UFSM

TESE DE DOUTORADO

PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE PLANTAS MEDICINAIS DA FAMÍLIA ASTERACEAE DO BIOMA PAMPA

Caroline Ziegler Stüker

PPGQ

Santa Maria, RS – Brasil

2012

Prospecção fitoquímica e atividade biológica de plantas medicinais da família Asteraceae do Bioma Pampa

por

Caroline Ziegler Stüker

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Orgânica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Química.**

Orientador: Ademir Farias Morel

Santa Maria, RS, Brasil

2012

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática
da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Stüker, Caroline Ziegler
Prospecção fitoquímica e atividade biológica de plantas medicinais da família Asteraceae do Bioma Pampa / Caroline Ziegler Stüker.-2012.
224 p.; 30cm

Orientador: Ademir Farias Morel
Coorientadora: Ionara Irion Dalcol
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, RS, 2012

1. Plantas medicinais 2. Família Asteraceae 3. Derivados do ácido clorogênico 4. flavonóides 5. Atividade biológica I. Morel, Ademir Farias II. Dalcol, Ionara Irion III. Título.

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE PLANTAS MEDICINAIS DA FAMÍLIA ASTERACEAE DO BIOMA PAMPA

elaborada por
Caroline Ziegler Stüker

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Química

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Ademir Farias Morel - UFSM
(Presidente/Orientador)

Profª. Drª. Ionara Irion Dalcol – UFSM

Profª. Drª. Melania Palermo Manfron - UFSM

Prof. Drª. Adriana Flach – UFRR

Profª. Drª. Neusa Fernandes de Moura – FURG

Profª. Drª. Graciela Maldaner - URCAMP

Prof. Dr. Eduardo Miranda Ethur - Univates

Santa Maria, 09 de abril de 2012.

A Deus pelo Seu amor, pela
oportunidade desta existência,
pela saúde, pela Sua presença e
proteção em todos os momentos.

Aos meus pais Nilo e Enelita e
ao meu irmão Felipe:
Obrigada por todo amor, carinho, apoio,
compreensão e incentivo dedicados sempre.
Obrigada por torcerem sempre
pela minha vitória, apesar da distância. Amo vocês!

Ao Alex, que acompanhou esses últimos
dias de correria e cansaço! Obrigada pela
tua paciência e incentivo! Te amo muito!

Ao Prof. Dr. Ademir Farias Morel, pela

orientação, incentivo, compreensão, paciência e

amizade durante todos esses anos de convívio. E por me apoiar no momento em que decidi deixar Santa Maria e seguir em busca de outras oportunidades.

Muito obrigada!

Prof. Drª. Emilia Carolina Dessoy (*in memoriam)* pela confiança, carinho, amizade, apoio e por ter me ensinado muitas coisas durante o tempo que passamos juntas. Tu serás sempre para mim um exemplo de firmeza, perseverança, alegria, afeto e amor à vida! Obrigada pela oportunidade de conhecer a química dos produtos naturais.

AGRADECIMENTOS

À Profª. Drª. Ionara I. Dalcol, pela amizade, convívio, incentivo e apoio durante a realização deste trabalho e pela oportunidade da realização do doutorado sanduíche em Barcelona.

As Profªs. Adriana Flach, Neusa F. de Moura e Melania Palermo pelas contribuições e disposição em fazerem parte da banca da examinadora deste trabalho.

Ao Prof. Ubiratan F. da Silva pela amizade, sugestões e por fazer parte da banca de qualificação.

Ao Prof Ernest Giralt e ao grupo de pesquisa do Institut Recerca de Biomedica, Barcelona-Espanha, pela acolhida durante os meses de doutorado sanduíche, em especial a Txell, ao Nessim e a Laura pela ajuda e amizade.

A Karine pela ajuda, convívio, amizade. Sinto saudades dos nossos dias de trabalho no laboratório e na microbiologia.

A Carla e ao Duda pela realização das análises de massa de alta resolução, pela amizade e ajuda durante o decorrer deste trabalho e pelo acolhimento aqui em Campinas. Amigos como vocês são tudo na vida!!!

A Noemi pela amizade, pelo carinho e principalmente pela ajuda incondicional nesta fase tão corrida e difícil.

A Paulinha pela amizade, carinho e pela leitura da tese. A Sabrina, pela amizade e carinho. Muito obrigada meninas.

Aos colegas e amigos de tantos anos de laboratório (Santa Maria) Graci Maldaner, Juliano, Vini Ilha, Tanize, Carol, Lu, Nalin, Ilaine, Susi, Graci, Marcelo, Alexandre, Euclésio, Gilvan, Sandro, Lari, Wellington (i*n memoriam)*, Enrique, Vanessa, Irene, Andréia e Vini Londero pela amizade, auxílio e companheirismo durante tantos anos.

Ao pessoal da Natura pela acolhida, pela amizade e por me entenderem e ajudarem, pincipalmente nesses últimos dias tão loucos.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química da UFSM, em especial ao Ademir e a Valéria, pela amizade, empenho e atenção prestada. Ademir, muito obrigada pelo "socorro" dos últimos dias, jamais vou esquecer. Obrigada mesmo.

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

Aos órgãos financiadores: CNPq e CAPES, pelas concessões de bolsas que viabilizaram a execução deste trabalho.

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE PLANTAS MEDICINAIS DA FAMÍLIA ASTERACEAE DO BIOMA PAMPA

Autora: Caroline Ziegler Stüker
Orientador: Ademir Farias Morel
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 09 de abril de 2012.

As espécies selecionadas para este estudo foram: *Pluchea sagittalis, Baccharis pentodonta* e *Baccharidastrum triplinervium,* todas pertencentes a família Asteraceae. Os extratos e frações das folhas e raízes destas três espécies de plantas medicinais do Rio Grande do Sul foram obtidos por diferentes processos de extração (a frio, a quente em soxhlet e extração aquosa) e submetidos à análise por CLAE. Estes extratos e frações obtidos foram submetidos a diferentes fracionamentos de onde foram isolados alguns metabólitos secundários (derivados do ácido clorogênico e flavonóides). Das folhas de *Pluchea sagittalis* foram isolados os metabólitos ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico. Do extrato bruto da raiz desta mesma espécie foram isolados os mesmos três metabólitos ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico além do ácido 1,3,5-tricafeoilquínico. De *Baccharis pentodonta* foram isolados os metabólitos 5,7,4'-triidroxi-6-metoxi-luteonina e 5,7,3,4'- tretrahidroxi-6-metoxi-flavona de suas folhas e os metabólitos ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico, ácido 4,5-dicafeoilquínico e ácido 3-feruloil-5-cafeoilquínico. Da raiz de *Baccharidastrum triplinervium* foram isolados os metabólitos ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico, ácido 4,5-dicafeoilquínico já isolados anteriormente das outras espécies trabalhadas. A elucidação estrutural desses metabólitos isolados se deu por RMN e por análises de massa de alta resolução. Adicionalmente os extratos e frações obtidos foram submetidos a testes *in vitro* e para determinação de suas atividades antimicrobiana, antioxidante e de inibição enzimática frente às enzimas POP e DPP IV. A maioria dos extratos e frações testados apresentou atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição em caldo por volta de 0,5 mg mL^{-1} e atividade antioxidante moderada pelo método do radical livre (DPPH) sendo a fração acetato de etila a que apresentou maior potencial. Dentre as atividades de inibição enzimática, as atividade mais pronunciadas foram frente a POP, sendo que apenas os extratos brutos das raízes de *B. pentodonta e B. triplinervium* apresentaram-se como potenciais inibidores da enzima DPP IV.

Palavras chave: Asteraceae, derivados do ácido clorogênico, flavonóides, atividades biológicas.

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Pos-Graduate Program in Chemistry
Federal University of Santa Maria

Phytochemical screening and biological activity of the medicinal plant family Asteraceae Pampa Biome

Author: Caroline Ziegler Stüker
Academic advisor: Ademir Farias Morel
Date and Location of Defense: Santa Maria, April, 9, 2012.

The species selected for this study were: *Pluchea sagittalis*, *Baccharis pentodonta* and *Baccharidastrum triplinervium*, all belonging to the Asteraceae family. The extracts and fractions from leaves and roots of three species of medicinal plants in Rio Grande do Sul were obtained by different extraction processes (cold, the hot water extraction and soxhlet) and subjected to HPLC analysis. These extracts and fractions were subjected to different fractionations were isolated where some secondary metabolites (chlorogenic acid derivatives and flavonoids).

In the leaves of *Pluchea sagittalis* were isolated the secundary metabolites 3,4-dicaffeoylquinic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid and 4,5-dicaffeoylquinic acid. The crude extract of the root of the same species were isolated the same three metabolites 3,4-dicaffeoylquinic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid and 4,5-dicaffeoylquinic acid and the 1,3, 5-tricaffeoylquinic acid. *Baccharis pentodonta* were isolated metabolites 5,7,4'-trihydroxy-6-methoxy-luteolin and 5,7,3,4'- tretrahydroxy-6-methoxy-flavon for leaves and their metabolites 3,4-dicaffeoylquinic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid, 4,5-dicaffeoylquinic acid and 3-feruloyl-5-caffeoylquinic acid. The root *Baccharidastrum triplinervium* were isolated metabolites 3,4-dicaffeoylquinic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid and 4,5-dicaffeoylquinic acid already isolated from other species previously worked. The structures of these metabolites isolated was characterized by NMR analysis and high resolution mass.

Additionally extracts and fractions obtained were tested *in vitro* and to determine their antimicrobial, antioxidant and enzyme inhibition against the enzyme DPP IV and POP. Most of the extracts and fractions tested showed antimicrobial activity by the method of microdilution around 0,5 mg ml^{-1} and moderate antioxidant activity by the method of free radical (DPPH) and the ethyl acetate fraction showed the highest potential. Among the activities of enzyme inhibition, the activity was more pronounced compared to POP, with only the crude extracts of the roots of *B. pentodonta* and *B. triplinervium* presented themselves as potential inhibitors of the enzyme DPP IV.

Keywords: Asteraceae. chlorogenic acid derivatives. flavonoids. biological activities.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. *Pluchea sagittalis* 41

Figura 2. *Baccharis pentodonta* em seu habitat natural 43

Figura 3. *Baccharidastrum triplinervium* (Less.) Cabrera 45

Figura 4. Estruturas dos principais formadores das classes de derivados do ácido clorogênico presentes na natureza. 47

Figura 5. Estrutura do ácido *trans* cinâmico e do ácido quínico 47

Figura 6. Ácido clorogênico – numerações utilizadas atualmente 48

Figura 7. Estrutura básica dos flavonóides 51

Figura 8. Estruturas básicas de algumas classes de flavonóides 52

Figura 9. Comparação entre placa de flavonóides eluídas na fase móvel acetato de etila: diclorometano: ácido fórmico : ácido acético : água (100 : 25 : 10 : 10 : 11) reveladas em λ = 366nm. **A)** Placa de CCD. **B)** Placa de CCDAE. 61

Figura 10. Estrutura do Cloranfenicol 70

Figura 11. Estrutura da Nistatina 70

Figura 12. Estrutura tridimensional da prolil oligopeptidase (POP) de origem suína (imagem cedida pelo grupo do Prof. Ernest Giralt – Barcelona. 2008) 72

Figura 13. Comparação entre a estrutura da DPP IV à esquerda e da POP à direita 73

Figura 14. CAMAG – equipamento utilizado nas análises dos perfis do extratos e frações das plantas estudadas por CCDAE 86

Figura 15. Equipamento de Infravermelho 91

Figura 16. Perfil fitoquímico em CCDAE dos extratos e frações de *P. sagittalis*, *B. pentodonta* e *B. triplinervium.* Placas eluídas na fase móvel acetato de etila : ácido fórmico: ácido acético: água 100:11:11:26. A) leitura em λ = 366 nm e B) leitura em λ = 254 nm. 100

Figura 17. Placas eluídas na fase móvel Acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água 100:11:11:26. **A)** revelador: NPPEG, usando leitura em λ = 366 nm. **B)** revelador Bornträger, em λ = 254 nm e **C**) revelador Bornträger, em λ = 366 nm. 101

Figura 18. Espectro de infravermelho de todas as frações e extratos obtidos para *P. sagittalis, B. pentodonta* e de *B. triplinervium.* 102

Figura 19. **A)** Espectro de IV do padrão ácido cafêico. **B)** Espectro de IV do padrão ácido clorogênico. 103

Figura 20. Espectro de IV dos extratos e frações das plantas estudadas. **A)** Extratos e frações de *P. sagittalis*. **B)** Extratos de frações de *B. pentodonta.* **C)** Extratos e frações de *B. triplinervium.* 104

Figura 21. Espectro de IV do ácido 1,3-dicafeoilquínico em nujol. 105

Figura 22. **A)** Ácido clorogênico. **B)** Ácido cafêico. 106

Figura 23. Perfil cromatográfico dos padrões ácido clorogênicos e ácido cafêico, por CLAE: Coluna: X-terra C18, 4,6 x 150 mm, partículas de 5 µm, com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 30 °C. FM A: ACN/ácido acético glacial 0,05%, FM B: H_2O/ácido acético glacial 0,05%, fluxo 1 mL

min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-60% em 2 minutos, 60-80% em 2 minutos, 80-100% em 2 minutos, 100%-3minutos e 100-15% em 4 minutos: total corrida 21 minutos. Ordem de eluição: ácido clorogênico (tR = 4,904) e ácido cafêico (tR = 6,049). Leitura em 312 nm. 106

Figura 24. Perfil cromatográfico do padrão ácido clorogênico, por CLAE: Coluna: X-terra C18, 4,6 x 150 mm, partículas de 5 µm, com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 30 °C. FM A: ACN/ácido acético glacial 0,05%, FM B: H_2O/ácido acético glacial 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-60% em 2 minutos, 60-80% em 2 minutos, 80-100% em 2 minutos, 100%-3minutos e 100-15% em 4 minutos: total corrida 21 minutos. Leitura em 312 nm e espectro de UV obtido também em 312 nm. 107

Figura 25. Espectro e expansões do espectro de RMN ^1H do ácido clorogênico (400 MHz, DMSO-*d6*). 108

Figura 26. Espectro e expansões do espectro de RMN ^1H do ácido clorogênico (400 MHz, DMSO-*d6*). 109

Figura 27. Perfil cromatográfico do padrão ácido cafêico, por CLAE: Coluna: X-terra C18, 4,6 x 150 mm, partículas de 5 µm, com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 30 °C. FM A: ACN/ácido acético glacial 0,05%, FM B: H_2O/ácido acético glacial 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-60% em 2 minutos, 60-80% em 2 minutos, 80-100% em 2 minutos, 100%-3minutos e 100-15% em 4 minutos: total corrida 21 minutos. Leitura em 312 nm e espectro de UV obtido também em 312 nm. 111

Figura 28. Espectro e expansões do espectro de RMN ^1H do ácido cafêico (400 MHz, DMSO-*d6*). 112

Figura 29. Espectro e expansões do espectro de RMN ^1H do ácido cafêico (400 MHz, DMSO-*d6*). 112

Figura 30. Perfil cromatográfico, por CLAE, da FAqA *P. sagittalis*: Coluna: X-terra C18: 4,6 x 150 mm, partículas de 5 µm, com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 30 °C. **FM A:** ACN/ácido acético glacial 0,05%, **FM B:** H_2O/ ácido acético glacial 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-60% em 2 minutos, 60-80% em 2 minutos, 80-100% em 2 minutos, 100%-3minutos e 100-15% em 4 minutos: total corrida 21 minutos. Leitura em λ = 312 nm..... 115

Figura 31. Perfil cromatográfico, por CLAE, da FAqA *P. sagittalis* (PS2) após filtração: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna equivalente e temperatura do forno em 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 2 minutos: total corrida 10 minutos. Leitura em λ = 312 nm. 117

Figura 32. Análise por CLAE semi-preparativo da FAqA *P. sagittalis* (PS2) após filtração: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 200 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 2 mL min^{-1}, 15-40% em 30 minutos. Leitura em 220 nm. 117

Figura 33. Estrutura do ácido 3,4-dicafeoilquínico 118

Figura 34. Perfil cromatográfico do composto isolado PS2P1, por CLAE: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 2 minutos: total corrida 10 minutos. Leitura em 312 nm. 119

Figura 35. Espectro de UV obtido para o metabólito PS2P1, em 312 nm, após análise no CLAE. 119

Figura 36. Espectro de massa obtido em CLAE-EM no modo negativo para o metabólito PS2P1. 120

Figura 37. Espectro de EM/EM do íon $[M-H]^-$ 515,2349 (modo negativo). Análise do composto isolado PS2P1, por infusão direta utilizando solução ACN : H_2O (1:1) 0,1% TFA. Equipamento utilizado: Synapt HDMS Q-TOF (Waters Co.). 120

Figura 38. Espectro de RMN de ^1H do metabólito PS2P1 em MeOD a 400MHz. 122

Figura 39. Expansão do espectro de RMN de ^1H do metabólito PS2P1 em MeOD a 400MHz. 123

Figura 40. Estrutura do ácido 3,5-dicafeoilquínico 125

Figura 41. Perfil cromatográfico do composto isolado PS2P1, por CLAE: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 2 minutos: total corrida 10 minutos. Leitura em 312 nm. 125

Figura 42. Espectro de UV obtido para o metabólito PS2P2, em 312 nm, após análise no CLAE. 126

Figura 43. Espectro de massa obtido POR CLAE-EM no modo negativo para o metabólito PS2P2. 126

Figura 44. Espectro de EM/EM do íon $[M-H]^-$ 515,2629 (modo negativo). Análise do composto isolado PS2P2, por infusão direta utilizando solução ACN : H2O (1:1) 0,1% TFA. Equipamento utilizado: Synapt HDMS Q-TOF (Waters Co.). 127

Figura 45. Espectro de RMN de ^1H do metabólito isolado PS2P2 em MeOD a 400MHz... 129

Figura 46. Expansão do espectro de RMN de ^1H do metabólito isolado PS2P2 em MeOD a 400MHz. 130

Figura 47. Estrutura do ácido 4,5-dicafeoilquínico 132

Figura 48. Perfil cromatográfico do composto isolado PS2P3, por CLAE: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 6 minutos: total corrida 14 minutos. Leitura em 312 nm. 132

Figura 49. Espectro de UV obtido para o metabólito PS2P3, em 312 nm, após análise no CLAE. 133

Figura 50. Espectro de massa obtido por CLAE-EM no modo negativo para o metabólito PS2P3. 133

Figura 51. Espectro de EM/EM do íon $[M-H]^-$ 515,2264 (modo negativo). Análise do composto isolado PS2P3, por infusão direta utilizando solução ACN : H2O (1:1) 0,1% TFA. Equipamento utilizado: Synapt HDMS Q-TOF (Waters Co.). 134

Figura 52. Espectro de RMN de ^1H do ácido metabólito PS2P3 em MeOD a 400MHz..... 136

Figura 53. Expansão do espectro de RMN de ^1H do ácido metabólito PS2P3 em MeOD a 400MHz. 137

Figura 54. Perfil cromatográfico em CLAE do EB raiz *P. sagittalis*: Coluna: X-terra C18, 4,6 x 150 mm, partículas de 5 µm, com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 30 °C. FM A: ACN/ácido acético glacial 0,05%, FM B: H_2O/ácido acético glacial 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-

60% em 2 minutos, 60-80% em 2 minutos, 80-100% em 2 minutos, 100%-3minutos e 100-15% em 4 minutos: total corrida 21 minutos. Leitura em 312 nm..... 141

Figura 55. Perfil cromatográfico, por CLAE, do EB raiz *P. sagittalis* (PS1) após filtração: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 2 minutos: total corrida 10 minutos. Leitura em 312 nm. 141

Figura 56. Análise por CLAE semi-preparativo do EB da raiz de *P. sagittalis* (PS1) após filtração: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 200 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 2 mL min^{-1}, 15-40% em 30 minutos. Leitura em 220 nm..... 142

Figura 57. Perfil cromatográfico do composto isolado PS1P1, por CLAE: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 6 minutos: total corrida 14 minutos. Leitura em 312 nm – **ácido 3,4-dicafeoilquínico**..... 143

Figura 58. Perfil cromatográfico do composto isolado PS1P2, por CLAE: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 6 minutos: total corrida 14 minutos. Leitura em 312 nm – **ácido 3,5-dicafeoilquínico**..... 144

Figura 59. Perfil cromatográfico do composto isolado PS1P3, por CLAE: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 6 minutos: total corrida 14 minutos. Leitura em 312 nm – **ácido 4,5-dicafeoilquínico**..... 144

Figura 60. Estrutura do ácido 1,3,5- tricafeoilquínico..... 145

Figura 61. Perfil cromatográfico do composto isolado PS1P5, por CLAE: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 6 minutos: total corrida 14 minutos. Leitura em 312 nm e espectro de UV do mesmo composto também em 312 nm..... 146

Figura 62. Espectro de massa obtido por CLAE-EM no modo negativo para o metabólito PS1P5..... 147

Figura 63. Espectro de EM/EM do íon $[M-H]^-$ 677,3439 (modo negativo). Análise do composto isolado PS1P5, por infusão direta utilizando solução ACN : H_2O (1:1) 0,1% TFA. Equipamento utilizado: Synapt HDMS Q-TOF (Waters Co.). 147

Figura 64. Perfil cromatográfico da fração BPF2, por CLAE: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 6 minutos: total corrida 14 minutos. Leitura em 312 nm. 150

Figura 65. Perfil cromatográfico da fração BPF3, por CLAE: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 6 minutos: total corrida 14 minutos. Leitura em 312 nm. 151

Figura 66. Perfil cromatográfico da FA folhas de *B. pentodonta*, por CLAE: Coluna: X-terra C18, 4,6 x 150 mm, partículas de 5 µm, com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 30 °C. FM A: ACN/ácido acético glacial 0,05%, FM B: H_2O/ácido acético glacial 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-60% em 2 minutos, 60-80% em 2 minutos, 80-100% em 2 minutos, 100%-3minutos e 100-15% em 4 minutos: total corrida 21 minutos. Leitura em 312 nm..... 152

Figura 67. Perfil cromatográfico por CLAE do metabólito isolado A3OC16: Coluna: X-terra C18, 4,6 x 150 mm, partículas de 5 µm, com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 30 °C. FM A: ACN/ácido acético glacial 0,05%, FM B: H_2O/ácido acético glacial 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-60% em 2 minutos, 60-80% em 2 minutos, 80-100% em 2 minutos, 100%-3minutos e 100-15% em 4 minutos: total corrida 21 minutos. Leitura em 312 nm..... 154

Figura 68. Espectro de massa do composto A3OC16, íon molecular $[M+H]^+$ 301,0729 (modo positivo). Análise por infusão direta utilizando solução ACN / H_2O (1:1) 0,1% TFA. Equipamento utilizado: Synapt HDMS Q-TOF (Waters Co.). 155

Figura 69. Estrutura A3OC16..... 155

Figura 70. Espectro de RMN de ^1H da amostra A3OC16 obtida em 400 MHz solubilizada em DMSO-*d6*. 156

Figura 71. Expansão do espectro de RMN de ^1H da amostra A3OC16 obtida em 400 MHz solubilizada em DMSO-*d6*. 156

Figura 72. em DMSO-*d6*. 157

Figura 73. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C da amostra A3OC16 obtida em 400 MHz solubilizada em DMSO-*d6*. 157

Figura 74. Espectro de COSY da amostra A3OC16 obtida em 400 MHz solubilizada em DMSO-*d6*..... 159

Figura 75. Espectro de HSQC da amostra A3OC16 obtida em 400 MHz solubilizada em DMSO-*d6*..... 160

Figura 76. Expansão do espectro de HSQC da amostra A3OC16 obtida em 400 MHz solubilizada em DMSO-*d6*..... 160

Figura 77. Correlações e acoplamentos observados nos espectros de HSQC e COSY. Os acoplamentos estão representados pelas setas em vermelho..... 161

Figura 78. Perfil cromatográfico do metabólito isolado A3OC14: Coluna C18, fluxo 1 mL min^{-1}, FMA: ACN/TFA 0,05%, FM B: H2O/TFA 0,05% 15-40% em 8 min e 41-100% em 21 min. Leitura em 312 nm..... 162

Figura 79. Espectro de massa do composto A3OC14, íon molecular $[M+H]^+$ 301,0729 (modo positivo). Análise por infusão direta utilizando solução ACN : H2O (1:1) 0,1% TFA. Equipamento utilizado: Synapt HDMS Q-TOF (Waters Co.). 163

Figura 80. Espectro de EM/EM do íon $[M+H]^+$ 317,0656 (modo positivo). Análise do composto isolado A3OC14, por infusão direta utilizando solução ACN : H2O (1:1) 0,1% TFA. Equipamento utilizado: Synapt HDMS Q-TOF (Waters Co.). 163

Figura 81. Estrutura do A4OC14..... 164

Figura 82. Espectro de RMN de ^1H da amostra A3OC14 obtida em 400 MHz solubilizada em DMSO–*d6*. 164

Figura 83. Expansão do espectro de RMN de ^1H da amostra A3OC14 obtida em 400 MHz solubilizada em DMSO–*d6*..... 165

Figura 84. Espectro de RMN de ^{13}C da amostra A3OC14 obtida em 400 MHz solubilizada em DMSO-*d6*. 165

Figura 85. Expansão do espectro de COSY da amostra A3OC14 obtida em 400 MHz solubilizada em DMSO-*d6*. 168

Figura 86. Espectro de COLOQ da amostra A3OC14 obtida em 400 MHz solubilizada em DMSO-*d6*. 169

Figura 87. Correlações e acoplamentos observados nos espectros de COLOQ e COSY. Os acoplamentos estão representados pelas setas em vermelho. 170

Figura 88. Perfil cromatográfico da fração BPR4, por CLAE: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 2 minutos: total corrida 10 minutos. Leitura em 312 nm. 173

Figura 89. Perfil cromatográfico por CLAE semi-preparativo da fração BPR4 após filtração: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 200 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 2 mL min^{-1}, 15-40% em 30 minutos. Leitura em 220 nm. 174

Figura 90. Perfil cromatográfico do composto isolado BPR4P1, por CLAE: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 6 minutos: total corrida 14 minutos. Leitura em 312 nm – **ácido 3,4-dicafeoilquínico** e espectro de UV do mesmo composto também em 312 nm. 175

Figura 91. Perfil cromatográfico do composto isolado BPR4P2, por CLAE: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 6 minutos: total corrida 14 minutos. Leitura em 312 nm – **ácido 3,5-dicafeoilquínico** e espectro de UV do mesmo composto também em 312 nm. 176

Figura 92. Perfil cromatográfico do composto isolado BPR4P3, por CLAE: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 6 minutos: total corrida 14 minutos. Leitura em 312 nm – **ácido 4,5-dicafeoilquínico** e espectro de UV do mesmo composto também em 312 nm. 177

Figura 93. Estrutura do 3-feruloil-5-cafeoilquínico..... 178

Figura 94. Perfil cromatográfico do composto isolado BPR4P4, por CLAE: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 2 minutos: total corrida 10 minutos. Leitura em 312 nm. 178

Figura 95. Espectro de EM/EM do íon $[M-H]^-$ 529,2050 (modo negativo). Análise do composto isolado BPR4P4, por infusão direta utilizando solução ACN : H2O (1:1) 0,1% TFA. Equipamento utilizado: Synapt HDMS Q-TOF (Waters Co.). 179

Figura 96. Perfil cromatográfico por CLAE: **A)** Fração diclorometano das folhas de *B. triplinervium*; **B)** Fração acetato de etila das folhas de *B. triplinervium*; **C)** Fração aquosa acetato de etila também das folhas de *B. triplinervium*. Coluna: X-terra C18, 4,6 x 150 mm, partículas de 5 µm, com pré-coluna semelhante e

temperatura do forno de 30 °C. FM A: ACN/ácido acético glacial 0,05%, FM B: H_2O/ácido acético glacial 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-60% em 2 minutos, 60-80% em 2 minutos, 80-100% em 2 minutos, 100%-3minutos e 100-15% em 4 minutos: total corrida 21 minutos. Leitura em 312 nm..... 183

Figura 97. Perfil cromatográfico da fração BT4 (sub-fração da FA das folhas de *B. triplinervium*), por CLAE: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 6 minutos: total corrida 14 minutos. Leitura em 280 nm..... 185

Figura 98. Perfil cromatográfico do EB das raízes de *B. triplinervium*, por CLAE: Coluna: X-terra C18, 4,6 x 150 mm, partículas de 5 µm, com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 30 °C. FM A: ACN/ácido acético glacial 0,05%, FM B: H_2O/ácido acético glacial 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-60% em 2 minutos, 60-80% em 2 minutos, 80-100% em 2 minutos, 100%-3minutos e 100-15% em 4 minutos: total corrida 21 minutos. Leitura em 312 nm. 186

Figura 99. Perfil cromatográfico, por CLAE, do EB raiz *B. triplinervium* (BT1) após filtração: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 2 minutos: total corrida 10 minutos.. Leitura em 312 nm. 188

Figura 100. Perfil cromatográfico, por CLAE, do EB raiz *B. triplinervium* (BT2) após filtração: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 6 minutos: total corrida 14 minutos. Leitura em 312 nm. 189

Figura 101. Perfil cromatográfico por CLAE semi-preparativo da fração BT1 após filtração: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 200 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 2 mL min^{-1}, 15-40% em 30 minutos. Leitura em 220 nm..... 190

Figura 102. Perfil cromatográfico do composto isolado BT1P1, por CLAE: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 6 minutos: total corrida 14 minutos. Leitura em 312 nm – **ácido 3,4-dicafeoilquínico** e espectro de UV do mesmo composto também em 312 nm. 191

Figura 103. Perfil cromatográfico do composto isolado BT1P2, por CLAE: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 6 minutos: total corrida 14 minutos. Leitura em 312 nm – **ácido 3,5-dicafeoilquínico** e espectro de UV do mesmo composto também em 312 nm. 192

Figura 104. Perfil cromatográfico do composto isolado BT1P3, por CLAE: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 6 minutos: total corrida 14 minutos. Leitura em 312 nm – **ácido 4,5-dicafeoilquínico** e espectro de UV do mesmo composto também em 312 nm. 193

Figura 105. Perfil cromatográfico da co-injeção dos metabólitos isolados PS1P1, PS2P1 e BPR4P1, por CLAE: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 2 minutos: total corrida 10 minutos.. Leitura em 312 nm e espectro de UV obtido..... 195

Figura 106. Perfil cromatográfico da co-injeção dos metabólitos isolados PS1P2, PS2P2 e BPR4P2, por CLAE: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 2 minutos: total corrida 10 minutos. Leitura em 312 nm e espectro de UV obtido..... 196

Figura 107. Perfil cromatográfico da co-injeção dos metabólitos isolados PS1P3, PS2P3 e BPR4P3, por CLAE: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 2 minutos: total corrida 10 minutos. Leitura em 312 nm e espectro de UV obtido..... 197

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação entre placas utilizadas para CCD e CCDAE..... 61

Tabela 2. Micro-organismos padrão ATCC utilizados nos testes de determinação da atividade antimicrobiana..... 93

Tabela 3. Dados de RMN de ^{1}H do ácido clorogênico (5-dicafeoilquínico). 110

Tabela 4. Dados de RMN de ^{1}H do ácido cafêico 113

Tabela 5. Frações obtidas com os respectivos sistemas solventes utilizados na filtração d FAqA de folhas de *P. sagittalis.* 116

Tabela 6. Dados de EM/EM obtidos para o metabólito PS2P1. 121

Tabela 7. Dados de RMN de ^{1}H do ácido 3,4-dicafeoilquínico 124

Tabela 8. Dados de EM/EM obtidos para a amostra PS2P2..... 127

Tabela 9. Dados de RMN de ^{1}H do ácido 3,5-dicafeoilquínico 131

Tabela 10. Dados de EM/EM obtidos para o metabólito PS2P3. 134

Tabela 11. Dados de RMN de ^{1}H do ácido 4,5-dicafeoilquínico 138

Tabela 12. Polaridades e frações obtidas na coluna de filtração em silica. 140

Tabela 13. Frações reunidas por semelhança de perfil obtido no CLAE, após coluna de filtração. 140

Tabela 14. Dados de EM/EM obtidos para o composto isolado PS1P5. 148

Tabela 15. Frações obtidas com os respectivos sistemas solventes utilizados na filtração do EB das folhas de *B. pentodonta*. 150

Tabela 16. Sistemas solventes e respectivas frações obtidas após a cromatografia em coluna da fração acetato de etila das folhas de *B. pentodonta*..... 153

Tabela 17. Frações agrupadas por semelhança de Rfs após a cromatografia em camada delgada das frações retiradas da CC realizada com a fração acetato de etila das folhas de *B. pentodonta* 153

Tabela 18. Deslocamentos de ^{1}H e ^{13}C em 400 MHz..... 158

Tabela 19. Deslocamentos de ^{1}H e 13C referentes ao metabólito A3OC14..... 167

Tabela 20. Correlações visualizadas no espectro de COLOQ para A3OC14..... 170

Tabela 21. Frações obtidas com os respectivos sistemas solventes utilizados na filtração do EB da raiz de *B. pentodonta*. 172

Tabela 22. Dados de EM/EM obtidos para o composto isolado BPR4P4. 179

Tabela 23. Sistemas solventes e respectivas frações obtidas no fracionamento da fração acetato d etila das folhas de *B. triplinervium*, por cromatografia em coluna..... 184

Tabela 24. Frações agrupadas por semelhança de Rfs, após análises de todas as alíquotas retiradas da coluna cromatográfica por CCD. 184

Tabela 25. Solventes utilizados no fracionamento por coluna cromatográfica e frações obtidas para cada um dos sistemas solventes..... 187

Tabela 26. Frações agrupadas por semelhança de Rfs. 187

Tabela 27. Comparação de compostos isolados das plantas estudadas. 198

Tabela 28. Resultados de CIM e CLM para os extratos e frações de *P. sagittalis, B. pentodonta* e *B. triplinervium*, em mg mL^{-1}. 203

Tabela 30. Atividade inibitória da POP frente aos extratos e frações obtidos de *P. sagittalis, B. pentodonta* e *B. triplinervium* 206

Tabela 31. IC_{50} obtidas para a POP de metabólitos isolados e padrões comerciais..... 207

Tabela 32. Atividade inibitória da DPP IV frente aos extratos e frações 208

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Biossíntese derivados clorogênicos**.** 55

Esquema 2. Biossíntese ácidos tricafeoilquínicos. 56

Esquema 3. Biossíntese de flavonóides 58

Esquema 4. Reação de redução do TTC, com a formação da formazana 68

Esquema 5. Reação do radical livre DPPH com a molécula doadora de H, originando a forma reduzida DPPH-H. 75

Esquema 6. Extração das folhas de *B. pentodonta* 79

Esquema 7. Extração a frio das folhas de *B. triplinervium* 80

Esquema 8. Extração líquido-líquido da fração aquosa das folhas de *P. sagittalis* 81

Esquema 9. Extração líquido-líquido da fração aquosa das folhas de *B. triplinervium* 81

Esquema 10. Extração em metanol à quente (Soxhlet) das raízes de *P. sagittalis* 82

Esquema 11. Extração em metanol à quente (Soxhlet) das raízes de *B. pentodonta* 83

Esquema 12. Extração em metanol à quente (Soxhlet) das raízes de *B. triplinervium* 83

Esquema 13. Extratos brutos e frações cromatografadas 84

Esquema 14. Análise da atividade antioxidante com DPPH. 96

Esquema 15. Extração líquido-líquido da fração aquosa das folhas de *P. sagittalis* 114

Esquema 16. Extração em metanol à quente (Soxhlet) das raízes de *P. sagittalis* 139

Esquema 17. Extração das folhas de *B. pentodonta* 149

Esquema 18. Extração em metanol à quente (Soxhlet) das raízes de *B. pentodonta* 171

Esquema 19. Extração à frio das folhas de *B. triplinervium* 181

Esquema 20. Extração líquido-líquido da fração aquosa das folhas de *B. triplinervium* 182

Esquema 21. Extração em metanol à quente das raízes de *B. triplinervium* 186

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Atividade antioxidante dos extratos brutos e frações de *P. sagittalis.* BHT-butil-hidroxi-tolueno: padrão. 210

Gráfico 2. Atividade antioxidante das frações de *B. pentodonta.* BHT-butil-hidroxi-tolueno: padrão. 211

Gráfico 3. Atividade antioxidante dos extratos brutos e frações de *B. triplinervium pentodonta.* BHT-butil-hidroxi-tolueno: padrão..... 212

Gráfico 4. Atividade antioxidante das frações aquosas de *B. triplinervium.* BHT-butil-hidroxi-tolueno: padrão. 212

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACFQ	– Ácido cafeoilferuloilquínico
ACG	– Ácido clorogênico
ACQ	– Ácido cafeoilquínico
AFQ	– Ácido feruloilquínico
ATCC	– American Type Culture Collection
BHT	– Butil hidroxi tolueno
CBM	– Concentração bactericida mínima
CC	– Cromatografia em coluna
CCD	– Cromatografia em camada delgada
CCDAE	– Cromatografia em camada delgada de alta eficiência
CCDP	– Cromatografia em camada delgada preparativa
CD3OD	– Clorofórmio deuterado
CFM	- Concentração fungicida mínima
CIM	– Concentração inibitória mínima
CLAE	– Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-EM	– Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas
COLOQ	– *Correlation Spectroscopy for Long-range Couplings*
COSY	– *Homonuclear Correlation Spectroscopy*
d	– Dubleto
Di-ACQ	– Ácido Dicafeoilquínico
DMSO - *d6*	– Dimetilsulfóxido hexadeuterado
DPP IV	– Dipeptidil dipeptidase IV
DPPH	– 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EM	– Espectrometria de massas
FE	– Fase estacionária
FM	– Fase móvel
HSQC	– *Heteronuclear Single Quantum Coherence*
Hz	– Hertz
IV	– Espectroscopia de infravermelho
m	– Multipleto
m/z	– Relação massa/carga
MeOD	– Metanol deuterado
NCCLS	– National Committee for Clinical Laboratory Standards
OMS	– Organização Mundial da Saúde
POP	– Prolil oligo peptidase
ppm	– parte por milhão
Rf	– Fator de retenção
RMN	– Ressonância Magnética Nuclear
RMN ^{13}C	– Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13
RMN ^{1}H	– Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio

s	– Singleto
TCC	– Cloreto de trifenil tetrazólio
Tetra-ACQ	– Ácido tetracafeoilquínico
TFA	– Ácido trifluoracético
TMS	– Tetratetil silano
Tri-ACQ	– Ácido tricafeoilquínico
UFC	– Unidades formadoras de colônias
UV	– Espectro de ultravioleta
δ	– Deslocamento químico
λ	– Comprimento de onda
µg	– Microgramas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....35

2 OBJETIVOS 37

3 REVISÃO DE LITERATURA 39
3.1 Família Asteraceae.....39
3.1.1 Gênero Pluchea.....40
3.1.2 Gênero Baccharis.....42
3.1.3 Gênero Baccharidastrum 44
3.2 Compostos Fenólicos: derivados do ácido clorogênico e flavonóides 46
3.2.1 Derivados do ácido clorogênico 46
3.2.2 Flavonóides.....51
3.3 Biossíntese dos compostos fenólicos 54
3.4 Métodos analíticos de separação e identificação de produtos naturais 59
3.4.1 Cromatografia em camada delgada (CCD) e Cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE).....59
3.4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....61
3.4.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-EM) 62
3.5 Atividades Biológicas.....63
3.6 Ensaios *in vitro* e micro-organismos patogênicos.....65
3.6.1 Determinação da atividade antimicrobiana "in vitro" 69
3.7 Atividade inibitória enzimática 71
3.7.1 Prolil Oligopeptidase (POP) 71
3.7.2 Dipeptidil Peptidase IV (DPP IV) 72
3.8 Atividade Antioxidante 73

4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....77
4.1 Coleta do material vegetal e identificação das plantas.....77
4.2 Secagem, moagem, extração e fracionamento do material vegetal 77
4.2.1 Fracionamento a frio de Baccharis pentodonta e Baccharidastrum triplinervium 78
4.2.2 Fracionamento líquido-líquido dos extratos aquosos das folhas de Pluchea sagittalis e Baccharidastrum triplinervium 80
4.2.3 Fracionamento à quente das raízes de Pluchea sagittalis, Baccharis pentodonta e Baccharidastrum triplinervium.....82
4.3 Materiais e Métodos Cromatográficos.....84
4.3.1 Cromatografia em coluna cromatográfica (CC) 84
4.3.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)/ Cromatografia em Camada Delgada de alta eficiência (CCDAE) e Cromatografia em Placa Preparativa (CPP).....85
4.3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....87
4.3.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) modo semi-preparativo.....88
4.3.5 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE/EM) 88
4.3.6 Espectrometria de massas de alta resolução (EMAR).....89
4.4 Equipamentos utilizados 90

4.4.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 90
4.4.2 Ponto de fusão 90
4.4.3 Espectroscopia de Infravermelho 90
4.4.4 Leitor de microplacas 91
4.4.5 Solventes e reagentes purificados 91
4.4.6 Padrões 92
4.5 Atividade Antimicrobiana 92
4.5.1 Determinação da atividade antimicrobiana "in vitro" pelo método de microdiluição em caldo (CIM) 92
4.5.2 Micro-organismos utilizados para a determinação da atividade antimicrobiana "in vitro" 93
4.6 Atividade Antioxidante 95
4.6.1 Método do radical livre DPPH 95
4.7 Atividade enzimática 97
4.7.1 Determinação da atividade inibidora da Prolil oligopeptidase (POP), por método fluorimétrico 97
4.7.2 Determinação da atividade inibidora da dipeptidil peptidase IV (DPP IV), por método fluorimétrico 98

5 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS 99
5.1 Prospecção fitoquímica dos extratos obtidos de *P. sagittalis*, *B. pentodonta* e *B. triplinervium* 99
5.1.1 Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE) 99
5.1.2 Espectroscopia de infravermelho 102
5.2 Análise de ácido clorogênico e ácido cafêico por CLAE e RMN 105
5.3 Análise dos extratos e isolamento dos componentes majoritários 114
5.3.1 Pluchea sagittalis 114
5.3.2 Baccharis pentodonta 149
5.3.3 Baccharidastrum triplinervium 181
5.4 Comparação dos resultados obtidos a partir da análise fitoquímica das plantas estudadas 194
5.5 Determinação das atividades biológicas "*in vitro*" dos extratos e frações de *Pluchea sagittalis*, *Baccharis pentodonta* e *Baccharidastrum triplinervium* 202
5.5.1 Método de Microdiluição em Caldo 202
5.6 Atividade Enzimática frente a POP e DPP IV dos extratos e frações de *P. sagittalis*, *B. pentodonta* e *B. triplinervium* 206
5.6.1 Atividade inibitória da POP 206
5.6.2 Atividade inibitória da DPP IV 207
5.7 Atividade Antioxidante pelo método de DPPH dos extratos e frações de *P. sagittalis*, *B. pentodonta* e *B. triplinervium* 209

6 CONCLUSÕES 213

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 215

1 INTRODUÇÃO

A utilização das plantas com fins medicinais para o tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das mais antigas práticas medicinais da humanidade[1].

Nosso país detém a maior biodiversidade do planeta, e os recursos naturais existentes aqui estão sendo cada vez mais explorados, sendo esses dados disponibilizados para a população[2].

No inicio da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde. Na Alemanha, onde se consome metade dos extratos vegetais comercializados em toda a Europa (cerca de US$ 3,5 bilhões do total de US$ 7 bilhões, ou US$ 42,90 per capita, em valores de 1997), plantas medicinais são utilizadas pela população para tratar resfriados (66%), gripe (38%), doenças do trato digestivo ou intestinal (25%), dores de cabeça (25%), entre outras doenças[3]. No ano de 1997, 1,5 milhão de pessoas utilizaram ervas medicinais durante o tratamento alopático[1]. Atualmente, 25% das drogas prescritas são derivadas de plantas e 80% da população mundial utiliza plantas medicinais como medicação básica havendo aumento desta taxa em torno de 7% ao ano[2].

No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, propagadas por usuários ou comerciantes. As pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes, assim como o controle da comercialização pelos órgãos oficiais em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais[1].

Nos últimos anos, o foco em pesquisa de produtos naturais vem aumentando em todo o mundo e uma grande quantidade de evidências vem sendo coletadas para mostrar o enorme potencial das plantas medicinais já utilizadas nos sistemas tradicionais desde a antiguidade[4].

Os produtos naturais têm sido historicamente utilizados como abundante fonte de novas moléculas para a descoberta de novos medicamentos, com base na sua

[1] PINTO, A.C.; VEIGA JÚNIOR, V. F.; MACIEL, M. A. M. Química Nova, 28, 3, 519, 2005.
[2] Química verde no Brasil: 2010-2030 - Ed. rev. e atual. - Brasília,DF: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2010.
[3] CALIXTO, J. B.; Braz. J. Med. Biol. Res., 33, 179, 2000.
[4] DAHANUKAR, S.A.; KULKARNI, R.A.; REGE, N.N. Indian J. Pharm., 32, S81, 2000.

capacidade de gerar estruturas diversificadas e originais[5]. Se avaliarmos esta diversidade estrutural e compararmos os produtos naturais com moléculas sintéticas podemos evidenciar que grande parte dos sintéticos possui rigidez estrutural porém não possui a quiralidade necessária para ser efetivamente utilizado como droga com propriedades farmacêuticas[6], enquanto que produtos naturais têm estruturas privilegiadas capazes de interagir com proteínas e outros alvos biológicos muito específicos[7]. Sendo assim, os produtos naturais atuam como modelos para o desenvolvimento de novos fármacos, sejam essas moléculas oriundas de plantas, micro-organismos ou de fontes ainda pouco exploradas como organismos marinhos[8].

O uso histórico, bem como a busca por novos produtos naturais biologicamente ativos, principalmente devido a grande diversidade estrutural presente entre os compostos naturais ainda pouco explorados, acabam por justificar e estimular a prospecção e o estudo de plantas medicinais e, por conseguinte de novos compostos naturais presentes no reino vegetal.

[5] YULIANA, N.; *et al.* Phytother. Res. 25, 2, 157, 2011.
[6] NISBET L.J.; MOORE, M. Curr. Opin. Biotechnol. 8, 708, 1997.
[7] KOEHN F.E.; CARTER G.T. Nat Rev Drug Discov 4, 206, 2005.
[8] OJIMA, I. J. of Medicinal Chemistry, 51, 2008.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como principais objetivos:

- ✓ Analisar os constituintes químicos presentes nas folhas e raízes de *Pluchea sagittalis*, *Baccharis pentodonta* e *Baccharidastrum triplinervium*, pertencentes à família Asteraceae.
- ✓ Isolar e identificar os metabólitos secundários presentes nessas espécies, utilizando técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas e massa de alta resolução, além de ressonância magnética nuclear;
- ✓ Avaliar biologicamente os extratos e frações obtidos destas mesmas espécies, pelo método de microdiluição em caldo;
- ✓ Avaliar a inibição enzimática desses extratos e frações frente às enzimas POP e DPPIV;
- ✓ Avaliar a atividade antioxidante dos extratos e frações pelo método do DPPH.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Família Asteraceae

Plantas pertencentes a esta família possuem hábitos variados e apresentam-se na forma de ervas, arbustos, trepadeiras ou excepcionalmente árvores. A grande maioria da família é formada por plantas de pequeno porte [9,10]. São encontradas em todos os tipos de habitats, mas principalmente nas regiões tropicais montanhosas da América do Sul[10]. A família Asteraceae é considerada a maior família das Angiospermas, com cerca de 1100 gêneros e 25.000 espécies[10].

Suas folhas são variadas, podendo ter diferentes formas. Podem ser inteiras ou fendidas, alternas ou opostas, latescentes ou não. As flores podem ser radiais ou zigomorfas até bilabiadas, hermafroditas ou de sexo separado podendo estar na mesma inflorescência ou em plantas dióicas. São pentâmeras com cálice profundamente modificado transformado em papilho e servindo à disseminação do fruto[11].

Plantas desta família são extensivamente estudadas quanto a sua composição química e atividade biológica levando ao desenvolvimento de novos fármacos, inseticidas, entre outros[10].

Muitos trabalhos científicos vêm sendo realizados com espécies desta família como o isolamento de uma variedade de metabólitos secundários, dos quais se destacam os flavonóides como importantes marcadores quimiotaxonômicos[10, 11].

---

[9] JOLY, A. B. Botânica: introdução à taxonomia vegetal. Companhia Ed. Nacional, São Paulo-SP, 777p, 1998.
[10] VERDI, L. G. Química Nova 28, 1, 85, 2005.
[11] EMERENCIANO, V. P; *et al*. Biochem. Syst. and Ecol. 29, 947, 2001.

3.1.1 Gênero *Pluchea*

O gênero *Pluchea* apresenta aproximadamente 40-80 espécies, que crescem nas regiões frias de todo globo[12].

A maioria das plantas deste gênero se distribui no continente Americano e em partes da África, Ásia e Europa[13].

São ervas perenes ou arbustos, às vezes aromáticas, geralmente pubescentes tendo às vezes tricomas glandulares. Suas folhas são simples, alternas, inteiras, dentadas ou serradas, pecioladas ou sésseis com as bases amplexicaules. E as flores periféricas pistiladas e corola filiforme. Suas brácteas são umbricadas e frequentemente de cor púrpura, hermafroditas e em pequena quantidade. Possui frutos aquênios e cilíndricos[13].

3.1.1.1 *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera

Erva originária do continente Americano e muito frequente nas regiões Sul e Sudeste do Brasil[14]. Também cresce em regiões úmidas do noroeste Argentino e Paraguaio[12].

Apresenta-se como um subarbusto anual ou perene dependendo das condições, sendo ereto, aromático, de caule herbáceo, cilíndrico, multialado, pouco ramificado com 30 a 90 cm de altura[14]. Possui folhas simples, alternas, rígido-pubescentes, com estipulas se estendendo pelo caule, de 3 a 5 cm de comprimento[12,14]. Tem flores lilacíneas, em capítulos oblongos reunidos em panículas corimbiformes terminais[14], sendo as marginais muito numerosas[12]. Os frutos são do tipo aquênio muito pequenos[14] (**Figura 1**).

---

[12] BÜRGER, M. E. Estudo Farmacológico do extrato da *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera (Compositae) sobre o trato gastrointestinal. Dissertação de Mestrado, UFSM, 1995.
[13] VILLASEÑOR, J. L. y VILAARREAL, J. A. Revista Mexicana de Biodiversidad. 77, 59, 2006.
[14] LORENZI, H; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo, SP, 2002

Figura 1. *Pluchea sagittalis*

Sinonímias [12,14]**:** *Conyza sagittalis* Lam

Baccharis sagittalis

Nomes populares[12,14]**:** lucera, erva-lucera, lucero, quitoco, madrecravo, tabacarana.

Usos populares: peitoral, carminativa e estomacal, com indicações para o tratamento caseiro de problemas de digestão, embaraços gástricos, flatulências, dispepsias nervosas, inflamações do útero, rins e bexiga, reumatismo, bronquite e resfriado e como estimulante do crescimento capilar[14].

Apesar de seu amplo uso popular, existem poucos estudos sobre a composição química e as propriedades farmacológicas desta planta[14]. Os poucos estudos que existem, revelaram que a espécie apresenta elevado conteúdo de ácidos cafeoilquínicos, entre eles os ácidos isoclorogênico, clorogênico e cafêico. Do extrato clorofórmico foram isolados flavonóides metilados[12].

Nesta espécie também já foram identificados acetilenos, taninos, esteróides, fitosteróis, saponinas e óleo essencial. No óleo essencial formam identificados α-pineno, canfeno, β-pineno, d-limoneno, 1,8-cineol, p-cimeno, linalol, cariofileno, α-terpineol e borneol, entre outros componentes[12].

3.1.2 Gênero *Baccharis*

O gênero *Baccharis* inclui mais de 500 espécies nativas[15] e exclusivas das Américas que estão distribuídas principalmente no Brasil e na região Andina. No Brasil são cerca de 120 espécies[16] concentradas na região Sul, sendo o Paraná considerado o centro de dispersão no país[17].

As espécies deste gênero são conhecidas como carquejas, vassoura e vassourinha, apresentam-se como arbustos lenhosos de grande diversidade morfológica e tendo em média 0,5 a 4,0 metros de altura. Propagam-se por sementes e estaquias a partir de plantas adultas[18].

Apresentam elevado valor sócio-econômico, com ampla dispersão nos estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Rio Grande do Sul, entre outras regiões do país, sendo grande parte delas utilizadas na medicina popular para controle ou tratamento de várias doenças[10]. São utilizadas principalmente como chás com indicação para disfunções do estômago, fígado, anemia, inflamações, diabetes, doenças da próstata e também como remédio para desintoxicação do organismo[19, 20, 21]. Algumas espécies são reconhecidamente tóxicas apesar de seu uso na medicina popular.

Justamente por seu amplo uso na medicina popular, o estudo de espécies do gênero *Baccharis* tem alcançado grandes avanços nos últimos anos, apesar de menos do que 25% (cerca de 120 espécies) das espécies deste gênero terem sido estudadas. Dentre estas, cerca de 30 foram submetidas a estudos de atividade biológica, onde se destacaram os efeitos alelopáticos, antimicrobianos, citotóxicos e anti-inflamatórios. Entre as espécies mais pesquisadas quanto à composição química e/ou atividade biológica, encontram-se *B. megapotamica*, *B. incarum*, *B. trimera*, *B. trinervis*, *B. salicifolia*, *B. crispa*, *B. coridifolia*, *B. dracunculifolia*, *B. grisebachii* e *B. tricuneata*[10].

---

[15] NESOM, G. L.; Phytologia, 69, 40, 1990.
[16] MOREIRA, F. P. M. Química. Nova, 26,3, 309, 2003.
[17] BARROSO, G. M. Sistemática das angiospermas do Brasil. Imprensa Universitária da UFV, Viçosa-MG, vol. 3, 326p, 1991.
[18] CASTRO, H. G. DE, FERREIRA, F. A. Contribuição ao estudo das plantas medicinais: carqueja. Viçosa: Suprema, 158p., 2000.
[19] KORBES, C. V. Manual de plantas medicinais, Grafit: Francisco Beltrão-PR, 1995.
[20] FRANCO, I. J. Ervas e plantas: a medicina dos simples. Imprimar: Chapecó-SC, 1995.
[21] CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, vol. I, 74p, 1984.

Fitoquimicamente pode-se observar que o gênero é caracterizado pelo acúmulo de sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e flavonóides[22,23].

3.1.2.1 *Baccharis pentodonta* Malme[24]

Planta distribuída geograficamente de São Paulo até o Rio Grande do Sul. É um arbusto com xilópio, do qual saem vários caules.

Folhas sésseis oblongo-cuneiformes, coriáceas, glabras, densamente glanduloso-pontuadas na página inferior, com margens inteiras, unidenteadas ou de 3-5-7 denteadas, com dentes patentes, com 6-20 mm de comprimento e 1,5 mm de largura. Os capítulos são sésseis, de 3-6 ordenados em espigas curtas, dispostos na extremidade de ramos folhosos. Capítulos femininos com invólucro de mais ou menos 5-6 mm de altura e 2 mm de diâmetro, com 3 séries de brácteas involucrais, com 4-5 flores. Capítulo masculino com invólucro de mais ou menos 3 mm de comprimento, e 3mm de diâmetro, com 5 flores.

Esta planta floresce nos meses de setembro e fevereiro, frutificando logo em seguida. Não há relatos de investigação fitoquímica nem registro do uso medicinal desta espécie, na literatura.

Figura 2. *Baccharis pentodonta* em seu habitat natural

[22] JARVIS, B. B.; *et al*. Phytochem. 30, 789, 1991.
[23] FULLAS, F.; *et al*. J Nat Prod. 57, 801, 1994.
[24] BUENO, L. O.; BARROSO, G. M. Compostas 5. SUBTRIBO: BACCHARIDINAE. *In:* Flora Ilustrada Catarinense, I Parte As Plantas, Monografia Completa, 304 páginas, Itajaí-SC, 2002.

Sinonímias: *Baccharis gracillima* Heering et Dusén

Baccharis pluridentata Heering

Nomes populares: vassoura

Usos populares: não registrados na literatura examinada.

3.1.3 *Gênero Baccharidastrum*[24]

Este gênero recebeu esta denominação devido a grande semelhança das espécies deste gênero com as espécies do gênero *Baccharis.*

Ocorrem espécies deste gênero no Brasil, Paraguai, Uruguai e nordeste da Argentina. No Rio Grande do Sul e em Santa Catarina está representado por duas espécies muito afins, porém distintas, principalmente pela forma das folhas. A espécie *B. triplinervium* possui folhas ovado-lanceoladas, com 6-8 cm de comprimento e cerca de 3 cm de largura enquanto que *B. argutm* possui folhas linear-lanceoladas, com 6-13 cm de comprimento e cerca de 0,2 a 2 cm de largura.

Representantes do gênero *Baccharidastrum* apresentam-se como arbustos glutinosos, com 1-2 m de altura. Folhas alternas, trinérveas, de ovado-lanceoladas a linear-lanceoladas. As flores femininas estão dispostas em muitas séries e suas corolas são tubulosas filiformes, membranáceas e de ápice denteado; o estilete longamente exserto do tubo da corola é dividido em dois ramos curtos. As flores masculinas dispostas em 2-6 estão localizadas na porção central do receptáculo. A corola da flor masculina é tubulosa, dividida em lacínios triangulares curtos possuindo estilete e tubo estaminal ultrapassando um pouco do comprimento do tubo da corola. Pápus constituído de cerdas finas e longas, sem espessamento apical[24].

3.1.3.1 *Baccharidastrum triplinervium* (Less.) Cabrera

Baccharidastrum triplinervium ocorre no Brasil, Paraguai, Uruguai e nordeste da Argentina até o delta e as margens do rio da Plata[25]. No Brasil, preferencialmente no Rio Grande do Sul, Paraná, Santa Catarina e Minas Gerais[24].

[25] LANGOHR, I. M.; GAVA, A.; BARROS, C. S. L. Pesquisa Veterinária Brasileira 25, 4, 235-238, 2005

Ocupa áreas de savana (campos naturais), capões e florestas secundárias, sempre associada com solos rasos. Sua ocorrência parece ser muito esparsa[25].

Sinonímias[24,25]**:** *Baccharis pseudoserrulata* I. L. Teodoro;
Baccharis serrulata DC., hom. Illeg;
Baccharis vulneraria Baker;
Conyza triplinervia Less.

Nomes populares: Grandiúva-de-cavalo[25], erva-santa, erva-de-sant'ana[24]

Usos populares: para lavagem de feridas e como abortivo[26]. Suas inflorescências são procuradas por abelhas nativas e exóticas, caracterizando grande produtividade de néctar em suas flores[24] (**Figura 3**).

Figura 3. *Baccharidastrum triplinervium* (Less.) Cabrera

Subarbusto de 1,5 a 2,0 m de altura, pouco ramificado. Folhas alternadas, trinervadas, ovado-lanceoladas, de 6 a 8 cm de comprimento por 1,3 a 4cm de largura. Os capítulos são muito numerosos, dispostos em densas cimas corimbiformes. As flores são dimorfas, sendo as marginais multisseriadas, numerosas, femininas, com corolas filiformes curtas, e as do disco somente em número de 2-6, masculinas. Há relatos de intoxicação causada por esta planta em bovinos do norte do Paraná [24,25].

Não há registro de estudos fitoquímicos para esta espécie na literatura.

[26] REITZ, PR, KLEIN, RM "O reino vegetal do Rio do Sul", *Sellowia – Anais Botânicos do Herbário,* Barbosa Rodrigues 16, 9-118, 1964.

3.2 Compostos Fenólicos: derivados do ácido clorogênico e flavonóides

Os compostos fenólicos, especialmente flavonóides e derivados do ácido clorogênico, são um tema importante na pesquisa e desenvolvimento. Por conseguinte, compostos fenólicos não são apenas utilizados como ingredientes para alimentos funcionais, mas também em outros produtos de promoção da saúde. Estes metabólitos tem se mostrado benéficos, para suas conhecidas ou suspeitas propriedades dietéticas/medicamentos [27,28 29,30,31].

3.2.1 *Derivados do ácido clorogênico*

Segundo Clifford (2000)[32], um dos primeiros relatos sobre os ácidos clorogênicos foi publicado em 1837 por Robiquet e Boutron. Porém o termo somente foi introduzido em 1846 por Payen.

Os ácidos clorogênicos (ACG) são uma família de ésteres formados a partir da esterificação de um ou mais resíduos de alguns ácidos *trans*-cinâmicos (*p*–cumárico, ferúlico e cafêico)[33] (**Figura 4)** com o ácido quínico (ácido 1L-1(OH) 3,4,5-tetraidroxicicloexanóico). O ácido quínico possui uma hidroxila axial na posição 1 e outra na posição 3, uma equatorial na posição 4 e outra na posição 5 (**Figura 5**)[32].

[27] CLIFFORD, M. N.; ZHENG, W.; KUHNERT, N. Phytochem. Anal. 17, 384, 2006.
[28] JOHNSTON, K.L.: CLIFFORD, M.N.; MORGAN, L.M. Am J. Clin Nutr 78, 728, 2003.
[29] CLIFFORD, M. N. Planta Med 12, 1103, 2004.
[30] CLIFFORD, M. N.; BROWN, J. E. In *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications,* Andersen O, Markham KR (eds). CRC Press: Boca Raton, FL; 320–370, 2006.
[31] TOLONEN, A.; *et al.* Phytochem. Anal. 13, 316, 2002.
[32] CLIFFORD, M. N. J Sci Food Agric 80, 1033, 2000.
[33] CLIFFORD, M.N.; *et al* J. Agric. Food Chem, 55, 929, 2007

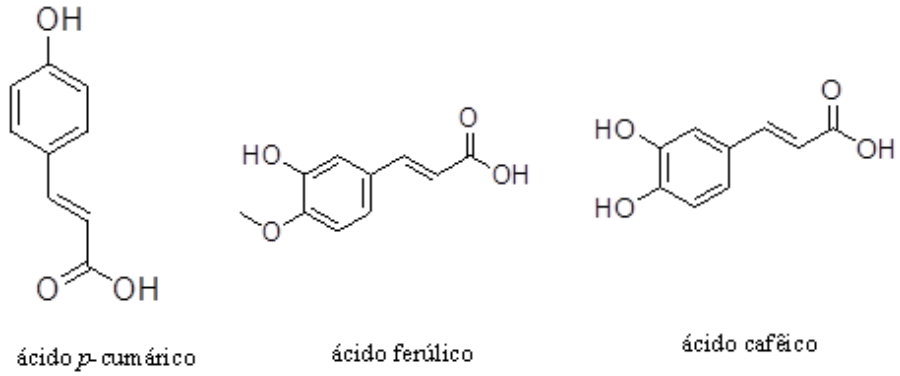


Figura 4. Estruturas dos principais formadores das classes de derivados do ácido clorogênico presentes na natureza.

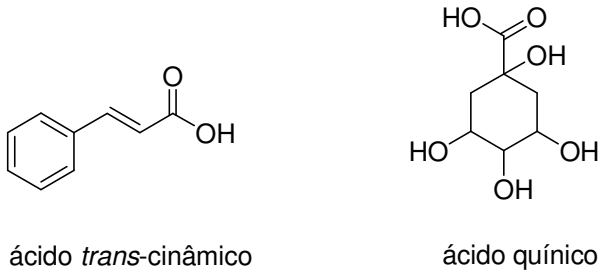


Figura 5. Estrutura do ácido *trans* cinâmico e do ácido quínico

Estes compostos fenólicos podem ser subdivididos pela identidade do derivado do ácido cinâmico pelo número e a posição dos substituintes acila. Os principais grupos encontrados na natureza são: os ácidos cafeoilquínicos (ACQ), formados pelo éster do ácido cafêico com o ácido quínico, com três isômeros principais (3-, 4-, e 5-ACQ); os ácidos dicafeoilquínicos (di-ACQ), formados por 2 resíduos do ácido cafêico com um de ácido quínico, cujos isômeros principais são 3,4-di-ACQ; 3,5-di-ACQ; 4,5-di-ACQ; ácidos feruloilquínicos, derivados da junção do éster do ácido ferúlico com o ácido quínico, com três isômeros (3-, 4- e 5-AFQ), ácidos *p*-cumaroilquínicos com três isômeros (3-, 4- e 5-*p*-ACoQ) e ácido cafeoil-feruloilquínicos (ACFQ)[34,35,36,37,38].

[34] CLIFFORD, M. N.; Knight, S.; Kuhnert, N. J Agric. Food Chem, 53, 3821, 2005
[35] DE MARIA, C. A. B; MOREIRA, R. F. A. Química Nova, 27, 4, 586, 2004.
[36] CLIFFORD, M. N.; *et al* J. Agric. Food Chem, 51, 2900, 2003
[37] FARAH E DONANGELO, Braz. J. Plant Physiol., 18,1, 23, 2006.
[38] MONTEIRO E TRUGO, J. Agric. Food Chem. 53, 1399, 2005

Clifford e colaboradores[32,39], descrevem ainda a presença de ácidos tri-cafeoilquínicos (tri-ACQ) e tetra-cafeoilquínicos (tetra-ACQ). Estes derivados juntamente com os derivados di-cafeoilquínicos são comuns na família *Asteraceae*[32].

O grupo mais abundante na natureza é dos ácidos cafeoilquínicos. O ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ), formado pela esterificação do ácido quínico com o ácido caféico é também conhecido com ácido clorogênico (ACG)[39, 40]. Este ácido é muitas vezes chamado de ácido 3-cafeoilquínico ou 3-ACQ. Atualmente as duas nomenclaturas são utilizadas. Na **Figura 6** encontra-se a estrutura deste ácido com as 2 numerações utilizadas. Segundo Clifford, a nomenclatura ácido 5-cafeoilquinico é a mais correta, já que a atual recomendação é de que a numeração siga a direção do maior número de substituintes do anel do ácido quínico[32,41]. O ACG é um antioxidante natural com aplicações na indústria farmacêutica, de alimentos e de cosméticos[42].

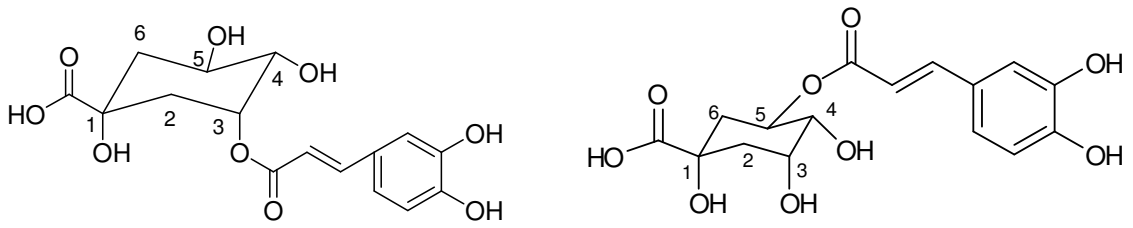


Figura 6. Ácido clorogênico – numerações utilizadas atualmente

Apesar de serem extensivamente estudados e amplamente distribuidos nas plantas, a identificação de derivados clorogênicos em misturas complexas é complicada[32,34,36,39]. Especialmente porque durante muitos anos a caracterização desses derivados em extratos de plantas foi prejudicada pela falta de padrões comerciais e pela dificuldade de se distinguir, de forma confiável, os isômeros de posição quando vários desses compostos encontra-se em baixas concentrações nos extratos[27,36]. O recente desenvolvimento de protocolos de CLAE-EM/EM capazes de distinguir esses isômeros de posição por seus padrões de fragmentação, e em muitos casos pela atribuiçao lógica do mecanismo de fragmentação, facilitou enormemente a sua caracterização. O que

[39] CLIFFORD, M. N. J. Sci Food. Agric., 79, 362, 1999.
[40] CHAN, E. W. C.; *et al.* LWT-Food Sci. Technol. 42, 1026, 2009.
[41] LIU, L.; *et al.* Food Chem. 112, 35, 2009.
[42] XIANG, Z.; NING, Z. LWT-Food Sci. Techn, 41, 1189, 2008.

permitiu também a detecção de várias novas classes de derivados de ácidos clorogênicos[27,34,36, 43,44]

Algumas considerações podem ser seguidas e empregadas para ajudar na identificação desses derivados[34]:

- o espectro de massas (EM) para o pico monoacilado de ACG corresponde ao pico EM^{n+1} para seu correspondente diacilado;

- subgrupos individuais de derivados clorogênicos podem ser distinguidos pelo seu íon molecular [ACG-H^+].

- os derivados 4-acila-ACG podem ser distinguidos por seu EM^2/EM^3 e pico base *m/z* 173.

-os derivados 5-acila-ACG podem ser distinguidos por seu EM^2/EM^3 e pico base com *m/z* 191, acompanhado por um pico pequeno (menor que 5% do pico base) do fragmento [cinamato-H^+].

-os derivados 3-acila-ACG podem ser distinguidos por seu EM^2/EM^3 [cinamato-H^+], pico base dos derivados do ácido *p*-cumaril quinico, AFQ e ACFQ ou pela combinação do seu EM^2/EM^3 e um pico com *m/z* 191, acompanhado por um pico intenso (maior que 50% do pico base) do fragmento [cinamato-H^+] caracterizando derivados ACQ e di-ACQ.

Derivados fenólicos possuem inúmeras propriedades farmacológicas, tais como antioxidante[45,46], anticarcinogênicos[47], antibacterianas[48], antimutagênicas[49], anti-inflamatórias[50], antialérgicas[51], anti-obesidade e antidiabéticas[52], anti-viral[53] e anti-HIV[54,55]. Muitas destas propriedades farmacológicas dependem de fenilpropanóides específicos, especialmente ácido 5-cafeoilquínico e ácidos dicafeoilquínicos, juntamente com vários outros flavonóides.

---

[43] CLIFFORD, M. N.; *et al.* J. Agric. Food Chem. 54, 1957, 2006.
[44] CLIFFORD, M. N.; WU, W. ; KUHNERT, N. Food Chemistry 95, 574, 2006.
[45] CHUDA, Y.; *et al. J. Agric Food Chem* 44**,** 2037, 1996.
[46] AZUMA, K.; *et al*. J. Agric Food Chem, 47, 3963, 1999.
[47] BAILEY, G. S.; WILLIAMS, D. E. Food Technology, 47, 105, 1993.
[48] MENG, L.; *et al*. Comptes Rendus Chimie, 1, 2008.
[49] LIVERIO, L.; *et al*. J.Study Med. Plants, 65, 203, 1994.
[50] UEDA, H.; YAMAZAKI, C.; YAMAZAKI, M. Biol. Pharm. Bulletin, 25, 1197, 2002.
[51] SANBONGI, C. *et al*., Clin. Exp. Allergy, 34, 971, 2004.
[52] HSU, C. L.; YEN, G. C. Mol. Nut. Food Res., 52, 53, 2008.
[53] LI, Y.; BUT, P.; OOI, V. Antiviral Research, 1, 68, 1, 2005.
[54] ROBINSON, W.E.; *et al*, Mol Pharmacol 50, 846, 1996.
[55] McDOUGALL, B.; *et al*. Antimicrob Agents Chemother, 42,1,140,1998.

De acordo com Islam e colaboradores[56] (2006), os ácidos di- e tri-cafeoilquínicos também apresentam atividades interessantes. A ingestão de derivados dos ácidos tri-cafeoilquínicos por ratos diabéticos levou a uma redução do teor de glicose sanguínea nesses animais. O ácido 3,4,5-tri-cafeoilquínico inibiu a progressão de AIDS [57], e derivados dos ácidos di-cafeoilquínicos apresentaram atividade anti-hepatotóxica[58]. Através de estudos *"in vivo"* e "*in vitro"*, análogos mono-, di- e tri-cafeoilquínicos têm demostrado inibição a HIV-1 integrase, enzima que catalisa a integração do DNA viral. O extrato da espécie *Baccharis thesioides* HKB apresentou atividade anti-HIV. Este extrato apresentou uma alta concentração de derivados dicafeoilquínicos, sendo que o ácido 3,5-dicafeoilquínico apresentou uma atividade duas vezes maior que seu isômero 4,5-dicafeoilquínico[59].

As frações absorvidas de ácido clorogênico e seus metabólitos podem induzir efeitos biológicos na corrente sanguínea[60]. O ácido clorogênico é capaz de reduzir o índice de triglicerídeos[61] e, juntamente com o ácido caféico apresenta atividade de inibição da oxidação do LDL "*in vitro*" podendo exercer funções protetoras contra doenças cardiovasculares[32,60].

Os derivados clorogênicos estão presentes em muitas plantas, entre elas café e a erva-mate. Em muitas plantas, incluindo café, a produção de derivados ACG é devido a esterificação que ocorre nas posições 3, 4, e 5 do ácido quínico e não na posição 1. Porém, na família Asteraceae, muitos derivados esterificados na posição 1 são encontrados. Bardana, arnica, alcachofra, entre outras, são plantas que apresentam derivados esterificados nesta posição. O café, rico em ácidos clorogênicos, tem demonstrado alguns benefícios a saúde como a redução de diabetes do tipo 2[62], Parkinson e Alzheimer. Estudos "*in vitro"* e "*in vivo"* têm atribuído as propriedades benéficas aos principais constituintes, os ácidos clorogênicos, capazes de agir como antioxidantes[63].

---

[56] ISLAM, S. J. Food. Sci. 71, R13, 2006.
[57] TAMURA *et al*., Mol. Nutr. Food Res. 50, 396, 2006.
[58] CHOI, J. *et al*. J. Med. Food, 8, 348, 2005.
[59] MIKETOVA, P. *et al*. J. Mass. Spectrom. 34, 1240, 1999.
[60] OLTHOF, R. M.; HOLLMANN, C. H.; KATAN, B.M. J. Nutr., 131, 66, 2001.
[61] KRIˇZMAN, M.; *et al.* J. Pharm. Biomed. Anal. 43, 481, 2007.
[62] JOHNSTON, K. L.; CLIFFORD, M. N.; MORGAN, L. M.; Am. J. Clin. Nutr.,78, 728, 2003.
[63] MONTEIRO, M., *et al.* J. Nut. 137, 2196, 2007.

3.2.2 *Flavonóides*

O termo flavonóide deriva do latim “flavus” e significa amarelo. Estes metabólitos são encontrados apenas em plantas, fazendo parte do metabolismo secundário e formam um grupo muito extenso, pelo número dos seus constituintes naturais e pela sua ampla distribuição na natureza[64].

Apresentam, caracteristicamente, dois núcleos fenólicos ligados por uma cadeia de três carbonos[65]. A numeração dos anéis A e C é feita com número ordinários, enquanto que o anel B é numerado utilizando-se apóstrofo[66]. Na **Figura 7** pode-se observar a estrutura característica de um flavonóide com sua respectiva numeração.

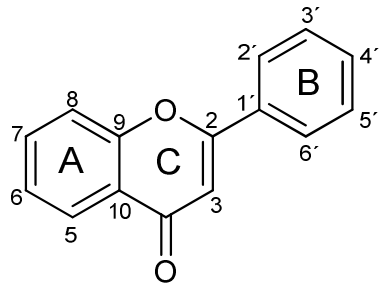


Figura 7. Estrutura básica dos flavonóides

Estes metabólitos podem ser encontrados na forma livre ou conjugados a açúcares, podendo, em uma mesma planta, uma mesma aglicona estar ligada a diferentes açúcares.

São conhecidas treze diferentes subclasses de flavonóides, e estas são diferenciadas pelas substituições que ocorrem na estrutura base[67,68]. Entre elas, encontram-se flavonóis, flavonas, isoflavonas, chalconas, auronas e flavanonas.

As estruturas básicas de algumas classes de flavonoides estão representadas na **Figura 8**[69,70]. Flavonóides contendo um grupo hidroxila no C-3 do anel C são classificados como 3-hidroxiflavonóides, que são flavonóis, antocianidinas, leuco-antocianidinas e catequinas. Os derivados sem este grupamento em 3-desoxiflavonóides

---

[64] COSTA, A. F. Farmacognosia. 5. ed. 2 v. Lisboa: Fundamental Calouste Gulbenkian, 1999.
[65] ERLUND, I. Nutr. Res., 24, 851, 2004.
[66] BRAVO,L. Nutr. Rev.,56,11, 317, 1998.
[67] TRUEBA, G. P. Ver. Cubana Invest. Biomédicas, 1, 22, 2003.
[68] HEIM, K.E., *et al*. J. Nut. Biochem. 13, 572, 2002.
[69] CORRADINI, E. Nat. Prod. Res., 5, 25, 469, 2011.
[70] VUKICS, V.; GUTTMAN, A. Mass Spectrom. Rev., 29, 1, 2010.

são classificados como flavanonas e flavonas. As flavanonas são isômeros das chalconas[65]. As isoflavonas são isômeros das flavonas, de ocorrência muito restrita em uma ou outra família de plantas. As chalconas e auronas possuem coloração amarelada, a qual se torna vermelha quando exposta a vapores alcalinos. Ocorrem principalmente na família Asteraceae. As auronas apresentam um anel central de cinco membros, enquanto que as chalconas não o possuem[71].

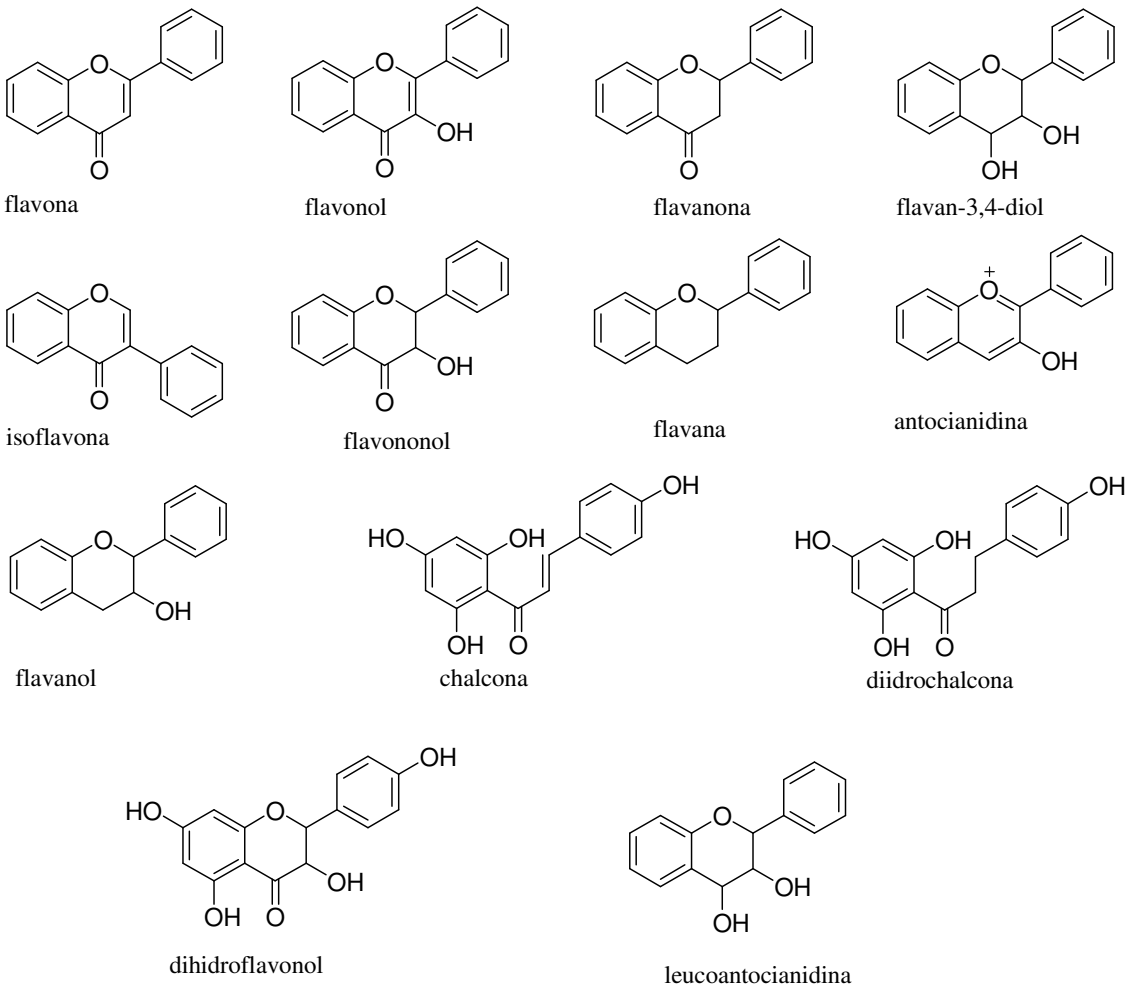


Figura 8. Estruturas básicas de algumas classes de flavonóides[69,70]

Os flavonóides são importantes para a saúde humana. Dietas ricas nesses compostos podem levar a diminuição de problemas cardiovasculares e aumento da longevidade[72]. Além das propriedades antioxidantes[73] bem estudadas e conhecidas,

[71] HARBORNE, J. B. A guide to modern techiniques of plant analysis. Londres: Phytochemical Methods. Chapman and Hall, 1994.
[72] PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUŠOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Fitoterapia 82, 513, 2011.

estes metabólitos possuem ainda inúmeros efeitos biológicos, tornando-se por isto muito importantes na natureza, no crescimento e desenvolvimento das plantas e nos seus mecanismos de defesa[74], podendo agir como antidiabéticos[75,76] antivirais[77], antibacterianos[78], anti-inflamatórios[79,80], vasodilatadores[74], anticâncer[81], anti-isquêmicos[82,83,84]. Além disso, agem como inibidores de enzimas, estimulantes, quelantes de metal e agentes redutores.

A busca por novos compostos biologicamente ativos é uma tarefa um pouco complicada em produtos naturais. Os flavonóides estão presentes em extratos de plantas e o isolamento de grandes quantidades desses metabólitos além de sua determinação estrutural é uma tarefa complicada, requerendo na maior parte das vezes uso de técnicas analíticas avançadas combinadas (por exemplo, RMN de ^{1}H e de ^{13}C, COSY, espectrometria de massas, raios-X) e grandes quantidades de amostras[85].

Atualmente, com o intuito de se facilitar o isolamento e a identificação de produtos naturais, entre eles derivados flavonóides, técnicas combinadas tais como o CLAE-EM vem sendo muito utilizadas. Tais metodologias representam uma alternativa rápida, de elevada sensibilidade e que utiliza pequena quantidade de amostra, sendo muito bem empregada para a elucidação estrutural de diversos metabólitos de plantas[86,87,88].

---

[73] BARTEL, B.; MATSUDA, S. P. T. Science 299, 352, 2003.
[74] CALDERONE, V. Pharmacol, 370, 290, 2004
[75] MIYAKE, Y.; *et al.* Lipids 33, 689, 1998.
[76] SONG, Y.; *et al*. J. Am. Coll. Nut. 24,376, 2005.
[77] WEBER, J. M.; *et al*. Antivir Res 58, 167, 2003.
[78] ALVESALO, J.; *et al* Biochem Pharmacol, 71, 735, 2006.
[79] SUBARNAS, A.; WAGNER, H. Phytomedicine, 7, 401, 2000.
[80] WIDLANSKY, M. E.; *et al*. Free Radic Biol Med 38, 499, 2005.
[81] FORMICA, J.V.; REGELSON, W. Food Chem Toxicol 33,1061, 1995.
[82] RUMP, A. F.; *et al.* Gen Pharmacol 26, 603, 1995.
[83] DUTHIE, G. G.; DUTHIE, S. J.; KYLE, J. A. M. Nutr Res Rev 13, 79, 2000.
[84] MLADĚNKA, P. Free Radic Biol Med 15, 963, 2010.
[85] FOSSEN, T.; *et al*. Food Chem., 81, 433, 2003.
[86] WOLFENDER, J.L.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K . Phytochem. Anal., 12, 2, 2001.
[87] ELIPE, M. V. S.. Anal. Chem, 1, 497, 2003.
[88] DE RIJKE, E.; *et al*. J. Chromatogr. A.45, 984, 2003.

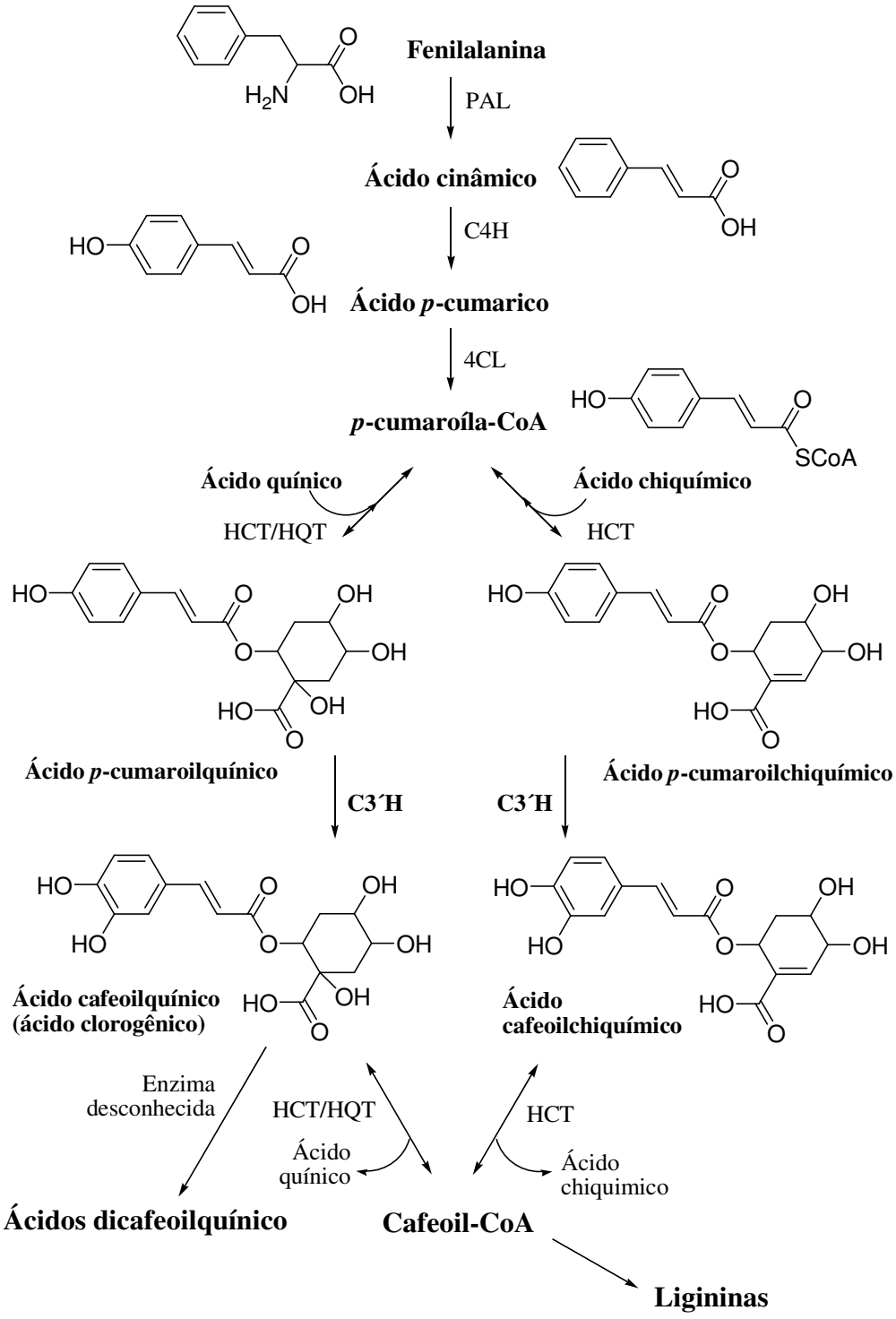
3.3 Biossíntese dos compostos fenólicos

Derivados do ácido clorogênico e flavonóides são formados a partir da via dos fenilpropanópides, uma das vias do metabolismo fenólico das plantas superiores[37]. O metabolismo dos fenilpropanóides pode ser induzido por estresses bióticos e abióticos tais como ferimentos no vegetal, radiação UV e ataque de patógenos [89,90]. Recentemente Moglia e colaboradores (2008)[91] observaram que a radiação UV aumenta o nível de ácidos cafeoilquínicos na alcachofra.

Nas plantas, os derivados fenólicos são sintetizados a partir da tirosina e da fenilalanina através da via do ácido chiquímico, pela transesterificação de cafeoil-CoA e do ácido quínico através da hidroxicinamoil-CoA: ação da hidroxicinamoil transferase (HQT)[92, 93]

O **Esquema 1** traz uma representação esquemática da formação dos derivados do ácido clorogênico.

[89] TREUTTER, D. Plant Growth Regulation, 34, 1, 71, 2001.
[90] COMINO*, C. et al*. BMC Plant Biology, 9,30, 2009.
[91] MOGLIA, A. *et l*. J Agric Food Chem, 56, 18, 641, 2008.
[92] STÖCKIGT, J.; ZENK, M. FEBS Lett 1974, 42, 2, 131, 1974.
[93] ULBRICH, B.; ZENK, M. Phytochemistry, 18, 929, 1979.

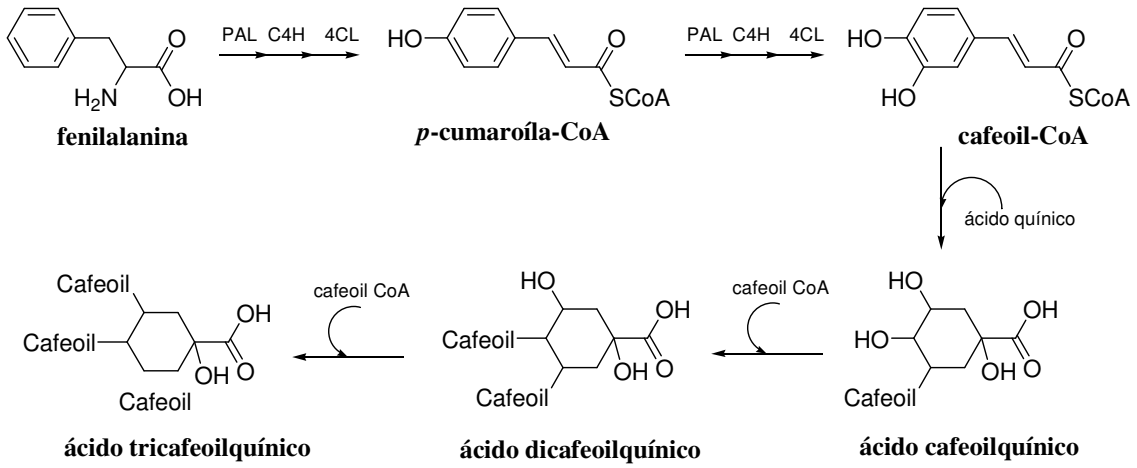


Esquema 1. Biossíntese derivados clorogênicos[90].

As enzimas envolvidas neste caminho biossintético: **PAL**, *fenilalanina amonia liase*; **C4H**, *cinamato 4-hidroxilase*; **4CL**, *4-hidroxicinamoil-CoA ligase*; **HCT**, *hidroxicinamoil-CoA chiquimato/quinato hidroxicinamoil transferase*; **HQT**, *hidroxicinamoil CoA quinato hidroxicinamoil transferase*; **C3'H**, *p-coumaroil ester 3'-hidroxilase*.

Os passos finais da biossíntese dos derivados clorogênicos 5-monoacilados (5-ACQ, 5-AFQ e 5-p-ACoQ) vem sendo estudados em várias plantas e parecem incluir a ligação do ácido *t*-cinâmico a coenzima A (CoA) por ação da ligase CoA, seguido de transferência para o ácido quínico por ação da cinamoil transferase[37]. A origem dos derivados 3- e 4- monoacilados, porém, não é clara.

Sobre a biossíntese de di- e tricafeoilquínicos, existem atualmente poucas informações disponíveis, porém acredita-se que o acúmulo prévio de ACG provavelmente não se faz necessário[37] (**Esquema 2**).



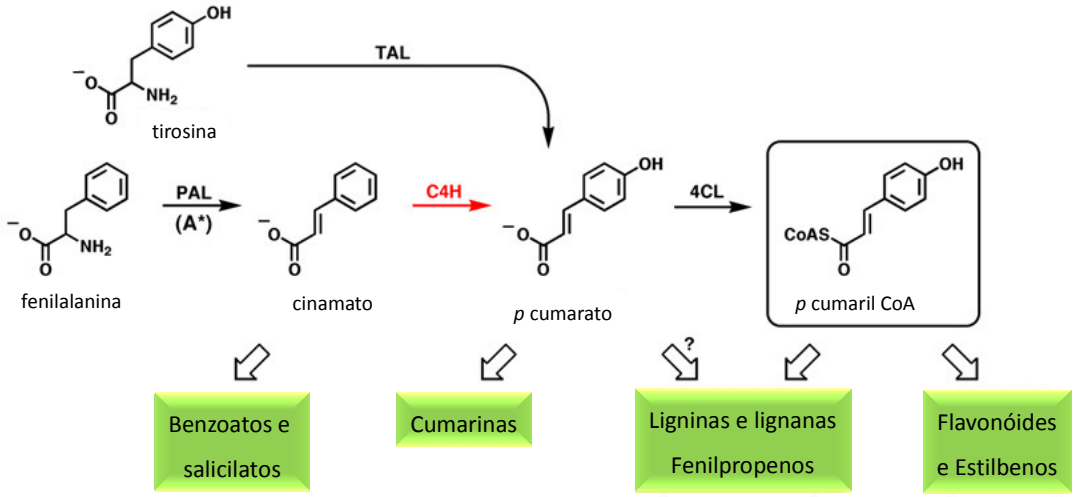
Esquema 2. Biossíntese ácidos tricafeoilquínicos[94].

A ação de algumas enzimas como a peroxidase[95] e a polifenol oxidase[96] sobre os derivados fenólicos (incluindo derivados do ACQ) pode levar a polimerização dos mesmos e a consequente formação de ligninas e pigmentos que acabam por contribuir com os mecanismos de defesa das plantas.

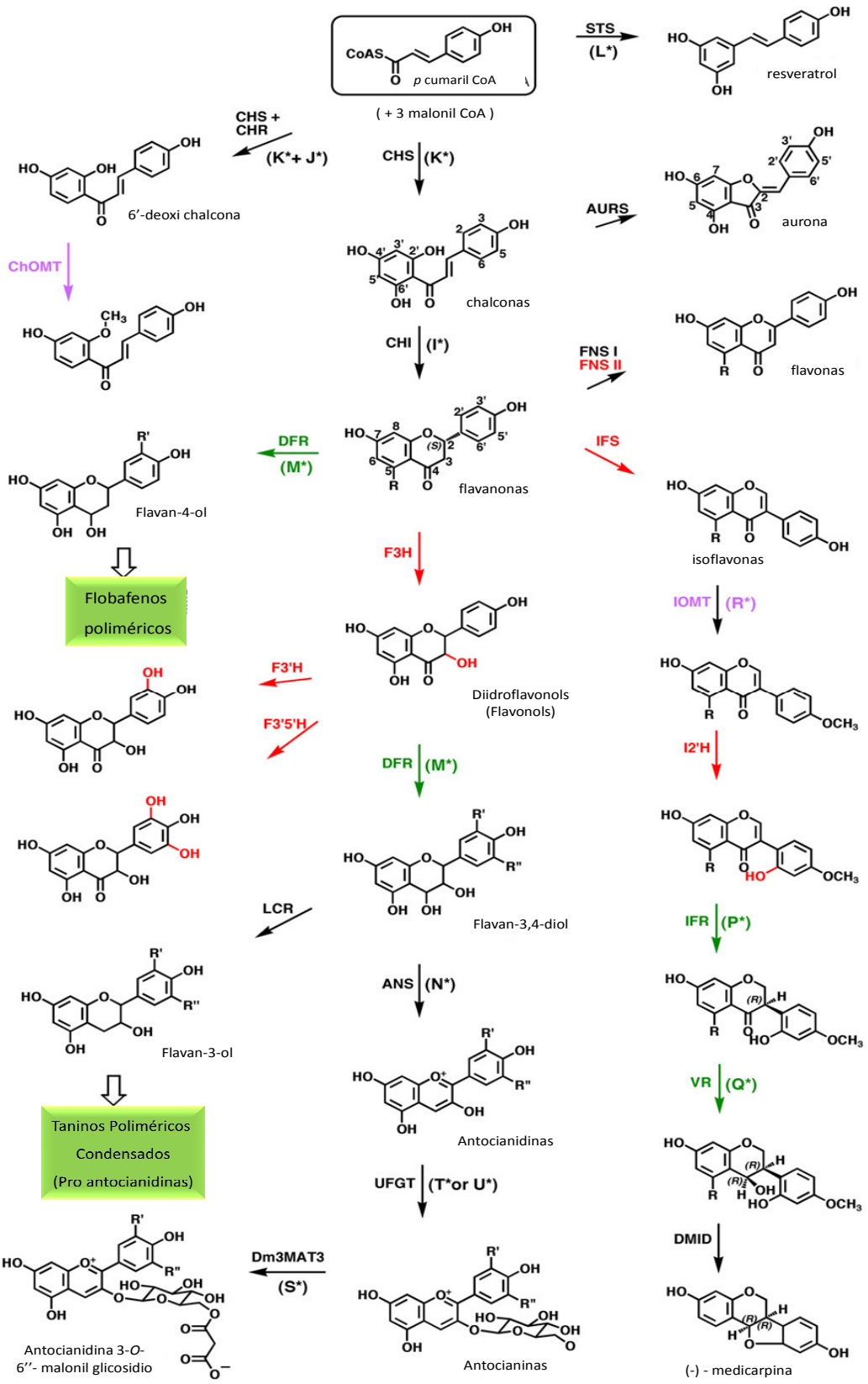
Os flavonóides são formados por uma série de reações de condensação (combinação de derivados sintetizados) a partir da fenilalanina (via metabólica do ácido chiquímico) e ácido acético (via acetato-malonato/ malonil-CoA)[97].

[94] LOU, J. The Plant Journal, 56, 316, 2008.
[95] TAKAHAMA, U. Phytochem.Rev. 3, 207, 2004.
[96] MAZZAFERA, P.; ROBINSON, S. P. Phytochemistry 55, 285, 2000.
[97] MARKHAM KR. Techniques of Flavonoid Identification. Academic Press: London, 1982.

Primeiramente, a fenilalanina é transformada em ácido cinâmico pela ação da fenilalanina amônio liase, enzima que liga os metabolismos primário (via do ácido chiquímico) e secundário (fenilpropanóides). O ácido cinâmico é hidrolisado a ácido cumárico (C9) que é transformado em 4-cumaroil-CoA e este é condensado a 3 unidades de malonil-CoA (C2) formando uma chalcona (C15), a partir da qual todos os flavonóides são formados. De acordo com a ciclização e o grau de insaturação e oxidação que ocorrem, os flavonóides podem ser classificados nos grupos já mencionados anteriormente **(Esquema 3)**[98].



[98] FERRER, J.,-L.; *et al*. Plant Physiology and Biochemistry 46, 356, 2008.



Esquema 3. Biossíntese de flavonóides

Nas plantas os flavonóides podem ocorrer de maneiras distintas dependendo das reações adicionais e ocasionais (geralmente hidroxilação, metilação e, mais frequentemente, glicosilação) que podem ocorrer com esses derivados durante a biossintese das plantas. A O-glicosilaçao pode ocorrer, por exemplo, na hidroxila da posição 7- em flavonas, flavanonas e isoflavonas e nas posições 3- e 5- em antocianidinas[69]. A glicose é o açúcar mais comumente encontrado, seguido de galactose, ramnose, arabinose e xilose[97,99,100]. O efeito da glicosilação torna os flavonóides mais solúveis, sendo a glicosilação, nas plantas, uma forma essencial de proteção, evitando danos citoplasmáticos e auxiliando no armazenamento destes flavonóides nos vacúolos das células[71]. A glicosilação também pode ocorrer ditretamente no núcleo base do flavonóide, formando flavonóides C-glicosilados sendo que geralmente as C-glicosilações ocorrem nas posições C-6 e/ou C-8[69,100]

3.4 Métodos analíticos de separação e identificação de produtos naturais

Estima-se que no reino vegetal ocorram de 100.000 a 200.000 metabólitos provenientes de plantas. E considerando-se o fato de que muitas preparações tradicionais com ervas contêm não uma, mas várias plantas medicinais, apenas métodos altamente seletivos e sensíveis serão capazes de assegurar a composição correta desses produtos naturais[101].

3.4.1 *Cromatografia em camada delgada (CCD) e Cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE)*

O perfil cromatográfico é característico para cada extrato de planta e a CCD permite que tenhamos várias informações sobre estes extratos em curto espaço de tempo, utilizando pequena quantidade de amostra e a baixo custo, ou seja, este método é

[99] IWASHINA, T. J. Plant Res. 113, 287, 2000.
[100] CUYCKENS, F; CLAEYS, M. J. Mass Spectrom, 39, 1, 1, 2004.
[101] OKSMAN-CALDENTEY, K.M.; INZE, D. Trends Plant Sci. 9, 433, 2004.

capaz de fornecer informações analíticas importantes sobre os extratos sem exigir equipamentos sofisticados[102,103].

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica de adsorção líquido–sólido e consiste na separação por diferença de afinidade dos componentes de uma mistura pela fase estacionária. Para a sua realização geralmente são utilizadas placas de sílica gel como fase estacionária e como fase móvel uma série de sistemas solvente. A detecção é feita inicialmente em luz ultravioleta sendo a placa posteriormente revelada com reagentes adequados para melhor visualização dos componentes da mistura; o valor do Rf (fator de retenção) também fornece informações sobre os compostos presentes nessas misturas[104].

A cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) segue o mesmo princípio da CCD, porém as partículas presentes na fase estacionária são otimizadas, possuindo menor tamanho e granulações mais finas e homogêneas. Outra vantagem da CCDAE é o menor tempo de análise. Quando se compara um método típico farmacopeico, o tempo de analise em CCD e de 45 a 60 minutos, enquanto que a realização do mesmo método por CCDAE leva de 8 a 20 minutos. Outra vantagem da CCDAE é a aplicação de volumes reduzidos de amostra, justamente pelo uso do aplicador automático, o que proporciona grande precisão e reprodutibilidade[105]. Na **Tabela 1**, podemos observar as principais diferenças entre a CCD e a CCDAE[105,106] enquanto que a **Figura 9** apresenta dois exemplos de separação de flavonóides por CCD e CCDAE[105].

---

[102] WAGNER, H.; BLADT, S. Plant Drug analysis: a thin layer chromatography atlas. Berlim: Springer, 384p, 1996.
[103] COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. Introdução a métodos cromatográficos. Campinas, UNICAMP, 1987.
[104] SPITZER, V.; SIMÕES, C. M. O. Óleos Voláteis. *In* SIMOES, C. M. O.; *et al*. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ªed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFC, p467-495, 1102p, 2004.
[105] REICH, E. High-performance thin-layer chromatografy for the analysis of medicinal plants. Thieme, 264p, 2007.
[106] Modificado de: ZERAIK, M. L.. Estudo Analítico dos flavonóides dos frutos do maracujá (*Passiflora* edulis Sims. F *flavicarpa* Degener). Tese de Doutorado, Instituto de Química de São Carlos, USP, 2010.

Tabela 1. Comparação entre placas utilizadas para CCD e CCDAE

Parâmetro	*CCD*	*CCDAE*
Tamanho usual placa	20x20 cm	10x20 cm
Diâmetro médio partículas	20 µm	5 µm
Volume aplicação	Máximo 50 µL	1-5 µL
Tamanho da banda	10-20 mm	6-8 mm
Distância de desenvolvimento % separação	10-15 (máx 18 cm)	6 cm
Tempo corrida	30 – 120 minutos	7 – 20 minutos

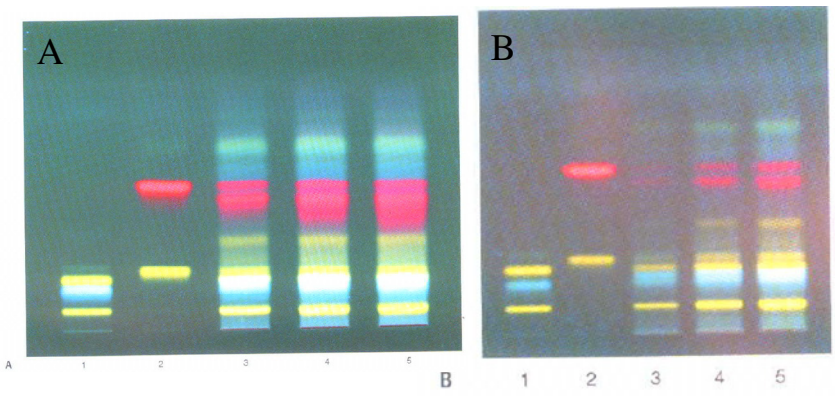


Figura 9. Comparação entre placa de flavonóides eluídas na fase móvel acetato de etila: diclorometano: ácido fórmico : ácido acético : água (100 : 25 : 10 : 10 : 11) reveladas em λ = 366nm. **A)** Placa de CCD. **B)** Placa de CCDAE[105].

3.4.2 *Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)*

Métodos utilizando cromatografia em camada delgada foram sempre muito utilizados na identificação e quantificação de misturas, especialmente compostas de flavonóides[107]. Porém a análise de metabólitos secundários em plantas é, mesmo na atualidade, um grande desafio devido a grande diversidade química, na maioria das vezes com pequena abundância e variabilidade que ocorre mesmo dentro de uma mesma espécie.

A separação de uma mistura por CLAE ocorre devido à interação entre soluto, fase estacionária (FE) e fase móvel (FM). Essas interações podem ser de diferentes tipos (ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, Van der Waals, entre outras) e de

[107] HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Alim. Nutr., Araraquara, 1, 19, 97, 2008.

acordo com a sua natureza o modo de separação pode ser dividido em cromatografia de fase reversa, de fase normal, de troca iônica ou de exclusão molecular. Na cromatografia em fase normal, a FE é mais polar que a FM; no modo reverso, a FM é mais polar que a FE. A cromatografia de fase reversa é mais utilizada em CLAE, uma vez que permite o uso de fase móvel aquosa.

Os componentes básicos de um instrumento de CLAE consistem basicamente em um reservatório de solvente, o qual contém a FM; uma bomba, usada para empurrar o solvente através da coluna; o regulador de pressão, para monitorar a pressão da bomba antes da coluna; a válvula de injeção; a coluna, contendo a FE, o detector e o registrador para obtenção do cromatograma[106].

Devido à necessidade de métodos altamente sensíveis e eficientes, a cromatografia em combinação com diferentes detectores está sendo amplamente empregada na análise de produtos naturais[108]. A cromatografia gasosa (CG) é uma ferramenta poderosa, porém somente pode ser utilizada para voláteis (caso contrário a derivatização dos analitos é necessária). Assim a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acaba sendo a técnica de escolha para a análise de produtos naturais, geralmente utilizando detectores de UV-visível e de massa. Este último possui ampla sensibilidade e seletividade, combinada a capacidade de elucidar e confirmar estruturas químicas, dependendo do instrumento utilizado[109,110].

3.4.3 *Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-EM)*

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) por si só pode ser considerada um excelente técnica de separação, porém o acoplamento com a espectrometria de massas é necessário em algumas situações. A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM) é extremamente importante na caracterização e determinação estrutural de metabólitos isolados de plantas.

A espectrometria de massas (EM) consiste no estudo de íons na fase gasosa, tendo como uma das suas principais aplicações a caracterização estrutural de compostos. Desde o início da técnica, ela vem sendo empregada no estudo estrutural de

[108] STEINMANN, D.; GANZERA, M. J. Pharm.Biom. Anal. 55, 744, 2011.
[109] GRAY, M.J.; *et al.* Biomed. Chromatogr. 24, 91, 2010.
[110] ZHOU, J. L.; QI, L. W.; LI, P. J. Chromatogr. A, 1216, 7582, 2009.

um grande número de moléculas orgânicas e é hoje uma das principais ferramentas de caracterização estrutural. Esta técnica é altamente sensível e permite a identificação estrutural de metabólitos presentes em extratos de plantas, mesmo em baixas concentrações, especialmente quando comparada a técnicas clássicas de isolamento de produtos naturais[111].

Os elementos formadores de um sistema de CLAE-EM incluem um amostrador automático, o sistema de CLAE, a fonte de ionização (faz a interface entre o CLAE e o EM) e o espectrômetro de massa. Idealmente, esses elementos estão todos sob o controle de um único sistema de computador.

Para que esta interface funcione perfeitamente existem algumas restrições sobre a taxa de fluxo e fases móveis que podem ser usados. Por exemplo, sistemas de CLAE-EM operando em fase reversa deveriam utilizar combinações com metanol, acetonitrila e água como fases móveis e quando necessário o uso de modificadores de fase móvel, par a melhor separação da amostra, estes deverão ser voláteis.

As fontes de ionização mais utilizadas no acoplamento CLAE-EM são a fonte de ionização química a pressão atmosférica (IQPA, APCI, *do inglês atmospheric pressure chemical ionization*) e o eletrospray (EI, ESI, *do inglês electrospray ionization*). Na ionização por eletrospray, o campo de alta voltagem formado produz nebulização da amostra vinda da coluna, resultando em gotículas carregadas que são centradas em direção ao analisador de massa. Essas gotículas ficam menores à medida que se aproximam do
entrada deste analisador: como as gotículas se tornam cada vez menores, íons individuais emergem e são separados pelo sistema do massa[112, 113].

3.5 Atividades Biológicas

Muito antes de a humanidade descobrir a existência de micróbios, a ideia de que algumas plantas possuíam o poder de curar doenças e que continham o que hoje denominamos antimicrobianos já era bem aceito. Desde a antiguidade, o homem utiliza plantas para tratar doenças e alguns destes medicamentos tradicionais são ainda incluídos como parte do tratamento habitual de várias doenças. Por exemplo, o uso

[111] WOLFENDER, J.L.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K.. J. Chromatogr. A, 1000, 437, 2000.
[112] NIESSEN, V.M. J. Chromatog. A, 1000, 413, 2003.
[113] KORFMACHER, W. A. DDT Reviews,10, 20, 1357, 2005.

da erva-cidreira (*Melissa officinalis*) e do alho (*Allium sativum*) descritos como de amplo espectro antimicrobiano[114].

Atualmente vem aumentando consideravelmente a preocupação com o aumento da resistência microbiana[115,116], sendo que a multirresistência é uma das principais causas de insucesso em tratamentos para infecções microbianas. Os vários antibióticos - amplamente utilizados- favorecem a seleção de bactérias resistentes a múltiplos agentes antibacterianos[117,118].

Mundialmente, as propriedades antimicrobianas de plantas medicinais estão sendo mais profundamente estudadas, sendo que nos últimos anos, metabólitos secundários de plantas, com atividades farmacológicas desconhecidas, têm sido extensivamente estudados como fonte de agentes medicinais. As plantas com sua grande variedade de constituintes químicos oferecem uma promissora fonte de novos agentes antimicrobianos. Existem vários relatos da presença de compostos antimicrobianos em diferentes partes da planta, incluindo, casacas dos frutos, folhas, raízes e flores[119].

Sendo assim, houve o surgimento de vários métodos aplicados a determinação da atividade antimicrobiana "*in vitro*", sendo aplicados em estudos preliminares na busca de novas substâncias biologicamente ativas. Atualmente técnicas de diluição, desenvolvidas em microplacas, possibilitam o uso de volumes reduzidos na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de produtos naturais, sejam eles extratos ou compostos puros. Estas técnicas permitem a análise de várias amostras e de uma ampla variedade de micro-organismos concomitantemente, utilizando pequenos volumes de amostra, com baixo custo, e apresentando resultados satisfatórios[120,121,122].

---

[114] RIOS, J.L.; RECIO, M.C. J. of Ethnophar, 100, 80, 2005.
[115] KAVITHA PALANIAPPAN, K.; HOLLEY, R. A. Int. J. Food Microbiol.140, 164, 2010.
[116] JENSEN, L.B.; *et al*. Environ. Int. 26, 581, 2001.
[117] NIKAIDO, H. Annu Rev Biochem 78, 119, 2009.
[118] KUETE, V. *et al*. Int. J. Antim. Ag., 37, 156, 2011.
[119] SWAMY, M.K.; *et al.* J. Phyt., 2, 11, 2010.
[120] DEVIIENNE, K. F.; RADDI, M. S. Braz. J. Microbiol 33, 166, 2002.
[121] ELLOF, J. N.;*et al.* Plant. Med. 64, 711, 1998.
[122]PELCZAR, JR, M. J.; *et al*. Biotecnologia: A Aplicação Industrial da Microbiologia *In:* Microbiologia: conceitos e aplicações, vol II, 2ºª ed. São Paulo: MAKRON Books, 398-422, 517p, 1996.

3.6 Ensaios *in vitro* e micro-organismos patogênicos

Atualmente existem ensaios *in vitro* capazes de determinar a menor concentração capaz de causar a morte do micro-organismo e estes são fundamentais em diversas situações de risco para que a dose mínima necessária do antibiótico capaz de matar o micro-organismo seja empregada durante o tratamento do paciente. Sendo assim pode-se afirmar que infecções graves requerem, obrigatoriamente, tratamento com base nas concentrações bactericida e fungicida, encontradas nestes ensaios para a cura total da infecção[123].

Entre os micro-organismos de escolha para a realização destes ensaios *in vitro* devem estar presentes aqueles potencialmente patogênicos. Este potencial pode se dar no contato inicial com o hospedeiro (no caso, homem), ou em casos de imunossupressão.

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) são cocos patógenos primários ou oportunistas que acometem homens e animais.[124] Tendem a formar grupamentos semelhantes a cachos de uva. São amplamente distribuídos na natureza e fazem parte da microbiota normal da pele e mucosas[125] estando frequentemente envolvidos em diversas infecções humanas.

Staphylococcus epidermidis (*S. epidermidis*) são cocos gram positivos, anaeróbios facultativos imóveis e habitam a maioria dos seres humanos[126]. Infecções produzidas por este micro-organismo incluem endocardites de válvulas cardíacas e infecções produzidas por cateteres endovenosos[127,128], entre outras.

O gênero *Escherichia* consiste em cinco espécies das quais a *E. coli* é a mais comum e clinicamente importante[129]. Este gênero compreende bacilos gram negativos. A *E. coli* é uma bactéria facultativa, considerada um dos habitantes mais comuns do

---

[123] LOEFFLER, J.; STEVENS , D. A. Clin. Infec. Dis. 36, 31, 2003.
[124] MURRAY, P. R.; *et al*. *Staphylococcus* e Microrganismos Relacionados. *In:* Microbiologia Médica, 4ª ed., Ed. Guanabara-Koogan S. A., p188-201, 762p, 2004.
[125] TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia, 4ªed, São Paulo: Atheneu, 697p, 2005.
[126] HÖRNER, R. Cocos gram +: estafilococos (catalase+) e microrganismos relacionados. *In*: Microbiologia Clinica- Caderno Didático, Farmácia, UFSM, 328p, 2003.
[127] TRABULSI, L. R. Staphylococcus ; 4ªed, Atheneu, 718p, 2004.
[128] ARRECUBIETA, C.*; et al.* SdrF, a *Staphylococcus epidermidis* Surface Protein, Binds Type I Collagen, JBC Papers, in Press, 2007.
[129] MURRAY, P. R.; *et al*. Enterobacteriaceae. *In:* Microbiologia Médica, 4ª ed., Ed. Guanabara-Koogan S. A., p 250-264, 762p, 2004.

trato intestinal[130]. Faz parte da microbiota normal dos seres humanos podendo estar associada a uma variedade de doenças incluindo sepse, gastroenterite e infecções das vias urinárias[130].

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) são bacilos gram negativos retos ou ligeiramente curvados, aeróbios[130], sendo que raramente faz parte da microbiota normal, exceto em pacientes hospitalizados ou imunocomprometidos[131]. São micro-organismos ubíquos encontrados no solo, na vegetação, na água e em ambientes hospitalares. As infecções por *Pseudomonas* são basicamente oportunistas[132], causando comumente infecções pulmonares e infecções do trato urinário[132].

Klebsiela pneumoniae (*K. pneumoniae*) é um bacilo gram negativo[133], comumente encontradas no solo e na água[130], sendo que 29% dos casos de infecções hospitalares são causadas por este micro-organismo, estando associado à elevada morbimortalidade[134].

O gênero *Baccilus* compreende bacilos grandes e esporulados, que vivem no solo como esporos ou como células vegetativas passando de um estado para outro de acordo com as condições ambientais[135]. *B. subtilis* é a espécie mais conhecida deste gênero e é frequentemente um contaminante[135]. Esse micro-organismo produz o antibiótico bacitracina que é efetivo contra uma grande variedade de bactérias gram positivas[136].

Streptococcus pyogenes (*S. pyogenes*) ou estreptococo β-hemolítico do grupo A de Lancefield[137] são cocos gram-positivos. São colonizadores da garganta e da pele humana sendo a espécie bacteriana mais frequentemente associada à etiologia de infecções primárias da faringe e amígdalas[138].

---

[130] TORTORA, G.J.; I. *et al*. Procariotos: Dominios Bactéria e Archae. *In*. Microbiologia, 8ª ed. Porto Alegre, Artmed, p 304-333, 893p, 2005.
[131] MURRAY, P. R.; *et al*. *Pseudomonas* e Microrganismos Relacionados. *In:* Microbiologia Médica, 4ª ed., Ed. Guanabara-Koogan S. A., p 280-286, 762p, 2004.
[132] TRABULSI, L. R *Pseudomonas*.; 4ªed, Atheneu, 718p, 2004.
[133] TRABULSI, L. R. Edwarsiella — Citrobacter — Klebsiella — Enterobacter — Hafnia —Serratia — Proteus — Morganella — Providencia.; 4ªed, atheneu, 718p, 2004.
[134] PEREIRA, A. S.;*et al.* Avaliação da acurácia de testes laboratoriais para detecção de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtora de betalactamase de espectro estendido. Jornal Brasileiro de Patoçogia e Medicina Laboratorial 39, 4, 301, 2003.
[135] TRABULSI, L. R. Outras espécies aeróbias e anaeróbias facultativas; 4ªed, Atheneu, 718p, 2004.
[136] PELCZAR, JR, M. J.; *et al*. Antibióticos e outros agentes quimioterápicos. *In:* Microbiologia: conceitos e aplicações, vol II, 2ºª ed. São Paulo: MAKRON Books, 111-140, 517p, 1996.
[137] WILSON, M. Microbial Inhabitants of Humans: Their Ecology and Role in Health and Disease, 1ª ed. Cambridge University Press, Cambridge, **2005**.)
[138] CUNNINGHAM, M. W.. Clin Microbiol Rev 13, 470, 2000.

Corynebacterium xerosis (*C. xerosis*) é uma bactéria gram-positiva que se encontra principalmente na microbiota da axila de adultos. Está intimamente ligada ao mau odor.

Cryptococcus neoformans (*C. neoformans*) é uma levedura encapsulada que pode infectar diversos animais. *C. neoformans* ainda é a principal causa de meningite fúngica e um importante fator na morbimortalidade de pacientes com AIDS[139] e receptores de transplantes. Este micro-organismo pode também provocar doença sistêmica em pacientes que não apresentam sistema imune deprimido.

Saccharomyces cerevisiae (*S. cerevisiae*) é uma levedura de brotamento, unicelular, não filamentosa, caracteristicamente esférica ou oval. Amplamente encontrada na natureza, frequentemente como pó branco cobrindo folhas e frutos[140]. É a espécie não patogênica mais comum deste gênero, frequentemente empregada em ensaios antifúngicos como representativo do reino Fungi[141].

Candida albicans (*C. albicans*) faz parte da microbiota normal do ser humano, mas geralmente está implicado em manifestações clinicas, principalmente em imunodeprimidos, que abrange desde infecções superficiais da pele até infecções sistêmicas potencialmente fatais.[142] A candidíase ocorre frequentemente em recém-nascidos, pacientes com imunodeficiência adquirida (AIDS) e indivíduos fazendo uso de antibióticos de amplo espectro[140].

Malassezia furfur (*M. furfur*) é uma levedura que ocorre naturalmente na superfície da pele de seres humanos. É o fungo responsável pela infecção oportunista pitiríase versicolor, caracterizada pelo aparecimento de manchas amarelas e acastanhadas (que parecem brancas devido ao contraste da pele bronzeada) na face, tronco, pescoço e braços. Esta doença é contagiosa e piora sob a ação do sol.

Ensaios de avaliação antimicrobiana são padronizados pelo NCCLS (do inglês, *National Committee for Clinical Laboratory Standars*)[143] e desenvolvidos para analisar

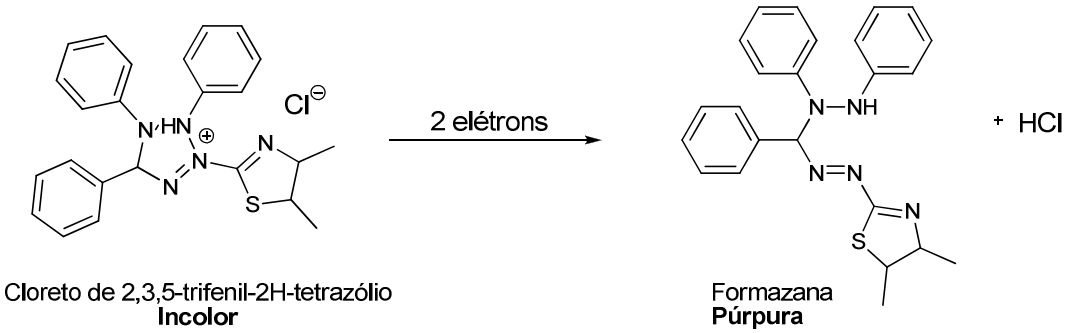
---

[139] SANATI, H. *et al*. J. Clin. Microbiol., 34, 5, 1280, 1996.
[140] TORTORA, G. J.; *et al.* Os Eucariotos: Fungos, Algas, Protozoários e Helmintos.. *In:* Microbiologia, 8ªed., Porto Alegre: Artmed, p 334-375, 893p, 2005.
[141] GROLL, A. H.; WALSH, T. J. Uncommon opportunistic fungi: new nosocomial threats. Clin. Microbiol. Infect. 7, 8-24, 2001.
[142] MURRAY, P. R.; *et al*. Micoses Oportunistas. *In:* Microbiologia Médica, 4ª ed., Ed. Guanabara-Koogan S. A., p 626-634, 762p, 2004.
[143]NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard, 5th edition, NCCLS document M7-A5, 2000.

agentes antimicrobianos convencionais como antibióticos. Para a realização de ensaios de extratos de plantas, modificações destes testes podem ser empregadas[144].

O perfil de atividade antimicrobiana de extratos vegetais é frequentemente realizado por métodos de difusão em disco e bioautografia,[144,145] enquanto que a quantificação da atividade antimicrobiana pode ser determinada por métodos de diluição, já que estudos realizados utilizando estes métodos demostraram-se mais eficientes na disponibilização de dados quantitativos[146].

A concentração inibitória mínima (CIM) é citada como sendo um dos principais métodos de diluição para determinação da atividade antimicrobiana de derivados vegetais. Cita-se também a concentração bactericida/fungicida mínima (CBM/CFM)[144]. Existem várias técnicas de determinação do ponto final. Os métodos mais atuais para determinação do CIM de extratos naturais usam indicadores de oxirredução, como sais de tetrazólio para indicação visual do ponto final[147]. Os sais de tetrazólio como o TTC (cloreto de 2,3,5-trifenil-2H-tetrazólio) são amplamente usados formando espécies coloridas, formazanas, ao serem reduzidos por componentes da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria do micro-organismo (**Esquema 4**).



Esquema 4. Reação de redução do TTC, com a formação da formazana

[144] HAMMER, K.A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. J.Appl. Microbiol, 86, 985, 1999.
[145] DORMAN, H.J.D., DEANS, S.G. J. Appl. Microbiol., 88, 3086, 2000.
[146] NASCIMENTO, P. F. C.;*et al.* Rev. Bras. Farmacogn. 17, 108, 2007.
[147] ALTMAN, F. P. Tetrazolium salts ans formazans. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag, 56p, 1976.

3.6.1 *Determinação da atividade antimicrobiana "in vitro"*

3.6.1.1 Microdiluição em Caldo

O método de microdiluição em caldo é um método quantitativo que consiste na diluição da amostra em um meio de cultura líquido onde será inoculado o micro-organismo teste. Ele permite a análise de várias amostras e várias espécies microbianas concomitantemente usando quantidades ínfimas de amostra[121], podendo ser utilizado na avaliação de misturas e de substâncias puras.

A partir deste teste tem se a definição da concentração inibitória mínima (CIM) que é a menor concentração de um determinado composto capaz de inibir o crescimento do micro-organismo em estudo em um dado meio de cultura [139,143,144,148,149].

O método de microdiluição em caldo é realizado em microplacas de 96 micropoços e ocorre pela diluição seriada da amostra em meio líquido. Os micro-organismos são inoculados na solução e as placas são incubadas. A CIM é determinada visualmente pelo aparecimento ou não de turvação e dos poços que não apresentaram crescimento são retiradas alíquotas que serão inoculadas em meio sólido para determinação da concentração bactericida ou fungicida mínima (CBM/CFM) que, é a menor concentração de substância capaz de matar 99,9% das unidades formadoras de colônia (UFC). O termo concentração letal mínima (CLM) também vem sendo usado englobando CBM e CFM[114].

3.6.1.1.1 Padrões utilizados nos testes antimicrobianos[136]

Na realização de um ensaio de determinação da atividade antimicrobiana se faz necessário o uso de padrões que possuam ações antimicrobianas conhecidas e comprovadas e de amplo espectro para que sirvam como parâmetro para a comparação com os dados obtidos das amostras testadas.

O cloranfenicol é produzido pela bactéria *Streptomyces venezuelae*, porém atualmente sua produção, devido a sua simplicidade estrutural e menor custo, se da sinteticamente (**Figura 10**).

---

[148] MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. J. of Appl. Microb. 84, 538, 1998.
[149] SHEEHAN, D. J.; *et al.* Clin. Infect. Dis. 17, 2, 494, 1993.

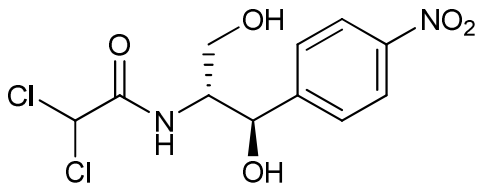


Figura 10. Estrutura do Cloranfenicol

Possui amplo espectro e na clinica é geralmente usado quando há desenvolvimento de resistência do micro-organismo aos outros antibióticos. Seu tamanho reativamente pequeno permite a difusão por diversas áreas do corpo que são normalmente inacessíveis a muitas outras drogas[150].

A nistatina também é produzida pelo gênero *Streptomyces* (*S. noursei*) sendo o primeiro antibiótico usado no tratamento antifúngico descoberto ainda na década de 50 (**Figura 11**). Este antibiótico é tóxico para humanos, sendo utilizado somente no tratamento de infecções fúngicas de pele e boca[130].

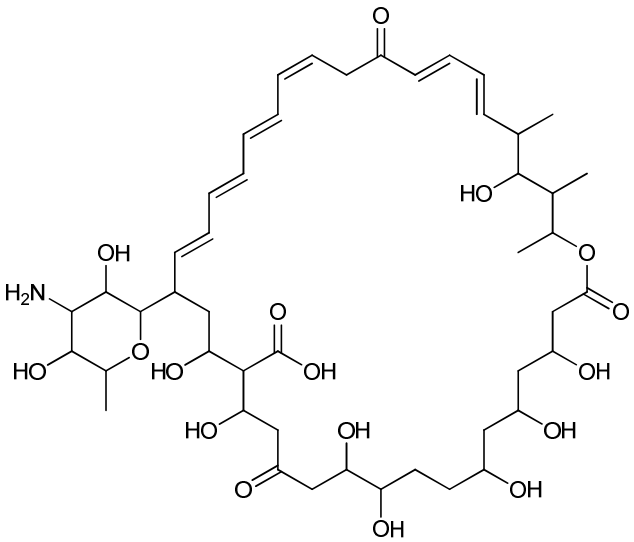


Figura 11. Estrutura da Nistatina

[150] TORTORA, G. J.; *et al. Drogas antimocrobianas. In:* Microbiologia, 8ªed., Porto Alegre: Artmed, p 559-589, 893p, 2005

3.7 Atividade inibitória enzimática

3.7.1 *Prolil Oligopeptidase (POP)*

A POP (**Figura 12**) é uma endopeptidase citosólica[151] e pertence à família das serina peptidase. Diferentemente de outras enzimas desta mesma família, caracteriza-se pela capacidade de hidrolisar somente substratos peptídicos relativamente pequenos (menos de 30 resíduos de aminoácidos). Uma propriedade específica da POP é a capacidade de clivar sequências peptídicas na carboxila terminal de resíduos de prolina (ligações *Pro-Xaa*), sendo conhecida por isso como "Post-Proline Cleaving Enzyme". Atualmente muitas enzimas da família das POP são alvos da grande indústria farmacêutica, pois degradam muitos neuropeptídeos envolvidos em funções neurológicas como aprendizagem e memória. As pesquisas indicam que a POP do cérebro humano está envolvida em uma variedade de transtornos e patologias do sistema nervoso central (SNC) tais como amnésia, diferentes estágios da depressão e o transtorno afetivo bipolar[152,153,154,155,156,157,158,159]. Em pacientes afetados, observou-se que o nível desta enzima no soro é maior que os níveis encontrados em pacientes não afetados.

[151] MAES, M.; BONACCORSO, S. Acta Psychiatr. Scand., 109, 126, 2004.
[152] BREEN, G.; *et al*. Bipolar Disorders, 6, 156, 2004.
[153] MAES, M. *et al* Psychiatry Research, 58, 217, 1995.
[154] SAKURAI, K.; CHUNG, H.S.; KAHNE D. J. Am. Chem. Soc, 126, 16288, 2004.
[155] MECCA, T; *et al*. Bioorg.Med.Chem., 12, 5057, 2004.
[156] MAES, M.; *et al*. Psychoneuroendocrinology, 23, 485, 1998.
[157] VENÄLÄINEN, J.; *et al.* Biochem. J, 382, 1003, 2004.
[158] ROEHRL, M.H.A WANG, J.Y.; WAGNER, G.. Biochemistry, 43, 16056, 2004.
[159] SCHMUCK, C.; WIENAND W. ; GEISER, L.. Highlights in Bioorganic Chem., 140, 2004.

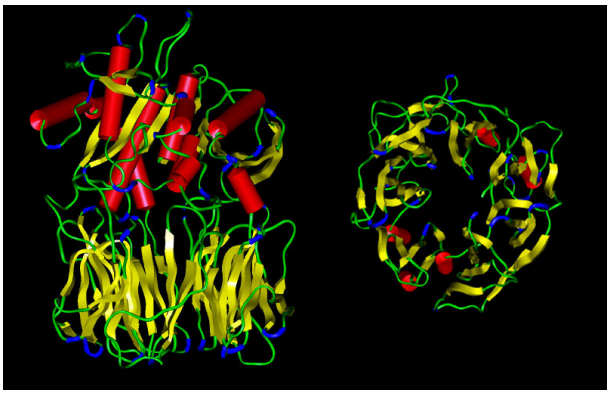


Figura 12. Estrutura tridimensional da prolil oligopeptidase (POP) de origem suína (imagem cedida pelo grupo do Prof. Ernest Giralt – Barcelona. 2008)

3.7.2 *Dipeptidil Peptidase IV (DPP IV)*

A DPP IV (também conhecida como CD 26) localiza-se na membrana celular[160], pertence à família das prolil oligopeptidase[161] e possui grande preferência por peptídeos que possuem como penúltimo aminoácido prolina (Pro) ou alanina (Ala)[162,163,164].

Estudos revelam que inibidores da enzima DPP IV demonstraram significativo potencial na terapia do diabetes mellitus[162]. A DPP IV possui diversos substratos, porém um dos principais deles que está associado ao diabetes mellitus é o peptídeo 1 tipo glucagon (GLP-1), responsável pela estimulação da secreção de insulina, suprimindo o glucagon,[161,163]. Nos pacientes com diabetes mellitus tipo 2, o GLP-1 encontra-se diminuído, devido justamente a ação da enzima DPP IV, que o degrada rapidamente *in vivo*[164]. Sendo assim, por ser um dos principais substratos da DPP IV caso haja inibição desta, o GLP-1 terá aumentada sua concentração e o paciente terá seus níveis de insulina restabelecidos.

O interesse na verificação do efeito inibitório dos extratos vegetais na inibição das enzimas POP e DPP IV simultaneamente deve-se à similaridade na estrutura terciária apresentada por ambas. Já que os sítios ativos das enzimas são espacialmente

[160] SENTANDREU, M.A.;TOLDRÁ, F. Food Chem., 75, 159, 2001.
[161] IDRIS, I,; DONNELLY, R. Diabetes, Obes. Metab., 9, 153, 2007.
[162] MCINTOSH, C. H. S.; *et al*. IJBCB, 38, 860, 2006.
[163] WEBER, A. E. J. Med. Chem., 47, 4135, 2004.
[164] BRANDT, I.; SCHARPÉ, S.; LAMBEIR, A.M. Clin. Chim. Acta, 377, 50, 2007.

similares, acredita-se que muitos dos inibidores conhecidos atuam tanto como inibidores da POP como inibidores da DPP IV[165,166].

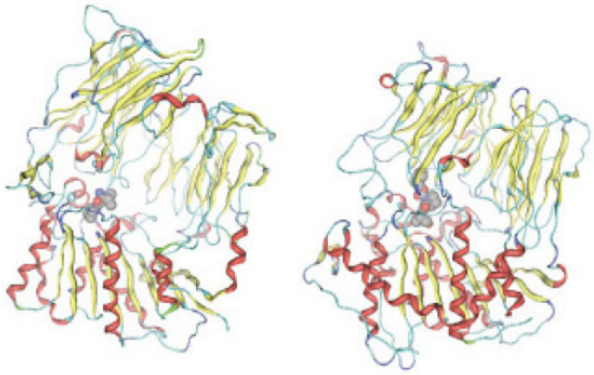


Figura 13. Comparação entre a estrutura da DPP IV à esquerda e da POP à direita[165]

3.8 Atividade Antioxidante

Halliwell e Gutteridge (1998)[167] propuseram uma definição para o termo antioxidante. Segundo eles qualquer substância que retarda, impede ou remova o dano oxidativo de uma molécula-alvo é considerado um antioxidante.

Antioxidantes têm como papel principal evitar danos aos componentes celulares que surgem como consequências de reações químicas as quais envolvem radicais livres[7272,168.] Quando há um excesso de radicais no organismo causado pelo desequilíbrio entre moléculas antioxidantes e oxidantes, ocorre o estresse oxidativo, e esses radicais acabam contribuindo nos processos de metagênese e carcinogênese, entre outras[169],[170].

Radicais ou espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERMON) são espécies altamente instáveis e reativas, que contém um ou mais elétrons não pareados. Sua presença é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais[171]. Essas

[165] ROSENBLUM, J. S.; KOZARICH, J. W Curr. Op. Chem. Biol., 7, 496, 2003.
[166] TARRAGÓ, T.; *et al.* ChemBioChem, 7, 827, 2006.
[167] HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. 3 ed. Oxford: Oxford University Press; 1998]
[168] YOUNG, I. S.; WOODSIDE, J. V.. J Clin Pathol, 54, 176, 2001.
[169] HUANG, D.; OU, B.; PRIOI, R. L.. J. Agric. Food Chem. 53, 6, 1841, 2005.
[170] ANTOLOVICH, M.; *et al.* Analyst, 127, 1, 183, 2002.
[171] FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S.; Rev. Ass. Méd. Bras., 43, 1, 61, 1997.

espécies são produzidas durante o metabolismo normal e também em situações patológicas[172].

Os antioxidantes podem ser classificados quanto seu modo de ação em: sequestrantes de radicais, sequestrantes de íons metálicos capazes de catalisar a oxidação lipídica ou sequestrantes de oxigênio[7272,173].

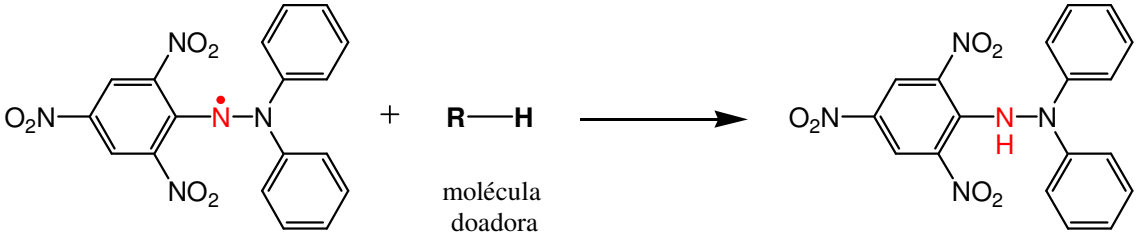
Também podem ser subdivididos em primários, secundários e terciários. Os antioxidantes primários, classe que inclui enzimas, quelantes e proteínas impedem a geração de espécies reativas ou sequestram-nas bloqueando a etapa inicial da cadeia radicalar. O radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) e os polifenóis BHA (t-butil hidróxi anisol) e BHT (t-butil hidróxi tolueno), entre outros, são compostos fenólicos que provem a remoção ou inativação dos radicais livres formados durante o início ou propagação da reação, pela doação de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia. Os antioxidantes secundários bloqueiam a etapa de propagação da cadeia radicalar sequestrando radicais intermediários e enquanto que os terciários atuam na remoção do dano oxidativo do DNA, proteínas e lipídeos[172].

Antioxidantes naturais merecem atenção, pois são sintetizados em grande quantidade pelas plantas e são capazes de captarem radicais livres. E é justamente por isso que há um crescente interesse no estudo de antioxidantes provenientes de plantas[174]. Dentre os grupos de metabólitos secundários derivados de plantas com esta atividade, os flavonóides merecem destaque já que possuem potente ação antioxidante. O interesse em possíveis benefícios à saúde causados por esses flavonóides tem aumentado devido justamente a esta potente atividade antioxidante frente a radicais livres observados *in vitro* para esta classe de compostos[72].

Diferentes métodos de medição da atividade antioxidante de extratos de plantas vêm sendo utilizados. O método do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) utiliza o radical livre estável DPPH e avalia sua capacidade oxidante e a dos compostos testados como doadores de hidrogênio (antioxidantes). Este radical muito estável apresenta absorção máxima em 517nm, sendo esta absorção diminuída após reação com moléculas antioxidantes, havendo desaparecimento da coloração roxa intensa (esta

[172] ÇAKIR, A.; *et al*. Turkey J. Chem., 30, 1, 2006.
[173] ABDALLA, D. S. P. Radicais livres e antioxidantes. In: OGA, S. Fundamentos de toxicologia. São Paulo: Atheneu, 474p, 2003.
[174] ORDOÑEZ, A. A. L..; *et al.* Food Chemistry 97, 452, 2006.

coloração perde intensidade e se torna amarelo pálido)[175]. A reação química que ocorre está representada no **Esquema 5.**



difenil picril hidrazila
"radical livre"

difenil picril hidrazina
"forma reduzida"

Esquema 5. Reação do radical livre DPPH com a molécula doadora de H, originando a forma reduzida DPPH-H.

[175] MOLYNEUX, P. Songklanakarin J. Sci. Tech. 26, 2, 211, 2003.

4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1 Coleta do material vegetal e identificação das plantas

As espécies selecionadas foram coletadas em Santana do Livramento, identificadas pela bióloga Prof.ª Thaís do Canto Dorow e armazenadas no Herbário da Universidade Federal de Santa Maria.

As coletas foram efetuadas entre janeiro de 2008 e dezembro de 2010. O material testemunho das espécies coletadas está armazenado no Herbário da UFSM sob as exsicatas abaixo: *Baccharis pentodonta* SMDB 10408, *Pluchea sagitallis* SMDB 10409 e *Baccharidastrum triplinervium* SMDB 10407.

4.2 Secagem, moagem, extração e fracionamento do material vegetal

As raízes das plantas estudadas foram lavadas e secas em estufa de ar circulante à aproximadamente 40°C por 3-4 dias. As raízes foram moídas em moinho de facas do tipo Willey, sendo os pós obtidos extraídos posteriormente com metanol a quente, sob refluxo, em soxhlet de onde obteve-se o extrato denominado genericamente como extrato bruto da raiz (EB raiz).

As folhas tiveram dois tratamentos distintos. Parte das folhas, frescas, teve seu óleo essencial extraído por hidrodestilação[176] e a porção aquosa resultante no balão submetida à extração líquido-líquido com solventes de polaridades crescentes (hexano, diclorometano e acetato de etila). Os extratos obtidos da porção aquosa (chá) foram denominados como sendo: fração aquosa hexano (FAqH), fração aquosa diclorometano (FAqD) e fração aquosa acetato (FAqA).

A outra parte das folhas foi previamente seca em estufa (à aproximadamente 40°C por 3-4 dias), moída e extraída com metanol ou com solventes de polaridades crescentes para a obtenção dos extratos à frio. O extrato obtido das folhas secas por extração à frio com metanol foi denominado extrato bruto das folhas (EB folhas), sendo esta extração realizada exclusivamente para *Baccharis pentodonta*. Os demais extratos oriundos da extração à frio com solventes de polaridades crescentes foram denominados

[176] STÜKER, C. Z. Estudo dos óleos voláteis de plantas medicinais da família Asteraceae do Rio Grande do Sul: *Baccharidastrum triplinervium*, *Baccharis pentodonta*, *Pluchea sagittalis* e *Eupatorium buniifolium*, Dissertação de Mestrado, UFSM, 2007.

como sendo: fração hexano (FH), fração diclorometano (FD) e fração acetato de etila (FA).

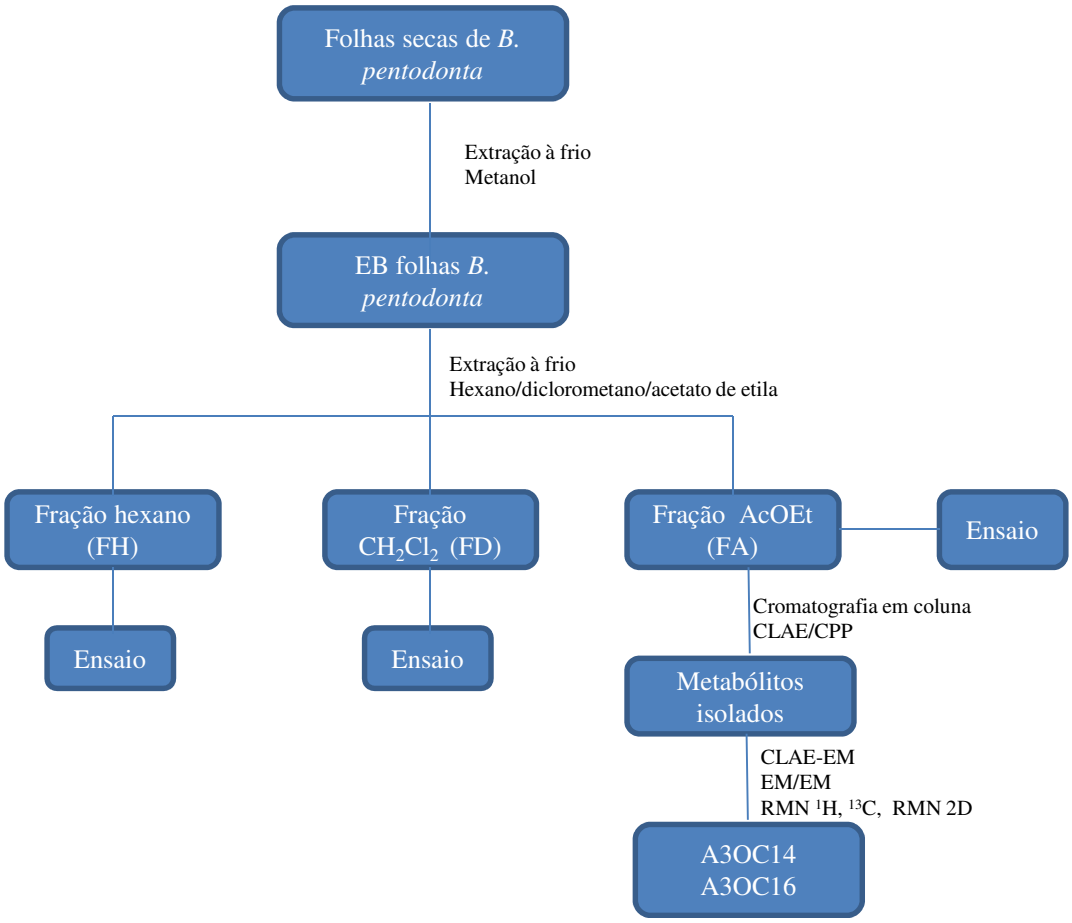
Para *Pluchea sagitallis* somente a extração da fração aquosa das folhas foi realizada, enquanto que para *Baccharis pentodonta* obteve-se o EB das folhas e as frações obtidas por extração subsequente dele. Para *Baccharidastrum triplinervium* foram obtidas tanto as frações aquosas quanto as frações a frio hexano, diclorometano e acetato de etila. Para todas as plantas foi realizada a extração da raiz em soxhlet (EB da raiz).

Todas as extrações com solventes foram realizadas até a completa exaustão do material vegetal. Os fracionamentos realizados para cada uma das plantas serão descritos a seguir.

4.2.1 *Fracionamento a frio de Baccharis pentodonta e Baccharidastrum triplinervium*

Folhas secas e moídas de *Baccharis pentodonta* (2,4 Kg) foram submetidas à extração a frio, em metanol (quantidade suficiente de solvente para cobrir todo material vegetal) até a exaustão. As folhas embebidas em metanol foram filtradas em papel filtro e a fração obtida teve o solvente evaporado em evaporador rotatório sob pressão reduzida, em banho-maria com temperatura variando entre 60 – 80ºC obtendo-se o extrato bruto de *B. pentodonta.*

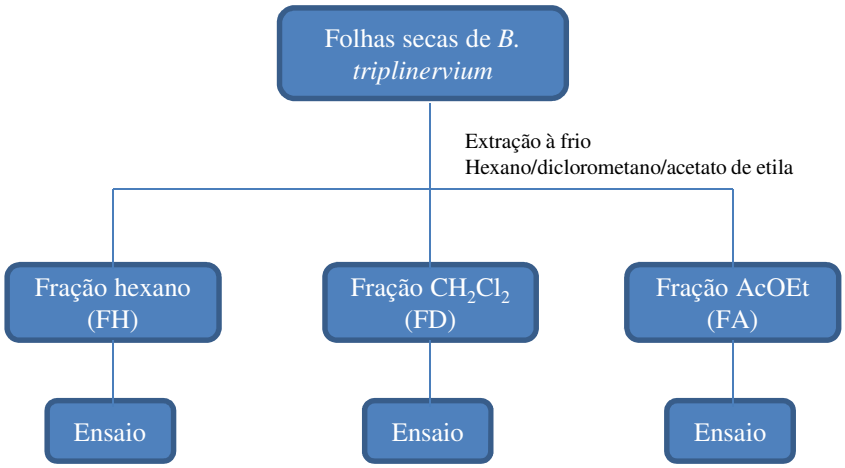
Aos 485,5 gramas do EB das folhas de *B. pentodonta* obtido adicionou-se água destilada suficiente para dissolver o extrato, sob leve aquecimento para facilitar e agilizar a solubilidade. Esta mistura foi colocada em três funis de separação distintos, onde procedeu-se a partição com solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade iniciando-se pela extração com hexano, seguida de diclorometano e acetato de etila. Em cada umas das extrações realizadas foram utilizados 300 mL de solvente orgânico, sendo que a extração foi mantida até a completa exaustão da fração aquosa. As fases orgânicas foram reunidas e os solventes evaporados em evaporador rotatório sob pressão reduzida, em banho-maria com temperatura variando entre 60 - 80ºC, de onde foram obtidas a fração hexânica de *B. pentodonta* (14 g), fração diclorometano de *B. pentodonta* (27,4 g) e fração acetato de etila de *B. pentodonta* (39 g). O esquema de extração a frio de *B. pentodonta* encontra-se no **Esquema 6**.



Esquema 6. Extração das folhas de *B. pentodonta*

Para *Baccharidastrum triplinervium* procedeu-se de maneira distinta. 1,3 kg de folhas secas e moídas foram separadas em três partes e extraídas separadamente, a frio, com solventes de polaridades crescentes (hexano, diclorometano e acetato de etila), conforme **Esquema 7**.

Diariamente, cada um desses extratos foi filtrado em papel filtro e seus solventes evaporados em evaporador rotatório até completa secura dos solventes orgânicos. Obtiveram-se de *B. triplinervium* as frações hexânica (118,8 g), diclorometano (27 g) e acetato de etila (32,5 g). Para esta planta foram obtidas também as frações aquosas descritas a seguir.



Esquema 7. Extração a frio das folhas de *B. triplinervium*

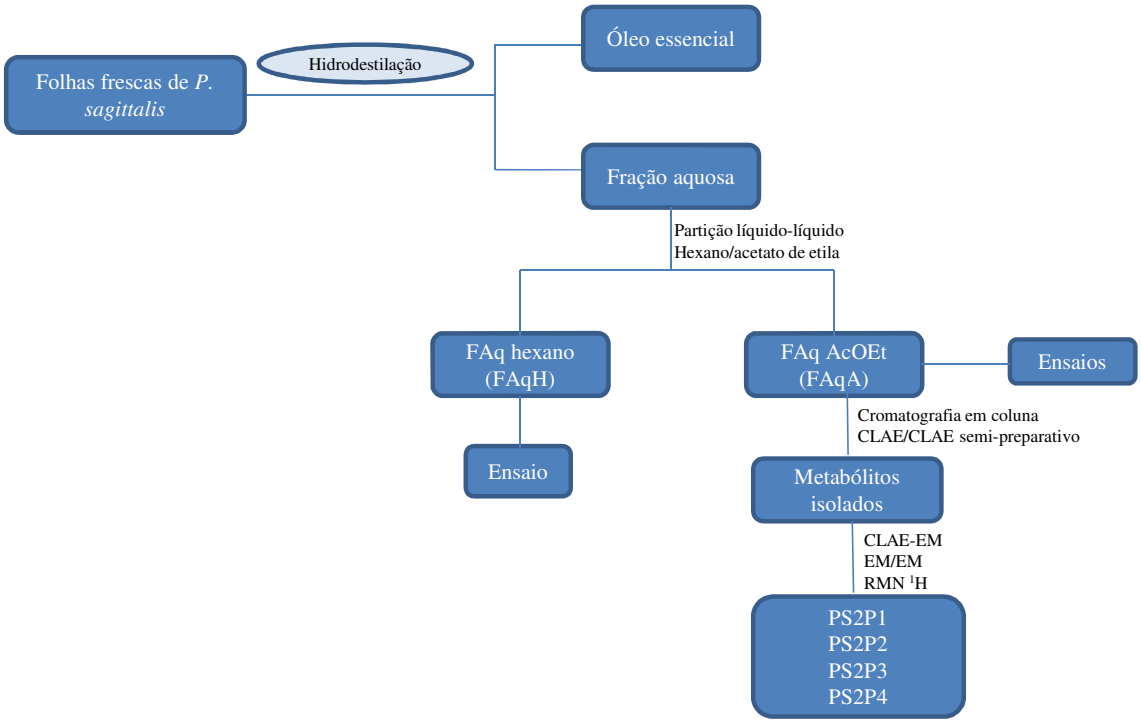
4.2.2 *Fracionamento líquido-líquido dos extratos aquosos das folhas de Pluchea sagittalis e Baccharidastrum triplinervium*

Realizou-se o processo de hidrodestilação, do qual se obteve a porção volátil já estudada anteriormente pelo grupo[176] e o resíduo aquoso (chá), este de interesse neste trabalho. Optou-se pela realização do fracionamento da porção aquosa resultante da hidrodestilação por ser na forma de chá o maior uso das plantas medicinais pela população mundial.

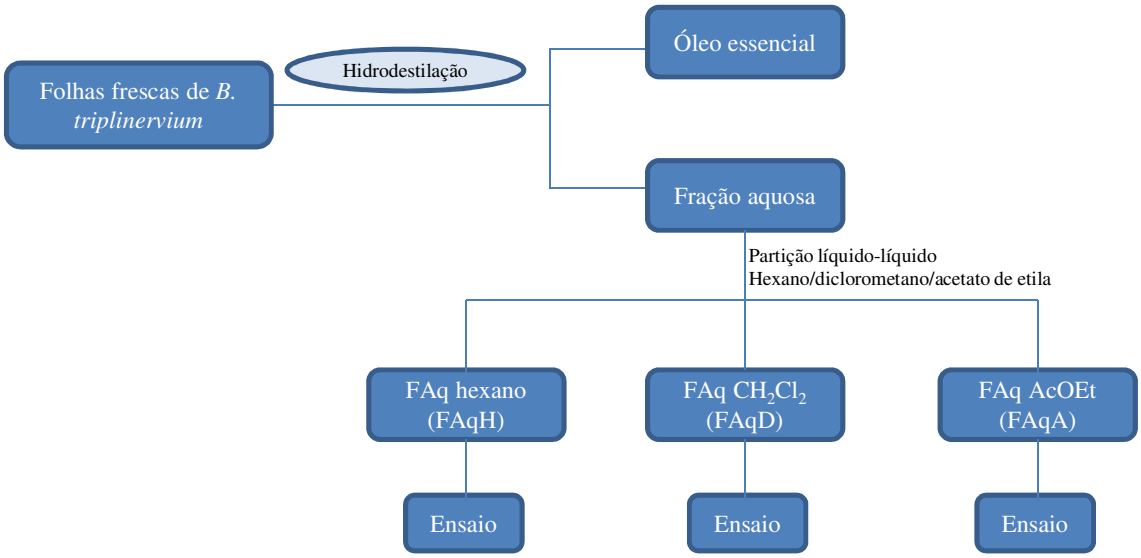
Extraiu-se a porção volátil de 1,5 kg de folhas frescas de *P. sagittalis* e 900 g de folhas frescas de *B. triplinervium*, por hidrodestilação. As porções aquosas resultante nos balões foram filtradas e submetidas a partição com solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade (hexano, diclorometano e acetato de etila). Para cada uma das extrações foram utilizados 300 mL de solvente orgânico, sendo a extração mantida até a completa exaustão da fração aquosa. As fases orgânicas foram reunidas e os solventes evaporados em evaporador rotatório sob pressão reduzida, em banho-maria com temperatura variando entre 60 -80ºC durante todo o procedimento.

Foram obtidas as seguintes frações aquosas: FAq hexano de *P. sagittalis* (326 mg), FAq acetato de etila de *P. sagittalis* (925 mg), FAq hexano de *B. triplinervium* (469,1 mg) , FAq diclorometano de *B. triplinervium* (159,1 mg) e a FAq acetato de etila

de *B. triplinervium* (154 mg). Os **Esquemas 8 e 9**, a seguir apresentam os fracionamentos realizados para *P. sagittalis* e *B. triplinervium*, respectivamente.



Esquema 8. Extração líquido-líquido da fração aquosa das folhas de *P. sagittalis*



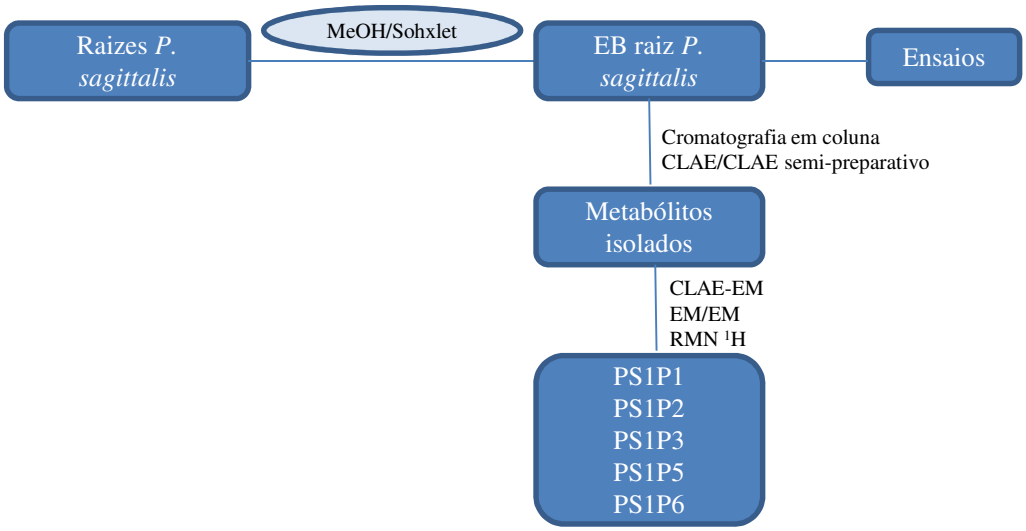
Esquema 9. Extração líquido-líquido da fração aquosa das folhas de *B. triplinervium*

4.2.3 *Fracionamento à quente das raízes de Pluchea sagittalis, Baccharis pentodonta e Baccharidastrum triplinervium*

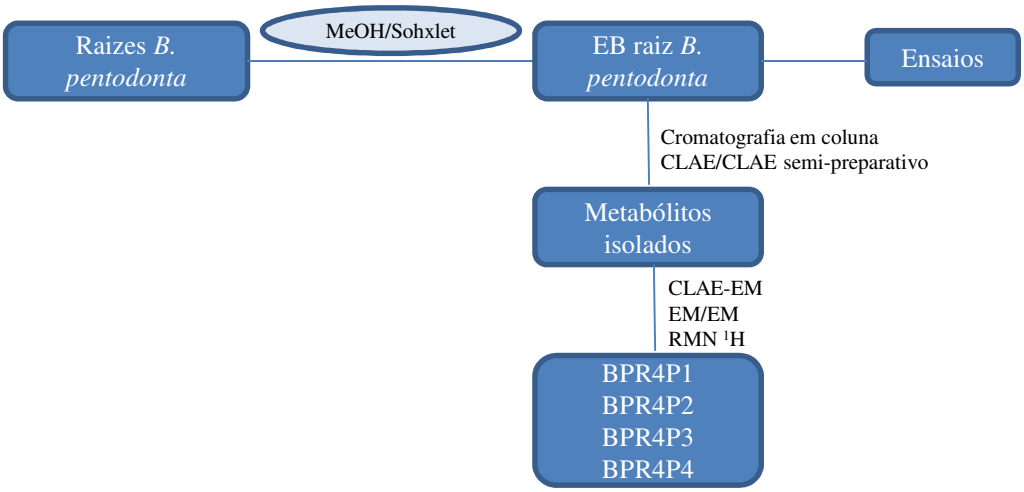
As raízes das três plantas estudadas foram lavadas, secas e moídas e submetidas a extração em metanol à quente em aparelho soxhlet até completa exaustão.

De *Pluchea sagittalis* foram obtidos 20,2 g de EB da raiz (**Esquema 10**), a partir da extração em metanol de 105 g de raízes secas e moídas, obtendo-se um rendimento de 19,2%, enquanto que de *Baccharis pentodonta* (**Esquema 11**) a partir de 761 g de raízes, obteve-se pelo mesmo processo 96 g de EB (R= 12,6%). As raízes de *B. triplinervium* (**Esquema 12**) também foram extraídas em soxhlet com metanol e obteve-se 15 g de EB, a partir de 134,6 g de raízes, alcançando-se um rendimento de 11,1 %.

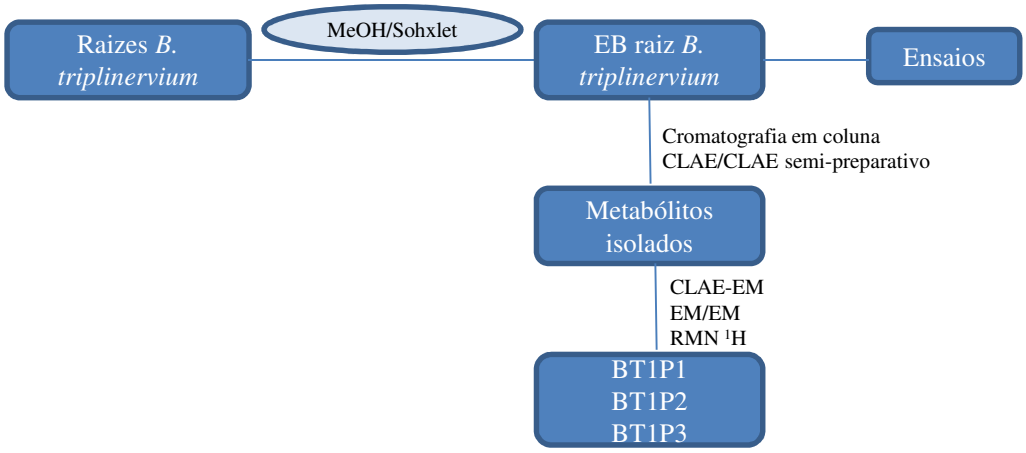
Os esquemas a seguir mostram o resumo dos fracionamentos realizados para cada uma das espécies estudadas neste trabalho.



Esquema 10. Extração em metanol à quente (Soxhlet) das raízes de *P. sagittalis*



Esquema 11. Extração em metanol à quente (Soxhlet) das raízes de *B. pentodonta*

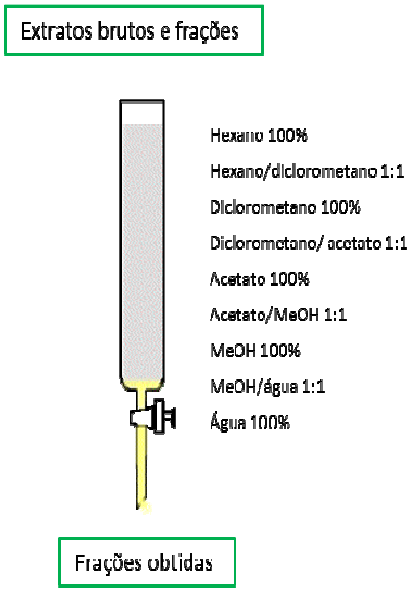


Esquema 12. Extração em metanol à quente (Soxhlet) das raízes de *B. triplinervium*

4.3 Materiais e Métodos Cromatográficos

4.3.1 *Cromatografia em coluna cromatográfica (CC)*

A cromatografia em coluna (CC) foi realizada com sílica gel (70-230mesh), e eluída por solventes puros ou sistemas de solventes, sendo este o método utilizado para realização da primeira filtração/fracionamento dos extratos brutos das raízes e das demais frações obtidas conforme o **Esquema 13**. Após filtração inicial as frações obtidas foram re-fracionadas em colunas cromatográficas menores ou em placas preparativas ou injetadas no CLAE para separação dos componentes principais.



Frações Obtidas	A	A/M	M	M/H2O	H2O
800mg EB raiz *P. sagittalis*			PS1 (281mg)		
180mg FAqA *P. sagittalis*			PS2 (134mg)		
800mg EB folhas *B. pentodonta*	-	-	BPF2 (283mg)	BPF3 (35mg)	
1,2g EB raiz *B. pentodonta*	-		BPR2 (22mg) BPR3 (209mg) BPR4 (166mg)		BPR5 (49mg)
800mg EB raiz *B. triplinervium*	BT5 (36mg)	BT1 (189mg)		BT2 (10mg)	
180mg FA folhas *B. triplinervium*		BT4 (8mg)			

Esquema 13. Extratos brutos e frações cromatografadas

O re-fracionamento e os cromatogramas obtidos em CLAE para as frações obtidas serão apresentados na discussão dos resultados.

4.3.2 *Cromatografia em Camada Delgada (CCD)/ Cromatografia em Camada Delgada de alta eficiência (CCDAE) e Cromatografia em Placa Preparativa (CPP)*

Para a CCD foram utilizadas cromatofolhas de sílica-gel 60 F_{254}, com 0,25 mm de espessura, sobre alumínio (Merck), como fase estacionária. Como fases móveis foram utilizadas diversas misturas de solventes com diferentes polaridades preparadas no decorrer deste trabalho, para a melhor solução de problemas específicos. A revelação foi realizada com luz UV (λ = 254 nm e 366 nm) e, através da borrifação de diferentes reveladores sendo os principais solução etanólica de H_2SO_4 a 10% e vanilina seguidos de tratamento térmico.

As análises por CCDAE foram realizadas em placas de sílica gel HPTLC 60F_{254} (10x20 cm). Alíquotas de 2 µL dos extratos e de 1 µL dos padrões ácido clorogênico e ácido cafêico (concentração de 1mg/mL) diluídos em metanol foram aplicadas nas placas com o aplicador automático ATS4 (**Figura 14 A**). A largura das bandas foi de 7 mm e a distância entre as bandas foi de 12 mm. Após a secagem das bandas, a separação foi realizada em uma cuba saturada (ADC2- **Figura 14 B**) até que fosse atingida a distância de migração do solvente de 70 mm. A análise foi realizada a temperatura ambiente utilizando como fase móvel acetato de etila: ácido fórmico : ácido acético : água (100:11:11:26). Após a secagem da placa com o auxílio de corrente de ar por 5 minutos, ocorreu a revelação em luz UV nos comprimentos de onda λ = 254 e λ = 366 nm (Reprostar 2- **Figura 14 C**). Posteriormente realizou-se a revelação com reveladores específicos. A placa foi imersa em uma cuba de imersão 20 x 10 cm (**Figura 14 D**) com os reagentes específicos dragendorff, Bornträger, NPPEG, vanilina e cloreto férrico para caracterização de alcalóides, cumarinas, antraquinonas, ácidos fenólicos, flavonóides, terpenóides e polifenóis entre outras. Após secagem as placas foram fotografadas (Reprostar 2- **Figura 14 C**). A programação das análises ocorre pelo software WinCATS. A **Figura 14** abaixo mostra o sistema utilizado para a realização do perfil cromatográfico dos extratos e frações das plantas estudadas.

Figura 14. CAMAG – equipamento utilizado nas análises dos perfis do extratos e frações das plantas estudadas por CCDAE

Na CPP foram empregadas placas de vidro 20 x 20 mm revestidas com 0,75 mm de sílica gel 60 GF_{254}, preparadas no laboratório. Após a eluição da placa em solvente específico, o procedimento realizado é semelhante ao que ocorre na CCD, ou seja, a placa e visualizada na luz UV, onde geralmente são marcadas as bandas de interesse. Caso haja necessidade, parte desta placa é revelada com revelador especifico. As bandas de interesse são então raspadas da placa de vidro e separadas (vale lembrar que a parte da placa onde foi aplicado o revelador não é utilizada) em frascos. Essas amostras com sílica serão dissolvidas em solvente de polaridade semelhante e filtradas para retirada da sílica. O que sobra após a filtração é evaporado em evaporador rotatório e tem-se a amostra isolada. Geralmente realiza-se CCD com diferentes fases móveis para se ter certeza de que a amostra retirada da CPP está realmente pura.

A CCD foi empregada preferencialmente para o acompanhamento das cromatografias realizadas em coluna durante os fracionamentos e para confirmação de pureza após realização da CPP, enquanto que o CCDAE foi utilizado na visualização dos perfis cromatográficos iniciais dos extratos obtidos das plantas estudadas.

4.3.3 *Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)*

Todas as análises de CLAE foram realizadas em equipamento Waters 2695 Separations Module, utilizando UV como detector (Waters 2996 Photodiode Array Detector), sendo as leituras realizadas entre λ = 220 E λ = 312 nm e a temperatura do forno em 25°C e 30°C. As colunas utilizadas foram: coluna X-terra C18, 4,6 x 150 mm, partículas de 5 µm e pré-coluna X-terra C18, 4 mm, partículas de 5 µm e coluna Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante.

As amostras foram dissolvidas em ACN/água 1:1 (5 $mg.mL^{-1}$) e os padrões ácido clorogênico e acido cafêico em metanol, na concentração de 1 $mg.mL^{-1}$. As amostras foram filtradas para posterior injeção no CLAE. Foram injetados 20 µL de cada amostra.

Os métodos inicialmente utilizados foram métodos comumente empregados no Institut Recerca Biomedica de Barcelona – Barcelona (IRB-BCN). Estes métodos eram bem difundidos e utilizados no laboratório e foram os métodos de primeira escolha. Foram também utilizados métodos disponíveis na literatura[33,36]. Abaixo estão dispostos os métodos utilizados nas análises dispostas no capítulo de resultados e discussões. São métodos gradiente e foram os escolhidos por proporcionarem uma melhor separação às amostras analisadas.

Método 1. Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 2 minutos: total corrida 10 minutos.

Método 2. Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 6 minutos: total corrida 14 minutos.

Método 3. Coluna: X-terra C18, 4,6 x 150 mm, partículas de 5 µm, com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 30 °C. FM A: ACN/ácido acético glacial 0,05%, FM B: H_2O/ácido acético glacial 0,05%, fluxo 1mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-60% em 2 minutos, 60-80% em 2 minutos, 80-100% em 2 minutos, 100%-3minutos e 100-15% em 4 minutos: total corrida 21 minutos.

4.3.4 *Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) modo semi-preparativo*

As injeções no CLAE semi-preparativo ocorreram em Waters 2695 Separations Module, utilizando Waters 2996 Photodiode Array Detector como detector UV, utilizando coluna Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm e temperatura do forno de 25 °C. As análises ocorreram em coluna semi-preparativa utilizando como fase móvel acetonitrila/água, estando o método utilizado descrito abaixo. As corridas realizadas neste sistema foram de 30 minutos, utilizando o comprimento de onda de 220 nm (λ = 220 nm).

Método Semi-preparativo. Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 200 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 2 mL min^{-1}, 15-40% em 30 minutos.

O volume de amostra injetado está descrito em resultados e discussões onde serão tratadas cada uma das injeções como respectivos isolamentos obtidos por CLAE semi-preparativo.

4.3.5 *Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE/EM)*

Foram realizadas análises de CLAE-EM tanto para os compostos isolados, quanto para alguns extratos e frações obtidos.

As análises foram realizadas em equipamento Waters 2695 Separations Module, utilizando Waters 2996 Photodiode Array Detector como detector UV e EMD 1000 ou Waters Micromans ZQ ESCi Multi Enabled como detectores de massa.

Na análise de EM utilizou-se a fonte de ionização eletrospray, operando no modo negativo. A tensão capilar do equipamento foi ajustada em 3000V, com taxa de

gás de nebulização de 12 L/h e temperatura a 300° C. Dados de espectrometria de massa forma adquiridos no modo scan entre *m/z* 100 e 1000[177].

Os métodos de escolha para a realização destas análises estão descritos abaixo.

Método 1. Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 com pré-coluna equivalente e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 0,4 mL min^{-1}, 15-40% em 30 minutos: total corrida 30 minutos. Este método foi utilizado para as análises de CLAE-EM de todos os metabólitos isolados.

Método 2. Coluna: X-terra C18, 4,6 x 150 mm, partículas de 5 um, com pré-coluna equivalente de 4 mm e temperatura do forno de 30 °C. FM A: ACN/ácido acético glacial 0,05%, FM B: H_2O/ácido acético glacial 0,05%, fluxo 0,6 mL min^{-1}, 15-40% em 16 minutos, 40-60% em 4 minutos, 60-80% em 4 minutos, 80-100% em 4 minutos, 100% em 6 minutos e 100-15% em 8 minutos: total corrida 42 minutos. Este método foi utilizado para as análises de CLAE-EM dos extratos e frações.

4.3.6 *Espectrometria de massas de alta resolução (EMAR)*

As análises das substâncias foram realizadas utilizando o equipamento Synapt HDMS G1 (Waters, USA) com geometria Q-TOF. Para a análise das substâncias por ESI(+)-QTOF-EM e EM/EM, a amostra contendo as substâncias foram diluídas para 10 μmol L^{-1} em H_2O/MeCN 1:1 com 0,1% de ácido fórmico. A amostra foi analisada por infusão direta da solução no instrumento utilizando uma bomba de seringa com fluxo de 10 μL min^{-1}. Os parâmetros utilizados foram voltagem do capilar de 3.0 KV, voltagem do cone 30 V, temperatura da fonte 100ºC, temperatura de dessolvatação de 200ºC, fluxo gás do cone 30 L h^{-1}, fluxo gás de dessolvatação de 900 L h^{-1}, energias de colisão do Trap e Transfer em 6 e 4 V, respectivamente (*QTOF-MS mode*). Para calibração foi utilizada uma solução de ácido fosfórico, na faixa de *m/z* 90 a 1000. As análises também foram realizadas utilizando o modo negativo ESI(-)-QTOF-EM e EM/EM, utilizando uma solução de H_2O/MeCN 1:1 com 0,1% de hidróxido de amônio. As condições experimentais utilizadas foram às mesmas empregadas nas análises do modo positivo.

[177] BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. Food Res. Intern. 40, 393, 2007

4.4 Equipamentos utilizados

4.4.1 *Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)*

Os espectros de ressonância magnética nuclear uni e bi dimensionais foram realizadas em espectrômetro Bruker DPX-400 operando a 400.13 MHz para ^{1}H e 100.32 MHZ para ^{13}C. Todos os experimentos foram realizados em tubos de 5 mm de diâmetro a 300K.

Os deslocamentos químicos são medidos em ppm em relação a um padrão interno de Me_4Si (δ=0) para espectros de hidrogênio sendo que no espectro de ^{13}C o próprio solvente serve para este fim. Foram utilizados CD_3OD, DMSO-*d6* e MeOD. Os espectros de 2D foram realizados conforme os parâmetros de aquisição fornecidos pelo aparelho.

4.4.2 *Ponto de fusão*

Os valores dos pontos fusão (não corrigidos) das substâncias foram determinadas em um aparelho MQAPF-301 da Microquímica.

4.4.3 *Espectroscopia de Infravermelho*

As análises de IV foram realizadas em equipamento *Spectrum 100 FT-IR*, da Perkin Elmer. Os extratos e frações que se apresentavam pastosos foram colocados diretamente no equipamento e a análise foi imediatamente realizada após o *ok* no software do equipamento enquanto que as amostras sólidas (pó), foram colocadas em um prato de metal específico do equipamento (**Figura 15**) sendo pressionadas para que formassem uma espécie de pastilha para posterior análise de determinação do infravermelho.

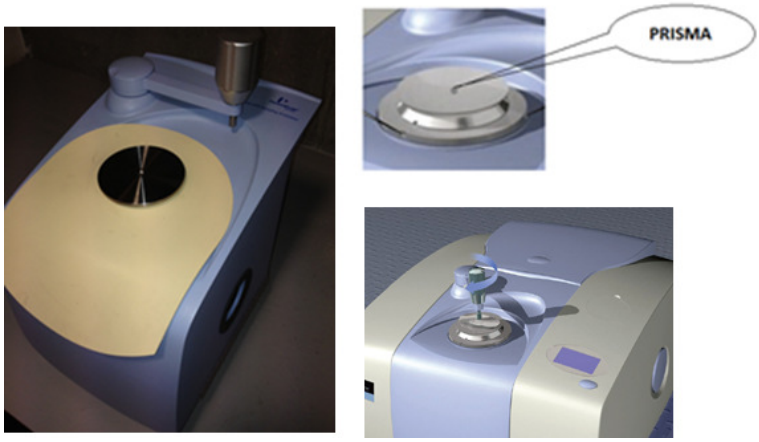


Figura 15. Equipamento de Infravermelho

4.4.4 *Leitor de microplacas*

As medidas de fluorescência das reações enzimáticas das enzimas POP e DPP IV foram realizadas em fluorímetro FL 600 Microplate Fluorescence Reader sendo as leituras realizadas em λ = 405 nm. As leituras foram todas realizadas em placas de polipropileno de 96 poços (fundo plano) a temperatura ambiente (22 a 25ºC). Foram realizadas três leituras em cada uma das placas.

4.4.5 *Solventes e reagentes purificados*

Todos os solventes utilizados para o fracionamento dos extratos, para a CC, para a CCD e para a CPP foram solventes de nível técnico que receberam tratamento para melhorar suas condições tanto de umidade como de possíveis contaminantes.

Hexano: refluxado com sódio metálico e destilado posteriormente.

Diclorometano: seco sobre $CaCl_2$ e destilado.

Acetato de etila: seco sobre $CaCl_2$ e destilado.

Metanol: refluxado e destilado sobre óxido de cálcio.

Os solventes utilizados nas corridas do CLAE, CLAE semi-preparativo, CLAE-EM, e CCDAE foram solventes de grau cromatográfico.

4.4.6 *Padrões*

Os padrões comerciais ácido clorogênico e ácido cafêico foram obtidos da Sigma Aldrich. Este foram utilizados como comparativos nas análises de CCDAE e também em algumas análises de CLAE sendo co-injetados com extratos e frações. Foram realizados ainda RMN de ^{1}H e ^{13}C desses padrões.

4.5 Atividade Antimicrobiana

4.5.1 *Determinação da atividade antimicrobiana "in vitro" pelo método de microdiluição em caldo (CIM)*

Os ensaios de microdiluição em caldo forma realizados em placas de 96 micropoços utilizando a técnica modificada do NCCLS[143,144,145]. Foram efetuadas uma série de diluições das amostras em meio caldo caseína de soja e Sabourand, iniciando da concentração de 0,5 mg mL^{-1} (0,5 – 0,031 mg mL^{-1}) para extratos brutos e frações. Os poços foram então inoculados com a suspensão microbiana e as placas foram incubadas por 24 horas a 35-37°C para bactérias e por 48 horas a 25-27ºC para fungos. Após o período de incubação, observou-se o crescimento microbiano, indicado pelo aparecimento de turvação, possibilitando assim, a verificação da CIM.

O CIM é determinado visualmente (aparecimento ou não de turvação) e dos poços que não apresentaram crescimento são retiradas alíquotas que serão inoculadas em meio sólido para determinação da concentração bactericida ou fungicida mínima (CBM/CFM), a menor concentração de substância capaz de matar 99,9% das unidades formadoras de colônia (UFC). O termo concentração letal mínima (CLM) também vem sendo usado englobando CBM e CFM, mas ainda não está bem estabelecido[144].

Os testes foram realizados em triplicata e sempre foi realizada a análise do padrão (cloranfenicol ou nistatina) simultaneamente. As placas também tinham controle de branco (CB) e de crescimento microbiano (controlo de inóculo, CI).

4.5.2 *Micro-organismos utilizados para a determinação da atividade antimicrobiana "in vitro"*

Para a verificação da atividade antimicrobiana dos extratos e frações foram utilizadas cepas padrão ATCC (American Type Culture Collection).

Tabela 2. Micro-organismos padrão ATCC utilizados nos testes de determinação da atividade antimicrobiana

BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS:	
Staphylococcus aureus	ATCC 6538
Staphylococcus epidermidis	ATCC 12228
Bacillus subtillis	ATCC 6633
Streptococcus pyogenes	ATCC 19615
Corynebacterium xerosis	ATCC 373
BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS:	
Escherichia coli	ATCC 25922
Klebsiella pneumoniae	ATCC 13883
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 9027
FUNGOS /LEVEDURAS:	
Candida albicans	ATCC 10231
Sacharomyces cerevisae	ATCC 2601
Cryptococcus neoformans	ATCC 28952
Malassezia furfur	ATCC 14523

4.5.2.1 Substâncias empregadas como padrões nos ensaios microbiológicos

Os padrões de antibióticos utilizados para verificação da atividade antimicrobiana foram Cloranfenicol para bactérias e Nistatina para fungos. Padrões estes preparados conforme FDA[178].

[178] FDA: Code of Federal Regulation, 21, 300, 1991

4.5.2.2 Meios de cultura empregados

Meio ágar nutriente: meio utilizado para o repique de bactérias.

Fórmula (g L^{-1})	
Cloreto de sódio	8,0
Extrato de carne	3,0
Peptona de gelatina	5,0
Ágar bacteriológico	15,0

Meio ágar sabouraud dextrosado: meio utilizado para repiques de fungos.

Fórmula (g L^{-1})	
Dextrose	40,0
Peptona de carne	5,0
Peptona de caseína	5,0
Ágar	15,0

Meio caldo caseína de soja: meio utilizado para realização dos ensaios de concentração inibitória mínima, no cultivo de bactérias.

Fórmula (g L^{-1})	
Dextrose	2,5
Cloreto de sódio	5,0
Fosfato dibásico de potássio	2,5
Peptona de caseína	17,0
Peptona de soja	3,0

Meio caldo sabouraud dextrosado: meio utilizado para o cultivo de fungos nos ensaios de concentração inibitória mínima.

Fórmula (g L^{-1})	
Dextrose	40,0
Peptona de carne	5,0
Peptona de caseína	5,0

Todos os meio foram preparados de acordo com as instruções do fabricante em água recém destilada e esterilizados em autoclave a 121 ^{o}C, 1 atm., por 20 minutos.

4.5.2.3 Manutenção dos micro-organismos indicadores

As cepas dos micro-organismos indicadores são armazenadas em tubos de ensaio (ágar inclinado) contendo 5 mL de ágar nutriente para bactérias ou ágar Sabouraud para fungos, em geladeira. Os repiques são realizados sempre 24 a 48 horas antes de cada análise.

4.5.2.4 Preparo das suspensões microbianas (inóculo)

Com o auxilio de uma alça de platina esterilizada foram transferidas culturas recentes dos microrganismos indicadores para tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina a 0,8%. Padronizou-se o inóculo fazendo a comparação deste com o tubo padronizado 0,5 da escala nefelométrica de McFarland que corresponde a aproximadamente a 1,5 x 10^{8} UFC mL^{-1} (Unidades Formadoras de Colônia por mL).

4.6 Atividade Antioxidante

4.6.1 *Método do radical livre DPPH*

O ensaio empregado[179,180,181] foi o do radical estável 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH). Para esta determinação, uma solução estoque de 6 $mg.mL^{-1}$ (30 mg de amostra em 5 mL de MeOH ou EtOH) foi preparada e as concentrações finais de 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,6 e 7,8 $\mu g.mL^{-1}$ foram obtidas, conforme descrito abaixo.

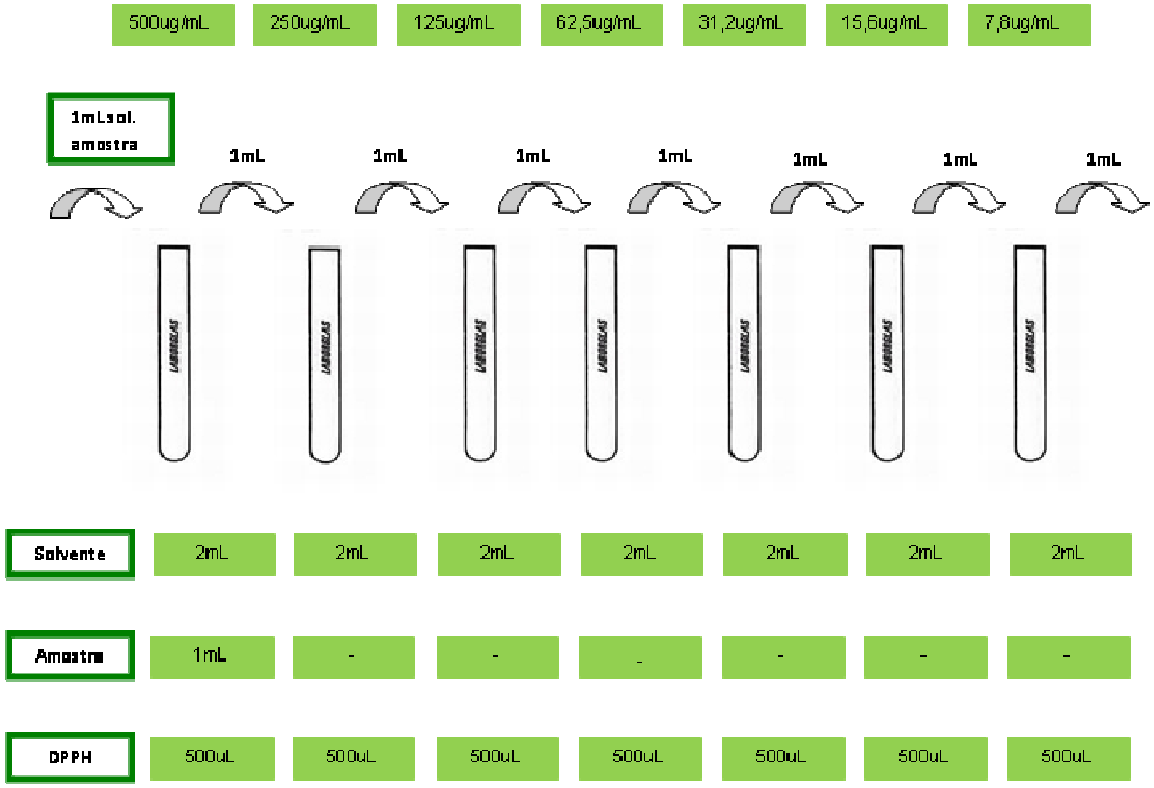
Em cada tudo de ensaio foram colocados 2 mL de metanol. Ao primeiro tudo de cada diluição (500 $\mu g.mL^{-1}$), denominado tubo 1, adicionou-se 1 mL da solução da amostra (6 $mg.mL^{-1}$). Este tubo foi homogeinizado, e passou-se 1 mL para o tubo 2 e assim sucessivamente para os demais tubos até o último tubo (7,8 $\mu g.mL^{-1}$), de onde,

[179] PELLATI, F.; BENVENUTI, S.; MAGRO, L.; MELEGARI, M.; SORAGNI, F. J. Pharm. Biom. Anal., 35, 289, 2004.
[180] FERRERES, F.; SOUSA, C.; VRCHOVSK, V.; VALENTÃO, P.; PEREIRA, J. A.; SEABRA, R. M.; ANDRADE, P. B. Eur. Food Res. Techn. 222,88, 2006.
[181] YOKOZAWA, T.; CHEN, C. P.; DONG, E.; TANAKA, T.; NONAKA, G. I., NISHIOKA, I. Biochem. Pharm., 56, 213, 1998.

após a homogeinização, foram retirados 1 mL da soluçao que foi descartada. Após a realização desta diluição, acrescentou-se a cada um dos tubos 0,5 mL de DPPH 0,004% em metanol e as amostras foram incubadas a temperatura ambiente, sob o abrigo da luz por 30 minutos. O decréscimo da absorbância foi medido em espectrofotômetro a λ=517 nm. O **Esquema 14** representa esquematicamente o teste realizado.

Como padrão positivo da análise utilizou-se o BHT (butil hidróxi tolueno) nas mesmas concentrações das amostras.

Para cada concentração de amostra testada foi descontado o valor obtido para o branco (amostra contendo a mesma quantidade de metanol, sem DPPH).



Esquema 14. Análise da atividade antioxidante com DPPH.

Os testes foram realizados em triplicata e a porcentagem de inibiçao foi calculada segundo a equaçao abaixo:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{(\text{Abs branco} - \text{Abs amostra}) \times 100}{\text{Abs branco}}$$

Sendo: Abs branco = absorção do branco (MeOH + DPPH); Abs amostra = absorção da solução da amostra na concentraçao correspondente + DPPH, após 30 minutos da adição do DPPH.

4.7 Atividade enzimática

4.7.1 *Determinação da atividade inibidora da Prolil oligopeptidase (POP), por método fluorimétrico*

A reação da enzima com um substrato é monitorada pela leitura de absorbância a 405 nm, tal como descrito por Toide e colaboradores (1995)[182].

Em cada um dos micropoços o buffer de atividade (136 µL, 100 mM de tampão fosfato, pH 8,0) foi pré-incubado a 37ºC e 90 rpm com 1µL da POP (7mM) e com diferentes concentrações de amostra diluídas em DMSO (inicial 5mg.mL^{-1} para extratos e frações e 100 mM para compostos puros), por 15 minutos. Um controle com DMSO na mesma diluição foi realizado. Após esta pré- incubação, 10 µL do substrato (ZGP-AMC, 3mM em 40% de 1,4-dioxano) foi adicionado e a reação foi novamente incubada por 1 hora a 37ºC a 90 rpm.

A reação foi interrompida após este tempo com acetato de sódio (150 µL, 1 M, pH 4) sendo a leitura realizada em fluorímetro em λ = 405 nm, a partir da formação de AMC.

Para as substâncias isoladas determinou-se a IC 50, sendo definida como a concentração do composto necessária para inibir 50 % da atividade da POP. A IC 50 foi obtida através do programa Graphad prism 4, considerando-se no eixo x o logaritmo da concentração utilizada e no eixo y a porcentagem das médias de inibição obtidas.

[182]TOIDE, K,; IWAMOTO, Y.; FUJIWARA, H.; ABE, H. J Pharmacol Exp Ther 274, 13708, 1995.

4.7.2 *Determinação da atividade inibidora da dipeptidil peptidase IV (DPP IV), por método fluorimétrico*

A atividade dos extratos, frações e compostos puros foi determinada seguindo-se uma metodologia semelhante à descrita acima, pelo método descrito por Checler e colaboradores (1985)[183], porém o substrato utilizado para esta enzima foi o H-Gli-Pro-AMC.

[183]CHECLER, F.; VINCENT, J. P.; KITABGI, P. J Neurochem 45, 1509, 1985.

5 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos de composição química, atividade biológica, enzimática e antioxidante para as plantas da família *Asteracea*e estudadas no decorrer deste trabalho.

Os resultados estão apresentados por planta estudada, iniciando-se por uma prospecção fitoquímica, a qual foi realizada em cromatografia de camada delgada de alta eficiência (CCDAE). Em seguida estão apresentados o isolamento de metabólitos de interesse e suas respectivas elucidações estruturais através de técnicas de espectrometria de massas de alta resolução (EMAR) e ressonância magnética nuclear (RMN). Por fim, os ensaios de atividade biológica e os resultados obtidos para cada um dos extratos, suas frações e os correspondentes compostos isolados.

5.1 Prospecção fitoquímica dos extratos obtidos de *P. sagittalis*, *B. pentodonta* e *B. triplinervium*

5.1.1 *Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE)*

A fim de se obter um perfil geral da composição química dos extratos e frações obtidas de *P. sagittalis, B. pentodonta* e *B. triplinervium* foi realizado, em CCDAE, o perfil fitoquímico dessas plantas. Optou-se por esta técnica, por ser simples, robusta e extremamente versátil, sendo muito empregada em análises de Produtos Naturais[184].

A partir deste perfil fitoquímico foi possível visualizar as principais classes de metabólitos que poderiam ser encontradas nos extratos de cada uma das plantas em estudo.

A **Figura 16** apresenta o perfil cromatográfico das placas de CCDAE, nos comprimentos de onda de $\lambda = 366$ nm e $\lambda = 254$ nm, após sua eluição.

[184] ATTIMARAD, M. *et al*. Pharm. Meth., 2, 2, April/June, 2011.

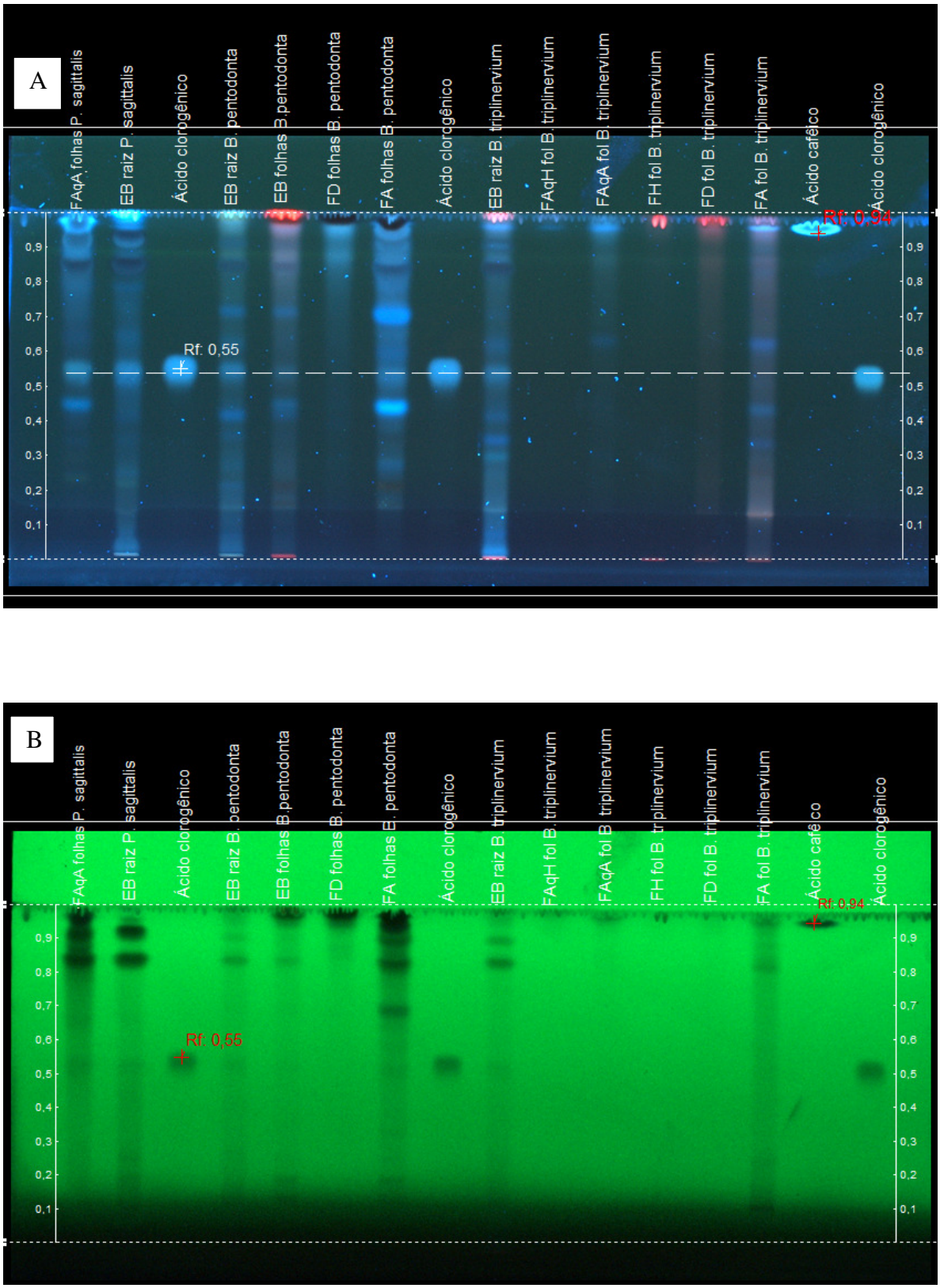


Figura 16. Perfil fitoquímico em CCDAE dos extratos e frações de *P. sagittalis*, *B. pentodonta* e *B. triplinervium.* Placas eluídas na fase móvel acetato de etila : ácido fórmico: ácido acético: água 100:11:11:26. A) leitura em λ = 366 nm e B) leitura em λ = 254 nm.

A partir da análise do perfil fitoquímico apresentado pelas plantas estudadas foi possível observar que as três plantas, apesar de não pertencerem ao mesmo gênero, apresentaram semelhanças entre si. Além disso, observou-se a presença do ácido clorogênico e do ácido cafêico na maioria dos extratos analisados. A análise por CCDAE também demostrou a presença de clorofila em algumas das frações (principalmente frações hexânicas e diclorometano). Decidiu-se que as frações contendo clorofila na sua composição não seriam avaliadas, já que a remoção da mesma dos extratos é bastante difícil e pouco eficiente. Portanto, não foram analisadas neste trabalho as frações hexânicas e diclorometano de nenhuma das plantas estudadas.

As frações que apresentaram melhor separação e potencial de serem trabalhadas foram re-analisadas por CCDAE, utilizando-se alguns reveladores que auxiliaram na detecção de classes de compostos presentes nos extratos e suas frações. Foram utilizados os reveladores Vanilina (para terpenóides), NP-PEG (para flavonóides, principalmente fenólicos), cloreto férrico (para flavonóides, taninos e fenólicos), Dragendorff (alcalóides) e Bornträger (cumarinas, fenólicos)[105]. A **Figura 17** apresenta as três placas de CCDAE após a aplicação de diferentes reveladores, onde podemos observar que as classes fitoquímicas presentes nas plantas estudadas são derivados fenólicos.

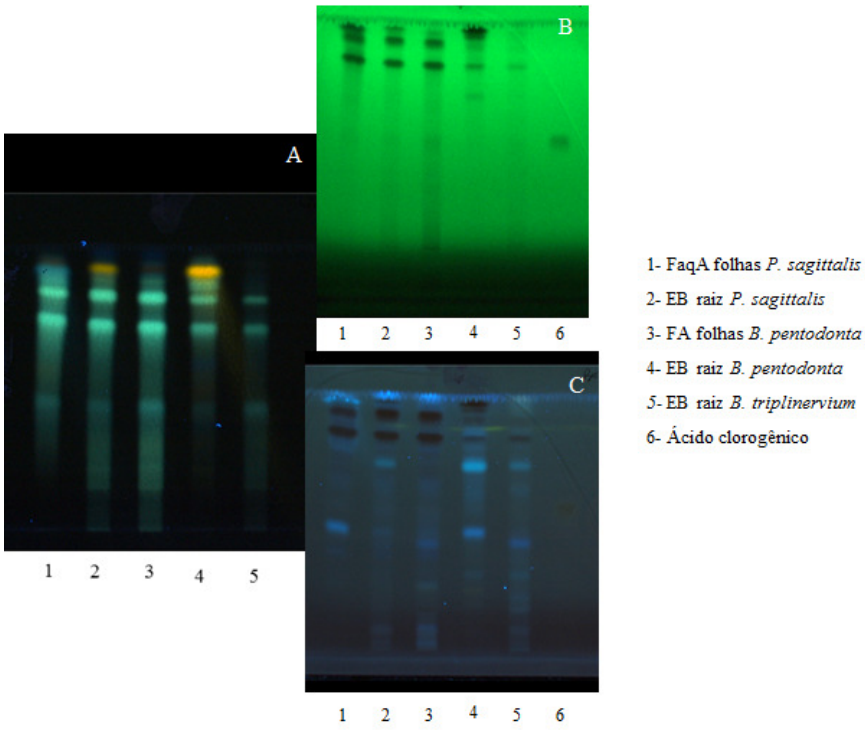


Figura 17. Placas eluídas na fase móvel Acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água 100:11:11:26. **A)** revelador: NPPEG, usando leitura em λ = 366 nm. **B)** revelador Bornträger, em λ = 254 nm e **C**) revelador Bornträger, em λ = 366 nm.

5.1.2 *Espectroscopia de infravermelho*

Todos os extratos e frações das plantas em estudo foram analisados por espectroscopia de infravermelho (IV). Esta técnica foi empregada com o propósito de se conhecer as bandas de IV presentes em cada uma das amostras, sendo que a **Figura 18** demonstra o perfil de IV dos extratos e frações de *P. sagittalis, B. pentodonta* e de *B. triplinervium.*

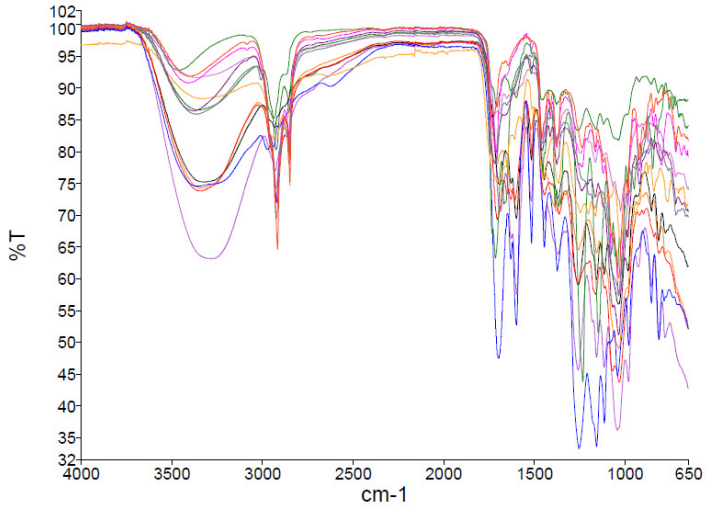


Figura 18. Espectro de infravermelho de todas as frações e extratos obtidos para *P. sagittalis, B. pentodonta* e de *B. triplinervium.*

Para efeito de comparação, a **Figura 19** apresenta os espectros de infravermelho dos padrões de ácido clorogênico e ácido cafêico, enquanto que a **Figura 20** traz o conjunto de espectros de infravermelho dos extratos e frações obtidas de cada uma das espécies estudadas, separadamente.

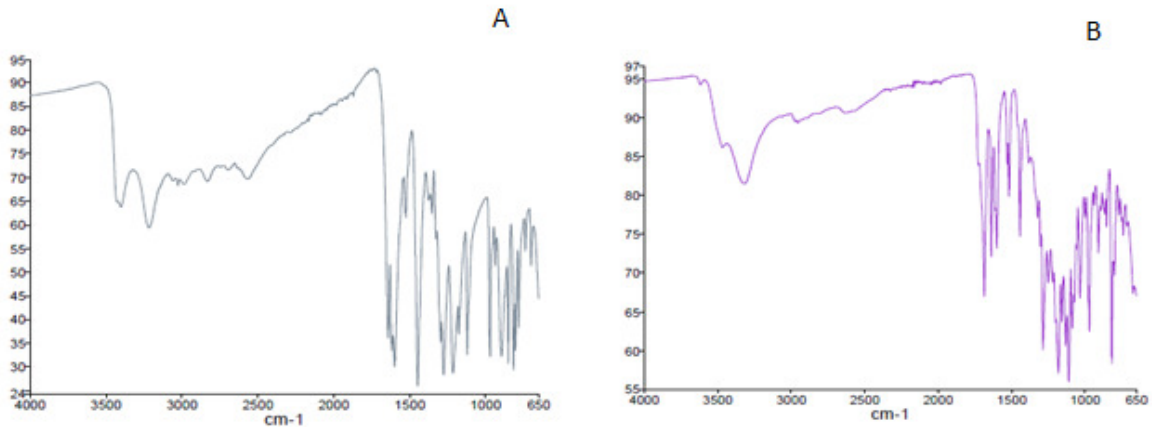
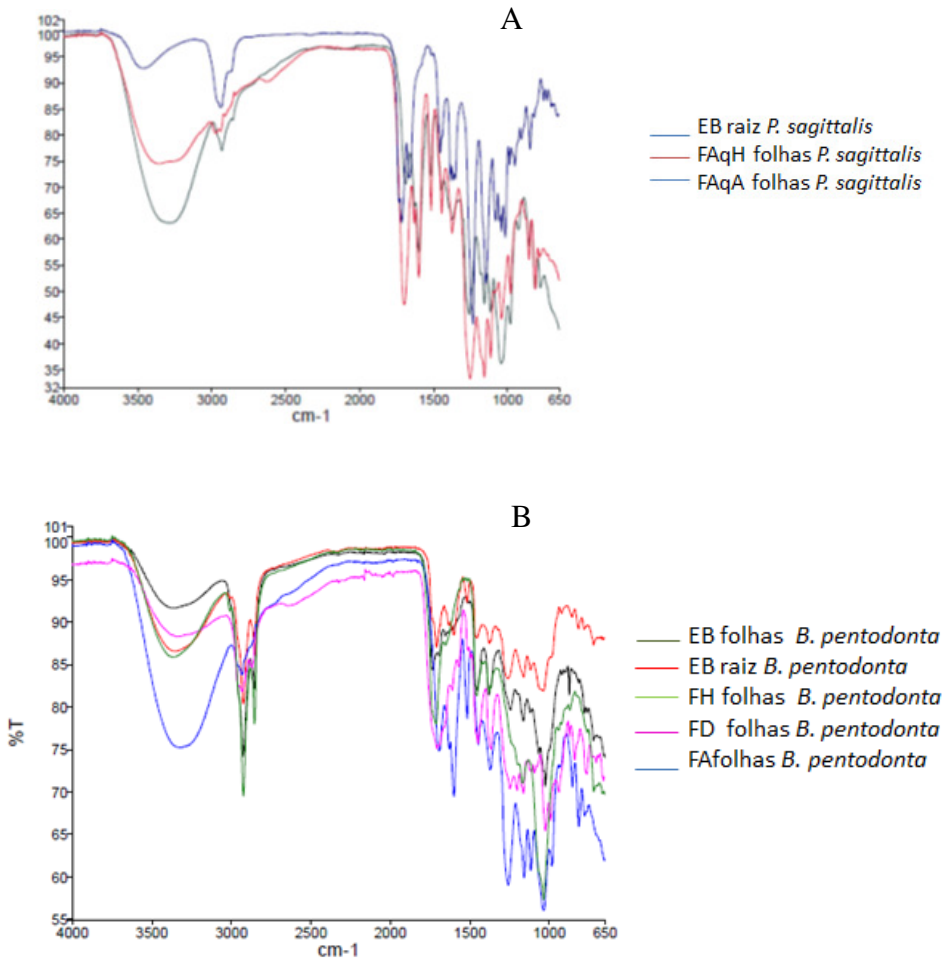


Figura 19. **A)** Espectro de IV do padrão ácido cafêico. **B)** Espectro de IV do padrão ácido clorogênico.



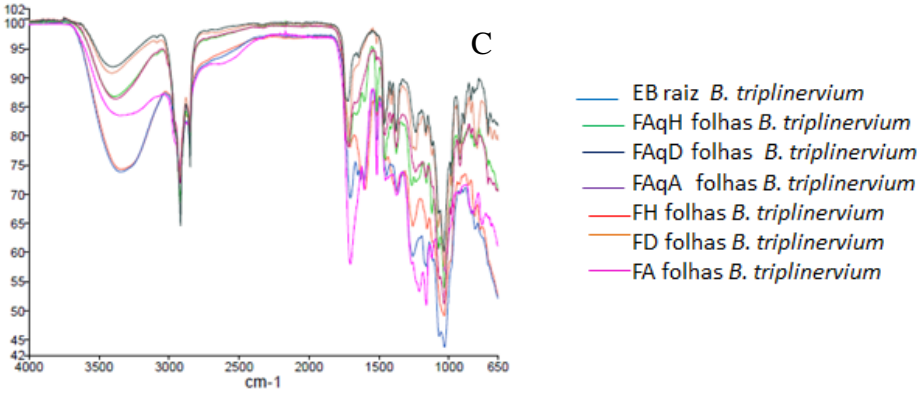


Figura 20. Espectro de IV dos extratos e frações das plantas estudadas. **A)** Extratos e frações de *P. sagittalis*. **B)** Extratos de frações de *B. pentodonta.* **C)** Extratos e frações de *B. triplinervium.*

Observando-se os espectros de infravermelho obtidos para os extratos e frações das plantas estudadas *P. sagittalis, B. pentodonta* e *B. triplinervium*, pode-se observar a presença de bandas características de hidroxilas (3384), carbonilas de – COOH (1700), ésteres α, β-insaturados, sistemas aromáticos (1550-800) e duplas ligações (1600)[185].

Os espectros de infravermelho obtidos para todas as amostras são semelhantes, apesar de se tratarem 3 espécies de gêneros diferentes e com procedimentos de fracionamento realizados com diferentes polaridades de folhas e raízes.

Ainda, comparando os espectros de infravermelho obtidos para os extratos e frações de cada uma das plantas estudadas, com o espectro de IV do ácido 1,3-dicafeoilquínico (**Figura 21**), disponível na literatura[34] observamos semelhança entre eles, possibilitando afirmar que o perfil de espectro de IV observado é característico de compostos derivados do ácido clorogênico, e provavelmente, de ácidos dicafeoilquínicos, apesar deste isômero não ter sido encontrado nas plantas estudadas.

[185] ZHU, X-F.; ZHANG, H-X.; LO, R. Nat. Prod. Res. 6, 23, 527, 2009.

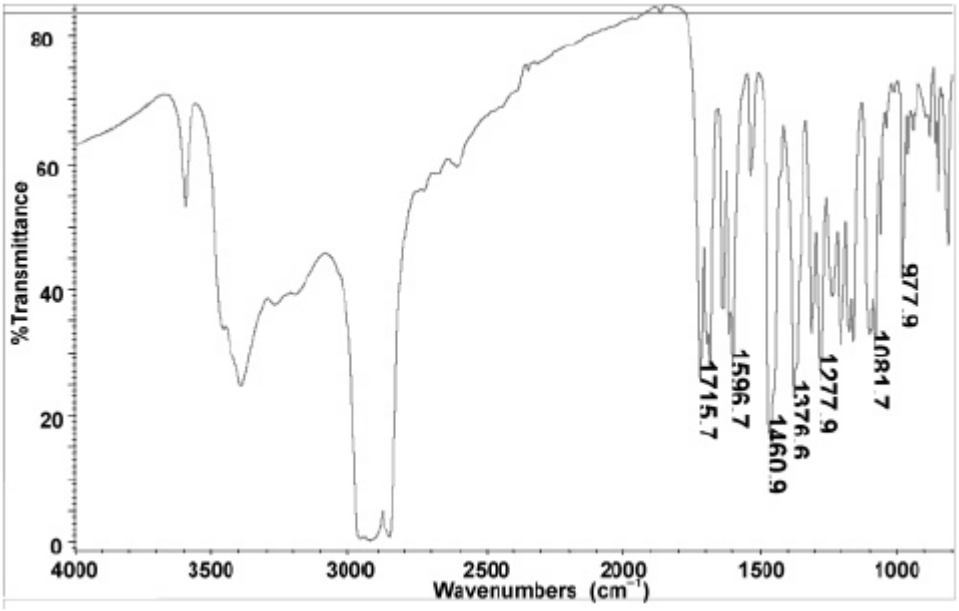


Figura 21. Espectro de IV do ácido 1,3-dicafeoilquínico em nujol[34].

A partir da análise dos perfis fitoquímicos obtidos das plantas estudadas e padrões comerciais de ácido cafêico e ácido clorogênico, por IV e por CCDAE, podemos observar que tanto o ácido clorogênico quanto o ácido cafêico são presença constantes na maioria dos extratos trabalhados. Isto provavelmente se deve ao fato de que os compostos isolados das plantas estudadas, têm estes metabólitos como percussores.

5.2 Análise de ácido clorogênico e ácido cafêico por CLAE e RMN

Os padrões comerciais ácido clorogênico e ácido cafêico (**Figura 22**) foram analisados por CLAE por co-injeção (**Figura 23**) e isoladamente. Foram também realizadas análises de ^{1}H e ^{13}C para ambos. Os dados obtidos para estes padrões encontram-se abaixo.

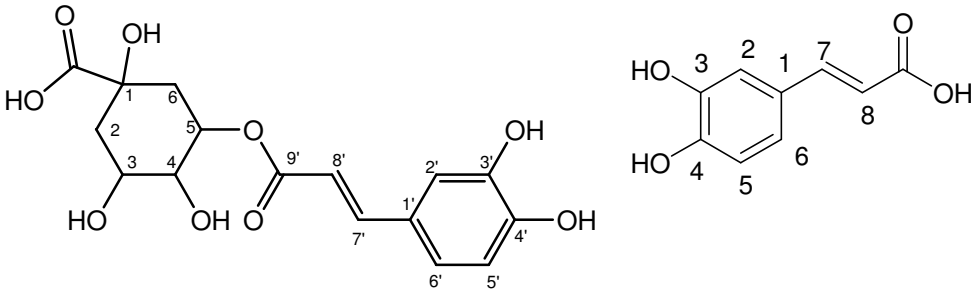


Figura 22. A) Ácido clorogênico. **B)** Ácido cafêico.

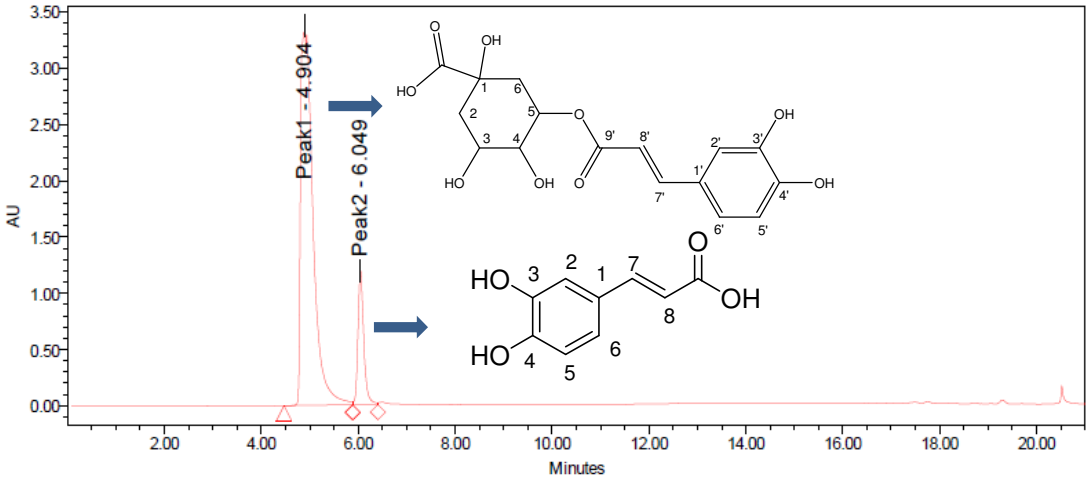


Figura 23. Perfil cromatográfico dos padrões ácido clorogênicos e ácido cafêico, por CLAE: Coluna: X-terra C18, 4,6 x 150 mm, partículas de 5 µm, com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 30 °C. FM A: ACN/ácido acético glacial 0,05%, FM B: H_2O/ácido acético glacial 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-60% em 2 minutos, 60-80% em 2 minutos, 80-100% em 2 minutos, 100%-3minutos e 100-15% em 4 minutos: total corrida 21 minutos. Ordem de eluição: ácido clorogênico (tR = 4,904) e ácido cafêico (tR = 6,049). Leitura em 312 nm.

A **figura 24** apresenta o cromatograma obtido em CLAE para o padrão comercial ácido clorogênico. Abaixo serão apresentadas e discutidas as análises de RMN de ^1H realizada para o padrão em questão e também para o padrão comercial ácido cafêico.

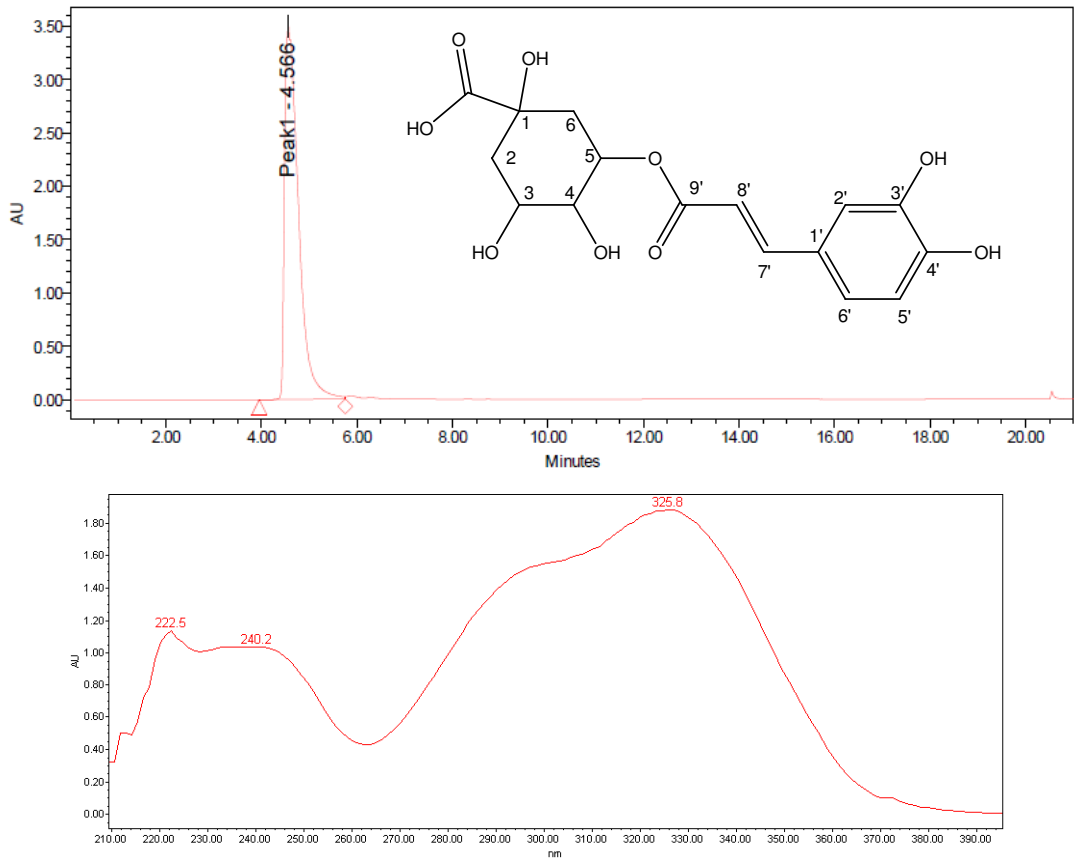


Figura 24. Perfil cromatográfico do padrão ácido clorogênico, por CLAE: Coluna: X-terra C18, 4,6 x 150 mm, partículas de 5 µm, com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 30 °C. FM A: ACN/ácido acético glacial 0,05%, FM B: H_2O/ácido acético glacial 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-60% em 2 minutos, 60-80% em 2 minutos, 80-100% em 2 minutos, 100%-3minutos e 100-15% em 4 minutos: total corrida 21 minutos. Leitura em 312 nm e espectro de UV obtido também em 312 nm.

Abaixo vimos o espectro de ^1H obtido para o padrão ácido clorogênico (**Figuras 25 e 26**). Esta análise foi realizada em equipamento de 400MHZ, utilizando DMSO deuterado como solvente de solubilização.

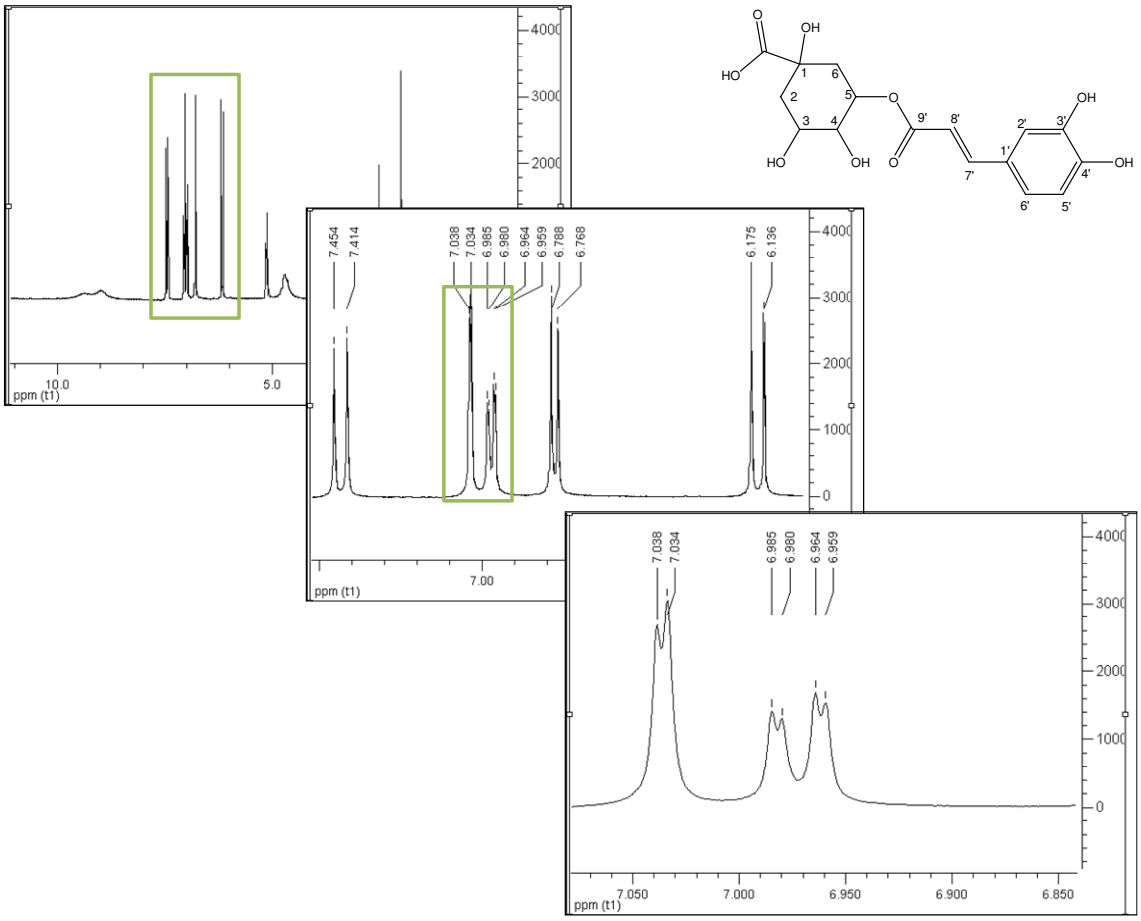


Figura 25. Espectro e expansões do espectro de RMN ^{1}H do ácido clorogênico (400 MHz, DMSO-*d6*).

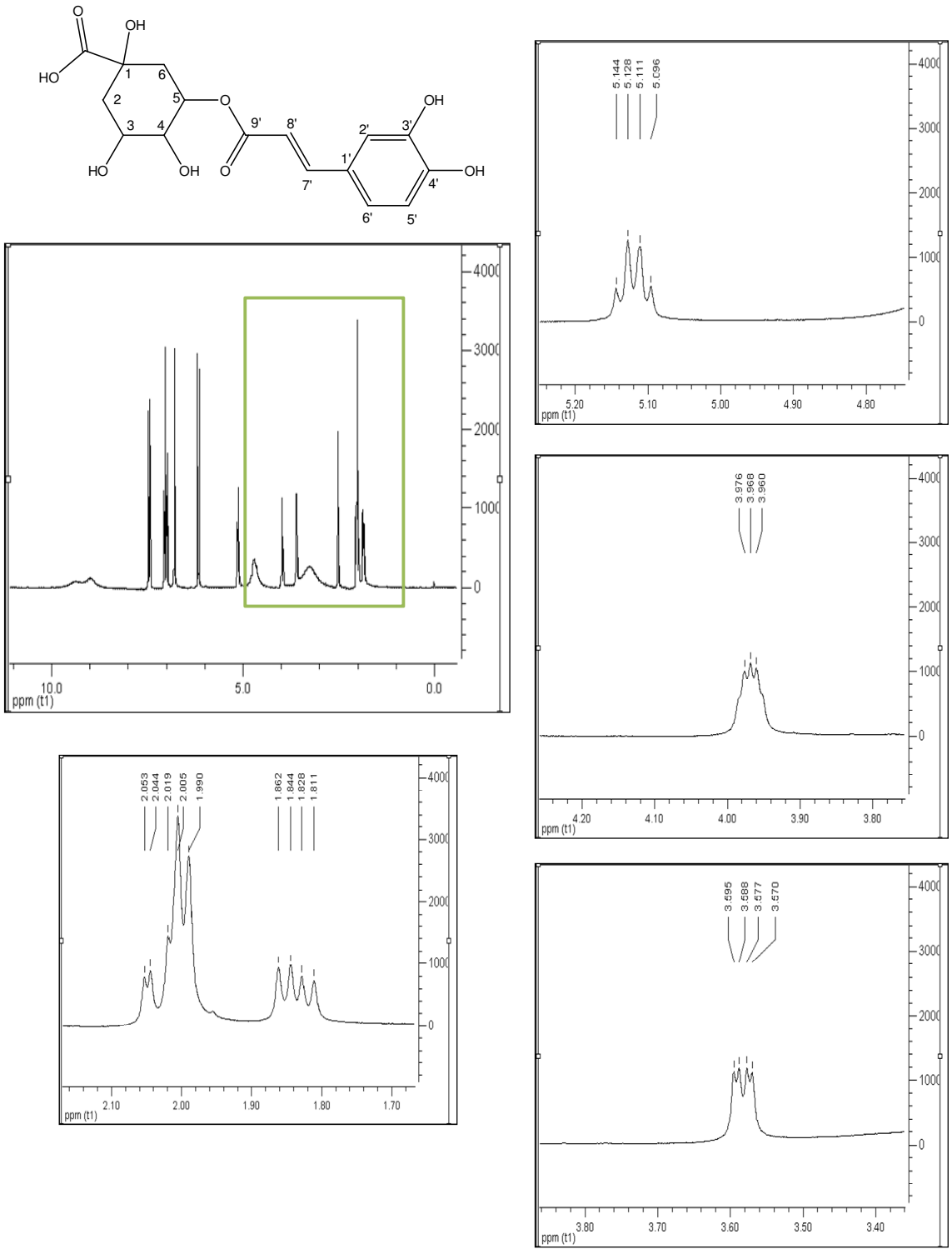


Figura 26. Espectro e expansões do espectro de RMN ^{1}H do ácido clorogênico (400 MHz, DMSO-*d6*).

Conforme pode ser visto no espectro de ^{1}H do ácido clorogênico, os deslocamentos químicos dos hidrogênios vinílicos estão como dubletos sendo o mais desblindado em δ 7,43 ppm (H-8') e o menos blindado em δ 6,15 ppm (H-7'), com *J* =

16 Hz. Os deslocamentos químicos dos hidrogênios aromáticos apresentam-se da seguinte maneira: um dubleto δ 6,98 ppm (H-5'), um dubleto δ 7,03 ppm (H-6') e um dubleto em δ 6,96 ppm (H-2').

Os hidrogênios da porção do ácido quínico apresentam sinais na forma de multipletos nas regiões δ 1,76 ppm a 2,1 ppm, sendo esses referentes aos hidrogênios nas posições 2 e 6 do ácido 5-cafeoilquínico. Nas regiões de δ 3,5 ppm e 5,14 ppm ligados a carbonos metoxílicos encontramos sinais que se apresentam na forma de multipletos referentes aos outros hidrogênios encontrados no ciclohexano, os quais apresentam-se na região mais desblindada do espectro devido ao efeito indutivo .

Tabela 3. Dados de RMN de ^{1}H do ácido clorogênico (5-dicafeoilquínico).

H	^{1}H (δ) [a]	^{1}H (δ) [b]
1	-	-
2		2,04 (*m*); 2,17 (*m*)
3	1,76-2,1 (*m*)	4,09 (*m*)
4	3,5-5,14 (*m*)	3,75 (*dd*, *J* = 3,2 e 9,9 Hz)
5		5,33 (*td*, *J* = 4,8 e 10 Hz)
6		2,04 (*m*); 2,17 (*m*)
1'	-	-
2'	6,96 (*d*)	7,14 (*d*, *J* = 2 Hz)
3'	-	-
4'	-	-
5'	6,98 (*d*)	6,89 (*d*, *J* = 8,4 Hz)
6'	7,03 (*d*)	7,05 (*dd*, *J* = 2,0 e 8,4 Hz)
7'	7,43 (*d*, *J* = 16 Hz)	7,60 (*d*, *J* = 15,9 Hz)
8'	6,15 (*d*, *J* = 16 Hz)	6,41 (*d*, *J* = 15,9)

[a] Dados obtidos experimentalmente para o ácido clorogênico, 400MHz, DMSO-*d6*. [b] [186]CHOI, J.; *et al.* 400MHz, CD_3OD.

[186] CHOI, J. *et al*. J. Nat. Prod., 69, 742, 2006

Como mencionado anteriormente, o padrão comercial ácido cafêico também foi analisado por CLAE e RMN. Abaixo na **Figura 27** está representado o cromatograma obtido por CLAE.

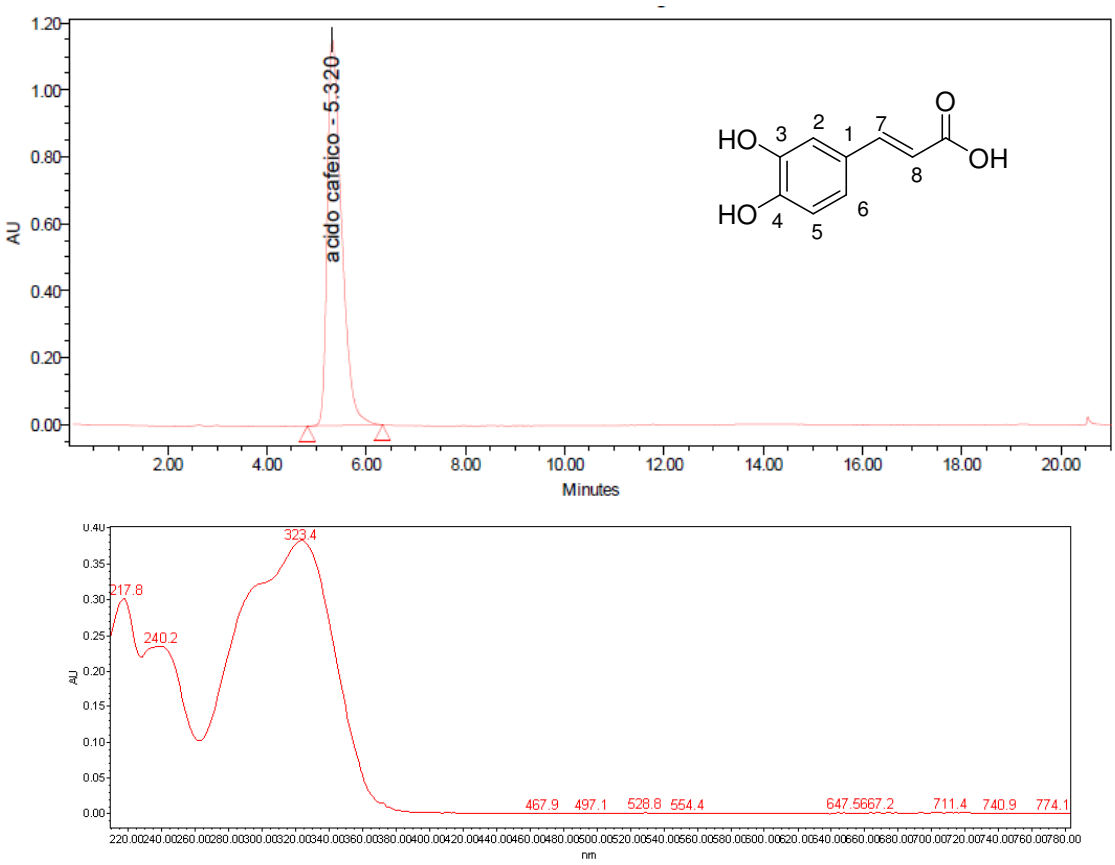


Figura 27. Perfil cromatográfico do padrão ácido cafêico, por CLAE: Coluna: X-terra C18, 4,6 x 150 mm, partículas de 5 µm, com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 30 °C. FM A: ACN/ácido acético glacial 0,05%, FM B: H_2O/ácido acético glacial 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-60% em 2 minutos, 60-80% em 2 minutos, 80-100% em 2 minutos, 100%-3minutos e 100-15% em 4 minutos: total corrida 21 minutos. Leitura em 312 nm e espectro de UV obtido também em 312 nm.

O ácido cafêico foi analisado em 400 MHz, solubilizado em DMSO deuterado e apresenta características de substância pura como podemos observar no espectro de RMN de ^1H apresentado a seguir, nas **Figuras 28 e 29**.

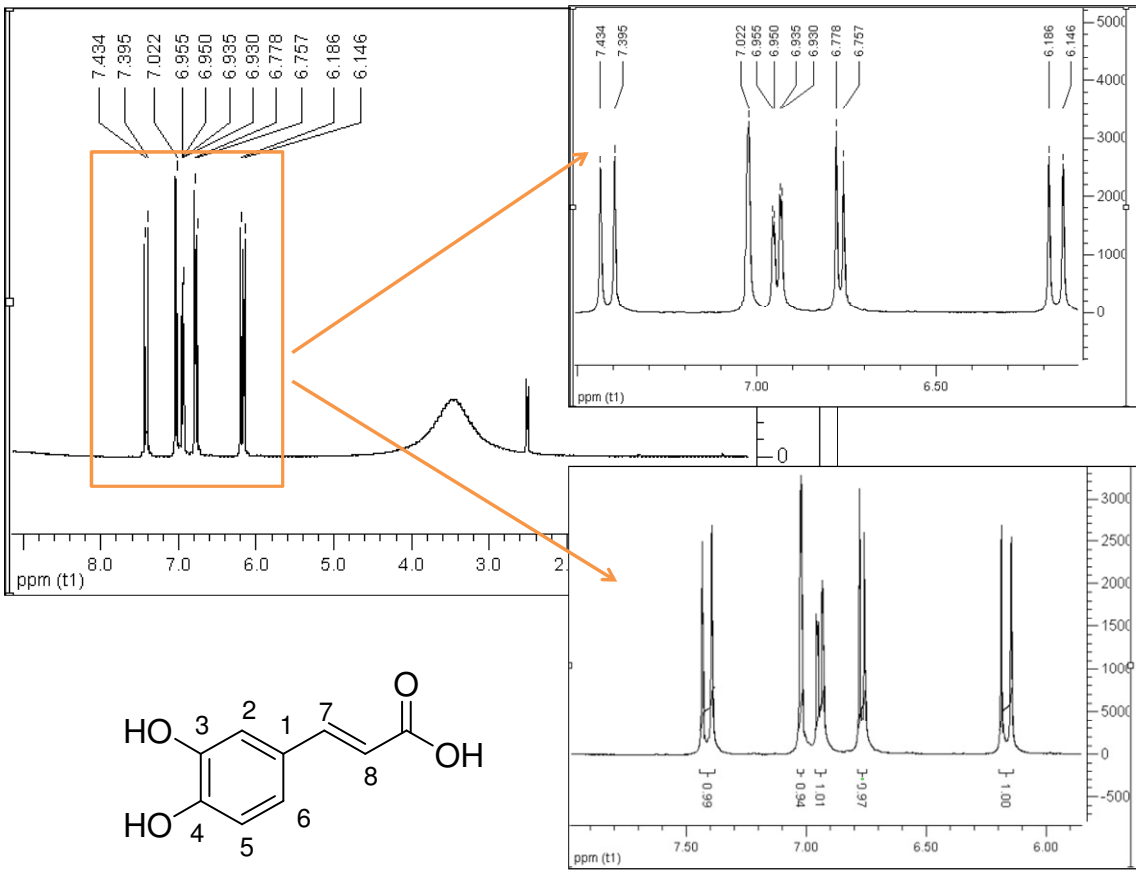


Figura 28. Espectro e expansões do espectro de RMN ^{1}H do ácido cafêico (400 MHz, DMSO-*d6*).

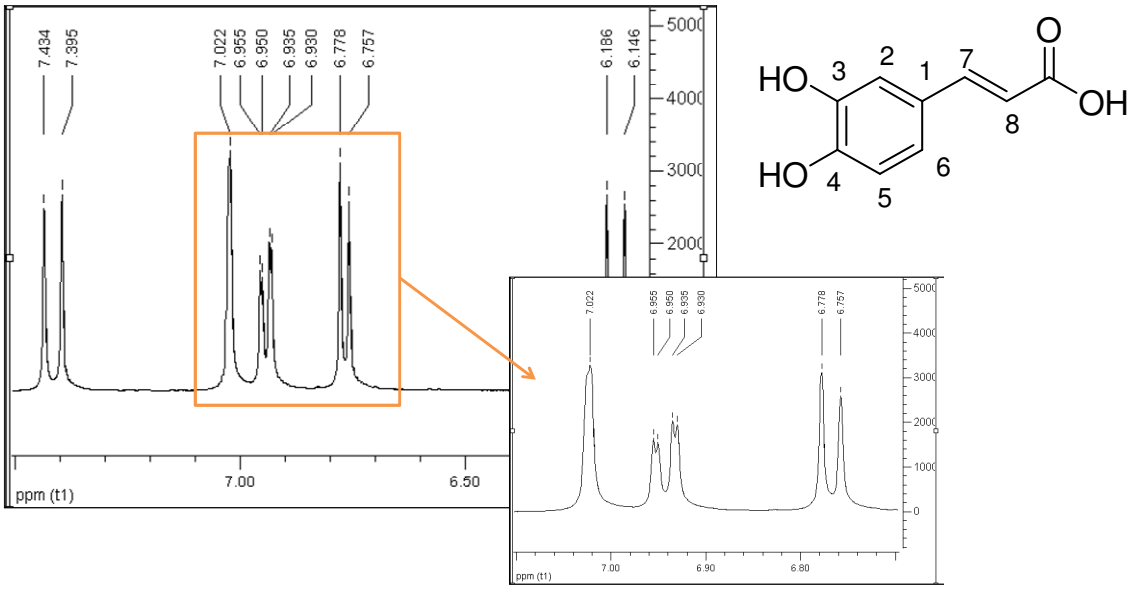


Figura 29. Espectro e expansões do espectro de RMN ^{1}H do ácido cafêico (400 MHz, DMSO-*d6*).

A análise do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-*d6*, **Figuras 28 e 29**) apresenta um singleto alargado em δ 7,02 ppm (H-2) e um dubleto em δ 6,76 ppm (*J* = 8,4 Hz- H5) e um duplo dubleto em δ 6,94 ppm (*J* = 8,0 - H-6), os quais indicavam a presença de um anel aromático 1,3,4- trissubstituído permitindo concluir que o derivado de ácido cinâmico em análise é o ácido cafêico[187].

Os dubletos em δ 6,16 ppm (*J* = 16 Hz – H-7) e δ 7,41 ppm (*J* = 15,2 Hz – H-8) auxiliaram a caracterização do composto como sendo o ácido cafêico[188].

Tabela 4. Dados de RMN de ^{1}H do ácido cafêico

H	Ácido cafêico ^{1}H (δ)[a]	^{1}H (δ) [b]
1	-	-
2	7,02 (1H, *s*)	7,02 (1H, *d*, *J* = 2,5 Hz)
3	-	-
4	-	-
5	6,76 (1H, *d*, *J* = 8,4 Hz)	6,76 (1H, *d*, *J* = 8,5 Hz)
6	6,94 (1H, *dd*, *J* = 8,0)	6,95 (1H, *dd*, *J* = 8,5 e 2,5 Hz)
7	6,16 (1H, *d*, *J* = 16 Hz)	6,17 (1H, *d*, *J* = 16 Hz)
8	7,42 (1H, *d*, *J* = 15,2 Hz)	7,38 (1H, *d*, *J* = 16 Hz)

[a] Dados obtidos experimentalmente para o ácido cafêico, 400MHz, DMSO-*d6*. [b] [188] PALE, *et al*, 2003.

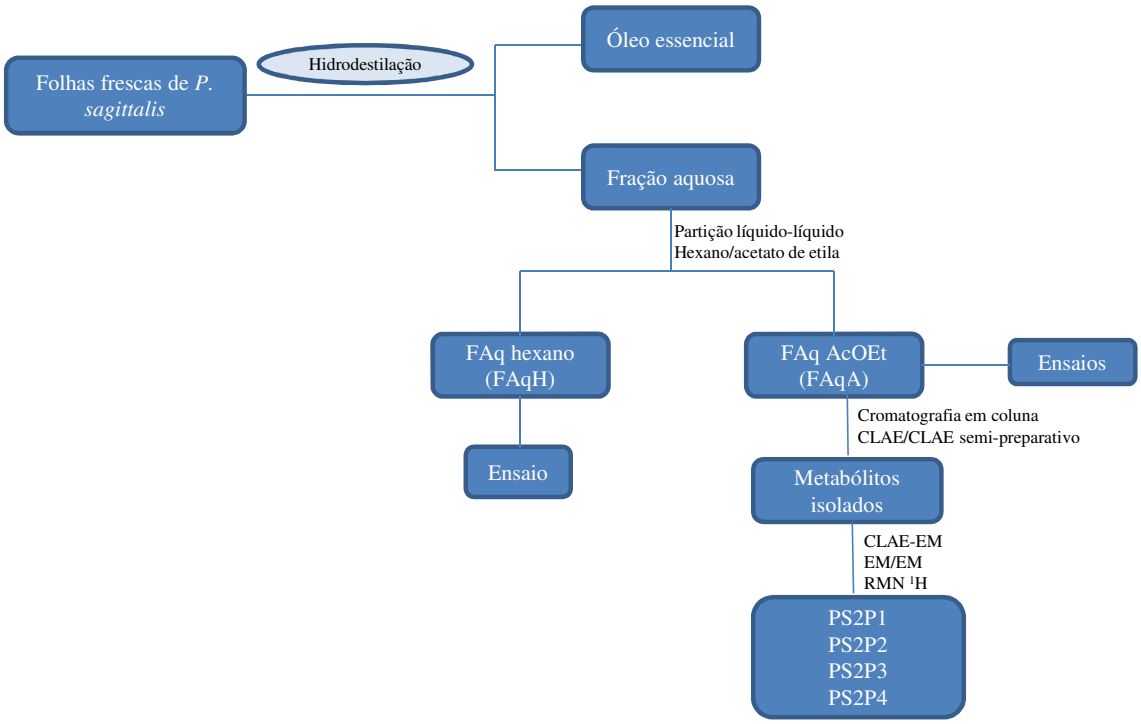
[187] REGASINI, L. O.; *et al*. Quimica Nova, 4, 31, 802, 2008.
[188] PALE, E.; *et al*. Phytochemistry, 64, 1395, 2003

5.3 Análise dos extratos e isolamento dos componentes majoritários

5.3.1 *Pluchea sagittalis*

5.3.1.1 Folhas

O **Esquema 15** abaixo apresenta o fracionamento que foi realizado com as folhas de *Pluchea sagittalis.*



Esquema 15. Extração líquido-líquido da fração aquosa das folhas de *P. sagittalis*

5.3.1.1.1 Fração aquosa acetato das folhas de *P. sagittalis*:

A fração aquosa acetato de etila obtida das folhas de *P. sagittalis* foi analisada por CLAE, estando o cromatograma obtido apresentado na **Figura 30**.

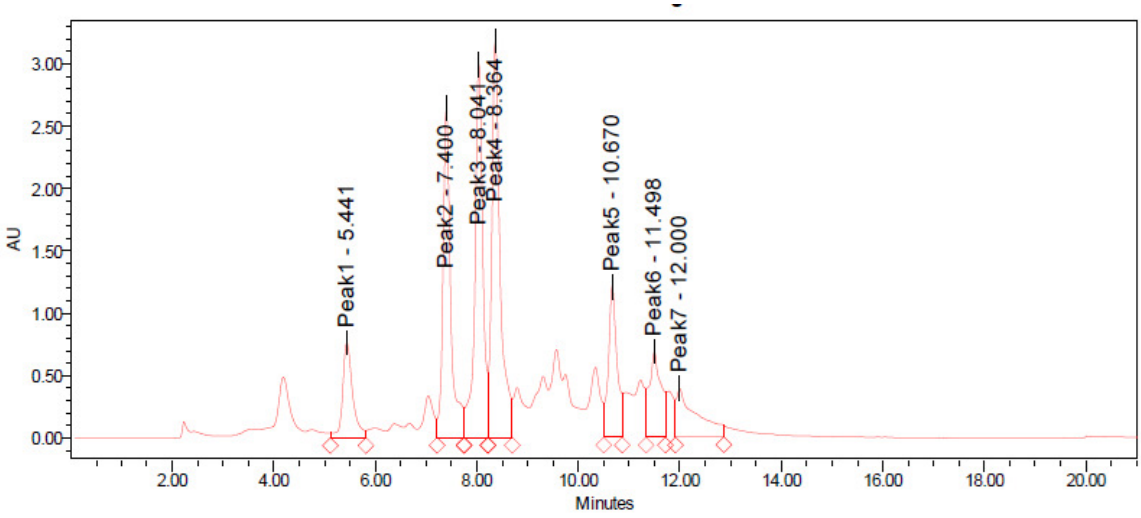


Figura 30. Perfil cromatográfico, por CLAE, da FAqA *P. sagittalis*: Coluna: X-terra C18: 4,6 x 150 mm, partículas de 5 µm, com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 30 °C. **FM A:** ACN/ácido acético glacial 0,05%, **FM B:** H_2O/ ácido acético glacial 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-60% em 2 minutos, 60-80% em 2 minutos, 80-100% em 2 minutos, 100%-3minutos e 100-15% em 4 minutos: total corrida 21 minutos. Leitura em λ = 312 nm.

Posteriormente, esta fração (FAqA) foi submetida a uma filtração prévia por cromatografia em coluna cromatográfica e as sub-frações obtidas foram analisadas por CLAE. Na coluna de filtração foram colocados 180 mg da FAqA em uma pastilha de metanol. O empacotamento foi em diclorometano, utilizando sílica gel (35-70 µm) como fase estacionária e solventes com polaridades crescentes como eluentes. Estes estão apresentados na **Tabela 5**, juntamente com as frações obtidas no fracionamento.

Tabela 5. Frações obtidas com os respectivos sistemas solventes utilizados na filtração d FAqA de folhas de *P. sagittalis.*

Fração	*Sistema solvente*	*Denominação*	*Massa*
1-15	D 100%	clorofila	-
16-20	D/A 1:1		
21-23	A 100%		
24-30	A/M 1:1	**PS2**	134mg
31-46	M 100%		
47-61	M/água 1:1		-
62-83	água 100%		-

As frações obtidas após filtração em coluna cromatográfica foram analisadas por CLAE e apresentaram perfis muito semelhantes. Foram então reunidas e denominadas PS2. Esta fração foi submetida ao CLAE semi-preparativo para o isolamento de seus constituintes. Neste processo cromatográfico utilizou-se como sistema solvente acetonitrila / água 15-40% em 30 minutos. Uma diluição de 31 mg da amostra (PS2) foi preparada em 5 mL de acetonitrila/água 1:4, sendo injetados no semi-preparativo 4,5 mL da mesma. A leitura foi em λ = 220 nm.

A **Figura 31** apresenta o perfil cromatográfico após reunião das frações obtidas na coluna cromatográfica (amostra PS2), enquanto a **Figura 32** traz o cromatograma obtido no CLAE semi-preparativo. Podem-se observar semelhanças entre o cromatograma inicial (**Figura 30**) e o cromatograma obtido após a reunião das frações retiradas da coluna de filtração (**Figura 31**).

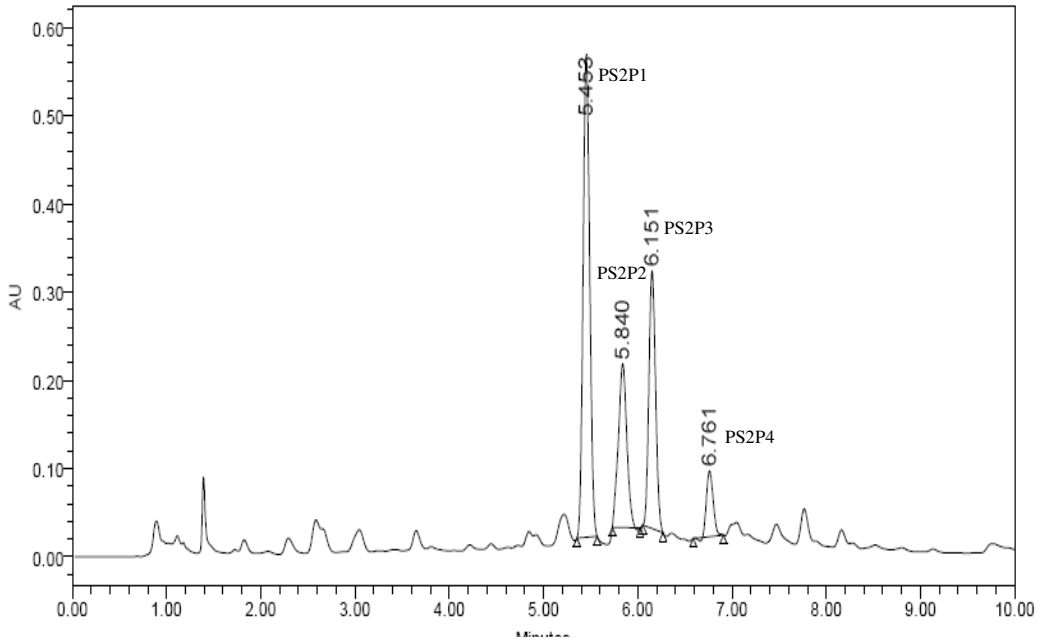


Figura 31. Perfil cromatográfico, por CLAE, da FAqA *P. sagittalis* (PS2) após filtração: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna equivalente e temperatura do forno em 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 2 minutos: total corrida 10 minutos. Leitura em λ = 312 nm.

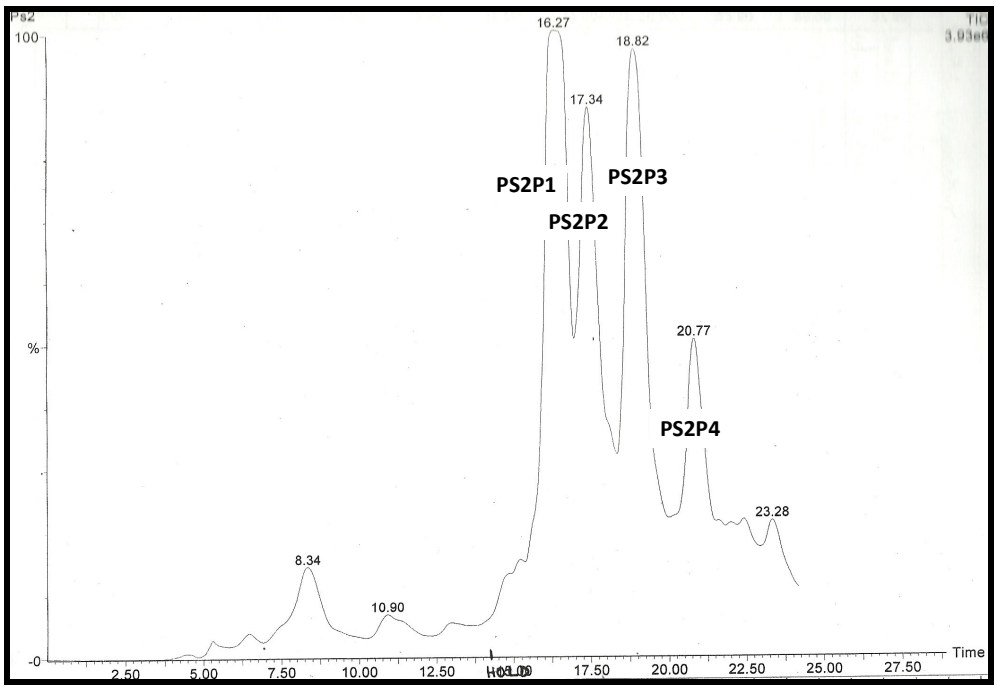


Figura 32. Análise por CLAE semi-preparativo da FAqA *P. sagittalis* (PS2) após filtração: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 200 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 2 mL min^{-1}, 15-40% em 30 minutos. Leitura em 220 nm.

Após a injeção da amostra PS2 no CLAE semi-preparativo, foram obtidos 4 compostos isolados: PS2P1, PS2P2, PS2P3 e PS2P4. Os cromatogramas dos metabólitos isolados e de CLAE/EM no modo negativo estão colocados abaixo, no momento da descrição dos metabólitos isolados.

O procedimento experimental realizado na análise do CLAE-EM está descrito na parte experimental da tese e foi o mesmo para todos os metabólitos isolados.

A identificação estrutural dos componentes isolados foi realizada a partir da comparação de dados obtidos de massa de alta resolução (EMAR)**,** em comparação com dados de literatura[34,36,39]. Espectros de ^{1}H foram obtidos para os metabólitos isolados e auxiliaram na determinação estrutural dos mesmos. Não foi possível a elucidação estrutural do metabólito PS2P4.

5.3.1.1.1.1 PS2P1:

O composto PS2P1 apresentou-se como um pó bege. Sua identificação estrutural foi realizada através da comparação dos dados obtidos por espectrometria de massas de alta resolução com dados da literatura[34,36]. Sendo este metabólito identificado como ácido 3,4-dicafeoilquínico, também conhecido como ácido isoclorogênico A (**Figura 33**).

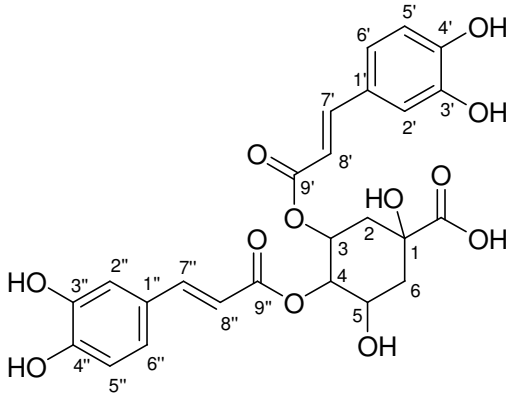


Figura 33. Estrutura do ácido 3,4-dicafeoilquínico

Na **Figura 34**, vimos o cromatograma obtido por CLAE do metabólito isolado. Seu espectro de UV está representado na **Figura 35**. Já na **Figura 36**, está o espectro de massa no modo negativo (CLAE/EM) também para o metabólito isolado. As fragmentações estão dispostas na **Figura 37**, enquanto o espectro de ^{1}H obtido

encontra-se na **Figura 38** e sua expansão na **Figura 39**. A **Tabela 6** apresenta os dados de EM/EM obtidos para o composto PS2P1 em comparação com os dados de literatura.

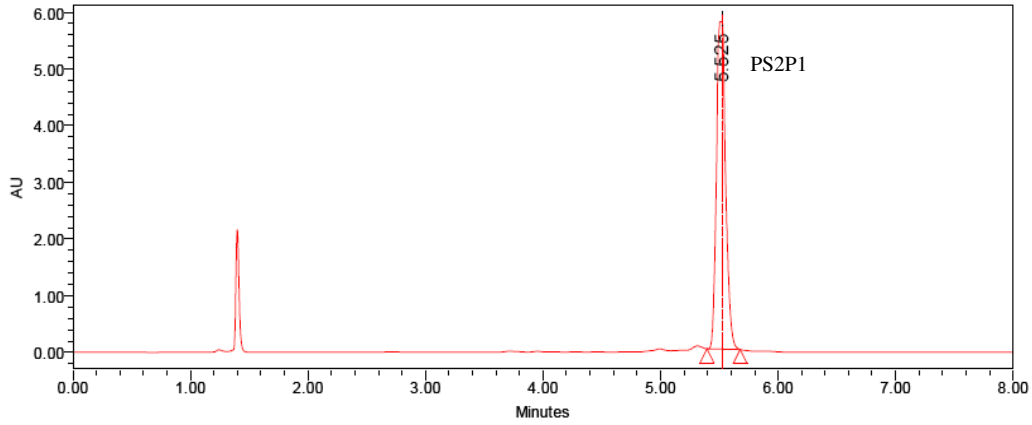


Figura 34. Perfil cromatográfico do composto isolado PS2P1, por CLAE: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 2 minutos: total corrida 10 minutos. Leitura em 312 nm.

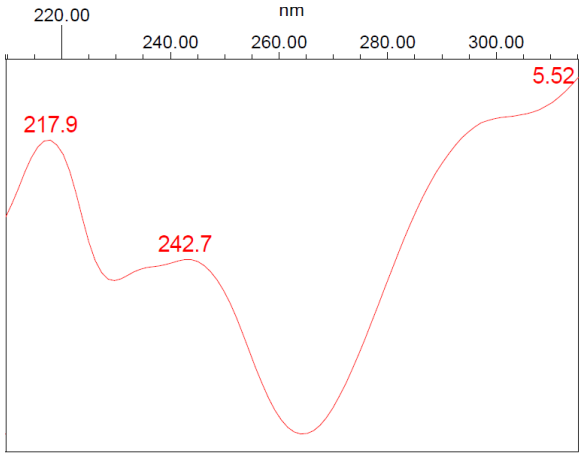


Figura 35. Espectro de UV obtido para o metabólito PS2P1, em 312 nm, após análise no CLAE.

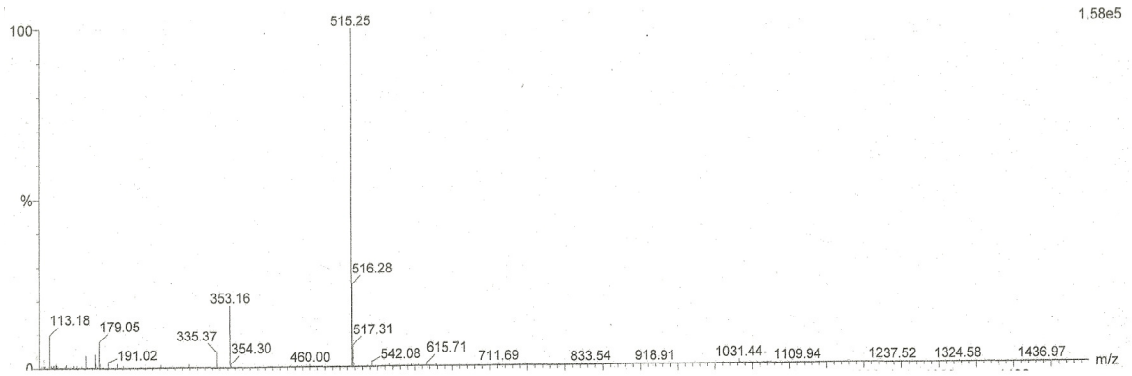


Figura 36. Espectro de massa obtido em CLAE-EM no modo negativo para o metabólito PS2P1.

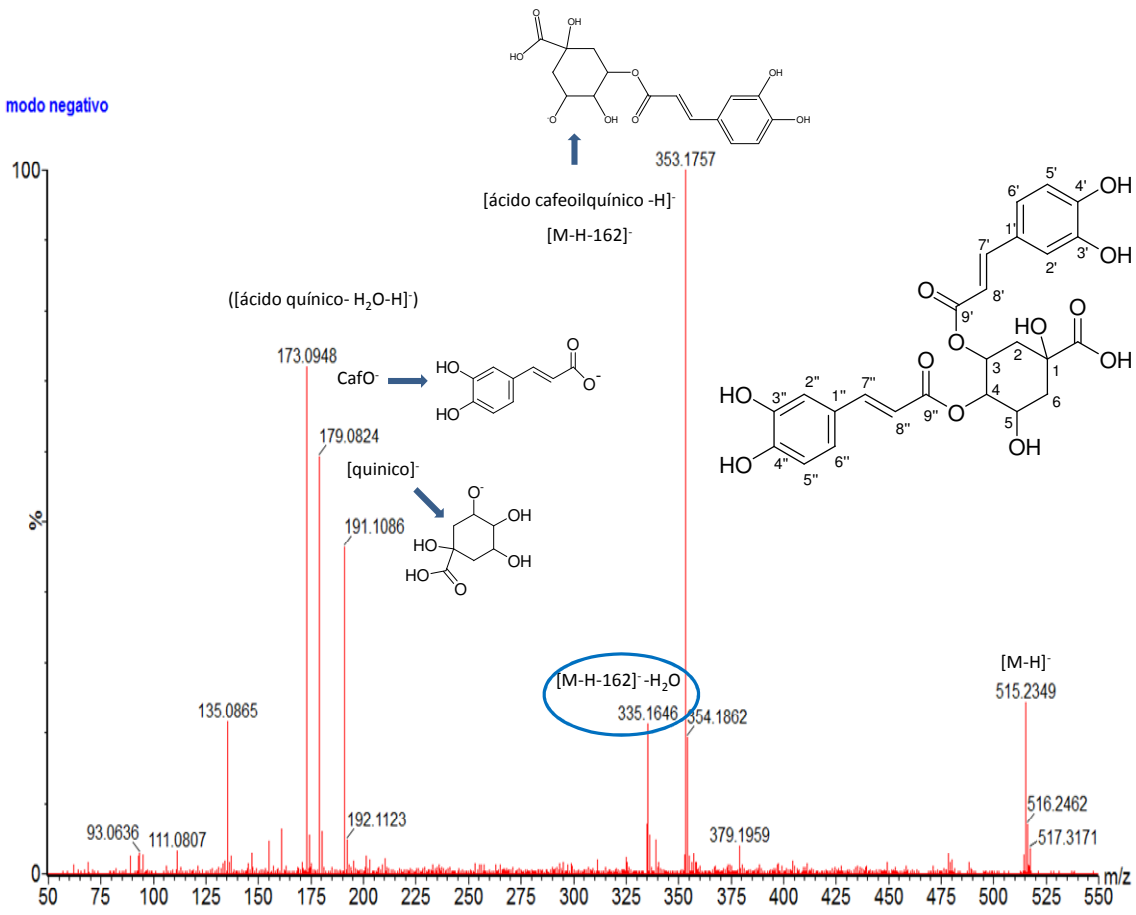


Figura 37. Espectro de EM/EM do íon $[M-H]^-$ 515,2349 (modo negativo). Análise do composto isolado PS2P1, por infusão direta utilizando solução ACN : H_2O (1:1) 0,1% TFA. Equipamento utilizado: Synapt HDMS Q-TOF (Waters Co.)

Tabela 6. Dados de EM/EM obtidos para o metabólito PS2P1.

	(M-H)	EM/EM					
		m/z	*m/z*	*m/z*	*m/z*	*m/z*	*m/z*
PS2P1[a]	515,2349	353,1757	335,1646	191,1086	179,0824	173,0948	135,0865
3,4-diACQ[34]	515,7	353,4	335,6	191,7	179,5	172,9	135,6
3,4-diACQ[36]	515,1	353	335,1	191,1	179,1	173	135,1

[a]Dados obtidos experimentalmente para PS2P1.

A partir da análise do espectro de massas (modo negativo) e da tabela acima, onde temos a comparação entre os dados obtidos para o composto isolado PS2P1 com os dados de literatura, algumas considerações podem ser feitas em relação a este metabolito isolado para determinação de sua estrutura.

O pico de massa *m/z* 515, 2349 corresponde a um íon desprotonado, caracteriza a fórmula molecular $C_{25}H_{23}O_{12}^-$ e é característico da classe dos dicafeoilquínicos (di-ésteres do ácido cafêico)[189].

A fragmentação do íon *m/z* 515, 2349 produziu os íons 353,1757 (pico base), 335,1646, 191,1086, 179,0824 e 173, 0948 (**Figura 37**), sendo que este último íon produto confirma a esterificação do ácido cafêico na posição 4 do ácido quínico. Sendo assim, os isômeros possíveis para PS2P1 seriam os ácidos 1,4; 3,4 ou 4,5-dicafeoiquínicos, porém o íon produto *m/z* 335, 1646 [34], formado pela perda de uma unidade cafeoila e H_2O, exclui o ácido 4,5-dicafeoilquínico, pois neste isômero este íon é pouco intenso, sendo na maioria das vezes não detectado. No espectro de PS2P1 também não estão presentes íons produtos de *m/z* 299 e *m/z* 203, os quais estão presentes no ácido 1,4-dicafeoilquínico, sendo assim determinou-se que o metabolito isolado PS2P1 é o **ácido 3,4-dicafeoilquínico**[34,36,190.]

Os picos de massa *m/z* 173, 179 e 191 são característicos de derivados de ácidos cafeoilquínicos, sendo observados na maioria dos derivados do ácido clorogênico[191, 59].

[189] WEISZ, G. M.; KAMMERER, D. R.; CARLE, R. Food Chem., 115, 758, 2009.
[190] SCHRAM, K.; *et al*. J. Mass Spectrom., 39, 384, 2004.
[191] JAISWAL, R.; KUHNERT, N. Rapid Commun. Mass Spectrom., 24, 2283, 2010.

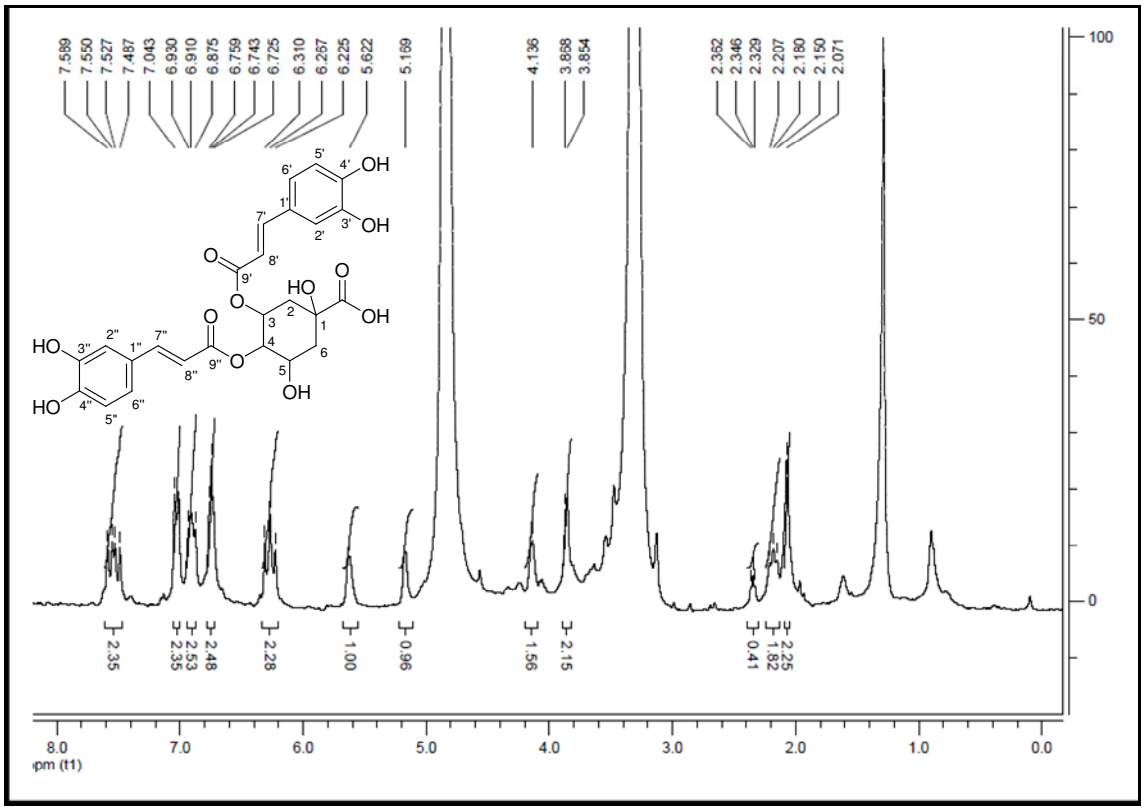


Figura 38. Espectro de RMN de ^{1}H do metabólito PS2P1 em MeOD a 400MHz.

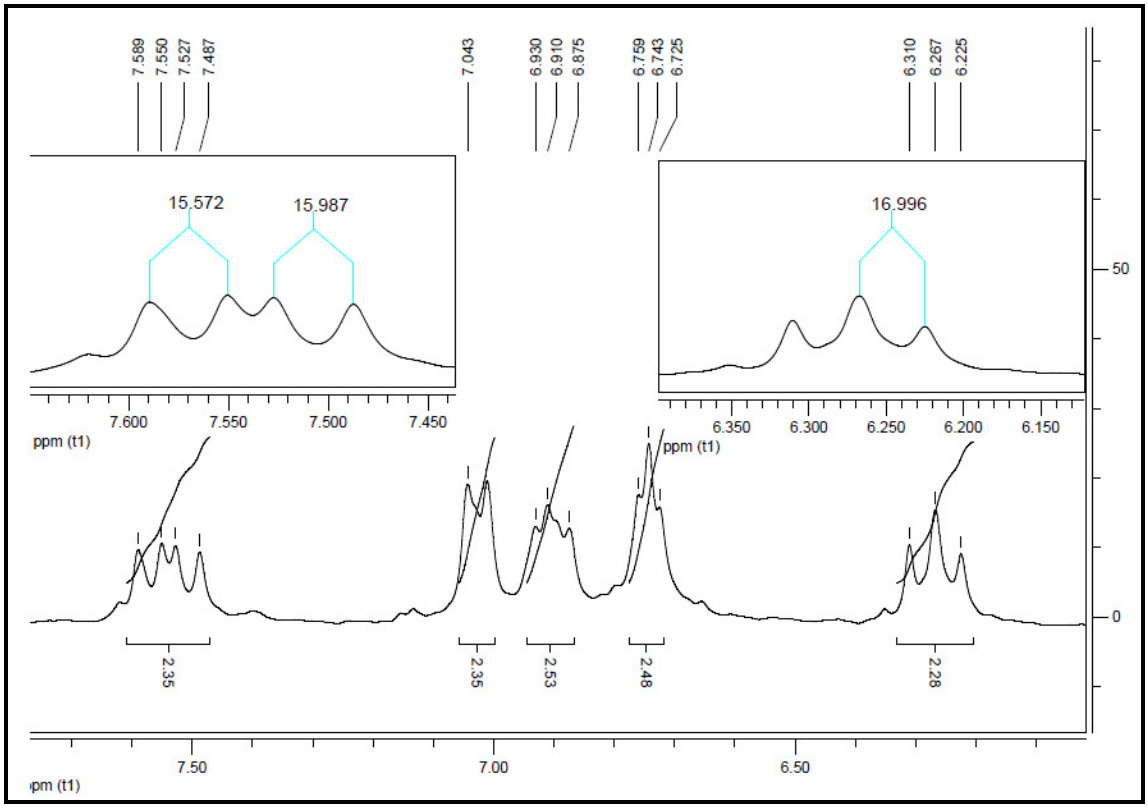


Figura 39. Expansão do espectro de RMN de ^{1}H do metabólito PS2P1 em MeOD a 400MHz.

A análise do espectro de RMN de ^{1}H **(Figuras 38 e 39)** mostrou, para a substância **PS2P1,** a presença de duas unidades cafeoíla devido aos sinais de dois grupos de hidrogênios vinílicos em δ 7,57 ppm e 7,5 ppm (*d***,** H-8'e H-8'', *J* = 15,5 Hz e 15,9 Hz) e δ 6,267 ppm (*t* alargado, H-7'e H-7''), dois hidrogênios aromáticos em δ 7,02 ppm (*d*, H-5' e H-5") na forma de dubletos com *J* = 15,9 Hz, sugerindo acoplamento *orto* no anel aromático, de um multipleto largo em δ 6,91 ppm (H-2'e H-2") e de dois hidrogênios aromáticos como multipleto em δ 6,74 ppm (H-6'e H-6").

Além desses sinais o espectro de RMN de ^{1}H mostrou a presença de sinais compreendidos na faixa de δ 2,07 – 2,36 ppm, característicos de hidrogênios do anel ciclohexano do ácido quínico. A **Tabela 7** resume dos dados obtidos experimentalmente para o metabolito PS2P1, bem como dados da literatura do ácido 3,4-dicafeoilquinico.

Tabela 7. Dados de RMN de ^{1}H do ácido 3,4-dicafeoilquínico

H	Ácido 3,4-dicafeoilquínico ^{1}H (δ) [a]	^{1}H (δ) [b]
2	*m* entre 2,07 – 2,36, referentes aos H do anel quínico (H-2 – H-6)	2,15 (*m*); 2,37 (*dd*, *J* = 3,7 e 14,9 Hz)
3		5,65 (*ddd*, *J* = 3,4, 3,7 e 4,3Hz)
4		5,01 (*dd*, *J* = 3,4 e 9 Hz)
5		4,39 (*ddd*, *J* = 4,3, 9 e 10,3 Hz)
6		2,11 (*dd*, *J* = 10,3 e 11,9 Hz); 2,25 (*m*)
2’	6,91 (*m* alargado)	7,03 (*d*, *J* = 2 Hz)
3’	-	-
4’	-	-
5’	7,02 (*d*, *J* = 12,8 Hz)	6,74 (*d*, *J* = 8,3 Hz)
6’	6,74 (*m*)	6,87 (*dd*, *J* = 2 e 8,3 Hz)
7’	7,57 (*d*, *J* = 15,5 Hz)	7,55 (*d*, *J* = 15,9 Hz)
8’	6,26 (*t* alargado)	6,27 (*d*, *J* = 15,9 Hz)
2’’	6,91 (*m* alargado)	7,05 (*d*, *J* = 2 Hz)
3’’	-	-
4’’	-	-
5’’	7,02 (*d*, *J* = 12,9 Hz)	6,78 (*d*, *J* = 8,3 Hz)
6’’	6,74 (*m*)	6,93 (*dd*, *J* = 2 e 8,3 Hz)
7’’	7,5 (*d*, *J* = 15,9 Hz)	7,58 (*d*, *J* = 15,9 Hz)
8’’	6,26 (*t* alargado)	6,30 (*d*, *J* = 15,9 Hz)

[a] Dados obtidos experimentalmente para PS2P1, 400MHz, MeOD, [b] [192] SATAKE, T.; *et al* 400MHz, CD_3OD

[192] SATAKE, T.; *et al.* J. Biol. Pharm. Bull., 30, 935, 2007.

5.3.1.1.1.2 PS2P2

O composto PS2P2 foi identificado como sendo o ácido 3,5-dicafeoilquinico (**Figura 40**) após comparação de dados de massa de alta resolução da literatura[34,36] com os dados obtidos apresentados na **Tabela 8**, abaixo. Este composto apresenta-se com um pó amarelo e seu cromatograma no CLAE encontra-se na **Figura 41**, enquanto que seu espetro de UV está na **Figura 42**. O espectro de massas no modo negativo está na **Figura 43** e as fragmentações obtidas por EM/EM estão na **Figura 44**.

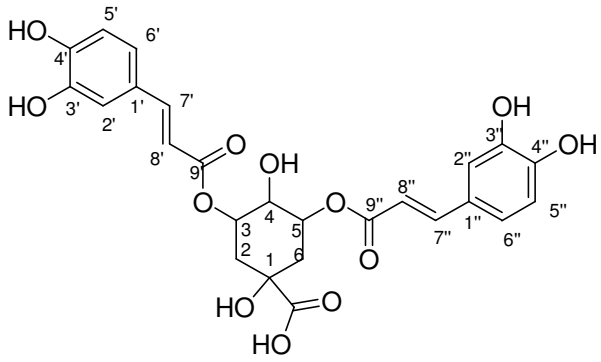


Figura 40. Estrutura do ácido 3,5-dicafeoilquínico

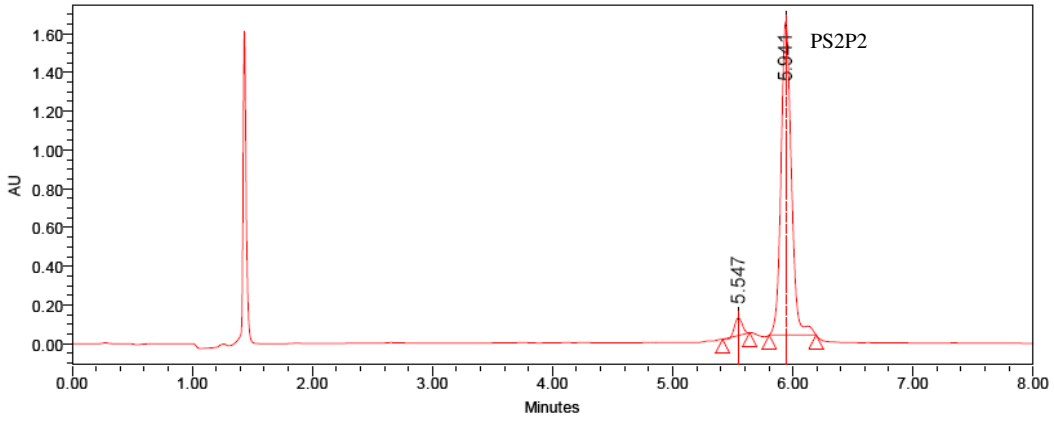


Figura 41. Perfil cromatográfico do composto isolado PS2P1, por CLAE: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 2 minutos: total corrida 10 minutos. Leitura em 312 nm.

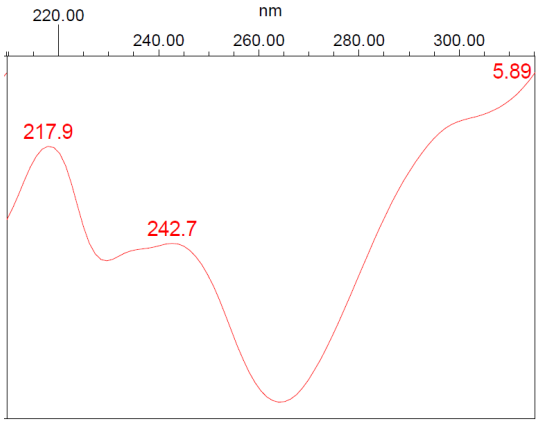


Figura 42. Espectro de UV obtido para o metabólito PS2P2, em 312 nm, após análise no CLAE.

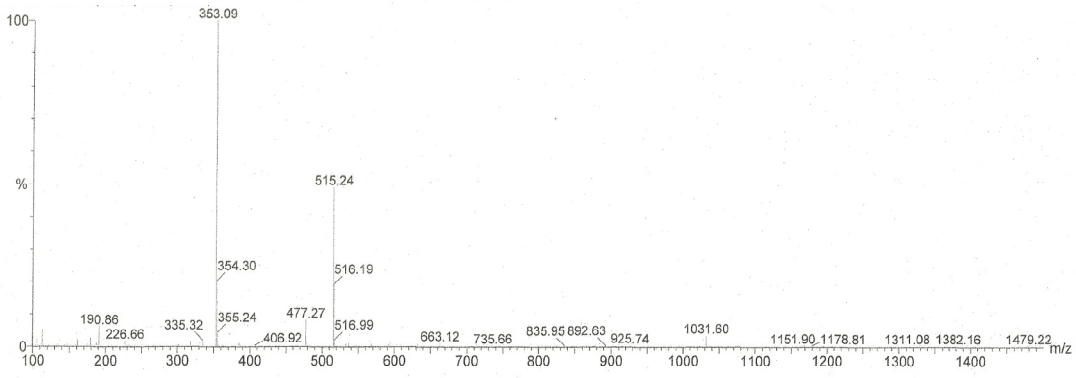


Figura 43. Espectro de massa obtido POR CLAE-EM no modo negativo para o metabólito PS2P2.

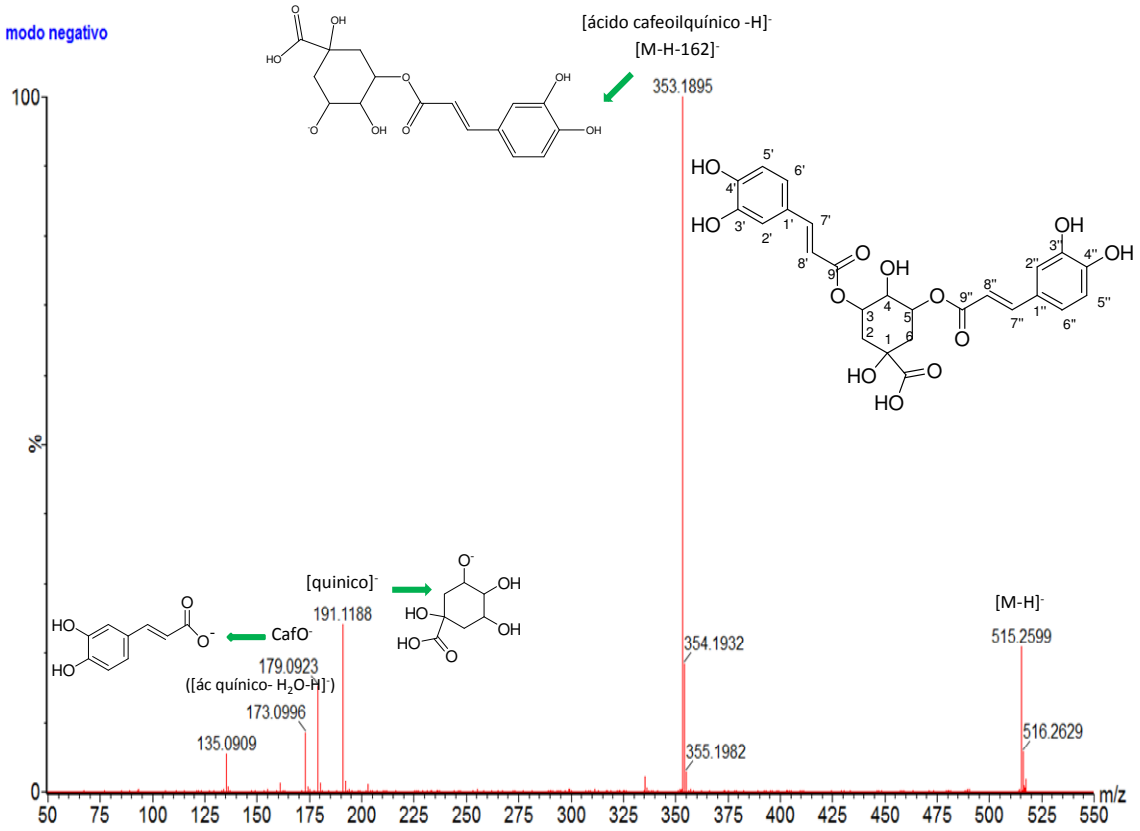


Figura 44. Espectro de EM/EM do íon $[M-H]^-$ 515,2629 (modo negativo). Análise do composto isolado PS2P2, por infusão direta utilizando solução ACN : H2O (1:1) 0,1% TFA. Equipamento utilizado: Synapt HDMS Q-TOF (Waters Co.)

Tabela 8. Dados de EM/EM obtidos para a amostra PS2P2.

	(M-H)	EM/EM				
		m/z	*m/z*	*m/z*	*m/z*	*m/z*
PS2P2[a]	515,2599	353,1895	191,1188	179,0923	173,0996	135,0909
3,5-diACQ[34]	515,2	353,5	191,5	179,5	173,5	135,6
3,5-diACQ[36]	515	353,1	191,2	179,2	-	135,1

[a]Dados obtidos experimentalmente para PS2P2.

Segundo Han e colaboradores (2009)[193], as diferenças de EM/EM podem ajudar muito na discriminação entre um ou outro isômero e isto acontece muito frequentemente com derivados dicafeoilquínicos.

O espectro de massas no modo de ionização negativo visualizado na **Figura 44**, exibiu o pico *m/z* 515,2599, sinal este que caracteriza a fórmula molecular $C_{25}H_{23}O_{12}$, a qual se refere a um derivado ácido dicafeoilquínico[189].

Na fragmentação do íon precursor *m/z* 515,2599 (**Figura 44**) foram formados os íons produtos de *m/z* 353,1895 (pico base), *m/z* 191,1188 e *m/z* 179,0923 e o íon produto *m/z* 173,0996 em baixa intensidade.

Segundo Clifford e colaboradores[34] a presença do pico *m/z* 179 em baixa concentração, ou seja, quando sua intensidade é muito menor que a metade do pico base, teremos o ácido 3,5-dicafeoilquinico. Isto, somado a ausência do íon produto *m/z* 335, o qual é formado pela perda de uma unidade cafeoil e H_2O, e a ausência dos íons de *m/z* 299 e *m/z* 203, presume-se que o metabolito isolado PS2P2 é o **ácido 3,5-dicafeoilquínico**[34,36,190]. O metabólito isolado PS2P2 foi também submetido a análise de RMN de ^1H estando o espectro obtido e sua expansão apresentados nas **Figuras 45** e **46**.

[193] HAN, T.; *et al.* Anal.Chim. Acta 634, 272, 2009.

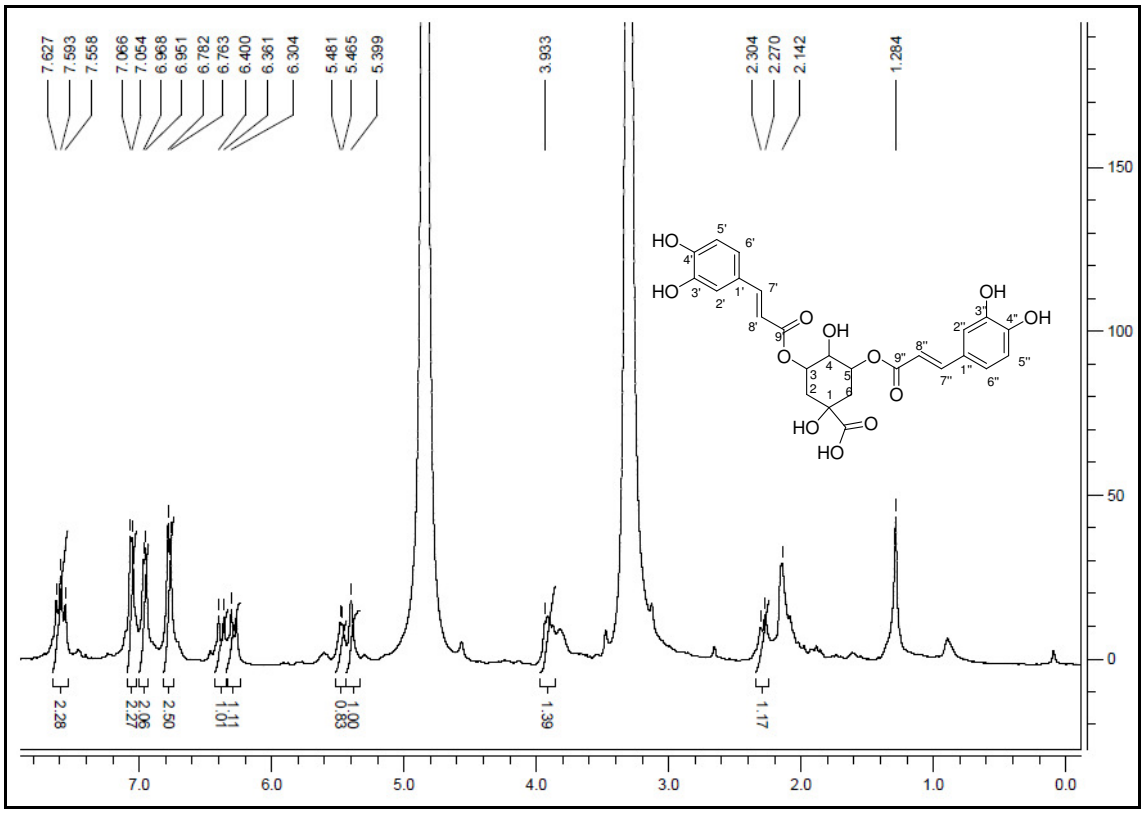


Figura 45. Espectro de RMN de ^{1}H do metabólito isolado PS2P2 em MeOD a 400MHz.

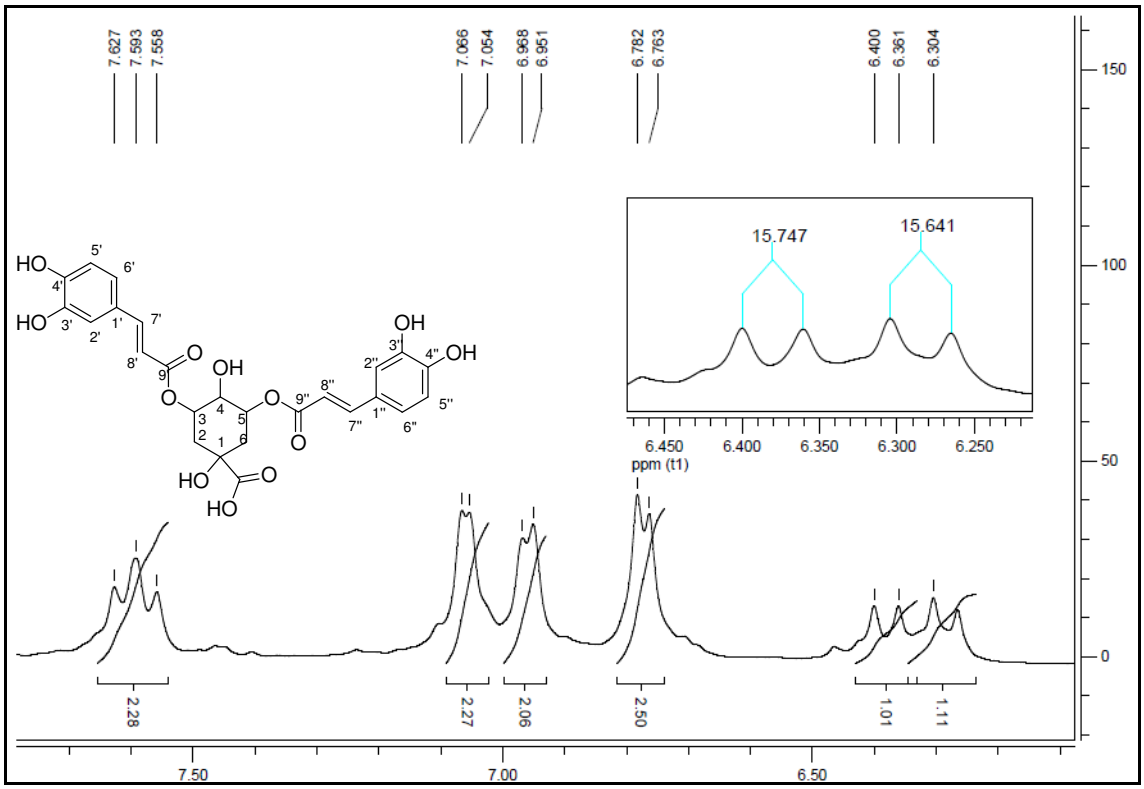


Figura 46. Expansão do espectro de RMN de ^{1}H do metabólito isolado PS2P2 em MeOD a 400MHz.

A estrutura da substância **PS2P2** foi determinada pela análise do espectro de RMN de ^{1}H **(Figuras 45 e 46)**, o qual mostrou a presença de duas unidades cafeoíla devido aos sinais de dois grupos de hidrogênios vinílicos em δ 7,59 ppm (*t* alargado, H-8'e H-8''), δ 6,38 ppm e 6,28 ppm (*d*, *J* = 15,6 Hz, H-7' e H-7"), de dois hidrogênios aromáticos em δ 7,06 ppm (*d*, H-2' e H-2''), sugerindo acoplamento meta (*J* =4,8), δ 6,95 ppm (*d*, H-5' e H-5"), sugerindo acoplamento em *orto* (*J* = 6,8) e em δ 6,77 ppm (*d*, H-6' e H-6"), também sugerindo acoplamento orto (*J*= 7,6).

Além desses sinais o espectro de RMN de ^{1}H mostrou a presença de sinais compreendidos na faixa de δ 1,2 – 2,3 ppm, característicos de hidrogênios do anel ciclohexano do ácido quínico. A **Tabela 9** resume os dados de RMN 1H obtidos para o PS2P2 e dados da literatura para o ácido 3,5-dicafeoilquinico.

Tabela 9. Dados de RMN de ^{1}H do ácido 3,5-dicafeoilquínico

H	Ácido 3,5-dicafeoilquínico ^{1}H (δ) [a]	^{1}H (δ) [b]
2	*m* entre 1,2 – 2,3, referentes aos H do anel quínico (H-2 – H-6)	2,13 – 2,34 (*m*)
3		5,43 (*m*)
4		3,97 (*dd*, *J* = 3,4 e 7,6 Hz)
5		5,39 (*ddd*, *J* = 5,9, 7,6 e 10,8 Hz)
6		2,13 – 2,34 (*m*)
2’	7,06 (*d*, *J* = 4,8 Hz)	7,06 (*d*, *J* = 2 Hz)
3’	-	-
4’	-	-
5’	6,95 (*d*, *J* = 6,8 Hz)	6,77 (*d*, *J* = 8,2 Hz)
6’	6,77 (*d*, *J* = 7,6 Hz)	6,96 (*dd*, *J* = 2 e 8,2 Hz)
7’	7,59 (*t* alargado)	7,57 (*d*, *J* = 16 Hz)
8’	6,38 (*d*, *J* = 15,6 Hz)	6,26 (*d*, *J* = 16 Hz)
2’’	7,06 (*d*, *J* = 4,8 Hz)	7,07 (*d*, *J* = 2 Hz)
3’’	-	-
4’’	-	-
5’’	6,95 (*d*, *J* = 6,8 Hz)	6,78 (*d*, *J* = 8,2 Hz)
6’’	6,77 (*d*, *J* = 7,6 Hz)	6,97 (*dd*, *J* = 2 e 8,2 Hz)
7’’	7,59 (*t* alargado)	7,61 (*d*, *J* = 16 Hz)
8’’	6,28 (*d*, *J* = 15,6 Hz)	6,34 (*d*, *J* = 16 Hz)

[a] Dados obtidos experimentalmente para PS2P2, 400MHz, MeOD, [b] [194]ZHU, X-F.; *et al*, 2004, 400MHz, CD_3OD

5.3.1.1.1.3 PS2P3

Esta substância foi isolada no CLAE semi-preparativo como um sólido amarelo, e sua identificação também de se deu pela comparação dos dados de massa de alta resolução com dados obtidos as literatura[34,36193] (**Tabela 10**), chegando-se a estrutura do ácido 4,5-dicafeoilquínico (**Figura 47**).

O cromatograma de CLAE do composto isolado está na **Figura 48** e o espectro da UV na **Figura 49**. O espectro obtido pela análise de CLAE-EM no modo negativo na

[194] ZHU, X-F.; ZHANG, H-X.; LO, R. J. Agric. Food Chem., 52, 7272, 2004.

encontra-se **Figura 50**, estando as fragmentações do EM/EM na **Figura 51**. O espectro de ^{1}H e sua expansão encontram-se nas **Figuras 52 e 53**.

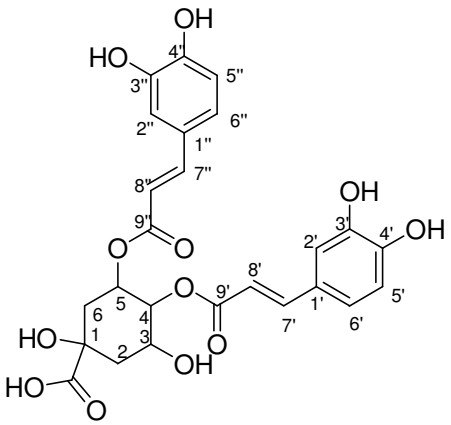


Figura 47. Estrutura do ácido 4,5-dicafeoilquínico

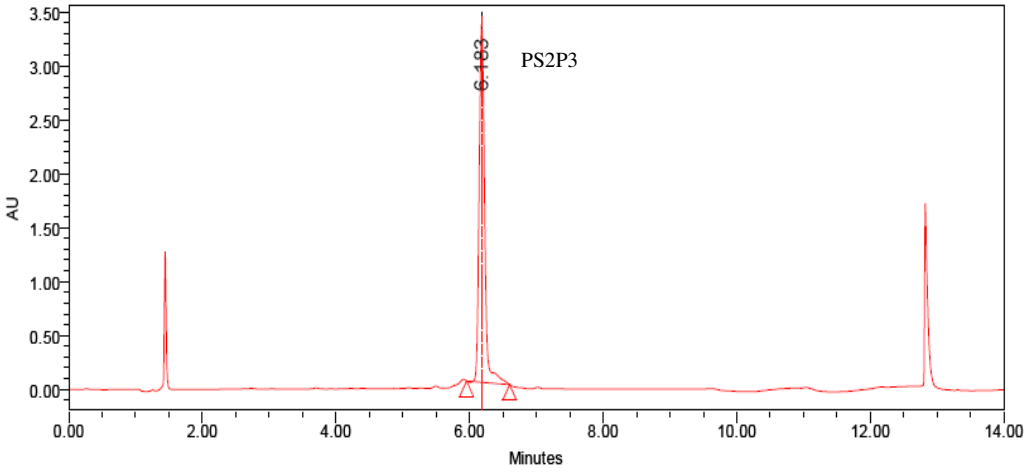


Figura 48. Perfil cromatográfico do composto isolado PS2P3, por CLAE: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 6 minutos: total corrida 14 minutos. Leitura em 312 nm.

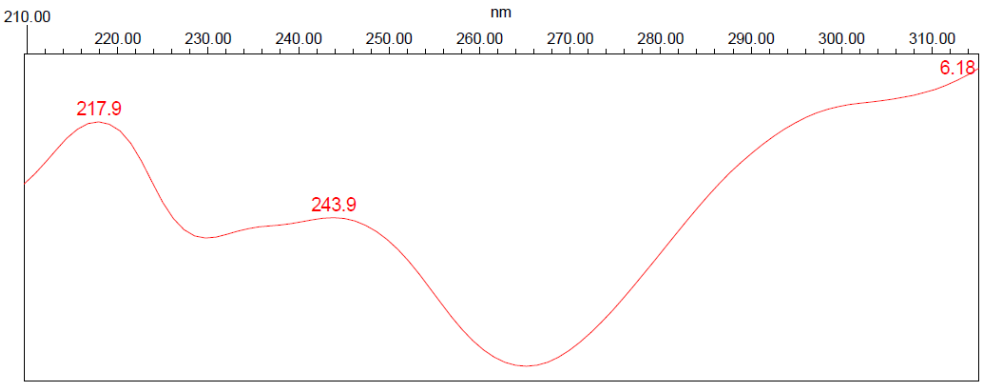


Figura 49. Espectro de UV obtido para o metabólito PS2P3, em 312 nm, após análise no CLAE.

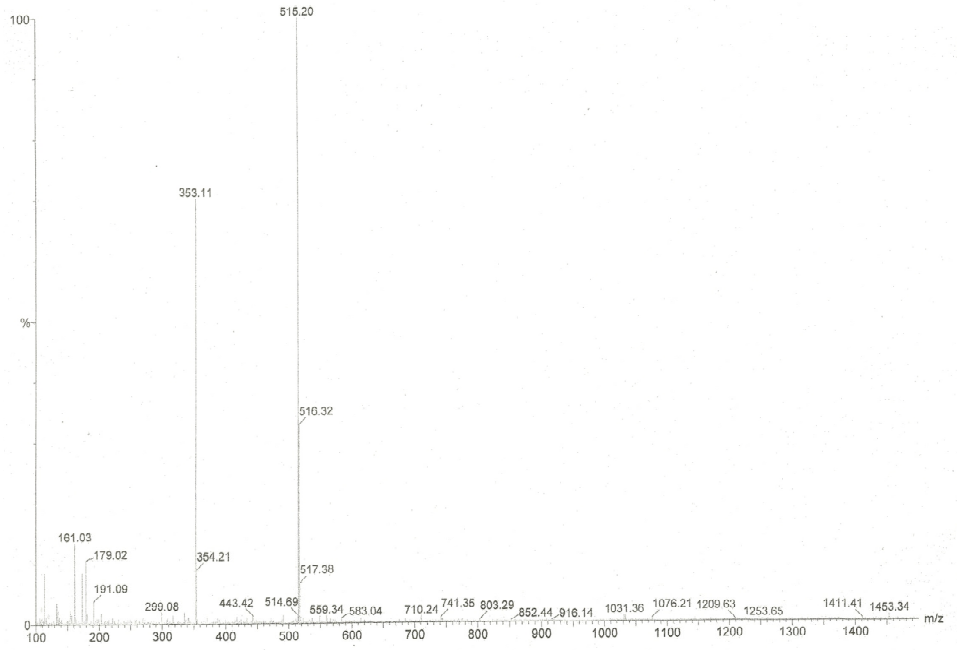


Figura 50. Espectro de massa obtido por CLAE-EM no modo negativo para o metabólito PS2P3.

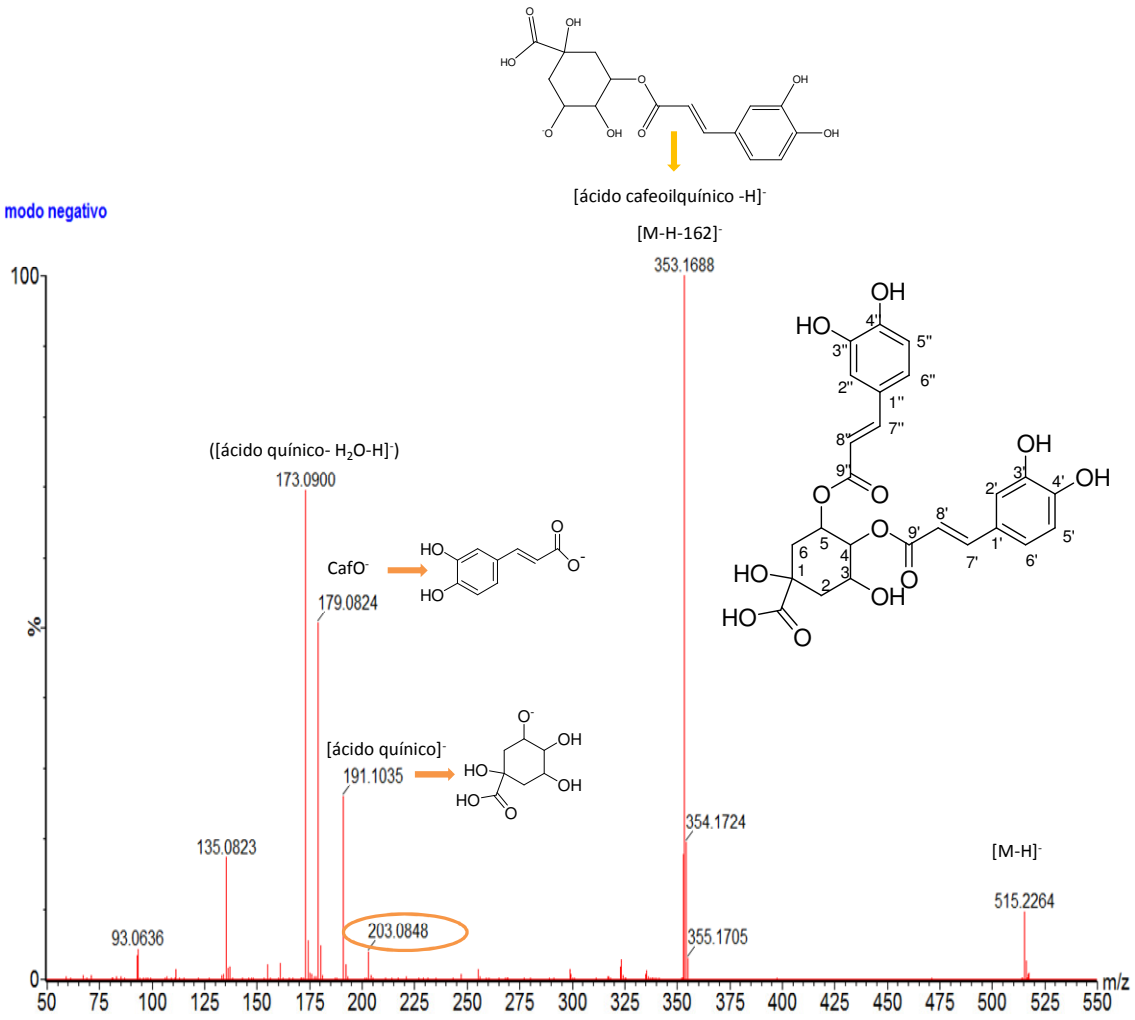


Figura 51. Espectro de EM/EM do íon $[M-H]^-$ 515,2264 (modo negativo). Análise do composto isolado PS2P3, por infusão direta utilizando solução ACN : H2O (1:1) 0,1% TFA. Equipamento utilizado: Synapt HDMS Q-TOF (Waters Co.)

Tabela 10. Dados de EM/EM obtidos para o metabólito PS2P3.

	(M-H)	EM/EM				
		m/z	*m/z*	*m/z*	*m/z*	*m/z*
PS2P3[a]	515,2264	353,1688	191,1035	179,0824	173,0900	135,0823
4,5-diACQ[34]	515,4	353,5	191,6	179,4	172,9	135,7
4,5-diACQ[36]	515,1	353,1	191,2	179,1	173,2	135,1
4,5-diACQ[193]	515	353	-	-	173	-

[a] Dados obtidos experimentalmente para PS2P3.

O espectro de massas do PS2P3 (**Figura 50)** foi obtido no modo de ionização negativo e exibiu o pico *m/z* 515,20 o qual é correspondente ao íon desprotonado e caracteriza a formula molecular $C_{25}H_{23}O_{12}$.

A fragmentação do íon *m/z* 515,2264 (**Figura 51**), produziu os íons *m/z* 353,1688 (pico base), *m/z* 203,0848, *m/z* 191,1035, *m/z* 179,0824 e *m/z* 173,0900 . Este último íon produto (*m/z* 173,0900) confirma que um ácido cafêico está esterificado na posição 4 do ácido quínico. Os possíveis isômeros seriam os ácidos 1,4-; 3,4- ou 4,5-dicafeoilquínicos.

Segundo Clifford (2003)[36] os isômeros ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico apresentam padrões de fragmentação similares, sendo que o isômero ácido 3,4-dicafeoiqluinico apresenta íons produto únicos e característicos. Apesar de saber-se que o metabólito PS2P3 não se tratava do ácido 3,5-dicafeoilquínico, já que este já teve sua estrutura determinada a partir da análises dos dados de massa de alta resolução obtidos e é o metabólito isolado PS2P2, a comparação entre ácido 3,5-dicafeoilquínico e o ácido 4,5-dicafeoilquínico, foi essencial para se determinar a estrutura do metabólito isolado PS2P3. A presença do íon produto *m/z* 173,0900 e a existência do fragmento de *m/z* 191,1035 em menor intensidade leva-nos a concluir que estamos perante o isômero ácido 4,5-dicafeoilquínico já que no ácido 3,5-dicafeoilquinico (**Figura 44**) o íon produto *m/z* 173,0900 aparece com menor intensidade que o fragmento de *m/z* 191,1035 [35].

A ausência do íon produto *m/z* 335, formado pela perda de um grupamento cafeoil e H_2O, exclui a possibilidade do metabólito PS2P3 ser o ácido 3,4-dicafeoilquínico [34,36] e a ausência do íon *m/z* 299, também exclui a que se tenha o derivado 1,4-dicafeoilquinico. Estes indícios confirmam que o metabólito isolado PS2P3 é o **ácido 4,5-dicafeoilquínico**.

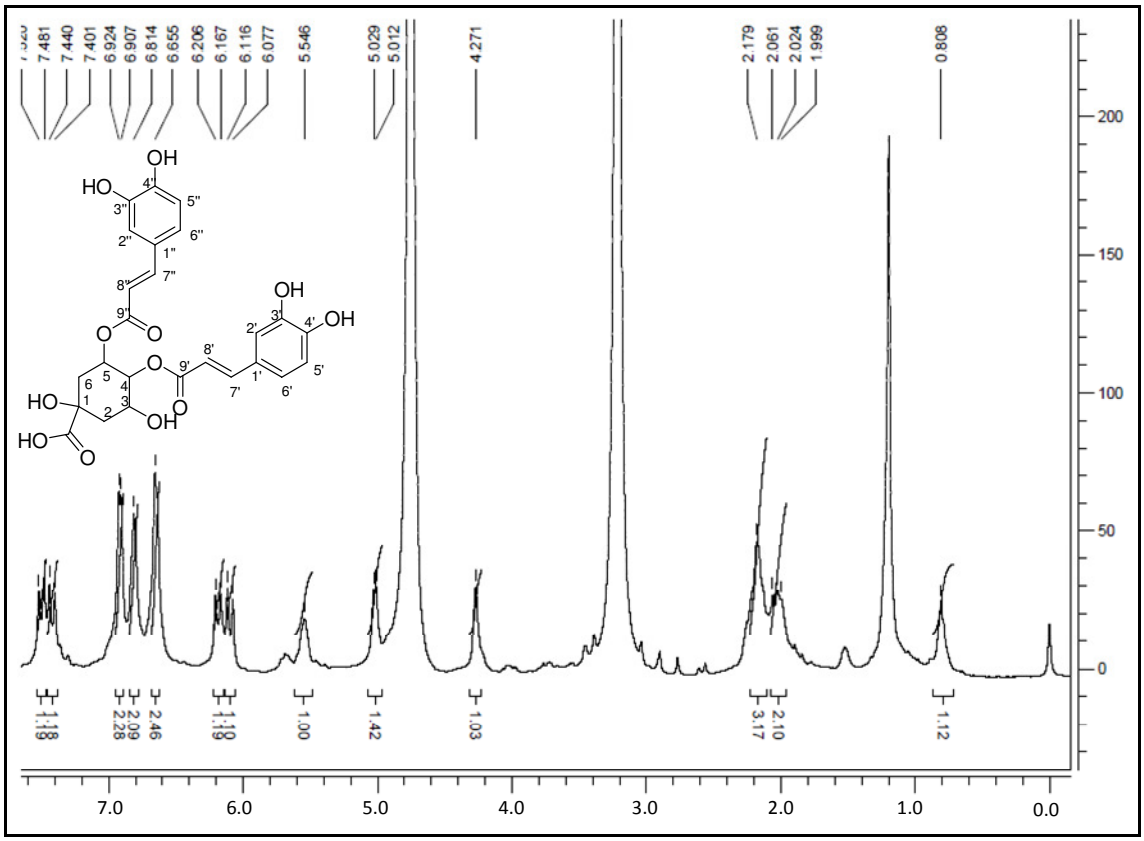


Figura 52. Espectro de RMN de ^{1}H do ácido metabólito PS2P3 em MeOD a 400MHz.

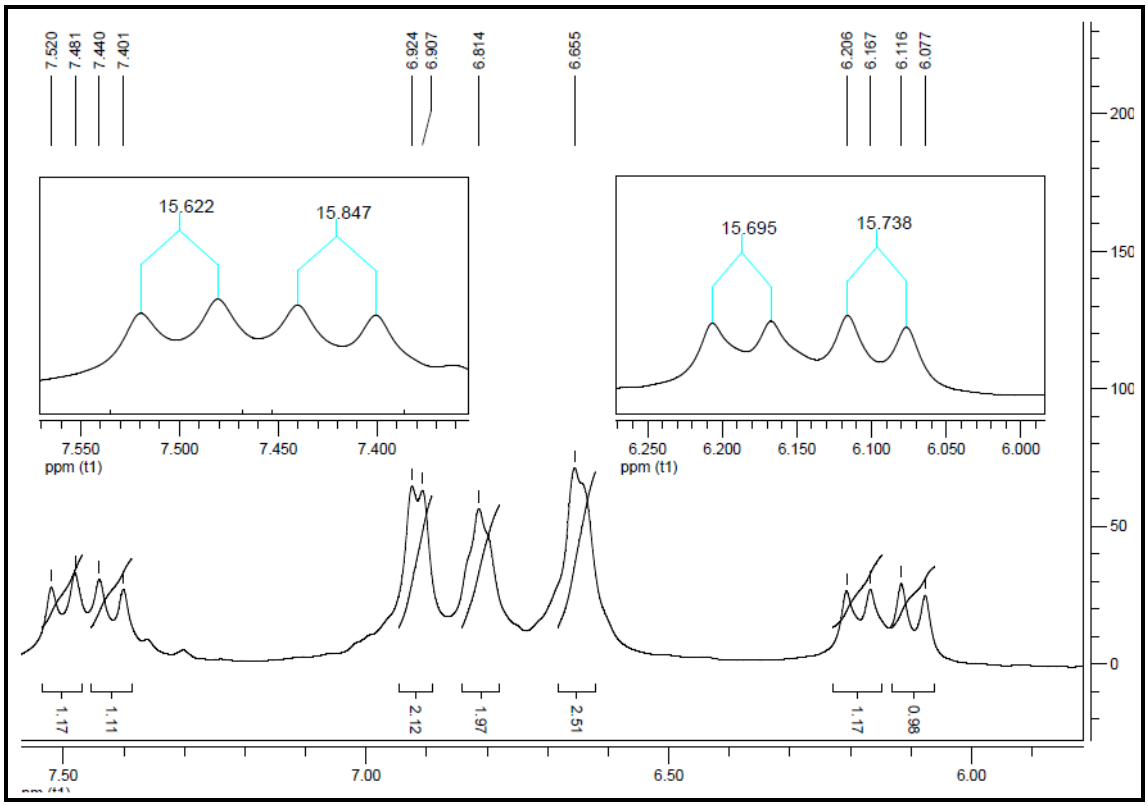


Figura 53. Expansão do espectro de RMN de ^{1}H do ácido metabólito PS2P3 em MeOD a 400MHz.

A análise do espectro de RMN de ^{1}H (**Figura 52 e 53**) mostrou, para a substância **PS2P3,** a presença de duas unidades cafeoíla devido aos sinais de dois grupos de hidrogênios vinílicos em δ 7,49 ppm e 7,42 ppm (*d***,** H-8'e H-8'', *J*=15,6) e δ 6,18 ppm e 6,09 ppm (*d*, H-7'e H-7'', *J* = 15,7 Hz), de dois hidrogênios aromáticos em δ 6,91 ppm (*d*, H-5' e H-5") na forma de dubletos com *J* = 6,8 Hz, sugerindo que estão em acoplamento *orto* no anel aromático, de um singleto largo em δ 6,81 ppm (H-2'e H-2") e de dois hidrogênios aromáticos como dubleto em δ 6,66 ppm (H-6' e H-6").

Além desses sinais o espectro de RMN de ^{1}H mostrou a presença de sinais compreendidos na faixa de δ 1,9 – 2,17 ppm, característicos de hidrogênios do anel ciclohexano do ácido quínico. A **Tabela 11** resume dos dados obtidos experimentalmente para o metabolito PS2P3, bem como dados da literatura do ácido 4,5-dicafeoilquinico.

Tabela 11. Dados de RMN de ^{1}H do ácido 4,5-dicafeoilquínico

H	Ácido 4,5-dicafeoilquínico ^{1}H (δ) [a]	^{1}H (δ) [b]
2	*m* entre 1,9 – 2,17, referentes aos H do anel quínico (H-2 – H-6)	1,90 – 2,2 (*m*)
3		4,39 (*ddd*, *J* = 3, 4,1 e 3,1 Hz)
4		5,14 (*dd*, *J* = 3 e 9,2 Hz)
5		5,66 (*m*)
6		1,90 – 2,2 (*m*)
2’	6,81 (*s* alargado)	7,03 (*d*, *J* = 2 Hz)
3’	-	-
4’	-	-
5’	6,91 (*d*, *J* = 6,8 Hz)	6,77 (*d*, *J* = 8,2 Hz)
6’	6,66 (*d*)	6,93 (*dd*, *J* = 2 e 8,2 Hz)
7’	7,49 (*d*, *J* = 15,6 Hz)	7,62 (*d*, *J* = 15,9 Hz)
8’	6,18 (*d*, *J* = 15,7 Hz)	6,31 (*d*, *J* = 15,9 Hz)
2’’	6,81 (*s* alargado)	7,05 (*d*, *J* = 2 Hz)
3’’	-	-
4’’	-	-
5’’	6,91 (*d*, *J* = 6,8 Hz)	6,78 (*d*, *J* = 8,2 Hz)
6’’	6,66 (*d*)	6,95 (*dd*, *J* = 2 e 8,2 Hz)
7’’	7,42 (*d*, *J* = 15,6 Hz)	7,54 (*d*, *J* = 15,9 Hz)
8’’	6,09 (*d*, *J* = 15,7 Hz)	6,22 (*d*, *J* = 15,9 Hz)

[a] Dados obtidos experimentalmente para PS2P3, 400MHz, MeOD, [b] [195] Barros, M.P., 2007, 400MHz, CD_3OD

A mistura dos ácidos 3,4-, 3,5- e 4,5- dicafeoilquínicos já havia sido reportada em *P. sagittalis* por Martino e colaboradores, em 1979[196].

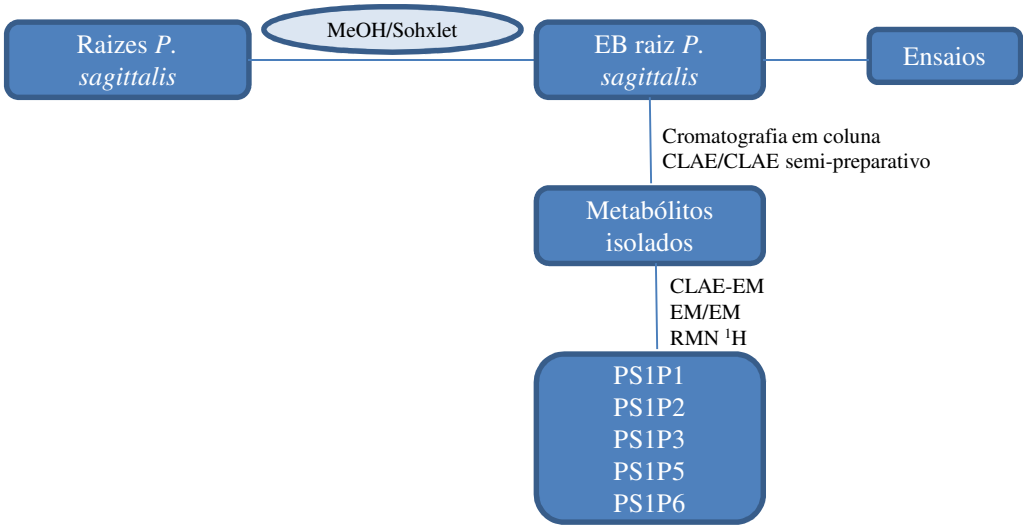
A presença de derivados do ácido dicafeoilquínico é muito frequente em plantas. Principalmente derivados que possuam a esterificação nas posições 3, 4 e 5, do acido quínico, caso dos metabólitos isolados de *P. sagittalis.* É importante ressaltar que a presença de derivados esterificados na posição 1, não é muito comum, porém isto ocorre em algumas plantas da família Asteraceae[34].

[195] Modificado de: BARROS, M. P.. Estudo Quimico e avaliação da atividade antiinflamatória, moluscicida e antioxidante da espécie vegetal *Chomelia obtusa* (Rubiaceae). Disseratção de mestrado, Universidade Estadual de Maringá, UEM, 2007.
[196] MARTINO, V. S.; DEBENEDETTI, S.; COUSSIO, J. D. Phytochemistry, 18, 2052, 1979.

Os metabólitos PS2P1, PS2P2 e PS2P3 apresentam grande semelhança nos seus espectros de UV e, por esta análise, fica inviável a distinção entre um e outro, podendo-se dizer que os espectros acima representados são característicos de derivados dicafeoilquínicos.

5.3.1.2 Raiz:

As raízes de *P. sagittalis* após serem lavadas secas e moídas, foram submetidas ao processo de extração que encontra-se no **Esquema 16**.



Esquema 16. Extração em metanol à quente (Soxhlet) das raízes de *P. sagittalis*

Como pode ser observado a partir do **Esquema 16**, não foram realizados fracionamentos com polaridades crescentes de solventes, somente uma rápida filtração em coluna cromatográfica, sendo as sub-fraçoes obtidas analisadas por CLAE.

A coluna de filtração foi empacotada com hexano/diclorometano 1:1, utilizando sílica gel (35-70um) como fase estacionária e solventes com polaridades crescentes como fases móveis. Nesta coluna foram colocados 800mg do extrato bruto da raiz de *P. sagittalis* adsorvido em uma pastilha de sílica e metanol, previamente seca. Na **Tabela 12**, se encontram as frações e suas polaridades e na **Tabela 13**, as frações reunidas.

Tabela 12. Polaridades e frações obtidas na coluna de filtração em silica.

Fração	Sistema solvente	Denominação
1-9	H/D 1:1	clorofila
10-18	D 100%	clorofila
19-23	D/A 25%	mistura
24-30	D/A 1:1	mistura
31-37	A 100%	mistura
38-53	A/M 10%	mistura
54-60	A/M 20%	mistura
61-65	A/M 1:1	mistura
66-72	M 100%	mistura
73-89	M/água 1:1	mistura

Tabela 13. Frações reunidas por semelhança de perfil obtido no CLAE, após coluna de filtração.

Frações	Sistema solvente	Denominação	Massa
1	H/D 1:1	clorofila	-
2-4	D 100%	clorofila	-
5-20	D/A 25%	ácido graxo+clorofila	-
21	D/A 1:1	ácido graxo+clorofila	-
22-40	A 100%	ácido graxo+clorofila	-
41-49	A/M 10%	**PS1**	281mg
50-64	A/M 20%		
65-67	A/M 1:1		
68-72	M 100%		
73-89	M/água 1:1		

As frações 41-89 foram reunidas devido a sua grande semelhança evidenciada após injeção no CLAE, sendo a fração resultante denominada PS1. Na **Figura 54,** encontra-se o perfil cromatográfico do EB da raiz de *P. sagittalis* antes do tratamento

por cromatografia em coluna, enquanto que na **Figura 55**, observa-se o perfil cromatográfico desta fração após cromatografia em coluna (PS1).

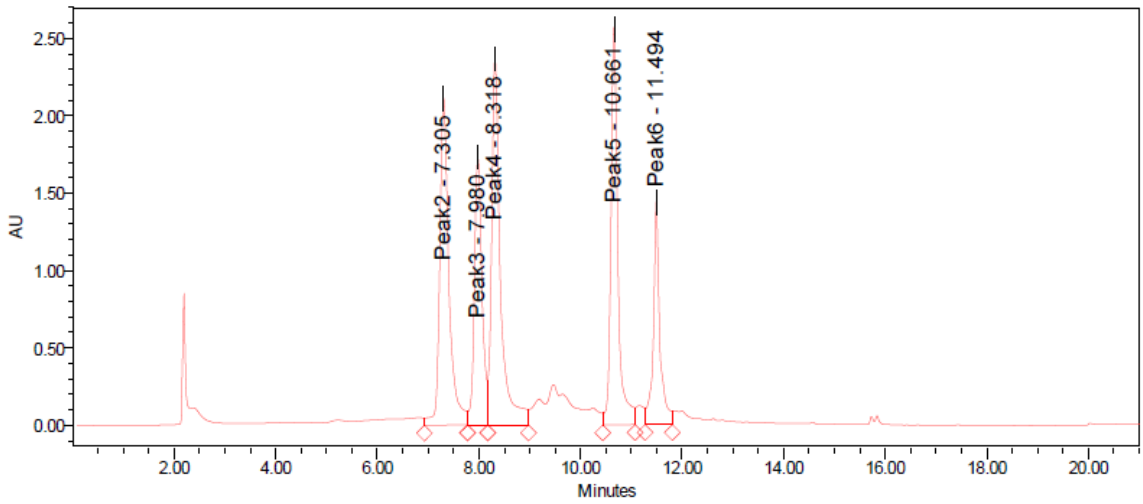


Figura 54. Perfil cromatográfico em CLAE do EB raiz *P. sagittalis*: Coluna: X-terra C18, 4,6 x 150 mm, partículas de 5 µm, com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 30 °C. FM A: ACN/ácido acético glacial 0,05%, FM B: H_2O/ácido acético glacial 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-60% em 2 minutos, 60-80% em 2 minutos, 80-100% em 2 minutos, 100%-3minutos e 100-15% em 4 minutos: total corrida 21 minutos. Leitura em 312 nm.

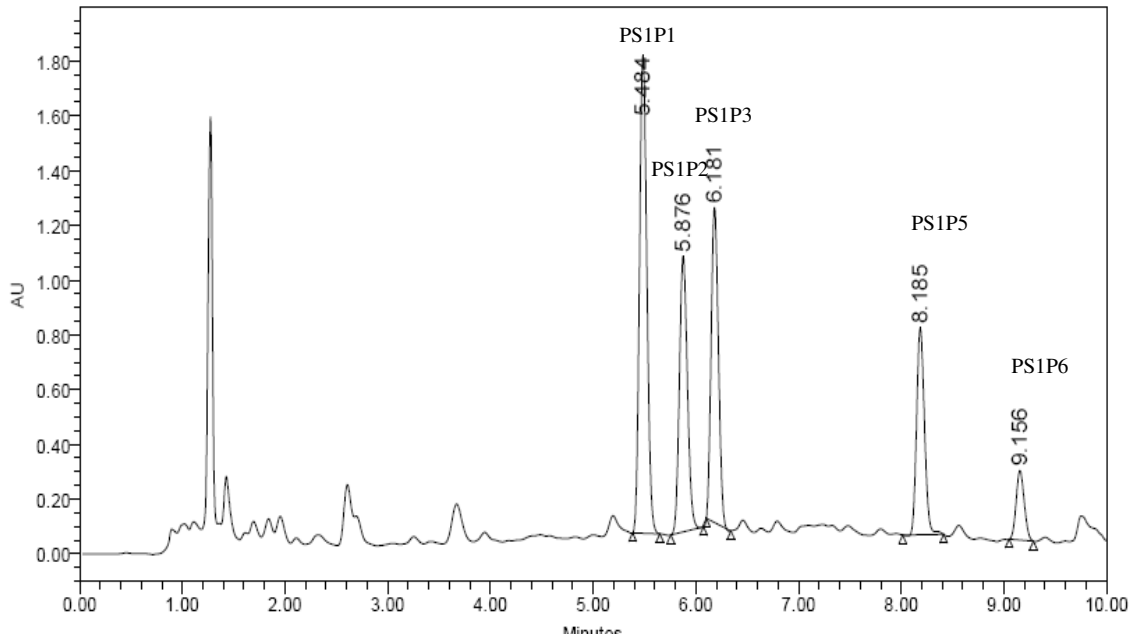


Figura 55. Perfil cromatográfico, por CLAE, do EB raiz *P. sagittalis* (PS1) após filtração: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B:

H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 2 minutos: total corrida 10 minutos. Leitura em 312 nm.

A fração PS1 foi submetida ao CLAE semi-preparativo para isolamento de seus 5 compostos majoritários.

A análise por CLAE semi-preparativo foi realizada utilizando como fase móvel acetonitrila/água em um gradiente de 15-40% em 30 minutos. 30 mg da amostra PS1 foi dissolvida em 5 mL de água e 4,5 mL da mesma foram injetados. O monitoramento da corrida foi em 220 nm. O cromatograma obtido no CLAE semi-preparativo encontra-se na **Figura 56.**

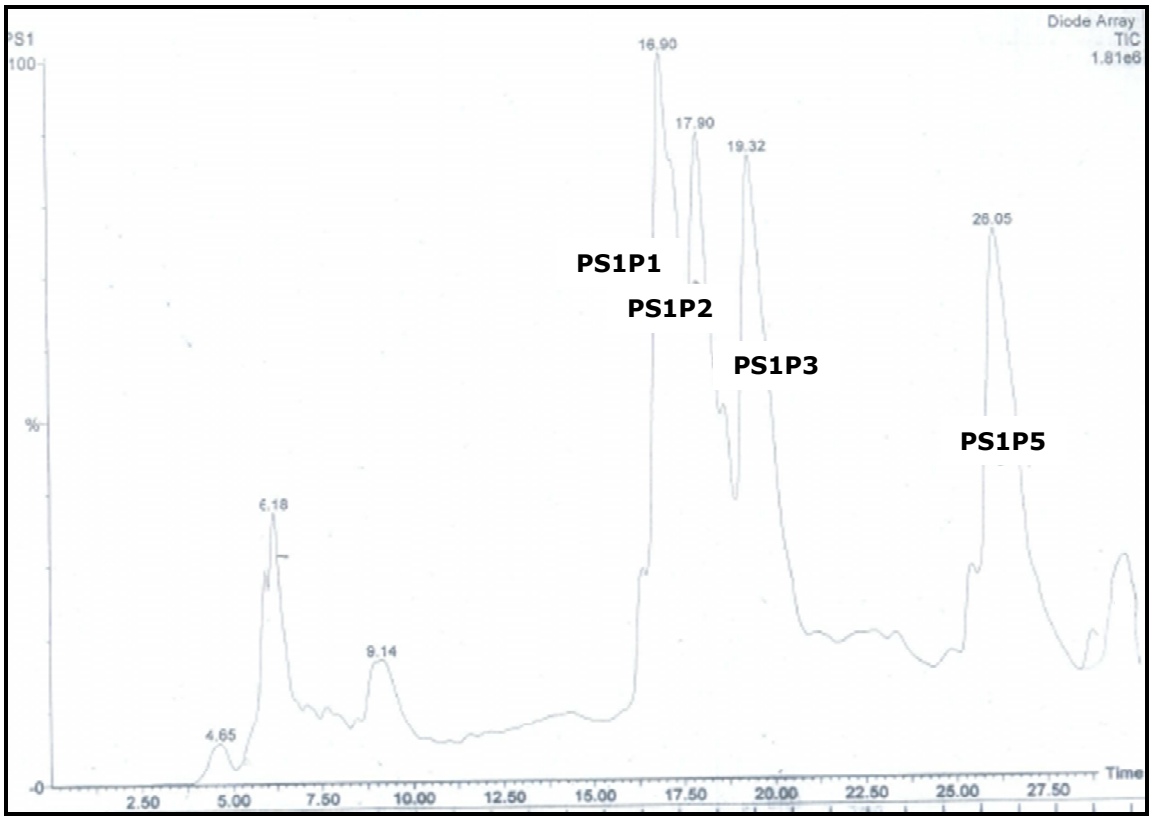


Figura 56. Análise por CLAE semi-preparativo do EB da raiz de *P. sagittalis* (PS1) após filtração: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 200 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 2 mL min^{-1}, 15-40% em 30 minutos. Leitura em 220 nm.

Os 3 primeiros metabólitos isolados, denominados aqui como sendo PS1P1, PS1P2 e PS1P3, já haviam sido isolados e identificados na fração aquosa acetato de etila de folhas de *Pluchea sagittalis* (FAqA), sendo os ácidos 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico e 4,5-dicafeoilquínico. O metabólito isolado PS1P5 será discutido posteriormente.

A confirmação de que estavam presentes os mesmos metabólitos isolados tanto do EB da raiz quanto da FAqA das folhas de *P. sagittalis* foi realizada por co-injeção, em CLAE. Os cromatogramas destas co-injeções serão apresentados ao final da discussão da espécie *B. triplinervium*, já que as 3 espécies apresentaram os ácidos 3,4-, 3,5- e 4,5-dicafeoilquínicos na sua composição.

Abaixo estão dispostos os cromatogramas de cada um dos metabólitos isolados obtidos por CLAE das raízes de *P. sagittalis* (**Figuras 57, 58 e 59**).

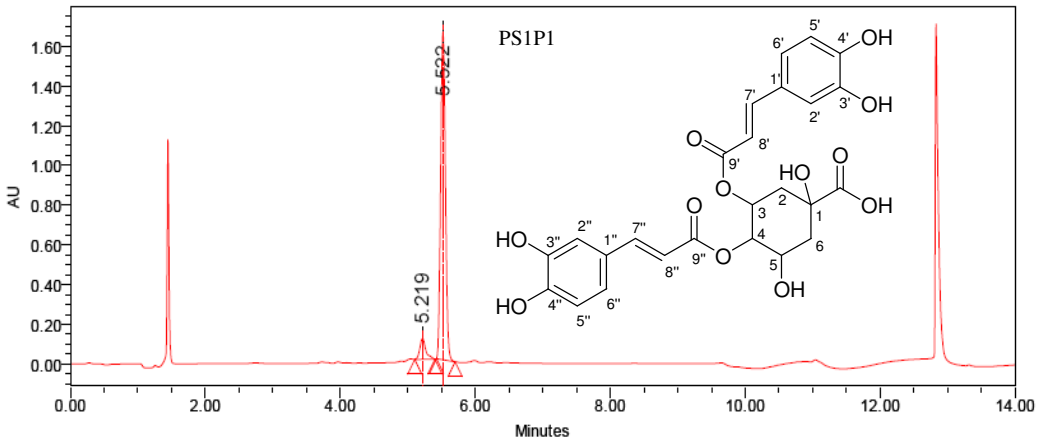


Figura 57. Perfil cromatográfico do composto isolado PS1P1, por CLAE: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 6 minutos: total corrida 14 minutos. Leitura em 312 nm – **ácido 3,4-dicafeoilquínico**.

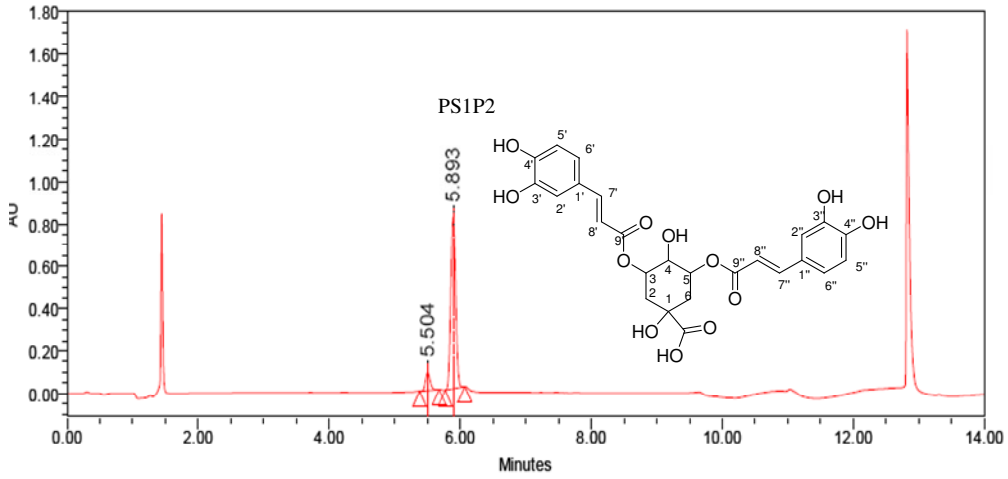


Figura 58. Perfil cromatográfico do composto isolado PS1P2, por CLAE: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 6 minutos: total corrida 14 minutos. Leitura em 312 nm – **ácido 3,5-dicafeoilquínico**.

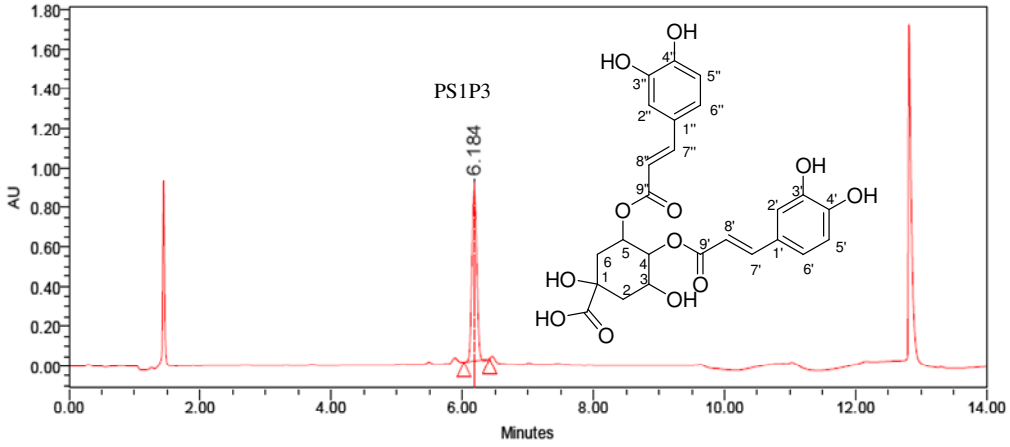


Figura 59. Perfil cromatográfico do composto isolado PS1P3, por CLAE: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 6 minutos: total corrida 14 minutos. Leitura em 312 nm – **ácido 4,5-dicafeoilquínico**.

O outro metabólito presente em PS1, PS1P5, também foi isolado na mesma análise realizada no CLAE semi-preparativo (**Figura 56**) não estando presentes na FAqA das folhas de *P. sagittalis.*

A identificação deste composto se deu por comparação de dados de massa de alta resolução obtidos experimentalmente *versus* dados de literatura[36,193].

5.3.1.2.1.1 PS1P5:

O metabólito isolado PS1P5, teve sua estrutura elucidada a partir de dados de EM/EM obtidos comparados aos dados de literatura[36,193]. Este composto apresenta-se como um pó amarelo (**Figura 60**) e seu cromatograma, obtido no CLAE está na **Figura 61**, juntamente com seu espectro de UV.

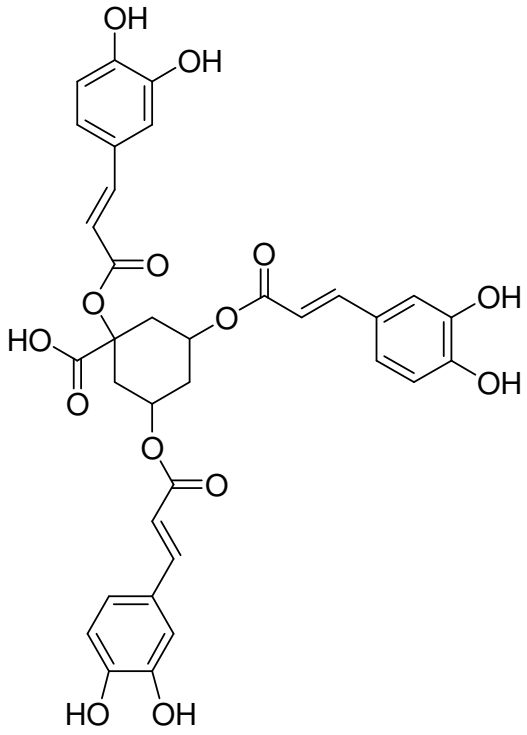


Figura 60. Estrutura do ácido 1,3,5- tricafeoilquínico

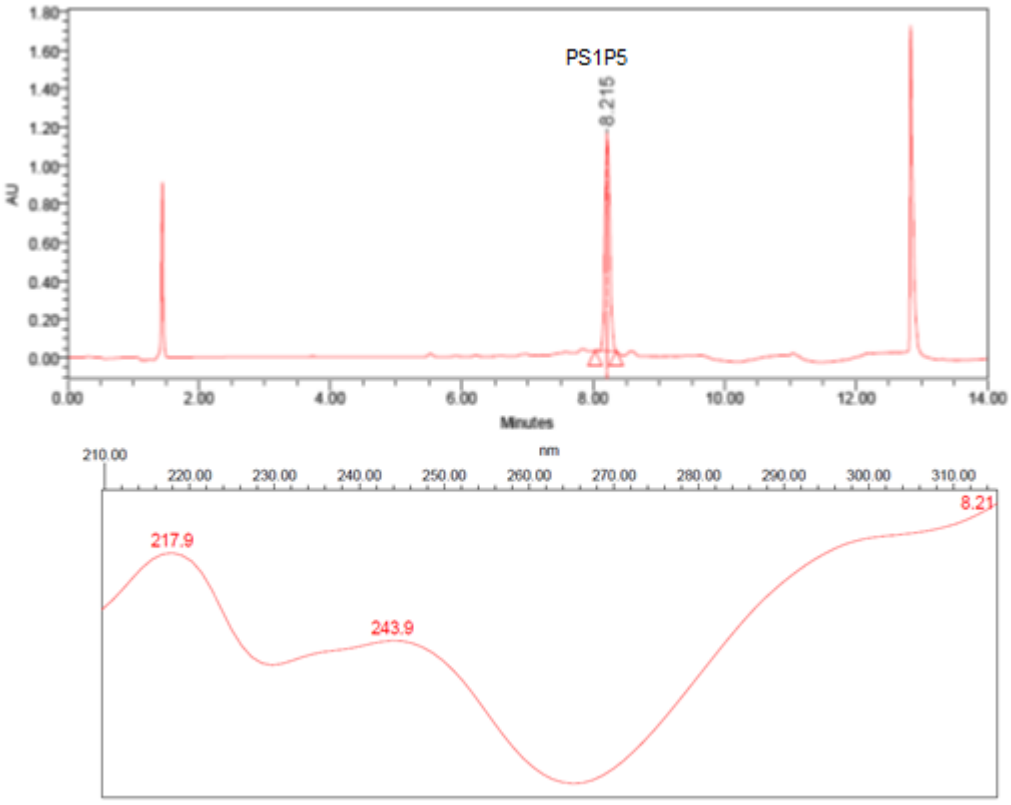


Figura 61. Perfil cromatográfico do composto isolado PS1P5, por CLAE: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 6 minutos: total corrida 14 minutos. Leitura em 312 nm e espectro de UV do mesmo composto também em 312 nm.

O espectro de massa obtido por CLAE-EM no modo negativo encontra-se na **Figura 62** enquanto que a fragmentação, obtida por EM/EM, encontra-se na **Figura 63.** A **Tabela 14** apresenta os dados obtidos para o metabólito isolado PS1P5 em comparação a dados disponíveis na literatura[36,193]. Após a elucidação estrutural, chegou-se ao composto **1,3,5-tricafeoilquínico**.

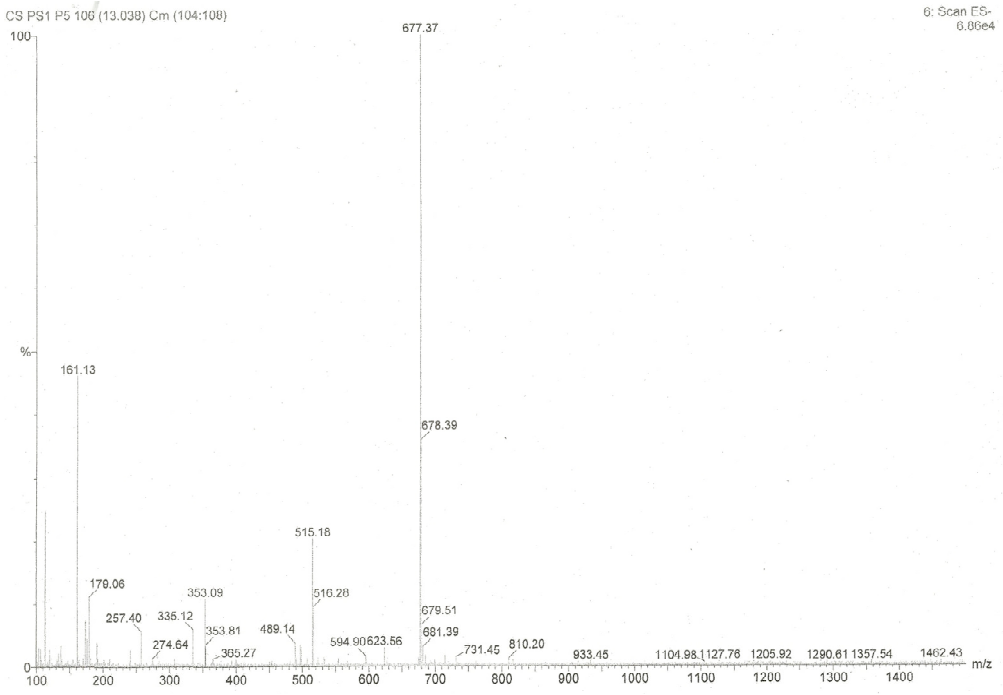


Figura 62. Espectro de massa obtido por CLAE-EM no modo negativo para o metabólito PS1P5.

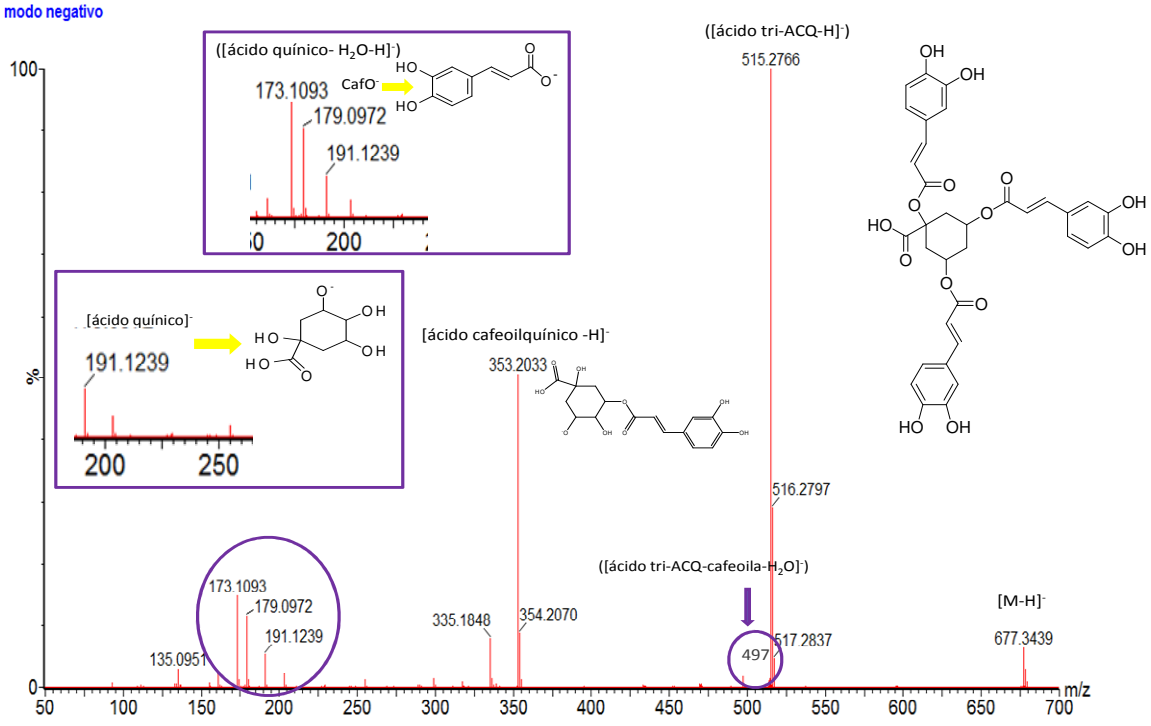


Figura 63. Espectro de EM/EM do íon $[M-H]^-$ 677,3439 (modo negativo). Análise do composto isolado PS1P5, por infusão direta utilizando solução ACN : H_2O (1:1) 0,1% TFA. Equipamento utilizado: Synapt HDMS Q-TOF (Waters Co.)

Tabela 14. Dados de EM/EM obtidos para o composto isolado PS1P5.

	(M-H)	EM/EM						
		m/z	*m/z**	*m/z*	*m/z*	*m/z*	*m/z*	*m/z*
PS1P5[a]	677,3439	515,2766	497	353,2033	335,1848	191,1239	179,0972	173,1093
1,3,5-triACQ[193]	677	515	497	353	335	-	-	-

[a]Dados obtidos experimentalmente para PS1P5. *Pico de intensidade muito fraca, porém visualizado.

O espectro de massas no modo negativo obtido para o metabólito isolado PS1P5 **(Figura 62)** apresenta um sinal de íon desprotonado *m/z* 677,37. Compostos que possuem como íon precursor o íon *m/z* 677,3439 denominam-se derivados tricafeoilquínicos. Outra característica marcante dos derivados tri-cafeoilquínicos é a presença, mesmo que em baixa intensidade, do pico *m/z* 497 devido a perda de uma cafeoila e de H_2O (tri-ACQ-cafeoil$^-$-H_2O).

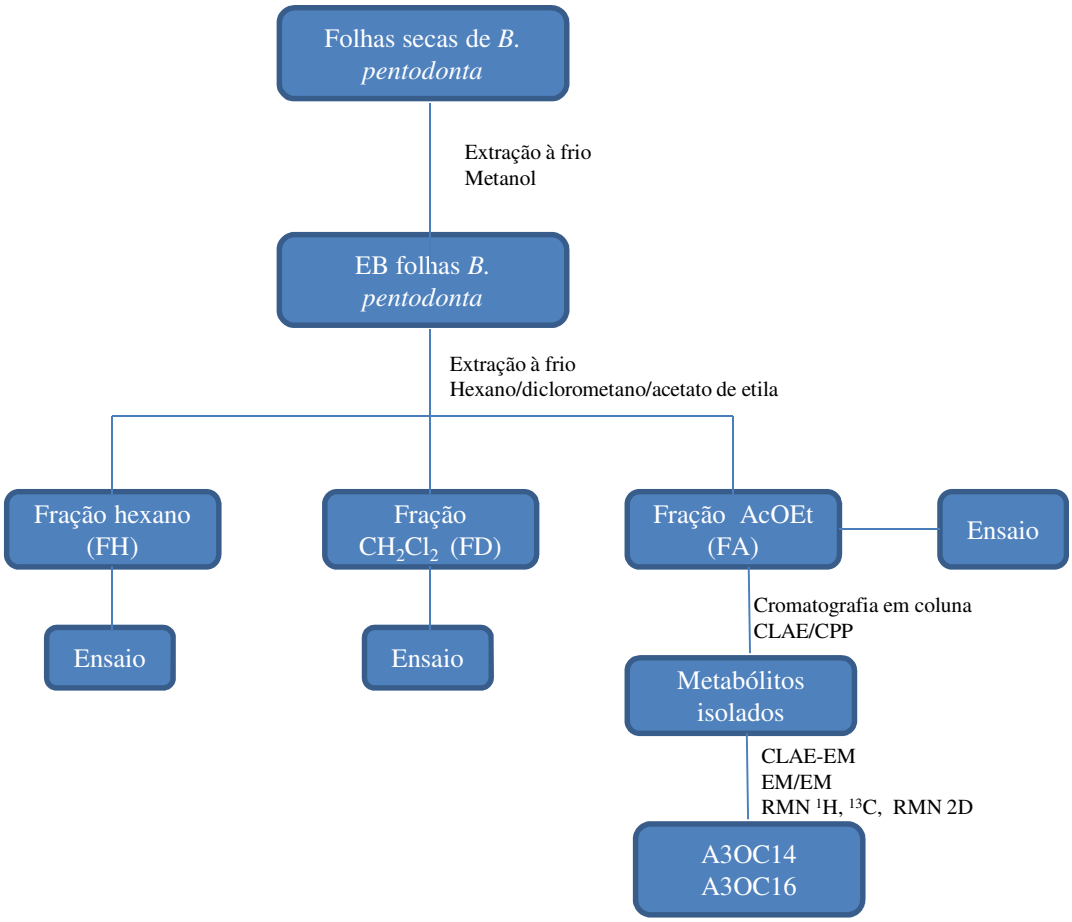
A fragmentação do íon precursor de *m/z* 677, 3439 **(Figura 63)** deu origem aos íons produtos *m/z* 515, 2566, *m/z* 497 (baixíssima intensidade, porém se consegue ver sinal), *m/z* 353,2033, *m/z* 191,1239, *m/z* 179,0972 e *m/z* 173,1093. É bem relatado na literatura, em plantas da família Asteraceae, a presença do derivado 1,3,5-tri-cafeoilquínico (1,3,5-tri-ACQ). Este derivado tricafeoilquínico apresenta como pico base *m/z* 515 (ácido dicafeoilquínico-H), seguido dos picos de m/z 353 (ácido cafeoilquínico-H), e dos demais picos *m/z* 191, *m/z* 179 e *m/z* 173 (ácido quínico-H_2O-H)[193].

O fato da fragmentação obtida para PS1P5 ser muito semelhante a do composto PS2P2 (3,5-dicafeoilquínico) anteriormente isolado e isto ser referenciado na literatura por Han e colaboradores[193] como sendo uma confirmação da presença do composto 1,3,5-tri-ACQ, somado ao fato de que os derivados tricafeoilquínicos, por possuírem o anel quínico totalmente esterificado serem mais facilmente identificados por EM/EM, corrobora para que o metabólito isolado PS1P5 seja identificado como sendo o **ácido 1,3,5-tricafeoilquínico**.

5.3.2 *Baccharis pentodonta*

5.3.2.1 Folhas

As folhas de *B. pentodonta* foram tratadas conforme representado no fluxograma do **Esquema 17**.



Esquema 17. Extração das folhas de *B. pentodonta*

O extrato bruto (EB) foi submetido a uma filtração em coluna e posteriormente analisado por CLAE.

A coluna cromatográfica de filtração de parte do EB das folhas de *B. pentodonta* (800 mg) foi empacotada com sílica gel (35-70 µm) e foram utilizados solventes com polaridades crescentes como eluentes. Estes estão apresentados na **Tabela 15**, juntamente com as frações obtidas. A coluna foi empacotada com H/D 1:1 e a amostra colocada em uma pastilha de sílica em metanol.

Tabela 15. Frações obtidas com os respectivos sistemas solventes utilizados na filtração do EB das folhas de *B. pentodonta*.

Fração	Sistema solvente	Denominação	Massa
1-8	H/D 1:1	clorofila	-
9-16	D 100%	clorofila	-
17-27	D/A 1:1	clorofila	-
28-50	A 100%	clorofila	-
51-70	M 100%	**BPF2**	283mg
71-100	M/água 1:1	**BPF3**	35mg

As frações obtidas após esta filtração foram também analisadas e as que apresentaram melhor separação foram submetidas ao CLAE semi-preparativo para isolamento. Abaixo estão apresentadas as análises por CLAE das frações submetidas ao CLAE semi-preparativo (**Figura 64 e Figura 65**). O fracionamento em CLAE semi-preparativo utilizou como fase móvel acetonitrila / água em um gradiente 15-40% em 30 minutos. De BPF2 foram dissolvidas 80 mg de amostra em 10 mL de acetonitrila / água 1:1, enquanto que de BPF3, 30 mg de amostra em 5 mL de acetonitrila / água 1:1, sendo injetados 4,5 mL de cada uma das amostras, separadamente no sistema semi-preparativo. O monitoramento das corridas foi em 220 nm.

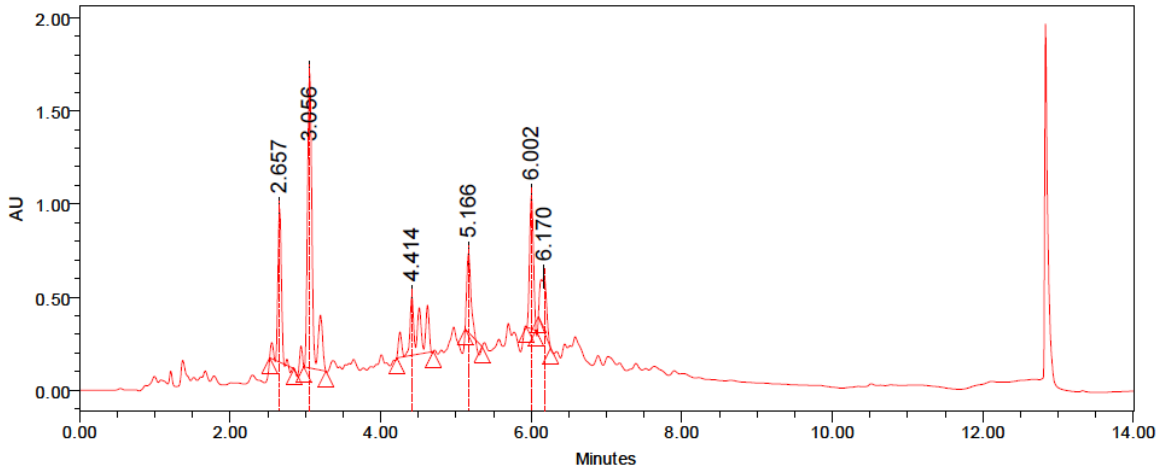


Figura 64. Perfil cromatográfico da fração BPF2, por CLAE: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno

de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 6 minutos: total corrida 14 minutos. Leitura em 312 nm.

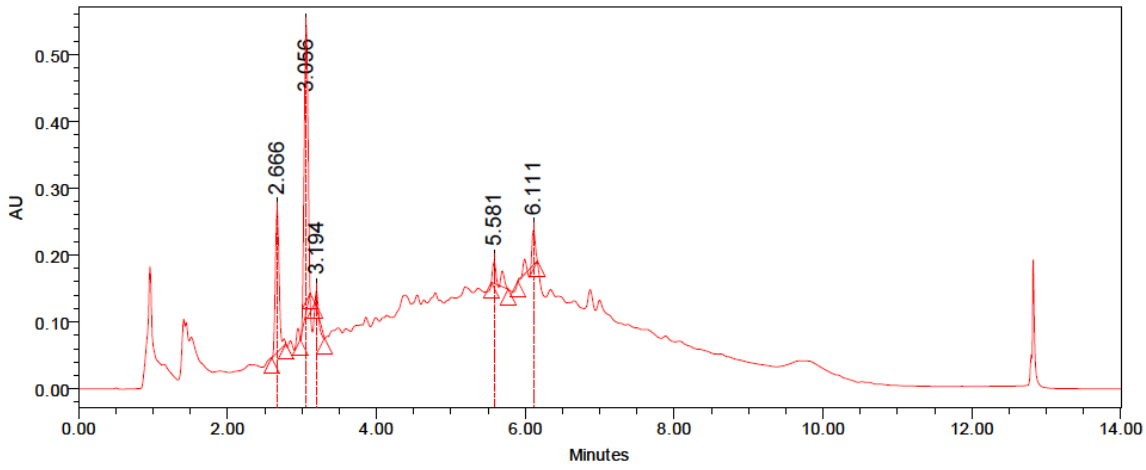


Figura 65. Perfil cromatográfico da fração BPF3, por CLAE: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 6 minutos: total corrida 14 minutos. Leitura em 312 nm.

A separação dos metabólitos presentes nas amostras em questão (BPF2 e BPF3) não foi eficiente e não foi possível o isolamento de metabólitos puros dessas duas frações.

5.3.2.1.1 Fração acetato de etila das folhas de *B. pentodonta*

Entre as frações obtidas, a fração acetato de etila foi a que se apresentou, dentre as frações analisadas, como a mais interessante por ser rica em componentes passíveis de separação por métodos cromatográficos, sendo por isso submetida à cromatografia em coluna. Abaixo, na **Figura 66**, tem-se o cromatograma obtido por CLAE para a fração acetato de etila das folhas de *B. pentodonta.* As frações hexânicas e diclorometano não foram trabalhadas por não apresentarem boa resolução na CCD e por terem alta concentração de clorofila na sua composição.

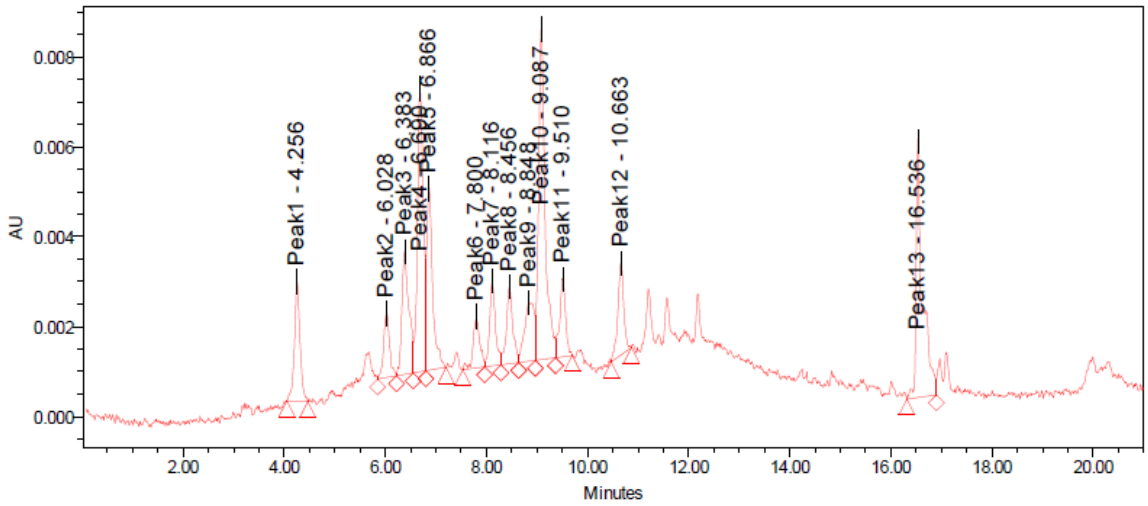


Figura 66. Perfil cromatográfico da FA folhas de *B. pentodonta*, por CLAE: Coluna: X-terra C18, 4,6 x 150 mm, partículas de 5 µm, com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 30 °C. FM A: ACN/ácido acético glacial 0,05%, FM B: H_2O/ácido acético glacial 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-60% em 2 minutos, 60-80% em 2 minutos, 80-100% em 2 minutos, 100%-3minutos e 100-15% em 4 minutos: total corrida 21 minutos. Leitura em 312 nm.

Parte da fração acetato de etila (6g) foi submetida a cromatografia em coluna, utilizando-se sílica gel 60 (230-40 mesh) como fase estacionária e hexano como fase móvel inicial. A polaridade da fase móvel foi aumentada gradativamente com acetato de etila e metanol. Como a amostra apresentou-se insolúvel no solvente de partida, fez-se uma pastilha em metanol para a colocação da amostra no sistema cromatográfico.

No decorrer da coluna, foram coletadas 105 frações. Estas foram analisadas por CCD em sistemas solventes com hexano, acetato e metanol e reveladas na luz UV 254 nm e 355 nm e com o revelador ácido sulfúrico / etanol (10 : 90) seguido de aquecimento e apresentaram-se impuras. As frações foram então agrupadas por semelhança de Rfs (fator de retenção) e as que apresentaram potencial de purificação foram submetidas a novos processos de separação. Umas das misturas foi submetida a CPP e a outra foi adicionado metanol à quente e, por diferença de solubilidade, obteve-se a fração solúvel em metanol pura. Os metabólitos isolados tiveram, em CCD, resultado positivo para cloreto férrico, indicando que se tratavam de derivados fenólicos.

Os sistemas solventes e as frações obtidas na cromatografia da FA de *B. pentodonta* estão apresentados abaixo, nas **Tabelas 16** e **17**. Os metabólitos positivos

para cloreto férrico isolados da fração acetato de etila de *B. pentodonta* foram denominados A3OC16 e A3OC14 e serão discutidos abaixo.

Tabela 16. Sistemas solventes e respectivas frações obtidas após a cromatografia em coluna da fração acetato de etila das folhas de *B. pentodonta*

Fração	*Sistema solvente*	*Substância*
1-3	H	mistura substâncias
4-11	H/A 30%	mistura substâncias
12-16	H/A 40%	mistura substâncias
17-38	H/A 1:1	mistura substâncias
39-44	A 100%	mistura substâncias
45-53	A/M 5%	mistura substâncias
54-59	A/M 10%	mistura substâncias
60-71	A/M 20%	mistura substâncias
72-85	A/M 30%	mistura substâncias
86-98	A/M 1:1	mistura substâncias
99-105	M 100%	mistura substâncias

Tabela 17. Frações agrupadas por semelhança de Rfs após a cromatografia em camada delgada das frações retiradas da CC realizada com a fração acetato de etila das folhas de *B. pentodonta*

Fração	*Sistema solvente*	*Substância*	*Massa*	*Purificação*	*Isolado*
19-22	H/A 1:1	**A3OC16** + impurezas	18mg	MeOH	5mg
25-28	H/A 1:1	**A3OC16** + impurezas	60mg	CPP	11mg
29-37	H/A 1:1	**A3OC14** + impurezas	397mg	pp em H/A 1:1	9mg
50-58	A/M 10%	impurezas	27mg	CPP	-
72-105	A/M 30%-M100%	impurezas	3g	CPP	-

5.3.2.1.1.1 A3OC16

A substância A3OC16 foi obtida após o tratamento da fração 19-22 com metanol. Após a adição de metanol foram obtidas 2 sub-frações: 1 solúvel e outra insolúvel (solubilizada com metanol a quente). Ambas foram analisadas por CCD (H/A 3 : 7) e reveladas na luz UV 254 nm e 355 nm e com o revelador acido sulfúrico/etanol (10 : 90) seguido de aquecimento. A sub-fracão insolúvel apresentou-se pura e foi seca e submetida ao RMN para sua elucidação estrutural.

Após comparação em CCD, observou-se que a fração 25-28 apresentava Rf semelhante ao do composto isolado A3OC16. Esta (60 mg) foi submetida a cromatografia em placa preparativa tendo como sistema solvente de eluição hexano : acetato 3 : 7. A placa foi eluída 2 vezes, obtendo-se 4 manchas amarelas observadas na luz UV 254 nm. Estas foram separadas e a fração 4 (11 mg) foi enviada para análise por RMN, confirmando a presença da substancia A3OC16 pura.

O A3OC16 apresenta-se como um sólido amarelo escuro, solúvel em metanol a quente, em clorofórmio e em DMSO com ponto de fusão determinado experimentalmente de (257,9-264) e Rf 0,6 em H/A 3 : 7. O perfil cromatográfico obtido por CLAE para o metabólito isolado encontra-se na **Figura 67**.

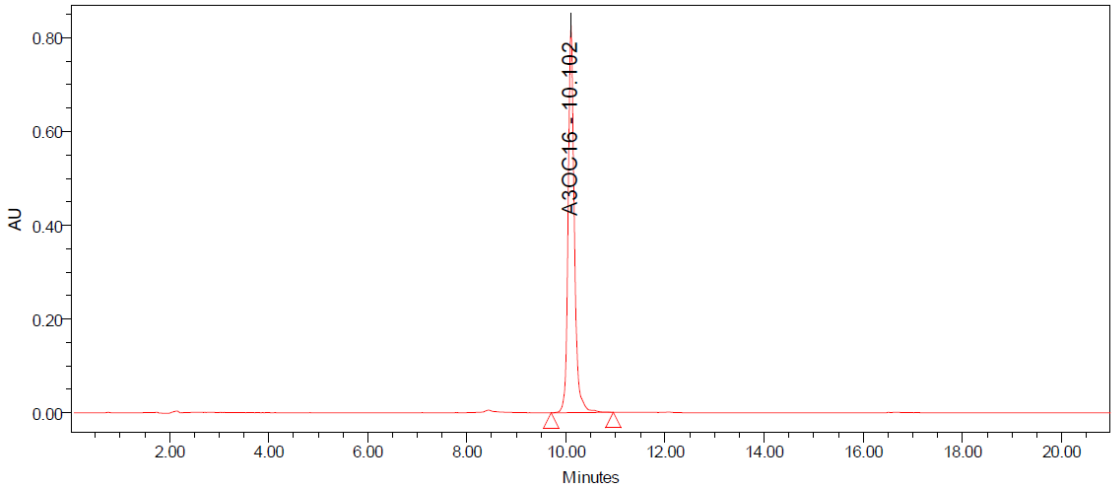


Figura 67. Perfil cromatográfico por CLAE do metabólito isolado A3OC16: Coluna: X-terra C18, 4,6 x 150 mm, partículas de 5 µm, com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 30 °C. FM A: ACN/ácido acético glacial 0,05%, FM B: H_2O/ácido acético glacial 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-60% em 2 minutos, 60-80% em 2 minutos, 80-100% em 2 minutos, 100%-3minutos e 100-15% em 4 minutos: total corrida 21 minutos. Leitura em 312 nm.

O espectro de massa de alta resolução obtido no modo positivo (ESI+), **Figura 68** apresentou como pico base o íon de m/z 301,0729 ($[M+H]^+$) , sendo que sua massa molecular acurada é compatível com a fórmula molecular $C_{16}H_{12}O_6$.

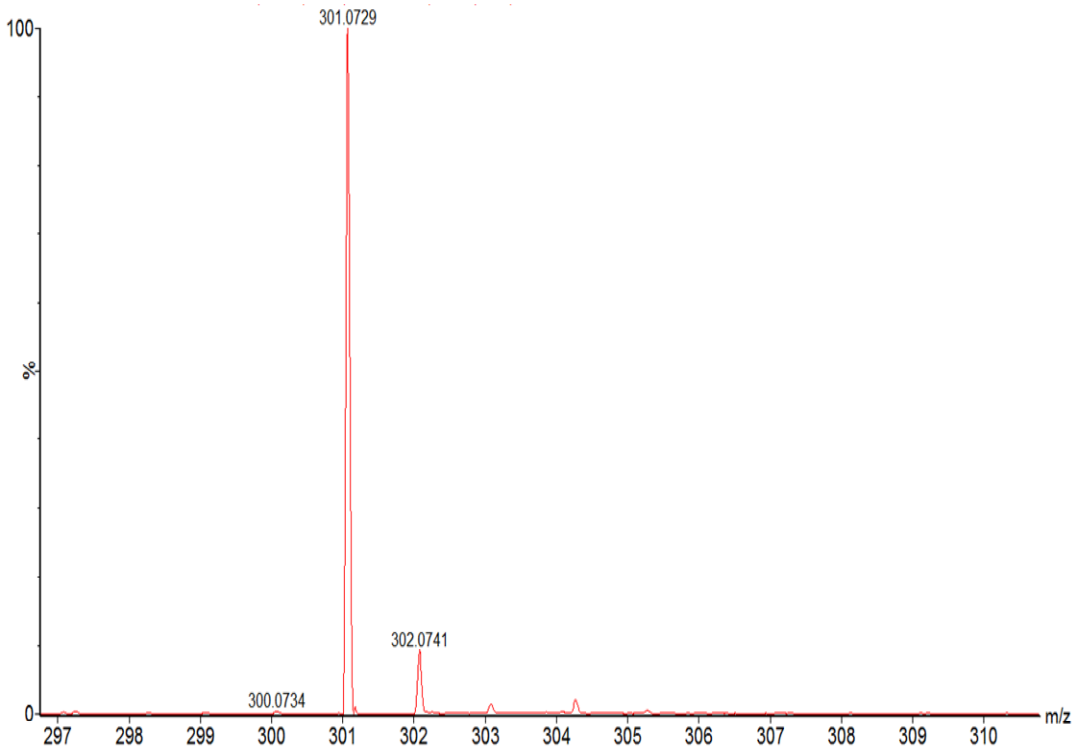


Figura 68. Espectro de massa do composto A3OC16, íon molecular $[M+H]^+$ 301,0729 (modo positivo). Análise por infusão direta utilizando solução ACN / H_2O (1:1) 0,1% TFA. Equipamento utilizado: Synapt HDMS Q-TOF (Waters Co.)

O metabólito A3OC16 (**Figura 69**) foi analisado em 400 MHz, dissolvido em DMSO deuterado (DMSO-*d6*) e apresenta características de substância pura como podemos observar nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C apresentados nas **Figuras 70, 71, 72** e **73**.

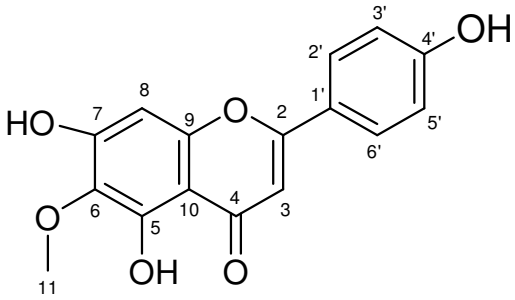


Figura 69. Estrutura A3OC16

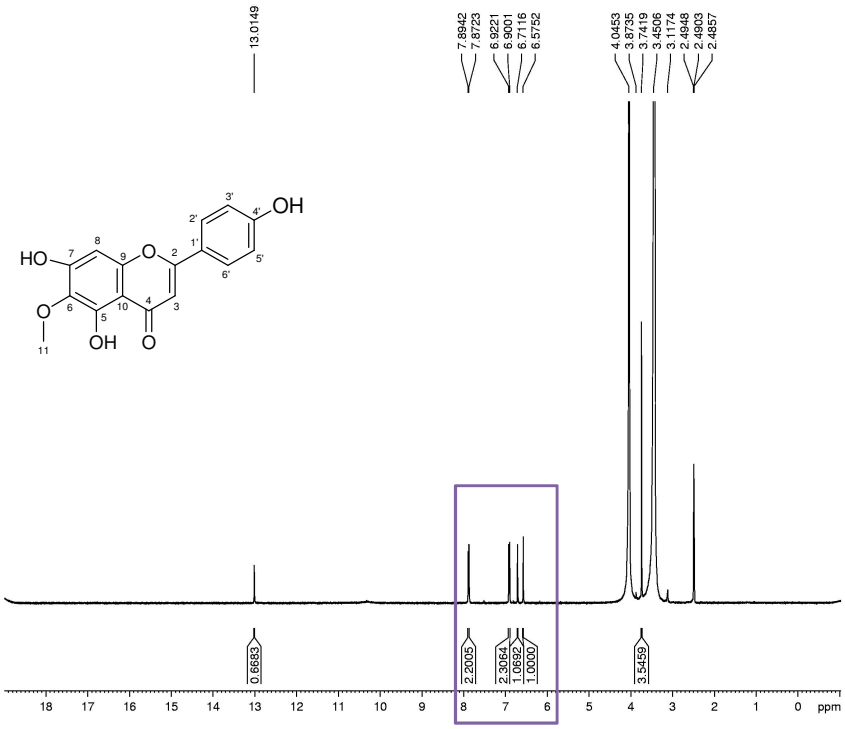


Figura 70. Espectro de RMN de ^{1}H da amostra A3OC16 obtida em 400 MHz solubilizada em DMSO-*d6.*

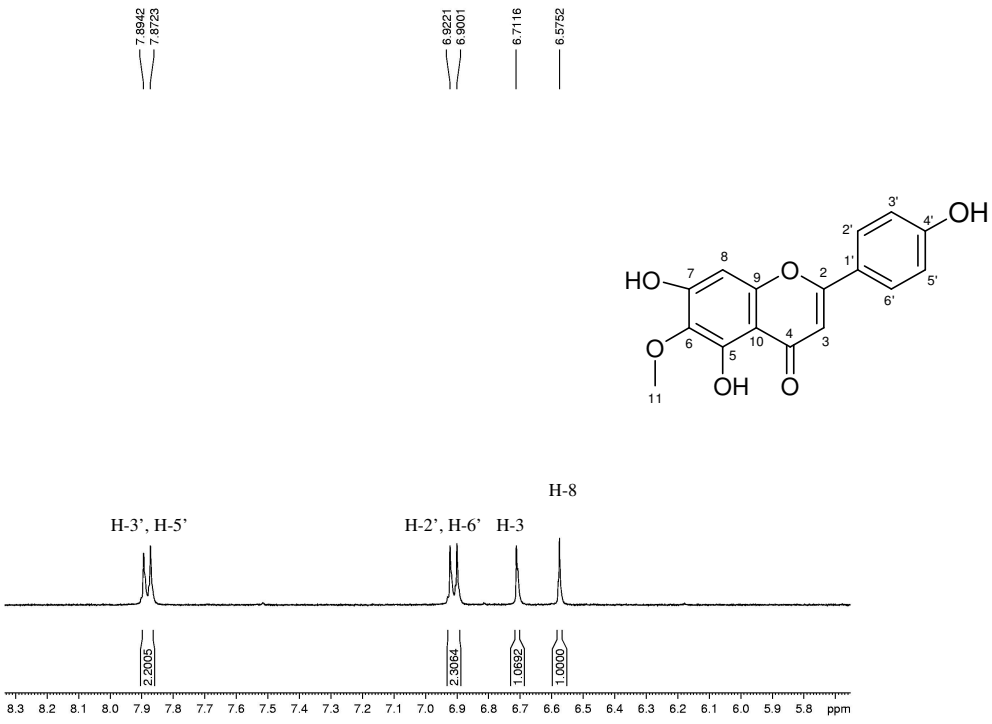


Figura 71. Expansão do espectro de RMN de ^{1}H da amostra A3OC16 obtida em 400 MHz solubilizada em DMSO-*d6.*

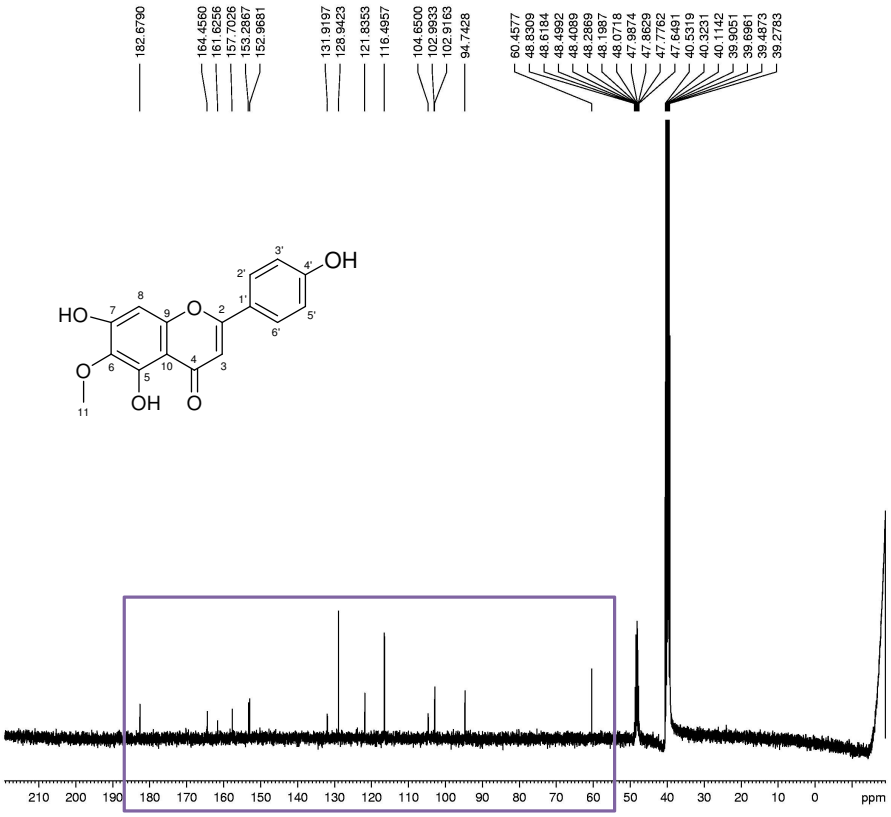


Figura 72. Espectro de RMN de ^{13}C da amostra A3OC16 obtida em 400 MHz solubilizada em DMSO-*d6*.

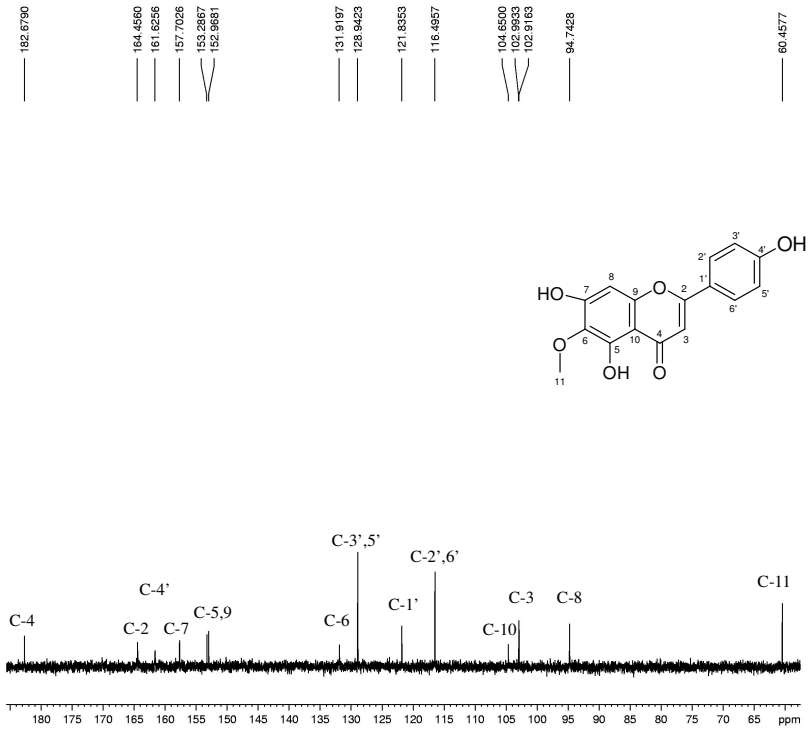


Figura 73. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C da amostra A3OC16 obtida em 400 MHz solubilizada em DMSO-*d6*.

A **Tabela 18** resume os valores de deslocamentos dos sinais de hidrogênio ^{1}H e de ^{13}C obtidos por RMN.

Tabela 18. Deslocamentos de ^{1}H e ^{13}C em 400 MHz

H/ C	δ ^{1}H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
2	-	164,45
3	6,71 (1H, *s*)	102,99
4	-	182,67
5	-	153,28
6	-	131,91
7	-	154,7
8	6,57 (1H, *s*)	94,74
9	-	152,96
10	-	104,65
11	3,74 (3H, *s*)	60,45
1’	-	121,83
2’	6,91 (2H, *d*, *J* = 8,8 Hz)	116.49
3’	7,88 (2H, *d*, *J* = 8,79 Hz)	128,94
4’	-	161,62
5’	7,88 (2H, *d*, *J* = 8,79 Hz)	128,94
6’	6,91 (2H, *d*, *J* = 8,8 Hz)	116.49

Analisando-se o perfil de ressonância do metabólito isolado observa-se no espectro de espectro de RMN de ^{1}H, sinais de deslocamento químicos característicos de compostos pertencentes à classe dos flavonóides em especial o sinal em δ 13,0 ppm devido a interação entre o oxigênio do C-4 e o hidrogênio da hidroxila ligada ao C-5.

O espectro de ^{1}H exibiu 6 sinais na região de hidrogênios aromáticos (δ 6,88-6,57 ppm), sendo dois hidrogênios como dubleto mais desblindado em δ 7,88 ppm (*J* = 8,79 Hz, H-3’ e H-5’) e dois hidrogênios também como dubleto em δ 6,91 ppm (*J* = 8,8 Hz, H-2’ e H-6’), sinais estes correspondentes ao anel C e B do núcleo flavonoídico. Na região dos aromáticos observa-se ainda dois singletos mais blindados em δ 6,71 ppm e δ 6, 57 ppm, referentes aos hidrogênios 3 e 8 do anel C e A. O espectro de RMN ^{1}H

apresenta ainda um sinal referente a três hidrogênios em δ 3,74 ppm, região mais blindada do espectro.

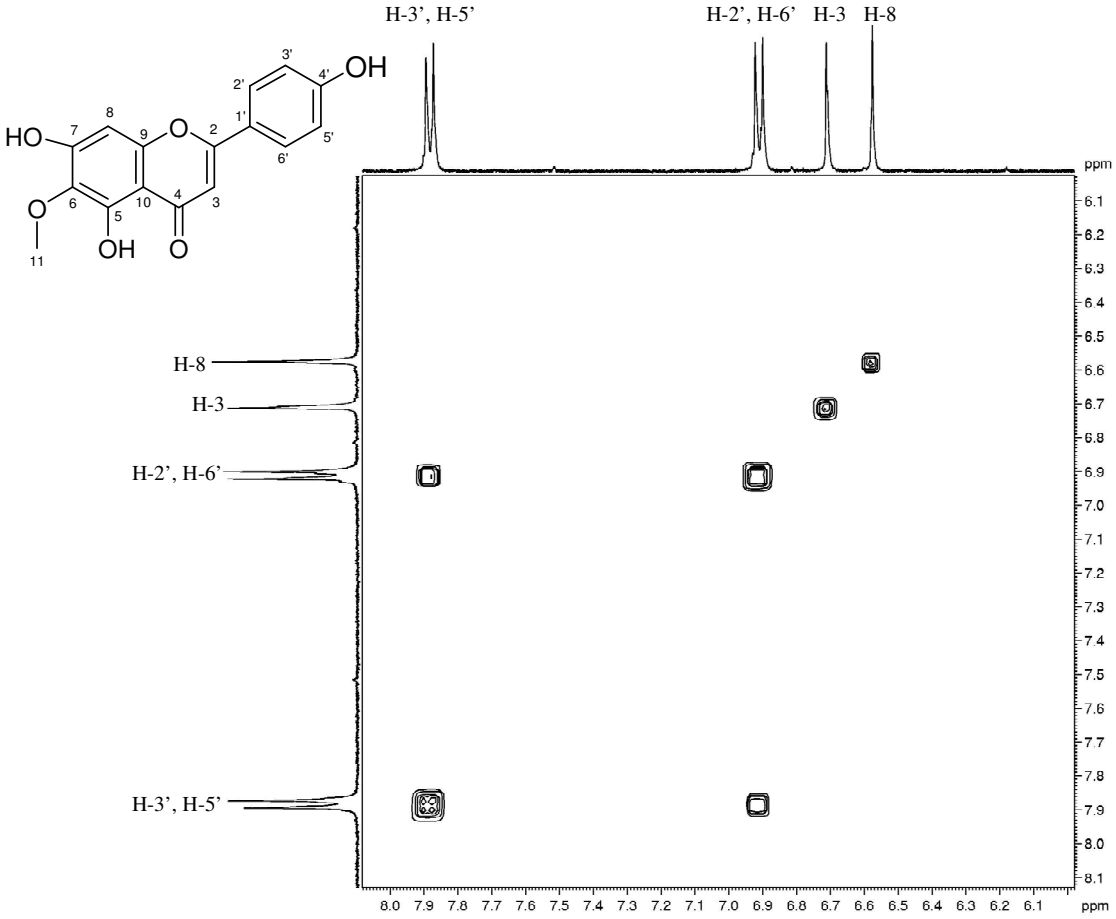


Figura 74. Espectro de COSY da amostra A3OC16 obtida em 400 MHz solubilizada em DMSO-*d6*.

O espectro de COSY (**Figura 74**) confirma o acoplamento de 8.8 Hz, entre os hidrogênios 2' e 6' e 3' e 5', sugerindo um acoplamento de hidrogênios na posição *orto* do anel aromático B.

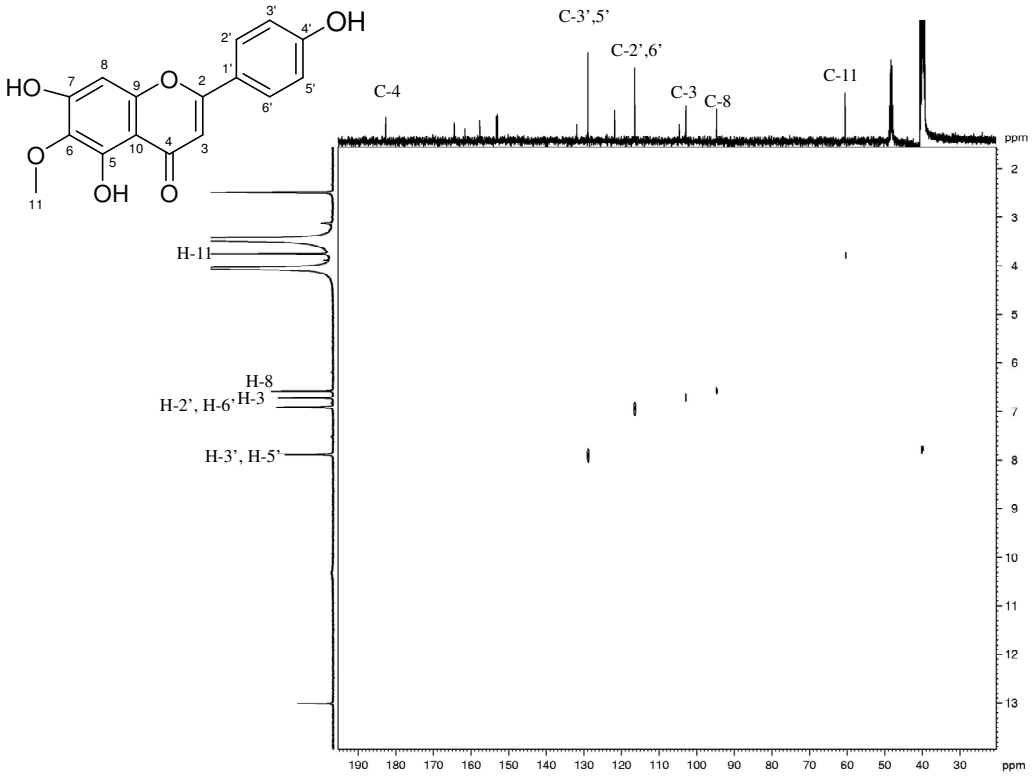


Figura 75. Espectro de HSQC da amostra A3OC16 obtida em 400 MHz solubilizada em DMSO-*d6*.

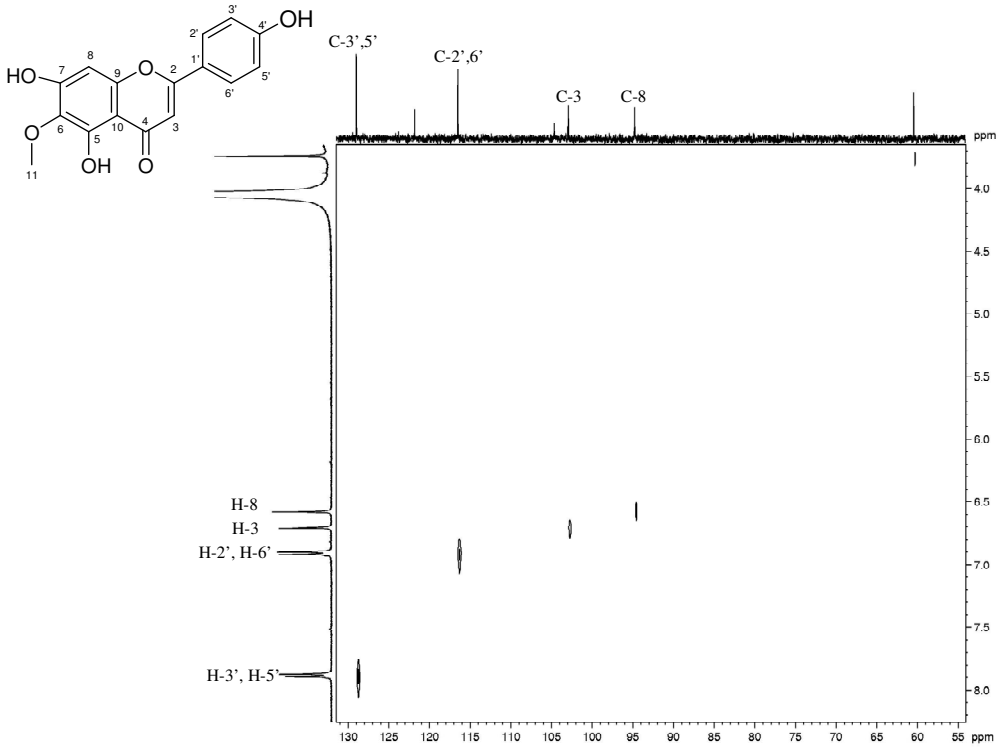


Figura 76. Expansão do espectro de HSQC da amostra A3OC16 obtida em 400 MHz solubilizada em DMSO-*d6*.

O espectro bidimensional HSQC (**Figuras 75 e 76**) mostra a correlação do hidrogênio H-8 (δ 6,57 ppm), com o carbono C8 (δ 94,74 ppm) e a correlação do hidrogênio H-3 (δ 6,71 ppm), com o carbono C3 (δ 102,99 ppm). Esta última correlação entre H-3 e C-3, um singleto não espectro de RMN ^{1}H, apresenta-se caracteristicamente para a classe das flavonas. Observa-se ainda os acoplamentos entre os hidrogênios 3' e 5' (δ 7,88 ppm) com os carbonos 3' e 5' (δ 128,94 ppm) e os acoplamentos entre os hidrogênios 2' e 6' (δ 6,91 ppm) com os carbonos 2' e 6' (δ 116,49 ppm), respectivamente.

O singleto em δ 3,74 ppm (H-11) que está correlacionado com o C11 (δ 60,45 ppm) apresenta-se em uma região mais desblindada do espectro quando comparada à região de hidrogênios de metila, desta forma podemos sugerir que o sinal é referente à uma metila ligada diretamente a um heteroátomo. A **Figura 77** demostra os acoplamentos retirados dos espectros de COSY e HSQC.

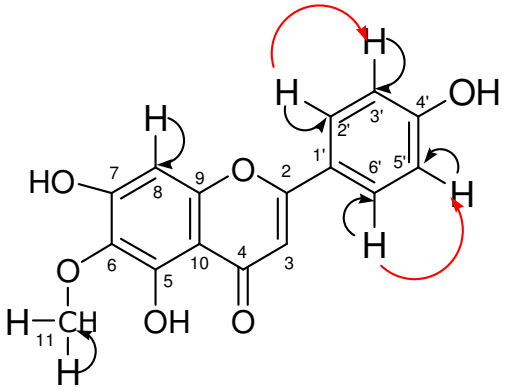


Figura 77. Correlações e acoplamentos observados nos espectros de HSQC e COSY. Os acoplamentos estão representados pelas setas em vermelho.

Com os dados obtidos dos experimentos de massa de alta resolução, RMN de ^{1}H, ^{13}C, COSY e HSQC, pode-se sugerir que o composto A3OC16 pertence à classe das flavonas e denomina-se **5,7,4'-triidroxi-6-metoxi-flavona** (**hispidulina**).

Segundo Verdi (2005)[10], a hispidulina já foi anteriormente isolada na família Asteraceae, inclusive no gênero *Baccharis*, nas espécies *B. flabellata*, *B. pseudotenuifolia*, *B. genistelloides* e *B. trimera*, entre outras. Este metabólito possui atividades anti-inflamatória e antioxidante conhecida e vem sendo estudada no tratamento de câncer[197].

[197] Lijun, H. *et al*. Cancer Sci. 102, 219, 2011.

5.3.2.1.1.2 A3OC14

O metabólito A3OC14 foi obtido por precipitação da fração 29-37. Após aproximadamente 12 horas de repouso na bancada a fração apresentou um precipitado que foi separado manualmente com pipeta de Pasteur e após avaliação por CCD (hexano : acetato 3 : 7) apresentou-se aparentemente puro. Este foi submetido também a uma CCD em diclorometano/metanol 5% para confirmação da pureza antes de ser enviado para o RMN.

O composto A3OC14 (9 mg) apresenta-se como um sólido amarelo escuro, com Rf 0,48 em H/A 3 : 7 e ponto de fusão medido experimentalmente de 230,7-236,4, solúvel em metanol e DMSO. O cromatograma obtido no CLAE encontra-se na **Figura 78**.

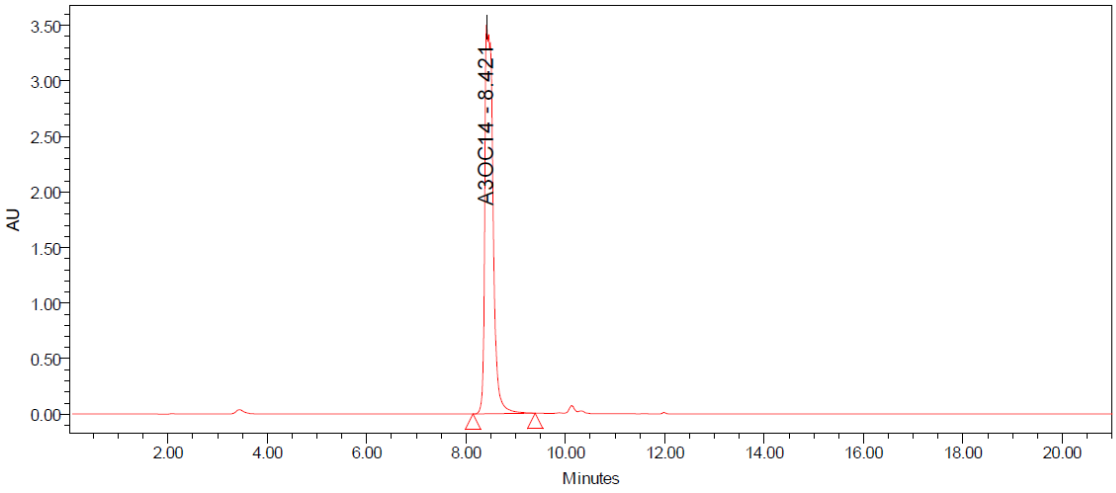


Figura 78. Perfil cromatográfico do metabólito isolado A3OC14: Coluna C18, fluxo 1 mL min^{-1}, FMA: ACN/TFA 0,05%, FM B: H2O/TFA 0,05% 15-40% em 8 min e 41-100% em 21 min. Leitura em 312 nm.

O espectro de massas obtido no modo positivo a partir do íon $[M+H]^+$ 317,0656 (**Figura 79**) apresentou como fragmentação principal o pico base m/z 302,0410 (**Figura 80**) referente a perda de uma metila, sendo a fórmula molecular acurada compatível com $C_{16}H_{12}O_7$.

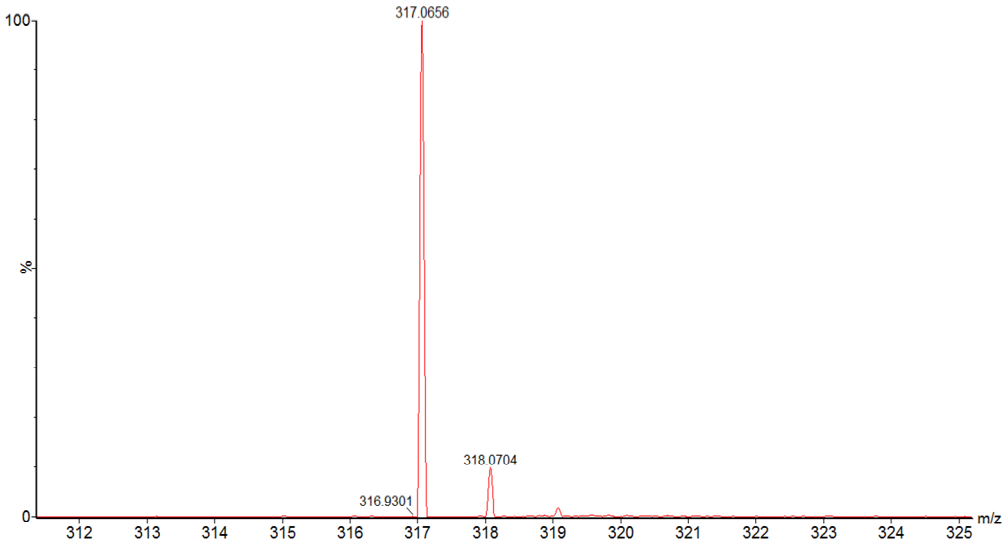


Figura 79. Espectro de massa do composto A3OC14, íon molecular $[M+H]^+$ 301,0729 (modo positivo). Análise por infusão direta utilizando solução ACN : H2O (1:1) 0,1% TFA. Equipamento utilizado: Synapt HDMS Q-TOF (Waters Co.)

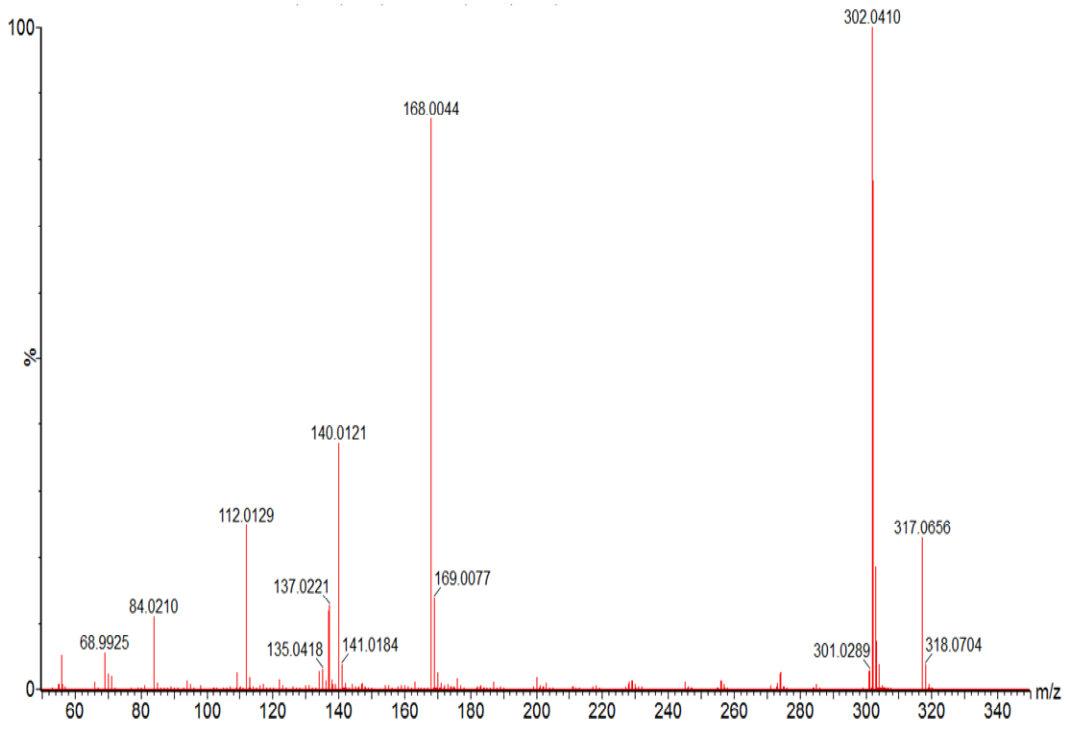


Figura 80. Espectro de EM/EM do íon $[M+H]^+$ 317,0656 (modo positivo). Análise do composto isolado A3OC14, por infusão direta utilizando solução ACN : H2O (1:1) 0,1% TFA. Equipamento utilizado: Synapt HDMS Q-TOF (Waters Co.)

O metabólito A3OC14 (**Figura 81**) foi analisado em 400 MHz, solubilizado em DMSO deuterado e apresenta características de substância pura como podemos observar nos espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C apresentados nas **Figuras 82, 83** e **84**.

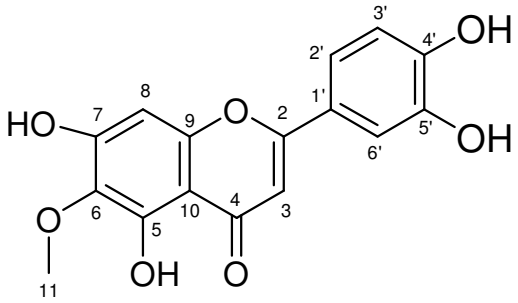


Figura 81. Estrutura do A4OC14

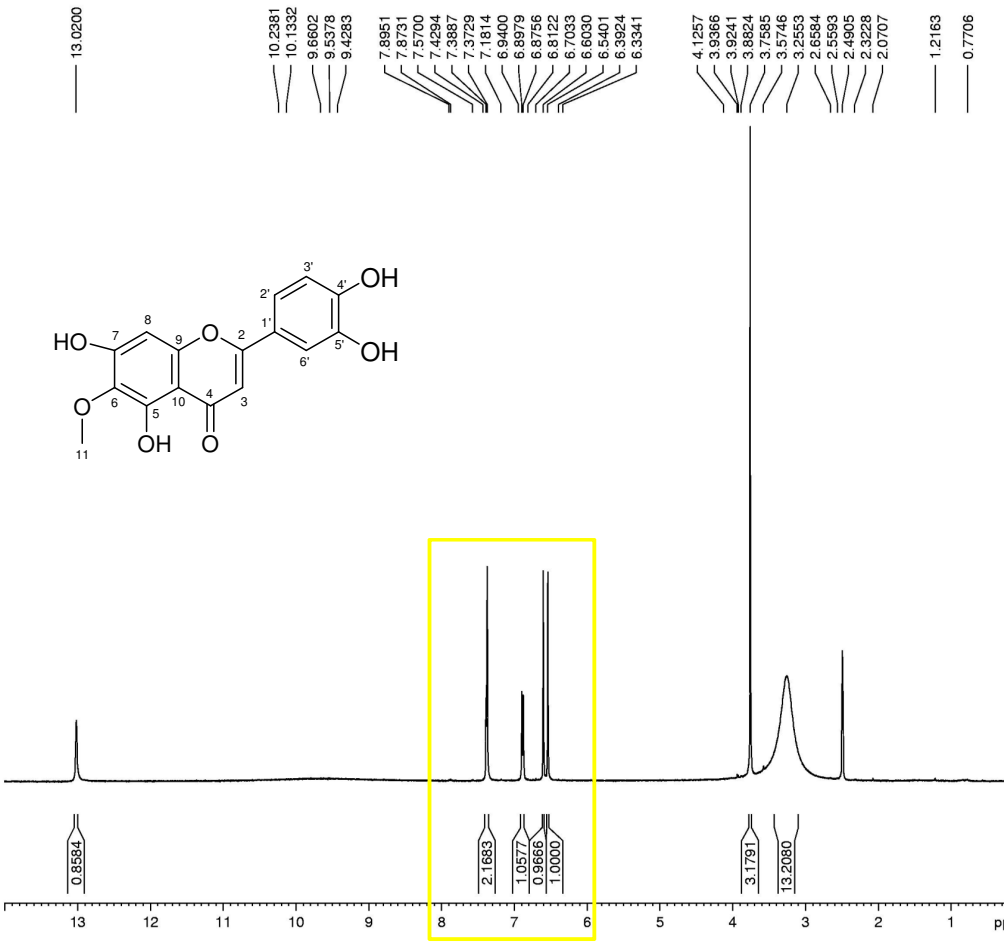


Figura 82. Espectro de RMN de ^{1}H da amostra A3OC14 obtida em 400 MHz solubilizada em DMSO–*d6*.

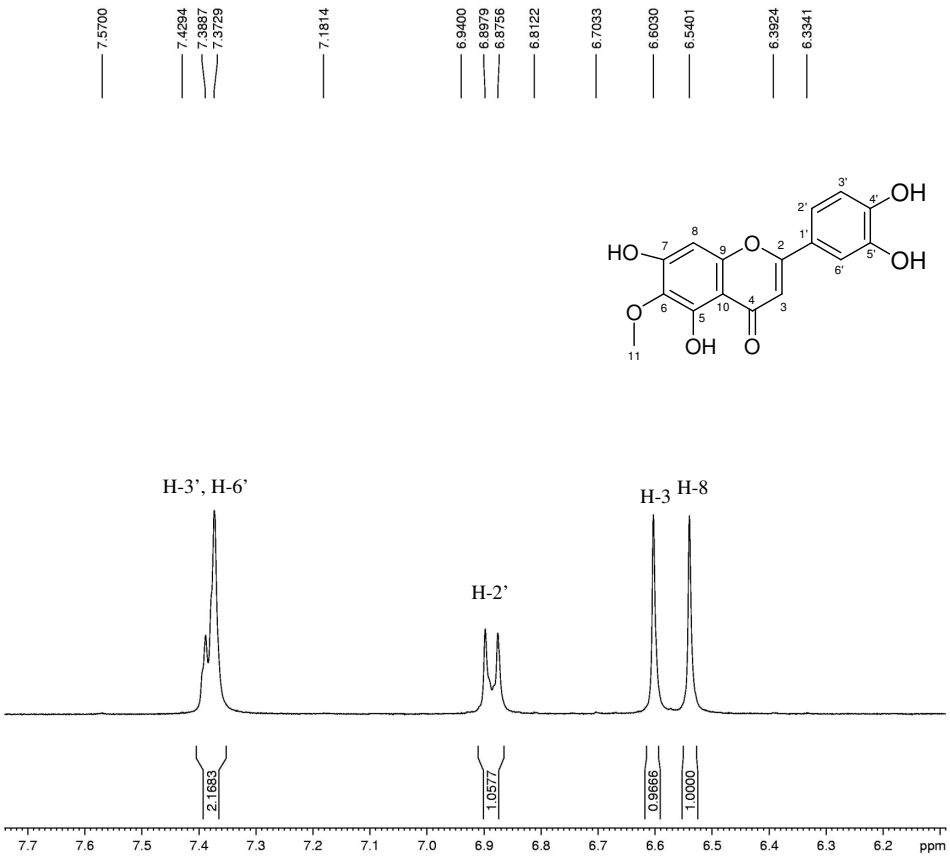


Figura 83. Expansão do espectro de RMN de ^{1}H da amostra A3OC14 obtida em 400 MHz solubilizada em DMSO–*d6*.

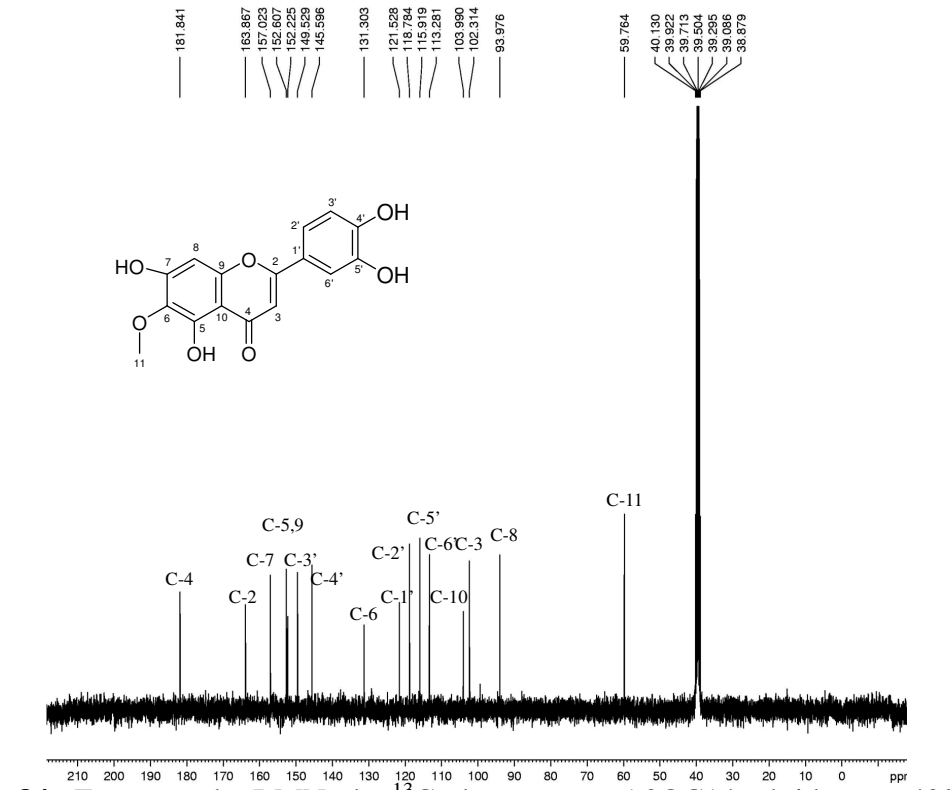


Figura 84. Espectro de RMN de ^{13}C da amostra A3OC14 obtida em 400 MHz solubilizada em DMSO-*d6*.

O espectro de ^{1}H exibiu 6 sinais na região de hidrogênios aromáticos (δ 7,42-6,54 ppm), sendo dois hidrogênios mais desblindados como um multipleto em δ 7,38 ppm (*J* = 7,28 Hz, H-3' e H-6') e um hidrogênio como dubleto em δ 6,92 ppm (*J* = 8,92 Hz, H-2') sinais estes correspondentes ao anel B do núcleo flavonoídico. O anel B poderia estar substituído em C-3'/4' ou C-2'/4', porém os valores dos valores dos deslocamentos químicos destes hidrogênios, bem como a visualização dos carbonos em δ 145,5 ppm e 149,5 ppm, confirmam que a substituição é do tipo catecol (C-3' e C-4')[198]. Na região dos aromáticos observa-se ainda dois singletos mais blindados em δ 6,6 ppm e δ 6, 54 ppm, referentes aos hidrogênios 3 e 8 do anel C e A, respectivamente.

O espectro de RMN ^{1}H apresenta ainda um sinal referente a três hidrogênios em δ 3,75 ppm, região mais blindada do espectro, sinal este pertencente a uma metila. Este espectro de RMN ^{1}H exibe também um pico mais desblindado em δ 13,02 ppm, característico da classe dos flavonoides e referente a interação entre o oxigênio ligado ao C-4 e o hidrogênio da hidroxila ligada ao C-5.

Na **tabela 19** estão descritos os sinais referentes aos deslocamentos dos sinais de ^{1}H e ^{13}C, referentes ao metabólito A3OC14.

[198] AGRAWAL, P. K. Carbon-13 NMR of flavonoids. Elseiver Science Publishing Company Inc, New York, cap 9, p 497-524, 1989.

Tabela 19. Deslocamentos de ^{1}H e 13C referentes ao metabólito A3OC14

H / C	δ ^{1}H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
2	-	163,86
3	6,6 (1H, *s*)	102,31
4	-	181,4
5	-	152,6
6	-	131,3
7	-	157,02
8	6,54 (1H, *s*)	93,97
9	-	152,22
10	-	103,99
11	3,75 (3H, *s*)	59,76
1’	-	121,52
2’	6,92 (1H, *d*, *J* = 8,92 Hz)	118,78
3’	7,38 (2H, *m*, *J* = 8,92 Hz)	145,52
4’	-	149,59
5’	-	115,91
6’	7,38 (2H, *m*, *J* = 8,92 Hz)	113,28

O expansão do espectro de COSY, **Figura 85**, abaixo, confirma o acoplamento de 8,92 Hz, entre os hidrogênios 2’e 3’/6’ e sugere que estes hidrogênios estão em acoplamento *orto* no anel B.

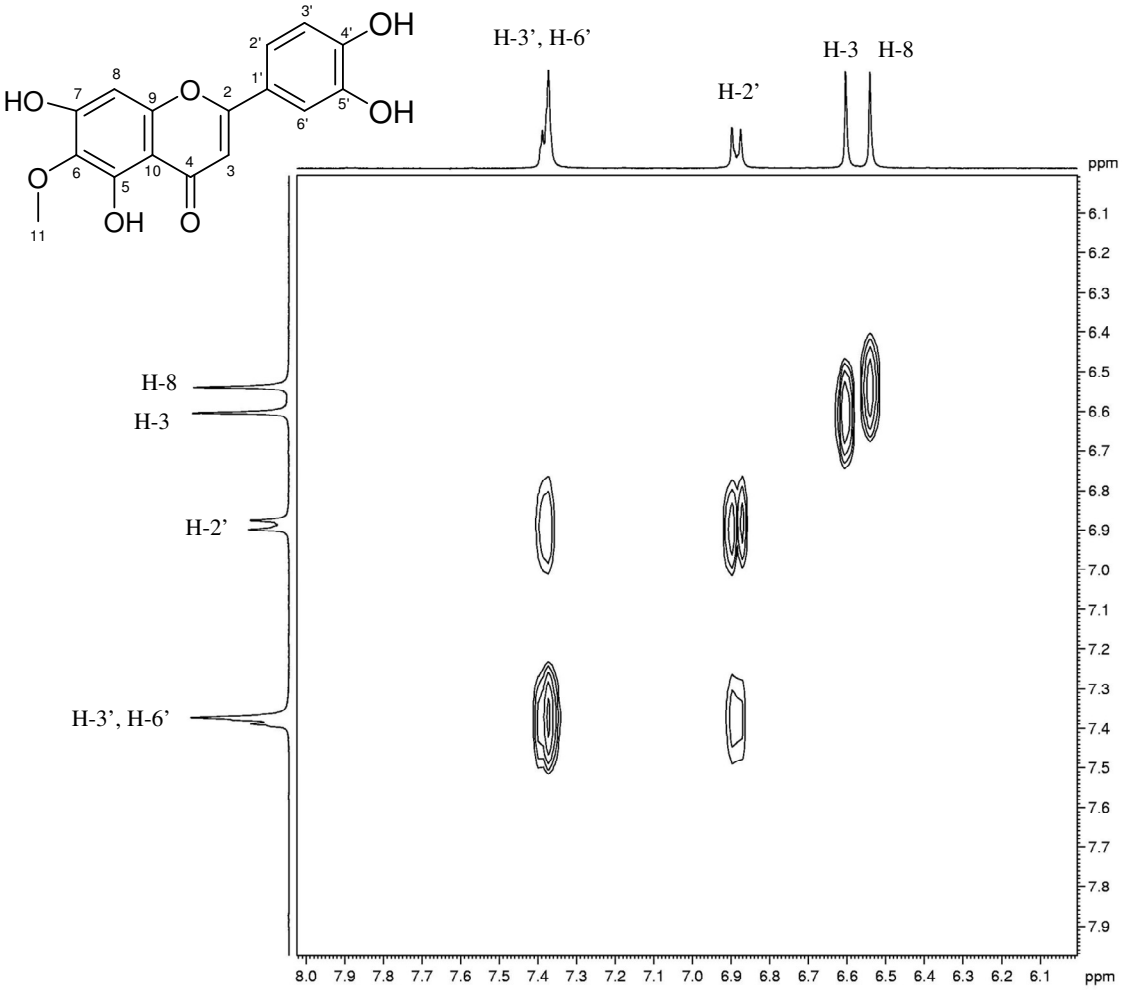


Figura 85. Expansão do espectro de COSY da amostra A3OC14 obtida em 400 MHz solubilizada em DMSO-*d6*.

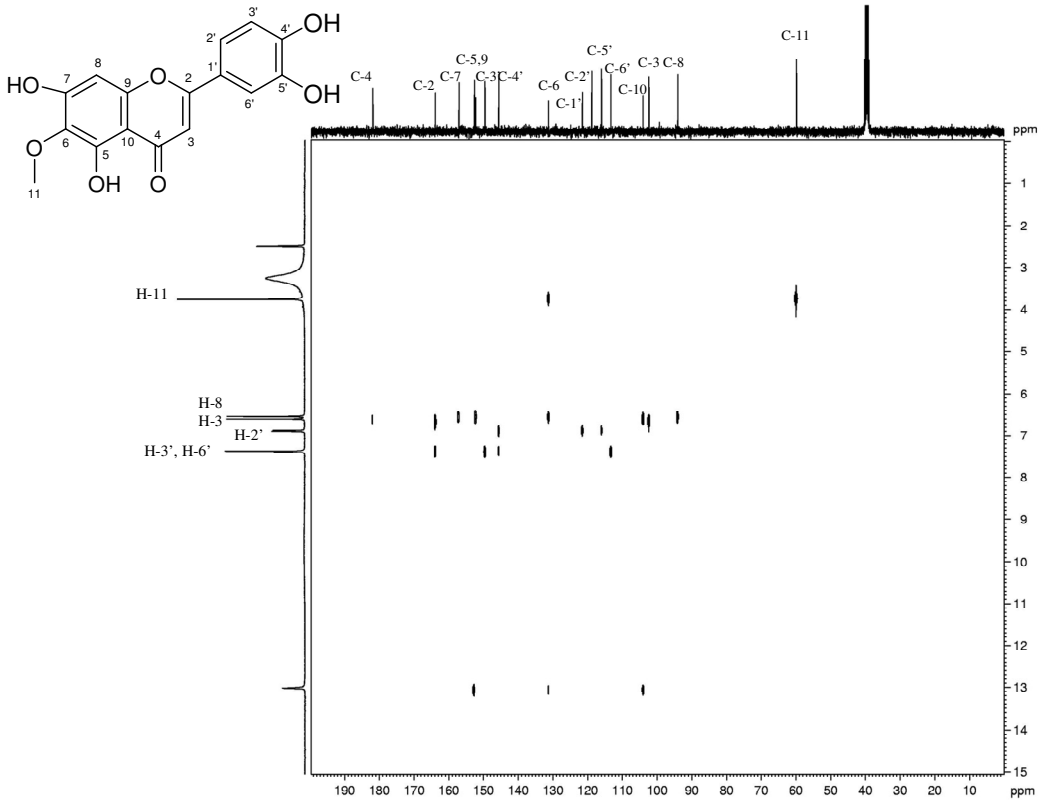


Figura 86. Espectro de COLOQ da amostra A3OC14 obtida em 400 MHz solubilizada em DMSO-*d6*.

O espectro bidimensional COLOQ (**Figura 86)** mostra as correlações entre os singletos dos hidrogênios H-3 (δ 6,60 ppm) e H-8 (δ 6,54 ppm) com os carbonos C-3 (δ 102,31 ppm) e C-8 (δ 93,97 ppm), respectivamente. Este singleto em H-3 (δ 6,60 ppm) acoplado ao C-3 (δ 102,31 ppm) é característico da classe das flavonas. O hidrogênio H–3 (δ 6,60 ppm) acopla ainda com os carbonos C-10 (δ 103,99 ppm), C-2 (δ 163,86 ppm) e o hidrogênio H-8 (δ 6,54 ppm) com os carbonos C-6 (δ 131,3 ppm), C-7 (δ 157,02 ppm) e C-5,9 (δ 152,6 ppm) Este espectro mostra ainda os acoplamentos entre os hidrogênios H-2' (δ 6,92 ppm) com os carbonos C-2' (δ 118,78 ppm), C-6'(δ 113,28 ppm) e C-4'(δ 145,59 ppm) e H-6'/3' (δ 7,38 ppm) com os carbonos C-6' (δ 113,28 ppm), C-4'(δ 145,59 ppm), C-3'(δ 149,52 ppm) e C-2 (δ 163,86 ppm).

O singleto em δ 3,75 ppm (H-11) que está correlacionado com o C11 (δ 59,76 ppm) apresenta-se em uma região desblindada do espectro quando comparada à região de hidrogênios da metila, desta forma, podemos sugerir que o sinal é referente à

uma metila ligada diretamente a um heteroátomo. A **Figura 87** demostra os acoplamentos retirados dos espectros bidimensionais de COSY e COLOQ.

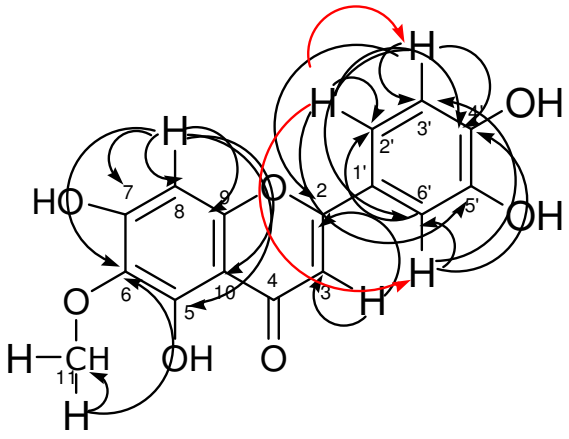


Figura 87. Correlações e acoplamentos observados nos espectros de COLOQ e COSY. Os acoplamentos estão representados pelas setas em vermelho.

Na **Tabela 20** podemos observar todas as correlações extraídas do espectro de COLOQ que auxiliaram a determinação da posição da metoxila no carbono 6 do anel A além de confirmar os sinais de carbonos nos sistemas de anéis aromáticos e hetero-aromáticos.

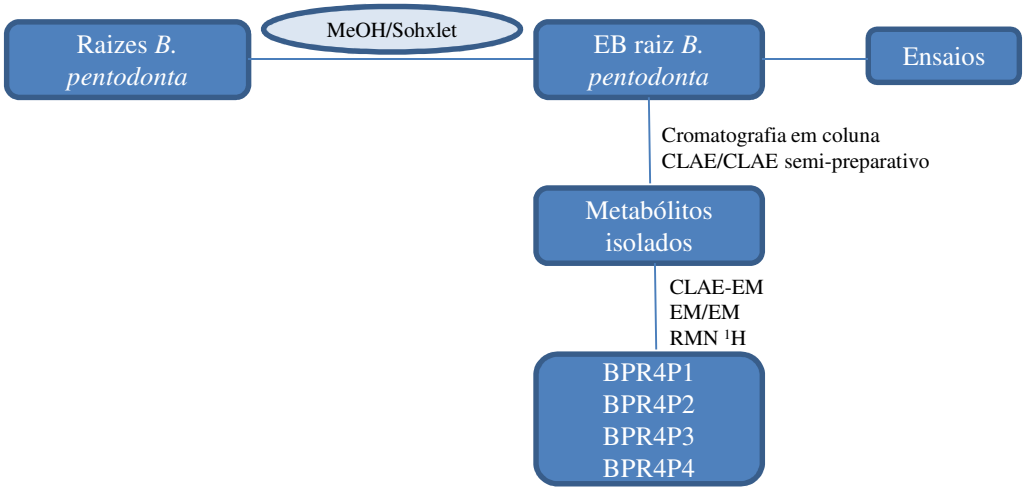
Tabela 20. Correlações visualizadas no espectro de COLOQ para A3OC14

δ ^{1}H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
(H-11) 3,37	(C-11) 59,76, (C-6) 131,3
(H-8) 6,54	(C-8) 93,97 (C-10) 103,99 (C-6) 131,3 (C-7) 157,02(C-5) 152,6 (C-9) 152,22
(H-3) 6,6	(C-3) 102,31 (C-2) 163,86
(H-3´) 7,38	(C-3´) 149,52 (C-6´) 113,28 (C-4´) 145,59 (C-2) 163,86
(H-6´) 7,38	(C-6´) 113,28 (C-4´) 145,59 (C-3´) 149,52 (C-2) 163,86
(H-2´) 6,92	(C-2´) 118,78 (C-5´) 115,91 (C-4´) 145,59

Com os dados obtidos dos experimentos de massa de alta resolução, RMN de ^{1}H, ^{13}C, COSY e COLOQ, pode-se sugerir que o composto A3OC14 pertence à classe dos flavonóides e denomina-se **5,7,3',4'-tetrahidroxi-6-metoxi-flavona** (**6-metoxi-luteonina**).

5.3.2.2 Raiz

A raiz de *B. pentodonta* moída foi extraída com metanol à quente em soxhlet até completa exaustão. O **Esquema 18** demonstra esquematicamente o tratamento realizado com a raiz de *B. pentodonta*.



Esquema 18. Extração em metanol à quente (Soxhlet) das raízes de *B. pentodonta*

O extrato bruto (EB) obtido foi submetido a uma filtração em coluna sendo posteriormente analisado por CLAE. As frações obtidas, bem como os sistemas solventes utilizados estão dispostos na **Tabela 21.**

A filtração foi realizada em coluna de sílica gel (30-70 µm) utilizando como solvente inicial hexano 100%. A amostra (1,2 g) foi adsorvida a sílica gel com metanol, formando uma pastilha posteriormente adicionada ao topo da coluna de filtração.

Tabela 21. Frações obtidas com os respectivos sistemas solventes utilizados na filtração do EB da raiz de *B. pentodonta*.

Fração	Sistema solvente	Denominação	Massa
1	H	ác. graxo/clorofila	-
2	H/D 1:1	clorofila	137mg
3-51	D 100%	clorofila	-
52-65	D/A 1:1	clorofila	-
66-73	A 100%	clorofila	-
74-97	A/M 1:1	**BPR2** - 82-103 (pp)= 22mg **BPR3** - 82-103 (sobre)= 209mg **BPR4** - 77-81= 166mg	397mg
98-106	M 100%	-	-
107-120	M/água 1:1	**BPR5**	50mg

As frações obtidas após esta filtração também foram analisadas e as que apresentaram boa resolução foram submetidas ao CLAE semi-preparativo para isolamento.

As sub-frações denominadas BPR2, BPR3 e BPR5 foram injetadas no CLAE semi-preparativo, porém nenhum composto puro foi obtido. A sub-fracão BPR4 apresentou boa resolução no CLAE e será discutida posteriormente.

5.3.2.2.1 Fração acetato/metanol do extrato bruto da raiz de *B. pentodonta* (BPR4)

A sub-fracão BPR4 (**Figura 88**) apresentou-se com a melhor resolução e foi injetada no CLAE semi-preparativo para isolamento de seus constituintes principais.

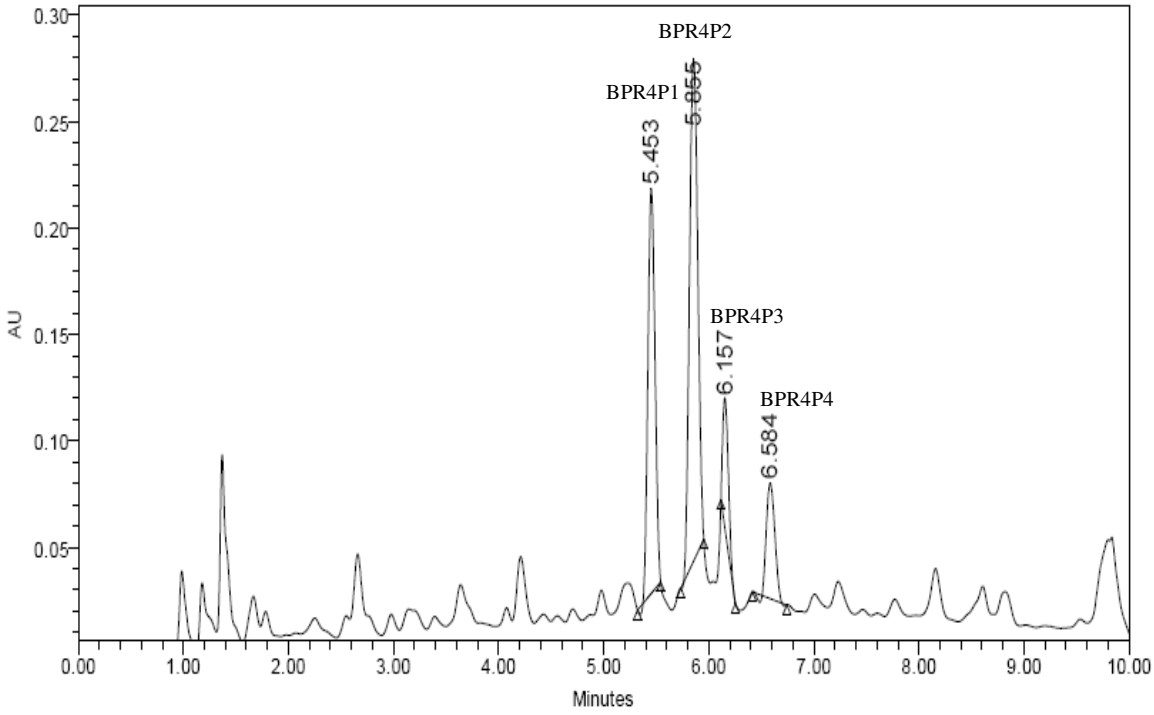


Figura 88. Perfil cromatográfico da fração BPR4, por CLAE: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 2 minutos: total corrida 10 minutos. Leitura em 312 nm.

Na **Figura 88**, acima, está representado o cromatograma obtido para a amostra BPR4 no CLAE. Na **Figura 89**, temos o perfil desta mesma amostra após injeção no CLAE semi-preparativo para o isolamento dos componentes majoritários. Na injeção utilizou-se como sistema solvente acetonitrila / água 15-40% em 30 minutos. 41 mg de amostra foi dissolvida em 5 mL de acetonitrila / água 1:4, sendo injetados no semi-preparativo 4,5 mL da mesma. A leitura foi em 220 nm.

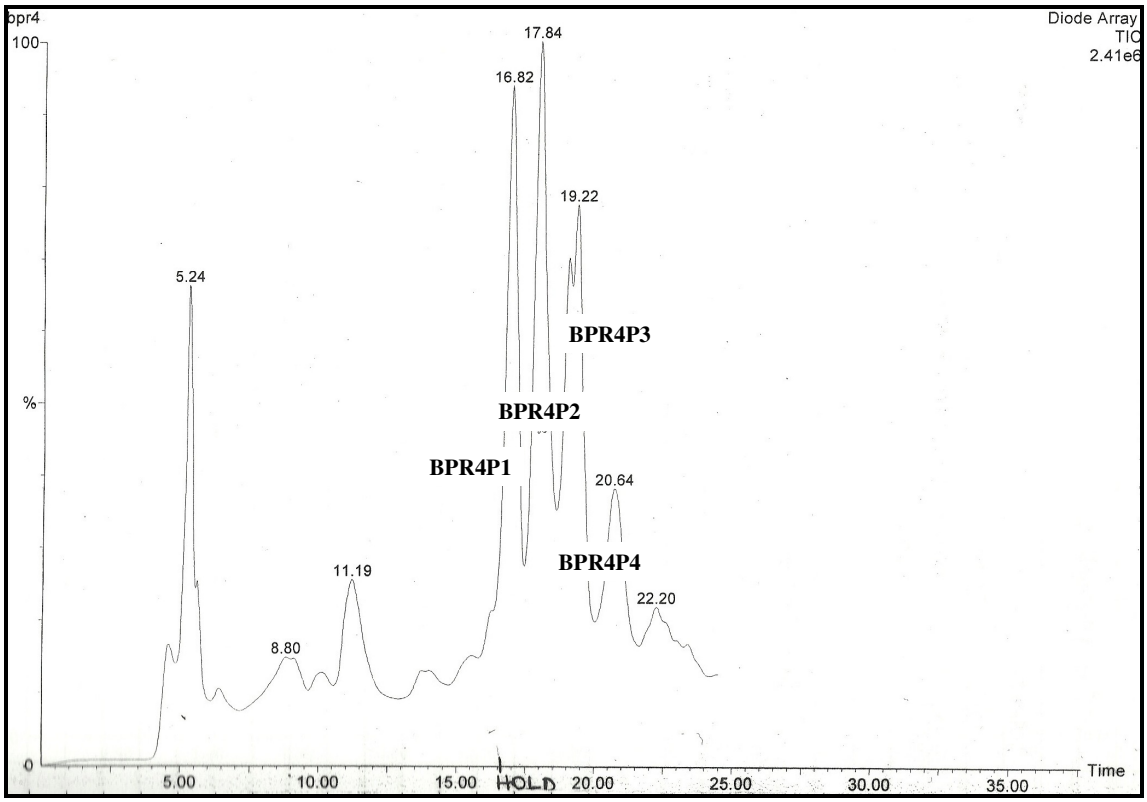


Figura 89. Perfil cromatográfico por CLAE semi-preparativo da fração BPR4 após filtração: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 200 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 2 mL min^{-1}, 15-40% em 30 minutos. Leitura em 220 nm.

Da sub-fracão BPR4 foram isoladas 4 substâncias, denominadas BPR4P1, BPR4P2, BPR4P3 e BPR4P4. As três primeiras substâncias são comuns aos metabólitos já isolados tanto na raiz, quanto na FAqA de *P. sagittalis* e foram citados anteriormente estando somente os cromatogramas e os espectros de UV obtidos por CLAE apresentados abaixo, nas **Figuras 90, 91** e **92**, respectivamente.

Segundo Miketova e col (1999)[59] o primeiro relato de dos ácidos 3,5- e 4,5-dicafeoilquínicos no gênero *Baccharis* foi em 1999, em *B. thesioides* HBK.

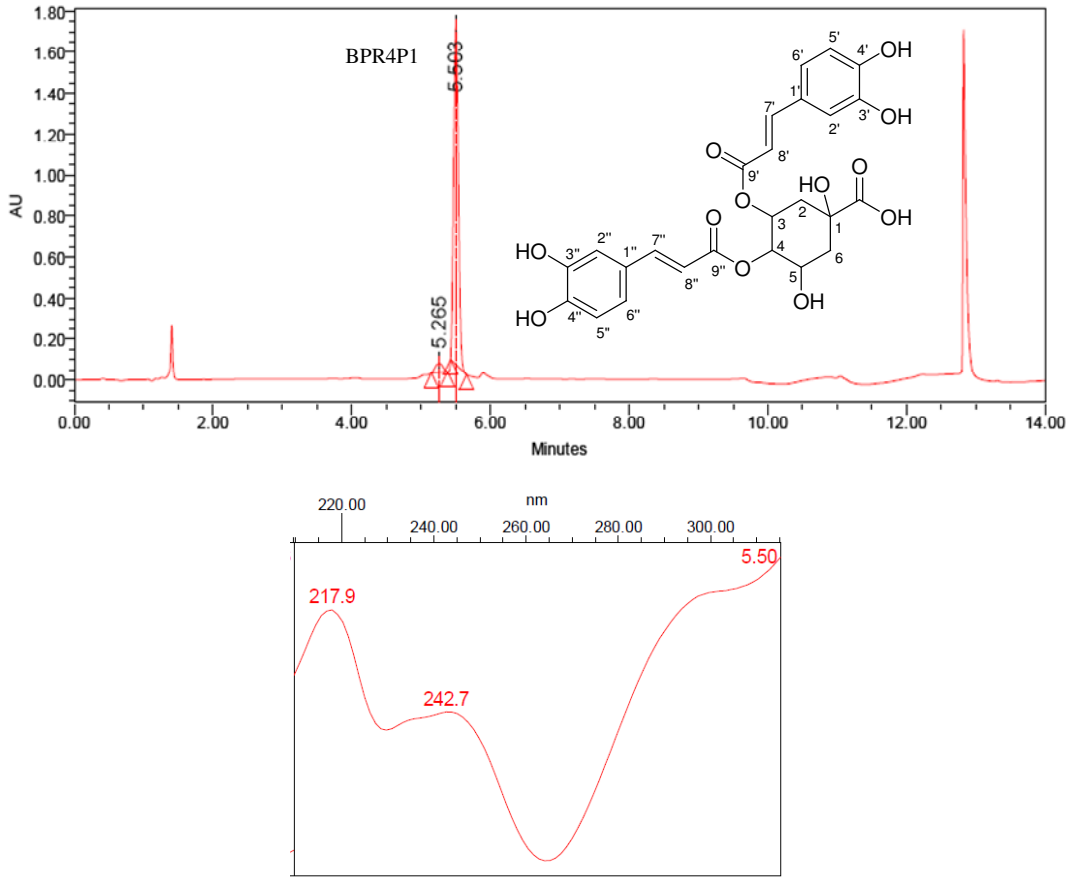


Figura 90. Perfil cromatográfico do composto isolado BPR4P1, por CLAE: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 6 minutos: total corrida 14 minutos. Leitura em 312 nm – **ácido 3,4-dicafeoilquínico** e espectro de UV do mesmo composto também em 312 nm.

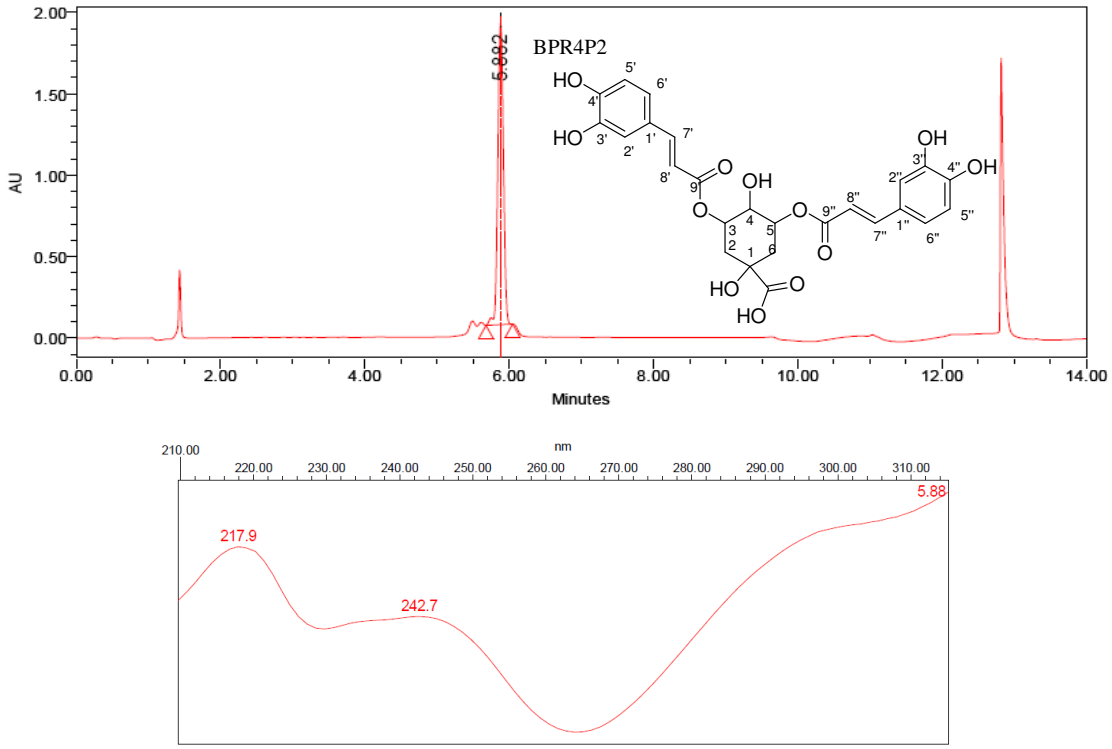


Figura 91. Perfil cromatográfico do composto isolado BPR4P2, por CLAE: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 6 minutos: total corrida 14 minutos. Leitura em 312 nm – **ácido 3,5-dicafeoilquínico** e espectro de UV do mesmo composto também em 312 nm.

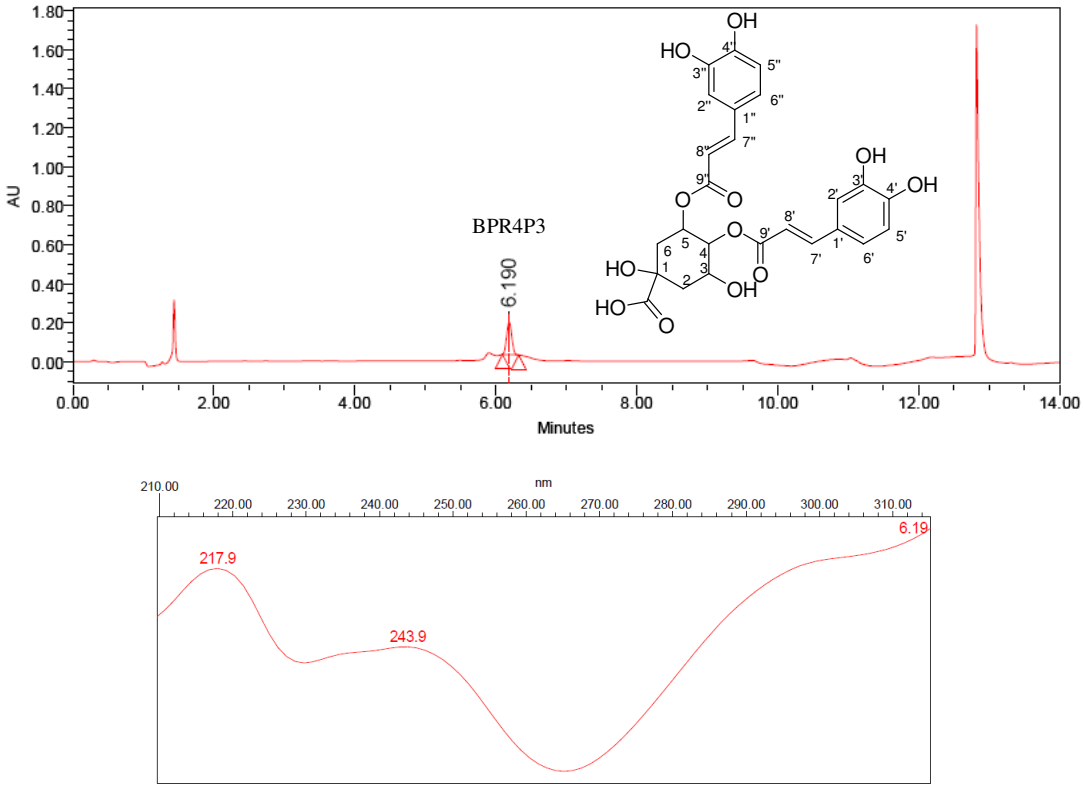


Figura 92. Perfil cromatográfico do composto isolado BPR4P3, por CLAE: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 6 minutos: total corrida 14 minutos. Leitura em 312 nm – **ácido 4,5-dicafeoilquínico** e espectro de UV do mesmo composto também em 312 nm.

5.3.2.2.1.1 BPR4P4

O metabólito BPR4P4, abaixo, foi isolado somente em *B. pentodonta* na forma de um sólido amarelado. Sua identificação foi realizada baseada na comparação dos dados obtidos por massa de alta resolução com dados disponíveis de literatura[36] chegando-se ao metabólito ácido 3-feruloil-5-cafeoilquínico (3-AFCQ) (**Figura 93**).

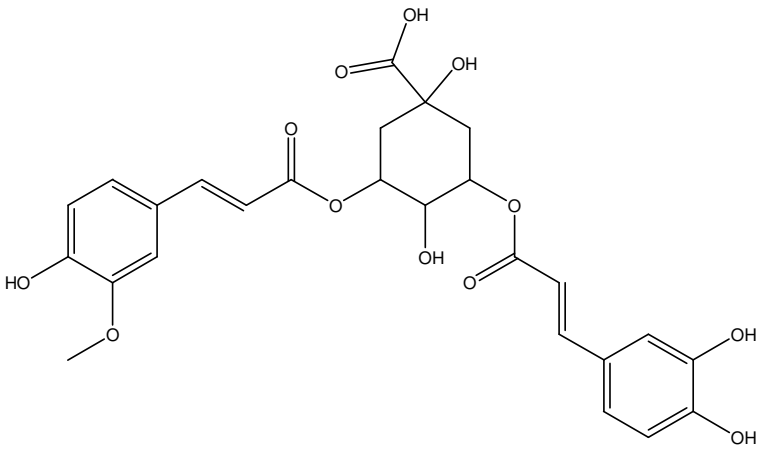


Figura 93. Estrutura do 3-feruloil-5-cafeoilquínico.

Na sequência está apresentado o cromatograma obtido por CLAE (**Figura 94**), além das fragmentações obtidas na análise de massa de alta resolução (**Figura 95**). A **Tabela 22** traz a comparação entre as fragmentações obtidas e os dados de literatura.

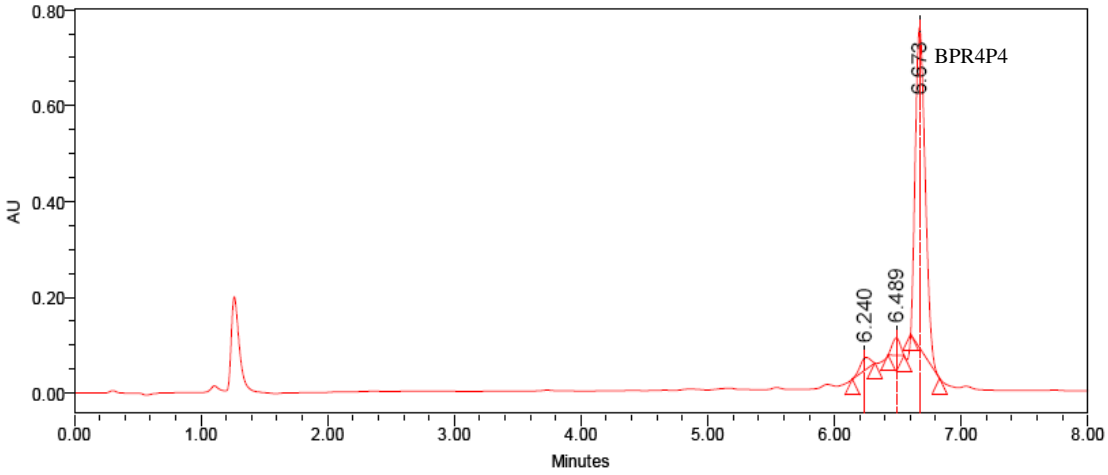


Figura 94. Perfil cromatográfico do composto isolado BPR4P4, por CLAE: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 2 minutos: total corrida 10 minutos. Leitura em 312 nm.

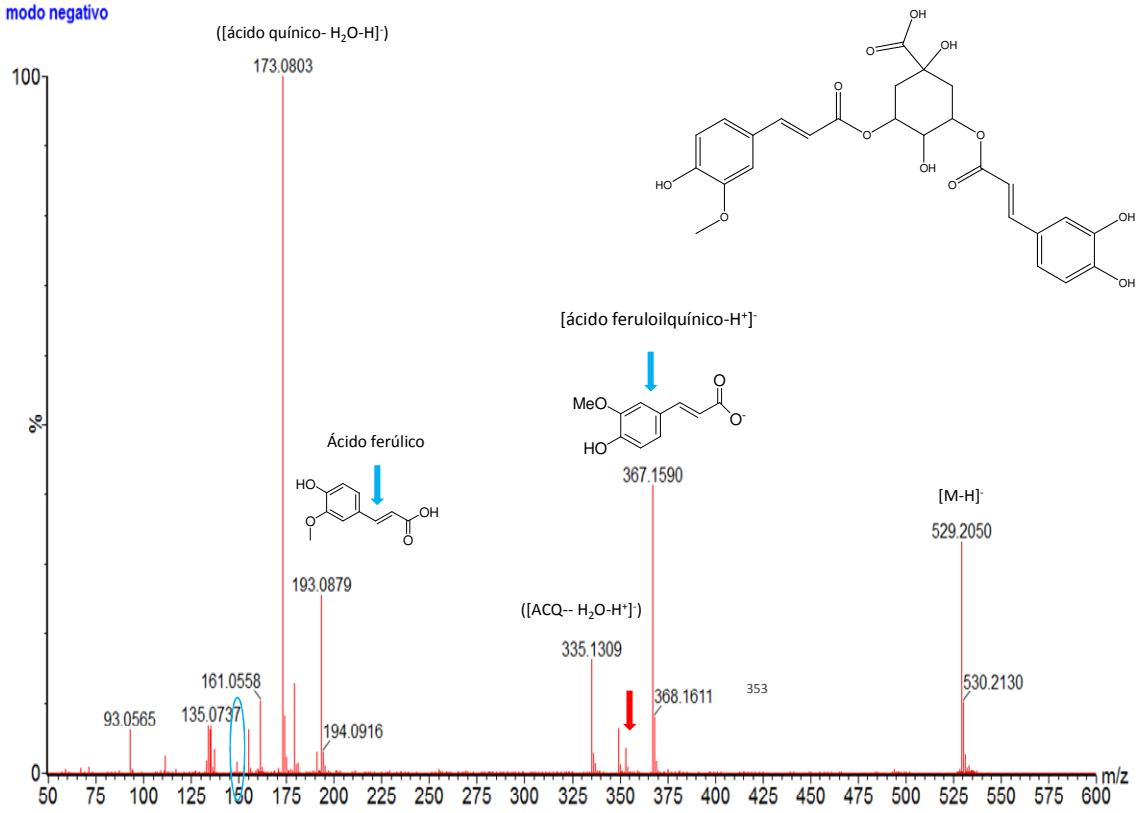


Figura 95. Espectro de EM/EM do íon $[M-H]^-$ 529,2050 (modo negativo). Análise do composto isolado BPR4P4, por infusão direta utilizando solução ACN : H2O (1:1) 0,1% TFA. Equipamento utilizado: Synapt HDMS Q-TOF (Waters Co.).

Tabela 22. Dados de EM/EM obtidos para o composto isolado BPR4P4.

	(M-H)	EM/EM				
		m/z	*m/z*	*m/z*	*m/z*	*m/z*
BPR4P4[a]	529,2050	367,1590	335,1309	193,08879	173,0803	149*
3-AFCQ[36]	529,2	367	335,5	-	173,4	149

[a]Dados obtidos experimentalmente ára BPR4P4. *Pico de intensidade muito fraca, porém visualizado.

O espectro de massa do metabólito isolado BPR4P4 apresenta como íon precursor *m/z* 529,2050, tendo como íon produto característico *m/z* 367,1590 ([ácido feruloilquínico - H]$^-$) resultante da perda de um grupamento cafeoila, os quais sao característicos de derivados feruloilquínicos. O espectro exibe ainda os íons produtos *m/z* 353 (em baixissima intensidade espectro, indicado por seta), *m/z* 193,0879, *m/z* 173,0803, *m/z* 135, 0737.

A perda preferencial do grupamento cafeoila em relação ao feruloila sugere que a molécula em questão seja o ácido 3-feruloil-5-cafeoilquínico ou o ácido 1-feruloil-5-cafeoilquínico. A presença do íon produto *m/z* 149 sugere que tenhamos o metabólito ácido 3-feruloil-5-cafeoilquínico, pois os íons produtos *m/z* 353 (*m/z* 353,1309) e *m/z* 193 (*m/z* 193,0879) definem a presença do grupo feruloila na posição 3. Outro indicio da presença do 3-feroloil-5-cafeoliquinico é a intensidade do íon produto *m/z* 173 (*m/z* 173, 0803), que deve ser mais intenso que os demais íons produtos presentes no espectro[199,200].

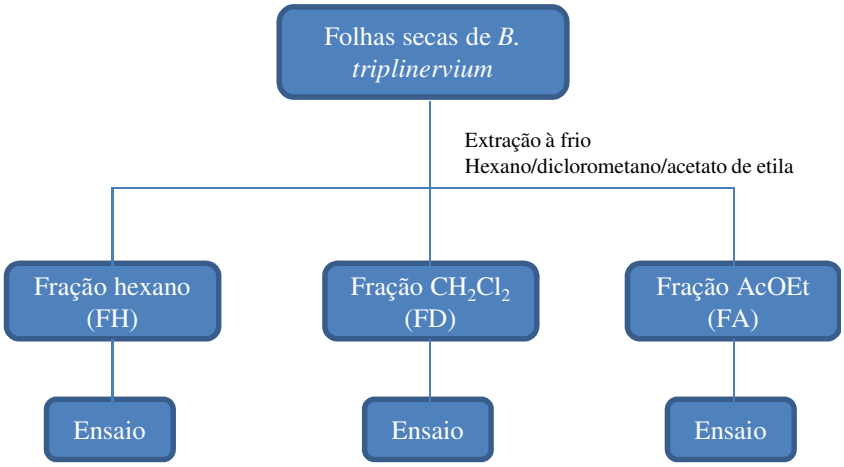
Sendo assim, podemos afirmar que o metabólito BPR4P4 é o ácido 3-feruloil-5-cafeoilquínico já que no espectro de massa deste isolado (**Figura 96**) o íon produto *m/z* 173,0803 aparece em maior intensidade que os demais e o íon produto *m/z* 149 está presente mesmo que em intensidade mínima (circulado no espectro da **Figura 97**).

[199] JAISWAL, R,; DESHPANDE, S.; KUHNERT, N. Phytochem. Anal., 22, 432, 2010.
[200] JAISWAL, R,; SOVDAT, T..; VIVAN, F.; KUHNERT, N J. Agric. Food Chem., 58, 5471, 2010

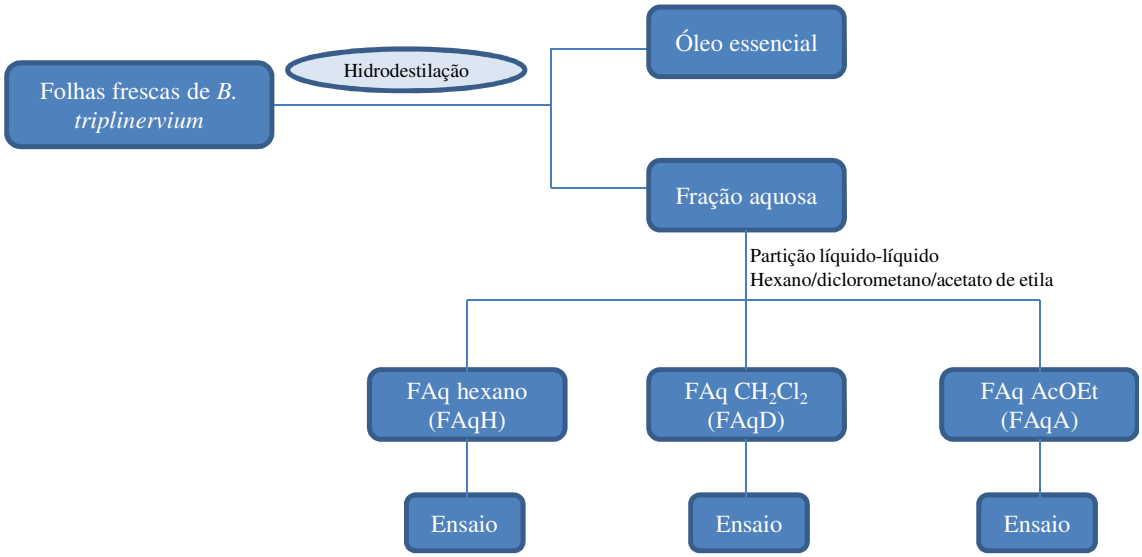
5.3.3 *Baccharidastrum triplinervium*

5.3.3.1 Folhas

As folhas de *B. triplinervium* foram tratadas de 2 maneiras diferentes. Parte das folhas, secas e moídas, foram extraídas a frio com solventes em polaridades crescentes. E, a outra parte das folhas, estas frescas e moídas tiveram seu óleo essencial extraído previamente[176], sendo a porção aquosa resultante extraída também com solventes de polaridades crescentes. Esta segunda extração (extração aquosa) foi realizada com o intuito de se obter frações derivadas de *B. triplinervium* que possuíssem menor concentração de clorofila. Os **Esquemas 19** e **20** abaixo representam as extrações realizadas com as folhas de *B. triplinervium*.

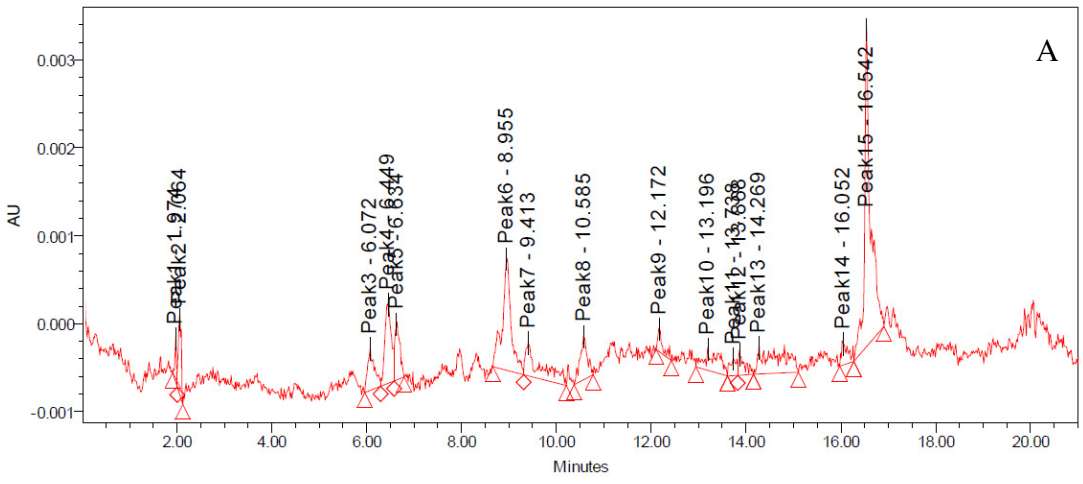


Esquema 19. Extração à frio das folhas de *B. triplinervium*



Esquema 20. Extração líquido-líquido da fração aquosa das folhas de *B. triplinervium*

Tanto as frações extraídas a frio com hexano e diclorometano, quanto as frações aquosas extraídas com estes mesmos solventes apresentaram alta concentração de clorofila em sua composição. A retirada de clorofila é algo difícil e que geralmente não origina bons resultados. Sendo assim, decidiu-se por não se trabalhar com as frações hexano e diclorometano de *B. triplinervium*. As frações acetato de etila (extraída a frio e aquosa) também se apresentam bastante esverdeadas, evidenciando a presença de clorofila nas mesmas. Alguns cromatogramas obtidos no CLAE para algumas dessas frações encontram-se dispostas na **Figura 96**, a seguir.



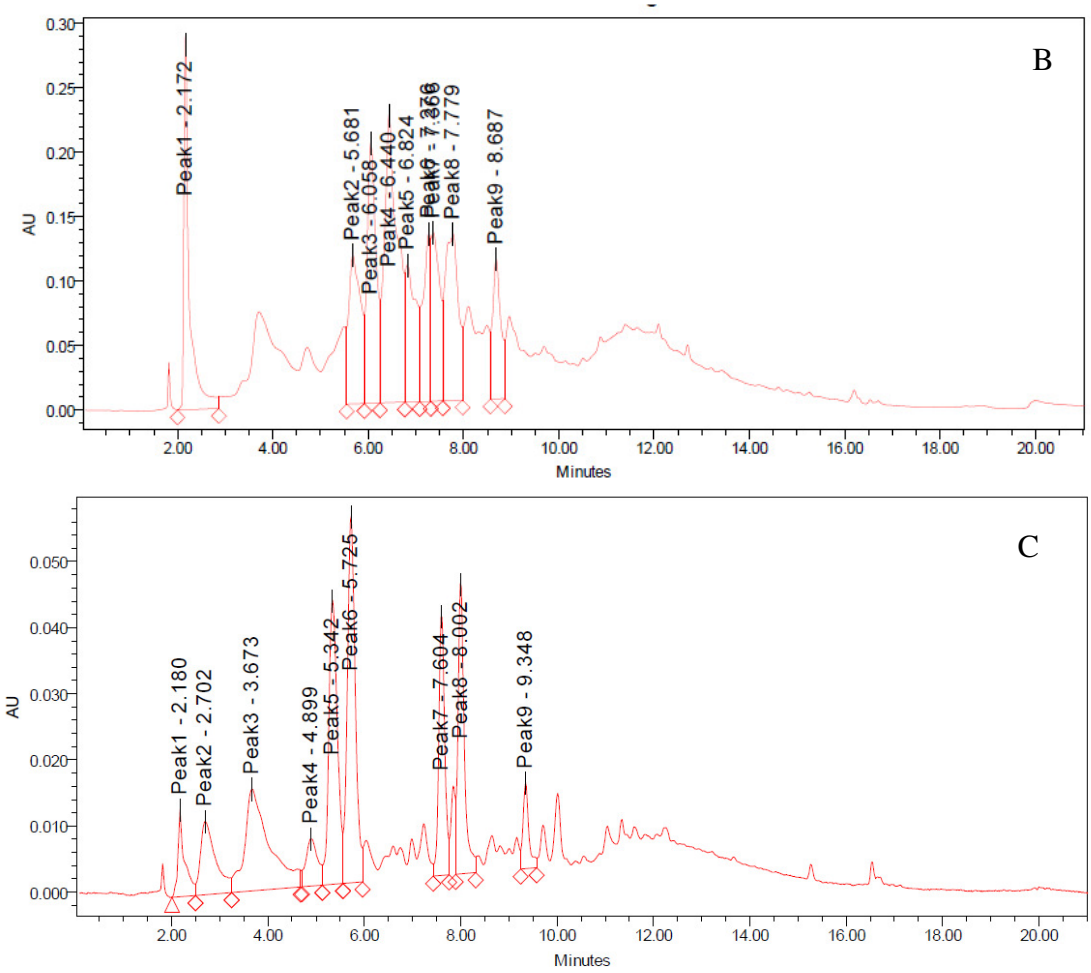


Figura 96. Perfil cromatográfico por CLAE: **A)** Fração diclorometano das folhas de *B. triplinervium*; **B)** Fração acetato de etila das folhas de *B. triplinervium*; **C)** Fração aquosa acetato de etila também das folhas de *B. triplinervium*. Coluna: X-terra C18, 4,6 x 150 mm, partículas de 5 µm, com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 30 °C. FM A: ACN/ácido acético glacial 0,05%, FM B: H_2O/ácido acético glacial 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-60% em 2 minutos, 60-80% em 2 minutos, 80-100% em 2 minutos, 100%-3minutos e 100-15% em 4 minutos: total corrida 21 minutos. Leitura em 312 nm.

Apesar de ainda se ter a presença de clorofila, mesmo nas frações acetato de etila, decidiu-se por trabalhar com a fração acetato de etila extraída a frio para se tentar isolar alguns de seus metabólitos. Esta fração foi então fracionada em coluna cromatográfica. 180 mg desta fração foram dissolvidas em metanol e posteriormente adsorvidos em sílica gel (35-70 µm), formando uma pastilha que foi adicionada ao topo da coluna. A coluna cromatográfica foi empacotada em hexano 100%, sendo este o solvente de eluição inicial, sendo esta polaridade aumentada quando necessário por

solventes de polaridades crescentes (diclorometano, acetato de etila entre outros). As frações obtidas com as respectivas fases móveis de eluição estão na **Tabela 23**. A **Tabela 24** mostra o agrupamento realizado para as frações que apresentaram semelhanças de Rfs.

Tabela 23. Sistemas solventes e respectivas frações obtidas no fracionamento da fração acetato d etila das folhas de *B. triplinervium*, por cromatografia em coluna.

Fração	Sistema solvente
1	H 100%
2-4	D 100%
5-7	D/A 1:1
8-9	A 100%
10-11	A 1:1
12	M/água 1:1
13	Água 100%

Tabela 24. Frações agrupadas por semelhança de Rfs, após análises de todas as alíquotas retiradas da coluna cromatográfica por CCD.

Fração	Sistema solvente	Substância
1	H 100%	clorofila
2	D 100%	ácido graxo*
3-7	D 100%- D/A 1:1	clorofila
8-12	A 100%-Água 100%	**BT4**

A fração BT4 foi analisada no CLAE e seu cromatograma encontra-se a seguir, na **Figura 97.**

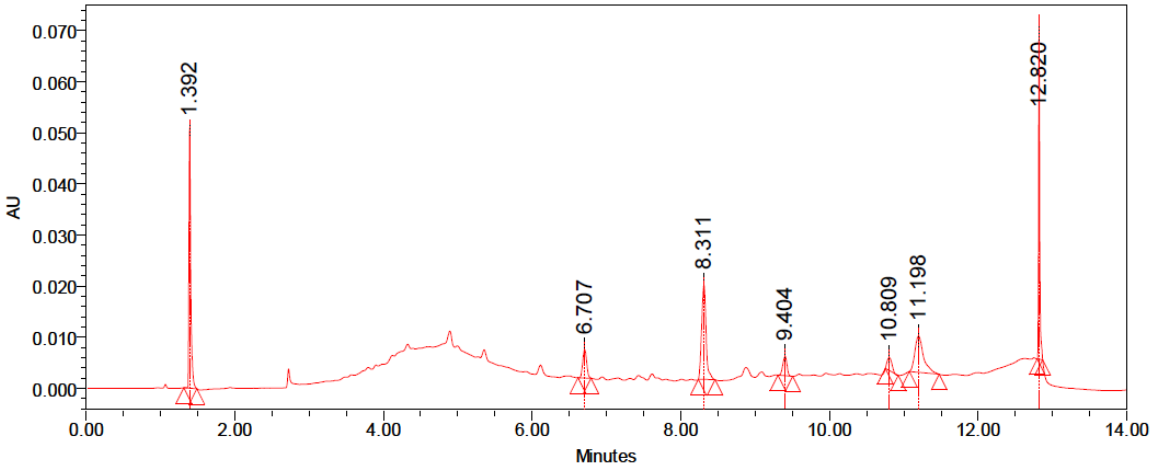
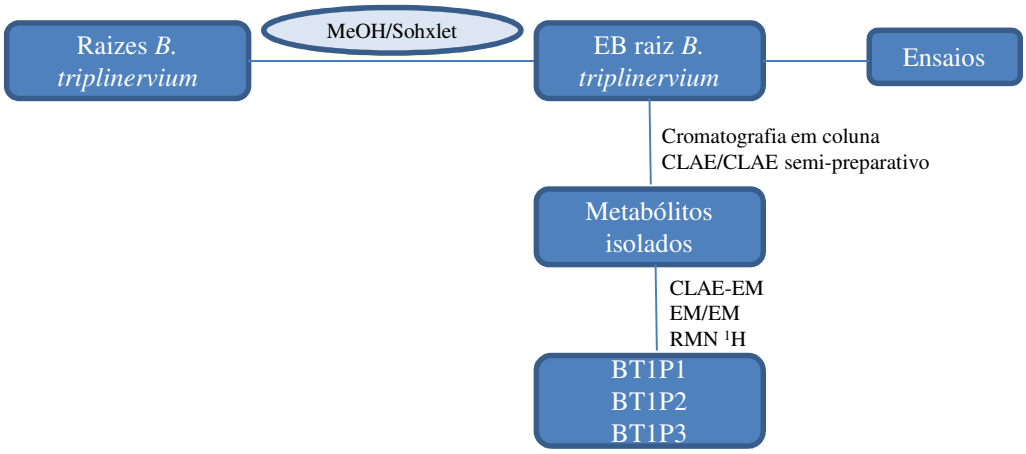


Figura 97. Perfil cromatográfico da fração BT4 (sub-fração da FA das folhas de *B. triplinervium*), por CLAE: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 6 minutos: total corrida 14 minutos. Leitura em 280 nm.

Esta fração apresentou um perfil um pouco diferente do evidenciado nas demais plantas estudadas e do próprio extrato bruto da raiz de *B. triplinervium* que será discutido posteriormente. Apesar de aparentemente apresentar um perfil com resolução suficiente para ser re-injetado no CLAE-semi-preparativo, quando esta injeção foi realizada, o resultado não foi interessante. Não houve o isolamento de nenhum derivado em quantidade suficiente para sua determinação estrutural.

5.3.3.2 Raiz

Após moagem e secagem as raízes de *B. triplinervium* foram extraídas a quente, com metanol, em soxhlet. O **Esquema 21** apresenta esquematicamente a extração realizada.



Esquema 21. Extração em metanol à quente das raízes de *B. triplinervium*

O cromatograma obtido, por CLAE, para o extrato bruto (EB) das raízes de *B. triplinervium* encontra-se na **Figura 98**.

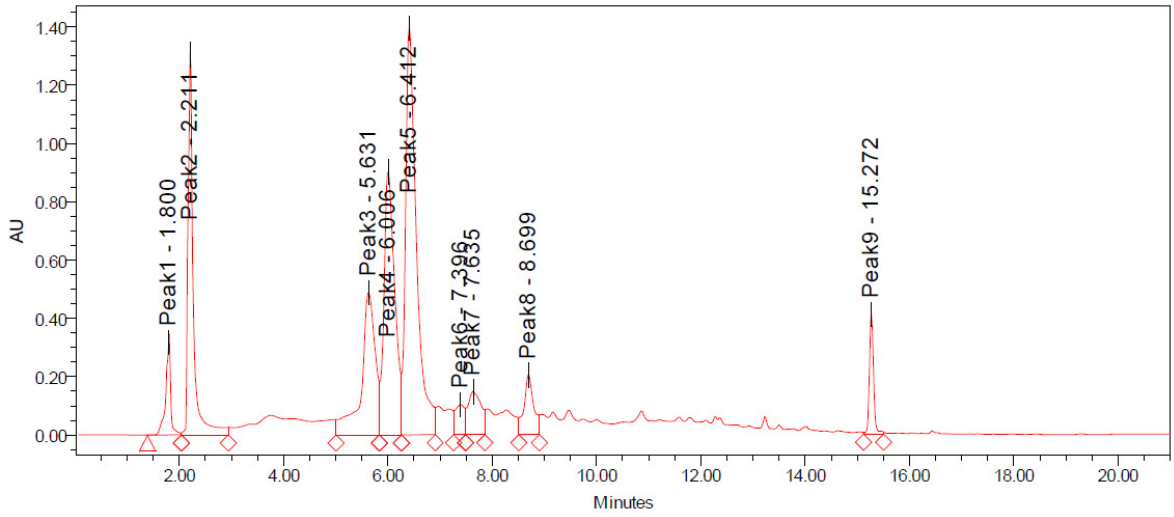


Figura 98. Perfil cromatográfico do EB das raízes de *B. triplinervium*, por CLAE: Coluna: X-terra C18, 4,6 x 150 mm, partículas de 5 µm, com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 30 °C. FM A: ACN/ácido acético glacial 0,05%, FM B: H_2O/ácido acético glacial 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-60% em 2 minutos, 60-80% em 2 minutos, 80-100% em 2 minutos, 100%-3minutos e 100-15% em 4 minutos: total corrida 21 minutos. Leitura em 312 nm.

O extrato bruto de *B. triplinervium* foi fracionado em coluna cromatográfica. Este fracionamento ocorreu em coluna de sílica (35-70 µm) utilizando solventes de polaridades crescentes. Nesta coluna foram adicionados sob a forma de pastilha de sílica

com metanol 800 mg do extrato bruto das raízes de *B. triplinervium*. O empacotamento da coluna foi com hexano estando os solventes utilizados bem como suas respectivas frações na **Tabela 25**.

Tabela 25. Solventes utilizados no fracionamento por coluna cromatográfica e frações obtidas para cada um dos sistemas solventes.

Fração	Sistema solvente
1	H 100%
2-43	H/D 1:1
44-55	D 100%
56-77	D/A 1:1
78-87	A 100%
88-110	A/M 1:1
111-118	M 100%
119-130	M/água 1:1

Após acompanhamento por CCD de todas as frações obtidas na coluna, foram reunidas algumas frações que eram semelhantes. O resultado obtido após esta junção de frações está na **Tabela 26**.

Tabela 26. Frações agrupadas por semelhança de Rfs.

Fração	Sistema solvente	Substância
1-9	H-H/D 1:1	clorofila
10-19	H/D 1:1	ácido graxo
20-42	H/D 1:1	**BT5**
43-60	D-D/A 1:1	impurezas
61-67	D/A 1:1	impurezas
68-90	D/A 1:1-A/M 1:1	impurezas
91-118	A/M 1:1- M 100%	**BT1**
119-130	M/água 1:1	**BT2**

As frações reunidas foram injetadas no CLAE para que se visualizasse o perfil fitoquímico. A amostra BT5 foi enviada para análise de RMN de ^{1}H, após retirada da clorofila por apresentar-se aparentemente pura. Porém, detectou-se que o metabólito é um ácido graxo e sua determinação estrutural não foi realizada.

As frações BT1 e BT2 também foram injetadas no CLAE, sendo a amostra BT1 a que apresentou melhor perfil fitoquímico com separação de seus compostos majoritários. Nas **Figuras 99** e **100**, abaixo, estão os cromatogramas obtidos para essas frações.

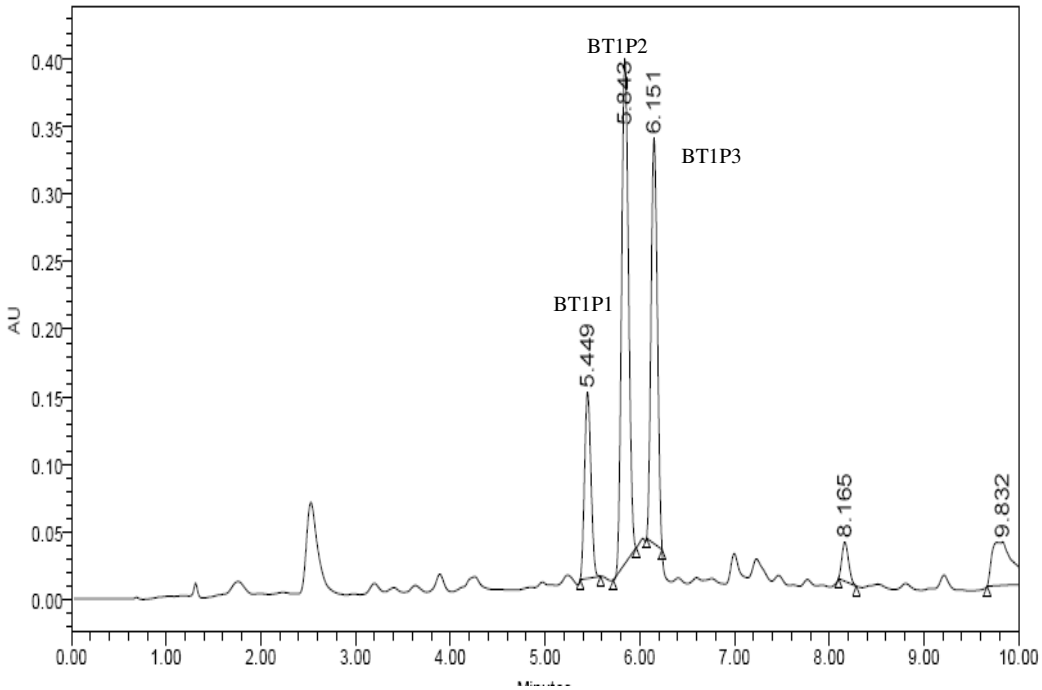


Figura 99. Perfil cromatográfico, por CLAE, do EB raiz *B. triplinervium* (BT1) após filtração: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 2 minutos: total corrida 10 minutos.. Leitura em 312 nm.

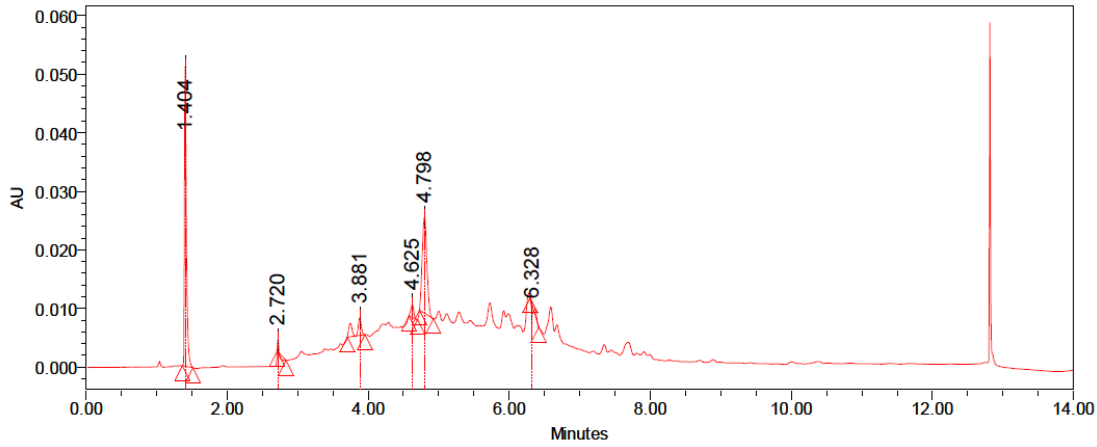


Figura 100. Perfil cromatográfico, por CLAE, do EB raiz *B. triplinervium* (BT2) após filtração: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 6 minutos: total corrida 14 minutos. Leitura em 312 nm.

A fração BT1 foi submetida a separação em CLAE semi-preparativo e dela foram isolados 3 metabólitos, metabólitos estes já isolados anteriormente tanto em *P. sagittalis* quanto em *B. pentodonta*.

No CLAE semi-preparativo utilizou-se como sistema solvente acetonitrila / água 15-40 % em 30 minutos. Uma diluição de 33 mg da amostra foi preparada em 5 mL de acetonitrila / água 1:4, sendo injetados no semi-preparativo 4,5 mL da mesma. A leitura foi em 220 nm. Na **Figura 101,** encontra-se o cromatograma obtido por CLAE semi-preparativo.

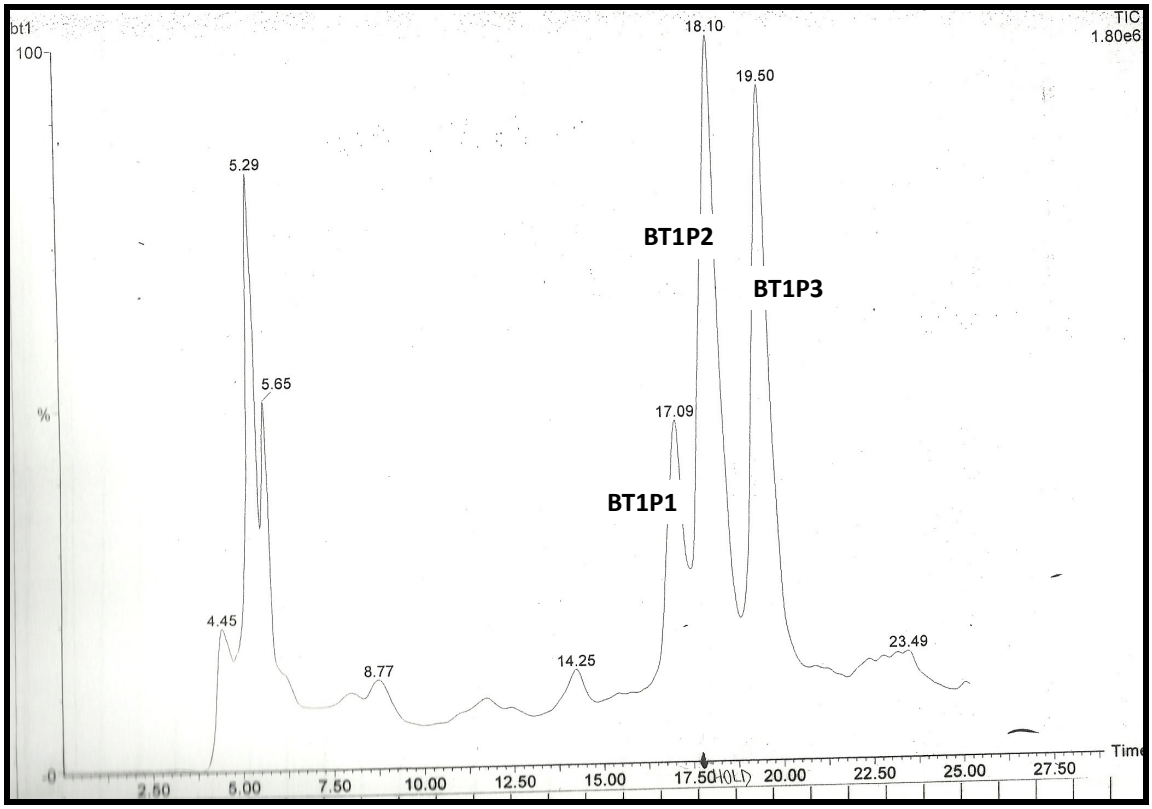


Figura 101. Perfil cromatográfico por CLAE semi-preparativo da fração BT1 após filtração: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 200 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 2 mL min^{-1}, 15-40% em 30 minutos. Leitura em 220 nm.

Os cromatogramas e espectros de UV dos metabólitos isolados estão apresentados abaixo, nas **Figuras 102**, **103** e **104**. A determinação estrutural foi realizada também por EM/EM e RMN de ^1H e já foi discutida anteriormente.

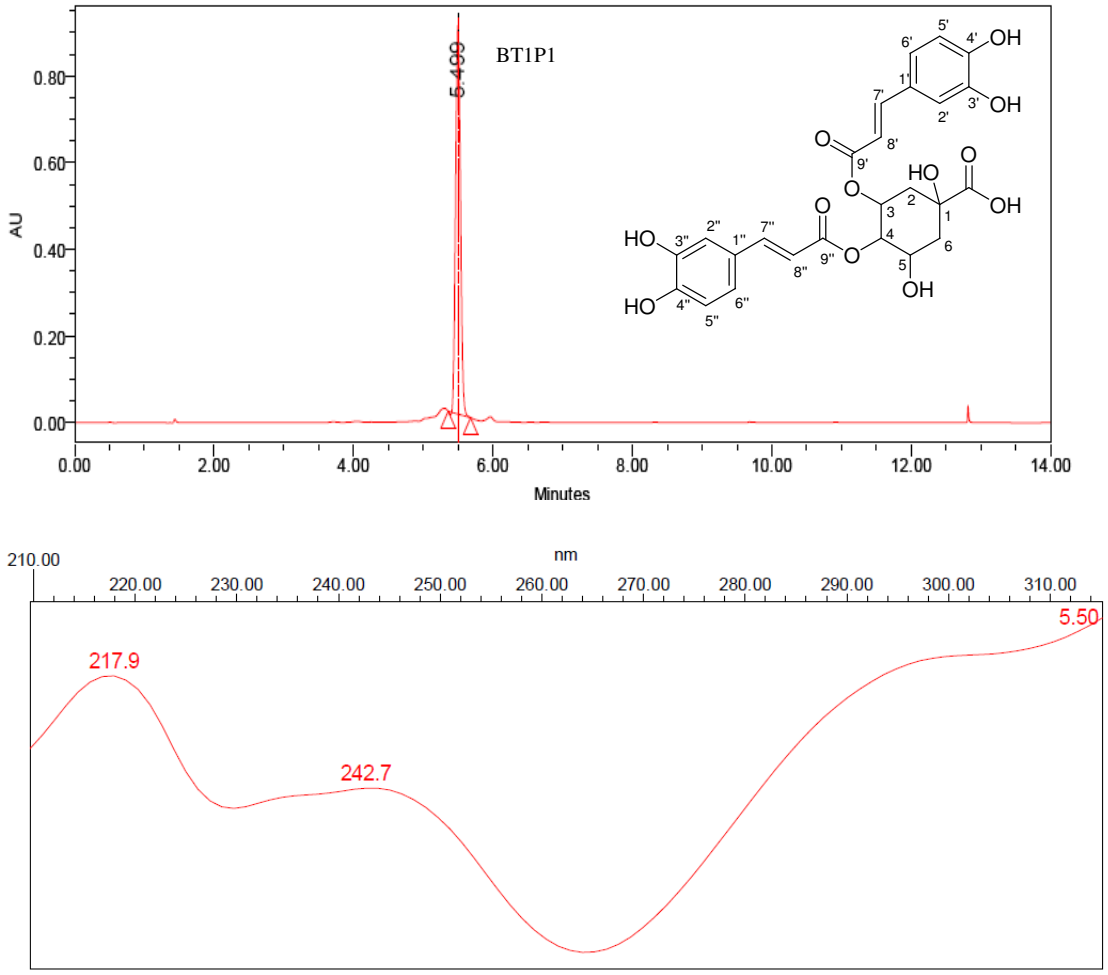


Figura 102. Perfil cromatográfico do composto isolado BT1P1, por CLAE: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 6 minutos: total corrida 14 minutos. Leitura em 312 nm – **ácido 3,4-dicafeoilquínico** e espectro de UV do mesmo composto também em 312 nm.

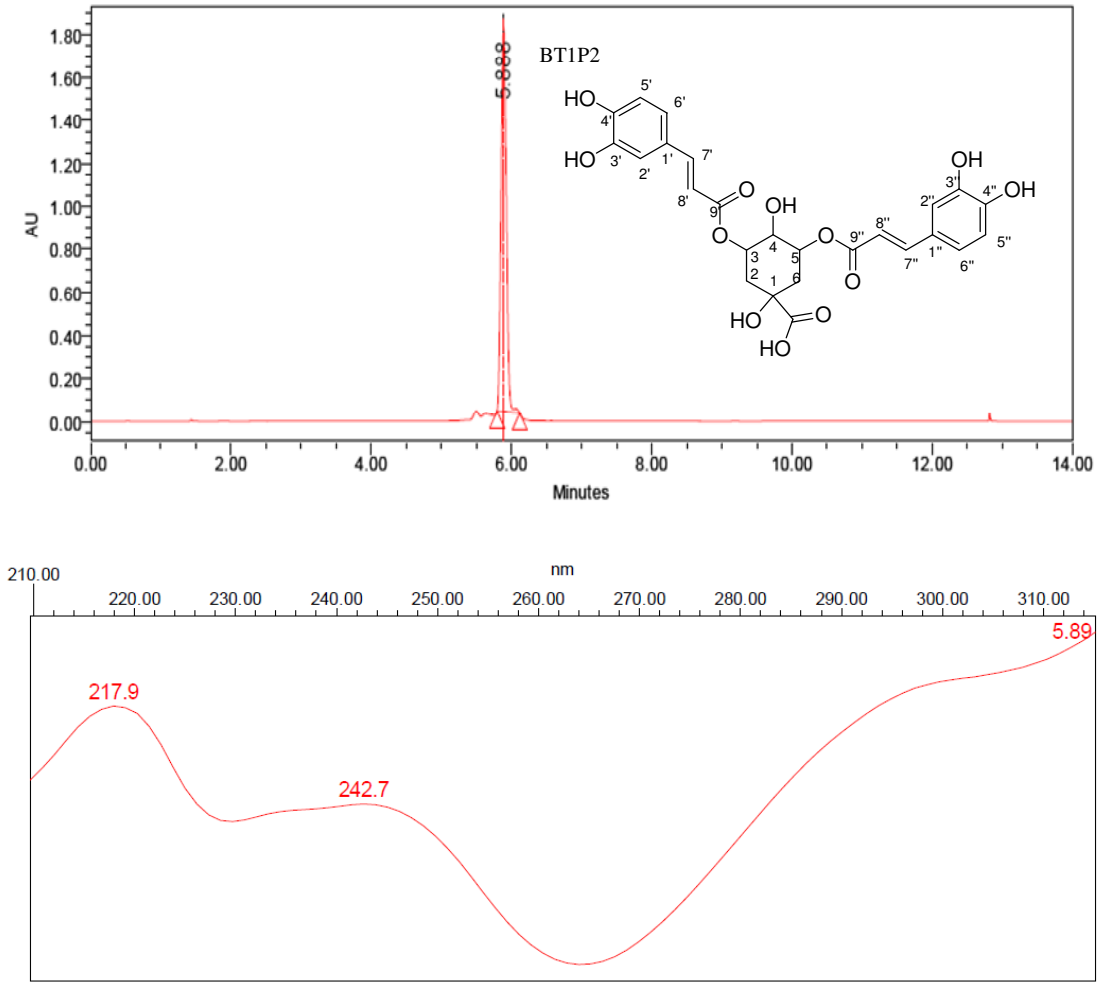


Figura 103. Perfil cromatográfico do composto isolado BT1P2, por CLAE: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 6 minutos: total corrida 14 minutos. Leitura em 312 nm – **ácido 3,5-dicafeoilquínico** e espectro de UV do mesmo composto também em 312 nm.

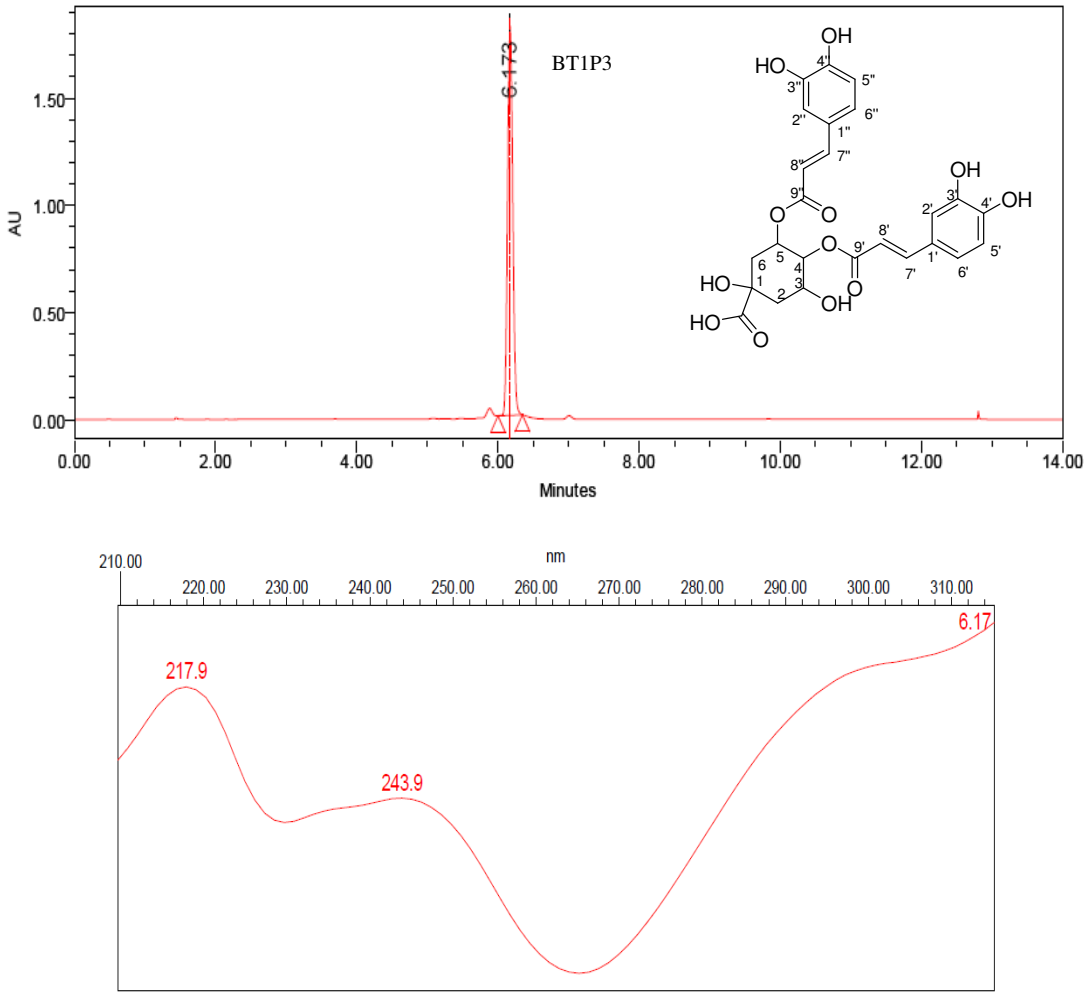


Figura 104. Perfil cromatográfico do composto isolado BT1P3, por CLAE: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 6 minutos: total corrida 14 minutos. Leitura em 312 nm – **ácido 4,5-dicafeoilquínico** e espectro de UV do mesmo composto também em 312 nm.

5.4 Comparação dos resultados obtidos a partir da análise fitoquímica das plantas estudadas

Todas as plantas trabalhadas apresentaram os mesmos 3 compostos majoritários, identificados como sendo ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5- dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico. Foram co-injetados os metabólitos isolados PS1P1, PS2P1, BPR4P1 e BT1P1; PS1P2, PS2P2, BPR4P2 e BT1P2 e PS1P3, PS2P3, BPR4P3 e BT1P3. Abaixo, nas **Figuras 105, 106** e **107** estão os cromatogramas das co-injeções obtidas por CLAE bem como os UV obtidos para cada uma delas. Os compostos PS1P1, PS2P1, BPR4P1 e BT1P1 identificados como sendo o ácido 3,4-dicafeoilquinico não se apresentaram totalmente puros e seu cromatograma de co-injeção apresenta 2 picos de impurezas presentes no tempos de retenção de 5,256 e 5,935 minutos. O mesmo ocorre com os metabólitos co-injetados PS1P2, PS2P2, BPR4P2 e BT1P2, identificados como ácido 3,5-dicafeoilquínico, que também possui uma impureza no tempo de retenção de 6,019 minutos.

A partir destas co-injeções pode-se afirmar que temos realmente os mesmos metabólitos isolados tanto em *P. sagittalis* e *B. pentodonta* quanto em *B. triplinervium*.

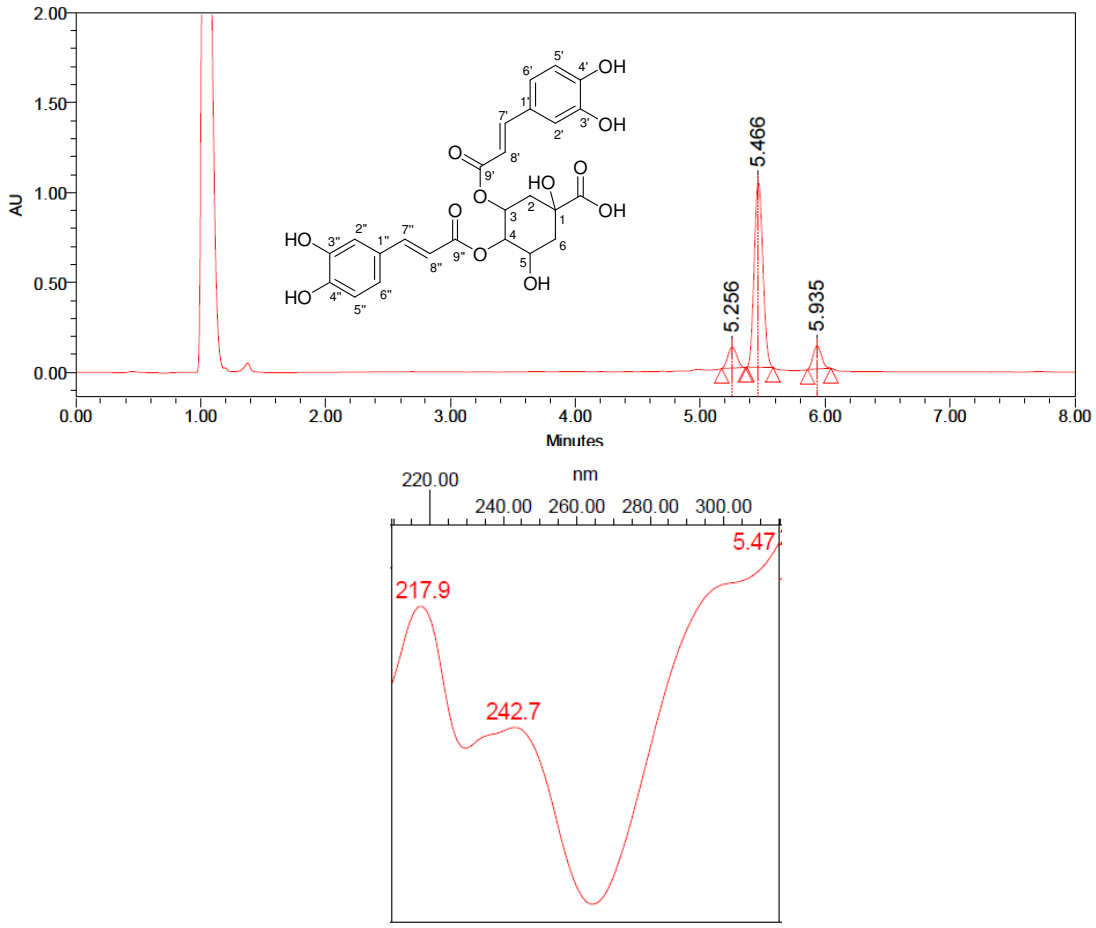


Figura 105. Perfil cromatográfico da co-injeção dos metabólitos isolados PS1P1, PS2P1 e BPR4P1, por CLAE: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 2 minutos: total corrida 10 minutos.. Leitura em 312 nm e espectro de UV obtido.

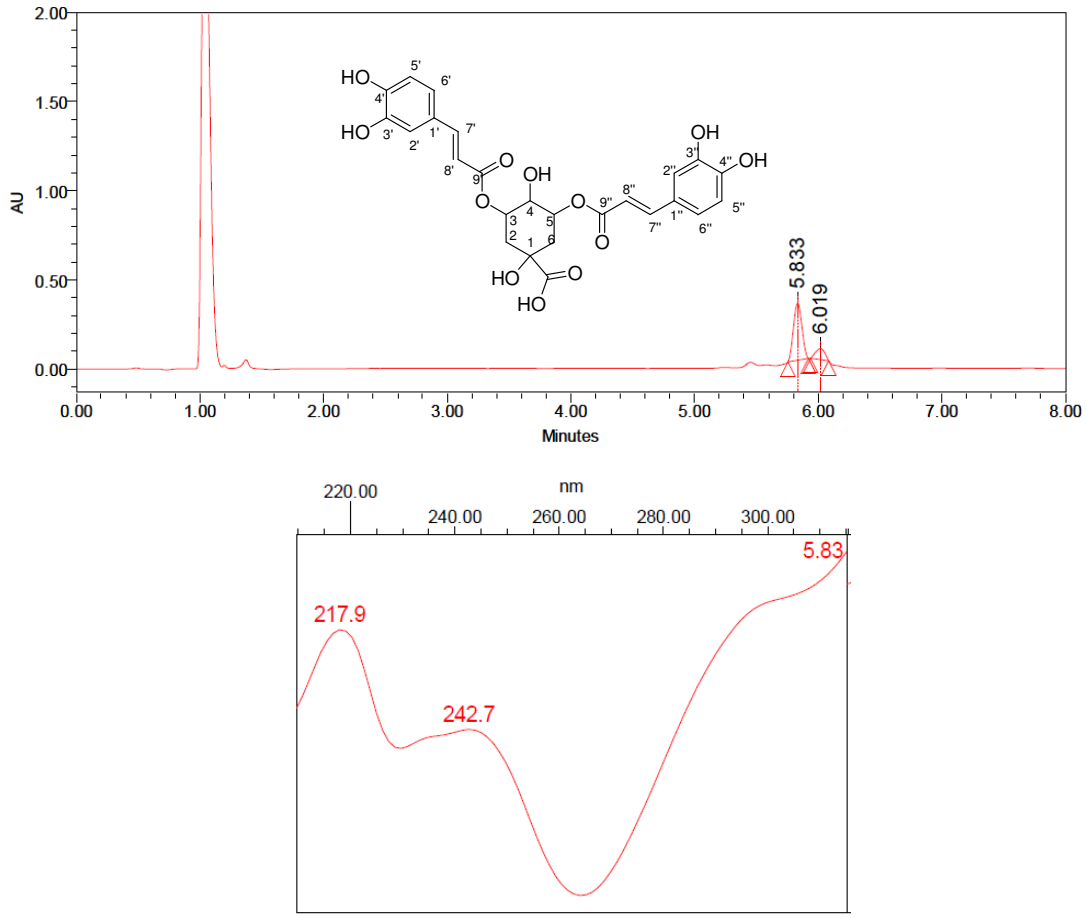


Figura 106. Perfil cromatográfico da co-injeção dos metabólitos isolados PS1P2, PS2P2 e BPR4P2, por CLAE: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 2 minutos: total corrida 10 minutos. Leitura em 312 nm e espectro de UV obtido.

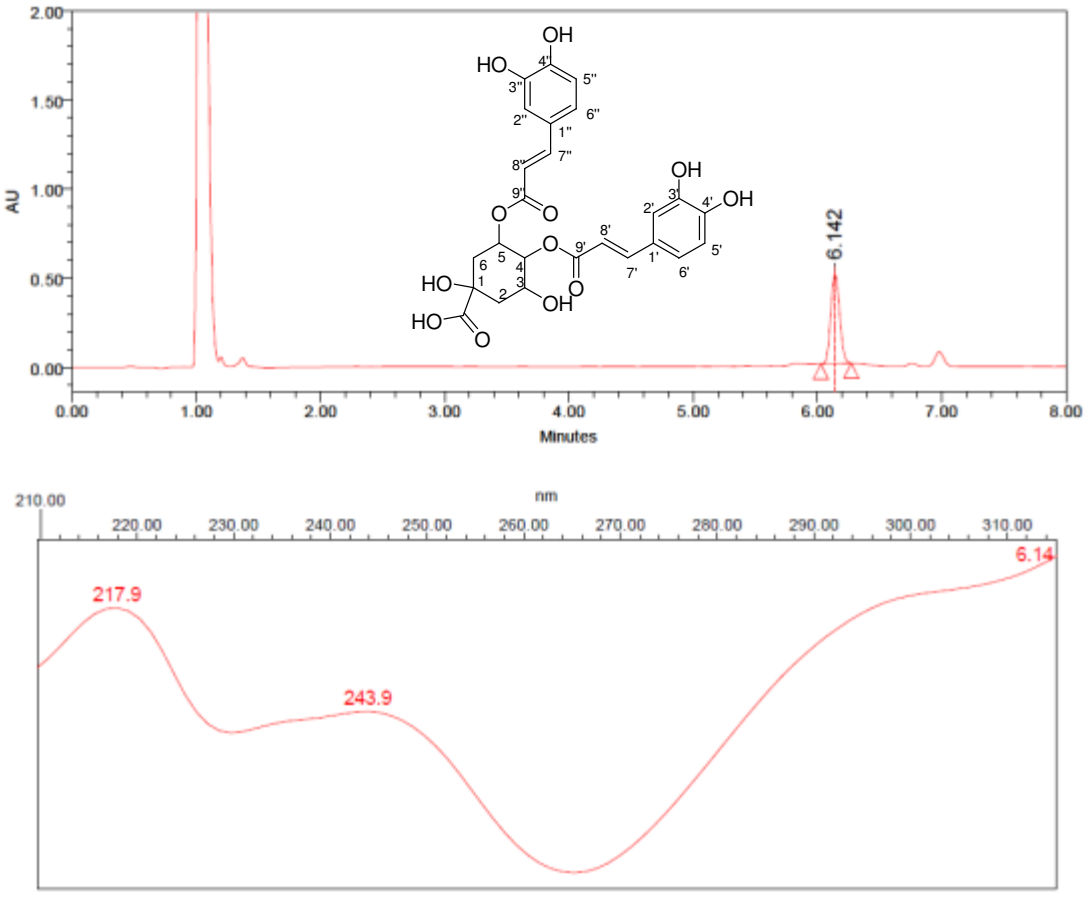
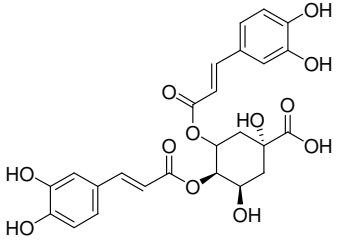
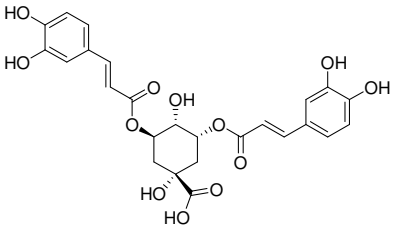
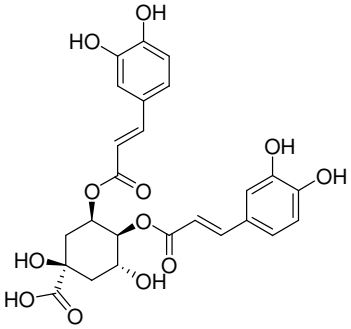
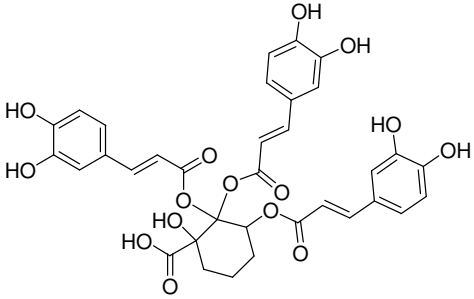
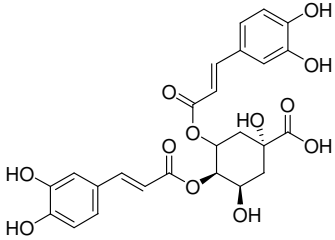
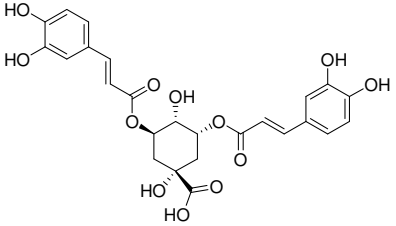
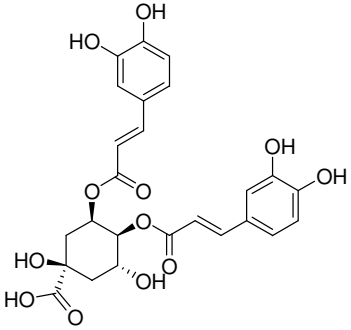
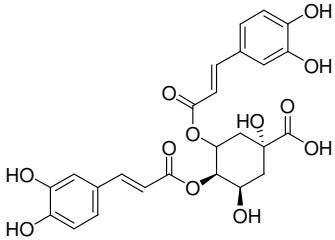
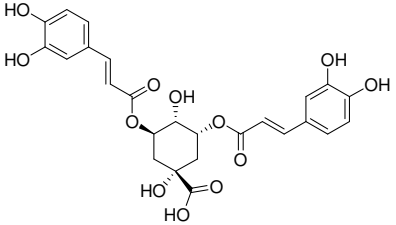
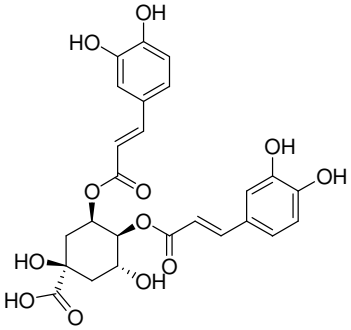
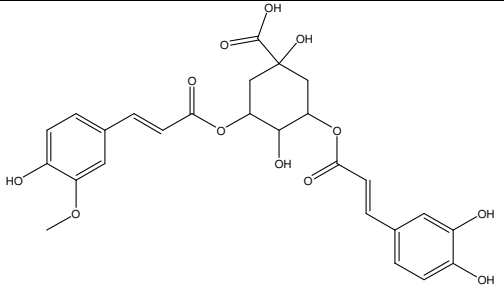


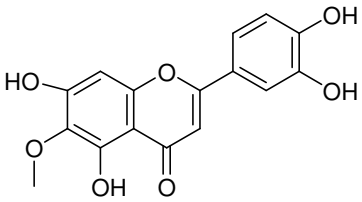
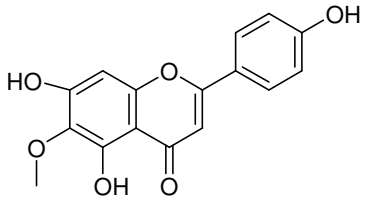
Figura 107. Perfil cromatográfico da co-injeção dos metabólitos isolados PS1P3, PS2P3 e BPR4P3, por CLAE: Coluna: Sun Fire C18, 4,6 x 100 mm, partículas de 3,5 µm com pré-coluna semelhante e temperatura do forno de 25 °C. FM A: ACN/TFA 0,05%, FM B: H_2O/TFA 0,05%, fluxo 1 mL min^{-1}, 15-40% em 8 minutos, 40-100% em 2 minutos: total corrida 10 minutos. Leitura em 312 nm e espectro de UV obtido.

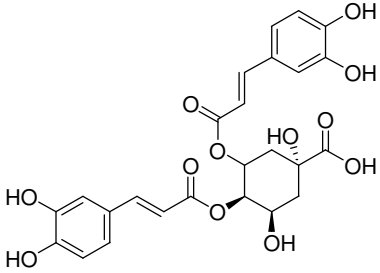
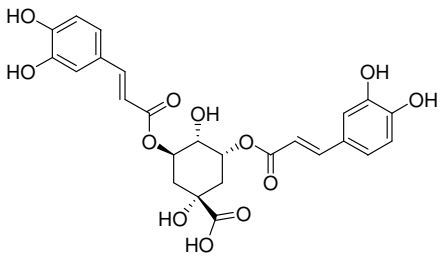
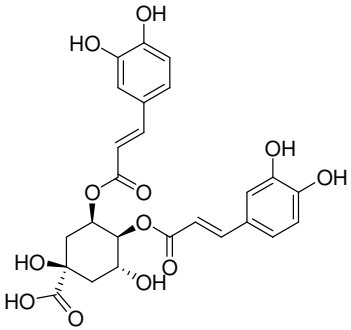
Na **Tabela 27**, abaixo, encontra-se um resumo dos compostos isolados para cada uma das espécies estudadas.

Tabela 27. Comparação de compostos isolados das plantas estudadas.

Plantas estudadas				
Pluchea sagittalis				
EB raiz	 **Ácido 3,4- dicafeoilquínico**	 **Ácido 3,5- dicafeoilquínico**	 **Ácido 4,5- dicafeoilquínico**	 **Ácido 1,3,5- tricafeoilquínico**

FAq acetato de etila folhas	 **Ácido 3,4- dicafeoilquínico**	 **Ácido 3,5- dicafeoilquínico**	 **Ácido 4,5- dicafeoilquínico**	
Baccharis pentodonta				
EB raiz	 **Ácido 3,4- dicafeoilquínico**	 **Ácido 3,5- dicafeoilquínico**	 **Ácido 4,5- dicafeoilquínico**	 **Ácido 3-feruloil-5-cafeoilquínico**

FA folhas acetato de etila	 **5,7,3',4'-tetrahidroxi-6-metoxi-flavona (6-metóxi luteonina)**	 **5,7,4'-tridroxi-6-metoxi-flavona (hispidulina).**		
Baccharidastrum triplinervium				

EB raiz	 **Ácido 3,4-dicafeoilquínico**	 **Ácido 3,5- dicafeoilquínico**	 **Ácido 4,5-dicafeoilquínico**	

5.5 Determinação das atividades biológicas "*in vitro*" dos extratos e frações de *Pluchea sagittalis*, *Baccharis pentodonta* e *Baccharidastrum triplinervium*

5.5.1 *Método de Microdiluição em Caldo*

O método de microdiluição em caldo foi realizado para os extratos e frações obtidos para as plantas estudadas. Substâncias isoladas não foram testadas pela pequena quantidade de amostra obtida nos isolamentos.

A análise por microdiluição em caldo foi realizada baseada na técnica do NCCLS modificada e é um método quantitativo muito utilizado em PNs[143,144].

Os resultados de CIM e CBM/CFM para extratos e frações de *P. sagittalis, B. pentodonta* e *B. triplinervium* são demonstrados na **Tabela 28** abaixo:

Tabela 28. Resultados de CIM e CLM para os extratos e frações de *P. sagittalis, B. pentodonta* e *B. triplinervium*, em mg mL^{-1}.

MO/Amostra	Sa ATCC 6538		Se ATCC 12228		Ec ATCC 25922		Pa ATCC 9027		Kp ATCC 13883		Bs ATCC 6633	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
FAqH fol *P.sagittalis*	0,5	>0,5	0,5	>0,5	0,5	>0,5	0,5	>0,5	0,5	>0,5	0,5	>0,5
FAqA fol *P.sagittalis*	0,5	>0,5	0,5	>0,5	0,5	>0,5	0,25	>0,5	0,5	>0,5	0,5	>0,5
EB raiz *P. sagittalis*	>0,5	-	>0,5	-	0,5	>0,5	0,5	>0,5	0,5	>0,5	0,5	>0,5
EB fol *B. pentodonta*	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-
EB raiz *B. pentodonta*	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-
FH fol B. *pentodonta*	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-
FD fol *B. pentodonta*	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-
FA fol *B. pentodonta*	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-
FAqH fol *B. triplinervium*	0,5	>0,5	>0,5	-	>0,5	-	0,5	>0,5	>0,5	-	>0,5	-
FAqD fol *B. triplinervium*	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-
FAqA fol *B. triplinervium*	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-
FH fol *B. triplinervium*	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	0,5	>0,5
FD fol *B. triplinervium*	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-
FA fol *B. triplinervium*	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-
EB raiz *B. triplinervium*	>0,5	-	>0,5	-	0,5	>0,5	>0,5	-	>0,5	-	0,5	>0,5
Padrão*	3,12.10 -3	-	3,12.10 -3	-	3,12.10 -3	-	6,25.10 -3	-	6,25.10 -3	-	3,12.10 -3	-

* Cloranfenicol

Continuação Tabela 28. Resultados de CIM e CLM para os extratos e frações de *P. sagittalis, B. pentodonta* e *B. triplinervium*, em mg mL^{-1}.

MO/Amostra	Sp ATCC 19615		Cx ATCC 373		Cn ATCC 28952		Sc ATCC 2601		Ca ATCC 10231		Mf ATCC 14523	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
FAqH fol *P.sagittalis*	0,5	>0,5	NT	NT	>0,5	-	>0,5	-	0,5	>0,5	NT	NT
FAqA fol *P.sagittalis*	0,5	>0,5	0,5	>0,5	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	0,125	0,125
EB raiz *P. sagittalis*	>0,5	-	0,5	>0,5	>0,5	-	>0,5	-	500	>0,5	0,125	0,125
EB fol *B. pentodonta*	>0,5	-	0,25	>0,5	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	0,125	0,125
EB raiz *B. pentodonta*	>0,5	-	0,5	>0,5	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	0,25	0,25
FH fol B. *pentodonta*	>0,5	-	NT	NT	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	NT	NT
FD fol *B. pentodonta*	>0,5	-	NT	NT	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	NT	NT
FA fol *B. pentodonta*	>0,5	-	0,125	>0,5	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	0,0625	0,0625
FAqH fol *B. triplinervium*	>0,5	-	NT	NT	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	NT	NT
FAqD fol *B. triplinervium*	>0,5	-	NT	NT	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	NT	NT
FAqA fol *B. triplinervium*	>0,5	-	NT	NT	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	NT	NT
FH fol *B. triplinervium*	>0,5	-	NT	NT	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	NT	NT
FD fol *B. triplinervium*	>0,5	-	NT	NT	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	NT	NT
FA fol *B. triplinervium*	>0,5	-	0,25	>0,5	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	0,0625	0,0625
EB raiz *B. triplinervium*	>0,5	-	0,125	>0,5	>0,5	-	>0,5	-	>0,5	-	0,125	0,125
Padrão*	6,25.10 -3	-	6,25.10 -3	-	10,3.10-3	-	10,3.10-3	-	20,6-.10-3	-	10,3.10-3	0,125

* Cloranfenicol para bactérias e Nistatina para fungos/leveduras.

Segundo Duarte e colaboradores[201], podemos considerar como forte uma atividade antimicrobiana de compostos obtidos a partir de plantas medicinais e aromáticas que apresentem CIM de até 0,5 mg mL^{-1}; concentrações compreendidas entre 0,5 e 1,5 mg mL^{-1} são consideradas moderadas e acima de 1,6 mg mL^{-1}, fracas. Se considerarmos como correta esta avaliação, observando a tabela acima, alguns extratos e frações obtidos das plantas estudadas podem ser considerados com atividade antimicrobiana forte, principalmente se considerarmos a levedura *M. furfur*. Este micro-organismo foi inibido na concentração de 0,125 mg mL^{-1}, quando os extratos brutos das raízes de *P. sagittalis* e *B. triplinervium* foram testadas, bem como o EB das folhas de *Baccharis pentodonta*. A fração aquosa acetato de etila das folhas de *P. sagittalis*, também apresentou ativa frente a essa levedura nesta mesma concentração, enquanto que as frações acetato das folhas de *B. pentodonta e B. triplinervium* foram ativas na concentração de 0,0625 mg mL^{-1}.

Olhando-se a tabela como um todo e observando-se semelhança entre os extratos e frações obtidos, podemos notar uma coerência entre os dados obtidos. Na literatura, Xia, e colaboradores (2011)[202] citam a atividade antimicrobiana por CIM para derivados do acido clorogênico, porém não para os dicafeoilquínicos. Os resultados variam entre 25 e 250 μg mL^{-1}, porém para derivados mono-ésteres. Entre eles destaca-se o próprio ácido clorogênico.

Coelho de Souza e colaboradores (2004)[203] estudaram a ação do extrato bruto metanólico das partes aéreas de *P. sagittalis* frente aos mesmos micro-organismos os quais foram testados neste trabalho o EB da raiz e as frações aquosas hexânica e acetato de etila. É importante ressaltar que foram preparados extratos aquosos por ser na forma de chá o principal uso desta planta no Rio Grande do Sul. Os micro-organismos testados (*S. aureus, S. epidermidis, E. coli, B. subtilis, C. albicans* e *S. cerevisae*) apresentaram-se resistentes ao EB das partes aéreas de *P. sagittalis*.

Na busca realizada não foram encontradas na literatura relatos de atividade antimicrobiana de *B. pentodonta* nem de *B. triplinervium.* Sabe-se, porém que muitas espécies de *Baccharis* possuem atividade antimicrobiana conhecida, principalmente de seus óleos essenciais[204].

---

[201] DUARTE, M. C. T. *et al.* Rev. Bras. Farmacog., 14, 1, 6, 2004.
[202] XIA, D. *et al*. Food Sci.Techn., 44, 347, 2011.
[203] DE SOUZA, C. G.; *et al*. J.Ethnopharm., 90, 135, 2004.
[204] FERRONATTO, R. *et al.* Rev. Bras. Farmacog., 17, 2, 224, 2007.

5.6 Atividade Enzimática frente a POP e DPP IV dos extratos e frações de *P. sagittalis*, *B. pentodonta* e *B. triplinervium*

5.6.1 *Atividade inibitória da POP*

Foram testados os padrões ácido clorogênico e ácido cafêico, extratos, frações e alguns compostos isolados frente a POP. Os resultados estão dispostos nas **Tabelas 29 e 30.**

Tabela 29. Atividade inibitória da POP frente aos extratos e frações obtidos de *P. sagittalis, B. pentodonta* e *B. triplinervium*

Extratos e frações	% Inibição (100 µg mL^{-1})
FaqA folhas *P. sagittalis*	94,98
EB raiz *P. sagittalis*	98,55
FH folhas *B. pentodonta*	96,13
FD folhas *B. pentodonta*	99,49
EB folhas *B. pentodonta*	95,48
EB raiz *B. pentodonta*	95,27
FH folhas *B. triplinervium*	92,96
FD folhas *B. triplinervium*	90,76
FA folhas *B. triplinervium*	97,70
EB Raiz *B. triplinervium*	94,50

Todos os extratos e frações testados apresentaram resultados muito semelhantes para a POP. Os resultados obtidos foram muito interessantes, já que tivemos quase que 100% de inibição da enzima na concentração de 100 µg mL^{-1} . A enzima POP é uma enzima que atua não somente no transtorno bipolar, mas também em outras vias, não sendo, portanto uma enzima seletiva. Sendo assim podemos considerar que os extratos e frações estudados apresentam relação direta com a inibição desta enzima.

A determinação da IC_{50} somente foi realizada para os compostos dos quais se obtiveram maiores quantidades e também para os padrões comerciais ácido clorogênico e ácido cafêico. Os resultados obtidos para estas amostras estão dispostos na **Tabela 30**.

Tabela 30. IC_{50} obtidas para a POP de metabólitos isolados e padrões comerciais

Metabólitos	IC_{50}
Ácido 3,4-dicafeoilquinico	5,53 µM
Ácido 4,5-dicafeoilquínico	4,74 µM
Ácido clorogênico	23 µM
Ácido cafêico	12,49 µM

Analisando-se os resultados obtidos para os metabólitos testados, podemos observar que os derivados dicafeoilquínicos apresentaram melhor atividade de inibição frente à enzima POP, quando comparados aos padrões ácido clorogênico e ácido cafêico testados. Estes mesmos metabólitos isolados das plantas estudadas tiveram ainda atividade inibitória superior a baicalina, considerado um inibidor natural da POP, o qual possui uma IC_{50} de 12 µM.

Sendo assim, pode-se afirmar que os derivados 3,5- e 4,5-dicafeoilquinicos são potenciais inibidores desta enzima, sendo que o ácido 4,5-dicafeoilquínico apresentou melhor atividade inibitória da POP já que foi capaz de inibir a enzima em uma concentração menor (IC_{50}=4,7 µM) do que os demais metabólitos testados.

5.6.2 *Atividade inibitória da DPP IV*

Para a enzima DPP IV somente foram testados os extratos e frações das plantas. Os resultados obtidos estão na **Tabela 31**, abaixo.

Tabela 31. Atividade inibitória da DPP IV frente aos extratos e frações

Extratos e frações	% Inibição (100 µg mL^{-1})
FaqA folhas *P. sagittalis*	40,19
EB raiz *P. sagittalis*	18,21
FH folhas *B. pentodonta*	12,16
FD folhas *B. pentodonta*	41,81
EB folhas *B. pentodonta*	25,87
EB raiz *B. pentodonta*	50,58
FH folhas *B. triplinervium*	2,41
FD folhas *B. triplinervium*	30,42
FA folhas *B. triplinervium*	14,02
EB raiz *B. triplinervium*	53,73

Buscando-se na literatura o tema inibidores naturais de enzimas DPP IV e POP, observa-se maior sucesso de produtos naturais atuando como inibidores da POP em relação à enzima DPP IV. A DPP IV é uma enzima altamente seletiva e por isso ao olharmos a **Tabela 31**, podemos observar alguns resultados potencialmente interessantes. Isto ocorre com os EB das raízes de *B. pentodonta* (50,58%) e *B. triplinervium* (53,73%), onde resultados próximos de 50% são considerados bons resultados de inibição para esta enzima. Ao compararem-se os resultados obtidos para inibição da enzima DPP IV desses extratos brutos (50,58-53,73%) com a porcentagem de inibição da DPP IV obtida para o EB da raiz de *P. sagittalis* (18,21%), pode-se inferir que a presença do ácido 1,3,5-tricafeoilquínico no EB da raiz de *P. sagittalis*, acaba por diminuir consideravelmente a atividade inibitória desta enzima e que este metabólito atua de maneira antagônica com os ácido 3,4-, 3,5- e 4,5-dicafeoilquínicos, já que nos EB das raízes de *B. pentodonta* (50,58%) e *B. triplinervium* (53,73%), somente os derivados dicafeoilquínicos estavam presentes. Para os demais extratos testados os resultados de inibição frente a enzima DPP IV não foram promissores (inibições entre 2,4 e 41,8%).

Mcintosh e colaboradores[162] afirmam que inibidores da enzima DPP IV demonstraram significativo potencial na terapia do diabetes mellitus[163]. Esta enzima age degradando o glucagon e sua inibição causará aumento deste e o paciente terá seus níveis de insulina restabelecidos. Na literatura temos descrito que *B. trimera* apresentou

sugestiva atividade antidiabética[205], o que pode significar que extratos obtidos desta espécie podem ter atividade inibitória frente a enzima DPP IV.

Sendo assim a realização de testes com extratos obtidos de diferentes plantas poderão contribuir enormemente para que se possa ter a dimensão do potencial da biodiversidade vegetal existente, frente a enzima DPP IV, o que seria extremamente importante para quem sabe no futuro, termos extratos de plantas como ativos principais na cura do Diabetes tipo 2 e de outras tantas doenças ainda incuráveis.

5.7 Atividade Antioxidante pelo método de DPPH dos extratos e frações de *P. sagittalis*, *B. pentodonta* e *B. triplinervium*

Antioxidantes geralmente são compostos fenólicos ou aminas aromáticas, flavonóides, entre outros, além de compostos sintéticos[206]. Por termos três espécies que apresentam em sua composição principalmente derivados fenólicos: derivados do ácido clorogênico e flavonóides decidiu-se pela realização de ensaios de atividade antioxidante.

A metodologia utilizada para a realização destes ensaios está descrita e detalhada na parte experimental. As concentrações testadas foram de 500 μg mL^{-1} a 15,62 μg mL^{-1}, sempre utilizado metanol como solvente de diluição da amostra.

[205] OLIVEIRA, A. C.; *et al.* J Ethnopharmacol 102, 465, 2005.
[206] LARSON, R.A. Phytochemistry, 27, 4, 969, 1988

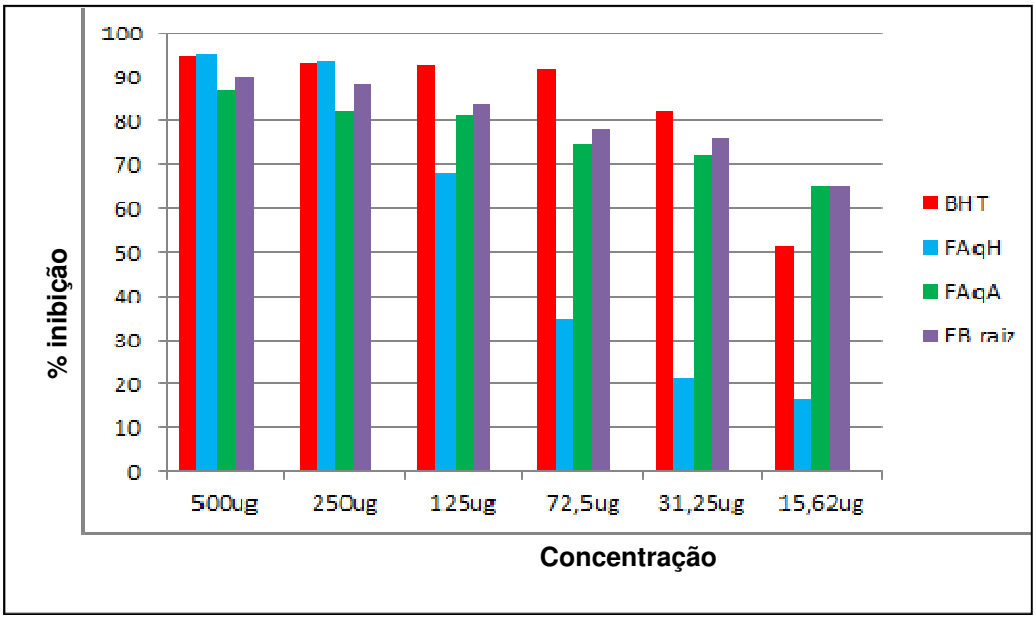


Gráfico 1. Atividade antioxidante dos extratos brutos e frações de *P. sagittalis.* BHT-butil-hidroxi-tolueno: padrão.

A partir da análise do **Gráfico 1**, pode-se verificar que nas maiores concentrações (500 e 250 µg mL^{-1}) tivemos uma atividade antioxidante acentuada tanto para as frações das folhas quanto para o EB da raiz de *P. sagittalis*, porém, quando observadas as menores concentrações vimos que a fração aquosa acetato de etila e o extrato bruto da raiz tiveram maior destaque. Esta melhor atividade destas frações se deve provavelmente, a presença dos derivados cafeoilquínicos, já que suas atividades antioxidantes já são bem descritas na literatura[207,208].

[207] JUNG, J-K.; *et al*. J. Food Compos. Anal. 24, 29, 2011.
[208] HUNG, T. M.; *et al.* J. Ethnophar., 108, 188, 2006.

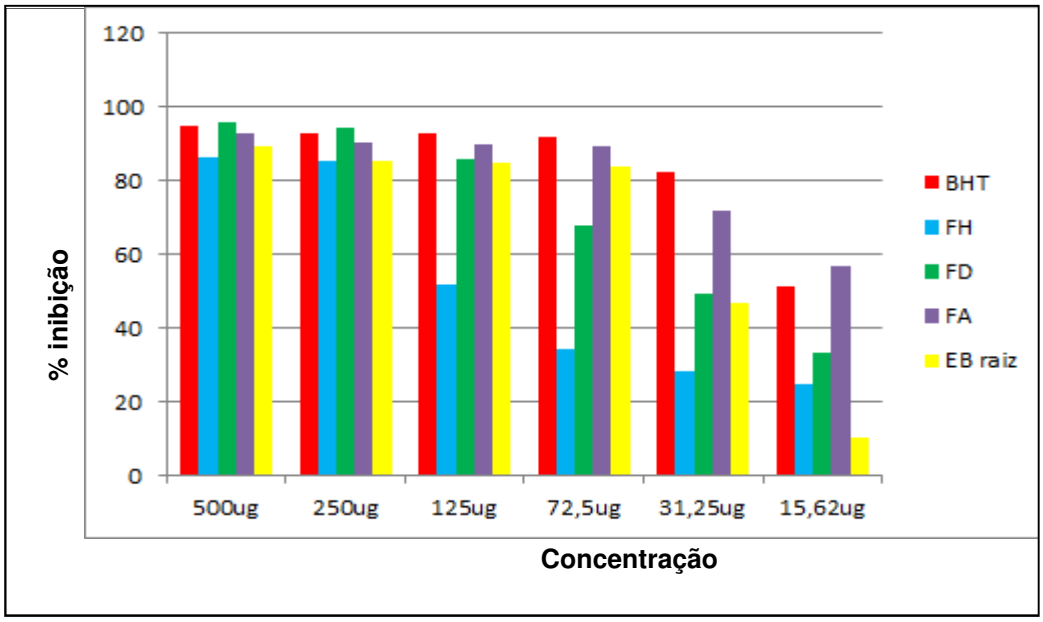


Gráfico 2. Atividade antioxidante das frações de *B. pentodonta.* BHT-butil-hidroxi-tolueno: padrão.

As frações acetato de etila e EB da raiz de *B. pentodonta* merecem destaque na análise do **Gráfico 2** acima. Conforme já foi dito na discussão dos metabólitos isolados, anteriormente, estas frações apresentaram flavonóides ou derivados desta classe além de ácidos dicafeoilquínicos em sua composição fitoquímica, derivados estes comuns no gênero *Baccharis*[11].

Compostos antioxidantes foram isolados em diferentes extratos e frações de diversas espécies de *Baccharis* [209]. Dias e colaboradores[210] relatam a atividade antioxidante evidente tanto no EB quanto na fração acetato de etila de *B. trimera.*

[209] SIMÕES-PIRES, C. A.; QUEIROZ, F.; HENRIQUES, A.T.; HOSTETTMANN, K. Phytochem. Anal., 16, 307, 2005
[210] DIAS, L. *et al.* Ver. Bras. Farmacog. 19, 1B, 309, Jan./Mar. 2009.

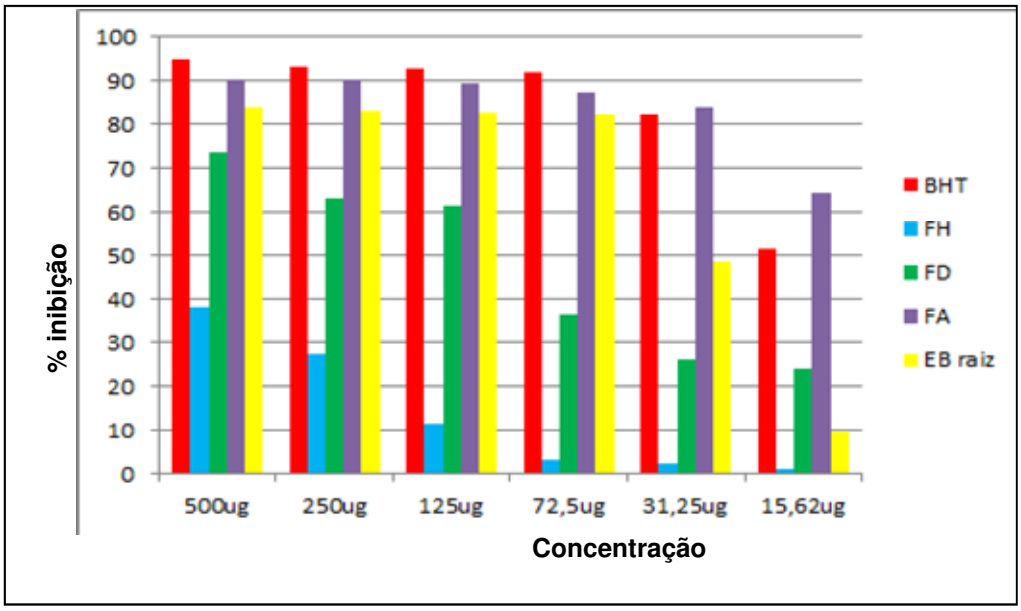


Gráfico 3. Atividade antioxidante dos extratos brutos e frações de *B. triplinervium pentodonta.* BHT-butil-hidroxi-tolueno: padrão.

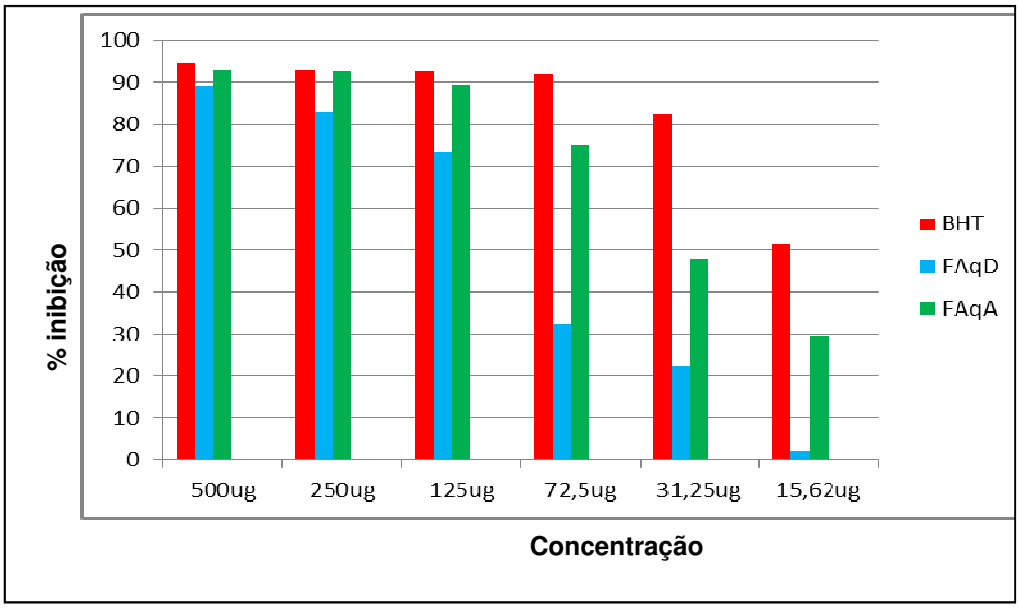


Gráfico 4. Atividade antioxidante das frações aquosas de *B. triplinervium.* BHT-butil-hidroxi-tolueno: padrão.

Os **Gráficos 3 e 4**, acima, apresentam a atividades antioxidantes das frações de *B. triplinervium.* Na literatura não há relatos de estudos realizados com esta planta, porém pode-se observar que as frações acetato de etila, provenientes da extração aquosa ou a frio, apresentam maior potencial de atividade antioxidante, confirmando o que já se esperava devido ao perfil fitoquímico observado para esta planta.

6 CONCLUSÕES

O estudo do perfil fitoquímico das três plantas estudadas levou ao isolamento de alguns metabólitos secundários fenólicos. Entre os metabólitos isolados, podemos salientar a presença de ácidos di- e tricafeoilquínicos (pertencentes a classe dos derivados do acido clorogênico) e de flavonóides (pertencentes a classe das flavonas).

Das folhas de *Pluchea sagittalis* foram isolados os metabólitos ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico. Do extrato bruto da raiz desta mesma espécie foram isolados os mesmos três metabólitos 3,4-diACQ, 3,5-diACQ e 4,5-diACQ além do ácido 1,3,5-tricafeoilquínico.

De *Baccharis pentodonta* foram isolados os metabólitos 5,7,4'- triidroxi-6-metoxi-luteonina e 6-metoxi-luteonina de suas folhas e os metabólitos 3,4-diACQ, 3,5-diACQ, 4,5-diACQ e ácido 3-feruloil-5-cafeoilquínico.

Enquanto que da raiz de *Baccharidastrum triplinervium* foram isolados os metabólitos 3,4-diACQ, 3,5-diACQ, 4,5-diCQA já isolados anteriormente das outras espécies trabalhadas. A elucidação estrutural desses metabólitos isolados se deu por RMN e por análises de massa de alta resolução.

Em relação à atividade antimicrobiana apresentada pelas plantas estudadas, de maneira geral, os resultados obtidos foram interessantes, podendo-se considerar que as plantas estudadas apresentaram boa atividade antimicrobiana, principalmente frente à levedura *M. furfur*. Os EB das raízes de *P. sagittalis, B.triplinervium* e o EB das folhas de *B. pentodonta* além das frações acetato de etila das duas últimas plantas e da FAq acetato de etila de *P. sagittalis* terem apresentado atividades fungicidas entre 0,125 e 0,0625 mg mL^{-1}.

A atividade inibitória dos extratos e frações frente às enzimas testadas foi mais interessante frente à enzima POP, com resultados de inibição próximos a 100%. Os metabólitos isolados testados (ácido 3,4-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico) foram mais ativos frente a este enzima quando comparados aos padrões comerciais ácido cafêico e ácido clorogênico, podendo-se afirmar que os extratos e frações de *P. sagittalis, B. pentodonta* e *B. triplinervium* são potenciais inibidores da enzima POP. Frente a enzima DPP IV as frações e extratos testados não apresentaram atividade pronunciada exceto os extrato brutos das raízes de *B. pentodonta* e *B. triplinervium* que

apresentaram inibições de 50,58 e 53,73% frente a enzima DPP IV. Estes resultados são extremamente importantes, pois inibidores naturais desta enzima são praticamente inexistentes.

As frações e extratos testados apresentaram atividade antioxidante interessante pelo método do radical livre (DPPH) sendo as frações hexânicas de *P. sagittalis* e *B. triplinervium* e a fração acetato de etila de ambas as espécies, além do EB da raiz de *P. sagittalis* as que apresentaram maior potencial antioxidante, com resultados próximos ao padrão BHT.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, D. S. P. Radicais livres e antioxidantes. In: OGA, S. Fundamentos de toxicologia. São Paulo: Atheneu, 474p, 2003.

AGRAWAL, P. K. Carbon-13 NMR of flavonoids. Elseiver Science Publishing Company Inc, New York, cap 9, p 497-524, 1989.

ALTMAN, F. P. Tetrazolium salts ans formazans. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag, 56p, 1976.

ALVESALO, J.; et al Biochem Pharmacol, 71, 735, 2006.

ANTOLOVICH, M.; et al. Analyst, 127, 1, 183, 2002.

ARRECUBIETA, C.; et al. SdrF, a Staphylococcus epidermidis Surface Protein, Binds Type I Collagen, JBC Papers, in Press, 2007.

ATTIMARAD, M. et al. Pharm. Meth., 2, 2, April/June, 2011.

AZUMA, K.; et al. J. Agric Food Chem, 47, 3963, 1999.

BAILEY, G. S.; WILLIAMS, D. E. Food Technology, 47, 105, 1993.

BARROSO, G. M. Sistemática das angiospermas do Brasil. Imprensa Universitária da UFV, Viçosa-MG, vol. 3, 326p, 1991.

BARTEL, B.; MATSUDA, S. P. T. Science 299, 352, 2003.

BRANDT, I.; SCHARPÉ, S.; LAMBEIR, A.M. Clin. Chim. Acta, 377, 50, 2007.

BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. Food Res. Intern. 40, 393, 2007

BRAVO,L. Nutr. Rev.,56,11, 317, 1998.

BREEN, G.; et al. Bipolar Disorders, 6, 156, 2004.

BUENO, L. O.; BARROSO, G. M. Compostas 5. SUBTRIBO: BACCHARIDINAE. In: Flora Ilustrada Catarinense, I Parte As Plantas, Monografia Completa, 304 páginas, Itajaí-SC, 2002.

BÜRGER, M. E. Estudo Farmacológico do extrato da Pluchea sagittalis (Lam.) Cabrera (Compositae) sobre o trato gastrointestinal. Dissertação de Mestrado, UFSM, 1995.

ÇAKIR, A.; et al. Turkey J. Chem., 30, 1, 2006.

CALDERONE, V. Pharmacol, 370, 290, 2004

CALIXTO, J. B.; Braz. J. Med. Biol. Res., 33, 179, 2000.

CASTRO, H. G. DE, FERREIRA, F. A. Contribuição ao estudo das plantas medicinais: carqueja. Viçosa: Suprema, 158p., 2000.

CHAN, E. W. C.; et al. LWT-Food Sci. Technol. 42, 1026, 2009.

CHECLER, F.; VINCENT, J. P.; KITABGI, P. J Neurochem 45, 1509, 1985.

CHOI, J. et al. J. Med. Food, 8, 348, 2005.

CHOI, J. et al. J. Nat. Prod., 69, 742, 2006

CHUDA, Y.; et al. J. Agric Food Chem 44, 2037, 1996.

CLIFFORD, M. N. Planta Med 12, 1103, 2004.

CLIFFORD, M. N. J Sci Food Agric 80, 1033, 2000.

CLIFFORD, M. N. J. Sci Food. Agric., 79, 362, 1999.

CLIFFORD, M. N.; BROWN, J. E. In Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications, Andersen O, Markham KR (eds). CRC Press: Boca Raton, FL; 320–370, 2006.

CLIFFORD, M. N.; et al J. Agric. Food Chem, 51, 2900, 2003.

CLIFFORD, M. N.; et al. J. Agric. Food Chem. 54, 1957, 2006.

CLIFFORD, M. N.; Knight, S.; Kuhnert, N. J Agric. Food Chem, 53, 3821, 2005.

CLIFFORD, M. N.; WU, W. ; KUHNERT, N. Food Chemistry 95, 574, 2006.

CLIFFORD, M. N.; ZHENG, W.; KUHNERT, N. Phytochem. Anal. 17, 384, 2006.

CLIFFORD, M.N.; et al J. Agric. Food Chem, 55, 929, 2007.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. Introdução a métodos cromatográficos. Campinas, UNICAMP, 1987.

COMINO, C. et al. BMC Plant Biology, 9,30, 2009.

CORRADINI, E. Nat. Prod. Res., 5, 25, 469, 2011.

CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, vol. I, 74p, 1984.

COSTA, A. F. Farmacognosia. 5. ed. 2 v. Lisboa: Fundamental Calouste Gulbenkian, 1999.

CUNNINGHAM, M. W.. Clin Microbiol Rev 13, 470, 2000.

CUYCKENS, F; CLAEYS, M. J. Mass Spectrom, 39, 1, 1, 2004.

DAHANUKAR, S.A.; KULKARNI, R.A.; REGE, N.N. Indian J. Pharm., 32, S81, 2000.

DE MARIA, C. A. B; MOREIRA, R. F. A. Química Nova, 27, 4, 586, 2004.

DE RIJKE, E.; et al. J. Chromatogr. A.45, 984, 2003.

DE SOUZA, C. G.; et al. J.Ethnopharm., 90, 135, 2004.

DEVIIENNE, K. F.; RADDI, M. S. Braz. J. Microbiol 33, 166, 2002.

DIAS, L. et al. Ver. Bras. Farmacog. 19, 1B, 309, Jan./Mar. 2009.

DORMAN, H.J.D., DEANS, S.G. J. Appl. Microbiol., 88, 3086, 2000.

DUARTE, M. C. T. et al. Rev. Bras. Farmacog., 14, 1, 6, 2004.

DUTHIE, G. G.; DUTHIE, S. J.; KYLE, J. A. M. Nutr Res Rev 13, 79, 2000.

ELIPE, M. V. S.. Anal. Chem, 1, 497, 2003.

ELLOF, J. N.;et al. Plant. Med. 64, 711, 1998.

EMERENCIANO, V. P; et al. Biochem. Syst. and Ecol. 29, 947, 2001.

ERLUND, I. Nutr. Res., 24, 851, 2004.

FARAH E DONANGELO, Braz. J. Plant Physiol., 18,1, 23, 2006.

FDA: Code of Federal Regulation, 21, 300, 1991.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S.; Rev. Ass. Méd. Bras., 43, 1, 61, 1997.

FERRER, J.,-L.; et al. Plant Physiology and Biochemistry 46, 356, 2008.

FERRERES, F.; SOUSA, C.; VRCHOVSK, V.; VALENTÃO, P.; PEREIRA, J. A.; SEABRA, R. M.; ANDRADE, P. B. Eur. Food Res. Techn. 222,88, 2006.

FERRONATTO, R. et al. Rev. Bras. Farmacog., 17, 2, 224, 2007.

FORMICA, J.V.; REGELSON, W. Food Chem Toxicol 33,1061, 1995.

FOSSEN, T.; et al. Food Chem., 81, 433, 2003.

FRANCO, I. J. Ervas e plantas: a medicina dos simples. Imprimar: Chapecó-SC, 1995.

FULLAS, F.; et al. J Nat Prod. 57, 801, 1994.

GRAY, M.J.; et al. Biomed. Chromatogr. 24, 91, 2010.

GROLL, A. H.; WALSH, T. J. Uncommon opportunistic fungi: new nosocomial threats. Clin. Microbiol. Infect. 7, 8-24, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. 3 ed. Oxford: Oxford University Press; 1998.

HAMMER, K.A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. J.Appl. Microbiol, 86, 985, 1999.

HAN, T.; et al. Anal.Chim. Acta 634, 272, 2009.

HARBORNE, J. B. A guide to modern techiniques of plant analysis. Londres: Phytochemical Methods. Chapman and Hall, 1994.

HEIM, K.E., et al. J. Nut. Biochem. 13, 572, 2002.

HÖRNER, R. Cocos gram +: estafilococos (catalase+) e microrganismos relacionados. In: Microbiologia Clinica- Caderno Didático, Farmácia, UFSM, 328p, 2003.

HSU, C. L.; YEN, G. C. Mol. Nut. Food Res., 52, 53, 2008.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOI, R. L.. J. Agric. Food Chem. 53, 6, 1841, 2005.

HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Alim. Nutr., Araraquara, 1, 19, 97, 2008.

HUNG, T. M.; et al. J. Ethnophar., 108, 188, 2006.

IDRIS, I,; DONNELLY, R. Diabetes, Obes. Metab., 9, 153, 2007.

ISLAM, S. J. Food. Sci. 71, R13, 2006.

IWASHINA, T. J. Plant Res. 113, 287, 2000.

JAISWAL, R,; DESHPANDE, S.; KUHNERT, N. Phytochem. Anal., 22, 432, 2010.

JAISWAL, R,; SOVDAT, T..; VIVAN, F.; KUHNERT, N J. Agric. Food Chem., 58, 5471, 2010.

JAISWAL, R.; KUHNERT, N. Rapid Commun. Mass Spectrom., 24, 2283, 2010.

JARVIS, B. B.; et al. Phytochem. 30, 789, 1991.

JENSEN, L.B.; et al. Environ. Int. 26, 581, 2001.

JOHNSTON, K.L.: CLIFFORD, M.N.; MORGAN, L.M. Am J. Clin Nutr 78, 728, 2003.

JOLY, A. B. Botânica: introdução à taxonomia vegetal. Companhia Ed. Nacional, São Paulo-SP, 777p, 1998.

JUNG, J-K.; et al. J. Food Compos. Anal. 24, 29, 2011.

KAVITHA PALANIAPPAN, K.; HOLLEY, R. A. Int. J. Food Microbiol.140, 164, 2010.

KOEHN F.E.; CARTER G.T. Nat Rev Drug Discov 4, 206, 2005.

KORBES, C. V. Manual de plantas medicinais, Grafit: Francisco Beltrão-PR, 1995.

KORFMACHER, W. A. DDT Reviews,10, 20, 1357, 2005.

KRIˇZMAN, M.; et al. J. Pharm. Biomed. Anal. 43, 481, 2007.

KUETE, V. et al. Int. J. Antim. Ag., 37, 156, 2011.

LANGOHR, I. M.; GAVA, A.; BARROS, C. S. L. Pesquisa Veterinária Brasileira 25, 4, 235-238, 2005.

LARSON, R.A. Phytochemistry, 27, 4, 969, 1988.

LI, Y.; BUT, P.; OOI, V. Antiviral Research, 1, 68, 1, 2005.

LIJUN, H. et al. Cancer Sci. 102, 219, 2011.

LIU, L.; et al. Food Chem. 112, 35, 2009.

LIVERIO, L.; et al. J.Study Med. Plants, 65, 203, 1994.

LOEFFLER, J.; STEVENS , D. A. Clin. Infec. Dis. 36, 31, 2003.

LORENZI, H; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo, SP, 2002.

LOU, J. The Plant Journal, 56, 316, 2008.

MAES, M. et al Psychiatry Research, 58, 217, 1995.

MAES, M.; BONACCORSO, S. Acta Psychiatr. Scand., 109, 126, 2004.

MAES, M.; et al. Psychoneuroendocrinology, 23, 485, 1998.

MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. J. of Appl. Microb. 84, 538, 1998.

MARKHAM KR. Techniques of Flavonoid Identification. Academic Press: London, 1982.

MARTINO, V. S.; DEBENEDETTI, S.; COUSSIO, J. D. Phytochemistry, 18, 2052, 1979.

MAZZAFERA, P.; ROBINSON, S. P. Phytochemistry 55, 285, 2000.

McDOUGALL, B.; et al. Antimicrob Agents Chemother, 42,1,140,1998.

MCINTOSH, C. H. S.; et al. IJBCB, 38, 860, 2006.

MECCA, T; et al. Bioorg.Med.Chem., 12, 5057, 2004.

MENG, L.; et al. Comptes Rendus Chimie, 1, 2008.

MIKETOVA, P. et al. J. Mass. Spectrom. 34, 1240, 1999.

MIYAKE, Y.; et al. Lipids 33, 689, 1998.

MLADĚNKA, P. Free Radic Biol Med 15, 963, 2010.

Modificado de: BARROS, M. P.. Estudo Quimico e avaliação da atividade antiinflamatória, moluscicida e antioxidante da espécie vegetal Chomelia obtusa (Rubiaceae). Disseratção de mestrado, Universidade Estadual de Maringá, UEM, 2007.

Modificado de: ZERAIK, M. L.. Estudo Analítico dos flavonóides dos frutos do maracujá (Passiflora edulis Sims. F flavicarpa Degener). Tese de Doutorado, Instituto de Química de São Carlos, USP, 2010.

MOGLIA, A. et l. J Agric Food Chem, 56, 18, 641, 2008.

MOLYNEUX, P. Songklanakarin J. Sci. Tech. 26, 2, 211, 2003.

MONTEIRO E TRUGO, J. Agric. Food Chem. 53, 1399, 2005

MONTEIRO, M., et al. J. Nut. 137, 2196, 2007.

MOREIRA, F. P. M. Química. Nova, 26,3, 309, 2003.

MURRAY, P. R.; et al. Enterobacteriaceae. In: Microbiologia Médica, 4ª ed., Ed. Guanabara-Koogan S. A., p 250-264, 762p, 2004.

MURRAY, P. R.; et al. Micoses Oportunistas. In: Microbiologia Médica, 4ª ed., Ed. Guanabara-Koogan S. A., p 626-634, 762p, 2004.

MURRAY, P. R.; et al. Pseudomonas e Microrganismos Relacionados. In: Microbiologia Médica, 4ª ed., Ed. Guanabara-Koogan S. A., p 280-286, 762p, 2004.

MURRAY, P. R.; et al. Staphylococcus e Microrganismos Relacionados. In: Microbiologia Médica, 4ª ed., Ed. Guanabara-Koogan S. A., p188-201, 762p, 2004.

NASCIMENTO, P. F. C.;et al. Rev. Bras. Farmacogn. 17, 108, 2007.

NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard, 5th edition, NCCLS document M7-A5, 2000.

NESOM, G. L.; Phytologia, 69, 40, 1990.

NIESSEN, V.M. J. Chromatog. A, 1000, 413, 2003.

NIKAIDO, H. Annu Rev Biochem 78, 119, 2009.

NISBET L.J.; MOORE, M. Curr. Opin. Biotechnol. 8, 708, 1997.

OJIMA, I. J. of Medicinal Chemistry, 51, 2008.

OKSMAN-CALDENTEY, K.M.; INZE, D. Trends Plant Sci. 9, 433, 2004.

OLIVEIRA, A. C.; et al. J Ethnopharmacol 102, 465, 2005.

OLTHOF, R. M.; HOLLMANN, C. H.; KATAN, B.M. J. Nutr., 131, 66, 2001.

ORDOÑEZ, A. A. L..; et al. Food Chemistry 97, 452, 2006.

PALE, E.; et al. Phytochemistry, 64, 1395, 2003

PELCZAR, JR, M. J.; et al. Antibióticos e outros agentes quimioterápicos. In: Microbiologia: conceitos e aplicações, vol II, 2ºª ed. São Paulo: MAKRON Books, 111-140, 517p, 1996.

PELCZAR, JR, M. J.; et al. Biotecnologia: A Aplicação Industrial da Microbiologia In: Microbiologia: conceitos e aplicações, vol II, 2ºª ed. São Paulo: MAKRON Books, 398-422, 517p, 1996.

PELLATI, F.; BENVENUTI, S.; MAGRO, L.; MELEGARI, M.; SORAGNI, F. J. Pharm. Biom. Anal., 35, 289, 2004.

PEREIRA, A. S.;et al. Avaliação da acurácia de testes laboratoriais para detecção de amostras de Klebsiella pneumoniae produtora de betalactamase de espectro estendido. Jornal Brasileiro de PatoLogia e Medicina Laboratorial 39, 4, 301, 2003.

PINTO, A.C.; VEIGA JÚNIOR, V. F.; MACIEL, M. A. M. Química Nova, 28, 3, 519, 2005.

PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUŠOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Fitoterapia 82, 513, 2011.

Química Verde no Brasil 2010-2030, Centro de Gestão e Estudos Estratégicos Ciência, Tecnologia e Inovação

REGASINI, L. O.; et al. Quimica Nova, 4, 31, 802, 2008.

REICH, E. High-performance thin-layer chromatografy for the analysis of medicinal plants. Thieme, 264p, 2007.

REITZ, PR, KLEIN, RM "O reino vegetal do Rio do Sul", Sellowia – Anais Botânicos do Herbário, Barbosa Rodrigues 16, 9-118, 1964.

RIOS, J.L.; RECIO, M.C. J. of Ethnophar, 100, 80, 2005.

ROBINSON, W.E.; et al, Mol Pharmacol 50, 846, 1996.

ROEHRL, M.H.A WANG, J.Y.; WAGNER, G.. Biochemistry, 43, 16056, 2004. SCHMUCK, C.; WIENAND W. ; GEISER, L.. Highlights in Bioorganic Chem., 140, 2004.

ROSENBLUM, J. S.; KOZARICH, J. W Curr. Op. Chem. Biol., 7, 496, 2003.

RUMP, A. F.; et al. Gen Pharmacol 26, 603, 1995.

SAKURAI, K.; CHUNG, H.S.; KAHNE D. J. Am. Chem. Soc, 126, 16288, 2004.

SANATI, H. et al. J. Clin. Microbiol., 34, 5, 1280, 1996.

SANBONGI, C. et al., Clin. Exp. Allergy, 34, 971, 2004.

SATAKE, T.; et al. J. Biol. Pharm. Bull., 30, 935, 2007.

SCHRAM, K.; et al. J. Mass Spectrom., 39, 384, 2004.

SENTANDREU, M.A.;TOLDRÁ, F. Food Chem., 75, 159, 2001.

SHEEHAN, D. J.; et al. Clin. Infect. Dis. 17, 2, 494, 1993.

SIMÕES-PIRES, C. A.; QUEIROZ, F.; HENRIQUES, A.T.; HOSTETTMANN, K. Phytochem. Anal., 16, 307, 2005

SONG, Y.; et al. J. Am. Coll. Nut. 24,376, 2005.

SPITZER, V.; SIMÕES, C. M. O. Óleos Voláteis. In SIMOES, C. M. O.; et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ªed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFC, p467-495, 1102p, 2004.

STEINMANN, D.; GANZERA, M. J. Pharm.Biom. Anal. 55, 744, 2011.

STÖCKIGT, J.; ZENK, M. FEBS Lett 1974, 42, 2, 131, 1974.

STÜKER, C. Z. Estudo dos óleos voláteis de plantas medicinais da família Asteraceae do Rio Grande do Sul: Baccharidastrum triplinervium, Baccharis pentodonta, Pluchea sagittalis e Eupatorium buniifolium, Dissertação de Mestrado, UFSM, 2007.

SUBARNAS, A.; WAGNER, H. Phytomedicine, 7, 401, 2000.

SWAMY, M.K.; et al. J. Phyt., 2, 11, 2010.

TAKAHAMA, U. Phytochem.Rev. 3, 207, 2004.

TAMURA et al., Mol. Nutr. Food Res. 50, 396, 2006.

TARRAGÓ, T.; et al. ChemBioChem, 7, 827, 2006.

TOIDE, K,; IWAMOTO, Y.; FUJIWARA, H.; ABE, H. J Pharmacol Exp Ther 274, 13708, 1995.

TOLONEN, A.; et al. Phytochem. Anal. 13, 316, 2002.

TORTORA, G. J.; et al. Drogas antimocrobianas. In: Microbiologia, 8ªed., Porto Alegre: Artmed, p 559-589, 893p, 2005

TORTORA, G. J.; et al. Os Eucariotos: Fungos, Algas, Protozoários e Helmintos.. In: Microbiologia, 8ªed., Porto Alegre: Artmed, p 334-375, 893p, 2005.

TORTORA, G.J.; I. et al. Procariotos: Dominios Bactéria e Archae. In. Microbiologia, 8ª ed. Porto Alegre, Artmed, p 304-333, 893p, 2005.

TRABULSI, L. R Pseudomonas.; 4ªed, Atheneu, 718p, 2004.

TRABULSI, L. R. Edwarsiella — Citrobacter — Klebsiella — Enterobacter — Hafnia —Serratia — Proteus — Morganella — Providencia.; 4ªed, atheneu, 718p, 2004.

TRABULSI, L. R. Outras espécies aeróbias e anaeróbias facultativas; 4ªed, Atheneu, 718p, 2004.

TRABULSI, L. R. Staphylococcus ; 4ªed, Atheneu, 718p, 2004.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia, 4ªed, São Paulo: Atheneu, 697p, 2005.

TREUTTER, D. Plant Growth Regulation, 34, 1, 71, 2001.

TRUEBA, G. P. Ver. Cubana Invest. Biomédicas, 1, 22, 2003.

UEDA, H.; YAMAZAKI, C.; YAMAZAKI, M. Biol. Pharm. Bulletin, 25, 1197, 2002.

ULBRICH, B.; ZENK, M. Phytochemistry, 18, 929, 1979.

VENÄLÄINEN, J.; et al. Biochem. J, 382, 1003, 2004.

VERDI, L. G. Química Nova 28, 1, 85, 2005.

VILLASEÑOR, J. L. y VILAARREAL, J. A. Revista Mexicana de Biodiversidad. 77, 59, 2006.

VUKICS, V.; GUTTMAN, A. Mass Spectrom. Rev., 29, 1, 2010.

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant Drug analysis: a thin layer chromatography atlas. Berlim: Springer, 384p, 1996.

WEBER, A. E. J. Med. Chem., 47, 4135, 2004.

WEBER, J. M.; et al. Antivir Res 58, 167, 2003.

WEISZ, G. M.; KAMMERER, D. R.; CARLE, R. Food Chem., 115, 758, 2009.

WIDLANSKY, M. E.; et al. Free Radic Biol Med 38, 499, 2005.

WILSON, M. Microbial Inhabitants of Humans: Their Ecology and Role in Health and Disease, 1ª ed. Cambridge University Press, Cambridge, 2005.

WOLFENDER, J.L.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K . Phytochem. Anal., 12, 2, 2001.

WOLFENDER, J.L.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K.. J. Chromatogr. A, 1000, 437, 2000.

XIA, D. et al. Food Sci.Techn., 44, 347, 2011.

XIANG, Z.; NING, Z. LWT-Food Sci. Techn, 41, 1189, 2008.

YOKOZAWA, T.; CHEN, C. P.; DONG, E.; TANAKA, T.; NONAKA, G. I., NISHIOKA, I. Biochem. Pharm., 56, 213, 1998.

YOUNG, I. S.; WOODSIDE, J. V.. J Clin Pathol, 54, 176, 2001.

YULIANA, N.; et al. Phytother. Res. 25, 2, 157, 2011.

ZHOU, J. L.; QI, L. W.; LI, P. J. Chromatogr. A, 1216, 7582, 2009.

ZHU, X-F.; ZHANG, H-X.; LO, R. J. Agric. Food Chem., 52, 7272, 2004.

ZHU, X-F.; ZHANG, H-X.; LO, R. Nat. Prod. Res. 6, 23, 527, 2009.