

**RAFAELA GRASSI ZAMPIERON**

**ESTUDO QUÍMICO E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE ESPÉCIES  
VEGETAIS UTILIZADAS NA MEDICINA POPULAR DE MATO  
GROSSO DO SUL – *ACHYROCLINE ALATA* (KUNTH) DC. E  
*ACHYROCLINE SATUREIOIDES* (LAM.) DC. – ASTERACEAE.**

Campo Grande, MS

2010

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**RAFAELA GRASSI ZAMPIERON**

**ESTUDO QUÍMICO E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE ESPÉCIES  
VEGETAIS UTILIZADAS NA MEDICINA POPULAR DE MATO  
GROSSO DO SUL – *ACHYROCLINE ALATA* (KUNTH) DC. E  
*ACHYROCLINE SATUREIOIDES* (LAM.) DC. – ASTERACEAE.**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do  
Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-  
Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: João Máximo de Siqueira

Campo Grande, MS

2010

**RAFAELA GRASSI ZAMPIERON**

**ESTUDO QUÍMICO E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE ESPÉCIES  
VEGETAIS UTILIZADAS NA MEDICINA POPULAR DE MATO  
GROSSO DO SUL – *ACHYROCLINE ALATA* (KUNTH) DC. E  
*ACHYROCLINE SATUREIODES* (LAM.) DC. – ASTERACEAE.**

Aprovada em 17 de Maio de 2010

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

**BANCA EXAMINADORA**

Orientador: João Máximo de Siqueira  
Universidade Federal de São João Del Rei

Damaris Silveira  
Universidade de Brasília

Mônica Cristina Toffoli Kadri  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Maria de Fátima Cepa Matos  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Adriano César de Moraes Baroni  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

*Dedico minha tese ao meu marido, Frank, e meus filhos Vítor e Vinícius, pelo infinito amor.*

*Muitas vezes, temos que nos resguardar por algum tempo e começar um processo de renovação. Para continuar a voar um vôo de vitórias, devemos às vezes nos desprender de lembranças, costumes e outras tradições do passado. Somente livres do peso do passado, poderemos aproveitar o valioso resultado de uma renovação.*

*Edvaldo Monteiro*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me dar força para concluir mais uma etapa.

Ao Programa Interinstitucional de pós-graduação em Saúde Unb/UFMS/UFG pela oportunidade de aperfeiçoamento dos meus conhecimentos.

Ao professor Dr. João Máximo de Siqueira pelo apoio, amizade e orientação.

A professora doutora Maria do Carmo Vieira pela doação das amostras deste trabalho.

Aos professores Dr. Carlos Alexandre Carollo, USP-Ribeirão Preto/SP, e Dr. Alberto, Universidade de Cadiz, Espanha, pelas análises feitas em colaboração.

A Univesidade de Cadiz, Espanha.

A Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP.

A professora Dra. Lílian Mentz pela identificação das amostras.

Ao João Roberto Fabri pela amizade verdadeira, ajuda técnica e dedicação.

A todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus pais sempre pela confiança e amor incondicional.

Aos meus amigos da Farmacognosia pela valiosa companhia.

À técnica Edilene Delphino Rodrigues pelos experimentos de RMN.

A Fundect pelo apoio financeiro do projeto.

## RESUMO

*Achyrocline alata* e *Achyrocline satureioides*, espécies pertencentes à família Asteraceae, são utilizadas na medicina tradicional de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, sendo *A. alata* considerada planta sucedânea de *A. satureioides*. *A. alata* (“jatei-ka-há”) é predominante neste estado enquanto que *A. satureioides* (“macela”) é predominante nos demais estados do país. Estas duas espécies foram coletadas em épocas diferentes, 1996 e 2002 para comparação fitoquímica. O presente trabalho teve como objetivo o isolamento de substâncias de *Achyrocline alata* para então compará-las às substâncias de *Achyrocline satureioides* descritas na literatura. Ainda como objetivo foi comparado os extratos obtidos dessas espécies através de ensaios químicos destinados a atividade antioxidante e seqüestradora de radicais livres, utilizando como modelo  $\beta$ -caroteno e radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazila, respectivamente. No estudo fitoquímico foram isolados quatro flavonóides de *A. alata* e por análise em CLAE-DAD-EM puderam ser identificadas onze substâncias tanto de *Achyrocline satureioides* como de *Achyrocline alata*. A análise *in vitro* para atividade seqüestradora de radicais e atividade antioxidante, de baixo custo, simples, rápidos e com boa reprodutibilidade, revelou atividade de extratos aquosos (forma farmacêutica conhecida como decocto 5%), 34  $\mu\text{g/mL}$ , de *Achyrocline alata*, *Achyrocline satureioides* e quercetina não apresentam diferença significativa. Para tintura (percolação), em todas as concentrações testadas, *Achyrocline alata* apresentou-se mais ativa que *Achyrocline satureioides*. E na fração acetato de etila e extrato hidrometanólico, *Achyrocline alata* e *Achyrocline satureioides*, na concentração de 34  $\mu\text{g/mL}$ , aliadas a quercetina não apresentam diferença significativa. Dentro de um mesmo experimento, porém, é possível considerar que todas as preparações de droga vegetal (extratos e tinturas) obtidos de *A. alata* revelaram-se, estatisticamente, semelhantes às preparações de *A. satureioides*. A análise em CLAE com detector de diodo revelou composição semelhante para as duas espécies, sem uma grande variação entre os anos diferentes de cultivo (1996 e 2002). Em análise com CLAE-DAD-EM foram identificados 11 compostos em *Achyrocline alata* e *Achyrocline satureioides*, entre eles derivados cafeoil quínico e flavonóides. Observou-se uma variação quantitativa entre as espécies, principalmente para a chalcona 4,2', 4'-triidroxi-6'-metoxichalcona que mostra um acúmulo maior em *A. alata*. Através de análise fitoquímica habitual, esta chalcona já tinha sido isolada de *A. alata* junto com flavonóides isolados desta espécie, previamente, mas está sendo descrito pela primeira vez nestas espécies.

**Unitermos:** Achyrocline, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, 4,2', 4'-triidroxi-6'-metoxichalcona

## ABSTRACT

*Achyrocline alata* and *Achyrocline satureioides*, species belonging to the Asteraceae family, are used in traditional medicine in Campo Grande, Mato Grosso do Sul. *A. alata* plant considered substitute of *A. satureioides*. *A. alata* (Jatei-ka-ha) is prevalent in this state while *A. satureioides* ("macela") is prevalent in other states. These two species were collected at different times, 1996 and 2002 for comparison phytochemistry. This study aimed to the isolation of substances of *Achyrocline alata* and then compares them to substances of *Achyrocline satureioides* described in the literature. Additionally, the work was compared to the extracts of these species through chemical tests for antioxidant activity and scavenging free radicals, using as a model  $\beta$ -carotene and 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazine, respectively. The phytochemical study four flavonoids were isolated from *A. alata* and analysis by HPLC-DAD-MS could be identified eleven substances both as *Achyrocline alata*. The analysis of in vitro radical scavenging activity and antioxidant activity, low cost, simple, rapid and reproducible, showed activity of aqueous extracts (pharmaceutical form known as decoction 5%), 34  $\mu\text{g}$  / mL of *Achyrocline alata*, *Achyrocline satureioides* and quercetin were not significantly different. To dye (percolation) in all concentrations tested, *Achyrocline alata* was more active than *Achyrocline satureioides*. And in the fraction of ethyl acetate and extract hydromethanolic *Achyrocline alata* 34  $\mu\text{g}$  / mL, combined with quercetin not significantly different. Within the same experiment, however, it is arguable that all preparations of plant drug (extracts and tinctures) obtained from *A. alata* proved to be statistically similar to preparations of *A. satureioides*. The analysis in HPLC with diode detector showed similar composition for both species, without a great variation between different years of cultivation (1996 and 2002). In analysis with HPLC-DAD-MS identified 11 compounds in *Achyrocline alata* and *Achyrocline satureioides* between him caffeoyl quinic derivatives and flavonoids. There was a quantitative variation among species, especially for chalcone 4,2', 4'-trihydroxy-6'-methyl-ether showing a greater accumulation in *A. alata*. Through phytochemical analysis usual, this chalcone had been isolated from *A. alata* with flavonoids isolated from this species previously, but is being described for the first time in these species.

**Key words:** Achyrocline, High Performance Liquid Efficiency, 4,2', 4'-trihydroxy-6'-methyl-ether



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	21
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	22
2.1	A FAMÍLIA ASTERACEAE.....	22
2.2	O GÊNERO <i>ACHYROCLINE</i> (LESS.) DC. 1838.....	23
2.3	<i>ACHYROCLINE ALATA</i> (KUNTH.) DC. E <i>ACHYROCLINE SATUREIOIDES</i> (LAM.) DC. ....	24
2.4	FLAVONÓIDES.....	32
2.5	ÓLEOS ESSENCIAIS.....	36
2.6	RADICAIS LIVRES.....	39
2.7	COMPOSTOS ANTIOXIDANTES E SEQÜESTRADORES DE RADICAIS LIVRES.....	45
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	49
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	51
4.1	MATERIAIS .....	51
4.2	MÉTODOS .....	54
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	63
5.1	FITOQUÍMICA.....	63
5.1.1	Fracionamento em Cromatografia em Coluna da fração clorofórmica/acetato de etila de <i>Achyrocline alata</i> .....	65
5.1.2	Isolamento, purificação e elucidação estrutural dos constituintes e marcadores químicos.....	67
5.2	ANÁLISE QUALITATIVA EM CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	81
5.2.1	Avaliação dos extratos, frações e substâncias obtidas de <i>Achyrocline alata</i> e <i>A. satureioides</i> por CLAE.....	81
5.2.2	Atividade antioxidante, utilizando autografia com o $\beta$ -caroteno.....	88

5.2.3	Atividade seqüestradora de radicais livres, utilizando autografia com o DPPH, ensaio qualitativo.....	90
5.2.4	Atividade seqüestradora de radicais livres utilizando como modelo o radical DPPH quantitativo por espectrofotometria.....	94
5.3	ANÁLISE QUALI E QUANTITATIVA EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	107
5.3.1	Análise em cromatografia líquida de alta eficiência de padrões, extratos e frações obtidos de <i>Achyrocline alata</i> e <i>Achyrocline satureioides</i> .....	107
<b>8</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>128</b>
<b>9</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>131</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>132</b>
	<b>APÊNCIDE A</b> .....	<b>142</b>
	<b>APÊNCIDE B</b> .....	<b>148</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

AcOEt	Acetato de etila P. A.
AcOH	Ácido Acético
DCM	Diclorometano P.A.
EtOH	Etanol P. A.
MeOH	Metanol P. A.
DMSO	Sulfóxido de Dimetila
Hx	Hexano P. A.
CHCl <sub>3</sub>	Clorofórmio P. A.
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN de <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
UV	Ultravioleta
TMS	Tetrametilsilano
CCD	Cromatografia em camada delgada de sílica gel
CCPS-AgNO <sub>3</sub>	Cromatografia em camada preparativa de sílica gel 60G e Sílica gel 60 G F <sub>254</sub> impregnada com AgNO <sub>3</sub>
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
m	Multiplete
s	Singleto
J	Constante de acoplamento
δ	Deslocamento químico em partes por milhão
ppm	Partes por milhão
PM	Peso molecular
Rf	Fator de retenção
F	Fração
N	Nitrogênio
P	Fósforo

K	Potássio
Ca	Cálcio
Ce(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	sulfato cérico
G	Grama
mg	Miligrama
EHx	Extrato Hexânico
EAcOEt	Extrato Acetato de Etila
ECHCl <sub>3</sub>	Extrato Clorofórmico
Me	Metila
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
EROs	Espécies Reativas de oxigênio
LPO	Lipoperoxidação
NP/PEG	Natural products/polietilenoglicol
CLAE-DAD-EM	Cromatografia Líquida de alta eficiência/Diodo/Massas
DPPH	Radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazila
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
Me	Metil

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Achyrocline alata</i> (7).....	24
<b>Figura 2-3.</b> <i>Achyrocline alata</i> : <b>2.</b> Aspecto geral do ramo aéreo; <b>3.</b> Vista geral do 2º entrenó do caule.Observar as alas (setas).....	25
<b>Figura 4.</b> Foto de <i>Achyrocline satureioides</i> (7).....	26
<b>Figura 5.</b> Núcleo dos flavonóides encontrados em <i>A. satureioides</i> (18).....	27
<b>Figura 6.</b> Substâncias encontradas em <i>A. bogotensis</i> , <i>A. tomentosa</i> e <i>A. flaccida</i> (17, 14, 8).....	29
<b>Figura 7.</b> Flavonóides isolados de <i>A. alata</i> (14).....	31
<b>Figura 8.</b> Biogênese simplificada dos flavonóides (22).....	33
<b>Figura 9.</b> Estrutura básica do flavonóide (36).....	34
<b>Figura 10.</b> Vias de geração de EROs e mecanismo de defesa enzimática (51).....	43
<b>Figura 11.</b> Transformação da planta medicinal em droga vegetal.....	55
<b>Figura 12.</b> Esquema demonstrativo do fracionamento do extrato hidrometanólico de <i>A. alata</i> .....	56
<b>Figura 13.</b> Partição realizada, em funil de separação, partindo do extrato hidrometanólico obtendo as frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila.....	64
<b>Figura 14.</b> Substâncias isoladas a partir do fracionamento da fração clorofórmio/acetato de etila FCHCl <sub>3</sub> /AcOET de <i>Achyrocline alata</i> .....	67
<b>Figura 15.</b> Bandas I e II de 4,2',4'-triidroxi-6',metoxichalcona, observadas no ultravioleta.....	69
<b>Figura 16.</b> Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio RMN de <sup>1</sup> H de 4,2',4'-triidroxi-6'-metoxichalcona obtido em 300 MHz, em DMSO-d <sub>6</sub> .....	70
<b>Figura 17.</b> Numeração dos carbonos na classe das chalconas (flavonóides) (69).....	71
<b>Figura 18.</b> Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de carbono RMN de <sup>13</sup> C de 4,2',4'-triidroxi-6'-metoxichalcona obtido em 75 MHz, em DMSO-d <sub>6</sub> .....	72

<b>Figura 19.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ , 75 MHz, Dept $135^\circ$ , de 4,2',4'-triidroxi-6'-metoxichalcona obtido em DMSO-d6.....	73
<b>Figura 20.</b> Correlações observadas a partir do Mapa de Correlações HMBC de 4,2',4'-triidroxi-6'-metoxichalcona obtido em DMSO-d6, com as setas indicando os carbonos analisados.....	74
<b>Figura 21.</b> Mapa de correlações HMBC de 4,2',4'-triidroxi-6'-metoxichalcona obtido em DMSO-d6 (Expansão).....	75
<b>Figura 22.</b> Espectro de massas de 4,2',4'-triidroxi-6'-metoxichalcona.....	76
<b>Figura 23.</b> Reação de complexação entre flavonóide e o elemento alumínio.....	78
<b>Figura 24.</b> Substâncias isoladas de <i>Achyrocline alata</i> – Gnafilina e 3-OMe-Quercetina.....	78
<b>Figura 25.</b> Representação da absorvância de Gnafilina e 3-OMe-quercetina, obtida em espectrofotômetro U-3000: a) UV em MeOH; b) UV em MeOH/ $\text{AlCl}_3$ ; c) UV em MeOH/ $\text{AlCl}_3$ / HCl.....	79
<b>Figura 26.</b> Padrão cromatográfico de rutina e quercetina (70).....	80
<b>Figura 27.</b> Estruturas de rutina e quercetina (69) .....	80
<b>Figura 28.</b> Análise CLAE (Cromatografia líquida em alta eficiência), com detector em ultravioleta, de substâncias isoladas de <i>Achyrocline alata</i> (4,2',4'-triidroxi-6'-metoxichalcona, gnafilina e 3-OMe-quercetina ) e padrões (quercetina e rutina) . ...	82
<b>Figura 29.</b> Análise CLAE (Cromatografia líquida em alta eficiência) com detector em ultravioleta dos extratos hidrometanólicos de <i>A. alata</i> (JTK- $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ ) e <i>A. satureioides</i> (MRC- $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ ).....	83
<b>Figura 30.</b> Análise CLAE (Cromatografia líquida em alta eficiência) com detector em ultravioleta de Extrato acetato de etila de <i>A. alata</i> e Extrato acetato de etila de <i>A. satureioides</i> . .....	84
<b>Figura 31.</b> Análise CLAE (Cromatografia líquida em alta eficiência) com detector em UV das Frações hexânica, acetato de etila em comparação com extrato hidrometanólico de <i>A. satureioides</i> . .....	86

<b>Figura 32.</b> Análise CLAE (Cromatografia líquida em alta eficiência) com detector em UV das Frações hexânica, acetato de etila em comparação com extrato hidrometanólico de <i>A. alata</i> .....	87
<b>Figura 33.</b> Esquema da atividade antioxidante, utilizando autografia com o $\beta$ -caroteno para substâncias isoladas de <i>A. alata</i> (chalcona, gnafalina e 3-OMe-quercetina) e padrões (rutina e quercetina, Merck).....	89
<b>Figura 34.</b> Esquema representativo da atividade seqüestradora de radicais livres, utilizando autografia com o DPPH para substâncias isoladas de <i>A. alata</i> (chalcona, gnafalina e 3-OMe-quercetina) e padrões (rutina e quercetina, Merck).....	92
<b>Figura 35.</b> Reação que ocorre no radical DPPH após exposição ao agente seqüestrador de radical livre (quercetina). ....	93
<b>Figura 36.</b> Etapas da reação radicalar considerando R como sendo um flavonóide. ....	93
<b>Figura 37.</b> Grupamentos hidroxilas mais importantes, selecionados em vermelho, para favorecer atividade de inibição da LPO, demonstrados em vermelho (34). ....	106
<b>Figura 38.</b> Grupamentos hidroxilas correlacionados para favorecer atividade de inibição da LPO, através da inibição da reação de Fenton, mostrando o local onde o metal pode se complexar (34). ....	106
<b>Figura 39.</b> Ácido clorogênico e derivados dissustituídos identificados em <i>Achyrocline alata</i> e <i>Achyrocline satureioides</i> por HPLC com detector diodo acoplado ao massas em comparação com padrões. ....	107
<b>Figura 40.</b> Cromatograma obtido em CLAE com detector diodo para a chalcona (4,2',4'-Triidroxil-6'-metoxichalcona) em 325 e 270 nm respectivamente, com tempo de retenção em 30.764 minutos. ....	110
<b>Figura 41.</b> Cromatograma obtido em CLAE com detector diodo para a chalcona (4,2',4'-Triidroxil-6'-metoxichalcona) em 270 nm e seu espectro de massa respectivamente. ....	111
<b>Figura 42.</b> Cromatograma obtido em CLAE com detector diodo para a 3-OMe-quercetina em 325 e 270 nm respectivamente, com tempo de retenção em 26.227 minutos. ....	112

<b>Figura 43.</b> Cromatograma obtido em CLAE com detector diodo para a 3-O Querquetina em 270 nm e o espectro de massas respectivamente. ....	113
<b>Figura 44.</b> Cromatograma obtido em CLAE com detector diodo para a gnofalina em 325 e 270 nm respectivamente, com tempo de retenção em 32.315 minutos. ....	114
<b>Figura 45.</b> Cromatograma obtido em CLAE com detector diodo para a gnofalina em 270 nm e espectro de massas respectivamente. ....	115
<b>Figura 46.</b> Cromatograma obtido em CLAE com detector diodo para a rutina (padrão Sigma) em 325 e 270 nm respectivamente. ....	116
<b>Figura 47.</b> Cromatograma obtido em CLAE com detector diodo para a querquetina (padrão Sigma) em 325 e 270 nm respectivamente, com tempo de retenção em 22.51 minutos. ....	117
<b>Figura 48.</b> Cromatograma obtido em CLAE com detector diodo para ácido clorogênico (padrão Sigma) em 325 e 270 nm respectivamente, com tempo de retenção em 2.277 minutos. ....	118
<b>Figura 49.</b> Cromatograma em CLAE com detector diodo para as amostras de <i>A.alata</i> (jatei-ka-há) e <i>A.satureioides</i> (macela) em 325 nm coletadas em 1996.....	120
<b>Figura 50.</b> Cromatograma em CLAE com detector diodo para as amostras de <i>A.alata</i> (jatei-ka-há) e <i>A.satureioides</i> (macela) em 270 nm coletadas em 1996.....	121
<b>Figura 51.</b> Cromatograma em CLAE com detector diodo para as amostras de <i>A.alata</i> (jatei-ka-há) e <i>A.satureioides</i> (macela) em 325 nm coletadas em 2002.....	122
<b>Figura 52.</b> Cromatograma em CLAE com detector diodo para as amostras de <i>A.alata</i> (jatei-ka-há) e <i>A.satureioides</i> (macela) em 270 nm coletadas em 1996.....	123
<b>Figura 53.</b> Cromatograma em CLAE de amostras de <i>A. satureioides</i> , Macela.....	124
<b>Figura 54.</b> Cromatograma dos padrões utilizados para identificação dos compostos presentes nas duas espécies. Nos detalhes podem ser observados os espectros de UV destes compostos (250-450 nm). As estruturas destes compostos estão mostradas na Figura 56. ....	126



**Figura 55.** Compostos químicos identificados por CLAE tanto de *A. Alata* quanto de *A. satureioides*. .....126

**Figura 56.** Cromatogramas das espécies *A. alata* (A – coletada em 1996, B – coletada em 2002) e *A. satureioides* (C – coletada em 1996, D – coletada em 2002). Detecção em 325 nm. Os picos cromatográficos identificados estão relatados na Tabela 12 e estruturas químicas identificadas na Figura 55. ....127

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01</b> - Compostos fenólicos isolados de <i>A. alata</i> e <i>A. saturoioides</i> .....	28
<b>Tabela 02</b> - Análise do óleo essencial de <i>A. alata</i> e <i>A. saturoioides</i> e a porcentagem avaliada por CG-MS destas substâncias (Ondina et al., 1999).....	38
<b>Tabela 03</b> - Principais espécies reativas de oxigênio nas formas de radicais e não radicais (Solomons & Fryhle, 2005). ....	42
<b>Tabela 04</b> - Flavonóides em diferentes estados de oxidação e suas atividades antioxidantes e/ou capturadoras de radicais livres.....	48
<b>Tabela 05</b> - Gradiente de solvente utilizado no fracionamento da fração clorofórmica/acetato de etila.....	65
<b>Tabela 06</b> - Aspecto físico das frações obtidas do fracionamento da fração clorofórmio/acetato de etila de <i>Achyrocline alata</i> coluna de sílica gel. ....	66
<b>Tabela 07</b> - Substâncias identificadas por CLAE de <i>Achyrocline alata</i> .....	68
<b>Tabela 08</b> - Dados de RMN <sup>13</sup> C da substância isolada 4,2',4'-triidroxi-6'-metoxichalcona comparados a substância helicrisitina de Puyvelde et al., 1989....	71
<b>Tabela 09</b> - Representação da equação dos gráficos e valor de R <sup>2</sup> dos extratos hidrometanólicos e metanólicos, bem como frações acetato de etila e clorofórmica de <i>Achyrocline alata</i> e <i>A. saturoioides</i> , além das substâncias isoladas de <i>A. alata</i> (3-OMe-quercetina, gnafilina, 4,2',4'-Triidroxi-6'-metoxichalcona) e rutina e quercetina, como padrões.....	100
<b>Tabela 10</b> - Comparação entre as estruturas dos flavonóides isolados de <i>A. alata</i> (3-OMe-quercetina, gnafilina e 4,2',4'-triidroxi-6'-metoxichalcona) e flavonóides como padrões (morina, biochanina A, narigenina e flavona, Merck) com relação às hidroxilas e aos substituintes.....	104
<b>Tabela 11</b> - Exemplos de flavonóides que apresentam atividade antioxidante crescente conforme o aumento do número de hidroxilas (Cook & Samman, 1996).....	106

**Tabela 12** - Substâncias identificadas por cromatografia líquida de alta eficiência em análise ao extrato hidrometanólico de *A. saturoioides* e *A. alata* por características espectrais e íons negativos em CLAE-DAD-EM.....109

**Tabela 13** - Identificação de alguns compostos do extrato hidrometanólico de *A. alata* e *A. saturoioides* por tempo de retenção, espectro de UV e íons negativos em CLAE-DAD-ESI-EM.....125

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 01.** Capacidade de descoloração do DPPH de substâncias isoladas de *Achyrocline alata* (3-OMe-quercetina, gnafalina e 4,2',4'-Triidroxi-6'-metoxichalcona, **chalcona**) e padrões (Rutina e quercetina - Merck).....95
- Gráfico 02.** Capacidade de descoloração do DPPH do extrato hidrometanólico (bruto) de *A.alata* (JTK) e extrato hidrometanólico (bruto) de *A.satureioides* (MAR) correlacionados com quercetina – Merck, padrão para o teste com DPPH.....96
- Gráfico 03.** Extrato aquoso de *A. alata* (JTK) e extrato aquoso de *A. satureioides* (MAR) correlacionados com quercetina – Merck, padrão para o teste com DPPH.....97
- Gráfico 04.** Capacidade de descoloração do DPPH da tintura de *A. alata* (JTK) e tintura de *A. satureioides* (MAR), em percolação, correlacionados com quercetina – Merck, padrão para o teste com DPPH.....98
- Gráfico 05.** Capacidade de descoloração do DPPH do extrato metanólico de *A.alata* (JTK) e extrato metanólico de *A.satureioides* (MAR) correlacionados com quercetina – Merck, padrão para o teste com DPPH.....99
- Gráfico 06.** Capacidade de descoloração do DPPH da fração Clorofórmica de *A. alata* (JTK) e *A. satureioides* (MAR) e fração Acetato de etila de *A. alata* (JTK) e *A. satureioides* (MAR) comparadas ao padrão do teste – quercetina.....101
- Gráfico 07.** Comparação entre capacidade de descoloração frente ao radical livre DPPH em espectrofotômetro dos flavonóides isolados de *A. alata* (3-OMe-quercetina, gnafalina e 4,2',4'-Triidroxi-6'-metoxichalcona) e flavonóides como padrões (morina, biochanina A, narigenina e flavona, MERCK).....103

# 1 INTRODUÇÃO

A química de produtos naturais, principalmente de espécies vegetais de uso popular, tem sido, ao longo dos anos, uma das principais linhas de pesquisa para a descoberta de novos agentes terapêuticos. A avaliação farmacológica associada a química de produtos naturais pode ser realizada através de ensaios biológicos de diferentes graus de complexidade, ensaios *in vitro* bem como *in vivo* (1).

A avaliação farmacológica utilizada como uma ferramenta para a comprovação científica, colabora com a literatura atual e órgãos fiscalizadores como ANVISA. Este procedimento abre uma perspectiva mais concreta da elaboração de produtos farmacêuticos elaborados a partir de plantas medicinais (Fitoterápicos), bem como reflete segurança quanto ao uso de uma espécie vegetal.

O processo de estudo de uma planta medicinal pode ser sucintamente descrito, em três etapas: (a) identificação botânica; (b) estudo fitoquímico; (c) ensaios biológicos *in vitro*, *in vivo*, pré-clínicos e clínicos. Estes passos podem conduzir a obtenção de monografias oficiais sobre a espécie vegetal inquirida, fornecendo suporte necessário à classificação quanto à segurança e a eficácia, que é indispensável para o uso racional de uma planta medicinal (2).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) tem sido a direcionadora para o desenvolvimento de protocolos e tecnologias apropriados para a obtenção de extratos vegetais brutos e purificados e, especialmente, a realização de ensaios clínicos. Segundo a ANVISA, a lista de fitoterápicos tem aumentando e, conseqüentemente, os critérios para a concessão do registro de liberação para comercialização devem ser mais rigorosos (2).

O controle de qualidade, as instalações, equipamentos adequados e recursos humanos capacitados estão entre os pontos primordiais para o desenvolvimento de insumos farmacêuticos na área de produtos naturais (3).

O presente trabalho tem o intuito de realizar estudo químico e biológico de duas espécies vegetais utilizadas na medicina tradicional de Mato Grosso do Sul. A

perspectiva é a contribuição para ciência bem como para população que utiliza a planta medicinal. Este propósito foi baseado em um levantamento de plantas medicinais mais solicitadas a raizeiros do centro da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, ou por eles indicadas (4).

Dentre as espécies citadas a *Achyrocline alata* (Kunth.) DC. é uma das seis plantas medicinais mais utilizadas na medicina tradicional nesta cidade, onde é conhecida popularmente como “jateí-ka-há” (4).

*A. alata*, jatei-ka-há, com *A. Satureioides*, muito comum no Brasil e países vizinhos, conhecida popularmente como “macela”, são utilizadas de forma indistinta, sendo *A. alata* considerada sucedânea de *A. satureioides* (4).

A partir de informações preliminares, foi desenvolvido o estudo químico de *Achyrocline alata*, “jatei-ka-há”, com a finalidade de comparar os resultados às informações da literatura sobre *A. satureioides*.

No presente estudo também foi realizado estudo biológico quanto ao potencial antioxidante bem como ensaio quanto à capacidade das duas espécies em seqüestrar o radical DPPH. Para complementar este estudo propôs-se a comparação por CLAE-DAD-EM entre extratos e substâncias isoladas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A FAMÍLIA ASTERACEAE

A família Asteraceae é cosmopolita, apresentando cerca de 1.535 gêneros, uma das maiores famílias das Angiospermas e 25.000 espécies amplamente distribuídas, representando cerca de 10% da flora mundial (5).

A família Asteraceae vem sendo estudada, nos últimos 25 anos, não apenas quanto a sua morfologia, anatomia, ontogenia e ecologia, mas também quanto à sua fitoquímica, citogenética e estrutura macromolecular (5).

As plantas da família Asteraceae são consideradas as mais abundantes nas regiões áridas do que nas regiões tropicais úmidas. No Brasil está representada por aproximadamente 180 gêneros, com espécies herbáceas, anuais ou perenes, subarbustivas ou arbustivas e raramente, arbóreas (5).

## 2.2 O GÊNERO *ACHYROCLINE* (LESS.) DC. 1838

O gênero *Achyrocline*, pertencente à família Asteraceae, inclui cerca de 30 espécies afro-americanas, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, nas Américas do Sul e Central incluindo África (5). Na América do Sul são encontradas *A. alata*, *A. tomentosa*, *A. flaccida* e *A. satureioides* (6).

O gênero *Achyrocline* é popularmente conhecido como macela-do-campo, macelinha, camomila, losna-do-mato e jatei-ka-há. *Achyrocline alata* (Figura 1) ocorre na região Sudeste, sendo conhecida pelos mesmos nomes populares e com propriedades e características semelhantes à *Achyrocline satureioides* (Figura 4) (7).

*Achyrocline* é da tribo *Gnaphalieae*, grupo *Helichrysum*. Esta tribo, no Brasil, está representada por cerca de 16 gêneros com poucas espécies. A sistemática de *Achyrocline* é problemática e cada espécie não foi ainda completamente definida (8,9).

Do grupo *Helichrysum* existem relatos, por Puyvelde et al. (1989), da planta *Helichrysum odoratissimum*, com origem semelhante às espécies do gênero *Achyrocline* mostrando-se semelhante macroscopicamente (10).

*Achyrocline* está bem distribuído amplamente desde Minas Gerais até a Argentina, possuindo, então, algumas espécies usadas na medicina tradicional destas localidades (8,9).

Plantas do gênero *Achyrocline* possuem como constituintes químicos relatados os flavonóides e óleos essenciais, principalmente. Knorst (1991) levantou uma questão importante que é a disponibilidade de matéria prima destas espécies, uma vez que sua obtenção ocorre através do extrativismo (11).

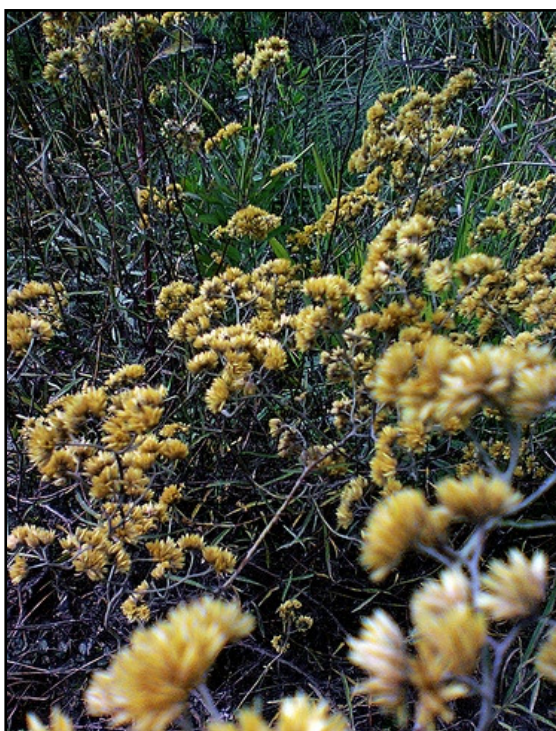
Algumas espécies do gênero *Achyrocline* podem ser citadas em relação a sua importância química e biológica como *A.alata*, *A.satureioides*, *A.flaccida* e *A. tomentosa* conforme descrevem Broussalis et al. (1988) (9).



### 2.3 *ACHYROCLINE ALATA* (KUNTH.) DC. E *ACHYROCLINE SATUREIODES* (LAM.) DC.

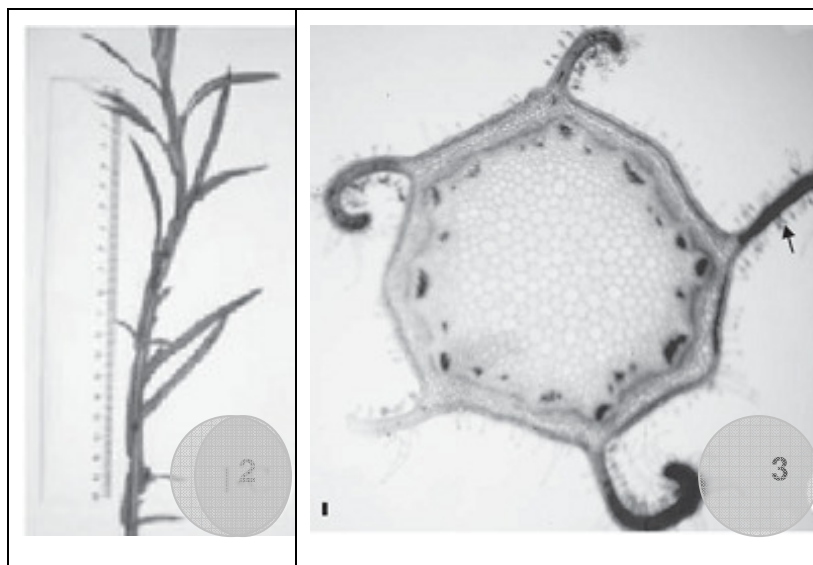
*Achyrocline alata* (Figura 1) é uma espécie que apresenta caracteres anatômicos semelhantes a outros representantes da família Asteraceae. Entretanto possui caracteres morfo-anatômicos próprios que a distinguem de outras espécies do mesmo gênero, como as cinco expansões aladas do caule, as quais podem ser vistas como aspecto geral do ramo aéreo, bem como a vista geral do 2º entrenó do caule (Figura 2-3) (12).

*Achyrocline alata* além do nome popular “jateí-ka-há” pode ser encontrada como “guira-guira” ou “macela” em algumas localidades (8).



FONTE: Lorenzi, 2002

**Figura 1.** *Achyrocline alata* (7).



FONTE: Mussury et al., 2007

**Figura 2-3.** *Achyrocline alata*. **2.** Aspecto geral do ramo aéreo; **3.** Vista geral do 2º entrenó do caule. Observar as alas (setas) (12).

No Brasil, a *A. saturoioides*<sup>1</sup>, popularmente conhecida como “macela” é predominante na medicina tradicional de Campo Grande-MS, enquanto *A. alata*<sup>2</sup> (“jatei-ka-há”) sendo menos freqüente (4).

Em Mato Grosso do Sul a situação se inverte, sendo “jatei-ka-há” adotada como sucedânea de “macela”. Em dois levantamentos feitos em 1992 e 2002, sobre o comércio de plantas medicinais disponíveis pelos raizeiros do centro da capital de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, inquirindo sobre as “plantas mais indicadas e/ou solicitadas pelos raizeiros aos consumidores”, “jatei-ka-há” se posicionou entre as três plantas mais indicadas, enquanto que “macela” entre a 15ª e 19ª posição (4).

A ordem de citação das espécies continua a mesma em cidades localizadas na região fronteira do estado de Mato Grosso do Sul com os países latinos, principalmente com o Paraguai (13).

<sup>1</sup> *Achyrocline saturoioides* D.C. tem como sinônimas *A. albicans* Griseb., *A. candidans* D.C., *A. citrina* Griseb., *A. flaccida* D.C., *A. mathiolaefolia* D.C., *A. molis* Benth., *A. vargasiana* D.C., *Gnaphalium flaccidum* Weism., *G. saturoioides* Lam. (5)

<sup>2</sup> *Achyrocline alata* D.C tem como sinônimas: *A. pterocauda* D.C. e *Gnaphalium alatum* H.B.K. (5)



FONTE: Lorenzi, 2002

**Figura 4.** Foto de *Achyrocline satureioides* (7)

A Farmacopéia Brasileira IV Edição relata para *A. satureioides* características muito semelhantes às aquelas observadas na inflorescência de *A. alata* em se tratando de suas características macroscópicas e microscópicas.

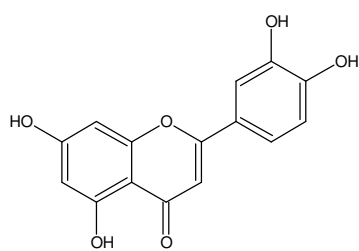
Investigações químicas de *Achyrocline satureioides* e *Achyrocline alata* publicadas anteriormente, resultaram no isolamento de diferentes flavonóides apresentados na Figura 6 e citados na Tabela 01 (9,14).

A presença dos ácidos cafeico, ácido clorogênico e derivados foi detectada em *A. satureioides* por Lopez et al. (2007) que analisaram os respectivos tempos de retenção, através do HPLC com detector de ultravioleta, em comparação com padrões de referência (15).

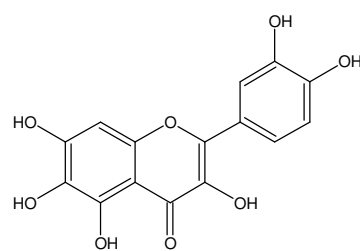
Investigações químicas em *A. tomentosa* e *A. flaccida* no isolamento de diferentes flavonóides apresentados na Figura 05 (9,14).

Em 2009, Retta et al., em investigações químicas em *A. tomentosa* e *A. flaccida* determinaram o teor de óleo essencial das espécies. O estudo demonstrou a extensa similaridade química quanto *A. tomentosa*, *A. flaccida*, *A. satureioides* e *A. alata* (16).

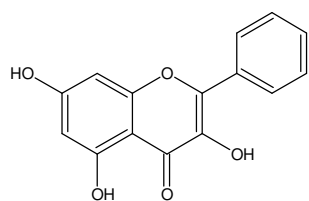
Sagawa et al. (2005) identificaram a presença de dímeros de ciclobutano (Figura 6) em *Achyrocline bogotensis*, planta da família Asteraceae utilizada na Colômbia para distúrbios da próstata (17).



Luteonina



Quercetagetina



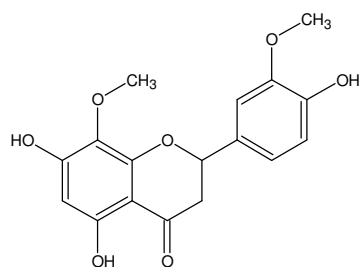
Galangina

**Figura 5.** Núcleo dos flavonóides encontrados em *A. saturoioides* (18)

**Tabela 01** - Compostos fenólicos isolados de *A. alata* e *A. saturoioides* (15,6).

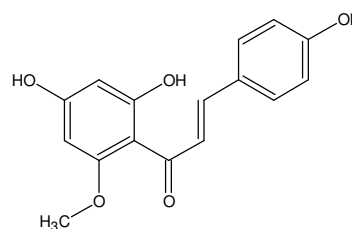
Compostos fenólicos	Presença (+) / ausência (-)	
	<i>A. saturoioides</i>	<i>A. alata</i>
Apigenina	-	+
Luteonina	+	-
Quercetina	+	+
3-OMe-quercetina	+	+
3,7-OMe-quercetina	+	-
3-OMe-7-diglicosídeoquercetina	+	-
Galangina	+	-
3-OMe-galangina	+	-
Gnafalina	+	+
Quercetagina	+	-
5-OMe-naringenina	+	+
Ácido caféico	+	+
Ácido clorogênico	+	+
Ácido isoclorogênico	+	+

FONTE: Lopez et al., 2007; Souza, 2002



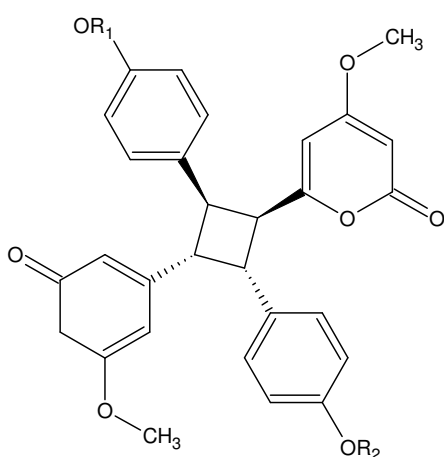
***Achyrocline tomentosa* DC.**

5, 7, 4' - triidroxi 8, 3' -  
dimetoxiflavanona



***Achyrocline flaccida* DC.**

4, 2, 4' - triidroxi 6' - metoxichalcona



***Achyrocline bogotensis* (HBK) DC.**

**Figura 6.** Substâncias encontradas em *A. bogotensis*, *A. tomentosa* e *A. flaccida* (17,14,8).

### 2.3.1 *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.

Espécie nativa da região sudeste tropical e temperado da América do Sul, mais comumente Brasil, Argentina e Uruguai (19). *A. satureioides* foi estudada sob o ponto de vista farmacológico (20).

O extrato aquoso de *A. satureioides* apresentou atividade antiinflamatória, motivo pelo qual é mais utilizada na medicina tradicional. Além de antiinflamatória apresentou atividades: analgésica, sedativa, antioxidante *in vitro*, hepatoprotetora e

antiespasmódica. As duas últimas atividades justificando sua utilização para disfunções gastrintestinais (21, 20, 22, 23, 24).

O estudo toxicológico do extrato aquoso de *A. satureioides* não revelou conseqüências tóxicas, apresentando uma ampla margem de segurança em se tratando do infuso a 2% (25).

Quanto ao extrato hidroetanólico foi avaliada a atividade antiherpética de *A. satureioides* podendo ser observado resultado positivo e expressivo (26).

Morquio et al. (2005) analisaram em coelhos a atividade de extratos de *A. satureioides* em preparações cosméticas quanto a sua capacidade fotoprotetora justificando a atividade pelas altas concentrações de luteonina, quercetina e 3-OMe-quercetina (27). Schwingel et al. (2008) relataram a associação de 3-OMe-quercetina com  $\beta$ - ciclodextrina discutindo sua caracterização e utilização na pele (28).

Fachinetto et al. (2007), bem como Ferraro et al. (2008) relatam que estudos experimentais têm demonstrado atividades anti-HIV, anti-proliferativa, antiherpética, analgésica e constipativa (29, 19).

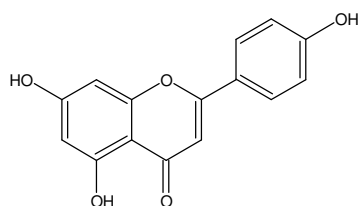
Em 2010, Chiari et al. demonstraram a atividade frente inibição da tirosinase a partir de estudo com espectrofotômetro. No estudo foram testados 91 extratos de diferentes plantas utilizadas na região central da Argentina sendo 18 relatadas com as maiores atividades, incluindo *A. satureioides* (30).

Quanto a atividade farmacológica Brandelli et al. (2009) citaram a utilização de *A. satureioides* na medicina tradicional indígena assim como outras duas espécies como *Eugenia uniflora* L., *Foeniculum vulgare* Miller e *Psidium guajava* L. visando atividade contra trofozoítos de *Giardia lamblia* (31).

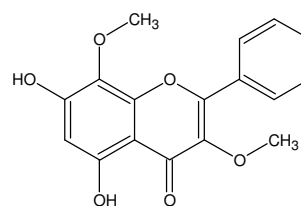
Além do potencial farmacológico de *A. satureioides* Duarte et al. (2008) relatam a espécie como planta infestante do milho safrinha na região do Médio Paranapanema em São Paulo (32).

### 2.3.2 *Achyrocline alata* (Kunth.) DC.

Para *A. alata* existem poucos relatos na literatura quanto ao estudo químico e biológico. Segundo o estudo químico realizado por Broussalis et al. (1993), as substâncias apresentadas na Figura 7 foram isoladas desta espécie, sendo algumas não encontradas em *A. satureioides* (14).



Apigenina



Gnafalina

**Figura 7.** Flavonóides isolados de *Achyrocline alata* (14).



## 2.4 FLAVONÓIDES

Diversas substâncias naturais como flavonóides e taninos, além de extratos vegetais, como *Gingko biloba* têm sido utilizadas como "seqüestradores" ou inibidores de radicais livres e/ou espécies reativas de oxigênios (EROs) (33).

### 2.4.1 Química dos Flavonóides

Flavonóides estão incluídos em um grande grupo de ocorrência natural, são de baixos pesos moleculares e encontrados praticamente em todas as partes das plantas (34). É um grupo formado por compostos polifenólicos com diversas estruturas químicas e características.

O termo flavonóide constantemente usado refere-se a um grande grupo de compostos químicos caracterizados pelo esqueleto  $C_6-C_3-C_6$  (anéis A, B e C) nos quais os componentes  $C_6$  são anéis aromáticos. Sua biogênese, processo de formação dos flavonóides, pode ser observada na Figura 8 bem como sua estrutura geral numerada na Figura 9 (35, 36, 34).

As maiores classes incluem flavanóis, flavonas, flavanonas, catequinas (ou flavanóis), antocianidinas, isoflavonas, diidroflavonóis e chalconas (36). Os flavonóides podem apresentar-se como agliconas (sem ligação com açúcar) e glicosídeos (com ligação com açúcar) (22). A atividade bioquímica dos flavonóides depende de sua estrutura química e a orientação relativa de seus ligantes.

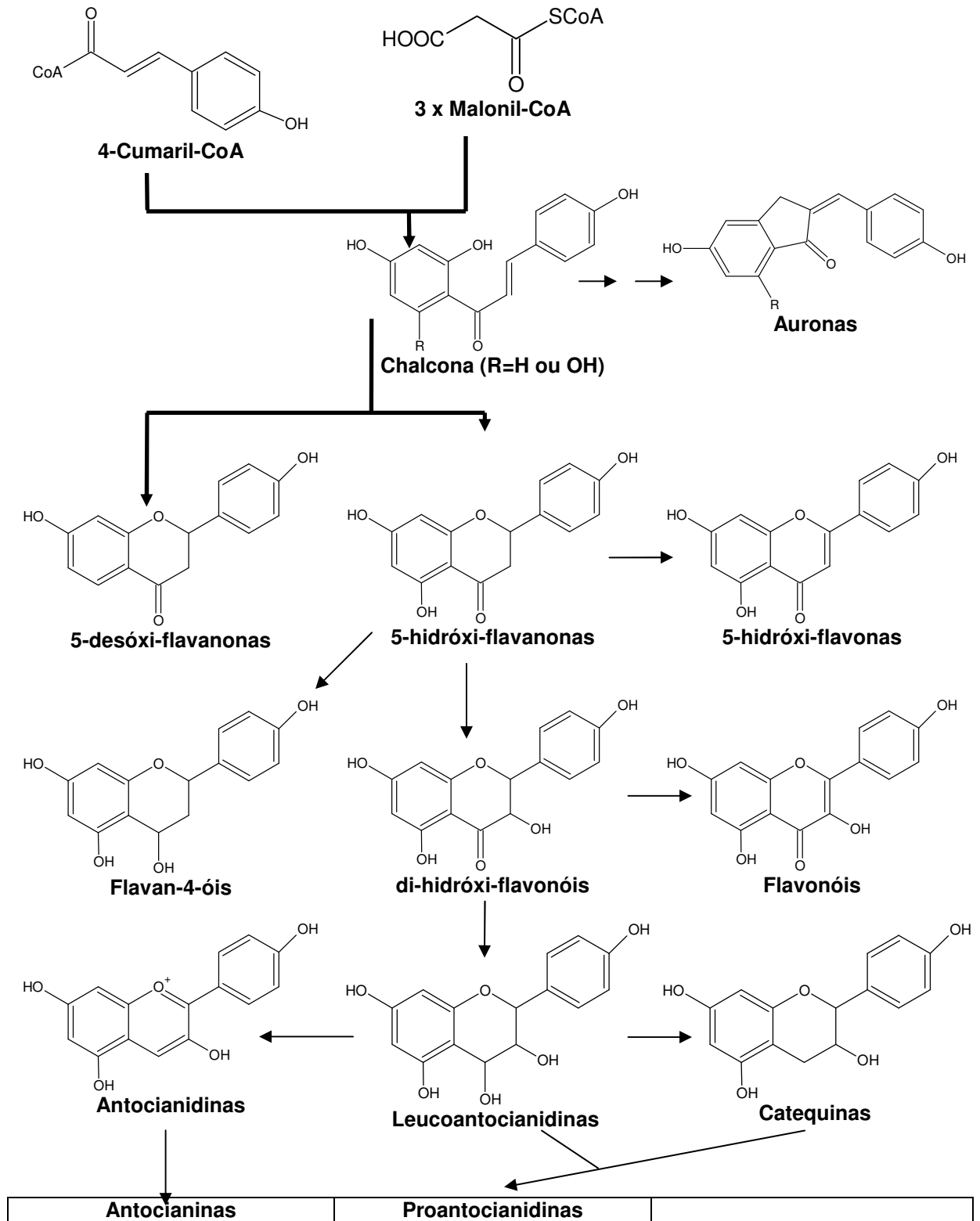
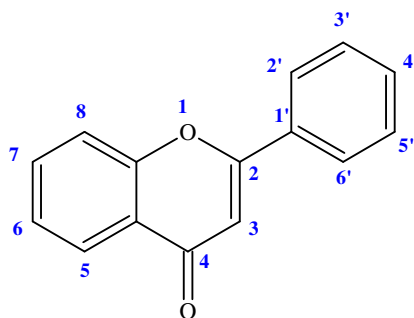


Figura 8. Biogênese simplificada dos flavonóides (22)



**Figura 9.** Estrutura básica do flavonóide (36)

### 2.4.2 Distribuição, função nas plantas e atividade biológica

Flavonóides são substâncias facilmente encontradas nas plantas. Mais de 4.000 já foram identificados em plantas vasculares e variam quanto ao tipo e quanto à quantidade (34).

A quantidade de espécies que foram examinadas sistematicamente para o conteúdo de flavonóides ainda é muito baixa. A identificação e quantificação de todos os tipos de flavonóides com função biológica ainda são incompletos.

Para as plantas a produção de flavonóides está destinada à proteção contra fungos parasitas, herbívoros, patógenos e injúria por oxidação das células. Eles ocorrem naturalmente em frutas, vegetais e flores (1).

Para ação de flavonóides em seres humanos foram publicados relatos de efeitos como atividade antibacteriana, antiviral, antiinflamatória, antialérgica e ações vasodilatadoras (1).

Outras atividades biológicas podem ser citadas como inibição da peroxidação de lipídeos (LPO), agregação plaquetária, permeabilidade e fragilidade do capilar, e atividade enzimática incluindo cicloxigenase e lipoxigenase (37, 38, 39).

A alta distribuição de flavonóides leva os relatos ainda quanto sua dosagem. Segundo Cook & Samman, 1996, sugerem uma dieta de 170 mg/dia de flavonóides, os quais podem contribuir com prevenção de tumores e da aterosclerose, pois

auxiliam a prevenção da lipoperoxidação e promovem o controle das reações em cadeia iniciadas por radicas livres (34).

A análise de outras plantas como por exemplo o chá verde, a cebola e a maçã revelam uma contribuição com 48%, 29% e 7% de flavonóides, respectivamente (34, 40).

## 2.5 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são compostos importantes para plantas como *Achyrocline alata* e *Achyrocline satureioides* e para tanto será relatado neste item os estudos quanto a estes compostos aromáticos.

Óleos essenciais em plantas possuem funções ecológicas relevantes, especialmente como inibidores da germinação, proteção contra predadores e atração de polinizadores (41).

Óleos essenciais, também chamados voláteis, são produtos obtidos de partes de plantas através, sobretudo, de destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos (41).

De forma geral, óleos essenciais são misturas complexas de substâncias lipofílicas geralmente odoríferas e líquidas. Sua principal característica é a volatilidade, aparência oleosa à temperatura ambiente e solubilidade em solventes orgânicos apolares (42).

Em água apresentam solubilidade limitada, mas suficiente para aromatizar as soluções aquosas, hidrolatos; o sabor geralmente apresenta-se acre (ácido) e picante e quanto à coloração, quando recentemente extraídos podem ser incolores ou ligeiramente amarelados. Poucos óleos essenciais apresentam cor, como o óleo volátil de camomila de coloração azulada, pelo seu alto teor de azuleno (43).

Em geral não são muito estáveis, principalmente na presença de ar, calor, luz, umidade e metais. A maioria de óleos possui índice de refração e são opticamente ativos, possuindo derivados terpênicos e fenilpropanóides (44).

Os terpenóides são derivados de unidades do isopreno e os fenilpropanóides se formam a partir do ácido chiquímico, que forma as unidades básicas dos ácidos cinâmico e p-cumárico (43).

No óleo essencial como mistura, os derivados fenilpropanóides e terpênicos apresentam-se em diferentes concentrações, normalmente, um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades (45).

O uso de extratos e óleos essenciais na indústria de cosméticos e, em particular, no ramo de perfumes remonta à Antigüidade. Na China, na Índia e no Oriente Médio, as plantas aromáticas, os óleos, as águas perfumadas e preparações cosméticas eram utilizadas na cozinha, em cosméticos, na medicina e nas práticas religiosas (46).

No mercado internacional o Brasil é o décimo maior importador de óleos essenciais e o quarto maior exportador somando US\$ 98 bilhões em 2004. Existem hoje aproximadamente 3.000 óleos conhecidos e 300 comercializados, sendo os seis principais produzidos e exportados os óleos de laranja, limão taiti, eucalipto, pau-rosa, lima e capim-limão (46).

Estudos sobre óleos essenciais, obtidos das inflorescências do gênero *Achyrocline*, relatam que amostras foram coletadas das áreas centrais da Argentina e analisadas por cromatografia gasosa e cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa. Com base neste estudo 52 compostos foram identificados. A substância cariofileno foi o composto mais abundante de todos os óleos estudados conforme mostra a Tabela 02 (41).

**Tabela 02** - Análise do óleo essencial de *A. alata* e *A. saturoioides* e a porcentagem avaliada por CG-MS destas substâncias (41).

<i>A. alata</i>		<i>A. saturoioides</i>	
<b>Substâncias identificadas por CG-MS</b>	<b>% área</b>	<b>Substâncias identificadas por CG-MS</b>	<b>% área</b>
Borneol	0,8	Borneol	8,2
$\alpha$ -terpineol	0,8	$\alpha$ -terpineol	6,0
Trans-cariofileno	72,7	Trans-cariofileno	27,7
$\alpha$ -Humuleno	8,5	$\alpha$ -Humuleno	9,5
$\Delta$ -Cadineno	2,9	$\delta$ -Cadineno	2,1
Álcool cariofileno	2,0	Álcool cariofileno	2,5
Epi- $\alpha$ -cadinol	0,8	Epi- $\alpha$ -cadinol	2,8
$\alpha$ -Cadineno*	0,7	$\alpha$ -cadinol*	2,0
$\gamma$ -muruleno*	0,8	1,8 cineol*	1,5

## 2.6 RADICAIS LIVRES

Os efeitos dos radicais livres sobre os sistemas biológicos têm estado em evidência nos últimos anos, especialmente nas doenças relacionadas com o aumento destas espécies reativas no organismo e ao envelhecimento precoce (47).

As espécies reativas de oxigênio (EROs), como radicais livres, têm despertado interesse e vêm sendo relacionadas com diferentes processos patológicos. Por este fato, a substância que demonstre ter a capacidade de seqüestrar estes radicais livres torna-se um alvo de pesquisa importante (48).

Radicais livres podem ser definidos como sendo átomos ou moléculas altamente reativos que possuem elétron desemparelhado em sua última camada (48).

São estruturas eletricamente instáveis que para tornarem-se estáveis, desestabilizam átomos e moléculas de nossas membranas celulares, em especial os lipídeos (49).

Possuem poder altamente destrutivo, mas, da mesma forma que o gás carbônico, é essencial para desencadear o estímulo respiratório, sendo essenciais para que haja vida e para que o nosso sistema de defesa orgânica seja eficaz (50).

As duas principais moléculas que geram radicais livres são: oxigênio, O<sub>2</sub>, e óxido nítrico (NO). As espécies reativas de oxigênio podem ser chamadas de EROs e estão listadas na Tabela 03 (43, 51).

As espécies reativas de oxigênio cedem o elétron não emparelhado, oxidando-se, ou recebem outro, reduzindo-se, ou seja, são o resultado de reações de óxido-redução (48).

As espécies reativas de oxigênio possuem um papel importante em certas doenças degenerativas, conduzindo, por exemplo, a aterosclerose. A enzima lipoxigenase estimula a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), facilitando o desenvolvimento desta doença (49).



A principal causa da aterosclerose é, portanto, a oxidação da LDL, tóxica para células endoteliais, quimiotática para os monócitos e induzem a diferenciação e a adesão de monócitos nas células endoteliais (52, 37).

A oxidação da LDL, lipoperoxidação, é conhecida por ser a reação de formação de radicais livres em células e tecidos. Um dos ácidos graxos mais abundantes nas membranas celulares é o ácido linoléico e é alvo da oxidação desencadeada por radicais livres. Lipoperoxidação é a típica reação em cadeia de radicais livres (49).

A degradação oxidativa de ácidos graxos ocorre em passos seguidos de iniciação e propagação. Para atuar sobre estes compostos as substâncias devem agir impedindo a formação de radicais livres bem como seqüestrando estes compostos (49).

Diversos modelos são propostos para uma avaliação prévia de substâncias e extratos vegetais com possível atividade antioxidante e seqüestradora de radicais, dentre eles a autografia de extratos e substâncias utilizando o  $\beta$ -caroteno ou DPPH (33, 53, 54).

No meio biológico, em geral, as moléculas não se encontram na forma de radicais livres, permanecendo com elétrons pareados, entretanto em determinadas situações, os radicais livres são formados e podem causar efeitos fisiológicos e patológicos (50).

Em um processo patológico como a reação inflamatória pode-se comparar o local da inflamação com um campo de batalha, no qual os radicais livres causam lesão celular, calor, rubor e edema local, mas em contrapartida, acabam com o agente invasor (50).

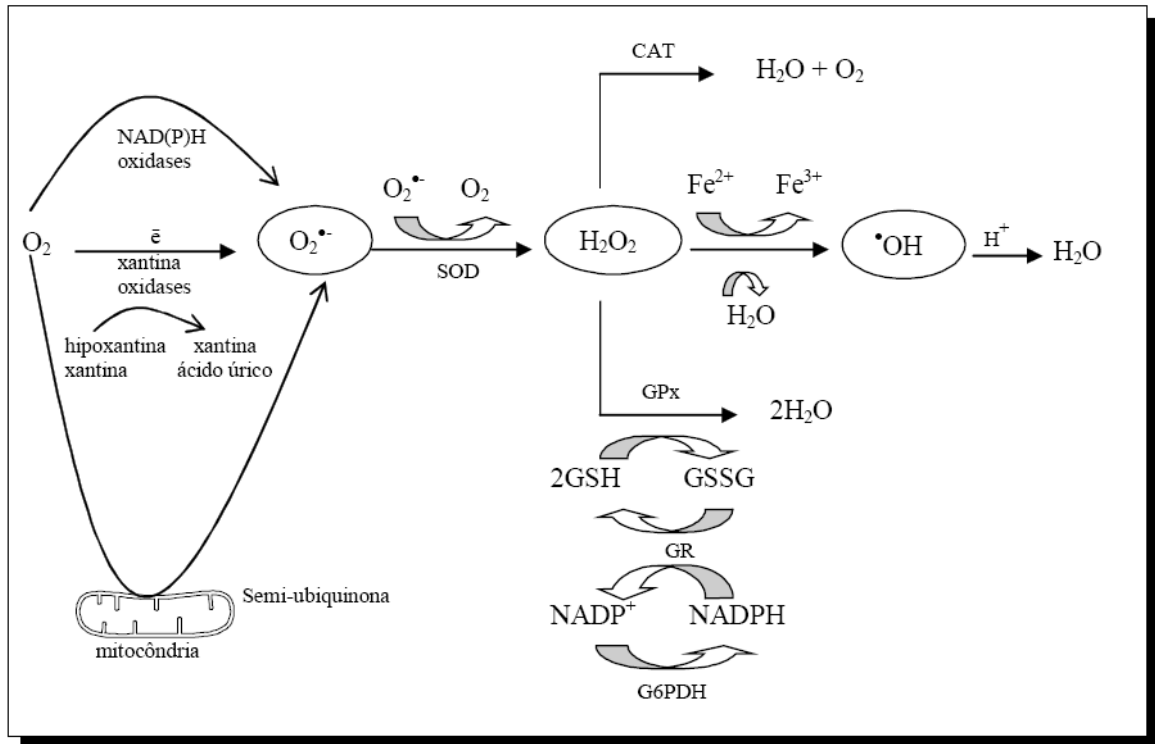
**Tabela 03** - Principais espécies reativas de oxigênio nas formas de radicais e não radicais (50).

<b>Espécies reativas de oxigênio (EROs)</b>	
<b>Radicais</b>	<b>Não radicais</b>
Superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ )	Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ )
Hidroxila ( $\cdot OH$ )	Ácido hipocloroso (HOCl)
Peroxila ( $RO_2^{\bullet}$ )	Ácido hipobromoso (HOBr)
Alcoxila ( $RO\cdot$ )	Ozônio ( $O_3$ )

Segundo Ferreira & Matsubara, 1997, as células possuem um sistema de defesa importante que é a ação enzimática. As enzimas são produzidas endogenamente e são conhecidas como detoxificadoras do agente radicalar antes que ele cause dano às células (48).

As enzimas atuam em primeira linha assim como os quelantes e as proteínas além de substâncias não enzimáticas, como é o caso do ascorbato, bilirrubina e carotenóides (51).

As enzimas trabalham como seqüestradoras de radicais livres protegendo as membranas celulares da lipoperoxidação. As principais enzimas são a glutathiona peroxidase (GSH-Px), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) e sua atuação está apresentada na Figura 10 (51).



**Figura 10.** Vias de geração de EROs e mecanismo de defesa enzimática (51).

O excesso de radicais livres pode ser gerado pelo estresse, excesso de exposição aos raios ultravioleta, fumo, alimentação rica em gordura, excesso de ingestão de ferro, excesso de carne, álcool e o consumo regular de pesticidas nos alimentos colaboram para o aumento de radicais livres no nosso corpo (55).

A exposição a radicais livres direta sobre a pele pode eventualmente levar ao desenvolvimento do câncer. A utilização tópica ou oral de produtos de antioxidantes pode conter o excesso de radicais livres e o estresse oxidativo (27).

O excesso também pode causar um verdadeiro bombardeio na membrana de nossas células. Tanto o envelhecimento celular como as doenças degenerativas, entre elas Alzheimer, artrite e câncer são prováveis produtos das agressões desses agentes em nossos tecidos (56).

Os radicais livres não neutralizados pelas substâncias antioxidantes causam danos ao organismo. Várias condições causam aumento dos radicais livres, entre elas o cigarro, o qual promove a formação de 100 mil novos radicais livres por tragada (57).

Os radicais livres são formados na mitocôndria, que pode ser considerada o motor das células. Esse elétron não pareado é extremamente instável e, na busca

de estabilidade, seqüestra um elétron de outro átomo. Cada vez que uma proteína ou um lipídeo perde um elétron, sofrem modificações irreversíveis na forma e na função e, por haver perdido um elétron, tornam-se um novo radical livre, criando uma verdadeira reação em cadeia (48).

É na mitocôndria que a célula produz energia a partir da glicose e do  $O_2$ . É neste processo que os radicais livres são formados e imediatamente neutralizados pelas enzimas existentes dentro da mitocôndria (57).

As enzimas têm vários minerais na sua composição como o ferro, manganês e selênio. No caso de deficiência na síntese dessas enzimas por falta dos minerais necessários, ou no excesso de  $O_2$  a ser metabolizado, teremos um aumento dos radicais livres que podem escapar da mitocôndria atingindo a célula e a corrente sangüínea, sendo então combatidos pelas vitaminas antioxidantes (vitamina C, E, A,  $\beta$ -caroteno e riboflavina) (57).

A literatura tem mostrado também que o *stress* profissional, escolar ou familiar, alimentação inadequada, poluição ambiental e radiações solares podem também levar a esta formação. A ingestão adequada dos minerais e das vitaminas que atuam no sistema antioxidante do organismo contribui para que os radicais livres permaneçam dentro dos limites fisiológicos não causando danos celulares (58).

A natureza do processo de envelhecimento tem sido alvo de vários estudos. Existem teorias para explicar o envelhecimento, mas a mais aceita até o presente momento é a Teoria dos Radicais Livres. (48).

## 2.7 COMPOSTOS ANTIOXIDANTES E SEQUÊSTRADORES DE RADICAIS LIVRES

Existem substâncias que neutralizam os radicais livres ou seus efeitos, que são conhecidas como antioxidantes. Há evidências de que substâncias endógenas e exógenas atuam como antioxidantes e podem estar removendo ou prevenindo a formação dos radicais livres. O processo de oxidação é extremamente natural e de ocorrência comum, como exemplos da oxidação da borracha, óleos e gorduras (59).

Alimentos antioxidantes são aqueles ricos em substâncias que podem “varrer” os radicais livres ou então fortalecer a membrana celular, como exemplos de alimentos com esta capacidade estão às frutas, hortaliças, fontes de  $\beta$ -caroteno, vitamina E, vitamina C e selênio que auxiliam a neutralizar os excessos de radicais livres (58).

O processo de oxidação é considerado um processo essencial em alguns ciclos biológicos como no mecanismo de defesa orgânica, sendo que, em concentração excessiva, causam efeitos danosos e dentre os efeitos benéficos podem ser citados a fagocitose (59).

Hortaliças como brócolis, couve-flor, espinafre e repolho, além de ricas em vitaminas, minerais e fibras, contêm substâncias antioxidantes. Outras fontes podem ser relatadas como (40):

- tomates-cereja, que contém licopeno (pigmento de ação antioxidante mais potente que o  $\beta$ -caroteno);
- To-Fu, queijo de soja que é uma fonte de fitormônios;
- chá verde, rico em polifenóis;
- uva e vinho como fontes de vitamina C e de resveratrol respectivamente;
- sementes de girassol que são consideradas fontes de vitamina E e bioflavonóides;
- sementes de linhaça ricas em de ômega 3, ômega 6,
- vitamina E

- o fibras (60).

Antioxidantes protegem sistemas biológicos contra efeitos danosos de reações que promovem oxidação de moléculas. Como defesa destes compostos danosos tem-se os compostos que atua de forma primária, como é o caso de proteínas, quelantes e enzimas antioxidantes, além de substâncias não enzimáticas (bilirrubina, carotenóides) (60).

Dentre as enzimas antioxidantes estão a SOD – superóxido dismutase, CAT – catalase, GSH-PX – glutathiona peroxidase. Estas, respectivamente, são responsáveis pela dismutação do radical superóxido e redução do peróxido de hidrogênio (Figura 10) (61).

As defesas naturais que podem ocorrer envolvem prevenção na defesa da formação do radical, remoção do radical antes de sua atuação, reparo do dano causado pelo radical, eliminação das moléculas danificadas, prevenção na mutação que pode ocorrer devido à presença das moléculas danificadas (reação enzimática) (61).

A vitamina E pode ser encontrada no óleo de germe de trigo, *Triticum vulgare*, Graminae, com 10% de lipídeos e 85% de glicerídeos e ácidos graxos insaturados. A vitamina E pode aliviar situações de *stress*, particularmente as geradas pelo oxigênio. Este tipo de vitamina atua através do bloqueio das moléculas instáveis de oxigênio singlete (62).

Vitamina E,  $\alpha$ -tocoferol, possui alto poder inibitório sobre radicais livres, inibindo lipoperoxidação, previne a oxidação espontânea dos elementos polinsaturados e protege, em termos funcionais, estruturas celulares importantes dos tecidos, supostamente através da inibição da peroxidação lipídica (49, 62).

A vitamina C (ácido ascórbico ou vitamina antiescorbútica), tem como principais fontes na natureza os cítricos, groselhas pretas, pimentão doce, salsa, couve-flor, batatas, batatas doces, brócolis, couve, morango, goiaba, manga. Dependendo da estação, um copo de tamanho médio de sumo de laranja fresco (i.e. 100g) rende cerca de 15 a 35 mg de vitamina C (60).

A vitamina C possui como função a produção de colágeno a qual atua como “cimento” intercelular que fornece à estrutura aos músculos, tecidos vasculares, ossos e cartilagens. Auxilia no metabolismo do ácido fólico, na função imunitária e

redox/antioxidante. Além de participarem das reações metabólicas de certos aminoácidos, em particular na prevenção da formação de nitrosaminas potencialmente carcinogênicas no estômago (63, 60).

Quanto à utilização de vitamina C na terapêutica os médicos recomendam que as mulheres grávidas aumentem a ingestão em cerca de 30% e durante a lactação é aconselhado um aumento de 60 a 70% de forma a garantir as necessidades da mãe, dado que um litro de leite materno contém cerca de 50 mg de vitamina C (63, 60).

A vitamina C é segura, pois não existem evidências de efeitos colaterais, mas a suplementação prolongada com doses elevadas pode ter efeito laxativo (63, 60).

Outras vitaminas, tais como as do complexo B (particularmente a B6, B12, ácido fólico e ácido pantotéico) e algumas substâncias farmacológicas ativas, bem como os compostos que ocorrem na natureza, conhecidos como bioflavonóides, podem ter um efeito acumulador da vitamina C (64).

O  $\beta$ -caroteno pode ser encontrado em vegetais amarelos e alaranjados como cenouras, batatas-doces, abóboras; frutas amarelas e alaranjadas como mangas, carambolas, nectarinas, pêssegos; vegetais de folhas verde-escuras como espinafres, brócolis, couve, chicória, agriões e as partes verdes de nabos, mostarda, dente de leão (63).

**Tabela 04** - Flavonóides em diferentes estados de oxidação e suas atividades antioxidantes e/ou seqüestradoras de radicais livres (65, 6, 66).

Flavonóide		Atividade
Luteonina	5,7,3',4'-tetraidroxiflavona	Ativo contra radical DPPH
Quercetina	5,7,3',4'-tetraidroxiflavonol	Ativo contra radical DPPH Protetor da oxidação lipídica celular
Miricetina	5,7,3',4',5'-pentaidróxiflavonol	Potente antioxidante em óleo de canola
Genisteína	4',5,7-triidróxiflavona	Atividade antioxidante reduzida
-	3-hidróxi-flavona	Não possui atividade antioxidante-
-	6-hidróxi-flavona	Não possui atividade antioxidante
-	3'-hidróxi-flavona	Não possui atividade antioxidante
Canferol	5,7,4'-triidróxiflavonol	Ativo contra radical DPPH e frente a lipoperoxidação lipídica
Baicaleína	-	Ativo contra lipoperoxidação lipídica

FONTE: Cao et al., 1997; Souza, 2002 ; Ignatov et al., 2002

Em ordem crescente de atividade antioxidante pode ser citado, segundo Ignatov et al. (2002) miricetina > rutina > quercetina > canferol > luteonina > apigenina > hesperetina > naringenina > hesperidina > biochanina A > daidzeína > genisteína (66). Estes dados são analisados segundo IC<sub>50</sub> do ácido ascórbico para IC<sub>50</sub> do antioxidante de interesse. Com relação a esta atividade sabe-se já que estruturas 3,4-diidroxi em conexão com anel aromático demonstra maior importância (66).



### 3 OBJETIVO

#### 3.1 OBJETIVOS GERAIS

- Realizar estudo comparativo de espécies vegetais utilizadas na medicina tradicional de Mato Grosso do Sul – *Achyrocline alata* (Kunth) DC. e *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar estudo químico das espécies vegetais *Achyrocline alata* (Kunth) DC. e *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.
- Analisar o potencial antioxidante das espécies *Achyrocline alata* (Kunth) DC. e *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.
- Realizar análise da capacidade seqüestradora de radicais livres de *Achyrocline alata* (Kunth) DC. e *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. De forma qualitativa bem como quantitativa.
- Analisar de forma comparativa os extratos e frações de *Achyrocline alata* (Kunth) DC. e *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. por HPLC com detector de ultravioleta assim como as substâncias isoladas de *A. alata*.
- Analisar por HPLC-DAD-MS extratos hidroetanólicos de *Achyrocline alata* (Kunth) DC. e *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. comparativamente de acordo com duas coletas realizadas em diferentes datas (1992 e 2002).

- Analisar por HPLC-DAD-MS extratos hidroetanólicos de *Achyrocline alata* (Kunth) DC. e *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. utilizando substâncias isoladas de *Achyrocline alata* (Kunth) DC. bem como outros padrões para identificação e quantificação.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 MATERIAIS

#### 4.1.1 Materiais utilizados para as técnicas: cromatografia em coluna, camada delgada e preparativa

- Para o fracionamento em coluna aberta foi utilizada, como fase estacionária, sílica gel 70-230 mesh, 60A°, Merck. Utilizou-se também sílica para coluna do tipo “flash”, como fase estacionária, sílica gel 35-70 mesh, Fluka, além do Sephadex LH-20, também utilizado em coluna aberta.
- Para cromatografia em camada delgada (CCDS), foram utilizadas placas ativadas (105°C por 30 min) de sílica gel 60 G, e sílica gel GF<sub>254</sub>.
- Em cromatografia em camada preparativa (CCPS) foram utilizadas placas de sílica gel 60 G, ativadas, pura ou mistura de sílica gel 60 G:GF<sub>254</sub>, 9:1. As recuperações das amostras foram feitas com MeOH e H<sub>2</sub>O.
- Também se utilizou CCPS impregnada com AgNO<sub>3</sub> (CCPS-AgNO<sub>3</sub>) na qual foram utilizada sílica gel 60 G : GF<sub>254</sub> : AgNO<sub>3</sub> 80:10:10. As placas foram preparadas em câmara escura, não foram ativadas e após 48 h foram utilizadas em ambiente com ausência de luz. Nestas placas a recuperação da amostra foi feita em CHCl<sub>3</sub>.
- As revelações cromatográficas foram feitas por irradiação de luz ultravioleta (Monitor UV, modelo UVGL – 25, UVP inc. com lâmpadas BlackRay de 254 e 365 nm) e com os seguintes reveladores:
  - i. sulfato cérico (Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>),
  - ii. vapores de iodo ,
  - iii. vanilina (1% em EtOH):ácido sulfúrico (5% em EtOH)

iv. NP/PEG (*Natural Products*/Polietilenoglicol).

- Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz), DEPT 135° e HMBC foram registrados no espectrômetro Bruker DPX-300, na UFMS/DQI.
- Para a obtenção dos espectros foram utilizados solventes deuterados como DMSO- $d_6$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\text{CDCl}_3$  (usando TMS como padrão interno) e  $\text{D}_2\text{O}$  (com Dioxano ou  $\text{CD}_3\text{OD}$  como padrão interno).
- A determinação da rotação específica,  $[\alpha]_D$ , foi feita em polarímetro Perkin-Elmer 341 EM.
- As absorvâncias foram analisadas em UV/Visível, no espectrofotômetro U-3000, da marca Hitachi.

#### 4.1.2 Materiais utilizados para as Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

- Espectro de massas de baixa resolução, obtido em um equipamento QTOF Micromass, por ionização por eletrospray. Condições de ESI(+).
- Análise em espectro de massas, LC-DAD-ESI-EM, foi obtida na Universidade de São Paulo (USP), na cidade de Ribeirão Preto, SP pelo Professor Dr. Carlos Alexandre Carollo.
- Análise em HPLC-DAD-MS foi realizada no aparelho Shimadzu LC-20A CLAE com detector diodo, CBM20A; Shimadzu, acoplado ao espectrômetro de massas, UltrOTOFG (Bruker Daltonics) ESI-qTOF.
- Para o método analítico em CLAE foi utilizada coluna Onyx™ 150 x 4,6 mm - C-18 – Phenomenex.
- Para análises em CLAE-DAD-EM foram utilizados solventes com alto grau de pureza Merck.

### 4.1.3 Materiais utilizados para ensaio antioxidante com $\beta$ -caroteno e ensaio qualitativo e quantitativo com DPPH

- Para o ensaio antioxidante em CCD foi utilizado o eluente:  $\text{CHCl}_3$ :AcOEt (6:4) 10mg da amostra foram diluídas em 1mL de MeOH 10 $\mu$ L aplicados na placa cromatográfica. Após a eluição a placa é borrifada com solução de  $\beta$ -caroteno (0,05%).
- Para o ensaio seqüestrador de radicais livres qualitativo em CCD foi utilizado o eluente:  $\text{CHCl}_3$ :AcOEt (6:4) 10mg da amostra foram diluídas em 1mL de MeOH 10 $\mu$ L aplicados na placa cromatográfica. Após a eluição a placa é borrifada com solução de DPPH a 0,2%.
- Na avaliação quantitativa para o ensaio seqüestrador de radicais livres utilizou-se solução metanólica recentemente preparada do radical DPPH, ALDRICH a 0,02% utilizando o espectrofotômetro (517nm) (FANEN) para leitura.

### 4.1.4 Padrões

- $\beta$ -caroteno - Sigma Chemical Co.
- DPPH - ALDRICH.
- Quercetina – Merck.
- Solventes para análise em CLAE – Merck.

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Cultivo das plantas medicinais

As duas espécies em estudo, *Achyrocline alata* (Kunth.) DC. e *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC, foram cultivadas no período de Setembro de 1996 a Abril de 2003 no Horto de Plantas Medicinais HPM, sob coordenação e responsabilidade da Prof. Dra. Maria do Carmo Vieira, NCA-UFGD-Dourados e, em seguida, foram submetidas às análises fitoquímica e ensaios na perspectiva de se isolar e testar as substâncias bioativas.

A cidade tem altitude media de 452 m e o clima classificado, pelo sistema Köppen como Cwa – Clima subtropical úmido (Estado do Mato Grosso do Sul em 1990). A média anual de chuva é de 1500 mm e temperatura anual de 22°C. A umidade relativa do ar é em média 73,18% (Estação Agroclimatológica - UFMS). O solo é originalmente vegetação de cerrado, classificando como típico Haplortox (Embrapa, 1999), com topografia plana. Análise química das amostras obtidas do solo exibiu: pH:H<sub>2</sub>O (1:2.5) = 5.3 e 6.0; P (mg/dm<sup>3</sup>) = 14.0; K (μmol/dm<sup>3</sup>) = 3.3; Al<sup>3+</sup> (μM/dm<sup>3</sup>) = 0.0; Ca<sup>2+</sup> (μM/dm<sup>3</sup>) = 30.0; Mg (μM/dm<sup>3</sup>) = 14.9; H + Al (μM/dm<sup>3</sup>) = 78.6; Sb (μM/dm<sup>3</sup>) = 42.9; CTC (μM/dm<sup>3</sup>) = 121.5; V (%) = 33.0 e Mo (g /kg) = 29,6.

### 4.2.2 Estudo fitoquímico de *Achyrocline alata*

Este estudo foi realizado no intuito de se isolar os constituintes bioativos (princípios ativos)<sup>3</sup>, bem como os marcadores químicos<sup>4</sup> dessa espécie com a finalidade de estabelecer parâmetros de comparação com *Achyrocline satureioides*, que já possui mais informações quanto substâncias bioativas na literatura.

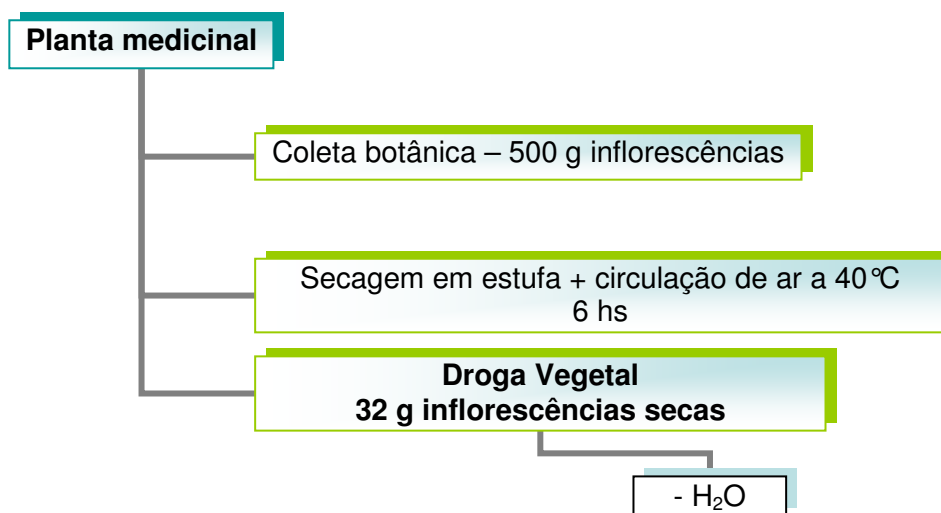
---

<sup>3</sup> Princípio ativo de medicamento fitoterápico - substância, ou classes químicas, quimicamente caracterizada, cuja ação farmacológica é conhecida e responsável, total ou parcialmente, pelos efeitos terapêuticos do medicamento fitoterápico (3).

<sup>4</sup> Marcador - componente ou classe de compostos químicos presente na matéria-prima vegetal, idealmente o próprio princípio ativo, e preferencialmente que tenha correlação com o efeito terapêutico, que é utilizado como referência no controle de qualidade da matéria-prima vegetal e dos medicamentos fitoterápicos (3).

Esta etapa se caracterizou pela obtenção de diferentes extratos do farmacógeno, as inflorescências.

A planta após a coleta passou por preparos visando à transformação da mesma em droga vegetal (Figura 11) e desta forma, não comprometendo a qualidade desta para o estudo (43).



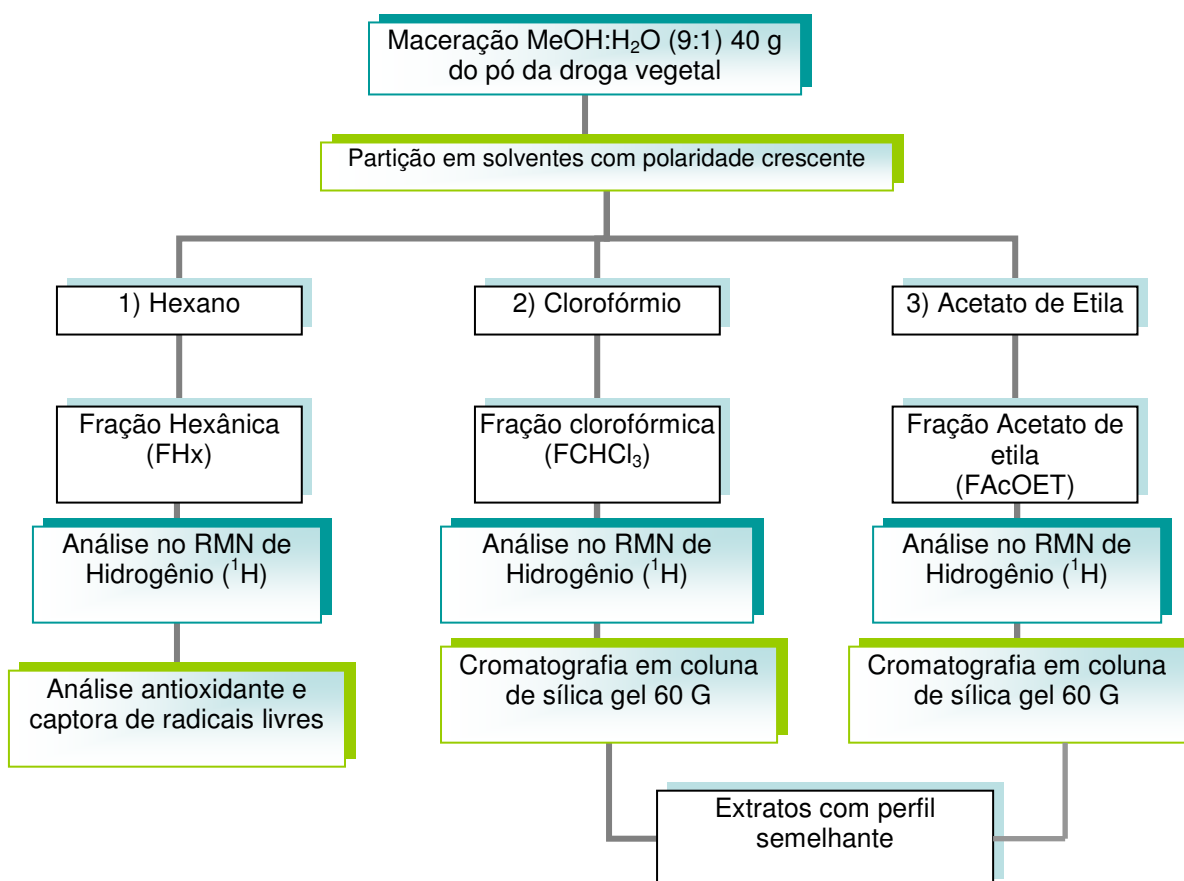
**Figura 11.** Transformação da planta medicinal em droga vegetal

#### 4.2.3 Fracionamento do extrato hidrometanólico

O preparo do extrato foi por maceração a temperatura ambiente com metanol: água, na proporção (9:1), de forma exaustiva, com troca do solvente na saturação do mesmo, sendo mantido em banho Maria a 40°C durante 15 dias. Os extratos de *A. alata* e *A. saturoioides* foram filtrados e concentrados no evaporador rotativo.

Esse extrato foi então submetido à partição obtendo-se, dessa forma as frações Hexânica (FHx), Clorofórmica (FCHCl<sub>3</sub>), Acetato de Etila (FACOEt) e Torta (Extrato MeOH:H<sub>2</sub>O).

As frações clorofórmica e acetato de etila foram reunidas, pois apresentavam o mesmo perfil cromatográfico (Figura 12).



**Figura 12.** Esquema demonstrativo do fracionamento do extrato hidrometanólico de *A. alata*.



#### 4.2.4 Obtenção de preparações fitoterápicas

Dentre as preparações fitoterápicas que foram obtidas se encontram as tinturas 20% (p/v) (percolação) e o decocto 5% (p/v), sendo todas preparadas de acordo com as Farmacopéias Brasileira 2<sup>a</sup>. e 3<sup>a</sup> Edições. Em seguida estas preparações fitoterápicas foram submetidas a um processo de comparação utilizando cromatografia em camada delgada:

##### 4.2.4.1 Tintura

A tintura foi obtida pelo processo de percolação, conforme descrito na Farmacopéia. Para uma preparação a 20% p/v, foram umedecidos 20 g da planta pulverizada com etanol:H<sub>2</sub>O 7:3, sendo depois mantida ao abrigo da luz por um período de 6 h. Posteriormente, por um processo de gotejamento lento, de 1mL/min obteve-se o percolado e o volume foi completado até 50 mL (67).

##### 4.2.4.2 Macerado

A tintura foi obtida pelo processo de maceração, conforme descrito na Farmacopéia. Para uma preparação a 20% p/v, foram umedecidos 20 g da planta pulverizada com 100 mL da mistura de etanol:H<sub>2</sub>O, na proporção 7:3, sendo depois mantida ao abrigo da luz por um período de 7 dias. Posteriormente, foi filtrado e obteve-se o macerado sendo o volume completado até 100 mL (67).

##### 4.2.4.3 Extrato Aquoso (decocto)

Para obtenção do extrato aquoso foram adicionados 100 mL de água em 5 g da droga vegetal e levados a fervura. Em seguida filtrado e o decocto resultante foi liofilizado (20).

#### 4.2.4.4 Extrato diclorometânico

O extrato diclorometânico foi preparado com 5 g da droga vegetal em recipiente fechado contendo 50 mL do solvente, sendo deixado em temperatura ambiente e em seguida foi filtrado e concentrado no rotavapor (20).

#### 4.2.4.5 Extrato metanólico

A torta resultante do extrato diclorometânico foi extraída com 50 mL de metanol por 24hs e em seguida foi filtrado e concentrado no rotavapor (20).

### 4.2.5 Análise comparativa quantitativa

Após padronização das condições cromatográficas das substâncias isoladas de *A. alata*, foram realizadas as análises dos extratos de *A. alata* e *A. satureioides* em CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).

#### 4.2.5.1 Extratos obtidos de *A. alata* e *A. satureioides*.

A partir das inflorescências secas das espécies (100 g) os extratos hidrometanólicos foram obtidos utilizando MeOH:H<sub>2</sub>O (7:3) sob 40° C (19.2 g e 20.7 g, respectivamente). Ambos os extratos foram concentrados sob pressão reduzida.

#### 4.2.5.2 Condições e instrumentação para Cromatografia líquida de Alta eficiência (HPLC)

Extratos para análise CLAE-DAD-ESI-EM foram obtidos pelos seguintes procedimentos: inflorescências secas e trituradas de *A. alata* e *A. saturoioides* (100 mg) foram extraídas com 3 mL de MeOH:H<sub>2</sub>O (7:3). Foram adicionados 3 mL de clorofórmio para remover compostos apolares do extrato hidrometanólico. A mistura foi submetida por 20 min ao ultra-som seguido de centrifugação e concentração; 20 µL de extrato hidrometanólico foram usados.

A análise CLAE-DAD-EM foi realizada no aparelho Shimadzu LC-20A HPLC com detector de iodo (CBM20A; Shimadzu) acoplado a UltrOTOFG (Bruker Daltonics) ESI-qTOF espectrômetro de massas. Para análise analítica no HPLC uma coluna monolítica (Onyx™ 150 x 4,6 mm - C-18 - Phenomenex) e pré coluna do mesmo material.

A fase móvel consiste de um gradiente linear eluído em 3 mL/min com as seguintes misturas: água:ácido acético 1% (v/v) (fase A) e acetonitrila:ácido acético 1% (fase B).

Os primeiros 8 minutos de eluição com a fase B com gradiente e 5-12%, seguido de 13-22% (8-25 min), 22-35% (25-29 min), 35% (29-30 min), 35-100% (30-34 min).

Os padrões usados foram obtidos a partir de: ácido clorogênico (**1** - 4.28 min), adquirido da Acros; isoquercetina (**2** - 11.98 min.) e quercetina (**8** - 23.45 min.) adquirido da Merck. 4,2',4'-triidroxí-6'-metoxichalcona (**10** - 30.77 min.), gnafilina (**11** - 32.32 min.), 3-OMe-quercetina (**9** - 26.23 min.) foram isolados de *A.alata*.

Ácido 3,5 dicafeoil quínico (**4** - 15.35 min.) e ácido 4,5 dicafeoil quínico (**6** - 17.78 min.) foram doados pelo Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes USP - Ribeirão Preto, SP. O tempo de retenção e espectros de UV dos padrões estão listados no item 5, Resultados e Discussões.

## 4.2.6 Ensaios químico de avaliação da atividade antioxidante

### 4.2.6.1 Atividade antioxidante - Ensaio de Autografia em CCD com $\beta$ -caroteno

Para o ensaio da atividade antioxidante foi desenvolvida a metodologia semelhante à proposta na literatura (33, 53, 54). Os cromatogramas foram obtidos em Placas 20x20 de Sílica-gel (MERCK) em camada delgada (CCD), os quais foram eluídos em solventes apropriados aos extratos.

Em seguida borrifou-se uma solução de  $\beta$ -caroteno (0,05%) (Sigma Chemical Co.) em clorofórmio (Merck) sobre a mesma. Em seguida as placas foram submetidas à radiação 254 nm (utilizando um aparato de lâmpadas germicidas de 8 e 16 W desenvolvido para o presente trabalho) até observação da descoloração do fundo da CCD.

### 4.2.6.2 Atividade seqüestradora de radicais livres - Ensaio de Autografia em CCD com DPPH

Para a atividade seqüestradora de radicais livres utilizando como modelo o radical DPPH (1,1-Difenil-2-picril-hidrazila) (Aldrich) foi realizada a cromatografia em camada delgada (CCD), da mesma forma como descrito anteriormente (item a), utilizando a solução de DPPH em MeOH a 0,2% como revelador (53, 54).

A placa de CCD, depois de revelada, foi submetida a exposição a uma radiação de 254 nm (utilizando um aparato de lâmpadas germicidas de 8 e 16 W) até observação de manchas, dos extratos, na coloração amarela sobre um fundo de coloração púrpura (DPPH).

#### 4.2.6.3 Atividade seqüestradora de radicais livres - Ensaio em espectrofotômetro com DPPH

Neste ensaio utilizou-se a concentração de 0,02% de DPPH em MeOH, sendo este ensaio quantitativo. A solução de DPPH foi adicionada a solução teste e a leitura realizada após 30 min em espectrofotômetro (FANEN) com o comprimento de onda igual a 517 nm (55). Os extratos foram testados em seis concentrações diferentes como sendo 0,34; 0,86; 1,30; 1,70; 3,40; 34,00 em µg/mL e em triplicata.

Os resultados foram comparados a um padrão positivo, a quercetina, um flavonóide muito descrito por sua atividade seqüestradora de radicais livres (55). Essa atividade foi determinada através da capacidade de descoloração que cada extrato apresentou sobre a solução de DPPH em comparação com a capacidade de descoloração da quercetina. Tal capacidade de descoloração foi determinada com o seguinte cálculo:

$$\text{Capacidade de descoloração (\%)} = \left( 1 - \frac{\text{Abs. A} - \text{Abs. BA}}{\text{Abs. B}} \right) \times 100$$

No qual *Abs.A* é a absorbância do extrato testado com a solução de DPPH (0,02% em MeOH), *Abs.BA* é a absorbância do extrato em metanol e *Abs.B* é a absorbância do branco (0,02% de DPPH em MeOH).

#### 4.2.7 Análise estatística

Para análise estatística foi aplicada a análise de variância e desvio padrão, corrigidos pela Professora Donizette Ritter, matemática, UNEMAT/ Campus de Colider/ MT. Todos os testes realizados em triplicata para cada amostra em análise.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 FITOQUÍMICA

O estudo fitoquímico realizado com a espécie *Achyrocline alata* revelou será abaixo relatado e discutido com a finalidade de demonstrar que a semelhança química entre *Achyrocline alata* e *Achyrocline satureioides*.

Na literatura foi relatada uma comparação entre *Achyrocline alata* e *Achyrocline satureioides* por Leal et al., 2006, quanto ao óleo essencial, no qual identificaram substâncias semelhantes e outras presentes somente em *A.alata* (68).

Em coleta das duas espécies em Dourados/MS no Campus da UFGD, pela professora Maria do Carmo Viera foi possível notar uma significativa diferença macroscópica, por exemplo: (a) *Achyrocline satureioides* com inflorescências mais claras; (b) *Achyrocline alata* apresentava-se com infestação de insetos; (c) forte odor aromático exalado presente em *Achyrocline alata*.

O odor identificado de *Achyrocline alata* permaneceu persistente após processo de secagem da planta, procedimento comum para transformação em drogas vegetais.

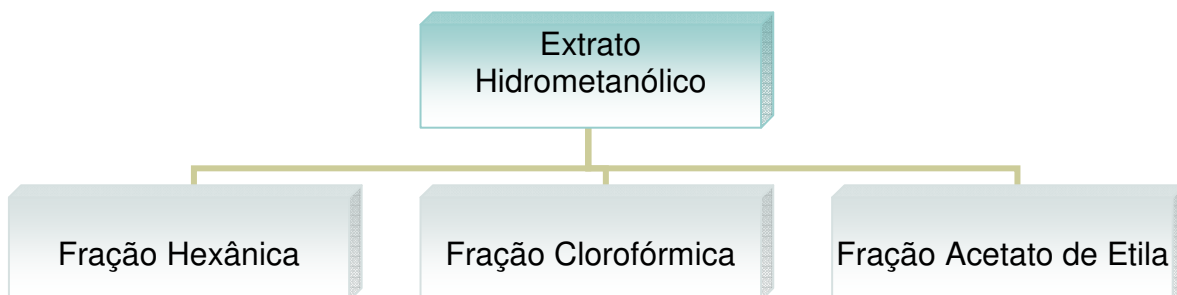
O mesmo odor pode ser detectado após o fracionamento do extrato de *Achyrocline alata*, principalmente na fração contendo a 4,2',4'-triidroxi-6',metoxichalcona. Puyvelde et al., 1989, relataram sobre de 4,2',4'-triidroxi-6',metoxichalcona, a helicrisitina (10).

Esta substância 4,2',4'-triidroxi-6',metoxichalcona foi isolada pela primeira vez de uma planta da família Asteraceae, *Helichrysum odoratissimum*, que por este fato foi nomeada helicrisitina. Este flavonóide da classe das chalconas está sendo relatado pela primeira vez no gênero *Achyrocline* e na espécie *A. alata*.

Para realizar o estudo fitoquímico foi preparado o extrato hidrometanólico (9:1) em processo de maceração por 7 dias. Realizou-se então uma partição, em

funil de separação, com o extrato hidrometanólico, e foram obtidas as frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila, conforme Figura 13.

Em seguida, por análise em CCD, identificou-se a semelhança entre frações clorofórmica e acetato de etila, sendo, portanto reunidas. Com isso, partiu-se para fracionamento das frações clorofórmio/ acetato de etila em conjunto, utilizando Sílica gel.



**Figura 13.** Partição realizada, em funil de separação, partindo do extrato hidrometanólico obtendo as Frações hexânica, Clorofórmica e Acetato de etila.

### 5.1.1 Fracionamento em Cromatografia em Coluna da fração clorofórmica/acetato de etila de *Achyrocline alata*

A separação realizada com a fração clorofórmio/acetato de etila foi feita em coluna de Sílica gel, na qual foram utilizados 1,15g da fração, com o gradiente de solvente conforme descrito na Tabela 05.

**Tabela 05** - Gradiente de solvente utilizado no fracionamento da fração clorofórmica/acetato de etila

Eluente	Proporção	Frações
CHCl <sub>3</sub>	-	1 a 53
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	9:1	54 a 75
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	8:2	76 a 131
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	6:4	132 a 142
MeOH:AcOEt	3:7	143 a 152
MeOH:AcOEt	1:1	153 a 163
MeOH	-	164 a 169

Finalizou-se, assim, um total de 169 frações, que foram avaliadas e reunidas quanto ao perfil cromatográfico em CCD. As frações mais puras foram separadas para análises espectroscópicas. O aspecto das frações pode ser avaliado na Tabela 06.



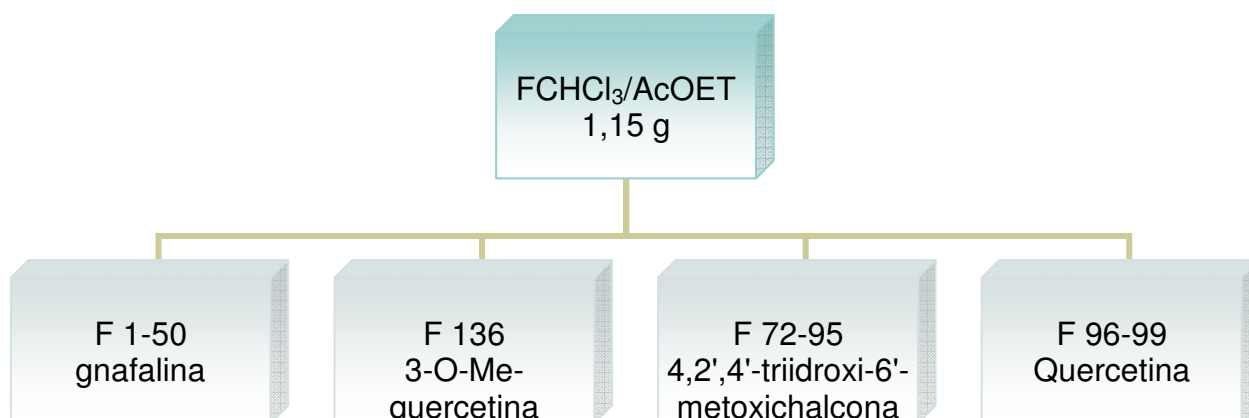
**Tabela 06** - Aspecto físico das frações obtidas do fracionamento da fração clorofórmio/acetato de etila de *Achyrocline alata* coluna de sílica gel.

<b>Frações Reunidas</b>	<b>Aspecto</b>
1-50	Fração de coloração amarela, com predominância de cristais bem definidos.
51-61	Fração de coloração amarela clara, amorfa
62-71	Fração de coloração amarela mais escura que a anterior e amorfa
72-95	Fração de coloração amarela, quase laranja, amorfa.
96-99	Fração de coloração amarelo-escura com presença de cristais em forma de ramos.
100-101	Fração de coloração amarelo-clara, em forma de cristais.
102-119	Fração de coloração amarela, amorfa.
120-135	Fração de coloração amarela, amorfa.
136-137	Fração cristalizada. Cristais bem definidos formando aglomerações, de coloração amarela.
138-139	Fração de coloração amarela, com cristais na parede do frasco, junto com substância amorfa.
140-169	Fração de coloração amarela, amorfa.

As amostras foram então purificadas para que pudessem ser obtidos os constituintes químicos puros de *A.alata*.

### 5.1.2 Isolamento, purificação e elucidação estrutural dos constituintes e marcadores químicos

A fração acetato de etila foi submetida a coluna de sílica-gel com um gradiente de  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ , sendo obtidas três substâncias flavonoídicas : 4,2',4'-triidroxi-6'-metoxichalcona, gnafilina, 3-O-Me-quercetina e quercetina (Figura 14). Estas substâncias puderam ser identificadas pelos dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  comparadas com os descritos na literatura (10, 69).



**Figura 14.** Substâncias isoladas a partir do fracionamento da fração clorofórmio/acetato de etila  $\text{FCHCl}_3/\text{AcOET}$  de *Achyrocline alata*.

Além desses flavonóides 4,2',4'-triidroxi-6'-metoxichalcona, gnafilina, 3-O-Me-quercetina, quercetina foram ainda identificados derivados, por CLAE, utilizando amostras autênticas, como podem ser observadas na Tabela 07.

**Tabela 07** - Substâncias identificadas por CLAE de *Achyrocline alata*.

<b>Picos</b>	<b>Compostos</b>	<b>Fórmula química (modo negativo)</b>
<b>1</b>	Ácido Clorogênico	$C_{16}H_{17}O_9^-$
<b>2</b>	Isoquercetrina	$C_{21}H_{19}O_{12}^-$
<b>3</b>	Ácido 3,4-dicafeoil quínico	$C_{25}H_{23}O_{12}^-$
<b>4</b>	Ácido 3,5-dicafeoil quínico	$C_{25}H_{23}O_{12}^-$
<b>5</b>	Derivado da quercetina não identificado	$C_{21}H_{19}O_{12}^-$
<b>6</b>	Ácido 4,5-dicafeoil quínico	$C_{25}H_{23}O_{12}^-$
<b>7</b>	Derivado do campferol não identificado	$C_{21}H_{19}O_{11}^-$
<b>8</b>	Quercetina	$C_{15}H_9O_7^-$

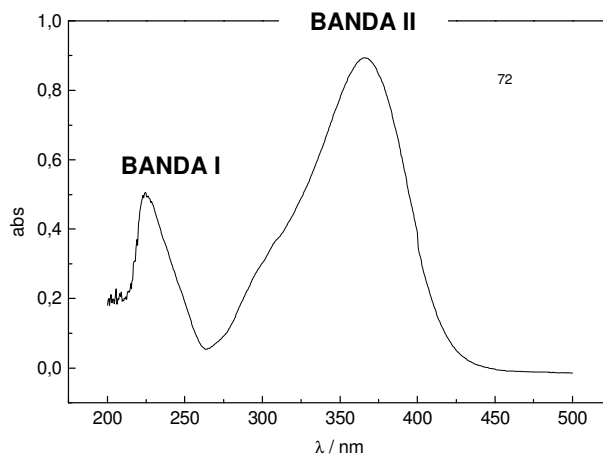
5.1.2.1 Identificação de 4,2',4'-triidroxi-6',metoxichalcona isolada da fração FCHCl<sub>3</sub>/AcOET de *Achyrocline alata*.

Dentre as substâncias isoladas de *A. alata* a substância 4,2',4'-triidroxi-6'-metoxichalcona (0.72% - rendimento de inflorescências secas) está sendo descrita pela primeira vez no gênero e que por não ser muito comum foram obtidos dados espectrais adicionais, espectrometria de RMN 1D e 2D-NMR e UV além de dados de ESI-EM.

A substância se apresentou como um pó fino amarelo purificada a partir da fração F 72-95. Em cromatografia em camada delgada em eluente para flavonóides (70 ) apresentou RF semelhante ao da quercetina (F 96-99), mas com uma coloração bem diferente.

Em análise utilizando espectrofotômetro de ultravioleta (DQI/CCET/LP4) foi possível constatar que a F 72-95 tratava-se de uma substância da classe dos flavonóides.

Ao adicionar os reagentes como  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{HCl}$  e  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$  pode ser observados deslocamento das bandas I e II (Figura 15), observadas no ultravioleta, típicas dessa classe de constituinte (71).



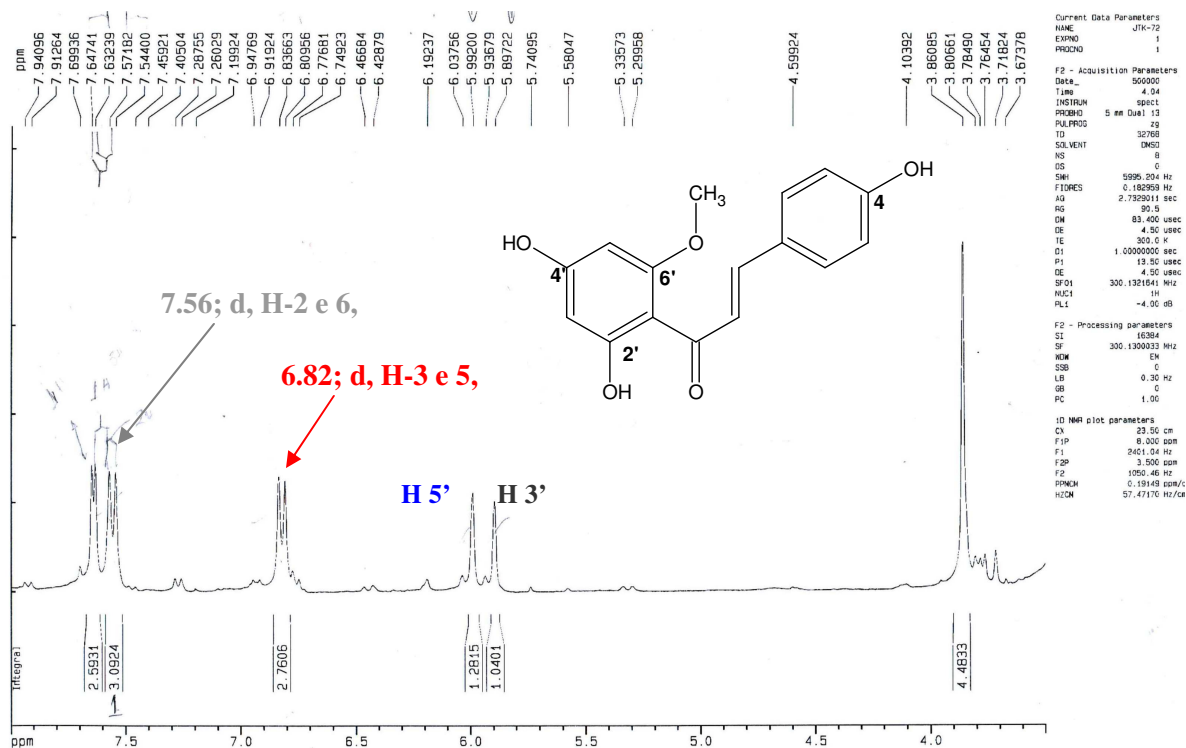
**Figura 15.** Bandas I e II de 4,2',4'-triidroxi-6',metoxichalcona, observadas no ultravioleta.

a) RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e Dept  $135^\circ$  de 4,2',4'-triidroxi-6',metoxichalcona

Ao ser submetida a RMN  $^1\text{H}$  (Figura 16) apresentou perfil de um flavonóide com um adequado grau de pureza. A numeração dos carbonos na classe das chalconas (flavonóides), de acordo com Agrawal et al., 1998, pode ser observada na Figura 17. Seus dados obtidos em 300 MHz, em  $\text{DMSO-d}_6$ , são observados (69).

b) 4,2',4'-trihydroxy-6'-methoxychalcone. UVmax (MeOH): 230 e 340 nm;

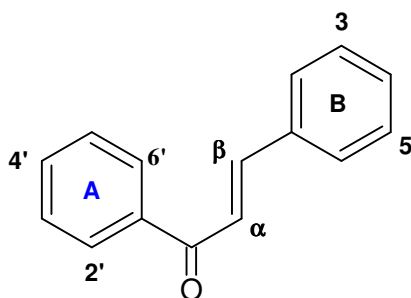
RMN  $^1\text{H}$  - (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  13,94 (s, H), 10,87 (s, H), 10,10 (s, H), desaparece após adição de  $\text{D}_2\text{O}$ , 7,65 (d, 15,8 Hz, H- $\beta$ ), 7,63 (d, 15,8 Hz, H- $\alpha$ ), 7,56 (d, J 8,4 Hz, H-2 e 6), 6,82 (d, 8,4 Hz, H-3 e 5), 5,99 (s, H-5'), 5,90 (s, H-3'), 3,86 (s,  $\text{OCH}_3$  em C-6').



**Figura 16.** Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio RMN de  $^1\text{H}$  de 4,2',4'-trihidroxi-6'-metoxichalcona obtido em 300 MHz, em DMSO- $\text{d}_6$ .

Ao ser submetida a RMN de  $^{13}\text{C}$ , 75 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ , (Figura 18) apresentou perfil de um flavonóide diferente do padrão comum desta classe de substâncias, podendo sugerir alguma estrutura diferenciada. Seus dados obtidos em 75 MHz, tendo como solvente DMSO- $\text{d}_6$  foram - 105.1 (C-1'), 166.4 (C-2'), 95.9 (C-3'), 164.9 (C-4'), 91.6 (C-5'), 162.6 (C-6'), 55.9 (OCH<sub>3</sub> em C-6'), 191.8 (C=O, C-'), 123.0 (C-), 142.9 (C-), 126.0 (C-1), 130.6 (C-2 e C-6), 116.0 (C3 e C-5), 159.9 (C-6).

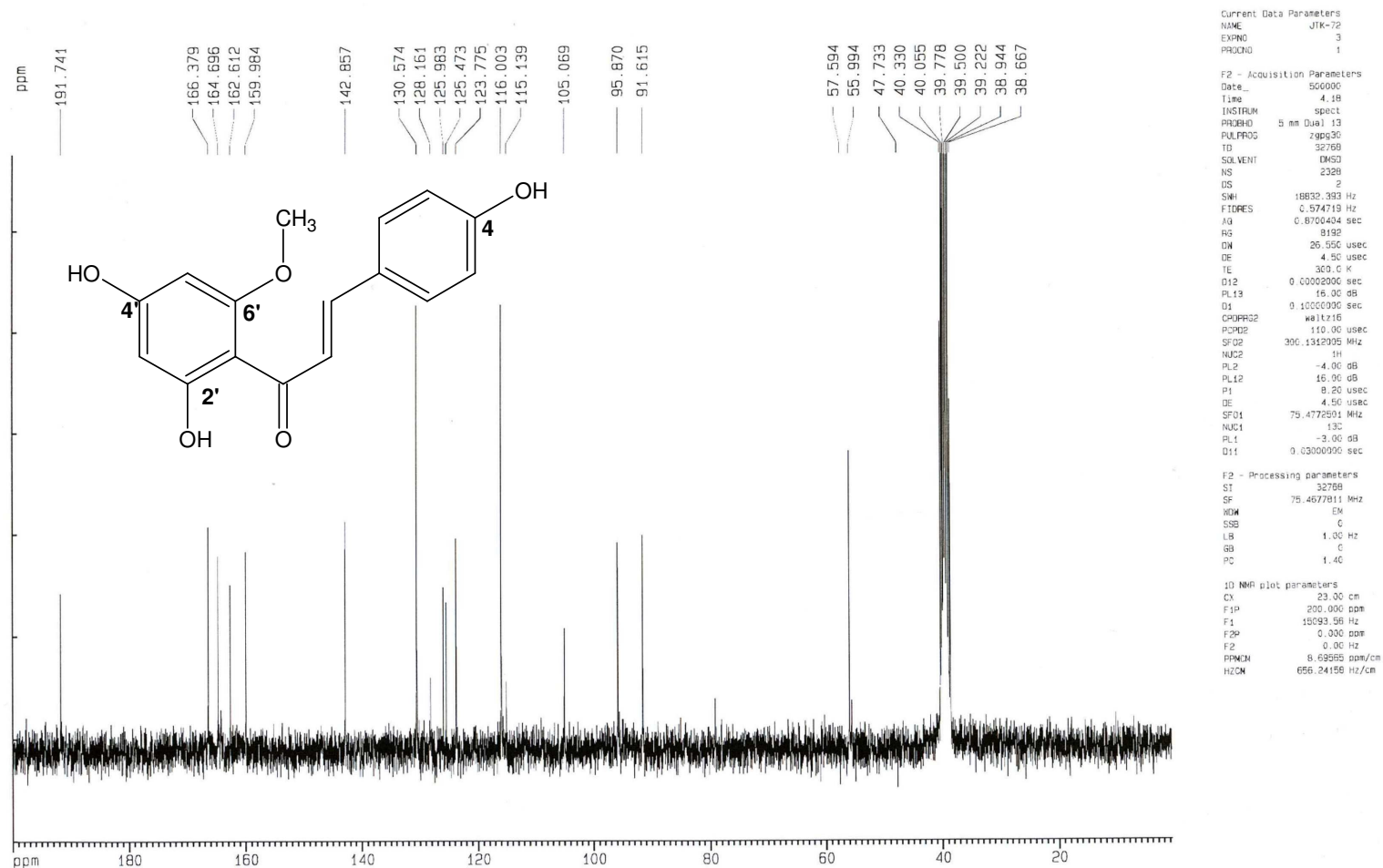
Em análise ao Dept 135° (Figura 19) pode ser confirmado o posicionamento de carbonos insaturados. Estes dados comparados aos dados apresentados por Puyvelde et al., 1989, puderam mostrar a semelhança das estruturas, como pode ser visto na tabela 08, sendo a numeração baseada na figura 18, de acordo com Agrawal et al., 1998 (10, 69).



**Figura 17.** Numeração dos carbonos na classe das chalconas (flavonóides) (69).

**Tabela 08** - Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$ , 75 MHz, DMSO- $d_6$ , da substância isolada 4,2',4'-triidroxi-6'-metoxichalcona comparados a substância helicrisitina (10).

Carbono	$\delta$ Puyvelde et al., 1989	$\delta$ 4,2',4'-triidroxi-6'- metoxichalcona
Ome	56,3	55,9
C-5'	92,2	91,6
C-3'	97,0	95,9
C-1	128,0	126,0
C-4	160,6	159,9
C-2	131,2	130,6
C-6	131,2	130,6
C-3	116,8	116,0
C-5	116,8	116,0
C- $\alpha$	125,2	123,0
C- $\beta$	143,3	142,9
C-1'	106,3	105,1
C-2'	165,7	166,4
C-4'	164,2	164,9
C-6'	168,9	162,6
C=O	193,1	191,8



**Figura 18.** Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de carbono RMN de  $^{13}\text{C}$  de 4,2',4'-trihidroxi-6'-metoxichalcona obtido em 75 MHz, em DMSO-d<sub>6</sub>.

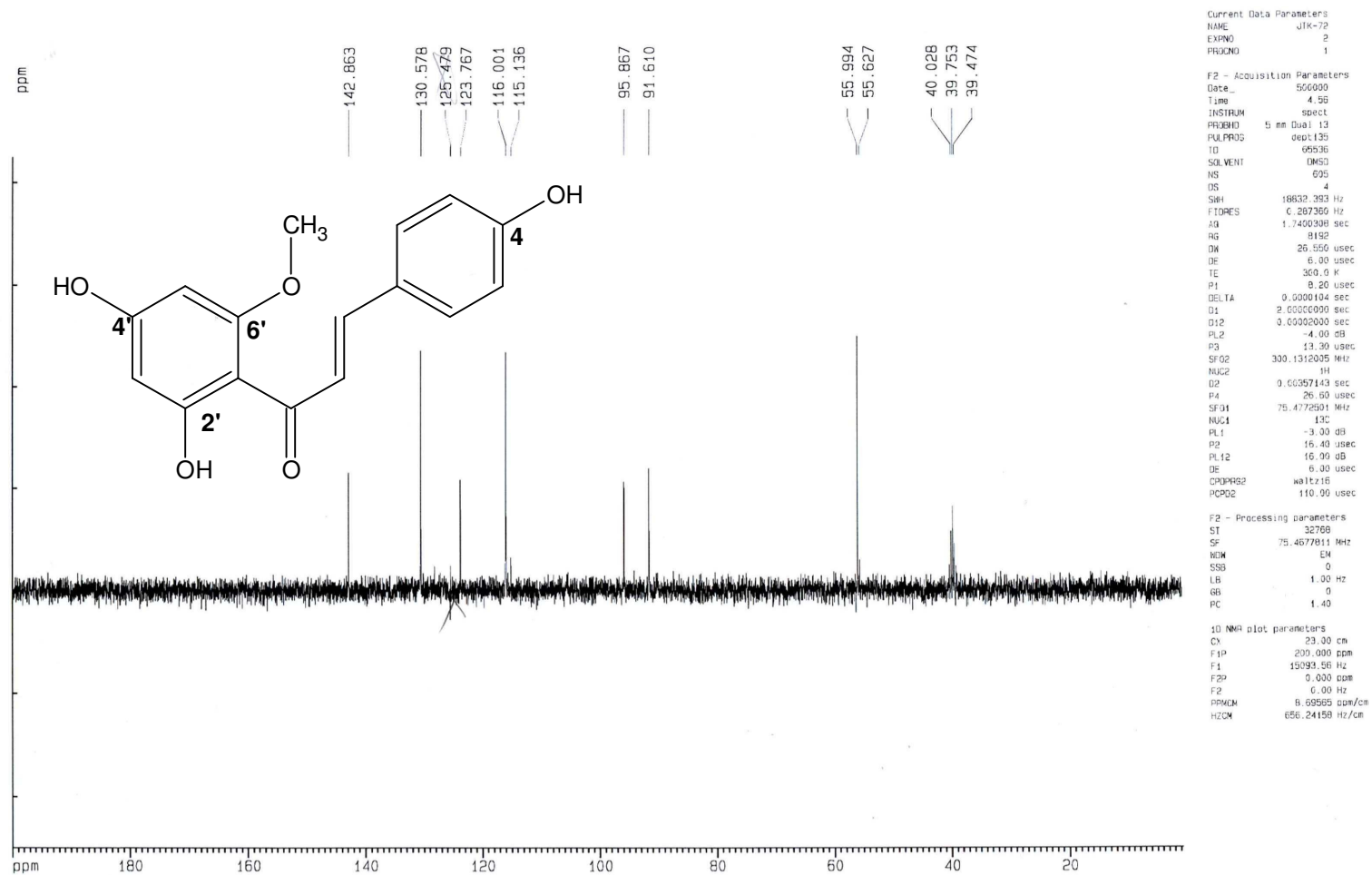
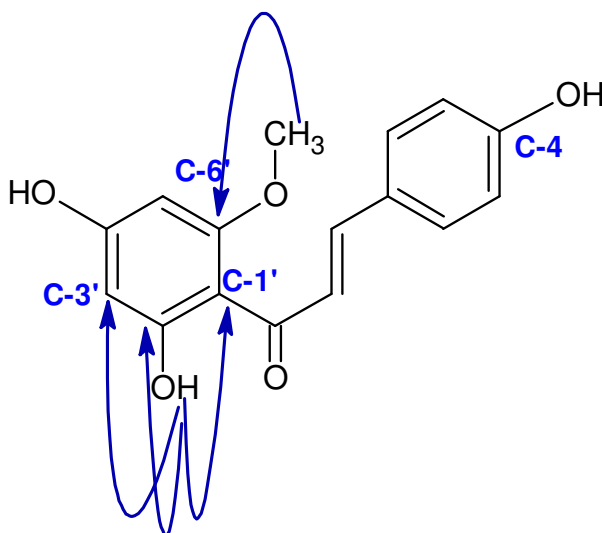


Figura 19. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C, 75 MHz, Dept 135°, de 4,2',4'-trihidroxi-6'-metoxichalcona obtido em DMSO-d<sub>6</sub>.



A confirmação da estrutura de 4,2',4'-triidroxi-6'-metoxichalcona pode ser feita com a complementação dos dados do mapa de correlações HMBC que mostrou os seguintes resultados -  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  3.86(OCH<sub>3</sub>)/162.6 (C-6'), 5.90(H-3')/91.6(C-5'), 5.99(H-5')/95.9(C-3'), 7.63(H- $\alpha$ )/191.7(C- $\beta'$ ), 13.94 (OH em C-2')/95.9(C-3'), 105.1(C-1'), 166.4(C-2'). Estas correlações podem ser vistas também nas Figuras 20 e 21. Principais correlações HMBC:  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  3.86(OCH<sub>3</sub>)/162.6 (C-6'), 5.90(H-3')/91.6(C-5'), 5.99(H-5')/95.9(C-3'), 7.63(H- $\alpha$ )/191.7(C- $\beta'$ ), 13.94 (OH em C-2')/95.9(C-3'), 105.1(C-1'), 166.4(C-2').



**Figura 20.** Correlações observadas a partir do Mapa de Correlações HMBC de 4,2',4'-triidroxi-6'-metoxichalcona obtido em DMSO-d<sub>6</sub>, com as setas indicando os carbonos analisados.

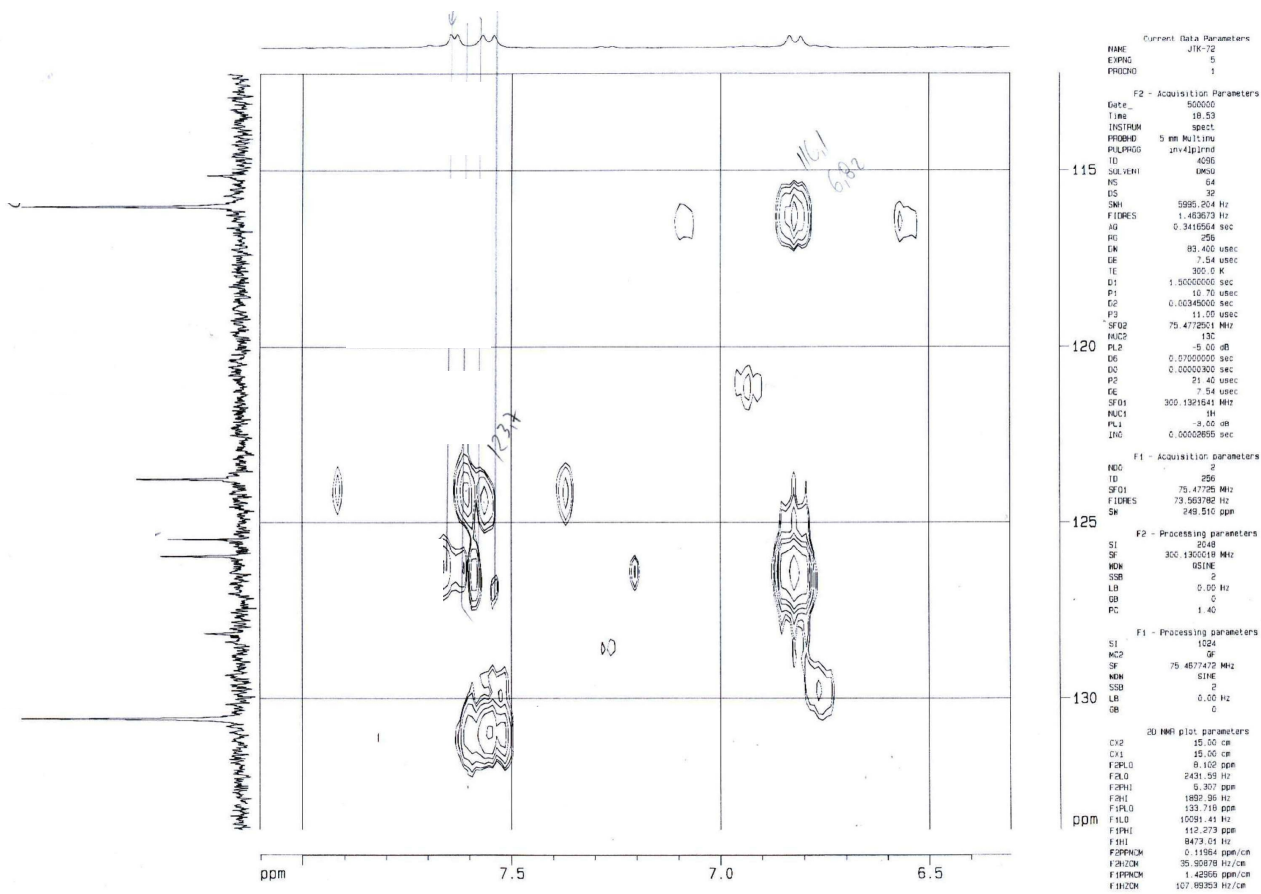
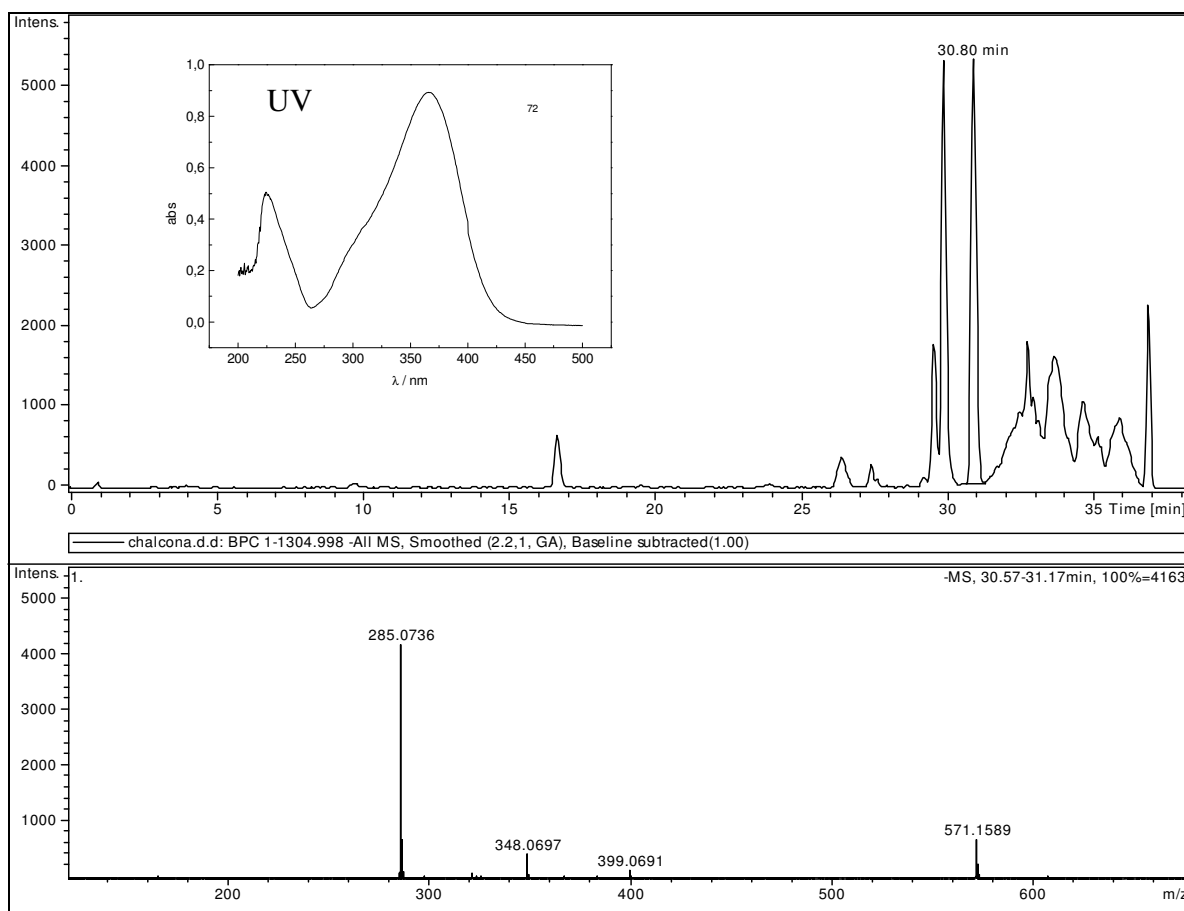


Figura 21. Mapa de correlações HMBC de 4,2',4'-trihidroxi-6'-metoxichalcona obtido em DMSO-d6 (Expansão).

A partir do espectro de massas (Figura 22) pode-se observar o íon molecular 285  $[M+H]^+$ , confirmando a estrutura 4,2',4'-triidroxi-6'-metoxichalcona obtida de *Achyrocline alata* – Asteraceae. Pelo ESI-MS foram observados duas fragmentações importantes, em modo positivo,  $m/z$  287  $[M+H]^+$ ;  $m/z$  167  $[C_8H_7O_4]^+$  e, em modo negativo,  $m/z$  285.



**Figura 22.** Espectro de massas de 4,2',4'-triidroxi-6'-metoxichalcona.

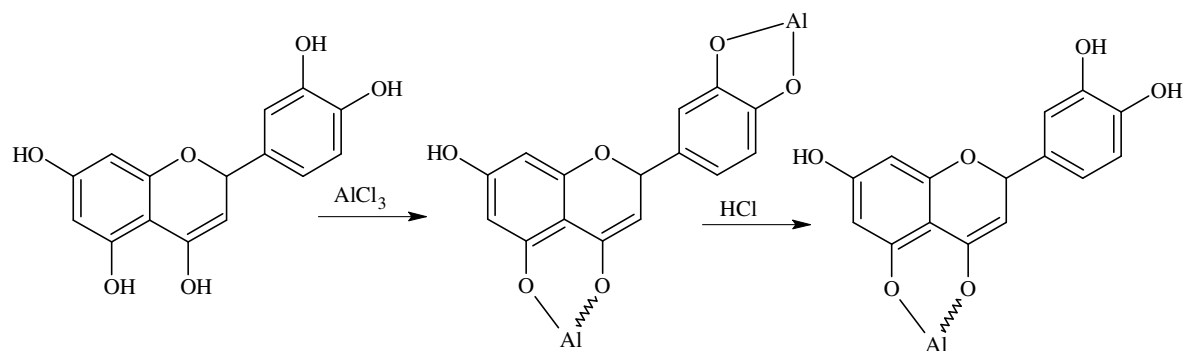
### 5.1.2.2 Identificação de gnafilina e 3-OMe-quercetina isoladas da fração acetato de etila de *Achyrocline alata*.

Entre as substâncias isoladas de *A. alata* as substâncias gnafilina e 3-OMe-quercetina apresentaram-se em alta concentração e puderam ser identificadas por espectrofotometria 1D e UV além de dados de CLAE para posterior confirmação. Seus dados espectrais (UV, RMN  $^1\text{H}$ ) foram comparados com outros flavonóides descritos na literatura (69).

Gnafilina e 3-OMe-quercetina são substâncias que se apresentaram como um pó fino amarelo claro. Em cromatografia em camada delgada em eluente para flavonóides (70) apresentaram  $R_f$  menor ao da quercetina e com uma coloração diferente.

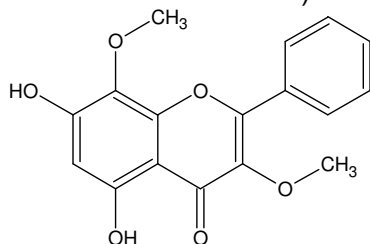
Os resultados obtidos com ultravioleta podem ser observados junto com dados descritos por Markham (1982), no qual apresenta o comportamento de flavonóides e os diferencia em classes (71). Estes dados associados aos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , além de Dept 135 $^\circ$  auxiliaram na identificação das substâncias isoladas de *A.alata* (гнаfilina e 3-OMe-quercetina – Figura 24) (69).

A técnica utilizando ultravioleta nos permite identificar o comportamento do flavonóide quanto a sua classe específica. Além disso, ao adicionar os reagentes como  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{HCl}$  e  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$  podem ser observados deslocamentos das bandas I e II do ultravioleta permitindo melhor identificação da classe na qual pertence o flavonóide. Estes deslocamentos são possíveis em virtude de complexos formados com o alumínio (Figuras 23 e 25).

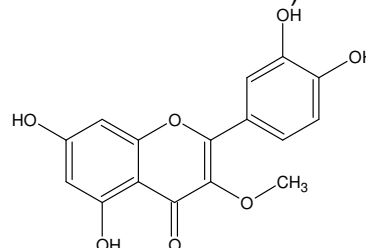


**Figura 23.** Reação de complexação entre flavonóide e o elemento alumínio.

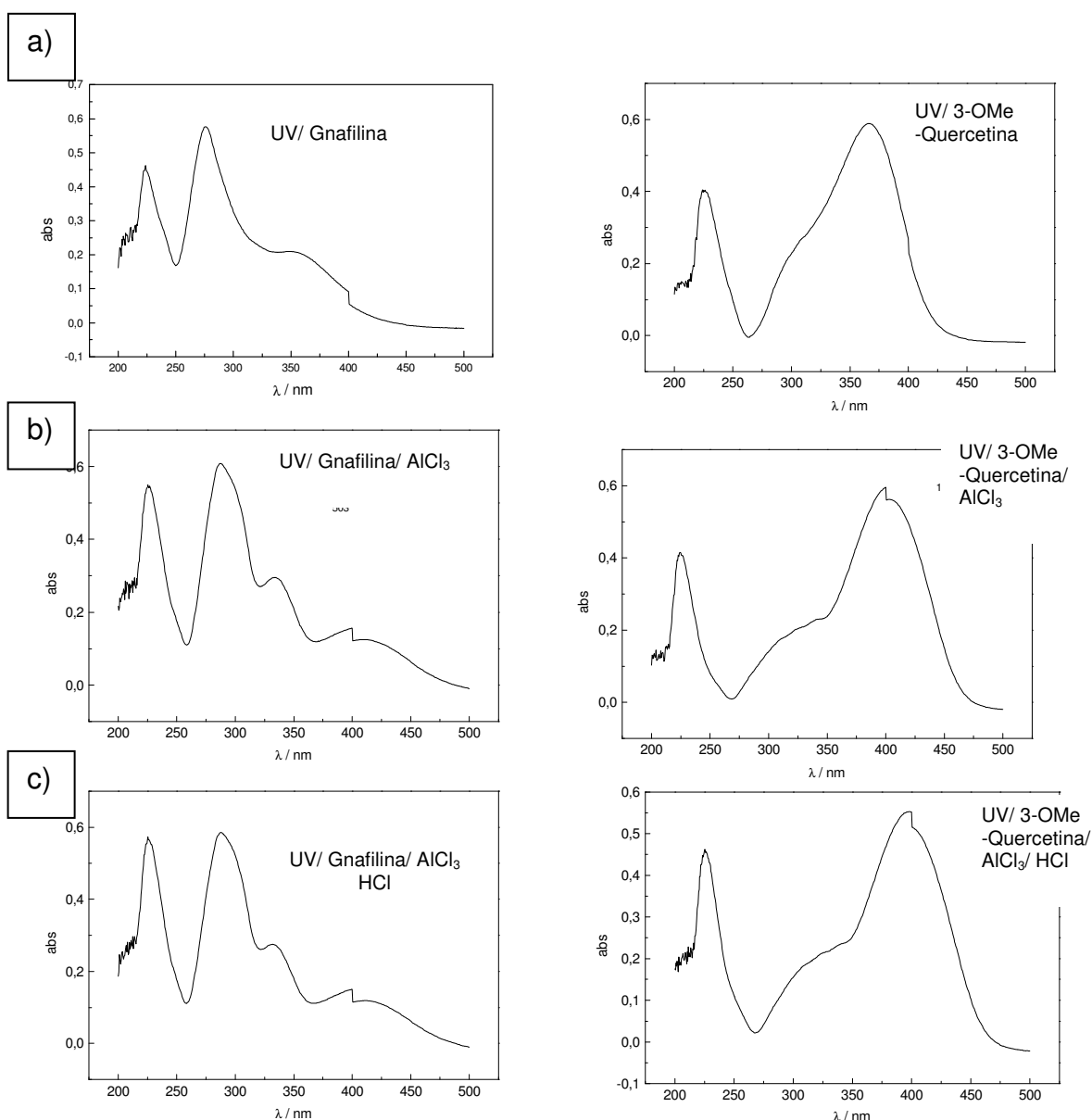
**GNAFILINA**  
(JTK 1-50, 5,7-diidroxi – 3,8-dimetoxiflavona)



**3-OMe-QUERCETINA**  
(JTK 136, 5,7,3', 4'-tetrahidroxi – 3-metóxi-flavonol)



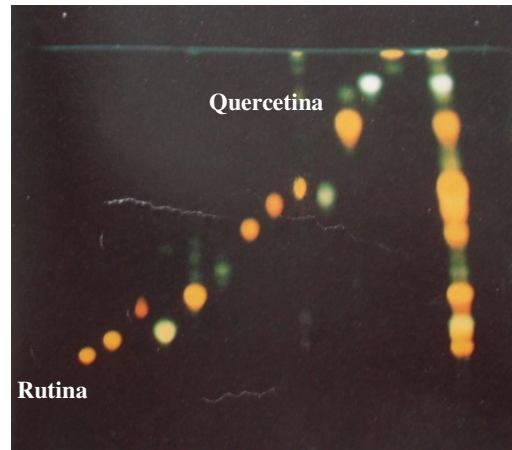
**Figura 24.** Substâncias isoladas de *Achyrocline alata* – Gnafilina e 3-OMe-Quercetina



**Figura 25.** Representação da absorvância de Gnafilina e 3-OMe-quercetina, obtida em espectrofotômetro U-3000: a) UV em MeOH; b) UV em MeOH/  $\text{AlCl}_3$ ; c) UV em MeOH/  $\text{AlCl}_3$ / HCl.

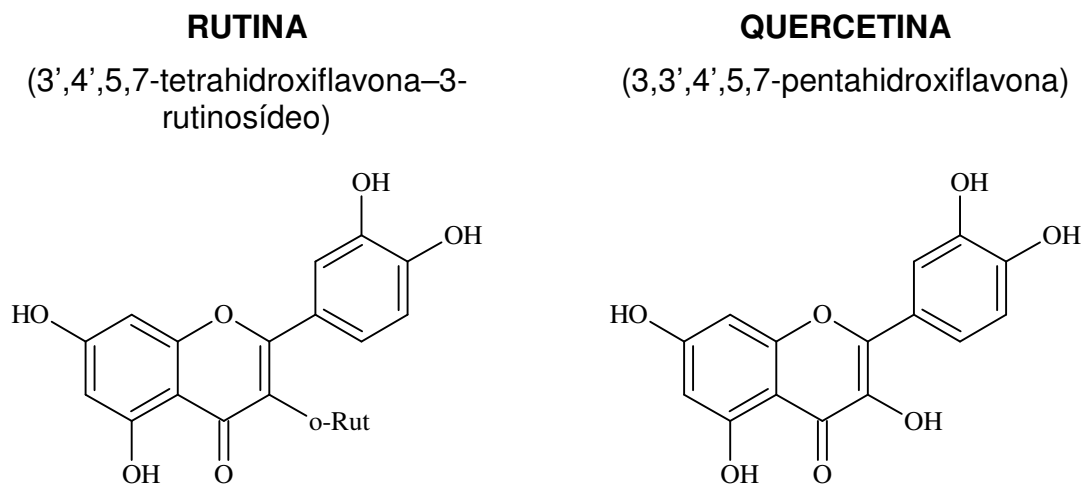
Outras substâncias como rutina e quercetina (Figura 26 e 27) foram identificadas em *Achyrocline alata* por CCD e identificadas de acordo com as técnicas apresentadas por Wagner et al., 1996 (Figura 26) (70).

Rutina e quercetina são pertencentes a classe dos flavonóis, apresentando o mesmo padrão de substituição. Os flavonóis têm como característica o anel A dissustituído por hidroxilas e anel B com uma hidroxila em C-3' (Figura 27).



FONTE: Wagner et al., 1996.

**Figura 26.** Padrão cromatográfico de rutina e quercetina (70).



**Figura 27.** Estruturas de rutina e quercetina (69).

## 5.2 ANÁLISE QUALITATIVA EM CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

### **5.2.1 Avaliação dos extratos, frações e substâncias obtidas de *Achyrocline alata* e *A. satureioides* por CLAE**

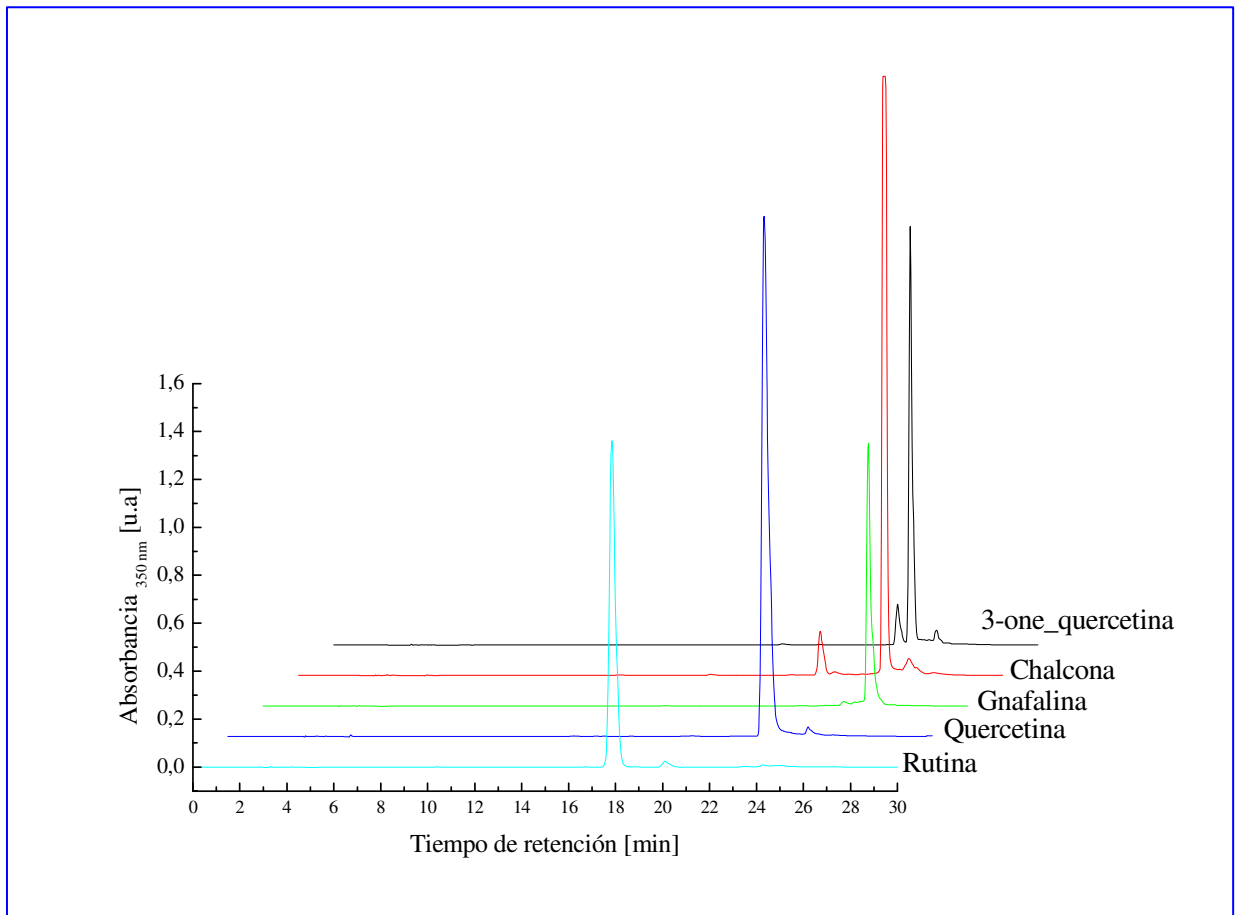
A técnica de CLAE foi realizada em Cadiz, na Espanha, pelo Dr. Alberto Oliveira-Bastidas acompanhada pelo Dr. João Máximo de Siqueira.

Os extratos e as frações de *Achyrocline alata* e *A. satureioides*, bem como as substâncias isoladas de *Achyrocline alata* foram os mesmos obtidos na UFMS/Laboratório de Farmacognosia.

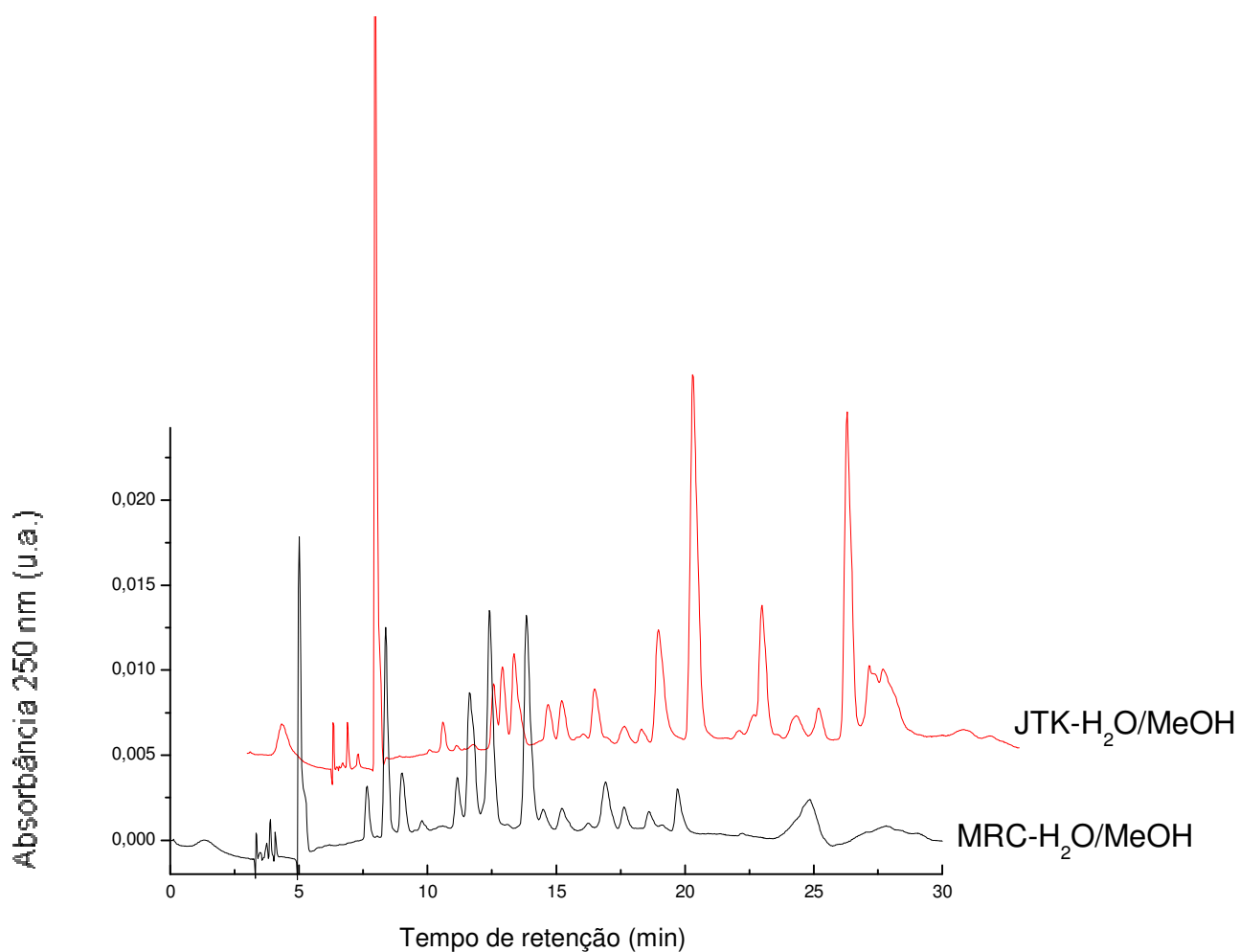
Inicialmente foram avaliadas as substâncias isoladas de *A.alata* como 4,2',4'-triidroxí-6'-metoxichalcona, gnafilina e 3-O-metil-quercetina, juntamente com padrões quercetina e rutina (Merck).

A análise CLAE (Cromatografia líquida em alta eficiência), com detector em ultravioleta, pode ser observada na figura 28.





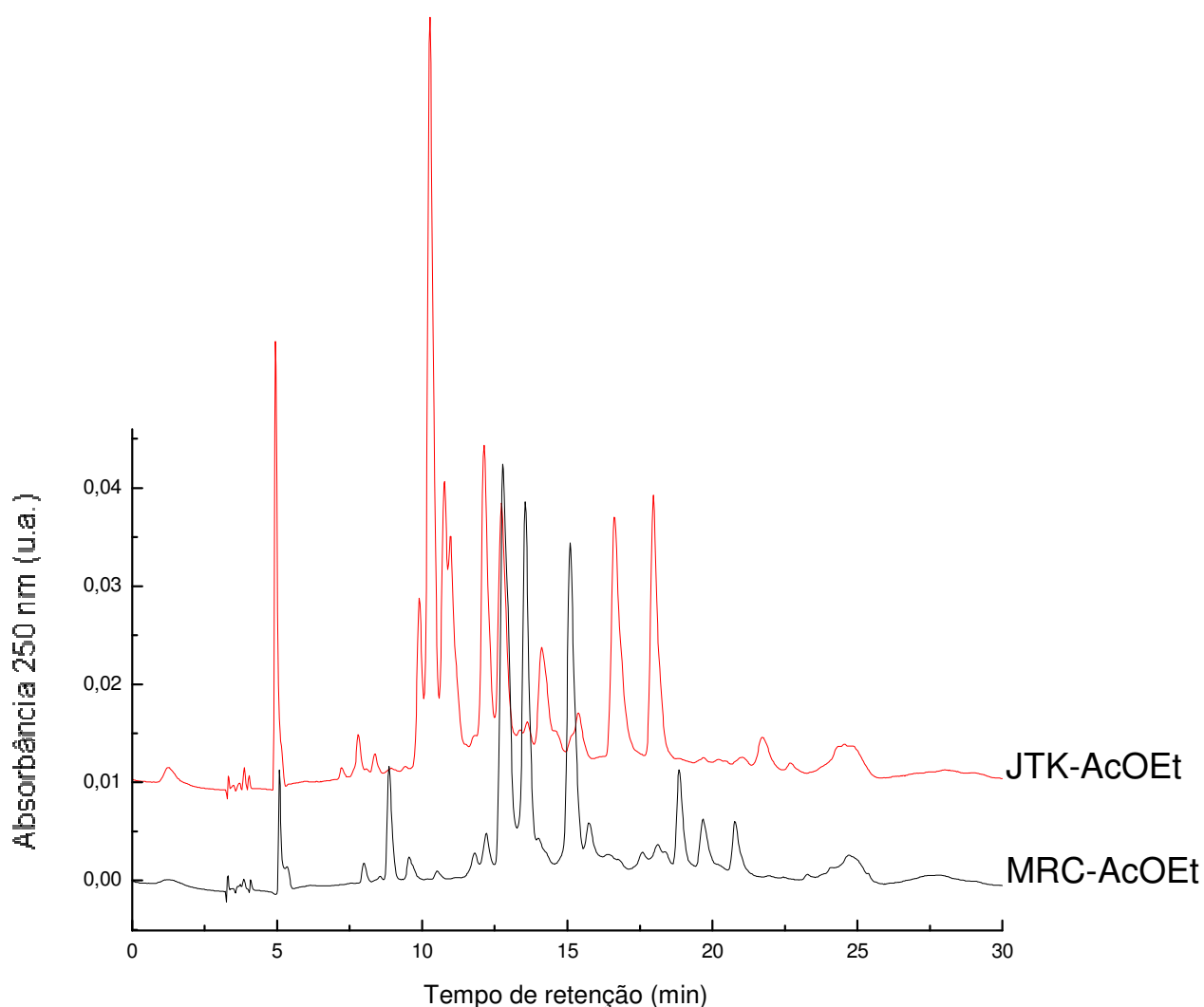
**Figura 28.** Análise CLAE (Cromatografia líquida em alta eficiência), com detector em ultravioleta, de substâncias isoladas de *Achyrocline alata* (4,2',4'-trihidroxi-6'-metoxichalcona, gnafalina e 3-O-metil-quercetina) e padrões (quercetina e rutina).



**Figura 29.** Análise CLAE (Cromatografia líquida em alta eficiência) com detector em ultravioleta dos extratos hidrometanólicos de *A. alata* (JTK-H<sub>2</sub>O/MeOH) e *A. satureioides* (MRC-H<sub>2</sub>O/MeOH)

Os extratos hidrometanólicos das duas espécies vegetais, *A. alata* e *A. satureioides*, foram comparados quantitativamente quanto a sua constituição química em CLAE por serem material de partida e a partir do qual foram realizados os fracionamentos.

O que pode ser observado no cromatograma da figura 29, entre 8 e 25 minutos, é a semelhança entre alguns picos.



**Figura 30.** Análise CLAE (Cromatografia líquida em alta eficiência) com detector em ultravioleta de Extrato acetato de etila de *A. alata* e Extrato acetato de etila de *A. satureioides*.

As frações acetato de etila das duas espécies vegetais, *A.alata* e *A.satureioides*, foram comparadas qualitativamente quanto a sua constituição química em CLAE por serem consideradas extrato enriquecidos de flavonóides (71).

Assim considera-se a fração acetato de etila rica em flavonóides pela afinidade química com os flavonóide (43). Esta classe de compostos é considerada predominante no gênero *Achyrocline* e responsável pelas atividades farmacológicas já relatadas na literatura.

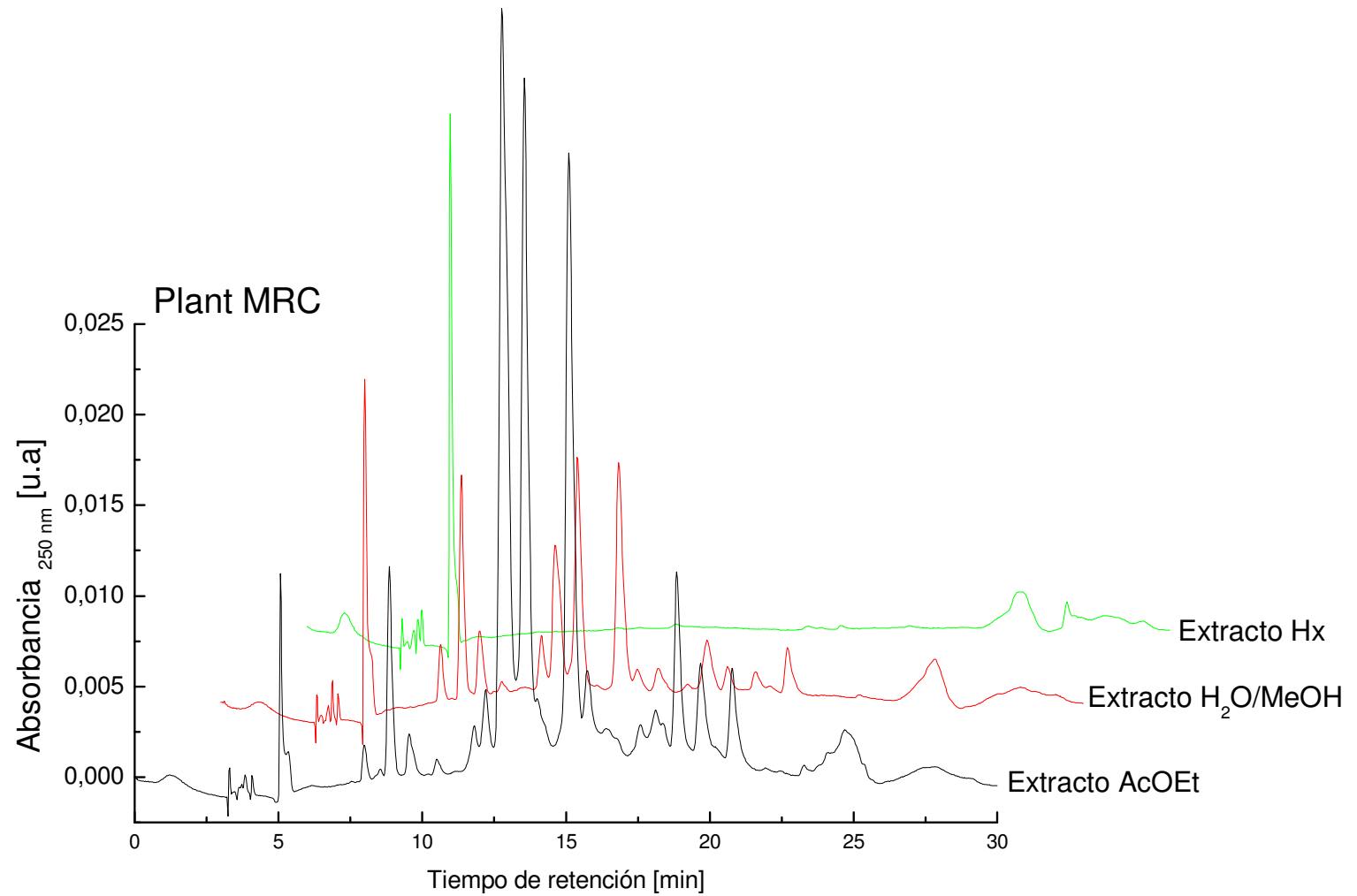
As figuras 31 e 32 mostram um comparativo entre as frações hexânica e acetato de etila de *A. alata* e *A. saturoioides* respectivamente comparadas ao extrato hidrometanólico. FAcOET e FHx são muito diferentes nos dois casos, como é realmente esperado, considerando a FAcOET mais polar que FHx.

A alta concentração de compostos fenólicos, muito bem distribuídos na FAcOET, em função da alta polaridade e afinidade aos flavonóides, refletem diretamente nas atividades antioxidante e seqüestradora de radicais livres.

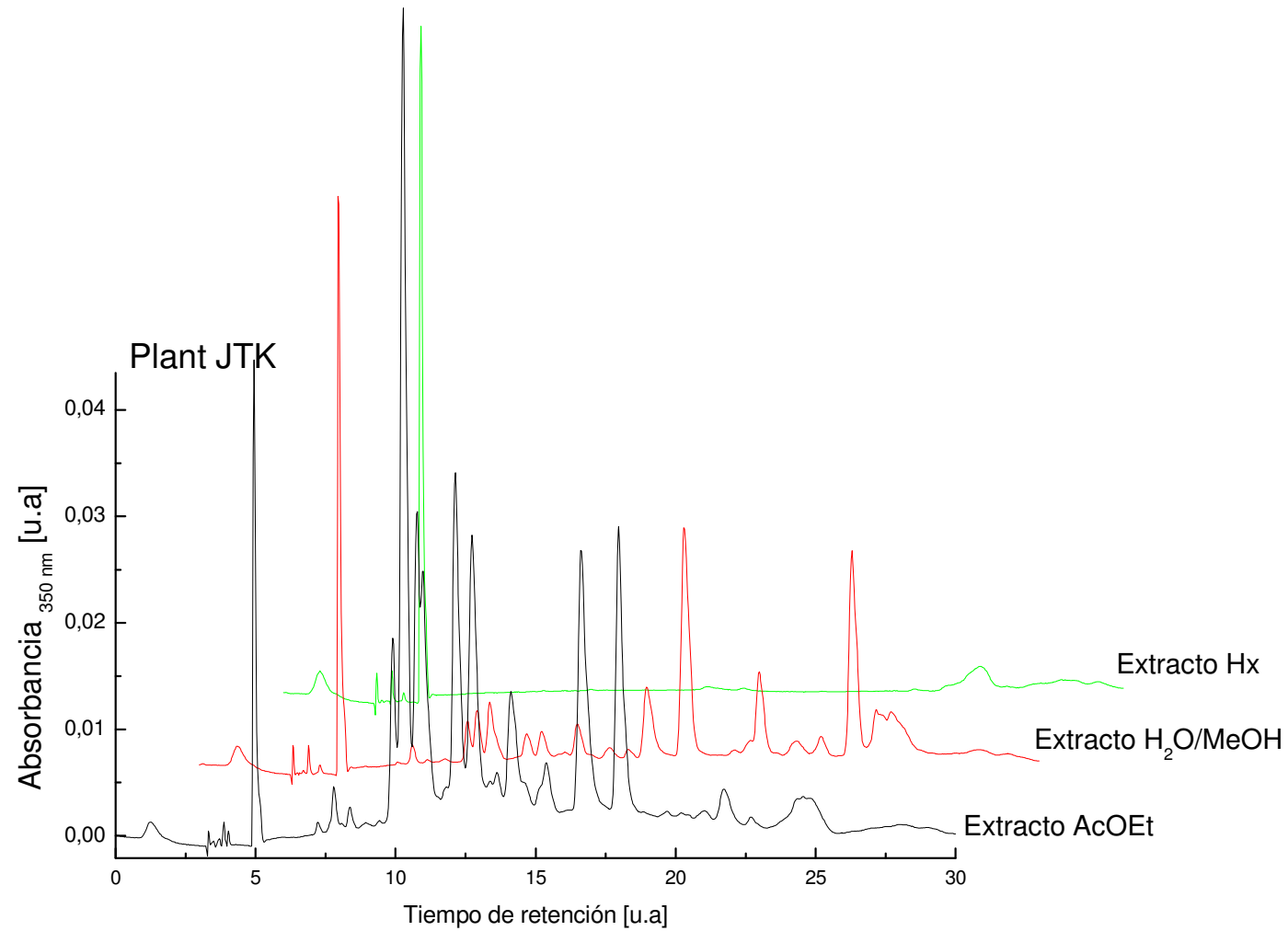
A presença de metoxilas ligadas aos flavonóides também influenciam nas atividades antioxidante e seqüestradora de radicais livres, mas como inibição.

Em comparação a literatura, Zhao et al. (2006) testou o extrato acetônico, o qual se mostrou o melhor para extração de compostos fenólicos como o melhor para atividade antioxidante (72).

Sabe-se que extratos são misturas complexas e com compostos de diferentes polaridades. Nos extratos até mesmo os compostos fenólicos diferem em sua polaridade e por isso também podem diferir quanto a ser um agente antioxidante, pro-oxidante ou seqüestrador de radical livre. Estes agentes podem atuar de forma sinérgica um com o outro, melhorando suas atividades ou até mesmo reduzindo-as.



**Figura 31.** Análise CLAE (Cromatografia líquida em alta eficiência) com detector em UV das Frações hexânica, acetato de etila em comparação com extrato hidrometanólico de *A. saturoioides*.



**Figura 32.** Análise CLAE (Cromatografia líquida em alta eficiência) com detector em UV das Frações hexânica, acetato de etila em comparação com extrato hidrometanólico de *A. alata*.

### 5.2.2 Atividade antioxidante, utilizando autografia com o $\beta$ -caroteno

Com este ensaio de autografia pode-se avaliar um prévio comportamento de extratos e frações de *A. alata* e *A. saturoioides* quanto ao potencial da atividade antioxidante.

Após o procedimento padrão de aplicar os compostos a serem testados e eluí-los em solventes específicos, a placa foi revelada com a solução 0,5% de  $\beta$ -caroteno em  $\text{CHCl}_3$ .

As manchas das amostras testadas não ficam evidentes inicialmente. Quando deixados por 5 a 6 minutos sob efeito da lâmpada de 254 nm pode ser observado a descoloração total do fundo da placa.

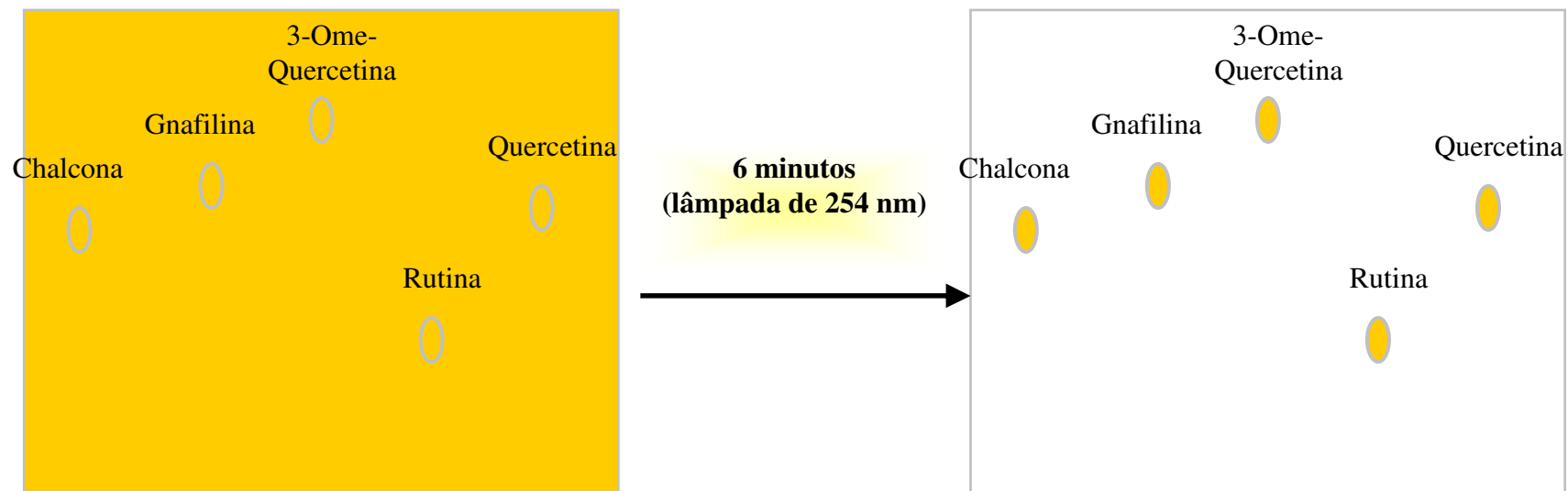
As manchas dos extratos e frações de *A. alata* e *A. saturoioides* ficam evidentes em coloração amarela revelando o resultado positivo para o teste.

Foram avaliadas também as substâncias isoladas de *A. alata* (Figura 33), 4,2',4'-trihidroxi-6'-metoxichalcona, gnafilina e 3-O-metil-quercetina, junto com os padrões rutina e quercetina, revelando da mesma forma do que para os extratos um resultado positivo.

Segundo Cavin et al. (1998), este é um teste eficiente, simples e rápido para uma análise prévia de flavonoídicos (53).

Com este ensaio permite-se observar que as amostras testadas foram eficientes ao impedirem a descoloração do  $\beta$ -caroteno, ou seja, impedirem sua oxidação, e então se pode dizer que apresentam um potencial efeito antioxidante, quando analisadas qualitativamente.

Na figura 33 esta atividade pode ser observada em esquema, demonstrando o momento após borrifar a solução de  $\beta$ -caroteno 0,5% (em  $\text{CHCl}_3$ ) e o término do teste após 6 minutos de exposição sob a lâmpada 254 nm.



Placa revelada com a solução 0,5%  $\beta$ -caroteno: $\text{CHCl}_3$

Descoloração total do fundo da placa

**Figura 33.** Esquema da atividade antioxidante, utilizando autografia com o  $\beta$ -caroteno para substâncias isoladas de *A. alata* (chalcona, gnafalina e 3-OMe-quercetina) e padrões (rutina e quercetina, Merck).



### **5.2.3 Atividade seqüestradora de radicais livres, utilizando autografia com o DPPH, ensaio qualitativo.**

Dentre todos os métodos já descritos para busca de novos compostos antioxidantes podem ser citados o método fotométrico, fluorimétrico, cromatográfico, eletroquímico e voltamétrico. Técnicas eletroanalíticas têm sido muito discutidas e bem aceitas (66).

Dentre estas técnicas sabe-se que ainda existem muitas limitações, como por exemplo: a baixa sensibilidade, o alto custo de equipamentos e a pouca seletividade. Então novas técnicas ainda vêm sendo discutidas para tentar suprir estas dificuldades (66).

Segundo Zhao et al. (2006) existe uma dificuldade em comparar técnicas e solventes ideais, pois as pesquisas têm se mostrado muito diferentes. Alguns estudos relatam que a capacidade de redução do composto pode ser um importante indicador da potencial atividade antioxidante (72).

Ainda assim compostos fenólicos podem exibir atividade antioxidante a partir da quelação de metais. Estes compostos são os maiores representantes da atividade antioxidante (72).

Zhao et al. (2006) relatam que o potencial antioxidante pode ser avaliado em função do processo extrativo e do solvente utilizado. Com isso avaliaram a atividade antioxidante através da capacidade de descoloração do radical DPPH em comparação com o potencial extrativo dos solventes e sua respectiva seletividade. A correlação foi feita entre os solventes acetona:água, etanol:água e metanol:água, sendo estas três misturas com 20% de água (72).

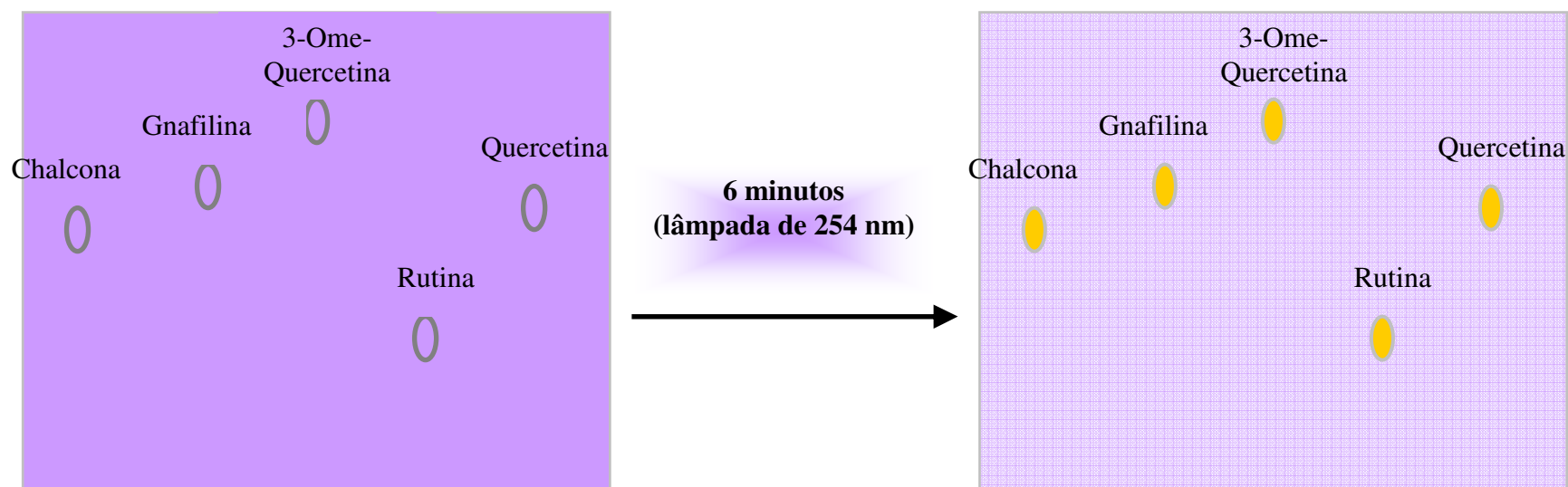
No presente estudo realizou-se o teste de autografia com uma solução de 0,2% de DPPH em MeOH como revelador da CCD. Este foi um teste qualitativo que a partir do qual pode ser observado em todas as amostras a presença de substâncias capazes de seqüestrar radicais livres.

O resultado foi observado através do aspecto da placa de CCD, no qual o fundo da placa fica da mesma cor que a solução de DPPH (violeta) enquanto que as

amostras com resultado positivo adquirem uma coloração amarela após alguns minutos de exposição na luz 254 nm.

Este ensaio também foi baseado e adaptado de Cavin et al. (1998), com a diferença da literatura sendo a forma como a placa foi colocada para descolorir. Neste trabalho foi utilizada luz com comprimento de onda de 254 nm e na literatura utilizaram-se da luz natural. Este foi considerado um ensaio também muito eficiente, simples e rápido para uma análise prévia do ensaio quantitativo com DPPH em espectrofotômetro (53).

Na figura 34 pode ser observado um esquema representativo do teste com a placa revelada com a solução de DPPH a 0,2% e 6 minutos após a exposição à luz 254 nm resultando, como esquematizado, as amostras com resultado positivo em coloração amarela.

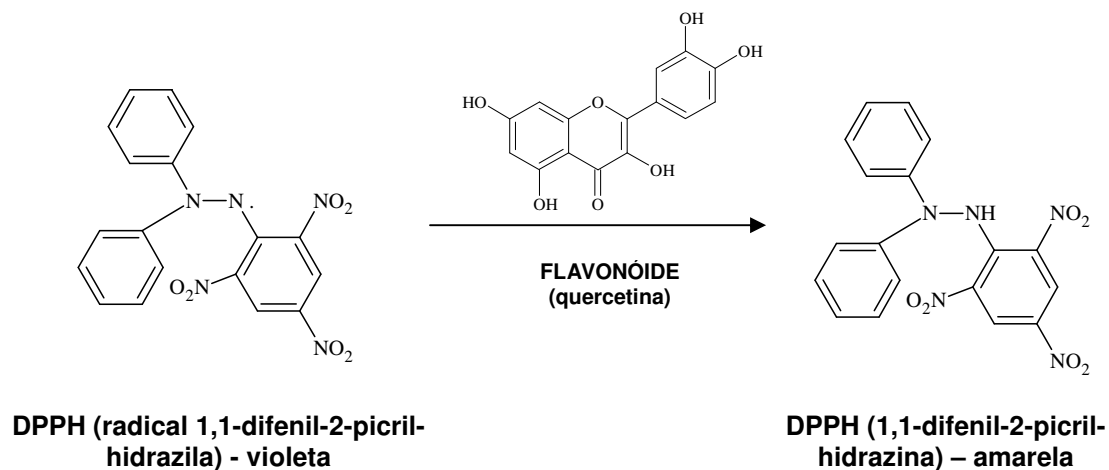


Placa revelada com a solução 0,2% DPPH:MeOH

Descoloração parcial do fundo da placa

**Figura 34.** Esquema representativo da atividade seqüestradora de radicais livres, utilizando autografia com o DPPH para substâncias isoladas de *A. alata* (chalcona, gnafalina e 3-OMe-quercetina) e padrões (rutina e quercetina, Merck).

A mudança na coloração ocorre, pois o DPPH é um radical (violeta) e ao entrar em contato com substâncias capazes de inativá-lo passa a ter uma coloração amarela (Figura 35).



**Figura 35.** Reação que ocorre no radical DPPH após exposição ao agente seqüestrador de radical livre (quercetina).

A estabilização do DPPH tem como consequência a formação de compostos instáveis, mas os flavonóides como radicais são estabilizados com facilidade por ressonância (Figura 36), diferente de outras substâncias.

$\text{RH} + \text{OH}\cdot$	$\longrightarrow$	$\text{R}\cdot + \text{H}_2\text{O}$	Reação de iniciação
$\text{R}\cdot + \text{O}_2$	$\longrightarrow$	$\text{ROO}\cdot$	Reação de propagação
$\text{RH} + \text{ROO}\cdot$	$\longrightarrow$	$\text{R}\cdot + \text{ROOH}$	
$\text{RROO}\cdot + \text{R}\cdot$	$\longrightarrow$	$\text{ROOR}$	Reação de terminação
$\text{ROO}\cdot + \text{ROO}\cdot$	$\longrightarrow$	$\text{ROOR} + \text{O}_2$	

**Figura 36.** Etapas da reação radicalar considerando R como sendo um flavonóide.

#### **5.2.4 Atividade seqüestradora de radicais livres utilizando como modelo o radical DPPH quantitativo por espectrofotometria**

Quanto a análise quantitativa realizada com solução de DPPH em MeOH de 0,02% em espectrofotômetro, apresentou resultados satisfatórios na comparação das duas espécies. Os resultados foram demonstrados sob a forma de gráficos (Gráficos de 1 a 7) que expressam a concentração em  $\mu\text{g/mL}$  em seu eixo x e capacidade de descoloração do radical DPPH expressa em porcentagem (%) no eixo y.

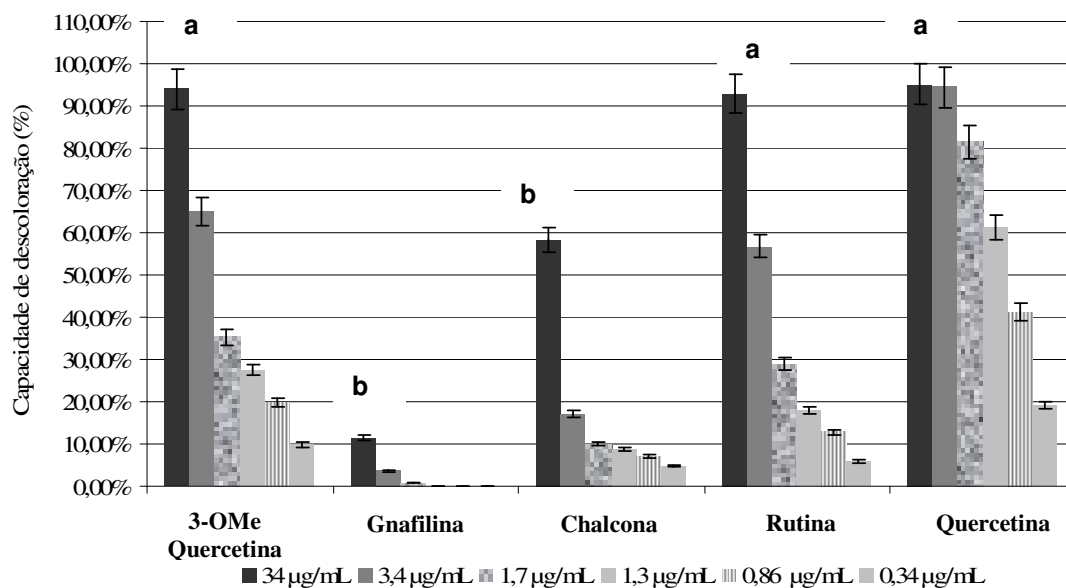
É importante ser dito que estes testes com radical DPPH realizados quantitativamente por espectrofotometria são realizados após resultados positivos ao teste qualitativo com o mesmo radical em bioautografia. Este teste também foi adaptado de Cavin et al. (1998), sendo que neste trabalho foram realizadas 6 concentrações diferentes em triplicata enquanto na literatura foram mostradas apenas 3 (53).

Este ensaio demonstrou e comprovou que a atividade seqüestradora de radicais livres foi mais significativa para algumas frações do que para compostos isolados. No caso, a fração rica em flavonóides apresentou uma atividade consideravelmente boa em relação a outras frações e extratos e principalmente com relação a substâncias isoladas.

Esta discussão quanto a utilização de compostos isolados ou extratos e frações é mostrada na literatura por Yunes & Calixto (2002), revelando que nem sempre as substâncias precisam ser isoladas para expressar sua atividade biológica (2).

Frequentemente estas substâncias presentes em uma mistura rica de constituintes, extrato ou fração, agem em sinergismo uma com as demais acentuando a atividade desejada.

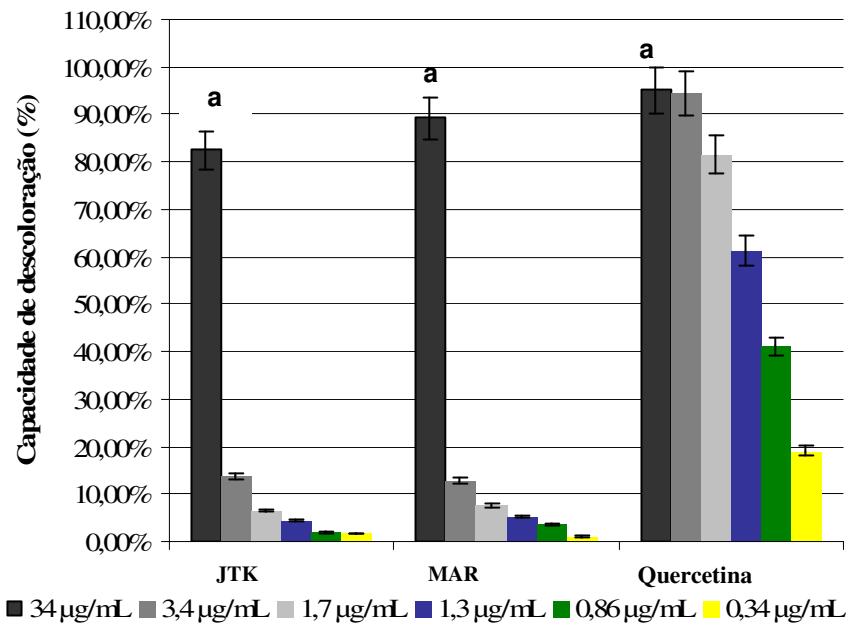
No presente trabalho não foi possível detectar este fenômeno. A avaliação da atividade seqüestradora de radicais das substâncias isoladas de “jatei-ka-há” é bastante distinta e mais pronunciada que nos extratos e frações testados.



( $p > 0,05$ ,  $n = 3$ )

**Gráfico 01.** Capacidade de descoloração do DPPH de substâncias isoladas de *Achyrocline alata* (3-OMe-quercetina, gnafilina e 4,2',4'-Triidroxi-6'-metoxichalcona, **chalcona**) e padrões (Rutina e quercetina - Merck).

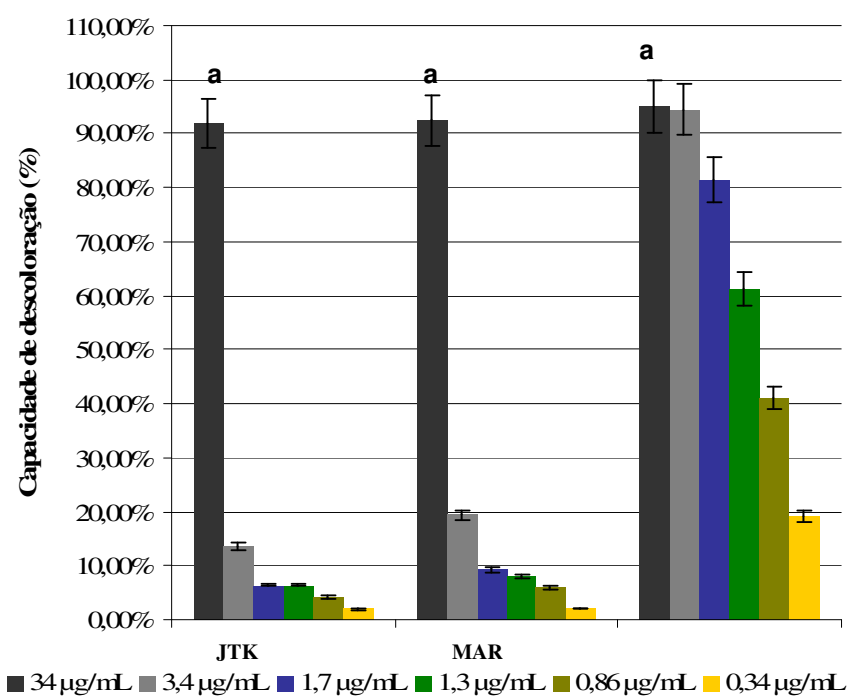
Não houve diferença na concentração de 34 µg/mL de 3-OMe-quercetina, rutina e quercetina é considerável, enquanto que gnafilina e 4,2',4'-Triidroxi-6'-metoxichalcona, em razão de seus padrões de substituição, não apresentam significância para o teste.



( $p > 0,05$ ,  $n = 3$ )

**Gráfico 02.** Capacidade de descoloração do DPPH do extrato hidrometanólico (bruto) de *A.alata* (JTK) e extrato hidrometanólico (bruto) de *A.satureioides* (MAR) correlacionados com quercetina – Merck, padrão para o teste com DPPH.

De acordo com o teste aplicado, os extratos hidrometanólicos (bruto) de *A. satureioides* (MAR) e de *A. alata* (JTK) em 34 µg/mL, apresentara-se semelhantes ao padrão quercetina.

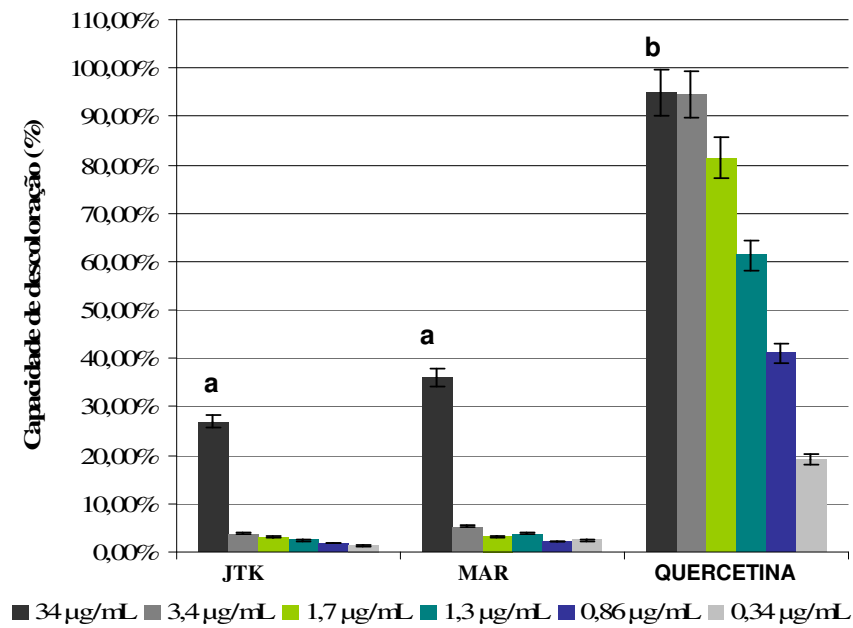


(\* $p > 0,05$ ,  $n=3$ )

**Gráfico 03.** Extrato aquoso de *A. alata* (JTK) e extrato aquoso de *A. saturoioides* (MAR) correlacionados com quercetina – Merck, padrão para o teste com DPPH.

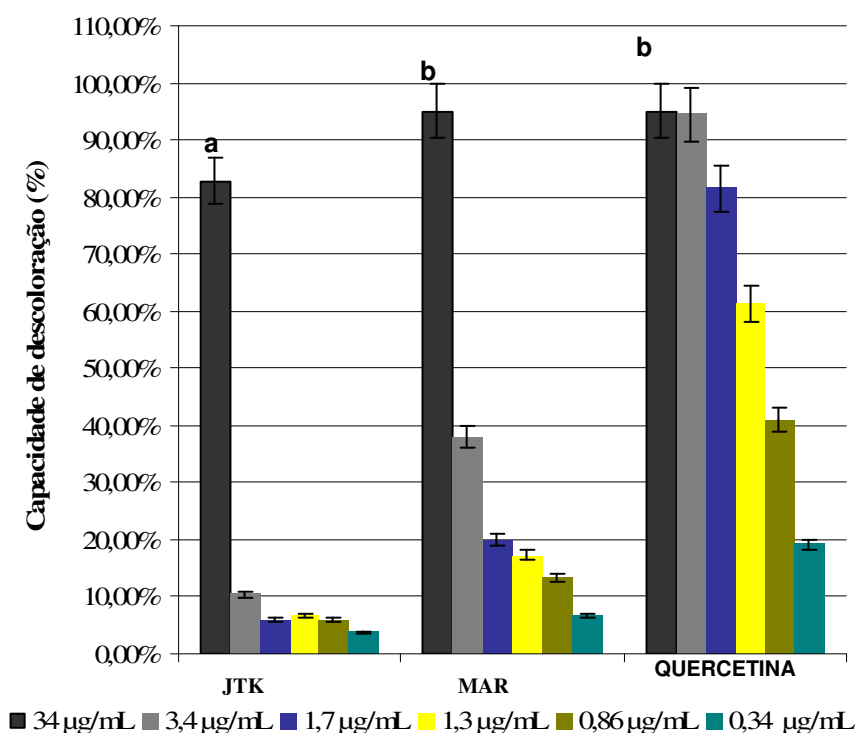
A avaliação do extrato aquoso é fundamental, pois representa a forma farmacêutica mais utilizada pela população, que são os chás (decocto 5%). Analisando os dados, a maior concentração de *A. alata* e *A. saturoioides* (JTK e MAR) (34 µg/mL) se assemelham com o padrão quercetina, não apresentando portanto diferença estatística.





**Gráfico 04.** Capacidade de descoloração do DPPH da tintura de *A. alata* (JTK) e tintura de *A. saturoioides* (MAR), em percolação, correlacionados com quercetina – Merck, padrão para o teste com DPPH.

A tintura é uma forma farmacêutica mais comumente encontrada nas farmácias de manipulação e que pode ser incorporada em excipientes e então administrada como fitoterápico. Em análise percebe-se que sua atividade tanto para *A.alata* quanto para *A.saturoioides* não são muito satisfatórias quando comparadas ao padrão quercetina. E em relação ao teste estatístico Tintura de *A. alata* (JTK) e tintura de *A. saturoioides* (MAR) não apresentaram diferença entre si na concentração de 34 µg/mL.



(\*p>0,05, n=3)

**Gráfico 05.** Capacidade de descoloração do DPPH do extrato metanólico de *A. alata* (JTK) e extrato metanólico de *A. saturoioides* (MAR) correlacionados com quercetina – Merck.

O extrato metanólico é rico em substâncias polares, entre elas substâncias altamente hidroxiladas e por isso podem representar boa atividade seqüestradora de radicais livres, como foram observados em *A.alata* e *A.saturoioides* em 34 µg/mL.

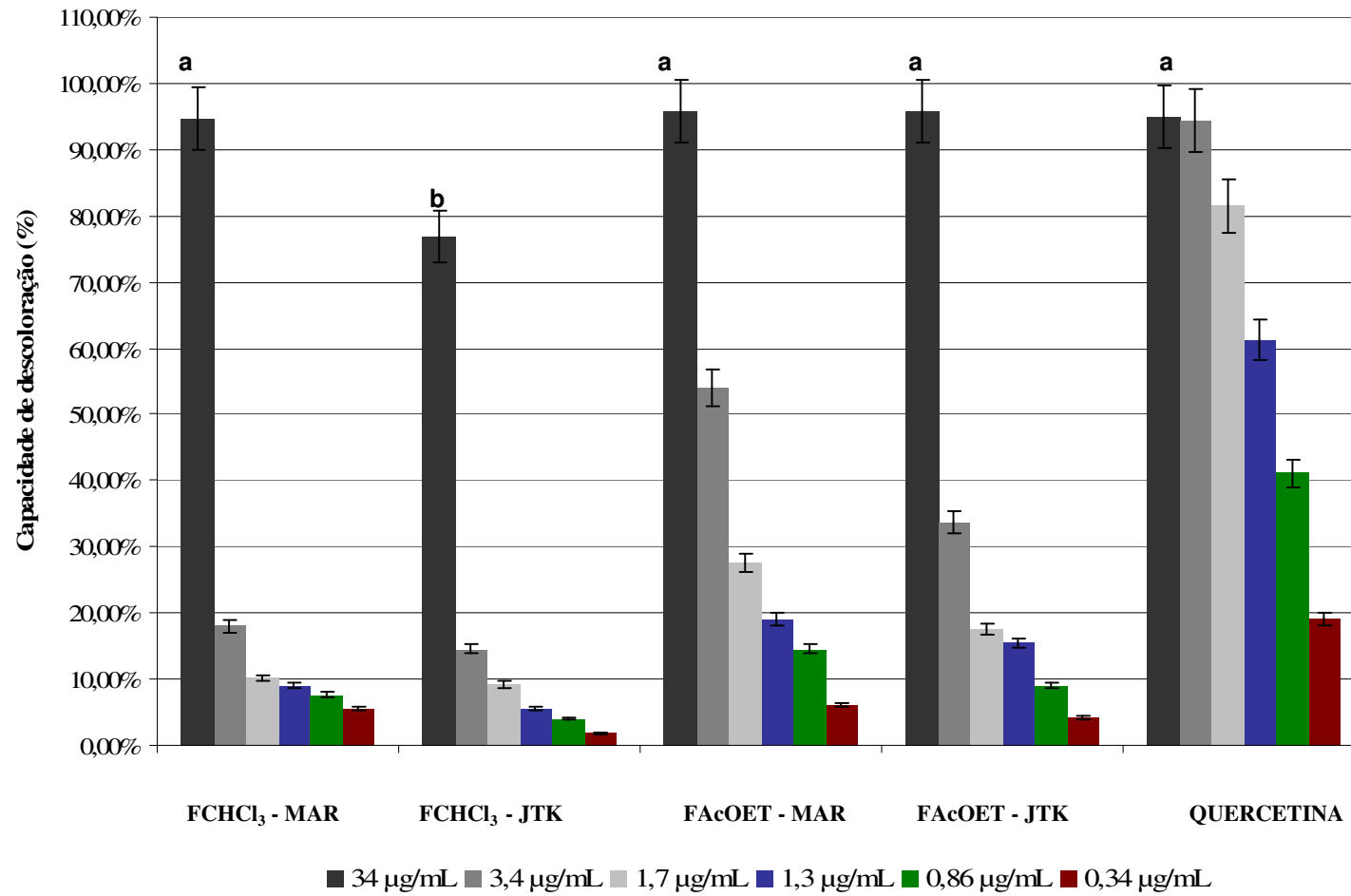
Este extrato metanólico de *A. saturoioides* (MAR) em 34 µg/mL apresentou-se semelhante ao padrão quercetina, enquanto que extrato metanólico de *A. alata* (JTK) não apresentou esta semelhança com o padrão. A equação do gráfico e seu respectivo R<sup>2</sup> dos extratos hidrometanólicos e metanólicos, bem como frações acetato de etila e clorofórmica de *Achyrocline alata* e *A. saturoioides*, além das substâncias isoladas de *A. alata* (3-OMe-quercetina, gnafilina, 4,2',4'-Triidroxí-6'-metoxichalcona) e rutina e quercetina, como padrões estão representadas na Tabela 09.

Neste mesmo padrão foi realizado o ensaio com o extrato em diclorometano para *A. alata* (JTK) e *A. satureioides* (MAR), no qual se obteve um resultado pouco expressivo quanto atividade antioxidante.

Para *A. alata* na concentração 34 µg/mL observou-se a capacidade de descoloração do radical DPPH em torno de 11% e para *A. satureioides* em torno de 19%. Não se considera um bom resultado, mas ao mesmo tempo previsível pelo fato de ser um solvente menos polar e por isso com afinidade reduzida pelos compostos com esperada atividade, que são aqueles polihidroxilados.

**Tabela 09** – Representação da equação dos gráficos e valor de  $R^2$  dos extratos hidrometanólicos e metanólicos, bem como frações acetato de etila e clorofórmica de *Achyrocline alata* e *A. satureioides*, além das substâncias isoladas de *A. alata* (3-OMe-quercetina, gnafilina, 4,2',4'-Triidroxi-6'-metoxichalcona) e rutina e quercetina, como padrões.

<b>Amostras analisadas</b>	<b>Equação do gráfico</b>	<b><math>R^2</math></b>
<i>A. alata</i> (Decocto)	$y = -0,1363x + 0,6842$	0,5294
<i>A. satureioides</i> (Decocto)	$y = -0,141x + 0,7218$	0,5814
<i>A. alata</i> (Extrato Hidroetanólico)	$y = -0,1165x + 0,601$	0,4891
<i>A. satureioides</i> (Extrato Hidroetanólico)	$y = -0,1346x + 0,6794$	0,543
<i>A. alata</i> (Tintura)	$y = -0,1165x + 0,601$	0,4891
<i>A. satureioides</i> (Tintura)	$y = -0,1481x + 0,8355$	0,7158
<i>A. alata</i> (FCHCl <sub>3</sub> )	$y = -0,1362x + 0,7184$	0,538
<i>A. satureioides</i> FCHCl <sub>3</sub> )	$y = -0,1172x + 0,5975$	0,5781
<i>A. alata</i> (FAcOET)	$y = -0,1643x + 0,9366$	0,8428
<i>A. satureioides</i> (FAcOET)	$y = -0,1526x + 0,8264$	0,7015
Rutina	$y = -0,1652x + 0,9364$	0,8694
3-OMe-quercetina	$y = -0,1612x + 0,9832$	0,9064
Gnafilina	$y = -0,0196x + 0,0949$	0,6617
4,2',4'-Triidroxi-6'-metoxichalcona	$y = -0,0858x + 0,478$	0,6193
Rutina	$y = -0,0196x + 0,0949$	0,6617
Quercetina	$y = -0,16x + 1,2141$	0,9465

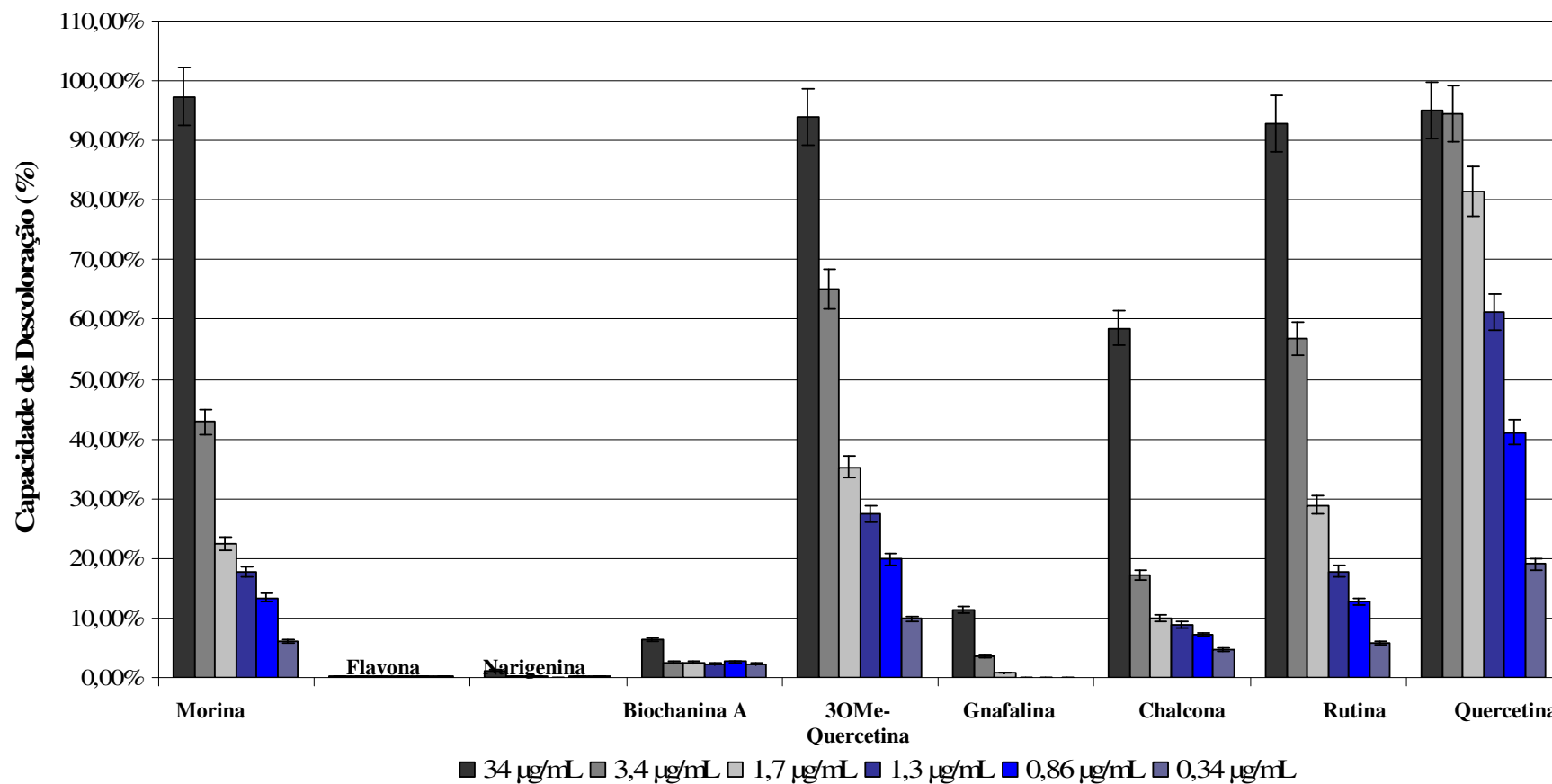


(\*p>0,05, n=3)

**Gráfico 06.** Capacidade de descoloração do DPPH da fração clorofórmica de *A. alata* (JTK) e *A. saturoioides* (MAR) e fração acetato de etila de *A. alata* (JTK) e *A. saturoioides* (MAR) comparadas ao padrão do teste – quercetina.

Em 34  $\mu\text{g}/\text{mL}$  as frações acetato de etila e clorofórmica de *A. saturoioides* bem como a fração acetato de etila de *A. alata* apresentam resultado estatisticamente semelhantes ao padrão quercetina.

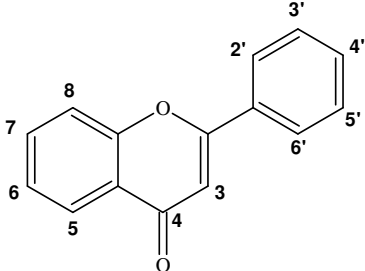
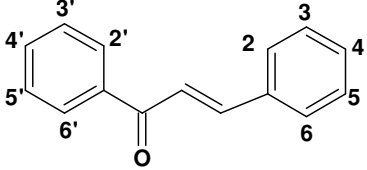
A fração acetato de etila (AcOEt) é, reconhecidamente, um solvente mais específico para extração de flavonóides, conforme apresentado anteriormente neste trabalho, e que está de acordo com o observado sobre a atividade seqüestradora de radicais quando comparadas com o padrão quercetina.



\* $p > 0,05$

**Gráfico 07.** Comparação entre capacidade de descoloração frente ao radical livre DPPH em espectrofotômetro dos flavonóides isolados de *A. alata* (3OMe-Quercetina, Gnafalina e 4,2',4'-Triidroxi-6'-metoxichalcona) e flavonóides como padrões (morina, biochanina A, narigenina e flavona, MERCK).

**Tabela 10** - Comparação entre as estruturas dos flavonóides isolados de *A. alata* (3OMe-Quercetina, Gnafalina e 4,2',4'-Triidroxi-6'-metoxichalcona) e flavonóides como padrões (morina, biochanina A, narigenina e flavona, MERCK) com relação as hidroxilas e aos substituintes

Classes de Flavonóides	Estruturas genéricas de flavonóides (1) e chalconas (2)	Total de grupos hidroxila	Posição de grupos hidroxila	Substituições na estrutura genérica
Quercetina		5	3, 5, 7, 3', 4'	-
Rutina		4	5, 7, 3', 4'	O-Rut (C-3)
Morina		5	3, 5, 7, 2', 4'	-
3-OMe- quercetina		4	5, 7, 3', 4'	O-CH <sub>3</sub> (C-3)
Chalcona		3	4', 6', 4	O-CH <sub>3</sub> (C-2')
Gnafalina		2	5, 7	O-CH <sub>3</sub> (C-3, C-8)
Biochanina-A		3	5, 7, 4'	CH <sub>3</sub> (C-4')
Narigenina		3	5, 7, 4'	-
Flavona		0	-	-

Os flavonóides testados estão sendo representados na Tabela 10 para melhor entendimento da diferença nas atividades apresentadas no Gráfico 07. Nota-se que há uma correlação muito evidente do posicionamento e quantidade de hidroxilas quando comparadas à capacidade de cada um em seqüestrar o radical livre DPPH.

Em Cook & Samman, 1996, há uma discussão quanto a este aspecto mostrando que a capacidade do flavonóide em inibir a peroxidação lipídica está ligada ao fato de um flavonóide estar mais substituído por hidroxilas (34).

Ainda em Cook & Samman (1996) é visto que se pode mostrar a relação estrutura-atividade sobre 8 aspectos quanto o potencial inibitório da lipoperoxidação lipídica (Tabela 11) (34).

(1) a presença de 3 grupamentos hidroxila, sendo um deles no carbono 3, que aumenta a atividade quando comparados com flavonóides sem esta substituição ou com outro substituinte.

(2) a dupla ligação entre carbonos 2 e 3.

(3) a carbonila no C-4 potencializa a atividade em alguns casos, principalmente quando no mesmo composto tem a presença de OH no C-3.

(4) o número de grupamentos hidroxilas está totalmente ligado ao potencial inibitório, podendo ser demonstrado pela Tabela 11.

(5) grupos hidroxilas de maior importância conforme demonstra a figura 33.

(6) a presença de grupos de açúcares pode afetar a atividade, como pode ser notado quando se compara rutina e quercetina (Gráfico 7).

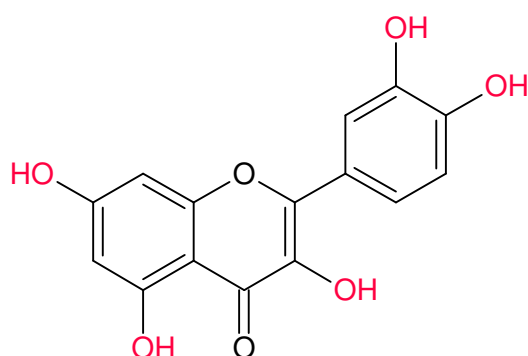
(7) redução da atividade pela presença de grupos metila, como pode ser visto comparando-se 3-OMe-quercetina e quercetina (Gráfico 7).

(8) flavonóides que possuem carbonila em C-4 junto com hidroxila em C-3 ou C-5 podem atuar por quelação de íons metálicos e assim prevenindo a formação de radicais através da reação de Fenton.

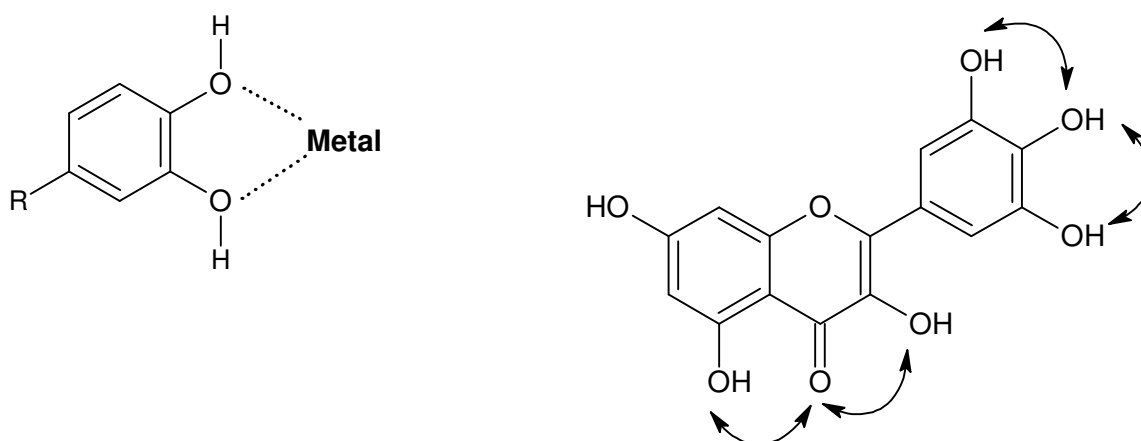


**Tabela 11** - Exemplos de flavonóides que apresentam atividade antioxidante crescente conforme o aumento do número de hidroxilas (Cook & Samman, 1996).

Flavonóides polihidroxiados	Posicionamento das hidroxilas
Miricetina	3, 5, 7, 3', 4', 5'
Quercetina	3, 5, 7, 3', 4'
Campferol	3, 5, 7, 4'
Galangina	3, 5, 7
Diosmina	3, 3'



**Figura 37.** Grupamentos hidroxilas mais importantes, selecionados em vermelho, para favorecer atividade de inibição da lipoperoxidação, demonstrados em vermelho (Cook & Samman, 1996).

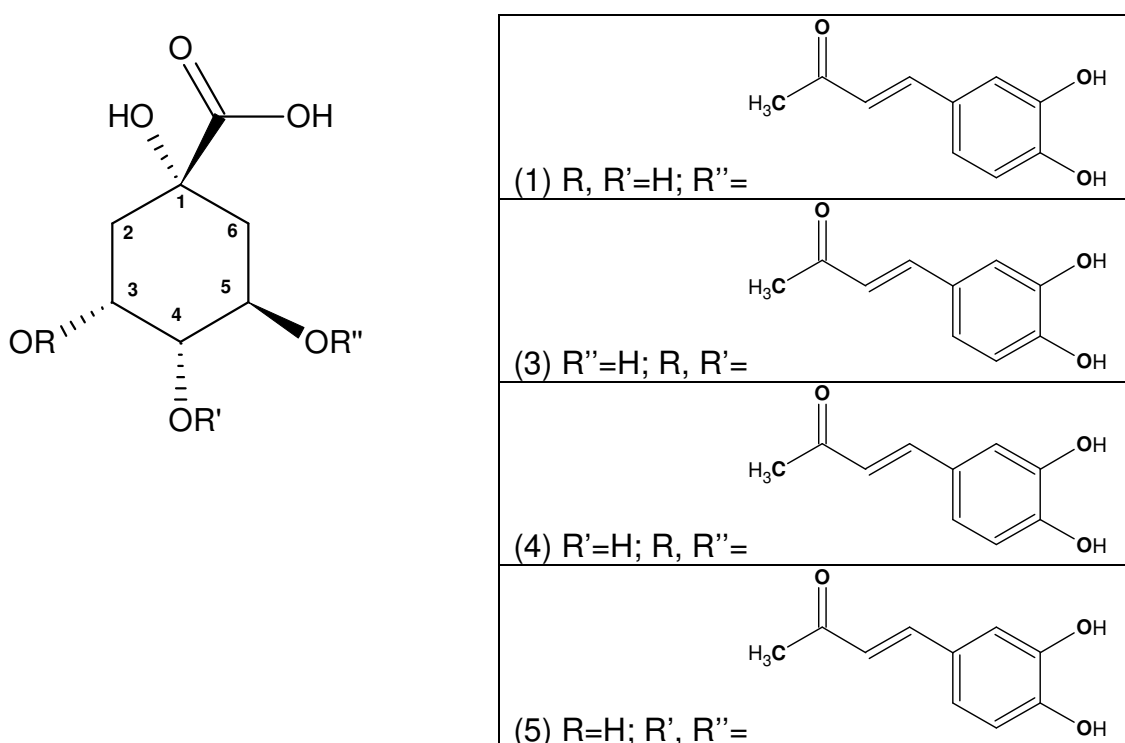


**Figura 38.** Grupamentos hidroxilas correlacionados para favorecer atividade de inibição da LPO, através da inibição da reação de Fenton, mostrando o local onde o metal pode se complexar (Cook & Samman, 1996).

### 5.3 ANÁLISE QUALI E QUANTITATIVA EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

#### 5.3.1 Análise em cromatografia líquida de alta eficiência de padrões, extratos e frações obtidos de *Achyrocline alata* e *Achyrocline satureioides*

Os extratos estudados apresentaram altas concentrações de flavonóides e seus derivados, caracterizados por UV. Nas tabelas 12 e 13, entre estes compostos, foi observado ácido 3-dicafeoil quínico e derivados (picos **3**, **4** e **6**); os picos **4** e **6** foram identificados através de comparação com padrões autênticos como ácidos 3,5 e 4,5 dicafeoil quínico, respectivamente (Figura 39).



**Figura 39.** Ácido clorogênico e derivados dissubstituídos identificados em *Achyrocline alata* e *Achyrocline satureioides* por HPLC com detector diodo acoplado ao massas em comparação com padrões.

O terceiro pico apresentou um tempo de retenção menor e por isto caracterizado por espectro de MS-MS, os fragmentos foram comparados com chaves de identificação destas classes propostas por Clifford, et al. (73, 74).

Nesta chave de identificação o fragmento  $m/z$  173 [M-2caf-H<sub>2</sub>O] - é característico de derivado substituído na posição 4, além da ausência da característica de íons de ácido 1,4-dicafeoil quínico ( $m/z$  299 e  $m/z$  203), permitiu a identificação do pico **3** como sendo ácido 3,4 dicafeoil quínico.

O pico **5** apresentou um espectro de UV semelhante para o flavonóide Quercetina. Esta combinação mostrou um íon em  $m/z$  463.0846, compatível com a fórmula química C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>O<sub>12</sub> - (463.0876).

Esta fórmula é a mesma apresentada pelo flavonóide isoquercetrina (**2**), além disto, foi observado no espectro de MS-MS (energia de colisão 15 eV) como fragmento principal o íon  $m/z$  301, compatível com a aglicona Quercetina, este fragmento sugeriu a perda de resíduos de hexila ( $m/z$  162).

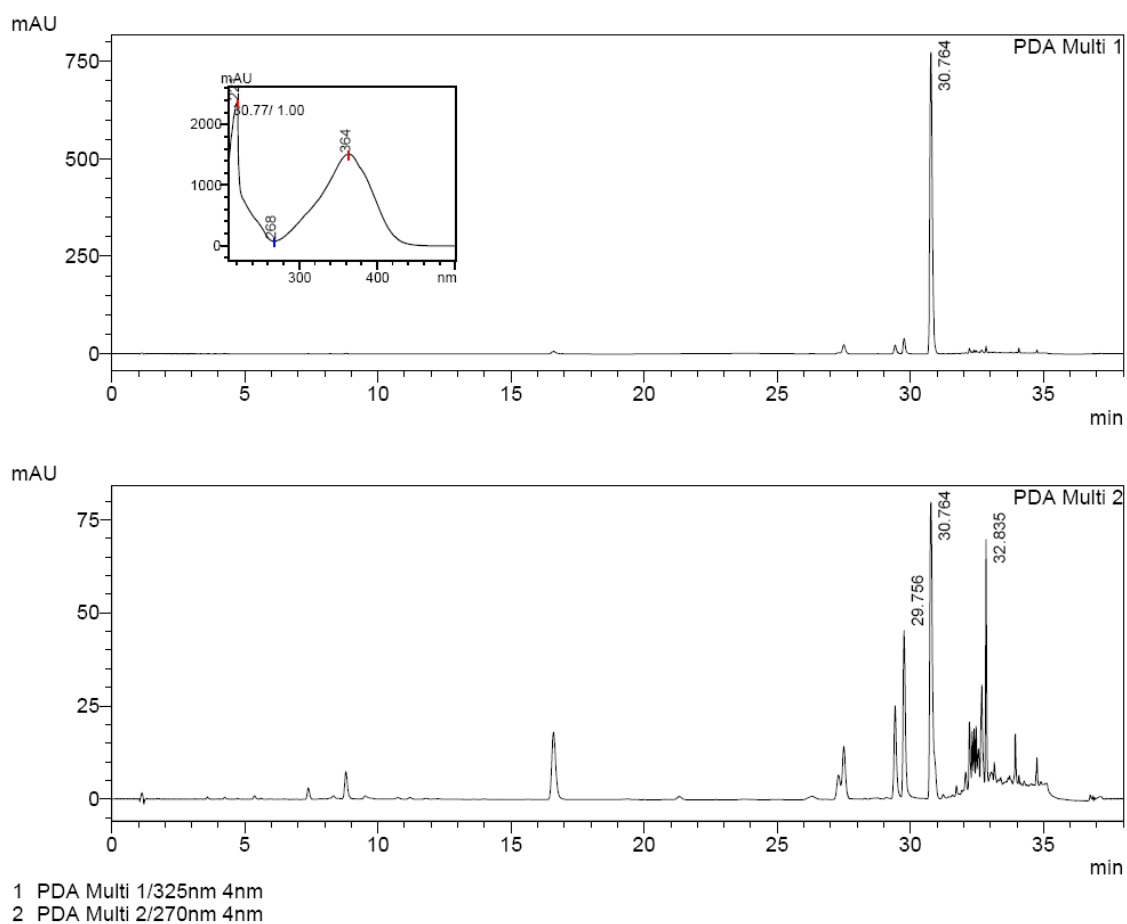
Reunindo estes dados foi possível caracterizar esta combinação provavelmente como quercetina, flavonol, derivado glicosilado ou galactosilado.

O pico **7** mostrou um espectro de UV previamente semelhante a combinação descrita, enquanto exibindo um peso molecular de  $m/z$  447.1259. Porém, no EM-EM (energia de colisão 15 eV) foi observado com fragmento principal, o íon  $m/z$  285, compatível com o flavonol caempferol. Assim, com os dados apresentados e por analogia, com a combinação previa descreveu-se a probabilidade de ser o flavonol caempferol como derivado glicosilado ou galactosilado.

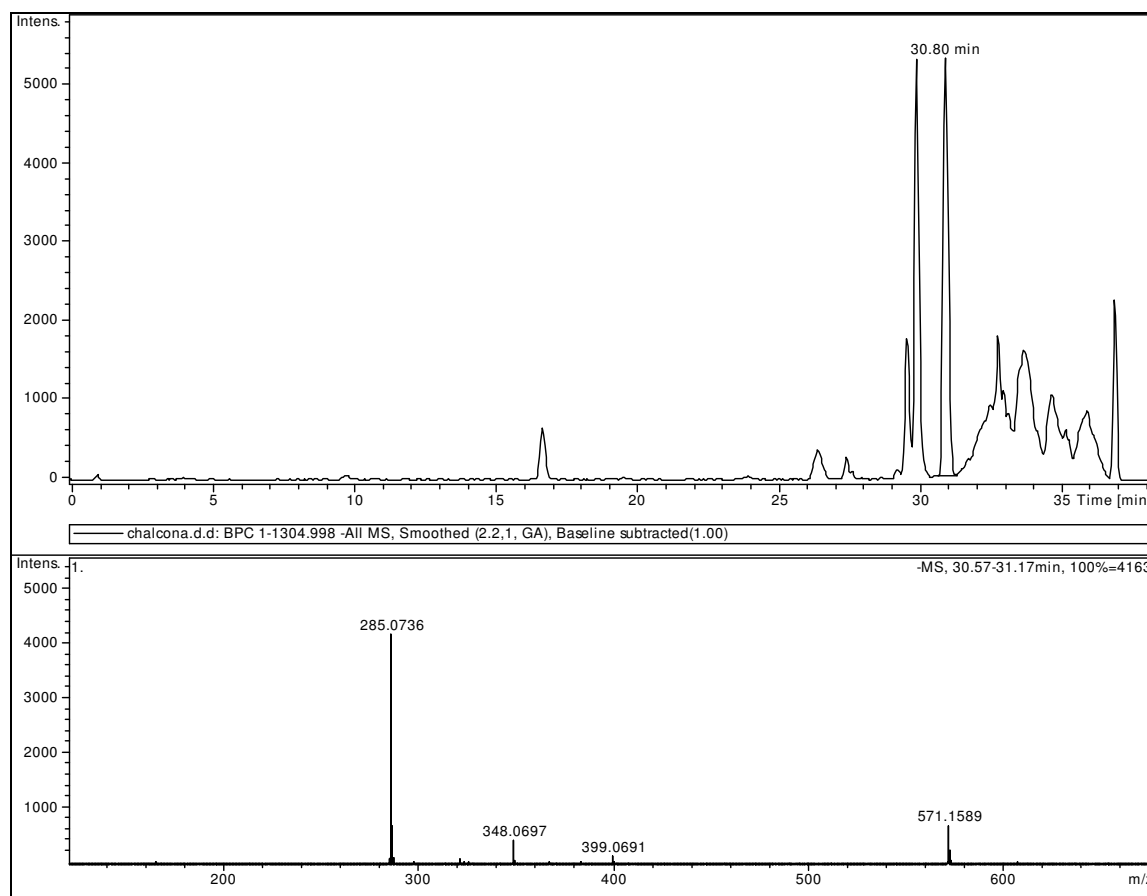
Os outros picos foram caracterizados por comparação com padrões antes de tempo de retenção, UV peso espectral e molecular em resolução alta.

**Tabela 12** - Substâncias identificadas por cromatografia líquida de alta eficiência em análise ao extrato hidrometanólico de *A. saturoioides* e *A. alata* por características espectrais e íons negativos em CLAE-DAD-ESI-EM.

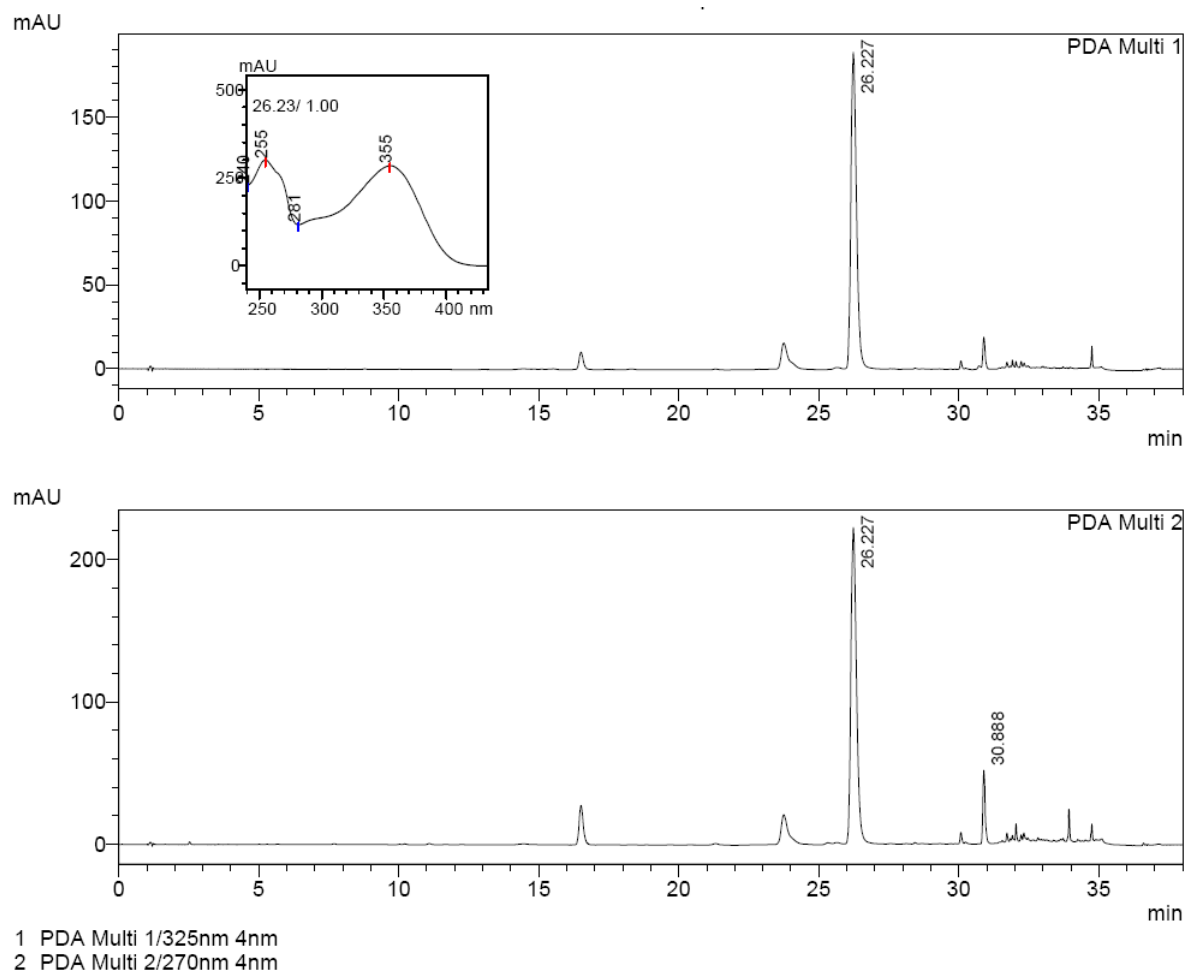
Picos	$t_R$ (min)	Compostos
<b>1</b>	4.28	Ácido clorogênico
<b>2</b>	11.98	Isoquercetina
<b>3</b>	14.60	Ácido 3,4-dicafeoil quínico
<b>4</b>	15.35	Ácido 3,5-dicafeoil quínico
<b>5</b>	16.30	Derivado da Quercetina não identificado
<b>6</b>	17.78	Ácido 4,5-dicafeoil quínico
<b>7</b>	22.53	Derivado do caempferol não identificado
<b>8</b>	23.45	Quercetina
<b>9</b>	26.23	3-O-metil-quercetina
<b>10</b>	30.77	4,2',4'-triidroxi-6'-metoxichalcona
<b>11</b>	32.32	Gnafilina



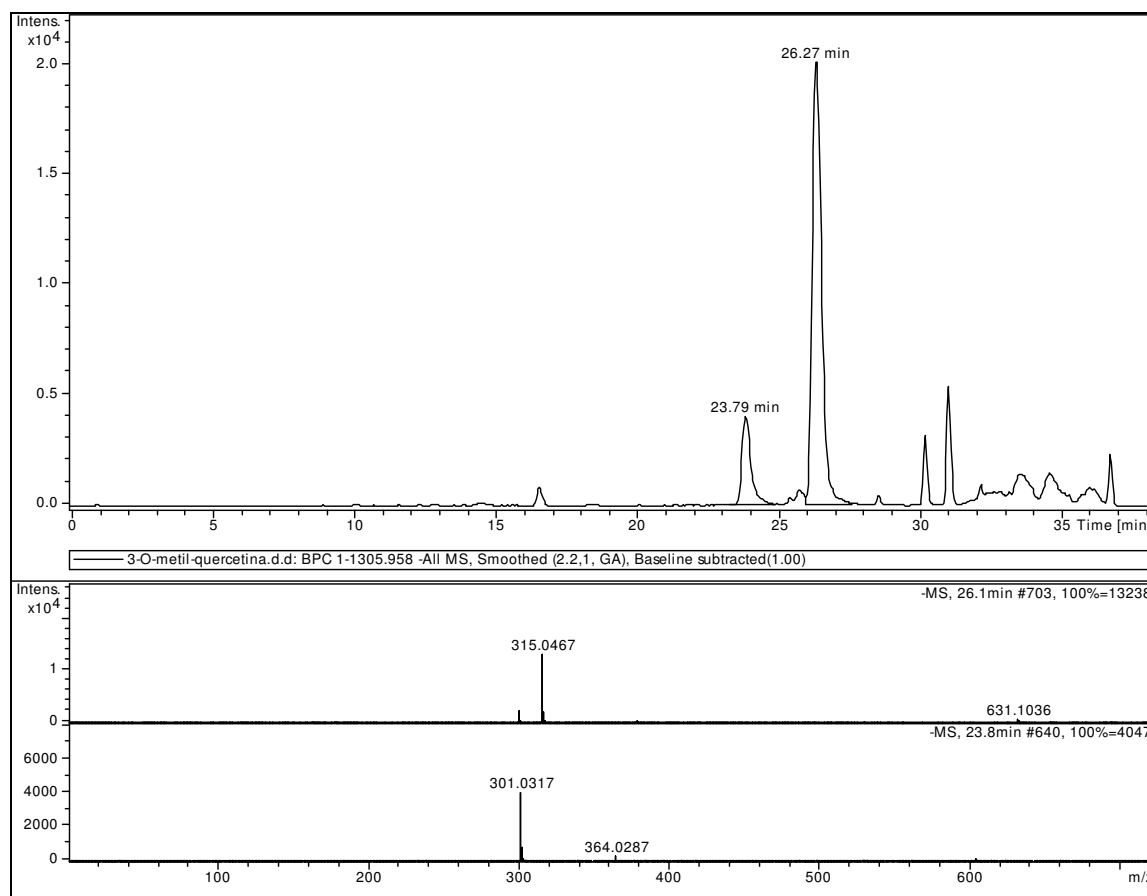
**Figura 40.** Cromatograma obtido em CLAE com detector diodo para a chalcona (4,2',4'-Triidroxi-6'-metoxichalcona) em 325 e 270 nm respectivamente, com tempo de retenção em 30.764 minutos.



**Figura 41.** Cromatograma obtido em CLAE com detector diodo para a chalcona (4,2',4'-Triidroxi-6'-metoxichalcona) em 270 nm e seu espectro de massa respectivamente.

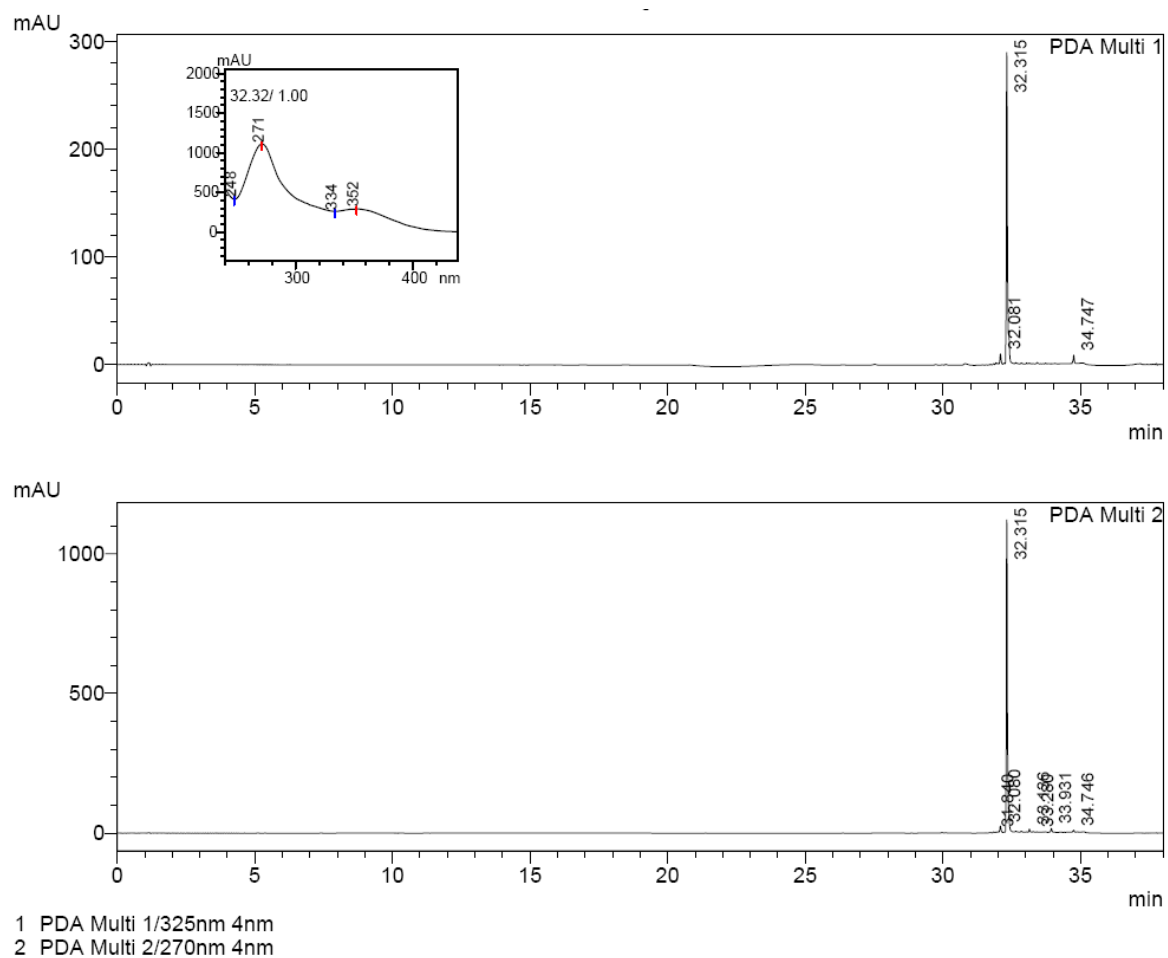


**Figura 42.** Cromatograma obtido em CLAE com detector diodo para a 3-O Mequercetina em 325 e 270 nm respectivamente, com tempo de retenção em 26.227 minutos.

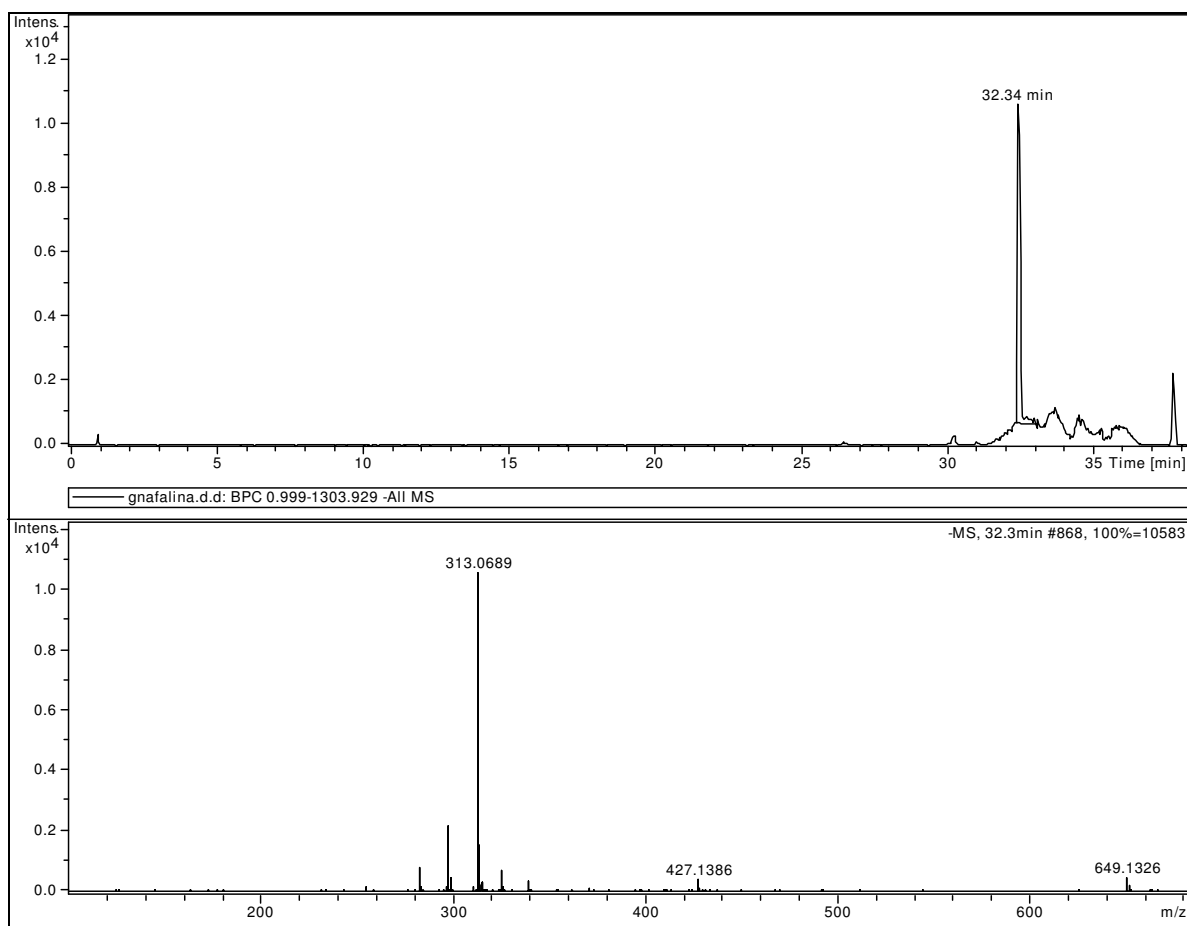


**Figura 43.** Cromatograma obtido em CLAE com detector diodo para a 3-O Me-querçetina em 270 nm e o espectro de massas respectivamente.

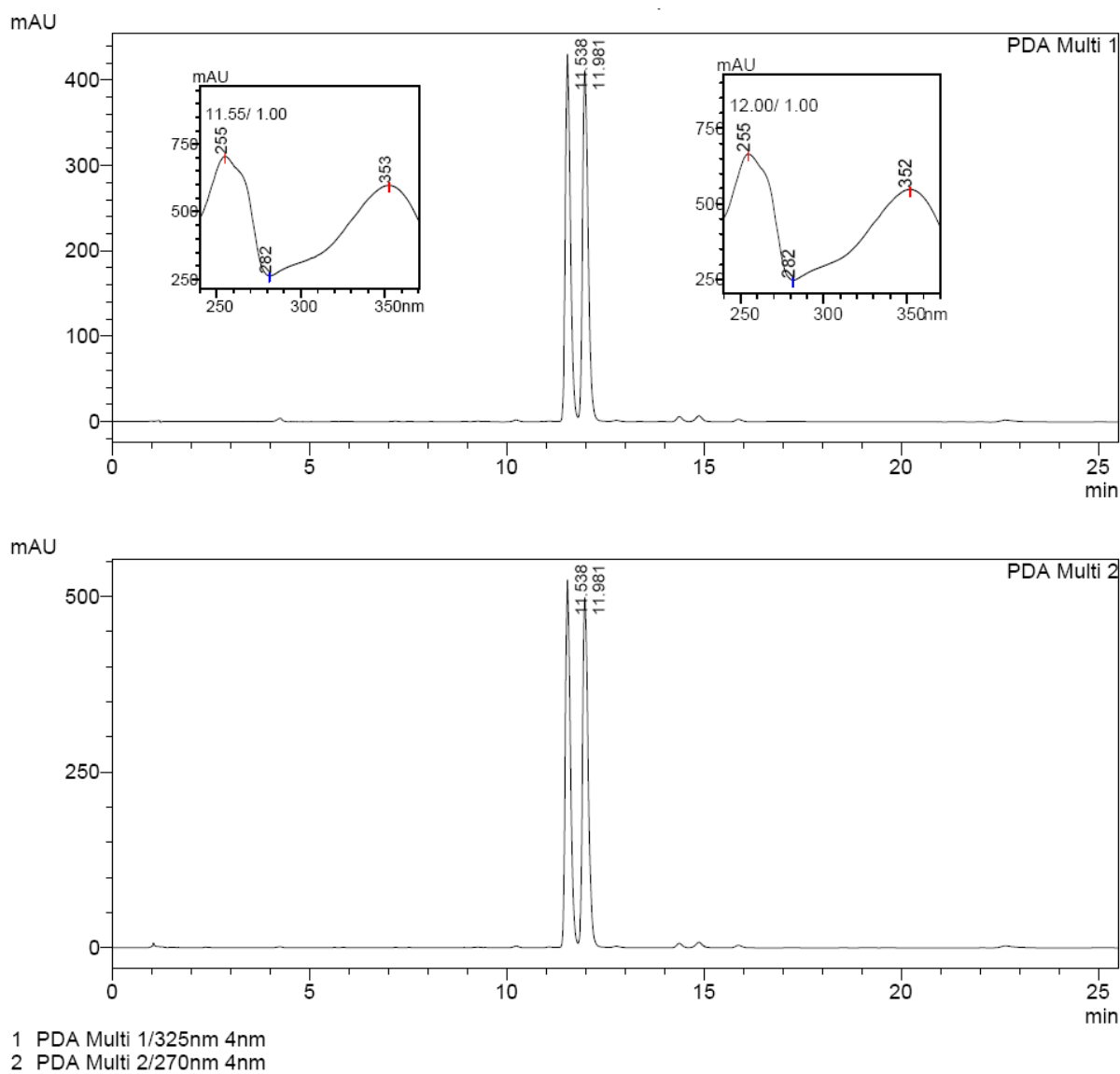




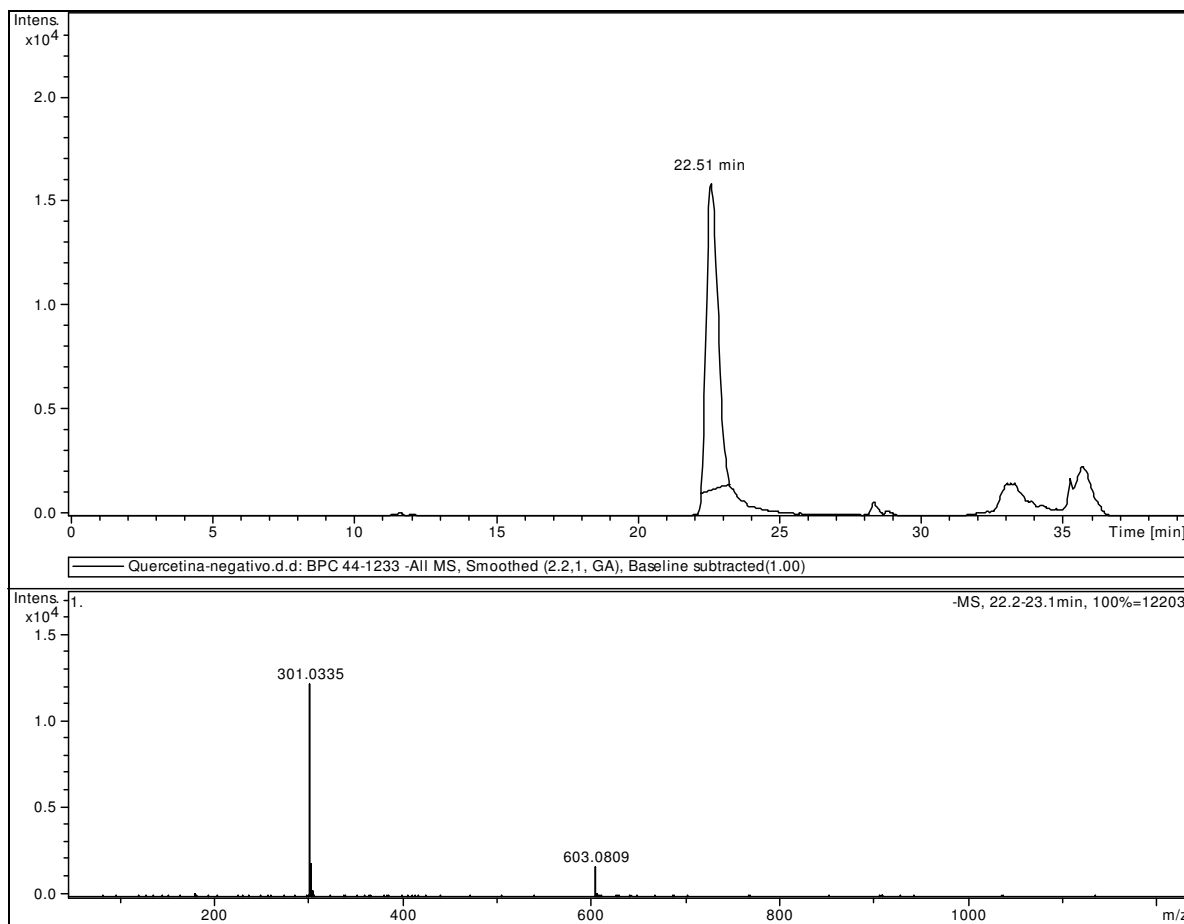
**Figura 44.** Cromatograma obtido em CLAE com detector diodo para a ginsenoside Rg1 em 325 e 270 nm respectivamente, com tempo de retenção em 32.315 minutos.



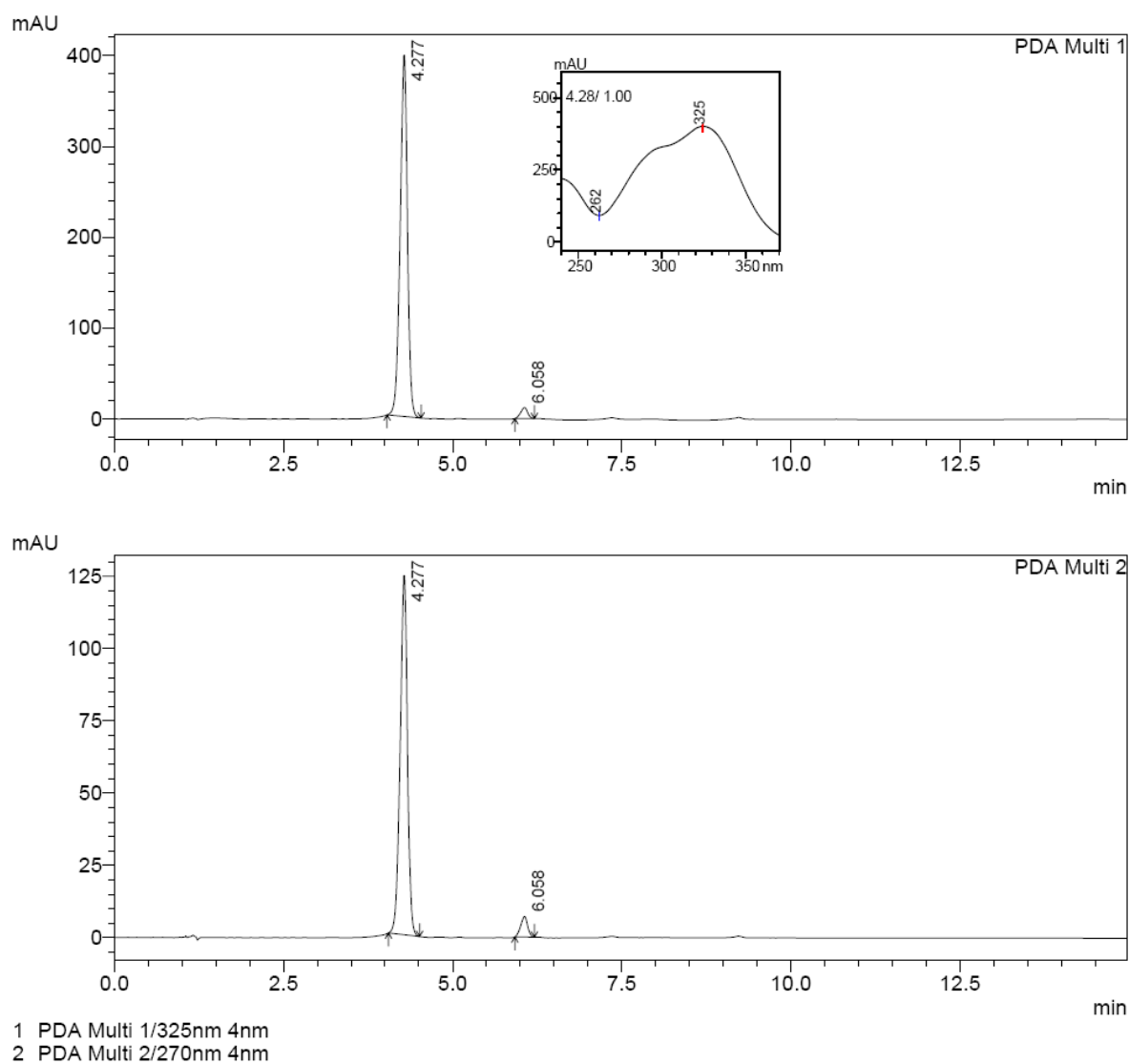
**Figura 45.** Cromatograma obtido em CLAE com detector diodo para a gnapafalina em 270 nm e espectro de massas respectivamente.



**Figura 46.** Cromatograma obtido em CLAE com detector diodo para a rutina (padrão Sigma) em 325 e 270 nm respectivamente.



**Figura 47.** Cromatograma obtido em CLAE com detector diodo para a quercetina (padrão Sigma) em 325 e 270 nm respectivamente, com tempo de retenção em 22.51 minutos.



**Figura 48.** Cromatograma obtido em CLAE com detector diodo para ácido clorogênico (padrão Sigma) em 325 e 270 nm respectivamente, com tempo de retenção em 2.277 minutos.

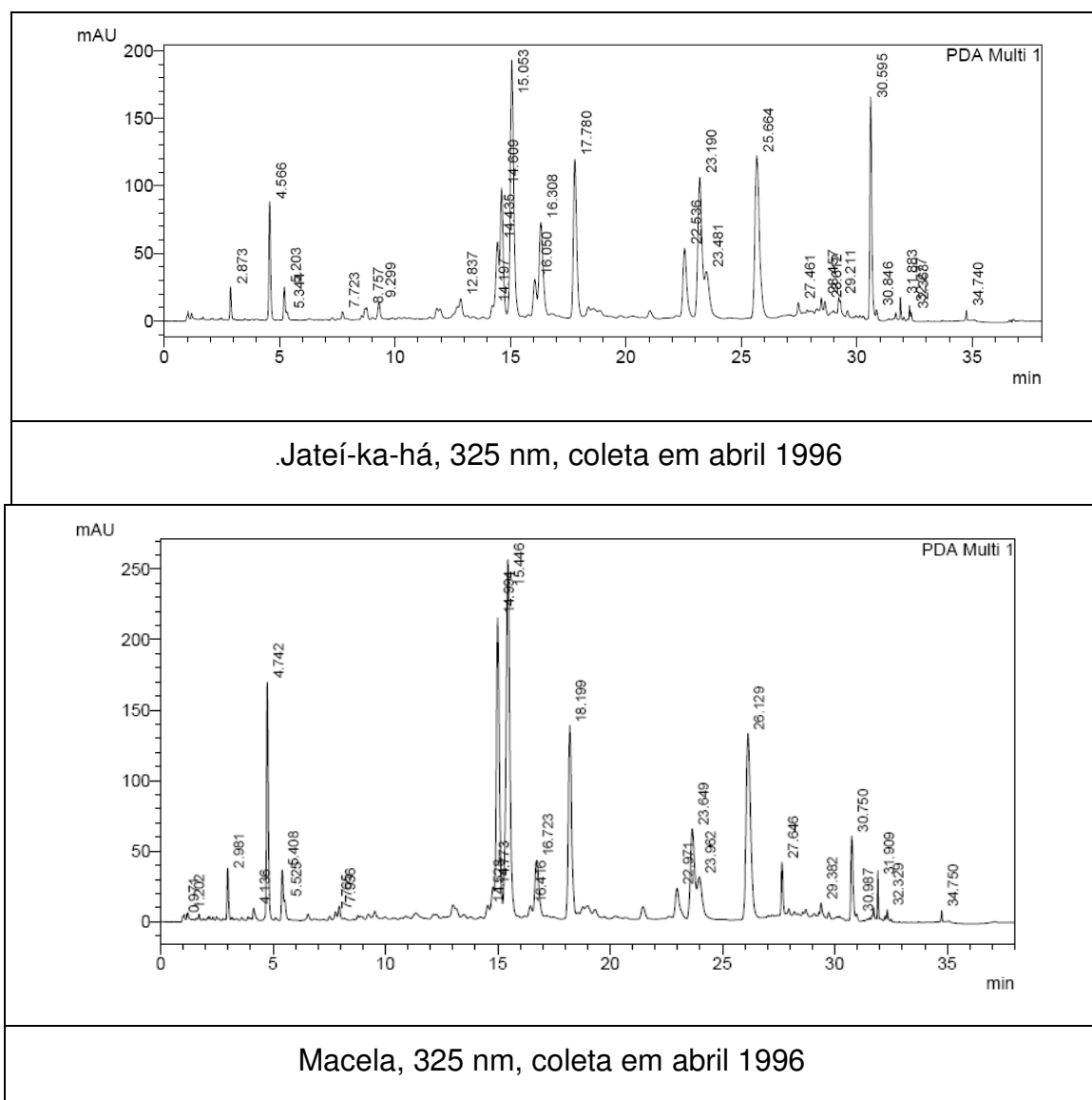
A análise em CLAE com detector de diodo revelou composição semelhante para as duas espécies (Figura 52), sem uma grande variação entre os anos diferentes de cultivo das espécies estudadas.

Esta semelhança também foi confirmada por comparação dos espectros gerada pela análise de massa, mas pode ser avaliada com esta técnica a diferença quanto a concentração das substâncias. A chalcona 4,2',4'-triidroxi-6'-metoxichalcona mostrou um acúmulo maior em *A. alata*.

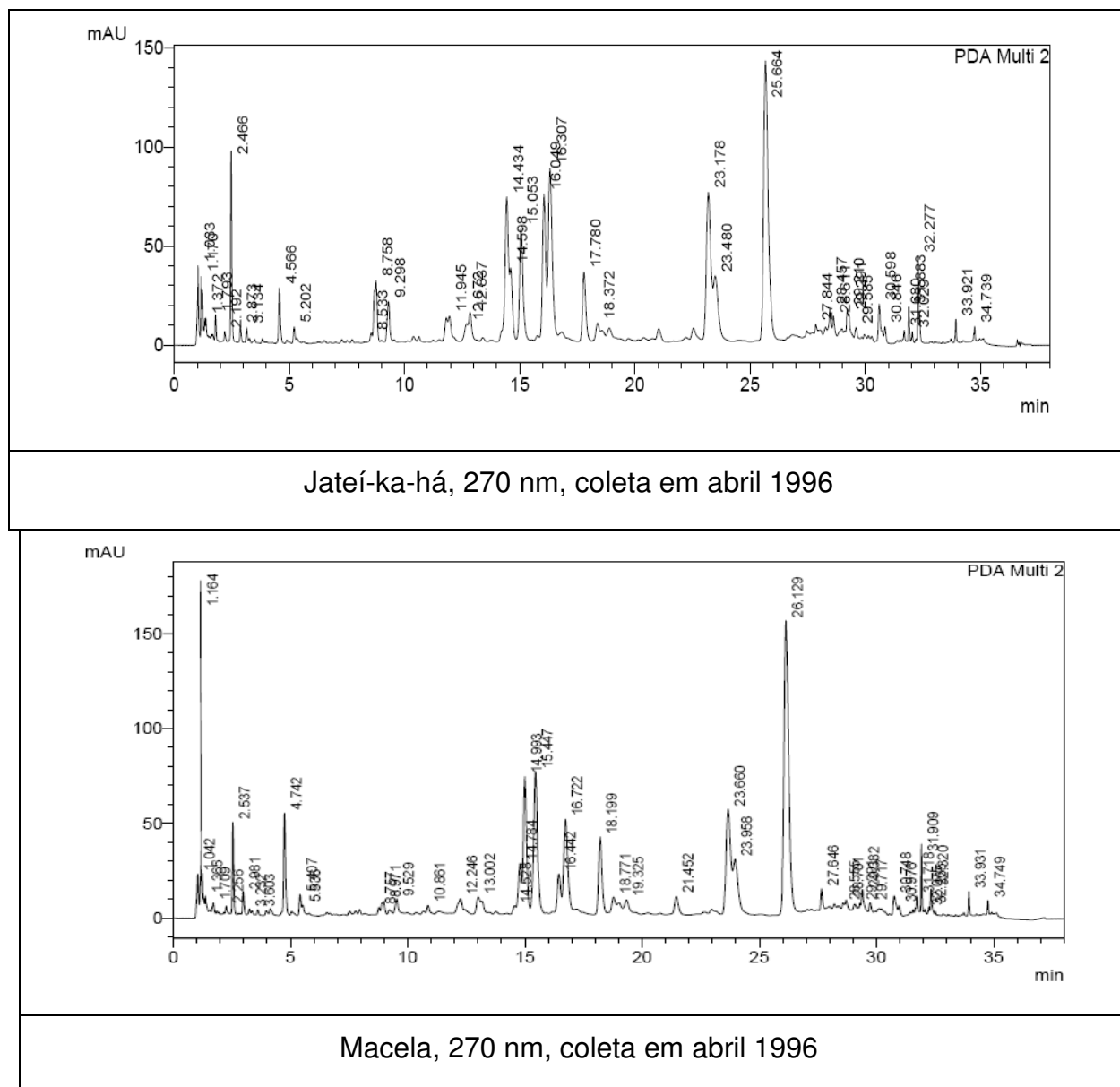
Através de análise fitoquímica habitual, esta chalcona já tinha sido isolada de *A. alata* junto com flavonóides isolados desta espécie, previamente, mas está sendo descrito pela primeira vez nestas espécies.

A determinação do conteúdo de derivados cafeoil em espécies do gênero *Achyrocline* nativas da Argentina e Uruguai foi avaliada recentemente, o que pode ser observado um perfil químico semelhante entre um ao outro (19).

De acordo com os espectros, o conteúdo principal de derivados cafeoil em espécies de *Achyrocline* poderia justificar alguns dos usos das duas espécies (*A. alata* e *A. satureioides*) na medicina tradicional de Campo Grande/MS.

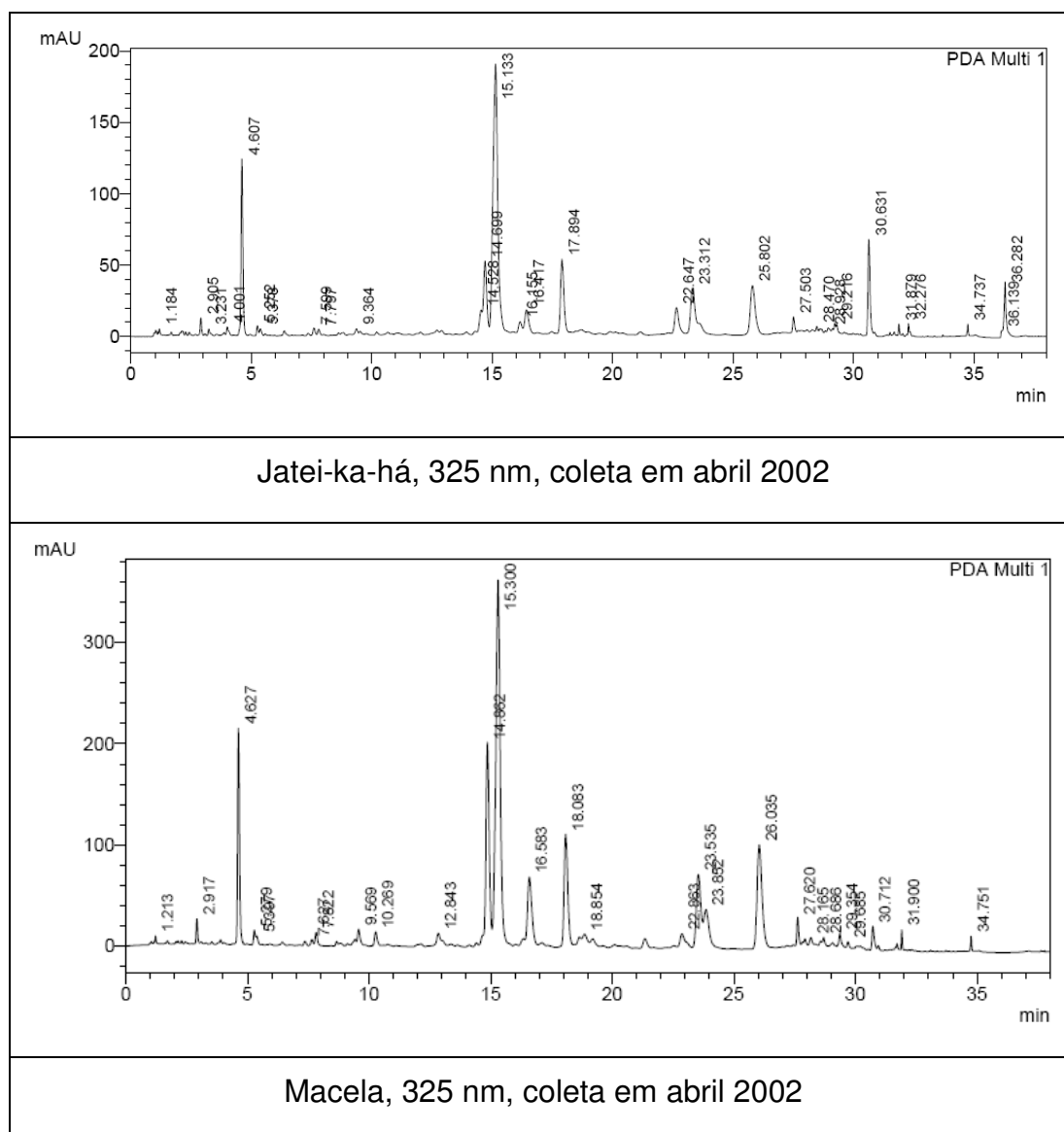


**Figura 49.** Cromatograma em CLAE com detector diodo para as amostras de *A.alata* (jateí-ka-há) e *A.satureioides* (macela) em 325 nm coletadas em 1996.

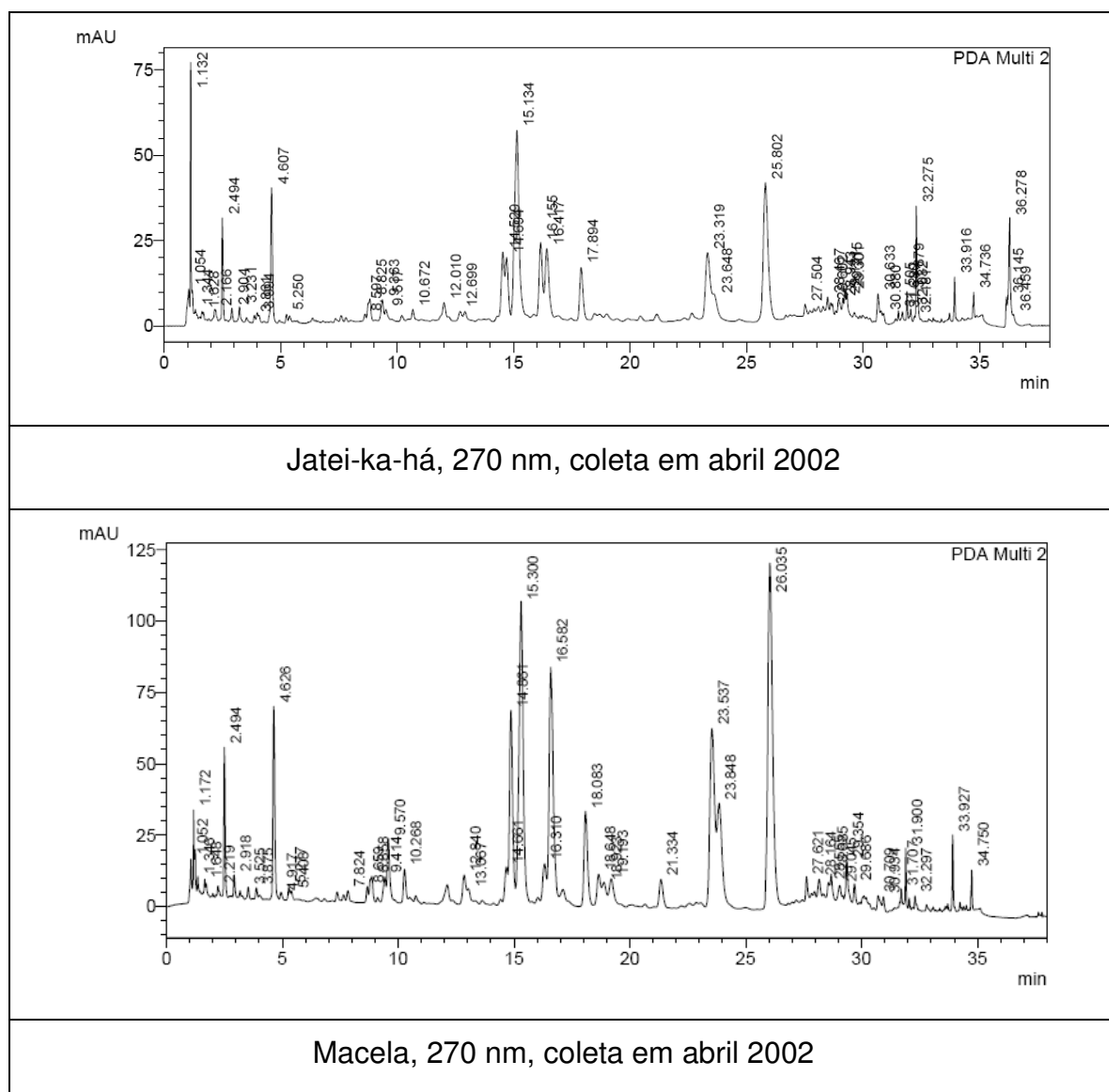


**Figura 50.** Cromatograma em CLAE com detector diodo para a amostras de *A.alata* (jateí-ka-há) e *A.satureioides* (macela) em 270 nm coletadas em 1996.



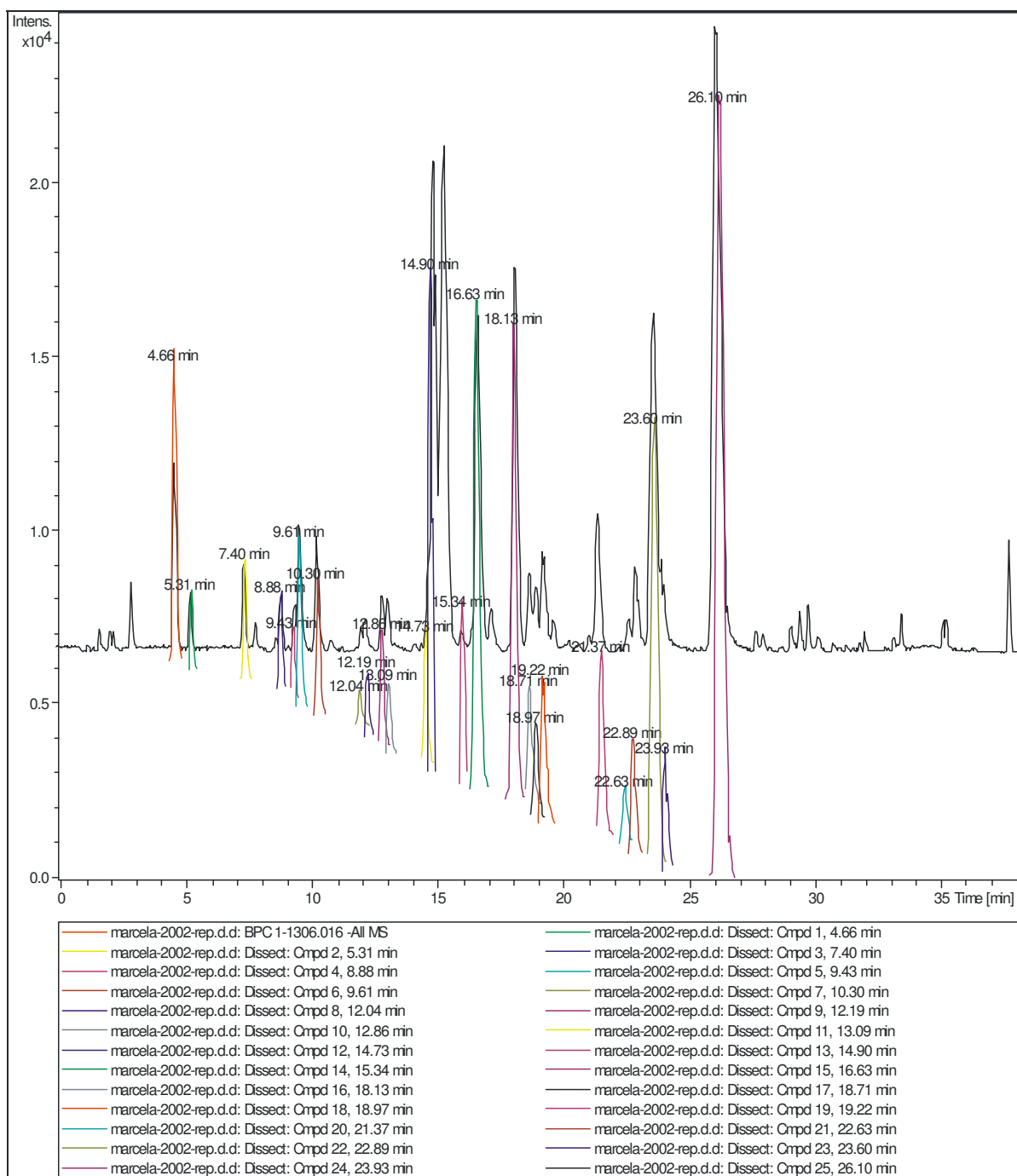


**Figura 51.** Cromatograma em CLAE com detector diodo para a amostras de *A.alata* (jatei-ka-há) e *A.saturoioides* (macela) em 325 nm coletadas em 2002.



**Figura 52.** Cromatograma em CLAE com detector diodo para as amostras de *A. alata* (jatei-ka-há) e *A. saturoioides* (macela) em 270 nm coletadas em 1996.

O método de doseamento empregado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), nas condições experimentais estabelecidas, mostrou-se linear preciso e exato, ideal para determinação dos flavonóides nos extratos estudados. Além disso, permitiu comparação de amostras coletadas em períodos diferentes, 1996 e 2002.

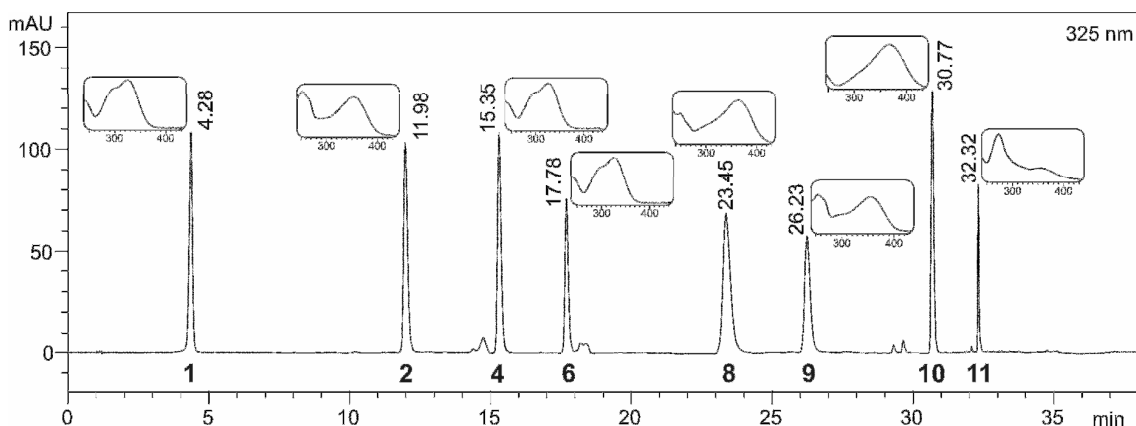


**Figura 53.** Cromatograma em CLAE de amostras de *A. saturoioides*, Macela.

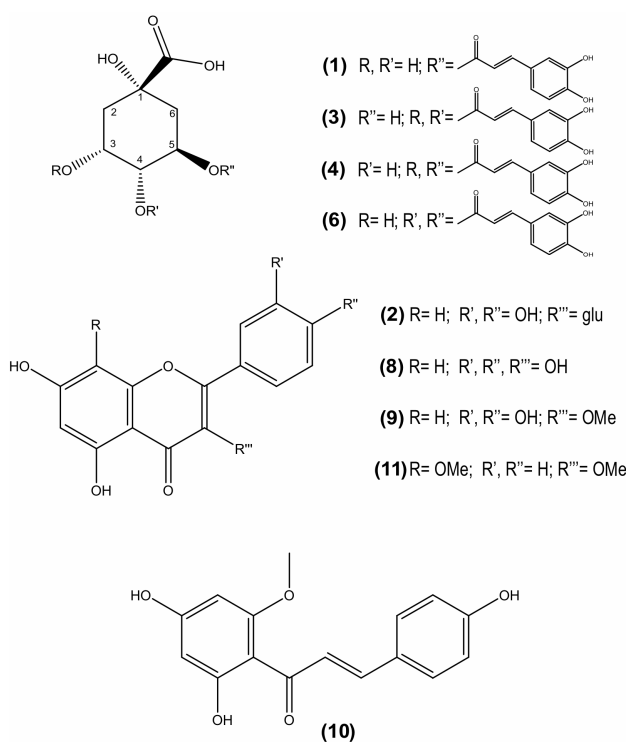
**Tabela 13** - Identificação de alguns compostos do extrato hidrometanólico de *A. alata* e *A. saturoioides* por tempo de retenção, espectro de UV e íons negativos em CLAE-DAD-ESI-EM.

Picos No.	$t_R$ (min)	Compostos	UV max (nm)	Ionização negativa MS ( $m/z$ )	Fórmula química
1	4.28	Ácido clorogênico	299, 325	353.0877 [M-H] <sup>-</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> O <sub>9</sub> <sup>-</sup>
2	11.98	Isoquercetrina	254, 267 <sup>sh</sup> , 361	463.0852 [M-H] <sup>-</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup>
3	14.60	Ácido 3,4-dicafeoil quínico	300, 325	515.1150 [M-H] <sup>-</sup>	C <sub>25</sub> H <sub>23</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup>
4	15.35	Ácido 3,5-dicafeoil quínico	299, 325	515.1150 [M-H] <sup>-</sup>	C <sub>25</sub> H <sub>23</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup>
5	16.30	Derivados da Quercetina	252, 267 <sup>sh</sup> , 364	463.0846 [M-H] <sup>-</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup>
6	17.78	Ácido 4,5-dicafeoil quínico	299, 324	515.1146 [M-H] <sup>-</sup>	C <sub>25</sub> H <sub>23</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup>
7	22.53	Derivados do campferol	229, 358	447.1259 [M-H] <sup>-</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub> <sup>-</sup>
8	23.45	Quercetina	254, 266 <sup>sh</sup> , 364	301.0327 [M-H] <sup>-</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>7</sub> <sup>-</sup>
9	26.23	3-O-metil-quercetina	255, 267 <sup>sh</sup> , 355	315.0491 [M-H] <sup>-</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub> <sup>-</sup>
10	30.77	4,2',4'-triidroxí-6'-metoxichalcona	367	285.0756 [M-H] <sup>-</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> O <sub>5</sub> <sup>-</sup>
11	32.32	Gnafilina	265, 314 <sup>m</sup>	313.0710 [M-H] <sup>-</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub> <sup>-</sup>

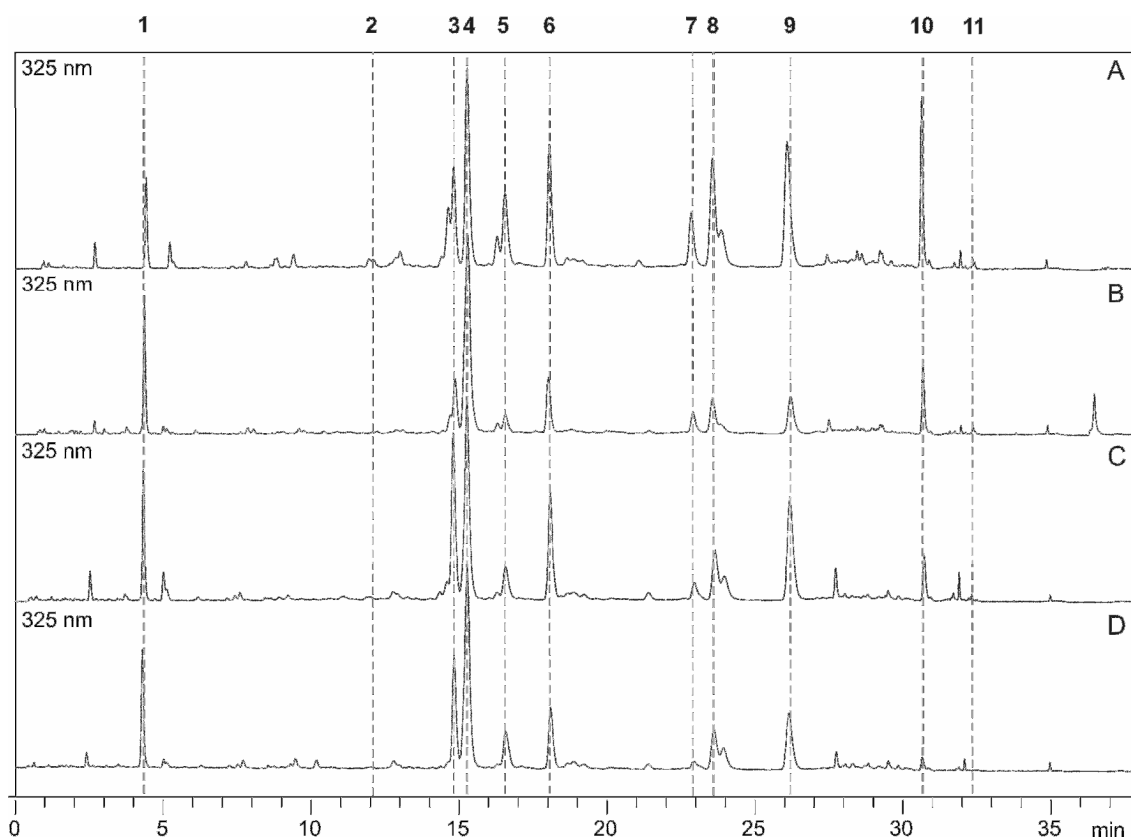
sh - shoulder, m minor peak



**Figura 54.** Cromatograma dos padrões utilizados para identificação dos compostos presentes nas duas espécies. Nos detalhes podem ser observados os espectros de UV destes compostos (250-450 nm). As estruturas destes compostos estão mostradas na Figura 56.



**Figura 55.** Compostos químicos identificados por CLAE tanto de *A. Alata* quanto de *A. saturoioides*.



**Figura 56.** Cromatogramas das espécies *A. alata* (A – coletada em 1996, B – coletada em 2002) e *A. saturoioides* (C – coletada em 1996, D – coletada em 2002). Detecção em 325 nm. Os picos cromatográficos identificados estão relatados na Tabela 13 e estruturas químicas identificadas na Figura 55.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Há diferentes modelos para avaliação da atividade seqüestradora de radicais e da atividade antioxidante, principalmente envolvendo reações químicas *in vitro*.

No presente trabalho, o modelo utilizado é composto por ensaios químicos *in vitro*, de baixo custo, simples, rápidos e com boa reprodutibilidade para a pesquisa de novos compostos antioxidantes e seqüestradores de radicais livres.

A participação de reações envolvendo a produção de radicais livres em diferentes processos patológicos e na defesa do organismo tem sido discutida, bem como o aumento de radicais em algumas organelas, devido a algum desequilíbrio, que pode ser danoso ao sistema biológico.

As metodologias mencionadas visam confirmar as atividades de substâncias naturais e extratos vegetais que freqüentemente não estão presentes *in loco* em organelas vitais de um sistema biológico, mas que, de outra forma, podem estar associadas indiretamente à defesa dessas organelas frente a um ataque por espécies ativas de oxigênio ou por qualquer outro radical produzido durante o estresse oxidativo.

Apesar dessa distinção entre os tipos de substâncias encontradas *in vivo* e *in loco* e dos metabólitos secundários testados nos modelos *in vitro*, é bastante difundido o hábito de inserção na dieta alimentar de alimentos ricos em substâncias com propriedade antioxidante, bem como sua utilização medicamentosa como forma preventiva.

Isto ocorre, pois, diferentes substâncias naturais e extratos vegetais apresentam atividade seqüestradora e/ou inibidora de radicais livres e espécies reativas de oxigênio.

Neste aspecto destacam-se as substâncias fenólicas, como por exemplo, os flavonóides, havendo evidências epidemiológicas para tal consideração.

Essa constatação poderia justificar o uso popular de *A. alata* e *A. satureioides* em diferentes doenças que envolvem processos inflamatório e infeccioso. Esta utilização já apontada em outro estudo, em função da presença de diferentes tipos de flavonóides e outras substâncias fenólicas constatadas na constituição química de ambas as espécies.

Por sua vez, o uso popular predominante de extratos aquosos (forma farmacêutica conhecida como decocto 5%), pela constatação de que em suas maiores concentrações apresentaram, dentro do modelo utilizado, atividades semelhantes em ambas as espécies, o que corrobora o fato de *Achyrocline alata* ser utilizada como sucedânea de *Achyrocline satureioides*.

Pode ser visto que maior concentração (34 µg/mL) do extrato aquoso de *Achyrocline alata*, *Achyrocline satureioides* e quercetina não apresentam diferença significativa.

Quanto a forma farmacêutica tintura (percolação), em todas as concentrações testadas, *Achyrocline alata* e *Achyrocline satureioides* apresentaram-se com capacidade de descoloração do radical DPPH inferior ao padrão quercetina.

Na fração acetato de etila, *Achyrocline alata* e *Achyrocline satureioides*, na concentração de 34 µg/mL, aliadas a quercetina não apresentam diferença significativa.

Para extrato hidrometanólico de *Achyrocline alata* e *Achyrocline satureioides*, na maior concentração (34 µg/mL), aliadas a quercetina não apresentam diferença significativa.

O modelo utilizado no presente trabalho permitiu comparar a eficiência das duas espécies vegetais quanto à inibição de DPPH, embora não tenha sido possível efetuar comparações com resultados encontrados na literatura para uma dessas espécies, uma vez que a metodologia e os padrões utilizados foram bastante distintos.

Dentro de um mesmo experimento, porém, é possível considerar que todas as preparações de droga vegetal (extratos e tinturas) obtidos de *A. alata* revelaram-



se, estatisticamente, semelhantes as preparações de *A. satureioides*, principalmente na concentração mais alta.

Nenhuma das espécies, *Achyrocline alata* ou *Achyrocline satureioides*, mostrou-se tão eficiente quanto a substância padrão (quercetina) na inibição de DPPH.

O fato das plantas apresentarem diversidade química revela a diferença na potência de uma atividade quando comparada a uma substância reconhecidamente ativa.

Apesar de ambas as espécies conterem flavonóides e estes, reconhecidamente, serem bons exemplos de princípios ativos antioxidantes, o padrão de substituição, bem como o tipo de estrutura do flavonóide presente e o teor de um extrato são variáveis que devem ser levados em consideração.

## 7 CONCLUSÃO

- Foi realizado o estudo comparativo das espécies vegetais utilizadas na medicina tradicional de Mato Grosso do Sul – *Achyrocline alata* (Kunth) DC. e *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.
- O estudo químico de *Achyrocline alata* (Kunth) DC. foi satisfatório e pode ser comparado aos dados já relatados na literatura de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.
- O potencial antioxidante e a capacidade seqüestradora de radicais livres das espécies *Achyrocline alata* (Kunth) DC. e *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. foi eficaz e abre ligação para realização de outros ensaios bem com testes farmacológicos.
- Os extratos e frações de *Achyrocline alata* (Kunth) DC. e *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. foram avaliados comparativamente por HPLC com detector de ultravioleta assim como as substâncias isoladas de *A. alata* contribuindo para proposição inicial que é o estudo comparativo.
- A Análise por HPLC-DAD-MS dos extratos hidroetanólicos de *Achyrocline alata* (Kunth) DC. e *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. comparativamente de acordo com duas coletas realizadas em diferentes datas (1992 e 2002) foi importante vindo contribuir principalmente pela identificação de uma substância inédita para as espécies como a 4,2',4'-triidroxí-6'-metoxichalcona.

## REFERÊNCIAS

- (1) Hostettmann K, Queiroz EF, Vieira OSTETTMANN, K., QUEIROZ, E.F., VIEIRA, P.C. Princípios ativos de plantas superiores. Edufscar, São Carlos-SP. 2003.
- (2) Yunes, R. A.,; Calixto, J. B. Plantas Medicinais: Sob a Ótica da Química Medicinal Moderna. Editora Argos, Rio de Janeiro-RJ. 2002.
- (3) Brasil, Agência Nacional de vigilância sanitária, Resolução RDC nº 17, de 2010.
- (4) Nunes GP, Silva MF da, Resende UM, Siqueira JM de. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2002; 13: 83-92. 2002.
- (5) Bremer K. Asteraceae – Cladistics & Classification. Timber Press, Portland, Oregon. 1994.
- (6) Souza KCB. Avaliação biológica de preparações obtidas das inflorescências de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (Marcela). Porto Alegre, Tese (Doutorado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio, Grande do Sul. 2002.
- (7) Lorenzi MH. Plantas daninhas do Brasil: nativas e exóticas. Ed. Plantarum Ltda., 3 ed. 2002.
- (8) Volpe AVT, Albiero ALM, Mourão KSM, et al. Farmacobotânica das partes aéreas de *Achyrocline alata* D.C. (Asteraceae). Acta Farmaceutica Bonaerense. 2006; 25 (4): 505-511.
- (9) Broussalis AM, Ferraro GE, Curni, A, et al. Phenolic constituents of four *Achyrocline* species. Biochemical Systematic and Ecology. 1988; 16 (4): 401-402.

- (10) Puyvelde LV, Kimpe N, Costa J, et al. Isolation of flavonoids and chalcone from *Helichrysum odoratissimum* and synthesis of helichysetin. *Journal of natural products*. 1989; 52 (3): 629-633.
- (11) Knorst MTNORST, M. T. Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato concentrado de *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC Compositae (marcela). 1991. Dissertação (Mestrado em Farmácia) Curso de Pós-graduação em Ciências farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 1991.
- (12) Mussury RM, Betoni R, Vieira MC, et al. USSURY, R.M. BETONI, R., VIEIRA, M.C., SCALON, S.D.P.Q., BARROS, S.S.U. Morfo-anatomia do eixo vegetativo aéreo de *Achyrocline alata* (Kunth) DC. (Asteraceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 2007; v.9 (2):, n.2, p. 94-101. 2007.
- (13) Siqueira, J.M., Palhano, P.C. Levantamento de plantas medicinais utilizadas no município de Amambai-MS. In *Resumo do XIII Simpósio de Plantas Mediciniais Fortaleza*. 1994.
- (14) Broussalis AM, Ferraro GE, Coussio JD. Phenolic constituents of *Achyrocline alata*. *Biochemical Systematic and Ecology*. 1993; 21 (2): p. 306.
- (15) Lopez P., Broussalis A., Rodríguez M., et al. Coussio J., Ferraro G. Análisis de muestras comerciales de "marcela" (*Achyrocline satureioides*). *Acta Farmaceutica Bonaerense*. 2007; 15: 243-249. 2007.
- (16) Retta D, Gattuso M, Gattuso S, et al. Essential oil composition of *Achyrocline flaccida* (Weinm) DC. (Asteraceae) from different locations of Argentina. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2009; 36: 877-881.
- (17) Sagawa T, Takaishi Y, Fujimoto Y, et al. Cyclobutane dimers from the Colombian medicinal plant *Achyrocline bogotensis*. *Journal of Natural Products*. 2005; v. 68: 502-505.

- (18) Ferraro G, Norbedo C, Coussio JD. Polyphenols from *Achyrocline satureioides*. *Phytochemistry*. 1981; 20 (8): 2053-2054.
- (19) Ferraro G, Anesini C, Ouviaña A, et al. Total phenolic content and antioxidant activity of extracts of *Achyrocline satureioides* flowers from different zones in Argentina. *Latin American Journal of Pharmacy*. 2008; 27 (4): 626-628.
- (20) Desmachelier C, Coussio J, Ciccía G. Antioxidant and free radical scavenging effects in extracts of medicinal herb *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (marcela). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1998; 31: 1163-1170.
- (21) Sonaglio ONAGLIO, D., Padronização de extrato hidroalcolico das sumidades floridas de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., Compositae (marcela). MSc Thesis: Curso de Pós- Graduação em Farmácia da UFRGS, Porto Alegre, Brazil. 1987.
- (22) SIMÕES, C. M., SCHENKEL, E. P., BAUER, L., and LANGELOH, A., Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Compositae. *Journal Ethnopharmacology*. v. 22, p. 281-293. 1998.
- (23) Kadarian C, Broussalis AM, Miño ADARIAN, C., BROUSSALIS, A. M., MIÑO, J, et al., LOPES, P., GORZALCZANY, S., FERRARO, G., ACEVEDO, C. Hepatoprotective activity of *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC. *Pharmacological Research*. 2002; v. 45 (1), n. 1,; p. 57-60. 2002.
- (24) Hnatyszyn O, Moscatelli V, Rondina R, et al. Flavonoids from *Achyrocline satureioides* with relaxant effects on the smooth muscle of Guinea pig *corpus cavernosum*. *Phytomedicine*. 2004; 11: 366-369.
- (25) Rivera F, Gervaz E, Sere C, et al. Toxicological studies of the aqueous extract from *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (Marcela). *Journal of Ethnopharmacology*. 2004; 95: 359-362.

- (26) Bettega JMR, Teixeira H, Bassani VL, et al. Evaluation of the antiherpetic activity of standardized extracts of *Achyrocline satureioides*. *Phytotherapy Research*. 2004; 18: 819-823.
- (27) Morquio AORQUIO, A, .; RIVERA-MEGRET, F, .; DajasAJAS, F. Photoprotection by tropical application of *Achyrocline satureioides* ('Marcela'). *Phytotherapy Research*. 2005; v. 19:, p. 486-490. 2005.
- (28) Schwingel L, Fasolo D, Holzschuh M, et al. Association of 3-O-methylquercetin with  $\beta$ -cyclodextrin: complex preparation, characterization and ex vivo skin permeation studies. *Journal Included Phenomen Macrocyclic Chemistry*. 2008; 62: 149-159.
- (29) Fachinetto JM, Bagatini MD, Durigon J, Silva ACF, Tedesco S.B. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2007; 17(1): 49-54.
- (30) Chiari ME, Joray MB, Ruiz G, et al. Tyrosinase inhibitory activity of native plants from central Argentina: isolation of an active principle from *Lhitrea molleoides*. *Food Chemistry*. 2010; 120: 10-14.
- (31) Brandelli LC, Giornani, RB, De Carli GA, et al. Indigenous traditional medicine: *in vitro* anti-giardial activity of plants used in the treatment of diahea. *Parasitology Research*. 2009; 104: 1345-1349.
- (32) Duarte AP, Silva AC, Deuber R. Plantas infestantes em lavouras de milho safrinha, sob diferentes manejos, no médio Paranapanema. *Planta Daninha*. 2007; 25 (2): 285-291.
- (33) Bouchet N, Barrier L, Fauconneau B. Radical scavenging activity and antioxidant properties of tannins from *Guiera senegalensis* (Combretaceae). *Phytotherapy Research*. 1998; 12: 159-162.
- (34) Cook NC, Samman S. Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutritional Biochemistry*. 1996; 7: 66-76.

- (35) Pathak D, Pathak K, Singla AK. Flavonoids as medicinal agents – recent advances. *Fitoterapia*. 1991; 62 (5): 371-389.
- (36) Harbone JB, Willians CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 2000; 55: 481-504.
- (37) Ng TB, Liu F, Wang WT. Antioxidative activity of natural products from plants. *Life science*. 2000; 66: 709-723.
- (38) Souza KCB, Bassani VL, Schapoval EES. LC determination of flavonoids: separation of quercetin, luteolin and 3-O-methylquercetin in *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. preparations. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2002; 28: 771-777.
- (39) Souza KCB, Bassani VL, Schapoval EES. Influence of excipients and technological process on anti-inflammatory activity of quercetin and *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. extracts by oral route. *Phytomedicine*. 2007; 14: 102-108.
- (40) Peterson J, Dwyer J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research*. 1998; 18 (12): 1995-2018.
- (41) Ondina LD, Modesto MD, Ruben GN, et al. Essential oils of *Achyrocline satureioides*, *Achyrocline alata*, and *Achyrocline tomentosa*. *Planta Medica*. 1999; 65 (2): 184-186.
- (42) Tapiero H, APIERO, H., Tew KD, Nguyem BAGEW, K. D., NGUYEM BA, G., et al., MATHE, G. Polyfenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomedical Pharmacotherapy*. 2002; v. 56:, p. 200-207. 2002.
- (43) Simões CM, Schenkel EP, Gosmann G, et al. IMÕES, C. M., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G.; de MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. UFRGS ed. 5ª ed. 2003.

- (44) Gugliucci A, Menini T. Three different pathways for human LDL oxidation are inhibited in vitro by water extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides*. *Life Sciences*. 2002; 71: 693-705.
- (45) Norbedo C, Ferraro C, Ferraro G, et al. Flavonoids from *Achyrocline flaccida*. *Phytochemistry*. 1984; 23 (11): 2698-2700.
- (46) Guerra MP, Nodari RO. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/ Editora da UFSC, Cap. 1, 2004: 13-26.
- (47) Polyakov NE, Kruppa AI, Leshina TV, et al. Carotenoids as antioxidants: spin trapping EPR and optical study. *Free radical Biology and Medicine*. v. 31, n. 1. 2001.
- (48) Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica do Brasil*. 1997; 43 (1): 61-68.
- (49) Kubo I, Masuoka N, Ha TJ, et al. Antioxidant activity anacardic acids. *Food Chemistry*. 2006; 99: 555–562.
- (50) Solomons G, OLOMONS, G & FryhleRYHLE, R. *Química Orgânica*. 8. ed, V.1 e 2. São Paulo: LTC. 2005.
- (51) Carbonari KA. Avaliação do potencial antioxidante (In vitro e In vivo) e antiinflamatório de *Ouratea parviflora*, *Polymnia sonchifolia* e *Marlierea obscura*. Dissertação de Mestrado, UFSC, Florianópolis, 2005.
- (52) Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymology*. 1990; 186: 1-85.



- (53) Cavin A, Hostettmann K, Dyatmyko W, et al. Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinospora crispa*. *Planta medica*. 1998; 64: 393-396.
- (54) Cavin A, Potterat O, Wolfender J-L, et al. Use of on-flow LC/1H NMR for the study of an antioxidant fraction from *Orophea enneandra* and isolation of a polyacetylene, lignans, and a tocopherol derivative. *Journal of Natural Products*. 1998; 61: 1497-1501.
- (55) Braca A, Sortino C, Politi M, Morelli I, Mendez J. Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2002; 79: 379-381.
- (56) Lionço MI, De Souza TP, Petrovick PR. Avaliação cromatográfica de polifenóis presentes nas partes morfológicas *Phyllanthus niruri*. *Caderno de Farmácia*. 2001; 17 (2): 117–120.
- (57) Devlin TM. *Manual de bioquímica com correlações clínicas*. Tradução de Yara M. Michelacci. São Paulo: Edgard Blucher, 2000.
- (58) Lewis E. Should we be concerned about herbal remedies. *Journal of ethnopharmacology*. 2001; 75: 141-164.
- (59) Joyeux M, Lobstein A, Anton R, et al. Comparative antilipoperoxidant, antinecrotic and scavenging properties of terpenes and biflavones from Ginkgo and some flavonoids. *Planta Medica*. 1995; 61: 126-129.
- (60) Alamed J, Chaiyasit W, McClements DJ, et al. Relationships between Free Radical Scavenging and Antioxidant Activity in Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009.
- (61) Mates JM, Pérez-Gómez C, Castro IN. Antioxidant enzymes and human disease. *Clinical Biochemistry*. 1999; 32 (8): p.595-603.

- (62) Araújo EL, Randau KP., Sena-Filho JG, et al. *Acanthospermum hispidum* DC (Asteraceae): perspectives for a phytotherapeutic product. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2008; 18: 777-784.
- (63) Borse BB, Kumar HV, Rao JM. Radical Scavenging conserves from unused fresh green tea leaves. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2007; 55: 1750-1754.
- (64) Henriques NM, Navalho JC, Varela JC, et al. *Dunaliella*: uma fonte natural de beta-caroteno com potencialidades de aproveitamento biotecnológico. *Boletim de Biotecnologia*. 1998; 61.
- (65) Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant as prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free radical Biology and Medicine*. 1997; 22 (5): 749-760.
- (66) Ignatov S, Shishniashvili D, Ge B, et al. Amperometric biosensor based on a functionalized gold electrode for the detection of antioxidants. *Biosensors & Bioelectronics*. 2002; 17: 191-199.
- (67) *Farmacopéia brasileira 4ª ed.*, São Paulo: Atheneu, 1988. pt. 1.
- (68) Leal PF, Queiroga CL, Rodrigues MVN, et al. Research Article Global Yields, Chemical Compositions, and Antioxidant activities of extracts from *Achyrocline alata* and *Achyrocline satureioides*. *Pharmacognosy Magazine*. 2006; 2 (7).
- (69) Agrawal PK, Bansal MC. *Carbon-13 NMR of Flavonoids*. New York, Ed. Elsevier. 1989.
- (70) Wagner H, Blat S. *Plant Drug Analysis – A thin chromatography atlas*. 2<sup>nd</sup> ed. Berlin: Springer, 1996. p. 48-49.
- (71) Markhan KR. *Techniques of flavonoid identification*. Academic Press. 1982.

- (72) Zhao H, Dong J, Lu J, et al. Effects of Extraction Solvent Mixtures on Antioxidant Activity Evaluation and Their Extraction Capacity and Selectivity for Free Phenolic Compounds in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006; 54: 7277–7286.
- (73) Clifford, M. N.; Johnston, K. L.; Knight, S.; Kuhnert, N. The cinnamoyl–amino acid conjugates of green robusta coffee beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003; 51.
- (74) Clifford MN, Knight S, Kuhnert N. Discriminating between the Six Isomers of Dicafeoylquinic Acid by LC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 53: 3821-3832.

## APÊNDICE A

## APÊNDICE B