



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA DROGA VEGETAL, ESTUDO  
FITOQUÍMICO E FARMACOLÓGICO DE *CNIDOSCOLUS QUERCIFOLIUS* POHL  
(EUPHORBIACEAE)**

**ANNA FLÁVIA COSTA FERNANDES**

**CAMPINA GRANDE-PB**

**2019**

**ANNA FLÁVIA COSTA FERNANDES**

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA DROGA VEGETAL, ESTUDO  
FITOQUÍMICO E FARMACOLÓGICO DE *CNIDOSCOLUS QUERCIFOLIUS* POHL  
(EUPHORBIACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito para obtenção do título de mestre em ciências farmacêuticas.

**Área de concentração:** Fármacos e medicamentos

**Orientador:** Prof. Dr. Harley da Silva Alves

CAMPINA GRANDE-PB

2019

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

F363c Fernandes, Anna Flávia Costa.  
Caracterização físico-química da droga vegetal, estudo fitoquímico e farmacológico de *Cnidoscolus quercifolius* Pohl (Euphorbiaceae) [manuscrito] / Anna Flávia Costa Fernandes. - 2019.  
138 p. : il. colorido.  
Digitado.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2019.  
"Orientação : Prof. Dr. Harley da Silva Alves, Coordenação do Curso de Farmácia - CCBS."  
1. Faveleira. 2. Fitoterápicos. 3. Porfirinas. 4. Atividades farmacológicas. I. Título

21. ed. CDD 615.321

**ANNA FLÁVIA COSTA FERNANDES**

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA DROGA VEGETAL, ESTUDO  
FITOQUÍMICO E FARMACOLÓGICO DE *CNIDOSCOLUS QUERCIFOLIUS* POHL  
(EUPHORBIACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito para obtenção do título de mestre em ciências farmacêuticas.

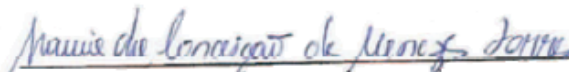
**Área de concentração:** Fármacos e medicamentos

Aprovada em: 14 / 03 / 2019.

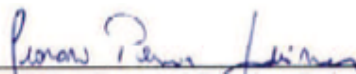
**BANCA EXAMINADORA**



Prof. Dr. Harley da Silva Alves (Orientador)  
Universidade Estadual da Paraíba



Prof. Dr. Maria da Conceição de Menezes Torres  
Universidade Estadual da Paraíba



Prof. Dr. Geovani Pereira Guimarães

Hospital Universitário Alcides Carneiro (HUAC-UFCG)

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo

A minha família por todo apoio e ajuda, em especial a Thiago pela enorme compreensão e grande ajuda em momentos complicados e que até hoje mesmo sem entender muito da minha pesquisa sempre ouviu todos os meus questionamentos.

Ao meu orientador, prof. Harley, por todos os ensinamentos, tantos os acadêmicos quanto os que eu levarei comigo para vida. Por sua perseverança e ajuda na concretização de mais esse objetivo mesmos diante dos percalços encontrados e por sempre acreditar que podemos fazer mais e aprender mais.

Aos componentes do Laboratório de Fitoquímica, em especial a prof. Ivana, George, Joanda, Sabrina, meus pibic's e hoje mestrandos Geovana e Antônio por toda ajuda e que nos oferecíamos. Aos colegas que estão e que já passaram por este programa de pós-graduação, não só os da minha turma, mas a Luanne, Paulo César, Wilma e Cleildo por toda ajuda e momentos de descontração que tínhamos ao nos encontrar.

Aos meus colegas de trabalho da Prefeitura Municipal de Picuí e da Prefeitura Municipal de Remígio pela compreensão nesse último mês relativamente ausente.

A este programa, aos professores e funcionários que o compõem, faço um agradecimento especial pela disponibilidade e grande auxílio (grande mesmo) que me foi fornecido e espero cumprir com os resultados esperados.

À grande ajuda recebida pelos funcionários da UFPB: Vicente, Evandro, Nonato, Alexsandro, por sempre ter sido bem recebida e orientada.

Aos professores examinadores da minha qualificação, prof. Ricardo Olimpio e prof. Ana Cláudia, pela disponibilidade que tiveram no processo de ficarmos até a noite no dia da apresentação, tudo em prol da ciência.

Aos professores convidados para banca, que se disponibilizaram dentro as condições encontradas para participar desta avaliação.

E a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho, meu sincero Muito Obrigada!

*“Resiliência é a capacidade de se recuperar de situações de crises e aprender com ela. É ter a mente flexível e o pensamento otimista, com metas claras e a certeza que tudo se supera.”*

*(Autor desconhecido)*

## RESUMO

A riqueza derivada do conhecimento sobre plantas medicinais que resulta na produção de fitoterápicos ou de compostos oriundos do metabolismo secundário com atividade farmacológica, ressurge como uma opção para as limitações encontradas na terapia atual. Porém, esses novos produtos não estão isentos de testes que comprovem sua indicação, eficácia, qualidade e segurança. *Cnidocolus quercifolius* (Faveleira) é uma planta característica do bioma Caatinga, amplamente difundida na medicina popular por suas propriedades anti-inflamatória, analgésica, antibiótica e diurética. Esta pesquisa teve por objetivo caracterizar por ensaios físico-químicos a droga vegetal oriunda das partes aéreas, bem como promover um estudo fitoquímico com a pesquisa de metabolitos secundários, ensaios de teor, isolamento e identificação de compostos presentes, além de avaliar os produtos obtidos de *C. quercifolius* frente a atividades farmacológicas. A caracterização físico-química foi realizada por métodos analíticos como a termogravimetria (TG), o infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e a microscopia eletrônica de varredura acoplada a espectroscopia de energia dispersiva; a fitoquímica buscou encontrar os principais metabolitos secundários e quantificar os compostos fenólicos, flavonoides e taninos condensados frente a padrões de referência. Os compostos foram isolados usando técnicas cromatográficas e espectroscópicas como infravermelho (IV), massa (MS) e ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . As atividades farmacológicas avaliadas foram: antimicrobiana, hemolítica, anti-*leishmania* e antiproliferativa. O perfil térmico revelou a ocorrência de três eventos de perda de massa, o FTIR a presença de grupos funcionais como hidroxilas, carbonilas, grupamento cianeto, entre outros; as fitomicrografias obtidas pelo MEV/EDS confirmaram a autenticidade do material vegetal e os principais íons presentes, comparando com dados da literatura. O *screening* fitoquímico mostrou reação positiva para fenóis, taninos, flavonoides e esteroides/triterpenoides, os teores de metabolitos quantificados foram de 74,19 mg g<sup>-1</sup> de polifenóis totais equivalentes de ácido gálico, 16,72 mg g<sup>-1</sup> de flavonoides equivalentes de quecertina e 48,39 mg g<sup>-1</sup> de taninos condensados equivalentes de catequina. O isolamento de substâncias culminou na identificação de dez compostos, sendo eles quatro porfirinas, um ácido cinâmico, um glicosídeo cianogênico, uma mistura de triterpenos e outras de esteroides. O teste de atividade hemolítica apresentou um baixo nível de toxicidade frente a hemácias humanas e as demais atividades expressaram discretos resultados pelas metodologias adotadas. Os resultados obtidos demonstraram que as técnicas analíticas permitiram caracterizar a droga vegetal, o que pode ser útil em estudos para a produção de fitoterápicos, além do relato de compostos identificados pela primeira vez na família, contribuindo dessa forma para sua quimiotaxonomia. Como também o direcionamento para utilização da planta mediante as atividades farmacológicas realizadas.

**Palavras-chaves:** Faveleira, Fitoterápicos, Porfirinas, Atividades farmacológicas.

## ABSTRACT

The richness derived from the knowledge about medicinal plants that results in the production of phytotherapies or compounds derived from secondary metabolism with pharmacological activity, resurfaces as an option for the limitations found in current therapy. However, these new products are not exempt from tests that prove their indication, effectiveness, quality and safety. *Cnidocolus quercifolius* (Faveleira) is a plant characteristic of the Caatinga biome, widely spread in folk medicine due to its anti-inflammatory, analgesic, antibiotic and diuretic properties. The objective of this research was to characterize the plant drug from aerial parts, as well as to promote a phytochemical study with the research of secondary metabolites, content tests, isolation and identification of the present compounds, besides evaluating the products obtained from *C. quercifolius* against pharmacological activities. The physico-chemical characterization was performed by analytical methods such as thermogravimetry (TG), Fourier transform infrared (FTIR) and scanning electron microscopy coupled to dispersive energy spectroscopy (SEM/EDS); the phytochemistry sought to find the main secondary metabolites and quantify the phenolic compounds, flavonoids and tannins condensed against reference standards. The compounds were isolated using chromatographic and spectroscopic techniques such as infrared (IR), mass (MS) and  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance (NMR). The pharmacological activities evaluated were: antimicrobial, hemolytic, anti-*leishmania* and antiproliferative. The thermal profile revealed the occurrence of three mass loss events, the FTIR the presence of functional groups such as hydroxyls, carbonyls, cyanide grouping, among others; the phytomyrographs obtained by the SEM/EDS confirmed the authenticity of the plant material and the main ions present, comparing with data from the literature. Phytochemical screening showed a positive reaction for phenols, tannins, flavonoids and steroids/triterpenoids. The quantified metabolite contents were 74.19 mg g<sup>-1</sup> of gallic acid equivalent total polyphenols, 16.72 mg g<sup>-1</sup> of flavonoids equivalent to quercetin and 48.39 mg g<sup>-1</sup> of catechin equivalent condensed tannins. The isolation of substances culminated in the identification of ten compounds, being four porphyrins, a cinnamic acid, a cyanogenic glycoside, a mixture of triterpenes and other steroids. The hemolytic activity test showed a low level of toxicity against human red blood cells and the other activities expressed discrete results by the methodologies adopted. The results showed that the analytical techniques allowed to characterize the plant drug, which can be useful in studies for the production of phytotherapies, besides the report of compounds identified for the first time in the family, thus contributing to its chemotaxonomy. As well as the targeting for plant utilization through the pharmacological activities performed.

**Key-words:** Faveleira, phytotherapies, porphyrins, pharmacological activities.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Partes de <i>Cnidoscolus quercifolius</i> Pohl. ....	29
<b>Figura 2.</b> Diagrama de equipamento de Termogravimetria .....	30
<b>Figura 3.</b> Esquema de funcionamento do microscópio eletrônico de varredura.....	32
<b>Figura 4.</b> Estrutura base do núcleo porfirínico .....	34
<b>Figura 5.</b> Biossíntese das feofitinas e feoforbídeos. ....	35
<b>Figura 6.</b> Estrutura do ácido cinâmico.....	36
<b>Figura 7.</b> Biossíntese do ácido cinâmico .....	36
<b>Figura 8.</b> Síntese de um glicosídeo cianogênico a partir do aminoácido valina.....	37
<b>Figura 9.</b> Estruturas dos glicosídeos cianogênicos: linamarina e lotaustralina .....	38
<b>Figura 10.</b> Biossíntese de terpenos. ....	40
<b>Figura 11.</b> Curva Termogravimétrica da droga vegetal <i>C. quercifolius</i> .....	56
<b>Figura 12.</b> Espectro na região do Infravermelho da droga vegetal de <i>C. quercifolius</i> . ....	57
<b>Figura 13.</b> Fotomicrografias da droga vegetal de <i>C. quercifolius</i> . ....	58
<b>Figura 14.</b> Espectro de EDS da droga vegetal <i>C. quercifolius</i> .....	59
<b>Figura 15.</b> Substâncias isoladas de <i>C. quercifolius</i> .....	61
<b>Figura 16.</b> Estruturas da 13 <sup>2</sup> -Hidroxi-(13 <sup>2</sup> -S)-feofitina a e 13 <sup>2</sup> -Hidroxi-(13 <sup>2</sup> -R)-feofitina a .....	64
<b>Figura 17.</b> Espectro de Infravermelho dos compostos <i>Cq-1</i> e <i>Cq-2</i> . ....	67
<b>Figura 18.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) de <i>Cq-1</i> e <i>Cq-2</i> .....	68
<b>Figura 19.</b> Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) de <i>Cq-1</i> e <i>Cq-2</i> .....	69
<b>Figura 20.</b> Expansão do Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) de <i>Cq-1</i> e <i>Cq-2</i> .....	69
<b>Figura 21.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz) de <i>Cq-1</i> e <i>Cq-2</i> . ....	70
<b>Figura 22.</b> Estrutura parcial de <i>Cq-3</i> e <i>Cq-4</i> mostrando os tipos de acoplamentos para os respectivos hidrogênios.....	71
<b>Figura 23.</b> Estrutura do 13 <sup>2</sup> -hidroxi-(13 <sup>2</sup> -S)-17 <sup>3</sup> -etoxifeoforbídeo a e 13 <sup>2</sup> -hidroxi-(13 <sup>2</sup> -S)-17 <sup>3</sup> -etoxifeoforbídeo b .....	73
<b>Figura 24.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) <i>Cq-3</i> e <i>Cq-4</i> .....	75
<b>Figura 25.</b> Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) de <i>Cq-3</i> e <i>Cq-4</i> .....	76
<b>Figura 26.</b> Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) de <i>Cq-3</i> e <i>Cq-4</i> .....	76
<b>Figura 27.</b> Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) de <i>Cq-3</i> e <i>Cq-4</i> .....	77
<b>Figura 28.</b> Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) de <i>Cq-3</i> e <i>Cq-4</i> .....	77
<b>Figura 29.</b> Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) de <i>Cq-3</i> e <i>Cq-4</i> .....	78
<b>Figura 30.</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz) de <i>Cq-3</i> e <i>Cq-4</i> .....	79
<b>Figura 31.</b> Estrutura do Ácido <i>trans</i> -cinâmico .....	81
<b>Figura 32.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (C <sub>3</sub> D <sub>6</sub> O, 500 MHz) de <i>Cq-5</i> .....	82
<b>Figura 33.</b> Espectro de expansão de RMN <sup>1</sup> H (C <sub>3</sub> D <sub>6</sub> O, 500 MHz) de <i>Cq-5</i> .....	83
<b>Figura 34.</b> Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (C <sub>3</sub> D <sub>6</sub> O, 500 MHz) de <i>Cq-5</i> .....	83
<b>Figura 35.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C (C <sub>3</sub> D <sub>6</sub> O, 50 MHz) de <i>Cq-5</i> .....	84
<b>Figura 36.</b> Estrutura do 2-(β-D-glicopiranosiloxi)-isobutironitrila (Linamarina) .....	86
<b>Figura 37.</b> Estrutura do Roseosídeo .....	87
<b>Figura 38.</b> Espectro de infravermelho de <i>Cq-6</i> .....	88
<b>Figura 39.</b> Espectro de Massa de <i>Cq-6</i> .....	88

<b>Figura 40.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N, 500 MHz) de <i>Cq-6</i> .....	89
<b>Figura 41.</b> Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N, 500 MHz) de <i>Cq-6</i> .....	90
<b>Figura 42.</b> Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N, 500 MHz) de <i>Cq-6</i> .....	90
<b>Figura 44.</b> Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C (C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N, 125 MHz) de <i>Cq-6</i> .....	91
<b>Figura 45.</b> Estruturas de lupeol-3β- <i>O</i> -cinamato e lupeol-3β- <i>O</i> -diidrocinamato .....	94
<b>Figura 46.</b> Espectro de Infravermelho de <i>Cq-7</i> e <i>Cq-8</i> .....	96
<b>Figura 47.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) da substância <i>Cq-7</i> e <i>Cq-8</i> .....	97
<b>Figura 48.</b> Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) de <i>Cq-7</i> e <i>Cq-8</i> .....	98
<b>Figura 49.</b> Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) de <i>Cq-7</i> e <i>Cq-8</i> .....	98
<b>Figura 50.</b> Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) de <i>Cq-7</i> e <i>Cq-8</i> .....	99
<b>Figura 51.</b> Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) de <i>Cq-7</i> e <i>Cq-8</i> .....	99
<b>Figura 52.</b> Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) de <i>Cq-7</i> e <i>Cq-8</i> .....	100
<b>Figura 53.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz) de <i>Cq-7</i> e <i>Cq-8</i> .....	101
<b>Figura 54.</b> Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz) de <i>Cq-7</i> e <i>Cq-8</i> .....	102
<b>Figura 55.</b> Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz) de <i>Cq-7</i> e <i>Cq-8</i> .....	102
<b>Figura 56.</b> Estruturas do β-sitosterol e Estigmasterol .....	104
<b>Figura 57.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 200 MHz) de <i>Cq-9</i> e <i>Cq-10</i> .....	106
<b>Figura 60.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 50 MHz) de <i>Cq-9</i> e <i>Cq-10</i> .....	107
<b>Figura 61.</b> Porcentagem de crescimento celular de linhagens tumorais humana frente as substâncias avaliadas.....	112

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Produção e partição do EEB das folhas de <i>C. quercifolius</i> .....	44
<b>Esquema 2.</b> Fracionamento da fase diclorometano.....	47
<b>Esquema 3</b> Fracionamento da fase hexânica .....	48

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Representação de gêneros de Euphorbiaceae com ocorrência destacada no Brasil e seu posicionamento sistemático.....	24
<b>Tabela 2.</b> Pesquisa de metabólitos secundários em <i>C. quercifolius</i> . ....	45
<b>Tabela 3.</b> Linhagens celulares tumorais e não tumorais utilizadas nos ensaios de atividade antiproliferativa in vitro e suas densidades de inoculação (D.I.).....	52
<b>Tabela 4.</b> Perfil térmico (TGA) da droga vegetal proveniente de <i>C. quercifolius</i> com suas respectivas perdas de massa, em cada intervalo de temperatura (°C).....	56
<b>Tabela 5.</b> Valores obtidos no ensaio de quantificação dos metabólitos secundários (polifenóis totais, flavonoides e taninos condensados) do EEB da espécie <i>C. quercifolius</i> Pohl. ....	60
<b>Tabela 6.</b> Dados dos deslocamentos químicos de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 200 e 50 MHz) de <b>Cq-1</b> e <b>Cq-2</b> e da literatura (CDCl <sub>3</sub> , 500 e 125 MHz) de Matsuo et al., (1996). ....	65
<b>Tabela 7.</b> Dados dos deslocamentos químicos de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 200 e 50 MHz) de <b>Cq-1</b> e <b>Cq-2</b> e da literatura (CDCl <sub>3</sub> , 300 e 75,5 MHz) de Jerz et al. (2007).....	66
<b>Tabela 8.</b> Dados dos deslocamentos químicos de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 400 e 100 MHz) de <b>Cq-3</b> e <b>Cq-4</b> e da literatura (CDCl <sub>3</sub> , 400 e 100 MHz) de Chaves et al. (2013).....	74
<b>Tabela 9.</b> Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (C <sub>3</sub> D <sub>6</sub> O, 500MHz e 50 MHz) da substância <b>Cq-5</b> , comparados com dados da literatura <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 400MHz e 100 MHz) de Yun et al., (2014). ....	81
<b>Tabela 10.</b> Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N, 500MHz) da substância <b>Cq-6</b> , comparados com dados da literatura: RMN <sup>1</sup> H de Seigler, 1975 e RMN <sup>13</sup> C (D <sub>2</sub> O) de Prawat (1995). ....	86
<b>Tabela 11.</b> Dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N, 500MHz) da unidade osídica de <b>Cq-6</b> comparados com a β-glicose presente na estrutura do Roseosídeo de Lopes e colaboradores (2012), (MeOD, 500 e 125 MHz). ....	87
<b>Tabela 12.</b> Dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 500 e 125 MHz) da substância <b>Cq-7</b> e <b>Cq-8</b> , comparados com dados da literatura (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz) de Oliveira-Júnior (2017). ....	95
<b>Tabela 13.</b> Dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (δ, CDCl <sub>3</sub> , 200 e 50 MHz) da substância <b>Cq-9</b> e <b>Cq-10</b> , comparados com dados da literatura (CDCl <sub>3</sub> , 50 MHz) de Alves (2008). ....	105
<b>Tabela 14.</b> Determinação da CIM do EEB, fases particionadas e Linamarina oriundos de <i>C. quercifolius</i> . ....	108
<b>Tabela 15.</b> Potencial Hemolisante do EEB, fases particionadas e Linamarina ( <b>Cq-6</b> ) oriundos de <i>C. quercifolius</i> . ....	109
<b>Tabela 16.</b> Atividade anti-leishmania do composto Linamarina ( <b>Cq-6</b> ). ....	110
<b>Tabela 17.</b> Atividade Antiproliferativa de linamarina ( <b>Cq-6</b> ) e os isômeros do lupeol-cinamato ( <b>Cq-7</b> e <b>Cq-8</b> ).....	111

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AcOEt** – Acetato de Etila

**AD-LIS/LIN** – Sistema Linamarinase/Linamarina Adenovírus Recombinante

**ANOVA** – Analysis Of Variance

**ATCC** – American Type Culture Collection

**CBM** – Concentração Bactericida Mínima

**CC** – Cromatografia em Coluna

**CCDA** – Cromatografia em Camada Delgada Analítica

**CCDP** – Cromatografia em camada delgada preparativa

**CDCl<sub>3</sub>** – Clorofórmio Deuterado

**CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>** – Diclorometano

**CHCl<sub>3</sub>** – Clorofórmio

**CIM** – Concentração Inibitória Mínima

**cm** – Centímetros

**CN** – Nitrila

**COX** – Ciclooxigenase

**D<sub>2</sub>O** – Água deuterada

***d*** – dubleto

***dd*** – Duplo Dubleto

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**EDTA** – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

**EEB** – Extrato Etanólico Bruto

**EM** – Espectrometria de massas

**FTIR** – Infrared Fourier Transform Fourier

**g** – Gramas

**GBM** – Glioblastoma Multiforme

**h** – horas

**HCC** – Hepatocarcinoma Celular

**HCN** – Ácido Cianídrico

**Hex** - Hexano

**IV** – Infravermelho

**J** – Constante de acoplamento

**LISLIN/GO** – Sistema de Entrega Linamarinase/Linamarina/Glicose Oxidase

**MetOD** – Metanol deuterado

**MetOH** – Metanol

**MetOH:H<sub>2</sub>O** – Metanol:Água

**MHz** – Mega Hertz

**m** – Multipleteo

**m/z** – Razão massa/carga

**MTT** – 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio

**min** – Minutos

**mg** – Miligramas

**mL** – Mililitros

**NaCl** – Cloreto de Sódio

**nm** - nanômetros

**ppm** – Parte por Milhão

**RMN <sup>13</sup>C** – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

**RMN <sup>1</sup>H** – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

**rpm** – Rotações Por Minuto

**s** – singleto

**sl** – Singleto largo

**t** – Tripleto

**TG** – Termogravimetria

**TMS** – Tetrametilsilano

**TR** – Tempo de retenção

**UFC** – Unidade Formadora de Colônia

**UV** – Ultravioleta

**δ** – Deslocamento Químico em partes por milhão.

**δ<sub>H</sub>** – Deslocamento Químico em partes por milhão de hidrogênio

**δ<sub>C</sub>** – Deslocamento Químico em partes por milhão de carbono

**μL** - Microlitro

**μm** – Micrometro

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>23</b>
3.1 FAMÍLIA EUPHORBIACEAE .....	24
3.1.1 Potencial econômico .....	25
3.1.2 Toxicidade relacionada à família Euphorbiaceae .....	25
3.2 GÊNERO <i>CNIDOSCOLUS</i> .....	25
3.3 <i>CNIDOSCOLUS QUERCIFOLIUS</i> POHL .....	27
3.4 TÉCNICAS ANALÍTICAS .....	30
3.4.1 Termogravimetria (TG) .....	30
3.4.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) .....	31
3.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) acoplada a Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) .....	32
3.5 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS ISOLADOS NA ESPÉCIE .....	33
3.5.1 Porfirinas .....	33
3.5.2 Ácido Cinâmico .....	35
3.5.3 Glicosídeos Cianogênicos .....	37
3.5.4 Terpenoides e esteroides .....	39
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>43</b>
4.1 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL .....	43
4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA DROGA VEGETAL .....	43
4.2.1 Termogravimetria .....	43
4.2.2 Análise de Infravermelho .....	43
4.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada a Espectroscopia de energia dispersiva .....	43
4.3 PREPARAÇÃO E PARTIÇÃO DO EXTRATO .....	44
4.4 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DO EEB .....	45



4.4.1	Screening fitoquímico.....	45
4.4.2	Determinação do teor de metabólitos secundários .....	45
4.5	FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO E ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS.....	46
4.6	IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS .....	48
4.7	ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS .....	49
4.7.1.	Atividade antimicrobiana .....	49
4.7.2.	Atividade hemolítica.....	49
4.7.3.	Atividade anti- <i>leishmania</i> .....	50
4.7.4.	Atividade antiproliferativa.....	51
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
5.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	55
5.1.1	Perfil Termogravimétrico da droga vegetal.....	55
5.1.2	Análise da droga vegetal por infravermelho.....	56
5.1.3.	Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada a Espectroscopia de Energia Dispersiva.....	58
5.2	CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA.....	59
5.3.	SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE <i>C. QUERCIFOLIUS</i> .....	61
5.2.1	Identificação de <i>Cq-1</i> e <i>Cq-2</i> .....	62
5.2.2	Identificação de <i>Cq-3</i> e <i>Cq-4</i> .....	71
5.2.3	Identificação de <i>Cq-5</i> .....	80
5.2.4	Identificação de <i>Cq-6</i> .....	85
5.2.5	Identificação de <i>Cq-7</i> e <i>Cq-8</i> .....	92
5.2.6	Identificação de <i>Cq-9</i> e <i>Cq-10</i> .....	102
5.3	ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS .....	108
5.3.1	Atividade antimicrobiana .....	108
5.3.2	Atividade hemolítica.....	109
5.3.3	Atividade anti- <i>leishmania</i> .....	110
5.3.4	Atividade antiproliferativa.....	111
<b>6.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>114</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>116</b>

---

# INTRODUÇÃO

---

## 1. INTRODUÇÃO

A prática terapêutica caracterizada pelo uso de plantas medicinais em diferentes formas farmacêuticas foi por um longo período de tempo o único recurso medicinal disponível para humanidade (CZELUSNIAK et al., 2012). Até hoje, alguns povos ainda fazem uso da fitoterapia e outras terapias tradicionais baseadas nos saberes e práticas que foram transmitidos ao longo das gerações (FERREIRA e PINTO, 2010).

A tendência observada para a fitoterapia é, como no passado, possuir um papel de destaque na atenção à saúde da população. Assim, é importante avaliar os efeitos terapêuticos dos fitoterápicos por meio de estudos e ensaios clínicos que garantam sua eficácia e segurança (VIEIRA et al., 2010).

Em complementação, a busca por compostos bioativos oriundos das plantas medicinais surge como uma ciência investigativa e comprobatória do saber popular, dessa maneira sendo possível obter moléculas com potencial para produção de novos fármacos.

O Século XXI mostrou uma diversificação nessa área no que se refere às fontes de biomoléculas, em primeiro lugar a pesquisa envolvendo plantas medicinais, os micro-organismos (principalmente os fungos) em segundo e os organismos marinhos em terceiro constituindo as fontes mais exploradas por pesquisadores brasileiros (BERLINCK et al., 2017). Newman e Cragg (2016) afirmam que as pesquisas nessa área não apenas permitem identificar novos compostos, mas também propõe novas estruturas moleculares que podem ser utilizadas como protótipos para novos candidatos à fármacos.

No entanto, o surgimento de novos modelos de fármacos oriundos da química combinatória, da triagem biológica automatizada e síntese química, que permitiam a geração e seleção de milhares de entidades químicas sintéticas ativas em testes *in vitro*, assim a produção em escala industrial, fizeram os produtos naturais ser momentaneamente “esquecidos” (RISHTON, 2008).

Mesmo assim, a pesquisa com produtos naturais ainda apresenta maior sucesso para a descoberta de compostos com características físico-químicas diferenciadas, presença de centros estereogênicos e diversidade de grupos farmacofóricos (SUKURU, 2009), além das estruturas químicas e variedade molecular ser muito superior aos derivados dos processos de síntese química (MAREGESI et al., 2008; SUKURU, 2009). Estima-se que cerca de 80% dos quase 160.000

compostos catalogados no *Dictionary of Natural Products* têm características favoráveis para serem considerados como potenciais modelos de fármacos (HARVEY, 2015).

Em relação aos fitoterápicos a aplicação de novas tecnologias em seu desenvolvimento contribui para a substituição dos atuais métodos utilizados, que consomem muito tempo, geram um alto custo e muitas vezes utilizam grandes quantidades de solventes orgânicos e reagentes tóxicos (ARAGÃO et al., 2002). Os métodos analíticos vêm sendo amplamente utilizados para caracterizar compostos presentes em plantas medicinais, seus produtos e extratos, assim como no controle de qualidade, pois fornecem, de forma rápida, dados sobre estabilidade do material analisado (CORREIA et al., 2013), objetivando padronizações que assegurem a constância dos efeitos farmacológicos e segurança quanto ao uso (ARNILLAS, 2015).

*Cnidocolus quercifolius*, conhecida como faveleira, é uma espécie característica do bioma caatinga brasileiro encontrada em todos os estados do nordeste (OLIVEIRA JÚNIOR, 2018). Podendo ser empregada para recuperação de áreas degradadas, alimentação animal, medicina popular, serraria, biodiesel, dentre outros (NÓBREGA, 2001; ARRIEL et al., 2004; MAIA, 2004).

Os estudos embasados no saber popular que buscam o potencial existente na utilização das plantas medicinais para o tratamento de doenças, juntamente com a busca por moléculas bioativas responsáveis por tais atividades ou até mesmo nos que resultam na produção de fitoterápicos eficazes e seguros, justificam pesquisas como esta.

-----  
**OBJETIVOS**  
-----

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Realizar uma caracterização físico-química da droga vegetal obtida das partes aéreas de *C. quercifolius*, promover um estudo fitoquímico e farmacológico dos produtos oriundos dos processos extrativo e cromatográfico desta espécie.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter a droga vegetal pulverizada
- Caracterizar a droga vegetal pulverizada por meio de análise térmica, infravermelho e microscopia eletrônica de varredura acoplada à espectrometria de energia dispersiva;
- Preparar o extrato etanólico bruto (EEB);
- Realizar o *screening* fitoquímico do EEB;
- Determinar o teor de metabólitos secundários do EEB;
- Obter fases particionadas (FP) pelo fracionamento do EEB;
- Isolar os constituintes químicos por meio de técnicas cromatográficas e identificá-los por técnicas espectrométricas;
- Verificar o potencial antimicrobiano *in vitro* e atividade hemolítica frente a hemácias humanas do EEB, FP e compostos isolados;
- Avaliar a atividade anti-*leishmania* e atividade antiproliferativa de compostos isolados.

---

# REFERENCIAL TEÓRICO

---

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

Os estudos de bioprospecção de plantas estimulam a pesquisa e exploração da biodiversidade de uma região, em associação ao conhecimento tradicional representa uma fonte inesgotável para obtenção de novos compostos naturais com potencial para produção de novos medicamentos, sejam estes fitoterápicos ou princípios ativos isolados (IÓCA et al., 2018). Estes produtos oriundos do metabolismo secundário das plantas representam 60% dos compostos classificados como *new chemical entities* (NCEs) ativos contra o câncer e 75% dos ativos contra doenças infecciosas obtidos entre 1981 e 2002 (DEMAIN, 2014).

Além disso, o uso de plantas medicinais é uma boa alternativa em lugares onde o acesso aos medicamentos é precário, ou no tratamento de doenças consideradas negligenciadas, assim como aos efeitos indesejáveis causados pelo uso incorreto e/ou abusivo dos medicamentos sintéticos (LOPES et al., 2015).

Inúmeras plantas que são utilizadas em preparações fitoterápicas necessitam de um rigoroso controle de qualidade, pois a literatura científica afirma que elas podem apresentar substâncias tóxicas ou composição química variável (NOLDIN et al., 2003; SILVA JÚNIOR, 2006; NUNES, 2009), sendo imprescindível o uso de forma responsável, racional, segura e não abusiva. E em virtude disso, várias nações vêm normatizando e legislando sobre os critérios de segurança, eficácia e qualidade que devem envolver as preparações fitoterápicas (REIS et al., 2004; BRASIL, 2004).

O governo federal brasileiro aprovou, através do Decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006, a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos (PNPMF) e o Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos, visando aumentar a fiscalização às plantas medicinais e fitoterápicos produzidos e comercializados no país, com medidas que assegurem o uso correto pela população, que promovam a utilização sustentável da biodiversidade brasileira e que estimulem o desenvolvimento da indústria nacional,.

A família Euphorbiaceae é comumente encontrada em levantamentos etnofarmacológicos e apresenta espécies com grande destaque medicinal, como as pertencentes ao gênero *Cnidocolus* (PEIXOTO SOBRINHO et al., 2012).



### 3.1 FAMÍLIA EUPHORBIACEAE

A família Euphorbiaceae está entre as famílias de maior importância econômica entre as Angiospermas e encontra-se representada, nas regiões tropicais e temperadas de todo o planeta (SÁTIRO e ROQUE, 2008). Atualmente, a família está posicionada entre as Eurosídeas I, na ordem Malpighiales, sem uma clara definição com os grupos de maior afinidade filogenética. Compreendendo em quatro subfamílias: Cheilosoideae (endêmica no sudeste asiático), Acalyphoideae, Crotonoideae e Euphorbioideae, descritos na Tabela 1. Compreendem um grupo de vegetais cuja diversidade floral e vegetativa é muito complexa entre as Eucotiledôneas, o que dificulta o agrupamento e a delimitação taxonômica das espécies (SOLTIS et al 2005, SIMPSON, 2006, LUCENA e ALVES, 2010). Segundo Judd et al. (1999), esta família é composta de 222 gêneros e 6.100 espécies.

Destaca-se a Região Nordeste como um grande centro de diversidade da família, com 216 espécies e 50 gêneros, distribuídas, em sua grande maioria, nas áreas de Caatinga (CORDEIRO e CARNEIRO-TORRES, 2006; LUCENA e ALVES, 2010). Os estudos de Oliveira (2013) afirmaram que a família Euphorbiaceae é uma das principais constituintes do Bioma Caatinga, devido a sua ampla diversidade e variação de hábitos que contribui para uma maior adaptação e eficiência contra o déficit hídrico intrínseco deste bioma.

**Tabela 1.** Representação de gêneros de Euphorbiaceae com ocorrência destacada no Brasil e seu posicionamento sistemático.

Família atual	Subfamílias	Gêneros
Euphorbiaceae s.s.	Acalyphoideae	<i>Acalypha</i> , <i>Alchornea</i> , <i>Aparisthmium</i> , <i>Bernardia</i> , <i>Chaetocarpus</i> , <i>Dalechampia</i> , <i>Ditaxis</i> , <i>Romanoa</i> , <i>Tragia</i> .
	Crotonoideae	<i>Aleurites</i> , <i>Cnidoscolus</i> , <i>Croton</i> , <i>Hevea</i> , <i>Jatropha</i> , <i>Manihot</i> , <i>Pausandra</i> , <i>Ricinus</i>
	Euphorbioideae	<i>Actinostemon</i> , <i>Algermonia</i> , <i>Chamaesyce</i> , <i>Euphorbia</i> , <i>Mabea</i> , <i>Maprounea</i> , <i>Poinsettia</i> , <i>Sapium</i> , <i>Sebastiania</i> , <i>Stillingia</i> .

Fonte: WURDACK, 2005; LUCENA e ALVES, 2010.

### 3.1.1 Potencial econômico

Na alimentação humana destaca-se a espécie *Manihot esculenta* Crantz, da qual é extraída a farinha de mandioca (CÔRREA et al, 2002), outras foram protagonistas da economia brasileira durante o século XIX e XX como as espécies dos gêneros *Hevea* Aubl. (Seringueira), das quais se extraíam o látex utilizado para a produção de borracha natural (RIBEIRO et al, 2004). Espécies do gênero *Cnidoscolus* se destacam pelo potencial forrageiro que possibilita a manutenção dos animais em regime de pastejo na Caatinga, principalmente nos períodos de estiagem (CANDEIA, 2005). Outros exemplos de espécies com potencial econômico são: mamona (*Ricinus communis* L.), coroa-de-cristo (*Euphorbia milii* Des Moul.), pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.), marmeleiro (*Croton blanchetianus* Baill), quebra-faca (*Croton micans* Müll. Arg.), velame (*Croton heliotropiifolius* Kunth) e urtiga (*Cnidoscolus urens* (L.) Arthur).

### 3.1.2 Toxicidade relacionada à família Euphorbiaceae

Muitas espécies da família Euphorbiaceae estão envolvidas em casos de intoxicação em humanos e animais. Um levantamento de dados realizado em um hospital na cidade de Ribeirão Preto – SP, entre 1995 e 2005, concluiu que de todos os casos de intoxicações por vegetais registrados, 22% eram relacionados a um representante desta família, deste percentual, 68% causados pela *Jatropha curcas* (pinhão-paraguaio), 20% pela *Ricinus communis* L. (mamona) e 12% pela *Euphorbia milii* Des Moul. (coroa-de-cristo) (OLIVEIRA, 2007).

Outro exemplo é a mandioca, tradicionalmente utilizada na alimentação em vários países. O consumo da mandioca brava (*Manihot esculenta* Crantz) está associado a problemas neurológicos crônicos em alguns países africanos principalmente em pessoas com deficiência de aminoácidos sulfurados (CAMPOS et al., 2016; BOTHA & PENRITH, 2008).

## 3.2 GÊNERO *CNIDOSCOLUS*

O gênero *Cnidoscolus* Pohl inclui cerca de 70 espécies, distribuídas somente na América tropical e situadas, principalmente, no México e Nordeste do Brasil, (PEIXOTO SOBRINHO et al., 2012; GOMES et al., 2014; MOURA et al., 2019). Este gênero foi sugerido por Pohl (1827) para

incluir espécies que apresentavam apenas um verticilo no perianto e tricomas urticantes. Porém, o gênero *Cnidoscolus* não foi aceito por botânicos posteriores como Müller (1865; 1866; 1873), Pax (1910), Pax & Hoffmann (1914) e Croizat (1943) que preferiram tratá-lo como seção ou subgênero de *Jatropha* L. Após os trabalhos de Pax & Hoffmann (1924; 1931), que revalidaram a maioria das espécies, *Cnidoscolus* passou a ser reconhecido por grande parte dos demais taxonomistas, evidenciando diferenças notáveis quando relacionado ao gênero *Jatropha*. Sua principal característica é a presença de tricomas urticantes que quando estimulados em contato com a pele podem provocar fortes dores localizadas (MELO e SALES, 2008).

Também existem casos relacionados ao potencial tóxico de espécies que compõem este gênero. No estudo de Oliveira e colaboradores (2008) foi relatado por produtores da região semiárida de estados no Nordeste, intoxicação em caprinos pela espécie *C. phyllacanthus* após ingestão de suas folhas. A toxicidade foi proporcional a quantidade consumida e ao grau de amadurecimento das mesmas, quanto maior a quantidade e mais frescas se encontravam as folhas, mais intensos foram os sinais clínicos de intoxicação levando inclusive um animal ao óbito.

Essa elevada toxicidade se dá pela presença de glicosídeos cianogênicos que possuem o ácido cianídrico (HCN) compondo suas estruturas. Esses metabólitos secundários atuam como substâncias de defesa da planta (SANTOS et al., 2005) e são capazes de liberar ácido cianídrico por meio de reações de hidrólise (JUFFO et al., 2012).

Há também relatos da presença de glicosídeos cianogênicos nas espécies *C. chayamansa* (GONZÁLEZ-LAREDO et al., 2003); *C. texanus*, (SEIGLER e BLOOMFIELD, 1969) e *C. aconitifolius* (KUTI e KONURU, 2006).

Espécies deste gênero também podem ser empregadas de outras formas, seu uso medicinal como agente antitumoral e anti-inflamatório para o sistema gênito-urinário, antisséptico, no tratamento de hematomas, fraturas, feridas, verrugas, disenteria, apendicite e reumatismo, como analgésico e antibiótico (PEIXOTO SOBRINHO et al., 2012; GOMES et al., 2015). Extratos, frações ou compostos isolados de *Cnidoscolus* apresentaram atividades como antioxidante, anti-inflamatório, antibacteriana, hipoglicêmica, hepatoprotetora, hipocolesterolêmica, citotóxica e antianêmica (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2018). Agra e colaboradores (2008) estudaram o perfil anti-inflamatório do extrato etanólico de *C. urens*, *C. quercifolius* e *C. infestus* e verificaram forte efeito anti-inflamatório tópico.

Senjobi (2011), constatou a presença de alcaloides, saponinas, taninos e glicosídeos cianogenéticos no extrato etanólico das folhas de *C. aconitifolius*. Flavonoides, triterpenos e diterpenos representam as principais classes de metabólitos secundários que foram isolados no gênero (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2018).

Outros metabólitos encontrados foram as cumarinas, as xantinas e as antocianinas (TAVARES e AMORIM, 2010). No estudo de Peixoto Sobrinho e colaboradores (2012) com extratos metanólicos das cascas de *C. urens*, *C. infestus*, *C. quercifolius* e *C. pubescens*, foi confirmada a presença de antocianinas, derivados antracênicos, antraquinonas, cumarinas, flavonoides, esteroides, lignanas, saponinas, taninos, terpenoides e xantinas. Os terpenoides e cumarinas estavam presentes em todas as espécies.

### 3.3 *CNIDOSCOLUS QUERCIFOLIUS* POHL.

A espécie *Cnidocolus quercifolius* Pohl (Figura 1), anteriormente classificada como *Jatropha phyllacantha* variação quercifolia Müll. Arg (TRÓPICOS®, 2019). É uma árvore tipicamente xerófila, irregularmente esgalhada, lactescente; floresce durante um longo período do ano; suas folhas são longas, grossas, lanceoladas, recortadas, com pequenos acúleos no limbo (DRUMOND et al., 2007), dotada ou não de espinhos urticantes (CAVALCANTI et al., 2011). Com raízes tuberculadas, sementes oleaginosas, folhas secas e cascas ricas em proteínas. Em solos de baixa fertilidade, se apresenta com um porte arbustivo, enquanto que em solos mais férteis se desenvolve em árvores de até cinco metros de altura (DUQUE, 1980).

Conhecida popularmente como faveleira, faveiro, mandioca brava, leiteira-de-espinho e urtiga de mamão (DANTAS, 2002), é encontrada em todos os estados do nordeste brasileiro até o norte de Minas Gerais, principalmente nas regiões da caatinga e do sertão (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2018).

As folhas maduras assim como a casca da faveleira servem de forragem para animais. Suas sementes têm grande importância na produção de óleo alimentício de alto valor energético e farinha, além de ser uma alternativa para a produção sustentável e racional de biodiesel. Por ser uma planta resistente à seca, também é indicada no reflorestamento de áreas degradadas (DUQUE, 1980).

Na medicina popular usa-se o decocto e o macerado da casca do caule contra inflamações dos ovários e da próstata (AGRA et al., 2008) e contra dor de dente (ROQUE et al., 2010). A casca

é também utilizada como antibiótico natural, em casos de infecção com secreção, úlcera estomacal, feridas e inflamação (ZAGO, 1998). Possui ação antirreumática, anti-hemorrágica, anti-inflamatória, antimicrobiana, expectorante, homeostática e cicatrizante (MATOS, 2002).

Na semente são encontradas substâncias como óleos, proteínas (albumina), taninos, amidos, aminoácidos, triterpenoides, mucilagem, oxalato de cálcio, matéria graxa, dentre outros (LORENZI e MATOS, 2002). A casca contém albumina, fenóis, flavonoides, xantonas e saponinas (DANTAS, 2002).

Os estudos de Oliveira Júnior e colaboradores (2017) resultaram na identificação de diterpenos (sandaracopimaradieno, 13-metil-17-norcaur15-eno, caur-16-eno e deidroabietano), triterpenos (lupeol e diplopteno), flavonoides (rutina e apigenina), dos triterpenos lupeol-3 $\beta$ -O-cinamato e lupeol-3 $\beta$ -O-dihidrocinamato, o hexanoato de lupeol, filacantona e favelanona do extrato do caule de *C. quercifolius*.

Gomes et al. (2014) avaliou o efeito antinociceptivo do extrato etanólico das cascas e folhas de *C. quercifolius* em camundongos por diversas metodologias, com os resultados obtidos os autores atribuíram aos extratos a capacidade de inibir a liberação de mediadores inflamatórios, como prostaglandinas e histamina, demonstrando que suas propriedades antinociceptiva e anti-inflamatória corroboram seu uso popular para tratar a dor e a inflamação.

**Figura 1.** Partes de *Cnidoscolus quercifolius* Pohl.



Fonte: Própria.

### 3.4 TÉCNICAS ANALÍTICAS

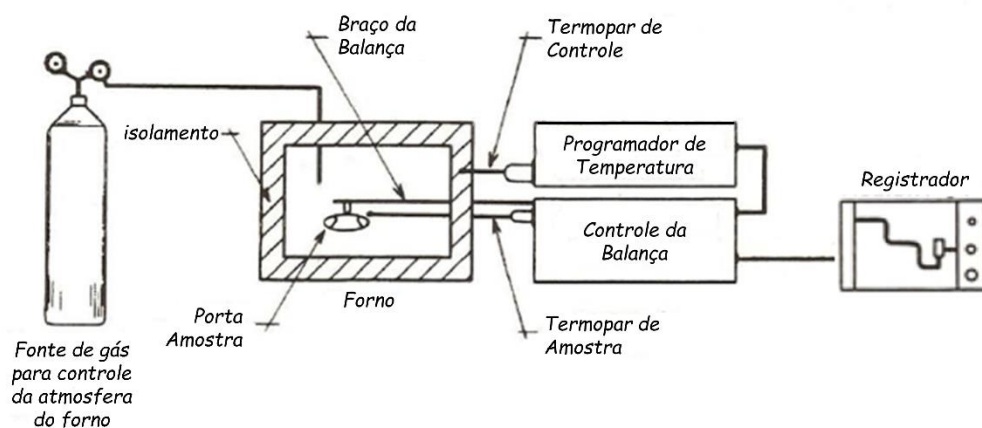
#### 3.4.1 Termogravimetria (TG)

É a técnica termoanalítica que acompanha a perda e/ou ganho de massa da amostra em função do tempo ou da temperatura. Já a Termogravimetria Derivada (DTG), nada mais é do que um arranjo matemático, no qual a derivada da variação massa em relação ao tempo ( $dm/dt$ ) é registrada em função da temperatura ou tempo (DENARI & CAVALHEIRO, 2012).

No intuito de melhorar a avaliação e visualização das curvas de TG, foram desenvolvidos equipamentos capazes de registrar automaticamente a derivada das curvas de termogravimetria, auxiliando a esclarecer cada passo, uma vez que as mesmas apresentam picos relacionados a cada etapa de variação de massa, permitindo uma melhor precisão no intervalo de temperatura, indicando a temperatura em que a velocidade de decomposição é máxima (FERREIRA, 2012; MOTHÉ & AZEVEDO, 2002).

O equipamento que realiza a análise termogravimétrica é basicamente composto pela termobalança, que permite a pesagem contínua de uma amostra em função da temperatura à medida que ela é resfriada ou aquecida. Seus principais componentes são: balança registradora, forno, suporte de amostra e sensor de temperatura, programador de temperatura do forno, sistema registrador e controle da atmosfera do forno, de acordo como observado na Figura 2 (DENARI & CARVALHEIRO, 2012).

**Figura 2.** Diagrama de equipamento de Termogravimetria



Fonte: Adaptado de DENARI & CAVALHEIRO, 2012.

Dentre as diversas aplicações da Termogravimetria pode-se citar: estudo da decomposição térmica de compostos orgânicos, inorgânicos e de substâncias poliméricas; destilação e evaporação de líquidos; determinação da velocidade de evaporação e sublimação; estudo de cinética de reação e determinações de pressão de vapor e calor de vaporização (CREMASCO & NAZARENO, 2011; SILVA et al., 2007).

Em seus estudos Santana (2013) utilizou Termogravimetria (TG) e Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) para caracterizar os extratos hidroalcoólicos nebulizados das cascas de *Ximenia americana* L. e *Schinopsis brasiliensis* Engl. Verificando que para *X. americana* as curvas de TG mostraram três processos de decomposição térmica dos compostos do extrato, com resíduo mineral de 39,71%. E para o extrato de *S. brasiliensis*, as curvas de TG também apresentaram três processos de decomposição térmica, com resíduo mineral de 37,58%.

#### 3.4.2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, em geral, realiza análises na região do infravermelho médio (400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ ), uma vez que todas as moléculas possuem frequências de absorção nessa faixa. Quando passa por uma molécula, a radiação de infravermelho gera ondas com comprimentos de absorção diferentes, causando vibrações em suas diferentes ligações químicas, como alongamento, contração e dobra (SANTANA, 2013).

Assim como outros processos de absorção, o infravermelho é um processo quantizado e se aplica à moléculas da mesma forma que as impressões digitais se aplicam aos seres humanos, visto que os padrões de absorção de moléculas diferentes jamais serão idênticos. Como também o espectro de infravermelho pode fornecer informações que ajudam a esclarecer sua própria estrutura (PAVIA, 2012).

Esta técnica vem sendo amplamente utilizada como uma alternativa rápida e eficiente em análises de adulteração em produtos de diversos segmentos, como fármacos (SILVA et al., 2012), alimentícios (KARTHEEK et al., 2011) adulterações por óleos vegetais de menor valor nutricional (SOUZA, 2018), frutas e vegetais (NICOLAI et al., 2007), para controle de qualidade de leite e derivados (SANTOS; PEREIRA-FILHO; RODRIGUEZ-SAONA, 2013), dentre outros.



### 3.4.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) acoplada a Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

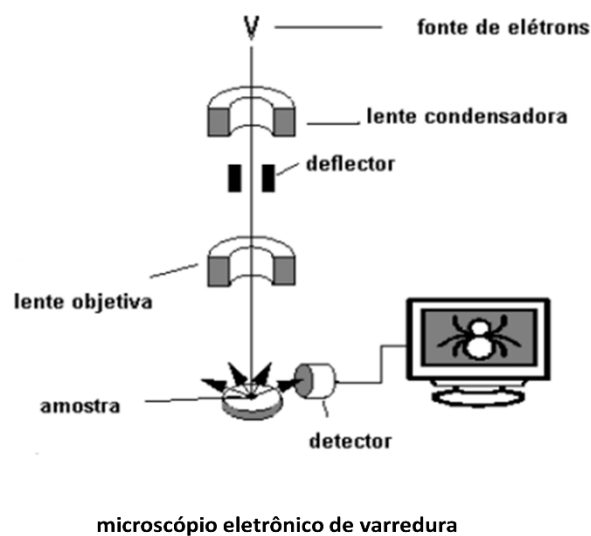
A microscopia eletrônica de varredura é utilizada em várias áreas de conhecimento, o uso desta técnica vem se tornando cada vez mais frequente por fornecer informações de detalhes, com aumentos de até 300.000 vezes, surgiu comercialmente em 1965 e desde então tornou-se indispensável em muitos tipos de pesquisa. (DUARTE et al., 2003).

Possibilita investigar a superfície de amostras com magnificações da ordem de centenas de milhares de vezes. Além disso, também permite a realização de microanálises por espectroscopia de energia dispersiva (EDS), que possibilita a identificação e mapeamento dos elementos químicos presentes no material (CETENE, 2019).

A imagem se forma por um feixe de elétrons de pequeno diâmetro que explora a superfície da amostra por linhas sucessivas e transmite o sinal do detector a uma tela sincronizada com a do feixe incidente. Por um sistema de bobinas de deflexão, o feixe é guiado de modo a varrer a superfície da amostra segundo uma malha retangular (Figura 3) (DEDAVID et al., 2007).

Pode ser aplicada na indústria têxtil, materiais de construção, metalurgia, mineração, indústrias de corantes/pigmentos, farmacêutico, cosméticos, químico e petroquímico, criminalística. Análises de materiais biológicos, plantas, fungos, bactérias, ossos e dentes (CETENE, 2019).

**Figura 3.** Esquema de funcionamento do microscópio eletrônico de varredura



Fonte: Adaptado de DEDAVID et al., 2007

### 3.5 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS ISOLADOS NA ESPÉCIE

O metabolismo secundário pode ser visto como a produção de compostos com funções específicas para o organismo: defesa contra herbívoros, ataque de patógenos, competição entre plantas e atração de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de semente e micro-organismos simbiotes.

Possuem também ação protetora em relação a mudanças de temperatura, conteúdo de água, níveis de luz, exposição aos raios ultravioleta, deficiência de nutrientes minerais, reprodução e outras ainda nem elucidadas (JAKIEMIU, 2008; TONIAL, 2014). Não possuem uma distribuição universal e, por isso, esses compostos podem ser utilizados em estudos taxonômicos (JAKIEMIU, 2008).

Dependendo da necessidade do composto secundário, a habilidade em produzi-lo pode ser finalizada ou interrompida temporariamente, podem ainda se apresentar em baixas concentrações e/ou grupos de plantas específicos, representando dessa forma um papel importante na interação das plantas como o meio ambiente (TONIAL, 2014).

Estes metabólitos passaram a ser explorados, principalmente na área química, medicinal, alimentícia e econômica, já que se comportam como substâncias antibióticas, pigmentos, toxinas, feromônios, enzimas inibidoras, agentes imunomoduladores, agonistas, antagonistas, antitumorais, promotores de crescimento de planta e animais, entre outras atividades (OKAFOR, 2007).

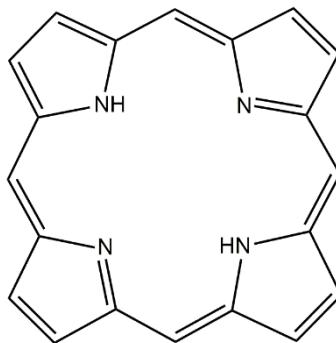
Sua biossíntese pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, pela via do ácido chiquímico e o acetato. O primeiro origina os aminoácidos aromáticos precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos. Alguns metabólitos não derivam apenas de um desses intermediários, assim como das combinações resultantes de uma unidade de ácido chiquímico e uma ou mais unidades de acetato ou derivados deste, como no caso das antraquinonas, flavonoides e dos taninos condensados (SIMÕES et al., 2010).

#### 3.5.1 Porfirinas

As porfirinas são compostos macrocíclicos conjugados cujo núcleo base é constituído por quatro anéis pirrólicos unidos entre si por pontes metínicas (Fig. 4, p. 31), consistem em moléculas fotossensibilizadoras que quando irradiadas com luz absorvem radiação da região do visível. Dos

seus derivados mais importantes destaca-se a clorofila, definida como uma clorina quelatada com magnésio e está relacionada com os processos fotossintéticos das plantas (SMITH, 2000).

**Figura 4.** Estrutura base do núcleo porfirínico

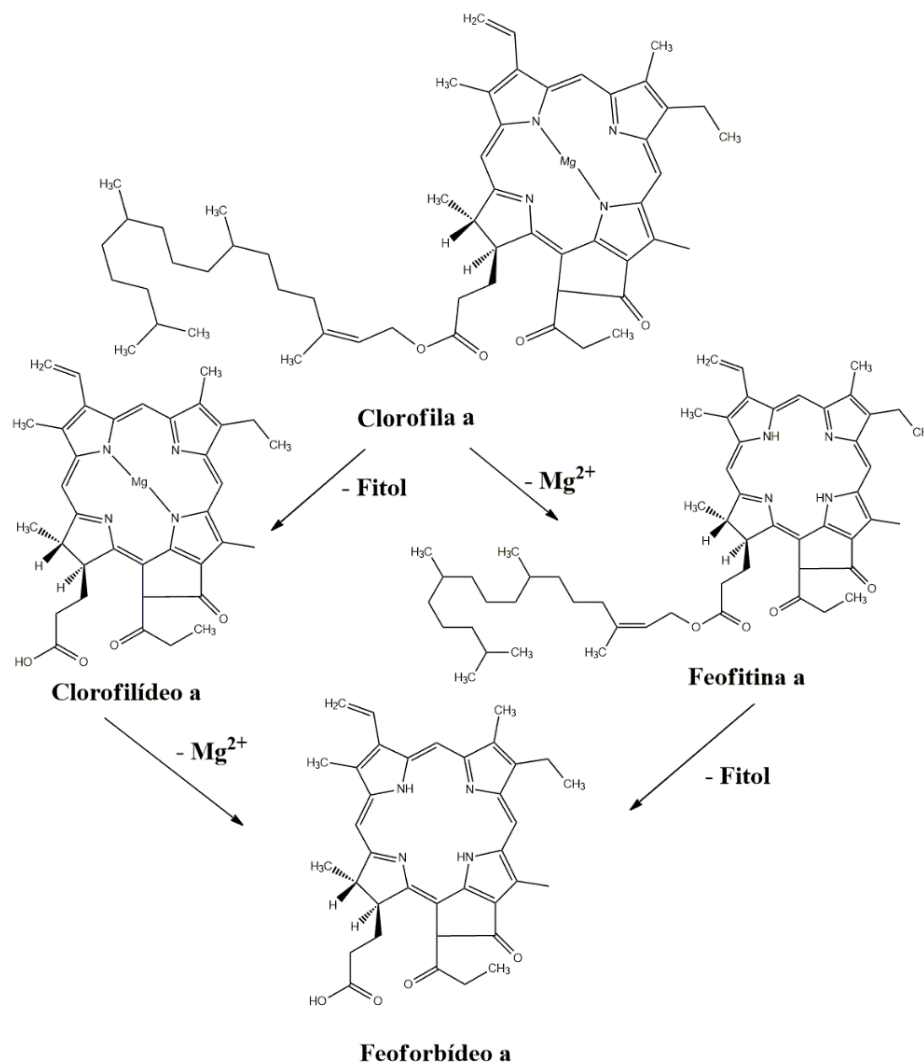


Fonte: ChemBioDraw Ultra

A clorofila ao sofrer perda do magnésio em meio ácido dá origem as feofitinas, as quais por sua vez, são hidrolisadas na porção éster por ação da clorofilase, produzindo o feoforbídeo A e fitol (STREIT et al., 2005), como pode ser observado na figura 3.

Esses compostos possuem grandes potencialidades biológicas associadas à versatilidade estrutural, possibilitando estudos que visam sua utilização particularmente na área do diagnóstico e tratamento de carcinomas (PURRELLO et al., 1999; TIAN et al., 1998; CARRE, 1999) e utilização em terapias fotodinâmicas (BASTOS et al., 2012).

**Figura 5.** Biossíntese das feofitinas e feoforbídeos.



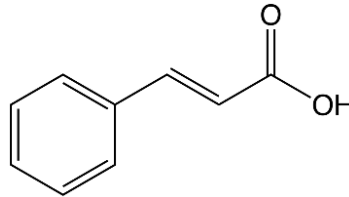
Fonte: Adaptado de Lanfer-Marquez, 2003

### 3.3.2. Ácido Cinâmico

Originado de plantas superiores, quimicamente consiste de um ácido graxo aromático composto de um anel fenil substituído por um grupo de ácido acrílico, que normalmente é encontrado na configuração *trans* (Figura 4), também denominado como ácido 3-fenil-2-propenóico (LIU et al, 1995). Pertence ao grupo das auxinas, hormônios vegetais responsáveis por regular o crescimento e a diferenciação celular, e alguns de seus derivados desempenham um importante

papel na defesa da planta contra o ataque de microrganismos e insetos (EKMEKCIOGLU et al., 1998; NIERO, 2010).

**Figura 6.** Estrutura do ácido cinâmico.

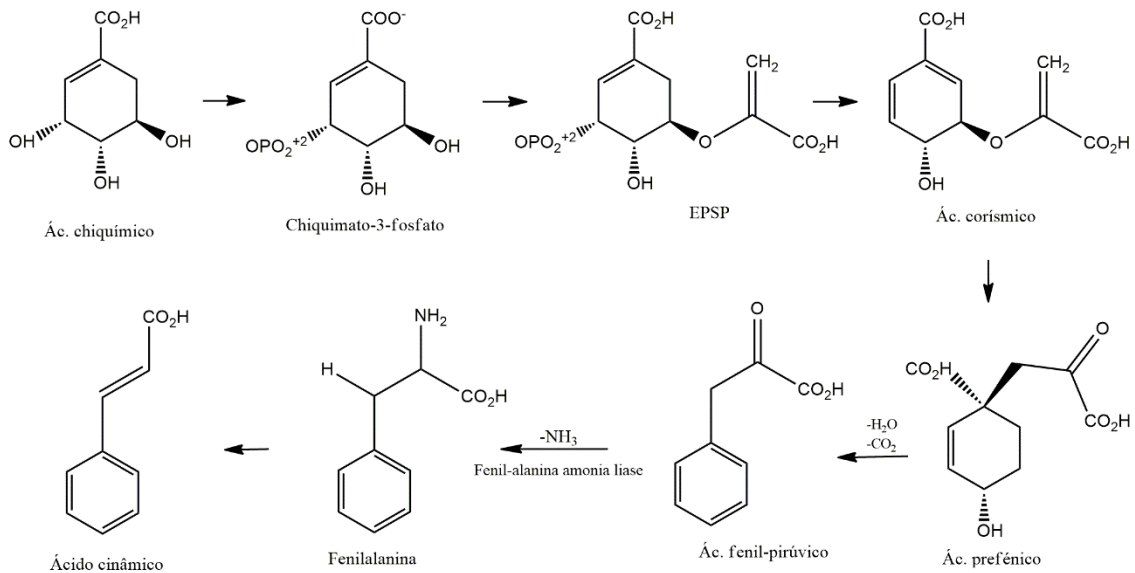


Fonte: ChemBioDraw Ultra

É originado biossinteticamente a partir da fenilalanina, pela ação da fenilalanina amonialiase que perde sua molécula de amônia, formando o ácido cinâmico. Este por sua vez é precursor da maioria dos compostos classificados como fenilpropanoides, as unidades formadoras dos compostos fenólicos mais complexos como lignóides e cumarinas (Fig. 5, p. 33) (SIMÕES et al., 2010).

Este composto tem despertado o interesse de diversos grupos de pesquisa por possuir uma ampla atividade terapêutica, vários estudos têm sido realizados a fim de comprovar ou entender suas propriedades, entre elas: antimicrobiana, antioxidante, anticancerígena e imunomoduladora (NUNES, 2016).

**Figura 7.** Biossintese do ácido cinâmico



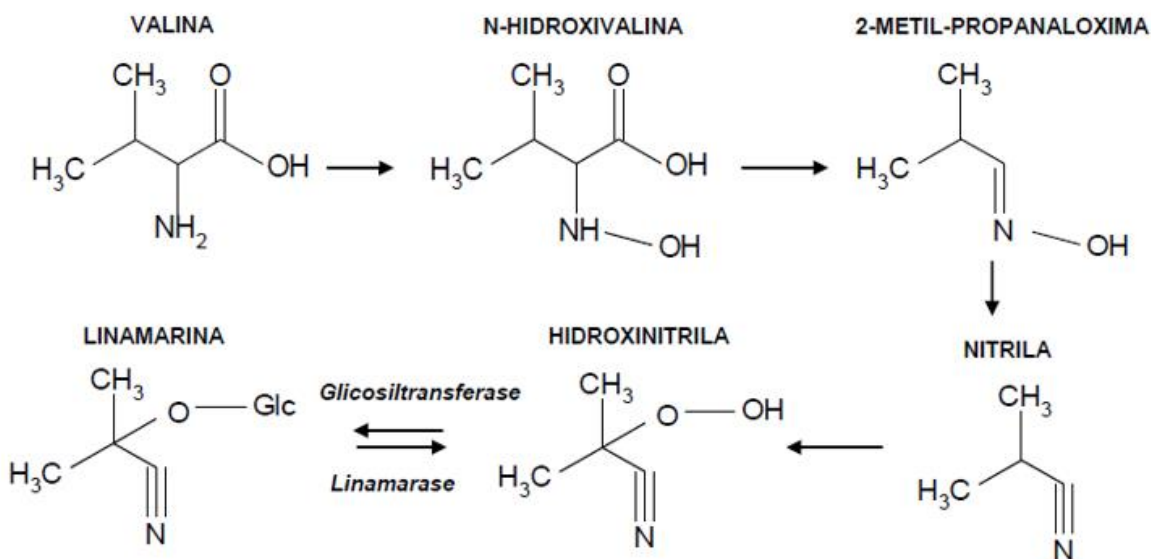
Fonte: adaptado de CZELUSNIAK, 2012.

### 3.3.3. Glicosídeos Cianogênicos

A estrutura básica dos glicosídeos cianogênicos inclui um núcleo de carbono ligado a um grupamento CN e dois grupos substituintes (R1: um grupo metila ou um grupo fenila ou *p*-hidroxifenila e R2: mais comumente pode ser um hidrogênio, mas também pode ser um grupo metila ou etila) e ligados a um açúcar, monossacarídeo ou dissacarídeo por uma ligação glicosídica (CRESSEY e REEVE, 2019).

Nas plantas, estes compostos são armazenados em vacúolos, e tem papel de atuar principalmente no seu sistema de defesa (GANJEWALA et al., 2010). A maioria é derivada de cinco aminoácidos hidrofóbicos: valina, leucina, isoleucina, fenilalanina e tirosina (POULTON, 1990; OWUAMANAM, 2010), como exemplificado na figura 6.

**Figura 8.** Síntese de um glicosídeo cianogênico a partir do aminoácido valina

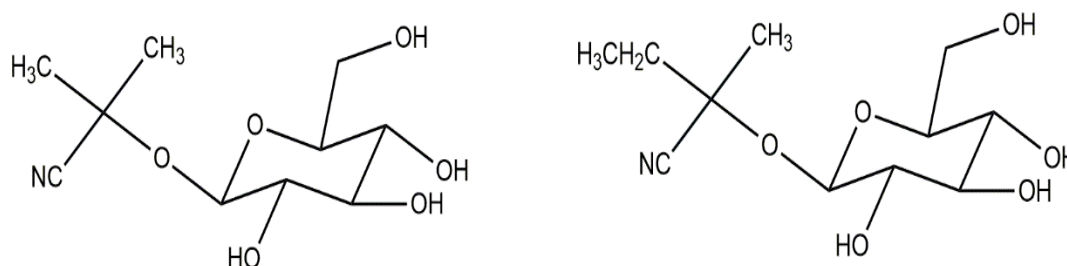


Fonte: adaptado de CRESSEY e REEVE, 2019.

Os glicosídeos cianogênicos são amplamente distribuídos no reino vegetal, sendo produzidos por mais de 2.600 plantas, muitas espécies alimentícias são cianogênicas: mandioca, feijão, cana-de-açúcar, aveia e vagem (LEÃO, 2013). Na mandioca são cerca de 95% de linamarina e 5% de lotaustralina (Figura 9), distribuídos de forma variável nas diferentes partes da planta

(BRADBURY; DENTON, 2010). No gênero *Cnidoscolus*, a linamarina já foi isolada na espécie *C. texanus*, por Seigler e Bloomfield (1969), identificada e quantificada em *C. aconitifolius* e *C. chayamansa* por Kuti e Konuru (2006) e é considerada o tipo predominante nas espécies deste gênero.

**Figura 9.** Estruturas dos glicosídeos cianogênicos: linamarina e lotaustralina



Fonte: ChemBioDraw Ultra

Por meio de uma reação de hidrólise ocorre a liberação do grupamento na forma de cianeto (HCN), esse mecanismo é o responsável pela toxicidade conhecida desta classe de compostos ((FSANZ, 2004; SPEIJERS, 1993). O HCN liberado é rapidamente absorvido no tudo digestivo e distribuído para os tecidos através da corrente sanguínea (TOKARNIA et al., 2000), bloqueando assim diversos complexos enzimáticos, sendo que o mecanismo primário de ação relaciona-se com a inibição da enzima citocromo-oxidase e seu local de ação é o ferro. da metalo-porfirina (FUKAMI 1976, GOMES 1980, BURROWS 1981). Como a absorção do HCN é rápida, os sinais de intoxicação cianídrica aparecem logo após ou mesmo durante a ingestão da planta.

Estudos envolvendo aplicação medicinal da linamarina, baseiam-se principalmente na utilização do seu poder tóxico. Segundo Cereda (2003), a base desta teoria está na ação detoxificante pela enzima rodanase. As células humanas normais têm rodanase e conseguem se defender do cianeto, mas células cancerosas não possuem rodanase e são alvos preferenciais do cianeto. Li e colaboradores (2010) realizaram um estudo utilizando um sistema linamarinase/linamarina adenovírus recombinante (Ad-lis/lin) para verificar a capacidade de inibição do hepatocarcinoma celular (HCC) em ratos. O resultado demonstrou que o sistema Ad-lis/lin pode proporcionar uma forma viável e eficaz para o tratamento de HCC, além de não ter apresentado citotoxicidade

considerável. No entanto, apesar destes resultados promissores, outras pesquisas se fazem necessárias para avaliar o potencial desta estratégia.

Girald e colaboradores (2011) também realizaram um estudo com ratos no combate às neoplasias, utilizando o sistema de entrega linamarinase/linamarina/glicose oxidase – lislin/GO no combate ao Glioblastoma Multiforme (GBM), por meio de um xenotransplante no cérebro dos ratos. O resultado foi em partes positivo pois houve eliminação dos tumores cerebrais pelo sistema, porém a dose do coquetel terapêutico foi tóxica ao animal.

#### 3.3.4. Terpenoides e esteroides

Os terpenos são compostos que ocorrem em todas as plantas e compreendem uma classe de metabólitos secundários com uma grande variedade estrutural (RAVEN et al., 2001; JAKIEMIU, 2008). Possuem larga distribuição entre o reino vegetal, especialmente nas plantas clorofiladas (FILHO, 2011).

O termo terpenoides é designado para definir todas as substâncias cuja origem biossintética, deriva de unidades de isopreno, pela via do ácido mevalônico (Fig. 8, p. ). De acordo com o número de unidades de isopreno, os terpenoides são classificados em hemiterpenos  $C_5H_8$ , monoterpenos  $C_{10}H_{16}$ ; sesquiterpenos  $C_{15}H_{24}$ ; diterpenos  $C_{20}H_{32}$ ; sesterpenos  $C_{25}H_{40}$ ; triterpenos  $C_{30}H_{48}$  aos quais os esteroides estão intimamente relacionados e, a partir de oito unidades, temos os politerpenos (DEWICK, 2002). Podem ainda ser divididos em quatro classes: triterpenos; esteroides (triterpenos que tem como estrutura base o ciclopentanoperidrofenantreno, ocorrendo na forma livre ou glicosilados); saponinas (glicosídeos esteroidais com ação surfactante e propriedades hemolíticas) e os glicosídeos cardioativos (OLEA; ROQUE, 1990).

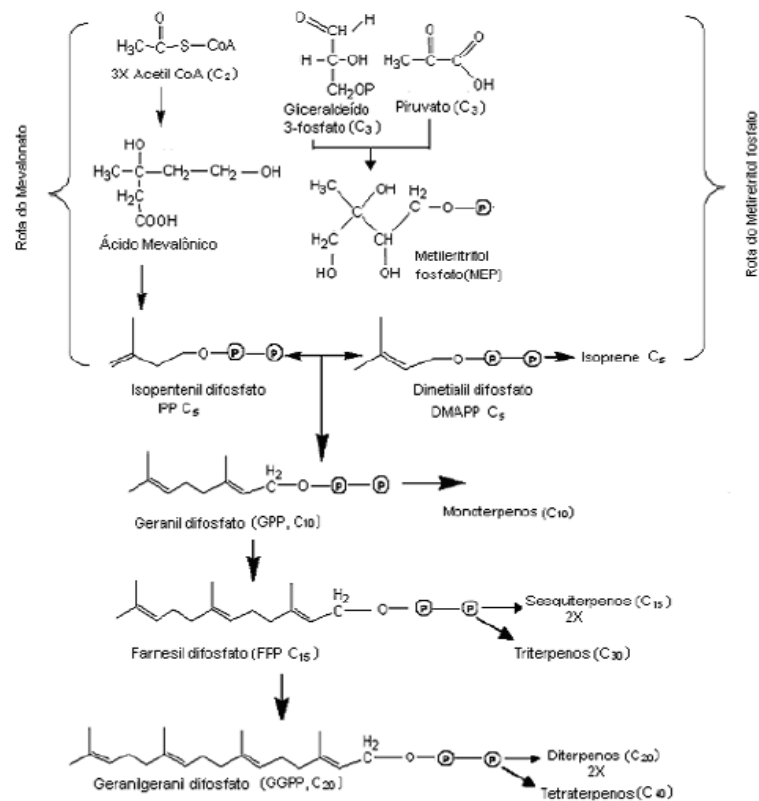
Os monoterpenos ( $C_{10}$ ) e sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), com estruturas terpênicas de menor massa molecular, apresentam volatilidade acentuada e essa última característica, por sua vez, apresenta grande importância para o aroma dos produtos naturais, particularmente de frutas cítricas, ervas aromáticas, especiarias e condimentos (FELIPE e BICKAS et al., 2017).

Os diterpenos ( $C_{20}$ ) compreendem um grande grupo de compostos não voláteis, possuindo uma vasta gama de atividades diferentes que incluem os hormônios, ácidos resínicos e agentes anticancerígenos (CROTEAU et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2003).



Os triterpenos (C<sub>30</sub>) formam os componentes das resinas, látex, ceras e cutícula das plantas. Entre os triterpenos está uma importante classe de substâncias, os esteroides, os quais são componentes dos lipídios de membrana e precursores de hormônios esteroides em mamíferos, plantas e insetos. Uma outra classe importante de triterpenos são as saponinas. Como o próprio nome indica, as saponinas são prontamente reconhecidas pela formação de espuma em certos extratos vegetais (PERES, 2004).

**Figura 10.** Biossíntese de terpenos.



Fonte: Adaptado de TAIZ E ZEIGER, 2004.

Dentre suas atividades biológicas têm-se o desenvolvimento e controle do sistema reprodutor humano, atuam como precursores da vitamina D, dos anticoncepcionais orais, anabolizantes e anti-inflamatórios (ROBBERS et al., 1997).

Os triterpenos vêm despertado grande interesse em pesquisas devido a diversas propriedades medicinais, tais como anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antitumoral,

antidiabética, antiulcerogênica, anticariogênica, hepatoprotetora, neuroprotetora, antiparasítica, analgésica e antioxidante (COLOMA et al., 2011).

Além dessas propriedades citadas, o campo da nanociência e química supramolecular também tem demonstrado grande interesse, como no caso do triterpeno pentacíclico triidroxilado do tipo oleanano (ácido arjunólico), bem como seus derivados alquílicos e arílicos que tem sido alvo de estudos nessa área. A capacidade desses compostos de gelificar quando em contato com solventes orgânicos em baixa concentração tem aberto a possibilidade de empregá-los em diversas áreas, tais como, fotografia, liberação de drogas no organismo, indústria alimentícia, cosméticos, hidrometalurgia e indústria de lubrificantes (BAG et al., 2009; SETH et al., 2011).

---

# METODOLOGIA

---

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

Foram utilizadas as folhas da espécie *C. quercifolius*, coletadas no Campus I da Universidade Estadual da Paraíba, localizado na cidade de Campina Grande – PB (7° 12'36.3" S / 35° 54'51.9" W), em junho de 2014. A espécie foi identificada e uma exsicata depositada no Herbário JPB - Lauro Pires Xavier da Universidade Federal da Paraíba sob o nº 61.260. A matéria-prima vegetal foi lavada, submetida a secagem em estufa de circulação de ar (Nova Ética) não ultrapassando 40°C e micronizada a pó usando moinho de facas.

### 4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA DROGA VEGETAL

#### 4.2.1 Termogravimetria

A análise termogravimétrica do pó das folhas de *C. quercifolius* foi obtida em uma termobalança modelo TGA-50H da Shimadzu, sob razão de aquecimento de 10° Cmin<sup>-1</sup> em faixa de temperatura de 25° C a 900° C e sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mLmin<sup>-1</sup>). Os cálculos de perda de massa foram realizados com auxílio do programa Tasy 60 da Shimadzu®.

#### 4.2.2 Análise de Infravermelho

As análises de FTIR foram realizadas em faixa de absorção de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup>, utilizando um aparelho Bruker-Vertex 70. Posteriormente, as curvas foram plotadas usando o programa Origin versão 8.0.

#### 4.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada a Espectroscopia de energia dispersiva

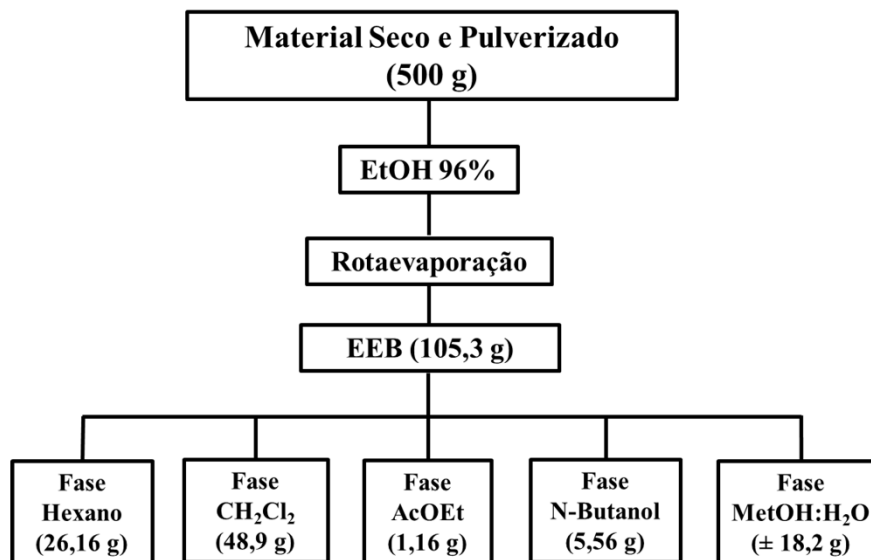
O material vegetal foi submetido à análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) juntamente com a análise química quantitativa por espectrometria de energia dispersiva (EDS) utilizando o equipamento Phenom ProX.

### 4.3 PREPARAÇÃO E PARTIÇÃO DO EXTRATO.

A produção do extrato etanólico bruto (EEB) se deu pelo processo de maceração exaustiva, utilizando etanol 96% como solvente, renovado a cada 72 horas, até o clareamento do mesmo. O extrato obtido foi submetido ao processo de rotaevaporação em temperatura inferior a 50° C, para eliminação do solvente.

Para o fracionamento do EEB foi realizada uma partição líquido:líquido com solventes em grau crescente de polaridade. Onde 100 gramas do EEB foram dissolvidos em uma solução de MeOH:H<sub>2</sub>O (7:3), e a partir desta ocorreram as partições com hexano (Hex), diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), acetato de etila (AcOEt) e n-butanol obedecendo a esta ordem e obtendo as respectivas fases particionadas (FP), conforme descrito no Esquema 1.

**Esquema 1.** Produção e partição do EEB das folhas de *C. quercifolius*



Fonte: Própria.

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DO EEB

##### 4.4.1 *Screening* fitoquímico

No *screening* fitoquímico foi avaliada a presença de alcaloides, esteroides/triterpenoides, fenóis, flavonoides, polissacarídeos e taninos. Os testes foram realizados por metodologia descrita por Barbosa (2001); Peixoto Sobrinho et al. (2012) e especificados na tabela 2.

**Tabela 2.** Pesquisa de metabólitos secundários em *C. quercifolius*.

Metabólito secundário	Reagente
Alcaloides	Dragendorff; Mayer; Bouchardat;
Esteroides/Triterpenoides	Liebermann-Buchard
Fenóis	Solução alcóolica de FeCl <sub>3</sub> a 1%
Flavonoides	Shinoda; oxalo-bórico
Polissacarídeos	Lugol
Taninos	Solução alcóolica de FeCl <sub>3</sub> a 1%

Fonte: Barbosa (2001); Peixoto Sobrinho et al. (2012)

##### 4.4.2 Determinação do teor de metabólitos secundários

A determinação do teor de polifenóis totais, flavonoides e taninos condensados foi realizada por espectrofotometria na região UV, ambos os métodos avaliaram a absorbância das soluções preparadas do extrato, definidas em metodologias específicas, frente a absorbância de soluções com reagentes padronizados, as quais expressaram os resultados baseados na concentração do metabólito secundário por miligramas equivalentes do reagente padrão. Inicialmente se obteve uma curva de calibração, específica para cada metabólito, feita a partir de uma solução do reagente padrão referente. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e tratados estatisticamente por ANOVA ( $p < 0,005$ ).

###### 4.4.2.1 Teor de polifenóis totais

Seguindo o método descrito por Chandra & Mejía (2004) com adaptações, foi adicionado 1 mL da solução aquosa do EEB (500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) em 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteau 1N. Esta

mistura permaneceu em repouso por 2 minutos. Posteriormente a este período, foi adicionado 2 mL de uma solução aquosa de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 20% (p/v), com novo repouso de 10 minutos. Em seguida, foi realizada a leitura da absorvância a 757 nm em espectrofotômetro frente a um branco composto por água destilada, reagente de Folin-Ciocalteu e solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 20%.

Para a obtenção da curva analítica, uma solução padrão de ácido gálico foi preparada nas concentrações de 1, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 30, 35, e 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### 4.3.2.2. *Teor de flavonoides*

Seguindo o método descrito por Meda et al. (2005), o EEB ( $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foi solubilizado em 5 mL de metanol, sendo adicionado o mesmo volume de uma solução (em metanol) de  $\text{AlCl}_3$  a 2% (p/v). A mistura permaneceu em repouso por 10 minutos antes da leitura da absorvância a 415 nm, frente a um branco composto pela solução metanólica de  $\text{AlCl}_3$ .

A curva de calibração foi construída a partir da solução do padrão quercetina em concentrações de 2, 4, 6, 8, 10, 13, 16, 19, 22, 26, 28 e 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### 4.3.2.3. *Teor de taninos condensados*

Este metabólito foi quantificado utilizando o método de Makkar e Becker (1993), no qual a amostra do EEB ( $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foi adicionado 3 mL de uma solução de catequina (4% p/v em metanol); em seguida foi adicionado 1,5 mL de HCl concentrado (37%) a esta solução. A reação ocorreu em tubos de ensaio, no banho-maria a cerca de 22° C. A leitura foi realizada a 500 nm, frente a um branco composto pela solução de catequina e HCl em etanol:água 50% (v/v).

A curva de calibração para este ensaio foi obtida a partir das soluções nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  do padrão catequina.

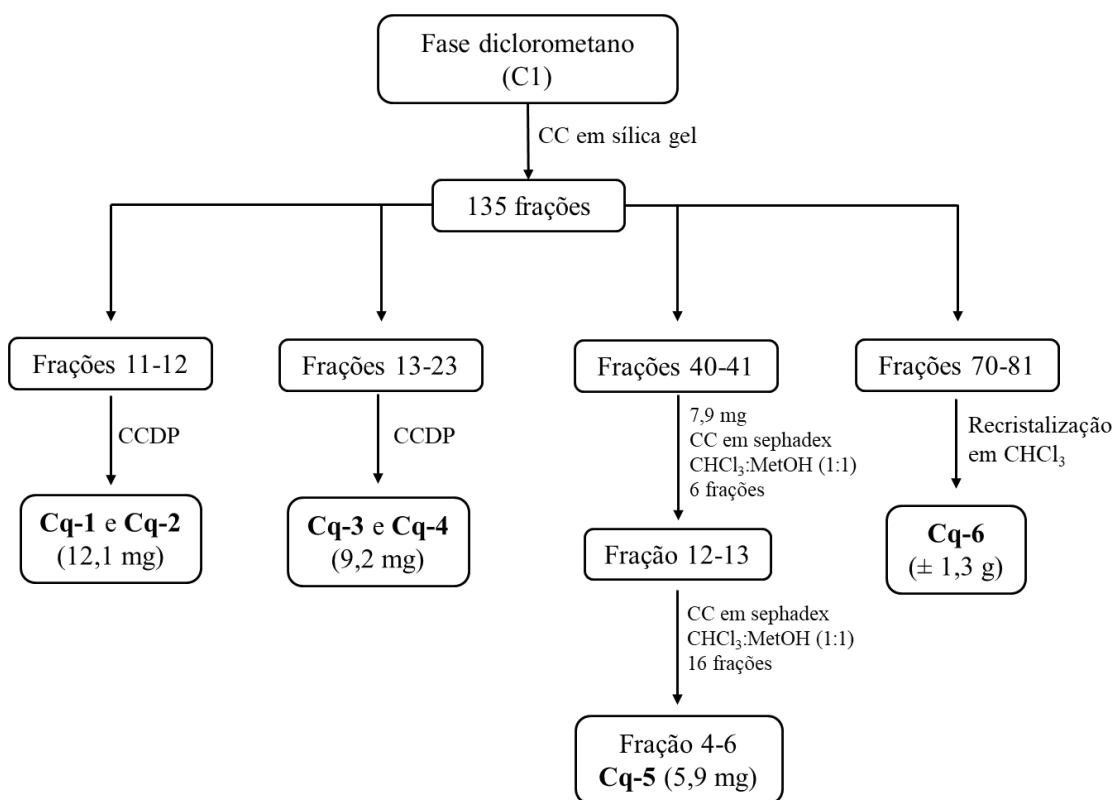
## 4.5 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO E ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS

As fases particionadas obtidas foram submetidas à cromatografia em coluna (CC) usando-se sílica gel (Macherey-Nagel) como fase estacionária e os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol puros e em diversas proporções como fase móvel. As frações foram analisadas

comparativamente em cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) utilizando diversos sistemas de eluição e reunidas, quando semelhantes, mediante o uso de sistemas reveladores como luz ultravioleta, em dois comprimentos de onda (254 e 365 nm) e/ou vapores de iodo sublimado. Algumas frações que apresentaram fatores de retenção (RF) muito próximos quando analisadas em CCDA e foram eluídas em CCDP (Cromatografia em Camada Delgada Preparativa) visando a separação dos mesmos.

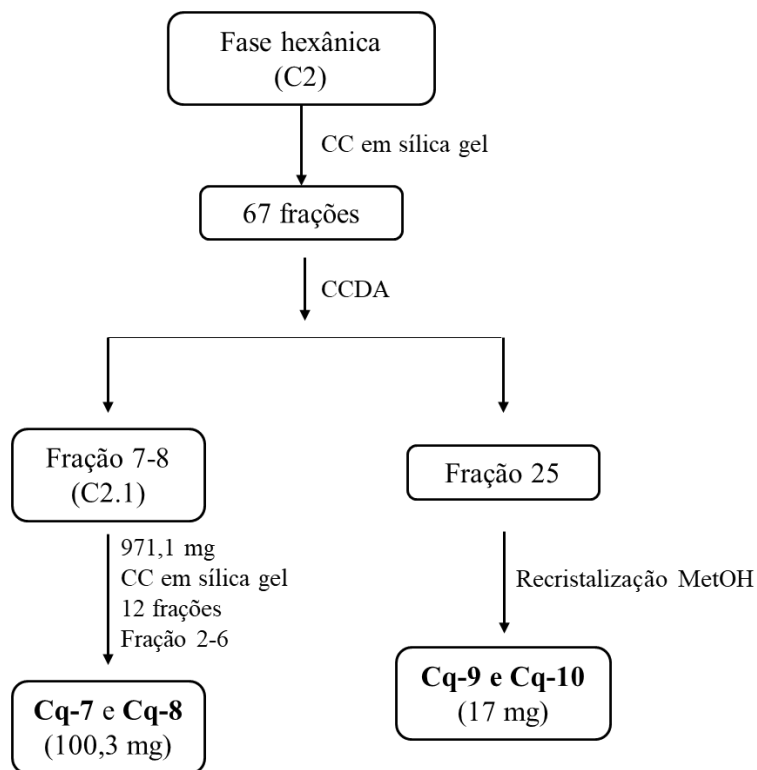
O fracionamento da fase diclorometano foi realizado por cromatografia em coluna, utilizando 40 g da amostra, tendo como fase estacionária sílica gel e como fase móvel os solventes hexano,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , AcOEt e MeOH puros ou em misturas binárias por ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 135 frações reunidas por semelhança de RF conforme verificado em CCDA e descrito no Esquema 2. Seguiu-se o mesmo procedimento para a fase hexânica, utilizando 20 g, obtendo-se 63 frações, conforme representado no Esquema 3.

**Esquema 2.** Fracionamento da fase diclorometano



Fonte: Própria



**Esquema 3** Fracionamento da fase hexânica

Fonte: Própria

#### 4.6 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS

As identificações estruturais dos constituintes isolados foram realizadas pelas técnicas espectroscópicas de Infravermelho (IV) utilizando o equipamento Perkin-Elmer, FT-IR-1750 em pastilhas de KBr com frequência medida em  $\text{cm}^{-1}$ . Espectrometria de massa (ESI/MS) modelo Amazon-X, da marca Bruker e Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio e carbono (RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) utilizando o equipamento da Varian operando em 200 e 500 MHz e o Oxford operando em 400 MHz. As análises foram realizadas no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IpeFarM) na Universidade Federal da Paraíba.

## 4.7 ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS

### 4.7.1. Atividade antimicrobiana

O EEB, as fases particionadas (hexânica, diclorometano, acetato de etila e n-butanólica) e a substância **Cq-6** foram solubilizadas em água destilada e DMSO a 0,5%, obtendo uma concentração final de 4000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  dos três primeiros e uma concentração final de 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  do produto isolado.

Os micro-organismos foram provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC): *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 76645 e *Candida tropicalis* ATCC 1369. As cepas foram estocadas em meios de culturas apropriados, de acordo com as recomendações do fornecedor e reativadas 24 horas antes da execução dos testes. Os inóculos foram preparados e padronizados em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) com turbidez equivalente ao tubo nº 0,5 da escala McFarland (CLSI, 2006).

O ensaio foi realizado pela técnica de microdiluição em placa (CLSI, 2009), que utilizou microplacas estéreis com 96 cavidades de fundo chato e tampa. Em cada poço, foi distribuído assepticamente, 100  $\mu\text{L}$  de Caldo Müeller-Hinton, sendo que na primeira sequência de poços na vertical foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  do produto-teste. Após as sucessivas diluições para os demais poços, foi adicionado 10  $\mu\text{L}$  do inóculo bacteriano em todas as cavidades contendo produtos-teste. As placas foram fechadas, seladas e incubadas por 37° C/24 h. Após o período de incubação, foi adicionado 20  $\mu\text{L}$  da solução aquosa de resazurina a 0,01% em cada poço, indicador colorimétrico de óxido-redução para caracterizar a viabilidade celular, passado o tempo de 2 horas com as placas em temperatura ambiente procederam-se as leituras. Os poços com cor azul indicam ausência de crescimento e de cor rosa, presença de crescimento bacteriano (PALOMINO et al., 2002).

### 4.7.2. Atividade hemolítica

O procedimento experimental foi revisto e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da UEPB (Certificado/CEP/UEPB No. 42778115.7.000.5187), seguindo a metodologia descrita por Pinto et al. (2012).

Utilizando sangue do tipo O+, coletado de voluntário adulto e sadio, colocado em tubo com EDTA. O plasma foi retirado após centrifugação a 2500 rpm por 5 minutos, posteriormente, a suspensão de hemácias foi lavada três vezes com solução salina a 1% a 2500 rpm por mais 5 minutos e ressuspendidas em solução salina a 1% com o volume final ajustado para 5%.

Em tubos de ensaio colocou-se 1,0 mL da suspensão de hemácia a 5% juntamente com 1,0 mL das soluções testes em tipos de concentração diferenciadas, onde o EEB e FP em 8 mg mL<sup>-1</sup> e 4 mg mL<sup>-1</sup> e o composto isolado **Cq-6** em 4 mg mL<sup>-1</sup> e 2 mg mL<sup>-1</sup>, aguardando 1 hora a temperatura ambiente para que ocorresse o processo de hemólise.

Após o tempo, cada tubo foi centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos, sendo o sobrenadante retirado para leitura em espectrofotômetro Biosystems BTS-310 no comprimento de onda de 540 nm. Como controle positivo foi utilizado Triton-X 100 e como negativo solução salina 1%. A análise foi realizada em triplicata e o cálculo do potencial hemolisante das substâncias seguiu a Equação 1.

$$Ph = \frac{A_e - A_b}{A_t} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Ph = Potencial Hemolisante (em porcentagem)

Ae = Absorbância do extrato

Ab = Absorbância do branco (controle negativo)

At = Absorbância do Triton-X 100 (controle positivo)

#### 4.7.3. Atividade anti-*leishmania*

Foram utilizados os parasitos da espécie *Leishmania (Leishmania) braziliensis* (MHOM/BR/2903), obtidos da Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC), os quais foram mantidos, *in vitro*, no Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas da Universidade Federal da Paraíba. As formas promastigotas de *L. braziliensis* foram cultivadas em meio Schneider® (Sigma, USA), suplementado com 20% de soro fetal bovino (SBF), 1% de urina humana masculina e antibióticos (penicilina 200 U mL<sup>-1</sup> e estreptomicina 0,1 mg mL<sup>-1</sup>) (Gibco, BR), mantidos incubados em estufa de demanda biológica de oxigênio (B.O.D.) a 26° C. Para manutenção da viabilidade celular, as células foram repicadas semanalmente e com o intuito de

futuras utilizações, as células em fase logarítmica de crescimento foram crio preservadas em meio Schneider suplementado acrescido de 12% de glicerina estéril e mantidas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

A substância **Cq-6** utilizada no estudo, foi solubilizada em dimetilsulfóxido (DMSO) (Mallinckrodt Chemicals, USA) a fim de se obter solução-estoque de  $20\text{ mg mL}^{-1}$ . Em cada protocolo, as solução-estoque foi diluída nos meios de cultura apropriados até atingir as concentrações desejadas, não ultrapassando a quantidade de 0,2% de DMSO.

Avaliou-se a atividade anti-*Leishmania* do composto utilizando o teste do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-zil]-2,5-difeniltetrazolio), (DAS NEVES, 2016). Esse método é baseado na atividade de enzimas desidrogenases citosólicas e mitocondriais, capazes de reduzir o MTT (coloração amarela) e formar um produto de coloração azul, insolúvel em água, o sal formazan. Em placa de 96 poços foram adicionados  $100\ \mu\text{L}$  de meio Schneider suplementado e cerca de  $1 \times 10^6$  promastigotas por poço. Posteriormente, foi adicionada a substância-teste em triplicata, previamente diluída em meio Schneider suplementado para um volume final de  $100\ \mu\text{L}$  para cada poço nas concentrações de 400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e  $3,12\ \mu\text{g mL}^{-1}$ . Em seguida foi incubada por 72 h em estufa de demanda biológica de oxigênio (B.O.D.) a temperatura de  $26^{\circ}\text{C}$ .

Ao final da incubação, foi adicionado  $10\ \mu\text{L}$  de MTT diluído em PBS a uma concentração final de  $5\text{ mg mL}^{-1}$ . A placa foi incubada por mais 4 h em estufa de demanda biológica de oxigênio a  $26^{\circ}\text{C}$ , e em seguida foi adicionado  $50\ \mu\text{L}$  de SDS a 10%. A placa ficou em *overnight* para dissolução do formazan e por último, foi realizada a leitura a 550 nm em leitora de placa (Biotek modelo ELx800). O controle negativo foi realizado com meio Schneider suplementado a 0,2% de DMSO. O controle positivo foi realizado na presença de anfotericina B como fármaco de referência.

#### 4.7.4. Atividade antiproliferativa

A atividade antiproliferativa das substâncias **Cq-6**, **Cq-7** e **Cq-8** foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Monks et al. (1991). Foram utilizadas até nove linhas celulares tumorais humanas (Tabela 3), cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer/EUA, e uma linhagem não tumoral humana HaCat (queratinócitos), cedida pelo Prof. Dr. Ricardo Della Coletta (FOP/UNICAMP). As células foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 (GIBCO BRL) suplementado com 5% de soro fetal bovino (GIBCO BRL) e uma mistura de penicilina:estreptomicina ( $1000\text{ U mL}^{-1}$ : $1000\ \mu\text{g mL}^{-1}$ , 1%) (meio completo).

**Tabela 3.** Linhagens celulares tumorais e não tumorais utilizadas nos ensaios de atividade antiproliferativa in vitro e suas densidades de inoculação (D.I.)

Linhagem	Órgão/Doença**	Origem	
		embrionária	D.I. (10 <sup>4</sup> cel mL <sup>-1</sup> )
U251	SNC; glioma	Ectoderme	4,0
MCF 7	Mama; adenocarcinoma	Ectoderme	6,0
NCI-ADR/RES *	Ovário; adenocarcinoma	Ectoderme	5,0
786-0	Rim; adenocarcinoma	Mesoderme	5,0
NCI-H460	Pulmão; carcinoma tipo não pequenas células	Endoderme	4,0
PC-3	Próstata; adenocarcinoma	Mesoderme	4,5
OVCAR-3	Ovário; adenocarcinoma	Mesoderme	7,0
HT-29	Colon; adenocarcinoma	Endoderme	5,0
K-562	Medula óssea; Leucemia mieloide crônica	Mesênquima	6,0
HaCaT	Pele (queratinócito) / Não tumoral	Ectoderme	4,0

\*linhagem resistente a múltiplos fármacos (CellMiner);

\*\*The Global Bioresource Center (ATCC)

As culturas foram plaqueadas em microplacas de 96 poços e incubadas a 37° C numa atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas de incubação, foram expostas a quatro concentrações (0,25; 2,5; 25 e 250 µg mL<sup>-1</sup>) das amostras, diluídas em DMSO/ RPMI (100 µL/ compartimento) e novamente incubadas nas condições estabelecidas anteriormente, só que por 48 horas.

Para preparação das amostras, uma alíquota de 5-10 mg foi dissolvida em 50-100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO Synth<sup>®</sup>). Após a dissolução, 50 µL dessa solução mãe foi dispersa em 950 µL de meio completo e diluída de forma sucessiva até a obtenção das concentrações finais de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg mL<sup>-1</sup>. Baseados em estudos anteriores, sabe-se que a concentração final de DMSO não interfere na viabilidade celular (DELLA TORRE, 2013). O medicamento quimioterápico cloridrato de doxorrubicina (Eurofarma) foi utilizado como controle positivo nas concentrações de 0,025; 0,25; 2,5 e 25 µg mL<sup>-1</sup>.

Após 48 horas de incubação, a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, as células foram fixadas com 50 µL/compartimento de TCA (ácido tricloroacético, Sigma<sup>®</sup>) a 50% e incubadas por 1 hora em geladeira, a 4° C. Depois de secas à temperatura ambiente, todas as placas foram coradas

com 50 µl/0,4% (p/v) de sulforrodamina B (SRB Sigma®) dissolvido em ácido acético a 1%; e mantido por 20 minutos à temperatura ambiente. As placas foram então lavadas com solução de ácido acético a 1% e secas à temperatura ambiente. Finalmente, o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com 150 µl Trizma Base (10 µM, pH 10,5) (Sigma®). Uma placa controle, denominada T0, contendo todas as linhagens tumorais avaliadas no experimento foi fixada com TCA, nas condições descritas acima, logo após a adição das amostras nas placas tratadas, a fim de determinar qual a quantidade de células presente no início do experimento.

A análise dos resultados foi realizada por leitura espectrofotométrica da absorbância a 540 nm em um leitor de microplacas (Molecular Devices®, modelo VersaMax). As médias das absorbâncias foram calculadas descontando o valor de seus respectivos brancos e determinou-se o crescimento (%) de cada linha testada contra as diferentes amostras, pelas fórmulas demonstradas (p.). Os dados de absorbância foram analisados e reunidos na elaboração de gráficos relacionando a porcentagem de crescimento celular com a concentração da amostra. Utilizando o software OriginPro® 8.0. Calculou-se a regressão linear das curvas obtidas com a porcentagem média de crescimento e calculou-se GI<sub>50</sub> (inibição de crescimento 50, concentração necessária para inibir a proliferação celular em 50%), de acordo com a Equação 2 e 3.

- Se  $TA \geq T0$ , amostra citostática (ou proliferação celular estimulada):

$$Crescimento (\%) = 100 \times \frac{[TA - T0]}{[T1 - T0]} \quad (Equação 2)$$

- Se  $TA < T0$ , amostra citocidada:

$$Crescimento (\%) = 100 \times \frac{[TA - T0]}{[T0]} \quad (Equação 3)$$

Sendo:

**TA** - Média da absorbância da célula tratada;

**T1** - Controle celular;

**T0** - Controle celular no dia da adição das amostras.

---

# RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

#### 5.1.1 Perfil Termogravimétrico da droga vegetal

A curva termogravimétrica (TG) (Figura 11) da droga vegetal mostrou a ocorrência de três eventos de perda de massa. No primeiro houve uma perda de 11,2%, essa perda inicial pode ser relacionada à desidratação da droga vegetal e a evaporação de constituintes voláteis como os óleos essenciais (WESOLOWSKI et al., 2003; COSTA, 2010). No segundo evento, houve uma perda equivalente a 50,9% da massa do material, uma perda significativa, que pode ser atribuída a decomposição térmica de carboidratos e demais compostos orgânicos presentes na droga vegetal (WESOLOWSKI et al., 2003; ARAÚJO et al., 2006; COSTA, 2010). No último evento a perda de massa foi equivalente a 26,9% entre as temperaturas de 425 e 675° C. Esta última perda pode ser referente à queima dos restos carbonizados da matéria orgânica (FARIA et al., 2002; COSTA, 2010), conforme Tabela 4. Os eventos descritos pela curva TG também podem ser observados na curva derivada (DTG), o que confirmou a ocorrência dos 3 eventos relativos as perdas de massa.

A termogravimetria é amplamente utilizada no controle de qualidade de drogas naturais ou sintéticas, pois fornecem dados sobre a estabilidade do material, em relação ao seu comportamento térmico. Além de que, o conhecimento do comportamento térmico do componente majoritário de uma planta, pode-se ser útil para identificar a autenticidade de um extrato bruto (GIOLITO e IONASHIRO, 1988).

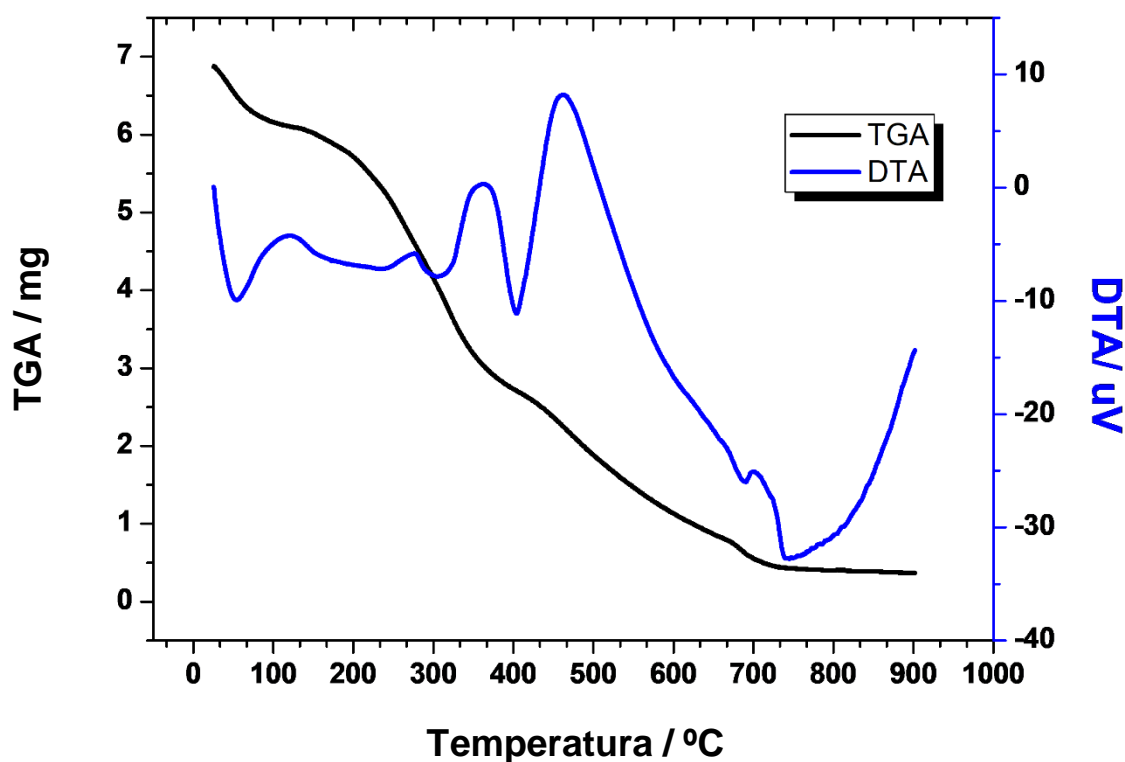
Amostras de drogas vegetais são misturas multicomponentes de compostos orgânicos e inorgânicos, e suas curvas de decomposição térmica são parcelas de fenômenos físico-químicos que ocorrem quando a mesma é aquecida. Assim, não é possível associar o efeito térmico e a perda da massa à identificação e decomposição de um determinado componente de amostra (OLIVEIRA et al., 2010). No entanto, as técnicas termoanalíticas podem ser utilizadas para caracterização, pois possibilitam a determinação dos teores de umidade e cinzas, estudos de estabilidade e da cinética de degradação, entre outras características do produto candidato a droga vegetal ou ingrediente ativo farmacêutico (SANTANA et al., 2012).



**Tabela 4.** Perfil térmico (TGA) da droga vegetal proveniente de *C. quercifolius* com suas respectivas perdas de massa, em cada intervalo de temperatura (°C).

Etapas de decomposição	Ti (° C)	Tf (° C)	Perda de massa (%)
Primeira	25	125	11,2
Segunda	125	425	50,9
Terceira	425	675	26,9

**Figura 11.** Curva Termogravimétrica da droga vegetal *C. quercifolius*.



Fonte: OriginPro® 8

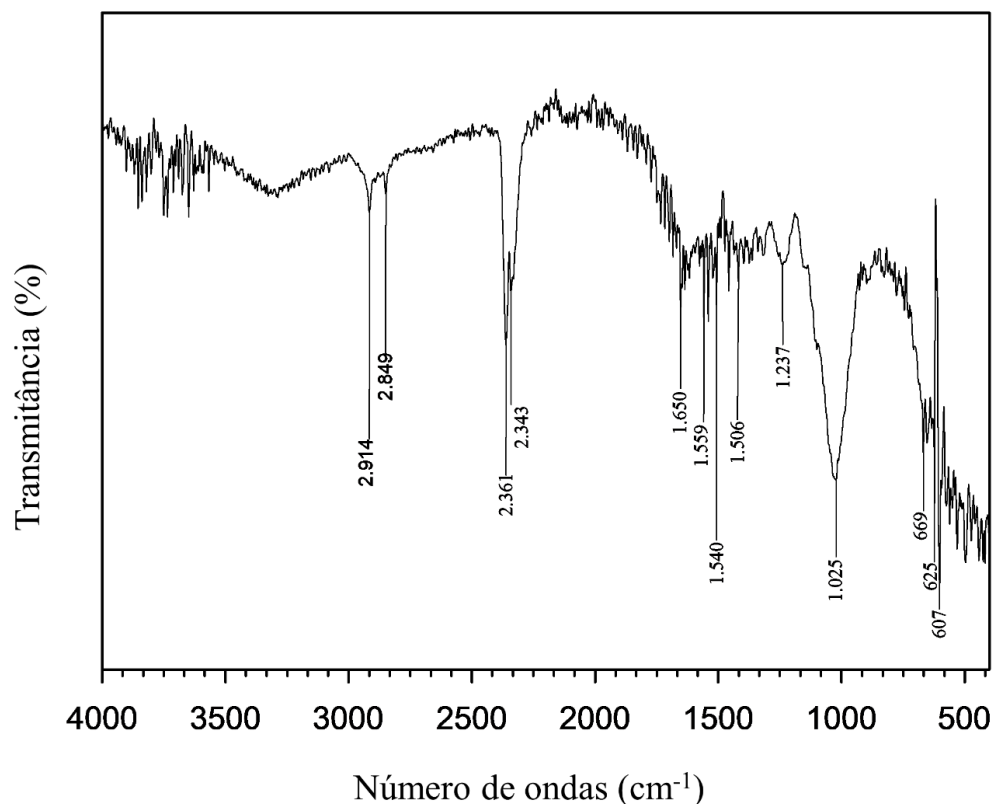
### 5.1.2 Análise da droga vegetal por infravermelho

O espectro na região do IV (Figura 12) apresentou uma banda larga em  $3.320\text{ cm}^{-1}$  característica de estiramento axial de ligação O-H. Verificou-se também duas bandas de absorção, uma em  $2.912\text{ cm}^{-1}$  e a outra em  $2.851\text{ cm}^{-1}$  relativas a estiramentos do tipo C-H de alcanos. Em  $2.343\text{ cm}^{-1}$  foi visualizada uma banda de média intensidade de  $\text{C}\equiv\text{N}$ , o que possivelmente indica a

presença de glicosídeos cianogênicos comumente encontrados em espécies do gênero *Cnidoscopus*. Bandas em  $1.649$  e  $1.560\text{ cm}^{-1}$  são sugestivas de ligação C=C de anéis aromáticos, que aliadas a uma banda de média intensidade em  $1.025\text{ cm}^{-1}$ , característica de ligação C-O (PAVIA et al., 2012), indica uma variedade de metabólitos secundários, como compostos fenólicos, taninos, flavonoides e terpenos.

A análise de extratos vegetais por essa técnica é de grande valor, uma vez que os espectros obtidos de forma rápida se relacionam diretamente com a composição química destes (SANTANA et al., 2012). Esta técnica pode ser considerada também a mais adequada dentre os métodos espectroscópicos não destrutivos, com atenção voltada para produtos farmacêuticos sólidos, uma vez que os materiais não estão sujeitos à energia térmica ou mecânica durante a preparação da amostra, o que impede possíveis transformações de estado sólido (TITA et al., 2011).

**Figura 12.** Espectro na região do Infravermelho da droga vegetal de *C. quercifolius*.

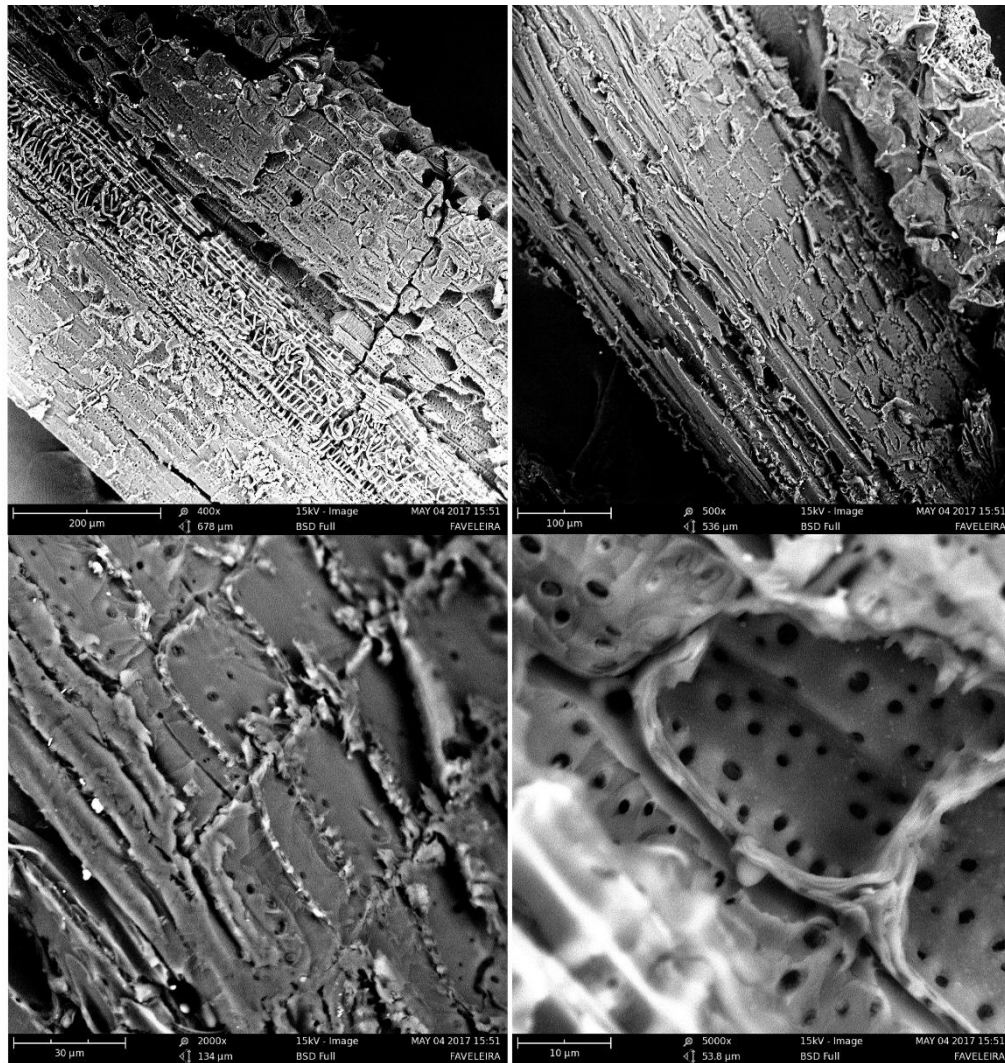


Fonte: OriginPro® 8

### 5.1.3. Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada a Espectroscopia de Energia Dispersiva

As imagens da microscopia eletrônica (Figura 13) contribuem para a identificação e autenticação do material utilizado no estudo, confirmando sua origem vegetal, correspondendo as folhas, devido à presença de estruturas características como células e vasos condutores (COSTA, 2017). A aparência murcha está relacionada com a secagem do material de estufa.

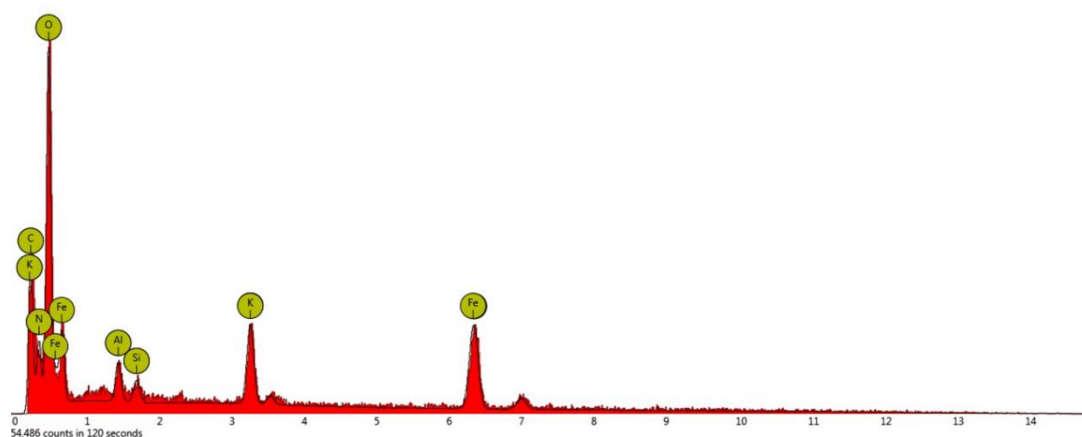
**Figura 13.** Fotomicrografias da droga vegetal de *C. quercifolius*.



Fonte: OriginPro® 8

A análise por EDS estima a composição química aproximada do material. Seu espectro indicou uma predominante presença do íon oxigênio, o que pode ser justificado pela presença de poros de acordo com a observação da Figura 13 (p. 58) com aumento de 2000x e 5000x, respectivamente. Do ponto de vista farmacotécnico, esses poros podem facilitar a penetração de solventes em processos extrativos e, conseqüentemente, a liberação de moléculas bioativas. A análise também se torna relevante no que diz respeito ao controle de qualidade do material, pois destaca a presença de possíveis impurezas ou contaminantes pela identificação dos íons silício, alumínio e ferro indicados pelo espectro (Figura 14), sugerindo tratamentos rigorosos no material antes sua manipulação como droga vegetal.

**Figura 14.** Espectro de EDS da droga vegetal *C. quercifolius*



Fonte: OriginPro® 8

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA

O rastreamento dos metabólitos secundários do extrato etanólico bruto (EEB) das folhas de *C. quercifolius* foi considerado positivo para a presença de fenóis, taninos, flavonoides e esteroides/triterpenoides.

A concentração de polifenóis foi de 74,19 mg g<sup>-1</sup> equivalentes de ácido gálico, com a equação de calibração do ácido gálico sendo  $y = 0,0247x - 0,0747$  ( $R^2 = 0,9894$ ). O teor de flavonoides foi de 16,72 mg g<sup>-1</sup> equivalentes de quercetina, a equação de calibração da quercetina

foi  $y = 0,034x - 0,0053$  ( $R^2 = 0,9977$ ). A concentração de taninos condensados foi de  $48,39 \text{ mg g}^{-1}$  equivalentes de catequina, tendo como equação de calibração da catequina  $y = 0,0024x + 0,0522$  ( $R^2 = 0,9924$ ), conforme os dados observados na tabela 5.

Estes resultados são corroborados pelo estudo de Peixoto Sobrinho e colaboradores (2012), que verificou a presença de metabólitos secundários em quatro espécies do gênero *Cnidocolus*: *C. infestus*; *C. pubescens*, *C. quercifolius* e *C. urens*. No extrato metanólico das folhas de *C. quercifolius* observou a presença destes mesmos metabólitos, além de antocianinas, derivados antracênicos, antraquinonas, cumarinas, lignanas, saponinas e xantinas. Também destacou a ausência de alcaloides e naftoquinonas em todas as espécies avaliadas.

Na triagem fitoquímica realizada por Gomes e colaboradores (2014), também foi constatada a presença de cumarinas, derivados antracênicos, flavonoides, lignanas e triterpenos/esteroides e a ausência de alcaloides, monoterpênicos/diterpênicos, antocianinas, naftoquinonas e saponinas no extrato etanólico das folhas de *C. quercifolius*. Além disso, também concluíram que os extratos da casca e folha apresentaram atividade anti-inflamatória e antinociceptiva, essas atividades podem estar relacionadas justamente à presença de flavonoides, visto que esses metabólitos possuem atividade anti-inflamatória (CARVALHO, 2004; SIMÕES et al., 2010), e a presença de triterpenos/esteroides que atuam na reação imunológica e revelam efeitos bastante promissores quando utilizados como anti-inflamatórios (CARVALHO, 2004; HUANG et al., 2012).

Os ensaios de teor revelaram em termos quantitativo a presença de compostos fenólicos, muitas pesquisas têm demonstrado uma relação significativa entre o conteúdo de compostos fenólicos e a atividade antioxidante (NAZARUK, 2008). Espécies que apresentaram maior conteúdo de compostos fenólicos obtiveram os melhores resultados nos ensaios de atividade antioxidante qualitativa (EAQ), no de remoção de radicais livres (DPPH) e no ensaio quelante do íon ferroso (FIC) (PEIXOTO SOBRINHO et al., 2012).

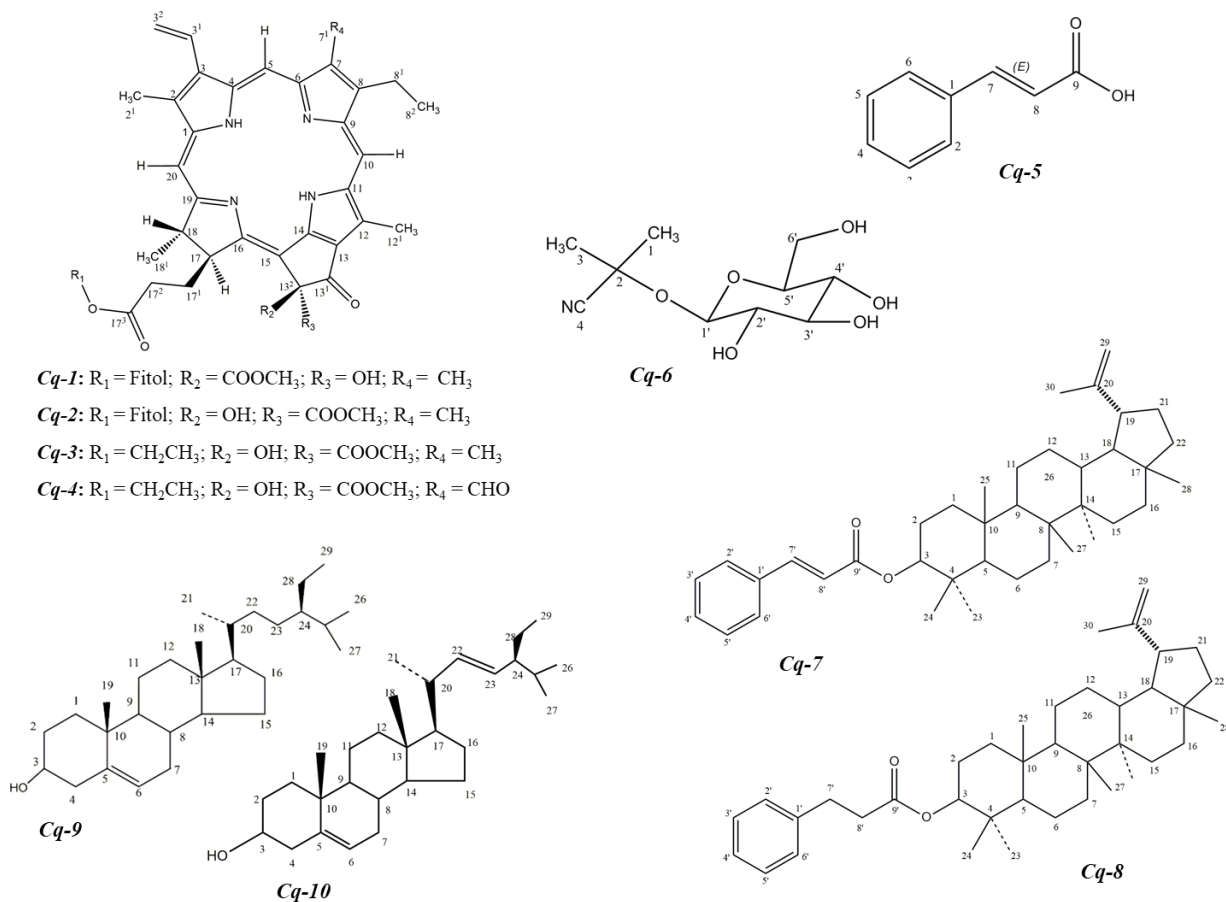
**Tabela 5.** Valores obtidos no ensaio de quantificação dos metabólitos secundários (polifenóis totais, flavonoides e taninos condensados) do EEB da espécie *C. quercifolius* Pohl.

Metabólito secundário	Padrão	Teor (%)	Teor ( $\text{mg g}^{-1}$ )
Polifenóis totais	Ácido gálico	7,41	79,14
Flavonoides	Quercetina	1,67	16,72
Taninos condensados	Catequina	4,83	48,39

### 5.3. SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *C. QUERCIFOLIUS*

O estudo fitoquímico do extrato etanólico bruto das folhas de *C. quercifolius* Pohl resultou no isolamento de dez substâncias, visualizadas na Figura 13. Identificadas como quatro derivados porfirínicos (*Cq-1*, *Cq-2*, *Cq-3* e *Cq-4*), um ácido cinâmico (*Cq-5*), um glicosídeo cianogênico (*Cq-6*), uma mistura de triterpenos (*Cq-7* e *Cq-8*) e outra de esteroides (*Cq-9* e *Cq-10*). Os códigos foram definidos de acordo com as iniciais da espécie e em ordem de isolamento.

**Figura 15.** Substâncias isoladas de *C. quercifolius*



Fonte: Própria

### 5.2.1 Identificação de *Cq-1* e *Cq-2*

A mistura contendo os compostos *Cq-1* e *Cq-2* (Figura 16, p. 64), apresentou-se com um pó verde azulado com brilho metálico, solúvel em  $\text{CHCl}_3$  (Clorofórmio).

O espectro de IV (Figura 17, p. 67) apresentou uma banda larga em torno de  $3442\text{ cm}^{-1}$  sugestiva de ligação O-H, bandas em  $2958$ ,  $2925$  e  $2856\text{ cm}^{-1}$  característicos de estiramentos de carbono  $\text{sp}^3$ , uma banda intensa em  $1732\text{ cm}^{-1}$  característica de carbonila de éster, outra banda de absorção em  $1620\text{ cm}^{-1}$  sugestiva de estiramento de C=C de alcenos, uma banda de absorção em  $1463\text{ cm}^{-1}$  e outra em  $1378\text{ cm}^{-1}$  sugestivas de dobramento de carbonos metilênicos e metílicos, respectivamente. Na região entre  $1287\text{ cm}^{-1}$  observa-se bandas de absorção indicativas de estiramento C-N de amina, na região entre  $1160$  e  $1041\text{ cm}^{-1}$  aparecem bandas características de estiramento C-O de éster e em  $742\text{ cm}^{-1}$  o espectro apresenta uma absorção corresponde a banda de cadeia longa de  $\text{CH}_2$  (PAVIA, 2012).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) mostrou um conjunto de sinais característicos de núcleo porfirínico presente em feofitinas (MATSUO et al., 1996; JERZ et al., 2007; CHAVES et al., 2013a). Em campo baixo foram visualizados três grupos de picos duplos, numa razão de aproximadamente 64% para o composto majoritário e 36% para o composto minoritário, o que sugerem a presença de duas feofitinas nessa amostra, os sinais em  $\delta_{\text{H}} 9,56$  (s, 1H);  $9,41$  (s, 1H) e  $8,64$  (s, 1H) foram atribuídos ao composto *Cq-1* e os sinais em  $\delta_{\text{H}} 9,53$  (s, 1H);  $9,38$  (s, 1H) e  $8,61$  (s, 1H) ao composto *Cq-2* (Figura 18, p. 68). De acordo com Chaves et al. (2013), esses sinais são característicos dos hidrogênios oleofínicos das posições 5, 10 e 20, respectivamente.

Os sinais em  $\delta_{\text{H}} 7,98$  (dd,  $J = 11,6$  e  $17,6$  Hz, 2H),  $6,23$  (dl,  $J = 17,9$  Hz, 2H) e  $6,17$  (dl,  $J = 11,7$  Hz, 2H) podem ser sugeridas para os hidrogênios vinílicos das posições  $3^1$ ,  $3^{2a}$  e  $3^{2b}$  dos dois compostos, respectivamente (Figura 19, p. 69).

Os sinais em  $\delta_{\text{H}} 3,64$  (m, 6H), além dos singletos em  $\delta_{\text{H}} 3,62$  (s, 3H);  $3,41$  e  $3,20$  (s, 6H), sendo estes três últimos característicos de hidrogênios de metilas ligadas a carbonos  $\text{sp}^2$ , podem ser atribuídos aos carbonos das posições  $8^1$ ,  $12^1$ ,  $2^1$  e  $7^1$ , dos dois compostos respectivamente (MATSUO et al., 1996; GOMES et al., 2015) (Figura 20, p. 69).

A diferenciação dos compostos se deu a partir da observação dos sinais em  $\delta_{\text{H}} 5,56$  (s, 1H) e  $\delta_{\text{H}} 5,37$  (s, 1H), que de acordo com Jerz et al. (2007) e Matsuo et al. (1996), permitem inferir que

ambas as absorções são sugestivas de hidroxilas na posição 13<sup>2</sup>, sendo que a primeira de hidroxila com estereoquímica *S* e a segunda *R* (Figura 20, p. 69).

De acordo com Matsuo et al. (1996), os sinais em  $\delta_{\text{H}} 4,10$  (*m*, 1H) e  $\delta_{\text{H}} 4,48$  (*m*, 1H) podem ser atribuídos para os H-17 e H-18 do isômero *S* e os sinais em  $\delta_{\text{H}} 4,51$  (*m*, 1H) e  $\delta_{\text{H}} 4,68$  (*m*, 1H) para os mesmos hidrogênios do isômero *R*. Além disso, um conjunto de sinais entre  $\delta_{\text{H}} 0,76$ -1,71, característicos de hidrogênios de grupos metílicos, metilênicos e metínicos sugerem a presença do grupamento fitol na molécula (JERZ et al., 2007) (Figura 20, p. 69).

No espectro de RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) de **Cq-1** foram visualizados picos para 55 átomos de carbono, sendo 19 para carbonos quaternários: 142,1 (C-1), 131,89 (C-2), 136,62 (C-3), 136,32 (C-4); 155,44 (C-6); 136,52 (C-7); 145,31 (C-8); 151,1 (C-9); 37,9 (C-11); 129,5 (C-12); 128,9 (C-13); 192,1 (C-13<sup>1</sup>); 89,1 (C-13<sup>2</sup>); 173,6 (C-13<sup>3</sup>); 149,9 (C-14); 107,7 (C-15); 162,5 (C-16); 172,9 (C-17<sup>3</sup>); 172,5 (C-19) 11 para carbonos metínicos: 129,1 (C-3<sup>1</sup>); 98,0 (C-5); 104,3 (C-10); 51,9 (C-17); 50,43 (C-18); 93,77 (C-20); 128,9 (C-2<sup>''</sup>); 143,0 (C-3<sup>''</sup>); 32,7 (C-7<sup>''</sup>); 32,8 (C-11<sup>''</sup>); 28,1 (C-15<sup>''</sup>). Para carbonos metilênicos: 123,0 (C-3<sup>2</sup>); 19,5 (C-8<sup>1</sup>); 31,7 (C-17<sup>1</sup>); 32,0 (C-17<sup>2</sup>); 60,5 (C-1<sup>''</sup>); 39,9 (C-4<sup>''</sup>); 25,5 (C-5<sup>''</sup>); 36,7; (C-6<sup>''</sup>); 37,2 (C-8<sup>''</sup>); 25,0 (C-9<sup>''</sup>); 37,5 (C-10<sup>''</sup>); 37,4 (C-12<sup>''</sup>); 25,4 (C-13<sup>''</sup>); 39,4 (C-14<sup>''</sup>) e 11 para carbonos metílicos: 12,2 (C-2<sup>1</sup>); 11,3 (C-7<sup>1</sup>); 17,6 (C-8<sup>2</sup>); 12,4 (C-12<sup>1</sup>); 53,5 (C-13<sup>4</sup>); 22,8 (18<sup>1</sup>); 22,8 (C-16<sup>''</sup>) ; 22,7 (C-17<sup>''</sup>); 19,8 (C-18<sup>''</sup>); 19,7 (C-19<sup>''</sup>) e 16,5 (C-20<sup>''</sup>) (Figura 21, p. 70).

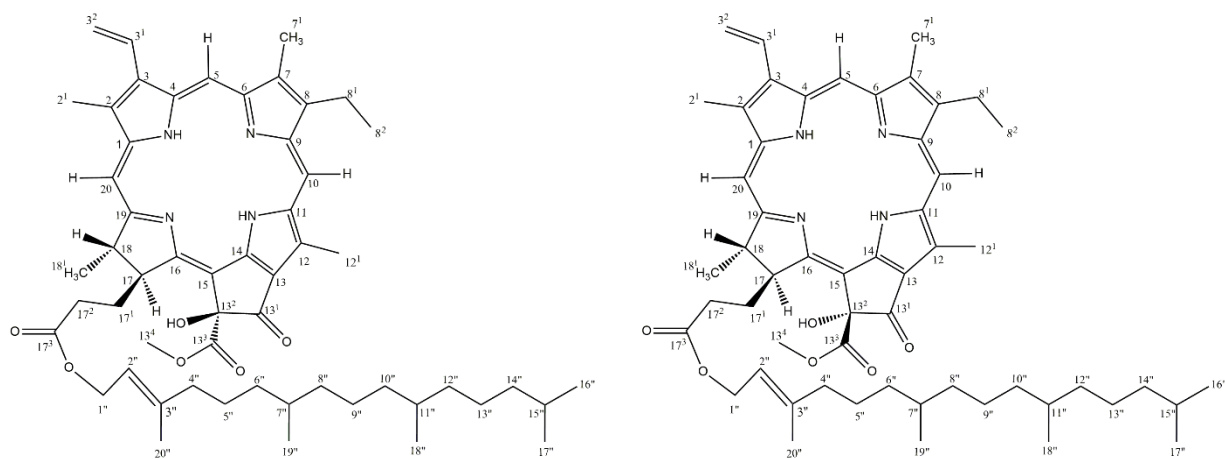
Para **Cq-2** o espectro de RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) também apresentou sinais para 55 átomos de carbono, destes 19 para carbonos quaternários: 142,2 (C-1); 132,0 (C-2); 136,5 (C-3); 136,3 (C-4); 155,6 (C-6); 136,4 (C-7); 145,3 (C-8); 151,0 (C-9); 137,8 (C-11); 129,7 (C-12); 129,1 (C-13); 192,3 (C-13<sup>1</sup>); 89,2 (C-13<sup>2</sup>); 173,7 (C-13<sup>3</sup>); 150,3 (C-14); 107,7 (C-15); 162,0 (C-16); 173,1 (C-17<sup>3</sup>); 172,9 (C-19); 11 para carbonos metínicos: 129,2 (C-3<sup>1</sup>); 97,9 (C-5); 104,2 (C-10); 50,9 (C-17); 50,2 (C-18); 93,5 (C-20); 128,9 (C-2<sup>''</sup>); 142,9 (C-3<sup>''</sup>); 32,6 (C-7<sup>''</sup>); 33,0 (C-11<sup>''</sup>); 28,1 (C-15<sup>''</sup>) 14 para carbonos metilênicos: 122,9 (C-3<sup>2</sup>); 19,6 (C-8<sup>1</sup>); 31,7 (C-17<sup>1</sup>); 32,0 (C-17<sup>2</sup>); 60,7 (C-1<sup>''</sup>); 39,9 (C-4<sup>''</sup>); 25,1 (C-5<sup>''</sup>); 36,6 (C-6<sup>''</sup>); 37,2 (C-8<sup>''</sup>); 25,0 (C-9<sup>''</sup>); 37,5 (C-10<sup>''</sup>); 37,4 (C-12<sup>''</sup>); 25,3 (C-13<sup>''</sup>); 39,4 (C-14<sup>''</sup>); 28,1 (C-15<sup>''</sup>) e 11 para carbonos metílicos: 12,3 (C-2<sup>1</sup>); 11,5 (C-7<sup>1</sup>); 17,6 (C-8<sup>2</sup>); 12,4 (12<sup>1</sup>); 53,9 (C-13<sup>4</sup>); 22,8 (C-18<sup>1</sup>); 22,8 (C-16<sup>''</sup>); 22,7 (C-17<sup>''</sup>); 19,8 (C-18<sup>''</sup>); 19,7 (C-19<sup>''</sup>) e 16,5 (C-20<sup>''</sup>) (Figura 21, p. 70).

Por meio da análise dos espectros de IV, RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, além da comparação com os dados obtidos na literatura foi possível identificar que a mistura de compostos tratavam-se dos



isômeros 13<sup>2</sup>-Hidroxi-(13<sup>2</sup>-*S*)-feofitina a (*Cq-1*) e 13<sup>2</sup>-Hidroxi-(13<sup>2</sup>-*R*)-feofitina a (*Cq-2*) isolada pela primeira vez na família Euphorbiaceae.

**Figura 16.** Estruturas da 13<sup>2</sup>-Hidroxi-(13<sup>2</sup>-*S*)-feofitina a e 13<sup>2</sup>-Hidroxi-(13<sup>2</sup>-*R*)-feofitina a



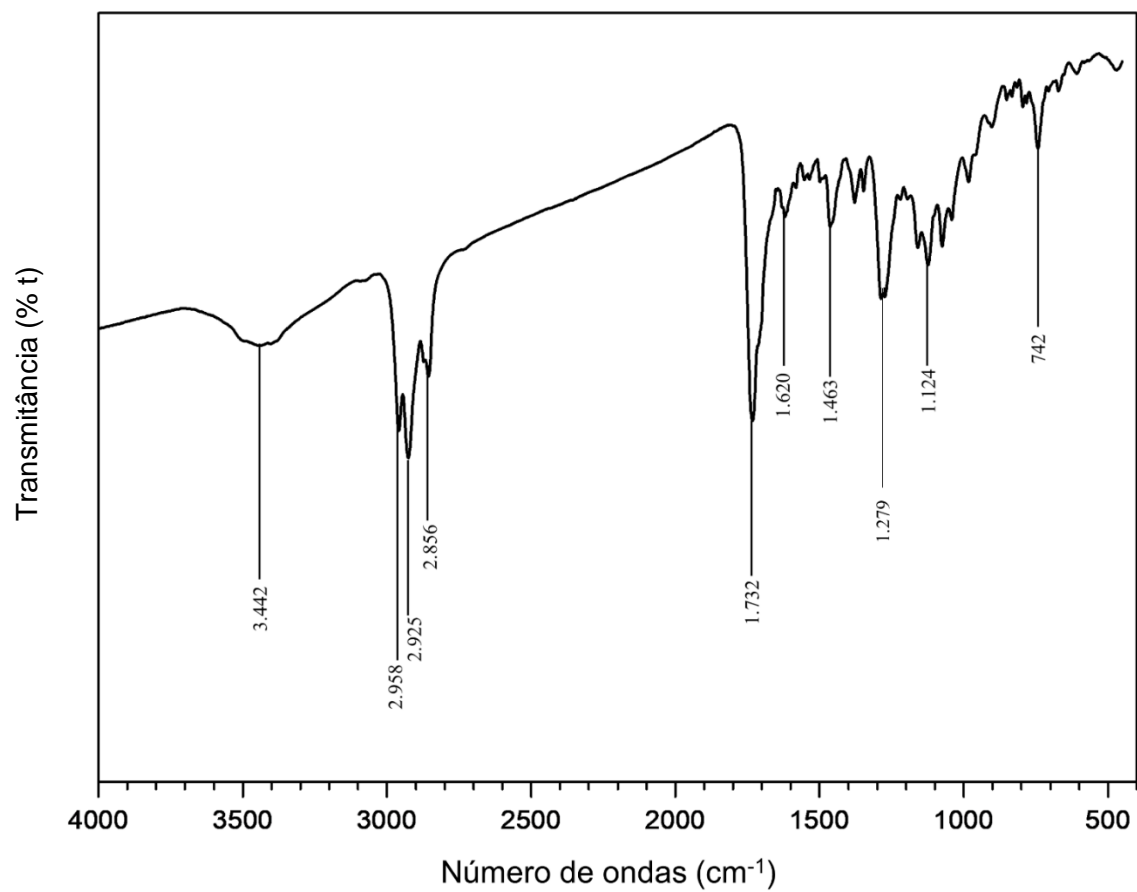
**Tabela 6.** Dados dos deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 e 50 MHz) de *Cq-1* e *Cq-2* e da literatura ( $\text{CDCl}_3$ , 500 e 125 MHz) de Matsuo et al., (1996).

<i>Cq-1</i>			13 <sup>2</sup> -Hidroxi-(13 <sup>2</sup> -S)-feofitina a		<i>Cq-2</i>		13 <sup>2</sup> -Hidroxi-(13 <sup>2</sup> -R)-feofitina a	
C	$\delta\text{H}$	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$	$\delta\text{C}$
1	-	142,1	-	142,8	-	142,2	-	142,9
2	-	131,8	-	131,8	-	132,0	-	131,9
3	-	136,6	-	136,6	-	136,5	-	136,5
4	-	136,3	-	136,3	-	136,3	-	136,4
6	-	155,4	-	155,4	-	155,6	-	155,6
7	-	136,5	-	136,2	-	136,4	-	136,3
8	-	145,3	-	145,8	-	145,3	-	145,3
9	-	151,1	-	151,1	-	151,0	-	151,0
11	-	137,9	-	137,8	-	137,8	-	137,8
12	-	129,5	-	129,4	-	129,7	-	129,3
13	-	128,9	-	127,0	-	129,1	-	129,7
13 <sup>1</sup>	-	192,1	-	192,0	-	192,3	-	192,0
13 <sup>2</sup>	5,56 (s)	89,1	5,53 (s)	89,0	5,37 (s)	89,2	5,35 (s)	89,1
13 <sup>3</sup>	-	173,6	-	172,8	-	173,7	-	173,0
14	-	149,9	-	149,8	-	150,3	-	150,2
15	-	107,7	-	107,7	-	107,7	-	107,6
16	-	162,5	-	162,5	-	162,0	-	161,91
17 <sup>3</sup>	-	172,9	-	173,6	-	173,1	-	173,7
19	-	172,5	-	172,4	-	172,9	-	172,8
CH								
3 <sup>1</sup>	7,98 (dd, $J=11,0 - 17,6$ Hz)	129,1	8,01 (dd)	129,1	7,98 (dd, $J=11,0 - 17,6$ Hz)	129,2	8,01 (dd)	129,1
5	9,56 (s)	98,0	9,47 (s)	98,0	9,53 (m)	97,9	9,46 (s)	97,9
10	9,41 (s)	104,3	9,62 (s)	104,3	9,38 (m)	104,2	9,61 (s)	104,2
17	4,20 (m)	51,9	4,48 (ddd)	51,8	4,49 (m)	50,9	4,17 (ddd)	50,8
18	4,49 (m)	50,4	4,50 (dq)	50,3	4,68 (m)	50,2	4,69 (dq)	50,2
20	8,64 (s)	93,7	8,65 (s)	93,6	8,61 (m)	93,5	8,63 (s)	93,4
CH <sub>2</sub>								
3 <sup>2</sup>	6,27 (d, $J = 17,9$ Hz) Z 6,17 (d, $J = 11,7$ Hz) E	123,0	6,20 (dd) Z 6,30 (dd) E	122,9	6,27 (d, $J = 17,9$ Hz) Z 6,17 (d, $J = 11,7$ Hz) E	122,9	6,20 (dd) Z 6,30 (dd) E	122,6
8 <sup>1</sup>	3,64 (m)	19,5	-	19,5	3,63 (m)	19,6	-	19,5
17 <sup>1</sup>	2,28 (m) 2,29 (m)	31,7	-	31,1	2,28 (m) 2,90 (m)	31,7	-	31,2
17 <sup>2</sup>	2,51 (m)	32,0	-	31,6	2,51 (m)	32,0	-	31,9
CH <sub>3</sub>								
2 <sup>1</sup>	3,41 (s)	12,2	3,43 (s)	12,1	3,41 (s)	12,3	3,42 (s)	12,1
7 <sup>1</sup>	3,20 (s)	11,3	-	11,3	3,20 (s)	11,5	-	11,3
8 <sup>2</sup>	1,68 (m)	17,6	1,70 (s)	17,4	1,68 (m)	17,6	1,70 (s)	17,5
12 <sup>1</sup>	3,70 (s)	12,4	3,74 (s)	12,3	3,70 (s)	12,4	3,72 (s)	12,2
13 <sup>4</sup>	3,72 (s)	53,5	3,62 (s)	53,4	3,72 (s)	53,9	3,64 (s)	53,8
18 <sup>1</sup>	1,70 (d, $J = 6,6$ Hz, 1H)	22,8	1,61 (d)	22,7	1,67 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H)	22,8	1,68 (d)	22,7

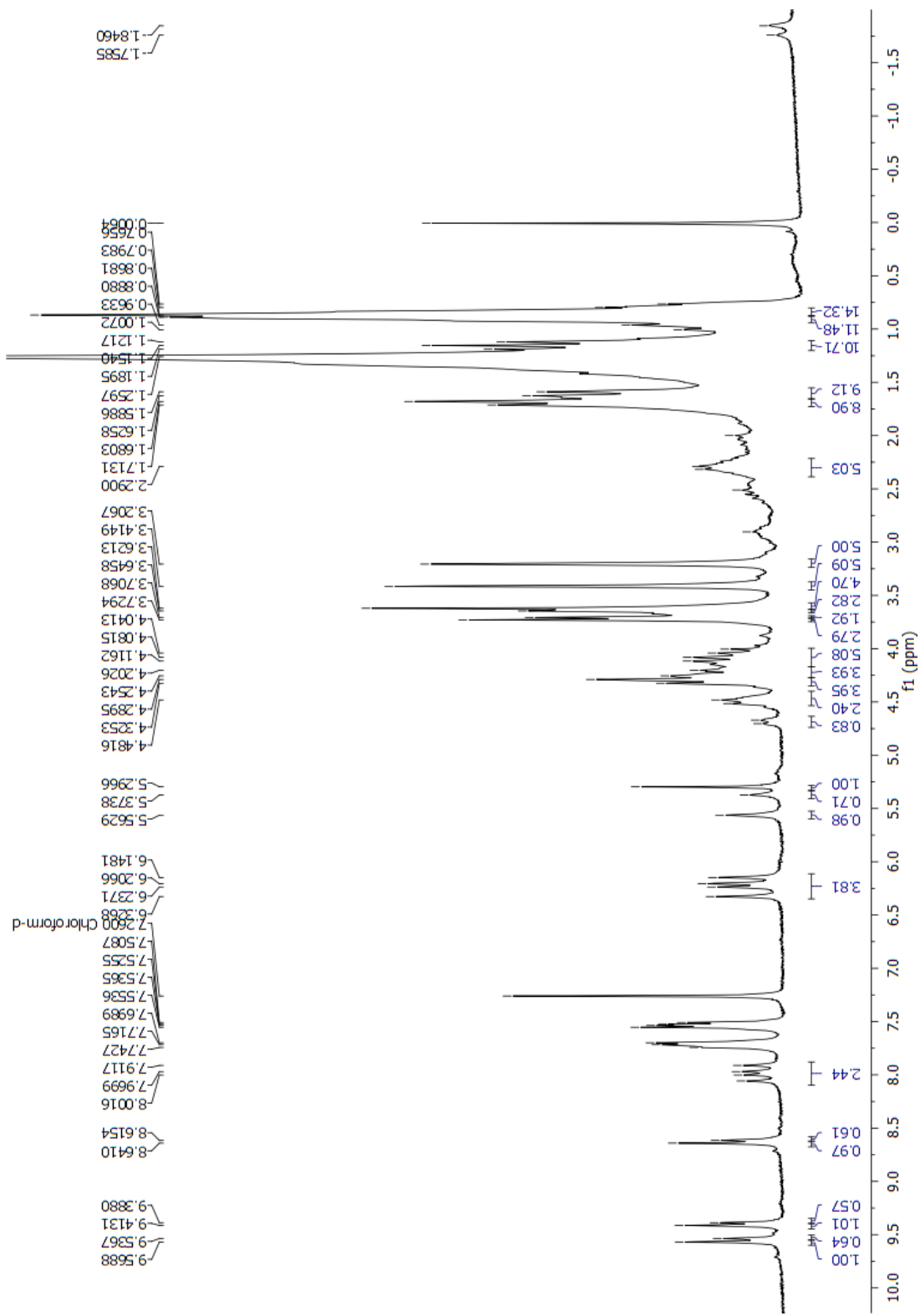
**Tabela 7.** Dados dos deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 e 50 MHz) de *Cq-1* e *Cq-2* e da literatura ( $\text{CDCl}_3$ , 300 e 75,5 MHz) de Jerz et al. (2007).

Fítol	<i>Cq-1</i>		<i>Cq-2</i>		Jerz et al., (2007)	
	$\delta\text{H}$	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$	$\Delta\text{c}$	$\delta\text{H}$	$\delta\text{C}$
1''		60,5		60,7	4,59 ( <i>d</i> , $J= 7,5$ Hz, 2H)	61,9
2''		128,9		128,9	5,24 ( <i>t</i> , $J= 7,5$ Hz, 2H)	118,4
3''		143,0		142,9		143,0
4''		39,9		39,9	1,93 ( <i>t</i> , $J= 7,5$ Hz, 2H)	40,2
5''		25,5		25,1		25,4
6''		36,7		36,6		37,0
7''		32,7		32,6		33,0
8''		37,2		37,2		37,6
9''		25,0		25,0		24,8
10''		37,4		37,5		37,8
11''		32,8		33,0		33,1
12''		37,4		37,4		37,7
13''		25,4		25,3		25,1
14''		39,4		39,4		39,7
15''		28,1		28,1		28,3
16''		22,8		22,8	0,83-0,88 ( <i>m</i> , 12H)	23,1
17''		22,7		22,7	0,83-0,88 ( <i>m</i> , 12H)	23,0
18''		19,8		19,8	0,83-0,88 ( <i>m</i> , 12H)	20,1
19''		19,7		19,7	0,83-0,88 ( <i>m</i> , 12H)	20,0
20''		16,5		16,0	1,63 ( <i>d</i> , 3H)	16,7

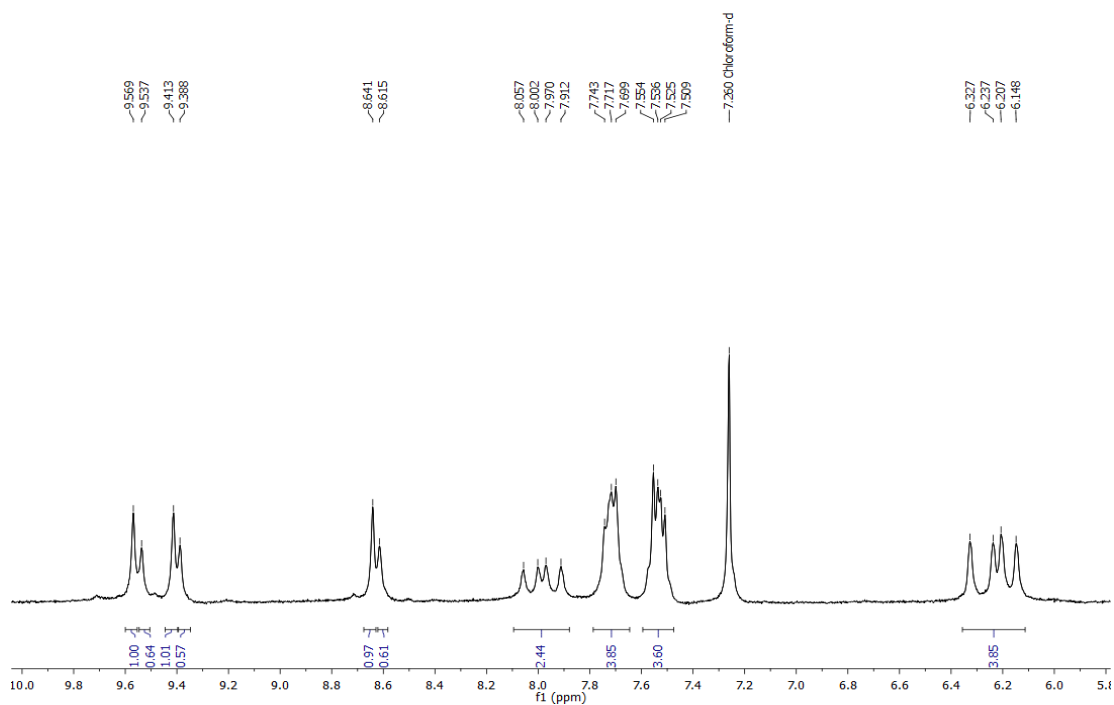
**Figura 17.** Espectro de Infravermelho dos compostos *Cq-1* e *Cq-2*.



**Figura 18.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) de *Cq-1* e *Cq-2*.



**Figura 19.** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) de *Cq-1* e *Cq-2*



**Figura 20.** Expansão do Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) de *Cq-1* e *Cq-2*

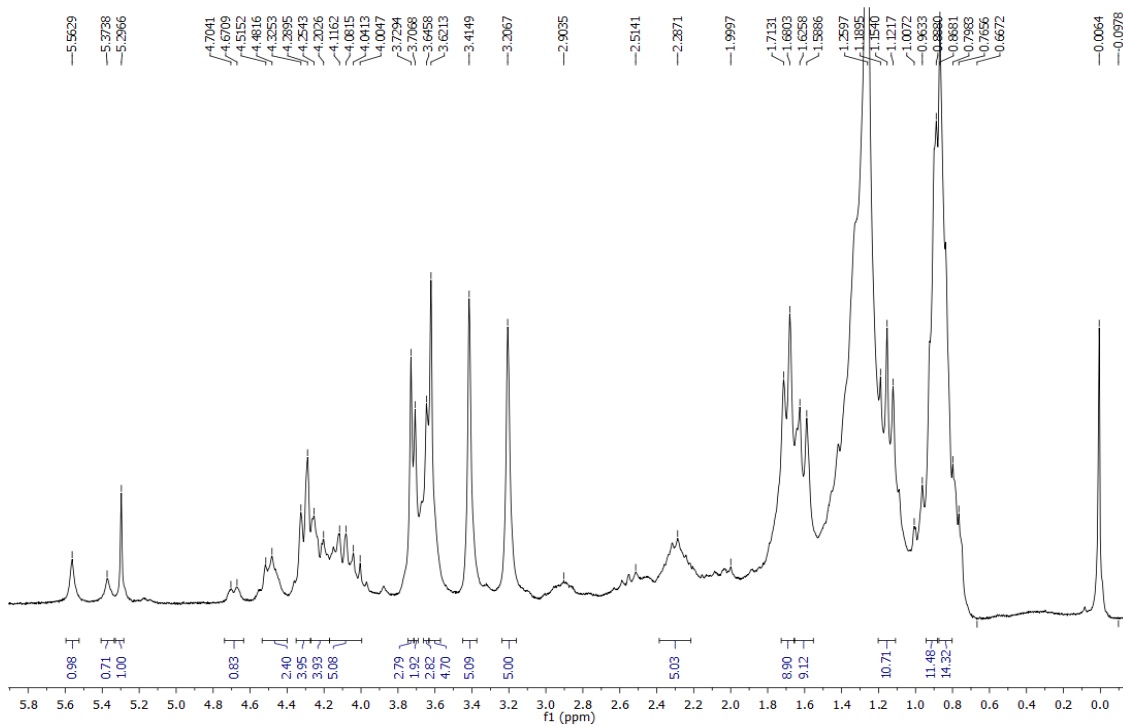
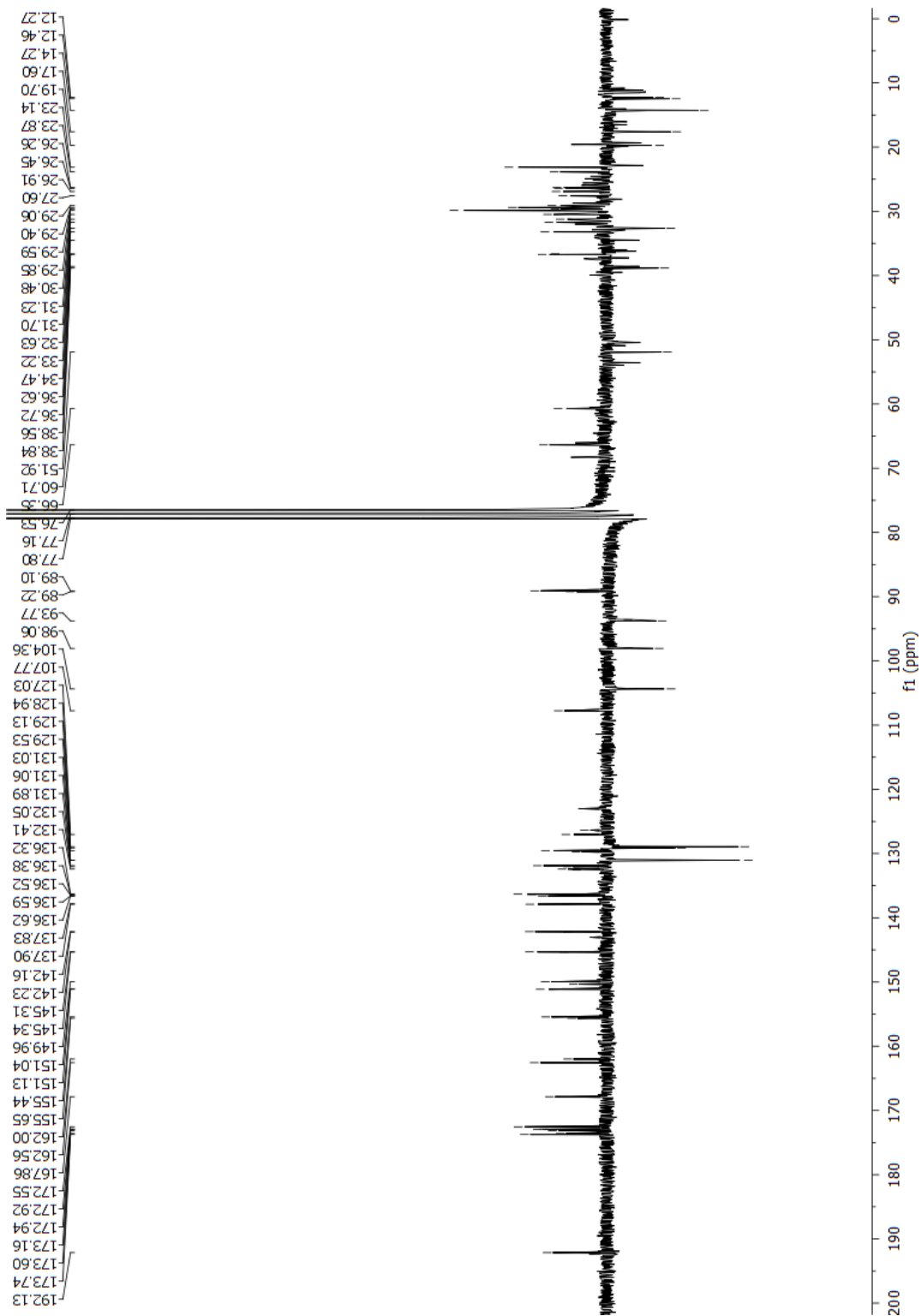


Figura 21. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) de *Cq-1* e *Cq-2*.



### 5.2.2 Identificação de *Cq-3* e *Cq-4*

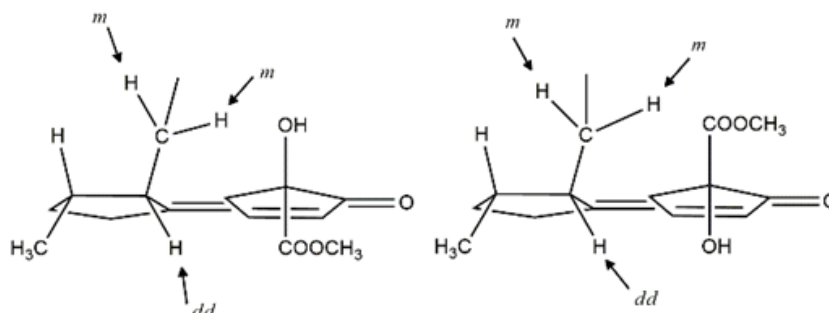
A amostra contendo *Cq-3* e *Cq-4* (Figura 22, p. 73) apresentou-se com um pó verde azulado com brilho metálico, solúvel em  $\text{CHCl}_3$ .

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) e suas expansões foram observados picos duplos que sugerem a presença de dois compostos pertencentes ao grupo das porfirinas. Para *Cq-3*, assim como em *Cq-1* e *Cq-2*, observou-se sinais para os hidrogênios pertencentes ao núcleo porfirínico em  $\delta_{\text{H}}$  9,52 (*s*, 1H, H-5), em  $\delta_{\text{H}}$  9,68 (*s*, 1H, H-10) e em  $\delta_{\text{H}}$  8,73 (*s*, 1H, H-20) (Figura 25, p. 74).

Os sinais para os hidrogênios vinílicos foram observadas em  $\delta_{\text{H}}$  8,00 (*dd*,  $J = 11,5$  e  $17,8$  Hz, 1H, H-3<sup>1</sup>), em  $\delta_{\text{H}}$  6,30 (*dd*,  $J = 1,3$  e  $17,8$  Hz, 1H, H-3<sup>2a</sup>) e em  $\delta_{\text{H}}$  6,21 (*dd*,  $J = 1,2$  e  $11,6$  Hz, 1H, H-3<sup>2b</sup>) (Figura 26, p. 74). Para as três metilas olefínicas foram atribuídos os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  3,43 (*s*, 3H, H-2<sup>1</sup>), em  $\delta_{\text{H}}$  3,25 (*s*, 3H, H-7<sup>1</sup>) e em  $\delta_{\text{H}}$  3,62 (*s*, 3H, H-12<sup>1</sup>) (Fig. 33 e 34, p. 77); e para metoxila o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  3,75 (*s*, 3H, H-13<sup>4</sup>). Além disso, verificou-se, também, os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  4,14 (*m*, 2H, H-17<sup>4</sup>) e 1,16 (*t*,  $J = 7,1$  Hz, 3H, H-17<sup>5</sup>) (Fig. 27, 28 e 29, p. 77 e 78) características para  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  de grupamento etoxi (SILVA et al., 2006; CHAVES et al., 2013), todos os sinais associados são indicativos da presença de um feoforbídeo.

O sinal em  $\delta_{\text{H}}$  4,11 (*dd*  $J = 7,1$  e  $6,0$  Hz, 1H) atribuído para o H-17, que permitiu definir a estereoquímica relativa da hidroxila no C-13<sup>2</sup> com configuração *S*. De acordo com Nakatani et al., (1991) e Kobayashi et al. (1991), quando a hidroxila está no mesmo lado do plano molecular do H-17 ocorre uma desproteção desse hidrogênio fazendo com que o  $\Delta\delta$  varie em até 0,53 ppm, como observado na Figura 22.

**Figura 22.** Estrutura parcial de *Cq-3* e *Cq-4* mostrando os tipos de acoplamentos para os respectivos hidrogênios



Fonte: Adaptado de Kobayashi et al., 1991



No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) foram visualizados 19 para carbonos quaternários em  $\delta_{\text{C}}$  142,47 (C-1); 132,30 (C-2); 136,16 (C-3); 136,40 (C-4); 155,65 (C-6); 136,16 (C-7); 145,13 (C-8); 150,52 (C-9); 137,83 (C-11); 126,70 (C-12); 127,33 (C-13); 192,07 (C-13<sup>1</sup>); 89,15 (C-13<sup>2</sup>); 173,73 (C-13<sup>3</sup>); 150,22 (C-14); 108,33 (C-15); 159,45 (C-16); 172,95 (C-17<sup>3</sup>) e 172,82 (C-19); 6 carbonos metínicos em  $\delta_{\text{C}}$  129,12 (C-3<sup>1</sup>); 98,12 (C-5); 104,48 (C-10); 52,15 (C-17); 50,59 (C-18) e 94,59 (C-20); 5 carbonos metilênicos em  $\delta_{\text{C}}$  123,38 (C-3<sup>2</sup>); 19,66 (C-8<sup>1</sup>); 29,84 (C-17<sup>1</sup>); 31,29 (C-17<sup>2</sup>) e 60,72 (C-17<sup>4</sup>) e 7 carbonos metílicos em  $\delta_{\text{C}}$  12,29 (C-2<sup>1</sup>); 11,40 (C-7<sup>1</sup>); 17,48 (C-8<sup>2</sup>); 12,56 (C-12<sup>1</sup>); 53,63 (C-13<sup>4</sup>); 14,27 (C-17<sup>5</sup>) e 22,87 (C-18<sup>1</sup>). (Figura 30, p. 79).

Também foi observado no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a ausência de sinais na região em torno de  $\delta_{\text{C}}$ : 61,9 (C-1<sup>''</sup>); 118,4 (C-2<sup>''</sup>); 143,0 (C-3<sup>''</sup>) e 40,2 (C-4<sup>''</sup>) característicos do grupo fitol (MATSUO et al., 1996), sugerindo que o composto não possui o respectivo grupo em sua estrutura. Essas informações associadas com os dados obtidos na literatura (CHAVES, 2013) permitiram identificar **Cq-3** como 13<sup>2</sup>-hidroxi-(13<sup>2</sup>-S)-17<sup>3</sup>-etoxifeoforbídeo a, isolado pela primeira vez na família Euphorbiaceae.

Para **Cq-4** foi visualizado um singlete em  $\delta_{\text{H}}$  11,17 (s, 1H, H-7<sup>1</sup>) condizente com hidrogênio de grupo formila e um outro sinal em  $\delta_{\text{H}}$  10,42 (s, 1H), característico do H-5 de núcleo porfirínico, que se desloca para campo mais baixo quando essas estruturas possuem o grupo aldeído na posição 7<sup>1</sup> (Duan et al, 2002). Essa posição para o grupo aldeído é confirmada pela ausência do sinal da metila visualizado para o primeiro composto (**Cq-3**), assim como para **Cq-1** e **Cq-2**. Esses sinais sugerem a presença de um feoforbídeo b.

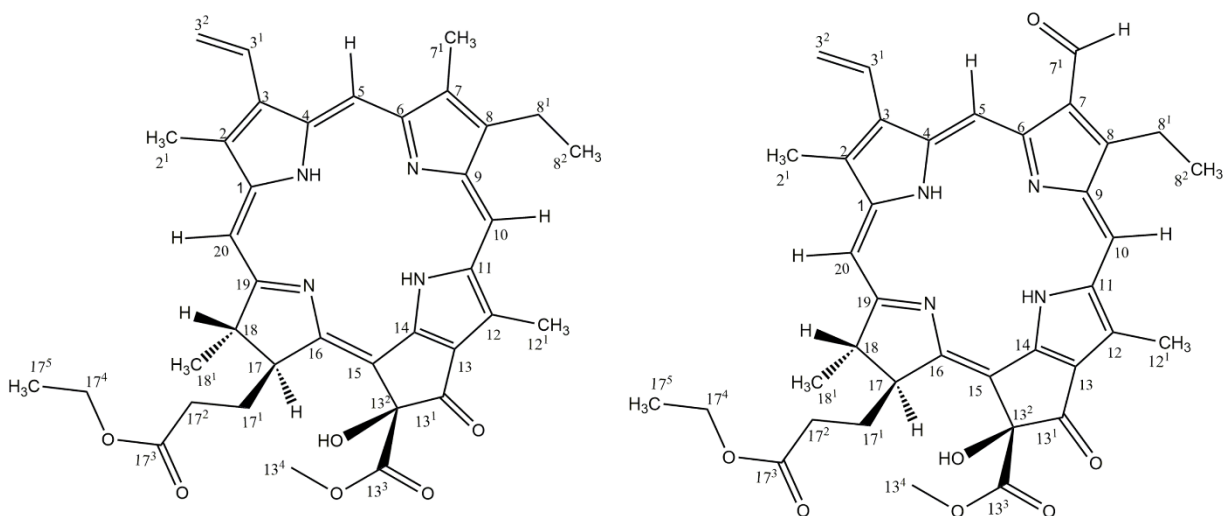
Assim como ocorre em **Cq-3**, também se atribuiu o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  4,04 (dd  $J= 7,1$  e  $1,4$  Hz, 1H) ao H-17, definindo assim a estereoquímica relativa da hidroxila de C-13<sup>4</sup> de **Cq-4** com *S* (NAKATANI et al., 1991; KOBAYASHI et al., 1991).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) e suas expansões mostrou a presença de 37 sinais, sendo que em  $\delta_{\text{C}}$ : 143,7 (C-1); 132,2 (C-2); 136,4 (C-3); 137,0 (C-4); 159,4 (C-6); 137,2 (C-7); 147,2 (C-8); 149,6 (C-9); 138,1 (C-11); 129,8 (C-12); 130,5 (C-13); 194,8 (C-13<sup>1</sup>); 89,4 (C-13<sup>2</sup>); 173,1 (C-13<sup>3</sup>); 151,0 (C-14); 103,0 (C-15); 164,2 (C-16); 173,4 (C-17<sup>3</sup>); 173,7 (C-19) são característicos para carbonos quaternários e as absorções  $\delta_{\text{C}}$ : 128,7 (C-3<sup>1</sup>); 102,2 (C-5); 190,8 (C-7<sup>1</sup>); 104,5 (C-10); 50,5 (C-17); 51,0 (C-18); 97,9 (C-20) sugestivos para os carbonos metínicos;  $\delta_{\text{C}}$ : 123,8 (C-3<sup>2</sup>); 19,2 (C-8<sup>1</sup>); 31,3 (C-17<sup>1</sup>); 30,4 (C-17<sup>2</sup>); 60,5 (C-17<sup>4</sup>) para metilênicos e  $\delta_{\text{C}}$ : 12,2 (C-

2<sup>1</sup>); 17,4 (C-8<sup>2</sup>); 12,6 (C-12<sup>1</sup>); 54,0 (C-13<sup>4</sup>); 14,1 (C-17<sup>5</sup>); 22,9 (C-18<sup>1</sup>) para metílicos, respectivamente (Figura .

Esses dados associados a ausência de sinas para o grupo fitol (MATSUO et al., 1996) e os obtidos na literatura (CHAVES, 2013) permitiram identificar **Cq-4** como 13<sup>2</sup>-hidroxi-(13<sup>2</sup>-S)-17<sup>3</sup>-etoxifeoforbídeo b, isolado pela primeira vez na família Euphorbiaceae.

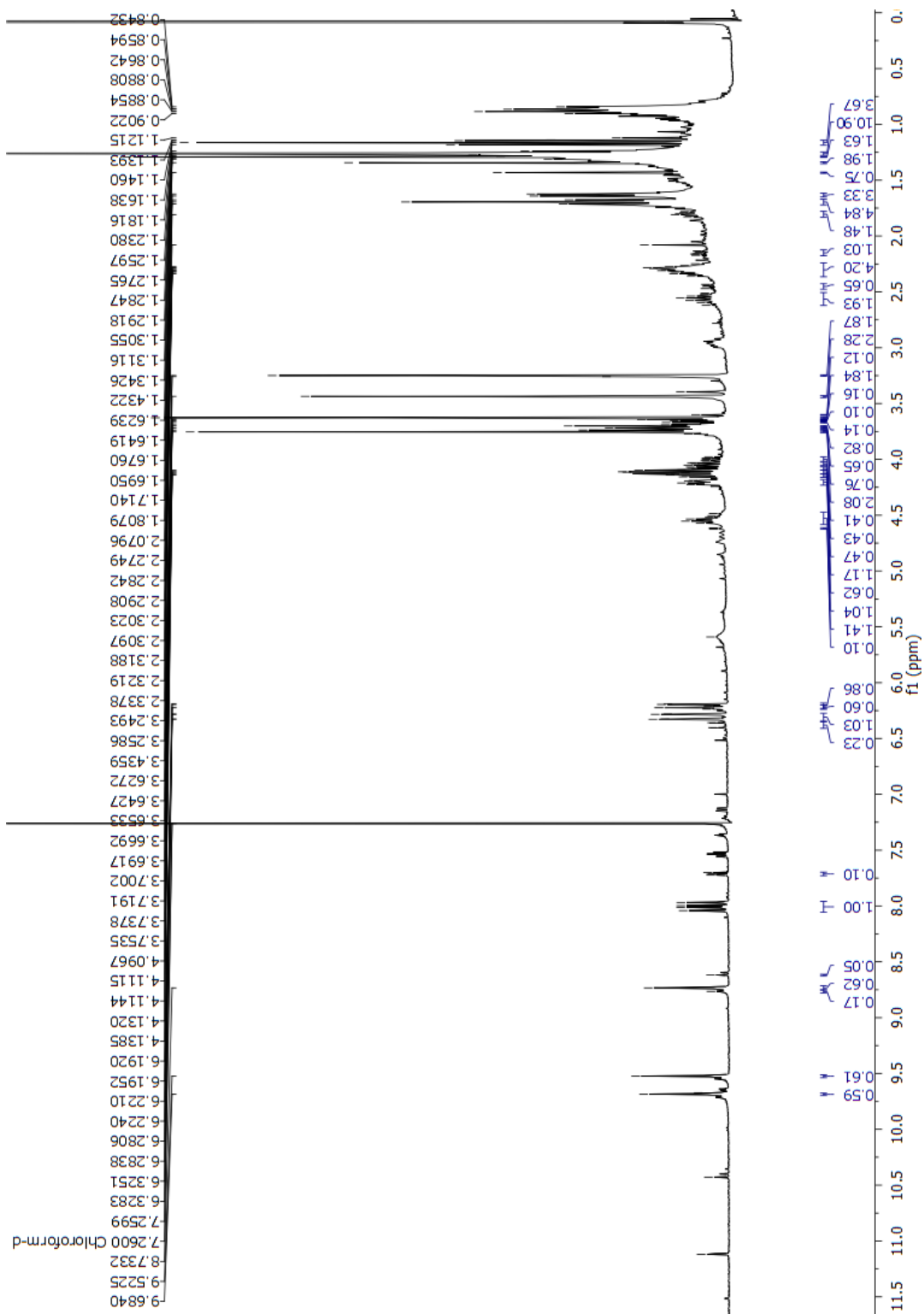
**Figura 23.** Estrutura do 13<sup>2</sup>-hidroxi-(13<sup>2</sup>-S)-17<sup>3</sup>-etoxifeoforbídeo a e 13<sup>2</sup>-hidroxi-(13<sup>2</sup>-S)-17<sup>3</sup>-etoxifeoforbídeo b

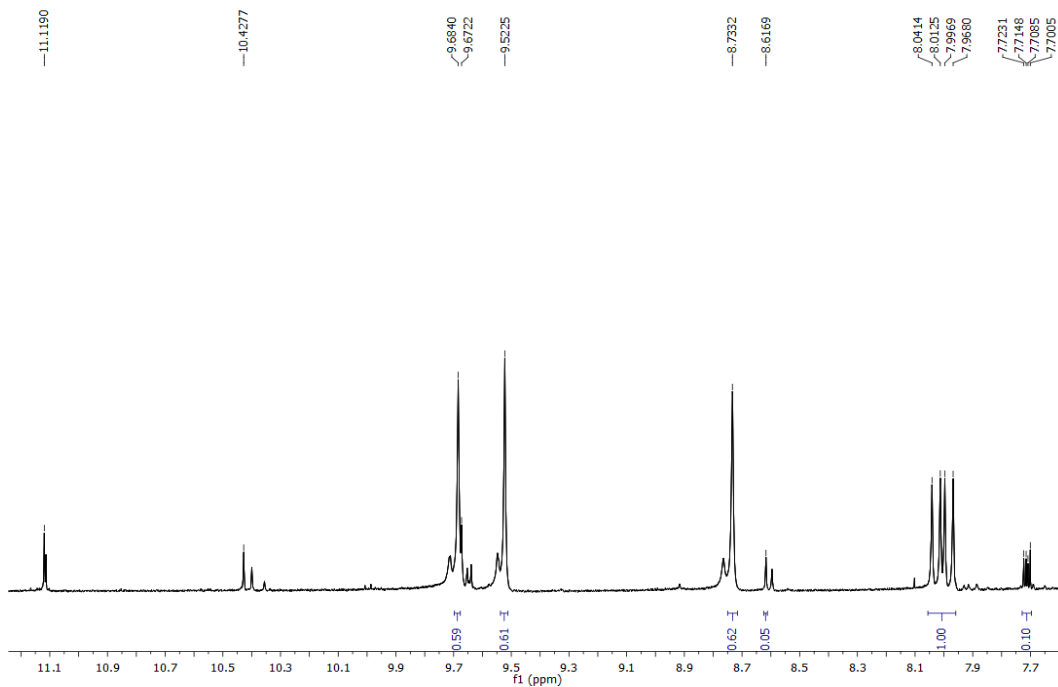
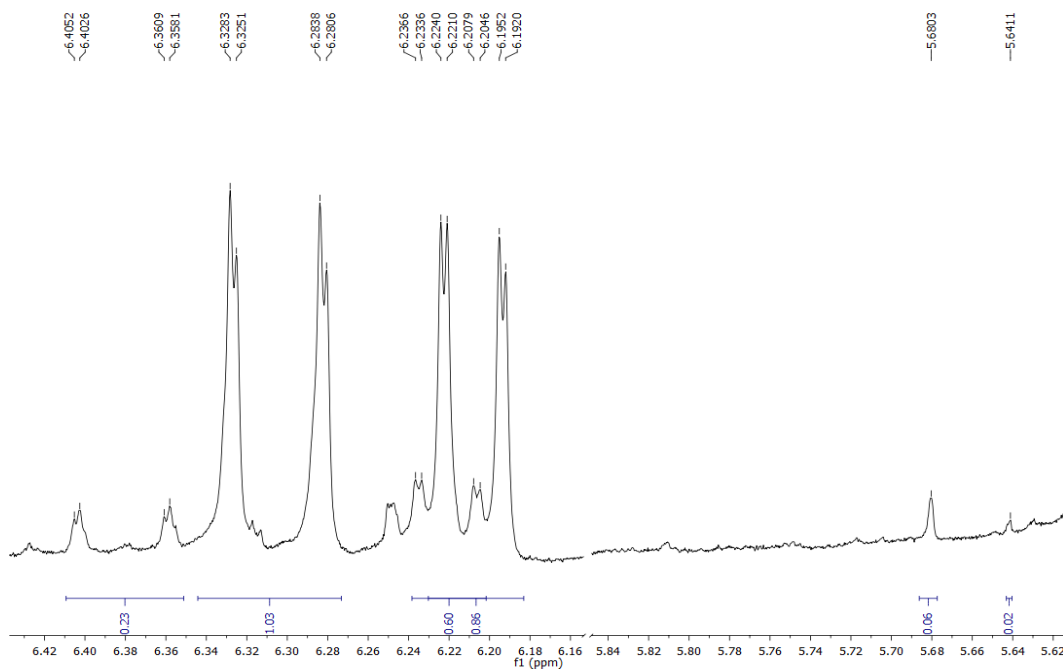


**Tabela 8.** Dados dos deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 e 100 MHz) de *Cq-3* e *Cq-4* e da literatura ( $\text{CDCl}_3$ , 400 e 100 MHz) de Chaves et al. (2013).

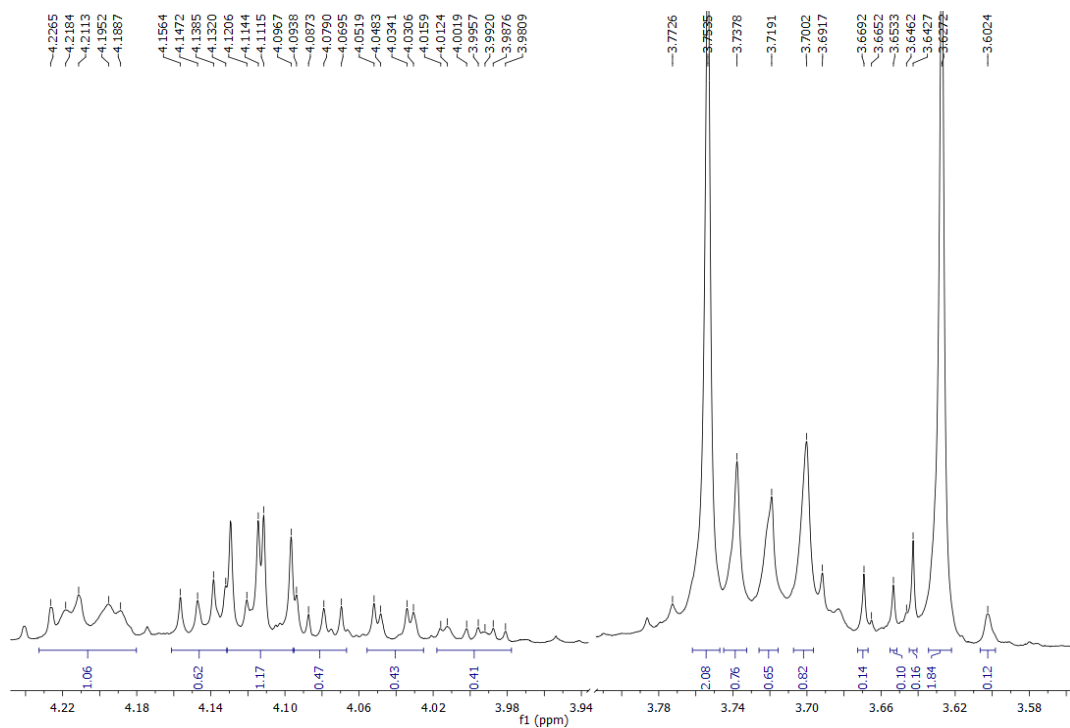
<i>Cq-3</i>			$^{13^2}$ -hidroxi-( $^{13^2}$ -S)- $^{17^3}$ -etoxifeoforbídeo a		<i>Cq-4</i>		$^{13^2}$ -hidroxi-( $^{13^2}$ -S)- $^{17^3}$ -etoxifeoforbídeo b	
C	$\delta\text{H}$	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$	$\delta\text{C}$
1	-	142,47	-	141,93	-	143,76	-	143,57
2	-	132,30	-	131,66	-	132,25	-	132,44
3	-	136,16	-	135,90	-	136,48	-	135,54
4	-	136,40	-	135,94	-	137,04	-	137,19
6	-	155,65	-	97,24	-	159,41	-	159,38
7	-	136,16	-	155,37	-	137,20	-	137,19
8	-	145,13	-	144,88	-	147,22	-	147,19
9	-	150,52	-	150,74	-	149,63	-	150,73
11	-	137,83	-	137,78	-	138,10	-	138,04
12	-	126,70	-	128,80	-	129,82	-	129,75
13	-	127,33	-	128,80	-	130,56	-	132,20
13 <sup>1</sup>	-	192,07	-	189,58	-	194,84	-	189,40
13 <sup>2</sup>	5,68 (s, OH)	89,15	6,30 (s, 1H)	64,72	5,64 (s, OH)	89,40	-	64,58
13 <sup>3</sup>	-	173,73	-	172,89	-	173,15	-	172,76
14	-	150,22	-	149,60	-	151,06	-	151,25
15	-	108,33	-	105,14	-	103,02	-	104,96
16	-	159,45	-	161,17	-	164,25	-	164,03
17 <sup>3</sup>	-	172,95	-	172,11	-	173,43	-	174,00
19	-	172,82	-	169,61	-	173,71	-	169,25
CH								
3 <sup>1</sup>	8,00 (dd, J= 11,5 e 17,8 Hz, 1H)	129,12	7,77 (dd, J= 17,5 e 12,5 Hz, 1H)	128,83	7,71 (dd, J=5,8 e 3,3 Hz, 1H)	128,74	7,97 (dd, J= 17,5 e 12,5 Hz, 1H)	128,65
5	9,52 (s, 1H)	98,12	9,07 (s, 1H)	97,24	10,42 (s)	102,28	10,33 (s)	101,60
7 <sup>1</sup>	-	-	-	-	11,19 (s)	190,80	11,12 (s)	187,72
10	9,68 (s, 1H)	104,48	9,28 (s, 1H)	104,12	9,67 (s)	104,59	9,61 (s)	105,01
17	4,11(dd, J= 7,1 e 6,0 Hz, 1H)	52,15	4,24 (dl, J=10,0 Hz, 1H)	51,16	4,04 (dd J= 7,1 e 1,4 Hz, 1H)	50,51	4,44 (dl, J=10,0 Hz)	51,35
18	4,55 (m, 1H)	50,59	4,48 (m, 1H)	50,10	4,50 (m, 1H)	51,00	4,18 (dl, J=10,0 Hz)	50,12
20	8,73 (s, 1H)	94,59	8,53 (s, 1H)	92,98	8,61 (s)	97,93	8,52 (s)	98,92
CH <sub>2</sub>								
3 <sup>2</sup>	6,30 (dd, J= 1,3 e 17,8 Hz, 1H) 6,21 (dd, J= 1,2 e 11,6 Hz, 1H)	123,38	6,14 (d, J=17,5 Hz, 1H) 6,05 (d, J=12,5 Hz, 1H)	122,47	6,38 (dd, J=17,8 e 1,1 Hz, 1H) 6,22 (dd, J=11,5 e 1,3 Hz, 1H)	123,82	6,20 (d, J= 15,0 Hz, 1H) 6,21 (d, J= 10,0 Hz, 1H)	122,47
8 <sup>1</sup>	3,72 (m)	19,66	3,41 (q, J = 15,0 Hz, 2H)	19,14	3,66 (m)	19,22	4,00 (m)	19,13
17 <sup>1</sup>	2,96 (m, 1H) 2,55 (m, 1H)	29,84	1,27 (sl, 2H)	29,82	2,15(m, 1H) 2,55 (m, 1H)	31,38	2,46 – 2,61	31,25
17 <sup>2</sup>	2,30 (m, 2H)	31,29	2,22-2,39 (m, 2H)	31,26	2,30 (m, 2H)	30,45	2,20 – 2,33	29,70
17 <sup>4</sup>	4,14 (m, 2H)	60,72	4,07 (q, J=12,5 Hz, 2H)	60,48	4,00 (m, 2H)	60,57	4,00	60,55
CH <sub>3</sub>								
2 <sup>1</sup>	3,43 (s)	12,29	3,31 (s, 3H)	11,93	3,39 (s)	12,22	3,36 (s)	12,05
7 <sup>1</sup>	3,24 (s)	11,40	2,98 (s, 3H)	10,89	-	-	-	-
8 <sup>2</sup>	1,69 (t, J= 7,6 Hz)	17,48	1,58 (t, J=10,0 Hz, 3H)	17,22	1,80 (m)	17,44	1,62 (m)	19,36
12 <sup>1</sup>	3,62 (s)	12,56	3,63 (s, 3H)	11,98	3,60 (s)	12,62	3,66 (s)	12,23
13 <sup>4</sup>	3,75 (s)	53,63	3,93 (s, 3H)	52,80	3,77 (s)	54,08	3,88 (s)	52,95
17 <sup>5</sup>	1,16 (t, J= 7,1 Hz)	14,27	1,15 (t, J= 5,0 Hz, 3H)	14,06	1,14 (t, J= 7,1 Hz, 1H)	14,19	1,10 (t, J=7,5 Hz)	14,07
18 <sup>1</sup>	1,63 (d, J= 7,2 Hz)	22,87	1,85 (d, J=5,0 Hz, 3H)	23,04	1,75 (d, J= 6,8 Hz, 1H)	22,98	1,80 (d, J= 5,0 Hz)	23,08

**Figura 24.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) *Cq-3* e *Cq-4*

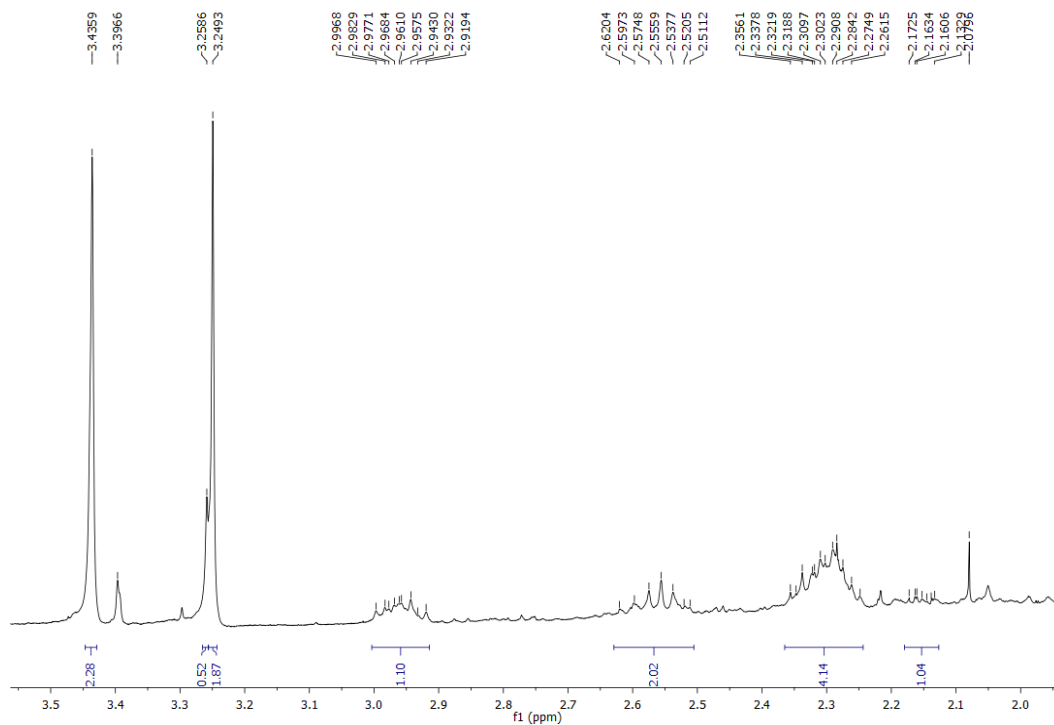


**Figura 25.** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) de *Cq-3* e *Cq-4***Figura 26.** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) de *Cq-3* e *Cq-4*

**Figura 27.** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) de *Cq-3* e *Cq-4*



**Figura 28.** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) de *Cq-3* e *Cq-4*



**Figura 29.** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) de *Cq-3* e *Cq-4*

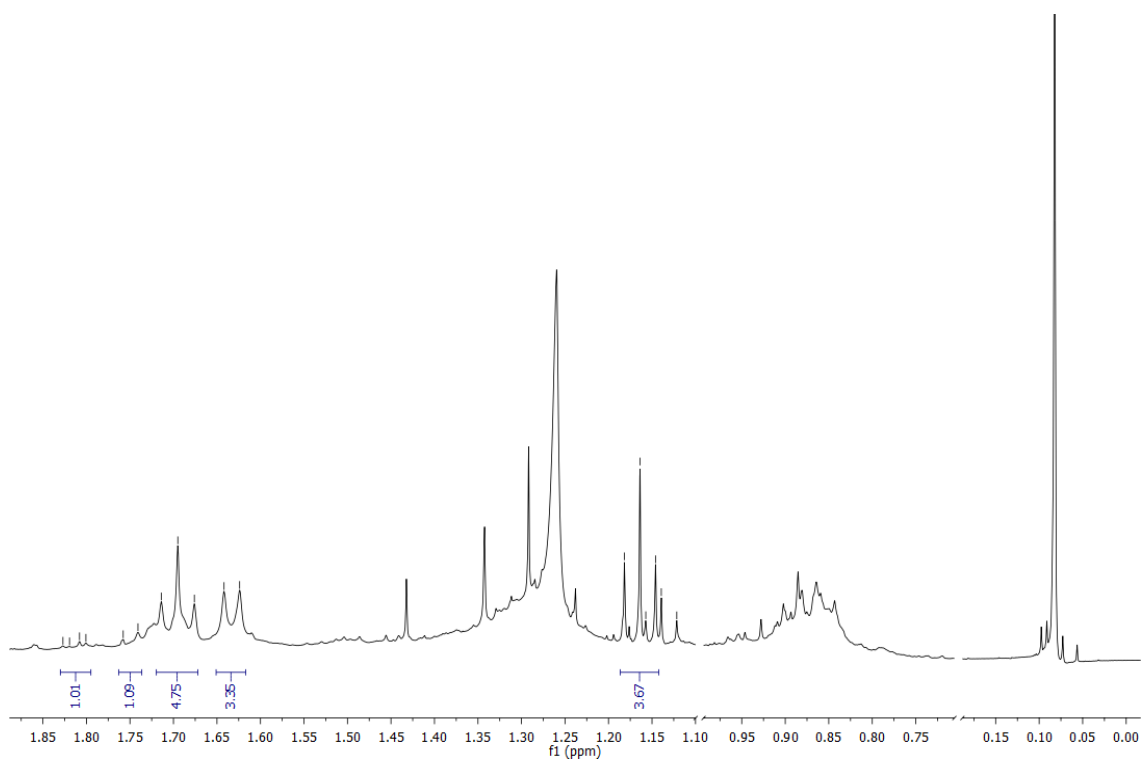
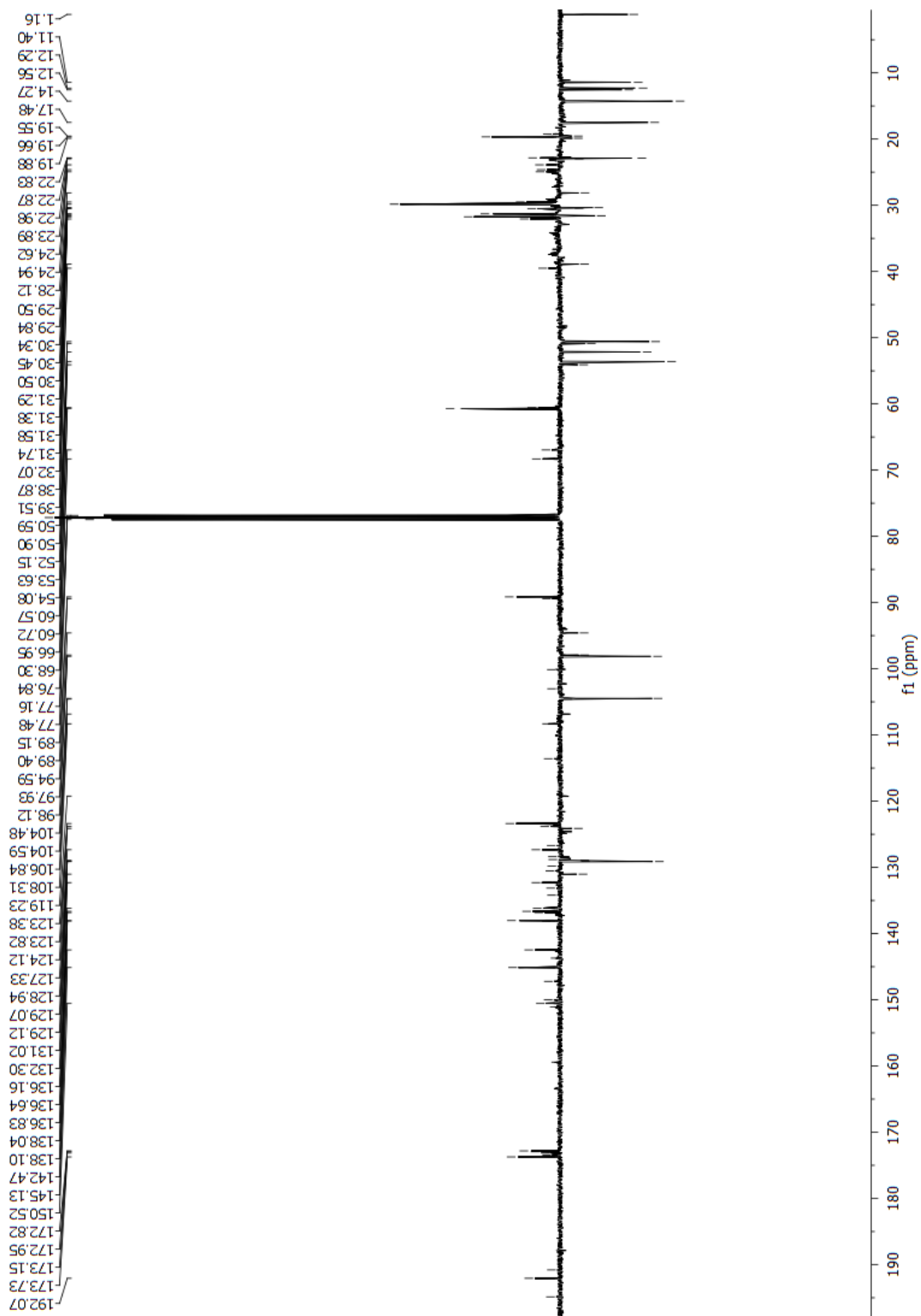


Figura 30. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) de Cq-3 e Cq-4





### 5.2.3 Identificação de **Cq-5**

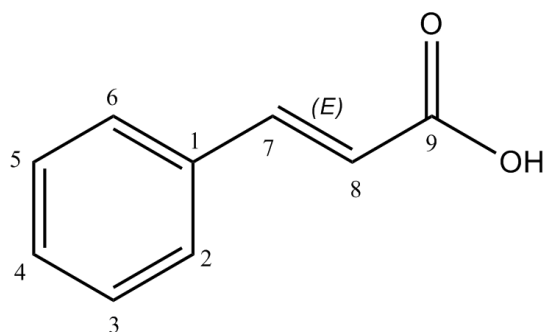
O constituinte químico codificado como **Cq-5** apresentou-se como um sólido amarelado, solúvel em C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O (acetona).

O espectro de RMN <sup>1</sup>H (C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O, 500MHz) mostrou a presença de dois multipletos, um em  $\delta$  7,43 (7,47 – 7,40; *m*, 3H) e o outro em  $\delta$  7,67 (7,70 – 7,64; *m*, 2H), sugestivos de presença de um anel aromático monossustituído, além de dois dubletos em  $\delta$  6,52 (*J* = 16,1 Hz, 1H) e  $\delta$  6,67 (*J* = 15,8 Hz, 1H), característicos de hidrogênios ligados a carbono sp<sup>2</sup> com estereoquímica *trans* (SALAZAR, 2009) (Figura 32, 33 e 34, p. 82 e 83).

No espectro de RMN de <sup>13</sup>C, técnica APT (C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O, 50 MHz), foram observados sete sinais, dos quais, cinco são relativos a carbonos metínicos:  $\delta_H$  119,27; 128,96; 129,77; 131,06 e 145,35 e dois sinais são relativos a carbonos não-hidrogenados ( $\delta_C$  135,46 e  $\delta_C$  167,70). Segundo Xu et al. (1999), os sinais em  $\delta_C$  128,92; 129,77, 131,06 e 135,46 podem ser atribuídos aos carbonos C-3 e C-5; C-2 e C-6; C-4; C-1, respectivamente, o que reforça a presença de um anel aromático monossustituído. Segundo Pavia (2012), este tipo de anel tem por característica apresentar apenas quatro picos na área de carbonos aromáticos, já que os carbonos *orto* e *meta* são duplicados por simetria (Figura 35, p. 84).

Os sinais em  $\delta_H$  6,52 e  $\delta$  7,67 do espectro de RMN de <sup>1</sup>H, em conjunto com os picos visualizados no espectro de RMN de <sup>13</sup>C em  $\delta_C$  119,27 e 145,35 permitem atribuí-los para os carbonos  $\alpha$  e  $\beta$  insaturados nas posições C-7 e C-8, respectivamente. Além disso, o deslocamento em  $\delta_C$  167,70 é compatível com a presença de uma carbonila (C=O) de ácido carboxílico ou éster (PAVIA, 2012).

Os dados visualizados nos espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, correlacionados com os da literatura, confirmam que o composto codificado por **Cq-5**, trata-se do ácido *trans*-cinâmico, cuja denominação química é (*E*)-3-fenil-2-propenóico, com fórmula molecular C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>, isolado anteriormente em outras espécies, como *Onychium contiggum* (XU et al., 1999) *Lansea coromandelica* (YUN et al., 2014).

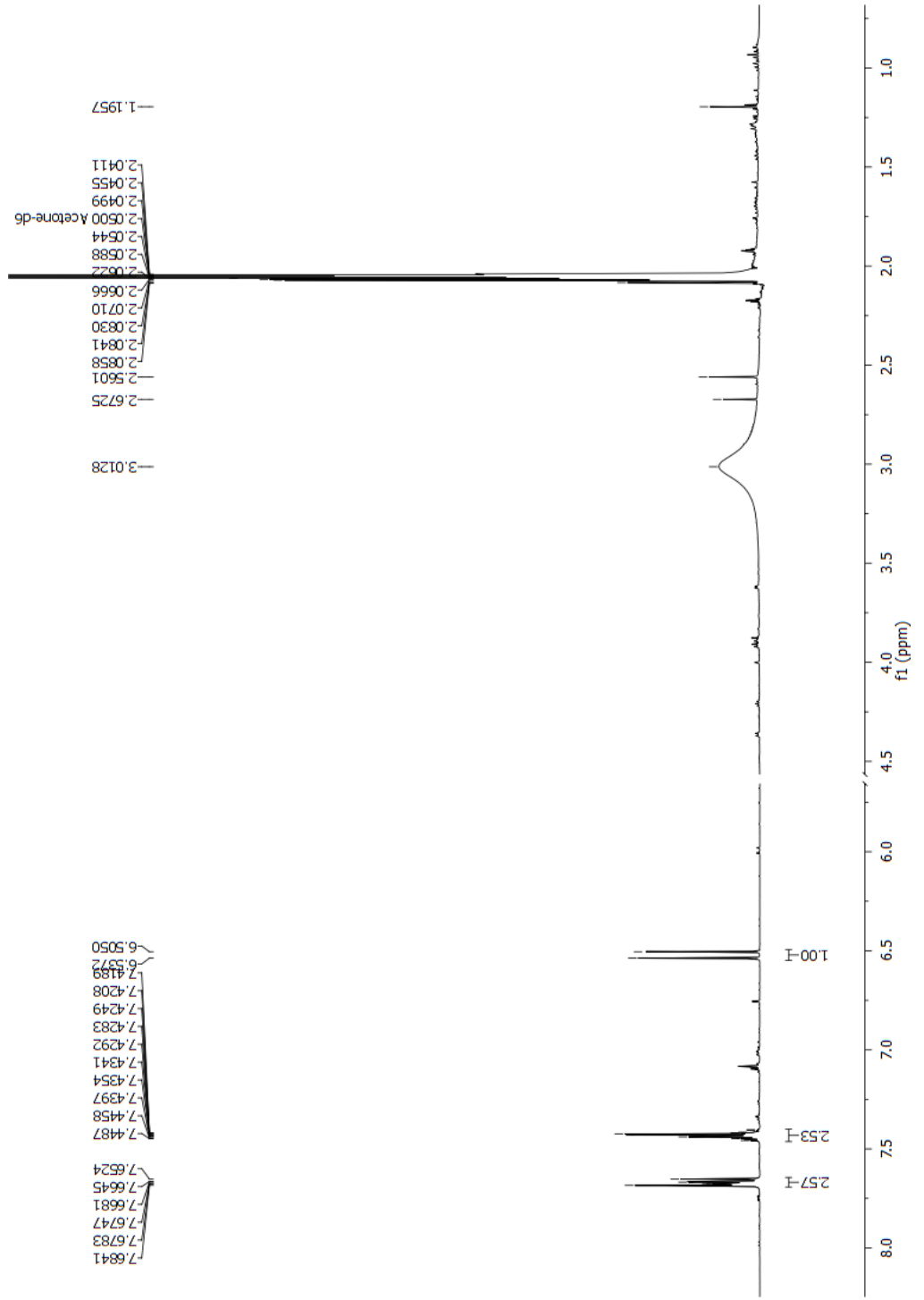
**Figura 31.** Estrutura do Ácido *trans*-cinâmico

Fonte: ChewBio

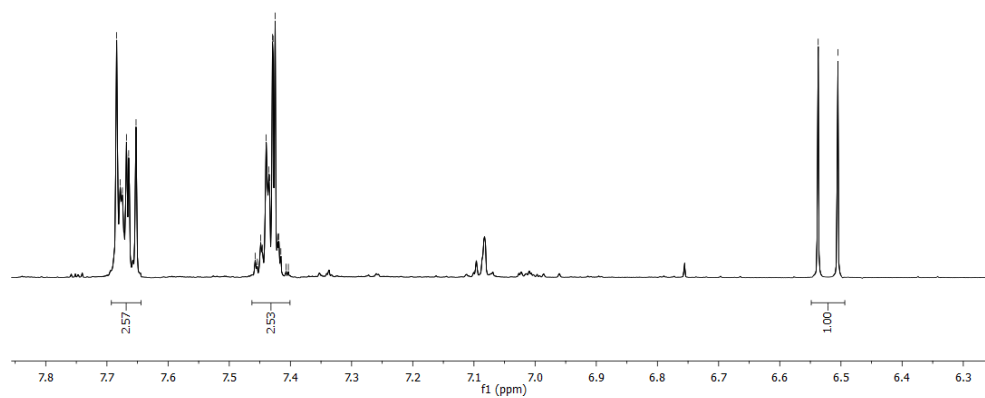
**Tabela 9.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 500MHz e 50 MHz) da substância **Cq-5**, comparados com dados da literatura  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz e 100 MHz) de Yun et al., (2014).

C	Cq-5		Ácido <i>trans</i> -cinâmico	
	$\delta\text{H}$	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$	$\delta\text{C}$
<b>1</b>	-	135,4		133,9
<b>9</b>	-	167,7	10,71 (1H)	172,6
<b>CH</b>				
<b>2/6</b>	7,67 ( <i>m</i> , 2H)	129,7	7,56 ( <i>m</i> , 2H)	128,9
<b>3/5</b>	7,43 ( <i>m</i> , 3H)	128,9	7,41 ( <i>m</i> , 3H)	128,3
<b>4</b>	7,43 ( <i>m</i> , 3H)	131,0	7,41 ( <i>m</i> , 3H)	130,7
<b>7</b>	6,52 ( <i>d</i> , $J = 16,0$ Hz, 1H)	119,2	6,48 ( <i>d</i> , $J = 16,0$ Hz, 1H)	117,3
<b>8</b>	7,67 ( <i>d</i> , $J = 16,0$ Hz, 1H)	145,3	7,81 ( <i>d</i> , $J = 16,0$ Hz, 1H)	147,0

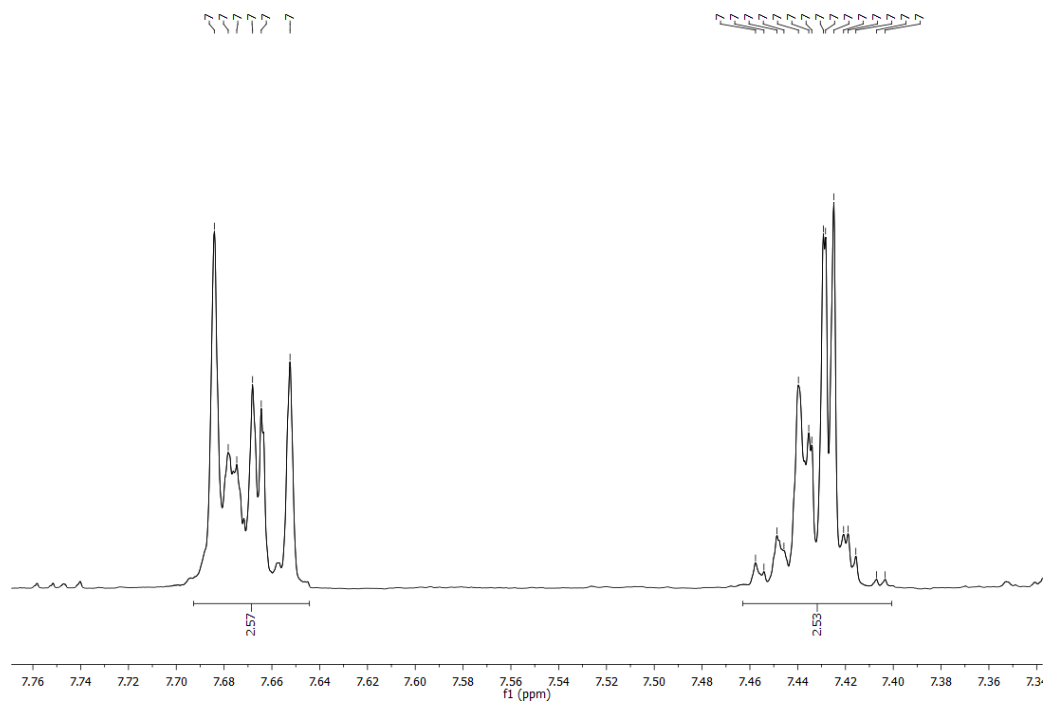
Figura 32. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 500 MHz) de **Cq-5**



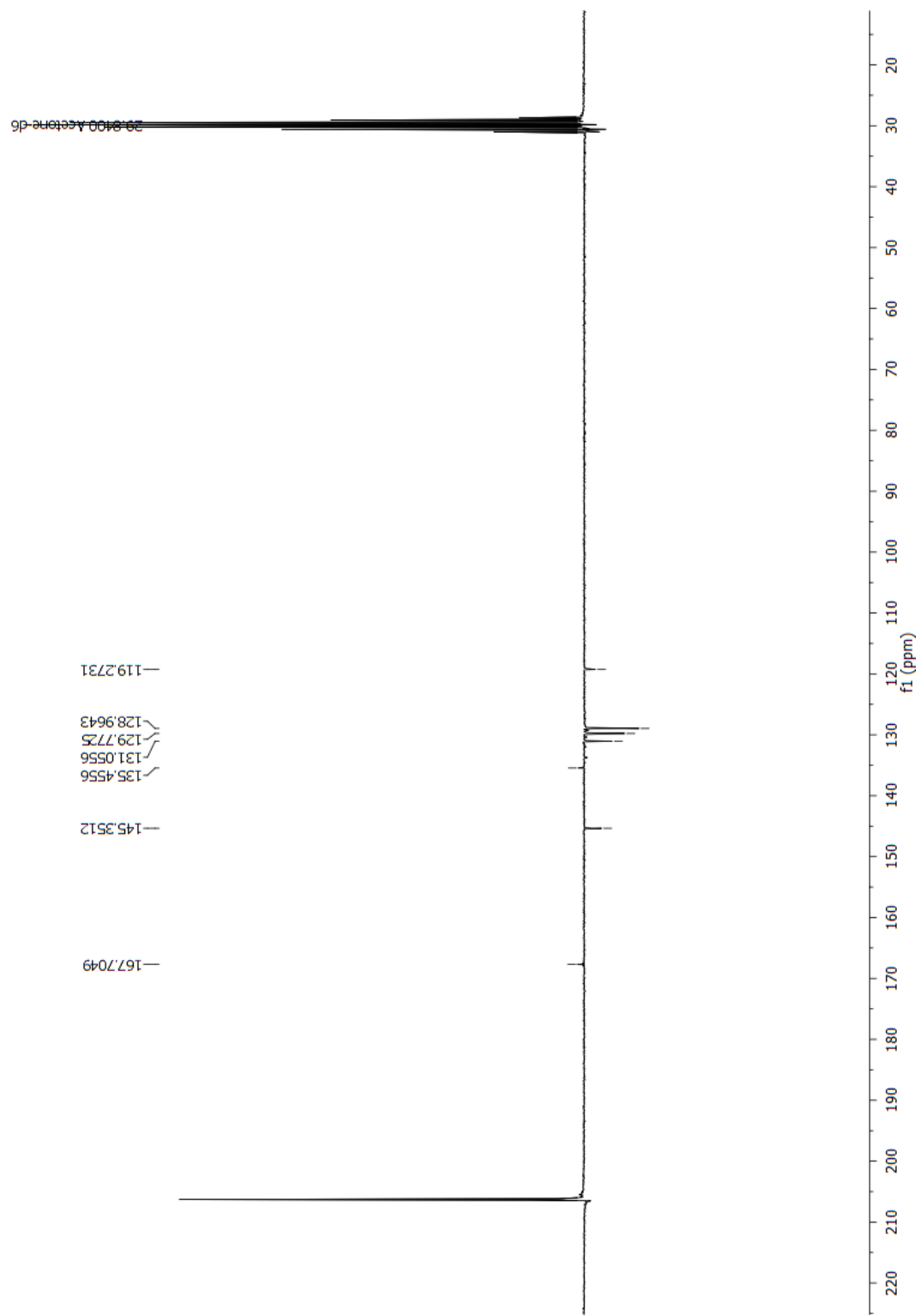
**Figura 33.** Espectro de expansão de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{C}_3\text{D}_9\text{O}$ , 500 MHz) de *Cq-5*



**Figura 34.** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 500 MHz) de *Cq-5*



**Figura 35.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 50 MHz) de *Cq-5*



#### 5.2.4 Identificação de *Cq-6*

O constituinte químico codificado como *Cq-6* (Figura 36) apresentou-se como cristais brancos, solúvel em MeOH, piridina e H<sub>2</sub>O.

O espectro no IV (Fig. 38, p. 88) apresentou bandas de absorção em 3425 e 3180 cm<sup>-1</sup>, sugestivas para presença de hidroxilas. As absorções em 2950 e 2875 cm<sup>-1</sup>, podem ser atribuídas a estiramentos do tipo C-H de carbono sp<sup>3</sup>. Uma banda de absorção em 1447 cm<sup>-1</sup> e outra em 1368 cm<sup>-1</sup> correspondentes a dobramento de carbonos metilênicos e metílicos, respectivamente. Outra banda de média intensidade em 1002 cm<sup>-1</sup>, compatível com estiramento C-O. Bandas fortes de absorção também são observadas entre 1068 e 1048 cm<sup>-1</sup>, referentes a estiramentos de éteres acetais (PAVIA, 2012). Percebe-se também uma banda com fraca absorção em torno de 2300 cm<sup>-1</sup>, que pode ser atribuída grupamento (CN), porém com uma absorção de média intensidade. Essa fraca absorção pode estar relacionada a algum efeito por rotação que o grupo funcional possa estar sofrendo de acordo com estrutura proposta.

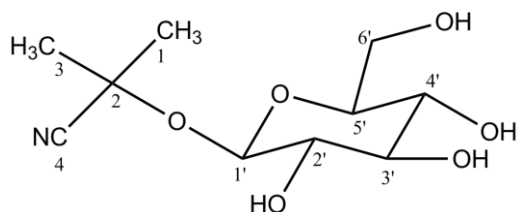
O espectro de RMN de <sup>1</sup>H (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 500MHz) mostrou a presença de dois singletos em campo alto, um em δ<sub>H</sub> 1,65 (3H) e outro em δ<sub>H</sub> 1,74 (3H), indicativos de presença de grupamentos metílicos. Um conjunto de sinais entre δ<sub>H</sub> 3,98 e 4,52 sugeriram a presença de uma unidade osídica na molécula. Corroboradas pela presença de um dubleto em δ<sub>H</sub> 5,29 (*J* = 7,7 Hz, 1H) característico de próton anomérico (SEIGLER, 1975). O valor de sua constante de acoplamento indica ser do tipo axial-axial e sugere uma configuração β para a unidade osídica (LEMEUX, 1964; CLAPP et al., 1966; SEIGLER, 1975; AGRAWAL, 1989).

O espectro de RMN de <sup>13</sup>C, técnica APT (δ, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 125 MHz) (Fig. 50 e 51, p. 90) mostrou a presença de dez sinais, dos quais, dois em (δ<sub>C</sub> 28,23 e 28,69), confirmaram a presença das metilas. Um sinal para carbono metilênico em δ<sub>C</sub> 63,13 e cinco sinais para carbonos metínicos (δ<sub>C</sub> 72,32; 75,42; 78,95; 79,09 e 102,07), confirmando a presença de uma glicose, sendo o último sinal equivalente ao carbono anomérico. Além disso, verificou-se a presença de dois sinais em δ<sub>C</sub> 71,89 e 122,52 para carbonos não hidrogenados, sugestivos para os C-2 e C-4, sendo o último característico para carbono de grupamento nitrila (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

No espectro de massas (Figura 39, p. 88) foi observado o pico do íon molecular em *m/z*=248 u [M+H]<sup>+</sup>, que permitiu calcular a fórmula molecular de composto em questão como sendo C<sub>10</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>6</sub>.

Os dados interpretados dos espectros de IV, MS e RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , em conjunto com os dados da literatura confirmam que o composto codificado por **Cq-6**, trata-se da linamarina, cujo nome químico é 2-( $\beta$ -D-glicopiranosiloxi)-isobutironitrila, isolada pela primeira vez na espécie, mas já obtido anteriormente por Clapp e colaboradores (1966); Seigler e Bloomfield (1969); Seigler (1975); Prawat e colaboradores (1995), Sornyotha e colaboradores (2007), tanto na espécie *Manihot esculenta*, quanto em outras espécies do gênero *Cnidoscolus*.

**Figura 36.** Estrutura do 2-( $\beta$ -D-glicopiranosiloxi)-isobutironitrila (Linamarina)



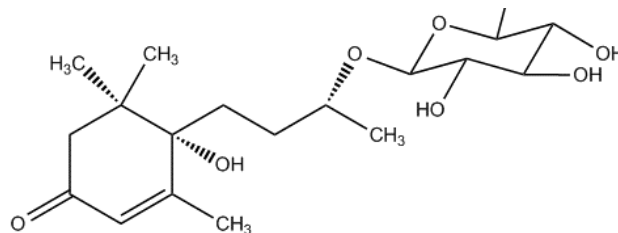
**Tabela 10.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 500MHz) da substância **Cq-6**, comparados com dados da literatura: RMN  $^1\text{H}$  de Seigler, 1975 e RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) de Prawat (1995).

C	<b>Cq-6</b>		<b>Linamarina</b>	
	$\delta\text{H}$	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$	$\delta\text{C}$
<b>2</b>	-	71,89	-	73,95
<b>4</b>	-	122,52	-	123,57
<b>CH</b>				
<b>1'</b>	5,29 ( <i>d</i> , $J = 7,7$ Hz – 1H)	102,27	4,45 ( <i>d</i> , $J = 7,0$ Hz)	100,98
<b>2'</b>	3,98 ( <i>m</i> , 1H)	75,42	2,9 – 3,4	74,87
<b>3'</b>	4,27 ( <i>m</i> , 2H)	79,09	2,9 – 3,4	78,12
<b>4'</b>	4,27 ( <i>m</i> , 2H)	72,32	2,9 – 3,4	71,56
<b>5'</b>	4,04 ( <i>t</i> , $J = 8,0$ Hz; 1H)	78,95	2,9 – 3,4	77,63
<b>CH<sub>2</sub></b>				
<b>6'</b>	4,35 ( <i>dd</i> , $J = 11,8; 5,3$ Hz; 1H) 4,52 ( <i>dl</i> , $J = 11,8$ Hz; 1H)	63,13	3,67 ( <i>m</i> )	62,79
<b>CH<sub>3</sub></b>				
<b>1</b>	1,65 ( <i>s</i> , 3H)	28,23	1,58 ( <i>s</i> )	28,39
<b>3</b>	1,74 ( <i>s</i> , 3H)	28,69	1,58 ( <i>s</i> )	29,09

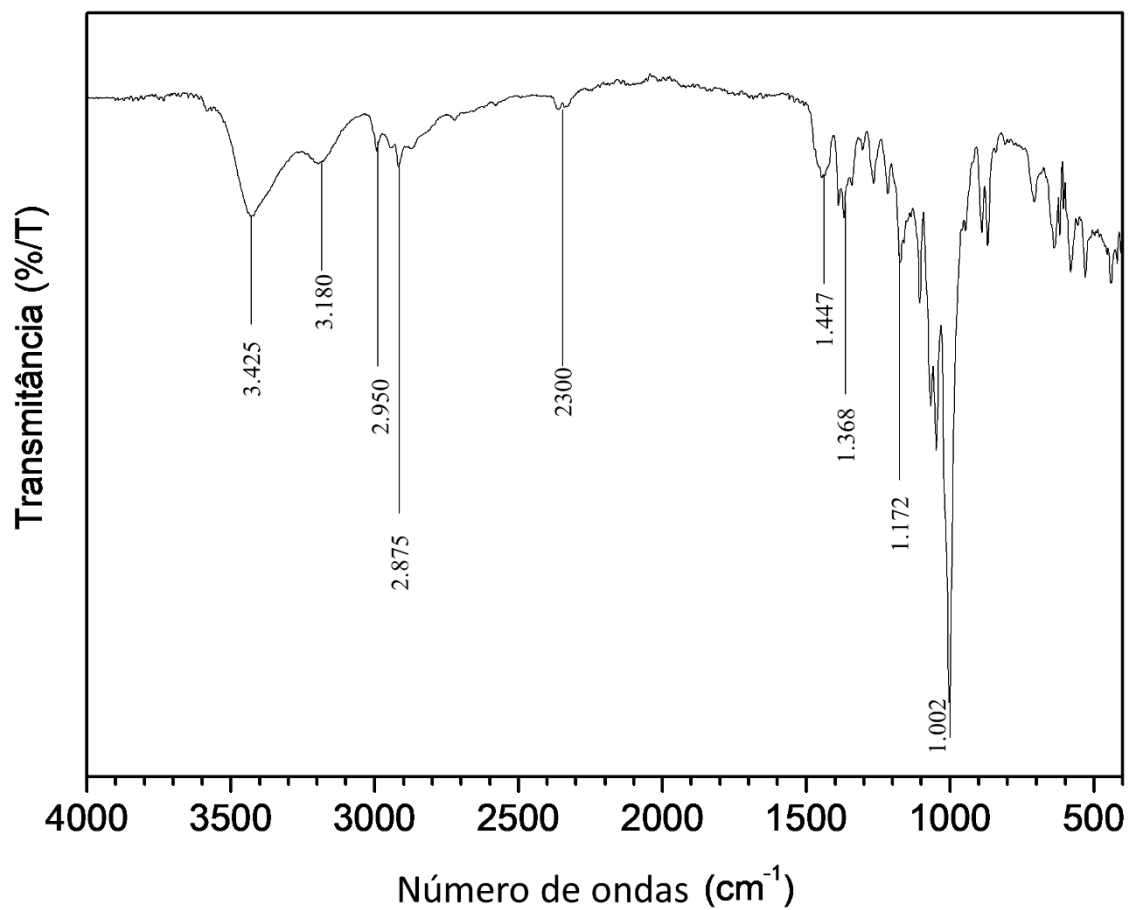
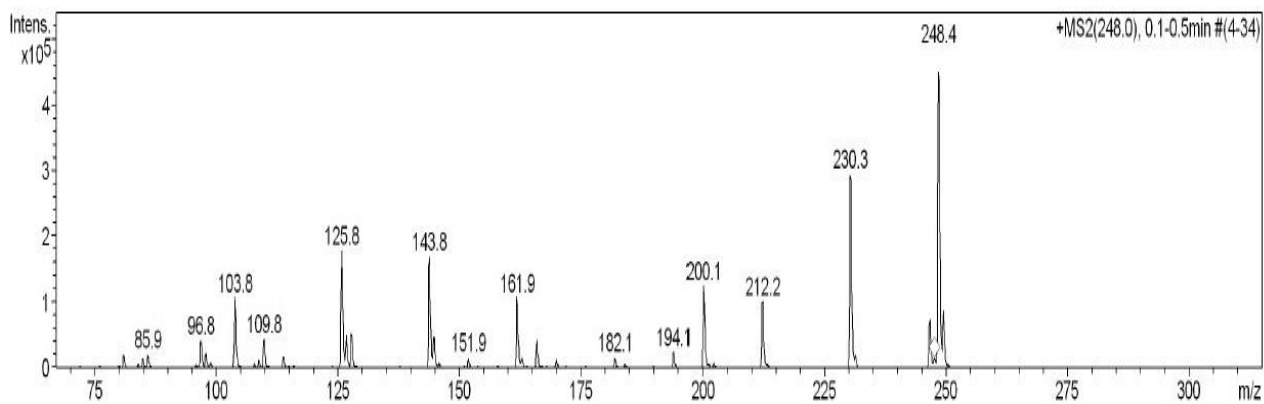
**Tabela 11.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 500MHz) da unidade osídica de **Cq-6** comparados com a  $\beta$ -glicose presente na estrutura do Roseosídeo de Lopes e colaboradores (2012), (MeOD, 500 e 125 MHz).

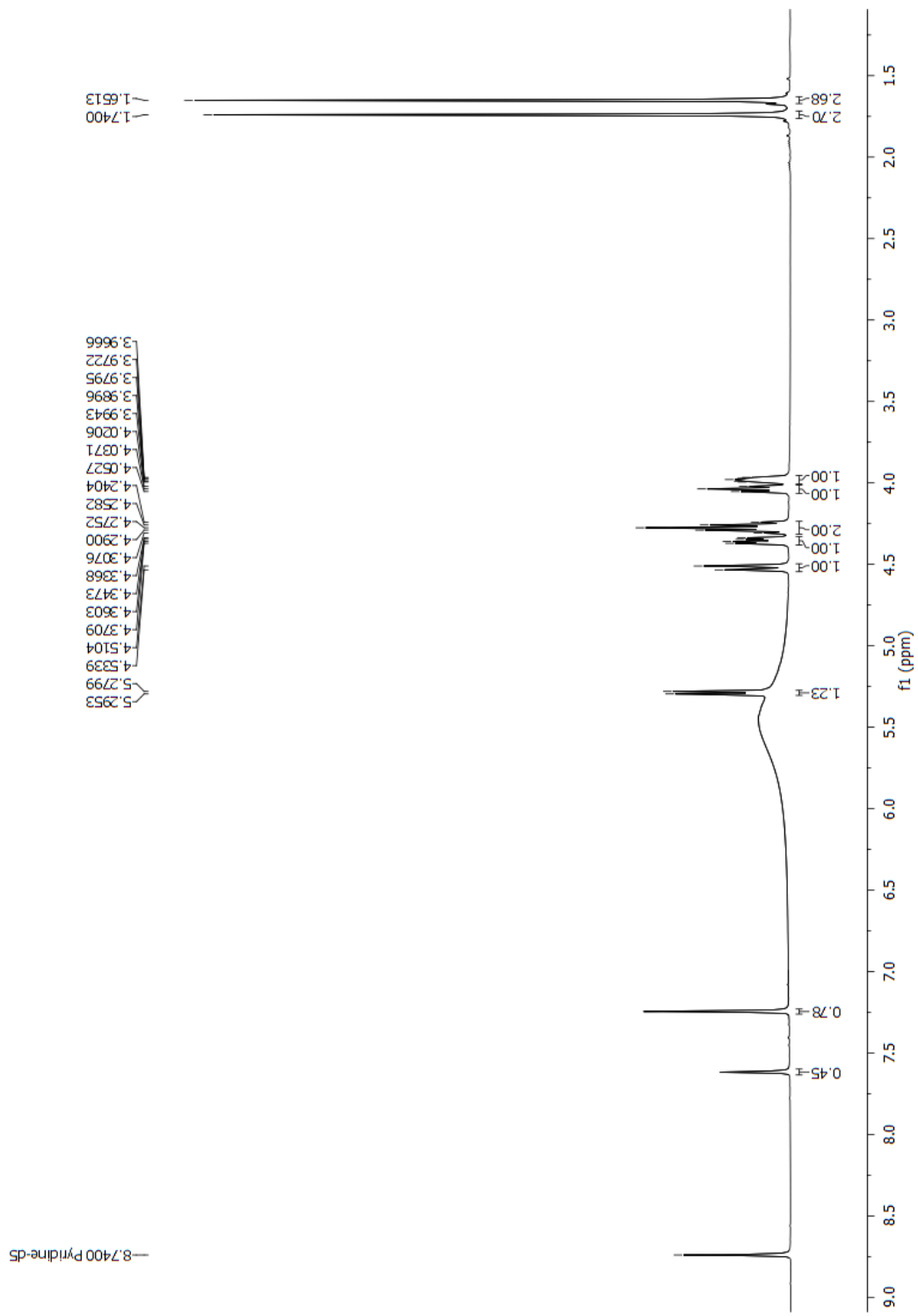
C	Cq-6		Roseosídeo	
	$\delta\text{H}$	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$	$\delta\text{C}$
<b>CH</b>				
1'	5,29 ( <i>d</i> , $J = 7,7$ Hz – 1H)	102,27	4,34 ( <i>d</i> , $J = 7,8$ Hz)	102,89
2'	3,98 ( <i>m</i> , 1H)	75,42	3,17 ( <i>t</i> , $J = 7,8$ Hz)	75,39
3'	4,27 ( <i>m</i> , 2H)	79,09	3,25 ( <i>m</i> )	78,25
4'	4,27 ( <i>m</i> , 2H)	72,32	3,24 ( <i>m</i> )	71,80
5'	4,04 ( <i>t</i> , $J = 8,0$ Hz; 1H)	78,95	3,34 ( <i>m</i> )	78,17
<b>CH<sub>2</sub></b>				
6'	4,35 ( <i>dd</i> , $J = 11,8; 5,3$ Hz; 1H)	63,13	3,85 ( <i>dd</i> , $J = 11,7; 1,4$ Hz)	62,98
	4,52 ( <i>dl</i> , $J = 11,8$ Hz; 1H)		3,63 ( <i>dd</i> , $J = 11,7; 5,2$ Hz)	

**Figura 37.** Estrutura do Roseosídeo

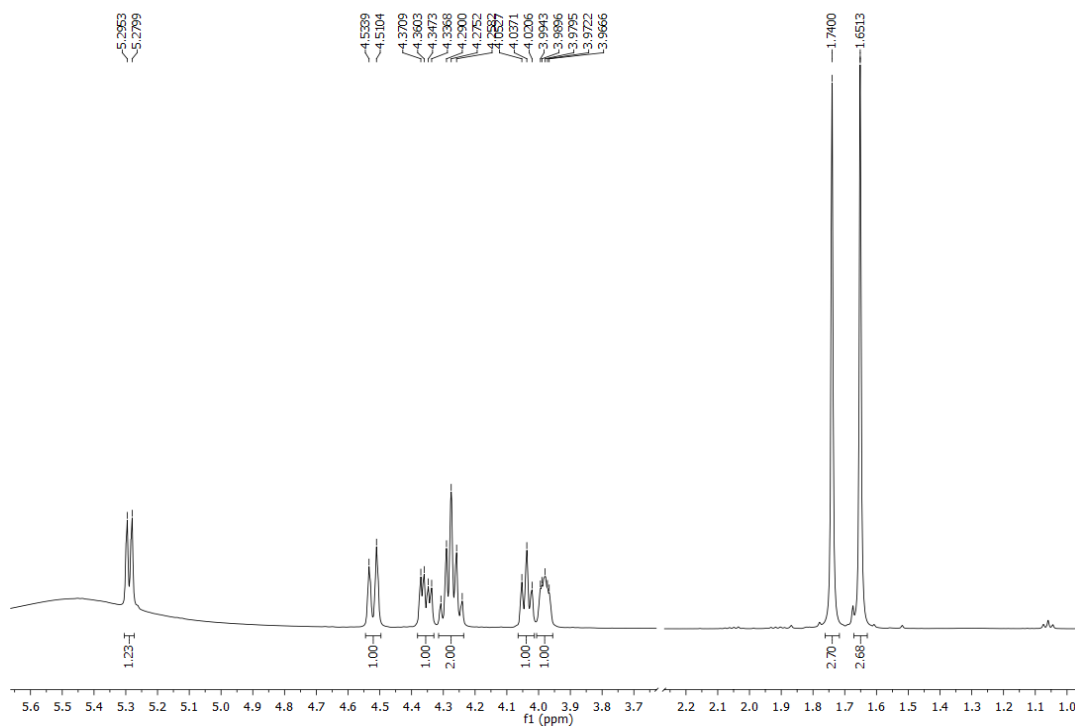




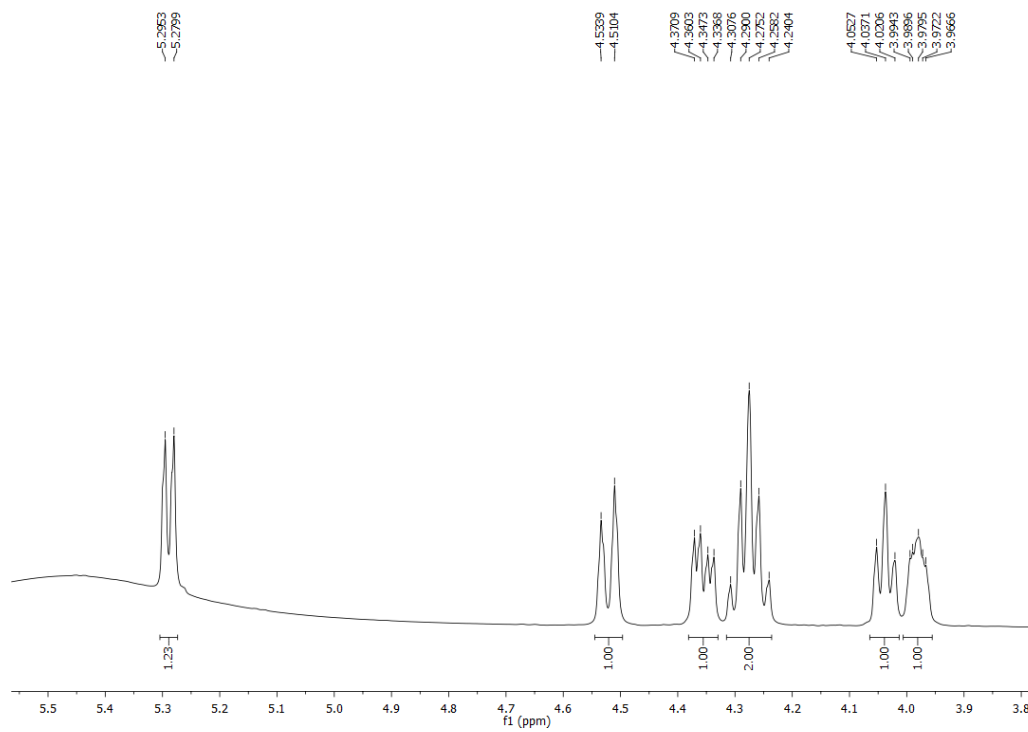
**Figura 38.** Espectro de infravermelho de *Cq-6***Figura 39.** Espectro de Massa de *Cq-6*

**Figura 40.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 500 MHz) de **Cq-6**

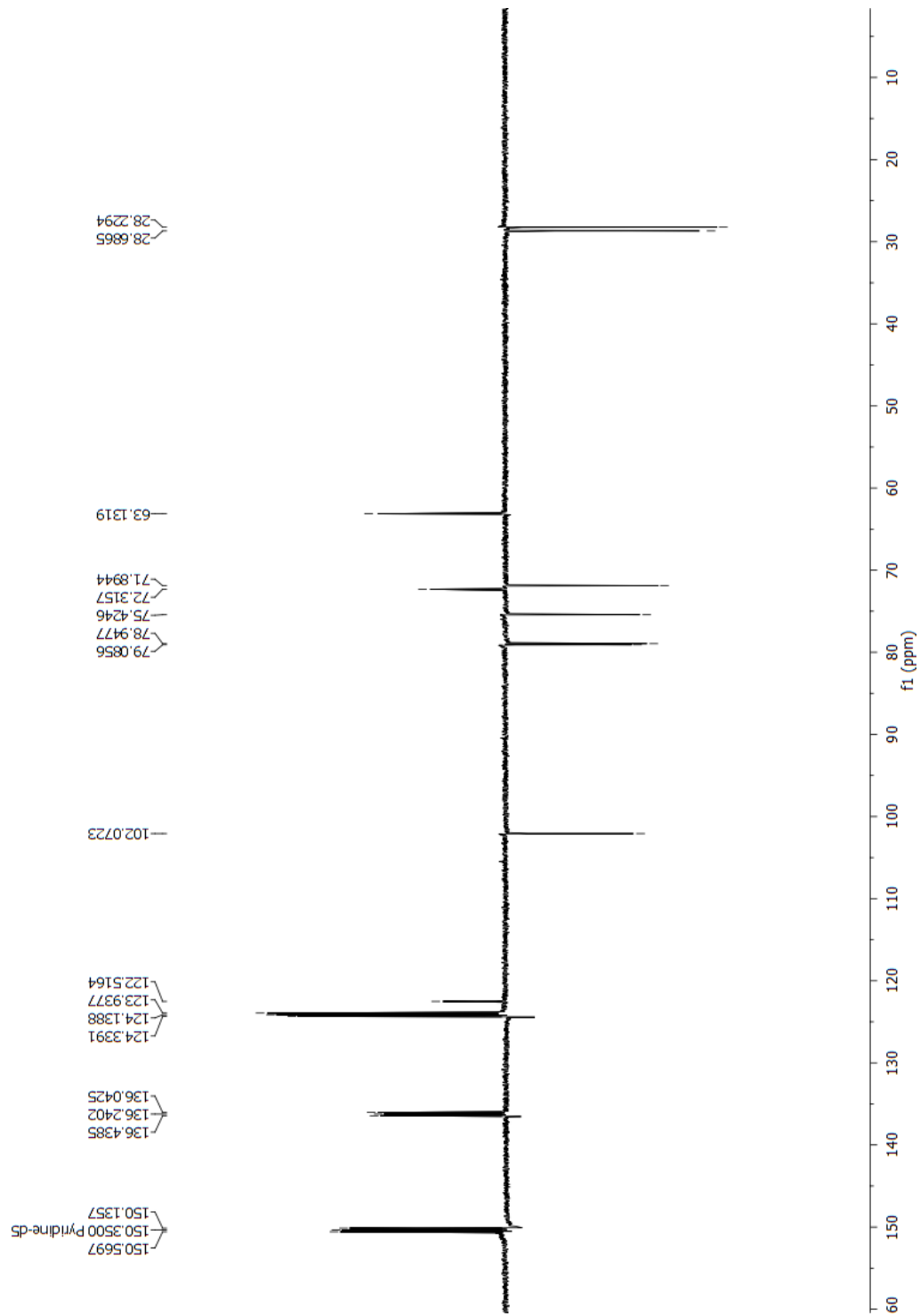
**Figura 41.** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 500 MHz) de *Cq-6*



**Figura 42.** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 500 MHz) de *Cq-6*



**Figura 43.** Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 125 MHz) de **Cq-6**



### 5.2.5 Identificação de *Cq-7* e *Cq-8*

O composto isolado apresentou-se como sólidos cristalinos, solúvel em clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) (Figura 45, p. 94).

O espectro de IV (Fig. 46, p. 96) apresentou uma fraca banda de absorção em torno de  $3075\text{ cm}^{-1}$ , sugestiva de estiramento C-H de anel aromático. As absorções observadas entre  $2933$  e  $2855\text{ cm}^{-1}$ , podem ser atribuídas a estiramentos C-H de carbonos metílicos e metilênicos. Observa-se também uma banda de absorção por volta de  $1722\text{ cm}^{-1}$  e outra em  $1703\text{ cm}^{-1}$ , característica de carbonila (C=O). Em  $1640\text{ cm}^{-1}$  observou-se uma banda de absorção referente a estiramento C=C de alceno, além de uma banda em  $1451\text{ cm}^{-1}$ , que sugere o mesmo tipo de estiramento, porém em anel aromático. Verificou-se em  $1465\text{ cm}^{-1}$  e em  $1383\text{ cm}^{-1}$  absorções compatíveis com dobramento de carbonos metilênicos e metílicos, respectivamente. Observou-se, também, bandas na região entre  $1275$  e  $1102\text{ cm}^{-1}$  características de estiramento C-O de éster (PAVIA, 2012).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) revelou uma série de sinais, muito dos quais se apresentaram de forma duplicada, sugerindo uma mistura de duas substâncias de estruturas similares.

Para *Cq-7*, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz), exibiu sinais na região de carbonos alifáticos em  $\delta_{\text{H}}$ : 0,79 (s, H-23); 0,94 (s, H-24); 0,89 (s, H-25); 1,02 (s, H-26); 0,93 (s, H-27) e 0,80 (s, H-28) (Fig. 47 e 48, p. 97 e 98), característicos de hidrogênios de esqueletos triterpênicos (HENRIQUE et al., 2014). Verificou-se em  $\delta_{\text{H}}$  1,68 (s, H-30) um sinal indicativo de grupo metila ligado a carbono insaturado (GOIS, 2010) (Fig. 49, p. 98) e em  $\delta_{\text{H}}$  4,69 (sl, 1H, H-29a) e em  $\delta_{\text{H}}$  4,57 (sl, 1H, 29b) absorções sugestivas de hidrogênios olefínicos (SANTOS, 2010) estes sinais associados a absorção em  $\delta_{\text{H}}$  4,62 (dd,  $J= 10,8$  e  $5,3\text{Hz}$ , 1H, H-3) indicativa de hidrogênio carbinólico (SANTOS, 2010), sugerem um esqueleto triterpênico do tipo lupeol para esta estrutura (Fig. 51, p. 99).

Também é possível ressaltar sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7,52 (H-2'; H-6'), em  $\delta_{\text{H}}$  7,38 (H-3'; H-4' e H-5'), característicos de absorção em região de aromático monossustituído (SILVESTREIN, WEBSTER, 2000; OLIVEIRA-JÚNIOR, 2017); que associados as absorções em  $\delta_{\text{H}}$  6,44 (d,  $J= 16,0$  Hz, 1H, H-7') e em  $\delta_{\text{H}}$  7,66 (d,  $J= 16,0$  Hz, 1H, H-8'), sugestivas de hidrogênios olefínicos do tipo *trans*, supõem um substituinte compatível com a estrutura do ácido cinâmico (OLIVEIRA-JÚNIOR, 2017) (Fig. 52, p. 100).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , utilizando a técnica APT, ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) e suas expansões (Fig. 63, 64 e 65, p. 102, 103 e 104) apresentou 39 sinais, dentre estes 8 para carbonos quaternários em  $\delta_{\text{C}}$ : 37,94 (C-4); 40,97 (C-8); 37,20 (C-10); 42,96 (C-14); 43,13 (C-17); 151,11 (C-20); 134,67 (C-1') e 166,99 (C-9'); 13 para carbonos metínicos em  $\delta_{\text{C}}$ : 81,15 (C-3); 55,49 (C-5); 50,42 (C-9); 38,16 (C-13); 48,41 (C-18); 48,14 (C-19); 128,39 (C-2', C-6'); 128,57 (C-3', C-5'); 130,25 (C-4'); 144,41 (C-7') e 119,01 (C-8'); 11 para carbonos metilênicos em  $\delta_{\text{C}}$ : 38,49 (C-1); 23,82 (C-2); 18,33 (C-6); 34,32 (C-7); 21,08 (C-11); 25,22 (C-12); 27,56 (C-15); 35,70 (C-16); 29,96 (C-21); 40,13 (C-22) e 109,49 (C-29) e 7 para carbonos metílicos em  $\delta_{\text{C}}$ : 28,02 (C-23); 16,68 (C-24); 16,31 (C-25); 16,11 (C-26); 14,66 (C-27); 18,15 (C-28) e 19,43 (C-30) (Figura 53, p. 101).

Para **Cq-8**, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz), também apresentou sinais condizentes com o esqueleto triterpênico do tipo lupeol. Assim como as absorções em região aromática:  $\delta_{\text{H}}$ : 7,19 (H-2', H-6'); 7,27 (H-3, H-5') e 7,20 (H-4'). Porém, este composto apresentou as absorções em  $\delta_{\text{H}}$  2,63 (*t*,  $J = 7,9$  Hz, 2H, H-8') e em  $\delta$  2,95 (*t*,  $J = 7,6$  Hz, 2H H-7'), sugestivas de hidrogênios alifáticos vicinais, em região desprotegida (OLIVEIRA-JÚNIOR, 2017) (Figura 51, p. 99).

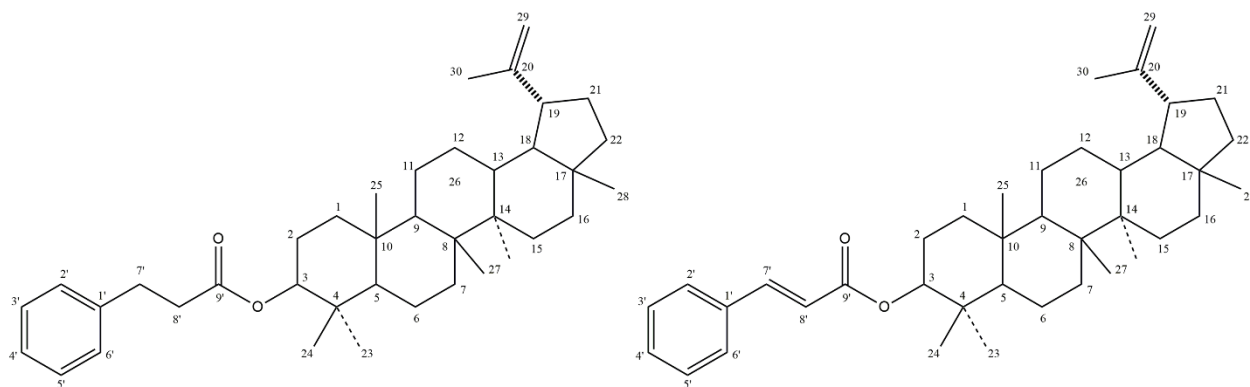
O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , utilizando a técnica APT, ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz), apresentou 39 sinais, dentre estes 8 para carbonos quaternários em  $\delta_{\text{C}}$ : 37,9 (C-4); 40,9 (C-8); 37,2 (C-10); 42,9 (C-14); 43,1 (C-17); 151,1 (C-20); 140,7 (C-1') e 172,8 (C-9'), 9 para carbonos metínicos em  $\delta_{\text{C}}$ : 81,2 (C-3); 55,4 (C-5); 50,4 (C-9); 38,1 (C-13); 48,4 (C-18); 48,1 (C-19); 128,1 (C-2', C-6'); 128,9 (C-3', C-5') e 126,3 (C-4'); 13 para carbonos metilênicos em  $\delta_{\text{C}}$ : 38,4 (C-1); 23,8 (C-2); 18,3 (C-6); 34,3 (C-7); 21,0 (C-11); 25,2 (C-12); 27,5 (C-15) 35,7 (C-16); 29,9 (C-21); 40,1 (C-22); 109,4 (C-29); 31,2 (C-7') e 36,3 (C-8'); e 7 para carbonos metílicos em  $\delta_{\text{C}}$ : 28,0 (C-23); 16,6 (C-24); 16,3 (C-25); 16,1 (C-26); 14,6 (C-27); 18,1 (C-28) e 19,4 (C-30) (Figura 53, p. 101)

Foi registrada a presença de um sinal em  $\delta_{\text{C}}$  81,15 e em  $\delta_{\text{C}}$  81,20 característico de carbono carbinólico, além de dois sinais dobrados em  $\delta_{\text{C}}$  109,49 e 151,11, característico de carbonos olefínicos. Todos esses dados em consonância com a presença de dois sinais, um em  $\delta_{\text{C}}$  166,99 e 172,82 (carbonila), permitem inferir que a estrutura em questão se trata de uma mistura de ésteres do lupeol ligados a unidades de cinamato e diidrocinaurato (OLIVEIRA-JÚNIOR, 2017).

Com base nos dados espectrais apresentados e nas informações da literatura, foi possível identificar **Cq-7** e **Cq-8** como lupeol-3 $\beta$ -*O*-cinamato (cinamato de lupeolila) e lupeol-3 $\beta$ -*O*-

diidrocinamato (diidrocinamato de lupeolila) já anteriormente descrito na espécie *C. quercifolius* (SILVA JÚNIOR, 2017).

**Figura 44.** Estruturas de lupeol-3 $\beta$ -*O*-cinamato e lupeol-3 $\beta$ -*O*-diidrocinamato



**Tabela 12.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 e 125 MHz) da substância *Cq-7* e *Cq-8*, comparados com dados da literatura ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) de Oliveira-Júnior (2017).

<i>Cq-7</i>			Cinamato de lupeolila		<i>Cq-8</i>		Diidrocinaurato de lupeolila	
C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
4	37,9	-	37,8	-	37,9	-	37,8	
8	40,9	-	40,9	-	40,9	-	40,9	
10	37,2	-	37,0	-	37,2	-	37,1	
14	42,9	-	42,8	-	42,9	-	42,8	
17	43,1	-	43,0	-	43,1	-	43,0	
20	151,1	-	150,9	-	151,1	-	150,9	
1'	134,6	-	134,6	-	140,7	-	140,6	
9'	166,9	-	166,9	-	172,8	-	172,8	
<b>CH</b>								
3	81,1	4,62 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 5,1 e 10,7 Hz)	81,0	4,63 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 5,2 e 10,4 Hz)	81,2	4,47 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 5,6 e 10,8 Hz)	81,1	4,48 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 5,6 e 10,0 Hz)
5	55,4	0,89 ( <i>m</i> )	55,3	0,84 ( <i>m</i> )	55,4	0,89 ( <i>m</i> )	55,5	0,84 ( <i>m</i> )
9	50,4	1,30 ( <i>m</i> )	50,3	1,30 ( <i>m</i> )	50,4	1,30 ( <i>m</i> )	50,4	1,30 ( <i>m</i> )
13	38,1	1,65 ( <i>m</i> )	38,0	1,66 ( <i>m</i> )	38,1	1,65 ( <i>m</i> )	38,1	1,66
18	48,4	1,36 ( <i>m</i> )	48,3	1,37 ( <i>m</i> )	48,4	1,36 ( <i>m</i> )	48,3	1,33
19	48,1	2,38 ( <i>m</i> )	48,0	2,38 ( <i>m</i> )	48,1	2,38 ( <i>m</i> )	48,0	2,38
2'/6'	128,3	7,52 ( <i>m</i> )	128,3	7,56	128,1	7,19 ( <i>m</i> )	128,1	7,19
3'/5'	128,5	7,38 ( <i>m</i> )	128,5	7,28	128,9	7,27 ( <i>m</i> )	128,9	7,38
4'	130,2	7,38 ( <i>m</i> )	130,1	7,39	126,3	7,20 ( <i>m</i> )	126,2	7,20
7'	144,4	7,66 ( <i>d</i> <i>J</i> = 16,0 Hz)	144,3	7,67 ( <i>d</i> )	-	-	-	-
8'	119,0	6,43 ( <i>d</i> <i>J</i> = 16,0 Hz)	118,9	6,45 ( <i>d</i> )	-	-	-	-
<b>CH<sub>2</sub></b>								
1	38,4	1,70 ( <i>m</i> ), 1,04 ( <i>s</i> )	38,4	1,73 e 0,98	38,4	1,70 <i>m</i> , 1,04 <i>s</i>	38,3	1,73 e 0,98
2	23,8	1,65 ( <i>m</i> ), 1,57( <i>m</i> )	23,8	1,60 e 1,58	23,8	1,65 <i>m</i> , 1,57 <i>m</i>	23,8	1,60 e 1,58
6	18,3	1,48 ( <i>m</i> ), 1,30( <i>m</i> )	18,2	1,50 e 1,30	18,3	1,48 <i>m</i> , 1,30 <i>m</i>	18,1	1,50 e 1,30
7	34,3	-	34,2	1,39	34,3	-	34,2	1,39
11	21,0	1,40 ( <i>m</i> ), 1,25 ( <i>s</i> )	20,9	1,41 e 1,25	21,0	1,40 <i>m</i> , 1,25 <i>s</i>	20,9	1,41 e 1,25
12	25,2	1,62 ( <i>m</i> ), 1,18 ( <i>s</i> )	25,1	1,66 e 1,09	25,2	1,62 <i>m</i> , 1,18 <i>s</i>	25,1	1,66 e 1,09
15	27,5	1,63 ( <i>m</i> )	27,4	1,64 e 1,03	27,5	1,63 <i>m</i>	27,4	1,64 e 1,03
16	35,7	1,49 ( <i>m</i> ), 1,41( <i>m</i> )	35,6	1,50 e 1,47	35,7	1,49 <i>m</i> , 1,41, <i>m</i>	35,6	1,50 e 1,47
21	29,9	1,90 ( <i>m</i> ), 1,30( <i>m</i> )	29,8	1,92 e 1,34 ( <i>m</i> )	29,9	1,90 <i>m</i> , 1,30, <i>m</i>	29,8	1,92 e 1,34
22	40,1	1,40 ( <i>m</i> ), 1,20( <i>m</i> )	40,0	1,39 e 1,21 ( <i>m</i> )	40,1	1,40 <i>m</i> , 1,20, <i>m</i>	40,0	1,39 e 1,21
29	109,4	29 a – 4,69 ( <i>sl</i> ) 29 b – 4,57 ( <i>sl</i> )	109,4	29a – 4,70 ( <i>s</i> ) 29b – 4,58 ( <i>s</i> )	109,4	29 a – 4,69 ( <i>sl</i> ) 29 b – 4,57 ( <i>sl</i> )	109,4	29a – 4,70 ( <i>s</i> ) 29b – 4,58 ( <i>s</i> )
7'	-	-	-	-	31,2	2,93 <i>t</i> (7,6)	31,1	2,96 ( <i>t</i> , <i>J</i> = Hz)
8'	-	-	-	-	36,3	2,60 <i>t</i> (7,9)	36,3	2,63 ( <i>t</i> , <i>J</i> = Hz)
<b>CH<sub>3</sub></b>								
23	28,0	0,79 ( <i>s</i> )	27,9	0,90 ( <i>s</i> )	28,0	0,92 ( <i>s</i> )	28,0	0,78 ( <i>s</i> )
24	16,6	0,94 ( <i>s</i> )	16,5	0,95 ( <i>s</i> )	16,6	0,84 ( <i>s</i> )	16,7	0,82 ( <i>s</i> )
25	16,3	0,89 ( <i>s</i> )	16,1	0,84 ( <i>s</i> )	16,3	0,88 ( <i>s</i> )	16,2	0,89 ( <i>s</i> )
26	16,1	1,02 ( <i>s</i> )	15,9	1,04 ( <i>s</i> )	16,1	1,06 ( <i>s</i> )	15,9	1,06 ( <i>s</i> )
27	14,6	0,93 ( <i>s</i> )	14,5	0,95 ( <i>s</i> )	14,6	0,95 ( <i>s</i> )	14,5	0,97 ( <i>s</i> )
28	18,1	0,80 ( <i>s</i> )	18,0	1,00 ( <i>s</i> )	18,1	0,80 ( <i>s</i> )	18,0	0,81 ( <i>s</i> )
30	19,4	1,68 ( <i>s</i> )	19,3	1,69 ( <i>s</i> )	19,4	1,69 ( <i>s</i> )	19,3	1,68 ( <i>s</i> )



Figura 45. Espectro de Infravermelho de *Cq-7* e *Cq-8*

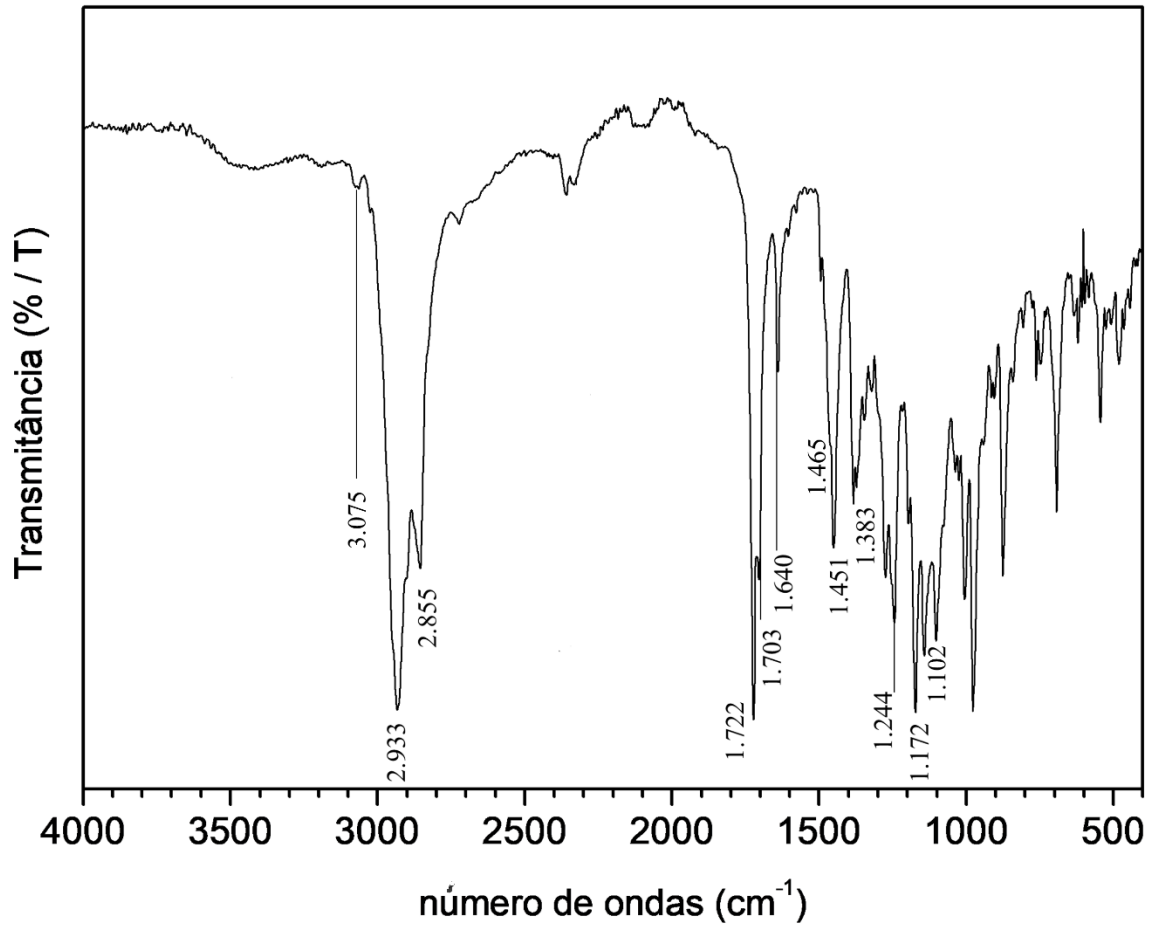
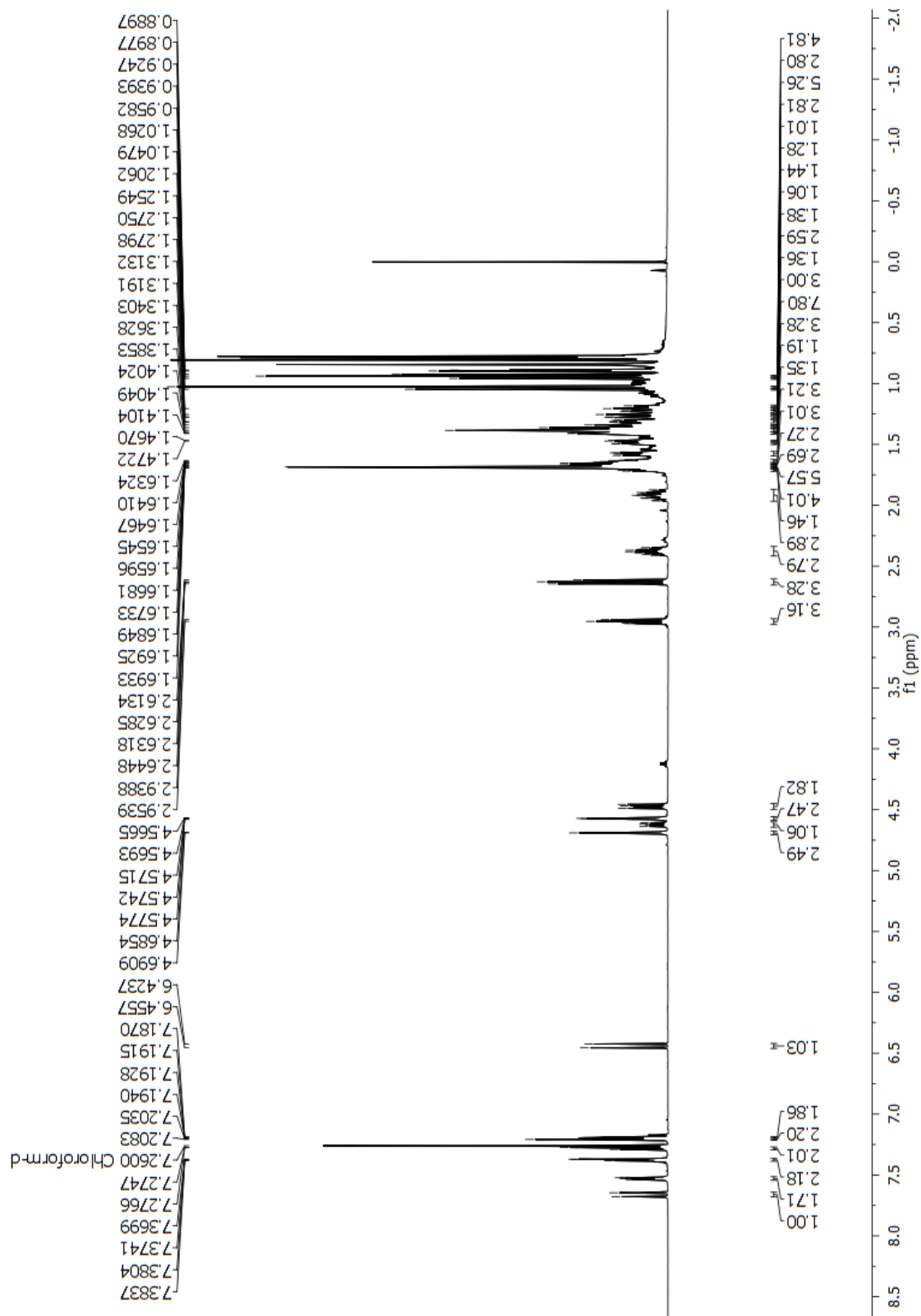
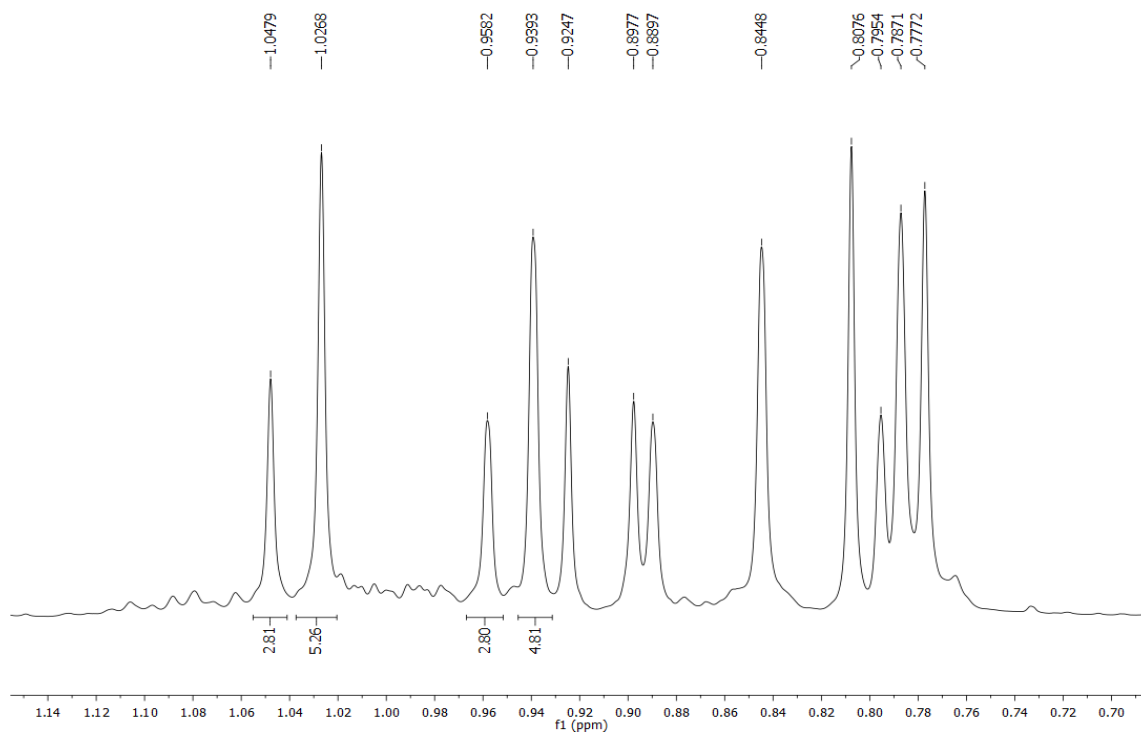


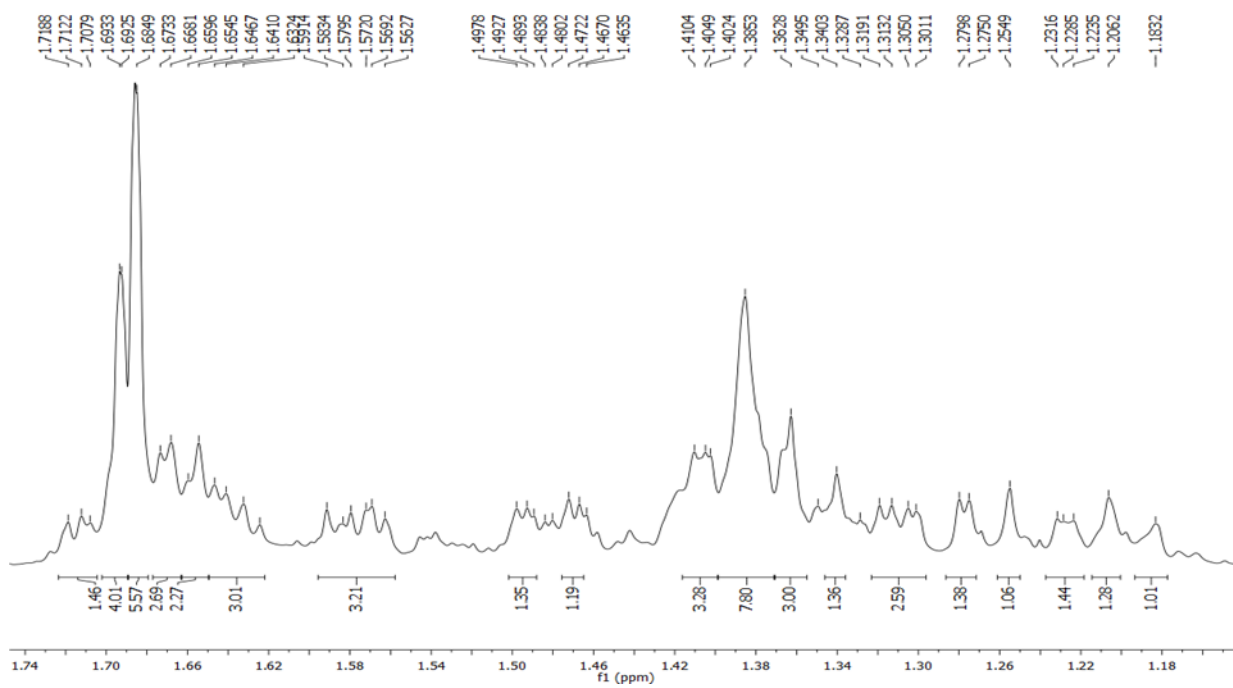
Figura 46. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) da substância **Cq-7** e **Cq-8**



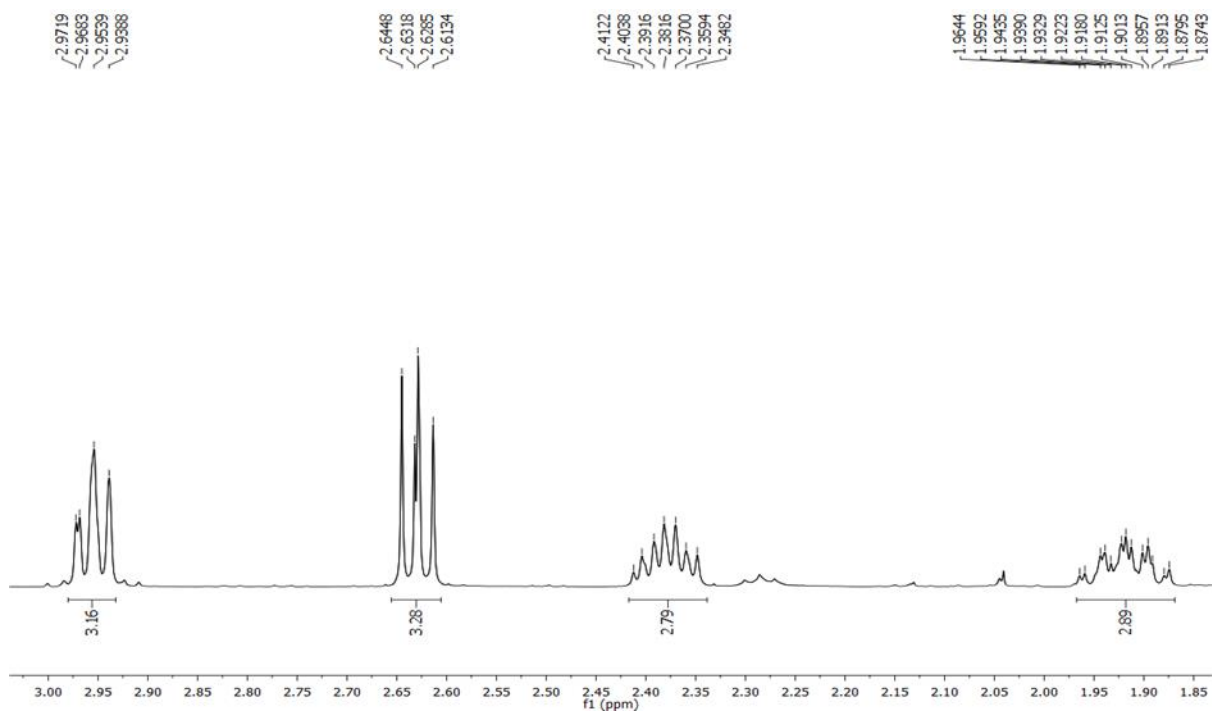
**Figura 47.** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) de *Cq-7* e *Cq-8*



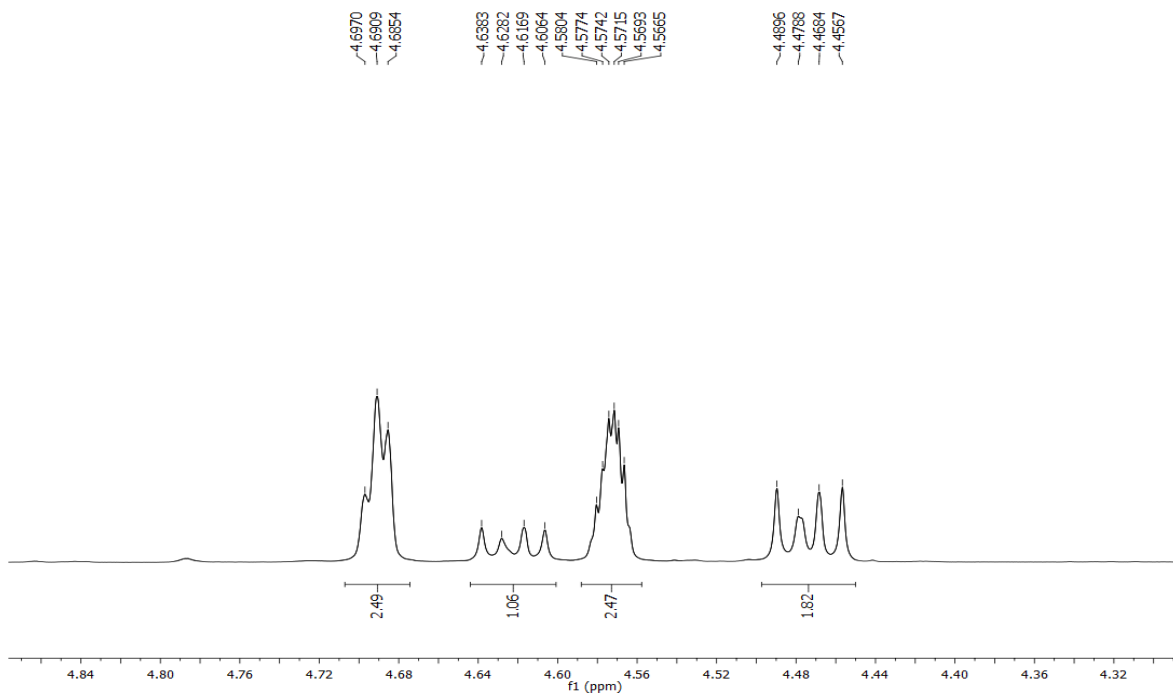
**Figura 48.** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) de *Cq-7* e *Cq-8*



**Figura 49.** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) de *Cq-7* e *Cq-8*



**Figura 50.** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) de *Cq-7* e *Cq-8*



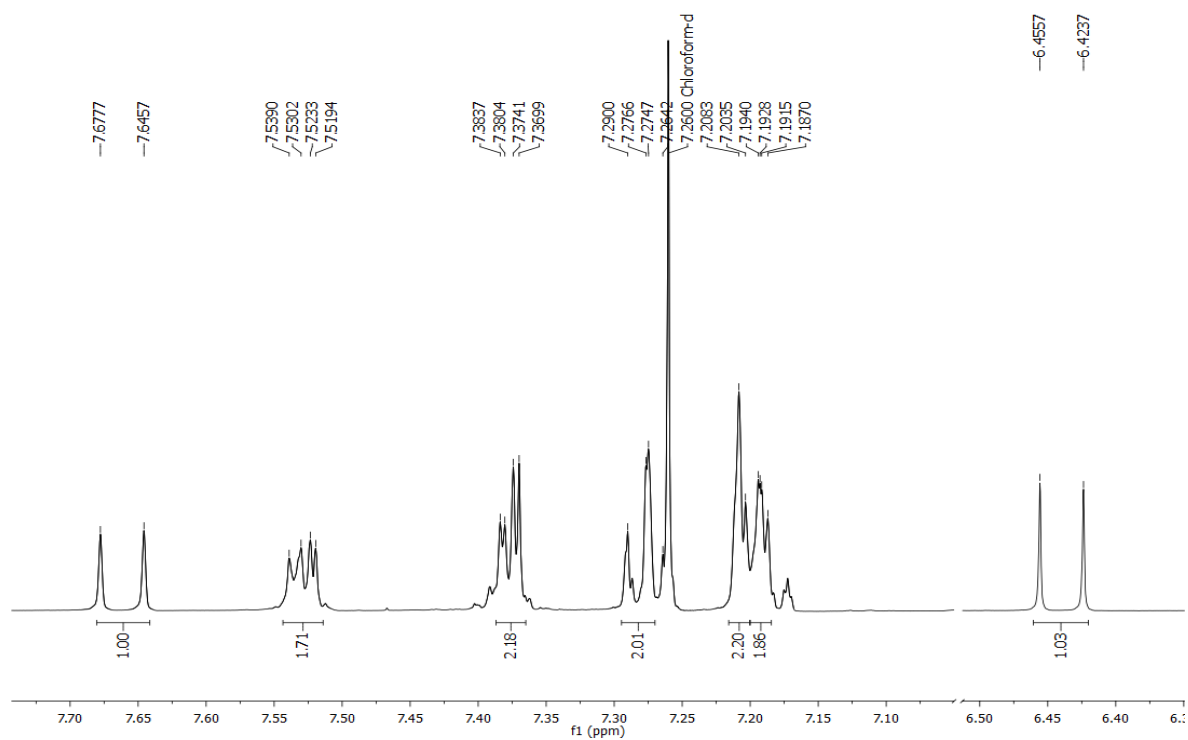
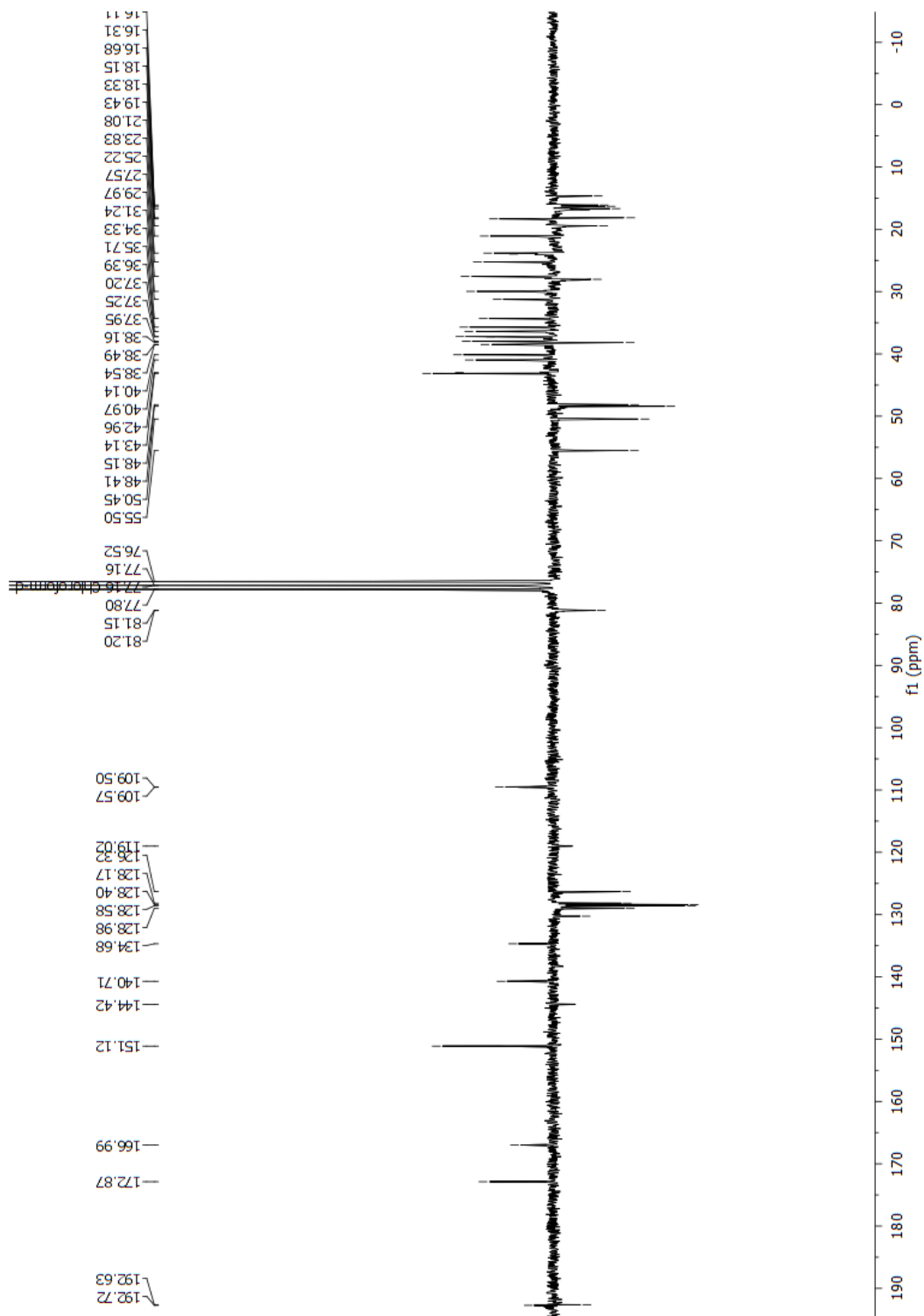
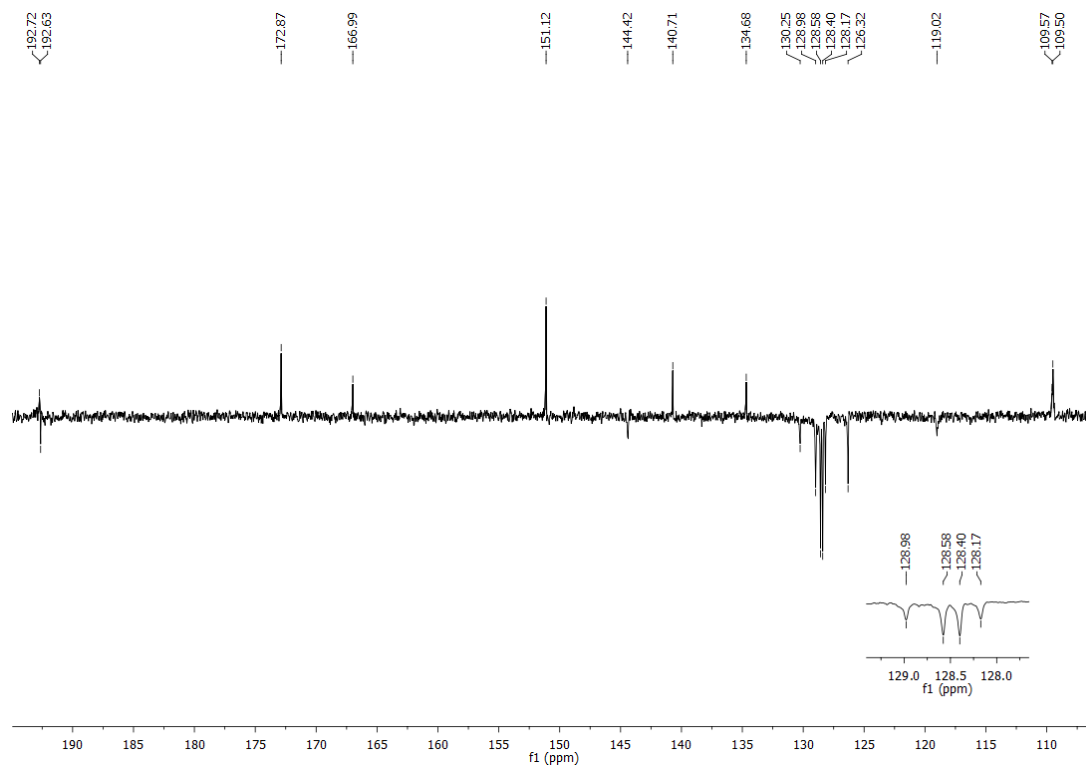
**Figura 51.** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) de *Cq-7* e *Cq-8*

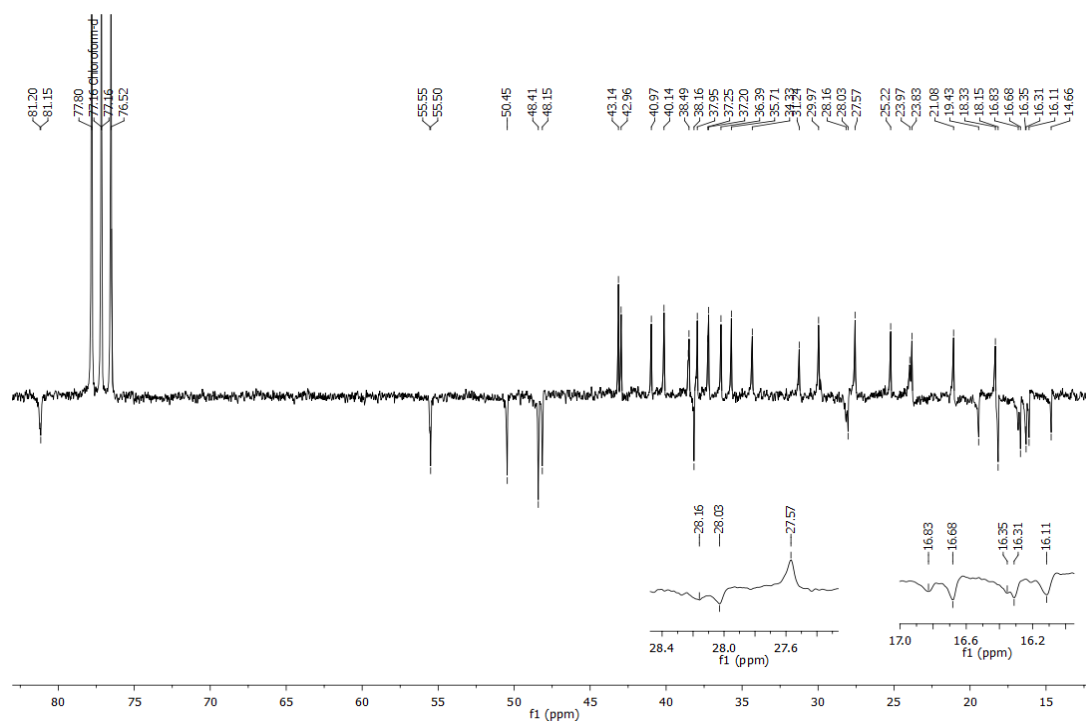
Figura 52. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) de *Cq-7* e *Cq-8*



**Figura 53.** Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) de *Cq-7* e *Cq-8*



**Figura 54.** Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) de *Cq-7* e *Cq-8*



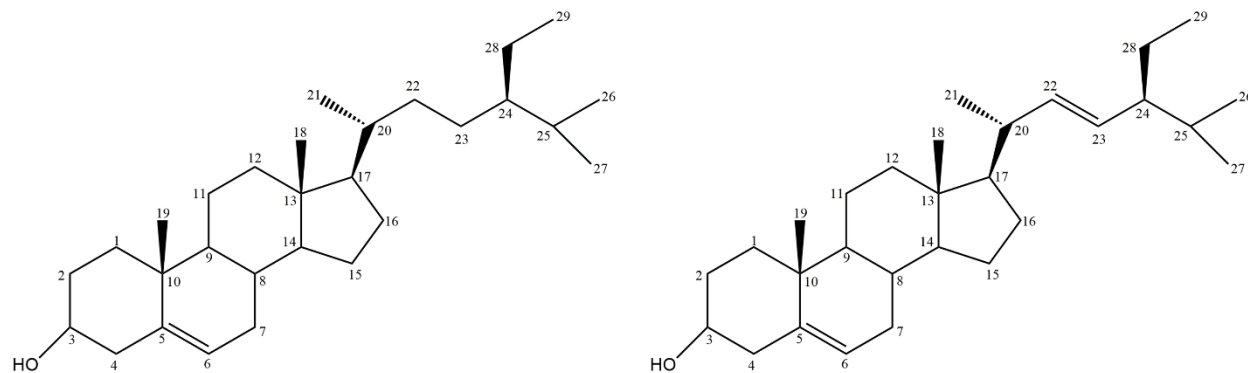
### 5.2.6 Identificação de *Cq-9* e *Cq-10*

A mistura apresentou-se como cristais brancos, solúveis em  $\text{CHCl}_3$  (Figura 54). A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200MHz) revelou um envelope de sinais entre  $\delta_{\text{H}} 2,3 - 0,65$  (Figura 55, p. ) característicos de hidrogênios metilênicos e metílicos de triterpenos e esteroides, sugestão essa reforçada pela presença de um multipeto em  $\delta_{\text{H}} 3,53$  (H-3), compatível com hidrogênio oximetínico na posição 3 do núcleo esteroidal e/ou triterpênico (ALVES, 2008; SOUZA, 2014) (Fig. 56, p. 109). Observou-se também um dubleto em  $\delta_{\text{H}} 5,35$  ( $d$ ,  $J = 4,9$  Hz, 1H) característico de hidrogênio olefínico de esteroides (Fig. 70, p. 109) (AHMED et al, 2001). Em  $\delta_{\text{H}} 5,08$  verificou-se a presença de um discreto multipeto referente a hidrogênios olefínicos das posições 22 e 23 da estrutura de estigmasterol (Fig. 69 e 70, p. 109), sugerindo que a substância em questão se trata de uma mistura dos esteroides  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol (ALVES, 2008).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200MHz), permitiu reforçar a proposta de núcleo esteroidal, indicada nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e verificada pela presença de metilas características entre  $\delta_{\text{C}} 12,01$  a  $19,98$  (SOUZA, 2014). Como também, pelas absorções em  $\delta_{\text{C}} 71,97$  (C-3);  $140,87$  e  $151,76$  (C-5);  $121,88$  (C-6) que correspondentes aos carbonos do esqueleto esteroidal do  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol (Fig. 72 e 73, p. 109).

Para a molécula do estigmasterol ainda foi observada a presença de dois sinais com menor intensidade em  $\delta_{\text{C}} 138,48$  e  $129,42$  que se referem aos carbonos olefínicos nas posições 22 e 23 (ALVES, 2008). O que complementa a sugestão para uma mistura de esteroides, sugerindo ainda uma proporção maior do  $\beta$ -sitosterol, verificada pela intensidade de sinais no espectro de carbono e a proporcionalidade das integrais entre os hidrogênios.

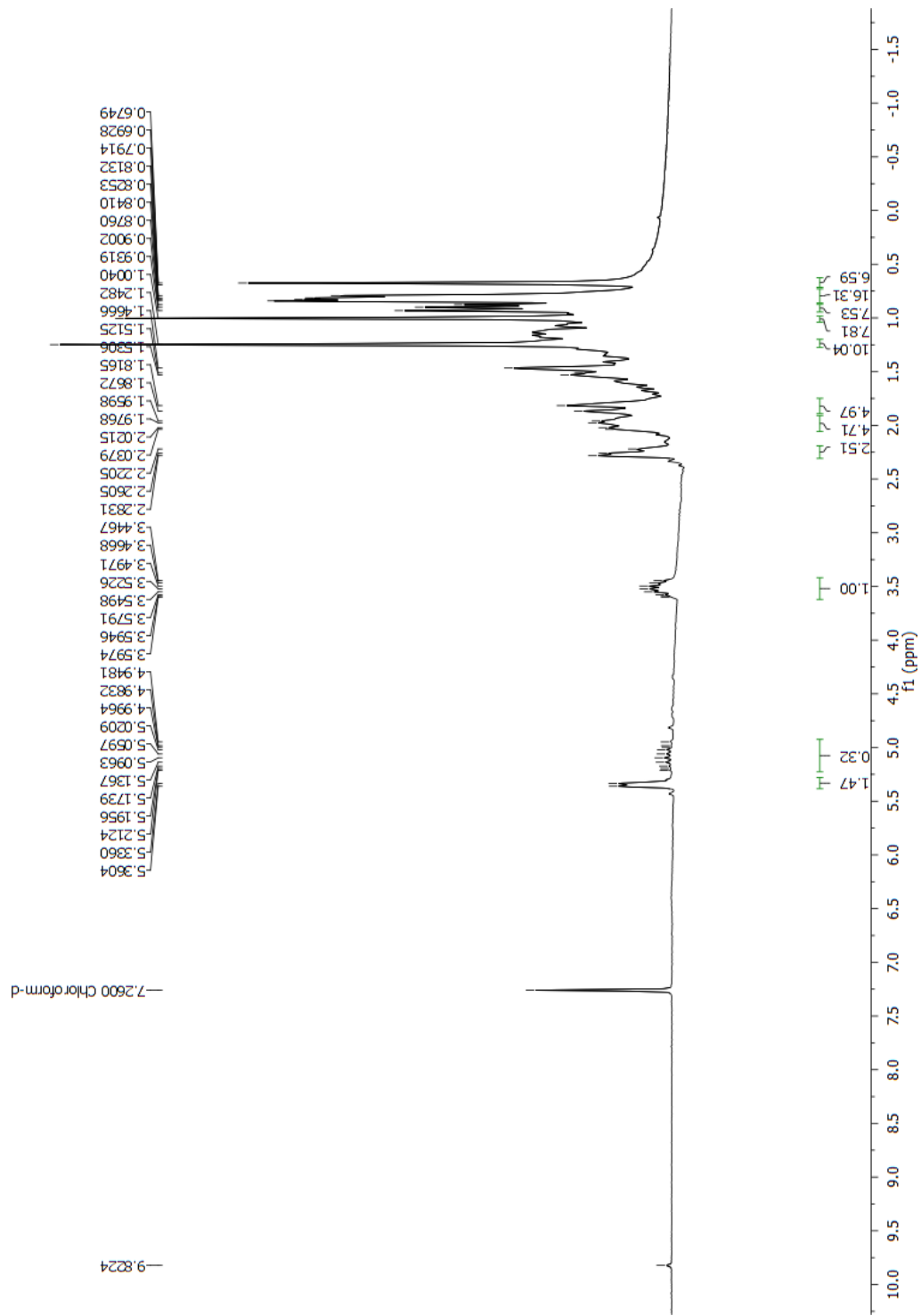


**Figura 55.** Estruturas do  $\beta$ -sitosterol e Estigmasterol

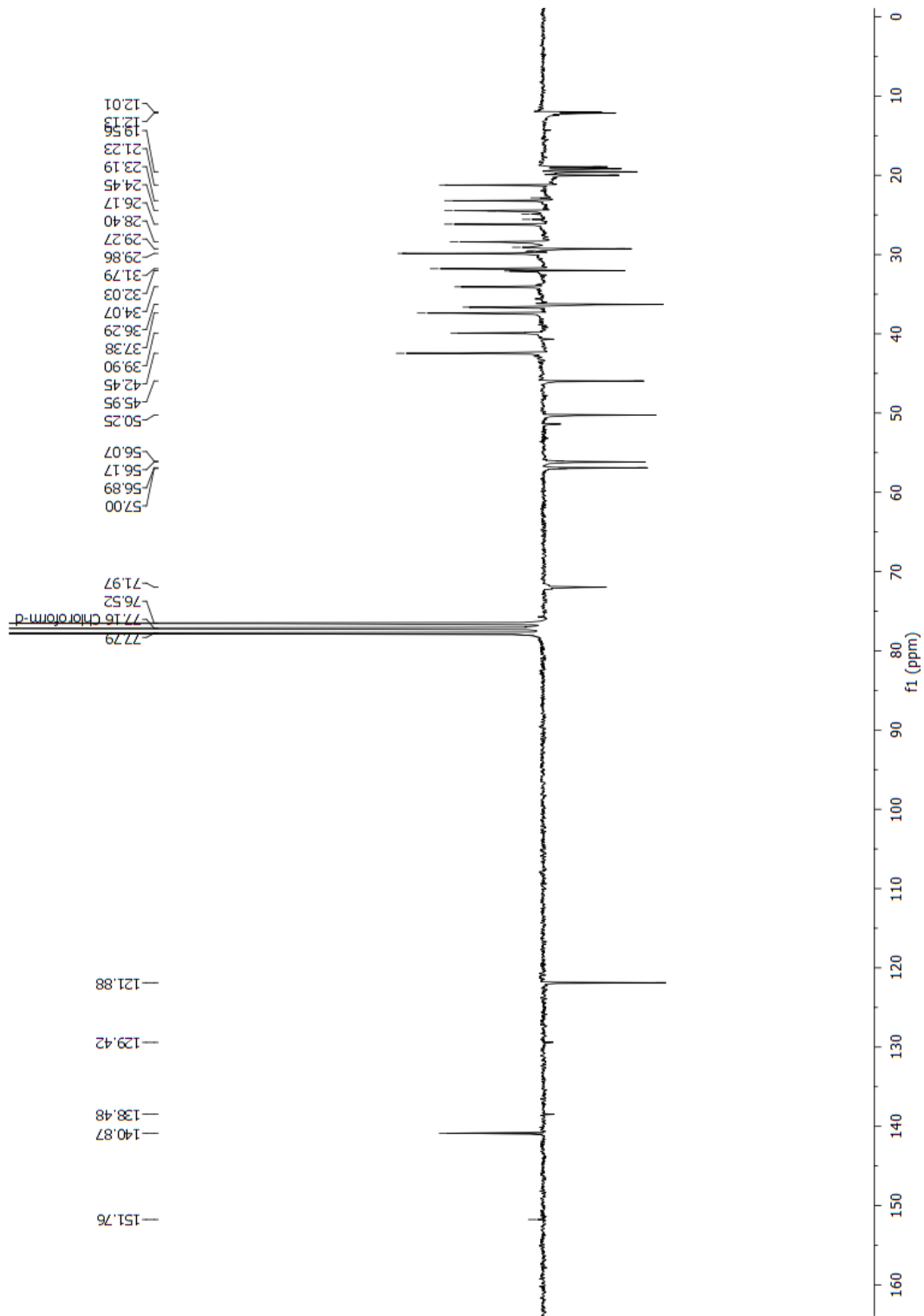
**Tabela 13.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 200 e 50 MHz) da substância *Cq-9* e *Cq-10*, comparados com dados da literatura ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) de Alves (2008).

	$\beta$ -sitosterol			Estigmasterol		
		Cq-9	Literatura		Cq-10	Literatura
<b>C</b>	$\delta\text{H}$	$\delta\text{C}$	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$	$\delta\text{C}$	$\delta\text{C}$
<b>5</b>		140,87	140,64		151,76	140,64
<b>10</b>		39,90	37,16		39,90	36,39
<b>13</b>		42,45	42,20		42,45	42,09
<b>CH</b>						
<b>3</b>	3,53 ( <i>m</i> )	71,97	71,61		71,97	71,61
<b>6</b>	5,33 ( <i>d</i> )	121,88	121,58		121,88	121,58
<b>8</b>		32,07	31,78		32,07	31,78
<b>9</b>		50,25	51,15		51,38	50,02
<b>14</b>		56,89	56,65		57,00	56,76
<b>17</b>		56,17	55,95		56,07	55,82
<b>20</b>		36,29	36,06		36,29	40,46
<b>22</b>		-	-		138,48	138,26
<b>23</b>		-	-		129,26	129,14
<b>24</b>		45,95	45,69		51,38	51,15
<b>25</b>		29,27	29,01		-	-
<b>CH<sub>2</sub></b>						
<b>1</b>		32,08	31,41		32,08	37,16
<b>2</b>		36,64	37,16		36,64	31,45
<b>4</b>		42,43	39,67		42,43	42,09
<b>7</b>		31,79	34,29		31,79	31,41
<b>11</b>		21,23	20,98		21,23	20,98
<b>12</b>		39,83	39,67		39,83	39,58
<b>15</b>		24,45	24,20		24,50	24,27
<b>16</b>		28,40	28,16		29,08	28,86
<b>22</b>		34,07	33,61		-	-
<b>23</b>		26,17	25,93		-	-
<b>28</b>		23,19	22,94		22,85	22,94
<b>CH<sub>3</sub></b>						
<b>18</b>		12,01	11,77		12,01	11,96
<b>19</b>		19,56	18,91		19,56	19,4
<b>21</b>		18,93	18,70		18,93	21,03
<b>26</b>		19,98	19,74		19,98	19,32
<b>27</b>		19,17	21,16		19,17	21,16
<b>29</b>		12,13	11,96		12,13	12,19

**Figura 56.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) de **Cq-9** e **Cq-10**



**Figura 57.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) de **Cq-9** e **Cq-10**



### 5.3 ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS

#### 5.3.1 Atividade antimicrobiana

Os produtos foram avaliados pela sua capacidade de inibir o crescimento bacteriano das cepas selecionadas e os resultados expressos pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), estão demonstrados na Tabela 14.

**Tabela 14.** Determinação da CIM do EEB, fases particionadas e Linamarina oriundos de *C. quercifolius*.

Produtos testados ( $\mu\text{m mL}^{-1}$ )	Cepas microbianas				
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>
<b>Linamarina</b>	2000	2000	1000	-	-
<b>EEB</b>	4000	-	4000	-	-
<b>Fase Hexânica</b>	-	4000	-	-	-
<b>Fase Diclorometano</b>	4000	-	4000	-	4000
<b>Fase AcOEt</b>	-	4000	4000	-	-
<b>Fase N-butanólica</b>	4000	-	2000	4000	4000

Legenda: (-) não apresentou inibição do crescimento.

A partir dos dados obtidos, baseados na metodologia utilizada, os resultados deste estudo obtidos para o EEB e as fases particionadas não justificam a indicação popular desta planta como antimicrobiana, visto que Aligiannis e colaboradores (2001) afirmam que produtos-teste com CIM determinada em uma concentração acima de 1,6 mg.ml<sup>-1</sup> são inibidores fracos. Os ensaios de Almeida (2013), também não foram considerados satisfatórios, no qual o extrato hidroalcolico a 80% da faveleira apresentou CIM e CBM em concentração acima de 2 mg mL<sup>-1</sup>.

Peixoto Sobrinho e colaboradores (2012) avaliaram o potencial antimicrobiano de espécies do gênero *Cnidocolus* e verificou que o extrato das folhas de *C. quercifolius* apresentou baixa atividade frente a cepas de *S. aureus* e *S. coagulase* negativa por apresentar uma CIM > 2000 ug ml<sup>-1</sup>. Em contrapartida, o extrato das cascas apresentou CIM entre 250 e 500 ug ml<sup>-1</sup>, demonstrando resultados muito promissores.

O composto Linamarina, apesar de sua elevada toxicidade descrita na literatura devido a presença do grupo cianeto, apresentou um valor de CIM que a enquadra como um inibidor moderado (CIM entre 0,6 e 1,5 mg mL<sup>-1</sup>) para as cepas de *E. coli* e fraco para as cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, o mesmo não apresentou atividade frente as cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis*. Esta discreta atividade pode ainda estar relacionada ao mecanismo de ação do grupamento CN, que está envolvido com a inibição da cadeia respiratória, podendo sua atividade ser melhor desempenhada em organismos que utilizem esta via para obtenção de energia.

A critério de classificação, para serem considerados inibidores potentes, os produtos deveriam obter CIM até 0,5 mg mL<sup>-1</sup>. Webster e colaboradores (2008) ainda afirmam que um valor de CIM satisfatório é considerado até 1000 µg mL<sup>-1</sup>.

### 5.3.2 Atividade hemolítica

O resultado do ensaio de hemólise frente a hemácias humanas demonstrou que todos os produtos avaliados apresentaram potencial hemolítico acima da 18%, observando-se que as fases diclorometano e AcOEt apresentaram os maiores percentuais. E o menor valor encontrado no ensaio foi para o composto isolado Linamarina com 18,51%, verificados na Tabela 15. O controle negativo (solução salina 0,9%) não provocou hemólise e o controle positivo (Triton-X) apresentou percentual de 100% de hemólise.

**Tabela 15.** Potencial Hemolisante do EEB, fases particionadas e Linamarina (*Cq-6*) oriundos de *C. quercifolius*.

Potencial Hemolisante (%)				
Concentração (mg mL <sup>-1</sup> )	EEB	Fase hexânica	Fase diclorometano	Linamarina ( <i>Cq-6</i> )
4,0	6,98	4,13	61,5	18,51
2,0	2,7	2,5	1,42	34,91
1,0	1,3	1,42	-	-
0,5	1,07	1,35	-	-

(-) produtos não avaliados nesta concentração.

Este tipo de ensaio quando relacionado com outra atividade farmacológica, como por exemplo a atividade antimicrobiana de extratos vegetais, permite o produto testado com atividade positiva não causar efeito tóxico ao organismo humano, durante sua utilização.

Senjobi e colaboradores (2011) realizaram um ensaio de toxicidade (CL50) frente a *artemia* salina do extrato etanólico das folhas de *Cnidocolus aconitifolius* e verificaram que o mesmo se mostrou altamente tóxico, com resultados significativos de acordo com as recomendações do Instituto Nacional do Câncer. O potencial tóxico obtido neste ensaio pode direcionar pesquisas para outros campos que utilizem esta propriedade para efetivação de sua ação, como nos estudos que envolvem citotoxicidade em células neoplásicas.

### 5.3.3 Atividade anti-*leishmania*

A tabela 16 mostra a atividade anti-*leishmania* do composto 2-( $\beta$ -D-glicopiranosiloxi)-isobutironitrila, conhecida como linamarina (**Cq-6**). Esta avaliação demonstrou que a substância não foi capaz de inibir o crescimento das formas promastigotas de *L. braziliensis* em nenhuma das concentrações testadas (2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

**Tabela 16.** Atividade anti-*leishmania* do composto Linamarina (**Cq-6**).

<b>Atividade anti-<i>leishmania</i></b>								
	<b>Linamarina (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>							
	<b>400</b>	<b>200</b>	<b>100</b>	<b>50</b>	<b>25</b>	<b>12,5</b>	<b>6,25</b>	<b>3,12</b>
<b>Formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i></b>	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA

SA: Sem atividade

A farmacoterapia atual tem restrições que limitam sua aplicação, como a alta toxicidade que se traduz em efeitos adversos sérios durante o tratamento, o desenvolvimento de parasitas resistentes que são difíceis de combater juntamente com a reincidência da doença, a ausência de terapias orais efetivas que melhorem a adesão dos pacientes e o alto custo que gera perdas econômicas principalmente para os países em desenvolvimento (ZULFIGAR et al., 2017; SILVA, 2018).

Alguns estudos que avaliaram o potencial citotóxico da linamarina (LI et al., 2010; GIRALD et al., 2011), utilizavam um sistema de entrega que continha o composto isolado e sua enzima (linamarinase), esta ao promover uma hidrólise na molécula, quebra a ligação com o grupamento HCN, deixando-o livre para exercer seu efeito tóxico. Com essa reação ocorrendo já na célula-alvo. Ou seja, para exercer seu efeito tóxico a linamarina precisa liberar o grupamento HCN de sua estrutura. Deste modo, é possível relacionar que ensaios de atividade citotóxica que não assegurem a liberação do HCN da linamarina, podem não alcançar a eficácia desejada.

#### 5.3.4 Atividade antiproliferativa

A Tabela 17 mostra que nas concentrações testadas, os produtos avaliados não demonstraram inibição significativa do crescimento celular quando comparado com o quimioterápico doxorrubicina (D), usado como controle positivo. Os gráficos (Figura 74, p. 117) mostram a porcentagem de crescimento celular em função dos compostos testados.

**Tabela 17.** Atividade Antiproliferativa de linamarina (*Cq-6*) e os isômeros do lupeol-cinamato (*Cq-7* e *Cq-8*)

Compound	GI <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )									
	G	B	Or	Ki	Lu	P	O	C	Le	Ke
(D)	<0,025	<0,025	0,14	0,094	<0,025	0,051	0,054	0,19	<0,025	0,034
( <i>Cq-6</i> )	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
( <i>Cq-7</i> e <i>Cq-8</i> )	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

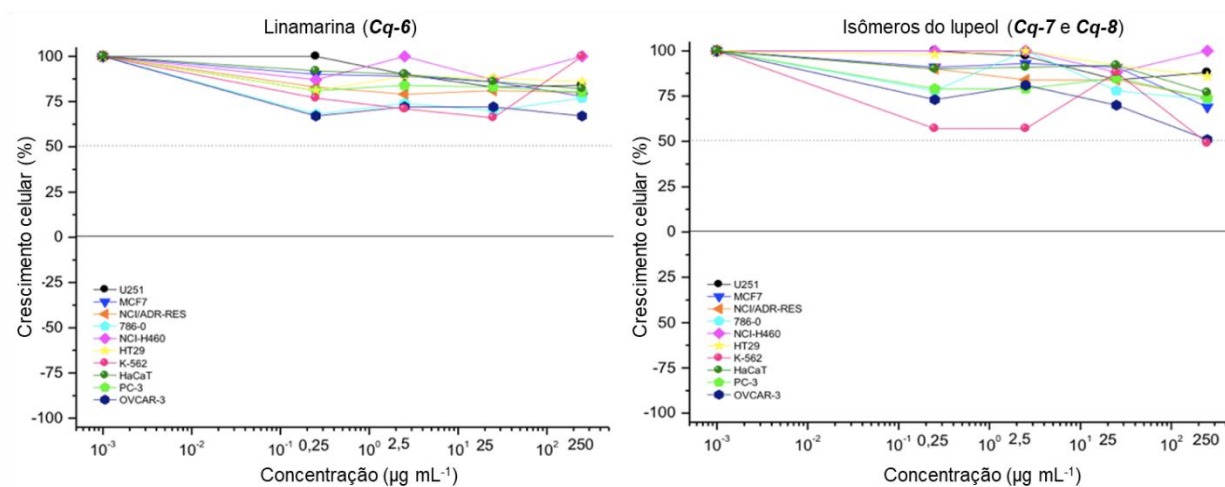
Human tumor lines: **G** = U251 (glioma); **B** = MCF-7 (breast); **Or** = NCI-ADR / RES (ovary with multiple drug resistance phenotype); **Ki** = 786-0 (kidney); **Lu** = NCI-H460 (lung, non-small cell type); **P** = PC-3 (prostate); **O** = OVCAR-3 (ovary); **C** = HT29 (colon); **Le** = K562 (leukemia). Human non-tumor line: **Ke** = HaCat (immortalized keratinocytes).

Ambos os compostos não mostraram uma concentração eficaz para inibir o crescimento de 50% das células testadas. Neste modelo experimental, uma das maneiras de inferir a porcentagem de crescimento é por leitura espectrofotométrica da absorbância de proteínas celulares coradas com Sulforrodamina B (SRB), um corante aniônico de coloração rosa brilhante. Portanto, quanto maior



a quantidade de SRB ligada ao compartimento, maior a quantidade de células viáveis e, consequentemente, menor a atividade antiproliferativa da amostra em avaliação.

**Figura 58.** Porcentagem de crescimento celular de linhagens tumorais humana frente as substâncias avaliadas



Em seus estudos Denny e colaboradores (2007), avaliaram o efeito antiproliferativo de extratos e da fração orgânica, obtidos das folhas de *Virola sebifera* (Myristaceae) e verificaram que os produtos que apresentaram resultados positivos para alcaloides e compostos nitrogenados pela triagem fitoquímica (extrato diclorometano e a fração orgânica obtida por extração ácido-base) também se mostraram ativos para as linhagens tumorais avaliadas, tendo o extrato diclorometano apresentado uma seletividade principal para a linhagem de pulmão NCI-460.

---

# CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O estudo de bioprospecção de *C. quercifolius* caracterizou através de técnicas analíticas a droga vegetal oriunda do pó das folhas, mostrando que essas técnicas podem ser aplicadas em etapas que envolvem a produção e controle de qualidade de futuros fitoterápicos.
- O *screening* fitoquímico revelou a presença de fenóis, taninos, flavonoides e esteroides/triterpenoides.
- Os ensaios de teor apresentaram valores de 74,19 mg g<sup>-1</sup> para polifenóis totais, 48,39 mg g<sup>-1</sup> para taninos condensados e 16,72 mg g<sup>-1</sup> para flavonoides.
- A atividade hemolítica para o EEB e fase hexânica evidenciaram que os mesmos não possuem potenciais tóxicos elevados, já os resultados da fase diclorometano e linamarina direcionam estes para atividades que utilizem este potencial, a exemplo da citotoxicidade em células neoplásicas.
- As dez substâncias isoladas foram: 13<sup>2</sup>-hidroxi-(13<sup>2</sup>-*S*)-feofitina a, 13<sup>2</sup>-hidroxi-(13<sup>2</sup>-*R*)-feofitina a, 13<sup>2</sup>-hidroxi-(13<sup>2</sup>-*S*)-etoxifeoforbídeo a, 13<sup>2</sup>-hidroxi-(13<sup>2</sup>-*S*)-etoxifeoforbídeo b, ácido trans-cinâmico, linamarina, lupeol-O-cinamato, Lupeol-O-diidrocinamato e os esteroides beta-sitosterol e estigmasterol.
- Os ensaios farmacológicos de atividade antimicrobiana, anti-*leishmania* e antiproliferativa não obtiveram bons resultados, porém se faz necessário avaliações por outros métodos ou ajustes nas metodologias utilizadas.

---

# REFERÊNCIAS

---

## REFERÊNCIAS

ADOLF, W.; OPFERKUCH, H. J.; HECKER, E. Irritant phorbol derivatives from four *Jatropha* species. **Phytochemistry**, v. 23, n. 1, p. 129-132, 1984.

AGRA, M. F.; SILVA K. N.; BASÍLIO I. J. L. D; FREITAS P. F; BARBOSA-FILHO J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy.**, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.

AGRAWAL, P. K. Carbon-13 NMR of flavonoids. **Elsevier**, New York, 1989.

ALIGIANNIS, N. et al., Composition and antimicrobial activity of the essential oils two *Origanum* species. **Journal Agric. Food Chemistry**, v.49, p.4168-70, 2001.

ALVES, H. S. Novos flavonoides monoterpênicos e outros constituintes químicos isolados de espécies de *Piper* (PIPERACEAE). Dissertação (Doutorado em produtos naturais e sintéticos bioativos), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

ARAGÃO C. F. S.; SOUZA F. S.; BARROS A. C. S.; VERAS J. W. E.; BARBOSA FILHO J. M.; MACÊDO R. O. Application of thermogravimetry (TG) in milona quality control (*Cissampelos sympodialis* Eichl.) Menispermaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy.** v. 12, p. 60-61, 2002.

ARAÚJO, A. A. S.; MERCURI, L. P.; SEIXAS, S. R.S.; STORPIRTIS, S.; MATOS, J. R. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.** v. 42, n. 2, p. 269-277, 2006.

ARNILLAS, E. A. P. Obtenção e caracterização da formulação fitoterápica contendo padrões de corante e extrato de *Arnica montana* L. e *Aesculus hippocastanum* L. Dissertação (mestrado) Universidade Federal do Pará, Belém, 2015.

ARRIEL, E. F.; PAULA, R. C.; BAKKE, O. A.; ARRIEL, N. H. C. Divergência genética em *Cnidocolus phyllacanthus* (Mart.) Pax et K. Hoffm. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v.8, n.2/3, p. 813- 822, 2004.

BAG, B. G.; DINDA, S. K.; DEY, P. P.; MALLIA, V. A.; WEISS, R. G. Self-Assembly of Esters of Arjunolic Acid into Fibrous Networks and the Properties of their Organogels. **Langmuir**, v. 25, n. 15, p. 8663-8671, 2009.

BARBOSA, W. L. R., Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais. 19p. Disponível em: <http://www.ufpa.br/proresp/revistaic/textodidatico>, 2001.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; COSTA, C. G.; ICHASO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. Sistemática de Angiospermas do Brasil. 2 ed. v.1, Viçosa: **UFV**, 309p. 2002.

BASTOS, M. M.; BOECHAT, N.; GOMES, A. T. P. C.; NEVES, M. G. P. M. S.; CAVALEIRO, J. A. S. *et al.* O Uso de Porfirinas em Terapia Fotodinâmica no Tratamento da Leishmaniose Cutânea, **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 3, p. 247-267, 2012.

BERLINCK, R. G. S.; BORGES, W. S.; SCOTTI, M.; VIEIRA, P. C. A química de produtos naturais do Brasil do século XXI. *Química Nova*, v. 40, n. 6, p. 706-710, 2017.

BOTHA, C. J.; PENRITH, M. L. Poisonous plants of veterinary and human importance in southern Africa. **Journal of Ethnopharmacology**, v.119, p.549–558, 2008.

BRADBURY, H. J.; DENTON, C. I.; Simple method to reduce the cyanogen content of gari made from cassava. **Food Chemistry**, p. 840-845, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) no 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 17 março. 2004.

BURROWS, G.E. Cyanide intoxication in sheep: Therapeutics. **Veterinary and human toxicology**. v. 23, n. 1, p. 22-28, 1981.

CAMPOS, S. C.; SILVA, C. G.; CAMPANA, P. R. V; ALMEIDA, V. L. Toxicidade de espécies vegetais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.18, n.1, supl. I, p.373-382, 2016.

CANDEIA, B. L. Faveleira (*Cnidoscopus phyllacanthus* (mart.) Pax et k. Hoffm.) Inerme: obtenção de mudas e crescimento comparado ao fenótipo com espinhos. Dissertação (mestrado em Zootecnia), Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2005.

CARRE, V.; GAUD, O.; SYLVAIN, I.; BOURDON, O.; SPIRO M.; BLAIS, J.; GRANET, R.; KRAUSZ, P.; GUILLOTON, M. Fungicidal properties of meso-arylglycosylporphyrins: influence of sugar substituents on photoinduced damage in the yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 48, n. 1, p. 57-62, 1999.

CARVALHO, J. C. T. Fitoterápico anti-inflamatório: aspectos químicos farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto, SP: **Tecmedd**, 2004.

CAVALCANTI, M. T.; SILVEIRA, D. C.; FLORENTINO, E. R.; SILVA, F. L. H.; MARACAJÁ, P. B. Caracterização biométrica e físico-química das sementes e amêndoas da faveleira (*Cnidoscopus phyllacanthus* (mart.) Pax. Et k. Hoffm.) com e sem espinhos. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. v. 06, n.1, p. 41-45, 2011.

CEREDA, M. P. Processamento da mandioca como mecanismo de detoxificação, p.47-81. In: Cereda, M. P. & Vilpoux, O. F. Tecnologia, uso e potencialidades de tuberosos amilacias. São Paulo, **Fundação Cargill**, v.3, cap.3, (Serie culturas de tuberosas amilacias latino americanas), 2003.

CHANDRA, S.; MEJÍA, E. G. Polyphenolic Compounds, Antioxidant Capacity, and Quinone Reductase Activity of an Aqueous Extract of *Ardisia compressa* in Comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and Green (Camellia sinensis) Teas. **Journal Agricola Food Chemistry**, v. 52, p. 3583-3589, 2004.

CHAVES, O. S. Novas substâncias para Malvaceae: *Sida rhombifolia* L. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa 2013.

CLAPP, R. C.; BISSET, F. H.; COBURN, R. A.; LONG JR, L. Cyanogenesis in manioc: linamarin and isolinamarin. **Phytochemistry**, v.5, p. 1323-1326. 1966.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUT – CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standards- 6th ed. Document M7-A6 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2006.

COLOMA, A. G.; BALBOA, C. L.; REINA, O. S. M.; FRAGA, B. M. Triterpene-based plant defenses. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, p. 245-260, 2011.

CORDEIRO, I; CARNEIRO-TORRES, D. S.; Euphorbiaceae. In: Maria Regina de V. Barbosa; Cynthia Sothers; Simon Mayo; Cíntia F. L. Gamarra; Alyne Carneiro de Mesquita (Org.). Checklist das Plantas do Nordeste Brasileiro: Angiospermas e Gymnospermas. Brasília: **Ministério da Ciência e Tecnologia** (1), p.71-74, 2006.

CORRÊA, A. D.; SANTOS, D. C.; NATIVIDADE, M. A. E.; ABREU, C. M. P.; XISTO, A. L. R. R.; CARVALHO, V. D. Farinha de folhas de mandioca – efeito da secagem das folhas sobre a atividade da linamarase. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 26, n. 2, p. 368-374, 2002.

CORREIA L. P.; PROCÓPIO J. V. V.; SANTANA C. P.; SANTOS A. F. O.; CAVALCANTE H. M. M.; MACÊDO R. O. Characterization of herbal medicine with different particle size using pyrolysis, GC/MS, SEM, and thermal techniques. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 111, n. 3, p. 1691-1698, 2013.

COSTA, R. S. Estudos de pré-formulação e formulação de *Heliotropium indicum* (L.) DC (Boraginaceae). Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.

COSTA P. Anatomical and elementary analysis of plant materials by Scanning Electron Microscopy (SEM). Disponível em: <http://anacomcientifica.blogspot.com.br/2016/01/analise-anatomica-e-elementar-de.html>, access in May 1, 2017.

CRESSEY, P.; REEVE, J. Metabolism of cyanogenic glycosides: A review. *Food and chemical toxicology*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.01.002>, acesso em 02 de fevereiro de 2019.

CROTEAU, R., KUTCHAN, T. M., LEWIS, N.; BUCHANAN, B., GRUISSEM, W., JONES, R. Natural Products (Secondary Metabolites) In: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. **American Society of Plant Physiologists**. p. 1250-1318, 2000.

CZELUSNIAK, K. E.; BROCCO, A.; PEREIRA, D. F.; FREITAS, G. B. L. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n. 2, p. 400-409, 2012.

DANTAS, I. C. O raizeiro e suas raízes: um novo olhar sobre o saber popular. 134f. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva), Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2002.

DAVID, J. P. L.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Herbal products: a business perspective for industry, a field little explored by pharmacists. **Infarma**. v. 16, p. 9-10, 2004.

DELLA TORRE, A. Óleo essencial de *Baccharis trimera* (less.) DC.: estudo fitoquímico e avaliação in vitro das atividades antiproliferativa e mutagênica. Dissertação (mestrado em biociências), Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.



DEMAIN, A. L. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, n. 2, p. 185–201, 2014.

DENARI, G. B.; CAVALHEIRO, E. T. Princípios e Aplicação de análise térmica. São Carlos: Instituto de Química de São Carlos, 2012.

DENI, C.; ZACHARIAS, M. E.; KOHN, L. K.; FOGGIO, M. A.; DE CARVALHO, J. E. Atividade antiproliferativa dos extratos e da fração orgânica obtidos das folhas de *Virola sebifera* Aubl. (Myristaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 598-603, out/dez 2007.

DEWICK, P. M., Medicinal natural products: a biosynthetic approach. **Chichester: John Wiley & Sons**, p. 172-240, 2002.

DRUMOND, M. A.; SALVIANO, L. M. C.; CAVALCANTI, N. B. Produção, distribuição da biomassa e composição bromatológica da parte aérea da faveleira. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. v. 2, n. 4, p. 308-310, 2007.

DUAN, H; TAKAISHIA, Y.; MOMOTAB, H.; OHMOTOB, Y.; TAKIB, T. Immunosuppressive constituents from *Saussurea medusa*. **Phytochemistry**, v. 59, p. 85–90, 2002.

DUQUE, J. G. O Nordeste e as Lavouras Xerófilas. Brasília: Fundação Guimarães Duque, 316p. Coleção Mossoroense, 143, 1980.

ENDO, Y; TSURUGI, K. The RNA N-glycosidase activity of Ricin A-chain. **The Journal of Biological Chemistry** 263(18): 8735-8739, 1988.

EKNEKCIOGLU, C.; STRAUSS-BLASCHKE, G.; MARKTL, W. The plasma membrane  $Fe^{3+}$ -reductase activity of caco-2 cells is modulated during differentiation. **Biochemistry and molecular biology international**. v. 46, n. 5, p. 951-961, 1998.

FARIA, E. A.; LEI, M. I. G., IONASHIRO M., ZUF T. O., ANTONIO FILHO, N. R. Estudos da estabilidade térmica de óleo e gorduras vegetais por TG/DTG e DTA. **Eclética Química**, v. 27, p. 1-9, 2002.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e química dos compostos naturais. **Química nova escola**. v. 39, n. 2, p. 120-130, 2017.

FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A fitoterapia no mundo atual. **Química Nova**, v.33, n.9, p.1829, 2010.

FERREIRA, R. A. R. Contribuição ao estudo cinético e balanço energético da pirólise autotérmica da palha da cana-de-açúcar através de análises de termogravimétricas e calorimetria. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, 2012.

FILHO, S. G. B. Feofitinas e esteroides glicosilados de *Turnera subulata* Sm. (TURNERACEAE). Dissertação (doutorado), Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, **Universidade Federal da Paraíba**, João Pessoa, 2011.

FOOD STANDARDS AUSTRALIA NEW ZEALAND – FANZ. Final assessment report proposal P257. Advice on the preparation of cassava and bamboo shoots. Canberra, v. 2, n. 04, p. 1-59, 2004.

FREITAS, J. C. B. R.; PRESGRAVE, O. A. F.; FINGOLA, F. F.; MENEZEX, M. A. C.; VASCONCELLOS, M. C.; SCHALL, V. T.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Toxicological study of molluscidal látex of *Euphorbia splendens*: irritant action on skin and eye. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 86 (Suppl. II): 87-88, 1991.

FUKAMI, J.I. Insecticides as inhibitors of respiration, p.353-96 In: Wilkinson, C.F., 1 ed. **Insecticide biochemistry and physiology**. New York, Plenum Press, cap.10, 1976.

GANJEWALA D.; KUMAR S.; DEVI S.A.; AMBIKA K. Advances in cyanogenic glycosides biosynthesis and analyses in plants: A review. **Acta Biologica Szegediensi** v. 54, p.1-14, 2010.

GIOLITO, I.; IONASHIRO, M. Nomenclatura em análise térmica: Parte II. **Cerâmica**, São Paulo, vol. 34:163-164, 1988;

GIRALD, W.; COLLIN, A.; IZQUIERDO, M. Toxicity and delivery methods for the linamarase/linamarin/glucose oxidase system, when used against human glioma tumors implanted in the brain of nude rats. **Cancer Letters**, 313, 99–107, 2011.

GOIS, R. W. S. Estudo fitoquímico e biológico de *Bauhinia acuruana* Moric. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

GOMES, F. A. Toxicose exógena em medicina do trabalho. Tratamento e prevenção- Intoxicação pelo ácido cianídrico e seus derivados. **Revista Rhodia**. 3: 6-7, 1980.

GOMES L. M. A.; ANDRADE T. M.; SILVA J. C.; LIMA J. T., QUINTANS-JÚNIOR, L. J., ALMEIDA, J. R. G. S. Phytochemical screening and anti-inflammatory activity of *Cnidioscolus quercifolius* (Euphorbiaceae) in mice. **Pharmacognosy Research**. 6:345-9, 2014a.

\_\_\_\_\_.; LIMA-SARAIVA, S.R.G.; ANDRADE, T.M.D.; Silva, J.C.; DINIZ, T.C.; BARRETO, V.N.S.; MENDES, R.L.; QUINTANS-JUNIOR, L.J.; QUINTANS, J. S. S.;LIMA, J.T.; ALMEIDA, J.R.G.S. Antinociceptive activity of the ethanolic extract from barks and leaves of *Cnidoscopus quercifolius* (Euphorbiaceae) in mice. **Journal of Young Pharmacists**, v.6, n.2, p. 64-69, 2014b.

GOMES, R. A.; TELES, Y. C. F.; PEREIRA, F. O.; RODRIGUES, L. A. S.; LIMA, E. O.; AGRA, M. F.; SOUZA, M. F. V. Phytoconstituents from *Sidastrum micranthum* (A. St.-Hil.) Fryxell (Malvaceae) and antimicrobial activity of phaeophytin a. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**. v. 51, n. 4, 2015.

GONZÁLEZ-LAREDO, R. F.; DE LA HOYA, M. E. F.; QUINTERO-RAMOS, M. J.; KARCHESY, J. J. Flavonoid and cyanogenic contents of chaya (spinach tree). **Plant food for human nutrition**, v 58. n 3. p. 1-8, 2003.

HARVEY, A. L.; EBEL, R. E.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111-129, 2015.

HENRIQUE, M. C.; NUNOMURA, R. C. S.; NUNOMURA, S. M.; SILVA, S. G. Constituintes químicos isolados dos galhos e cascas de amapazeiro (*Parahancornia amapa*, Apocynaceae). **Acta Amazonica**, v. 44 (4), 533-538, 2014.

HUANG, G. J.; PAN, C. H.; LIU, F. C.; WU, T. S.; WU, C. H. Anti-inflammatory effects of ethanolic extract of *Antrodia salmonea* in the lipopolysaccharide-stimulated RAW246.7 macrophages and the k-carrageenan-induced paw edema model. **Food Chemical Toxicology**, v. 50, p. 1485-1493, 2012.

IÓCA, L. P.; NICÁCIO, K. J.; BERLINCK, R. G. S. Natural Products from Marine Invertebrates and Microorganisms in Brazil between 2004 and 2017: Still the Challenges, More Rewards **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 5, p. 998-1031, 2018.

JAKIEMIU, E. A. R. Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris* L.). Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008

JERZ, G.; ARREY, T. N.; DU, Q.; WINTERHALTER, P. Structural characterization of 132-hydroxy-(13<sup>2</sup>-S)-phaeophytin-a from leaves and stems of *Amaranthus tricolor* isolated by highspeed countercurrent chromatography. **ScienceDirect – Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, p. 413-418, 2007.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOG, E. A.; STEVENS, P. F. Plant Systematic. A phylogenetic approach. **Sinauer Associates**, Sunserland, 1999.

JUFFO, G. D.; PAVARINI, S. P.; WOUTERS, F.; OLIVEIRA, L. G. S.; ANTONIASSI, N. A. B.; CRUZ, C. E. F.; DRIEMEIER, D. Intoxicação espontânea por *Sorghum sudanense* em bovinos leiteiros no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Vol. 32, n. 3, p. 217-220, 2012.

KOBAYASHI, M.; ISHIDA, K.; TERABAYASHI, S.; MITSUHASHI, H. 10-Hydroxypheophytins and a new norlabdane diterpene from the leaves of *Cupressus funebris* Endl. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 12, p. 3348-3449. 1991

KARTHEEK, M. et al. Determination of Adulterants in Food: A Review. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 2, p. 629 - 636, 2011.

KUTI, J. O.; KONORU, H. B. Cyanogenic glycosides content in two edible leaves of tree spinach (*Cnidoscolus* spp.). **Journal of Food Composition and Analysis** 19, 556-561, 2006.

LEÃO, V. E. R. Degradação térmica dos glicosídeos cianogênicos e carotenoides totais do tucupi. Dissertação: Universidade Federal do Pará, Belém, 2013.

LEMOS, T. L. G. de; SILVEIRA, E. R.; OLIVEIRA, M. F.; FILHO, R. B.; HUFFORD, C. D. Terpenoids from *Cnidoscolus phyllacanthus* Pax et Hoff. **J. Braz. Chem. Soc.** v.2, n.3, 1991.

LI, J.; LI, H.; ZHU, L.; SONG, W.; LI, R.; WANG D, DOU, K. The adenovirus-mediated linamarase/linamarin suicide system: A potential strategy for the treatment of hepatocellular carcinoma. **Cancer Letters**, 289, 217-227, 2010.

LIU, J. Cinnamic acid: a natural product with potential use in cancer intervention. **Int. J. Cancer**: v. 62, n. 3, p. 345-350, 1995.

LOPES, M. A.; NOGUEIRA, I. S.; OBICI, S.; ALBIERO, A. L. M. Estudo das plantas medicinais, utilizadas pelos pacientes atendidos no programa “Estratégia saúde da família” em Maringá/PR/Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. v.17, n.4, supl. I, p.702-706, 2015.

LORENZI H.; MATOS F. J. A.; Plantas medicinais no Brasil - nativas e exóticas. Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2002.

LUCENA, M. F. A. ALVES, M. Notas taxonômicas para Euphorbiaceae *s.l.* do Nordeste do Brasil. **Hoehnea** 37(1): 71-85, 3 fig., 2010.

MAIA, G. M. Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades. São Paulo: D & Z Computação Gráfica e Editora, 413 p., 2004.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Vanillin-HCl method for condensed tannins: Effect of organic solvents used for extraction of tannins. **Journal of Chemical Ecology**, n. 4, v. 19, 1993.

MAREGESI, S. M.; PIETERS, L.; NGASSAPA, O. D.; APERS, S.; VINGERHOETS, R.; COS, P.; BERGHE, D. A. V.; VLIETINCK, A. J. Screening os some tanzanian medicinal plants from bunda district for antibacterial, antifungal and antiviral activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, p. 58-66, 2008.

MATOS, F. J. A. Farmácias Vivas: Sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades. 4 ed. Rev. Ampliada/ F. J. de Abreu Matos. Fortaleza-CE. Editora UFC, 2002.

MATSUO, A.; ONO, K.; HAMASAKI, K.; NOZAKI, H. Phaeophytins from a cell suspension culture of the liverwort *Plagiochila ovalifolia*. **Phytochemistry**, v. 42, n.2, p. 427-430, 1996.

MEDA, A.; LAMIEN, C. E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOULMA, O. G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 91, p. 571-577, 2005.

MELO, A. L.; SALES, M. F. O gênero *Cnidoscolus* Pohl (Crotonoideae-Euphorbiaceae) no Estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**. 22(3): 806-827, 2008.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K. VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, p. 757-766, 1991.

MOURA, L. F. W. G.; DA SILVA NETO, J. X.; LOPES, T. D. P.; BENJAMIN, S. R.; BRITO, F. C. R.; MAGALHÃES, F. E. A.; FLOREAN, E. O. P. T.; DE SOUSA, D. O. B.; GUEDES, M. I. F. Ethnobotanic, phytochemical uses and ethnopharmacological profile of genus *Cnidoscolus* spp. (Euphorbiaceae): A comprehensive overview. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 109, p. 1670-1679, 2019.

NAKATANI, Y.; OURISSON, G.; BECK, J. P. Chemistry and biochemistry of Chinese drugs. VII. Cystostatic pheophytins from *Silkworm excreta*, and derived photocytotoxic pheophorbides. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 8, p. 2261-2269, 1991.

NAZARUK J. Antioxidant activity and total phenolic content in *Cirsium* five species from north-east region of Poland. **Phytotherapy**. v.79, p. 194-196, 2008.

NEVES, P. G. R. Avaliação *in vitro* da quercetina como um potencial agente anti-*leishmania*". Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, 79, 629-661. 2016.

NIERO, E. L. de O., Efeito do ácido cinâmico sobre melanócitos e células derivadas de melanoma humanos: avaliação do seu potencial antitumoral e de proteção contra danos celulares causados por radiação ultravioleta.

NÓBREGA, S.B.P. Caracterização da faveleira (*Cnidocolus quercifolius*) como fonte alternativa na alimentação humana e animal, no semiárido paraibano. 2001. 145f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2001.

NOLDIN, V. F.; FILHO, V. C.; MONACHE, F. D.; BENASSI, J. C.; CHRISTMANN, I. L.; PEDROSA, R. C.; YUNES, R. A. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (alcachofra) cultivada no Brasil. **Química Nova**, vol. 26,n.3,p.331-334, 2003.

NUNES, K. M. Caracterização química e físico-química e estudos preliminares de planejamento da formulação fitoterápica semissólida contendo tintura de *Calêndula officinalis* L. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos) – **Universidade Federal do Pará**, 2009.

NUNES, N. M. Termodinâmica de interação entre ácido cinâmico e cinamato de metila e albumina de soro bovino. Dissertação: Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2016.

OKAFOR, N. Modern industrial microbiology and biotechnology. Science Publishers, Enfield, 2007.

OLIVEIRA, R. B., GODOY, S. A. P., COSTA, F. B. Plantas tóxicas: conhecimento e prevenção de acidentes. Ribeirão Preto – SP: **Editora Holos**, 2003. 64p.

OLIVEIRA, R. B.; GIMENEZ, V. M. M.; GODOY, S. A. P. Intoxicações com espécies da família Euphorbiaceae. **Revista Brasileira de Biociências**, v 5. supl 1. p 69-71, 2007.

OLIVEIRA, D. M.; PIMENTEL, L. A.; ARAÚJO, J. A. S.; MEDEIROS, R. M. T.; DANTAS, A. F. M.; RIT-CORREIA, F. Intoxicação por *Cnidocolus phyllacanthus* (Euphorbiaceae) em caprinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v 28. n 1, p. 36-42. 2008.

OLIVEIRA, E. J.; ALVAREZ, E. D. A.; LIMA, N. G. P. B.; MACÊDO, R. O. Usefulness of pyrolysis coupled to gas chromatography/mass spectrometry for evaluating the reproducibility of commercial samples of *Cymbopogon citratus* Stapf. Poaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.20, p.93-99, 2010.

OLIVEIRA, D. G. A família Euphorbiaceae Juss. um fragmento de Caatinga em Sergipe, **Scientia Plena**, v 9. n. 4, 2013.

OLIVEIRA-JÚNIOR, R. G. Estudo fitoquímico e avaliação do efeito citotóxico de *Cnidoscolus quercifolius* Pohl (Euphorbiaceae) em células do melanoma humano. Dissertação (mestrado em recursos naturais) Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, 2017.

\_\_\_\_\_; FERRAZ, C. A. A.; PONTES, M. C.; CAVALCANTE, N. B.; ARAÚJO, E. C. C.; OLIVEIRA, A. P.; PICOT, L.; ROLIM, L. A.; ALMEIDA, J. R. G. S. Antibacterial activity of terpenoids isolated from *Cnidoscolus quercifolius* Pohl (Euphorbiaceae), a Brazilian medicinal plant from Caatinga biome. **European Journal of Integrative Medicine**. 2018.

OWUAMANAM, C. I.; IWOUNO, J. O.; IHEDIOHANMA N. C.; BARBER L. I. Cyanide Reduction, Functional and Sensory Quality of Gari as Affected by pH, temperature and fermentation time. **Journal of Nutrition**, v. 9; p. 980-986, 2010.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin Microtiter Assay Plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. *Introduction to Spectroscopy*. 4. ed. Califórnia: Brooks/Cole, 2012.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S.; CASTRO, V. T. N. A.; SARAIVA, A. M.; ALMEIDA, D. M.; TAVARES, E. A.; PISCIOTTANO, M. N. C.; AMORIM, E. L. C. Phytochemical screening and antibacterial activity of four *Cnidoscolus* species (Euphorbiaceae) against standard strains and clinical isolates. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 6, n.21, p.3742-3748, 2012.

PERES, L. E. P. *Metabolismo Secundário*. Piracicaba – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/USP, p. 1-10, 2004.

PINTO, D. S.; DUARTE, F. M.; COSTA, J. I. V.; ALMEIDA FILHO, G. G.; ALVES, H. S.; CHAVES, M. C. O.; PESSÔA, H. L. F. Antibacterial and Hemolytic Activities from *Piper montealegreanum* Yuncker (Piperaceae). **Anti-Infective Agents**, v. 10, p. 1-5, 2012.

POULTON J.E. Cyanogenesis in plants. **Plant Physiol.** v. 94, p. 401-405, 1990.

PRAWAT, H.; MAHIDOL, C.; RUCHIRAWAT, S.; PRAWAT, U.; TUNTIWACHWUT-TIKUL, P.; TOOPTAKONG, U.; TAYLORS, W. C.; PAKAWATCHAI, C.; SKELTON, B. W.; WHITE, A. H. Cyanogenic and non-cyanogenic glycosides from *Manihot esculenta*. **Phytochemistry.** v.40, n.4, p.1167-1175, 1995.

PURRELLO, R.; GURRIERI, S.; LAUCERI, R. Porphyrin Assemblies as Chemical Sensors, **Coord. Chem. Rev.** v. 190, p. 683-706, 1999.

REIS, M. C. P.; LEDA, P. H. O.; PEREIRA, M. T. C. L.; TUNALA, E. A. M. Experiência na implantação do programa de fitoterapia do município do Rio de Janeiro. **Revista Divulgação em Saúde para Debate**, Rio de Janeiro, n. 30, p. 42-49, 2004.

RISHTON, G. M. Natural Products as a Robust Source of New Drugs and Drug Leads: Past Successes and Present Day Issues. **The American Journal of Cardiology**, v. 101 p.43D-49D, 2008.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. Farmacognosia e Farmacobiotechnologia, 372p. 1. ed. São Paulo: Editorial premier, 1997.

ROQUE, A. A. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.** v.12, n.1, p.31-42, 2010.

SALAZAR, K. J. M., Estudo Químico e Biossintético de Peperomias. Tese de Doutorado. Insituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2009.

SANTANA C. P.; FERNANDES F. H. A.; SANTOS R. L.; CORREIA, L. P.; CONCEIÇÃO, M. M.; MACÊDO, R. O; MEDEIROS, A. C. D. Thermal characterization of dried extract of medicinal plant by DSC and analytical techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry.** 113, 443-447, 2012.

SANTANA, C. P. Caracterização de extratos nebulizados de plantas medicinais por técnicas analíticas. Trabalho de conclusão de curso, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2013.

SANTOS, J. C. O; DANTAS, J. P.; MEDEIROS, C. A.; ATHAÍDE-FILHO, P. F.; CONCEIÇÃO, M. M.; SANTOS Jr, J. R.; SOUZA, A. G. Thermal analysis in sustainable development: Thermoanalytical study of faveleira seeds (*Cnidocolus quercifolius*). **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry.** Vol. 79, n. 2, p. 271-275, 2005.



SANTOS, R. A. F. Avaliação das propriedades biológicas dos derivados sintéticos do  $\beta$ -sitosterol e triterpenos. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

SANTOS, P. M.; PEREIRA-FILHO, E. R.; RODRIGUEZ-SAONA, L. E. Rapid detection and quantification of milk adulteration using infrared microspectroscopy and chemometrics analysis. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 19-24, maio 2013.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 6 ed. Rio de Janeiro: Livros técnicos e científicos, 2000.

SÁTIRO, L. N.; ROQUE, N. A família Euphorbiaceae nas caatingas arenosas do médio rio São Francisco, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, 22: 99-119, 2008.

SCHVARTSMAN, S. Plantas venenosas e animais peçonhentos. 2 ed. São Paulo: Sarvier, 1992.

SEIGLER, D. S.; BLOOMFIELD, J. J.; Constituents of the genus *Cnidocolus*, **Phytochemistry**, v 8. p 935. Inglaterra, 1969.

SEIGLER, D. S. Isolation and characterization of naturally occurring cyanogenic compounds. **Phytochemistry**, v.14, p.9-29. 1975.

SENJOBI, C. T.; MOODY, J. O.; ETTU, A. O. Antimicrobial and Cytotoxic Effects of *Cnidocolus aconitifolius* (Miller) Johnson. **Journal of Agriculture and Biological Sciences**. v. 2(2), p. 21, 2011.

SETH, S. K.; MAITY, G. C.; KAR, T. Structural elucidation, Hirshfeld surface analysis and quantum mechanical study of para-nitro benzyldene methyl arjunolate. **Journal of Molecular Structure**, v. 1000, p. 120–126, 2011.

SILVA, M. S.; TAVARES, J. F.; QUEIROGA, K. F.; AGRA, M. F.; BARBOSA FILHO, J. M. Alcaloides e outros constituintes de *Xylopiya langsdorffiana* (Annonaceae). **Quimica Nova**, v. 32, n. 6, p. 1566-1570, jul. 2009.

SILVA JÚNIOR, J. O. C.; VIEIRA, J. L. F.; BARBOSA, W. L. R.; PEREIRA, N. L. Caracterização físico-química do extrato seco por nebulização de *Symphytum officinales* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16 (supl.), p. 671-677, 2006.

SIMÕES, C. M. O.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento, 6. Ed. Porto Alegre: UFRGS, 2010.

SIMPSON, M. G. Plant Systematics. **Elsevier Academic Press**, p. 259-269, 2006.

SMITH, K. M. The Porphyrin Handbook. Nova Iorque, Academic Press, 2000.

SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; ENDRESS, P. K.; CHASE, M. W. Phylogeny and Evolution of Angiosperms. **Sunderland**, p. 169-205, 2005.

SORNYOTHA, S.; KYU, K. L.; RATANAKHANOKCHAI, K. Purification and detection of linamarin from cassava root cortex by high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1750-1754, 2007.

SOUZA, M. S. R. Contribuição para o conhecimento fitoquímico da espécie *Vismia guianensis* (Hypericaceae). Dissertação (Mestrado em produtos naturais), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.

SOVA, M. Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 12(8), p. 749-767, 2012.

SILVA, M. A. et al. Development and analytical validation of a multivariate calibration method for determination of amoxicillin in suspension formulations by near infrared spectroscopy. **Talanta**, v. 89, p. 342-51, 2012.

SPEIJERS, G.; Cyanogenic glycosides, WHO Food additives series:30. Toxicological evaluation of certain food additives and naturally occurring toxicants. **JECFA**, Geneva, p. 299-337. 1993.

STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. H. As clorofilas. **Ciência Rural**, v.35, n.3, p.748-755, junho, 2005.

SUKURU, S. C.; JENKINS, J. L.; BECKWITH, R. E.; SCHEIBER, J.; BENDER, A.; MIKHAILOV, D.; DAVIES, J. W.; GLICK, M. J.; Plate-based diversity selection based on empirical HTS data to enhance the number of hits and their chemical diversity. **Journal of Biomolecular Screening**. v. 14, n. 6, p. 690-699, 2009.

TAVARES, E. A.; AMORIM, E. L. C. Estudo químico e biológico de duas espécies do gênero *cnidoscolus* presentes no bioma caatinga com potencial atividade antioxidante, **Anais do XVIII Comic e II Comitê**, UFPE, 2010.

TIAN, H. J.; INOUE, K.; YOZA, K.; ISHI-I, T.; SHINKAI, S. New Organic Gelators Bearing a Porphyrin group: A new Strategy to Create ordered Porphyrin Assemblies. **Chemistry Letters**, p. 871-872, 1998.

TITA B, FULIAS A, BANDUR G, MARIAN E, TITA D. Compatibility study between ketoprofen and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. V. 56, n. 2, p. 221-231, 2011.

TOMAZ, A. C. A.; NOGUEIRA, R. B. S. S.; PINTO, D. S.; AGRA, M. F.; SOUZA, M. F. V.; DA-CUNHA, E. V. L. Chemical Constituents from *Richardia grandiflora* (Cham. & Schldl.) Steud. (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, p. 47-52, 2008.

TONIAL, F. Bioprospecção de metabólitos secundários de endófitos de *Schinus terebinthifolius*. Dissertação (mestrado) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

TROPICOS<sup>®</sup>, disponível em: <https://www.tropicos.org/Name/50168800>, acesso em 30 de janeiro de 2019.

VIEIRA, S. C. H.; SÓLON, S.; VIEIRA, M. C.; ZÁRATE, N. A. H. Levantamento de fitoterápicos manipulados em farmácias magistrais de Dourados-MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 28-34, 2010.

XU, Y-L.; MA Y-B; XIONG, J. Flavonoids from *Onychium contiggum*. **Acta Botanica Yunnanica**, v. 21, n. 3, 386-392, Jan, 1999.

YUN, X.; HUO-MING, S.; GUANG-YING, C.; MING-HUI, J.; JIN-YUE, D. Chemical Constituents from Barks of *Lannea coromandelica*. **Chinese Herbal Medicines**, v.6 (1), 65-69, 2014.

WEBSTER, D.; TASCHEREAU, P.; BELLAND, R.J.; SAND, C.; RENNIE, R.P. Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 140–146, 2008.

WESOLOWSKI, M., SUCHACZ, B.; KONIECZYNSKI, P. The Application of Artificial Neural Networks for the Selection of Key Thermoanalytical Parameters in Medicinal Plants Analysis. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, vol. 6, 811-820, 2003.

WURDACK, K. J.; HOFFMAN, P. Análise Filogenética molecular de uniovulate Euphorbiaceae, utilizando RBCC plastid e sequências de ADNtml-F, *American Journal of Botany*, n. 92, p. 1397, 2005.v

ZAGO, R. Câncer tem cura! Petrópolis: Vozes, 1998.

---

# ANEXOS

---



## Use of thermoanalytical analysis for the evaluation of a new raw material from *Cnidocolus quercifolius* Pohl. (Euphorbiaceae)

Anna Flávia Costa Fernandes<sup>1</sup> · Wilma Raianny Vieira Rocha<sup>1</sup> · Cleildo Pereira de Santana<sup>1</sup> · Harley da Silva Alves<sup>1</sup>

Received: 18 August 2017 / Accepted: 22 August 2018  
© Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary 2018

### Abstract

The wealth derived from the traditional knowledge about medicinal plants and phytotherapies resurges as an option to the undesirable effects and damages caused by synthetic drugs, also as the limited options available for some diseases. However, this does not exempt them from testing; it proves their effectiveness, quality and safety. *Cnidocolus quercifolius*, known popularly as faveleira, is a characteristic plant of the Caatinga biome, widespread in popular medicine. The aim of this study was to determine physicochemical profile of the leaves from *C. quercifolius* by analytical methods, including electron microscopy of the particles and phytochemical, spectroscopic, thermogravimetric and hemolytic tests of the vegetal drug. Phytochemical screening showed positivity for phenols, tannins, flavonoids and steroids/triterpenoids, and the quantification assays obtained values of 74.19 mg g<sup>-1</sup> for total polyphenols, 48.39 mg g<sup>-1</sup> for condensed tannins and 16.72 mg g<sup>-1</sup> for flavonoids. The SEM analysis confirmed the authenticity of the plant material used, and the ESD identified the main ions present. The infrared spectrum revealed the presence of bands characteristic of hydroxyl, C–H bond of aliphatic compounds, C = N grouping, carbonyl, C=C bond of aromatic rings and C–O bond. The thermal profile revealed the occurrence of three mass loss events including loss of water, burning of carbohydrates and carbonized remains of organic material. The hemolytic test showed a low level of toxicity. The results showed that the analytical techniques allowed characterizing the physicochemical properties of the vegetal drug, which may be useful in studies for the production of phytotherapies.

Keywords Faveleira · Quality control · Analytical methods

### Introduction

The therapeutic practice, characterized by the use of medicinal plants in different pharmaceutical forms, was for a long time the only medicinal resource available to humans [1]. To this day, some people still make conscious use of traditional herbal medicines related to the knowledge and practices acquired over the course of the century [2]. The trend observed for phytotherapy is that, as in the past, it will play an important role in the health care of the population. Thus, it is important to evaluate the therapeutic

effects of phytomedicines through randomized, double-blind, placebo-controlled studies involving a significant number of people. Besides to studies evaluating activity by clinical trials, another relevant aspect is the standardization of this activity, which ensures a uniform amount in each dose, as well as its efficacy and safety [3, 4].

In recent years, there is a notable return and growth of this therapeutic practice, which may be associated with undesirable effects and damage to the health and to the environment involving synthetic drugs [5]. It is estimated that at least 25% of all modern medicines derive directly or indirectly from medicinal plants, mainly through the application of modern technologies associated with traditional knowledge [6]. In some industrialized countries, the use of traditional medicine products is significant, as in Canada, France, Germany and Italy, where 70–90% of its population resort to this alternative therapy [7].

✉ Harley da Silva Alves  
harley.alves@hotmail.com

<sup>1</sup> Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, State University of Paraíba, Rua Baraúnas, 351 Bairro Universitário, Campina Grande, PB 58429-500, Brazil

By virtue of this, several nations have been regulating and legislating on the safety, efficacy and quality criteria that involve the phytotherapeutic preparations [8]. In 2006, the Brazilian Federal Government approved measures that ensure access and the correct use by the population, that promote sustainable use of Brazilian biodiversity and that stimulate the development of the national industry, through Decree no. 5.813 of June 22, which instituted the National Policy of Medicinal Plants and Phytomedicines. In 2008 it was created the National Committee of Medicinal Plants and Phytomedicines, with representatives of governmental and non-governmental organizations of all Brazilian biomes [9]. Currently, the registration and the notification of national herbal products are regulated by Resolution of the Collegiate Directors (RCD), no. 26, of May 13, 2014 [10].

Analytical methods are widely used in the quality control of extracts and products derived from herbal drugs [11], since they provide, in a fast and accurate way, data on the stability of the analyzed material, taking into account the objectives of ensuring its pharmacological effects and safety [12]. They also aim to replace the current classical methods that are time consuming, costly and use large quantities of organic solvents and toxic reagents [13].

Recent research has shown the use of FTIR and TG/DTA to standardize the quality of herbal products obtained from *Spondias dulcis* Parkinson [14]. Leite et al. [15] performed the characterization of dried extracts of the leaves from *Myracrodruon urundeuva* Allemão and evaluated their compatibility with pharmaceutical excipients by means of TG, DTA and SEM. Already Sampaio et al. [16], using thermoanalytical techniques, performed the characterization of dry extracts of the leaves from *Arrabidaea*

*chica* (Humb. & Bompl.) B. Verl.



Fig. 1 Photography of *C. quercifolius*



Fig. 2 Photography of the leaves from *C. quercifolius*



Fig. 3 Photography of the flowers from *C. quercifolius* Pohl

The species *Cnidocolus quercifolius* Pohl. (Figs. 1, 2, 3), also known as faveleira, is a tree native from the backwoods of Northeastern Brazil, with xerophytes characteristic and well adapted to the climatic conditions of Caatinga biome [17]. Morphologically it is classified as a tree, with simple, alternating, thick leaves that have ribs with stinging spines. The flowers are white, arranged in summits and fruits in capsules containing oleaginous seeds [18]. Of great economic potential, it can be used for recovery of degraded areas, animal and human nutrition, medicine, biodiesel production, among others [19, 20]. In popular medicine, the bark is used as natural antibiotic, in cases of infection with secretion, stomach ulcer, wounds and inflammations [21]. It has anti-rheumatic, anti-hemorrhagic, anti-inflammatory, antimicrobial, expectorant, homeostatic and cicatrizing action [22]. The present study aims to determine the physicochemical characteristics of plant drug obtained of the leaves from *C. quercifolius*.

## Materials and methods

### Plant material

The leaves from *C. quercifolius* Pohl, originating from an adult tree about 8 years old, were collected in Campus I of the State University of Paraíba, located in the city of Campina Grande—PB ( $7^{\circ}12'36.3''\text{S}/35^{\circ}54'51.9''\text{W}$ ), in June 2014, during the rainy season. The plant material was identified and deposited at the Herbarium JPB—Lauro Pires Xavier of the Federal University of Paraíba under no. 61.260. The vegetable raw material was subjected to drying in a circulating air oven at 40 °C (Nova Ética), and the micronization process of the powder made in mill of knives. The obtained powder was subjected to the extraction process by percolation in ethanol 96% (v/v), to obtain the crude ethanolic extract (CEE), subjected to the solvent elimination process under reduced pressure with a temperature below 50 °C. 100 g of CEE was dissolved in solution of MeOH/H<sub>2</sub>O (7:3—v/v), with obtaining of a hydroalcoholic solution, subsequently partitioned with the solvents: hexane, dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol.

### Phytochemistry analysis

The phytochemical study involved the identification of the main secondary metabolites present in CEE [23, 24], available in Table 1. The determination of polyphenol content, flavonoids and condensed tannins was performed by spectrophotometry in the UV region (UV mini-1240 Shimadzu®); initially a calibration curve was obtained, specific for each metabolite, made from a solution of the standard reagent. All assays were performed in triplicate and treated statistically by ANOVA ( $p \leq 0.005$ ).

### Quantification of polyphenols

1 mL of the aqueous CEE solution was added to 1 mL of the Folin–Ciocalteu 1 N reagent, this mixture remained at rest for 2 min. Subsequently to this period, 2 mL of a 20% (w/v) aqueous solution of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> was added, with a

further 10 min rest. The samples were analyzed by reading their absorbance in a spectrophotometer (757 nm) against a blank solution consisting of distilled water, Folin–Ciocalteu reagent and 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution [25].

To obtain the calibration curve, a standard aqueous solution of gallic acid (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) was prepared in concentrations of 1, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 35 and 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The concentration of polyphenols was expressed in equivalent milligrams of gallic acid. The analysis was performed in triplicate ( $n = 3$ ) and the result expressed by the arithmetic mean. The equation of the calibration curve was  $y = 0.0247x - 0.0747$  ( $R^2 = 0.9894$ ).

### Quantification of flavonoids

CEE was solubilized in 5 mL of methanol and the same volume of a 2% (w/v) AlCl<sub>3</sub> methanolic solution was added. The mixture was allowed to stand for 10 min before reading the absorbance in a spectrophotometer (415 nm), against a blank solution composed only of AlCl<sub>3</sub> [26].

The calibration curve was constructed from a standard solution at 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , prepared by dissolving 10 mg of quercetin in 100 mL of methanol. From this solution were made dilutions in triplicate, obtaining quercetin solutions at concentrations of 16, 19, 22, 26, 28 and 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The concentration of flavonoids was expressed in equivalent milligrams of quercetin. The analysis was performed in triplicate ( $n = 3$ ) and the result expressed by the arithmetic mean. The equation of the calibration curve was  $y = 0.034x - 0.0053$  ( $R^2 = 0.9977$ ).

### Quantification of condensed tannins

CEE sample was added to 3 mL of a solution of catechins (4% w/v in methanol) and then to 1.5 mL of concentrated HCl (37%), the reaction occurred in test tubes dipped in water at 22 °C. The absorbance reading of the solutions was carried out with a spectrophotometer (500 nm), against a “blank” composed of a solution with vanillin, HCl and a 50% (v/v) ethanol/water solution [27].

The calibration curve for this assay was obtained from a standard solution of catechins obtained by dissolving 10 mg of the standard in 100 mL of methanol. From the

solution, dilutions were made in triplicate, in order to obtain solutions in concentrations of 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of the catechins standard. The concentration of condensed tannins was expressed in equivalent milligrams of catechins. The analysis was performed in triplicate ( $n = 3$ ) and the result expressed by the arithmetic mean. The equation of the calibration curve was  $y = 0.0024x + 0.0522$  ( $R^2 = 0.9924$ ).

Table 1 Research of secondary metabolites in *C. quercifolius* Pohl

Secondary metabolite	Reagent
Alkaloids	Dragendorff, Mayer, Bouchardat
Steroids/triterpenoids	Liebermann–Burchard
Flavonoids	Shinoda; oxalo-boric
Polysaccharides	Lugol
Tannins	FeCl <sub>3</sub> to 1% (w/v)

## Scanning electron microscopy

The plant material was submitted to scanning electron microscopy (SEM) analysis together with the quantitative chemical analysis by energy-dispersive spectrometry (EDS) Phenom ProX. The software of the equipment itself determined the diameter of the particles.

## Spectroscopy (FTIR)

The FTIR spectra were analyzed in a Bruker-Vertex 70 spectrometer within the range of 400–4000  $\text{cm}^{-1}$ . The spectrum obtained was plotted using the Origin version 8.0 program.

## Thermogravimetry

The thermogravimetric analysis of leaves powder from *C. quercifolius* was obtained on a model thermobalance TGA-50H Shimadzu, with a heating rate of 10  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  in a temperature range of 25–900  $^{\circ}\text{C}$  and under dynamic nitrogen atmosphere (50  $\text{mL min}^{-1}$ ). Mass loss calculations were performed using the program TASys 60 da Shimadzu<sup>®</sup>.

## Cytotoxicity in human erythrocytes

The experimental procedure was reviewed and approved by the UEPB Ethics Committee on Human Research (Certificate/CEP/UEPB number 42778115.7.000.5187). The blood (O?) was collected from healthy, adult volunteers, deposited in a tube with EDTA (anticoagulant).

Plasma was withdrawn after centrifugations at 2500 rpm for 5 min; subsequently, the red cell suspension was washed with a saline solution (0.9% w/v) in three further centrifugation at 2500 rpm for 5 min. Disregarding the supernatant, the washed red blood cells were suspended in saline (0.9%) and the final solution concentration was adjusted to 5%.

In the test tubes, 2 mL of the red blood cell suspension was added and 2 mL of the samples pre-prepared in saline solution (0.9%) at the concentrations of 4000, 2000, 1000 and 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . After 60 min (time required for hemolysis reaction), each tube was centrifuged at 2500 rpm for 10 min, removing the supernatant for spectrophotometer (Biosystems BTS-310) reading, in the

wavelength of 540 nm [28]. A solution of 0.01% Triton-X 100 was used as a positive control and saline solution (0.9%) as negative control. The analysis was performed in triplicate ( $n = 3$ ), and the result was obtained from the arithmetic mean of the samples and the hemolytic potential calculated according to Eq. (1):

$$H_p \approx \frac{A_e - A_b}{A_t} \times 100 \quad \delta 1p$$

where  $H_p$  is the hemolytic potential (in percentage);  $A_e$ , absorbance of extract;  $A_b$ , absorbance of “blank” (negative control); and  $A_t$ , Triton-X 100 Absorbance (positive control).

## Results and discussion

The screening of the main secondary metabolites of the leaves from *C. quercifolius* was considered positive for the presence of phenols, tannins, flavonoids and steroids/triterpenoids. These results are similar to those found by Peixoto Sobrinho et al. [29], which verified the presence of these secondary metabolites in four species of the genus *Cnidocolus*: *C. infestus*; *C. pubescens*, *C. quercifolius* and *C. urens*, in addition, corroborate the results found in the infrared spectrum. Another study also found the presence of coumarins, anthraconic derivatives, flavonoids, lignans and triterpenes/steroids and the absence of alkaloids, monoterpenes/diterpenes, anthocyanins, naphthoquinones and saponins in the ethanolic extract of the leaves from *C. quercifolius*. There was also verified that extracts of the bark and leaves from *C. quercifolius* could present anti-inflammatory and antinociceptive activity [30]. These activities are probably related to the presence of flavonoids and triterpenes/steroids that act on the immunological reaction and show promising effects [31].

The content tests presented values of 74.19  $\text{mg g}^{-1}$  for polyphenols, 16.72  $\text{mg g}^{-1}$  for flavonoids and 48.39  $\text{mg g}^{-1}$  for condensed tannins (Table 2), revealing a predominance of phenolic compounds, which have in their composition hydroxyls and aromatic rings in single or polymer forms, suggesting the presence of flavonoids, tannins, benzoquinones, xanthonones, lignins and coumarins [32]. Research has shown significant relationship between the content of phenolic compounds and antioxidant activity [33]. Experiments with the genus *Cnidocolus* found that the species with the highest content of phenolic compounds obtained the best results in qualitative antioxidant activity

Table 2 Values obtained in the test for the content of secondary metabolites (polyphenols, flavonoids, condensed tannins) of CEE from *C. quercifolius* Pohl

Secondary metabolite	Pattern	Content/%	Content/ $\text{mg g}^{-1}$
Polyphenols	Gallic acid	7.41	79.14
Flavonoids	Quercetin	1.67	16.72
Condensed tannins	Catechins	4.83	48.39



assays, in the removal of free radicals and ferrous ion chelating test [29].

The images (Figs. 4, 5) of the electron microscopy contribute to the identification and authentication of the material used in the study, confirming that it is of vegetable origin, corresponding the leaves, due to the presence of characteristic structures such as cells and conducting vessels [34]. The wilted appearance is related to the drying of the greenhouse material.

The EDS analysis estimates the approximate chemical composition of the material. Its spectrum indicates a large presence of the oxygen ion, which can be justified by the large presence of pores according to the observation of Figs. 6 and 7 with increase of 50009. From the pharmaceutical point of view, the large presence of pores can facilitate the penetration of solvents into extractive processes and consequently release of active principles. The analysis also becomes relevant in what concerns the quality control of the material, because it highlights the presence of possible impurities by the identification of the silicon,

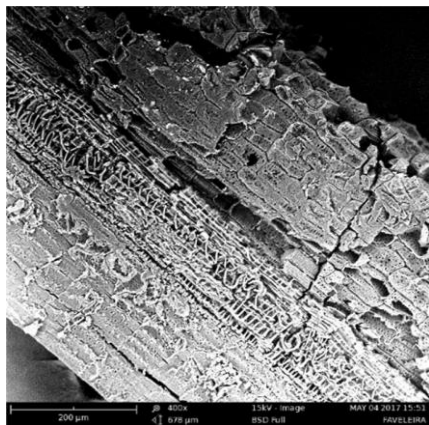


Fig. 4 Photomicrography of the plant drug 9400

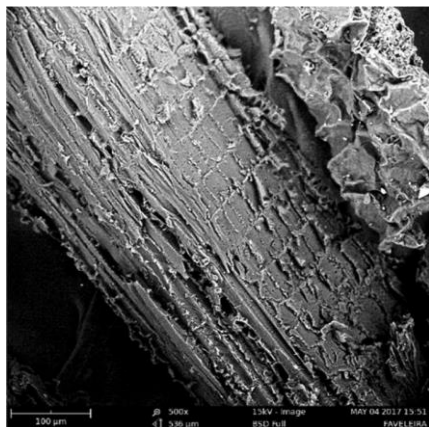


Fig. 5 Photomicrography of the plant drug 9500

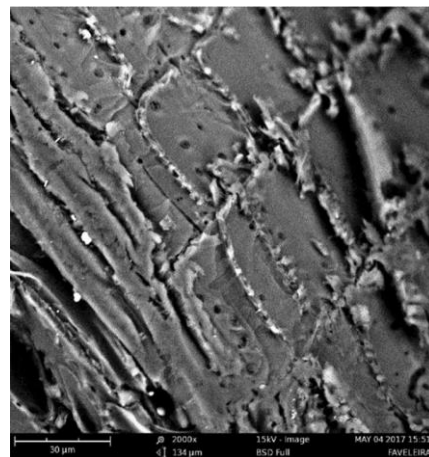


Fig. 6 Photomicrography of the plant drug 95000

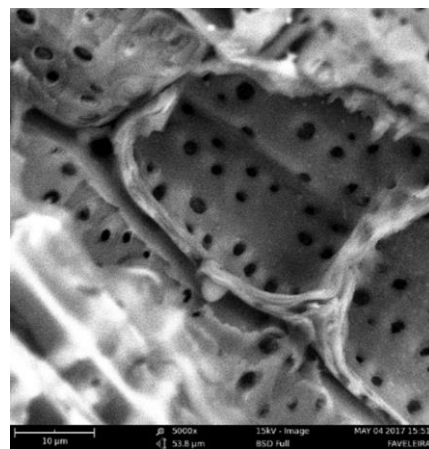


Fig. 7 Photomicrography of the plant drug 95000

aluminum and iron ions indicated by the spectrum (Fig. 8), suggesting rigorous treatments in the material before its manipulation like vegetal drug.

The IR spectrum (Fig. 9) presented a broadband in  $3.320\text{ cm}^{-1}$  characteristic of bond O-H; two absorption bands were also observed, one in  $2.914\text{ cm}^{-1}$  and another in  $2.849\text{ cm}^{-1}$  related to C-H stretches of alkanes. In  $2.343\text{ cm}^{-1}$ , a medium intensity absorption band was viewed of  $\text{C}\equiv\text{N}$ , which possibly indicates the presence of cyanogenic glycosides commonly found in species of the family Euphorbiaceae. Absorption bands in  $1.650\text{ cm}^{-1}$  and  $1.559\text{ cm}^{-1}$  indicative of C=C bond of aromatic rings, when associated with a medium intensity absorption band in  $1.025\text{ cm}^{-1}$  (C-O binding characteristic), indicate the presence of functional groups as ether, ester, alcohol, carboxylic acid and indicates a variety of secondary metabolites, as phenolic compounds, tannins, flavonoids and terpenes [35].

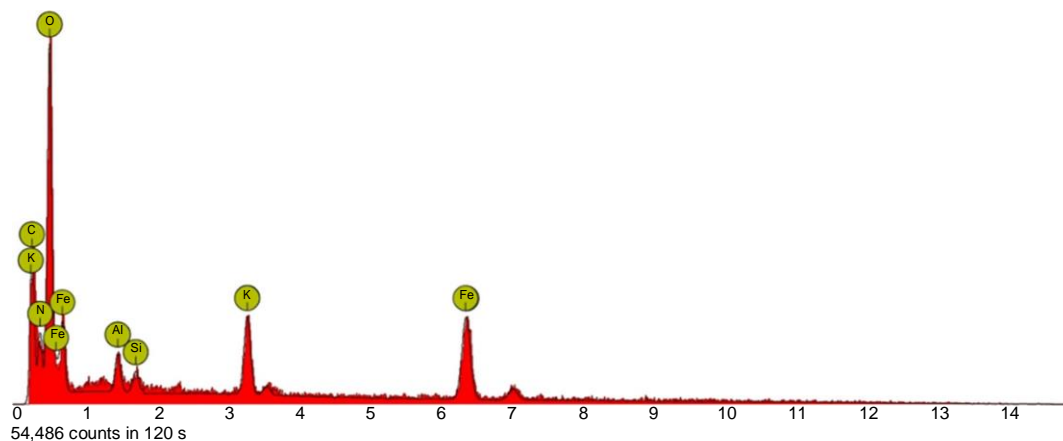


Fig. 8 EDS spectrum of the plant drug

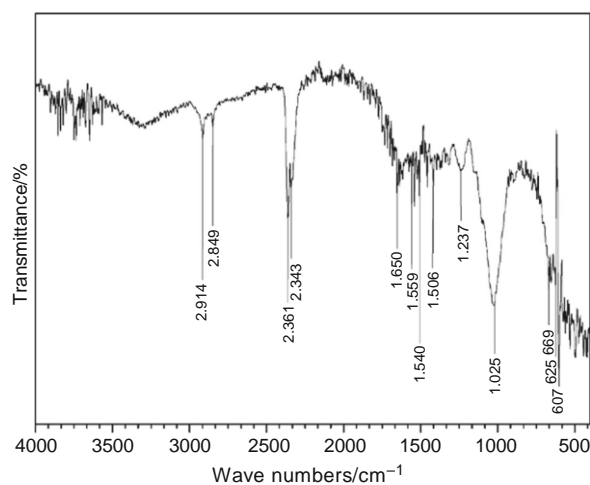
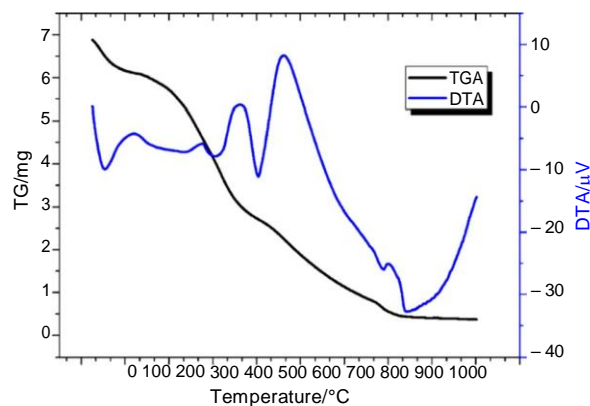


Fig. 9 Infrared spectrum of the plant drug

The analysis of plant extracts by this technique is of great value, since the spectra are obtained quickly and are directly related to the chemical composition of these [36]. This technique can also be considered the most suitable among nondestructive spectroscopic methods with a focus on solid pharmaceuticals, as the materials are not subjected to thermal or mechanical energy during sample preparation prevents possible solid-state transformations [37].

The thermogravimetric curve (TG) of plant drug (Fig. 10) presented the occurrence of three mass loss events. In the first event, a loss of 11.2% may be related to dehydration of the plant drug and the evaporation of volatile constituents, such as essential oils [38]. In the second, there was a loss equivalent to 50.9% of the mass of the material, a significant loss, which can be attributed to the thermal decomposition of carbohydrates and other organic compounds present in the drug, besides the

Fig. 10 Thermogravimetric curve of the plant drug from *C. quercifolius* Pohl

beginning of the process of carbonization of the vegetal material [38, 39]. In the last event, the loss of mass was equivalent to 26.9% between the temperatures of 425 and 675 °C, the latter may refer to the burning of charred organic matter [38–40] (Table 3). The events described by the TG curve can also be observed in the derived curve (DTA), which confirms the occurrence of the 3 events related to mass losses.

Plant drug samples are multicomponent mixtures of organic and inorganic compounds, and their thermal decomposition curves are parts of physicochemical phenomena that occur when it is heated. Thus, it is not possible to associate the thermal decomposition effect and the mass loss event with the identification and quantification of the specific component of the sample [41]. However, thermoanalytical techniques should be used in characterization studies, since they allow the determination of measures such humidity, organic and inorganic ashes, stability studies and

Table 3 Thermal profile (TG) of vegetal drug from *C. quercifolius* with their respective mass losses, in each temperature range (°C)

Stages of decomposition	$T_i/^\circ\text{C}$	$T_f/^\circ\text{C}$	Mass loss/%	Mass loss/mg
First	25	125	11.2	0.77
Second	125	425	50.9	3.5
Third	425	675	26.9	1.85

Table 4 Hemolytic potential of CEE and phases from *C. quercifolius* Pohl

Concentration/mg mL <sup>-1</sup>	CEE/%	Hexane phase/%	Dichloromethane phase/%
4.0	6.98	4.13	61.5
2.0	2.7	2.5	1.42
1.0	1.3	1.42	–
0.5	1.07	1.35	–

–, products that did not present hemolysis

degradation kinetics and other characteristics of vegetal drug product or active pharmaceutical ingredient [37].

Hemolytic activity was employed to evaluate the potential of the product in to cause erythrocytes membrane lesions by optical reading of released hemoglobin. The result of the test showed that the majority of the evaluated products presented low percentages of toxicity, except for the dichloromethane phase, which presented in the concentration of 4000 1g mL<sup>-1</sup> a percentage around 60% of hemolysis (Table 4). This type of test, when related to some pharmacological activity or even with some therapeutic indication based on popular medicine, evaluates the toxic potential of the extract to the human organism. The presence of a result considered toxic does not rule out the use of the tested product, but can direct its application to areas that take advantage of this property. A toxicity test against *Artemia salina* from the ethanolic extract of the leaves from *C. aconitifolius* found that its high toxicity showed very significant results in relation to those recommended by INCA (National Cancer Institute) [42]. These results may be useful in cytotoxicity studies in neoplastic cells.

## Conclusions

The use of medicinal plants and phytomedicines is growing in a worldwide scale. In this context, measures are needed to qualify these products, preventing people from having uncontrolled access and lacking sufficient scientific knowledge of their therapeutic and toxic effects. In accordance with the standards recommended by the Brazilian legislation, the plant raw material from *C. quercifolius* was subjected to numerous experiments. The results of these experiments were favorable for in-depth phytochemical and pharmacological studies that provide a good support for the production of future phytomedicines.

Acknowledgements The authors acknowledge to Northeast Biomedical Evaluation and Development Laboratory (CERTBIO)/Federal University of Campina Grande.

## References

1. Czelusniak KE, Brocco A, Pereira DF, Freitas GBL. Morpho-anatomy, phytochemistry and pharmacology of *Mikania glomerata* Sprengel: a brief literature review. *Braz J Med Plants*. 2012;14:400–9.
2. Ferreira VF, Pinto AC. Phytotherapy in the world today. *New Chem*. 2010;33:1829.
3. David JPL, Nascimento JAP, David JM. Herbal products: a business perspective for industry, a field little explored by pharmacists. *Infarma*. 2004;16:9–10.
4. Vieira SCH, Sólón S, Vieira MC, Zárate NAH. Survey of the phytotherapics manipulated in magistral drugstores from Dourados-MG. *Braz J Pharmacogn*. 2010;20:28–34.
5. Machado BFMT, Fernandes Júnior A. Essential oils: general aspects about and use in natural therapies. *Acad Noteb*. 2011;3:105–27.
6. Ministry of Health. Integrative and complementary practices: medicinal plants and phytotherapy in primary care. Brasília: Ministry of Health; 2012.
7. World Health Organization (WHO). The world medicines situation 2011: traditional medicines: global situation issues and challenges. Geneva: WHO; 2011. p. 2011.
8. Reis MCP, Leda PHO, Pereira MTCL, Tunala EAM. Experience on implantation in the program of phytotherapy in the Rio de Janeiro City. *Health Dissem Mag Debate*. 2004;30:42–9.
9. Brazil. Ministry of Health. National Sanitary Surveillance Agency. Ministry Ordinance number 2960, of December 9, 2008. Approves the National Program of Medicinal and Phytotherapics Plants and creates the National Committee of Medicinal and Phytotherapics Plants, Official Journal of the Union. [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri2960\\_09\\_12\\_2008.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri2960_09_12_2008.html). Access in 3 Dec 2016.
10. Brazil. Ministry of Health. National Sanitary Surveillance Agency. Collegiate Board Resolution (RDC) No. 26 of May 13, 2014. Provides for the Registration of phytotherapics, registration and notification of traditional phytotherapics. Official Diary of the Union. <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=14/05/2014&jornal=1&pagina=52&totalArquivos=100>. Access in 3 Dec 2016.