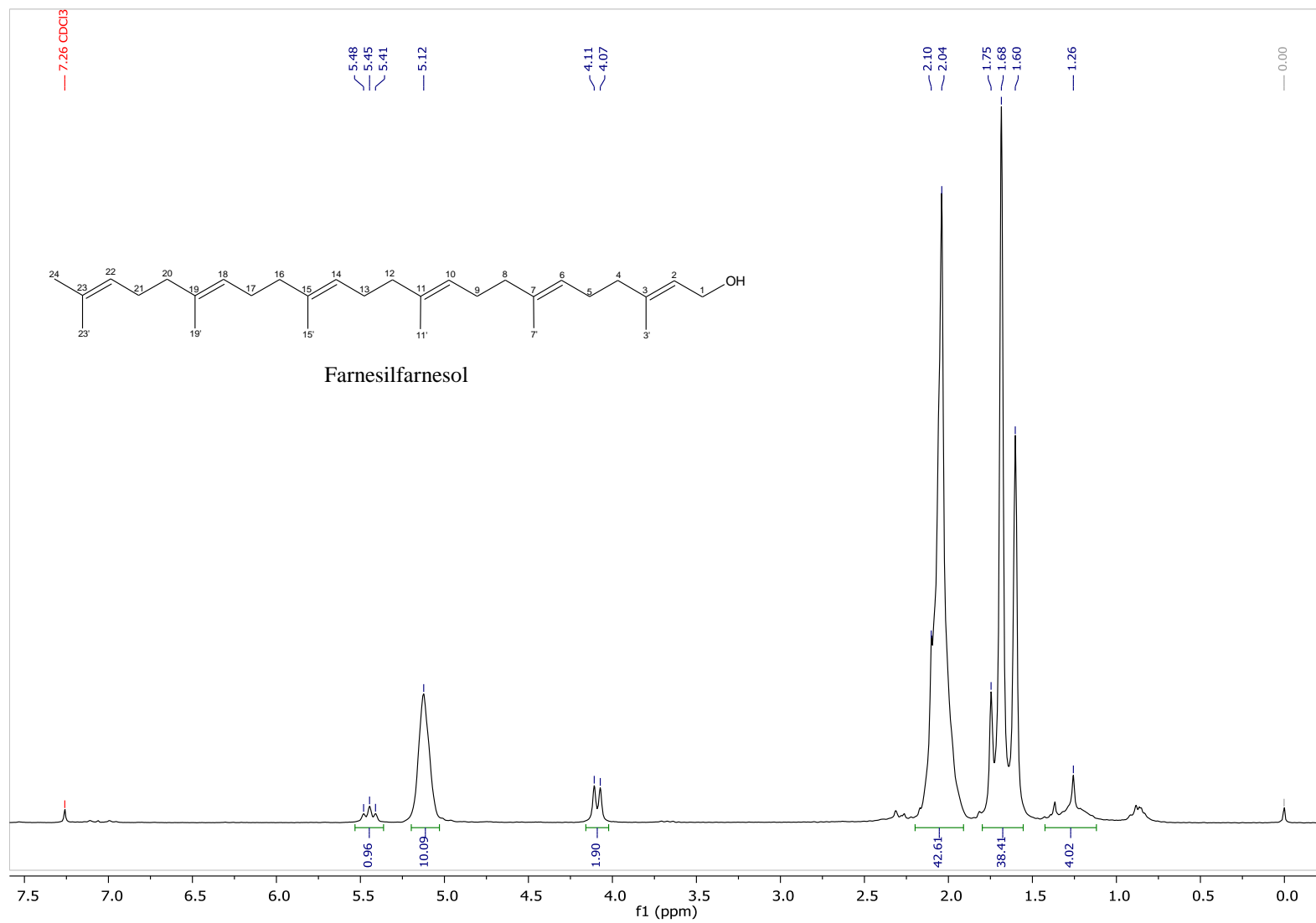
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e o subespectro DEPT  $135^\circ$  (Figura 11, pág. 27) mostram sinais de carbono não hidrogenado em  $\delta_{\text{C}} 140,09$ ,  $136,29$ ,  $135,58$ ,  $135,49$ ,  $135,10$  e  $131,46$ . Na região de  $\delta_{\text{C}} 125,23$  a  $124,35$  são observados sinais correspondentes aos átomos de carbono olefínicos. Um sinal em  $\delta_{\text{C}} 59,22$  correspondente a um átomo de carbono metilênico ligado a oxigênio. Sinais de átomos de carbono de grupos metilênicos ( $\text{CH}_2$ ) são observados em  $\delta_{\text{C}} 39,94$ ,  $32,42$ ,  $26,98$ ,  $26,88$ ,  $26,61$  e  $26,52$ . Por fim, os sinais dos grupos metila são observados em  $25,91$ ,  $23,66$ ,  $17,9$  e  $16,21$ .

A atribuição dos sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  e de  $^1\text{H}$  foi realizada conforme comparação com dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e de  $^1\text{H}$  descritos na literatura para o composto farnesilfarnesol como mostrado na Tabela 3 (pág. 28).

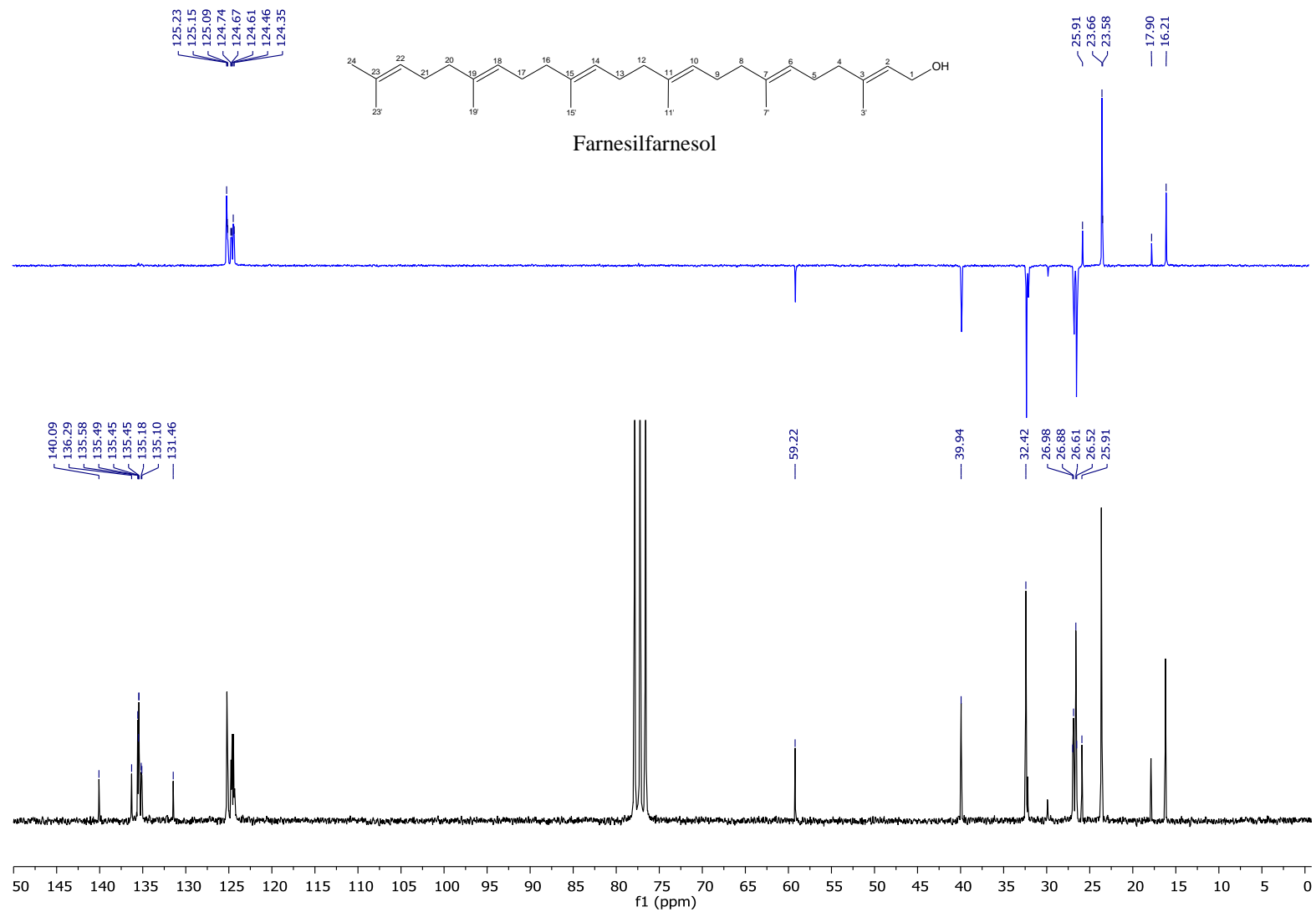


**Figura 9.** Espectro de absorção na região do infravermelho de SSFO-II (ATR).





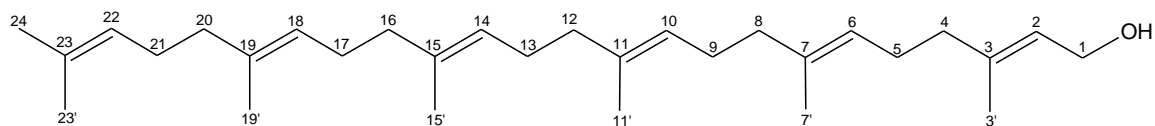
**Figura 10.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de SSFO-II (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>).



**Figura 11.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e subspectro DEPT-135° de SSFO-II (100 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).

**Tabela 3.** Atribuição dos sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  e de  $^1\text{H}$  de SSFO-II a partir dos dados de RMN de farnesilfarnesol descritos na literatura<sup>50</sup>

Carbono	SSFO-II (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	Literatura (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	Hidrogênio	SSFO-II (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	Literatura (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ )
C-1	59,24	59,5	H-1	5,41 - 5,48	5,38 - 5,42 (t, $J = 6,8$ Hz)
C-2	124,38	123,4	H-2	4,09	4,13 (d, $J = 6,8$ Hz)
C-3	135,13	135,1	-	-	-
C-3'	17,89	17,7	H-3'	1,60	1,60 (s)
C-4'	39,97	39,8	H-4	2,04 - 2,10	2,01 - 2,08 (m)
C-5'	26,64	26,4	H-5		
C-6'	124,48	123,8	H-6	5,09 - 5,15	5,11 - 5,17 (m)
C-7	135,47	135,0	-	-	-
C-7'	16,21	16,1	H-7'	1,60	1,60 (s)
C-8	39,97	39,8	H-8	2,04 - 2,10	2,01-2,08 (m)
C-9	26,64	26,7	H-9		
C-10	125,09	124,2	H-10	5,09 - 5,15	5,11 - 5,17 (m)
C-11	135,47	135,0	-	-	-
C-11'	16,21	16,1	H-11'	1,60	1,60 (s)
C-12	39,97	39,8	H-12	2,04 - 2,10	2,01-2,08 (m)
C-13	26,64	26,8	H-13		
C-14	125,15	124,3	H-14	5,09 - 5,15	5,11 - 5,17 (m)
C-15	135,60	135,8	-	-	-
C-15'	16,21	16,1	H-15'	1,60	1,60 (s)
C-16	39,97	39,8	H-16	2,04 - 2,10	2,01-2,08 (m)
C-17	26,90	29,8	H-17		
C-18	125,22	124,5	H-18	5,09 - 5,15	5,11 - 5,17 (m)
C-19	140,09	138,8	-	-	-
C-19'	16,21	16,1	H-19'	1,60	1,60 (s)
C-20	39,97	39,8	H-20	2,04 - 2,10	2,01-2,08 (m)
C-21	26,90	*	H-21		
C-22	125,22	124,5	H-22	5,09 - 5,15	5,11 - 5,17 (m)
C-23	135,10	131,3	-	-	-
C-23'	16,21	16,1	H-23'	1,68	1,68 (s)
C-24	25,94	25,7	H-24	1,68	1,68 (s)



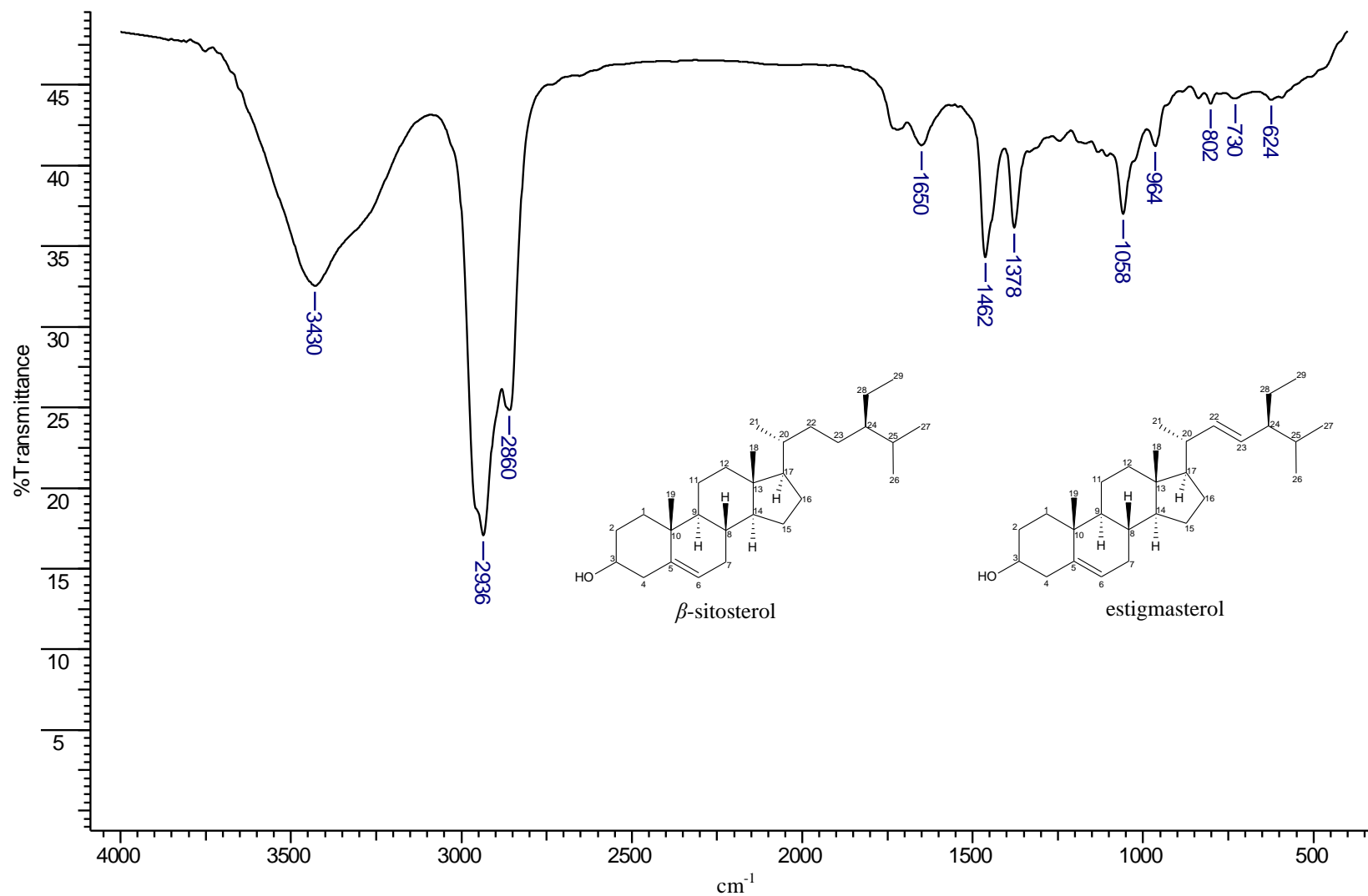
### 1.3. SSFO-III

A amostra SSFO-III foi isolada após lavagem com metanol do grupo EH29 e cromatografia de camada delgada preparativa como um sólido branco, o qual foi identificado como sendo uma mistura de  $\beta$ -sitosterol (a) e estigmasterol (b) após análise dos espectros de RMN.

O espectro de absorção no infravermelho de SSFO-III (Figura 12, pág. 30) mostra uma banda de absorção em  $3430\text{ cm}^{-1}$  atribuída à deformação axial da ligação O-H, em acordo com a absorção em  $1058\text{ cm}^{-1}$  atribuída ao estiramento da ligação C-O. As bandas de absorção na região de  $3000 - 2800\text{ cm}^{-1}$ , em  $1462\text{ cm}^{-1}$  e  $1378\text{ cm}^{-1}$  foram atribuídas à deformação axial da ligação C-H de grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ .

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de SSFO-III apresentado na Figura 13 (pág. 31) mostra um sinal duplete em  $\delta_{\text{H}} 5,35$  ( $J=5,2$ ) que foi atribuído ao átomo de hidrogênio olefínico  $\text{H}_6$  do  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol. Os sinais duplos dupletos em  $\delta_{\text{H}} 5,16$  ( $J = 8,8$  e  $15,2$  Hz) e  $\delta_{\text{H}} 5,02$  ( $J = 8,8$  e  $15,6$  Hz) foram atribuídos aos átomos de hidrogênio olefínicos H-22 e H-23 do estigmasterol. O sinal multiplete entre  $\delta_{\text{H}} 3,56$  e  $3,48$  foi atribuído ao átomo de hidrogênio carbinólico H-3 do  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol. Os vários sinais na região em  $\delta_{\text{H}} 2,40 - 0,60$  foram atribuídos aos átomos de hidrogênio alifáticos de ambos os esteroides.

A Figura 14 (pág. 32) apresenta o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e o subespectro DEPT, os quais mostram os sinais característicos de átomos de carbono alquenílicos em  $\delta_{\text{C}} 140,61$  (C) e  $121,74$  (CH), atribuídos a C-5 e C-6 do  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol, respectivamente. Os sinais em  $\delta_{\text{C}} 138,33$  e  $129,33$  (CH) foram atribuídos respectivamente a C-22 e C-23 do estigmasterol. Os demais sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram atribuídos conforme comparação com dados na literatura de RMN de  $^{13}\text{C}$  do  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol como mostrado na Tabela 4 (pág. 33).



**Figura 12.** Espectro de absorção na região do infravermelho de SSFO-III (KBr).

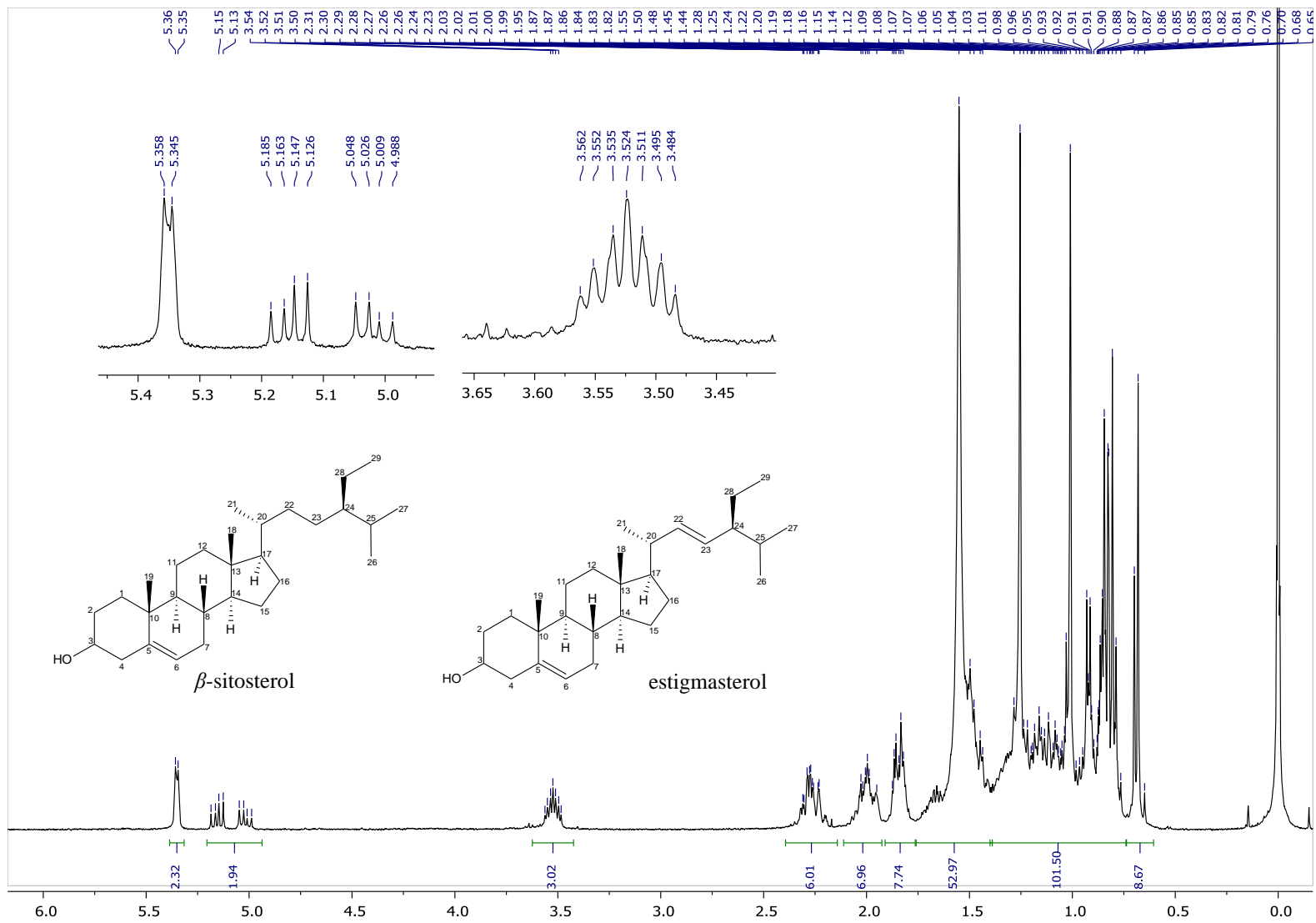
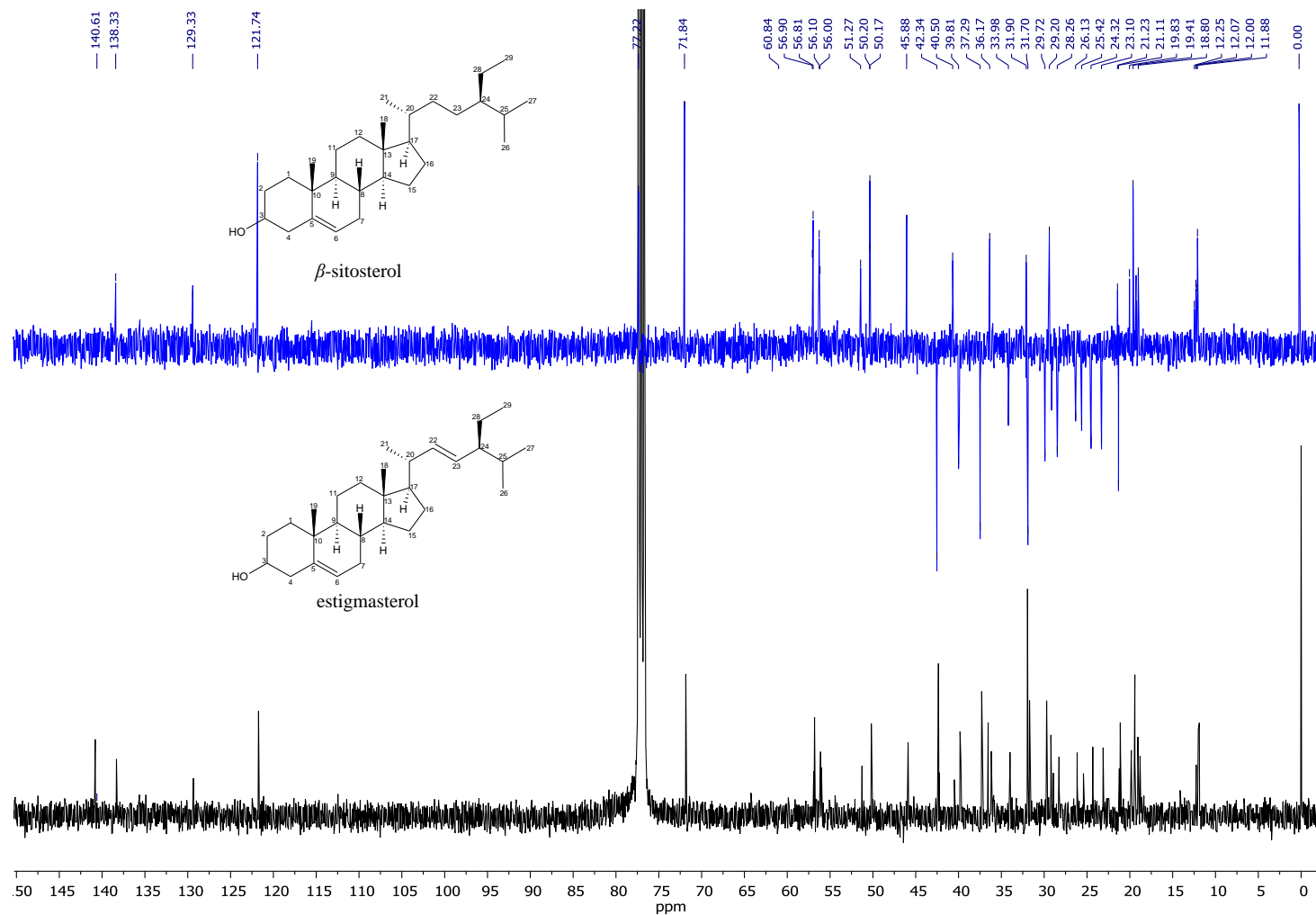


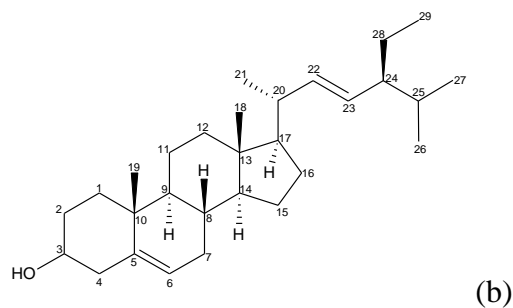
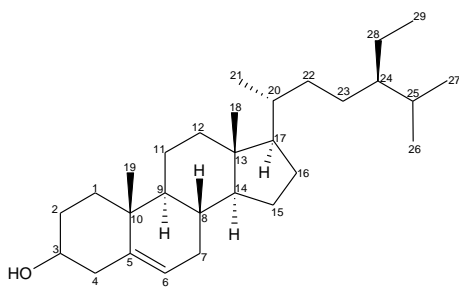
Figura 13. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de SSFO-III (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>).



**Figura 14.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e subespectro DEPT 135° de SSFO-III (100 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).

**Tabela 4.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de SSFO-III e de  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol descritos na literatura<sup>51</sup>

Átomo	SSFO-III (a) (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	$\beta$ -Sitosterol (150 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	SSFO-III (b) (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	Estigmasterol (150 MHz, $\text{CDCl}_3$ )
C-1	37,29	37,24	37,29	37,24
C-2	31,71	31,65	31,71	31,65
C-3	71,84	71,80	71,84	71,80
C-4	42,35	42,28	42,35	42,29
C-5	140,80	140,74	140,80	140,74
C-6	121,73	121,71	121,73	121,71
C-7	31,95	31,88	31,95	31,89
C-8	31,71	31,90	31,71	31,89
C-9	50,19	50,14	50,19	50,15
C-10	36,54	36,49	36,54	36,49
C-11	21,11	21,07	21,11	21,07
C-12	39,82	39,75	39,82	39,69
C-13	42,35	42,28	42,35	42,20
C-14	56,81	56,75	56,81	56,76
C-15	24,33	24,29	24,33	24,35
C-16	28,26	28,24	28,92	28,91
C-17	56,11	56,03	56,11	55,94
C-18	11,88	11,97	12,07	12,03
C-19	19,41	19,38	19,41	19,39
C-20	36,17	36,13	40,49	40,48
C-21	18,80	18,76	21,11	21,07
C-22	34,00	33,93	138,32	138,31
C-23	26,15	26,04	129,33	129,26
C-24	45,89	45,82	51,27	51,23
C-25	29,21	29,13	31,95	31,90
C-26	19,06	19,02	21,23	21,20
C-27	19,83	19,81	19,00	18,97
C-28	23,12	23,05	25,41	25,40
C-29	12,00	11,84	12,25	12,24



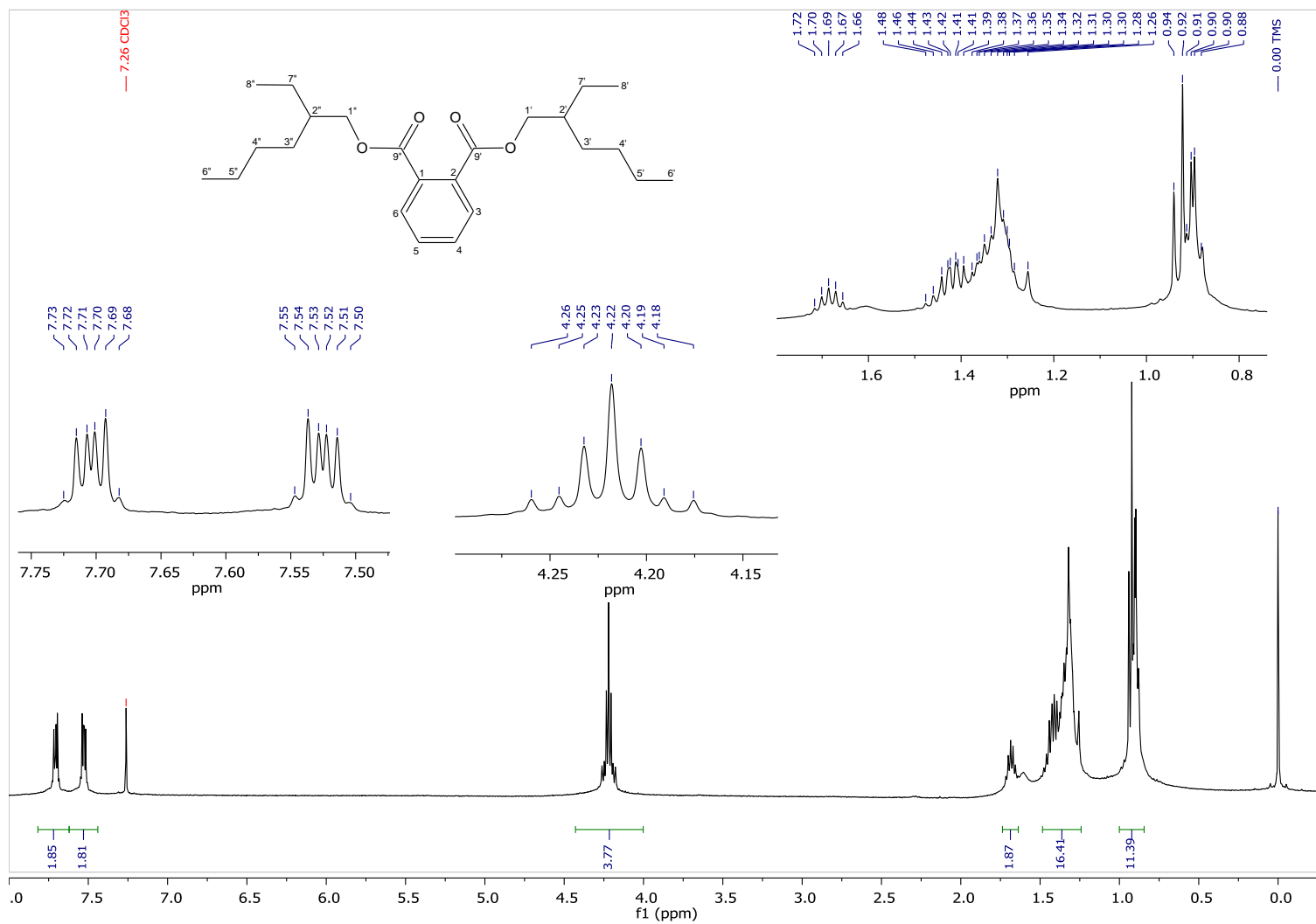


#### 1.4. SSFO-IV

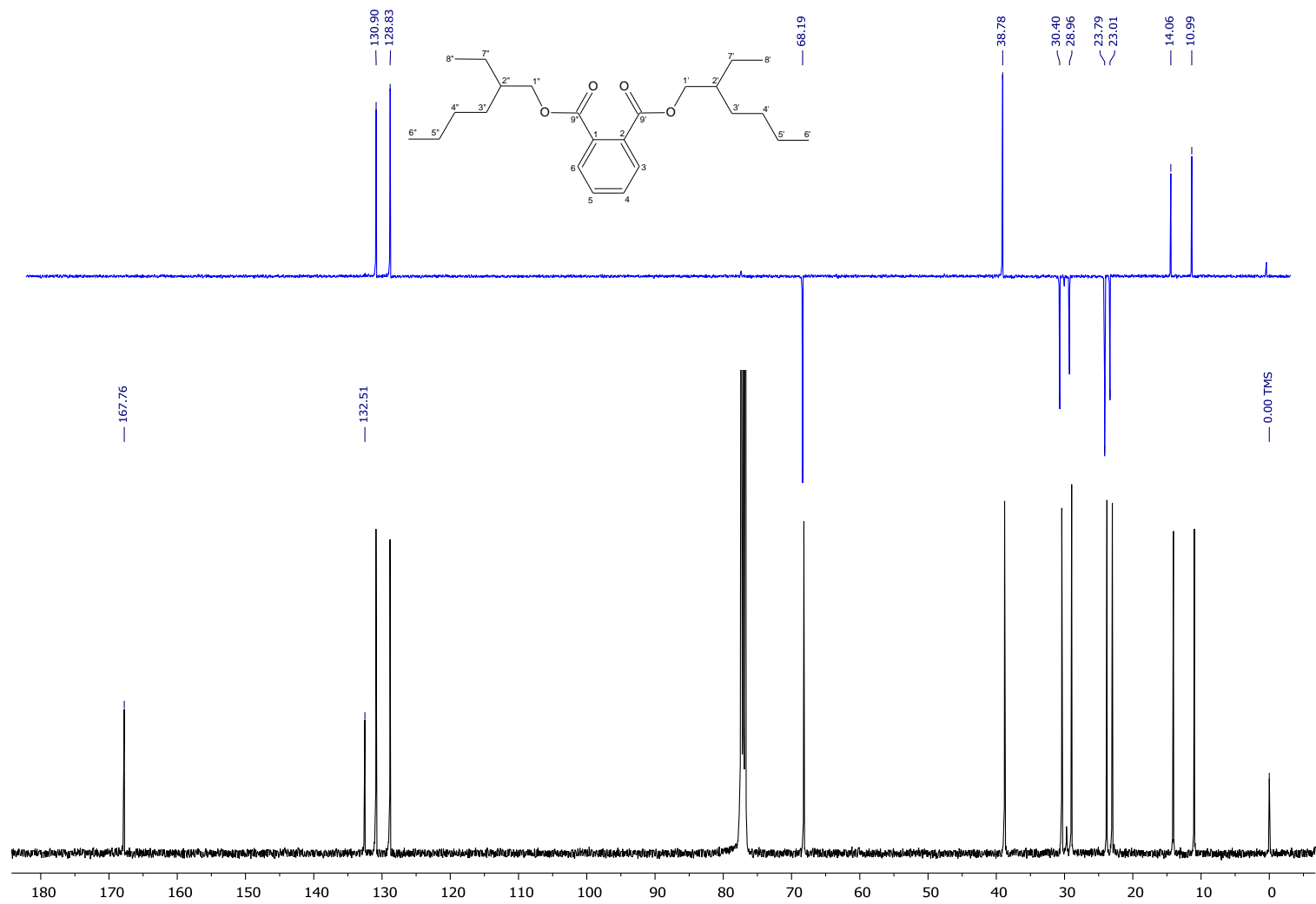
A amostra SSFO-IV foi isolada da fração em diclorometano do extrato etanólico das folhas de *S. stipulaceum* após sucessivos fracionamentos em coluna de sílica gel, como um sólido incolor de aparência oleosa, sendo identificado como bis-(2-etil-hexil)ftalato pela análises dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e comparação com dados da literatura.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de SSFO-IV (Figura 15, pág. 35) mostra dois sinais duplos dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  7,71 ( $J = 4$  e 8 Hz) e 7,53 ( $J = 4$  e 8 Hz) característicos de átomos de hidrogênio aromáticos em anel *orto* substituído, em que cada sinal integra para dois átomos de hidrogênio. O sinal multipletto desblindado em  $\delta_{\text{H}}$  4,22 foi atribuído a quatro átomos de hidrogênio ligado a carbono oxigenado ( $2 \times \text{OCH}_2$ ). O sinal multipletto em  $\delta_{\text{H}}$  1,69, que integra para dois átomos de hidrogênio, foi atribuído a dois grupos metínicos. O sinal multipletto em  $\delta_{\text{H}}$  1,48 a 1,26, que integra para 16 átomos, corresponde a átomos de hidrogênio de grupos alifáticos ( $\text{CH}_2$ ). Por fim, dois sinais triplete em  $\delta_{\text{H}}$  0,92 ( $J = 7,6$  Hz) e em  $\delta_{\text{H}}$  0,90 ( $J = 6,8$  Hz), integrando para seis átomos de hidrogênio cada, foram atribuídos a dois grupos metila terminais não equivalentes.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e o subespectro DEPT  $135^\circ$  (Figura 16, pág. 36) mostram um sinal de carbono não hidrogenado em  $\delta_{\text{C}}$  167,76 que foi atribuído a carbono carbonílico de grupo éster ( $\text{C}=\text{O}$ ). Os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  132,51, 130,90 e 128,83 correspondem a átomos de carbono aromáticos, para os quais as multiplicidades foram observadas no subespectro DEPT como C, CH e CH, respectivamente. O sinal desblindado em  $\delta_{\text{C}}$  68,19 ( $\text{CH}_2$ ) foi atribuído aos grupos  $\text{OCH}_2$ , enquanto o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  38,78 (CH) foi atribuído aos átomos de carbono metínicos. Os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  30,40, 28,96, 23,79 e 23,01 foram atribuídos a átomos de carbono metilénicos ( $\text{CH}_2$ ) enquanto os átomos de carbono dos grupos metila foram observados em  $\delta_{\text{C}}$  14,05 e 10,98. A maioria dos sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  foi atribuída conforme comparação com dados na literatura de RMN de  $^{13}\text{C}$  para o bis(2-etil-hexil)ftalato (Tabela 5, pág. 37).



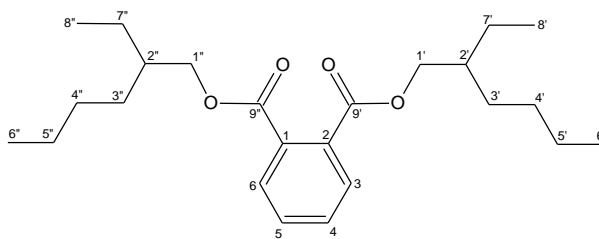
**Figura 15.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de SSFO-IV (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 16.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e subespectro DEPT-135° de SSFO-IV (100 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).

**Tabela 5.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  de SSFO-IV e de bis-(2-etil-hexil) ftalato descritos na literatura<sup>52</sup>

Carbono	SSFO-IV (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	Bis-(2-etil- hexil) ftalato (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	Hidrogênio	SSFO-IV (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	Bis-(2-etil-hexil) ftalato (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ )
C-1 e C-2	132,51	132,19	Carbono não hidrogenado		
C-3 e C-6	130,90	130,49	H-3 e H-6	7,71	7,68
C-4 e C-5	128,83	128,48	H-4 e H-5	7,53	7,53
C-1' e C-1''	68,19	67,73	H-1' e H-1''	4,22	4,20
C-2' e C-2''	38,78	38,46	H-2' e H-2''	1,69	1,69 - 1,65
C-3' e C-3''	30,41	-	H-3' e H-3''	1,48 - 1,26	1,31 - 1,24
C-4' e C-4''	28,96	-	H-4' e H-4''	1,31 - 1,29	-
C-5' e C-5''	23,00	-	H-5' e H-5''	1,31 - 1,29	-
C-6' e C-6''	14,05	13,78	H-6' e H-6''	0,90	0,79
C-7' e C-7''	23,79	-	H-7' e H-7''	1,48 - 1,26	1,24 - 1,31
C-8' e C-8''	10,98	10,38	H-8' e H-8''	0,92	0,84
C-9' e C-9''	167,76	167,28	Carbono não hidrogenado		



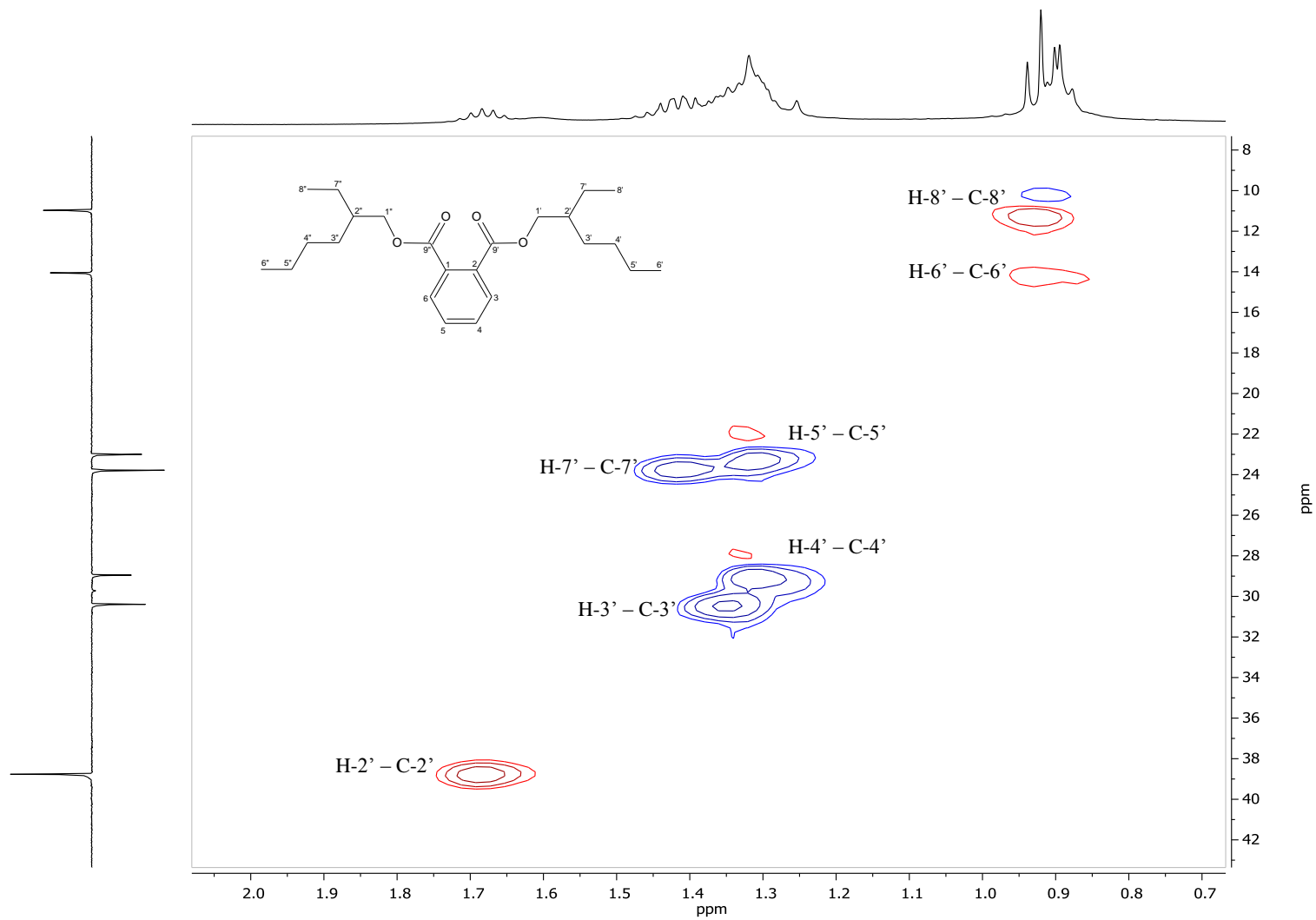
Para complementar as atribuições da literatura foi realizada uma análise detalhada dos mapas de contornos heteronucleares de SSFO-IV.

A expansão do mapa de contornos HSQC é apresentada na Figura 17 (pág. 39). O sinal de hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  1,69 (H-2') correlaciona-se com o sinal de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  38,79 (C-2'). As correlações dos grupos metilênicos foram observadas em  $\delta_{\text{H}}$  1,35 e  $\delta_{\text{C}}$  30,41 (H-3' – C-3'),  $\delta_{\text{H}}$  1,31 e  $\delta_{\text{C}}$  28,96 (H-4' – C-4'),  $\delta_{\text{H}}$  1,41 e  $\delta_{\text{C}}$  23,79 (H-7' – C-7'),  $\delta_{\text{H}}$  1,29 e  $\delta_{\text{C}}$  23,00 (H-5' – C-5'). Por fim, os sinais de hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  0,92 (H-8') e  $\delta_{\text{H}}$  0,90 (H-6')

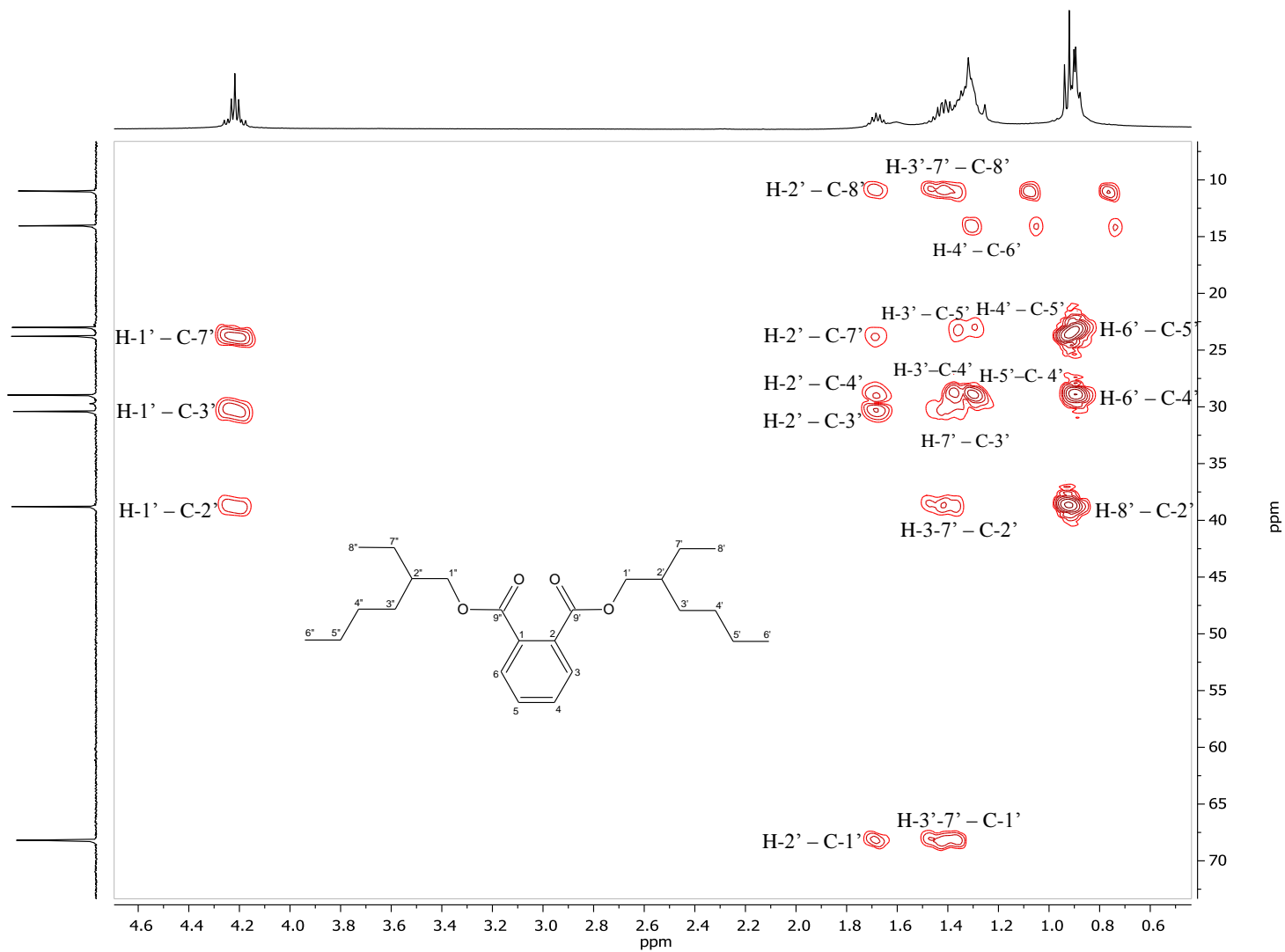
correlacionam-se com os sinais dos átomos de carbonos dos grupos metila em  $\delta_C$  10,98 (C-8') e  $\delta_C$  14,05 (C-6'), respectivamente.

As posições dos átomos de carbono 3', 4', 5' e 7' são confirmadas pelo mapa de contornos HMBC na Figura 18 (pág. 40). O sinal em  $\delta_H$  4,22 (H<sub>1</sub>') apresenta correlações com os sinais de carbono em  $\delta_C$  23,79 (C-7'), 30,41 (C-3') e 38,79 (C-2'). O sinal de hidrogênio em  $\delta_H$  1,69 (H-2') correlaciona-se com os sinais de carbono em  $\delta_C$  10,98 (C-8'), 23,79 (C-7'), 28,96 (C-4'), 30,41 (C-3') e 68,19 (C-1'). O sinal em 1,41 (H-7') encontra-se correlacionado com os sinais de carbono em  $\delta_C$  10,98 (C-8'), 30,41 (C-3'), 38,79 (C-2') e 68,19 (C-1'), confirmando a posição do C-7'. O sinal em  $\delta_H$  1,35 (H-3') apresenta correlações com os sinais de carbono em  $\delta_C$  23,00 (C-5'), 28,96 (C-4') e 68,19 (C-1'), confirmando a posição do C-3'. Enquanto o sinal multiplete em  $\delta_H$  1,29-1,31, que corresponde aos átomos de hidrogênio 4' e 5', correlaciona-se com os sinais de carbono em  $\delta_C$  14,05 (C-6'), 23,00 (C-5') e 28,96 (C-4'). O sinal tripleto em  $\delta_H$  0,92 (H-8') apresenta correlações com o sinal de carbono em  $\delta_C$  38,79 (C-2'). O sinal tripleto em  $\delta_H$  0,90 (H-6') correlaciona-se com os sinais de carbono em  $\delta_C$  23,00 (C-5') e 28,96 (C-4').

A análise detalhada dos mapas de contornos de SSFO-IV permitiu atribuir todos os deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para o composto bis-(2-etil-hexil) ftalato.



**Figura 17.** Expansão do mapa de contornos HSQC de SSFO-IV (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 18.** Expansão do mapa de contornos HMBC de SSFO-IV (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>).

# **CAPÍTULO V**

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FLORES E FOLHAS**

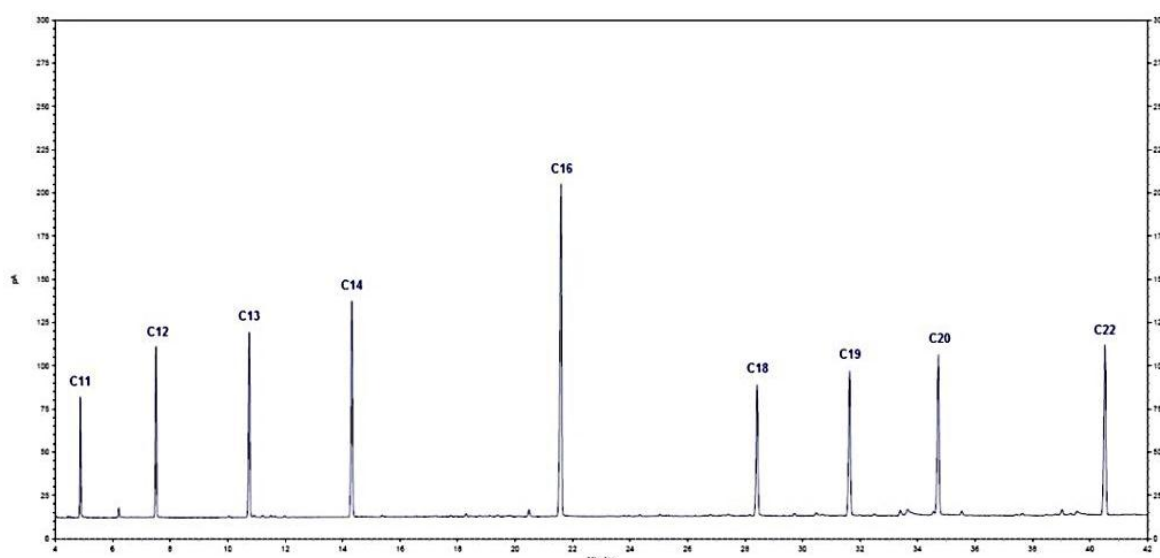


## 1. Óleo essencial das flores de *S. stipulaceum*

### 1.1. Composição do óleo essencial das flores coletadas em maio (FL-M)

A hidrodestilação das flores de *S. stipulaceum* coletadas em maio (FL-M) forneceu um líquido viscoso e amarelado de cheiro forte e agradável o qual foi analisado imediatamente por cromatografia a gás. O rendimento da extração foi 0,08% calculado segundo a Equação 1 (pág. 18).

A Figura 19 mostra o cromatograma dos padrões de hidrocarbonetos injetados nas mesmas condições experimentais de análise do óleo essencial.



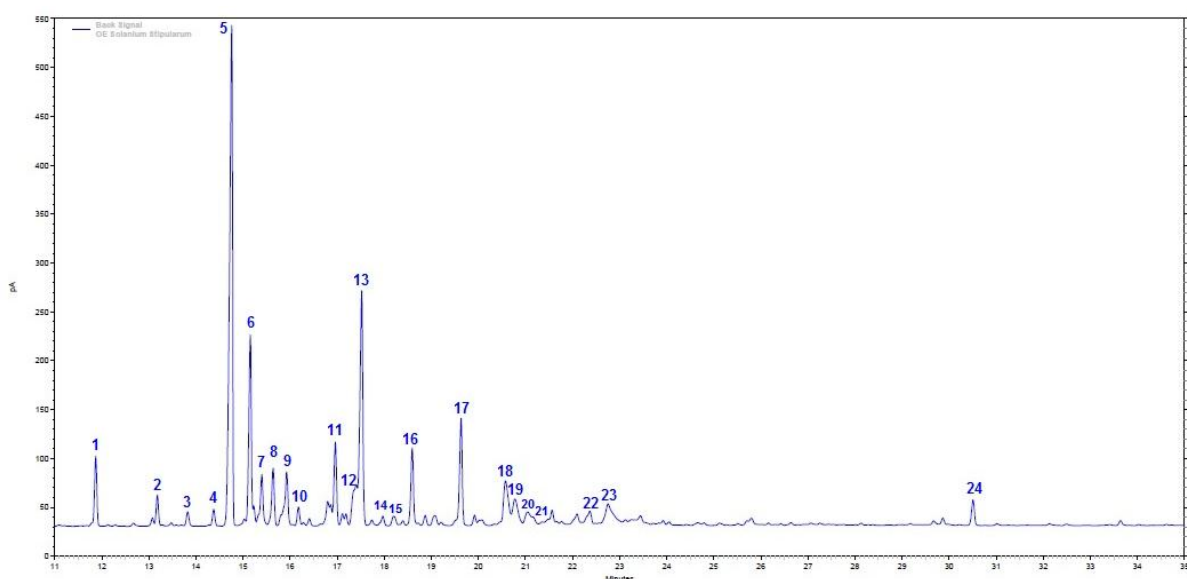
**Figura 19.** Cromatograma de CG-FID dos padrões de hidrocarbonetos lineares.

A Tabela 6 mostra o tempo de retenção dos padrões de hidrocarbonetos injetados. Estes dados foram usados para o cálculo do índice de retenção linear dos constituintes do óleo essencial segundo a Equação 2 (pág. 19).

**Tabela 6.** Padrões de hidrocarbonetos lineares para cálculo do índice de retenção linear

Hidrocarboneto	TR (min)
C <sub>11</sub>	4,879
C <sub>12</sub>	7,506
C <sub>13</sub>	10,752
C <sub>14</sub>	14,326
C <sub>16</sub>	21,601
C <sub>18</sub>	28,415
C <sub>19</sub>	31,636
C <sub>20</sub>	34,723
C <sub>22</sub>	40,521

As análises dos cromatogramas de CG-FID (Figura 20) e CG-EM do óleo essencial isolado das flores de *S. stipulaceum* coletadas em maio permitiram a identificação de vinte e quatro compostos (Tabela 7, pág. 44). A identificação dos picos do cromatograma obtido por CG-FID do óleo essencial foi baseada no método de Kováts, para condições não isotérmicas utilizando a definição de Van Den Dool e Kratz, segundo a comparação com os tempos de retenção de hidrocarbonetos saturados. Além disso, o espectro de massas dos compostos de cada pico do cromatograma de CG-EM do óleo foi comparado com os dados encontrados na biblioteca espectral NIST11.



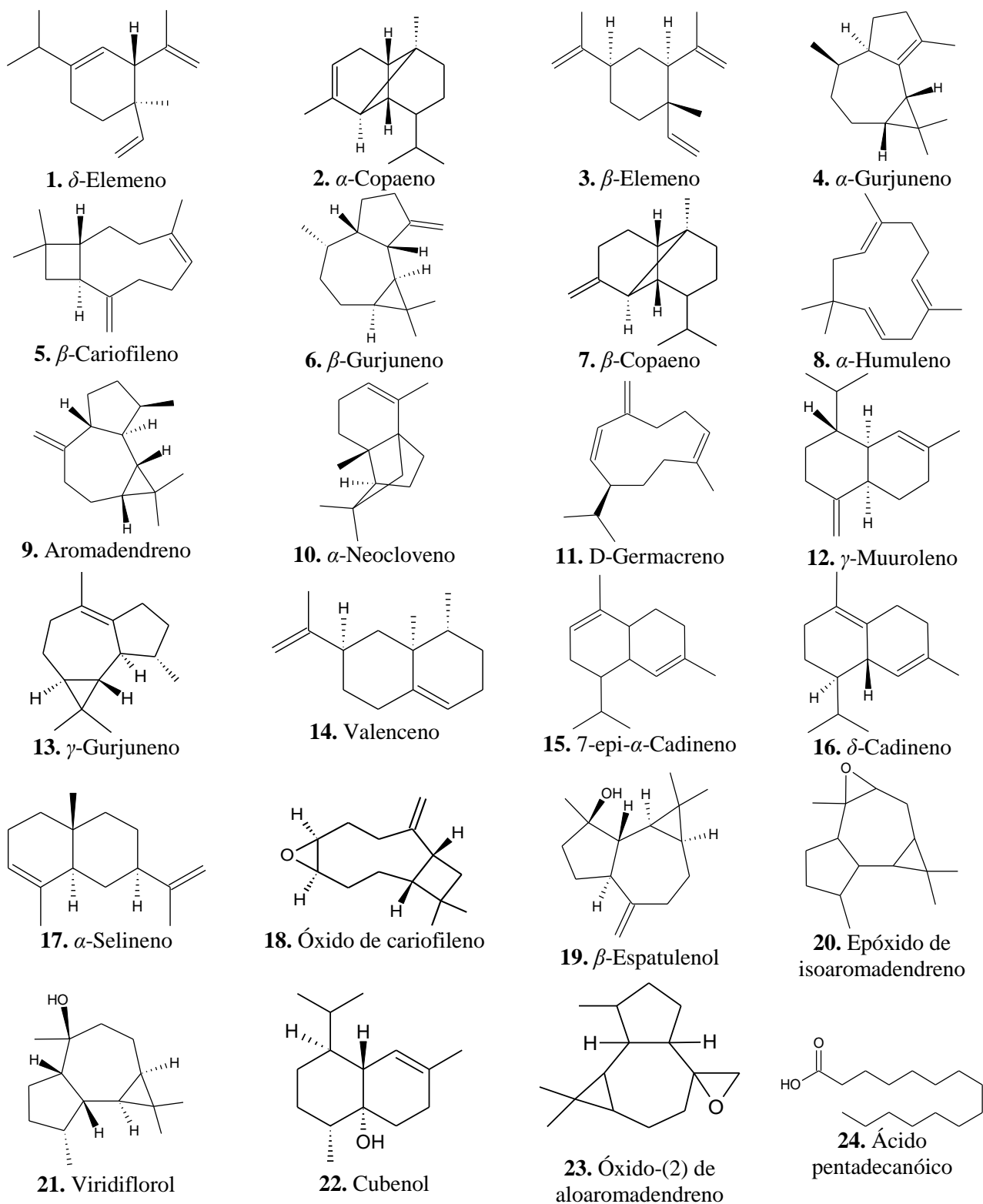
**Figura 20.** Cromatograma de CG-FID do óleo essencial isolado das flores de *Solanum stipulaceum* coletadas em maio (FL-M).

A Tabela 7 (pág. 44) mostra os dados de cromatografia a gás e o tipo de composto dos componentes identificados no óleo essencial das flores (FL-M). Os índices de retenção de lineares calculados ( $IRL_C$ ) são próximos aos índices correspondentes obtidos a partir de dados da literatura ( $IRL_L$ ), sendo possível a identificação dos componentes com tempos de retenção registrados entre 12,473 e 31,107 min. A Figura 21 (pág. 45) apresenta a estrutura química dos compostos voláteis identificados nesse óleo essencial.

**Tabela 7.** Constituintes químicos do óleo essencial das flores de *S. stipulaceum* (FL-M)

TR (min)	Composto	PR (%)	IRL <sub>C</sub>	IRL <sub>L</sub>	PS (%)	Tipo de composto
12,473	$\delta$ -Elemeno ( <b>1</b> )	2,81	1331	1335	94	Sesquiterpeno monocíclico
13,781	$\alpha$ -Copaeno ( <b>2</b> )	1,18	1368	1374	92	Sesquiterpeno tricíclico
14,425	$\beta$ -Elemeno ( <b>3</b> )	0,62	1386	1389	87	Sesquiterpeno monocíclico
14,978	$\alpha$ -Gurjuneno ( <b>4</b> )	0,72	1401	1402	88	Sesquiterpeno tricíclico
15,361	$\beta$ -Cariofileno ( <b>5</b> )	25,84	1411	1418	91	Sesquiterpeno bicíclico
15,756	$\beta$ -Gurjuneno ( <b>6</b> )	8,24	1423	1425	92	Sesquiterpeno tricíclico
15,999	$\beta$ -Copaeno ( <b>7</b> )	2,39	1429	1430	88	Sesquiterpeno tricíclico
16,241	$\alpha$ -Humuleno ( <b>8</b> )	2,72	1436	1442	92	Sesquiterpeno monocíclico
16,528	Aromadendreno ( <b>9</b> )	3,46	1444	1441	95	Sesquiterpeno tricíclico
16,777	$\alpha$ -Neocloveno ( <b>10</b> )	0,83	1451	1454	82	Sesquiterpeno tricíclico
17,563	D-Germacreno ( <b>11</b> )	3,65	1472	1480	91	Sesquiterpeno monocíclico
18,008	$\gamma$ -Muuroleno ( <b>12</b> )	1,83	1484	1485	88	Sesquiterpeno bicíclico
18,123	$\gamma$ -Gurjuneno ( <b>13</b> )	11,86	1487	1489	91	Sesquiterpeno tricíclico
18,570	Valenceno ( <b>14</b> )	0,51	1500	1496	84	Sesquiterpeno bicíclico
18,798	7-epi- $\alpha$ -Cadineno ( <b>15</b> )	0,64	1506	1507	89	Sesquiterpeno bicíclico
19,196	$\delta$ -Cadineno ( <b>16</b> )	3,58	1517	1522	94	Sesquiterpeno bicíclico
20,233	$\alpha$ -Selineno ( <b>17</b> )	5,32	1545	1540	90	Sesquiterpeno bicíclico
21,180	Óxido de cariofileno ( <b>18</b> )	3,59	1571	1573	88	Epóxido sesquiterpênico
21,378	$\beta$ -Espatuleno ( <b>19</b> )	2,36	1576	1576	87	Sesquiterpenol
21,644	Epóxido de isoaromadendreno ( <b>20</b> )	1,06	1584	1584	86	Epóxido sesquiterpênico
21,721	Viridiflorol ( <b>21</b> )	0,48	1586	1587	93	Sesquiterpenol
22,970	Cubenol ( <b>22</b> )	1,00	1621	1625	85	Sesquiterpenol
23,351	Óxido-(2) de aloaromadendreno ( <b>23</b> )	2,22	1633	1639	81	Epóxido sesquiterpênico
31,107	Ácido pentadecanoico ( <b>24</b> )	1,25	1863	1869	93	Ácido carboxílico

TR = tempo de retenção; PR = porcentagem relativa da área sob o pico; IRL<sub>C</sub> = índice de retenção linear calculado; IRL<sub>L</sub> = índice de retenção linear da literatura<sup>53</sup>; PS = porcentagem de similaridade baseada no banco de dados NIST11.



**Figura 21.** Estrutura química dos compostos identificados no óleo essencial das flores de *S. stipulaceum* (OEFL-M).

Os constituintes majoritários do óleo essencial extraído das flores de *S. stipulaceum* são hidrocarbonetos sesquiterpênicos (76,21%), classificados em monocíclicos (9,80%), bicíclicos (37,72%) e tricíclicos (27,50%), enquanto que epóxidos sesquiterpênicos (6,87%) e sesquiterpenois (3,84%) estão presentes em menores quantidades.

O componente principal do óleo é o sesquiterpeno  $\beta$ -cariofileno (25,84%), seguido pelo  $\gamma$ -gurjuneno (11,86%) e o  $\beta$ -gurjuneno (8,24%). Outros componentes são  $\alpha$ -selineno (5,32%), D-germacreno (3,65%),  $\delta$ -cadineno (3,58%) e aromadendreno (3,46%). Também foram identificados seis sesquiterpenos oxigenados: óxido de cariofileno (3,59%),  $\beta$ -espatulenol (2,36%), óxido-(2) de aloaromadendreno (2,22%), epóxido de isoaromadendreno (1,06%), cubenol (1,00%) e viridiflorol (0,48%).

Os diferentes compostos identificados nos óleos essenciais das flores de *S. stipulaceum* têm apresentado um amplo espectro de atividades biológicas. O  $\beta$ -cariofileno (**5**), identificado como o principal componente do óleo essencial, apresenta atividades antibacteriana, antioxidante, anti-inflamatória e neuroprotetora,<sup>54-57</sup> além de ser eficiente na homeostase da glicose, útil para o tratamento da diabetes.<sup>58</sup> O óxido de cariofileno (**18**) apresenta atividades antifúngica, analgésica, anti-inflamatória, anticancerígena e gastroprotetora.<sup>57, 59-61</sup> Ambos os sesquiterpenos desempenham um papel importante na defesa das plantas no ecossistema.<sup>62</sup>

Por outro lado, o  $\beta$ -elemeno (**3**) apresenta uma ampla atividade antitumoral, sendo eficiente contra células cancerosas de pulmão,<sup>63</sup> fígado,<sup>64</sup> mama<sup>65</sup> e próstata,<sup>66</sup> dentre outras. Este composto foi aprovado recentemente na China para uso clínico no tratamento de diferentes tipos de câncer.<sup>65</sup> O isômero  $\delta$ -elemeno (**1**) apresenta também importante atividade antitumoral, mostrando resultados positivos frente a células cancerosas colorretais<sup>67</sup> e de pulmão.<sup>68</sup> Para o sesquiterpeno  $\alpha$ -humuleno (**8**) foi reportada atividade citotóxica contra células cancerosas de mama e colorretais<sup>69</sup> e anti-inflamatória.<sup>70</sup>

O principal sesquiterpenol identificado no óleo essencial,  $\beta$ -espatulenol (**19**), apresenta atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.<sup>71</sup> Óleos essenciais com misturas ricas em  $\beta$ -espatulenol e D-germacreno mostram atividades antifúngica, antibacteriana e citotóxica.<sup>72</sup>

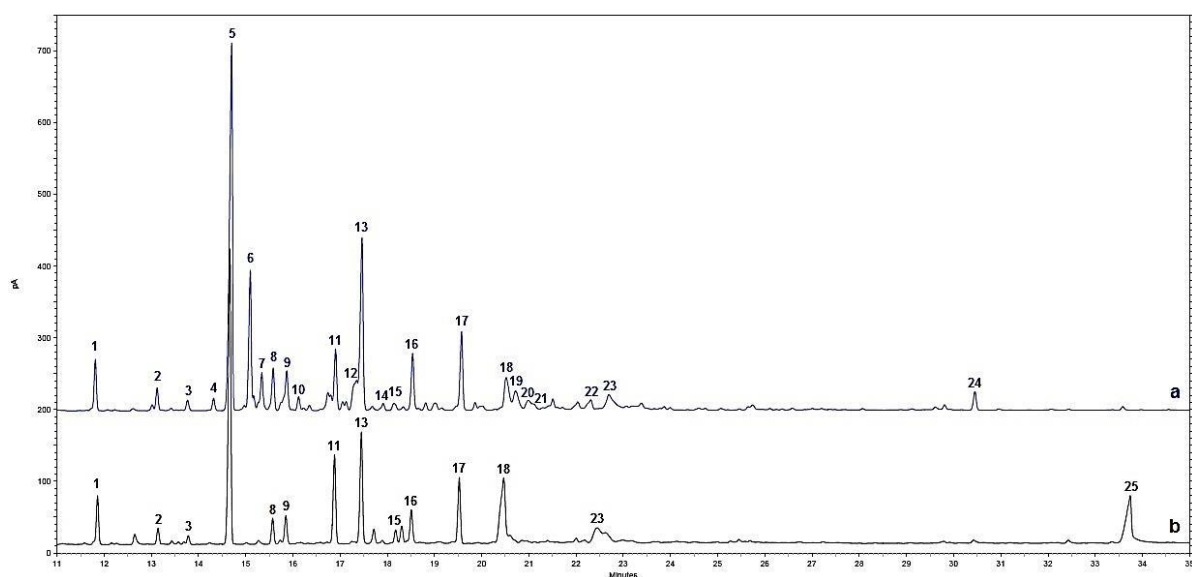
Poucos estudos encontram-se na literatura sobre a composição química dos óleos essenciais das flores de espécies do gênero *Solanum*. Para *S. stuckeflii*, o monoterpene mirceno foi identificado como o constituinte majoritário, mas a presença de sesquiterpenos, tais como  $\alpha$ -copaeno,  $\beta$ -elemeno,  $\beta$ -cariofileno,  $\gamma$ -muuroleno, D-germacreno e  $\delta$ -cadineno, foi reportada também. No caso do óleo essencial das flores de *S. incisurm*,  $\beta$ -pineno foi reportado

como o principal componente, enquanto  $\beta$ -cariofileno e  $\beta$ -selineno foram os sesquiterpenos predominantes.<sup>73</sup>

Por sua vez, óleos essenciais das flores de *Nicotiana longiflora* e *Brugmansia suaveolens*, ambas as espécies pertencentes à família Solanaceae, são constituídos principalmente por monoterpenos, aldeídos e alcoóis, embora o  $\beta$ -cariofileno foi identificado como componente volátil das flores de *N. longiflora*.<sup>74-75</sup>

### 1.2. Variações sazonais no óleo essencial das flores de *S. stipulaceum*

O rendimento na extração do óleo essencial para as flores coletadas no mês de setembro foi 0,03%, observando-se uma diminuição significativa com respeito ao óleo obtido no mês de maio (0,08%). Por outro lado, importantes diferenças quanto à composição química foram encontradas quando a coleta do material foi realizada em diferentes meses do ano. A Figura 22 mostra os cromatogramas de CG-FID dos óleos essenciais das flores coletadas em maio (a) e em setembro (b) de 2014. Somente quatorze compostos foram identificados no óleo essencial de FL-S.



**Figura 22.** Cromatogramas de CG-FID dos óleos essenciais obtidos das flores de maio, OEFL-M (a), e setembro, OEFL-S (b).

A Tabela 8 (pág. 49) apresenta a composição química dos óleos essenciais obtidos em maio e setembro. No óleo essencial da amostra FL-S, a porcentagem de hidrocarbonetos sesquiterpênicos foi 65,84% (contra 76,21% no óleo essencial obtido em maio), classificados

em monocíclicos (15,09%), bicíclicos (36,77%) e tricíclicos (13,98%). Por sua vez, 14,64% corresponde aos epóxidos sesquiterpênicos, mas nenhum sesquiterpenol foi identificado nesta amostra (contra 6,87% e 3,84% no óleo essencial obtido em maio, respectivamente).

A variação mais notável foi observada para o  $\beta$ -gurjuneno (**6**), não sendo detectado na amostra de setembro, mas presente em grande quantidade (8,24%) no óleo essencial de maio. Por outro lado, a porcentagem de óxido de cariofileno (**18**) aumentou três vezes em relação ao óleo essencial de maio. Além disso, o ácido pentadecanoico (**24**) não foi identificado na amostra de setembro, embora o ácido palmítico (**25**) corresponda a 9,85% deste óleo essencial.

As diferenças observadas na composição dos óleos essenciais obtidos em diferentes épocas do ano podem estar relacionadas com diversos fatores abióticos e bióticos, como temperatura, umidade, período de desenvolvimento da planta, disponibilidade hídrica, sazonalidade, índice pluviométrico e polinização.<sup>76-78</sup> Estes fatores influenciam na produção de metabólitos secundários, tal como foi observado para o óleo essencial das flores coletadas no mês de maio, em que a produção de terpenoides encontra-se favorecida, o que pode estar relacionado com o fato deste tipo de compostos ser vetores de polinização.<sup>79</sup>

Diferenças no rendimento e na composição dos óleos essenciais sob a influência do tempo de coleta têm sido relatadas para várias plantas. Por exemplo, o nível de sesquiterpenoides no óleo essencial das partes aéreas de *Hypericum perforatum* (Cistaceae) varia segundo o ciclo fenológico da planta, alcançando valores máximos nos períodos de pré-floração e floração.<sup>80</sup> No caso das partes aéreas de *Santolina rosmarinifolia* (Asteraceae), o rendimento do óleo essencial aumentou no período de floração e variações por sazonalidade na composição do óleo foram observadas para compostos monoterpênicos<sup>79</sup>. A literatura descreve também mudanças na composição do óleo essencial de acordo como o tempo de coleta para as partes aéreas de *Elyonurus muticus* (Poaceae), apresentando maiores porcentagens de  $\beta$ -cariofileno e espatulenol na primavera.<sup>78</sup>

**Tabela 8.** Constituintes químicos dos óleos essenciais das flores de *S. stipulaceum* obtidos em maio (FL-M) e setembro (FL-S)

Nome do composto	Porcentagem (%)	
	FL-M	FL-S
$\delta$ -Elemeno (1)	2,81	4,17
$\alpha$ -Copaeno (2)	1,18	1,42
$\beta$ -Elemeno (3)	0,62	0,78
$\alpha$ -Gurjuneno (4)	0,72	ND
$\beta$ -Cariofileno (5)	25,84	26,48
$\beta$ -Gurjuneno (6)	8,24	ND
$\beta$ -Copaeno (7)	2,39	ND
$\alpha$ -Humuleno (8)	2,72	2,24
Aromadendreno (9)	3,46	2,54
$\alpha$ -Neocloveno (10)	0,83	ND
D-Germacreno (11)	3,65	7,90
$\gamma$ -Muuroleno (12)	1,83	ND
$\gamma$ -Gurjuneno (13)	11,86	10,02
Valenceno (14)	0,51	ND
7-epi- $\alpha$ -Cadineno (15)	0,64	1,32
$\delta$ -Cadineno (16)	3,58	3,27
$\alpha$ -Selineno (17)	5,32	5,70
Óxido de cariofileno (18)	3,59	10,95
$\beta$ -Espotulenol (19)	2,36	ND
Epóxido de isoaromadendreno (20)	1,06	ND
Viridiflorol (21)	0,48	ND
Cubenol (22)	1,00	ND
Óxido-(2) de aloaromadendreno (23)	2,22	3,69
Ácido pentadecanóico (24)	1,25	ND
Ácido palmítico (25)	ND	9,85
<b>% Total identificado</b>	88,16	90,33

ND: Não detectado



### 1.3. Efeito da radiação gama

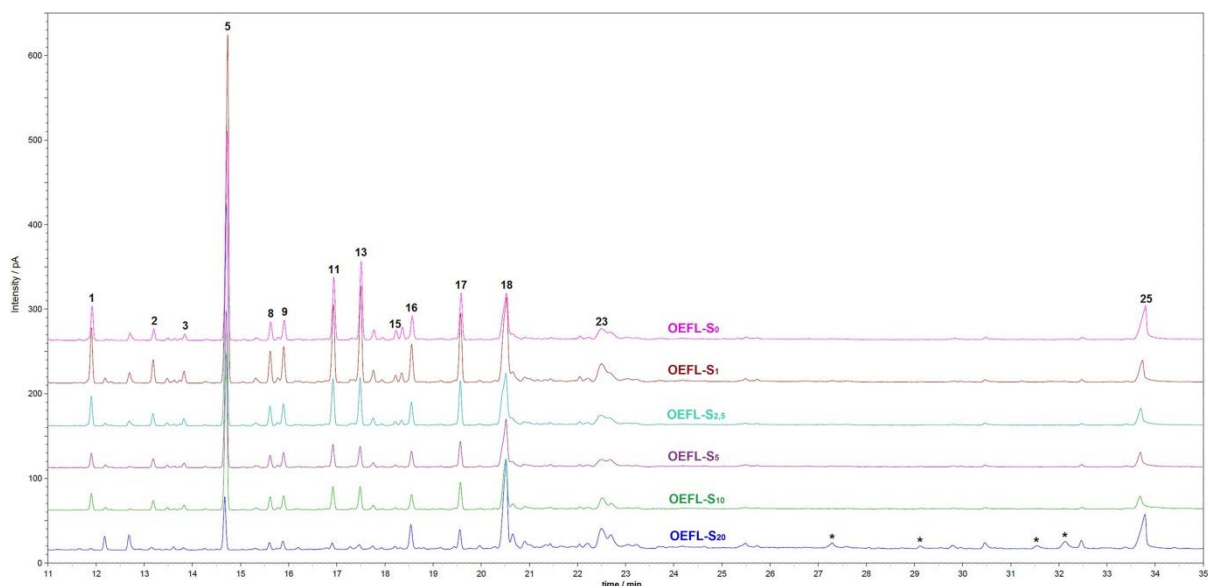
A radiação gama pode influenciar tanto o rendimento da extração de metabólitos secundários quanto a composição química dos óleos essenciais. A Tabela 9 apresenta a massa de óleo essencial (OE) obtida e o rendimento da extração após hidrodestilação das flores de *S. stipulaceum* coletadas no mês de setembro e submetidas a radiação gama (FL-S<sub>1</sub>, FL-S<sub>2,5</sub>, FL-S<sub>5</sub>, FL-S<sub>10</sub> e FL-S<sub>20</sub>). Observa-se em relação ao óleo essencial obtido das flores não irradiadas (OEFL-S<sub>0</sub>) um aumento no rendimento da extração dos óleos para o material vegetal irradiado. Não obstante, esse aumento não se apresenta diretamente relacionado com a dose de radiação aplicada, uma vez que, a uma dose de 10,0 kGy foi obtido o maior rendimento.

**Tabela 9.** Rendimento da extração dos óleos essenciais das flores de *S. stipulaceum* coletadas em setembro e submetidas a radiação gama

Amostra	Massa do óleo (mg)	Rendimento (%)
OEFL-S <sub>0</sub>	6,3	0,032
OEFL-S <sub>1</sub>	7,4	0,037
OEFL-S <sub>2,5</sub>	8,0	0,040
OEFL-S <sub>5</sub>	7,8	0,039
OEFL-S <sub>10</sub>	9,6	0,048
OEFL-S <sub>20</sub>	9,0	0,045

Estes resultados confirmam que a radiação gama pode causar danos às membranas das células vegetais e, conseqüentemente, o processo de extração dos óleos essenciais pode tornar-se favorecido quando o material vegetal for submetido à radioesterilização.<sup>35</sup>

A Figura 23 (pág. 51) mostra os cromatogramas de CG-FID das flores coletadas em setembro e irradiadas (FL-S<sub>1</sub>, FL-S<sub>2,5</sub>, FL-S<sub>5</sub>, FL-S<sub>10</sub> e FL-S<sub>20</sub>) e a amostra controle (FL-S<sub>0</sub>), sendo observadas variações na composição dos óleos essenciais para todos os compostos identificados.



**Figura 23.** Cromatogramas de CG-FID dos óleos essenciais das flores de *S. stipulaceum* não irradiadas e irradiadas.

Através da análise dos cromatogramas foi possível calcular a proporção relativa dos componentes identificados nas amostras irradiadas comparado com a amostra que não foi submetida à radiação, esses resultados são apresentados na Tabela 10 (pág. 52).

Os resultados mostram que a radiação gama provoca alterações na composição do óleo essencial das flores de *S. stipulaceum* coletadas no mês de setembro. Porém, não há uma relação direta entre a dose de radiação e as variações observadas.

A radioesterilização das flores de *S. stipulaceum* resultou em um aumento na quantidade de  $\alpha$ -copaeno,  $\beta$ -elemeno,  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno, aromadendreno,  $\delta$ -cadineno, óxido de cariofileno e óxido-(2) de alloaromadendreno. No entanto, foram observadas diminuições na composição de  $\delta$ -elemeno, D-germacreno, viridiflorol e  $\alpha$ -selineno. No caso do ácido palmítico, doses menores do que 10,0 kGy provocaram uma diminuição na sua porcentagem.

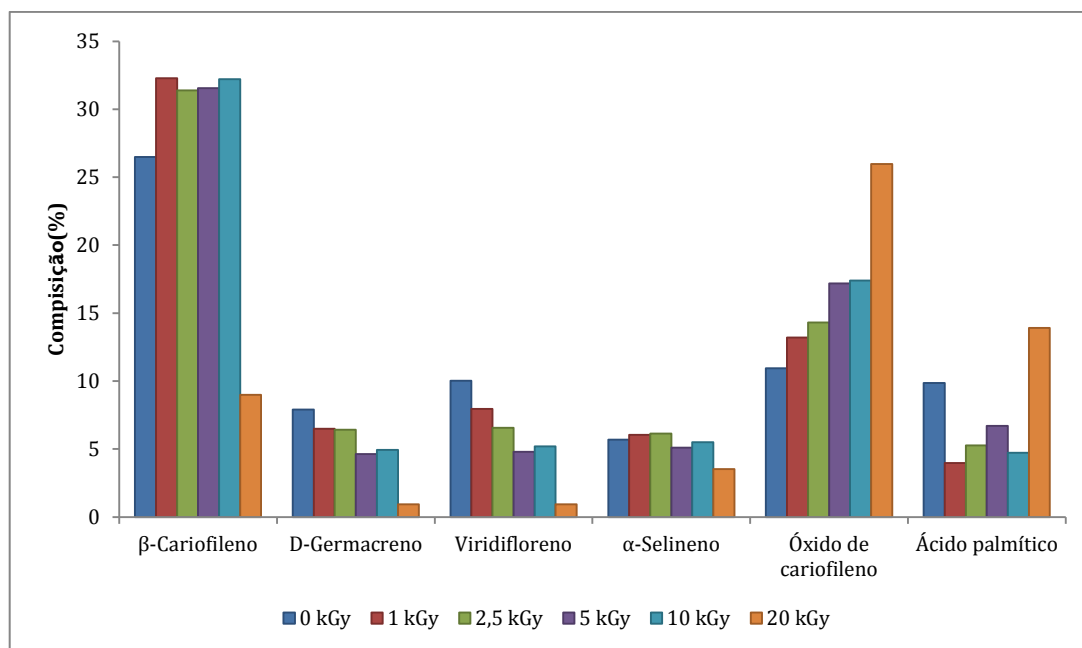
A dose de radiação de 1,0 kGy aumentou a quantidade da maioria dos constituintes do óleo, isto pode ser devido ao aumento da extractabilidade destes compostos.<sup>35</sup> No entanto, os compostos 7-epi- $\alpha$ -cadineno e ácido palmítico não apresentaram o mesmo comportamento.

**Tabela 10.** Composição química dos óleos essenciais obtidos das flores irradiadas de *S. stipulaceum* coletadas em setembro

Composição (%)							
No. Pico	Nome do composto	OEFL-S <sub>0</sub>	OEFL-S <sub>1</sub>	OEFL-S <sub>2,5</sub>	OEFL-S <sub>5</sub>	OEFL-S <sub>10</sub>	OEFL-S <sub>20</sub>
1	$\delta$ -Elemeno	4,17	4,28	3,82	2,83	3,39	ND
2	$\alpha$ -Copaeno	1,42	1,89	1,69	1,88	2,02	0,55
3	$\beta$ -Elemeno	0,78	0,99	0,99	0,97	1,07	0,37
5	$\beta$ -Cariofileno	26,48	32,28	31,38	31,56	32,22	8,99
8	$\alpha$ -Humuleno	2,24	2,55	2,59	2,51	2,73	1,29
9	Aromadendreno	2,54	2,96	3,00	3,15	3,02	1,65
11	D-Germacreno	7,90	6,48	6,43	4,63	4,93	0,93
13	$\gamma$ -Gurjuneno	10,02	7,96	6,56	4,80	5,20	0,92
15	7-epi- $\alpha$ -Cadineno	1,32	0,68	0,62	0,61	0,50	0,63
16	$\delta$ -Cadineno	3,27	3,40	3,53	3,57	3,42	4,85
17	$\alpha$ -Selineno	5,70	6,04	6,13	5,10	5,50	3,52
18	Óxido de cariofileno	10,95	13,20	14,32	17,19	17,39	25,98
23	Óxido-(2) de aloaromadendreno	3,69	4,27	3,76	3,95	5,61	9,18
25	Ácido palmítico	9,85	3,98	5,27	6,70	4,72	13,91
<b>%Total identificado</b>		90,34	90,96	90,09	89,45	91,71	72,77

ND: Não detectado

A Figura 24 (pág. 53) resume as variações percentuais da concentração dos constituintes majoritários dos óleos essenciais das flores coletadas em setembro e que foram submetidas a radiação gama. Pela análise desta figura é possível observar que o processo de radiação promoveu um aumento na concentração do  $\beta$ -cariofileno e do óxido de cariofileno. No entanto, variações irregulares são observadas para os compostos D-germacreno,  $\gamma$ -gurjuneno,  $\alpha$ -selineno e ácido palmítico. Uma dose de 20,0 kGy promoveu uma diminuição significativa na composição da maioria dos constituintes principais, exceto para o óxido de cariofileno e o ácido palmítico.



**Figura 24.** Composição dos constituintes majoritários dos óleos essenciais obtidos das flores coletadas em setembro e submetidas a diferentes doses de radiação gama.

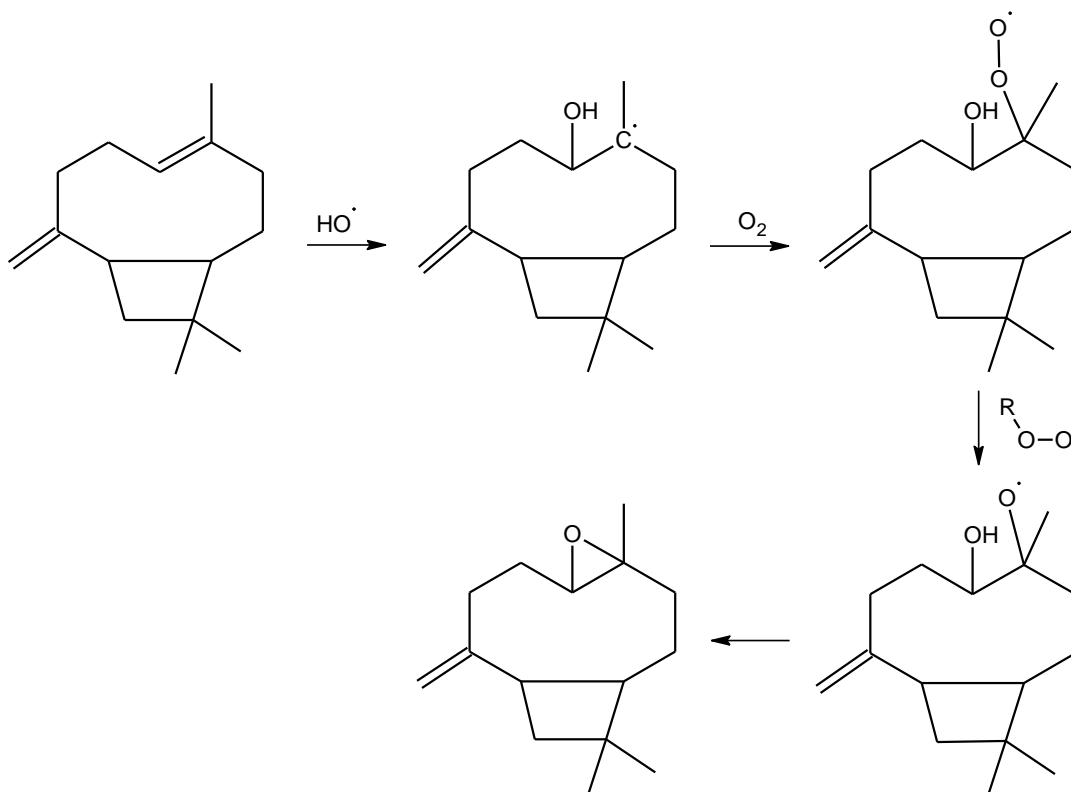
As concentrações do  $\delta$ -cadineno e do óxido-(2) de aloaromadendreno também aumentaram quando as flores foram submetidas a 20,0 kGy. Para os demais compostos identificados, esta dose de radiação esteve acompanhada de uma redução na concentração.

Quatro picos entre 27 e 33 min (Figura 23, pág 51), com índices de retenção linear 1768, 1823, 1898 e 1917 foram detectados no óleo essencial obtido das flores submetidas a 20,0 kGy. Estes compostos devem corresponder a produtos radiolíticos, obtidos como resultado da radiação ionizante, e correspondem a 8,1% da composição total, mas não foi possível identificá-los.

A diminuição da quantidade de  $\beta$ -cariofileno no óleo essencial obtido da amostra submetida a 20,0 kGy, junto com o aumento significativo na composição de óxido de cariofileno, pode ser explicada pela oxidação do  $\beta$ -cariofileno como resultado da irradiação ou pela ação de radicais livres gerados na ionização da água. Esse fenômeno foi observado também no óleo essencial de *Piper nigrum L.* Após uma dose de 30 kGy foi obtido um aumento do teor de óxido de cariofileno, ao mesmo tempo que foi observada uma diminuição importante na quantidade de  $\beta$ -cariofileno.<sup>29</sup>

Com base nos mecanismos propostos na literatura<sup>81</sup> para a oxidação do  $\beta$ -pineno e do  $\beta$ -cariofileno na presença de radicais foi proposta a oxidação do  $\beta$ -cariofileno por ação de

radicais hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) para a formação de óxido de cariofileno. Radicais hidroxila, produzidos pela ação dos raios gama em moléculas de água, podem iniciar a oxidação do  $\beta$ -cariofileno por adição radicalar na ligação dupla ou pela subtração do átomo de hidrogênio, seguido pela adição de oxigênio molecular para produzir radicais  $\beta$ -hidroxialquilperoxila. A reação dos radicais hidroperoxila ( $\text{HO}_2\cdot$ ) com radicais peróxido orgânicos ( $\text{RO}_2\cdot$ ) produz radicais  $\beta$ -hidroxialcooxila, o que pode finalizar com a formação de anel epóxido para produzir o óxido de cariofileno (Figura 25).



**Figura 25.** Proposta da oxidação do  $\beta$ -cariofileno por ação de radicais hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) para a formação de óxido de cariofileno.

O processo de oxidação radicalar ou o efeito direto da radiação gama pode ter acontecido com os outros sesquiterpenos e sesquiterpenoides presentes no óleo essencial. Isto explicaria a diminuição da abundância relativa da maioria dos constituintes principais. Subprodutos, como óxidos, alcoóis, aldeídos e cetonas, podem não ter sido extraídos junto com o óleo essencial ou a sua presença é tão baixa que não foi possível a sua detecção por CG-FID.

A diminuição na composição do ácido palmítico sob doses menores do que 10,0 kGy sugere uma importante susceptibilidade deste à radiação gama, sendo que ligações químicas

C-C podem ser quebradas nas proximidades do grupo carbonila, produzindo cadeias de hidrocarbonetos e ácidos de cadeia menor.

Em contraste, o aumento na composição deste ácido no óleo essencial obtido do material submetido a uma dose de 20,0 kGy pode ter sido o resultado da oxidação de outros compostos lipídicos (ácidos graxos insaturados e acilgliceróis) presentes nas flores, sendo obtidos diferentes produtos da oxidação, dentre esses o ácido palmítico.<sup>82</sup>

#### 1.4. Atividade citotóxica dos óleos essenciais das flores de *S. stipulaceum*

Os resultados do teste de citotoxicidade dos óleos essenciais das flores irradiadas e não irradiadas sobre células tumorais de leucemia aguda são apresentados na Tabela 11, como a concentração do óleo essencial que reduz a viabilidade celular a 50% (CI<sub>50</sub>).

**Tabela 11.** Atividade citotóxica *in vitro* dos óleos essenciais das flores irradiadas

Amostra	CI <sub>50</sub> (µg/mL) ± DP * Linhagem celular		
	HL-60	THP-1	Wi-26VA4
OEFL-S <sub>0</sub>	>100	>100	>100
OEFL-S <sub>1</sub>	>100	84,51 ± 4,14	>100
OEFL-S <sub>2,5</sub>	>100	73,43 ± 2,19	>100
OEFL-S <sub>5</sub>	96,07 ± 4,98	52,73 ± 2,78	>100
OEFL-S <sub>10</sub>	89,67 ± 3,78	40,12 ± 1,65	>100
Etoposideo	9,70 ± 1,29	13,80 ± 1,81	7,10 ± 1,03

De acordo com esses resultados, o óleo essencial das flores de *S. stipulaceum* não se apresenta como um agente citotóxico importante frente a estas linhagens celulares, embora, vários dos constituintes identificados neste óleo essencial apresentam atividade citotóxica contra diferentes tipos de células cancerígenas, como exposto no item III.1.1 (pág. 46).

Poucos estudos têm sido realizados sobre a citotoxicidade dos óleos essenciais das espécies do gênero *Solanum*. O óleo essencial das folhas de *S. erianthum* apresentou 98,86% e 97,94% de letalidade sobre células cancerígenas de mama e próstata, respectivamente.<sup>83</sup> O óleo essencial das folhas de *S. macranthum* não apresentou citotoxicidade sobre as células cancerígenas de próstata e a porcentagem de letalidade sobre as células de mama foi de 2%.<sup>83</sup> Por sua vez, o óleo essencial das folhas de *S. spirale* apresentou atividade citotóxica significativa frente a diferentes linhagens celulares, com valores de CI<sub>50</sub> iguais a 19,69, 26,42 e 24,02 µg/mL, para câncer de mama, bucal e pequenos tumores de pulmão,

respectivamente.<sup>84</sup> Porém, esse é o primeiro relato da atividade citotóxica dos óleos essenciais das flores de uma espécie do gênero *Solanum*.

Por outro lado, a literatura reporta alguns casos de atividade citotóxica de óleos essenciais de outras espécies de plantas sobre as células tumorais usadas neste ensaio. Assim, os óleos essenciais de *Cymbopogon flexuosus* (Poaceae), *Casearia sylvestris* (Salicaceae) e *Croton regelianus* (Euphorbiaceae) foram ativos frente a células HL-60 com CI<sub>50</sub> igual a 30,0, 29,0 e 22,2 µg/mL, respectivamente.<sup>85</sup> Enquanto para a linhagem celular THP-1, o óleo essencial de *Artemisia indica* (Asteraceae) apresentou CI<sub>50</sub> igual a 10 µg/mL e *Malus domestica* (Rosaceae) inibiu o crescimento do 65,7% das células a 1000 µg/mL.<sup>85-86</sup>

O que se pode observar para a atividade citotóxica dos óleos essenciais obtidos das flores irradiadas de *S. stipulaceum* é que, com o aumento da dose de radiação gama, o CI<sub>50</sub> do óleo essencial diminui, o que significa que a citotoxicidade aumenta, mesmo que em relação ao etoposídeo (controle positivo) a atividade de todos os óleos essenciais tenha sido muito fraca e nenhum deles possa ser considerado citotóxico.

Diversos fatores podem afetar a atividade dos óleos essenciais, uma vez que a concentração de vários dos compostos identificados teve alterações conforme o nível de radiação. Particularmente, a abundância do óxido de cariofileno foi aumentando com o aumento da dose de radiação gama e este composto tem sido sugerido como um potencial candidato para a prevenção e o tratamento do câncer.<sup>61</sup> Portanto, o aumento da citotoxicidade pode estar relacionado com a presença deste sesquiterpeno no óleo essencial.

Apesar disso, o óleo essencial deve ser considerado como uma mistura complexa de metabólitos secundários e a radiação gama afetou de maneira irregular a concentração de vários dos metabólitos identificados. Assim, pode existir sinergismo entre os diversos constituintes e a citotoxicidade de algum dos compostos pode estar modulada pela presença de outros. Além disso, o conjunto de componentes do óleo essencial influi na capacidade de penetração celular, a atração lipofílica ou hidrofílica, na fixação nas paredes e membranas celulares e na distribuição celular. Esta última característica é muito importante porque a distribuição do óleo na célula determina os diferentes tipos de reações que podem ocorrer, em função da sua compartimentação na célula.<sup>16</sup>

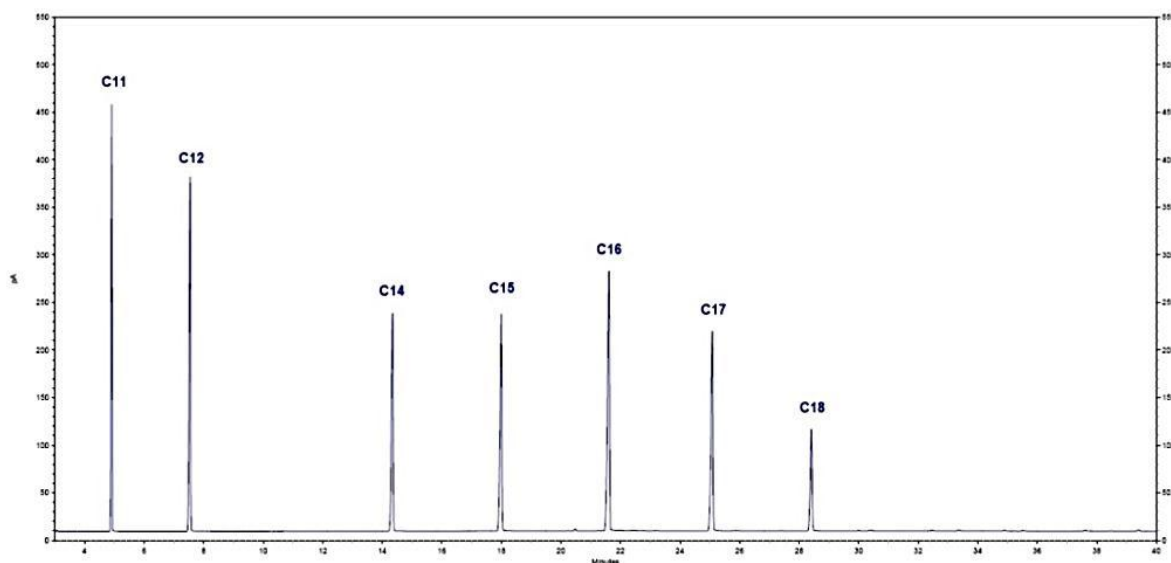
## **2. Óleos essenciais das folhas de *S. stipulaceum***

Um líquido amarelo e viscoso de cheiro forte e agradável foi obtido após hidrodestilação das folhas de *S. stipulaceum*. Este foi analisado imediatamente por

cromatografia a gás acoplada a detector por ionização de chama (CG-FID) e cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).

### 2.1. Composição do óleo essencial

Na Figura 26 é apresentado o cromatograma dos padrões de hidrocarbonetos que foram injetados no cromatógrafo nas mesmas condições experimentais de análise dos óleos essenciais.



**Figura 26.** Cromatograma de CG-FID dos padrões de hidrocarbonetos lineares.

A Tabela 12 mostra os tempos de retenção dos padrões de hidrocarbonetos injetados. Estes dados foram usados para o cálculo do índice de retenção linear dos constituintes do óleo essencial segundo a Equação 2 (pág. 19).

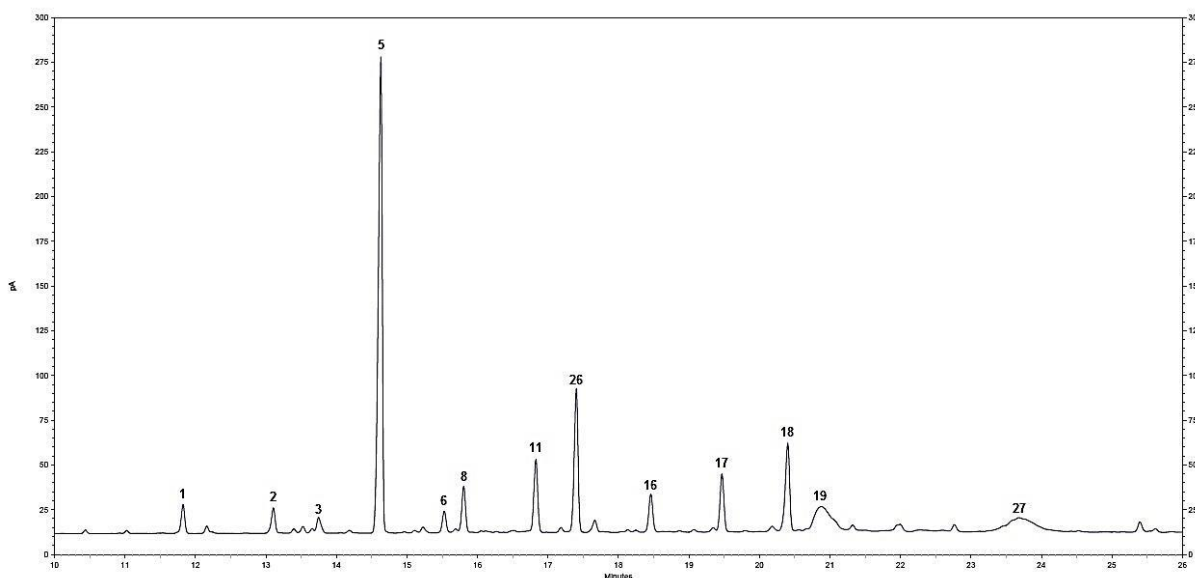
**Tabela 12.** Padrões de hidrocarbonetos lineares para cálculo de índice de retenção linear

Hidrocarboneto	TR (min)
C <sub>11</sub>	4,845
C <sub>12</sub>	7,474
C <sub>14</sub>	14,275
C <sub>15</sub>	17,933
C <sub>16</sub>	21,545
C <sub>17</sub>	25,022
C <sub>18</sub>	28,343

A análise dos cromatogramas de CG-FID (Figura 27) e CG-EM do óleo essencial isolado das folhas de *S. stipulaceum* permitiu a identificação de 13 compostos (Tabela 13, pág. 59). A identificação dos constituintes do óleo essencial foi baseada no método de Kováts,



para condições não isotérmicas utilizando a definição de Van Den Dool e Kratz, segundo a comparação com os tempos de retenção de hidrocarbonetos saturados. Além disso, os espectros de massas dos compostos de cada pico do cromatograma de CG-EM do óleo foram comparados com os espectros da biblioteca espectral NIST11.



**Figura 27.** Cromatograma de CG-FID do óleo essencial das folhas de *S. stipulaceum*.

A composição química do óleo essencial das folhas é apresentada na Tabela 13 (pág. 59). Os índices de retenção lineares calculados ( $IRL_C$ ) são próximos aos índices correspondentes obtidos a partir de dados da literatura ( $IRL_L$ ), sendo possível a identificação dos componentes com tempos de retenção registrados entre 11,823 e 23,679 min.

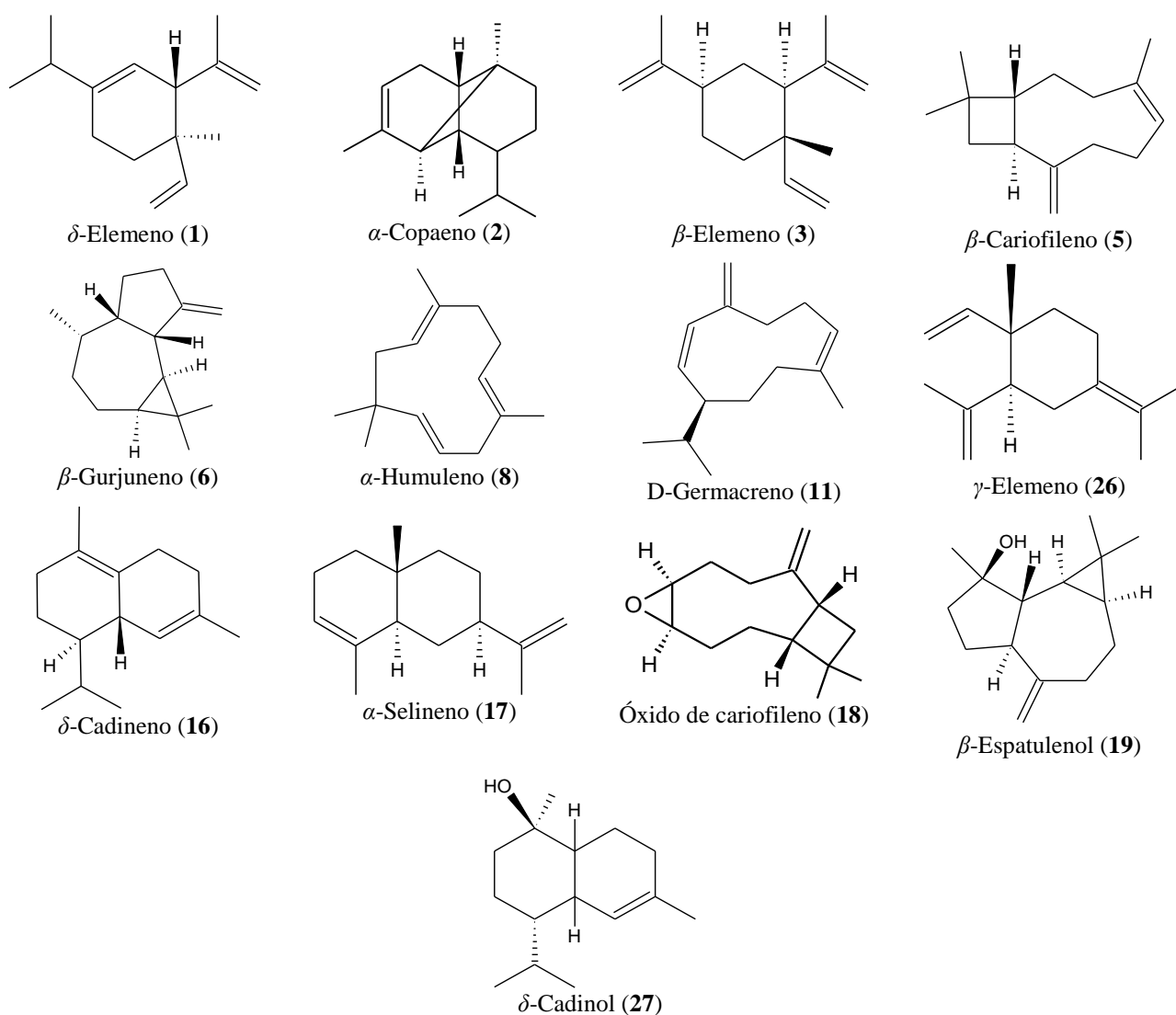
O óleo essencial extraído das folhas de *S. stipulaceum* é constituído principalmente por hidrocarbonetos sesquiterpênicos (66,94%), divididos em monocíclicos (21,56%), bicíclicos (41,78%) e tricíclicos (3,60%). Fazem parte do óleo também epóxidos sesquiterpênicos (7,80%) e sesquiterpenois (16,37%).

**Tabela 13.** Constituintes químicos e informações cromatográficas do óleo essencial das folhas de *S. stipulaceum* coletados no mês de setembro

TR (min)	Composto	PR (%)	IRL <sub>C</sub>	IRL <sub>L</sub>	PS (%)	Tipo de composto
11,823	$\delta$ -Elemeno (1)	2,14 $\pm$ 0,27	1328	1335	84	Sesquiterpeno monocíclico
13,105	$\alpha$ -Copaeno (2)	1,89 $\pm$ 0,12	1366	1374	86	Sesquiterpeno tricíclico
13,746	$\beta$ -Elemeno (3)	1,40 $\pm$ 0,15	1384	1389	78	Sesquiterpeno monocíclico
14,630	$\beta$ -Cariofileno (5)	34,65 $\pm$ 0,89	1410	1418	87	Sesquiterpeno bicíclico
15,529	$\beta$ -Gurjuneno (6)	1,71 $\pm$ 0,13	1434	1431	89	Sesquiterpeno tricíclico
15,804	$\alpha$ -Humuleno (8)	3,40 $\pm$ 0,07	1442	1442	87	Sesquiterpeno monocíclico
16,830	D-Germacreno (11)	5,08 $\pm$ 0,45	1470	1480	87	Sesquiterpeno monocíclico
17,403	$\gamma$ -Elemeno (26)	9,54 $\pm$ 1,04	1486	1478	91	Sesquiterpeno monocíclico
18,458	$\delta$ -Cadineno (16)	2,85 $\pm$ 0,23	1515	1522	87	Sesquiterpeno bicíclico
19,468	$\alpha$ -Selineno (17)	4,29 $\pm$ 0,30	1543	1540	84	Sesquiterpeno bicíclico
20,402	Óxido de cariofileno (18)	7,80 $\pm$ 0,32	1568	1573	84	Epóxido sesquiterpénico
20,883	$\beta$ -Espatuleno (19)	8,85 $\pm$ 0,25	1582	1576	-	Sesquiterpenol
23,679	$\delta$ -Cadinol (27)	7,52 $\pm$ 0,75	1661	1658	-	Sesquiterpenol

TR= tempo de retenção; PR= porcentagem relativa da área sob o pico; IRL<sub>C</sub>= índice de retenção linear calculado; IRL<sub>L</sub>= índice de retenção linear da literatura<sup>53</sup>; PS= porcentagem de similaridade baseada no banco de dados NIST 11.0.

Assim como nas flores, o componente principal do óleo essencial das folhas é o sesquiterpeno  $\beta$ -cariofileno (34,65%) seguido pelo  $\gamma$ -elemeno (9,54%). Outros componentes principais são  $\beta$ -espatulenol (7,52%), óxido de cariofileno (7,80%),  $\delta$ -cadinol (7,52%), D-germacreno (5,08%),  $\alpha$ -selineno (4,29%) e  $\alpha$ -humuleno (3,40%). Também foram identificados os compostos  $\delta$ -cadineno (2,85%),  $\delta$ -elemeno (2,14%),  $\alpha$ -copaeno (1,89%),  $\beta$ -gurjuneno (1,71%) e  $\beta$ -elemeno (1,40%). A Figura 28 mostra a estrutura química dos constituintes identificados no óleo essencial das folhas de *S. stipulaceum*.



**Figura 28.** Estrutura química dos compostos identificados no óleo essencial das folhas de *S. stipulaceum* coletadas em setembro (FO-S).

Em estudos previamente relatados sobre a composição do óleo essencial das folhas de *S. stipulaceum*, foram identificados os compostos  $\delta$ -elemeno,  $\alpha$ -copaeno, Z-cariofileno, E-cariofileno,  $\alpha$ -humuleno, D-germacreno, biciclogermacreno, B-germacreno, óxido de cariofileno, globulol, viridiflorol, espatulenol,  $\delta$ -cadinol e fitol.<sup>19</sup> Neste trabalho, os compostos  $\delta$ -elemeno,  $\alpha$ -copaeno,  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno, D-germacreno, óxido de cariofileno, espatulenol e  $\delta$ -cadinol foram identificados também. Porém, os compostos  $\beta$ -gurjuneno,  $\gamma$ -elemeno,  $\delta$ -cadineno e  $\alpha$ -selineno foram identificados pela primeira vez neste óleo essencial. Óleos essenciais extraídos das folhas de outras espécies do gênero *Solanum* têm compostos que foram identificados também neste trabalho, como mostrado na Tabela 14.

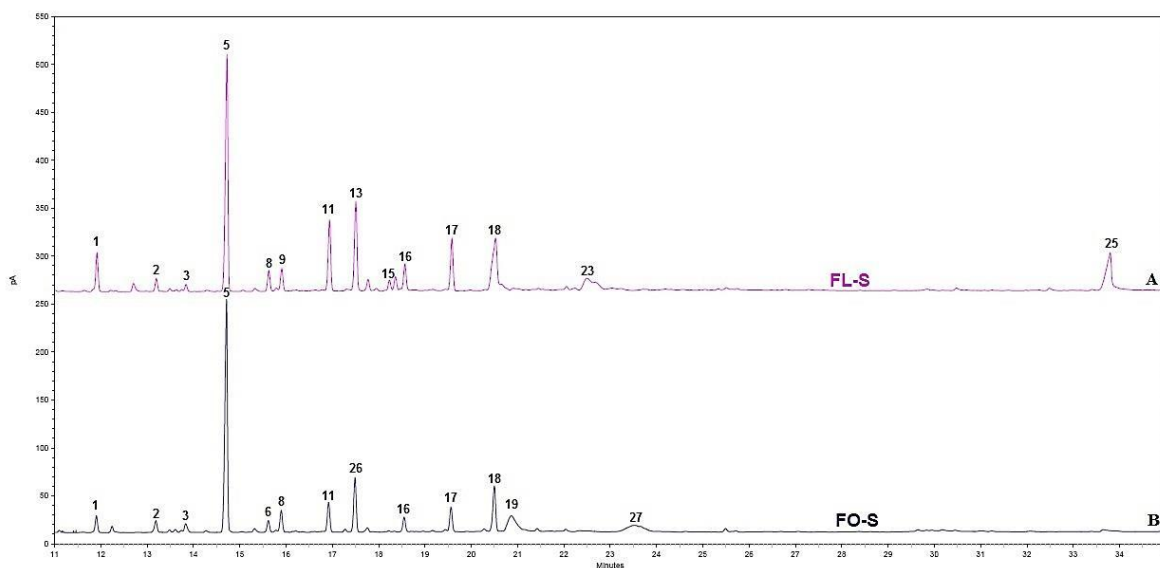
**Tabela 14.** Compostos identificados nos óleos essenciais das folhas de outras espécies do gênero *Solanum* comuns aos constituintes do óleo essencial de *S. stipulaceum*

Espécie	Compostos comuns às folhas de <i>S. stipulaceum</i>
<i>S. bicolor</i> <sup>87</sup>	$\beta$ -Cariofileno, $\alpha$ -humuleno, D-germacreno, $\delta$ -cadineno, $\beta$ -espatulenol, óxido de cariofileno e $\delta$ -cadinol
<i>S. erianthum</i> <sup>83</sup>	$\beta$ -Cariofileno, D-germacreno, $\beta$ -elemeno, $\alpha$ -copaeno, $\beta$ -gurjuneno e $\delta$ -cadineno
<i>S. juglandifolium</i> <sup>88</sup>	$\delta$ -Elemeno, D-germacreno, $\beta$ -elemeno, $\alpha$ -copaeno, $\delta$ -cadineno e $\beta$ -cariofileno
<i>S. macranthum</i> <sup>83</sup>	$\beta$ -Cariofileno
<i>S. nigrum</i> var. <i>virginicum</i> <sup>89</sup>	D-Germacreno, $\beta$ -elemeno, $\alpha$ -copaeno, $\delta$ -cadineno, $\beta$ -gurjuneno, $\beta$ -cariofileno e óxido de cariofileno
<i>S. pseudocapsicum</i> <sup>90</sup>	$\beta$ -Cariofileno e $\delta$ -cadineno
<i>S. sarrachoides</i> <sup>91</sup>	$\beta$ -Cariofileno e óxido de cariofileno
<i>S. spirale</i> <sup>84</sup>	$\alpha$ -Humuleno e $\alpha$ -selineno
<i>S. torvum</i> <sup>92</sup>	$\beta$ -Cariofileno e D-germacreno
<i>S. verbascifolium</i> <sup>93</sup>	$\gamma$ -Elemeno
<i>S. xanthocarpum</i> <sup>94</sup>	$\beta$ -Cariofileno

Os óleos essenciais das espécies do gênero *Solanum* são classificados<sup>89</sup> como (I) óleos abundantes em hidrocarbonetos monoterpênicos, (II) óleos abundantes em hidrocarbonetos sesquiterpênicos, (III) óleos abundantes em monoterpênicos oxigenados e ácido graxos, (IV) óleos ricos em ácido graxos (V), óleos ricos em diterpenos e ácidos graxos e (VI) óleos com

proporções significativas de derivados terpênicos como alcoóis, ésteres e lactonas. Como resultado, o óleo essencial das folhas de *S. stipulaceum* classifica-se no segundo grupo sendo que 66,94% da composição total do óleo corresponde a hidrocarbonetos sesquiterpênicos.

A Figura 29 apresenta os cromatogramas de CG-FID dos óleos essenciais obtidos das flores (A) e das folhas (B) coletadas no mesmo mês. Observa-se grande similaridade nestes cromatogramas, embora apresente diferenças na composição química destes óleos essenciais. Os sesquiterpenos  $\beta$ -cariofileno e óxido de cariofileno fazem parte dos compostos majoritários comuns a ambos os óleos essenciais. Por outro lado, os compostos aromadendreno,  $\gamma$ -gurjuneno, 7-*epi*- $\alpha$ -cadineno, óxido-(2) de aloaromadendreno e ácido palmítico não foram detectados no óleo essencial das folhas. Enquanto que os compostos  $\gamma$ -elemeno e  $\delta$ -cadinol foram identificados em importantes percentagens relativas no óleo essencial das folhas e não foram detectados nas flores. Particularmente, os compostos  $\beta$ -gurjuneno e  $\beta$ -espatulenol foram detectados no óleo essencial das folhas, porém foram identificados nas flores coletadas em maio e não no óleo obtido no mês de setembro.



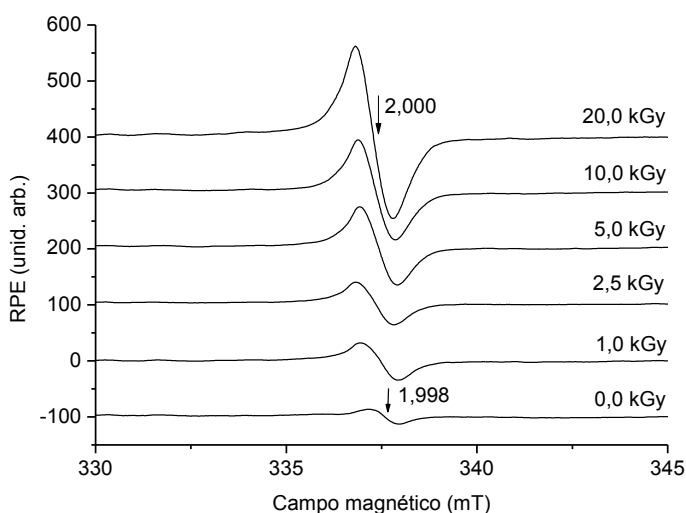
**Figura 29.** Cromatogramas de CG-FID dos óleos essenciais isolados das flores FL-S (A) e folhas FO-S (B) de *S. stipulaceum*.

## 2.2. Efeito da radiação gama na presença de radicais livres

A absorção de radiação ionizante pelo material vegetal tem como consequência a formação de radicais livres que podem ser detectados por ressonância paramagnética eletrônica (RPE). Geralmente, o tempo de vida destes radicais é curto. No entanto, em amostras sólidas e secas, são relativamente estáveis e podem ser detectados durante um longo

período de tempo após o tratamento por irradiação.<sup>95</sup> A intensidade do sinal de RPE está relacionada com a concentração de radicais na amostra. Além disso, o valor do fator  $g$  é uma característica intrínseca da espécie paramagnética.<sup>96</sup>

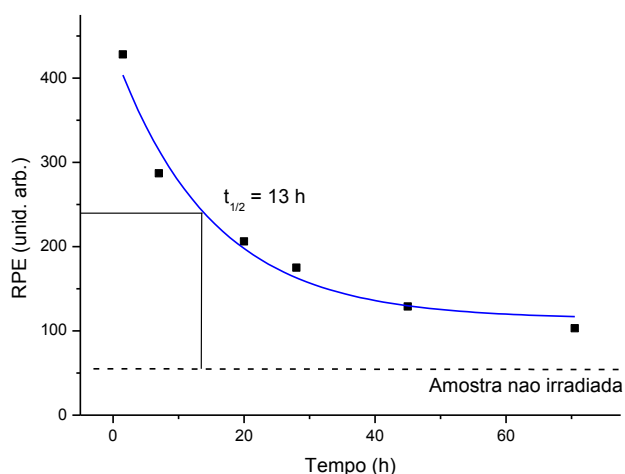
A análise de RPE das folhas de *S. stipulaceum* não irradiadas mostrou a presença de um centro paramagnético axialmente simétrico com  $g_{\parallel} = 1,998(1)$  e  $g_{\perp} = 2,000(1)$  (Figura 30). Entretanto, as análises de RPE das amostras irradiadas após 3 h do procedimento de irradiação mostraram a presença de outra espécie radical com um fator  $g$  igual a  $2,000(1)$ . A intensidade do sinal de RPE aumentou conforme o aumento da dose de radiação gama, como é mostrado na Figura 30. Esses resultados sugerem que o tratamento de irradiação induz a formação de radicais nas folhas de *S. stipulaceum*, caracterizados por um valor do fator  $g$  parecido com o radical “nativo”. Além disso, o aumento na concentração destas espécies paramagnéticas está diretamente relacionado com o aumento da dose de radiação gama.



**Figura 30.** Espectros de RPE das folhas de *S. stipulaceum* (FO-S) submetidas a diferentes doses de radiação gama.

O sinal de RPE observado nas folhas não irradiadas pode estar relacionado com a presença de radicais próprios da planta, que têm sido relatados como radicais de açúcares e celulose ou ter como origem semiquinonas e lignina.<sup>97-98</sup> Diferentes estudos têm relatado a presença de radicais “nativos” em várias especiarias e plantas aromáticas e medicinais, como por exemplo: *Piper nigrum* (pimenta-preta), *Origanum vulgare* (orégano),<sup>99</sup> *Petroselinum crispum* (perexil), *Anethum graveolens* (endro),<sup>100</sup> *Withania somnifera* (aswagandha), *Salacia reticulata* (vairi), *Embllica officinalis*<sup>52</sup>, *Curcuma longa* (haldi) e *Tinospora cordifolia* (guduchi).<sup>98</sup>

O resultado do decaimento do sinal de RPE para as folhas irradiadas a 20,0 kGy é apresentado na Figura 31. Observa-se que os radicais livres presentes na amostra inicialmente são altamente instáveis, com um tempo de meia vida de aproximadamente 13 h. Esses radicais presentes na amostra após irradiação podem ter reagido entre eles, produzindo compostos neutros, ou com compostos contidos nas folhas para produzir outro tipo de radicais que conduzem posteriormente à formação de produtos neutros não detectáveis pela RPE. A estabilidade desses radicais formados após irradiação depende principalmente da estrutura do material vegetal, da temperatura, da umidade e da presença de oxigênio e luz.<sup>98</sup>



**Figura 31.** Curva de decaimento do sinal da RPE com o tempo para as folhas de *S. stipulaceum* irradiadas a 20,0 kGy.

### 2.3. Efeito da radiação gama no rendimento

Os rendimentos da hidrodestilação das folhas coletadas em setembro e submetidas a diferentes doses de radiação gama (OEFO<sub>1</sub>, OEFO<sub>2,5</sub>, OEFO<sub>5</sub>, OEFO<sub>10</sub>, OEFO<sub>20</sub>), além das amostras não irradiadas (OEFO<sub>0</sub>), foram calculados segundo a Equação 1 (pág. 18). Estes resultados são apresentados na Tabela 15. O procedimento de irradiação, extração e análise cromatográfica foi realizado em triplicata.

**Tabela 15.** Rendimento dos óleos essenciais obtidos das folhas de *S. stipulaceum*

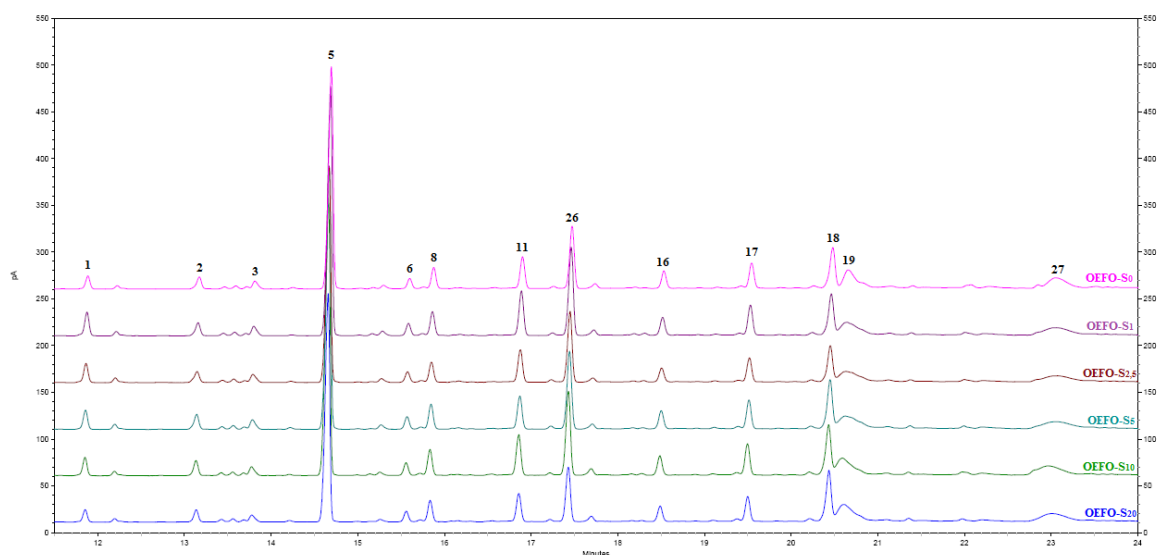
Amostra	Rendimento (%)
OEFO <sub>0</sub>	0,048 ± 0,010
OEFO <sub>1</sub>	0,059 ± 0,006
OEFO <sub>2,5</sub>	0,058 ± 0,006
OEFO <sub>5</sub>	0,049 ± 0,007
OEFO <sub>10</sub>	0,056 ± 0,005
OEFO <sub>20</sub>	0,055 ± 0,008

Esses resultados mostram que o procedimento extrativo é afetado levemente quando o material vegetal é irradiado, apesar de não existir uma relação direta entre a dose de radiação gama e a variação no rendimento da extração para as folhas de *S. stipulaceum*.

Análise de variância realizada para avaliar o efeito da radiação gama no rendimento da extração do óleo essencial mostrou que as variações observadas não são estatisticamente significativas, o que significa que o processo extrativo não é afetado de maneira significativa por efeito da radiação gama.

#### 2.4. Efeito da radiação gama na composição do óleo essencial

Na Figura 32 encontram-se os cromatogramas de CG-FID dos óleos essenciais obtidos das folhas irradiadas e a amostra controle (0,0 kGy). Pode-se observar que não há variações qualitativas consideráveis nos constituintes dos óleos essenciais.



**Figura 32.** Cromatogramas de CG-FID dos óleos essenciais obtidos das folhas da amostra controle e as amostras irradiadas

Através da análise dos cromatogramas foi possível calcular a proporção relativa dos compostos identificados nas amostras irradiadas (OEFO-S<sub>1</sub>, OEFO-S<sub>2,5</sub>, OEFO-S<sub>5</sub>, OEFO-S<sub>10</sub>, OEFO-S<sub>20</sub>) comparado com a amostra que não foi submetida à radiação (OEFO-S<sub>0</sub>), estes resultados são apresentados na Tabela 16 (pág. 66).



**Tabela 16.** Composição química dos óleos essenciais das folhas irradiadas de *S. stipulaceum* coletadas em setembro

Nome do composto	Composição $\pm$ DP (%)					
	OEFO <sub>0</sub>	OEFO <sub>1</sub>	OEFO <sub>2,5</sub>	OEFO <sub>5</sub>	OEFO <sub>10</sub>	OEFO <sub>20</sub>
$\delta$ -Elemeno (1)	2,1 $\pm$ 0,3	3,5 $\pm$ 0,9	3,1 $\pm$ 0,8	2,8 $\pm$ 0,5	2,5 $\pm$ 0,3	2,5 $\pm$ 0,5
$\alpha$ -Copaeno (2)	1,9 $\pm$ 0,1	1,8 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,2	2,0 $\pm$ 0,1	1,9 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,1
$\beta$ -Elemeno (3)	1,4 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,1
$\beta$ -Cariofileno (5)	34,6 $\pm$ 0,9	35,3 $\pm$ 0,3	36,7 $\pm$ 1,0	35,9 $\pm$ 1,5	35,9 $\pm$ 1,2	37,2 $\pm$ 1,7
$\beta$ -Gurjuneno (6)	1,7 $\pm$ 0,1	1,8 $\pm$ 0,1	1,8 $\pm$ 0,1	1,7 $\pm$ 0,0	1,7 $\pm$ 0,1	1,7 $\pm$ 0,1
$\alpha$ -Humuleno (8)	3,4 $\pm$ 0,1	3,3 $\pm$ 0,1	3,4 $\pm$ 0,0	3,4 $\pm$ 0,1	3,4 $\pm$ 0,1	3,5 $\pm$ 0,1
D-Germacreno (11)	5,1 $\pm$ 0,4	6,6 $\pm$ 0,4	5,7 $\pm$ 0,5	5,6 $\pm$ 0,6	5,4 $\pm$ 0,2	5,0 $\pm$ 0,3
$\gamma$ -Elemeno (26)	9,5 $\pm$ 1,0	12,4 $\pm$ 0,9	11,5 $\pm$ 1,1	11,4 $\pm$ 0,8	11,3 $\pm$ 0,4	10,5 $\pm$ 1,6
$\delta$ -Cadineno (16)	2,8 $\pm$ 0,2	2,5 $\pm$ 0,1	2,7 $\pm$ 0,1	2,8 $\pm$ 0,2	2,7 $\pm$ 0,1	2,7 $\pm$ 0,2
$\alpha$ -Selineno (17)	4,3 $\pm$ 0,3	4,5 $\pm$ 0,0	4,2 $\pm$ 0,0	4,2 $\pm$ 0,1	4,3 $\pm$ 0,0	4,1 $\pm$ 0,3
Oxido de cariofileno (18)	7,8 $\pm$ 0,3	6,2 $\pm$ 1	6,6 $\pm$ 1,2	7,3 $\pm$ 0,9	8,8 $\pm$ 1,7	8,9 $\pm$ 1,3
$\beta$ -Espatuleno (19)	8,8 $\pm$ 0,3	6,8 $\pm$ 0,9	7,2 $\pm$ 1,4	7,2 $\pm$ 0,2	7,7 $\pm$ 0,1	8,4 $\pm$ 1,7
$\delta$ -Cadinol (28)	7,5 $\pm$ 0,8	5,7 $\pm$ 1,0	5,2 $\pm$ 1,0	6,1 $\pm$ 0,7	5,6 $\pm$ 0,5	5,0 $\pm$ 1,1

De acordo com os dados apresentados na Tabela 16, observa-se que não há alterações importantes na maioria dos componentes identificados dos óleos essenciais obtidos após irradiação das folhas. Para os compostos  $\alpha$ -copaeno,  $\beta$ -elemeno,  $\beta$ -gurjuneno,  $\alpha$ -humuleno,  $\delta$ -cadineno e  $\alpha$ -selineno, as variações na concentração foram pouco significativas. Por sua vez, a concentração dos compostos  $\delta$ -elemeno,  $\beta$ -cariofileno, D-germacreno e  $\gamma$ -elemeno aumentou quando as folhas foram submetidas a uma dose de 1,0 kGy, enquanto uma diminuição na concentração do óxido de cariofileno,  $\beta$ -espatuleno e  $\delta$ -cadineno foi observada sob as mesmas condições de radiação.

Também foi observado que doses maiores de radiação gama provocaram diminuições na concentração do  $\delta$ -elemeno, embora todos os óleos essenciais obtidos a partir das amostras irradiadas apresentaram maior concentração deste sesquiterpeno em relação a amostra não irradiada.

Para o composto majoritário,  $\beta$ -cariofileno, observou-se um aumento na concentração quando as folhas foram irradiadas a dose de até 2,5 kGy. Para doses de 5,0 kGy e 10,0 kGy, obteve-se o mesmo resultado para este composto e, ao irradiar a amostra com 20,0 kGy, a concentração do  $\beta$ -cariofileno sofre ligeiro aumento.

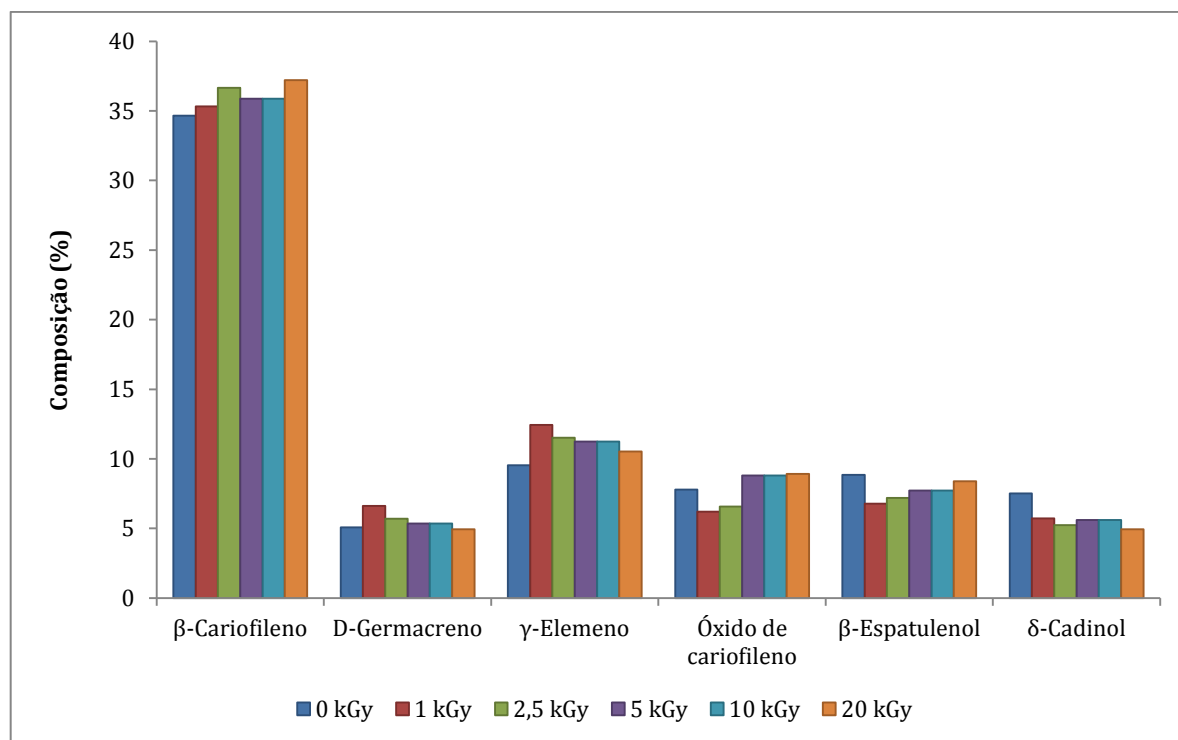
O comportamento da concentração dos compostos D-germacreno e  $\gamma$ -elemeno é similar nos óleos essenciais das amostras irradiadas, sendo que para ambos os compostos a concentração diminui quanto maior for a dose de radiação gama. Embora em todas as amostras encontram-se em maior abundância em relação às folhas não irradiadas.

A composição dos sesquiterpenos oxigenados, óxido de cariofileno e  $\beta$ -espatulenol encontrou-se afetada pela radiação gama. Assim, a concentração diminui de forma considerável com uma dose de 1,0 kGy e aumenta gradualmente com o aumento da dose de radiação gama. Embora a concentração desses compostos nas folhas submetidas à maior dose de radiação não seja muito diferente em relação às amostras não irradiadas.

Por fim, a abundância do  $\delta$ -cadinol nos óleos essenciais das amostras irradiadas foi menor em relação à amostra controle. Embora as variações observadas não mantenham nenhuma relação com a dose de radiação gama, por apresentarem um comportamento irregular.

Na Figura 33 (pág. 68) é apresentada a variação porcentual da área sob pico dos componentes majoritários identificados no óleo essencial das folhas de *S. stipulaceum* submetidas a radiação gama.

Embora os dados apresentados mostrem que a radiação gama afeta de forma irregular a concentração dos componentes identificados no óleo essencial das folhas, a análise de variância à qual os resultados foram submetidos mostra que as variações da composição do óleo não são estatisticamente significativas, exceto para os compostos D-germacreno e  $\delta$ -cadinol para os quais a variância foi significativa. Este resultado implica que a irradiação das folhas de *S. stipulaceum* até uma dose igual a 20,0 kGy é segura para a descontaminação microbiológica deste material sem afetar de forma considerável os seus metabólitos secundários voláteis.



**Figura 33.** Composição dos constituintes majoritários dos óleos essenciais obtidos das folhas coletadas em setembro e submetidas a radiação gama.

Ao comparar os resultados obtidos do efeito da radiação gama sobre a composição química dos óleos essenciais das flores e folhas de *S. stipulaceum*, observou-se que os metabólitos voláteis presentes nas flores apresentam maior suscetibilidade a este tipo de radiação do que as folhas. A resistência à radiação gama dos metabólitos secundários nas plantas tem sido relacionada com a presença de compostos antioxidantes,<sup>33</sup> uma vez que, os radicais produzidos pelo efeito da radiação podem ser sequestrados por esses compostos, evitando alterações estruturais nos metabólitos.

### 2.5. *Atividade antioxidante do óleo essencial das folhas de S. stipulaceum e efeito da radiação gama*

Os resultados da atividade antioxidante dos óleos essenciais obtidos a partir das folhas irradiadas e não irradiadas como porcentagem de atividade antioxidante (%AA) a 5 mg/mL e a concentração efetiva 50 (CE<sub>50</sub>) são apresentadas na Tabela 17 (pág. 69).

**Tabela 17.** Atividade antioxidante dos óleos essenciais das folhas de *S. stipulaceum*

Amostra	%AA	CE <sub>50</sub> (mg/mL)
OEFO <sub>0</sub>	82,87 ± 1,43	1,92
OEFO <sub>1</sub>	71,02 ± 2,33	1,86
OEFO <sub>2,5</sub>	76,93 ± 0,83	1,90
OEFO <sub>5</sub>	89,22 ± 1,95	1,18
OEFO <sub>10</sub>	67,49 ± 1,39	2,71
OEFO <sub>20</sub>	65,61 ± 2,90	5,13
Ácido L-ascórbico	97,45 ± 1,78	< 0,08

Esses resultados mostram que o óleo essencial das folhas de *S. stipulaceum* não irradiadas apresenta importante atividade antioxidante, pois consegue sequestrar mais de 80% do radical livre DPPH na menor concentração testada (5 mg/mL) com CE<sub>50</sub> igual a 1,92 mg/mL. A presença de compostos sesquiterpênicos nos óleos essenciais tem sido relacionada com propriedades antioxidantes. Isto explica a alta porcentagem de atividade apresentada pelo óleo essencial das folhas de *S. stipulaceum*, uma vez que todos os compostos voláteis identificados possuem esqueleto sesquiterpênico.<sup>101</sup>

Além disso, a literatura reporta propriedades antioxidantes para alguns dos compostos identificados. Este é o caso do composto maioritário do óleo essencial, o  $\beta$ -cariofileno, reportado como um importante agente sequestrante de radicais livres, principalmente radicais hidroxila e ânions superóxido. Embora, os autores desse estudo reportem que o  $\beta$ -cariofileno não é um sequestrante efetivo de radicais DPPH. Contrário ao observado para o óleo essencial das folhas de *S. stipulaceum*, isto pode estar relacionado com sinergismo entre este sesquiterpeno e outros componentes do óleo essencial, o que resulta em um aumento da atividade sequestrante de radicais.<sup>54</sup>

Um estudo realizado sobre a atividade antioxidante dos compostos voláteis de *Melaleuca leucadendron* (Myrtaceae) avaliou a porcentagem de inibição do radical livre DPPH do  $\beta$ -cariofileno, obtendo 60,76% de inibição a uma concentração igual a 5 mg/mL e CI<sub>50</sub> de 3,68 mg/mL.<sup>102</sup> Além disto, um estudo realizado sobre os óleos essenciais de *Marrubium peregrinum* L. (Lamiaceae) concluiu que os compostos  $\beta$ -cariofileno, D-germacreno, espatulenol e oxido de cariofileno são os responsáveis pela capacidade sequestrante de radicais deste óleo essencial.<sup>103</sup>

Poucos estudos têm sido reportados sobre a atividade antioxidante dos óleos essenciais das folhas de outras espécies da família Solanaceae, sendo que somente um estudo foi encontrado na literatura para óleos essenciais do gênero *Solanum*. Assim, o óleo essencial das folhas de *S. spirale* apresentou  $CI_{50} = 41,89$  mg/mL que, segundo os autores, significa fraca atividade antioxidante quando comparada com as substâncias controle.<sup>84</sup> O óleo essencial de *Capsicum annuum* apresentou porcentagem de inibição do DPPH maior a 90% a uma concentração de 5 mg/mL, sendo identificado o capsaicinol como o composto responsável pela atividade antioxidante observada.<sup>104</sup>

Sobre o efeito da radiação gama na atividade antioxidante, observam-se alterações importantes da atividade dos óleos essenciais com relação ao óleo essencial obtido das folhas não irradiadas. As doses de radiação iguais a 1,0 e 2,5 kGy diminuem a atividade antioxidante do óleo, enquanto que uma dose de radiação gama igual a 5,0 kGy aumenta a atividade antioxidante do óleo até 89,22%. No entanto, os óleos essenciais obtidos de folhas submetidas a doses maiores de radiação (10,0 e 20,0 kGy) apresentaram menor porcentagem de atividade antioxidante em comparação com os demais óleos.

Com respeito à  $CE_{50}$  observa-se que baixas doses de radiação gama não afetam significativamente a concentração efetiva do óleo essencial. Houve uma diminuição neste parâmetro quando as folhas foram irradiadas a 5,0 kGy e, finalmente, observa-se que doses de 10,0 e 20,0 kGy diminuíram a atividade antioxidante dos óleos essenciais observando-se um aumento na  $CE_{50}$ .

Considerando os óleos essenciais como uma mistura complexa de compostos voláteis, não é possível relacionar as alterações na atividade antioxidante com as variações obtidas na composição química após exposição à radiação gama. O conjunto de compostos voláteis influencia a capacidade sequestrante do óleo, sendo possível ainda que a atividade antioxidante seja o resultado de sinergismo entre os componentes de óleo essencial.<sup>105</sup>

Estes resultados diferem daqueles obtidos para óleos essenciais de *Zataria multiflora*, para os quais a capacidade sequestrante de radicais livres não foi afetada pela radiação a 10 e 25 kGy.<sup>45</sup> No mesmo contexto, as propriedades antioxidantes dos óleos essenciais de *Cuminum cyminum*, antes e após o tratamento de irradiação (10 e 25 kGy) não apresentaram alterações significativas.<sup>40</sup> No entanto, a composição química destes óleos essenciais é diferente do óleo essencial das folhas de *S. stipulaceum* e seus constituintes voláteis foram afetados de maneiras diferentes pela radiação gama.

## 2.6. Atividade citotóxica do óleo essencial das folhas de *S. stipulaceum* e efeito da radiação gama

Os resultados do teste de citotoxicidade dos óleos essenciais das folhas irradiadas e não irradiadas sobre células tumorais de leucemia aguda são apresentados na Tabela 18, como a concentração do óleo essencial que reduz a viabilidade celular a 50% (CI<sub>50</sub>).

**Tabela 18.** Atividade citotóxica *in vitro* dos óleos essenciais das folhas de *S. stipulaceum*, etoposídeo (controle) e  $\beta$ -cariofileno (padrão)

Amostra	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) $\pm$ DP		
	Linhagem celular		
	HL-60	THP-1	Wi-26VA4
OEFO <sub>0</sub>	39,04 $\pm$ 4,32	32,31 $\pm$ 3,07	>100
OEFO <sub>1</sub>	42,63 $\pm$ 3,12	27,85 $\pm$ 2,46	91,3 $\pm$ 7,18
OEFO <sub>2,5</sub>	32,70 $\pm$ 2,87	19,97 $\pm$ 1,45	93,11 $\pm$ 6,20
OEFO <sub>5</sub>	18,98 $\pm$ 1,53	17,52 $\pm$ 1,38	89,15 $\pm$ 4,16
OEFO <sub>10</sub>	29,56 $\pm$ 3,45	15,59 $\pm$ 1,10	81,15 $\pm$ 4,16
OEFO <sub>20</sub>	63,45 $\pm$ 4,24	14,00 $\pm$ 0,95	72,49 $\pm$ 4,71
Etoposídeo	9,70 $\pm$ 1,29	13,80 $\pm$ 1,81	7,10 $\pm$ 1,03
$\beta$ -Cariofileno	41,10 $\pm$ 1,34	26,87 $\pm$ 1,95	93,81 $\pm$ 4,68

O óleo essencial obtido das folhas não irradiadas e o  $\beta$ -cariofileno não apresentaram citotoxicidade frente aos modelos de leucemia mieloide aguda (HL-60 e THP-1), quando comparada com o controle não seletivo (etoposídeo). A atividade citotóxica dos óleos essenciais obtidos das amostras irradiadas foi maior do que a atividade apresentada pelos óleos das amostras não irradiadas. Nas células THP-1, a atividade citotóxica aumentou em uma relação direta com a dose de radiação. Além disso, os óleos essenciais obtidos das folhas irradiadas a doses maiores do que 2,5 kGy apresentaram citotoxicidade comparável com a ação correspondente do etoposídeo sobre essa linhagem celular. Estes resultados indicam que os óleos obtidos das amostras irradiadas têm um grande potencial como agentes anti-leucêmicos. Por outro lado, foram obtidos valores muito baixos de atividade citotóxica para a linhagem de células normais Wi-26VA4, indicando maior seletividade para linhagens celulares de leucemia.

Esses resultados sugerem a necessidade de estudar com maior profundidade os efeitos da radiação gama nas atividades biológicas dos óleos essenciais das folhas de *S. stipulaceum*, uma vez que, apesar de não ter observado variações estatisticamente significativas na composição do óleo essencial por CG-FID, importantes variações na atividade antileucêmica dos óleos foram observadas.

# **CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**



O estudo fitoquímico do extrato hexânico e da fração em diclorometano do extrato etanólico das folhas de *Solanum stipulaceum* Roem & Schult permitiu o isolamento e identificação de hidrocarbonetos lineares e dos metabólitos:  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, farnesilfarnesol e bis-(2-etil-hexil) ftalato. Isto contribui para o conhecimento da composição química desta planta, uma vez que poucos estudos têm sido desenvolvidos até o momento para seus extratos menos polares.

A composição química do óleo essencial das flores de *S. stipulaceum* é reportada pela primeira vez na literatura, além do estudo do efeito do tempo de coleta na composição deste óleo essencial. O estudo realizado sobre as flores coletadas no mês de maio (outono) permitiu a identificação de 24 compostos, apresentando maior riqueza em metabólitos secundários em relação ao óleo obtido no mês de setembro, sendo  $\beta$ -cariofileno,  $\gamma$ -gurjuneno e  $\beta$ -gurjuneno os compostos majoritários. Por sua vez, no óleo essencial obtido em setembro (primavera) os constituintes principais foram  $\beta$ -cariofileno, óxido de  $\beta$ -cariofileno, viridifloreno e ácido palmítico. Para os compostos  $\alpha$ -copaeno,  $\beta$ -elemeno e  $\alpha$ -humuleno, observou-se que o efeito da sazonalidade não é significativo.

A radiação gama afetou de maneira importante a composição do óleo essencial das flores de *S. stipulaceum* em uma dose de radiação maior do que 10,0 kGy. A 20,0 kGy, a concentração da maioria dos constituintes químicos do óleo volátil foi reduzida, excetuando o óxido de cariofileno e o ácido palmítico. De acordo com isso, foi sugerido um mecanismo de oxidação em condições radiculares para a obtenção do óxido de cariofileno a partir do  $\beta$ -cariofileno, mecanismo que pode ser extrapolado para diferentes compostos encontrados no óleo essencial com ligações duplas susceptíveis de oxidação. Isto pode explicar a diminuição na concentração de vários dos compostos voláteis nos óleos essenciais obtidos após irradiação do material vegetal.

O estudo da atividade antileucêmica dos óleos essenciais das flores de *S. stipulaceum* irradiadas e não irradiadas permitiu relacionar o aumento da dose de radiação gama com o aumento da citotoxicidade destes óleos. Porém, os valores encontrados para o IC<sub>50</sub> dos óleos essenciais não os sugerem como importantes agentes antileucêmicos.

A partir do estudo do óleo essencial das folhas de *S. stipulaceum* foi possível identificar 13 compostos, sendo os principais  $\beta$ -cariofileno,  $\gamma$ -elemeno,  $\beta$ -espatulenol, óxido de cariofileno e  $\delta$ -cadinol. Os compostos  $\beta$ -gurjuneno,  $\gamma$ -elemeno,  $\delta$ -cadineno e  $\alpha$ -selineno foram identificados pela primeira vez no óleo essencial das folhas desta espécie vegetal. As variações produzidas pela irradiação das folhas na composição do óleo essencial não foram

estatisticamente significativas o que sugere, em comparação com as flores, um mecanismo de proteção próprio das folhas desta espécie. Pois, mesmo tendo compostos similares, a maior dose de radiação testada (20,0 kGy) não afetou a composição do óleo essencial. As análises realizadas por RPE das folhas não irradiadas indicam a presença de radicais “nativos” no material vegetal, o que pode estar relacionado com a não formação de produtos radiolíticos.

As análises por ressonância paramagnética eletrônica das folhas irradiadas de *S. stipulaceum* mostraram uma relação direta entre a dose de radiação gama e a produção de radicais livres no material vegetal. Além disso, o estudo do decaimento da concentração dos radicais produzidos com o tempo mostrou a instabilidade destes radicais, uma vez que eles apresentam um tempo de meia vida de 13 h.

O estudo da atividade antioxidante dos óleos essenciais das folhas de *S. stipulaceum* irradiadas e não irradiadas mostrou que a radiação gama até 2,5 kGy não afeta de maneira considerável a atividade antioxidante destes óleos. Entretanto, uma dose de 5,0 kGy aumentou a atividade antiradicalar do óleo e, pelo contrário, doses maiores de radiação gama (10,0 e 20,0 kGy) diminuíram a atividade dos óleos essenciais.

A partir do estudo da atividade antileucêmica dos óleos essenciais das folhas de *S. stipulaceum* irradiadas e não irradiadas foi possível observar que os óleos obtidos a partir das amostras irradiadas a doses maiores do que 2,5 kGy apresentam importante atividade antileucêmica frente à linhagem celular THP-1, com valores de IC<sub>50</sub> similares aos apresentados pelo etoposídeo. Além disso, houve uma seletividade dos óleos essenciais para células cancerígenas, uma vez que não apresentaram citotoxicidade frente a células normais (Wi-26VA4).

Como perspectiva, pode-se dar continuidade ao isolamento e caracterização dos metabólitos secundários das folhas de *S. stipulaceum*, assim como é preciso estudar com maior profundidade os mecanismos pelos quais a radiação gama afeta a atividade biológica dos óleos essenciais isolados das flores e folhas desta espécie.

**REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS**

1. D'Arcy, W. G., The Solanaceae since 1976, with a review of its biogeography. In *Solanaceae III: Taxonomy, Chemistry, Evolution*, Hawkes, J. G.; Lester, R. N.; Nee, M.; Estrada, N., Eds. Royal Botanic Gardens Kew and Linnean society of London: Kew, U.K., 1991.
2. Stehmann, J. R.; Mentz, L. A.; Agra, M. F.; Vignoli-Silva, M.; Giacomini, L.; Rodrigues, I. M. C. Solanaceae Lista de Espécies da Flora do Brasil. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB14865> (Acessado em 17/10/15).
3. Stevens, P. F. Angiosperm Phylogeny Website. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/> (Acessado em 04/10/15).
4. Peralta, J.; Royuela, M. Herbario - Departamento de Ciencias del Medio Natural Universidad Pública de Navarra. <http://www.unavarra.es/herbario/htm/Solanaceae.htm> (Acessado em 16/10/15).
5. PBI Solanum Project. . <http://www.solanaceasource.org/> (Acessado em 17/10/15).
6. Orozco, C. I.; Beltrán, G. D.; Porras, N.; Nee, M., Listado de especies espinosas de *Solanum* L. (*Leptostemonum*, Solanaceae) *Biota Colombiana*, **2008**, 9 (2), 239-249.
7. Amir, M.; Kumar, S., Possible industrial applications of genus *Solanum* in twentyfirst century - A review. *Journal of Scientific & Industrial Research*, **2004**, 63, 116-124.
8. Silva, T. M. S.; Câmara, C. A.; Agra, M. d. F.; de Carvalho, M. G.; Frana, M. T.; Brandoline, S. V. P. B.; Paschoal, L. d. S.; Braz-Filho, R., Molluscicidal activity of *Solanum* species of the Northeast of Brazil on *Biomphalaria glabrata*. *Fitoterapia*, **2006**, 77 (6), 449-452.
9. Ribeiro, E. A. N.; Batitucci, M. C. P.; Lima, J. A. T.; Araújo, I. G. A.; Mauad, H.; Medeiros, I. A., Cardiovascular effects induced by the aqueous fraction of the ethanol extract of the stem of *Solanum stipulaceum* in rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **2002**, 12 (supl.), 34-35.
10. Silva, T. M. S.; Nascimento, R. J. B.; Batista, M. M.; Agra, M. F.; Camara, C. A., Brine shrimp bioassay of some species of *Solanum* from Northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, **2007**, 17 (1), 35-38.
11. Silva, T. M. S.; Batista, M. M.; Camara, C. A.; Agra, M. F., Molluscicidal activity of some Brazilian *Solanum* spp. (Solanaceae) against *Biomphalaria glabrata*. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, **2005**, 99 (4), 419-425.
12. Araujo, C. A.; Silva, D. M.; Vilar, E. L. S.; Palmeira, K. D. F.; Santos, K. N.; Oliveira, T. F.; Rocha, M. O.; Ferreira Júnior, W. S.; Batista, J. S.; Silva, M. S., Avaliação da atividade

antiulcerogênica do extrato aquoso das folhas de *Solanum stipulaceum*. In *XX Congresso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina "Prof. Dr. Francisco José de Abreu Matos"*, Fortaleza - Ceará - Brasil, 2011.

13. Bezerra, R.; Sarmiento, T.; de Amorim, C.; de Fátima, M.; de Luna, K.; da Silva, A., Flavonoides e atividade antioxidante das folhas de *Solanum stipulaceum*. In *28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Sociedade Brasileira de Química: Poços de Caldas, MG, 2005.

14. Bezerra, R.; de Luna, K.; Sarmiento, T.; de Fátima, M.; de Amorim, C., Presença de flavonóides nos tricomas de *Solanum asperum* Rich. e *Solanum stipulaceum*, *Solanum* sect. *Brevantherum*. In *29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Sociedade Brasileira de Química: Águas de Lindóia, SP, 2006.

15. Silva, T. M. S.; Agra, M. F.; Bhattacharyya, J., Chemotaxonomic Investigation of Two Species of *Solanum* Sect. *Brevantherum* Seithe (Solanaceae). *Acta Horticulturae*, **2007**, 745, 295-300.

16. Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M., Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, **2008**, 46 (2), 446-475.

17. Raut, J. S.; Karuppayil, S. M., A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, **2014**, 62, 250-264.

18. Angioni, A.; Barra, A.; Coroneo, V.; Dessi, S.; Cabras, P., Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54, 4364–4370.

19. Fátima, E.; Alves, C.; Bandeira, P.; Albuquerque, M.; Lemos, T.; Menezes, J.; Santos, H., Composição química do óleo essencial das folhas de *Solanum stipulaceum*. In *32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Fortaleza, CE, 2009.

20. WHO traditional medicine strategy: 2014-2023. World Health Organization: Geneva, 2013.

21. De La Cruz, M. G., O acesso aos fitoterápicos e plantas medicinais e a inclusão social - Diagnóstico situacional da cadeia produtiva farmacêutica no estado de Mato Grosso. Governo do estado de Mato Grosso: 2005.

22. Vieira, I. F. R.; Leal, A. S.; Krambrock, K.; Tambourg, E. B., Identification of Irradiated Medicinal Plants by Electron Paramagnetic Resonance. *Brazilian Journal of Food Technology*, **2007**, 10 (1), 63-69.

23. WHO, WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants. World Health Organization: Geneva, 2003.
24. Roberts, P. B., Food irradiation is safe: Half a century of studies. *Radiation Physics and Chemistry*, **2014**, *105*, 78-82.
25. CODEX, Codex General Standard for Irradiated Foods. CODEX STAN 106-1983, REV.1-2003. 2003.
26. Aquino, K. A. S., Sterilization by Gamma Irradiation. In *Gamma Radiation*, Adrovic, P. F., Ed. 2012.
27. WHO *High-dose irradiation: wholesomeness of food irradiated with doses above 10 kGy: report of a Joint FAO/IAEA/WHO study group*; World Health Organization: Geneva, 1999.
28. Silindir, M.; Özer, A. Y., Sterilization Methods and the Comparison of E-Beam Sterilization with Gamma Radiation Sterilization. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2009**, *34*, 43-53.
29. Sádecká, J., Influence of Two Sterilisation Ways, Gamma-Irradiation and Heat Treatment, on the Volatiles of Black Pepper (*Piper nigrum* L.). *Czech Journal of Food Sciences*, **2010**, *28* (1), 44-52.
30. Thongphasuk, P.; Thongphasuk, J.; Bavovada, R.; Chamulitrat, W., Effects of gamma irradiation on active components, free radicals and toxicity of cassumunar ginger rhizomes. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **2014**, *6* (7), 432 - 436.
31. Thongphasuk, P.; Thongphasuk, J., Effects of irradiation on active components of medicinal plants: A review. *Rangsit Journal of Arts and Sciences*, **2012**, *2* (1), 57-71.
32. 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**, *80* (11), 1247-1249.
33. Haddad, M.; Herent, M.-F.; Tilquin, B.; Quetin-Leclercq, J., Effect of Gamma and e-Beam Radiation on the Essential Oils of *Thymus vulgaris thymoliferum*, *Eucalyptus radiata*, and *Lavandula angustifolia*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2007**, *55* (15), 6082-6086.
34. Yalcin, H.; Ozturk, I.; Hayta, M.; Sagdic, O.; Gumus, T., Effect of Gamma-Irradiation on Some Chemical Characteristics and Volatile Content of Linseed. *Journal of Medicinal Food*, **2011**, *14* (10), 1223-1228.

35. Onyenekwe, P. C.; Stahl, M.; Adejo, G., Post-irradiation changes of the volatile oil constituents of *Monodora myristica* (Gaertn) Dunal. *Natural Product Research*, **2012**, *26* (21), 2030-2034.
36. Elizalde, J. J.; Espinoza, M., Effect of Ionizing Irradiation on Origanum Leaves (*Origanum vulgare* L.) Essential Oil Composition. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, **2011**, *14* (2), 164-171.
37. Saranz Camargo, E. E.; Telascra, M.; Vilegas, W., Effect of the decontamination using gamma irradiation on the essential oil of *Turnera diffusa* Wild. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, **2008**, *18* (3), 356-359.
38. 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**, *76* (11-12), 1869-1874.
39. Kirkin, C.; Mitrevski, B.; Gunes, G.; Marriott, P. J., Combined effects of gamma-irradiation and modified atmosphere packaging on quality of some spices. *Food Chemistry*, **2014**, *154*, 255-261.
40. Fatemi, F.; Dadkhah, A.; Rezaei, M. B.; Dini, S., Effect of  $\gamma$ -Irradiation on the Chemical Composition and Antioxidant Properties of Cumin Extracts. *Journal of Food Biochemistry*, **2013**, *37* (4), 432-439.
41. Fatemi, F.; Dini, S.; Rezaei, M. B.; Dadkhah, A.; Dabbagh, R.; Naij, S., The effect of  $\gamma$ -irradiation on the chemical composition and antioxidant activities of peppermint essential oil and extract. *Journal of Essential Oil Research*, **2014**, *26* (2), 97-104.
42. Karamalakova, Y.; Sharma, J.; Nikolova, G.; Stanev, S.; Arora, R.; Gadjeva, V.; Zheleva, A., Studies on Antioxidant Properties before and after UV- And  $\Gamma$ -Irradiation of Bulgarian Lavender Essential Oil Isolated from *Lavandula Angostifolia* Mill. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, **2014**, *27* (3), 3861-3865.
43. Fatemi, F.; Allameh, A.; Khalafi, H.; Rajaei, R.; Davoodian, N.; Rezaei, M. B., Biochemical Properties of  $\gamma$ -Irradiated Caraway Essential Oils. *Journal of Food Biochemistry*, **2011**, *35* (2), 650-662.
44. Zantar, S.; Haouzi, R.; Chabbi, M.; Laglaoui, A.; Mouhib, M.; Mohammed, B.; Bakkali, M.; Zerrouk, M. H., Effect of gamma irradiation on chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Thymus vulgaris* and *Mentha pulegium* essential oils. *Radiation Physics and Chemistry*, **2015**, *115*, 6-11.

45. Fatemi, F.; Asri, Y.; Rasooli, I.; Alipoor, S. D.; Shaterloo, M., Chemical composition and antioxidant properties of  $\gamma$ -irradiated Iranian *Zataria multiflora* extracts. *Pharmaceutical Biology*, **2012**, *50* (2), 232-238.
46. Kováts, E., Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentions indices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. *Helvetica Chimica Acta*, **1985**, *41* (7), 1915-1932.
47. Van Den Dool, H.; Kratz, P. D., A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*, **1963**, *11* (463-471).
48. Mensor, L. L.; Menezes, F. S.; Leitão, G. G.; Reis, A. S.; Santos, T. C. d.; Coube, C. S.; Leitão, S. G., Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research*, **2001**, *15* (2), 127-130.
49. Chen, Z.; Bertin, R.; Frolidi, G., EC<sub>50</sub> estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. *Food Chemistry*, **2013**, *138*, 414–420.
50. Streiff, S.; Ribeiro, N.; Wu, Z.; Gumienna-Kontecka, E.; Elhabiri, M.; Albrecht-Gary, A. M.; Ourisson, G.; Nakatani, Y., “Primitive” Membrane from Polyprenyl Phosphates and Polyprenyl Alcohols. *Chemistry & Biology*, **2007**, *14* (3), 313 - 319.
51. Ragasa, C. Y.; Buluran, A. I.; Mandia, E. H.; Shen, C.-C., Chemical constituents of *Cayratia trifolia*. *Der Pharma Chemica*, **2014**, *6* (6), 418-422.
52. Katade, S. R.; Pawar, P. V.; Tungikar, V. B.; Tambe, A. S.; Kalal, K. M.; Wakharkar, R. D.; Deshpande, N. R., Larvicidal Activity of Bis(2-ethylhexyl) Benzene-1,2-dicarboxylate from *Sterculia guttata* Seeds Against Two Mosquito Species. *Chemistry & Biodiversity*, **2006**, *3*, 49 - 53.
53. NIST Mass Spec Data Center, S. E. S., director,, Retention Indices. In *NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69*, Linstrom, P. J.; Mallard, W. G., Eds. National Institute of Standards and Technology: Gaithersburg MD, 20899.
54. Calleja, M. A.; Vieites, J. M.; Montero-Meléndez, T.; Torres, M. I.; Faus, M. J.; Gil, A.; Suárez, A., The antioxidant effect of  $\beta$ -caryophyllene protects rat liver from carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation. *British Journal of Nutrition*, **2013**, *109* (3), 394-401.
55. Sain, S.; Naoghare, P. K.; Devi, S. S.; Daiwile, A.; Krishnamurthi, K.; Arrigo, P.; Chakrabarti, T., Beta Caryophyllene and Caryophyllene Oxide, Isolated from *Aegle*



Marmelos, as the Potent Anti-inflammatory Agents against Lymphoma and Neuroblastoma Cells *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem*, **2014**, *13* (1), 45-55.

56. Chang, H. J.; Kim, J. M.; Lee, J. C.; Kim, W. K.; Chun, H. S., Protective effect of  $\beta$ -caryophyllene, a natural bicyclic sesquiterpene, against cerebral ischemic injury. *Journal of Medicinal Food*, **2013**, *16* (6), 471-480.

57. Goren, A. C.; Piozzi, F.; Akcicek, E.; Kılıç, T.; Çarıkçı, S.; Mozioglu, E.; Setzer, W. N., Essential oil composition of twenty-two *Stachys* species (mountain tea) and their biological activities. *Phytochemistry Letters*, **2011**, *4* (4), 448-453.

58. Basha, R. H.; Sankaranarayanan, C.,  $\beta$ -Caryophyllene, a natural sesquiterpene, modulates carbohydrate metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Acta Histochemica*, **2014**, *116* (8), 1469-1479.

59. Chavan, M. J.; Wakte, P. S.; Shinde, D. B., Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. *Phytomedicine*, **2010**, *17* (2), 149-151.

60. Sánchez, M. E.; Cruz, L.; Cupido, M. G.; García, G.; Arrieta, J., Gastroprotective activity of caryophyllene oxide: the role of nitric oxide, prostaglandins and sulfhydryls. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **2014**, *4* (9), 1-5.

61. Park, K.-R.; Nam, D.; Yun, H.-M.; Lee, S.-G.; Jang, H.-J.; Sethi, G.; Cho, S. K.; Ahn, K. S.,  $\beta$ -Caryophyllene oxide inhibits growth and induces apoptosis through the suppression of PI3K/AKT/mTOR/S6K1 pathways and ROS-mediated MAPKs activation. *Cancer Letters*, **2011**, *312* (2), 178-188.

62. Reinsvold, R. E.; Jinkerson, R. E.; Radakovits, R.; Posewitz, M. C.; Basu, C., The production of the sesquiterpene  $\beta$ -caryophyllene in a transgenic strain of the cyanobacterium *Synechocystis*. *Journal of Plant Physiology*, **2011**, *168* (8), 848-852.

63. Wang, G.; Li, X.; Huang, F.; Zhao, J.; Ding, H.; Cunningham, C.; Coad, J. E.; Flynn, D. C.; Reed, E.; Li, Q. Q., Antitumor effect of  $\beta$ -elemene in non-small-cell lung cancer cells is mediated via induction of cell cycle arrest and apoptotic cell death. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*, **2005**, *62* (7-8), 881-893.

64. Dai, Z.-J.; Tang, W.; Lu, W.-F.; Gao, J.; Kang, H.-F.; Ma, X.-B.; Min, W.-L.; Wang, X.-J.; Wu, W.-Y., Antiproliferative and apoptotic effects of  $\beta$ -elemene on human hepatoma HepG2 cells. *Cancer Cell International*, **2013**, *13*, 27.

65. Guan, C.; Liu, W.; Yue, Y.; Jin, H.; Wang, X.; Wang, X.-J., Inhibitory effect of  $\beta$ -elemene on human breast cancer cells. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, **2014**, *7* (7), 3948-3956.

66. Li, Q. Q.; Wang, G.; Huang, F.; Banda, M.; Reed, E., Antineoplastic effect of  $\beta$ -elemene on prostate cancer cells and other types of solid tumour cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **2010**, 62 (8), 1018-1027.
67. Xie, C.-Y.; Yang, W.; Li, M.; Ying, J.; Tao, S.-J.; Li, K.; Dong, J.-H.; Wang, X.-S., Cell Apoptosis Induced by  $\delta$ -Elemene in Colorectal Adenocarcinoma Cells via a Mitochondrial-mediated Pathway. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, **2009**, 129 (11), 1403—1413.
68. Xie, C. Y.; Yang, W.; Ying, J.; Ni, Q. C.; Pan, X. D.; Dong, J. H.; Li, K.; Wang, X. S., B-Cell Lymphoma-2 Over-Expression Protects  $\delta$ -Elemene-Induced Apoptosis in Human Lung Carcinoma Mucoepidermoid Cells via a Nuclear Factor Kappa B-Related Pathway. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **2011**, 34 (8), 1279-1286.
69. Hadri, A. e.; Gómez, M. Á.; Sanz, J.; González, A.; Idaomar, M.; Ribas, B.; Benedí, J.; Sánchez, M. I., Cytotoxic activity of  $\alpha$ -humulene and transcaryophyllene from *Salvia officinalis* in animal and human tumor cells. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, **2010**, 76 (3), 343-356.
70. Fernandes, E. S.; Passos, G. F.; Medeiros, R.; da Cunha, F. M.; Ferreira, J.; Campos, M. M.; Pianowski, L. F.; Calixto, J. B., Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *European Journal of Pharmacology*, **2007**, 569 (3), 228-236.
71. Bougatsosa, C.; Ngassapab, O.; Runyorob, D. K. B.; Chinou, I. B., Chemical Composition and in vitro Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two Helichrysum Species from Tanzania. *Zeitschrift für Naturforschung*, **2004**, 59c, 368-372.
72. Shakeri, A.; Khakdan, F.; Soheili, V.; Sahebkar, A.; Rassam, G.; Asili, J., Chemical composition, antibacterial activity, and cytotoxicity of essential oil from *Nepeta ucrainica* L. spp. *kopetdagensis*. *Industrial Crops and Products*, **2014**, 58, 315-321.
73. Zygadlo, J. A.; Grosso, N. R., Volatile Constituents from the Flowers of *Solanum stuckertii* and *S. incisum*. *Journal of Essential Oil Research*, **1997**, 9 (1), 111-113.
74. Anthony, S. J.; Zuchowski, W.; Setzer, W. N., Composition of the Floral Essential Oil of *Brugmansia suaveolens*. *Records of Natural Products*, **2009**, 3 (2), 76-81.
75. Schlotzhauer, W. S.; Horvat, R. J.; Chortyk, O. T., Volatile Constituents from the Flowers of *Nicotiana longiflora*. *Journal of Essential Oil Research*, **1994**, 6, 195-197.
76. Gobbo-Neto, L.; Lopes, N. P., Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quimica Nova*, **2007**, 30 (2), 374-381.

77. Barra, A., Factors affecting chemical variability of essential oils: A review of recent developments. *Natural Product Communications*, **2009**, *4* (8), 1147-1154.
78. Hess, S. C.; Peres, M. T. L. P.; Batista, A. L.; Rodrigues, J. P.; Tiviroli, S. C.; Oliveira, L. G. L.; Santos, C. W. C.; Fedel, L. E. S., Evaluation of seasonal changes in chemical composition and antibacterial activity of *Elyonurus muticus* (Sprengel) O. Kuntze (Gramineae). *Quimica Nova*, **2007**, *30* (2), 370-373.
79. Palá-Paúl, J.; Pérez-Alonso, M. J.; Velasco-Negueruela, A.; Palá-Paúl, R.; Sanz, J.; Conejero, F., Seasonal variation in chemical constituents of *Santolina rosmarinifolia* L. ssp. *rosmarinifolia*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **2001**, *29*, 663-672.
80. Radusiene, J.; Judzentiene, A.; Bernotiene, G., Essential oil composition and variability of *Hypericum perforatum* L. growing in Lithuania. *Biochemical Systematics and Ecology*, **2005**, *33* (2), 113-124.
81. Jaoui, M.; Leungsakul, S.; Kamens, R. M., Gas and Particle Products Distribution from the Reaction of  $\beta$ -Caryophyllene with Ozone. *Journal of Atmospheric Chemistry*, **2003**, *45*, 261-287.
82. Brito, M. S.; Villavicencio, A. L. C. H.; Mancini-filho, J., Effects of irradiation on trans fatty acids formation in ground beef. *Radiation Physics and Chemistry*, **2002**, *63*, 337-340.
83. Essien, E. E.; Ogunwande, I. A.; Setzer, W. N.; Ekundayo, O., Chemical composition, antimicrobial, and cytotoxicity studies on *S. erianthum* and *S. macranthum* essential oils. *Pharmaceutical Biology*, **2012**, *50* (4), 474-480.
84. Keawsa-Ard, S.; Liawruangrath, B.; Liawruangrath, S.; Teerawutgulrag, A.; Pyne, S. G., Chemical constituents and antioxidant and biological activities of the essential oil from leaves of *Solanum spirale*. *Natural Product Communications: an international journal for communications and reviews*, **2012**, *7* (7), 955-958.
85. Bayala, B.; Bassole, I. H. N.; Scifo, R.; Gnoula, C.; Morel, L.; Lobaccaro, J.-M. A.; Simpire, J., Anticancer activity of essential oils and their chemical components - a review. *American Journal of Cancer Research*, **2014**, *4* (6), 591-607.
86. Walia, M.; Mann, T. S.; Kumar, D.; Agnihotri, V. K.; Singh, B., Chemical Composition and In Vitro Cytotoxic Activity of Essential Oil of Leaves of *Malus domestica* Growing in Western Himalaya (India). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2012**, *2012*, 1-6.

87. Colmenares, A. P.; Rojas, L. B.; Arias, E.; Arzola, J. C.; Usubillaga, A., Analysis of Chemical Constituents of the Volatile Oil from Leaves of *Solanum bicolor*. *Natural Product Communications*, **2010**, 5 (4), 615 - 616.
88. Quijano-Céllis, C.; Pino, J. A.; Morales, G., Essential Oil of *Solanum juglandifolium* Humb. & Bonpl. ex Dunal Leaves from Colombia. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, **2014**, 17 (3), 441-444.
89. Ogundajo, A. L.; Oladosu, I. A.; Ogunwande, I. A.; Flamini, G.; Owolabi, M. S., Study on the volatile constituents of *Solanum nigrum* var. *virginicum* L. from Nigeria. *Asian Journal of Plant Science and Research*, **2013**, 3 (1), 94-98.
90. Aliero, A. A.; Grierson, D. S.; Afolayan, A. J., Chemical Composition of the Essential Oil from *Solanum pseudocapsicum*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **2006**, 9 (6), 1175-1177.
91. Murungi, L. K.; Kirwa, H.; Torto, B., Differences in essential oil content of berries and leaves of *Solanum sarrachoides* (Solanaceae) and the effects on oviposition of the tomato spider mite (*Tetranychus evansi*). *Industrial Crops and Products*, **2013**, 46, 73-79.
92. Ogunwande, I. A.; Avoseha, N. O.; Flaminib, G.; Hassana, A.-S. O.; Ogunmoyec, A. O.; Ogunsanwoa, A. O.; Yusufa, K. O.; Kelechia, A. O.; Tiamiyua, Z. A.; Taboweia, G. O., Essential Oils from the Leaves of Six Medicinal Plants of Nigeria. *Natural Product Communications*, **2013**, 8 (12), 243-248.
93. Rui-jun, M.; Shou-jun, G.; Hui, Z.; Tao, Z., Chemical Constituents of Essential Oil from Leaves of *Solanum verbascifolium* (Solanaceae). *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, **2006**, 14 (6), 526-529.
94. Satyala, P.; Maharjanb, S.; Setzera, W. N., Volatile Constituents from the Leaves, Fruits (Berries), Stems and Roots of *Solanum xanthocarpum* from Nepal. *Natural Product Communications*, **2015**, 10 (2), 361 - 364.
95. Leal, A. S.; Krambrock, K.; Guedes, K.; Rodrigues, R. R., Ressonância Paramagnética Eletrônica–RPE aplicada à análise de especiarias irradiadas (com radiação gama). *Food Science and Technology*, **2004**, 24 (3), 427-430.
96. CEN, EN 1787, Determination of irradiated food containing cellulose: analysis by EPR. (European Committee for Standardization, rue de Stassart 36, B-1050 Brussels, Belgium.). **2000**.

97. Yamaoki, R.; Kimura, S.; Ohta, M., Evaluation of absorbed dose in irradiated sugar-containing plant material (peony roots) by an ESR method. *Radiation Physics and Chemistry*, **2015**, *117*, 41-47.
98. Sanyal, B.; Chatterjee, S.; Variyar, P. S.; Sharma, A., Application of EPR Spectroscopy to Identify Irradiated Indian Medicinal Plant Products. *Journal of Food Science*, **2012**, *77* (6), C710-C718.
99. Bortolin, E.; Bustos Griffin, E.; Cruz-Zaragoza, E.; Coste, V.; Onori, S., Electron paramagnetic resonance detection of Mexican irradiated spices. *International Journal of Food Science and Technology*, **2006**, *41* (4), 375-382.
100. Slave, R. M.; Negut, C. D.; Grecu, V. V., ESR on some gamma-irradiated aromatic herbs. *Romanian Journal of Physics*, **2014**, *59* (7-8), 826–833.
101. Ordaz, G.; D'Armas, H.; Yáñez, D.; Moreno, S., Composición química de los aceites esenciales de las hojas de *Helicteres guazumifolia* (Sterculiaceae), *Piper tuberculatum* (Piperaceae), *Scoparia dulcis* (Arecaceae) y *Solanum subinerme* (Solanaceae), recolectadas en Sucre, Venezuela. *Revista Biología Tropical*, **2011**, *59* (2), 585-595.
102. Rini, P.; Ohtani, Y.; Ichiura, H., Antioxidant, anti-hyaluronidase and antifungal activities of *Melaleuca leucadendron* Linn. leaf oils. *Journal of Wood Science*, **2012**, *58* (5), 429-436.
103. Kaurinovic, B.; Vlaisavljevic, S.; Popovic, M.; Vastag, D.; Djurendic-Brenesel, M., Antioxidant Properties of *Marrubium peregrinum* L. (Lamiaceae) Essential Oil. *Molecules*, **2010**, *15* (9), 5943-5955.
104. Saleh, M. A.; Clark, S.; Woodard, B.; Deolu-Sobogun, S. A., Antioxidant and free radical scavenging activities of essential oils. *Ethnicity & Disease*, **2010**, *20*, SI78-SI82.
105. Horváthová, J.; Suhaj, M.; Polovka, M.; Brezová, V.; Šimko, P., The Influence of Gamma-Irradiation on the Formation of Free Radicals and Antioxidant Status of Oregano (*Origanum vulgare* L.). *Czech Journal of Food Sciences*, **2007**, *25* (3), 131-143.

# **ANEXO I**

**Artigo publicado no Journal of the Brazilian  
Chemical Society**

## Essential Oil from Flowers of *Solanum stipulaceum*: Composition, Effects of $\gamma$ -Radiation, and Antileukemic Activity

Aura M. B. Osorio,<sup>\*a</sup> Thiago M. Silva,<sup>a</sup> Lucienir P. Duarte,<sup>a</sup> Vany P. Ferraz,<sup>a</sup>  
Márcio T. Pereira,<sup>b</sup> Maria O. Mercadante-Simões,<sup>c</sup> Fernanda C. G. Evangelista,<sup>d</sup>  
Adriano P. Sabino<sup>d</sup> and Antônio F. C. Alcântara<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas (ICEx),  
Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte-MG, Brazil

<sup>b</sup>Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, 31270-901 Belo Horizonte-MG, Brazil

<sup>c</sup>Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS),  
Universidade Estadual de Montes Claros, 39401-089 Montes Claros-MG, Brazil

<sup>d</sup>Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia (FaFar),  
Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte-MG, Brazil

The composition of essential oils from flowers of *Solanum stipulaceum* Roem & Schult collected in May and September was studied for the first time. Effects of  $\gamma$ -radiation on volatile constituents were investigated by gas chromatography (GC) with flame ionization detector (FID). In addition, the antileukemic activity was studied by a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay against human cell lines HL-60 and THP-1. The main constituents of the essential oil of flowers collected in May were  $\beta$ -caryophyllene (25.8%),  $\gamma$ -gurjunene (11.9%), and  $\beta$ -gurjunene (8.2%), whereas the essential oil of flowers collected in September was mainly composed of  $\beta$ -caryophyllene (26.5%), caryophyllene oxide (11.0%), and  $\gamma$ -gurjunene (10.0%). The main components of essential oil from flowers collected in September were not significantly affected by  $\gamma$ -radiation at lower doses than 10.0 kGy. No cytotoxic activity in leukemic cell lines was observed for non-irradiated samples. However, irradiated samples exhibited slightly cytotoxic activity.

**Keywords:** *Solanum stipulaceum*, essential oil,  $\beta$ -caryophyllene, gamma-radiation, antileukemic activity

### Introduction

Essential oils are mixtures of volatile natural organic compounds usually obtained from plant material, which usually consist of terpenoids, aromatic, and aliphatic compounds.<sup>1</sup> Essential oils exhibit a large spectrum of biological properties, such as antimicrobial, analgesic, and antiseptic.<sup>2</sup> The pleasant fragrance of the essential oil components makes them a raw material widely employed by cosmetic, pharmaceutical, agricultural, and food industries. In nature, essential oils play an important role in the protection of plants in their ecosystem.<sup>3</sup>

The family Solanaceae includes about 3,000 species distributed in 96 genera, and 1,500 of them belong to the

genus *Solanum*. *Solanum* species occur in different regions around the world, with the greatest diversity concentrated in Central and South America.<sup>4</sup> *Solanum stipulaceum* Roem & Schult (popularly known as “caiaçarinha”) is an endemic and native Brazilian plant, widely distributed in the Cerrado region of the state of Minas Gerais.<sup>5</sup> The polar extract of the stem of *S. stipulaceum* exhibits molluscicidal activity and cardiac-depressant properties.<sup>6,7</sup> Alkaloids, such as solasodine, solaparnaine, and solamargin, were isolated from their fruits, stems and branches.<sup>8,9</sup> Although some studies have been reported for extracts of *S. stipulaceum*, the flowers have not been studied.

$\gamma$ -Radiation is an efficient method for microbial decontamination and insect disinfestation of vegetal materials. Moreover, radiosterilization is the most widely used method for commercial preparations of medicinal

\*e-mail: aurambo@ufmg.br, aurama92@hotmail.com

plants.<sup>10</sup> However, chemical composition and biological activities of vegetal species can be changed when plant material is exposed to  $\gamma$ -radiation.<sup>11</sup> In the case of volatile compounds, some studies indicated that the  $\gamma$ -radiation effect is negligible,<sup>12-14</sup> however, significant changes in the essential oil composition have been observed for samples exposed at high doses of ionizing radiation.<sup>15-17</sup>

The present work describes for the first time the chemical composition of the essential oil from flowers of *S. stipulaceum*. Seasonal variations are also considered in the analysis of chemical oil composition, and the effects of  $\gamma$ -radiation on essential oil constituents are studied for flowers submitted at different radiation doses. Moreover, antileukemic activity and evaluation of  $\gamma$ -radiation effects on cytotoxicity are investigated for the essential oil from flowers of *S. stipulaceum*.

## Experimental

### Plant material

Flowers of *Solanum stipulaceum* Roem & Schult were collected in Montes Claros (state of Minas Gerais, Brazil) in May and September 2014 (samples MS and SS, respectively). The botanical identification was made by Maria Olivia Mercadante-Simões (Universidade Estadual de Montes Claros, Minas Gerais, Brazil). The voucher specimen (BHCB 169873) has been deposited in the Herbarium of the Instituto de Ciências Biológicas of the Universidade Federal de Minas Gerais.

### Ionizing radiation treatment

Flower samples collected in September 2014 (SS) were irradiated. Five samples (20.0 g) were placed in plastic packages and exposed to  $\gamma$ -radiation at 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, and 20.0 kGy at room temperature (22 °C) in the Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN, Belo Horizonte, Brazil). The samples were exposed to  $\gamma$ -radiation using a GammaBeam-127 irradiator, model IR-214 (Nordion Inc.) equipped with a cobalt-60 source. The dose rate was 2.81 kGy h<sup>-1</sup>. The irradiator was calibrated with a Fricke standard dosimeter, and the absorbed doses were controlled by the exposure time of each sample to the source.

### Essential oils isolation and analysis

Irradiated and non-irradiated flowers of *S. stipulaceum* were submitted to hydrodistillation for 5 h on a Clevenger-type apparatus. After distillation, the essential oils were

extracted three times with dichloromethane, dried over anhydrous sodium sulfate and filtered. After solvent evaporation, volatile oils were stored at 4 °C in the dark until analysis.<sup>18</sup> Solutions of essential oils at 1% in chloroform were prepared for gas chromatography (GC) analysis. All reagents and organic solvents were purchased from Sigma-Aldrich Co. GC with flame ionization detector (FID) analyses were carried out using an Agilent HP 7820A GC system. An Agilent HP5 column (30 m  $\times$  0.32 mm  $\times$  0.25  $\mu$ m) was used with hydrogen as the carrier gas (3 mL min<sup>-1</sup>). The GC oven temperature was programmed from 70-250 °C at 3 °C min<sup>-1</sup>, with injector temperature at 250 °C, injection volume 1  $\mu$ L, split ratio adjusted at 30:1, and FID detector temperature at 250 °C. Percentages of separated compounds were calculated from GC-FID peak areas using EZChrom Elite Compact software. GC/mass spectrometry (MS) analyses were performed using a Shimadzu QP2010 ULTRA GC/MS system. An Rxi-1MS column (30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu$ m) was used with helium as carrier gas (1.5 mL min<sup>-1</sup>). GC oven temperature was kept at 70 °C for 2 min and programmed to 250 °C at 5 °C min<sup>-1</sup>. The injector temperature was 250 °C, and the injection volume was 1  $\mu$ L. The split ratio was adjusted at 10:1. MS interface and the detector temperature was 250 °C. Electron ionization (EI) MS were recorded at 70 eV. Data acquisition was performed and analyzed by GCMSsolution software. Identification of essential oil components was carried out after comparison with those available in the computer library (NIST11) and by comparison of their Kováts retention index with a series of *n*-alkanes.

### Antileukemic activity

The cytotoxicity of essential oils was assessed using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich) colorimetric assay. The evaluation of the cytotoxic activity was performed with human acute promyelocytic leukemia cell line American Type Culture Collection (ATCC) # CCL-240 (HL-60), acute monocytic leukemia cells ATCC # TIB-202 (THP-1) and lung fibroblast ATCC # CCL-95.1 (Wi-26VA4) cell lines. Cells were plated in 96-well plates (2  $\times$  10<sup>5</sup> cells per well) and incubated for 24 h at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. After 24 h, the wells were washed with culture medium (RPMI-1640 + 20% inactivated fetal bovine serum + 2 mmol L<sup>-1</sup> L-glutamine) and incubated with samples at concentrations from 0.10 to 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. After 48 h of incubation, the plates were treated with MTT (5 mg mL<sup>-1</sup>). Colorimetric measurements were performed at 550 nm using the microplate reader Spectramax M5e.



All experiments were performed in triplicate. Cytotoxicity was scored as the percent of reduction in absorbance *vs.* untreated control cultures. The results were expressed by the IC<sub>50</sub> values (concentration of the drug that reduced cell viability by 50%). IC<sub>50</sub> values were calculated using OriginPro 8.0 software.

## Results and Discussion

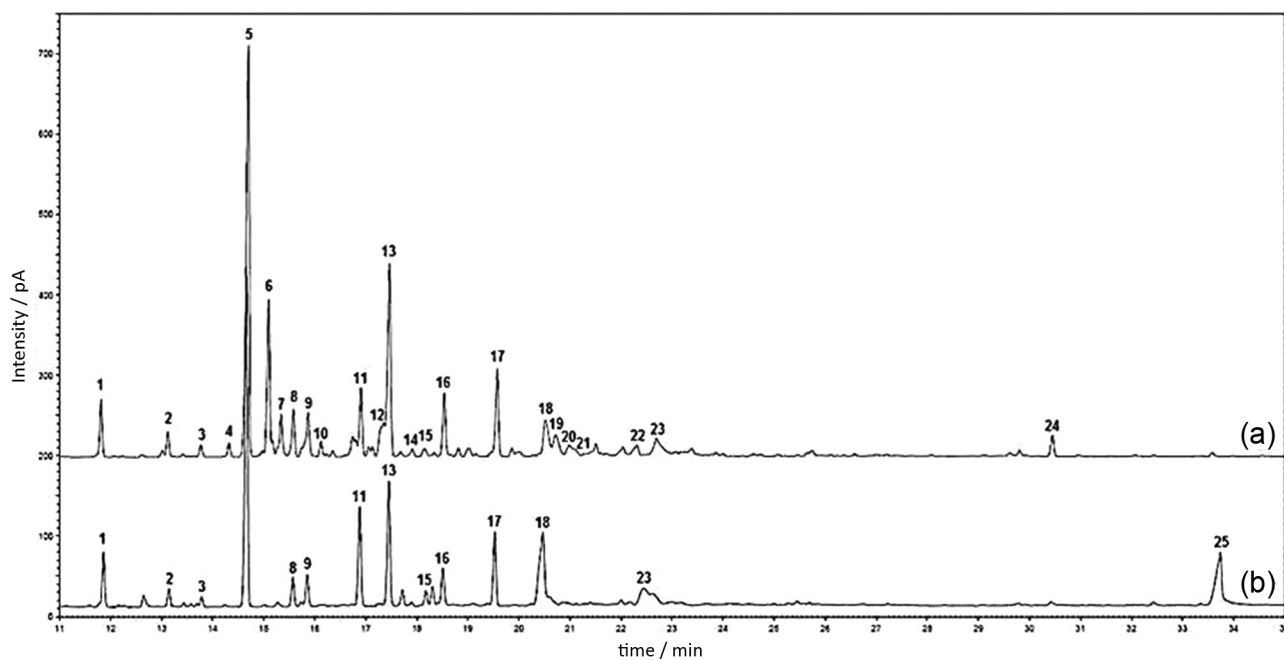
Hydrodistillation of non-irradiated samples collected in May and September provided pale yellowish oils with a pleasant aroma, yielding 0.08 and 0.03% (m/m), respectively, from flower extracts. Figure 1 shows the GC-FID chromatograms of essential oils from samples MS and SS. Twenty-four constituents were identified in the essential oil from MS, corresponding to 88.2% of the overall oil composition. In turn, essential oil from SS provided only fourteen constituents with chemical structures identified, corresponding to 90.3% of the overall oil composition. The compound name, Kováts retention index, and percentage of the volatile constituents of both samples are given in Table 1.

Essential oil from MS provided a high content of sesquiterpene hydrocarbons (76.2%). The most abundant component was  $\beta$ -caryophyllene (25.8%), followed by  $\gamma$ -gurjunene (11.9%),  $\beta$ -gurjunene (8.2%),  $\alpha$ -selinene (5.3%), *D*-germacrene (3.6%),  $\delta$ -cadinene (3.6%), aromadendrene (3.5%),  $\delta$ -elemene (2.8%),  $\alpha$ -humulene (2.7%),  $\beta$ -copaene (2.4%)  $\gamma$ -muurolene (1.8%),  $\alpha$ -copaene (1.2%),  $\alpha$ -neoclovene (0.8%), and

$\alpha$ -gurjunene (0.7%). Sesquiterpene epoxides (6.9%) and sesquiterpenols (3.8%) were found in relatively smaller amounts, specifically, caryophyllene oxide (3.6%), alloaromadendrene oxide-(2) (2.2%), isoaromadendrene epoxide (1.1%),  $\beta$ -spathulenol (2.4%), cubenol (1.0%), and viridiflorol (0.5%). Pentadecanoic acid (1.3%) was also detected in MS essential oil. On the other hand, essential oil from SS contains fewer volatile constituents than MS, exhibiting only fourteen constituents (Figure 1 and Table 1). Essential oil from SS contains a lower content of sesquiterpenes (65.9%) and a higher content of sesquiterpene epoxides (14.6%) in relation to oil from MS (76.2 and 6.9%, respectively). Sesquiterpenols were not detected in SS. The volatile compounds  $\alpha$ -gurjunene,  $\beta$ -gurjunene,  $\beta$ -copaene,  $\alpha$ -neoclovene,  $\gamma$ -muurolene, valencene, isoaromadendrene epoxide, and pentadecanoic acid were not detected in the essential oil of SS. On the other hand, essential oil of SS contains a high content of palmitic acid (9.9%). However, this carboxylic acid was not detected in the essential oil of MS.

Essential oils from flowers of other species of *Solanum* contain many sesquiterpenes, which were also identified in the present work.  $\beta$ -Caryophyllene,  $\alpha$ -copaene,  $\beta$ -elemene,  $\gamma$ -muurolene, *D*-germacrene, and  $\delta$ -cadinene were reported in the essential oil from flowers of *S. stuckeflii*,<sup>20</sup> whereas  $\beta$ -caryophyllene and  $\beta$ -selinene were the predominant sesquiterpenes in the essential oil from flowers of *S. incisurm*.<sup>20</sup>

The differences observed in the composition of essential oils from MS and SS may be related to



**Figure 1.** GC-FID chromatograms of essential oils from flowers of *Solanum stipulaceum* for samples collected in (a) May (MS) and (b) September (SS).

**Table 1.** Chemical composition of essential oils from flowers of *S. stipulaceum* collected in May (MS) and September (SS)

Peak No.	Compound <sup>a</sup>	RI <sup>b</sup>	RI <sup>c</sup>	Composition / %	
				MS	SS
1	$\delta$ -elemene	1331	1337	2.8	4.2
2	$\alpha$ -copaene	1368	1375	1.2	1.4
3	$\beta$ -elemene	1386	1389	0.6	0.8
4	$\alpha$ -gurjunene	1401	1408	0.7	ND <sup>d</sup>
5	$\beta$ -caryophyllene	1411	1418	25.8	26.5
6	$\beta$ -gurjunene	1423	1425	8.2	ND <sup>d</sup>
7	$\beta$ -copaene	1429	1430	2.4	ND <sup>d</sup>
8	$\alpha$ -humulene	1436	1442	2.7	2.2
9	aromandendrene	1444	1441	3.5	2.5
10	$\alpha$ -neoclovene	1451	1454	0.8	ND <sup>d</sup>
11	<i>D</i> -germacrene	1472	1480	3.6	7.9
12	$\gamma$ -muurolene	1484	1485	1.8	ND <sup>d</sup>
13	$\gamma$ -gurjunene	1487	1489	11.9	10.0
14	valencene	1500	1499	0.5	ND <sup>d</sup>
15	<i>7-epi</i> - $\alpha$ -cadinene	1506	1507	0.6	1.3
16	$\delta$ -cadinene	1517	1521	3.6	3.3
17	$\alpha$ -selinene	1545	1530	5.3	5.7
18	caryophyllene oxide	1571	1573	3.6	11.0
19	$\beta$ -spathulenol	1576	1578	2.4	ND <sup>d</sup>
20	isoaromadendrene epoxide	1584	1584	1.1	ND <sup>d</sup>
21	viridiflorol	1586	1587	0.5	ND <sup>d</sup>
22	cubenol	1621	1625	1.0	ND <sup>d</sup>
23	alloaromadendrene oxide-(2)	1633	1625	2.2	3.7
24	pentadecanoic acid	1863	1869	1.2	ND <sup>d</sup>
25	palmitic acid	1970	1970	ND <sup>d</sup>	9.9
Total identified components / %				88.2	90.3

<sup>a</sup>The compounds are listed in order of their elution on HP-5 column; <sup>b</sup>calculated Kováts retention index; <sup>c</sup>Kováts retention index reported in literature<sup>19</sup> for the HP-5 column; <sup>d</sup>not detected.

environmental factors, such as variation in temperature, photoperiod, and humidity conditions and pollinators.<sup>21</sup> These biotic and abiotic factors influence the production of secondary metabolites in plants which can explain the greater variety of constituents in the essential oil from MS in relation to SS.

The effects of  $\gamma$ -radiation on essential oils from flowers of *S. stipulaceum* were observed in the extraction yield and their chemical composition. The yield of volatile oil obtained from non-irradiated flowers collected in September (0.03%) was slightly increased by gamma radiation. Extraction yield was 0.04% for irradiated material at 1.0, 2.5, and 5.0 kGy. Additionally, the extraction yield was 0.05% for irradiated material at higher doses (10.0 and 20.0 kGy). This increase of the extraction yields is due to damage to plant tissues caused by radiation.<sup>22</sup>

Figure 2 shows the GC-FID chromatograms of essential oils from irradiated flowers of *S. stipulaceum* collected in September, and their chemical composition is shown in Table 2. Essential oils from irradiated material exhibited a higher content of caryophyllene oxide,  $\delta$ -cadinene, and alloaromadendrene oxide-(2) at all radiation doses than the corresponding non-irradiated sample. The content of some constituents increased at a dose of 1.0 kGy, mainly  $\beta$ -caryophyllene, aromadendrene, and caryophyllene oxide, probably as a result of the increase of their extractability.<sup>16</sup> On the other hand, the volatile compounds *D*-germacrene,  $\gamma$ -gurjunene,  $\alpha$ -selinene, *7-epi*- $\alpha$ -cadinene, and palmitic acid decreased after irradiation at 1.0 kGy, which could be due to their radiation sensitivity (Figure 3).<sup>23</sup> An increase of the content of  $\alpha$ -copaene,  $\beta$ -elemene,  $\beta$ -caryophyllene,  $\alpha$ -humulene, and aromadendrene was observed for

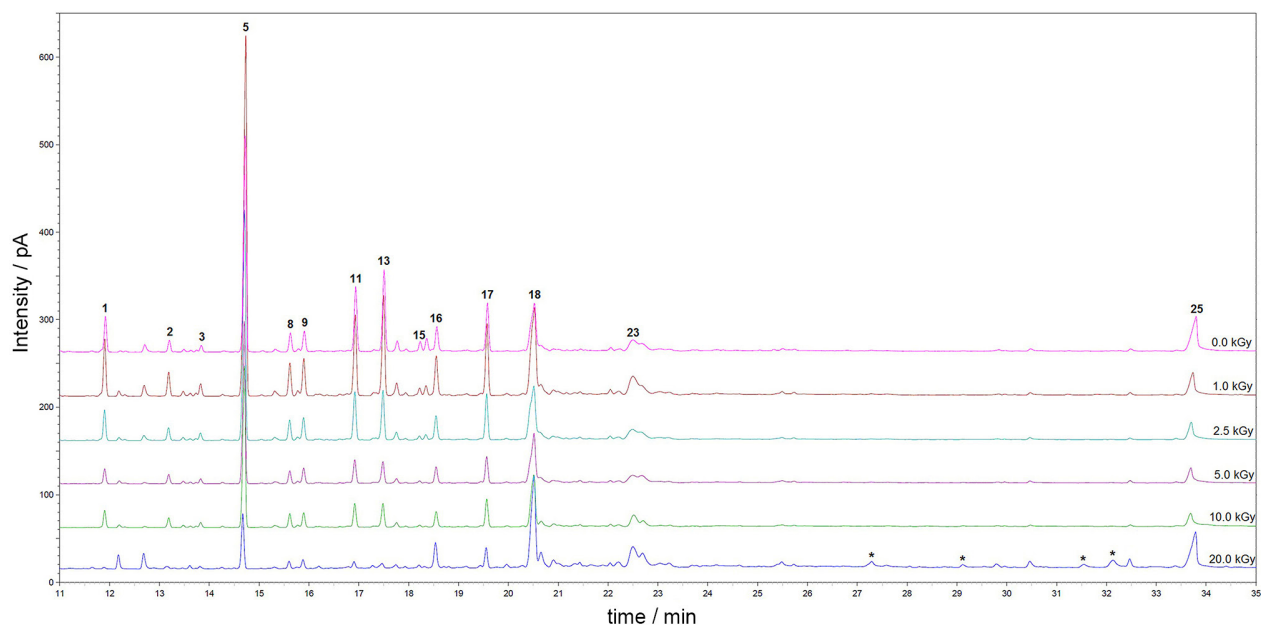
essential oil from flowers exposed to  $\gamma$ -radiation at doses below 10.0 kGy. However, the content of these compounds decreased for samples exposed at a dose of 20.0 kGy. On the other hand, the content of  $\delta$ -elemene, *D*-germacrene,  $\gamma$ -gurjunene, 7-*epi*- $\alpha$ -cadinene, and  $\alpha$ -selinene decreased when flowers were exposed to  $\gamma$ -radiation at different doses. The content of palmitic acid decreased when flowers were irradiated at doses from 1.0 to 10.0 kGy and its content increased at a dose of 20.0 kGy. The content of  $\delta$ -cadinene, caryophyllene oxide, and alloaromadendrene oxide-(2) also increased at 20.0 kGy (Table 2 and Figure 3). Four new peaks (between 27 and 33 min) were observed in the chromatogram for samples irradiated at 20.0 kGy (Figure 2). Compounds corresponding to these peaks were not identified. Therefore, they were attributed to radiolytic products and correspond to 8.1% of the total oil composition. As a result,  $\gamma$ -radiation induces irregular changes in the composition of the essential oil from flowers of *S. stipulaceum*. However, a direct relation between radiation dose and changes in the essential oil composition was not observed. These results are in agreement with those reported in the literature for essential oils from *Angelica gigas* Nakai, in which the content of sesquiterpene hydrocarbons and oxygenated sesquiterpenes increased without any correlation with  $\gamma$ -radiation dose.<sup>23</sup> Yalcin *et al.*<sup>15</sup> also reported irregular changes in the volatile profile of linseed exposed to  $\gamma$ -radiation, in addition to significant decreases in the content of linseed volatile compounds induced by higher doses of  $\gamma$ -radiation.

Oxidation of  $\beta$ -caryophyllene promoted by  $\gamma$ -radiation or action of free radicals generated in the ionization of water

can explain the increase in the content of caryophyllene oxide when flower samples were irradiated at 20.0 kGy. Similar results were also observed for the essential oil from *Piper nigrum* L. after radiation at a dose of 30 kGy. An increase in the content of caryophyllene oxide is matched by a decrease of  $\beta$ -caryophyllene.<sup>17</sup> Hydroxyl radicals (HO $\cdot$ ) are generated from water molecules by exposure to  $\gamma$ -radiation. This radical can initiate oxidation of  $\beta$ -caryophyllene by radical addition to the double internal bond, followed by the addition of molecular oxygen to produce peroxy radicals (RO $_2\cdot$ ). The reaction of the formed peroxy radicals with another organic peroxy radical (RO $_2\cdot$ ) formed *in situ* produces  $\beta$ -hydroxyalkoxyl (RO $\cdot$ ) radicals which undergo a ring-retaining reaction to obtain caryophyllene oxide.<sup>24</sup> This oxidation process can occur with other sesquiterpenes of the essential oil, justifying the decrease in the composition of major constituents of the essential oil (Figure 2).

The essential oil from flowers of *S. stipulaceum* contains some active components that have been reported to exhibit cytotoxic activity.  $\beta$ -Caryophyllene, the major constituent identified in this essential oil, has been reported as a cytotoxic agent against human breast and colorectal adenocarcinoma cells.<sup>25</sup> Moreover, the volatile compounds  $\alpha$ -humulene,  $\beta$ -elemene,  $\delta$ -elemene, and caryophyllene oxide exhibit cytotoxicity against different human cancer cells.<sup>25-28</sup>

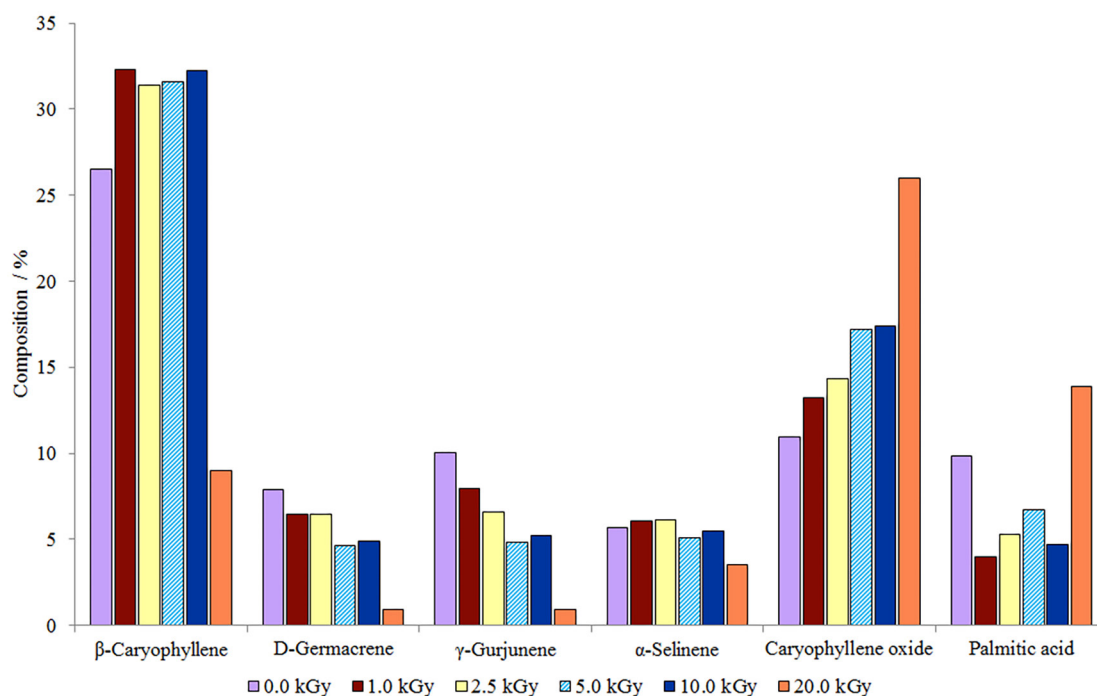
Some cytotoxicity studies on essential oils from *Solanum* sp. have been reported in the literature. The essential oil from leaves of *S. erianthum* exhibited 98.85 and 97.94% of cell lethality against breast and prostate



**Figure 2.** GC-FID chromatograms of essential oils from non-irradiated and irradiated flowers of *S. stipulaceum* collected in September (\*: new peaks detected).

**Table 2.** Composition of volatile oils from irradiated flowers of *S. stipulaceum* collected in September

Compound	Composition / %					
	$\gamma$ -Radiation dose / kGy					
	0.0	1.0	2.5	5.0	10.0	20.0
$\delta$ -Elemene	4.2	4.3	3.8	2.8	3.4	ND <sup>a</sup>
$\alpha$ -Copaene	1.4	1.9	1.7	1.9	2.0	ND <sup>a</sup>
$\beta$ -Elemene	0.8	1.0	1.0	1.0	1.1	0.4
$\beta$ -Caryophyllene	26.5	32.3	31.4	31.6	32.2	9.0
$\alpha$ -Humulene	2.2	2.6	2.6	2.5	2.7	1.3
Aromandendrene	2.5	3.0	3.0	3.2	3.0	1.6
<i>D</i> -Germacrene	7.9	6.5	6.4	4.6	4.9	0.9
$\gamma$ -Gurjunene	10.0	8.0	6.6	4.8	5.2	0.9
7- <i>epi</i> - $\alpha$ -Cadinene	1.3	0.7	0.6	0.6	0.5	0.3
$\delta$ -Cadinene	3.3	3.4	3.5	3.6	3.4	4.8
$\alpha$ -Selinene	5.7	6.0	6.1	5.1	5.5	3.5
Caryophyllene oxide	11.0	13.2	14.3	17.2	17.4	26.0
Alloaromadendrene oxide-(2)	3.7	4.3	3.8	4.0	5.6	9.2
Palmitic acid	9.9	4.0	5.3	6.7	4.7	13.9

<sup>a</sup>Not detected.**Figure 3.** Composition of major constituents of the essential oil from non-irradiated and irradiated flowers of *S. stipulaceum* collected in September.

cancer cells, respectively.<sup>29</sup> Moreover, the essential oil from leaves of *S. macranthum* exhibited 2% lethality against breast cancer cells,<sup>29</sup> whereas the essential oil from leaves of *S. spirale* exhibited significant cytotoxicity against breast, oral and lung cancer cells ( $IC_{50} = 19.69, 26.42$  and  $24.02 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively).<sup>30</sup>

Table 3 shows the results of the cytotoxicity of essential oils from flowers of *S. stipulaceum* collected in September and irradiated. Cytotoxic action of the non-irradiated sample was not observed for an acute myeloid leukemia (AML) model, specifically HL-60 and THP1 cell lines, when compared with the non-selective chemotherapy

control etoposide. Cytotoxic activity was increased for essential oils from irradiated samples, exhibiting a direct relationship with the radiation dose. However, the increase of the cytotoxicity of the samples is not comparable to the corresponding action of etoposide. The essential oil from flowers irradiated at 20.0 kGy was not considered for the cytotoxic assay because the volatile oil composition was significantly affected by  $\gamma$ -radiation.

**Table 3.** Cytotoxic activity *in vitro* of essential oils from non-irradiated and irradiated flowers of *S. stipulaceum* and etoposide (control) for AML cell lines and control

Sample (radiation dose)	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> / ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		
	HL-60	THP-1	Wi-26VA4
EO <sub>0</sub> (0.0 kGy)	> 100	> 100	> 100
EO <sub>1</sub> (1.0 kGy)	> 100	84.51 $\pm$ 4.14	> 100
EO <sub>2</sub> (2.5 kGy)	> 100	73.43 $\pm$ 2.19	> 100
EO <sub>5</sub> (5.0 kGy)	96.07 $\pm$ 4.98	52.73 $\pm$ 2.78	> 100
EO <sub>10</sub> (10.0 kGy)	89.67 $\pm$ 3.78	40.12 $\pm$ 1.65	> 100
Etoposide	9.70 $\pm$ 1.29	13.80 $\pm$ 1.81	7.10 $\pm$ 1.03

<sup>a</sup>Values presented as average  $\pm$  standard deviation. IC<sub>50</sub>: half-maximal inhibitory concentration; HL-60: human acute promyelocytic leukemia ATCC# CCL-240 cell line; THP-1: acute monocytic leukemia ATCC# TIB-202 cell line; Wi-26VA4: lung fibroblast ATCC# CCL-95.1 cell line.

Some factors may affect the cytotoxic activity of the essential oils from irradiated flowers of *S. stipulaceum*. Concentration of various essential oil constituents, such as caryophyllene, a sesquiterpenoid reported as a potential candidate for prevention and treatment of cancer, increased with the  $\gamma$ -irradiation dose.<sup>31</sup> However, since the essential oil is a mixture of volatile compounds, the biological properties can be the result of synergism.<sup>32</sup>

## Conclusions

The essential oil composition from flowers of *S. stipulaceum* was here reported for the first time. Twenty-four constituents of the oil were identified in flowers collected in May, and fourteen in the sample collected in September. The major components were  $\beta$ -caryophyllene,  $\gamma$ -gurjunene, and  $\beta$ -gurjunene in the May sample, whereas, in flowers collected in September,  $\beta$ -caryophyllene, caryophyllene oxide,  $\gamma$ -gurjunene, and palmitic acid were identified as the major volatile components.

Essential oils from flowers of *S. stipulaceum* exhibited a decrease in the content of the major volatile components when exposed to  $\gamma$ -radiation at 20.0 kGy, induced by oxidation of their constituents. However, a radiation dose at 10.0 kGy, which is the conventional dose for

radiosterilization of plant material, did not significantly affect the content of volatile oil constituents.

The essential oil from non-irradiated flowers of *S. stipulaceum* did not show significant cytotoxic activity against HL-60 and THP-1 cell lines. However, an increase of the antileukemic activity was observed for essential oils from flowers exposed to  $\gamma$ -radiation.

## Acknowledgements

The authors thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) for their financial support.

## References

- Guimarães, R.; Sousa, M. J.; Ferreira, I. C. F. R.; *Ind. Crops. Prod.* **2010**, *32*, 152.
- Raut, J. S.; Karuppaiyl, S. M.; *Ind. Crops. Prod.* **2014**, *62*, 250.
- Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M.; *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 446.
- Batista-Franklin, C. P. R.; Gonçalves-Esteves, V.; *Acta Bot. Bras.* **2008**, *22*, 782.
- <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB14865> accessed in August 2015.
- Silva, T. M. S.; Câmara, C. A.; Agra, M. D. F.; de Carvalho, M. G.; Frana, M. T.; Brandoline, S. V. P. B.; Paschoal, L. D. S.; Braz-Filho, R.; *Fitoterapia* **2006**, *77*, 449.
- Ribeiro, E. A. N.; Batitucci, M. C. P.; Lima, J. A. T.; Araújo, I. G. A.; Mauad, H.; Medeiros, I. A.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2002**, *12*, 34.
- Silva, T. M. S.; Agra, M. D. F.; Bhattacharyya, J.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2005**, *15*, 292.
- Silva, T. M. S.; Agra, M. F.; Bhattacharyya, J.; *Acta Hort.* **2007**, *745*, 295.
- Thongphasuk, P.; Thongphasuk, J.; *RJAS* **2012**, *2*, 57.
- Silva, T. M.; Dias, M. D.; Pereira, M. T.; Takahashi, J. A.; Ferraz, V. P.; Piló-Veloso, D.; Alcântara, A. F. C.; *Radiat. Phys. Chem.* **2012**, *81*, 22.
- 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.; *Radiat. Phys. Chem.* **2009**, *78*, 665.
- Fatemi, F.; Dini, S.; Rezaei, M. B.; Dadkhah, A.; Dabbagh, R.; Najj, S.; *J. Essent. Oil Res.* **2014**, *26*, 97.
- Silva, T. M.; Miranda, R. R. S.; Ferraz, V. P.; Pereira, M. T.; de Siqueira, E. P.; Alcântara, A. F. C.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2013**, *23*, 600.

15. Yalcin, H.; Ozturk, I.; Hayta, M.; Sagdic, O.; Gumus, T.; *J. Med. Food* **2011**, *14*, 1223.
16. Onyenekwe, P. C.; Stahl, M.; Adejo, G.; *Nat. Prod. Res.* **2012**, *26*, 2030.
17. Sádecká, J.; *Czech J. Food. Sci.* **2010**, *28*, 44.
18. Guenther, E.; *The Essential Oils*, vol. I; D. Van Nostrand Co.: New York, 1948, p. 316.
19. <http://webbook.nist.gov/chemistry/> accessed in August 2015.
20. Zygadlo, J. A.; Grosso, N. R.; *J. Essent. Oil Res.* **1997**, *9*, 111.
21. Gobbo-Neto, L.; Lopes, N. P.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 374.
22. Dhanya, R.; Mishra, B. B.; Khaleel, K. M.; *Radiat. Phys. Chem.* **2011**, *80*, 1247.
23. Seo, H.-Y.; Kim, J.-H.; Song, H.-P.; Kim, D.-H.; Byun, M.-W.; Kwon, J.-H.; Kim, K.-S.; *Radiat. Phys. Chem.* **2007**, *76*, 1869.
24. Jaoui, M.; Leungsakul, S.; Kamens, R. M.; *J. Atmos. Chem.* **2003**, *45*, 261.
25. Hadri, A. E.; Gómez, M. Á.; Sanz, J.; González, A.; Idaomar, M.; Ribas, B.; Benedí, J.; Sánchez, M. I.; *An. R. Acad. Nac. Farm.* **2010**, *76*, 343.
26. Dai, Z.-J.; Tang, W.; Lu, W.-F.; Gao, J.; Kang, H.-F.; Ma, X.-B.; Min, W.-L.; Wang, X.-J.; Wu, W.-Y.; *Cancer Cell Int.* **2013**, *13*, 27.
27. Xie, C.-Y.; Yang, W.; Li, M.; Ying, J.; Tao, S.-J.; Li, K.; Dong, J.-H.; Wang, X.-S.; *J. Pharm. Soc. Jpn.* **2009**, *129*, 1403.
28. Jun, N. J.; Mosaddik, A.; Moon, J. Y.; Jang, K.-C.; Lee, D.-S.; Ahn, K. S.; Cho, S. K.; *Rec. Nat. Prod.* **2011**, *5*, 242.
29. Essien, E. E.; Ogunwande, I. A.; Setzer, W. N.; Ekundayo, O.; *Pharm. Biol.* **2012**, *50*, 474.
30. Keawsa-Ard, S.; Liawruangrath, B.; Liawruangrath, S.; Teerawutgulrag, A.; Pyne, S. G.; *Nat. Prod. Commun.* **2012**, *7*, 955.
31. Park, K.-R.; Nam, D.; Yun, H.-M.; Lee, S.-G.; Jang, H.-J.; Sethi, G.; Cho, S. K.; Ahn, K. S.; *Cancer Lett.* **2011**, *312*, 178.
32. Silva, C. E. L.; Minguzzi, S.; Silva, R. C. L.; Matos, M. F. C.; Tofoli, D.; Carvalho, J. E.; Ruiz, A. L. T. G.; Costa, W. F.; Simionatto, E.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2015**, *26*, 233.

Submitted: June 29, 2015

Published online: August 21, 2015

## **ANEXO II**

**Resumo aceito no 3rd Annual International  
Conference on Pharmaceutical Sciences**

<u><a href="#">Athens Institute for Education and Research</a></u> Abstract Submitting Form	
<b>Conference</b>	<u><a href="#">3<sup>rd</sup> Annual International Conference on Pharmaceutical Sciences, 2-5 May 2016, Athens, Greece</a></u>
<b>Title of Paper</b>	Effect of gamma-radiation on antileukemic activity of essential oils from leaves and flowers of <i>S. stipulaceum</i>
<b>Abstract</b>	<p>gamma-Radiation is an efficient and widely used method to microbial decontamination and insect disinfestation of food, herbs and spices. Moreover, radiosterilization is the most widespread method for commercial preparation of medicinal plants. However, as consequence of the interaction between radiation-induced radicals with secondary metabolites, chemical composition and biological activity of irradiated plant materials may be altered. Flowers and leaves of <i>Solanum stipulaceum</i> Roem &amp; Schult were irradiated at 1.0, 2.5, 5.0, and 10.0 kGy, then its volatile oil was extracted by hydrodistillation and the antileukemic activity of these oils was studied by the colorimetric MTT assay. Essential oils from non-irradiated flowers and leaves did not show cytotoxic action for acute myeloid leukemia <sup>52</sup> model, specifically HL-60 and THP1 cell lines, when compared with the non-selective chemotherapy control etoposide. Cytotoxic activity was increased for essential oils from irradiated flowers and leaves of <i>S. stipulaceum</i>. Essential oils obtained from leaves irradiated at doses <math>\geq 2.5</math> kGy showed comparable cytotoxic effect with the corresponding action of etoposide for THP-1 cell lines. Additionally, essential oils from irradiated flowers and leaves showed very low cytotoxic action against normal Wi-26VA4 cell line, indicating a higher selectivity to leukemic cell lines. In conclusion, essential oils from non-irradiated flowers and leaves of <i>S. stipulaceum</i> did not show significant cytotoxic activity against HL-60 and THP-1 cell lines. However, an increase of the antileukemic activity was observed for essential oils exposed to <math>\gamma</math>-radiation. In particular, essential oils from irradiated leaves of <i>S. stipulaceum</i> exhibited a significant cytotoxic activity on THP-1 cell line, showing potential antileukemic use of these oils. More studies including more leukemic models are necessary to better understand these effects and mechanism involved in the <math>\gamma</math>-radiation use.</p>
<b>Keywords</b>	<i>Solanum stipulaceum</i> , gamma-radiation, essential oil, antileukemic activity.





Athens, 8 October 2015

Aura María Blandón Osorio, Fernanda Evangelista,  
Adriano De Paula Sabino & Antônio Flávio De Carvalho Alcântara  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Brazil

**Our Ref: PHA2016/0744049**

**Dear Colleagues,**

I would like to inform you that the selection academic committee has decided to invite you to speak at our **3<sup>rd</sup> Annual International Conference on Pharmaceutical Sciences, 2-5 May 2016, Athens, Greece** on the topic of:

**Effect of Gamma-Radiation on Antileukemic Activity of Essential Oils from *S. Stipulaceum* Leaves and Flowers**

Please be prepared for an **oral presentation in English only** of 15-20 minutes including discussion and visit the conference website <http://www.atiner.gr/pharmako.htm> for more information. Confirm your participation by completing and sending the registration form before **7 December 2015** by fax, regular mail or email. The registration form can be downloaded from <http://www.atiner.gr/REG-FORM.doc>.

For your convenience, a special conference rate has been arranged with a local hotel to be announced 1-2 weeks before the conference. Please complete the registration form for the nights you want accommodation for. Reservations should be made as soon as possible as the offer only stands as long as rooms are available. If you need more information on the accommodation please send us an email (not to the hotel itself) at [hotel@atiner.gr](mailto:hotel@atiner.gr). The conference's social program is available on <http://www.atiner.gr/2016/SOC-PHA.htm>. These are academic events which give the opportunity to our conference participants to further discuss the issues developed during the formal sessions and establish academic collaborations with other scholars from many different countries.

If you want your paper to be considered (peer reviewed) for publication and only then, please submit your manuscript by **4 April 2016** following the paper guidelines, which can be downloaded from: [http://www.atiner.gr/docs/Paper\\_Guidelines.htm](http://www.atiner.gr/docs/Paper_Guidelines.htm). **Papers cannot exceed 5000 words (everything included) and must be sent by email only.** For more information, please see our abstract and paper publication policy on <http://www.atiner.gr/acceptance.htm>. **Please do not submit your paper if you do not want it to be published by ATINER.**

Please support ATINER by asking your library to order our publications from previous conferences, either as books or selected conference proceedings. Visit our publications website for contents and order forms ([http://www.atiner.gr/docs/BOOK\\_PUBLICATIONS.htm](http://www.atiner.gr/docs/BOOK_PUBLICATIONS.htm)).

I look forward to meeting you in Athens.

Sincerely,

Dr. Gregory T. Papanikos, President