



UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Química de Araraquara

Programa de Pós-Graduação em Química

Estudo químico e biológico do extrato etanol 70 % das
folhas de *Solanum paniculatum* L. (Solanaceae)

ALEXANDER BÁRBARO VALERINO DÍAZ

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lourdes Campaner dos Santos

Araraquara

2018

UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Química de Araraquara

Programa de Pós-Graduação em Química

Estudo químico e biológico do extrato etanol 70 % das
folhas de *Solanum paniculatum* L. (Solanaceae)

ALEXANDER BÁRBARO VALERINO DÍAZ

Tese apresentada ao Instituto
de Química, Universidade
Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lourdes Campaner dos Santos

Araraquara

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

V163e	Valerino Díaz, Alexander Bárbaro Estudo químico e biológico do extrato etanol 70% das folhas de <i>Solanum paniculatum</i> L (Solanaceae) / Alexander Bárbaro Valerino Díaz. – Araraquara: [s.n.], 2018 181 f.: il. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Lourdes Campaner dos Santos 1. Solanaceae. 2. Saponinas. 3. Cromatografia líquida de alta eficiência. 4. Leishmaniose. 5. Citotoxicidade. I. Título
-------	---

Elaboração: Seção Técnica de Tratamento da Informação
Biblioteca do Instituto de Química, Unesp, câmpus de Araraquara

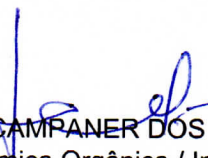
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

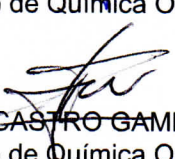
TÍTULO DA TESE: "Estudo químico e biológico do extrato etanol 70% das folhas de *Solanum paniculatum* L. (Solanaceae)"

AUTOR: ALEXANDER BARBARO VALERINO DÍAZ

ORIENTADORA: LOURDES CAMPANER DOS SANTOS

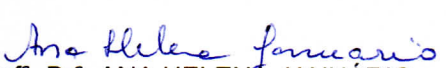
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:


Profª Drª LOURDES CAMPANER DOS SANTOS
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. IAN CASTRO GAMBOA
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Dr. NIVALDO BORALLE
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Profª. Drª. ANNE LIGIA DOKKEDAL BOSQUEIRO
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências - UNESP - Bauru


Profª. Drª. ANA HELENA JANUÁRIO
Departamento de Química / Universidade de Franca - UNIFRAN - Franca

Araraquara, 23 de novembro de 2018

Dados curriculares

Dados pessoais

Nome: Alexander Bárbaro Valerino Díaz

Filiação: Pedro Juan Valerino Varona e Bárbara Miriam Díaz Chapián

Naturalidade: La Habana/Cuba

E-mail: alexandervalerinodiaz@gmail.com

Formação acadêmica

Graduação

Instituição: Faculdade de Química Universidade da Havana, UH, Cuba.

Título da dissertação: Influencia de la temperatura y la composición en el proceso de hinchamiento en hidrogeles de Poli-[N-isopropil acrilamida-N,N Dimetilacrilamida

Orientador: Dr. Dionisio Zaldivar.

Local: Universidade da Habana, Faculdade de Química.

Curso: Química Licenciatura.

Período: 1996 – 2001.

Pós-graduação:

Mestrado

Instituição: Faculdade de Química Universidade da Havana, UH, Cuba.

Título da dissertação: Estudio fitoquímico y de actividad alelopática del follaje de *Lantana trifolia* L.

Orientador: Dra. Iraida Spengler Salabarría.

Local: Universidade da Habana, Faculdade de Química.

Período: 2004– 2006.

Doutorado

Instituição: Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Instituto de Química de Araraquara.

Título da Tese: Estudo químico do extrato etanol 70 % das folhas de *Solanum paniculatum* L. (Solanaceae).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lourdes Campaner dos Santos

Bolsista: CAPES (período 08/2015 – 03/2019)

Local: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Instituto de Química. Araraquara/SP

Período: 02/2015 – 03/2019

Atuação profissional

- 1) Empresa BRASCUBA Cigarrillos S.A – BRASCUBA (Souza Cruz Brasil - British American Tobacco (BAT))

Período: 2007-2014. Vínculo: Enquadramento funcional: funcionário, Carga horária: 48

h, Regime: Dedicación exclusiva.

Especialista em Manutenção do Produto. Analista de Qualidade do Produto.

2) Instituto de Investigaciones del Tabaco.

Período: 2001-2007. Vínculo: Servidor público. Pesquisador. Carga horária: 44 h,

Regime: Dedicación exclusiva.

Artigos publicados em revistas científicas

1. **VALERINO-DIAZ, A. B.**; GAMIOTEA-TURRO, D.; ZANATTA, C.; VILEGAS, W. GOMES MARTINS, C. H.; SOUZA SILVA, T.; RASTRELLI, L. AND SANTOS L.C. New polyhydroxylated steroidal saponins from *Solanum paniculatum* L. leaf alcohol tincture with antibacterial activity against oral pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 33, p. 8703–8713, 2018.
2. GAMIOTEA-TURRO, D.; CAMAFORTE, N. A. P.; **VALERINO-DIAZ, A. B.**; ORTIZ-NUÑEZ, Y.; RINALDO, D.; BOSQUEIRO, J.R.; DOKKEDAL, A.L. AND SANTOS, L.C. Qualitative and quantitative analysis of ethanolic extract and phenolic fraction of *Jatropha aethiopica* (Euphorbiaceae) leaves and their hypoglycemic potential. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 6, p. 1419–1427, 2018.
3. SPENGLER, I.; **VALERINO, A.**; GONZÁLEZ, T.; GAMIOTEA, D.; GARCÍA, T. H. Estudio fitoquímico y de actividad alelopática del extracto de *n*-hexano de hojas de *Lantana trifolia* L. **Revista Cenic. Ciencias químicas**, v. 40, p. 33 - 37, 2009.
4. ALFONSO, M.; **VALERINO-DIAZ, A. B.** *Orobancha ramosa*: Primer reporte en Cuba en la estación Experimental Agronómica de Santiago de las Vegas y posteriores investigaciones. **Agrotecnia de Cuba**, v. 31, p.10, 2007.
5. **DÍAZ, A. B. V.**; SPENGLER, I.; MAURICE, T.; GONZÁLEZ, T. Estudio fitoquímico preliminar del extracto de etanol de hojas de *Lantana trifolia* L. Actividad Alelopática. **Revista Cubana de Química**, v. XII, p. 228 - 232, 2005.
6. ESCOBAR, J. L.; GARCÍA, D.; **VALERINO, A.**; ZALDÍVAR, D.; HERNAEZ, E.; KATIME, I. Cephazoline sodium release from poly (N-isopropyl acrylamide-co-N,N-dimethylacrylamide) hydrogels. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 91, p. 3433 - 3437, 2004.
7. ESCOBAR, J. L.; GARCIA, D. M.; **DÍAZ, A. B. V.**; ZALDÍVAR, D.; HERNAEZ, E.; KATIME, I. Influencia de la temperatura y la composición en el proceso de hinchamiento en hidrogeles de Poli-[N-isopropil acrilamida-N,N Dimetilacrilamida]. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 4, p.1 - 13, 2003.

Participação em congressos

1. **Valerino-Díaz, A. B.**; Gamio-tea-Turro, D.; Zanatta, A. C.; Vilegas, W. and Santos, L. C. Apresentação Oral. **41ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. New steroidal saponins from *Solanum paniculatum* (Solanaceae) leaves. 2018.
2. **Valerino-Díaz, A. B.**; Gamio-tea-Turro, D.; Zanatta, A. C.; Vilegas, W. and Santos, L. C. Apresentação painel. **41ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. New steroidal saponins from *Solanum paniculatum* (Solanaceae) leaves. 2018.
3. Gamio-tea-Turro, D.; **Valerino-Díaz, A. B.**; Ortiz-Núñez, Y.; Rinaldo, D., Bosqueiro, J. R.; Camaforte, N. A. and Santos, L. C. Apresentação painel. **41ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. Chemical characterization of antidiabetic active ethanolic extract from *Jatropha aethiopica* (Euphorbiaceae) leaves. 2018.
4. Pimenta, L. P.; Pedroso, R. C. N.; Souza, W. P.; **Valerino-Díaz, A. B.**; Santos dos, L. C.; Soares, M. A.; Tavares, D. C.; Silva, M. L. A.; Cunha, W. R.; Pauletti, P. M.; Januário, A. H. Apresentação painel **41ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. Pentacyclic triterpenes and the cytotoxic potential of *Vochysia divergens* Pohl stem extract. 2018.
5. **Valerino-Díaz, A. B.**; Gamio-tea-Turro, D.; Gomes, M. C. H.; Vasconcelos, L. A. M.; Vilegas, W.; Santos dos, L. C. Apresentação Painel. **6th Brazilian Conference on Natural Products**. Antimicrobial Activity of the Ethanol Extract and the Saponin Fraction from *Solanum paniculatum* L. 2017.
6. Gamio-tea-Turro, D.; **Valerino-Díaz, A. B.**; Marcondes, T. H. and Santos, L. C. Apresentação Painel. **XIII Jornada Paulista de Plantas Medicinais**. Phenolic compounds from *Jatropha aethiopica* used in the folk Cuban medicine. 2017.
7. **Valerino-Díaz, A. B.**; Collantes, J.; Boffill, L.; Souza, V. Apresentação Oral. **IV Workshop do Produto**. Tendências no mercado e principais produtos cubanos. 2014.
8. **Valerino-Díaz, A. B.**; Santos, S.; Boffill, L.; Silva, A. Apresentação Oral **I Workshop de Produto**. Visão Global dos Produtos em Cuba. Perspectivas Futuras. 2012.
9. Gamio-tea-Turro, D.; Ruenes-Figueroa, M. E.; Álvarez-Valdés, M. E.; Aguado-Rodríguez, Y.; Lorenzo-Rodríguez, Y.; Ortiz-Núñez, Y.; **Valerino-Díaz, A. B.**; Spengler-Salabarría, I. Apresentação Painel. **III Congreso Internacional de Farmacología de Productos Naturales (FAPRONATURA 2012)**. Natural products: Bio-regulators in the seed germination for obtaining innocuous foods. 2012.
10. Gamio-tea-Turro, D.; Aguado-Rodríguez, Y.; Ruenes-Figueroa, M. E.; Álvarez-Valdés, M. E.; Ortiz-Núñez, Y.; Lorenzo-Rodríguez, Y.; **Valerino-Díaz, A. B.** **IV Congreso de Agricultura Tropical**. Extratos vegetais como promotores da germinação de sementes de hortaliças. 2012
11. Gamio-tea-Turro, D.; Álvarez-Valdés, M. E.; Perera, W.; Aguado-Rodríguez, Y.; Ortiz-Núñez, Y.; **Valerino-Díaz, A. B.**; Spengler-Salabarría, I.; Lorenzo-Rodríguez, Y. **IV Congreso Iberoamericano y del Caribe de Productos y**

- Medicinas Naturales (ProdMedNatur 2010).** Propiedades anti-oxidantes da espécie *Jatropha aethiopica*. 2010
12. Gamioatea-Turro, D.; Álvarez-Valdés, M. E.; Aguado-Rodriguez, Y.; Ortiz-Nuñez, Y.; Lorenzo-Rodriguez, Y. and **Valerino-Díaz, A. B.** Usos etnomédicos de las especies de *Jatrophas* presentes en el Arboretum del INIFAT. **Ier Congreso Internacional LABIOFAM 2010. Ier Simposio de Productos Naturales en la Terapia contra el Cáncer.** 2010.
 13. Gamioatea-Turro, D.; Perera, W.; Álvarez-Valdés, M. E.; Lorenzo-Rodriguez, Y.; Ortiz-Nuñez, Y.; Aguado-Rodriguez, Y.; **Valerino-Díaz, A. B.**; Spengler-Salabarria, I. Determinación de la capacidad antioxidante y del contenido de fenoles totales de la especie *Jatropha aethiopica*. **XVIII Congresso Ítalo-Latino-americano de Etno medicina. “Juan Tomás Roig y Mesa”. VIII Taller de los Productos Naturales.** 2009.
 14. Gamioatea-Turro, D.; Álvarez-Valdés, M. E.; Lorenzo-Rodriguez, Y.; Ortiz-Nuñez, Y.; Aguado-Rodriguez, Y.; **Valerino-Díaz, A. B.**; Spengler-Salabarria, I. Propriedades etnomédicas de três espécies de *Jatropha* cultivadas em Cuba. **XVIII Congresso Ítalo- Latino-americano de Etno medicina. “Juan Tomás Roig y Mesa”. VIII Taller de los Productos Naturales.** 2009.
 15. Geada, D. **Valerino-Díaz, A. B.** Bioactive vegetal extracts and developed countries: Total characterization feasibility from an agricultural and biomedical perspective. **XV Congresso Internacional del Centro Nacional de Investigações Científicas.** 2010.
 16. Geada, D. **Valerino-Díaz, A. B.** Orobanche ramosa: Patents and allelopathic knowledge as the keys for a future successful integrate plague management in tobacco industry. **XV Congresso Internacional del Centro Nacional de Investigações Científicas.** 2010.
 17.) Geada, D. **Valerino-Díaz, A. B.** Potencialidades da alelopatía como uma estratégia para a nova gestão de projetos na industria do tabaco. **XV Congresso Internacional del Centro Nacional de Investigações Científicas.** 2010.
 18. Geada, D. **Valerino-Díaz, A. B.** Efeito alelopático do extrato etanol de folhas de *Lantana trifolia* L. em sementes de tabaco. **XVI Fórum da Ciencia y Tecnología del Instituto de Investigaciones del Tabaco.** 2010.
 19. Gamioatea-Turro, D.; Álvarez-Valdés, M. E.; Lorenzo-Rodriguez, Y.; Sánchez, R.; Hernández, Y.; González, M; Ortiz-Nuñez, Y.; **Valerino-Díaz, A. B.**; Spengler-Salabarria, I. Estudio preliminar de germinación de semillas de interés económico utilizando extractos de plantas. **XVI Congreso Científico Internacional del INCA.** 2008.
 20. **Valerino-Díaz, A. B.**; Morera, T.; Spengler-Salabarria, I.; Maurice, T. Estudo da actividade alelopática de folhas de *Lantana trifolia* L. Isolamento e caracterização de dois flavonoides. 2006.
 21. **Valerino-Díaz, A. B.**; Morera, T.; Spengler-Salabarria, I.; Maurice, T. Estudio fitoquímico preliminar del extrato de etanol de folhas de *Lantana trifolia* L. Actividade Alelopática. **18 Conferencia de Química,** 2005.
 22. **Valerino-Díaz, A. B.**; Morera, T.; Spengler-Salabarria, I.; Maurice, T. Apresentação Oral. La alelopatía, uma alternativa promissória para o controle de plantas daninhas. **Seminário Iberoamericano. Resistencia de malezas a herbicidas.** 2005.

23. **Valerino-Díaz, A. B.**; Morera, T.; Spengler-Salabarría, I.; Maurice, T. Apresentação Oral. Estudo fitoquímico biodirigido da actividade alelopática das folhas de *Lantana trifolia* L, Parte I. **XVII Congreso de la Asociación Internacional de Malezas**, 2005.
24. Escobar, J. L.; García, D.; **Valerino-Díaz, A. B.**; Zaldívar, D.; Hernaez, E.; Katime, I. Estudo da transição crítica a baixas temperaturas (LCST) em hidrogelos de Poli N-Isopropil acrilamida- co- N,N dimetil acrilamida. **III Congreso Internacional de Biomateriales**. 2003.
25. Escobar, J. L.; García, D.; **Valerino-Díaz, A. B.**; Zaldívar, D.; Hernaez, E.; Katime, I. Cephazoline sodium release from poly(N-isopropyl acrylamide-co-N,N-dimethylacrylamide) hydrogels. **III Congreso Internacional de Biomateriales**. 2003.

Organização de cursos

1. 1^{ra} Escola de Verão do Instituto de Química de Araraquara (UNESP-SP) (Fevereiro 2018). Prof^a. Dr^a. Lourdes C. dos Santos, Prof^a. Dr^a. Isabele R. Nascimento, **Alexander B. Valerino Díaz**, Daylin Gamiotea-Turro, Ana C. Zanatta, Felipe Hilário, Marcelo Amorim, Mayra Fonseca, Weslei Botero.

Orientações

1. Supervisão no desenvolvimento do TCC do aluno João Pedro Molina Gil, estudante do curso de Bacharelado em Química do Instituto de Química de Araraquara; onde desenvolve o projeto intitulado Estudo Químico do extrato etanol 70 % das folhas de *Solanum Lycocarpum* L. (Solanaceae) com bolsa CNPq.
2. Supervisão no desenvolvimento do TCC da aluna Ivis Menendez Lorient, estudante do Técnico Médio em Química do Instituto Politécnico de Química da Havana, Cuba; onde desenvolveu o projeto intitulado Desenvolvimento de uma técnica analítica para a determinação de ditiocarbamatos em folhas de tabaco, 2003.
3. Supervisão no desenvolvimento do TCC da aluna Yaniris García, estudante de Licenciatura em Química da Faculdade de Química da Universidade da Havana, Cuba; onde desenvolveu o projeto intitulado Estudo fitoquímico e da atividade alelopática do extrato *n*-hexano em folhas de *Lantana trifolia* L, 2006.

"If you can't fly then run, if you can't run then walk, if you can't walk then crawl, but whatever you do you have to keep moving forward."

Martin Luther King Jr.

"Se você não pode voar, corra, se você não pode correr, caminhe, se você não pode andar, então rasteje, mas o que quer que você faça, você tem que seguir em frente".

Martin Luther King Jr.

Dedicado a:

Pedro Juan Valerino Varona

O Maior Homem que eu já conheci na minha vida...

Meu Pai

In memoriam

AGRADECIMENTOS

Foram muitas pessoas e instituições que fizeram possível a culminação deste projeto, sem vocês esta caminhada não teria dado lugar.

Agradeço no primeiro lugar a Deus... por iluminar a minha vida e tornar o impossível em possível por isso e muito mais só posso ter gratidão.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Lourdes Campaner dos Santos, para quem não tenho palavras para expressar a minha gratidão, pela dedicação e empenho na orientação desta tese, por ser um verdadeiro exemplo como pesquisadora, pela confiança dedicada a mim, sobre tudo, por ser mais do que orientadora. Muito obrigado mesmo professora...!!!

Ao professor Prof. Dr. Wagner Vilegas, por permitir desenvolver este projeto de pesquisa com esta maravilhosa espécie.

Às agências de fomento CAPES, FAPESP e CNPq, pelo apoio na realização das pesquisas desenvolvidas.

Aos funcionários do Instituto de Química, da Seção Técnica da Pós-graduação, aos servidores públicos da Biblioteca, da STAEPE, da STI, dos Serviços de Manutenção e Serviços Gerais por tudo o apoio administrativo e demais.

Aos professores, técnicos e doutorandos do Departamento de Química Orgânica por tudo o aprendizado que vocês transmitiram para mim, especialmente por sempre estarem dispostos a ajudar com muita paciência e carinho: Nivaldo Boralle, Lucinéia Vizzotto Marconcini, Ian Castro Gamboa, Ângela Regina Araújo, Isabelle Rodrigues Nascimento, Juliana Rodrigues, João Luiz Bronzel Junior, Mayra Fonseca e Camila Cunha.

Aos colegas do Laboratório de Fitoquímica, por toda a ajuda que vocês deram durante estes 4 anos, por todo o que com vocês aprendi que me ajudou a crescer como profissional, e por recebermos como uma família, muito obrigado mesmo: Weslei Botero, Felipe Hilário, João Pedro, Thayná Marcondes, Pedrinho, Ana Carolina Zanatta Silva (Aninha), Leonice, Henrique, Maiara Borges o meu carinho e amizade para todos!!!.

Aos meus amigos cubanos em Araraquara, a todos e cada uns de vocês minha profunda gratidão por constituir a minha família cubana no Brasil: Mayté Paredes, Celia M. Casado, Jorge R. Chanfrau, Bárbara M. Reyes, Deivys Leandro Portuondo, Alexander Batista, Ana Isa Pérez Cordoves, Leonar D. Granela, Michael Pérez Rodríguez, Yani, Vivian Ruiz, Diógenes Puentes e a sua família, Elsie Pérez e seu esposo Marcos. Aos médicos cubanos Jorge, Yadian e a sua esposa Erika por toda a amizade e carinho quando mais precisei e sempre estiveram dispostos a ajudar.

Aos meus amigos brasileiros que ganhei neste maravilhoso país, vocês desde já fazem parte de minha família por todo o que compartilhei junto a vocês, cada conversa, cada lugar que conheci com vocês, cada coisa que aprendi deste país. Enfim, GRATIDÃO meus amigos, eu levarei cada um de vocês comigo por sempre: Paulo Henrique e a sua família, Marcus Freitas, Marcelo Ferreira e a sua família, Cristiano e Valquíria Silva, Cecília Onofrio, Profa. Dayana Barinotti, Reinaldo Bento e a sua família, Osmar e a sua família, Sueli Pereiras, Endrigo Zapata. Vocês fizeram os nossos dias no Brasil muito mais lindos!!!.

A mis amigos de siempre, que como digo más que amigos son mis hermanos, la familia que escogi. A pesar de la distancia, muchas gracias por estar siempre presentes en los momentos más difíciles dándome apoyo incondicional, la ayuda necesaria y el consejo oportuno: a Wilmer Perera, Jorge Luis Escobar Ivirico, Dunia García, Abel Gomez, Luis Hanoi Roldán, Maite Loretto. Muchas Gracias !!!.

A Beatriz Leander y mi sobrino Marlon Valerino por siempre estar presente en nuestro día a día a pesar de la distancia, por el apoyo diario, simplemente gracias...!!!

A mi suegra y mi cuñado por estar siempre en los momentos más difíciles apoyando incondicionalmente, en ustedes he encontrado una nueva familia.

A mi querida madre para tí vá especialmente dedicado este trabajo por ser la gran guerrera que eres. Por siempre inculcarme valores como la honestidade, la dedicación y la entrega, y por sobre todas las cosas por nunca dejarme desistir cuando en apariencia todo parecía más difícil. Que Dios te bendiga, muchas gracias mamá!!!!.

A mis hermanos Reynier Valerino y Martin Valerino por todo el apoyo que me han dado en todo este tempo, ya que han sido mi brazo derecho con nuestra madre en Cuba, por eso y mucho más les agradeceré eternamente...

Para minha filha Lauren Valerino meu maior tesouro, meu maior e mais lindo projeto. Minha princesa, minha outra metade, quero que você saiba que papai te ama muito e que você é e será sempre minha maior motivação e minha razão de viver. Eu te amo!!!.

Finalmente mais muito importante, gostaria de agradecer a minha esposa Daylin Gamiotea, por tudo o apoio nesta pesquisa, por me acompanhar nesta caminhada, por acreditar sempre em mim, mas sobre tudo por fazer junto a mim realidade este sonho!!!.

Enfim, sou grato a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que este sonho se tornasse realidade. **Muito Obrigado!!!.**

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”

Marthin Luther King Jr.

RESUMO

A espécie *Solanum paniculatum* conhecida popularmente como *jurubeba*, é amplamente usada pela população brasileira pelos seus usos medicinais para o tratamento de disfunções digestivas e doenças do fígado. A espécie é a única dentro do gênero *Solanum* que está incluída na lista do Sistema Único de Saúde (SUS) de espécies para o desenvolvimento de formulações de fitoterápicos. Como parte de nossa contribuição ao entendimento em relação ao uso e benefício desta espécie, o objetivo do presente trabalho consistiu no estudo químico do extrato etanol 70 % obtido a partir das folhas de *S. paniculatum*, através da identificação, isolamento e elucidação estrutural dos principais metabólitos presentes no extrato, assim como avaliar as atividades citotóxica do extrato etanol 70% para linhagens tumorais, antibacteriana, leishmanicida, esquistossomosose e de viabilidade celular para células normais, tanto para o extrato como para a fração enriquecida de saponinas (**f26**). Diferentes técnicas cromatográficas de isolamento e purificação (Sephadex LH-20, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Arranjo de Diodo (CLAE-DAD), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Índice de Refracção (CLAE-IR)) foram empregadas, o que possibilitou o isolamento de 11 substâncias que foram caracterizadas utilizando técnicas espectroscópicas (uni e bidimensionais) e a espectrometria de massas. O fracionamento do extrato etanol 70 % levou ao isolamento de 8 saponinas esteroidais inéditas denominadas: 6-O- α -L-ramnopiranosil-(1'' $\rightarrow$ 3')- β -D-quinovopiranosil-(22S,23R,25S)-3 β ,6 α ,23-triidroxi-5 α -espirostano (**1**), 6-O- α -L-ramnopiranosil-(1'' $\rightarrow$ 3')- β -D-quinovopiranosil-(22S,23R,25R)-3 β ,6 α ,23-triidroxi-5 α -espirostano (**2**), 6-O- β -D-xilopiranosil-(1'' $\rightarrow$ 3')- β -D-quinovopiranosil-(22S,23R,25S)-3 β ,6 α ,23-triidroxi-5 α -espirostano (**3**), 6-O- β -D-xilopiranosil-(1'' $\rightarrow$ 3')- β -D-quinovopiranosil-(22S,23R,25R)-3 β ,6 α ,23-triidroxi-5 α -espirostano (**4**), 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1'' $\rightarrow$ 3')- β -D-quinovopiranosil-(22S,23S,25R)-3 β ,6 α ,23-triidroxi-5 α -espirostano (**5**), 3-O- β -D-xilopiranosil-(1'' $\rightarrow$ 3')- β -D-quinovopiranosil-(22S,23S,25R)-3 β ,6 α ,23-triidroxi-5 α -espirostano (**6**), 6-O- α -L-ramnopiranosil-(1'' $\rightarrow$ 3')- β -D-quinovopiranosil-(22S,25S)-1 β ,3 β ,6 α -triidroxi-5 α -espirostano (**7**), 6-O- β -D-xilopiranosil-(1'' $\rightarrow$ 3')- β -D-quinovopiranosil-(22S,25S)-3 β ,4 β ,6 α -triidroxi-5 α -espirostano (**8**), assim como a rutina (**9**), o ácido cafeico (**10**) e o anidrido cafeico (**10a**). Os teores das saponinas (**1-8**) no extrato etanol 70 % foram realizadas por quantificação por UPLC-ESI-IT-MS, e demonstrou-se os altos conteúdos de saponinas que apresentou o extrato etanol 70 % ($333,6 \pm 0,09$ mg.g⁻¹ do extrato). O ensaio de citotoxicidade do extrato etanol 70 % mostrou uma baixa toxicidade com valores de CIM₅₀ superiores a 192,92 μ g mL⁻¹ para cada linhagem testada, no entanto, o extrato etanol 70 %, assim como a fração (**f26**) mostraram-se ativos no estudo das atividades antibacteriana com valores de CIM entre 6,25-100 μ g/mL, leishmanicida (CI₅₀ menores de 15 μ g/mL) e esquistossomosose (CIM 12,5 μ g/mL). Os testes de viabilidade celular mostraram uma baixa citotoxicidade do extrato e da fração com valores de concentrações superiores a 625 μ g/mL e IC₅₀ de 316 μ g/mL. Os resultados obtidos forneceram dados relevantes em relação à composição química da espécie, avaliação biológica, assim como dos teores das saponinas presentes no extrato etanol 70 % das folhas de *S. paniculatum*.

Palavras chaves: *Solanum paniculatum*, saponina esteroideal, quantificação LC/MS, atividade leishmanicida, atividade antibacteriana.

ABSTRACT

Solanum paniculatum popularly known as *jurubeba*, is a species widely used in the Brazilian folk medicine for the treatment of liver and gastrointestinal disorders. Remarkably important it is the fact that is the only species of the genus *Solanum* that has been included in the Brazilian Health Unique System (SUS in Portuguese) list of medicinal plants of interest for the development of phytotherapeutic formulations. As part of our contribution toward understanding the uses and benefits derived from this species, the aim of the present work was the study of the chemical composition of the ethanolic 70 % extract of the leaves of *S. paniculatum*, through the identification, isolation and structural elucidation of the metabolites present in the extract. We also evaluated the cytotoxic activity of the alcoholic tincture (70 %) as well as, the antibacterial, antileishmanial, antischistosomal activities and cell viability test (normal cells) of the ethanolic 70 % extract and the enriched fraction of saponins (**f26**). Different chromatographic techniques for isolation and purification were performed (Sephadex LH-20, High Performance Liquid Chromatography coupled to the Diode Array Detector (CLAE-DAD), High Performance Liquid Chromatography coupled to the Refractive Index Detector (HPLC-RI), which led to the isolation of 11 substances, that were characterized using spectroscopic techniques (one and two dimensional) and mass spectrometry. Fractionation of hydroalcoholic [ethanol (70%)] tincture led to the isolation of eight new steroidal saponins named: 6-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1'' $\rightarrow$ 3')- β -D-quinovopyranosyl-(22S,23R,25S)-3 β ,6 α ,23-trihydroxy-5 α -spirostane (**1**), 6-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1'' $\rightarrow$ 3')- β -D-quinovopyranosyl-(22S,23R,25R)-3 β ,6 α ,23-trihydroxy-5 α -spirostane (**2**), 6-O- β -D-xylopyranosyl-(1'' $\rightarrow$ 3')- β -D-quinovopyranosyl-(22S,23R,25S)-3 β ,6 α ,23-trihydroxy-5 α -spirostane (**3**), 6-O- β -D-xylopyranosyl-(1'' $\rightarrow$ 3')- β -D-quinovopyranosyl-(22S,23R,25R)-3 β ,6 α ,23-trihydroxy-5 α -spirostane (**4**), 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1'' $\rightarrow$ 3')- β -D-quinovopyranosyl-(22S,23S,25R)-3 β ,6 α ,23-trihydroxy-5 α -spirostane (**5**), 3-O- β -D-xylopyranosyl-(1'' $\rightarrow$ 3')- β -D-quinovopyranosyl-(22S,23S,25R)-3 β ,6 α ,23-trihydroxy-5 α -spirostane (**6**), 6-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1'' $\rightarrow$ 3')- β -D-quinovopyranosyl-(22S,25S)-1 β ,3 β ,6 α -trihydroxy-5 α -spirostane (**7**), 6-O- β -D-xylopyranosyl-(1'' $\rightarrow$ 3')- β -D-quinovopyranosyl-(22S,25S)-3 β ,4 β ,6 α -trihydroxy-5 α -spirostane (**8**), as well as rutin (**9**), caffeic acid (**10**) and caffeic anhydride (**10a**). Saponins (**1-8**) quantification in the 70% ethanol extract were performed by UPLC-ESI-IT-MS, this procedure allowed to determine the high content of saponins in the tincture (333.6 ± 0.09 mg.g⁻¹). The antitumor test for the ethanolic 70 % extract showed low activity against the cell tested with MIC values higher than 192.92 μ g/mL, nonetheless, the ethanolic extract as well as the **f26** fraction were active in the study of antibacterial (MIC values ranging between 6.25-100 μ g/mL), leishmanicidal (values of IC₅₀ under 15 μ g/mL) and schistosomicidal activities (MIC 12.5 μ g/mL). The cell viability test showed a low cytotoxicity of ethanolic 70 % extract and the saponin fraction, with concentrations values up to 625 μ g/mL and IC₅₀ values from 316 μ g/mL. The obtained results provided evidence regarding the chemical composition of the species, biological activities as well as the saponins content in the tincture.

Keywords: *Solanum paniculatum*, spirostanic saponins, LC/MS quantification, leishmanicidal activity, antibacterial activity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A549	Linhagens de células de adenocarcinoma humano de pulmão
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ACOH	Ácido acético
BAW	<i>Butanol:Acetic Acid:Water</i> (Butanol: Ácido acético: Água)
^{13}C	Isótopo do carbono 13
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CD_3OD	Metanol deuterado
CHCl_3	Clorofórmio
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-ESI-MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Ionização por Electrospray - acoplada a Espectrometria de Massas
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detector de Arranjo de diodos
CLAE-IR	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detector de Índice de Refração
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
δ_{H}	Deslocamento químico de hidrogênio
δ_{C}	Deslocamento químico de carbono
D_2O	Água deuterada
DAD	Detector de arranjo de Diodos
DEPT-135	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DPR	Desvio Padrão Relativo
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM	Espectrometria de Massas
ESI	<i>Electrospray ionization</i> (Ionização por electrospray)
ESIMS/MS	<i>Electrospray ionization Mass Spectrometry</i> (Ionização por electrospray – Espectrometria de massas)
ESI-QqTOF-MS	Fonte de ionização por eletrospray, analisador tempo de voo e detector de espectrometria de massas.
EtOH	Etanol

FIA-ESI-IT-MS	<i>Flow Injection Analysis – ElectroSpray - Ion Trap – Mass Spectrometry</i> (Análise de injeção de fluxo – Ionização por Electrospray – Ion Trap – Espectrometria de Massas)
^1H	Isótopo do hidrogênio
^1H - ^1H COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i> ^1H - ^1H
H_2O	Água
HCl	Ácido clorhídrico
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
HepG2	Linhagens de células de carcinoma de fígado hepatocelular humano
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>
HRESIMS/MS	<i>High Resolution ElectroSpray Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de massas de alta resolução com fonte de ionização por electrospray)
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IR	Índice de Refração
IC_{50}	<i>Midium Inhibitory Concentration</i> (50% da Concentração inibitória mínima)
J	Constante de acoplamento
LC-MS	Liquid Chromatography - Mass Spectrometer (Cromatografia Líquida – Espectrometria de Massas)
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
LM3	Linhagem celular: câncer de mama murino
LP-07	Linhagem celular: adenocarcinoma de pulmão murino
MCF-7	Linhagem celular: adenocarcinoma de mama humano
MeOH	Metanol
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i> (Monitoramento de Reações Múltiplas)
MTT	Brometo de 3-((4,5-dimetiltiazol)-2, il)-2,5-difeniltetrazólio
m/z	Relação massa/carga
^{15}N	Isótopo do nitrogênio
NaHCO_3	Hidrogeno carbonato de sódio
NH_4OH	Hidróxido de amonia
Nm	Nanometros
NOESY - 1D	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy – One Dimension</i>
NP-PEG	Produto Natural -difenilborato de aminoetanol/polietilenglicol
Ppm	Partes por milhão
PTFE	Politetrafluoroetileno
QqTOF	<i>Quadrupole Time Of Flight</i> (Analisador Quadrupolo e Tempo de voo)

RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN- ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN- ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RPMI	Meio de cultura para o crescimento de células (<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>)
SIM	<i>Selected Ion Monitoring</i> (Monitoramento de Íon Seleccionado)
SPE	<i>Solid Fase Extraction</i> (Extração em fase sólida)
TFA	Ácido Trifluoracético
TOCSY-1D	<i>Total Correlation Spectroscopy One-Dimension</i>
UNESP-SP	Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” – São Paulo
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UPLC-ESI-IT-MS	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography - ElectroSpray Ionization - Ion Trap - Mass Spectrometry</i> (Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência - Ionização por ElectroSpray - Ion Trap - Espectrometria de massas)
UPLC-MS	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry</i> (Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência - Espectrometria de massas)
UV	Ultravioleta
XTT	Hidrato de benzenilsulfito 3'-[1-[(fenilamino)-carbonil-3,4-tetrazólio]-bis-(4-metoxi-6-nitro) de sódio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Substâncias isoladas das folhas de <i>Solanum torvum</i>	26
Figura 2. Espécie de <i>Solanum paniculatum</i> L. (jurubeba).....	27
Figura 3. Substâncias isoladas das folhas, frutos e ramos de <i>S. paniculatum</i>	29
Figura 4. Sapogenina alcaloidal.	32
Figura 5. Sapogenina triterpénica.	32
Figura 6. Sapogenina espirostânica.....	32
Figura 7. Sapogenina furostânica.	32
Figura 8. Sapogenina furoespirostânica.	33
Figura 9. Biossíntese de saponinas esteroidais.	34
Figura 10. Distribuição das massas das frações após separação por permeação em gel em Sephadex LH-20 e agrupamentos por CCD.....	44
Figura 11. Distribuição das massas das frações após separação por permeação em gel em Sephadex LH-20 e agrupamentos por CCD do extrato n-butanol.	47
Figura 12. Reação de redução do MTT ao formazan.....	50
Figura 13. Fluxograma de preparo e fracionamento do extrato etanol 70% das folhas de <i>S. paniculatum</i>	58
Figura 14. Perfil cromatográfico em CLAE-DAD do extrato etanol 70% das folhas de <i>S. paniculatum</i> e espectros no UV representativos a 270 nm.....	60
Figura 15. Perfil cromatográfico da fração R e espectros no UV representativos a 270 nm.	62
Figura 16. Perfil cromatográfico do extrato <i>n</i> -butanol e espectros no UV representativos a 270 nm.....	63
Figura 17. Perfil cromatográfico do extrato aquoso e espectros no UV representativos a 270 nm.....	64
Figura 18. Perfil cromatográfico da fração f26 no CLAE-IR.....	65
Figura 19. Espectro de RMN- ¹ H da substância 1 (14,1 T, CD ₃ OD).	67
Figura 20. Espectro TOCSY-1D da substância 1 . Irradiação em δ_H 4,26.....	68
Figura 21. Espectro TOCSY-1D da substância 1 . Irradiação em δ_H 5,13.....	68
Figura 22. Espectro de RMN- ¹³ C da substância 1 . (14,1 T, CD ₃ OD).....	69
Figura 23. Espectro DEPT-135° da substância 1 . (14,1 T, CD ₃ OD).	70
Figura 24. Mapa de contorno HMBC da substância 1 . (14,1 T, CD ₃ OD).....	71
Figura 25. Principais correlações no mapa de contorno HMBC para a aglicona da substância 1	71
Figura 26. Espectro NOESY-1D da substância 1 . Irradiação seletiva em δ_H 3,56.	72
Figura 27. Interação via NOESY- 1D do H-23 com o H-20 na substância 1	72
Figura 28. Espectro NOESY-1D substância 1 . Irradiação seletiva em δ_H 0,81 73	
Figura 29. Espectro NOESY-1D da substância 1 . Irradiação seletiva em δ_H 0,87. (14,1 T, CD ₃ OD).....	74
Figura 30. Principais interações observadas no espectro NOESY-1D para a substância 1	74
Figura 31. Correlações ¹ H- ¹ H COSY da substância 1	75
Figura 32. Expansão do espectro ¹ H- ¹ H COSY da substância 1 . (14,1 T, CD ₃ OD). ...	75
Figura 33. Configuração do estereocentro C-22 para 23-hidroxi-espirostanos.	76
Figura 34. Espectro HRESI-MS da substância 1 . Modo positivo.	78
Figura 35. Espectro ESIMS/MS do íon molecular [M+H] ⁺ <i>m/z</i> 741,4410 da substância 1 . Modo positivo.....	78
Figura 36. Estrutura da substância 1	79
Figura 37. Espectro de RMN- ¹ H da substância 2 (14,1 T, CD ₃ OD).	80
Figura 38. Espectro de RMN- ¹³ C da substância 2 (14,1 T, CD ₃ OD).....	80
Figura 39. Espectro ¹ H- ¹ H COSY da substância 2 (14,1 T, CD ₃ OD).....	81
Figura 40. Espectro HSQC da substância 2 (14,1 T, CD ₃ OD).	81
Figura 41. Mapa de contorno HMBC da substância 2 . (14,1 T, CD ₃ OD).....	82

Figura 42. Espectro NOESY-1D da substância 2 . Irradiação seletiva em δ_H 0,81. (14,1 T, CD ₃ OD).....	83
Figura 43. Espectro NOESY-1D da substância 2 . Irradiação seletiva em δ_H 0,87.	83
Figura 44. Espectro NOESY-1D da substância 2 . Irradiação seletiva em δ_H 3,51.	84
Figura 45. Espectro HRESI-MS da substância 2 . Modo positivo.	85
Figura 46. Estrutura da substância 2	85
Figura 47. Espectro de RMN- ¹ H da substância 3 (14,1 T, CD ₃ OD).	86
Figura 48. Espectro de RMN- ¹³ C da substância 3 (14,1 T, CD ₃ OD).	87
Figura 49. Espectro DEPT-135 da substância 3 (14,1 T, CD ₃ OD).	88
Figura 50. Espectro NOESY-1D do composto 3 . Irradiação seletiva em δ_H 3,56.	89
Figura 51. Espectro NOESY-1D da substância 3 . Irradiação seletiva em δ_H 0,86.	89
Figura 52. Espectro NOESY-1D do composto 3 . Irradiação seletiva em δ_H 0,81.	90
Figura 53. Espectro TOCSY-1D do composto 3 . Irradiação em δ_H 4,30.	91
Figura 54. Espectro TOCSY-1D do composto 3 . Irradiação em δ_H 4,47.	91
Figura 55. Espectro HRESI-MS da substância 3 . Modo positivo.	92
Figura 56. Estrutura da substância 3	93
Figura 57. Espectro de RMN- ¹ H da substância 4 (14,1 T, CD ₃ OD).	94
Figura 58. Espectro de RMN- ¹³ C da substância 4 (14,1 T, CD ₃ OD).	94
Figura 59. Espectro DEPT-135° da substância 4 (14,1 T, CD ₃ OD).	95
Figura 60. Espectro NOESY-1D da substância 4 . Irradiação seletiva em δ_H 0,87. (14,1 T, CD ₃ OD).....	96
Figura 61. Espectro NOESY-1D da substância 4 . Irradiação seletiva em δ_H 0,81.	96
Figura 62. Espectro NOESY-1D da substância 4 . Irradiação seletiva em δ_H 3,52 (14,1 T, CD ₃ OD).....	97
Figura 63. Mapa de contorno HMBC da substância 4 (14,1 T, CD ₃ OD).	98
Figura 64. Espectro TOCSY-1D da substância 4 . Irradiação em δ_H 4,31.	99
Figura 65. Espectro TOCSY-1D da substância 4 . Irradiação em δ_H 4,47.	99
Figura 66. Espectro HSQC da substância 4 . (14,1 T, CD ₃ OD).	100
Figura 67. Espectro HRESI-MS da substância 4 . Modo positivo.	100
Figura 68. Estrutura da substância 4	101
Figura 69. Espectro de RMN- ¹ H da substância 5 (14,1 T, CD ₃ OD).	102
Figura 70. Expansão do mapa de contorno HMBC da substância 5	103
Figura 71. Expansão do espectro ¹ H- ¹ H COSY da substância 5 . (14,1 T, CD ₃ OD). .	104
Figura 72. Interação via NOESY-1D do H-23 δ_H 3,62 com a CH ₃ -21 δ_H 1,15 na substância 5	104
Figura 73. Espectro NOESY-1D da substância 5 . Irradiação seletiva em δ_H 3,62 (14,1 T, CD ₃ OD).....	105
Figura 74. Espectro HRESI-MS da substância 5 . Modo positivo.	106
Figura 75. Estrutura da substância 5	106
Figura 76. Espectro de RMN- ¹ H da substância 6 (14,1 T, CD ₃ OD).	107
Figura 77. Expansão do mapa de contorno HMBC da substância 6 (14,1 T, CD ₃ OD).	109
Figura 78. Expansão do espectro ¹ H- ¹ H COSY da substância 6 (14,1 T, CD ₃ OD).	110
Figura 79. Espectro NOESY-1D da substância 6 . Irradiação seletiva em δ_H 3,62.	111
Figura 80. Espectro HRESI-MS da substância 6 . Modo positivo.	111
Figura 81. Estrutura da substância 6	112
Figura 82. Espectro de RMN- ¹ H da substância 7 (14,1 T, CD ₃ OD).	113
Figura 83. Espectro de RMN- ¹³ C da substância 7 (14,1 T, CD ₃ OD).	114
Figura 84. Espectro TOCSY-1D da substância 7 . Irradiação em δ_H 4,26.	115
Figura 85. Espectro TOCSY-1D da substância 7 . Irradiação em δ_H 5,13.	116
Figura 86. Mapa de contorno HMBC da substância 7 (14,1 T, CD ₃ OD).	116
Figura 87. Espectro DEPT-135° da substância 7 (14,1 T, CD ₃ OD).	117
Figura 88. Ampliação do mapa de contorno HMBC da substância 7	118
Figura 89. Espectro NOESY-1D da substância 7 . Irradiação seletiva em δ_H 0,85.	119

Figura 90. Espectro NOESY-1D da substância 7 . Irradiação seletiva em δ_H 0,87 (14,1 T, CD ₃ OD).....	120
Figura 91. Ampliação do espectro ¹ H- ¹ H COSY da substância 7 (14,1 T, CD ₃ OD). .	120
Figura 92. Espectro NOESY-1D da substância 7 . Irradiação seletiva em δ_H 2,53 (14,1 T, CD ₃ OD).....	121
Figura 93. Espectro HRESI-MS da substância 7 . Modo positivo.	122
Figura 94. Espectro HSQC da substância 7 (14,1 T, CD ₃ OD).	123
Figura 95. Estrutura da substância 7	123
Figura 96. Espectro de RMN- ¹ H da substância 8 (14,1 T, CD ₃ OD).	124
Figura 97. Espectro de RMN- ¹³ C da substância 8 (14,1 T, CD ₃ OD).	125
Figura 98. Ampliação do espectro ¹ H- ¹ H COSY da substância 8 (14,1 T, CD ₃ OD). .	125
Figura 99. Espectro TOCSY-1D da substância 8 . Irradiação em δ_H 4,30.....	126
Figura 100. Espectro TOCSY-1D da substância 8 . Irradiação em δ_H 4,47.....	127
Figura 101. Mapa de contorno HMBC da substância 8 (14,1 T, CD ₃ OD).....	128
Figura 102. Espectro NOESY-1D da substância 8 . Irradiação seletiva em δ_H 0,87..	129
Figura 103. Espectro NOESY-1D da substância 8 . Irradiação seletiva em δ_H 0,84 (14,1 T, CD ₃ OD).....	129
Figura 104. Espectro NOESY-1D da substância 8 . Irradiação seletiva em δ_H 2,51 (14,1 T, CD ₃ OD).....	130
Figura 105. Espectro HSQC da substância 8 (14,1 T, CD ₃ OD).	131
Figura 106. Espectro HRESI-MS da substância 8 . Modo positivo.	131
Figura 107. Estrutura da substância 8	132
Figura 108. Saponinas espirostânicas inéditas (1-8) isoladas do extrato etanol 70 % das folhas de <i>S. paniculatum</i>	139
Figura 109. Espectro de RMN - ¹ H da substância 9 (14,1 T, CD ₃ OD).	141
Figura 110. Estrutura da substância 9	143
Figura 111. Espectro RMN- ¹ H e ampliação da mistura de 10 + 10a (14,1T, CD ₃ OD).	145
Figura 112. Estrutura da substância 10	146
Figura 113. Espectro RMN- ¹ H da mistura de 10 + 10^a (14,1T, CD ₃ OD).....	147
Figura 114. Estrutura da substância 10a	148
Figura 115. Cromatograma do extrato etanol 70 % das folhas de <i>S. paniculatum</i>	149
Figura 116. Curvas analíticas obtidas pelo método de calibração externa das soluções padrões 1-8	150
Figura 117. Cromatograma de monitoramento de íon selecionado (SIM) <i>m/z</i> 725 correspondente ao extrato etanol 70 %. Cromatogramas dos padrões 3 , 4 , 6 e 8	154
Figura 118. Cromatograma de monitoramento de íon selecionado (SIM) <i>m/z</i> 739 correspondente ao extrato etanol 70 %. Cromatogramas dos padrões 1 , 2 , 5 e 7	154
Figura 119. Gráfico comparativo entre os valores de CIM ₅₀ para as linhagens tumorais testadas.	157
Figura 120. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em µg/mL do extrato etanol 70% e a fração f'26 frente às cepas de bactérias testadas.	159
Figura 121. Reação de redução do XTT ao formazan.	168
Figura 122. Viabilidade celular de fibroblastos de pulmão de humano (GM07492A) tratadas com diferentes concentrações (µg mL ⁻¹) do extrato etanol 70 %.	168
Figura 123. Viabilidade celular de fibroblastos de pulmão de humano (GM07492A) tratadas com diferentes concentrações (µg mL ⁻¹) da fração f'26	169

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Massa do extrato etanol 70% e rendimento obtidos da percolação das folhas de <i>S. paniculatum</i>	59
Tabela 2. Massas do extrato <i>n</i> -butanol e aquoso e rendimento obtidos na partição líquido-líquido.....	63
Tabela 3. Deslocamentos químicos de hidrogênio para as substâncias 1-8^a	133
Tabela 4. Deslocamentos químicos de carbono (ppm) para as substâncias 1-8^a	136
Tabela 5. Deslocamentos químicos de hidrogênio e ¹³ C da substância 9	142
Tabela 6. Deslocamentos químicos de hidrogênio da substância 10	145
Tabela 7. Deslocamentos químicos de hidrogênio da substância 10a	147
Tabela 8. Níveis de concentrações usados para a construção das curvas analíticas para os padrões 1-8	150
Tabela 9. Parâmetros das curvas analíticas dos padrões 1-8	152
Tabela 10. Valores de limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para os padrões (1-8).	153
Tabela 11. Desvio padrão relativo (DPR) (%) das áreas calculadas para os picos correspondentes as substâncias 1-8	155
Tabela 12. Teores das saponinas isoladas no extrato etanol 70 % das folhas de <i>S. paniculatum</i>	156
Tabela 13. Valores de citotoxicidade para o extrato etanol 70% das folhas de <i>S. paniculatum</i>	157
Tabela 14. Valores de CIM para o extrato etanol 70% e fração f'26 frente às cepas de bactérias testadas.	160
Tabela 15. Atividade leishmanicida do extrato etanol 70 % e a fração f'26 contra as formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e determinação dos valores de concentração inibitória 50 % (CI ₅₀ µg/mL).....	163
Tabela 16. Viabilidade dos vermes adultos de <i>S. mansoni</i> (em porcentagem) frente ao extrato etanol 70% e a fração f'26	166
Tabela 17. Valores de IC ₅₀ para linhagem celular (GMO7492A) obtidos após tratamento durante 24 horas com extrato etanol 70 % e fração f'26 das folhas <i>S. paniculatum</i>	169

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	24
1.1 A família Solanaceae.....	25
1.2 Gênero <i>Solanum</i>	25
1.3 <i>Solanum paniculatum</i> L.	27
1.4 Saponinas esteroidais.	31
1.5 Biossíntese de saponinas esteroidais.....	33
1.6 Quantificação de saponinas esteroidais.....	35
2 OBJETIVOS.	37
2.1 Objetivo geral:	37
2.2 Objetivos específicos:.....	37
3 PARTE EXPERIMENTAL.	38
3.1 Materiais, Reagentes e Soluções.	38
3.2 Procedimentos gerais instrumentais.	38
3.3 Metodologia.....	42
3.3.1 Etapa Botânica.....	42
3.3.2 Etapa Farmacognóstica.	42
3.3.3 Etapa Química.	42
3.3.4 Etapa de avaliação das atividades biológicas.....	50
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.	58
4.1 Etapa química.....	58
4.1.1 Obtenção do extrato das folhas de <i>S. paniculatum</i> por percolação....	58
4.1.2 Análise do extrato etanol 70% por CLAE-DAD.....	59
4.1.3 Análise da fração R por CLAE-DAD.	61
4.1.4 Extração líquido-líquido.....	62
4.1.5 Análise dos extratos <i>n</i> -butanol e aquoso por CLAE-DAD.....	63

4.1.6 Separações em CLAE-IR semi-preparativo da fração f ²⁶ .	64
4.2 Elucidação estrutural das substâncias isoladas.	65
4.2.1 Elucidação estrutural do substância 1.	65
4.2.2 Elucidação estrutural da substância 2.	79
4.2.3 Elucidação estrutural da substância 3.	86
4.2.4 Elucidação estrutural da substância 4.	93
4.2.5 Elucidação estrutural da substância 5.	101
4.2.6 Elucidação estrutural da substância 6.	107
4.2.7 Elucidação estrutural da substância 7.	112
4.2.8 Elucidação estrutural da substância 8.	123
4.2.9 Elucidação estrutural da substância 9.	140
4.2.10 Elucidação estrutural da substância 10 e 10a.	144
4.3. Quantificação no extrato etanol 70 % das saponinas isoladas.	148
4.3.1 Linearidade e sensibilidade.	149
4.3.2 Limites de detecção e quantificação.	152
4.3.3 Seletividade.	153
4.3.4 Precisão.	155
4.3.5 Quantificação das saponinas isoladas.	155
4.4 Atividades biológicas.	156
4.4.1 Determinação da atividade citotóxica.	156
4.4.2 Avaliação da atividade antibacteriana.	158
4.4.3 Avaliação da atividade leishmanicida.	161
4.4.4 Avaliação da atividade esquistossomicida.	164
4.4.5 Avaliação da citotoxicidade em células normais.	167
4 CONCLUSÕES.	170
REFÊRENCIAS.	172

1 INTRODUÇÃO

A biodiversidade brasileira abriga em seus variados ecossistemas uma grande diversidade de plantas, constituindo-se uma das mais ricas floras do mundo e, portanto, uma fonte promissória de produtos naturais, assim como um arsenal de matéria-prima para a produção de fitofármacos e fitoterápicos (PINTO, 2013).

Todavia até o momento pouco se conhece sobre a composição química de aproximadamente 99,6 % das plantas que pertencem à flora brasileira (PINTO et al., 2001), e segundo os pesquisadores estima-se que pelo menos a metade das espécies vegetais existentes no Brasil, possui alguma propriedade medicinal (CASTRO, GAVILANES, 2000). Portanto os estudos da composição química das espécies a partir da identificação dos grupos de substâncias relevantes, assim como o isolamento e elucidação estrutural, constituem hoje o principal objetivo de pesquisadores pertencentes a muitas áreas do conhecimento como a química, a farmacologia e a biologia (VERMA, SINGH, 2008).

De fato, diversas substâncias com diversificadas e complexas estruturas químicas, já foram identificadas como princípios ativos de vários extratos vegetais pesquisados pela farmacognosia mundial. Uma vertente de pesquisas dentro da farmacognosia que tem sido utilizada com o objetivo de facilitar o processo de descoberta de novas substâncias é a etnofarmacologia. A etnofarmacologia é o ramo da etnobiologia/etnobotânica que associa informações obtidas de comunidades que fazem o uso da flora medicinal com estudos químico-farmacológicos realizados em laboratórios especializados. Não é o interesse principal isolar todas as substâncias de um determinado extrato vegetal, e sim identificar as substâncias responsáveis pela ação farmacológica (ELISABETSHY, 2001). Assim, existe o interesse em conhecer os principais princípios ativos das plantas com potencial uso tanto na medicina humana, quanto na medicina veterinária.

1.1 A família Solanaceae.

A família Solanaceae é uma das maiores entre as Angiospermas, apresentando uma ampla distribuição geográfica em todos os continentes, desde desertos até florestas tropicais, predominando em regiões de clima tropical a clima temperado. Muitas espécies pertencentes à família são encontradas especialmente nas Américas Central e do Sul, onde há um grande centro de diversidade e endemismo (SOARES et al., 2007). A família contém 150 gêneros e cerca de 3000 espécies (SOUZA e LORENZI, 2012), apresentando uma alta diversidade de espécies de importância econômica como a batata (*S. tuberosum* L.), o tomate (*S. lycopersicum* L.) (FRIEDMANN et al., 2005), a berinjela (*S. melongena* L.) (GONÇALVES et al., 2006), o jiló (*S. gilo* L.), o tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) (FRIEDMANN et al., 2005), as pimentas verdes e vermelhas (*Capsicum* spp), dentre outras (VAZ, 2008). Algumas espécies de importância medicinal pertencentes à família Solanaceae encontram-se agrupadas nos seguintes gêneros (SHAH et al., 2013): ***Solanum***, *Atropa*, *Capsicum*, *Datura*, *Withania*, *Hyoscyamus*.

Tem sido relatado o uso de muitas espécies pertencentes a estes gêneros para o tratamento de doenças relacionadas com a artrite, problemas gástricos (úlceras gástricas), problemas no intestino, do fígado, câncer de mama, dores de cabeça e náuseas, como analgésicos, como antiviral, dentre muitas outras (SHAH et al., 2013).

1.2 Gênero *Solanum*.

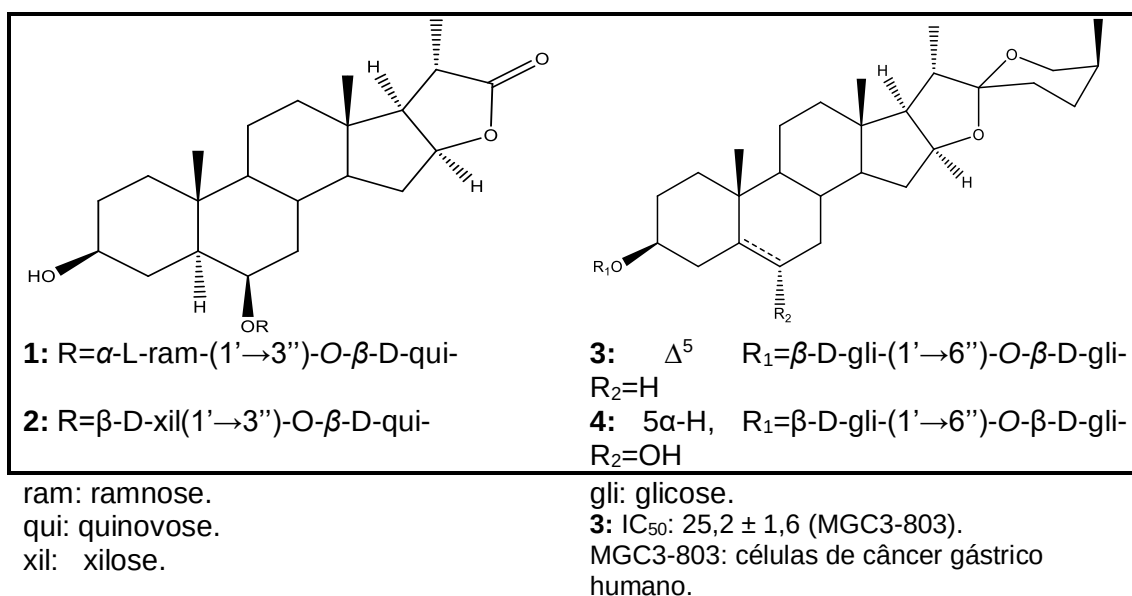
O gênero *Solanum* é um dos mais importantes e complexos dentro da família Solanaceae (PEREIRA et al., 2016), estando entre os mais numerosos do mundo em número de espécies (cerca de 1500 espécies). Além das espécies cultivadas, são relatadas cerca de 200 espécies selvagens, algumas nativas do Brasil. Essas espécies selvagens também apresentam relevância comercial na medida em que podem constituir plantas invasoras ou apresentar potencial medicinal (SILVA et al., 2003)

Estas espécies fazem parte dos sistemas ecológicos pertencentes às regiões tropicais e subtropicais e têm na América do Sul seu centro de diversidade e distribuição (NEE, 1999).

Muitas destas espécies são utilizadas na medicina popular brasileira (AGRA; BHATTACHARYYA, 1999), devido às propriedades biológicas mostradas por várias espécies do gênero, como a atividade antioxidante (*S. tuberosum* e *S. lyratum*), proteção contra as úlceras gástricas (*S. nigrum*), atividade antineoplásica (*S. nigrum*, *S. lyratum*, *S. dulcamara*, *S. capsicastrum*, *S. trilobatum*, *S. indicum*) (AMIR, KUMAR, 2006). As plantas do gênero *Solanum* têm a capacidade de biossintetizar esteroides, alcaloides, livres ou na forma de heterosídeos, saponinas, flavonoides glicosilados, assim como outros metabólitos secundários estruturalmente diversificados e complexos, (IKEDA et al., 2003).

Estudos fitoquímicos preliminares das folhas de espécies pertencentes ao gênero *Solanum* forneceram substâncias do tipo saponinas esteroidais (LI et al., 2014) e alcaloidais com atividade citotóxica (ARTHAN et al., 2002), antiviral (NOHARA, 2004), anti-inflamatória (EMMANUEL et al., 2007) e antifúngica (ROWAN et al., 1983). As substâncias isoladas das folhas de *Solanum torvum* com atividade citotóxica (LU et al., 2009) são mostradas na Figura 1.

Figura 1. Substâncias isoladas das folhas de *Solanum torvum*.

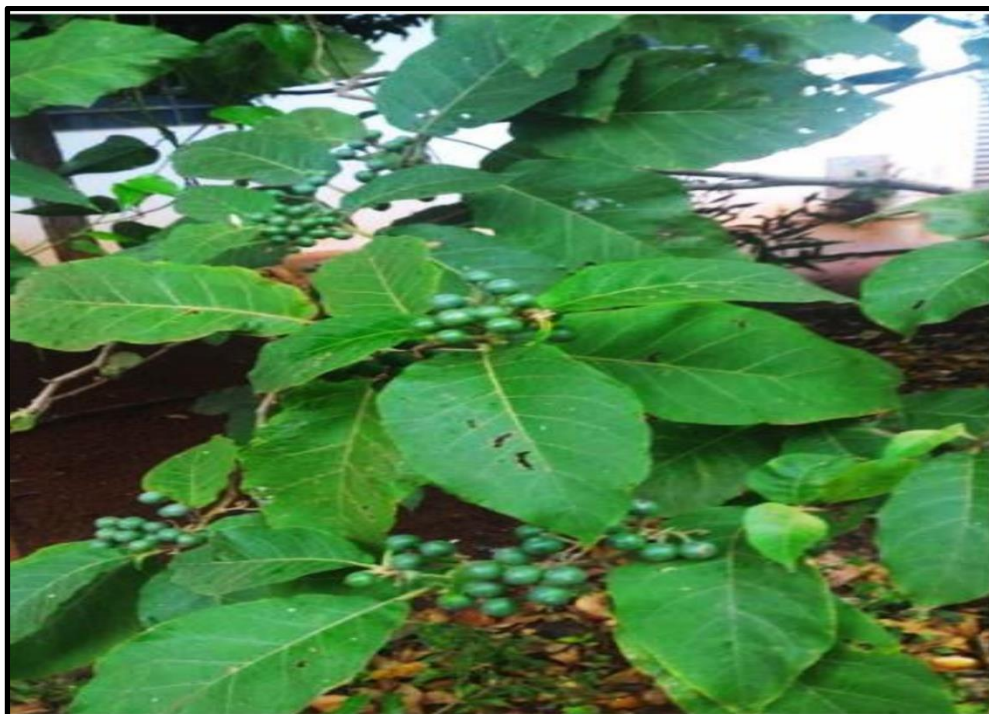


Estas descobertas sugerem que o estudo fitoquímico de algumas destas espécies possam levar a descobertas de novas substâncias com potencial farmacológico para uso da população.

1.3 *Solanum paniculatum* L.

Solanum paniculatum L. (Figura 2) conhecida popularmente como “jurubeba” (LORENZI e MATOS, 2002) é uma planta medicinal de sabor amargo usada em todo o Brasil como tônico e aperitivo há várias décadas. A espécie é a única do gênero *Solanum* que está na relação de plantas do Sistema Único de Saúde (SUS) para o desenvolvimento de fitoterápicos pela farmacopeia Brasileira (FARMACOPÉIA, 1988).

Figura 2. Espécie de *Solanum paniculatum* L. (jurubeba).



Fonte: Imagem fornecida pelo autor.

Esta espécie é muito conhecida pela população brasileira e destaca-se pelos seus diferentes usos medicinais (MIRANDA et al, 2013) e por sua ampla distribuição.

Nativa do Brasil, a espécie é encontrada nas regiões: Norte (Pará), Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe), Centro-oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo), Sul (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina) (MINISTÉRIO DE SAÚDE, ANVISA, 2012).

Solanum paniculatum L. é muito utilizada pela população para o tratamento de algumas doenças, sendo as raízes indicadas no tratamento de anemias, desordens hepáticas e digestivas e também são usadas no tratamento da artrite (VIEIRA JÚNIOR et al., 2015).

Por outro lado, as folhas são usadas na medicina popular para o tratamento de afecções como: distúrbios gástricos (fala de apetite, flatulência e azia), cicatrizante, diurético, tônico, tratamento da anemia, artrite, febrífugo, bronquite e tosse, e nos distúrbios hepáticos (hepatites e icterícia) (NURIT-SILVA et al., 2012).

O estudo fitoquímico prévio realizado a partir do extrato etanol 70% dos ramos de *S. paniculatum* mostrou a presença de várias saponinas esteroidais e o ácido caféico, enquanto que do extrato etanol 70% das folhas foram isoladas várias saponinas esteroidais, a rutina, assim como uma mistura de flavonoides rutina e quercetina (VIEIRA JÚNIOR et al., 2015).

Nosso grupo de pesquisa, dentro do Programa Biota-Fapesp (número processo: 2009/52237-9, coordenado pelo Prof. Wagner Vilegas) realizou alguns estudos com o extrato etanol 70 % das folhas, frutos e ramos de *S. paniculatum*, onde foram identificadas as substâncias (22*R*, 23*S*, 25*R*)-3 β ,6 α ,23-triidroxi-5 α -espirostano-6-*O*- β -D-xilopiranosil-(1'''' $\rightarrow$ 3''')-*O*-[β -D-quinovopiranosil(1''' $\rightarrow$ 2')]-*O*-[α -L-ramnopiranosil(1''' $\rightarrow$ 3')]-*O*- β -D-quinovopiranoside e a yamogenina-3-*O*- β -D-glucopiranosil(1'' $\rightarrow$ 6')-*O*- β -D-glucopiranoside (VIEIRA JÚNIOR et al., 2015).

Algumas das substâncias que foram previamente isoladas do extrato etanol 70 % das folhas de *S. paniculatum*, estão sendo apresentadas na Figura 3.

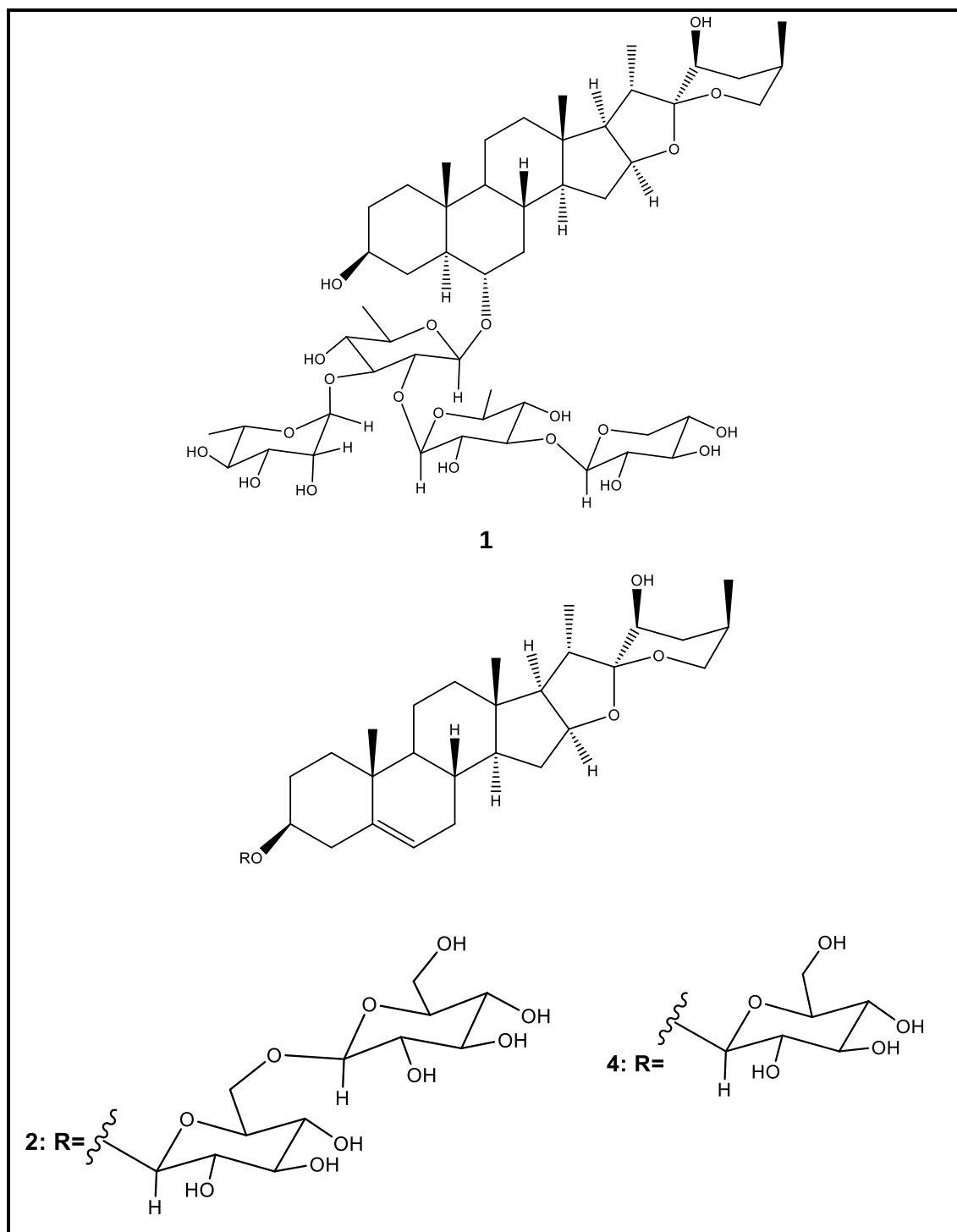
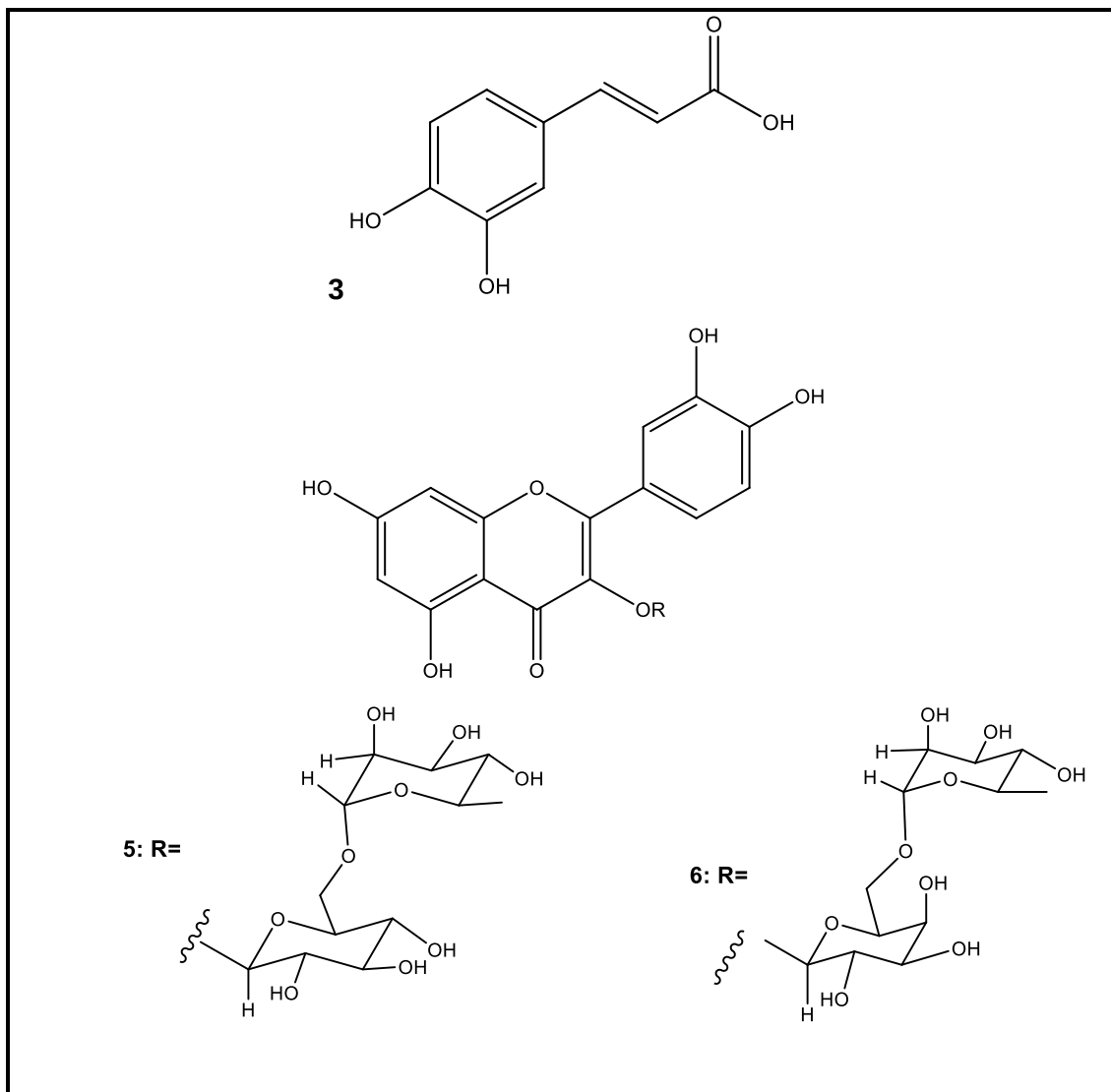
Figura 3. Substâncias isoladas das folhas, frutos e ramos de *S. paniculatum*.

Figura 3. Continuação.

Quanto às atividades biológicas, os resultados farmacológicos obtidos até o presente apontam para uma importante ação farmacológica desta espécie como analgésica, antinociceptiva e antiulcerogênica (VIEIRA JÚNIOR et al., 2015).

Considerando-se, portanto, que esta espécie possui um potencial químico e farmacológico ainda a ser investigado, neste projeto estudamos o extrato etanol 70% das folhas de *S. paniculatum*, com a finalidade de isolar e identificar os metabólitos ainda não conhecidos na espécie. Também foi realizada a quantificação dos marcadores químicos no extrato etanol 70%, assim como os testes de atividades biológicas que ainda não tinham sido realizados

até o momento para a espécie *S. paniculatum*.

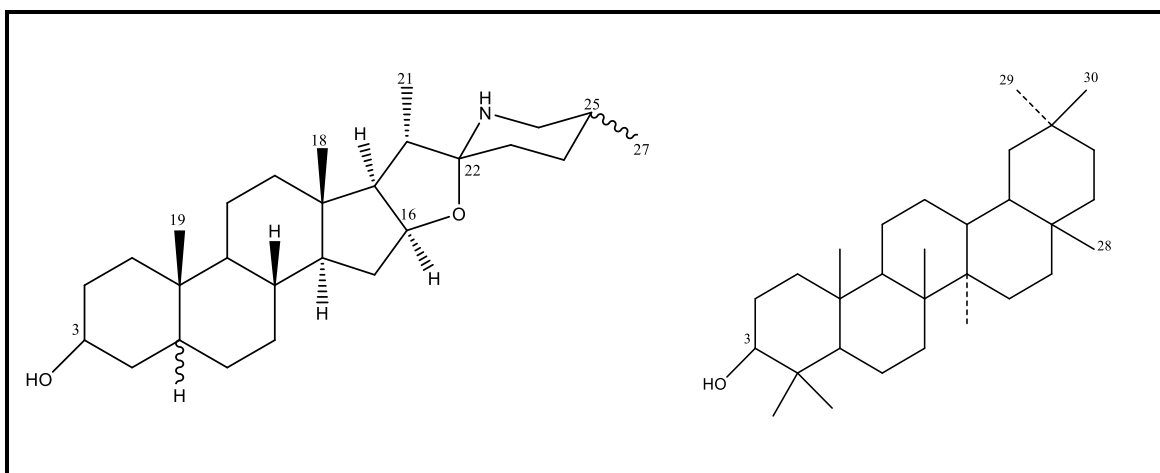
1.4 Saponinas esteroidais.

As saponinas constituem uma grande classe de substâncias que apresentam na sua estrutura ao menos um glicosídeo. Muitas saponinas possuem propriedades detergentes, devido a diminuírem a tensão superficial de soluções aquosas e, portanto, fornecem espumas estáveis quando em contato com a água. Essas atividades provêm do fato de apresentarem em sua estrutura uma parte lipofílica denominada aglicona ou sapogenina e uma parte hidrofílica constituído por um ou mais açúcares (SCHENKEL et al., 2001).

A espuma formada é estável à ação de ácidos minerais diluídos, diferenciando-se dos sabões comuns. De fato, o nome “saponina” deriva da palavra latina *sapo* (sabão). Sabe-se também que as saponinas causam hemólise (lise dos eritrócitos com a liberação de hemoglobina), têm um sabor amargo e são tóxicas para os peixes. Embora esses atributos não sejam comuns a todas as saponinas conhecidas, às vezes são usados para caracterizar e identificar essa classe de substâncias (HOTTESTMANN, MARSTON, 2005).

As saponinas esteroidais apresentam uma ampla diversidade estrutural e pesquisadores têm demonstrado um grande interesse no seu isolamento e caracterização a partir de extratos vegetais devido ao seu grande e diverso potencial farmacológico (HOTTESTMANN, MARSTON, 2005).

Dependendo da aglicona, as sapogeninas podem ser classificadas em: sapogeninas esteroidais (C_{27}), sapogeninas alcaloidais (C_{27}) (Figura 4), sapogeninas triterpénicas (C_{30}) (Figura 5).

Figura 4. Sapogenina alcaloidal.**Figura 5.** Sapogenina triterpénica.

Neste sentido, as sapogeninas esteroidais são divididas em 3 grupos principais: sapogeninas espiroestânicas ou espirostanos (Figura 6), sapogeninas furoestânicas (Figura 7) e sapogeninas furoespiroestânicas (Figura 8).

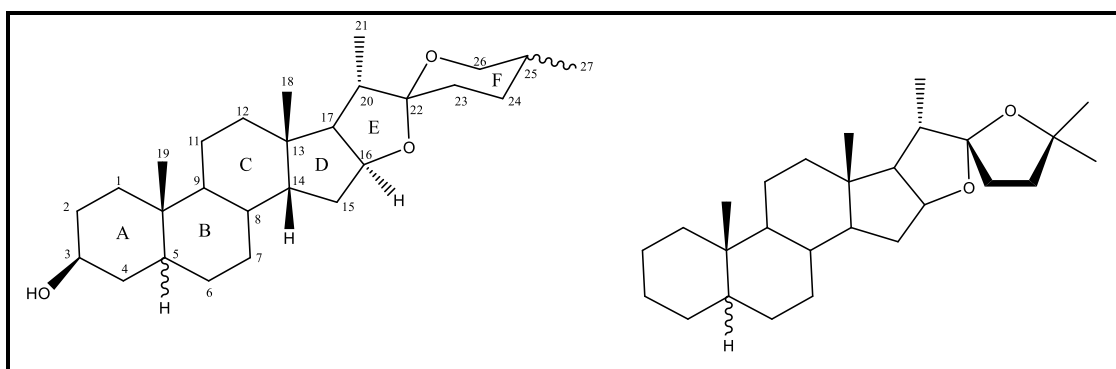
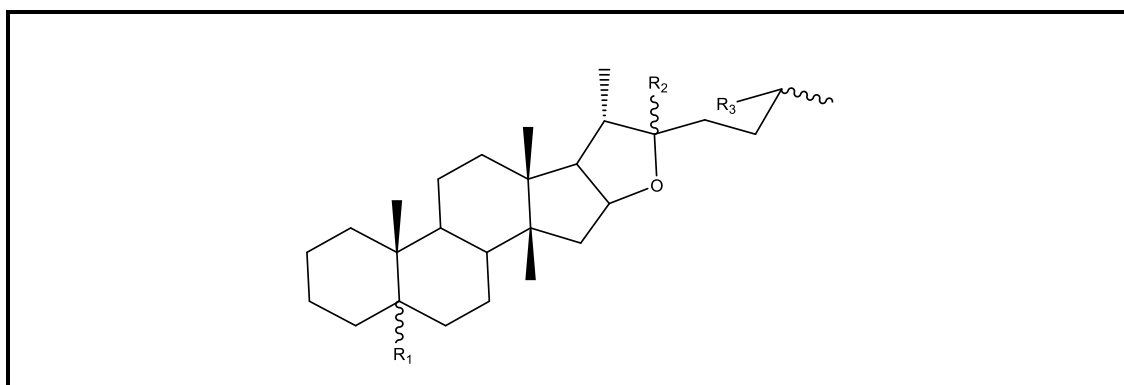
Figura 6. Sapogenina espiroestânica.**Figura 7.** Sapogenina furoestânica.

Figura 8. Sapogenina furoespiroestânica.

Os espirostanos (Figura 6) representam o maior subgrupo dentro das sapogeninas esteroidais e possuem o núcleo base ciclopentanoperidrofenantreno presente no androstano e colestano (AGRAWAL et al., 2003). No entanto, no caso das sapogeninas esteroidais, existem mais dois anéis heterocíclicos (E, F) ligados entre si por um carbono espiroacetálico (C-22). A maioria das sapogeninas espiroacetálicas que ocorrem na natureza possuem uma configuração *R* em C-22. Por outro lado, a metila CH₃-21 possui a orientação α e portanto uma configuração *S* em torno do carbono C-20 (AGRAWAL et al., 2003).

A junção entre os anéis AB pode ser *cis* ou *trans*, sendo a mais comum a junção *trans* e a metila CH₃-19 apresentará uma orientação β . Por outro lado, a junção dos anéis BC e CD na aglicona é *trans*, enquanto que a junção dos anéis DE sempre é *cis* (AGRAWAL et al., 2003).

Os espirostanos diferem também na configuração da metila CH₃-27 pertencente ao anel F. Se a orientação desta metila for em *axial*, a configuração em C-25 será *S*. No entanto, se a sua orientação for em *equatorial*, a configuração em C-25 será *R*. (AGRAWAL et al., 2003).

1.5 Biossíntese de saponinas esteroidais.

A biossíntese das saponinas esteroidais acontece pela rota do mevalonato, tendo como precursor o colesterol. Neste sentido, a função espiroacetálica da saponina é derivada da cadeia lateral do colesterol, pelas sucessivas reações de oxidação nas posições 16, 22 e 26, respectivamente,

sendo hidroxiladas assim as posições 16 e 26. No entanto, a posição 22 é oxidada até carbonila (Figura 9). Estas modificações permitem a formação do anel espiroacetálico pelo ataque nucleofílico da hidroxila da posição 16 à carbonila C-22, formando o hemiacetal. Posteriormente, a assistência do par de elétrons do oxigênio permite a saída da hidroxila (H_2O) da posição 22 (no meio ácido) formando uma dupla ligação. Finalmente, o grupo hidroxila da posição 26 faz um ataque nucleofílico na posição C-22 (deficiente em elétrons) permitindo assim a formação do anel F da saponina esteroideal.

É muito interessante observar as diferentes configurações do estereocentro C-25 (*R* ou *S*). Neste sentido, as possíveis estereoquímicas são formadas pelo fato das posições 26 ou 27 serem hidroxilas indistintamente na primeira etapa da reação (DEWICK, 2002).

O conjunto de reações que acontecem na rota biosintética das saponinas esteroidais é apresentado na Figura 9.

Figura 9. Biossíntese de saponinas esteroidais.

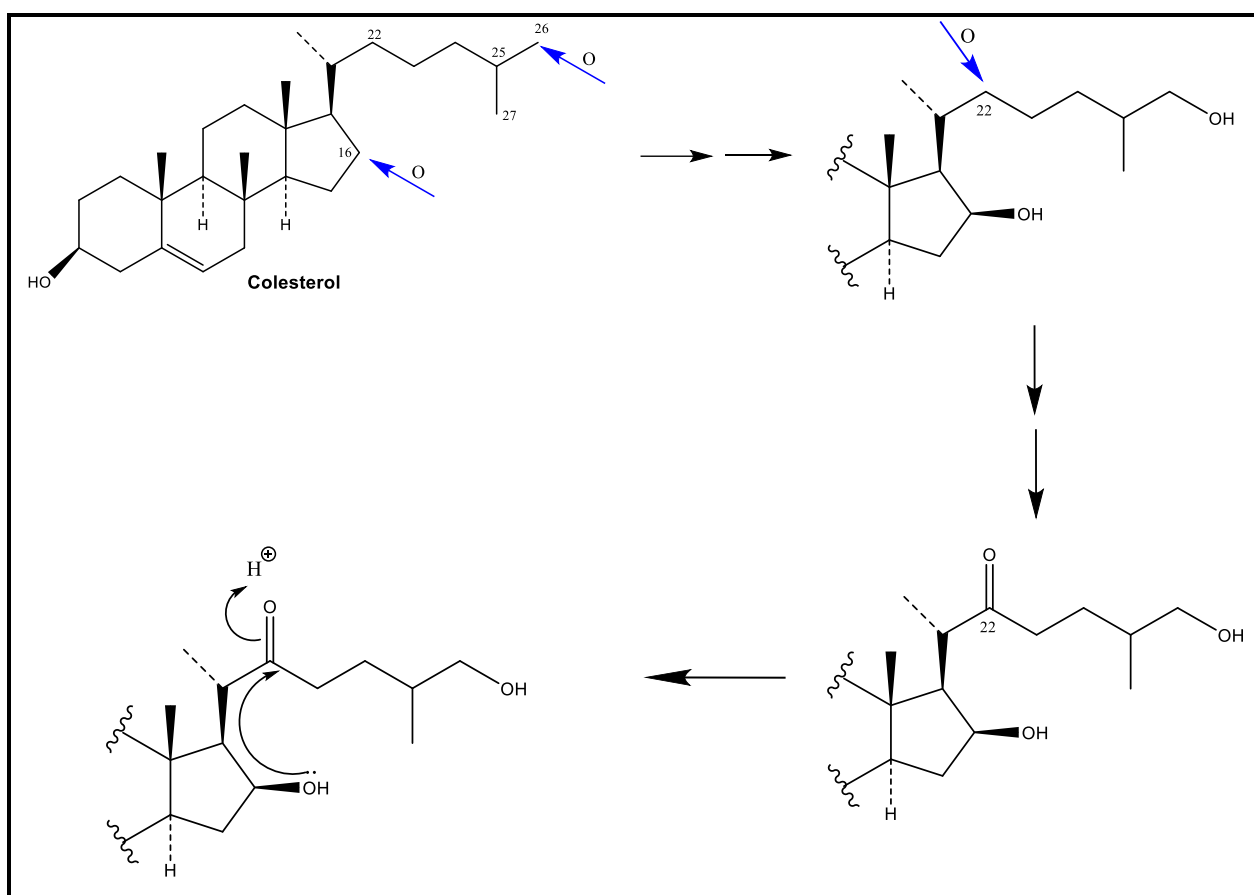
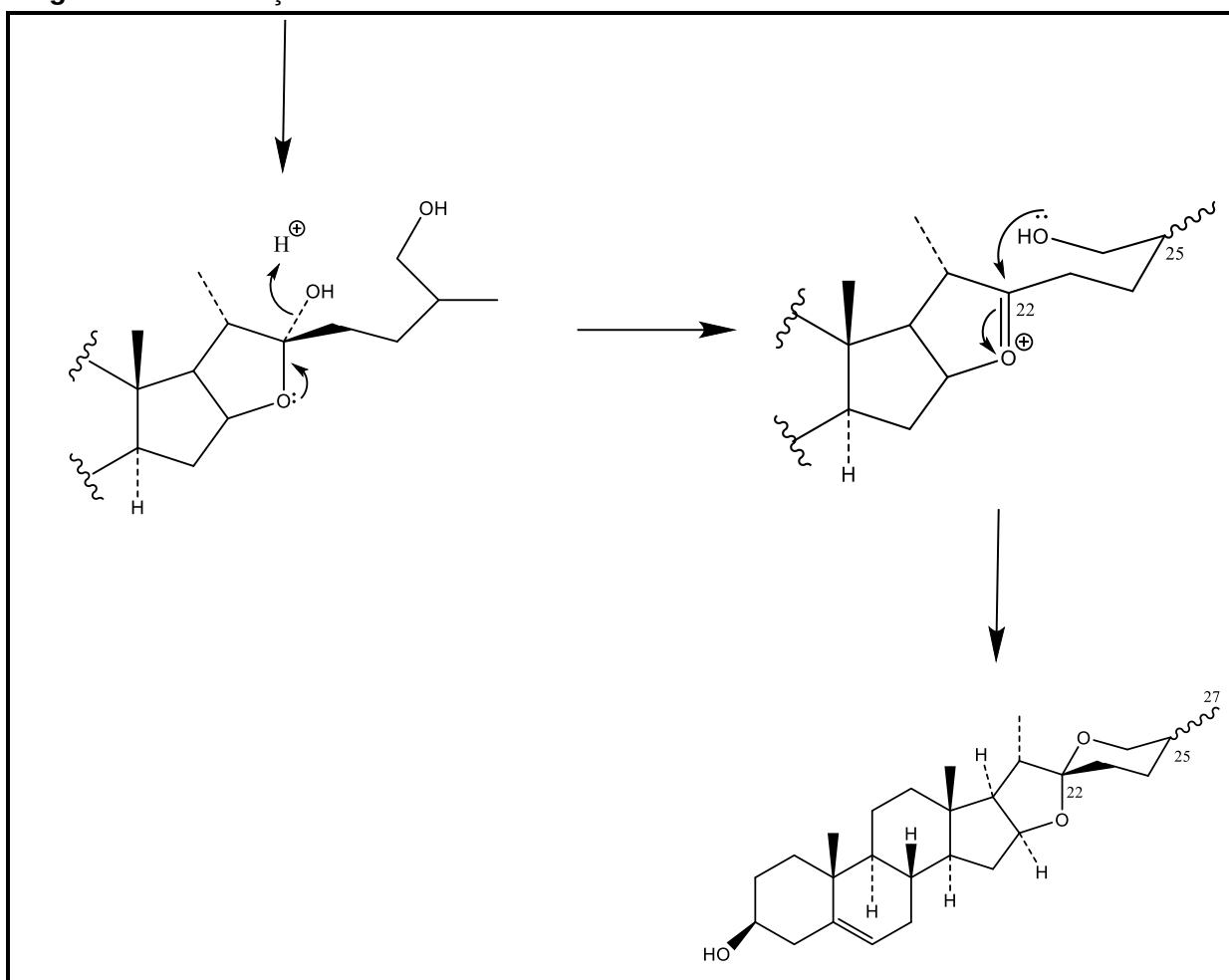


Figura 9. Continuação

Adaptado: DEWICK, 2002

1.6 Quantificação de saponinas esteroidais.

As plantas representam uma fonte de substâncias ativas para diversas áreas de interesse. A obtenção do perfil químico de extratos brutos não é uma tarefa fácil de ser estudada em razão da diversidade de classes de substâncias presente nas plantas. No entanto, o avanço tecnológico de técnicas analíticas, proporciona um papel importante no estudo das composições químicas complexas, com altos níveis de sensibilidade e seletividade (NICULAU et. al., 2016).

É muito importante ressaltar que as saponinas apresentam pouquíssimos grupos cromóforos e, portanto, são detectadas no detector UV em curtos comprimentos de onda (200-210 nm), o que torna muitas vezes a detecção muito difícil por cromatografia líquida acoplada ao detector ultravioleta

(CLAE-DAD), principalmente quando é necessário que a detecção seja em pequenas quantidades. Por esse motivo, o espectrômetro de massas é o principal equipamento para as análises cromatográficas quantitativas para este tipo de substâncias.

Para a quantificação de saponinas esteroidais usando a cromatografia líquida acoplada a massas (UPLC-ESI-IT-MS), existem dois modos de detecção e identificação, conhecidos como monitoramento de reações múltiplas (MRM) e o monitoramento de íon selecionado (SIM) (NICULAU et. al., 2016).

Modo MRM: Dois estágios de filtragem de massas são empregados. No primeiro estágio, um íon de interesse (o precursor) é pré-selecionado e induzido a fragmentar. No segundo estágio, em vez de obter varredura completa m/z onde todos os possíveis íons de fragmento derivados do precursor são analisados em massa, apenas são analisados um número pequeno de íons de um fragmento específico de sequência (íons de transição).

Modo SIM: Os íons de interesse são previamente selecionados pelo operador conforme sua relação m/z e tempo de retenção, a fim de analisar apenas o que lhe interessa e tornar a precisão da espectrometria ainda maior. Quando a análise é feita pelo modo de varredura SIM, é possível identificar íons específicos conforme o tempo. Para isso ser feito, é necessário dizermos quais íons serão considerados, e em qual período da análise.

FOUBERT e colaboradores (2010) relataram a quantificação de 14 maesasaponinas (saponinas triterpênicas) na planta medicinal *Maesa lanceolata* por UPLC-MS. As saponinas foram quantificadas no modo positivo utilizando experimento de monitoramento de íon selecionado (SIM). A quantificação das 14 saponinas foi realizada obtendo-se bons resultados de linearidade ($r^2 > 0,99$), precisão intra- e inter-dia e recuperação.

Considerando que na espécie *S. paniculatum* existem saponinas de difícil detecção quando analisadas por CLAE-DAD, a técnica UPLC-MS com modo de detecção SIM torna-se uma ferramenta indispensável para a quantificação destas substâncias no extrato analisado.

2 OBJETIVOS.

2.1 Objetivo geral:

Investigar quimicamente o extrato etanol 70% das folhas da espécie *S. paniculatum*, a fim de obter frações e substâncias isoladas, para possíveis aplicações no desenvolvimento de fitoterápicos para o tratamento de doenças crônicas. Este foi um dos principais objetivos inseridos na realização do Projeto Biota-Fapesp No. 2009/52237-9 já finalizado.

2.2 Objetivos específicos:

A partir do extrato etanol 70% das folhas de *S. paniculatum*:

- Realizar o perfil cromatográfico do extrato e frações por CLAE-DAD;
- Fracionar o extrato etanol 70%, por técnicas cromatográficas convencionais até o isolamento dos metabólitos secundários;
- Elucidar ou determinar as estruturas das substâncias isoladas por técnicas espectrométricas e espectroscópicas (RMN uni e bidimensionais, UV, EM) dos metabólitos secundários isolados;
- Quantificar as principais substâncias isoladas por UPLC-ESI-MS;
- Realizar o ensaio de atividade antitumoral do extrato etanol 70 % das folhas de *S. paniculatum*;
- Realizar o ensaio de viabilidade de células normais do extrato etanol 70 % e das frações enriquecidas das folhas de *S. paniculatum*;
- Realizar o ensaio de atividade antimicrobiano do extrato etanol 70 % e das frações enriquecidas das folhas de *S. paniculatum*;
- Realizar o ensaio de atividade leishmanicida (*Leishmania amazonensis*) do extrato etanol 70 % e das frações enriquecidas das folhas de *S. paniculatum*;
- Realizar o ensaio de atividade esquistossomicida (*Schistosoma mansoni*) do extrato etanol 70 % e das frações enriquecidas das folhas de *S. paniculatum*.

3 PARTE EXPERIMENTAL.

3.1 Materiais, reagentes e soluções.

Os procedimentos experimentais foram realizados utilizando solventes grau PA, *n*-butanol, etanol, clorofórmio, metanol (Synthlab); para as análises em CLAE foram utilizados solventes grau CLAE: metanol (Tedia) e água Milli-Q (Millipore®); para as análises em espectrômetro de massas foi utilizado metanol (Merck) grau LC/MS, e para a análise em RMN das substâncias isoladas nos procedimentos cromatográficos foi utilizado como solvente CD₃OD (Aldrich).

Cartuchos de extração em fase sólida (SPE) de fase reversa a base de octadecilsilano C₁₈ com 500 mg/mL (33 µm, Supelco®) foram usados na etapa de limpeza dos extratos e frações, sendo as soluções resultantes filtradas em membranas de PTFE (politetrafluoroetileno, teflon®, Millipore®) com poro de 0,45 µm.

Foram utilizadas placas de camada delgada de sílica gel 60 em suporte de alumínio (Merck®) (20 x 20 cm x 0,2 mm) na triagem fitoquímica dos extratos e frações, a eluição foi realizada em cuba saturada com os sistemas de solventes: CHCl₃/MeOH/H₂O (43:37:20, v/v/v, fase orgânica) e BAW *n*-butanol/ácido acético/água (65:25:15, v/v/v). A revelação das placas foi feita com luz UV (Câmara com luz UV 254/356 nm – Chromatovue®) e anisaldeído/H₂SO₄, com posterior aquecimento no forno a 120 °C nesta ordem. Outros reveladores como o iodo, NP-PEG (Produto Natural-difenilborato de aminoetanol/polietilenglicol) e Dragendorff (WAGNER et al., 1984) também foram utilizados.

3.2 Procedimentos gerais instrumentais.

Os extratos e frações foram concentrados em um rotaevaporador rotativo sob pressão reduzida (Heidolph®, Laborota 4001 – efficient) equipado com bomba a vácuo (Heidolph®, Rotavac valve control) em temperatura menor que 40 °C.

A concentração do extrato aquoso foi realizada no liofilizador modelo Savant. As balanças analíticas Bioprecisa® FA2104N (capacidade 200 g e precisão de 0,1 mg) e Shimadzu® modelo AY-220 (capacidade para 220 g e

precisão de 0,0001 mg) foram usadas na pesagem das folhas, dos extratos e frações, respectivamente.

O fracionamento dos extratos etanol 70% e *n*-butanol por cromatografia por permeação em gel foi realizado em coluna de vidro com 80 cm de altura por 2 cm de diâmetro interno, empacotada com Sephadex® LH-20 (Pharmacia). O solvente foi bombeado para a coluna com o auxílio de uma bomba peristáltica (Pharmacia) a uma vazão de 3,0 mL/min. As frações (5 mL) foram coletadas com um coletor automático Redifrac (Pharmacia).

A Cromatografia em Camada Delgada (CCD) foi utilizada para as análises do perfil cromatográfico das frações obtidas a partir do fracionamento do o extrato etanol 70 % e o extrato *n*-butanol na coluna de Sephadex LH-20.

A revelação das placas cromatográficas foi realizada na estufa Marconi® a 110 °C.

As análises cromatográficas foram realizadas em um CLAE analítico modelo PU-2089 (Jasco®), acoplado a um detector de arranjo de foto diodos (DAD), modelo MD-2018 (Jasco®) e a um injetor automático modelo AS-2055 (Jasco®), com uma bomba quaternária modelo PU-2089s Plus e forno de coluna CO-2065 Plus.

Em modo analítico foi usada uma coluna de fase reversa C₁₈, modelo Thermo Hypersil Gold de 250 x 4,6 mm d.i, com partículas de tamanho médio de 5 µm, com coluna de guarda da Thermo de 4 x 3 mm.

Para a purificação da fração **R** obtida a partir do fracionamento do extrato etanol 70% em Sephadex LH-20, foi utilizado o CLAE Preparativo modelo LC 2086 Plus Jasco® NET II/ADC, acoplado a um detector DAD, modelo MD-2010 Jasco® plus multiwavelength, com faixa de varredura de 195-650 nm e intervalo mínimo de 1 nm (Jasco®), com uma bomba modelo Jasco® plus 2086 Intelligent Preparative Pump, misturador modelo Jasco® Mx-2086-32 Dynamic mixer. A coluna utilizada foi a Hypersil Gold C₁₈ Thermo 5µ, 250 x 30 mm e a corrida cromatográfica foi realizada no modo isocrático utilizando MeOH: H₂O 35% em 25 min.

Para a obtenção dos cromatogramas das substâncias puras obtidas a partir do fracionamento da fração **R**, isolados no CLAE acoplado a detector DAD Preparativo foi utilizado o CLAE analítico descrito previamente.

O software ChromNav 1.18.03 (Jasco) foi utilizado para controle, coleta e processamento dos dados.

As análises cromatográficas da fração **f'26** obtida a partir do fracionamento do extrato *n*-butanol em Sephadex LH-20, foi utilizado um CLAE com detector de índice de refração (IR) modelo Knauer–Azura, com detector smartline 2300, com duas bombas modelos Pump 1 ASM 2.1L Knauer (10 mL/min) e Pump 2P 6.1 L Knauer (50 mL/min), sendo a capacidade do loop de 100 µL.

No modo analítico foi utilizada uma coluna de fase reversa C₁₈ Hydro RP synergji 4µ, 80 Å, 250 x 4,6 mm, sendo o fluxo de 1 mL/min, enquanto no modo semi-preparativo foi utilizada uma coluna de fase reversa Hydro RP synergji, 80Å 4µ 250mm x 10 mm, sendo o fluxo utilizado de 2mL/min. O sistema de solvente utilizado nas eluições cromatográficas foi MeOH:H₂O (7:3, v/v) (modo isocrático).

As análises de RMN unidimensional: ¹H, ¹³C, DEPT-135, TOCSY-1D, NOESY-1D e bidimensional: ¹H-¹H-COSY, HSQC, HMBC, foram realizadas em espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker® Avance III HD 600 (14,1 Tesla) com sonda criogênica de 5 mm, com detecção inversa de três canais (¹H, ¹³C e ¹⁵N) um gradiente z, além da sintonia automática via ATM (*Automatic Tunning and Matching*) e trocador automático de amostra (*Sample Express*). As substâncias isoladas foram solubilizadas em metanol deuterado (Aldrich)).

O software Top Spin versão 3.5 foi utilizado na aquisição dos espectro.

Os espectros de massas das substâncias puras foram registrados no modo positivo em um espectrômetro de massas modelo Bruker Maxis Impact equipado com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI) e analisador tempo de voo (time of flight) (QqTOF) (configuração ESI-QqTOF-MS).

A determinação da configuração absoluta dos monossacarídeos foi realizada por meio da cromatografia gasosa acoplada a massas (CG/MS) sob as seguintes condições experimentais:

- Cromatógrafo gasoso modelo Agilent 7890B acoplado a um detector de massas 5977A, sendo a temperatura da detecção 220 °C.
- Coluna capilar HP-5MS (50 x 0,25, 0,25 µm).
- Temperatura da coluna: 150-260 °C (8 °C/min).

- Gás: Hélio (0,8 mL/min).
- Temperatura de injeção: 250 °C.
- Volume de injeção: 0,5 µL.

A determinação do teor das saponinas isoladas foi realizada no Laboratório do Instituto de Biociências, Campus do Litoral Paulista de São Vicente - UNESP coordenado pelo Prof. Dr. Wagner Vilegas. Os experimentos foram realizados em parceria com a doutoranda Ana C. Zanatta.

As análises por UPLC-ESI-IT-MS foram realizadas num equipamento de cromatografia líquida de ultra eficiência modelo Thermo Scientific®, consistindo num injetor automático (Accela AS), uma bomba quaternária (Accela 600) acoplada a um espectrômetro de massas LTQ XL equipado com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI) (Thermo, San Jose, CA, EUA) e analisador íon-trap (IT). As otimizações das condições cromatográficas para o extrato foram realizadas numa coluna ACQUITY UPLC BEH (C₁₈ 50 x 2,1 mm, 1,7 µm), à temperatura ambiente.

O método otimizado para o extrato consistiu no programa de gradiente linear 5-100% no eluente B (MeOH) em 18 min. O volume de injeção utilizado para cada amostra foi de 10 µL e a vazão de 0,300 mLmin⁻¹. Depois de manter 100% de B durante 5 min, a coluna foi recondicionada à condição inicial para as análises realizadas em sequência.

As condições selecionadas que permitiram uma melhor ionização das saponinas (tune) foram: tubo capilar de sílica fundida a 350 °C, voltagem de pulverização de 5,98 kV, voltagem do capilar de -45.1 V, voltagem da lente de -100 V e uma vazão de 5,0 µL min⁻¹.

Os espectros de massas foram adquiridos no modo negativo e processados no *software* Xcalibur (versão 2.0).

3.3 Metodologia.

3.3.1 Etapa Botânica.

As folhas de *Solanum paniculatum* L. foram coletadas no dia 20 de fevereiro de 2015, no horto de Plantas Medicinais e Tóxicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, situado nas coordenadas geográficas 21°48'52.44"S e 48°12'07.13"O, UNESP de Araraquara, e identificadas pelo Prof. Dr. Luiz Vitor Sacramento. Uma exsicata (HRCB 60754) foi depositada no Herbário na UNESP do Instituto de Biociências do Rio Claro.

3.3.2 Etapa Farmacognóstica.

a) Secagem.

O material botânico coletado e identificado foi seco em estufa em ar circulante a 40°C.

b) Moagem

O material botânico foi finamente fracionado em moinho de facas com rotor vertical MAO 90 CF a fim de se facilitar a extração de seus constituintes químicos na etapa seguinte.

3.3.3 Etapa Química.

3.3.3.1 Extração.

O pó obtido na moagem foi extraído com etanol 70% por meio da percolação exaustiva.

Uma quantidade fixa do pó (250 g) foi intumescida com quantidade fixa do solvente extrator (etanol 1,5 L) durante 6 horas. Em seguida, o percolador foi empacotado homogeneamente com a mistura pó + etanol (EtOH:H₂O, 7:3 v/v) e o efluente foi coletado na vazão de 1,0-2,0 mL/min/Kg. Sendo utilizado um volume total de 7 L de solvente EtOH:H₂O, 7:3 v/v durante a percolação.

Foi padronizado o procedimento operacional da percolação para a etapa

de obtenção de extratos mantendo constante a razão droga vegetal: solvente extrator.

Após a extração, o líquido extrator foi rotoevaporador sob pressão reduzida em evaporador rotativo em temperatura inferior a 40°C. O extrato foi transferido para vidro tarado e deixado em capela até completa eliminação do solvente.

3.3.3.2 Etapa cromatográfica.

a) Otimização do extrato etanol 70 % das folhas de *S. paniculatum*.

As análises cromatográficas para a otimização do cromatograma do extrato etanol 70 %, foram realizadas em CLAE-DAD (descrito na sessão 3.2) em modo analítico.

Inicialmente, foi obtido o cromatograma do extrato etanol 70% de folhas de *S. paniculatum* utilizando-se um gradiente exploratório, onde a concentração de MeOH (solvente B) em H₂O (solvente A) variou de 5 a 100 % (v/v) em 60 minutos.

Várias condições foram avaliadas para a obtenção da melhor separação dos picos majoritários, sendo escolhida a condição no modo gradiente MeOH:H₂O (5:75 v/v) em 45 min. A fase móvel utilizada foi acidificada com 0,1 % de ácido trifluoracético (TFA), sendo que as otimizações cromatográficas decorreram de acordo com a resolução dos picos cromatográficos, sendo necessárias modificações na proporção da fase móvel e no tempo de análise.

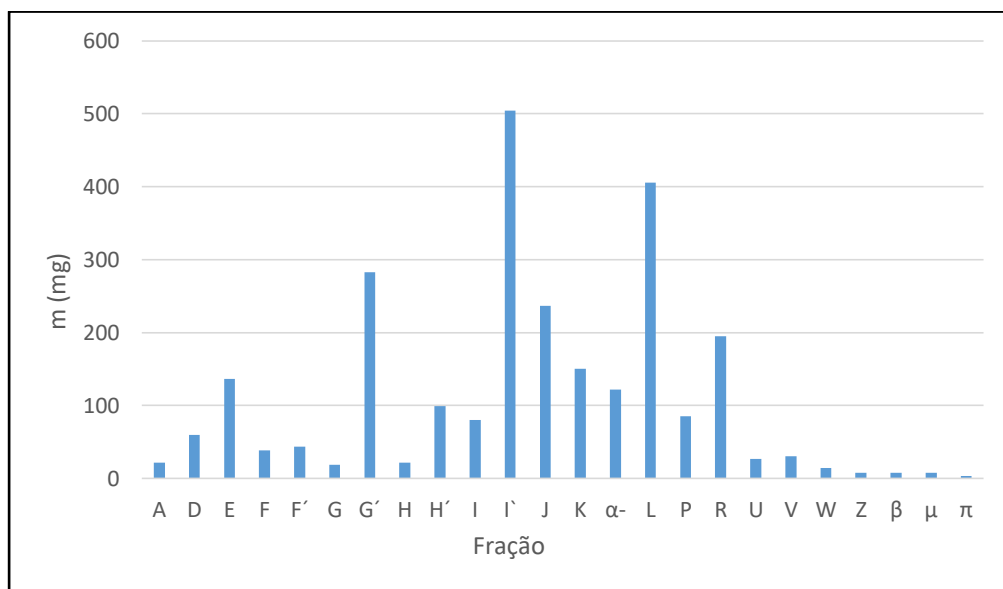
b) Fracionamento em Sephadex LH-20 do extrato etanol 70 %.

Para o fracionamento do extrato etanol 70 %, primeiramente 3 g do extrato foram dissolvidos em MeOH:H₂O em proporção 7:3 (v/v). A mistura foi inicialmente homogeneizada em vórtex e posteriormente colocada no ultrassom por 3 min até completa dissolução, e em seguida a solução foi centrifugada para eliminação de partículas.

O sobrenadante foi aplicado no topo de uma coluna (85 x 2,5 cm) contendo resina Sephadex LH-20. As frações com aproximadamente 5 mL foram recolhidas em coletor automático Redifrac (Pharmacia Biotech), vazão de 3 mL/min e eluídas em MeOH:H₂O, (7:3, v/v) sendo obtidas 174 frações as quais foram eluídas em MeOH:H₂O, (7:3, v/v), reveladas sob luz UV e com anisaldeído, o sistema de solvente utilizado na CCD foi BAW (*n*-butanol:ácido acético:água) 65:25:15 v/v/v.

Estas frações foram reunidas de acordo com os valores de R_f por CCD resultando em 24 frações. A figura 10 apresenta a distribuição das massas das frações após separação por permeação em gel em Sephadex LH-20 e agrupamentos por CCD do extrato.

Figura 10. Distribuição das massas das frações após separação por permeação em gel em Sephadex LH-20 e agrupamentos por CCD.



c) Otimização da fração **R** por CLAE-DAD analítico.

A fração **R** foi selecionada para análise no CLAE-DAD analítico devido ao perfil obtido a partir da cromatografia em camada delgada (CCD).

Foi registrado o cromatograma para a fração **R**, por CLAE-DAD analítico conforme descrito no item 3.2. A condição cromatográfica que permitiu uma

melhor resolução dos picos no cromatograma otimizado para a fração **R**, foi no modo isocrático 35% MeOH em 25min.

d) Purificação da fração **R** em CLAE-DAD Preparativo.

A fração **R** (150 mg), foi submetida ao procedimento de purificação por CLAE-DAD (Preparativo, modo isocrático) como descrito na seção 3.2. A amostra foi solubilizada na fase móvel H₂O:MeOH (1:1, v/v) (1,2 mL). Posteriormente esta solução foi filtrada em Millex (0,45 µm), obtendo-se assim uma concentração de 125 mg/mL.

A separação das substâncias foi realizada em uma coluna de fase reversa C₁₈ imobilizadas com octadecilsilano, modelo Thermo Hypersil Gold de 250 x 30 mm d.i, com partículas de tamanho médio de 5 µm. O volume injetado foi de 300 µL, e a vazão de 13,0 mL.min⁻¹. A fase móvel utilizada consistiu de água 65 % (eluente A) e metanol 35 % (eluente B) contendo 0,1 % de TFA. O método de eluição foi isocrático e o tempo da corrida foi de 25 min.

Este procedimento de separação forneceu 4 substâncias denominadas **9** (10,2 mg), **10** (5,1 mg), **11** (4,9 mg) e **12** (3,8 mg). As substâncias **9** e **10** foram elucidadas segundo a análise dos dados do experimento de RMN-¹H, assim como pela comparação com dados da Literatura, sendo que a substância **10** constituiu uma mistura de dois ácidos fenólicos (**10** + **10a**). As substâncias **11** e **12** resultaram em misturas complexas cujas estruturas estão sendo elucidadas estruturalmente.

e) Extração líquido-líquido.

Realizou-se a partição líquido-líquido do extrato etanol 70%, usando como solvente extrator *n*-butanol. Primeiramente o extrato etanol 70% (45 g) foi solubilizado em 2,25 L de água com ajuda do ultrassom modelo Unique. Na sequência, a fase *n*-butanol foi saturada com água em funil de separação. A partição foi realizada em funil de separação de 1L de capacidade dividido em 3 volumes de solvente extrator (*n*-butanol saturado em água, 0,75 L cada vez). O

extrato *n*-butanol obtido foi concentrado em evaporador rotativo, enquanto o extrato aquoso obtido foi liofilizado.

f) Obtenção dos perfis cromatográficos dos extratos *n*-butanol e aquoso.

As análises cromatográficas foram realizadas em um CLAE-DAD (descrito na sessão 3.2). Em modo analítico foi usada uma coluna de fase reversa C₁₈, modelo Thermo Hypersil Gold de 250 x 4,6 mm d.i, com partículas de tamanho médio de 5 µm. O volume de injeção foi de 10 µL, a vazão utilizada de 1 mL/min e a temperatura do forno ajustada para 25°C.

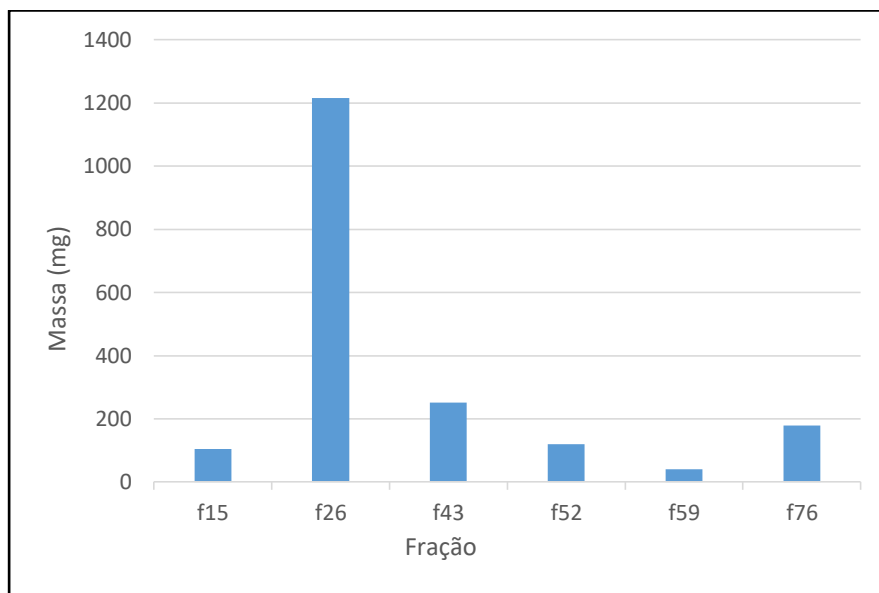
Os cromatogramas, tanto para o extrato *n*-butanol quanto para o extrato aquoso foram obtidos no modo gradiente, usando como fase móvel a mistura de solventes MeOH:H₂O [5:75 v/v, acidificada com 0,1% de ácido trifluoracético (TFA)] em 45 min.

g) Fracionamento em Sephadex LH-20 do extrato *n*-butanol.

O fracionamento do extrato *n*-butanol foi realizado em coluna (85 cm x 2,5 cm) contendo resina Sephadex LH-20 de acordo ao descrito na seção 3.3.3.2 b, sendo obtidas 120 frações, as quais foram eluídas em MeOH:H₂O, (7:3, v/v) e reveladas sob luz UV e com anisaldeído, o sistema de solvente utilizado na CCD foi BAW (*n*-butanol:ácido acético:água) 65:25:15 v/v/v.

Estas frações foram reunidas de acordo com os valores de R_f por CCD resultando em 6 frações. A figura 11 apresenta a distribuição das massas das frações após separação por permeação em gel em Sephadex LH-20 e agrupamentos por CCD do extrato *n*-butanol.

Figura 11. Distribuição das massas das frações após separação por permeação em gel em Sephadex LH-20 e agrupamentos por CCD do extrato n-butanol.



h) Análise e purificação da fração **f'26** em CLAE-IR.

A fração **f'26** foi analisada por CLAE-IR, no modo analítico, utilizando-se uma coluna de fase reversa C₁₈, Hydro RP synerg (4μ, 80Å, 250mm x 4,6 mm), com vazão de 1 mL/min.

Para a separação das substâncias, utilizou-se no modo semi-preparativo, uma coluna de fase reversa Hydro RP synerg, (80Å 4μ 250mm x 10 mm), com vazão de 2 mL/min. O fracionamento da fração **f'26** (250 mg) consistiu em solubilizar a fração em 2,5 mL da mistura de solvente MeOH:H₂O (7:3 v/v) e injetar em CLAE-IR (100 mg/mL), sendo o volume de injeção 100 μL.

Neste procedimento utilizou-se como fase móvel MeOH:H₂O (7:3 v/v) no modo isocrático. Esta separação cromatográfica rendeu 8 substâncias denominadas: **1** (13,6 mg), **2** (4,7 mg), **3**, (17,4 mg), **4** (3,4 mg), **5** (4 mg), **6** (3,1 mg), **7** (5,4 mg) e **8** (3,9 mg) as quais foram elucidadas estruturalmente usando as correspondentes técnicas espectroscópicas uni e bidimensionais assim como a espectrometria de massas.

3.3.3.3 Hidrólises ácida das saponinas. Determinação da configuração absoluta dos monossacarídeos.

Dois miligramas de cada saponina esteroidal (**1-8**) separadamente, foram solubilizadas em 5 mL de dioxano: H₂O 1:1 (v/v) (a água foi previamente acidificada com HCL 0,5 M). Depois disso, a mistura foi aquecida em banho de água (100°C) por 2h. A aglicona resultante desta reação foi separada por precipitação em gelo e filtrada.

A fase aquosa foi neutralizada com NH₄OH e concentrada usando evaporador rotativo, resultando assim a fração dos glicosídeos. Os monossacarídeos foram inicialmente analisados por CCD usando como sistema de solvente EtOAc – MeOH – H₂O – AcOH (11:2:2:2) e comparados com padrões (ZAMILPA et al., 1987).

Os valores de R_f obtidos para a D-quinovose, L-ramnose e D-xilose foram 0.65, 0.50 e 0.75 respectivamente no sistema de solvente usado.

Após isso, a fase aquosa resultante foi seca em liofilizador e o resíduo foi solubilizado em 2 mL de piridina. Em seguida, foram adicionados à solução 2 mL de cloridrato de L-cisteína-metil éster e a mistura foi aquecida a 60° C por 1 h. Passado esse tempo foram adicionados 0,5 mL de trimetilclorosilano e a solução foi aquecida a 60° C por 30 min. Imediatamente, a solução foi seca e dissolvida em 1 mL de água. Seguidamente, a solução foi extraída com *n*-hexano (1 mL x 3). Finalmente, o sobrenadante foi submetido a análise por CG/MS (HARA et al., 1987) (LU et al., 2009).

As configurações absolutas dos monossacarídeos foram confirmadas como D-quinovose, L-ramnose e D-xilose por comparação dos tempos de retenção dos derivados de monossacarídeos com os respectivos padrões: D-quinovose (12,51 min.), L-ramnose (12,67 min.) e D-xilose (11,89 min.), respectivamente .

3.3.3.4 Quantificação das saponinas isoladas.

A quantificação das saponinas no extrato etanol 70 % foi realizada a partir da preparação das soluções dos correspondentes padrões de saponinas (1-8) isolados a partir do extrato etanol 70 % das folhas de *S. paniculatum*.

Neste trabalho, a quantificação por UPLC-ESI-IT-MS foi feita pela construção de uma curva analítica baseada na variação de concentração de um padrão externo.

As soluções dos padrões foram utilizadas na construção de 8 curvas analíticas, que consistiram na preparação de diluições a partir de uma solução estoque de cada padrão $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, utilizando-se como eluente metanol.

Os resultados obtidos foram plotados em um gráfico onde são relacionadas as áreas dos picos de cada substância (saponina) obtida *versus* concentração. Cada nível de concentração foi analisado em triplicata. As áreas médias dos picos cromatográficos obtidos foram interpoladas em função da concentração utilizando regressão linear. O coeficiente de correlação (r^2), coeficientes lineares (**a**) e angulares (**b**) foram obtidos a partir das curvas de calibração de cada padrão.

O limite de detecção (**LD**) foi calculado utilizando a expressão a seguir: $LD = 3,3 \times DP_b/a$, no entanto, o limite de quantificação (**LQ**) foi calculado de acordo com a seguinte expressão $LQ = 10 DP_b/a$ onde **DP_b** é o desvio padrão da intersecção com o eixo Y e **a** representa o coeficiente angular da curva analítica (sensibilidade do aparelho) (MARCUCCI, 2011).

As injeções dos extratos foram feitas em 6 vezes, com intervalo de 24 horas entre cada uma para assim determinar a precisão do método analítico, avaliando assim o desvio padrão relativo (**DPR**) referente às áreas dos picos das substâncias estudadas.

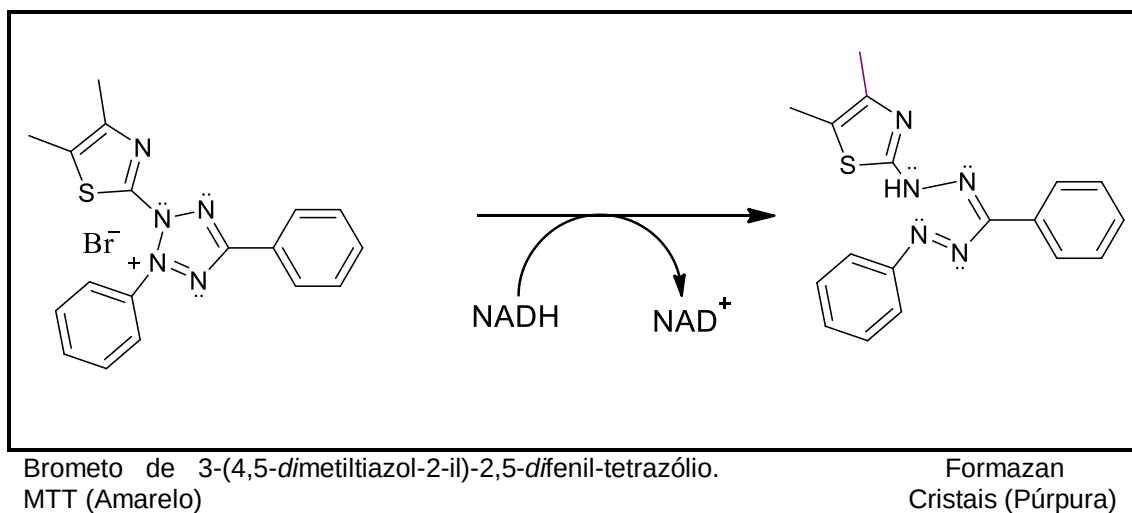
3.3.4 Etapa de avaliação das atividades biológicas.

3.3.4.1 Avaliação da atividade antitumoral.

Ensaio de viabilidade celular de células tumorais LM3, LP-07 e MCF-7.

A avaliação do potencial antitumoral do extrato de etanol 70% foi realizada em colaboração com a Prof^a. Dr^a. Iracilda Zeppone Carlos, pesquisadora da FCFAr – UNESP Araraquara. Para o ensaio de viabilidade celular, foi utilizado o método baseado na capacidade das células viáveis de clivar o anel tetrazólico presente no sal de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) (amarelo) pela ação de enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria ativas, formando cristais de formazana de cor púrpura (Mosmann, 1983) (Figura 12).

Figura 12. Reação de redução do MTT ao formazan.



O ensaio do MTT foi realizado para as linhagens LM3 (câncer de mama murino), LP-07 (câncer de pulmão murino) e MCF-7 (câncer de mama humano), sendo estas linhagens cedidas pelo Instituto de Oncologia Angel H. Roffo – Buenos Aires – Argentina e pelo Banco de Células de Rio de Janeiro – Rio de Janeiro.

As células foram cultivadas em meio RPMI-1640-C suplementadas com um 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico e mantidos em estufa contendo 5% de CO₂ a 37 °C. As células foram semeadas em microplacas de 96 poços

(100 μL na concentração de 1,106 células/mL) e expostas a 8 concentrações crescentes de extrato em triplicata (100 μL) por 24 horas a 37 °C.

Depois desse tratamento, as células foram incubadas com solução de MTT (100 μL na concentração de 0,5 mg mL^{-1} de meio de cultura) por 4 horas a 37 °C. Após essa incubação, os sobrenadantes foram descartados e as células aderentes tratadas com 100 μL de isopropanol para solubilizar os cristais de formazanan formados. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotometro em 540 nm com filtro de referência de 620 nm.

Como parâmetro foram utilizados controles positivos 100 μL de cisplatina + 100 μL do meio de cultura e negativos 200 μL do meio de cultura. A partir dos resultados obtidos com a viabilidade celular, foi possível construir um gráfico de Concentração vs Viabilidade celular e a partir do mesmo, obter os valores de IC_{50} dos extratos a partir de uma curva dose-resposta pelo software Originpro 8 (OriginLab®).

3.3.4.2 Avaliação da atividade citotóxica frente às células normais.

A avaliação da atividade citotóxica frente a células normais foi realizada no Laboratório de Mutagênese na Universidade de Franca sob a supervisão da Prof^a. Dr^a. Denise Crispim Tabares. O ensaio de viabilidade celular seguiu a metodologia descrita por BERRIDGE; HERST; TAN, (2005).

a) Ajuste das concentrações das suspensões das células normais.

A avaliação atividade citotóxica foi realizada utilizando o ensaio colorimétrico do XTT (ROEHM et al., 1991) -Kit XTT (Roche Diagnostics). A linhagem normal de fibroblasto de pulmão humano (GM07492A), foi cedida pelo Laboratório de Mutagênese da Universidade de São Paulo do Campus de Ribeirão Preto, São Paulo.

As células encontram-se estocadas em nitrogênio líquido (−195°C), em alíquotas de 1 x 10⁶ células mL^{-1} em uma solução de congelamento composta de 50% de meio de cultura (HAM F10 + DMEM, na proporção 1:1, Sigma-Aldrich,

40% de soro bovino fetal (Nutricell) e 10% de DMSO (Sigma-Aldrich). Para realização dos experimentos as células foram descongeladas e colocadas em cultivo em meio de cultura HAM F10 + DMEM, na proporção 1:1.

O meio de cultura foi suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1,2 g L⁻¹ de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich), 0,1 g L⁻¹ de estreptomicina (Sigma-Aldrich) e 0,06 g L⁻¹ penicilina (Sigma-Aldrich).

As células foram cultivadas em monocamada com 10 mL de meio de cultura utilizando frascos descartáveis de 25cm² (Corning) a 36,5°C em estufa de CO₂ (Sanyo) em atmosfera de 5% de gás carbônico (CO₂).

A cada dois ou três dias, as células foram sub cultivadas, usando PBS para lavá-las e tripsina (solução 10x, Sigma-Aldrich) na proporção 1 tripsina: 9 PBS, para desprender as células da superfície interna do frasco de cultura.

Após o desprendimento das células 1,5 mL de meio de cultura completo (suplementado com 10% de soro bovino fetal) foi adicionado ao frasco para inativação da tripsina e homogeneizado. Em seguida, 200 µL de células foram colocados em cultivo em novos frascos contendo 10 mL de meio de cultura completo e incubado a 36,5°C. Para a realização dos ensaios, a linhagem celular escolhida (GM07492A) foi utilizada a partir da quarta passagem até a décima quarta passagem.

b) Ensaio de viabilidade celular com as células normais GM07492A.

A atividade citotóxica na linhagem celular foi avaliada após 24 horas de tratamento. A metodologia utilizada foi de acordo com orientações do fabricante com algumas modificações.

O extrato etanol 70 % das folhas de *S. paniculatum*, assim com a fração **f'26**, foram diretamente diluídos em meio de cultura (HAM F10 + DMEM 1:1) suplementado com 10% de soro bovino fetal nas diferentes concentrações que variam de 2500 a 19,50 µg mL⁻¹.

Para realizar os experimentos, 1x10³ células foram semeadas em microplacas de 96 poços. Em cada poço, o volume máximo foi de 100 µL de meio de cultura (HAM F10 + DMEM 1:1) suplementado com 10% de soro bovino fetal.

Após 24 h, as culturas foram tratadas com as diferentes concentrações do extrato etanol 70 % e da fração **f'26** anteriormente descritos.

Os grupos controles negativos (sem tratamento), solvente (DMSO 0,4%) e positivo (DMSO 25%), foram incluídos nos poços. Na sequência, as placas foram incubadas a 36,5°C por 24 horas.

Depois desse período de tratamento, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com 100 µL de PBS para retirar o tratamento evitando possíveis alterações no resultado e expostas a 100 µL de meio cultura HAM-F10 sem vermelho de fenol. Então, 25 µL de XTT foram adicionados em cada poço e as microplacas incubadas a 36,5°C por 17h.

A absorbância das amostras foi determinada através de um leitor de multiplacas (Elisa –Asysm programa Microwin 2.000) no comprimento de onda de 450 nm e comprimento de referência de 620 nm.

A quantidade de produto solúvel formado (formazan) foi proporcional ao número de células viáveis. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados de IC₅₀ (concentração que inibe 50% de crescimento) obtidos para as células normais ou sadias, GM07492A.

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e foi utilizado o método Tukey para a comparação dos diferentes tratamentos. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $P < 0,05$. Todas as análises foram realizadas no GraphPad Prisma, V. 5.00.

3.3.4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana.

Os ensaios antimicrobianos in vitro foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (LaPeMA) da Universidade de Franca sob supervisão do professor Dr. Carlos Henrique Gomes Martins, colaborador neste projeto.

As bactérias avaliadas neste ensaio foram bactérias bucais isoladas de pacientes e de coleção de cultura, sendo elas: *Enterococcus faecalis* (ATCC 4082 e isolado clínico), *Streptococcus salivarius* (ATCC 25975 e isolado clínico),

Streptococcus. sobrinus (ATCC 33478), *Streptococcus. mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus. sanguinis* (ATCC 10556 e isolado clínico), *Streptococcus. mitis*, (ATCC 49456), *Streptococcus.oralis* (ATCC 55229 e isolado clínico), *Lactobacillus casei* (ATCC 11578 e isolado clínico). As cepas empregadas foram mantidas no LaPeMA da Universidade de Franca, sob criopreservação (-80°C).

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das amostras foi realizada segundo a metodologia da diluição em caldo proposta pelo “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2012). Foram utilizadas microplacas com fundo chato esterilizadas com 96 orifícios (TPP®, EUA).

Cada orifício recebeu o inóculo, o meio de cultura líquido Brain Heart Infusion (BH – Difco) e as soluções das amostras em concentrações finais que variaram de 0,195 a 400 µg/mL, sendo o volume final de 100 µL.

O inóculo foi ajustado para a bactéria, a uma concentração de 5×10^5 Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL), segundo as normas do CLSI, por meio da verificação das absorbâncias em 625 nm. Logo após a micropipetagem as placas foram tampadas e incubadas a 37°C por 24 horas, sem agitação, segundo suas exigências atmosféricas.

Terminado o período de incubação, foram adicionados em cada orifício das placas 30 µL de resazurina a 0,02% em solução aquosa esterilizada onde, após 30 minutos de reincubação, a leitura foi realizada.

A resazurina facilita verificar a presença de crescimento microbiano, a coloração azul indica ausência de crescimento microbiano, enquanto a cor vermelha indica a presença de células viáveis em crescimento. Dessa maneira foi possível determinar a menor concentração da amostra capaz de inibir o crescimento da bactéria avaliada. Para o controle positivo, as concentrações avaliadas variaram de 0,115 a 59 µg/mL (Clorexidina), perfazendo 100 µL de volume final. Foram realizados o controle de esterilidade do caldo, do solvente e da cultura.

3.3.4.4 Avaliação da atividade leishmanicida.

A avaliação da atividade leishmanicida foi realizada no Laboratório de Pesquisas em Parasitologia na Universidade de Franca sob a supervisão da

Prof^a. Dr^a. Lizandra Guidi Magalhães.

Para avaliação da atividade leishmanicida as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR175/M2904) foram mantidas *in vivo* em camundongos BALB/c e após 60-70 dias de infecção os parasitos foram obtidos das lesões originadas nas patas e mantidos *in vitro* em meio M199 (Invitrogen®) suplementado com 2 mM de L-glutamina, 10 mM de NaHCO₃, 100 µg/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 10% de soro bovino fetal inativado. As garrafas foram mantidas a 25°C e o meio foi trocado a cada dois dias. As formas promastigotas foram coletadas no sobrenadante a partir do sexto dia. Após o período de crescimento exponencial dos parasitos foi realizada a contagem em câmara de Neubauer e o número de parasitos foi ajustado para 1 x 10⁶ formas promastigotas ativas/mL.

O ensaio foi realizado em triplicata, utilizando uma placa de cultura de células de 96 poços como descrito por Muelas-Serrano et al., 2000. As amostras a serem testadas foram previamente dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth) e adicionados nas culturas nas concentrações de 1,56 a 50 µg/mL. Anfotericina B foi adicionada nas culturas nas concentrações de 0,19 a 0,005 µg/mL.

As culturas foram incubadas a 25°C em estufa BOD (Quimis) por 24h e a atividade leishmanicida foi determinada pela inibição do crescimento das formas promastigotas pela contagem em câmara de Neubauer (Global Glass – Porto Alegre, BR) do número total de promastigotas vivas, levando-se em consideração a motilidade flagelar. Como controle negativo foi utilizado meio RPMI 1640 (Gibco) contendo 0,1 % de DMSO (Synth) e como controle positivo foi utilizado Anfotericina B (Eurofarma – São Paulo, BR) na concentração de 1 µg/mL.

Os resultados foram expressos como a média da porcentagem de lise em relação ao controle negativo (0,1% DMSO). Foram realizados dois experimentos em triplicata. Os valores de concentração inibitória 50% (CI₅₀) foram determinados por meio de curvas de regressão não-linear utilizando o software *GraphPad Prism* versão 5.0 para Windows (GraphPad software, USA).

3.3.4.5 Avaliação da atividade esquistossomicida.

A avaliação da atividade esquistossomose foi realizada no Laboratório de Pesquisas em Parasitologia na Universidade de Franca sob a supervisão da Prof^a. Dr^a. Lisandra Guidi Magalhães.

a) Manutenção do ciclo de vida de *Schistosoma mansoni*.

O ciclo biológico de *S. mansoni*, linhagem LE é rotineiramente mantido pela passagem seriada em moluscos *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro invertebrado e em camundongos Balb/C como hospedeiro invertebrado no Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas, do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP sob a supervisão do Prof. Dr. Vanderlei Rodrigues.

Os ovos de *S. mansoni* presentes nas fezes de camundongos previamente infectados com o parasita foram recolhidos pelo método de Hoffmann e expostos por aproximadamente 1 hora sob luz, para a liberação dos miracídios. Os miracídios foram utilizados para infectar o hospedeiro intermediário, que após 38 a 43 dias liberaram a forma infectante do parasita, as cercárias, que por sua vez infectaram o hospedeiro vertebrado. As cercárias foram inoculadas nos camundongos via subcutânea e após aproximadamente 45 dias os vermes adultos foram recuperados do sistema porta hepático por perfusão (SMITHERS, TERRY, 1965). Após a coleta, os parasitas foram mantidos em meio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) (Invitrogen) até o momento do uso.

b) Avaliação das substâncias em vermes adultos mantidos *in vitro*.

Casais de vermes adultos foram recuperados de camundongos Balb/c ou Swiss, via perfusão do sistema porta-hepático em condições assépticas, como descritas anteriormente. Em seguida, os parasitas foram lavados em RPMI 1640 (Gibco) tamponado com HEPES 20 µM, pH 7,5, suplementado com penicilina (100 µg/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e 10% de soro bovino fetal

(Gibco). Posteriormente, um casal de verme adulto foi transferido por poço em uma placa de cultura de 24 poços contendo o mesmo meio descrito anteriormente e incubados em atmosfera umidificante a 37°C na presença de 5% CO₂.

Após 24 horas de incubação, as substâncias previamente dissolvidas foram adicionadas ao meio RPMI 1640 em diferentes concentrações. Os parasitas foram incubados nas mesmas condições descritas anteriormente por 120 horas e monitorado a cada 24 horas usando um microscópio invertido (Leitz Diavert) para avaliar as condições gerais dos parasitas como: pareamento, taxa de mortalidade, atividade motora, alteração no tegumento e produção de ovos.

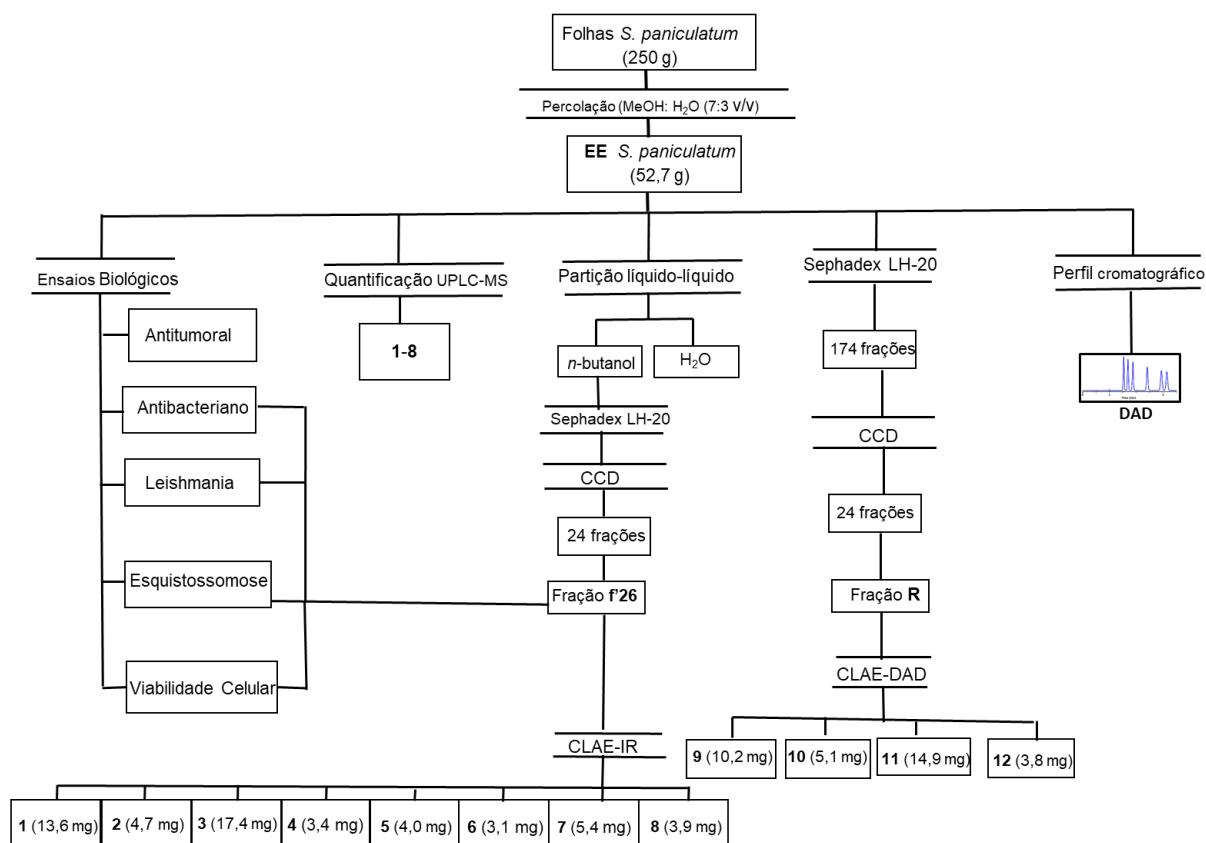
Como controle negativo foram utilizados vermes adultos mantidos em meio RPMI 1640 ou em meio RPMI 1640 com a solução das substâncias, e como controle positivo será utilizado vermes adultos incubados com 12,5 µM de Praziquantel. Foram realizados três experimentos independentes, sendo avaliados quatro casais de parasitas por concentração (MAGALHÃES et al., 2009).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.

4.1 Etapa química.

O fracionamento do extrato etanol 70 % (EE) das folhas de *S. paniculatum*, assim como um resumo das etapas de trabalho desenvolvidas, apresentam-se na Figura 13.

Figura 13. Fluxograma de preparo e fracionamento do extrato etanol 70% das folhas de *S. paniculatum*.



4.1.1 Obtenção do extrato das folhas de *S. paniculatum* por percolação.

O método de extração por percolação foi o empregado para a obtenção do extrato etanol 70% das folhas de *S. paniculatum* sendo utilizado como solvente extrator EtOH:H₂O (7:3, v/v). Esta metodologia foi empregada em todos os trabalhos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa, para extração das substâncias polares desta espécie, exibindo bons rendimentos (VIEIRA JÚNIOR et al., 2015). O rendimento obtido do extrato etanol 70 % neste

procedimento é apresentado na tabela 1.

Tabela 1. Massa do extrato etanol 70% e rendimento obtidos da percolação das folhas de *S. paniculatum*.

Espécie	Massa (g) / Rendimento (%)
<i>S. paniculatum</i> (250 g)	52,7 g (21,1%)

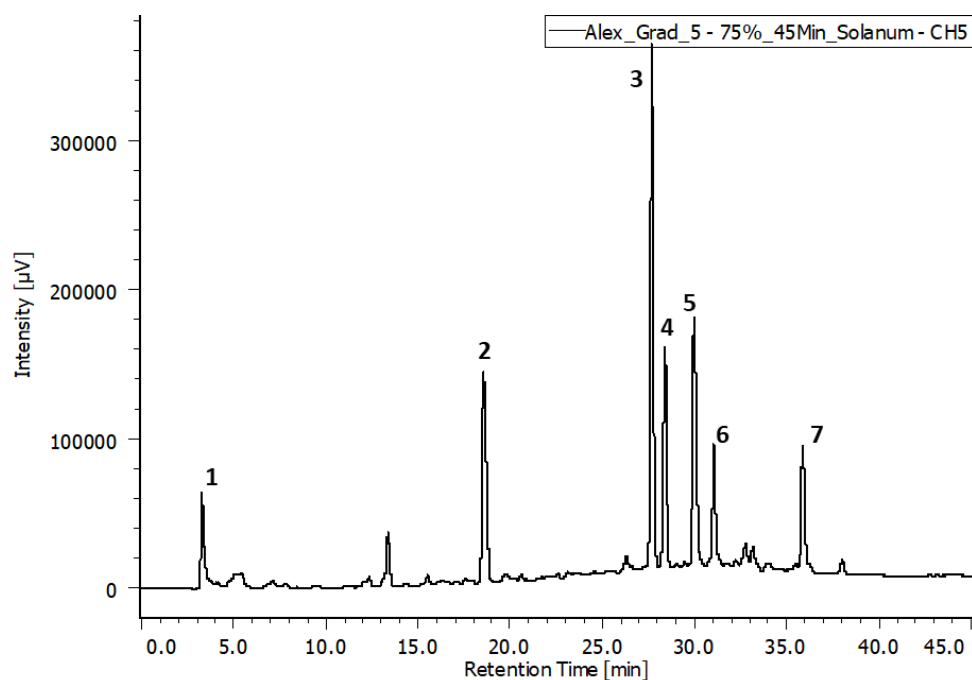
4.1.2 Análise do extrato etanol 70% por CLAE-DAD.

As análises do extrato etanol 70% obtido das folhas de *S. paniculatum* foi feito por CLAE-DAD com o objetivo de realizar uma triagem química rápida. Realizou-se, assim, o perfil cromatográfico para a identificação das substâncias majoritárias para delimitar as estratégias para o seu isolamento.

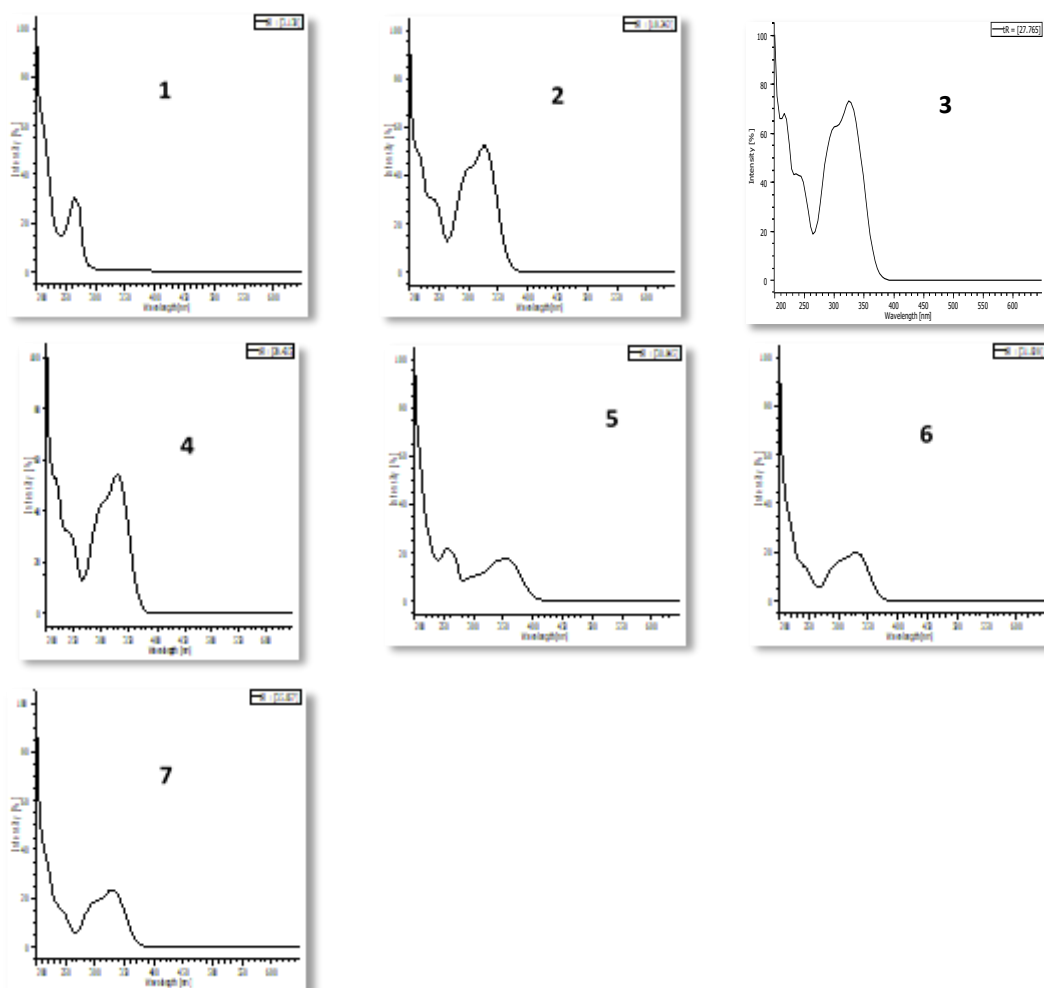
O perfil cromatográfico traçado por CLAE-DAD é de grande utilidade no estudo de extratos polares, devido à possibilidade de comparação dos tempos de retenção (t_R) das substâncias conhecidas com padrões (comerciais ou já isolados em laboratório), assim como pela similaridade de seus espectros no UV. A análise destes dados possibilita inferir ou identificar a classe de substâncias que se encontram presentes nos extratos ou na fração em estudo (RINALDO et al., 2010).

A Figura 14 apresenta o cromatograma otimizado monitorado em 270 nm para avaliar a presença das principais substâncias que absorvem no espectro UV (180-400 nm) presentes no extrato etanol 70% das folhas de *S. paniculatum* com os espectros UV representativos.

Figura 14. Perfil cromatográfico em CLAE-DAD do extrato etanol 70% das folhas de *S. paniculatum* e espectros no UV representativos a 270 nm.



Método: gradiente MeOH:H₂O (5:75 v/v) em 45 min.



O perfil cromatográfico por CLAE-DAD do extrato etanol 70% de acordo com a análise dos espectros UV representativos para cada pico sugere a presença de uma substância fenólica (UV pico 1), substâncias derivadas do ácido clorogênico (UV, picos 2, 3, 4, 6 e 7) além do flavonoide (UV pico 5) (MERKEN, BEECHER; 2000).

4.1.3 Análise da fração R por CLAE-DAD.

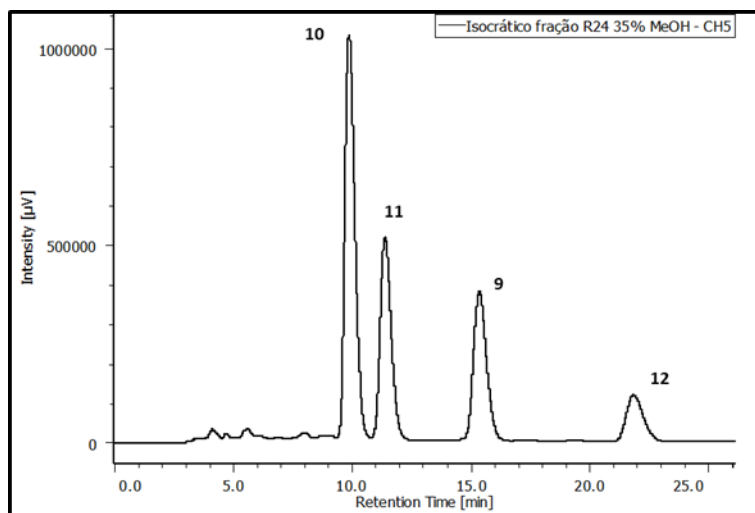
A análise da fração **R** (Figura 10, pag. 32) foi realizada usando a CLAE-DAD com o objetivo de obter o seu perfil cromatográfico e assim estabelecer estratégias adequadas para a separação eficiente das substâncias presentes na fração analisada.

A Figura 15 (pag. 50) apresenta o cromatograma otimizado monitorado a 270 nm, assim como os espectros no UV para avaliar a presença das principais substâncias que se encontram presentes na fração **R**.

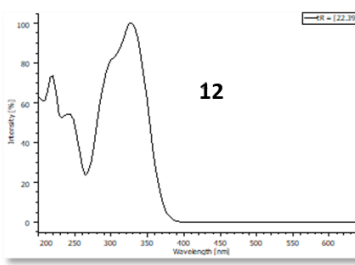
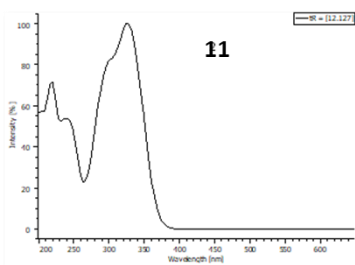
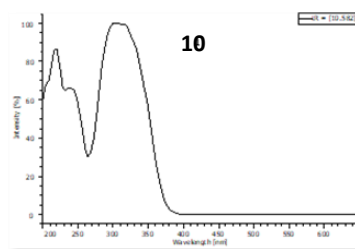
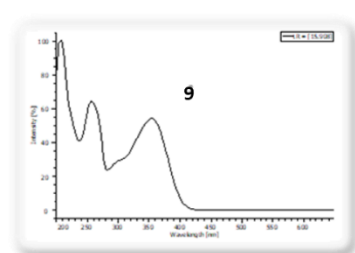
O cromatograma mostra a presença de 4 substâncias com absorção a 270 nm. Os espectros no UV sugerem a presença de derivados do ácido clorogênico (UV, picos 10, 11 e 12) e de flavonoide (UV pico 9) (MERKEN, BEECHER; 2000).

Utilizando o método de transposição de dados do CLAE-DAD analítico para o preparativo (SNYDER, KIRKLAND, DOLAN, 2010), foi possível obter a separação de 4 substâncias denominadas **10** (10,2 mg), **11** (5,1 mg), **9** (4,9 mg) e **12** (3,8 mg).

Figura 15. Perfil cromatográfico da fração **R** e espectros no UV representativos a 270 nm.



Método: isocrático MeOH 35% em 25 min.



De acordo aos dados espectroscópicos de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e pela comparação com dados da Literatura, foram elucidadas as estruturas das substâncias **9** e **10**.

4.1.4 Extração líquido-líquido.

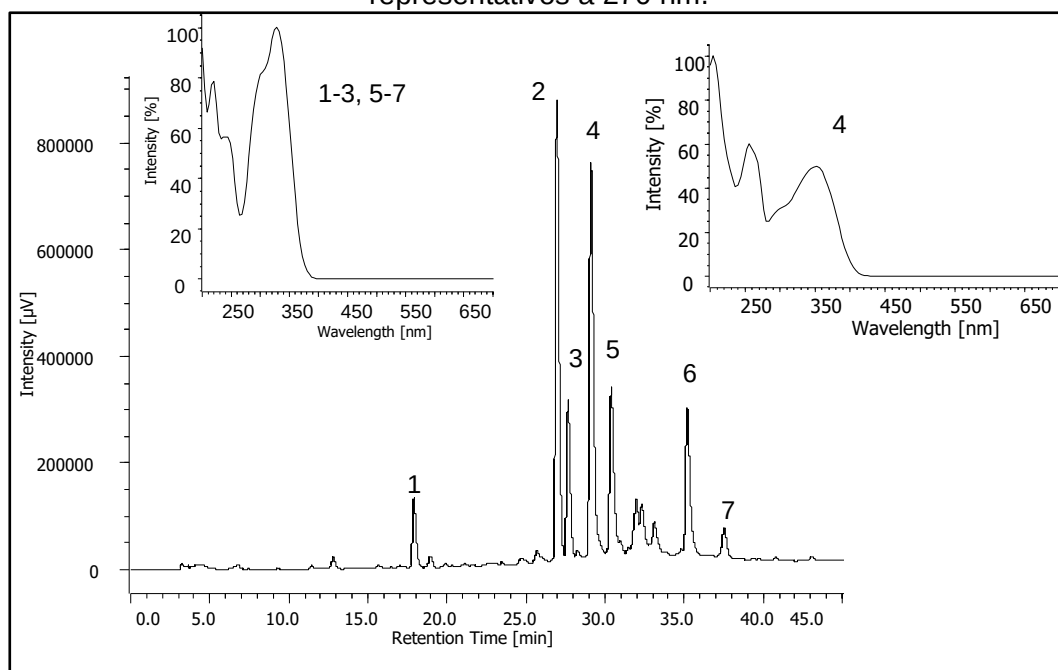
De acordo com o descrito na Parte experimental (item 3.3.3.2e) realizou-se a partição líquido-líquido do extrato etanol 70 % usando como solvente extrator *n*-butanol. Após secagem de cada extrato foi possível obter as massas assim como os rendimentos da extração (Tabela 2) para cada extrato.

Tabela 2. Massas do extrato *n*-butanol e aquoso e rendimento obtidos na partição líquido-líquido.

Extrato	Massa (g) / Rendimento (%)
<i>n</i> -butanol	21,9 / 48,7
Aquoso	15,0 / 33,3

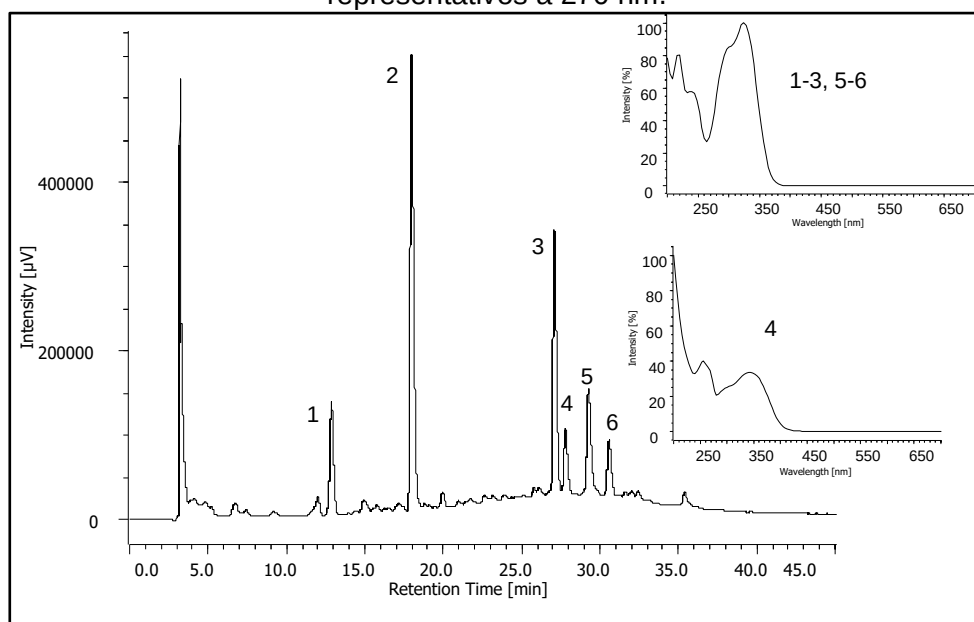
4.1.5 Análise dos extratos *n*-butanol e aquoso por CLAE-DAD.

Os perfis cromatográficos por CLAE-DAD analítico para a identificação das substâncias majoritárias presentes nos extratos *n*-butanol e aquoso foram obtidos em 270 nm. Nas figuras a seguir (Figuras 16 e 17) pode-se observar que os dois extratos apresentaram espectros no UV semelhantes às substâncias presentes em cada extrato, indicando a presença de substâncias fenólicas com grupos cromóforos idênticos aos observados nos extratos etanol 70%, sugerindo, portanto, mais uma vez, a presença de derivados do ácido clorogênico (picos 1-3, 5-7), e flavonoides (pico 4) (MERKEN, BEECHER; 2000). No entanto, foi possível detectar no extrato aquoso a presença de derivados do ácido clorogênico (picos 1-3, 5-6) e flavonoide (pico 4).

Figura 16. Perfil cromatográfico do extrato *n*-butanol e espectros no UV representativos a 270 nm.

Gradiente MeOH:H₂O 5:75 (v/v) em 45 min.

Figura 17. Perfil cromatográfico do extrato aquoso e espectros no UV representativos a 270 nm.

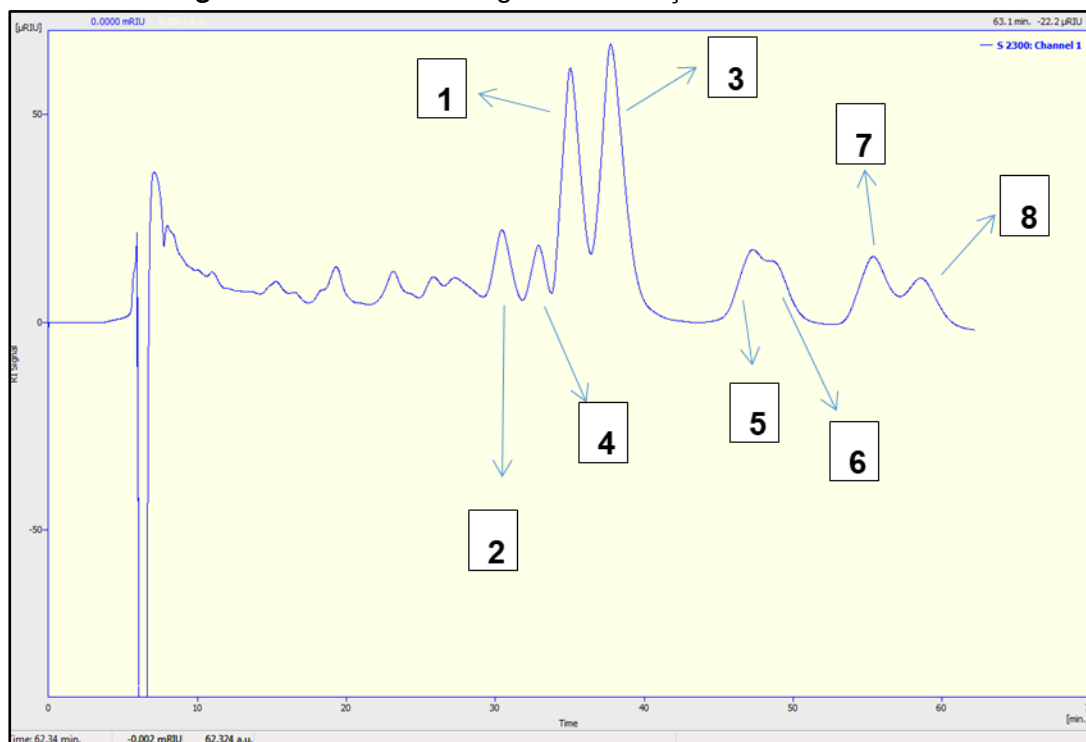


Gradiente MeOH:H₂O 5:75 (v/v) em 45 min.

4.1.6 Separações em CLAE-IR semi-preparativo da fração f'26.

A fração **f'26** (205 mg) foi submetida à separação das substâncias presentes utilizando a CLAE-IR semi-preparativo, conforme item 3.3.3.2h descrita na parte experimental.

O cromatograma obtido nesta etapa de separação utilizando como fase móvel MeOH:H₂O (7:3 v/v) no modo isocrático é mostrado a seguir na Figura 18.

Figura 18. Perfil cromatográfico da fração **f'26** no CLAE-IR

Método isocrático MeOH:H₂O (7:3 v/v). Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

As 8 substâncias purificadas neste procedimento foram denominadas substância **1** (13,6 mg), substância **2** (4,7 mg), substância **3**, (17,4 mg), substância **4** (3,4 mg), substância **5** (4 mg), substância **6** (3,1 mg), substância **7** (5,4 mg) e substância **8** (3,9 mg).

De acordo com os dados espectroscópicos de Ressonância Magnética Nuclear mono e bidimensionais, assim como pelos dados da Espectrometria de Massas de alta resolução (HRESI/MS), foram elucidadas estruturalmente as substâncias isoladas desta fração (VALERINO-DIAZ et. al, 2018).

4.2 Elucidação estrutural das substâncias isoladas.

4.2.1 Elucidação estrutural da substância 1.

A fração **f'26** do extrato *n*-butanol, obtida a partir da extração líquido-líquido do extrato etanol 70 % das folhas de *S. paniculatum*, foi fracionada por CLAE-IR fornecendo 8 substâncias puras.

A elucidação estrutural destas substâncias foi realizada pela análise dos dados obtidos a partir das técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (uni e

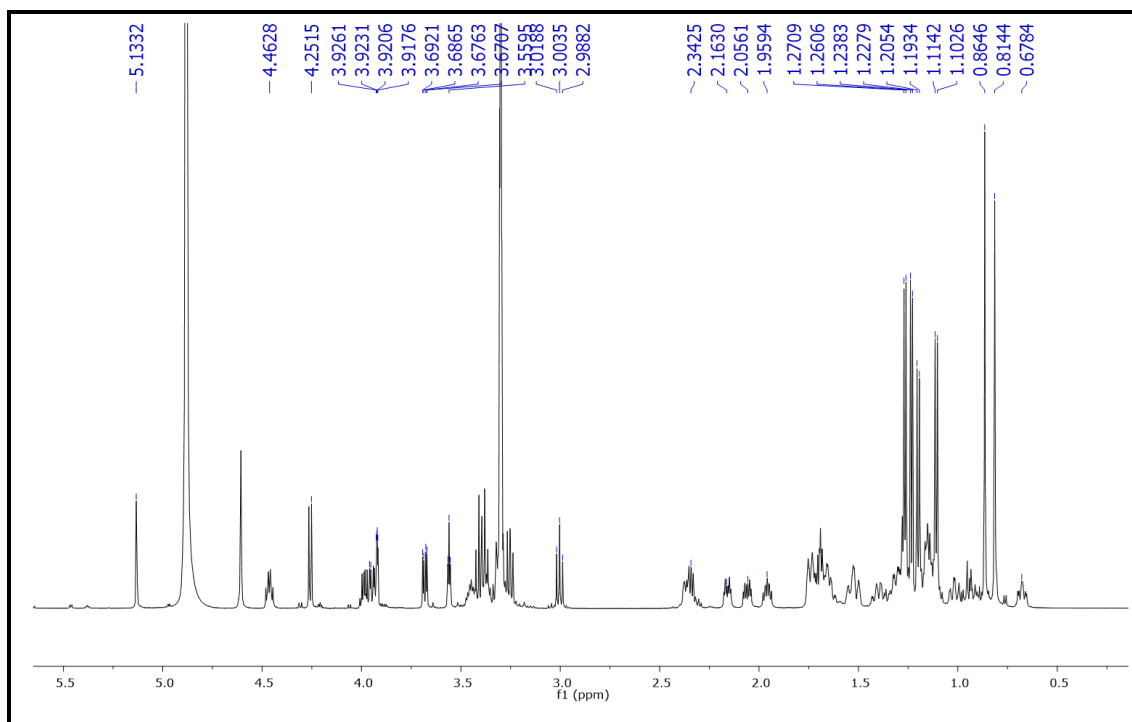
bidimensionais), assim como pela análise dos espectros de massas (HRESIMS/MS).

A substância **1** (13,6 mg) foi obtida como um sólido amorfo de coloração amarela.

Na análise dos sinais de RMN-¹H da substância **1** (Tabela 3, pag. 133, Figura 19), observou-se a presença de dois singletos: um em δ_H 0,81 (3H) e outro em δ_H 0,87 (3H) que correspondem aos sinais de grupos metílicos nas posições CH₃-18 e CH₃-19 do núcleo esteroidal (AGRAWAL et al., 1995).

Observou-se ainda no espectro de RMN-¹H quatro sinais que correspondem a metilas com deslocamentos químicos em: δ_H 1,11 (3H), δ_H 1,20 (3H), δ_H 1,27 (3H) e δ_H 1,23 (3H). Estes sinais foram atribuídos às CH₃-21 e CH₃-27 da aglicona, e as outras duas pertencentes possivelmente às unidades de açúcares nas posições CH₃-6' e CH₃-6'' respectivamente.

Na região mais desblindada do espectro de RMN-¹H foi possível observar os sinais de três grupos metinos, fazendo ligações com carbonos carbinólicos em δ_H 3,37 (H-3), δ_H 3,45 (H-6), δ_H 3,56 (H-23), assim como sinais de dois hidrogênios ligados a carbonos anoméricos em δ_H 4,26 (*d*, *J* = 7,9 Hz, H-1') e δ_H 5,13 (*d*, *J* = 1,6 Hz, H-1'') respectivamente. O sinal em δ_H 4,46 corresponde ao hidrogênio na posição C₁₆ característico do sistema espiroetano de uma saponina esteroidal (AGRAWAL, 2003).

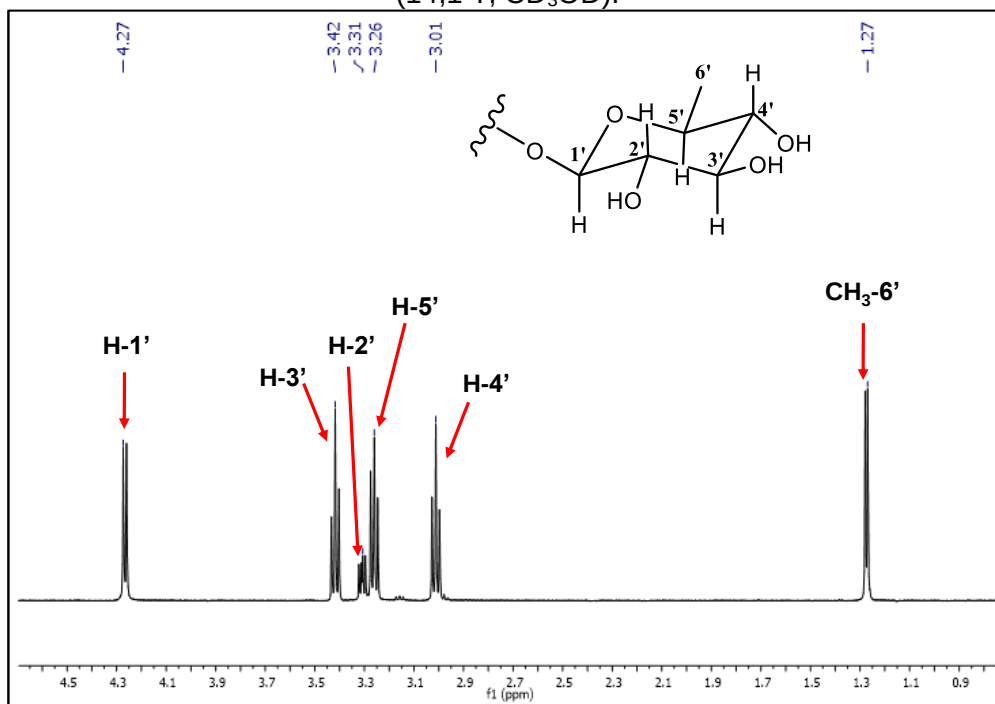
Figura 19. Espectro de RMN-¹H da substância **1** (14,1 T, CD₃OD).

Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

Para a determinação dos hidrogênios que conformam os glicosídeos, realizou-se o experimento TOCSY-1D (Figuras 20, 21). Para isso, irradiou-se seletivamente o hidrogênio em δ_H 4,26 (*d*, $J = 7,9$ Hz, H-1') que apresentou correlação com os hidrogênios em δ_H 3,25 (*m*, H-2'), δ_H 3,41 (*m*, H-3'), δ_H 3,00 (*t*, $J=9,2$, H-4'), δ_H 3,30 (*m*, H-5'), e com a metila em δ_H 1,27 (*d*, $J = 6,2$ Hz, CH₃-6'), o que permitiu estabelecer que esta unidade pertence a quinovose.

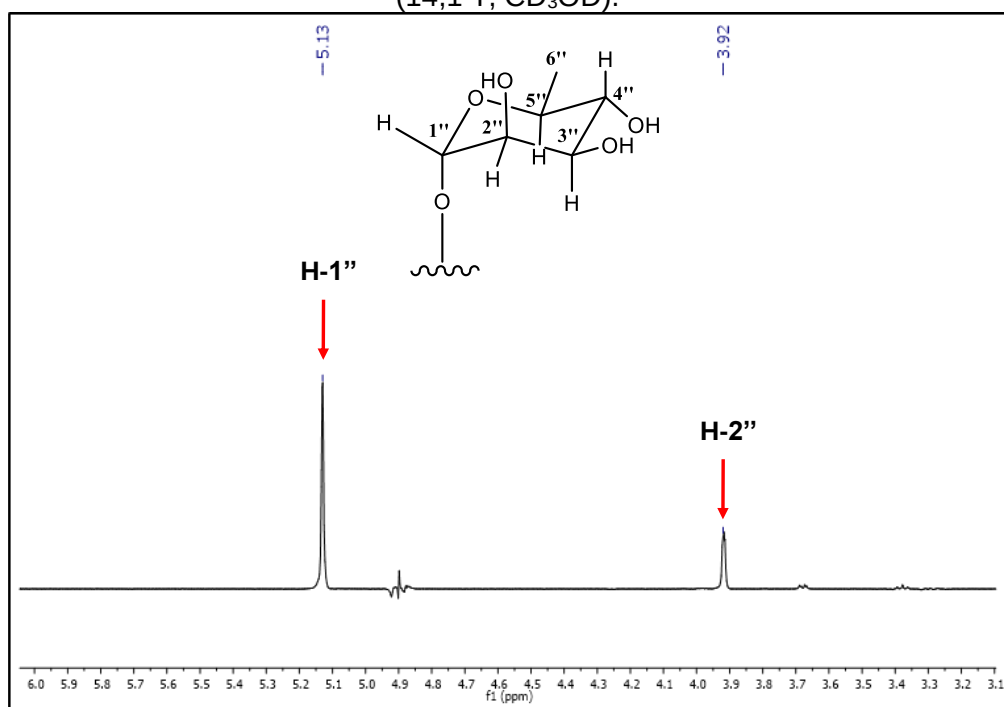
Quando irradiado o hidrogênio em δ_H 5,13 (*d*, $J = 1,6$ Hz, H-1''), observou-se somente o sinal em δ_H 3,92 (*dd*, $J = 8,0$ Hz) que foi atribuído ao H-2''. Este fato aliado à presença no espectro de RMN-¹H do duplete correspondente à metila CH₃-6'' em δ_H 1,23 (*d*, $J = 6,2$ Hz) permitiu estabelecer esta outra unidade de açúcar como sendo a ramnose (Figura 21, 19).

Figura 20. Espectro TOCSY-1D da substância **1**. Irradiação em δ_H 4,26. (14,1 T, CD_3OD).



Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

Figura 21. Espectro TOCSY-1D da substância **1**. Irradiação em δ_H 5,13. (14,1 T, CD_3OD).

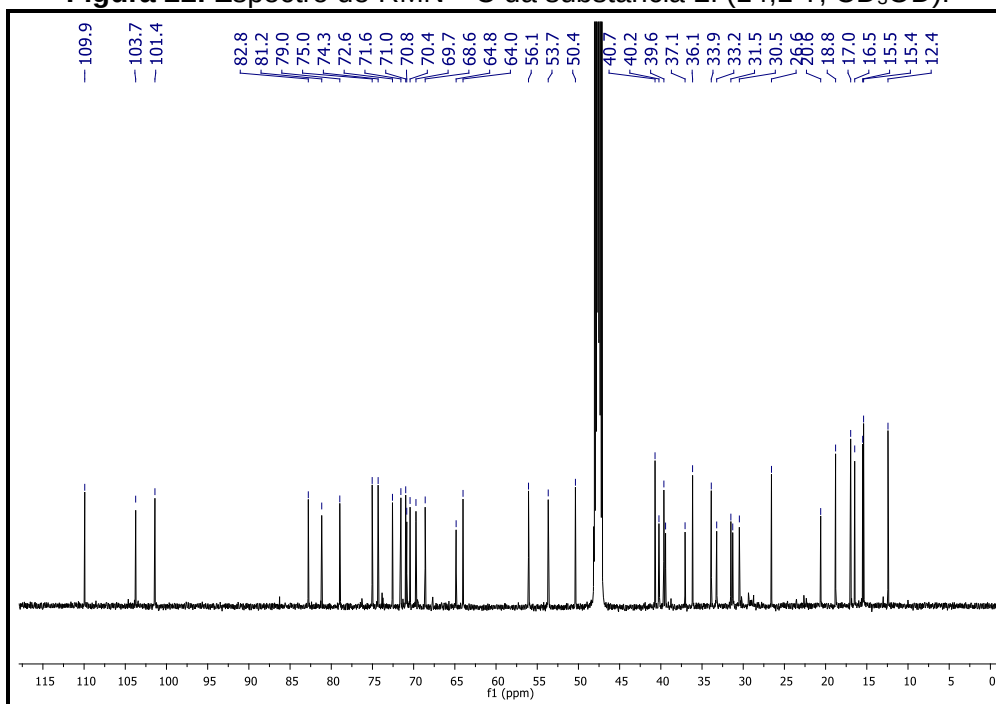


Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

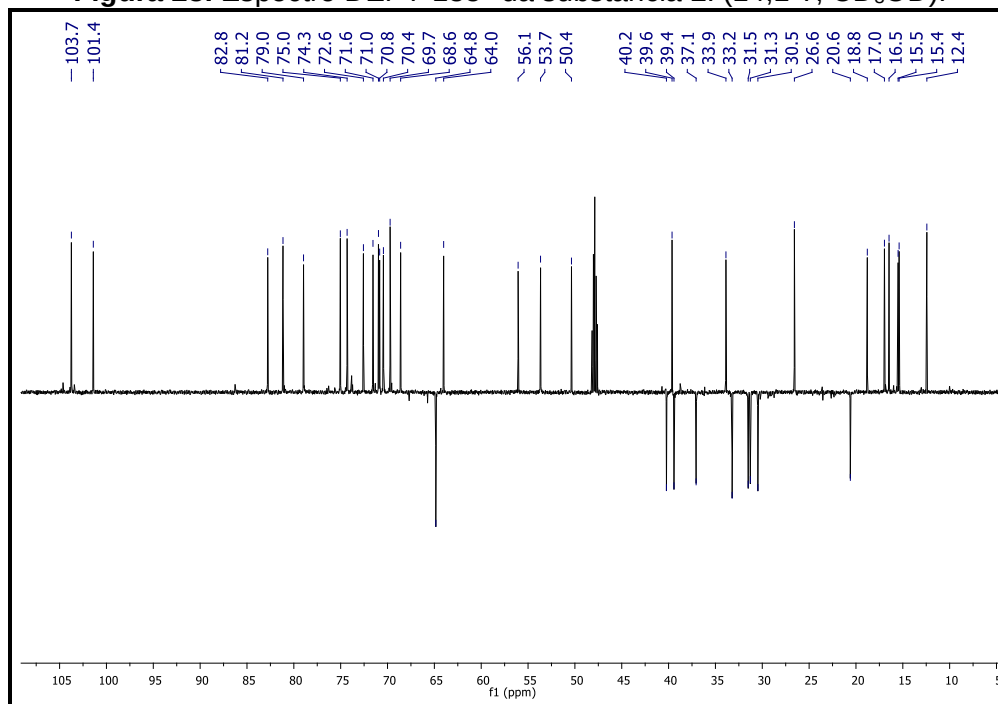
O espectro de RMN- ^{13}C (Figura 22), aliado às informações do experimento DEPT-135 (Figura 23, Tabelas 4, pag. 136) possibilitaram atribuir os 27 carbonos que conformam a aglicona no sapogenol, sendo oito carbonos secundários, sete carbonos terciários, dois carbonos quaternários, quatro grupos metilas, quatro carbonos terciários ligados a oxigênio, um carbono secundário ligado a oxigênio e um carbono acetálico. Ainda pode-se observar 12 sinais atribuídas às unidades de açúcar β -D-quinovose e α -L-ramnose.

Os sinais existentes na região mais desblindada do espectro de RMN- ^{13}C em δ_{C} 109,9 e δ_{C} 81,2 correspondem aos carbonos C_{22} e C_{16} característicos da cadeia espiroacetálica presente neste tipo de composto (AGRAWAL et al., 1995). Os carbonos em δ_{C} 103,7 e δ_{C} 101,4 foram atribuídos aos carbonos anoméricos da quinovose e da ramnose da saponina, respectivamente. Na análise na região mais blindada do espectro podem-se observar os deslocamentos químicos das metilas C_{18} (δ_{C} 12,4), C_{19} (δ_{C} 15,4), C_{21} (δ_{C} 15,5) e C_{27} (δ_{C} 18,8) da saponina esteroidal.

Figura 22. Espectro de RMN- ^{13}C da substância **1**. (14,1 T, CD_3OD).

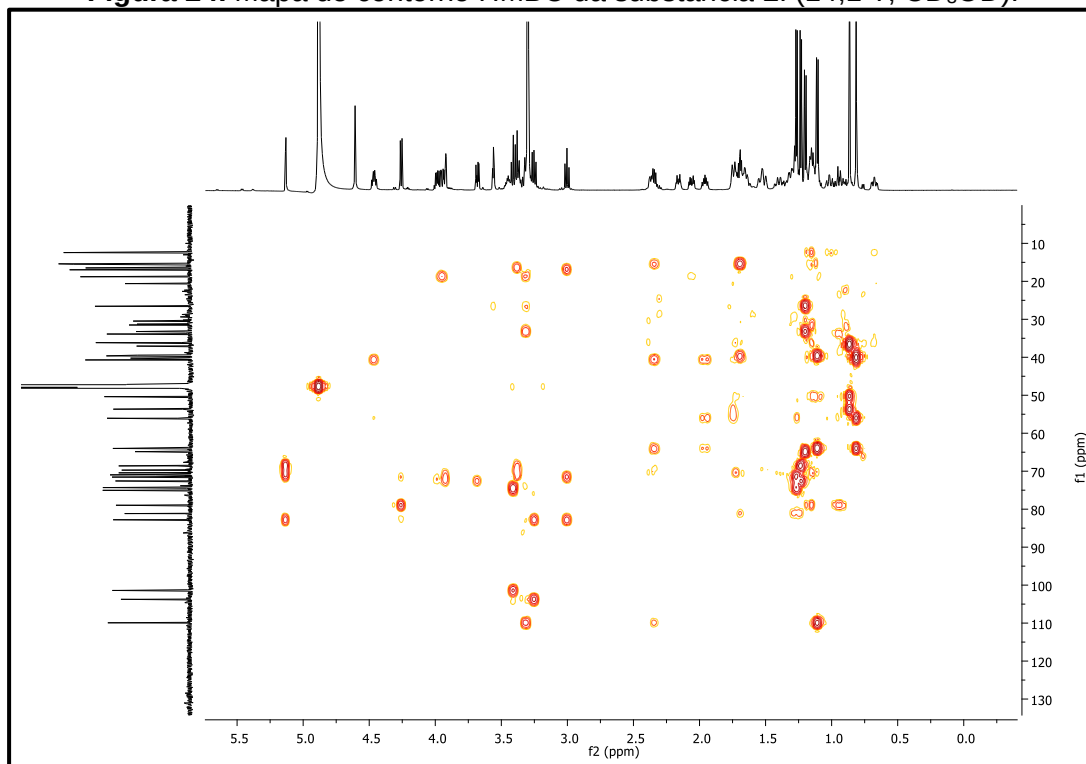


Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

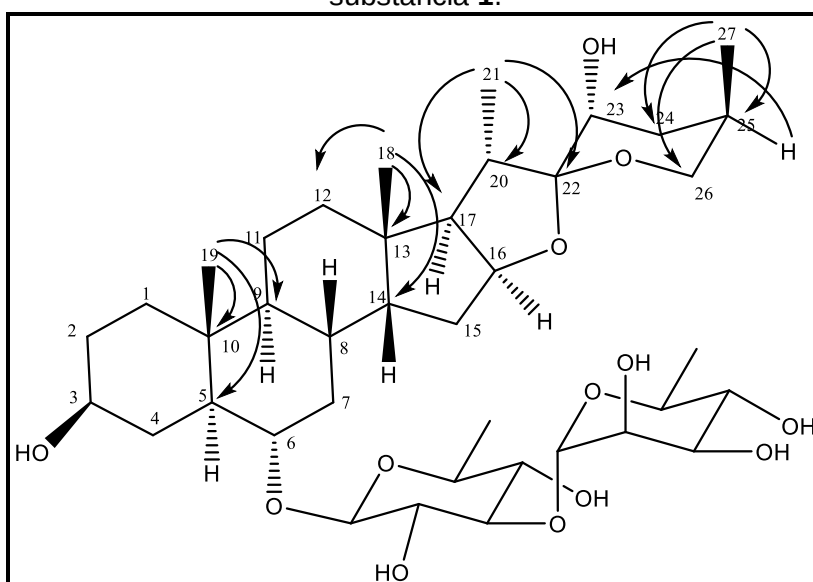
Figura 23. Espectro DEPT-135° da substância **1**. (14,1 T, CD₃OD).

Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

Para revelar as correlações dos respectivos hidrogênios e carbonos na molécula, no mapa do contorno de HMBC (Figura 24) foram analisadas as correlações a J^2 e J^3 . Neste sentido, podem-se observar as correlações que estabelecem a CH_3 -19 com o C-10 / C-9 / C-5; a CH_3 -18 com o C-12 / C-13 / C-14, C-17; CH_3 -21 com o C-20 / C-22; a CH_3 -27 com o C-25 / C-26, assim como o H-25 com C-23. A correlação entre o H-25 (δ_{H} 1,66) com o C-23 (δ_{C} 69,7), indicou que existe a presença de um grupo hidroxila em C-23 (Figura 25).

Figura 24. Mapa de contorno HMBC da substância **1**. (14,1 T, CD₃OD).

Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

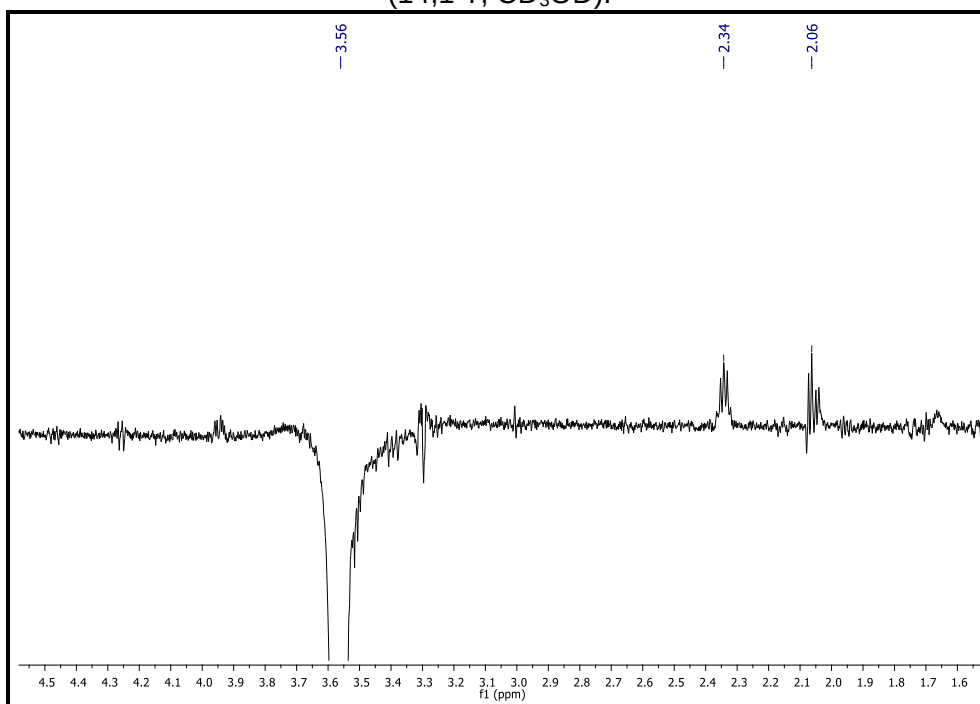
Figura 25. Principais correlações no mapa de contorno HMBC para a aglicona da substância **1**.

Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

A análise do espectro NOESY-1D permitiu estabelecer a configuração existente entre os anéis AB, BC, CD e DE assim como a configuração do carbono C-23 (Figura 26).

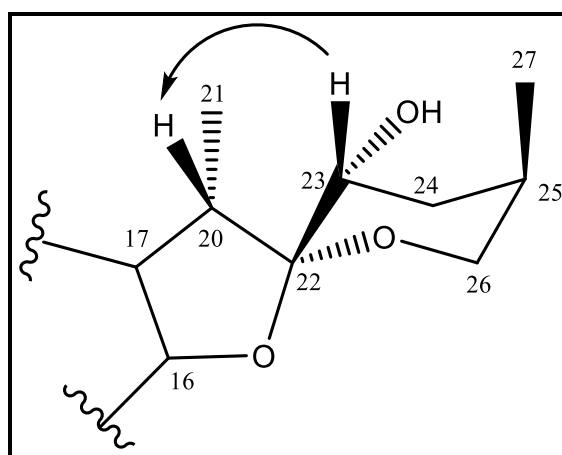
Para isso, a irradiação seletiva em H-23 (δ_H 3,56) possibilitou verificar a interação com o H-20 (δ_H 2,34) e com o H-24 que encontra-se em posição *axial* pertencente ao grupo CH_2 -24_{a,b} [δ_{Hb} 2,06] sugerindo a posição *axial* para o H-23 e configuração *R* para C-23 (Figura 27).

Figura 26. Espectro NOESY-1D da substância **1**. Irradiação seletiva em δ_H 3,56. (14,1 T, CD_3OD).



Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

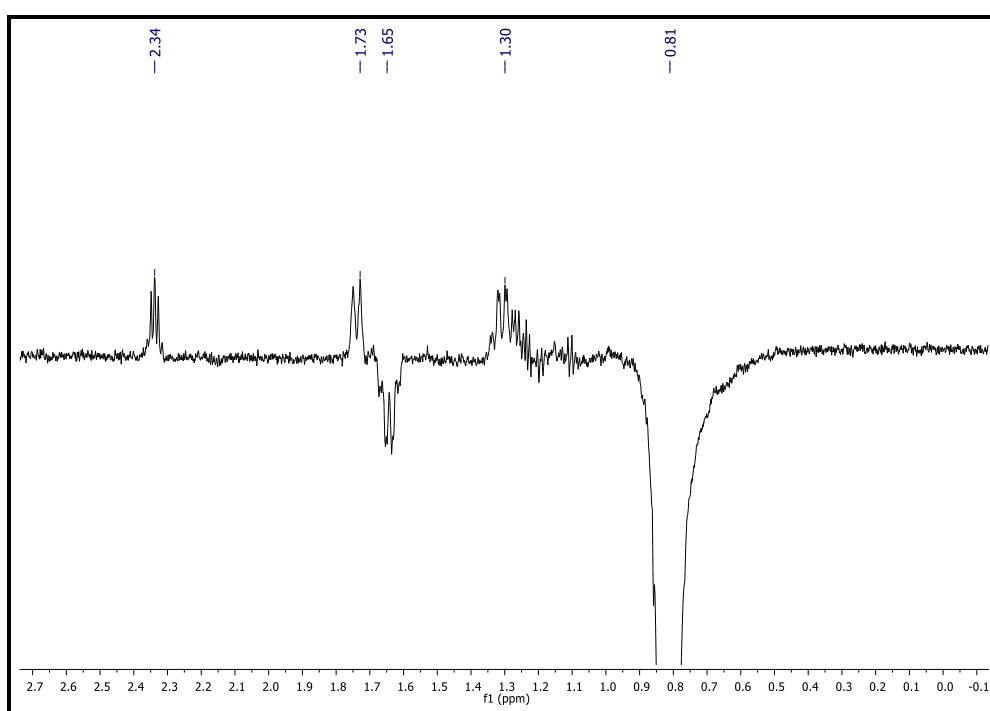
Figura 27. Interação via NOESY- 1D do H-23 com o H-20 na substância **1**.



Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

Por outro lado, a irradiação da metila $\text{CH}_3\text{-18}$ (δ_{H} 0,81) (Figura 28), evidenciou interações com os hidrogênios: H-20 (δ_{H} 2,34), H-12 (δ_{H} 1,74), H-8 (δ_{H} 1,64) e H-11 (δ_{H} 1,30), confirmando sua orientação em β e que a junção dos anéis CD é *trans*, assim como a junção dos anéis DE é *cis*. Portanto, o experimento NOESY-1D, possibilitou ainda confirmar a orientação α para $\text{CH}_3\text{-21}$ e, portanto, a configuração S para C-20.

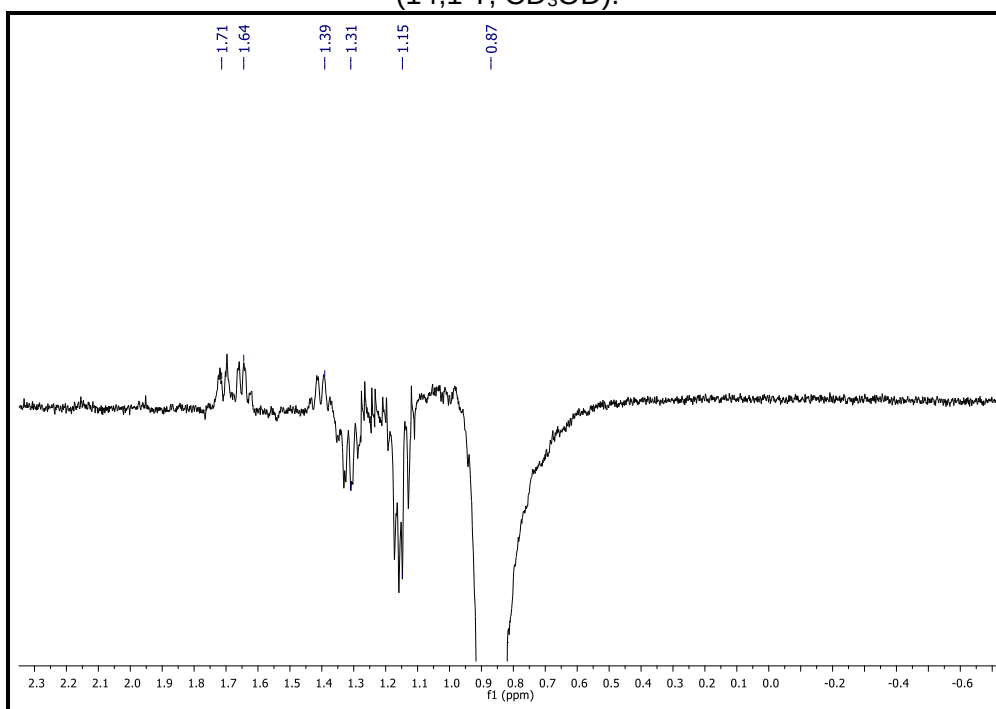
Figura 28. Espectro NOESY-1D substância **1**. Irradiação seletiva em δ_{H} 0,81 (14,1 T, CD_3OD).



Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

Outros resultados obtidos a partir da análise do espectro NOESY-1D (Figura 29) permitiram confirmar a configuração entre os anéis AB e BC na estrutura de sapogenol. Neste sentido, as interações estabelecidas pela metila $\text{CH}_3\text{-19}$, (δ_{H} 0,87) com os hidrogênios: H-1 (δ_{H} 1,71), H-2 (δ_{H} 1,15), H-4 (δ_{H} 1,38), H-8 (δ_{H} 1,64) e H-11 (δ_{H} 1,30) ratifica a junção *trans* entre os anéis AB e BC, assim como a metila $\text{CH}_3\text{-19}$ ocupando uma posição β no sapogenol.

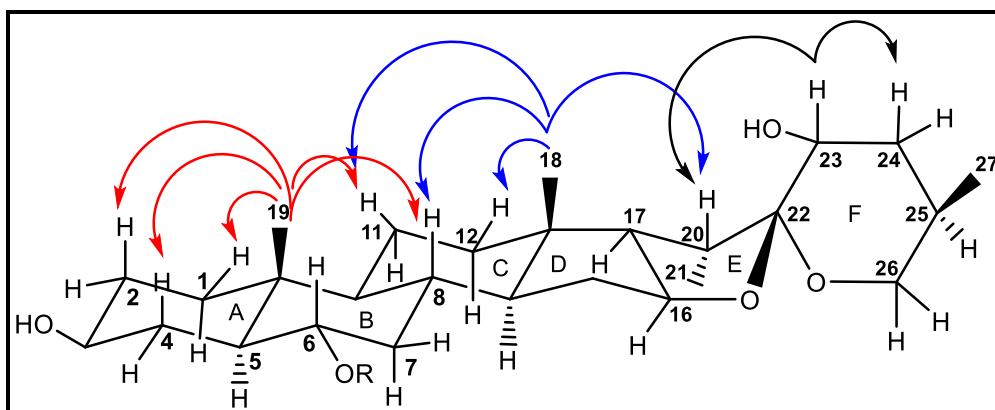
Figura 29. Espectro NOESY-1D da substância **1**. Irradiação seletiva em δ_H 0,87. (14,1 T, CD_3OD).



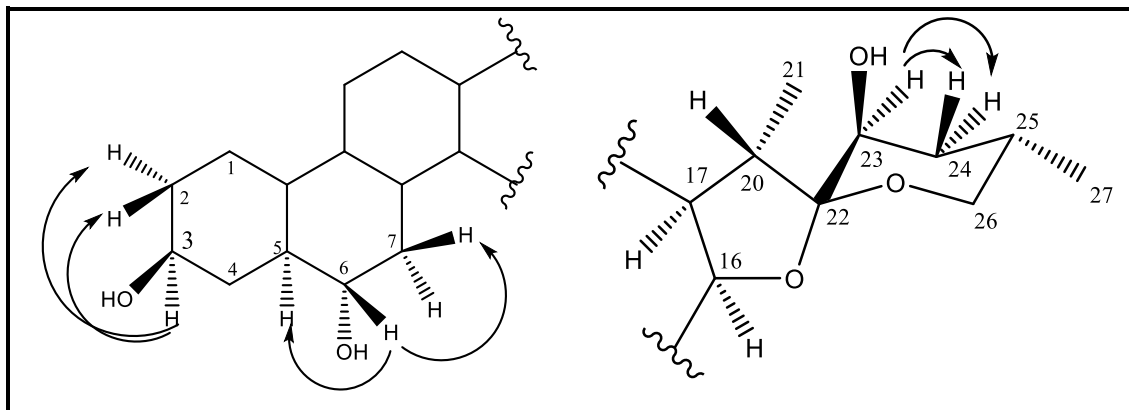
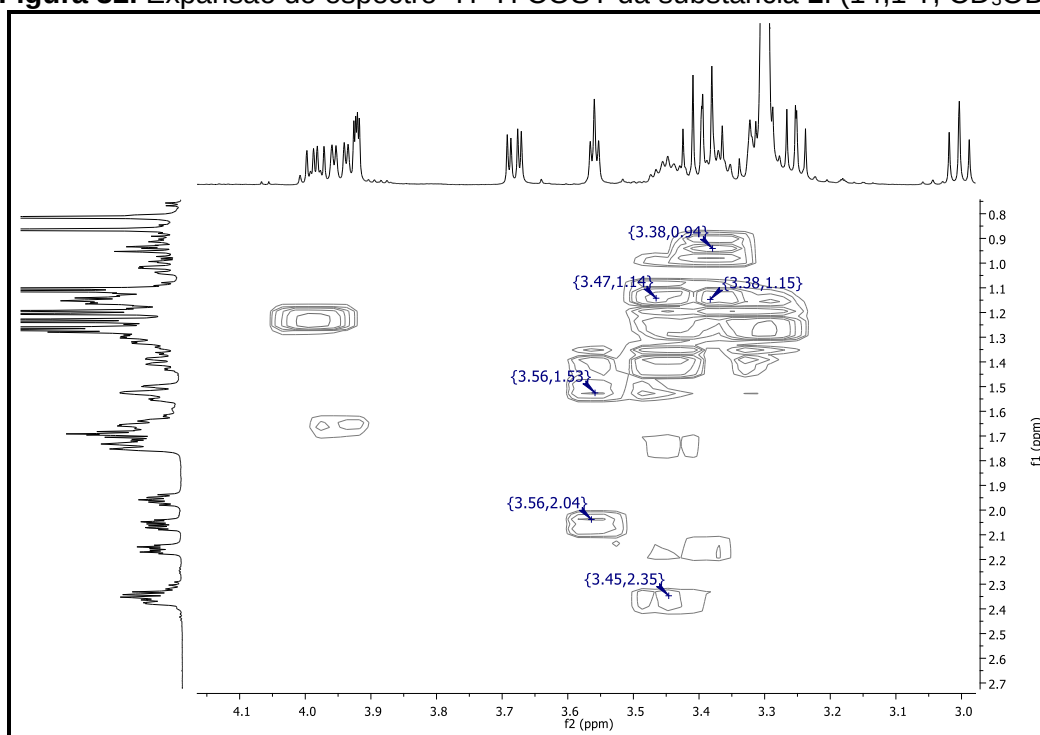
Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

Na Figura 30 apresenta-se um resumo das interações observadas no espectro NOESY-1D para a substância **1**.

Figura 30. Principais interações observadas no espectro NOESY-1D para a substância **1**.



O espectro ^1H - ^1H COSY (Figura 31) apresenta a correlação entre o H-3 (δ_H 3,45) com o CH_2 -2_{a,b} [(δ_{Ha} 1,15 e δ_{Hb} 2,35)]; entre o H-6 (δ_H 3,38) com o H-7 (δ_H 0,94) e o H-5 (δ_H 1,15); entre o H-23 (δ_H 3,56) e o CH_2 -24_{a,b} [(δ_{Ha} 1,53 e δ_{Hb} 2,06)] sugerindo a ocorrência da hidroxila em C-3, C-23 e C-6 (Figura 32).

Figura 31. Correlações ^1H - ^1H COSY da substância **1**.**Figura 32.** Expansão do espectro ^1H - ^1H COSY da substância **1**. (14,1 T, CD_3OD).

Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

A configuração do C-25 (*S* ou *R*) em 23-hidroxiespirostanol é determinada observando-se o deslocamento químico dos hidrogênios da metila CH_3 -27. Deste modo, quando o grupo metílico CH_3 -27 encontra-se em posição *axial* (orientação β), apresentará um deslocamento químico entre δ_{H} 1,10-1,53, devido às interações 1,3-*diaxiais* (com o hidrogênio ou a hidroxila) na posição C-23 (LIDA et al., 2005). Por outro lado, quando o grupo metílico CH_3 -27 se encontra na posição *equatorial*, esta apresentará um deslocamento químico

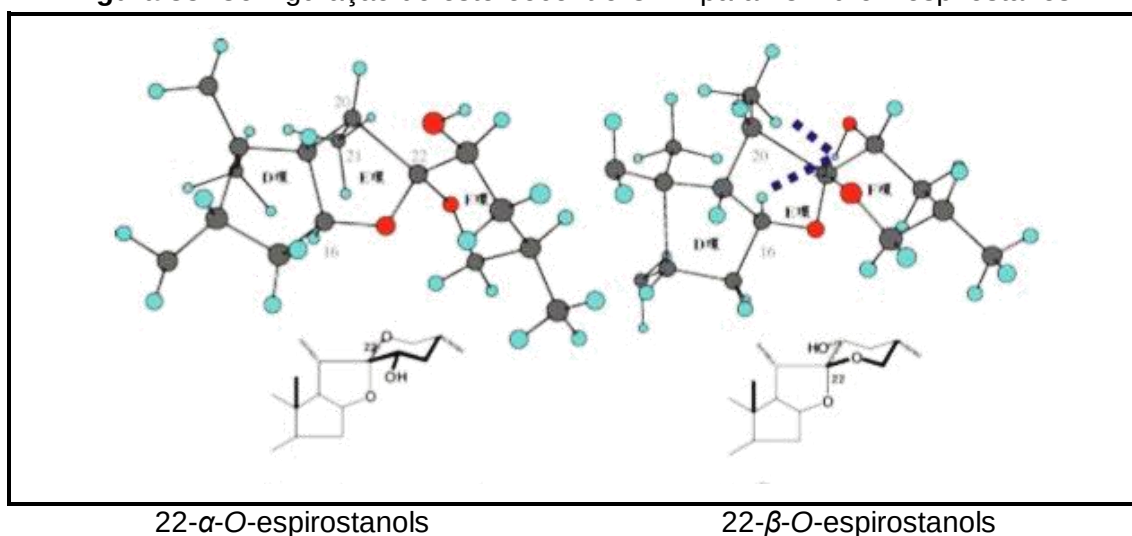
entre δ_H 0,71-0,83 (devido à ausência de interação com outros grupos), portanto, o carbono C-25 terá uma configuração *R* (LIDA et al., 2005). No caso do composto **1** a CH_3 -27 apresenta deslocamento químico em δ_H 1,20 sugerindo uma orientação *axial* e, portanto, configuração *S* para o C-25.

Para a determinação da configuração em C-22 (β ou α), a análise dos deslocamentos químicos de RMN- ^1H de CH_3 -21 e H-16 foram comparadas com outros 23-hidroxi-espirostanols, além dos deslocamentos químicos de RMN ^{13}C do C-20 (MAHMOOD et al., 2002).

Neste sentido, para os 22- α -O-espirostanols a metila CH_3 -21 apresenta deslocamento químico entre (δ_H 1,08-1,26); H-16 (δ_H 4,49-4,56) e C-20 em (δ_C 35,0-36,2). No caso de 22- β -O-espirostanols, a metila CH_3 -21 apresentará deslocamento químico entre δ_H (1,52-1,54); H-16 (δ_H 5,18-5,20) e o C-20 (δ_C 43,0-44) (MATSUSHITA et al., 2007).

Este comportamento é devido a que no caso dos 22- β -O-espirostanols tanto a metila CH_3 -21 como o H-16 estão espacialmente mais próximos ao grupo hidroxila que ocupa a posição C-23, isto provoca uma maior repulsão eletrônica entre eles, obtendo-se maiores deslocamentos químicos quando comparados com os 22- α -O-espirostanols (Figura 33).

Figura 33. Configuração do estereocentro C-22 para 23-hidroxi-espirostanos.



Adaptado de: MATSUSHITA et al., 2007

A substância **1** apresentou sinal no espectro de RMN- ^1H para a metila CH_3 -21 em (δ_H 1,11); H-16 (δ_H 4,46) assim como para o C-20 em δ_C 39,6 no

espectro de RMN- ^{13}C , sugerindo uma configuração 22- α -O-espirostanol.

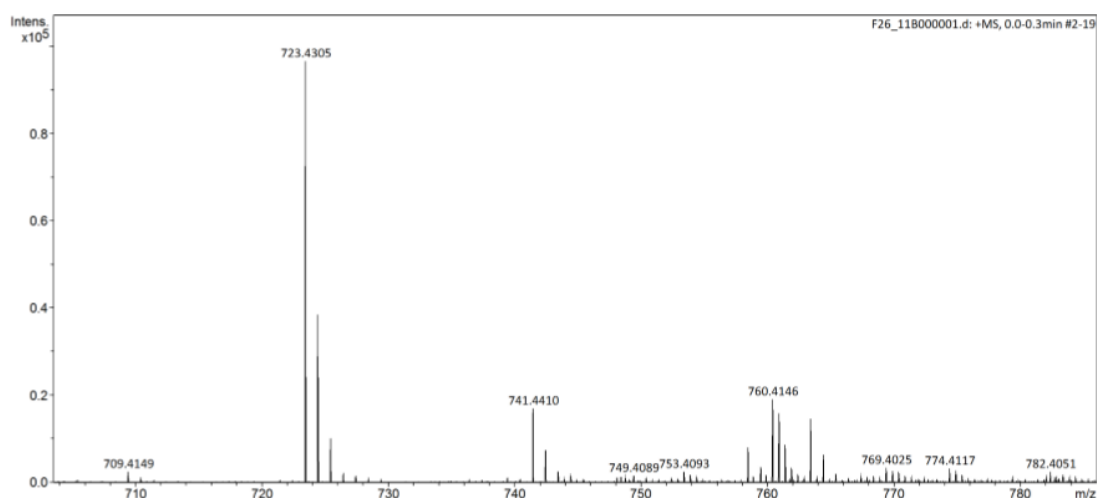
Este fato confirma que a configuração do estereocentro C-22 para 23-hidroxiespirostanos pode ser determinada de acordo com os valores obtidos dos dados de RMN- ^1H e ^{13}C para a CH_3 -21, o H-16 (deslocamentos químicos de RMN- ^1H) e o C-20 (deslocamento químico de RMN- ^{13}C) (MATSUSHITA et al., 2007).

Portanto, a aglicona do composto **1** foi caracterizada como: (22S, 23R, 25S)-3 β , 6 α , 23-triidroxi-5 α -espirostanol.

A análise do experimento no mapa de contorno HMBC (Figura 24) ajudou na determinação do sítio de ligação do açúcar com a aglicona. Para isto, foram observadas as correlações entre o hidrogênio anomérico da quinovose H-1' (δ_{H} 4,26) com o carbono C-6 (δ_{C} 78,9) do sapogenol, o que permitiu estabelecer a ligação da posição C-1' da quinovose com a posição C-6 da aglicona. Por outro lado, foi também observado no mapa de contorno HMBC a correlação entre o hidrogênio H-3' (δ_{H} 3,41) da quinovose com o carbono C-1'' (δ_{C} 101,4) da ramnose, o que permitiu estabelecer a ligação (1'' $\rightarrow$ 3') entre as unidades de açúcares quinovose-ramnose.

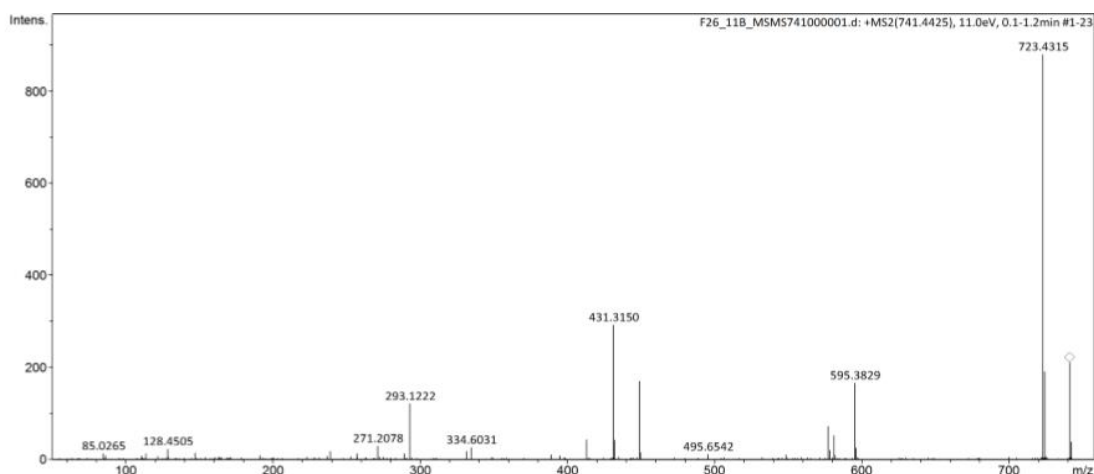
Os deslocamentos químicos da substância **1** são muito similares com o torvosídeo K(2) isolado dos frutos de *Solanum torvum* (LIDA et al., 2005), porém as principais diferenças encontradas foram na configuração dos carbonos C-22 e C-23 na substância **1**.

O espectro de massas de alta resolução para a substância **1** permitiu determinar o íon molecular protonado $[\text{M}+\text{H}]^+$ com m/z 741,4410 (calculado m/z 741,4420) no modo positivo (Figura 34). Esta massa possibilitou estabelecer a fórmula molecular deste composto como $\text{C}_{39}\text{H}_{64}\text{O}_{13}$.

Figura 34. Espectro HRESI-MS da substância **1**. Modo positivo.

Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

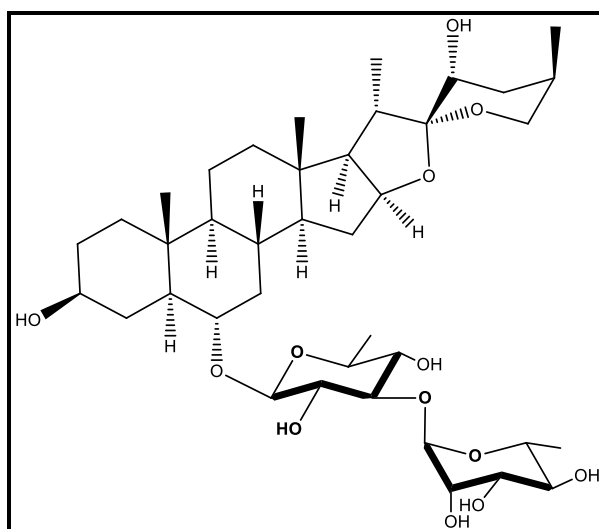
O espectro de massas ESIMS/MS no modo positivo (Figura 35) permitiu obter os fragmentos MS² correspondentes à fragmentação do íon molecular [M+H]⁺ com m/z 741,4410, sendo que o fragmento com m/z 723,4315 corresponde à perda [M+ H - H₂O]⁺, o fragmento m/z 595,3829 com a perda [M+ H - ram]⁺, e o fragmento m/z 431,3150 com a perda [M+ H - ram - H₂O]⁺.

Figura 35. Espectro ESIMS/MS do íon molecular [M+H]⁺ m/z 741,4410 da substância **1**. Modo positivo.

Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

Análises dos dados espectroscópicos e espectrométricos obtidos e pela comparação parcial com os dados da literatura (LIDA et al., 2005) sugerem que a substância **1** é o 6-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1'' $\rightarrow$ 3')- β -D-quinovopiranosil-(22*S*,23*R*,25*S*)-3 β ,6 α ,23-triidroxi-5 α -espirostanos. Esta substância foi descrita pela primeira vez na Literatura por VALERINO-DIAZ e colaboradores, (2018). (Figura 36)

Figura 36. Estrutura da substância **1**.



4.2.2 Elucidação estrutural da substância 2.

A substância **2** foi obtida como um sólido amorfo, de coloração amarela com uma massa de 4,7 mg. Os espectros de RMN- ^1H e ^{13}C (Figuras 37, 38; Tabelas 3, 4; págs. 133, 136) apresentaram um padrão bastante semelhante à substância **1**, exceto para o sinal atribuído para a CH_3 -27, (δ_{H} 0,76, d, $J = 6,6$ Hz) confirmando que esta encontra-se no anel F em *equatorial* com configuração *R* em C-25 (LIDA et al., 2005). Portanto a substância **2** é considerada um epímero da substância **1**.

Figura 37. Espectro de RMN- ^1H da substância **2** (14,1 T, CD_3OD).

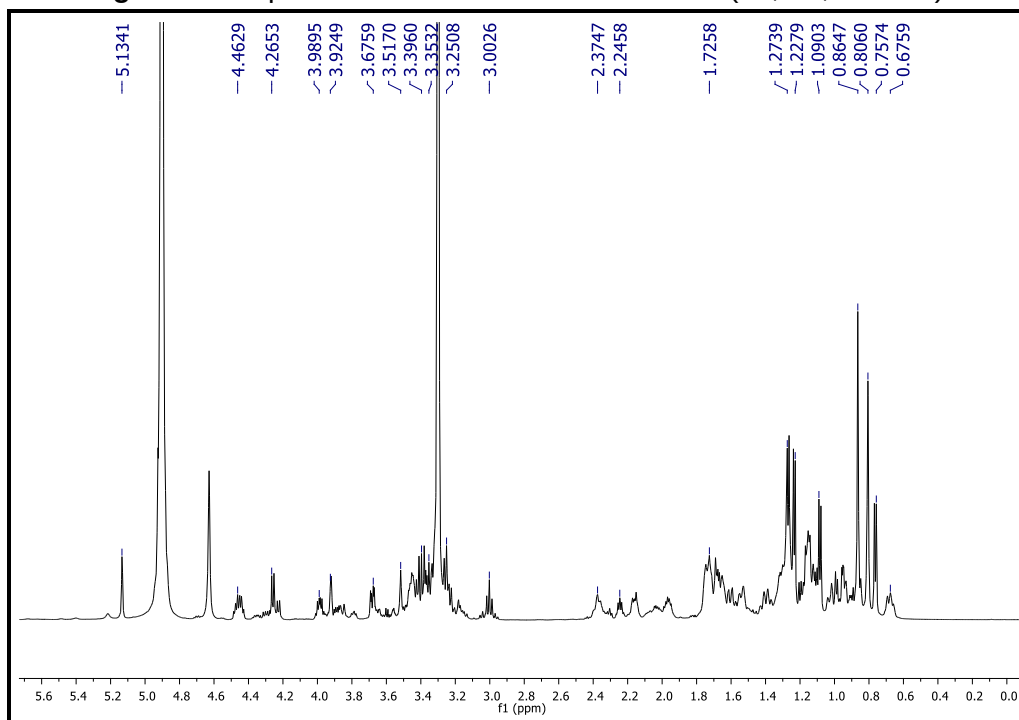
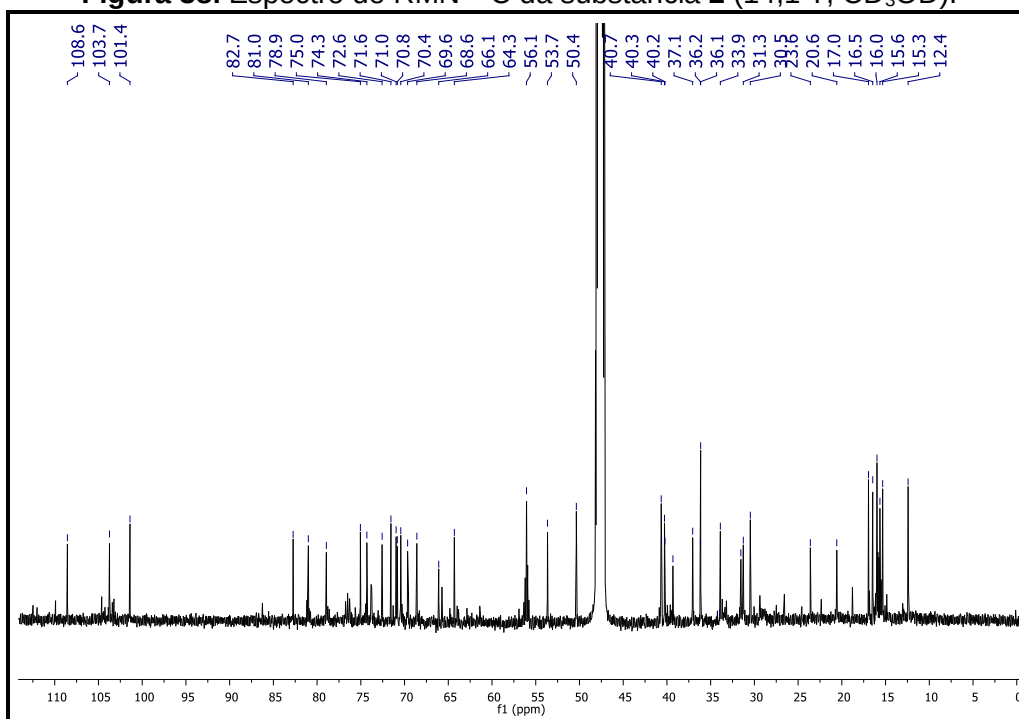


Figura 38. Espectro de RMN- ^{13}C da substância **2** (14,1 T, CD_3OD).



As análises dos espectros de ^1H - ^1H COSY, HSQC e HMBC (Figuras 39-41) permitiram a atribuição dos sinais de hidrogênios e carbonos, os quais são apresentados nas Tabelas 3 e 4; págs. 133, 136.

Figura 39. Espectro ^1H - ^1H COSY da substância **2** (14,1 T, CD_3OD)

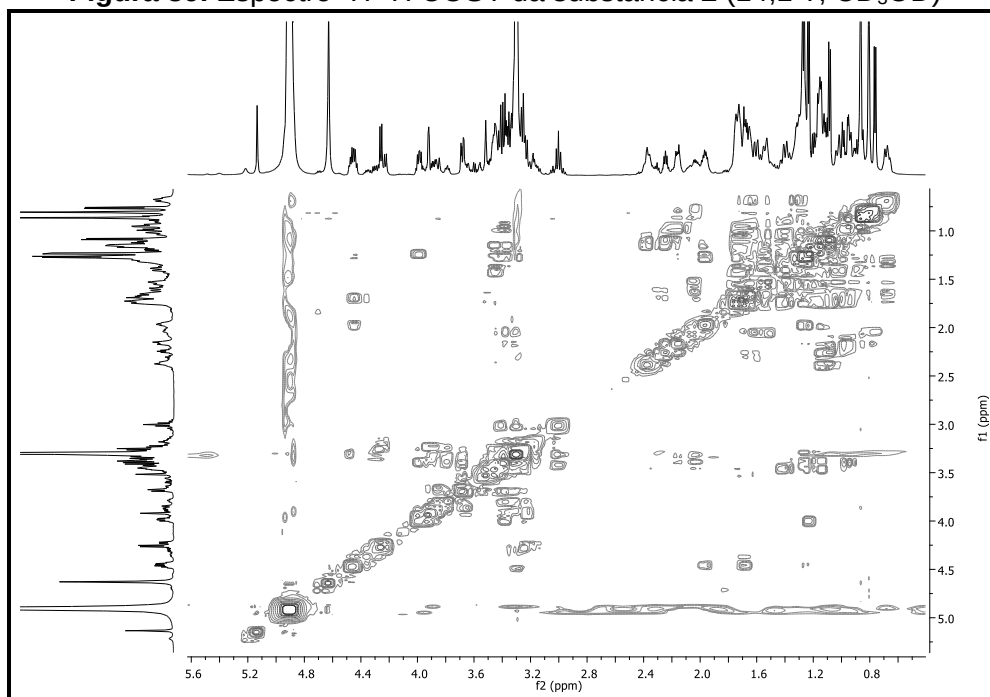


Figura 40. Espectro HSQC da substância **2** (14,1 T, CD_3OD).

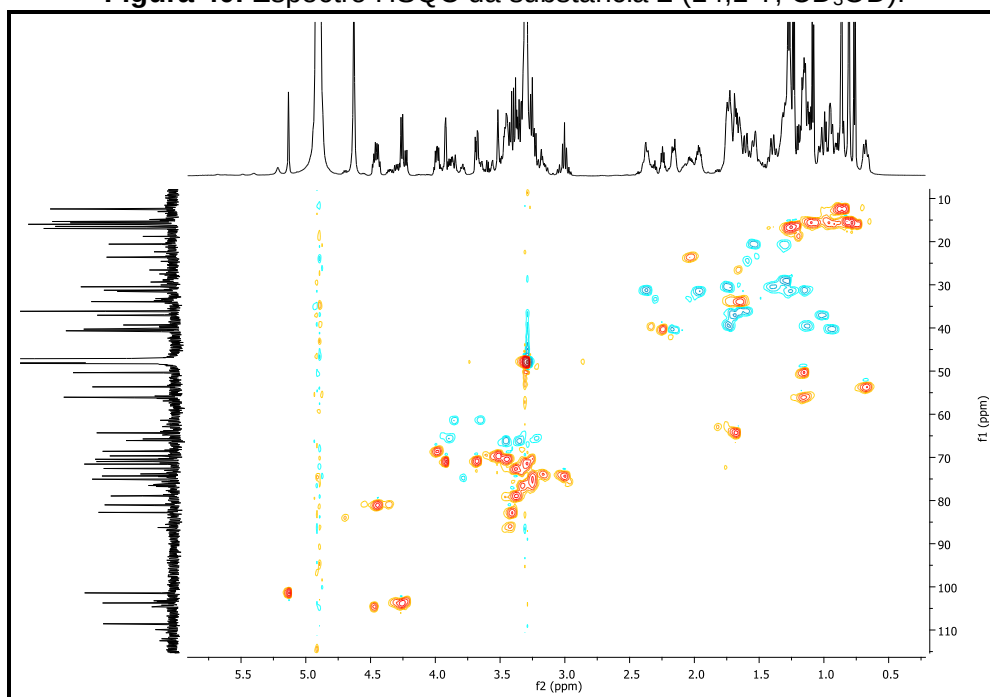
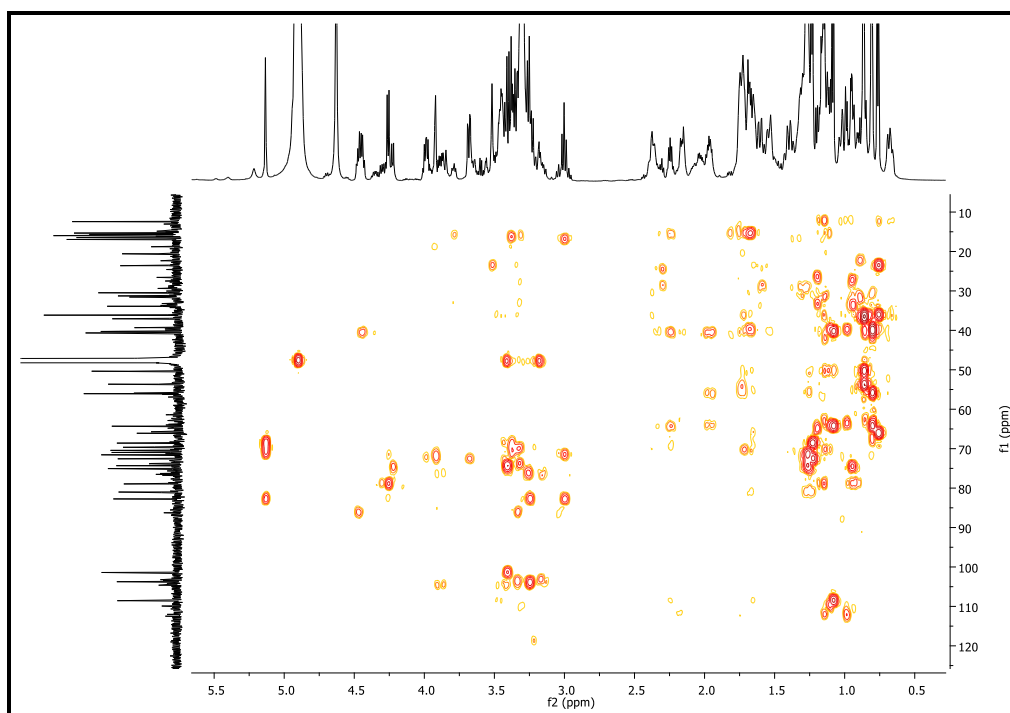


Figura 41. Mapa de contorno HMBC da substância **2**. (14,1 T, CD₃OD).

As interações no espectro NOESY-1D para a aglicona da substância **2** foram estudadas a fim de se estabelecer as configurações entre os anéis AB, BC, CD e DE (Figuras 42, 43), assim como para determinar os substituintes que aparecem em cada face da molécula.

Neste experimento pode-se observar as mesmas interações via NOESY encontradas na substância **1**, o que confirma para o composto **2** a junção *trans* entre os anéis AB, BC e CD, assim como a junção *cis* entre os anéis DE. Também se confirmou a configuração β para as CH₃-18 e CH₃-19, assim como uma orientação α para CH₃-21, com configuração *S* para o C-20 no sapogenol.

Figura 42. Espectro NOESY-1D da substância **2**. Irradiação seletiva em δ_H 0,81. (14,1 T, CD_3OD).

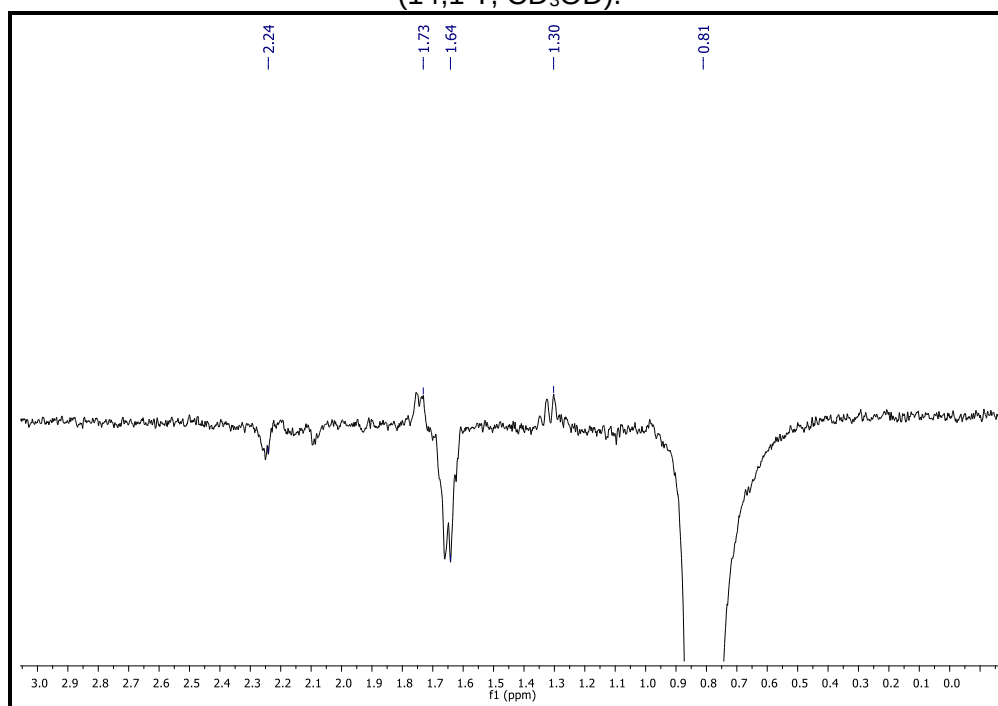
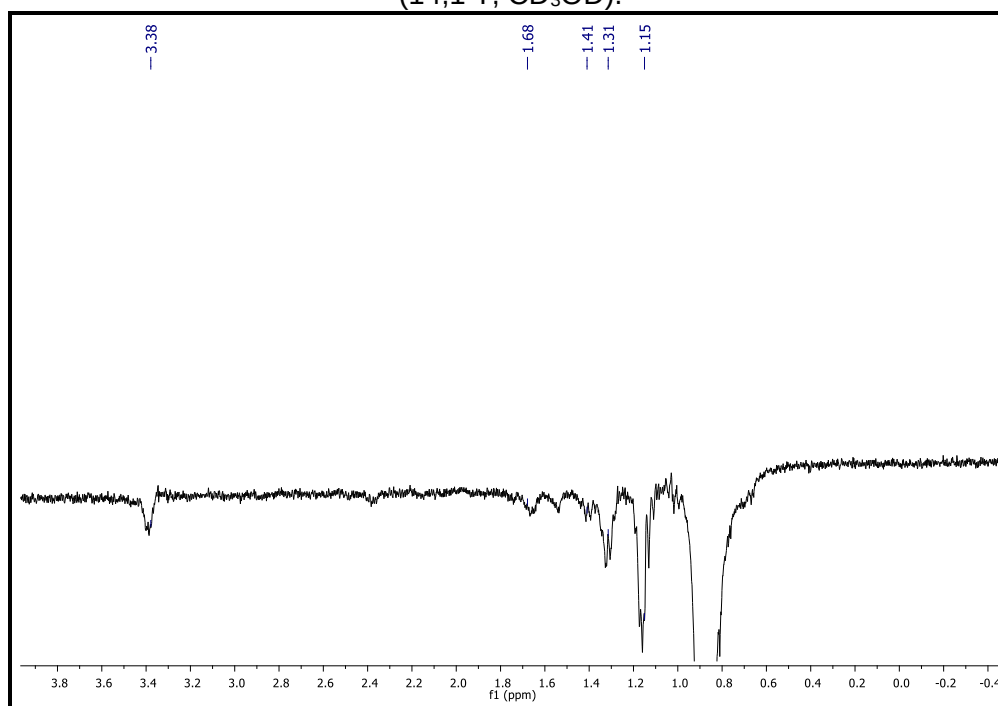
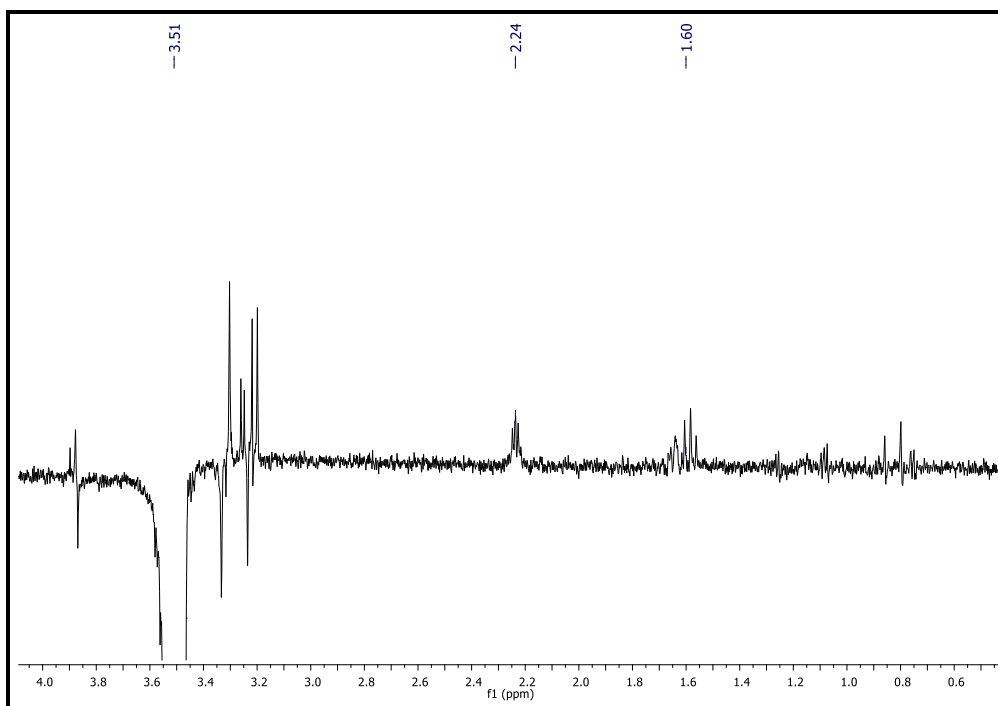


Figura 43. Espectro NOESY-1D da substância **2**. Irradiação seletiva em δ_H 0,87. (14,1 T, CD_3OD).



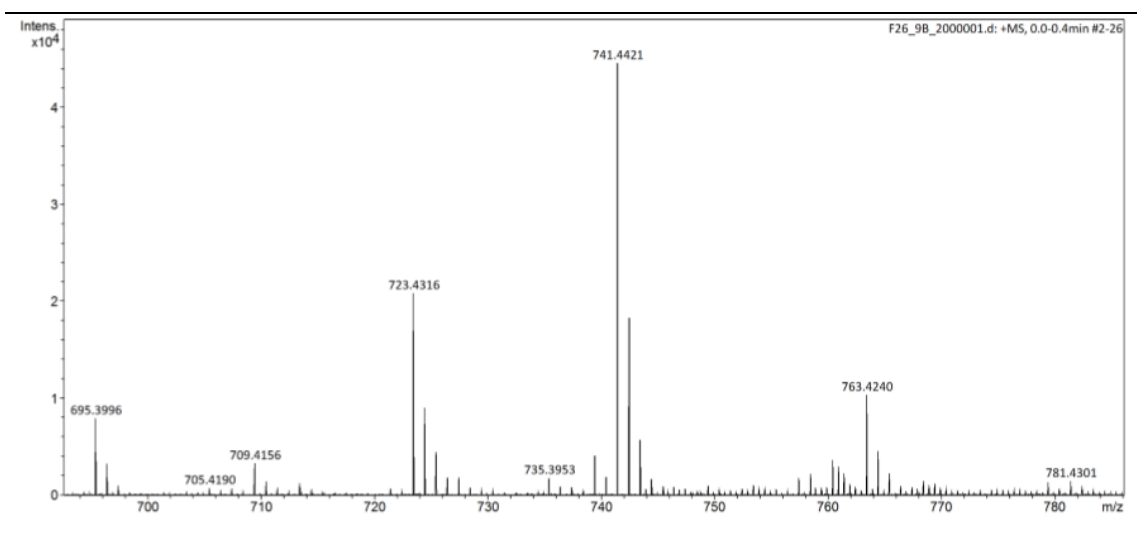
Finalmente, a irradiação seletiva (NOESY-1D) do H-23 (δ_H 3,51, m) (Figura 44) apresentou interação com o H-20 (δ_H 2,24, m) e o H-24 (δ_H 1,60, m), justificando sua posição em *axial* com configuração *R* no C-23.

Figura 44. Espectro NOESY-1D da substância **2**. Irradiação seletiva em δ_H 3,51. (14,1 T, CD_3OD).



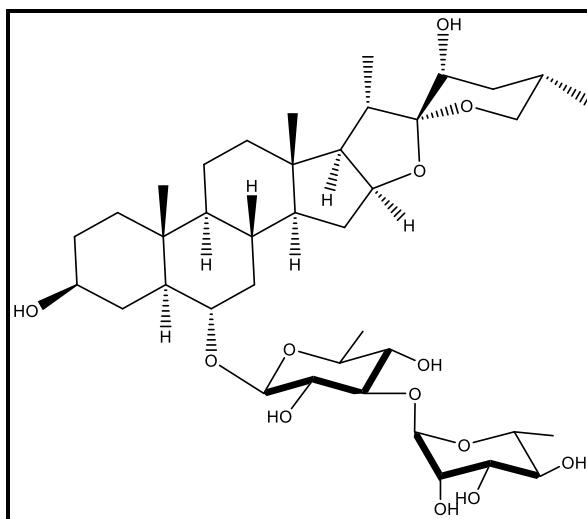
A determinação da configuração do estereocentro C-22 foi determinada de acordo à metodologia proposta por MATSUSHITA e colaboradores (2007). Neste sentido, a aglicona apresenta sinais no RMN- ^1H (Tabela 3, pag. 120) da metila CH_3 -21 em (δ_H 1,09 d, $J = 7,0$ Hz) e H-16 (δ_H 4,45, m) assim como um deslocamento químico de carbono no espectro de RMN- ^{13}C para C-20 de δ_c 40,3 (Tabela 4, pag. 123), indicando que a substância **2** apresenta uma configuração em C-22 α -O-espirostanol (C-22S) (MATSUSHITA et al., 2007).

O espectro de massas da substância **2** permitiu determinar a fórmula molecular como $C_{39}H_{64}O_{13}$ apresentando um íon molecular protonado $[M+H]^+$ em m/z 741,4421 (calculado: 741,4420) no HRESI-MS (modo positivo) de acordo ao mostrado na Figura 45.

Figura 45. Espectro HRESI-MS da substância **2**. Modo positivo.

A comparação dos dados espectroscópicos da substância **2** com a saponina esteroidal isolada a partir de folhas de *S. chrysotrichum* (ZAMILPA et al., 2002) mostrou deslocamentos químicos muito semelhantes tanto no RMN- ^1H como no RMN- ^{13}C , sendo que a diferença na substância **2** encontra-se na configuração do estereocentro C-22 (S).

Portanto, a substância **2** foi identificada como o 6-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1'' $\rightarrow$ 3')- β -D-quinovopiranosil-(22*S*,23*R*,25*R*)-3 β ,6 α ,23-triidroxi-5 α -espirostano (Figura 46). Esta substância está sendo isolada e descrita pela primeira vez na Literatura.

Figura 46. Estrutura da substância **2**.

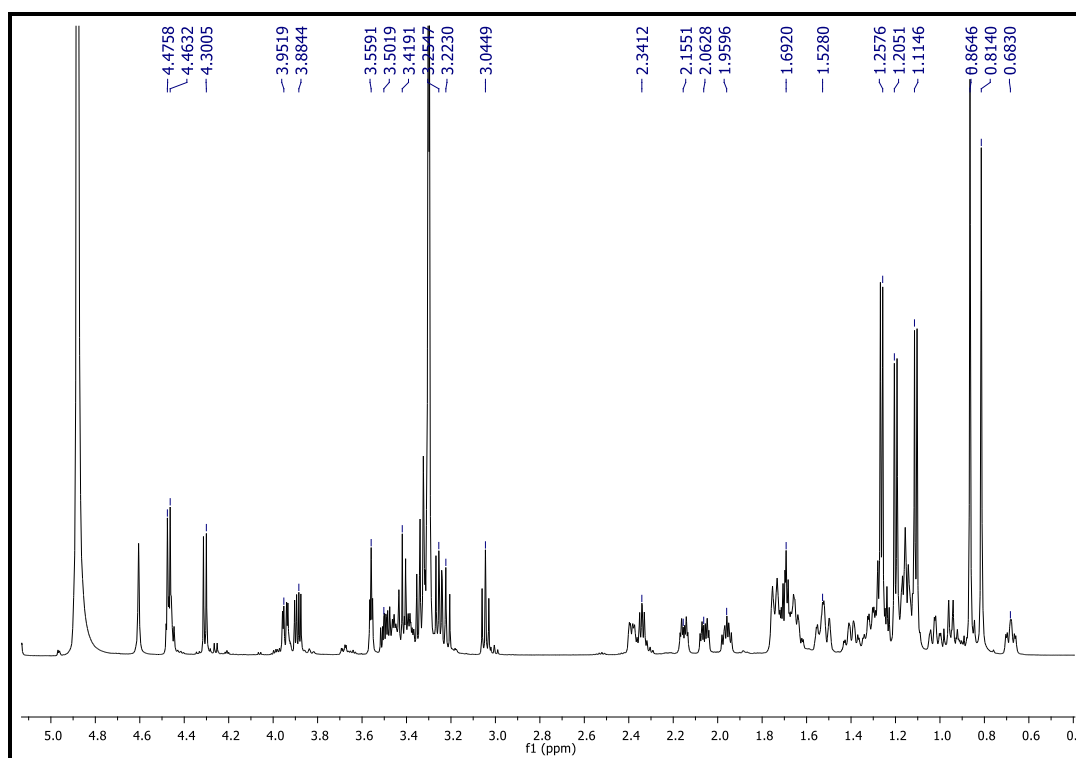
4.2.3 Elucidação estrutural da substância 3.

A substância **3** foi obtida como um sólido amorfo, de coloração amarela (17,4 mg). O espectro de RMN-¹H (Figura 47) apresentou o padrão característico de saponinas esteroidais, com dois dupletos na região mais blindada em δ_H 1,11 e δ_H 1,20 que correspondem às metilas nas posições CH₃-21 e CH₃-27 do núcleo esteroidal.

Nesta mesma região, foram observados dois singletos: um em δ_H 0,81 e outro em δ_H 0,86 sendo atribuídas às CH₃-18 e CH₃-19 do sistema tetracíclico. Na região mais desblindada do espectro podem-se observar dois dupletos, com deslocamentos químicos em δ_H 4,30 e em δ_H 4,47 que correspondem aos hidrogênios anoméricos de duas unidades de açúcares.

O sinal em δ_H 4,47 corresponde ao hidrogênio da posição H-16, característico do sistema espirostano de uma saponina esteroidal (AGRAWAL et al., 1995). Na região entre δ_H 2,90 e δ_H 4,00 encontram-se os deslocamentos químicos dos demais hidrogênios das duas unidades glicosídicas.

Figura 47. Espectro de RMN-¹H da substância **3** (14,1 T, CD₃OD).



O deslocamento químico da $\text{CH}_3\text{-27}$ (δ_{H} 1,20) sugere que esta ocupa uma posição *axial* no anel F do sapogenol e portanto, a configuração de C-25 foi proposta como S (LIDA et al., 2005).

O espectro de RMN- ^{13}C (Figura 48) apresentou 38 sinais de carbono que, aliados às informações do experimento DEPT-135° (Figura 49), permitiram determinar que 3 pertencem a carbonos quaternários, 20 a carbonos terciários, 10 a carbonos secundários e 5 a carbonos primários.

Os sinais existentes na região mais desblindada do espectro em δ_{C} 109,9 e δ_{C} 81,2 correspondem aos carbonos C_{22} e C_{16} característicos da cadeia espiroacetálica presente neste tipo de substância (AGRAWAL, 2003).

Os deslocamentos químicos dos carbonos em δ_{C} 103,4 e δ_{C} 104,6 foram atribuídos aos carbonos anoméricos dos dois açúcares presentes na saponina. Por outro lado, na região mais blindada do espectro podem ser observados os deslocamentos químicos das metilas C_{18} (δ_{C} 12,4); C_{19} (δ_{C} 15,4); C_{21} (δ_{C} 15,5) e C_{27} (δ_{C} 18,8) da saponina esteroidal.

Figura 48. Espectro de RMN- ^{13}C da substância **3** (14,1 T, CD_3OD).

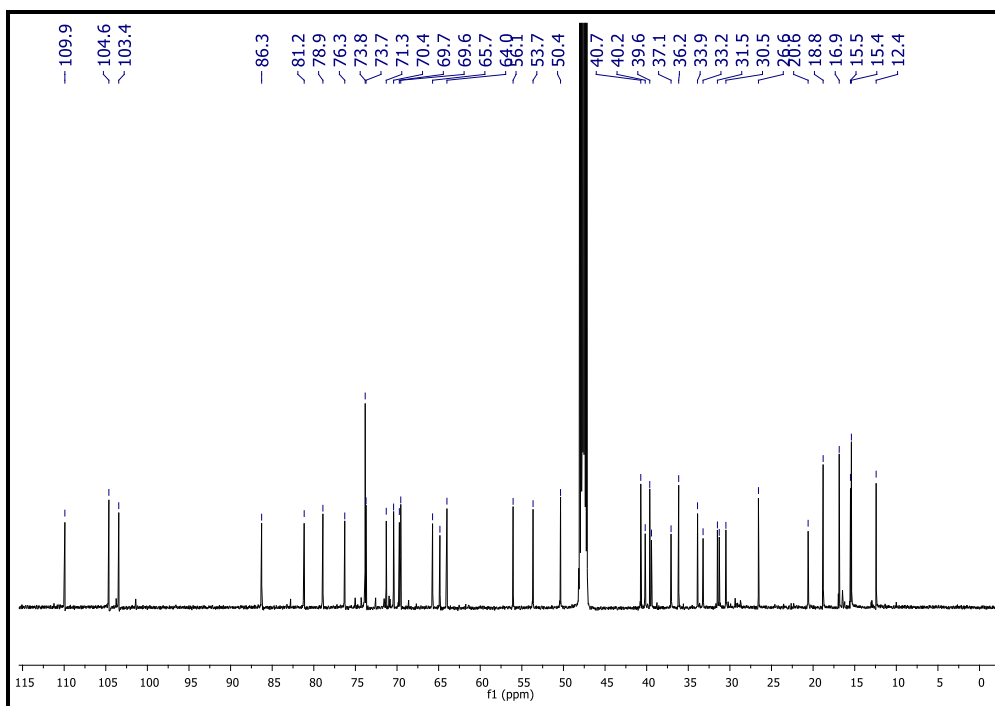
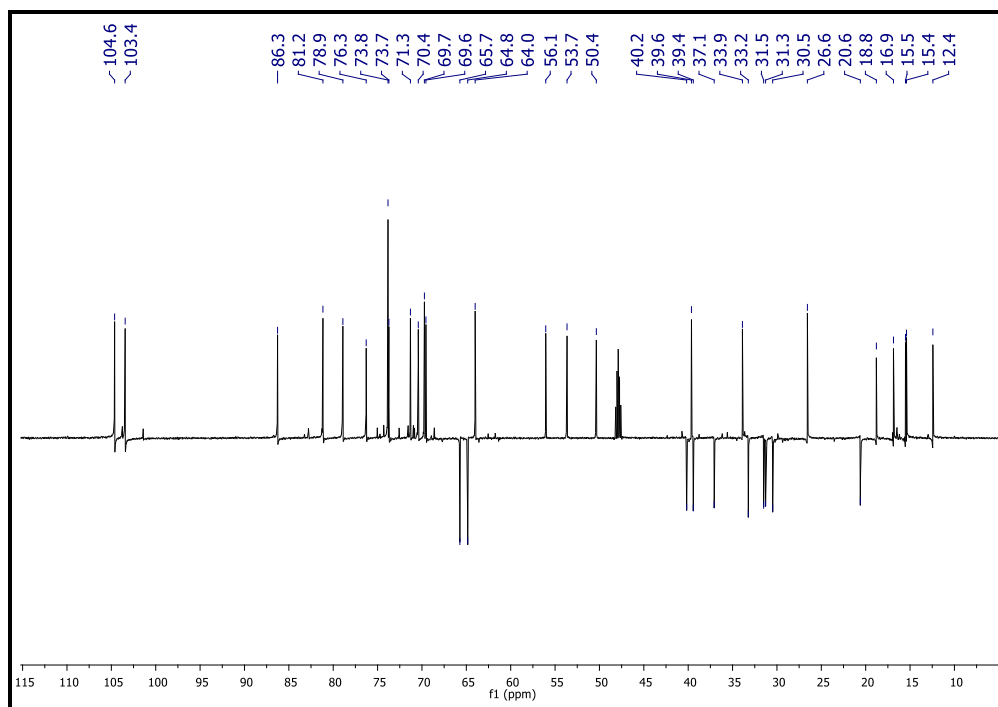


Figura 49. Espectro DEPT-135 da substância **3** (14,1 T, CD₃OD).

O espectro NOESY-1D (Figura 50) mostrou as interações entre o H-23 (δ_H 3,56) com o H-20 (δ_H 2,34) e com o H-24 (δ_H 2,06), sugerindo que o H-23 está em *axial* no sapogenol e, portanto, a configuração *R* para o C-23.

As interações observadas via NOESY-1D (Figuras 51, 52) para as metilas CH_3 -19 (δ_H 0,86) e CH_3 -18 (δ_H 0,81) na substância **3** são muito similares às observadas nas substâncias **1** e **2**, o que permitiu estabelecer para a substância **3** uma junção *trans* entre os anéis AB, BC e CD, assim como uma junção *cis* entre os anéis DE. Também se confirmou a configuração β para CH_3 -18 e CH_3 -19, assim como uma orientação α para CH_3 -21 (configuração *S* para C-20) no sapogenol.

Figura 50. Espectro NOESY-1D do composto **3**. Irradiação seletiva em δ_H 3,56. (14,1 T, CD_3OD).

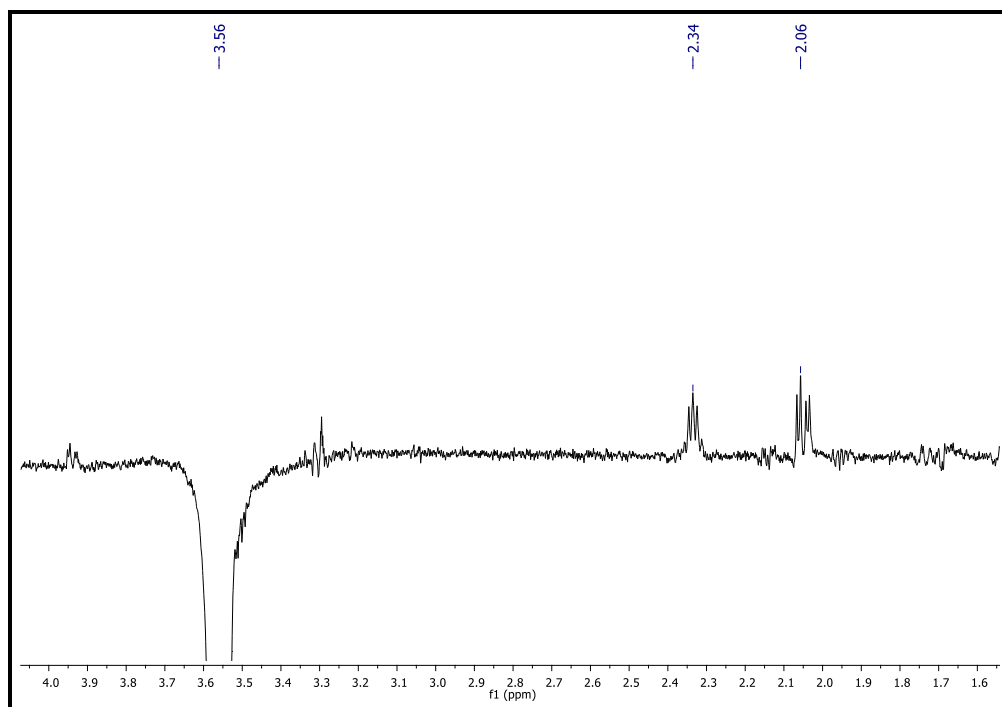


Figura 51. Espectro NOESY-1D da substância **3**. Irradiação seletiva em δ_H 0,86. (14,1 T, CD_3OD).

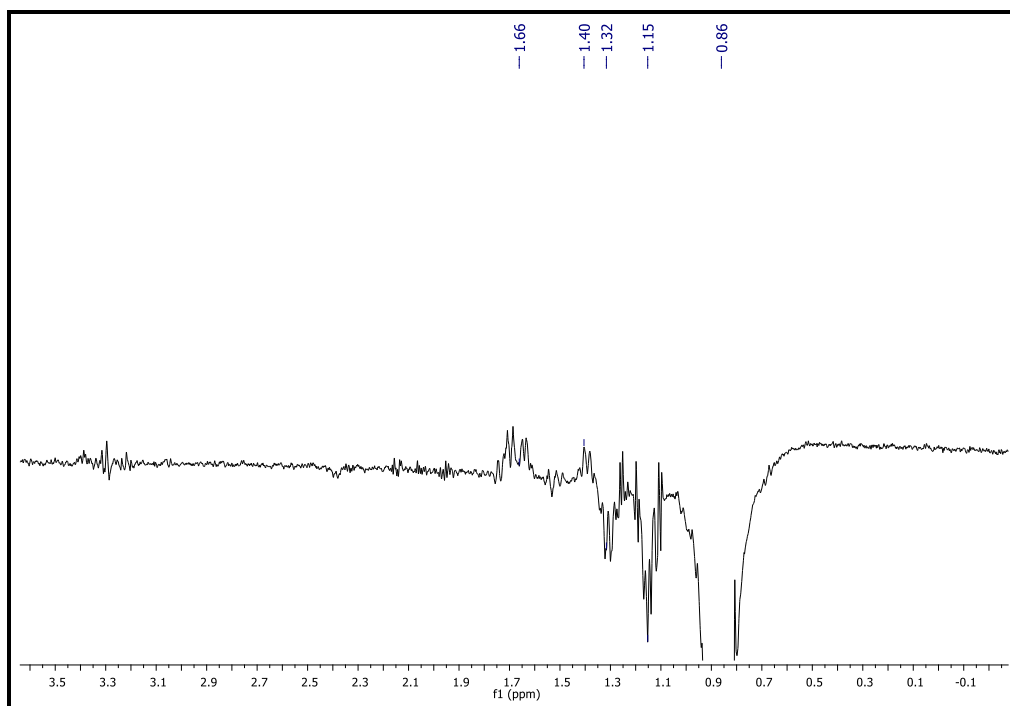
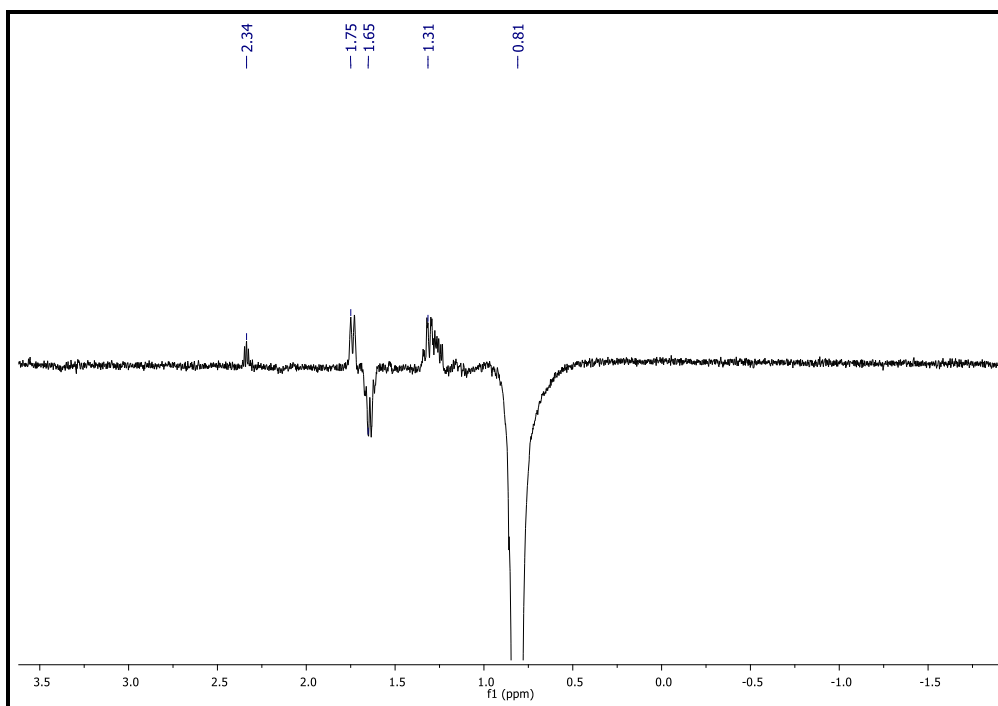


Figura 52. Espectro NOESY-1D do composto **3**. Irradiação seletiva em δ_H 0,81. (14,1 T, CD_3OD).



Os deslocamentos químicos para as duas unidades de açúcares da substância **3** foram atribuídos utilizando a técnica TOCSY-1D. A irradiação no hidrogênio anomérico em δ_H 4,30 permitiu demonstrar que o sistema de spin desta unidade glicosídica é constituído pelos hidrogênios com deslocamentos químicos em δ_H 3,35 (H-2'); δ_H 3,42 (H-3'); δ_H 3,05 (H-4'); δ_H 3,32 (H-5') e δ_H 1,26 (CH_3 -6') (Figura 53).

Por outro lado, a irradiação seletiva utilizando a técnica TOCSY-1D no hidrogênio com deslocamento químico em δ_H 4,47, ($J = 7,6$ Hz), permitiu demonstrar que este glicosídeo é constituído pelos hidrogênios com deslocamentos químicos em δ_H 3,26 (H-2''); δ_H 3,33 (H-3''); δ_H 3,50 (H-4''); e o metileno em δ_H 3,23 e δ_H 3,89 (CH_2 -5'') (Figura 54).

As análises destes experimentos permitiram determinar as duas unidades de açúcares como β -D-quinovose (hidrogênio anomérico em δ_H 4,30) e β -D-xilose (hidrogênio anomérico em δ_H 4,47).

Figura 53. Espectro TOCSY-1D do composto **3**. Irradiação em δ_H 4,30. (14,1 T, CD_3OD).

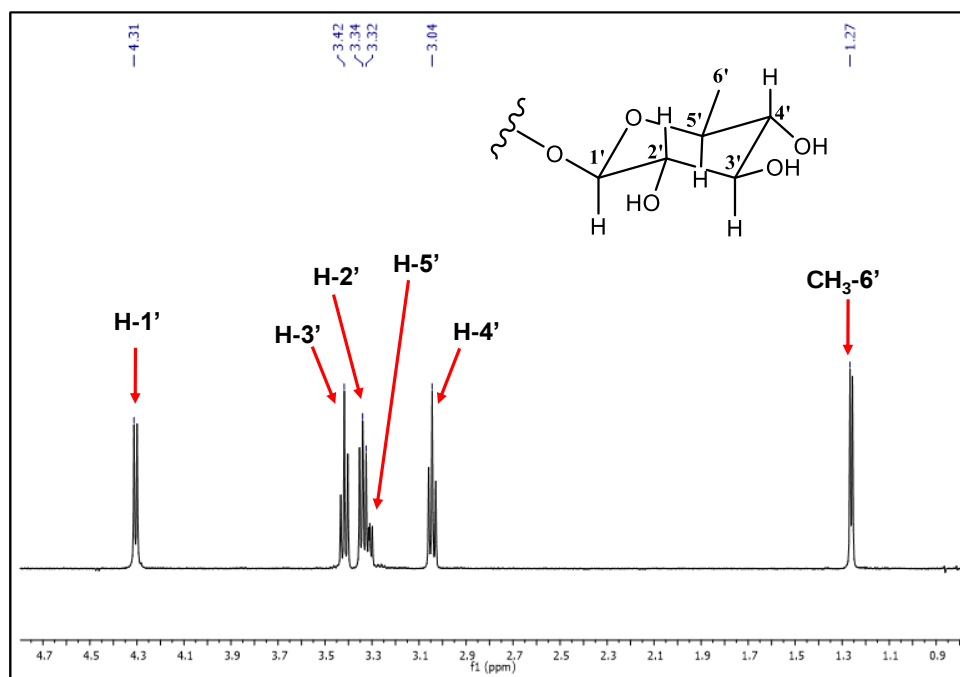
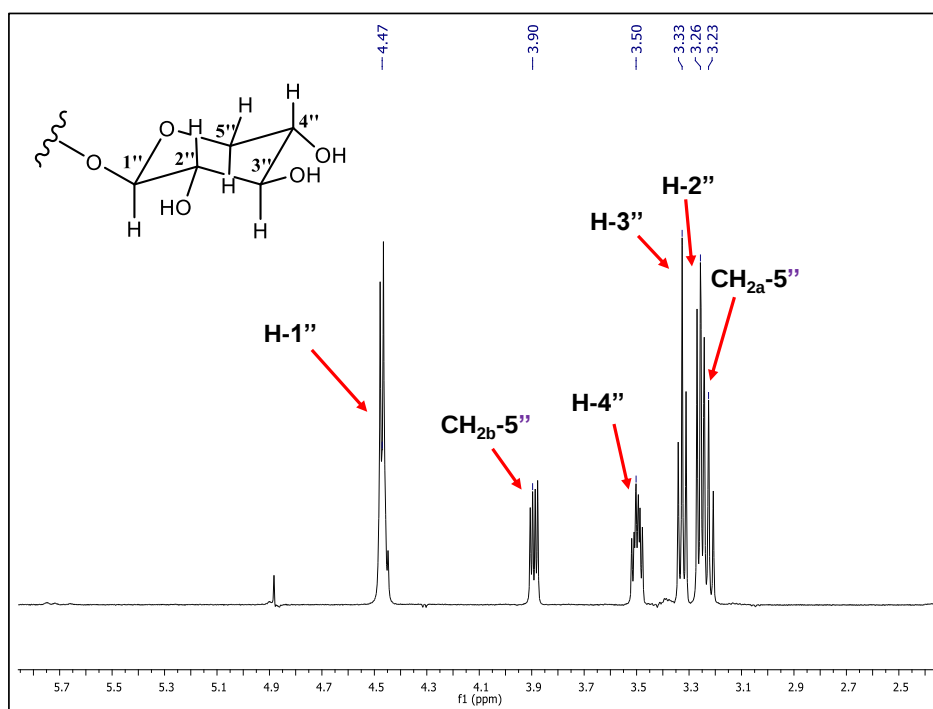


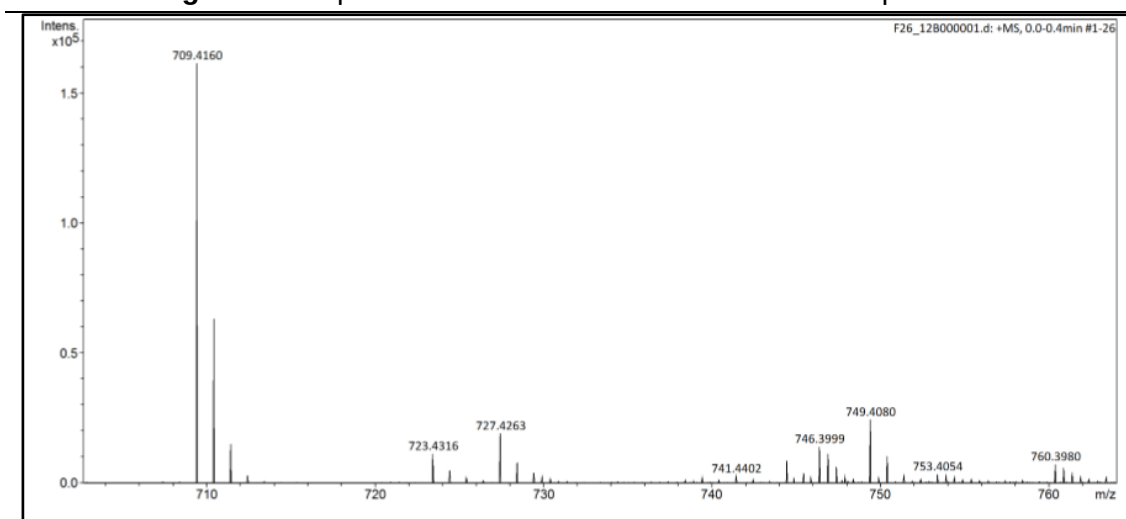
Figura 54. Espectro TOCSY-1D do composto **3**. Irradiação em δ_H 4,47. (14,1 T, CD_3OD).



A aglicona da substância **3** apresenta sinais no RMN- ^1H (Tabelas 3, 4; págs. 133, 136) da metila CH_3 -21 em (δ_{H} 1,11 d, $J = 7,0$ Hz) e H-16 (δ_{H} 4,47, m) assim como o deslocamento químico de carbono no espectro de RMN- ^{13}C para C-20 de δ_{C} 39,6, o que sugere que a substância **3** apresenta uma configuração em C- 22 (S) (MATSUSHITA et al., 2007).

O espectro de HRESI-MS no modo positivo (Figura 55) mostrou o íon molecular protonado $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 727,4263 (calculado: 727,4263), compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{38}\text{H}_{62}\text{O}_{13}$.

Figura 55. Espectro HRESI-MS da substância **3**. Modo positivo.



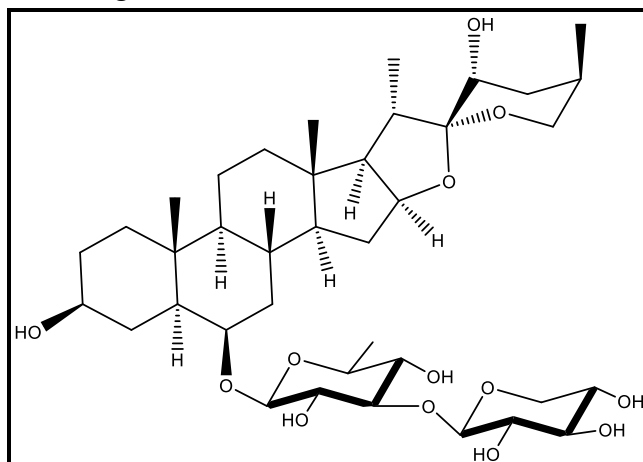
Os dados espectroscópicos da substância **2** são muito semelhantes com os previamente obtidos de uma saponina esteroidal isolada por RIPPENGER, SHEREIBER, (1968) das folhas de *S. paniculatum*, assim como por GONZÁLEZ e colaboradores (2004) das folhas de *S. hispidum*.

No entanto, a principal diferença estrutural na substância **3** em relação às substâncias previamente isoladas reportadas na Literatura, está referida na configuração do centro estereogênico C-22 com configuração S.

Portanto, pela análise dos dados espectroscópicos uni e bidimensionais e da espectrometria de massas apresentados, assim como pela comparação parcial com os dados de RMN da substância **3** com a Literatura, podemos identificá-la como 6-O- β -D-xilopiranosil-(1'' $\rightarrow$ 3')- β -D-quinovopiranosil-

(22*S*,23*R*,25*S*)-3 β ,6 α ,23-triidroxi-5 α -espiroetano, sendo esta substância descrita pela primeira na literatura (inérita). A estrutura da substância **3** é mostrada na Figura 56.

Figura 56. Estrutura da substância **3**.

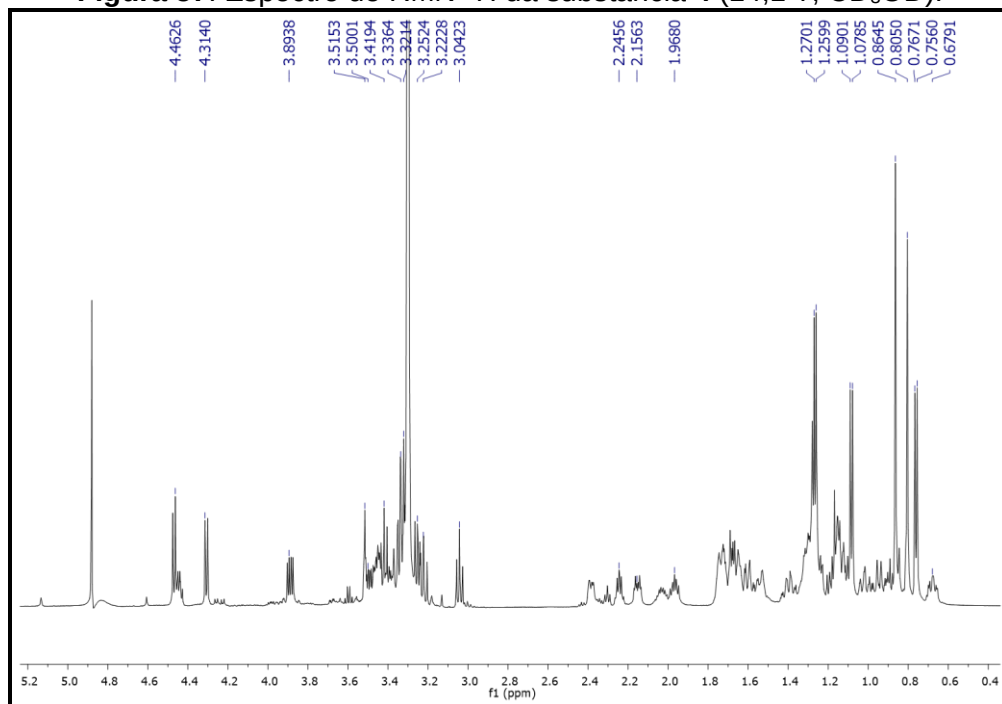


4.2.4 Elucidação estrutural da substância 4.

A substância **4** foi isolada como um sólido amorfo, de coloração amarela (3,4 mg). Os dados dos espectros de RMN-¹H, RMN-¹³C (Figuras 57, 58) assim como DEPT-135° (Figura 59) da substância **4** mostraram similaridade com o composto **3**, exceto pelo deslocamento químico do hidrogênio de CH₃-27 (δ_H 0,76, J = 6,7 Hz), o que indica uma posição *equatorial* com a configuração *R* em C-25 (LIDA et al., 2005).

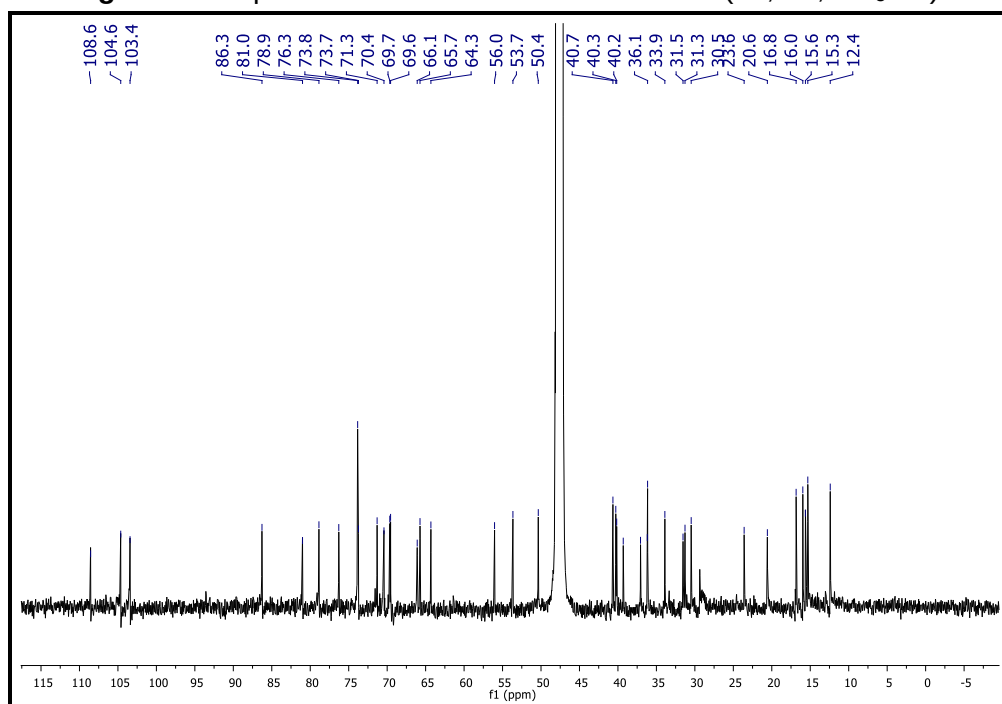
A configuração do C-22 foi determinada como *S* (22- α) de acordo com os deslocamentos químicos correspondentes no RMN-¹³C para o C-20 (δ_c 40.3) assim como para o H-16 (δ_H 4,45) e H₃-21 (δ_H 1,09; J = 7.0 Hz) no espectro de RMN-¹H (MATSUSHITA et al., 2007).

Figura 57. Espectro de RMN-¹H da substância **4** (14,1 T, CD₃OD).

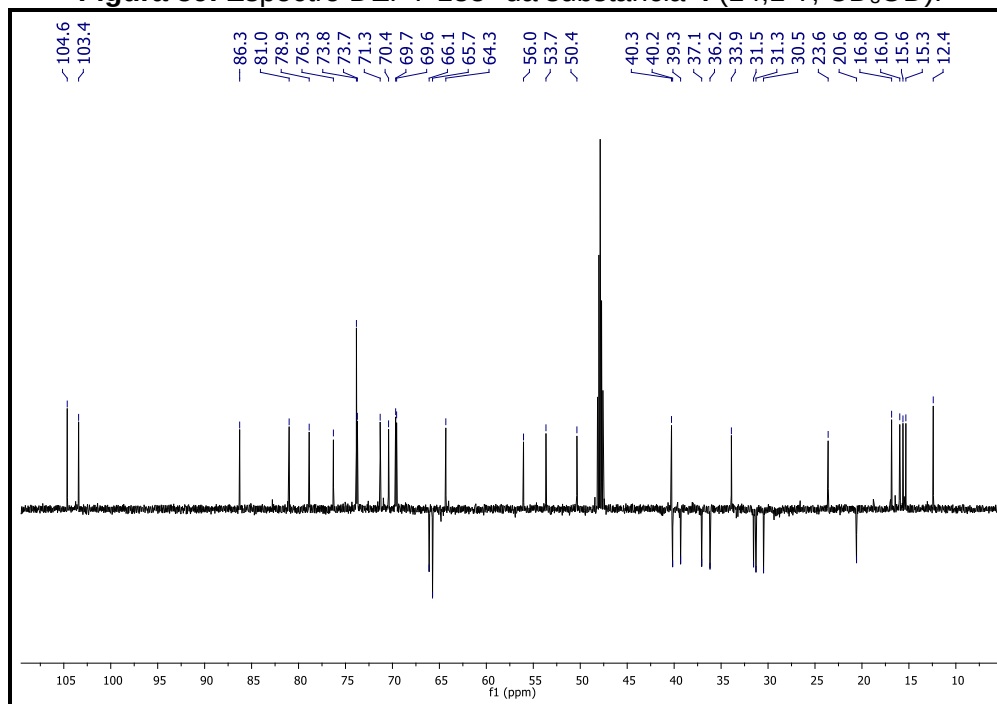


Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

Figura 58. Espectro de RMN-¹³C da substância **4** (14,1 T, CD₃OD).



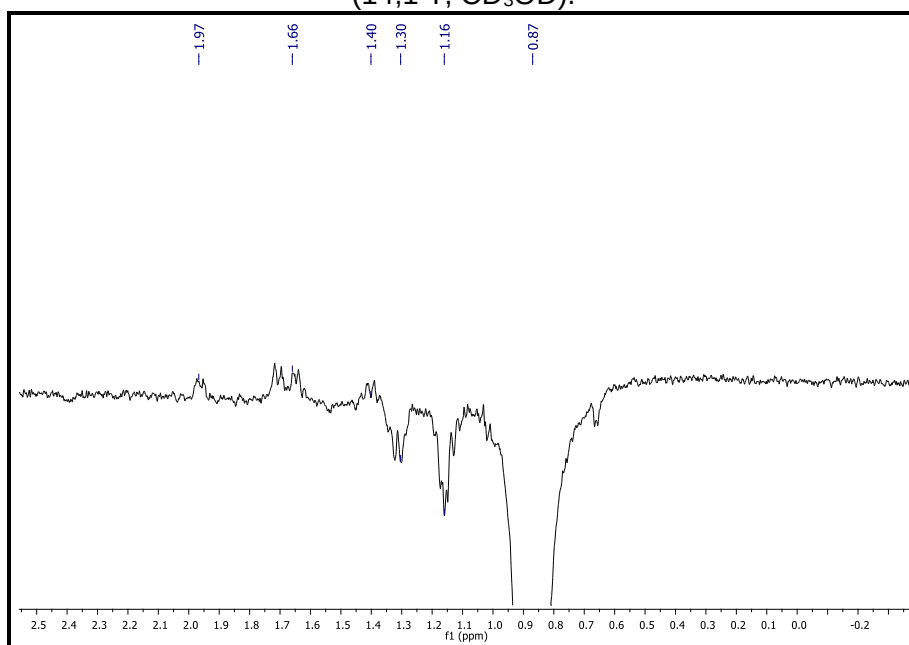
Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

Figura 59. Espectro DEPT-135° da substância **4** (14,1 T, CD₃OD).

Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

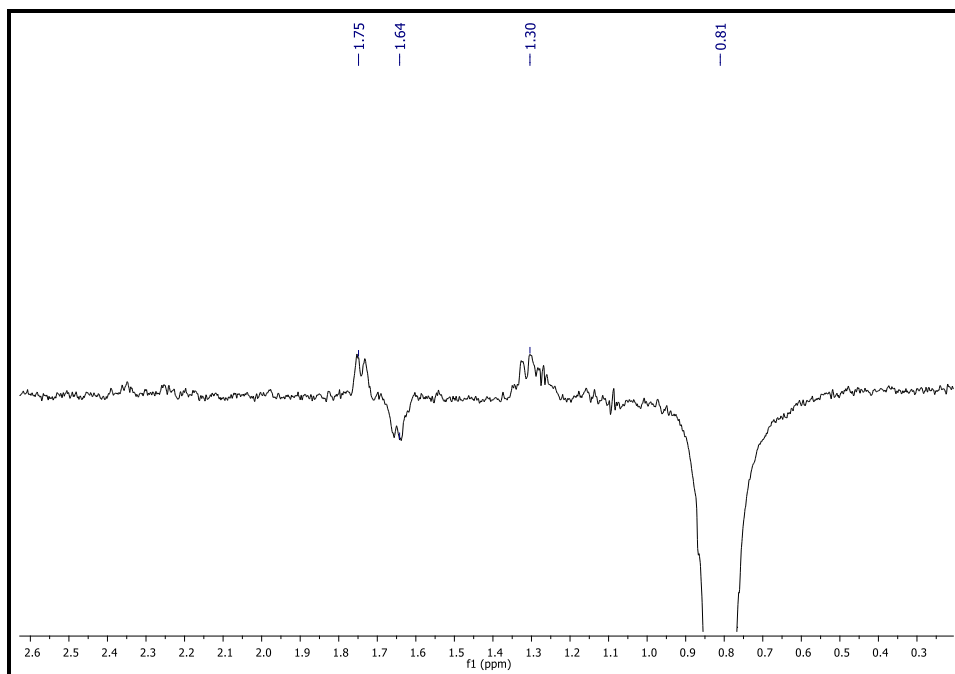
A análise do espectro NOESY-1D (Figuras 60, 61) para a substância **4** permitiu confirmar a configuração dos anéis que constituem a estrutura do sapogenol. Neste sentido, as interações observadas para a CH₃-19 (δ_H 0,87, s) assim como para a CH₃-18 (δ_H 0,81, s) foram similares às observadas para as substâncias **1**, **2**, e **3**, o que permitiu estabelecer a existência de uma junção *trans* entre os anéis AB, BC e CD, assim como uma junção *cis* entre os anéis DE. Também se confirmou a configuração β para as metilas CH₃-18 e CH₃-19, assim como uma orientação α para a metila CH₃-21 (configuração *S* para o C-20) no sapogenol. Finalmente, a interação existente no espectro NOESY-1D (Figura 62) entre o H-23 (δ_H 3,52) com o H-20 (δ_H 2,25) confirmou a orientação *axial* do H-23 e a configuração em C-23 como *R*.

Figura 60. Espectro NOESY-1D da substância **4**. Irradiação seletiva em δ_H 0,87. (14,1 T, CD_3OD).



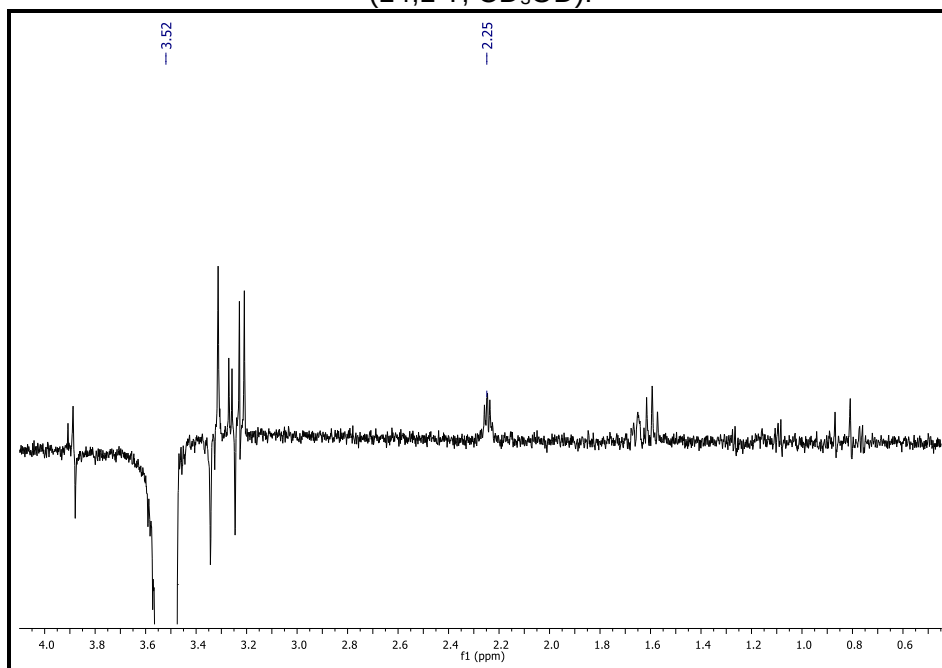
Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

Figura 61. Espectro NOESY-1D da substância **4**. Irradiação seletiva em δ_H 0,81 (14,1 T, CD_3OD).



Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

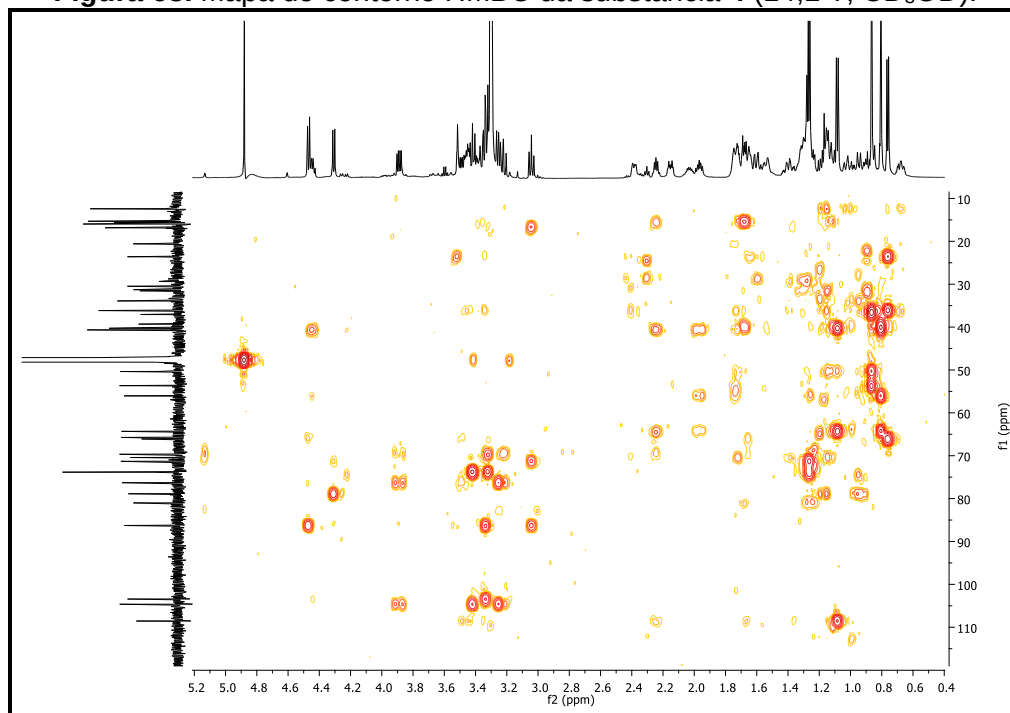
Figura 62. Espectro NOESY-1D da substância **4**. Irradiação seletiva em δ_{H} 3,52 (14,1 T, CD_3OD).



Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

Para determinar a conectividade dos açúcares, a análise no mapa de contorno HMBC (Figura 63, pag. 99) revelou as correspondentes correlações.

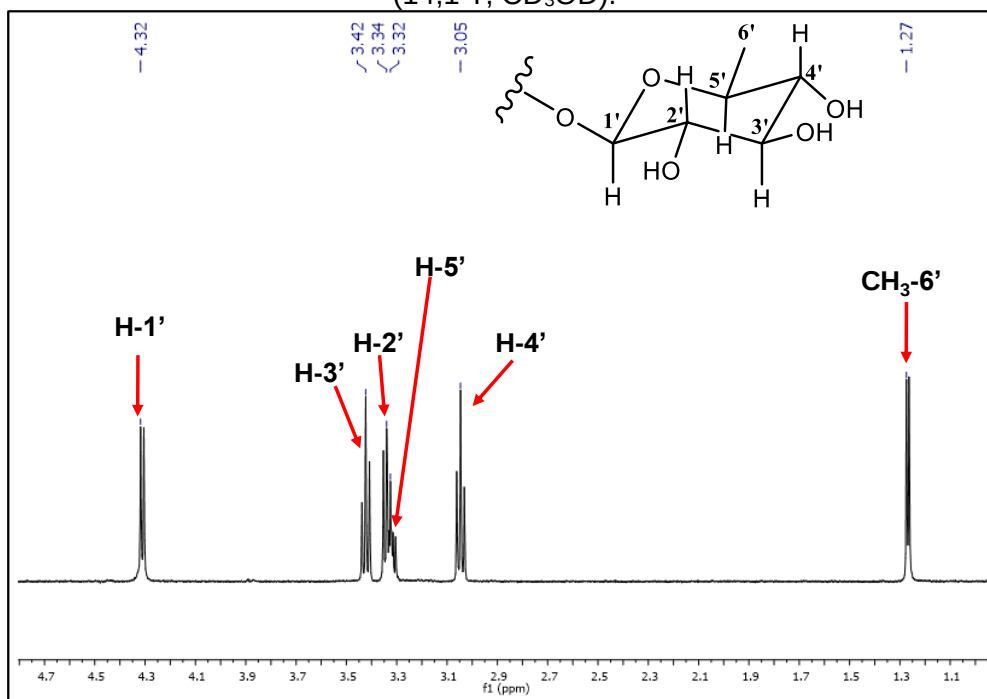
Foram observadas as correlações entre o hidrogênio anomérico em δ_{H} 4,31 ($J = 7,8$ Hz, H-1') com o carbono em δ_{C} 78,9 (C-6) sugerindo a ligação entre a posição H-1' da quinovose com a posição C-6 da aglicona, assim como a correlação entre o hidrogênio anomérico H-1'' em δ_{H} 4,47 ($J = 7,6$) da xilose fazendo correlação com o C-3' (δ_{C} 86,3) da quinovose, o que indica a ligação (1'' $\rightarrow$ 3') entre as unidades de açúcares.

Figura 63. Mapa de contorno HMBC da substância **4** (14,1 T, CD₃OD).

Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

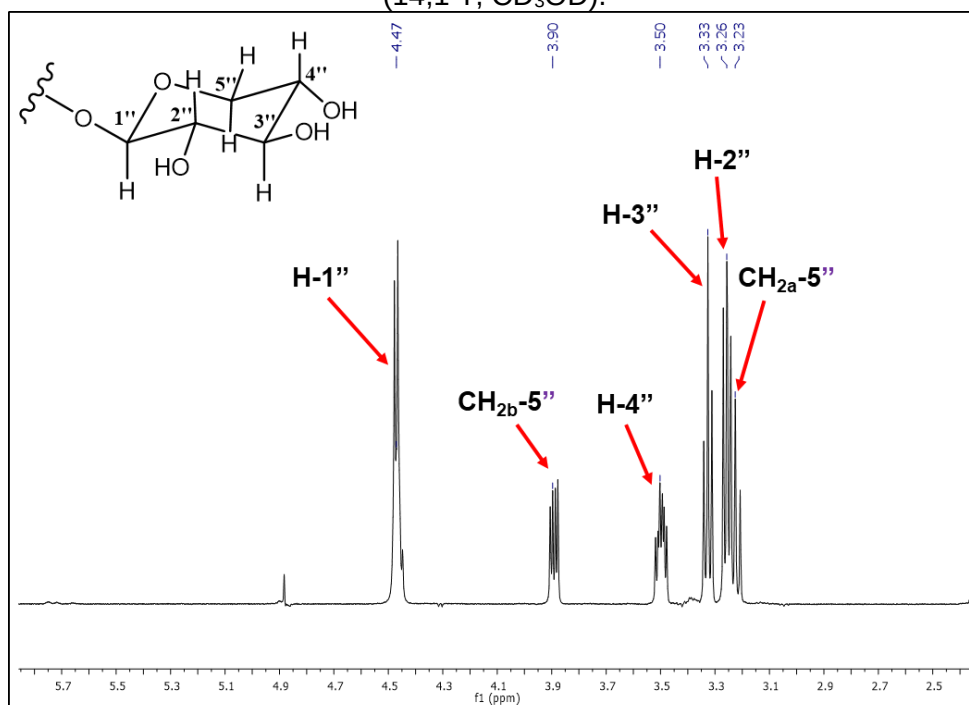
De acordo com os dados obtidos, e utilizando outras técnicas espectroscópicas (TOCSY-1D e HSQC, Figuras 64-66), foi possível atribuir os demais sinais, o que permitiu concluir que a substância **4** é um epímero da substância **3**, diferindo somente na configuração do C-25 (*R*).

Figura 64. Espectro TOCSY-1D da substância **4**. Irradiação em δ_H 4,31. (14,1 T, CD_3OD).

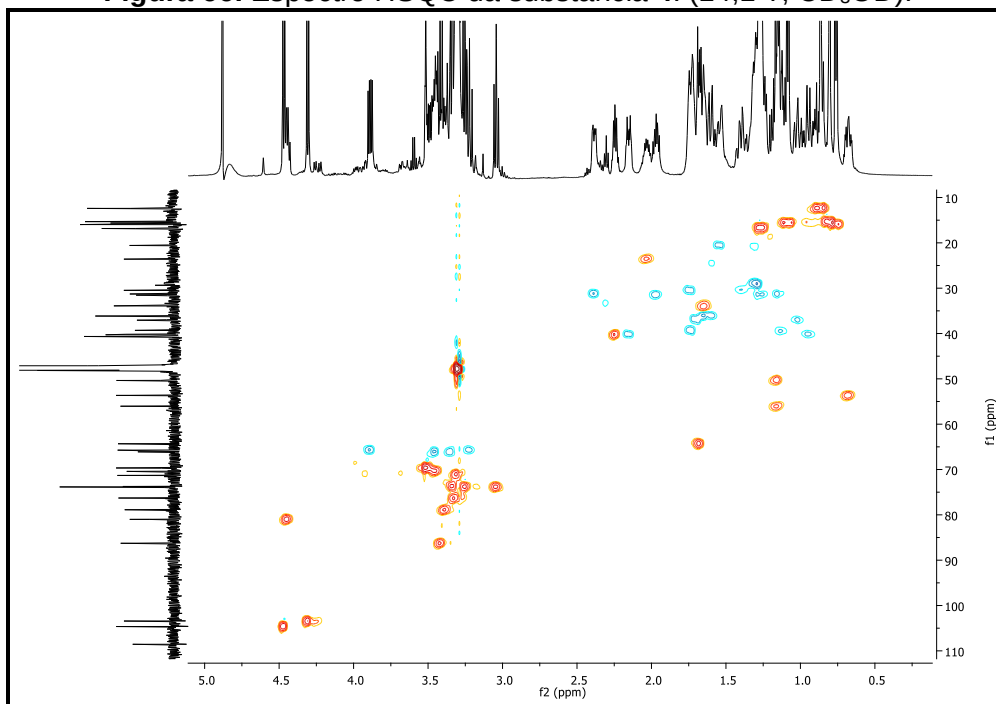


Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

Figura 65. Espectro TOCSY-1D da substância **4**. Irradiação em δ_H 4,47. (14,1 T, CD_3OD).

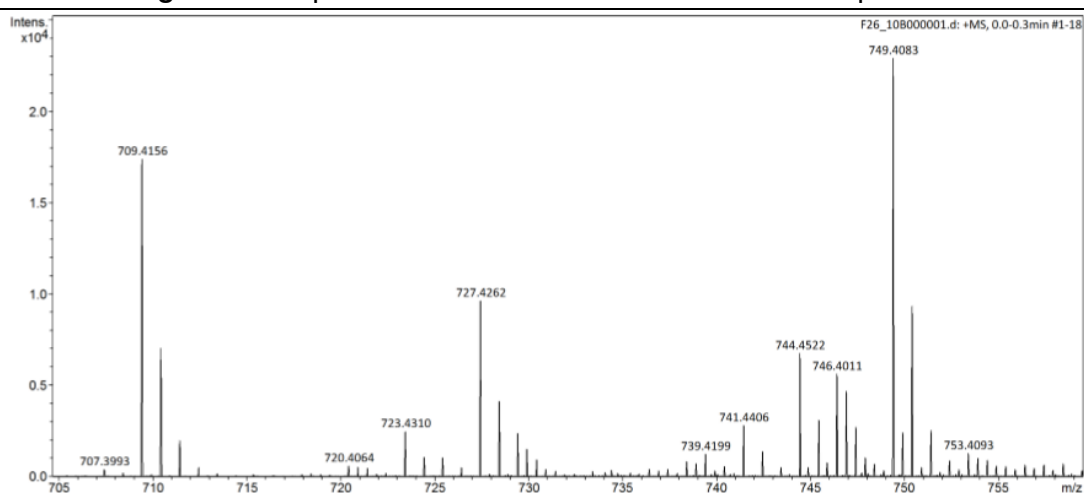


Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

Figura 66. Espectro HSQC da substância **4**. (14,1 T, CD₃OD).

Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

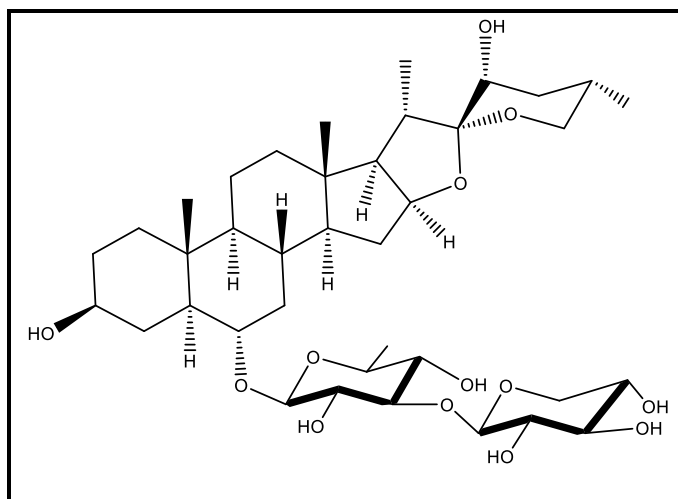
O espectro de massas HRESIMS mostrou o íon molecular protonado $[M+H]^+$ em m/z 727,4262 (calculado: 727,4263) no modo positivo (Figura 67), sugerindo a fórmula molecular para a substância **4** como C₃₈H₆₂O₁₃.

Figura 67. Espectro HRESI-MS da substância **4**. Modo positivo.

Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

Portanto, a estrutura da substância **4** foi elucidada como 6-*O*- β -D-xilopiranosil-(1'' $\rightarrow$ 3')- β -D-quinovopiranosil-(22*S*,23*R*,25*R*)-3 β ,6 α ,23-triidroxi-5 α -espirostanos. Este composto foi descrito pela primeira vez na literatura por VALERINO-DIAZ e colaboradores, (2018). A estrutura proposta para a substância **4** se apresenta na Figura 68.

Figura 68. Estrutura da substância **4**.



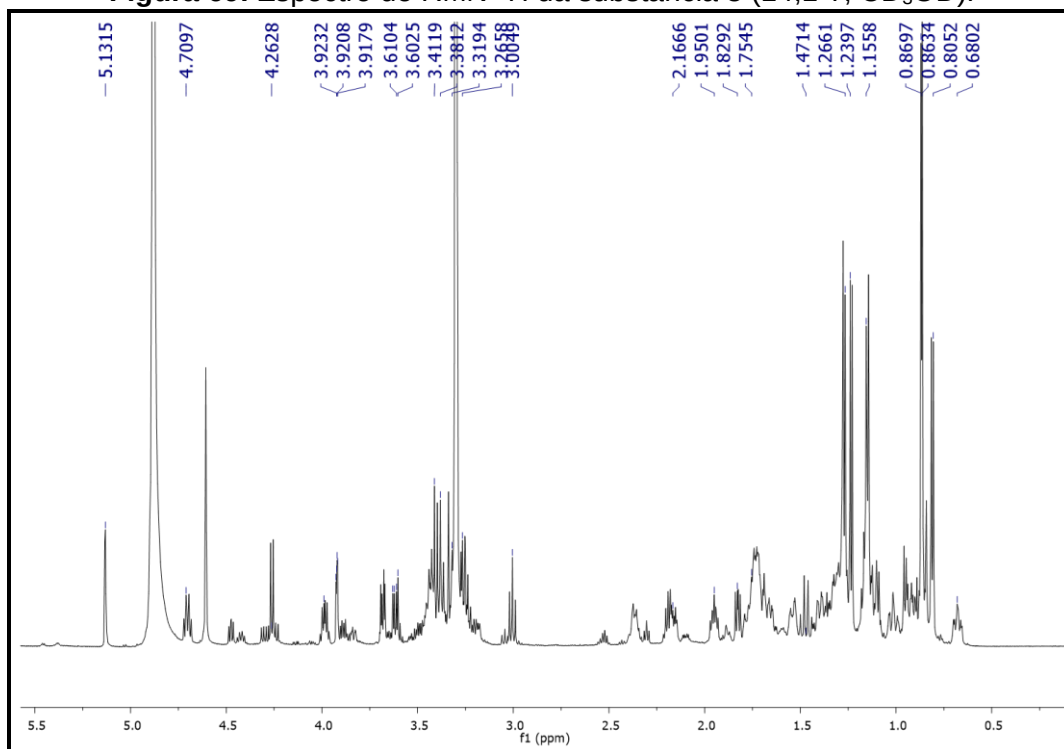
4.2.5 Elucidação estrutural da substância **5**.

A substância **5** (4 mg) foi obtida como um sólido amorfo, de coloração amarela. O espectro de RMN-¹H (Figura 69, Tabela 3; pág. 133) mostrou dois singletos que correspondem às metilas em δ_H 0,87 (CH₃-18) e δ_H 0,86 (CH₃-19), quatro dupletos correspondente a metilas em δ_H 1,15 (CH₃-21) e δ_H 0,81 (CH₃-27). Os outros dois dupletos que apresentam deslocamentos químicos em δ_H 1,27 e δ_H 1,23 foram atribuídos às metilas dos açúcares presentes na saponina.

A presença das duas unidades de açúcares foi confirmada no espectro de RMN-¹H pela análise da região no espectro de dois dupletos, sendo um em δ_H 4,26 ($J = 7,9$ Hz, H-1') e outro em δ_H 5,12 ($J = 1,5$ Hz, H-1'') que correspondem aos hidrogênios anoméricos das duas unidades glicosídicas. Quando comparamos os deslocamentos químicos de hidrogênios e carbonos das duas unidades glicosídicas da substância **5** com as unidades glicosídicas presentes nas substâncias **1** e **2**, podemos observar uma grande similaridade (ver Tabelas 3, 4; págs. 133, 136); portanto as duas unidades de açúcares na

substância **5** foram identificadas como β -D-quinovose e α -L-ramnose, respectivamente.

Figura 69. Espectro de RMN- ^1H da substância **5** (14,1 T, CD_3OD).

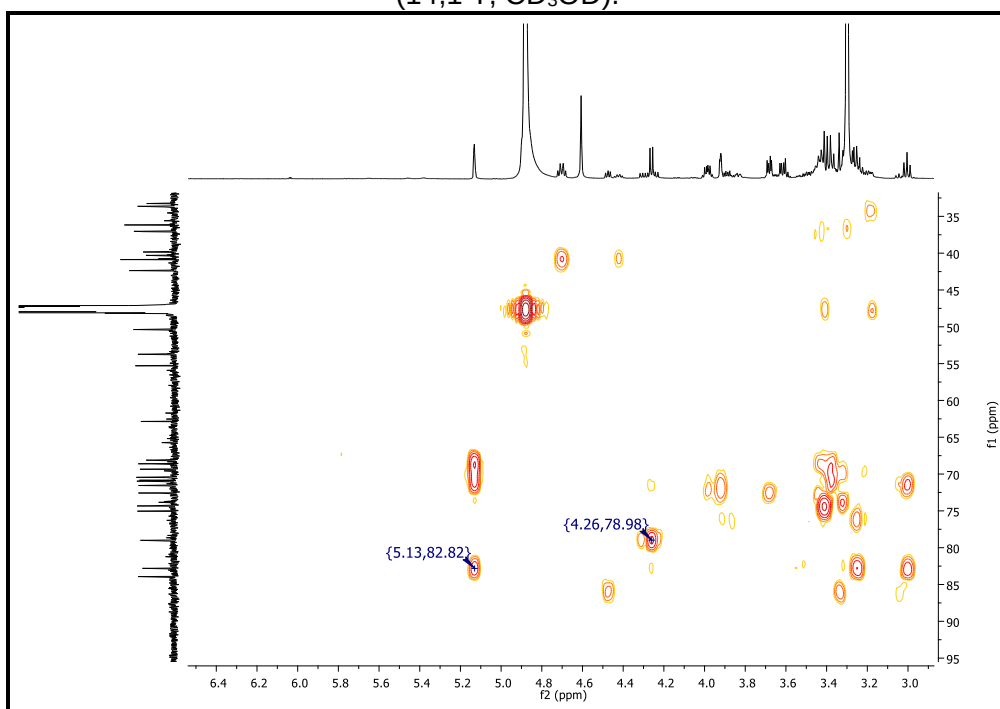


Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

A ligação entre as duas unidades glicosídicas foi determinada como (1'' $\rightarrow$ 3') de acordo as correlações observadas no mapa de contorno HMBC (Figura 70). O hidrogênio anomérico da ramnose em δ_{H} 5,12 ($J = 1,5$ Hz, H-1'') apresentou correlação à J^3 com o carbono em δ_{C} 82,8 (C-3' da quinovose).

A correlação existente entre o hidrogênio anomérico da quinovose em δ_{H} 4,26 (d, $J = 7,9$ Hz, H-1') e o carbono em δ_{C} 79,0 possibilitou atribuir a ligação do glicosídeo na posição C-3 da aglicona.

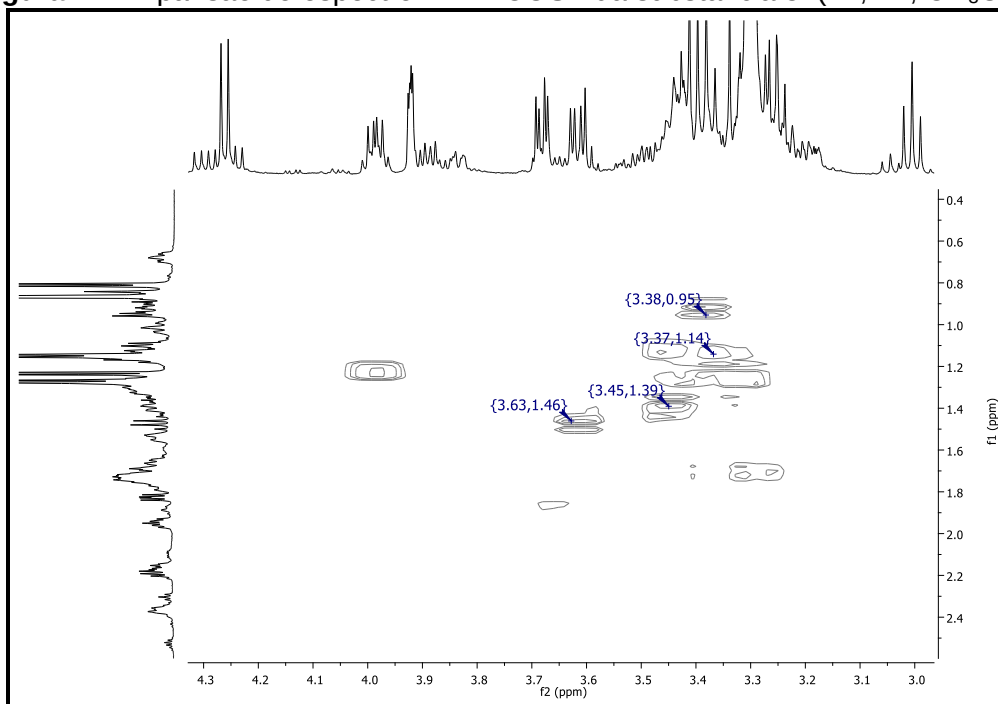
Figura 70. Expansão do mapa de contorno HMBC da substância **5**. (14,1 T, CD₃OD).



Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

O espectro ^1H - ^1H COSY (Figura 71) mostrou a correlação entre os hidrogênios vizinhos atribuído na posição H-3 (δ_{H} 3,38) com o H-2 (δ_{H} 1,15) e o H-4 (δ_{H} 0,93), sugerindo substituição na posição C-3 por uma hidroxila ou um glicosídeo.

A correlação observada no espectro ^1H - ^1H COSY entre o H-6 (δ_{H} 3,44) com o H-7 (δ_{H} 1,40) e do H-23 (δ_{H} 3,62) com o H-24 (δ_{H} 1,47) possibilitou sugerir a existência de hidroxilas nos carbonos das posições C-6 e C-23.

Figura 71. Expansão do espectro ^1H - ^1H COSY da substância **5**. (14,1 T, CD_3OD).

Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

A análise do espectro NOESY-1D (Figuras 72, 73) mostra a interação existente entre o H-23 (δ_{H} 3,62, dd, $J = 2,76$ Hz) com a metila CH_3 -21 (δ_{H} 1,15, d, $J = 7,3$ Hz), o que possibilitou estabelecer sua posição no anel E como *equatorial* e a configuração em C-23 foi estabelecida como S.

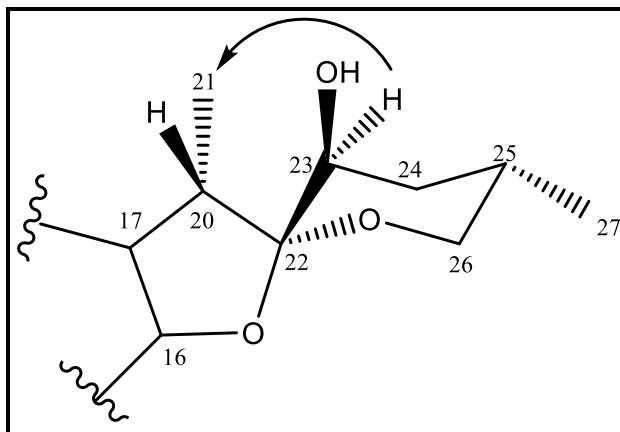
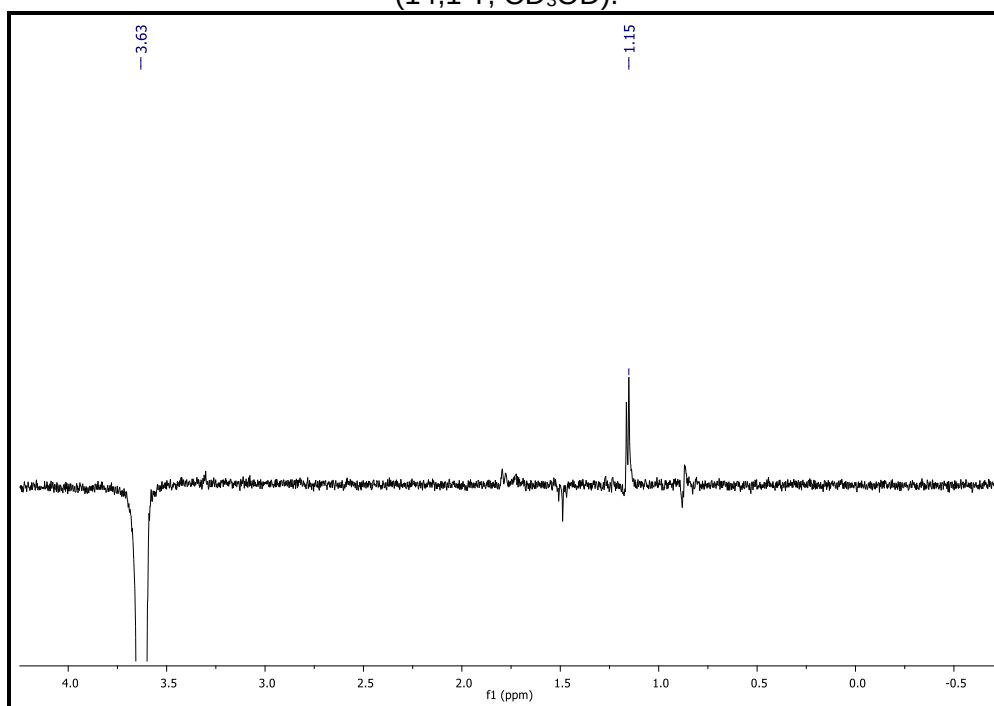
Figura 72. Interação via NOESY-1D do H-23 δ_{H} 3,62 com a CH_3 -21 δ_{H} 1,15 na substância **5**.

Figura 73. Espectro NOESY-1D da substância **5**. Irradiação seletiva em δ_H 3,62 (14,1 T, CD_3OD).



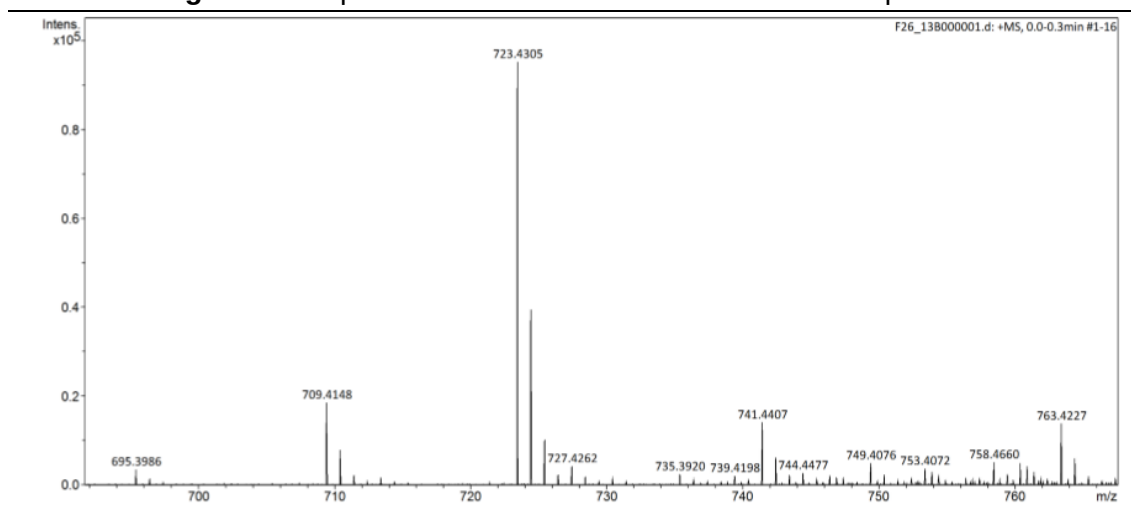
Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

A aglicona da substância **5** apresenta sinais no RMN- ^1H (Tabela 3, pag. 120) da metila CH_3 -21 em (δ_H 1,15 d, $J = 7,3$ Hz) e H-16 (δ_H 4,70, m) assim como um deslocamento químico de carbono no espectro de RMN- ^{13}C para C-20 (Tabela 4, pág. 136) de δ_c 42,4, sugerindo que a substância **3** apresenta uma configuração em C-22 (S) (MATSUSHITA et al., 2007).

Os deslocamentos químicos dos 27 átomos de carbono no núcleo esteroidal do composto **5** são muito similares ao espirotorvosídeo, uma saponina esteroidal isolada das folhas de *S. torvum* (SHAIQ et al., 2008).

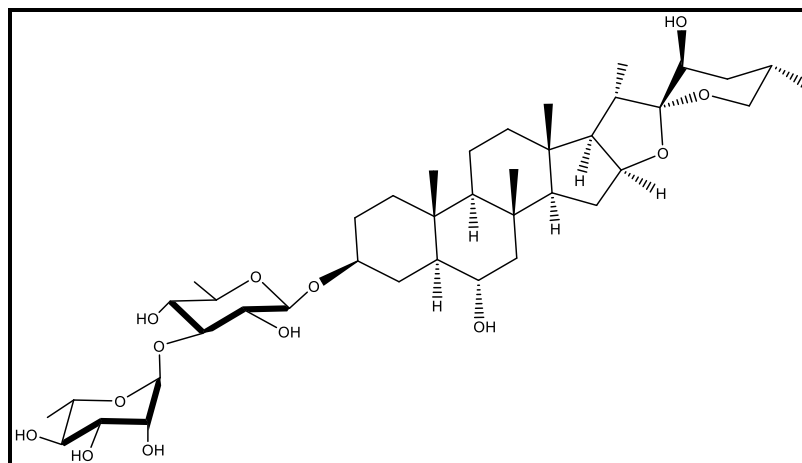
As principais diferenças entre o espirotorvosídeo e o composto **5** estão na configuração em C-25 e o C-22. No caso do composto **5**, a metila CH_3 -27 possui o deslocamento químico em δ_H 0,81, sugerindo a posição *equatorial* para esta metila e configuração *R* para o C-25 (LIDA et al., 2005). Por outro lado, no caso do espirotorvosídeo, não tem a descrição para a configuração do estereocentro C-22.

A fórmula molecular para a substância **5** foi determinada como $C_{39}H_{64}O_{13}$ e está em concordância com o íon molecular protonado $[M+H]^+$ em m/z 741,4407 (calculado: 741,4420), obtido em HRESI-MS no modo positivo (Figura 74).

Figura 74. Espectro HRESI-MS da substância **5**. Modo positivo.

Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

Portanto, pela análise dos dados de RMN (uni e bidimensionais) e a espectrometria de massas obtidos da substância **5**, assim como pela comparação parcial com os dados da literatura (SHAIQ et al., 2008), permitiram determinar que a substância **5** é o 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1'' $\rightarrow$ 3')- β -D-quinovopiranosil-(22S,23S,25R)-3 β ,6 α ,23-triidroxi-5 α -espirostanos. A estrutura da substância **5** (Figura 75) foi descrita pela primeira vez na Literatura por VALERINO-DIAZ e colaboradores, (2018).

Figura 75. Estrutura da substância **5**.

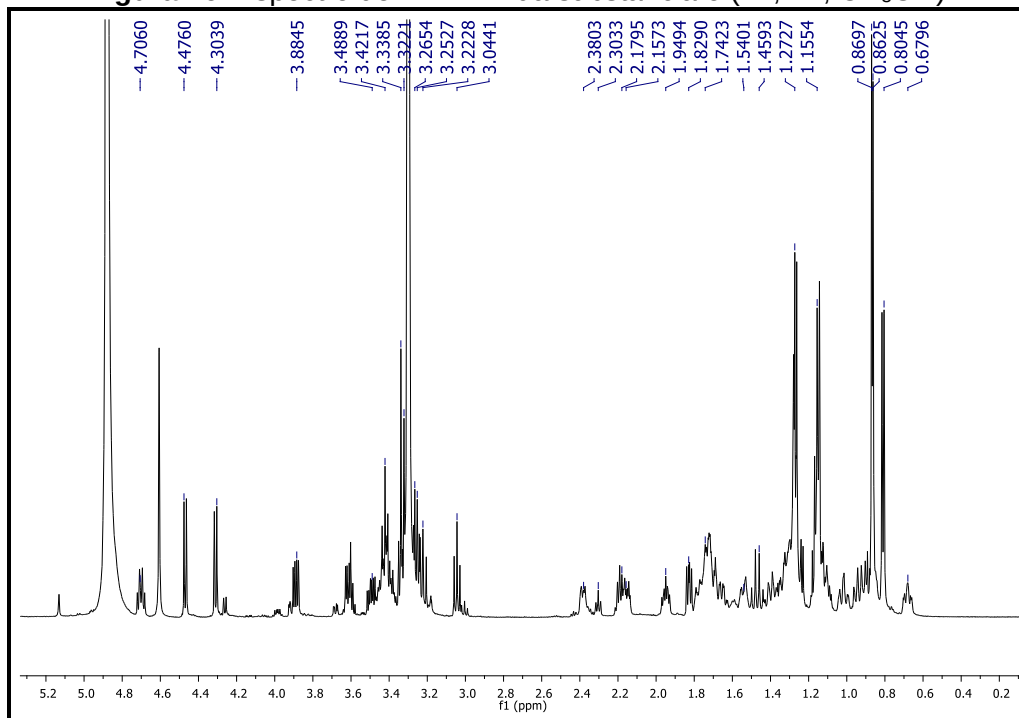
4.2.6 Elucidação estrutural da substância 6.

A substância **6** foi obtida como um sólido amarelo amorfo (3,1 mg). Os dados de RMN-¹H (Tabela 3, pag. 133, Figura 76) da substância **6** indicaram a presença de dois singletos que integram para três hidrogênios cada sinal: um em δ_H 0,87 (s, CH₃-18) e outro em δ_H 0,86 (s, CH₃-19) indicando a presença de duas metilas. Dois dupletos foram também observados com deslocamentos químicos em δ_H 1,15 (d, $J=7,3$ Hz, CH₃-21) e δ_H 0,81 (d, $J=6,5$ Hz, CH₃-27), que foram atribuídos às metilas nas posições 21 e 27, características do esqueleto de uma saponina esteroidal (AGRAWAL, 2003).

Na região mais blindada do espectro do RMN-¹H, um duplete em δ_H 1,27 (d, $J = 6,2$ Hz) foi observado, sugerindo a existência de uma metila pertencente a um glicosídeo.

A presença dos glicosídeos foi confirmada pela detecção de sinais com deslocamento químicos de hidrogênios anoméricos no espectro de RMN-¹H em δ_H 4,30 ($J = 7,8$ Hz, H-1') e δ_H 4,47 ($J = 7,0$ Hz, H-1'').

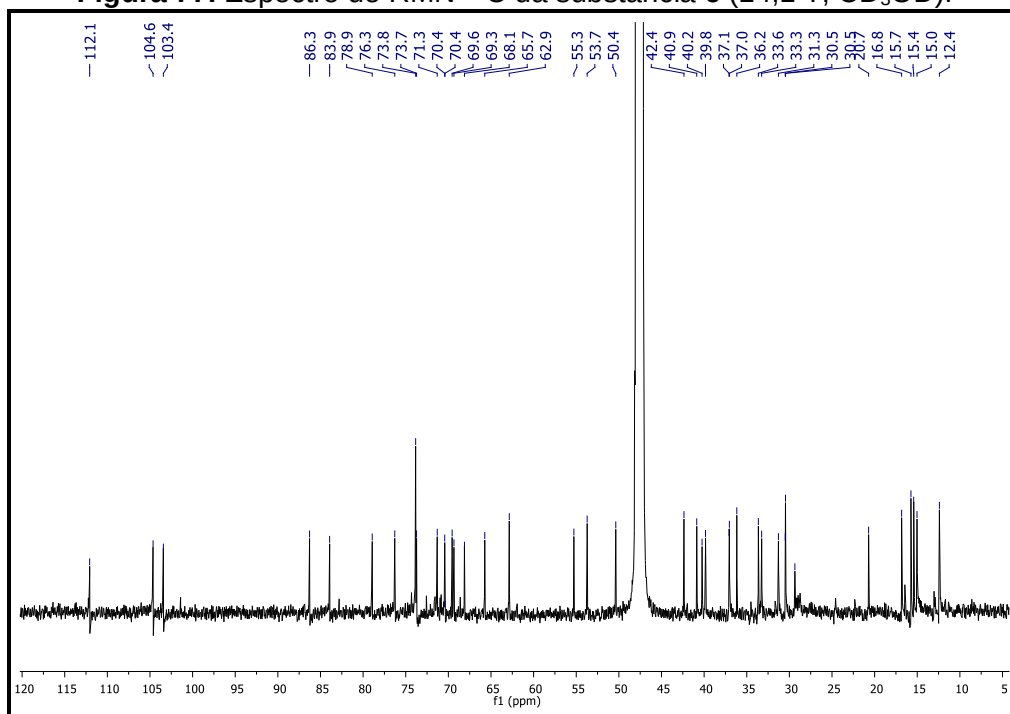
Figura 76. Espectro de RMN-¹H da substância **6** (14,1 T, CD₃OD).



Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

Comparando os dados de RMN- ^1H e de ^{13}C (ver Tabelas 3, 4; págs. 133, 136; Figura 77) da substância **6** com as substâncias **3** e **4** constatou-se uma grande semelhança nos deslocamentos químicos de hidrogênio e ^{13}C , portanto, foi possível definir as duas unidades glicosídicas da substância **6** como β -D-quinovose e β -D-xilose respectivamente.

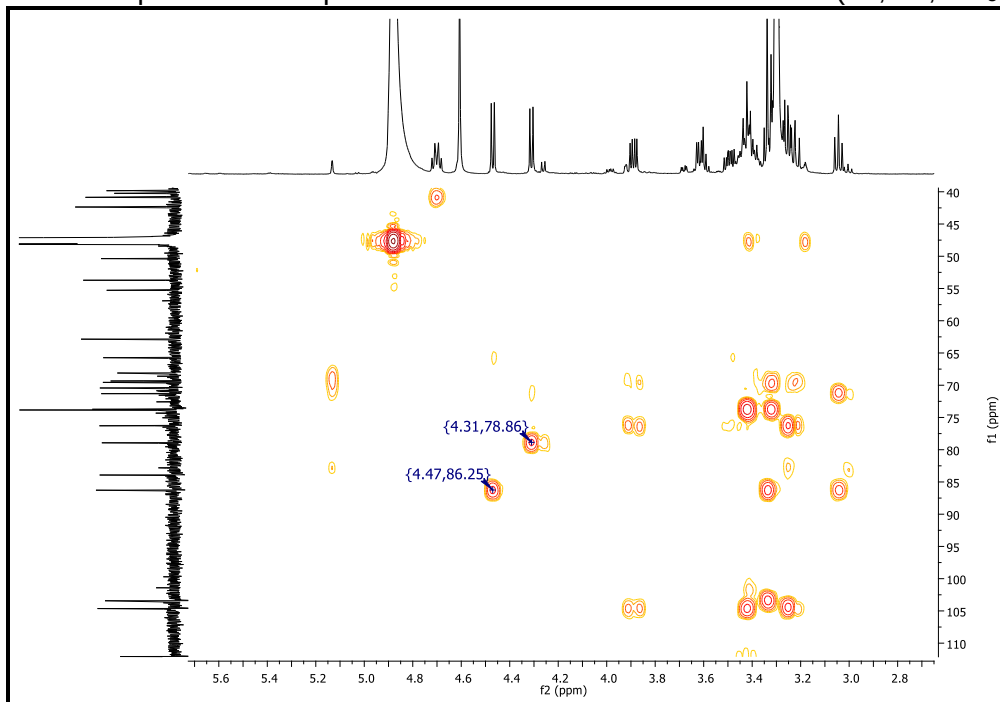
Figura 77. Espectro de RMN- ^{13}C da substância **6** (14,1 T, CD_3OD).



Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

A ligação entre os dois açúcares foi determinada como (1''→3') de acordo com as correlações observadas no mapa de contorno HMBC (Figura 78) entre o hidrogênio anomérico da xilose em δ_{H} 4,47 ($J = 7,0$ Hz, H-1'') e o carbono em δ_{C} 82,3 que corresponde a C-3' da quinovose.

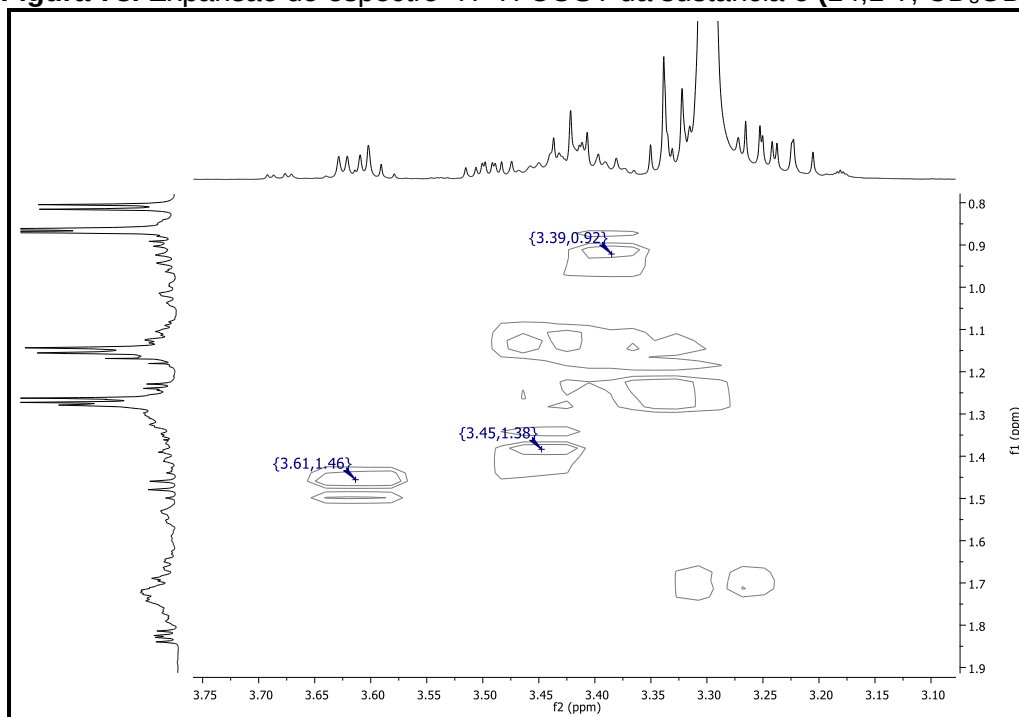
A correlação observada entre o hidrogênio anomérico em δ_{H} 4,30 ($J = 7,8$ Hz, H-1') e o carbono em δ_{C} 79,0 possibilitou estabelecer a ligação da quinovose (H-1') com a posição C-3 da aglicona.

Figura 77. Expansão do mapa de contorno HMBC da substância **6** (14,1 T, CD₃OD).

Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

O espectro ^1H - ^1H COSY (Figura 79) mostrou a correlação entre o H-3 (δ_{H} 3,39) com o H-4 (δ_{H} 0,94) sugerindo que a posição em C-3 da aglicona está substituída pelo glicosídeo. A correlação entre o H-6 (δ_{H} 3,45) com o H-7 (δ_{H} 1,39); entre o H-23 (δ_{H} 3,62) com o H-24 (δ_{H} 1,46) sugerem a presença de hidroxilas em, C-6 e C-23 do sapogenol.

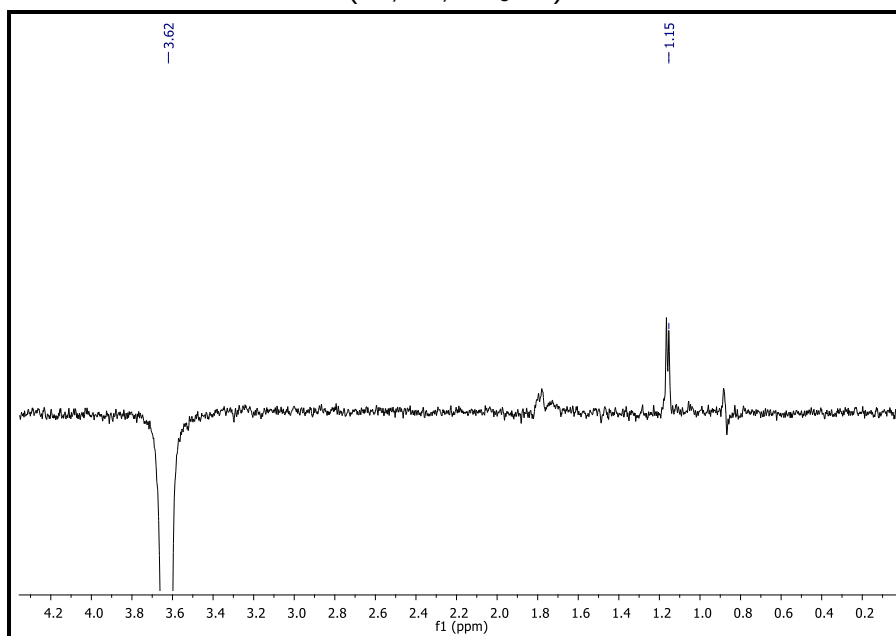
Por outro lado, o deslocamento químico da metila CH_3 -27 (δ_{H} 0,81) indica que a mesma se encontra em *equatorial* e que o C-25 possui configuração *R* no anel F do sapogenol (LIDA et al., 2005).

Figura 78. Expansão do espectro ^1H - ^1H COSY da substância **6** (14,1 T, CD_3OD).

Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

O espectro de NOESY-1D (Figura 80) para a substância **6** mostrou interações similares às encontradas para a substância **5**. Assim pôde-se constatar devido à interação entre o H-23 (δ_{H} 3,62, m) e a metila CH_3 -21, que o H-23 ocupa uma posição *equatorial* no anel F e, portanto, a configuração do carbono C-23 foi estabelecida como S.

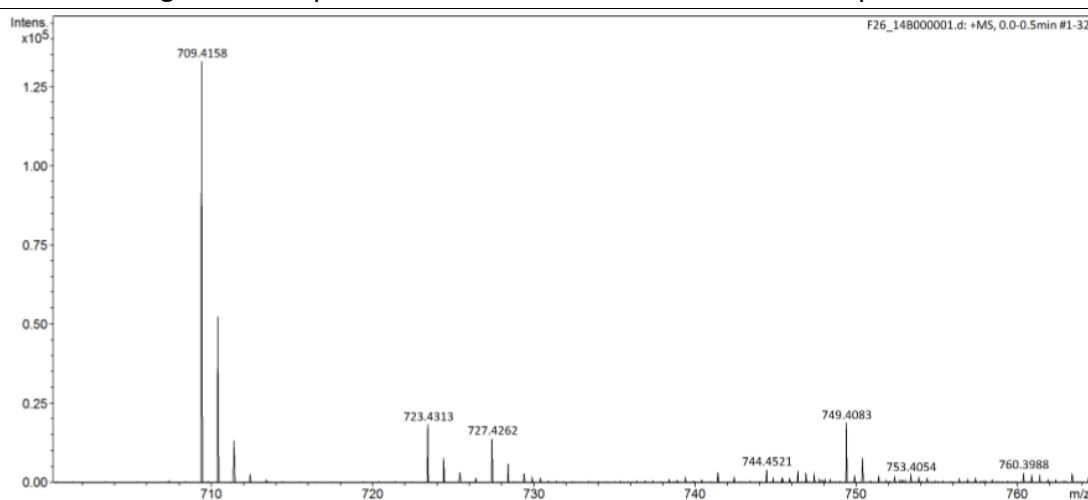
Figura 79. Espectro NOESY-1D da substância **6**. Irradiação seletiva em δ_H 3,62 (14,1 T, CD_3OD).



Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

A substância **6** apresentou no experimento HRESI-MS (modo positivo), o íon molecular protonado $[M+H]^+$ com m/z 727,4262 (calculado: 727,4263), o que permitiu determinar a fórmula molecular para a substância **6** como $C_{38}H_{62}O_{13}$, (Figura 81).

Figura 80. Espectro HRESI-MS da substância **6**. Modo positivo.



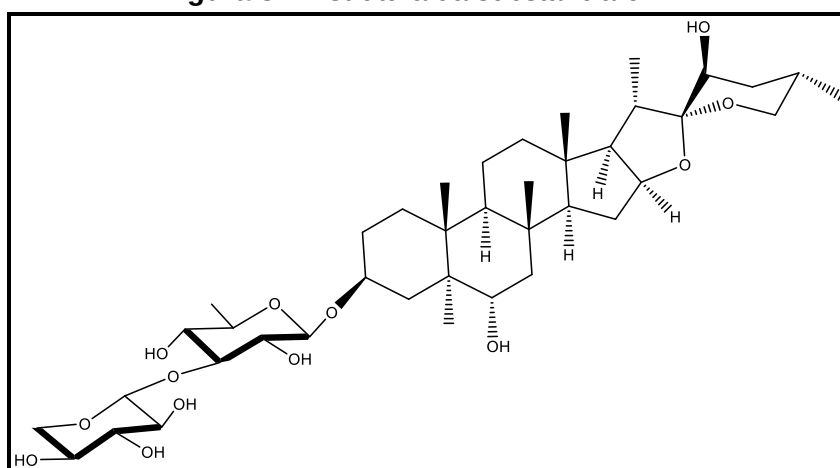
Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

Comparando os dados obtidos nos espectros de RMN- ^1H e RMN- ^{13}C (Tabelas 3, 4; págs. 133, 136) da aglicona da substância **6** com os dados

espectroscópicos da aglicona da substância **5** observa-se uma grande similaridade nos deslocamentos químicos de hidrogênio e ^{13}C , o que permitiu concluir que existe uma considerável similaridade estrutural entre as duas. Portanto, a estrutura da substância **6** foi elucidada como 3-O- β -D-xilopiranosil(1'' $\rightarrow$ 3')- β -D-quinovopiranosil-(22S,23S,25R)-3 β ,6 α ,23-triidroxi-5 α -espirostanos.

Esta saponina esteroidal foi isolada e descrita pela primeira vez na literatura por VALERINO-DIAZ e colaboradores, (2018), e está sendo apresentada na Figura 82.

Figura 81. Estrutura da substância **6**.



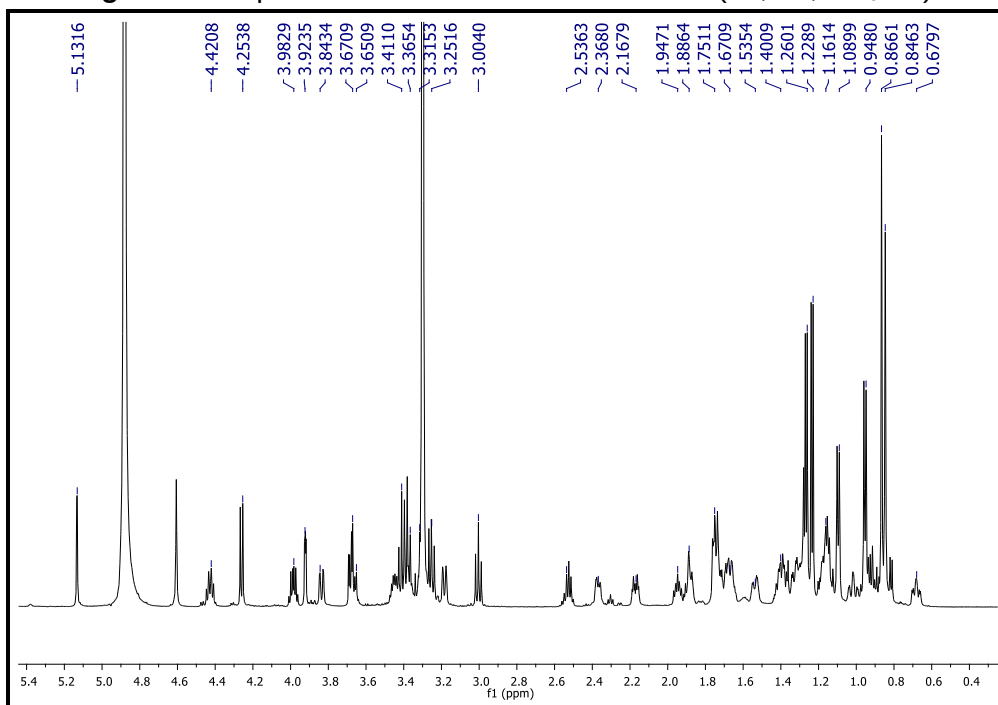
4.2.7 Elucidação estrutural da substância **7**.

A substância **7** foi isolada como um sólido amorfo, de coloração amarela com uma massa de 5,4 mg.

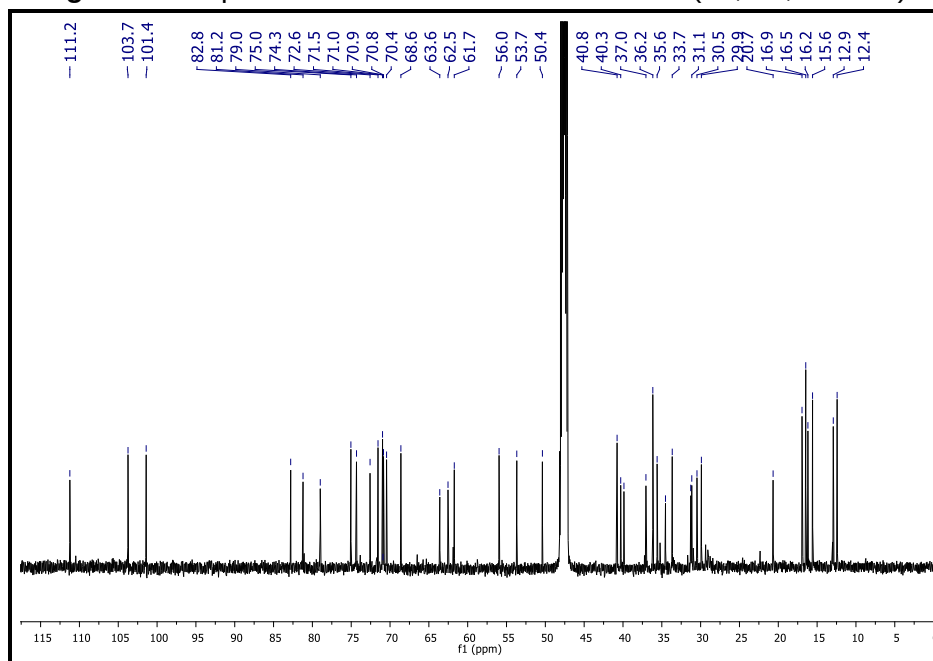
O espectro de RMN- ^1H (Figura 82, Tabela 3; pág. 133) da substância **7**, mostrou a presença de duas metilas ligadas a carbonos quaternários sendo uma em δ_{H} 0,85 (s, H-18) e outra em δ_{H} 0,87 (s, H-19), quatro metilas ligadas a carbonos terciários sendo uma em δ_{H} 1,09 (d, $J = 7,1$; CH_3 -27), δ_{H} 0,95 (d, $J = 7,0$; CH_3 -21), δ_{H} 1,26 (d, $J = 6,0$; CH_3 -6'), δ_{H} 1,23 (d, $J = 6,0$; CH_3 -6''). Ainda foram observados dois hidrogênios anoméricos sendo um em δ_{H} 4,26 (d, $J = 7,8$; H-1') e outro em δ_{H} 5,13 (d, $J = 1,2$; H-1'').

Os deslocamentos químicos para as duas unidades de açúcar observadas nos espectros de RMN- ^1H e RMN- ^{13}C (Figura 83, Tabela 3, 4; págs. 133, 136) são muito similares aos deslocamentos químicos dos glicosídeos presentes nas substâncias **1**, **2** e **5**.

Figura 82. Espectro de RMN- ^1H da substância **7** (14,1 T, CD_3OD).



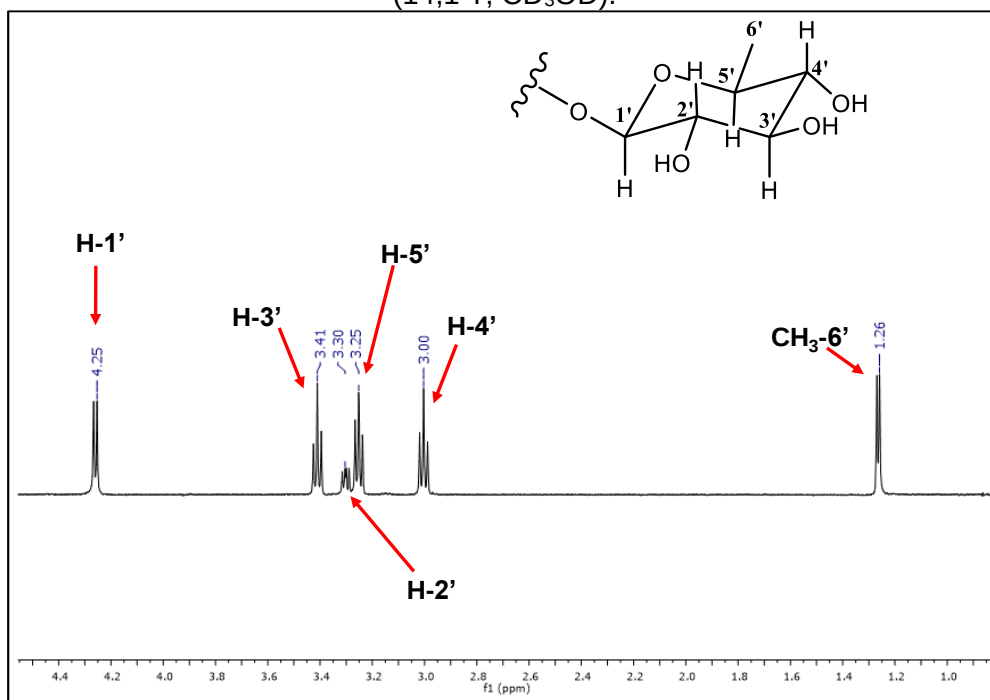
Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

Figura 83. Espectro de RMN- ^{13}C da substância **7** (14,1 T, CD_3OD).

Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

Estas semelhanças foram confirmadas mediante o experimento TOCSY-1D (Figuras 84, 85), irradiando o hidrogênio anomérico em δ_{H} 4,26 (H-1') que mostrou correlações com os hidrogênios em δ_{H} 3,25 (H-2''); δ_{H} 3,41 (H-3''); δ_{H} 3,00 (H-4''); δ_{H} 3,30 (H-5'') e a metila em δ_{H} 1,26 (CH_3 -6'). A irradiação em δ_{H} 5,13 (H-1''), mostrou correlação somente com o H-2'' em δ_{H} 3,92 (H-2'') permitindo assim estabelecer os glicosídeos da substância **7** como β -D-quinovose e α -L-ramnose, respectivamente.

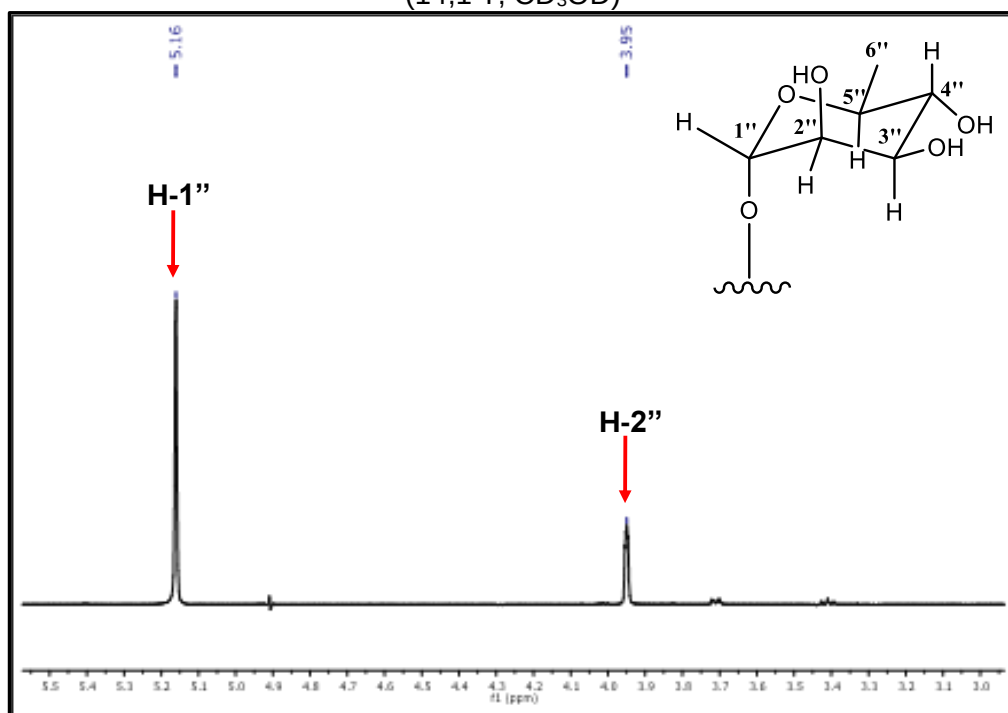
Figura 84. Espectro TOCSY-1D da substância **7**. Irradiação em δ_H 4.26. (14,1 T, CD_3OD).



Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

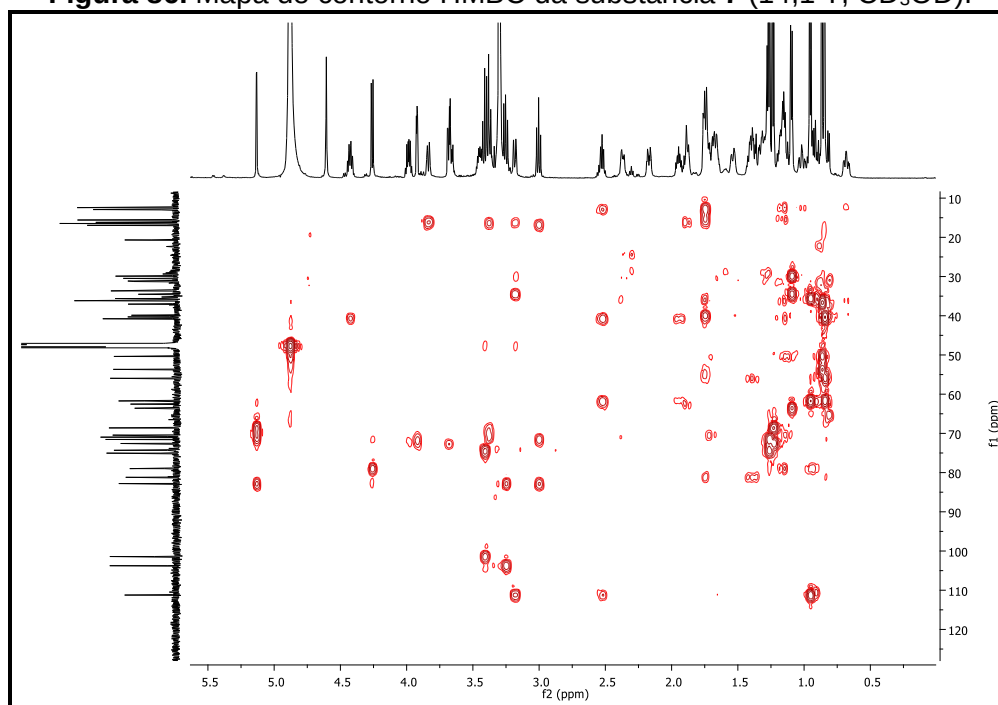
A ligação entre as duas unidades de açúcares foi determinada como (1''→3') devido às correlações a J^2 e J^3 encontradas no mapa de contorno HMBC (Figura 86) entre o hidrogênio anomérico da ramnose em δ_H 5,13 ($J = 1,2$ Hz) e o carbono da posição C-3' da quinovose em δ_C 82,8. A ligação estabelecida entre o glicosídeo e a aglicona foi também deduzida de acordo a correlação estabelecida entre o hidrogênio anomérico da quinovose em δ_H 4,26 (H-1') e o carbono C-6 em δ_C 79,0 do esterol.

Figura 85. Espectro TOCSY-1D da substância **7**. Irradiação em δ_H 5,13. (14,1 T, CD_3OD)



Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

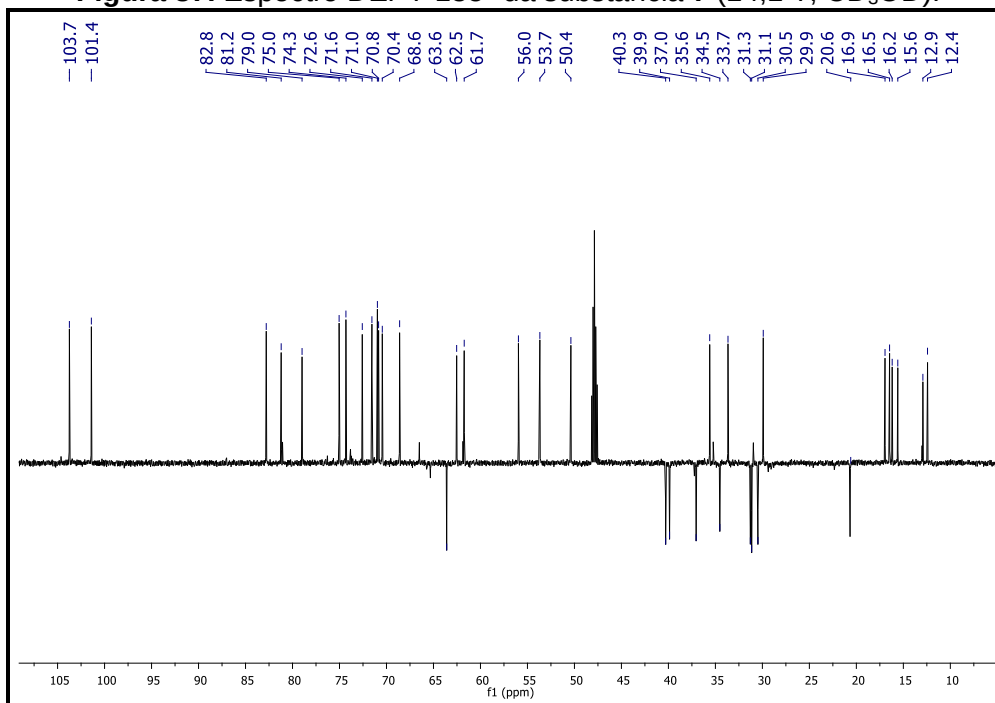
Figura 86. Mapa de contorno HMBC da substância **7** (14,1 T, CD_3OD).



Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

As análises dos espectros de RMN- ^{13}C e DEPT-135 (Figuras 83, 87, Tabela 4; pág. 136), mostraram os 27 átomos de carbono do sapogenol, ficando constituídos por oito grupos metilenos, sete grupos metínicos, dois carbonos quaternários, quatro grupos metílicos, quatro metínicos ligados a oxigênio e um carbono acetálico (C-22).

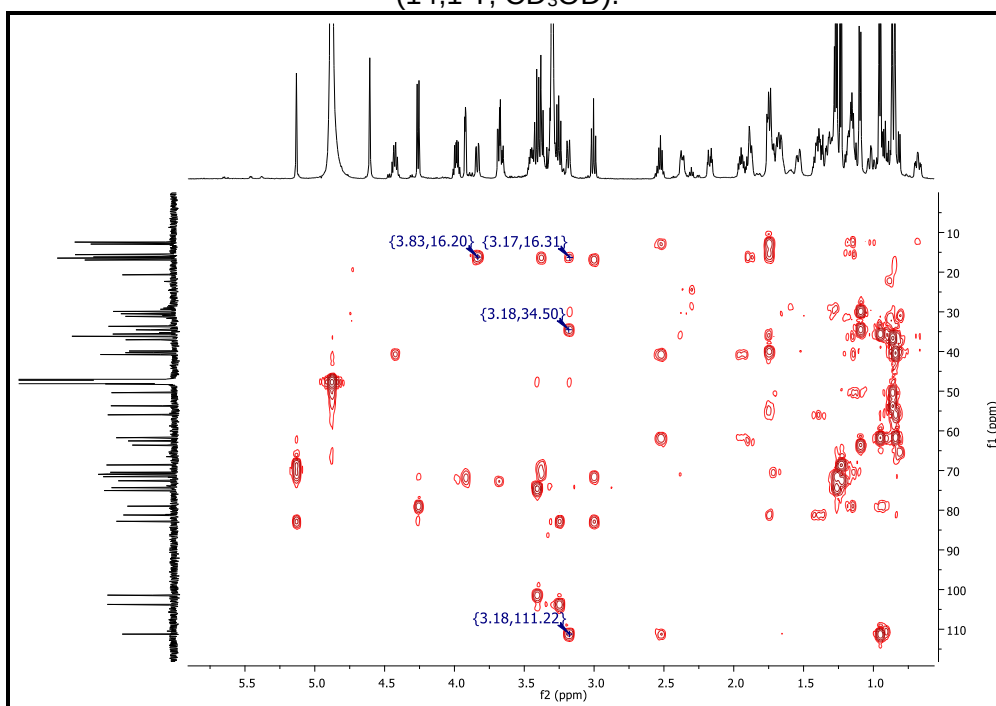
Figura 87. Espectro DEPT-135° da substância **7** (14,1 T, CD_3OD).



Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

O mapa de contorno HMBC (ampliação, Figura 88) revelou as conectividades a J^2 e J^3 estabelecidas entre os átomos de hidrogênio e os carbonos no anel F. Neste sentido, foram observadas as correlações entre o H-26ax em δ_{H} 3,84 com a metila CH_3 -27 em δ_{C} 16,2; o H-26eq em δ_{H} 3,18 com a metila CH_3 -27 em δ_{C} 16,2, com o C-24 em δ_{C} 34,5 e com o C-22 em δ_{C} 11,2. Estas correlações justificam a presença de um anel F não substituído.

Figura 88. Ampliação do mapa de contorno HMBC da substância **7** (14,1 T, CD₃OD).



Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

A estereoquímica para CH₃-27 foi inferida aplicando o método proposto por Agrawal, que baseia-se na diferença dos deslocamentos químicos entre os hidrogênios geminais na posição CH₂-26. (AGRAWAL et al., 2003). No caso de sapogeninas não substituídas no anel F com a configuração *S* em C-25, estas apresentam diferença no deslocamento químico para os hidrogênios geminais CH₂-26 = ($\Delta_{ab} = \delta_a - \delta_b$) maior que 0,35. No entanto, para substâncias com configuração *R* no C-25, a diferença entre os deslocamentos químicos dos hidrogênios CH₂-26 será menor que 0,20 (AGRAWAL, 2003).

No caso da substância **7**, a diferença observada no deslocamento químico para os hidrogênios geminais CH₂-26 foi de 0,66 (δ_{Ha} 3,84 para o H_{26a} e δ_{Hb} 3,18 para H_{26b}), o que possibilita concluir que o C-25 apresenta uma configuração *S*.

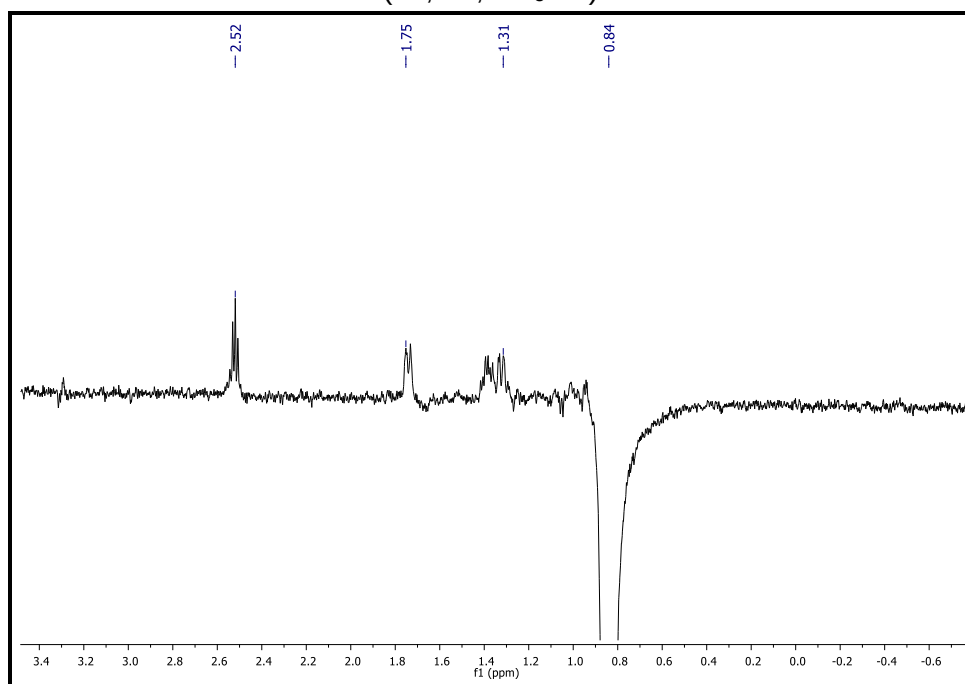
Outro dado relevante observado por AGRAWAL (2003) refere-se à orientação CH₃-27. Quando o deslocamento químico desta metila está entre δ_H 0,71-0,83, o C-25 apresenta configuração *R* e quando for entre 0,91-1,13, o C-25 apresenta configuração *S*.

Para a metila CH₃-27 da substância **7** observou-se um duplete em δ_H 1.09,

o que confirma uma orientação axial de $\text{CH}_3\text{-27}$ e consequentemente a configuração *S* em C-25.

Irradiação seletiva no espectro de NOESY-1D (Figuras 89, 90), nas metilas $\text{CH}_3\text{-18}$ (δ_{H} 0,85) e $\text{CH}_3\text{-19}$ (δ_{H} 0,87) evidenciaram interações para o composto **7** muito similares às observadas nas substâncias **1**, **2**, **3** e **5**, confirmando uma junção *trans* entre os anéis AB, BC e CD, e uma junção *cis* entre os anéis DE, assim como uma orientação β para as metilas $\text{CH}_3\text{-18}$ e $\text{CH}_3\text{-19}$.

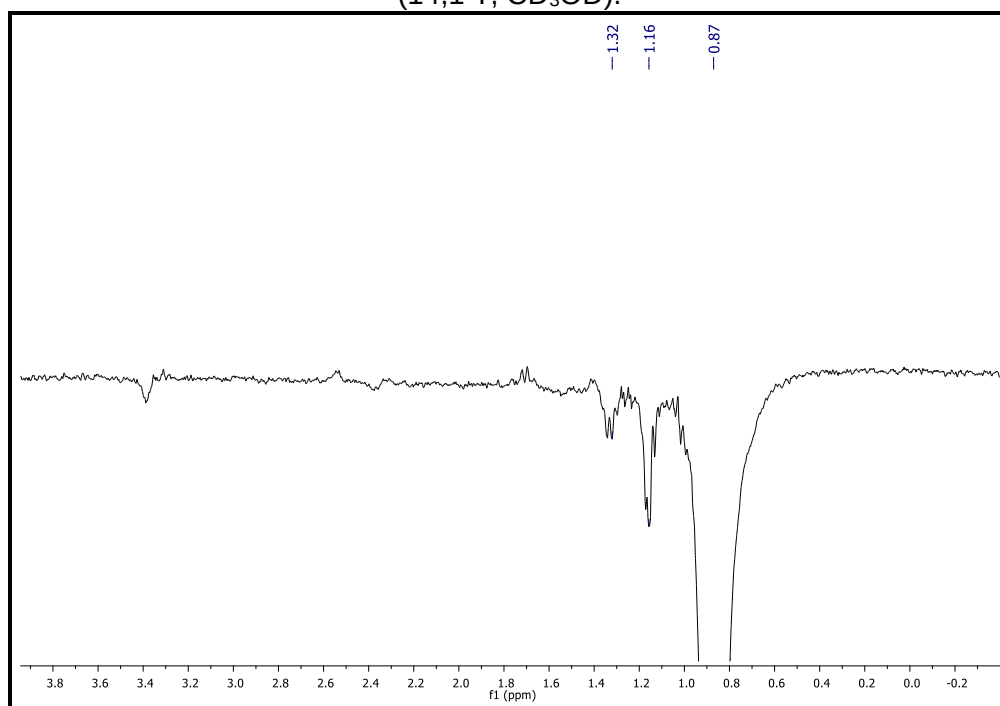
Figura 89. Espectro NOESY-1D da substância **7**. Irradiação seletiva em δ_{H} 0,85 (14,1 T, CD_3OD).



Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

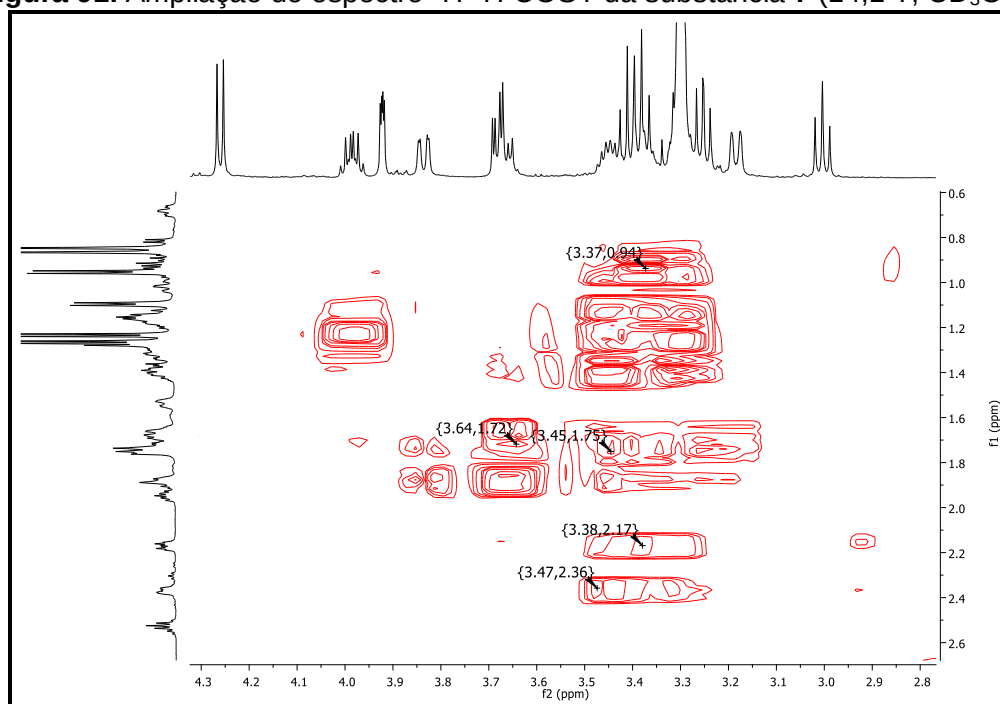
As correlações observadas no espectro $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$ COSY (Figura 91), entre o H-3 (δ_{H} 3,45, m) e o H-2 (δ_{H} 1,74) e o H-4 (δ_{H} 2,37); entre o H-1 (δ_{H} 3,65) e o H-2 (δ_{H} 1,74), assim como o H-6 (δ_{H} 3,37) com o $\text{CH}_2\text{-7}$ em δ_{H} 0,94; e δ_{H} 2,17 permitiram detectar a ocorrência da hidroxila nas posições C-1, C-3 e substituição do glicosídeo na posição C-6 no sapogenol. A substituição na posição C-6 pelo glicosídeo foi anteriormente descrita de acordo às correlações observadas no mapa de contorno HMBC (Figura 88).

Figura 90. Espectro NOESY-1D da substância **7**. Irradiação seletiva em δ_H 0,87 (14,1 T, CD_3OD).



Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

Figura 91. Ampliação do espectro ^1H - ^1H COSY da substância **7** (14,1 T, CD_3OD).

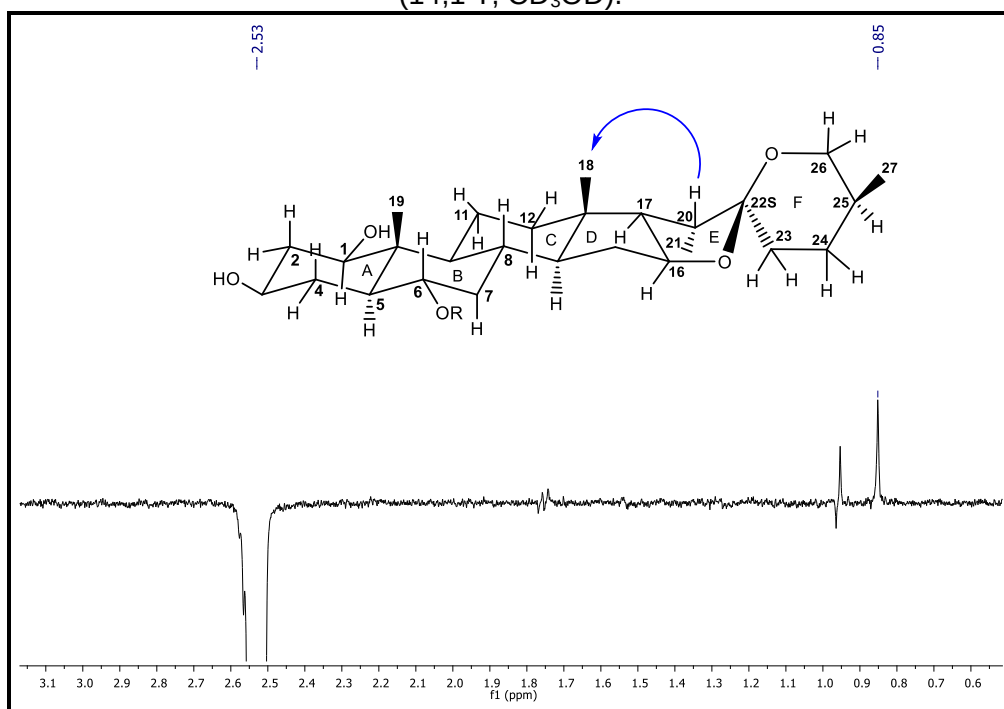


Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

O espectro NOESY-1D (Figura 92) mostrou a interação que estabelece o hidrogênio H-20 δ_H 2.53, (q, $J = 7.0$ Hz) com a metila que ocupa a posição CH₃-18 δ_H 0,85 o que permitiu determinar a configuração do estereocentro C-22 como S.

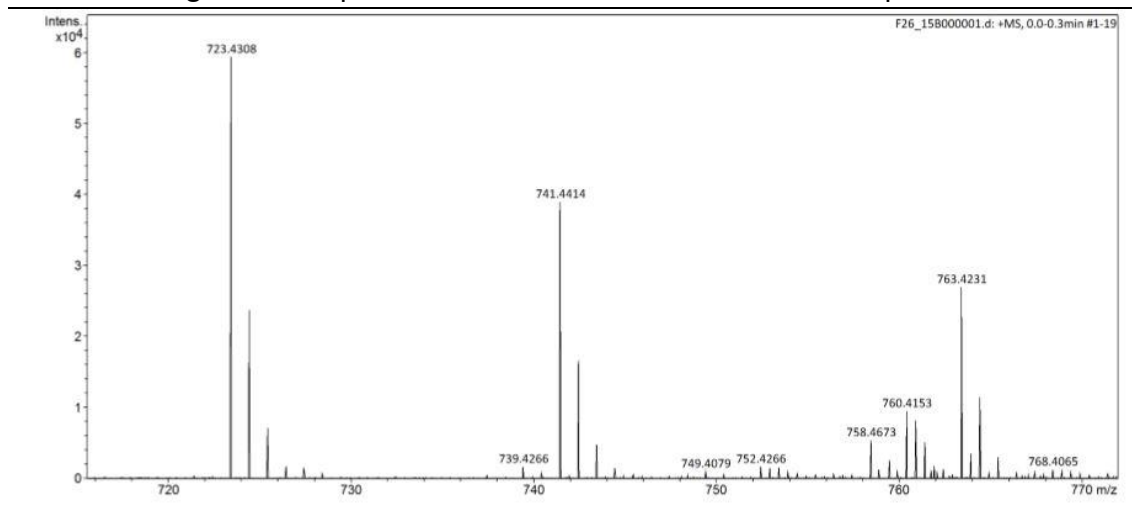
No caso que o C-22 ocupa uma configuração *R* em saponinas com anel F não substituído; quando é irradiado o H-20 são observadas as interações via NOESY-1D tanto com a CH₃-18 como com o metileno CH₂-23 do anel F (PEREZ et al., 2013).

Figura 92. Espectro NOESY-1D da substância 7. Irradiação seletiva em δ_H 2,53 (14,1 T, CD₃OD).



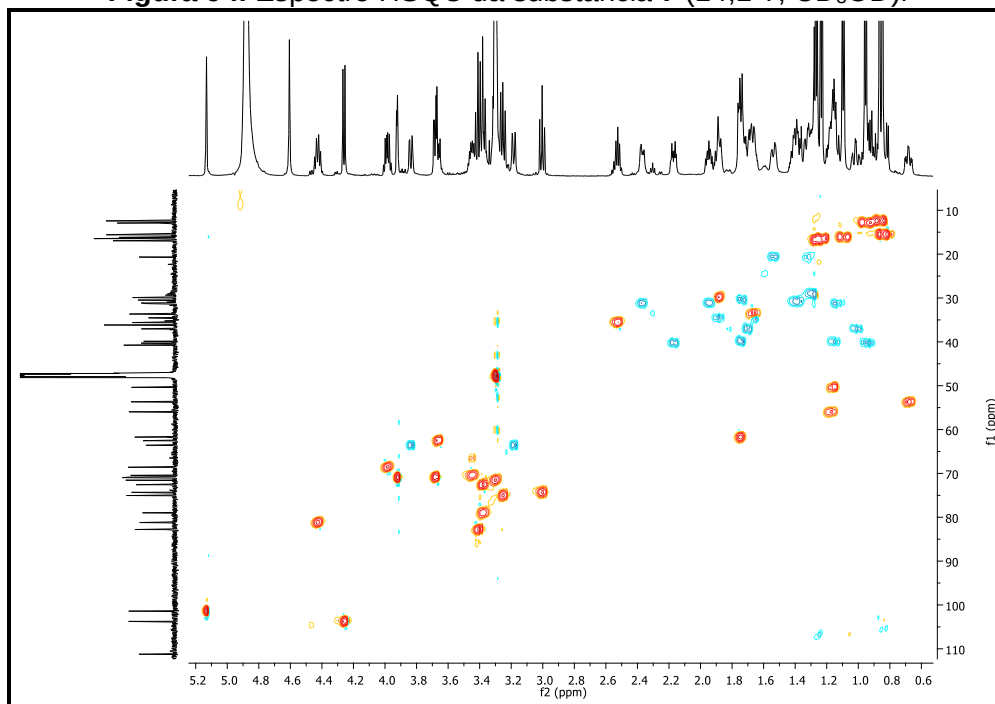
Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

O experimento HRESI-MS (modo positivo) forneceu o íon molecular protonado $[M+H]^+$ em m/z 741.4414 (calculado: 741,4420) o que está em concordância com a fórmula molecular proposta para a substância 7 como C₃₉H₆₄O₁₃, (Figura 93).

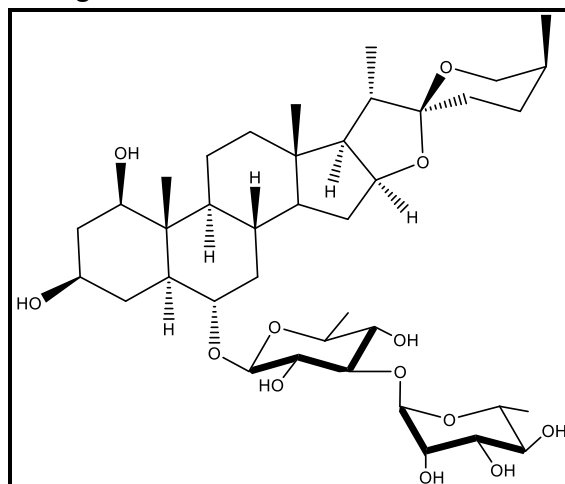
Figura 93. Espectro HRESI-MS da substância **7**. Modo positivo.

Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

Os demais sinais de deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C foram atribuídos de acordo com os dados obtidos a partir dos espectros de HMBC (Figura 88), e HSQC (Figura 94), o que permitiu caracterizar a substância **7** pela primeira vez na Literatura por VALERINO-DIAZ e colaboradores, (2018) como 6-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1'' $\rightarrow$ 3')- β -D-quinovopiranosil-(22*S*,25*S*)-1 β ,3 β ,6 α -triidroxi-5 α -espirostano (Figura 95).

Figura 94. Espectro HSQC da substância **7** (14,1 T, CD₃OD).

Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

Figura 95. Estrutura da substância **7**.

4.2.8 Elucidação estrutural da substância **8**.

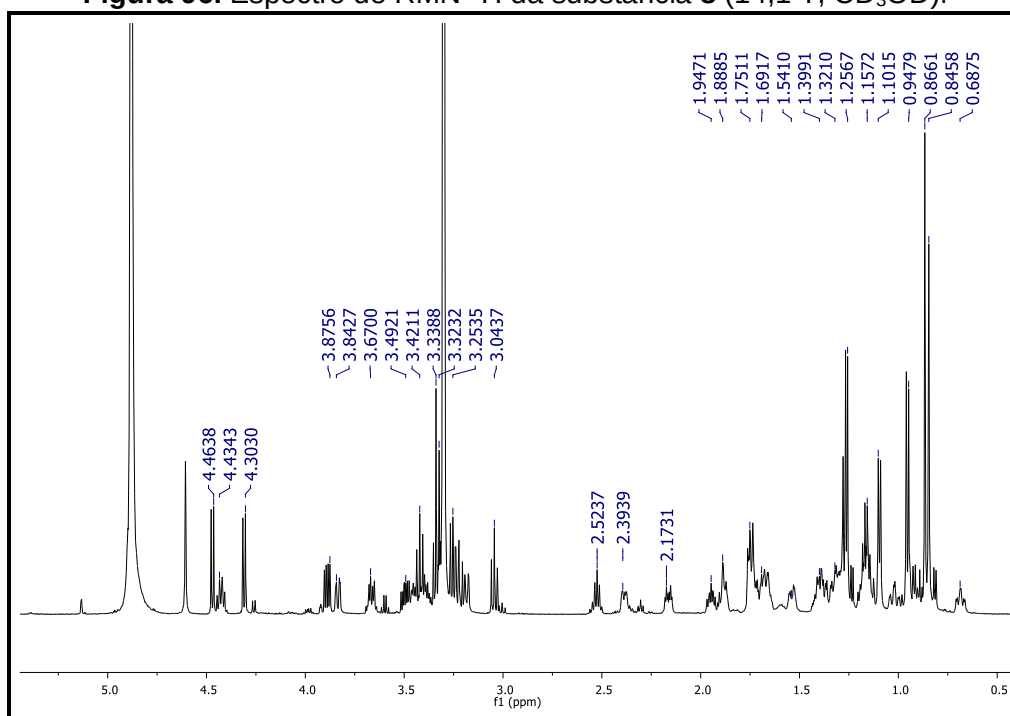
A substância **8** foi obtida como um sólido, de coloração amarela (3,9 mg). Os espectros de RMN-¹H e de RMN-¹³C (Figuras 96, 97) e os dados listados nas Tabelas 3, 4; págs. 133, 136, mostraram para a aglicona da substância **8** deslocamentos químicos muito similares à substância **7** porém, algumas

diferenças foram encontradas no espectro ^1H - ^1H COSY (Figura 98).

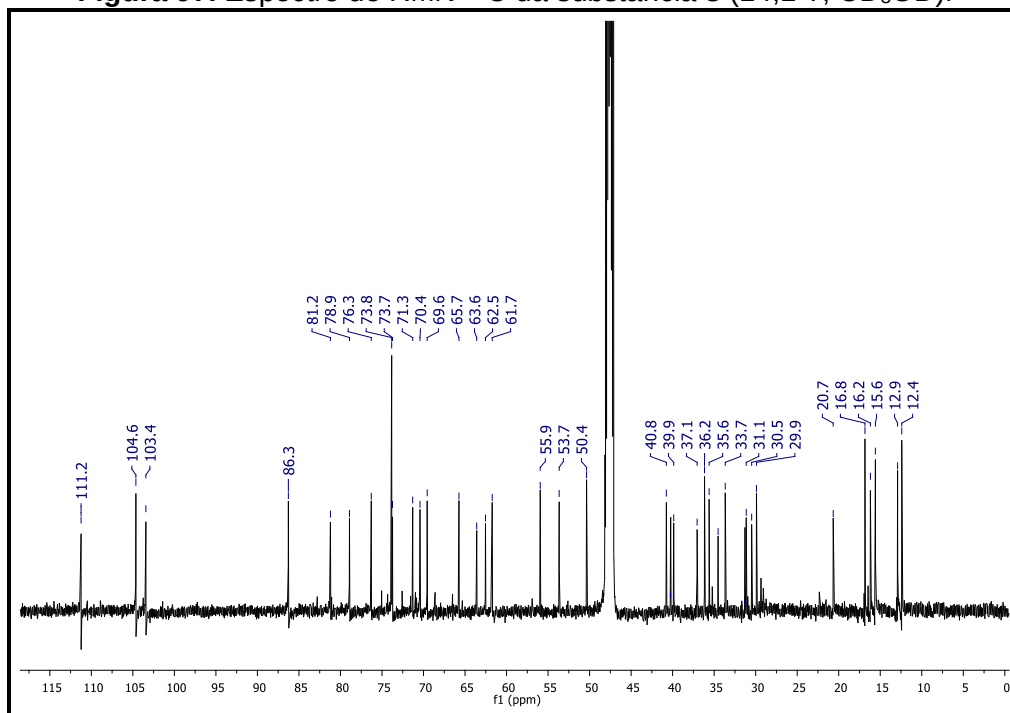
No espectro ^1H - ^1H COSY, foram observadas as correlações entre o H-3 (δ_{H} 3,67) com o H-2 (δ_{H} 1,92); entre o H-4 (δ_{H} 3,45) com o H-5 (δ_{H} 1,16), assim como o H-6 (δ_{H} 3,40) com o H-5 (δ_{H} 1,16) e o H-7 (δ_{H} 0,96), o que permitiu verificar a presença de hidroxilas em C-3, C-4 assim como uma possível substituição do glicosídeo em C-6.

Por outro lado, observou-se a presença na região mais desblindada do espectro de RMN- ^1H (Figura 96) de dois hidrogênios anoméricos, sendo um em δ_{H} 4,30 ($J = 8,0\text{Hz}$, H-1') e outro em δ_{H} 4,47 ($J = 7,0$, H-1'') atribuídos a duas unidades de açúcares diferentes das encontradas no composto **7**.

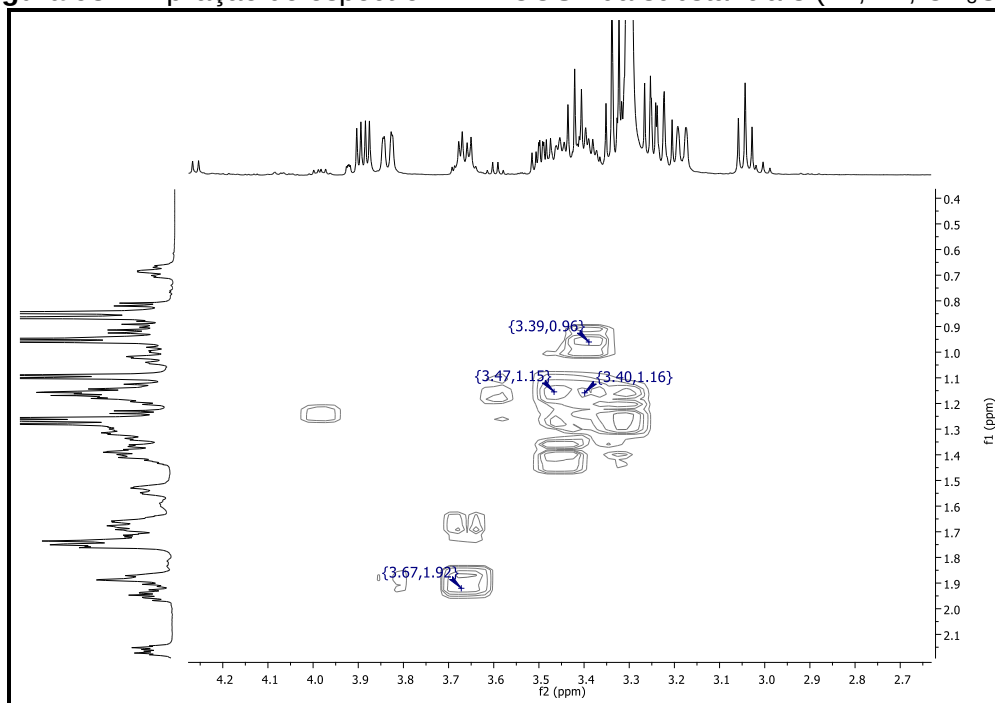
Figura 96. Espectro de RMN- ^1H da substância **8** (14,1 T, CD_3OD).



Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

Figura 97. Espectro de RMN- ^{13}C da substância **8** (14,1 T, CD_3OD).

Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

Figura 98. Ampliação do espectro ^1H - ^1H COSY da substância **8** (14,1 T, CD_3OD).

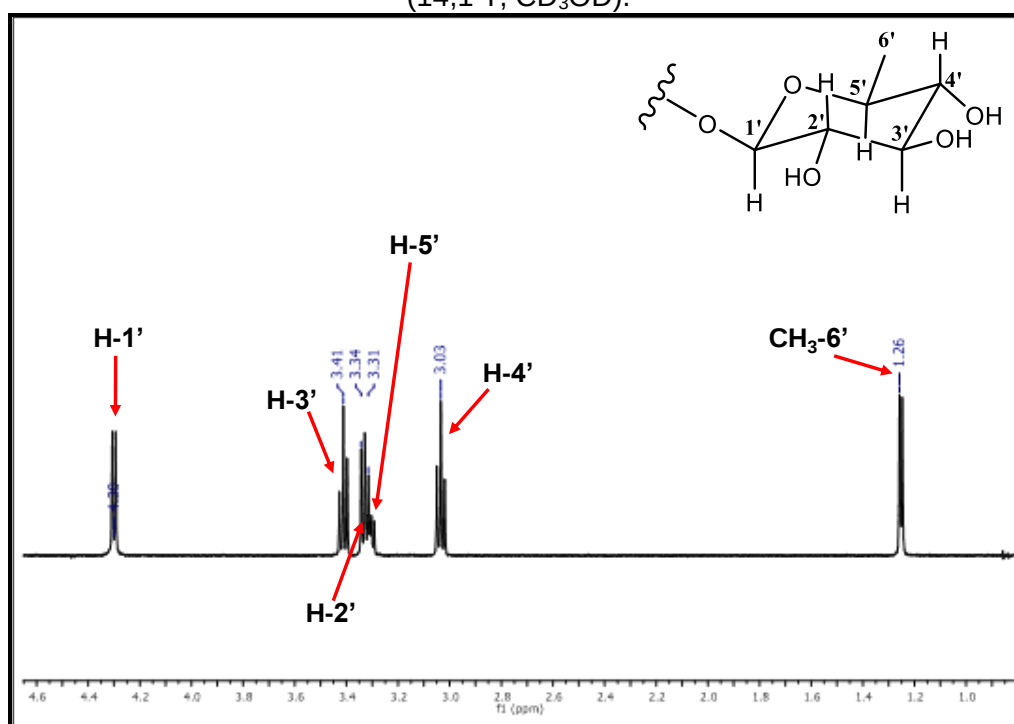
Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

Para a atribuição das duas unidades de açúcar na substância **8**, realizou-se uma irradiação seletiva dos hidrogênios anoméricos correspondentes, utilizando a técnica de TOCSY-1D (Figura 99).

Quando foi irradiado o hidrogênio anomérico em δ_H 4,30 ($J = 8,0$ Hz, H-1'), observou-se todo o sistema de spins pertencente à unidade da β -D-quinovose (Figura 100), enquanto que a irradiação do hidrogênio anomérico em δ_H 4,47 ($J = 7,0$, H-1'') conduziu ao sistema de spins pertencente a unidade de β -D-xilose (Figura 100).

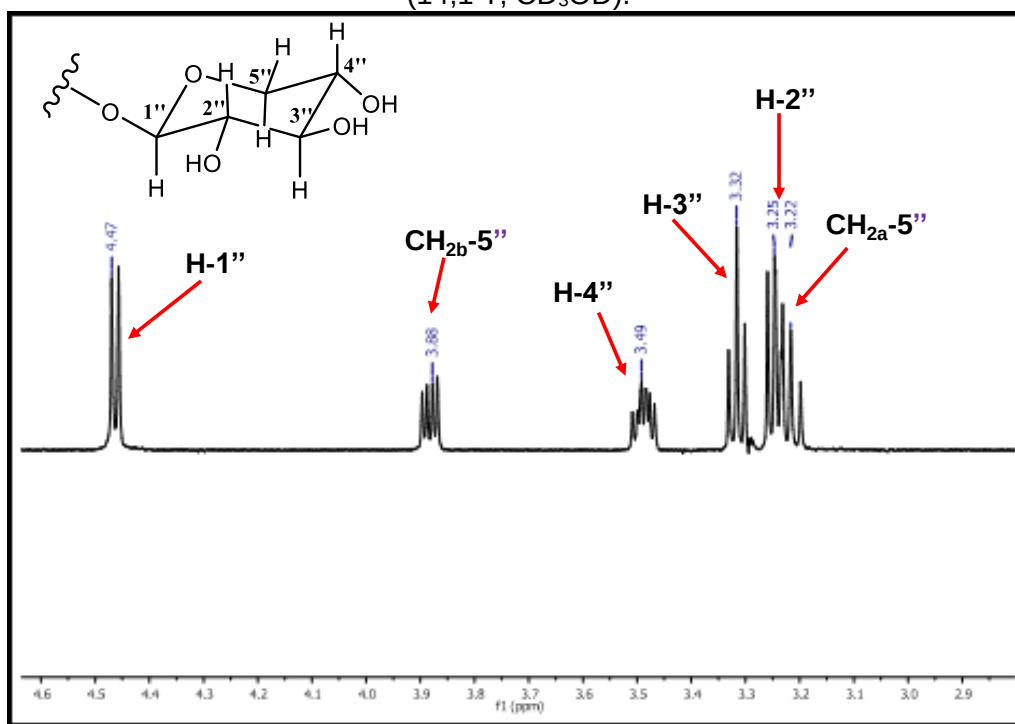
Por outro lado, os deslocamentos químicos de RMN- ^1H , assim como de RMN- ^{13}C (Tabelas 3, 4; págs. 133, 136) das duas unidades de açúcares da substância **8** são muito similares às observadas para as substâncias **3**, **4** e **6**, o que confirma a presença da β -D-quinovose e β -D-xilose nesta molécula.

Figura 99. Espectro TOCSY-1D da substância **8**. Irradiação em δ_H 4,30 (14,1 T, CD_3OD).



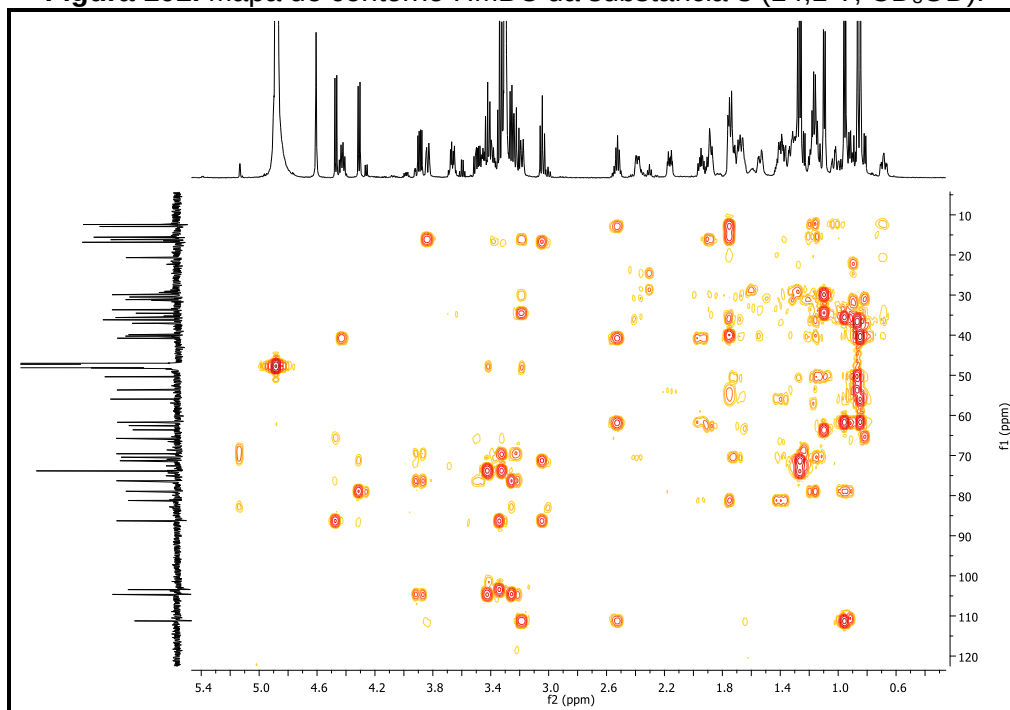
Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

Figura 100. Espectro TOCSY-1D da substância **8**. Irradiação em δ_H 4,47 (14,1 T, CD_3OD).



Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

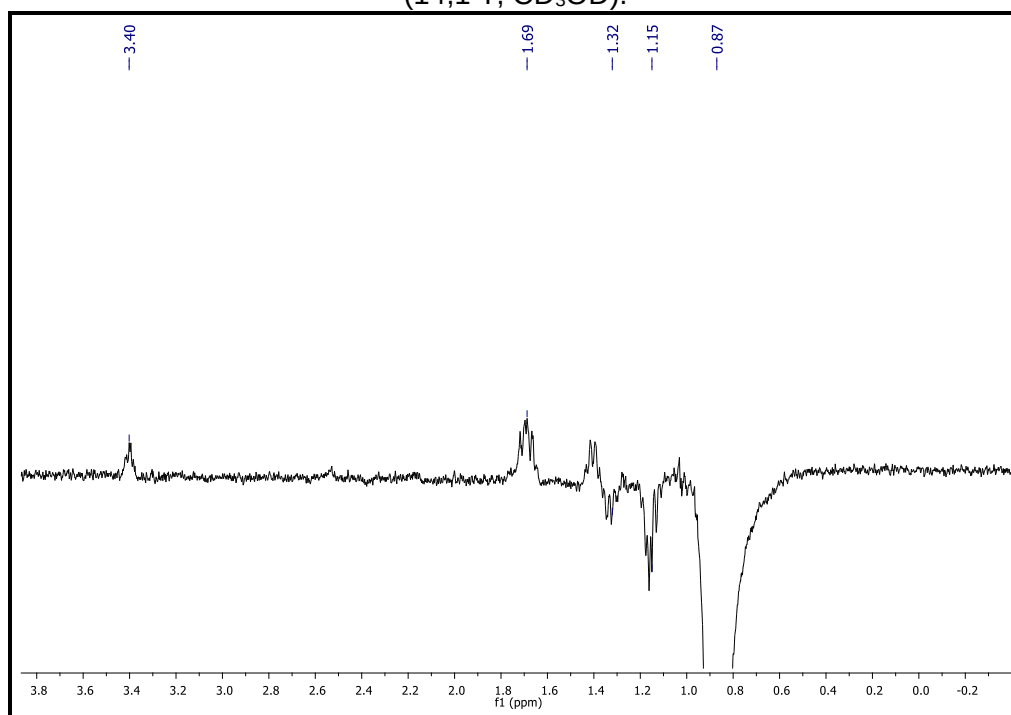
O sítio da ligação entre as unidades glicosídicas foi determinado como (1''→3') devido às correlações encontradas no mapa de contorno HMBC (Figura 101), entre o hidrogênio anomérico da xilose em δ_H 4,47 ($J = 7,0$, H-1'') e o carbono C-3' da quinovose em δ_C 86,3. A ligação entre o glicosídeo e a aglicona foi deduzida pela correlação no mapa de contorno HMBC entre o hidrogênio da quinovose em δ_H 4,30 ($J = 8,0$ Hz, H-1') e o carbono C-6 em δ_C 78,9 da aglicona.

Figura 101. Mapa de contorno HMBC da substância **8** (14,1 T, CD₃OD).

Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

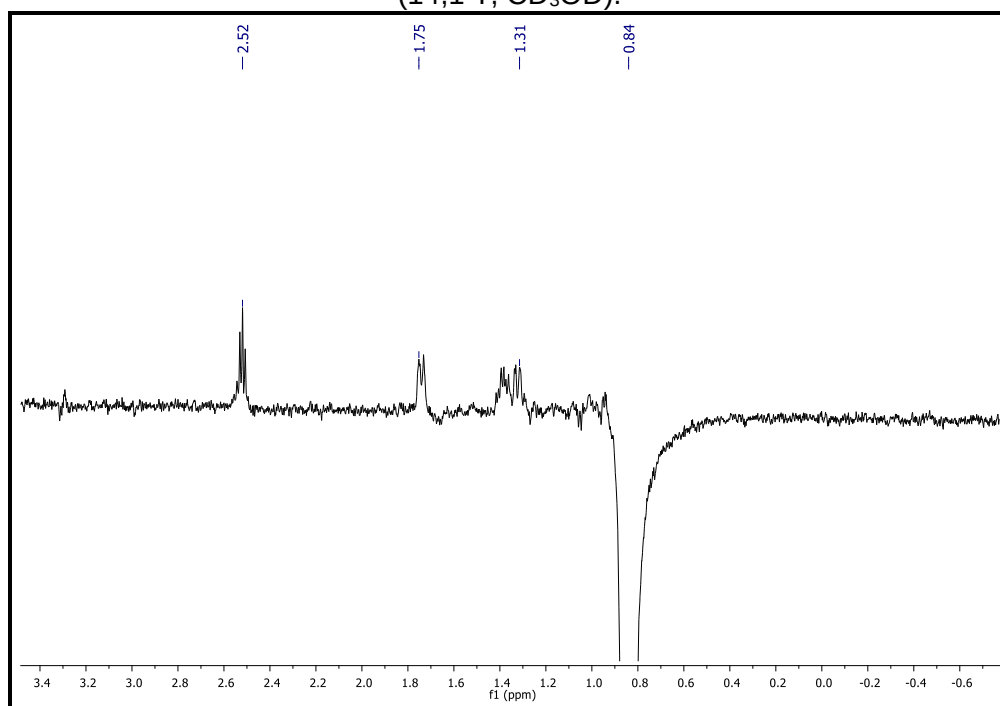
As análises das interações obtidas no espectro de NOESY-1D para a substância **8** (Figuras 102, 103) quando foram irradiadas as metilas CH₃-18 δ_H 0,87 e CH₃-19 δ_H 0,84, revelaram as mesmas interações que foram encontradas para a substância **7**, o que confirma uma junção *trans* entre os anéis AB, BC e CD, assim como uma junção *cis* entre os anéis DE. Também se confirmou a orientação β para as metilas CH₃-18 e CH₃-19, assim como uma orientação α para CH₃-21 no sapogenol.

Figura 102. Espectro NOESY-1D da substância **8**. Irradiação seletiva em δ_H 0,87 (14,1 T, CD_3OD).



Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

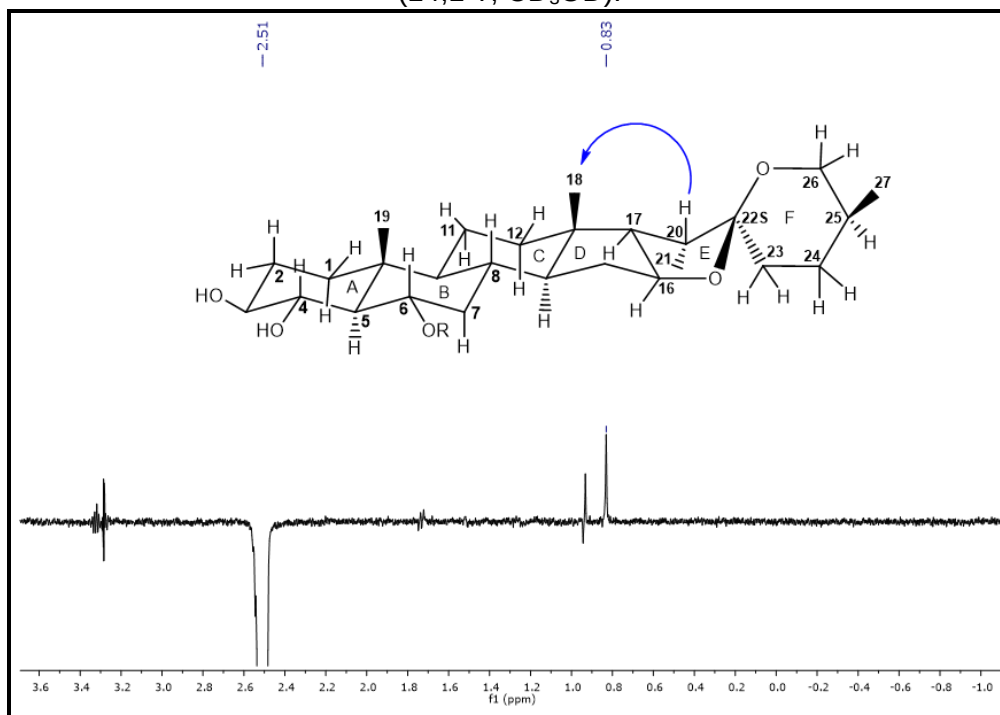
Figura 103. Espectro NOESY-1D da substância **8**. Irradiação seletiva em δ_H 0,84 (14,1 T, CD_3OD).



Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

O espectro NOESY-1D (Figura 104) com irradiação seletiva no H-20 permitiu determinar a configuração do estereocentro C-22 como *S*, devido à interação que estabelece o hidrogênio H-20 δ_H 2,51, (q, $J = 7.0$ Hz) somente com a metila que ocupa a posição CH₃-18 δ_H 0,84.

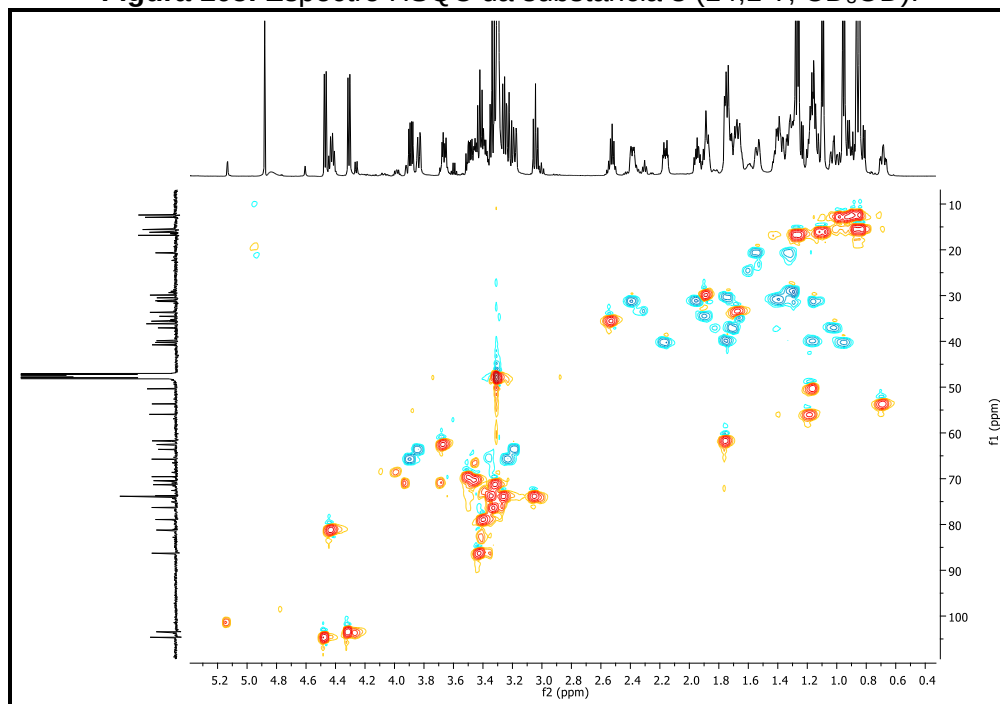
Figura 104. Espectro NOESY-1D da substância **8**. Irradiação seletiva em δ_H 2,51 (14,1 T, CD₃OD).



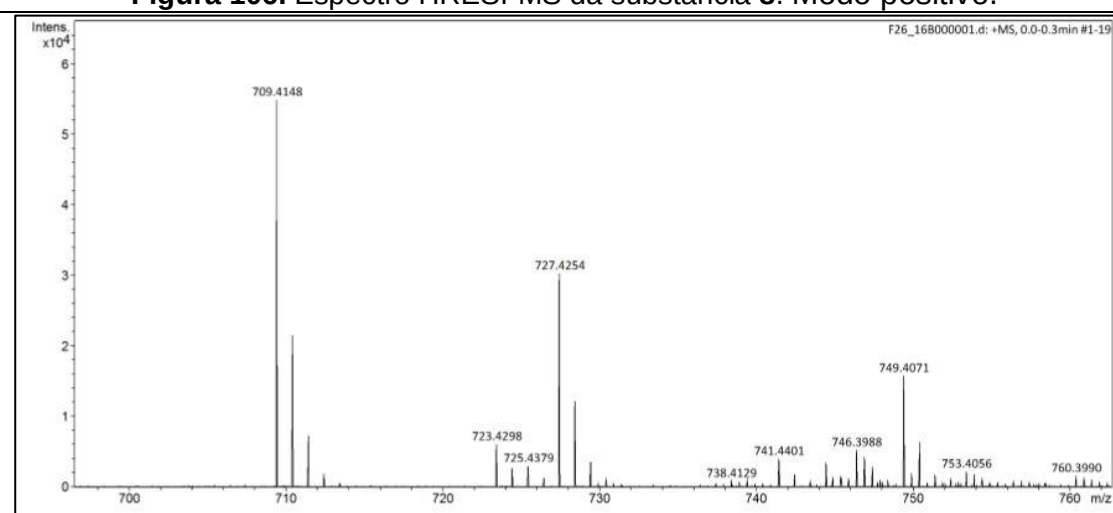
Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

Os demais deslocamentos químicos foram atribuídos a partir dos dados espectroscópicos obtidos nos espectros HMBC (Figura 101), HSQC (Figura 105) e ¹H-¹H COSY.

A fórmula molecular da substância **8** foi deduzida como C₃₈H₆₂O₁₃, a partir do íon molecular protonado [M+H]⁺ observado em m/z 727,4254 (calculado: 727,4263) obtido no HRESI-MS (Figura 106).

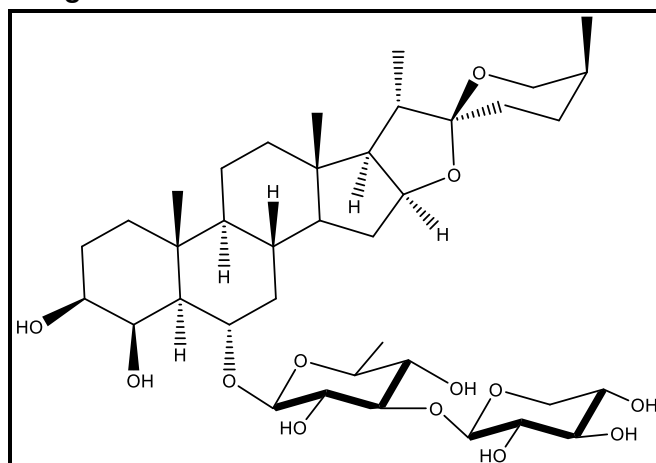
Figura 105. Espectro HSQC da substância **8** (14,1 T, CD₃OD).

Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

Figura 106. Espectro HRESI-MS da substância **8**. Modo positivo.

Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

A estrutura para a substância **8** foi caracterizada como 6-*O*- β -D-xilopiranosil-(1'' $\rightarrow$ 3')- β -D-quinovopiranosil-(2*S*,25*S*)-3 β ,4 β ,6 α -triidroxi-5 α -espirostanos. Esta estrutura foi descrita pela primeira vez na literatura (Figura 107) por VALERINO-DIAZ e colaboradores, (2018).

Figura 107. Estrutura da substância **8**.

As Tabelas 3 e 4 apresentam os deslocamentos químicos obtidos de RMN- ^1H e RMN- ^{13}C das substâncias **1-8**. A seguir, na Figura 108 se apresenta um resumo das saponinas espirostânicas isoladas a partir do extrato etanol 70 % das folhas de *S. paniculatum*, mostrando as diferenças na estrutura entre cada uma.

Tabela 3. Deslocamentos químicos de hidrogênio para as substâncias **1-8^a**

Posição	1	2	3	4	5	6	7	8
δ_H (ppm); (J, Hz) ^b								
1	1,13; 1,74; <i>m</i>	1,00; 1,69; <i>m</i>	1,02; 1,73;	1,02; 1,73;	1,15; 1,79;	1,02; 1,78;	3,65; <i>m</i>	1,15; 1,75; <i>m</i>
2	1,15; 2,35; <i>m</i>	1,15; 2,37; <i>m</i>	1,16; 2,39; <i>m</i>	1,16; 2,39; <i>m</i>	1,15; 2,37; <i>m</i>	1,16; 2,38; <i>m</i>	1,16; 1,74; <i>m</i>	1,92; 2,39; <i>m</i>
3	3,45; <i>m</i>	3,45; <i>m</i>	3,46; <i>m</i>	3,46; <i>m</i>	3,38; <i>m</i>	3,39; <i>m</i>	3,45; <i>m</i>	3,67; <i>m</i>
4	1,38 1,74; <i>m</i>	1,40 1,74; <i>m</i>	1,40 1,75; <i>m</i>	1,40 1,75; <i>m</i>	0,93 2,15; <i>m</i>	0,94 2,16; <i>m</i>	1,95 2,37; <i>m</i>	3,45; <i>m</i>
5	1,15; <i>m</i>	1,15; <i>m</i>	1,16; <i>m</i>	1,16; <i>m</i>	1,15; <i>m</i>	1,16; <i>m</i>	1,16; <i>m</i>	1,15; <i>m</i>
6	3,37; <i>m</i>	3,37; <i>m</i>	3,40; <i>m</i>	3,40; <i>m</i>	3,44; <i>m</i>	3,45; <i>m</i>	3,37; <i>m</i>	3,40; <i>m</i>
7	0,94; 2,16; <i>m</i>	0,94; 2,16; <i>m</i>	0,95; 2,16; <i>m</i>	0,95; 2,16; <i>m</i>	1,40; 1,76; <i>m</i>	1,39; <i>m</i>	0,94; 2,17; <i>m</i>	0,96; 2,17; <i>m</i>
8	1,64; <i>m</i>	1,64; <i>m</i>	1,66; <i>m</i>	1,66; <i>m</i>	1,65; <i>m</i>	1,65; <i>m</i>	1,66; <i>m</i>	1,69; <i>m</i>
9	0,68; <i>td</i> (2,5; 3,9; 4,0)	0,67; <i>m</i>	0,68; <i>td</i> (2,1; 3,7; 3,9)	0,68; <i>td</i> (2,1; 3,7; 3,9)	0,68; <i>td</i> (2,0; 3,8; 4,1)	0,68; <i>td</i> (2,1; 3,8; 4,0)	0,68; <i>td</i> (2,4; 3,8; 3,9)	0,69; <i>td</i> (2,2; 3,8; 3,9)
10	-	-	-	-	-	-	-	-
11	1,30; 1,53; <i>m</i>	1,30; 1,54; <i>m</i>	1,31; 1,53; <i>m</i>	1,31; 1,53; <i>m</i>	1,33; 1,54; <i>m</i>	1,33; 1,54; <i>m</i>	1,31; 1,54; <i>m</i>	1,32; 1,54; <i>m</i>
12	1,01; 1,74; <i>m</i>	1,13; 1,73; <i>m</i>	1,15; 1,75; <i>m</i>	1,15; 1,75; <i>m</i>	1,15; 1,73; <i>m</i>	1,15; 1,74; <i>m</i>	1,02; 1,67; <i>m</i>	1,01; 1,70; <i>m</i>
13	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 3. Continuação.

Posição	1	2	3	4	5	6	7	8
δ_H (ppm); (J, Hz) ^b								
14	1,15; <i>m</i>	1,15; <i>m</i>	1,16; <i>m</i>	1,16; <i>m</i>	1,10; <i>m</i>	1,10; <i>m</i>	1,16; <i>m</i>	1,17; <i>m</i>
15	1,27; 1,96; <i>m</i>	1,25; 1,96; <i>m</i>	1,28; 1,97; <i>m</i>	1,28; 1,97; <i>m</i>	1,95; 2,30; <i>m</i>	1,95; 2,30; <i>m</i>	1,40; 1,75; <i>m</i>	1,40; 1,75; <i>m</i>
16	4,46; <i>m</i>	4,45; <i>m</i>	4,47; <i>m</i>	4,47; <i>m</i>	4,70; <i>m</i>	4,71; <i>m</i>	4,42; <i>m</i>	4,43; <i>m</i>
17	1,69; <i>m</i>	1,67; <i>m</i>	1,70; <i>m</i>	1,70; <i>m</i>	1,83; <i>dd</i> (6,4; 9,1)	1,83; <i>dd</i> (6,3)	1,74; <i>m</i>	1,75; <i>m</i>
18	0,81; <i>s</i>	0,81; <i>s</i>	0,81; <i>s</i>	0,81; <i>s</i>	0,87; <i>s</i>	0,86; <i>s</i>	0,85; <i>s</i>	0,84; <i>s</i>
19	0,87; <i>s</i>	0,87; <i>s</i>	0,86; <i>s</i>	0,86; <i>s</i>	0,86; <i>s</i>	0,87; <i>s</i>	0,87; <i>s</i>	0,87; <i>s</i>
20	2,34; <i>m</i>	2,24; <i>q</i> (7,0)	2,34; <i>q</i> (7,0)	2,34; <i>q</i> (7,0)	2,19; <i>m</i>	2,18; <i>m</i>	2,53; <i>q</i> (7,0)	2,52; <i>q</i> (7,0)
21	1,11; <i>d</i> (7,0)	1,09; <i>d</i> (7,0)	1,11; <i>d</i> (7,0)	1,11; <i>d</i> (7,0)	1,15; <i>d</i> (7,3)	1,15; <i>d</i> (7,3)	0,95; <i>d</i> (7,0)	0,95; <i>d</i> (7,0)
22	-	-	-	-	-	-	-	-
23	3,56; <i>t</i> (3,6)	3,51; <i>m</i>	3,57; <i>t</i> (3,7)	3,57; <i>t</i> (3,7)	3,62; <i>dd</i> (2,8; 4,7)	3,62; <i>m</i>	1,15; 1,39; <i>m</i>	1,15; 1,39; <i>m</i>
24	1,52; 2,06; <i>m</i>	1,60; <i>m</i>	1,52; 2,06; <i>m</i>	1,52; 2,06; <i>m</i>	1,47; <i>d</i> (11,9) 1,70; <i>m</i>	1,46; <i>dd</i> (11,9) 1,70; <i>m</i>	1,64; 1,89; <i>m</i>	1,66; 1,89; <i>m</i>
25	1,66; <i>m</i>	2,03; <i>m</i>	1,67; <i>m</i>	1,67; <i>m</i>	1,70; <i>m</i>	1,72; <i>m</i>	1,89; <i>m</i>	1,89; <i>m</i>
26	3,31; <i>m</i> 3,95; <i>d</i> (3,7)	3,35; 3,45; <i>m</i>	3,32; <i>m</i> 3,95; <i>dd</i> (3,5; 11,0)	3,32; <i>m</i> 3,95; <i>dd</i> (3,5; 11,0)	3,29; 3,43; <i>m</i>	3,30; 3,43; <i>m</i>	3,18; <i>d</i> (10,8) 3,84; <i>m</i>	3,20; <i>m</i> 3,84; <i>dd</i> (1,9)
27	1,20; <i>d</i> (7,2)	0,76; <i>d</i> (6,6)	1,20; <i>d</i> (7,3)	0,76; <i>d</i> (6,7)	0,80; <i>d</i> (6,54)	0,81; <i>d</i> (6,5)	1,09; <i>d</i> (7,1)	1,10; <i>d</i> (7,0)

Tabela 3. Continuação.

	1	2	3	4	5	6	7	8
	Qui ^c	Qui	Qui	Qui	Qui	Qui	Qui	Qui
1'	4,26; <i>d</i> (7,9)	4,26; <i>d</i> (7,9)	4,30; <i>d</i> (7,8)	4,31; <i>d</i> (7,8)	4,26; <i>d</i> (7,9)	4,30; <i>d</i> (7,8)	4,26; <i>d</i> (7,8)	4,30; <i>d</i> (8,0)
2'	3,25; <i>m</i>	3,25; <i>m</i>	3,35; <i>dd</i> (7,8)	3,34; <i>m</i>	3,26; <i>m</i>	3,34; <i>m</i>	3,25; <i>dd</i> (7,8; 8,94)	3,34; <i>m</i>
3'	3,41; <i>m</i>	3,40; <i>m</i>	3,42; <i>m</i>	3,42; <i>m</i>	3,41; <i>m</i>	3,42; <i>m</i>	3,41; <i>m</i>	3,42; <i>m</i>
4'	3,00; <i>t</i> (9,2)	3,00; <i>t</i> (9,1)	3,05; <i>t</i> (9,1)	3,04; <i>t</i> (9,1)	3,00; <i>t</i> (9,2)	3,05; <i>t</i> (9,1)	3,00; <i>t</i> (9,0)	3,05; <i>t</i> (9,1)
5'	3,30; <i>m</i>	3,29; <i>m</i>	3,32; <i>m</i>	3,31; <i>m</i>	3,30; <i>m</i>	3,32; <i>m</i>	3,30; <i>m</i>	3,31; <i>m</i>
6'	1,27; <i>d</i> (6,2)	1,27; <i>d</i> (6,1)	1,26; <i>d</i> (6,1)	1,27; <i>d</i> (6,1)	1,27; <i>d</i> (6,3)	1,27; <i>d</i> (6,2)	1,26; <i>d</i> (6,0)	1,26; <i>d</i> (6,0)
	Ram ^d	Ram	Xil ^e	Xil	Ram	Xil	Ram	Xil
1''	5,13; <i>d</i> (1,6)	5,13; <i>d</i> (1,3)	4,47; <i>d</i> (7,62)	4,47; <i>d</i> (7,6)	5,12; <i>d</i> (1,5)	4,47; <i>d</i> (7,0)	5,13; <i>d</i> (1,2)	4,47; <i>d</i> (7,6)
2''	3,92; <i>dd</i> (1,6; 3,3)	3,92; <i>m</i>	3,26; <i>m</i>	3,25; <i>m</i>	3,92; <i>dd</i> (1,5)	3,26; <i>m</i>	3,92; <i>dd</i> (1,2, 3,2)	3,26; <i>m</i>
3''	3,68; <i>dd</i> (3,4)	3,68; <i>dd</i> (3,2)	3,33; <i>m</i>	3,33; <i>m</i>	3,68; <i>m</i>	3,33; <i>m</i>	3,67; <i>m</i>	3,33; <i>m</i>
4''	3,38; <i>m</i>	3,37; <i>m</i>	3,50; <i>m</i>	3,50; <i>m</i>	3,37; <i>m</i>	3,49; <i>m</i>	3,37; <i>m</i>	3,49; <i>m</i>
5''	3,99; <i>m</i>	3,98; <i>m</i>	3,23; <i>m</i> 3,89; <i>dd</i> (5,4)	3,23; <i>m</i> 3,89; <i>dd</i> (5,4)	3,99; <i>m</i>	3,23; <i>d</i> (2,6) 3,88; <i>dd</i> (5,4)	3,98; <i>m</i>	3,23; <i>m</i> 3,89; <i>dd</i> (5,3)
6''	1,23; <i>d</i> (6,2)	1,23; <i>d</i> (6,2)	-	-	1,23; <i>d</i> (6,2)	-	1,23; <i>d</i> (6,0)	-

^a Atribuições foram feitas de acordo aos dados obtidos nos espectros ¹H-¹H COSY, HSQC, HMBC, TOCSY-1D e NOESY-1D.

^b As constantes de acoplamentos foram medidas a partir dos dados obtidos no RMN-¹H em hertz.

^c β -D-quinovopiranosídeo, ^d α -L-ramnopiranosídeo, ^e β -D-xilopiranosídeo.

Dados obtidos: 14,1 T; CD₃OD. Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

Tabela 4. Deslocamentos químicos de carbono (ppm) para as substâncias **1-8^a**.

	1	2	3	4	5	6	7	8
Posição	δ_c ; tipo	δ_c ; tipo	δ_c ; tipo	δ_c ; tipo	δ_c ; tipo	δ_c ; tipo	δ_c ; tipo	δ_c ; tipo
1	37,1; CH ₂	37,1; CH ₂	37,1; CH ₂	37,1; CH ₂	37,0; CH ₂	37,0; CH ₂	62,5; CH	39,9; CH ₂
2	31,3; CH ₂	31,3; CH ₂	31,3; CH ₂	31,3; CH ₂	31,3; CH ₂	31,3; CH ₂	39,8; CH ₂	31,1; CH ₂
3	70,4; CH	70,4; CH	70,4; CH	70,4; CH	79,0; CH	78,9; CH	70,4; CH	62,5; CH
4	30,5; CH ₂	30,5; CH ₂	30,5; CH ₂	30,5; CH ₂	40,3; CH ₂	40,2; CH ₂	31,3; CH ₂	70,4; CH
5	50,4; CH	50,4; CH	50,4; CH	50,4; CH	50,4; CH	50,4; CH	50,4; CH	50,4; CH
6	78,9; CH	78,9; CH	78,9; CH	78,9; CH	70,5; CH	70,4; CH	79,0; CH	78,9; CH
7	40,2; CH ₂	40,2; CH ₂	40,2; CH ₂	40,2; CH ₂	30,5; CH ₂	30,5; CH ₂	40,3; CH ₂	40,2; CH ₂
8	33,9; CH	33,9; CH	33,9; CH	33,9; CH	33,6; CH	33,6; CH	33,7; CH	33,7; CH
9	53,7; CH	53,7; CH	53,7; CH	53,7; CH	53,7; CH	53,7; CH	53,7; CH	53,7; CH
10	36,2; C	36,1; C	36,2; C	36,2; C	36,2; C	36,2; C	36,2; C	36,2; C
11	20,6; CH ₂	20,6; CH ₂	20,6; CH ₂	20,6; CH ₂	20,7; CH ₂	20,7; CH ₂	20,6; CH ₂	20,7; CH ₂
12	39,4; CH ₂	39,3; CH ₂	39,4; CH ₂	39,3; CH ₂	39,8; CH ₂	39,8; CH ₂	37,0; CH ₂	37,1; CH ₂
13	40,7; C	40,7; C	40,7; C	40,7; C	40,9; C	40,9; C	40,8; C	40,8; C
14	56,1; CH	56,1; CH	56,1; CH	56,1; CH	55,1; CH	55,3; CH	56,0; CH	55,9; CH
15	31,5; CH ₂	31,6; CH ₂	31,5; CH ₂	31,5; CH ₂	33,3; CH ₂	33,3; CH ₂	30,5; CH ₂	30,5; CH ₂
16	81,2; CH	81,0; CH	81,2; CH	81,0; CH	83,9; CH	83,9; CH	81,2; CH	81,2; CH
17	64,0; CH	64,3; CH	64,0; CH	64,3; CH	62,9; CH	62,9; CH	61,7; CH	61,7; CH

Tabela 4. Continuação.

	1	2	3	4	5	6	7	8
Posição	δ_c ; tipo	δ_c ; tipo	δ_c ; tipo	δ_c ; tipo	δ_c ; tipo	δ_c ; tipo	δ_c ; tipo	δ_c ; tipo
18	15,4; CH ₃	15,3; CH ₃	15,4; CH ₃	15,3; CH ₃	15,4; CH ₃	15,4; CH ₃	15,6; CH ₃	15,6; CH ₃
19	12,4; CH ₃	12,4; CH ₃	12,4; CH ₃	12,4; CH ₃	12,4; CH ₃	12,4; CH ₃	12,4; CH ₃	12,4; CH ₃
20	39,6; CH	40,3; CH	39,6; CH	40,3; CH	42,4; CH	42,4; CH	35,6; CH	35,6; CH
21	15,5; CH ₃	15,6; CH ₃	15,5; CH ₃	15,6; CH ₃	15,0; CH ₃	15,0; CH ₃	12,9; CH ₃	12,9; CH ₃
22	109,9; C	108,6; C	109,9; C	108,6; C	112,1; C	111,1; C	111,2; C	111,2; C
23	69,7; CH	69,7; CH	69,6; CH	69,6; CH	69,4; CH	69,4; CH	31,1; CH ₂	31,3; CH ₂
24	33,2; CH ₂	36,2; CH ₂	33,2; CH ₂	36,2; CH ₂	37,1; CH ₂	37,1; CH ₂	34,5; CH ₂	34,5; CH ₂
25	26,6; CH	23,6; CH	26,6; CH	23,6; CH	30,5; CH	30,5; CH	29,9; CH	29,9; CH
26	64,9; CH ₂	66,1; CH ₂	64,8; CH ₂	66,1; CH ₂	68,1; CH ₂	68,1; CH ₂	63,6; CH ₂	63,6; CH ₂
27	18,8; CH ₃	16,0; CH ₃	18,8; CH ₃	15,9; CH ₃	15,8; CH ₃	15,7; CH ₃	16,2; CH ₃	16,2; CH ₃
	Qui ^b	Qui	Qui	Qui	Qui	Qui	Qui	Qui
1'	103,7;CH	103,7; CH	103,4; CH	103,4;CH	103,7;CH	103,4;CH	103,7;CH	103,4;CH
2'	75,0; CH	75,1; CH	73,7; CH	73,7; CH	75,0; CH	73,7; CH	75,0; CH	73,7; CH
3'	82,8; CH	82,7; CH	86,3; CH	86,3; CH	82,8; CH	86,3; CH	82,8; CH	86,3; CH
4'	74,3; CH	74,3; CH	73,8; CH	73,8; CH	74,3; CH	73,8; CH	74,3; CH	73,8; CH
5'	71,6; CH	71,6; CH	71,3; CH	71,3; CH	71,6; CH	71,3; CH	71,6; CH	71,3; CH
6'	16,9; CH ₃	17,0; CH ₃	16,9; CH ₃	16,9; CH ₃	16,9; CH ₃	16,8; CH ₃	16,9; CH ₃	16,8; CH ₃

Tabela 4. Continuação.

	1	2	3	4	5	6	7	8
	Ram^c	Ram	Xil^d	Xil	Ram	Xil	Ram	Xil
1''	101,4; CH	101,4; CH	104,6; CH	104,6; CH	101,4; CH	104,0; CH	101,4; CH	104,6; CH
2''	71,0; CH	71,0; CH	73,8; CH	73,8; CH	71; CH	73,8; CH	71,0; CH	73,8; CH
3''	70,8; CH	70,8; CH	76,3; CH	76,3; CH	70,8; CH	76,3; CH	70,8; CH	76,3; CH
4''	72,6; CH	72,6; CH	69,7; CH	69,7; CH	72,6; CH	69,6; CH	72,6; CH	69,6; CH
5''	68,6; CH	68,6; CH	65,7; CH	65,7; CH ₂	68,6; CH	65,8; CH ₂	68,6; CH	65,7; CH ₂
6''	16,5; CH ₃	16,5; CH ₃	-	-	16,5; CH ₃	-	16,5; CH ₃	-

^a Atribuições foram feitas de acordo aos dados obtidos nos espectros DEPT-135, HSQC e HMBC.

^b β -D-quinovopiranosídeo, ^c α -L-ramnopiranosídeo, ^d β -D-xilopiranosídeo.

Dados obtidos: 14,1 T; CD₃OD. Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al., 2018

Figura 108. Saponinas espirostânicas inéditas (**1-8**) isoladas do extrato etanol 70 % das folhas de *S. paniculatum*.

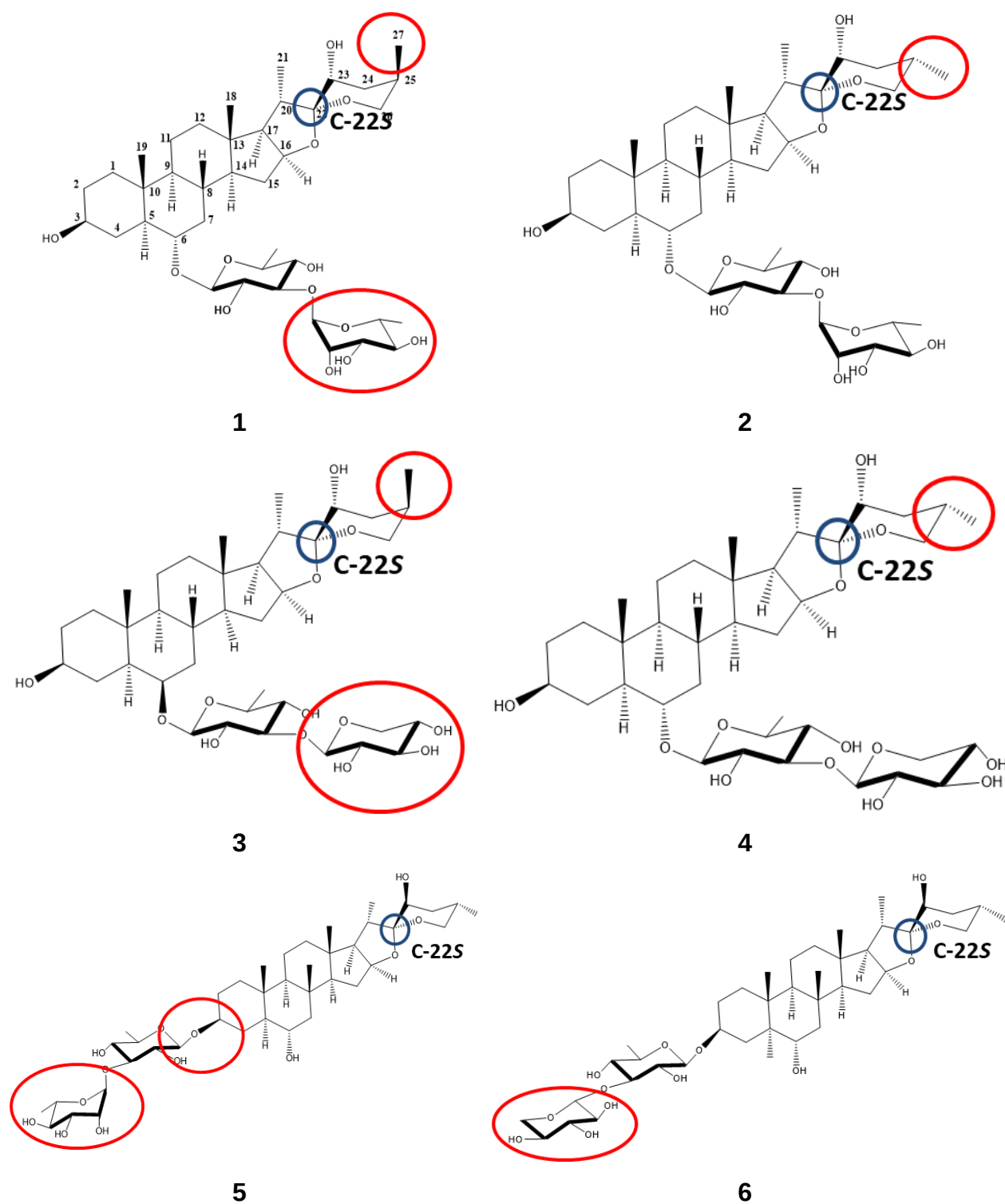
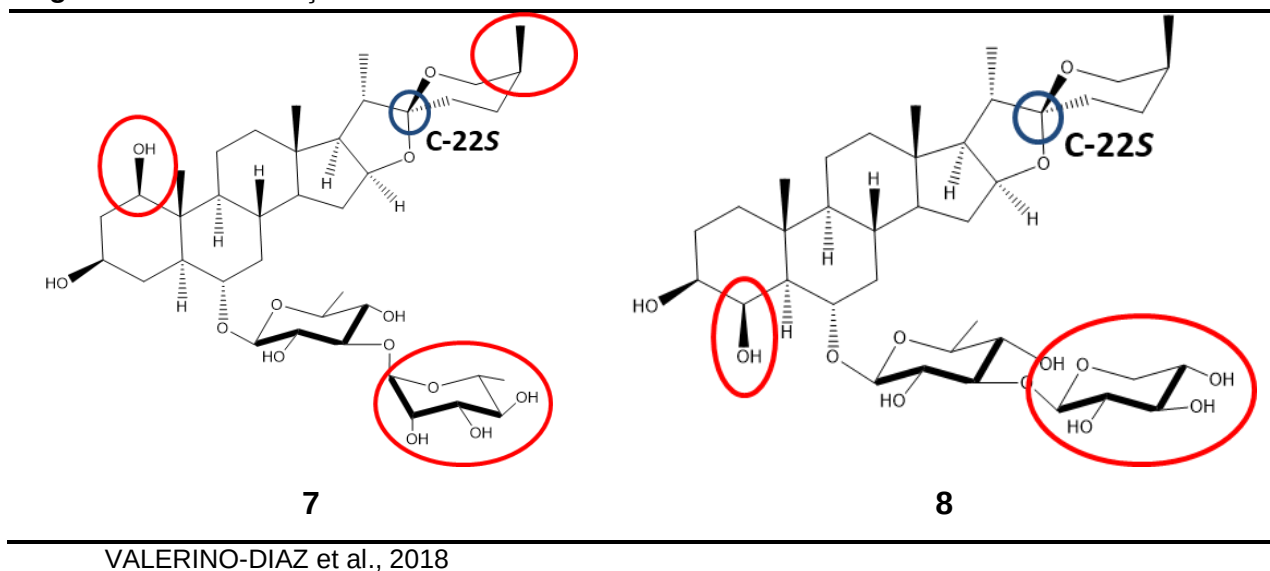


Figura 108. Continuação.

4.2.9 Elucidação estrutural da substância 9.

A substância **9** (3,9 mg) foi isolada como um sólido amorfo amarelo. O espectro de RMN ^1H (Figura 109; pag.128), mostra na região (6-8 ppm) a presença de hidrogênios aromáticos característicos de um flavonoide derivado da quercetina (AGRAWAL, 1989).

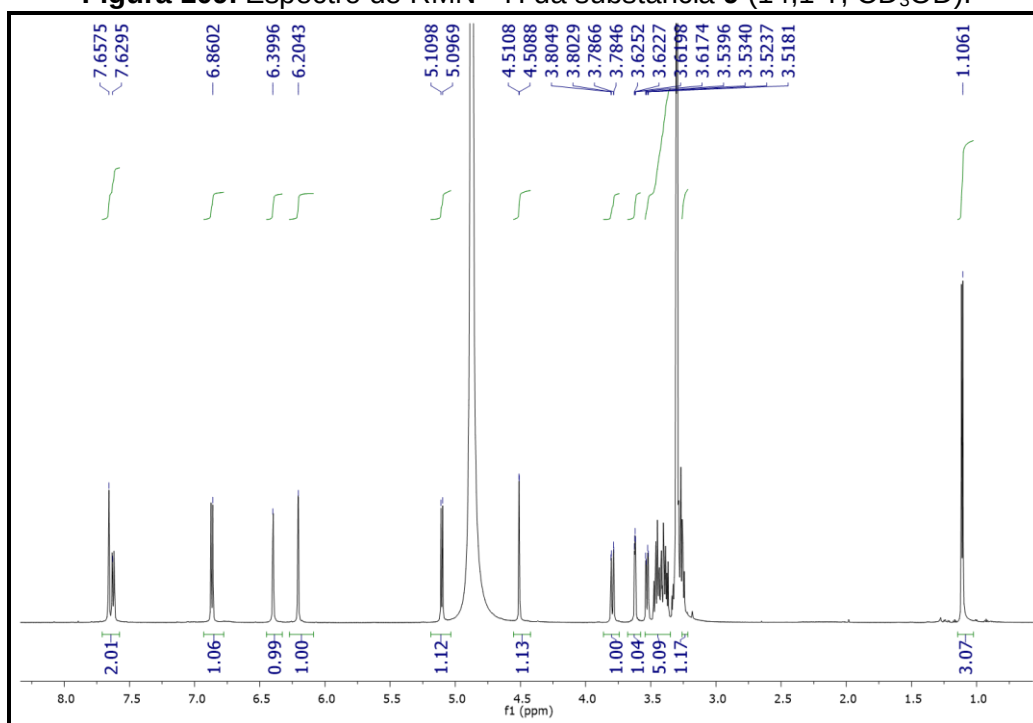
Observou-se nesta mesma região, um duplete em δ_{H} 7,66 ($J = 1,9$ Hz) atribuído ao H-2' que acopla em *meta* com o H-6', um duplo duplete em δ_{H} 7,63 (1H, $J = 1,9; 8,3$ Hz) atribuído ao H-6' que acopla com o H-2' em *meta* e com o H-5' em *orto*. Observa-se ainda, um duplete em δ_{H} 6,87 (1H, $J = 8,3$ Hz) referente ao acoplamento em *orto* do H-5' com o H-6'.

Por outro lado, nesta mesma região foram observados dois dupletos com deslocamentos químicos em δ_{H} 6,40 (1H, $J = 2,0$ Hz) e δ_{H} 6,21 (1H, $J = 2,0$ Hz) que indicam acoplamento *meta* entre ambos os hidrogênios que foram atribuídos aos H-8 e H-6 do anel A do flavonoide, confirmando assim a aglicona da quercetina.

A região entre δ_{H} 3,20-5,10 ppm é característica de hidrogênios de açúcares, sendo os deslocamentos químicos em δ_{H} 5,10 (d, $J = 7,7$ Hz) e δ_{H} 4,5 (d, $J = 1,2$ Hz), característicos de hidrogênios anoméricos, com configurações β e α respectivamente, sugerindo a presença de duas unidades de açúcares. Na região de hidrogênios alifáticos, observou-se a presença de uma metila em δ_{H}

1,11 (d, $J = 6,2$ Hz), confirmando que esta substância possui uma unidade de ramnose.

Figura 109. Espectro de RMN ^1H da substância **9** (14,1 T, CD_3OD).



A tabela 5 apresenta os dados dos deslocamentos químicos de hidrogênio e de ^{13}C para a substância **9**. A tabela 5 mostra também os dados comparativos dos deslocamentos químicos de ^{13}C com a literatura.

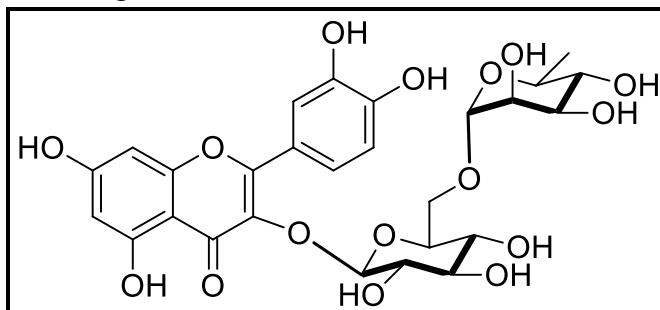
Tabela 5. Deslocamentos químicos de hidrogênio e ^{13}C da substância **9**.

Posição	$\delta^1\text{H}(\text{ppm})$ $\delta_{\text{H}} (\text{J, Hz})^{\text{a}}$	$\delta^{13}\text{C} (\text{ppm})$	$\delta^{13}\text{C} (\text{ppm})$ (AGRAWAL, 1989) em $\text{DMSO-d}_6+\text{D}_2\text{O}$
2	-	158,2	156,4
3	-	134,4	133,6
4	-	177,1	177,4
5	-	161,7	161,2
6	6,21, <i>d</i> , (1,9)	98,5	98,8
7	-	165,5	164,0
8	6,40, <i>d</i> , (1,9)	93,4	93,6
9	-	157,4	156,6
10	-	104,5	105,2
1'	-	121,8	121,6
2'	7,66, <i>d</i> , (2,0)	116,3	115,3
3'	-	144,7	144,6
4'	-	148,6	148,3
5'	6,87, <i>d</i> , (8,5)	114,8	116,3
6'	7,63, <i>dd</i> , (2,0, 8,5)	122,2	121,6
Glicose			
1''	5,10, <i>d</i> (7,7)	103,3	103,4
2''	3,46, <i>m</i>	74,3	75,3
3''	3,31, <i>m</i>	75,9	77,4
4''	3,26, <i>m</i>	70,0	71,1
5''	3,31, <i>m</i>	75,9	76,6
6''	3,80, 3,37, <i>dd</i> (1,2, 11,0)	67,1	68,7
Ramnose			
1'''	4,51, <i>d</i> (1,2)	101,1	102,0
2'''	3,62, <i>dd</i> (1,2, 3,2)	70,7	71,5
3'''	3,53, <i>dd</i> (3,2, 9,5)	70,9	71,7
4'''	3,27, <i>m</i>	72,6	73,2
5'''	3,43, <i>m</i>	68,4	69,7
6'''	1,1, <i>d</i> (6,1)	16,4	18,6

^aAs constantes de acoplamentos foram medidas a partir dos dados obtidos no RMN- ^1H em hertz. 14,1 T, CD_3OD

De acordo com a análise do espectro RMN- ^1H (Figura 109), e pela comparação com os dados da literatura (AGRAWAL, 1989), pôde-se identificar a substância **9** como a quercetina-3-O- β -D-glicopiranosil-(6" $\rightarrow$ 1''')-O- α -L-ramnopiranosídeo (**Rutina**) (Figura 110).

Figura 110. Estrutura da substância **9**.



A rutina já foi previamente isolada na espécie *S. paniculatum* (VIEIRA JR. et al, 2014) e se encontra presente em várias fontes alimentares como cebola, uva, trigo serraceno, feijão vermelho, maçãs, tomates e bebidas como vinho tinto e chá preto (THOMPSON et al., 1999; HOLLMAN et al., 1995) e destaca-se pelas suas diversas atividades farmacológicas (PEDRIALI, 2005).

Segundo os estudos de AFANAS`EV e colaboradores (1989) que pesquisaram a atividade antioxidante da rutina e da quercetina, demonstraram que estes flavonoides têm uma ação terapêutica em patologias que envolvem radicais livres, e não são tóxicos, em especial a rutina. Por outro lado, entre as atividades terapêuticas da rutina, encontra-se a melhora nos sintomas de insuficiência dos vasos linfáticos e venosos associados com algumas doenças hemorrágicas ou de hipertensão, por promover a normalização da resistência e permeabilidade da parede destes vasos (PATHAK et al., 1991).

4.2.10 Elucidação estrutural da substância 10 e 10a.

As substâncias **10** e **10a** (5,1 mg) foram obtidas como uma mistura de dois ácidos fenólicos (espectro UV secção 4.1.3), de coloração branca e cujas estruturas são discutidas a seguir.

4.2.10.1 Elucidação estrutural da substância 10.

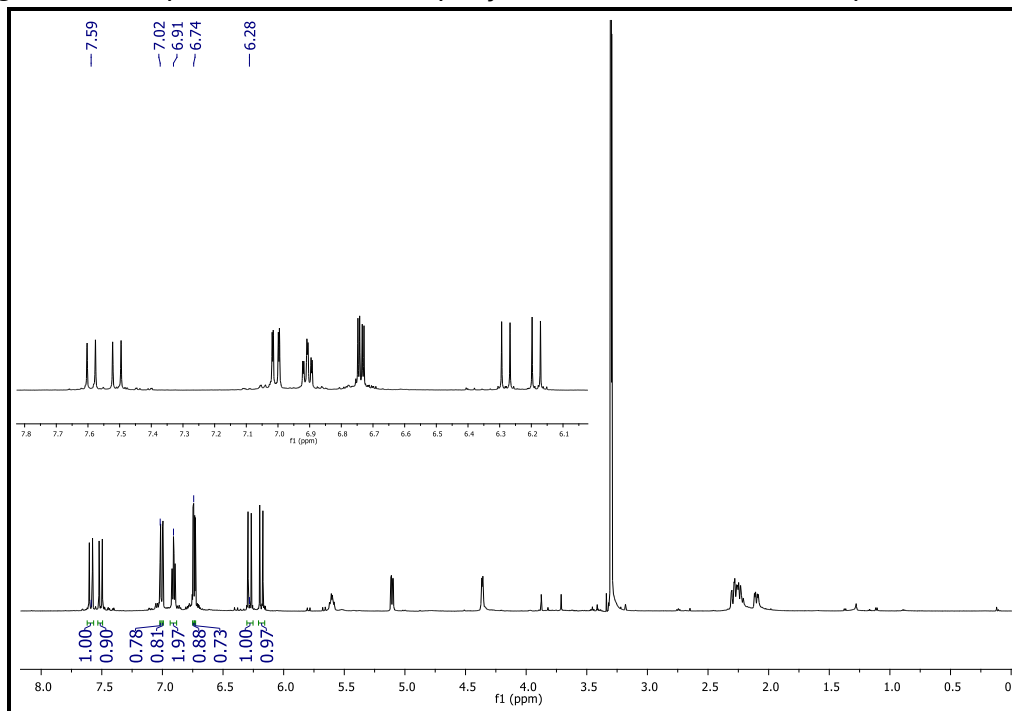
No espectro de RMN-¹H (Figura 111) da mistura **10 + 10a**, observa-se na região entre 6-7,7 ppm a presença de hidrogênios aromáticos característicos de substâncias fenólicas contendo na sua estrutura duplas ligações (GAMIOTEA-TURRO, 2018).

No espectro de RMN-¹H (Figura 111) foram observados dois dupletos em δ_H 7,59 (1H, d, $J = 15,8$ Hz, H-3,) e em δ_H 6,28 (1H, d, $J = 15,8$ Hz, H-2), e que foram atribuídos aos hidrogênios correspondentes a uma dupla ligação em posição *trans*.

Por outro lado, entre 6,7-7,2 ppm observou-se sinais características de um anel aromático tri-substituído com um sistema tipo *AMX*, sendo o duplete em δ_H 7,02 (1H, d, $J = 2,0$ Hz) atribuídos ao H-5 do anel fenólico.

O triplo duplete em δ_H 6,91 (2H, td; $J = 2,0; 8,2$ Hz) foi atribuído ao hidrogênio na posição H-9 que correlaciona em *meta* com o H-5 e em *orto* com o H-8.

Finalmente, o duplete em δ_H 6,74 (1H, d; $J = 8,0$ Hz) foi atribuído ao H-8 que faz correlação em *orto* com H-9.

Figura 111. Espectro RMN- ^1H e ampliação da mistura de **10** + **10a** (14,1T, CD_3OD).

Na tabela 6 apresentam-se os dados de deslocamento químico de hidrogênio para a substância **10**, assim como os dados comparativos dos deslocamentos químicos de hidrogênio reportados na Literatura.

Tabela 6. Deslocamentos químicos de hidrogênio da substância **10**.

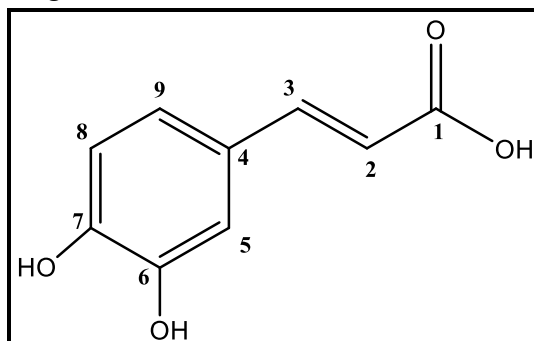
Posição	Substância 10 δ_{H} (ppm), J (Hz) ^b	Literatura δ_{H} (ppm) ^a , J (Hz)
1	-	-
2	6,28; d (15,8)	6,17; d, (15,8)
3	7,59; d, (15,8)	7,41; d, (15,8)
4	-	-
5	7,02; d, (2,0)	7,02; d, (2,0)
6	-	-
7	-	-
8	6,74; d, (8,0)	6,76; d, (8,2)
9	6,91; td, (2,0; 8,0)	6,96; dd (2,0; 8,2)

^a Dados: DMSO- d_6 , 600 MHz, GAMIOTEA-TURRO et al., 2018.

^b As constantes de acoplamentos foram medidas a partir dos dados obtidos no RMN- ^1H em hertz. Espectro de RMN- ^1H da substância **10** obtido a 14,1 T em CD_3OD .

De acordo aos dados espectroscópicos analisados no RMN- ^1H , assim como pela comparação com a literatura conclui-se que a estrutura para a substância **10** corresponde ao ácido cafeico e está sendo apresentada na Figura 112. Esta substância já foi previamente isolada na espécie *S. paniculatum* (VIEIRA JR. et al, 2015).

Figura 112. Estrutura da substância **10**.

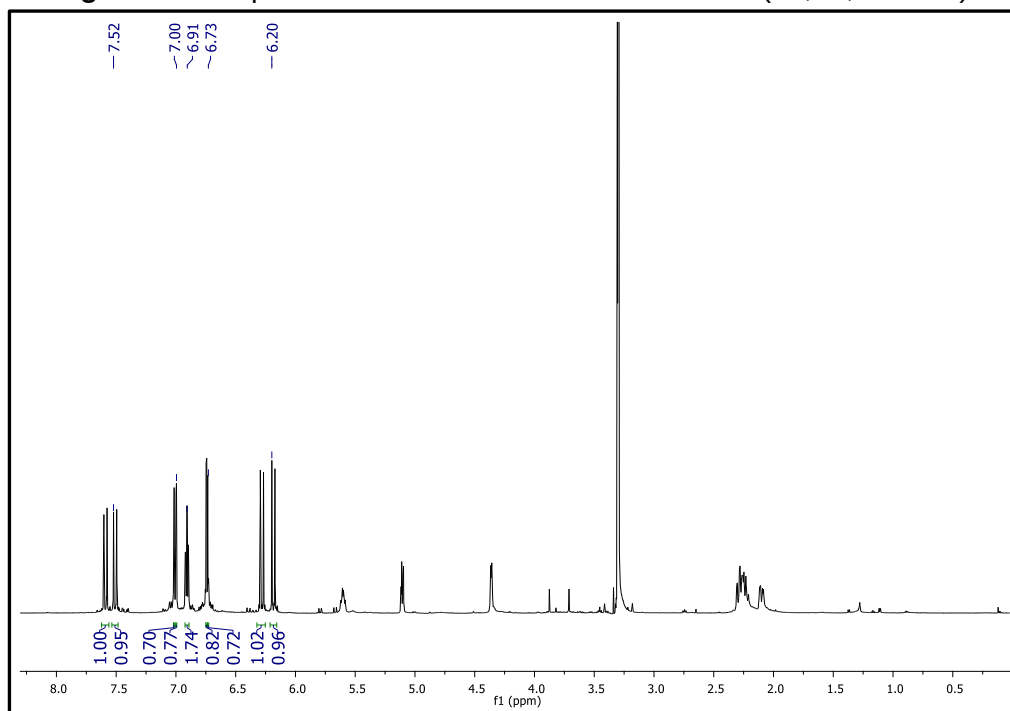


4.2.10.2 Elucidação estrutural da substância 10a.

A substância **10a** apresentou no espectro de RMN- ^1H (Figura 113) dois dupletos em δ_{H} 7,51 (1H, d, $J = 15,8$ Hz, H-3) e em δ_{H} 6,19 (1H, d, $J = 15,8$ Hz, H-2) que foram atribuídos aos hidrogênios correspondentes a uma dupla ligação em posição *trans*. Por outro lado, na região correspondente aos hidrogênios aromáticos observou-se os dupletos em δ_{H} 6,99 (1H, d, $J = 2,0$ Hz) que foi atribuído ao H-5 do anel fenólico.

O triplo duplete em δ_{H} 6,91 (2H, td, $J = 2,0; 8,2$ Hz) foi atribuído ao hidrogênio na posição H-9, no entanto, o duplete em δ_{H} 6,73 (1H, d, $J = 8,0$ Hz) foi atribuído ao H-8 que faz correlação em *orto* com H-9.

Fazendo uma análise dos dados obtidos de RMN- ^1H concluiu-se que a substância **10a** é simétrica.

Figura 113. Espectro RMN-¹H da mistura de **10** + **10^a** (14,1T, CD₃OD).

Na tabela 7 apresentam-se os dados de deslocamento químico de hidrogênio para a substância **10a**, assim como os dados comparativos dos deslocamentos químicos de hidrogênio reportados na Literatura.

Tabela 7. Deslocamentos químicos de hidrogênio da substância **10a**.

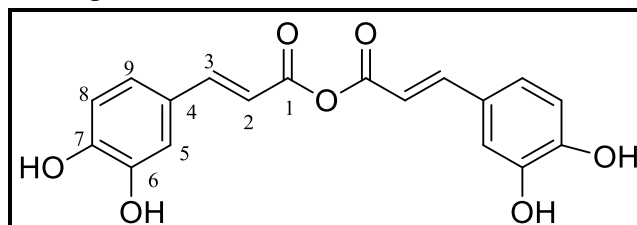
Posição	Substância 10a δ_H (ppm), J (Hz) ^b	Literatura δ_H (ppm) ^a , J (Hz)
1	-	-
2	6,19; d (15,8)	6,23; d (15,7)
3	7,51; d, (15,8)	7,46; d,(15,7)
4	-	-
5	6,99; d, (2,0)	7,01; d, (2,0)
6	-	-
7	-	-
8	6,73; d, (8,0)	6,75; d, (8,0)
9	6,91; td, (2,0; 8,0)	6,92; dd, (1,9; 8,0)

^a Dados: CD₃OD, 400 MHz, IQBAL et al., 2005.

^b As constantes de acoplamentos foram medidas a partir dos dados obtidos no RMN-¹H em hertz. Espectro de RMN-¹H da substância **10a** obtido a 14,1 T em CD₃OD.

De acordo aos dados espectroscópicos analisados no RMN- ^1H , assim como pela comparação com a Literatura (IQBAL et al., 2005) permitiram determinar a estrutura para a substância **10a** como o anidrido caféico (Figura 114). Esta substância está sendo isolada pela primeira vez na espécie.

Figura 114. Estrutura da substância **10a**.



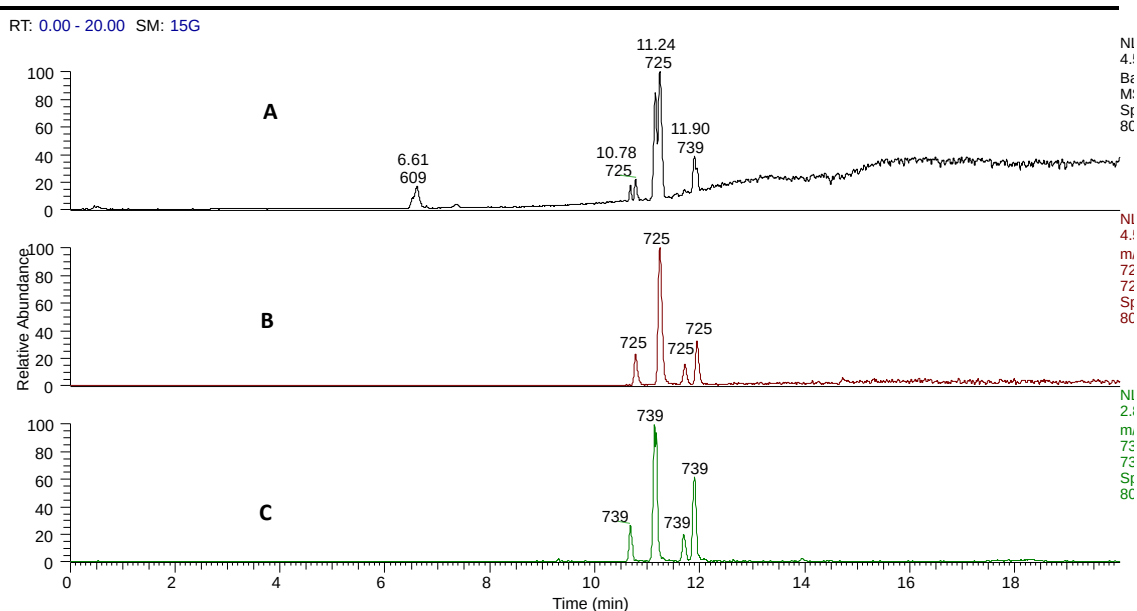
4.3. Quantificação no extrato etanol 70 % das saponinas isoladas.

A quantificação das saponinas presentes no extrato etanol 70 % das folhas de *S. paniculatum* permitiu determinar os teores de cada uma das saponinas presentes no extrato etanol 70 %. Os padrões foram confirmados pela análise por UPLC-ESI-MS/MS no modo negativo. O estudo dos parâmetros avaliados gerou informações quanto ao desempenho do método assim como a estimativa de incertezas associadas aos resultados.

As substâncias quantificadas neste trabalho foram previamente identificadas como: 6-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1'' $\rightarrow$ 3')- β -D-quinovopiranosil-(22*S*,23*R*,25*S*)-3 β ,6 α ,23-triidroxi-5 α -espirostano (**1**), 6-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1'' $\rightarrow$ 3')- β -D-quinovopiranosil-(22*S*,23*R*,25*R*)-3 β ,6 α ,23-triidroxi-5 α -espirostano (**2**), 6-*O*- β -D-xilopiranosil-(1'' $\rightarrow$ 3')- β -D-quinovopiranosil-(22*S*,23*R*,25*S*)-3 β ,6 α ,23-triidroxi-5 α -espirostano (**3**), 6-*O*- β -D-xilopiranosil-(1'' $\rightarrow$ 3')- β -D-quinovopiranosil-(22*S*,23*R*,25*R*)-3 β ,6 α ,23-triidroxi-5 α -espirostano (**4**), 3-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1'' $\rightarrow$ 3')- β -D-quinovopiranosil-(22*S*,23*S*,25*R*)-3 β ,6 α ,23-triidroxi-5 α -espirostano (**5**), 3-*O*- β -D-xilopiranosil-(1'' $\rightarrow$ 3')- β -D-quinovopiranosil-(22*S*,23*S*,25*R*)-3 β ,6 α ,23-triidroxi-5 α -espirostano (**6**), 6-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1'' $\rightarrow$ 3')- β -D-quinovopiranosil-(22*S*,25*S*)-1 β ,3 β ,6 α -triidroxi-5 α -espirostano (**7**), 6-*O*- β -D-xilopiranosil-(1'' $\rightarrow$ 3')- β -D-quinovopiranosil-(22*S*,25*S*)-3 β ,4 β ,6 α -triidroxi-5 α -espirostano (**8**).

Os cromatogramas do extrato etanol 70 % das folhas de *S. paniculatum*, assim como os cromatogramas de monitoramento de íons selecionado (SIM: monitoramento de íon selecionado) para os íons m/z 725 (íons moleculares correspondentes às substâncias **3**, **4**, **6** e **8**) e m/z 739 (íons moleculares correspondentes às substâncias **1**, **2**, **5** e **7**) são apresentados na Figura 115 A, B, e C.

Figura 115. Cromatograma do extrato etanol 70 % das folhas de *S. paniculatum*.



- (A) Cromatograma do extrato etanol 70 % das folhas de *S. paniculatum*, 5-100 % B em 18 min. (solvente B: MeOH, solvente A: H₂O).
(B) Cromatograma de monitoramento de íon selecionado (SIM) dos íons m/z : 725 (modo negativo).
(C) Cromatograma de monitoramento de íon selecionado (SIM) dos íons m/z : 739 (modo negativo).

4.3.1 Linearidade e sensibilidade.

A linearidade refere-se à capacidade do método de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, enquadrados em faixas analíticas especificadas (MARCUCCI, 2011). Esse parâmetro pode ser demonstrado pelo coeficiente de correlação do gráfico analítico (r^2).

Os valores das áreas dos picos cromatográficos foram relacionados com os cinco níveis de concentrações utilizadas para a construção das curvas analíticas de cada padrão de acordo ao mostrado na Figura 116.

Os níveis de concentrações usados para cada padrão estão sendo apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Níveis de concentrações usados para a construção das curvas analíticas para os padrões 1-8.

Padrão	Níveis de concentrações ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
1	2,5 / 1,25 / 0,625 / 0,3125 / 0,15625
2	1,25 / 0,625 / 0,3125 / 0,15625 / 0,07812
3	2,5 / 1,25 / 0,625 / 0,3125 / 0,15625
4	1,25 / 0,625 / 0,3125 / 0,15625 / 0,07812
5	0,625 / 0,3125 / 0,15625 / 0,07812 / 0,03906
6	0,625 / 0,3125 / 0,15625 / 0,07812 / 0,03906
7	2,5 / 1,25 / 0,625 / 0,3125 / 0,15625
8	1,25 / 0,625 / 0,3125 / 0,15625 / 0,07812

Figura 116. Curvas analíticas obtidas pelo método de calibração externa das soluções padrões 1-8.

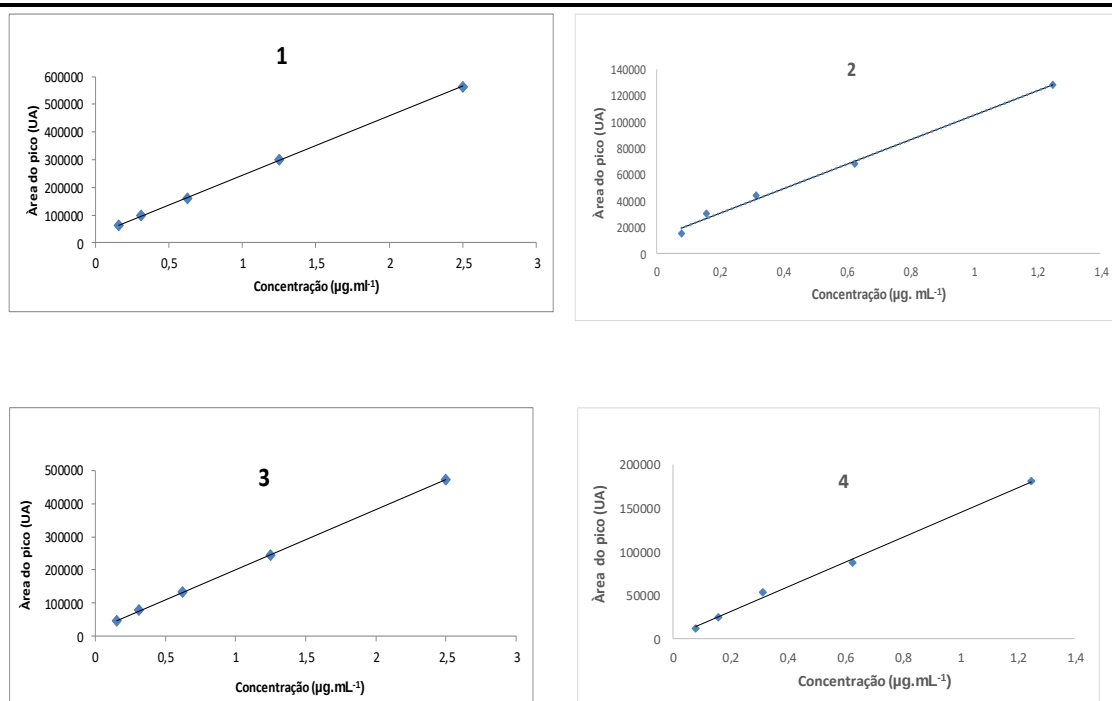
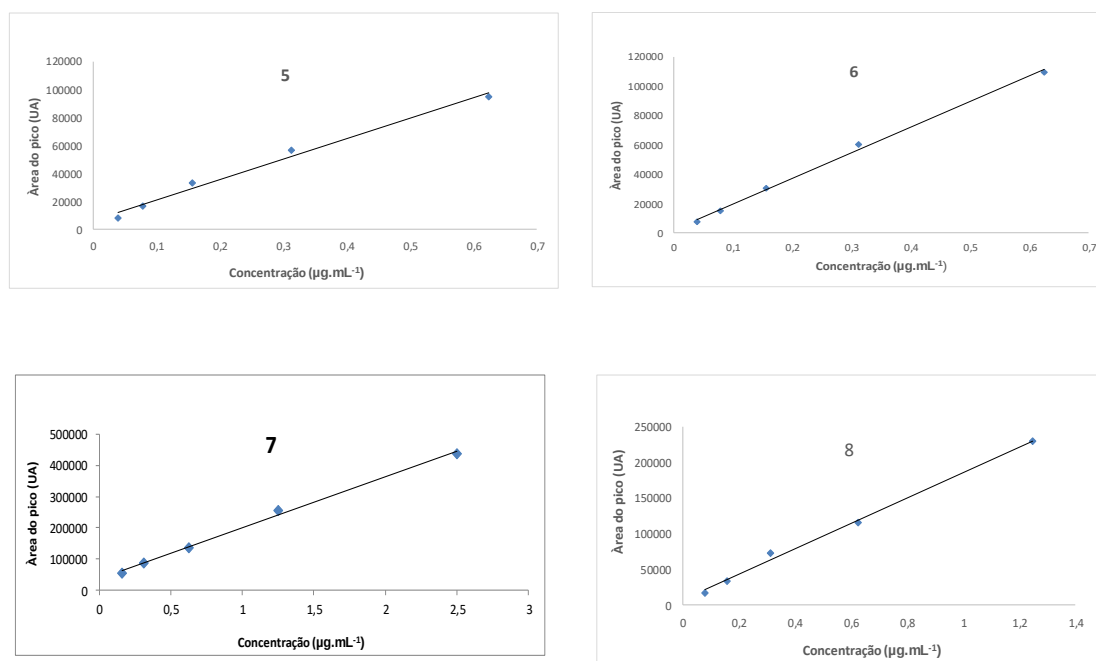


Figura 116. Continuação.

A equação linear da curva analítica é determinada pela seguinte equação (1):

$$y = ax + b \quad (1)$$

Onde **a** representa o coeficiente linear e **b** é a intersecção com o eixo Y (coeficiente angular). De acordo ao método dos mínimos quadrados, obtiveram-se os valores de **a** e **b** que estão sendo apresentados na Tabela 9, que também traz o coeficiente de correlação obtido da análise da regressão linear; este valor indica a linearidade do método.

Tabela 9. Parâmetros das curvas analíticas dos padrões 1-8.

Padrão	Coefficiente linear (a)	Coefficiente angular (b)	Fator de correlação (r^2)	Faixa linear ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
1	214537	2921	0,9999	0,098 – 2,5
2	92856	12324	0,9994	0,028 – 1,25
3	180448	20120	0,9999	0,087– 2,5
4	141575	3491	0,9989	0,008 –1,25
5	145255	6854,5	0,9975	0,048 – 0,625
6	174515	2527,7	0,9972	0,054 – 0,625
7	163353	36486	0,9985	0,21– 2,5
8	177970	7794,9	0,9992	0,04– 1,25

No intervalo de linearidade avaliado para cada padrão, as regressões lineares apresentaram coeficientes de correlação (r^2) superiores a 0,99, estando dentro dos valores exigidos pela ANVISA para análises de princípios ativos em matéria prima vegetal. Esses resultados indicam uma boa proporcionalidade entre a concentração do padrão e a área do pico cromatográfico no intervalo de concentração analisado (AGÊNCIA..., 2003).

4.3.2 Limites de detecção e quantificação.

O limite de detecção (**LD**) é definido como a menor concentração do analito que pode ser detectada, mais não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas pela técnica instrumental utilizada; enquanto o limite de quantificação (**LQ**) é a menor concentração do analito, que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis, sob as condições experimentais adotadas (MARCUCCI, 2011).

Os valores obtidos de LD e LQ obtidos para cada substância estão reportados na Tabela 10.

Tabela 10. Valores de limites de detecção (**LD**) e quantificação (**LQ**) para os padrões (**1-8**).

Padrão	LD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
1	0,03	0,09
2	0,009	0,03
3	0,03	0,09
4	0,003	0,008
5	0,02	0,05
6	0,02	0,05
7	0,07	0,21
8	0,01	0,04

4.3.3 Seletividade.

A seletividade é definida como a capacidade do método em detectar o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz complexa (extrato vegetal) (RIBANI et al., 2004). Nesse caso a seletividade do método foi comprovada pela comparação dos tempos de retenção (*tr*) dos padrões (**1-8**) com os *tr* dos picos obtidos no cromatograma de íons extraídos (SIM) no extrato etanol 70 % para os íons *m/z* 725 e *m/z* 739 (Figuras 117,118).

Figura 117. Cromatograma de monitoramento de íon selecionado (SIM) m/z 725 correspondente ao extrato etanol 70 %. Cromatogramas dos padrões **3, 4, 6 e 8**.

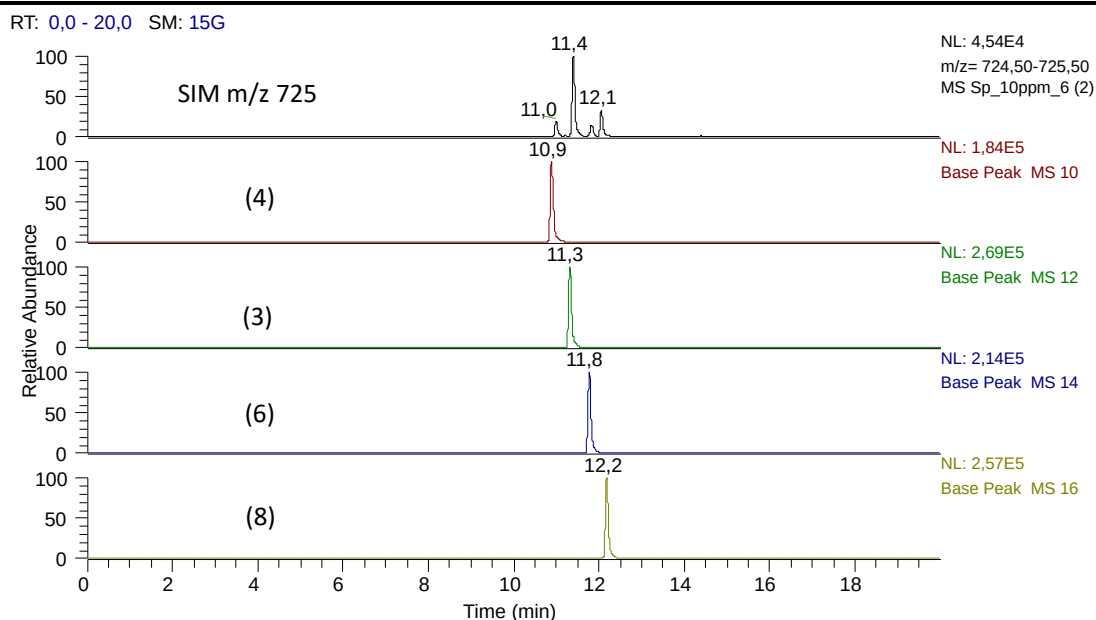
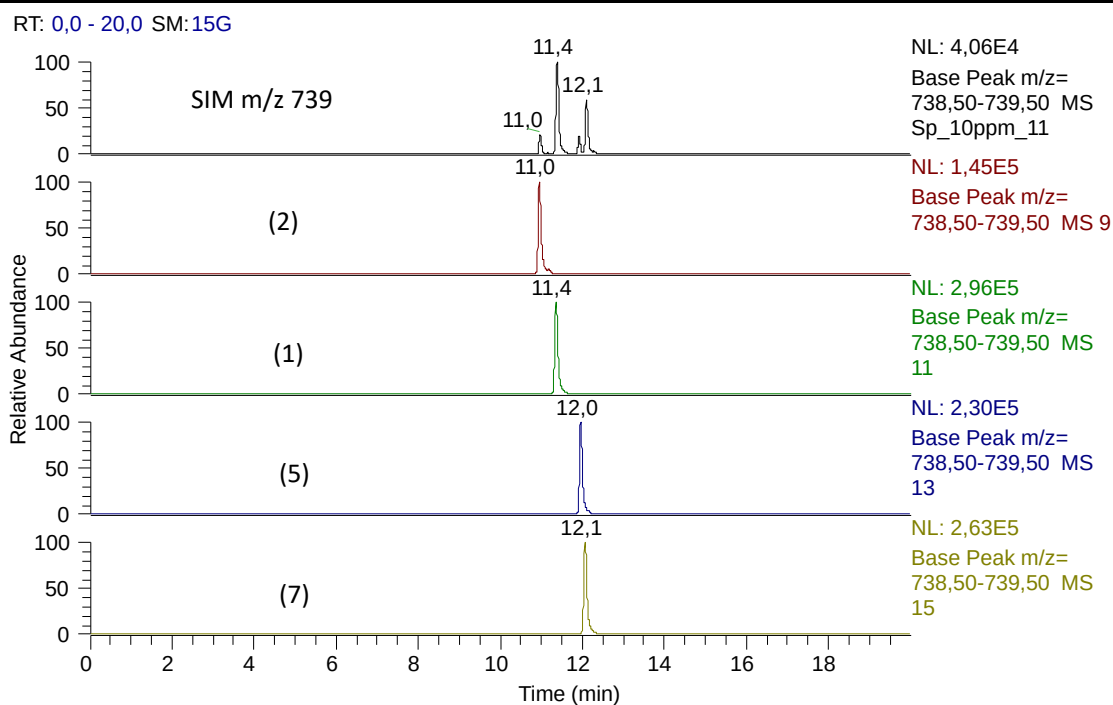


Figura 118. Cromatograma de monitoramento de íon selecionado (SIM) m/z 739 correspondente ao extrato etanol 70 %. Cromatogramas dos padrões **1, 2, 5 e 7**.



4.3.4 Precisão.

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos de uma série de repetições da análise, e pode ser avaliada pelo desvio padrão relativo (DPR) dos resultados em um ensaio de repetibilidade, onde as repetições são realizadas em um mesmo laboratório, por um mesmo analista em um curto período de tempo (AGÊNCIA..., 2003).

Para a quantificação das substâncias estudadas, foram realizadas 18 corridas cromatográficas, sendo 6 corridas a cada 24 horas. Os DPR intradias e interdias das concentrações das substâncias estudadas são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Desvio padrão relativo (DPR) (%) das áreas calculadas para os picos correspondentes as substâncias **1-8**.

Padrão	Dia 1 concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	DPR (%)	Dia 2 concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	DPR (%)	Dia 3 concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	DPR (%)	Interdias DPR (%)
1	0,73	1,30	0,72	2,67	0,72	2,95	0,69
2	0,25	1,29	0,26	1,60	0,26	2,76	1,0
3	1,03	0,94	1,04	1,51	1,06	1,58	1,35
4	0,25	2,41	0,26	1,84	0,26	1,91	1,94
5	0,18	1,28	0,18	2,34	0,18	2,26	0,94
6	0,16	1,76	0,16	2,16	0,15	3,16	0,55
7	0,43	2,35	0,43	1,85	0,43	0,86	0,81
8	0,30	1,79	0,29	1,49	0,29	2,02	1,70

Os resultados obtidos se encontram dentro dos limites estabelecidos pela RE 899/03 para o DPR das medidas, que deve ser de no máximo, 5% (AGÊNCIA..., 2003). Portanto conclui-se que, o método proposto para cada padrão apresenta uma precisão satisfatória.

4.3.5 Quantificação das saponinas isoladas.

Os teores das substâncias isoladas e identificadas (saponinas) no extrato etanol 70 % das folhas de *S. paniculatum*, foram determinados pela interpolação de suas áreas na curva de calibração de cada padrão a partir das

correspondentes áreas determinadas no extrato e estão sendo apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Teores das saponinas isoladas no extrato etanol 70 % das folhas de *S. paniculatum*.

Analito	[] ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) $\pm$ DPR ^a	[] (mg.g^{-1}) $\pm$ DPR
1	0,71 $\pm$ 0,02	71,2 $\pm$ 0,2
2	0,26 $\pm$ 0,01	25,8 $\pm$ 0,1
3	1,04 $\pm$ 0,02	103,5 $\pm$ 0,2
4	0,26 $\pm$ 0,003	25,7 $\pm$ 0,03
5	0,17 $\pm$ 0,01	17,5 $\pm$ 0,1
6	0,15 $\pm$ 0,004	14,8 $\pm$ 0,04
7	0,43 $\pm$ 0,02	43,0 $\pm$ 0,2
8	0,32 $\pm$ 0,004	32,1 $\pm$ 0,04
Teor total	3,34 $\pm$ 0,091	333,6 $\pm$ 0,09

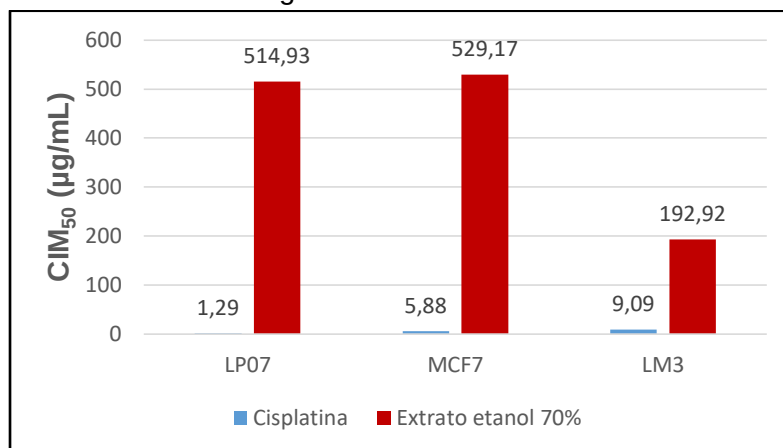
^aDPR: Desvio Padrão Relativo.

De acordo ao mostrado na tabela, pode-se concluir que as saponinas esteroidais isoladas no extrato etanol 70 % encontram-se em altos teores no extrato etanol 70 % das folhas de *S. paniculatum*.

4.4 Atividades biológicas.

4.4.1 Determinação da atividade citotóxica.

Os ensaios biológicos do efeito inibitório utilizando o método MTT de crescimento celular causado pelo extrato etanol 70% das folhas de *S. paniculatum* e a cisplatina (controle positivo), foram realizados *in vitro* utilizando linhagens de células tumorais murinos LP07 (adenocarcinoma de pulmão), células tumorais humanas, MCF7 (câncer de mama humana) assim como o adenocarcinoma mamário murino LM3. A dose citotóxica para 50 % das células (CIM₅₀) foi definida utilizando o método estatístico de curva dose-resposta sigmoidal e estão apresentados na Figura 119; pag. 144 e na Tabela 13; pag. 144.

Figura 119. Gráfico comparativo entre os valores de CIM₅₀ para as linhagens tumorais testadas.**Tabela 13.** Valores de citotoxicidade para o extrato etanol 70% das folhas de *S. paniculatum*.

Extrato etanólico	CIM ₅₀ (µg.mL ⁻¹ ± DPR ^d)		
	LP07 ^a	MCF7 ^b	LM3 ^c
Cisplatina	1,29 ± 0,40	5,88 ± 4,30	9.09 ± 3.70
Extrato etanol 70%	514,93±3,92	519,17±12,75	192,92±4,79

^aLP07 (adenocarcinoma de pulmão).^bMCF7 (adenocarcinoma da mama humana).^cLM3 (adenocarcinoma mamário murino).^dDPR = Desvio Padrão Relativo.

A maioria dos medicamentos anticancerígenos foram descobertos através de análises aleatórias de materiais vegetais. O Instituto Nacional do Câncer considera um valor CIM₅₀ menor que 30 µg/mL para os extratos brutos ativos contra células cancerosas (BOIK, 2001). Portanto, uma vez que um extrato apresente um valor de CIM₅₀ inferior ou igual à exigência do Instituto Nacional do Câncer para linhagem de células cancerígenas, este pode ser considerado uma fonte promissora de substâncias bioativos que podem, na sequência serem purificados para o desenvolvimento de drogas anticâncer (OSKOUÉIAN et al., 2011).

Segundo BOIK (2001), o resultado dos testes de citotoxicidade para o extrato etanol 70% das folhas de *S. paniculatum* para as linhagens das células tumorais LM3, MCF7 e LP07 não pode ser considerado como uma fonte promissora de substâncias bioativas. Porém, na literatura encontram-se

referências de atividade antitumoral de substâncias isoladas de outras espécies de *Solanum* (saponinas esteroidais e alcaloidais), especificamente ativos para outras linhagens de células cancerígenas como o carcinoma de fígado hepatocelular humano (HepG2) e o adenocarcinoma humano de pulmão (A549), onde os substâncias isoladas do extrato etanol 70% mostraram uma citotoxicidade relevante com valores de IC₅₀ entre $23,2 \pm 0,8$ e $45,3 \pm 2,1$ (linhagens HepG2) (LU et al, 2011).

Segundo ALMEIDA, (2005), a avaliação da atividade citotóxica de extratos, frações, assim como das substâncias isoladas do extrato de uma espécie vegetal, é de muita importância para se avaliar o potencial antitumoral das substâncias pertencentes na espécie em estudo. Portanto, faz-se necessário avaliar extratos, frações e as substâncias isoladas das folhas de *S. paniculatum* frente a outras linhagens tumorais ainda não avaliadas, para comprovar ou não a atividade antitumoral.

4.4.2 Avaliação da atividade antibacteriana.

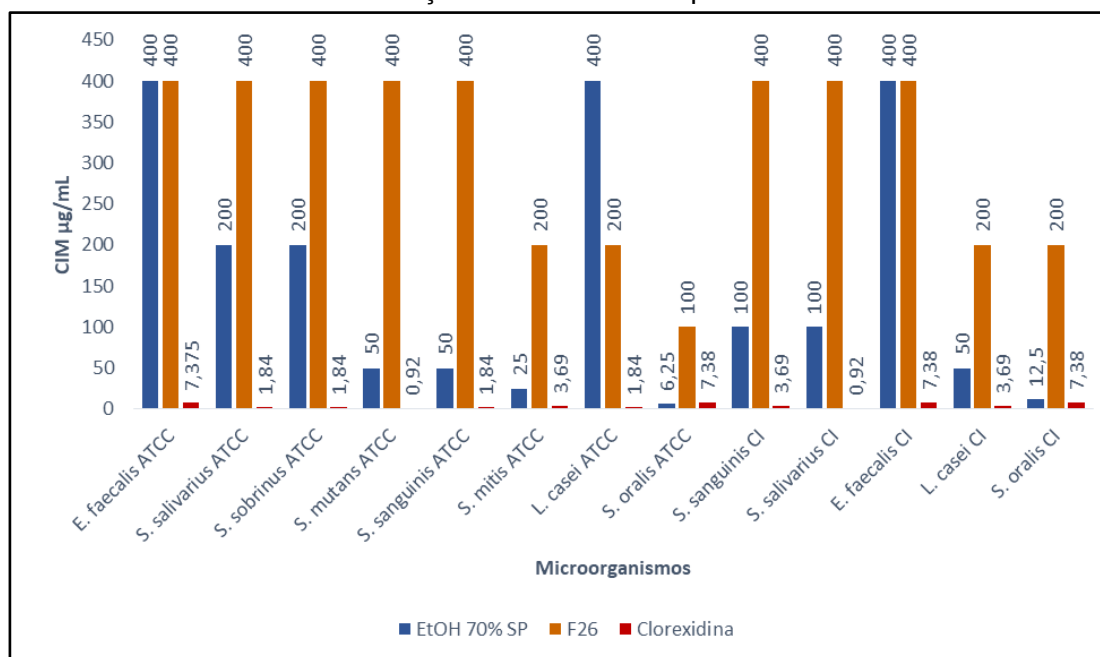
Os resultados de atividade antibacteriana tanto para o extrato etanol 70 % quanto para a fração **f26** são mostrados na Tabela 14 e na Figura 120. Os resultados de CIM para a atividade antibacteriana mostraram que principalmente o extrato etanol 70 % mostrou uma forte inibição frente à maioria das cepas testadas.

Neste sentido, o extrato etanol 70 % mostrou uma elevada atividade antibacteriana para as cepas de coleção de cultura: *Streptococcus mutans* (50 µg/mL), *S. sanguinis* (50 µg/mL), *S. mitis* (25 µg/mL), assim como frente às cepas isoladas da boca de pacientes (isolados clínicos): *S. sanguinis* (100 µg/mL), *S. salivarius* (100 µg/mL) e *Lactobacillus casei* (50 µg/mL), onde também o extrato mostrou uma alta inibição do crescimento bacteriano. Por outro lado, o extrato mostrou uma alta atividade antibacteriana frente às cepas de *S. oralis*, onde os valores de CIM do extrato obtido frente a esta coleção de cultura (6,25 µg/mL) foram inferiores ao controle positivo usado (Clorexidina 7,375 µg/mL) (VALERINO-DIAZ et al., 2018).

No caso do isolado clínico do *S. oralis*, o extrato mostrou igualmente uma alta inibição do crescimento (12,5 µg/mL). Por outro lado, a fração **f26** se mostrou

particularmente ativa frente à cepa de coleção de cultura *S. oralis* (100 µg/mL).

Figura 120. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em µg/mL do extrato etanol 70% e a fração **F26** frente às cepas de bactérias testadas.



Adaptado de: VALERINO-DIAZ et al.; 2018

Tabela 14. Valores de CIM para o extrato etanol 70% e fração **f'26** frente às cepas de bactérias testadas.

Resultados em µg/mL.													
Substâncias	<i>E. faecalis</i> ATCC 4082	<i>S. salivarius</i> ATCC 25975	<i>S. sobrinus</i> ATCC 33478	<i>S. mutans</i> ATCC 25175	<i>S. sanguinis</i> ATCC 10556	<i>S. mitis</i> ATCC 49456	<i>L. casei</i> ATCC 11578	<i>S. sanguinis</i> Isolado Clínico	<i>S. salivarius</i> Isolado Clínico	<i>E. faecalis</i> Isolado Clínico	<i>L. casei</i> Isolado Clínico	<i>S. oralis</i> ATCC 55229	<i>S. oralis</i> Isolado Clínico
EtOH 70% SP	>400	200	200	50	50	25	400	100	100	400	50	6,25	12,5
f'26	>400	400	400	400	400	200	200	400	400	>400	200	100	200
Clorexidina	7,375	1,844	1,844	0,922	1,844	3,688	1,844	3,688	0,922	7,375	3,688	7,375	7,375

- Concentrações das amostras testadas frente às bactérias aeróbias = 0,195 µg/mL a 400 µg/mL.
- Concentrações do controle positivo testado para as bactérias aeróbias (Clorexidina) = 0,115µg/mL a 59,0 µg/mL.

LEGENDA:

E. faecalis = *Enterococcus faecalis*.

L. casei = *Lactobacillus casei*.

S. salivarius = *Streptococcus salivarius*.

S.oralis = *Streptococcus oralis*.

S. sobrinus = *Streptococcus sobrinus*.

S. mutans = *Streptococcus mutans*.

S. sanguinis = *Streptococcus sanguinis*.

S. mitis = *Streptococcus mitis*.

ATCC= American Type Culture Collection

Na literatura, não existe um consenso sobre o nível de inibição aceitável para produtos naturais quando comparados com antibióticos padrões (TEXEIRA, 2006). Alguns autores consideram somente resultados similares aos de antibióticos, enquanto outros consideram com bom potencial mesmo aqueles com níveis de inibições superiores.

Rios e Recio (2005) propuseram uma classificação para materiais vegetais com base nos resultados de CIM, considerando como uma forte inibição (materiais vegetais considerados como promissórios antibacterianos) um valor de CIM abaixo de 100 µg/mL para extratos e frações e até 10 µg/mL no caso de substâncias isoladas, sendo considerados inativos aqueles extratos e frações que apresentem valores de CIM até 1000 µg/mL e para substâncias isoladas um valor de 100 µg/mL.

Tendo em conta esta classificação chegou-se à conclusão que principalmente o extrato etanol 70 % apresentou excelentes resultados de atividade antibacteriana frente a algumas cepas estudadas. A ação antibacteriana observada no extrato sugere seu uso como adjuvante no controle da cárie dental (MOURA CL et al., 2011).

4.4.3 Avaliação da atividade leishmanicida.

A leishmaniose é considerada como um grupo de doenças tropicais causadas por parasitas protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, afetando anualmente umas 12 milhões de pessoas ao redor do mundo em 88 países. Estima-se que haja aproximadamente entre 2 ou 3 milhões de novos casos de infecções por leishmaniose a cada ano, estando umas 350 milhões de pessoas em risco de adquirir a doença. (DE CARVALHO, FERREIRA, 2012; ROCHA et al., 2005). Esta doença é transmitida pela picada de mosquitos-palha infectados pelo protozoário parasita *Leishmania*.

Historicamente, o tratamento desta doença tem sido pela quimioterapia com o uso de metais tóxicos como o antimônio. Neste sentido, quando este tipo de tratamento não é efetivo, outros medicamentos são usados como a pentadimina e a anfotericina B. Todos estes tratamentos farmacêuticos requerem injeções assim como supervisão clínica ou hospitalização durante o

tratamento, devido à severidade dos efeitos colaterais provocados aos pacientes.

Recentemente, tem tido um especial interesse na busca de substâncias, extratos ou frações com atividade leishmanicida, obtidas a partir de fontes naturais (WRIGHT, PHILLIPSON, 1990). Nesse sentido, o potencial dos produtos vegetais como uma fonte de drogas ativas frente à *Leishmania* foi demonstrada e tem sido considerada uma abordagem promissora. Sendo assim, na literatura aparecem relatados vários estudos sobre triagem de extratos de plantas ativos à *Leishmania* (GACHET et al., 2010; GARCÍA et al., 2012) assim como as avaliações de suas atividades. A análise fitoquímica dos extratos ativos de *Bambusa vulgaris* revelaram a presença de diferentes metabólitos bioativos como: alcaloides, taninos, substâncias fenólicas, **saponinas**, flavonoides e antraquinonas (YAKUBU, BUKOYE, 2009).

A espécie em estudo apresentou altos teores de saponinas e isso levou a fazer o teste de atividade leishmanicida para o extrato etanol 70 %, assim como para a fração de saponinas (**f'26**). É importante notar que, embora existam numerosos relatos na literatura relacionando à atividade leishmanicida de extratos vegetais, a descrição dessa atividade na espécie *S. paniculatum* está sendo relatada pela primeira vez.

Na Tabela 15 são apresentados os resultados de atividade leishmanicida tanto para o extrato etanol 70 % quanto para a fração **f'26**. De acordo com García e colaboradores (2012), um extrato ou fração é considerado como um potente inibidor do crescimento das formas promastigotas quando o valor de CI_{50} (concentração inibitória 50 %) é menor que 15 µg/mL.

Tabela 15. Atividade leishmanicida do extrato etanol 70 % e a fração **f'26** contra as formas promastigotas de *L. amazonensis* e determinação dos valores de concentração inibitória 50 % (CI₅₀ µg/mL).

Amostras	% lises ± D.P ^a / Concentrações (µg/mL)						CI ₅₀ (µg/mL)
	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	
EtOH	68,11 ±	53,57 ±	45,89 ±	38,83 ±	30,89 ±	22,98 ±	
70 %	1,71	3,64	1,78	2,52	0,57	1,48	15,77 ± 0,53
f'26	69,48 ±	64,30 ±	57,83 ±	49,08 ±	44,82 ±	34,47 ±	
	1,52	2,17	1,12	0,60	1,94	2,54	6,26 ± 0,41
	0,19	0,095	0,047	0,023	0,011	0,005	CI₅₀(µg/mL)
Anf. B^b	99,88 ±	78,33 ±	68,74 ±	54,67 ±	42,44 ±	35,68 ±	
	0,60	24,43	21,97	17,77	20,97	15,76	0,015 ± 0,34

^aD.P: Desvio Padrão.

^bControle Positivo: Anfotericina B.

Os resultados de CI₅₀ para atividade leishmanicida do extrato etanol 70 % e da fração **f'26**, mostraram uma forte inibição contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*. Especialmente ativa se mostrou a fração **f'26** com valores de CI₅₀ de 6,26 µg/mL. Por tanto, o extrato 70 % assim como a fração **f'26** mostraram ativos frente *L. amazonensis*.

Um outro resultado que ratifica o potencial leishmanicida do extrato e da fração **f'26** está relacionado com os valores de lise celular nas concentrações testadas. Neste sentido, de acordo com os resultados mostrados na tabela, observou-se que o extrato e a fração causaram uma lise significativa (%) em todas as concentrações testadas quando comparado com o controle positivo. Novamente a fração **f'26** se mostrou mais ativa que o extrato etanol 70 %.

Estes promissores resultados sugerem realizar estudos da atividade leishmanicida das substâncias isoladas (saponinas), para assim estabelecer quais são as substâncias mais ativas e estabelecer também as relações estrutura-atividade na busca de novas drogas antiprotozoárias de origem naturais a partir do extrato etanol 70 % das folhas de *S. paniculatum*.

4.4.4 Avaliação da atividade esquistossomicida.

A esquistossomose constitui uma doença (infecção) causada por helmintos, afetando a mais de 200 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo que mais de 779 milhões de pessoas vivem em zonas consideradas de alto risco de infecção (GRYSEELS et al., 2006). Esta doença ocupa o segundo lugar na lista de doenças tropicais depois da malária, tendo assim uma grande repercussão social e econômica.

No Brasil, a esquistossomose representa um grave problema de saúde pública devido principalmente ao fato que abrange 19 estados, tendo, segundo KATZ e PEIXOTO (2000), mais de oito milhões de pessoas infectadas e outras 30 milhões estão expostas a risco de infecção.

Atualmente, o praziquantel (PZQ) é o principal fármaco utilizado para o tratamento da esquistossomose humana, porém o seu uso extensivo tem culminado no inevitável aparecimento de resistência de linhagens do verme ao fármaco (DOENHOFF et al., 2008).

Tendo em conta estes fatos, a busca de novos fármacos com ação esquistossomicidas mais eficazes se tornou uma necessidade.

As plantas representam uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, que poderiam servir para o desenvolvimento de novos fármacos na forma de extratos, frações ou substâncias puras.

Na literatura aparecem vários relatos de extratos, frações e substâncias ativas obtidas a partir de plantas medicinais com um grande potencial esquistossomicidas (MOSTAFA et al.; 2011). Alguns testes com extratos vegetais estão sendo bem-sucedidos na China (XIAO et al.; 2000) como os avaliados a partir da *Artemísia annua*, onde diferentes extratos se mostraram ativos contra o *S. mansoni* (XIAO et al.; 2000).

Por outro lado, a atividade esquistossomicida do extrato aquoso bruto de gengibre (*Zingiber officinale*) foi investigada por MOSTAFA e colaboradores 2011, que observaram que a carga parasitária de camundongos tratados com gengibre foi menor do que a dos não-tratados.

Numa outra espécie, *Rauvolfia vomitoria*, o extrato etanólico obtido das cascas causou redução da atividade motora e a morte de vermes adultos de *S. mansoni* após 120 h de exposição *in vitro*. A atividade reportada para o extrato

desta planta pode ser devida aos diferentes tipos de substâncias presentes no mesmo.

Estudos anteriores identificaram a presença de fitoquímicos, como alcaloides, taninos, **saponinas**, **flavonóides**, esteroides, terpenoides e glicosídeos cardíacos no extrato etanólico de *R. vomitoria* (AJAYI, OWOLABI, 2012).

Apesar de existirem numerosos relatos na literatura relacionando à atividade esquistossomícida de extratos vegetais, frações e substâncias isoladas, a descrição dessa atividade na espécie *S. paniculatum* está sendo relatada pela primeira vez.

Considerando assim os pontos anteriormente descritos, e tendo em conta os constituintes químicos isolados e detectados na espécie *S. paniculatum*, com este ensaio avaliou-se o potencial do extrato etanol 70 % e a fração **f'26** (fração de saponinas) obtidos das folhas de *S. paniculatum*, quanto aos seus potenciais esquistossomícidase em vermes adultos tratados in vitro.

Na Tabela 16 apresentam-se os resultados de viabilidade dos vermes adultos de *S. mansoni* expostos a diferentes concentrações do extrato etanol 70 % e da fração **f'26**.

Tabela 16. Viabilidade dos vermes adultos de *S. mansoni* (em porcentagem) frente ao extrato etanol 70% e a fração **f'26**.

Concentração (µg/mL)	Nº de vermes	Tempo de incubação (h)	Nº de vermes mortos (%) extrato etanol 70%	Nº de vermes mortos (%) fração f'26
Controle negativo	4	24	0	0
		48	0	0
		72	0	0
12,5	4	24	25	25
		48	50	75
		72	50	75
25	4	24	50	25
		48	50	75
		72	75	75
50	4	24	50	50
		48	50	50
		72	75	75
100	4	24	50	75
		48	75	75
		72	100	100
200	4	24	75	100
		48	75	100
		72	100	100

De acordo com os resultados obtidos, a concentração mínima analisada do extrato etanol 70 % que apresentou atividade esquistossomicida foi de 12,5 µg/mL, onde pode-se observar que 50 % dos vermes foram mortos nesta concentração após 48 h em contato com o extrato.

A mortalidade dos vermes aumentou na medida que a concentração do extrato aumentou assim como o tempo de exposição ao extrato, sendo que a 100 µg/mL observou-se um 100 % de mortalidade dos vermes após 72 h de exposição.

Por outro lado, a fração de saponinas **f'26** apresentou uma maior atividade esquistossomicida na concentração mínima analisada que apresentou atividade esquistossomicida (12,5 µg/mL), onde comprovou-se que o 75 % dos vermes foram mortos nesta concentração após 48 h em contato com a fração. Novamente, a mortalidade dos vermes incrementou-se uma vez que a concentração da fração aumentou assim como o tempo de exposição, sendo que a 100 µg/mL observou-se um 100 % de mortalidade dos vermes após 72 h de exposição.

Fazendo uma comparação do extrato etanol 70 % com a fração **f'26** em relação ao potencial de atividade esquistossomicida, conclui-se que a fração se mostrou ligeiramente mais ativa que o extrato etanol 70 %.

Portanto, tendo em conta o valor de concentração que apresentou atividade esquistossomicida (12,5 µg/mL) com uma redução do número de vermes, conclui-se que quanto o extrato etanol 70 % quanto a fração **f'26** apresentaram uma significativa atividade esquistossomicida em tratamento *in vitro* em verme adulto de *S. mansoni*, o que evidencia o potencial desta atividade da espécie (OLIVEIRA, 2008).

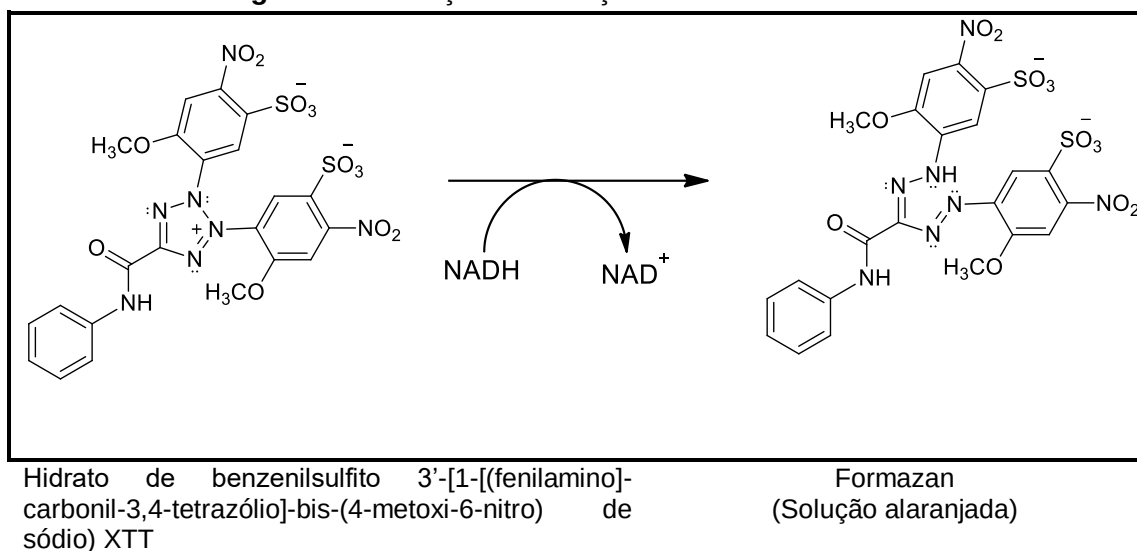
Novos estudos de atividade esquistossomicida do extrato etanol 70 %, fração **f'26** e substâncias isoladas em testes *in vivo* pode ser útil para investigar suas ações no hospedeiro, o que deve proporcionar novas perspectivas para o controle alternativo do parasito, permitindo o desenvolvimento de medicamentos eficazes contra a esquistossomose.

4.4.5 Avaliação da citotoxicidade em células normais.

A técnica do ensaio colorimétrico do XTT consiste na absorção do sal pela membrana celular, o transporte até a membrana mitocondrial e a metabolização do sal de tetrazólio (3-[1- (fenil amino carbonil)-3,4-tetrazólio]-bis (4-metil-6-nitro) ácido benzeno sulfonato sódio hidratado) em formazan (Figura 121).

É um ensaio recomendado para screenings complexos de substancias químicas por apresentar um índice confiável para avaliar atividade mitocondrial e, assim, a viabilidade e função celulares (BERRIDGE et al., 2005).

Estudos sugerem que a redução do corante XTT ocorre na superfície da célula, quando que as oxirredutases mitocondriais contribuem para a resposta do sal. Assim, fica então postulado que o XTT é capaz de medir o estado redox de nucleotídeos de piridina na célula (BERRIDGE HERST; TAN, 2005), produzindo um formazan altamente colorido e alaranjado (ROEHM et al., 1991).

Figura 121. Reação de redução do XTT ao formazan.

Os resultados de viabilidade celular do extrato etanol 70 %, assim como da fração enriquecida de saponinas (**f'26**) pelo sal de XTT estão representados nos Figuras 122 e 123. A partir dos resultados, foi realizado o cálculo do IC₅₀ (concentração que inibe 50% de crescimento) tanto para o extrato como para a fração expressos na Tabela 17.

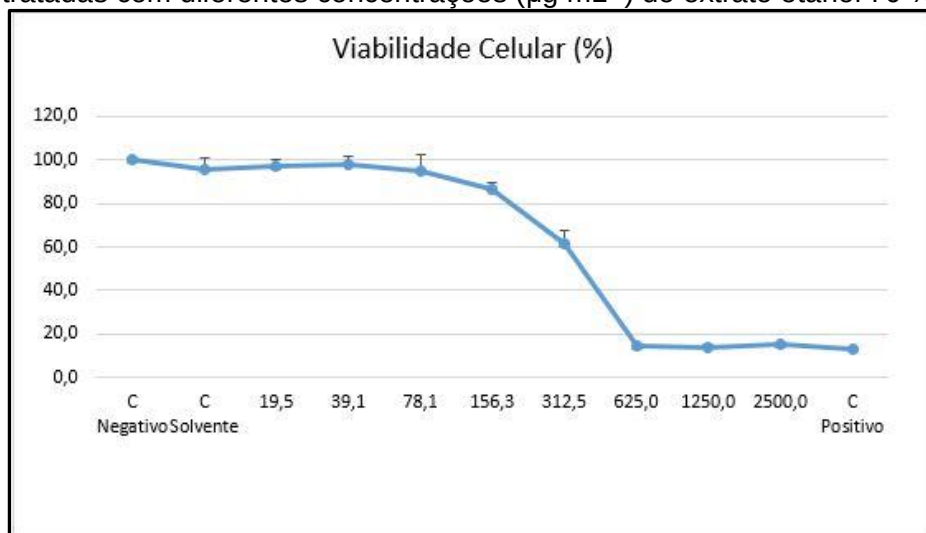
Figura 122. Viabilidade celular de fibroblastos de pulmão de humano (GM07492A) tratadas com diferentes concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) do extrato etanol 70 %.

Figura 123. Viabilidade celular de fibroblastos de pulmão de humano (GM07492A) tratadas com diferentes concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) da fração **f'26**.

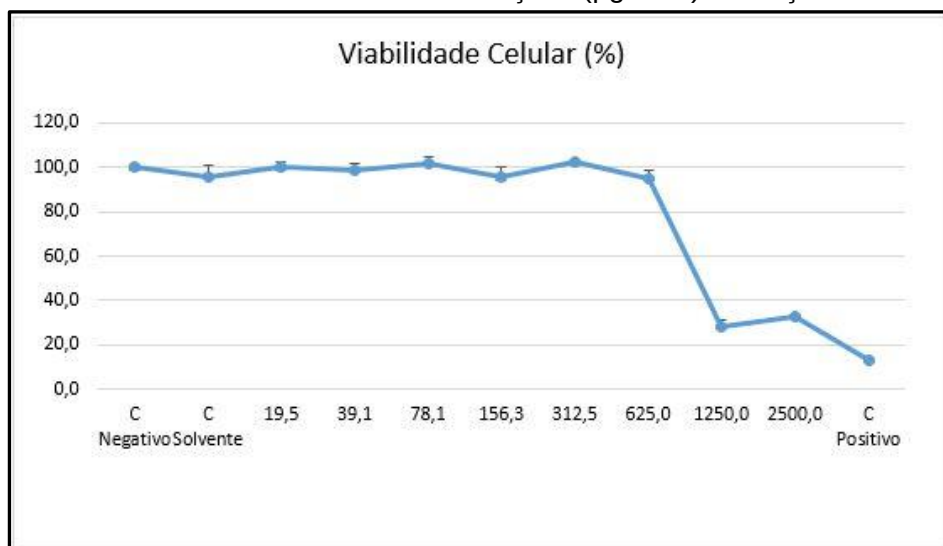


Tabela 17. Valores de IC_{50} para linhagem celular (GM07492A) obtidos após tratamento durante 24 horas com extrato etanol 70 % e fração **f'26** das folhas *S. paniculatum*.

	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Extrato etanol 70 %	$316,3 \pm 27,3$
Fração f'26	$971,7 \pm 61,4$

Os resultados obtidos a partir do extrato etanol 70 % e da fração **f'26** permitiram observar citotoxicidade sobre a linhagem celular testada (GM07492A) em concentrações igual ou superior a 625 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato e a partir de 1250 $\mu\text{g/mL}$ para a fração testada. Os valores encontrados de IC_{50} foram de 316,3 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato etanol 70 % e 971,7 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, sendo então o extrato mais tóxico que a fração **f'26**. Esse resultado permite propor o uso confiável do extrato de *S. paniculatum* como fitoterápico devido à sua não toxicidade.

4 CONCLUSÕES.

O estudo químico do extrato etanol 70 % das folhas da espécie *S. paniculatum* permitiu o isolamento e identificação de 11 substâncias das quais, 8 saponinas esteroidais foram descritas pela primeira vez na Literatura denominadas: 6-O- α -L-ramnopiranosil-(1'' $\rightarrow$ 3')- β -D-quinovopiranosil-(22S,23R,25S)-3 β ,6 α ,23-triidroxi-5 α -espirostano **(1)**, 6-O- α -L-ramnopiranosil-(1'' $\rightarrow$ 3')- β -D-quinovopiranosil-(22S,23R,25R)-3 β ,6 α ,23-triidroxi-5 α -espirostano **(2)**, 6-O- β -D-xilopiranosil-(1'' $\rightarrow$ 3')- β -D-quinovopiranosil-(22S,23R,25S)-3 β ,6 α ,23-triidroxi-5 α -espirostano **(3)**, 6-O- β -D-xilopiranosil-(1'' $\rightarrow$ 3')- β -D-quinovopiranosil-(22S,23R,25R)-3 β ,6 α ,23-triidroxi-5 α -espirostano **(4)**, 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1'' $\rightarrow$ 3')- β -D-quinovopiranosil-(22S,23S,25R)-3 β ,6 α ,23-triidroxi-5 α -espirostano **(5)**, 3-O- β -D-xilopiranosil-(1'' $\rightarrow$ 3')- β -D-quinovopiranosil-(22S,23S,25R)-3 β ,6 α ,23-triidroxi-5 α -espirostano **(6)**, 6-O- α -L-ramnopiranosil-(1'' $\rightarrow$ 3')- β -D-quinovopiranosil-(22S,25S)-1 β ,3 β ,6 α -triidroxi-5 α -espirostano **(7)**, 6-O- β -D-xilopiranosil-(1'' $\rightarrow$ 3')- β -D-quinovopiranosil-(22S,25S)-3 β ,4 β ,6 α -triidroxi-5 α -espirostano **(8)**. Também foram isoladas as substâncias rutina **(9)**, o ácido cafeico **(10)** e o anidrido cafeico **(10a)** estas últimas em mistura.

Foram determinados os teores das saponinas no extrato etanol 70 % das folhas de *S. paniculatum* a través do desenvolvimento do método UPLC/MS, sendo os teores obtidos para cada uma das saponinas como segue (em mg.g⁻¹ do extrato) **(1)**: 71,2 $\pm$ 0,2; **(2)**: 25,8 $\pm$ 0,1; **(3)**: 103,5 $\pm$ 0,2; **(4)**: 25,7 $\pm$ 0,03; **(5)**: 17,5 $\pm$ 0,1; **(6)**: 14,8 $\pm$ 0,04; **(7)**: 43,0 $\pm$ 0,2 e **(8)**: 32,1 $\pm$ 0,04.

O método empregado apresentou boa linearidade ($r^2 > 0,99$) e seletividade na determinação das substâncias de interesse além de boa precisão. Para as análises de repetibilidade e precisão intermediária os valores de desvio padrão relativo ficaram na faixa de 0,69 - 1,94 %.

O extrato etanol 70 % apresentou uma baixa inibição do crescimento das linhagens tumorais LP07 (adenocarcinoma de pulmão), células tumorais humanas, MCF7 (câncer de mama humana) assim como o adenocarcinoma mamário murino LM3 quando comparado com o padrão de controle cisplatina, com valores de CIM₅₀ superiores a 192,92 μ g mL⁻¹ para as linhagens testadas.

O extrato etanol 70 % apresentou uma promissora atividade antibacteriana frente aos patógenos orais *Streptococcus sanguinis*, *S. oralis*, *S. mutans*, *S. mitis* e *Lactobaccillus casei*, com valores que variam entre 6,25-100 µg/mL. No entanto, a fração de saponinas (**f'26**) mostrou menor atividade contra todas as cepas testadas com valores entre 100-400 µg/mL.

Tanto o extrato etanol 70 % como a fração **f'26** se mostraram ativos frente à *Leishmania amazonensis* (teste de atividade leishmanicida), com valores frente às formas promastigotas de IC₅₀ (concentração inibitória 50 %) menores de 15 µg/mL. Especialmente ativo mostrou-se a fração enriquecida de saponinas (**f'26**), que mostrou um valor de CI₅₀ de 6,26 ± 0,41 µg/mL.

Em relação à atividade esquistossomicida, igualmente o extrato etanol 70 % (50 % de mortalidade dos vermes) e a fração **f'26** (75 % mortalidade dos vermes) se mostraram ativos frente à *Schistosoma mansoni*, com valores de concentração mínima determinada de 12,5 µg/mL. Neste caso, a fração de saponinas se mostrou ligeiramente mais ativa que o extrato etanol 70 %.

O teste de viabilidade celular em células normais tanto para o extrato etanol 70 % como para a fração enriquecida de saponinas **f'26**, apresentou baixa citotoxicidade a concentrações iguais ou superiores de 625 µg/mL para o extrato. No entanto, a fração mostrou ser menos citotóxica com valores de concentração igual ou superior a 1250 µg/mL. Os valores encontrados de IC₅₀ foram de 316,3 µg/mL para o extrato etanol 70 % e 971,7 µg/mL respectivamente o que confirma que o extrato resultou ser mais tóxico que a fração rica em saponinas.

Devido aos resultados promissores obtidos neste estudo, tanto com fração, como para o extrato etanol 70% das folhas de *S. paniculatum*, sugerimos dar continuidade aos estudos dos ensaios biológicos mais específicos, para sua aplicabilidade.

REFERÊNCIAS.

AFANAS'EV, J. B.; DOROZHKO, A. J.; BRODSKILL, A. V.; KOSTYUK, V. A.; PATAPOVITCH, A. I. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, v. 38, p. 1763-1769, 1989

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jun. 2003. Disponível em: <http://redsang.ial.sp.gov.br/site/docs_leis/vm/vm1.pdf>. Acesso em: 20 maio 2018.

AGRA, M. F.; BHATTACHARYYA, Journal of Ethnomedicinal and Phytochemical Investigation of *Solanum* species in northeast of Brazil. In Solanaceae. **Advances in Biology and Utilization**, v. IV, p. 341–343, 1999.

AGRAWAL, K. P. Spectral assignment and reference data: 25R/25S stereochemistry of spirothane-type steroidal sapogenins and steroidal saponins via chemical shift of geminal protons of ring F. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 41, p. 965-968, 2003.

AGRAWAL, K. P.; JAIN, D. C.; PATHAK, K. A. NMR Spectroscopy of Steroidal Sapogenins and Steroidal Saponins: an Update. **Magnetic Resonance in Chemistry**, vol. 33, p. 923-953, 1995.

AGRAWAL, K. P. **Carbon-13 NMR of flavonoids**, v. 39, p. 1631, 1989.

AJAYI, S. S.; OWOLABI, L. O. Phytochemical screening, anti-nutrient composition, proximate analyses and the antimicrobial activities of the aqueous and organic extracts of bark of *Rauvolfia vomitoria* and leaves of *Peperomia pellucida*. **International Research Journal of Biochemistry and Bioinformatics**, v. 2, p. 127–134, 2012.

AMIR, M.; KUMAR, S. Possible industrial applications of genus *Solanum* in twenty first century- A review. **Journal of Scientific Industrial Research**, v. 63, p. 116-124, 2004.

ARTHAN, D.; SUASTI, T.; KITTA KOOP, P.; PITTAYAKCHACHOWUTB, D.; THEBTARANONTH, Y. Antiviral isoflavonoid sulfate and steroidal glycosides from fruit of *Solanum torvum* leaves. **Phytochemistry**, v. 59, p. 459-463, 2002.

BERRIDGE, M. V.; HERST, P. M.; TAN, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. **Biotechnology Annual Review**, v. 11, p. 127 - 152, 2005.

CASTRO, E. M. de.; GAVILANES, M. L. In:_____. **Morfo-anatomia de plantas medicinais**. Lavras; UFLA, 2000, 173 p.

DE CARVALHO, P. B.; FERREIRA, E. I. Leishmaiasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. **Fitoterapia**, v. 72, p. 599-618, 2012.

DOENHOFF, M. J.; CIOLI, D.; UTZINGER, J. Praquiquel: mechanism of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. **Infect Diseases**, v. 21, p. 659-667, 2008.

DEWICK, P. M. **The mevalonate and deoxyxylulose phosphate pathways: terpenoids and steroids**. In:_____. Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach. 2. ed. John Wiley & Sons, LTD. 2002. Chap. 5, p. 237.

ELISABETSHY, E. **Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas**. In: SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3 ed. Ed. UFRGS/Ed. UFSC. Porto Alegre, 2001. Cap. 6, p. 87-99.

EMMANUEL, S.; IGNACIMUTHU, S.; PERUMALSAMY, R.; AMALRAJ, T. Antiinflammatory activity of *Solanum trilobatum*. **Fitoterapia**, v. 77, no. 7, p. 611-612, 2007.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FOUBERT, K.; CUYCKENS, F.; VLEESCHOUWER, K.; THEUNIS, M.; VLIETINCK, A.; PIETERS, L.; APERS, S. Rapid quantification of 14 saponins of *Maesa lanceolata* by UPLC–MS/MS. **Talanta**, v. 81, p. 1258, 2010.

FRIEDMANN, M.; LEE, K-R.; KIM, H.J.; LEE, I.S.; KOZUKUE, N. Anticarcinogenic effects of glycoalkaloids from potato against cervical, liver, lymphoma, and stomach cancer cells, **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 53, n. 15, p. 6162–6169, 2005.

GACHET, M.; LECARO, S.; J. KAISER S. M. Assessment of antiprotozoal activity of plants traditionally used in Ecuador in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p. 184–197, 2010.

GAMIOTEA-TURRO, D.; CAMAFORTE, N. A. P.; VALERINO-DIAZ, A. B.; ORTIZ-NUÑEZ, Y.; RINALDO, D.; DOKKEDAL, A. L.; BOSQUEIRO, J. R.; dos SANTOS, L. C. Qualitative and quantitative analysis of ethanolic extract and phenolic fraction of *Jatropha aethiopica* (Euphorbiaceae) leaves and their hypoglycemic potential. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, no. 6, p. 1419-1427, 2018.

GAMIOTEA-TURRO, D. **Estudo fitoquímico e atividades biológicas do extrato etanólico das folhas de *Jatropha aethiopica* (Euphorbiaceae)**. 2018. G192e. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2018.

GARCÍA, M.; MONZOTE, L.; SCULL, R.; HERRERA, P. Activity of Cuban plants

extracts against *Leishmania amazonensis*, **International Scholarly Research Network Pharmacology**, v. 2012, p.1-7, 2012.

GONÇALVES, M.C.R.; DINIZ, M. F. F. M.; BORBA, J. D. C.; NUNES, X. P.; BARBOSA-FILHO, J. M. Berinjela (*Solanum melongena* L.) – mito ou realidade no combate as dislipidemias?. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 252–257, 2006.

GONZÁLEZ, M.; ZAMILPA, A.; MARQUINA, S.; NAVARRO, V.; ALVAREZ, L. Antimicotic spirostanol saponins from *Solanum hispidum* leaves and their structure-activity relationships. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 938–941, 2004.

GRYSEELS, B.; POLMANN, K.; CLERINX, J.; KESTENS, L. Esquistossomose humana. **Lancet**, v. 368, p. 1106-1118, 2006.

HOLLMAN, P. C.; VAN TRIPP, J.; BUYSMAN, M. N.; VAN DER GAAG, M. S.; MENGELERS, M. B. Relative Bioavailability of the flavonoide quercetin from various foods in man. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 418, p. 152-156, 1995.

HARA, S.; OKABE, K.; MIHASHI, K. Gas-liquid chromatographic separation of aldose enantiomers as trimethylsilyl ethers of methyl 2-(polyhydroxialkyl)-thiazolidine-4(R)-carboxilates. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, p. 501-5016, 1987.

HOTTESTMANN, K.; MARSTON, A. Introduction. In:_____. **Saponins**. Chemistry & pharmacology of natural products. New York: Cambrige University press, 2005. Chap.1, p. 1.

IKEDA, T; TSUMAGARI, H.; HONBU, T.; NOHARA, T. Cytotoxic activity of steroidal glycosides from *Solanum* plants, **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, p. 1198-1201, 2003.

IQBAL, K.; NAWAZ, A. S.; MALIK, A.; RIAZ, N.; MUKHTAR, N.; MOHAMAAD, P.; CHOUDHARY, I. M. Isolation and lipoxygenase-inhibition studies of phenolics constituents from *Erethia obtusifolia*. **Chemistry and Biodiversity**, v. 2, p. 104-111, 2005.

KATZ, N.; PEIXOTO, S. V. Análise crítica da estimativa do número de portadores de *esquistossomose mansonii* no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, p. 303-308, 2000.

LI, J.; ZHANG, L.; HUANG, C.; GUO, F.; LI, Y. Five new cytotoxic steroidal glycosides from the fruits of *Solanum torvum*. **Fitoterapia**, v. 93, p. 209-215, 2014.

LIDA, Y.; YANAI, Y.; ONO, M.; IKEDA, T.; NOHARA, T. Three unusual 22- β -O-23-Hydroxi-(5 α)-spirostanol glycosides from the fruits of *Solanum torvum*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 53 no.9, p. 1122-1125, 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil**. Nova Odessa, Brasil: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2002.

LU, Y.; LUO, J.; HUANG, X.; KONG, L. Four new steroidal glycosides from *Solanum torvum* and their cytotoxic activities. **Steroids**, v. 74, p. 95-101, 2009.

MAGALHÃES, L. G.; MACHADO, C. B.; MORAIS, E. R.; MOREIRA, E. B.; SOARES, C. S.; DA SILVA, S. H.; DA SILVA FILHO, A. A.; RODRIGUES, V. In vitro schistosomicidal activity of curcumin against *Schistosoma mansonii* adult worms. **Parasitology Research**, v. 10, n.5, p. 712-727, 2009.

MAHMOOD, U.; THAKUR, R.S.; BLUNDEN, G. Neochlorogenin, neosolaspigenin and solaspigenin from *Solanum torvum* leaves. **Journal of Natural Products**, v. 46, p. 427-428, 2003.

MATSUSHITA, S.; YANAI, Y.; FUSYUKU, A.; IKEDA, T.; ONO, M.; NOHARA, T. Distinction of Absolute Configuration at C-22 of C-23-hydroxylspirostane and C-23-hydroxyspirosolane glycosides. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 5, p. 1079-1081, 2007.

MARCUCCI, M. C. **Validação de princípios ativos de plantas medicinais e fitoterápicos**. Farmacognosia, Coletânea Científica. 271–293, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE e ANVISA. **Monografia da espécie *Solanum paniculatum* (jurubeba)**, 2012.

MERKEN, H.M.; BEECHER, G.R. Measurement of food flavonoids by high performance liquid chromatography: a review. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 48, p. 577-599, 2000.

MIRANDA, M.A.; TIOSSIA, R. F. J.; SILVA, M. R.; RODRIGUES, K. C.; KUENHA, C. C.; OLIVEIRA, L. G. R. *In vitro* leishmanicidal and cytotoxic activities of the glycoalkaloids from *Solanum lycocarpum* (Solanaceae) fruits. **Chemistry & Biodiversity**, v. 10, p. 642-648, 2013.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1/2, p. 55-63, 1983.

MOSTAFA, O. M.; EID, R. A.; ADLY, M. A. Antischistosomal activity of ginger (*Zinbiber officinale*) against *schistosoma mansoni* harbored in C57 mice. **Parasitology Research**, v. 109, p. 395-403, 2011.

MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL, J. J.; MARTINEZ-DÍAZ, R. A.; ESCARI, J. A.; MARTINEZ-FERNANDEZ, J. R.; GÓMEZ-BARRIO, A. *In vitro* screening of American plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 101-107, 2000.

NEE, M. Synopsis of *Solanum* the New World. In Solanaceae. **Advances in Biology and Utilization**, v. IV, p. 285–333, 1999.

NICULAU, E. S.; FREITAS, S. D. L.; SÁ, I. C. G.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. das G. F. Análise quantitativa de produtos naturais em plantas por CL-EM. **Revista Virtual de Química**, v. 8, no. 1, p. 204-230.

NOHARA, T. Search for function of natural oligoglycosides- Solanaceae and Leguminosae origin glycoside, **Yakugaku Zasshi**, v. 124, p. 183-205, 2004.

NURIT-SILVA, K.; COSTA SIVA, R.; BASÍLIO, I. J. L. D.; AGRA, M. F. Leaf epidermal characters of Brazilian species of *Solanum* section Torva as taxonomic evidence. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 58, no. 9, p. 806-814, 2012.

OLIVEIRA, F. A. **Estudo da atividade de *Phyllanthus amantus* L. contra o *Schistosoma mansoni* linhagem BH.** (Dissertação de mestrado Química) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, 2008.

PATHAK, D.; PATHAK, K.; SINGLA, A. K. Flavonoids as medicinal agents: recent advances. **Fitoterapia**, v. 57, p. 371-389, 1991.

PEDRIALI, C. A., **Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes.** (Dissertação Mestrado Química) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

PEREIRA, I. S. P.; RODRIGUES, V. F.; VEGA, M. R. G. Flavonoides do gênero *Solanum*. **Revista Virtual de Química**, v. 8, No. 1, p.4-26, 2016.

PEREZ, J. A.; CALLE, M. J.; SIMONET, M. A.; GUERRA, O. J.; STOCHMAL, A. Bioactive Steroidal Saponins from *Agave affoyana* flowers. **Phytochemistry**, v. 95, p. 298-307, 2013.

PINTO, J. E. B. P.; LAMEIRA, O. A.; SANTIAGO, E. J. A.; SILVA, F. G. In: _____. **Cultivos de plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. UFLA/FAEP, 2001. V. 1, 185 p.

PINTO, F. C. L. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do nordeste do Brasil: *Solanum buddleifolium* SENDTN**. (Dissertação de Mestrado em Química), Universidade Federal de Ceará, 2013.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RINALDO, D.; BATISTA, J. M. JR.; RODRIGUES, J.; BENFATTI, A. C.; RODRIGUES, C. M.; DOS SANTOS, L. C.; FURLAN, M.; VILEGAS, W. Determination of catechin diastereomers from the leaves of *Byrsonima* species using chiral CLAE-PAD-CD. **Chirality**, v. 22, no.8, p. 726-733, 2010.

RIOS, J. L.; RECIO M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 80-84, 2005.

RIPPENGER, H.; SCHREIBER, K. Estruture of paniculonin A and B, two new spirostane glycosides from *Solanum Paniculatum* L. **Chemische Berichte**, v. 101, p. 2450–2458, 1968.

ROCHA, L. G.; ALMEIDA, J. R. G. S.; MACÊDO, R. O.; BARBOSA-FILHO, J. M. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine**, v. 12, p. 514-535, 2005.

ROEHM, N. W.; RODGERS, G. H.; HATFIELD, S. M.; GLASEBROOK, A. L. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. **Journal of Immunological Methods**, v.142, p. 257-265, 1991.

ROWAN, D. D.; MACDONALD, P. E.; SKIPP, R. A. Two new glycosides,

acutatiside A and B from *Solanum aculetissimum*. **Phytochemistry**, v. 22, p. 733-736, 1983.

SILVA, T. M. S.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FIHO, R.; AGRA, M. Ocorrência de flavonas e seus glicosídeos em espécies do gênero *Solanum* (Solanaceae). **Química Nova**, v. 26, p. 517-522, 2003.

SHAH, V. V.; SHAH, N. D.; PATREKAR, D. V. Medicinal plants from Solanaceae family. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v.6, no. 2, p. 143-151, 2013.

SHAIQ ALI, M.; TABBASUM, S.; AHMED, S. Spirotrvoside: A new steroidal-glycoside from *Solanum torvum* (Solanaceae). **Journal of the Chemical Society of Pakistán**, v. 30, p. 494–498, 2008.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Ed. UFRGS/Ed. UFSC. Porto Alegre, 2001. Cap. 27, p. 597-619.

SMITHERS, S. R.; TERRY, R. J. Infection of Laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni*: and the recovery of adult worms. **Parasitology**, v. 55, p. 695 – 700, 1965.

SOARES, E. L. C.; VIGNOLI-SILVA, M.; VENDRUSCOLO, G. S.; MENTZ, L. A. Solanaceae Nativas no Rio Grande do Sul, Brasil: Listagem I. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 1050-1052, 2007.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. 2012. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado na APG III**. 3ª ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa. 768p.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**, 3rd Ed. New York: John Wiley & Sons, 2010, p. 765.

VALERINO-DÍAZ, A. B.; GAMIOTEA-TURRO, D.; ZANATTA, A. C.; VILEGAS, W.; MARTINS, C. H. G.; SILVA, T. S.; RASTRELLI, L.; SANTOS, L. C. New polyhydroxylated steroidal saponins from *Solanum paniculatum* L. leaf alcohol tincture with antibacterial activity against oral pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 8703-8713, 2018.

VAZ, N. P. **Alcalóides Esteroidais dos Frutos Maduros de *Solanum caavurana* Vell.** (Dissertação de Mestrado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

VERMA, S.; SINGH, S. P. Current and future status of herbal medicines. **Veterinary World**, v.1, no.11, p. 347-350, 2008.

VIEIRA JÚNIOR, G. M.; QUINTINO DA ROCHA, C.; RODRIGUES, TdS.; HAKIKO HIRUMA-LIMA, C.; VILEGAS, W. New steroidal saponins and antiulcer activity from *Solanum paniculatum* L. **Food Chemistry**, v. 86, p. 160-167, 2015.

WAGNER, H.; BLADTH, S.; ZGAINSKY, E. M. Plant Drug Analysis, **A Thin Layer Chromatography Atlas**, Berlin: Springer, 1984.

WRIGHT, C. W.; PHILLIPSON, J. D. Natural products and the development of selective antiprotozoal drugs. **Phytotherapy Research**, v. 4, p. 127–139, 1990.

XIAO, S. H.; CATTO, B. A. The profilatic effects of Artemether against *Schistosoma japonicum* infections. **Parasitology Today**, v. 16, p. 122-126, 2000.

YAKUBU, M. T. B.; BUKOYE, B. Abortifacient potentials of the aqueous extract of *Bambusa vulgaris* leaves in pregnant Dutch rabbits. **Contraception**, v. 80, p. 308–313, 2009.

ZAMILPA, A.; TORTORIELLO, J.; NAVARRO, V.; DELGADO, G.; ALVAREZ, L. Five New steroidal saponins from *Solanum chrysotrichum* leaves and their antimicotic activity. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 1815–1819, 2002.