



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

HELMARCOS NUNES PEREIRA

**Estudo fitoquímico e atividade biológica das raízes de
Apodanthera congestiflora Cogn. (Cucurbitaceae)**

**CAMPINA GRANDE-PB
Setembro/2017**

HELMARCOS NUNES PEREIRA

**Estudo fitoquímico e atividade biológica das raízes de
Apodanthera congestiflora Cogn. (Cucurbitaceae)**

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual da Paraíba, em
cumprimento dos requisitos exigidos
pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, para a
obtenção de título de Mestre.

Linha de pesquisa: Obtenção e avaliação da atividade biológica de produtos naturais e sintéticos de interesse farmacêutico.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Harley da Silva Alves

CAMPINA GRANDE-PB
Setembro/2017

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.

P436e Pereira, Helimarcos Nunes.
Estudo fitoquímico e atividade biológica das raízes de
Apodanthera congestiflora Cogn. (Cucurbitaceae) [manuscrito]
: / Helimarcos Nunes Pereira. - 2017.
146 p. : il. colorido.

Digitado.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências
Biológicas e da Saúde, 2017.
"Orientação : Prof. Dr. Harley da Silva Alves,
Departamento de Farmácia - CCBS."

1. Atividade anti-inflamatória. 2. Cucurbitaceae. 3. Plantas
medicinais.

21. ed. CDD 615.321

HELIMARCOS NUNES PEREIRA

Estudo fitoquímico e atividade biológica das raízes de *Apodanthera congestiflora* Cogn. (Cucurbitaceae)

Dissertação apresentada à Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento dos requisitos exigidos pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção de título de Mestre.

Aprovado em 06 de Setembro de 2017.

Banca examinadora



Prof^o Dr. Harley da Silva Alves
Orientador/UEPB



Prof^o Dr (a). Maria da Conceição de Menezes Tôrres
Membro interno da banca/UEPB



Prof^o Dr (a). Alyne da Silva Portela
Membro externo da banca/UNIFACISA

“Queira
Basta ser sincero e desejar
profundo
Você será capaz de sacudir
o mundo,
vai Tente outra vez
Tente
E não diga que a vitória está
perdida
Se é de batalhas que se vive
a vida.”
(Paulo Coelho e Raul Seixas)

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as bênçãos, proteção e orientação no meu caminho. Sem ele não teria trilhado meu caminho e feito às escolhas que me levaram até aqui. Só tenho a agradecer e sempre colocar minha vida diante de ti.

Aos meus pais, Lindalva e Antonio, por toda dedicação e apoio prestados durante toda minha trajetória, pois sem vocês eu não teria conseguido me levantar após cada queda, ultrapassar cada obstáculo e seguir em frente sempre em busca de meus sonhos e anseios. Quero agradecer e partilhar desse momento com vocês que sempre estiveram ao meu lado, dividindo as lágrimas e também os sorrisos.

A meu querido avô Antonio que sempre me acalentou com suas palavras carinhosas e me ensinou com sua rica experiência de vida, sempre acreditando em meu futuro e me dando ânimo para continuar meu caminho. E também aos meus avós “Dedim”, Maria José e Sebastiana que estão na companhia de Deus e sempre olham por mim e estão sempre a me iluminar.

Aos meus irmãos Maria da Guia e Raimundo que sempre estiveram comigo me incentivando, dividindo as lutas e, cada um ao seu jeito, me ajudando sempre que possível.

A minha esposa Celestiane que desde que entrou em minha vida vem compartilhando todos os momentos, sejam eles difíceis ou agradáveis, e sempre ofereceu apoio, subsídio e carinho.

Aos amigos do laboratório e da vida Professor João Walter, Jhonatha Alexandre, Bruna, Malu e Sabrina pelo companheirismo e parceria na vida cotidiana e na rotina laboratorial

Aos colegas do Labfit e do laboratório de ensaios farmacológicos que me ajudaram durante a pesquisa e compartilharam momentos de dificuldade e alegria.

Ao meu orientador, professor Harley da Silva Alves e à minha co-orientadora, professora Vanda Lúcia dos Santos, por me acompanharem e repassarem seus ensinamentos.

A professora Dilma Maria de Melo Trovão pelo apoio durante toda a pesquisa.

A todos os professores do Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e, em especial a professora Fátima Sanches, por me ensinar o verdadeiro sentido da pesquisa e que me motivou a realizar todo esse projeto.

Aos profissionais do Instituto Nacional do Semiárido (INSA), Ipefarm (principalmente aos professores Josean e Marcelo Sobral), Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (Certbio UEPB/UFCG) e do Laboratório de Análises Clínicas da UEPB (LAC) pelo apoio na realização das análises.

A Capes e a UEPB que forneceram apoio financeiro e estrutural para realização deste trabalho.

E às professoras Aline Portela e Maria da Conceição que aceitaram participar da banca examinadora e contribuir neste trabalho.

RESUMO

O presente trabalho descreve os primeiros estudos fitoquímicos, avaliação biológica e caracterização físico-química das raízes da *Apodanthera congestiflora* Cogn. Essa cucurbitácea conhecida popularmente como cabeça de negro é citada em estudos etnobotânicos pelas suas atividades analgésica, anti-inflamatória, depurativa, antiparasitária e antimicrobiana. Foi realizada a preparação de um extrato aquoso por decocção (EAN-Ac) e outros por extração acelerada com os solventes hexano, acetato e etanol (FH-Ac, FA-Ac, FE-Ac). A droga vegetal (DV-Ac) e o EAN-Ac foram submetidos ao controle de qualidade através de métodos farmacopeicos tradicionais e por técnicas instrumentais. Ambos se mostraram dentro dos parâmetros preconizados pelos compêndios oficiais. Os extratos passaram por uma avaliação fitoquímica preliminar, demonstrando a presença de saponinas, polissacarídeos e alcaloides e, especificamente, o EAN-Ac e o FA-Ac apresentaram na quantificação teores significativos de polifenóis, flavonoides e taninos. Na avaliação da atividade biológica e prospecção fitoquímica foi seguido o modelo de estudo bioguiado, norteador pela atividade anti-inflamatória. O EAN-AC-Ac e o FA-Ac exibiram atividade anti-inflamatória. Esse último também apresentou atividade antimicrobiana frente às cepas de *S. aureus* e *C. albicans* e apresentou um potencial toxicológico considerável. Diante disso, o FA-Ac foi selecionado e dele foram isolados (através de técnicas cromatográficas) e identificados através de técnicas espectroscópicas (IV, RMN ^1H e ^{13}C) 2 ácidos fenólicos esterificados, o ferulato 2-ácido propenóico, 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) decil éster (Ac-1) e o p-cinamato 2-ácido propenóico, 3-(4-hidroxifenil)-decil éster (Ac-2). Além desses últimos, foram purificados 3 triterpenoides glicosilados da classe das norcucurbitacinas: o 29-nor-1, 2, 3, 4, 5,10- dehidro-25- O- acetil- 2- O- β -D- glicopiranosil-3,16 α , 20 (R)- trihidroxi-11,22-dioxocurbita- 6,23, dieno (Ac-3), conhecido como Cayaponosídeo A; o 29-nor-1, 2, 3, 4, 5,10-dehidro-25-O- acetil-2-O- β -D-glicopiranosil-3,16 α , 20 (R)-trihidroxi-11, 22-dioxocurbita- 6- eno (Ac-4), conhecido como Fevicordina A e o 19-norcolesta-1, 3, 5, 10-6-tetraeno-11,22-diona, 2-(β -D-glicopiranosil)-3, 16, 20,25-tetrahidroxi-4, 9,14-trimetil-(9 β , 16 α), conhecido por Cayaponosídeo C. Os ésteres fenólicos isolados no presente estudo já são conhecidos amplamente na literatura, mas os triterpenos obtidos pertencem a uma classe com poucos estudos descritos e, de forma geral, o isolamento desses compostos químicos é pioneiro na referida espécie. Além disso, o EAN-AC-Ac, obtido por decocção, não apresentou evidências de toxicidade, inferindo que *A. congestiflora* é segura para o uso pela população na forma de decocto, mas com o devido critério, pois apresenta em sua constituição princípios ativos potencialmente tóxicos.

Palavras-chave: Atividade anti-inflamatória. Prospecção fitoquímica. Cucurbitaceae. Norcucurbitacinas.

ABSTRACT

The present work describes the first phytochemical studies, biological evaluation and physical-chemical characterization of *Apodanthera congestiflora* Cogn roots. This cucurbitacea popularly known as “cabeça de negro” is cited in ethnobotanical studies for its analgesic, anti-inflammatory, depurative, antiparasitic and antimicrobial activities. The preparation of an aqueous extract by decoction (EAN-Ac) and others by accelerated extraction with the solvents hexane, acetate and ethanol (FH-Ac, FA-Ac, FE-Ac) was carried out. The vegetal drug (DV-Ac) and EAN-Ac were submitted to quality control through traditional pharmacopoeial methods and instrumental techniques. Both were within the parameters recommended by the official compendia. The extracts underwent a preliminary phytochemical evaluation, demonstrating the presence of saponins, polysaccharides and alkaloids. Specifically, EAN-Ac and FA-Ac presented quantification of polyphenols, flavonoids and tannins. In the evaluation of the biological activity and phytochemical prospecting the bioguided study model was followed, guided by the anti-inflammatory activity. EAN-AC-Ac and FA-Ac exhibited anti-inflammatory activity. The latter also presented antimicrobial activity against strains of *S. aureus* and *C. albicans* and presented a considerable toxicological potential. The FA-Ac was selected and isolated (through chromatographic techniques) and identified by spectroscopic techniques (IR, ¹H and ¹³C) 2 esterified phenolic acids, 2-propenoic acid ferulate, 3- (4- hydroxy-3-methoxyphenyl) decyl ester (Ac-1) and p-cinnamate 2-propenoic acid, 3- (4-hydroxyphenyl) decyl ester (Ac-2). In addition to the latter, 3 glycosylated triterpenoids of the norcucurbitacin class were purified: 29-nor-1,2,3,4,5,10-dehydro-25-O-acetyl-2-O-β-D-glucopyranosyl-3, 16α, 20 (R) -trihydroxy-11,22-dioxocurbite-6.23, diene (Ac-3), known as Cayaponoside A; (R) -trihydroxy-11,22-dihydro-25-O-acetyl-2-O-β-D-glucopyranosyl-3,16α, 20β- (Ac-4), known as Fevicordine A and 19-norcolesta-1,3,5,10-6-tetraene-11,22-dione, 2- (β-D-glucopyranosyl) -6- 3, 16, 20,25-tetrahydroxy-4,9,14-trimethyl- (9β, 16α), known as Cayaponoside C. The phenolic esters isolated in the present study are already widely known in the literature, but the triterpenes obtained belong to a class with few studies described and, in general, the isolation of these chemical compounds is pioneer in the mentioned species. In addition, the EAN-AC-Ac, obtained by decoction, did not present evidence of toxicity, inferring that *A. congestiflora* is safe for use by the population in the form of decoction, but with the proper criterion, since it presents in its constitution active principles potentially toxic.

Keywords: Anti-inflammatory activity. Phytochemical prospecting. Cucurbitaceae. Norcucurbitacins.

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA- Análise de Variância de uma via
ACAM- *Herbário Manuel de Arruda Câmara*
ASE – Extração Acelerada por Solvente
ATCC- American Type Culture Collection
CC- Cromatografia em coluna
CCDA- Cromatografia em camada delgada
CCDP- Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CEUA – Comitê de Ética em Uso de animais
CL50- Concentração Letal Média CL50
COX – ciclo-oxigenase
d- dubleto
d.p. – desvio-padrão
DRX- difração de raios-X
DV- droga vegetal
DTA- Análise Térmica Diferencial

EAN-Ac – Extrato Aquoso Nebulizado de *Apodanthera congestiflora* Cogn
EDS- Espectrometria de Dispersão de Energia
EDTA- Ethylenediamine tetraacetic acid
FA-Ac– Extrato acetato de *Apodanthera congestiflora* Cogn
FE-Ac – Extrato etanólico de *Apodanthera congestiflora* Cogn
FH-Ac– Extrato hexânico de *Apodanthera congestiflora* Cogn
HMBC- *Heteronuclear MultipleBond Coherence*
HSQC- *Heteronuclear Single Quantum Coherence*
IL- Interleucina
J= Constante de acoplamento
IV- Espectroscopia no infravermelho
LOX- Lipo-oxigenase
LPS- Lipopolissacarídeos
kV- *Quilovoltagem*
MEV- Microscopia eletrônica de varredura
MHz- Mega-hertz
NO- Óxido Nítrico

NOESY- *Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – *Phosphate Buffered Saline*

PGI - prostaciclina

pH – Potencial hidrogeniônico

p/v- Partes por volume

RMN– Ressonância Magnética Nuclear

SUS- Sistema Único de Saúde

TF- Transformada de Fourier

TG- Termogravimetria

TNF – fator de necrose tumoral

TPA-12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato

Tx – tromboxano

V.O- Via oral

δ - Deslocamento químico

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1.** Detalhes da espécie *Apodanthera congestiflora* Cogn. 24
- Figura 2.** Estrutura de cucurbitacinas conhecidas 27
- Figura 3.** Estrutura da fevicordina A, exemplo de norcucurbitacina 28

Capítulo 2

- Figura 1.** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da DV-Ac e do EAN-Ac de *A. congestiflora*, revelando que ambos apresentam partículas amorfas, sem padronização nas suas dimensões, tamanhos e formas: 1a (DV-Ac, na magnificação x1000) e 1b (EAN-Ac, na magnificação x3000) 42
- Figura 2.** Difratoograma da DV-Ac e do EAN-Ac, mostrando um alto grau de amorfização e ausência de picos de cristalinidade aparentes: 2a (DV), 2b (EAN-Ac), 2c (DV e EAN-Ac, respectivamente) 43
- Figura 3.** EDS da DV-Ac e do EAN-Ac, mostrando a média da composição elementar das 3 partículas com maior abundância nas amostras analisadas: 3a (DV-Ac) e 3b (EAN-Ac) 44
- Figura 4.** Espectros no infravermelho da DV (8a) e do EAN-AC (8b) 45
- Figura 5.** Curvas da TG e DTa de *A. congestiflora*, mostrando seu comportamento térmico por picos de degradação endotérmica: 9a (DV-Ac) e 9b (EAN-Ac) 46

Capítulo 3

- Figura 1.** Composto Ac-1, isolado da FA-Ac de *Apodanthera congestiflora* 62
- Figura 2.** Composto Ac-2, isolado de FA-Ac da *Apodanthera congestiflora* 64
- Figura 3.** Composto Ac-3, isolado da FA-Ac da *Apodanthera congestiflora* 67
- Figura 4.** Composto Ac-4, isolado da FA-Ac de *Apodanthera congestiflora* 69
- Figura 5.** Composto Ac-5, isolado da FA-Ac da *Apodanthera congestiflora* 72
- Figura 6.** Espectro de absorção na região do infravermelho (IV) (pastilhas de KBr) do Ac-1 da *Apodanthera congestiflora* 75
- Figura 7.** Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto Ac-1 da *Apodanthera congestiflora* 76
- Figura 8.** Expansão do Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto Ac-1 77

de *Apodanthera congestiflora*

| | |
|--|-----------|
| Figura 9. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto Ac-1 de <i>Apodanthera congestiflora</i> | 80 |
| Figura 10. Mapa de correlação heteronuclear HSQC do composto Ac-1 da <i>Apodanthera congestiflora</i> | 81 |
| Figura 11. Mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto Ac-1 da <i>Apodanthera congestiflora</i> | 82 |
| Figura 12. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto Ac-2 de <i>Apodanthera congestiflora</i> | 83 |
| Figura 13. Expansão do espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto Ac-2 da <i>Apodanthera congestiflora</i> | 84 |
| Figura 14. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto Ac-2 de <i>Apodanthera congestiflora</i> | 85 |
| Figura 15. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto Ac-2 da <i>Apodanthera congestiflora</i> | 86 |
| Figura 16. Mapa de correlação heteronuclear HSQC do composto Ac-2 de <i>Apodanthera congestiflora</i> | 87 |
| Figura 17. Mapa de contorno HMBC do composto Ac-2 da <i>Apodanthera congestiflora</i> | 88 |
| Figura 18. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da mistura de compostos Ac-3 e Ac-4 da <i>Apodanthera congestiflora</i> | 89 |
| Figura 19. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da mistura de compostos Ac-3 e Ac-4 da <i>Apodanthera congestiflora</i> | 90 |
| Figura 20. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da mistura de compostos Ac-3 e Ac-4 da <i>Apodanthera congestiflora</i> | 91 |
| Figura 21. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da mistura de compostos Ac-3 e Ac-4 da <i>Apodanthera congestiflora</i> | 92 |
| Figura 22. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da mistura de compostos Ac-3 e Ac-4 de <i>Apodanthera congestiflora</i> | 93 |
| Figura 23. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da mistura de compostos Ac-3 e Ac-4 da <i>Apodanthera congestiflora</i> | 94 |
| Figura 24. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da mistura de compostos Ac-3 e Ac-4 da <i>Apodanthera congestiflora</i> | 95 |

| | |
|---|------------|
| Figura 25. Mapa de correlação heteronuclear HSQC da mistura de compostos Ac-3 e Ac-4 da <i>Apodanthera congestiflora</i> | 96 |
| Figura 26. Expansão do mapa de correlação heteronuclear HSQC da mistura de compostos Ac-3 e Ac-4 da <i>Apodanthera congestiflora</i> | 97 |
| Figura 27. Expansão do mapa de correlação heteronuclear HSQC da mistura de compostos Ac-3 e Ac-4 de <i>Apodanthera congestiflora</i> | 98 |
| Figura 28. Expansão do mapa de correlação heteronuclear HMBC da mistura de compostos Ac-3 e Ac-4 de <i>Apodanthera congestiflora</i> | 99 |
| Figura 29. Expansão do mapa de correlação heteronuclear NOESY da mistura de compostos Ac-3 e Ac-4 da <i>Apodanthera congestiflora</i> | 100 |
| Figura 30. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do compostos Ac-5 de <i>Apodanthera congestiflora</i> | 101 |
| Figura 31. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto Ac-5 da <i>Apodanthera congestiflora</i> | 102 |
| Figura 32. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto Ac-5 de <i>Apodanthera congestiflora</i> | 103 |
| Figura 33. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto Ac-5 da <i>Apodanthera congestiflora</i> | 104 |
| Figura 34. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto Ac-5 da <i>Apodanthera congestiflora</i> | 105 |
| Figura 35. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto Ac-5 de <i>Apodanthera congestiflora</i> | 106 |
| Figura 36. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto Ac-5 de <i>Apodanthera congestiflora</i> | 107 |
| Figura 37. Mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto Ac-5 de <i>Apodanthera congestiflora</i> | 108 |
| Figura 38. Mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto Ac-5 de <i>Apodanthera congestiflora</i> | 109 |
| Figura 39. Expansão do mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto Ac-5 de <i>Apodanthera congestiflora</i> | 110 |
| Figura 40. Mapa de correlação heteronuclear HSQC do composto Ac-5 da <i>Apodanthera congestiflora</i> | 111 |
| Figura 41. Expansão de correlação heteronuclear HSQC do composto Ac-5 de | 112 |

Capítulo 4

| | |
|---|------------|
| Figura 1. Modelo do bolsão inflamatório induzido por carragenina em camundongos <i>Swiss</i> | 122 |
| Figura 2. Fases II do modelo de nocicepção induzida por formalina | 125 |
| Figuras 3. Concentração de TNF- α (a) e IL-6 (b) no exsudato do lavado da cavidade peritoneal de camundongos submetidos à peritonite por carragenina e tratados com o FA-Ac (150 e 200 mg/Kg) | 128 |
| Figura 4 - Efeito da administração oral da FA-Ac e do EAN-AC-Ac no consumo de água durante os 14 dias de observação | 134 |
| Figura 5. Efeito dos extratos FAC-Ac (a) e EAN-Ac sobre a mortalidade de náuplios de <i>Artemia salina</i> | 136 |
| Figura 6. Porcentagem de hemólise em eritrócitos do tipos sanguíneos A, B e O na presença dos extratos FA-AC ou EAN-AC de <i>Apodanthera congestiflora</i> (1 μ g/mL, 2,5 μ g/mL, 5 μ g/mL). As barras indicam a média \pm EPM da porcentagem da hemólise (n=3). | 138 |

Lista de tabelas

Capítulo 2

- Tabela 1.** Pesquisa dos metabólitos secundários da *A. congestiflora* **39**
- Tabela 2.** Índices de densidade calculados para a DV e o EAN-AC da *A. congestiflora* **41**

Capítulo 3

- Tabela 1.** Otimização da proporção terra de Diatomácea/droga vegetal, empregando hexano como solvente extrator **59**
- Tabela 2.** Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) e H (CDCl_3 , 200 MHz) do composto Ac-1 em comparação com os dados da literatura **63**
- Tabela 3.** Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) e H (CDCl_3 , 200 MHz) do composto Ac-2 em comparação com os dados da literatura **65**
- Tabela 4.** Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) e H (CDCl_3 , 400 MHz) da porção glicosídica do composto Ac-3 **68**
- Tabela 6.** Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) e H (CDCl_3 , 400 MHz) do composto Ac-4 em comparação com a literatura **70**
- Tabela 7.** Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) e H (CDCl_3 , 400 MHz) do composto Ac-5 em comparação com os dados da literatura **73**

Capítulo 4

- Tabela 1.** Efeito antiquimiotático da FA-Ac sobre o número de leucócitos totais e de proteínas totais no exsudato da cavidade intraperitoneal de camundongos no modelo de peritonite induzida por carragenina **125**
- Tabela 2.** Efeito da FA-Ac, Ac-1 e EAN-AC-Ac sobre o número de leucócitos totais no exsudato da cavidade escapular de camundongos após bolsão inflamatório **129**

SUMÁRIO

| | | |
|------------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 19 |
| 2 | OBJETIVOS | 21 |
| 2.1 | Objetivos gerais | 21 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 21 |
| | CAPÍTULO 1. Fundamentação teórica | 22 |
| 1 | Plantas medicinais: Uma alternativa terapêutica | 22 |
| 2 | Família Cucurbitaceae | 23 |
| 3 | <i>Apodanthera congestiflora</i> Cong. | 24 |
| 4 | Triterpenos | 25 |
| | Referências | 30 |
| | CAPÍTULO 2. Caracterização físico-química conjunta entre a droga vegetal e o extrato da <i>Apodanthera congestiflora</i> Cogn. (Cucurbitaceae): Um novo modelo de controle de qualidade de matérias-primas vegetais | 35 |
| 1 | Introdução | 36 |
| 2 | Materiais e métodos | 38 |
| 2.1 | Obtenção da droga vegetal e preparação do extrato aquoso | 38 |
| 2.2 | Controle de qualidade preliminar | 38 |
| 2.3 | Caracterização morfológica e análise elementar das partículas do DV-Ac e EAN-Ac | 38 |
| 2.4 | Termogravimetria | 39 |
| 2.5 | Difração de raios-x | 39 |
| 2.6 | Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier | 39 |
| 2.7 | Análises fitoquímicas | 39 |
| 3 | Resultados e discussão | 41 |
| 4 | Conclusão | 48 |
| | Referências | 49 |

| | |
|---|------------|
| CAPÍTULO 3. Isolamento bioguiado de dois ésteres fenólicos e 3 triterpenos glicosilados das raízes da <i>Apodanthera congestiflora</i> Cogn. (Cucurbitaceae) | 52 |
| 1 Introdução | 53 |
| 2 Materiais e métodos | 55 |
| 2.1 Local da pesquisa | 55 |
| 2.2 Material botânico | 55 |
| 2.3 Extração acelerada por solvente (EAS) | 55 |
| 2.4 <i>Screening</i> biológico para identificação dos extratos promissores | 56 |
| 2.5 Análise semi-quantitativa da FA-Ac | 56 |
| 2.6 Cromatografia em coluna aberta (CCA) da FA-Ac | 57 |
| 2.7 Isolamento de Ac-1 | 57 |
| 2.8 Isolamento de Ac-2 | 57 |
| 2.9 Isolamento dos compostos AC-3, Ac-4 e Ac-5 | 58 |
| 2.10 Análise no infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF) | 58 |
| 2.11 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) | 58 |
| 3 Resultados e discussão | 59 |
| 3.1 Rendimento das extrações | 59 |
| 3.2 Fitoquímica preliminar | 60 |
| 3.3 Fitoconstituintes isolados | 60 |
| 3.3.1 Identificação de Ac-1 | 60 |
| 3.3.2 Identificação de Ac-2 | 63 |
| 3.3.3 Identificação de AC-3 e Ac-4 | 65 |
| 3.3.4 Identificação do composto Ac-5 | 70 |
| 4 Conclusão | 74 |
| Material suplementar | 75 |
| Referências | 111 |
| CAPÍTULO 4. Avaliação farmacológica e toxicológica de <i>Apodanthera congestiflora</i> Cogn. (Cucurbitaceae) | 115 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 1 | Introdução | 116 |
| 2 | Materiais e métodos | 117 |
| 2.1 | Local da pesquisa | 117 |
| 2.2 | Material botânico | 117 |
| 2.3 | Obtenção dos extratos e do éster fenólico (Ac-1) | 117 |
| 2.4 | Animais | 117 |
| 2.5 | Atividade anti-inflamatória | 118 |
| 2.5.1 | Triagem bioguiada através de teste de nocicepção induzida por formalina | 118 |
| 2.5.2 | Peritonite induzida por carragenina | 118 |
| 2.5.3 | Bolsão inflamatório induzido por carragenina | 119 |
| 2.6 | Atividade antimicrobiana | 120 |
| 2.7 | Toxicidade | 120 |
| 2.7.1 | Toxicidade aguda | |
| 2.7.2 | <i>Artemia salina</i> | 121 |
| 2.7.3 | Toxicidade em eritrócitos | 121 |
| 2.8 | Análise estatística | 122 |
| 3 | Resultados e discussão | 123 |
| 3.1 | Atividade anti-inflamatória | 123 |
| 3.1.1 | Screening farmacológico | 123 |
| 3.1.2 | Peritonite induzida por carragenina | 124 |
| 3.1.3 | Bolsão inflamatório | 129 |
| 3.2 | Atividade antimicrobiana | 131 |
| 3.3 | Toxicidade aguda | 131 |
| 3.6 | <i>Artemia salina</i> | 133 |
| 3.7 | Toxicidade em eritrócitos | 134 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 4 | Conclusão | 137 |
| | Referências | 138 |
| | Anexo I. Folha de aprovação pelo Comitê de ética | 144 |

1. INTRODUÇÃO

O valor medicinal de algumas plantas foi algo percebido, instintivamente, por diversos animais como uma forma de proteção e cura de enfermidades. Os primatas, tendo o homem como seu representante mais “ilustre”, sistematizaram esse costume. Dai nasceu à prática da cura de doenças, realizada pelas diversas civilizações, através da utilização de plantas.

Comunidades indígenas e rurais são provas materiais da efetividade do tratamento com vegetais, tendo isso geralmente como único recurso para o tratamento de algumas doenças. Essa medida é favorável à saúde humana, desde que o usuário tenha conhecimento a respeito de seu propósito, riscos e benefícios [1].

Plantas medicinais se constituem em uma fonte de grande importância econômica, valorizada em todo o mundo [2]. O Brasil com suas dimensões continentais apresenta fauna e flora ricas e com uma biodiversidade que se caracteriza e se diferencia por apresentar diversas formações vegetais decorrentes de variações edafoclimáticas, as quais caracterizam seus diferentes biomas.

A Caatinga é um bioma brasileiro com diversas espécies vegetais importantes nos aspectos botânico e terapêutico. Nesse domínio fitogeográfico é provável encontrar elevadas taxas de endemismo, mensurando que cerca de 40% das espécies da formação florística identificada seja endêmica [3].

Estudos etnobotânicos realizados relatam o uso de plantas medicinais encontradas na Caatinga para diversas finalidades medicinais e isso alerta para a grande potencialidade terapêutica contida na flora desse bioma [4,5].

Um passo inicial para o aproveitamento dessa riqueza de compostos bioativos é a pesquisa química e farmacológica minuciosas. Para tanto o alinhamento de técnicas cromatográficas e espectroscópicas se constitui num importante instrumento para o isolamento e identificação dos constituintes das plantas e análise de sua qualidade.

Nessa perspectiva, muitas famílias de plantas da região do semiárido vêm sendo estudadas visando à confirmação dos relatos dos seus usos populares contra diversas patologias e a descoberta de substâncias com potencialidades terapêuticas [6]. Isso porque, antes de se realizar estudos abrangentes, alguns pesquisadores se baseiam em certos critérios para se estudar alguma família ou planta, um deles é o conhecimento popular.

Foram publicados muitos estudos de cunho etnofarmacológico envolvendo plantas da Caatinga, sobretudo tratando das famílias Fabaceae, Euphorbiaceae, Cactaceae, Cucurbitaceae, Lamiaceae, Rutaceae, Anacardiaceae e Asteraceae [1, 5,7,8]. E, entre essas famílias vegetais se destaca a Cucurbitaceae, a qual detém grande importância econômica, não só no Brasil, mas também na maioria dos países tropicais e é valorizada como a segunda maior família vegetal do mundo, depois da Solanaceae [9].

Nesse bioma nordestino existem poucas Cucurbitáceas nativas. Os exemplares encontrados são pertencentes, quase que exclusivamente, aos gêneros *Apodanthera* e *Pseudoapodanthera* [10]. Um levantamento realizado sobre as Cucurbitáceas desse bioma relatou a presença de sete espécies endêmicas. Outras plantas da família também são encontradas na região, que mesmo não sendo nativas, se adaptaram às condições do local e compõem a flora da região.

Entre as espécies do gênero *Pseudopodanthera*, *Apodanthera congestiflora* Cogn., conhecida como cabeça de negro, é endêmica do semiárido e se destaca em estudos etnobotânicos por ser citada como planta medicinal de uso recorrente para enfermidades inflamatórias, doenças de pele e como depurativo sanguíneo [11-12].

Para o gênero *Apodanthera* é citada a presença de triterpenos como constituintes químicos isolados na espécie *Apodanthera undulata* Gray, sendo o único descrito na literatura, até então, para o referido gênero [13]. No entanto, não existem trabalhos que relatem a pesquisa da constituição química e de modelos farmacológicos que testem as atividades biológicas descritas para *A. congestiflora*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um estudo farmacológico sobre *Apodanthera congestiflora* Cogn. (Cucurbitaceae), de modo a contribuir para o conhecimento científico de uma das espécies endêmicas do semiárido brasileiro.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar o controle de qualidade físico-químico da droga vegetal obtida das raízes.
- Produzir extratos a partir da droga vegetal em pó.
- Realizar o controle de qualidade físico-químico do extrato aquoso nebulizado e comparar com o realizado com a droga vegetal.
- Avaliar as atividades farmacológicas e toxicológicas dos extratos selecionados na bioprospecção.
- Selecionar através de estudo bioguiado, a partir de relatos etnofarmacológico, os extratos para a prospecção fitoquímica.
- Desenvolver análises fitoquímicas quali-quantitativas e o isolamento e identificação de fitoconstituintes.
- Avaliar a atividade biológica dos compostos isolados no estudo desenvolvido.

CAPÍTULO 1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1 Plantas medicinais: uma alternativa terapêutica

O mito da origem totalmente sintética da maioria dos medicamentos em uso já está em descrédito até no imaginário popular. Os profissionais de saúde já estão abrindo o campo de visão para essa realidade. Sendo que as comunidades indígenas, populações rurais e grande parte da população já valorizam as plantas medicinais e outros produtos naturais como fonte de cura para diversas enfermidades.

No Brasil, em 2006, foi aprovada por base no Decreto 5.813, a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos que teve como objetivo a garantia para a população do acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, favorecendo a utilização sustentável da biodiversidade, o aprimoramento da cadeia produtiva e da indústria brasileira [14]. Sendo que a elaboração da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS culminou por incentivar, entre outras práticas, o uso de plantas medicinais.

Além das vantagens inerentes ao uso das plantas medicinais, tais como o acesso e diversidade em praticamente todas as regiões brasileiras, o fator econômico também se destaca. O valor medicinal de muitas espécies vegetais na atualidade é proveniente de certa forma da divulgação das vantagens da terapia fitoterápica.

Tendo em vista que desde o século XIX através do aprimoramento da química analítica e do auxílio das farmacopeias bem consolidadas e atualizadas ao longo do tempo por estudos científicos, existe a possibilidade e já é difundida a elaboração de medicamentos e diversas matérias-primas originados das plantas medicinais [15].

Uma revisão realizada por Newman e Crag [16] atestou que além de representarem mais de 50% da terapêutica medicamentosa atual, o uso de produtos naturais e/ou seus modelos estruturais com a finalidade de descoberta e desenvolvimento da entidade final do fármaco é prática constante na cadeia produtiva de novas drogas. Os mesmos citam a área do câncer que entre 1940 e final de 2014 os produtos naturais ou deles derivados representaram 49% do total de fármacos desenvolvidos. Essa influência é marcante e se estendeu para outras áreas como a de drogas anti-infecciosas, a qual é dependente de produtos naturais e suas estruturas como modelo.

Nessa perspectiva, os elementos da biodiversidade são capazes de gerar uma enorme variedade de produtos de relevância econômica, principalmente aqueles de

importância para a saúde como é o caso dos fitofármacos e fitoterápicos [17]. As espécies vegetais usadas na medicina popular são de diversas famílias, entre as quais se destacam a Anarcadiaceae, Fabaceae, Lamiaceae, Cucurbitaceae, Asteraceae, Apocynaceae, Euphorbiaceae, Rubiaceae, entre outras.

2 Família Cucurbitaceae

As espécies de Cucurbitáceas são caracterizadas por serem trepadeiras com aparência herbácea ou lenhosa, perenes ou anuais, raramente arbustos ou árvores. Demonstram a presença de tubérculos subterrâneos ou superficiais e são extremamente sensíveis a baixas temperaturas, fator limitante para a sua distribuição e área geográfica de plantação [18-19].

Quanto à sua biodiversidade e distribuição genética, a família Cucurbitaceae possui 12 tribos e 118 gêneros conhecidos [20], sendo que somente no Brasil são encontrados 30 gêneros e 147 espécies (57 endêmicas), uma subespécie (não endêmica) e uma variedade (não endêmica) [21].

Nacionalmente, as Cucurbitáceas possuem uma enorme diversidade de espécies vegetais, algumas de interesse econômico pelo seu uso alimentício, ornamental e terapêutico. As plantas dessa família são cultivadas principalmente para fins alimentares, aromáticos, medicinais, ornamentais ou como fonte de matérias-primas para alguns produtos [18].

Numerosas são as espécies dessa família que são usadas na alimentação. A exemplo das abóboras (*Cucurbita moschata*, *Cucurbita maxima*), o chuchu (*Sechium edule*), o maxixe (*Cucumis anguria*), a melancia (*Citrullus lanatus*), o melão (*Cucumis melo*) e o pepino (*Cucumis sativus*) [22-23].

Além do uso alimentício que é bastante difundido, elas ainda são usadas para finalidades terapêuticas, como é o caso da *Cucurbita pepovar* RG (conhecida popularmente como Abobrinha), utilizada como antiparasitário [24]. E outras como a *Luffa cilíndrica*, conhecida como bucha são usadas clinicamente, mas podem provocar uma intoxicação severa ao ser humano, chegando até ao óbito [25].

Um dos gêneros dessa família é o *Apodanthera*, o qual está distribuído na América tropical e subtropical em três seções bem delimitadas geograficamente e diferenciadas pela estrutura das inflorescências de flores estaminadas e pistiladas, bem como pela textura e superfície foliar [18].

Tal gênero encontra-se representado no Brasil por 11 espécies (10 delas endêmicas) e são distribuídas em duas seções: *Apodanthera* e *Pseudoapodanthera*. Esse último é endêmico das regiões semiáridas da Caatinga e campos rupestres do nordeste brasileiro [18].

Na Caatinga existem poucas Cucurbitáceas nativas. Os exemplares são pertencentes, quase que exclusivamente, aos gêneros *Apodanthera* e *Pseudoapodanthera* [10]. Levantamentos realizados sobre as presentes nesse bioma relataram sete espécies endêmicas.

3 *Apodanthera congestiflora* Cogn.

A. congestiflora Cogn., conhecida como cabeça de negro é endêmica do semiárido e se destaca em estudos etnobotânicos por ser citada como planta medicinal de uso recorrente em diversos locais onde a população nativa faz uso de plantas da Caatinga [11, 26].

Essa trepadeira foi identificada por Célestin Alfred Cogniaux em 1916. A designação *congestiflora* faz menção à inflorescência: congestionar = densas, flora = flores. É uma espécie em que os gêneros são separados em indivíduos diferentes e suas flores são de coloração amarelada (figura 1). Durante a estiagem é comum às plantas desta seção perder toda ou grande parte de sua folhagem, como forma de adequação ao estresse hídrico [11].

Figura 1. Detalhes da espécie *Apodanthera congestiflora* Cogn.



Fonte: <http://www.bihrmann.com/caudiciforms/subs/apo-con-sub.asp>.

Para corroborar essa importância, um levantamento de espécies medicinais utilizadas pela comunidade do sítio Nazaré, município de Milagres-CE, indicou que a raiz da *Apodanthera congestiflora* Cogn., consumida na forma de chá e lambedor é usada para o tratamento de dores de coluna [26]. Já outro estudo realizado na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó-RN, apresentou mais de oito aplicações terapêuticas da referida espécie, com destaque para a atividade depurativa do sangue [5].

Os estudos etnofarmacológicos e os critérios quimiotaxonômicos sugerem o potencial biológico dessa planta. Na literatura consultada não existe nenhum estudo que avalie a atividade biológica dessa espécie. Nessa perspectiva, se enxerga a necessidade de estudos de atividade biológica que comprovem as aplicações citadas pelo uso popular.

4 Triterpenos

Os triterpenoides são um grande grupo de substâncias que ocorrem naturalmente e que apresentam estruturas cíclicas relativamente complexas, com um esqueleto de carbono com seis unidades de isopreno. O seu precursor biológico imediato é o hidrocarboneto C_{30} acíclico, o esqualeno. Devido a múltiplas substituições de grupos funcionais, eles podem ocorrer como álcoois, aldeídos ou ácidos carboxílicos e seus ésteres, éteres ou glicosídeos. Isso faz com que múltiplas estruturas triterpenoides possam ser identificadas em muitas famílias de plantas e também em tecidos animais. Os terpenos verdadeiros mais amplamente distribuídos (triterpenoides pentacíclicos, C_{30}) pertencem a vários grupos estruturais, baseados em esqueletos de hopano, lupano ou gamacerano [27].

Os dois primeiros grupos são compostos de cinco anéis. Os triterpenos derivados de hopano são os produtos naturais mais abundantes na terra e ocorrem amplamente nos procariotas como elementos que conferem rigidez à membrana. O composto mais simples desta série é o diplopteno e o mais abundante em procariotas é o c_{35} bacteriohopanopoliol, contendo cadeia lateral com número variável de grupos hidroxila vicinais. O lupeol à base de lupano é um composto onipresente encontrado em muitas frutas e outros vegetais [27].

O representante típico dos compostos derivados do gamacerano é o tetrahimanol (gamacerano- 21α -ol), que ocorre amplamente em organismos vivos. De grande distribuição são também o α e β -amirina e seus derivados, os ácidos ursólico e

oleanólico. Eles podem ser encontrados em revestimentos cerosos de folhas e frutas, em resinas e cascas, e também em látex, desempenhando o papel de proteção contra micróbios e insetos. Alguns deles são princípios amargos, como a limonina que ocorre em frutas cítricas ou as cucurbitacinas, as quais podem ser encontradas em pepinos [27].

Essas substâncias são encontradas principalmente em plantas da família Cucurbitaceae, majoritariamente em partes subterrâneas como as raízes, nos frutos e sementes. Tais compostos se destacam pela sua toxicidade e, sobretudo, pela atividade citotóxica *in vitro* [28].

De uma forma geral, as cucurbitacinas são os componentes encontrados em maior quantidade nas espécies da família Cucurbitaceae. Esses compostos são triterpenos tetracíclicos de esqueleto pouco comum 19 (10→9 β) *abeo*-5 α -lanosteno. Até então, já foram descritas cerca de 50 cucurbitacinas e suas principais diferenças estruturais estão relacionadas às funcionalidades no anel A, cadeia lateral e fatores estereoquímicos [29].

A evolução histórica do isolamento e determinação estrutural das cucurbitacinas se assemelha com a própria história da fitoquímica. A primeira molécula isolada, a elaterina (depois denominada cucurbitacina E), data de 1831 e, como todas as substâncias naturais oriundas de plantas medicinais no século XIX, só teve sua estrutura desvendada vários anos mais tarde, devido ao desenvolvimento da teoria estrutural e das técnicas experimentais [30].

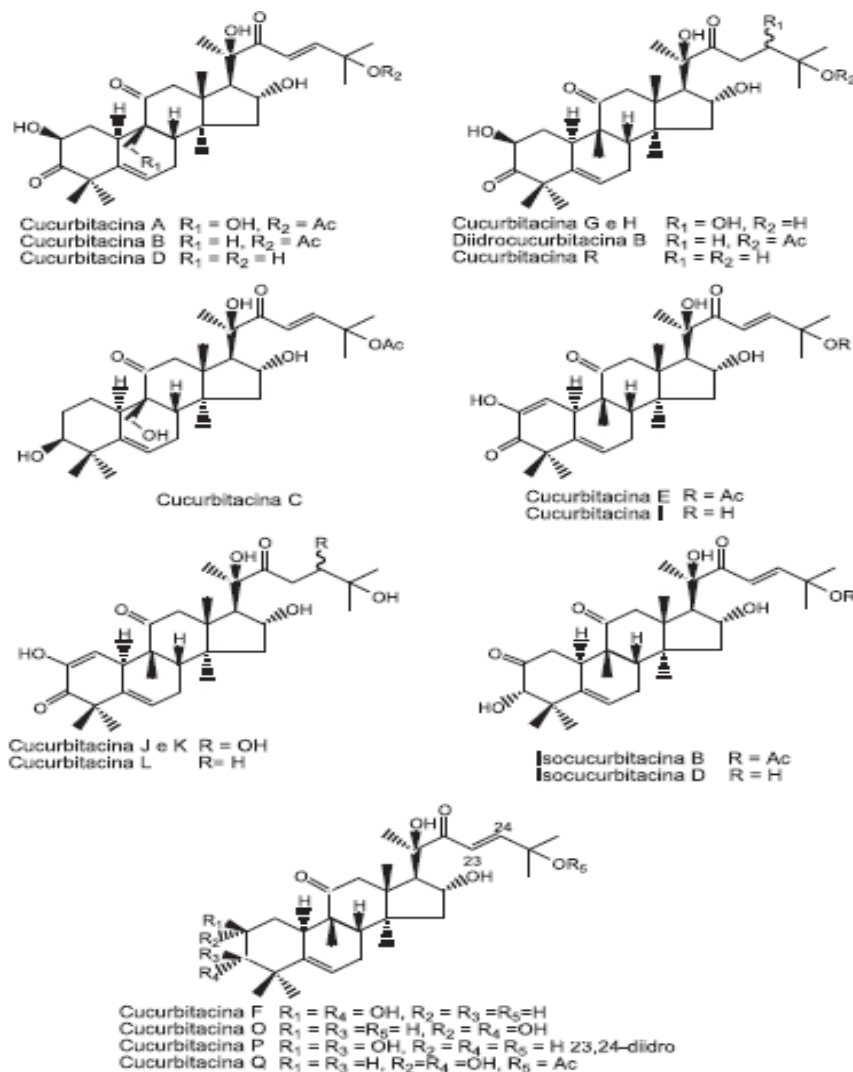
Estruturalmente é possível reconhecer algumas características comuns à maioria desses compostos. Apresentam uma dupla ligação entre os carbonos C-5 e C-6 e a maior parte exhibe grupos hidroxilas nos carbonos C-16, C-20 e C-22. Estudos evidenciaram que as principais características estruturais de diferenciação das cucurbitacinas estão localizadas no anel A e na cadeia lateral [30].

No tocante ao anel A foram encontradas até o momento doze variações estruturais em cucurbitacinas em oito sistemas básicos. Aquelas que contêm apenas uma hidroxila em C-3 se exibem na natureza como glicosídeos e podem apresentar um esqueleto com menor oxigenação que as outras cucurbitacinas. A orientação da hidroxila em C-3 é de um modo geral β (axial), entretanto foram isoladas algumas cucurbitacinas glicosiladas com o substituinte em C-3 (OGli) α orientado [30].

A descoberta que as cucurbitacinas apresentavam oito átomos de carbono na cadeia lateral foi um dos fatores que contribuíram para a elucidação do esqueleto dessas substâncias. Os primeiros trabalhos de identificação estrutural usaram basicamente

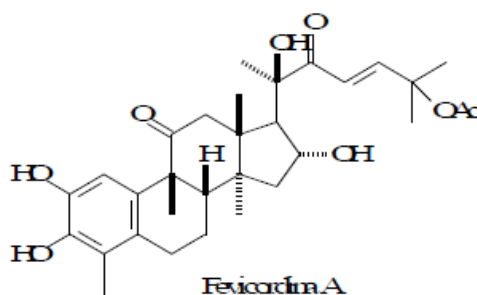
transformações químicas que incluíam várias reações de clivagem¹. As primeiras a serem identificadas foram as acíclicas (majoritárias) com um grupamento carbonila em C-22 e com ou sem insaturação em C-23 e 24 (Figura 2) [30].

Figura 2. Estrutura de cucurbitacinas conhecidas



Até então várias cucurbitacinas foram isoladas, incluindo algumas com modificações estruturais como as nor, hexanor, heptanor, octanor e neocucurbitacinas. As *norcucurbitacinas* possuem o anel A aromatizado, com perda de um dos grupos metilas geminais ligados a C-4. São geralmente glicosiladas em C-2 e foram isoladas de espécies latino-americanas da família Cucurbitaceae (Figura 3) [30].

Figura 3. Estrutura da fevicordina A, exemplo de norcucurbitacina [31]



A diversidade de atividades biológicas faz dos triterpenoides o grupo mais importante de terpenoides. Nas últimas décadas, pesquisas de novos compostos bioativos de plantas utilizadas na medicina tradicional levaram ao isolamento de inúmeros triterpenoides com importantes propriedades farmacológicas [31-32].

As plantas são a principal fonte de triterpenoides com atividades biológicas. Numerosos relatos mostram que as famílias Rhamnaceae, Cucurbitaceae, Ganodermataceae e Apocynaceae produzem uma grande variedade de triterpenoides tetracíclicos; por outro lado, as famílias Ranunculaceae, Burseraceae, Capparidaceae, e Lamiaceae são reconhecidas por conter triterpenoides pentacíclicos [32-38]. Estes compostos são sintetizados por plantas como defesa contra micróbios, insetos e herbívoros, e são essenciais para sua sobrevivência [39].

Inúmeros relatos descrevem os mecanismos moleculares subjacentes à capacidade dos triterpenoides em modular alvos moleculares, como citoquinas, quimiocinas, intermediários reativos do oxigênio, oncogenes, enzimas inflamatórias, proteínas anti-apoptóticas e fatores de transcrição [32, 33, 36,40].

Os diversos usos dos triterpenos na indústria farmacêutica os distinguem como substâncias economicamente importantes que geram vendas anuais de mais de 12 bilhões de dólares [41-43]. Eles apresentam inúmeras propriedades farmacológicas, tais como anticâncer, bactericida, fungicida, analgésica, espermicida, cardiovascular, moluscicida, antialérgica, antiparasitária, antidiabética, anti-viral e anti-inflamatória [44-47].

Numerosos estudos evidenciam os efeitos anti-inflamatórios dos triterpenoides. Alguns demonstraram que o extrato acetato de etila de sementes de *Picrorhiza kurroa* continham uma variedade de derivados triterpenoides do ácido oleanólico capazes de inibir a enzima COX-2 em níveis de 25 a 49,6 [34]. Adicionalmente, terpenoides tetracíclicos obtidos de extratos da *Chisocheton paniculatus* Hier (Meliaceae) mostram efeitos inibitórios sobre a produção de óxido nítrico [48].

Triterpenoides do tipo ursano como o ácido β -boswellic e o ácido α - β -boswellic inibem o 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) em modelo de inflamação em camundongos [49]. Além disso, o ácido β -boswellic contrapõe-se aos efeitos dos lipopolissacarídeos e é um inibidor seletivo de COX-1 com valores de IC₅₀ com valores de 15 μ M [50]. Além disso, ele diminuiu em duas vezes a catálise da enzima 12-LOX. O 12-urseno 2-dicetona isolado de *Boswellia serrata* Triana & Planch (Burseraceae) é capaz de inibir mediadores chave do processo inflamatório como o TNF- α , IL-1 β e a IL-6 [51].

O olibanumol E, um triterpenoide do tipo oleanano, reduz consideravelmente a produção de NO em macrófagos ativados por Lipopolissacarídeos (LPS), e diminui os efeitos inflamatórios induzidos por TPA; Este efeito também é exibido por triterpenoides do tipo lupano, ácido lupeólico e seu derivado acetilado. A biossíntese de eicosanoides pelas enzimas COX, 5-LOX e 12-LOX é diminuída pela ação do ácido 3-acetil-28-hidroxi-lupeólico [52].

Assim, devido a um amplo espectro de benefícios para a vida humana, a pesquisa visando à descoberta de novas classes e a melhoria das características químicas dos triterpenos tem sido contínuas nos últimos anos. E, nessa perspectiva, as espécies vegetais despontam como a alternativa com maior viabilidade.

Referências

1. BADKE, M. R.; BUDÓ, M. D. L. D.; SILVA, F. M. D.; RESSEL, L. B. Plantas Medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Escola Anna Nery**, v. 15, n. 1, p. 132-9, 2011.
2. KUMAR, M.; ALOK, S.; JAIN, S. K.; DIXIT, V. K. Macroscopical, anatomical and physico-chemical studies on fruits of *Coccinia indica* Wight & Arn. (Cucurbitaceae). **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, p. 121-128, 2014.
3. ABÍLIO, F. J. P.; FLORENTINO, H. S.; RUFFO, T. L. M. Educação Ambiental no Bioma Caatinga: formação continuada de professores de escolas públicas de São João do Cariri, Paraíba. **Pesquisa em Educação Ambiental**, v. 5, n. 1, p. 171-193, 2010.
4. MARINHO, M. G. V.; SILVA, C. C.; ANDRADE, L. H. C. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em área de caatinga no município de São José de Espinharas, Paraíba, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, n. 2, p. 170-182, 2011.
5. ROQUE, A. A.; ROCHA, R. M.; LOIOLA, M. I. B. 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 Medicinais**, v. 12, n. 1, p. 31-42, 2010.
6. OLIVEIRA, D. F.; LIMA, L. J. F.; COSTA, D. A.; ALENCAR, M. C. B.; CARMO, E. S. Estudo etnofarmacológico sobre produtos naturais e sintéticos citados para tratamento de casos suspeitos de micoses superficiais no município de Cuité–PB. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 10, n. 2, p. 88-100, 2015.
7. GUERRA, A. M. N. D. M.; PESSOA, M. D. F.; SOUZA, C. S. M. D.; MARACAJÁ, P. B. Utilização de plantas medicinais pela comunidade rural Moacir Lucena, Apodi-RN. **Biosciense journal (Online)**, v. 26, n. 3, p. 442-450, 2010.
8. SILVA, N. C. B.; RÉGIS, A. C. D.; ESQUIBEL, M. A.; SANTOS, J. E. S.; ALMEIDA, M. Z. Uso de plantas medicinais na comunidade quilombola da Barra II–Bahia, Brasil. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 11, n. 5, 2012.
9. BHOWMICK, B K.; JHA, S. Differential heterochromatin distribution, flow cytometric genome size and meiotic behavior of chromosomes in three *Cucurbitaceae* species. **Scientia Horticulturae**, v. 193, p. 322-329, 2015.
10. GIULIETTI, A. M.; BOCAGE NETA, A. L.; CASTRO, A. A. J. F.; GAMARRA-ROJAS, C.F.L. SAMPAIO, E. V. S. B.; VIRGÍNIO, J. F. et al.

- Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga. **Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**, p. 48-90, 2004.
11. ROQUE, A. A.; LOIOLA, M. I. B. Potencial de uso dos recursos vegetais em uma comunidade rural no semiárido potiguar. **Revista Caatinga**, v. 26, n. 4, p. 88-98, 2013.
 12. SILVA, J. P. R. Perfil etnobotânico: uso de plantas medicinais pela população de Nova Olinda–PB. Campina Grande–PB. **Monografia** (conclusão de curso). 47p. Universidade Estadual da Paraíba-UEPB, 2015.
 13. AKJHISA, Toshihiro et al. Sterols of the *cucurbitaceae*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 6, p. 1693-1700, 1987.
 14. FIGUEREDO, C. A; GURGE, I. G. D.; JUNIOR, G. D. G. A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. **Physis-Revista de Saúde Coletiva**, v. 24, n. 2, p. 381-400, 2014.
 15. CECHINEL FILHO, V. et al. **Medicamentos de origem vegetal: atualidades, desafios e perspectivas**. Itajaí: Ed. UNIVALI; 2015.
 16. NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.
 17. SIMÕES et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Florianópolis: Editora Artmed, 2017.
 18. LIMA, L. F. P. **Estudos taxonômicos e morfológicos em Cucurbitaceae brasileiras**. 2010. 232p. Tese (doutorado em Botânica). Programa de pós-graduação em Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
 19. SCHAEFER, H.; RENNER, S. S. Phylogenetic relationships in the order Cucurbitales and a new classification of the gourd family (Cucurbitaceae). **Taxon**, v. 60, p.122–138, 2011.
 20. NA, C. S.; LEE, Y. H.; MURAI, Y.; IWASHINA, T.; KIM, T. W.; HONG, S. H. Flavonol 3,7-diglycosides from the aerial parts of *Sicyos angulatus* (Cucurbitaceae) in Korea and Japan. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 48, p. 235–237, 2013.
 21. FORZZA, R.C. et al. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v. 2, 2010.
 22. BELGRANO, M. J. Estudio sistemático y biogeográfico del género *Apodanthera* Arn. (Cucurbitaceae). 2012. 200p. La Plata. **Tese** (doutorado em Ciências naturais). FA-Acultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, 2012.

23. INUI, H.; HIROTA, M.; GOTO, J.; YOSHIHARA, R.; KODAMA, N.; MATSUI, T.; et al. Zinc finger protein genes from *Cucurbita pepo* are promising tools for conferring *non-Cucurbitaceae* plants with ability to accumulate persistent organic pollutants. **Chemosphere**, v. 123, p. 48-54, 2015.
24. OYEYEMI, I. T.; BAKARE, A. A. Genotoxic and anti-genotoxic effect of aqueous extracts of *Spondias mombin* L., *Nymphaea lotus* L. and *Luffa cylindrica* L. on *Allium cepa* root tip cells. **Caryologia**, v. 66, n. 4, p. 360-367, 2013.
25. GUERRERO, E. Y.; OMAÑA, B; RODRÍGUEZ-ACOSTA, A. Caso de intoxicación en Venezuela, por el uso de la planta de Estropajo o Tusa (*Luffa cylindrica*). **Revista do Institute Nacional de Higien**, v. 44, n. 2, p. 3-6, 2013.
26. SILVA, C. G.; MARINHO, M. G. V; LUCENA, M. F. A.; COSTA, J. G M. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em área de Caatinga na comunidade do Sítio Nazaré, município de Milagres, Ceará, Brasil. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 17, n. 1, p. 133-142, 2015.
27. OLESZEK, W.; KAPUSTA, I; STOCHMAL, A. 20 TLC of Triterpenes (Including Saponins). **Thin Layer Chromatography in Phytochemistry**, p. 1672, 2008.
28. LANG, K. L. **Obtenção de cucurbitacinas a partir de plantas nativas e modificações estruturais visando à síntese de compostos bioativos**. 2012. 304p. Tese (doutorado em Química). Programa de pós-graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.
29. MACHADO, V. R.; LANG, K. L.; DURÁN, F. J.; CABRERA, G. M.; PALERMO, J. A.; SCHENKEL, E. P. et al. Di-hidrocurbitacina B: semi-síntese de novos derivados glicosilados. **Química Nova**, v. 38, n. 1, p. 37-41, 2015.
30. VALENTE, L. M. M. Cucurbitacinas e suas principais características estruturais. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 944-948, 2004.
31. HIMENO, E. et al. Structures of new non-aromatized nor-cucurbitacin glucosides in the roots of *Cayaponia tayuya*. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 41, n. 5, p. 986-988, 1993.
32. FU, J.; WANG, S.; LU, H.; MA, J.; KE, X.; LIU, T.; LUO, Y. In vitro inhibitory effects of terpenoids from *Chloranthus multistachys* on epithelial-mesenchymal transition via down-regulation of Runx2 activation in human breast cancer. **Phytomedicine**, v. 22, n. 1, p. 165-172, 2015.
33. NGUYEN, V. T.; TUNG, N. T.; CUONG, T. D.; HUNG, T. M.; KIM, J. A.; WOO, M. H.; CHOI, J. S.; LEE, J.-H.; MIN, B. S. Cytotoxic and anti-angiogenic effects of lanostane triterpenoids from *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry Letters**, v. 12, p. 69-74, 2015.

34. TIAN, Z.; YANG, M.; HUANG, F.; LI, K.; SI, J.; SHI, L.; CHEN, S.; XIAO, P. Cytotoxicity of three cycloartane triterpenoids from *Cimicifuga dahurica*. **Cancer Letters**, v. 226, n. 1, p. 65-75, 2005.
35. ZHANG, Y.; DEWITT, D. L.; MURUGESAN, S.; NAIR, M. G. Cyclooxygenase-2 enzyme inhibitory triterpenoids from *Picrorhiza kurroa* seeds. **Life Science**, v. 77, n. 25, p. 3222-3230, 2005.
36. KO, H. H.; HUNG, C. F.; WANG, J. P.; LIN, C. N. Antiinflammatory triterpenoids and steroids from *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 1, p. 234-239, 2008.
37. LIANG, C.; DING, Y.; NGUYEN, H. T.; KIM, J. A.; BOO, H. J.; KANG, H. K.; NGUYEN, M. C.; KIM, Y. H. OLEAN-Acane-type triterpenoids from *Panax stipulean-Acatus* and their anticancer activities. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 23, p. 7110-7115, 2010.
38. RAMALHETE, C.; DA CRUZ, F. P.; LOPES, D.; MULHOVO, S.; ROSARIO, V. E.; PRUDENCIO, M.; FERREIRA, M. J. Triterpenoids as inhibitors of erythrocytic and liver stages of Plasmodium infections. **Bioorganic Medicinal Chemistri**, v. 19, n. 24, p. 7474-7481, 2011.
39. RASCON-VALENZUELA, L.; VELAZQUEZ, C.; GARIBAY-ESCOBAR, A.; MEDINA-JUAREZ, L. A.; VILEGAS, W.; ROBLES-ZEPEDA, R. E. Antiproliferative activity of cardenolide glycosides from *Asclepias subulata*. **Journal Ethnopharmacology**, v. 171, n., p. 280-286, 2015.
40. ZHENG, X.; LUO, X.; YE, G.; CHEN, Y.; JI, X.; WEN, L.; XU, Y.; XU, H.; ZHAN, R.; CHEN, W. Characterisation of two oxidosqualene cyclases responsible for triterpenoid biosynthesis in *Ilex asprella*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 2, p. 3564-3578, 2015
41. YAN, X. J.; GONG, L. H.; ZHENG, F. Y.; CHENG, K. J.; CHEN, Z. S.; SHI, Z. Triterpenoids as reversal agents for anticancer drug resistance treatment. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 4, p. 482-488, 2014.
42. DZUBAK, P.; HAJDUCH, M.; VYDRA, D.; HUSTOVA, A.; KVASNICA, M.; BIEDERMANN, D.; MARKOVA, L.; URBAN, M.; SAREK, J. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. **Natural Products Reports**, v. 23, n. 3, p. 394-411, 2006.
43. MUFFLER, K.; LEIPOLD, D.; SCHELLER, M.-C.; HAAS, C.; STEINGROEWER, J.; BLEY, T.; NEUHAUS, H. E.; MIRATA, M. A.; SCHRADER, J.; ULBER, R. Biotransformation of triterpenes. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 1-15, 2011.

44. NAZARUK, J.; BORZYM-KLUCZYK, M. The role of triterpenes in the management of diabetes mellitus and its complications. **Phytochem Review**, v. 14, n. 4, p. 675-690, 2015.
45. SHENG, H.; SUN, H. Synthesis, biology and clinical significance of pentacyclic triterpenes: a multi-target approach to prevention and treatment of metabolic and vascular diseases. **Natural Product Report**, v. 28, n. 3, p. 543-593, 2011.
46. QIAO, A.; WANG, Y.; XIANG, L.; ZHANG, Z.; HE, X. Triterpenoids of sour jujube show pronounced inhibitory effect on human tumor cells and antioxidant activity. **Fitoterapia**, v. 98, n., p. 137-142, 2014.
47. SINGH, S.; FARSWAN, M.; ALI, S.; AFZAL, M.; AL-ABBASI, F. A.; KAZMI, I.; ANWAR, F. Antidiabetic potential of triterpenoid saponin isolated from *Primula denticulate*. **Pharmacy Biology**, v. 52, n. 6, p. 750-755, 2014.
48. LI, S.; ZHAO, J.; WANG, W.; LU, Y.; XU, Q.; LIU, Y.; LI, X.; KHAN, I. A.; YANG, S. Seven new triterpenoids from the aerial parts of *Ilex cornuta* and protective effects against H₂O₂-induced myocardial cell injury. **Phytochemistry Letters**, v. 14, n., p. 178-184, 2015.
49. YANG, M.-H.; WANG, J.-S.; LUO, J.-G.; WANG, X.-B.; KONG, L.-Y. Four new triterpenoids from *Chisocheton paniculatus* and their anti-inflammatory activities. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 90, n. 2, p. 199-204, 2011.
50. BANNO, N.; AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; TOKUDA, H.; TABATA, K.; NAKAMURA, Y.; NISHIMURA, R.; KIMURA, Y.; SUZUKI, T. Anti-inflammatory activities of the triterpene acids from the resin of *Boswellia carteri*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n. 2, p. 249-253, 2006.
51. HENKEL, A.; KATHER, N.; MONCH, B.; NORTHOFF, H.; JAUCH, J.; WERZ, O. Boswellic acids from frankincense inhibit lipopolysaccharide functionality through direct molecular interference. **Biochemistry Pharmacology**, v. 83, n. 1, p. 115-121, 2012.
52. GAYATHRI, B.; MANJULA, N.; VINAYKUMAR, K. S.; LAKSHMI, B. S.; BALAKRISHNAN, A. Pure compound from *Boswellia serrata* extract exhibits anti-inflammatory property in human PBMCs and mouse macrophages through inhibition of TNF α , IL-1 β , NO and MAP kinases. **International Immunopharmacology**, v. 7, n. 4, p. 473-482, 2007.

CAPÍTULO 2. Caracterização físico-química conjunta entre a droga vegetal e o extrato da *Apodanthera congestiflora* Cogn. (*Cucurbitaceae*): Um novo modelo de controle de qualidade de matérias-primas vegetais

RESUMO

A *Apodanthera congestiflora* cogn. é uma cucurbitácea brasileira, conhecida pelas suas atividades anti-inflamatória e antiparasitária. O trabalho objetivou determinar as características físico-químicas da droga vegetal (DV) e do extrato aquoso nebulizado (EAN-AC) da *A. congestiflora*, utilizando métodos oficiais e outras técnicas analíticas: microscopia eletrônica de varredura (MEV), Espectrometria de Dispersão de Energia (EDS), termogravimetria (TG), difração de raios-X (DRX) e Infravermelho (IV), aplicadas na caracterização de extratos vegetais. A DV e o EAN-Ac apresentaram granulometria variada e umidade, cinzas, pH e densidade aceitáveis. A difração de raios-X e a microscopia eletrônica de varredura sugeriram que as partículas dos compostos analisados são amorfas, com diferentes tamanhos. A decomposição térmica dos compostos orgânicos ocorreu em 3 etapas, com perdas de massas semelhantes, principalmente no evento resultante da perda de água e da presença de resíduos inorgânicos, esses últimos também verificados na análise elementar no EDS. Tais características confirmaram as análises preliminares de tamisação, teor de cinzas e umidade. O *screening* fitoquímico mostrou resultados positivos para saponinas, alcaloides e polissacarídeos e nos ensaios semi-quantitativos foram obtidos os valores de $59,84 \pm 1,24$ mg/g para polifenóis totais, $55,28 \pm 7,14$ mg/g para taninos e $34,78 \pm 2,79$ mg/g para flavonoides. Os espectros no infravermelho mostraram picos característicos de grupamentos de O-H, C-H, C=O, C=C e C-O, que aliados aos resultados das análises fitoquímicas reforçam a presença desses fitoconstituintes. Os resultados revelaram que as técnicas analíticas possibilitaram a caracterização em conjunto da DV e do EAN-AC, fornecendo subsídios para a obtenção de um novo fitoterápico.

Palavras-chave: Cabeça de negro. Técnicas termoanalíticas. Fitoterápicos. Controle de qualidade.

1 Introdução

Plantas medicinais constituem uma fonte de grande importância econômica, valorizada em todo o mundo [1]. E o Brasil, com suas dimensões continentais, apresenta fauna e flora ricas e com uma biodiversidade que se caracteriza e se diferencia por apresentar diversas formações vegetais decorrentes de variações edafoclimáticas, as quais caracterizam seus diferentes biomas.

A Caatinga é uma floresta tropical sazonalmente seca que compreende uma parcela considerável do eixo sul da América. É um bioma exclusivo do Brasil, e cobre aproximadamente 11% do território do país [2]. O clima desse bioma se destaca por uma longa estação seca [3,4]. Os solos baixos e pedregosos e as elevadas temperaturas favorecem o surgimento de vegetação xerófila e decídua, habituada a extensos períodos secos [5].

Ela se destaca pela presença de diversas espécies vegetais importantes nos aspectos botânico e terapêutico. Nesse domínio fitogeográfico é provável encontrar elevadas taxas de endemismo, mensurando que cerca de 40% das espécies da formação florística identificada seja endêmica [6]. Nesse contexto, estudos etnobotânicos relatam o uso de plantas medicinais encontradas na Caatinga para diversas finalidades medicinais e, tal fato, alerta para a grande potencialidade terapêutica contida na flora desse bioma [7].

Mesmo com essa diversidade biológica e com um imenso potencial terapêutico o Brasil ainda sofre com a falta de aproveitamento e a preservação dessa riqueza, isso porque cerca de 6% das espécies de plantas superiores tiveram algum estudo biológico e outras 15% apresentam investigação química realizada ou em andamento até o presente momento [8].

Mesmo com esse aproveitamento limitado o uso de produtos de origem natural tem se refletido numa alternativa terapêutica interessante em comparação aos tradicionais medicamentos industrializados. Isso porque, além da vantagem econômica estes podem se tornar alternativas para o tratamento de doenças resistentes ao atual arsenal terapêutico, como é o caso das infecções bacterianas e as neoplasias. Nesse contexto, os produtos naturais à base de plantas possuem extensa pesquisa científica [8-10].

No entanto, para se chegar a um medicamento desenvolvido a partir de uma planta, este deve passar por várias etapas e por uma pesquisa multidisciplinar desde o

campo da botânica, microbiologia, biologia molecular, farmacologia, toxicologia, experimentos clínicos e técnicas analíticas como a espectroscopia, cromatografia, estudos computacionais, entre outras. Além disso, a pesquisa deve seguir algumas etapas essenciais, desde a pesquisa da planta, coleta, obtenção da droga vegetal, extração, isolamento de componentes ativos, até culminar com o desenvolvimento de uma forma farmacêutica adequada para o uso *in vivo* [8,11-12].

Em se tratando da exploração da riqueza biológica da Caatinga, com finalidades medicinais, uma família botânica pesquisada é a Cucurbitaceae. Apesar de existirem poucas espécies nativas na região os exemplares encontrados são pertencentes, quase que exclusivamente, aos gêneros *Apodanthera* e *Pseudoapodanthera*, com o relato da presença de sete espécies endêmicas [13].

Apodanthera congestiflora Cogn., conhecida como “cabeça de negro”, é endêmica do semiárido e se destaca em estudos etnobotânicos por ser citada como planta medicinal de uso recorrente para enfermidades inflamatórias, doenças de pele e como depurativo sanguíneo [14]. No gênero a qual ela pertence é citada a presença de triterpenos como constituintes químicos de ampla incidência, principalmente na espécie *Apodanthera undulata* Gray [15].

Tendo em vista a busca por medicamentos provenientes de plantas medicinais, consideradas uma alternativa de baixo custo e acessível a maior parte da população se faz necessário realizar a caracterização de novas matérias-primas de fontes vegetais. Assim, o objetivo deste estudo foi determinar de forma conciliada as características físico-químicas da droga vegetal e do extrato nebulizado obtidos das raízes de *A. congestiflora* Cogn, e, assim, garantir um controle de qualidade mais eficaz na produção de um possível fitoterápico.

2 Material e métodos

2.1 Obtenção da droga vegetal e preparação do extrato aquoso

As raízes de *A. congestiflora* Cogn. foram coletadas na cidade de Barra de Santana-PB, no mês de Novembro de 2015 (coordenadas: S6°43'18" – W36°3'46"). O material foi identificado pelo Botânico Dr. José Iranildo Miranda de Melo e a exsicata depositada no Herbário Manuel de Arruda Câmara (ACAM) na Universidade Estadual da Paraíba, sob o número 1000.

As partes usadas foram secas em estufa de circulação de ar (330/5, FANEM) até peso constante. O material seco foi triturado em moinho de Facas Wiley de 10 mesh (Solab- equipamentos para laboratórios Ltda., Piracicaba, SP, Brasil), dando origem a droga vegetal (DV-Ac). O mesmo foi submetido à extração por maceração dinâmica, usando água destilada a 100 °C (pó:solvente, 1:10 m/V), mantidos em agitação (500 rpm) por 15 minutos e, posteriormente, o extrato foi separado do resíduo através de filtração simples e o filtrado foi nebulizado e aparelho spray dryer (LABMAQ – MSD 0.5), na temperatura de saída de 100 ° C, resultando na obtenção do extrato aquoso nebulizado (EAN-Ac).

2.2 Controle de qualidade preliminar

As análises das características físico-químicas da DV-Ac e do EAN-Ac seguiram as metodologias propostas pela farmacopeia brasileira, com algumas adaptações [13]. Na granulometria as amostras foram colocadas em um vibrador de tamises, por 20 minutos. Na perda por dessecação foi realizado o método da estufa, em que as amostras foram aquecidas em estufa a 105 ° C, durante 2 horas, seguido de resfriamento em dessecador e pesagem. Além disso, foram determinados o teor de cinzas, o pH e a densidade.

2.3 Caracterização morfológica e análise elementar das partículas do DV-Ac e EAN-Ac

Foi empregado o microscópio eletrônico de varredura (Phenom ProX). O diâmetro médio das partículas da amostra foi analisado através da MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura), utilizando o software do próprio equipamento. Além disso, no mesmo aparelho foi realizada a EDS (Espectrometria de Dispersão de Energia) para realizar a análise qualitativa dos elementos químicos presentes na amostra.

2.4 Termogravimetria

As curvas termogravimétricas foram obtidas em um TGA 4000 (Perkin Elmer do Brasil Ltda- São Paulo - SP - Brasil), em atmosfera de nitrogênio ($50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), de 25 a $900 \text{ }^\circ\text{C}$, com uma taxa de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. A massa submetida à análise foi de $8,0 \pm 0,1 \text{ mg}$.

2.5 Difração de raios-x

O difratômetro XRD-600 (Shimadzu Scientific Instruments) foi utilizado com um ângulo de varredura (2θ), na faixa de temperatura $2^\circ\text{C} - 70^\circ\text{C}$, com uma taxa de 2° Min^{-1} e o sistema Cu ($K \alpha 1$). O aparelho foi operado em tensão de 40,00 kV e uma corrente de 30 mA. Os dados foram avaliados com o auxílio do Software Origem (versão 8.0) [16].

2.6 Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier

Para análise no infravermelho, 1 mg do DV-Ac e EAN-Ac foram submetidos à análise espectroscópica no intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} , utilizando pastilhas de KBr. Os dados espectrais foram registrados em aparelho BOMEN FT-IR (modelo MB-100) e analisados Software Origem (versão 8.0) [16].

2.7 Análises fitoquímicas

O *screening* qualitativo (figura 3) seguiu a metodologia descrita por Matos (1997) e Barbosa (2001) [17-18].

Tabela 1. Pesquisa dos metabólitos secundários da *A. congestiflora*

| GRUPO QUÍMICO | TESTE APLICADO |
|----------------------|---|
| Alcaloides | Dragendorff; Mayer; Bouchardat; ácido sílico-tungstico. |
| Flavonoides | Shinoda; oxalo-bórico |
| Esteroides | Liebermann-Buchard |
| Taninos | FeCl_3 a 2%. |
| Saponinas | Teste de espuma |

A análise quantitativa foi realizada para os grupos químicos polifenóis [19], flavonoides [20] e taninos [21] em placas de 96 poços, utilizando reagentes específicos para cada fitoconstituente e a leitura das absorvâncias foi realizada em Leitor de ELISA série Expert Plus (Nova analítica, São Paulo-SP, Brasil).

3 Resultados e discussão

Através dos dados obtidos nas análises recomendadas pela farmacopeia brasileira [23] observou-se um caráter ácido tanto na droga vegetal quanto no extrato aquoso nebulizado, em que ambos apresentaram um pH por volta de 6,00. Esse fato sugere a presença de substâncias ácidas no material estudado e pode servir como um fator de conservação, prevenindo a contaminação microbiana.

Quanto ao teor de umidade a DV-Ac apresentou um valor de $7,18\% \pm 0,14$ contra $8,06\% \pm 0,17$ apresentado pelo EAN-Ac, sendo considerada aceitável essa elevação, pois neste último não foram adicionados agentes secantes, tampouco conservado em dessecador. Na determinação do quantitativo de cinzas os resultados mostraram um percentual de $5,2\% \pm 0,04$ para a DV-Ac e de $6,88\% \pm 0,22$ para o EAN-Ac, mostrando um aumento no teor de impurezas inorgânicas, possivelmente no decorrer do processo extrativo.

Na avaliação das características reológicas se verificou que as amostras apresentaram baixa capacidade de empacotamento (tabela 2). Para a DV, um fator de Hausner abaixo de 1,5 e um índice de Carr inferior a 20% lhe conferem propriedades reológicas mais estáveis [17,18,22]. Já o EAN-AC teve seu fluxo classificado como deficiente, principalmente pelo índice de Carr elevado [17,18,24]. No entanto, a padronização de elaborações farmacêuticas à base de drogas vegetais ou extratos secos é uma estratégia propícia para melhorar a estabilidade, manuseio, transporte e armazenamento do produto e pode contornar esses problemas de estabilidade [24].

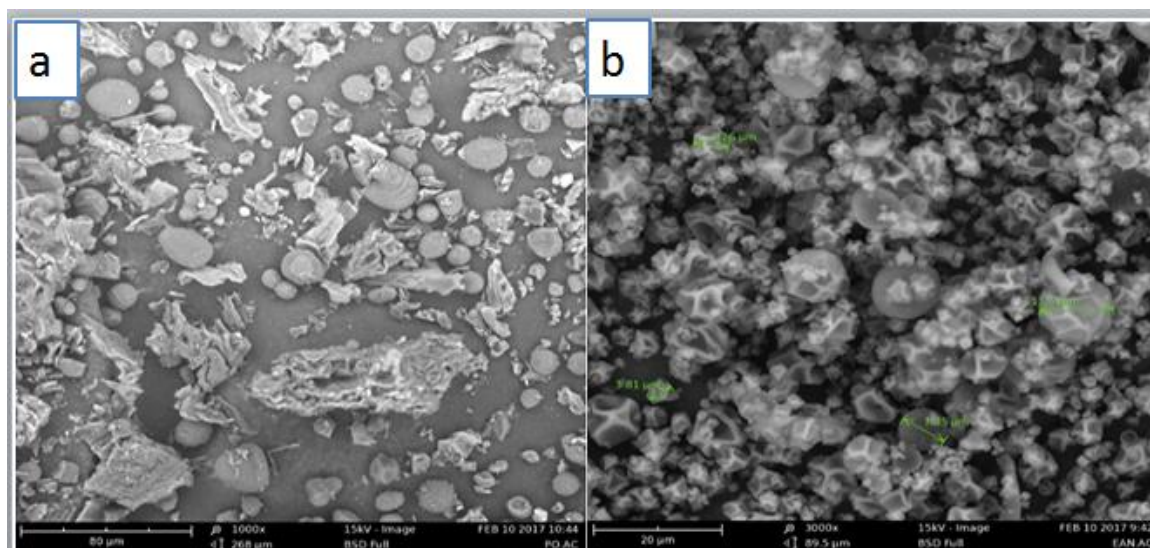
Tabela 2. Índices de densidade calculados para a DV e o EAN-AC da *A. congestiflora*

| fator calculado | valor obtido | |
|---|--------------|--------|
| | DV | EAN-AC |
| Densidade bruta (g/cm ³) | 0,45 | 0,19 |
| Densidade de compactação (g/cm ³) | 0,55 | 0,32 |
| Índice de Carr (%) | 18,2 | 41,1 |
| Compressibilidade (cm ³) | 4,0 | 3,0 |
| Fator de Hausner | 1,22 | 1,69 |

A DV-Ac apresentou partículas com tamanhos variáveis, fator que impossibilitou sua classificação granulométrica de acordo com o preconizado pela farmacopeia brasileira [23]. No entanto, ficou evidenciado que a maioria das partículas estava situada entre os tamanhos de 150 e 75 μm (34,4%) e 355 e 180 μm (33,6%). Tal constatação se

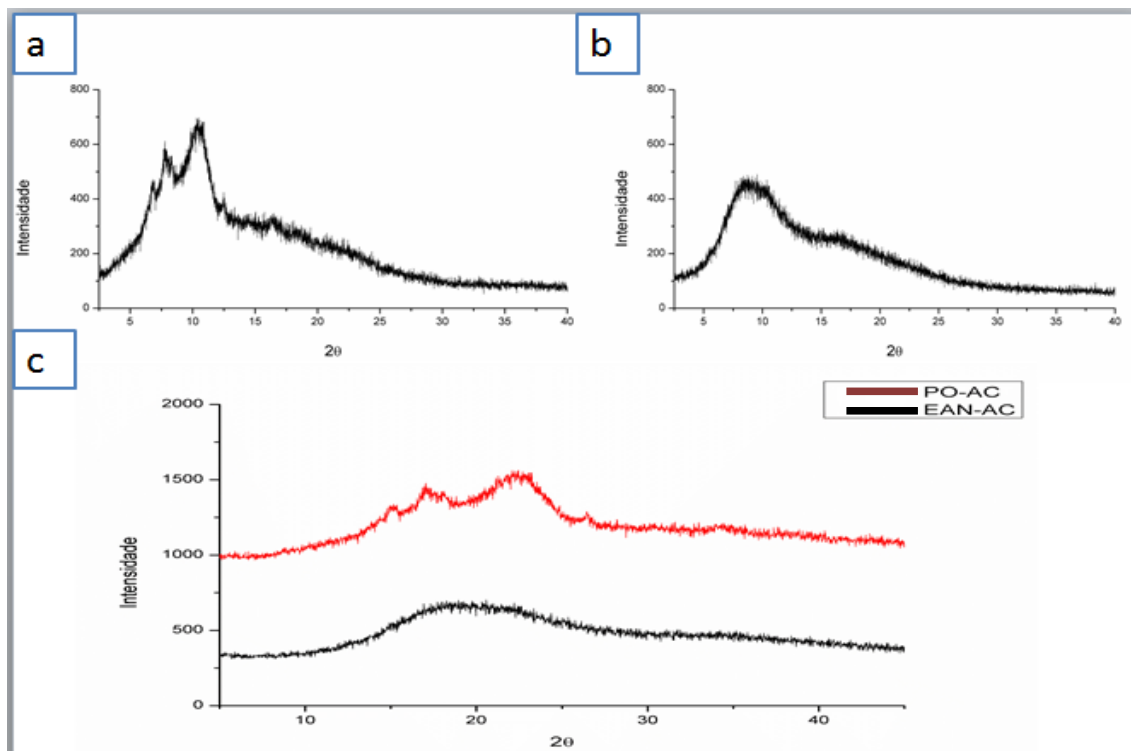
confirmou ao se analisar a microscopia eletrônica de varredura (MEV) dessa amostra, isso porque foi mostrado partículas de formas e tamanhos diversos, caracterizando-a como um pó heterogêneo (Figura 1a).

Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da DV-Ac e do EAN-Ac de *A. congestiflora*, revelando que ambos apresentam partículas amorfas, sem padronização nas suas dimensões, tamanhos e formas: 1a (DV-Ac, na magnificação x1000) e 1b (EAN-Ac, na magnificação x3000)



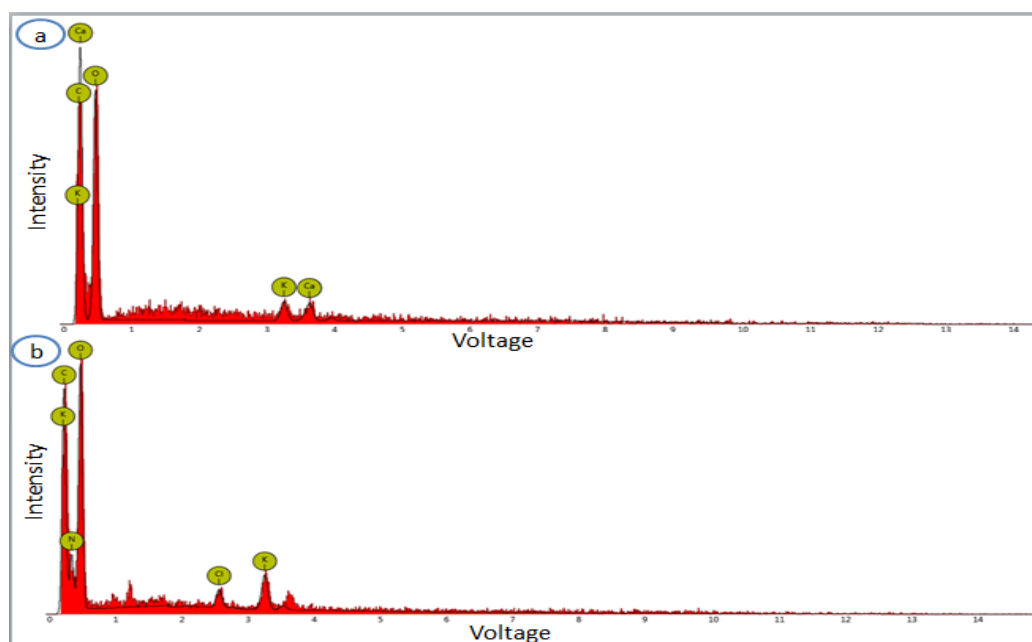
Na análise das partículas da DV-Ac e do EAN-Ac por MEV foi verificado uma falta de uniformidade e desorganização (figura 1). Essas características foram corroboradas pelos dados da difração de raios-x, na qual os difratogramas de ambas as amostras apontaram para um alto grau de amorfismo. Isso é um fato comum para drogas vegetais e para a maioria dos extratos provenientes, pois nesses estão presentes muitas substâncias com diferentes propriedades físico-químicas [24].

Figura 2. Difratograma da DV-Ac e do EAN-Ac, mostrando um alto grau de amorfização e ausência de picos de cristalinidade aparentes: 2a (DV), 2b (EAN-Ac), 2c (DV e EAN-Ac, respectivamente)



Na Espectrometria de Dispersão de Energia (EDS) das partículas da DV-Ac foi constatada a presença de Oxigênio ($81,7\% \pm 1,3$), Carbono ($13,7\% \pm 3,4$), Potássio ($4,8\% \pm 1,2$) e Cálcio ($3,8\% \pm 0,1$). O teor desses compostos inorgânicos pode ser resultado de contaminantes presentes na droga vegetal mesmo após o processo de limpeza (figura 3a). Por outro lado, a análise do EAN-Ac mostrou que, além dos átomos de C ($7,7\% \pm 0,2$) e O ($79,5\% \pm 5,0$), diferentes sinais indicaram a presença de K ($5,8\% \pm 1,4$) e Cl ($2,4\% \pm 0,4$), como mostrado na figura 3b. Esses elementos químicos minerais podem ser oriundos da própria droga vegetal e também do processo extrativo realizado com água. Essa análise também foi importante porque reforçou os achados de traços de resíduos inorgânicos evidenciados nos ensaios de teor de cinzas na mufla e na técnica de TG/DTA.

Figura 3. EDS da DV-Ac e do EAN-Ac, mostrando a média da composição elementar das 3 partículas com maior abundância nas amostras analisadas: 3a (DV-Ac) e 3b (EAN-Ac)



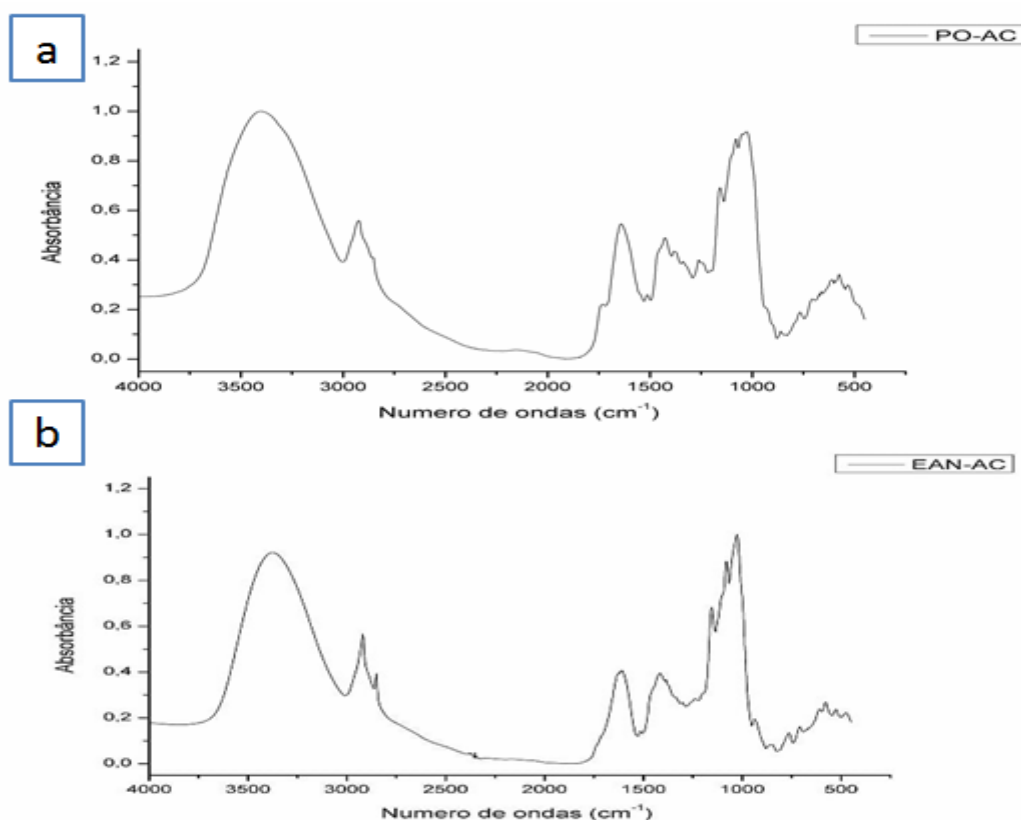
Na análise do espectro de IV da DV (Figura 4a) foi possível observar a presença de estiramentos na região de 3400 cm^{-1} sugestivos de grupamento hidroxila. Foi possível verificar também um ombro em torno de 1700 cm^{-1} sugestivo de função carbonilada. Picos de média intensidade em 2900 e 1600 cm^{-1} sugerem a presença de ligação C-H de carbono sp^3 e sp^2 de anéis aromáticos, respectivamente. As absorções próximas de 1000 cm^{-1} são compatíveis com ligações C-O, o que sugeriu a presença de metabólitos secundários como polifenóis, terpenos e outros [11, 22, 27].

O espectro da região do infravermelho (IV) do EAN-AC mostrou uma proeminente absorção na região de 3400 cm^{-1} , sugestiva do estiramento axial de O-H, como apresentado na figura 4b. As bandas de absorção na região de 2931 cm^{-1} , típicas de estiramento C-H (alcano), foram conferidas às características dos compostos orgânicos presentes nesse extrato. Ainda foi possível observar no EAN-AC a presença de grupamento metilênico e metílico, apontados nas regiões de absorções de 1363 e 1450 cm^{-1} . A intensidade moderada dos picos observados nas bandas de 1035 e 1230 cm^{-1} são atribuídos a ligações carbono-oxigênio (CO), sugestivo dos grupos funcionais álcool, éter, ácido carboxílico e seus derivados [27]. A sugestão de compostos com dupla C=C se torna possível pela presença da banda de absorção em 1618 cm^{-1} e aliado a isso a absorção em 604 cm^{-1} propõe a presença de grupamentos CH de núcleos aromáticos [27]. A partir disso, pode-se sugerir a presença de compostos naturais como

os polifenóis, terpenos, saponinas, flavonoides, antraquinonas e ácidos graxos monoinsaturados [11, 22, 27]. Nota-se que as principais bandas de absorção presentes na DV foram preservadas no EAN-AC, resguardadas algumas alterações.

Para a pesquisa dos principais fitoconstituintes no EAN-AC foi realizado o screening fitoquímico preliminar que evidenciou a presença de alcaloides, saponinas e polissacarídeos nesse extrato. Já na análise quantitativa para grupos químicos específicos foi constatado teores de $59,84 \pm 1,24$ mg/g para polifenóis totais, $55,28 \pm 7,14$ mg/g para taninos e $34,78 \pm 2,79$ mg/g para flavonoides. Essas substâncias já foram detectadas em outras espécies de Cucurbitáceas [26, 29], no entanto, ainda não havia estudos semelhantes na literatura feitos com *A. congestiflora*.

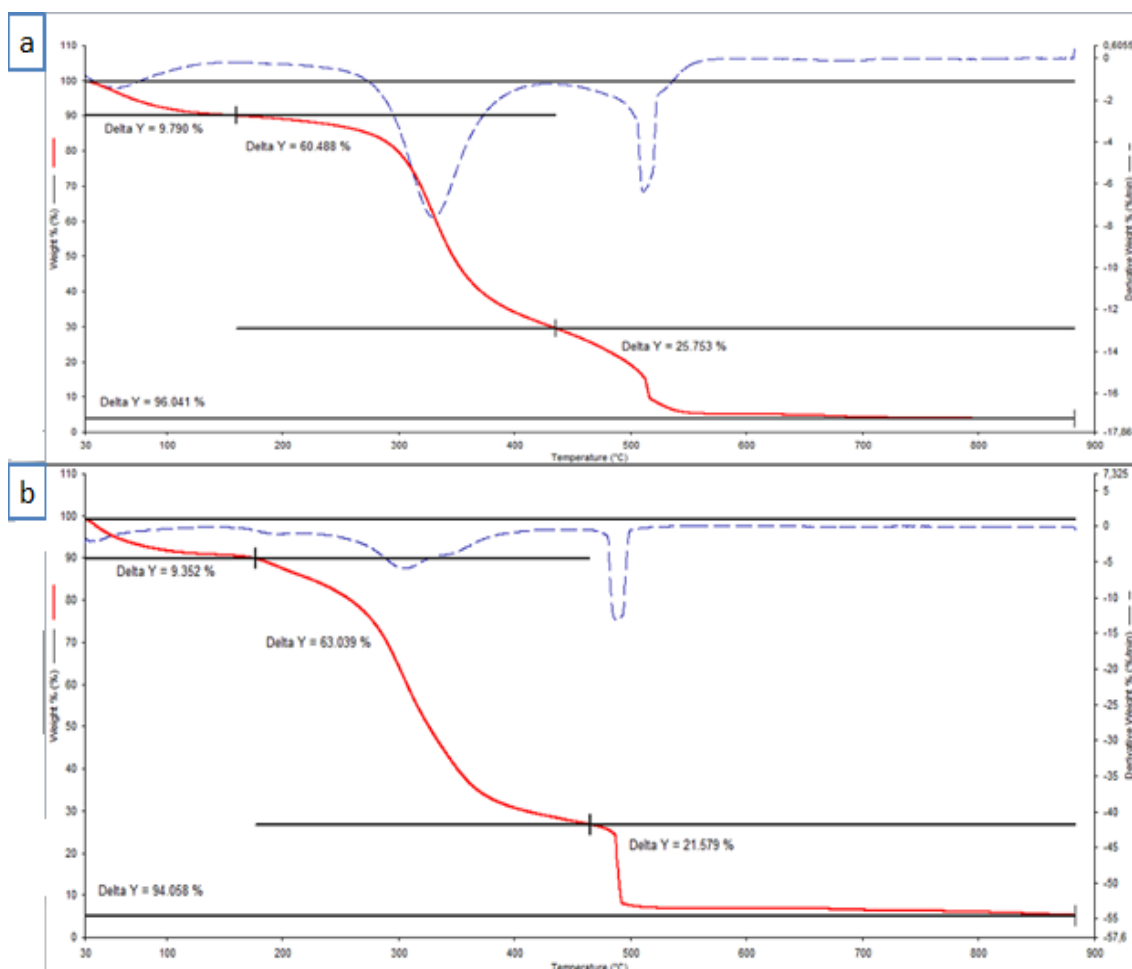
Figura 4. Espectros no infravermelho da DV (4a) e do EAN-AC (4b)



A figura 5a indica que a decomposição térmica da DV-Ac ocorreu em três etapas consecutivas. O primeiro passo mostra a perda de massa de 9,79% na faixa de temperatura de 100-200 °C, fato que pode ser explicado pela perda de água e outros componentes voláteis. O segundo passo mostra a perda de massa de 60,48% na faixa de temperatura de 200-430° C que pode ser atribuída a decomposição térmica de carboidratos e outros compostos orgânicos e, por último, a terceira etapa mostra a perda

de 25,65% na faixa de temperatura de 430-510 °C, não ocorrendo a completa decomposição do composto. Desta forma, a massa residual de 3,96% pode ser atribuída ao teor de cinzas, valor inferior ao verificado através do método anteriormente realizado.

Figura 5. Curvas da TG e DTa de *A. congestiflora*, mostrando seu comportamento térmico por picos de degradação endotérmica: 5a (DV-Ac) e 5b (EAN-Ac)



Na análise da curva TG/DTa do EAN-AC foi constatado um perfil de degradação térmica semelhante ao verificado para a DV (figura 5b). Isso porque a decomposição térmica do EAN-AC também ocorreu em três etapas consecutivas, sendo a primeira com perda de massa de 9,35% na faixa de temperatura situada entre 100-200 °C, inferindo-se uma perda de água e de material volátil. O segundo passo mostra a perda de 63,04% na faixa de temperatura de 200-470 °C, sugestiva de compostos carbonizáveis e, por último, a terceira etapa mostrou a perda de 21,58% na faixa de temperatura de 470-490 °C, não ocorrendo a completa decomposição do composto. No entanto, apesar do valor de 5,94% do resíduo mineral ser menor se comparado ao apresentado no método da mufla para o

EAN-AC, este se apresenta superior ao apresentado pela DV, assim como foi determinado pelo método farmacopeico [23].

A degradação da DV e do EAN-AC que ocorreu em diferentes temperaturas é explicada pelo fato de que amostras de drogas vegetais apresentarem uma infinidade de componentes, com combinações de compostos orgânicos e inorgânicos, e suas curvas de decomposição térmica estão implicadas na presença de eventos físicos e químicos que ocorrem com o aumento da temperatura. Não obstante, ocorre a influência da morfologia e imperfeições das partículas e perda de compostos gasosos [30-32].

4 Conclusão

Por meio dos métodos propostos na farmacopeia se obteve informações importantes sobre as características físico-químicas da droga vegetal e do extrato aquoso nebulizado das raízes de *Apodanthera congestiflora* Cogn. Para corroborar esses estudos preliminares foram utilizadas técnicas analíticas mais precisas, as quais foram capazes de caracterizar as referidas amostras e conferir um maior rigor científico ao estudo desenvolvido. Nesse sentido, se deu a contribuição do DRX e do MEV para fundamentar a evidência do caráter amorfo e a presença de partículas com diferentes tamanhos nas amostras analisadas. Por fim, a Espectrometria de Dispersão de Energia, a análise térmica e a espectroscopia na região do IV evidenciaram a presença de múltiplos grupamentos químicos nas amostras de *A. congestiflora*, fato corroborado nas análises fitoquímicas da DV-Ac e do EAN-Ac que evidenciou a presença de alcaloides, saponinas e polissacarídeos. Sendo possível a quantificação dos teores de polifenóis totais, flavonoides e taninos condensados. Desta forma, o presente estudo é importante para o conhecimento farmacognóstico e para o desenvolvimento de um medicamento a partir da referida espécie e também pode servir de modelo para estudos com outras espécies vegetais, seguindo a rota de avaliação simultânea entre a droga vegetal e os extratos obtidos, visando a um melhor desempenho no processo produtivo e de controle de qualidade.

Referências

1. KUMAR, M. et al. Macroscopical, anatomical and physico-chemical studies on fruits of *Coccinia indica* Wight & Arn. (*Cucurbitaceae*). **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, p. S121-S128, 2014.
2. SILVA, J.M.C., TABARELLI M, Fonseca, M.T, Lins LV. Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação. Brasília: Ministério do Meio Ambiente -Universidade Federal de Pernambuco-Conservation International-Biodiversitas-Embrapa Semi-árido. 2003.
3. EITEN G. Vegetação do cerrado. Em: M. N. Pinto (Ed.), Cerrado: Caracterização, ocupação e perspectivas Brasília: Editora da Universidade de Brasília. 1994; pp. 17–73.
4. KROL, M. S. et al. The semi-arid integrated model (SIM), a regional integrated model assessing water availability, vulnerability of ecosystems and society in NE-Brazil. **Physics and Chemistry of the Earth, Part B: Hydrology, Ocean-Acs and Atmosphere**, v. 26, n. 7, p. 529-533, 2001.
5. POR F.D, Imperatriz-Fonseca VL, L. Neto F. Biomes of Brazil: **Na illustrated natural history/Biomos do Brasil: Uma história natural ilustrada**. Sofia, Bulgaria: Pensoft Publishers. 2005.
6. ABÍLIO, F. J.P.; S. FLORENTINO, H.; RUFFO, T. L. Educação Ambiental no Bioma Caatinga: formação continuada de professores de escolas públicas de São João do Cariri, Paraíba. **Pesquisa em Educação Ambiental**, v. 5, n. 1, p. 171-193, 2010.
7. ROQUE, A. A.; ROCHA, R. M.; LOIOLA, M. I. B. 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.
8. CECHINEL Filho V et al. Medicamentos de origem vegetal: atualidades, desafios e perspectivas. Itajaí: Ed. UNIVALI; 2015.
9. ORHAN, I. E. et al. Neurobiological evaluation of thirty-one medicinal plant extracts using microtiter enzyme assays. **Clinical Phytoscience**, v. 2, n. 1, p. 9, 2017.
10. AUMEERUDDY-ELALFI, Z.; GURIB-FAKIM, A.; MAHOMOODALLY, M. Fawzi. Chemical composition, antimicrobial and antibiotic potentiating activity of essential oils from 10 tropical medicinal plants from Mauritius. **Journal of Herbal Medicine**, v. 6, n. 2, p. 88-95, 2016

11. SIMÕES et al. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Florianópolis: Editora Artmed, 2017.
12. MALONE, M. H. The pharmacological evaluation of natural products—general and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. **Journal of ethnopharmacology**, v. 8, n. 2, p. 127-147, 1983.
13. GIULIETTI, A.M, BOCAGE, N. A.L; CASTRO, A.A.J.F.; GAMARRA-ROJAS, C.F.L; SAMPAIO, E.V.S.B; VIRGÍNIO, J.F et al. Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga. Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação. pp. 48-90, 2004.
14. ROQUE, A.A.; BEZERRA LOIOLA, MARIA IRACEMA. Potencial de uso dos recursos vegetais em uma comunidade rural no semiárido potiguar. **Revista Caatinga**, v. 26, n. 4, 2013.
15. AKJHISA, Toshihiro et al. Sterols of the *Cucurbitaceae*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 6, p. 1693-1700, 1987.
16. KUMAR, Naveen; SINGH, Praveen; KUMAR, Satish. Physical, X-ray diffraction and scanning electron microscopic studies of uroliths. 2006.
17. VOIGT, R. Pharmazeutische Technologie. 9 Uberarb. Aufl., Stuttgart: issenschaftliche, 2000.
18. MATOS, F.J.A. Introduction to Experimental Phytochemistry. 2nd ed. Fortaleza: UFC. 1997.
19. CHANDRA, S.; GONZALEZ DE MEJIA, E. 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 of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 11, p. 3583-3589, 2004.
20. MEDA, A. et al. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food chemistry**, v. 91, n. 3, p. 571-577, 2005.
21. 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**, v. 19, n. 4, p. 613-621, 1993.
22. BARBOSA, W.V.L. Manual for phytochemical and chromatographic analysis of plant extracts. Federal University of Pará (UFPA). Belém, 2001.
23. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira, volume 1. 5ª Ed. Brasília, 2010.

24. CORTÉS-ROJAS, D. F.; OLIVEIRA, W. P. Physicochemical properties of phytopharmaceutical preparations as affected by drying methods and carriers. **Drying Technology**, v. 30, n. 9, p. 921-934, 2012.
25. DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 2, p. 303-336, 2012.
26. HUSSAIN, A. I. et al. Phenolic profile and antioxidant activity of various extracts from *Citrullus colocynthis* (L.) from the Pakistani flora. **Industrial crops and products**, v. 45, p. 416-422, 2013.
27. SILVERSTEIN, R.M, BASSLER, G.C, MORRILL, T.C. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos, 6 ed., John Wiley & Sons: New York, 2000.
28. BYKOV, I. Characterization of natural and technical lignins using FTIR spectroscopy. 2008.
29. CHEKROUN, E. et al. Antioxidant activity and phytochemical screening of two *Cucurbitaceae*: *Citrullus colocynthis* fruits and *Bryonia dioica* roots. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, n. 8, p. 632-637, 2015.
30. COSTA, R. S. et al. Investigation of thermal behavior of *eliotropium indicum* L. lyophilized extract by TG and DSC. **Journal of thermal analysis and calorimetry**, v. 111, n. 3, p. 1959-1964, 2013.
31. WESOŁOWSKI, M.; KONIECZYŃSKI, P. Thermoanalytical, chemical and principal component analysis of plant drugs. **International journal of pharmaceuticals**, v. 262, n. 1, p. 29-37, 2003.

Capítulo 3. Isolamento bioguiado de dois ésteres fenólicos e 3 triterpenos glicosilados das raízes da *Apodanthera congestiflora* Cogn. (Cucurbitaceae)

RESUMO

O presente trabalho descreve o primeiro estudo fitoquímico das raízes de *Apodanthera congestiflora* Cogn. Essa cucurbitácea conhecida popularmente como cabeça de negro é citada em estudos etnobotânicos pelas suas atividades analgésica, anti-inflamatória, depurativa, antiparasitária e antimicrobiana. Foi realizada a preparação de um extrato por extração acelerada por solvente, em diferentes faixas de polaridade. Para a prospecção fitoquímica foi seguido o modelo do estudo bioguiado, norteado pela atividade anti-inflamatória. O extrato acetato (FA-Ac) foi submetido a uma avaliação fitoquímica preliminar, demonstrando a presença de saponinas, polissacarídeos e alcaloides. E na análise semi-quantitativa apresentou teores significativos de polifenóis, flavonoides e taninos. Através da extração bioguiada foi selecionado o FA-Ac em que foram isolados e identificados 2 ácidos fenólicos esterificados: o ferulato 2-ácido propenóico, 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) decil éster (Ac-1) e o p-cinamato 2-ácido propenóico, 3-(4-hidroxifenil)-decil éster (Ac-2). Além desses, foram purificados 3 triterpenos glicosilados da classe das norcucurbitacinas: o 29-nor-1,2,3,4,5,10-dehidro-25-O-acetil-2-O-β-D-glicopiranosil-3,16 α, 20 (R)-trihidroxi-11,22-dioxocurbita-6,23, dieno (Ac-3), conhecido como Cayaponosídeo A; o 29-nor-1,2,3,4,5,10-dehidro-25-O-acetil-2-O-β-D-glicopiranosil-3,16 α, 20 (R)-trihidroxi-11,22-dioxocurbita-6-eno (Ac-4), conhecido como Fevicordina A e o 19-norcolesta-1,3,5,10-6-tetraeno-11,22-diona, 2- (β-D-glicopiranosil)-3,16,20,25-tetrahidroxi-4,9,14-trimetil-(9 β, 16 α) (Ac-5), conhecido por Cayaponosídeo C. Os polifenóis isolados no presente estudo são inéditos no gênero *Apodanthera* e já foram isolados em outras espécies da família cucurbitaceae, mas os triterpenos obtidos pertencem a uma classe com poucos estudos descritos e, de forma geral, o isolamento desses compostos químicos é pioneiro na referida espécie.

Palavras-chave: Prospecção fitoquímica. Cucurbitaceae. Norcucurbitacinas.

1 Introdução

O uso de plantas com finalidade curativa já é uma realidade em muitas partes do mundo, passando de terapia alternativa para um tratamento consolidado e incentivado por órgãos de saúde de diversos países, como é o caso do ministério da saúde do Brasil [1]. No entanto, nos dias atuais muitas substâncias de exclusivas de plantas brasileiras foram patenteadas por empresas ou entidades governamentais internacionais.

Esta questão demonstra a enorme variedade de espécies vegetais de interesse medicinais encontrados nos biomas brasileiros e, também, a necessidade do desenvolvimento de tecnologia nacional aliada a pesquisas que consolidem o uso desses recursos [2].

Para tanto os estudos fitoquímicos são indispensáveis, sobretudo quando se completam através das etapas de isolamento, elucidação estrutural e identificação de constituintes do vegetal, principalmente aqueles provenientes do metabolismo secundário, responsáveis, ou não, pela ação biológica da planta em estudo [3].

Várias espécies tiveram pesquisas que confirmaram atividades farmacológicas descritas na medicina popular e ainda realizaram controle de qualidade das matérias-primas utilizadas, algumas com compostos biologicamente ativos isolados. Nesse sentido, alguns grupos de pesquisa se especializaram em determinadas famílias de plantas em que alguns membros já haviam sido estudados [3-4].

Em se tratando da utilização de plantas medicinais nas diversas terapias existe uma grande preocupação com a qualidade das drogas vegetais e seus derivados. Essa longa cadeia tem início na identificação adequada da espécie botânica, passa pela escolha da planta com a suposta atividade desejada e culmina por técnicas analíticas que permitem identificar com clareza o material estudado [5].

Nessa perspectiva, a família Cucurbitaceae se destaca por possuir uma enorme diversidade de espécies vegetais, algumas de interesse econômico pelo seu uso alimentício, ornamental e terapêutico. Sendo que as espécies são cultivadas principalmente para fins alimentares, aromáticos, medicinais, ornamentais ou como fonte de matérias-primas para alguns produtos [6-7].

Um representante bem estudado dessa família é a *Momordica charantia*, conhecida como “melão-de- São-Caetano”. Seus frutos, folhas e raízes são usados corriqueiramente para diabetes, cicatrizante, no combate a parasitas internos e

ectoparasitas, cólicas e recentemente no combate a células neoplásicas. A avaliação dos seus fitoconstituintes revelou a presença de compostos biologicamente ativos, principalmente da classe dos triterpenos, a exemplo de 50 novos glicosídeos cucurbitanos [8-10].

A cabeça de negro, nome popular da *Apodanthera congestiflora* Cogn., é outra representante dessa família, sendo endêmica do semiárido do Brasil e que se destaca em estudos etnobotânicos, principalmente por sua atividade anti-inflamatória e antiparasitária [11-12]. Entretanto, apesar do seu uso corrente na medicina popular inexistem estudos experimentais que relatem a composição química ou a atividade terapêutica descrita tradicionalmente para essa espécie.

Tendo em vista essa problemática, o presente trabalho propõe um estudo fitoquímico bioguiado das raízes de *Apodanthera congestiflora* Cogn., visando o isolamento de constituintes químicos, principalmente aqueles responsáveis pelas atividades biológicas da referida espécie.

2 Materiais e métodos

2.1 Local da pesquisa

A parte inicial da pesquisa foi realizada no Instituto Nacional do Semiárido-INSA, na cidade de Campina Grande-PB (seleção, limpeza e secagem das raízes e obtenção dos extratos hexânico, Acetato de etila e etanólico).

O isolamento dos compostos através de técnicas cromatográficas (cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada) foi realizado no Laboratório de Fitoquímica e o controle de qualidade físico-químico do pó no Laboratório de Físico-Química do Centro de Ciência e Tecnologia, ambos na Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

A espectroscopia no Infravermelho foi realizada no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (Certbio) Universidade Federal de Campina Grande e os espectros de Ressonância Magnética Nuclear foram obtidos no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPerFarm), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

2.2 Material botânico

As raízes de *A. Congestiflora* Cogn. foram coletadas na cidade de Barra de Santana-PB no mês de Novembro de 2015 (coordenadas: S6°43'18" – W36°3'46"). Após a coleta, o material foi identificado pelo Botânico Dr. José Iranildo Miranda de Melo e a exsicata depositada no Herbário Manuel *de* Arruda Câmara (ACAM) na Universidade Estadual da Paraíba, sob o número 1000.

2.3 Extração acelerada por solvente (EAS)

As raízes de *A. Congestiflora* Cogn. foram secas em estufa de circulação de ar (40 °C) e pulverizadas em moinho de facas com granulometria de 10 mesh. Posteriormente, foram submetidas à extração pela técnica de Extração acelerada por solvente, no aparelho ASE 350[®] da DIONEX Corporation (Sunnyvale, CA, EUA). Para tanto foi selecionado a proporção entre o pó e terra diatomácea (preenchimento da célula de extração). Os solventes selecionados foram o hexano, acetato de etila e etanol. Os extratos obtidos foram denominados extrato hexânico (FH-Ac), acetato (FA-Ac) e etanólico (FE-Ac). As amostras foram secas em sistema de evaporação Rocket[®] (DIONEX Corporation). Foi calculado o rendimento percentual de cada extração.

2.4 *Screening* biológico para a identificação dos extratos promissores

Para o prosseguimento dos estudos fitoquímicos foi seguida a estratégia do fracionamento e isolamento bioguiado, tendo em vista as vantagens econômicas e a obtenção de resultados mais eficazes na busca de compostos bioativos [13-15]. Para tanto, se deu a seleção dos extratos a serem utilizados mediante a verificação das atividades anti-inflamatória/antinociceptiva em modelo *in vivo* (camundongos *Swiss*). Foi realizado o teste da formalina, onde foram testados por via oral os extratos FH-Ac, FA-Ac e FE-Ac, nas doses de 100,150 e 200 mg/kg de peso animal. Os parâmetros avaliados foram o tempo das lambidas nas patas inflamadas com agente flogístico (formalina).

2.5 Análise semi-quantitativa da FA-Ac

A análise semi-quantitativa foi realizada apenas no extrato acetato de etila para os grupos químicos polifenóis [16], flavonoides [17] e taninos [18], de acordo com a seleção realizada no ensaio de atividade biológica. Em placas de 96 poços, utilizando reagentes específicos para cada fitoconstituente foi efetuada a leitura das absorvâncias em Leitor de ELISA série Expert Plus (Nova analítica).

O teor total de polifenóis foi avaliado com o reagente de Folin- Ciocalteu, usando o ácido gálico (A.G) como padrão de referência. Alíquotas de amostras de teste (100 μ L) a 5 mg/mL foram misturados com 2 mL Solução de Na_2CO_3 (2%). Após 5 min., Adicionou-se 100 μ L de reagente Folin-Ciocalteu (0,2 N) à mistura, mantendo-a em repouso por 30 min. À temperatura ambiente e ao abrigo da luz a leitura foi realizada contra um branco a 700 nm. Uma curva de calibração foi realizada em paralelo nas mesmas condições operacionais usando A.G como controle positivo. Os resultados foram expressos como mg de A.G equivalente por grama de extrato seco (mg AG eq/g).

O teor total de flavonoides foi quantificado por um método colorimétrico. Cada amostra (100 μ L) a 1 mg/mL foi misturada com 200 μ L de água destilada e 0,15 mL de solução de NaNO_2 (15%). Após 6 min, 150 μ L de AlCl_3 (10%) e 100 μ L de solução de NaOH (4%) foram adicionados. Imediatamente, adicionou-se água para completar o volume para 200 μ L nas placas, misturadas e incubadas durante 15 min., à temperatura ambiente. A absorvância foi medida a 510 nm. Uma curva de calibração foi realizada simultaneamente nas mesmas condições operacionais usando Quercetina (Qct) como

controle positivo. Os resultados foram expressos como equivalente de catequina por grama de extrato seco (mg Qct eq/g).

A concentração de taninos foi determinada por um método colorimétrico. Cada amostra (100 μ L) a 1 mg/mL foi misturada com 25 μ L de Metanol e 150 μ L de solução de vanilina (4%) e realizados diluições sucessivas das amostras que posteriormente ficaram em repouso por 20 minutos. A absorbância foi medida a 500 nm. Uma curva de calibração foi realizada simultaneamente nas mesmas condições operacionais usando Catequina (Cat), como controle positivo. Os resultados foram expressos como equivalente de catequina por grama de extrato seco (mg Cat eq/g).

Foram considerados os valores de absorbância aceitáveis para os extratos aqueles que estivessem determinados pelo método estatístico que estabeleceu a equação que originou a relação concentração/absorbância de cada amostra testada.

2.6 Cromatografia em Coluna aberta (CC) da FA-Ac

O extrato acetato de etila (5,0 g) foi cromatografada em coluna aberta de gel de sílica como fase estacionária e fase móvel com solventes em gradiente de polaridade e/ou misturas binárias (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol). Dessa coluna (C1) foram obtidas 70 frações.

2.7 Isolamento de Ac-1

A fração C₁F₂ (65,5 mg) foi filtrada com uma mistura de hexano e diclorometano (1:10 v/v) até restar um pó branco na amostra inicial. Esse composto resultante foi avaliado por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e codificado como Ac-1.

2.8 Isolamento de Ac-2

As frações C₁F₃, C₁F₄, C₁F₅, C₁F₆, C₁F₇ e C₁F₈ foram reunidas, com base nos seus perfis cromatográficos evidenciados na CCDA, e a amostra resultante (180 mg) foi cromatografada numa coluna de sílica gel (C2). Após as eluições com misturas binárias de solventes foram originadas 50 frações. Com base no seu perfil na CCDA as frações C₂F₁₅ e C₂F₁₆ foram reunidas e codificadas como Ac-2.

2.9 Isolamento dos compostos Ac-3, Ac-4 e Ac-5

A eluição da coluna 1 com a fase móvel formada pela mistura acetato de etila: metanol (94:6 v/v) forneceu 10 frações C_1F_{36} - C_1F_{45} . A primeira fração dessa série deu origem aos compostos Ac-3 e Ac-4, na forma de mistura.

As frações C_1F_{41} , C_1F_{42} e C_1F_{43} foram submetidas ao processo de recristalização, com acetona (aquecimento à 40°C, por 10 minutos e refrigeração à 8 °C, por 24 horas). Desse processo resultou em cada amostra a formação de duas fases, as primeiras na forma de precipitados brancos, de que foram separadas e codificadas C_1F_{42} ppt, C_1F_{42} ppt e C_1F_{43} ppt e seus respectivos sobrenadantes C_1F_{42} sob, C_1F_{42} sob e C_1F_{43} sob, fase superior das amostras.

As amostras foram então submetidas à CCDA, sendo selecionadas as frações C_1F_{42} ppt, C_1F_{42} sob e C_1F_{43} ppt para a realização da Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP). As frações foram aplicadas em placas separadas e eluídas em fases móveis binárias hexano:acetato de etila (1:9, 3:7, 5:5, 7:3, 9:1v/v) e acetato 100%. Ao final, as manchas desenvolvidas foram secas ao ar livre e visualizadas sob luz ultravioleta. Cada uma das manchas fluorescentes foram marcadas e coletadas separadamente. Por fim, o material foi dissolvido com os solventes acetona e metanol e, em seguida, filtradas. Ao final cada amostra obtida foi submetida CCDA e a fração proveniente da purificação de C_1F_{42} ppt deu origem à molécula isolada Ac-5.

2.10 Análise no infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF)

A massa de 1 mg do composto Ac-1 foi submetido à análise espectroscópica no infravermelho médio, utilizando pastilhas de KBr. Os dados espectrais foram registrados em aparelho BOMEN FT-IR (modelo MB-100) e analisados no Software Origem (versão 8.0).

2.11 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Cada molécula purificada foi submetida às técnicas de RMN, para obtenção dos espectros de RMN de 1H e ^{13}C , utilizando técnicas uni e bidimensionais. Os espectros foram registrados em espectrômetro VARIAN SYSTEM de 200 MHz (moléculas Ac1 e Ac2) e de 400 MHz (moléculas Ac3, Ac4 e Ac5).

3 Resultados e discussão

3.1 Rendimento das extrações

Na otimização da extração acelerada por solventes (ASE) foram fixados alguns parâmetros que foram pré-estabelecidos. O gás utilizado foi o Nitrogênio, com fluxo dinâmico de solvente, a 40 °C, 200 g de droga vegetal e a proporção droga solvente foi de 1/5 p/v. Foi avaliada a influência da proporção terra diatomácea/droga vegetal através da quantificação do rendimento em cada situação (3 condições). O solvente escolhido foi o hexano devido ao menor custo e facilidade de reaproveitamento (Tabela 1).

Tabela 1. Otimização da proporção terra de Diatomácea/droga vegetal, empregando hexano como solvente extrator

| Teste | Proporção terra diatomácea/pó | Rendimento (%) |
|--------------|--|-----------------------|
| 1 | 1/5 | 0,31 |
| 2 | 1/4 | 0,60 |
| 3 | 1/2 | 0,72 |

A proporção de 1/2 de Diatomácea/droga vegetal apresentou o melhor rendimento extrativo (figura 10). Tal fato pode estar ligado à heterogeneidade da droga vegetal. Tal explicação pode ser reforçada pelo ensaio de granulometria e microscopia eletrônica de Varredura (MEV), realizados na caracterização do material, o qual demonstrou a presença de partículas de diferentes tamanhos e formas. Nesse sentido, o uso da terra de diatomáceas pode favorecer o contato do solvente com o pó, proporcionando um maior rendimento extrativo.

A extração do FE-Ac apresentou maior rendimento (5,5%), seguida do FA-Ac (1,1%) e do FH-Ac (0,55%). Para este último, o rendimento se mostrou inferior ao obtido nos testes iniciais. Esse fato pode indicar que os experimentos realizados foram insuficientes para determinar um método robusto e reproduzível; até porque, no ensaio realizado foi considerada apenas a concentração da terra diatomácea como variável determinante para o rendimento de todo o processo de extração no ASE. E, esse método pode ser influenciado por outras variáveis que determinam sua eficiência e robustez [19-22].

Na extração realizada pelo processo de maceração foi obtido um extrato etanólico bruto cujo rendimento foi de 3,2%, sendo inclusive inferior ao valor encontrado para a fase etanólica, obtida através da extração acelerada por solvente, mesmo sendo a terceira

fase de um processo de extração exaustiva de um mesmo material. Isso confirma a vantagem do ASE, considerada mais rápida, com maiores rendimentos e com redução de quantidade de solvente, se comparada a outros métodos de extração de drogas vegetais [19-22].

Considera-se como perspectiva para experimentos futuros a realização de um planejamento fatorial para avaliar outras variáveis na otimização das condições de extração da droga vegetal no ASE, sendo este um método considerado eficaz e em estudos semelhantes se mostrou superior a técnicas extrativas tradicionais, tais como maceração, percolação, ultrassom e fluido supercrítico [19-25].

3.2 Fitoquímica preliminar

A análise quantitativa de grupos químicos específicos evidenciou teores de $59,84 \pm 1,24$ mg/g para polifenóis totais, $55,28 \pm 7,14$ mg/g para taninos e $34,78 \pm 2,79$ mg/g para flavonoides. Essas substâncias já foram mensuradas e detectadas em outras espécies de Cucurbitáceas nas suas diferentes partes [26-27]. Um estudo conduzido com as raízes da *Cucurbita pepo* L. verificou uma concentração de 2,40 mg/g de flavonoides e de 1,55 mg/g de polifenóis totais [26]. Nesse estudo o teor de polifenóis e flavonoides foi significativamente menor que o analisado em *A. congestiflora*. Alguns fatores podem explicar essa discrepância, tais como a própria diferença na constituição química de cada espécie, o método extrativo empregado, o método analítico de quantificação e o período de coleta do material botânico. Esse último fator pode ser influenciado pela sazonalidade, a qual pode acarretar numa maior ou menor produção de alguns metabólitos secundários.

3.3 Fitoconstituintes isolados

3.3.1 Identificação de Ac-1

O composto Ac-1 (13,7 mg) se apresentou como um sólido branco amorfo, solúvel em CHCl_3 . Seu ponto de fusão foi determinado na faixa de 115°C - 130°C . Como o ponto de fusão é um dos critérios de pureza, se inferiu que a amostra não estava pura. Na literatura é relatado que esse ferulato possui ponto de fusão de 125°C [28].

No espectro de IV visualizou-se (Figura 6, pág. 77) uma banda larga em torno de 3390 cm^{-1} , característica de deformação axial de hidroxila. Em 2940 cm^{-1} se observou um estiramento sugestivo de ligações C-H de carbonos sp^3 . Em 1628 cm^{-1} , foi vista uma banda de deformação axial que poder ser atribuída a uma ligação C- sp^2 de anel

aromático Por fim, não se pode visualizar com clareza, mas pode-se atribuir a deformação axial em 1705 cm^{-1} à carbonila de éster [29].

O IV de um éster ferúlico com estrutura semelhante ao isolado nesse trabalho mostrou um espectro com bandas de absorção com valores de 3440 e 1712 cm^{-1} , evidenciando a presença das funções álcool e éster, respectivamente. Além da presença de uma banda de absorção em 1685 cm^{-1} , determinando a presença de um grupo éster conjugado, apresentando também absorções em 1619 e 960 cm^{-1} (características de duplas ligações conjugadas).

O espectro de RMN de ^1H (figuras 7 e 8, págs. 78 e 79) (δ , CDCl_3 200 MHz) mostrou a presença de 3 sinais em $\delta_{\text{H}} 7,07$ (dd, $J=1,9$ e $8,2$; 1H), $\delta_{\text{H}} 7,03$ (d, $J=1,9$ Hz, 1 H) e $\delta_{\text{H}} 6,91$ (d, $J= 8,2$ Hz; 1H), característicos de hidrogênios aromáticos de núcleo trissubstituído. Em $\delta_{\text{H}} 7,60$ (d, $J=15,9$ Hz, 1H) e $\delta_{\text{H}} 6,29$ (d, $J=15,9$ Hz, 1H) foram visualizados hidrogênios característicos de configuração *trans*. Em $\delta_{\text{H}} 3,92$ (s, 3H) foi visto um sinal correspondente a metoxila aromática e em $\delta_{\text{H}} 4,18$ (t, $J=6,75$ Hz, 2H) outro sinal característico de hidrogênio desblindado, próximo a grupo retirador de elétrons. Foram visualizados ainda os seguintes sinais: $\delta_{\text{H}} 1,69$ (m, 2H), $\delta_{\text{H}} 1,40$ (m, 2 H), $\delta_{\text{H}} 1,63$ (m, 2H), $\delta_{\text{H}} 1, 29$ (m, 2 H), $\delta_{\text{H}} 0,88$ (m, $J=6,8$ Hz, 3H) que sugerem a presença de uma cadeia alifática na molécula.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 9, pág. 80) (δ , CDCl_3 , 125 MHz), utilizando a técnica APT, foram visualizados quatro sinais para carbonos não hidrogenados ($\delta_{\text{C}} 167,5$; $148,0$; $146,9$; $127,2$), cinco sinais para carbonos metínicos ($\delta_{\text{C}} 144,7$; $129,2$; $115,8$; $114,8$ e $109,4$) e nove sinais para carbonos metilênicos ($\delta_{\text{C}} 64,8$; $32,08$; $29,86$; $29,82$; $29,76$; $29,71$; $28,59$; $26,52$ e $29,47$) e dois sinais para carbonos metílicos ($\delta_{\text{C}} 56,1$ e $14,3$).

No mapa de correlação heteronuclear HSQC ($^1\text{H X }^{13}\text{C}$) foram visualizados as correlações entre $\delta_{\text{H}} 7,03/ \delta_{\text{C}} 109,4$; $\delta_{\text{H}} 7,07/ \delta_{\text{C}} 123,2$ e $\delta_{\text{H}} 6,91/ \delta_{\text{C}} 114,8$ e $\delta_{\text{H}} 3,92/ \delta_{\text{C}} 56,1$ (figura 10, pág. 81) que juntamente com as correlações vistas no espectro HMBC ($^1\text{H X }^{13}\text{C}$) entre $\delta_{\text{H}} 7,07/ \delta_{\text{C}} 148,1$; $144,8$; $114,8$ e $109,4$; de $\delta_{\text{H}} 7,03/ \delta_{\text{C}} 146,9$; $148,0$ $144,8$ e $123,2$; de $\delta_{\text{H}} 6,91/ \delta_{\text{C}} 148,0$; $146,9$; $127,2$ e $123,2$ e de $\delta_{\text{H}} 3,92/ \delta_{\text{C}} 146,9$ permitem atribuir os valores de $\delta_{\text{H}} 7,07$, $\delta_{\text{H}} 7,03$ e $\delta_{\text{H}} 6,91$ para as posições 6, 2 e 5, respectivamente e a metoxila em $\delta_{\text{H}} 3,92$ ligada ao C-3. Por exclusão, o sinal em $\delta_{\text{C}} 148,02$ foi atribuído ao carbono oxigenado da posição 4.

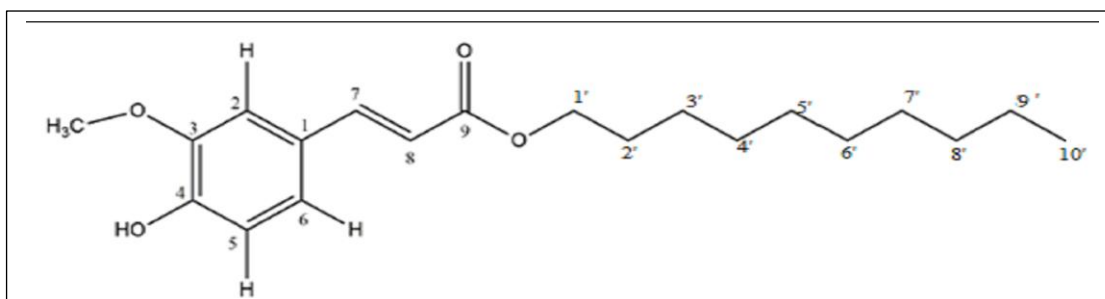
No mapa de correlação heteronuclear HSQC foram vistas também as correlações entre: $\delta_{\text{H}} 7,60/ \delta_{\text{C}} 144,8$ e $\delta_{\text{H}} 6,29/ \delta_{\text{C}} 115,8$; que por meio dos acoplamentos observados

no HMBC (figura 11, pág.82) entre δ_H 7,60/ δ_C 167,5; 123,2; 115,2 e de δ_H 6,29/ δ_C 167,5 e 127,2 permitem atribuir δ_H 7,60 e δ_H 6,29 para as posições 1 e 6 e δ_C 127,22 e δ_C 167,55 para os carbonos 1 e 5, respectivamente.

Ainda no HSQC foram visualizadas as correlações de δ_H 4.18/ δ_C 64,7; δ_H 1.69/ δ_C 28.9 e δ_H 1.40/ δ_C 26,2 e no HMBC de δ_H 4.18/ δ_C 167,5; 28,9 e 26,2 e de δ_H 1.69/ 64,8; 29,4 e 26,2 que corrobora a presença de carbonila de éster ou amida na posição 9 e que permite inferir δ_H 4.18, δ_H 1.69 e δ_C 140 para as posições 3, 2 e 7. Na tabela 2 são relacionados os valores encontrados nos espectros de Ac-1 e de um composto semelhante encontrado na literatura [29].

O envelope de sinais entre δ_H 1,39-1,21 visto do espectro de RMN de 1H e o tripleto em δ_H 0,87 ($J=6,8$ Hz), além dos demais sinais para carbonos metilênicos (δ_C 29,8; 29,6; 29,5; 29,4 e 22,8) permitiram sugerir que o composto codificado por Ac-1 trata-se do 2-ácido propenóico, 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) decil éster, sendo classificado como um ácido clorogênico derivado da esterificação do ácido ferúlico (figura 1).

Figura 1. Composto Ac-1, isolado da FA-Ac de *Apodanthera congestiflora*



Na família Cucurbitaceae alguns estudos já demonstraram a presença dessa classe de substâncias, principalmente nas espécies com atividade antioxidante, como o caso da *Citrullus lanatus* [30]. Todavia, para *A. congestiflora* e, por conseguinte, no gênero *Apodanthera* a presença de um composto pertencente à classe dos ésteres do ácido ferúlico está sendo descrita pela primeira vez.

Tabela 2. Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) e ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do composto Ac-1 em comparação com os dados da literatura

| C | Ac-1 | | Ferulato (Baldé 1991) | |
|-------------------|---------------------|-----------------------------|--------------------------|---------------------|
| | δ_{C} | δ_{H} | δ_{C} | δ_{H} |
| 1 | 127,0 | — | 127,11 | — |
| 2 | 109,4 | 7,01 (d, j=1,9 Hz) | 109,3 | 7.03 (d) |
| 3 | 146,9 | — | 147,8 | — |
| 4 | 148,0 | — | 146,7 | — |
| 5 | 114,8 | 6,91 (d, j=8,20 Hz) | 114,6 | 6.91 (d) |
| 6 | 123,2 | 7,07 (dd, J=8,25 e 1,95 Hz) | 122,9 | 7.07 (dd) |
| 7 | 144,8 | 7,60 (d, J=15,9 Hz) | 144,6 | 7.61 (d) |
| 8 | 115,8 | 6,29 (d, J=15,9 Hz) | 115,6 | 6.29 (d) |
| 9 | 167,5 | — | 167,3 | — |
| CH ₃ O | 56,1 | 3,92 (s) | 55,90 | 3,90 (s) |
| 1' | 64,8 | 4,18 (t) | 64,6 | 4,18 (t) |
| 2' | 32,09 | 1,69 (m) | 31,8 | 1,64 (m) |
| 3' | 29,86 | 1,29 (m) | 29,6 | 1,25 |
| 4' | 29,82 | | | 1,25 |
| 5' | 29,76 | | | 1,25 |
| 6' | 29,71 | | | 1,25 |
| 7' | 29,59 | | | 1,25 |
| 8' | 29,52 | | | 1,25 |
| 9' | 29,47 | | | 1,25 |
| CH ₃ | 14,3 | 0,87 (m, J=6,8; 3H) | 14,1 | 0,86 (t) |

3.2 Identificação de Ac-2

O espectro de RMN de ^1H (figuras 12, 13 e 14; págs. 83-85) mostrou sinais sugestivos de prótons ligados a carbono sp^2 com estereoquímica *trans* em δ_{H} 7,62 (d, J=15,9 Hz, 1H) e 6,30 (d, J=15,9 Hz, 1H) e 2 sinais característicos de prótons

aromáticos em δ_H 7,43 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H) e δ_H 6,83 (d, $J=8,6$ Hz, 2H), típicos de sistema AA'BB' [31]. Foram vistos ainda um singlete largo (1H) em δ_H 4,18 (t, $J= 6,7$ Hz, 1H), δ_H 1,69 (m), δ_H 1,37 (m) e 0,87 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H), semelhantes àqueles vistos para o Ac-1 [29].

No espectro de RMN de ^{13}C pela técnica APT (figura 15, pág. 86) foram visualizados sinais para carbonos metínicos (δ_C 167,7; 157,7; 127,6; 144,3; 116,0 e 115,1), para carbonos metilênicos (δ_C 64,8; 32,08; 29,86; 29,81; 29,75; 29,74; 29,70; 29,52; 29,46 e 29,43) e um sinal para o carbono metílico em δ_C 14,3. Esses sinais permitiram identificar uma cadeia alifática na molécula, pois foram semelhantes aos da literatura [32].

No mapa de correlação heteronuclear HSQC (figura 16, pág. 87) foram vistos os acoplamentos entre δ_H 7,62/ δ_C 144,3 e δ_H 6,30/115,1; δ_H 7,43/ δ_C 130,1 e δ_H 6,83/ 156,0 e no HMBC foram visualizadas interações de δ_H 7,62/ δ_C 155,1; 167,7 e 127,5; o que confirmou δ_H 7,62 e δ_H 6,30 para os hidrogênios 7 e 8 e δ_C 167,7; 127,5 e 130,1 para os carbonos 9, 1 e 2 respectivamente.

No HMBC (figura 17, pág. 88), as interações entre δ_H 6,83/ δ_C 157,7; 130,1 e 127,5 e de δ_H 7,43/ δ_C 116,0; 157,7; 127,5 e 144,3 confirmaram δ_H 6,83 e δ_H 7,43 para os hidrogênios 3 e 5 e 2 e 6, respectivamente. E, por exclusão δ_C 157,69 para a hidroxila no carbono 4. No HSQC observou-se correlação de δ_H 4,18/ δ_C 64,8 e no HMBC entre δ_H 4,18/ δ_C 167,7 e 32,1; confirmando δ_H 4,18 para a posição C-1'.

Desta forma, a comparação de Ac-2 com Ac-1, além dos dados da literatura permitiram identificar os compostos em questão como sendo o 2-ácido propenóico, 3-(4-hidroxifenil)- decil éster (figura 2). Esse composto já foi descrito em várias famílias botânicas [32]. Mas, assim como o ferulato Ac-1 é a primeira descrição feita do seu isolamento a partir de *A. congestiflora* ou do gênero *Apodanthera*.

Figura 2. Composto Ac-2, isolado da FA-Ac da *Apodanthera congestiflora*

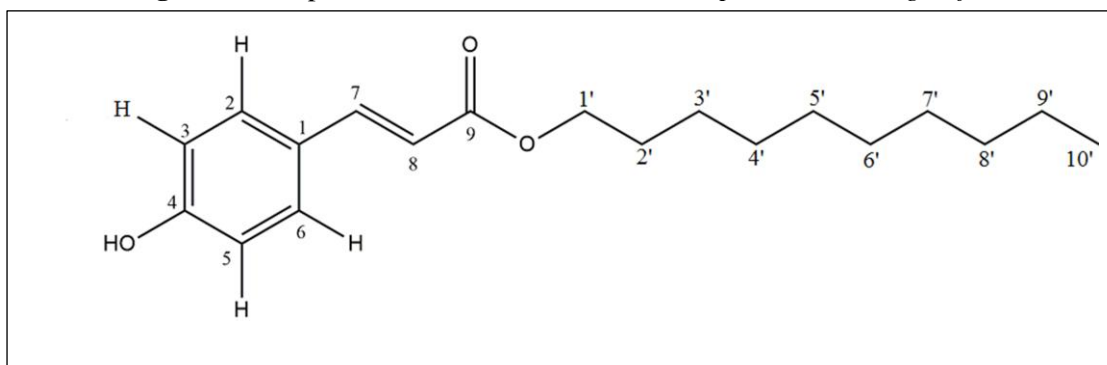


Tabela 3. Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) e H (CDCl_3 , 400 MHz) do composto Ac-2 em comparação com os dados da literatura [32]

| C | Ac-2 | | p-Cumarato de nonadecila (Correia et al., 2003) | |
|-----------------------|---------------------|---------------------------|--|---------------------|
| | δ_{C} | δ_{H} | δ_{C} | δ_{H} |
| 1 | 127,5 | ----- | | ----- |
| 2 | 130,2 | 7,43 (d, J= 8,6 Hz, 1H) | 129,8 | 7,43 (J= 8 Hz) |
| 3 | 116,0 | 6,83 (d, J= 8,6 Hz, 1H) | 115,4 | 6,84 (J= 8 Hz) |
| 4 | 157,7 | ----- | 158,0 | ----- |
| 5 | 116,0 | 6,83 (d, J= 8,6 Hz, 1H) | 115,4 | 6,84 (J= 8 Hz) |
| 6 | 130,2 | 7,43 (d, J= 8,6 Hz, 1H) | 129,8 | 7,43 (J= 8 Hz) |
| 7 | 144,3 | 7,62 (J= 15,1 Hz) | 144,2 | 7,62 (J= 17 Hz) |
| 8 | 115,1 | 6,30 (J= 15,9 Hz) | 115,8 | 6,30 (J= 17 Hz) |
| 9 | 167,7 | ----- | 167,5 | ----- |
| 1' | 64,7 | 4,18 (t, 6,5 Hz) | 65,0 | 4,20 (t, 6,8 Hz) |
| 2' | 32,08 | 1,69 (m) | | |
| 3' | 29,86 | | 29,6 | |
| 4' | 29,81 | | | |
| 5' | 29,75 | | | |
| 6' | 29,74 | | | |
| 7' | 29,70 | | | |
| 8' | 29,52 | | | |
| 9' | 29,46 | | 29,2 | |
| CH₃ | 14,3 | 0,87 (t, J= 6,8 Hz, 3 Hz) | 14,1 | 0,85 (t, J=7,5 Hz) |

3.3 Identificação dos compostos Ac-3 e Ac-4

O espectro de RMN de ^1H (figuras 18-21, págs. 78-81) mostrou a presença dos sinais em δ_{H} 6,56 (1,1H); δ_{H} 6,87(d, $J=10,1$ Hz; 1H) 5,79 (dd, 6,3 e 10,1 Hz, 1H); e 0,93 (s,3H); 0,99 (s,3H); 1,22 (s,3H); 1,38 (s, 3H); 1,42(s, 6H) e 2,22 (s,3H). Sendo os três primeiros sugestivos de hidrogênio ligados a carbono sp^2 e os demais característicos de grupamentos metila. Foram vistos ainda no espectro de RMN de ^{13}C , utilizando a técnica APT (figuras 22-24, págs. 82-84), o sinal em δ_{C} 216,7; característico de carbonila cetônica saturada, que juntamente com as metilas citadas e dados da literatura permitem sugerir que a molécula em questão trata-se de um triterpeno tetracíclico de núcleo cucurbitano [33].

A presença do próton aromático em δ_{H} 6,56 que no mapa de correlação heteronuclear HSQC ($\text{H}^1 \times \text{C}^1$) (figuras 25-27, págs. 96-98) mostrou acoplamento com δ_{C} 112,56 e no mapa de correlação heteronuclear HMBC (figura 28, pág.99), com δ_{C} 145,2; 145,9; 129,7 e 128,2 permitem inferir a presença de um anel aromático pentassubstituído com um núcleo do tipo 2,3-di-*o*-glicosil, corroborado pela presença de sinais entre δ_{H} 3,35- 4,62 e que comparados a valores da literatura sugerem a presença de um açúcar na molécula (tabela 4) [34].

O sinal em δ_{H} 2,22 correlacionado no HSQC com δ_{C} 11,2 e no HMBC com δ_{C} 123,3; 145,9 e 128,2; é característico de metila aromática e permite evidenciar, juntamente com os dados descritos na literatura, que a molécula em questão tem um núcleo de uma norcucurbitacina do tipo Fevicordina [36-37]. Além disso, foi visualizado no HSQC correlação entre δ_{H} 4,61/104,9 e no HMBC de δ_{H} 4,62/145,2; o que permitiu definir que a molécula de açúcar estava ligada ao carbono 2, sendo do tipo β -glicose [34].

No HSQC foram vistas também correlações entre δ_{H} 6,9/ δ_{C} 126,1; δ_{H} 5,8/ δ_{C} 127,2 δ_{H} 2,55/ δ_{C} 48,1; δ_{H} 1,22/ δ_{C} 26,6; δ_{H} 2,72 e 3,01/ δ_{C} 52,1; sugerindo esses sinais para as posições 6, 7, 8, 19 e 12, respectivamente, sendo confirmados pelas atribuições do HMBC de δ_{H} 6,87/ δ_{C} 48,1; 128,24; 127,2 e 129,7; δ_{H} 5,79/ δ_{C} 128,2; 48,1 e 48,9; δ_{H} 2,55/ δ_{C} 18,0; 26,6; 48,9; 50,4; 126,1; 127,2 e 216,2 δ_{H} 1,22 / δ_{C} 48,2; 216,2 e δ_{H} 2,7 e 3,01/ δ_{C} 216,2; 50,4; 48,9; o que permitiu atribuir às metilas em δ_{H} 1,2; 0,9 e 1,0 às posições 28, 18, e 30 e a carbonila para a posição 11.

No anel D da norcucurbitacina foi possível visualizar correlações no HSQC entre δ_{H} 1,37 e 2,03/ δ_{C} 44,8; δ_{H} 4,4 (tl, 7,6 Hz, 1,H) e de δ_{H} 2,44 (d, $j=7,3$ Hz , 1H)/

δC 59,9 e no HMBC de δH 1,37 e 2,03 δC 50,4; 59,9; 71,8; de δH 4,45/48,9; 59,9; 80,8 e de δH 2,44/25,5; 18,1; 71,8 e 80,8 e 216,2; o que permite atribuir δH 1,37 e 2,03 δh 4,45 e δH 2,44 às posições 15, 16, e 17 e δC 25,5; δC 80,8 e 216,7 para os carbonos 21, 20 e 22, respectivamente. O mapa de correlação homonuclear NOESY (H^1 X H^1) (figura 29, pág. 89) mostrou correlações entre δH 0,93 e δH 2,44 de δH 1,22/ δH 2,55 e de δH 2,5; confirmando as metilas das posições 18, 19 e 30, com as configurações β , β e α , respectivamente.

A cadeia lateral da molécula foi confirmada pelas observações já visualizadas no HMBC entre δH 2,44 e δC 80,8 e 216,7, sendo possível observar ainda correlações no HSQC dois multipletos (2H) em δH 2,69 e 2,77/ δC 32,8 e δH 1,98/ δC 35,8 e dois singletos em δH 1,42/ δC 26,21 (3H) em δH 1,42/ δc 26,30 sugestivos de grupamentos metílicos. As correlações vistas no HMBC entre δH 2,69 e 2,77/ δc 216,8; 35,8 e 83,1; de δH 1,98/ δc 216,7; 32,8; 83,1; 26, 2 e 22, 3 entre δH 1,42/ δc 83,1 e 35,8 fornecem subsídios para definir os seguintes carbonos (δc) 32,83, 35,76; 83,10; 26,21; 26,30 para as posições 23, 24, 25, 27 e 26, respectivamente. Foi visto também um sinal em δH 1,92 (s, 3H) correlacionando no HSQC com δc 22,3 e no HMBC com δc 172,5 e 83,1; permitindo atribuir a presença de grupo acetoxi para a posição 25.

A análise dos dados de RMN de 1H e ^{13}C utilizando técnicas uni e bidimensionais, e comparação com dados da literatura (tabela 5) [35] permitiu identificar o Ac-3 como sendo o 29-nor-1,2,3,4,5,10-dehidro-25-O-acetil-2-O- β -D-glicopiranosil-3,16- α , 20 (R)-trihidroxi-11,22-dioxocurbita-6,23, dieno (figura 3).

Figura 3. Composto Ac-3, isolado da FA-Ac da *Apodanthera congestiflora*

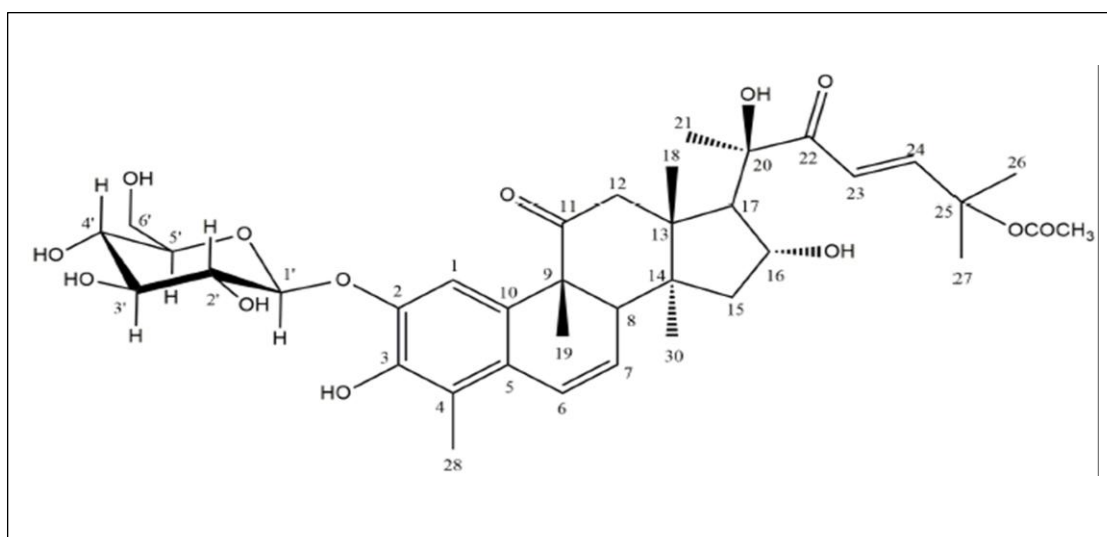


Tabela 4. Dados de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) e ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do composto Ac-3

| C | Ac-3 | | δ_{C} [35] | δ_{H} [35] |
|----|---------------------|---------------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| | δ_{C} | δ_{H} | | |
| 1 | 112,56 | 6,58 | 108,30 | 6,42 s |
| 2 | 145,19 | — | 147,26 | — |
| 3 | | — | 137,16 | — |
| 4 | 123,29 | — | 128,43 | — |
| 5 | 128,24 | — | 126,29 | — |
| 6 | 127,14 | 6,87 | 125,86 | 6,75 d(10) |
| 7 | 126,12 | 5,79 | 124,74 | 5,73 dd (10,6) |
| 8 | 48,15 | 2,55 | 45,99 | 2,70-2,50m |
| 9 | 51,95 | — | 50,82 | — |
| 10 | 129,72 | — | 136,16 | — |
| 11 | 216,17 | — | 212,32 | — |
| 12 | 51,94 | — | 51,17 | 2,96 dd (14,7 e 5,1) 2,82 d(14,7) |
| 13 | 50,45 | — | 47,83 | — |
| 14 | 18,07 | 0,93 | 48,59 | — |
| 15 | 44,76 | 1,37 e 2,03 | 41,44 | — |
| 16 | 71,81 | 4,45 | 73,86 | 5,20-5,00 m |
| 17 | 59,9 | 2,44(d,7,3) | 54,23 | 2,70-2,50 m |
| 18 | 20,33 | 0,99 | 19,57 | 0,89 s |
| 19 | | 1,22 | 17,61 | 1,27s |
| 20 | 80,81 | — | 78,49 | ----- |
| 21 | 26,2 | — | 23,47 | 1,43 s |
| 22 | 205 | — | 200,81 | ----- |
| 23 | 122,6 | — | 119,29 | 6,36 d (15,6) |
| 24 | 151,6 | 1,98 (m, 2H) | 152,66 | 7,12 d (15,6) |
| 25 | 83,10 | ----- | 80,87 | ----- |
| 26 | 26,30 | 1,42 | 26,38 | 1,52 s |
| 27 | 26,21 | 1,42 | 26,32 | 1,51 s |
| 28 | 11,2 | — | 11,86 | 2,24 s |
| 30 | 18,07 | — | 20,27 | 1,08 s |

No espectro de RMN de ^1H e C^{13} de Ac-3 foi possível visualizar alguns outros sinais, muitos dos quais duplicados no C^{13} , contudo com algumas pequenas diferenças, que forneceu subsídios para identificar uma segunda norcurbitacina, que pela integração dos picos dos prótons parece ser 2:1.

Os dados de RMN de ^1H mostraram dois picos em δH 6,97 (d, $J=15,8$ Hz, 1H) e δH 6,79 (d $J=15,8$ Hz, 1H) sugestivos de acoplamento trans. No mapa de correlação HSQC foi possível visualizar correlação de δH 6,97/151,6 e de δH 6,79/ δC 122,6 e no mapa de correlação HMBC visualizou-se acoplamentos de δH 6,97/ δC 83,1; 26,6; 26,6; 122,6; e 205,3 e de δH 6,79/ δC 81,1; 83,1; 151,6 e 205,3; confirmando δH 6,97 e δH 6,79 para os hidrogênios das posições 24 e 23 e δC 205,3; 83,1, 26,6 e 26,6 e 81,1 para os carbonos 22, 25, 26, 27, e 20, respectivamente. Ainda foi possível incrementar o grupo acetoxi na posição 25 pelas correlações vistas no HSQC entre δH 1,98/ δC 21,9 e no HMBC entre δH 1,98/171,9 e 83,1.

Essa sumarização dos dados de RMN de ^1H e C^{13} (figuras 16-21), aliados aos dados da literatura (Tabela 6) permitiu identificar o Ac-4 como sendo o 29-nor-1,2,3,4,5,10-dehidro-25-O-acetil-2-O- β -D-glicopiranosil-3,16 α , 20 (R)-trihidroxi-11,22-dioxocurbita-6-eno, conhecido por fevicordina A, isolada pela segunda vez [35] (figura 4).

Figura 4. Composto Ac-4, isolado da FA-Ac de *Apodanthera congestiflora*

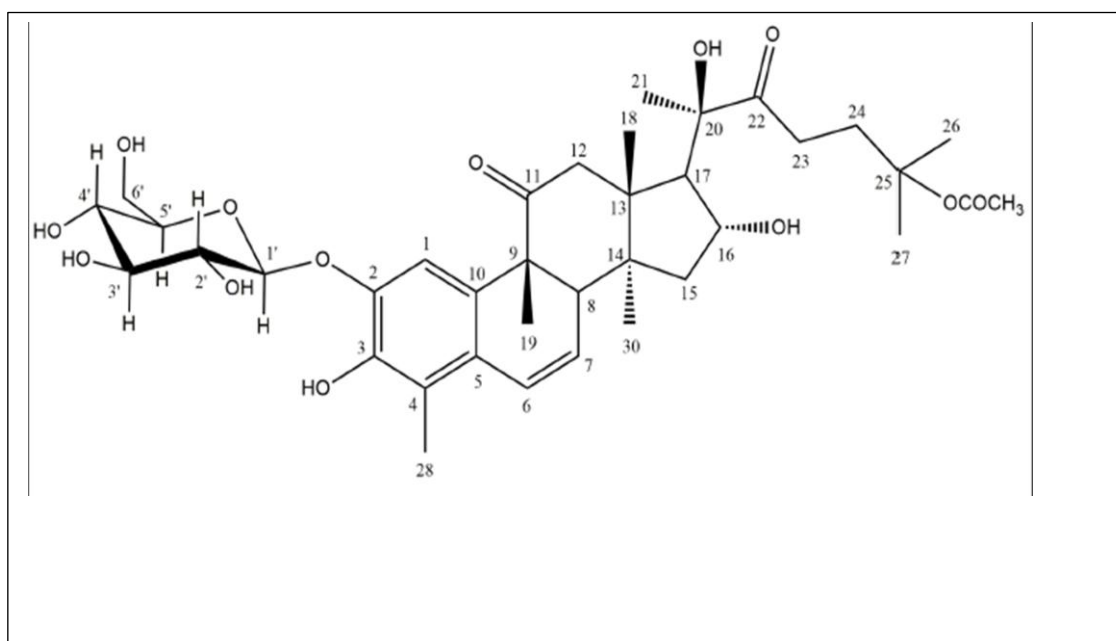


Tabela 4. Dados de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) e ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do composto Ac-4

| C | Ac-4 | | fevicordina A (Matos, 1993) | |
|----|---------------------|---------------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| | δ_{C} | δ_{H} | δ_{C} | δ_{H} |
| 1 | 112,6 | — | 108,3 | 6,42 s |
| 2 | 145,2 | — | 147,3 | — |
| 3 | 145,9 | — | 137,2 | — |
| 4 | 123,3 | — | 128,4 | — |
| 5 | 128,2 | — | 126,3 | — |
| 6 | 126,1 | 6,87 | 125,8 | 6,75 d (10) |
| 7 | 127,1 | 5,79 | 124,7 | 5,73 dd (10,6) |
| 8 | 48,1 | 2,55 | 46,0 | 2,70-2,50 m |
| 9 | 51,9 | — | 50,8 | — |
| 10 | 129,7 | — | 136,2 | — |
| 11 | 216,2 | — | 212,3 | — |
| 12 | 51,9 | — | 51,2 | 2,96 dd (14,7 e 5,1) 2,82 d (14,7) |
| 13 | 50,4 | — | 47,8 | — |
| 14 | 18,1 | 0,93 | 48,6 | — |
| 15 | 44,8 | 1,37 e 2,03 | 41,4 | — |
| 16 | 71,8 | 4,45 | 73,8 | 5,20-5,00 m |
| 17 | 59,9 | 2,44 (d,7,3) | 54,2 | 2,70-2,50 m |
| 18 | 20,3 | 0,99 | 19,6 | 0,89 s |
| 19 | 26,6 | 1,22 | 17,6 | 1,27 s |
| 20 | 80,8 | — | 78,5 | — |
| 21 | 26,2 | — | 23,5 | 1,43 s |
| 22 | 216,7 | — | 200,8 | — |
| 23 | — | — | — | — |
| 24 | — | — | — | — |
| 25 | 83,1 | — | 80,8 | — |
| 26 | 26,3 | 1,42 | 26,4 | 1,52 s |
| 27 | 26,2 | 1,42 | 26,3 | 1,51 s |
| 28 | 22,2 | — | — | — |
| 30 | 18,07 | 0,9 | 20,3 | 1,08 s |

3.4 Identificação de Ac-5

O espectro de RMN de ^1H de Ac-5 (figuras 30-32, págs. 101-103) evidenciou um padrão estrutural semelhante aos de Ac -3 e Ac- 4, com sinais em δ_{H} 6,55 (s, 1H); 6,87 (d, $J= 10,1$, 1H) e 5,80 (dd, $J= 6,3$ e $10,1$ Hz, 1H), característicos de prótons ligados a carbonos sp^2 e em 1,22; 1,01; 0,93; 1,38; 1,16; 1,17 e 2,22; singletos com integral para três hidrogênios, sugestivos de grupamentos metílicos, sendo o último sinal condizente com metila aromática de esqueleto de triterpeno do tipo norcucurbitano. O sinal em δ_{H} 6,55 mostrou interação direta, visto no mapa de correlação heteronuclear HMBC (figuras 37-39, págs. 108-110) com δ_{C} 129,7; 128,2; 145,2; 145,7 e 52,1; que também podem ser evidenciados no APT ^{13}C (figuras 33-36, págs. 104-107). Isso sugere também na molécula a presença de um núcleo aromático pentassubstituído [38].

No HSQC (figura 40-41, págs. 100-101) visualizou-se correlação de δ_{H} 4,62/ δ_{C} 104,9 e no HMBC com δ_{C} 145,2. Foi visto também acoplamento de δ_{H} 2,22/ δ_{C} 11,3 no HSQC e de δ_{H} 2,22/ δ_{C} 123,3; 145,7 e 128,2 no HMBC, o que confirmou a presença de uma unidade osídica no carbono 2, do grupamento hidroxil em 3 e da metila em 4 e do próton δ_{H} 6,55 em 1 e, por exclusão, δ_{C} 129,72 e 128,23 para os carbonos 10 e 5, respectivamente.

Os sinais em δ_{H} 6,87 e em δ_{H} 5,80 mostraram correlação direta com δ_{C} 126,10 e δ_{H} 127,24 e correlação indireta com δ_{C} 48,13, 129,72 e 123,34 e δ_{C} 48,13, 52,13, 49,02 e 128,23, confirmando δ_{H} 6,87 e δ_{H} 5,80 para os hidrogênios 6 e 7 e δ_{C} 48,13, que no HSQC acopla com δ_{H} 2,5; 52,1; 49,0 para os carbonos 8, 9 e 14, respectivamente. A metila em δ_{H} 1,22 foi vista no HSQC com δ_{H} 26,62 e no HMBC com δ_{C} 52,1 e 216,3; o que confirmou sua presença no C-9 e um grupamento ceto no C-11. As correlações de δ_{H} 2,72 e 3,02 (d, $J=14,6$ Hz, 1H) δ_{C} 51,9 no HSQC e de δ_{H} 2,72 e 3,02/ δ_{C} 216,3; 52,1; 50,5; 20,3 e 49,0 no HMBC permitiram atribuir os hidrogênios δ_{H} 2,7 (α) e 3,02 (β) para a posição 12 e os valores de δ_{C} 50,5 e 20,3 para o carbono 13 e a metila em 18, respectivamente.

Foram vistos ainda as seguintes correlações no HSQC: δ 0,93/18,1; δ_{H} 1,37 e 2,04/44,7; δ_{H} 4,43 (t, $J= 7,5$ Hz, 1H)/71,8 e δ_{H} 2,46 (d, $J= 7,3$ Hz, 1H)/ δ_{C} 59,7; (figura 39) e no HMBC entre δ_{H} 0,93/ δ_{C} 49,02 e 44,74; δ_{H} 1,37 e 2,04/ δ_{C} 18,1; 59,5; 80,8; 71,8; δ_{H} 4,43/ δ_{C} 49,0; 80,8; 50,5 e δ_{H} 2,46/ δ_{C} 217,4; 71,8; 80,8; 20,3 e 50,49 para os carbonos 30,15,16, e 17, respectivamente.

Na análise dos dados do grupamento osídico pode-se observar no espectro de RMN de H^1 a presença de um dubleto em δH 4,62 ($J=7,6\text{Hz}$, 1H) o que sugere uma configuração β para o substituinte do carbono aromático. Foram vistos ainda os sinais em δh 3,45-3,51(m, 2H), δH 3,35 (m,1H), δH 3,54 (m,1H) e δH 3,83(dd, τ) e δH 3,95 (dd 1H). No HSQC foram observadas as correlações de δH 4,62/ δC 104,88; δH 3,45-3,51 / δC 74,75 e 70,8 δH 3,35/ δC 77,6 δH 3,54/ δC 78,1 e δH 3,83 e 3,95/62,0 e no HMBC de δH 4,62/ δC 74,7; 77,6; 78,1; 105,0 e 145,2 e de δH 3,95/70,8, o que confirma δH 4,62, 3,45; 3,51, 3,35, 3,54 e 3,83/ 3,99 para as posições 1', 2'e 4', 3',5' e 6', respectivamente e a presença de uma β -D glicose ligada ao carbono 2.

A presença de uma cadeia lateral na molécula foi evidenciada pelas correlações no HMBC, de δH 2,46/ δC 80,8 e 217,4 e de δH 1,38/ δC 25,4 no HSQC, e δH 1,38/ δC 80,8; 217,4 e 59,67 (HMBC), confirmando a metila δH 1,38 e o carbono oxi- metínico em C-20 e uma carbonila cetônica em C-22. Os hidrogênios em δH 2,75, δH 1,68; δH 1,16 e δH 1,17 se correlacionam no HSQC com δC 33,2; δC 38,1; δC 29,1 e 29,3 (figura 39-40), sugerindo os dois primeiros sinais para os carbonos 23 e 24 e os dois últimos para as metilas 27 e 26, respectivamente. No HMBC, ocorre correlação de δH 2,75/ δC 38,1; 217,4 e 70,8; de δH 1,68/ δC 217,4; 33,1; 70,8; 29,1 e 29,3; entre δH 1,16/ δC 70,8; 29,3 e 38,0; o que confirmou as posições citadas anteriormente, e por exclusão permitiu definir δC 70,85 para o C-25, sustentando um grupamento hidroxil, de acordo com os dados da literatura. A interpretação dos espectros de RMN de Ac-5, em conjunto com os dados da literatura (Tabela 7) [39], permitiram identificar Ac-5 como sendo o nome 19-norcolesta-1,3,5,10-6-tetraeno-11,22-diona, 2- (β -D-glicopiranosil)-3,16,20,25-tetrahidroxil-4,9,14-trimetil-(9 β , 16 α), conhecido como Cayaposídio C, isolado anteriormente somente de *Cayaponia tayuia*, porém pela primeira vez no gênero *Apodanthera* (figura 5).

Figura 5. Composto Ac-5, isolado da FA-Ac de *Apodanthera congestiflora*

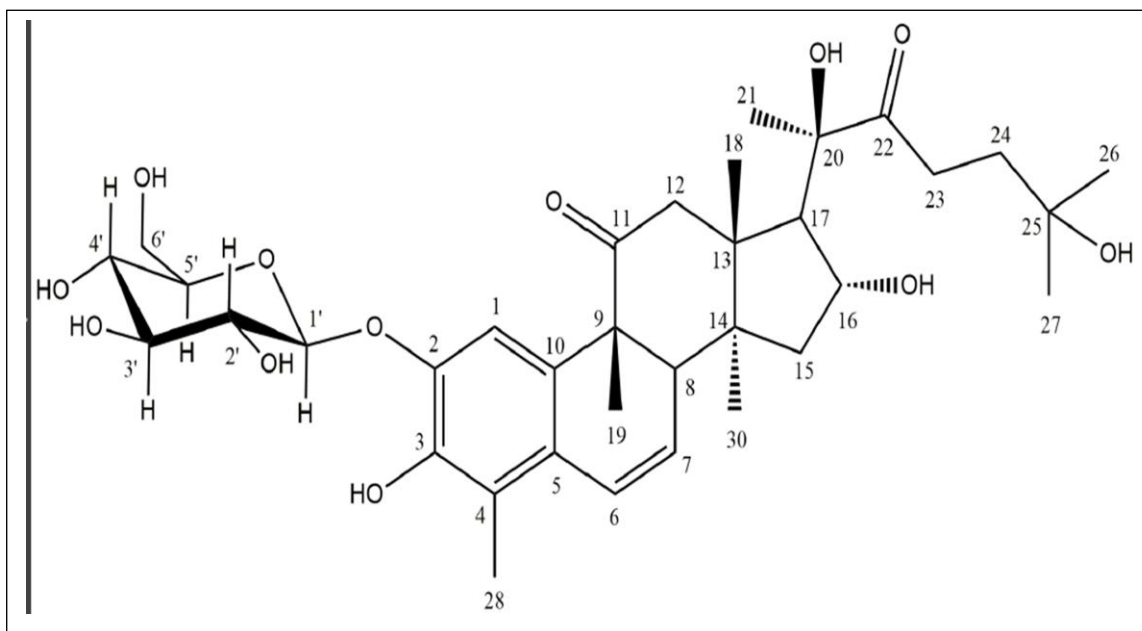


Tabela 7. Dados de RMN de C (CDCl₃, 100 MHz) e H (CDCl₃, 400 MHz) do composto Ac-5 em comparação com os dados da literatura [39]

| Posição | Ac-5 | | Cayaposídio C (Himeno, 1993) | |
|---------|------------|------------------------------|---------------------------------|---------------------|
| | δ_C | δ_H | δ_C | δ_H |
| 1 | 112,6 | 6,51 (s) | 113,6 | 6,57 |
| 2 | 145,2 | _____ | 146,1 | _____ |
| 3 | 145,7 | _____ | 146,5 | _____ |
| 4 | 123,3 | _____ | 124,1 | _____ |
| 5 | 129,7 | _____ | 130,6 | _____ |
| 6 | 126,1 | 6,89 d, ($J = 10,0$) | 126,9 | 6,87 (d, $J=10$) |
| 7 | 127,2 | 5,82 dd, ($J = 10,0, 6,0$) | 128,0 | 5,80 (dd; $J=610$) |
| 8 | 48,1 | 2,56 d ($J = 6,0$) | 49,0 | 2,54 (d, $J=6,0$) |
| 9 | 52,1 | _____ | 52,9 | _____ |
| 10 | 129,7 | _____ | 129,1 | _____ |
| 11 | 216,2 | _____ | 216,8 | _____ |
| 12 | 51,9 | _____ | 52,7 | _____ |
| 13 | 50,4 | _____ | 51,3 | _____ |
| 14 | 49,0 | _____ | 50,4 | _____ |
| 15 | 44,7 | _____ | 45,6 | _____ |
| 16 | 71,7 | _____ | 72,6 | _____ |
| 17 | 59,9 | _____ | 60,5 | _____ |
| 18 | 20,3 | 0,93 (s) | 21,1 | 0,94 (s) |
| 19 | 26,6 | 1,22 (s) | 27,4 | 1,22 (s) |
| 20 | 80,7 | _____ | 81,6 | _____ |
| 21 | 25,4 | 1,39 (s) | 26,2 | 1,39 (s) |
| 22 | 217,4 | _____ | 218,0 | _____ |
| 23 | 33,1 | _____ | 33,9 | 2,7-2,8 (m) |
| 24 | 38,0 | _____ | 38,9 | 1,7 (m) |
| 25 | 70,8 | _____ | 71,6 | _____ |
| 26 | 29,3 | 1,16 | 30,2 | 1,17 (s) |
| 27 | 29,1 | 1,17 | 29,9 | 1,17 (s) |
| 28 | 11,2 | 2,22 | 12,0 | 2,22 (s) |
| 30 | 18,0 | 1,01 | 18,9 | 1,01 (s) |

4 CONCLUSÃO

A pesquisa de compostos bioativos oriundos de espécies nativas da Caatinga é algo relevante, tanto do ponto de vista econômico, quanto no aspecto do desenvolvimento local e preservação dessas espécies. Dessa forma, o estudo desenvolvido foi importante porque realizou o isolamento de constituintes químicos de uma cucurbitácea endêmica do semiárido nordestino.

Os ésteres fenólicos ferulato e p-cumarato que foram isolados já são conhecidos amplamente na literatura. No entanto, foram isolados pela primeira vez no gênero *Apodanthera* e na espécie em estudo.

Os triterpenos obtidos pertencem à classe das norcucurbitacinas, uma subdivisão das cucurbitacinas que possuem um esqueleto biogeneticamente incomum e poucos estudos descritos e, de forma geral, o isolamento desses compostos químicos é pioneiro na *Apodanthera congestiflora*.

O isolamento de compostos fenólicos e triterpenos, duas classes químicas marcadamente diferentes, foi importante para sugerir uma potencial diversidade de compostos químicos presentes na espécie e incentivar a realização de outros estudos de prospecção fitoquímica.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Figura 6. Espectro de absorção na região do infravermelho (IV) (pastilhas de KBr) do Ac-1 da *Apodanthera congestiflora*

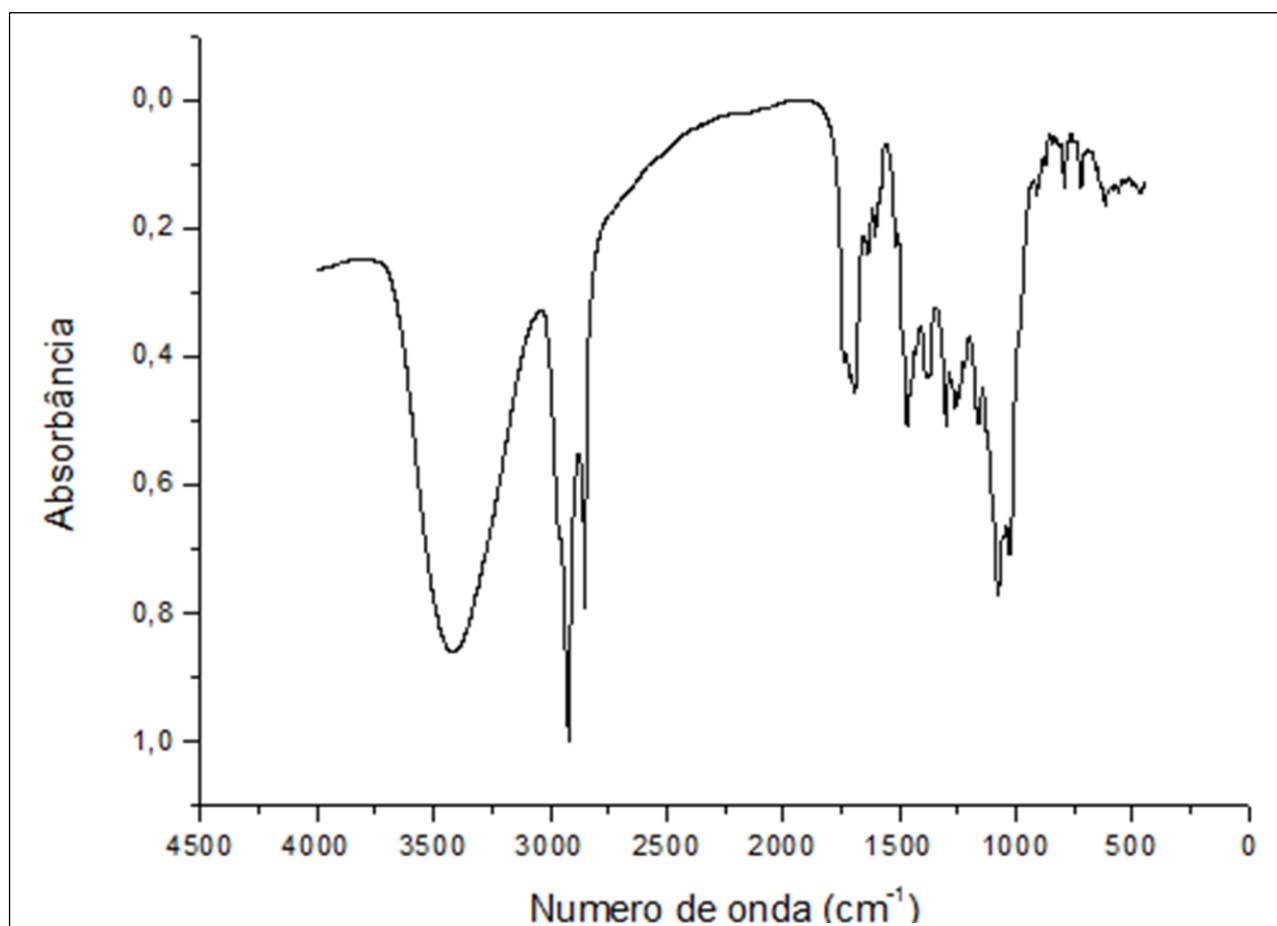


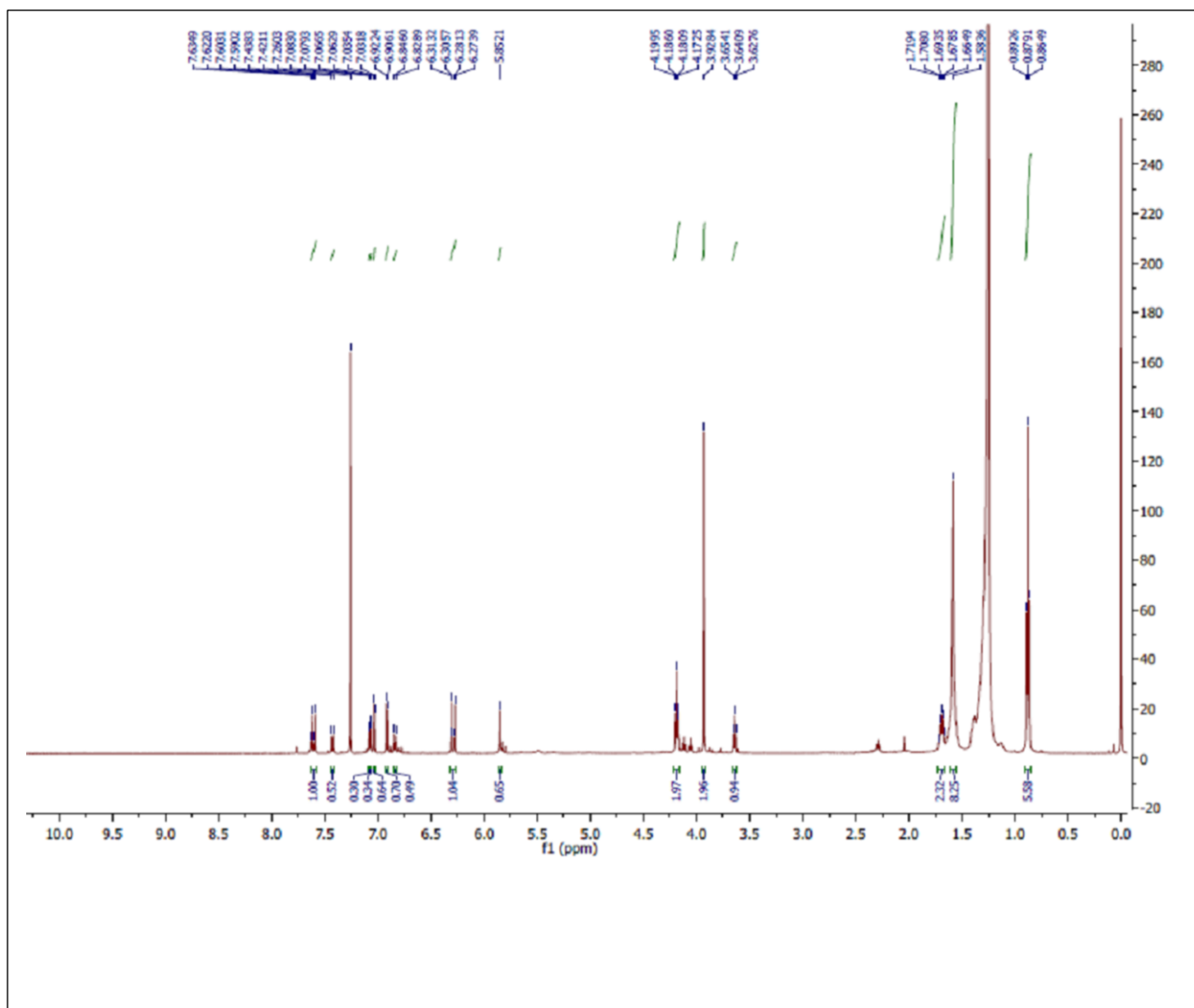
Figura 7. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto Ac-1 de *Apodanthera*

Figura 8. Expansão do Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto Ac-1 de *Apodanthera congestiflora*

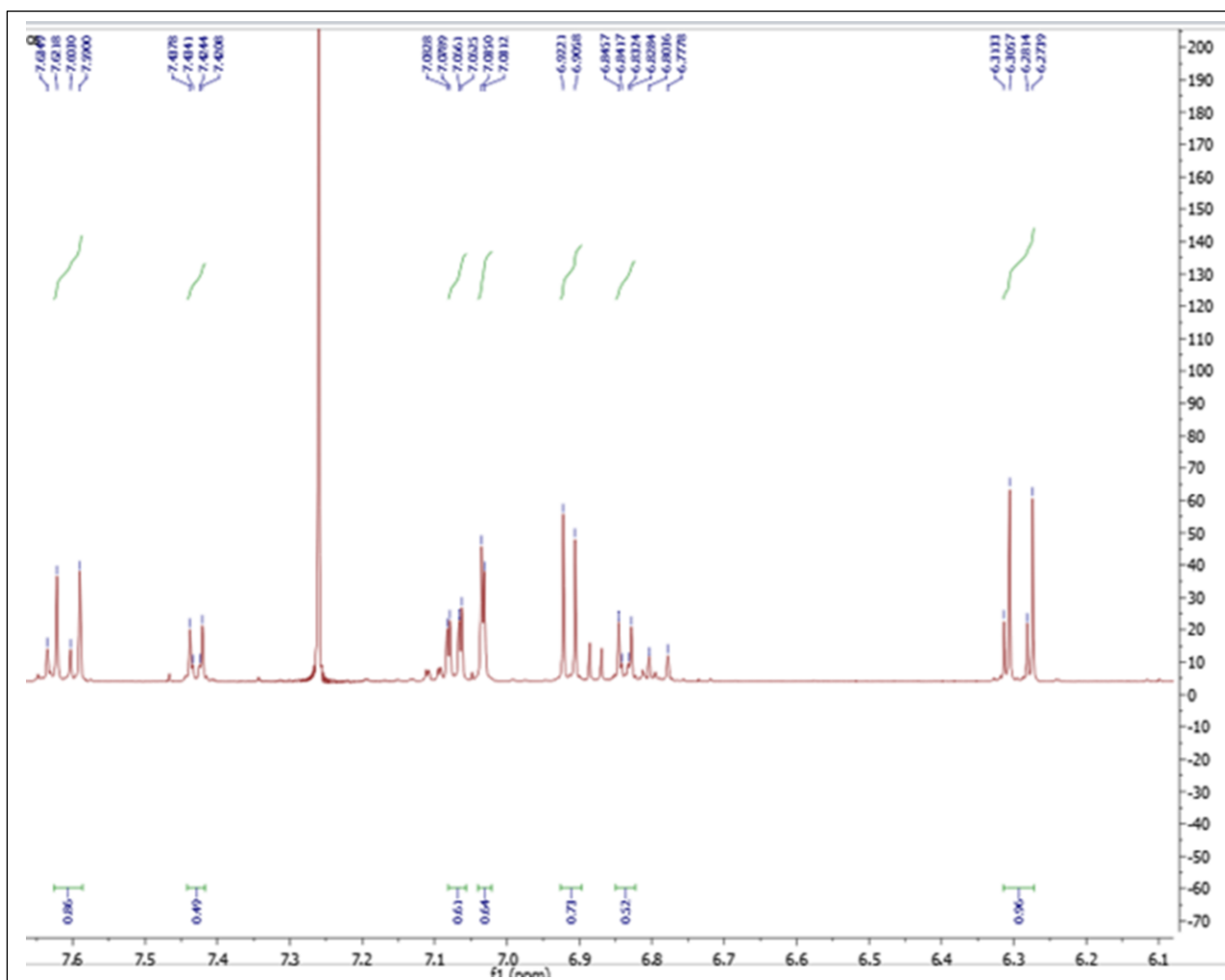


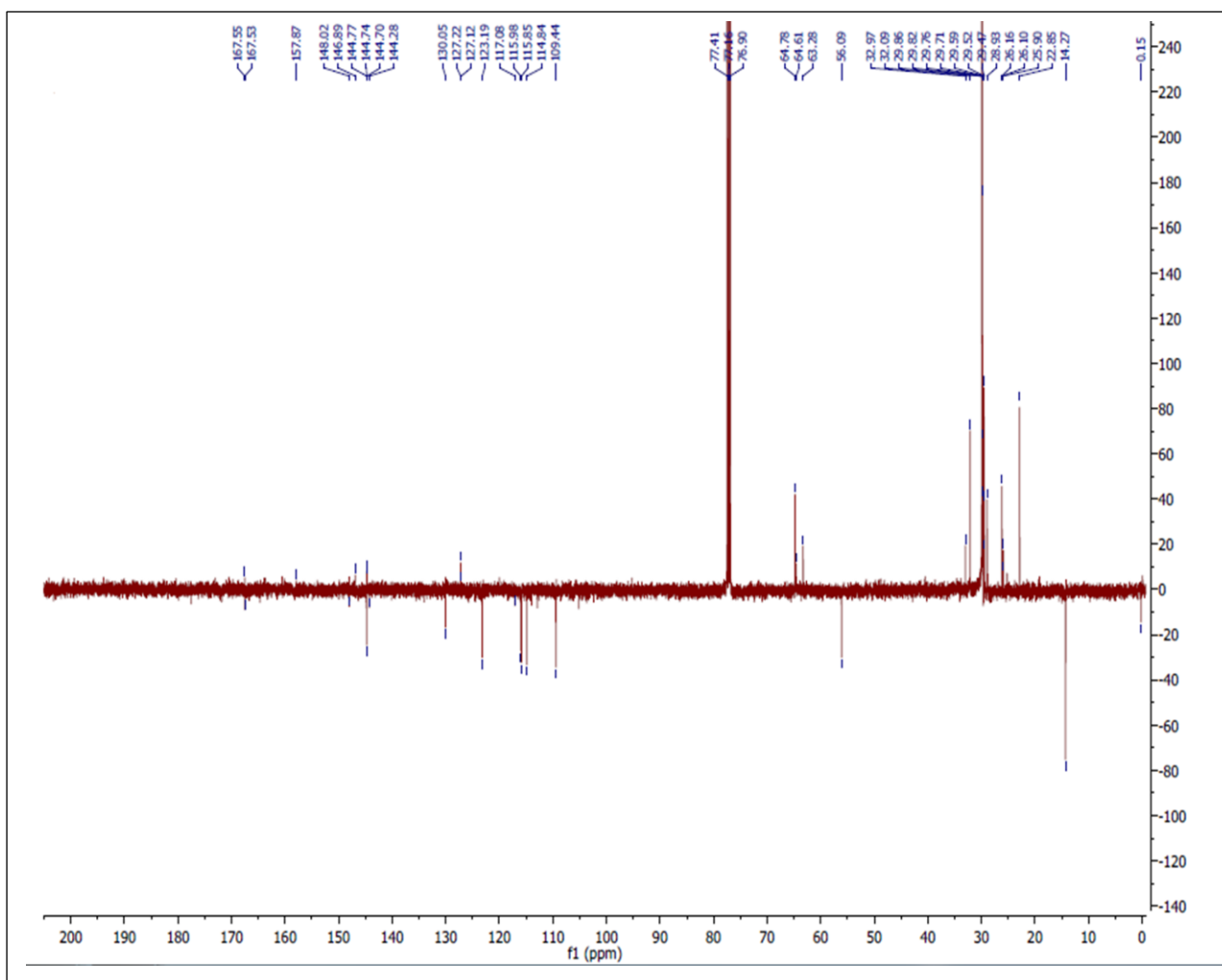
Figura 9. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto Ac-1 de *Apodanthera*

Figura 10. Mapa de correlação heteronuclear HSQC do composto Ac-1 de *Apodanthera congestiflora*

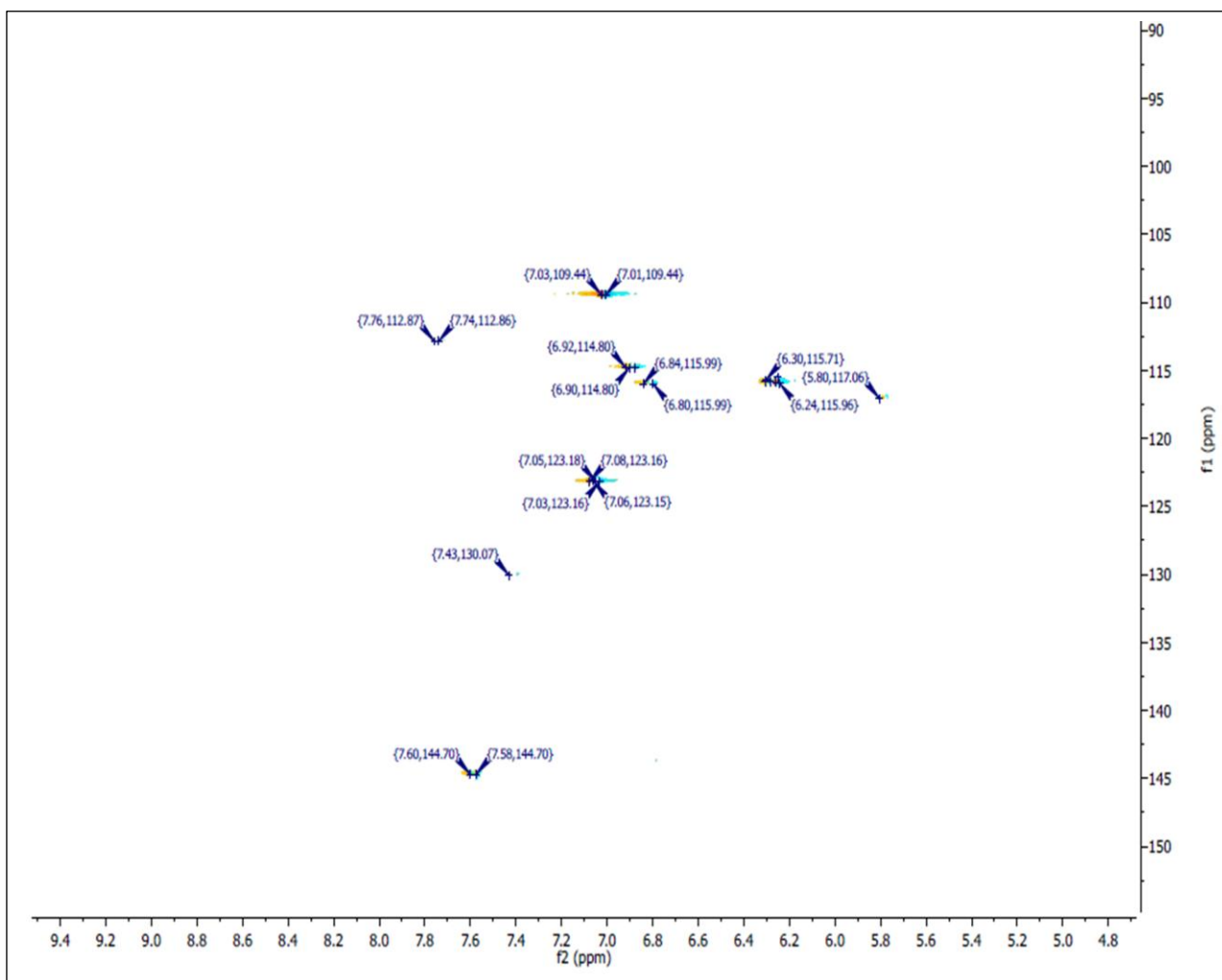


Figura 11. Mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto Ac-1 de *Apodanthera congestiflora*

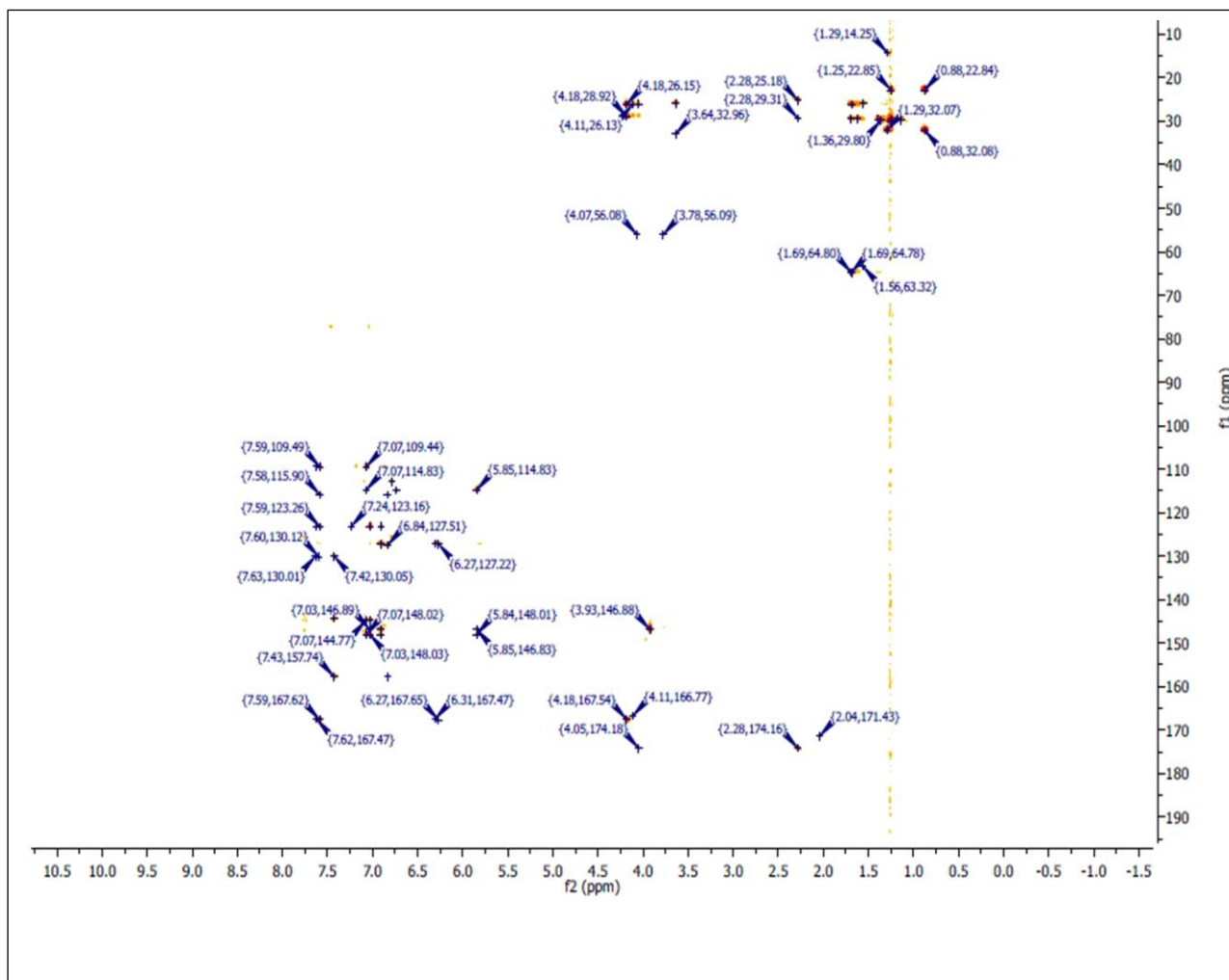


Figura 12. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto Ac-2 de *Apodanthera congestiflora*

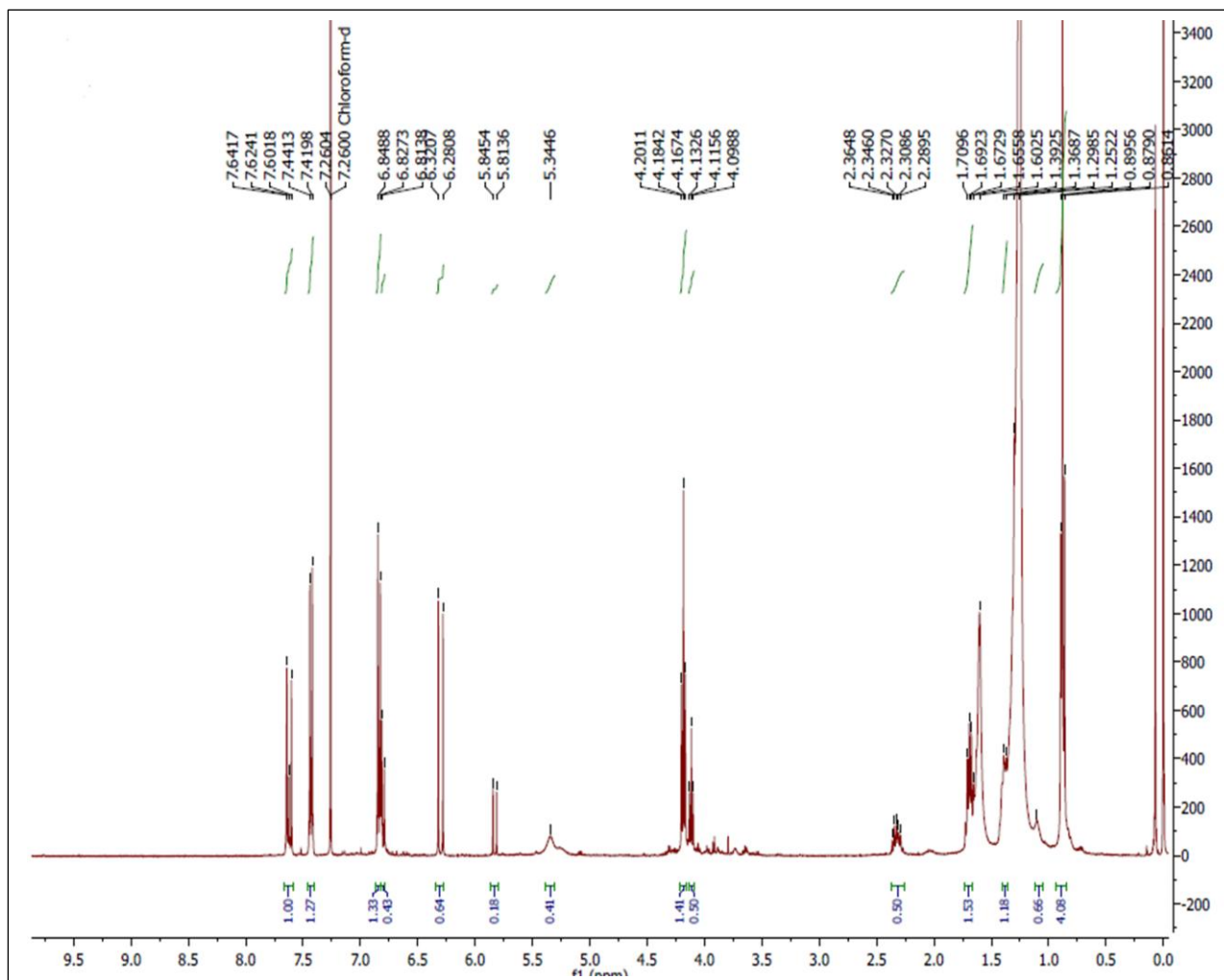


Figura 13. Expansão do espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto Ac-2 da *Apodanthera congestiflora*

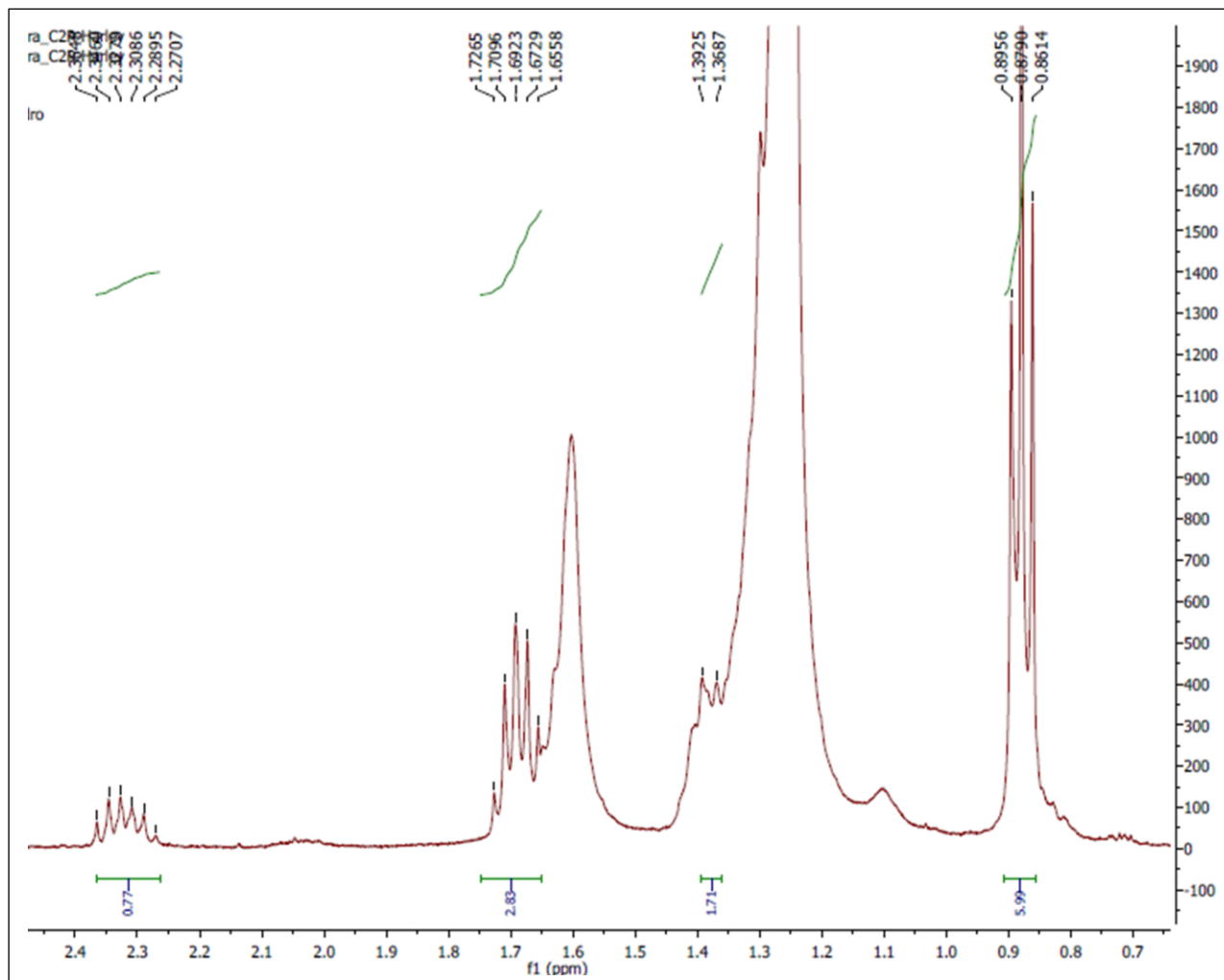


Figura 14. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto Ac-2 de *Apodanthera congestiflora*

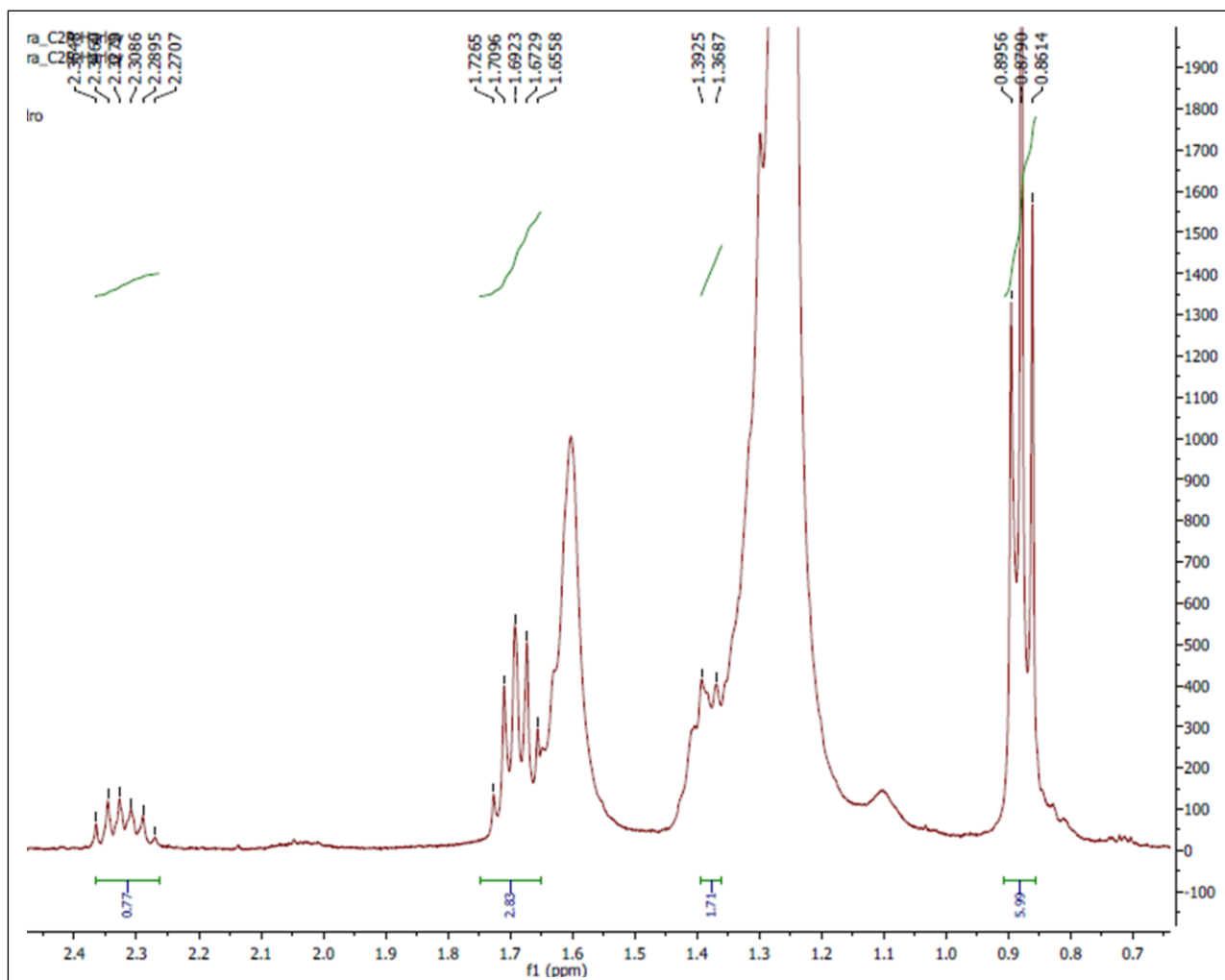


Figura 15. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto Ac-2 de *Apodanthera congestiflora*

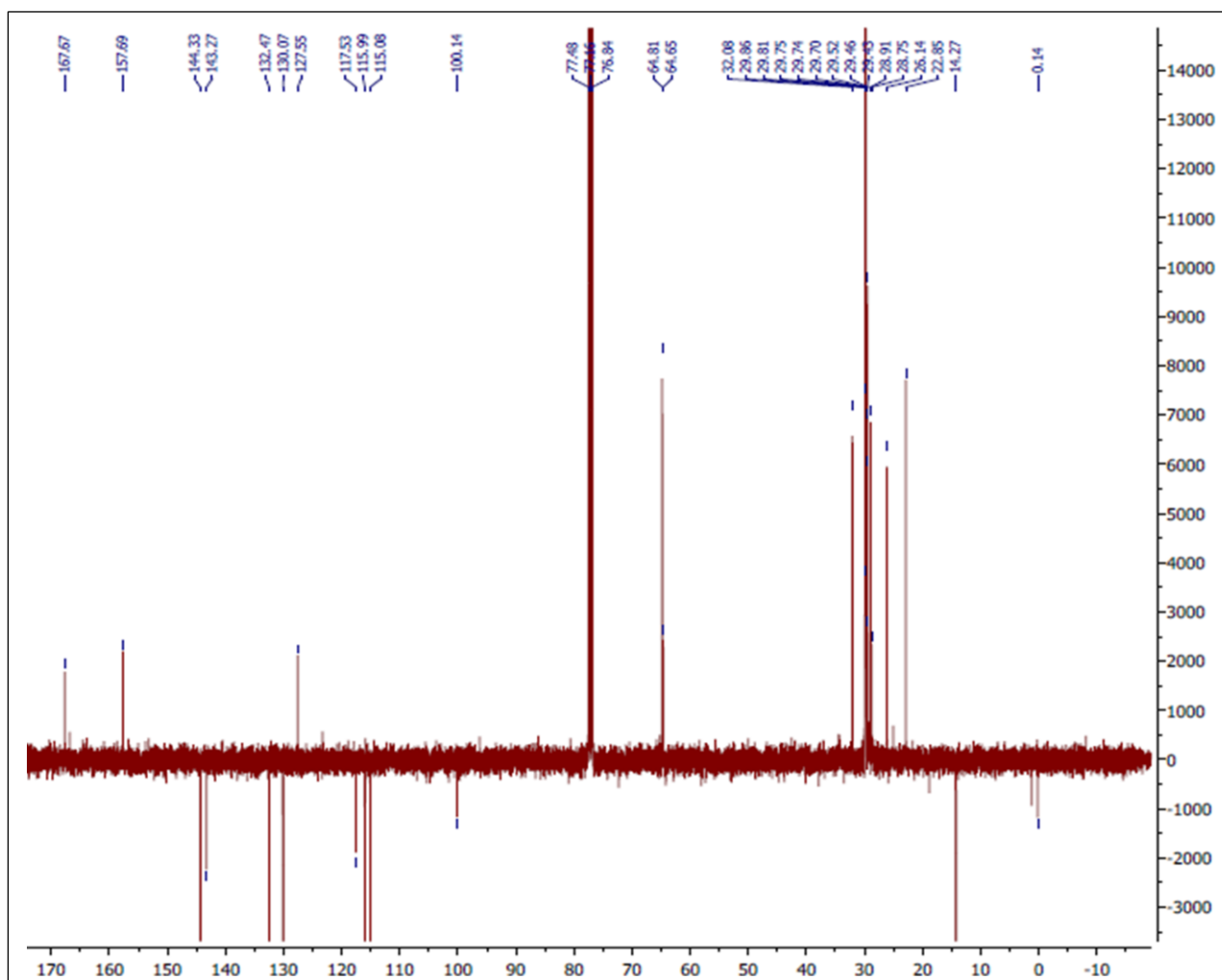


Figura 16. Mapa de correlação heteronuclear HSQC do composto Ac-2 de *Apodanthera congestiflora*

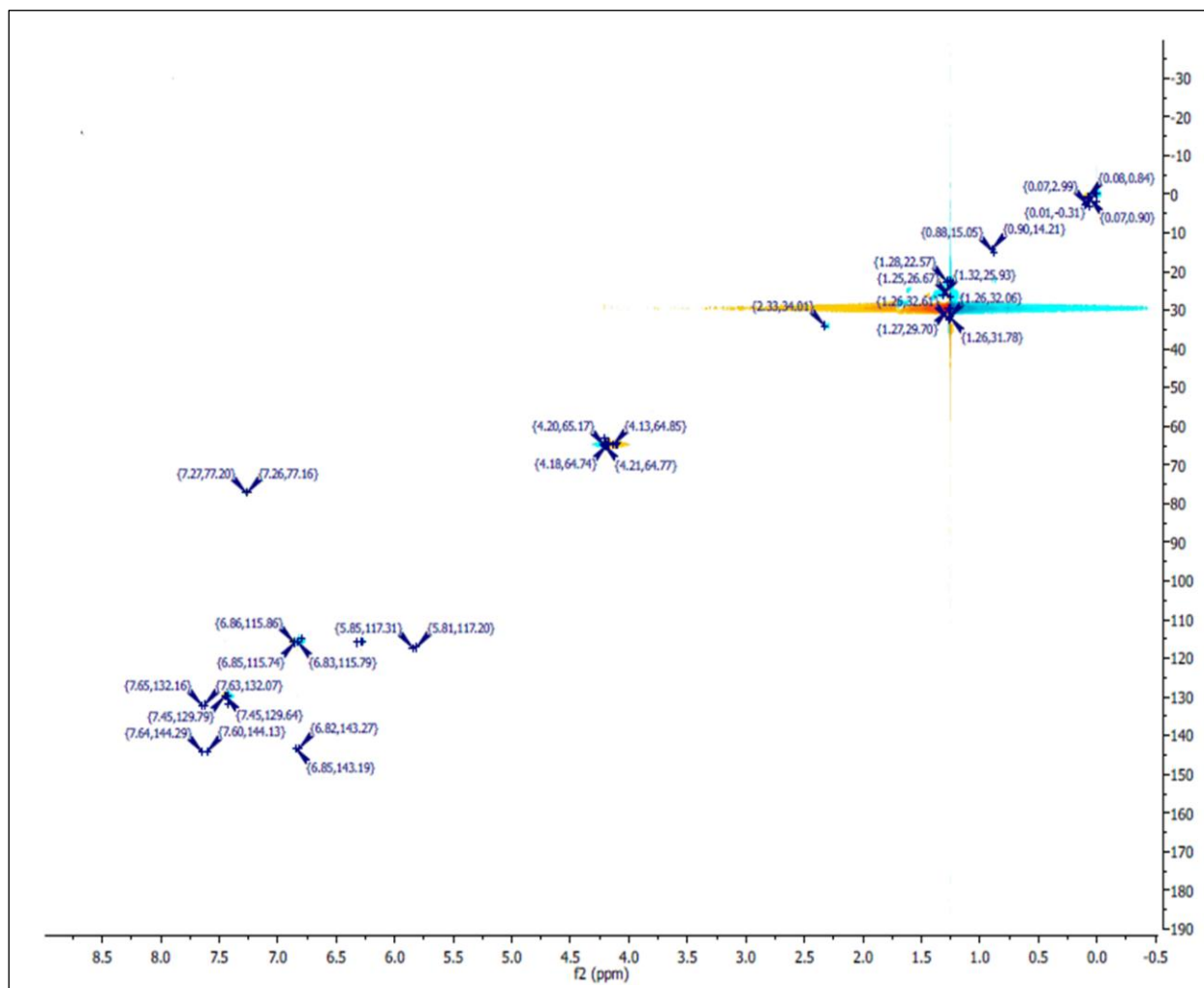


Figura 17. Mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto Ac-2 da *Apodanthera congestiflora*

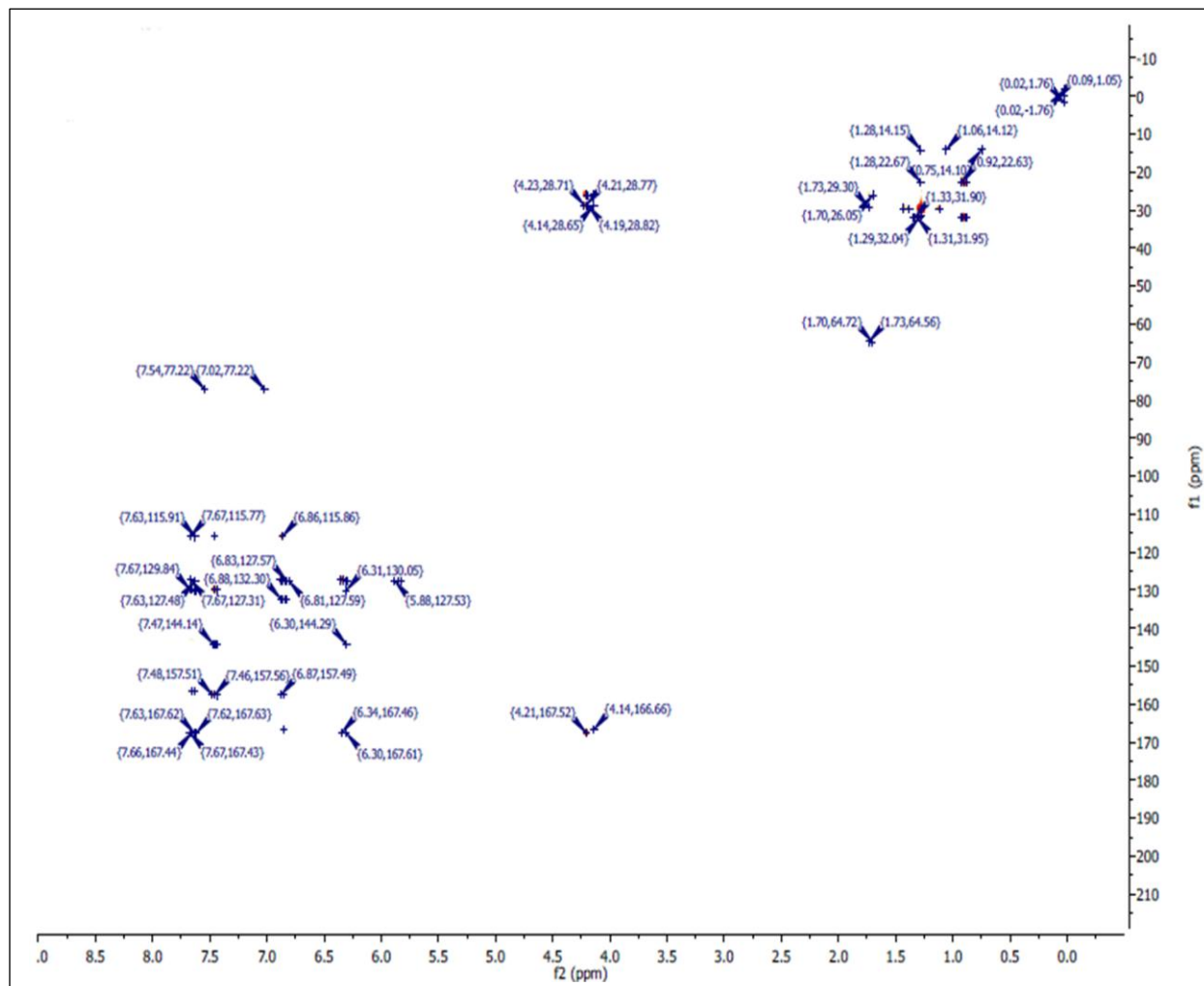


Figura 18. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da mistura de compostos Ac-3 e Ac-4 da *Apodanthera congestiflora*

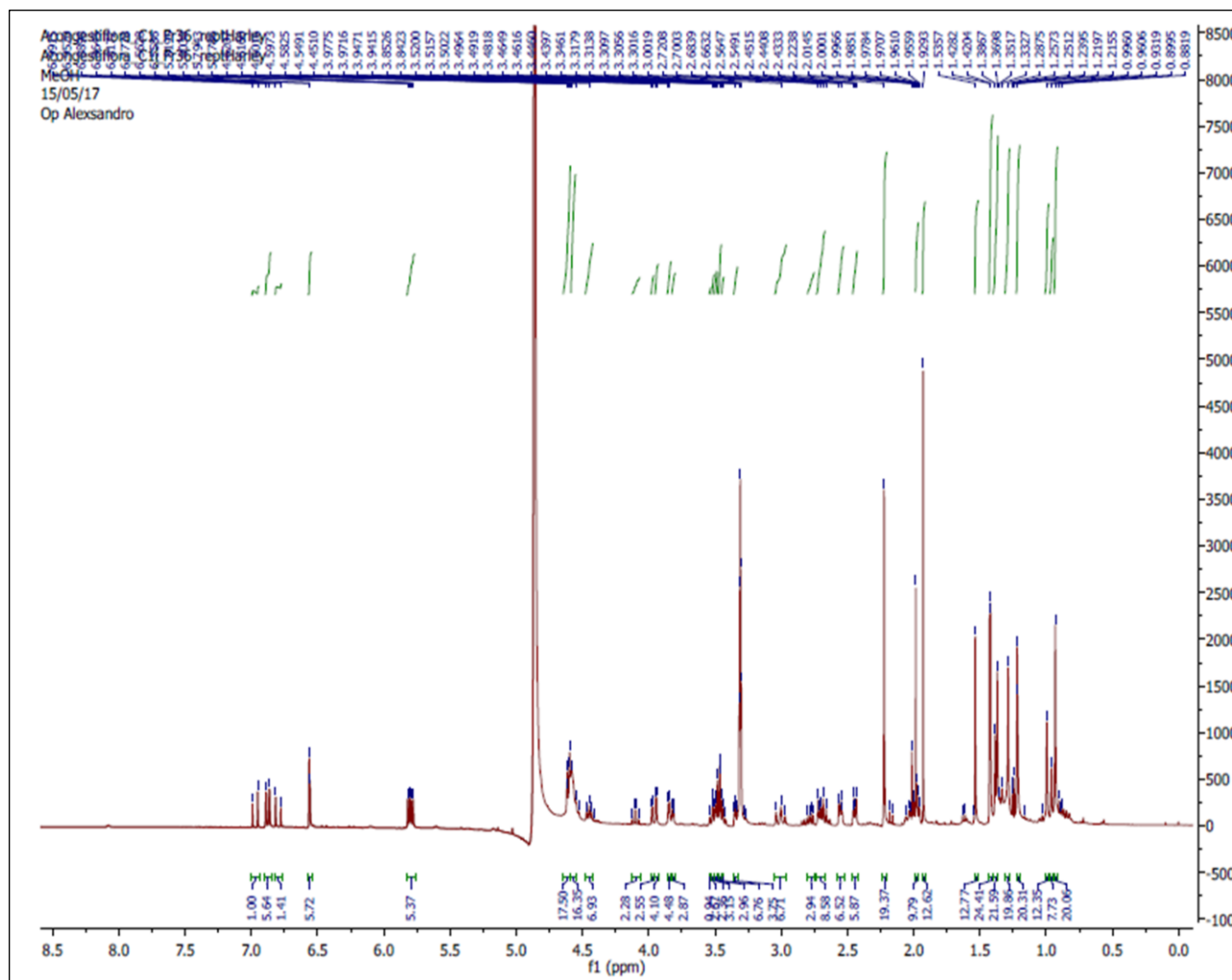


Figura 19. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da mistura de compostos Ac-3 e Ac-4 da *Apodanthera congestiflora*

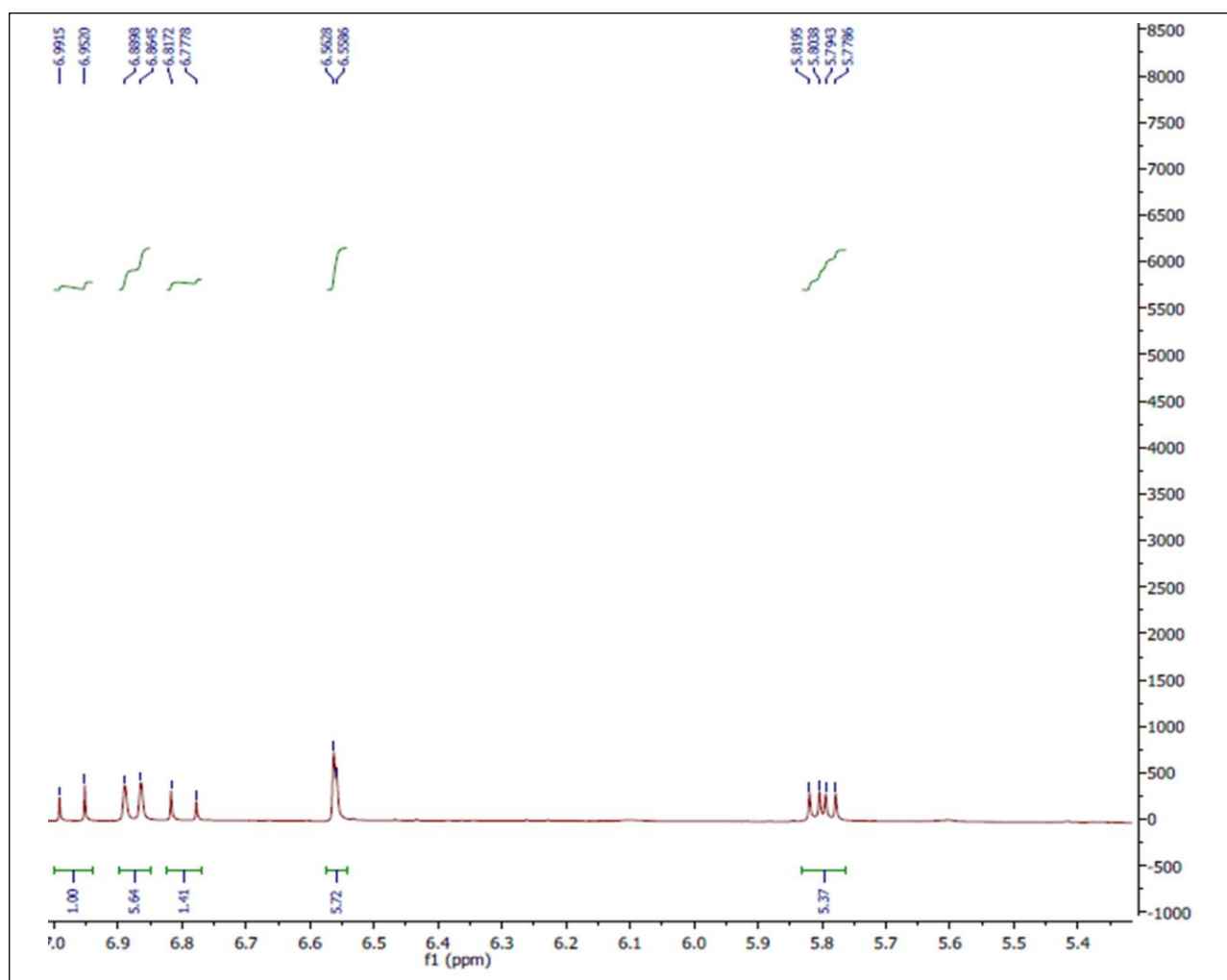


Figura 20. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da mistura de compostos Ac-3 e Ac-4 da *Apodanthera congestiflora*

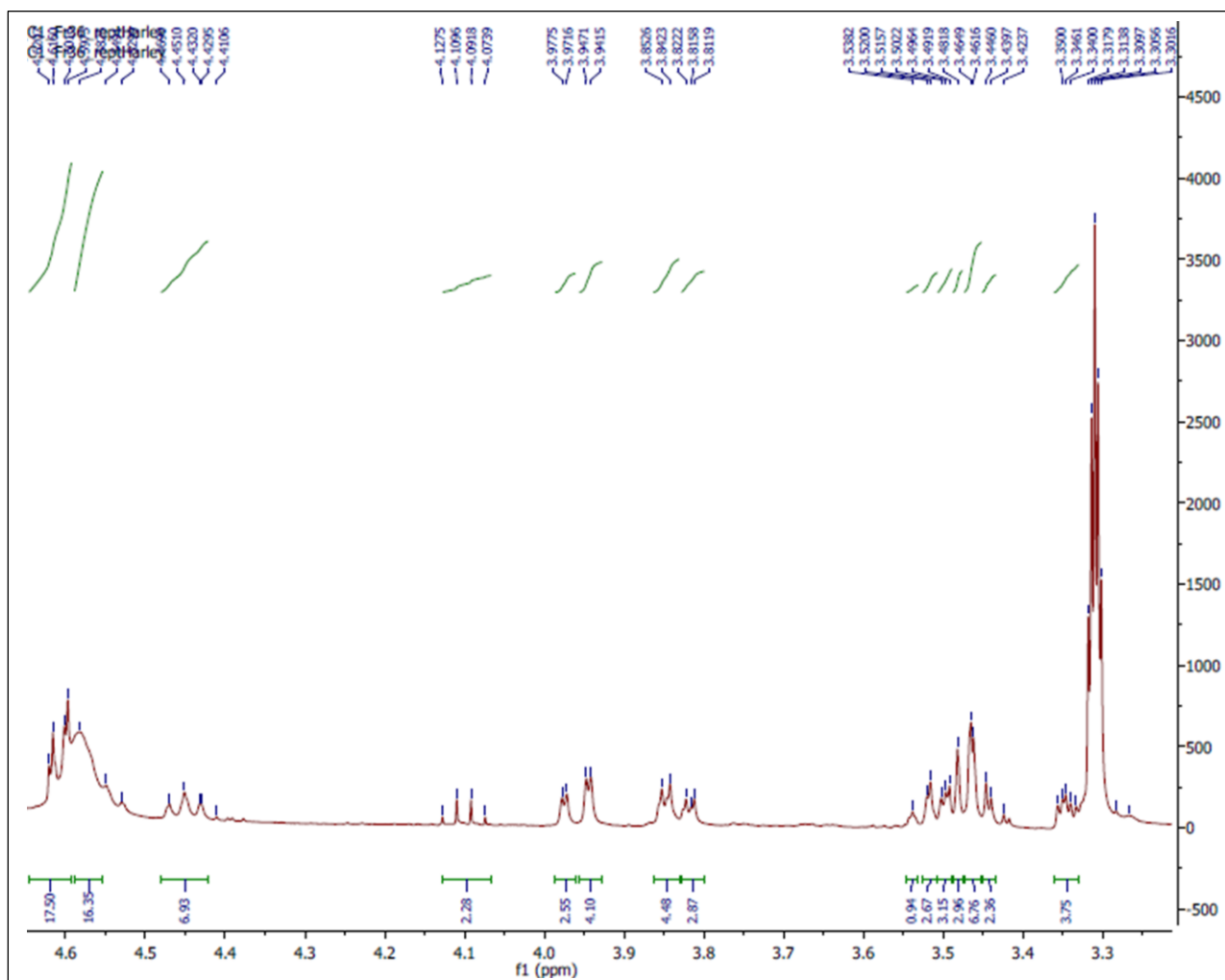


Figura 22. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da mistura de compostos Ac-3 e Ac-4 de *Apodanthera congestiflora*

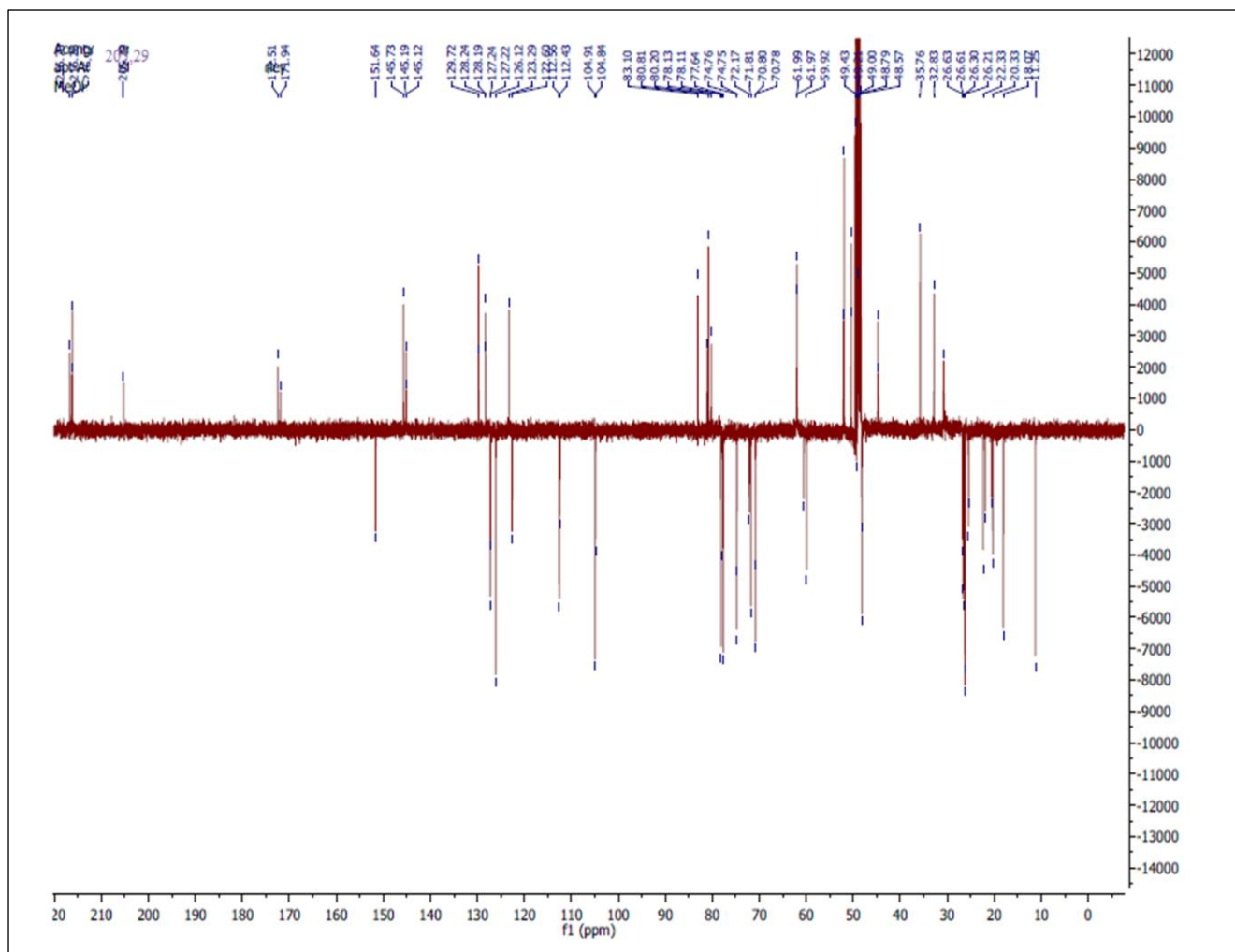


Figura 23. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da mistura de compostos Ac-3 e Ac-4 da *Apodanthera congestiflora*

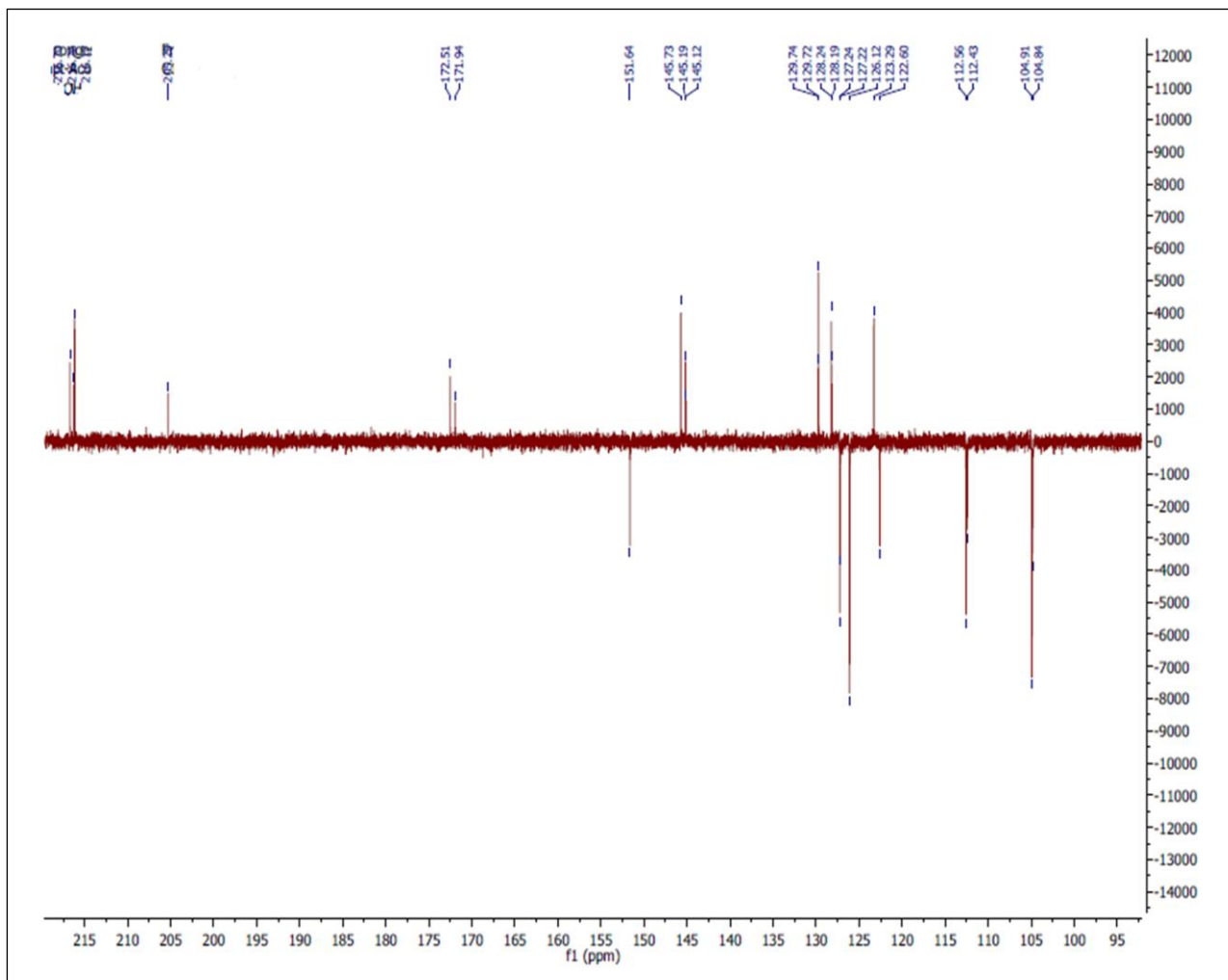


Figura 24. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da mistura de compostos Ac-3 e Ac-4 da *Apodanthera congestiflora*

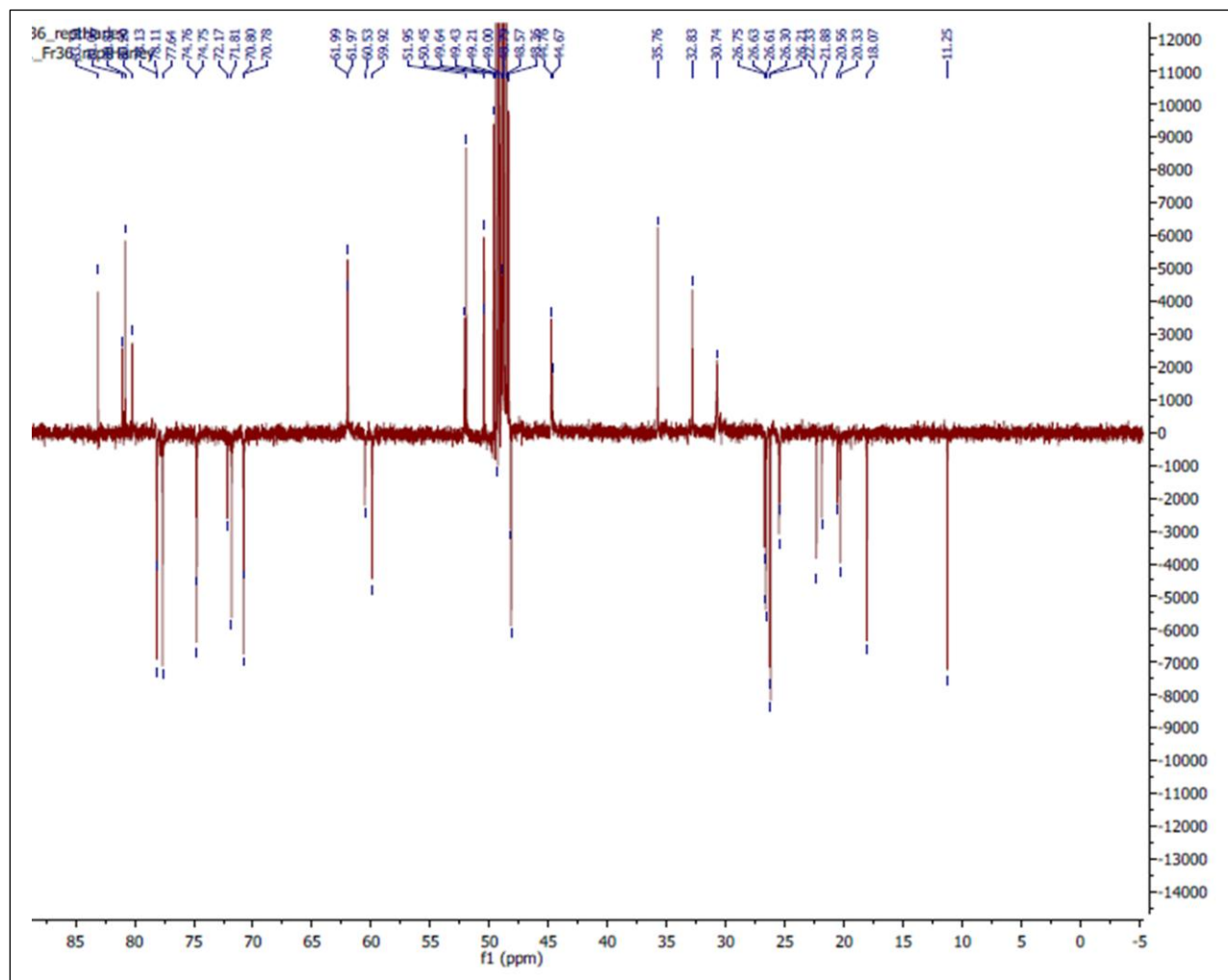


Figura 25. Mapa de correlação heteronuclear HSQC da mistura de compostos Ac-3 e Ac-4 da *Apodanthera congestiflora*

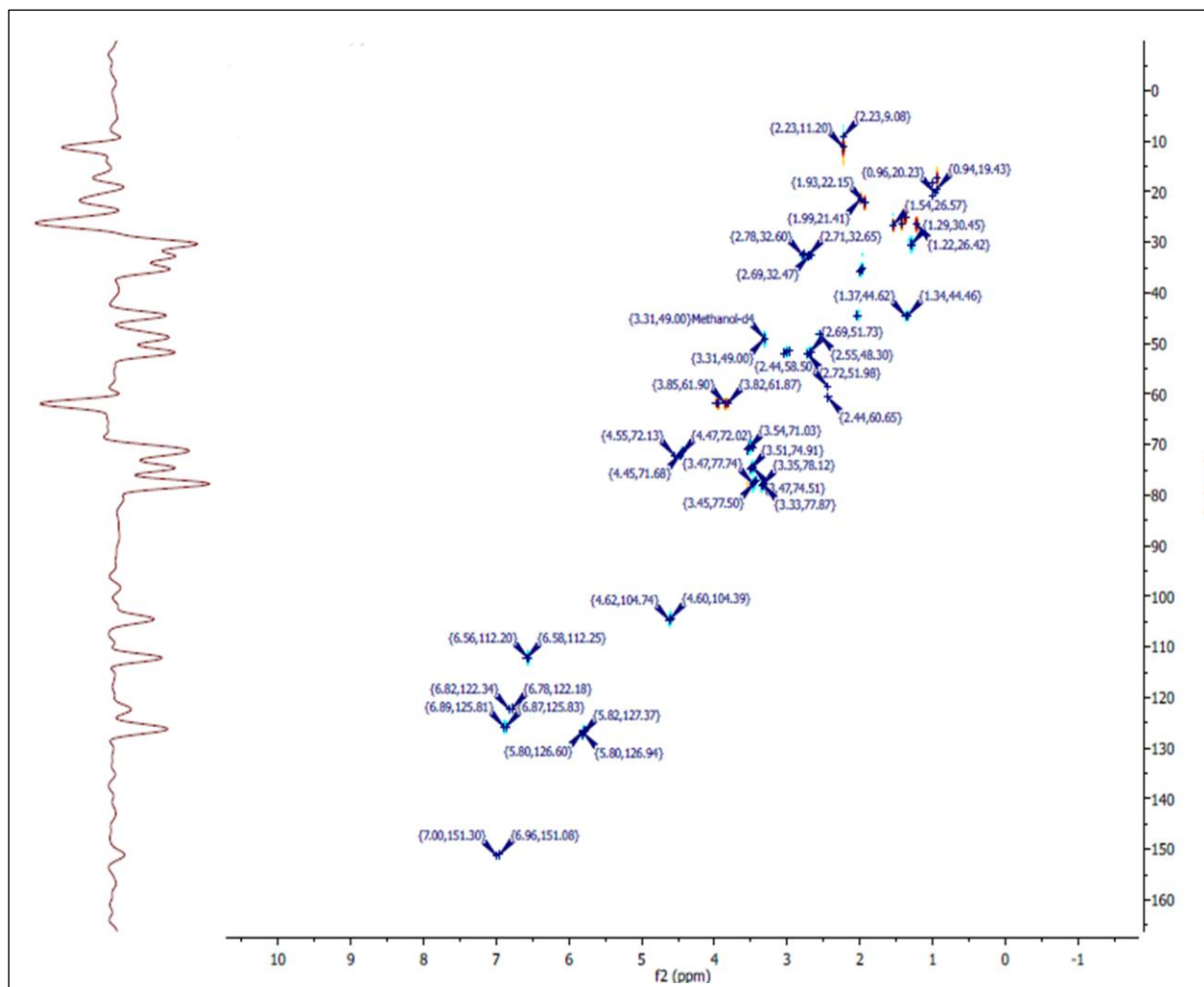


Figura 26. Expansão do mapa de correlação heteronuclear HSQC da mistura de compostos Ac-3 e Ac-4 de *Apodanthera congestiflora*

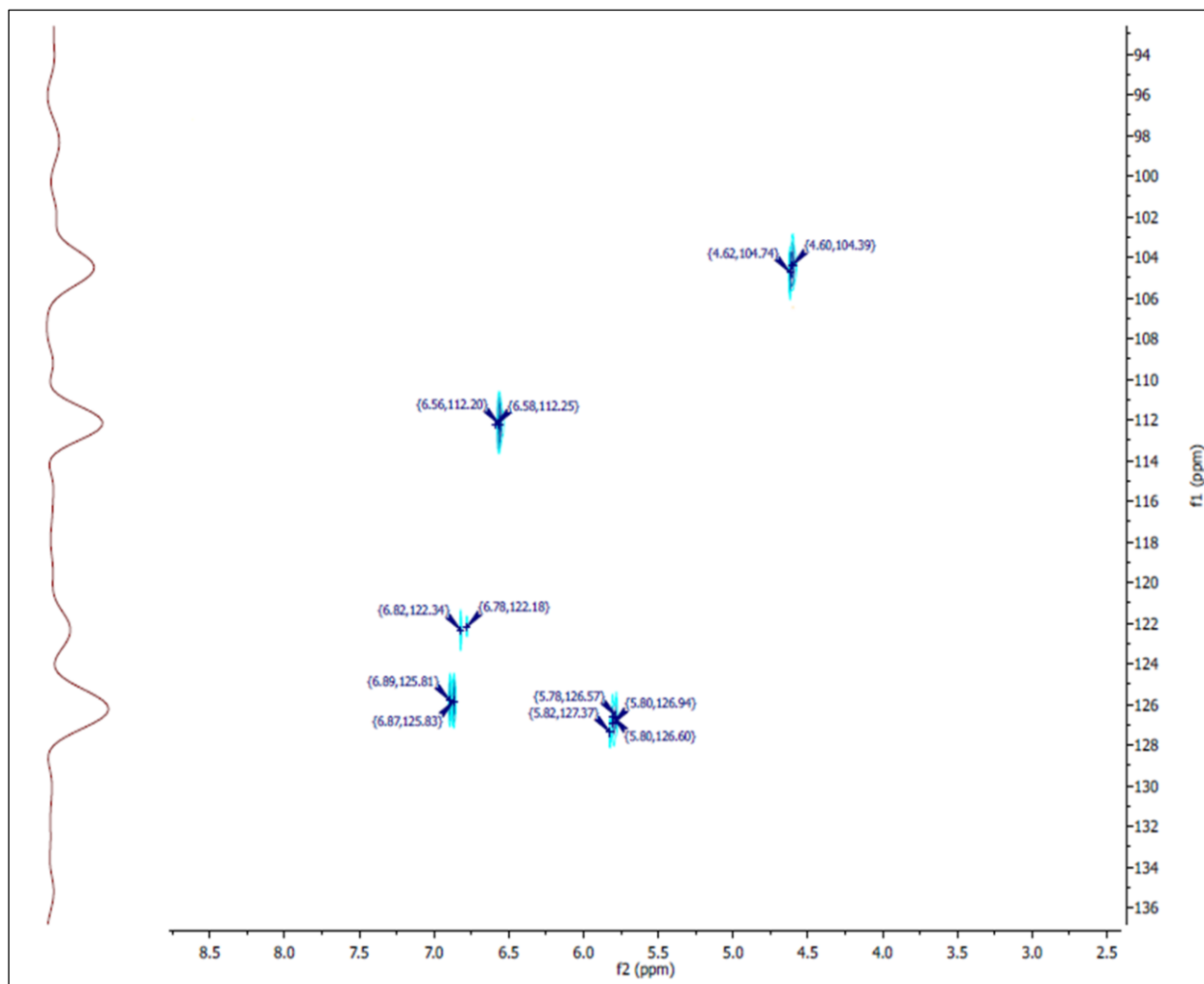


Figura 27. Expansão do mapa de correlação heronuclear HSQC da mistura de compostos Ac-3 e Ac-4 de *Apodanthera congestiflora*

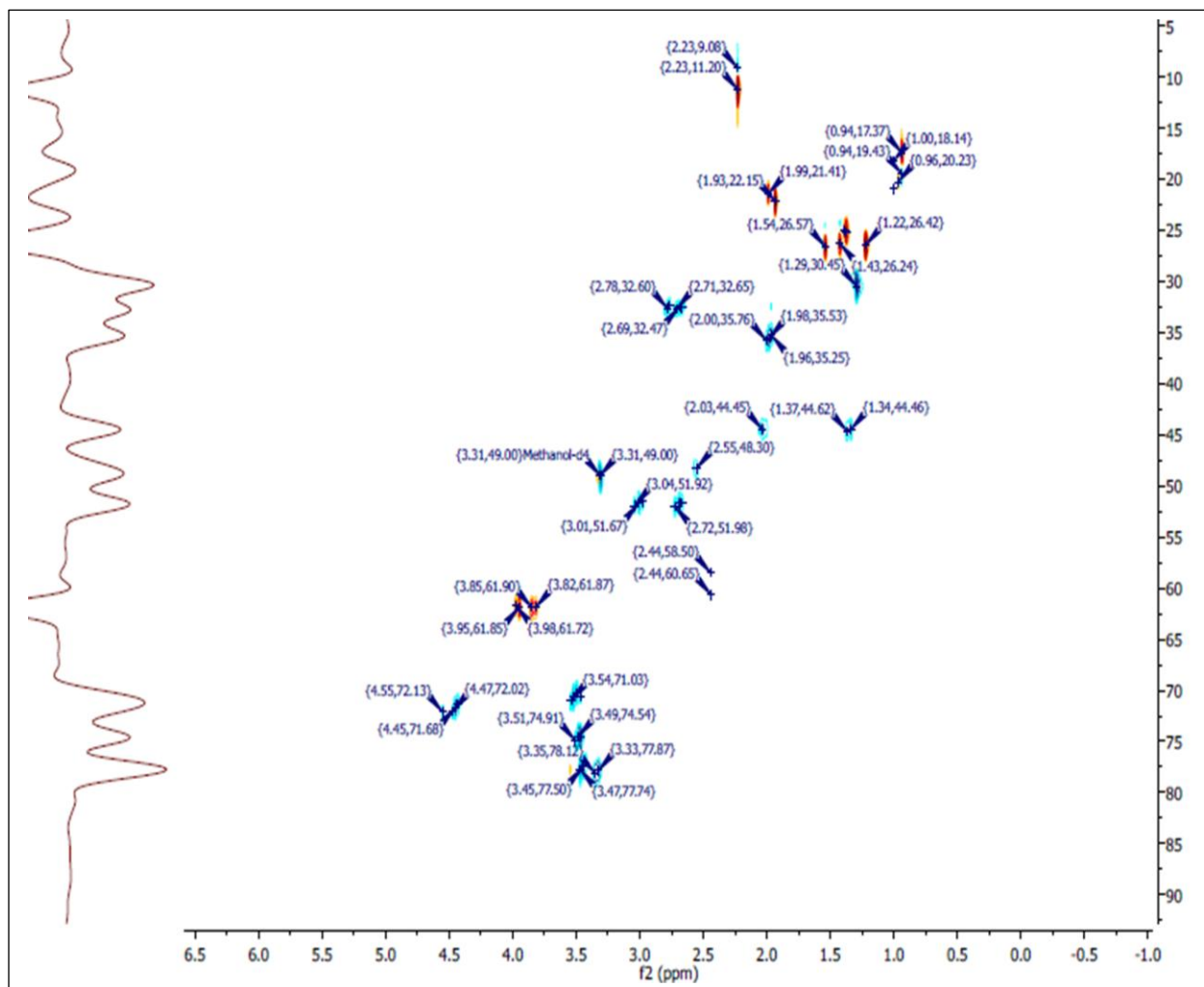


Figura 29. Expansão do mapa de contorno NOESY da mistura de compostos Ac-3 e Ac-4 da *Apodanthera congestiflora*

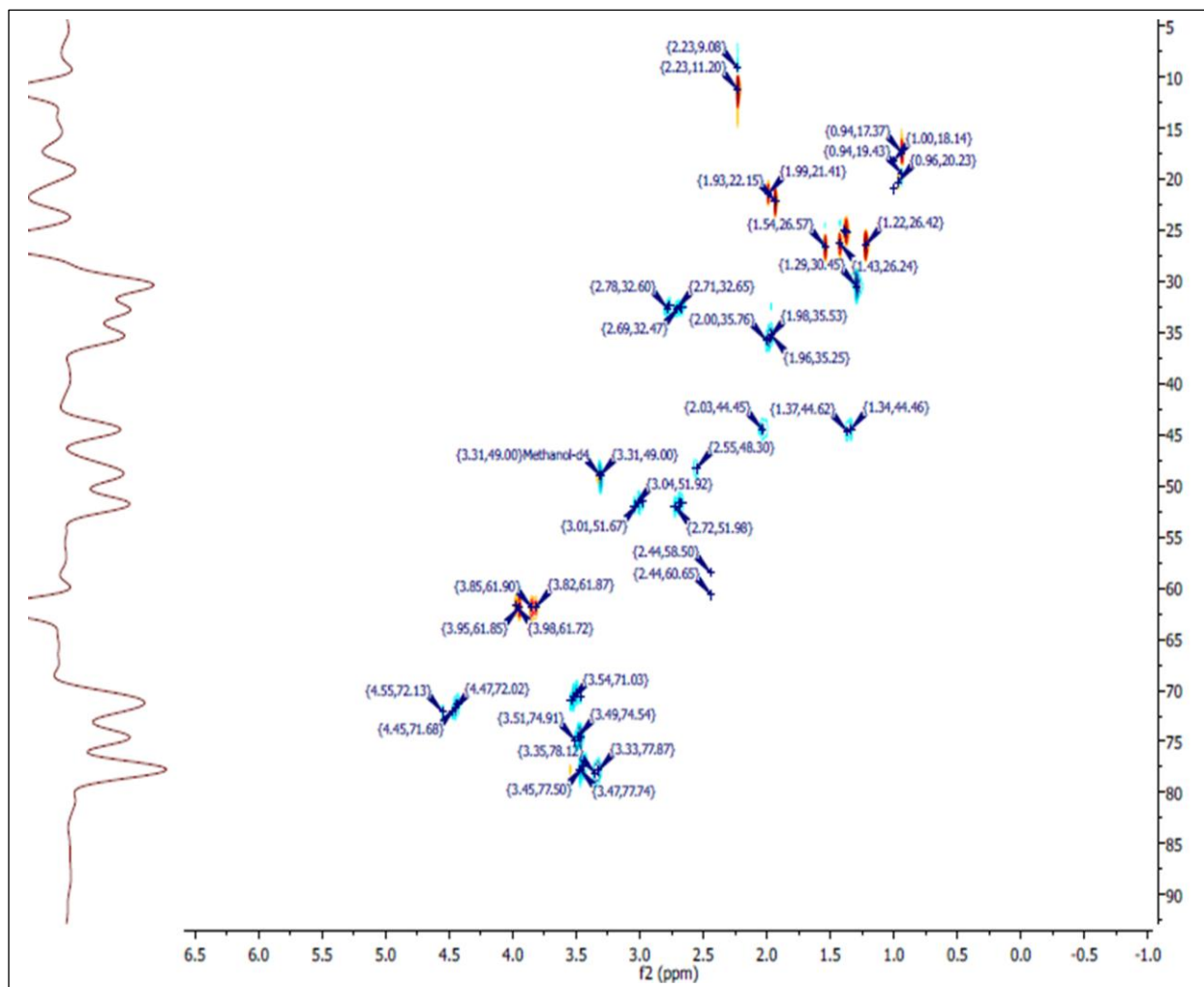


Figura 30. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do compostos Ac-5 de *Apodanthera congestiflora*

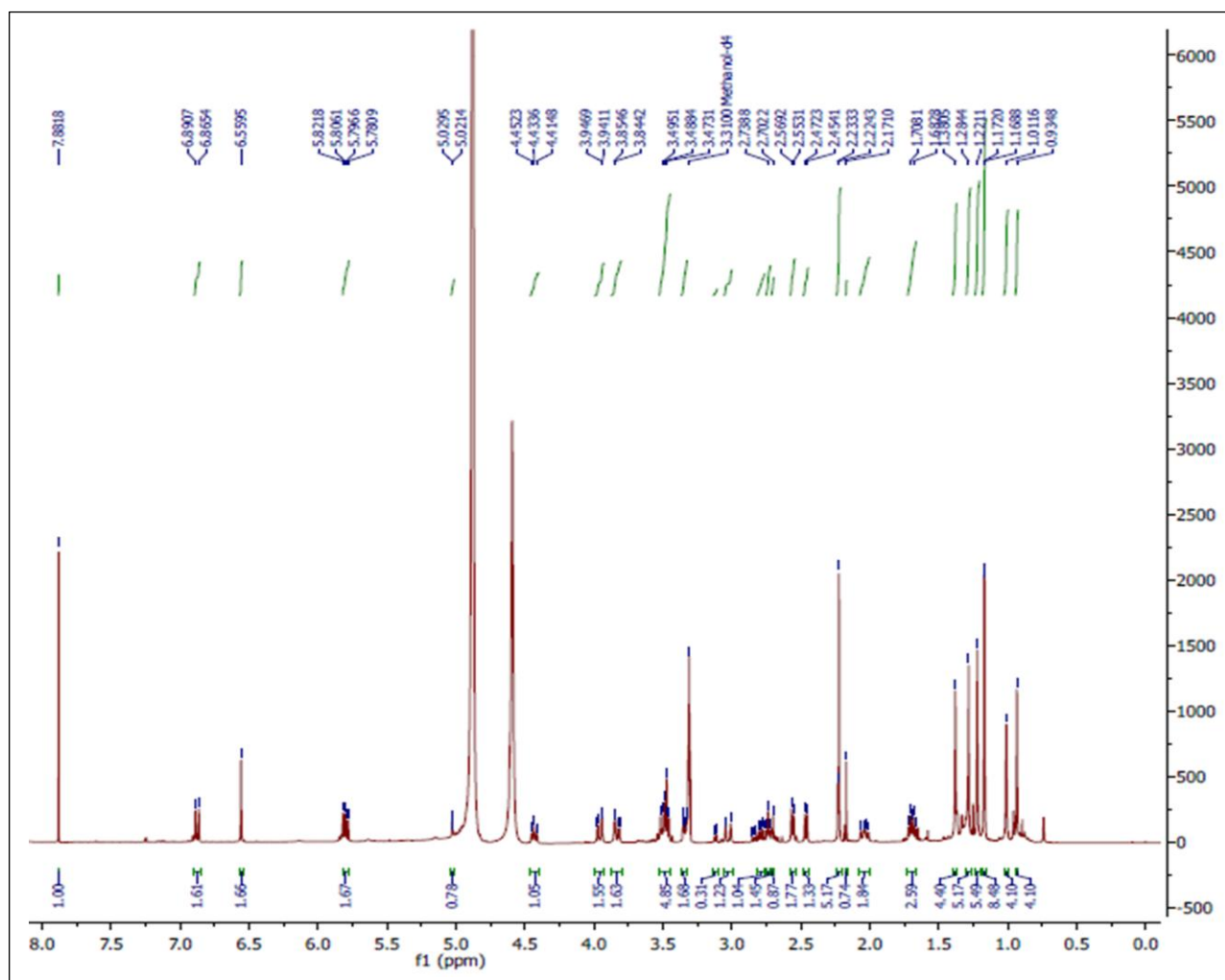


Figura 31. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto Ac-5 da *Apodanthera congestiflora*

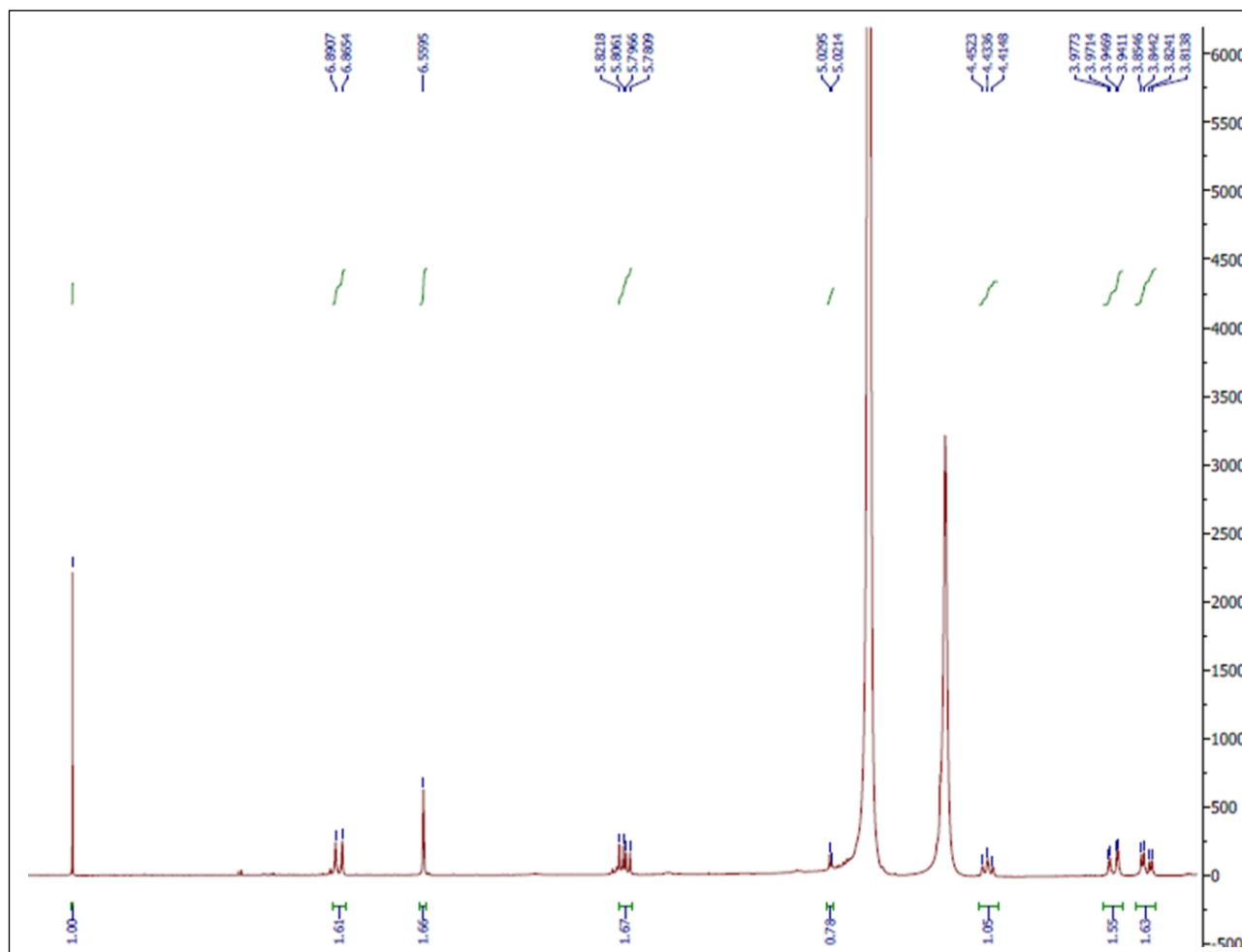


Figura 32. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto Ac-5 de *Apodanthera congestiflora*

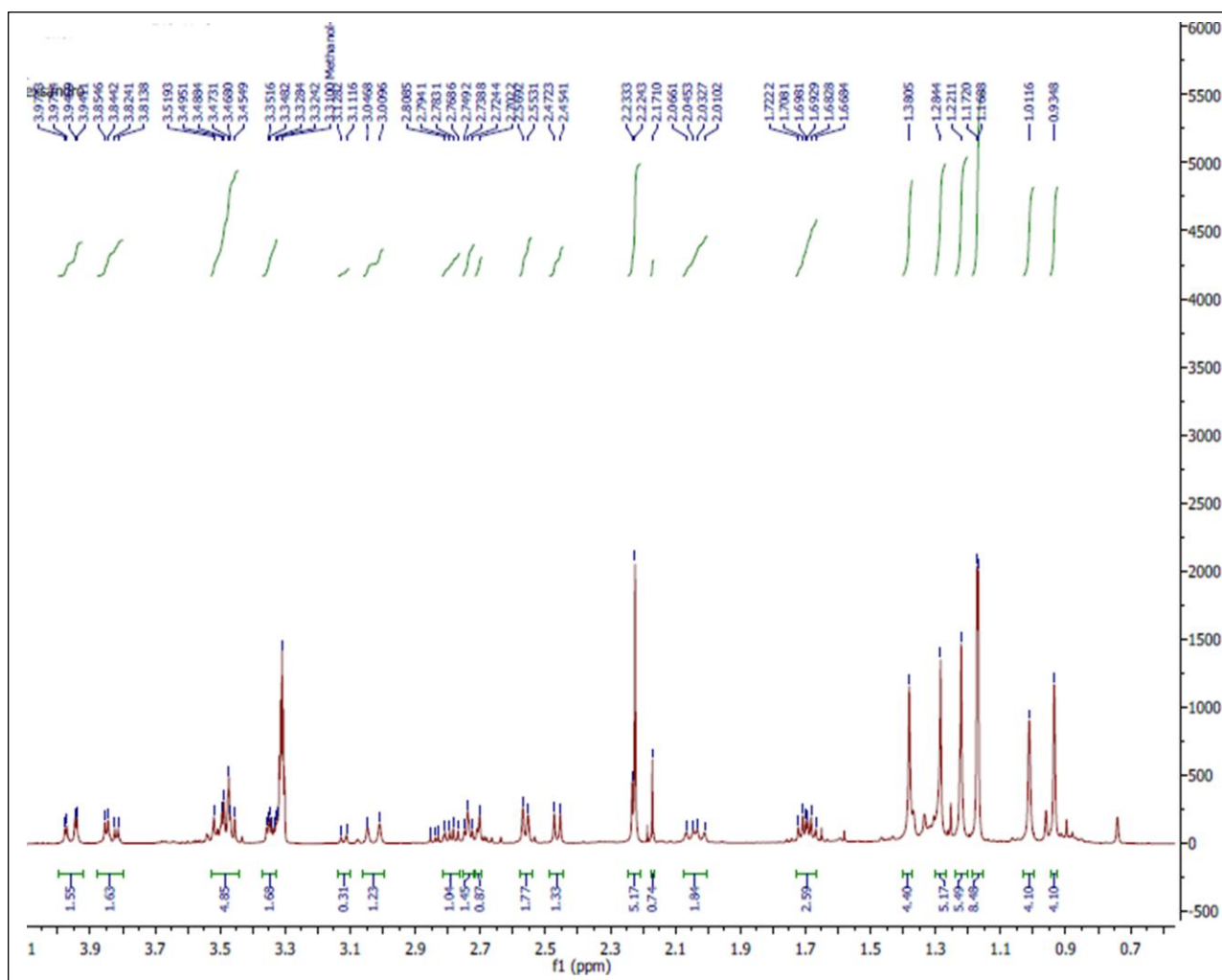


Figura 33. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto Ac-5 da *Apodanthera congestiflora*

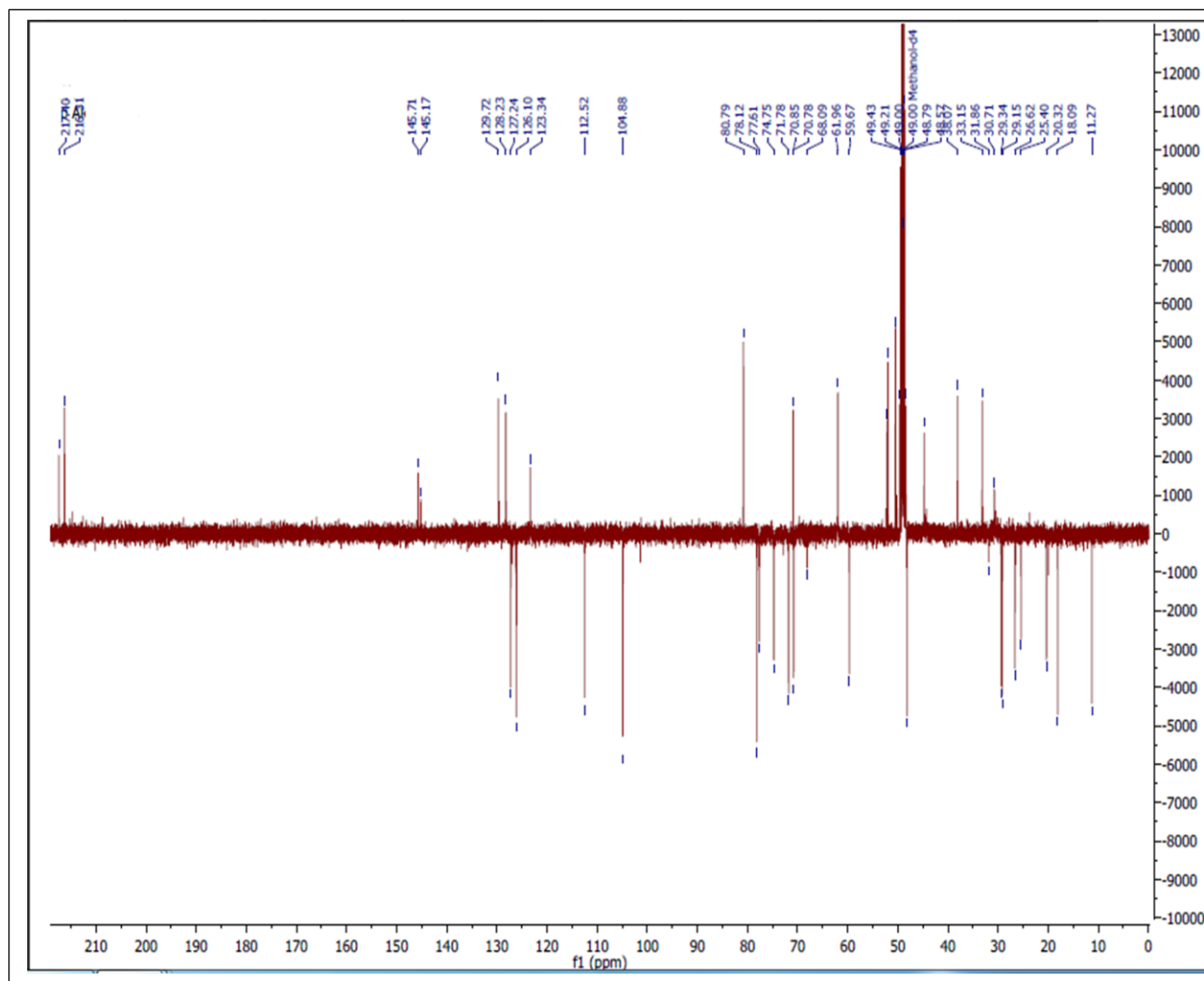


Figura 34. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto Ac-5 da *Apodanthera congestiflora*

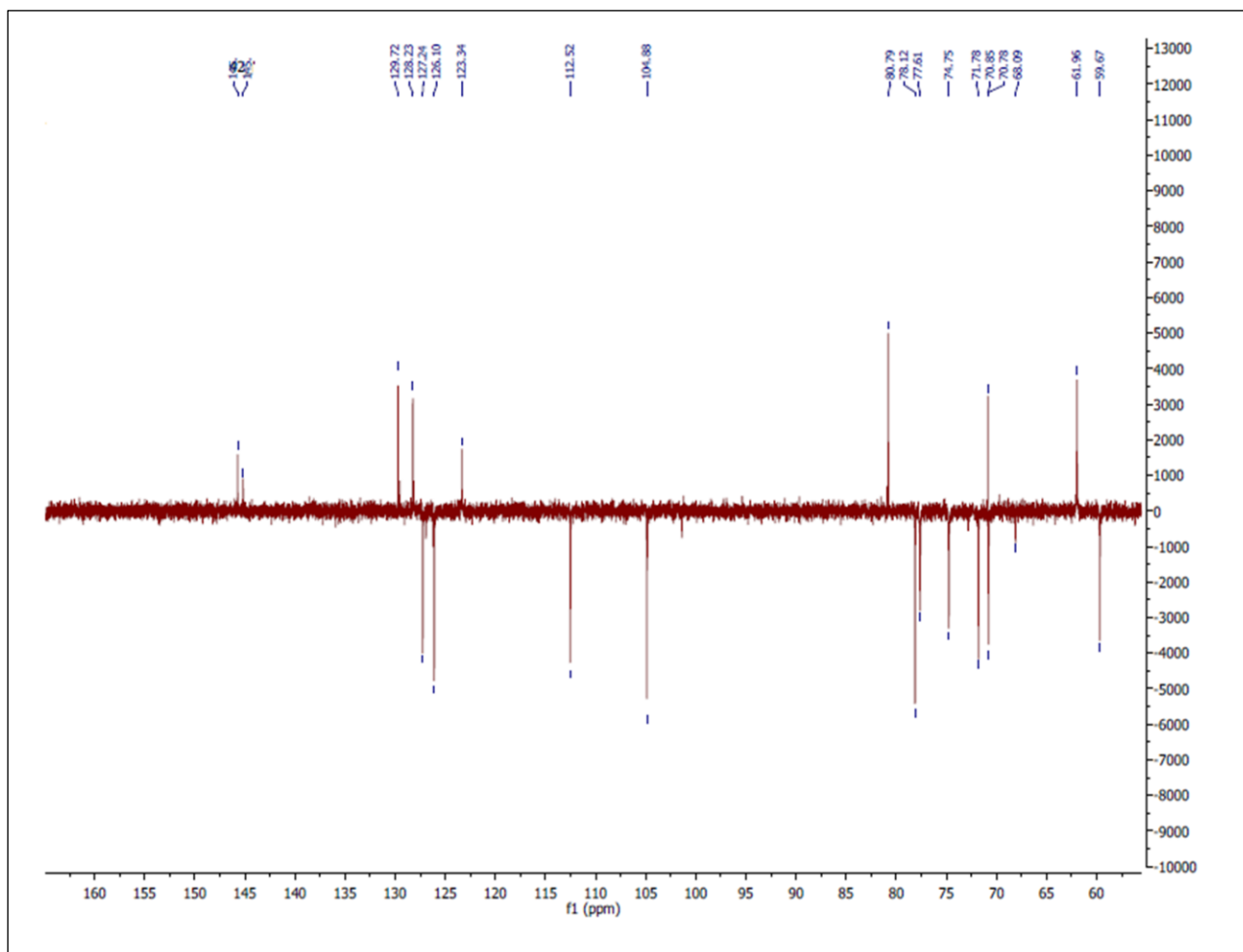


Figura 35. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto Ac-5 de *Apodanthera congestiflora*

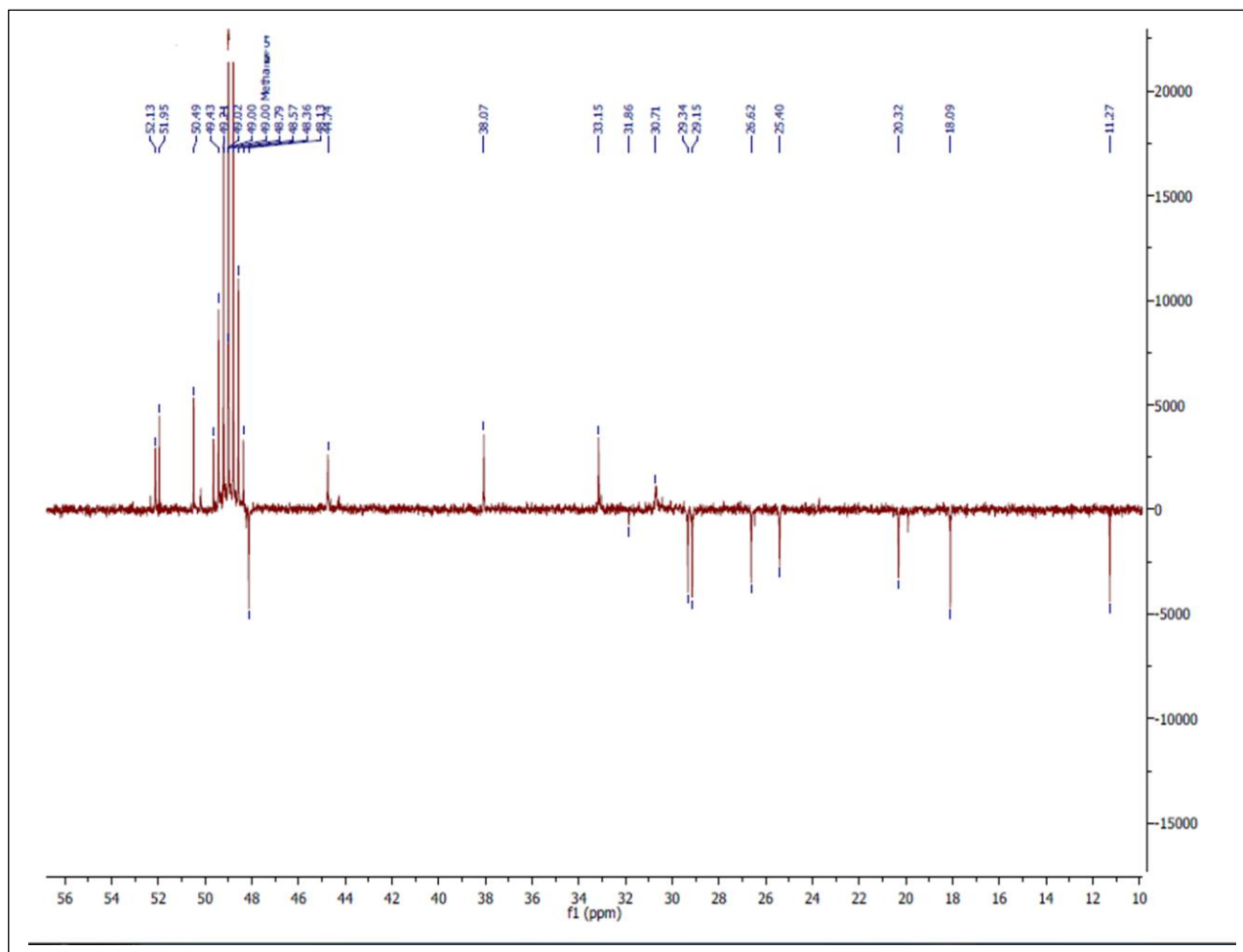


Figura 36. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto Ac-5 de *Apodanthera congestiflora*

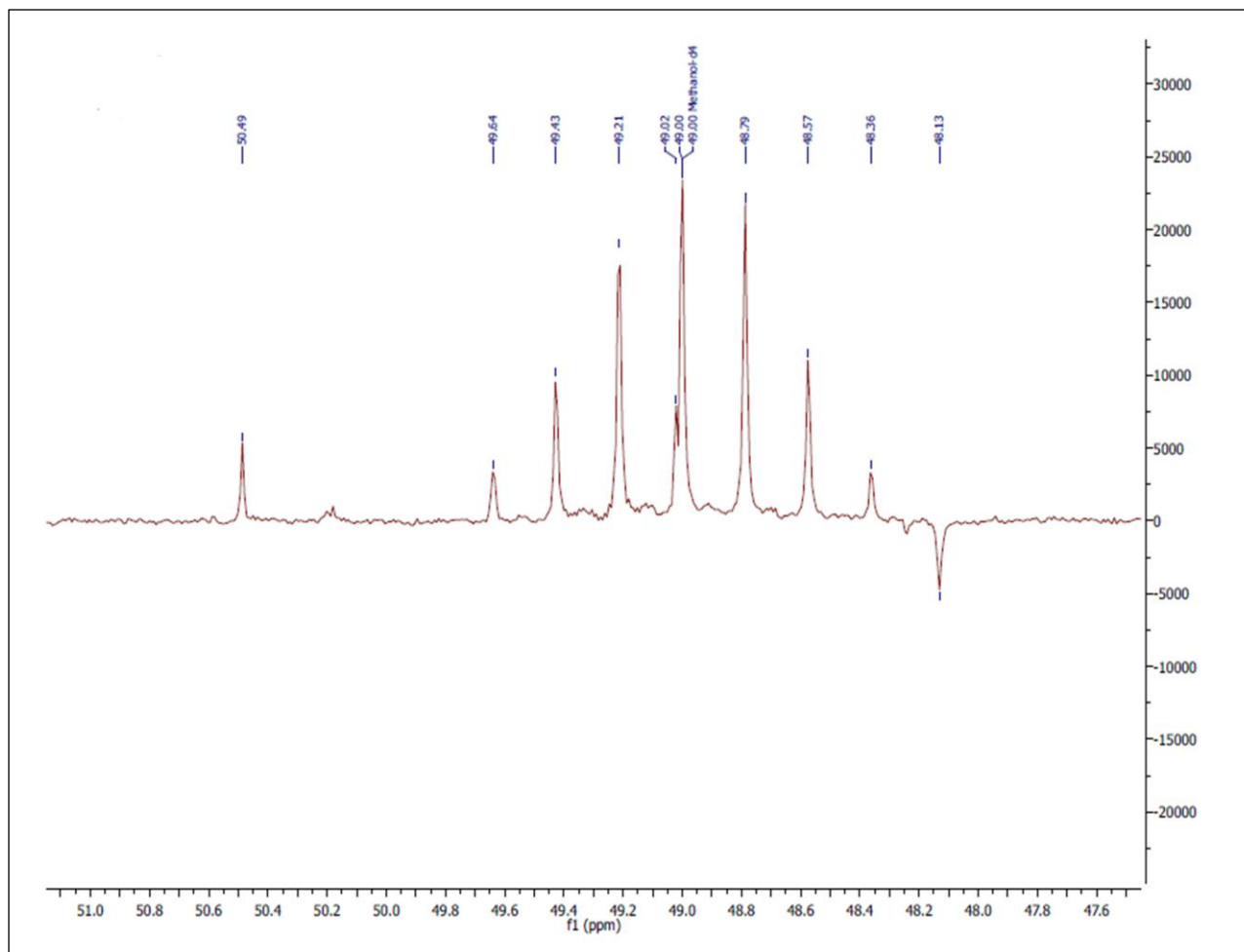


Figura 37. Mapa de contorno HMBC do composto Ac-5 de *Apodanthera congestiflora*

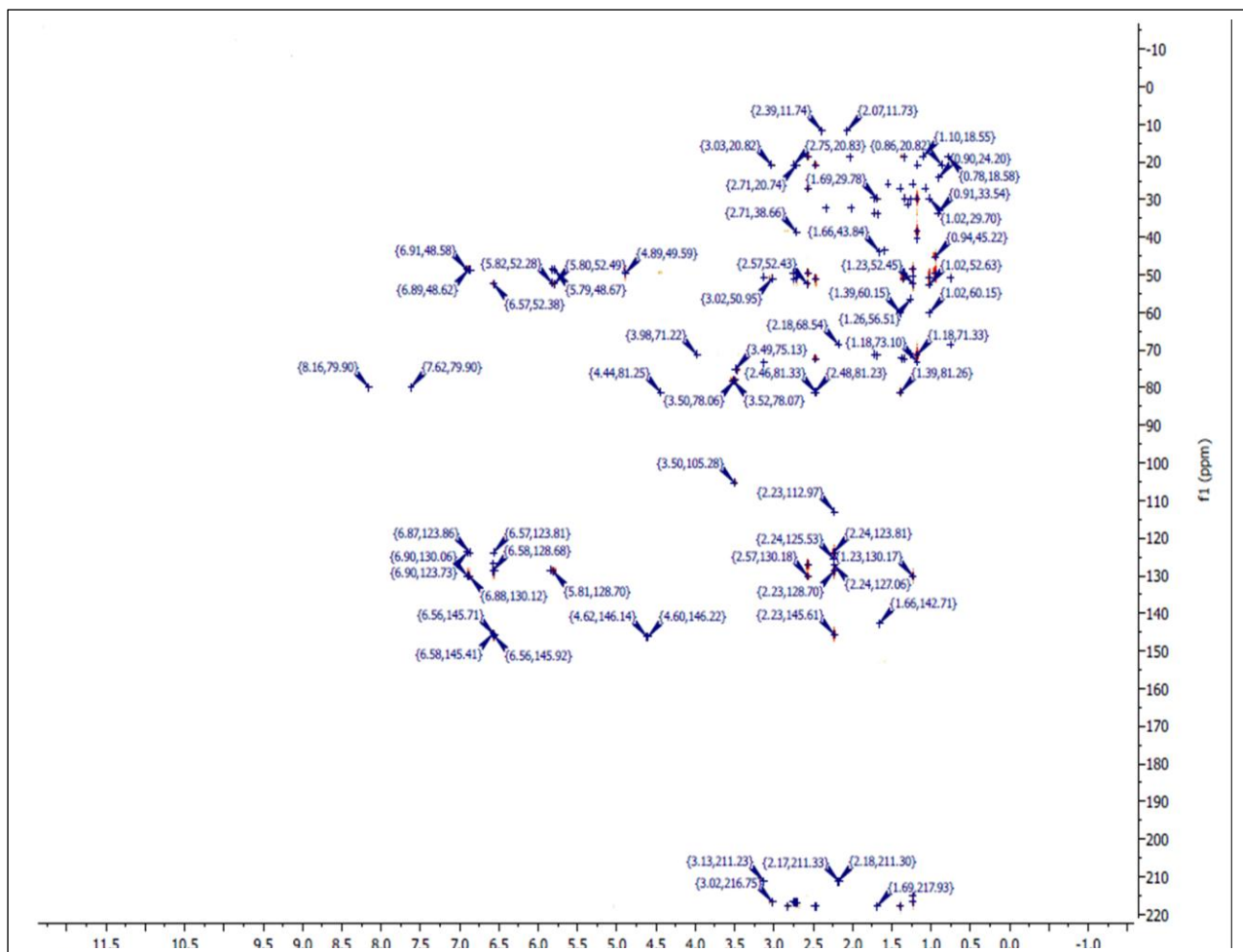


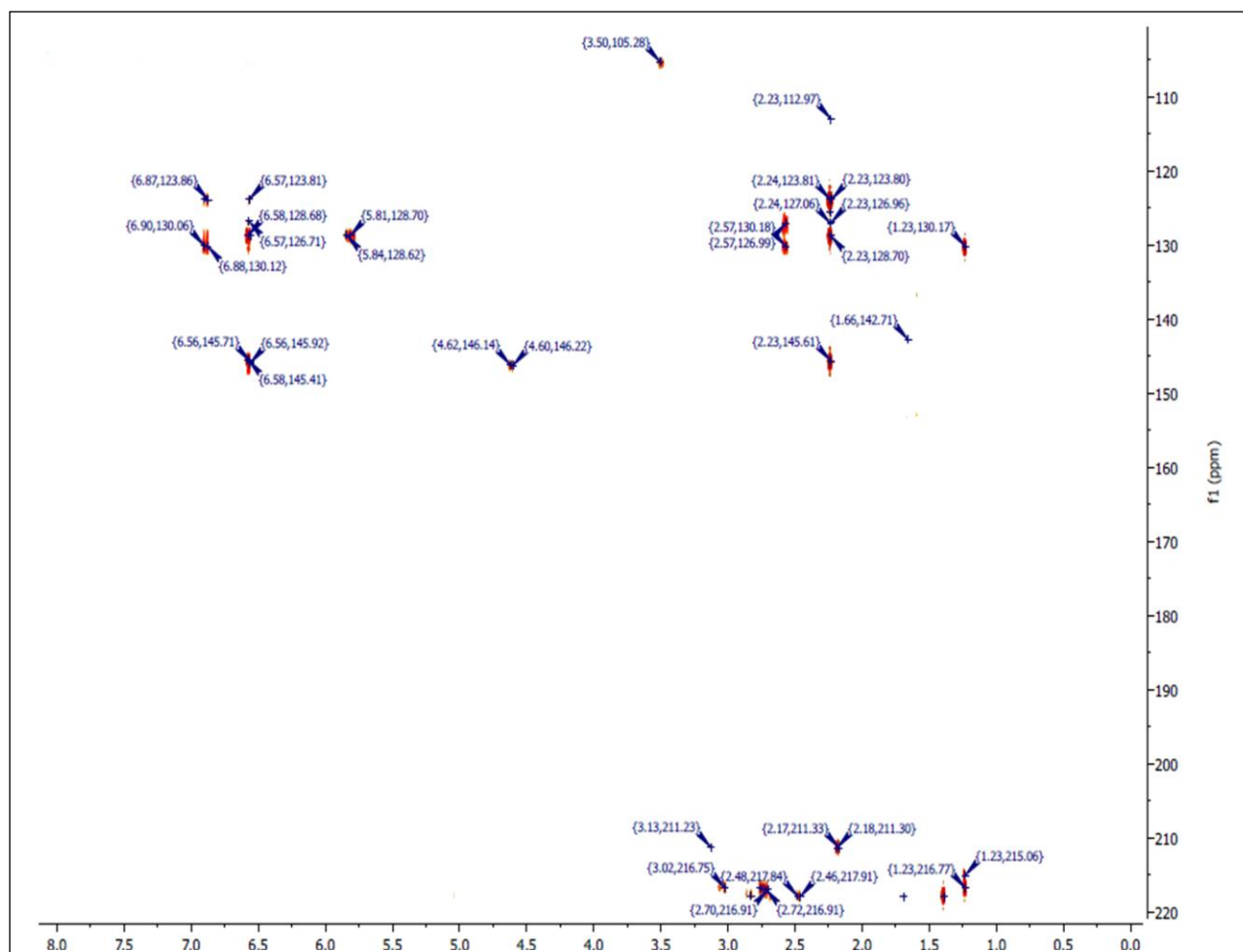
Figura 38. Mapa de contorno HMBC do composto Ac-5 de *Apodanthera congestiflora*

Figura 39. Expansão do mapa de contorno HMBC do composto Ac-5 de *Apodanthera congestiflora*

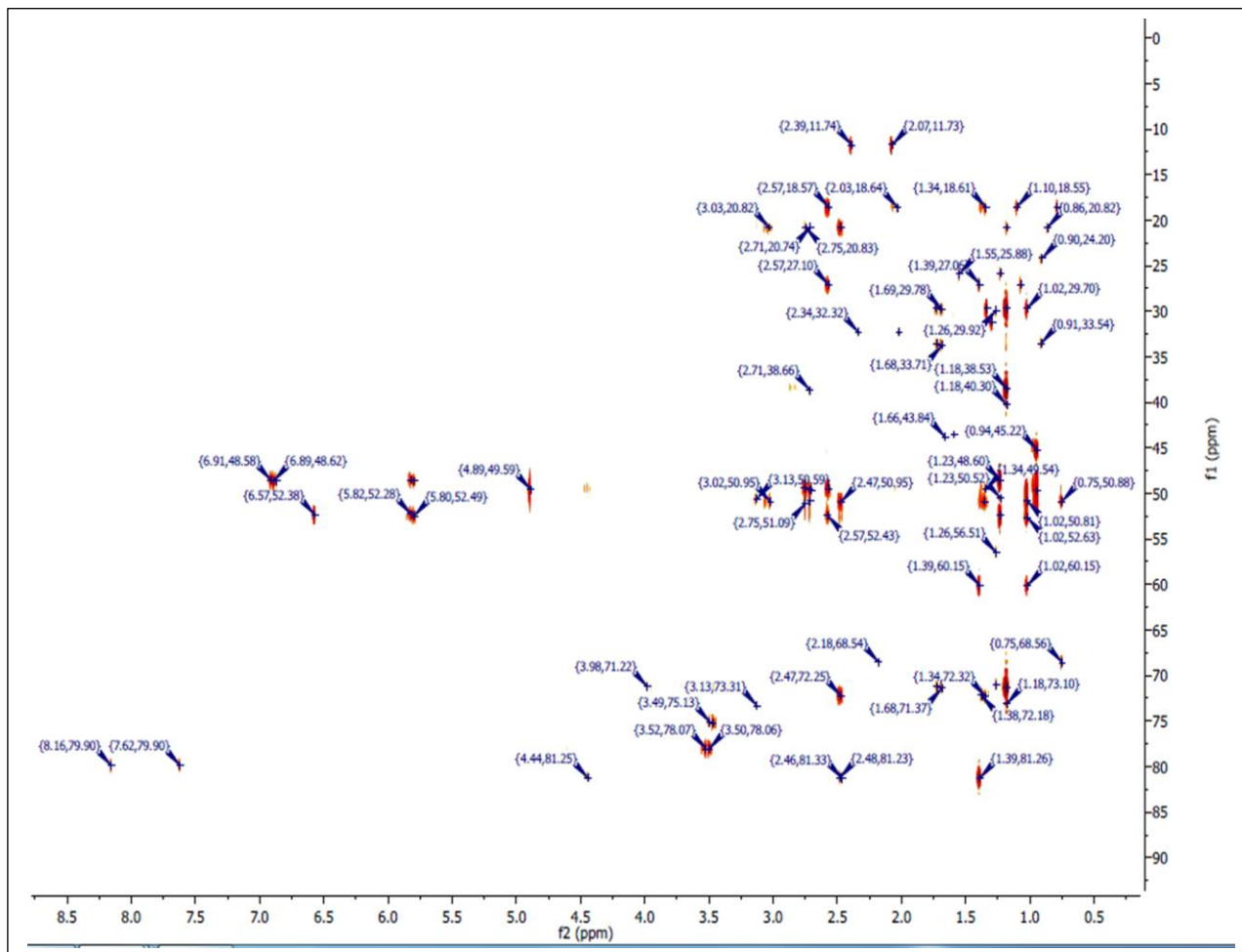


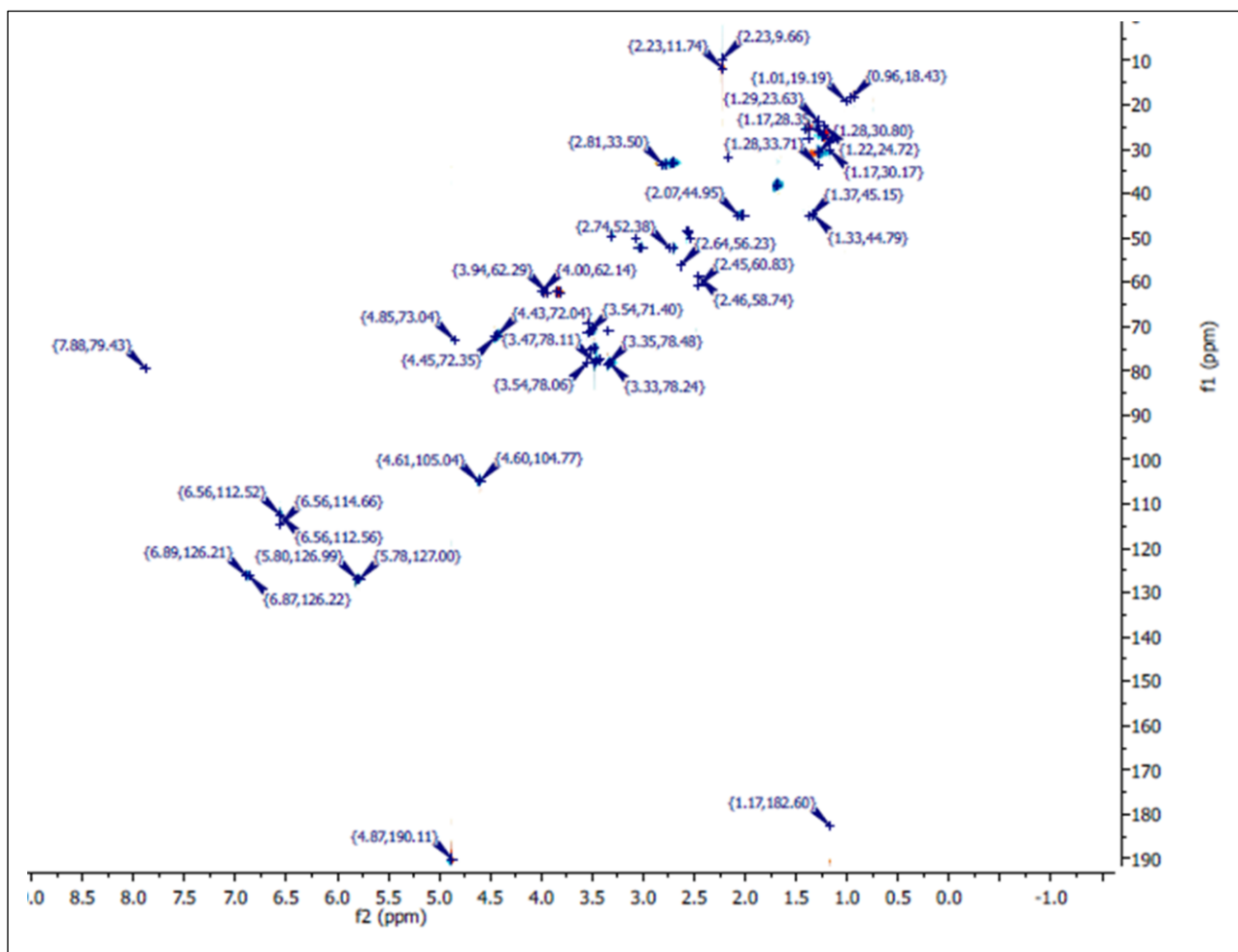
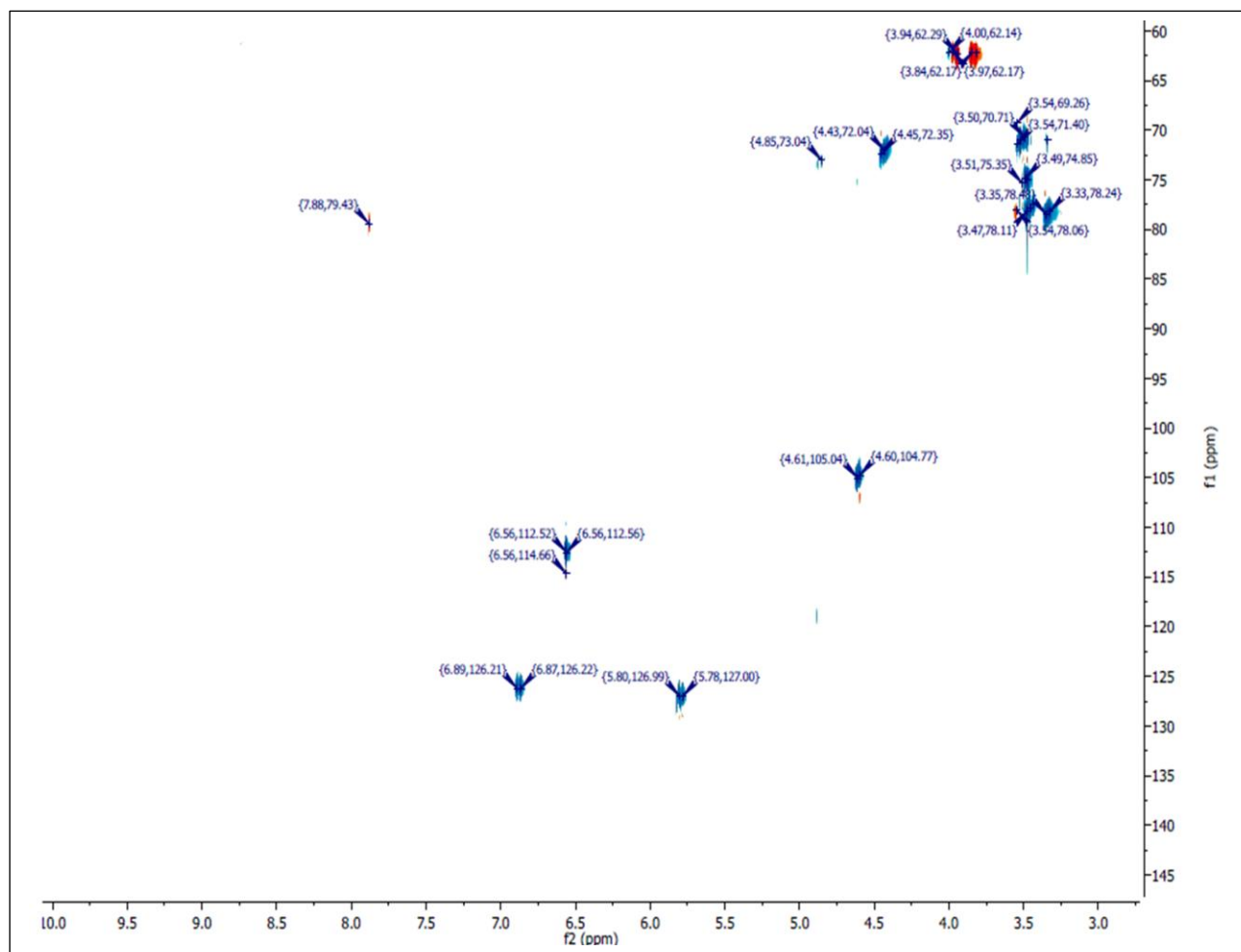
Figura 40. Mapa de contorno HSQC do composto Ac-5 da *Apodanthera congestiflora*

Figura 41. Expansão do mapa de contorno HSQC do composto Ac-5 de *Apodanthera congestiflora*



Referências

1. CARVALHO, A. C.; SILVEIRA, D. Drogas vegetais: uma antiga nova forma de utilização de plantas medicinais. **Brasília médica**, v. 47, n. 2, 2010.
2. DANTAS. O Raizeiro. Campina Grande: EDUEPB, 2007.
3. KLEIN, T. et al. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 241-248, 2010.
4. MICHELIN, D. C. et al. Controle de qualidade da raiz de *Operculina macrocarpa* (Linn) Urb., *Convolvulaceae*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 1, p. 18-22, 2010.
5. KUMAR, M. et al. Macroscopical, anatomical and physico-chemical studies on fruits of *Coccinia indica* Wight & Arn. (*Cucurbitaceae*). **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, p. S121-S128, 2014.
6. LIMA, L. F. P. **Estudos taxonômicos e morfológicos em Cucurbitaceae brasileiras**. Porto Alegre, Tese de doutorado. 2010. 232p. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
7. IBRAHIM, S. et al. Cucumol A: a cytotoxic triterpenoid from *Cucumis melo* seeds. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 6, p. 701-704, 2016.
8. CHEN, J.; TIAN, R.; QIU, M.; LU, L.; ZHENG, Y.; ZHANG, Z. Trinorcucurbitane and cucurbitane triterpenoids from the roots of *Momordica charantia*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 4, p.1043-8, 2008.
9. ZHANG, J. et al. Cucurbitane triterpenoids from the leaves of *Momordica charantia*, and their cancer chemopreventive effects and cytotoxicities. **Chemistry & biodiversity**, v. 9, n. 2, p. 428-440, 2012.
10. CHENG, Hsueh-Ling et al. EMCD, a hypoglycemic triterpene isolated from *Momordica charantia* wild variant, attenuates TNF- α -induced inflammation in FL83B cells in an AMP-activated protein kinase-independent manner. **European journal of pharmacology**, v. 689, n. 1, p. 241-248, 2012.
11. ROQUE, A. A.; LOIOLA, M. I. B. Potencial de uso dos recursos vegetais em uma comunidade rural no semiárido potiguar. **Revista Caatinga**, v. 26, n. 4, p. 88-98, 2013.
12. SILVA, J. P. R. Perfil etnobotânico: uso de plantas medicinais pela população de Nova Olinda–PB. Campina Grande–PB. Monografia (conclusão de curso). 47p. Universidade Estadual da Paraíba-UEPB, 2015.

13. SBAI, H. et al. Bioguided fractionation and isolation of phytotoxic compounds from *Apium graveolens* L. aerial parts (*Apiaceae*). **South African Journal of Botany**, v. 108, p. 423-430, 2017.
14. CAMPOS, J. J. et al. Bioguided isolation of myricetin-3-O- β -galactopyranoside with antinociceptive activity from the aerial part of *Davilla elliptica* St.-Hil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 150, n. 1, p. 270-274, 2013.
15. PIETERS, L; VLIETINCK, A. J. Bioguided isolation of pharmacologically active plant components, still a valuable strategy for the finding of new lead compounds? **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, n. 1, p. 57-60, 2005.
16. CHANDRA, S; GONZALEZ, MEJIA, E. 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 of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 11, p. 3583-3589, 2004.
17. MEDA, A. et al. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food chemistry**, v. 91, n. 3, p. 571-577, 2005.
18. 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**, v. 19, n. 4, p. 613-621, 1993.
19. BERMEJO, D. V. et al. Pressurized liquid extraction of caffeine and catechins from green tea leaves using ethyl lactate, water and ethyl lactate+ water mixtures. **Food and bioproducts processing**, v. 96, p. 106-112, 2015.
20. VILLANUEVA-BERMEJO, D; REGLERO, G; FORNARI, T. Recent advances in the processing of green tea biomolecules using ethyl lactate. A review. **Trends in Food Science & Technology**, 2017.
21. ALAÑÓN, M. E. et al. Extraction of natural flavorings with antioxidant capacity from cooperage by-products by green extraction procedure with subcritical fluids. **Industrial Crops and Products**, v. 103, p. 222-232, 2017.
22. LI, Xiao-Juan et al. Application of cavitation system to accelerate aqueous enzymatic extraction of seed oil from *Cucurbita pepo* L. and evaluation of hypoglycemic effect. **Food chemistry**, v. 212, p. 403-410, 2016.
23. KANG, Jae-Hyun; KIM, S.; MOON, B. Optimization by response surface methodology of lutein recovery from paprika leaves using accelerated solvent extraction. **Food chemistry**, v. 205, p. 140-145, 2016.

24. MELECCHI, M. I. S. Caracterização química de extratos de *Hibiscus tiliaceus*: estudo comparativo de métodos de extração. 2005.
25. JENTZER, JEAN-Ac-Baptiste et al. Response surFA-Ace methodology to optimise Accelerated Solvent Extraction of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. **Food chemistry**, v. 166, p. 561-567, 2015.
26. THIRUVENGADAM, M.; REKHA, K.; CHUNG, Ill-Min. Induction of hairy roots by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of spine gourd (*Momordica dioica* Roxb. ex. willd) for the assessment of phenolic compounds and biological activities. **Scientia Horticulturae**, v. 198, p. 132-141, 2016.
27. CHEKROUN, E. et al. Antioxidant activity and phytochemical screening of two *Cucurbitaceae*: *Citrullus colocynthis* fruits and *Bryonia dioica* roots. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, n. 8, p. 632-637, 2015.
28. GOTO, T. et al. Synthesis and characterization of poly [(ferulic acid)-alt-(glycine)]. **Polymer**, v. 112, p. 385-392, 2017.
29. BALDÉ, A. M. et al. Ferulic acid esters from stem bark of *Pavetta owariensis*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 3, p. 1024-1026, 1991.
30. SILVEIRA, A. L. C. **Validação de métodos para a determinação de compostos fenólicos em melancia**. 2013. Tese de Doutorado.
31. PAVIA, D. L., et al. **Introdução à espectroscopia**. Cengage Learning, 2010.
32. CORREIA, S. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Constituents of the bark of *Tapirira guianensis* (Anacardiaceae). **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 36-38, 2003.
33. VALENTE, L. M. M. Cucurbitacinas e suas principais características estruturais. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 944-948, 2004.
34. VALENTE, L. M. M et al. New norcucurbitacin and heptanorcucurbitacin glucosides from *Fevillea trilobata*. **Journal of natural products**, v. 56, n. 10, p. 1772-1778, 1993.
35. MATOS, M. E. O. et al. New nor-cucurbitacin glucosides from *Wilbrandia* species. **Journal of the brazilian chemical society**, v. 4, n. 3, p. 143-146, 1993.
36. ACHENBACH, H.; HEFTER-BÜBL, U.; CONSTENLA, M. A. Fevicordin A and fevicordin A glucoside, novel norcucurbitacins from *Fevillea*

- cordifolia*. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 6, p. 441-442, 1987.
- 37 CHEN, J. Chao et al. Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities. **Natural product reports**, v. 22, n. 3, p. 386-399, 2005.
- 38 ACHENBACH, H. et al. Cucurbitanes and cucurbitane-type glycosides from *Ibervillea sonora*. **Phytochemistry**, v. 33, n. 2, p. 437-445, 1993.
- 39 HIMENO, E. et al. Structures of new non-aromatized nor-cucurbitacin glucosides in the roots of *Cayaponia tayuya*. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 41, n. 5, p. 986-988, 1993.

Capítulo 4

Avaliação farmacológica e toxicológica de *Apodanthera congestiflora* Cogn. (Cucurbitaceae)

RESUMO

Apodanthera congestiflora Cogn, conhecida como cabeça de negro, é endêmica do semiárido brasileiro e se destaca em estudos etnobotânicos como planta medicinal de uso difundido em afecções inflamatórias e parasitárias. O presente estudo teve como objetivo realizar a prospecção fitoquímica dos extratos das raízes de *A. congestiflora*, a partir de um estudo biológico norteado pelo conhecimento popular. Os extratos hexânico (FH-Ac), acetato (FA-Ac) e etanólico (FE-Ac) foram obtidos das raízes pelo método de extração acelerada por solvente (ASE) e o extrato aquoso nebulizado através de extração a quente com posterior secagem por aspersão. O estudo farmacológico preliminar avaliou o perfil antinociceptivo/anti-inflamatório de FH-Ac, FA-Ac e FE-Ac através do modelo da nocicepção induzida por formalina. Como resultado foi selecionado a FA-Ac foi submetida a cromatografia e técnicas espectroscópicas e, deste modo, foram isolados e identificados 2 ésteres fenólicos (Ac-1 e Ac-2), um ferulato e um p-cumarato; e 3 triterpenos glicosilados (Ac-3, Ac-4 e Ac-5). O FA-Ac e o EAN-AC-Ac apresentaram significativa atividade anti-inflamatória, sendo que o primeiro também apresentou as atividades antimicrobiana, hemolítica e considerável potencial toxicológico. O composto isolado foi estudado quanto às atividades anti-inflamatória nos métodos do bolsão de ar e edema de pata induzidos por carragenina. Esse ferulato apresentou atividade anti-inflamatória ao inibir a migração leucocitária em 32,5% no bolsão de ar e reduzir o volume plantar no modelo do edema de pata por carragenina (45,7%). A partir do estudo bioguiado foi possível comprovar a atividade anti-inflamatória do FA-Ac e do EAN-AC-Ac das raízes de *A. congestiflora* e do derivado do ácido ferúlico isolado, contribuindo para o conhecimento químico e o potencial terapêutico de uma cucurbitácea endêmica da Caatinga.

Palavras-chave: Estudo bioguiado. Polifenóis. Cucurbitaceae. Triterpenos glicosilados.

1 Introdução

O Brasil possui uma extensa biodiversidade, com aproximadamente 45 mil espécies vegetais e, desta forma, vem conseguindo obter destas uma gama de princípios ativos através de inúmeros grupos de pesquisa que se dedicam à área. Infelizmente o ritmo da produção de novos e efetivos medicamentos não segue o da pesquisa [1].

Várias enfermidades que atingem a população mundial ainda possuem lacunas na sua terapia, principalmente no acesso aos medicamentos, muitas vezes pelo alto custo destes. Por outro lado, mesmo os que possuem baixos custos e são mais acessíveis esbarram, muitas vezes, em inconvenientes como as reações adversas e efeitos colaterais.

Os medicamentos anti-inflamatórios são um grupo de fármacos que carece de maiores pesquisas para a descoberta de representantes mais eficientes e seguros, uma vez que os comercializados atualmente exibem efeitos colaterais graves como danos ao aparelho gastrointestinal e cardiovascular [2-3].

Nesse sentido, a utilização recorrente de plantas medicinais registradas pela etnofarmacologia tem norteado a condução de estudos fitoquímicos, biológicos e toxicológicos, atuando como alternativa para substituição de medicamentos de uso consagrado pela população [4].

Entre as famílias botânicas estudadas pelas suas propriedades farmacológicas, a *Cucurbitaceae* possui estudos que demonstram várias atividades farmacológicas importantes, tais como a antiviral, antidiabética, antioxidante, antiparasitária, antiulcerogênica, antiproliferativa, hepatoprotetora e também anti-inflamatória e analgésica [5-6].

Apodanthera congestiflora Cogn. é um membro dessa família sem estudos farmacoquímicos descritos na literatura. Embora existam estudos de cunho etnofarmacológico que descrevem as atividades antiparasitária, antimicrobiana, anti-inflamatória e depurativa para a referida espécie [7-9].

Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo a avaliação preliminar das atividades antimicrobiana, anti-inflamatória, antinociceptiva e toxicológica a partir dos extratos acetato e aquoso nebulizado e de um ferulato isolado de *A. congestiflora*.

2 Materiais e métodos

2.1 Local da Pesquisa

Os ensaios toxicofarmacológicos foram realizados no Laboratório de Ensaio Farmacológicos e Laboratório de ensaios microbiológicos, ambos na Universidade Estadual da Paraíba, em Campina Grande.

2.2 Material botânico

As raízes de *A. Congestiflora* Cogn. foram coletadas no Município de Barra de Santana-PB (coordenadas: S6°43'18" – W36°3'46"), no mês de Novembro de 2015. O material foi identificado pelo Botânico Dr. José Iranildo Miranda de Melo e a exsicata depositada no Herbário Manuel de Arruda Câmara (ACAM) na Universidade Estadual da Paraíba, sob o número 1000.

2.3 Obtenção dos extratos e do éster fenólico Ac-1

As raízes foram secas em estufa de circulação de ar (40°C) e pulverizadas em moinho de FA-Acas com granulometria de 10 mesh. Uma amostra de 400g da droga vegetal passou pela extração acelerada por solvente, no aparelho ASE 350[®] da DONEX Corporation. Os extratos obtidos foram o heânico (FH-Ac), acetato (FA-Ac) e etanólico (FE-Ac). Através de métodos cromatográficos foi isolado o composto Ac-1 do extrato acetato.

Uma amostra de 200g da droga vegetal em pó foi submetida à extração aquosa à quente, simulando uma decocção usual, principal forma de uso pela população. O método consistiu na extração com água destilada à 100 °C (droga:solvente 1:10 p/v). E, posteriormente, o extrato foi separado do resíduo através de filtração simples e o filtrado obtido foi seco por spray dryer (LABMAQ – MSD 0.5). Pela extração realizada foi obtido o extrato aquoso nebulizado (EAN-Ac).

2.4 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss (Mus musculus)* adultos, pesando entre 25 a 35g, de ambos os sexos. Foram acondicionados em gaiolas plásticas em ambiente com temperatura e umidade controladas, ciclo claro-escuro de 12 horas e comida e água *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram submetidos à aprovação pelo Comitê de ética em uso de animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Sociais e Aplicadas de

Campina Grande (FACISA)– Número do Projeto/Protocolo: 62020042016 e CIAEP/CONCEA: 01.001.2012, em 01/04/2016 (Anexo 1).

2.5 Atividade anti-inflamatória

2.5.1 Triagem bioguiada através de teste de nocicepção induzida por formalina

Camundongos adultos (n=6) de ambos os sexos, em jejum prévio de 12 horas, foram tratados por via oral com 10 mL/kg do veículo com Cremophor, FH-Ac, FA-Ac e FE-Ac nas doses de 75 e 150 mg/kg. Após 30 minutos foi injetada formalina a 1% (20 µL) na região subplantar da pata direita e em seguida, os animais foram transferidos para funis de vidro transparentes e a reatividade animal foi observada, sendo registrado o tempo de início e término da ocorrência de lambeduras na pata que recebeu o agente flogístico pelos 5 minutos iniciais (Fase I - neurogênica) e entre 15 e 30 minutos (Fase II - inflamatória). O cálculo foi feito a partir da subtração do tempo final pelo inicial em cada fase ($T_f - T_o$), obtendo dessa forma o tempo em que cada animal passou lambendo a pata que recebeu o agente flogístico. O percentual de inibição foi calculado usando a fórmula: $\text{Inibição} = (V-X)/V \times 100\%$, onde V é o grupo veículo e X os testes ou controle positivo [10].

2.5.2 Peritonite induzida por carragenina

Camundongos adultos (grupo n=6) de ambos os sexos, em jejum prévio de 6 horas, foram tratados por via oral com 10 mL/kg do veículo com Cremophor, indometacina (10 mg/kg) e FA-Ac nas doses de 150 e 200 mg/kg. Após 30 min, foi injetada uma solução de carragenina a 1% (0,1 mL/10g) na cavidade intraperitoneal dos animais. Quatro horas após a indução da inflamação, os animais foram sacrificados e a cavidade intraperitoneal lavada com 2 mL do tampão fosfato alcalino-PBS heparinizado (pH 7,2), massageando cuidadosamente para diluição das células. Posteriormente esta solução contendo o PBS heparinizado+células do peritônio foi transferida para tubos de ensaio e, desta, foi coletado 0,02 mL e depositado em tubo contendo 0,4 mL de solução de Turk. Após cinco minutos foi realizada a contagem global de leucócitos polimorfonucleares em Câmara de Neubauer [11].

O percentual de inibição foi calculado usando a fórmula: $\text{Inibição} = (V-X)/V \times 100\%$, onde V é o número de leucócitos do grupo veículo e X os testes ou controle positivo [12].

Por fim, a solução contendo PBS heparinizado+células do peritônio foi centrifugada (1600 rpm) e o sobrenadante foi recolhido e nele foi determinado o conteúdo de proteínas totais no aparelho automatizado Hitaschi 907 [13] e determinadas citocinas.

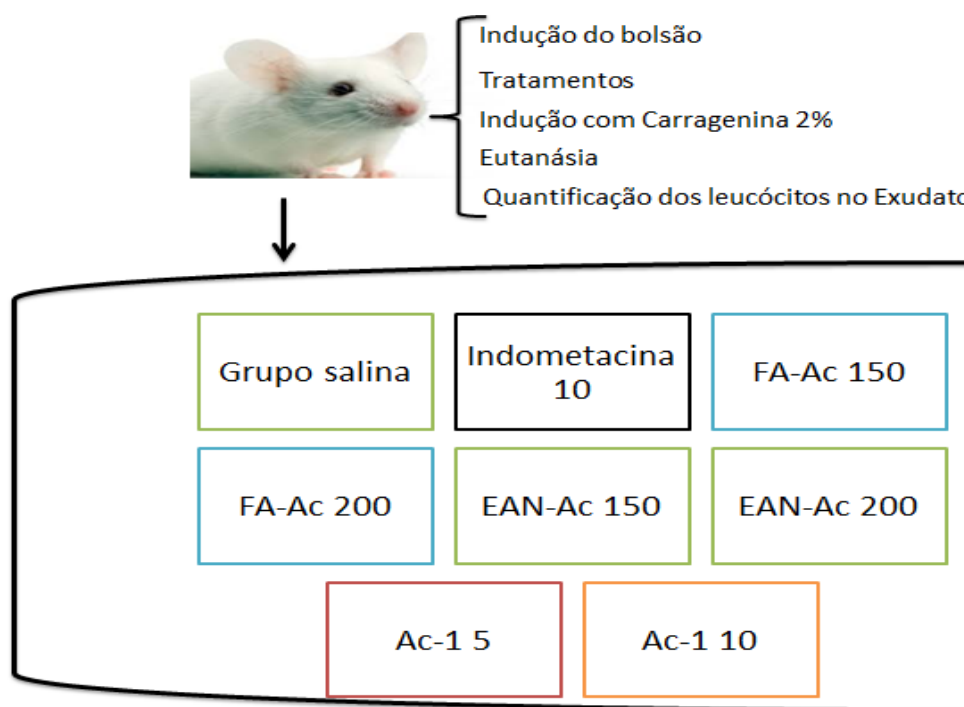
A realização da dosagem de Citocinas foi segundo o protocolo de procedimento padrão para dosagens de citocinas fornecidas pelo fabricante. Assim, foram utilizados tubos para citometria de fluxo, micropipetador multicanal e de 1 mL, PBS tween 20% e kit referente a cada citocina para modelos em camundongos (BD™) Cytrometric Bead Array (CBA) mouse Th1/ Th2/ Th17 CBA Kit.

Para a dosagem de NO foram utilizadas placa de 96 poços, micropipetador multicanal, reagente de Griess e uma solução de nitrito de sódio (69 M) (padrão). Foi realizada de acordo com a metodologia de Griess. Para realização do teste, foi preparada uma solução de nitrito de sódio a 69 µM e feita a curva padrão e plaqueados 50 µL das amostras em uma placa de 96 poços. Sob proteção da luz, foram adicionados 50 µL do reagente de Griess e a leitura foi realizada após 10 minutos em leitor de microplacas a 540 nm.

2.5.3 Bolsão inflamatório induzido por carragenina

Os camundongos foram divididos em 7 grupos (n = 6), machos e fêmeas separados aleatoriamente. Os animais foram anestesiados com éter e recebeu uma injeção subcutânea de 2,5 ml de ar no dorso, procedimento repetido após 3 dias. No sétimo dia, cada grupo, respectivamente, recebeu o tratamento com FA-Ac (150 mg e 200 mg/kg), EAN-Ac (150 mg e 200 mg/kg), Indometacina (10 mg/kg), Ac-1 (10 mg/kg) e veículo salina. Após 1 hora da administração das substâncias, os animais receberam 1 ml de carragenina 1% na região dorsal. Após 6 horas da administração da carragenina, os animais foram eutanasiados em câmara de éter e foi aplicado 3 ml de PBS (solução tampão fosfato com 0,1% de EDTA) nos bolsões dorsais. Os exudatos foram diluídos em solução de Turk (cristal violeta 0,01% em ácido acético 3%) e foi realizada a contagem do número de leucócitos polimorfo nucleares em hemocítmetro de Neubauer [33].

Figura 1. Modelo do bolsão inflamatório induzido por carragenina em camundongos *Swiss*



2.6 Atividade antimicrobiana

Para avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos FH-Ac, FA-Ac e FE-Ac foi empregado o método da microdiluição em placa. Foram utilizadas cepas provenientes da American Type Culture Collection (ATCC): *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 76645. Essas linhagens foram estocadas e mantidas em meios de cultura apropriados. Os extratos foram diluídos em DMSO a 5% em água destilada.

Utilizou-se o caldo Müeller-Hinton (MH), para as cepas bacterianas e caldo Sabouraud para *Candida albicans*. Em microplacas estéreis de 96 cavidades com fundo em forma de “U”, providas de tampa, distribuiu-se, asépticamente, 100 µL do caldo correspondente. O extrato foi utilizado em concentrações variando de 1000 a 0,98 µg/mL. [14].

2.7 Toxicidade

2.7.1 Toxicidade aguda

Na primeira fase do modelo foram avaliadas as alterações comportamentais frente ao sistema nervoso central, autônomo e ocorrência de morte. Deste modo, 36

camundongos adultos, divididos em 8 grupos, com machos e fêmeas em igual número, foram tratados por via oral (gavagem). Assim, 2 grupos foram tratados com salina V.O, 2 grupos tratados com FA-Ac (1000 mg/kg) e mais 2 grupos com EAN-AC-Ac (2000 mg/kg).

Os parâmetros de massa corporal, consumo de água e de ração, foram avaliados durante 30 min, 1, 2, 4, e a cada 24 horas por 14 dias, bem como, o estado de consciência e a disposição geral, a coordenação motora, o tônus muscular, os reflexos e a atividade do sistema nervoso autônomo.

Por fim, no 15º dia, os animais foram pesados e eutanasiados e seus órgãos (fígado, baço, coração e rins) foram pesados e avaliados macroscopicamente para verificar alterações no peso e/ou coloração [13].

2.7.2 *Artemia salina*

O teste de letalidade por *Artemia salina* foi usado para prever a atividade citotóxica dos extratos FA-Ac e EAN-Ac. As soluções de estoque dos extratos foram feitas em Cremophor e depois ajustado para 5 ml com água do mar artificial para obter concentrações variando de 10-5000 µg / ml e incubado em frascos em triplicata com larvas de *A. salina*. Dez náuplios desse crustáceo foram colocados em cada um dos frascos em triplicata. Um Controle com náuplios foram colocadas em uma mistura de água do mar artificial (3,8 g / l de sal marinho) e Cremophor apenas. Concentrações de Cremophor foram restritas a 5% ou abaixo. Após 24 h, os náuplios foram examinados contra um fundo iluminado, e foi determinado o número médio de sobreviventes em cada frasco (triplicata).

2.7.3 Toxicidade em eritrócitos

A atividade hemolítica de extratos vegetais, ou de uma preparação contendo saponinas, é avaliada por comparação com a atividade de um padrão de saponina com potencial de hemólise 1000 unidades por grama. Uma suspensão de eritrócitos é combinada com volumes iguais de uma diluição seriada do extrato. A menor concentração hemolítica total foi determinada posteriormente ao repouso do sistema por um período característico de tempo [13].

2.8 Análise estatística

Os resultados, quando necessário, foram avaliados através da análise de variância de uma via (ANOVA), seguida dos pós-testes adequados. Todos os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (d.p.) e o nível de significância mínimo de $p < 0,05$ analisados pelo software GraphPad Prism 5.0.

3 Resultados e discussão

3.2 Atividade anti-inflamatória

3.1.2 Screening farmacológico

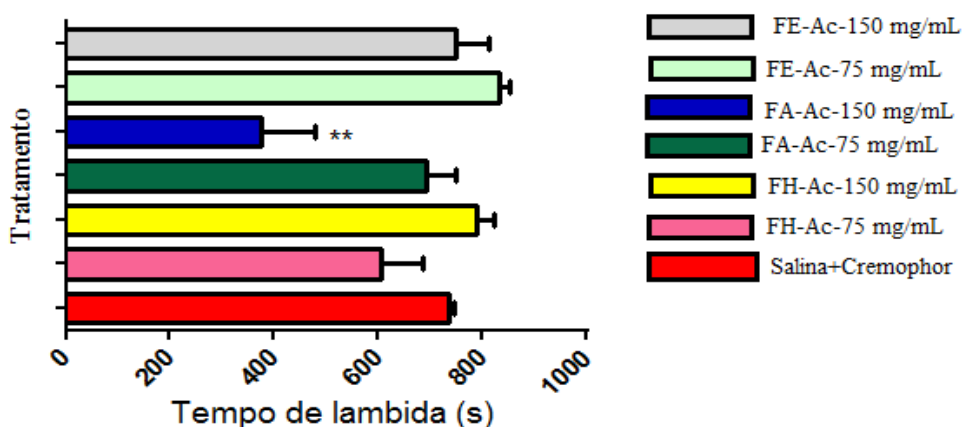
Na literatura não há registros de estudos farmacológicos conduzidos com a *A. conchostiflora*. No entanto, baseado nos estudos etnofarmacológicos que evidenciaram o uso dessa planta no tratamento de dores de coluna [14], se pretendeu validar esse conhecimento popular através de ensaios com modelos farmacológicos de investigação de atividades anti-inflamatória, antinociceptiva, hemolítica e tóxica.

Foram avaliados inicialmente os extratos hexânico (FH-Ac), acetato de etila (FA-Ac) e etanólico (FE-Ac). Para tanto foi empregado o modelo de nociceção induzida por formalina para se determinar as potencialidades analgésicas e anti-inflamatórias dos referidos extratos.

Na fase I do teste se avaliou a inibição da nociceção e na fase II se verificou a instalação do processo inflamatório. Nesta última ocorre a migração de substâncias pró-inflamatórias, a exemplo das prostaglandinas, por isso alguns autores consideram o presente modelo capaz de avaliar em primeiro plano o processo algico e em última análise a capacidade anti-inflamatória de substâncias sob investigação [15].

Os extratos nas doses testadas foram incapazes de inibir o processo nociceptivo na primeira fase do referido modelo. Na segunda fase o FA-Ac na dose de 150 mg/kg reduziu em 49,5% a nociceção, sendo significativa a inibição se comparada ao controle negativo (Figura 1). Os resultados sugeriram que o FA-Ac apresenta propriedades anti-inflamatórias, a qual necessitou de uma investigação mais aprofundada, com modelos mais específicos.

Figura 2. Fases II do modelo de nociceção induzida por formalina



No estudo fitoquímico quantitativo realizado em paralelo no FA-Ac se determinou as concentrações de 55,28±7,14 de taninos, 59,84±1,24 de polifenóis e 34,78±2,68 de flavonoides. Além disso, nesse extrato durante a prospecção fitoquímica foram isolados dois ésteres fenólicos e três triterpenos glicosilados. Esses achados corroboram com a evidência da atividade anti-inflamatória demonstrada, isso porque os metabólitos secundários quantificados e os fitoconstituintes isolados apresentam várias atividades biológicas, entre elas a anti-inflamatória, principalmente pelo aumento na permeabilidade capilar, inibição do exudato proteico e da migração de leucócitos [16].

A. congestiflora pertence a uma família com atividades farmacológicas importantes descritas na medicina popular. Em estudos quimiotaxonômicos as cucurbitáceas se caracterizam por apresentar as cucurbitacinas, triterpenos que conferem aos membros dessa família um imenso potencial bioprospector, causando interesse devido a sua toxicidade e ao amplo espectro de atividades terapêuticas [17].

Ao longo dos últimos anos, há registros de centenas de trabalhos que investigaram as atividades de tais compostos, reunindo informações sobre estruturas e atividades biológicas de cucurbitacinas, se destacaram entre as diversas atividades biológicas o bloqueio da divisão celular e os efeitos purgativo, abortivo, citotóxico, antineoplásico, anti-inflamatório, hepato-protetor, curativo, antiparasitário e antimicrobiano [18].

3.1.2 Peritonite induzida por carragenina

Após a triagem realizada a FA-Ac foi escolhida para a realização dos demais modelos de investigação de atividade anti-inflamatória. O modelo da peritonite induzida por carragenina. Nesse teste se avaliou a migração leucocitária através da quantificação do número de leucócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$) no exsudato peritoneal [19]. Também se realizou a quantificação do teor de proteínas e de citocinas pró-inflamatórias no mesmo exudato inflamatório.

Foi possível observar uma menor quantidade de leucócitos polimorfonucleares (tabela 6) e de proteínas totais no exsudato, quantitativamente semelhantes no grupo em que se administrou indometacina (10 mg/kg) e no tratado com o FA-Ac (200 mg/kg). Embora a comparação de potência anti-inflamatória não é possível na medida que extratos possuem uma miscelânea de compostos químicos, os quais podem atuar de forma sinérgica ou individualizada.

Tabela 1. Efeito antiquimiotático da FA-Ac sobre o número de leucócitos totais e de proteínas totais no exsudato da cavidade intraperitoneal de camundongos no modelo de peritonite induzida por carragenina

| | Número global de polimorfonucleares ($\times 10^3/\text{mm}^3$) | Proteínas totais no exudato (g/dL) | Inibição (%) | |
|-----------------|---|------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| | | | Número global de polimorfonucleares | Proteínas totais no exudato |
| Salina | 13,53 \pm 3,50 | 29,6 | ----- | ----- |
| Indometacina | 4,45 \pm 0,77 ^{***} | 10,4 ^{***} | 67,0 | 64,8 |
| FA-Ac 150 mg/kg | 8,26 \pm 1,97 ^{**} | 13,6 ^{***} | 38,8 | 54,0 |
| FA-Ac 200 mg/kg | 3,54 \pm 0,67 ^{***} | 7,2 ^{***} | 73,8 | 75,7 |

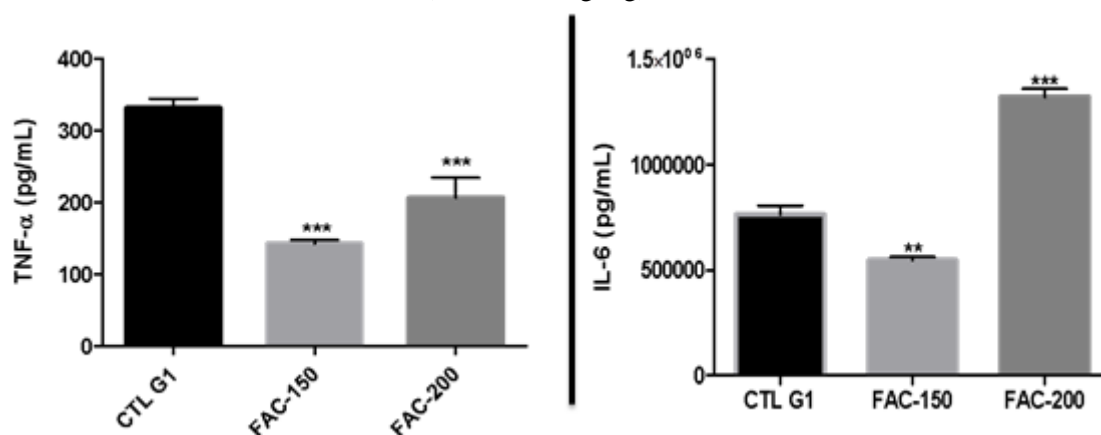
Os resultados estão expressos como média \pm d.p. (n=5). Análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do post teste de Tukey, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. A ausência de asteriscos demonstra que os dados não foram significativos.

Pelos dados observa-se que houve diferença estatisticamente significativa entre as doses de 150 e 200 mg/kg do FA-Ac em ambos os parâmetros observados. Nesse quesito se sugere que as substâncias presentes nesse extrato impedem a migração leucocitária ou simplesmente atuam inibindo os mediadores químicos responsáveis pelo processo inflamatório [19].

Quanto aos mediadores químicos também foi investigada a influência das principais citocinas pró-inflamatórias no efeito produzido pelo extrato (figura 7). Isso porque a peritonite induzida por carragenina promove a migração leucocitária peritoneal e produção de citocinas pro-inflamatórias [20].

Durante a peritonite inflamatória, mediadores tais como TNF- α e IL-6 foram quantificados e mostraram-se reduzidos pelo pré-tratamento com o FA-Ac.

Figuras 3. Concentração de TNF- α (a) e IL-6 (b) no exsudato do lavado da cavidade peritoneal de camundongos submetidos à peritonite por carragenina e tratados com o FA-Ac (150 e 200 mg/Kg).



***p < 0,001, **p < 0,01 e *p < 0,05 em relação ao grupo controle após análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni.

Ficou evidente que o extrato influencia na expressão do TNF- α e, assim, se confirma o achado da diminuição da migração leucocitária. Embora macrófagos e células T tenham sido considerados os principais produtores de TNF- α , outras células também podem produzi-lo como células B, natural killers, células endoteliais, mastócitos, neutrófilos e etc. [21].

Esta é uma citocina pro-inflamatória implicada na patogênese de muitas doenças. Esta molécula interage com seu receptor para desencadear suas funções através de muitas vias de sinalização, incluindo a ativação do fator nuclear kapa- β (NF-kB) envolvido com o processo inflamatório [22-23]. Essa citocina desempenha um importante papel no sistema imune durante processos inflamatórios, proliferação celular, diferenciação e apoptose. Molécula que não é usualmente detectada em indivíduos saudáveis, mas tem seus níveis séricos e teciduais aumentados em processos inflamatórios e infecciosos [21].

A outra citocina que teve seus níveis diminuídos no modelo de peritonite foi a IL-6. Esta é uma citocina pro-inflamatória que tem papel vital sobre o processo inflamatório e a ativação de macrófagos, e é um dos mais importantes mediadores da febre e das respostas de fase aguda [24-25].

A IL-6 não é expressa em indivíduos saudáveis, mas é rapidamente sintetizada em condições de lesão tecidual e infecções e é crítica para a manutenção das defesas do organismo [26]. Além disso, a produção anormal e excessiva de IL-6 tem sido relacionada com processos inflamatórios severos e complicados e doenças imunes

crônicas [26]. A descoberta inicial da IL-6 revelou sua importância na promoção da expansão e ativação das células T e B e na resposta inflamatória da fase aguda [26].

Fazendo uma relação da promissora atividade anti-inflamatória evidenciada para o FA-Ac e os seus constituintes isolados se chega a uma estreita ligação causa efeito. Isso porque foram isoladas 3 cucurbitacinas e pesquisas com esse grupo de substâncias isoladas de outras cucurbitáceas demonstraram uma forte atividade anti-inflamatória, comprovada com modelos biológicos aplicados a elas [18,27].

Triterpenoides são constituintes que tem despertado grande interesse em anos recentes devido ao seu potencial farmacológico com inúmeras atividades terapêuticas, tais como anticâncer, antimicrobiana, antidiurética e anti-inflamatória [28-30].

Estudos tem mostrado que a ação anti-inflamatória de triterpenoides pode estar associada com a inibição de transcrição do NF- κ B, inibição da COX-2 e inibição da produção de citocinas pro-inflamatória, [31,32] Recentemente, tem-se mostrado que triterpenoides inibem a produção de NO [24,33], PGE2, IL-6, e diminui a migração leucocitária em modelo de peritonite [24].

Vários estudos tem mostrado ação inibitória de triterpenos sobre a produção de TNF- α em diferentes modelos de inflamação [28, 31, 32, 34, 35]. De Almeida e cols (2015) estudaram vários triterpenos e descreveram efeitos inibitórios sobre a produção da IL-6, corroborando achados anteriores [36].

Na verificação dos níveis de outras citocinas e mediadores, tais como IL-4, IL-17 e do óxido nítrico (NO) no modelo de peritonite não foi encontrada significância estatística dos resultados do FA-Ac em relação ao controle negativo, demonstrando que o extrato interfere no processo inflamatório sem inibir essas vias de sinalização.

O óxido nítrico (NO) é um mensageiro pouco ortodoxo que tem inúmeros alvos moleculares. Em mamíferos o NO pode ser gerado por 3 diferentes isoformas da enzima NO sintase (NOS): a neuronal (NOSn), a induzida (NOSi) e a endotelial (NOSe).

A NOSi não é usualmente expressa nas células, mas pode ser induzida por citocinas, lipopolissacarídeos bacterianos e outros agentes. Embora primeiramente identificada em macrófagos, sua expressão pode ser induzida em praticamente todo tipo celular [37].

Esse fato norteou para a exclusão de algumas possíveis rotas de atuação dos princípios ativos presentes nesse extrato. Principalmente a não atuação do óxido nítrico. Isso porque a grande maioria dos processos inflamatória são caracterizados por abundância de atividade de macrófagos e neutrófilos e quantidades significantes de NO,

provenientes da NOSi, podem ser secretadas por estas células onde são responsáveis por vários dos sinais e sintomas da inflamação, e inclusive, por danos nos tecidos vizinhos [37].

Segundo o método realizado a A IL-4 foi outra citocina que também não participou na inibição do processo anti-inflamatório exibido pelo extrato. Ela é multifuncional e produzida principalmente por células T ativadas, mas também por mastócitos, basófilos e eosinófilos.

Funcionalmente a IL-4 é muito conhecida por definir o fenótipo Th2 dos linfócitos e pela regulação da proliferação celular, apoptose, e expressão de inúmeros genes em vários tipos celulares, incluindo linfócitos, macrófagos, fibroblastos, células epiteliais e endoteliais. Por sua atuação sobre macrófagos, um tipo celular criticamente envolvido com a inflamação, a IL-4 desempenha um papel no processo inflamatório [38].

Além destas últimas a IL-17 também não teve seus níveis alterados nesse modelo. Isso é uma característica, muitas vezes vantajosa, pois a mesma é uma citocina pro-inflamatória com papel crítico em certas condições inflamatórias crônicas. Estudos mostram que esta citocina pode ocasionar a produção de outras citocinas pro-inflamatórias importantes [39].

Devido ao papel central das citocinas na regulação das respostas imunes e inflamatórias, estratégias terapêuticas que buscam interferir nas redes de sinalização das citocinas tem emergido como importantes opções para o tratamento de doenças inflamatórias, auto-imunes e do câncer. Através da neutralização de citocinas pro-inflamatórias específicas se pode minimizar muitos efeitos colaterais uma vez que este tipo de intervenção opera quase que exclusivamente em compartimentos extracelulares ao invés de intracelulares, tornando mínima a toxicidade sobre órgãos e podendo configurar-se como excelente alternativa aos AINES na terapêutica de processos inflamatórios [40].

Muitos inibidores da sinalização de citocinas já estão atualmente em uso ou em fases finais de desenvolvimento, para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas [41], [25], e ênfase tem se dado aquelas citocinas que são produzidas nos momentos iniciais das cascatas inflamatórias, tais como a IL-6 e o TNF- α [41].

3.1.3 Bolsão inflamatório por carragenina

Foi avaliada a atividade do FA-Ac, EAN-AC-Ac e Ac-1 frente ao recrutamento leucocitário também pelo modelo do bolsão inflamatório.

Quanto ao EAN-AC-Ac o modelo serviu para confirmar o apelo etnofarmacológico do presente estudo, isso porque a população em geral ao utilizar *A. congestiflora* faz uso da mesma em forma de chá e a produção inicial desse extrato foi semelhante ao processo caseiro, diferindo apenas pelo procedimento de secagem por aspersão, o qual confere maior estabilidade se comparado ao chá na forma líquida [7,14].

Na tabela 2 podem ser evidenciados os resultados do modelo do bolsão inflamatório. Pode ser observado que a FA-Ac, EAN-AC-Ac e Ac-1 nas doses administradas apresentaram significativo efeito na diminuição do número de leucócitos no exsudato. Isso porque a diminuição da infiltração leucocitária é um dos sinais não clínicos da remissão do processo inflamatório [3].

Tabela 2. Efeito da FA-Ac, Ac-1 e EAN-AC-Ac sobre o número de leucócitos totais no exsudato da cavidade escapular de camundongos após bolsão inflamatório

| Tratamentos | Número global de polimorfonucleares ($\times 10^3/\text{mm}^3$) | Inibição (%) |
|---------------------|---|--------------|
| Salina | 1,57 \pm 0,08 | -- |
| Indometacina | 0,61 \pm 0,27*** | 61,1% |
| FA-Ac 150 mg/kg | 0,75 \pm 0,14*** | 52,3% |
| FA-Ac 200 mg/kg | 0,74 \pm 0,30*** | 53,2% |
| Ac-1 10 mg/kg | 1,06 \pm 0,17** | 32,5% |
| EAN-AC-Ac 150 mg/kg | 0,72 \pm 0,13*** | 54,0% |
| EAN-AC-Ac 200 mg/kg | 0,77 \pm 0,12*** | 50,8% |

Os resultados estão expressos como média \pm d.p. (n=5). Análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do post teste de Tukey, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. A ausência de asteriscos demonstra que os dados não foram significativos.

O composto Ac-1 também apresentou uma atividade significativa na redução significativa no infiltrado leucocitário (*p<0,05), no entanto com um percentual de inibição inferior ao apresentado pela FA-Ac e EAN-Ac. Sendo

novamente a comparação em termos de potência ser inviável, pois os extratos possuem na composição uma gama de substâncias químicas, podendo ser ou não biologicamente ativas.

Nesse contexto, cabe observar que ainda que uma planta possa ter uma constituição formada por centenas de metabólitos secundários, geralmente os constituintes presentes em maior concentração são geralmente isolados primeiramente e mais facilmente pelos métodos clássicos. A análise de substâncias ativas é de grande complexidade, pelo fato dos compostos presentes em menor proporção na planta são, em muitos casos, os responsáveis pelos efeitos biológicos mais satisfatórios [1].

São necessários outros testes para se avaliar de forma mais contundente a atividade anti-inflamatória do Ac-1, testando inclusive outras doses para se verificar, entre outros aspectos, a potência desse princípio ativo. Por outro lado, se faz necessário mais estudos sobre as características químicas e físico-químicas desse composto, as quais podem interferir de forma preponderante nas suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas [3].

Os ácidos hidroxicinâmicos, como o ácido ferúlico e seu éster (Ac-1) são os antioxidantes mais ativos da classe dos ácidos fenólicos. Tal característica é justificada pela dupla ligação presente na molécula dos derivados do ácido cinâmico que interfere na estabilidade do radical por ressonância do deslocamento do elétron desemparelhado, enquanto os demais ácidos fenólicos não possuem essa característica [42].

O ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico) é um antioxidante abundante e importante na prevenção e / ou tratamento de muitos distúrbios ligados ao estresse oxidativo, como doença de Alzheimer, diabetes, câncer, doenças cardiovasculares e aterosclerose. E essa potência antioxidante pode ser um dos mecanismos das atividades farmacológica apresentadas na literatura e da atividade anti-inflamatória evidenciada nesse trabalho, pois o processo inflamatório como um todo possui um forte componente oxidativo [43].

A atividade do EAN-Ac foi condizente com o uso popular de *A. congestiflora* para as patologias de origem inflamatória como as raquialgias, confirmando a viabilidade do uso da planta para essa finalidade [14]. Alguns trabalhos realizados com extratos aquosos de outras espécies de cucurbitáceas também evidenciaram um

efeito anti-inflamatório apreciável, atentando para as potencialidades das pesquisas com essa família [44].

3.2 Atividade antimicrobiana

Na verificação preliminar do potencial antimicrobiano observou-se atividade antibacteriana apenas do FA-Ac contra *S. aureus* na concentração de 500 µg/mL. Os demais extratos conservaram a viabilidade das cepas utilizadas, sugerindo que os mesmos não apresentam atividade contra as bactérias utilizadas.

Da mesma forma que na atividade antibacteriana, na verificação da atividade contra a *C. albicans* o FA-Ac foi o único a apresentar a capacidade de inibição e esta se deu na concentração de 250 µg/mL.

A presença de taninos e flavonoides pode conferir atividade antimicrobiana a um extrato [45-48]. Dessa maneira, a presença desses compostos no FA-Ac, atestada na Fitoquímica semi-quantitativa pode ter contribuído na atividade verificada contra uma cepa bacteriana e outra fúngica.

Além disso, outra explicação para as atividades antimicrobianas citadas para a fase acetato de etila se encontra nos seus fitoconstituintes isolados. Isso porque foram isolados dois polifenóis na forma de ésteres do ácido ferúlico e 3 triterpenos glicosilados, os quais em conjunto podem promover uma atividade antimicrobiana, assim como foi verificado em pesquisas envolvendo outros membros da família *Cucurbitaceae* [49-50]. No entanto, para se confirmar essa inferência são necessários mais estudos, empregando outras metodologias para a avaliação da atividade antimicrobiana.

3.3 Toxicidade

3.3.1 Toxicidade aguda

Por fim se buscou determinar a toxicidade aguda da FA-Ac e do EAN-Ac da *A. congestiflora*. Isso porque muitas plantas são completamente desconhecidas quanto ao potencial de causar intoxicações, sendo a quantidade de plantas potencialmente tóxicas elevada [51]. E, nesse aspecto, algumas espécies da família *Cucurbitaceae* foram avaliadas, sendo que algumas delas tiveram seu potencial toxicológico confirmado a partir desses ensaios [52].

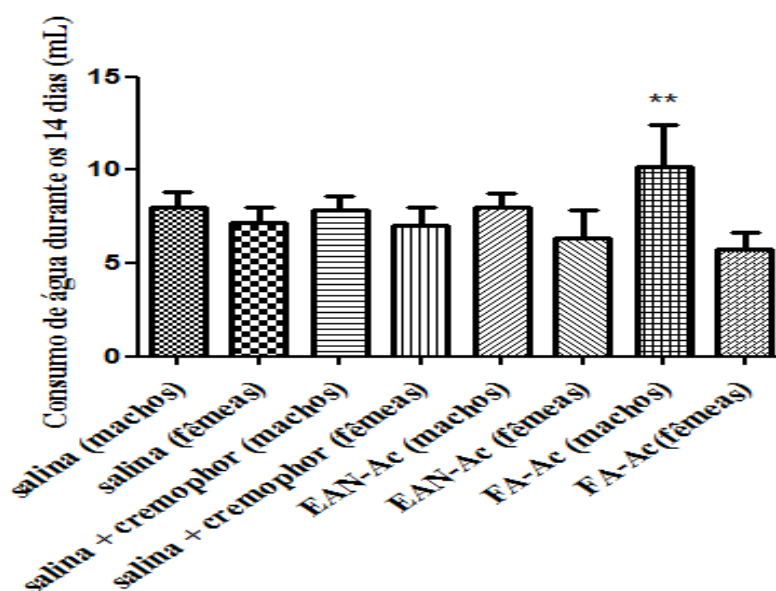
Antes de se realizar o modelo de toxicidade aguda proposto com a FA-Ac e o EAN-AC-Ac se realizou um teste piloto como 3 camundongos machos e 3 fêmeas para cada extrato, administrando-se a dose de 2000 mg/kg v.o. No teste com a FA-

Ac 1 animal macho foi a óbito em cerca de 30 minutos e outras 3 fêmeas após 1 hora. Nos animais tratados com o EAN-Ac não se observou ocorrência de óbitos após 4 horas de observação. A partir desses dados se conduziu o experimento com a FA-Ac administrada na dose de 1000 mg/kg e a EAN-Ac na dose de 2000 mg/kg.

A administração da FA-Ac ocasionou a morte de 3 fêmeas durante todo o experimento. E Pelo *screening* hipocrático, observou-se leve sonolência durante a primeira hora, com episódios de diarreia em ambos os grupos de machos e fêmeas nos 3 primeiros dias.

Quanto ao consumo de água não ocorreu diferença estatística para os grupos tratados com a EA-Ac na dose de 2000 mg/kg, já no grupo tratado com a FA-Ac houve diferença estatística apenas no grupo de machos, com um aumento do consumo de água por cada animal (Figura 5).

Figura 4. Efeito da administração oral da FA-Ac e do EAN-Ac no consumo de água durante os 14 dias de observação



Apesar dos óbitos ocorridos o FA-Ac Os órgãos não mostraram alterações macroscópicas e os pesos relativos dos órgãos não tiveram diferença estatística significativa entre os animais tratados e os controles (tabela 3). Para a avaliação dos animais tratados com o EAN-Ac não ocorreram alterações comportamentais significativas, óbitos, alterações no consumo de água e ração e peso ou modificações macroscópicas nos Órgãos.

Tabela 3. Efeito da administração da FA-Ac sobre os parâmetros consumo de água e de ração, evolução ponderal e peso relativos dos Órgãos durante os 14 dias

| Parâmetros | Tratamentos | | | |
|------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------|----------------|
| | Controle Negativo (machos) | Controle negativo (fêmeas) | FA-Ac (machos) | FA-Ac (fêmeas) |
| Consumo de água (ml) | 8,036 ± 0,77 | 7,202 ± 0,77 | 10,18 ± 2,26 | 5,714 ± 0,97 |
| Consumo de ração (g) | 6,869 ± 0,69 | 6,238 ± 0,95 | 7,833 ± 2,03 | 6,369 ± 1,95 |
| Evolução ponderal (g) | | | | |
| Inicial | 29,17 ± 0,98 | 24,33 ± 0,81 | 25,83 ± 1,16 | 25,20 ± 0,83 |
| Final | 38,17 ± 2,92 | 29,50 ± 1,51 | 37,33 ± 1,52 | 30,33 ± 1,63 |
| Peso dos órgãos | | | | |
| Baço | 0,4557 ± 0,16 | 0,4151 ± 0,07 | 0,5455 ± 0,06 | 0,5246 ± 0,20 |
| Rins | 1,250 ± 0,08 | 1,067 ± 0,12 | 1,305 ± 0,06 | 1,124 ± 0,18 |
| Fígado | 5,399 ± 1,22 | 5,171 ± 0,73 | 5,820 ± 0,22 | 5,250 ± 0,96 |
| Coração | 0,4025 ± 0,05 | 0,4148 ± 0,04 | 0,4749 ± 0,02 | 0,4479 ± 0,07 |

No estudo da toxicidade ficou evidenciado que a FA-Ac possui uma toxicidade superior a do EAN-Ac. Desta forma, se deve conduzir outros testes para dimensionar a faixa terapêutica para a fase, embora ela tenha apresentado nos testes farmacológicos atividades anti-inflamatória considerável. Por outro lado, o EAN-AC-Ac não demonstrou indícios de toxicidade na dose testada e, portanto, sendo possível inferir certo grau segurança quanto uso popular da raiz de *A. congestiflora* na forma de decocto.

3.3.2 *Artemia salina*

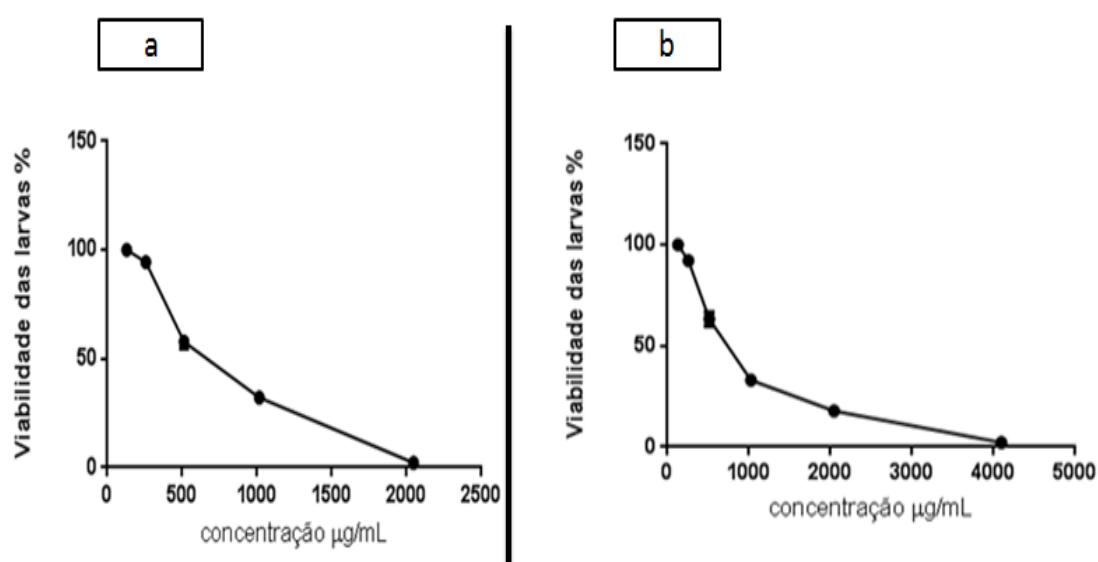
Esta é a primeira vez que extratos obtidos da *A. congestiflora* são submetidos à ensaios de toxicidade pelo método *in vivo* ou *in vitro*, sendo que popularmente essa espécie é descrita como potencialmente tóxica [4].

Os resultados obtidos no ensaio com *A. salina para* o FA-Ac indicam uma toxicidade considerável (CL50= 705,6 µg/mL). Já o EAN-Ac demonstrou menor toxicidade (CL50 = 650,00 µg/mL) em relação a outro extrato testado. A toxicidade

com *A. salina* mostrou boa correlação com a toxicidade aguda, pois nesse último o EAN-Ac também apresentou menor potencial toxicológico. No entanto, nesse ensaio substâncias com CL50 > 1000 µg/mL são consideradas pouco tóxicas [53]. Assim, ambos os extratos se apresentaram dentro da faixa de toxicidade segura (figura 5).

Dessa forma, esses ensaios *in vitro* são importantes, pois muitas vezes podem substituir testes *in vivo* ou confirmá-los. Principalmente na perspectiva atual de menor uso de animais quando existirem métodos alternativos.

Figura 5. Efeito dos extratos FAC-Ac (a) e EAN-Ac sobre a mortalidade de náuplios de *Artemia salina*



3.3.3 Toxicidade em eritrócitos

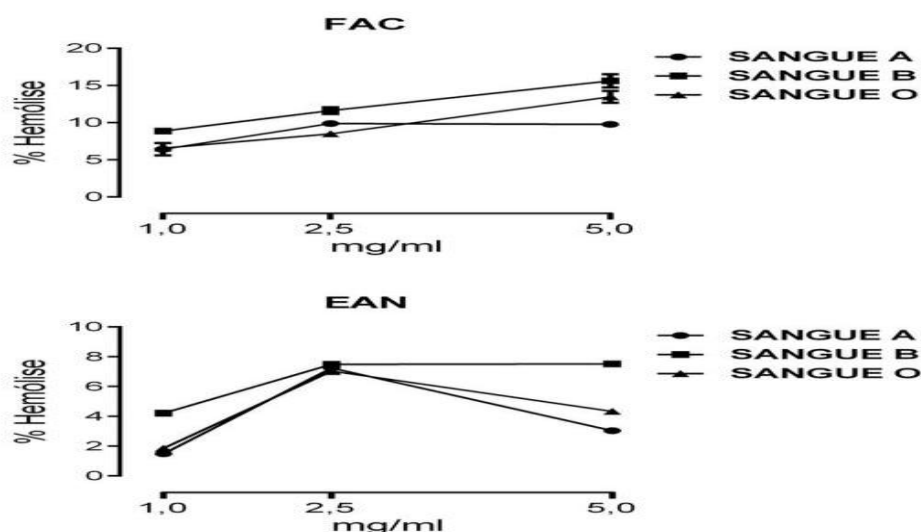
A hemólise é definida pela extrusão do glóbulo vermelho, liberando hemoglobina. A hemoglobina livre no plasma causa prejuízos a saúde promovendo graves danos em órgãos vitais tais como fígado, rins e coração, sendo indispensável dessa maneira a observação desse fenômeno biológico [52]. Nesse sentido na triagem de atividades biológicas e toxicológicas de extratos vegetais, é de grande importância a investigação da atividade hemolítica das espécies pesquisadas [53]. A técnica de medição da hemólise através da quantificação da absorbância do lavado de hemácias em contato com as substâncias testes é mais recente e recomendada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, a qual indica a observação de absorbância em ultravioleta, sendo este um ensaio preconizado no Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos [54]. Independente da metodologia

adotada é essencial a avaliação dessa atividade, indicando prováveis danos da espécie estudada sobre os eritrócitos [55].

A atividade hemolítica foi apreciada para os extratos acetato (FA-Ac) e aquoso nebulizado-EAN-Ac (Figura 11). Ambos os extratos não apresentaram valores de percentual de hemólise consideráveis em relação ao controle Triton-x. O FA-Ac apresentou valores de hemólise crescentes conforme o aumento da concentração desse extrato para os sangues A e B, no entanto para o sangue O ocorreu um decréscimo no percentual hemolítico na concentração de 5mg/mL. Os antígenos dos sistemas ABO e H são carboidratos e, desta forma, não são produtos primários dos genes que realizam o controle da sua expressão. Estes produzem as enzimas glicosiltransferases, que levam açúcares, adicionando-os a uma substância inicial da membrana da hemácia [55]. Por esse motivo é importante a realização do ensaio de hemólise comparando todo o sistema ABO, pois assim se consegue um resultado mais global do perfil hemolítico das substâncias estudadas.

Quanto ao EAN-Ac ocorreu um decréscimo no percentual hemolítico nas concentrações de 2,5 e 5mg/mL para os sorotipos A e O e no B esse percentual se manteve crescente (figura 6). Na triagem fitoquímica o teste se mostrou positivo para a presença de saponinas, metabolito secundário com conhecida atividade hemolítica [56]. No entanto, a sua concentração no extrato pode não ser suficiente para exercer esse efeito esperado. Um dos primeiros modelos de ação das saponinas em direção às membranas refere que ocorre a formação espontânea de complexos entre saponinas e colesterol, seguida da associação destes complexos a "estruturas de tipo micelar bidimensional" dentro da membrana. As cadeias de açúcar hidrófilas das saponinas, provavelmente orientadas para o centro de um complexo do tipo micelar, fato que leva à formação de um poro aquoso que desarticula a membrana [57-58].

Figura 6 - Porcentagem de hemólise em eritrócitos do tipos sanguíneos A, B e O na presença dos extratos FA-AC ou EAN-AC da *Apodanthera congestiflora* (1 µg/mL, 2,5 µg/mL, 5 µg/mL). As barras indicam a média ± EPM da porcentagem da hemólise (n=3).



Já para o FA-Ac não foi realizada a avaliação fitoquímica preliminar, no entanto dele foram isolados 3 triterpenos do tipo cucurbitanos e a despeito do potencial hemolítico das saponinas triterpênicas, alguns desses compostos naturais possuem estudos que evidenciaram o seu caráter protetor em relação a hemólise, principalmente pelo bloqueio da ação do sistema complemento [59]. Já outros compostos dessa classe são associados à toxicidade devido a sua capacidade de causar hemólise. Esse efeito é resultante da sua capacidade de interagir com os componentes da membrana celular dos eritrócitos, principalmente com as moléculas de colesterol, induzindo uma deformação na membrana com conseqüente extravasamento do conteúdo intracelular [60-63].

A hemólise pode ser devida a presença de substâncias ou compostos utilizados como medicamentos ou constituintes das plantas. Desta forma, resultados negativos obtidos em modelos com extratos provenientes de plantas indicaram ausência de toxicidade para membrana do eritrócito nos modelos utilizado.

Os resultados evidenciam que, em eritrócitos humanos, o extrato causou hemólise discreta (abaixo de 20%) mesmo em concentrações consideradas elevadas. Nesse sentido, um produto natural para não apresentar atividade hemolítica, deve apresentar CH_{50} maior que 1250 µg/mL. Portanto, os dados obtidos sugerem que o referido extrato apresenta baixa citotoxicidade frente a eritrócitos.

4 Conclusão

O presente estudo demonstrou que o extrato acetato possui atividade anti-inflamatória, a qual é possivelmente mediada pela supressão da produção das citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e a IL-6. Além de possuir atividade antimicrobiana discreta contra *S. aureus* e *C. albicans*. A mesma atividade anti-inflamatória foi evidenciada para o extrato aquoso nebulizado e o éster ferúlico isolado. Por outro lado, os resultados obtidos nesta pesquisa conferem base científica preliminar quanto ao potencial toxicológico do FA-Ac e EAN-Ac, sendo que o primeiro mostrou possuir maior toxicidade. Deste modo, *Apodanthera congestiflora* mostrou-se uma fonte promissora de substâncias com atividade biológica. No entanto, ressalva-se o cuidado para o potencial toxicológico apresentado, sendo assim seu uso condicionado à determinação de doses seguras.

REFERÊNCIAS

CECHINEL FILHO, V. Medicamentos de origem vegetal: atualidades, desafios e perspectivas. Ed. UNIVALI, Itajai-SC, 2015.

GRIS, P.; GAUTHEIR, J.; CHENG, P.; GIBSON, D. G.; GRIS, D.; LAUR, D.; PERSON, J.; WENTUORTH, S.; NACKLEY, A. G.; MAWNER, W.; DIATCHENKO, L; A novel alternatively spliced isoform of the mu-opioid receptor functional antagonism. **Molecular Pain**, v. 6, p. 1-10, 2010.

HILAL-DANDAN, R.; BRUNTON, L. **Manual de farmacologia e terapêutica de Goodman & Gilman**. AMGH Editora, 2015.

LINS, F. S. V. Levantamento Etnobotânico das espécies vegetais cultivadas e utilizadas com fins medicinais no município de Cuité, Paraíba. [Monografia], p. 16, Cuité-Paraíba, 2013.

YASIR, M. et al. Antioxidant and genoprotective activity of selected cucurbitaceae seed extracts and LC-ESIMS/MS identification of phenolic components. **Food chemistry**, v. 199, p. 307-313, 2016.

ATTANAYAKE, A. P. et al. Efficacy and toxicological evaluation of *Coccinia grandis* (*Cucurbitaceae*) extract in male Wistar rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 3, n. 6, p. 460-466, 2013.

RODRIGUES, M. Q. Plantas medicinais utilizadas pelos moradores dos assentamentos de nova conquista e patativa do assaré – PB e fitoterápicos comercializados no município de patos-PB. [Monografia], Patos-Paraíba, 2015.

ROQUE, A. A.; ROCHA, R. M.; LOIOLA, M. I. B. 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.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin teste in mice: dissociation between inflammatory an non-inflammatory pain. **Revista Pain**, v. 30, p. 103-114, 1987.

SPILLER, F. et al. Anti-inflammatory effects of red pepper (*Capsicum baccatum*) on carrageenan-and antigen-induced inflammation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, n. 4, p. 473-478, 2008.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; EJ, D. B. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings journal**, v. 18, p. 412, 1959.

GABILAN, N. H. Purificação parcial de toxinas da Anêmona do Mar *Bunodosoma caissarum* Correa 1964 – Estudo das propriedades da atividade hemolítica. 1992. 40 f. **Tese** (Doutorado), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1992.

OLIVEIRA, A. C. B. et al. Avaliação toxicológica pré-clínica do chá das folhas de *Morus nigra* L.(*Moraceae*). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 15, n. 2, p. 244-9, 2013.

SILVA, J. P. R. Perfil etnobotânico: uso de plantas medicinais pela população de Nova Olinda–PB. Campina Grande-PB. Monografia (conclusão de curso). 47p. Universidade Estadual da Paraíba-UEPB, 2015.

SHIBATA, M.; OHBUBO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, p. 347-352, 1989.

ANDIA, I.; MAFFULLI, N. Platelet-rich plasma for managing pain and inflammation in osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 9, n. 12, p. 721-730, 2013.

RAJASREE, R. S. et al. Phytochemicals of Cucurbitaceae family—A review. **International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research**, v. 8, p. 113-123, 2016.

CASTARDO, J. C. Avaliação da atividade do extrato hidroalcolólico bruto da *Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zappi em modelos experimentais de inflamação aguda em camundongos. Dissertação de Mestrado em Farmacologia da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

SILVA, L. R.; ALVES, A. F.; CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; BRAGA, R. M.; DE ALMEIDA, R. N.; BARBOSA-FILHO, J. M.; PIUVEZAM, M. R. Milonine, a Morphinandienone Alkaloid, Has Anti-Inflammatory and Analgesic Effects by Inhibiting TNF-alpha and IL-1beta Production. **Inflammation**, v., n., p., 2017.

ZELOVA, H.; HOSEK, J. TNF-alpha signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. **Inflamm Res**, v. 62, n. 7, p. 641-651, 2013.

AGGARWAL, B. B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 9, p. 745-756, 2003.

ZHANG, C.; CHEN, Z.; MENG, X.; LI, M.; ZHANG, L.; HUANG, A. The involvement and possible mechanism of pro-inflammatory tumor necrosis FA-Actor alpha (TNF-alpha) in thoracic ossification of the ligamentum flavum. **PLoS One**, v. 12, n. 6, p. e0178986, 2017.

NIU, X.; YAO, H.; LI, W.; MU, Q.; LI, H.; HU, H.; LI, Y.; HUANG, H. delta-Amyrone, a specific inhibitor of cyclooxygenase-2, exhibits anti-inflammatory effects in vitro and in vivo of mice. **International Immunopharmacology**, v. 21, n. 1, p. 112-118, 2014.

ARTEAGA FIGUEROA, L.; BARBOSA NAVARRO, L.; PATINO VERA, M.; PETRICEVICH, V. L. Preliminary Studies of the Immunomodulator Effect of the *Bougainvillea xbutiana* Extract in a Mouse Model. **Evidence Based Complementary Alternative Medicine**, v. 2015, n., p. 479412, 2015.

JORDAN, S. C.; CHOI, J.; KIM, I.; WU, G.; TOYODA, M.; SHIN, B.; VO, A. Interleukin-6, A Cytokine Critical to Mediation of Inflammation, Autoimmunity and Allograft Rejection: Therapeutic Implications of IL-6 Receptor Blockade. **Transplantation**, v. 101, n. 1, p. 32-44, 2017.

ABDELKHALEK, Abdelfattah A. et al. Derivatives of Cucurbitacin-E-glucoside produced by *Curvularia lunata* NRRL 2178: Anti-inflammatory, antipyretic, antitumor activities, and effect on biochemical parameters. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2017.

GUPTA, M. B.; BHALLA, T. N.; GUPTA, G. P.; MITRA, C. R.; BHARGAVA, K. P. Anti-inflammatory activity of natural products (I) triterpenoids. **EuropEAN-Ac Journal of Pharmacology**, v. 6, n. 1, p. 67-70, 1969.

MELO, C. M.; CARVALHO, K. M.; NEVES, J. C.; MORAIS, T. C.; RAO, V. S.; SANTOS, F. A.; BRITO, G. A.; CHAVES, M. H. alpha,beta-amyrin, a natural triterpenoid ameliorates L-arginine-induced acute pancreatitis in rats. **World J Gastroenterol**, v. 16, n. 34, p. 4272-4280, 2010.

MATOS, I.; BENTO, A. F.; MARCON, R.; CLAUDINO, R. F.; CALIXTO, J. B. Preventive and therapeutic oral administration of the pentacyclic triterpene alpha,beta-amyrin ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice: the relevance of cannabinoid system. **Mol Immunol**, v. 54, n. 3-4, p. 482-492, 2013.

UKIYA, M.; AKIHISA, T.; TOKUDA, H.; SUZUKI, H.; MUKAINAKA, T.; ICHIISHI, E.; YASUKAWA, K.; KASAHARA, Y.; NISHINO, H. Constituents of Compositae plants III. Anti-tumor promoting effects and cytotoxic activity against human cancer cell lines of triterpene diols and triols from edible chrysanthemum flowers. **Cancer Lett**, v. 177, n. 1, p. 7-12, 2002.

DA SILVA, K. A.; PASZCUK, A. F.; PASSOS, G. F.; SILVA, E. S.; BENTO, A. F.; MEOTTI, F. C.; CALIXTO, J. B. Activation of cannabinoid receptors by the pentacyclic triterpene alpha,beta-amyrin inhibits inflammatory and neuropathic persistent pain in mice. **Pain**, v. 152, n. 8, p. 1872-1887, 2011.

ALMEIDA, P. D.; BOLETI, A. P.; RUDIGER, A. L.; LOURENCO, G. A.; DA VEIGA JUNIOR, V. F.; LIMA, E. S. Anti-Inflammatory Activity of Triterpenes Isolated from *Protium paniculatum* Oil-Resins. **Evidence Based Complementary Alternative Medicine**, v. 2015, n., p. 293768, 2015.

TEIXEIRA, C. R.; TEIXEIRA, M. J.; GOMES, R. B.; SANTOS, C. S.; ANDRADE, B. B.; RAFFAELE-NETTO, I.; SILVA, J. S.; GUGLIELMOTTI, A.; MIRANDA, J. C.; BARRAL, A.; BRODSKYN, C.; BARRAL-NETTO, M. Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. **Journal of Immunology**, v. 175, n. 12, p. 8346-8353, 2005.

MEDEIROS, R.; OTUKI, M. F.; AVELLAR, M. C.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene alpha-amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **European Journal of Pharmacology**, v. 559, n. 2-3, p. 227-235, 2007.

HOLANDA PINTO, S. A.; PINTO, L. M.; CUNHA, G. M.; CHAVES, M. H.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Anti-inflammatory effect of alpha, beta-Amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis. **Inflammopharmacology**, v. 16, n. 1, p. 48-52, 2008.

LEE, S. W.; YUN, B. R.; KIM, M. H.; PARK, C. S.; LEE, W. S.; OH, H. M.; RHO, M. C. Phenolic compounds isolated from *Psoralea corylifolia* inhibit IL-6-induced STAT3 activation. **Planta Medicinal**, v. 78, n. 9, p. 903-906, 2012.

FORSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal**, v. 33, n. 7, p. 829-837, 837a-837d, 2012.

LUZINA, I. G.; KEEGAN, A. D.; HELLER, N. M.; ROOK, G. A.; SHEA-DONOHUE, T.; ATAMAS, S. P. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of "alternatives". **Journal of Leukocyte Biology**, v. 92, n. 4, p. 753-764, 2012.

VENKATESHA, S. H.; DUDICS, S.; ACHARYA, B.; MOUDGIL, K. D. Cytokine-modulating strategies and newer cytokine targets for arthritis therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 1, p. 887-906, 2014.

DINARELLO, C. A. Anti-inflammatory Agents: Present and Future. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 935-950, 2010

KOPF, M.; BACHMANN, M. F.; MARSLAND, B. J. Averting inflammation by targeting the cytokine environment. **Natural Review Drug Discovery**, v. 9, n. 9, p. 703-718, 2010.

SILVEIRA, A. L. C. **Validação de métodos para a determinação de compostos fenólicos em melancia**. 2013. Tese de Doutorado.

HIGUCHI, M. Antioxidant Properties of Wheat Bran against Oxidative Stress. In: **Wheat and Rice in Disease Prevention and Health**. 2014. p. 181-199.

ADEDAPO, A.; ADEWUYI, T.; SOFIDIYA, M.. Phytochemistry, anti-inflammatory and analgesic activities of the aqueous leaf extract of *Lagenaria breviflora* (*Cucurbitaceae*) in laboratory animals. **Revista de Biología Tropical**, v. 61, n. 1, p. 281-290, 2013.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3875-3883, 1991.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R. et al. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **Journal of applied microbiology**, v. 90, n. 4, p. 494-507, 2001.

VELURI, R. et al. Phytotoxic and antimicrobial activities of catechin derivatives. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 5, p. 1077-1082, 2004.

BYLKA, W.; MATLAWSKA, I.; PILEWSKI, N. A. Natural flavonoids as antimicrobial agents. **Jana**, v. 7, n. 2, p. 9-16, 2004.

MIRO, M. Cucurbitacins and their pharmacological effects. **Phytotherapy research**, v. 9, n. 3, p. 159-168, 1995.

RATHEE, Deepti et al. Phytochemical screening and antimicrobial activity of *Picrorrhiza kurroa*, an Indian traditional plant used to treat chronic diarrhea. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 9, p. S1307-S1313, 2016.

KNAUS, U.; WAGNER, H. Effects of boswellic acid of *Boswellia serrata* and other triterpenic acids on the complement system. **Phytomedicine**, v. 3, n. 1, p. 77-80, 1996

DEWICK, Paul M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. John Wiley & Sons, 2002.

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v. 45, n. 05, p. 31-34, 1982.

CARVALHO et al. Efeito da bomba de infusão de soluções sobre o grau de hemólise em concentrados de hemácias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. V.29, n. 2. 149-152, 2007

BEDNARCZUK, V. O. et al. Tests in vitro and in vivo used in the toxicological screening of natural products. **Visão Acadêmica**, v. 11, p. 43-50, 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIO (ANVISA). Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos. Brasília. 2003.

GIRELLO, A.L, KÜHN, T.I.B.B. **Fundamentos da imuno-hematologia eritrocitária**. São Paulo, Ed. Senac, 2002.

SIMÕES et al. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Florianópolis: Editora Artmed, 2017.

GAUTHIER, C. et al. Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semi-synthetic and natural lupane-and oleanane-type saponins. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 17, n. 5, p. 2002-2008, 2009.

AUGUSTIN, J. M. et al. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. **Phytochemistry**, v. 72, n. 6, p. 435-457, 2011.

Glauert, A.M.; Dingle, J.T.; Lucy, J.A. Action of saponin on biological cell membranes. **Nature**, v.196, p.952-955, 1962.

KARABALIEV, M.; KOCHEV, V. Interaction of solid supported thin lipid films with saponin. *Sensors and Actuators B*, v.88, p.101-105, 2003.

CARVALHO, G. D; ARRUDA, V. M. **Caderno sobre plantas tóxicas: principais plantas tóxicas causadoras de morte súbita em bovinos**. 1ª ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2011.

ANEXO

Anexo I. Folha de aprovação pelo Comitê de ética





PARECER
NÚMERO DO PROJETO/ PROTOCOLO : 6201042016
CIAEP/CONCEA Nº: 01.001.2012
DATA DO PARECER: 01/04/2016

1. Pesquisador Responsável: **Helimarcos Nunes Pereira**
Título do Projeto: ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS RAÍZES DE *Apodanthera congestiflora* Cogn. (CURCUBITACEAE)
2. Considerações: Este projeto envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794 de 08 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do CESED, em 01 / 04 / 2016.

| | |
|---------------------|---|
| Vigência do Projeto | 01 de março de 2015 a 01 de março de 2017 |
| Espécie / linhagem | Camundongos Swiss (<i>Mus musculus</i>) |
| Nº de animais | 120 |
| Peso / idade | 25 a 35 g / adultos |
| Sexo | Feminino e masculino |
| Origem | FCM |

Parecer Final: APROVADO



Thárcia Kiara B. de Oliveira
Coordenadora do CEUA-CESED



Av. Senador Agostinho de Figueiredo, 1001 - Itararé
 CEP: 58164-940 - Campina Grande, PB Fone: 51. 2101.8800
 www.ceued.br | concea@ceued.br | fcm@ceued.br | eiec@ceued.br
 CNPJ: 02.108.025/0001-40