

Sumário

Lista de Figura	3
Lista de tabelas.....	8
Lista de Abreviações, Códigos e Siglas	11
Resumo	12
Abstract	13
Introdução.....	14
1 Revisão Bibliográfica	16
1.1 Família Apocynaceae	16
1.2 Ocorrência de Triterpenos e Pregnanos para a Família Apocynaceae	17
1.3 Gênero <i>Macrosiphonia</i>	23
1.3.1 <i>Macrosiphonia petraea</i>	23
1.3.2 <i>Macrosiphonia velame</i>	24
1.3.3 <i>Macrosiphonia longiflora</i>	25
2 Objetivo	26
2.1 Objetivos Específicos	26
3 Material e Equipamentos	27
4 Metodologia	28
4.1 Identificação das espécies vegetais.....	28
4.2 Preparo dos extratos para análise dos componentes principais.....	29
4.3 Metodologia para análise de componentes principais.....	29
4.4 Preparo dos extratos para estudo fitoquímico.....	30
4.5 Fracionamento do extrato bruto.....	31
4.6 Fracionamento cromatográfico da fase hexânica de <i>M. velame</i>	31
4.7 Fracionamento da fase acetato de etila de <i>M. velame</i>	32
4.8 Fracionamento cromatográfico da fase hexânica de <i>M. petraea</i>	33
4.9 Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila de <i>M. petraea</i>	34
4.10 Preparo das amostras para análise por HPLC/MS-MS	35
4.11 Ensaio de citotoxicidade <i>in vivo</i> sobre microcrustáceos <i>Artemia salina</i>	36
4.12 Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> sobre a linhagens de células tumorais para avaliação da atividade antiproliferativa	37
4.13 Avaliação de atividade genotóxica: ensaio SMART em células somáticas de <i>D. melanogaster</i>	38
4.14 Quimiosistemática da Família Apocynaceae.....	39
5 Resultados e discussão	41

5.1	Análise multivariada de componentes principais do extrato etanólico dos espécimes de <i>Macrosiphonia</i>	41
5.2	Comparação por análise multivariada dos extratos etanólicos entre as amostras de espécies de <i>Macrosiphonia</i> e amostras comercializadas.....	48
5.3	Análise multivariada de componentes principais da Infusão (extrato aquoso) dos espécimes de <i>M. petraea</i> , <i>M. velame</i> e <i>Macrosiphonia longiflora</i>	58
5.4	Comparação por análise multivariada das Infusões (extratos aquosos) entre as amostras de <i>M. petraea</i> , <i>M. velame</i> , <i>M. longiflora</i> e amostras comercializadas.	63
5.5	Análise fitoquímica de <i>Macrosiphonia petraea</i> e <i>Macrosiphonia velame</i>	72
5.6	Análise dos dados obtidos via HPLC/MS-MS, para os extratos etanólicos e infusão, das amostras de <i>Macrosiphonia</i> e amostras comercializadas.....	89
5.7	Avaliação da Atividade Citotóxica <i>in vivo</i> sobre a microcrustáceo <i>Artemia salina</i>	102
5.8	Avaliação da Atividade Citotóxica <i>in vitro</i> sobre a células neoplásicas	102
5.9	Avaliação da Atividade Genotóxica.....	103
5.10	Quimiosistemática e Prospecção: Pregnanos e Triterpenos na Família Apocynaceae.....	108
6	Conclusão.....	116
7	Referências	118
Anexo 1	126
Anexo 2	133
Anexo 3	140
Anexo 4	142

Lista de Figura

Figura 1 – Representação de alguns compostos obtidos de espécies da família Apocynaceae.....	16
Figura 2: Esqueleto carbônico dos triterpenos ocorrentes na família Apocynaceae.....	19
Figura 3: Configuração das junções dos anéis A, B, C e D para os compostos do tipo pregnano. Retirada e adaptada de Dewick (2009).	20
Figura 4: Estereoquímica das posições mais comumente substituídas nos esqueletos carbônicos do tipo pregnano (4a) e localização de insaturações ocorridas nos esqueletos carbônicos do tipo pregnano (4b).....	21
Figura 5: Tipos químicos de precursores dos pregnanos relatados na família Apocynaceae – propostas sugeridas de tipos de esqueleto.	21
Figura 6: Fonte: o autor. Foto do espécime <i>M. petraea</i>	23
Figura 7: Fonte: o autor. Foto do espécime <i>M. velame</i>	24
Figura 8 – Fonte: ASU Vascular Plant Herbarium. Foto do espécime <i>M. longiflora</i>	25
Figura 9: Espectros de RMN de ¹ H (300,13 MHz, CDCl ₃) para os extratos brutos de <i>M. petraea</i> e <i>M. velame</i>	30
Figura 10 – Floxograma para a separação e obtenção dos compostos oriundos da espécie <i>M. velame</i>	32
Figura 11 - Floxograma para a separação e obtenção dos compostos oriundos da espécie <i>M. petraea</i>	34
Figura 12: Gráfico de <i>Scores</i> representando a separação dos grupos A – <i>Macrosiphonia petraea</i> (Mp); B – <i>Macrosiphonia velame</i> (Mv) e C – <i>Macrosiphonia longiflora</i> (Ml).....	42
Figura 13: Gráficos de <i>loadings</i> representando os pontos influentes para a formação e separação observados na PCA dos espécimes coletados.	43
Figura 14 – Gráficos com sinais que influenciam na separação dos grupos observados na PCA dos extratos etanólicos das amostras de <i>Macrosiphonia petraea</i> (Mp), <i>Macrosiphonia velame</i> (Mv) e <i>Macrosiphonia longiflora</i> (Ml); o grupo A é influenciado pelos sinais indicados pelo separador em linha tracejada de cor verde, o grupo B pelos sinais compreendidos pelo separador em linha tracejada de cor azul e C é influenciado pelos sinais envolvidos pelo separador em linha contínua de cor vermelha.	44
Figura 15: Gráfico de <i>Scores</i> representando a separação dos grupos A – amostras de <i>M. petraea</i> (Mp), grupo B – amostras de <i>M. velame</i> (Mv) e grupo C – <i>M. longiflora</i> (Ml) com intervalos de dados entre δ ¹ H 1,22 e 1,30 retirados.....	46

Figura 16: Gráficos de *loadings* apresenta os pontos de influência para a formação da PCA dos espécimes coletados com intervalos de dados entre δ ^1H 1,22 e 1,30 retirados. 47

Figura 17 – Espectros obtidos pelo experimento unidimensional de RMN de ^1H (CDCl_3 – 300,13 MHz – ns = 128) para as amostras 1 – *Macrosiphonia petraea* (Mp); 2 – *Macrosiphonia velame* (Mv); 3 – *Macrosiphonia longiflora* (MI); 4 – amostra de Cuiabá (CBA); 5 – amostra de Rondonópolis (ROO); 6 – amostra de Campo Grande (CGR); 7 – amostra de Corumbá (CMB); 8, 9, 10 e 11 – amostras de Dourados (DSR1, DRS2, DSR3 e DSR4, respectivamente) e 12 – amostra de Ponta Porã (PPA). A região entre δ 1,20 e δ 1,80 ppm foi retirada (possíveis contaminantes e interferentes), e a janela de δ 7,0 a δ 0,5 ppm teve *bucketing* de 0,02 ppm. 49

Figura 18: Gráfico de Scores demonstrando a separação e formação dos grupos M, formado pela amostra de *M. petraea* (Mp), N, constituído pelas amostras de *M. velame* (Mv), amostras de *M. longiflora* (MI), amostra de Cuiabá (CBA) e amostras de Rondonópolis (ROO) e grupo O, formado pelas amostras de Campo Grande (CGR), Corumbá (CMB), Dourados (DRS1, DRS2, DRS3 e DRS4) e Ponta Porã (PPA). 50

Figura 19: Gráficos de *loadings* contendo os pontos que influenciam a separação dos dados para a formação da análise de PCA dos espécimes coletados e amostras compradas, com o intervalo de δ ^1H entre δ 1,20 e δ 1,80 retirado. 51

Figura 20 – Os gráficos apresentam os sinais que influenciam para a separação dos grupos observados na PCA; 16a: os gráficos demonstram os sinais influentes para a formação dos grupos M (amostras de *M. petraea* (Mp)) e N (amostras de *M. velame* (Mv), amostras de *M. longiflora* (MI), amostra de Cuiabá (CBA) e amostras de Rondonópolis (ROO)); 16b: os gráficos demonstram os sinais influentes para a formação do grupo O (amostras de Campo Grande (CGR), amostra de Corumbá (CMB), amostras de Dourados (DRS1, DRS2, DRS3 e DRS4) e amostra de Ponta Porã (PPA). 53

Figura 21 – Apresenta o gráfico 3D do resultado obtido para a análise de PCA, onde apresentam: a formação de subgrupos no grupo O formado pelas amostras comercializadas no estado de Mato Grosso do Sul, separando as amostras do Sul do estado DRS1, DRS2, DRS3, DRS4 e PPA, das amostras da região Central e Oeste do estado, CGR e CMB, respectivamente, e que ambos se distinguem das amostras de espécies do gênero *Macrosiphonia*. 54

Figura 22 – Dendrograma apresentando a separação em dois clados, um formado pelas amostras das espécies dos gêneros *Macrosiphonia* (Mp, Mv e MI) e amostras comercializadas no estado de Mato Grosso, e o segundo clado formado pelas amostras comercializadas no estado de Mato Grosso do Sul (CGR, CMB, DRS1, DRS2, DRS3, DRS4 e PPA). 55

Figura 23 – Heatmap apresenta, com esclaca de 40 valores, os sinais de deslocamento quimico de RMN de ^1H , que influenciaram na separação e formação dos clados observados no dendrograma na análise de PCA dos extratos etanólicos.	56
Figura 24 - Gráfico de <i>Scores</i> representando a separação dos grupos A – amostras de <i>M. petraea</i> , grupo B – amostras de <i>M. velame</i> e grupo C – <i>M. longiflora</i> com intervalo de dados entre δ ^1H 4,50 e 5,10 retirado.	58
Figura 25 - Gráficos de <i>loadings</i> contendo os sinais de RMN de ^1H que exercem influência na separação dos dados para a formação da análise de PCA dos espécimes coletados, com o intervalo de dados δ ^1H entre δ 4,50 e δ 5,10 retirado.	59
Figura 26 - Gráfico de <i>Scores</i> representando a separação dos grupos A – amostras de <i>M. petraea</i> (Mp), grupo B – amostras de <i>M. velame</i> (Mv) e grupo C – <i>M. longiflora</i> (MI) com os intervalos de dados entre δ 3,00 e δ 4,50 e δ ^1H 4,50 e 5,10 e retirados.	60
Figura 27 - Gráficos de <i>loadings</i> apresenta os pontos influências na separação dos dados para a formação da análise de PCA dos espécimes coletados com os intervalos de dados δ ^1H entre δ 3,00 e δ 4,50 e δ 4,50 e δ 5,10 retirados.	61
Figura 28 - Gráficos contendo alguns sinais que influenciam a separação dos grupos observados na PCA para amostras da infusão das espécies de <i>Macrosiphonia petraea</i> (Mp), <i>Macrosiphonia velame</i> (Mv) e <i>Macrosiphonia longiflora</i> (MI): a figura 28a apresenta os sinais que influenciam na separação do grupo C (<i>Macrosiphonia longiflora</i> (MI) e a figura 28b, valores que influenciam na separação e formação dos grupos A (<i>Macrosiphonia petraea</i> (Mp)) e B (<i>Macrosiphonia velame</i> (Mv)).	62
Figura 29 - Espectros obtidos pelo experimento unidimensional de RMN de ^1H (D_2O – 300,13 MHz – ns = 128) para as amostras 1 – <i>Macrosiphonia petraea</i> (Mp); 2 – <i>Macrosiphonia velame</i> (Mv); 3 – <i>Macrosiphonia longiflora</i> (MI); 4 – amostra de Cuiabá (CBA); 5 – amostra de Rondonópolis (ROO); 6 – amostra de Campo Grande (CGR); 7 – amostra de Corumbá (CMB); 8, 9, 10 e 11 – amostras de Dourados (DSR1, DRS2, DSR3 e DSR4, respectivamente) e 12 – amostra de Ponta Porã (PPA). A região entre δ 4,50 e δ 5,10 ppm (possíveis contaminantes e interferentes) foi retirada e a janela de δ 8,40 a δ 0,50 ppm teve <i>bucketing</i> de 0,02 ppm.	63
Figura 30 - Gráfico de <i>Scores</i> demonstrando a separação e formação de grupos retirando os intervalos de dados δ RMN de ^1H entre δ 4,50 e δ 5,10: grupo M formado pelas amostras de <i>M. petraea</i> (Mp), amostras <i>M. velame</i> (Mv), amostras de <i>M. longiflora</i> (MI), amostra de Cuiabá (CBA) e amostras de Rondonópolis (ROO), amostras de Campo Grande (CGR), e uma amostra da cidade de Dourados DRS3 e o grupo N formado pelas, amostra de Corumbá (CMB), amostras de Dourados (DRS1, DRS2, DRS4) e amostra de Ponta Porã (PPA).	64

Figura 31 - Gráficos de <i>loadings</i> apresenta os pontos influências na separação dos dados para a formação da análise de PCA entre os espécimes coletados e comercializados com os intervalos de dados δ RMN de ^1H entre δ 4,50 e δ 5,10 retirados.....	65
Figura 32 - Gráfico de <i>Scores</i> demonstrando a separação e formação de grupos retirando os intervalos de dados δ ^1H entre δ 3,00 e δ 4,50 e δ 4,50 e δ 5,10: grupo M formado pelas amostras de <i>M. petraea</i> (Mp), amostras <i>M. velame</i> (Mv), amostras de <i>M. longiflora</i> (MI), amostra de Cuiabá (CBA) e amostras de Rondonópolis (ROO) e amostras de Campo Grande (CGR) e o grupo N formado pelas, amostra de Corumbá (CMB), amostras de Dourados (DRS1, DRS2, DRS3 e DRS4) e amostra de Ponta Porã (PPA).....	67
Figura 33 - Gráficos de <i>loadings</i> apresenta os pontos influências na separação dos dados para a formação da análise de PCA entre os espécimes coletados e amostras comercializadas com os intervalos de dados δ ^1H entre δ 3,00 e δ 4,50 e δ 4,50 e δ 5,10 retirados.....	68
Figura 34 - Dendrograma apresentando a separação das amostras estudadas em três clados: um formado pelas amostras das espécies dos gêneros <i>Macrosiphonia</i> (Mp, Mv e MI) e amostras comercializadas no estado de Mato Grosso (CBA e ROO) e Mato Grosso do Sul (CGR e DRS3), e o segundo e terceiro clados formados apenas pelas amostras comercializadas no estado de Mato Grosso do Sul (CMB, DRS1, DRS2, DRS4 e PPA).	69
Figura 35 - Heatmap apresenta, com escala de 40 valores, os sinais de deslocamento químico de RMN de ^1H , que influenciaram na separação e formação dos clados observados no dendrograma para a análise dos componentes majoritários presentes na infusão.....	71
Figura 36: Estrutura química dos compostos 1, 2 e 3: lupeol, α -amirina e β -amirina, respectivamente.	73
Figura 37 - Espectro de RMN de ^1H (300,13 MHz, CDCl_3) e de ^{13}C (75,47 MHz, CDCl_3) dos compostos 1, 2 e 3, obtidos de <i>M. petraea</i>	74
Figura 38: Espectro de RMN de ^1H (300,13 MHz, CDCl_3) e de ^{13}C (75,47 MHz, CDCl_3) dos compostos 1, 2 e 3, obtidos de <i>M. velame</i>	75
Figura 39: Estrutura química dos compostos 4 e 5: ácido arjunólico e ácido asiático.....	77
Figura 40: Espectro de RMN de ^1H (300,13 MHz, Pyr-d6) e de ^{13}C (75,47 MHz, Pyr-d6) dos compostos 4 e 5, obtidos de <i>M. petraea</i>	78
Figura 41: Espectro de RMN de ^1H (300,13 MHz, Pyr-d6) e de ^{13}C (75,47 MHz, Pyr-d6) dos compostos 4 e 5, obtidos de <i>M. velame</i>	79
Figura 42: Estrutura química dos compostos 6, 7 e 8: Acetato de lupeol, Acetato de α -amirina e Acetato de β -amirina, respectivamente.	81
Figura 43: Espectro de RMN de ^1H (300,13 MHz, CDCl_3) e de ^{13}C (75,47 MHz, CDCl_3) dos compostos 6, 7 e 8, obtidos de <i>M. petraea</i>	82

Figura 44: Espectro de RMN de ^1H (300,13 MHz, CDCl_3) e de ^{13}C (75,47 MHz, CDCl_3) dos compostos 6, 7 e 8, obtidos de <i>M. velame</i> .	83
Figura 45: Estrutura química dos compostos 9 e 10: ácido 3-O-acetil-oleanólico e ácido 3-O-acetil-ursólico.	85
Figura 46: Espectro de RMN de ^1H (300,13 MHz, CDCl_3) e de ^{13}C (75,47 MHz, CDCl_3) dos compostos 9 e 10, obtidos de <i>M. petraea</i> .	86
Figura 47: Compostos obtidos de <i>M. petraea</i> : retirada do artigo de De Assis Junior <i>et al.</i> , 2013.	88
Figura 48 – Fragmentações mais comuns observadas no experimento de Massas para os compostos da classe dos triterpenos.	90
Figura 49 – Proposta de fragmentação observada para os compostos derivados de álcool graxo.	91
Figura 50 – Fragmentação observada para os compostos derivados da rota de biossíntese $\text{C}_6\text{-C}_3$.	92
Figura 51: Cladograma de Agrawal. <i>et al.</i> , (2011), onde foi realizada a adição de distribuição de ocorrência de triterpenos e pregnanos em gêneros de Apocynaceae. Colorações, vermelha e preta caracterizam alcaloides e cardenolideos, respectivamente (original), coloração azul e amarelo inserido demonstram a ocorrência de pregnanos e triterpenos, respectivamente.	109
Figura 52: a. Densidade de distribuição total de espécies dos gêneros da família Apocynaceae que apresentaram algum relato de ocorrência de compostos do tipo pregnano, mapas retirados do banco de dados <i>tropicos.org</i> e realizado a sobreposição. Distribuição de espécimes de gêneros da família Apocynaceae que apresentaram relatos da literatura da obtenção de compostos do tipo pregnano (Tabela 34), mapa retirado do banco de dados <i>tropicos.org</i> e informações de distribuição por pontos inseridos pelo autor.	112
Figura 53: a. Densidade de distribuição total de espécies dos gêneros da família Apocynaceae que apresentaram algum relato de ocorrência de compostos do tipo triterpênicos, mapa retirado do banco de dados <i>tropicos.org</i> e realizado a sobreposição. b. Distribuição de espécimes de gêneros da família Apocynaceae que apresentaram relatos na literatura da obtenção de compostos do tipo triterpenos (Anexo 2, Tabela 35), mapa retirado do banco de dados <i>tropicos.org</i> e informações de distribuição por pontos inseridos pelo autor.	114

Lista de tabelas

Tabela 1: Tipos de esqueletos triterpênicos que ocorrem em gêneros da família Apocynaceae - uma reorganização dos dados contidos no artigo do autor El-Kashef <i>et al.</i> , 2015, relacionando os gêneros por tipo de ocorrência de esqueletos carbônicos.....	18
Tabela 2: Distribuição de esqueletos carbônicos precursores de pregnanos em gêneros da família Apocynaceae, organizada pela ocorrência de tipos de esqueleto-base proposto.	22
Tabela 3: Dados de RMN de ^{13}C (75,47 MHz, CDCl_3) do composto 1 (lupeol), 2 (α -amirina) e 3 (β -amirina), sendo os compostos 1a, 2a e 3a – obtidos de <i>M. petraea</i> e 1b, 2b e 3b – obtidos de <i>M. velame</i> , em comparação com os valores retirados das referências (Sobrinho <i>et. al.</i> 1991 e Balestrin <i>et. al.</i> , 2008).....	76
Tabela 4: Dados de RMN ^{13}C (Pyr-d5, 75,47 MHz) dos compostos 4 (ácido arjunólico) e 5 (ácido asiático), sendo os compostos 4a e 5a – obtidos de <i>M. petraea</i> e 4b e 5b – obtidos de <i>M. velame</i> , em comparação com os valores retirados das referências Li <i>et al.</i> , 2009 e Hu <i>et al.</i> , 2011.....	80
Tabela 5: Dados de RMN ^{13}C (75,47 MHz, CDCl_3) do composto 6 (acetato de lupeol), 7 (acetato de α -amirina) e 8 (acetato de β -amirina), sendo os compostos 6a, 7a e 8a – obtidos de <i>M. petraea</i> e 6b, 7b e 8b – obtidos de <i>M. velame</i> , em comparação com os valores retirados das referências Sobrinho <i>et al.</i> , 1991 e Li <i>et al.</i> , 2008.....	84
Tabela 6: Dados de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 9 (Acetato de ácido oleanólico) e do composto 10 (Acetato de ácido ursólico), em comparação com os valores retirados das referências Talapatra <i>et. al.</i> , 1981 e Kwon <i>et. al.</i> , 2008.	87
Tabela 7 – Dados de Massas obtidos para o extrato etanólico do espécime de <i>Macrosiphonia petraea</i> (Mp).	93
Tabela 8 - Dados de Massas obtidos para a infusão (extrato aquoso) do espécime de <i>Macrosiphonia petraea</i> (Mp).	94
Tabela 9 - Dados de Massas obtidos para o extrato etanólico do espécime de <i>Macrosiphonia velame</i> (Mv).....	94
Tabela 10 - Dados de Massas obtidos para a infusão (extrato aquoso) do espécime de <i>Macrosiphonia velame</i> (Mv).	94
Tabela 11 - Dados de Massas obtidos para o extrato etanólico do espécime de <i>Macrosiphonia longiflora</i> (Ml).	95
Tabela 12 - Dados de Massas obtidos para a infusão (extrato aquoso) do espécime de <i>Macrosiphonia longiflora</i> (Ml).	95

Tabela 13 - Dados de Massas obtidos para o extrato etanólico da amostra comercializada na cidade de Cuiabá (CBA) (MT).....	95
Tabela 14 - Dados de Massas obtidos para a infusão (extrato aquoso) da amostra comercializada na cidade de Cuiabá (CBA) (MT).	96
Tabela 15 - Dados de Massas obtidos para o extrato etanólico da amostra comercializada na cidade de Rondonópolis (ROO) (MT).....	96
Tabela 16 - Dados de Massas obtidos para a infusão (extrato aquoso) da amostra comercializada na cidade de Rondonópolis (ROO) (MT).	96
Tabela 17 - Dados de Massas obtidos para o extrato etanólico da amostra comercializada na cidade de Campo Grande (CGR) (MS).	97
Tabela 18 - Dados de Massas obtidos para a infusão (extrato aquoso) da amostra comercializada na cidade de Campo Grande (CGR) (MS).....	97
Tabela 19 - Dados de Massas obtidos para o extrato etanólico da amostra comercializada na cidade de Corumbá (CMB) (MS).....	97
Tabela 20 - Dados de Massas obtidos para a infusão (extrato aquoso) da amostra comercializada na cidade de Corumbá (CMB) (MS).	98
Tabela 21 - Dados de Massas obtidos para o extrato etanólico da amostra comercializada na cidade de Dourados (DRS1) (MS).	98
Tabela 22 - Dados de Massas obtidos para a infusão (extrato aquoso) da amostra comercializada na cidade de Dourados (DRS1) (MS).....	98
Tabela 23 - Dados de Massas obtidos para o extrato etanólico da amostra comercializada na cidade de Dourados (DRS2) (MS).	99
Tabela 24 - Dados de Massas obtidos para a infusão (extrato aquoso) da amostra comercializada na cidade de Dourados (DRS2) (MS).....	99
Tabela 25 - Dados de Massas obtidos para o extrato etanólico da amostra comercializada na cidade de Dourados (DRS3) (MS).	99
Tabela 26 - Dados de Massas obtidos para a infusão (extrato aquoso) da amostra comercializada na cidade de Dourados (DRS3) (MS).....	100
Tabela 27 - Dados de Massas obtidos para o extrato etanólico da amostra comercializada na cidade de Dourados (DRS4) (MS).	100
Tabela 28 – Dados de Massas obtidos para a infusão (extrato aquoso) da amostra comercializada na cidade de Dourados (DRS4) (MS).....	100
Tabela 29 - Dados de Massas obtidos para o extrato etanólico da amostra comercializada na cidade de Ponta Porã (PPA) (MS).	101
Tabela 30 - Dados de Massas obtidos para a infusão (extrato aquoso) da amostra comercializada na cidade de Ponta Porã (PPA) (MS).....	101

Tabela 31 - Valores de GI ₅₀ (µg/mL) expressos em $x \pm SD$ das amostras-teste da espécie <i>Macrosiphonia petraea</i> (Apocynaceae).....	102
Tabela 32 - Resumo dos resultados obtidos com os descendentes trans-heterozigótica marcados (MH) de <i>D. melanogaster</i> derivado do padrão (ST) transversal após tratamento crónico com larvas de extracto aquoso (EAq), extracto de etanol (EEtOH), fase metanólica (fMet), hexano (FHEX) e acetato de etilo (AcOH), obtido de <i>Macrossiphonia petraea</i>	105
Tabela 33 - Resumo dos resultados obtidos com os descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) de <i>Drosophila melanogaster</i> derivada da descendência do cruzamento de alta bioativação (HB) após o tratamento crônico de larvas com extrato aquoso (EAq), extrato de etanol (EEtOH), fase metanólica (fMet), hexano (FHEX) e acetato de etilo (AcOH), obtido de <i>Macrossiphonia petraea</i>	107
Tabela 34 - Distribuição de espécimes estudados que apresentam os compostos da classe dos pregnanos.....	111
Tabela 35 - Distribuição de espécimes estudados que apresentam os compostos da classe triterpenos.....	113

Lista de Abreviações, Códigos e Siglas

CCDA – Cromatografia em camada delgada analítica

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

TMS – Tetrametilsilano

TSP – Sal de sódio do ácido 3-trimetilsilil propionico

CDCl_3 – Clorofórmio deuterado

Pyr- d_5 – Piridina deuterada

MeOH – Metanol

HEX – Hexano

DCM – Diclorometano

AcOEt – Acetato de Etila

PCA – *Principal Component Analysis* (Análise de componentes principais)

MCF7 (ATCC – HTB-22, células de carcinoma de mama)

786 (ATCC – CRL-1932, células de carcinoma de rim)

PC-3 (ATCC CRL 1435, células de carcinoma de próstata)

NCI/ADR-RES (células de adenocarcinoma de ovário resistente)

NIH/3T3 (ATCC–CRL-1658, células de fibroblasto murino)

GI_{50} – inibição de 50% do crescimento celular.

SRB – sulforrodamina B

DMSO – Dimetilsulfóxido

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

MS – Espectrometria de Massas

Resumo

As espécies *Macrosiphonia velame* e *Macrosiphonia petraea* (Apocynaceae), conhecidas popularmente como Velame branco e Velame, respectivamente, são utilizadas medicinalmente na cultura popular dos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, sendo aferidas a infusão de suas raízes diversas propriedades medicinais, com destaque à ação anti-inflamatória. No presente trabalho, foram realizados os estudos químicos dos extratos etanólicos das raízes de *M. petraea* e *M. velame*, esta última sendo quimicamente investigada pela primeira vez. Os fracionamentos cromatográficos destes materiais proporcionaram a identificação de triterpenoides de ambas as espécies, os quais possuem comprovada atividade anti-inflamatória, podendo-se sustentar, assim, as propriedades medicinais atribuídas pela população. Foram, ainda, investigados os potenciais citotóxicos e mutagênicos para os extratos e fases da espécie *M. petraea*, verificando-se potente ação citotóxica sobre a células não neoplásicas (NIH/3T3) e potencial ação genotóxica sobre as moscas de fruta *Drosophila melanogaster*. Ademais, foi realizado um estudo comparativo entre os perfis químicos das infusões e extratos etanólicos das espécies *M. petraea*, *M. velame* e *M. longiflora* e de amostras comercializadas sob os nomes Velame e Velame branco em seis cidades dos estados de Mato Grosso (MT) e Mato Grosso do Sul (MS) por meio de RMN de ^1H e análise multivariada (PCA). Atribuiu-se com esta análise a similaridade entre as amostras comercializadas no estado de Mato Grosso e as espécies *M. velame* e *M. longiflora*, enquanto as amostras comercializadas no estado de Mato Grosso do Sul não apresentaram boa correlação com as espécies coletadas, o que indicou que estas não se tratavam de fontes botânicas de *M. velame*, *M. petraea* e/ou *M. longiflora*. Por fim, um estudo de quimiosistemática para a família Apocynaceae baseado na ocorrência dos metabólitos triterpenos e pregnanos, revelou que os triterpenos ocorrem desde os gêneros mais primitivos dentro desta família, havendo, entretanto, a ocorrência de pregnanos em espécies mais recentes de Apocynaceae.

Palavras-Chave: *Macrosiphonia*, Análise Multivariada, Quimiosistemática

Abstract

Macrosiphonia velame and *Macrosiphonia petraea* (Apocynaceae), known popularly as “Velame branco” and “Velame”, respectively, are species used medicinally in traditional culture of Mato Grosso and Mato Grosso do Sul states, being attributed to their roots tea many medicinal properties, with emphasis to the anti-inflammatory effect of these plants. In this study, the chemical studies of ethanolic extracts from the roots of *M. petraea* and *M. velame* were carried out, the latter specie being chemically investigated for the first time; the chromatographic procedure of these materials promoted the isolation of triterpenoids from both species, which possess anti-inflammatory activity and can be responsible, therefore, for this medicinal action attributed for *M. petraea* and *M. velame* by population. We also investigated the cytotoxic potential of *M. petraea* to human carcinogenic cell lines and its mutagenic effect, being verified a potent cytotoxic action against non-neoplastic cells (NIH/3T3), as well a genotoxic effect by the roots of this plant. Moreover, a comparison between the chemical profiles obtained by ¹H NMR data of infusion and ethanolic extracts of *M. petraea*, *M. velame* and *M. longiflora* specimens and samples commercialized under the names of Velame and Velame branco in six cities from Mato Grosso (MT) and Mato Grosso do Sul (MS) states was taken using multivariate analysis (PCA); this analysis assigned similarity between samples of *M. velame* and *M. longiflora*, while samples bought in MS state did not exhibited good correlation with the collected specimens, demonstrating not come from botanical sources *M. velame*, *M. petraea* and/or *M. longiflora*. Finally, a chemosystematics study for Apocynaceae family based on triterpenes and pregnane metabolites demonstrated that the first occur since the most primitive genera, the occurrence of pregnanes, however, being detected in recent Apocynaceae species.

Keywords: *Macrosiphonia*, Multivariate Analysis, Chemosystematics.

Introdução

A utilização de plantas como material medicinal por culturas passadas sempre despertou no homem a curiosidade sobre a composição destes organismos. A descoberta de substâncias presentes em plantas é bastante antiga, como consta nos relatos de isolamento da morfina por Setürner (1817), utilizada como analgésico e oriunda da “papoula dormideira” (*Papaver somniferum*), e da obtenção de quinina, por Peletier e Caventou (1818-1821), obtida da *Cinchona* sendo utilizada contra malária (Geissmam, *et al.*, 1969, Phillipson, 2001). Esses estudos contribuíram para a obtenção de compostos com atividade biológica, como os mencionados acima, empregados para fins medicinais ou utilizados como modelos para a síntese de novos fármacos (Cechinel Filho, 1998; Newman, 2000).

Existem, aproximadamente, no planeta 450.000 espécies de plantas, mas apenas cerca de 20% das espécies vegetais conhecidas já tiveram algum estudo relacionada, seja, químico, farmacológico, e/ou morfológico, e alguns destes apresentando ainda pouca relevância relacionada às produções científicas a respeito da constituição química e/ou ação farmacologia presentes (Hostettmann *et al.*, 2003 e Hamburger *et al.*, 1991). O Brasil destaca-se em relação aos estudos sobre plantas por apresentar a maior biodiversidade de espécies vegetais do planeta, apresentando uma ampla variedade de plantas medicinais utilizadas pela população, sendo que cada região do país apresenta espécies distintas administradas de formas diferentes, de acordo com cada cultura (Guarim-Neto & Morais, 2003).

O bioma Cerrado entra neste contexto como sendo o ecossistema com a maior biodiversidade de espécies vegetais, tendo aproximadamente 96% de sua totalidade inserida no território brasileiro, a qual abrange cerca de 6670 espécies, distribuídas em 170 famílias e 1140 gêneros. Entretanto, pela exploração extrativista desordenada, pelo desmatamento, bem como queimadas, muitas espécies vegetais estão correndo risco de chegar à extinção antes mesmo de terem algum estudo relacionado a elas (Klink, 2005).

A população brasileira por muitas vezes busca como primeiro recurso para tratamentos medicinais os produtos de origem natural, especialmente as plantas com históricos medicinais. Apesar disso, a maioria das plantas utilizadas na medicina popular brasileira tem pouco ou nenhum estudo científico a elas relacionado, sejam os estudos sobre sua composição química ou os que se referem à investigação farmacológica. Estas plantas, mesmo sendo utilizadas na medicina popular há muito tempo, podem apresentar toxicidade ou alguma reação sinérgica (quando utilizado com outros fármacos), o que oferece risco à população (Veiga *et al.*, 2005).

Neste panorama, enquadra-se a suma importância dos estudos de etnofarmacologia, que buscam a unificação dos saberes e utilização de plantas nas culturas antigas, dos estudos fitoquímicos, que promovem o isolamento e caracterização dos compostos de origem vegetal, e da farmacologia, que estuda os efeitos biológicos que esses constituintes químicos exibem. A união dessas linhas de pesquisas da Ciência contribui para a descoberta de compostos que possam estar relacionados alguma atividade biológica e, também assegura a eficácia medicinal das espécies utilizadas na medicina popular.

No presente trabalho foram realizados os estudos químicos de espécies de *Macrosiphonia petraea* (Velame) e *Macrosiphonia velame* (Velame branco) pertencentes à família Apocynaceae, que são comercializadas e utilizadas medicinalmente na cultura Sul-mato-grossense e Mato-grossense, com principal indicação para o tratamento de inflamações. Ademais, foi realizada uma comparação por análise de perfil químico entre três espécies do gênero *Macrosiphonia* (*M. petraea*, *M. velame* e *M. longiflora*) e amostras comercializadas com os nomes populares de Velame e Velame branco, atribuídos de forma geral a estas espécies. Um estudo de quimiosistemática para a família Apocynaceae, baseado na ocorrência dos compostos do tipo triterpenos e pregnanos, foi também realizado. Além disso, efetuou-se a avaliação das atividades tóxica/citotóxica (frente à *Artemia salina* e linhagens de células carcinogênicas humanas MCF-7 (ATCC–HTB-22, adenocarcinoma de mama), PC-3 (ATCC-CRL-1435, adenocarcinoma de próstata), 786-0 (ATCC–CRL-1932, adenocarcinoma de rim), HT-29 (ATCC–HTB-38 adenocarcinoma de cólon), UACC-62 (melanoma humano), NCI/ADR-RES (adenocarcinoma de ovário resistente) e não neoplásicas - NIH/3T3 (ATCC–CRL-1658, fibroblasto murino)) e da ação genotóxica, frente a *Drosophila melanogaster*, pela espécie *M. petraea*.

1 Revisão Bibliográfica

1.1 Família Apocynaceae

Por apresentar no Brasil cerca de 850 espécies com aproximadamente 90 gêneros e devido ao seu grande potencial medicinal, a família Apocynaceae torna-se uma importante fonte de material vegetal para estudos (Souza e Lorenzi, 2005). Destacam-se, como compostos já obtidos, os alcaloides vincristina e vimblastina (*Catharanthus*), com propriedades antitumorais; reserpina, serpentina e serpentinina (*Rauwolfia*), com atividade contra hipertensão e arritmia cardíaca, e os glicosídeos cardiotônicos estrofantinidina e cimarina (*Strophantus*) (Figura 1) que detêm também ação reguladora do ritmo cardíaco (Di Stasi e Hiruma-Lima, 2002).

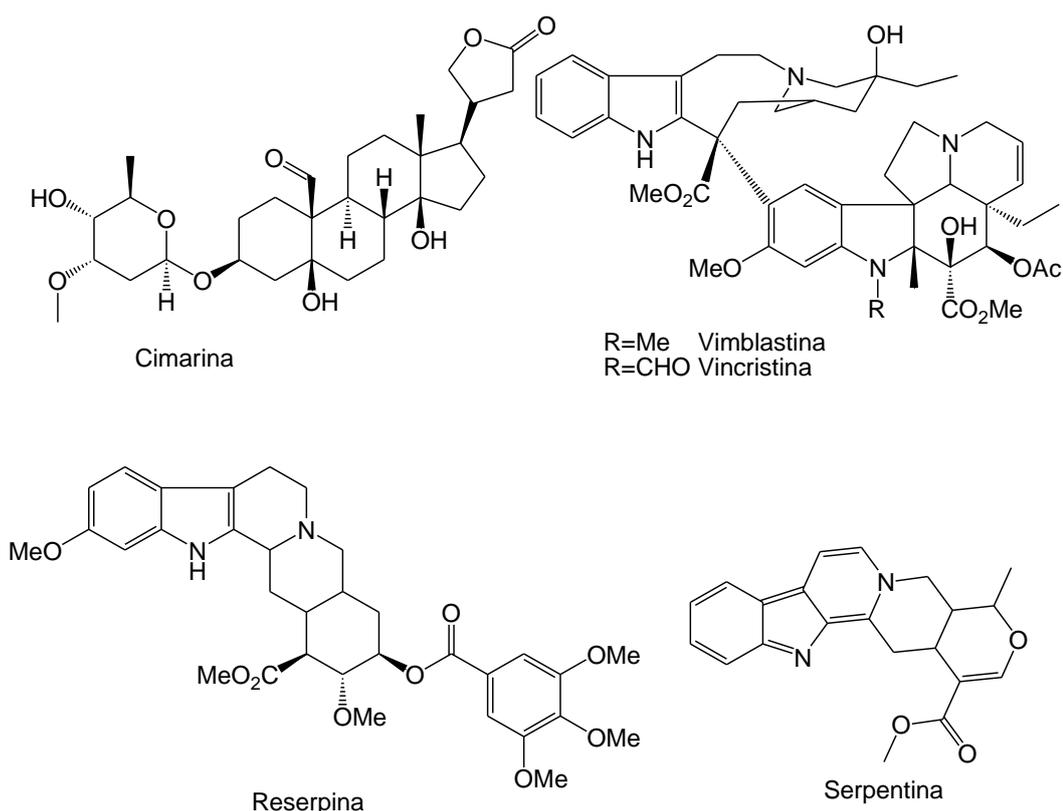


Figura 1 – Representação de alguns compostos obtidos de espécies da família Apocynaceae.

Ademais, outros gêneros desta família apresentam destaque na busca de compostos bioativos destacando-se na literatura científica os gêneros *Plumeria*, *Aspidosperma* e *Mandevilla* (Di Stasi; Hiruma-Lima, 2002).

1.2 Ocorrência de Triterpenos e Pregnanos para a Família Apocynaceae

As pesquisas relacionadas à obtenção dos constituintes químicos presentes em espécies da família Apocynaceae sempre conduz à busca de suas famosas classes de metabólitos: sua inigualável variedade de alcaloides, seus diversos esqueletos de iridoides e seus extraordinários cardenolídeos. Ademais, duas outras classes de metabólitos são deveras importantes: os esteroides de esqueletos pregnano e os compostos do tipo triterpenos; ambos não só contribuem para aumentar a diversidade de classes de compostos descritas em Apocynaceae, como também fornecem dados importantes para gerar uma análise sobre a quimiosistemática dessa grande família.

Os metabólitos da classe dos triterpenos são encontrados em uma grande variedade de famílias botânicas, apresentando boa variedade de tipos de esqueletos carbônicos, apresentam em sua estrutura 30 átomos de carbono, formando estruturas com 5 ou 4 anéis de 6 e/ou 5 membros. A principal característica que auxilia no reconhecimento desta classe de metabólitos por RMN é: os deslocamentos químicos característicos de seus carbonos sp^2 os quais apresentam valores típicos e bem descritos na literatura, para cada tipo de esqueleto carbônico (Dewick, 2009 e Mahato e Kundo, 1994).

Há diversos artigos de revisão na literatura que abordam a diversidade estrutural e a presença desses metabólitos em espécies vegetais. Para a família Apocynaceae, um artigo recente de revisão (El-Kashef *et al.*, 2015) apresenta um levantamento bibliográfico entre os anos 1955-2013 para a ocorrência e os tipos de compostos triterpênicos obtidos em gêneros dessa família. Apesar de haver uma diversidade enorme de esqueletos carbônicos, a distribuição de triterpenos na família Apocynaceae ocorre por cinco tipos de esqueletos (Tabela 1); Três pentacíclicos: Lupano, Oleanano e Ursano, com deslocamento químico de seus carbonos sp^2 característico a $\delta 109,0$ (CH_2) e $\delta 151,0$ (C), $\delta 125,0$ (CH) e $\delta 139,0$ (C) e $\delta 121,0$ (CH) e $\delta 145,0$ (C), respectivamente (Mahato e Kundo 1994), e dois tetracíclicos: Dammarano e Cicloartano, com deslocamento químico de seus carbonos sp^2 em $\delta 125,0$ (CH) e $\delta 131,0$ (C) (Asakawa *et al.*, 1976) e $\delta 125,0$ (CH) e $\delta 139,0$ (C) (Lago e Roque, 2009), respectivamente (Figura 2), e ainda para os compostos de esqueleto Cicloartano, os sinais de deslocamento químico de RMN de 1H para os H-25 em δ (ppm) 0,37 e 0,55 são característicos.

Tabela 1: Tipos de esqueletos triterpênicos que ocorrem em gêneros da família Apocynaceae - uma reorganização dos dados contidos no artigo do autor El-Kashef *et al.*, 2015, relacionando os gêneros por tipo de ocorrência de esqueletos carbônicos.

Gêneros	Tipo de esqueleto triterpênico	Referências
<i>Adenium; Caralluma; Ceropogia; Finlaysonia; Laseguea; Leptadenia</i>	Lupano	El-Kashef <i>et al.</i> , 2015
<i>Amalocalyx; Amsonia; Apocynum; Catharanthus; Cerbera; Melodinus; Trachelospermum; Vinca</i>	Oleanano	
<i>Dischidia; Ecdysanthera; Echites; Funtumia; Pergularia; Pleiocarpa; Rauvolfia; Rhazya</i>	Ursano	
<i>Beaumontia; Marsdenia</i>	Ursano e Oleanano	
<i>Cynanchum; Dipladenia; Holarrhena</i>	Ursano e Lupano	
<i>Asclepias; Gymnema</i>	Lupano e Oleanano	
<i>Alstonia; Alyxia; Aspidosperma; Calotropis; Carissa; Himatanthus; Ichnocarpus; Mandevilla; Macrosiphonia; Mucoa; Parahancornia; Peltastes; Periploca; Tabernaemontana; Thevetia</i>	Lupano, Oleanano e Ursano	
<i>Nerium</i>	Lupano, Oleanano, Ursano e Dammarano	
<i>Plumeria</i>	Lupano, Oleanano, Ursano, Dammarano e Cycloartano	
<i>Wrightia</i>	Oleanano, Ursano, Dammarano e Cicloartano	

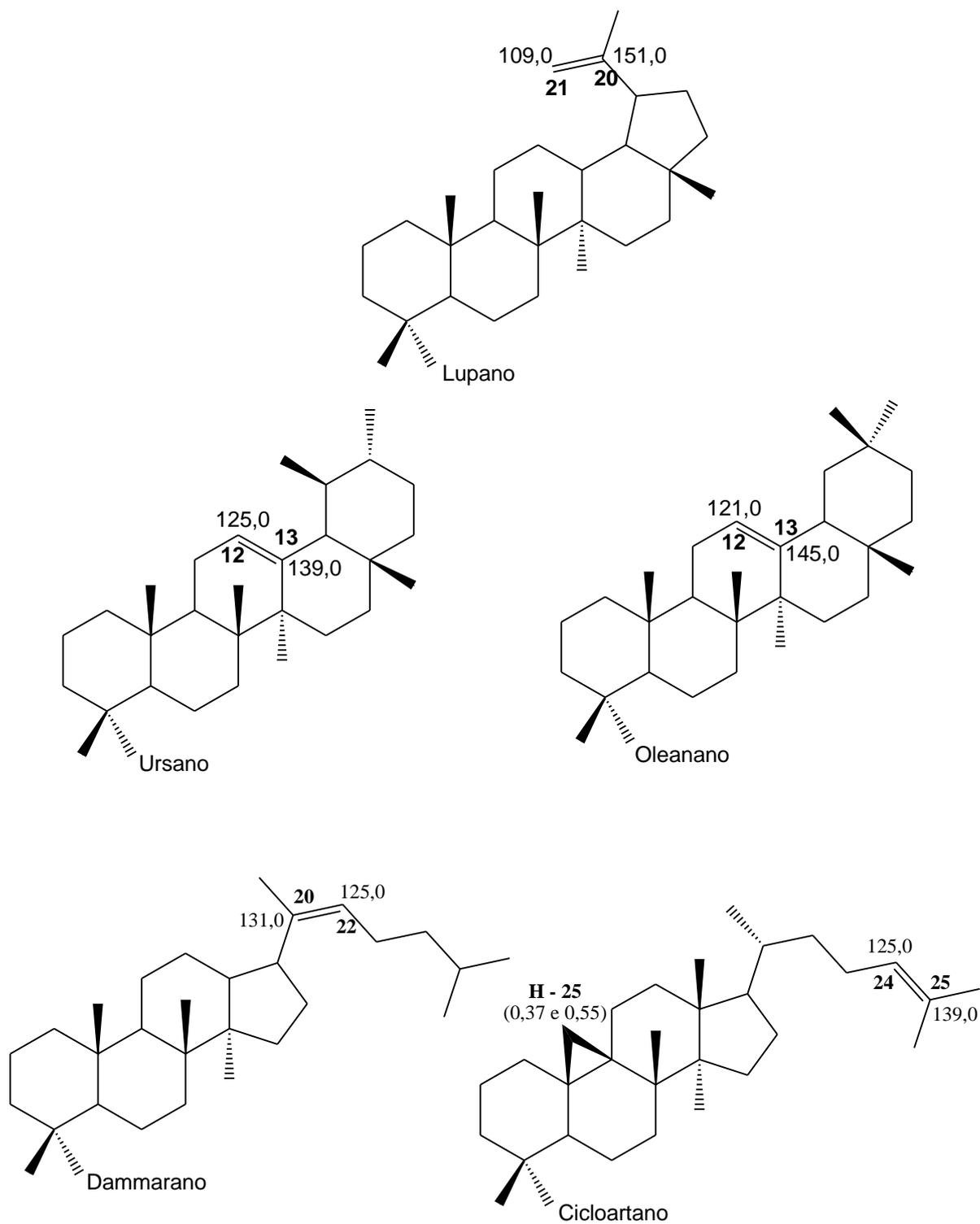


Figura 2: Esqueleto carbônico dos triterpenos ocorrentes na família Apocynaceae.

Outra classe de metabólitos, que derivam da rota de biossíntese dos triterpenos e esteroides, é a dos compostos da classe dos pregnanos, que apresentam esqueleto carbônico com 21 membros, distribuídos em 4 anéis (anéis A, B e C com seis membros e anel D de cinco membros) apresentando as seguintes configurações para as junções dos seus anéis: A/B (*trans* ou *cis*), B/C (*trans*) e C/D (*trans* ou *cis*) (Figura 3).

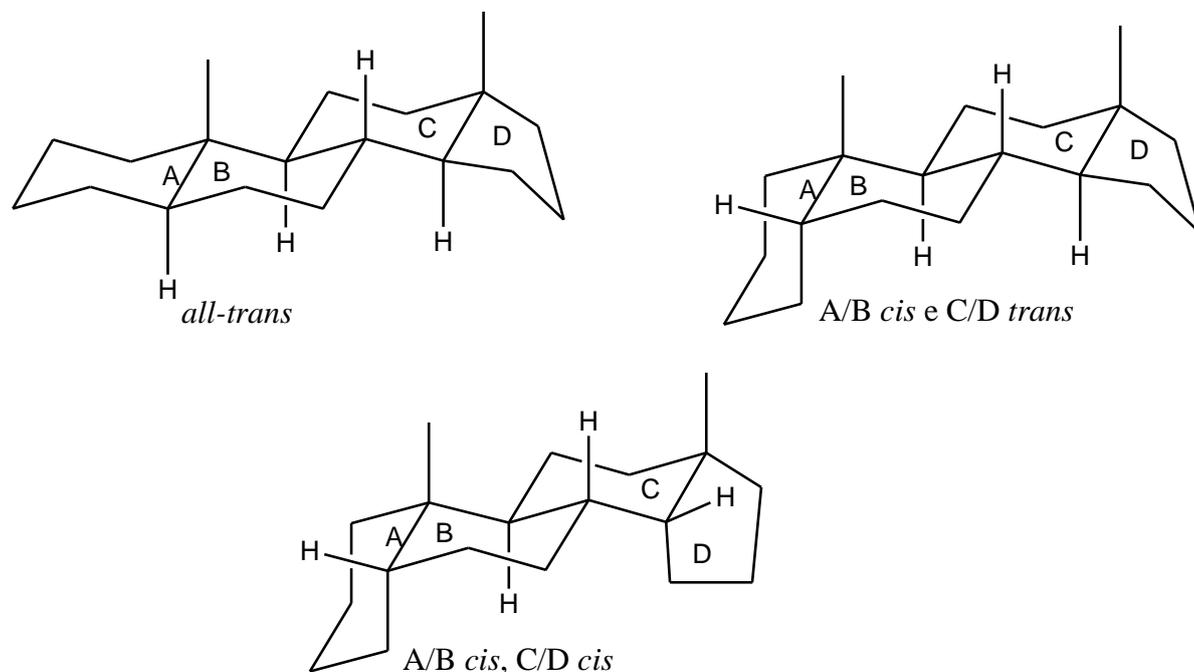


Figura 3: Configuração das junções dos anéis A, B, C e D para os compostos do tipo pregnano. Retirada e adaptada de Dewick (2009).

Os compostos do tipo pregnano podem apresentar diversificação estrutural pela inserção de grupos substituintes, principalmente nas posições C-3 (α e β), C-5 (α), C-6 (β), C-7 (α), C-8 (β), C-11 (α), C-12 (α e β), C-14 (β), C-15 (α), C-16 (α) e C-17 (α e β), sendo as estereoquímicas listadas as mais comumente encontradas neste tipo de composto (Figura 4a). Assim como nos esqueletos carbônicos dos triterpenos e dos esteroides, os compostos do tipo pregnanos apresentam duplas ligações características com carbonos sp^2 mais ocorrentes nas posições C-1, C-4, C-5, C-6, C-11 e C-16 (Figura 4b) (Deepak, 1989).

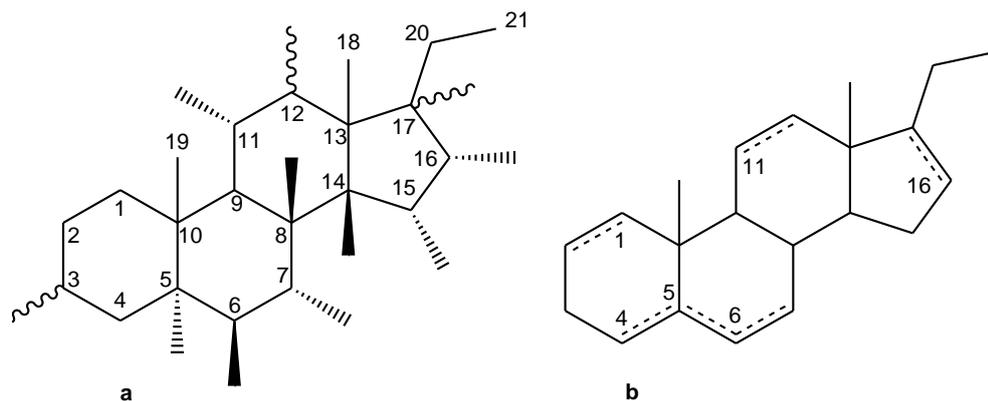


Figura 4: Estereoquímica das posições mais comumente substituídas nos esqueletos carbônicos do tipo pregnano (**4a**) e localização de insaturações ocorridas nos esqueletos carbônicos do tipo pregnano (**4b**).

Os compostos do tipo pregnano são também descritos em vários trabalhos com espécies vegetais, e a uma boa variedade no tipo de esqueletos carbônicos é relatada, apesar de ser observado em várias famílias, como demonstrado no artigo do (Gottlieb *et al.*, 2002). Poucos são os artigos de revisão sobre esta classe e nenhum relato destes compostos foi descrito especificamente para a família Apocynaceae.

A realização de levantamento bibliográfico permite a atribuição das substâncias-base responsáveis pela formação dos compostos do tipo pregnanos em gêneros da família Apocynaceae (Figura 5, Tabela 2). Foi observada a ocorrência de três tipos químicos básicos, que apresentam estrutura que derivam da progesterona, a qual apresenta um carbono sp^2 na posição 4 e um grupo cetona no carbono 3, da pregnenolona, que apresenta insaturação no carbono 5 e grupo hidroxila na posição 3, e da 5α -pregnan-20-ona, que contém átomos de carbono saturados e grupo hidroxila na posição 3.

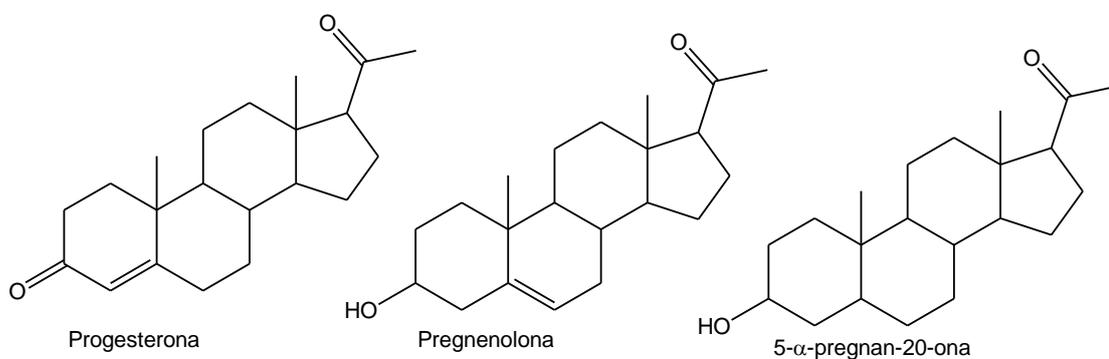


Figura 5: Tipos químicos de precursores dos pregnanos relatados na família Apocynaceae – propostas sugeridas de tipos de esqueleto.

Tabela 2: Distribuição de esqueletos carbônicos precursores de pregnanos em gêneros da família Apocynaceae, organizada pela ocorrência de tipos de esqueleto-base proposto.

Gêneros	Estrutura-base	Referências
<i>Adenium</i>	Progesterona	Nakamura <i>et al.</i> , (2000)
<i>Apocynum</i>		Abe <i>et al.</i> , (1987) Abe <i>et al.</i> , (1994)
<i>Holarrhena</i>		Tscheche <i>et al.</i> , (1964)
<i>Macrosiphonia</i>		De Assis Jr <i>et al.</i> , (2013)
<i>Asclepias</i>		Warashima e Noro (2000) Abe <i>et al.</i> , (2000)
<i>Calotropis</i>		Ibrahim <i>et al.</i> , (2015)
<i>Ceropegia</i>		García <i>et al.</i> , (2011)
<i>Cryptolepis</i>		Paulo e Houghton (2003)
<i>Epigynum</i>		Cao <i>et al.</i> , (2005)
<i>Hoya</i>		Abe <i>et al.</i> , (1999)
<i>Leptadenia</i>		Srivastav <i>et al.</i> , (1994) Cioffi <i>et al.</i> , (2006)
<i>Mandevilla</i>		Yunes <i>et al.</i> , (1993) Bento <i>et al.</i> , (1996)
<i>Marsdenia</i>		Abe <i>et al.</i> , (1999). McGarvey <i>et al.</i> , (2012), Deng <i>et al.</i> , (2005), Gupta <i>et al.</i> , (2003)
<i>Pachypodium</i>		El-Kashef <i>et al.</i> , (2014)
<i>Pergularia</i>	Khare <i>et al.</i> , (1986)	
<i>Periploca</i>	Shi <i>et al.</i> , (2014), Wang <i>et al.</i> , (2011), Siciliano <i>et al.</i> , (2005), Sethi <i>et al.</i> , (1988), Deepak <i>et al.</i> , (1985)	
<i>Stapelia</i>	El Sayed <i>et al.</i> , (1995)	
<i>Trachelospermum</i>	Abe e Yamauchi (1980)	
<i>Vincetoxicum</i>	Lavault <i>et al.</i> , (1999)	
<i>Nerium</i>	Pregnenolona	Abe e Yamauchi (1976), Abee Yamauchi (1992)
<i>Gymnena</i>	5 α -pregnan-20-ona	Yoshikawa <i>et al.</i> , (1999), Yoshikawa <i>et al.</i> , (1998), Srisurichan (2014)
<i>Wrightia</i>	5 α -pregnan-20-ona	Kawamoto <i>et al.</i> , (2003)
<i>Telosma</i>		Huan <i>et al.</i> (2001)

1.3 Gênero *Macrosiphonia*

O gênero *Macrosiphonia* foi inserido na família Apocynaceae após uma subdivisão do gênero *Mandevilla* (Simões *et al.*, 2007). Com isso, muitas sinonímias das espécies de *Macrosiphonia* estão associadas à nomenclatura do gênero *Mandevilla*; um exemplo é a espécie *Macrosiphonia velame*, referida em alguns trabalhos com a sinonímia de *Mandevilla velame* (GUARIM-Neto & Moraes, 2003). As espécies do gênero *Macrosiphonia* encontram-se distribuídas do México até a Argentina (Simões *et al.*, 2004) e no Brasil encontram-se cinco espécies, *M. petraea*, *M. velame*, *M. longiflora*, *M. martii* e *M. virescens*, distribuídas no Sudeste e Centro-Oeste (Barban, 1985).

1.3.1 *Macrosiphonia petraea*

Macrosiphonia petraea, conhecida popularmente como Velame, (Figura 6), pertencente à família Apocynaceae, é nativa do cerrado e ocorre nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil nos Estados de Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná e Mato Grosso do Sul (Barban, 1985). No Estado de Mato Grosso do Sul, mateiros/raizeiros indicam a ingestão da Infusão da raiz de *M. petraea* para o combate de inflamações (De Assis Jr. *et al.*, 2013). O estudo químico realizado anteriormente com suas raízes dessa espécie resultou na identificação 17 compostos (triterpenos, pregnanos, lignanas e álcool graxo) (De Assis Jr. *et al.*, 2013), alguns com atividade anti-inflamatória e outros com atividade citotóxica mencionada na literatura.



Figura 6: Fonte: o autor. Foto do espécime *M. petraea*.

1.3.2 *Macrosiphonia velame*

M. velame (Figura 7), conhecida popularmente como velame-branco, ocorre no ambiente cerrado e encontra-se distribuída nos estados de Goiás, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, São Paulo, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (Barban, 1985). Trata-se de uma espécie utilizada na medicina tradicional, através da ingestão da infusão de suas raízes, sendo indicada para o tratamento de diversas doenças. Entre as propriedades atribuídas a esta planta, estão as atividades anti-inflamatória, antinociceptiva e antipirética (Ribeiro *et al.*, 2010). Estudos qualitativos das raízes desta espécie demonstraram a ocorrência das classes de compostos pertencentes às classes dos alcaloides, flavonoides e a ausência de cumarinas (Violante *et al.*, 2010); não foram encontrados registros de estudos químicos detalhados desta espécie durante nosso levantamento.



Figura 7: Fonte: o autor. Foto do espécime *M. velame*.

1.3.3 *Marosiphonia longiflora*

M. longiflora (Figura 8), conhecida popularmente como velame, velmae-bronca e velame do campo, tem sua ocorrência no cerrado e sua distribuição ocorre nos estados de Mato grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, e Rio Grande do Sul (Barban, 1985). Na medicina popular do estado de Mato Grosso a inestão do chá de produzidos utilizando-se suas raízes tem indicação para tratamento de inflamações, febre, vitiligo, relaxante muscular, entre outros (Bieski *et al.*, 2012). Estudos de ensaio biológicos demonstraram que os hidroetanólico de *M. longiflora* apresentaram baixo citotoxicidade e potencial atividade anti-inflamatória (Da Silva *et al.*, 2014), porém nenhum estudo químico aprofundado foi realizado com essa espécie.



Figura 8 – Fonte: ASU Vascular Plant Herbarium. Foto do espécime *M. longiflora*.

2 Objetivo

Este trabalho visou o estudo fitoquímico, de atividades biológicas e o estudo de comparação (por análise dos componentes principais (PCA)) entre espécies do gênero *Macrosiphonia* (Apocynaceae) utilizadas na medicina tradicional no estado do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul,

2.1 Objetivos Específicos

a) Realizar o estudo químico dos extratos das raízes de *Macrosiphonia petraea* e *Macrosiphonia velame* por partição líquido-líquido e técnicas cromatográficas;

b) Efetuar o isolamento e a identificação e/ou elucidação estrutural dos metabólitos acumulados pelas referidas plantas.

c) Avaliar o perfil químico dos extratos etanólicos e aquosos de espécimes de *M. petraea*, *M. velame* e *M. longiflora*, bem como de amostras de plantas comercializadas sob os nomes Velame e Velame branco, por meio de RMN e análise multivariada (PCA).

d) Realizar uma abordagem quimiosistemática baseada na ocorrência de compostos do tipo triterpenos e pregnanos na família Apocynaceae.

e) Avaliar os potenciais tóxicos (sobre à *Artemia salina*) e citotóxicos (sobre a linhagens de células carcinogênicas humanas MCF-7, PC-3, 786-0, HT-29, UACC-62, NCI/ADR-RES e não neoplásica NIH/3T3) dos extratos e fases das espécies estudadas.

f) Avaliar os potenciais genotóxicos (sobre o ensaio SMART com *Drosophila melanogaster*) dos extratos e fases das espécies estudadas.

3 Material e Equipamentos

O estudo fitoquímico das raízes dos espécimes de *M. petraea* e *M. velame* foi realizado por meio de técnicas cromatográficas para a obtenção de seus compostos, especificamente, cromatografia em coluna por adsorção e/ou exclusão. Os perfis cromatográficos foram analisados por meio de CCDA (cromatografia em camada delgada analítica).

Para a cromatografia em coluna por adsorção, foram utilizados dois tipos de fases estacionárias: sílica gel 0,060-0,200 mm (70-230 *mesh*), com diâmetro de poro de 6,0 nm, e sílica gel 0,035-0,070 mm (230-400 *mesh*), com diâmetro do poro de 6,0 nm. Para a cromatografia em coluna por exclusão de tamanho, foi utilizada a fase estacionária Sephadex LH-20[®], com diâmetro de partícula de 25 a 100 μm .

As análises em CCDA foram realizadas utilizando-se cromatofolhas de alumínio de 20 cm x 20 cm da Merck[®] contendo como fase estacionária sílica gel 60 GF₂₅₄ e/ou sílica gel 60 F₂₅₄ (200 μm). Como reveladores foram utilizados sulfato de cério IV [Ce(SO₄)₂] – solução a 2% em H₂SO₄, e solução de vanilina sulfúrica – 10% m/v em H₂O/CH₃OH/H₂SO₄ 45:45:10 v/v/v – promovendo-se, para ambos, a visualização das manchas através de aquecimento (chapa de aquecimento).

Para a identificação dos compostos obtidos foram utilizadas as técnicas espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de Hidrogênio (¹H) e Carbono-13 (¹³C) – unidimensionais.

Para as técnicas de identificação/caracterização foram utilizados os espectrômetros:

- de RMN – Bruker, modelo DPX-300, sonda de detecção dual (¹H 300,130 MHz e ¹³C 75,468MHz) para tubos de amostras de 5 mm de diâmetro com sistema de “Lock” de deutério (²H) e, utilizando como referência interna os sinais de ¹H e ¹³C do tetrametilsilano (TMS) para os solventes orgânicos deuterados metanol (CD₃OD), clorofórmio (CDCl₃) e piridina (Pyr-d₅), da marca CIL[®] (Cambridge Isotope Laboratories, Inc) e como referência internada o sal de sódio do ácido 3-trimetilsilil propionico (TSP) para o solvente óxido de deutério (D₂O)

- HPLC/MS-MS – Cromatógrafo UFLC Shimadzu LC-20AD acoplado a detectores DAD e IES-Q-QTOF microTOFIII (Bruker Daltonics), monitorado entre 240-800 nm e operando em modo de ionização negativo (m/z 120-1300). Utilizando gradiente de eluição com água (fase A) e acetonitrila (fase B), ambos com 0,1% de ácido fórmico. Fluxo: 0,3mL/min Temperatura da coluna: 50°C, Coluna Kinetex 2.6 μ , C18, 100A.

Outros Equipamentos:

- Balança analítica: AND HR120 (120g x 0.0001 g);
- Centrífuga: CELM MODELO COMBATE COM TIMER - 3.400 RPM (60Hz) / 2.500 RPM (50Hz), 4 caçapas quádruplas para 16 tubos de 15 ml;
- Ultrassom: UNIQUE MODELO USC-1850 - Frequência US. 25KHz, potência 154 W, volume 5,7 L, gabinete em aço inox, temporizador de 60 min;
- Liofilizador: CHRIST – ALPHA 1-2 LD PLUS – temperatura do condensador -55 °C, bomba de vácuo VACCUBRAND RZ 2,5 com US plug 2.3 / 2.8 m³/h de bombeamento, velocidade máxima a 50/60 Hz, pressão mínima 4,0 x 10⁻⁴ mbar.

4 Metodologia

4.1 Identificação das espécies vegetais

As plantas em estudo, *Macrosiphonia petraea* (Velame), coletada no município de Bonito – MS em março de 2015, *Macrosiphonia velame* (Velame branco) e *Macrosiphonia longiflora* (Velame do campo), coletadas no município de Cuiabá – MT, em junho de 2015. Para todas as espécies foram produzidas exsiccatas, as quais foram analisadas e identificadas pelo Prof. Dr. Arnildo Pott, sendo elas posteriormente depositadas no herbário da CGMS da UFMS sob os números WG 272 (*M. velame*), WG273 (*M. velame*) e WG274 (*M. longiflora*).

4.2 Preparo dos extratos para análise dos componentes principais

Para a realização da análise dos componentes principais dos extratos etanólicos e dos infusões (extratos aquosos), foram utilizadas as raízes dos materiais vegetais coletados e comercializados com o nome popular de Velame ou Velame branco, totalizando 12 amostras: três espécimes coletados (*Macrosiphonia petraea*, *Macrosiphonia velame* e *Macrosiphonia longiflora*), e nove amostras adquiridas comercialmente, 2 do estado de Mato Grosso, obtidas nas cidades de Cuiabá e Rondonópolis, e 7 do estado de Mato Grosso do Sul, provenientes das cidades de Campo Grande (1 amostra), Corumbá (1 amostra), Dourados (4 amostra) e Ponta Porã (1 amostra).

Cada amostra foi preparada em triplicata, utilizando 300,0 mg de material vegetal por amostra. Para o preparo do extrato etanólico, efetuou-se a extração com 5,0 mL de solvente etanol absoluto por 15 minutos sob sonificação em aparelho de ultrassom, seguido por centrifugação por 4 min (3500 rpm), obtendo-se uma recuperação de 4,0 mL do líquido extrator, que, após secagem, deu origem aos extratos. Para o preparo da infusão (extrato aquoso) utilizou-se o mesmo procedimento acima descrito, substituindo-se o solvente orgânico por água quente, na temperatura de fervura, e extração por infusão. Para secagem do material foi utilizado o aparelho liofilizador CHRIST – ALPHA 1-2 LD PLUS, com temperatura de -55 °C e 0,11 mbar de pressão por um período de 24 horas, obtendo assim os extratos.

4.3 Metodologia para análise de componentes principais

Para a obtenção dos dados espectrais, foi utilizada a técnica de espectrometria de RMN de ^1H , transferindo-se para tubos de ressonância de 5,0 mm uma massa de 10,0 mg para cada amostra solubilizadas em 600 μL do solvente clorofórmio deuterado (CDCl_3), para os experimentos com os extratos etanólicos, ou óxido de deutério (D_2O), para os experimentos com as infusões (extratos aquosos); como padrão interno utilizou-se TMS (0,1%) ou TSP (0,1%), respectivamente. Os espectros foram obtidos em equipamento Bruker® (300,13 MHz), com sequência de pulso zg, tempo de aquisição de 9,80 s, números de scans de 128 e tempo de obtenção do experimento de 23,0 min.

Foi utilizado o *software* MestReC® para processamento dos dados espectrométricos e realização do *bucketing* (corte) de 0,02 ppm dos espectros com janelas de 7,0 a 0,5 ppm,

para os extratos etanólicos, e de 8,5 a 0,5 para as infusões (extratos aquosos). Para efetuar as análises estatísticas, utilizou-se o *software* MetaboAnalyst 3.0®.

4.4 Preparo dos extratos para estudo fitoquímico

As raízes das espécies de interesse para o estudo químico foram trituradas por ação mecânica (utilizando um moinho elétrico de quatro facas), e armazenadas separadamente em recipientes à temperatura ambiente, sendo, posteriormente submetidas, a extrações sucessivas com álcool etílico. Esses materiais tiveram sua parte sólida separada por meio de filtrações, sendo os filtrados resultantes concentrados em evaporador rotativo à pressão reduzida. Posteriormente eliminou-se o solvente orgânico até a secagem do material, originaram-se os extratos etanólicos brutos. A Figura 9 apresenta os perfis químicos por espectro de RMN de ^1H dos dois extratos obtidos.

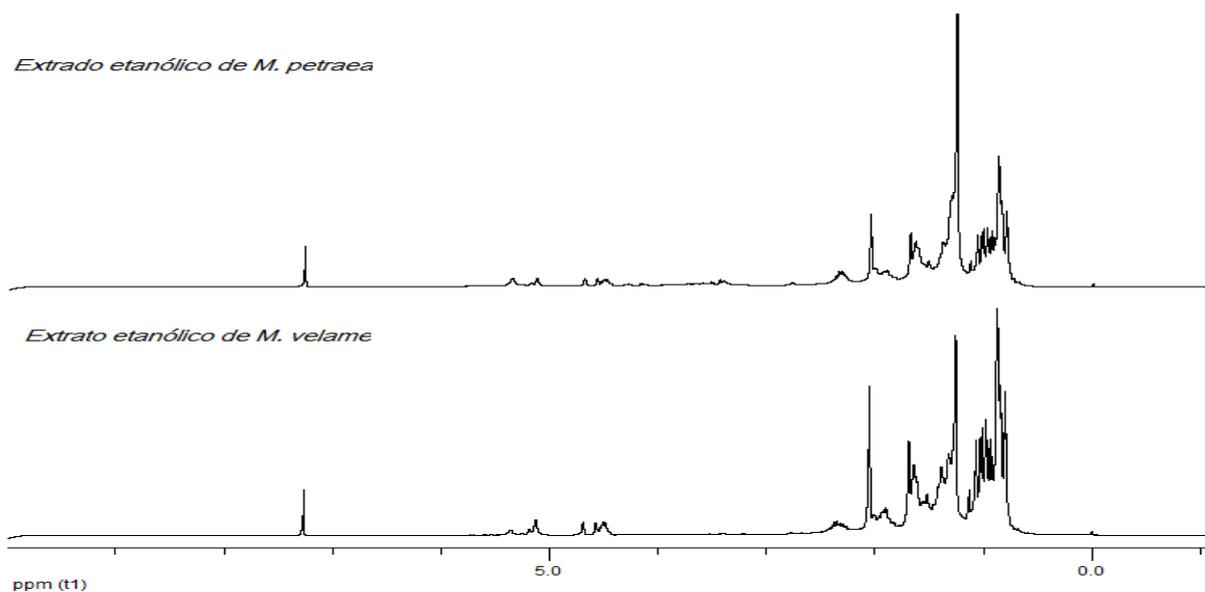


Figura 9: Espectros de RMN de ^1H (300,13 MHz, CDCl_3) para os extratos brutos de *M. petraea* e *M. velame*.

4.5 Fracionamento do extrato bruto

Os extratos brutos secos (30,0 g para *M. velame* e 22,0 g para *M. petraea*) foram suspendidos com solução hidroalcoólica (MeOH:H₂O 9:1), sendo o material que foi solubilizado submetido a partições líquido-líquido, utilizando-se hexano, acetato de etila, sucessivamente, dando origem a três fases: hexânica, acetato de etila e hidrometanólica. Após a eliminação dos solventes, obtiveram-se os respectivos resíduos, os quais foram armazenados em temperatura baixa em refrigeradores.

4.6 Fracionamento cromatográfico da fase hexânica de *M. velame*

A fase hexânica (3,00 g) (fluxograma, Figura 10) foi submetida ao fracionamento cromatográfico em coluna cromatográfica aberta com diâmetro e altura de 3,5 cm e 13,0 cm, respectivamente, empregando sílica gel 0,060-0,200 mm/ 6,0µm de diâmetro de poro como fase estacionária. Como fase móveis foi utilizado misturas dos solventes hexano (HEX), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) em gradiente crescente de polaridade (proporções HEX:DCM 1:1; DCM; DCM:AcOEt 8:2; DCM:AcOEt 1:1; AcOEt; AcOEt:MeOH 1:1). Deste processo, após análise cromatográfica em CCDA, e agrupamento por similaridade de manchas observadas, foram obtidas 15 frações, numeradas de 1 a 15. As frações 2 e 7 foram, posteriormente, selecionadas para estudo mais detalhado, devido aos seus perfis cromatográficos em CCDA.

A fração 2, apresentou-se como um sólido branco (2,50 g), do qual foi identificada por análise dos espectros dos experimentos de RMN de ¹H e de ¹³C como sendo uma mistura dos compostos **6**, **7** e **8**. A fração 7 (300,0 mg), foi submetida a processo cromatográfico em coluna utilizando como fase estacionária Sephadex[®] LH 20, (altura de 7,0 cm e diâmetro de 1,5 cm) e como eluente o solvente clorofórmio em método isocrático. Desse fracionamento, obtiveram-se 3 novas frações, as quais foram, então, analisadas por cromatografia em camada delgada (CCDA). A fração 2 (150,0 mg), foi tratada por método cromatográfico utilizando-se coluna de sílica gel 230-400 *mesh* (altura de 12,0 cm e diâmetro de 2,0 cm) eluída com os solventes hexano, diclorometano e metanol, em gradiente crescente de polaridade (proporções HEX:DCM 1:1; DCM; DCM:MeOH 8:2). A análise em CCDA das 11 subfrações obtidas por este processo, em conjunto com a avaliação dos perfis dos experimentos de RMN de ¹H e ¹³C destas amostras, permitiu a identificação dos compostos **1**, **2** e **3** na subfração 1.

4.7 Fracionamento da fase acetato de etila de *M. velame*

A fase acetato de etila (AcOEt) (3,00g) (fluxograma, Figura 10) foi submetida a processo cromatográfico em coluna aberta com diâmetro e altura de 3,5 cm e 12,0 cm, respectivamente, preenchida com sílica gel (0,060-0,200 mm), utilizando-se como sistema de eluente acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) em gradiente de polaridade crescente (AcOEt; AcOEt:MeOH 9:1, 8:2, 6:4, 4:6, 2:8; e MeOH 100%). Após avaliação do perfil cromatográfico por cromatografia em camada delgada (CCDA), as amostras foram reunidas, originando-se assim 22 frações. Devido ao perfil cromatográfico apresentado em CCDA, a fração 9 foi selecionada para ser estudada.

A fração 9 (400,0mg) foi submetida à separação por cromatografia em coluna utilizando como fase estacionária o polímero Sephadex[®] LH-20 (altura de 28,0 cm e diâmetro de 1,5 cm), empregando-se como fase móvel os solventes clorofórmio e metanol (CHCl₃:MeOH 1:1) de forma isocrática. Pela análise em cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e agrupamentos por semelhanças, obteve-se 15 subfrações. Na subfração 5, a partir da análise dos experimentos de RMN ¹H e ¹³C, foram identificados os compostos **4 e 5**.

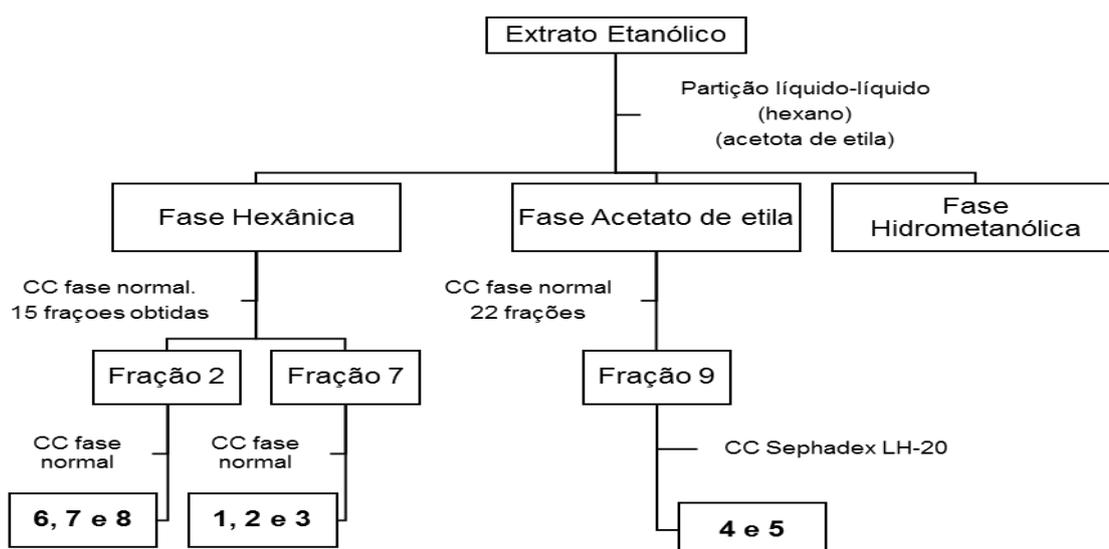


Figura 10 – Fluxograma para a separação e obtenção dos compostos oriundos da espécie *M. velame*.

4.8 Fracionamento cromatográfico da fase hexânica de *M. petraea*

A fase hexânica (3,00 g) (fluxograma, Figura 11) foi submetida a processo cromatográfico utilizando coluna aberta com diâmetro e altura de 3,5 cm e 12,0 cm, respectivamente, empregando sílica gel 70-230 *mesh*/ 6,0 µm de diâmetro de poro, utilizando-se como eluente os solventes hexano (HEX), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) em gradiente crescente de polaridade (proporções de HEX 100%; HEX:AcOEt 95:05, 9:1, 8:2, 6:4 e 4:6; AcOEt; AcOEt:MeOH 1:1). Deste processo e por análise em cromatografia planar, foram obtidas 14 frações, numeradas de 1 a 14. As frações 6 e 9 foram selecionadas para serem estudadas devido aos seus perfis cromatográficos observados em CCDA.

A fração 6 (400,0 mg) foi submetida a processo cromatográfico em coluna utilizando como fase estacionária sílica gel 200-400 *mesh* (altura de 12,0 cm e diâmetro de 1,5 cm) e fase móvel com os solventes hexano e acetato de etila em método de gradiente crescente de polaridade; a análise em cromatografia em camada delgada (CCDA) permitiu, por agrupamento por similaridades das manchas observadas, obter 9 subfrações deste processo. A subfração 2 (135,0 mg), oriunda do fracionamento acima descrito, foi submetida a processo cromatográfico em coluna (altura de 12,0 cm e diâmetro de 1,5 cm), constituída de sílica gel 200-400 *mesh*, sendo utilizados os solventes hexano e diclorometano em gradiente crescente de polaridade (proporções HEX:DCM 8:2, 6:4, 1:1 e DCM) como fase móvel. A avaliação do perfil cromatográfico em CCDA permitiu o agrupamento em 13 frações, resultantes desta separação, identificando-se na fração 13, após sua análise por experimento de RMN de ^1H e ^{13}C , os compostos **1**, **2** e **3**.

A fração 9 (100,0 mg), originária do fracionamento inicial da fase hexânica supracitada, foi submetida a processo cromatográfico em coluna utilizando como fase estacionária Sephadex® LH 20 (altura de 18,0 cm e diâmetro de 1,5 cm), tendo-se como fase móvel o solvente clorofórmio em método isocrático. Deste processo, originaram-se 8 frações, após a análise por CCDA. Da fração 2 foi submetida a experimentos de RMN ^1H e ^{13}C e identificou-se os compostos **6**, **7** e **8** como seus constituintes.

4.9 Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila de *M. petraea*

A fase Acetato de etila (AcOEt) (2,50g) (Fluxugrma, Figura 11) foi submetida a processo cromatográfico em coluna aberta com diâmetro e altura correspondentes a 3,5 cm e 12,0 cm, respectivamente, preenchida com sílica gel 0,060-0,200 mm/ 6,0µm de diâmetro de poro e utilizando-se como sistema de eluente clorofórmio (CHCl₃) e metanol (MeOH), em gradiente de polaridade crescente (CHCl₃; CHCl₃:MeOH 95:05, 9:1, 8:2, 6:4, 4:6, 2:8; e MeOH). Após análise do perfil cromatográfico apresentado em cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), foram obtidas 24 frações, sendo as frações 5 e 9 selecionadas para serem estudadas, devido aos seus perfis cromatográficos em CCDA.

A fração 5 (150,0 mg) foi submetida a processo cromatográfico utilizando coluna preenchida de Sephadex[®] LH 20 (altura de 18,0 cm e diâmetro de 1,5 cm) e fase móvel com solvente clorofórmio e metanol (CHCl₃:MeOH 9:1) em método isocrático. A análise em cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) permitiu o agrupamento pela similaridade das manchas observadas, resultando em 6 frações, sendo na fração 3, por análise dos experimentos de RMN de ¹H e ¹³C, identificados os compostos **9** e **10**.

A fração 9 (106,0 mg) foi submetida ao mesmo procedimento cromatográfico realizado com a fração 5 supracitada (coluna com altura de 18,0 cm e diâmetro de 1,5 cm, fase estacionária Sephadex[®] LH 20 e fase móvel com CHCl₃:MeOH 9:1 em método isocrático), obtendo-se 8 frações desta separação. Na fração 7, por análise dos experimentos de RMN de ¹H e ¹³C, foram identificados os compostos **4** e **5**.

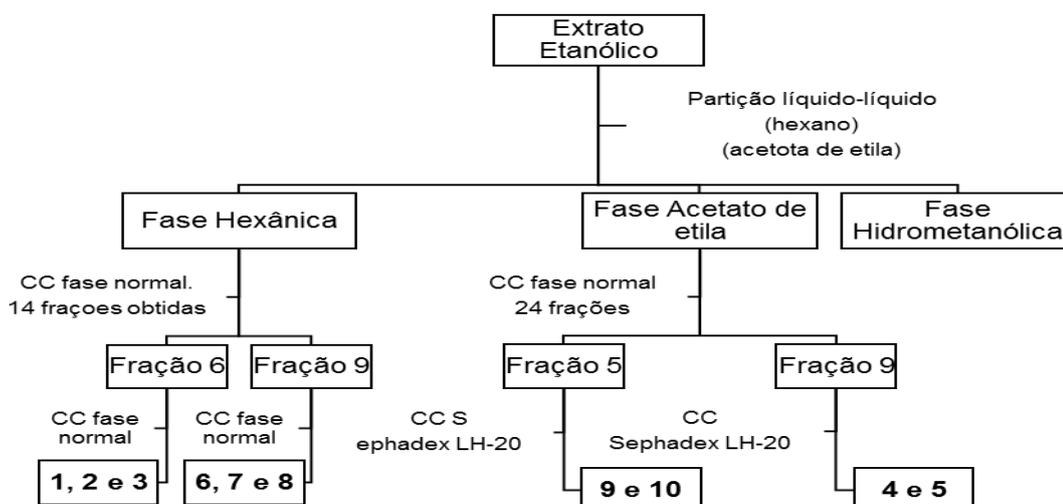


Figura 11 - Fluxograma para a separação e obtenção dos compostos oriundos da espécie *M. petraea*.

4.10 Preparo das amostras para análise por HPLC/MS-MS

Para as análises por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada ao detector de Massas, os extratos etanólicos e as infusões (extratos aquosos) foram preparados conforme o procedimento adotado para obtenção das amostras empregadas para a análise dos componentes principais (PCA) por RMN de ^1H (item 4.3) e utilizando os mesmos extratos obtidos para as 12 amostras descritas.

Após secagem dos materiais extraídos, pesou-se 3,0 mg de cada amostra, que foram ressolubilizados no solvente orgânico metanol, adicionando-se em seguida água deionizada até obter a proporção final de 70% de metanol e 30% de água. A dispersão obtida foi filtrada em filtro PTFE 0.22 μm e transferido para um Vial de 2,0 mL, sendo conduzido posteriormente para análise.

As análises foram realizadas utilizando gradiente de eluição com água (solvente A) e acetonitrila (solvente B), ambos acidificados com 0,1% de ácido fórmico. Para o extrato etanólico o tempo de análise foi de 52,0 min, iniciando com 25% de solvente B, e aumento o a proporção do solvente B, nos intervalos e proporções de: 1,0-5,0 min 25% de solvente B, 5,0-40 min de 25% a 80% de solvente B, 40-45 min manteve-se em 80% de solvente B e 45-52 min de 80% a 25 % de solvente B. Para as infusões o tempo de análise foi de 44,0 min, iniciando com 3% de solvente B, e aumento a proporção de solvente B, nos intervalos e proporções de: 1,0-2,0 min 3% de solvente B, 2,0-25,0 min de 3% a 25% de solvente B, 25-40 min de 25% a 80% de solvente B e 40-43 min manteve-se constante em 80% de solvente B, 43-44 min de 80% a 3% de solvente B. Os parâmetros empregados no HPLC/MS-MS envolveram fluxo de 0,3 mL/min, temperatura da coluna de 50°C, monitoramento entre 240-800nm e modo de ionização negativo (m/z 120-1300).

4.11 Ensaio de citotoxicidade *in vivo* sobre microcrustáceos *Artemia salina*

Para a realização do teste de toxicidade sobre *Artemia salina* foram utilizados os extratos etanólicos e as fases hexânica, acetato de etila e hidrometanólica, bem como da infusão das raízes de *M. petraea* e *M. velame* utilizando no bioensaio o método de Meyer *et al.*, 1982, sendo este descrito abaixo:

Procedimentos iniciais:

- Solução salina: a solução foi preparada dissolvendo 38 g de sal para cada 1 L de água. Em seguida filtrou-se em papel de filtro;
- Controle Positivo: em 20 mL de solução salina foram dissolvidos 20 mg de quinidina e 200 µL de DMSO;
- Controle Negativo: em 20 mL de solução salina foram dissolvidos 20 µL de DMSO;
- Amostra: em 20 mL de solução salina foram dissolvidos 20 mg da amostra (extratos) e 200 µL de DMSO;

Ovos de *Artemia salina* foram colocados em solução salina, para eclosão. Após a eclosão (48 horas), deu-se início ao teste. Para tanto, foram feitas quatro diluições a partir de cada amostra preparada, sendo cada concentração analisada em triplicata: 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL e 62,5 µg/mL. Em cada um dos tubos de ensaio contendo as referidas soluções-teste nas concentrações citadas e controles positivo e negativo, foram colocadas 10 larvas de *A. salina*. Os controles positivo e negativo também foram analisados em triplicata e nas mesmas concentrações dos extratos testados.

Após 24 horas de exposição, os resultados foram expressos em µg/mL, como a dose necessária para matar 50% (DL₅₀) das larvas, sendo os valores de DL₅₀ calculados através do programa *Probitos*®.

4.12 Ensaio de citotoxicidade *in vitro* sobre a linhagens de células tumorais para avaliação da atividade antiproliferativa

Os ensaios foram conduzidos pela aluna de Mestrado Laura Alves Verão Martins (Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste/UFMS), sob orientação da Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima C. Matos, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFMS.

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* foi realizado com o extrato etanólico, a infusão e fases hexânica, acetato de etila e hidrometanólica das raízes de *M. petraea*, empregando-se o método colorimétrico da sulforrodamina B (SRB) (Freshney, 2005; Monks *et al.*, 1991). Foram utilizadas as seguintes linhagens de células neoplásicas: MCF-7 (ATCC–HTB-22, adenocarcinoma de mama), PC-3 (ATCC-CRL-1435, adenocarcinoma de próstata), 786-0 (ATCC–CRL-1932, adenocarcinoma de rim), HT-29 (ATCC–HTB-38 adenocarcinoma de cólon), UACC-62 (melanoma humano), NCI/ADR-RES (adenocarcinoma de ovário resistente) e também foi utilizada uma linhagem de células não neoplásicas - NIH/3T3 (ATCC–CRL-1658, fibroblasto murino).

As diferentes linhagens celulares foram expostas a concentrações variadas dos extratos e fases de *M. petraea*. Decorrido o período de incubação (48 horas), as proteínas celulares foram precipitadas pela adição de ácido tricloroacético 40% e coradas através de solução de SRB, sendo a absorvância determinada em 540 nm em leitor de microplacas (SpectraMax 190 Microplate Reader). Foram obtidas as absorvâncias do extrato (T), controle negativo (CN), branco dos extratos e a leitura do início da incubação, antes da adição extratos (T₀). Em todos os experimentos foi incluído um controle positivo, doxorrubicina, nas concentrações de 0,25, 2,5 e 25 mg/mL. Como parâmetro para citotoxicidade utilizou-se o valor da GI₅₀, que representa concentração da amostra que inibe 50% do crescimento celular.

4.13 Avaliação de atividade genotóxica: ensaio SMART em células somáticas de *D. melanogaster*

Os ensaios foram conduzidos pela Prof^a. Dr^a. Zaira Rosa Guterres, do Grupo de Estudos de Ciências Ambientais e Educação (GEAMBE) da Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul (UEMS – Unidade de Mundo Novo).

O teste SMART em células somáticas de *Drosophila melanogaster* para avaliação de atividade genotóxica foi realizado com o extrato etanólico, fases obtidas (hexânica, acetato de etila e hidrometanólica) e infusão das raízes de *M. petraea* de acordo com protocolos previamente estabelecidos (Graf e Van Schaik, 1992), por meio de cruzamentos experimentais utilizando três linhagens portadoras dos marcadores recessivos, encontrados no cromossomo 3 das células do disco imaginal das asas de *D. melanogaster*.

[1] linhagem “*multiple wing hairs*” (*mwh*);

[2] linhagem “*flare-3*” (*flr3*) e

[3] linhagem “ORR; *flare-3*” (ORR; *flare-3*)

Esta última linhagem contém genes responsáveis por expressar um alto nível de enzimas de metabolização do tipo citocromo P(CYP)6 A2 (Graf e Van Schaik, 1992). Com estas linhagens foram realizados dois diferentes cruzamentos:

1) cruzamento padrão (ST – *standard cross*) entre machos “*mwh*” e fêmeas virgens “*flr3*” (Graf *et al.*, 1984; Graf e Van Schaik, 1992)

2) cruzamento de alta bioativação (HB – *high bioactivation cross*) entre machos “*mwh*” e fêmeas virgens “ORR; *flr3*” (Graf e Van Schaik, 1992).

Ovos dos dois cruzamentos foram coletados por 8 horas em frasco contendo base de ágar-ágar (4% p/v) coberta com uma camada de fermento biológico suplementado com açúcar. Larvas de terceiro estágio de desenvolvimento (72 ± 4 h) foram transferidas para frascos de vidros contendo meio alternativo (purê instantâneo de batata Yoki[®]) e tratadas com três concentrações dos extratos, que foram testados em solução, preparadas imediatamente antes do uso, sendo dissolvidos em uma mistura de 1% de *tween*-80 e 3% etanol em água Milli-Q.

Como controle positivo foi utilizado o agente genotóxico cloridrato de doxorubicina (DXR) na concentração de $0,125 \text{ mg.mL}^{-1}$ e como controle negativo apenas o solvente (água Milli-Q, 1% de *Tween*-80 e 3% etanol).

Para a realização das análises os indivíduos, após tratamento com os extratos, foram coletados e fixados em etanol 70%. As asas foram analisadas quanto à ocorrência de diferentes tipos de manchas mutantes, em microscópios ópticos com magnificação de 400x.

Os resultados observados foram avaliados estatisticamente por meio do teste Binomial Condicional. As frequências de cada tipo de mancha mutante por mosca foram comparadas com os respectivos controles negativos, possibilitando a caracterização dos resultados como positivos, fraco-positivos, negativos ou inconclusivos (Frei e Würigler, 1988).

4.14 Quimiosistemática da Família Apocynaceae

A realização do estudo de quimiosistemática da família Apocynaceae, baseada nas classes de compostos dos triterpenos e pregnanos, deu-se através das análises de dados observações realizadas através de levantamento bibliográfico sobre a quimiosistemática desta família. Tomou-se como base os artigos dos autores: El-Kashef *et al.*, (2015), que realizaram uma revisão de triterpenos na família Apocynaceae, Gottlieb *et al.*, (2002), que descreveram as ocorrências dos compostos do tipo pregnano em diversas classes e famílias botânicas, Livshultz, *et al.*, (2007), que realizaram uma organização filogenética da família Apocynaceae e Agrawal *et al.*, (2011), que fizeram uma disposição desta família em uma grande árvore filogenética baseada no trabalho de Livshultz *et al.*, (2007) e também uma análise de quimiosistemática para a família Apocynaceae, baseada na produção dos metabólitos secundários da classe dos alcaloides e cardenolideos.

Como mencionado anteriormente, esses trabalhos conduziram à realização de uma abordagem sobre a quimiosistemática de duas classes de compostos: os triterpenos e os pregnanos, para a qual foram realizadas pesquisas na literatura sobre a ocorrência dessas duas classes de metabólitos em espécies dos gêneros da família Apocynaceae. Ademais, foi realizada uma adição ao cladograma publicado pelo autor Agrawal *et al.*, (2011) (que dispõe acerca da presença de compostos da classe dos alcaloides e cardenolideos para gêneros da família Apocynaceae) sobre a ocorrência de pregnanos e triterpenos em gêneros dessa família, possibilitando criar uma relação entre a produção e a filogenia observada entre gêneros para essas duas classes de metabólitos.

Ainda, o trabalho do autor Agrawal *et al.*, (2011) demonstra a possibilidade de maior ocorrência e concentração de metabólitos do tipo cardenolideo quando espécies vegetais se encontram próximas ou dentro das linhas dos trópicos (Câncer e Capricórnio) e linha do

Equador, visto que esses compostos são utilizados para defesa contra predadores (principalmente insetos). Como nas regiões mais quentes do globo a densidade populacional de insetos é maior e mais diversificada, há a promoção do armazenamento por plantas de mais metabólitos que possibilitem sua defesa contra estes predadores. Esses fatos conduziram à comparação entre as espécies onde há relatos da ocorrência de pregnanos e triterpenos, e sua pela distribuição geográfica no globo, realizando assim, uma tentativa de contribuir para a geoquímica da família Apocynaceae baseada nessas duas classes de metabólitos. O levantamento bibliográfico foi realizado utilizando o site *tropicos.org* e trabalhos publicados nas bases de dados SciFinder® e WebOfScience®, de modo a se reunir informações acerca das espécies de Apocynaceae com ocorrência confirmada de triterpenos e/ou pregnanos e as respectivas localizações geográficas destas plantas, bem como obter a descrição dos tipos de triterpenos e/ou pregnanos isolados, contribuindo assim para a prospecção desses compostos por meio da análise da distribuição global dentro da família Apocynaceae.

5 Resultados e discussão

5.1 Análise multivariada de componentes principais do extrato etanólico dos espécimes de *Macrosiphonia*

A comparação química entre os perfis químicos das espécies do gênero *Macrosiphonia* coletadas e identificadas, *M. petraea* (Mp), *M. velame* (Mv) e *M. longiflora* (Ml), mostrou uma porcentagem de variância explicada de 99,4% (97,5% explicados por PC1 e 1,9% explicados por PC2), com a formação de três grupos: **A** – formados por espécimes de *M. petraea*, **B** – formados pelos espécimes de *M. velame* e **C** – formados pelos espécimes de *M. longiflora* (Figura 12).

A separação originada apresentou como principais influências, observadas no gráfico de *loading* (Figura 13), os sinais ocorrentes em deslocamento químico de RMN de ^1H (δ , ppm) de δ 0,80, δ 0,84, δ 0,86, δ 0,88, δ 0,98 e δ 2,06 para as amostras do grupo **B**; para as amostras do grupo **A** há a influência dos sinais de deslocamento químico de RMN de ^1H a δ 1,26, δ 1,28, δ 1,30 e δ 1,32 e para o grupo **C** uma maior influência é observada para os valores a δ 0,80, δ 0,84, δ 0,86; δ 0,88; δ 0,90, δ 0,98; δ 1,34 e δ 2,06, para o grupo **C**, como demonstrado na Figura 14.

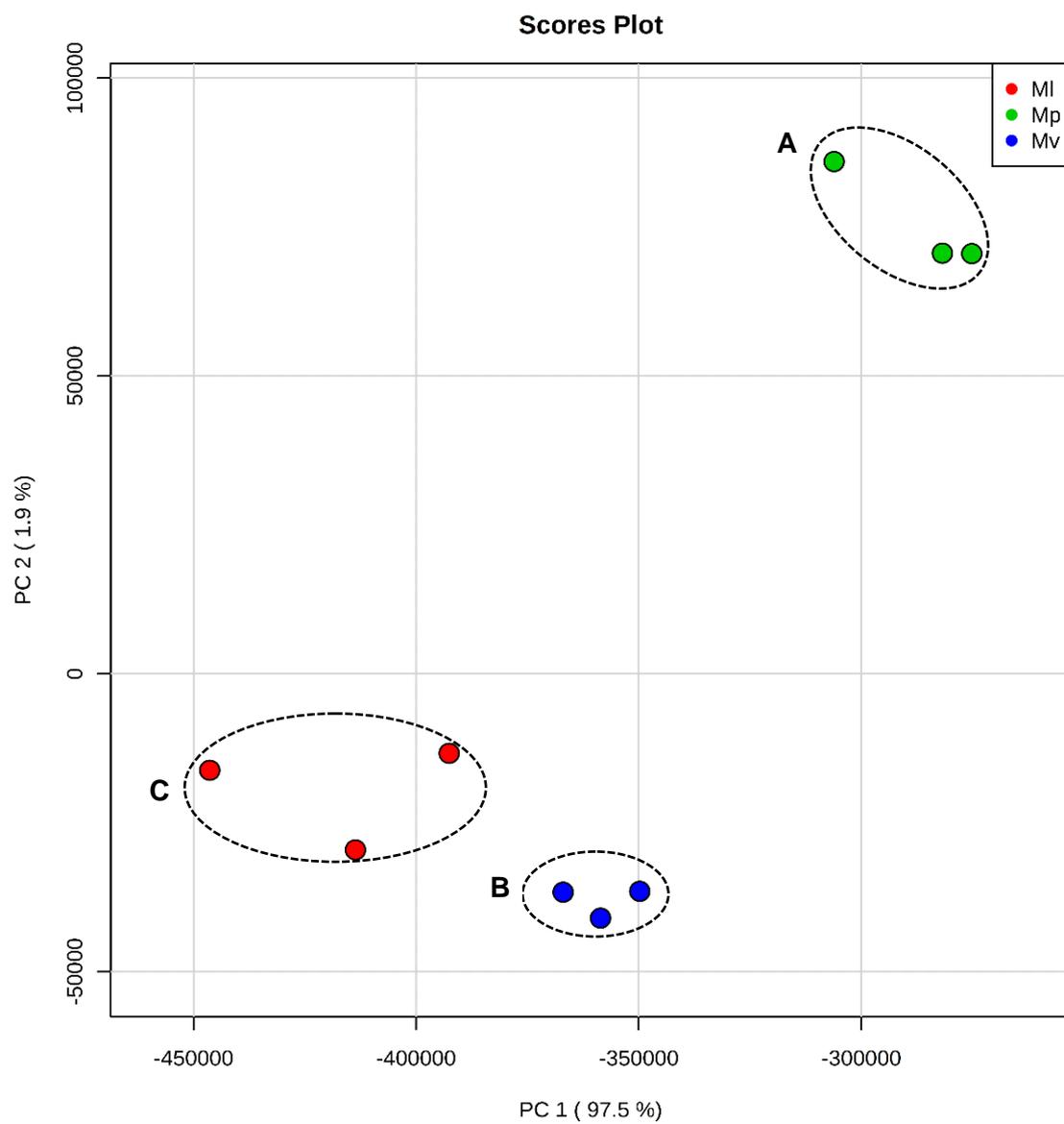


Figura 12: Gráfico de Scores representando a separação dos grupos **A** – *Macrosiphonia petraea* (**Mp**); **B** – *Macrosiphonia velame* (**Mv**) e **C** – *Macrosiphonia longiflora* (**MI**).

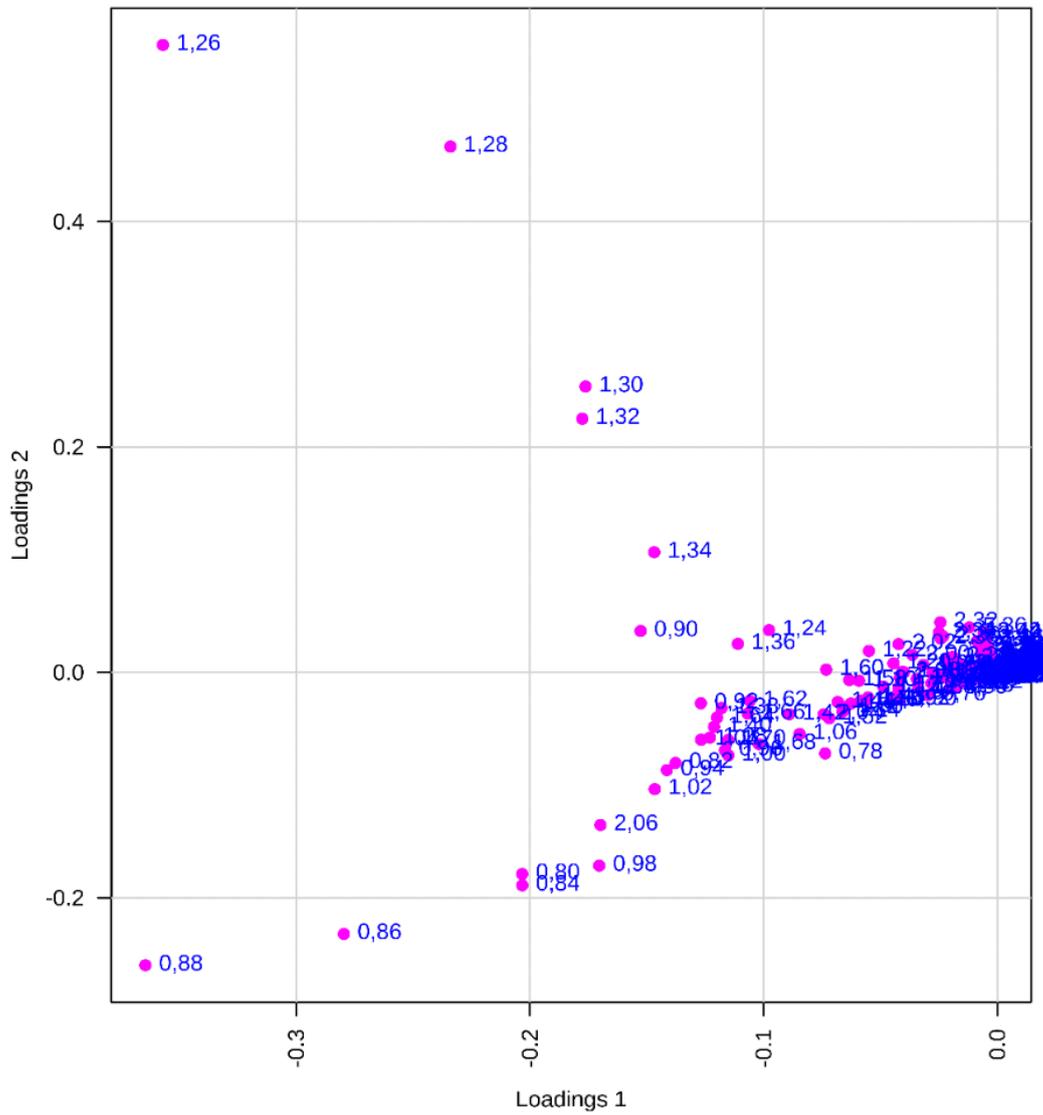


Figura 13: Gráficos de *loadings* representando os pontos influentes para a formação e separação observados na PCA dos espécimes coletados.

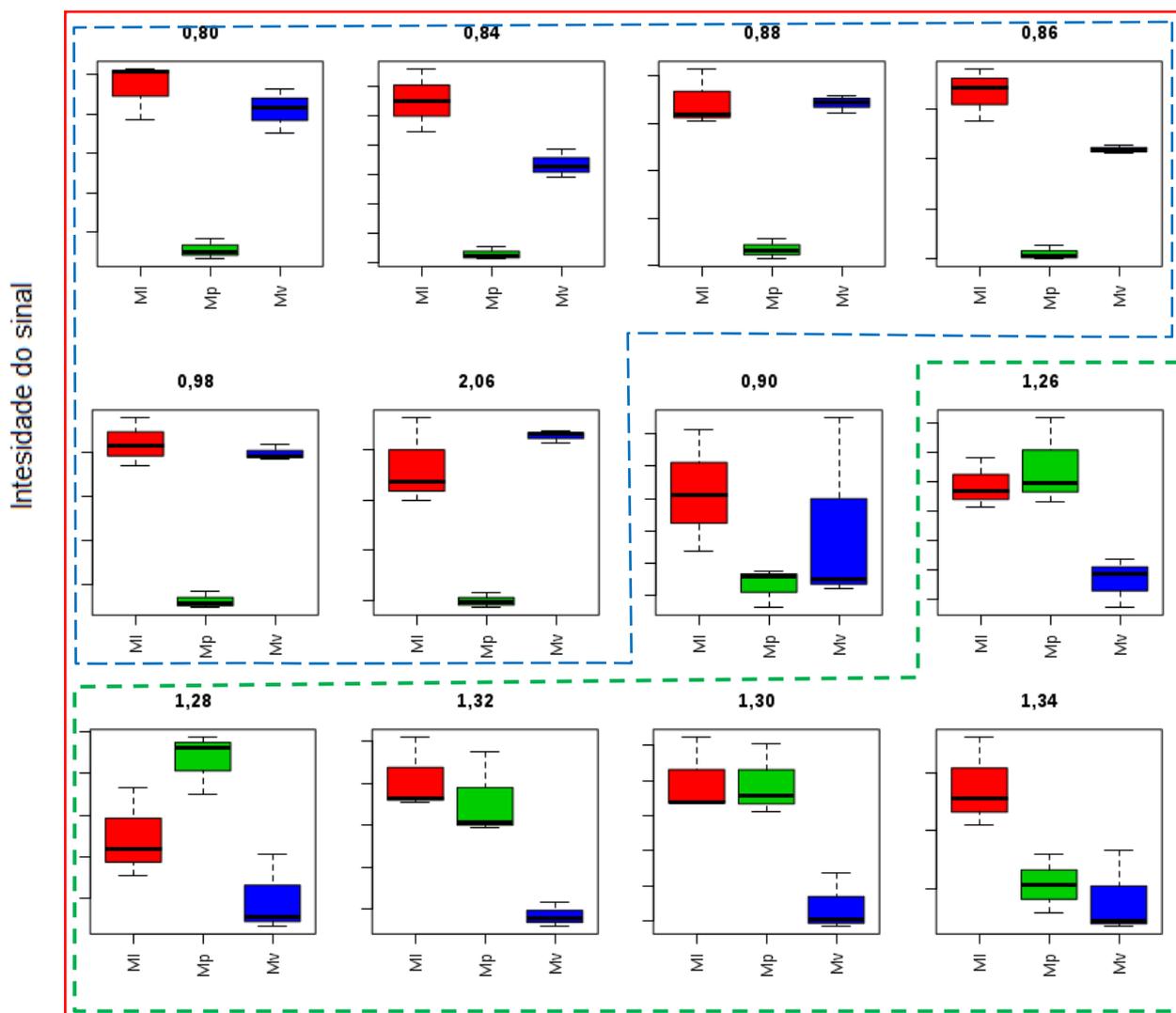


Figura 14 – Gráficos com sinais que influenciam na separação dos grupos observados na PCA dos extratos etanólicos das amostras de *Macrosiphonia petraea* (Mp), *Macrosiphonia velame* (Mv) e *Macrosiphonia longiflora* (MI); o grupo A é influenciado pelos sinais indicados pelo separador em linha tracejada de cor verde, o grupo B pelos sinais compreendidos pelo separador em linha tracejada de cor azul e C é influenciado pelos sinais envolvidos pelo separador em linha contínua de cor vermelha.

A região entre os deslocamentos químicos de RMN de ^1H (ppm) δ 0,70 e δ 1,30 são características para as metilas presentes em compostos com esqueletos de tipo triterpênico e/ou esteroides. Os espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos (Anexo 1) mostraram uma boa correlação para a classe de compostos dos triterpenos, que além dos sinais das metilas triterpênicas permite observar os deslocamentos químicos de RMN de ^1H (ppm) na região de δ 4,50 a δ 5,50 (hidrogênios ligados a carbonos sp^2 , típicos de suas duplas ligações), na região de δ 3,50 a δ 4,50 (hidrogênios ligados a carbonos carbinólicos sp^3 , típicos quando substituído por hidroxila (-OH) na posição três (C-3) e quando substituído por um grupo acetil (-COOCH₃) na mesma posição, respectivamente).

Ademais, o que conduz à formação e separação dos três grupos, e com isso a diferenciação entre as espécies de *Macrosiphonia*, pode ser a variação da concentração dos constituintes químicos majoritários, pertencentes à classe dos triterpenos, como pode ser visto na Figura 14, a qual demonstra as influências das intensidades dos sinais observados no espectro de RMN de ^1H , responsáveis pela diferenciação entre as espécies, de acordo com o gráfico de *loadings*.

Entretanto, a região de deslocamento químico de RMN de ^1H entre δ 1,20 e δ 1,30, também é uma região observada para compostos graxos (CH_2 , do material graxo), que pode ser oriundo da própria amostra ou de possíveis contaminantes, que podem estar presentes no solvente orgânico utilizado para extração e/ou solvente empregado para a análise. Por ser uma região de possíveis contaminantes, esta porção foi retirada e uma nova PCA foi gerada (Figuras 15 e 16). Essa análise, por sua vez, apresentou 99,5% de variância explicada (99,0% explicada por PC1 e 0,5% explicada por PC2).

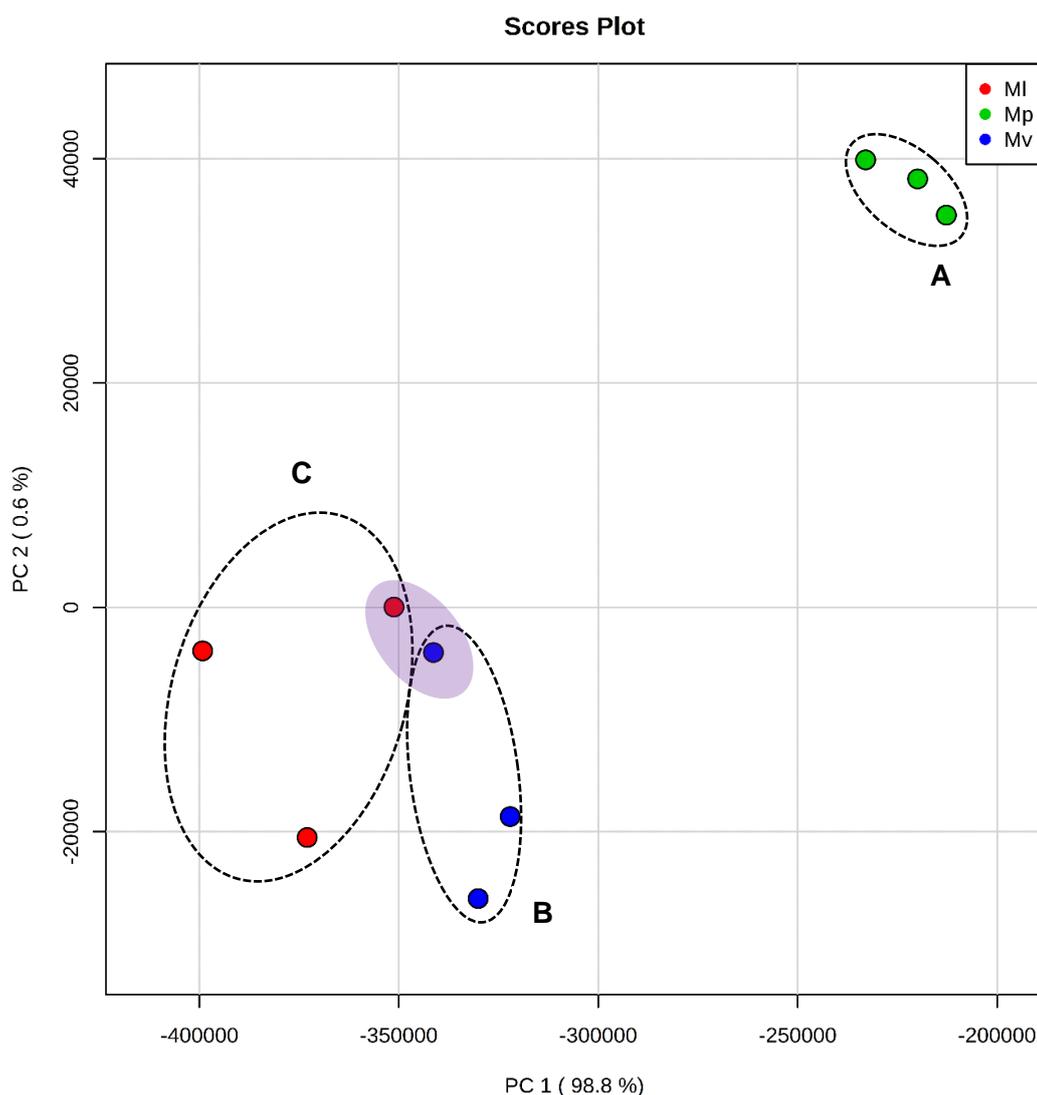


Figura 15: Gráfico de Scores representando a separação dos grupos **A** – amostras de *M. petraea* (**Mp**), grupo **B** – amostras de *M. velame* (**Mv**) e grupo **C** – *M. longiflora* (**MI**) com intervalos de dados entre $\delta^1\text{H}$ 1,22 e 1,30 retirados.

Há relativa aproximação de todos os grupos, demonstrada pela diminuição dos valores da escala no eixo y (eixo da PC2) em comparação com a primeira análise (Figura 12), principalmente entre os grupos **B** (*M. velame*) e **C** (*M. longiflora*), apresentando uma região onde é possível realizar uma inserção de agrupamento entre uma amostra do grupo **B** e uma amostra do grupo **C**, destacada em roxo na Figura 15, demonstra que os perfis químicos dessas espécies são similares. Entretanto, o afastamento do grupo **A** (*M. petraea*), pelo aumento dos valores da escala do eixo x (eixo da PC1), em comparação com a primeira análise, e a separação observada entre os grupos **A**, **B** e **C** (Figura 15) demonstram que, mesmo com uma aproximação entre os grupos, ainda há diferenças entre

as três espécies, e, além disso, outros grupos de conjuntos de sinais influenciam os agrupamentos observados (Figura 16). Sendo assim, a região de sinais entre δ 1,20 a δ 1,30 no espectro de RMN de ^1H pode conter interferentes para as análises, podendo ser retirada.

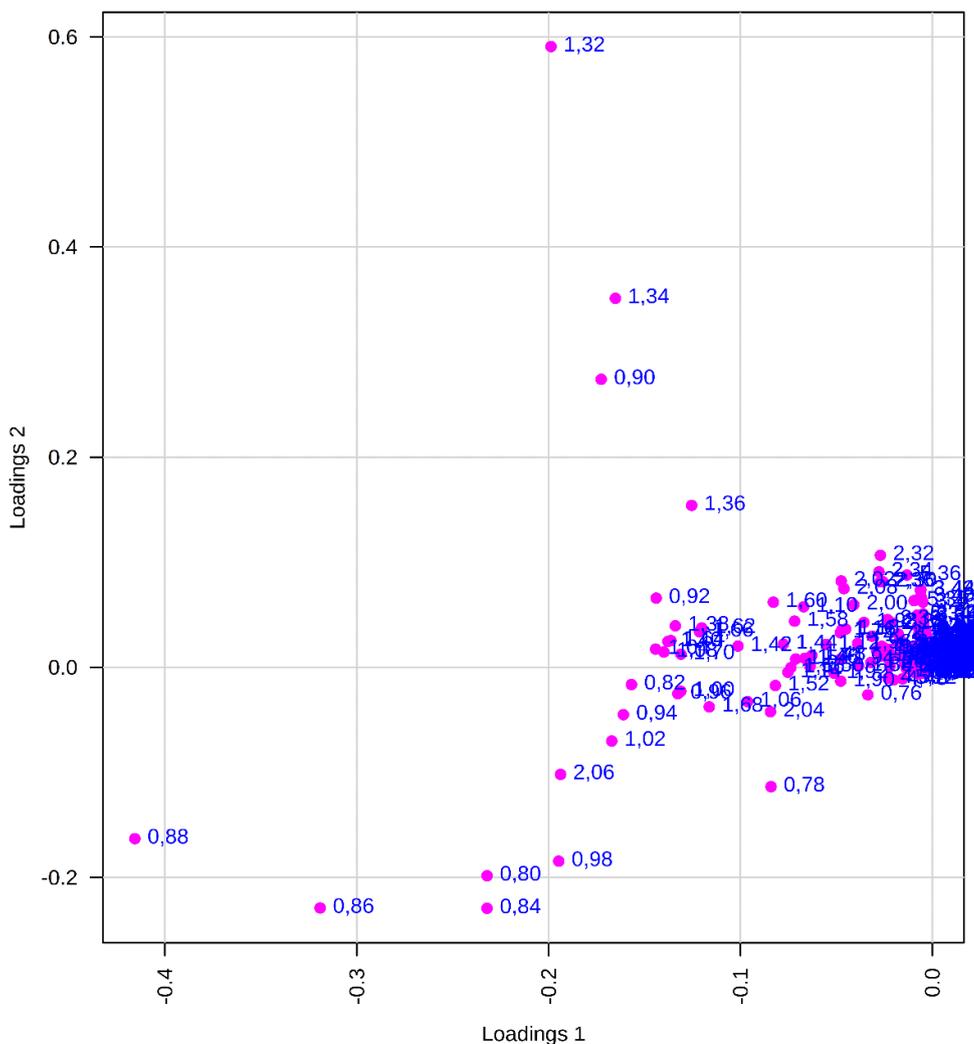


Figura 16: Gráficos de *loadings* apresenta os pontos de influência para a formação da PCA dos espécimes coletados com intervalos de dados entre δ ^1H 1,22 e 1,30 retirados.

A análise da Figura 16 possibilita determinar que a principal diferença entre as amostras do grupo **A** e as amostras do grupo **B** e **C** encontra-se na região de deslocamento químico no espectro de RMN de ^1H entre δ (ppm) 0,80 a 1,02, apresentando maior intensidade dos sinais referentes às metilas triterpênicas. A região de δ 2,06, característica de um grupo metil ligado na posição α à carboxila do grupo acetil (CH_3COO^-) e observada

principalmente quando este está substituindo o hidrogênio ligado ao oxigênio presente na posição C-3 dos triterpenos, contribui também para os dados estatísticos das amostras dos grupos **B** e **C**.

Outro grupo de sinais, com valores de deslocamentos químicos no espectro de RMN de ^1H de δ 1,32 a δ 1,36 e δ 0,90, corroborou mais para os dados estatísticos do grupo **A**, demonstrando que, mesmo com perfis químicos semelhantes, as amostras de *M. petraea* (grupo **A**), *M. velame* (grupo **B**) e *M. longiflora* (grupo **C**) distinguem-se pela ocorrência de compostos majoritários, apresentando maiores componentes graxos na espécie *M. petraea* e componentes triterpênicos nas espécies de *M. velame* e *M. longiflora*.

5.2 Comparação por análise multivariada dos extratos etanólicos entre as amostras de espécies de *Macrosiphonia* e amostras comercializadas.

Para a realização do estudo de comparação entre os espécimes coletados e identificados de *Macrosiphonia petraea*, *Macrosiphonia velame* e *Macrosiphonia longiflora* e as raízes de plantas comercializadas nas cidades de Campo Grande, Corumbá, Dourados e Ponta Porã, no estado de Mato Grosso do Sul, e Cuiabá e Rondonópolis, no estado de Mato Grosso, sob o nome de Velame e/ou Velame branco (Anexo 1), foi empregada a metodologia de análise dos componentes principais ou componentes majoritários (PCA).

Foram utilizados para análise dos componentes principais 12 amostras: os 3 espécimes coletados e 9 amostras adquiridas comercialmente de raizeiros nas cidades mencionadas acima. A análise apresentou uma porcentagem de variância de separação de dados de 96,3% (87% explicados por PC1 e 9,3% explicados por PC2) (Anexo 3), onde se observa a formação de quatro grupos: o grupo **M**, formado apenas pelas amostras de *M. petraea* (**Mp**), o grupo **N** formado pelas amostras de **Mv**, **MI**, **CBA** e **ROO**, que são, respectivamente, *M. velame*, *M. longiflora* e amostras comercializadas em Cuiabá e Rondonópolis, o grupo **O**, formado pelas amostras provenientes das cidades de Campo Grande (**CGR**) e Corumbá (**CMB**) de Dourados (**DRS1**, **DRS2**, **DRS3** e **DRS4**) e de Ponta Porã (**PPA**).

Na tentativa de obter uma melhor resposta para a análise dos componentes principais, realizou-se um tratamento nos dados obtidos pela exclusão de regiões que podem apresentar possíveis interferentes nas amostras, como os sinais com deslocamento químico de RMN de ^1H (ppm) entre δ 1,20 e δ 1,80 (Figura 17), uma vez que esta é uma

região característica de material graxo e, também, uma região típica do sinal proveniente de resíduo de água presente no solvente orgânico utilizado. Após este procedimento, uma nova PCA foi gerada, a qual apresentou uma porcentagem de separação dos dados de 98,9% (94,5% explicado por PC1 e 4,4% explicado por PC2) (Figuras 18 e 19).

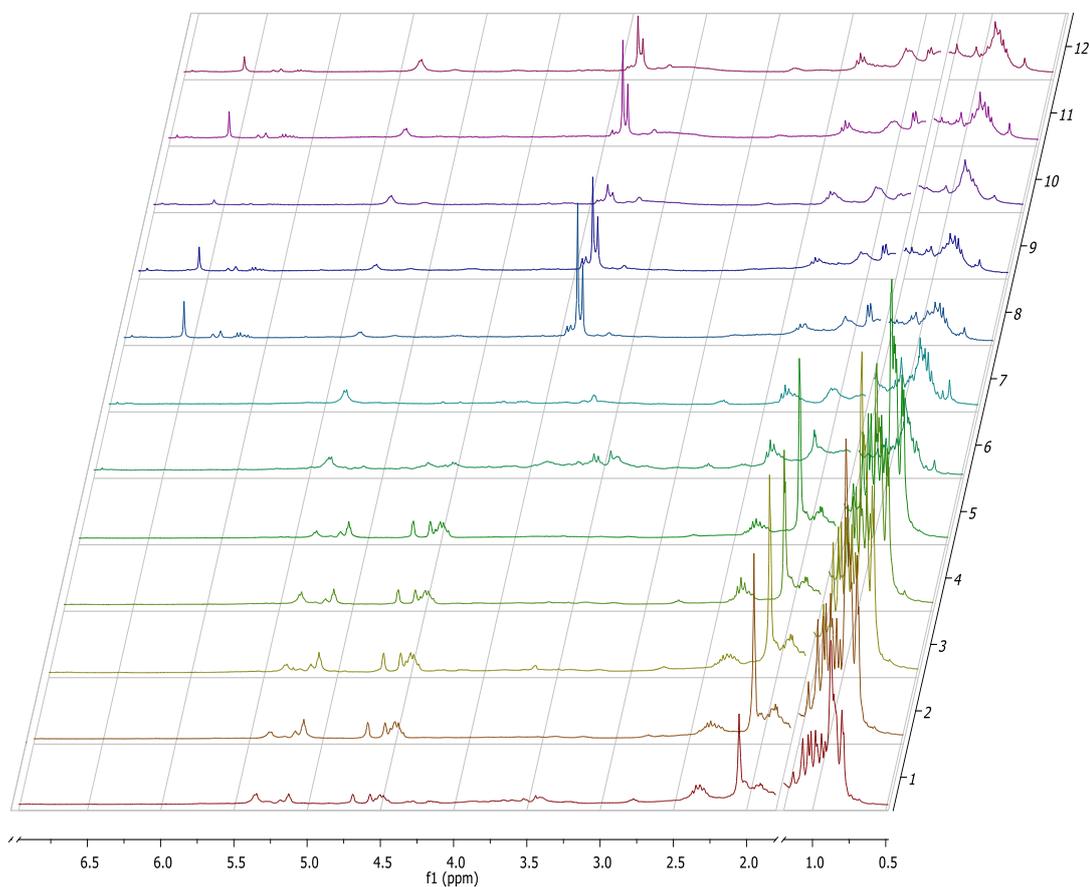


Figura 17 – Espectros obtidos pelo experimento unidimensional de RMN de ^1H (CDCl_3 – 300,13 MHz – ns = 128) para as amostras 1 – *Macrosiphonia petraea* (**Mp**); 2 – *Macrosiphonia velame* (**Mv**); 3 – *Macrosiphonia longiflora* (**Ml**); 4 – amostra de Cuiabá (**CBA**); 5 – amostra de Rondonópolis (**ROO**); 6 – amostra de Campo Grande (**CGR**); 7 – amostra de Corumbá (**CMB**); 8, 9, 10 e 11 – amostras de Dourados (**DSR1**, **DSR2**, **DSR3** e **DSR4**, respectivamente) e 12 – amostra de Ponta Porã (**PPA**). A região entre δ 1,20 e δ 1,80 ppm foi retirada (possíveis contaminantes e interferentes), e a janela de δ 7,0 a δ 0,5 ppm teve *bucketing* de 0,02 ppm.

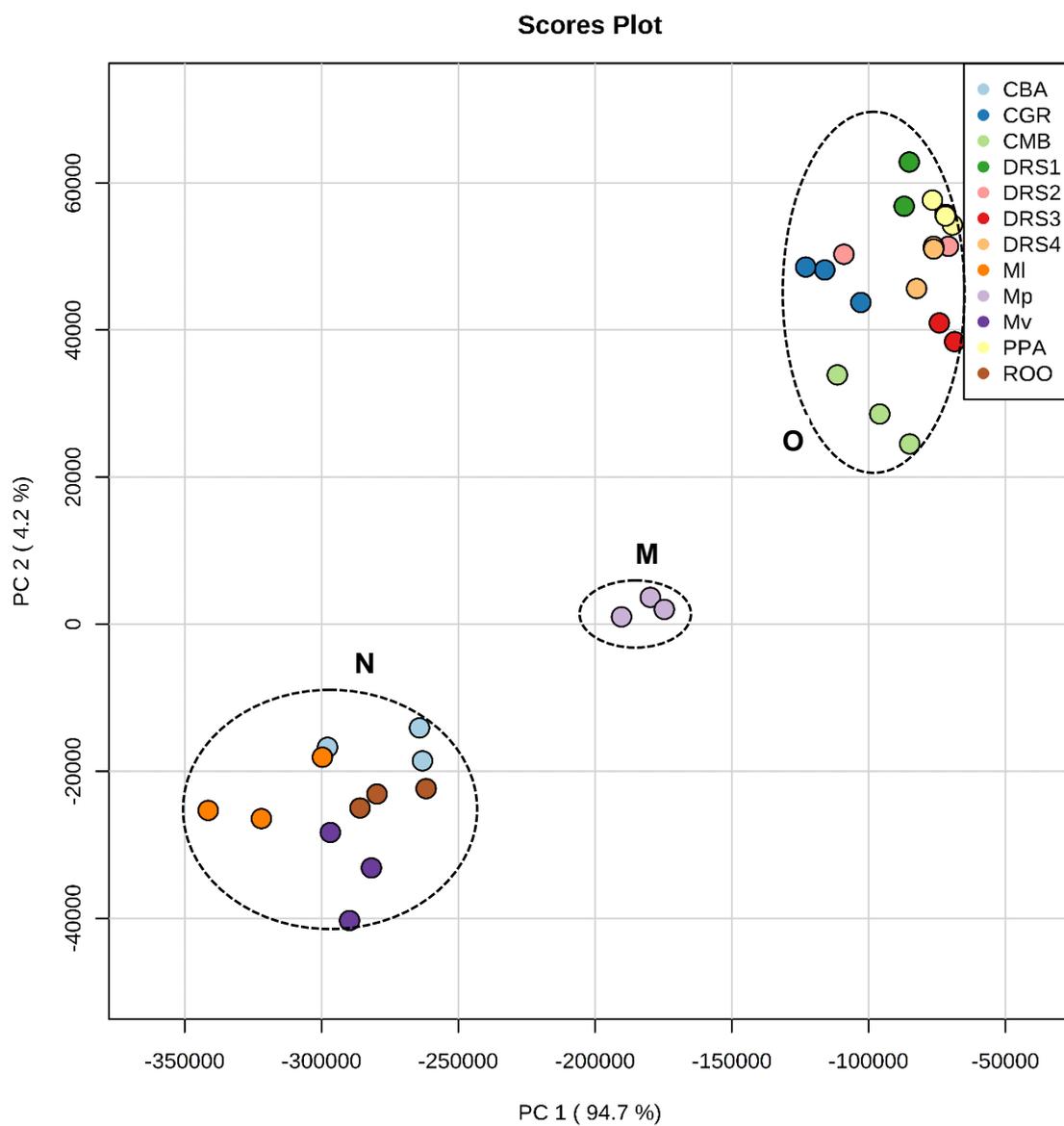


Figura 18: Gráfico de *Scores* demonstrando a separação e formação dos grupos **M**, formado pela amostra de *M. petraea* (**Mp**), **N**, constituído pelas amostras de *M. velame* (**Mv**), amostras de *M. longiflora* (**MI**), amostra de Cuiabá (**CBA**) e amostras de Rondonópolis (**ROO**) e grupo **O**, formado pelas amostras de Campo Grande (**CGR**), Corumbá (**CMB**), Dourados (**DRS1**, **DRS2**, **DRS3** e **DRS4**) e Ponta Porã (**PPA**).

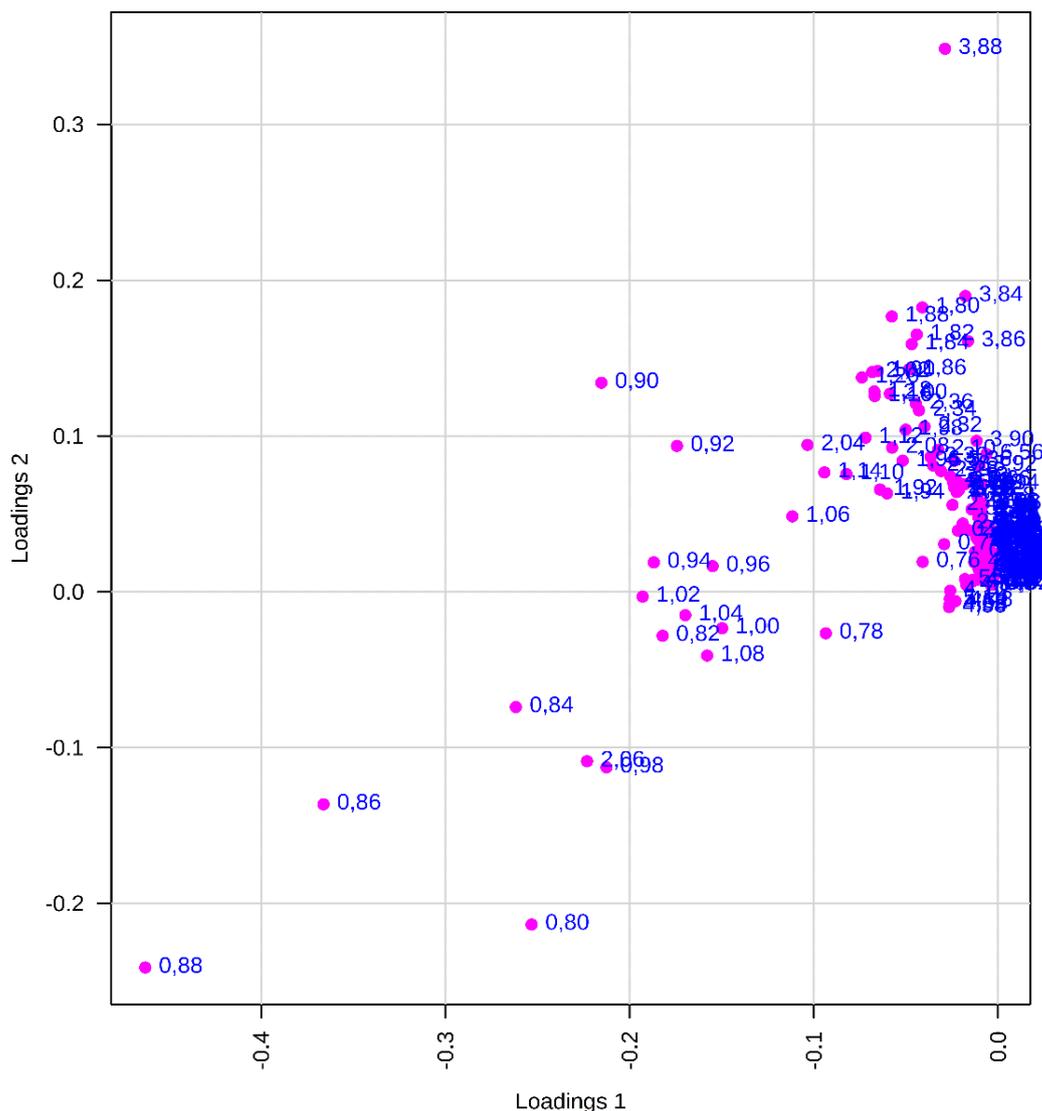


Figura 19: Gráficos de *loadings* contendo os pontos que influenciam a separação dos dados para a formação da análise de PCA dos espécimes coletados e amostras compradas, com o intervalo de δ ^1H entre δ 1,20 e δ 1,80 retirado.

Essa nova análise possibilitou a formação e separação de 3 grupos, **M**, **N** e **O**, que se distinguem entre si por apresentarem conjuntos de sinais que remetem a diferentes constituintes químicos majoritários. O agrupamento do grupo **N**, composto pelas amostras **Mv**, **MI**, **CBA** e **RRO**, ocorreu por estas apresentarem similaridade entre as regiões de deslocamento químico de RMN de ^1H (ppm) entre δ 0,80 a δ 1,06 e δ 2,06, que são sinais característicos para triterpenos, conforme discussão da Figura 16. As amostras do grupo **O**, que contém as amostras comercializadas nas cidades de Campo Grande (**CGR**), Corumbá (**CMB**), Dourados (**DRS1**, **DRS2**, **DRS3** e **DRS4**) e Ponta Porã (**PPA**), se agrupam pela

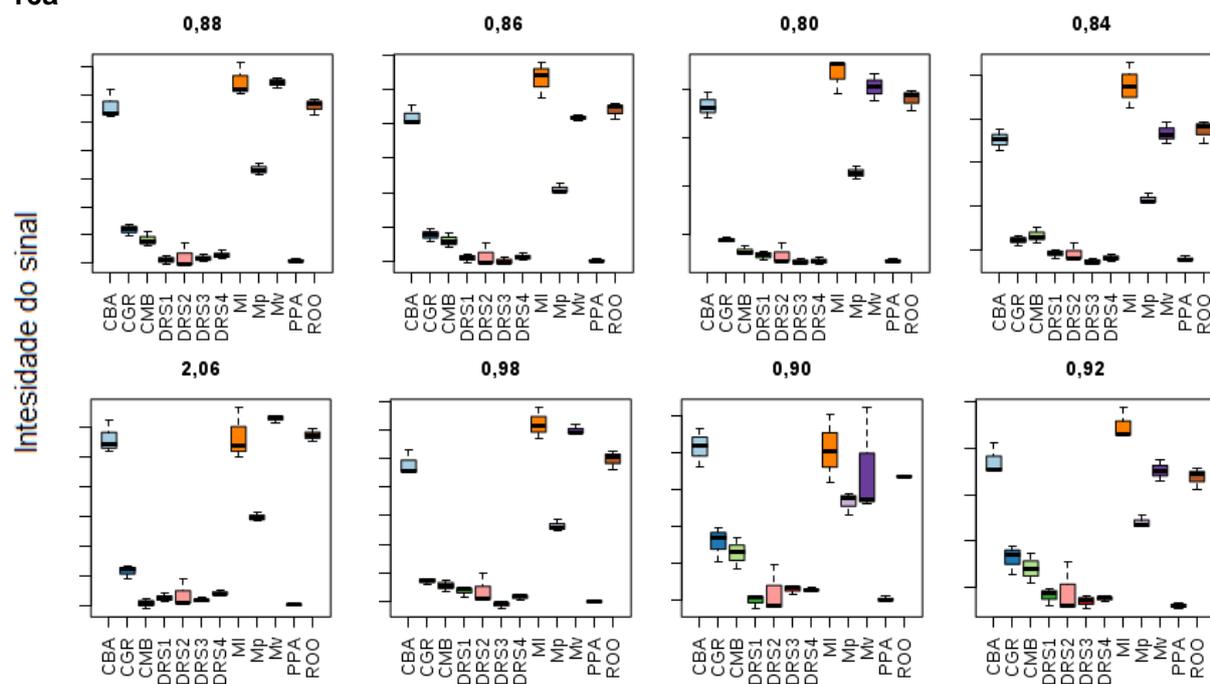
presença de sinais na região de δ 3,84, δ 3,86, δ 3,88, característicos de metoxilas, e entre δ 1,82 a δ 1,90, que influenciam na formação deste conjunto, porém de forma menos acentuada. O grupo **M**, onde está presente apenas a amostra de *M. petraea* (**Mp**), tem como principal característica os sinais referentes a compostos triterpenos apresentando deslocamentos químicos de RMN de ^1H (ppm) entre δ 0,9 e δ 1,04 e δ 2,04, diferenciando-se do grupo **N** pela concentração dos seus constituintes majoritários, como pode ser observado na Figura 20.

Ademais, podemos observar que as amostras oriundas do estado de Mato Grosso, as amostras coletadas de *M. velame* (**Mv**) e *M. longiflora* (**Ml**), e as adquiridas no comércio das cidades de Cuiabá (**CBA**) e Rondonópolis (**RRO**), que formam o grupo (**N**), apresentam bom agrupamento (proximidade na análise de PCA), o que permite a proposta que as raízes comercializadas com o nome de Velame nestas cidades mencionadas podem ter sido originadas de espécies botânicas similares aos espécimes de *Macrosiphonia velame* e/ou *Macrosiphonia longiflora*.

As amostras obtidas no estado de Mato Grosso do Sul, entretanto, apresentaram-se quimicamente diferentes em relação às amostras obtidas de Mato Grosso, segregando as plantas destas regiões em dois grupos: grupo **O**, formado pelas amostras comercializadas nas cidades de Campo Grande (**CGR**), Corumbá (**CMB**), Dourados (**DRS1**, **DRS2**, **DRS3** e **DRS4**) e Ponta Porã (**PPA**) e grupo **N**, que compreende amostras oriundas de Cuiabá (**CBA**) e Rondonópolis (**RRO**). O grupo **M**, formado por *M. petraea* (**Mp**), não apresentou semelhanças de constituintes químicos com nenhuma das amostras obtidas dos estados de MT ou MS, demonstrando a possível distinção botânica de todas as amostras em relação à esta espécie. Esta separação observada demonstra, portanto, que raízes comercializadas sob nome de Velame e/ou Velame branco no estado de Mato Grosso do Sul não apresentam características de serem obtidas de fontes botânicas similares as espécies de *Macrosiphonia petraea*, *Macrosiphonia velame* ou *Macrosiphonia longiflora*.

O grupo **O** - amostras de Mato Grosso do Sul - apresenta, ainda, uma diferença entre as regiões do estado, podendo ser dividido em dois grupos próximos, como demonstrado na Figura 21.

16a



16b

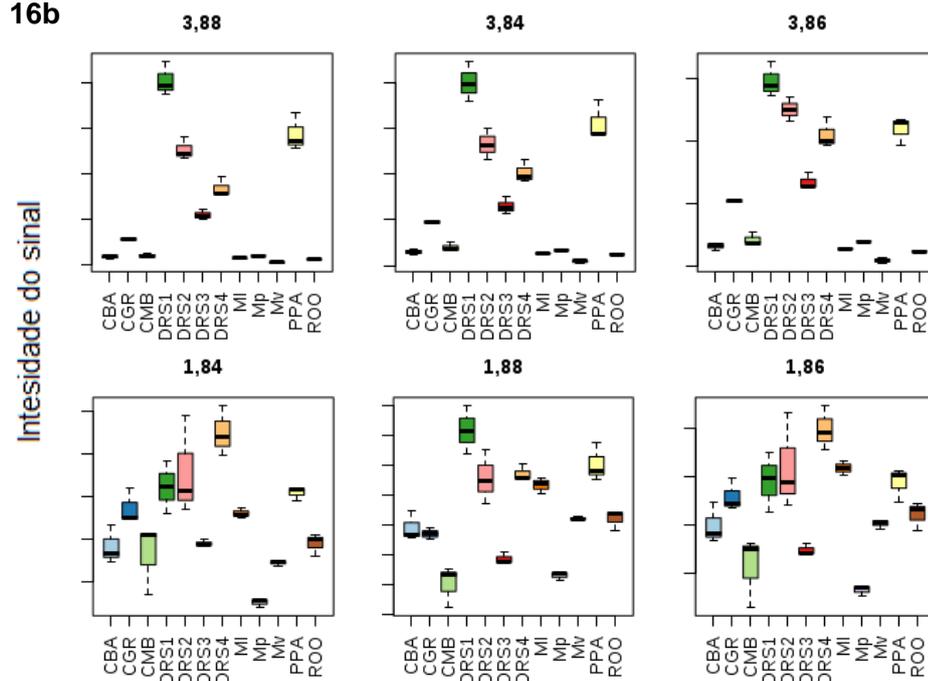


Figura 20 – Os gráficos apresentam os sinais que influenciam para a separação dos grupos observados na PCA; **16a**: os gráficos demonstram os sinais influentes para a formação dos grupos **M** (amostras de *M. petraea* (**Mp**)) e **N** (amostras de *M. velame* (**Mv**), amostras de *M. longiflora* (**MI**), amostra de Cuiabá (**CBA**) e amostras de Rondonópolis (**ROO**)); **16b**: os gráficos demonstram os sinais influentes para a formação do grupo **O** (amostras de Campo Grande (**CGR**), amostra de Corumbá (**CMB**), amostras de Dourados (**DRS1**, **DRS2**, **DRS3** e **DRS4**) e amostra de Ponta Porã (**PPA**)).

Conforme observado na Figura 20, há a formação do grupo de amostras **DRS1**, **DRS2**, **DRS3** e **DRS4** (Dourados) e **PPA** (Ponta Porã), oriundas do Sul do estado de Mato Grosso do Sul, devido à concentração de constituintes químicos que apresentam sinais de

RMN de ^1H (ppm) na região de δ 3,84 a δ 3,88; as amostras obtidas das regiões Central e Oeste do estado de Mato Grosso do Sul, tratando-se de amostras provenientes de Campo Grande (**CGR**) e Corumbá (**CMB**), possuem similaridades entre si, compartilhando compostos com hidrogênios presentes nas regiões de deslocamento químico de δ 1,82 a δ 1,90 e por apresentarem menor concentração de sinais de RMN de ^1H (ppm) no intervalo entre δ 3,84 e δ 3,88 (Figura 20). Desta forma, é possível supor que as amostras de raízes comercializadas no Sul do estado, obtidas das cidades de Dourados (**DRS1** a **DRS4**) e Ponta Porã (**PPA**), podem ser oriundas de fontes vegetais diferentes quando comparadas às das regiões Centro e Oeste, provindo, ainda, de espécies não pertencentes ao gênero *Macrosiphonia*.

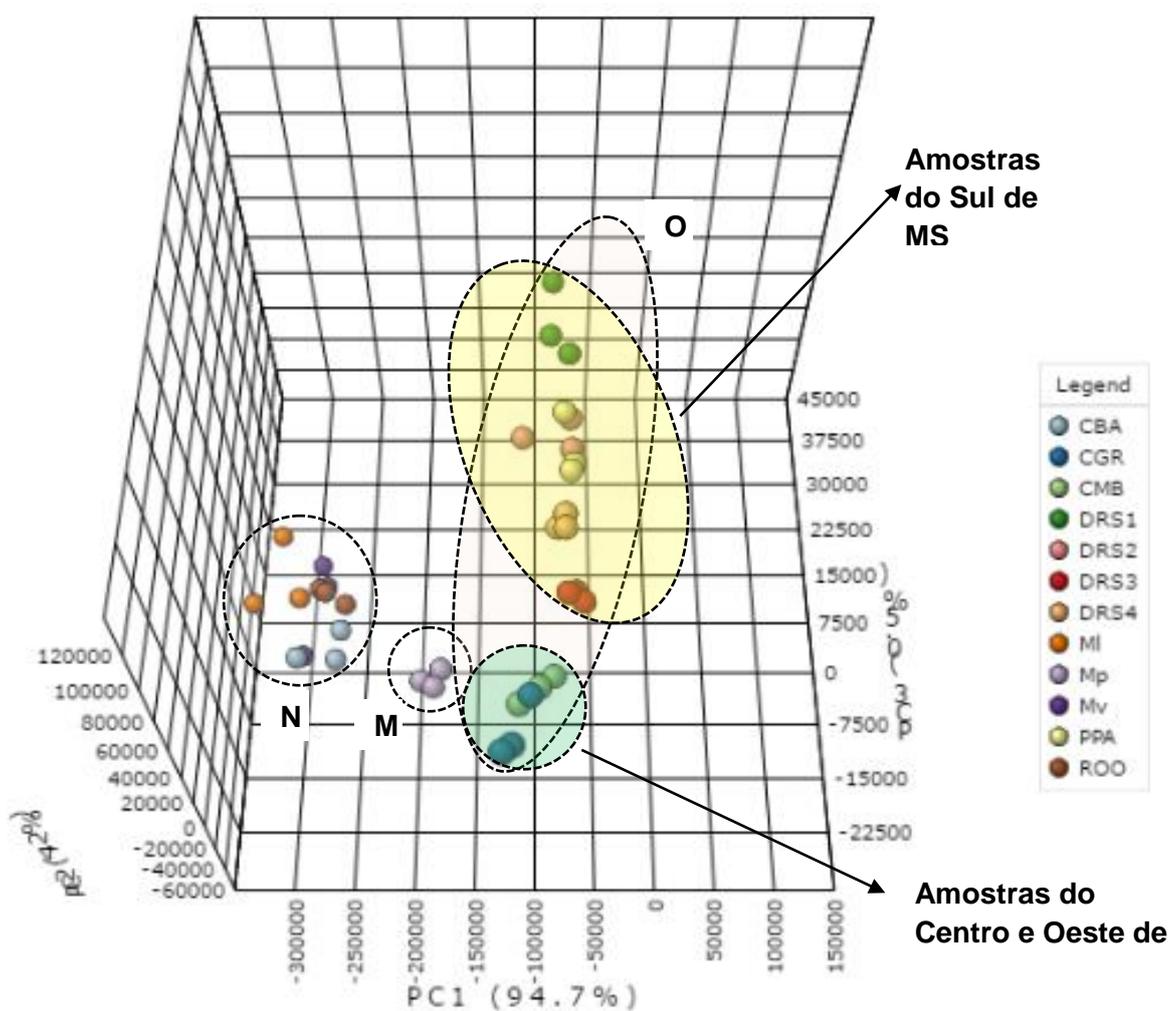


Figura 21 – Apresenta o gráfico 3D do resultado obtido para a análise de PCA, onde apresentam: a formação de subgrupos no grupo **O** formado pelas amostras comercializadas no estado de Mato Grosso do Sul, separando as amostras do Sul do estado **DRS1**, **DRS2**, **DRS3**, **DRS4** e **PPA**, das amostras da região Central e Oeste do estado, **CGR** e **CMB**, respectivamente, e que ambos se distinguem das amostras de espécies do gênero *Macrosiphonia*.

Ademais, através das análises de conjuntos de dados obtidos dos experimentos unidimensionais de RMN de ^1H , foi possível gerar uma análise de Cluster obtendo-se o dendograma (Figura 22) e *Heatmap* (Figura 23).

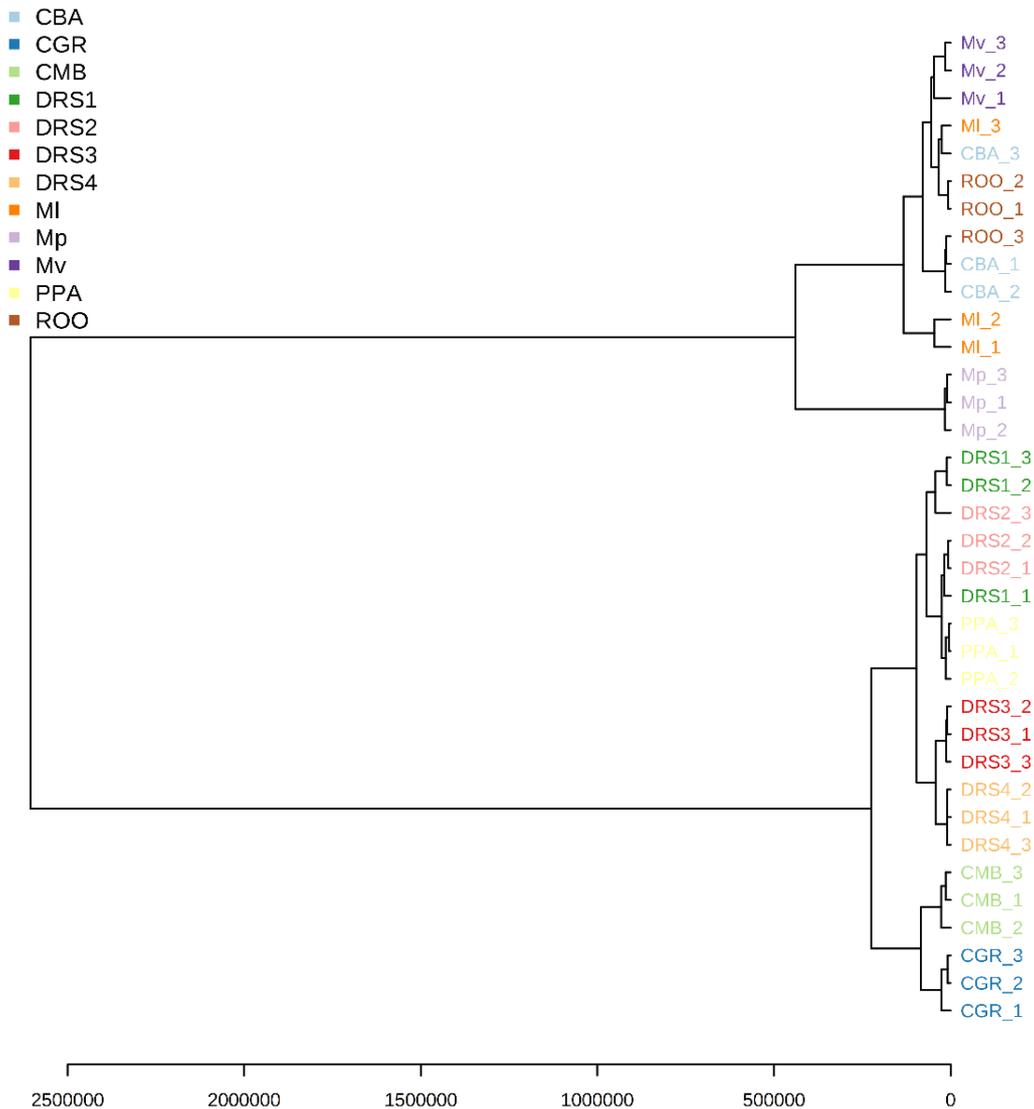


Figura 22 – Dendrograma apresentando a separação em dois cladogramas, um formado pelas amostras das espécies dos gêneros *Macrosiphonia* (**Mp**, **Mv** e **MI**) e amostras comercializadas no estado de Mato Grosso, e o segundo clado formado pelas amostras comercializadas no estado de Mato Grosso do Sul (**CGR**, **CMB**, **DRS1**, **DRS2**, **DRS3**, **DRS4** e **PPA**).

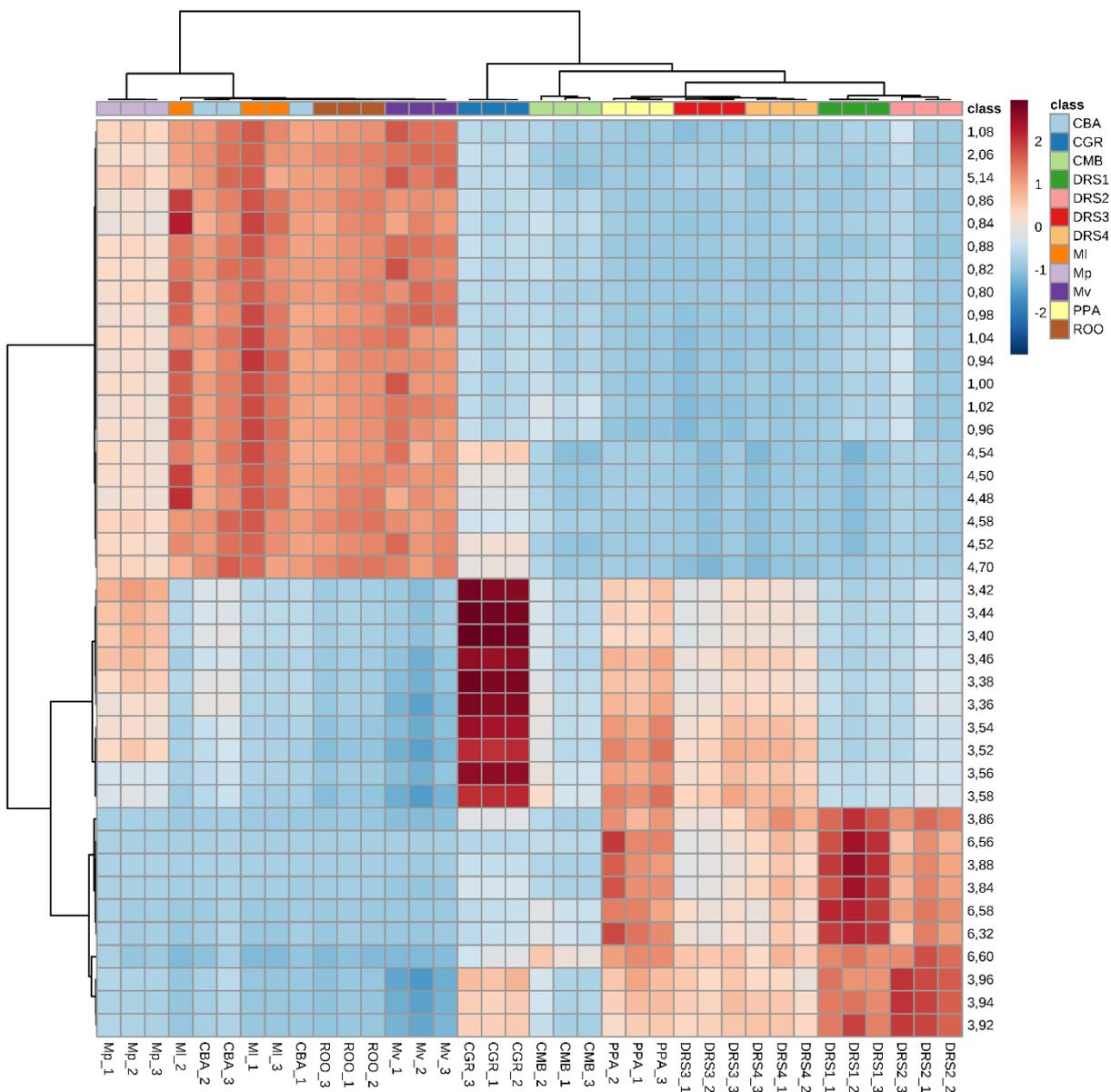


Figura 23 – Heatmap apresenta, com escala de 40 valores, os sinais de deslocamento químico de RMN de ^1H , que influenciaram na separação e formação dos cladogramas observados no dendrograma na análise de PCA dos extratos etanólicos.

O dendrograma (Figura 22) separa as amostras em dois grandes cladogramas. O primeiro cladograma, formado pelas amostras das espécies de *Macrosiphonia* coletadas e identificadas, sendo elas *M. petraea* (**Mp**), *M. velame* (**Mv**) e *M. longiflora* (**MI**), e pelas amostras comerciais do estado de Mato Grosso, demonstra a correlação entre os dados químicos destas espécies do gênero de *Macrosiphonia* e, também, relaciona que as amostras comercializadas nas cidades de Cuiabá (**CBA**) e Rondonópolis (**ROO**) têm características similares com os espécimes coletados, podendo-se ressaltar que estas raízes comercializadas podem ter sido obtidas de fontes botânicas análogas a *M. velame* e/ou *M.*

longiflora. Pode-se observar ainda para este clado a separação da espécie de *M. petraea* (**Mp**) das outras duas espécies de *Macrosiphonia*, a qual ocorre devido às distintas concentrações de componentes majoritários que cada uma destas plantas apresenta; esta característica é também demonstrada no gráfico de *Heatmap* (Figura 23), podendo-se concluir, assim, que estes espécimes são quimicamente próximas, apresentando similaridades de seus constituintes químicos majoritários, o que era esperado por serem espécies do mesmo gênero, porém se distinguem pelos níveis de concentração dos componentes principais. A atribuição de influências geográficas para a diferenciação das amostras de *Macrosiphonia* mostra-se, ainda, plausível, uma vez que estas foram obtidas de regiões diferentes e sabe-se que a geografia pode influenciar na produção e acúmulo de determinados constituintes químicos (Agrawal *et al.*, 2012).

O segundo clado, formado pelas amostras comercializadas no estado de Mato Grosso do Sul, também apresenta uma subdivisão, tendo-se separado as amostras do Sul do estado, comercializadas em Dourados (**DRS1**, **DRS2**, **DRS3** e **DRS4**) e Ponta Porã (**PPA**), das amostras do Centro e Oeste do MS, comercializadas em Campo Grande (**CGR**) e Corumbá (**CMB**), respectivamente, assim como observado pelo gráfico de PCA da Figura 18.

O gráfico de *Heatmap* (Figura 23) demonstra também a subdivisão de clados com relação à localidade das amostras no estado de Mato Grosso do Sul, fundamentando-se principalmente na presença de sinais na região de deslocamento químico de RMN de ^1H (ppm) entre δ 6,00 e δ 7,00, característicos para compostos com hibridização sp^2 entre átomos de carbono, principalmente de compostos aromáticos, e sinais a 3,80 e 3,95 ppm, típicos de grupos metoxílicos ($-\text{OCH}_3$) ligados a anéis aromáticos, que influencia na formação do grupo com as amostras comercializadas na região Sul do estado de Mato Grosso do Sul. Nas amostras comercializadas na região Central e Oeste do estado, entretanto, a interferência dos referidos sinais não é observada, o que conduziu então à separação dessas amostras. Uma vez que as espécies estudadas de *M. petraea*, *M. velame* e *M. longiflora* não apresentam os conjuntos de sinais com valores de deslocamento químico no espectro de RMN de ^1H referidos acima (a 3,80, 3,95, 6,00 e 7,00 ppm), este gráfico demonstra também que as amostras obtidas do Mato Grosso do Sul provinham de espécies botânicas não pertencentes ao gênero *Macrosiphonia*.

5.3 Análise multivariada de componentes principais da Infusão (extrato aquoso) dos espécimes de *M. petraea*, *M. velame* e *Macrosiphonia longiflora*

A primeira análise realizada com os dados de perfil químico obtidos por experimentos de RMN de ^1H das infusões das espécies do gênero *Macrosiphonia* (Anexo 2) foi a comparação entre os espécimes coletados e identificados de *M. petraea* (**Mp**), *M. velame* (**Mv**) e *M. longiflora* (**MI**), retirando-se a região de deslocamento químico de RMN de ^1H (ppm) entre δ 4,50 e δ 5,10, correspondente ao resíduo de água (H_2O) presente no solvente óxido de deutério (D_2O) usado na solubilização das amostras. Essa análise apresentou uma porcentagem de separação de dados igual a 99,0% (97,3 % explicados por PC1 e 1,7% explicados por PC2) (Figuras 24 e 25).

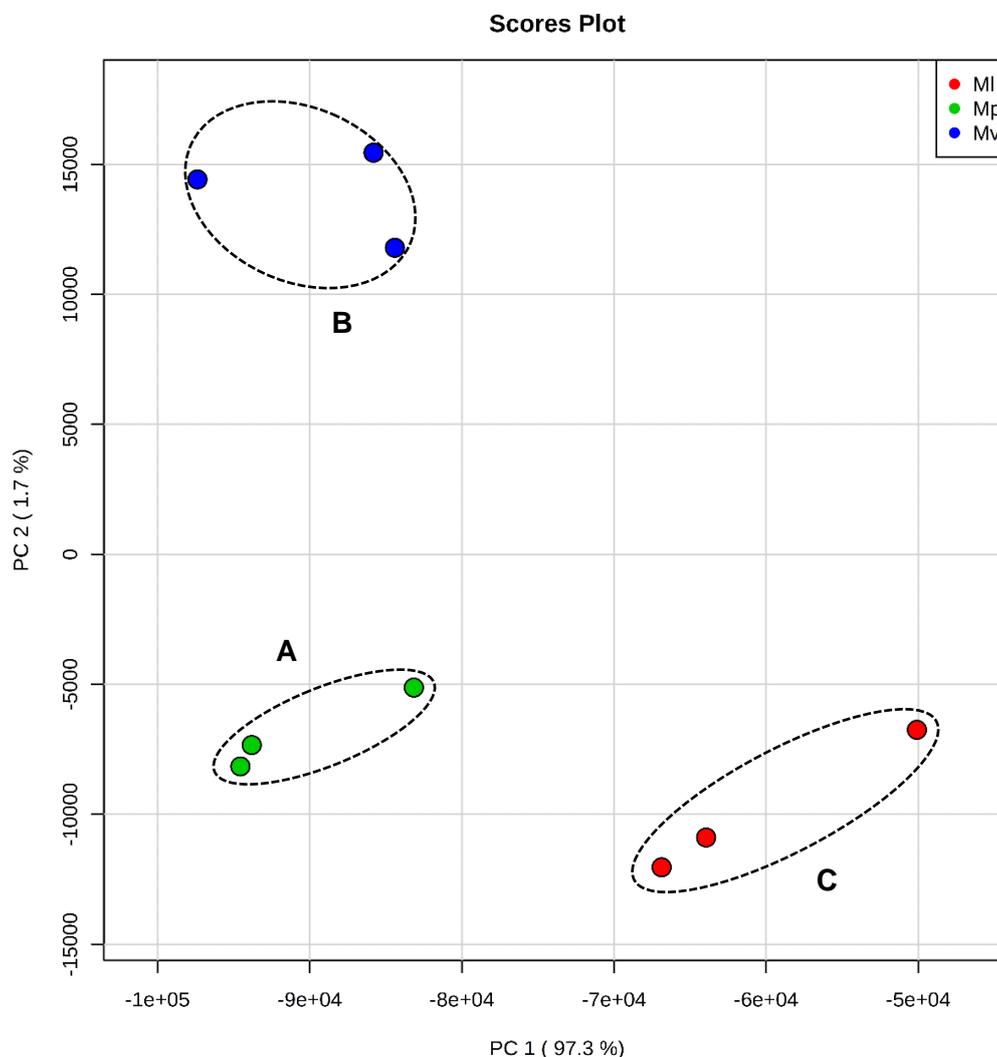


Figura 24 - Gráfico de Scores representando a separação dos grupos **A** – amostras de *M. petraea*, grupo **B** – amostras de *M. velame* e grupo **C** – *M. longiflora* com intervalo de dados entre δ ^1H 4,50 e 5,10 retirado.

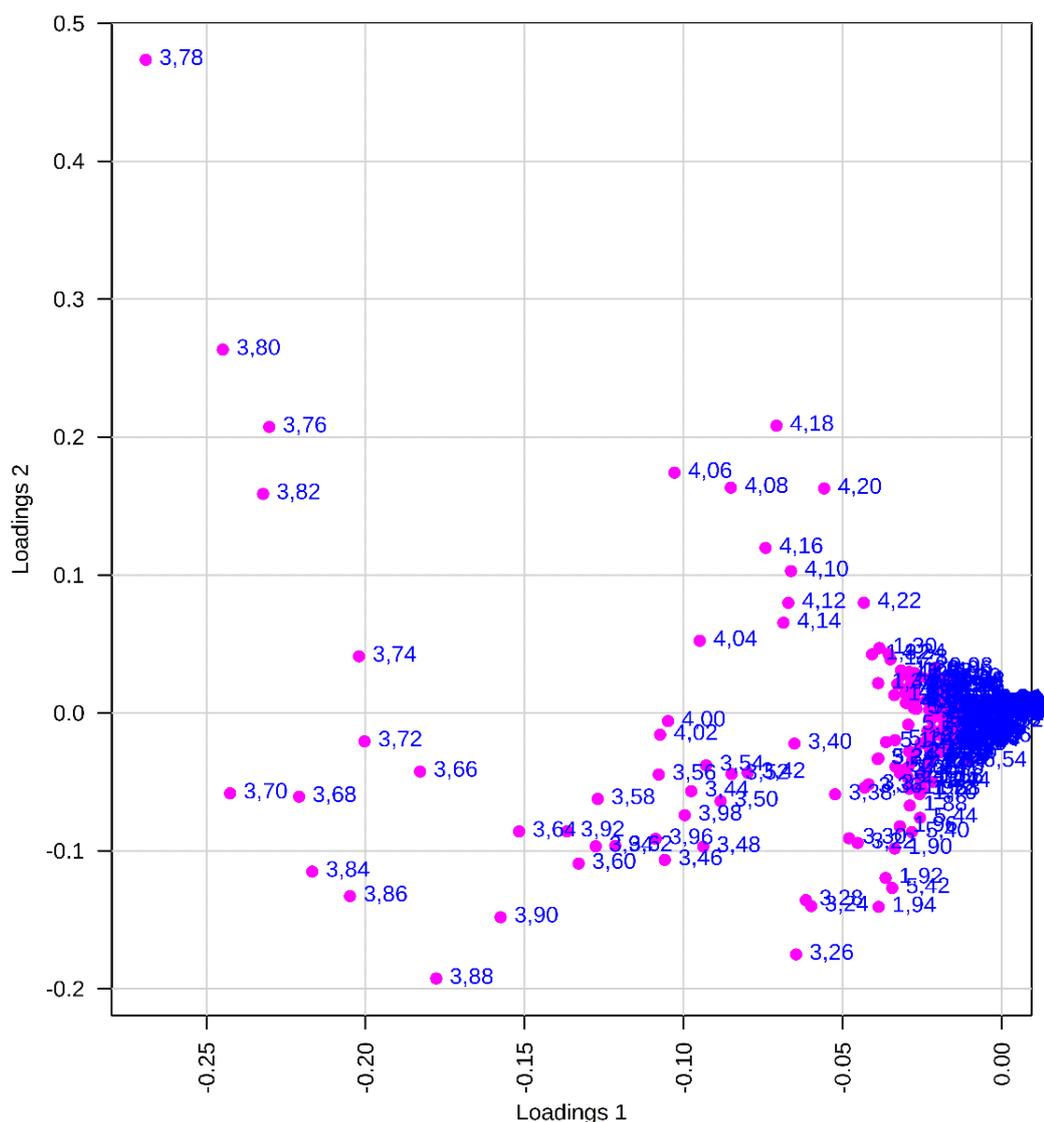


Figura 25 - Gráficos de *loadings* contendo os sinais de RMN de ¹H que exercem influência na separação dos dados para a formação da análise de PCA dos espécimes coletados, com o intervalo de dados δ ¹H entre δ 4,50 e δ 5,10 retirado.

Assim como ocorrido na análise dos extratos etanólicos destas três espécies, estas se diferenciaram não pela presença de compostos majoritários de classes diferentes, mas possivelmente pelas concentrações de seus mesmos constituintes principais, especialmente por compostos que apresentam alta taxa de oxigenação (Figura 25), como açúcares, o que era esperado devido ao procedimento de extração das raízes com água em seu ponto de fervura.

Na tentativa de melhorar a interpretação da composição química majoritária, foi realizada a exclusão dos sinais de deslocamento químico de RMN de ^1H (ppm) localizados entre δ 3,00 e δ 4,50, região de predominância de compostos poli-oxigenados, como os derivados glicosídicos, obtendo-se, assim, uma PCA com porcentagem de separação de dados de 97,7% (93,0% explicados por PC1 e 4,7% explicados por PC2) (Figura 26 e 27).

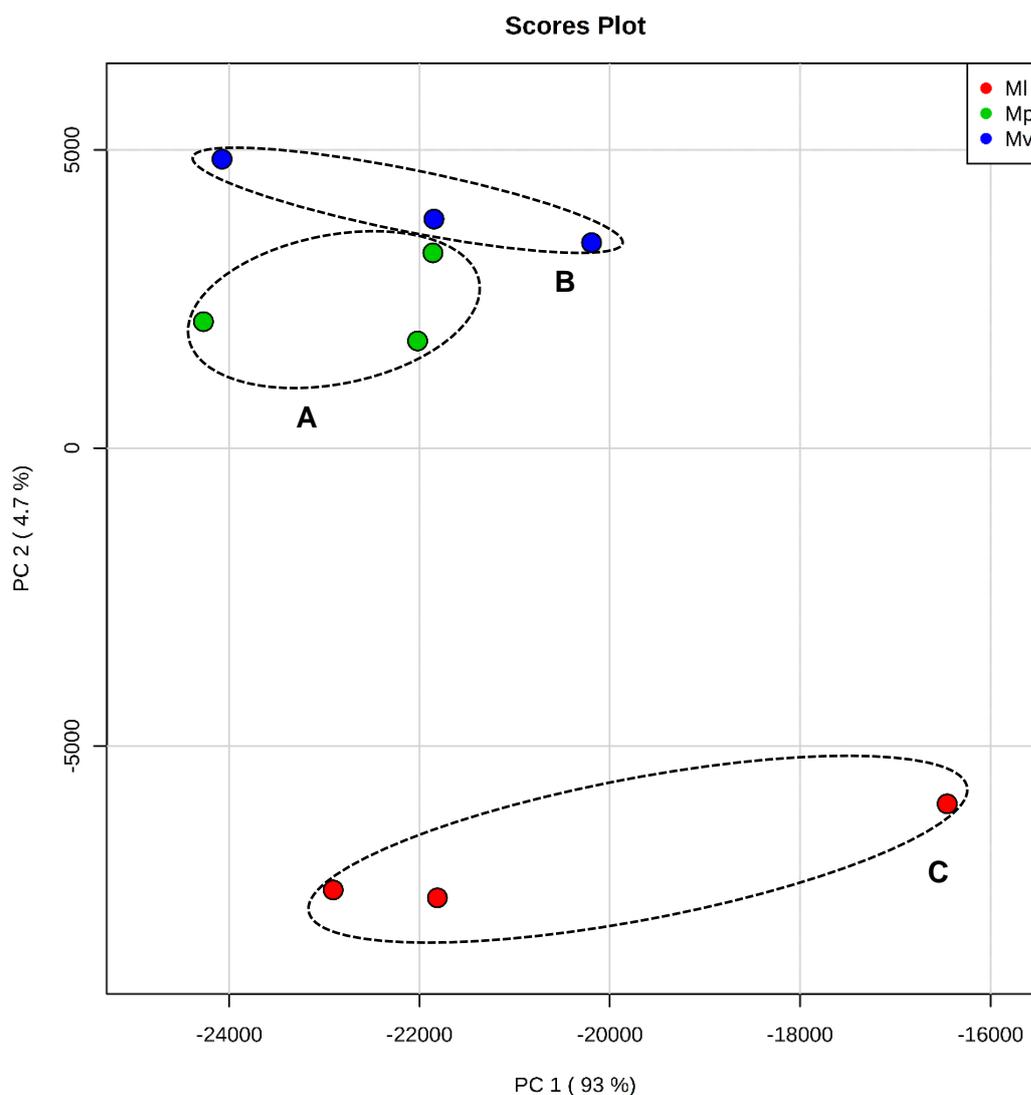


Figura 26 - Gráfico de Scores representando a separação dos grupos **A** – amostras de *M. petraea* (**Mp**), grupo **B** – amostras de *M. velame* (**Mv**) e grupo **C** – *M. longiflora* (**MI**) com os intervalos de dados entre δ 3,00 e δ 4,50 e δ ^1H 4,50 e 5,10 e retirados.

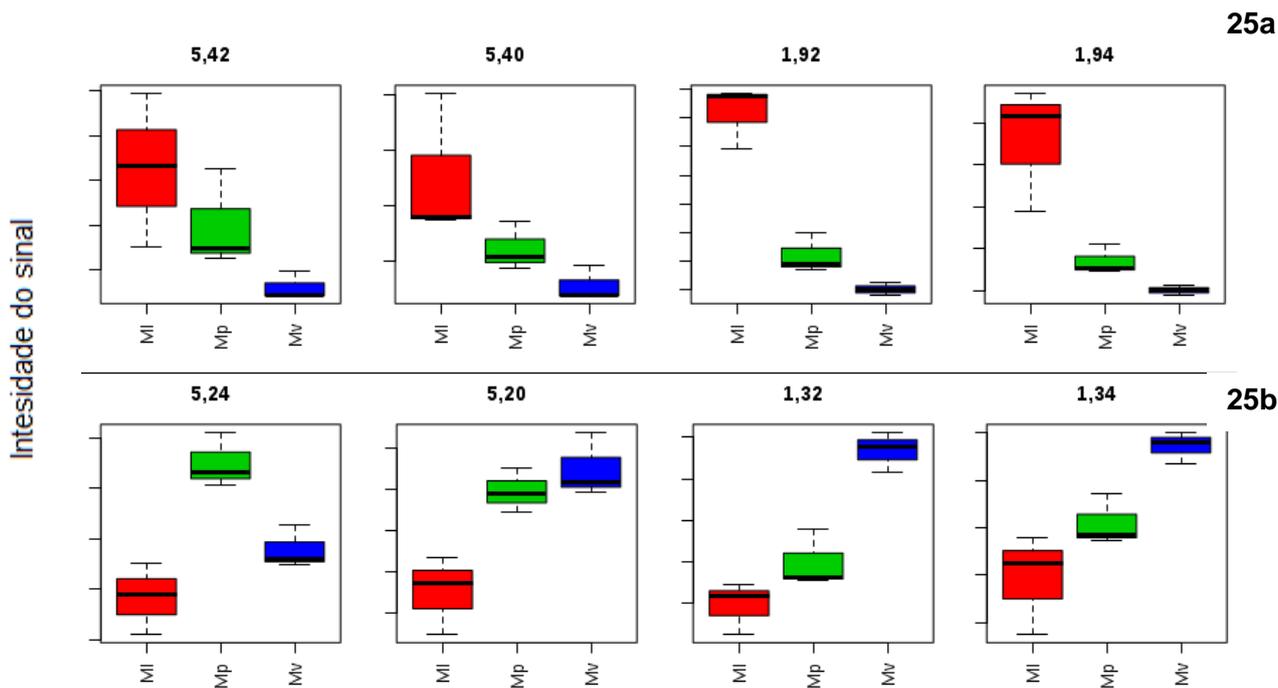


Figura 28 - Gráficos contendo alguns sinais que influenciam a separação dos grupos observados na PCA para amostras da infusão das espécies de *Macrosiphonia petraea* (**Mp**), *Macrosiphonia velame* (**Mv**) e *Macrosiphonia longiflora* (**MI**): a figura 28a apresenta os sinais que influenciam na separação do grupo **C** (*Macrosiphonia longiflora* (**MI**)) e a figura 28b, valores que influenciam na separação e formação dos grupos **A** (*Macrosiphonia petraea* (**Mp**)) e **B** (*Macrosiphonia velame* (**Mv**)).

Novamente, a separação de dados ocorreu devido as possíveis diferenças de concentração dos componentes majoritários das amostras e não por diferenças expressivas de composição química, como pode ser observado na Figura 28. Com a retirada da região de compostos que apresentam alta taxa de oxigenação, observa-se que os constituintes químicos das espécies do gênero de *Macrosiphonia* presentes em suas infusões, além de açúcares, envolvem compostos alifáticos e insaturados, visto a presença de sinais na região de deslocamento químico de RMN de ^1H (ppm) entre δ 1,20 e δ 2,50, característicos para de grupos metílicos, metilênicos e metínicos, e sinais localizados entre δ 5,12 e δ 5,50 e a δ 6,50 e δ 7,00, característicos para hidrogênios ligados a carbonos sp^2 isolados e hidrogênios ligados a carbonos sp^2 de sistemas conjugados, como os presentes em anéis aromáticos, respectivamente. O estudo fitoquímico anterior de um espécime de *Macrosiphonia petraea* coletado no estado de Mato Grosso do Sul, realizado por nosso grupo de pesquisa (De Assis Junior *et al.*, 2013), demonstrou a presença de compostos do tipo $\text{C}_6\text{-C}_3$, os quais podem corresponder aos sinais de deslocamento químico de RMN de ^1H observados e estar presentes na infusão analisado referente desta planta.

5.4 Comparação por análise multivariada das Infusões (extratos aquosos) entre as amostras de *M. petraea*, *M. velame*, *M. longiflora* e amostras comercializadas.

A análise de comparação dos componentes majoritários presentes na infusão das amostras coletadas e identificadas do gênero *Macrosiphonia* (*M. petraea* (**Mp**), *M. velame* (**Mv**) e *M. longiflora* (**MI**)) e amostras comercializadas nas cidades de Cuiabá (**CBA**) e Rondonópolis (**ROO**), do estado de Mato Grosso, Campo Grande (**CGR**), Corumbá (**CMB**), Dourados (**DRS1**, **DRS2**, **DRS3** e **DRS4**) e Ponta Porã (**PPA**), do estado de Mato Grosso do Sul, foi realizada retirando-se a região de deslocamento químico de RMN de ^1H (ppm) entre δ 4,50 e δ 5,10, na qual se observa o sinal residual de água (H_2O) presente no solvente deuterado óxido de deutério (D_2O) (Figura 29).

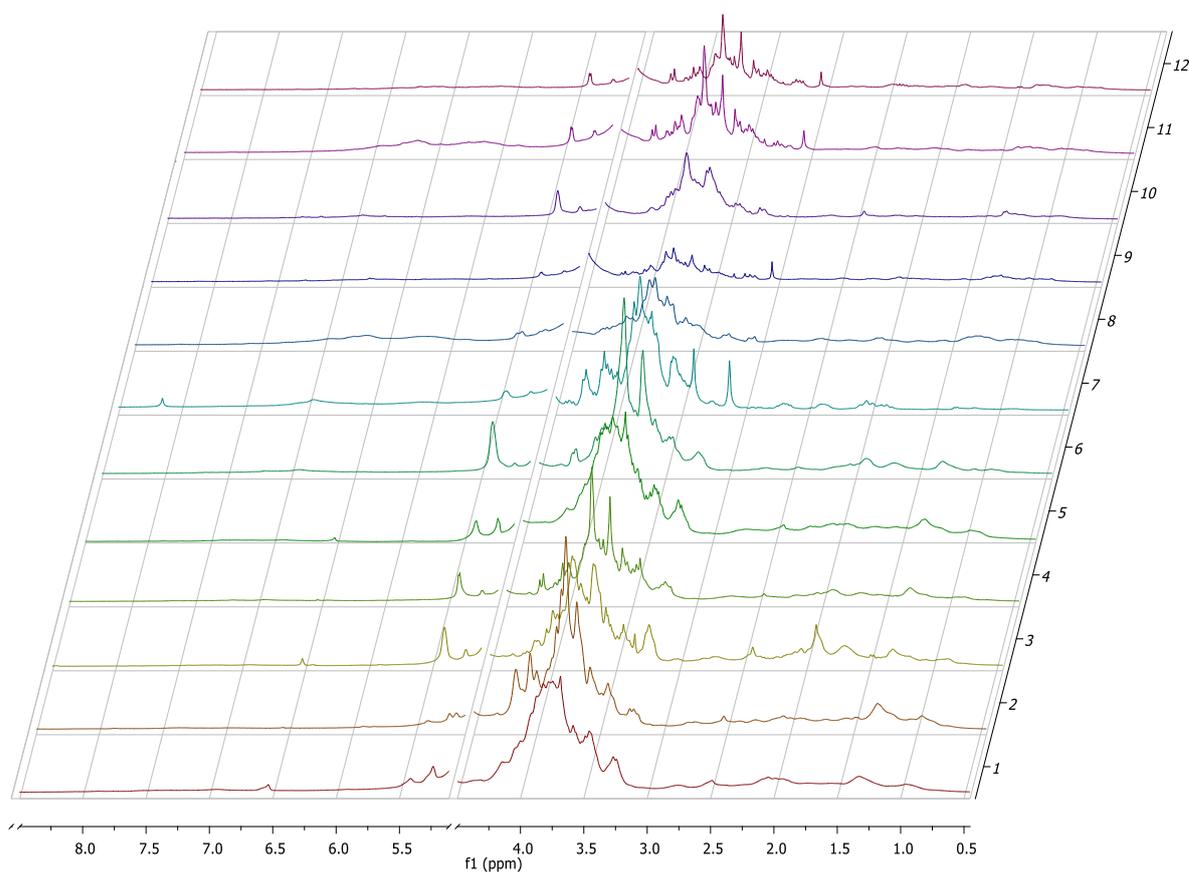


Figura 29 - Espectros obtidos pelo experimento unidimensional de RMN de ^1H (D_2O – 300,13 MHz – ns = 128) para as amostras 1 – *Macrosiphonia petraea* (**Mp**); 2 – *Macrosiphonia velame* (**Mv**); 3 – *Macrosiphonia longiflora* (**MI**); 4 – amostra de Cuiabá (**CBA**); 5 – amostra de Rondonópolis (**ROO**); 6 – amostra de Campo Grande (**CGR**); 7 – amostra de Corumbá (**CMB**); 8, 9, 10 e 11 – amostras de Dourados (**DRS1**, **DRS2**, **DRS3** e **DRS4**, respectivamente) e 12 – amostra de Ponta Porã (**PPA**). A região entre δ 4,50 e δ 5,10 ppm (possíveis contaminantes e interferentes) foi retirada e a janela de δ 8,40 a δ 0,50 ppm teve *bucketing* de 0,02 ppm.

A análise multivariada, então, foi realizada e apresentou como resultado uma separação de dados com a porcentagem de 95,4% (92,1 % explicado por PC1 e 3,3% explicado por PC2) (Figuras 30 e 31).

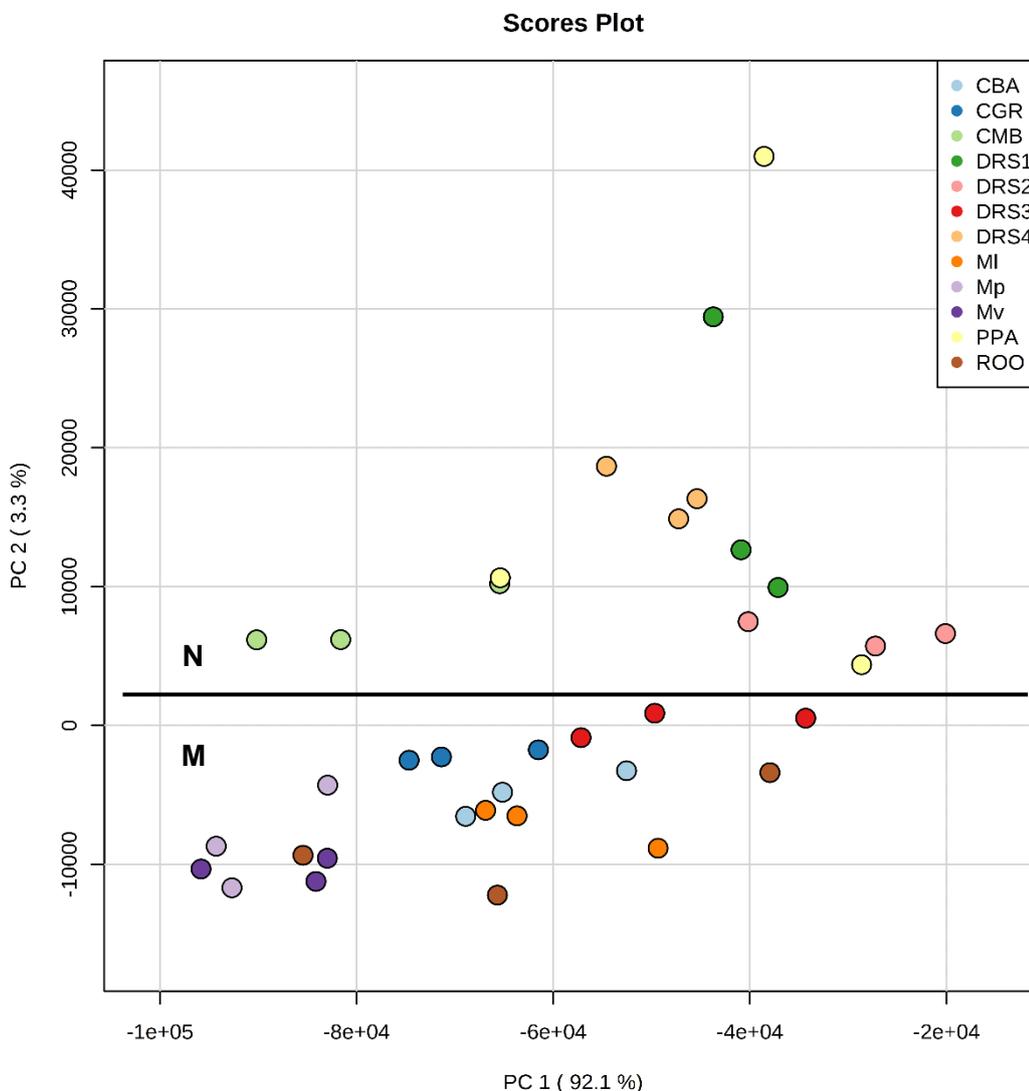


Figura 30 - Gráfico de Scores demonstrando a separação e formação de grupos retirando os intervalos de dados δ RMN de ^1H entre δ 4,50 e δ 5,10: grupo **M** formado pelas amostras de *M. petraea* (**Mp**), amostras *M. velame* (**Mv**), amostras de *M. longiflora* (**MI**), amostra de Cuiabá (**CBA**) e amostras de Rondonópolis (**ROO**), amostras de Campo Grande (**CGR**), e uma amostra da cidade de Dourados **DRS3** e o grupo **N** formado pelas, amostra de Corumbá (**CMB**), amostras de Dourados (**DRS1**, **DRS2**, **DRS4**) e amostra de Ponta Porã (**PPA**).

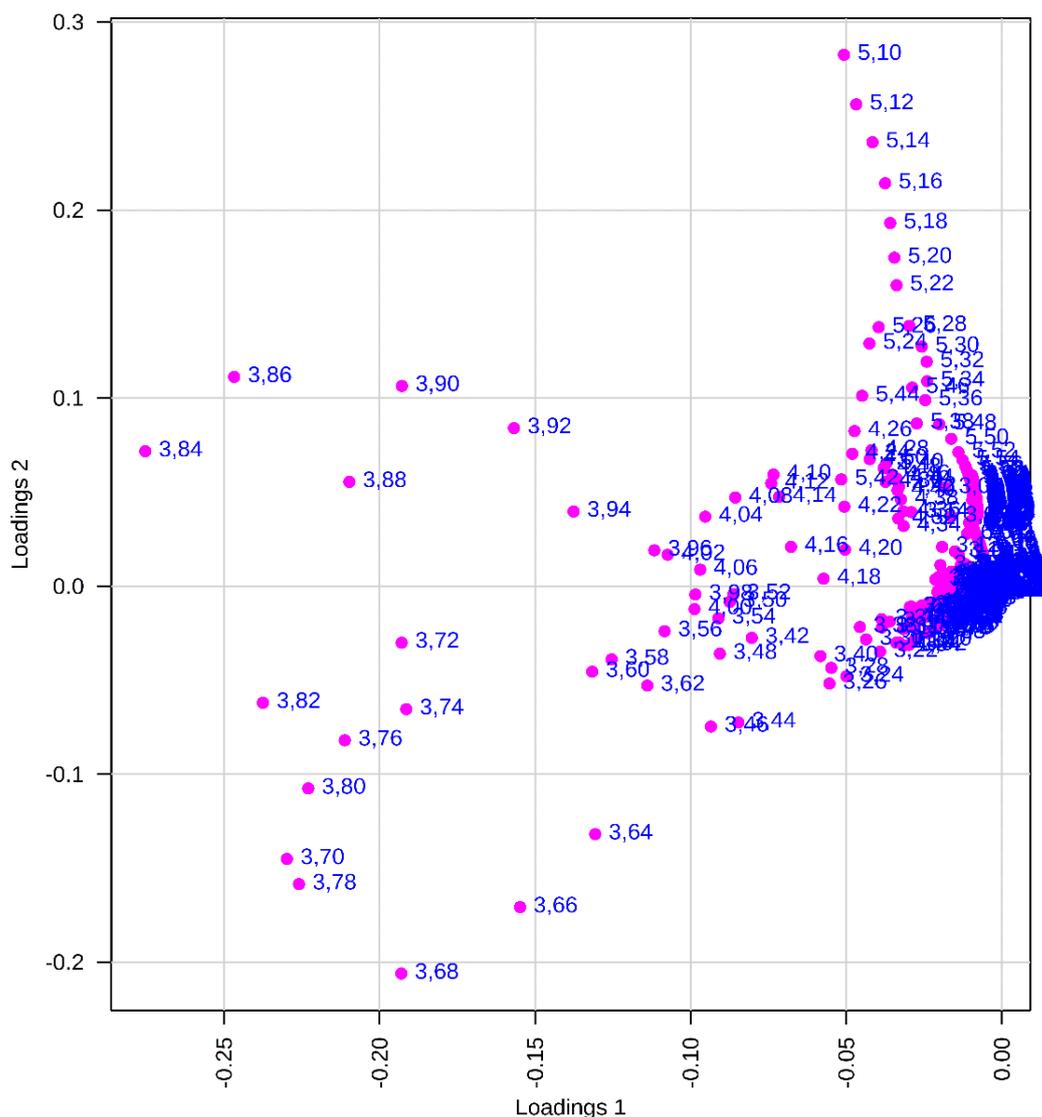


Figura 31 - Gráficos de *loadings* apresenta os pontos influências na separação dos dados para a formação da análise de PCA entre os espécimes coletados e comercializados com os intervalos de dados δ RMN de ^1H entre δ 4,50 e δ 5,10 retirados

Na Figura 30, observam-se dois grandes grupos, **M** e **N**. O grupo **M** é formado pelas amostras de espécies coletadas pertencentes ao gênero *Macrosiphonia* (*M. petraea* (**Mp**), *M. velame* (**Mv**) e *M. longiflora* (**Ml**)) e amostras comercializadas nas cidades de Cuiabá (**CBA**) e Rondonópolis (**ROO**), do estado do Mato Grosso, Campo Grande (**CGR**) e uma amostra obtida da cidade de Dourados (**DRS3**), do estado de Mato Grosso do Sul. Estas amostras citadas se organizaram principalmente pela influência de sinais na região de deslocamento químico de RMN de ^1H (ppm) entre a região de δ 3,50 e δ 4,50, referente a hidrogênios de compostos poli-oxigenados, conforme observado na análise das infusões

das espécies do gênero *Macrosiphonia* (item 5.3), demonstrando haver similaridade entre as amostras adquiridas no estado de Mato Grosso (**CBA** e **ROO**). Pode-se sustentar, portanto, que as raízes comercializadas nas cidades de Cuiabá (**CBA**) e Rondonópolis (**ROO**) podem ser oriundas de espécies botânicas similares às plantas de estudo.

A formação do grupo **N**, constituído pelas amostras comercializadas nas cidades de Dourados (**DRS1**, **DRS2** e **DRS4**) e Ponta Porã (**PPA**), envolve sinais influentes que ocorrem na região de deslocamento químico de RMN de ^1H (ppm) entre δ 5,12 e δ 5,50, havendo ainda uma menor influência pelos sinais localizados na região entre δ 3,84 e δ 3,94; sendo assim, pode-se atribuir a presença de componentes majoritários de natureza olefínica em maior concentração no grupo **N** do que nas amostras do grupo **M**.

Ademais, conforme realizado para a análise das amostras coletadas de espécies do gênero *Macrosiphonia*, com o intuito de se obter uma melhor visualização dos componentes majoritários presentes nessas amostras, uma nova análise de PCA foi gerada (Figuras 32 e 33), retirando-se as regiões de deslocamento químico de RMN de ^1H (ppm) entre δ 3,00 e δ 4,50 ppm, por ser uma região de compostos poli-oxigenados, principalmente glicosídeos, que influenciam principalmente para a formação do grupo **M**.

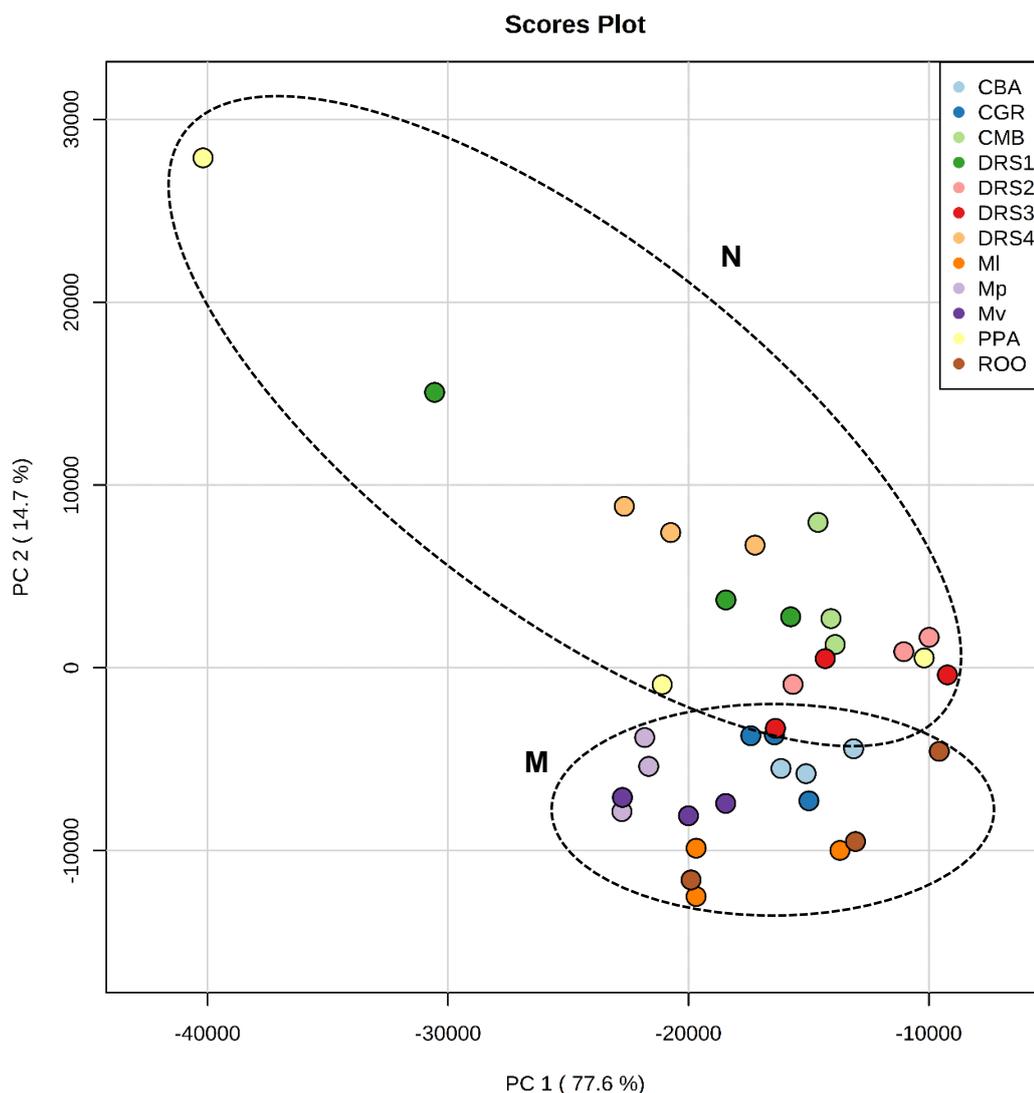


Figura 32 - Gráfico de Scores demonstrando a separação e formação de grupos retirando os intervalos de dados $\delta^1\text{H}$ entre δ 3,00 e δ 4,50 e δ 4,50 e δ 5,10: grupo **M** formado pelas amostras de *M. petraea* (**Mp**), amostras *M. velame* (**Mv**), amostras de *M. longiflora* (**MI**), amostra de Cuiabá (**CBA**) e amostras de Rondonópolis (**ROO**) e amostras de Campo Grande (**CGR**) e o grupo **N** formado pelas, amostra de Corumbá (**CMB**), amostras de Dourados (**DRS1**, **DRS2**, **DRS3** e **DRS4**) e amostra de Ponta Porã (**PPA**).

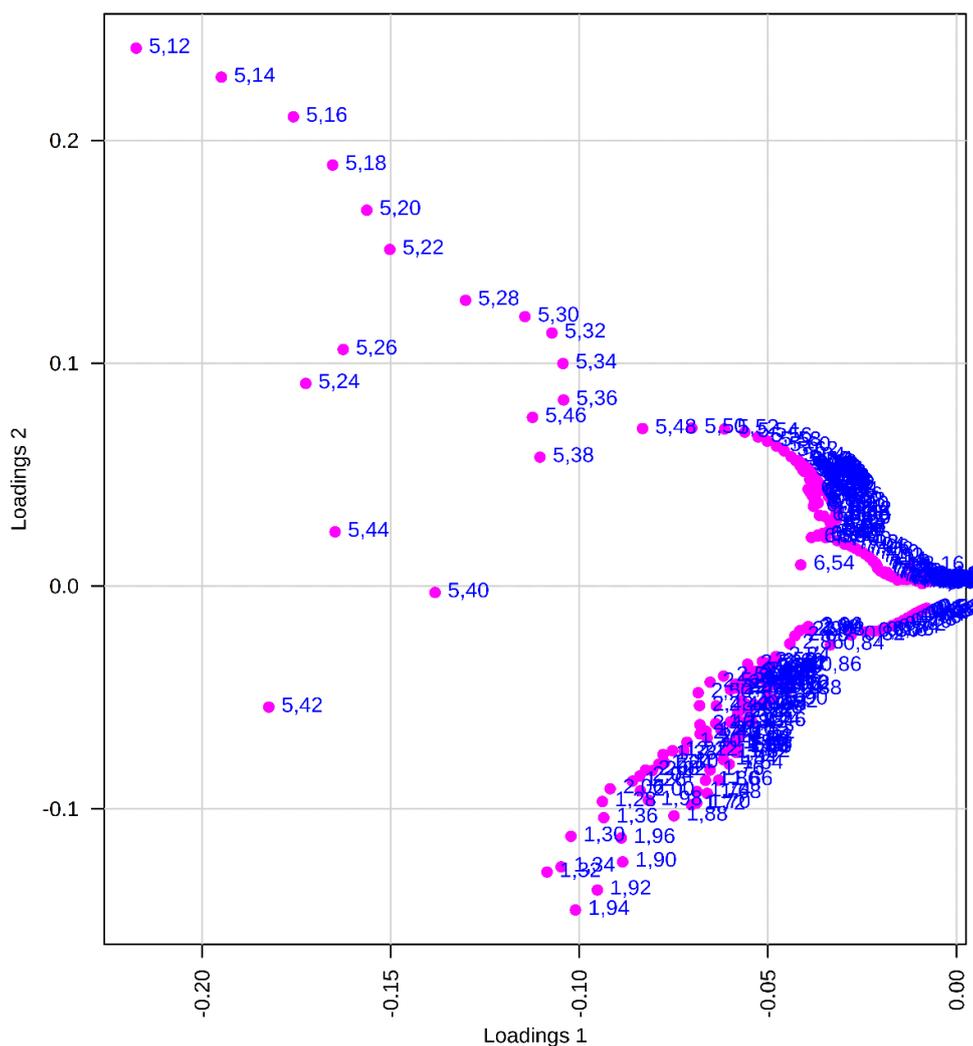


Figura 33 - Gráficos de *loadings* apresenta os pontos influências na separação dos dados para a formação da análise de PCA entre os espécimes coletados e amostras comercializadas com os intervalos de dados δ ^1H entre δ 3,00 e δ 4,50 e δ 4,50 e δ 5,10 retirados.

Nesta nova análise (Figura 32), obteve-se uma porcentagem de separação dos dados de 92,3% (77,6 % explicados por PC1 e 14,7% explicados por PC2) com a formação de dois grupos, **M** e **N**, sendo que a formação do grupo **M** foi influenciada por hidrogênios com valores de deslocamento químico de RMN de ^1H (ppm) entre δ 1,20 e δ 2,50 e também por sinais na região de hidrogênios ligados a carbonos olefínicos, presentes na região entre δ 5,40 e δ 5,42. O grupo **N**, por sua vez, apresentou como principais sinais influentes na formação do grupo localizados na região de deslocamento químico de RMN de ^1H (ppm) entre δ 5,12 e δ 7,00, referentes a hidrogênios ligados a carbonos com hidridização sp^2

isolados e conjugados, respectivamente, sendo o último característico de compostos aromáticos.

Ademais, para uma melhor visualização da separação das amostras através da análise dos componentes majoritários, gráficos de dendrograma e *Heatmap* (Figuras 34 e 35) foram gerados para a primeira PCA (Figura 30), onde foi retirada a região de deslocamento químico de RMN de ^1H (ppm) entre δ 4,50 e δ 5,10, correspondente ao resíduo de água presente no solvente D_2O .

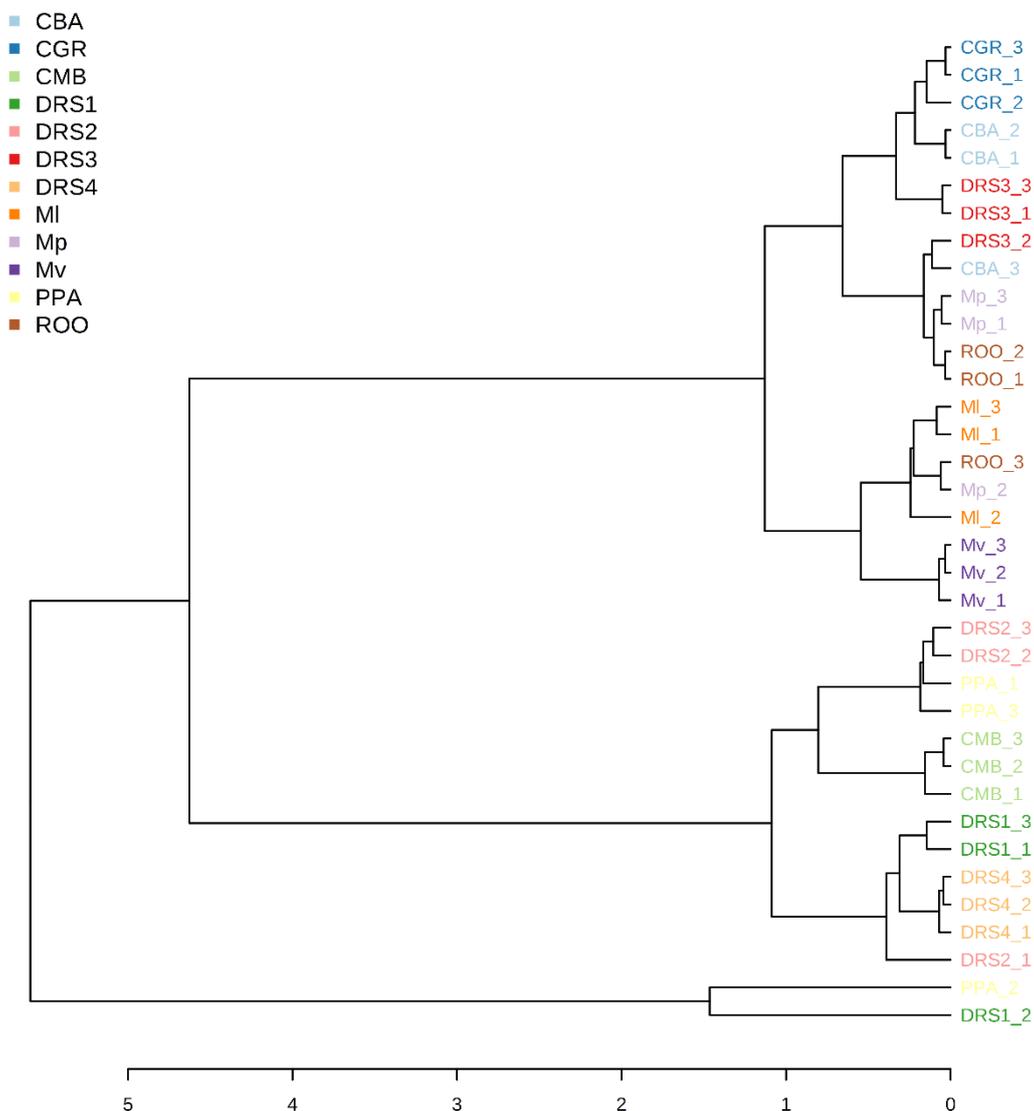


Figura 34 - Dendrograma apresentando a separação das amostras estudadas em três clados: um formado pelas amostras das espécies dos gêneros *Macrosiphonia* (**Mp**, **Mv** e **MI**) e amostras comercializadas no estado de Mato Grosso (**CBA** e **ROO**) e Mato Grosso do Sul (**CGR** e **DRS3**), e o segundo e terceiro clados formados apenas pelas amostras comercializadas no estado de Mato Grosso do Sul (**CMB**, **DRS1**, **DRS2**, **DRS4** e **PPA**).

O dendrograma formado gerou três clados: o primeiro, formado pelas amostras coletadas e identificadas do gênero *Macrosiphonia* (*M. petraea* (**Mp**), *M. velame* (**Mv**) e *M. longiflora*) e pelas amostras comercializadas nas cidades de Cuiabá (**CBA**), Rondonópolis (**ROO**), Campo Grande (**CGR**) e uma amostra de Dourados (**DRS3**), ressalta a similaridade de constituintes entre as amostras do gênero *Macrosiphonia*, também observada no dendrograma dos extratos etanólicos destas plantas (item 5.2). As amostras do estado de Mato Grosso, **CBA** e **ROO**, apresentaram-se novamente relacionadas às fontes botânicas de *Macrosiphonia*. As amostras de Mato Grosso do Sul (**CGR** e **DRS3**), mesmo reunidas com as amostras do gênero *Macrosiphonia* na análise dos componentes principais da infusão não se apresentam semelhantes ao extrato etanólico (item 5.2, Figura 18), o que se deve ao tipo de solvente empregado para a extração dos constituintes das amostras; nas infusões, estas amostras comerciais e coletadas se assemelharam devido ao teor de glicosídeos.

Os outros dois clados observados no dendrograma são formados por amostras comercializadas no estado de Mato Grosso do Sul (**CMB**, **DRS1**, **DRS2**, **DRS4** e **PPA**), ressaltando-se que estas amostras não são similares às espécies do gênero *Macrosiphonia* estudadas, diferenciando-se pela natureza de seus constituintes químicos majoritários.

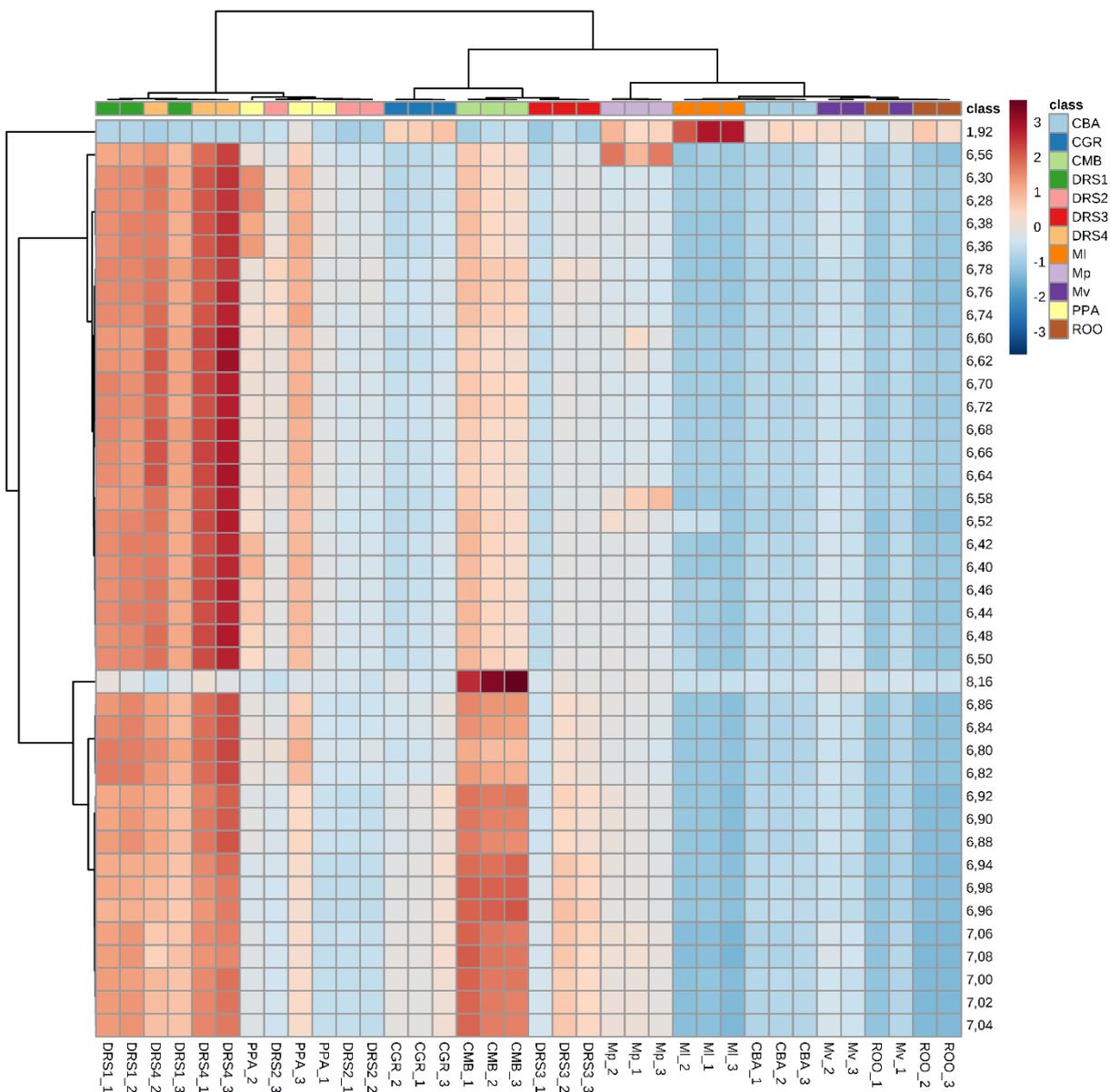


Figura 35 - Heatmap apresenta, com escala de 40 valores, os sinais de deslocamento químico de RMN de ^1H , que influenciaram na separação e formação dos clados observados no dendrograma para a análise dos componentes majoritários presentes na infusão.

O gráfico de *Heatmap* (Figura 35) demonstra que a separação dos três clados observados no dendrograma (Figura 34) se deu principalmente pela presença e intensidades dos sinais na região de deslocamento químico de RMN de ^1H (ppm) de δ 6,40 e δ 7,00, característicos de hidrogênios ligados a carbonos hidridizados sp^2 de sistemas aromáticos. Os hidrogênios relacionados aos sinais supracitados influenciaram o agrupamento do segundo e terceiro clado (**CMB**, **DRS1**, **DRS2**, **DRS4** e **PPA**), o que não foi observado para na formação do primeiro grupo (**Mp**, **Mv**, **MI**, **CBA**, **ROO**, **CGR** e **DRS3**).

5.5 Análise fitoquímica de *Macrosiphonia petraea* e *Macrosiphonia velame*

Nos estudos fitoquímicos realizados com as espécies *M. petraea* e *M. velame* foram identificados derivados triterpênicos que apresentam três tipos de esqueleto: Lupano, Oleanano e Ursano.

Os triterpenos lupeol (esqueleto Lupano) (**1**), α -amirina (esqueleto Ursano) (**2**) e β -amirina (esqueleto Oleanano) (**3**), obtidos em mistura da fase hexânica de *M. petraea* e *M. velame*, foram identificados com base na análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e posterior comparação com dados descritos na literatura (Sobrinho et. al. 1991 e Balestrin et. al., 2008), (Tabela 3).

No espectro de RMN de ^1H (Figura 37 e 38) os principais sinais a serem investigados para a primeira tentativa de identificação dos compostos triterpênicos deu-se pela observação dos sinais característicos em deslocamento químico de RMN de ^1H (δ , ppm) 4,56 (*s*) e 4,69 (*s*) para os hidrogênios metilênicos do carbono sp^2 característico do esqueleto lupano, (δ , ppm) 5,18 (*t*) e 5,13 (*t*) e para o hidrogênio metínico do carbono sp^2 dos esqueletos oleanano e ursano, respectivamente. Ademais, a observação dos hidrogênios ligados a carbono carbinólico em (δ , ppm) 3,50 (*m*) e de hidrogênios metílicos com deslocamento (δ , ppm) entre 0,70 e 1,30, contribuíram para a identificação da origem triterpênica dos compostos **1**, **2** e **3**, (Figura 36).

Para os experimentos de RMN de ^{13}C , as principais análises realizadas para a identificação da ocorrência de esqueletos triterpênicos deram-se pela interpretação dos deslocamentos químicos (δ) observados para os carbonos olefínicos (sp^2) destes compostos, que formam pares característicos para cada esqueleto: para o esqueleto Lupano, δ 109,0 (CH_2) e δ 151,0 (C), Ursano δ 125,0 (CH) e δ 139,0 (C) e Oleanano δ 121,0 (CH) e δ 145,0 (C). Além disso, a observação dos deslocamentos do carbono carbinólico em 78,0 ppm (C-3) e a densidade de sinais entre a região de 12,0 a 60,0 ppm, conduz à interpretação da ocorrência de compostos triterpênicos (Figura 36).

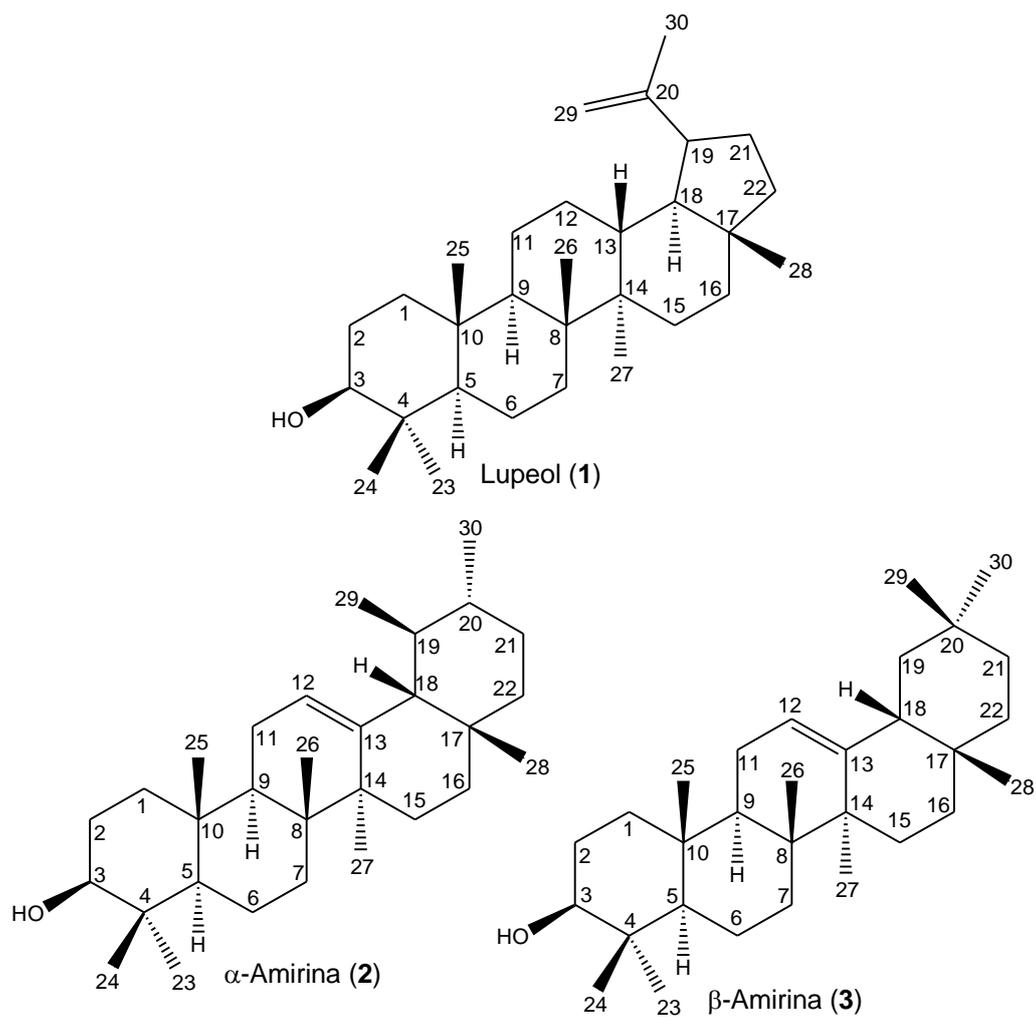


Figura 36: Estrutura química dos compostos **1**, **2** e **3**: lupeol, α -amirina e β -amirina, respectivamente.

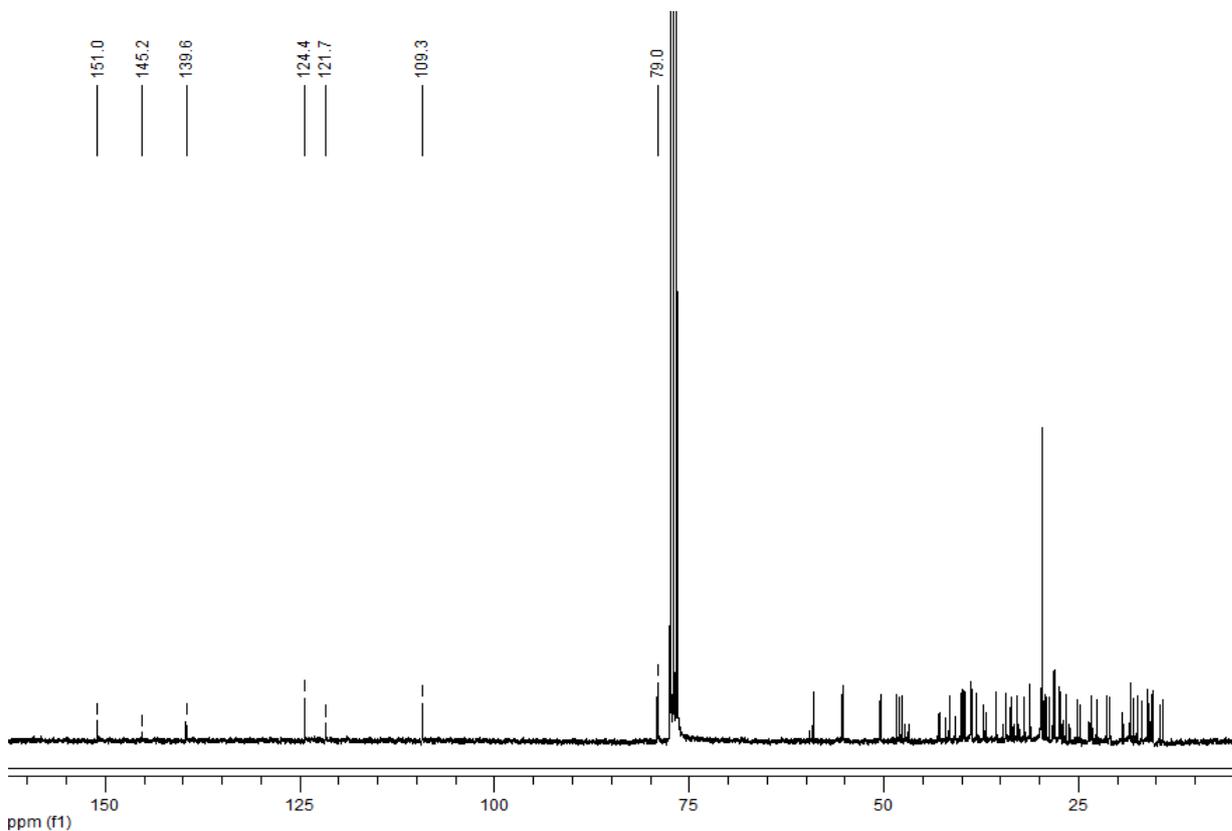
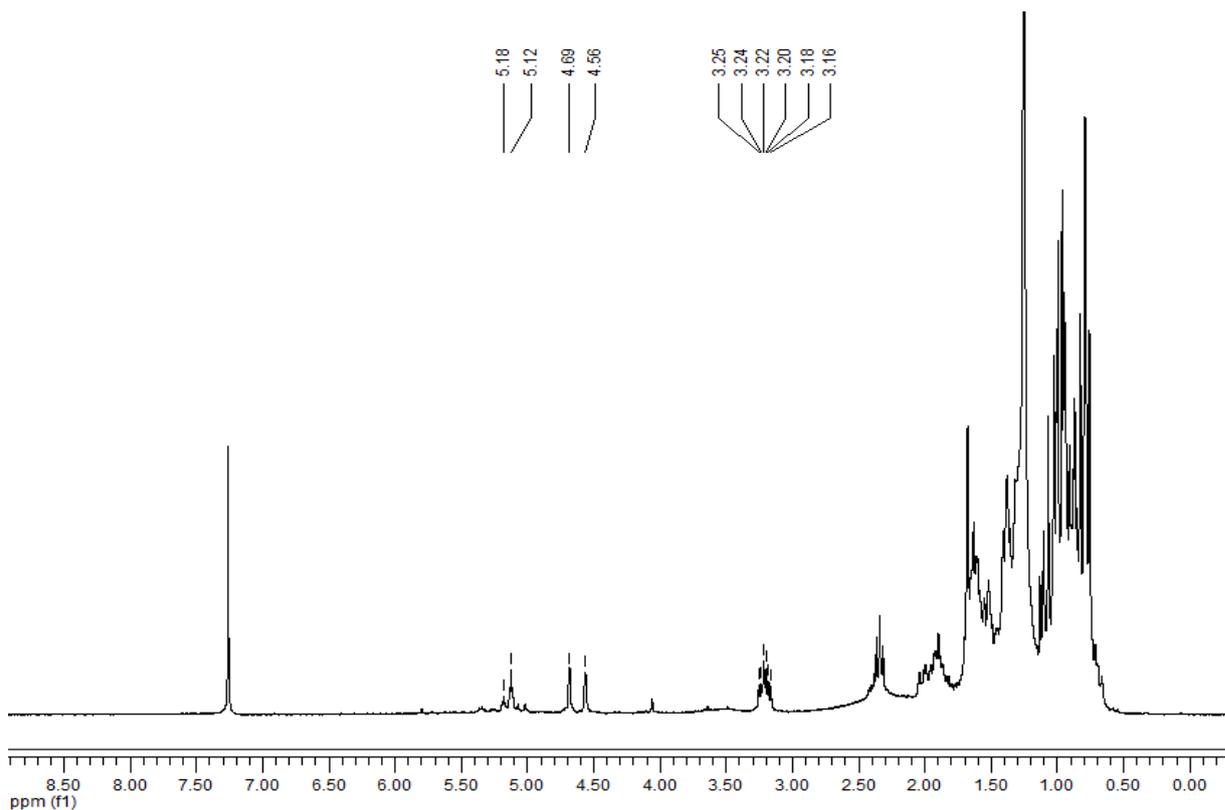


Figura 37 - Espectro de RMN de ¹H (300,13 MHz, CDCl₃) e de ¹³C (75,47 MHz, CDCl₃) dos compostos **1**, **2** e **3**, obtidos de *M. petraea*

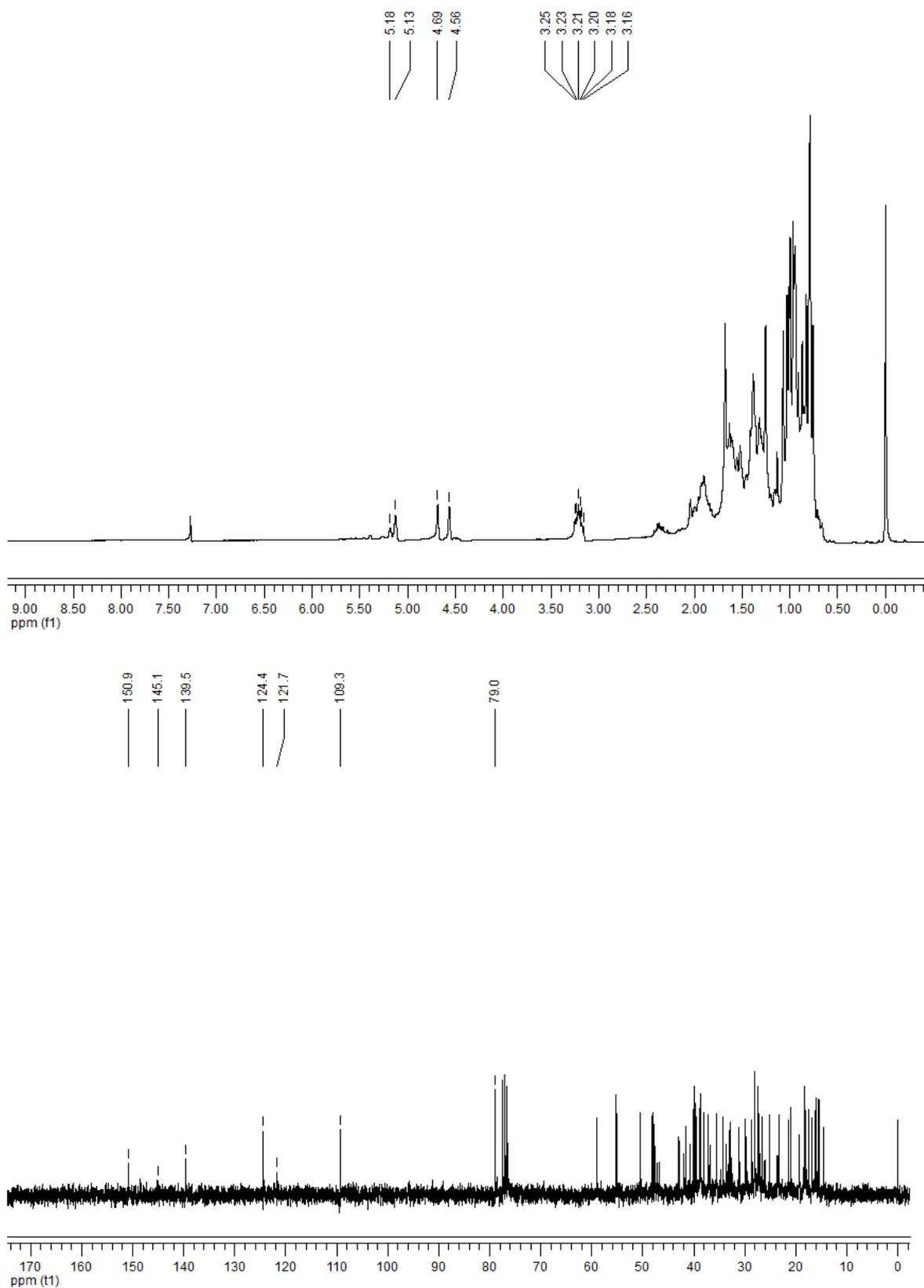


Figura 38: Espectro de RMN de ^1H (300,13 MHz, CDCl_3) e de ^{13}C (75,47 MHz, CDCl_3) dos compostos **1**, **2** e **3**, obtidos de *M. velame*

Tabela 3: Dados de RMN de ^{13}C (75,47 MHz, CDCl_3) do composto 1 (lupeol), 2 (α -amirina) e 3 (β -amirina), sendo os compostos 1a, 2a e 3a – obtidos de *M. petraea* e 1b, 2b e 3b – obtidos de *M. velame*, em comparação com os valores retirados das referências (Sobrinho et. al. 1991 e Balestrin et. al., 2008)

Nº do C	$\delta^{13}\text{C}$								
	1a	1b	Lupeol	2a	2b	α -amirina	3a	3b	β -amirina
01	38,7	38,7	38,7	38,6	38,6	38,7	38,6	38,6	38,7
02	27,4	27,4	27,4	27,3	27,3	27,2	27,3	27,3	27,3
03	79,0	78,9	78,9	79,0	78,9	78,3	79,0	78,9	79,0
04	38,8	38,8	38,8	38,8	38,8	38,7	38,8	38,8	38,8
05	55,3	55,3	55,3	55,2	55,2	55,2	55,3	55,3	55,3
06	18,3	18,3	18,3	18,4	18,4	18,3	18,4	18,4	18,5
07	34,3	34,3	34,2	32,9	32,9	32,9	32,7	32,7	32,8
08	40,8	40,8	40,8	40,0	40,0	40,0	38,8	38,8	38,8
09	50,4	50,4	50,4	47,7	47,7	47,7	47,7	47,7	47,7
10	37,2	37,2	37,1	36,9	36,9	36,9	37,2	37,2	37,6
11	20,9	20,9	20,9	23,3	23,3	23,3	23,7	23,7	23,6
12	25,2	25,2	25,1	124,4	124,1	124,3	121,7	121,5	121,6
13	38,1	38,1	38,0	139,6	139,0	139,3	145,2	145,0	145,1
14	42,8	42,8	42,8	42,1	42,1	42,0	41,7	41,7	41,8
15	27,4	27,4	27,4	28,7	28,7	28,7	26,2	26,2	26,2
16	35,6	35,6	35,5	26,6	26,6	26,6	26,9	26,9	27,0
17	43,0	43,0	43,0	33,7	33,7	33,7	32,5	32,5	32,5
18	48,3	48,3	48,2	59,1	59,1	58,9	47,2	47,2	47,4
19	48,0	48,0	47,9	39,7	39,7	39,6	46,8	46,8	46,9
20	151,0	150,9	150,9	39,6	39,6	39,6	31,1	31,1	31,1
21	29,9	29,9	29,8	31,3	31,3	31,2	34,7	34,7	34,8
22	40,0	40,0	40,0	41,5	41,5	41,5	37,2	37,2	37,2
23	28,0	28,0	28,0	28,1	28,1	28,1	28,4	28,4	28,2
24	15,4	15,4	15,4	15,6	15,6	15,6	15,5	15,5	15,5
25	16,1	16,1	16,1	15,7	15,7	15,6	15,6	15,6	15,6
26	16,0	16,0	15,9	16,9	16,9	16,8	16,9	16,9	16,9
27	14,5	14,5	14,5	23,4	23,4	23,3	26,0	26,0	26,0
28	18,0	18,0	18,0	28,1	28,1	28,1	28,4	28,4	28,4
29	109,3	109,2	109,3	17,5	17,5	17,4	33,3	33,3	33,3
30	19,3	19,3	19,3	21,4	21,4	21,3	23,7	23,7	23,7

O espectro de RMN de ^{13}C dos compostos **4** e **5** (Figura 40 e 41), obtidos da fase hexânica de *M. velame* e *M. petraea*, indicaram tratar-se de dois triterpenos ácidos, uma vez que dois sinais com valores de deslocamento químico em aproximadamente 180,0 ppm no espectro de RMN de ^{13}C é observado. Ademais, os sinais dos carbonos sp^2 de dois conjuntos de sinais da ligação dupla destas substâncias apresentam deslocamento químico em aproximadamente 122,0 (CH) e 145,0 (C), para um par, e 125,0 (CH) e 139,0 (C) outro par, no espectro de RMN de ^{13}C . evidenciaram que estes compostos possuem como base estrutural os esqueletos oleanano e ursano, respectivamente (Sobrinho et. al., 1991 e Li et. al. 2008), (Figura 39). A localização de uma carboxila em C-28 foi definida, para ambos os casos, através dos valores de deslocamento químico de C-18 (δ 42,7 em **4** e δ 54,3 em **5**), que sofre significativa variação em função da presença deste grupo funcional no carbono 28, quando comparados com C-18 de **2** e **3**, além da ausência do sinal referente à metila C-28, correspondente a 28,0 ppm nos esqueletos oleanano e ursano, (Tabela 4).

Nos espectros de RMN de ^{13}C de **4** e **5** foram observados, ainda, três sinais de carbonos carbinólicos, sendo dois CH (δ 77,9 e δ 68,7) e um CH_2 (δ 66,2). As intensidades relativas destes sinais em relação aos demais existentes indicaram que estes grupos funcionais estão presentes em ambos compostos e, pela coincidência dos sinais, acima citados, que se localizam em regiões distantes do anel E. Uma busca na literatura sustentou a proposta de três hidroxilas presentes nas estruturas de **4** e **5** localizadas em C-2 α , C-3 β e C-23, levando à identificação de **4** como sendo o ácido 2 α ,3 β ,23- tri-hidróxi-olean-12-en-28-óico (Li *et al.*, 2009), conhecido também como ácido arjunólico, e de **5** como sendo o ácido 2 α ,3 β ,23-tri-hidróxi-urs-12-en-28-óico (Hu *et al.*, 2011), denominado ácido asiático, (Figura 39).

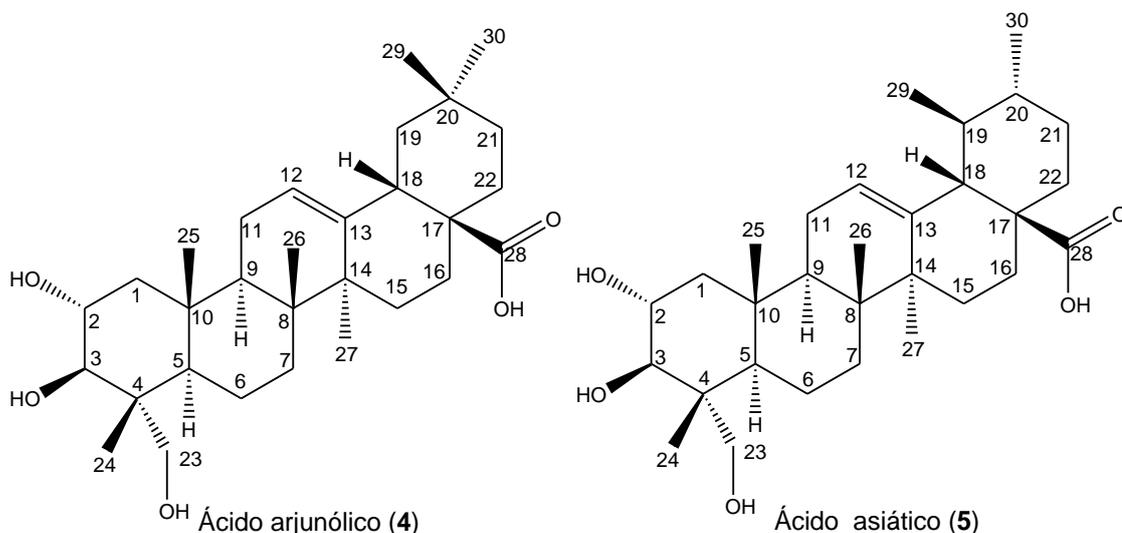


Figura 39: Estrutura química dos compostos **4** e **5**: ácido arjunólico e ácido asiático.

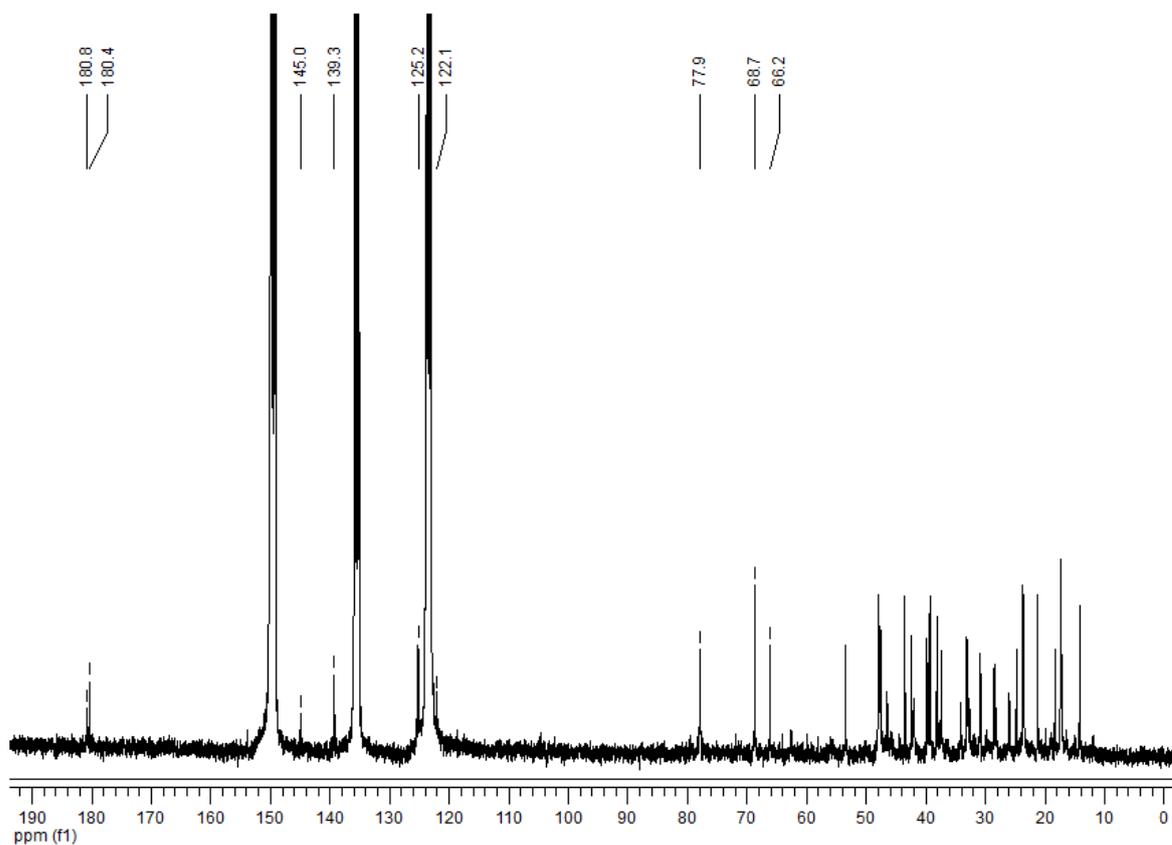
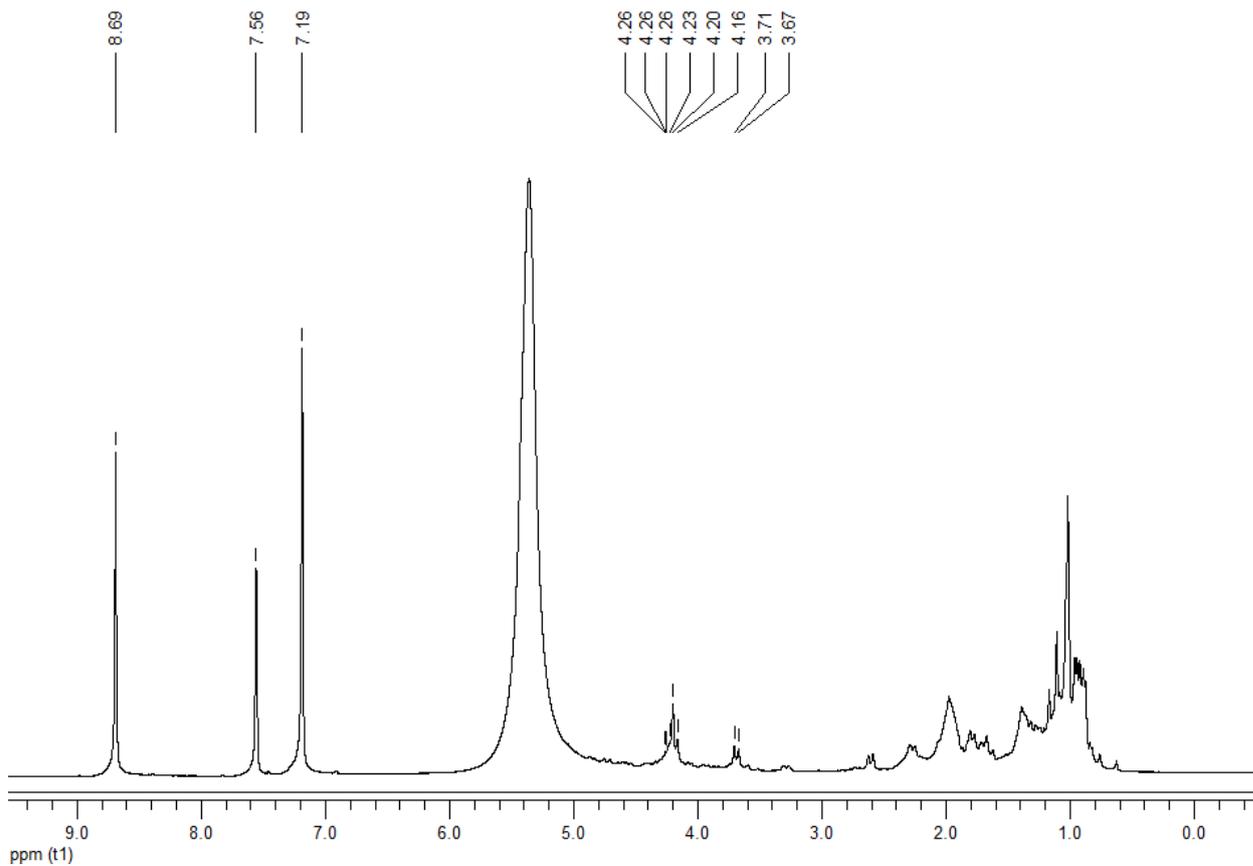


Figura 40: Espectro de RMN de ^1H (300,13 MHz, Pyr-d6) e de ^{13}C (75,47 MHz, Pyr-d6) dos compostos 4 e 5, obtidos de *M. petraea*.

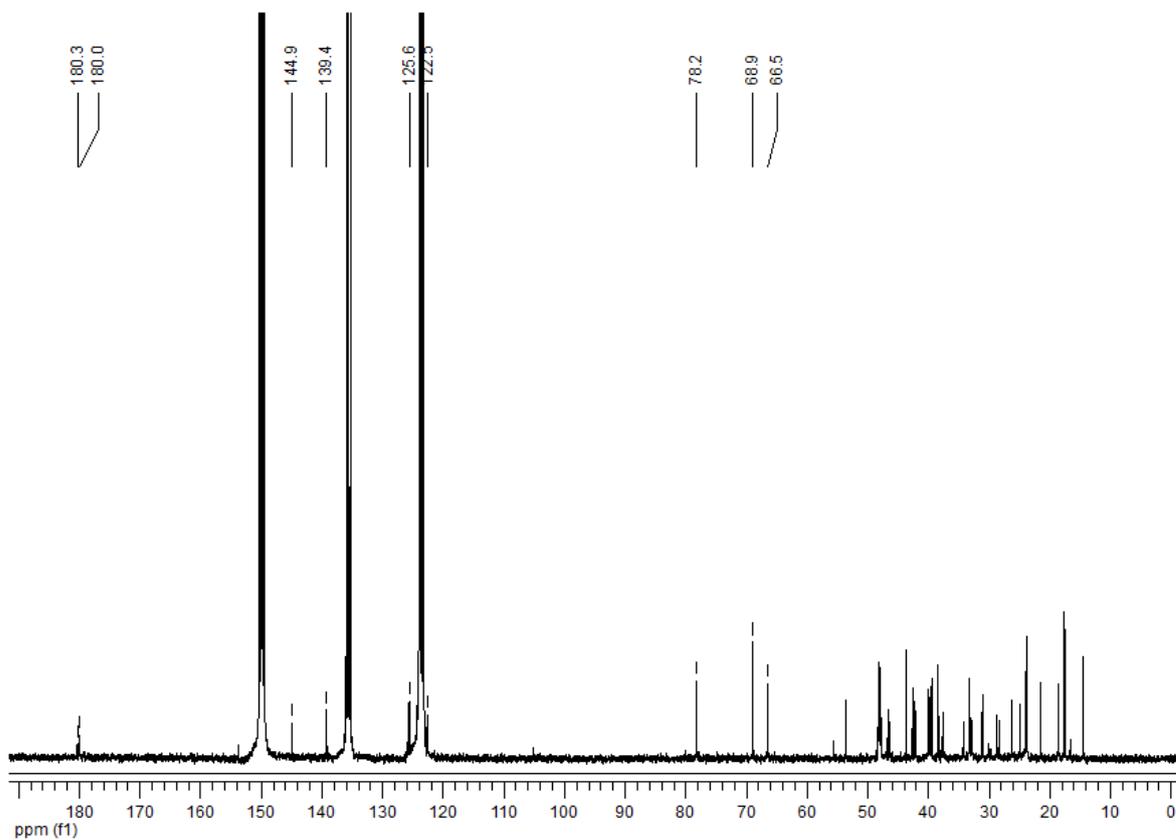
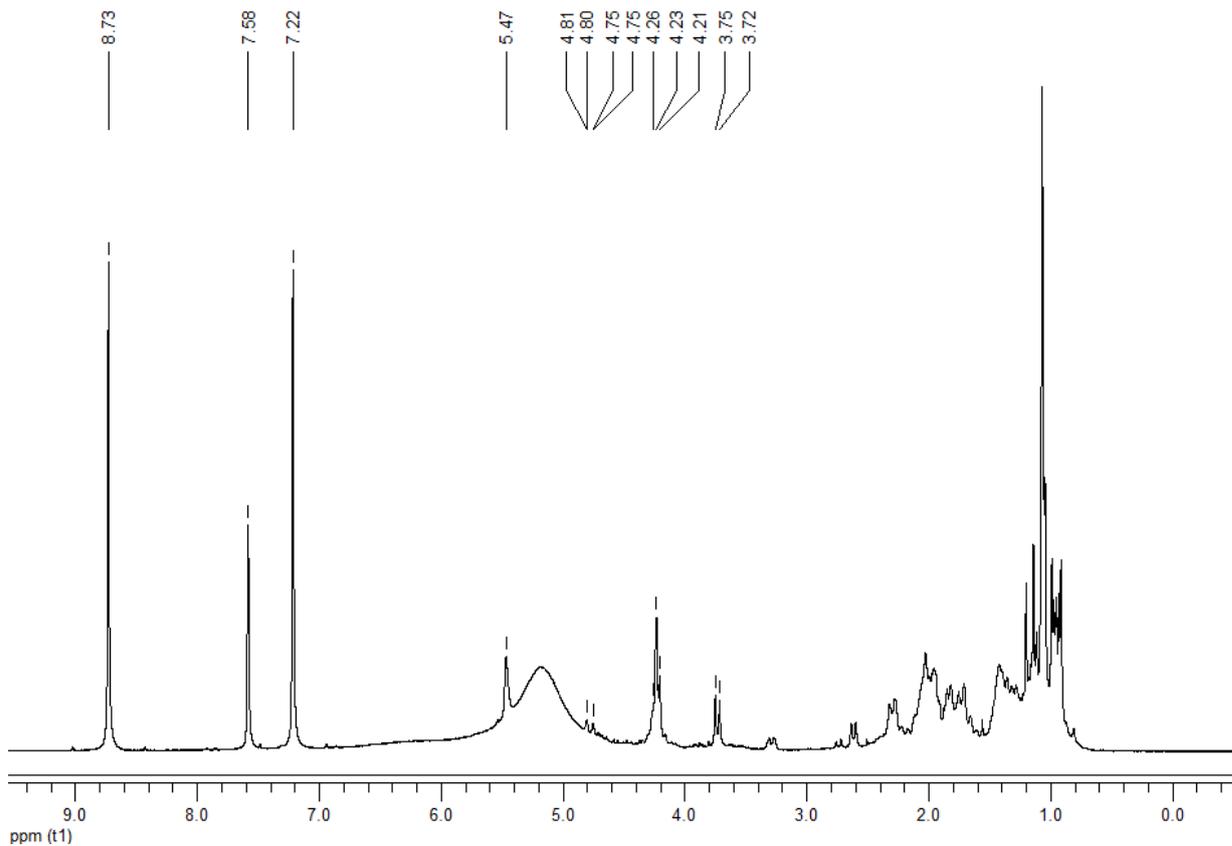


Figura 41: Espectro de RMN de ^1H (300,13 MHz, Pyr-d6) e de ^{13}C (75,47 MHz, Pyr-d6) dos compostos **4** e **5**, obtidos de *M. velame*.

Tabela 4: Dados de RMN ^{13}C (Pyr-d5, 75,47 MHz) dos compostos 4 (ácido arjunólico) e 5 (ácido asiático), sendo os compostos 4a e 5a – obtidos de *M. petraea* e 4b e 5b – obtidos de *M. velame*, em comparação com os valores retirados das referências Li *et al.*, 2009 e Hu *et al.*, 2011.

Nº dos C	$\delta^{13}\text{C}$					
	4a	4b	Ácido arjunólico	5a	5b	Ácido asiático
1	47,3	47,2	46,3	47,3	47,9	46,9
2	68,7	68,9	68,8	68,7	68,9	69,4
3	77,9	78,2	78,2	77,9	78,2	78,3
4	44,2	44,1	43,5	44,1	44,1	44,0
5	48,2	48,2	47,8	48,2	48,2	48,3
6	19,0	19,0	18,4	19,0	19,0	20,1
7	33,3	33,2	32,8	33,3	33,6	33,7
8	39,0	39,0	39,7	40,6	40,6	41,3
9	48,8	48,9	48,1	48,0	48,0	47,5
10	39,0	39,0	38,3	31,6	31,6	28,6
11	24,0	24,0	23,8	24,0	24,5	24,9
12	122,1	122,3	122,5	125,2	125,6	126,5
13	145,0	144,9	144,8	139,3	139,4	139,1
14	43,0	43,0	42,1	43,4	43,4	43,3
15	28,8	28,8	28,2	29,2	29,2	29,4
16	24,5	24,6	23,6	25,3	25,3	25,6
17	47,7	47,6	47,6	48,2	48,2	48,6
18	42,6	42,7	41,6	54,3	54,3	54,2
19	45,8	45,8	42,1	40,4	40,4	40,2
20	30,8	30,7	29,9	40,4	40,4	40,8
21	31,8	31,8	30,8	33,8	33,8	31,5
22	34,9	34,9	34,1	38,0	38,0	38,2
23	66,2	66,5	66,4	66,2	66,5	66,1
24	13,9	13,9	14,2	13,9	13,9	14,1
25	17,4	17,5	17,2	17,7	17,7	17,7
26	17,8	17,8	17,4	17,8	17,8	18,1
27	26,5	26,5	26,0	24,2	24,2	24,0
28	180,8	180,3	180,3	180,0	180,0	181,9
29	33,6	33,6	33,1	17,7	17,7	17,2
30	24,0	24,0	23,7	21,8	21,8	21,8

Observou-se, também, nas fases hexânica e acetato de etila de *M. velame* e *M. petraea*, a presença de cinco triterpenos acetilados (6-10). O primeiro conjunto com três destes compostos, os menos polares, é constituído de acetato de lupeol (6), acetato de α -amirina (7) e acetato de β -amirina (8). Estes triterpenos, obtidos em mistura foram identificados principalmente pelos dados de RMN de ^{13}C , (Figura 43 e 44). Este espectro apresentou os sinais dos carbonos de ligação dupla típicos de cada esqueleto e as diferentes proporções dos componentes facilitou a listagem de cada conjunto de sinais e, portanto, a comparação com os dados descritos na literatura (Sobrinho *et al.*, 1991 e Li *et al.*, 2008), (Tabela 5). As presenças dos grupos acetato foram definidas com base nos sinais

dos espectros de RMN de ^1H a δ 4,49 (H-3) e δ 2,03 (H_3CCOO), e de ^{13}C , em δ 80,8 (C-3), δ 170,8 (H_3CCOO) e δ 22,6 (H_3CCOO). A comparação destes e demais dados com os relatados na literatura mostraram boa compatibilidade, confirmando a identificação dos compostos **6**, **7** e **8** (Figura 42).

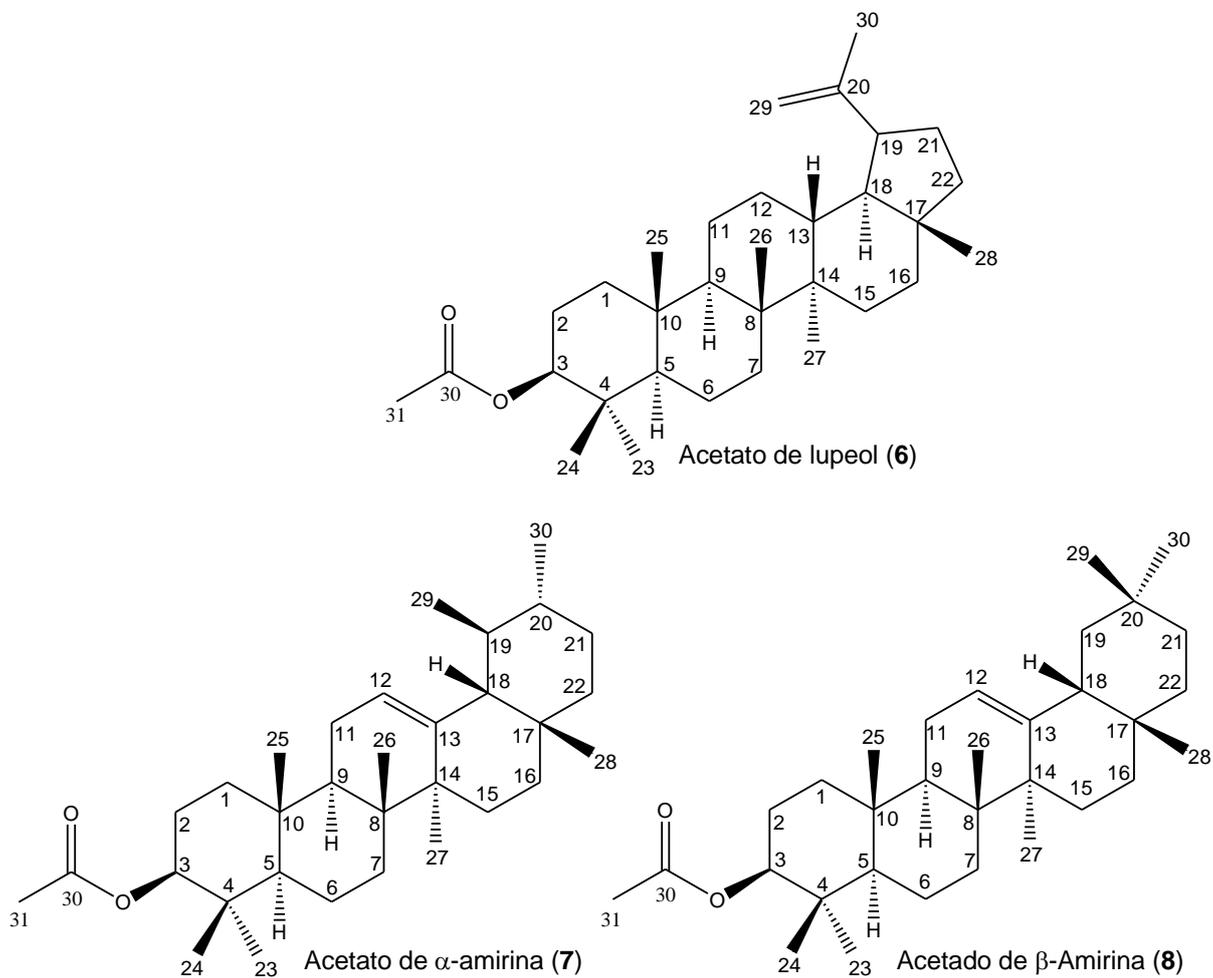


Figura 42: Estrutura química dos compostos **6**, **7** e **8**: Acetato de lupeol, Acetato de α -amirina e Acetato de β -amirina, respectivamente.

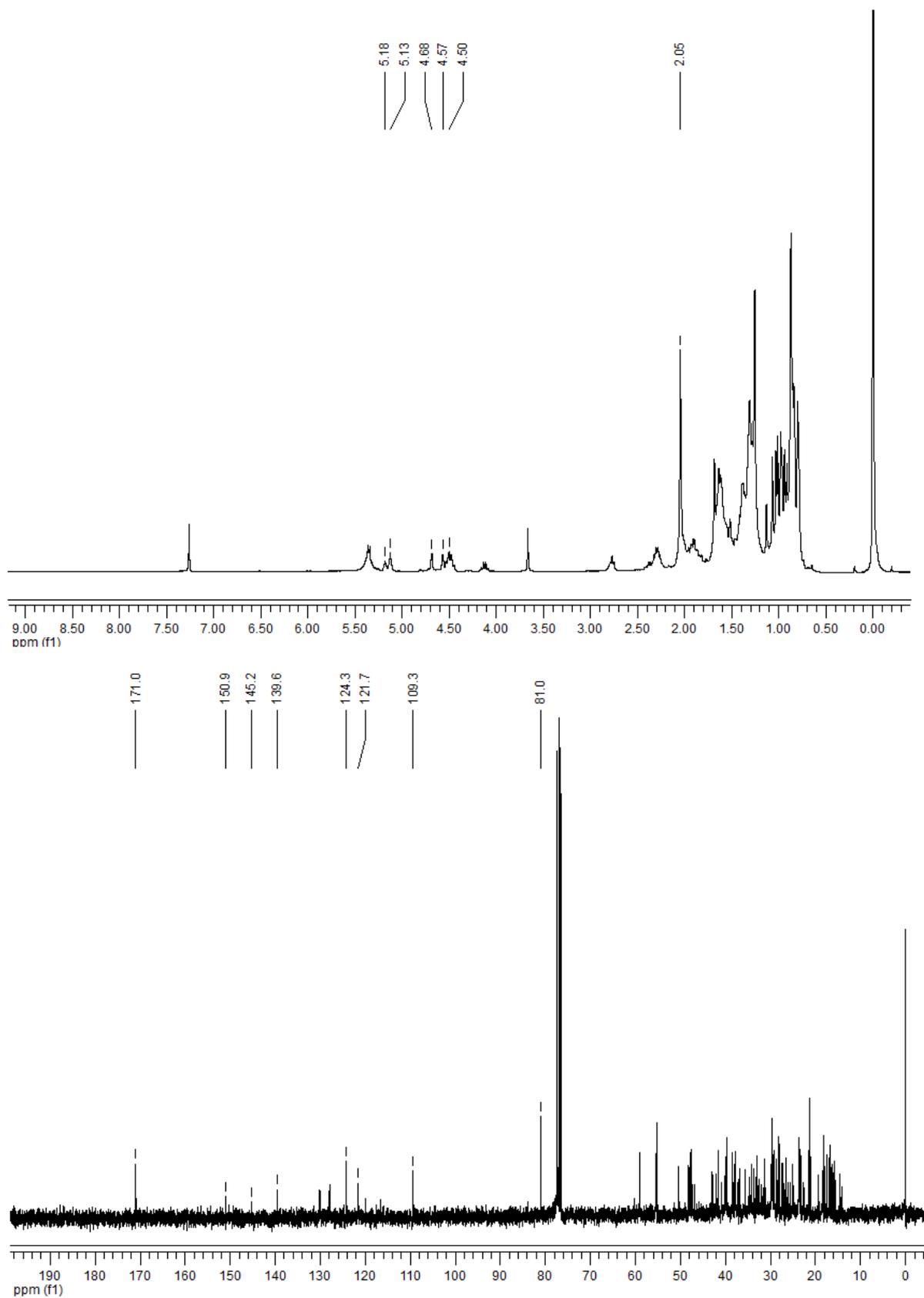


Figura 43: Espectro de RMN de ^1H (300,13 MHz, CDCl_3) e de ^{13}C (75,47 MHz, CDCl_3) dos compostos 6, 7 e 8, obtidos de *M. petraea*.

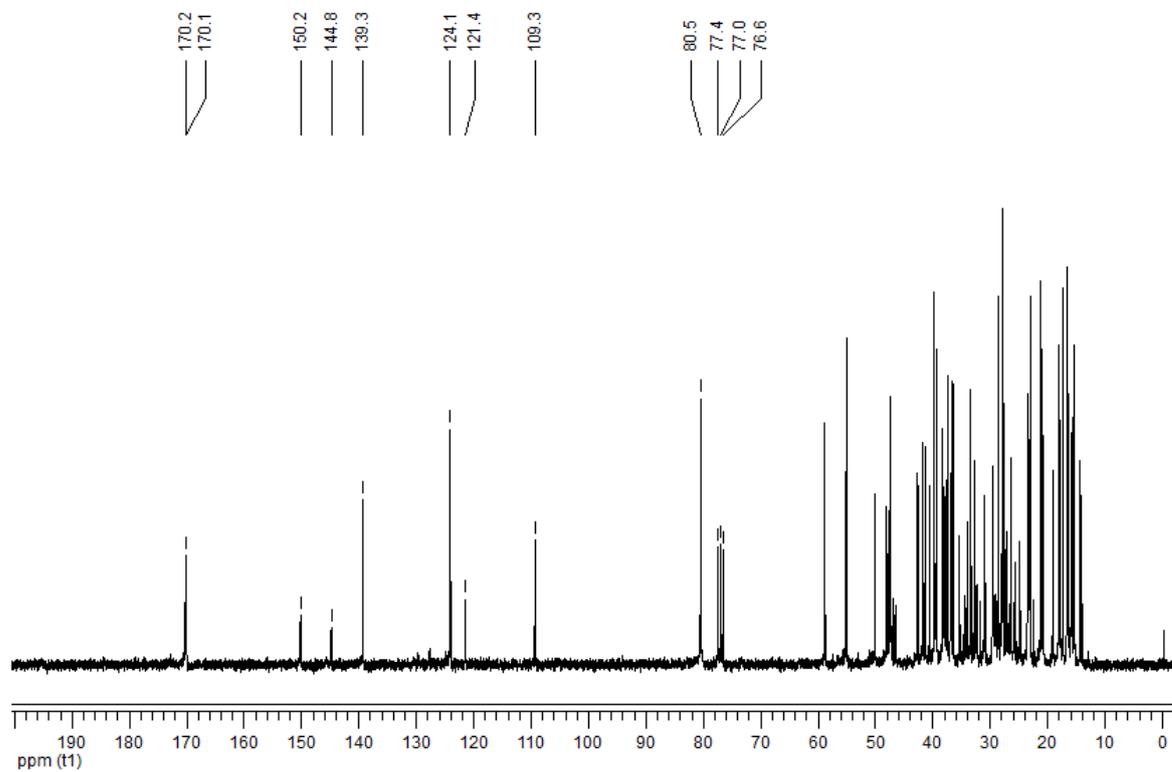
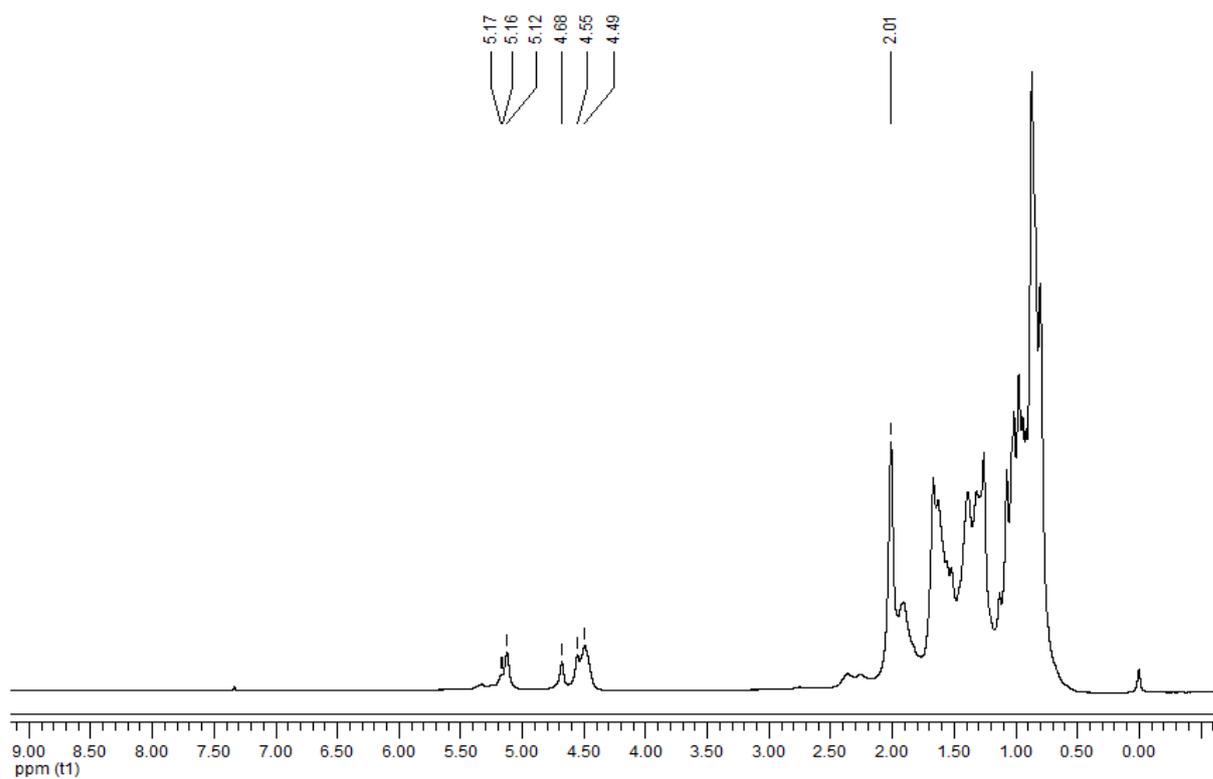


Figura 44: Espectro de RMN de ^1H (300,13 MHz, CDCl_3) e de ^{13}C (75,47 MHz, CDCl_3) dos compostos **6**, **7** e **8**, obtidos de *M. velame*.

Tabela 5: Dados de RMN ^{13}C (75,47 MHz, CDCl_3) do composto **6** (acetato de lupeol), **7** (acetato de α -amirina) e **8** (acetato de β -amirina), sendo os compostos 6a, 7a e 8a – obtidos de *M. petraea* e 6b, 7b e 8b – obtidos de *M. velame*, em coparação com os valores retirados das referências Sobrinho *et al.*, 1991 e Li *et al.*, 2008.

Nº do C	$\delta^{13}\text{C}$								
	6a	6b	Acetato de lupeol	7a	7b	Acetato de α -amirina	8a	8b	Acetato de β -amirina
01	38,7	38,7	38,7	38,6	38,6	38,7	38,6	38,6	38,7
02	27,4	27,4	27,4	27,3	27,3	27,2	27,3	27,3	27,3
03	81,0	80,5	78,9	81,0	80,5	78,3	81,0	80,5	79,0
04	38,8	38,8	38,8	38,8	38,8	38,7	38,8	38,8	38,8
05	55,3	55,3	55,3	55,2	55,2	55,2	55,3	55,3	55,3
06	18,3	18,3	18,3	18,4	18,4	18,3	18,4	18,4	18,5
07	34,3	34,3	34,2	32,9	32,9	32,9	32,7	32,7	32,8
08	40,8	40,8	40,8	40,0	40,0	40,0	38,8	38,8	38,8
09	50,4	50,4	50,4	47,7	47,7	47,7	47,7	47,7	47,7
10	37,2	37,2	37,1	36,9	36,9	36,9	37,2	37,2	37,6
11	20,9	20,9	20,9	23,3	23,3	23,3	23,7	23,7	23,6
12	25,2	25,2	25,1	124,3	124,1	124,3	121,7	121,4	121,6
13	38,1	38,1	38,0	139,6	139,3	139,3	145,2	145,8	145,1
14	42,8	42,8	42,8	42,1	42,1	42,0	41,7	41,7	41,8
15	27,4	27,4	27,4	28,7	28,7	28,7	26,2	26,2	26,2
16	35,6	35,6	35,5	26,6	26,6	26,6	26,9	26,9	27,0
17	43,0	43,0	43,0	33,7	33,7	33,7	32,5	32,5	32,5
18	48,3	48,3	48,2	59,1	59,1	58,9	47,2	47,2	47,4
19	48,0	48,0	47,9	39,7	39,7	39,6	46,8	46,8	46,9
20	150,9	150,2	150,4	39,6	39,6	39,6	31,1	31,1	31,1
21	29,9	29,9	29,8	31,3	31,3	31,2	34,7	34,7	34,8
22	40,0	40,0	40,0	41,5	41,5	41,5	37,2	37,2	37,2
23	28,0	28,0	28,0	28,1	28,1	28,1	28,4	28,4	28,2
24	15,4	15,4	15,4	15,6	15,6	15,6	15,5	15,5	15,5
25	16,1	16,1	16,1	15,7	15,7	15,6	15,6	15,6	15,6
26	16,0	16,0	15,9	16,9	16,9	16,8	16,9	16,9	16,9
27	14,5	14,5	14,5	23,4	23,4	23,3	26,0	26,0	26,0
28	18,0	18,0	18,0	28,1	28,1	28,1	28,4	28,4	28,4
29	109,3	109,3	109,3	17,5	17,5	17,4	33,3	33,3	33,3
30	19,3	19,3	19,3	21,4	21,4	21,3	23,7	23,7	23,7
31	171,0	170,1	170,4	171,0	170,1	170,4	171,0	170,1	170,4
32	22,6	22,6	21,2	22,6	22,6	21,2	22,6	22,6	21,2

O outro conjunto com dois compostos apresentou sinais em deslocamento químico (δ) em 121,0 (CH) e 145,0 (C) e 126,0 (CH) e 139,0 (C), tratando-se de esqueletos triterpênicos oleanano e ursano, respectivamente. Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C (Figura 46), evidenciaram a presença das unidades acetila de forma semelhante ao mencionado para as substâncias **7** e **8**. A carboxila presente no carbono 28 foi definida da mesma maneira que para os compostos **4** e **5**. Desta forma, e com comparação com os dados da literatura (Talapatra *et. al.*, 1981 e Kwon *et. al.*, 2008), (Tabela 6), os compostos **9** e **10** foram identificados como sendo o ácido 3-O-acetil-oleanólico e ácido 3-O-acetil-ursólico, respectivamente, (Figura 45), presentes em *M. petraea*.

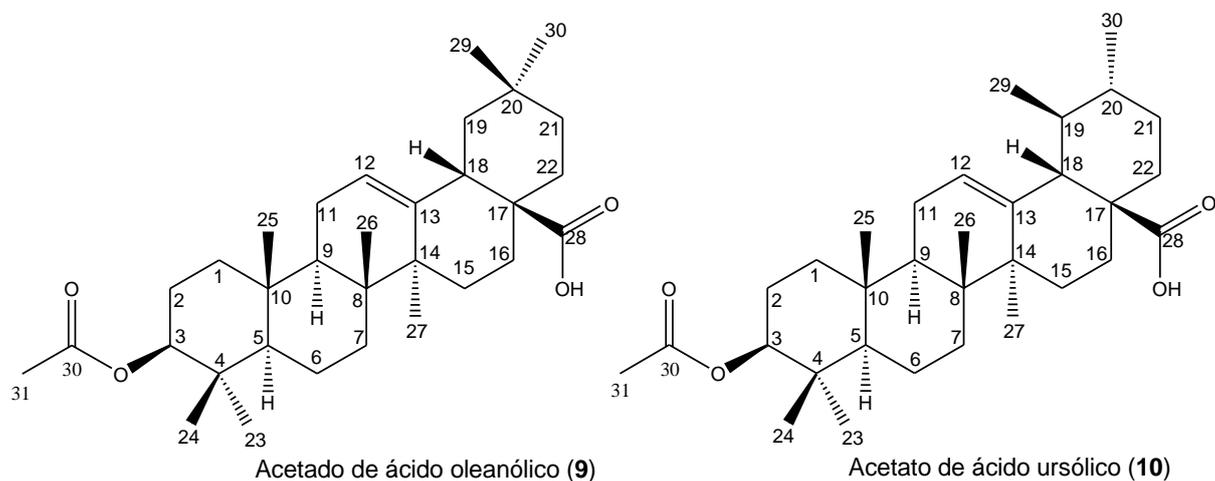


Figura 45: Estrutura química dos compostos **9** e **10**: ácido 3-O-acetil-oleanólico e ácido 3-O-acetil-ursólico.

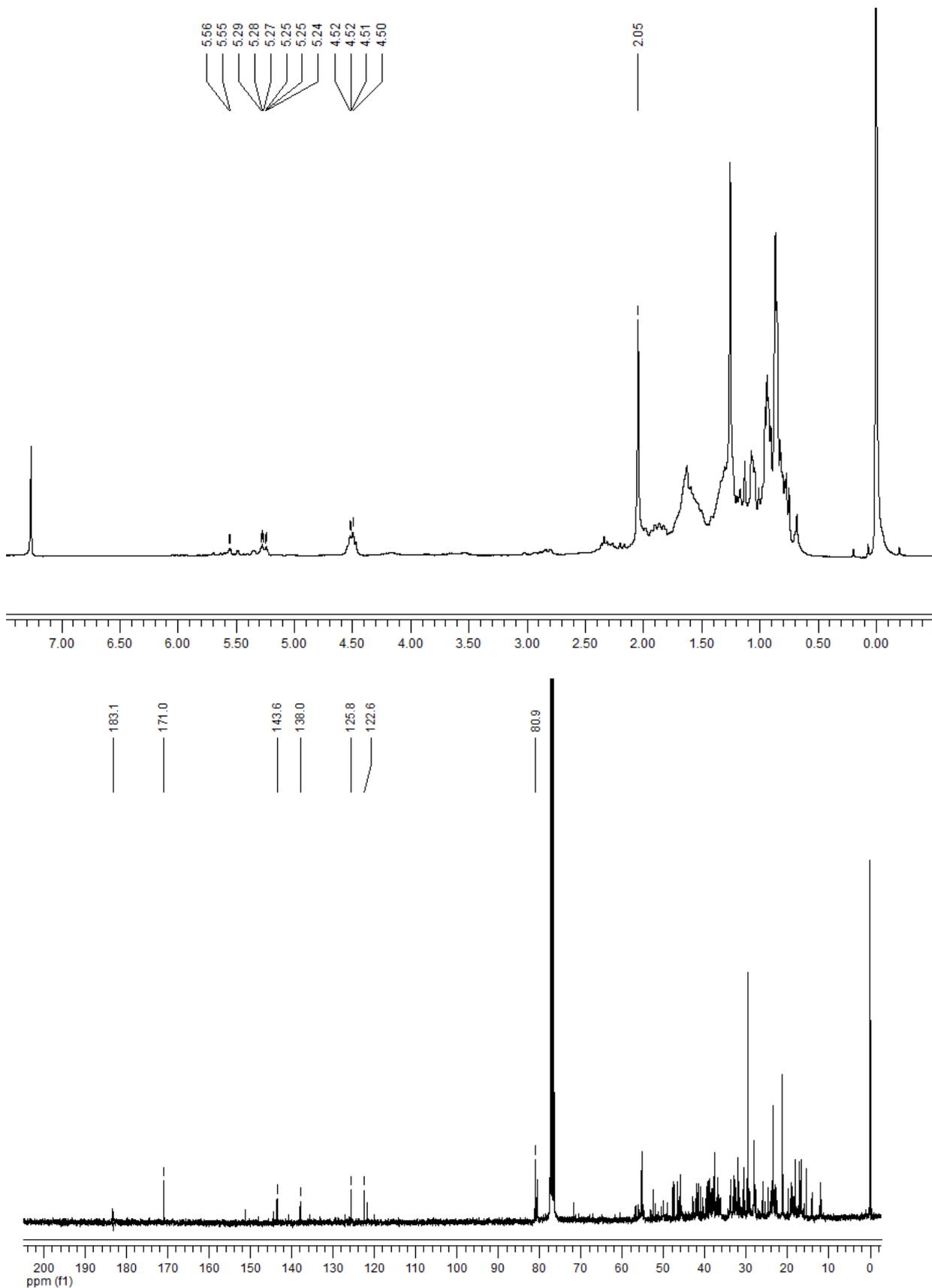


Figura 46: Espectro de RMN de ^1H (300,13 MHz, CDCl_3) e de ^{13}C (75,47 MHz, CDCl_3) dos compostos 9 e 10, obtidos de *M. petraea*.

Tabela 6: Dados de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **9** (Acetato de ácido oleanólico) e do composto **10** (Acetato de ácido ursólico), em comparação com os valores retirados das referências Talapatra *et. al.*, 1981 e Kwon *et. al.*, 2008.

Nº de C	$\delta^{13}\text{C}$			
	Composto 9	Acetato de ácido oleanólico	Composto 10	Acetato de ácido ursólico
1	38,2	38,4	38,1	38,7
2	23,3	23,6	23,4	23,5
3	80,9	81,1	80,9	81,1
4	37,7	37,8	37,7	37,9
5	55,3	55,4	55,3	55,4
6	18,2	18,3	18,2	18,3
7	32,5	32,7	32,4	32,9
8	39,3	39,9	39,5	40,0
9	47,4	47,6	47,5	47,7
10	36,9	37,0	36,9	36,9
11	24,1	23,6	23,5	23,3
12	122,6	123,0	125,8	124,3
13	143,6	144,4	138,0	139,3
14	41,8	41,7	41,6	42,0
15	27,7	26,6	29,7	28,7
16	22,9	23,4	27,4	26,6
17	46,5	46,6	47,9	48,1
18	38,8	41,3	52,5	52,8
19	45,8	45,8	40,9	39,1
20	30,7	30,6	39,0	38,8
21	33,8	33,8	30,6	30,7
22	32,8	32,3	36,7	36,7
23	23,6	28,1	33,0	28,2
24	16,1	15,6	17,0	15,5
25	15,5	15,3	15,4	15,7
26	17,1	16,8	17,1	16,9
27	25,9	26,0	23,6	23,6
28	183,1	181,0	183,1	181,0
29	33,6	33,1	16,6	16,9
30	21,2	23,6	21,2	21,2
31	171,0	171,3	171,0	171,3
32	21,3	21,3	21,3	21,3

Ademais, durante a realização de projeto de mestrado com a espécie *M. petraea* foi identificado e descrito na literatura a ocorrência de compostos da classe pregnanos, triterpenos, lignanas, esteroides e um ácido graxo (De Assis jr. *et al.*, 2013) (Figura 47).

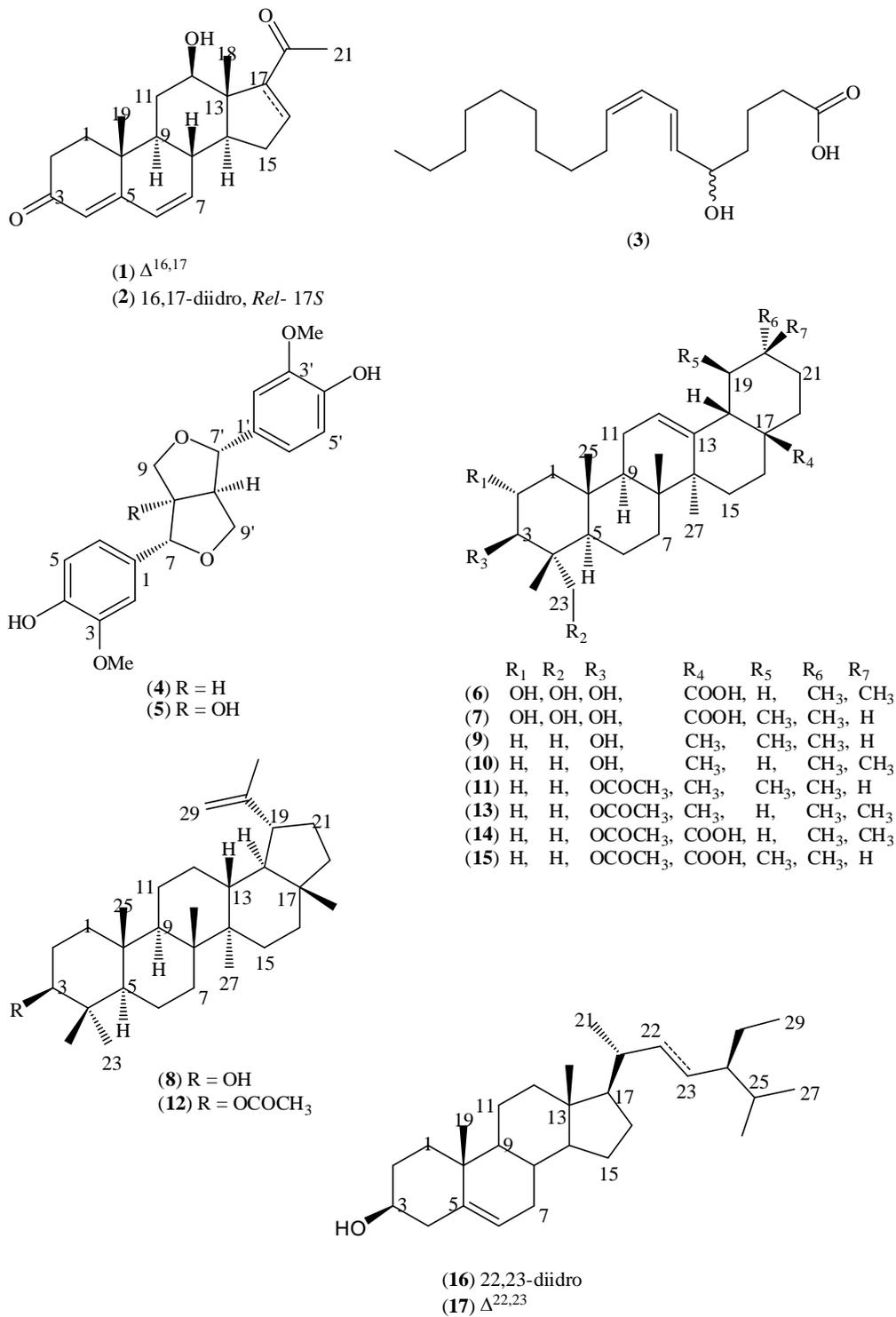


Figura 47: Compostos obtidos de *M. petraea*: retirada do artigo de De Assis Junior *et al.*, 2013.

5.6 Análise dos dados obtidos via HPLC/MS-MS, para os extratos etanólicos e infusão, das amostras de *Macrosiphonia* e amostras comercializadas.

As análises dos cromatogramas obtidos para os extratos etanólicos e infusões das amostras do gênero *Macrosiphonia* e amostras comercializadas por experimentos realizados no equipamento HPLC acoplado ao Massas (HPLC/MS-MS) (Anexo 4), operando em modo negativo, possibilitou a extração dos dados de: tempo de retenção (R_t), íon molecular (m/z $[M-H]^-$), adutos de ácido fórmico (m/z $[M+HCOOH-H]^-$) e cloro (m/z $[M+Cl-H]^-$) e duas vezes o íon molecular (m/z $[2M-H]^-$), além de fragmentações dos constituintes químicos destes materiais, os quais são evidenciados nas tabelas 7 a 30.

Através das análises desses parâmetros e buscas efetuadas na literatura utilizando os bancos de dados SciFinder®, Web of Science® e o banco de dados fornecidos pelo software *DataAnalysis*, foram determinados alguns fragmentos de massas que possibilitaram propostas das classes de compostos constituintes dos extratos etanólicos e infusões das espécies de *Macrosiphonia* e das amostras comercializadas.

O estudo fitoquímico realizado com as raízes de espécimes de *Macrosiphonia petraea* e *Macrosiphonia velame* (item 5.5) revelou a ocorrência de grande teor de triterpenos. Logo, para a identificação por espectrometria de Massas destas substâncias, os principais parâmetros estabelecidos envolveram a busca por íons com fórmula molecular relacionada a $C_{30}H_xO_y$ (com possíveis variações dos valores x e y) e por fragmentos previstos no modo negativo para este tipo de composto, relacionados a: perda de um H^+ , formando o íon m/z $[M-H]^-$, desidratação, formando o íon m/z $[M-H_2O-H]^-$, descarboxilação, formando o íon m/z $[M-CO_2-H]^-$, todos demonstrados na Figura 48.

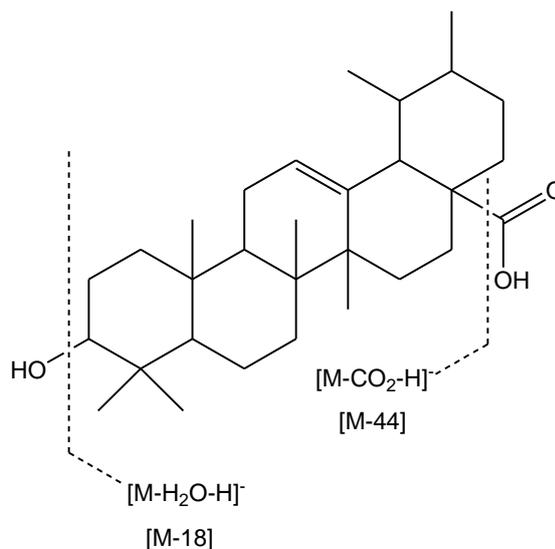


Figura 48 – Fragmentações mais comuns observadas no experimento de Massas para os compostos da classe dos triterpenos.

O composto 14 (Tabela 7) apresentou a fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_4$, deduzida com base no pico de m/z $[M-H]^-$ igual a 471,3450, e fragmentos com valores de m/z iguais a 453,3310 ($[M-H_2O-H]^-$) e 427,3593 ($[M-CO_2-H]^-$), os quais sustentaram a proposta deste composto como pertencente à classe dos triterpenos. Devido às condições de análise adotadas no HPLC/MS-MS, poucos triterpenoides foram identificados, seja por falta de fragmentação, ou por não haver fórmula molecular proposta pelo *software*, deste modo, a afirmação da natureza triterpênica, de alguns picos no cromatograma, não pôde ser feita.

Outra classe de compostos observada por meio da análise do cromatograma obtido pelo experimento de HPLC/MS-MS foram substâncias derivadas de álcoois graxos, identificadas anteriormente para um espécime de *Macrosiphonia petraea* estudado por nosso grupo de pesquisa (De Assis Junior *et al.*, 2013). Uma grande variedade de derivados de álcoois graxos foi detectada nos espécimes de *Macrosiphonia* coletados, apresentando entre si diferenças no teor de oxigenação e insaturações, sendo observadas fórmulas moleculares e íons moleculares (m/z $[M-H]^-$) com: $C_{18}H_{32}O_3$ e m/z $[M-H]^- = 295,2249$; $C_{18}H_{30}O_3$ e m/z $[M-H]^- = 293,2087$, $C_{18}H_{32}O_5$ e m/z $[M-H]^- = 329,2333$; e $C_{18}H_{34}O_4$ e m/z $[M-H]^- = 313,2347$. Deste modo, pode-se propor que estes compostos têm uma estrutura acíclica com 18 átomos de carbono, contendo em uma de suas extremidades um grupo carboxílico (previsto pelo composto isolado anteriormente de *M. petraea*; De Assis Junior *et al.*, 2013), podendo apresentar insaturações e oxigenações por toda a cadeia carbônica, seguindo padrões de oxigenação e insaturações alternados, derivado de sua rota de biossíntese policetídica.

Ademais, dois padrões de fragmentação são observados e apresentam relação massa/carga igual a m/z 201,10 e m/z 171,09 para a maioria dos compostos derivados de álcoois graxos, podendo-se, através desses fragmentos, sugerir parte da estrutura molecular deste tipo de composto presente em amostras coletadas de *Macrosiphonia* (Figura 49). Esses dois fragmentos originam-se de quebras alílicas ocorridas nas insaturações presentes na cadeia carbônica, sugerindo, assim, que estes compostos apresentam uma oxigenação em C7 e hibridização sp^2 entre os carbonos C8-C9 e que esta se trata da estrutura-base; seus derivados apresentariam oxigenações e insaturação localizadas depois do carbono dez (C10). Entretanto, para confirmar as estereoquímicas e posições reais destes grupos funcionais, a obtenção de dados de outros experimentos é necessária.

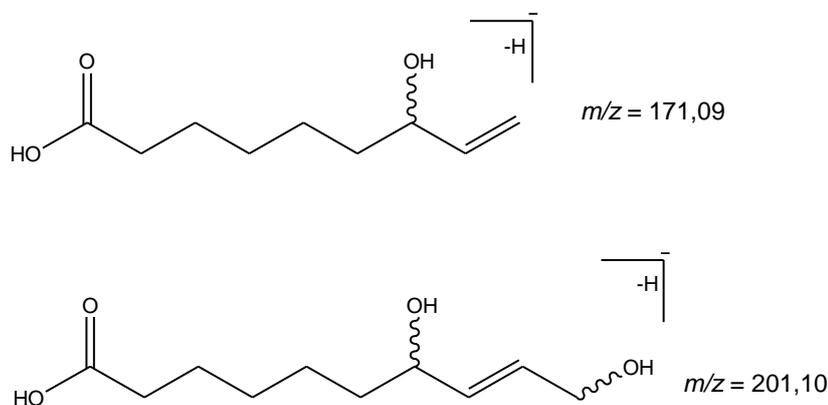


Figura 49 – Proposta de fragmentação observada para os compostos derivados de álcool graxo.

As classes dos flavonoides, lignanas e derivados do ácido clorogênico, que são compostos derivados de precursores dos fenilpropanoides (C_6-C_3), estes oriundos do ácido chiquímico, também foram observados, sendo caracterizados pela presença de quatro fragmentos-base com razões massa/carga de m/z 191,05 (fragmento derivado do ácido químico), m/z 179,03 (fragmento derivado do ácido químico desidratado) e m/z 173,04 e m/z 161,02 (fragmentos derivados do ácido cafeico) (Figura 50). Para definição estrutural destes compostos, outras técnicas devem ser utilizadas.

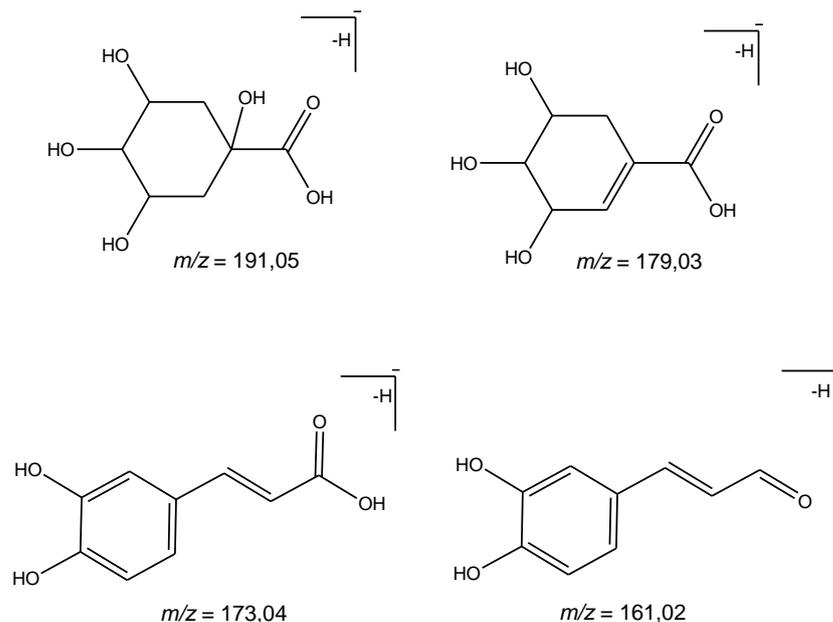


Figura 50 – Fragmentação observada para os compostos derivados da rota de biossíntese C₆-C₃.

A partir dos dados de fragmentação acima descritos e análise das tabelas obtidas para todas as amostras estudadas, observa-se que há uma semelhança entre as amostras do gênero *Macrosiphonia* (*M. petraea*, *M. velame* e *M. longiflora*) e amostras comercializadas nas cidades de Cuiabá e Rondonópolis, do estado de Mato Grosso, sendo que os dados de massas obtidos corroboraram com os resultados da análise de PCA, a qual sugere que essas amostras comercializadas podem ter sido obtidas de espécies botânicas similares às do gênero *Macrosiphonia* (item 5.2, Figura 18). As demais amostras comercializadas nas cidades de Campo Grande, Corumbá, Dourados e Ponta Porã, no estado de Mato Grosso do Sul, entretanto, não apresentam uma boa correlação de íons moleculares e fragmentações, demonstrando composição química distinta em relação à apresentada pelas espécies do gênero de *Macrosiphonia*. Esta observação corrobora, também, com os dados obtidos na análise multivariada (item 5.2, Figura 18), na qual se evidencia que estas amostras provêm de fontes botânicas diferentes.

Tabela 7 – Dados de Massas obtidos para o extrato etanólico do espécime de *Macrosiphonia petraea* (Mp).

N°	Rt (min)	Classe de composto	Fórmula	m/z [M-H] ⁻	m/z [2M-H] ⁻	m/z [M+HCOOH-H] ⁻	m/z [M+Cl-H] ⁻	MS/MS Fragmentação
1	1,1	C ₆ -C ₃	C ₁₉ H ₁₈ O ₆	341,1028	683,2134	387,1085	377,0797	191,0519;
2	1,2	C ₆ -C ₃	C ₂₃ H ₁₄ O ₃	353,0806	707,1711	417,0980		191,0520; 179,0307; 173,0408
3	2,2	C ₆ -C ₃	C ₃₂ H ₂₀ O ₇	515,1106				191,0521; 179,0304; 173,0418; 161,0208
4	19,0	Triterpeno	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	487,3006				469,2866; 443,3098; 425,2996; 407,2903
5	20,4	Triterpeno	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	487,3362				
6	22,1	Álcool Graxo	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	313,2347				201,1097; 171,0992; 165,0896
7	22,3	Triterpeno	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	487,3363				
8	24,6	Álcool Graxo	C ₁₈ H ₃₆ O ₄	315,2505				297,2438; 201,1134; 171,1036
9	27,0	Álcool Graxo	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	295,2245				277,2116; 171,1008
10	27,9	Álcool Graxo	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	293,2087				
11	29,9	Álcool Graxo	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	295,2253				
12	30,2	Álcool Graxo	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	295,2248				
13	39,5	Álcool Graxo	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	255,2306				
14	40,4	Triterpeno	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	471,3450				453,3310; 427,3593;
15	40,5	Álcool Graxo	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	281,2452				

Tabela 8 - Dados de Massas obtidos para a infusão (extrato aquoso) do espécime de *Macrosiphonia petraea* (Mp).

N°	Rt (min)	Classe de composto	Formula	m/z [M-H] ⁻	m/z [2M-H] ⁻	m/z [M+HCOOH-H] ⁻	m/z [M+Cl-H] ⁻	MS/MS Fragmentação
1	9,9	C ₆ -C ₃	C ₉ H ₈ O ₄	179,0349				
2	13,3	C ₆ -C ₃	C ₉ H ₈ O ₃	163,0382				
3	31,5	Álcool Graxo	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	329,2333				211,1328; 171,0999
4	35,7	Álcool Graxo	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	313,2381				201,1130; 185,0086; 171,0987
5	36,8	Álcool Graxo	C ₁₈ H ₃₆ O ₄	315,2539				171,1024

Tabela 9 - Dados de Massas obtidos para o extrato etanólico do espécime de *Macrosiphonia velame* (Mv).

N°	Rt (min)	Classe de composto	Fórmula	m/z [M-H] ⁻	m/z [2M-H] ⁻	m/z [M+HCOOH-H] ⁻	m/z [M+Cl-H] ⁻	MS/MS Fragmentação
1	13,0	Álcool Graxo	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	329,2300				211,1316; 183,1357; 171,1005
2	15,3	Álcool Graxo	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	327,2151				
3	15,9	Álcool Graxo	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	329,2299				201,1108; 171,1005
4	18,1	Triterpeno	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	503,3316				
5	20,4	Triterpeno	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	487,3365				
6	27,0	Álcool Graxo	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	295,2250				171,0995;

Tabela 10 - Dados de Massas obtidos para a infusão (extrato aquoso) do espécime de *Macrosiphonia velame* (Mv).

N°	Rt (min)	Classe de composto	Formula	m/z [M-H] ⁻	m/z [2M-H] ⁻	m/z [M+HCOOH-H] ⁻	m/z [M+Cl-H] ⁻	MS/MS Fragmentação
1	31,4	Álcool Graxo	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	329,2343				211,1363; 183,1417; 171,0989
2	32,8	Álcool Graxo	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	329,2341				201,1161; 171,1015

Tabela 11 - Dados de Massas obtidos para o extrato etanólico do espécime de *Macrosiphonia longiflora* (MI).

N°	Rt (min)	Classe de composto	Formula	m/z [M-H] ⁻	m/z [2M-H] ⁻	m/z [M+HCOOH-H] ⁻	m/z [M+Cl-H] ⁻	MS/MS Fragmentação
1	17,9	Triterpeno	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	503,3466				
2	20,2	Triterpeno	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	487,3503				
3	22,1	Triterpeno	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	487,3524				
4	28,3	Álcool Graxo	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	293,2122				

Tabela 12 - Dados de Massas obtidos para a infusão (extrato aquoso) do espécime de *Macrosiphonia longiflora* (MI).

N°	Rt (min)	Classe de composto	Formula	m/z [M-H] ⁻	m/z [2M-H] ⁻	m/z [M+HCOOH-H] ⁻	m/z [M+Cl-H] ⁻	MS/MS Fragmentação
1	31,4	Álcool Graxo	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	329,2333				
2	32,8	Álcool Graxo	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	329,2333				

Tabela 13 - Dados de Massas obtidos para o extrato etanólico da amostra comercializada na cidade de Cuiabá (CBA) (MT).

N°	Rt (min)	Classe de composto	Formula	m/z [M-H] ⁻	m/z [2M-H] ⁻	m/z [M+HCOOH-H] ⁻	m/z [M+Cl-H] ⁻	MS/MS Fragmentação
1	1,0	Sucrose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	341,1098	683,2272			179,0556
2	1,3	C ₆ -C ₃	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0892				191,0563; 179,0365; 173,0474; 161,0256
3	20,2	Triterpeno	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	487,3420				
4	26,6	Álcool Graxo	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	295,2277				277,2088
5	26,8	Álcool Graxo	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	295,2278				277,2139; 171,1020
6	29,0	Álcool Graxo	C ₁₈ H ₃₄ O ₃	297,2440				
7	40,3	Álcool Graxo	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	281,2486				

Tabela 14 - Dados de Massas obtidos para a infusão (extrato aquoso) da amostra comercializada na cidade de Cuiabá (**CBA**) (MT).

N°	Rt (min)	Classe de composto	Formula	m/z [M-H] ⁻	m/z [2M-H] ⁻	m/z [M+HCOOH-H] ⁻	m/z [M+Cl-H] ⁻	MS/MS Fragmentação
1	6,4	C ₆ -C ₃	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0901				
2	10,6	C ₆ -C ₃	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0857				
3	13,8	C ₆ -C ₃	C ₁₆ H ₂₀ O ₁₀	371,0987				

Tabela 15 - Dados de Massas obtidos para o extrato etanólico da amostra comercializada na cidade de Rondonópolis (**ROO**) (MT).

N°	Rt (min)	Classe de composto	Formula	m/z [M-H] ⁻	m/z [2M-H] ⁻	m/z [M+HCOOH-H] ⁻	m/z [M+Cl-H] ⁻	MS/MS Fragmentação
1	1,1	C ₆ -C ₃	C ₁₉ H ₁₈ O ₆	341,1041				191,0533
2	1,3	C ₆ -C ₃	C ₂₃ H ₁₄ O ₄	353,0831				191,0526; 179,0296; 173,0420; 161,0312
3	18,0	Triterpeno	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	503,3334				
4	20,3	Triterpeno	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	487,3376				
5	22,0	Álcool Graxo	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	313,2352				201,1101
6	26,9	Álcool Graxo	C ₁₈ H ₃₂ O ₄	295,2241				
7	40,5	Álcool Graxo	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	281,2477				

Tabela 16 - Dados de Massas obtidos para a infusão (extrato aquoso) da amostra comercializada na cidade de Rondonópolis (**ROO**) (MT).

N°	Rt (min)	Classe de composto	Formula	m/z [M-H] ⁻	m/z [2M-H] ⁻	m/z [M+HCOOH-H] ⁻	m/z [M+Cl-H] ⁻	MS/MS Fragmentação
1	10,0	C ₆ -C ₃	C ₉ H ₈ O ₄	179,0323				

Tabela 17 - Dados de Massas obtidos para o extrato etanólico da amostra comercializada na cidade de Campo Grande (**CGR**) (MS).

N°	Rt (min)	Classe de composto	Formula	m/z [M-H] ⁻	m/z [2M-H] ⁻	m/z [M+HCOOH-H] ⁻	m/z [M+Cl-H] ⁻	MS/MS Fragmentação
1	1,0	Sucrose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	341,1102	683,2291	387,1144		
2	1,3	C ₆ -C ₃	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0887				191,0561
3	1,5	C ₆ -C ₃	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	367,1044				173,0448; 191,0576
4	3,4	C ₆ -C ₃	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₀	483,1317				173,0457; 163,0390
5	17,9	Triterpeno	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	503,3383		549,3455		
6	20,2	Triterpeno	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	487,3437				
7	26,8	Álcool Graxo	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	295,2272				183,0133; 171,0986

Tabela 18 - Dados de Massas obtidos para a infusão (extrato aquoso) da amostra comercializada na cidade de Campo Grande (**CGR**) (MS).

N°	Rt (min)	Classe de composto	Formula	m/z [M-H] ⁻	m/z [2M-H] ⁻	m/z [M+COOH-H] ⁻	m/z [M+Cl-H] ⁻	MS/MS Fragmentação
3	6,2	C ₆ -C ₃	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0876				179,0337; 191,0612
8	10,5	C ₆ -C ₃	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353,0878	707,1829			191,0565; 173,0444; 161,0229
16	14,4	C ₆ -C ₃	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	367,1033				193,0499; 173,0457
17	15,0	C ₆ -C ₃	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	367,1032				191,0562, 160,0213

Tabela 19 - Dados de Massas obtidos para o extrato etanólico da amostra comercializada na cidade de Corumbá (**CMB**) (MS).

N°	Rt (min)	Classe de composto	Formula	m/z [M-H] ⁻	m/z [2M-H] ⁻	m/z [M+HCOOH-H] ⁻	m/z [M+Cl-H] ⁻	MS/MS Fragmentação
1	1,0	Sucrose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	341,1068	683,2209	387,1117		
2	1,8	ND	C ₂₄ H ₂₀ O ₉	451,1016				231,0261; 217,0123; 189,0189
3	23,5	ND	C ₁₅ H ₂₂ O ₄	265,1471				

D – Não determinado

Tabela 20 - Dados de Massas obtidos para a infusão (extrato aquoso) da amostra comercializada na cidade de Corumbá (CMB) (MS).

N°	Rt (min)	Classe de composto	Formula	m/z [M-H] ⁻	m/z [2M-H] ⁻	m/z [M+HCOOH-H] ⁻	m/z [M+Cl-H] ⁻	MS/MS Fragmentação
1	18,1	ND	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	449,1127				285,0431; 178,9989; 150,0332
2	18,7	ND	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	449,1126				285,0427; 179,0002
3	20,0	ND	C ₁₄ H ₂₆ O ₁₆	449,1131				285,0431; 179,0014; 151,0110

ND – Não determinado

Tabela 21 - Dados de Massas obtidos para o extrato etanólico da amostra comercializada na cidade de Dourados (DRS1) (MS).

N°	Rt (min)	Classe de composto	Formula	m/z [M-H] ⁻	m/z [2M-H] ⁻	m/z [M+HCOOH-H] ⁻	m/z [M+Cl-H] ⁻	MS/MS Fragmentação
1	1,0	ND	C ₁₉ H ₁₈ O ₆	341,1016	683,2107	387,1016		
9	14,2	ND	C ₁₂ H ₂₈ O ₉	315,1679				
10	17,9	ND	C ₂₆ H ₅₄ O ₁₆	621,3306				
11	21,1	ND	C ₂₁ H ₃₂ O ₁₀	443,1921				

ND – Não determinado

Tabela 22 - Dados de Massas obtidos para a infusão (extrato aquoso) da amostra comercializada na cidade de Dourados (DRS1) (MS).

N°	Rt (min)	Classe de composto	Formula	m/z [M-H] ⁻	m/z [2M-H] ⁻	m/z [M+HCOOH-H] ⁻	m/z [M+Cl-H] ⁻	MS/MS Fragmentação
1	4,2	ND	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	305,0649				
2	7,2	ND	C ₁₈ H ₂₀ O ₁₃	447,1123				
3	12,8	ND	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₂	445,1346				
4	14,1	ND	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₂	445,1352				
5	15,2	ND	C ₂₁ H ₃₆ O ₁₁	463,2173		509,2240		

ND – Não determinado

Tabela 23 - Dados de Massas obtidos para o extrato etanólico da amostra comercializada na cidade de Dourados (DRS2) (MS).

N°	Rt (min)	Classe de composto	Formula	<i>m/z</i> [M-H] ⁻	<i>m/z</i> [2M-H] ⁻	<i>m/z</i> [M+HCOOH-H] ⁻	<i>m/z</i> [M+Cl-H] ⁻	MS/MS Fragmentação
1	1,0	Sucrose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	341,1107		387,1165		

ND – Não determinado

Tabela 24 - Dados de Massas obtidos para a infusão (extrato aquoso) da amostra comercializada na cidade de Dourados (DRS2) (MS).

N°	Rt (min)	Classe de composto	Formula	<i>m/z</i> [M-H] ⁻	<i>m/z</i> [2M-H] ⁻	<i>m/z</i> [M+COOH-H] ⁻	<i>m/z</i> [M+Cl-H] ⁻	MS/MS Fragmentação
1	12,8	ND	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₂	445,1341				
2	14,2	ND	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₂	445,1329				
3	15,2	ND	C ₂₁ H ₃₆ O ₁₁	463,2185		509,2240		
4	15,5	ND	C ₂₁ H ₃₆ O ₁₁	463,2167		509,2230		
5	20,6	ND	C ₂₂ H ₃₆ O ₁₁	475,2181				

ND – Não determinado

Tabela 25 - Dados de Massas obtidos para o extrato etanólico da amostra comercializada na cidade de Dourados (DRS3) (MS).

N°	Rt (min)	Classe de composto	Formula	<i>m/z</i> [M-H] ⁻	<i>m/z</i> [2M-H] ⁻	<i>m/z</i> [M+HCOOH-H] ⁻	<i>m/z</i> [M+Cl-H] ⁻	MS/MS Fragmentação
1	1,0	ND	C ₁₉ H ₁₈ O ₆	341,1005	683,2093	387,1051		
2	1,4	ND	C ₁₈ H ₃₈ O ₁₆	509,2115				463,2097; 331,1660; 161,0403

ND – Não determinado

Tabela 26 - Dados de Massas obtidos para a infusão (extrato aquoso) da amostra comercializada na cidade de Dourados (**DRS3**) (MS).

N°	Rt (min)	Classe de composto	Formula	<i>m/z</i> [M-H] ⁻	<i>m/z</i> [2M-H] ⁻	<i>m/z</i> [M+HCOOH-H] ⁻	<i>m/z</i> [M+Cl-H] ⁻	MS/MS Fragmentação
1	8,5	ND	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	305,0684				
2	8,9	ND	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289,0738				
3	12,4	ND	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289,0724				
4	14,8	ND	C ₁₇ H ₃₀ O ₉	377,1811				
5	15,2	ND	C ₂₁ H ₃₆ O ₁₁	463,2185		509,2240		

ND – Não determinado

Tabela 27 - Dados de Massas obtidos para o extrato etanólico da amostra comercializada na cidade de Dourados (**DSR4**) (MS).

N°	Rt (min)	Classe de composto	Formula	<i>m/z</i> [M-H] ⁻	<i>m/z</i> [2M-H] ⁻	<i>m/z</i> [M+HCOOH-H] ⁻	<i>m/z</i> [M+Cl-H] ⁻	MS/MS Fragmentação
1	1,0	ND	C ₁₉ H ₁₈ O ₆	341,1008	683,2100	387,1056		

ND – Não determinado

Tabela 28 – Dados de Massas obtidos para a infusão (extrato aquoso) da amostra comercializada na cidade de Dourados (**DRS4**) (MS)

N°	Rt (min)	Classe de composto	Formula	<i>m/z</i> [M-H] ⁻	<i>m/z</i> [2M-H] ⁻	<i>m/z</i> [M+HCOOH-H] ⁻	<i>m/z</i> [M+Cl-H] ⁻	MS/MS Fragmentação
1	4,2	ND	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	305,0667				
2	8,6	ND	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	305,0664				
3	15,2	ND	C ₂₁ H ₃₆ O ₁₁	463,2193		509,2258		
5	20,6	ND	C ₂₂ H ₃₆ O ₁₁	475,2192				

ND – Não determinado

Tabela 29 - Dados de Massas obtidos para o extrato etanólico da amostra comercializada na cidade de Ponta Porã (PPA) (MS).

N°	Rt (min)	Classe de composto	Formula	m/z [M-H] ⁻	m/z [2M-H] ⁻	m/z [M+HCOOH-H] ⁻	m/z [M+Cl-H] ⁻	MS/MS Fragmentação
1	1,0	Sucrose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	341,1063		387,1117		
2	1,3	ND	C ₂₃ H ₁₄ O ₅	369,0784				207,0270, 193,0061; 190,9993; 163,0013
3	11,8	ND	C ₂₉ H ₃₂ O ₄	443,2239				
4	22,2	ND	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	313,2359				

ND – Não determinado

Tabela 30 - Dados de Massas obtidos para a infusão (extrato aquoso) da amostra comercializada na cidade de Ponta Porã (PPA) (MS).

N°	Rt (min)	Classe de composto	Formula	m/z [M-H] ⁻	m/z [2M-H] ⁻	m/z [M+HCOOH-H] ⁻	m/z [M+Cl-H] ⁻	MS/MS Fragmentação
1	4,0	ND	C ₇ H ₆ O ₄	153,0173				
2	7,7	ND	C ₁₅ H ₂₀ O ₁₀	359,1016				
3	11,3	ND	C ₂₉ H ₂₀ O ₄	431,1270				
4	12,0	ND	C ₃₄ H ₂₆ O ₉	577,1486				
11	25,8	ND	C ₃₁ H ₃₀ O ₃	449,2085				

ND – Não determinado

5.7 Avaliação da Atividade Citotóxica *in vivo* sobre a microcrustáceo *Artemia salina*

O extrato etanólico de *M. petraea* apresentou uma potente atividade, apresentando um valor de $CL_{50}=1,26 \mu\text{g/mL}$. Os resultados obtidos com o extrato aquoso (infusão) e fases (hexânica, acetado de etila e hidrometanólica) de *M. petraea* e *M. velame*, assim como o extrato etanólico de *M. velame* foram inconclusivos, sendo letal nas menores concentrações testadas, precisando assim ser reavaliado.

5.8 Avaliação da Atividade Citotóxica *in vitro* sobre a células neoplásicas

A atividade citotóxica do extrato aquoso (infusão), etanólico e das fases oriundas da partição líquido-líquido do extrato etanólico (fases: hexânica (Hex), hidrometanólica (MeOH/H₂O) e acetato de etila (AcOEt) foi avaliada pelo método SRB (sulforrodamina B), sobre as seguintes linhagens: MCF-7 (ATCC-HTB-22, adenocarcinoma de mama), PC-3 (ATCC-CRL-1435, adenocarcinoma de próstata), 786-0 (ATCC-CRL-1932, adenocarcinoma de rim), HT-29 (ATCC-HTB-38 adenocarcinoma de cólon), UACC-62 (melanoma humano), NCI/ADR-RES (adenocarcinoma de ovário resistente) e também foi utilizada uma linhagem de células não neoplásicas - NIH/3T3 (ATCC-CRL-1658, fibroblasto murino).

Tabela 31 - Valores de GI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) expressos em $x \pm SD$ das amostras-teste da espécie *Macrosiphonia petraea* (Apocynaceae)

Extrato e Fases		Linhagens de células						
		PC-3	786-0	HT-29	MCF-7	UACC-62	NCI/ADR-RES	NIH/3T3
<i>M. petraea</i> (Raiz)	<u>Ext. EtOH</u>	31,74 $\pm 2,01$	56,98 $\pm 0,79$	49,30 $\pm 4,39$	53,47 $\pm 5,96$	68,95 $\pm 0,98$	229,02 $\pm 5,88$	17,41 $\pm 0,80$
	<u>Fase Hex</u>	>250	>250	>250	-----	-----	-----	34,59 $\pm 1,10$
	<u>Fase AcOEt</u>	21,59 $\pm 4,58$	36,27 $\pm 1,76$	23,57 $\pm 2,90$	31,21 $\pm 2,34$	30,06 $\pm 1,50$	27,41 $\pm 0,68$	2,36 $\pm 0,01$
	<u>Fase MeOH/H₂O</u>	47,47 $\pm 3,03$	47,68 $\pm 0,27$	77,66 $\pm 5,29$	53,87 $\pm 0,37$	31,28 $\pm 1,00$	239,02 $\pm 6,94$	15,00 $\pm 0,10$
	<u>Doxorrubicina</u>	0,24 $\pm 0,005$	0,07 $\pm 0,01$	0,30 $\pm 0,07$	0,12 $\pm 0,04$	0,29 $\pm 0,06$	2,99 $\pm 0,40$	0,54 $\pm 0,20$

Para as análises dos resultados, considerou-se as amostras com $GI_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$ potencialmente ativas (ITARATH *et al.*, 2004), ao passo que as amostras que apresentaram $GI_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$ foram consideradas inativas. Das amostras testadas apenas a fase hexânica de *M. petraea* apresentou $GI_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$ (inativa), destacando-se, dentre as

frações ativas, a fase acetato de etila, que apresentou $GI_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$ para as células neoplásicas PC-3, HT-29 e NCI/ADR-RES. Ademais, todas as amostras apresentaram $GI_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$ frente a células não neoplásicas NIH/3T3, com exceção da fase hexânica que apresentou GI_{50} de $34,59 \mu\text{g/mL}$, demonstrando assim que mesmo que os extratos e fases detenham forte potencial citotóxico para células neoplásicas, a ingestão dos compostos presentes na espécie de *M. petraea* podem ser nocivos a saúde humana. A ação citotóxica para a fase acetato de etila possuiu, ainda, maior intensidade em relação ao extrato etanólico, o que possibilita a proposta de concentração dos compostos responsáveis por tal atividade nesta fase. A investigação química da fase supracitada de *M. petraea* realizada por nosso grupo de pesquisa (De Assis Junior *et al.*, 2013) permitiu a detecção de compostos das classes pregnano e álcool graxo, podendo-se, assim, supostamente atribuir a citotoxicidade observada no presente trabalho a estes tipos de compostos, para os quais já foram citadas atividades citotóxicas (Jiang *et al.*, 2008 e Bai *et al.*, 2006)

5.9 Avaliação da Atividade Genotóxica

No ensaio SMART, a toxicidade dos extratos (aquoso (infusão) e etanólico) e das fases (hexânica, hidrometanólica e acetato de etila) foi determinada em função do aumento da porcentagem de larvas tratadas que não atingiram o estágio adulto, quando comparada com o controle. O extrato aquoso foi tóxico na concentração de 5mg/mL , o extrato etanólico e as fases hexânica e hidrometanólica foram tóxicos em concentrações acima de $1,0 \text{mg/mL}$ e a fase acetato de etila foi tóxica em todas as concentrações avaliadas.

As doses selecionadas para o estudo de genotoxicidade apresentaram uma taxa de mortalidade menor do que 30% dos indivíduos, quando comparada com o controle. A avaliação da genotoxicidade foi realizada por meio dos descendentes resultantes dos cruzamentos padrão (ST) e de alta bioativação (HB), os quais foram tratados cronicamente com três diferentes concentrações do extrato aquoso (EAq) e etanólico (EEOH) e as fases hidrometanólica (FM), hexânica (FH), acetato de etila (FAE).

A Tabela 32 mostra a frequência de formação de clone nos descendentes do cruzamento ST, os quais apresentam níveis basais do citocromo P-450 (CYP6A2), observa-se que o EAq na concentração de $2,5\text{mg/mL}$ aumentou a frequência de formação de clones, estatisticamente significativo quando comparado com o controle, apresentando atividade genotóxica.

Resultado similar foi obtido com o extrato etanólico (EEOH), cujas frequências de formação de clones variaram de 1,64 a 2,56, diferindo estatisticamente da obtida no controle 0,92. Para a fase hidrometanólica, somente a concentração de 1,0 mg/mL, aumentou a formação de clones, diferindo estatisticamente do obtido no controle. Todas as concentrações avaliadas da fase hexânica, induziram a formação de clones, cujas frequências variaram de 1,74 a 1,95, diferindo estatisticamente do controle (0,92), apresentando atividade genotóxica.

Tabela 32 - Resumo dos resultados obtidos com os descendentes trans-heterozigótica marcados (MH) de *D. melanogaster* derivado do padrão (ST) transversal após tratamento crónico com larvas de extracto aquoso (EAq), extracto de etanol (EEtOH), fase metanólica (fMet), hexano (FHex) e acetato de etilo (AcOH), obtido de *Macrossiphonia petraea*.

Spots per fly (number of spots) statistical diagnosis ^a														Frequency of	
Genotypes and treatments	N. of flies	Small single			Large single			Twin spots			Total spots			Spots with	clone formation /10 ⁵
(mg/mL)	(N)	spots (1-2 cells) ^b			spots (>2 cells) ^b									<i>mwh</i> clone ^c	cells per cell division
		<i>m</i> = 2			<i>m</i> = 5			<i>m</i> = 5			<i>m</i> = 2			(n)	(n/NC) ^d
		F	N°	D	F	N°	D	F	N°	D	F	N°	D		Observed
<i>mwh/flr</i> ³															
Control	20	0,20	(08)		0,05	(01)		0,00	(00)		0,45	(9)		9	0,92
BaP	20	0,65	(13)	i	0,05	(01)	i	0,00	(00)		0,70	(14)	i	14	1,43
DXR	20	3,20	(64)	+	2,25	(45)	+	3,30	(66)	+	8,75	(175)	+	173	17,72
EAq [1,25]	20	0,70	(14)	i	0,10	(02)	i	0,00	(00)	i	0,80	(16)	i	16	1,64
EAq [2,50]	20	0,75	(15)	i	0,05	(01)	i	0,05	(01)	i	0,35	(17)	+	17	1,74
EAq [5,0]	*														
EEtOH [0,25]	20	0,80	(16)	i	0,10	(02)	i	0,10	(02)	i	1,00	(20)	+	20	2,04
EEtOH [0,50]	20	0,60	(12)	i	0,10	(02)	i	0,10	(02)	i	0,80	(16)	i	16	1,64
EEtOH [1,0]	20	1,00	(20)	i	0,10	(02)	i	0,15	(03)	i	1,25	(25)	+	25	2,56
FMet [0,25]	20	0,15	(03)	-	0,10	(02)	i	0,00	(00)	-	0,38	(05)	-	05	0,51
FMet [0,50]	20	0,65	(13)	i	0,00	(00)	i	0,05	(01)	i	0,70	(14)	i	14	1,43
FMet [1,0]	20	0,70	(14)	i	0,10	(02)	i	0,05	(01)	i	0,85	(17)	+	17	1,74
FHex [0,25]	20	0,60	(12)	i	0,25	(05)	i	0,00	(00)	i	0,85	(17)	+	17	1,74
FHex [0,50]	20	0,80	(16)	+	0,10	(02)	i	0,05	(01)	i	0,95	(19)	+	19	1,95
FHex [1,0]	20	0,75	(15)	i	0,15	(03)	i	0,05	(01)	i	0,95	(19)	+	19	1,95
ActOH [0,25]	*														
ActOH [0,50]	*														
ActOH [1,0]	*														

^a diagnósticos estatísticos de acordo com Frei e Würigler (1988): U-teste, frente e verso; níveis de probabilidade: -, negativo; +, Positivo; i, inconclusivos; $p \leq 0,05$ vs controle; ^b Including raros pontos individuais flr3; ^c Considerando clones MWh de MWh único e pontos individuais; ^d Frequência de formação de clones: clone / moscas / 48.800 células (sem correção de tamanho).

Nos descendentes do cruzamento HB, tratados com EAq, verifica-se que a frequência de formação de clones variou de 4,61 a 7,48 com prevalência de manchas simples pequena, enquanto que a obtida no controle foi de 1,33. Resultado similar foi obtido com o EEOH, a frequência de formação de clones variou de 6,25 a 8,81, estatisticamente diferente do observado no controle. A maior frequência de formação de clones observada nos grupos tratados com a fase hidrometanólica (FM) foi 2,46 e para a hexânica (FH) 2,76, todas as concentrações avaliadas induziram um aumento estatisticamente significativo de mutações (Tabela 33).

Verifica-se que do total de manchas mutantes ocasionadas pelo EAq e EEOH, FM e FH, a maioria é classificada como simples e pequena, de acordo com Graf *et al* (1984), o número total de manchas mutantes fornece dados quantitativos sobre a atividade genotóxica do extrato e/ou composto, o tipo de mancha pode revelar quais foram as diferentes lesões envolvidas na origem dos clones. Manchas mutantes simples (pequenas ou grandes), expressando o fenótipo *flr³* ou *mwh*, indicam a ocorrência de mutações pontuais, alterações cromossômicas e recombinação mitótica. Entretanto, manchas gêmeas, formadas por células adjacentes *flr³* ou *mwh*, são originadas exclusivamente por recombinação.

Os resultados observados nos descendentes dos cruzamentos ST e HB, indicaram que houve um aumento estatisticamente significativo na frequência de formação de clones quando comparado com o controle, para todos os extratos e fases avaliados. No entanto, indivíduos resultantes do cruzamento HB, os quais apresentam altos níveis de citocromo P-450, enzimas de metabolização, tratados com EAq e EEtOH apresentaram uma frequência de formação de clones três vezes mais elevada do que a observada em indivíduos ST. Estes dados sugerem que nas condições experimentais descritas, os constituintes químicos presentes nos extratos, se tornam mais genotóxicos após a metabolização.

Ademais, duas classes de compostos, que foram obtidas de uma espécie de *M. petraeae*, durante projeto de mestrado realizado por nosso grupo de pesquisa (De Assis Junior *et al.*, 2013) estão sendo avaliados frente a atividade genotóxicas, os pregnanos, Neridienano A e Cybisterol (Figura 47, composto 1 e 2, respectivamente) e o um álcool, graxo ácido 5-hidroxi-octadeca-6(E),8(Z)-dienoico (Figura 47, composto 3). Ambas as classes, até o presente momento apresentam atividade genotóxica tanto para o cruzamento ST como para o HB, demonstrando assim serem compostos que possuem atividade genotóxica e podem ser os responsáveis pela atividade observada nos extratos e fases estudadas.

Tabela 33 - Resumo dos resultados obtidos com os descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) de *Drosophila melanogaster* derivada da descendência do cruzamento de alta bioativação (HB) após o tratamento crônico de larvas com extrato aquoso (EAq), extrato de etanol (EEtOH), fase metanólica (fMet), hexano (FHex) e acetato de etilo (AcOH), obtido de *Macrossiphonia petraea*.

Spots per fly (number of spots) statistical diagnosis ^a														Frequency of	
Genotypes and treatments (mg/mL)	N. of Flies (N)	Small single spots (1-2 cells) ^b			Large single spots (>2 cells) ^b			Twin spots			Total spots			Spots with clone <i>mwh</i> ^c (n)	clone formation/10 ⁵ cells per cell division (n/NC) ^e Observado
		<i>m</i> = 2			<i>m</i> = 5			<i>m</i> = 5			<i>m</i> = 2				
		F	N°	D	F	N°	D	F	N°	D	F	N°	D		
<i>mwh/flr</i> ³															
Control	20	0,60	(12)		0,05	(01)		0,00	(00)		0,65	(13)		13	1,33
BaP	20	1,40	(28)	+	0,10	(02)	-	0,10	(02)	-	1,60	(32)	+	32	3,27
DXR	20	3,90	(78)	+	1,95	(39)	+	3,40	(68)	+	9,25	(185)	+	183	18,95
EAq [1,25]	20	2,70	(54)	+	0,25	(05)	+	0,00	(00)	i	2,95	(59)	+	59	6,04
EAq [2,50]	20	3,10	(62)	+	0,50	(10)	+	0,05	(01)	i	3,65	(73)	+	73	7,48
EAq [5,0]	20*	1,00	(40)	i	0,20	(04)	i	0,05	(01)	i	2,25	(45)	+	45	4,61
EEtOH [0,25]	20	3,15	(63)	+	0,60	(12)	+	0,10	(02)	i	3,85	(77)	+	77	7,88
EEtOH [0,50]	20	3,35	(67)	+	0,95	(19)	+	0,00	(00)	i	4,30	(86)	+	86	8,81
EEtOH [1,0]	20*	2,45	(49)	+	0,55	(11)	+	0,05	(01)	i	3,05	(61)	+	61	6,25
FMet [0,25]	20	1,10	(22)	+	0,10	(02)	i	0,00	(00)	i	1,20	(24)	+	24	2,46
FMet [0,50]	20	0,85	(17)	i	0,15	(03)	i	0,10	(02)	i	1,10	(22)	+	22	2,25
FMet [1,0]	20	1,00	(20)	+	0,05	(01)	i	0,00	(00)	i	1,05	(21)	+	21	2,15
FHex [0,25]	20	0,60	(12)	i	0,05	(01)	i	0,00	(00)	i	0,65	(13)	i	13	1,33
FHex [0,50]	20	0,90	(18)	i	0,15	(03)	i	0,10	(02)	i	1,15	(23)	+	23	2,35
FHex [1,0]	20	1,15	(23)	+	0,10	(02)	i	0,10	(02)	i	1,35	(27)	+	27	2,76
AcOEt[0,25]	*														
AcOEt [0,50]	*														
AcOEt [1,0]	*														

^a diagnósticos estatísticos de acordo com Frei e Würzler (1988): U-teste, frente e verso; níveis de probabilidade: -, negativo; +, Positivo; i, inconclusivos; $p \leq 0,05$ vs controle; ^b Including raros pontos individuais flr3; ^c Considerando clones MWh de MWh único e pontos individuais; ^d Frequência de formação de clones: clone / moscas / 48.800 células (sem correção de tamanho).

5.10 Quimiosistemática e Prospecção: Pregnanos e Triterpenos na Família Apocynaceae

Para demonstrar a distribuição da produção dos compostos do tipo pregnano e triterpenos na família Apocynaceae uma adição no cladograma disposto no artigo de Agrawal. *et al.*, (2011) foi realizada com o interesse de promover uma comparação filogenética entre os gêneros nos quais há relatos de produção de triterpenos e pregnanos, e gêneros que não constam relatos da produção desses compostos (Figura 51).

Gêneros da família Apocynaceae que apresentam descrição de obtenção de compostos triterpenos em alguma espécie dentro dos gêneros:

Amalocalyx; Amsonia; Apocynum; Catharanthus; Cerbera; Melodinus; Trachelospermum; Vinca; Dischidia; Ecdysanthera; Echites; Funtumia; Pergularia; Pleiocarpa; Rauvolfia; Rhazya; Beaumontia; Marsdenia; Cynanchum; Dipladenia; Holarrhena; Asclepias; Gymnema; Alstonia; Alyxia; Aspidosperma; Calotropis; Carissa; Himatanthus; Ichnocarpus; Mandevilla; Macrosiphonia; Mucoa; Parahancornia; Peltastes; Periploca; Tabernaemontana; Thevetia; Nerium; Plumeria; Wrightia

Gêneros da família Apocynaceae para os quais há relatos sobre a ocorrência de obtenção de compostos pregnanos em alguma espécie dentro do gênero.

Apocynum; Holarrhena; Macrosiphonia; Asclepias; Calotropis; Ceropogia; Cryptolepis; Epigynum; Hoya; Leptadenia; Mandevilla; Marsdenia; Pachypodium; Pergularia; Periploca; Stapelia; Trachelospermum; Vincetoxicum; Nerium; Gymnena; Wrightia; Telosma.



Figura 51: Cladograma de Agrawal. *et al.*, (2011), onde foi realizada a adição de distribuição de ocorrência de triterpenos e pregnanos em gêneros de Apocynaceae. Colorações, vermelha e preta caracterizam alcaloides e cardenolideos, respectivamente (original), coloração azul e amarelo inserido demonstram a ocorrência de pregnanos e triterpenos, respectivamente.

Observações realizadas com a adição das informações inseridas no cladograma de Agrawal. *et al.*, 2011, sobre a classe dos triterpenos, demonstra que não há influência de filogenia que discrimine a produção dessa classe de compostos dentro dos gêneros da família Apocynaceae, visto que o a presença desta classe, e também dos alcaloides, são traços primitivos. Sua ocorrência é observada desde espécies mais primitivas às espécies mais recentes, demonstrando que esses tipos de compostos estão presentes desde as primeiras especiações e diferenciações das espécies, dentro desta família. De modo similar. Esse fato nos conduz a propor que a ocorrência de triterpenos pode ser observada e distribuída por todos os gêneros da família Apocynaceae.

Para os compostos da classe dos pregnanos, baseado na interpretação realizada no cladograma de Agrawal *et al.*, 2011. Podemos aferir pela distribuição de filogenia que, a ocorrência de pregnanos nos gêneros da família Apocynaceae apresenta um ponto de diferenciação, onde ocorre a especiação entre os gêneros *Wrightia* e *Carissa*, visto que abaixo do gênero *Carissa*, no cladograma (Figura 51), não há descrição de ocorrência de compostos do tipo pregnano, e que acima do gênero *Wrightia* é observado a ocorrência dessa classe de composto.

Apresentando maior distribuição em gêneros que estão na parte superior cladograma, onde se encontram também as espécies mais recentes, o que pode conduzir a interpretação de que a via de biossíntese dos pregnanos pode ser mais recente que as demais rotas presentes em gêneros da família Apocynaceae e analisadas através do cladograma de Agrawal *et al.*, 2011. E também podemos sustentar, até o presente momento, que a ocorrência dos pregnanos na família Apocynaceae dá-se pelas especiações e diferenciações filogenéticas entre os gêneros.

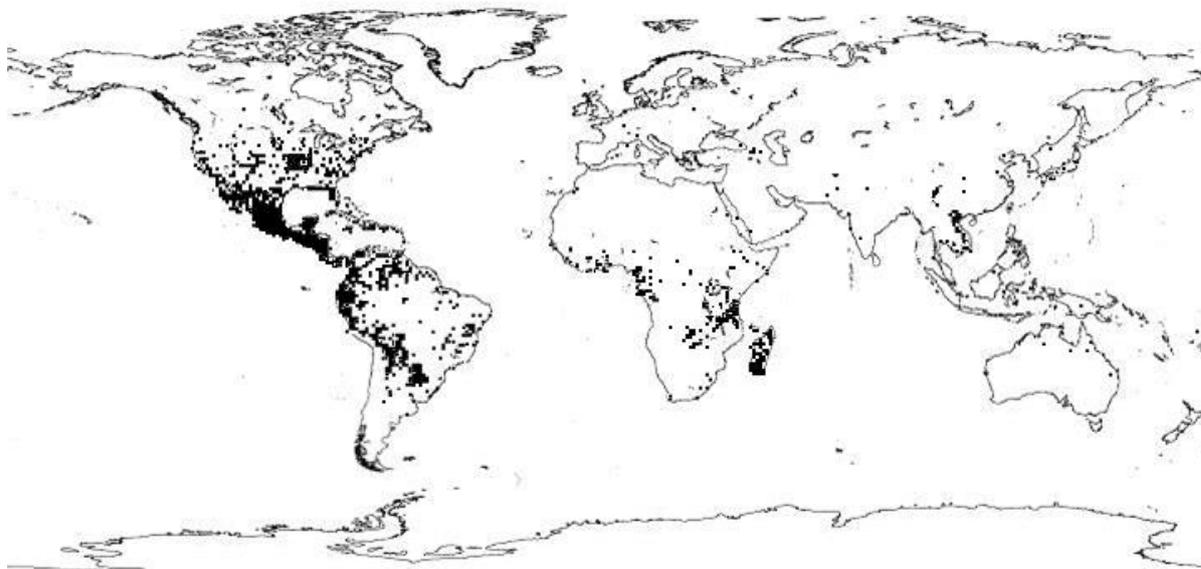
E somando-se informações, ainda, do banco de dados *tropicos.org* sobre a densidade de distribuição de espécimes vegetais, e ao realizar uma organização por sobreposição dos mapas de densidade de distribuição de espécies por gênero (Figura 52 e 53), foi possível promover comparações entre a filogenia e a geografia de distribuição de espécimes produtores dessas duas classes de metabolitos: pregnanos e triterpenos; contribuindo assim, para uma quimiosistemática baseada na filogenia e geoquímica dessa grande família.

Sendo assim, através de levantamento bibliográfico, utilizando o site do *tropicos.org* e trabalhos publicados nas literaturas (Tabela 34 e Tabela 35), fizemos uma relação que conduz a prospecção de pregnanos e triterpenos, através da análise da distribuição global das espécies dos gêneros da família Apocynaceae.

Tabela 34 - Distribuição de espécimes estudados que apresentam os compostos da classe dos pregnanos.

Espécie	Ocorrência	Referências
<i>Adenium obesum</i>	Tailândia, Filipinas	Nakamura <i>et al.</i> , (2000)
<i>Amalocalyx yunnanensis</i>	China	Ying-Jie <i>et al.</i> , (1992)
<i>Apocynum venetum</i>	Japão	Abe <i>et al.</i> , (1987)
<i>Asclepias incarnata</i>	Estados Unidos	Warashima e Noro (2000)
<i>Calotropis procera</i>	Egito	Ibrahim <i>et al.</i> , (2015)
<i>Ceropegia fusca</i>	Ilhas Canárias	García <i>et al.</i> , (2011)
<i>Cryptolepis obtusa</i>	Moçambique	Paulo e Houghton (2003)
<i>Desmidorchis flava</i>	Oman (OM)	Raees <i>et al.</i> , (2015)
<i>Ecdysanthera rosea</i>	China	Song <i>et al.</i> , (2014)
<i>Epigynum auritum</i>	China	Cao <i>et al.</i> , (2005)
<i>Gomphocarpus fruticosus</i>	Egito	Marzouk <i>et al.</i> , (2015)
<i>Gymnema alternifolium</i>	Taipei, Taiwan	Yoshikawa <i>et al.</i> , (1998),
<i>Gymnema griffithii</i>	Tailândia	Srisurichan <i>et al.</i> , (2014)
<i>Hoya carnosa</i>	Japão	Abe <i>et al.</i> , (1999)
<i>Leptadenia pyrotechnica</i>	Mali	Cioffi <i>et al.</i> , (2006)
<i>Leptadenia reticulata</i>	Índia	Srivastav <i>et al.</i> , (1994)
<i>Macrosiphonia petraea</i>	Brasil (MS)	De Assis Jr <i>et al.</i> , (2013)
<i>Macrosiphonia velame</i>	Brasil (MT)	Ribeiro <i>et al.</i> , (2010)
<i>Mandevilla illustre</i>	Brasil (MG)	Bento <i>et al.</i> , (1996)
<i>Mandevilla velutina</i>	Brasil	Yunes <i>et al.</i> , (1993)
<i>Marsdenia roylei</i>	Índia	Gupta <i>et al.</i> , (2003)
<i>Marsdenia tenacissima</i>	China	Deng <i>et al.</i> , (2005)
<i>Marsdenia tomentosa</i>	Japão (Fukuaka)	Abe <i>et al.</i> , (1999)
<i>Parabarium huaitingii</i>	Guangxi, China (AS)	Lei <i>et al.</i> , (2011)
<i>Pentalinon andrieuxii</i>	Campeche, México (AN)	Yam-Puc <i>et al.</i> , (2012)
<i>Pergularia pallida</i>	Índia	Khare <i>et al.</i> , (1986)
<i>Periploca graeca</i>	Itália	Siciliano <i>et al.</i> , (2005)
<i>Periploca sepium</i>	China	Wang <i>et al.</i> (2011)
<i>Stapelia variegata</i>	Egito	El Sayed <i>et al.</i> , (1995)
<i>Telosma procumbens</i>	Vietnã	Huan <i>et al.</i> , (2001)
<i>Trachelospernum asiaticum</i>	Japão (Fukuaka)	Abe e Yamauchi (1981)
<i>Vincetoxicum hirundinaria</i>	França	Lavault <i>et al.</i> , (1999)
<i>Wrightia javanica</i>	Tailândia	Kawamoto <i>et al.</i> , (2003)

a



b

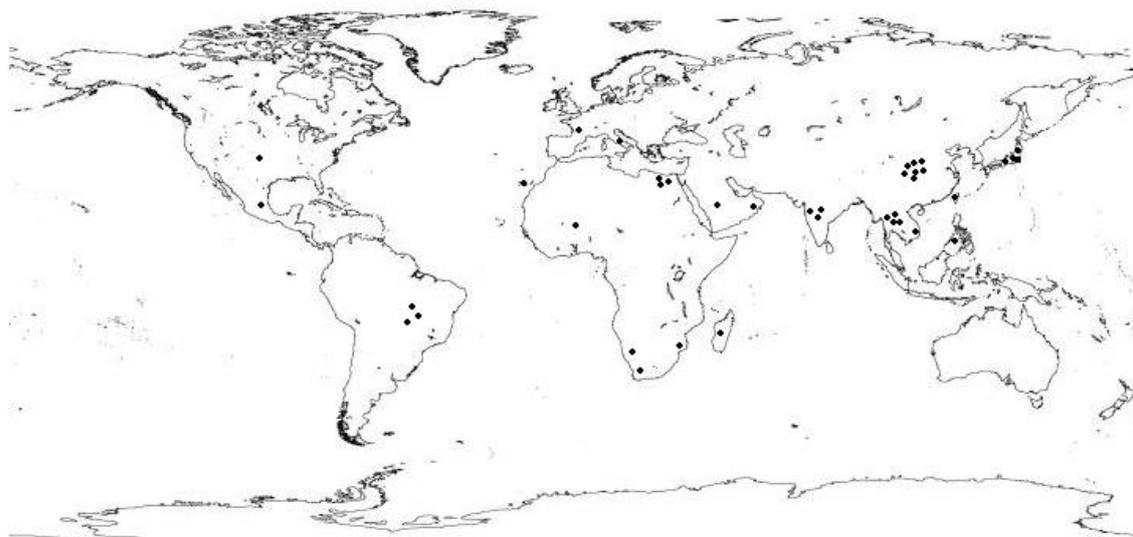
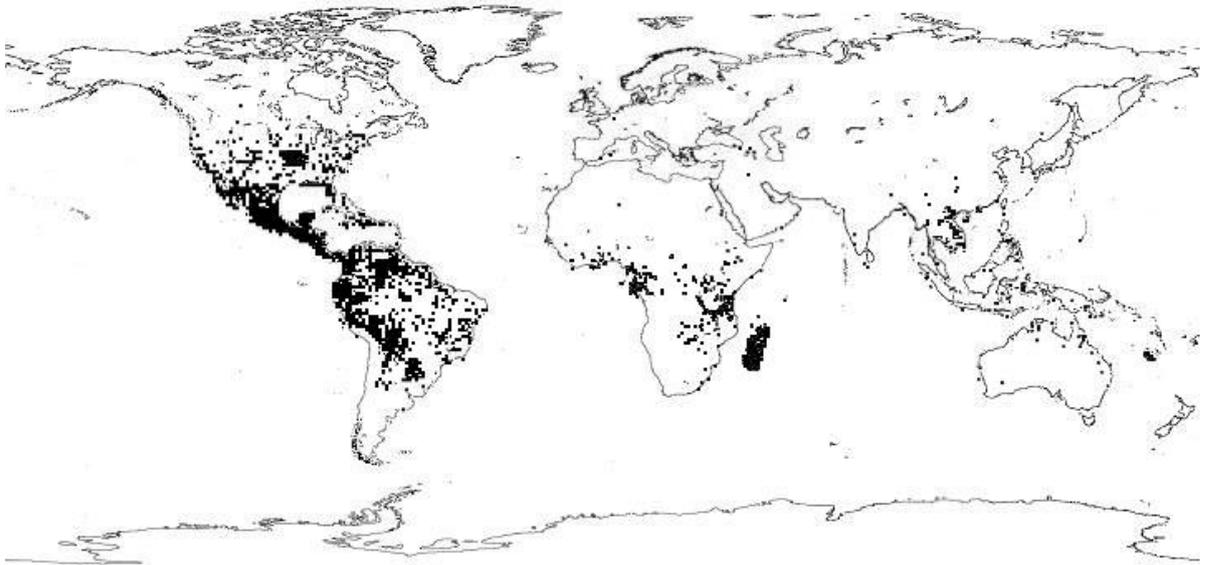


Figura 52: a. Densidade de distribuição total de espécies dos gêneros da família Apocynaceae que apresentaram algum relato de ocorrência de compostos do tipo pregnano, mapas retirados do banco de dados *tropicos.org* e realizado a sobreposição. Distribuição de espécimes de gêneros da família Apocynaceae que apresentaram relatos da literatura da obtenção de compostos do tipo pregnano (Tabela 34), mapa retirado do banco de dados *tropicos.org* e informações de distribuição por pontos inseridos pelo autor.

Tabela 35 - Distribuição de espécimes estudados que apresentam os compostos da classe triterpenos

Espécie	Ocorrência	Referências
<i>Adenium obesum</i>	Nigéria	Tijjani <i>et al.</i> , (2012)
<i>Alstonia scholaris</i>	Índia	Sultana <i>et al.</i> , (2010)
	Paquistão	Sultana <i>et al.</i> , (2013)
<i>Amsonia grandiflora</i>	Estados Unidos	Wahyuono <i>et al.</i> , (1987)
<i>Aspidosperma illustre</i>	Brasil (ES)	Barbosa <i>et al.</i> , (2010)
<i>Aspidosperma nitidum</i>	Brasil (AM)	Pereira <i>et al.</i> , (2006)
<i>Caralluma russeliana</i>	Arábia Saudita	Abdel-Mogib <i>et al.</i> , (2013)
<i>Carissa carandas</i>	Paquistão	Siddiqui <i>et al.</i> , (2004)
<i>Carissa spinarum</i>	Índia	Chanda <i>et al.</i> , (2014)
<i>Cynanchum hancockianum</i>	Mongólia	Lou <i>et al.</i> , (1991)
<i>Cynanchum paniculatum</i>	China	Niu <i>et al.</i> , (2015)
<i>Dischidia formosana</i>	Taiwan	Chen <i>et al.</i> , (1993)
<i>Finlaysonia obovata</i>	Orissa (Índia)	Mishra <i>et al.</i> , (2012)
<i>Gymnema sylvestre</i>	China	Ye <i>et al.</i> , (2000)
	Índia	Zarrelli <i>et al.</i> , (2013)
<i>Himatanthus drasticus</i>	Brasil	Lucetti <i>et al.</i> , (2010)
<i>Himatanthus sucuuba</i>	Brasil	Silva <i>et al.</i> , (1998)
	Peru	Wood <i>et al.</i> , (2001)
<i>Holarrhena curtisii</i>	Tailândia	Srisurichan <i>et al.</i> , (2015)
<i>Ichnocarpus frutescens</i>	Índia	Singh <i>et al.</i> , (2014)
<i>Laseguea erecta</i>	Brasil	Carvalho <i>et al.</i> , (2006)
<i>Leptadenia pyrotechnica</i>	Paquistão	Noor <i>et al.</i> , (1993)
<i>Mandevilla guanabarica</i>	Brasil (RJ)	Zorat <i>et al.</i> , (2011)
<i>Mandevilla moricandiana</i>	Brasil (RJ)	
<i>Marsdenia callosa</i>	México	Maldonado <i>et al.</i> , (2013)
<i>Marsdenia globifera</i>	China	Qiu <i>et al.</i> , (1993)
<i>Mucoa duckei</i>	Brasil (Amazônia)	Galotta <i>et al.</i> , (2012)
<i>Nerium oleander</i>	Japão	Zhao <i>et al.</i> , (2007)
	Paquistão	Begun <i>et al.</i> , (1997)
<i>Pachypodium lamerei</i>	Madagascar	El-Kashef <i>et al.</i> , (2014)
<i>Parahancornia amapa</i>	Brasil (AP)	Sobrinho <i>et al.</i> , (1991)
<i>Parsonia straminea</i>	Austrália	Griffin <i>et al.</i> , (1971)
<i>Peltastes peltatus</i>	Brasil	Humberto <i>et al.</i> , (2004)
<i>Pergularia tomentosa</i>	Argélia	Babaamer <i>et al.</i> , (2012)
<i>Periploca aphylla</i>	Paquistão	Mustafa <i>et al.</i> , (2000)
<i>Pleiocarpa pycnantha</i>	Nigéria	Omoyeni <i>et al.</i> , (2015)
<i>Plumeria inodora</i>	Venezuela	Grignon-Dubois <i>et al.</i> , (2007)
<i>Plumeria obtusa</i>	Paquistão	Siddiqui <i>et al.</i> , (1999)
		Siddiqui <i>et al.</i> , (2004)
<i>Plumeria rubra</i>	Paquistão	Akhtar <i>et al.</i> , (1993)
<i>Rauvolfia vomitoria</i>	Camarões	Fannang <i>et al.</i> , (2011)
<i>Rhazya stricta</i>	Paquistão	Sultana <i>et al.</i> , (2010)
<i>Tabernaemontana hilariana</i>	Brasil (SP)	Cardoso <i>et al.</i> , (1998)
<i>Thevetia neriifolia</i>	Paquistão	Begum <i>et al.</i> , (1993)
<i>Trachelospernum asiaticum</i>	Japão	Abe & Yamauchi <i>et al.</i> , (1987)

a



b

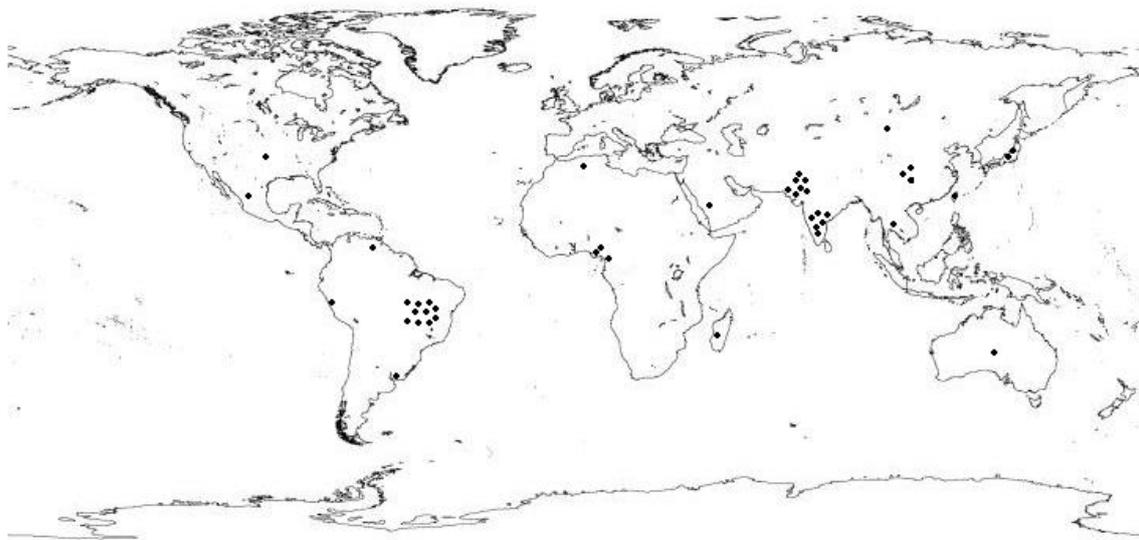


Figura 53: a. Densidade de distribuição total de espécies dos gêneros da família Apocynaceae que apresentaram algum relato de ocorrência de compostos do tipo triterpênicos, mapa retirado do banco de dados *tropicos.org* e realizado a sobreposição. b. Distribuição de espécimes de gêneros da família Apocynaceae que apresentaram relatos na literatura da obtenção de compostos do tipo triterpenos (Anexo 2, Tabela 35), mapa retirado do banco de dados *tropicos.org* e informações de distribuição por pontos inseridos pelo autor.

Espera-se que gêneros próximos em uma árvore filogenética apresentem grupos de classes de metabólitos semelhantes, o que é deveras verdadeiro e observado na literatura, por vezes espécies de um mesmo gênero não demonstram tal comportamento e isso pode ocorrer devido à região em que se encontram os espécimes em comparação, gerando assim uma geoquímica que contribui para a quimiosistemática das famílias botânicas.

Pela análise geográfica das espécies observou-se que a ocorrência das duas classes de compostos ocorre, até o momento pelos dados já publicados, em regiões de clima tropical, como o sul da China, Índia, Paquistão e Brasil, de onde se obteve os maiores relatos de ocorrência de espécimes, estudados quimicamente, e que, apresentam as classes dos pregnanos e/ou triterpenos. Essa análise nos permite aferir que, a produção desses metabólitos pode ter sua prospecção dirigida em termos de filogenia, como observado para os pregnanos, que apresentam ser uma rota de biossíntese mais recente, e por ordem de distribuição geográfica, tendo sua principal ocorrência em climas tropicais.

Ademais, não se pode afirmar o fato de que, através dos estudos fitoquímicos realizados com as espécies de um gênero, que este não tem a rota de biossíntese da produção de pregnanos ou triterpenos, ou qualquer classe de metabólitos, pois vários fatores podem influenciar no bloqueio ou desbloqueio de uma rota de biossíntese. Pesquisas devem ser relacionadas para a afirmação correta de ocorrências de pregnanos e triterpenos, e outras classes de metabólitos, nos gêneros da família Apocynaceae ou qualquer outra família, citando dois aspectos que podem contribuir para essa afirmação, os estudos fitoquímicos completos e estudos de genômica das espécies.

A *priori*, os estudos fitoquímicos, os quais têm como interesse a busca de compostos oriundos de plantas, por muitas vezes conduzem à identificação de compostos majoritários presentes em extratos, levando à perda de informação sobre a variedade e complexidade de constituintes. Neste sentido, o estudo fitoquímico detalhado não apenas enriquece a descrição da composição e potencial de cada planta para a produção dos metabólitos como também contribui amplamente com a quimiosistemática.

Segundo, através da abordagem genômica, utilizada para estudos de biossíntese de metabolitos e do mapeamento da ocorrência dos genes codificadores de enzimas que conduzem a produção dos metabolitos de interesse, pode-se determinar se há presença de uma determinada via metabólica no espécime vegetal. Sendo assim, mesmo não apresentando os metabolitos, derivados das rotas estudadas, pode-se afirmar que em algum momento essa transcrição foi observada e que foi adquirida de espécime ascendente e pode ser transferida para descendentes.

6 Conclusão

O estudo fitoquímico das raízes de espécimes de *Macrosiphonia petraea* e *Macrosiphonia velame* ocorrentes no estado de Mato Grosso do Sul promoveu a obtenção de compostos do tipo triterpeno, os quais se destacam por seu reconhecido potencial anti-inflamatório. Tendo em vista a indicação popular de uso destas plantas para tratamento de inflamações, a ocorrência de compostos triterpênicos pode sustentar a veracidade desta aplicação medicinal. O presente trabalho envolve, ainda, o primeiro estudo químico realizado com *M. velame*.

A análise comparativa dos constituintes principais ou majoritários (PCA) de exemplares coletados de *M. petraea*, *M. velame* e *M. longiflora*, e amostras vendidas sob os nomes Velame e/ou Velame Branco demonstrou uma ótima correlação entre os espécimes de *M. velame* e *M. longiflora* e amostras comercializadas no estado de Mato Grosso, podendo-se aferir que as raízes adquiridas comercialmente nesta localidade provém de indivíduos de fontes botânicas similares às plantas coletadas supracitadas; as amostras obtidas no estado de Mato Grosso do Sul, entretanto, não apresentaram similaridade química com *M. velame*, *M. longiflora* ou *M. petraea*, determinando-se, assim, que os materiais comercializados no estado de Mato Grosso do Sul não se tratam de indivíduos de nenhuma destas espécies. Dados obtidos por espectrometria de Massas sustentaram, ainda, as observações promovidas pelas análises multivariadas e evidenciaram a possibilidade de ocorrência em espécies de *Macrosiphonia* de compostos triterpênicos e derivados de álcoois graxos e derivados fenilpropaoides (C₆-C₃).

Os resultados obtidos para a inibição do crescimento de linhagens de células neoplásicas pelo extrato etanólico e fases de *M. petraea* demonstraram que, das amostras testadas, a fase acetato de etila foi a mais ativa, apresentando moderada atividade antiproliferativa (com valores de GI₅₀ compreendidos entre 21,59 e 36,27 µg/mL). Todas as amostras, exceto a fase hexânica, apresentaram GI₅₀ inferior a 30 µg/mL sobre células não neoplásicas (NIH/3T3), podendo ser consideradas citotóxicas para este tipo de célula, o que corrobora com os resultados obtidos nos ensaios de atividade genotóxica sobre à *Drosophila melanogaster*, os quais indicaram a natureza prejudicial do extrato etanólico e infusão de *M. petraea* em altas concentrações, antes e após sua metabolização.

A análise quimiosistemática da família Apocynaceae sob a ótica de ocorrência de pregnanos e triterpenos demonstrou que compostos do tipo pregnano são expressos nos gêneros mais recentes desta família, enquanto que compostos triterpênicos apresentam

distribuição por toda esta. Ademais, sendo os compostos das classes dos cardenolideos responsáveis por atividades genotóxicas e citotóxicas, bem como pregnanos, conforme observado neste trabalho, pode-se sustentar que espécies pertencentes aos gêneros que apresentam estes tipos de compostos ou gêneros filogeneticamente próximos a estes possuem grande probabilidade de deterem propriedades citotóxicas e genotóxicas.

7 Referências

- ABDEL-MOGIB, M.; RAGHIB, H. M. Two new pregnane glycoside diesters from *Caralluma russeliana*. **Natural Product Research**, v. 27, n. 14, p. 1287-1292, 2013.
- ABE, F. *et al.*, Cardenolide glycosides from the roots of *Apocynum Cannabinum*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 42, n. 10, p. 2028-2031, 1994.
- ABE, F. *et al.*, Pregnane glycosides from *Marsdenia tomentosa*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, n. 6, p. 869-875, 1999.
- ABE, F. *et al.*, Pregnane glycosides from the roots of *Asclepias tuberosa*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 48, n. 7, p. 1017-1022, 2000.
- ABE, F. *et al.*, Pregnanes and pregnane glycosides from *Hoya carnososa*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, n. 8, p. 1128-1133, 1999.
- ABE, F. *et al.*, Pregnanes and pregnane glycosides from the roots of *Apocynum venetum* var *basikurumon* (*Apocynum*). **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n. 10, p. 4087-4092, 1987.
- ABE, F.; YAMAUCHI, T. Pregnanes in the root bark of *Nerium Odorum*. **Phytochemistry**, v. 15, p. 1745-1748, 1976.
- ABE, F.; YAMAUCHI, T. Two Pregnanes from *Oleander* leaves. **Phytochemistry**, v. 31, p. 2819-2820, 1992.
- ABE, F.; YAMAUCHI, T.; TEIKASIDE-A, A. Pregnane glycoside of *Trachelospermum asiaticum*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 2, p. 416-420, 1981.
- AGRAWAL, A. *et al.*, Toxic cardenolides: chemical ecology and coevolution of specialized plant-herbivore interactions. **New Phytologist**, v. 194, p. 28-45, 2012.
- ASAKAWA, J. *et al.*, ¹³C NMR study of ginseng sapogenins and their related dammarane type triterpenes. **Tetrahedron**, v. 13, p. 1935-1939, 1976.
- AKHTAR, N.; MALIK, A. Oleanene type triterpenes from *Plumeria rubra*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 6, p. 1523-1525, 1993.
- BABAAMER, Z. Y. *et al.*, Two new taraxasterol type triterpenes from *Pergularia tomentosa* growing wild in Algeria. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 14, n. 12, p. 1137-1143, 2012.
- BAI, L. *et al.*, Bioactive pregnanes from *Nerium oleander*. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 14-18, 2006.
- BALESTRIN, L. *et al.*, Contribuição ao estudo fitoquímico de *Dorstenia multiformis* Miquel (Moraceae) com abordagem em atividade antioxidante. **Brazilian Journal Phamacognosy**, v. 18, p. 230-235, 2008.

- BARBAN, J. R. *Revisão Taxonômica do Gênero Macrosiphonia Muell. – Arg. (Apocynaceae)*. [Dissertação de Mestrado] Campinas: Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 1985.
- BARBOSA, L. F. *et al.*, Chemical Constituents from *Aspidosperma illustre* (Apocynaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 8, p. 1434-1438, 2010.
- BEGUM, S. *et al.*, Constituents of the leaves of *Thevetia neriifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 4, p. 613-617, 1993.
- BEGUM, S.; SULTANA, R.; SIDDIQUI, B. S. Triterpenoids from the leaves of *Nerium oleander*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 2, p. 329-332, 1997.
- BENTO, E. S. *et al.*, The structure of velutinol A is (15R,16R,20S)-14,16:15,20:16,21-triepoxy-15,16-seco-14 beta,17 alpha-pregn-5-ene-3 beta,15-diol. A combined quantitative overhauser effect and molecular modelling study. **Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2**, n. 7, p. 1359-1366, 1996.
- BIESKI, A. M. *et al.*, Ethnopharmacology of medicinal plants of the pantanal region (Mato Grosso, Brazil). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012.
- CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. Effect of a crude extract of *Mandevilla velutina* on contractions induced by bradykinin and [des-Arg9]-bradykinin in isolated vessels of the rabbit. **Brazilian Journal Pharmacognosy**, v. 88, p. 937–941, 1986.
- CAO, J. X. *et al.*, Three novel pregnane glycosides from *Epigynum auritum*. **Tetrahedron**, v. 61, n. 27, p. 6630-6633, 2005.
- CARDOSO, C. A. L. *et al.*, Qualitative determination of índole alkaloids, triterpenoids and steroids of *Tabernaemontana hilariana*. **Journal of Chromatografy A**, v. 808, p. 264-268, 1998.
- CARVALHO, M. G. D. *et al.*, Special metabolites isolated from *Laseguea erecta* (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 497-500, 2006.
- CECHINEL FILHO, V. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade, **Química Nova**, v. 21, n.1, 1998.
- CHANDA, J. *et al.*, RP_HPLC simultaneous estimation of betulinic acid and ursolic acid in *Carissa spinarum*. **Natural product research**, v. 28, n. 21, p. 1926-1928, 2014.
- CHEN, Z. S.; LEE, G. H.; KUO, Y. H. Disformone and dischidiol from *Dischidia formosana*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 3, p. 783-786, 1993.
- CIOFFI, G. *et al.*, Pregnane glycosides from *Leptadenia pyrotechnica*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 4, p. 625-635, 2006.
- DA SILVA, A. O. *et al.*, Evaluation of anti-inflammatory and mechanism of action of extract of *Macrosiphonia longiflora* (Desf.) Müll. Arg. **Journal if Ethnopharmacology**, v. 154, p. 319-329, 2014.
- DE ASSIS JUNIOR, L. R. *et al.*, Pregnanes and other constituents of the roots of *Macrosiphonia petraea* (A. St.-Hil.) Kuntze (Apocynaceae). **Química Nova**, v. 36, n. 4, p. 519, 2013.

- DE CARVALHO, M. G. *et al.*, Acyl lupeol esters from *Parahancornia amapa* (Apocynaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 4, p. 556-559, 2001.
- DEEPAK, D.; KHARE, A.; KHARE, M. P.; Plant pregnanes, **Phytochemistry**, v. 28, n. 12, p. 3255-3263, 1989.
- DEEPAK, D.; KHARE, M. P.; KHARE, A. A pregnane ester diglycoside from *Periploca calophylla*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 12, p. 3015-3017, 1985.
- DENG, J.; LIAO, Z. X.; CHEN, D. F. Marsdenosides A-H, polyoxypregnane glycosides from *Marsdenia tenacissima*. **Phytochemistry**, v. 66, n. 9, p. 1040-1051, 2005.
- DEWICK, P. M. *Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach*, ed: 3^a, 2009
- DI STASI L.C; HIRUMA-LIMA C.A.; Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. São Paulo: **Editora UNESP**, p. 375-385, 2002.
- EL-KASHEF, D. F. *et al.*, Triterpenes and sterols of Family Apocynaceae (2013-1955), A review. **Journal of Pharmacognosy and phytochemistry**, v. 4, n. 2, p. 21-39, 2015.
- EL-KASHEF, D. F. *et al.*, Investigation of the unsaponifiable and saponifiable matters of *Pachypodium lamerei* drake leaves and stems by GC/MS. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 3, p. 128-132, 2014.
- ELSAYED, K. A. *et al.*, Pregnane glycosides from *Stapelia variegata*. **Phytochemistry**, v. 39, n. 2, p. 395-403, 1995.
- FANNANG, S. V. *et al.*, A new acylated triterpene with antimicrobial activity from the leaves of *Rauvolfia vomitoria*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 47, n. 3, p. 404-407, 2011.
- FREI, H. & WÜRGLER, F. E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from Drosophila assay indicate a positive, negative, or inconclusive result. **Mutation Research**, v. 203, p. 297-308, 1988.
- FRESHNEY, I. R. Culture of animal cells. A manual of basic technique. **New York: Wiley-Liss**, ed. 5^a, 2005.
- GALOTTA, A. L. Q. A.; *et al.*, Chemical constituents from the leaves of *Mucosa duckei* (Markgraf) Zarucchi (Apocynaceae) a medicinal plant from the Amazon region. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, p. 470-472, 2012.
- GARCIA, V. P. *et al.*, Pregnane steroidal glycosides and their cytostatic activities. **Glycobiology**, v. 21, n. 5, p. 619-624, 2011.
- GEISSMAN, T. A.; CROUT, D. H. G. *Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism*. 1st ed. San Francisco: Freeman, Cooper & Company, 1969.
- GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. M. B. Shamanism or Science?, **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 74. p. 135-144, 2002.
- GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. M. B. Steroids, taxonomic markers?, **Plant Systematics Evolution**, v. 184. p. 41-76, 1993.

- GRAF, U. & VAN SCHAİK, N. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v. 271, p. 59-67, 1992
- GRAF, U. *et al.*, Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Mutagenesis**, v. 6, p. 153-188, 1984
- GRIFFIN, W. J.; PARKIN, J. E. Constituents of *Parsonia straminea*. **Plata Medica**, v. 20, n. 4, p. 97-99, 1971.
- GRIGNON-DUBOIS, M.; REZZONICO, B. Pentacyclic triterpenes from *Plumeria inodora*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 43, n. 3, p. 351-352, 2007.
- GUARIM-NETO, G.; MORAIS, R.G. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botanica Brasilica**, v. 17, p. 561-584, 2003.
- GUPTA, V. S. *et al.*, Pregnanes and pregnane glycosides from *Marsdenia roylei*. **Phytochemistry**, v. 64, n. 8, p. 1327-1333, 2003.
- HAMBURGER, M.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Search for new drugs of plant origin. **Advances in Drug Research**, v. 20, p. 167-169, 1991.
- HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA P. C. A importância das plantas medicinais: Princípios ativos de plantas superiores. Série de textos da Escola de Verão em Química-IV, São Carlos, SP, EdUFSCa., 152 p. 2003.
- HU, H-B. *et al.*, Constituents of the Root of *Anemone tomentosa*. **Archives of Pharmacal Reserach**, v. 34, p.1097-1105, 2011.
- HUAN, V. D. *et al.*, Sweet pregnane glycosides from *Telosma procumbens*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 49, n. 4, p. 453-460, 2001.
- HUMBERTO, M. M. S. *et al.*, Pentacyclic triterpene 5-phenylpenta-2,4-dienoyl ester from *Peltastes peltatus* (Vell.) Woodson. **Phytichemical Analysis**, v. 15, p. 339-344, 2004.
- IBRAHIM, S. R. M. *et al.*, Calotroposides H-N, new cytotoxic oxypregnane oligoglycosides from the root bark of *Calotropis procera*. **Steroids**, v. 96, p. 63-72, 2015.
- JIANG, R-W. *et al.*, Antineoplastic unsaturated fatty acids from *Fijian macroalgae*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 13, p. 2495-2500, 2008.
- KAWAMOTO, S. *et al.*, Wrightiamines A and B, two new cytotoxic pregnane alkaloids from *Wrightia javanica*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 6, p. 737-739, 2003.
- KHARE, N. K. *et al.*, Sarcogenin, a pregnane derivative from *Pergularia pallida* and *Sarcostemma brevistigma*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 2, p. 491-493, 1986.
- KLINK, A. C.; MACHADO, R. B. A.; Conservação do cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, 2005.
- KREIS, W.; HENSEL, A.; STUHLEMMER, U. Cardenolideo biosynthesis in foxglove. **Planta Medica**, v. 64, p. 491-499, 1998.

- KWON, J-H. *et al.*, Triterpenoids and a sterol from the stem-bark of *Styrax japonica* and their protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activities. **Phytotherapy Research.**, v. 22, p. 1303-1306, 2008.
- LAGO, J. H.; ROQUE, N. F. Estudo Fitoquímico da madeira de *Guarea macrophylla* (Meliaceae). **Química Nova**, v. 32, p. 2351-2354, 2009.
- LAVAUULT, M.; RICHOMME, P.; BRUNETON, J. Acetophenones and new pregnane glycosides from the roots of *Vincetoxicum hirundinaria*. **Fitoterapia**, v. 70, n. 2, p. 216-220, 1999.
- LEI, T.; *et al.*, A new pregnane glycoside and oligosaccharide from *Parabarium huaitingii*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 13, p. 1030-1035, 2011.
- LI, E-N.; ZHOU, G-D, KONG, L-Y. Chemical Constituents from the Leaves of *Eriobotya japonica*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 7, p. 190-192, 2009.
- LI, J. *et al.*, Chemical Constituents from roots and Stems of *Ervatamia hainanensis*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 6, p. 271-274, 2008.
- LINDEMANN, P.; LUCKNER, M. Biosynthesis of pregnane derivatives in somatic embryos of *Digitalis lanata*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 3, p. 507-513, 1997.
- LIVSHULTZ, T. *et al.*, Phylogeny of Apocynoideae and the APSA clade (Apocynaceae s.l.). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 94. p. 324–359. 2007.
- LUCETTI, D. L. *et al.*, Anti-inflammatory effects and possible mechanism of action of lupeol acetate isolated from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. **Journal of Inflammation**, v. 7, n. 10, p. 2-11, 2010
- LOU, H. X. *et al.*, Stereochemistry of novel triterpenes from *Cynanchum hancokianum*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 9, p. 2271-2276, 1991.
- MALDONADO, E.; JUAREZ-JAIMES, V. Chemical constituents from *Marsdenia callosa*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 48, p. 219-221, 2013.
- MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids a compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, p. 1517-1575, 1994.
- MARZOUK, A. *et al.*, A new pregnane glycoside from *Gomphocarpus fruticosus* growing in Egypt. **Natural product research**, v. 23, p. 1-8, 2015
- MCGARVEY, B. D. *et al.*, Dereplication of known pregnane glycosides and structural characterization of novel pregnanes in *Marsdenia tenacissima* by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47, n. 6, p. 687-693, 2012.
- Meyer, B. N. *et al.*, Brine shrimp – a conveniente general bioassay for active-plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 1, p. 31-34, 1982.
- MISHRA, P. M.; SREE, A.; PANIGRAHI, M. Isolation of a lupane triterpene fatty acid ester with antibacterial activity from the leaves of *Finlaysonia obovata*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 48, n. 1, p. 161-163, 2012.

- MONKS, A. *et al.*, Feasibility of high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, n. 11, p. 757-766, 1991
- MUSTAFA, G. *et al.*, Lupene-type triterpenes from *Periploca aphylla*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 6, p. 881-883, 2000.
- NAKAMURA, M. *et al.*, Cytotoxic pregnanes from leaves of *Adenium obesum*. **Natural Medicines**, v. 54, n. 3, p. 158-159, 2000.
- NEWMAN, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M. The influence of natural products upon drug Discovery. **Natural Products Report**, v. 17, p. 215-234,
- NIU, Y.-L. *et al.*, Chemical constituents from *Cynanchum paniculatum* (Bunge) Kitag. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 61, p. 139-142, 2015.
- NOOR, F. *et al.*, A triterpenoid from *Lepetadenia pyrotechnica*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 1, p. 211-212, 1993.
- OMOYENI, O. A. *et al.*, *Pleiocarpa pycnantha* leaves and its triterpenes induce apoptotic cell death in Caco-2 cells in vitro. **Bmc Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, 2015.
- PAULO, A.; Houghton, P. J. Chemotaxonomic analysis of the genus *Cryptolepis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n. 2, p. 155-166, 2003.
- PEREIRA, M. M. *et al.*, Constituintes químicos e estudo biológico de *Aspidosperma nitidum* (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 3, p. 1-8, 2006.
- PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, p.237-243, 2001.
- QIU, S. X.; GONG, Y.; CHEUNG, H. T. A. A triterpene from *Marsdenia globifera*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 5, p. 1385-1387, 1993.
- RIBEIRO, V. R.; SILVA, R. M.; LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. O. Antiinflammatory, antinociceptive and antipyretic effects of hydroethanolic extract from *Macrosiphonia velame* (A. St.-Hil.) M. Arg. in animal models. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, p. 515-526, 2010.
- RAEES, M. A. *et al.*, Desmiflavasides A and B: Two new bioactive pregnane glycosides from the *Desmidorchis flava*. **Phytochemistry Letters**, v. 12, p. 153-157, 2015.
- SETHI, A. *et al.*, A novel pregnane glycoside from *Periploca calophylla*. **Journal of Natural Products**, v. 51, n. 4, p. 787-790, 1988.
- SHI, B.-J. *et al.*, A new pregnane glycoside from the root barks of *Periploca sepium*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 49, n. 6, p. 1043-1047, 2014.
- SICILIANO, T. *et al.*, Sulfated pregnane glycosides from *Periploca graeca*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 8, p. 1164-1168, 2005.
- SIDDIQUI, B. S. *et al.*, Chemical constituents of leaves and stem bark of *Plumeria obtusa*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 14, p. 2077-2084, 2004.

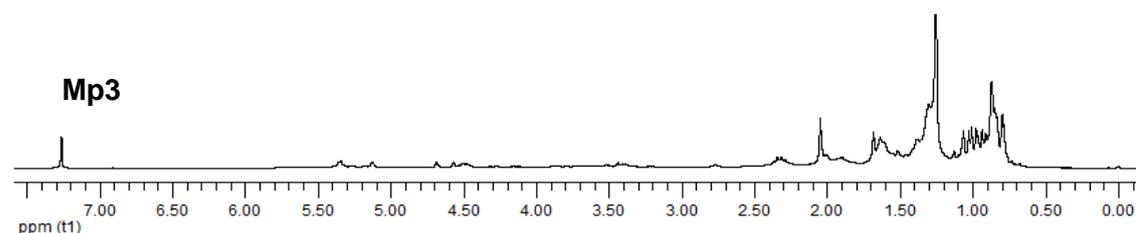
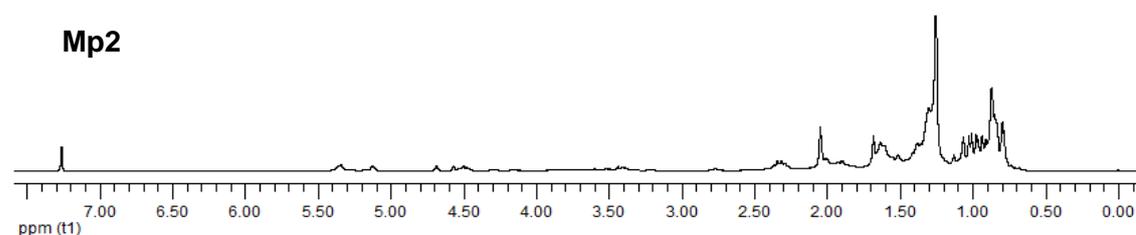
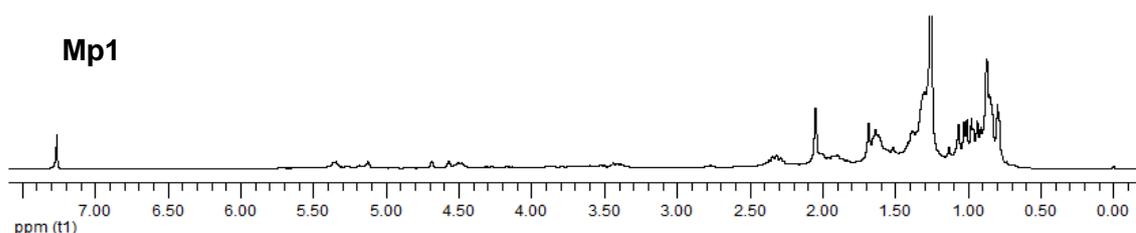
- SIDDIQUI, B. S.; FIRDOUS; BEGUM, S. Two triterpenoids from the leaves of *Plumeria obtusa*. **Phytochemistry**, v. 52, n. 6, p. 1111-1115, 1999.
- SILVA, J. R. D. *et al.*, Triterpenic esters from *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 702-704, 1998.
- SIMÕES, A. O. *et al.*, Tribal and intergeneric relationships of *Mesechiteae* (Apocynoideae, Apocynaceae): evidence from three noncoding plastid DNA regions and morphology. **American Journal of Botany**, v. 91, p. 1409-1418, 2004
- SIMÕES, A.O.; KINOSHITA, L.S.; ENDRESS, M.E. New Combinations in *Mandevilla* Lindley (Apocynaceae). **Novon**, v. 17, p. 87-90, 2007
- SOBRINHO D. C. *et al.*, Triterpenoids Isolated from *Parahancornia amapa* J. **Braz. Chem. Soc**, v. 2, p. 15-20, 1991.
- SONG, C-W. New antimicrobial pregnane glycosides from the stem of *Ecdysanthera rósea*. **Fitoterapia**, v. 99, p. 267-275. 2014.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Instituto Plantarum, **Nova Odessa**, p. 640, 2005.
- SRISURICHAN, S.; PUTHONG, S.; PORNPAKAKUL, S. Pregnane type steroidal glycosides from *Gymnema griffithii* Craib. **Phytochemistry**, v. 106, p. 197-206, 2014.
- SRIVASTAV, S.; DEEPAK, D.; KHARE, A. 3 novel pregnane glycosides from *leptadenia reticulata* wight and arn. **Tetrahedron**, v. 50, n. 3, p. 789-798, 1994.
- SULTANA, N. *et al.*, Two new triterpenes from *Alstonia scholaris* flowers. **Natural Product Research**, v. 27, n. 14, p. 1277-1286, 2013.
- SULTANA, N.; KHALID, A. Phytochemical and enzyme inhibitory studies on indigenous medicinal plant *Rhazya stricta*. **Natural Product Research**, v. 24, n. 4, p. 305-314, 2010.
- SULTANA, N.; SALEEM, M. Phytochemical Studies on *Alstonia scholaris*. **Zeitschrift Fur Naturforschung Section B-a Journal of Chemical Sciences**, v. 65, n. 2, p. 203-210, 2010.
- TALAPATRA., S. K.; SARKAR, A. C.; TALAPATRA, B. Terpenoid and related compounds 18. 2 pentacyclic triterpenes from *Rubia cordifolia*. **Phytochemistry**, v.20, p. 1923-1927, 1981.
- TIJJANI, A.; NDUKWE, I. G.; AYO, R. G. Isolation and characterization of Lup-20(29)-ene-3, 28-diol (Betulin) from the Stem-Bark of *Adenium obesum* (Apocynaceae). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 2, p. 259-262, 2012.
- TSCHESCHE, R.; MORNER, I.; SNATZKE, G. Uber digitanolglykoside .8. Holadyson, ein neues digitenol aus *Holarrhena antidysenterica* wall. **Annalen Der Chemie-Justus Liebig**, v. 670, p. 103, 1963.
- VEIGA Jr, V. F.; PINTO, A. C. Plantas Medicinais: Cura Segura?. **Química Nova**, v. 28, p. 519, 2005.
- VIOLANTE, I. M. P. *et al.*, Avaliação in vitro da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 19, p. 452-457, 2010.

- WAHYUONO, S. *et al.*, Triterpenoids of *Amsonia grandiflora*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 4, p. 1213-1213, 1987.
- WANG, L. *et al.*, Five new C-21 steroidal glycosides from *Periploca sepium*. **Steroids**, v. 76, n. 3, p. 238-243, 2011.
- WARASHINA, T.; NORO, T. Cardenolide and oxypregnane glycosides from the root of *Asclepias incarnata* L. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 48, n. 4, p. 516-524, 2000.
- WOOD, C. A. *et al.*, A bioactive spiro lactone iridoid and triterpenoids from *Himatanthus sucuuba*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 49, n. 11, p. 1477-1478, 2001.
- YAM-PUC, A. *et al.*, Steroids from the root extract of *Pentalinon andrieuxii*. **Phytochemistry Letters**, v. 5, p. 45-48, 2012.
- YE, W. C. *et al.*, Oleanane saponins from *Gymnema sylvestre*. **Phytochemistry**, v. 53, n. 8, p. 893-899, 2000.
- YOSHIKAWA, K. *et al.*, Pregnane glycosides, gymnepregosides A-F from the roots of *Gymnema alternifolium*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 46, n. 8, p. 1239-1243, 1998.
- YOSHIKAWA, K. *et al.*, Pregnane glycosides, gymnepregosides G-Q from the roots of *Gymnema alternifolium*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, n. 6, p. 798-804, 1999.
- YUNES, R. A. *et al.*, The structure of velutinol-a, an antiinflammatory compound with a novel pregnane skeleton. **Phytochemical Analysis**, v. 4, n. 2, p. 76-81, 1993.
- YUNES, R. A.; Pedrosa, R. C.; Cechinel Filho, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, p. 147, 2001.
- Ying-Jie, H. *et al.*, Steroidal Constituents from *Amalocalyx yunnanesis*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 6, p. 2099-2102, 1992.
- ZARRELLI, A. *et al.*, New Acylated oleanane and lupane triterpenes from *Gymnema sylvestre*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 96, n. 12, p. 2200-2206, 2013.
- ZHAO, M. *et al.*, Bioactive cardenolides from the stems and twigs of *Nerium oleander*. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 7, p. 1098-1103, 2007.

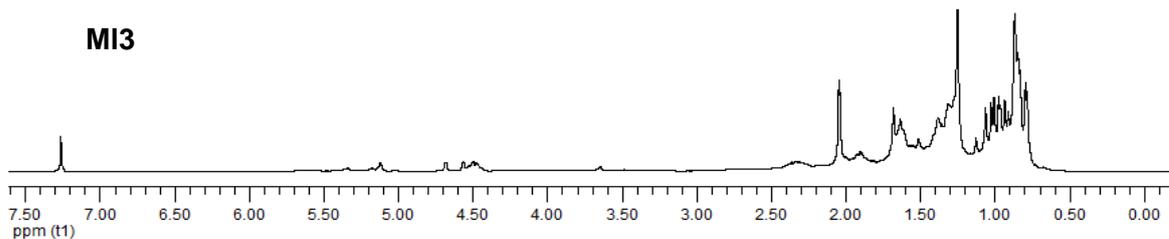
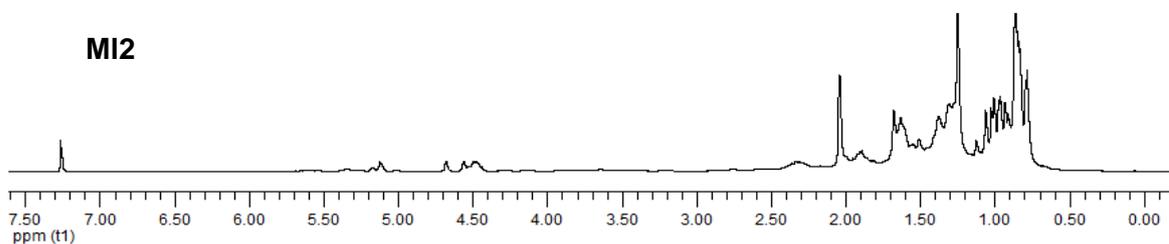
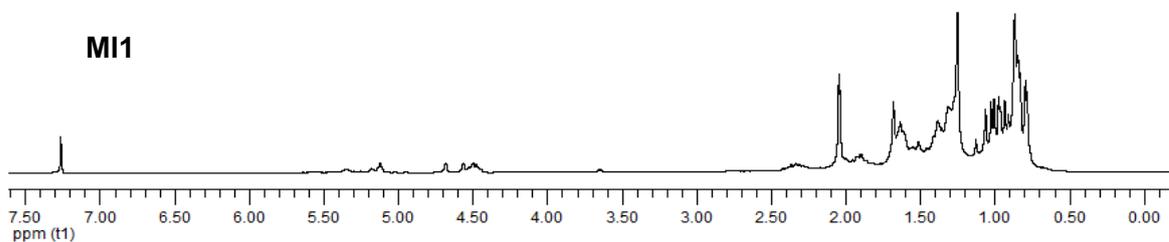
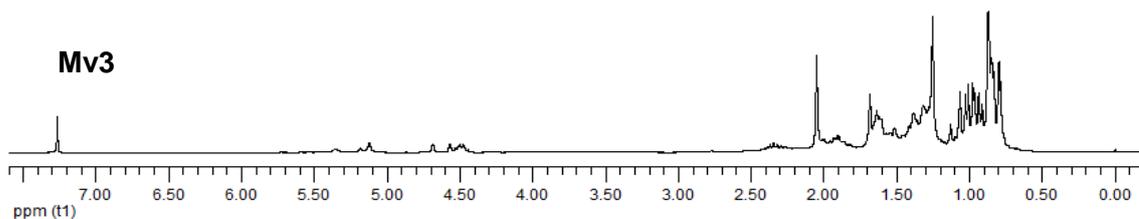
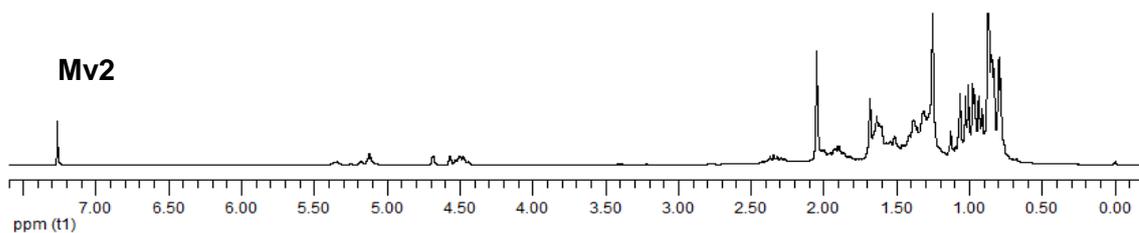
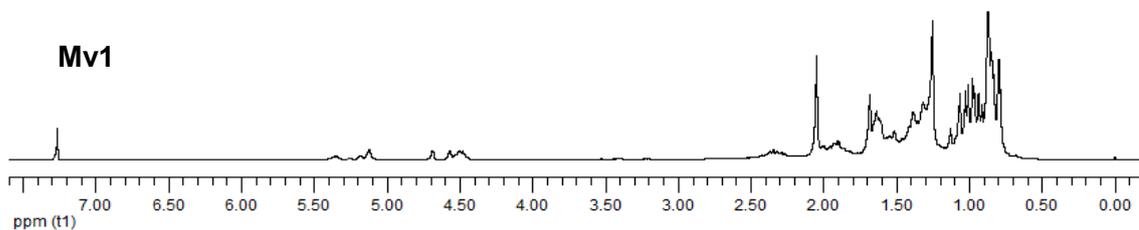
Anexo 1

Espectros de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) das amostras utilizados para a realização da análise dos componentes principais (PCA). Amostras **Mp** – *M. petraea* (coletada), **Mv** – *M. velame* (coletada), **MI** – *M. longiflora*, **CBA** – amostra compradas em Cuiabá (MT), **ROO** – amostras de Rondonópolis (MT), **CGR** – amostras compradas em Campo Grande (MS), **CMB** – amostra compradas em Corumbá (MS) e **PPA** – amostra compradas em Ponta Porã (MS) e **DRS1**, **DRS2**, **DRS3** e **DRS4** – amostras compradas em Dourados.

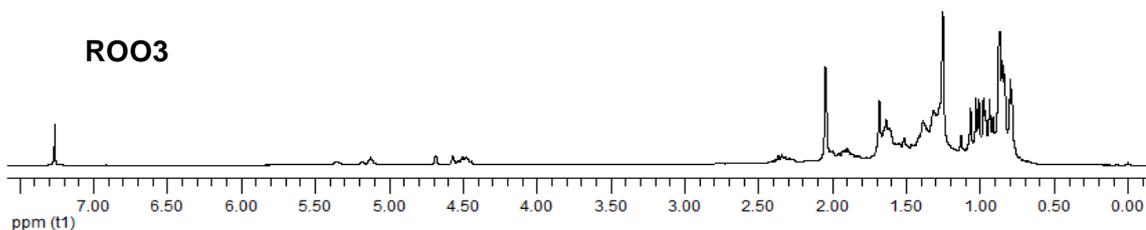
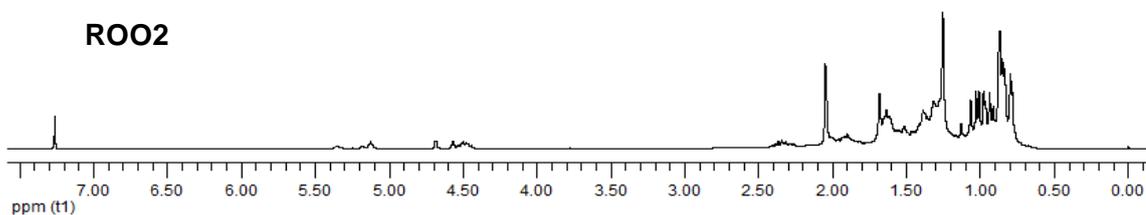
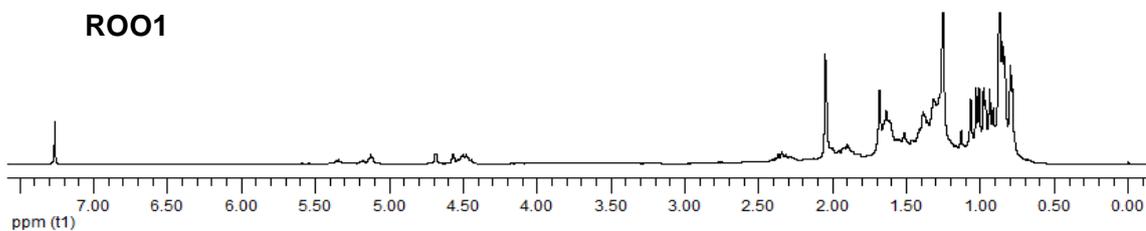
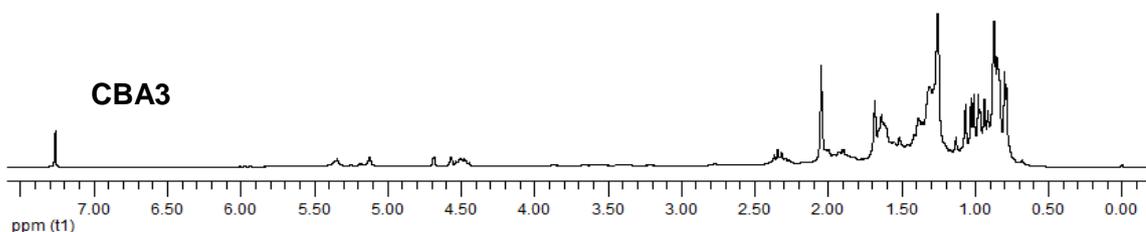
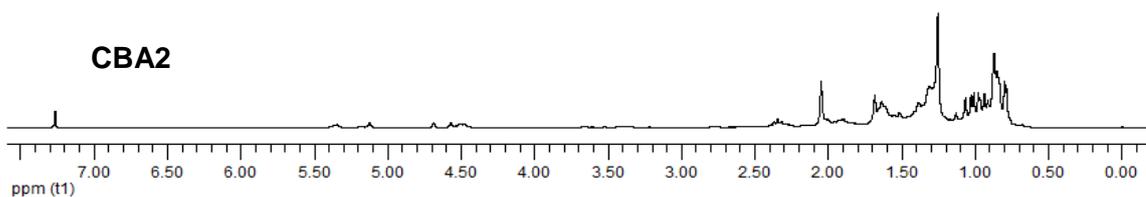
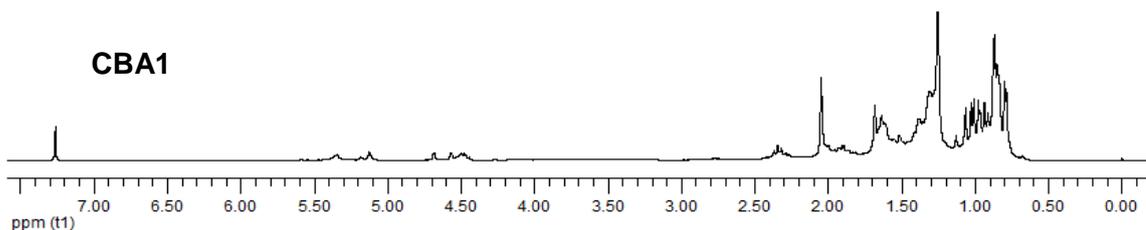
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	^1H	Points Count	32768
Pulse Sequence	zg	Solvent	CDCl_3	Original Points Count	32768
Acquisition Time (sec)	9.8042	Number Scans	128	Receiver Gain	128
SW (cyclical) (Hz)	3342.25	TD	65536	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	27



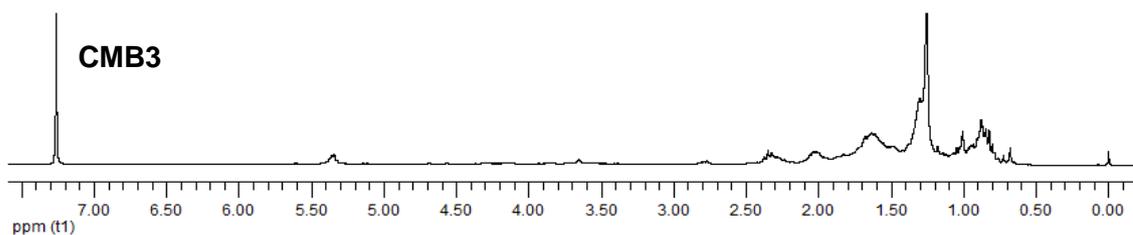
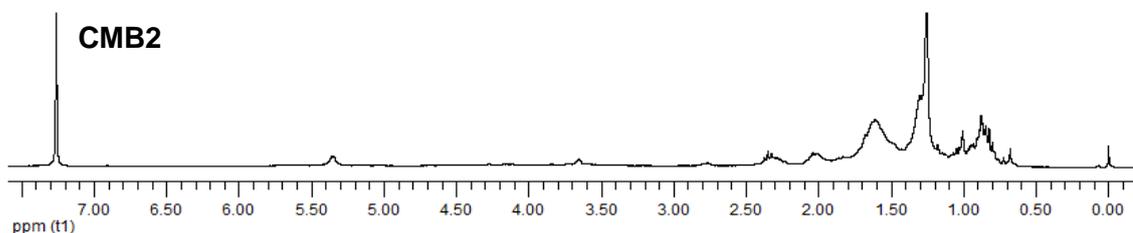
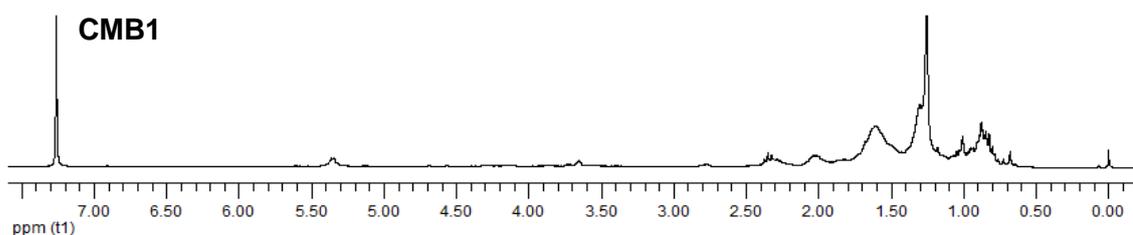
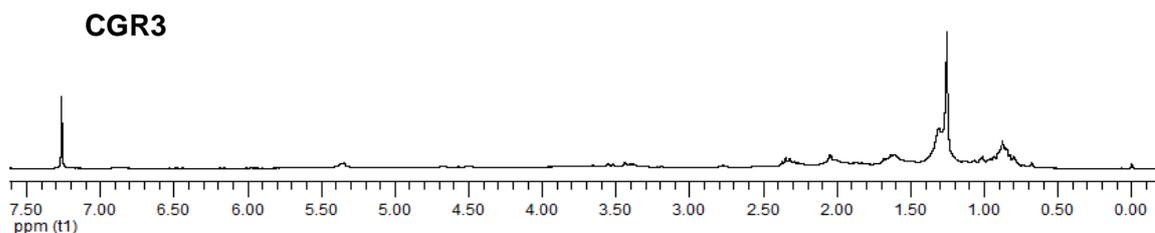
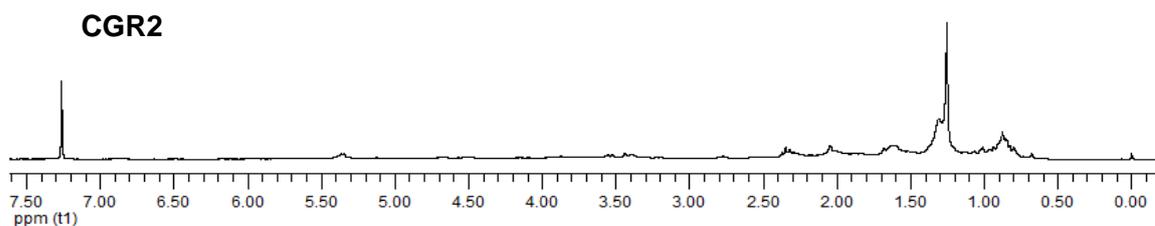
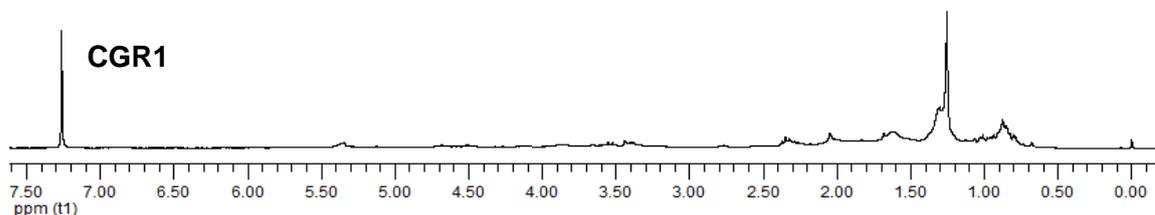
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	¹ H	Points Count	32768
Pulse Sequence	zg	Solvent	CDCl ₃	Original Points Count	32768
Acquisition Time (sec)	9.8042	Number Scans	128	Receiver Gain	128
SW (cyclical) (Hz)	3342.25	TD	65536	Temperatura (°C)	27



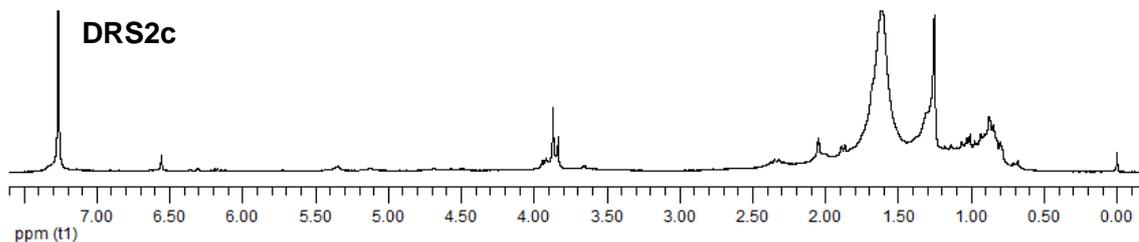
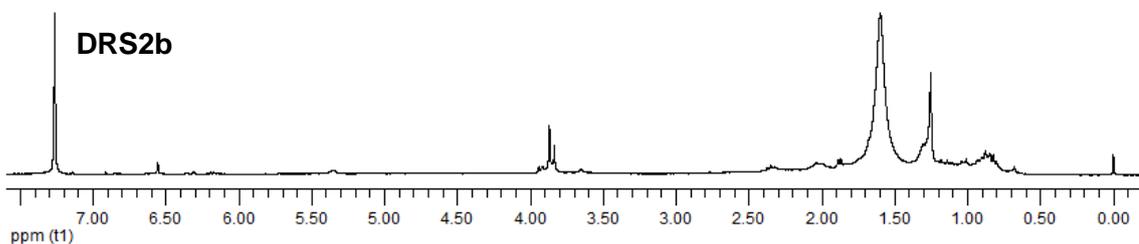
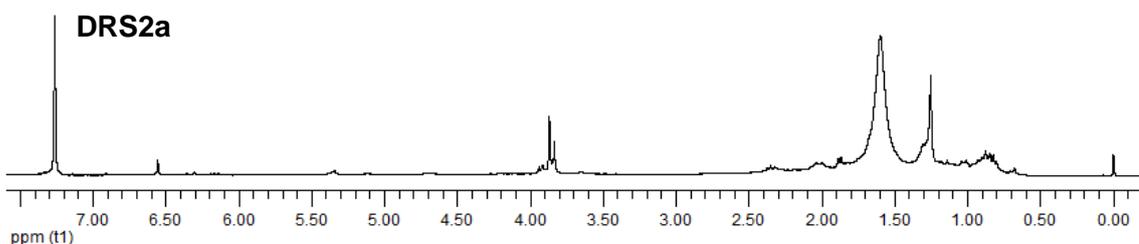
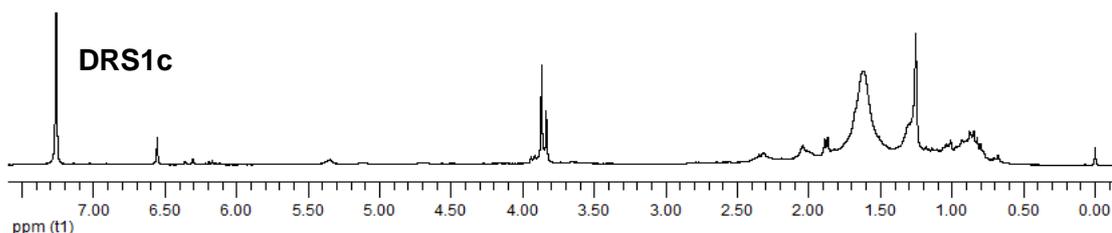
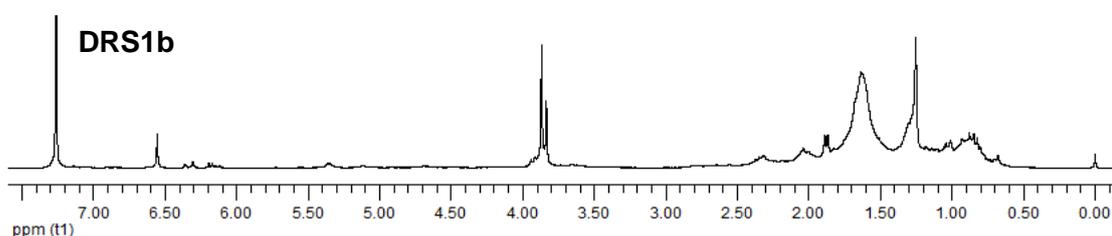
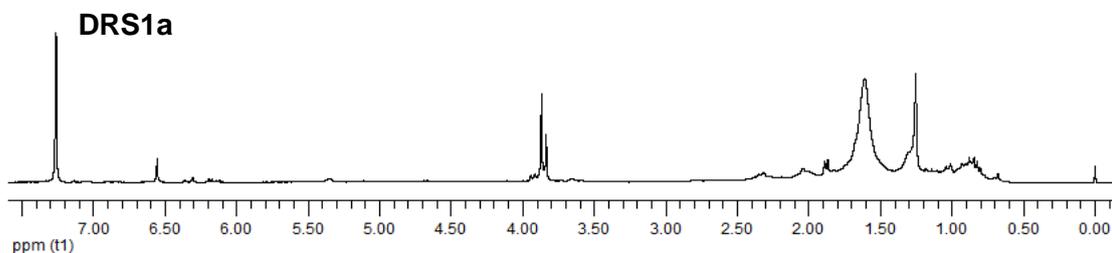
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	¹ H	Points Count	32768
Pulse Sequence	zg	Solvent	CDCl ₃	Original Points Count	32768
Acquisition Time (sec)	9.8042	Number Scans	128	Receiver Gain	128
SW (cyclical) (Hz)	3342.25	TD	65536	Temperatura (°C)	27



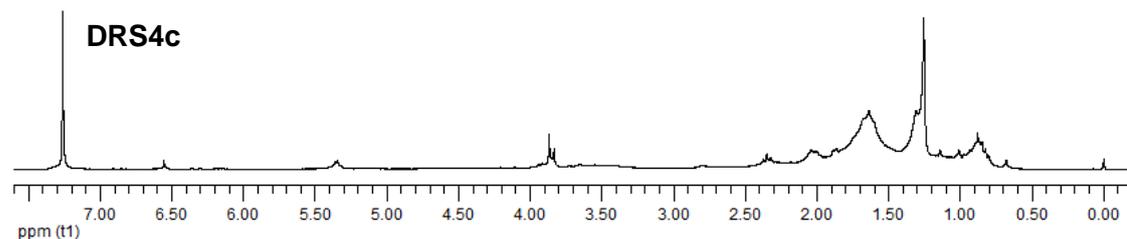
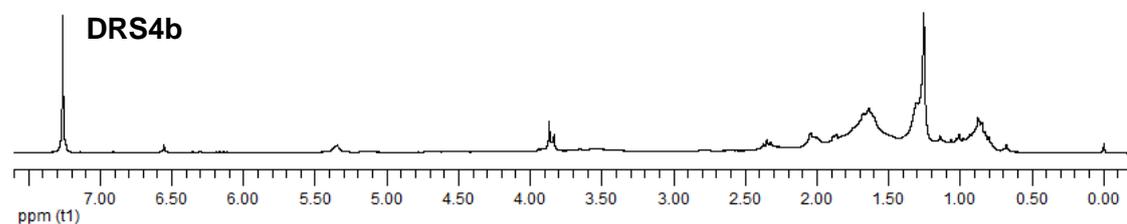
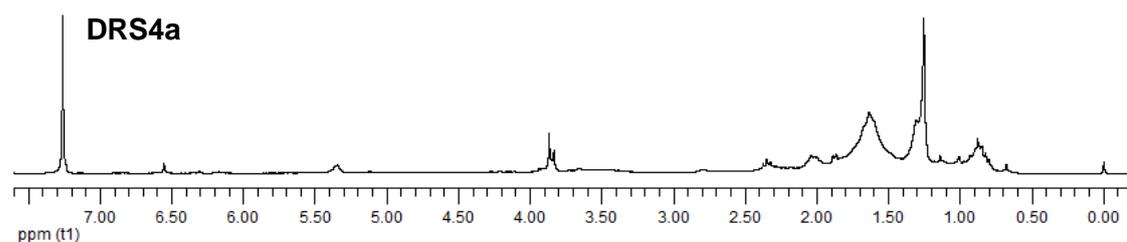
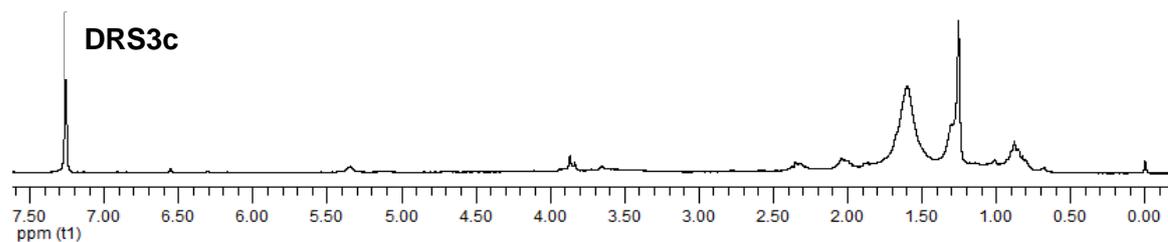
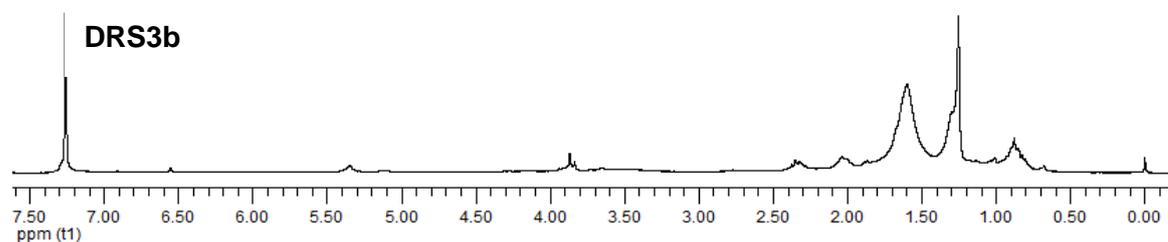
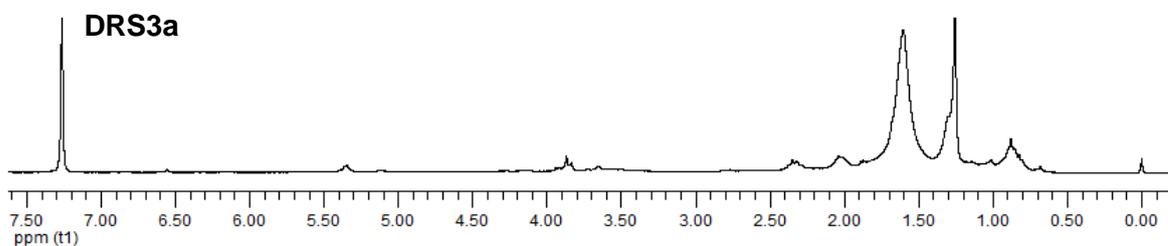
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	¹ H	Points Count	32768
Pulse Sequence	zg	Solvent	CDCl ₃	Original Points Count	32768
Acquisition Time (sec)	9.8042	Number Scans	128	Receiver Gain	128
SW (cyclical) (Hz)	3342.25	TD	65536	Temperatura (°C)	27



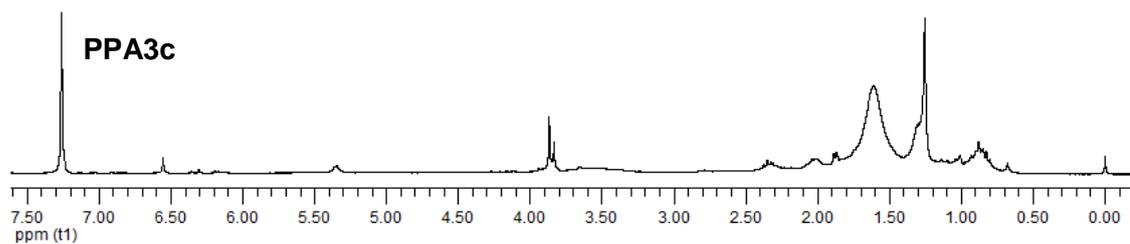
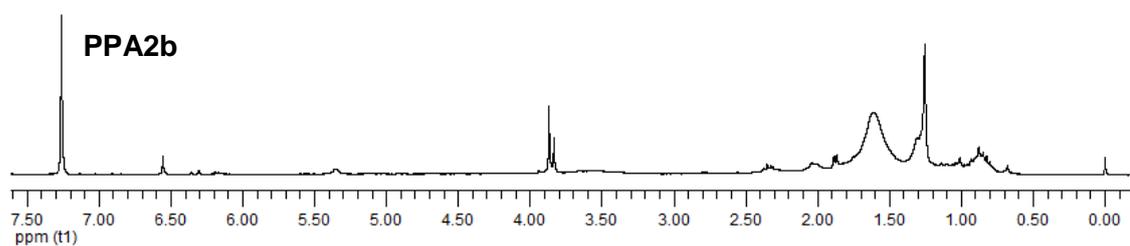
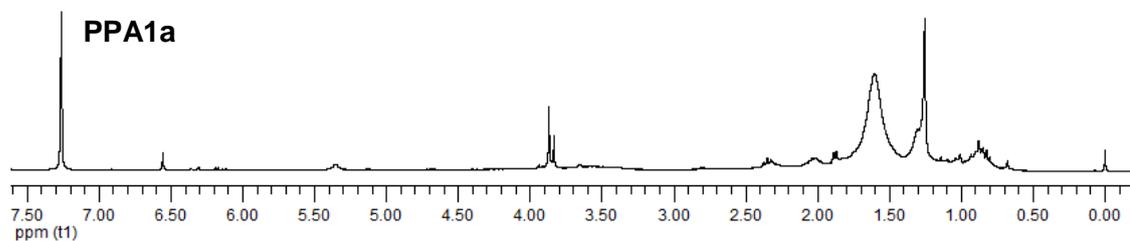
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	¹ H	Points Count	32768
Pulse Sequence	zg	Solvent	CDCl ₃	Original Points Count	32768
Acquisition Time (sec)	9.8042	Number Scans	128	Receiver Gain	128
SW (cyclical) (Hz)	3342.25	TD	65536	Temperatura (°C)	27



Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	¹ H	Points Count	32768
Pulse Sequence	zg	Solvent	CDCl ₃	Original Points Count	32768
Acquisition Time (sec)	9.8042	Number Scans	128	Receiver Gain	128
SW (cyclical) (Hz)	3342.25	TD	65536	Temperatura (°C)	27



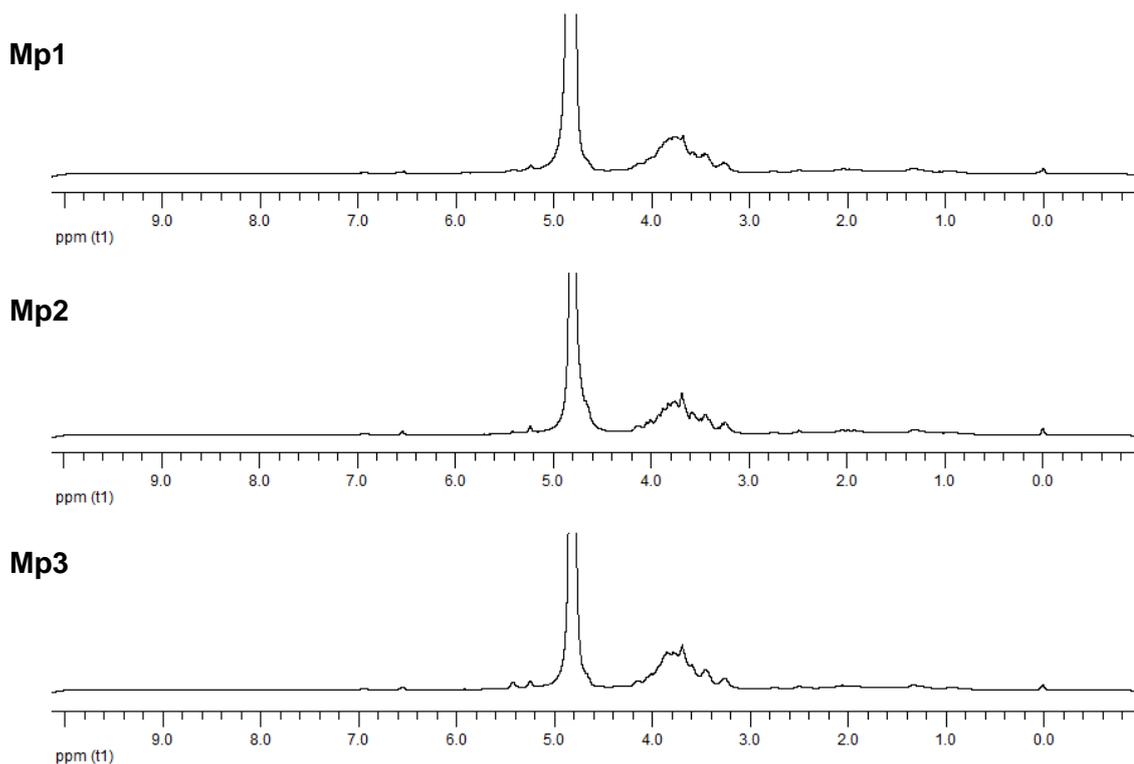
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	¹ H	Points Count	32768
Pulse Sequence	zg	Solvent	CDCl ₃	Original Points Count	32768
Acquisition Time (sec)	9.8042	Number Scans	128	Receiver Gain	128
SW (cyclical) (Hz)	3342.25	TD	65536	Temperatura (°C)	27



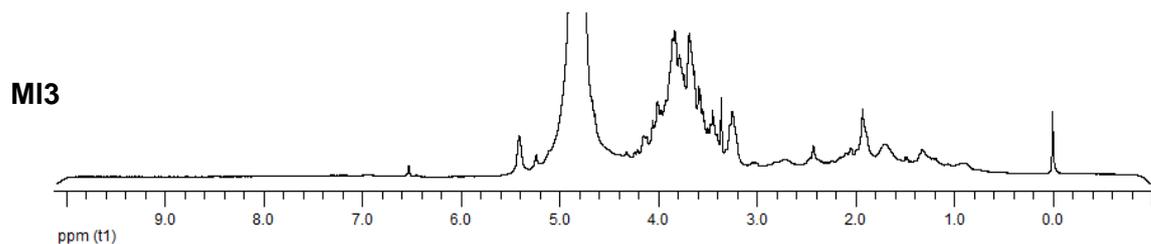
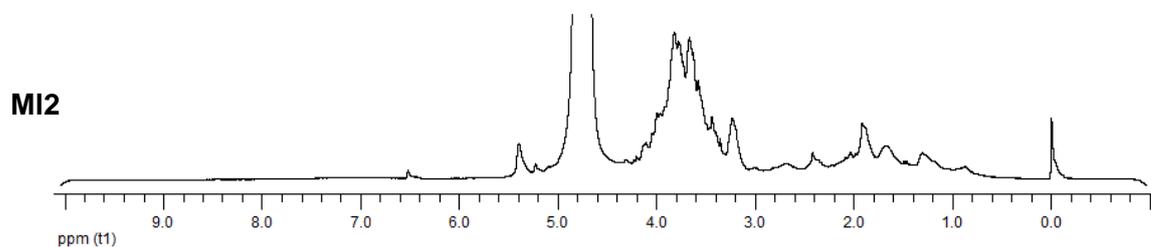
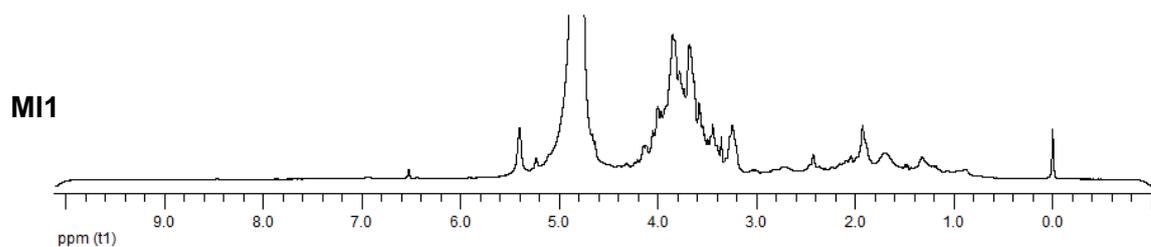
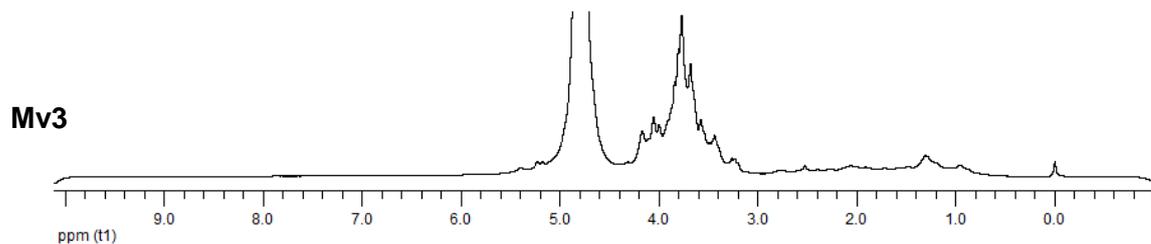
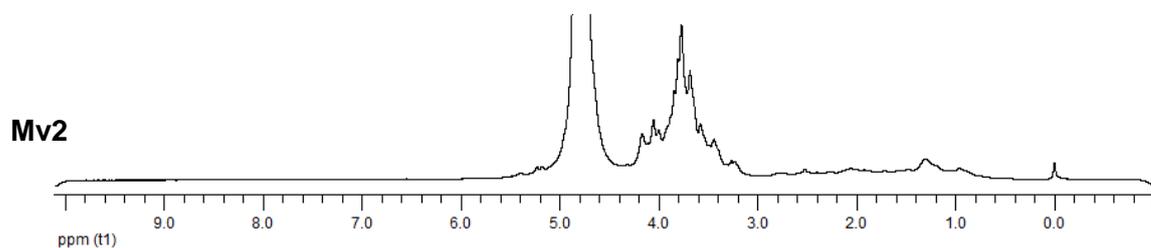
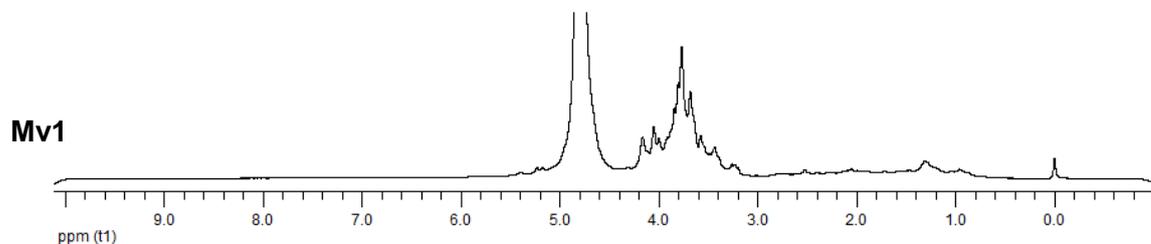
Anexo 2

Espectros de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) das amostras utilizados para a realização da análise dos componentes principais (PCA). Amostras **Mp** – *M. petraea* (coletada), **Mv** – *M. velame* (coletada), **MI** – *M. longiflora*, **CBA** – amostra compradas em Cuiabá (MT), **ROO** – amostras de Rondonópolis (MT), **CGR** – amostras compradas em Campo Grande (MS), **CMB** – amostra compradas em Corumbá (MS) e **PPA** – amostra compradas em Ponta Porã (MS) e **DRS1**, **DRS2**, **DRS3** e **DRS4** – amostras compradas em Dourados.

Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	^1H	Points Count	32768
Pulse Sequence	zg	Solvent	D_2O	Original Points Count	32768
Acquisition Time (sec)	9.8042	Number Scans	128	Receiver Gain	128
SW (cyclical) (Hz)	3342.25	TD	65536	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	27

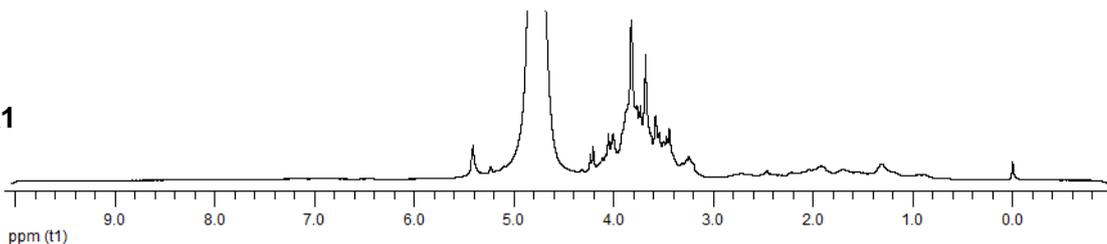


Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	¹ H	Points Count	32768
Pulse Sequence	zg	Solvent	D ₂ O	Original Points Count	32768
Acquisition Time (sec)	9.8042	Number Scans	128	Receiver Gain	128
SW (cyclical) (Hz)	3342.25	TD	65536	Temperatura (°C)	27

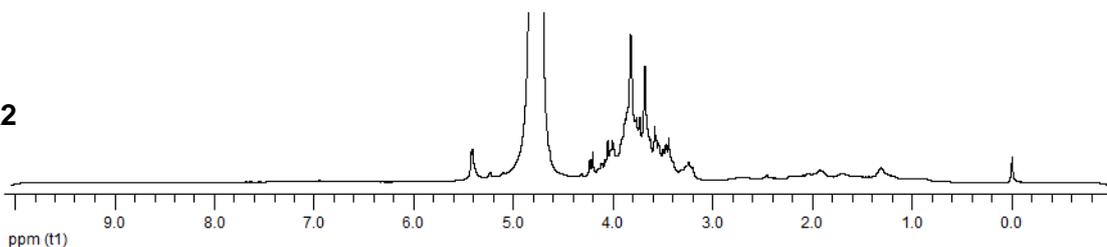


Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	¹ H	Points Count	32768
Pulse Sequence	zg	Solvent	D ₂ O	Original Points Count	32768
Acquisition Time (sec)	9.8042	Number Scans	128	Receiver Gain	128
SW (cyclical) (Hz)	3342.25	TD	65536	Temperatura (°C)	27

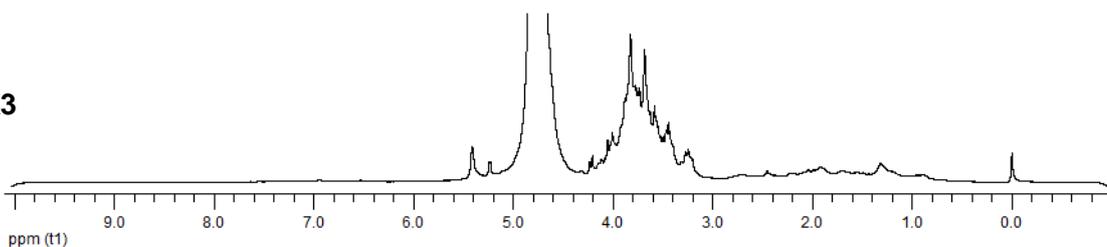
CBA1



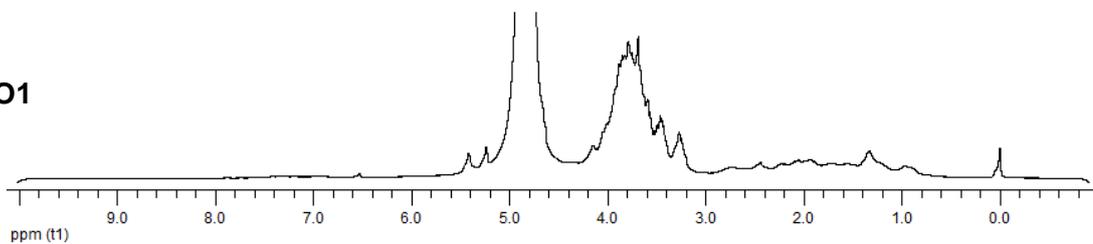
CBA2



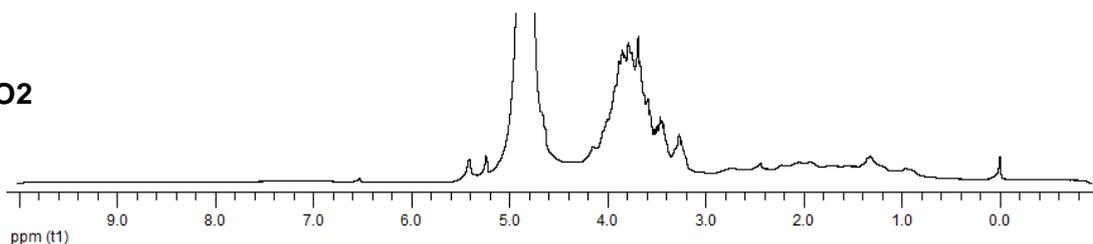
CBA3



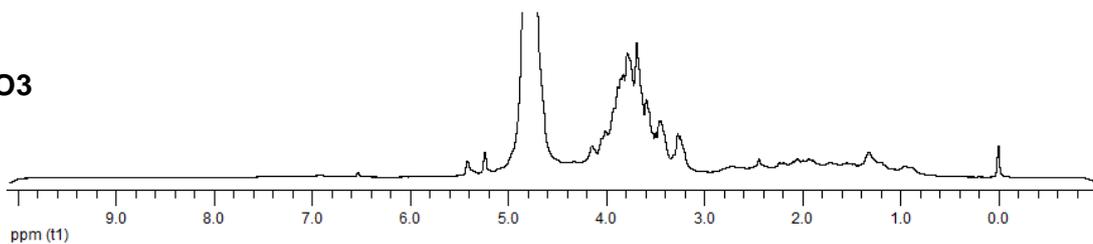
ROO1



ROO2

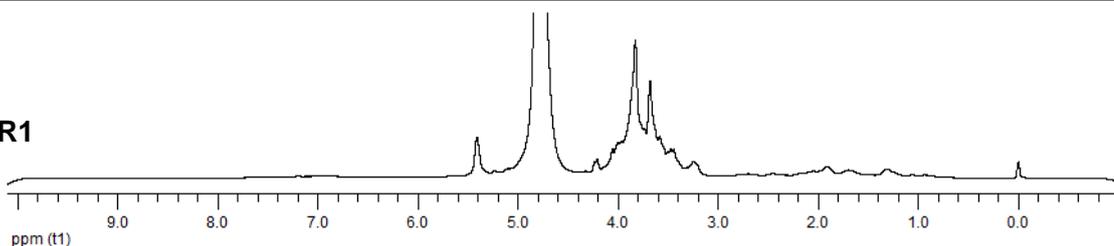


ROO3

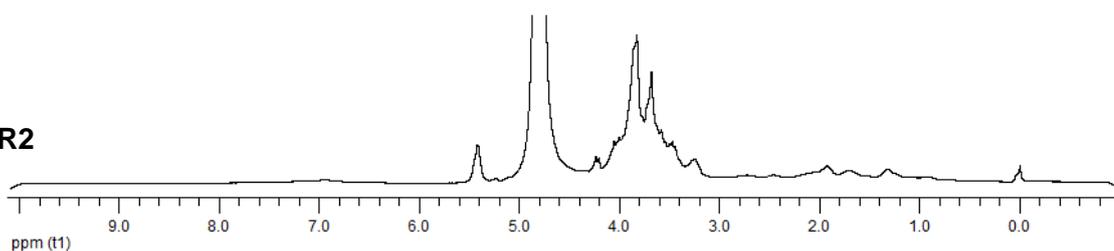


Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	¹ H	Points Count	32768
Pulse Sequence	zg	Solvent	D ₂ O	Original Points Count	32768
Acquisition Time (sec)	9.8042	Number Scans	128	Receiver Gain	128
SW (cyclical) (Hz)	3342.25	TD	65536	Temperatura (°C)	27

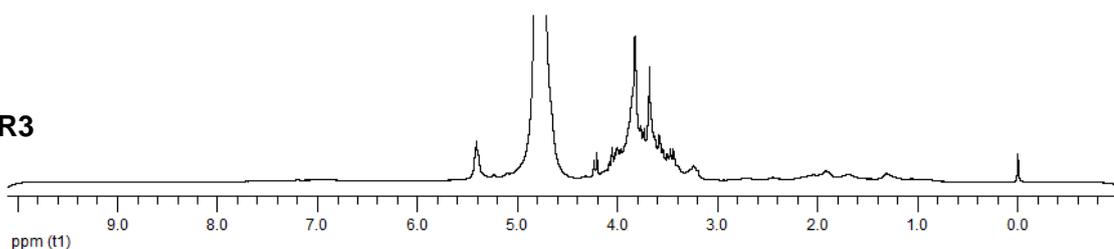
CGR1



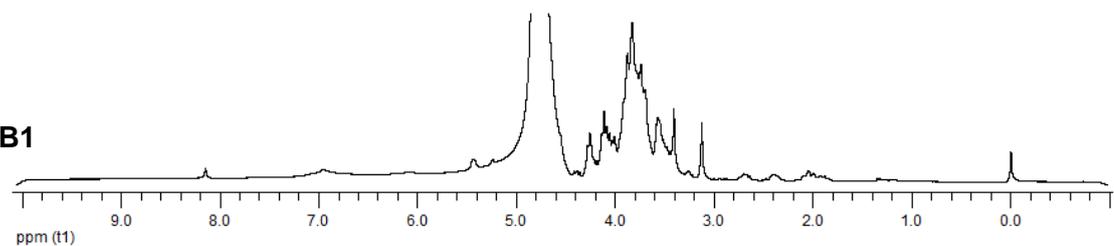
CGR2



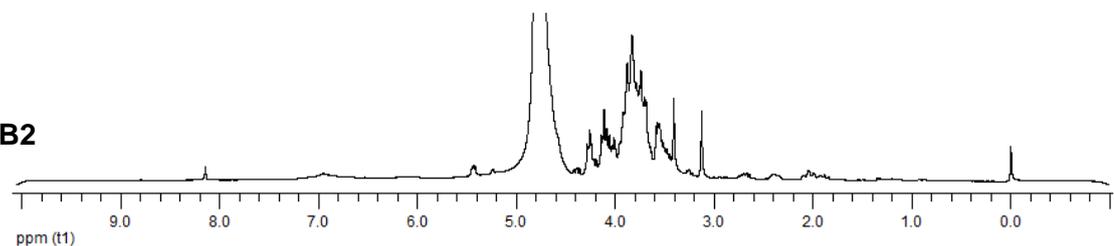
CGR3



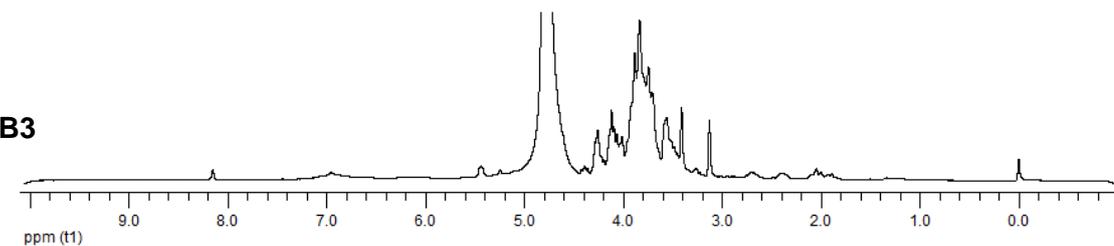
CMB1



CMB2

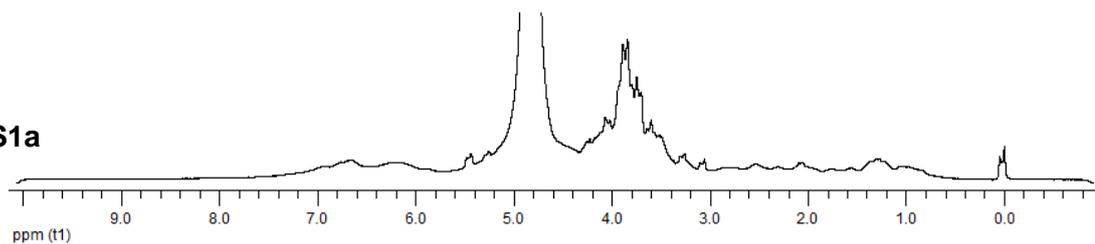


CMB3

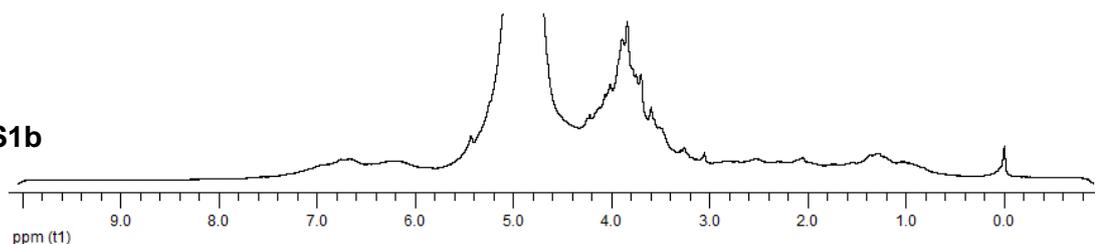


Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	¹ H	Points Count	32768
Pulse Sequence	zg	Solvent	D ₂ O	Original Points Count	32768
Acquisition Time (sec)	9.8042	Number Scans	128	Receiver Gain	128
SW (cyclical) (Hz)	3342.25	TD	65536	Temperatura (°C)	27

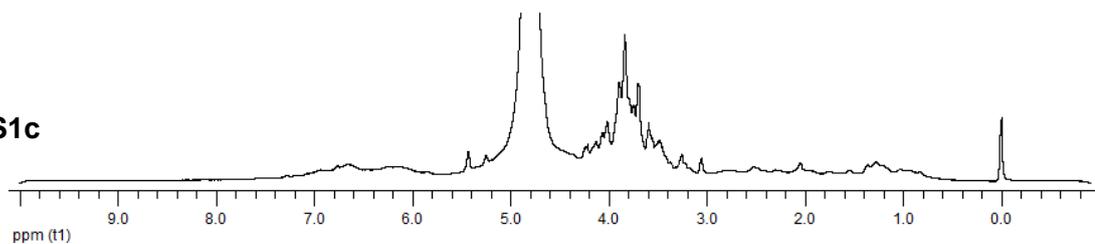
DRS1a



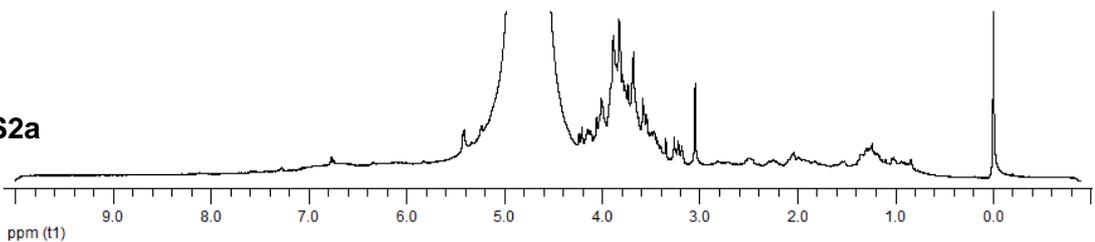
DRS1b



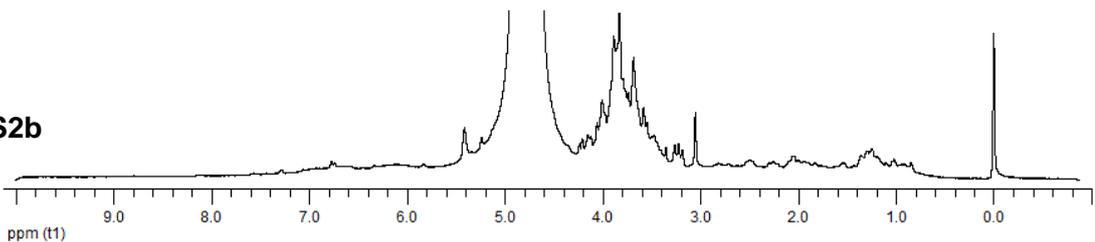
DRS1c



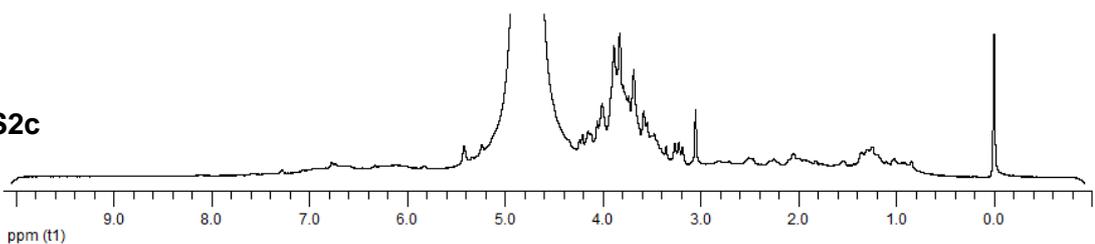
DRS2a



DRS2b

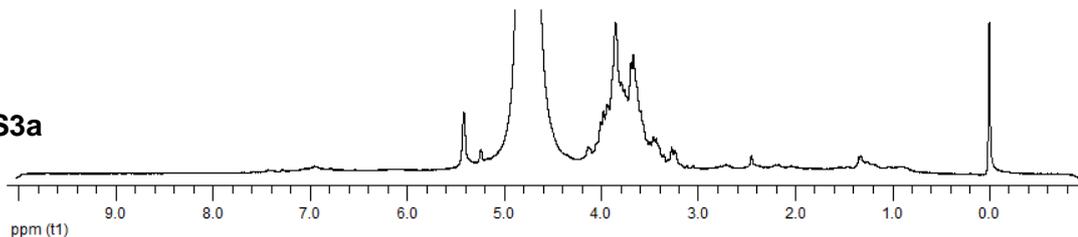


DRS2c

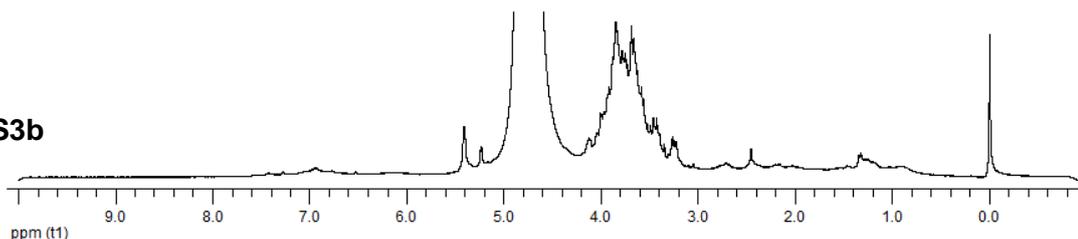


Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	¹ H	Points Count	32768
Pulse Sequence	zg	Solvent	D ₂ O	Original Points Count	32768
Acquisition Time (sec)	9.8042	Number Scans	128	Receiver Gain	128
SW (cyclical) (Hz)	3342.25	TD	65536	Temperatura (°C)	27

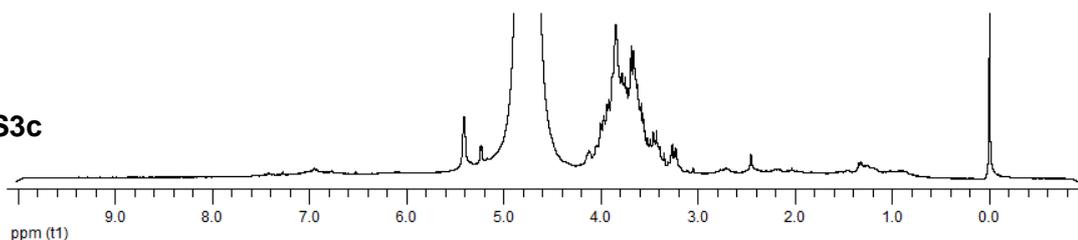
DRS3a



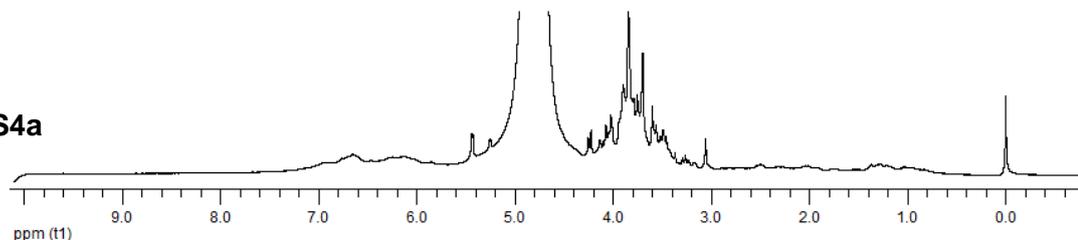
DRS3b



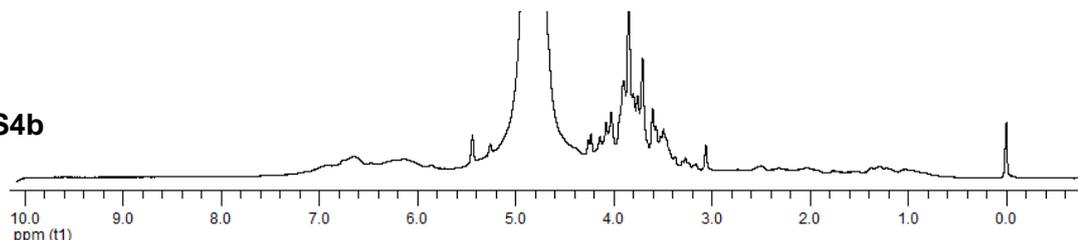
DRS3c



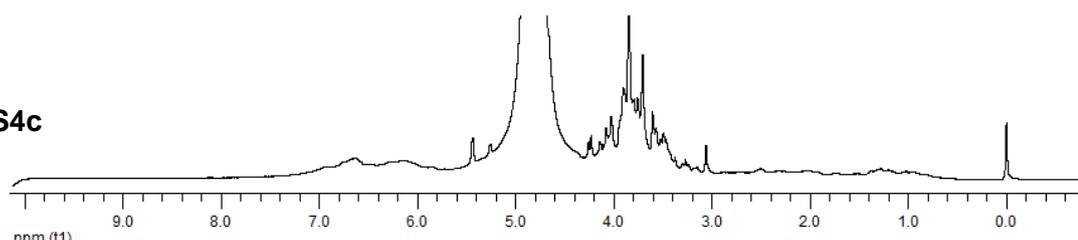
DRS4a



DRS4b

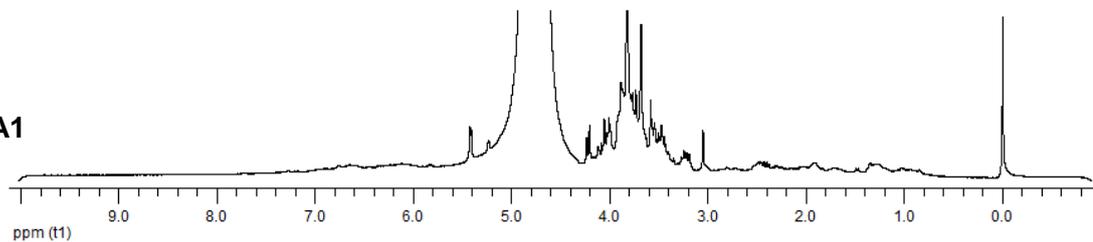


DRS4c

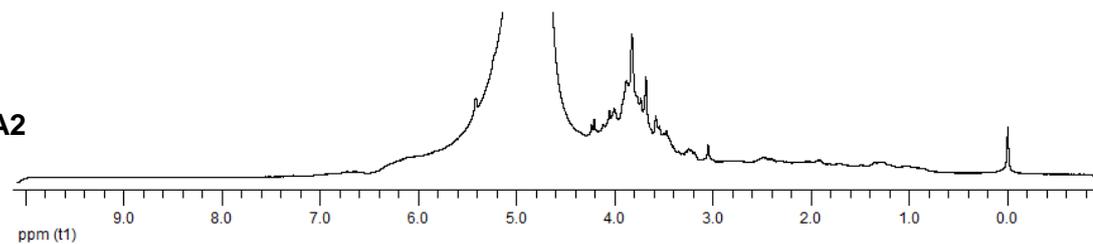


Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	¹ H	Points Count	32768
Pulse Sequence	zg	Solvent	D ₂ O	Original Points Count	32768
Acquisition Time (sec)	9.8042	Number Scans	128	Receiver Gain	128
SW (cyclical) (Hz)	3342.25	TD	65536	Temperatura (°C)	27

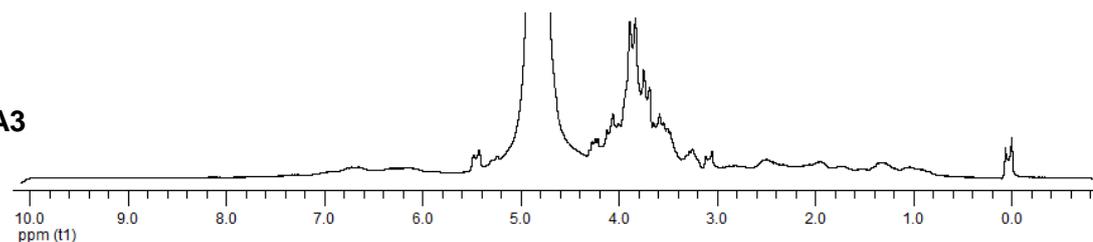
PPA1



PPA2



PPA3



Anexo 3

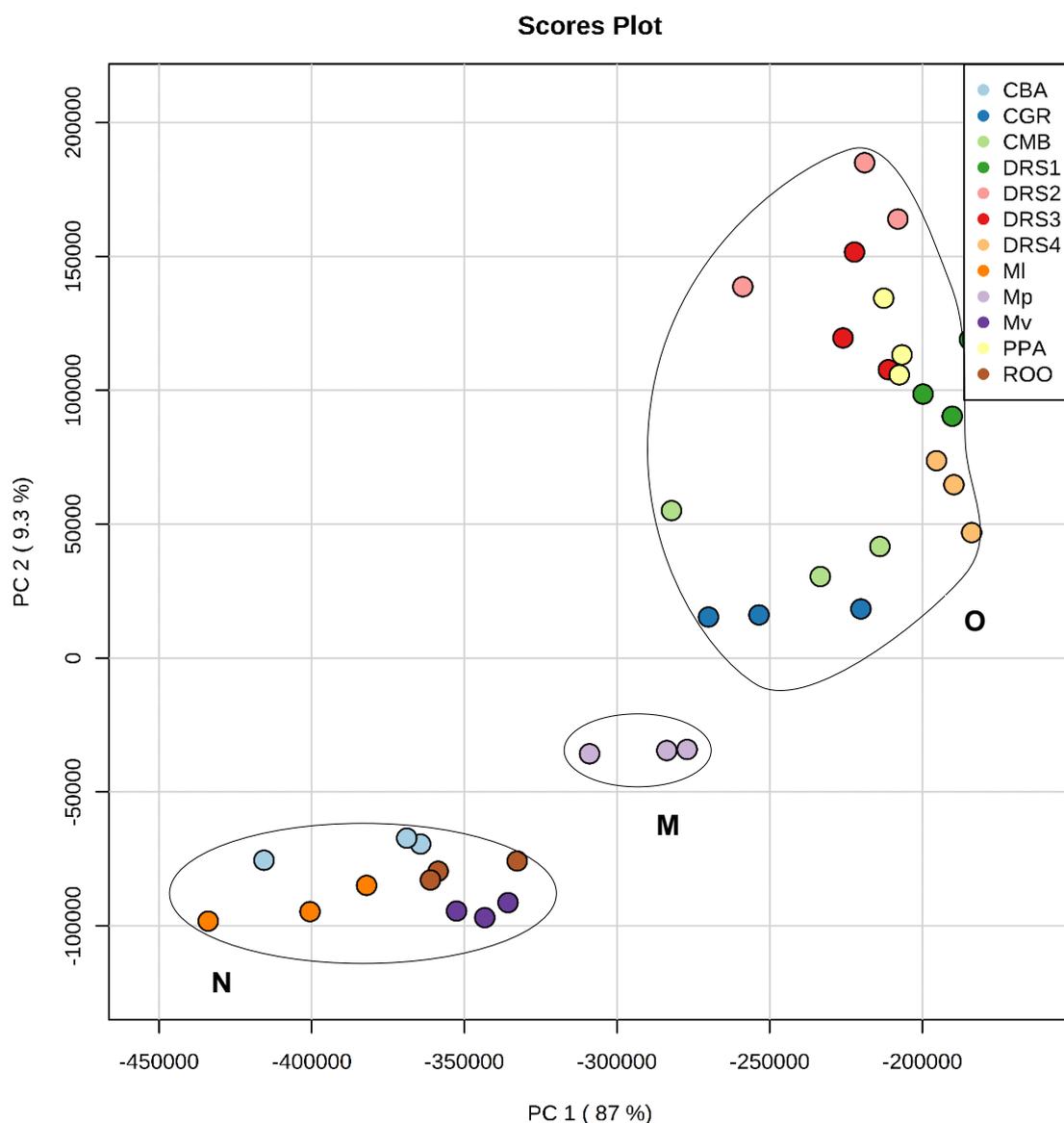
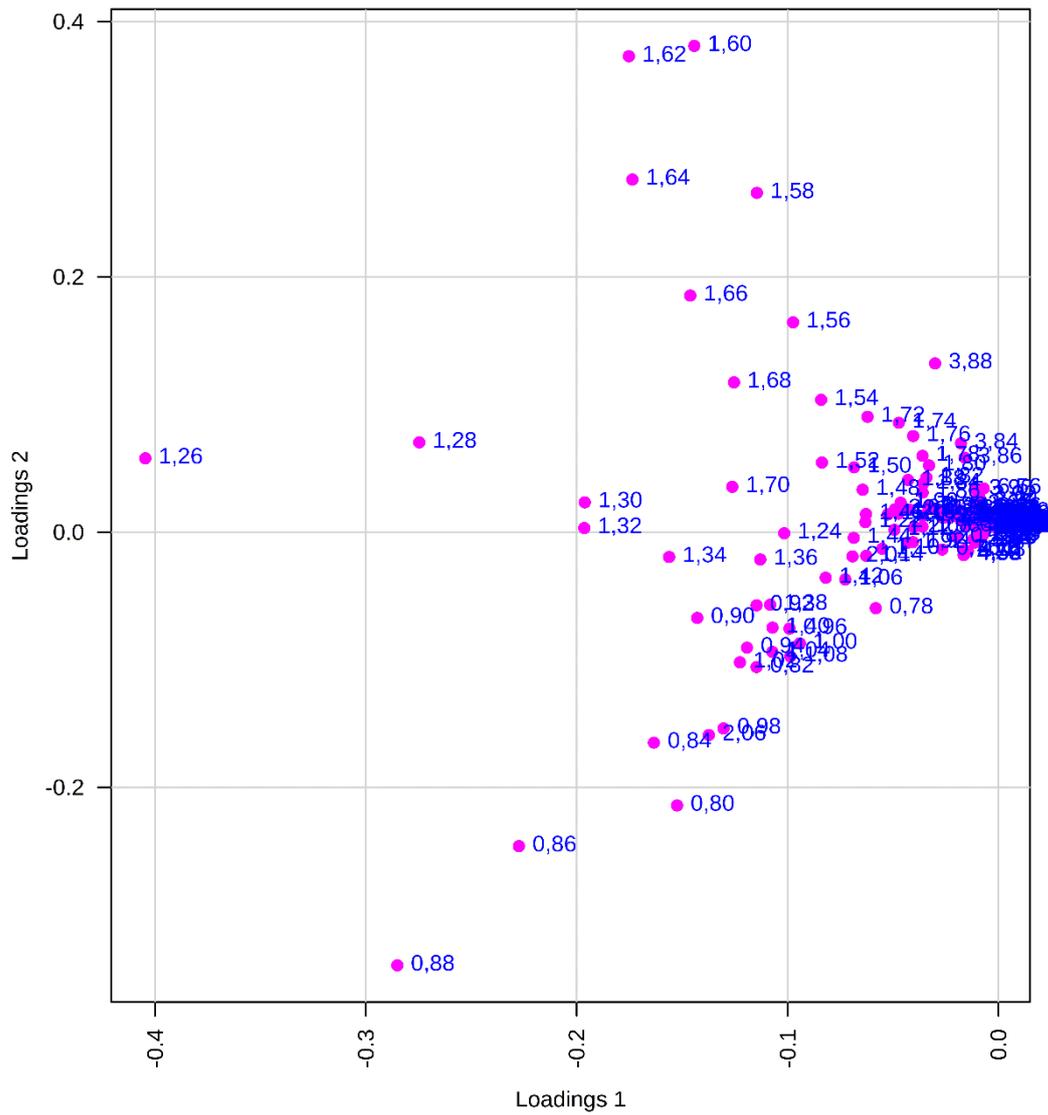


Gráfico de *Scores* demonstrando a separação e formação de grupos para a PCA gerada com os dados de RMN de ^1H adquiridos para os extratos etonólicos: grupo **M** formado pelas amostras **Mp** – amostras de *M. petraea*, grupo **N** formado pelas amostras **Mv**, **MI**, **CBA** e **ROO** (*M. velame*, *M. longiflora*, amostra comprada na cidade de Cuiabá (MT) e amostras comprada na cidade de Rondonópolis (MT), respectivamente) - grupo **O** formado pelas amostras comercializadas nas cidades de Campo Grande (CGR), Corumbá (CMB), Dourados (DRS1, DRS2, DRS3 e DRS4) e Ponta Porã (PPA).



Gráficos de *loadings* representa os pontos influentes na separação de dados na formação da PCA do extrato etanólico dos espécimes coletados e amostras comercializadas.

Anexo 4

Cromatograma total obtido na análise feita em HPLC/MS-MS, das amostras **Mp** – *M. petraea* (coletada), **Mv** – *M. velame* (coletada), **MI** – *M. longiflora*, **CBA** – amostra compradas em Cuiabá (MT), **ROO** – amostras de Rondonópolis (MT), **CGR** – amostras compradas em Campo Grande (MS), **CMB** – amostra compradas em Corumbá (MS) e **PPA** – amostra compradas em Ponta Porã (MS) e **DRS1**, **DRS2**, **DRS3** e **DRS4** – amostras compradas em Dourados.

As análises foram realizadas utilizando gradiente de eluição com água (solvente A) e acetonitrila (solvente B), ambos com 0,1% de ácido fórmico. Para o extrato etanólico o tempo de análise foi de 52,0 min, iniciando com 25% de solvente B, e aumento o gradiente nos intervalos de 1,0-5,0 min 25% de solvente B, 5,0-40 min 25% a 80% de solvente B, 40-45 min 80% de solvente B e 45-52 min 80% a 25 % de solvente B. Para a infusão o tempo de análise foi de 44,0 min, iniciando com 3% de solvente B, e aumento o gradiente nos intervalos de 1,0-2,0 min 3% de solvente B, 2,0-25,0 min 3% a 25% de solvente B, 25-40 min 25% a 80% de solvente B e 40-43 min 80% de solvente B, 43-44 min 80% a 3% de solvente B. Os parâmetros empregados no HPLC/MS-MS envolveram fluxo de 0,3 mL/min, temperatura da coluna de 50°C, monitoramento entre 240-800nm e modo de ionização negativo (m/z 120-1300), modo negativo.

