

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**

MARIA AMÉLIA LIMA DOS SANTOS TENÓRIO

**ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *Zeyheria
tuberculosa* (VELL) BUREAU (BIGNONIACEAE), COM ATIVIDADE INIBIDORA
DA LINFOPROLIFERAÇÃO, POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR**

Maceió

2011

MARIA AMÉLIA LIMA DOS SANTOS TENÓRIO

ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *Zeyheria tuberculosa* (VELL) BUREAU (BIGNONIACEAE), COM ATIVIDADE INIBIDORA DA LINFOPROLIFERAÇÃO, POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Edson de Souza Bento

Coorientador: Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana

Maceió

Fevereiro de 2015

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Maria Helena Mendes Lessa

T312a Tenório, Maria Amélia Lima dos Santos.
Análise quimiométrica do extrato das folhas de *Zeyheria tuberculosa* (Vell) Bureau (Bignoniaceae), com atividade inibidora da linfoproliferação, por ressonância magnética nuclear / Maria Amélia Lima dos Santos Tenório. – Maceió, 2015.
124 f. : ils, tabs.

Orientador: Edson de Souza Bento.
Coorientador: Antônio Euzébio Goulart Santana.
Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2014.

Bibliografia. f. 113-123.

1. Ácido Ursólico. 2. Ácido Oleanólico. 3. Quantificação. 4. Quimiometria. 5. Teste MTT. I. Título.

CDU: 54.061:633.88



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
 Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
 57072-970, Maceió-AL, Brasil
 Fone: (82) 3214-1144
 Email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de tese da doutoranda **Maria Amélia Lima dos Santos Tenório**, intitulada: “**Análise Quimiométrica do extrato das folhas de *Zeyheria tuberculosa* (Vell) Bureau (Bignoniaceae), com atividade inibidora da linfoproliferação, por Ressonância Magnética Nuclear**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 19 de fevereiro de 2015, às 09h00, na Sala de Reuniões do IQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Edson de Souza Bento
 Orientador (PPGQB/IQB/UFAL)

Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana
 Coorientador (PPGQB/IQB/UFAL)

Emiliano de Oliveira Barreto
 (ICBS/UFAL)

Luiz Carlos Caetano
 (IQB/UFAL)

Josiane Souza Luna
 (IFAL)

Maria Teresa Salles Trevisan
 (UFC)

Dedico este trabalho:

Aos meus amados pais, Eivaldo Soares dos Santos e Maria Lúcia Lima dos Santos, por todo o amor, o cuidado, a entrega e os sacrifícios.

Aos meus amados Ruy Albuquerque Tenório e Camila Maria Lima dos Santos, pelo amor, os cuidados constantes e as orações.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Jesus Cristo, pelo seu infinito amor e pela sua presença e providência em todas as minhas alegrias e aflições;

Aos meus amados pais, Erivaldo Soares dos Santos e Maria Lúcia Lima dos Santos, por todo o amor e dedicação. Ao meu esposo Ruy Albuquerque Tenório pelo amor, paciência e pela ajuda na formatação deste trabalho. E as minhas irmãs, Camila Maria L. dos Santos, Betânia Pereira e Eunice Maria da Silva pelos cuidados e orações. Ao querido Yuri Tenório pelo carinho e pela ajuda na formatação do trabalho;

Aos meus queridos orientadores, Prof. Dr. Edson de Souza Bento e Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana, pela orientação, oportunidade, confiança e incentivo durante o doutorado e pelos bons momentos juntos;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) do Ministério da Educação (MEC) por ter fomentado a nossa pesquisa, pela bolsa de doutorado fornecida, pelo cuidado com a excelência dos Cursos de pós-graduação stricto sensu e pelo acesso aos Periódicos da Capes;

Ao Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas pelo Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia, responsável pela minha qualificação profissional;

À Coordenação do Programa de Pós-graduação de Química e Biotecnologia. Ao Anderson, Ana Paula e demais funcionários da secretaria do PPGQB, pelo apoio e dedicação;

Ao Instituto do Milênio do Semi-Árido pelo material vegetal fornecido pelo projeto IMSEAR;

Aos Laboratórios de Pesquisa em Recursos Naturais e de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas onde foram desenvolvidos os experimentos e análises;

Aos Laboratórios de Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) pela avaliação das atividades citotóxica e farmacológica;

Ao Prof. Dr. Emiliano por ter gentilmente me recebido em seu laboratório. A doutoranda Janylle e ao IC Noé, por terem contribuído na parte experimental de forma tão significativa para a realização deste trabalho;

A Profa. Dra. Jia Li e ao Prof. Dr. Luiz Caetano por terem contribuído de forma tão significativa na parte técnica deste trabalho e pelos ensinamentos;

Aos colegas de laboratório Adilson Sabino (doutorando) e Alexandre Crispim (mestrando) por terem contribuído de forma significativa na parte experimental deste trabalho, pelos ensinamentos e pelos bons momentos juntos;

A banca examinadora que participou da minha qualificação, as professoras doutoras Ana Catarina R. Leite, Josiane de S. Luna e Maria Raquel F. de Lima, pelas correções e ensinamentos;

A todos os professores que contribuíram para a minha formação por meio das disciplinas e os excelentes cursos ministrados;

Aos colegas de laboratório Maria dos Prazeres Menezes (doutoranda), Raquel Ferreira (MsC), Marcos Sá (MsC), Ísis Torres (MsC), aos alunos de iniciação científica, Kerlly Buffe, Mariel Matos, Michele Marques, Lucas Henrique, Stephanie e aos demais colegas dos laboratórios de Ressonância Magnética Nuclear e de Pesquisa em Recursos Naturais, pelas contribuições prestadas durante a parte experimental deste trabalho e pelos bons momentos juntos;

Aos técnicos Aldy Santos e Margarida Teodoro que sempre estiveram disponíveis e contribuindo para este trabalho;

Aos colegas de sala de aula que de alguma forma contribuíram para a minha formação durante o Curso de Doutorado e também pelos bons momentos juntos;

A Nilda e demais servidores da UFAL responsáveis pela higienização dos ambientes de estudo e trabalho.

***“O temor do Senhor é o princípio
da sabedoria; e o conhecimento
do Santo é o entendimento.”
(Provérbios 8:13)***

RESUMO

Desde os tempos antigos, os produtos naturais são utilizados como fonte de medicamentos, para prevenir e tratar doenças. Atualmente, o alto custo e o tempo despendido para as análises de produtos naturais têm sido significativamente reduzidos pelo uso de abordagens modernas, como a análise quimiométrica, que dão agilidade ao processo de desenvolvimento de novos produtos. Este trabalho teve como objetivo a análise quimiométrica do extrato etanólico, da fração em clorofórmio e subfrações do extrato bruto das folhas de *Zeyheria tuberculosa* (Vell) Bureau (Bignoniaceae), por Ressonância Magnética Nuclear, com a caracterização e quantificação dos compostos majoritários presentes nestes, além da construção de um modelo capaz de selecionar extratos potencialmente promissores, servindo como guia para um posterior isolamento das substâncias de interesse, viabilizando a descoberta de compostos bioativos. A fração em clorofórmio que concentrou a quase totalidade dos metabólitos do extrato bruto, apresentou 100 % de atividade inibitória da linfoproliferação, sendo por isso escolhida para caracterização e quantificação dos compostos majoritários presentes. A análise espectral de RMN da fração em clorofórmio, incluindo experimentos 1D (^1H , ^{13}C , DEPT 90°, DEPT 135°) e 2D (J-Resolvido, HSQC e HMBC) permitiu a elucidação estrutural detalhada de dois compostos majoritários, os Ácidos Ursólico e Oleanólico, ambos identificados pela primeira vez nesta espécie. Devido à importância desses ácidos no tratamento de doenças da pele e vários tipos de câncer, foram determinadas as quantificações relativas destes triterpenos no extrato bruto (ZTB), na fração em clorofórmio (ZTP2) e nas subfrações, utilizando-se para este fim técnicas de RMN e ferramentas quimiométricas (programas Matlab, AMIX e SIMCA). Todos os espectros foram processados e analisados utilizando o programa TOPSPIN (BRUKER). Os resultados quantitativos e qualitativos da análise quimiométrica por RMN do extrato bruto, fração clorofórmica e subfrações de *Z. tuberculosa* mostraram que as frações ZTF3 (avaliada no teste MTT como sendo atóxica nas concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e ZTF6 (avaliada no teste MTT como sendo atóxica na concentração de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e citotóxica nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) são as mais ricas dos ácidos oleanólico e ursólico, respectivamente, e por isso são as mais promissoras para o isolamento destes triterpenos. Já a fração ZTF4 foi a segunda fração mais rica tanto em ácido ursólico como em ácido oleanólico, sendo a mais promissora para o isolamento destes dois ácidos juntos, considerando ainda que esta fração foi avaliada no teste MTT como atóxica nas concentrações de 10 e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, e citotóxica apenas na concentração de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Os ácidos ursólico e oleanólico possuem uma gama de propriedades terapêuticas e um alto valor comercial, sendo de grande relevância os resultados qualitativos e quantitativos, obtidos neste trabalho, referentes a esses triterpenos encontrados nas folhas da espécie *Zeyheria tuberculosa*. O modelo proposto neste trabalho foi eficiente, conforme indicado pelos valores do parâmetro Q, e satisfatório para a classificação das amostras em grupos e subgrupos, segundo a presença dos ácidos ursólico e oleanólico (composição química) e a concentração destes nas amostras, podendo ser de grande utilidade na identificação de extratos potencialmente promissores, servindo como guia para um posterior isolamento da(s) substância(s) de interesse.

Palavras-chave: Ácido Oleanólico. Ácido Ursólico. Quantificação. Quimiometria. Teste MTT.

ABSTRACT

Since ancient times, natural products are used as source of medicines to prevent and treat disease. Currently, high cost and time taken for analysis of natural products have been significantly reduced by the use of modern approaches such as chemometric analysis, which gives flexibility to the process of development of new products. This study aimed to chemometric analysis of the ethanol extract, fraction in chloroform and subfractions of the crude extract of leaves *Zeyheria tuberculosa* (Vell) Bureau (Bignoniaceae), for Nuclear Magnetic Resonance, with the characterization and quantification of the major compounds present in these, as well as construction of a model to select potentially promising extracts, serving as a guide for further isolation of the substances of interest, enabling the discovery of bioactive compounds. The fraction in chloroform which concentrated almost all the ethanol extract metabolites, showed 100% inhibitory activity lymphocyte proliferation at a concentration of $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, and is therefore chosen for characterization and quantification of the major compounds present. The NMR spectral analysis of the fraction in chloroform, including 1D experiments (^1H , ^{13}C , DEPT 90° , DEPT 135°) and 2D (J-Resolved, HSQC and HMBC) allowed the detailed structural elucidation of two major compounds, ursolic and oleanolic acids, both identified for the first time in this species. Due to the importance of these acids in the treatment of skin diseases and various cancers, measurements were determined for these triterpenes in ethanol extract (ZTB), fraction in chloroform (ZTP2) and the subfractions, using techniques for this purpose NMR and chemometric tools (Matlab programs, AMIX and SIMCA). All spectra were processed and analyzed using the program topspin (BRUKER). The qualitative and quantitative results of the chemometrics analysis for NMR of the ethanol extract, fraction in chloroform and subfractions of *Zeyheria tuberculosa* showed that fractions ZTF3 (evaluated in MTT as being non-cytotoxic at concentrations of 10, 50 and $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and ZTF6 (measured in MTT as being non-cytotoxic at the concentration of $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and cytotoxic at concentrations of 50 and $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) are the richest of oleanolic and ursolic acids, respectively, and so are more promising for the isolation of these triterpenes. The fraction ZTF4 was second richer fraction both as oleanolic acid and ursolic acid, the most promising for the isolation of these two acids together, also considering that this fraction was evaluated in MTT as non-cytotoxic at concentrations of 10 and $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, and only the cytotoxic concentration of $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. The ursolic and oleanolic acids have a range of therapeutic properties and a high commercial value, being highly relevant the qualitative and quantitative results obtained in this study, referring to these triterpenes found in the leaves of the species *Zeyheria tuberculosa*. The model proposed in this work was efficient, as indicated by the values of the Q parameter, and suitable for the classification of samples into groups and subgroups according to the presence of ursolic and oleanolic acids (chemical composition) and the concentration of these in the samples, and it may be useful in the identification of potentially promising extracts, serving as a guide for subsequent isolation of the substance of interest.

Keywords: Oleanolic Acid. Ursolic Acid. Quantification. Chemometric. MTT Test.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Zeyheria tuberculosa</i> ; (a) Folhas e Flores, (b) Frutos, (c) Sementes, (d) Casca, (e) Madeira.....	24
Figura 2 - Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais (a), Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (b).....	36
Figura 3 - Espectro de RMN ^1H da fração ZTP2 em CDCl_3	54
Figura 4 - Espectro de RMN ^1H do extrato ZTB (vermelho) e da fração ZTP2 (azul) em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 5:2	55
Figura 5 - Espectro de RMN ^{13}C da fração ZTP2 em CDCl_3	56
Figura 6 - Espectro de RMN ^1H da fração ZTP2 em CDCl_3	57
Figura 7 - Expansão do Espectro de RMN ^1H de ZTP2 em CDCl_3	57
Figura 8 - Espectro de RMN ^{13}C de ZTP2 com expansão em CDCl_3	58
Figura 9 - Expansão (1) do Espectro de RMN ^{13}C de ZTP2 em CDCl_3	59
Figura 10 - Expansão (2) do Espectro de RMN ^{13}C de ZTP2 em CDCl_3	59
Figura 11 - Espectro de RMN DEPT 90° de ZTP2 em CDCl_3	59
Figura 12 - Expansão (1) do Espectro de RMN DEPT 90° de ZTP2 em CDCl_3	60
Figura 13 - Expansão (2) do Espectro de RMN DEPT 90° de ZTP2 em CDCl_3	60
Figura 14 - Espectro de RMN DEPT 135° de ZTP2 em CDCl_3	60
Figura 15 - Expansão (1) espectro de RMN DEPT 135° de ZTP2 em CDCl_3	61
Figura 16 - Espectro de RMN HSQC de ZTP2 em CDCl_3	62
Figura 17 - Expansão (1) do Espectro de RMN HSQC de ZTP2 em CDCl_3	62
Figura 18 - Expansão (2) do Espectro de RMN HSQC de ZTP2 em CDCl_3	62
Figura 19 - Expansão (3) do Espectro de RMN HSQC de ZTP2 em CDCl_3	63
Figura 20 - Espectro de RMN J-Resolvido de ZTP2 em CDCl_3	63
Figura 21 - Expansão (1) do espectro de RMN J-Resolvido de ZTP2 em CDCl_3	64
Figura 22 - Expansão (2) do espectro de RMN J-Resolvido de ZTP2 em CDCl_3	64
Figura 23 - Espectro de RMN HMBC de ZTP2 em CDCl_3	65
Figura 24 - Expansão (1) do espectro de RMN HMBC de ZTP2 em CDCl_3	65
Figura 25 - Expansão (2) do Espectro de RMN HMBC de ZTP2 em CDCl_3	65

Figura 26 - Expansão (3) do Espectro de RMN HMBC de ZTP2 em CDCl ₃	66
Figura 27 - Estrutura do Ácido Ursólico.....	67
Figura 28 - Estrutura do Ácido Oleanólico.....	68
Figura 29 - Espectro de RMN ¹ H da fração ZTF1 em CDCl ₃ /CD ₃ OD 5:2.....	74
Figura 30 - Espectro de RMN ¹ H da fração ZTF2 em CDCl ₃ /CD ₃ OD 5:2.....	75
Figura 31 - Espectro de RMN ¹ H da fração ZTF3 em CDCl ₃ /CD ₃ OD 5:2.....	75
Figura 32 - Espectro de RMN ¹ H da fração ZTF4 em CDCl ₃ /CD ₃ OD 5:2.....	75
Figura 33 - Espectro de RMN ¹ H da fração ZTF5 em CDCl ₃ /CD ₃ OD 5:2.....	76
Figura 34 - Espectro de RMN ¹ H da fração ZTF6 em CDCl ₃ /CD ₃ OD 5:2.....	76
Figura 35 - Espectro de RMN ¹ H da fração ZTF7 em CDCl ₃ /CD ₃ OD 5:2.....	76
Figura 36 - Espectro de RMN ¹ H da fração ZTF8 em CDCl ₃ /CD ₃ OD 5:2.....	77
Figura 37 - Espectro de RMN ¹ H da fração ZTF9 em CDCl ₃ /CD ₃ OD 5:2.....	77
Figura 38 - Espectro de RMN ¹ H da fração ZTP2 em CDCl ₃ /CD ₃ OD 5:2.....	77
Figura 39 - Espectro de RMN ¹ H das frações ZTF1-ZTF9 em CDCl ₃ /CD ₃ OD 5:2.....	78
Figura 40 - Espectro de RMN ¹ H das frações ZTF1-ZTF9 e do extrato ZTP2 em CDCl ₃ /CD ₃ OD 5:2.....	78
Figura 41 - Representação da Quantificação Relativa obtida com o emprego do programa Matlab: (a) gráfico <i>PCA</i> gerado na quantificação, (b) sinais do ácido ursólico (δ 0,82) quantificados nas amostras, (c) perfil médio relativo de todas as amostras	87
Figura 42 - Representação da Quantificação Relativa do ácido ursólico obtida com o emprego do programa Matlab: (a) quantificação 1, (b) quantificação 2, (c) quantificação 3, (d) As bolas coloridas representam as amostra quantificadas.....	87
Figura 43 - Representação da Quantificação Relativa obtida com o emprego do programa Matlab: (a) gráfico <i>PCA</i> gerado na quantificação, (b) sinais do ácido oleanólico (δ 1,15) quantificados nas amostras (c) perfil médio relativo de todas as amostras	89
Figura 44 - Representação da Quantificação relativa do ácido oleanólico obtida com o emprego do programa Matlab: (a) quantificação 1, (b) quantificação 2, (c) quantificação 3, (d) amostra.....	89
Figura 45 - <i>PCA</i> das amostras das três quantificações (análise em triplicata), produzido no programa de análise multivariada SIMCA. Grupo 1:	

Amostras ZTF3, ZTF4, ZTF5, ZTF6, ZTF7 e ZTF8. Grupo 2: Amostras ZTP2 e ZTB. Grupo 3: Amostras ZTF2 - Grupo 4: Amostras ZTF9. Grupo 5: Amostras ZTF1.....	93
Figura 46 - Expansão do grupo 1 pertencente ao gráfico <i>PCA</i> da figura 45.....	93
Figura 47 - Gráfico de <i>Loadings: PC1 e PC2 x Variável</i> (deslocamentos químicos). Grupo 1 (deslocamentos comuns aos ácidos ursólico e oleanólico e ainda deslocamentos exclusivos do ácido oleanólico). Grupo 2 (deslocamentos comuns aos ácidos ursólico e oleanólico e ainda deslocamentos exclusivos do ácido ursólico). Grupo 3 (deslocamentos comuns a ZTF1, ZTF2, ZTF9, ZTP2 e ZTB). Grupo 4 (deslocamentos comuns a ZTF2, ZTP2 e ZTB).....	95
Figura 48 - Valores de contribuição das Componentes Principais <i>PC1 e PC2</i> na variância ($R = 0,6899$).....	96
Figura 49 - As colunas pareadas formam a curva de variância. O melhor ponto de contribuição é a partir do início da curva (componente 1) até o fim da curva (componente 5), mostrados pelas setas em vermelho. Contribuição das cinco Componentes Principais, <i>PC1 a PC5</i> , na variância ($R = 0,95305$)	97
Figura 50 - Gráfico de <i>PC1 e PC3</i> das amostras quantificadas. As amostras foram agrupadas (1-5) de modo semelhante aos grupos (1-5) do gráfico de <i>PC1 e PC2</i>	98
Figura 51 - <i>PC1 e PC4</i> das amostras quantificadas.....	98
Figura 52 - Gráfico de <i>PC1 e PC5</i> das amostras quantificadas.....	100
Figura 53 - Gráfico de <i>PC2 e PC3</i> das amostras quantificadas	101
Figura 54 - Expansão do gráfico de <i>PC2 e PC3</i> das amostras quantificadas.....	101
Figura 55 - Efeito de <i>Z. tuberculosis</i> na viabilidade de macrófagos murinos, utilizando o ensaio MTT. As células foram tratadas com os extratos e frações de <i>Z. tuberculosis</i> (10, 50 ou 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e expostas durante 24 horas. Os dados foram expressos como % das células viáveis em comparação com o grupo controle e foram apresentados como média \pm SEM.....	104
Figura 56 - Análise Correlativa MTT x Concentração de AU em 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ($R = -0,11519$)	108
Figura 57 - Análise Correlativa MTT x Concentração de AU em 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ($R = -0,72463$)	109
Figura 58 - Análise Correlativa MTT x Concentração de AU em 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ($R = -0,72805$)	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Filtração da Fração ZTP2 Proveniente do Extrato ZTB	42
Tabela 2 - Variação de Coloração Observada nos Tubos (I).....	44
Tabela 3 - Variação de Coloração Observada nos Tubos (II).....	45
Tabela 4 - Resultado da Prospecção Fitoquímica do Extrato ZTB da Folha de <i>Z. tuberculosa</i>	53
Tabela 5 - Análise Geral dos Metabólitos da Fração Clorofórmica por RMN 1D e 2D	69
Tabela 6 - Integrações de Sinais dos Ácidos Ursólico e Oleanólico.....	83
Tabela 7 - Média das Integrações de Sinais dos Ácidos Ursólico e Oleanólico	84
Tabela 8 - Quantificação Relativa dos Ácidos Ursólico e Oleanólico.....	84
Tabela 9 - Quantificação Relativa dos Ácidos Ursólico e Oleanólico	85
Tabela 10 - Quantidades relativas dos Ácidos Ursólico e Oleanólico em relação à ZTB.....	86
Tabela 11 - Integrações de Sinais dos Ácidos Ursólico e Oleanólico	91
Tabela 12 - Quantidades relativas dos Ácidos Ursólico e Oleanólico.....	92
Tabela 13 - Média dos valores de absorvância do ensaio de viabilidade celular (MTT) com os extratos e frações de <i>Z. tuberculosa</i> nas concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	104
Tabela 14 - Desvio padrão dos valores de absorvância do ensaio de viabilidade celular (MTT) com os extratos e frações de <i>Z. tuberculosa</i> nas concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	104
Tabela 15 - Erro padrão dos valores de absorvância do ensaio de viabilidade celular (MTT) com os extratos e frações de <i>Z. tuberculosa</i> nas concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de Etila
ACP	Análise de Componentes Principais
CC	Cromatografia em Coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CHCl ₃	Clorofórmio
CDCl ₃	Clorofórmio Deuterado
CP	Componentes Principais
ConA	Concanavalina A
CW	<i>Continuous Wave</i>
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DIL	Decaimento Livre da Indução
EtOH	Etanol
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FT	<i>Fourier Transform</i>
FID	<i>Free Induction Decay</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IMSEAR	Instituto do Milênio do Semi-árido
MeOH	Metanol
MeOD	Metanol Deuterado
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
OC	Onda Contínua
PCA	<i>Principal Components Analysis</i>
PC's	<i>Principal Components</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
REA	Relação Estrutura Atividade
RG	Ganho do Receptor
TF	Transformada de Fourier
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

δ	Deslocamento Químico
d	Dupleto
dd	Duplo Dupleto
Hz	Hertz
J	Constante de Acoplamento
MHz	Megahertz
mL	Mililitros
nm	Nanômetro
s	Simpleto
t	Tripleto
μ L	Microlitros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REFERENCIAL TEÓRICO	24
2.1	A Espécie <i>Zeyheria tuberculosa</i> (Vell.) Bureau	24
2.2	Considerações sobre Triterpenos	28
2.3	Considerações sobre Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	29
2.3.1	Método de Onda Contínua (OC) ou <i>Continuous Wave (CW)</i>	29
2.3.2	Método de Transformada de Fourier (FT)	30
2.3.3	Deslocamento Químico (δ) em ppm	30
2.3.4	Acoplamento (J) em Hz	31
2.3.5	Integração	31
2.3.6	Relaxação Nuclear	31
2.3.7	RMN de ^{13}C	32
2.3.8	DEPTs	32
2.3.9	Experimentos de RMN Bidimensionais	32
2.3.9.1	HSQC (<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>)	32
2.3.9.2	HMBC (<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>)	33
2.3.9.3	J-Resolvido.....	33
2.4	Quimiometria	33
2.4.1	Análise de Componentes Principais – <i>PCA</i>	34
3	EXPERIMENTAL	36
3.1	Local de Realização do Trabalho	36
3.2	Material Botânico	37
3.3	Materiais, Equipamentos, Métodos de Extração e de Purificação	37

3.3.1	Solventes	37
3.3.2	Análise Cromatográfica	37
3.3.3	Reveladores	38
3.3.4	Preparação do Extrato Bruto.....	38
3.3.5	Métodos de Fracionamento e Purificação	38
3.3.6	Espectrômetros	39
3.4	Preparação e Etapas de Fracionamento do Extrato Bruto	39
3.4.1	Preparação do Extrato Etanólico das Folhas de <i>Z. tuberculosa</i>	39
3.4.2	Partição Líquido-Líquido do Extrato ZTB das Folhas de <i>Z. tuberculosa</i>	39
3.4.3	Análise Geral dos Metabólitos da Fração Clorofórmica utilizando a RMN.....	42
3.4.4	Filtração da Fração ZTP2 Proveniente do Extrato ZTB	42
3.4.5	Análise do Perfil Químico das Nove Frações, provenientes de ZTP2, utilizando a RMN.....	43
3.5	Prospecção Fitoquímica	43
3.5.1	Teste para Fenóis e Taninos	43
3.5.2	Teste para Antocianinas, Antocianidinas e Flavonóides	44
3.5.3	Teste para Leucoantocianidinas, Catequinas e Flavononas	44
3.5.4	Teste para Flavonóis, Flavanonas, Flavanonóis e Xantonas.....	45
3.5.5	Teste para Esteroides e Triterpenoides	45
3.5.6	Teste para Saponinas	46
3.5.7	Teste para Alcalóides	46
3.5.8	Teste para Antraquinonas, Antronas e Cumarinas.....	46
3.6	Bioensaios	47
3.6.1	Ensaio de Viabilidade Celular (Teste MTT)	47
3.6.1.1	Reagentes e instrumentos usados no ensaio MTT	47

3.6.1.2 Animais	47
3.6.1.3 Cultura de Células	47
3.6.1.4 Ensaio de Viabilidade Celular por Redução do MTT	48
3.6.1.5 Análise Estatística	49
3.6.1.6 Análise Correlativa	49
3.7 Quantificações Relativas dos Metabólitos Majoritários Principais Presentes nos Extratos Etanólico (ZTB), Clorofórmico (ZTP2) e Frações (ZTF1-ZTF9) das Folhas de <i>Z. Tuberculosa</i>.....	49
3.7.1 Quantificação Relativa Utilizando Cálculos Matemáticos	50
3.7.2 Quantificação Relativa Utilizando Análise Multivariada	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.1 Prospecção Fitoquímica do Extrato ZTB das Folhas de <i>Z. tuberculosa</i>.....	52
4.2 Análise Geral dos Metabólitos e Identificação Estrutural dos Compostos Presentes na Fração ZTP2.....	53
4.2.1 Análise Geral dos Metabólitos Presentes na Fração ZTP2	54
4.2.1.1 RMN ¹ H da fração ZTP2	54
4.2.1.2 RMN ¹³ C da fração ZTP2	55
4.2.2 Identificação Estrutural dos Compostos Presentes na Fração ZTP2.....	56
4.2.2.1 Ressonância Magnética Nuclear Unidimensional	56
4.2.2.2 Ressonância Magnética Nuclear Bidimensional	61
4.3 Análise do Perfil Químico das Nove Frações, Provenientes de ZTP2, Utilizando a RMN	74
4.4 Quantificações Relativas dos Metabólitos Majoritários Principais Presentes nos Extratos Etanólico (ZTB), Clorofórmico (ZTP2) e Frações (ZTF1-ZTF9) das Folhas de <i>Z. Tuberculosa</i>	79
4.4.1 Quantificação Relativa Utilizando Cálculos Matemáticos	79

4.4.2	Quantificação Relativa Utilizando Análise Multivariada	86
4.5	Bioensaios	102
4.5.1	Ensaio de Viabilidade Celular por Redução do MTT.....	102
4.5.2	Análise Correlativa: Atividade Citotóxica x Concentração de Ácido Ursólico	107
5	CONCLUSÃO	111
	REFERÊNCIAS	112

1 INTRODUÇÃO

Desde os tempos primitivos os vegetais são necessários à existência da sociedade como fonte de alimentos, de materiais para o vestuário, construção de casas, defesa e ataque, na produção de meios de transporte, como instrumento de trabalhos artísticos, culturais e religiosos, no controle de pragas e ainda com fins medicinais, para prevenção, tratamento e cura de doenças (PINTO et al., 2002; SIMÕES et al., 2003).

Dentro desse campo vasto de utilização dos vegetais será focado neste trabalho apenas o seu potencial medicinal. Entretanto nem todos os vegetais possuem propriedades medicinais. A Organização Mundial de Saúde (OMS) define planta medicinal como “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas para fins terapêuticos” (TÔRRES et al., 2005; VEIGA JÚNIOR et al., 2005).

As substâncias que podem ser usadas na terapêutica são conhecidas como metabólitos secundários e não são comuns à maioria das plantas, sendo características de grupos taxonômicos como família e gênero, são classificadas de acordo com a sua rota biossintética e são essenciais ao desenvolvimento, regulação, equilíbrio e defesa desses organismos (HARBORNE, 1999; MACEDO JÚNIOR, 2007; FUNARI et al., 2013).

No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65 – 80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (VEIGA JÚNIOR et al., 2005; BAGATINI et al., 2007). A facilidade na aquisição de plantas, o baixo custo, a eficiência na prevenção e no tratamento de doenças, e a tradição do uso de plantas medicinais, contribuem para a grande utilização desses produtos naturais pelas populações dos países em desenvolvimento (SIMÕES et al., 2003).

No Brasil, até 1996, a estimativa do consumo de medicamentos sintéticos era em torno de 63%, porém esse consumo vinha por parte de apenas 20% da população. O restante utilizava os produtos de origem natural, principalmente as plantas medicinais e seus extratos, como a principal ou a única opção terapêutica (AQUINO, 2007).

Atualmente, 82% da população brasileira, aproximadamente, utilizam produtos à base de ervas, pois mesmo com a grande evolução da medicina convencional a partir da segunda metade do século XX, ainda existem dificuldades básicas na sua utilização pelas populações carentes, que vão desde o acesso aos centros de atendimentos hospitalares até a obtenção de exames e medicamentos (VEIGA JÚNIOR et al., 2005; AQUINO, 2007).

O decreto presidencial no. 5.813, de 22 de junho de 2006, instituiu a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos como prioridade nacional e enfatiza a necessidade do uso sustentável da biodiversidade brasileira, uma vez que as plantas medicinais de uso tradicional selecionadas tenham procedimentos de controle de qualidade bem estabelecidos e executados, elas podem ampliar o campo de opções terapêuticas, contribuindo assim para a ampliação e melhoria do Sistema Único de Saúde (SUS) (FUNARI et al., 2013).

A nossa biodiversidade é ainda pouco explorada e seu uso racional, se estruturado em pesquisa multidisciplinar e desenvolvimento tecnológico inovador, trará grandes benefícios econômico e social ao país. Os produtos naturais descritos até hoje foram isolados ou registrados a partir de menos de 10% da biodiversidade do mundo, sendo esta percentagem ainda menor quando se refere às atividades biológicas e/ou farmacológicas relatadas. (MISHRA E TIWARI, 2011; CRAGG E NEWMAN, 2013; HAEFNER, 2003).

O alto custo e o tempo despendido para as análises de produtos naturais impulsionaram muitas pesquisas sobre a racionalização metodológica para tais fins. Pouco tempo atrás muitos métodos de fracionamento e purificação de produtos naturais presentes em um extrato constituído por centenas de substâncias, encontradas em pequenas quantidades, frequentemente resultavam em substâncias já conhecidas, presentes em várias espécies ou gêneros (SASHIDHARA E ROSAIAH, 2007; NG et al., 2009).

O alto gasto de energia e de solventes nas análises e preparo das amostras a serem investigadas, despertam a atenção de muitos pesquisadores, empresas e órgãos regulamentadores, os quais têm buscando alternativas mais eficientes e menos impactantes. Os profissionais da área de química dos produtos naturais devem também dar atenção a essas questões, uma vez que as suas práticas

laboratoriais podem trazer impactos diretos ao meio ambiente (GABER et al., 2011; DAI et al., 2013).

Portanto, é de extrema importância a utilização de metodologias e métodos analíticos capazes de mapear e identificar substâncias bioativas em quantidades mínimas de extrato, sem os trabalhosos e dispendiosos fracionamentos e isolamentos (NG et al., 2009).

Atualmente, o tempo gasto no processo de desenvolvimento de produtos farmacêuticos e outros economicamente importantes, derivados da nossa biodiversidade, tem sido significativamente reduzido pelo uso de abordagens modernas que dão agilidade ao processo de desenvolvimento de novos produtos, uma vez que permitem a seleção dos extratos potencialmente promissores para estudos de atividade e isolamento dirigido para as substâncias ativas de interesse (NG et al., 2009).

Segundo Konishi et al. (2007) as comparações de amostras são importantes na escolha de alvos potencialmente inovadores em extratos complexos, e unidas a um vasto campo de ensaios moleculares que também requeiram quantidades mínimas de extratos e substâncias, sendo esses ensaios utilizados preferencialmente antes da decisão pelo isolamento do composto de interesse. A simples comparação entre um extrato ativo e um extrato inativo pode indicar os metabólitos essenciais à atividade observada para o primeiro (aqueles associados aos sinais espectroscópicos e/ou cromatográficos observados apenas na amostra ativa), agilizando a descoberta de compostos bioativos na pesquisa (FUNARI et al., 2013).

Também, dentre as abordagens modernas, podem ser citadas as técnicas quimiométricas de análise multivariada capazes de correlacionar um perfil metabólico a uma determinada atividade biológica. Elas permitem a classificação ou a formação de conglomerados de dados ou *clusters*, utilizando para este fim a análise de componentes principais (PCA) ou análise hierárquica de agrupamentos (HCA), mínimos quadrados parciais (PLS), análises discriminantes e análises de correlações, entre outras (VERPOORTE et al., 2007).

Segundo Funari et al. (2012) o uso de análise multivariada de dados permitiu o agrupamento de amostras por semelhanças na produção de metabólitos especiais selecionados. Assim, a partir do pré-tratamento dos dados obtidos por técnicas de

separação e/ou espectroscópicas, como a ressonância magnética nuclear, poderão ser usadas técnicas quimiométricas capazes de selecionar informações relevantes para diferentes propósitos.

A ressonância magnética nuclear vem se destacando na obtenção de perfis metabólicos de amostras complexas e nas análises qualitativas e quantitativas de metabólitos provenientes de sistemas biológicos, por ser uma técnica não destrutiva, possibilitando a obtenção de espectros em suspensão, em tecidos intactos, extratos ou metabólitos pré-purificados ou brutos. A incorporação de experimentos bidimensionais ou *n*-dimensionais, assim como o uso de ferramentas estatísticas, são alternativas interessantes para vencer alguns obstáculos dessa técnica, como a sobreposição de sinais em espectros de alta complexidade (RATCLIFFE et al., 2001; VERPOORTE et al., 2007; WOLFENDER et al, 2009).

Objetivo Geral

Análise quimiométrica do extrato etanólico, da fração em clorofórmio e subfrações do extrato etanólico das folhas de *Zeyheria tuberculosa* (Vell) Bureau (Bignoniaceae), por Ressonância Magnética Nuclear, com a caracterização e quantificação dos compostos majoritários presentes em quantidades mínimas dos referidos extrato, fração e subfrações, além da construção de um modelo capaz de selecionar extratos potencialmente promissores, servindo como guia para um posterior isolamento das substâncias de interesse, viabilizando a descoberta de compostos bioativos.

Objetivos Específicos

- Análise do perfil químico da fração em clorofórmio do extrato etanólico das folhas de *Zeyheria tuberculosa* (Vell) Bureau (Bignoniaceae).
- Análise do perfil químico das subfrações oriundas da fração em clorofórmio.
- Elucidação estrutural dos compostos majoritários presentes na fração em clorofórmio.

- Quantificações relativas dos compostos majoritários presentes no extrato etanólico, fração em clorofórmio e nas suas subfrações, utilizando para este fim a RMN e ferramentas quimiométricas.
- O uso da quimiometria por RMN para construção de um modelo capaz de selecionar extratos potencialmente promissores, de forma qualitativa e quantitativa, servindo como guia para um posterior isolamento das substâncias de interesse.
- Determinação do efeito citotóxico do extrato etanólico, da fração clorofórmica e das subfrações de *Z. tuberculosa* na viabilidade de macrófagos murinos, utilizando o ensaio colorimétrico MTT.

Justificativa

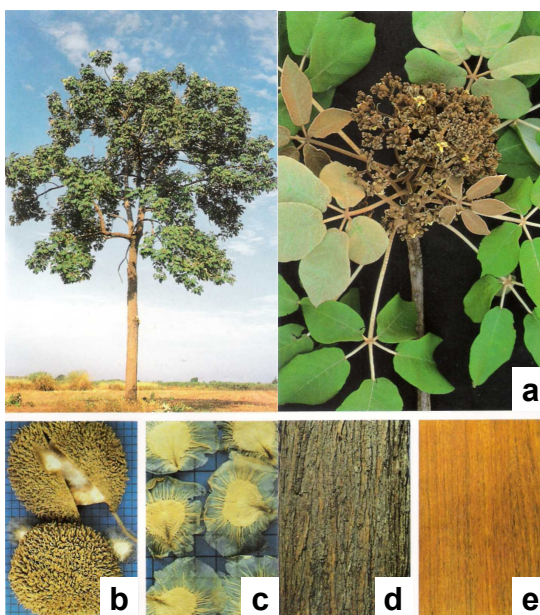
No projeto do Milênio do Semi-Árido para o estudo da biodiversidade do Semi-Árido nordestino, coube ao nosso grupo realizar o estudo fitoquímico de algumas espécies de plantas, com base em um trabalho de seleção de plantas ativas quanto à atividade tripanosomicida, inibidora da linfoproliferação, inibidora da produção de $\cdot\text{NO}$ e atividade antibiótica, realizado pelo IMSEAR (INSTITUTO DO MILÊNIO DO SEMIÁRIDO). Entre as espécies escolhidas pelo IMSEAR encontra-se a *Zeyheria tuberculosa*, cuja fração em clorofórmio apresentou 100 % de atividade inibitória da linfoproliferação, sendo por isso disponibilizada a planta para caracterização e quantificação dos compostos majoritários presentes. A fração clorofórmica foi elaborada pelo nosso grupo e enviada para os referidos testes, os quais foram executados pelo grupo da professora Dra. Milena Botelho Pereira Soares, na FIOCRUZ/IMSEAR. O uso da quimiometria neste trabalho deve-se ao fato de que a análise quimiométrica tem viabilizado economicamente o estudo fitoquímico de plantas, sendo de grande eficiência na obtenção de informações quantitativas a respeito de metabólitos presentes em misturas, muitas vezes em quantidades muito pequenas, possibilitando a seleção de extratos potencialmente promissores para estudos de atividade e de isolamento dirigido para os compostos bioativos de interesse.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A Espécie *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bureau

A espécie *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bureau (Figura 1), de acordo com a linha filogenética de Arthur Cronquist (BASTOS, 2008) apresenta a seguinte classificação sistemática: **Domínio** Eukaryota, **Reino** Plantae, **Sub reino** Viridaeplantae, **Filo** Tracheophyta, **Sub filo** Euphyllophytina, **Infra filo** Radiatopses, **Classe** Magnoliopsida, **Sub classe** Lamiidae, **Super ordem** Lamianae, **Ordem** Scrophulariales, **Família** Bignoniaceae, **Gênero** *Zeyheria*, **Espécie** *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bureau.

Figura 1 - *Zeyheria tuberculosa*; (a) Folhas e Flores, (b) Frutos, (c) Sementes (d) Casca (e) Madeira.



Fonte: http://www.achetudoeregiao.com.br/Arvores/Zeyheria_tuberculosa.htm. em 2014

A família Bignoniaceae, é representada por mais de 100 gêneros e 800 espécies com distribuição pantropical, sendo o maior número de espécies desta família encontradas no Neotrópico (MACHADO et al., 2006).

O gênero *Zeyheria* é composto pelas espécies *Z. barbata* Miq., *Z. digitada* Miq., *Z. fluviatilis* Miq., *Z. hamburiana* Corr. Mello, *Z. kuntzei* K. Shum., *Z. surinanensis* Miq., *Z. velloziana* Miers, *Z. montana* Mart., *Z. digitalis* (Vell.) Hoehne

e *Z. tuberculosa* (Vell) Bureau (BASTOS, 2008).

A espécie *Z. tuberculosa* recebe vários nomes populares como ipê-tabaco, ipê-felpudo, bucho-de-carneiro, bucho-de-boi, ipê branco, bucho de bode e ocorre no Brasil em área de mata atlântica a florestas decíduas de São Paulo a Pernambuco, em altitudes de 50-1000 m (ZIDKO, 2002; LUCCHESI, 2006).

A árvore é de médio a grande porte, atinge mais de 30 m de altura. Possui folhas em tufos terminais, pentadigitadas, grandes (40-60 cm de comprimento x 25-40 cm de largura), com pecíolo longo (15-30 cm). A folha inteira, assim como o resto da planta, é recoberta por um tomento espesso, semelhante a um veludo, sendo desta característica a origem do nome felpudo (FERREIRA E LUZ, 1985).

A inflorescência surge após a brotação das folhas, em panícula terminal com 20-30 cm, densa, piramidal, felpuda, com dezenas de pequenas flores (menos de 2 cm) pouco vistosas. O fruto possui cápsula do tipo síliqua, lenhosa, grande (desde 13x10 cm até 20x15 cm), achatada, oval a oblonga e externamente muricada, isto é, revestida de densas expansões, sendo esta a razão do nome da espécie, *Z. tuberculosa* (FERREIRA E LUZ, 1985).

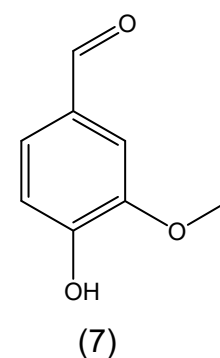
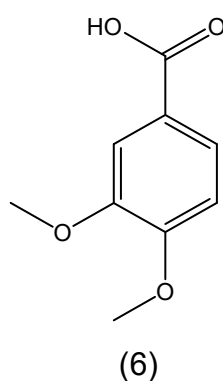
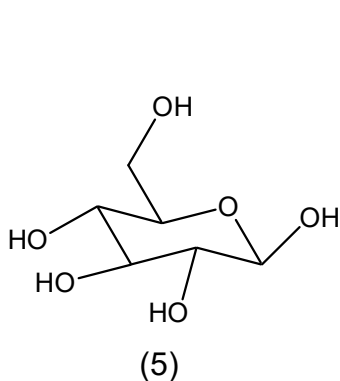
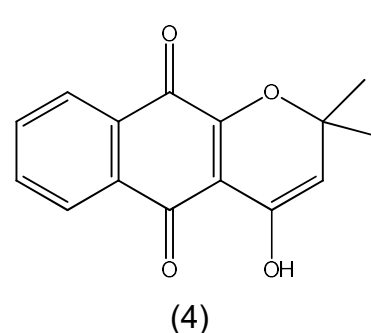
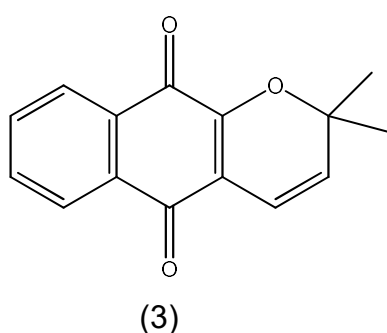
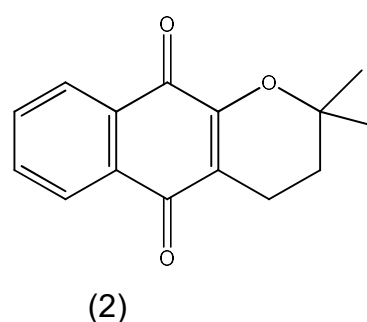
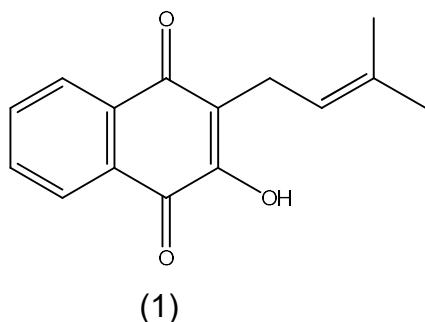
As sementes são aladas, achatadas; núcleo cordiforme, branco-amarelado, felpudo, com 2 cm ou menos de diâmetro e não possuem dormência, germinando facilmente entre 1 e 2 semanas quando colocadas sob uma fina camada de solo ou palha umidoso (FERREIRA E LUZ, 1985).

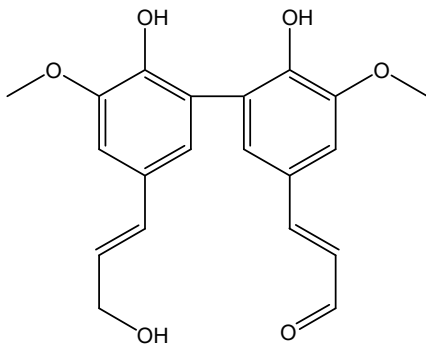
Espécies pertencentes à família Bignoniaceae (*Jacaranda micranta* Cham., *Tabebuia caraiba* Bur., *Tecoma sambucifolia* Kunth e *T. stans* L.) foram bastante utilizadas como anestésico, antiinflamatório, anticoncepcional, antisifilítico e antireumático por culturas indígenas da América do Sul (BASTOS, 2008).

Quanto às espécies do gênero *Zeyheria*, as raízes da *Z. montana* são bastante usadas na medicina popular contra as doenças de pele. Há indicação de que o extrato aquoso da *Z. tuberculosa* seja utilizado no tratamento do câncer, e estudos biológicos realizados com o caule desta espécie revelou atividade antimicrobiana (BASTOS, 2008; SILVEIRA et al., 1975; WEINBERG et al., 1976). A fração clorofórmica desta espécie apresentou-se ativa quanto à inibição da linfoproliferação, em testes feitos pelo IMSEAR.

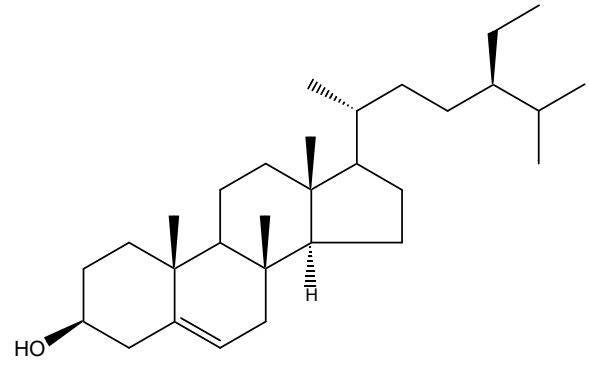
A literatura descreve o estudo fitoquímico de três espécies do gênero *Zeyheria*: a *Z. Montana* M., onde da madeira (extratos benzênico e etanólico) foi

isolada uma naftoquinona, o Lapachol (1), e das raízes os quinóides α -Lapachona (2), o Desidro- α -Lapachona (3) e o 4-hidroxi- α -Lapachona (4) (JÁCOME et al., 1999; MAGANHA et al., 2006); a *Z. digitalis* (Vell.), de onde foi isolado a D-glicose (5), o Ácido Verátrico (6), a Vanilina (7), o Lapachol (1), a lignana Zeyherol (8) e o β -Sitosterol (9) (SILVEIRA et al., 1975; FACCIONE et al., 2004); e a *Z. tuberculosa* (Vell) Bureau, onde do extrato da folha foi isolada a lignana Zeiherol (8), e do extrato do caule os flavonóides 5,6,7-Trimetoxiflavona (10), 5,6,7,8-Tetrametoxiflavona (11), 4'-Hidroxi-5,6,7,8-Tetrametoxiflavona (12) e 3,5,7,8-Tetrametoxiflavona (13), o Lapachol (1), α -Lapachona (2), o Desidro- α -Lapachona (3) o 4-Hidroxi- α -Lapachona (4) e o β -Sitosterol (9) (BASTOS, 2008; GRAHAM et al., 2000; KUTNEY e HANSEN, 1971; WEINBERG et al., 1976).

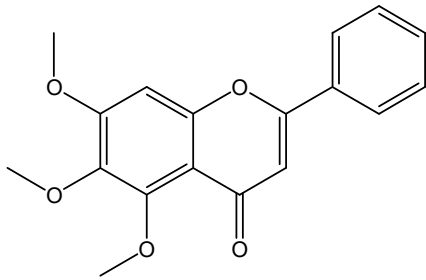




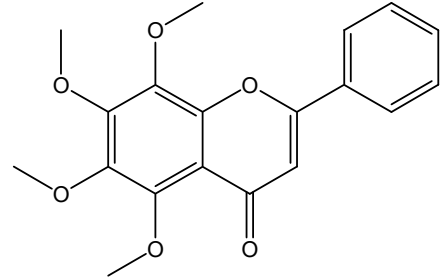
(8)



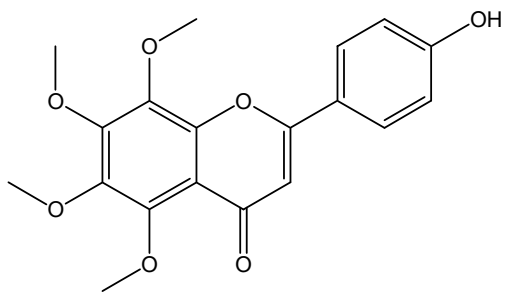
(9)



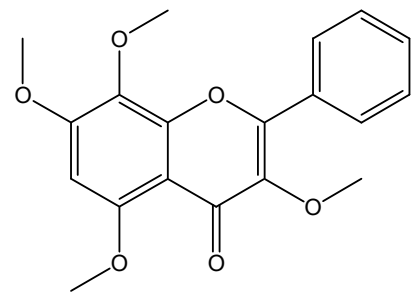
(10)



(11)



(12)



(13)

2.2 Considerações sobre Triterpenos

Dentre os metabólitos secundários existe a família dos terpenóides conhecidos pelas suas funções fisiológicas e biológicas, sendo usados como anti-inflamatórios, analgésicos, anti-tumorais e ações no sistema cardiovascular, tendo os triterpenos como um grupo importante (NIERO e MALHEIROS, 2007; PINTO et al., 2008).

Os triterpenos (C_{30}) são formados estruturalmente por seis unidades de isopreno (C_5H_{10}), biosintetizados pela ciclização do esqualeno, a exemplo do Ácido Ursólico e Oleanólico. Estes ácidos são isômeros constitucionais distinguindo-se apenas quanto à localização de dois grupos metila no anel E, localizados no caso do ácido ursólico em C-20 e em C-19, enquanto no ácido oleanólico ambos estão em C-20 (PATOCKA, 2003).

Várias atividades biológicas destes dois ácidos encontrados nas plantas têm sido comparadas cientificamente, tais como antimicrobiana, hepatoprotetora, antiparasitária, antivirótica, antiedematogênica, cardioprotetora em pacientes com hiperglicemia, anti-inflamatória, antioxidante, anti-tumoral, indução de apoptose, antiproliferativa, imunorreguladora (SATTAR et al., 1995; SARASWAT et al., 1996; LEITE et al., 2001; PAVLOVA et al., 2003; SHISHODIA et al., 2003; HSU et al., 2004; MA et al., 2005; DZUBAK et al., 2006; JUAN et al., 2006; PATHAK et al., 2007; HE E LIU, 2007; COSTA et al., 2008; IKEDA et al., 2008; TSAI E YIN, 2008; CARVALHO et al., 2009; HUANG et al., 2011; CHECKER et al., 2012; SHANMUGAM et al., 2012; YANG et al., 2013).

Checker et al. (2012) utilizando em camundongos o modelo da doença enxerto-versus-hospedeiro para estudar o potencial imunomodulador do ácido ursólico, relatam que este ácido inibiu a proliferação de linfócitos, induzida por ConA, *in vitro*, de forma dose-dependente. Este ácido também inibiu a ativação, proliferação e secreção de citocinas em macrófagos, células B e células T, demonstrando a sua atividade imunossupressora.

À importância dos ácidos ursólico e oleanólico na terapêutica, principalmente no tratamento de doenças da pele e vários tipos de câncer, justifica o seu alto valor comercial. Estes dois triterpenos estão disponíveis comercialmente e cada 25 mg do ácido ursólico (padrão analítico) custa R\$ 2.094,00 reais e cada 10 mg do ácido

oleonólico (padrão analítico) custa R\$ 420,00 reais (SIGMA, 2015).

2.3 Considerações sobre Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia de RMN foi desenvolvida no final da década de 1940, objetivando o estudo das propriedades de núcleos atômicos. Em 1951, os químicos perceberam que a espectroscopia de RMN também poderia ser usada para determinar as estruturas de substâncias orgânicas (SILVERSTEIN E WEBSTER, 1998).

Segundo esse estudo, os núcleos de alguns elementos, como ^1H e ^{13}C , comportam-se como se fossem ímãs girando em torno de um eixo. Desta forma, se um composto contendo ^1H ou ^{13}C for colocado em um campo magnético muito forte e irradiado simultaneamente com energia eletromagnética, os seus núcleos podem absorver energia através de um processo chamado de ressonância magnética. Nesse contexto, “ressonância” refere-se à transição do spin nuclear entre os níveis de energia α e β em resposta à radiação de radiofrequência (KOSKELA, 2005; SILVERSTEIN E WEBSTER, 1998).

Essa absorção de energia é quantizada e produz um espectro característico para o composto, sendo a absorção medida em espectrômetros de RMN. Para isso dois tipos de espectrômetros podem ser utilizados: os de Onda Contínua (OC) e os de Transformada de Fourier (TF) (BENTO, 1997; GIL e GERALDES, 1987).

2.3.1 Método de Onda Contínua (OC) ou *Continuous Wave (CW)*

No espectrômetro de onda contínua utiliza-se um ímã que gera um campo magnético e um oscilador de frequência de rádio. A condição de ressonância pode ser obtida de duas maneiras: irradiando a amostra com energia eletromagnética de frequência variável, enquanto que o campo magnético é mantido constante, ou ainda irradiá-la com frequência constante, enquanto a força do campo magnético é variada (KOSKELA, 2005).

Estas duas abordagens são chamadas de varredura de frequência e varredura de campo, respectivamente, onde, nas duas técnicas, a amostra está em contínua irradiação da radiofrequência transmitida. Cada núcleo é excitado individualmente, levando-se vários minutos para ser fornecido o espectro, originado diretamente como uma função da frequência (BENTO, 1997; WILLIAMS e FLEMING, 1987).

2.3.2 Método de Transformada de Fourier (TF)

Ao contrário do método *CW*, no qual cada núcleo é irradiado com frequências consecutivas, no método TF a amostra é irradiada por um pulso curto e poderoso de rádio frequência, que excita todos os núcleos simultaneamente. Quando os núcleos relaxam, produzem um sinal complexo chamado decaimento livre da indução (DIL) ou *Free Induction Decay (FID)* (GIL e GERALDES, 1987; SILVA, 2002).

Um computador converte as informações que são fornecidas como uma função do tempo (*FID*) para um formato em função da frequência, através de uma operação matemática chamada Transformada de Fourier (TF) ou *Fourier Transform (FT)*, produzindo um espectro em poucos segundos. Neste espectro podem ser explorados, entre outras características, o deslocamento químico (posição do sinal), os acoplamentos (interações escalares) mostrados pelos sinais desdobrados e a área do pico (integração) (HOLLER et al., 2002).

2.3.3 Deslocamento Químico (δ) em ppm

Em uma determinada molécula alguns núcleos estão em regiões de maior densidade eletrônica do que os outros e, como resultado, os núcleos absorvem energia em forças de campos magnéticos ligeiramente diferentes. Conseqüentemente, os sinais para esses núcleos ocorrem em posições diferentes no espectro de RMN. A posição na qual um sinal aparece no espectro de RMN é chamada deslocamento químico. Esse deslocamento depende do ambiente magnético de cada núcleo, do efeito anisotrópico, do efeito do solvente e das ligações de hidrogênio (GIL e GERALDES, 1987; SILVERSTEIN E WEBSTER, 1998).

Os deslocamentos químicos são medidos em uma escala de (δ). Diz-se que os sinais à esquerda do espectro aparecem em campo baixo (alta frequência) e aqueles à direita aparecem em campo alto (baixa frequência). Uma característica observada é a relação entre o número de sinais no espectro e o número de diferentes tipos de núcleos no composto (PARELLA, 1998; WILLIAMS e FLEMING, 1987).

2.3.4 Acoplamento (J) em Hz

A multiplicidade de um sinal em um espectro de RMN aparece como uma consequência das interações magnéticas entre núcleos com spin ($I \neq 0$) transmitido através das ligações da molécula e isto é conhecido como acoplamento escalar (spin-spin). O sinal de RMN de um núcleo acoplado para "n" núcleos equivalentes com spin I será dividido em um multipletto com $(2nI+1)$ linhas (KOSKELA, 2005).

À distância, em hertz (Hz), entre duas linhas, ou seja, entre dois picos adjacentes de um sinal de RMN desdobrado, é chamado de constante de acoplamento (J). No caso do acoplamento a três ligações em fragmentos H-C-C-H, J irá depender do ângulo diedro, no qual a relação de Karplus correlaciona o valor da constante de acoplamento com o ângulo diedro (SILVA, 2002; MACKIN E SHAKA, 1996).

2.3.5 Integração

No cálculo das áreas de cada sinal, o mais importante não é a sua altura, mas a área abaixo deste sinal. Esta área é proporcional ao número de hidrogênios que deram origem ao sinal. O programa que gera o espectro mede essas áreas automaticamente e constrói curvas de integração sob cada sinal (SHOOLERY, 1972; SILVERSTEIN E WEBSTER, 1998).

2.3.6 Relaxação Nuclear

Existem dois tipos principais de processos de relaxação em RMN: a relaxação spin-rede (ou longitudinal) e a relaxação spin-spin (ou transversal). A relaxação longitudinal é um decaimento exponencial de primeira ordem, caracterizado por um

tempo de relaxação T_1 (tempo de vida médio dos núcleos no estado de maior energia). A relaxação transversal também é um processo de primeira ordem, que pode ser caracterizada por um tempo de relaxação T_2 , sendo a causa do alargamento das linhas de RMN (MACKIN E SHAKA, 1996; HOLLER et al., 2002).

2.3.7 RMN de ^{13}C

Os espectros de ^{13}C são normalmente menos complexos e mais fáceis de interpretar do que os espectros de RMN ^1H . Um aspecto dos espectros de RMN de ^{13}C que simplifica o processo de interpretação é que cada núcleo de carbono em uma molécula orgânica produz apenas um pico de RMN de ^{13}C , em função de que os efeitos do acoplamento carbono-carbono, responsáveis pelo desdobramento de sinais em picos múltiplos, são cancelados (HOLLER et al., 2002; PARELLA, 1998).

Os núcleos de ^{13}C são de baixa abundância, de pequena razão giromagnética e de sensibilidade baixa. Os espectros de RMN de ^{13}C só podem ser obtidos por espectrômetros de pulso de RMN FT, onde se torna possível o acúmulo de *FIDs* (HOLLER et al., 2002; REIF et al., 1996).

2.3.8 DEPTs

Na interpretação de um espectro de RMN de ^{13}C é de grande utilidade identificar quais sinais pertencem ao núcleo de C (quaternário), CH (metínico), CH_2 (metilênico) e CH_3 (metila). Para as aplicações de rotina, os experimentos DEPT 90 e DEPT 135, são suficientes. O DEPT 90 gera somente os sinais dos grupos CH, enquanto que o DEPT 135 gera sinais negativos para os núcleos de carbono em grupos CH_2 e sinais positivos para os grupos CH e CH_3 (SILVA, 2002).

2.3.9 Experimentos de RMN Bidimensionais

2.3.9.1 HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*)

Através dessa técnica, que depende dos acoplamentos $^1J_{C,H}$, pode-se distinguir os carbonos que contêm os hidrogênios já anteriormente assinalados no espectro de RMN 1H , ou vice-versa. O espectro apresenta um eixo horizontal, dimensão F_2 , que corresponde ao δ_H e um eixo vertical, dimensão F_1 , correspondente ao δ_C . Outra técnica interessante relacionada ao HSQC é o experimento de RMN 2 D HSQC-TOCSY, que mostra correlações C,H,H ou seja tem o aspecto de um HSQC mas, além das correlações C,H há também correlações H,H como no TOCSY (KAISER, 2000; SILVA et al., 2005).

2.3.9.2 HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*)

O experimento HMBC, normalmente realizado para a caracterização estrutural de moléculas orgânicas naturais e sintéticas, é uma técnica de correlação heteronuclear que fornece informações sobre as interações escalares entre hidrogênios e carbonos a longa distância e separados por duas, três ou quatro ligações covalentes (SILVA et al., 2005; RICCIO et al., 2003).

2.3.9.3 J-Resolvido

A técnica do J-Resolvido permite determinar as constantes de acoplamento, J , que não podem ser determinadas pelo espectro convencional de RMN 1H e ^{13}C totalmente acoplado, isto porque esta técnica separa, em duas dimensões, os efeitos de deslocamento químico e da constante de acoplamento. Em uma dimensão do espectro 2D J-Resolvido observa-se a informação do acoplamento e na outra dimensão a informação dos deslocamentos químicos. Esta técnica é importante na interpretação espectral de casos onde ocorre a sobreposição de sinais de hidrogênio, ajudando a resolver os multipletos sobrepostos no espectro convencional 1D (BRAR E PHADHAN, 2003; PEDROZA, 2007)

2.4 Quimiometria

A Quimiometria é a aplicação de métodos estatísticos ou matemáticos em dados de origem química, para otimizar experimentos, obter conhecimento geral de

sistemas químicos e extrair as informações mais relevantes. A Sociedade Internacional de Quimiometria (International Chemometrics Society - ICS) define a Quimiometria como sendo “a ciência relacionada a medidas realizadas em um sistema ou processo químico, obtendo informações sobre o estado do sistema através da aplicação de métodos matemáticos ou estatísticos”.

Os métodos estatísticos, para analisar variáveis, estão dispostos em dois grupos: um que trata da estatística, que olha as variáveis de maneira isolada – a estatística univariada, e outro que olha as variáveis de forma conjunta – a estatística multivariada.

Portanto, cada vez mais se necessita de ferramentas estatísticas que apresentem uma visão mais global do fenômeno, que aquela possível numa abordagem univariada. A denominação “Análise Multivariada” corresponde a um grande número de métodos e técnicas que utilizam, simultaneamente, todas as variáveis na interpretação teórica do conjunto de dados obtidos (NETO, 2004).

Existem vários métodos de análise multivariada, com finalidades bem diversas entre si, pois cada método tem sua fundamentação teórica e sua aplicabilidade. Quando o interesse é verificar como as amostras se relacionam, ou seja, o quanto estas são semelhantes, segundo as variáveis utilizadas no trabalho, destacam-se dois métodos, que podem ser utilizados: a análise de agrupamento hierárquico e a análise fatorial com análise de componentes principais.

A análise exploratória (análise de componentes principais e análise de agrupamentos hierárquicos) e a calibração multivariada (método dos mínimos quadrados parciais) são áreas da quimiometria bastante utilizadas (FERREIRA et al, 1999; ALVES, 2010)

2.4.1 Análise de Componentes Principais – PCA

A Análise de Componentes Principais (ACP) ou *Principal Components Analysis (PCA)* é um método estatístico multivariado, utilizado para compressão de dados sem perda de informações relevantes. Geralmente, a PCA é utilizada com o objetivo de visualizar a estrutura dos dados, encontrar similaridades entre amostras, detectar amostras anômalas (*outliers*) e reduzir a dimensionalidade do conjunto de

dados. A análise de componentes principais aborda aspectos como a geração, a seleção e a interpretação das componentes investigadas, com o intuito de determinar as variáveis de maior influência na formação de cada componente, que serão utilizadas para estudos futuros, tais como de controle de qualidade, estudos ambientais, estudos populacionais entre outros.

Esta análise descreve os dados contidos num quadro indivíduos-variáveis numéricas: p variáveis serão mediadas com n indivíduos, sendo considerada um método fatorial, pois a redução do número de variáveis não se faz por uma simples seleção de algumas variáveis, mas pela construção de novas variáveis sintéticas, obtidas pela combinação linear das variáveis iniciais, por meio dos fatores (BOUROCHE; SAPORTA, 1982). Assim, a análise é desenvolvida de maneira que os conjuntos de dados possam ser representados por um número reduzido de novas variáveis chamadas de componentes principais (*PC*), que são combinações lineares das variáveis originais (LOPES, 2014; FERREIRA et al., 1999).

A *PCA* possibilita a identificação das medidas responsáveis pelas maiores variações entre os resultados e transforma um conjunto original de variáveis em outro conjunto (*PC*) com a menor perda de informação possível, buscando eliminar algumas variáveis originais que possuam pouca informação. Essa redução de variáveis só será possível se as p variáveis iniciais não forem independentes e possuírem coeficientes de correlação não nulos.

A primeira componente, *PC1*, é definida na direção de máxima variância do conjunto de dados. A *PC2* é definida na direção que descreve a máxima variância no espaço da *PC1*, de forma que cada componente principal, *PC1*, *PC2*, *PC3* entre outros, é responsável pela fração sucessiva de variância de dados, consistindo em um sistema de coordenadas ortogonais entre si e, portanto, não correlacionadas (HAYASHI, 2012).

A maior parte da variância total contida nos dados é explicada pelas primeiras *PC*'s, as quais podem ser usadas para representá-los. Na análise exploratória são examinadas as relações entre as amostras e entre as variáveis, através de gráficos de *escores* e *loadings*, os quais permitem avaliar a influência de cada variável em cada amostra, encontrando similaridades ou diferenças nos dados (FERREIRA, 2002).

3 EXPERIMENTAL

3.1 Local de Realização do Trabalho

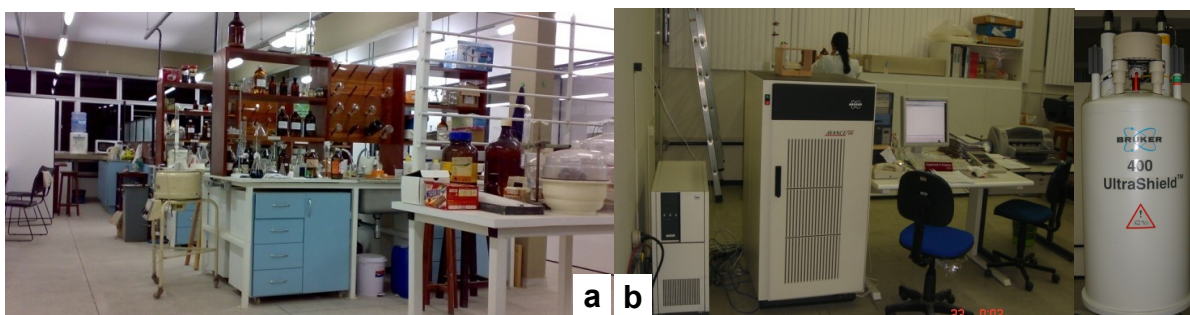
A coleta do material botânico foi realizada em Salinas (MG) pelo grupo de botânica da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), dentro do projeto do Milênio de estudo da biodiversidade nordestina (IMSEAR).

Os procedimentos de preparação do extrato etanólico, frações e subfrações, a identificação estrutural e a quantificação relativa dos constituintes químicos das folhas de *Z. tuberculosa* foram realizados nos Laboratórios de Pesquisa em Recursos Naturais (Figura 2-a), e de Ressonância Magnética Nuclear (Figura 2-b), do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, em Maceió-AL.

O ensaio de atividade biológica inibitória da linfoproliferação da fração em clorofórmio de *Z. tuberculosa* foi realizado no Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz da Fundação Oswaldo Cruz em Salvador-BA.

O ensaio de atividade citotóxica (MTT) dos extratos e frações de *Z. tuberculosa* foram realizados no Laboratório de Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, em Maceió-AL.

Figura 2 - Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais (a), Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (b)



Fonte: Autora, 2014

3.2 Material Botânico

A espécie *Z. tuberculosa* foi coletada em agosto de 2006, na cidade de Salinas (MG), pela Dra. Tânia Ribeiro, e selecionada no projeto do Milênio de estudo da biodiversidade nordestina – IMSEAR. Uma exsicata encontra-se depositada no Herbário de Plantas Medicinais da UEFS em Feira de Santana (BA), com o n° 186.

3.3 Materiais, Equipamentos, Métodos de Extração e Purificação

3.3.1 Solventes

Os solventes utilizados foram: etanol, hexano, clorofórmio, acetato de etila, acetona, metanol e água destilada, sendo que na preparação do extrato bruto, nas partições e filtrações cromatográficas os solventes utilizados foram destilados no Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais. Os solventes deuterados utilizados nas análises espectroscópicas foram clorofórmio deuterado, metanol deuterado e TMS, da *CIL (Cambridge Isotope Laboratories)*

3.3.2 Análise Cromatográfica

O adsorvente utilizado nas filtrações cromatográficas foi o gel de sílica G 60 (70-230 Mesh ASTM, Merck, Darmstadt - Alemanha). A quantidade da sílica foi de 20 a 25 vezes a quantidade da amostra. Nas análises feitas através de cromatografia em camada delgada (CCD) utilizou-se como adsorvente a sílica gel 60 PF254 da Merck (Darmstadt - Alemanha). Na preparação das placas de CCD foi utilizado um espalhador mecânico com espessura de 0,25 mm, para a distribuição da suspensão de sílica com água destilada (10 mL) sobre as placas de vidro, que foram ativadas em estufa a 100°C por uma hora. Também foram utilizadas placas de CCD da Merck (Merck, Darmstadt - Alemanha).

3.3.3 Reveladores

Os cromogramas nas cromatoplasmas foram visualizados por irradiação com Luz na região do Ultravioleta (UV), nos comprimentos de onda 254 e 366 nm, por imersão em cuba com Iodo, seguindo-se por borrifação com Sulfato Cérico, ou Anisaldeído, ou solução de Ácido Fosfomolibdico 5% ou solução de Liebermann-Burchard. As placas após borrifação foram aquecidas em estufa por 5 minutos, a 100 °C.

- Para a solução de Sulfato Cérico dissolveu-se 2,1 g de $Ce(SO_4)_2$ em uma solução contendo 21 mL de H_2SO_4 e 50 mL de água destilada. Em seguida adicionou-se mais água destilada completando o volume da solução para 300 mL.
- Para a solução de Anisaldeído foi preparada uma mistura de 3 mL de Anisaldeído com 150 mL de Ácido Acético Glacial, a qual foi adicionada a uma solução de 6 mL de H_2SO_4 e 141 mL de água destilada.
- Para a solução de Ácido Fosfomolibdico 5%, dissolveu-se 5 g de Ácido Fosfomolibdico em 100 mL de Álcool Etílico a quente (80-90°C), por 5 minutos.
- Para a solução de Liebermann-Burchard misturou-se 50 mL de Anidrido Acético com 10 gotas de Ácido Sulfúrico concentrado.

3.3.4 Preparação do Extrato Bruto

Na preparação do extrato etanólico utilizou-se uma forrageira para trituração das folhas (Nogueira, Itapia - São Paulo) e um extrator de aço inoxidável para extração (Fabra - São Paulo). A concentração do extrato contendo grandes volumes de solventes foi efetuada em evaporador rotativo sob pressão reduzida.

3.3.5 Métodos de Fracionamento e Purificação

O procedimento de fracionamento do extrato etanólico envolveu técnicas seqüenciais como: partição líquido-líquido e coluna filtrante de sílica. Essas técnicas fizeram-se necessárias por que o extrato bruto da folha utilizada é rico em clorofila e em diversos outros compostos (conforme bioprospeção realizada) e sua análise espectroscópica direta seria extremamente trabalhosa, por isso o uso prévio da

partição líquido-líquido e da coluna filtrante permitiu o fracionamento do extrato etanólico bruto em misturas menos complexas facilitando o trabalho de identificação e elucidação estrutural.

3.3.6 Espectrômetros

Os experimentos de RMN unidimensionais (^1H , ^{13}C , DEPT 135, DEPT 90) e bidimensionais (HSQC, HMBC, J-Resolvido) foram realizados em espectrômetro BRUKER AVANCE (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C). Os deslocamentos químicos dos sinais dos carbonos dos solventes deuterados utilizados foram expressos em escala δ (delta).

3.4 Etapas de Fracionamento do Extrato Bruto

3.4.1 Preparação do Extrato Etanólico Bruto das Folhas de *Z. tuberculosa*

As folhas secas de *Z. tuberculosa* (5400 g) foram trituradas a pó em uma forrageira (Nogueira, Itapira – São Paulo). O material depois de pulverizado foi submetido à extração com 20 L de Etanol a 90 % a temperatura ambiente (26 ± 1 °C) por 3 dias e filtrado. O procedimento de extração com o resíduo foi repetido por três vezes. Após evaporação do solvente por destilação a pressão reduzida em aparelho rotatório a 50 °C e remoção da água residual em dessecador obteve-se o respectivo extrato bruto (600,45 g), identificado como ZTB.

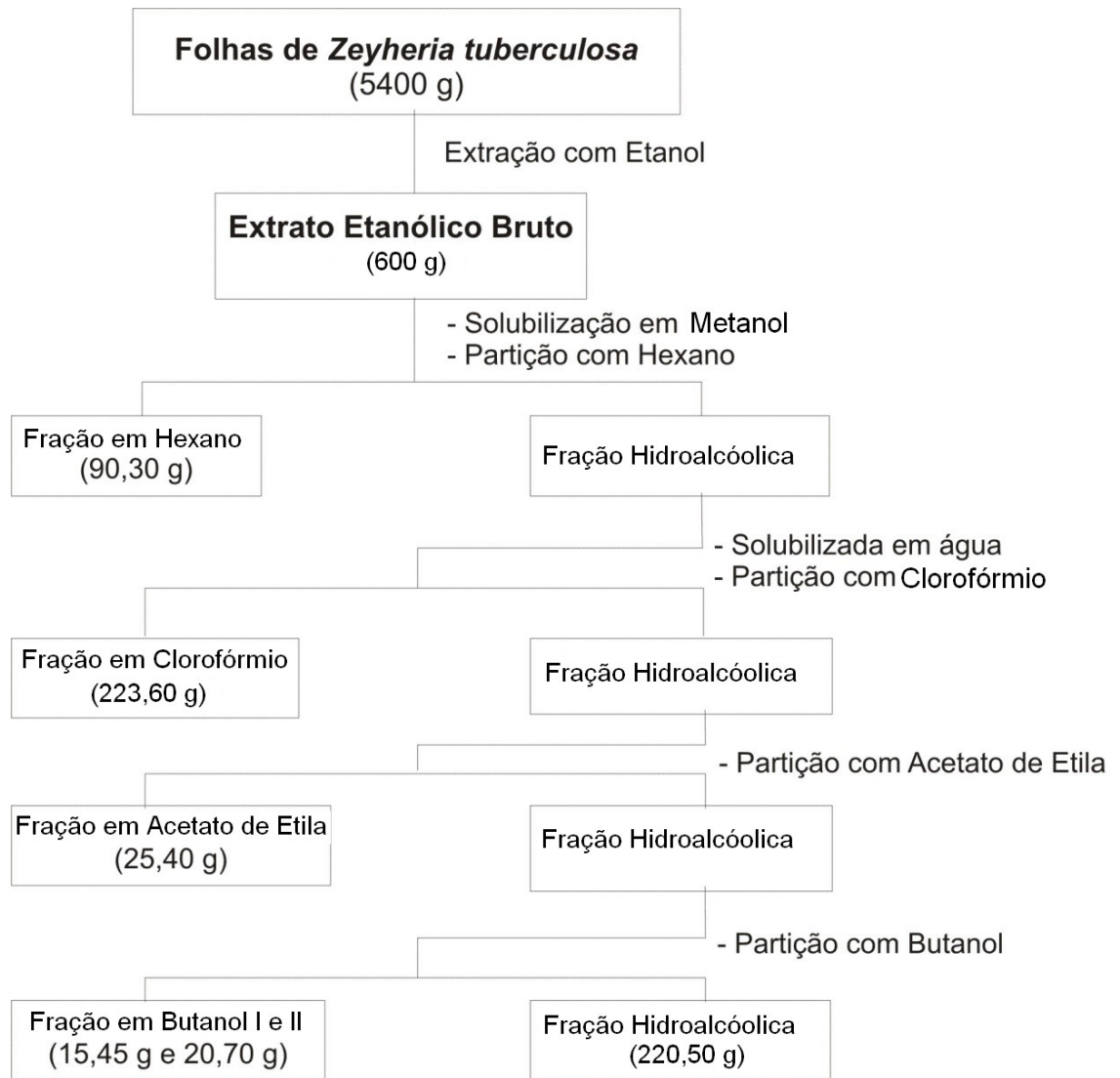
3.4.2 Partição Líquido-Líquido do Extrato ZTB das Folhas de *Z. tuberculosa*

Uma suspensão de 100 g do extrato etanólico bruto em uma solução de Água/Metanol (3:2) foi extraída sucessivamente com Hexano (4 x 500 mL), Clorofórmio (4 x 500 mL), Acetato de Etila (4 x 500 mL) e Butanol (4 x 500 mL). O processo foi realizado seis vezes. Após remoção do solvente por destilação a pressão reduzida foram obtidas seis frações em Hexano (ZTP1) (90,30 g; 13,59 %), Clorofórmio (ZTP2) (223,60 g; 33,65 %), Acetato de Etila (ZTP3) (25,40 g; 3,82 %);

Butanol I (ZTP4) (15,45 g; 2,33 %), Butanol II (ZTP5) (20,70 g; 3,11 %) e Hidroalcoólica (ZTP6) (220,5 g; 20,39 %) (Fluxograma).

A partição com Butanol deu origem a duas frações: ZTP4 e ZTP5. Isto aconteceu porque à medida que a fase butanólica foi sendo concentrada as primeiras coletas apresentaram-se como sendo um concentrado oleoso, já as últimas coletas quando concentradas mostraram-se sólidas, por isso a fase foi separada em duas frações, butanólica I (oleosa) e butanólica II (sólida).

No projeto do Milênio do Semi-Árido estas frações já tinham sido preparadas e submetidas aos ensaios de atividade inibitória da linfoproliferação, na FIOCRUZ/BA. A fração clorofórmica apresentou-se ativa quanto à inibição da linfoproliferação. Por isso, a ZTP2 também foi a fração escolhida, nesta nova partição, para dar continuidade ao processo de identificação do princípio ativo.

Fluxograma - Partição Líquido-Líquido do Extrato ZTB das Folhas de *Z. tuberculosa*.

3.4.3 Análise Geral dos Metabólitos da Fração Clorofórmica utilizando a RMN

Uma amostra de 15 mg da fração clorofórmica (ZTP2), proveniente do extrato etanólico (ZTB), foi submetida a análise de RMN ^1H e ^{13}C com o intuito de se obter uma análise geral das classes de metabólitos, com possível identificação dos metabólitos ativos. Essa análise inicial indicou a presença de sinais de substâncias reconhecidas na literatura pelo vasto campo de atividades biológicas, partindo-se então para análises de RMN DEPTs 90° e 135° e Bidimensionais visando à identificação estrutural das substâncias presentes.

3.4.4 Filtração da Fração ZTP2 Proveniente do Extrato ZTB

Dando continuidade ao fracionamento, 215,0 g da fração ZTP2 foram solubilizadas em Clorofórmio e em seguida incorporadas em gel de sílica ativada utilizando como solventes: Hexano, Clorofórmio, Metanol e mistura dos mesmos, fornecendo nove frações identificadas conforme mostra a tabela 1. Essas frações foram submetidas à análise comparativa através de CCD e reveladas com Anisaldeído, Sulfato Cérico e/ou vapores de Iodo.

Após análise em CCD, que demonstrou similaridade entre as frações provenientes da ZTP2, estas foram levadas para análise espectroscópica (RMN).

Tabela 1 - Filtração da Fração ZTP2 Proveniente do Extrato ZTB

Subfrações da Filtração de ZTP2	Peso da Amostra
Hexano (ZTF1)	0,40 g
Hexano/Clorofórmio 1:1 (ZTF2)	105,80 g
Clorofórmio (ZTF3)	10,80 g
Clorofórmio/Metanol 2% (ZTF4)	15,75 g
Clorofórmio/Metanol 5% (ZTF5)	12,25 g
Clorofórmio/Metanol 10% (ZTF6)	21,25 g
Clorofórmio/Metanol 20% (ZTF7)	24,50 g
Clorofórmio/Metanol 1:1 (ZTF8)	13,25 g
Metanol (ZTF9)	9,00 g

Fonte: Autora, 2014

3.4.5 Análise do Perfil Químico das Nove Frações, provenientes de ZTP2, utilizando a RMN

Foram enviadas para análise de RMN ^1H amostras de 8 mg de cada uma das frações provenientes de ZTP2, especialmente para se evitar o trabalho com frações contendo muitas informações já conhecidas, diminuindo assim custo financeiro e desperdício de tempo. Os perfis químicos foram então comparados.

3.5 Prospecção Fitoquímica

Foram realizados os testes de prospecção fitoquímica com o extrato ZTB das folhas da *Zeyheria tuberculosa*, seguindo-se a descrição de Matos (1997). Os métodos utilizados nesta abordagem são apenas qualitativos. Para os testes foram utilizados sete tubos de ensaio, numerados de 1 a 7. Em cada tubo foram colocados 3 mg do extrato solubilizados em 4 mL de Etanol.

3.5.1 Teste para Fenóis e Taninos

Para esse teste foram utilizadas duas soluções previamente preparadas:

- Solução de HCl 3 mol.L^{-1} – Adicionou-se 33,3 mL de HCl concentrado em água destilada suficiente para 100 mL de solução, em um balão volumétrico.

- Solução de cloreto férrico (FeCl_3) – Adicionou-se 9 g de FeCl_3 em 50 mL de água destilada contendo 2 mL de ácido clorídrico 3 mol.L^{-1} . Em seguida completou-se o volume para 100 mL com etanol, em um balão volumétrico.

No tubo de ensaio de número 1 foram adicionadas três gotas de solução alcoólica de FeCl_3 1 mol.L^{-1} . Agitou-se bem e observou-se a variação de cor e a formação de precipitado verde escuro abundante. Este resultado foi comparado com um teste em branco, usando-se água e FeCl_3 . A coloração variando entre azul e vermelho é indicativo de fenóis. A formação de um precipitado azul escuro indica a

presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis). A cor verde indica a presença de taninos flobabênicos (taninos condensados ou catéquicos).

3.5.2 Teste para Antocianinas, Antocianidinas e Flavonóides

Para este teste foi preparada um solução de NaOH 1 mol.L⁻¹ dissolvendo-se 4 g deste reagente em água destilada para 100 mL de solução em balão volumétrico. O tubo de número 2 foi acidulado com HCl 3 mol.L⁻¹ a pH 3 e os tubos 3 e 4 foram alcalinizados com NaOH 1 mol.L⁻¹ a pH 8,5 e 11, respectivamente. A observação de qualquer mudança da coloração da solução foi interpretada como mostrado na tabela 2.

Tabela 2. Variação de Coloração Observada nos Tubos (I)

Constituintes	Cor		
	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4
	Ácido pH = 3	Alcalino pH = 8,5	Alcalino pH = 11
Antocianinas e Antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul – Púrpura
Flavonas, Flavonóis e Xantonas	-	-	Amarela
Chalconas e Auronas	Vermelha	-	Vermelho Púrpuro
Flavanonóis	-	-	Vermelho Laranja

Fonte: Autora, 2014

3.5.3 Teste para Leucoantocianidinas, Catequinas e Flavononas

O tubo 5 foi acidulado por adição de HCl 3 mol.L⁻¹ até pH 1 - 3 e o tubo 6 foi alcalinizado com NaOH 1 mol.L⁻¹ até pH 11. Os tubos foram cuidadosamente aquecidos. Foi observada modificação na coloração por comparação com os tubos com pH correspondentes usados no teste anterior. A interpretação dos resultados foi feita como mostrado na tabela 3.

Tabela 3 - Variação de Coloração Observada nos Tubos (II)

Constituintes	Cor	
	Tubo 5	Tubo 6
	Meio Ácido	Meio Alcalino
Leucoantocianidinas	Vermelha	-
Catequinas (Taninos Catéquicos)	Pardo-amarelada	-
Flavononas	-	Vermelho Laranja

Fonte: Autora, 2014

3.5.4 Teste para Flavonóis, Flavanonas, Flavanonóis e Xantonas

No tubo de número 7, foram adicionados alguns miligramas de magnésio granulado e 0,5 mL de HCl concentrado. Aguardou-se o término da reação indicado pelo fim da efervescência. Comparou-se a cor dos tubos 5 e 7 (acidificados). O aparecimento ou intensificação da cor vermelha é indicativo da presença de flavonóis, flavanonas, flavanonóis e/ou xantonas, livres ou seus heterosídeos.

3.5.5 Teste para Esteroides e Triterpenoides

Adicionou-se 10 mL de uma solução etanólica do extrato em um béquer e deixou-se secar em banho-maria. Extraíu-se o resíduo seco do béquer com três porções de 2 mL de CHCl_3 . Filtrou-se a solução clorofórmica em um pequeno funil fechado com um pouco de algodão, coberta com uma pequena quantidade de Na_2SO_4 anidro, para um tubo de ensaio bem seco. Adicionou-se 1 mL de anidrido acético e agitou-se suavemente. Juntou-se cuidadosamente três gotas de H_2SO_4 concentrado. Tornou-se a agitar suavemente, e foi observado se havia o rápido desenvolvimento de cores. A coloração azul seguida da verde permanente é um indicativo da presença de esteróides livres. A coloração parda até vermelha indica triterpenóides pentacíclicos livres.

3.5.6 Teste para Saponinas

Os resíduos insolúveis em clorofórmio, separados no teste anterior, foram solubilizados em água destilada e a solução foi filtrada para um tubo de ensaio. Agitou-se fortemente o tubo com a solução, por três minutos e observou-se a formação da espuma. Uma espuma persistente e abundante (colarinho) indica a presença de saponinas.

3.5.7 Teste para Alcalóides

O extrato foi colocado em um tubo de ensaio, solubilizado com metanol e submetido à CCD. Após eluição, a placa foi revelada com reagente de Dragendorff. O surgimento de manchas de cor alaranjada sugere a presença de alcalóides.

- Preparação do reagente de Dragendorff – 5 g de Subnitrato de Bismuto foram solubilizados em 50 mL de água, seguido da adição de 12 mL de HCl. Em seguida, adicionou-se lentamente e sob agitação, 25 g de Iodeto de Potássio. Após a dissolução, o volume foi completado com água destilada para 100 mL de solução em balão volumétrico. A 25 mL desta solução foram adicionados 18 mL de Ácido Acético glacial e completou-se o volume para 100 mL com água destilada, obtendo-se o reagente de Dragendorff.

3.5.8 Teste para Antraquinonas, Antronas e Cumarinas

Foram marcados pontos com o extrato em uma placa cromatográfica, a qual foi eluída em clorofórmio. A placa foi borrifada com uma solução de Hidróxido de Potássio a 10%. Observou-se a presença das cores indicativas com luz na região do UV a 365 nm. A cor vermelha indica antraquinona, a amarela indica antrona e a azul indica cumarina.

3.6 Bioensaios

3.6.1 Ensaio de Viabilidade Celular (Teste MTT)

3.6.1.1 Reagentes e instrumentos usados no ensaio MTT

Foram utilizados no ensaio de viabilidade celular o DMSO (dimetilsulfóxido; Synth) e o MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio; Sigma). A densidade óptica de cada poço foi medida a 540 nm em um analisador, e absorvância de MTT e do produto formazan foi medida a 540 nm, em espectrofotômetro (SHIMADZU).

3.6.1.2 Animais

Os camundongos Swiss, fêmeas, pesando entre 25-30 g foram provenientes do Biotério da Universidade Federal de Alagoas. Estes animais foram mantidos no Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, com ciclo de iluminação claro/escuro, e temperatura controlada em torno de 20 ± 4 °C, com livre acesso a ração e água.

O protocolo experimental foi realizado em conformidade com as diretrizes institucionais e éticas (CEUA 055/2014).

3.6.1.3 Cultura de Células

Os procedimentos para obtenção das células, plaqueamento e tratamento foram realizados em câmara de fluxo laminar. As células foram obtidas por lavado peritonial de camundongos Swiss, com solução PBS/EDTA 10 mM gelada. A suspensão celular obtida foi recolhida em tubo de falcon de 15 mL. O cultivo celular deu-se em placas de poliestireno contendo 96 poços. O número de placas variou conforme o tipo e o número de experimentos, os quais foram realizados em triplicata. O número de células foi determinado por contagem em câmara de Neubauer, tendo sido utilizada uma alíquota de 10 μ L proveniente da ressuspensão de 10 μ L de solução de meio de cultura e células em 90 μ L de corante azul tripan 0,02%, fator de diluição 10, empregado para corar as células mortas. No plaqueamento celular foram

preparados 23 mL do meio de cultura mais 1 mL de células, distribuídos em 92 poços, sendo 200 µL/poço, equivalente a $1,5 \times 10^5$ células/poço, e quatro poços para cada concentração dos extratos (10 µL, 50 µL e 100 µL). As placas foram incubadas em estufa para a adesão por 2 h. Após este tempo deu-se início ao teste colorimétrico, tendo como controle de células viáveis as células não tratadas (controle 1) e como controle de morte o Tween 3% (controle 2).

3.6.1.4 Ensaio de Viabilidade Celular por Redução do MTT

O efeito citotóxico do extrato e frações de *Zeyheria tuberculosa* Vell. Bureau em macrófagos murinos foi determinado utilizando o método de ensaio da redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), de acordo com Mosmann (1983). Os macrófagos peritoniais foram obtidos por lavado peritoneal e distribuídos em placa de 96 poços ($2,5 \times 10^5$ células/poço) e após 2 h de incubação (em estufa de CO₂ a 37 °C), as células aderentes foram tratadas com extratos e frações de *Z. tuberculosa*, por 24 h em concentrações que variaram de 10 a 100 µg.mL⁻¹ em meio de cultura (RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino). Posteriormente, as células foram incubadas com MTT (5 µg.mL⁻¹). Após 4 horas de incubação, a 37 °C, o sobrenadante foi descartado e a solução de DMSO (150 µl/poço) foi adicionada a cada placa de cultura. Após 15 min de incubação à temperatura ambiente, as absorbâncias do produto formazan do MTT, solubilizado em DMSO, foram medidas em espectrofotômetro a 540 nm. A atividade de redução do MTT foi determinada como sendo a percentagem de células viáveis (grupo controle [(absorbância de células tratadas / absorbância de células não tratadas) × 100]).

3.6.1.5 Análise Estatística

Na análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism v. 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA).

3.6.1.6 Análise Correlativa

A análise correlativa entre o efeito citotóxico dos extratos e frações de *Z. tuberculosa* e as respectivas concentrações dos ácidos ursólico e oleanólico presentes nos referidos extratos e frações foi realizada com o emprego do programa Excell.

3.7 Quantificações Relativas dos Metabólitos Majoritários Principais Presentes nos Extratos Etanólico (ZTB), Clorofórmico (ZTP2) e Frações (ZTF1-ZTF9) das Folhas de *Z. tuberculosa*

Na quantificação foram utilizadas 8 mg das seguintes amostras: ZTB (extrato etanólico), ZTP2 (fração originado da partição de ZTB) e ZTF1-ZTF9 (subfrações originadas da filtração de ZTP2). As amostras foram individualmente pulverizadas, pesadas em tubos de vidros individuais, com capacidade de 1 mL, e solubilizadas em 700 µL da solução prévia, solução estoque, preparada a partir de 500 µL de clorofórmio deuterado e 200 µL de metanol deuterado. Foi adicionado ainda 1 gota de TMS para 14 mL da solução estoque preparada. Após solubilização as onze amostras foram adicionadas em tubos de RMN de mesma altura e diâmetro, com volume de 700 µL cada. O experimento foi feito em triplicata.

Todas as amostras foram submetidas a experimentos de RMN ^1H , sendo realizados em espectrômetro de RMN BRUKER AVANCE 400 (9,4 Tesla), observando-se o núcleo de hidrogênio a 400,13 MHz, equipado com uma sonda multinuclear de detecção direta, para tubos com diâmetro sw 5 mm. Os experimentos foram realizados com sequências de pulsos de excitação de 30° e sem supressão do sinal do solvente. Para cada amostra, 16 varreduras acumulativas foram gravadas com os seguintes parâmetros: 64K pontos de dados (aquisição),

com largura do pulso de 3.33 μ s (ângulo de 30°); tempo de aquisição 2 s, relaxamento de 1 s, sendo a largura da janela espectral de 12 ppm. Foram aplicadas Transformadas de Fourier com LB de 0,3 Hz para todas as amostras. Todos os parâmetros, incluindo o RG (Ganho do Receptor) e a janela espectral, foram os mesmos para todas as amostras analisadas.

3.7.1 Quantificação Relativa Utilizando Cálculos Matemáticos

As quantificações por RMN ^1H dos metabólitos majoritários presentes nos extratos e frações foram feitas por normalização com relação à área do sinal em 3,5 ppm do padrão interno (CD_3OD), que foi adicionado em concentração constante para todas as amostras.

A determinação quantitativa foi realizada pela análise de sinais distintos de cada composto alvo que puderam ser claramente identificados nos espectros de RMN ^1H dos extratos e frações da planta e sem qualquer sobreposição dos mesmos. O sinal do metanol deuterado serviu como padrão interno e o sinal de TMS foi usado como sinal de referência interna para os deslocamentos químicos. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm, em relação ao sinal TMS- d_4 em 0,00 ppm.

Assim, curvas de integração foram construídas e as áreas de cada sinal foram medidas e usadas em cálculos matemáticos simples (Equação 1) que possibilitaram a quantificação relativa.

Equação 1 (HOLZGRABE, 2010):

$$\frac{n_x}{n_y} = \frac{A_x \cdot N_y}{A_y \cdot N_x}$$

Onde:

n = quantidade de matéria (mol) de um composto;

A = área referente à linha de ressonância;

N = número de núcleos que absorvem na frequência da linha de ressonância.

3.7.2 Quantificação Relativa Utilizando Análise Multivariada

Na determinação quantitativa por análise multivariada foram usados sinais distintos de cada composto alvo que puderam ser claramente identificados nos espectros de RMN ^1H dos extratos e frações. Assim, a concentração relativa do ácido ursólico foi medida pela integração do sinal em δ 0,82 (s), referente a um hidrogênio metílico, e a concentração do ácido oleanólico pela integração do sinal em δ 1,15 (s), sendo este também um hidrogênio pertencente a um grupo metílico.

Os dados dos experimentos de RMN ^1H passaram por um pré-processamento (calibração, correções da fase e linha de base) com o uso do programa TOPSPIN (BRUKER), sendo em seguida exportados para o programa Matlab para a etapa de quantificação, onde todos os dados espectroscópicos foram normalizados e escalonados. Os resultados das duas quantificações foram comparados, conforme os dados apresentados nas tabelas 8-10 e 12.

Estes dados também foram analisados pelo método estatístico multivariado PCA (Análise de Componentes Principais) para serem observadas as semelhanças entre os extratos e frações quantificados. A informação de entrada para a produção dos PC's é a tabela de dados construída no programa AMIX, a partir dos espectros de RMN. Cada linha na tabela refere-se a um espectro (amostra) e cada coluna refere-se aos *buckets* (variáveis). Assim, os espectros de RMN de todas as amostras foram divididos em regiões de tamanhos iguais, denominadas *buckets*, e, a seguir, integradas. No programa AMIX foi escolhido a técnica clássica de *bucket* retangular simples e o tamanho de 0,05 ppm para cada *bucket*. Desta forma, os dados espectroscópicos pré-processados no programa TOPSPIN, foram normalizados, escalonados e convertidos no programa AMIX para o formato de tabela, a qual foi salva como um arquivo do Excell, sendo em seguida transportada para o programa SIMCA, onde foram produzidos todos os PC's.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Prospecção Fitoquímica do Extrato ZTB das Folhas de *Z. tuberculosa*

A prospecção fitoquímica teve como objetivo conhecer os constituintes químicos e/ou avaliar sua presença no extrato da planta. Esta metodologia é importante quando não se dispõe de estudos químicos sobre a espécie de interesse.

A análise fitoquímica preliminar indica os grupos de metabólitos secundários relevantes. Caso o interesse esteja restrito a uma classe específica de constituintes ou substâncias responsáveis por certa atividade biológica, a investigação será direcionada para o isolamento e elucidação estrutural das substâncias desejadas (ESTEVAM, 2006).

A prospecção fitoquímica do extrato etanólico (ZTB) obtido da folha de *Z. tuberculosa* sugeriu os seguintes constituintes químicos: taninos, flavononas, flavonóis, xantonas, esteroides, triterpenos e saponinas (Tabela 04).

Tabela 4 - Resultado da Prospecção Fitoquímica do Extrato ZTB da Folha de *Z. tuberculosa*

Constituintes Químicos	Extrato ZTB da Folha de <i>Z. tuberculosa</i>
1- Fenóis	-
2- Tanino	+
1- Antocianinas	-
2- Antocianidinas	-
3- Flavonoides	-
1- Leucoantocianidinas	-
2- Catequinas	-
3- Flavononas	+
1- Flavonóis	+
2- Flavanonóis	-
3- Xantonas	+
1- Esteroides	+
2- Triterpenos	+
1- Saponinas	+
1- Alcaloides	-
1- Antraquinonas	-
2- Antronas	-
3- Cumarinas	-

(+) - Presente; (-) - Ausente.

Fonte: Autora, 2014

4.2 Análise Geral dos Metabólitos e Identificação Estrutural dos Compostos Presentes na Fração ZTP2

Neste trabalho foram realizados experimentos de RMN ^1H e de RMN ^{13}C da fração ZTP2, que foi a fração da partição do extrato bruto que apresentou atividade imunomodulatória. As demais frações da partição, além de não apresentarem atividade imunomodulatória, apresentaram-se pouco solúveis em solventes

deuterados comuns e maior complexidade espectral, dificultando assim a obtenção dos espectros adequados para as respectivas atribuições.

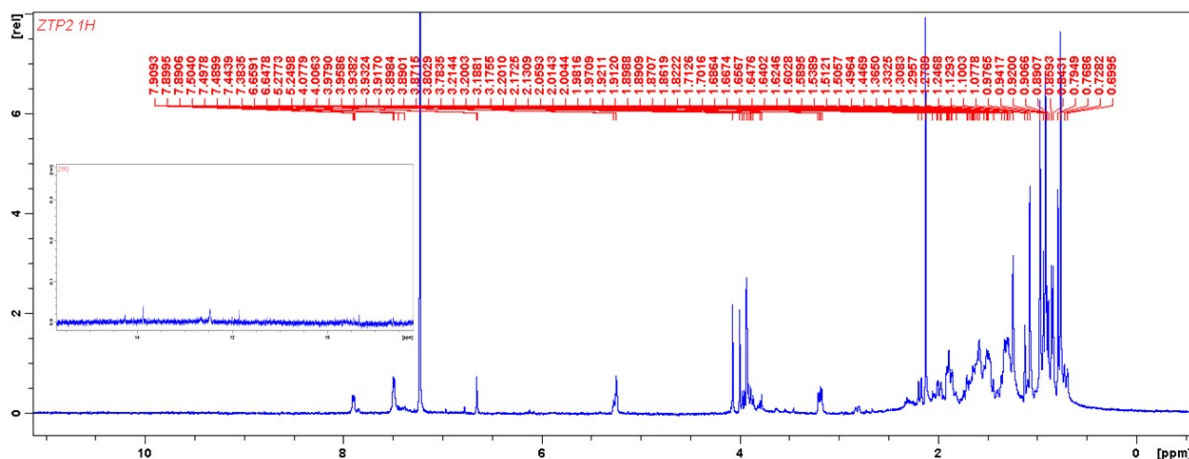
4.2.1 Análise Geral dos Metabólitos Presentes na Fração ZTP2

4.2.1.1 RMN ^1H da fração ZTP2

Os deslocamentos químicos do espectro de RMN ^1H foram definidos segundo as regiões do espectro conhecidas como alifática (0 a 1,5 ppm), acíclica (2,0 a 3,0 ppm), olefínica e aromática (4,6 a 8,5 ppm) e carbonílica (9,0 a 12,0 ppm).

No espectro de RMN ^1H da fração ZTP2 (Figura 3) a região alifática (0 a 1,5 ppm) foi a que apresentou a maior quantidade de sinais, enquanto que a carbonílica (9,0 a 12,0 ppm) uma menor quantidade. O referido espectro mostrou que as absorções de ^1H compõem alta concentração na região alifática (H_{CH} , H_{CH_2} e H_{CH_3}), presença de sinais de hidrogênio entre 3,0 ppm a 4,5 ppm, sendo bem visualizado um duplo duplete característico de hidrogênio carbinólico, e presença de sinais de hidrogênio olefínico/aromático na faixa entre 5,0 a 8,0 ppm.

Figura 3 - Espectro de RMN ^1H da fração ZTP2 em CDCl_3

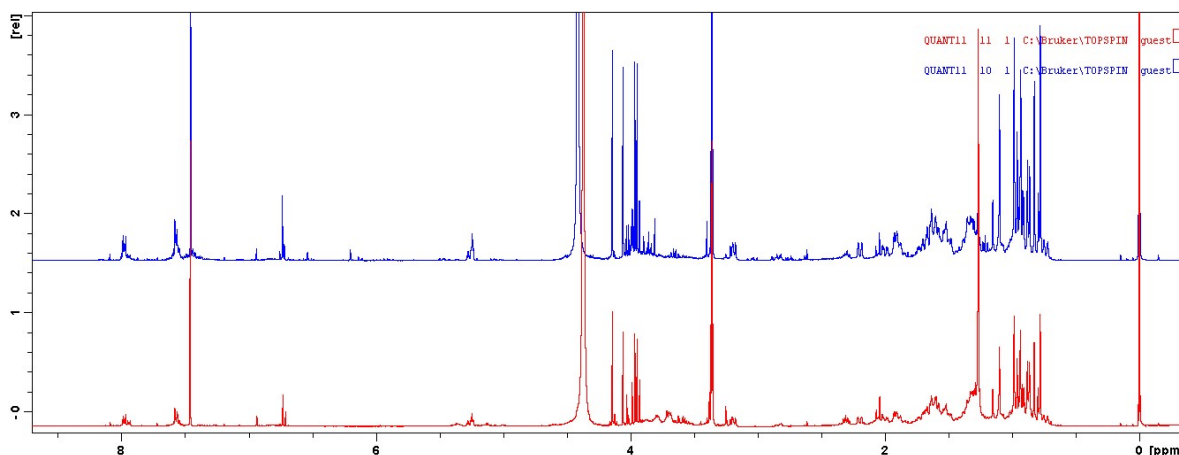


Fonte: Autora, 2014

O perfil químico do espectro de RMN ^1H da fração ZTP2 permitiu atribuir à presença de substâncias ácidas, possivelmente triterpenos, açúcares e compostos aromáticos.

Comparando os perfis químicos dos espectros de RMN ^1H da fração ZTP2 (extrato semi-bruto) e do extrato etanólico (bruto) observa-se ainda que ZTP2 concentrou a quase totalidade de metabólitos do extrato etanólico (Figura 4).

Figura 04 - Espectro de RMN ^1H do extrato ZTB (vermelho) e da fração ZTP2 (azul) em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 5:2



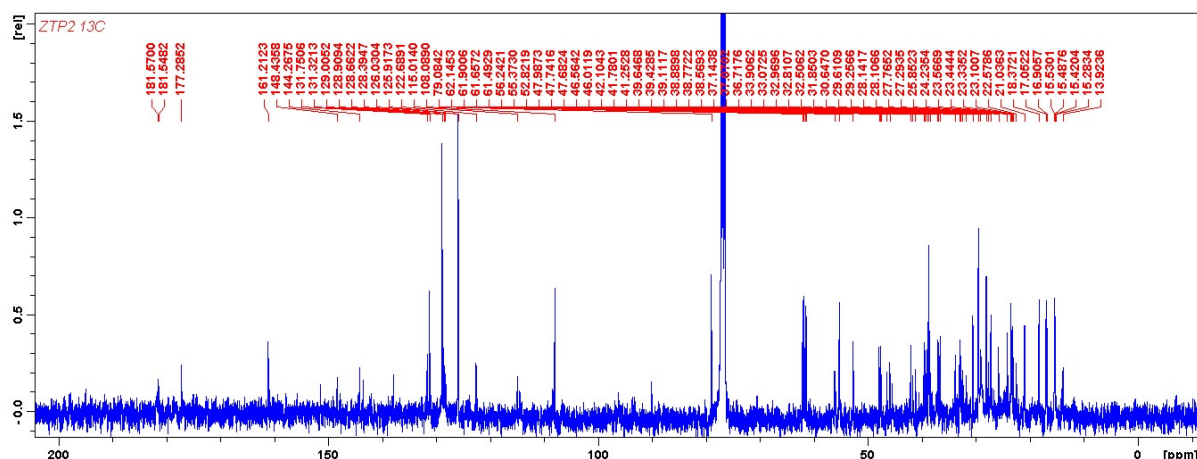
Fonte: Autora, 2014

4.2.1.2 RMN ^{13}C da fração ZTP2

Os deslocamentos químicos do espectro de RMN ^{13}C foram definidos segundo as regiões do espectro conhecidas como alifática (0 a 55 ppm), olefínica e aromática (110 a 155 ppm), carbonílica e acílica (155 a 220 ppm).

No espectro de RMN ^{13}C da fração ZTP2 (Figura 5) a região alifática (0 a 55 ppm) foi a que apresentou a maior quantidade de sinais, enquanto que a carbonílica e acílica (155 a 220 ppm) as menores quantidades. Foi observado neste espectro uma alta concentração de sinais na região alifática (C, CH, CH₂ e CH₃), presença de sinais de carbonos entre 60 ppm a 110 ppm, presença de sinais de carbono olefínico/aromático e presença de sinais carbono carbonila/acila na faixa entre 155 a 182 ppm (Figura 05).

Figura 05 - Espectro de RMN ^{13}C da fração ZTP2 em CDCl_3



Fonte: Autora, 2014

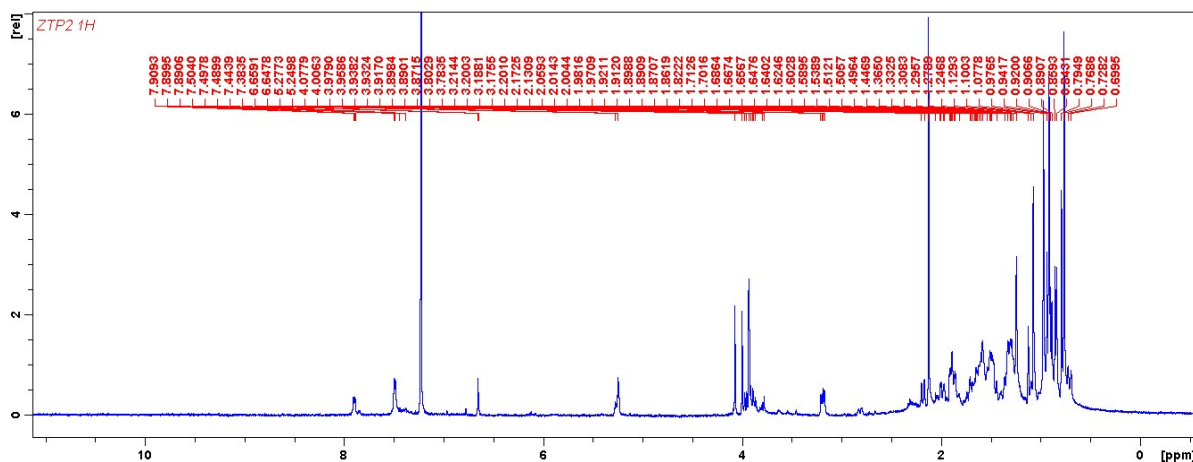
O perfil químico de RMN ^{13}C da fração ZTP2 permitiu atribuir à presença de substâncias ácidas, possivelmente triterpenos, açúcares e compostos aromáticos.

4.2.2 Identificação Estrutural dos Compostos Presentes na Fração ZTP2

4.2.2.1 Ressonância Magnética Nuclear Unidimensional

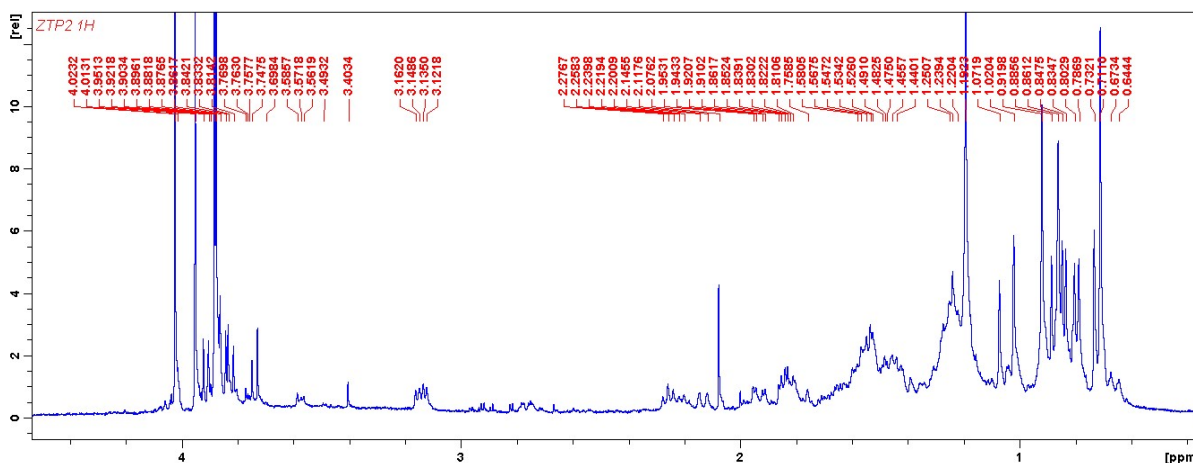
A análise do espectro de RMN ^1H da fração codificada como ZTP2, obtida a 400 MHz em CDCl_3 (Figuras 06 e 07) em conjunto com o espectro J-Resolvido (Figuras 20-22), evidenciou a presença de 11 sinais na região mais blindada entre δ 0,7 e 1,28. Porém, 3 destes sinais com deslocamento em δ 0,78; δ 0,93 e δ 0,98 possuem, cada um deles, duas metilas sobrepostas, perfazendo um total de 14 sinais, sendo 12 deles simpletos atribuídos a hidrogênios de grupos metilas ligados a carbonos não hidrogenados e 2 dupletos relativos aos hidrogênios de metilas ligadas a carbonos monohidrogenados (Tabela 05). Observa-se ainda, no espectro de RMN ^1H , 2 sinais sobrepostos em δ 3,2 na forma de um duplo duplete relativos a hidrogênios carbinólicos e dois sinais tripleto em δ 5,25 e δ 5,29 relativos a hidrogênios olefínicos (Figura 06; Tabela 05) (ARAÚJO e CHAVES, 2005; JUNGES et al., 2000).

Figura 06 - Espectro de RMN ^1H da fração ZTP2 em CDCl_3



Fonte: Autora, 2014

Figura 07 - Expansão do Espectro de RMN ^1H de ZTP2 em CDCl_3 .



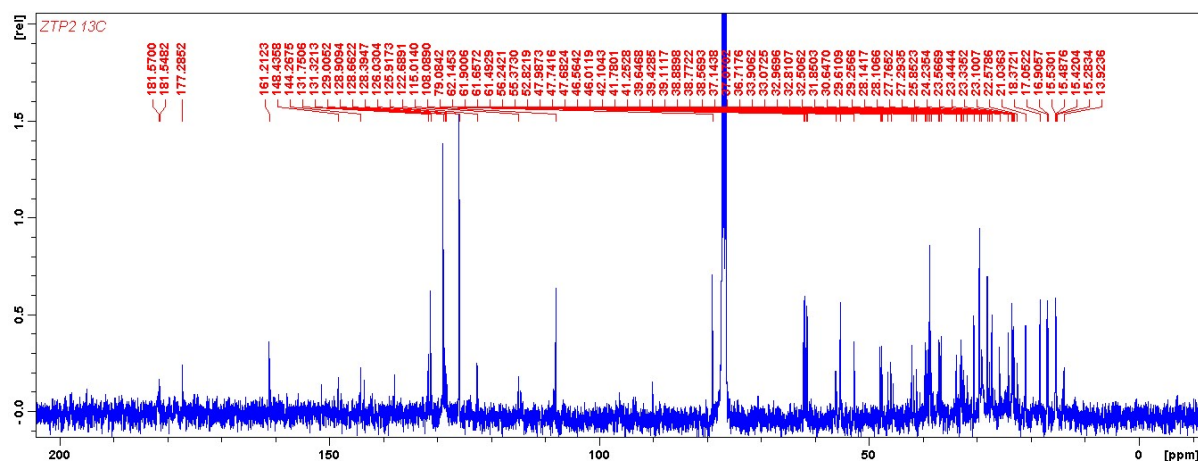
Fonte: Autora, 2014

A análise comparativa dos espectros de ^{13}C (Figuras 08, 09 e 10), DEPT 90° (Figuras 11, 12 e 13) e DEPT 135° (Figuras 14, 15) da fração ZTP2, juntamente com a literatura, evidenciou duas substâncias majoritárias: a primeira com um total de 30 átomos de carbonos: sendo 7 carbonos metílicos (δ 15,66; 15,88; 17,19; 17,22; 21,36; 23,81; 28,35) e 9 carbonos metilênicos (δ 18,54; 23,51; 24,37; 27,41; 28,24; 30,84; 33,26; 36,93; 38,96), com base no espectro DEPT 135° ; 7 carbonos metínicos (δ 39,06; 39,28; 47,79; 52,89; 55,46; 79,30; 126,03), baseado nos dados obtidos a partir do espectro DEPT 90° e 7 carbonos não hidrogenados (δ 37,22; 38,67; 39,74; 48,15; 138,19; 182,40), sendo um deles (δ 182,40) um grupo carbonila, cuja

informação foi obtida a partir da análise do espectro de ^{13}C , em conjunto com os dados obtidos com os espectros DEPTs (90° e 135°). A segunda substância também com um total de 30 átomos de carbonos: sendo 7 carbonos metílicos (δ 15,22; 15,76; 17,22; 23,79; 26,11; 28,31; 33,19) e 10 carbonos metilênicos (δ 18,52; 23,21; 23,62; 27,38; 27,92; 32,68; 32,90; 34,06; 38,85; 45,82), com base no espectro DEPT 135° , 5 carbonos metínicos (δ 41,32; 47,86; 55,81; 79,28; 122,81), baseado nos dados obtidos a partir do espectro DEPT 90° e 8 carbonos não hidrogenados (δ 30,88; 37,29; 38,96; 39,52; 41,90; 46,74; 144,67; 182,65), sendo um deles (δ 182,65) um grupo carbonila, cuja informação foi obtida a partir da análise do espectro de ^{13}C , em conjunto com os dados obtidos com os espectros DEPTs (90° e 135°) (SILVA, 2006; SOLOMONS e FRYHLE, 2005). Estes dados conferem sinais característicos de esqueletos do tipo ursano e oleanano, respectivamente.

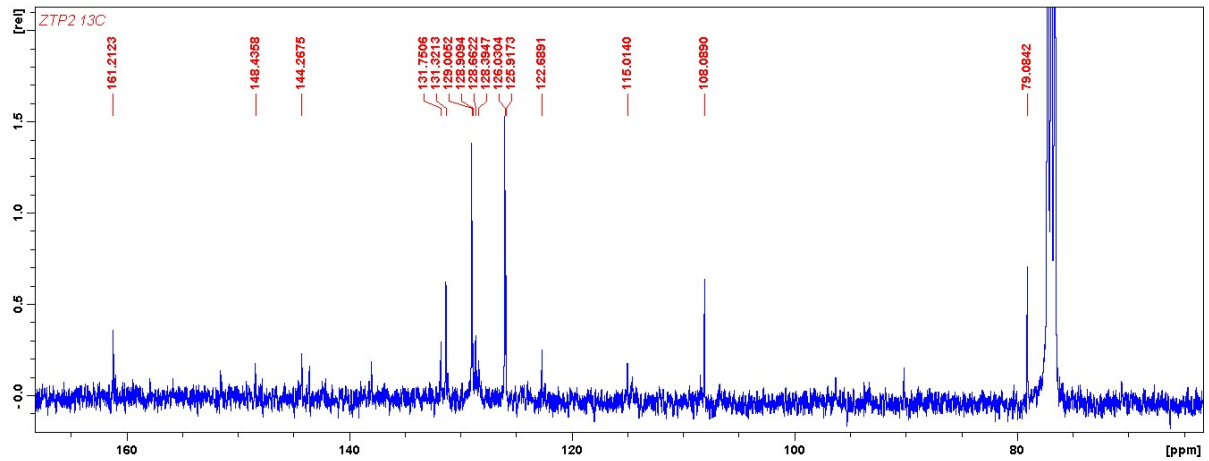
Os valores de deslocamentos químicos sugerem a presença de duas carbonilas de grupo ácido em δ 182,40 e 182,65; a presença de dois carbonos carbinólicos em δ 79,28 e 79,30 e a existência na molécula de duas ligações duplas do tipo trissubstituída com sinais em δ 122,81; 126,03; 138,19 e 144,67; ligações estas características dos esqueletos do tipo ursano e oleanano (JUNGES et al., 2000; MAHATO & KUNDU, 1994). A análise completa dos deslocamentos químicos do RMN ^{13}C encontra-se descrita na tabela 05.

Figura 08 - Espectro de RMN ^{13}C de ZTP2 com Expansão em CDCl_3 .



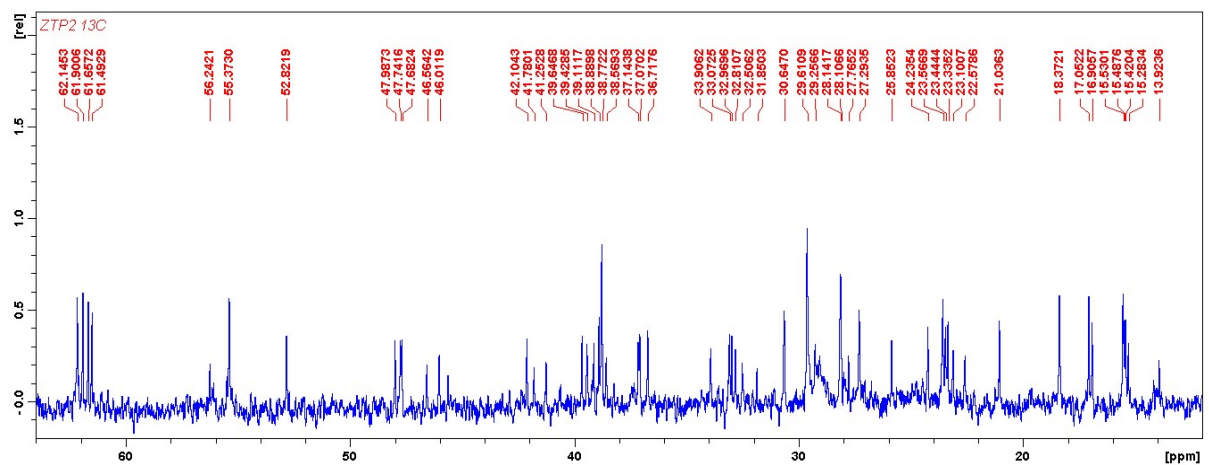
Fonte: Autora, 2014

Figura 09 - Expansão (1) do Espectro de RMN ^{13}C de ZTP2 em CDCl_3



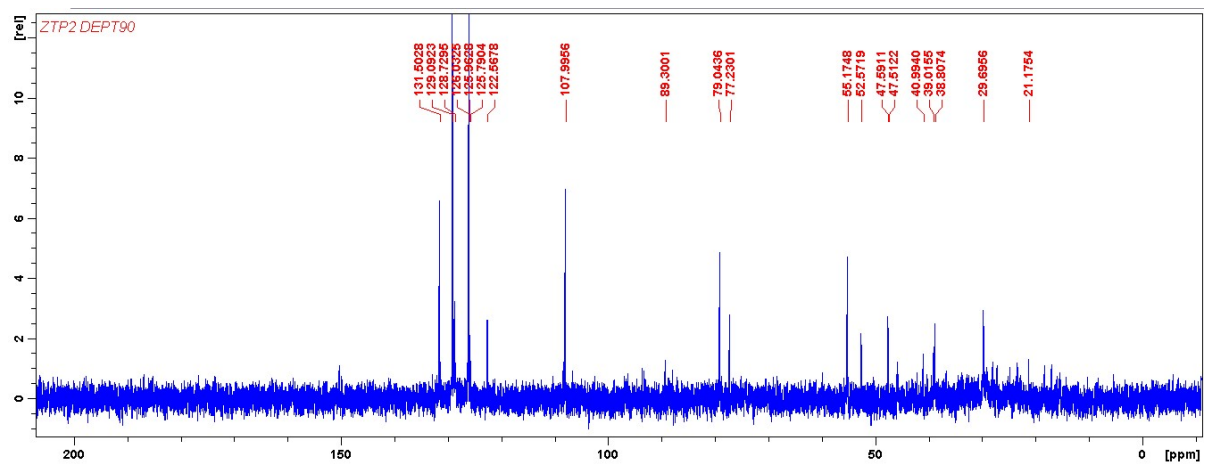
Fonte: Autora, 2014

Figura 10 - Expansão (2) do Espectro de RMN ^{13}C de ZTP2 em CDCl_3



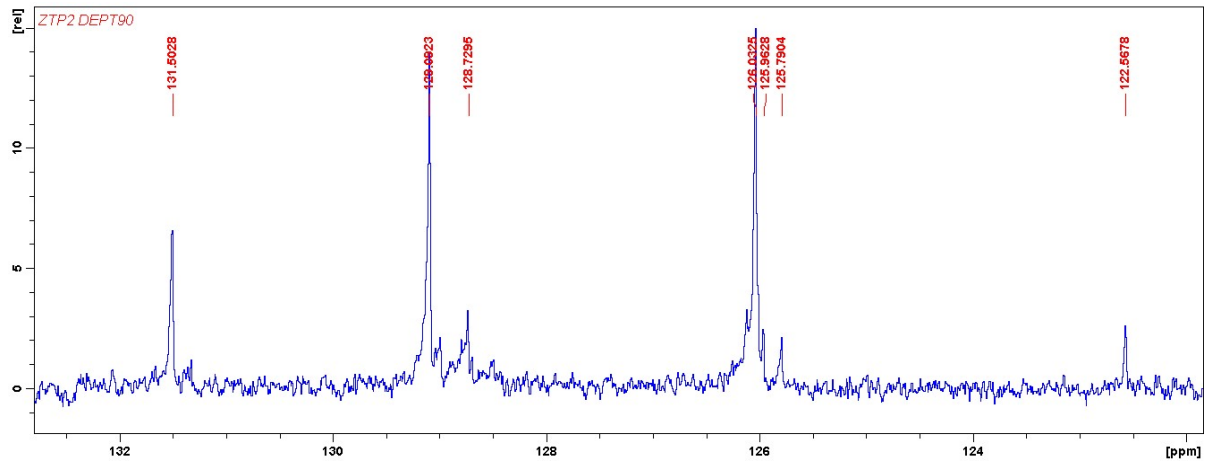
Fonte: Autora, 2014

Figura 11 - Espectro de RMN DEPT 90° de ZTP2 em CDCl_3



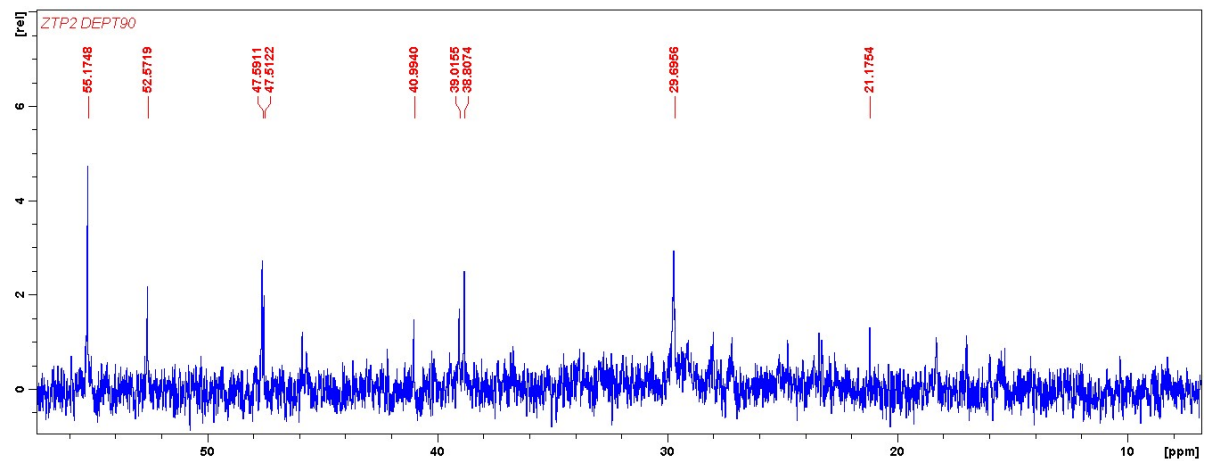
Fonte: Autora, 2014

Figura 12 - Expansão (1) do Espectro de RMN DEPT 90° de ZTP2 em CDCl₃



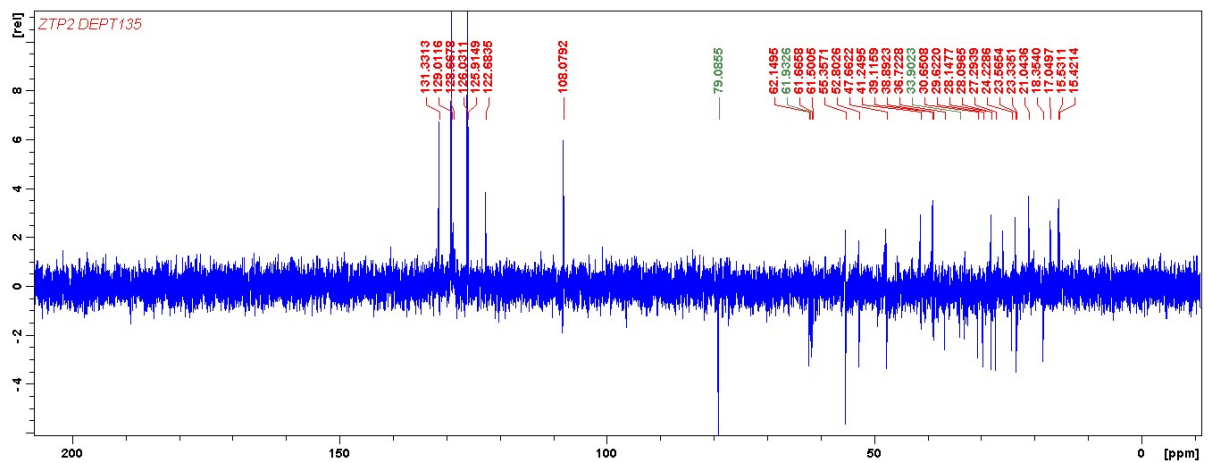
Fonte: Autora, 2014

Figura 13 - Expansão (2) do Espectro de RMN DEPT 90° de ZTP2 em CDCl₃



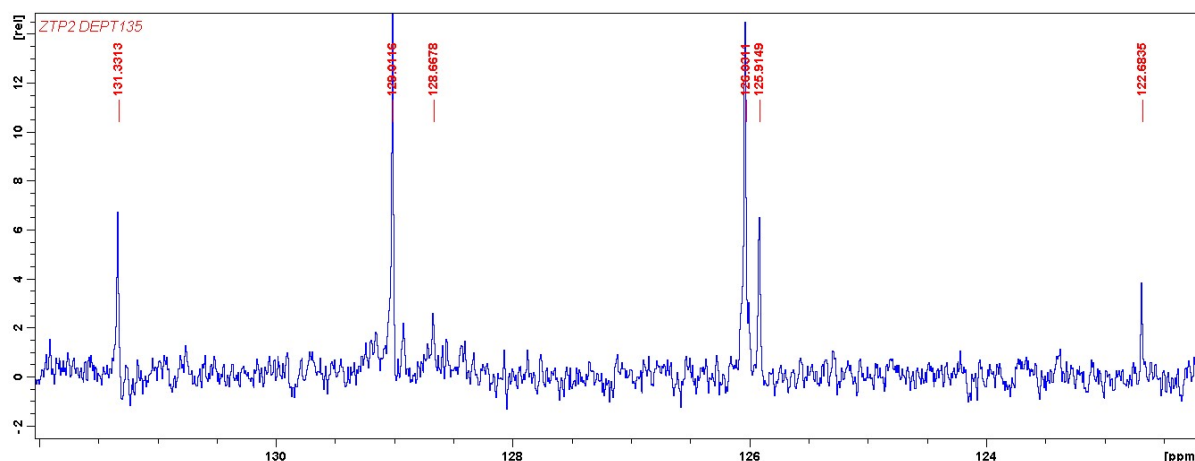
Fonte: Autora, 2014

Figura 14 - Espectro de RMN DEPT 135° de ZTP2 em CDCl₃



Fonte: Autora, 2014

Figura 15 - Expansão (1) do espectro de RMN DEPT 135° de ZTP2 em CDCl₃

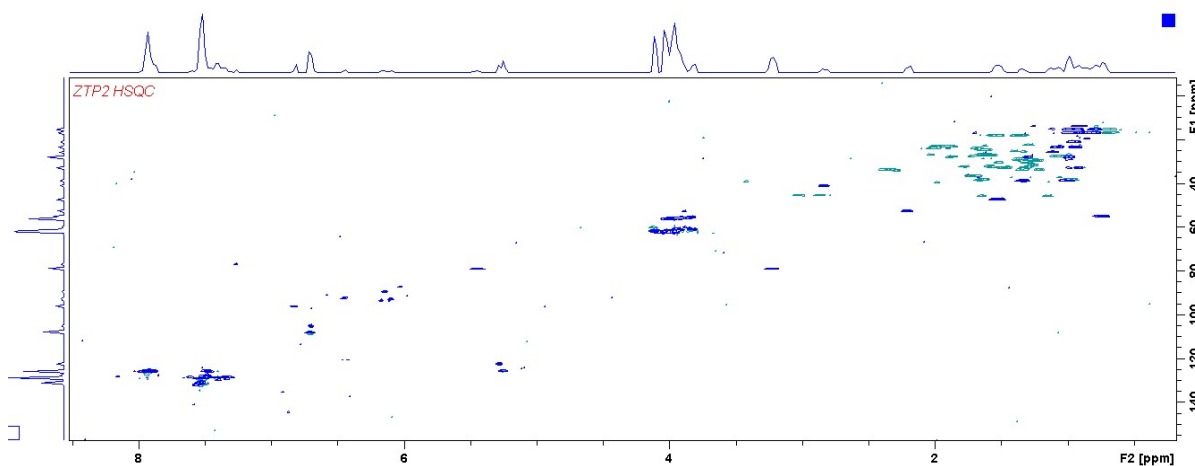


Fonte: Autora, 2014

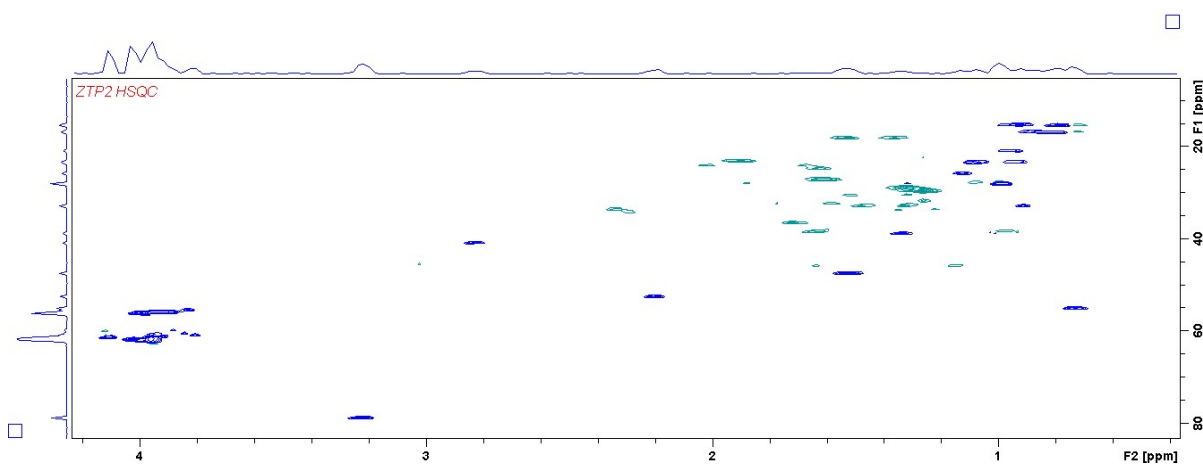
4.2.2.2 Ressonância Magnética Nuclear Bidimensional

Para se obter um mapeamento estrutural mais preciso dos compostos foram utilizados as técnicas bidimensionais de RMN (HSQC, HMBC e J-Resolvido).

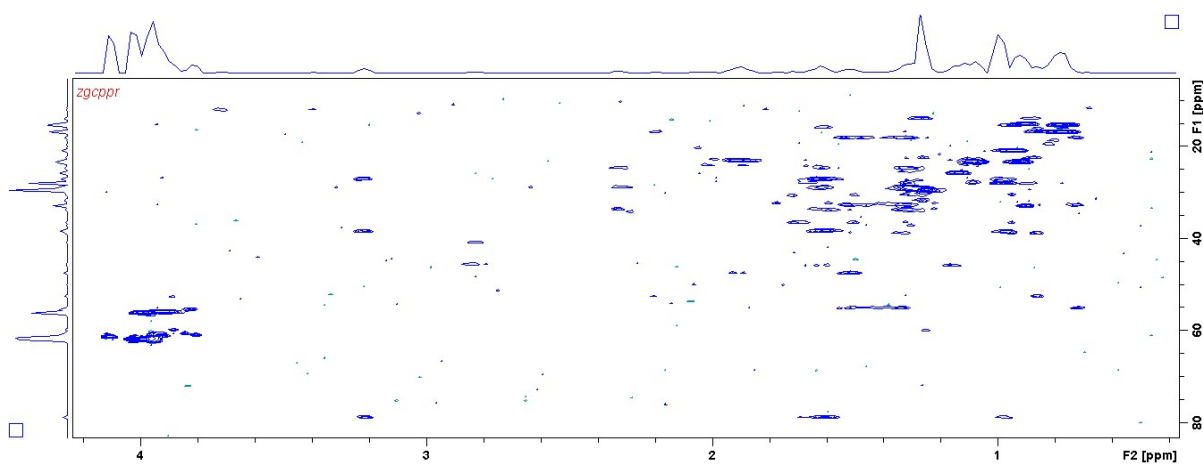
A análise dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C da fração ZTP2 indicaram a natureza dos hidrogênios e dos carbonos das moléculas identificadas. Os espectros de ¹³C e DEPTs 90° e 135° possibilitaram a identificação dos sinais dos carbonos quanto aos grupos metila, metileno, metínico e quanto aos carbonos não hidrogenados, enquanto a numeração dos sinais de carbonos foi feita com base na literatura e na análise dos espectros HSQC e HMBC. A identificação dos hidrogênios dos grupos foi feita com base nos espectros HSQC (Figuras 16-19), que mostrou a correlação direta destes com os seus respectivos carbonos (Tabela 05) (CARVALHO e BRAZ FILHO, 1993; KAISER, 2000; MALHEIROS et al., 1996).

Figura 16 - Espectro de RMN HSQC de ZTP2 em CDCl_3 

Fonte: Autora, 2014

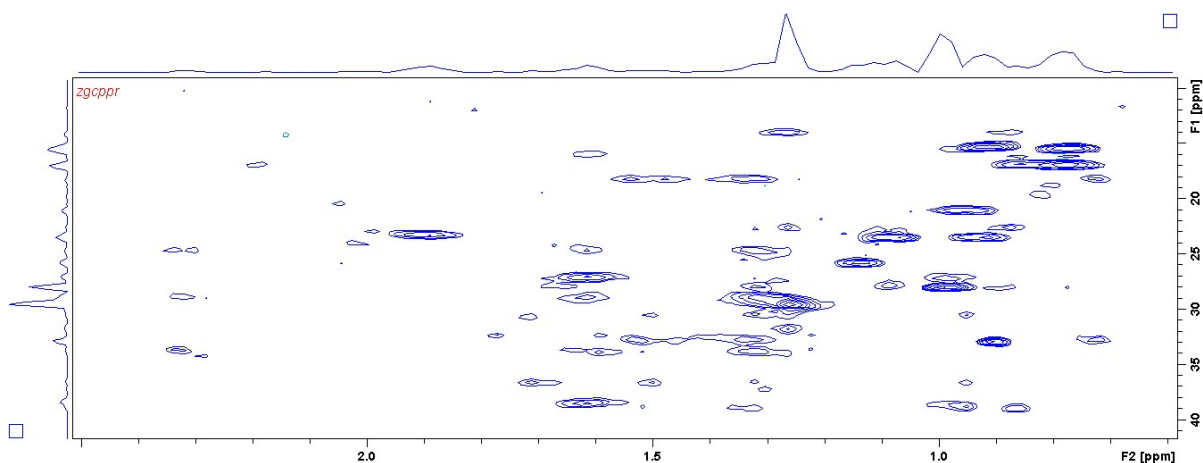
Figura 17 - Expansão (1) do Espectro de RMN HSQC de ZTP2 em CDCl_3 

Fonte: Autora, 2014

Figura 18 - Expansão (2) do Espectro de RMN HSQC de ZTP2 em CDCl_3 

Fonte: Autora, 2014

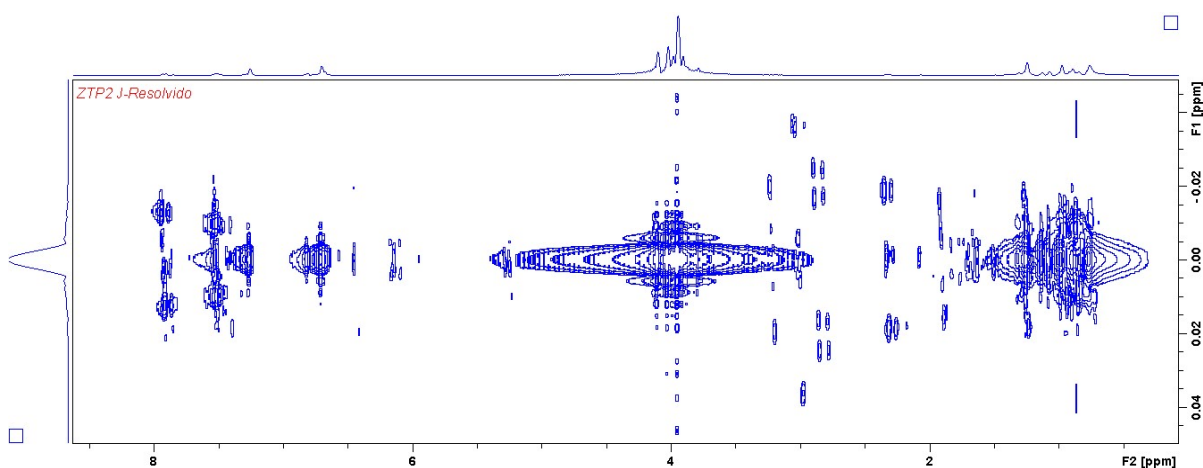
Figura 19 - Expansão (3) do Espectro de RMN HSQC de ZTP2 em CDCl_3



Fonte: Autora, 2014

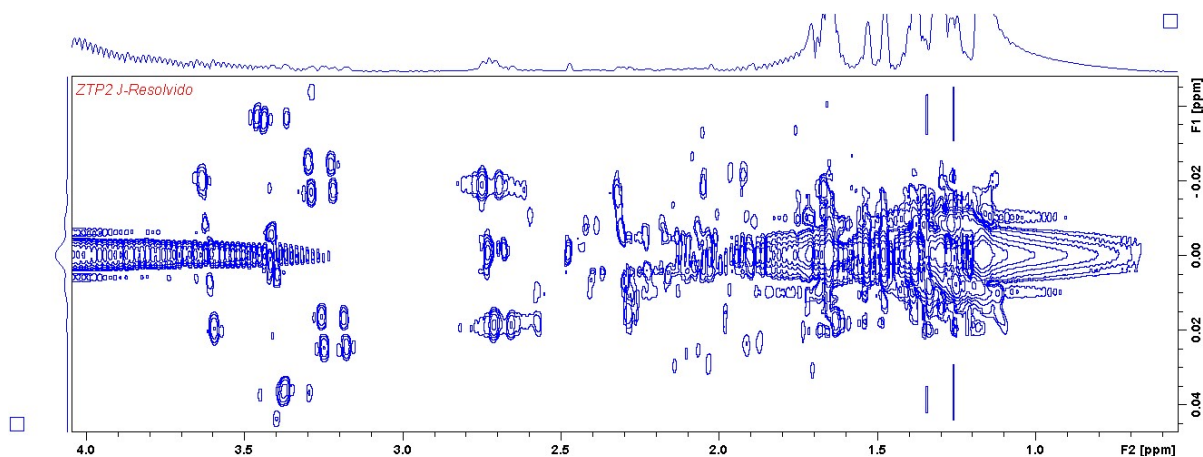
A análise do espectro HSQC permitiu a observação de todas as correlações diretas C-H como indicado na tabela 05. Para a primeira molécula, com esqueleto ursano, este espectro confirma as correlações do hidrogênio carbinólico (δ 3,219) com o carbono δ 79,30; do hidrogênio vinílico (δ 5,25) com carbono δ 126,03 e dos hidrogênios metílicos (δ 0,922; 0,869; 0,936; 1,068; 0,989) com os seus respectivos carbonos (δ 15,66; 17,22; 21,36; 23,81; 28,35). Para a segunda molécula, com esqueleto oleanano foi confirmada as correlações do hidrogênio carbinólico (δ 3,272) com o carbono δ 79,28; do hidrogênio vinílico (δ 5,29) com o carbono δ 122,81 e dos hidrogênios metílicos (δ 0,789; 0,798; 0,936; 1,127; 0,989; 0,912) com os seus respectivos carbonos (δ 15,76; 17,22; 23,79; 26,11; 28,31; 33,19).

Figura 20 - Espectro de RMN J-Resolvido de ZTP2 em CDCl_3



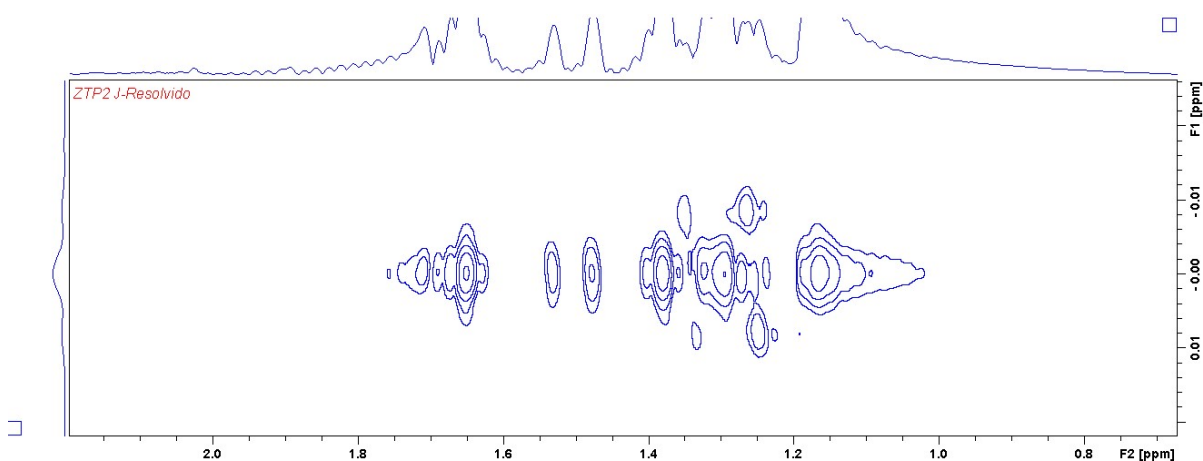
Fonte: Autora, 2014

Figura 21 - Expansão (1) do espectro de RMN J-Resolvido de ZTP2 em CDCl_3



Fonte: Autora, 2014

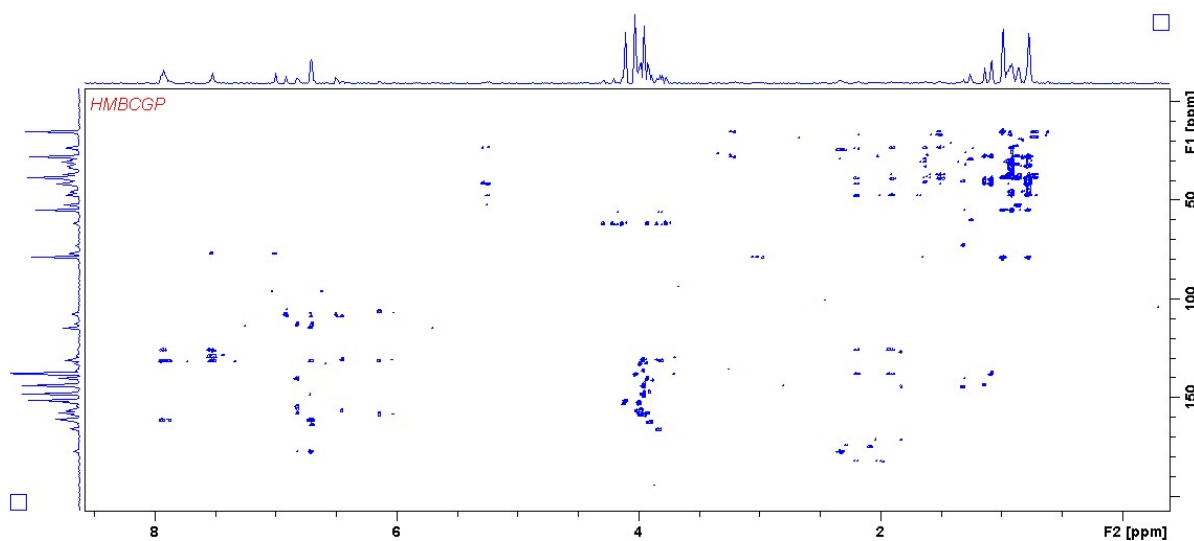
Figura 22 - Expansão (2) do espectro de RMN J-Resolvido de ZTP2 em CDCl_3



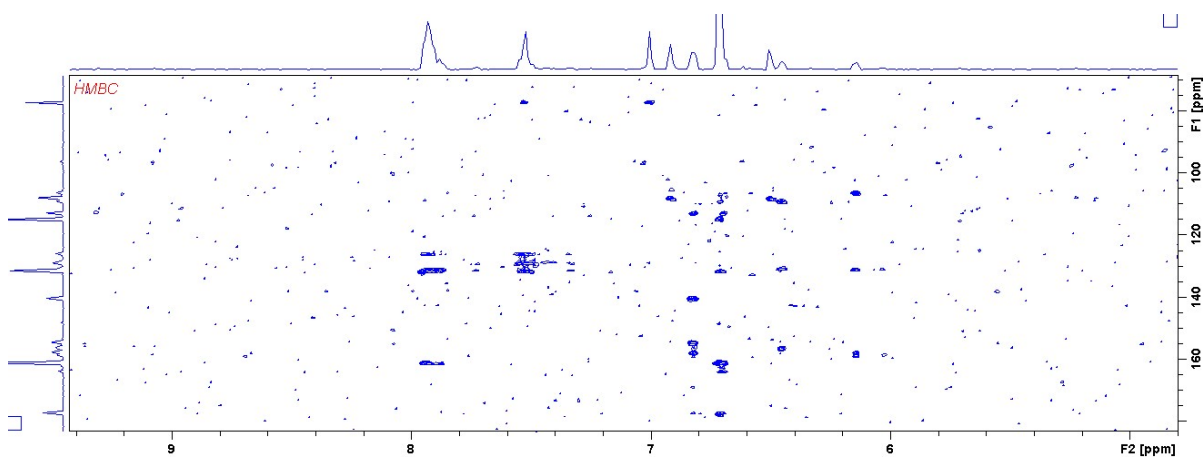
Fonte: Autora, 2014

A análise do espectro de RMN J-Resolvido permitiu a identificação da multiplicidade dos sinais sobrepostos em δ 3,2 como sendo dois sinais na forma de um duplo duplete, relativos a hidrogênios carbinólicos. Na análise também foi possível a visualização de dois sinais na forma de dupletos, relativos aos hidrogênios de metilas ligadas a carbonos monohidrogenados.

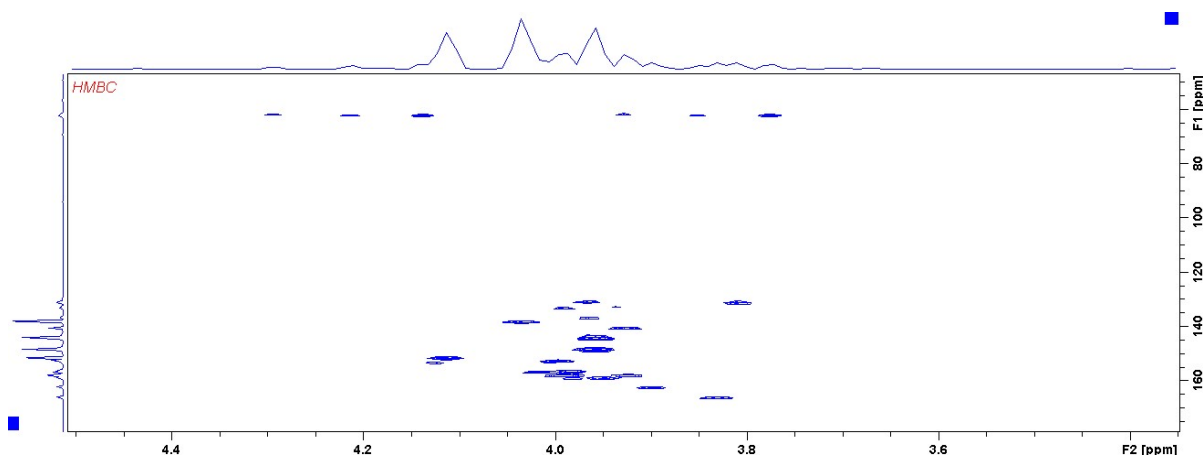
A análise do espectro HMBC (Figuras 23-26) (correlação H-C a longa distância) mostrou às interações observadas entre átomos de carbono não hidrogenados.

Figura 23 - Espectro de RMN HMBC de ZTP2 em CDCl_3 

Fonte: Autora, 2014

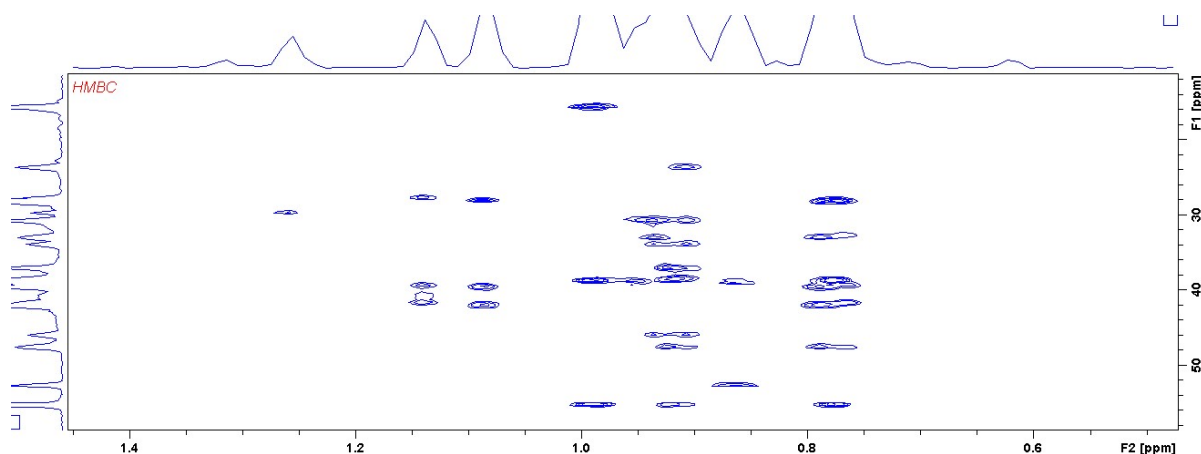
Figura 24 - Expansão (1) do espectro de RMN HMBC de ZTP2 em CDCl_3 

Fonte: Autora, 2014

Figura 25 - Expansão (2) do Espectro de RMN HMBC de ZTP2 em CDCl_3 

Fonte: Autora, 2014

Figura 26 - Expansão (3) do Espectro de RMN HMBC de ZTP2 em CDCl_3



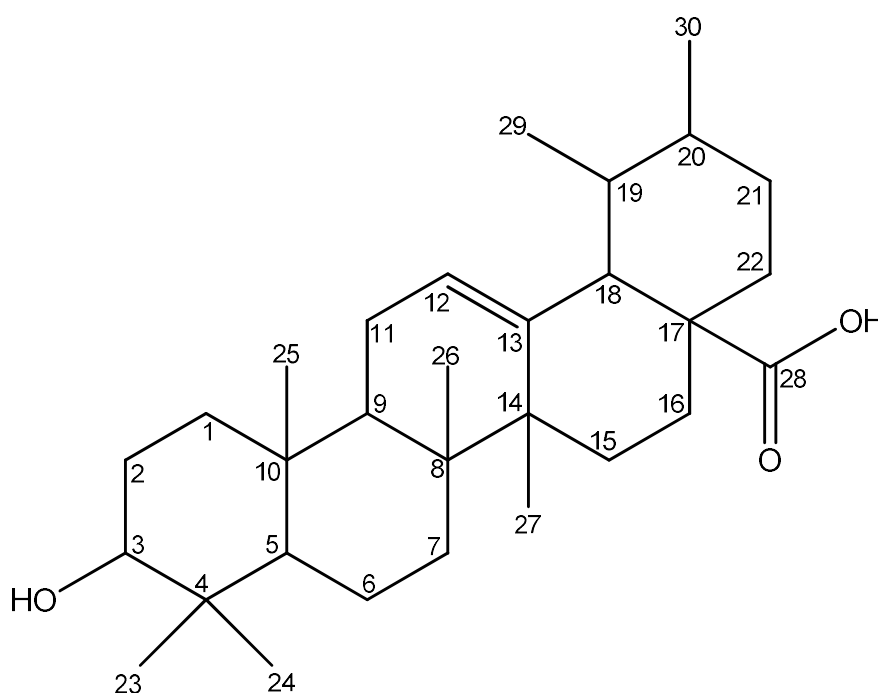
Fonte: Autora, 2014

Visando a determinação do modo como os carbonos hidrogenados estão interligados através dos carbonos não hidrogenados, foram observadas as correlações no espectro HMBC (Figuras 23-26), $^{2-3}J_{C,H}$. Assim, na primeira molécula observa-se que o C_3 (δ 79,30) está correlacionado com os hidrogênios dos grupos metilas H-23 (δ 0,989) e H-24 (δ 0,706). O C_4 (δ 38,67) quaternário, correlaciona com o H-3 (δ 3,219) e também com os hidrogênios H-23 (δ 0,989) e H-24 (δ 0,706). Isto confirma que estas metilas estão no mesmo carbono, α à hidroxila. O C_{10} (δ 37,22) quaternário mostra correlação com os hidrogênios H-2 (δ 2,045) e H-25 (δ 0,922). Para a segunda molécula tem-se que o C_3 (δ 79,28) está correlacionado com os hidrogênios de duas metilas, H-23 (δ 0,99) e H-24 (δ 0,789), confirmando que estas metilas estão no mesmo carbono C_4 (δ 38,96) e que este está ligado ao C_3 (δ 78,28).

Na molécula de esqueleto ursano o C_8 (δ 39,74) quaternário mostra correlação com os hidrogênios H-11 (δ 1,32 e δ 1,88) e com os hidrogênios das metilas H-26 (δ 0,836) e H-27 (δ 1,068). Considerando que o C_{10} (δ 37,22) é um carbono quaternário, que correlaciona com os hidrogênios H-25 (δ 0,922), e estes hidrogênios correlacionam com o carbono C_1 (δ 38,96) e C_9 (δ 47,79), confirma-se que a metila C_{25} está ligada ao C_{10} (δ 37,22), e este está ligado ao C_9 (δ 47,79). Na molécula de esqueleto oleanano o C_7 (δ 32,69) mostra correlação com os hidrogênios das duas metilas, H-26 (δ 0,798) e H-27 (δ 1,127), que são as mesmas correlações do C_8 (δ 39,52).

A primeira molécula apresenta os hidrogênios H-11 (δ 1,32 e δ 1,88) correlacionados com o C₉ (δ 47,79) e com o C₈ (δ 39,74) quaternário. O H-12 (δ 5,25) mostra correlação com o C₁₃ (δ 138,19) e com o carbono quaternário C₁₄ (δ 42,22), sendo que este último mostra correlação com os hidrogênios das metilas H-26 (δ 0,836) e H-27 (δ 1,068). Assim, as correlações observadas nos espectros bidimensionais, que proporcionaram a determinação estrutural da substância identificada como sendo um triterpeno de esqueleto do tipo ursano conhecido como Ácido Ursólico (Figura 27), estão demonstradas nas figuras 16-26, tabela 05.

Figura 27 - Estrutura do Ácido Ursólico

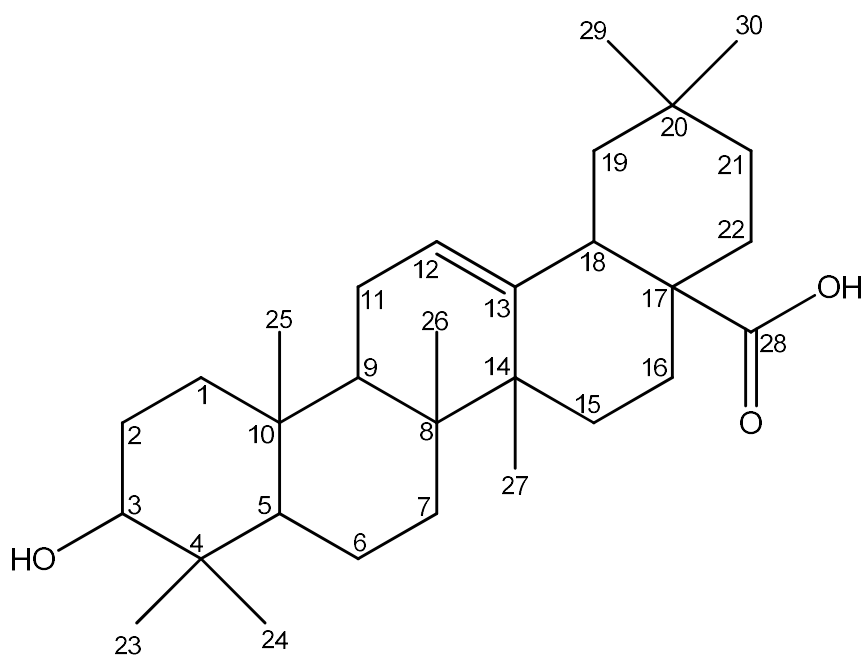


Fonte: Autora, 2014

Quanto a segunda molécula identificada na fração ZTP2, observa-se que o H₁₂ (δ 5,29) do C₁₂ (δ 122,81), identificado como carbono vinílico, mostra correlação com o C₁₄ (δ 41,90) quaternário, que está correlacionado também com os hidrogênios do C₁₁ e com os hidrogênios das metilas C₂₆ e C₂₇. Observa-se ainda que o C₁₃ (δ 144,67) é altamente desprotegido, devido à ligação dupla, e está

correlacionado com os hidrogênios do C₁₁ e do C₁₈. Portanto, as correlações mostram que a molécula identificada como sendo um triterpeno de esqueleto do tipo oleanano, de fato é o Ácido Oleanólico (Figura 28), estão nas figuras 16-26.

Figura 28 - Estrutura do Ácido Oleanólico



Fonte: Autora, 2014

Tabela 05: Análise Geral dos Metabólitos da Fração Clorofórmica por RMN 1D e 2D.

Nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Tipo	Dados da Literatura**	Nº
1	182,65		C-AO*	181,0	28
2	182,40		C-AU*	180,0	28
3	178,25				
4	177,75		C		
5	177,61				
6	161,51		C		
7	158,13				
8	154,84				
9	152,81				
10	151,83				
11	148,60		C		
12	148,06				
13	144,67		C-AO	143,4	13
14	144,42				
15	143,83				
16	140,71				
17	139,07				
18	138,98				
19	138,38				
20	138,19		C-AU	138,0	13
21	132,25		C		
22	131,81				
23	131,77		CH		
24	131,69		CH		
25	131,57	7,531	CH		
26	131,52				
27	129,41				
28	129,29	7,521	CH		
29	129,24	7,521	C		
30	129,19	7,521	C		

Tabela 05: Análise Geral dos Metabólitos da Fração Clorofórmica por RMN 1D e 2D (cont.)

Nº	δ ^{13}C	δ ^1H	Tipo	Dados da Literatura**	Nº
31	129,10				
32	128,99	7,413	CH		
33	128,94	7,413	CH		
34	128,70				
35	128,64	7,607			
36	128,60	7,607			
37	128,02	7,482			
38	126,54				
39	126,50				
40	126,33				
41	126,26	7,47	CH		
42	126,24	7,93			
43	126,18				
44	126,03	5,25	CH-AU	125,5	12
45	122,81	5,29	CH-AO	122,1	12
46	115,12		C		
47	113,14				
48	108,57				
49	108,50				
50	108,22	6,709	CH		
51	105,49	6,700			
52	96,51	6,817			
53	93,84	6,172			
54	93,43	6,093			
55	93,01	6,445			
56	89,77	6,152			
57	79,44				
58	79,30	3,219	CH-AU	78,8	3
59	79,28	3,272	CH-AO	78,7	3
60	77,43		CH		

Tabela 05: Análise Geral dos Metabólitos da Fração Clorofórmica por RMN 1D e 2D (cont.)

N°	δ ^{13}C	δ ^1H	Tipo	Dados da Literatura**	N°
61	62,47		CH ₂ ?		
62	62,40				
63	62,36				
64	62,26	4,040	CH ₂		
65	62,02	3,962	CH ₂		
66	61,92				
67	61,85	4,118	CH ₂		
68	61,81				
69	61,74				
70	61,39				
71	61,33	3,806			
72	56,76				
73	56,55	3,982			
74	56,51		C		
75	56,41				
76	56,34				
77	56,33	3,942			
78	55,81	3,825	CH-AO	55,2	5
79	55,46	0,727	CH-AU	55,4	5
80	52,89	2,183	CH-AU	52,8	18
81	48,15		C-AU	48,1	17
82	47,86		CH-AO	47,6	9
83	47,79	1,525	CH-AU	47,5	9
84	46,74		C-AO	46,6	17
85	46,14	1,636; 1,166	CH ₂		
86	45,82	2,905	CH ₂ -AO	45,8	19
87	45,78	3,023			
88	42,22		C-AU	42,0	14
89	41,90		C-AO	41,6	14
90	41,32	2,828	CH-AO	41,3	18
91	39,74		C-AU	39,6	8

Tabela 05: Análise Geral dos Metabólitos da Fração Clorofórmica por RMN 1D e 2D (cont.)

N°	δ ^{13}C	δ ^1H	Tipo	Dados da Literatura**	
92	39,52		C-AO	39,3	8
93	39,28	1,342	CH-AU	38,8	20
94	39,06	1,032	CH-AU	39,1	19
95	38,96		C-AO	38,7	4
96	38,96		CH ₂ -AU	38,8	1
97	38,85	1,635	CH ₂ -AO	38,5	1
98	38,67		C-AU	38,8	4
99	38,63	0,972	CH ₂		
100	37,29		C-AO	37,0	10
101	37,22		C-AU	37,0	10
102	36,93	1,715	CH ₂ -AU	36,7	22
103	34,06	1,351	CH ₂ -AO	33,8	21
104	33,96	1,225; 2,337	CH ₂		
105	33,26		CH ₂ -AU	33,0	7
106	33,19	0,912	CH ₃ -AO	33,0	29
107	33,16	1,479; 0,867	CH ₂		
108	33,06	1,323	CH ₂		
109	32,90	1,538	CH ₂ -AO	32,6	7
110	32,68	1,778; 1,595	CH ₂ -AO	32,3	22
111	32,12		C		
112	32,04	1,264	CH ₂		
113	30,88		C-AO	30,6	20
114	30,84	1,518; 1,323	CH ₂ -AU	30,7	21
115	29,89		CH		
116	29,87		C		
117	29,85		CH		
118	29,80	1,264	CH ₂		
119	29,66				
120	29,55		CH ₂		
121	29,46				
122	29,30				

Tabela 05: Análise Geral dos Metabólitos da Fração Clorofórmica por RMN 1D e 2D (conclusão)

N°	δ ^{13}C	δ ^1H	Tipo	Dados da Literatura**	N°
123	28,35	0,989	CH ₃ -AU	28,2	23
124	28,31	0,990	CH ₃ -AO	28,1	23
125	28,24	1,322; 1,880	CH ₂ -AU	23,3	11
126	27,92	1,085	CH ₂ -AO	23,4	16
127	27,44		CH ₂		
128	27,41	2,045	CH ₂ -AU	27,3	2
129	27,38	1,610	CH ₂ -AO	27,4	2
130	26,11	1,127	CH ₃ -AO	26,0	27
131	25,73	1,323	CH ₂		
132	24,98	1,628	CH ₂		
133	24,37	2,011	CH ₂ -AU	24,3	16
134	23,81	1,068	CH ₃ -AU	23,6	27
135	23,79	0,936	CH ₃ -AO	23,6	30
136	23,62		CH ₂ -AO	23,1	11
137	23,51	1,905	CH ₂ -AU	28,2	15
138	23,21	1,616	CH ₂ -AO	27,7	15
139	22,88	1,287	CH ₂		
140	21,36	0,936	CH ₃ -AU	21,2	30
141	18,54	1,362	CH ₂ -AU	18,4	6
142	18,52	1,538	CH ₂ -AO	18,3	6
143	17,22	0,798	CH ₃ -AO	16,8	26
144	17,22	0,869	CH ₃ -AU	16,9	29
145	17,19	0,836	CH ₃ -AU	16,9	26
146	17,14	0,723	CH ₂		
147	15,80	0,706	CH ₃ -AU	15,5	24
148	15,76	0,789	CH ₃ -AO	15,6	24
149	15,76	0,717	CH ₂		
150	15,66	0,922	CH ₃ -AU	15,7	25
151	15,52		CH ₃ -AO	15,3	25
152	14,45				
153	14,29		CH ₃		

AU* = Ácido Ursólico (**FALCÃO et al., 2003); AO* = Ácido Oleanólico (**MAHATO E KUNDU, 1994)

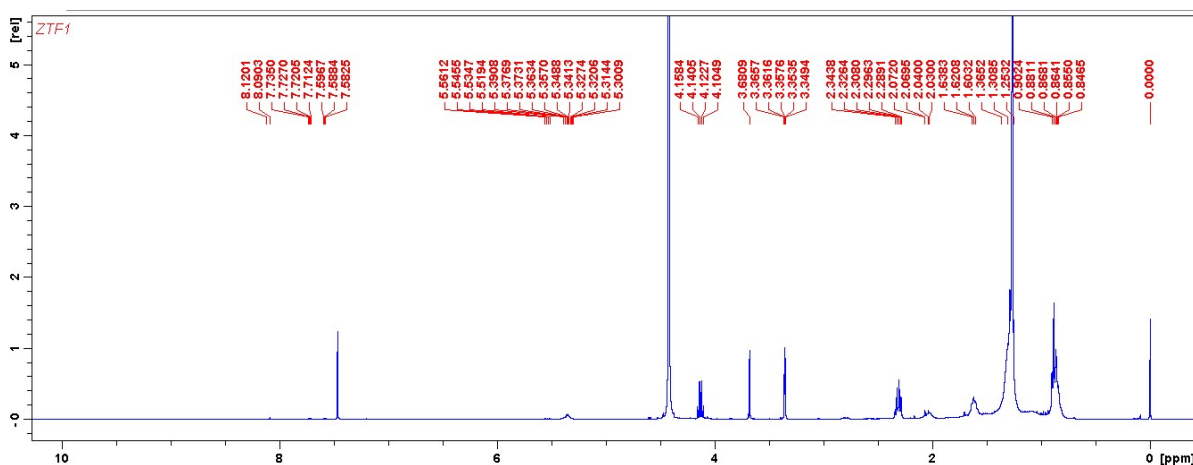
Fonte: Autora, 2014

4.3 Análise do Perfil Químico das Nove Frações, Provenientes de ZTP2, Utilizando a RMN

A comparação dos perfis químicos das subfrações ZTF1-ZTF9 (Figuras 29-37), provenientes da fração ZTP2, mostrou haver grande semelhança entre os constituintes das amostras ZTF3-ZTF8 (Figuras 31-36). Também semelhantes ao extrato ZTP2, os referidos espectros mostraram alta concentração de sinais na região alifática (H_{CH} , H_{CH_2} e H_{CH_3}), entre 0 a 1,5 ppm; devido a presença de sinais de hidrogênio entre 3,0 ppm a 4,5 ppm, sendo bem visualizado um duplo duplete característico de hidrogênio carbinólico e presença de sinais de hidrogênio olefínico na faixa entre 5,0 a 8,0 ppm (Figuras 38-40). A fração ZTF2 (Figura 30) diferente das demais frações apresentou maior concentração de sinais de hidrogênio entre 3,0 ppm a 4,5 ppm. A fração ZTF1 (Figura 29) foi a que apresentou maior diferença entre todas as frações, apresentando poucos sinais no espectro, e demonstrando a presença de muita graxa.

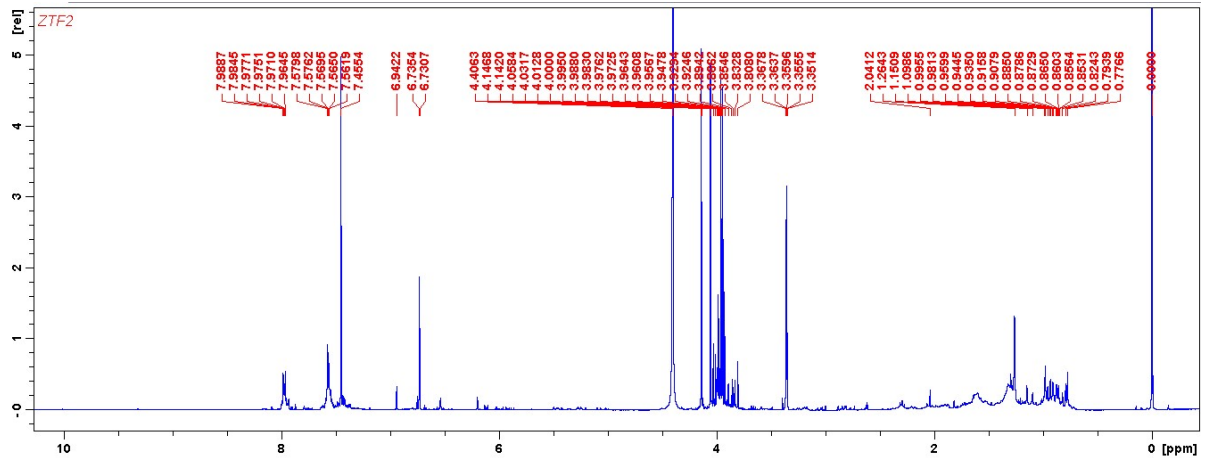
Assim, o perfil químico dos espectros de RMN 1H das frações ZTF3-ZTF8 permitiu atribuir à presença de substâncias ácidas, da classe dos triterpenos, possivelmente os mesmos identificados em ZTP2, os ácidos ursólico e oleanólico, os quais se apresentam nas frações ZTF3-ZTF8 como componentes majoritários, além de outros constituintes minoritários.

Figura 29 - Espectro de RMN 1H da fração ZTF1 em $CDCl_3/CD_3OD$ 5:2



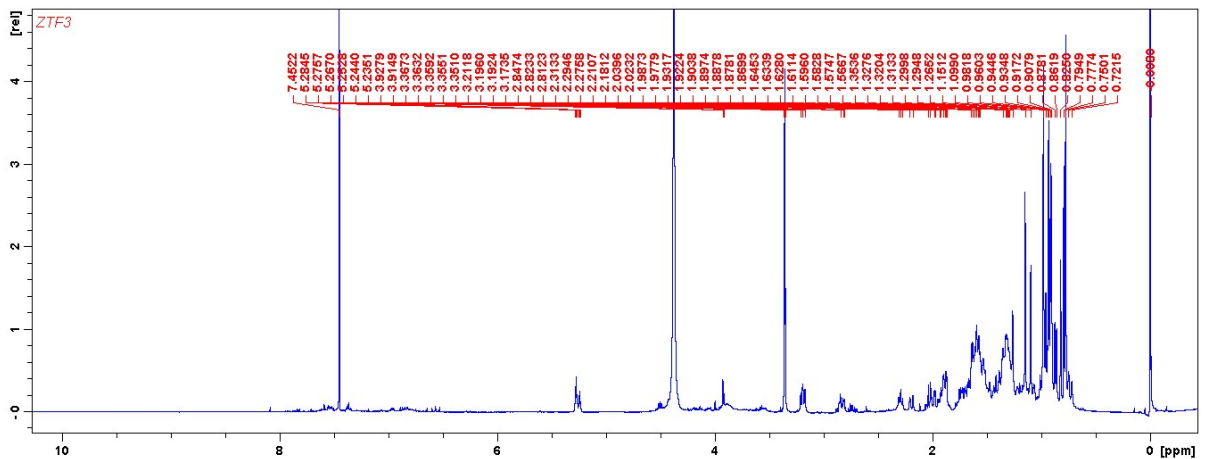
Fonte: Autora, 2014

Figura 30 - Espectro de RMN ^1H da fração ZTF2 em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 5:2



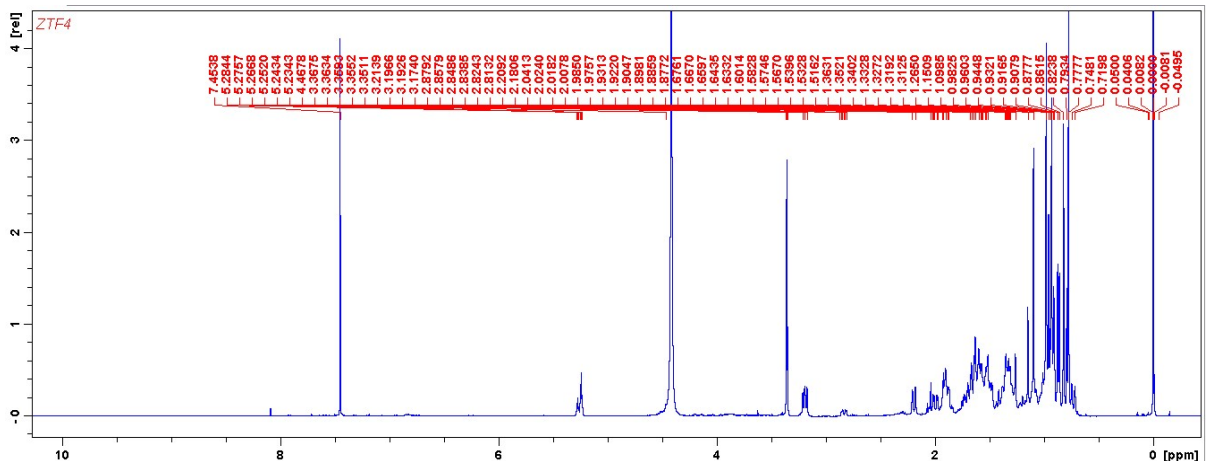
Fonte: Autora, 2014

Figura 31 - Espectro de RMN ^1H da fração ZTF3 em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 5:2



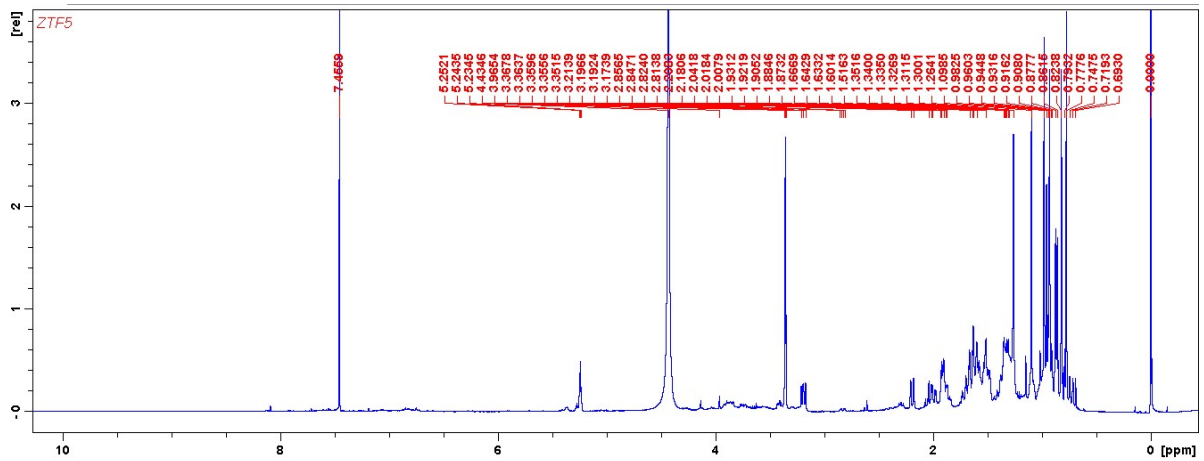
Fonte: Autora, 2014

Figura 32 - Espectro de RMN ^1H da fração ZTF4 em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 5:2



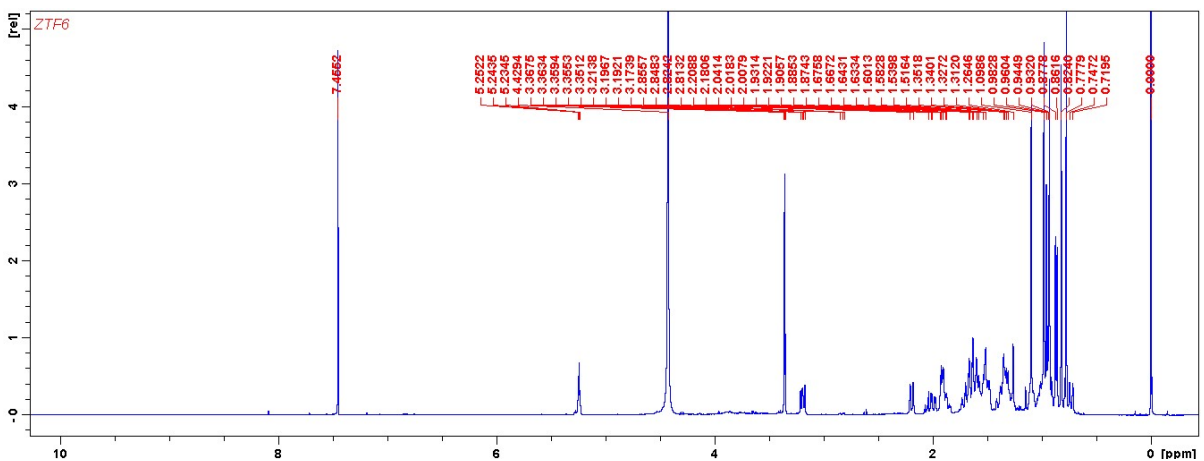
Fonte: Autora, 2014

Figura 33 - Espectro de RMN ^1H da fração ZTF5 em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 5:2



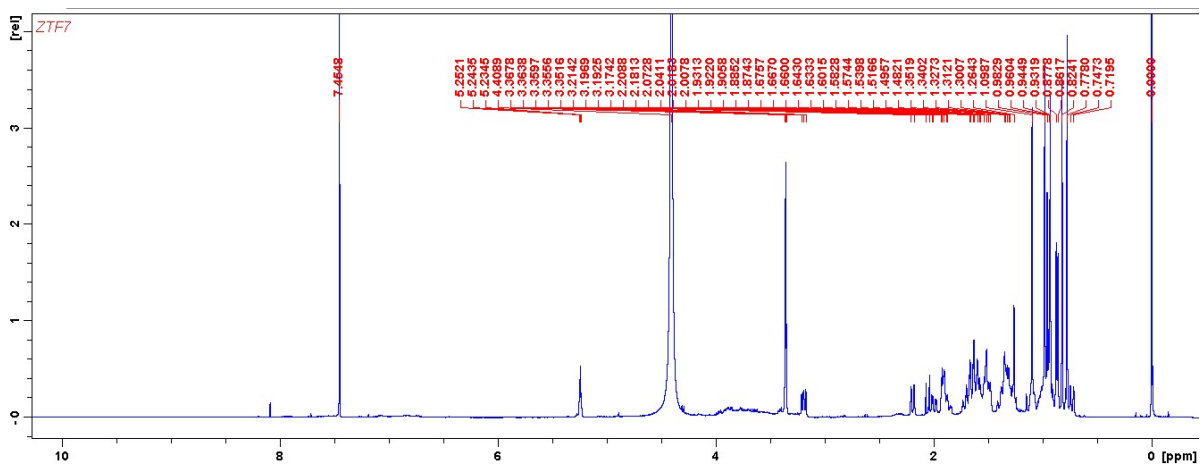
Fonte: Autora, 2014

Figura 34 - Espectro de RMN ^1H da fração ZTF6 em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 5:2



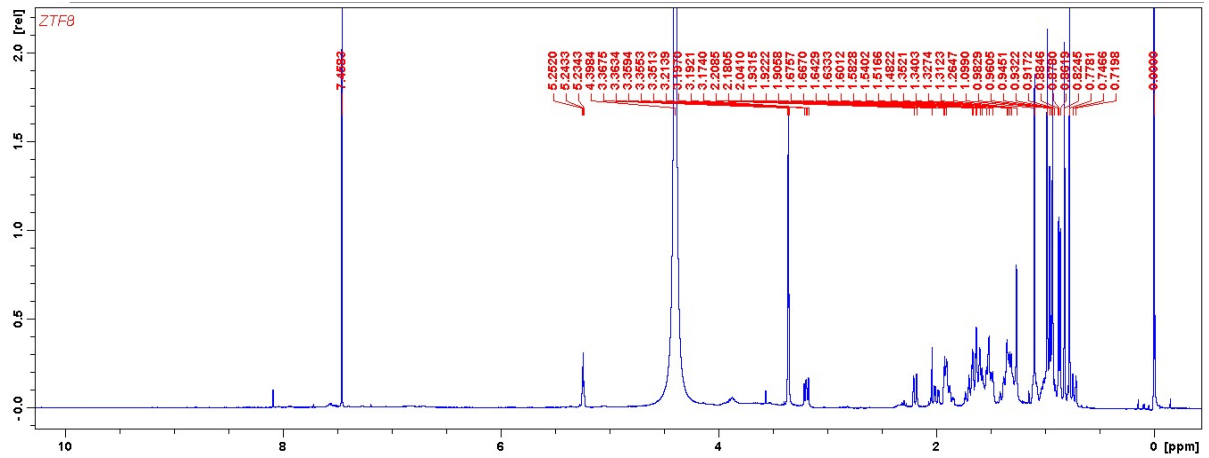
Fonte: Autora, 2014

Figura 35 - Espectro de RMN ^1H da fração ZTF7 em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 5:2



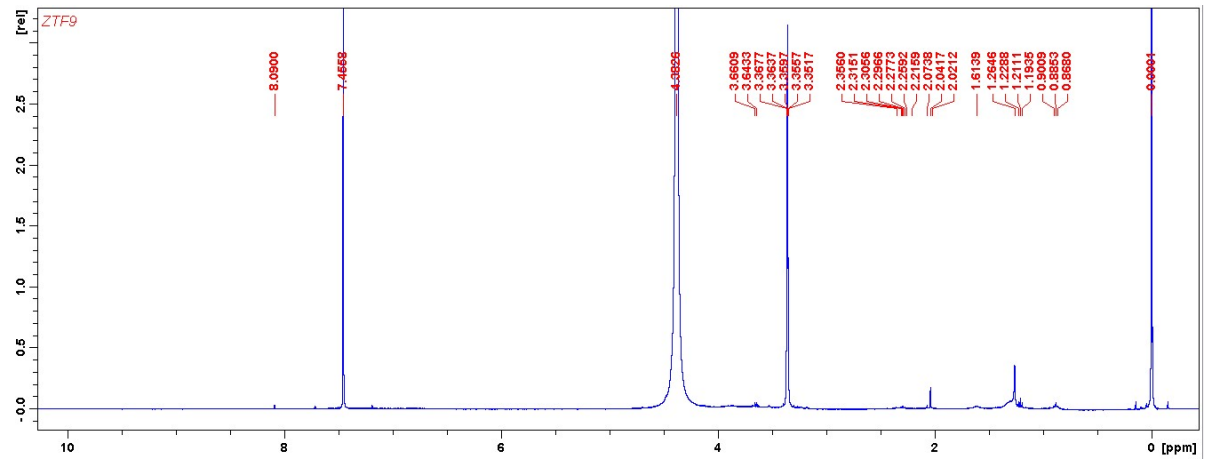
Fonte: Autora, 2014

Figura 36 - Espectro de RMN ^1H da fração ZTF8 em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 5:2



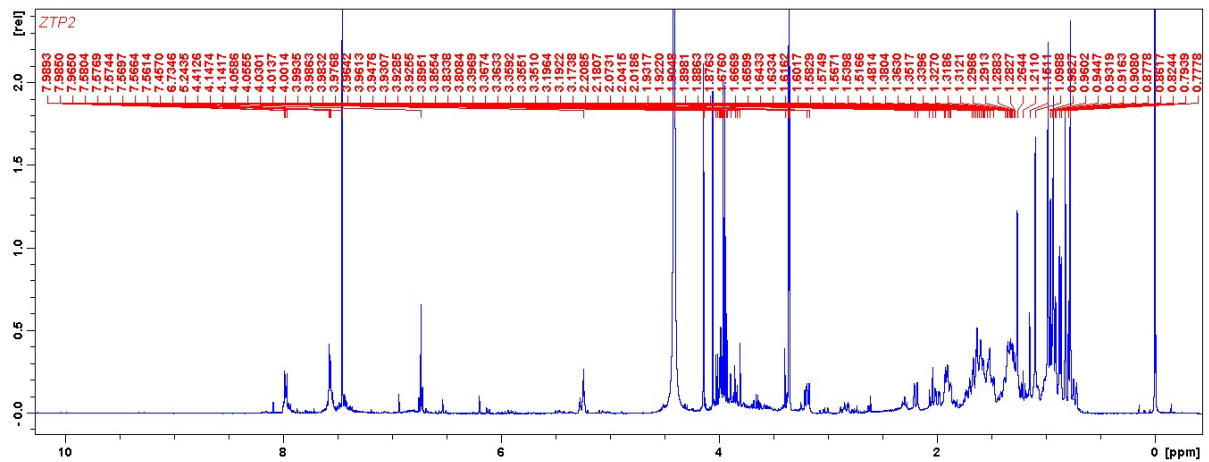
Fonte: Autora, 2014

Figura 37 - Espectro de RMN ^1H da fração ZTF9 em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 5:2



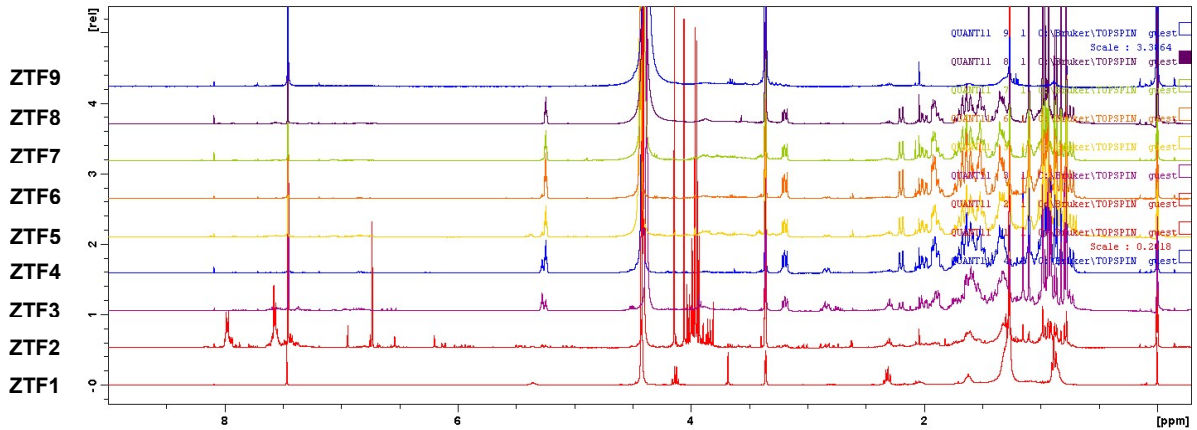
Fonte: Autora, 2014

Figura 38 - Espectro de RMN ^1H da fração ZTP2 em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 5:2



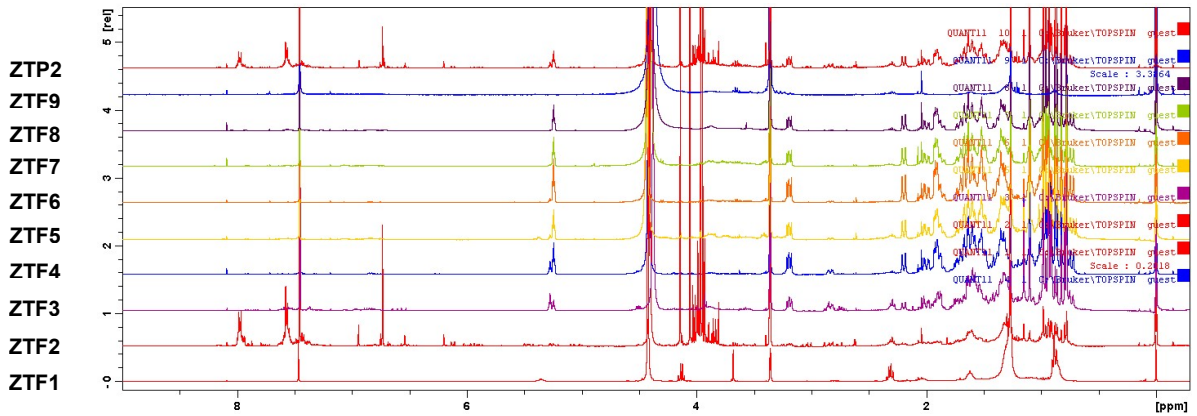
Fonte: Autora, 2014

Figura 39 - Espectro de RMN ^1H das frações ZTF1-ZTF9 em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 5:2



Fonte: Autora, 2014

Figura 40 - Espectro de RMN ^1H das frações ZTF1-ZTF9 e do extrato ZTP2 em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 5:2



Fonte: Autora, 2014

4.4 Quantificações Relativas dos Metabólitos Majoritários Principais Presentes nos Extratos Etanólico (ZTB), Clorofórmico (ZTP2) e Frações (ZTF1-ZTF9) das Folhas de *Z. tuberculosa*

Para o conhecimento do perfil químico da fração ZTP2 e das subfrações ZTF1-ZTF9, foram executados, inicialmente, experimentos de RMN ^1H e a partir destes dados foram escolhidos para quantificação a fração ZTP2 e as subfrações ZTF3-ZTF8, que continham os ácidos ursólico e/ou oleanólico. Uma vez que a fração ZTP2 concentrou a quase totalidade de metabólitos do extrato ZTB, conforme visto na comparação dos perfis, e apresentando o extrato etanólico sinais característicos dos referidos triterpenos, este extrato foi também escolhido para quantificação.

4.4.1 Quantificação Relativa Utilizando Cálculos Matemáticos

A quantificação dos ácidos ursólico (AU) e oleanólico (AO) presentes no extrato ZTB, na fração ZTP2, e nas subfrações ZTF3-ZTF8, foi feita mediante as integrações de sinais característicos desses triterpenos (AU = singlete em δ 0,82 e AO = singlete em δ 1,15] e do sinal na forma de um quinteto em δ 3,36 ppm do padrão interno (metanol deuterado), que foi adicionado sempre em volume constante (200 μL), mais 500 μL de clorofórmio deuterado, totalizando 700 μL de solvente deuterado para todas as amostras. As concentrações dos triterpenos são proporcionais à razão entre as áreas dos sinais analisados em relação ao sinal do metanol deuterado (HOLZGRABE et al., 2005; MALZ E JANCKE, 2005). As quantificações dos triterpenos foram feitas em triplicata.

Considerando $I_{\text{CD}_3\text{OD}}$ = valor da integração do quinteto do metanol deuterado, I_{AU} = valor da integração do sinal do ácido ursólico e I_{AO} = valor da integração do sinal do ácido oleanólico (Tabelas 6 e 7), tem-se:

Metanol deuterado = CD_3OD

$$d = m/v$$

$$0,89 = m/0,2 \text{ mL}$$

$$m = 0,178\text{g}$$

$$MM = 12,011 + (4 \times 2,0158) + 15,999 = 36,0732$$

$$n = m/MM$$

$$n = 0,178/36,0732$$

$$n_M = 0,004934411 \text{ mol}$$

$$V_{\text{sol.}} = 700\mu\text{L} = 0,7 \text{ mL} = 0,0007\text{L}$$

$$C_M = n/V_{\text{sol.}}$$

$$C_M = 0,004934411/0,0007$$

$$C_M = 7,04915857 \text{ mol.L}^{-1}$$

Quantificação dos Ácidos Ursólico (AU) e Oleanólico (AO):

$$I_{\text{CD}_3\text{OD}} = 1$$

A_x = área do sinal integrado do composto (X)

$I_{\text{AU}} = A_{\text{AU}}$ (área do sinal do ácido ursólico integrado)

$I_{\text{AO}} = A_{\text{AO}}$ (área do sinal do ácido oleanólico integrado)

n_x = número de mols do composto (X)

$n_M = 0,004934411 \text{ mol}$ (número de mols do metanol deuterado)

$V_{\text{sol.}} = 700\mu\text{L} = 0,7 \text{ mL} = 0,0007\text{L}$ (volume da solução contido em cada tubo de RMN)

Determinação do número de mols (n_x) dos Ácidos Ursólico e Oleanólico (MALZ E JANCKE, 2005; SANTOS E COLNAGO, 2013):

$$\frac{n_x}{n_y} = \frac{A_x \cdot N_x}{A_y \cdot N_y}$$

$$\frac{n_{AU}}{n_M} = \frac{A_{AU} \cdot N_{AU}}{A_M \cdot N_M}$$

$$\frac{n_{AU}}{0,004934411} = \frac{A_{AU} \cdot 1}{1 \cdot 3}$$

$$n_{AU} = \frac{0,004934411 \cdot A_{AU}}{3}$$

$$n_{AU} = 0,001644804 \cdot A_{AU} \quad (\text{fórmula utilizada para o cálculo do número de mols do ácido ursólico contido nas amostras, tabela 8})$$

$$\frac{n_{AO}}{n_M} = \frac{A_{AO} \cdot N_{AO}}{A_M \cdot N_M}$$

$$\frac{n_{AO}}{0,004934411} = \frac{A_{AO} \cdot 1}{1 \cdot 3}$$

$$n_{AO} = 0,001644804 \cdot A_{AO} \quad (\text{fórmula utilizada para o cálculo do número de mols do ácido oleanólico contido nas amostras, tabela 8})$$

Determinação da concentração em mols.L⁻¹ (C_x) dos Ácidos Ursólico e Oleanólico na amostra ZTF3 (as concentrações molares desses triterpenos nas demais amostras foram calculadas da mesma forma que na amostra ZTF3, conforme mostrado abaixo):

$$C_{AU} = \frac{n_{AU}}{V_{sol.}}$$

$$C_{AUZTF3} = \frac{0,0005975573}{0,0007}$$

$$C_{AUZTF3} = 0,85365329 \text{ mol.L}^{-1} \text{ (fórmula utilizada para o cálculo da concentração molar do ácido ursólico, tabela 9)}$$

$$C_{AO} = \frac{n_{AO}}{V_{sol.}}$$

$$C_{AOZTF3} = \frac{0,0009763557}{0,0007}$$

$$C_{AOZTF3} = 1,39479386 \text{ mol.L}^{-1} \text{ (fórmula utilizada para o cálculo da concentração molar do ácido oleanólico, tabela 9)}$$

Tabela 06 - Integrações de Sinais dos Ácidos Ursólico e Oleanólico

Código das Amostras Quantificadas		Medidas das Integrações dos Sinais		
		*AU _{50,82}	*AO _{51,15}	CD3OD _{53,36}
Quantificação 1	ZTF3	0,3860	0,5550	1
	ZTF4	1,0329	0,4634	1
	ZTF5	0,9330	0,2240	1
	ZTF6	1,2630	0,1502	1
	ZTF7	0,8880	0,1030	1
	ZTF8	0,6795	0,0543	1
	ZTP2	0,4930	0,2320	1
	ZTB	0,2990	0,1820	1
Quantificação 2	ZTF3	0,3320	0,5820	1
	ZTF4	0,9807	0,4829	1
	ZTF5	0,8760	0,1920	1
	ZTF6	1,1677	0,1797	1
	ZTF7	0,8610	0,0970	1
	ZTF8	0,7409	0,0502	1
	ZTP2	0,4870	0,2360	1
	ZTB	0,3360	0,2020	1
Quantificação 3	ZTF3	0,3710	0,6430	1
	ZTF4	0,9482	0,5032	1
	ZTF5	0,8690	0,2080	1
	ZTF6	1,4756	0,1548	1
	ZTF7	0,6570	0,0860	1
	ZTF8	0,7753	0,0587	1
	ZTP2	0,5400	0,2630	1
	ZTB	0,3070	0,1860	1

AU* = Ácido Ursólico; AO* = Ácido Oleanólico

Fonte: Autora, 2014

Tabela 07 - Média das Integrações de Sinais dos Ácidos Ursólico e Oleanólico

Código - Nome das Amostras Quantificadas	Média das Medidas das Integrações dos Sinais		
	*AU _{δ0,82}	*AO _{δ1,15}	CD3OD _{δ3,36}
ZTF3 - Subfração Clorofórmio	0,3633	0,5936	1
ZTF4 - Subfração Clorofórmio / Metanol 2%	0,9873	0,4832	1
ZTF5 - Subfração Clorofórmio /Metanol 5%	0,8933	0,2081	1
ZTF6 - Subfração Clorofórmio/Metanol 10%	1,3021	0,1616	1
ZTF7 - Subfração Clorofórmio/Metanol 20%	0,8022	0,0960	1
ZTF8 - Subfração Clorofórmio/Metanol 1:1	0,7319	0,0544	1
ZTP2 - Fração em Clorofórmio	0,5070	0,2442	1
ZTB - Extrato Etanólico (Bruto)	0,3145	0,1905	1

AU* = Ácido Ursólico; AO* = Ácido Oleanólico

Fonte: Autora, 2014

Tabela 08 - Quantificação Relativa dos Ácidos Ursólico e Oleanólico

Código das Amostras Quantificadas	Número de Mols (n) dos Ácidos Ursólico e Oleanólico		
	nAU _{δ0,82}	nAO _{δ1,15}	nCD3OD _{δ3,36}
ZTF3	0,0005975573	0,00097635507	0,0049344101
ZTF4	0,001623915	0,0007947693	0,004934411
ZTF5	0,001469303	0,0003422837	0,004934411
ZTF6	0,002141699	0,0002658003	0,004934411
ZTF7	0,001319462	0,0001579012	0,004934411
ZTF8	0,001203832	0,0000894773	0,004934411
ZTP2	0,000833916	0,0004016611	0,004934411
ZTB	0,000517291	0,0003133352	0,004934411

Fonte: Autora, 2014

Tabela 09 - Quantificação Relativa dos Ácidos Ursólico e Oleanólico

Código das Amostras Quantificadas	Concentração em mol.L ⁻¹ dos Ácidos Ursólico e Oleanólico		
	AU _{δ0,82}	AO _{δ1,15}	CD3OD _{δ3,36}
ZTF3	0,85365329	1,39479386	7,049158507
ZTF4	2,3198786	1,1353847	7,04915857
ZTF5	2,0990043	0,4889767	7,04915857
ZTF6	3,0595710	0,3797147	7,04915857
ZTF7	1,8849457	0,2255731	7,04915857
ZTF8	1,7197610	0,1278248	7,04915857
ZTP2	1,1913080	0,5738016	7,04915857
ZTB	0,7389870	0,4476217	7,04915857

Fonte: Autora, 2014

Os cálculos do número de mols e da concentração molar mostram que as frações mais ricas em ácido ursólico são ZTF6 ($n = 0,002141699$) e ZTF4 ($n = 0,001623915$). Logo se tem que a concentração relativa do ácido ursólico é maior nas amostras ZTF6 e ZTF4, seguidas em ordem decrescente das amostras ZTF5, ZTF7, ZTF8, ZTP2, ZTF3 e ZTB. Quanto ao ácido oleanólico, as frações mais ricas deste ácido são ZTF3 ($n = 0,000976355$) e ZTF4 ($n = 0,0007947693$). Assim, a concentração relativa do ácido oleanólico é maior nas amostras ZTF3 e ZTF4, seguidas em ordem decrescente das amostras ZTP2, ZTF5, ZTB, ZTF6, ZTF7, e ZTF8.

Dividindo-se o número de mols dos ácidos ursólico e oleanólico presentes em cada fração pelo número de mols destes ácidos em ZTB, tem-se a razão molar de cada amostra relativa à ZTB. Logo, têm-se que a quantidade de ácido ursólico em ZTF6 é 4,14 vezes maior que em ZTB, e em ZTF4 é 3,13 vezes maior que em ZTB. A quantidade de ácido oleanólico em ZTF3 é 3,12 vezes maior que em ZTB, e em ZTF4 é 2,54 vezes maior que em ZTB. As razões molares ou quantidades relativas das outras frações em relação à ZTB estão na tabela 10.

A determinação da quantificação relativa é a maneira mais simples para se obter uma informação quantitativa, com base em espectros de RMN, na qual a razão molar de dois compostos pode ser calculada. Contudo, a quantificação relativa não

apresenta a concentração absoluta dos compostos na amostra, para este fim teria que ser feita uma quantificação absoluta (SANTOS E COLNAGO, 2013).

Tabela 10 - Quantidades relativas dos Ácidos Ursólico e Oleanólico em relação à ZTB

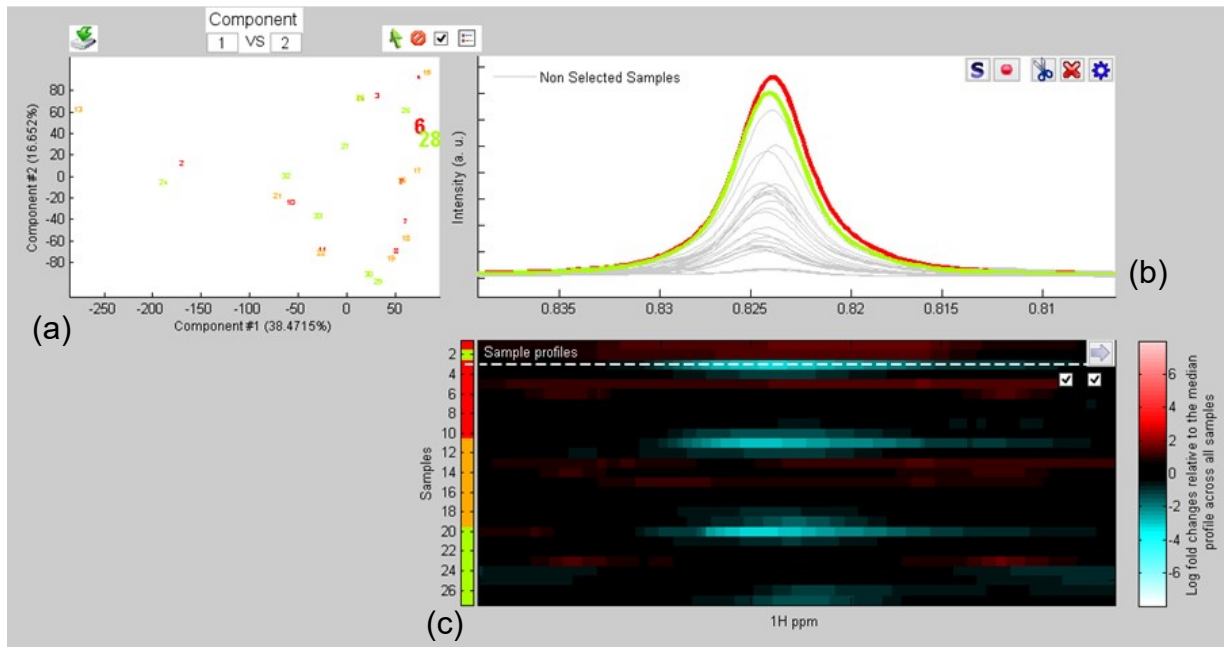
Código das Amostras Quantificadas	Quantidade Relativa (Razão Molar: ZTFX / ZTB)	
	AU _{δ0,82}	AO _{δ1,15}
ZTF3	1,155	3,116
ZTF4	3,139	2,536
ZTF5	2,840	1,092
ZTF6	4,140	0,848
ZTF7	2,551	0,504
ZTF8	2,327	0,285
ZTP2	1,612	1,282

Fonte: Autora, 2014

4.4.2 Quantificação Relativa Utilizando Análise Multivariada

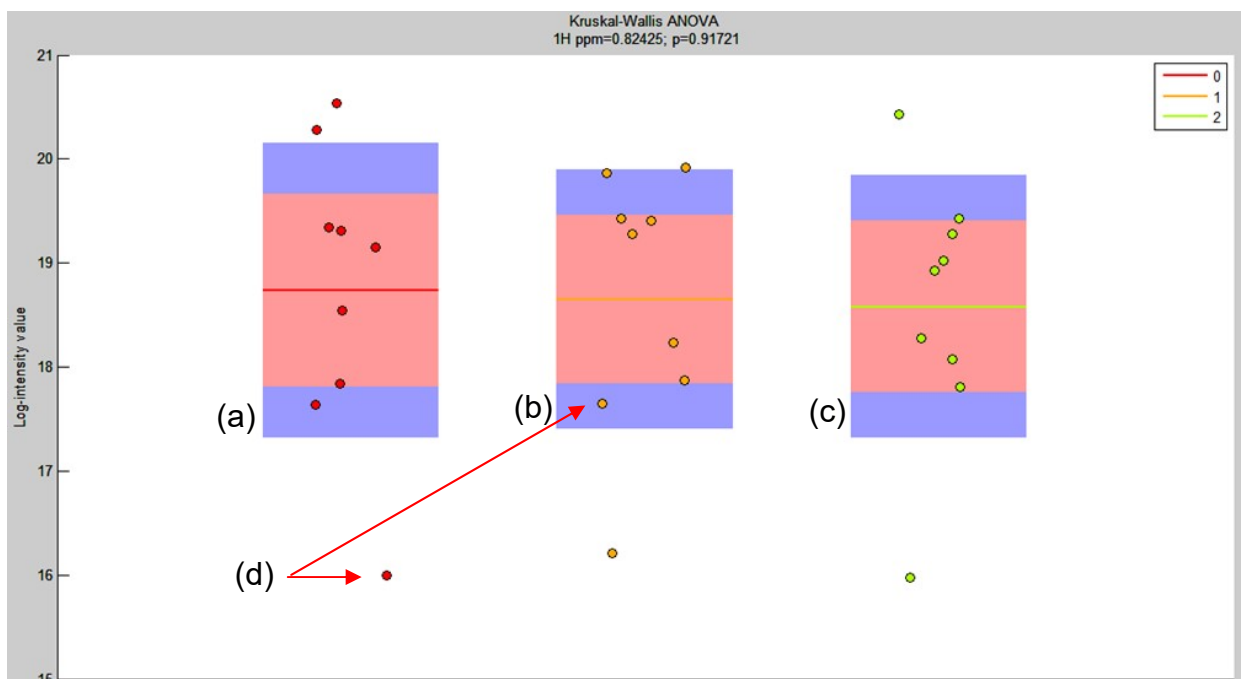
A quantificação realizada utilizando o programa de análise multivariada Matlab (MATRIX LABORATORY) (Figuras 41-44) diferente da quantificação por cálculo matemático, na qual a razão molar entre dois compostos pode ser calculada, é apresentada na forma logarítmica, indicando a intensidade do sinal de RMN em função da concentração, é apresentada nas Figuras 41 e 43. Assim, as medidas mostradas na tabela 12, obtidas a partir dos gráficos, são medidas logarítmicas da intensidade dos sinais dos ácidos ursólico (δ 0,82) e oleanólico (δ 1,15) (Figuras 41 e 43, respectivamente), que permitem conhecer a proporção de uma amostra relativa à outra (HOLZGRABE et al., 2005; MALZ E JANCKE, 2005). Contudo, essas medidas não revelam a concentração absoluta dos compostos na amostra (quantificação absoluta) (MALZ E JANCKE, 2005; SANTOS E COLNAGO, 2013).

Figura 41 - Representação da Quantificação Relativa obtida com o emprego do programa Matlab: (a) gráfico PCA gerado na quantificação, (b) sinais do ácido ursólico (δ 0,82) quantificados nas amostras, (c) perfil médio relativo de todas as amostras.



Fonte: Autora, 2015

Figura 42 - Representação da Quantificação Relativa do ácido ursólico obtida com o emprego do programa Matlab: (a) quantificação 1, (b) quantificação 2, (c) quantificação 3, (d) As bolas coloridas representam as amostras quantificadas.

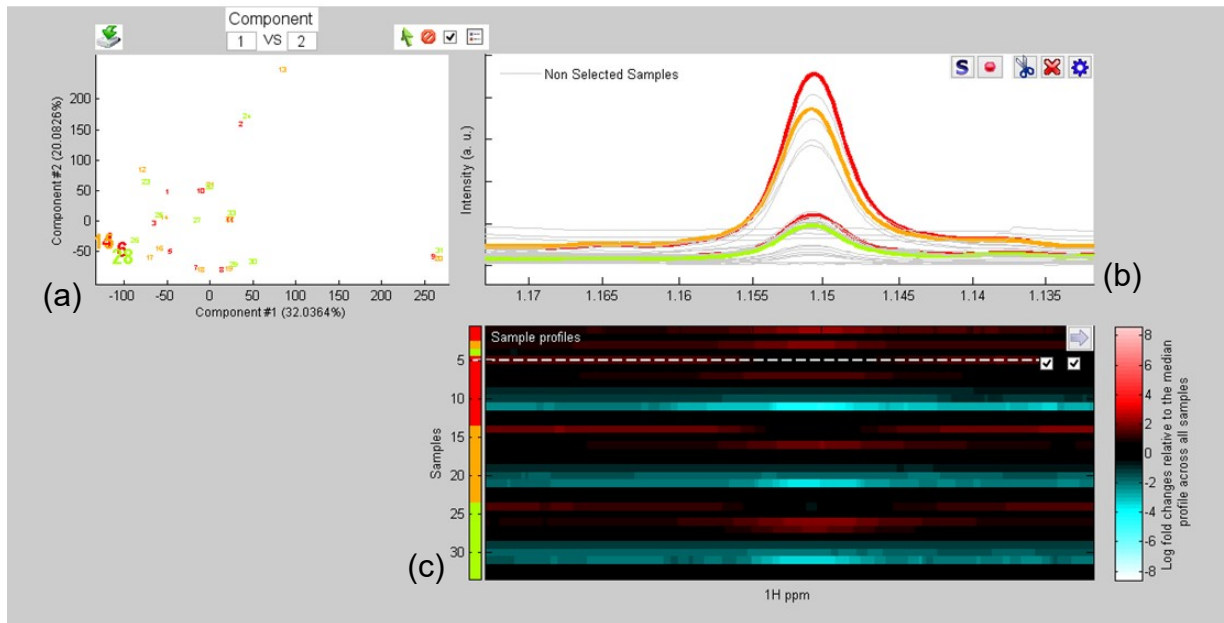


Fonte: Autora, 2015

O gráfico (Figura 42) apresenta o teste de Kruskal-Wallis ANOVA com $p = 0,91721$. Este teste não paramétrico é utilizado na comparação de três ou mais amostras independentes. Ele indica se há diferença entre pelo menos duas delas. Quando o teste de Kruskal-Wallis conduz a resultados significativos, então pelo menos uma das amostras é diferente das restantes. O teste não identifica onde ocorrem e quantas são as diferenças (LOPES, 2014).

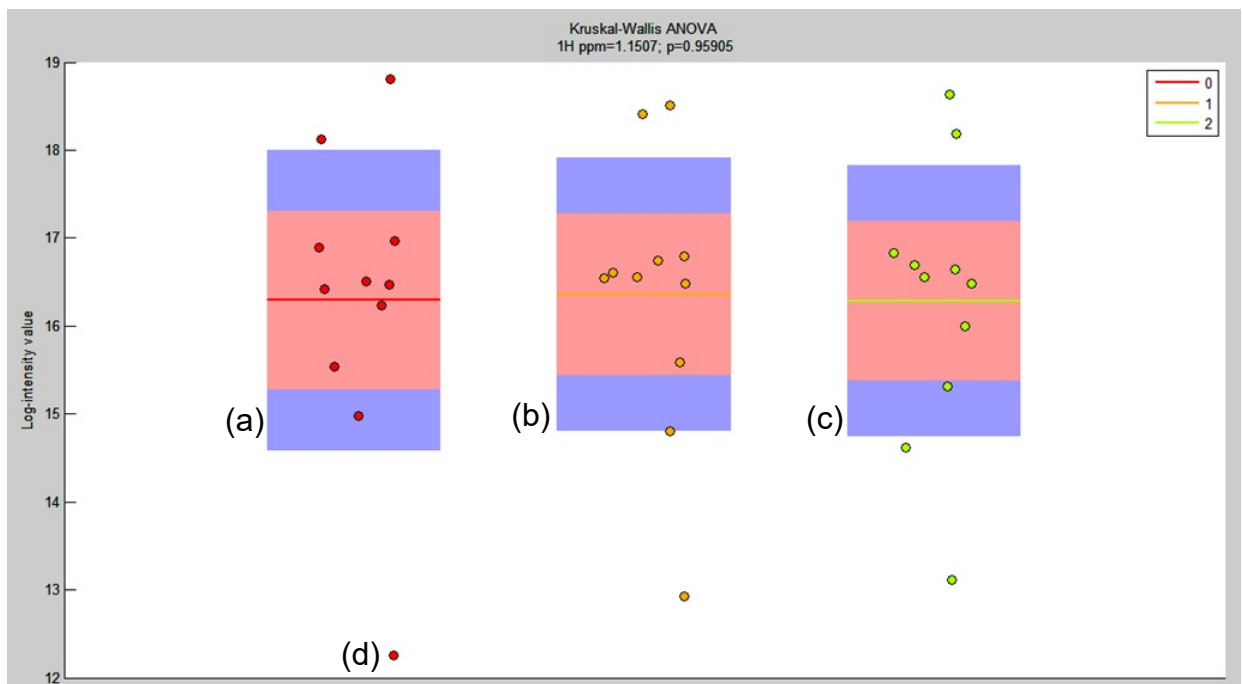
Os resultados da quantificação mostram que ZTF6 (maior concentração) e ZTF4 foram as amostras que apresentaram as maiores concentrações de ácido ursólico, seguidas das amostras em ordem decrescente: **ZTF7, ZTF8, ZTF5**, ZTP2, ZTF3 e ZTB (Tabelas 11 e 12). Comparando os resultados encontrados nesta quantificação (Tabela 12) com os obtidos na quantificação manual ($ZTF6 > ZTF4 > ZTF5 > ZTF7 > ZTF8 > ZTP2 > ZTF3 > ZTB$), tabelas 8-10, para o ácido ursólico, observa-se que a amostra ZTF5 apresentou uma concentração maior de ácido ursólico do que as amostras ZTF7 e ZTF8, na quantificação por Matlab, e menor que ZTF7 e ZTF8 na quantificação manual (cálculos matemáticos). Assim, todas as frações foram analisadas por *PCA* visando uma melhor compreensão da semelhança entre as amostras e do resultado atípico mostrado pela fração ZTF5.

Figura 43 - Representação da Quantificação Relativa obtida com o emprego do programa Matlab: (a) gráfico PCA gerado na quantificação, (b) sinais do ácido oleanólico (δ 1,15) quantificados nas amostras (c) perfil médio relativo de todas as amostras.



Fonte: Autora, 2015

Figura 44 - Representação da Quantificação relativa do ácido oleanólico obtida com o emprego do programa Matlab: (a) quantificação 1, (b) quantificação 2, (c) quantificação 3, (d) amostra.



Fonte: Autora, 2015

O gráfico (Figura 44) apresenta o teste de Kruskal-Wallis ANOVA com $p = 0,95905$ e mostra os resultados da quantificação do ácido oleanólico, cujo sinal quantificado pode ser observado na figura 43. As amostras ZTF3 (maior concentração) e ZTF4 foram as que apresentaram as maiores concentrações de ácido oleanólico, seguidas das amostras em ordem decrescente: ZTP2, **ZTF6**, **ZTF5**, ZTF7, ZTF8 e ZTB (Tabela 12). Comparando os resultados encontrados nesta quantificação (Tabela 12) com os obtidos na quantificação manual (Tabelas 8) ($ZTF3 > ZTF4 > ZTP2 > \mathbf{ZTF5} > \mathbf{ZTF6} > ZTF7 > ZTF8 > ZTB$), observa-se que a amostra ZTF6 apresentou uma concentração maior de ácido oleanólico do que a amostra ZTF5, na quantificação por Matlab, e menor que ZTF5 na quantificação manual. Portanto, todas as frações foram analisadas por *PCA* visando uma melhor compreensão da semelhança entre as amostras e dos resultados atípicos mostrados pelas frações ZTF5 e ZTF6.

Tabela 11 - Integrações de Sinais dos Ácidos Ursólico e Oleanólico

Código das Amostras Quantificadas	Média dos valores de log na base 2 da intensidade do s sinal de RMN para cada amostra (<i>Log Intensity value</i>)		
	*AU _{50,82}	*AO _{δ1,15}	
Quantificação 1	ZTF3	17,85	18,90
	ZTF4	20,25	18,15
	ZTF5	19,15	16,55
	ZTF6	20,50	16,90
	ZTF7	19,35	16,50
	ZTF8	19,30	16,40
	ZTP2	18,55	17,00
	ZTB	17,60	16,25
Quantificação 2	ZTF3	17,90	18,50
	ZTF4	19,85	18,40
	ZTF5	19,40	16,70
	ZTF6	19,95	16,80
	ZTF7	19,35	16,65
	ZTF8	19,25	16,60
	ZTP2	18,25	16,85
	ZTB	17,65	16,50
Quantificação 3	ZTF3	18,10	18,70
	ZTF4	19,40	18,20
	ZTF5	19,25	16,65
	ZTF6	20,45	16,70
	ZTF7	19,00	16,60
	ZTF8	18,95	16,50
	ZTP2	18,30	16,90
	ZTB	17,85	16,10

Fonte: Autora, 2014

Tabela 12 - Quantidades Relativas dos Ácidos Ursólico e Oleanólico

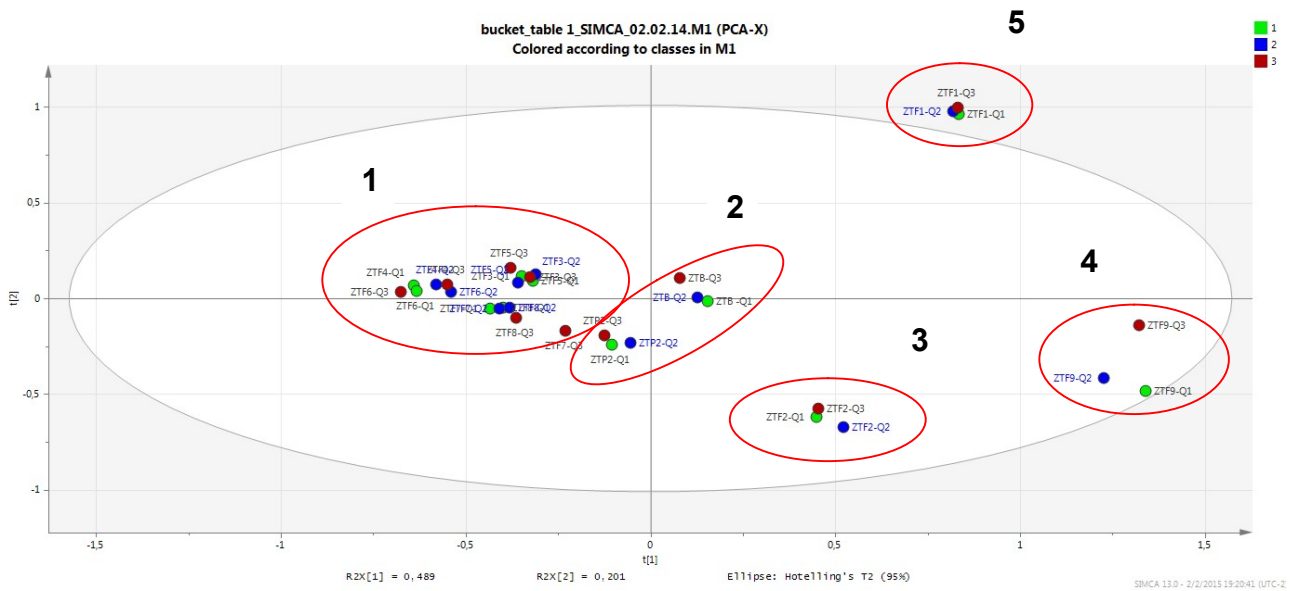
Código - Nome das Amostras Quantificadas	Média dos valores de log na base 2 da intensidade do sinal de RMN para cada amostra (<i>Log Intensity Value</i>)	
	AU _{δ0,82}	AO _{δ1,15}
ZTF3 - Subfração Clorofórmio	17,95	18,70
ZTF4 - Subfração Clorofórmio / Metanol 2%	19,83	18,25
ZTF5 - Subfração Clorofórmio /Metanol 5%	19,27	16,63
ZTF6 - Subfração Clorofórmio/Metanol 10%	20,30	16,80
ZTF7 - Subfração Clorofórmio/Metanol 20%	19,23	16,58
ZTF8 - Subfração Clorofórmio/Metanol 1:1	19,17	16,50
ZTP2 - Fração em Clorofórmio	18,37	16,92
ZTB - Extrato Etanólico (Bruto)	17,70	16,28

Fonte: Autora, 2014

Neste trabalho todas as amostras da quantificação foram avaliadas pelo método *PCA* quanto à similaridade. A análise de Componentes Principais (*PCA*) também é um método estatístico multivariado (utilizado para compressão de dados sem perda de informações relevantes), onde são examinadas as relações entre as amostras e entre as variáveis, através de gráficos de *scores* e *loadings*, os quais permitem avaliar a influência de cada variável em cada amostra, encontrando similaridades ou diferenças nos dados (FERREIRA, 2002).

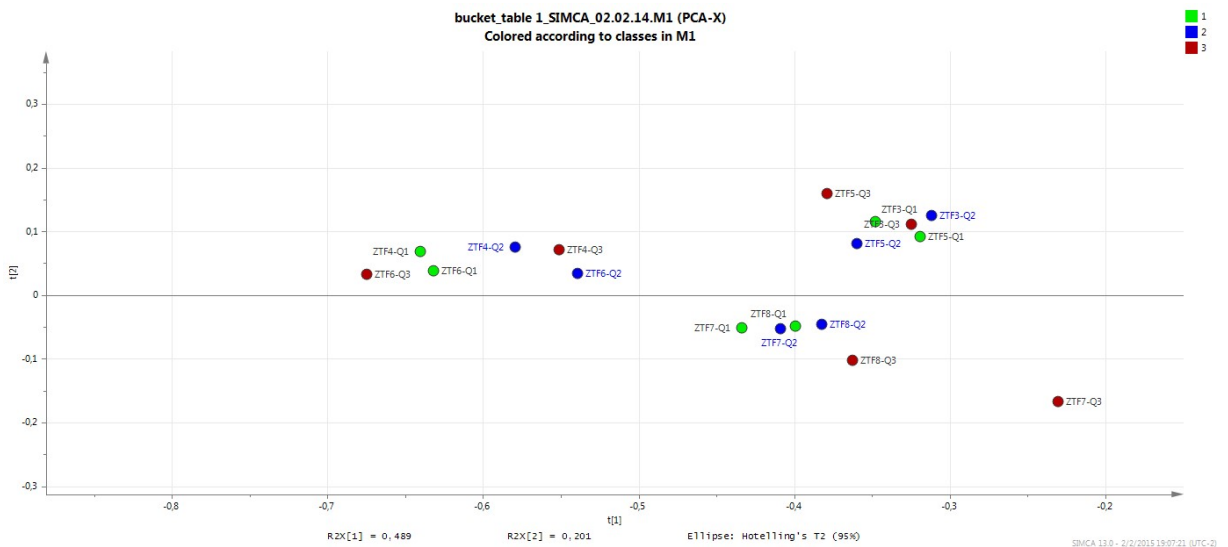
Os gráficos de Componentes Principais (*PC's*) (figuras 45-54) apresentados neste estudo foram produzidos nos programas AMIX (BRUKER) e SIMCA (UMETRICS). Nestes gráficos as amostras das três quantificações são apresentadas com os seus devidos códigos (ZTF3, ZTF4, ZTF5, ZTF6, ZTF7, ZTF8, ZTP2 e ZTB) seguidos de Q1 (no caso de amostras que vieram da quantificação 1), Q2 (amostras que vieram da quantificação 2) e Q3 (amostras que vieram da quantificação 3). As amostras ZTF1 (Subfração Hexano), ZTF2 (Subfração Hexano / Clorofórmio 1:1) e ZTF9 (Subfração Metanol) também foram analisadas pelo método *PCA*.

Figura 45 - PCA das amostras das três quantificações (análise em triplicata), produzido no programa de análise multivariada SIMCA. Grupo 1: Amostras ZTF3, ZTF4, ZTF5, ZTF6, ZTF7 e ZTF8. Grupo 2: Amostras ZTP2 e ZTB. Grupo 3: Amostras ZTF2. Grupo 4: Amostras ZTF9. Grupo 5: Amostras ZTF1.



Fonte: Autora, 2015

Figura 46 - Expansão do grupo 1 pertencente ao gráfico PCA da figura 45.



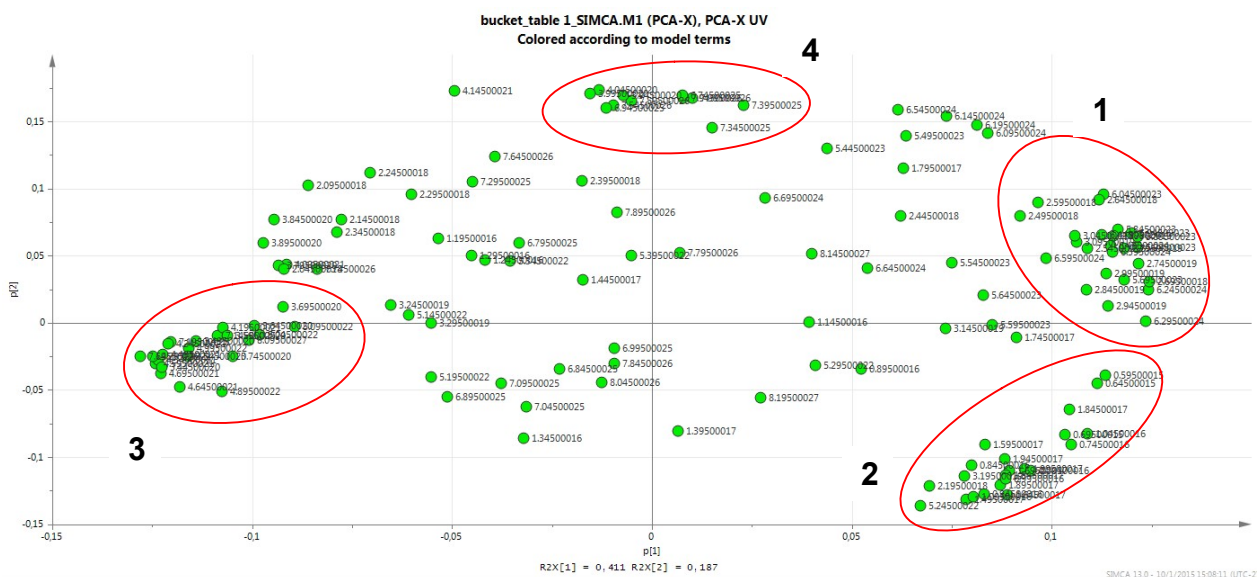
Fonte: Autora, 2015

Quando foi aplicada a *PCA* aos dados espectroscópicos foi observada nos gráficos, representados nas figuras 45 e 46, uma separação entre as amostras quantificadas, formando grupos, conforme a similaridade apresentada. As amostras do grupo 3, 4 e 5 não foram quantificadas, pois não apresentaram nas análises dos perfis químicos os triterpenos alvos (ácidos ursólico e olanólico), porém, como vieram da mesma filtração, foram analisadas junto com as demais, no processo da quantificação.

Observa-se pela distância onde se encontram os grupos 4 e 5 (fora da região esférica) que de fato eles possuem uma composição química bem diferente dos demais grupos, sendo ainda diferentes entre si. Observa-se ainda que o grupo 3 apesar de diferente, está localizado relativamente próximo ao grupo 2, por apresentar em sua composição química resíduos dos triterpenos alvos, como visto em seu perfil químico.

As amostras dos grupos 1 e 2 apresentaram-se pouco dispersas. Considerando *PC1* e *PC2* verifica-se que as amostras estão dispostas próximas uma das outras, e ainda que pareçam ser dois grupos diferentes, os valores expressos nos dois eixos perpendiculares são baixos. Assim, mesmo que essas amostras tenham vindo de filtrações com mistura de solventes de diferentes polaridades, são amostras qualitativamente muito semelhantes.

Figura 47 - Gráfico de Loadings: PC1 e PC2 x Variável (deslocamentos químicos). Grupo 1 (deslocamentos comuns aos ácidos ursólico e oleanólico e ainda deslocamentos exclusivos do ácido oleanólico). Grupo 2 (deslocamentos comuns aos ácidos ursólico e oleanólico e ainda deslocamentos exclusivos do ácido ursólico). Grupo 3 (deslocamentos comuns a ZTF1, ZTF2, ZTF9, ZTP2 e ZTB). Grupo 4 (deslocamentos comuns a ZTF2, ZTP2 e ZTB)



Fonte: Autora, 2015

O gráfico de *Loadings* (Figura 47) representa *PC1* e *PC2* x Variável, que neste caso se trata dos deslocamentos químicos (^1H). Verifica-se nas duas componentes principais consideradas nesta análise de *PCA*, que foram tomadas como importantes às regiões em que todos os espectros de hidrogênio das amostras quantificadas apresentaram maiores quantidades de sinais e maiores intensidades destes. Uma vez que todas as amostras quantificadas são ricas em ácido ursólico e oleanólico, os sinais de maior intensidade são destes triterpenos.

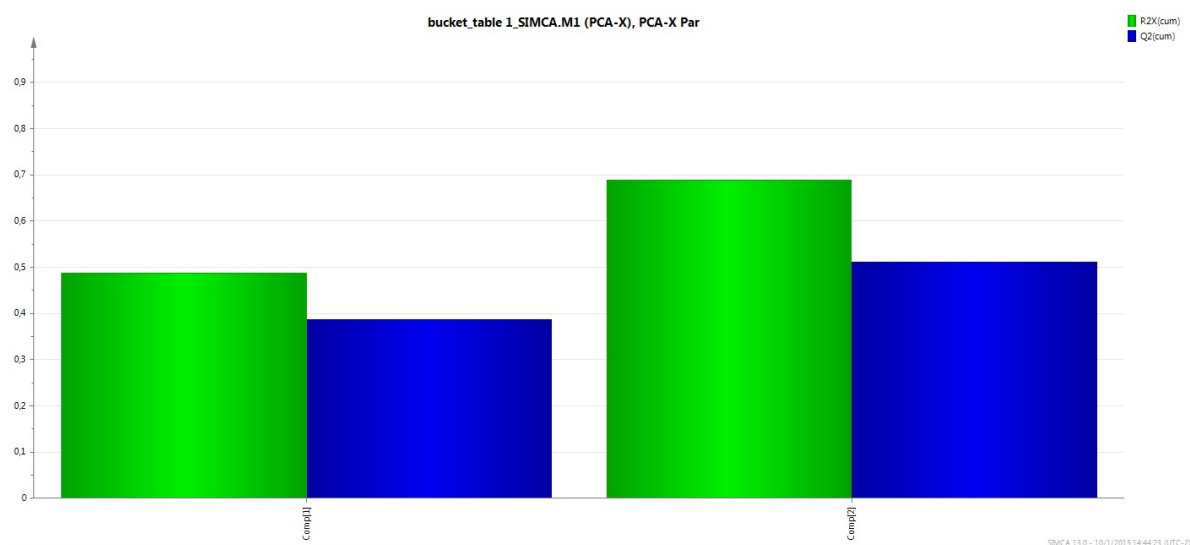
No gráfico grande parte dos deslocamentos mostrados no grupo 1 são do sinal de um duplo duplete em δ 2.845 encontrado apenas no ácido oleanólico, do sinal de um duplo duplete em δ 3.095 referente ao hidrogênio carbinólico, encontrado nos dois triterpenos, do sinal em δ 5.695 também encontrado nos dois ácidos, referente a um tripleto do hidrogênio olefínico. Já no grupo 2, muito próximo ao agrupamento 1, foram considerados os deslocamentos referentes aos sinais das

várias metilas pertencentes aos dois triterpenos, além dos deslocamentos do sinal de um duplete em δ 2.195 encontrado apenas no ácido ursólico e ainda os deslocamentos do sinal de um tripleto em δ 5.245, referente ao hidrogênio olefínico, também encontrado nos dois triterpenos.

Com base na análise acima, foi possível perceber a diferença entre os grupos 1 e 2, tendo como evidência os deslocamentos do sinal de um duplo duplete do ácido oleanólico (grupo 1) e os do sinal de um duplete do ácido ursólico (grupo 2), sinais estes comuns a todas as amostras quantificadas. O grupo 3 está mais distante devido aos deslocamentos na faixa de δ 7.10 – 7.7 ppm e na faixa de δ 3.5 - 5 ppm, característicos de sinais das amostras ZTF1, ZTF2, ZTF9 e encontrados ainda nas amostras ZTP2 e ZTB. Já no grupo 4 observa-se os deslocamentos nas faixas δ 3.9 – 4.10 e na faixa de δ 7.00 - 8,00 ppm característicos das amostras ZTF2, ZTP2 e ZTB.

Assim, o gráfico de *loadings* (Figura 47) complementa o gráfico da figura 45 e explica porque as amostras ZTP2 e ZTB, grupo 2 (Figura 45), encontram-se centralizadas entre os grupos 1, 3, 4 e 5, devido ao fato destas amostras possuírem sinais característicos desses quatro grupos.

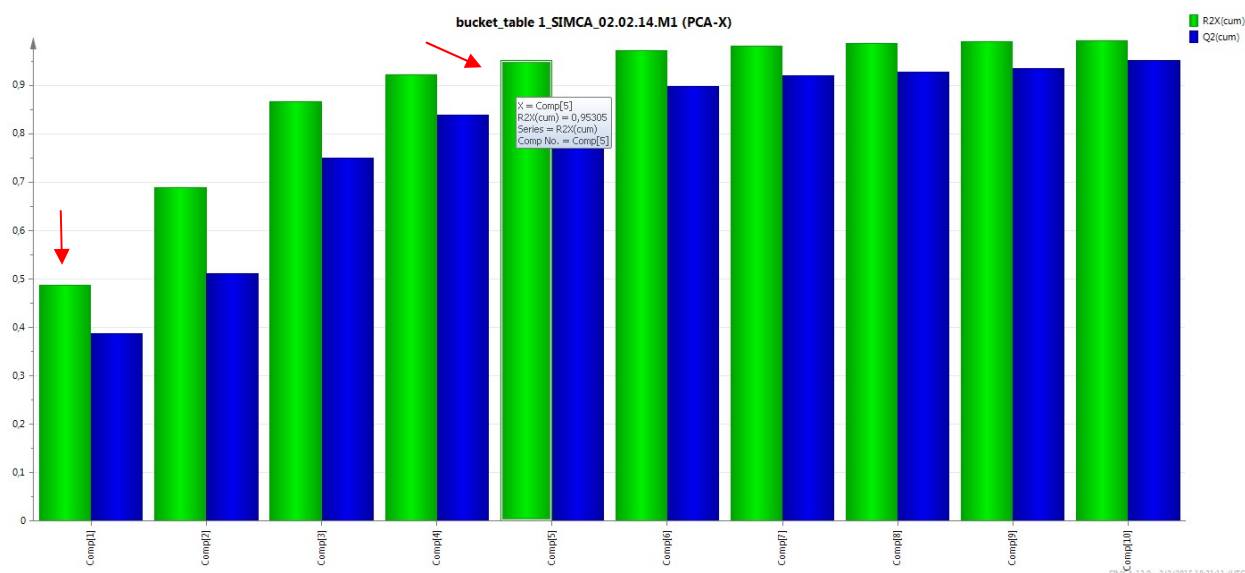
Figura 48 - Valores de contribuição das Componentes Principais PC1 e PC2 na variância (R = 0,6899).



Fonte: Autora, 2014

O gráfico da figura 48 mostra a contribuição das componentes principais *PC1* e *PC2* na variância, as quais explicaram apenas 68,99 % da variabilidade total dos dados, conforme o valor do coeficiente R, representado pelo retângulo verde à direita (somatório), ou seja, o retângulo verde a esquerda mostra a contribuição de *PC1* e o retângulo verde a direita mostra a soma das contribuições de *PC1* e *PC2*. O retângulo verde representa R, parâmetro que explica a variação total dos dados, enquanto que o retângulo azul representa Q, parâmetro de previsão da variação. Quanto mais próximo de 1 for o valor de R mais bem explicada a variabilidade dos dados no método ou modelo, e quanto mais próximo de 1 for o valor de Q mais eficiente o método ou maior o poder preditivo do modelo (ERIKSSON et al., 2006).

Figura 49 - As colunas pareadas formam a curva de variância. O melhor ponto de contribuição é a partir do início da curva (componente 1) até o fim da curva (componente 5), mostrados pelas setas em vermelho. Contribuição das cinco Componentes Principais, *PC1* a *PC5*, na variância (R = 0,95305).

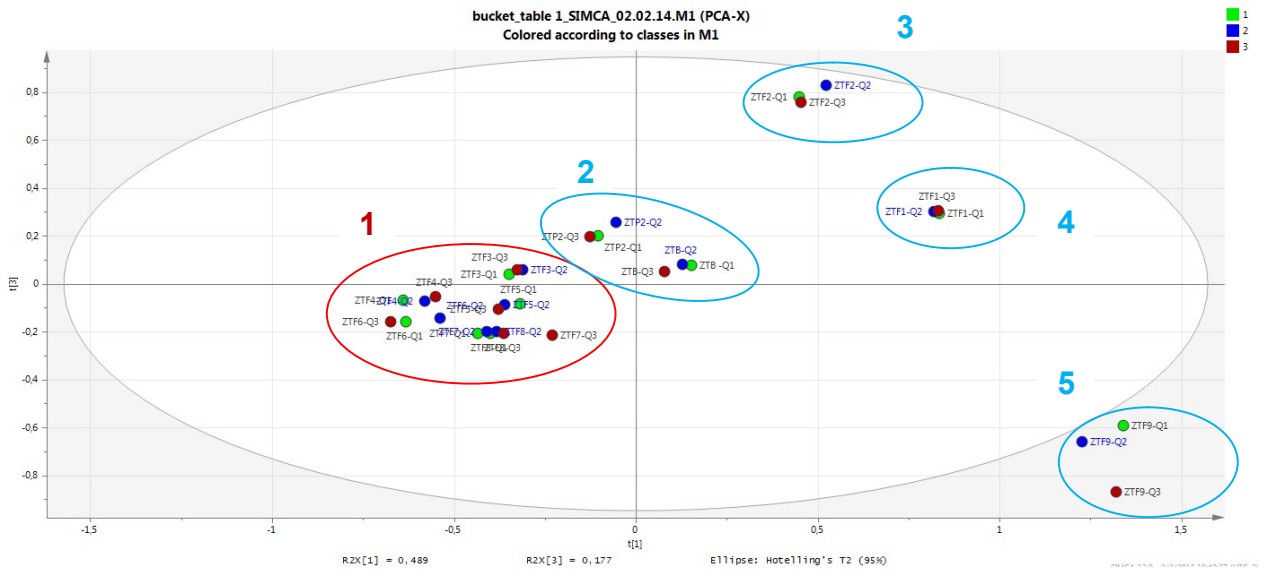


Fonte: Autora, 2014

Devido à semelhança entre as amostras do grupo 1 (Figura 45), não foi possível distinguir entre as amostras desse grupo, usando apenas duas componentes *PC1* e *PC2*. Por isso partiu-se para a análise das componentes *PC3*, *PC4* e *PC5*, figuras 50-54. As cinco componentes *PC1*, *PC2*, *PC3*, *PC4* e *PC5*

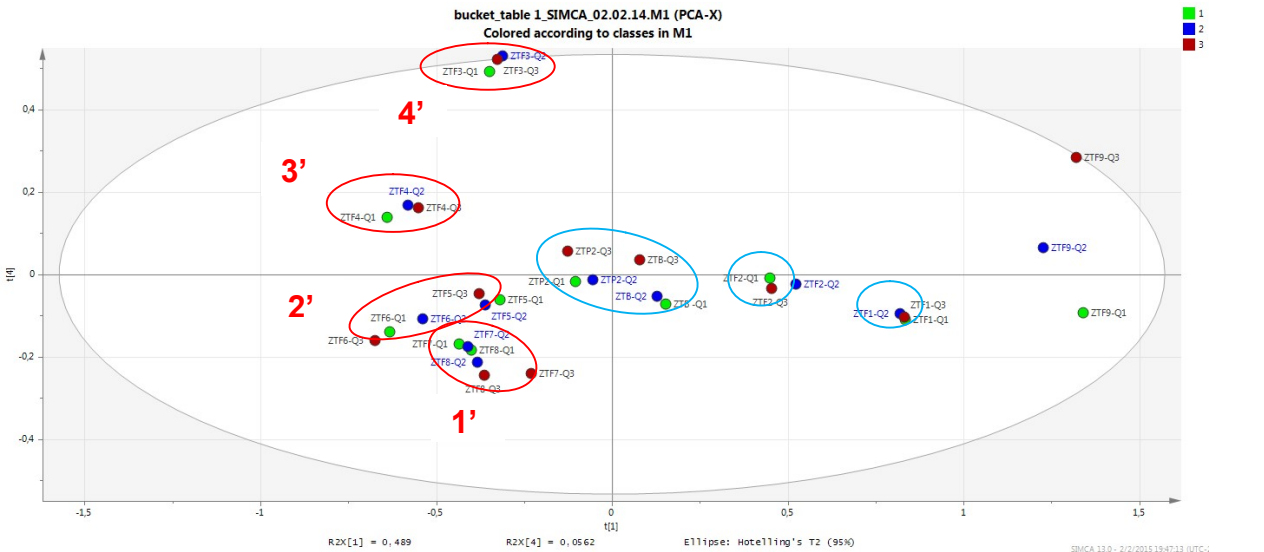
explicaram 95,31 % da variabilidade total dos dados e foram escolhidas com base na curva de variância, mostrada no gráfico da figura 49.

Figura 50 - Gráfico de PC1 e PC3 das amostras quantificadas. As amostras foram agrupadas (1-5) de modo semelhante aos grupos (1-5) do gráfico de PC1 e PC2.



Fonte: Autora, 2015

Figura 51 - PC1 e PC4 das amostras quantificadas.



Fonte: Autora, 2015

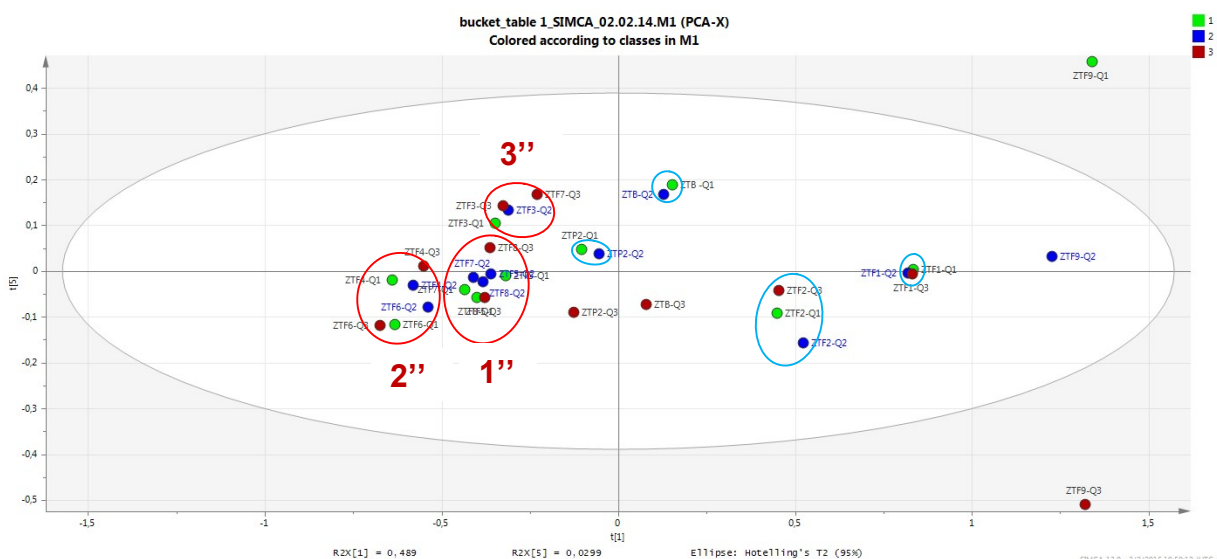
As amostras do grupo 1 (ZTF3, ZTF4, ZTF5, ZTF6, ZTF7 e ZTF8), figura 46, apresentam nos espectros de RMN ^1H o mesmo perfil químico, mas diferenciados na intensidade dos sinais dos metabólitos majoritários escolhidos para a quantificação (triterpenos) e conseqüentemente na concentração destes, conforme visto no processo de quantificação. Na análise por *PC1* e *PC3* (Figura 50) não foi novamente possível a diferenciação entre as amostras do grupo 1 (círculo vermelho), semelhante a *PC1* e *PC2* (Figuras 45). Porém, na análise de *PC1* e *PC4* (Figura 51) percebe-se que houve uma melhor separação das amostras deste grupo, podendo-se inclusive enumerar as amostras do grupo 1 em subgrupos (1'- 4'), em círculos vermelhos (Figura 51). Estes subgrupos apresentam as amostras com maior similaridade possível.

As amostras dos subgrupos 1' (ZTF7 e ZTF8) e 2' (ZTF5 e ZTF6) são mais semelhantes, por isso estão mais próximas entre si do que as amostras dos subgrupos 3' (ZTF4) e 4' (ZTF3). Observa-se que o fator chave de agrupamento entre essas amostras é a concentração de ácido oleanólico (o gráfico de *loadings* mostra os deslocamentos dos sinais do ácido oleanólico, alguns até exclusivos deste triterpeno, como variáveis importantes para a similaridade entre as amostras), ou seja, o fator de similaridade agora é quantitativo, apesar da grande semelhança qualitativa. A amostra ZTF3 (subgrupo 4') possui a maior concentração relativa de ácido oleanólico (Tabelas 08 e 12), por isso esta amostra é a mais separada de todos os subgrupos. A amostra ZTF4 (subgrupo 3') possui a segunda maior concentração relativa de ácido oleanólico, o que explica a sua dispersão dos demais grupos. As amostras ZTF5 e ZTF6 estão muito próximas e foram unidas no subgrupo 2' por apresentarem praticamente a mesma concentração de ácido oleanólico. A semelhança quantitativa entre ZTF5 e ZTF6 explica os resultados atípicos apresentados nas duas quantificações onde a amostra ZTF6 apresentou na quantificação por Matlab uma concentração de ácido oleanólico ligeiramente maior do que a amostra ZTF5, e ainda ligeiramente menor que ZTF5 na quantificação manual (Tabelas 12 e 08, respectivamente).

A similaridade das amostras ZTF7 e ZTF8 (subgrupo 1', figura 51) não foi explicada pela concentração de ácido oleanólico, pois ZTF7 apresenta o dobro da concentração de ZTF8, relativa a este ácido. Partiu-se então para a análise de *PC1*

e *PC5*, como também de *PC2* e *PC3* (Figura 52-54), com o intuito de se terem respostas para a similaridade entre as amostras do subgrupo 1'.

Figura 52 - Gráfico de *PC1* e *PC5* das amostras quantificadas.

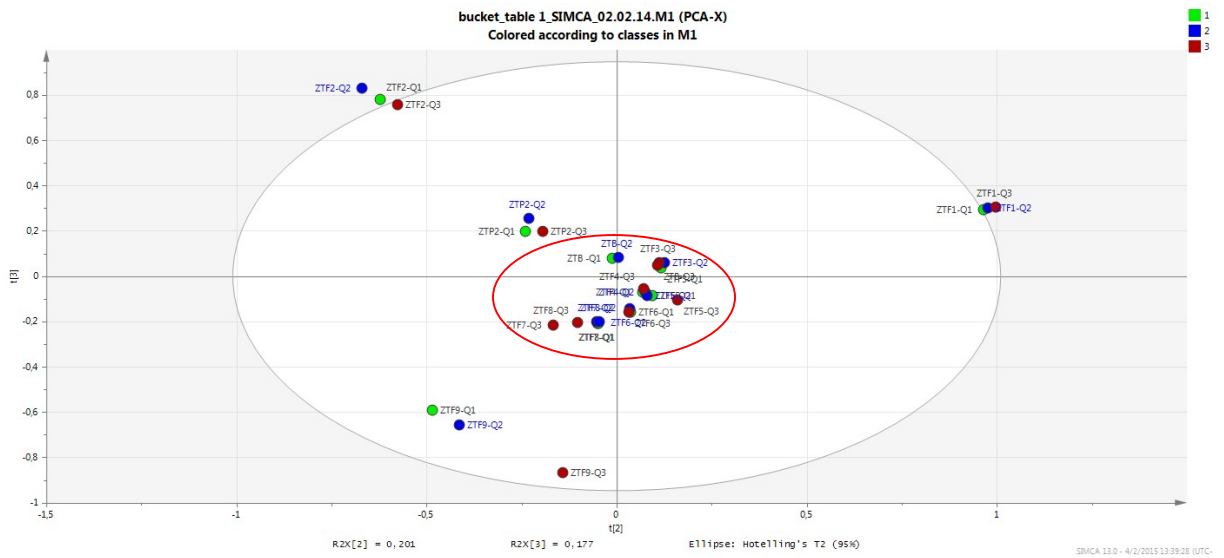


Fonte: Autora, 2015

A similaridade das amostras ZTF7 e ZTF8 (subgrupo 1') é explicada pela concentração do ácido ursólico e não pela do ácido oleanólico. As amostras mais semelhantes no gráfico da figura 52 foram agrupadas em subgrupos 1''- 3''. As amostras do subgrupo 1'' (ZTF5, ZTF7 e ZTF8), apesar da proximidade com as amostras dos subgrupos 2'' (ZTF4 e ZTF6) e do subgrupo 3'' (ZTF3), estão mais agrupadas entre si, ou seja são mais semelhantes, pois possuem número de mols de ácido ursólico semelhantes, tabela 08.

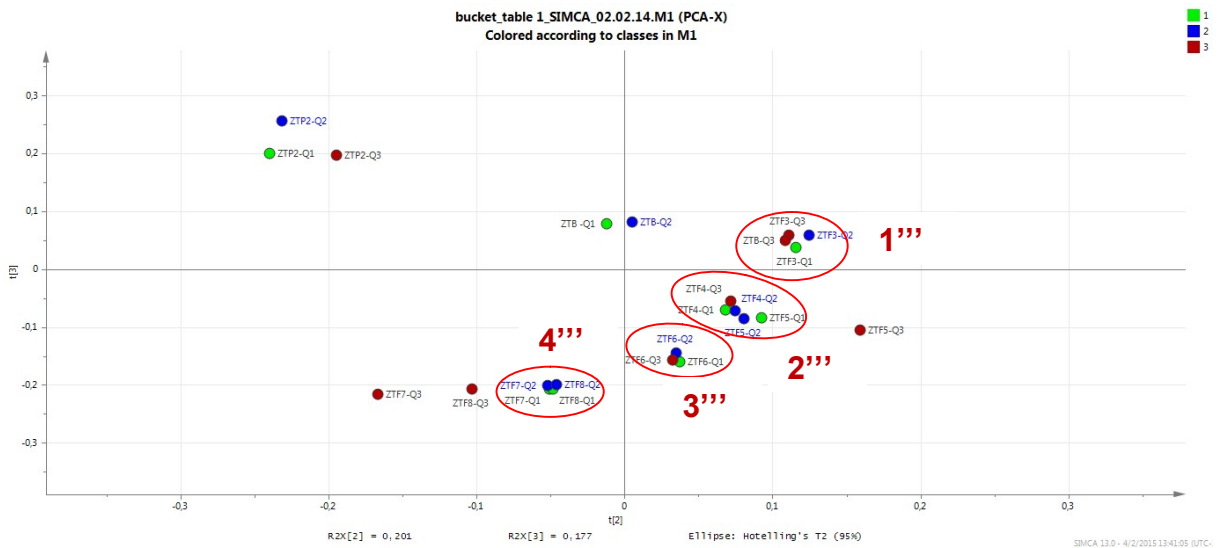
Esta semelhança quantitativa entre ZTF5, ZTF7 e ZTF8, relativa ao ácido ursólico, explica também o resultado atípico mostrado pela fração ZTF5, a qual apresentou uma concentração ligeiramente maior de ácido ursólico do que as amostras ZTF7 e ZTF8, na quantificação por Matlab, e ligeiramente menor que ZTF7 e ZTF8 na quantificação manual. A concentração desse triterpeno também é o fator responsável da similaridade do subgrupo 2'' (Figura 52), pois ZTF6 e ZTF4 foram as amostras que apresentaram as maiores quantidades de ácido ursólico.

Figura 53 - Gráfico de *PC2* e *PC3* das amostras quantificadas.



Fonte: Autora, 2015

Figura 54 - Expansão do gráfico de *PC2* e *PC3* das amostras quantificadas.



Fonte: Autora, 2015

O gráfico *PC2* e *PC3* da figura 53 apresenta as amostras ZTF3-ZTF8 bem agrupadas (círculo vermelho), mas a expansão do referido agrupamento (Figura 54) revela alguns agrupamentos não visualizados em *PC1* e *PC5*, e confirma outros

agrupamentos vistos em *PC1* e *PC5*. As amostras mais semelhantes no gráfico da figura 54 foram agrupadas em subgrupos 1'''- 4'''.

A amostra ZTF3 está bem junto de ZTB (subgrupo 1''') por apresentarem concentrações de ácido ursólico semelhantes, da mesma forma que as amostras ZTF4-ZTF5 (subgrupo 2''') e ZTF7-ZTF8 (subgrupo 4''') também estão agrupadas devido à similaridade quantitativa dessas amostras referente ao ácido ursólico. O subgrupo 3''' (ZTF6) encontra-se isolado dos demais subgrupos (amostras) por possuir uma concentração de ácido ursólico quatro vezes maior que o das amostras do subgrupo 1''' e duas vezes maior que o das amostras do subgrupo 4''' (Tabela 10, p. 89).

O gráfico de *loadings* mostra os deslocamentos de sinais exclusivos do ácido ursólico, e outros deslocamentos não exclusivos, como sendo variáveis importantes para a similaridade entre as amostras.

4.5 Bioensaio

4.5.1 Ensaio de Viabilidade Celular por Redução do MTT

Os resultados do ensaio de viabilidade celular por redução do MTT apresentados na figura 55 e tabelas 14-16 mostram a porcentagem de macrófagos murinos viáveis em relação aos controles 1 (células tratadas com RPMI) quando comparado a células tratadas com diferentes concentrações (10, 50 ou 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) do extrato, fração e subfrações de *Z. tuberculosis* por 24 horas.

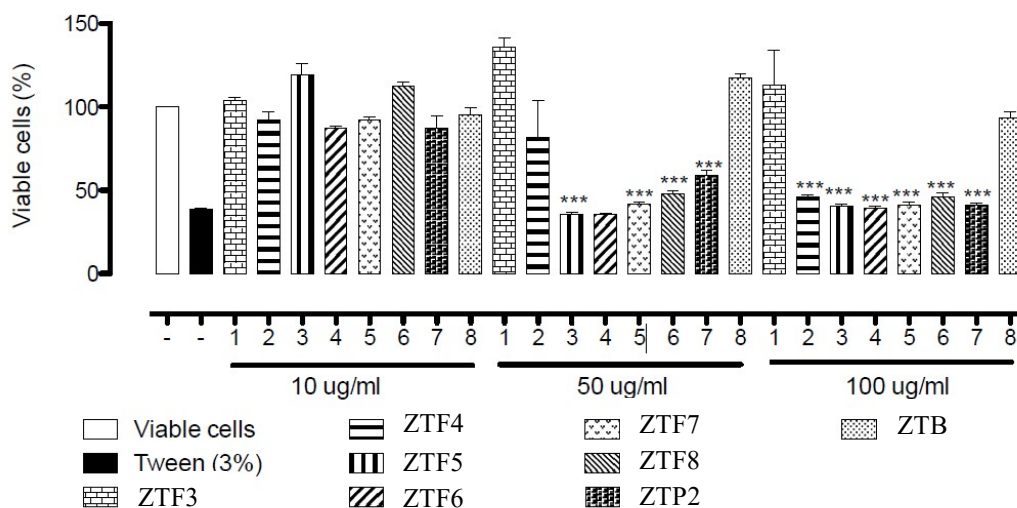
O grupo controle 1 (células não tratadas) foi considerado como tendo 100 % de viabilidade celular. O grupo controle 2 apresentou citotoxicidade uma redução significativa na viabilidade celular, cerca de 62 %, quando comparado ao grupo tratado apenas com RPMI (Figura 55; Tabela 14).

Na concentração de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, os extratos e frações de *Z. tuberculosis* não apresentaram efeito citotóxico na viabilidade de macrófagos murinos: Os grupos de células tratados com as frações ZTF3, ZTF5 e ZTF8 apresentaram 100 % de viabilidade celular; o grupo tratado com o extrato ZTB mostrou 95,41 % de viabilidade; os tratados com as frações ZTF4 e ZTF7 mostraram mais de 90 % de

viabilidade; e os grupos tratados com a fração ZTF6 e o extrato ZTP2 apresentaram mais de 87 % de viabilidade celular (Figura 55; Tabela 14).

Entretanto, nas demais concentrações esses extratos e frações apresentaram efeito citotóxico, havendo uma redução estatisticamente significativa da viabilidade celular, com exceção da fração ZTF3 e do extrato ZTB que permaneceram ambos atóxicos. Os grupos tratados com ZTF3 e ZTB mantiveram os 100% de viabilidade na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e apresentaram 100 % e 93,59 % de viabilidade celular na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. A fração ZTF4 mostrou-se atóxica na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e tóxica na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O grupo tratado com esta fração, apesar de ter apresentado 81,71% de viabilidade na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, teve sua viabilidade celular reduzida para 45,86 % na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As frações ZTF5 e ZTF6 apresentaram os maiores efeitos citotóxicos nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As frações ZTF5, ZTF6, ZTF7, ZTF8 e o extrato ZTP2 se mostraram citotóxicas nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, pois os grupos tratados na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ tiveram suas viabilidades reduzidas para 35,80 %, 35,80 %, 41,91 %, 47,68 % e 58,97 %, respectivamente, e os grupos tratados na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ tiveram suas viabilidades reduzidas para 40,38 %, 39,30 %, 40,78 %, 45,76 % e 41,22 %, respectivamente (Figura 55; Tabela 14). Portanto, os resultados mostraram que as frações ZTF3 e ZTB não são citotóxicas nas concentrações testadas. ZTF4 é citotóxica a partir da concentração 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. E todas as demais frações são citotóxicas a partir da concentração 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Figura 55 - Efeito de *Z. tuberculosis* na viabilidade de macrófagos murinos, utilizando o ensaio MTT. As células foram tratadas com os extratos e frações de *Z. tuberculosis* (10, 50 ou 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e expostas durante 24 horas. Os dados foram expressos como % das células viáveis em comparação com o grupo controle e foram apresentados como média + - SEM.



Fonte: Autora, 2015

Tabela 13 - Média dos valores de absorvância do ensaio de viabilidade celular (MTT) com os extratos e frações de *Z. tuberculosis* nas concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Concentração	Controle 1	Controle 2	ZTF3	ZTF4	ZTF5	ZTF6	ZTF7	ZTF8	ZTP2	ZTB
10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	100,0	38,31	103,7	92,16	119,3	87,23	92,01	112,4	87,13	95,41
50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	100,0	38,31	135,8	81,71	35,80	35,80	41,91	47,68	58,97	117,3
100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	100,0	38,31	113,2	45,86	40,38	39,30	40,78	45,76	41,22	93,59

Fonte: Autora, 2014

Tabela 14 - Desvio padrão dos valores de absorvância do ensaio de viabilidade celular (MTT) com os extratos e frações de *Z. tuberculosis* nas concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Concentração	Controle 1	Controle 2	ZTF3	ZTF4	ZTF5	ZTF6	ZTF7	ZTF8	ZTP2	ZTB
10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0,0	1,188	3,828	9,873	13,63	2,711	4,760	5,457	15,73	8,122
50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0,0	1,188	10,98	45,14	2,518	0,999	1,662	4,677	5,753	5,180
100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0,0	1,188	41,40	3,318	2,594	1,874	4,536	5,085	2,118	7,145

Fonte: Autora, 2014

Tabela 15 - Erro padrão dos valores de absorvância do ensaio de viabilidade celular (MTT) com os extratos e frações de *Z. tuberculosa* nas concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

Concentração	Controle 1	Controle 2	ZTF3	ZTF4	ZTF5	ZTF6	ZTF7	ZTF8	ZTP2	ZTB
10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0,0	0,5938	1,914	4,936	6,815	1,355	2,380	2,728	7,864	4,061
50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0,0	0,5938	5,492	22,57	1,259	0,4996	0,8310	2,338	2,876	2,590
100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0,0	0,5938	20,70	1,659	1,297	0,9369	2,268	2,543	1,059	3,573

Fonte: Autora, 2014

A espécie *Z. tuberculosa* é usada na medicina popular brasileira para o tratamento de câncer e doenças de pele (BASTOS et al., 2009). Vários compostos bio-ativos são reportados na família Bignoniaceae, e dentre os mais comuns e farmacologicamente importantes estão os ácidos ursólico e oleanólico (RAHMATULLAH et al., 2010).

O ensaio MTT (brometo de tetrazólio) foi usado neste trabalho por ser um indicador sensível da morte celular (BEHL et al., 1994), além de ser amplamente utilizado para calcular a atividade metabólica de células viáveis, sendo facilmente absorvido por estas (MOSMANN, 1983; KATO et al., 1997; SHEARMAN et al., 1994; YAN et al., 1996). Para Heo et al. (2001) este método é adequado para quantificar a viabilidade celular, uma vez que esta é determinada medindo-se a atividade das enzimas succinato desidrogenases mitocondriais através da redução do MTT, ou seja, estimando a capacidade da célula de clivar o anel tetrazólio do sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (composto hidrosolúvel que apresenta coloração amarelo-pálido em solução), pela ação daquelas desidrogenases presentes na mitocôndria, produzindo cristais de formazan (composto não solúvel em água e de coloração azul-escuro) (MOSMANN, 1983). A succinato desidrogenase mitocondrial é ativa em células com o metabolismo da cadeia respiratória intacto. Assim, o formazan armazenado no citoplasma celular e quantificado por espectrofotômetro possui correlação direta com o número de células viáveis (TEIXEIRA, 2012).

Os resultados obtidos por Sarmiento et al. (2014) no teste de toxicidade com *Artemia salina*, utilizando o extrato bruto do caule de *Z. tuberculosa*, mostraram ausência de toxicidade, nas mesmas concentrações usadas com as folhas, neste trabalho. Semelhantemente à folha, as frações do caule apresentaram-se algumas

atóxicas e outras tóxicas, o que mostra a necessidade, segundo Bastos et al. (2009), de mais estudos para uma espécie tão usada na medicina popular.

Os resultados citotóxicos deste trabalho mostram que a redução da viabilidade celular ocorreu com o aumento das concentrações dos extratos e frações, com exceção do extrato ZTB e da fração ZTF3, como relatado anteriormente. Uma vez que os extratos e frações de *Z. tuberculosa* são ricos em ácido ursólico e/ou oleanólico observa-se que a medida que as concentrações dos triterpenos aumentam também aumenta a citotoxicidade dos extratos e frações (Tabelas 08 e 14; Figura 55).

Conforme Silva (2009) o ácido ursólico quando avaliado pelo método MTT nas concentrações de 0,5; 2,0; 8,0; 32,0 e 128,0 μM demonstrou alta citotoxicidade em 128,0 μM (média de 70,54% de lise celular), sendo por isso testado in vitro até a concentração de 32,0 μM no trabalho citado, onde se mostrou potencialmente ativo sobre formas intracelulares de *Toxoplasma gondii*. O ácido oleanólico, que também foi testado nas mesmas concentrações, não apresentou qualquer citotoxicidade que pudesse ser observada no teste de viabilidade celular (MTT).

Resultados de pesquisa indicam que o ácido ursólico tem um efeito protetor dose-dependente contra a neurotoxicidade induzida pela proteína amilóide em células *PC12*. O pré-tratamento com a concentração de 10 μM resultou em um decréscimo de 13-20% de níveis de EROS, devido à propriedade de eliminação de radicais livres desse triterpeno (PEITRI et al., 1997; RAPIN et al., 1998), porém, na concentração 100 μM houve uma redução da viabilidade celular, conforme teste MTT, com morte induzida de células *PC12* (HEO et al., 2001).

O interesse na atividade citotóxica de triterpenos vem crescendo após descoberta da citotoxicidade seletiva exibida pelo ácido betulínico contra o melanoma, com indução de apoptose. A literatura também relata a citotoxicidade significativa e pouco explorada, quando comparada com o ácido betulínico, apresentada pelo ácido ursólico e seus derivados esterificados contra algumas linhagens de células tumorais (MA et al., 2005) ácido betulínico.

A avaliação da citotoxicidade do ácido ursólico e seus derivados realizada pela REA (Estudo das Relações Estrutura Química e Atividade Biológica) e estudos sobre o mecanismo citotóxico revelaram que os triterpenos que possuem dois

grupos de formação de ligação de hidrogênio (um H-doador e um grupo carbonilo) nas posições 3 e 28 exibem atividade citotóxica (MA et al., 2005).

4.5.2 Análise Correlativa: Atividade Citotóxica x Concentração de Ácido Ursólico

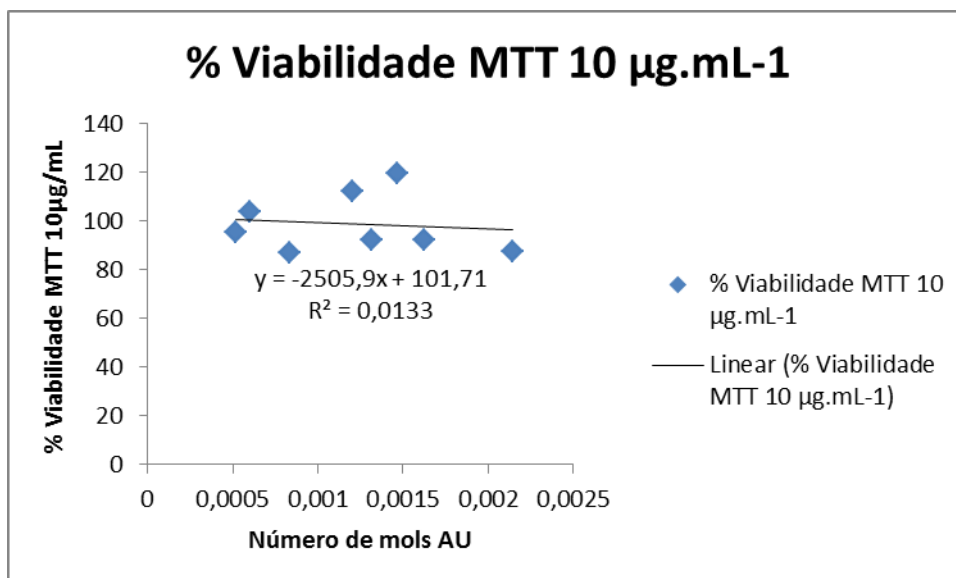
Foi feita uma análise de correlação entre a atividade citotóxica apresentada pelos extratos e frações as folhas de *Z. tuberculosa* versus a concentração de ácido ursólico, presente nestes, usando o programa EXCEL.

A análise de correlação foi realizada apenas com o ácido ursólico, porque este demonstrou no teste MTT ser o possível causador do efeito citotóxico apresentado pelos extratos e frações nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, considerando que a maior concentração de ácido oleanólico foi em ZTF3 (atóxica em todas as concentrações), enquanto que a maior concentrações de ácido ursólico foi em ZTF6, amostra que apresentou o maior efeito citotóxico. Os níveis desses compostos foram obtidos por quantificação, integrando-se a área do pico de sinais característicos de cada um deles, nos espectros de RMN ^1H das amostras.

Os resultados da correlação entre a Viabilidade Celular (Teste MTT) e o níveis de ácido ursólico mostraram valores negativos para a covariância nas três concentrações 10, 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Quando a covariância assume valores negativos isto indica que as duas variáveis em questão, se relacionam de forma negativa ou inversa, ou seja, quando uma cresce a outra diminui. Isso explica por que o aumento das concentrações dos extratos e frações de 10 para 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ diminui a viabilidade celular no MTT.

A covariância sofre influência das escalas das variáveis e por isso apesar de ser estatisticamente adequada para medir a relação linear entre duas variáveis, ela não é adequada para comparar graus de relação entre variáveis. Para evitar essa influência foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson (R), através da função CORREL do Excel. Quando a correlação é positiva, quanto mais próximo de 1 for o valor de R mais perfeita é a relação (LOPES, 2014). No caso deste estudo, como a correlação entre Viabilidade celular e níveis de ácido ursólico é negativa, quanto mais próximo de -1 for o coeficiente R, mais perfeita é a relação entre as referidas variáveis.

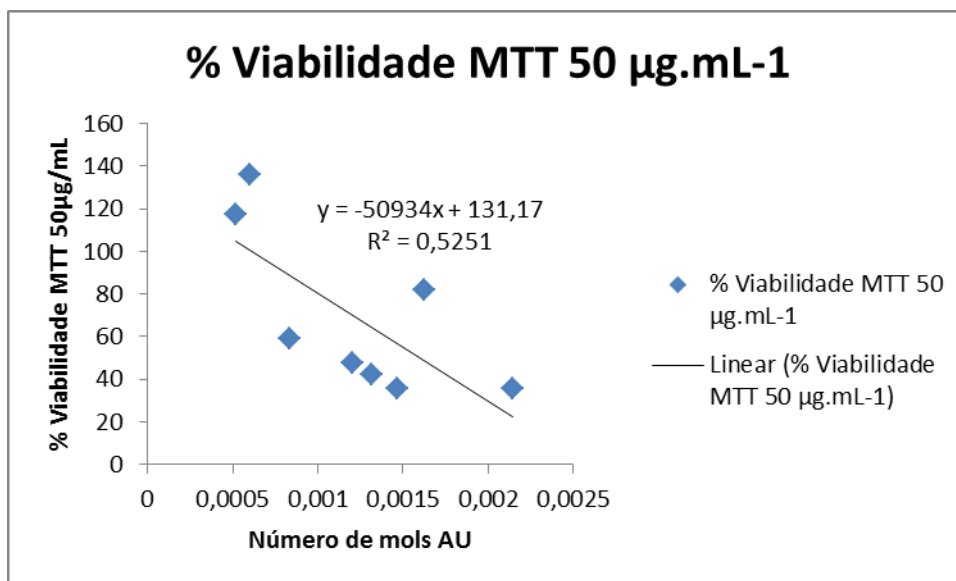
Figura 56 - Análise Correlativa MTT x Concentração de AU em 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
(R = -0,11519)



Fonte: Autora, 2015

O gráfico da figura 56 acima, mostra que a correlação entre Número de mols de AU e a viabilidade celular, na concentração em 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, não é tão boa, pois o $R = -0,11519$ está distante de -1 e próximo de zero. Estes resultados conferem com o ensaio MTT realizado, pois todas as frações nessa concentração foram atóxicas, mesmo os extratos e frações tendo quantidades diferentes de ácido ursólico, como mostra a quantificação.

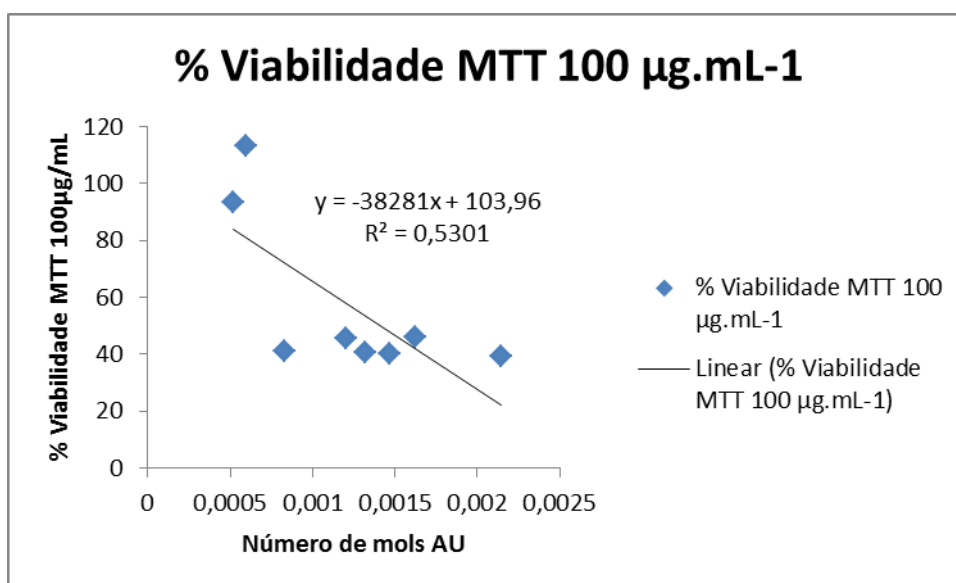
Figura 57 - Análise Correlativa MTT x Concentração de AU em 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
(R = -0,72463)



Fonte: Autora, 2015

No entanto, quando a concentração das amostras aumentou para 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, como mostra o gráfico representado pela figura 57, a correlação entre Número de mols de AU e a viabilidade celular tendeu a ideal, pois o $R = -0,72463$ está próximo de -1 e distante de zero. Estes resultados também conferem com o ensaio MTT realizado, pois com o aumento da concentração das amostras de 10 para 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e conseqüentemente um aumento 5 vezes maior de ácido ursólico nestas amostras, ocorreu uma diminuição da viabilidade, com exceção de ZTF3 e ZTB .

Figura 58 - Análise Correlativa MTT x Concentração de AU em 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
(R = -0,72805)



Fonte: Autora, 2015

Resultado significativo de correlação, conforme mostrado pelo valor do coeficiente de Pearson, $R = -0,72805$, aconteceu também na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 58). Estes resultados conferem com o ensaio MTT realizado, uma vez que houve um aumento 10 vezes maior de ácido ursólico nesta concentração, conseqüentemente ocorreu uma diminuição da viabilidade, porém ZTF3 e ZTB continuaram atípicas.

Os gráficos de correlação mostram que a fração ZTF6 foi a mais citotóxica em todas as concentrações, sendo esta a fração mais rica em ácido ursólico.

5 CONCLUSÃO

A fração clorofórmica concentrou a quase totalidade de metabólitos do extrato etanólico das folhas da *Zeyheria tuberculosa*. Desta fração, duas substâncias majoritárias foram elucidadas estruturalmente e quantificadas, os ácidos ursólico e oleanólico. Isto com base nas análises por RMN unidimensionais e bidimensionais e análise multivariada. Estes triterpenos também foram caracterizados e quantificados no extrato etanólico e subfrações oriundas da fração ZTP2.

O método de quantificação utilizando análise multivariada demonstrou ser um método confiável, com resultados semelhantes à quantificação manual. Além de ser um método simples e rápido, já que em poucos minutos foram obtidas as quantificações de vários sinais dos compostos majoritários presentes no extrato etanólico, na fração em clorofórmio e subfrações do extrato etanólico de *Zeyheria tuberculosa*. Por estes motivos, este método foi considerado mais eficiente que o método de quantificação manual.

Na análise multivariada (PCA), quando aplicada aos dados espectroscópicos, PC1 e PC2 tiveram como chave do agrupamento e da separação entre as amostras o fator qualitativo. Ou seja, a presença dos ácidos ursólico e oleanólico. Para PC1 e PC4 o fator de similaridade foi o quantitativo, tendo como fator chave a concentração de ácido oleanólico. PC1 e PC5 tiveram como fator de similaridade também o quantitativo, sendo que, neste caso, o fator chave do agrupamento e da separação entre as amostras é a concentração de ácido ursólico.

A análise quimiométrica por RMN do extrato bruto, fração clorofórmica e subfrações de *Z. tuberculosa* mostrou que as frações ZTF3 e ZTF6 são as mais promissoras para o isolamento dos ácidos oleanólico e ursólico, respectivamente. Já a fração ZTF4 foi a segunda fração mais rica tanto em ácido ursólico como em ácido oleanólico, sendo a mais promissora para o isolamento destes dois ácidos juntos. Considerando ainda que esta fração foi avaliada no teste MTT como atóxica nas concentrações de 10 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e citotóxica apenas na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

O modelo (PCA) construído neste trabalho, em conjunto com o método de quantificação por análise multivariada, pode ser de grande eficiência na obtenção de informações qualitativas e quantitativas a respeito de metabólitos presentes em

misturas, muitas vezes em quantidades muito pequenas. Este modelo foi eficiente, conforme indicado pelos valores do parâmetro Q. Também foi satisfatório para a classificação das amostras em grupos e subgrupos, segundo a presença dos ácidos ursólico e oleanólico (composição química) e a concentração destes nas amostras. Portanto, o referido modelo pode ser de grande utilidade na identificação de extratos potencialmente promissores, servindo como guia para um posterior isolamento da(s) substância(s) de interesse.

REFERÊNCIAS

- AQUINO, S. **Avaliação da microbiota fúngica e da presença de micotoxinas em amostras de plantas medicinais irradiadas adquiridas no comércio varejista e atacadista.** 2007. 103f. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, autarquia associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- ARAUJO, D. S.; CHAVES, M. H. Triterpenóides pentacíclicos das folhas de *Terminalia brasiliensis*. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 996-999, 2005.
- ALVES, J. O. **Espectrometria de massas com ionização electrospray (ESI-MS) e métodos quimiométricos: caracterização de azeites de oliva (extra virgem e puro) e outros óleos vegetais e quantificação de óleos adulterantes em azeite de oliva extra virgem.** 2010. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.
- BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. The use of *Allium cepa* test as a bioindicator of genotoxicity of medicinal plants infusions. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 3, p. 444-447, 2007.
- BASTOS, M. L. A. **Avaliação da Atividade Antimicrobiana “in vitro e in vivo” e Estudo Químico Biomonitorado de *Piper hayneanum* C.DC. (Piperaceae) e *Zeyheria tuberculosa* (Vell) Bur. (Bignoniaceae).** 2008. 250f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2008.
- BASTOS, M. L. A. et al. Studies on the antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of *Zeyheria tuberculosa* (Vell) Bur. (Bignoniaceae). **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 12, p. 16-21, 2009.
- BEHL, C. et al. Hydrogen peroxide mediates amyloid β protein toxicity. **Cell.**, v. 77, p. 817-827, 1994.
- BENTO, E. de S. **Applications of MD and NMR magnetization transfer experiments to structural analysis.** 1997. 149f. Tese (Doutorado em Química) - Queen Mary and Westfield College, University of London, London, 1997.
- BOUROCHE, J. M.; SAPORTA, G. **Análise de dados.** Rio de Janeiro, Ed. Zahar, 1982.
- BRAR, A.S., PHADHAN, D.R. Complete spectral assignments of Methacrylonitrilestyrene-methyl methacrylate terpolymers by 2D NMR spectroscopy. **Journal of Molecular Structure**, v. 649, p. 245-255, 2003.

CALIXTO, J. B. Twenty-Five of research on medicinal plants in Latin America. **Journal Ethnopharmacol**, v. 100, p. 131-134, 2007.

CARVALHO, M. G.; BRAZ FILHO, R. Novas Técnicas de RMN e os Deslocamentos Químicos dos Átomos de ^1H e ^{13}C da Isoflavona Duartina. **Química Nova**, v. 16, n. 2, p. 89-94, 1993.

CARVALHO, C. A. et al. Atividade antioxidante de *Jacaranda decurrens* Cham., Bignoniaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 2B, p. 592-598, 2009.

COSTA, H. N. R. et al. Chemical constituents and antiedematogenic activity of *Peltodon radicans* (Lamiaceae). **Química Nova**, v. 31, n. 04, p. 81-86 2008.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1830, n. 6, p. 3670-95, 2013.

CHECKER, R.; SANDUR, S. K.; SHARMA, D. et al. Potent Anti-Inflammatory Activity of Ursolic Acid, a Triterpenoid Antioxidant, Is Mediated through Suppression of NF- κ B, AP-1 and NF-AT. **PLoS ONE**, n. 7, v. 2, p. e31318, 2012.

COSTA, J. F. O. **Investigação de atividades anti-*Leishmania amazonensis*, anti-*Trypanosoma cruzi* e imunomoduladora de extratos de plantas do semi-árido brasileiro**. 2004. 79p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz, Fundação Oswaldo Cruz, Universidade da Bahia, Salvador, 2004.

COSTA, J. F. O. et al. Immunomodulatory activity of extracts from *Cordia superba* Cham. and *C. fuscescens* A. DC. (Boraginaceae), plant species native from Brazilian semi-arid. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 1, p. 11-15, 2008.

COSTA, J. F. O. et al. Immunomodulatory and antibacterial activities of extracts from Rutaceae species. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 4, p. 502-505, 2009.

COSTA, J. F. O. **Avaliação da atividade imunossupressora de moléculas isoladas de vegetais e derivados sintéticos, in vitro e em modelos de endotoxemia**. 2010. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, 2010.

DAI, Y. et al. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. **Anal Chim Acta.**, v. 5, n. 766, p. 61-8, 2013.

DEVI, K. P. et al. Immunomodulatory effects of *Premna tomentosa* extract against Cr (VI) induced toxicity in splenic lymphocytes - an in vitro study. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 57, p. 105-108, 2003.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo, Ed. Universidade Estadual Paulista, 1996.

DZUBAK, P. et al. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. **Nat Prod Rep**, v. 23, p. 394-411, 2006.

ERIKSSON et al. **Multi- and Megavariate Data Analysis (Part I): Basic Principles and Applications**. Sweden, Umetrics Academy, 2006.

ESTEVAN, C. S. **Estudo fitoquímico biomonitorado da entrecasca de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae)**. 2006. 192f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2006.

FACCIONE M. et al. Synthesis of asperphenamate and aurantiamide benzoate for structural revision. **Rev Latinoamer Quím**, v. 32, 7-14, 2004.

FALCÃO, D. Q.; FERNANDES, S. B. O.; MENEZES, F. S. Triterpenos de *Hyptis fasciculata* Benth. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 13, p. 81-83, 2003.

FERREIRA, M.; FIGUEREDO LUZ, H. Ipê Felpudo (*Zeyheria tuberculosa* (Vell) Bur.): Essência Nativa Pioneira com Grande Potencial Silvicultural. **Revista Scientia Forestalis**, v.31, p.13-21, 1985.

FERREIRA, M. M. C. Multivariate QSAR. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, n. 6, p.742-753, 2002.

FERREIRA, M. M. C. et al. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 724-731, 1999.

FUNARI, C. S. et al. High resolution ultra high pressure liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry dereplication strategy for the metabolite profiling of Brazilian *Lippia* species. **Journal of Chromatography A.**, v. 1259, p. 167–178, 2012.

FUNARI, C. S. et al. Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: estado da arte, perspectivas e desafios. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1605-1609, 2013.

GABER, Y. et al. HPLC-EAT (Environmental Assessment Tool): A tool for profiling safety, health and environmental impacts of liquid chromatography methods. **Green Chem.**, v. 13, p. 2021-2025, 2011.

GIL, V. M. S.; GERALDES, C. F. G. C. **Ressonância Magnética Nuclear: Fundamentos, Métodos e Aplicações**. 1. ed. Lisboa, Ed. Fundação Calouste Gulbenkian, 1987.

GRAHAM, J. G. et al. Plants Used Against Cancer – An Extension of the Work of Jonathan Hartwell. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 347-377, 2000.

HAEFNER, B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. **Drug Discov Today**, n. 8, v. 12, p. 536-44, 2003.

HAYASHI, S. S. **Determinação qualitativa e quantitativa de metabólitos secundários de *Malva sylvestris* em extratos e especialidades farmacêuticas**. 2012. Dissertação (Mestrado) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

HARBORNE J. B. Classes and functions of secondary products. In: Walton N. J.; Brown D. E. **Chemicals from plants, perspectives on secondary plant products**. London, Imperial College, 1999. p. 1-25.

HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A.; SKOOG, D. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5. ed. São Paulo, Ed. Bookman, 2002. v. 1.

HEO, HO-JIN. et al. Ursolic Acid of *Origanum majorana* L. Reduces A α -induced Oxidative Injury. **Mol. Cells**, v. 13, n. 1, p. 5-11, 2001.

HOLZGRABE, U. Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications Institute of Pharmacy and Food Chemistry. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 57, p. 229–240, 2010.

HOLZGRABE, U. et al. Quantitative NMR spectroscopy - Applications in drug analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 38, p. 806–812, 2005.

HE, X.; LIU, R. H. Triterpenoids Isolated from Apple Peels Have Potent Antiproliferative Activity and May Be Partially Responsible for Apple's Anticancer Activity. **J Agric Food Chem**, v. 55, p. 4366-4370, 2007.

HSU, Y.; KUO, P. L.; LIN, C. C. Proliferative inhibition, cell-cycle dysregulation, and induction of apoptosis by ursolic acid in human non-small cell lung cancer A549 cells. **Life Sci**, n. 75, p. 2303-2316, 2004.

HUANG, C. Y. et al. Inhibition of cell proliferation, invasion and migration by ursolic acid in human lung cancer cell lines. **Toxicoln Vitro**, v. 25, n. 7, p. 1274-80, 2011.

<https://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>.

IKEDA, Y.; MURAKAMI, A.; OHIGASH, H. Review Ursolic acid: An anti- and pro-inflammatory triterpenoid. **Mol Nutr Food Res**, v. 52, p. 26-42, 2008.

JÁCOME, R. L. R. P. et al. Análise de Naftoquinonas em Extratos Brutos de Raízes

de *Zeyheria Montana* M. (bolsa-de-pastor). **Química Nova**, v. 22, n. 2, p. 175-177, 1999.

JUAN, M. E. et al. Olive Fruit Extracts Inhibit Proliferation and Induce Apoptosis in HT-29 Human Colon Cancer Cells. **J Nut**, v. 136, n. 10, p. 2553-7, 2006.

JUNGES, M. J. et al. Triterpenos Ursanos e Oleananos do Caule de *Eugenia florida* DC. **Revista de Pesquisa e Pós-Graduação**, v. 1, p. 13-20, 2000.

KAISER, C. R. RMN 2D: Detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 231-236, 2000.

KATO, M., SAITO, H., ABE, K. Nanomolar amyloid β protein-induced inhibition of cellular redox activity in cultured astrocytes. **J. Neurochem**, v. 68, p. 1880-1895, 1997.

KONISHI, Y.; KIYOTA, T.; DRAGHICI, C. Molecular formula analysis by an MS/MS/MS technique to expedite dereplication of natural products. **Anal Chem.**, v. 79, n. 3, p. 1187-97, 2007.

KOSKELA, H. **Some Aspects of Polarisation Transfer in NMR Spectroscopy.**, 2005. 120p. Dissertação (Mestrado) - Faculty of Science, University of Oulun, Oulun Yliopisto, 2005.

KUTNEY, J.P.; HANSSSEN, H.W. 5,6,7-Trimethoxyflavone and 5,6,7,8-Tetramethoxyflavone from *Zeyhera tuberculosa*. **Phytochemistry**, v. 10, p. 3298, 1971.

LEITE, J. P. V. et al. Isolamento biomonitorado de uma substância tripanossomicida de *Arrabidaea triplinervia* (Bignoniaceae), o ácido ursólico. **Rev Bras Farmacogn**, n. 11, p. 77-87, 2001.

LOPES, J. N. R. **Estudos quimiométricos em amostras de arroz nacional: caracterização do perfil de aminoácidos e sua correlação com o teor de arsênio.** 2014. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2014.

LUCHESE, A.M. **Plantas da caatinga: perfil botânico, fitoquímica e atividade biológica.** Recife, Ed. Associação Plantas do Nordeste, 2006. v. 4.

MA, C. et al. The cytotoxic activity of ursolic acid derivatives. **Eur J Med Chem**, n. 40, p. 582-589, 2005.

MACEDO JUNIOR, F. C. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C no estudo de rotas biossintéticas de produtos naturais. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 116-124, 2007.

- MACHADO, S. R.; GREGÓRIO E. A.; GUIMARÃES E. Ovary Peltate Trichomes of *Zeyheria montana* (Bignoniaceae): Developmental Ultrastructure and Secretion in Relation to Function. **Annals of Botany**, v. 97, p. 357–369, 2006.
- MACKIN,, G.; SHAKA, A. J. Phase-Sensitive Two-Dimensional HMQC and HMQC-TOCSY Spectra Obtained Using Double Pulsed-Field-Gradient Spin Echoes. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 118, p. 247–255, 1996.
- MAGANHA, J. et al. Embryo Development Alteration in Rats Treated With Lapachol. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 6, p. 927-934, 2006.
- MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. ^{13}C RMN spectra of pentacyclic triterpenoids a compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517-1575, 1994.
- MAKARE, N.; BODHANKAR, S.; RANGARI, V. Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica* L. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 133-137, 2001.
- MALZ, F.; JANCKE, F. H. Validation of quantitative NMR. **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.38, (2005) 813–823
- MALHEIROS, A.; SCHUQUEL, I. T. A.; VIDOTTI, G. J. Atribuição Inequívoca de Deslocamentos Químicos de RMN de ^1H e ^{13}C de Plumierídeo Isolado da *Allamanda Cathartica*. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 457-459, 1996.
- MATOS, F. J. A. **Introdução a Fitoquímica Experimental**. 2. ed. Belo-Horizonte, UFC. 2ª ed, 1997.
- MA, CHAO-MEI. et al. The cytotoxic activity of ursolic acid derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, p. 582–589, 2005.
- MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: an evolving role in future drug discovery. **Eur J Med Chem.**, v. 46, n. 10, p. 4769-807, 2011.
- MOSMANN, TIM. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 55, p. 55-63, 1983.
- NETO, M. M. J. Estatística multivariada. Revista de Filosofia e Ensino. 9 maio 2004. Disponível em: http://www.criticanarede.com/cien_estatistica.html. Acesso em: 9 maio 2004.
- NIERO R.; MALHEIROS A. Triterpenos e sua importância químico-medicinal, 2007. In Yunes R.A.; Cechinel Filho V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 1. ed. Itajaí, Ed. UNIVALI, 2007. p. 237-258.

NG, J. et al. Dereplication and de novo sequencing of nonribosomal peptides. **Nature Methods**, v. 6, p. 596 – 599, 2009.

PARELLA, T. Pulsed field gradients: a new tool for routine NMR. **Magnetic Resonance Chemical**, v. 36, p. 467-495, 1998.

PATHAK, A. K. et al. Ursolic Acid Inhibits STAT3 Activation Pathway Leading to Suppression of Proliferation and Chemosensitization of Human Multiple Myeloma Cells. **Mol Cancer Res**, v. 5, n. 9, p. 943-55, 2007.

PATOČKA, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine Signification. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 1, p. 7-12, 2003.

PATWARDHAN, B. et al. Search of immunomodulatory agents: a review. **Indian Drugs**, v. 28, p. 348-358, 1990.

PAVLOVA, N. I. et al. Antiviral activity of betulin, betulinic and betulonic acids against enveloped and non-enveloped viruses. **Fitoterapia**, v. 74, p. 489-492, 2003.

PEDROZA, J. O. **Preparação do terpolímero de estireno/ octadecilacrilamida/ ácido acrílico e caracterização por RMN**. 2007. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

PEITRI, S. et al. Cardioprotective and antioxidant effects of the terpenoid constituents of *Ginkgo biloba* extract Egb 761. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 29, p. 1601-1611, 1997.

PEREIRA, A. S. et al. Desafios da Química Analítica Frente às Necessidades da Indústria Farmacêutica. **Química Nova**, v. 28, p. S107-S111, 2005.

PHILLIPSON, J. D. 50 years of medicinal plant research – every progress in methodology is a progress in science. **Planta Medica**, v. 69, p. 491-495, 2003.

PINTO, A. C.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Current status, challenges and trends on natural products in brazil. **Química Nova**, v. 25, 2002.

PINTO, D. S. et al. Secondary metabolites isolated from *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 367-372, 2008.

RATCLIFFE, R. G.; ROSCHER, A.; SACHAR-HILL, Y. “Plant RMN spectroscopy”, **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 39, p. 267-300, 2001.

RAHMATULLAH, M. et al. A survey of medicinal plants used by folk medicinal practitioners of station purbo para village of Jamalpur Sadar Upazila in Jamalpur district, Bangladesh. **Am-Eurasian J Sustain Agric**. v. 4, p. 122-35, 2010.

RAPIN, J. R., ZAIBI, M., AND DRIEU, K. In vitro and in vivo effects of an extract of Ginkgo biloba extract (Egb 761), ginkgolide B, and bilobalide on apoptosis in primary cultures of rat hippocampal neurons. **Drug Dev. Res.**, v. 45, p. 23-29, 1998.

REIF, B. et al. Adequate, a new set of experiments to determine the constitution of small molecules at natural abundance. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 118, p. 282–285, 1996.

RICCIO, R. et al. Stereochemical analysis of natural products. Approaches relying on the combination of NMR spectroscopy and computational methods. **Pure and Applied Chemistry**, v. 75, p. 295–308, 2003.

RUBEL, R. **Produção de compostos bioativos de *Ganoderma lucidum* por fermentação em estado sólido: avaliação da ação antitumoral, imunomoduladora e hipolipidêmica.** 2006. 191f. Tese (Doutorado) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

RUDNICK, G. **Farmacologia Clínica: Série Incrivelmente Fácil.** 1. ed. Rio de Janeiro - RJ, Ed. Guanabara Koogan S. A., 2003.

SANTOS, M. da S., COLNAGO, L. A. Validação de método quantitativo por RMN de ¹H para análises de formulações farmacêuticas. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 324-330, 2013.

SARASWAT, B. et al. Protective action of ursolic acid against chemical induced hepato-toxicity in rats. **Indian J. Pharmacol**, v. 28, p. 232-239, 1996.

SARMENTO, P. et al. Avaliação do extrato da *Zeyheria tuberculosa* na perspectiva de um produto para cicatrização de feridas. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**, v. 22, n. 1, p. 165-72, 2014.

SASHIDHARA, K.V.; ROSAIAH, J.N. Various dereplication strategies using LC-MS for rapid natural product lead identification and drug discovery. **Nat. Prod. Commun.**, v. 2, p. 193–202, 2007.

SATTAR, A. et al. Chemical composition and biological activity of leaf exudates from some Lamiaceae plants. **Pharmazie**, v. 50, p. 62-65, 1995.

SHANMUGAM, M. K. et al. Ursolic Acid Inhibits the Initiation, Progression of Prostate Cancer and Prolongs the Survival of TRAMP Mice by Modulating Pro-Inflammatory Pathways. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. e32476, 2012.

SHEARMAN, M. S.; REGAN, C. I.; IVERSEN, L. L. Inhibition of PC12 cell redox activity is a specific, early indicator of the mechanism of β -amyloid mediated cell death. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 91, p. 1470-1474, 1994.

SHISHODIA, S. et al. Ursolic Acid Inhibits Nuclear Factor- B Activation Induced by Carcinogenic Agents through Suppression of I B Kinase and p65 Phosphorylation: Correlation with Down-Regulation of Cyclooxygenase 2, Matrix Metalloproteinase 9, and Cyclin D11. **Cancer Research**, v. 63, p. 4375-4383, 2003.

SHOOLERY, J. **A Basic Guide to NMR**. 1. ed. Palo Alto - California, Ed. Varian Associates, 1972.

SOARES, M. B. P. et al. Antiparasitic and Immunomodulatory Activities of 1,1-bis(4-Hydroxyphenyl)-2-Phenyl-but-1-ene and Its Protected and Free 2-Ferrocenyl Derivatives. **Drug Development Research**, v. 71, p. 69-75, 2010.

SILVA, A. A. G.; FIGUEIREDO, M. A. S. de. Manifestações estomatológicas em pacientes receptores de transplante renal sob terapia imunossupressora – Avaliação clínica de um ano. **Revista Odonto Ciência**, v. 25, p. 49-75, 1998.

SILVA, D. M. **Estudo químico e de atividades biológicas da *Mansoa hirsuta* D.C. (Bignoneaceae)**. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2006.

SILVA, J. B. P. et al. Aplicação de análise de componentes principais para verificação de atribuições de sinais nos espectros de RMN ¹H: o caso dos 3-aril (1,2,4)-oxadiazol-5-carboidrazida benzilidenos. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 492-496, 2005.

SILVA, M. J. **Aplicações de Ressonância Magnética Nuclear na elucidação estrutural de dois compostos químicos obtidos a partir de *Derris sp* e *Euphorbia tirucalli* L.** 2002. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2002.

SILVA, M. R. da. **Padronização de método colorimétrico para avaliação de atividade biológica de substâncias sobre formas taquizoítas de *Toxoplasma gondii*, com a avaliação de triterpenos ácidos sobre o parasito.** 2009. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

SILVEIRA, J. C. da; GOTTLIEB, O. R.; OLIVEIRA, G. G. de. Chemistry of Brazilian Bignoniaceae. 1. Zeyherol, a Dilignol from *Zeyhera digitalis*. **Phytochemistry**, v. 14, n. 8, p. 1829-1830, 1975.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 6. ed. USA, Ed. John Willey & Sons, 1998.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis, Eds. UFRGS/UFSC, 2003.

STITES, P. D.; TERR, A. I.; PARSOLW, T. C. **Imunologia Médica**. 1. ed. Rio de Janeiro - RJ, Ed. Guanabara Koogan S. A., 2000.

SOARES, A. K. A. et al. Avaliação da Segurança Clínica de um Fitoterápico Contendo *Myroxylon toluifera*, *Grindelia robusta*, *Copaifera officinalis*, *Myroxylon toluifera*, *Nasturtium officinale*, Própolis e Mel em Voluntários Saudáveis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 447-454, 2006.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. 8. ed. Rio de Janeiro - RJ, Ed. Copyright, 2005.

SOUZA, M. V. N. et al. Natural Products in Advance Clinical Trials Applied to Cancer. **Revista Fitos**, v. 3, n. 2, p. 25-42, 2007.

TAVARES, L. A.; FERREIRA, A. G. Análises quali- e quantitativa de cafés comerciais via Ressonância Magnética Nuclear, **Química Nova**, v. 29, p. 911-915, 2006.

TEIXEIRA, R. O. et al. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L. in vivo assays. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, p. 551 – 555, 2003.

TEIXEIRA, J. P. **Efeitos das neurotoxinas Mlx-8 e Mlx-9 isoladas do veneno da serpente *Micrurus lemniscatus* sobre astrócitos em cultura**. 2012. Dissertação (Mestrado) - Instituto Butantan, São Paulo, 2012.

TOLEDO, A. C. O. et al. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, 2003.

TÔRRES, A. R. et al. Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: riscos e benefícios. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, n. 4, p. 373-380, 2005.

TSAI, S-J., YIN, M. Antioxidative and Anti-Inflammatory Protection of Oleanolic Acid and Ursolic Acid in PC12 Cells. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 7, p. H174-78, 2008.

VALENTE, A. M. M. P. **O uso da RMN na caracterização e quantificação de metabólitos produzidos por microorganismos com potencial biotecnológico**. 2007. Tese (Doutorado) – UFSCar, São Carlos, 2007.

VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H.; KIM, H. K. NMR-based metabolomics at work in phytochemistry. **Phytochem Rev.**, v. 6, p. 3-14, 2007.

VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura Segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 1-16, 2005.

WEINBERG, D. et al. The chemistry of Brazilian Bignoniaceae. Part 2. Naphthoquinones from *Zeyheria tuberculosa*. **Phytochemistry**, v. 15, p. 570, 1976.

WILLIAMS, D. H.; FLEMING, I. **Spectroscopic methods in organic chemistry**. 4. ed. Maidenhead - Berkshire - England, Ed. McGRAW-HILL Book Company (UK) Limited, 1987.

WOLFENDER, J. L. et al. MS-based plant metabolomic approaches for biomarker discovery. **Nat Prod Commun.**, v. 4, n. 10, p. 1417-30, 2009.

XU, B-J. et al. "Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin". **Food Control**, v. 17, p. 271-285, 2006.

YAN, S. D. et al. RAGE and amyloid- β peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. **Nature**, v. 382, p. 685-691, 1996.

YANG, S. et al. Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of constituents from *Toonasinensis* on human cancer cells. **Cancer Cell International**, v. 13, p. 12, 2013.

ZIDKO, A. **Coléopteros (insecta) associados às estruturas reprodutivas de espécies florestais arbóreas nativas no estado de São Paulo. Piracicaba**. 2002. 59f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luíz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2002.

Zeyheria tuberculosa, disponível em: <http://www.achetudoeregiao.com.br/Arvores/Zeyheria_tuberculosa.htm>, acessado em novembro de 2014.